

标准编制说明

一、任务来源及背景

按照国家药品监督管理局办公厅《国家药监局综合司关于印发 2020 年医疗器械行业标准制修订项目计划项目的通知》（药监综械注〔2020〕48 号）的有关规定和要求，标准计划项目《组织工程医疗产品 用以评价软骨形成的硫酸糖胺聚糖（sGAG）的定量检测》（项目编号：N2020003-T-ZJY）由全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会（SAC/TC110/SC3）归口，标准起草单位是中国食品药品检定研究院、四川大学（四川医疗器械生物材料和制品检验中心）。

二、制定标准的必要性和意义。

硫酸糖胺聚糖（sGAG）是天然软骨的细胞外基质主要成分之一，因此在评价组织工程构建物的软骨形成时 sGAG 含量是首选的检测指标。本标准选用了广泛应用于 sGAG 定量检测的 1,9 -二甲基亚甲基蓝（DMMB）染料，旨在提出一种 sGAG 定量检测方法既适用于检测关节软骨、半月板、弹性软骨等天然软骨细胞外基质中 sGAG 含量检测，又适用于组织工程软骨的细胞外基质中 sGAG 含量检测。本标准的制定是修改采用国际标准 ISO 13019:2018，有利于对组织工程构建物的软骨形成进行客观评价，从而保证我国相关产品水平与国际保持同步，有利于打破国际贸易壁垒，增强我国相关产品的技术竞争力，促进相关产业的发展。

三、主要起草验证过程

本标准草案于 2018 年开始预研，完成标准的翻译；于 2019 年在立项时完成了草案的初稿（工作组讨论稿）。于 2020 年 1 月起草小组开始进行了认真的编辑核对，完善了工作组讨论稿；2020 年 3 月 12 日，组织工程医疗器械产品分技术委员会秘书处组织起草小组通过网络视频会议形式，召开医疗器械标准草案（工作组讨论稿）研讨会。会议上起草小组对标准草案内容进行逐字逐句的研讨，根据讨论意见对草案再次进行修改完善，同时拟定了标准验证方案。2020 年 4~6 月由 2 家实验室开展了验证实验，对标准中规定的方法的可行性和可靠性进行了验证。2020 年 6 月完成了验证实验。在验证实验结果分析的基础上，进一步完善了标准草案，形成“征求意见稿”，于 2020 年 7 月 7 日发文至医疗器械标准管理中心及全体委员，向全体委员及社会广泛征求意见。

四、标准编制原则和依据

本标准的制定贯彻了国家标准 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写》的有关规定。本标准是对国际标准“ISO 13019:2018 (Tissue-engineered medical products-Bioactive ceramics –Quantification of sulfated glycosaminoglycans (sGAG) for evaluation of chondrogenesis)”的修改转化。

五、主要实验（或验证）的情况

按照标准中给出的方法，选择天然软骨和组织工程软骨，通过以下四个步骤进行定量检测：预处理、sGAG 的提取、sGAG 含量的测定以及 sGAG 含量的归一化计算。

实验组按样品分为耳软骨、肋软骨、半月板和组织工程软骨 4 组。其中，前 3 组为兔来源的天然软骨，由中国食品药品检定研究院提供；第 4 组为组织工程软骨，由四川大学（四川医疗器械生物材料和制品检验中心）提供，具体验证情况如下：

1、平行测试样品预处理方法验证：无菌环境中从 PBS 溶液中取出每个平行测试样品，先用无菌纱布吸去样品表面液体；将平行测试样品放入 2 mL EP 管中，用眼科手术剪将样品剪碎（约 1 mm）；用装有平行测试样品的 EP 管质量减去空离心管质量，计算每个平行测试样品的质量。验证结果表明样品预处理方法是可行的和可靠的。

2、从预处理的平行测试样品中提取 sGAG 方法验证：用 PBS 配制木瓜蛋白酶溶液，浓度为 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，现用现配；将恒温摇床预热至 60 $^{\circ}\text{C}$ ，备用；以平行测试样品密度为 1.0 g/mL 计算每个测试样品体积，然后在装有样品的 EP 管中加入 9 倍或 45 倍样品体积的木瓜蛋白酶溶液消化预处理的平行测试样品，于恒温摇床内 60 $^{\circ}\text{C}$ 持续消化过夜。消化结束后，将平行测试样品 5 000 g 离心 3 min，将每个样品上清液分别转移到新的离心管中。验证结果表明 sGAG 提取方法可行的和可靠的。

