

ICS 11.040.01

CCS C 30

T/CSBM

团 体 标 准

T/CSBM 0046—2024

涂层抗凝血性能体外试验方法

Testing method for anticoagulation properties of coating in vitro

2024-05-14 发布

2024-10-01 实施

中国生物材料学会 发布

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 总则	1
5 试验方法	1
6 报告	4
参考文献	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。

本文件由中国生物材料学会提出。

本文件由中国生物材料学会团体标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：江苏百赛飞生物科技有限公司、百因特表界面检验检测技术（苏州）有限公司、苏州苏大卫生与环境技术研究所有限公司、四川大学、四川医疗器械生物材料和制品检验中心有限公司、深圳市药品检验研究院（深圳市医疗器械检测中心）、山东省医疗器械和药品包装检验研究院、苏州大学、苏州工业园区生物材料表界面工程研究院。

本文件主要起草人：李丹、陈益平、王丽洁、梁洁、王云兵、袁暾、王书晗、刘成虎、方菁嶷、陈红。

引　　言

脑血管疾病是心脏血管和脑血管疾病的统称，泛指由于高血脂、动脉粥样硬化、高血压等所导致的心脏、大脑及全身组织发生的缺血性或出血性疾病。据统计，全世界每年死于心脑血管疾病的人数居各种死因首位，严重威胁着人类的健康及生命安全。随着现代医学的发展，越来越多的血液接触类医疗器械被应用于心脑血管类疾病的治疗。

器械在使用过程中往往会因为非生理性血流剪切力、低速流、流动滞止等流动因素和非自体的机械结构因素，血浆中蛋白质首先会瞬间在器械材料表面吸附形成血浆蛋白层，然后血小板会在血浆蛋白表面黏附、聚集，进而使血小板激活、凝血级联及补体激活，最终导致血栓形成。现代医学发展至今，尽管历经数十年的研究与实践，仍未能开发出一种具有持久血液相容性的材料，而材料表面引发的凝血或血栓问题一直是血液相容性问题中最普遍也是最严重的，病人在使用这些器械的过程中，绝大多数情况仍需同步辅以抗凝药物，但即便如此，仍然无法完全避免血栓在材料表面生成，且会增加出血的风险。因此，在材料/器械表面设计及构建安全和有效的抗凝血表面涂层为这一问题的解决提供了思路，能有效避免材料表面发生凝血和血栓的形成。

然而，国内带抗凝涂层医疗器械的研究和发展刚刚起步，对于抗凝涂层的功能性和安全性评价研究也十分匮乏，尚没有适用于医疗器械涂层抗凝性的体外检测标准及监管措施，企业多是采用动物实验或临床试验结果来进行评价，大大增加了企业的研发和时间成本，尤其是在原材料筛选和研发过程中，无法得到快速的响应，严重不利于创新产品的快速研发和迭代。因此，建立涂层抗凝血性能体外试验方法十分必要，有助于规范和监督医疗器械涂层市场的健康持续发展，最终推动整个医疗器械行业和人类健康产业的高品质发展。

涂层抗凝血性能体外试验方法

1 范围

本文件规定了涂层抗凝血性能体外试验的总则、试验方法和报告。

本文件适用于通过强结合力均匀固定在材料或器械表面的抗凝涂层。

本文件不适用于能从表面快速洗脱或释放的涂层。

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

YY/T 1911 医疗器械凝血试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗凝涂层 anticoagulant coating

通过一定的强结合力均匀涂覆在器械表面的具有抗凝血功能的物质。

3.2

抗凝血性能 anticoagulation properties

器械表面涂层具有阻止或抑制血栓形成的能力。

4 总则

本文件推荐了用于表征涂层抗凝血性能的体外试验方法，包括蛋白质吸附测试、血小板黏附试验、凝血时间和体外血栓测试四种方法。

5 试验方法

5.1 蛋白质吸附测试

5.1.1 概述

当血液与医疗器械接触时，器械表面会迅速的吸附上纤维蛋白原等血浆蛋白，吸附的血浆蛋白会进一步造成血小板的大量黏附，最终导致凝血的形成。因此，评估吸附在器械表面血浆蛋白的吸附情况，可作为判断涂层抗凝性能的重要指标。

