



1814

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1859—2022

动物源性心血管植入物抗钙化评价 大鼠皮下植入试验

Anti-calcification evaluation of animal derived cardiovascular implants—
Test for rat subcutaneous implantation

2022-10-17 发布

2023-10-01 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 原理	2
5 主要试剂和仪器	2
5.1 试剂	2
5.2 溶液配制	2
5.3 仪器	2
6 供试品植入	2
6.1 动物选择	2
6.2 供试品	2
6.3 试验步骤	2
7 大体观察	3
8 钙含量测定	3
8.1 方法一 火焰-原子吸收分光光度法	3
8.2 方法二 电感耦合等离子体原子发射光谱法	4
8.3 钙含量计算	4
8.4 重复性	4
9 试验报告	5

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。

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/SC 2)归口。

本文件起草单位：中国食品药品检定研究院、华南理工大学、金仕生物科技(常熟)有限公司、北京佰仁医疗科技股份有限公司、四川医疗器械生物材料和制品检验中心有限公司、深圳市医疗器械检测中心。

本文件主要起草人：付海洋、付步芳、杜昶、刘静、金磊、李家林、王书晗、于秋航、王春仁、韩倩倩、王召旭。

引 言

当前抗钙化评价的动物实验方法有很多选择,本文件旨在提供一种评价动物源性心血管植入物抗钙化性能的方法,供进行抗钙化风险研究时参考。该方法属于非循环系统植入模型,具有以下特点:实验动物为幼年大鼠,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样本间的比较;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乳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。



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

本文件描述了大鼠皮下植入评价动物源性心血管植入物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的大鼠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制备

GB/T 4470 火焰发射、原子吸收和原子荧光光谱分析术语

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 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

GB/T 16886.2 医疗器械生物学评价 第2部分:动物福利要求

中华人民共和国药典 2020年版 四部

3 术语和定义

GB 12279、GB/T 16886.1、GB/T 16886.2、GB/T 4470 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1: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。

注2:本文件仅规定了经抗钙化处理的试验样品和未经抗钙化处理的对照品进行抗钙化评价的试验方法。如有需要,可再增加已上市产品作为参考对照。

3.3

供试品 sample

待测试的样品。

3.4

重复性 repeatability

重复性条件下的精密度。

4 原理

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,分析用水应符合 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),置于 200 mL 烧杯中,加入 20 mL 水,慢慢加入 50 mL 盐酸(5.1.1),转移至 1 000 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度。

5.2.3 钙标准贮备液(1 000 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,用水稀释至刻度,摇匀。

5.3 仪器

干燥箱、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 g~55 g 的 SPF 级 Wistar 雄性幼鼠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 30 cm²(单面面积)。

建议一只大鼠一侧植入供试品面积不大于 2 cm²(单面面积)。

6.3 试验步骤

称量每只动物的体重并记录。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安乐死,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，根据试验目的需要可以再增加其他时间点。

7 大体观察

小心去除移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（精确到 0.000 1 g），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，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。随后加入一定量的氯化镧溶液（5.2.2）（定容后，溶液中镧的含量应为 2 g/L），用水定容至刻度，混匀，作为检验液。同法制备不加供试品的空白检验液。

8.1.2 标准溶液配制

按照表 1，在一系列 25 mL 容量瓶中加入钙标准使用液（5.2.4），同时加入 2.5 mL 氯化镧溶液（5.2.2），使得钙标准使用液中镧的最终含量为 2 g/L，以 1% 硝酸定容至刻度，混匀备用。

表 1 钙标准使用液的配制

钙标准使用液（5.2.4）体积/mL	0	0.625	1.25	2.5	5	12.5
标准曲线系列溶液钙含量/（μg/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）²⁾，并调节仪器至最佳工作状态。使用 10% 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

在最佳的测定条件下，按照《中华人民共和国药典》（2020 版）四部 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³⁾，需要进行定量稀释后再进行测定，稀释后的溶液中镧含量应为 2 g/L。

2) 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。
3) 当检验液吸光度值小于标准曲线最低点（0.25 μg/mL）时，建议使用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。

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 0.000 1 g),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,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 标准溶液配制

按照表 1,在一系列 25 mL 容量瓶中加入钙标准使用液(5.2.4),以 1%硝酸定容至刻度,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的最佳分析条件(可参考表 3)⁴⁾,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,按照《中华人民共和国药典》(2020 版)四部 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的光谱强度,从标准曲线上计算出相应钙含量。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

钙含量按式(1)计算:

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

式中:

- X ——供试品中钙含量;
- c₁ ——供试品检验液中钙含量,单位为微克每毫升(μg/mL);
- c₂ ——空白检验液中钙含量,单位为微克每毫升(μg/mL);
- 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 3 位有效数字。

8.4 重复性

供试品中钙含量测定的重复性可接受范围应符合《中华人民共和国药典》(2020 版)四部 9101 分析方法验证指导原则中的规定。

4) 实际测试时仪器的工作条件根据具体设备进行适当的调整。

9 试验报告

试验报告至少应包括以下内容：

- a) 供试品、实验室名称、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，统计学分析数据（均值、极值、标准差及变异系数等）；若 8 周取材时动物体重增长明显异常，或对照品的钙含量 $<11\%$ ，则应在报告中明确标注，该动物的对照组及样品组数据皆不计入统计分析中；
 - 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文件中未作规定的各种操作。
-

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
动物源性心血管植入物抗钙化评价
大鼠皮下植入试验
YY/T 1859—2022

*

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

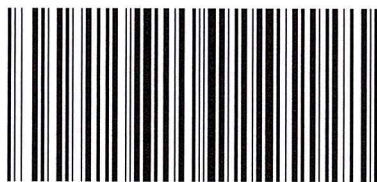
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 20 千字
2022年11月第一版 2022年11月第一次印刷

*

书号: 155066·2-36801 定价 20.00 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 1859-2022



码上扫一扫 正版服务到