3、二甲基亚甲基蓝（DMMB）实验测定平行测试样品 sGAG 含量验证：首先按照标准中给出的方法，制备 DMMB 试剂，然后将 10.0 mg 6-硫酸软骨素加入 20 mL 提取液（即浓度为 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的木瓜蛋白酶溶液）中，制备 0.5 mg/mL 的 6-硫酸软骨素溶液，搅拌数分钟使其完全溶解；用提取液配制一系列浓度的 6-硫酸软骨素溶液，分别为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将 0.3 mL 的提取样品或者标准品加入 3 mL 的 DMMB 溶液中，混匀，立即用分光光度计检测 530 nm 的吸光度（比色皿法）；将 0.02 mL 的提取样品或者 6-硫酸软骨素标准品先加入 96 孔微孔板，然后用排枪每孔快速加入 0.2 mL DMMB 溶液，用酶标仪立即检测 530 nm 的吸光度（微孔板法）。

采用微孔板法对 4 组共 13 个样品进行测试，每组各取 1 个样品采用比色皿法进行检测，与微孔板法所得结果进行比较。经比对分析，微孔板法和比色皿法对于相同样品 sGAG 含量

所得结果基本一致，4 个样品两种方法检测结果相对偏差均在 10.0% 以内。验证结果表明 DMMB 实验方法（微孔板法和比色皿法）是可行的和可靠的。

4、sGAG 含量归一化计算合理性验证：首先确认平行测试样品吸光度值（OD 值）均在标准曲线范围内，然后将吸光度转换成 sGAG 浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ），然后乘以每个样品添加消化液体积和稀释倍数得到样品中 sGAG 含量（ μg ），再除以平行测试样品的湿重使其均一化为单位质量 sGAG 含量（ $\mu\text{g/mg}$ ）。

$$\text{sGAG } (\mu\text{g/mg}) = A \times B \times C / D$$

式中，

A——sGAG 浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

B——稀释倍数；

C——提取液的体积（mL）+平行样品的体积（mL）；

D——平行测试试样的湿重，mg。

依据各样品 sGAG 含量均一化结果（表 4），不同样品 sGAG 含量确有差异，中国食品药品检定研究院验证实验结果为：各组样品 sGAG 含量（ $\mu\text{g/mg}$ ）由高到低依次为：肋软骨（ 52.07 ± 7.74 ）>耳软骨（ 46.58 ± 5.01 ）>组织工程软骨（ 34.46 ± 0.48 ）>半月板（ 7.40 ± 0.39 ）。四川大学的验证结果为：肋软骨（ 48.64 ± 3.12 ）>耳软骨（ 40.51 ± 1.81 ）>组织工程软骨（ 32.10 ± 2.98 ）>半月板（ 9.76 ± 3.63 ）。验证结果表明 sGAG 含量均一化计算方法是合理的。

两家实验室的验证实验结果是基本一致的。

以上验证结果显示，标准中给出的方法是可行的和可靠的，能够用于定量检测天然软骨（软骨植入物动物实验时的实验动物再生软骨）和组织工程软骨细胞外基质中 sGAG 含量的检测。

六、重大意见分歧的处理依据和结果的说明

无。

七、采用国际标准或国外先进标准程度的说明，以及与国内外同类标准的对比情况

本标准主要是结合我国的标准管理要求对国际标准“ISO 13019:2018（Tissue-engineered medical products-Bioactive ceramics –Quantification of sulfated glycosaminoglycans (sGAG) for evaluation of chondrogenesis）”作修改采用。主要为编辑性修改，技术内容与国际标准一致。

八、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系。

本标准与有关的现行法律、法规和强制性国家标准无冲突和交叉。为组织工程软骨或软骨植入物的动物实验中再生软骨的评价提供了新的方法。

九、行业标准作为强制性行业标准或推荐性行业标准的建议

本标准为方法标准，建议作为推荐性行业标准。

十、贯彻标准的措施和建议

标准发布后 1 年内，将根据各方反馈意见择期召开标准宣贯会议。向监管部门、技术审评部门、检验机构、生产企业等使用单位发放标准宣贯资料，并解答标准中相关技术难点和疑点。建议本标准在发布之日起 12 个月实施。

十一、废止现行有关标准的建议

无。

十二、其他应予说明的事项

无。

全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会
组织工程医疗器械产品分技术委员会
二〇二〇年七月七日