

中华人民共和国医疗器械行业标准

XX/T XXXXX—XXXX

动物源性心血管植入物抗钙化评价:大鼠皮下植入试验

Calcification evaluation of animal derived cardiovascular implants: Test for rat
subcutaneous implantation

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上

- XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

发 布

目 录

目 录..... 1

前 言..... 2

引 言..... 3

1 范围..... 4

2 规范性引用文件..... 4

3 术语和定义..... 4

4 目的..... 4

5 主要试剂和仪器..... 5

 5.1 试剂..... 5

 5.2 溶液配制..... 5

 5.3 仪器..... 5

6 供试品植入..... 5

 6.1 动物选择..... 5

 6.2 供试品..... 5

 6.3 试验步骤..... 5

7 大体观察..... 6

8 钙含量测定..... 6

 8.1 方法一 火焰——原子吸收分光光度法..... 6

 8.2 方法二 电感耦合等离子体原子发射光谱法..... 7

 8.3 钙含量计算..... 7

 8.4 重复性..... 8

9 试验报告..... 8

前 言

本文件按照GB/T1.1-2020《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心血管植入物分技术委员会（SAC/TC 110/SC2）归口。

本文件的起草单位：

本文件的起草人：

引 言

GB 12279-2008《心血管植入物 人工心脏瓣膜》中提出了对置入心脏和循环系统替代物的抗钙化性能的检测要求，但没有给出具体的试验方法。本标准旨在提供一种评价动物源性心血管植入物抗钙化性能的评价方法。该方法属于非循环系统植入模型，具有以下特点：试验动物为幼年大鼠，对钙化反应敏感；可以实现大样本量试验；可以进行同宿主不同生物瓣间的比较；可消除组间系统误差，最大限度减少个体差异对试验结果的影响。大鼠皮下植入试验的原理是检测宿主对植入物的反应，以易发生钙化反应的刚离奶幼年大鼠作宿主模型，观察其对植入材料的钙化反应，验证材料抗钙化处理工艺是否有效。但动物试验只能对发生钙化的风险进行初步评估，产品远期的抗钙化能力还必须经过长期、大样本的临床跟踪和随访才能获得更可靠的结论。

动物源性心血管植入物抗钙化评价:大鼠皮下植入试验

1 范围

本文件规定了大鼠皮下植入评价心血管植入物的抗钙化性能的试验方法。

本文件适用于动物源性心血管植入物（例如：生物瓣、心脏大血管及动静脉血管生物补片）的小动物体内抗钙化性能评价试验。

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 602 化学试剂 杂质测定用标准溶液的配制

GB/T 4470 火焰发射、原子吸收和原子荧光光谱分析术语（GB/T4470-1988，idt ISO 6955 :1982）

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 12279 心血管植入物 人工心脏瓣膜

GB/T 16886.1 第1部分:风险管理过程中的评价与试验

GB/T 16886.2 第2部分:动物福利要求

中华人民共和国药典 2020年版 四部通则

3 术语和定义

GB 12279-2008、GB/T 16886.1-2011、GB/T 16886.2-2011、GB/T 4470-1988界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1...试验样品 test sample

经过抗钙化处理的材料。

注：抗钙化性能评价的对象。

3.2...对照品 control sample

未经过抗钙化处理的材料，可再现植入物未经处理时的钙化程度。

注：对照品的目的是显示大鼠皮下植入模型诱导钙化的适用性。

3.3...供试品 sample

包括试验样品和对照品。

3.4...重复性 repeatability

重复性条件下的精密度。

4 目的

通过将经过抗钙化处理的试验样品和未经抗钙化处理的对照品同时植入同一只大鼠背部皮下，一定时间后取出植入物，经过观察、钙含量分析，比较试验样品与对照品，从而确定对试验样品进行的抗钙化处理是否有效。

5 主要试剂和仪器

5.1 试剂

5.1.1 盐酸：优级纯及以上。

5.1.2 硝酸：优级纯及以上。

5.1.3 氧化镧： La_2O_3 ，纯度大于 99.99%。

5.2 溶液配制

5.2.1 除另有说明，分析用水符合 GB/T 6682 规定的二级以上蒸馏水或其纯度相当的水。

5.2.2 氯化镧溶液（含镧 20 g/L）：称取 23.45 g 氧化镧（5.1.3）于 200 mL 烧杯中，加入 20 mL 水，慢慢加入 50 mL 盐酸（5.1.1），转移至 1000 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度线。

5.2.3 钙标准贮备液（1000 mg/L）：按 GB/T 602 的规定配制，或采用由国家标准物质研究中心提供的商品化有证标准溶液。

5.2.4 钙元素标准使用液（10 mg/L）：取钙标准贮备液 0.5 mL，置于 50 mL 容量瓶中，用水稀释至 30 mL 刻度，摇匀。此时溶液 1.00 mL 含钙 0.01 mg。