5.1.2 方法一

5.1.2.1 原理

通过ELISA间接法，样品表面吸附一定量的纤维蛋白原（Fg）作为抗原，将吸附Fg的样品先与特异性的纤维蛋白原抗体结合，然后加入酶标记的二抗形成复合物，最后通过底物反应产生显色信号来检测样品上吸附的Fg的含量。

5.1.2.2 试验步骤

样品在以pH 7.4的缓冲液配置的Fg溶液中浸泡吸附1 h~4 h后, 取出样品轻轻洗去表面未牢固吸附的Fg, 置于容器中依次加入纤维蛋白原抗体和带有酶标记的二抗进行结合, 然后加入显色剂和终止液, 测试反应液在最大吸收波长下的吸光度值, 通过与无涂层的同种材料样品比较, 间接反映有无涂层样品对Fg吸附量的差异。

注：制备体积较大或较厚的涂层材料时，宜尽量减少切割面的暴露，且使Fg蛋白溶液完全覆盖试验样品。

5. 1. 3 方法二

5.1.3.1 原理

在碱性环境下，蛋白质分子中肽键与Cu²⁺络合并将Cu²⁺还原成Cu¹⁺。二喹啉甲酸（BCA）特异地与Cu¹⁺结合形成稳定的紫蓝色复合物，在562 nm处的吸光度与纤维蛋白原（Fg）浓度呈线性关系，通过建立Fg浓度—吸光度标准曲线，可计算样品表面吸附的蛋白质浓度。

5. 1. 3. 2 试验步骤

5.1.3.2.1 将 Fg 用 pH 7.4 的缓冲液配置成不同浓度的标准溶液，参照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒的要求加入配置好的 BCA 工作液，37 °C 孵育 30 min 后，立即在 562 nm 处测试吸光度值，以 Fg 浓度为横坐标，吸光度为纵坐标制作标准曲线，采用线性方程进行拟合。

5.1.3.2.2 样品在 Fg-PBS 溶液浸泡吸附 1 h~4 h 后, 取出样品轻轻洗去表面未牢固吸附的 Fg, 置于容器中加入 BCA 工作液, 37 ℃ 孵育 30 min 后, 立即读取反应液吸光度值, 带入标准曲线, 计算得到蛋白浓度。通过与无涂层的同种材料样品比较, 反映有无涂层样品对 Fg 吸附量的差异。

注1：不同材料会有不同的背景响应值，样品应进行未吸附Fg的测试获取背景数据。例如PVC、镍钛合金和Pebax等材料采用本方法时背景值较大，在选择方法时宜结合材料特性充分考虑。

注2：制备体积较大或较厚的涂层材料时，宜尽量减少切割面的暴露，且使Fg蛋白溶液完全覆盖试验样品。

5. 1. 3. 3 结果分析

按式(1)计算样品蛋白的吸附量。

式中：

θ ——蛋白质吸附量, 单位为 μg);

c_1 —样品吸附的蛋白浓度, 单位为 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

c_0 —样品背景的浓度, 单位为 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

V ——缓冲液体积，单位为ml

5.1.4 方法三

5.1.4.1 原理

通过痕量标记蛋白的示踪技术来定量分析蛋白在基材表面上的准确吸附量。通过氯化碘 (ICl) 将¹²⁵I阴离子氧化成为¹²⁵I₂单质，然后取代蛋白质酪氨酸残基苯环上羟基邻位的氢，从而将¹²⁵I标记于蛋白质。通过测量吸附在样品表面的放射量来表征蛋白的吸附量。

5.1.4.2 试验步骤

将¹²⁵I标记后的蛋白质溶液通过阴离子交换树脂柱以除去未反应的¹²⁵I离子，测定¹²⁵I标记的蛋白质溶液在280 nm处的吸光值，除以吸光系数后得到标记蛋白溶液的浓度。将标记蛋白溶液按比例与未标记蛋白溶液混合，作为¹²⁵I蛋白质吸附液。将待测样品浸入¹²⁵I蛋白质吸附液中一定时间后，润洗并晾干，使用 γ -计数器测定待测样品表面的放射量。同时测定已知蛋白质含量的¹²⁵I蛋白质吸附液的放射量，从而定量表征样品表面蛋白质的吸附量。

