

T/CSBM

团 体 标 准

T/CSBM 0051—2024

超支化聚赖氨酸接枝表面的表征

Characterization of hyperbranched polylysine-grafted surfaces

2024 - 11 - 25 发布

2025 - 04 - 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 要求 1

5 试验方法 2

附录 A（规范性） 超支化聚赖氨酸接枝表面抑菌性能试验方法 贴膜法 3

参考文献 7

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：浙江大学、浙江大学滨江研究院、浙江大学绍兴研究院、浙江大学医学院附属口腔医院、上海交通大学医学院附属第九人民医院、博慧（浙江）生物技术有限责任公司、北京莱顿生物材料有限公司、常州百康特医疗器械有限公司、江苏创英医疗器械有限公司、四川医疗器械生物材料和制品检验中心、浙江省医疗器械检验研究院。

本文件主要起草人：高长有、朱旻、董晓飞、杨国利、沈育明、胡乔巨、张亚琼、王兆龙、何晓倩、席月、史俊宇、宋海清、谢黎黎、夏宇、宋洪广、戴晓东、杨明亮、钱晓锦、尹克云、王亚宁、徐向彩。

引 言

基于当前现有的医疗器械接枝表面的产品标准和抗菌或抑菌性能的主要测试标准,本文件规定了超支化聚赖氨酸接枝表面的表征的通用要求,旨在帮助评价器械接枝表面的安全性。

本文件概述了超支化聚赖氨酸接枝表面的表征的技术要求及其对应的测试方法,包括基本材料的物理、化学特性和抑菌性能等评估,同时概述了一种医疗器械表面抑菌性能的测试方法。

本文件所涉及的聚赖氨酸均非食品添加所用。

超支化聚赖氨酸接枝表面的表征

1 范围

本文件规定了超支化聚赖氨酸接枝表面的要求和试验方法。

本文件适用于医疗器械用高分子材料基于超支化聚赖氨酸接枝钛金属表面的表征,其他基底材料的聚赖氨酸接枝表面可参考使用。

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。

ISO 19749 纳米技术.用扫描电子显微镜测量颗粒尺寸和形状分布 (Nanotechnologies—Measurements of particle size and shape distributions by scanning electron microscopy)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

超支化聚赖氨酸 hyperbranched polylysine

以赖氨酸为单体,通过缩合聚合而成的具有三维超支化结构的树枝状大分子。

3.2

接枝 grafted

以共价键形式将超支化聚赖氨酸化学键接于基底材料表面的行为。

4 要求

4.1 物理化学性能

4.1.1 鉴别

使用X射线光电子能谱(XPS)对接枝表面元素进行测试,同时满足以下要求则视为基底表面成功制备超支化聚赖氨酸接枝表面:

- a) 未接枝超支化聚赖氨酸接枝表面的试样中,所含氮元素(N)的原子含量 $\leq 3\%$;
- b) 超支化聚赖氨酸接枝表面的试样中,所含氮元素(N)的原子含量 $\geq 8\%$ 。

4.1.2 接枝表面厚度

接枝表面厚度应符合制造商的要求。

4.1.3 接枝表面形貌

适用时,接枝表面形貌应符合制造商的要求。

4.2 抑菌性能

4.2.1 通则

产品根据采购商需求，要求超支化聚赖氨酸接枝表面具有抑菌性能时适用。

4.2.2 适用菌种

抑菌性能适用菌种如下：

- a) 大肠埃希菌（ATCC 8099）；
- b) 金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）；
- c) 白色念珠菌（ATCC 10231）。

注：可根据需要使用其他菌种。使用其他菌种时，应在检测报告中注明并说明理由。

4.2.3 抑菌率

对超支化聚赖氨酸接枝表面有抑菌性能要求时，超支化聚赖氨酸接枝表面对大肠埃希菌（ATCC 8099）、金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、白色念珠菌（ATCC 10231）的抑菌率均 $\geq 50\%$ 。可根据需要使用其他菌种，使用其他菌种时，应在检测报告中注明并说明理由。

5 试验方法

5.1 物理化学性能

5.1.1 鉴别

以钛片作为试验基底，将基底制成 $10\text{ mm}\times 10\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 的薄片，按工艺将超支化聚赖氨酸接枝于基底表面后，使用X射线光电子能谱（XPS）对接枝表面元素进行定量测试。同一批次的样品随机选择3片，每片随机测试三个点位，结果均应符合4.1.1的要求。

5.1.2 接枝表面厚度

使用电动轮廓仪、椭偏仪或其他测厚仪（测厚方法）测试接枝表面厚度。

5.1.3 接枝表面形貌

按ISO 19749，使用扫描电子显微镜（SEM）、原子力显微镜（AFM）等方法观察超支化聚赖氨酸接枝表面形貌。

5.2 抑菌性能

按附录A的规定进行试验。

附录 A

(规范性)

