



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0988.3—2021

外科植入物涂层 第3部分：贻贝黏蛋白材料

Coatings of surgical implants—Part 3: Mussel adhesive proteins

2021-09-06 发布

2022-09-01 实施

国家药品监督管理局 发布



目 次

前言	III
引言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 动物源性材料要求	1
5 要求	2
6 试验方法	2
附录 A (规范性) 贻贝黏蛋白定性检测法	4
附录 B (规范性) 多巴含量试验	5
附录 C (规范性) 附着试验	6
附录 D (规范性) 降解试验	7
参考文献	9

前 言

本文件按照 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。

本文件是 YY/T 0988《外科植入物涂层》的第3部分。YY/T 0988 已经发布了以下部分：

- 第1部分：钴-28 铬-6 钼粉末；
- 第2部分：钛及钛-6 铝-4 钒合金粉末；
- 第3部分：贻贝黏蛋白材料；
- 第11部分：磷酸钙涂层和金属涂层拉伸试验方法；
- 第12部分：磷酸钙涂层和金属涂层剪切试验方法；
- 第13部分：磷酸钙、金属和磷酸钙/金属复合涂层剪切和弯曲疲劳试验方法；
- 第14部分：多孔涂层体视学评价方法；
- 第15部分：金属热喷涂涂层耐磨性能试验方法。

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。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会(SAC/TC 110)归口。

本文件起草单位：江阴贝瑞森生化技术有限公司、天津市医疗器械质量监督检验中心、中国食品药品检定研究院。

本文件主要起草人：宋茂谦、朱进清、杨婉娟、高敏、张旺、母瑞红。

引 言

外科植入物涂层是指添加到基材上的与基材自然表面性质不同的材料层,或对原基板表面进行有意的转换或重建,形成的一种新的表面材料。外科植入物涂层可由金属、陶瓷、聚合物等制成,涂层的性能可能影响到植入物的性能及安全。

YY/T 0988 将提供不同涂层材料的性能要求及试验方法,以规范涂层产品的质量。

YY/T 0988 第 1 部分~第 10 部分为不同类型涂层材料的性能要求,第 11 部分~第 15 部分为相关试验方法。

- 第 1 部分:规定了用于在钴-28 铬-6 钼植入物上形成涂层的钴-28 铬-6 钼合金粉末的要求,但不适用于粉末制成的涂层的性能。
- 第 2 部分:规定了用于在钛合金植入物上形成涂层的纯钛粉和钛-6 铝-4 钒合金粉末的要求,但不适用于粉末制成的涂层的性能。
- 第 3 部分:规定了外科植入物涂层用贻贝黏蛋白材料的技术要求和试验方法,适用于源于贻贝的用于外科植入物涂层的贻贝黏蛋白材料。贻贝黏蛋白是一种亲水性蛋白质,可以在一些医疗器械表面形成涂层,成为植入材料与生物大分子间接接触媒介。贻贝黏蛋白材料固化到外科植入物上形成表面涂层,其目的是在植入器械表面形成蛋白质涂层。外科植入物可以是金属、高分子材料、无机材料(如陶瓷)等。
- 第 4 部分~第 10 部分为预留部分。
- 第 11 部分:提供了在室温条件下覆盖在致密金属基体上的磷酸钙涂层和金属多孔涂层的拉伸试验方法。
- 第 12 部分:提供了在室温条件下粘结在致密金属基体上的连续磷酸钙涂层和金属涂层剪切试验方法。
- 第 13 部分:提供了磷酸钙涂层、多孔和非多孔金属涂层剪切和弯曲疲劳性能试验方法,也包含确定覆盖有磷酸钙的金属涂层弯曲疲劳性能的试验方法。
- 第 14 部分:提供了表征附着于无孔基体上的各种多孔涂层的涂层厚度、孔隙率和平均截距的体视学试验方法。
- 第 15 部分:提供了量化热喷涂方法喷涂在金属平面上金属涂层耐磨性能的试验方法。

外科植入物涂层

第3部分:贻贝黏蛋白材料

1 范围

本文件规定了外科植入物涂层用贻贝黏蛋白材料的技术要求和试验方法。

本文件适用于源于贻贝的用于外科植入物涂层的贻贝黏蛋白材料。

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 14233.1—2008 医用输液、输血、注射器具检验方法 第1部分:化学分析方法

GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分:风险管理过程中的评价与试验

YY/T 0615.1 标示“无菌”医疗器械的要求 第1部分:最终灭菌医疗器械的要求

YY/T 0615.2 标示“无菌”医疗器械的要求 第2部分:无菌加工医疗器械的要求

YY/T 0771.1 动物源医疗器械 第1部分:风险管理应用

YY/T 0771.2 动物源医疗器械 第2部分:来源、收集与处置的控制

YY/T 0771.3 动物源医疗器械 第3部分:病毒和传播性海绵状脑病(TSE)因子去除与灭活的确认

中华人民共和国药典(2020年版四部)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

贻贝黏蛋白 mussel adhesive protein

含有多巴基团的蛋白质,多巴基团可以自氧化交联,使之形成高分子聚合物。

[来源:YY/T 1293.6—2020,3.1]

3.2

贻贝黏蛋白涂层 mussel adhesive protein coating

贻贝黏蛋白通过涂覆,或在加工过程中作为添加剂加入植入物中,并以贻贝黏蛋白作为主要成分的涂层。

4 动物源性材料要求

动物组织中提取制备的贻贝黏蛋白材料应按照 YY/T 0771.1、YY/T 0771.2、YY/T 0771.3 的要求进行管理和控制。

5 要求

5.1 鉴别

定性鉴别:贻贝黏蛋白材料与氯化硝基四氮唑蓝(NBT)染色液显色为蓝紫色。

5.2 蛋白含量

贻贝黏蛋白材料的蛋白含量应不低于产品标示值的 90%。

5.3 多巴含量

贻贝黏蛋白材料的多巴含量应不低于产品标示蛋白含量的 0.3%。

5.4 酸碱度

贻贝黏蛋白材料的 pH 应在 3.5~6.0 的范围内,在涂覆到外科植入物前调节 pH 中性。

5.5 重金属

贻贝黏蛋白材料的重金属含量应不超过 $10\ \mu\text{g/g}$,砷含量应不超过 $4\ \mu\text{g/g}$,汞含量应不超过 $4\ \mu\text{g/g}$ 。

5.6 附着性能

贻贝黏蛋白材料与外科植入物应能均匀附着。

5.7 降解

贻贝黏蛋白材料的降解时间应符合产品标示值。

5.8 无菌

最终灭菌的产品应符合 YY/T 0615.1 的要求,采用无菌加工的产品应符合 YY/T 0615.2 的要求。

5.9 细菌内毒素

贻贝黏蛋白材料的细菌内毒素控制应能满足其所涂敷医疗器械产品的细菌内毒素含量控制要求。

5.10 生物相容性

应对贻贝黏蛋白材料进行生物相容性评价,评价结果应表明无不可接受的生物学风险。

6 试验方法

6.1 鉴别

按照附录 A 的方法测定,应符合 5.1 的规定。

6.2 蛋白含量

按照《中华人民共和国药典(2020 年版四部)》0731 蛋白含量测定法中的第二法福林酚法进行测定,应符合 5.2 的规定。

6.3 多巴含量

按照附录 B 试验,多巴含量应符合 5.3 的规定。

6.4 酸碱度

按照《中华人民共和国药典(2020 年版四部)》0631 pH 测定法进行试验,酸碱度应符合 5.4 的规定。

6.5 重金属

按照《中华人民共和国药典(2020 年版四部)》0821 重金属检查法第二法进行试验。总砷、总汞样品预处理方法采用《中华人民共和国药典(2020 年版四部)》2321 项下方法,总砷、汞含量按照 GB/T 14233.1—2008 中原子荧光光谱法或按《中华人民共和国药典(2020 年版四部)》0412 电感耦合等离子质谱法(ICP-MS)进行试验,重金属含量应符合 5.5 的规定。

6.6 附着性能

附着性能可通过静态和动态性能进行评价。静态性能评价是将涂布贻贝黏蛋白材料的外科植入物以适当的表面观测方法如直接观察、显微观察或者扫描电镜观测涂层状态。动态性能评价是将涂布贻贝黏蛋白材料的外科植入物,放置在离心装置中离心,以适当的表面观测方法如直接观察、显微观察或者扫描电镜观测涂层状态。按照附录 C 试验,以外科植入物涂层脱落所计算的力值反映其附着力性能。

