

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 1469—2026

医用透明质酸钠敷料小鼠体内透皮吸收评价方法 微孔板荧光法

Method for evaluating percutaneous absorption of medical sodium hyaluronate dressings in mice —Microplate fluorescence method

2026 – 10 – 12 发布

2026 – 10 – 18 实施

广西标准化协会 发 布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 1

5 原理 1

6 试验动物 1

7 试剂和材料 2

8 仪器设备 2

9 试验步骤 2

10 结果判定 5

附录 A（资料性） 透明质酸钠的荧光标记步骤 6

附录 B（资料性） Cy5 标记透明质酸钠的荧光光谱扫描图及紫外可见光谱扫描图 7

附录 C（资料性） 液相色谱、质谱条件 8

附录 D（资料性） 标准曲线 9

附录 E（资料性） 砂纸磨皮法 10

前 言

本文件参照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广西药师协会提出、归口并宣贯。

本文件起草单位：广西壮族自治区食品药品审评查验中心、广西壮族自治区中医药研究院、广西南宁雅莎医药技术开发有限公司、桂林古方健康医疗科技有限公司、广西药师协会、桂林华诺威基因药业股份有限公司。

本文件主要起草人：蒋受军、韦洁、陆梅元、刘静、陈诚、袁榕穗、黄艳、黄云峰、方雪湾、黄秋燕、陈长艳、李雨洋、卢静、卢羽璇、卢华昌、李星宇、罗璐、洪鸿儒、韦宛伶、石舶汕、袁健童、陈宗妮、孙婕、钱捷豪、麦艳莹、梁东明、梁记敏、曹斌、韦忠明、宫猛、莫东海。

医用透明质酸钠敷料小鼠体内透皮吸收评价方法 微孔板荧光法

1 范围

本文件界定了医用透明质酸钠敷料小鼠体内透皮吸收的缩略语，描述了用微孔板荧光法对医用透明质酸钠敷料经小鼠体内透皮吸收进行评价的方法。

本文件适用于创面敷贴、凝胶敷料、液体敷料、膏状敷料等医用透明质酸钠敷料经小鼠体内透皮吸收的评价。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB 14922 实验动物 微生物、寄生虫学等级及监测
GB 14925 实验动物 环境及设施
YY/T 1571 组织工程医疗器械产品 透明质酸钠
T/GMDMA 0029 重组胶原蛋白医用敷料体外透皮吸收评价指南（荧光标记法）

3 术语和定义

YY/T 1571界定的术语和定义适用于本文件。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Cy5: 氰染料Cy5 (Cyanine 5)
Cy5-NHS: 菁染料Cy5 N-羟基琥珀酰亚胺酯
DAPI: 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-Diamidino-2-Phenylindole)
LC-MS/MS: 液相色谱-串联质谱 (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry)
PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffered Saline)
RFU: 相对荧光单位 (Relative Fluorescence Unit)

5 原理

采用Cy5-NHS荧光染料对透明质酸钠进行共价标记，与敷料基质混合制备测试样品。在小鼠非慢性创面皮肤上涂抹样品，分别在不同时间点采集小鼠血清，采用微孔板荧光法定量检测血清中透明质酸钠浓度，结合皮肤组织冰冻切片荧光显微镜观察，综合判断透明质酸钠透皮吸收情况。

6 试验动物

6.1 动物选择

选用符合GB 14922规定的SPF级小鼠，周龄为6~8周，可选择昆明及Balb/c品系。

6.2 动物数量和性别

每组动物数量不少于4只，且为雄性。

6.3 饲养环境

应符合GB 14925的规定。

6.4 动物准备

试验开始前，小鼠在各自的笼中饲养至少5 d以适应实验室环境。

6.5 动物分组

将动物按体重随机分成空白组、敷料不同时长处理组。

7 试剂和材料

除另有说明外，试验用水应符合GB/T 6682 中一级水的要求。

7.1 试剂与溶液配制

7.1.1 Cy5-NHS 荧光染料：纯度 $\geq 95\%$ 。

7.1.2 医用透明质酸钠原料：应符合YY/T 1571 的规定。

7.1.3 医用透明质酸钠创面敷料空白基质（不含透明质酸钠）。

7.1.4 乙腈（ CH_3CN ）：色谱纯。

7.1.5 甲酸（ HCOOH ）：色谱纯。

7.1.6 乙腈溶液（50%）：将乙腈与超纯水按体积比1:1 混合制备。

7.1.7 多聚甲醛溶液（4%）。

7.1.8 0.1%甲酸溶液：精密吸取甲酸溶液1 mL，注入1 000 mL 容量瓶中，加超纯水稀释定容，摇匀，过0.45 μm 水系滤膜，超声30 min，即得。

