

ICS 11.040.01

C 30

点击此处添加中国标准文献分类号

中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXX. 2—XXXX

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

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

征求意见稿

(本稿完成日期: 2020-7-6)

在提交反馈意见时, 请将你所知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

建议本标准自发布之日起 12 个月实施。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 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：标准文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件是YY/T XXXX《生物医用材料体外降解性能评价方法》的第2部分。YY/T XXXX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这些专利的责任。

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：。

本文件主要起草人：。

引 言

贻贝黏蛋白提取自海洋贻贝的足丝腺，经纯化后获得高纯度的单一蛋白质。贻贝黏蛋白具有通过自氧化交联形成聚合物的特性，因此具有广谱粘接性、形成抗水保护膜以及良好的生物相容性，在生物医药领域的应用越来越广泛。

人体的不同部位有着截然不同的生理环境，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的变化都是不相同的。目前文献结果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，本部分并不能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研究时，应结合实际，可参照但并不局限于本文件给出的方法。

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体外降解性能评价方法。
本文件适用于贻贝黏蛋白体外降解性能评价。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 降解 degradation

由材料中的化学变化引起的机械性能和/或化学完整性的降低。

3.2 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。

3.3 体外降解 *in vitro* degradation

在模拟生理环境中发生的降解。

4 体外降解体系的建立

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

降解试验应在洁净、可密闭的、化学惰性的容器中进行。

4.4 供试品制备

待测样品按照 1: 1 (v/v) 比例与 pH5 生理盐水混合, 涡旋混匀高速离心取上清液, 以 NaOH 调节 pH 至 7.5, 混匀密封室温放置过夜, 然后高速离心弃去上清液, 沉淀用 pH7.5 的生理盐水洗涤一次, 制备成供试品。并取样进行氨基酸浓度分析, 记为每个供试品的初始氨基酸浓度。

注: 固态样品可以省略这一步骤。

4.5 降解介质

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, 总酶活不低于 84 U/mL 的混合固定化酶。固定化酶浓度应大于 5% (W/V)。

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。

5 样品检测

5.1 降解过程

取适量供试品加入到降解介质中, 待测样品和降解介质的比例可依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 个平行, 每个平行样单独使用一个容器。

每个时间点至少 1 个空白对照, 以证明容器、降解介质等对分析不产生干扰。

5.2 降解温度

降解过程的环境温度应为 $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 。

5.3 时间点设置

除零点外, 应至少包含 5 个时间点以得出降解趋势, 时间点按测试品需求设置。

5.4 样品检测

按照 5.1 操作取出的样品, 高速离心后取上清液, 以适宜的方法水解为氨基酸, 进行氨基酸定量分析, 测定不同时间降解产物的氨基酸总浓度。同时测定降解反应初始时样本的氨基酸含量。

6 结果评估

6.1 降解率

计算不同时间点降解产物的氨基酸总浓度相对于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。

降解率 = 测试点氨基酸浓度 / 初始氨基酸浓度 * 100%

6.2 数据分析

绘制样品降解率随时间的变化趋势图, 对降解结果进行评价。

7 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) 降解液；
- c) 降解温度；
- d) 试验方法的详细描述和论证；
- e) 试验结果；
- f) 结论。

征求意见稿

附录 A

（资料性附录） 固定化酶制备方法

取15mL悬浮于乙醇/丙酮中的CNBr活化琼脂悬浊液，抽滤，使用1mM HCl溶液冲洗3遍，抽滤，称量琼脂湿重。使用30mL 0.1M NaHCO₃（含0.5M NaCl，PH8.3）溶液配制 0.15mg/mL 的胰蛋白酶或0.15mg/mL 糜蛋白酶或0.6mg/mL的弹性蛋白酶溶液，与CNBr活化琼脂混合，4℃过夜温和震荡（100rpm）。使用5倍量的NaHCO₃溶液清洗，转移至0.1M Tris-HCl缓冲液中（PH8.0），放置2h。使用5倍偶联缓冲液体积的0.1M NaAc/HAc（PH4.0, 含0.5M NaCl）与0.1M Tris-HCl（PH8.0, 含0.5M NaCl）交替洗涤3遍，抽滤。

征求意见稿