

液相色谱法测定注射用透明质酸钠溶液含量

LC-466

摘要：注射用透明质酸钠溶液因其良好的生物降解性及生物相容性在医学美容中被大量使用。近些年，非法制售和使用透明质酸钠溶液常有报道，注射用透明质酸钠溶液质量关乎消费者人身安全及切身利益。本文使用液相色谱仪，建立了微生物来源样品中透明质酸钠含量检测方法。该方法操作简单、灵敏度高、重复性好，可用于注射用透明质酸钠溶液含量测定。

关键词：HPLC 医疗器械 透明质酸钠

技术特点：

- ❖ 该方法检出限及定量限分别为 0.027 $\mu\text{g/mL}$ 及 0.092 $\mu\text{g/mL}$ ，远优于标准规定。
- ❖ Nexera LC-40D XS 液相色谱仪稳定性好，保留时间及峰面积 RSD 分别为 0.015% 和 0.18%。

透明质酸是一种酸性粘多糖类物质，在人体中发挥着润滑关节、调节血管壁的通透性、维持皮肤结构和功能、促进创伤愈合等作用，是人体皮肤细胞外基质中自然存在且不可或缺的天然保湿因子。注射用透明质酸钠溶液因其良好的生物降解性及生物相容性在医学美容中被大量使用。注射用透明质酸钠溶液一般含有医用透明质酸钠、氨基酸及维生素，通过皮内注射的方式为面部或颈部等部位皮肤补充自身所需的物质，以改善肌肤状态，同时起到补水保湿、增加组织容积、祛纹美容的作用，在医学整

形中作为注射用软组织填充剂，用于注射到皮肤真皮层或皮下组织内，达到纠正皱纹，改善皮肤外观的作用，并在医美行业应用日益广泛。此类产品在我国被作为第三类医疗器械进行严格管理。近些年，非法制售和使用透明质酸钠溶液常有报道，注射用透明质酸钠溶液质量关乎消费者人身安全及切身利益。

目前，相关含量测定方法报道较少，本文使用岛津液相色谱仪建立了注射用透明质酸钠溶液含量测定方法。

■ 实验部分

1.1 仪器

液相色谱仪 Nexera LC-40D XS

输液泵：LC-40D XS ×2

脱气机：DGU-405

自动进样器：SIL-40C XS

系统控制器：CBM-40

检测器：SPD-M40

柱温箱：CTO-40C

1.2 分析条件

色谱柱：Shodex OH pak SB-806 HQ (300 mm × 8.0 mm I.D., 13 μm)

流动相：0.1% (V/V) 磷酸水溶液

进样体积：10 μL

流速：1.0 mL/min

分析时间：20 min

柱温：60°C

检测波长：232 nm

1.3 试剂配制

0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液

称取磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 0.7172 g，置 10 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀。

5 mmol/L 酶解缓冲液

称取磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.1369 g、磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 0.0440 g, 加水 200 mL 混匀, 作为 5 mmol/L 酶解缓冲液。

透明质酸酶 (1.0×10^3 IU/mL) 溶液

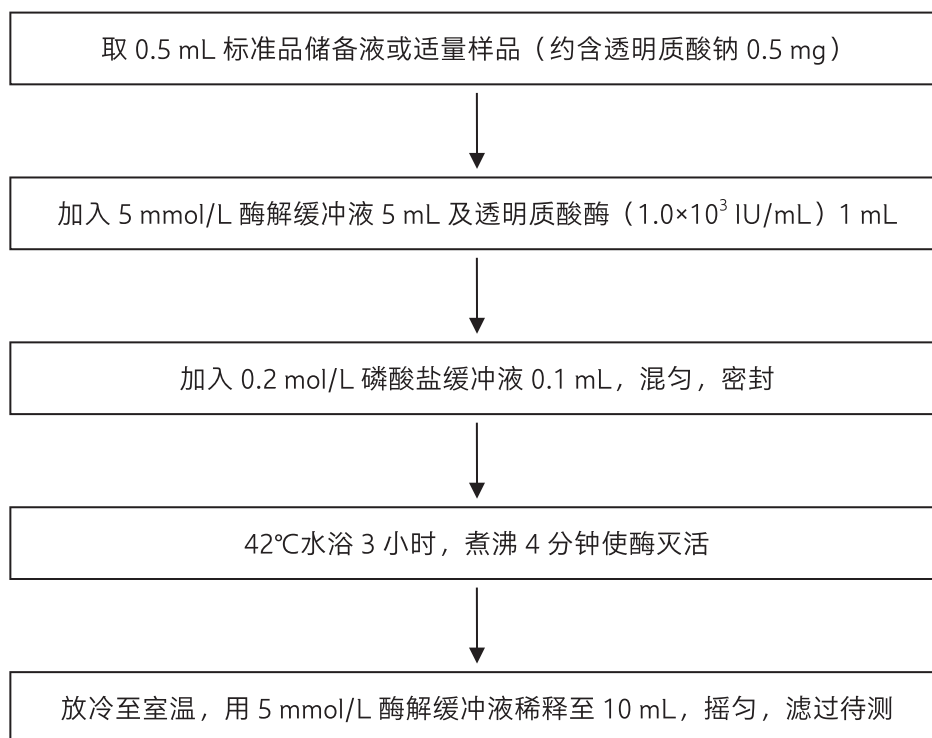
量取 5.0×10^4 IU/mL 的透明质酸酶溶液 0.5 mL, 用 5 mmol/L 酶解缓冲液稀释至 25 mL 制成含透明质酸酶 1.0×10^3 IU/mL 的溶液。

1.4 标准品配制和样品前处理

1.4.1 标准溶液配制

取透明质酸钠对照品 50 mg 加 5 mmol/L 酶解缓冲液 50 mL, 使透明质酸钠溶胀, 至完全溶解后, 稀释制成每 1 mL 中含透明质酸钠约 1 mg 的溶液, 摇匀, 作为贮备液。