7.1.9 PBS：取磷酸缓冲盐粉末2 g 溶解于500 mL 超纯水中，使用pH 计测定pH，以0.1 mol/L 氢氧化钠滴定液调节pH 值为8.0，以超纯水定容至2 L，过0.45 μm 水系滤膜，即得。

7.1.10 二甲基亚砜（ $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ ）。

7.1.11 含DAPI 的抗荧光衰减封片剂。

7.2 材料

7.2.1 无纺布（如适用）。

7.2.2 无菌砂纸：粒径为125 μm （120 目）。

7.2.3 棕色离心管：1.5 mL、5 mL、15 mL。

7.2.4 384 孔黑色酶标板。

7.2.5 组织冰冻切片包埋剂。

8 仪器设备

8.1 荧光光谱仪：激发波长范围为550 nm~650 nm，发射波长范围为650 nm~750 nm。

8.2 多功能检测仪：配置荧光检测模块，激发波长为625 nm，发射波长为660 nm。

8.3 研究级倒置荧光显微镜：配备激发/发射滤光片（激发波长范围为590 nm~650 nm，发射波长范围为662 nm~738 nm）。

8.4 冰冻切片机。

8.5 天平：感量为0.01 mg。

8.6 液相色谱-质谱联用仪。

8.7 色谱柱： C_{18} 反相色谱柱（2.1 mm $\times$ 50 mm，4 μm ）或相当者。

8.8 高速冷冻离心机：最大转速不低于12 000 r/min，运行温度4℃。

8.9 紫外可见光光谱分析仪：波长范围为200 nm~800 nm。

9 试验步骤

9.1 荧光标记及效果评价

9.1.1 将荧光分子通过共价结合的方式标记到透明质酸钠上（标记步骤见附录 A，或可使用已标记的商品），宜采用 Cy5 作为透明质酸钠的荧光标记物。经过分离纯化获得 Cy5 标记透明质酸钠，经过冻干后，将 Cy5 标记透明质酸钠冻干粉置于 -20°C 避光保存，备用。宜标记后 6 个月内用于后续试验。

9.1.2 采用荧光光谱仪（8.1）对 Cy5 标记透明质酸钠进行荧光光谱扫描，或采用紫外可见光光谱分析仪（8.9）进行紫外可见光谱扫描，Cy5 标记透明质酸钠的荧光光谱扫描图及紫外可见光谱扫描图见附录 B。

9.2 受试物制备

经 Cy5 荧光标记透明质酸钠，按终产品生产工艺制备成透明质酸钠医用创面敷料受试物。

9.3 游离 Cy5 清除验证的测定

9.3.1 对照品溶液配制

称取 Cy5-NHS 荧光染料（7.1.1）1.00 mg，置于 5 mL 棕色离心管中，再加入 0.5 mL 二甲基亚砜溶液（7.1.10）溶解配成储备液后，加入 1 mL PBS（7.1.9）稀释，吸取溶解后的溶液 200 μL 至 10 mL 容量瓶中，用乙腈溶液（7.1.6）稀释至刻度，作为对照品溶液。配制过程应全程避光。

9.3.2 供试品溶液配制

称取适量 Cy5 标记透明质酸钠冻干粉样品加入水制成终浓度为 0.5 mg/mL 的溶液，吸取溶解后的溶液 200 μL 至 5 mL 棕色离心管中，用乙腈溶液（7.1.6）稀释至 2 mL，过滤，取续滤液，作为供试品溶液。配制过程应全程避光。

9.3.3 空白对照溶液

选择乙腈溶液（7.1.6）作为空白对照溶液。

9.3.4 测定

用液相色谱-质谱联用仪（8.6）测定游离 Cy5 残留，液相色谱、质谱条件见附录 C。

9.3.5 结果判定

Cy5 标记透明质酸钠供试品图谱中与 Cy5-NHS 对照品色谱峰保留时间对应处不应检出 Cy5 染料离子峰（ m/z 580（Cy5-NHS 原型）、 m/z 483（Cy5-NHS 碎片）、 m/z 482（Cy5-NHS 碎片））。

9.4 Cy5 标记透明质酸钠荧光光谱确认

9.4.1 称取 1.00 mg Cy5 标记透明质酸钠冻干粉，加入 2 mL 纯水充分溶解。进行荧光光谱分析：

- 发射光谱：激发波长 640 nm，发射波长扫描范围为 650 nm~750 nm；
- 激发光谱：发射波长 660 nm，激发波长扫描范围为 550 nm~650 nm。