6.7 降解

按照附录 D 试验,将贻贝黏蛋白材料置于固定化酶降解液中,降解时间应符合 5.7 的规定。

6.8 无菌

按照《中华人民共和国药典(2020 年版四部)》1101 无菌检查法进行试验,应符合 5.8 的规定。

6.9 细菌内毒素

按照《中华人民共和国药典(2020 年版四部)》1143 细菌内毒素检查法进行试验,细菌内毒素应符合 5.9 的规定。

6.10 生物相容性

按照 GB/T 16886.1 的要求对贻贝黏蛋白材料进行生物学评价,应无不可接受的生物学风险。

附录 A

(规范性)

贻贝黏蛋白定性检测法

A.1 原理

在碱性和过量甘氨酸作为还原剂的条件下,多巴蛋白分子内的多巴(DOPA)残基的 1,2-苯二酚可氧化转化为醌类化合物,加入 NBT 后,生成不溶性的蓝紫色结晶甲贻(Formazan)。

A.2 试剂

A.2.1 甘氨酸-钾缓冲液(pH 10):称取 75 g 甘氨酸溶解于 400 mL 水中,用固体氢氧化钾调节 pH 到 10,加水定容至 500 mL,配好后 4 ℃保存。

A.2.2 硼酸钠溶液:称取 2.5 g 十水合硼酸钠溶于 40 mL 水中,40 ℃超声溶解,临用现配。

A.2.3 NBT 染色液:称取 9 mg NBT 加 15 mL 甘氨酸-钾缓冲液(A.2.1)溶解,混匀,临用现配。

A.3 步骤

A.3.1 取 2 μ L 样品涂布在 5 cm $\times$ 5 cm 的 0.2 μ m 的硝酸纤维素膜(NC 膜)上,标记样品位置。

A.3.2 样品被 NC 膜吸收后,将载有样品的 NC 膜放置于 500 mL 烧杯中,加纯水 300 mL 后超声 10 min。

A.3.3 取出 NC 膜放入培养皿,加入 NBT 染色液(A.2.3)避光染色 45 min。

A.3.4 取出 NC 膜用硼酸钠溶液(A.2.2)冲洗两次后,保存于硼酸钠溶液中过夜,再用纯水冲洗 3 次,观察样品标记处有蓝紫色斑点生成。

附 录 B
(规范性)
多巴含量试验

B.1 原理

含有 3,4-二羟基苯丙氨酸(DOPA)结构的物质在酸性条件下呈黄色,当过量碱加入时会变为深橘红色。

B.2 试剂

B.2.1 盐酸溶液:取 0.1 mL 盐酸用纯水稀释定容至 100 mL。

B.2.2 DOPA 标准溶液:称取 DOPA 标准品 20 mg 用盐酸溶液(B.2.1)定容至 100 mL,临用现配。

B.2.3 酸性试剂:取 4.3 mL 盐酸,用纯水稀释定容至 100 mL。

B.2.4 碱性试剂:称取 4.0 g 氢氧化钠,用纯水稀释定容至 100 mL。

B.2.5 亚硝酸试剂:称取 二水合钼酸钠 10 g 和亚硝酸钠 10 g,用纯水溶解并定容至 100 mL。

B.3 步骤

B.3.1 DOPA 标准液系列制备:分别取 DOPA 标准溶液(B.2.2)0 mL、0.1 mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL、2.5 mL、3 mL 用盐酸溶液(B.2.1)稀释定容至 10 mL,摇匀,备用。

B.3.2 分别取上述系列标准液 1 mL,向每支试管中加入 0.5 mL 酸性试剂(B.2.3),然后向每支试管依次加入 1.5 mL 亚硝酸试剂(B.2.5)和 2 mL 碱性试剂(B.2.4)(碱性试剂要在亚硝酸试剂加入后的 5 min 内加入),摇匀。

B.3.3 取待测样品 1 mL 于 10 mL 试管中按照上述方法进行操作,以 0 号管为空白,用 1 cm 比色皿在波长为 500 nm 下测定配制好的标准溶液和样品溶液吸光度。

注:样品如有干扰比色现象,用 3 000 r/min 转速离心 10 min,取上清液进行比色。

B.3.4 以 DOPA 浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标做标准曲线,再根据测得的样品溶液的吸光度计算出样品的 DOPA 含量。

附录 C

(规范性)

