



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1806.2—2021

生物医用材料体外降解性能评价方法 第2部分：贻贝黏蛋白

Evaluation method for in vitro degradation performance of biomedical materials—
Part 2: Mussel adhesive protein

2021-09-06 发布

2022-09-01 实施

国家药品监督管理局 发布



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 1806《生物医用材料体外降解性能评价方法》的第2部分。YY/T 1806 已经发布了以下部分：

——第1部分：可降解聚酯类；

——第2部分：贻贝黏蛋白。

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。

本文件由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会(SAC/TC 248)归口。

本文件起草单位：江阴贝瑞森生化技术有限公司、山东省医疗器械产品质量检验中心、中国食品药品检定研究院。

本文件主要起草人：顾辰昊、陈方、杜晓丹、宋茂谦、孟晓依、徐红。

引 言

贻贝黏蛋白是提取自海洋贻贝的足丝腺经纯化后获得的高纯度单一蛋白质。贻贝黏蛋白具有通过自氧化交联形成聚合物的特性,具有广谱粘接性,可形成抗水保护膜并具有良好的生物相容性,在生物医药领域的应用越来越广泛。

人体的不同部位有着不同的生理环境,同一生物材料在不同的应用环境中,其自身的酶解和所引发的人体免疫系统反应都是不相同的。研究表明贻贝黏蛋白的降解主要为酶解,适宜的贻贝黏蛋白降解性能评价标准方法可以促进贻贝黏蛋白的性能研究和产品开发,也可对相关产品的质量控制提供方法。由于贻贝黏蛋白产品剂型、适应症的多样性,本文件未给出适用于所有产品的具体试验方法。在进行特定产品的体外降解试验时,可结合实际情况,参考但并不局限于本文件给出的方法。

YY/T 1806 旨在建立生物医用材料体外降解性能评价方法,拟由两个部分构成。

- 第1部分:可降解聚酯类。目的在于给出可降解聚酯类生物医用材料/器械的体外降解性能评价方法。
- 第2部分:贻贝黏蛋白。目的在于给出贻贝黏蛋白生物医用材料/器械的体外降解性能评价方法。

生物医用材料体外降解性能评价方法

第2部分:贻贝黏蛋白

1 范围

本文件规定了贻贝黏蛋白材料/器械体外降解性能评价方法。

本文件适用于贻贝黏蛋白材料/器械体外降解性能评价。

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 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分:样品制备与参照材料

GB/T 16886.13 医疗器械生物学评价 第13部分:聚合物医疗器械降解产物的定性与定量

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

固定化酶 **immobilized enzyme**

在一定的空间范围内起催化作用,并能反复和连续使用的酶。

3.2

体外降解 **in vitro degradation**

在模拟生理环境中发生的降解。

4 体外降解试验设计

4.1 概述

将经过处理的适量试样置于容器中,加入相应量的降解介质,涡旋均匀并密封容器,保持适宜的温度。在试验的不同周期取样,用于贻贝黏蛋白降解性能的评价。

4.2 仪器

高效液相色谱仪(HPLC)或氨基酸分析仪、电子天平、pH计、离心机、烘箱等。

4.3 容器

按照 GB/T 16886.12 的要求,降解试验应在洁净、可密闭的、化学惰性的容器中进行。

4.4 溶液配制

50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液:取 1.25 mL 2 mol/L Tris 溶液,加饱和 NaCl 溶液稀释至 50 mL,以

HCl 调节 pH 至 9.5 ± 0.2 , 室温配制。

4.5 供试品制备

取液体待测样品 40 mL(凝胶取待测样品 40 g)与 40 mL 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液混合, 涡旋混匀, 分装到离心管中, 5 mL/管, 密封 37 °C 放置 48 h, 然后高速离心(16 000 g, 5 min), 弃去上清液, 沉淀用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗涤两次, 制备成供试品。

4.6 试验步骤

试验设计遵循 GB/T 16886.13 中试验溶液应尽可能与预期的聚合物医疗器械的应用环境相同的原则, 依据产品的使用部位和应用环境选择适宜的蛋白酶种类和配比。例如, 用于皮下植入的产品, 可采用磷酸缓冲液(PBS)中添加胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶配制, 其中胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶的活性比为 10 : 10 : 1, 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%。