5.3 仪器

干燥箱、万分之一电子天平、微波消解仪、火焰-原子吸收分光光度计、电感耦合等离子体原子发射光谱仪。

6 供试品植入

6.1 动物选择

推荐选择 3 周龄刚断乳体重 45-55g 左右的 Wistar 雄性 SPF 级幼鼠¹⁾。

6.2 供试品

试验样品在试验前应按照临床产品使用说明书进行冲洗等处理；

对照品为未经抗钙化处理的样片，在试验前应按照要求同样进行冲洗等处理。

考虑到一个生物瓣使用材料的尺寸，生物瓣检测时建议试验样品面积不少于 30cm²。

建议一只大鼠一侧植入供试品面积不大于 2cm²。

6.3 试验步骤

将每只动物的体重进行称量并记录。随后将动物进行麻醉，剃去术野被毛，常规消毒。右侧背部皮下植入试验样品 1 个，左侧背部皮下植入对照品 1 个，缝合皮肤切口。8 周结束后，对动物体重进行称量并处死，取出植入物。

1) 其他动物模型如能证明产生相同的或者更好的效果也可使用。

注：8周是观察钙化反应的一个重要时间点，根据实验目的需要可以再增加其它时间点。

7 大体观察

小心去除移植植物表面的宿主组织，生理盐水冲洗并且整理平整后晾干，经恒温烘箱干燥至恒重，对干燥后的供试品进行图片记录。

8 钙含量测定

8.1 方法一 火焰——原子吸收分光光度法

8.1.1 检验液的制备

准确称取干燥至恒重的供试品一片²⁾（精确到0.0001g），置于消解内罐中，加入5 mL硝酸（5.1.2），盖好安全阀，安装好保护套后，将消解罐放入微波消解系统内，设置微波消解程序进行消解。供试品消解结束后，取出内罐，转移消解液至25 mL容量瓶中；用少量水多次洗涤内罐壁，并将其同时转移到容量瓶中；随后加入一定量的镧溶液（5.2.1）（定容后溶液中镧浓度应为2g/L），用水定容至刻度线，混匀，作为检验液；同法制备不加供试品的空白试验液。

8.1.2 标准曲线配制

按照表1，在一系列25 mL容量瓶中加入钙元素标准使用液（5.2.3），同时加入2.5 mL氯化镧溶液（5.2.1），使得钙标准使用液中镧的最终质量浓度为2 g/L，以1%硝酸定容至刻度线，混匀备用。

表1 钙标准使用液的配制

钙元素标准使用液（5.2.3）体积 mL	0	0.625	1.25	2.5	5	12.5
标准曲线系列溶液钙浓度 $\mu\text{g/mL}$	0	0.25	0.5	1	2	5

8.1.3 测定

按照试验要求及仪器规定，设置火焰-原子吸收分光光度计的最佳分析条件（可参考表2）³⁾，并调节仪器至最佳工作状态。使用10%的硝酸对管路进行冲洗，降低空白值以保证试验结果的准确性。

表2 火焰-原子吸收分光光度计工作条件

元素	波长（nm）	灯电流（mA）	火焰类型	乙炔（L/min）	空气（L/min）
钙	422.7	9.0	乙炔-空气	1.5	3.5

2) 注：本标准下文中所涉及的所有供试品均为1cm×1cm。

3) 实际测试时仪器的工作条件可以根据具体设备进行适当的调整。

在最佳的测定条件下，参照《中华人民共和国药典》2020版 四部通则 0406 原子吸收分光光度法检测空白检验液和检验液中钙元素的吸光度值。检验液的浓度在标准曲线的范围之外的⁴⁾，需要进行定量稀释后再进行测定，稀释后的溶液中镧浓度应为2 g/L。

8.2 方法二 电感耦合等离子体原子发射光谱法

8.2.1 检验液的制备

准确称取干燥至恒重的供试品一片（精确到0.0001g），置于消解内罐中，加入5 mL硝酸（5.1.2），盖好安全阀，安装好保护套后，将消解罐放入微波消解系统内，设置微波消解程序进行消解。供试品消解结束后，取出内罐，转移消解液至25 mL容量瓶中；用少量水多次洗涤内罐壁，并将其同时转移到容量瓶中，用水定容至刻度线，混匀，作为检验液；同法制备不加供试品的空白检验液。