9.4.2 判定标准：最大激发波长应在 $640\text{ nm} \pm 5\text{ nm}$ ，最大发射波长应在 $660\text{ nm} \pm 5\text{ nm}$ ，表明荧光标记成功。

9.5 定量方法确认

9.5.1 线性范围、检测限、定量限

9.5.1.1 用纯水稀释 Cy5 标记透明质酸钠冻干粉，制备一系列梯度浓度（浓度分别为 10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、60 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 、160 $\mu\text{g/mL}$ 、320 $\mu\text{g/mL}$ 、640 $\mu\text{g/mL}$ ）的 Cy5 标记透明质酸钠供试品溶液。每个浓度各取 50 μL 加入 384 孔黑色酶标板，平行 2 孔，采用多功能检测仪（8.2）以终点法检测荧光强度，以纯水作为空白本底。以 $\log$ （浓度）为横坐标， $\log$ （荧光强度）为纵坐标绘制标准曲线（见附录 D）。

9.5.1.2 判定标准：

- 线性范围：相关系数 R^2 应 ≥ 0.99 ；
- 检测限：空白本底荧光强度对应浓度的 3 倍；

c) 定量限：空白本底荧光强度对应浓度的 10 倍。

9.5.2 准确度

9.5.2.1 从 9.5.1.1 中取 200 μL 40 $\mu\text{g/mL}$ 供试品溶液 6 份，向每一份中加入 100 μL 160 $\mu\text{g/mL}$ 供试品溶液，混合均匀，取 50 μL 加入 384 孔黑色酶标板检测荧光强度，计算加标回收率。

9.5.2.2 判定标准：平均回收率应在 75%~115% 之间。

9.5.3 精密度

9.5.3.1 从 9.5.1.1 中取 50 μL 80 $\mu\text{g/mL}$ 供试品溶液，重复取样 6 次加入 384 孔黑色酶标板检测荧光强度，计算相对标准偏差 (RSD)。

9.5.3.2 判定标准：RSD 应 $\leq 10\%$ 。

9.6 小鼠体内透皮吸收试验

9.6.1 非慢性创面模型的建立

取 6~8 周龄雄性小鼠，采用砂纸磨皮法（见附录 E）、微针穿刺法等方法制备非慢性创面模型，微针穿刺法按 T/GDMDMA 0029 的规定执行。

9.6.2 受试物上样及试验时长

9.6.2.1 应依据终产品说明书确定产品每日累计使用时长，最低试验时长为每日累计使用时长的 2 倍；如按照说明书使用时间计算出的最低试验时长小于 4h，最低的试验时长宜设定为 4h。最高试验时长不宜超过 24 h。宜在试验结束时间点取样，可根据试验时长及具体情况设定期间取样次数。

9.6.2.2 取透明质酸钠医用创面敷料受试物 0.5 mL 涂抹或者使用无纺布（7.2.1）覆盖于创面皮肤表面，采用黑色粘扣环扣腹部遮蔽创面，按 9.6.2.1 试验时间点要求，采集以下生物样本：

- 麻醉后摘眼球取血，静置 40 min 后采用高速冷冻离心机（8.8）离心取血清；
- 处死小鼠，取涂抹受试物的皮肤，用纯水反复冲洗表面残留受试物，采用组织冷冻切片包埋剂冷冻保存；

9.6.2.3 取未涂抹受试物的空白小鼠作为对照，按 9.6.2.2 方法采集血清、皮肤。

9.6.3 受试物检测

9.6.3.1 定性检测

取组织冷冻切片包埋剂包埋皮肤，采用冰冻切片机（8.4）进行冰冻切片，厚度为 8 μm ~10 μm ，用多聚甲醛溶液（4%）（7.1.7）固定 15 min，滴加含 DAPI 的抗荧光衰减封片剂封片（7.1.11），在倒置荧光显微镜下观察皮肤各层及皮下组织中 Cy5 标记透明质酸钠的荧光分布情况（Cy5-NHS：激发波长为 590 nm~650 nm，发射波长为 662 nm~738 nm，DAPI 通道：激发波长为 330 nm~380 nm，发射波长为 420 nm~470 nm）。

9.6.3.2 定量检测

取血清各 50 μL 加入 384 孔黑色酶标板，在相同荧光参数下检测荧光强度，根据标准曲线计算各组血清理论所含透明质酸钠浓度。

9.7 试验数据处理与阳性判定

9.7.1 CUT-OFF 值计算

计算空白组小鼠血清理论所含透明质酸钠浓度的平均值 ($\bar{x}$) 和标准差 (s)。以 ($\bar{x}$) + 3s (平均值加 3 倍标准差) 作为阳性检出判定的临界值 (CUT-OFF 值)。若空白组检测值低于定量限 (LOQ)，则以 LOQ 作为 CUT-OFF 值。