附着试验

C.1 原理

贻贝黏蛋白在溶液中,随着溶液 pH 的升高,贻贝黏蛋白自发吸附到与其接触的第一表面,可以形成非常薄并且均匀的涂层。

C.2 试剂

碳酸氢钠溶液:称取碳酸氢钠固体 8.40 g,于 1 L 烧杯中加入纯化水 800 mL 溶解,溶解后将溶液转移至 1 L 容量瓶定容至 1 L,既得。

C.3 步骤

C.3.1 供试品包被容器的选择:将需要使用贻贝黏蛋白进行附着包被的供试品,选取合适的容器进行盛放,附着包被时,需使含有贻贝黏蛋白的溶液完全没过被包被的供试品,计算此时所需的溶液的总体积(V , mL)及与溶液接触的容器及供试品的总面积(S , cm^2)。

C.3.2 贻贝黏蛋白用量的计算:根据供试品所需的包被密度(C , $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)计算贻贝黏蛋白的用量(A , μg),用式(C.1)计算:

$$A = C \times S \times \alpha \quad \dots\dots\dots (\text{C.1})$$

式中:

α ——校正系数, $\alpha = 1.5$ 。

C.3.3 贻贝黏蛋白溶液的制备:使用固定浓度的贻贝黏蛋白溶液,或用纯水稀释到指定浓度。

C.3.4 供试品的附着包被:将供试品放置于所选的供试品盛放容器中,在容器中加入 0.9 倍体积量的碳酸氢钠溶液,再加入 0.1 倍体积量的贻贝黏蛋白溶液,混匀。室温避光放置进行附着包被过夜,至少 16 h。

C.3.5 纯水清洗包被表面:包被结束,转移出包被溶液,再在容器中缓慢加入 1 倍体积的纯水,轻轻晃动冲洗供试品及容器表面的残留包被溶液,转移出冲洗溶液。

C.3.6 供试品的干燥:供试品置于供试品盛放容器中放于 $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的烘箱中进行干燥约 3 h,使供试品表面干燥。

C.3.7 附着力测定:静态附着性能评价是将涂布贻贝黏蛋白材料的外科植入物以适当的表面观测方法如直接观察、显微观察或者扫描电镜观测涂层状态。动态附着性能评价是将涂布贻贝黏蛋白材料的外科植入物,放置在离心装置中离心,以适当的表面观测方法如直接观察、显微观察或者扫描电镜观测涂层状态。以涂层脱落所计算的力值反映其附着力性能。

附录 D

(规范性)

降解试验

D.1 原理

贻贝黏蛋白的降解主要为酶解,人体的不同部位有着不同的酶。通过模拟使用部位的酶环境,研究贻贝黏蛋白材料的降解性能。

D.2 试剂

D.2.1 溶液 A:50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)缓冲液:取 1.25 mL 2 mol/L 三羟甲基氨基甲烷溶液,加饱和氯化钠溶液稀释至 50 mL,以盐酸调节 pH 至 9.5 ± 0.2 ,室温配制。

D.2.2 溶液 B:0.1 mol/L 碳酸氢钠(含 0.5 mol/L 氯化钠,pH 8.3):称取碳酸氢钠固体 8.40 g,氯化钠固体 29.22 g 于 1 L 烧杯中加入纯化水 800 mL 溶解,溶解后将溶液转移至 1 L 容量瓶定容至 1 L。

D.2.3 溶液 C:0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0,含 0.5 mol/L 氯化钠):称取三羟甲基氨基甲烷固体 12.11 g,氯化钠固体 29.22 g 于 1 L 烧杯中加入纯化水 800 mL 溶解,溶解后使用 1 mol/L 的盐酸溶液调节 pH 至 8.0,将溶液转移至 1 L 容量瓶定容至 1 L。

D.2.4 溶液 D:0.1 mol/L 乙酸钠/乙酸(pH 4.0,含 0.5 mol/L 氯化钠):称取乙酸钠固体 16.41 g,于 1 L 烧杯中加入纯化水 800 mL 溶解,溶解后将溶液转移至 1 L 容量瓶定容至 1 L,既得 0.2 mol/L 乙酸钠溶液。取乙酸含量 $>99.5\%$ 的无水乙酸溶液 11.5 mL 定容至 1 L,既得 0.2 mol/L 乙酸溶液。取 500 mL 0.2 mol/L 乙酸钠溶液使用 0.2 mol/L 乙酸溶液调节 pH 至 4.0,既得 0.2 mol/L pH 4.0 的乙酸钠/乙酸缓冲液。取 0.2 mol/L pH 4.0 的乙酸钠/乙酸缓冲液 500 mL 于 1 L 烧杯中,加入纯化水 300 mL,氯化钠固体 29.22 g 溶解,溶解后将溶液转移至 1 L 容量瓶定容至 1 L。