1.4.2 样品前处理



1.5 测定方法

取供试品溶液与对照品溶液注入 HPLC, 记录色谱图。按单点外标法以峰面积计算。

■ 结果与讨论

2.1 标准品色谱图

标准品色谱图见图 1。

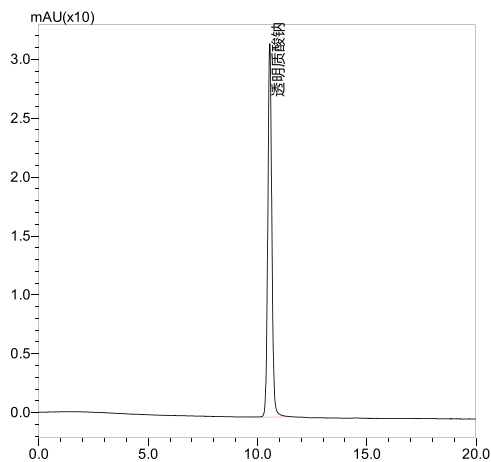


图1 标准品（上机浓度 50 µg/mL）色谱图

2.2 精密度测定结果

按 1.2 中的分析条件对标准品溶液连续进样测定 5 次，精密度结果如表 1 所示，结果显示保留时间 RSD 为 0.015%，峰面积 RSD 为 0.18%，仪器及方法精密度良好。

表 1 精密度考察结果

编号	保留时间 (min)	峰面积
1	10.580	405,437
2	10.579	405,129
3	10.578	405,503
4	10.577	405,292
5	10.576	403,766
RSD%	0.015	0.18

2.3 检出限及定量限

按 1.2 中的分析条件对稀释后标准品溶液分析，谱图见图 2，计算检出限 (S/N=3) 及定量限 (S/N=10)，计算结果见表 2，检出限及定量限分别为 0.027 µg/mL 及 0.092 µg/mL，检出限及定量限低。

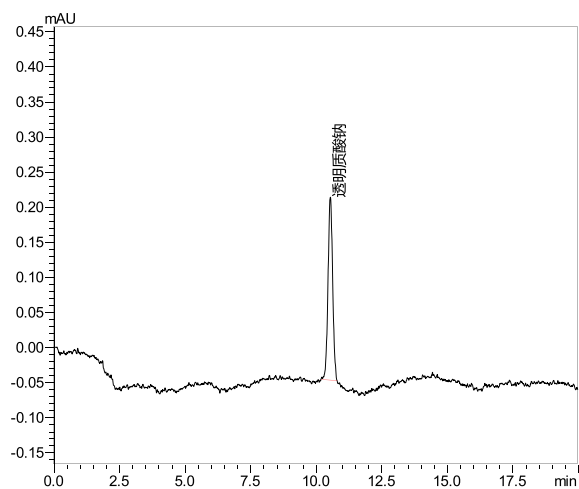


图2 稀释后标准品（上机浓度 0.5 µg/mL）色谱图

表 2 检出限及定量限计算结果表 (µg/mL)

检测浓度	峰高	噪音	信噪比	检出限	定量限
0.5	260	4.76	54.6	0.027	0.092

2.4 准确度及市售样品测定结果

分别取 4 个不同厂商生产的透明质酸钠注射液，按 1.4 中的方法进行前处理，按 1.2 中的分析条件进行测定，样品谱图见图 3，测定结果见表 3，测定结果与理论浓度比较，准确度在 109.9%~117.0% 之间，满足日常测定需求。

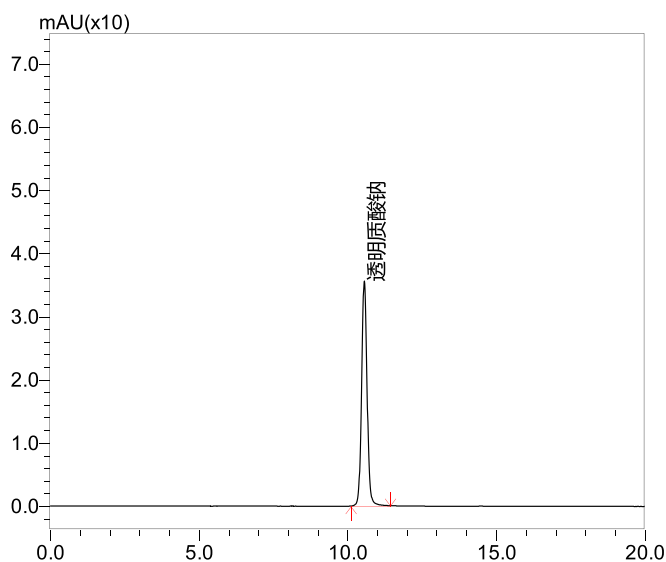


图 3 Sample001 色谱图

表 3 回收率测定结果 (n=3)

编号	标示含量 (mg/mL)	测定含量 (mg/mL)	准确度 %	标准规定
Sample001	10.0	11.59	115.9	80%-120%
Sample002	5.0	5.85	117.0	
Sample003	5.0	5.49	109.8	
Sample004	7.0	8.085	115.5	

■ 结论

本文使用 Nexera LC-40D XS 液相色谱仪，建立了透明质酸钠含量检测方法。该方法峰型尖锐对称，保留时间及峰面积 RSD 分别为 0.015% 及 0.18%，检出限及定量限分别为 0.027 µg/mL 及 0.092 µg/mL，准确度在 109.9%~117.0% 之间，满足日常测定需求。该方法操作简单、灵敏度高、重复性好，可用于注射用透明质酸钠溶液含量测定。

岛津应用云