9.7.2 阳性判定

各时间点样本血清浓度若低于 CUT-OFF 值，判定为透皮吸收阴性（血清学阴性）；若高于或等于 CUT-OFF 值，判定为透皮吸收阳性（血清学阳性）。

10 结果判定

依据定性（皮肤切片）与定量（血清）检测结果进行综合判定：

- a) 透皮吸收阳性：若任一取样时间点真皮层观察到 Cy5 标记透明质酸钠的特征荧光分布，或任一时间点血清中透明质酸钠换算浓度高于 CUT-OFF 值，即判定该敷料具有透皮吸收。
- b) 透皮吸收阴性：所有取样时间点的真皮层均未观察到特征荧光分布，且所有时间点血清浓度均低于 CUT-OFF 值。



附 录 A
(资料性)
透明质酸钠的荧光标记步骤

A.1 仪器耗材

A.1.1 超滤管。

A.1.2 高速冷冻离心机(8.8)。

A.2 试剂

A.2.1 Cy5-NHS荧光染料(7.1.1)。

A.2.2 医用透明质酸钠原料(7.1.2)。

A.2.3 二甲基亚砜(C_2H_6OS)(7.1.10)。

A.2.4 PBS(7.1.9)。

A.2.5 无水乙醇。

A.3 制备过程

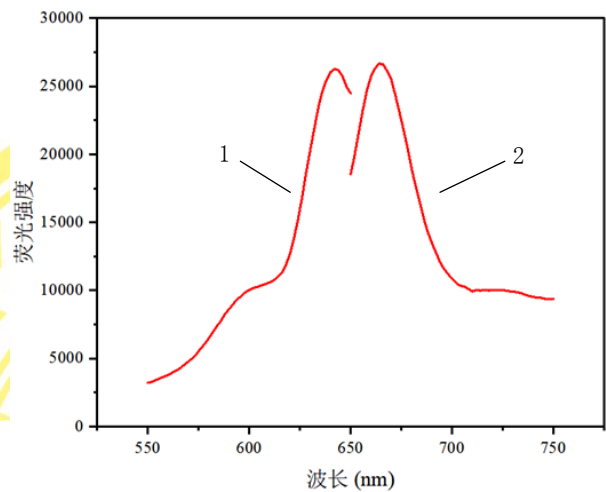
称取医用透明质酸钠原料,将其溶解于pH值为8.0的PBS中,制备透明质酸钠溶液。同时,在避光条件下称取Cy5荧光染料,并将其溶解于二甲基亚砜中,形成染料溶液。将两溶液混合均匀,涡旋振荡10min,得到Cy5标记透明质酸钠产物溶液。避光反应18 h后,采用超滤管高速离心进行回收富集,采用乙醇进行反复清洗,以去除游离的Cy5染料。将Cy5标记透明质酸钠冻干18h,得到粉末状产物,保存于-20℃。

附 录 B

(资料性)

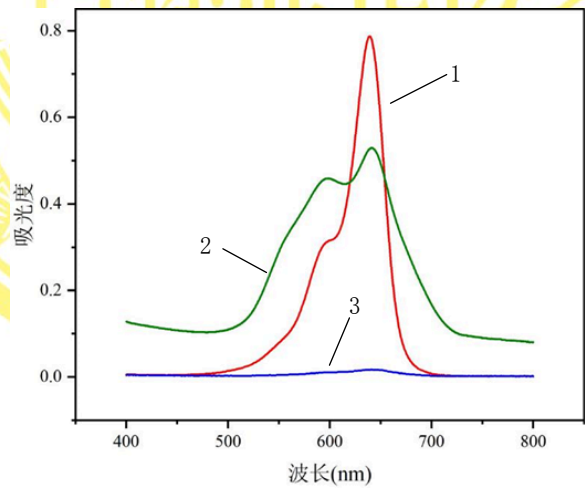
Cy5 标记透明质酸钠的荧光光谱扫描图及紫外可见光谱扫描图

Cy5标记透明质酸钠的荧光光谱分析图见图B. 1，Cy5标记透明质酸钠、透明质酸钠原料、Cy5-NHS 染料的紫外可见光谱图见图B. 2。



标引序号说明：
1——激发波长；
2——发射波长。

图B. 1 Cy5 标记透明质酸钠的荧光光谱分析图



标引序号说明：
1——Cy5-NHS染料；
2——Cy5标记透明质酸钠；
3——透明质酸钠原料。

图B. 2 Cy5 标记透明质酸钠、透明质酸钠原料、Cy5-NHS 染料的紫外可见光谱图

附 录 C
(资料性)
液相色谱、质谱条件

C.1 液相色谱条件

- C.1.1 色谱柱: C₁₈反相色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 4 μm)。
- C.1.2 流动相A: 0.1%甲酸溶液; 流动相B: 乙腈溶液。
- C.1.3 流速: 0.3 mL/min。
- C.1.4 洗脱梯度见表C.1。