8.2.2 标准曲线绘制

按照表1，在一系列25 mL容量瓶中加入钙元素标准使用液（5.2.3），以1%硝酸定容至刻度线，混匀备用。

8.2.3 测定

按照试验要求及仪器规定，设置电感耦合等离子体原子发射光谱仪（ICP-OES）的最佳分析条件（可参考表3）⁵⁾，并调节仪器至最佳工作状态。使用10%的硝酸对管路进行冲洗，降低空白值以保证试验结果的准确性。

表3 电感耦合等离子体原子发射光谱仪工作条件

波长 (nm)	功率 (kw)	等离子气流量 (L/min)	辅助气流量 (L/min)	雾化器流速 (L/min)	观测方式	读取时间 (s)	蠕动泵转速 (mL/min)
317.933	1.2	15.0	0.5	0.5	轴向	3	1.0

在最佳的测定条件下，参照《中华人民共和国药典》2020版 四部通则 0411 电感耦合等离子体原子发射光谱法检测空白检测液和检测液中钙元素的光谱强度，从标准曲线上计算出相应钙的浓度，对于钙含量超出标准曲线浓度范围的供试品，可定量稀释后测定。

8.3 钙含量计算

钙元素的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{(c_1 - c_2) \times V}{m} \times 10^{-3} \times 100 \quad (1)$$

X —— 供试品中钙含量的质量分数，以 % 表示；

c₁ —— 供试品检验液中钙元素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

c₂ —— 空白检验液中钙元素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

4) 当检验液吸光度值小于标曲最低点（0.25 μg/mL）时，建议使用方法二 电感耦合等离子体原子发射光谱法对检验液进行再次测定。

5) 实际测试时仪器的工作条件可以根据具体设备进行适当的调整。

v —— 检验液的定容体积，单位为毫升（mL）

m —— 供试品的质量，单位为毫克（mg）

计算结果保留三位有效数字。

8.4 重复性

供试品中待测定成分含量和精密度可接受范围参考 《中华人民共和国药典》 2020年版 四部通则 9101 分析方法验证指导原则。

9 试验报告

试验报告至少应包括以下内容：

- a) 供试品、试验室名称、试验日期等信息；
- b) 使用的标准；
- c) 使用的方法；
- d) 分析结果及其表示：
术前动物体重的均值、极值、标准差以及变异系数；对照品以及对应试验样品的钙含量百分比数值，统计学分析数据（均值、极值、标准差及变异系数等）⁶⁾
- e) 与基本分析步骤的差异；
- f) 测定中观察到的异常现象；
- g) 对结果可能产生影响的本标准中未作规定的各种操作。

6) 若八周取材时动物体重增长明显异常，或对照品的钙含量百分比数值<11%，则应在报告中明确标注，该只动物的对照组及样品组数据皆不计入统计分析中。

《动物源性心血管植入物抗钙化评价:大鼠皮下植入试验》

行业标准编制说明

一、工作简况

根据国家食品药品监督管理局标准管理中心 2021 年制修订行业标准的工作计划,由 SAC/TC110 全国外科植入物及矫形器械标准化技术委员会归口制定《动物源性心血管植入物抗钙化评价:大鼠皮下植入试验》行业标准。该标准由中国食品药品检定研究院负责起草。

关于《动物源性心血管植入物抗钙化评价:大鼠皮下植入试验》标准前期已做了大量筹备工作。中国食品药品检定研究院根据以往的检测及研究工作中积累的相关的经验和实验数据,牵头起草了《动物源性心血管植入物抗钙化评价:大鼠皮下植入试验》行业标准。我院十分重视该标准的起草工作。2021 年 4 月 12 日,标准制定工作组在腾讯会议网络平台召开了标准制定工作启动会,参会单位共 9 家共计 17 人。本次工作组会议牵头起草单位中国食品药品检定研究院就标准立项的前期工作做了详细汇报;就标准的制定内容进行了讨论,达成初步意见;就起草验证工作进行了安排和分工;就工作时间结点与验证工作组成员进行了确认。会后标准起草工作组根据启动会工作分工及时将样品分发到各个单位,随即展开验证工作。

二、标准编制原则和确定标准主要内容

本标准按 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》给出的规则起草,并参考了《中华人民共和国药典》2020 年版 四部通则 关于原子吸收分光光度法和电感耦合等离子体原子发射光谱法确定的相关内容和要求。

本标准建立了一种大鼠皮下植入模型,对动物源性心血管植入物进行抗钙化评价的标准方法。本标准主要包括:

1 范围

2 规范性引用文件

3 术语和定义

4 目的

5 主要试剂和仪器

6 供试品植入

7 大体观察

8 钙含量测定

9 试验报告

下面针对本标准中给出的动物源性心血管植入物抗钙化评价:大鼠皮下植入试验的原理和合理性进行说明:

(一) 试验方法原理

动物源性心血管植入物在术后发生的最大问题就是钙化,钙化会导致植入物变脆,进而导致其生理功能的衰退和丧失。然而,诱发钙化的原因是来自各个方面的,普通的体外试验很难模拟在体内发生的免疫反应等重要的可能导致钙化的因素,由此应建立动物模型来模拟动物源性心血管植入物植入人体后发生的钙化。经过长期的相关试验与工作经验的积累,认为大鼠皮下植入模型是能够满足该目的的理想模型。

对于植入物的钙化程度,可通过微波消解后利用火焰原子吸收分光光度法和电感耦合等离子体原子发射光谱法测定。

火焰原子吸收分光光度法是基于测量蒸汽中原子对特征电磁辐射的吸收强度定量分析的一种仪器分析方法,是目前测定生物瓣膜类样品中钙含量的最常用方法,上机测定钙元素时需要加入一定量的掩蔽剂;电感耦合等离子体原子发射光谱法是以等离子体为激发光源的原子发射光谱分析方法,测定钙元素时所受干扰较少,无需加入其他试剂。通过实验,在给定浓度的范围内,两种方法测定的结果准确性没有显著性的差异,因此本标准提供火焰原子吸收分光光度法和电感耦合等离子体原子发射光谱法两种方法对钙含量进行测定。

（二）试验方法合理性

本标准涵盖了大鼠皮下植入模型动物的选择、动物源性心血管植入物植入的规格要求及植入方法，提供了植入物取出后的处理以及钙含量测定的两种方法。此外，除了本标准中推荐使用的动物模型，其他动物模型如能证明产生相同的或者更好的效果也可使用。

本标准推荐了使用的钙含量测试方法，并给出了火焰-原子吸收分光光度计与电感耦合等离子体原子发射光谱仪参考工作条件，但实际操作中，因使用的仪器品牌型号等因素的差别，所以在测定前，应保证分析仪器具备较高的灵敏度，并经系统的方法学确认。

通过上述分析，本标准给出的大鼠皮下植入试验方法是合理且具有可操作性的。

三. 主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果；

在前期实验中，已进行多次动物植入试验和钙含量测定试验，并系统性地进行了试验方法学确认。首先全面考察了大鼠皮下植入模型的科学性和可行性：大鼠的品系、性别、周龄以及取材时间点进行了对比，确定了反应最明显的大鼠模型及合理的取材时间点；其次对用于钙含量测定的两种试验方法进行了多方面的方法学验证：两种方法各自的专属性，线性，方法检出限、定量限、准确度及精密度，还将两种方法进行了对比，结果表明两种方法对钙含量的测定都是符合2020版《中国药典》分析方法与验证指南要求的。

心血管植入物属于长期植入人体的第三类高风险医疗器械，产品质量直接关系到公众身体健康和生命安危。钙化损伤是影响心血管植入物使用效果的重要因素，例如生物瓣常因钙化而失效。抗钙化性能是评价产品安全有效的一个重要指标，《GB12279-2008 心血管植入物 人工心脏瓣膜》中提出了对置入心脏和循环系统替代物的抗钙化性能检测要求，但由于目前缺少相关检测方法标准，产品的抗钙化性能检验方法多种多样，各种评价方法和评价结果缺少可比性。因此制定钙化评价检测方法行业标准，对该类产品抗钙化性能进行客观、科学的评价对制造商、用户和监管部门都非常重要。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对

比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比的情况。

本标准在制定过程中未查到同类国际标准；

五、与有关的现行法令、法规和强制性国家标准、行业标准的关系。

本标准与有关的现行法令、法规和强制性国家标准、行业标准不冲突。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

有些专家提出本标准应对供试样品钙含量许可限度作出规定，由于本标准属于方法标准，主要是对动物源性心血管植入物钙含量测定方法作出规定，许可限度不属于本标准涉及的内容，可在后续的其它相关标准中作出规定。

七、行业标准作为强制性行业标准或推荐性行业标准的建议。

本标准主要建立起体内大鼠皮下植入模型—动物源性心血管植入物抗钙化评价的试验方法。

本标准属于方法标准，同时为了不限技术进步的，也可采用本标准规定方法之外的其它经过验证的方法。基于上述原因，建议把本标准作为推荐性标准。

八、贯彻行业标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容）

本标准需要宣贯，计划在标准发布后实施前安排宣贯。本标准为首次制定的推荐性标准，相关企业和检测机构需对其进行标准方法的确认，综合考虑目前标准的宣贯时间、标准使用者所需必要的相关技术及管理的准备和调整时间等因素。建议本标准自发布之日起 12 个月开始实施。

九、废止现行有关标准的建议

无

十、其他应予说明的事项

无

《动物源性心血管植入物抗钙化评价:大鼠皮下植入试验》标准起草小组

2021 年 月