



中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

用于增材制造的医用甲基丙烯酸酯化明胶

Medical Gelatin Methacryloyl for Additive Manufacturing

(草案)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家药品监督管理局 发布

目 次

目 次	I
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 性能要求	2
5 试验方法	4
6 检验规则	6
7 标识、包装、运输、贮存	6
8 质量证明文件	7
附录 A	8
附录 B	11
附录 C	12
附录 D	13

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。

本标准由国家药品监督管理局提出。

本标准由医用增材制造技术医疗器械标准化技术归口单位归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

引 言

甲基丙烯酰化明胶兼具天然和合成生物材料的特征，其化学成分接近于天然细胞外基质的胶原，具有适于细胞生长和分化的结构。由于可以通过光控方式成形，有优异的增材制造性能，目前国内外相关企业及科研院所都将其作为生物墨水的关键材料，然而目前甲基丙烯酰化明胶的取代率测定、质量品控等缺乏系统及规范性定义。为了规范质量管理，保证材料质的稳定，为生物医药应用提供支撑，有必要建立用于增材制造的医用甲基丙烯酰化明胶标准。

用于增材制造的医用甲基丙烯酸酯化明胶

1 范围

本文件规定了用于增材制造的医用甲基丙烯酸酯化明胶的技术要求、试验方法、检验规则和标志、包装、运输、贮存。

本文件适用于医用甲基丙烯酸酯化明胶材料。

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 16886.1-2011 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 16886.5-2017 医疗器械生物学评价 第5部分：体外细胞毒性试验
GB/T 16886.9-2001 医疗器械生物学评价 第9部分：潜在降解产物的定性和定量框架
GB/T 16886.13-2017 医疗器械生物学评价 第13部分：聚合物医疗器械降解产物的定性与定量
GB/T 16886.18-2011 医疗器械生物学评价 第18部分：材料化学表征
GB/T 16886.19-2011 医疗器械生物学评价 第19部分：材料物理化学、形态学和表面特性表征
GB/T 35351 增材制造 术语
QB 2354-2005 药用明胶
YY/T 0771.1—2020 动物源医疗器械 第1部分：风险管理应用
YY/T 0771.2—2020 动物源医疗器械 第2部分：来源、收集与处置的控制
YY/T 1435-2016 组织工程医疗器械产品 水凝胶表征指南
YY/T 1445-2016 组织工程医疗器械产品 术语
YY/T 1562-2017 组织工程医疗器械产品生物材料支架细胞活性试验指南
YY/T 1654—2019 组织工程医疗器械产品 海藻酸钠
中华人民共和国药典2020年版四部

3 术语和定义

GB/T 35351、YY/T 1445-2016 界定的以及下列术语和定义适用于本标准。

3.1

甲基丙烯酸酯化明胶 Gelatin Methacryloyl (GelMA)