D.3 步骤

D.3.1 供试品制备:取液体待测样品加水稀释至 0.5 mg/mL,再与等量溶液 A 混合,涡旋混匀,分装到离心管中,5 mL/管,密封 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 48 h,然后高速离心($16\ 000\ g$, 5 min)弃去上清液,沉淀用溶液 A 洗涤两次,制备成供试品。

D.3.2 固定化酶制备:取悬浮于乙醇/丙酮中的溴化氰(CNBr)活化琼脂悬浊液 15 mL,抽滤,用 1 mmol/L 盐酸溶液冲洗树脂,每次用量 100 mL,抽尽溶液,冲洗树脂 3 次后,抽干液体称量琼脂湿重。用 30 mL 溶液 B 配制 0.15 mg/mL 的胰蛋白酶或 0.15 mg/mL 糜蛋白酶或 0.6 mg/mL 的弹性蛋白酶溶液,与冲洗称重后的 CNBr 活化琼脂混合, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温和震荡(100 r/min)过夜后抽干液体。使用 50 mL 溶液 B 冲洗树脂后抽干溶液,树脂转移至溶液 C 中,室温放置 2 h。使用 50 mL 的溶液 D 与 50 mL 的溶液 C 交替冲洗抽滤树脂 3 遍,抽干,备用。

D.3.3 混合固定化酶制备:用磷酸缓冲液(PBS)中添加按胰蛋白酶:糜蛋白酶:弹性蛋白酶=10:10:1 活性比配制,总酶活性不低于 84 U/mL 的混合固定化酶。固定化酶质量浓度应大于 5%。

D.3.4 取适量供试品加入到降解介质中,供试品和降解介质的比例可根据供试品浓度和固定化酶活性调整。混合均匀并于 $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ 持续搅拌,按设定的时间取样。

D.3.5 取相应时间点的供试品,高速离心($16\ 000\ g$, 5 min)后取上清液,以适宜的方法水解为氨基酸(零点供试品直接水解),进行氨基酸定量分析,测定不同时间点降解产物的氨基酸总浓度($\mu\text{mol/mL}$)。计算不同时间点降解产物的氨基酸总浓度与供试品中氨基酸的初始总浓度的比值,记为该样品的降解率,用式(D.1)计算:

$$DR = \frac{c_n}{c_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (D.1)$$

式中：

DR —— 降解率；

c_n —— 测试点氨基酸浓度，单位为微摩尔每毫升($\mu\text{mol/mL}$)；

c_0 —— 初始氨基酸浓度，单位为微摩尔每毫升($\mu\text{mol/mL}$)。

参 考 文 献

- [1] GB/T 9969 工业产品使用说明书 总则
 - [2] GB/T 16886.2 医疗器械生物学评价 第2部分:动物福利要求
 - [3] GB/T 16886.3 医疗器械生物学评价 第3部分:遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验
 - [4] GB/T 16886.4 医疗器械生物学评价 第4部分:与血液相互作用试验选择
 - [5] GB/T 16886.5 医疗器械生物学评价 第5部分:体外细胞毒性试验
 - [6] GB/T 16886.6 医疗器械生物学评价 第6部分:植入后局部反应试验
 - [7] GB/T 16886.10 医疗器械生物学评价 第10部分:刺激与皮肤致敏试验
 - [8] GB/T 16886.20 医疗器械生物学评价 第20部分:医疗器械免疫毒理学试验原则和方法
 - [9] YY/T 0316 医疗器械 风险管理对医疗器械的应用
 - [10] YY/T 1293.6—2020 接触性创面敷料 第6部分:胎贝黏蛋白敷料
 - [11] MA Paz, R Flückiger, A Boak, HM Kagan, PM Gallop. Specific Detection of Quinoproteins by Redox-cycling Staining. The Journal of Biological Chemistry 1991, 266:689-692.
-

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
外 科 植 入 物 涂 层
第 3 部分:贻贝黏蛋白材料
YY/T 0988.3—2021

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

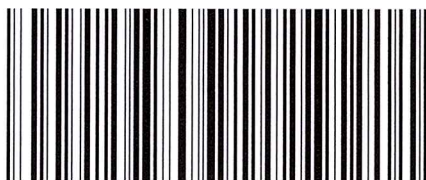
*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 27 千字
2021 年 10 月第一版 2021 年 10 月第一次印刷

*

书号: 155066·2-35992 定价 24.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



YY/T 0988.3—2021



码上扫一扫 正版服务到