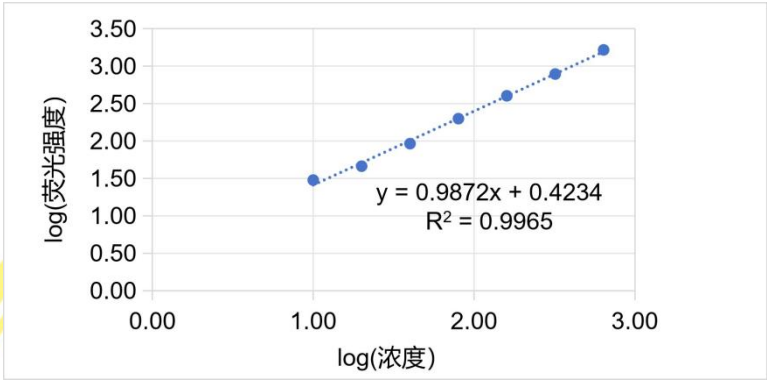
表C.1 洗脱梯度

时间/min	A/%	B/%
0	95	5
1	95	5
3	68	32
8	55	45
11	10	90
13	10	90
13.1	95	5
15	95	5

- C.1.5 柱温: 25℃。
- C.1.6 进样量: 2 μL。
- C.2 质谱条件
- C.2.1 离子源: ESI, 正离子模式。
- C.2.2 毛细管电压: 3.2 kV。
- C.2.3 扫描方式: 目标离子扫描 (SIM)。
- C.2.4 扫描离子: m/z 580 (Cy5-NHS原型)、 m/z 483 (Cy5-NHS碎片)、 m/z 482 (Cy5-NHS碎片)。
- C.2.5 鞘气流速: 40 mL/min。
- C.2.6 辅助气流速: 10 mL/min。
- C.2.7 辅助气温度: 320℃。

附录 D
(资料性)
标准曲线

标准曲线见图D. 1。



图D. 1 标准曲线



附录 E
(资料性)
砂纸磨皮法

E.1 仪器耗材

- E.1.1 异氟烷麻醉机。
- E.1.2 小鼠呼吸面罩。
- E.1.3 异氟烷。
- E.1.4 无菌磨砂纸，粒径为125 μm (120目)。
- E.1.5 脱毛膏。
- E.1.6 无菌吸水纸。

E.2 制备过程

- E.2.1 提前开启异氟烷麻醉机，调试设备参数至稳定状态，将小鼠固定后佩戴小鼠呼吸面罩，通过面罩持续吸入异氟烷进行气体麻醉，观察小鼠角膜反射、肢体肌张力，待小鼠完全进入深度麻醉、无自主活动及疼痛反射后，将小鼠俯卧固定于操作台面，备用。
 - E.2.2 选取小鼠背部平整皮肤区域，均匀涂抹适量脱毛膏，完全覆盖预设造模区域，室温静置3 min~5 min，待背部被毛充分软化松动后，轻柔擦拭去除脱落被毛，精准清理出2 cm×2 cm的完整无毛皮肤区域。
 - E.2.3 使用无菌吸水纸轻轻擦拭脱毛区域皮肤，彻底擦净残留的脱毛膏、毛发碎屑及皮肤表面污渍，保证造模皮肤平整、干燥、洁净，无残留杂质，避免影响后续磨皮造模效果。
 - E.2.4 取粒径125 μm (120目)的无菌磨砂纸，手持磨砂纸对小鼠2 cm×2 cm的剃毛皮肤区域进行匀速、适度、均匀往复磨擦，磨擦力度轻柔且一致，全程均匀覆盖整个预设皮肤区域，避免局部过度磨损或磨擦不全。持续磨擦至皮肤表层破损、皮肤泛红，创面出现均匀点状轻微渗血，无大面积出血、皮肤撕裂及深层组织损伤为止，成功构建小鼠非慢性皮肤创面模型。
-

中华人民共和国团体标准
医用透明质酸钠敷料小鼠体内透皮吸收评价方法
微孔板荧光法
T/GXAS 1469—2026
广西标准化协会统一印制
版权专有 侵权必究