超支化聚赖氨酸接枝表面抑菌性能试验方法 贴膜法

A.1 适用范围

A.1.1 本方法适用于具有抑制细菌或真菌作用的超支化聚赖氨酸接枝表面的抑菌效果测定。

A.1.2 本方法适用于细菌或真菌直接接触于接枝表面的类型，通过将细菌种植于样品表面，然后用塑料薄膜覆盖，使细菌与样品表面充分接触，以测定其抑菌效果。

A.1.3 本方法不适用于浸提、扩散等可溶出性抑菌接枝表面的抑菌效果测定。

A.2 材料和制样

A.2.1 试验菌株

大肠埃希菌（ATCC 8099）、金黄色葡萄球菌（ATCC6538）、白色念珠菌（ATCC10231），也可根据特定用途选用其他菌株。

A.2.2 试剂

pH为7.2~7.4的0.03 mol/L磷酸盐缓冲溶液（PBS）。

A.2.3 培养基

营养琼脂培养基、营养肉汤培养基。

A.2.4 试验器材

试验器材如下：

- a) 高压蒸汽灭菌锅：温度（ 121 ± 2 ）℃、压力（ 103 ± 5 ）kPa；
- b) pH计：精度 ± 0.2 ；
- c) 天平：感量 ± 0.01 g；
- d) 移液器：枪头应灭菌；
- e) 培养箱：控温精度 ± 1 ℃；
- f) 漩涡搅拌器；
- g) 超声波清洗器；
- h) 带螺盖试管：灭菌；
- i) 平皿：直径90 mm~100 mm，应灭菌；
- j) 加塞锥形瓶或三角瓶；
- k) 覆盖膜：选用厚度为0.05 mm~0.10 mm的聚乙烯或聚丙烯材料。

A.2.5 试验制样

A.2.5.1 试样制备3片，对照样片制备6片，对照样片与试样基底相同，但不含抑菌接枝表面。

A.2.5.2 除特别说明外，覆盖膜的尺寸为（ 40 ± 2 ）mm×（ 40 ± 2 ）mm，试样尺寸为（ 50 ± 2 ）mm×（ 50 ± 2 ）mm，对照样片尺寸与试样一致。如果试样尺寸不为（ 50 ± 2 ）mm×（ 50 ± 2 ）mm，则根据试样的大小按比例减小覆盖膜尺寸，但覆盖膜面积应不小于400 mm²，且覆盖膜边缘距试样边缘2.5 mm~5.0 mm。所使用试样和覆盖膜的实际尺寸应在试验报告中说明，对应的接种液体积应按覆盖膜面积变化的比例进

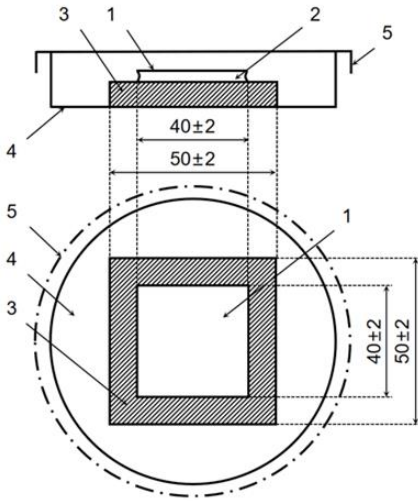
行调整并在试验报告中记录。

A.2.5.3 在制样时，注意避免试样被微生物或有机物污染。必要时，可在试验前使用 75%酒精擦洗、紫外灭菌 30 min 或其他不影响接枝表面抑菌性能的方法清洗试样。清洗方法应在试验报告中注明。

A.3 试验步骤

A.3.1.1 将试验菌株于新鲜斜面培养基培养 24 h 后的培养物用 PBS 洗下，制成菌悬液。将菌悬液用 1/500 的营养肉汤稀释为 2.5×10^5 CFU/mL ~ 1.0×10^6 CFU/mL 试验用菌悬液。

A.3.1.2 取 3 个试样，将试样有效抑菌面朝上，放于无菌平皿中，取 0.4 mL 试验用菌悬液滴于样片中央，倾斜平皿使其均匀扩散于样片表面。薄膜覆盖，小心触压薄膜，使菌液均匀散开，避免菌液溢出薄膜外。盖上平皿盖。同时取 3 个对照样片放于无菌平皿中，取 0.4 mL 试验用菌悬液滴于样片中央，倾斜平皿使其均匀扩散于样片表面。按相同方法用薄膜覆盖，盖上平皿盖，见图 A.1。