注: 固定化酶可采用市售品, 也可自行配制和制备。固定化酶制备方法见附录 A。

取适量供试品加入降解介质中, 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。混合均匀并持续搅拌, 按设定的时间取样。

每个时间点至少 3 份样品, 每份样品单独使用一个容器。

每个时间点至少 1 个空白对照, 以证明容器、试验溶液等对分析不产生干扰。

4.7 降解温度

降解过程的温度宜为 $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 。

4.8 时间点设置

应至少包含 5 个时间点(包括零点)以得出降解趋势, 降解终点的设置宜基于试验目的, 可考虑下列情况:

- 达到了基于风险分析后设定的时间; 或
- 完全降解为氨基酸, 中间取样点根据实际情况设置。

5 降解结果评价

5.1 降解率

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, 用下式计算:

$$\text{DR} = \frac{c_n}{c_0} \times 100$$

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($\mu\text{mol/mL}$)。

5.2 数据处理

数据处理如下:

- a) 计算 3 份样品数据相对平均偏差(RAD),不得超过 15%;
- b) 取 3 份样品数据平均值,绘制样品降解率随时间的变化趋势图,对降解结果进行描述。

6 试验报告

试验报告宜包括以下信息:

- a) 试样名称、规格、生产批号和数量的描述;
- b) 降解介质;
- c) 降解温度;
- d) 试验方法的详细描述和论证;
- e) 试验结果。



附 录 A
(资料性)
固定化酶制备方法

A.1 溶液配制

溶液 A: 0.1 mol/L NaHCO_3 (含 0.5 mol/L NaCl , pH 8.3): 称取 NaHCO_3 固体 8.40 g, NaCl 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, 即得。

溶液 B: 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0, 含 0.5 mol/L NaCl): 称取 Tris 固体 12.11 g, NaCl 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 HCl 溶液调节 pH 至 8.0, 将溶液转移至 1 L 容量瓶定容至 1 L, 即得。

溶液 C: 0.1 mol/L 乙酸钠 (NaAc)/乙酸 (AcOH) (pH 4.0, 含 0.5 mol/L NaCl): 称取 NaAc 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, 即得 0.2 mol/L NaAc 溶液。取 AcOH 含量 $>99.5\%$ 的无水 AcOH 溶液 11.5 mL 定容至 1 L, 即得 0.2 mol/L AcOH 溶液。取 500 mL 0.2 mol/L NaAc 溶液使用 0.2 mol/L AcOH 溶液调节 pH 至 4.0, 即得 0.2 mol/L pH 4.0 的 NaAc/AcOH 缓冲液。取 0.2 mol/L pH 4.0 的 NaAc/AcOH 缓冲液 500 mL 于 1 L 烧杯中, 加入纯化水 300 mL, NaCl 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, 即得。

A.2 制备方法

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 HCl 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 °C 温和震荡 (100 r/min) 过夜后抽干液体。使用 50 mL 溶液 A 冲洗树脂后抽干溶液, 树脂转移至溶液 B 中, 室温放置 2 h。使用 50 mL 的溶液 C 与 50 mL 的溶液 B 交替冲洗抽滤树脂 3 遍, 抽干, 即得。

参 考 文 献

- [1] 吴珂,康瑞娟,何利中.贻贝黏蛋白降解的关键酶.智慧健康,3.23(2017):33-35+38.
-

YY/T 1806.2-2021

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
生物医用材料体外降解性能评价方法
第 2 部分:贻贝黏蛋白
YY/T 1806.2—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

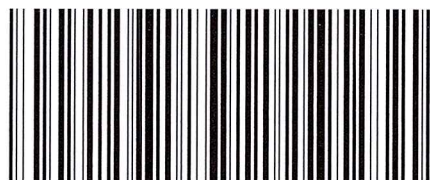
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 17 千字
2021 年 10 月第一版 2021 年 10 月第一次印刷

*

书号: 155066 • 2-35994 定价 18.00 元



YY/T 1806.2-2021



码上扫一扫 正版服务到

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