5.2 血小板黏附试验

5.2.1 概述

在凝血形成过程中，血小板的黏附和聚集扮演了重要的角色。黏附在器械表面的血小板活化后会释放大量促凝物质，并发生形态的变化，加速血小板的聚集和活化，从而使凝血反应急剧扩大。因此评估器械表面黏附血小板的形态和数量，可作为判断涂层抗凝性能的重要指标。

5.2.2 试验步骤

样品或对照材料与新鲜的抗凝全血或富血小板血浆 (PRP) 37 °C下接触孵育后用生理盐水轻轻洗去表面非黏附的血小板，宜采取包括但不限于以下方法对样品表面黏附的血小板进行观察和分析：

- 样品经乙醇梯度脱水、戊二醛固定、喷金后采用扫描电子显微镜 (SEM) 观察样品表面血小板的数量、分布和形态；
- 样品经固定、免疫组化染色、晾干后采用荧光显微镜观察样品表面血小板数量和分布；
- 采用细胞裂解液对样品表面黏附的血小板进行裂解，参照市售乳酸脱氢酶 (LDH) 活性浓度试剂盒的测试方法检测裂解液中 LDH 活性浓度，在样品之间间接比较血小板黏附的数量。

注1：与样品孵育后的全血或PRP也可进行血小板计数，比较样品接触前后的血小板的变化。

注2：宜使用健康成人新鲜血液进行试验，若使用其他动物血液，应验证其适宜性。

注3：宜优先采用与临床场景相似的动态条件进行试验，例如Chandler Loop系统模型。

5.3 凝血时间

5.3.1 概述

本方法适用于带肝素涂层的医疗器械。肝素通过对抗凝血酶的激活阻断凝血反应，导致凝血时间延长。因此，比较样品接触血液后凝血时间的变化，可以反映样品的抗凝效果。

5.3.2 试验步骤

按YY/T 1911方法制备血浆、兔脑磷脂和氯化钙溶液，按GB/T 16886.12的规定制备样品。试验样品和血浆直接接触，依次加入预热的兔脑磷脂和氯化钙溶液后，样品不取出，肉眼观察血浆中出现的冻状凝固物的时间（最长至5 min），用计时器以秒为单位记录。

注：也可使用凝血仪获得凝血时间测试结果。

5.4 体外血栓测试

5.4.1 概述

医疗器械和全血直接接触后会吸附或黏附各类血浆蛋白和血细胞等,激活凝血途径,最终形成血栓。评估器械和全血接触后表面血栓的形成情况,可以反映样品的抗凝效果。

5.4.2 试验步骤

样品或对照材料与新鲜的全血37 °C下接触孵育后用生理盐水轻轻涮洗,然后肉眼或显微镜观察器械表面形成的血栓情况,也可称量生成血栓的湿重或干重等指标。

注1: 宜使用健康成人新鲜血液进行试验,若使用其他动物血液,应验证其适宜性。全血可使用: 非抗凝人体全血、抗凝人体全血、抗凝人体复钙化全血等。

注2: 宜优先采用与临床场景相似的动态条件进行试验,例如Chandler Loop系统模型。孵育时长的选择根据样品临床用途和试验目的设定。

6 报告

试验报告应包括但不限于以下内容:

- a) 样品的识别;
- b) 样品制备方法;
- c) 测试方法;
- d) 测试条件;
- e) 测试结果。

参 考 文 献

- [1] GB/T 14233.2 医用输液、输血、注射器具检验方法 第2部分: 生物学试验方法
 - [2] GB/T 16886.4 医疗器械生物学评价 第4部分: 与血液相互作用试验选择
 - [3] YY/T 1631.2 输血器与血液成分相容性测定 第2部分: 血液成分损伤评定
 - [4] YY/T 1649.1 医疗器械与血小板相互作用试验 第1部分: 体外血小板计数法
 - [5] Tim L H , Bhogal P , Marcus P , et al. Hydrophilic Stent Coating Inhibits Platelet Adhesion on Stent Surfaces: Initial Results In Vitro[J]. *Cardiovascular & Interventional Radiology*, 2018:1-7. DOI:10.1007/s00270-018-2036-7.
-