标引序号说明：

- 1——覆盖膜；
- 2——试验用菌悬液；
- 3——试样；
- 4——培养皿；
- 5——培养皿盖。

图A.1 试验用菌悬液接种示意图

A.3.1.3 试验用菌悬液不应从覆盖膜边缘溢出，可采取以下方法防止试验用菌悬液溢出：

- a) 减少菌液体积以适应试样表面，但菌液体积应不小于 0.1 mL。当菌液体积减少时，应增加接种液细菌的浓度；
- b) 如果采用 a) 方法仍发生溢出，可通过增加琼脂或其他惰性增稠剂增加菌液的粘度。

A.3.1.4 将 3 个接种试验用菌悬液的试样平皿和 3 个对照样片平皿，置于温度 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度不低于 90% 的条件下培养 (24 ± 2) h。

A.3.1.5 向平皿中加入 10 mL PBS，用移液枪充分冲洗平皿中的样片和覆盖薄膜，将细菌洗下，必要时可使用超声振荡洗脱菌液。

A.3.1.6 吸取 1 mL 洗下的菌液，宜选取 10 倍稀释和 100 倍稀释度接种，每个稀释度接种 2 个营养琼脂平皿，置于 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度不低于 90% 的条件下培养 40 h~48 h。

A.3.1.7 将另 3 个对照样片“0”时间接种菌液后，立即洗脱菌液并接种，洗脱和接种方法与试验样片相同，以试验用同批次稀释液接种营养琼脂培养基作为阴性对照，试验重复 3 次。

A.4 活菌数的计算

A.4.1 按式 (A.1) 计算活菌数。

$$N = \frac{C \times D \times V \times 100}{A} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

N ——样本上的活菌数，单位为 CFU/cm^2 ；

C ——2 个营养琼脂平皿的平均菌落数，单位为 $\text{CFU}/\text{样片}$ ；

D ——稀释倍数；

V ——洗脱用 PBS 的体积数，单位为 mL ；

A ——覆盖膜的表面积，单位为 mm^2 。

A.4.2 计算每组试样回收活菌数的几何平均数，记录活菌数时取 2 位有效数字。若某一稀释倍数的所有琼脂平板上都没有菌落，则将活菌数计作 $<V$ 。计算平均数时，若各稀释度均没有菌数，则记录为 V 。

A.5 结果的计算与判定

A.5.1 试验成立条

符合以下条件时试验成立：

- 各次试验阴性对照均无菌生长；
- 对照样片“0”时间接种后的活菌数 N 平均值不少于 $1.0 \times 10^5 \text{ CFU}/\text{cm}^2$ ；
- 覆盖了薄膜的对照样片培养 24 h 后的活菌数 N 不少于 $1.0 \times 10^4 \text{ CFU}/\text{cm}^2$ 。

A.5.2 抑菌率的计算

按式 (A.2) 计算抑菌率。

$$X = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

X ——抑菌率；

A_0 ——对照样片在接种后培养 24 h 的活菌数的平均值，单位为 CFU/cm^2 ；

A_1 ——样片在接种后培养 24 h 的活菌数的平均值，单位为 CFU/cm^2 。

A.5.3 结果判定

各次试验抑菌率均 $\geq 50\%$ ，可判定该试样具有抑菌作用；各次试验抑菌率均 $\geq 90\%$ ，可判定该试样具有较强抑菌作用。

A.6 试验报告

试验报告应包括以下信息：

- 注明采用本文件；

- b) 经抑菌处理和未经抑菌处理试样所用的基底材质、尺寸、形状和厚度；
- c) 覆盖膜的材料类型、尺寸、形状和厚度；
- d) 试验菌株，如采用其他菌种需说明原因；
- e) 接种菌液的体积；
- f) 接种菌液中的活菌数；
- g) A. 5. 2 中 A_0 和 A_1 值；
- h) 抑菌率 X ；
- i) 若采用了不同于本文件的一些操作，如试样清洗方法的变更、惰性增稠剂的使用、菌液回收方法变更及培养温度不同时，均应详细说明；
- j) 实验室的名称等识别资料及实验室负责人的姓名和签字；
- k) 试验开始日期；
- l) 试验报告日期。

参 考 文 献

- [1] GB/T 31402—2023 塑料和其他无孔材料表面抗菌活性的测定
 - [2] WS/T 650—2019 抗菌和抑菌效果评价方法
 - [3] JIS Z 2801:2010 Antibacterial products -- Test for antibacterial activity and efficacy
 - [4] 消毒技术规范（2002年版）（卫法监发【2002】282号）
 - [5] 中华人民共和国药典（2020年版）（国家药监局 国家卫生健康委 2020年第78号）
 - [6] Suzuki, S., IMAI, S., and KoURAI, H. Background and evidence leading to the establishment of the JIS standard for antimicrobial products, *Biocontrol Science*, 19(2006), pp. 135-145.
-