通过酰化试剂甲基丙烯酸酐对明胶分子上赖氨酸的伯胺残基进行甲基丙烯酸酯化取代制得。

3.2

取代度 Degree of Substitute

明胶分子上氨基被甲基丙烯基团取代的程度，以%表示。

3.3

相转变 Phase Transition

甲基丙烯酰化明胶水溶液在外界温度降低时发生由液态到固态的物理相变，温度升高后又发生由固态到液态的相转变，这种相变是物理可逆的。

4 性能要求

4.1 外观

应为白色海绵状或粉末状固体。

4.2 结构组成

应采用¹H-核磁共振光谱(NMR)检测，典型¹H-NMR谱显示见图1，其典型峰特征（ppm）应基本一致。

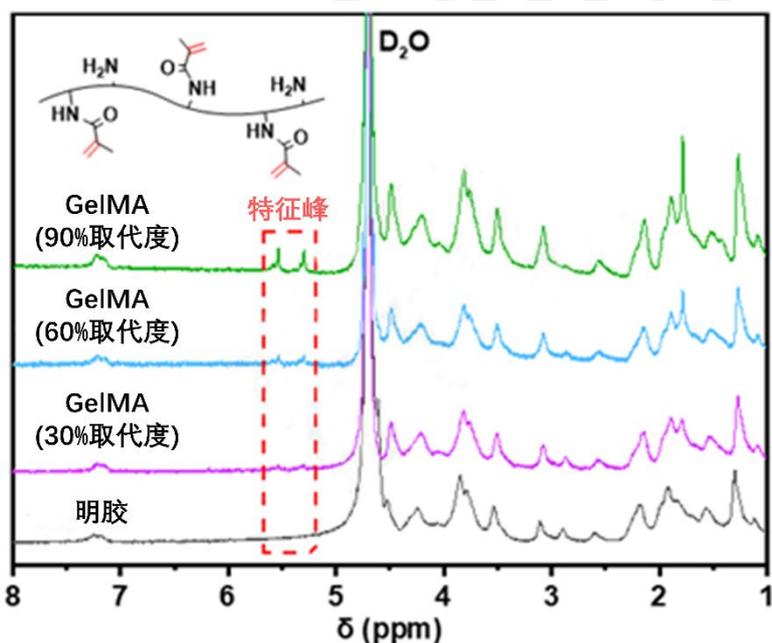


图1 典型¹H-NMR谱

4.3 取代度

应确定甲基丙烯酰化明胶的氨基取代度及其允差范围。

注：推荐取代度及允差范围：30%（±5%）；60%（±5%）；90%（±5%）。

4.4 重均分子量及其分子量分布

应确定甲基丙烯酰化明胶的重均分子量及其允差范围，以及分子量分布数值。

注：推荐重均分子量：40~230 kDa。

4.5 水分

应不大于0.1%（质量分数）。

4.6 炽灼残渣

应不大于2%（质量分数）。

4.7 透光率

波长450nm处：应不小于70 %，
波长620nm处：应不小于80 %。

4.8 酸碱度

应确定酸碱度及其允差范围。

注：取代度的不同可能导致酸碱度有所差异，推荐2%浓度溶液的pH值应为6.5~7.5。

4.9 电导率

应确定电导率及其允差范围。

注：取代度的不同可能导致电导率有所差异，推荐2%浓度溶液的电导率不大于1 mS/cm。

4.10 蛋白质含量

应为其标示值的80%~120%。

4.11 相转变温度

4.11.1 升温相转变温度

应确定升温相转变温度及其允差范围。

注：取代度和分子量分布的不同可能导致升温相转变温度有所差异，参考值：30%取代度，100~200 kDa重均分子量（28~30 ℃）；60%取代度，100~200 kDa重均分子量（27~30 ℃）；90%取代度，100~200 kDa重均分子量（26~29 ℃）。

4.11.2 降温相转变温度

应确定降温相转变温度及其允差范围。

注：取代度和重均分子量的不同可能导致降温相转变温度有所差异，参考值：30%取代度，100~200 kDa重均分子量（16~21 ℃）；60%取代度，100~200 kDa重均分子量（16~20 ℃）；90%取代度，100~200 kDa重均分子量（15~19 ℃）

4.12 光固化储能模量

应确定光固化储能模量及其允差范围。

注：取代度和重均分子量的不同可能导致光固化储能模量有所差异，参考值：30%取代度，100~200 kDa重均分子量（200~400 Pa）；60%取代度，100~200 kDa重均分子量（1000~1400 Pa）；90%取代度，100~200 kDa重均分子量（1500~3000 Pa）

4.13 生物学评价

按照GB/T 16886.1所述的基本原则进行生物安全性评价，甲基丙烯酰化明胶应不释放对人体有不良作用的物质。

4.14 降解性能

应确定降解性能。

4.15 原材料安全性

原材料明胶应符合QB 2354-2005、YY/T 0771.1—2020、YY/T 0771.2—2020 的要求。

5 试验方法

5.1 外观

目测法，在光线明亮处观察。

5.2 结构组成

溶剂为氘代水，配制浓度0.5~1%（w/v）的溶液，室温测试，按照《中华人民共和国药典》2020年版四部通 0441 则核磁共振氢谱法测定。

5.3 取代度

取代度可通过以下两种方法来确定，TNBS法以及核磁共振氢谱法。试验方法详见附录A。

5.4 重均分子量及其分子量分布

依照《中华人民共和国药典》2020版通则0514分子排阻色谱法测定。

5.5 水分

按照《中华人民共和国药典》2020年版四部通则 0832 水分测定法第二法（烘干法）进行。

5.6 炽灼残渣

取本品1.0g，依照《中华人民共和国药典》2020版通则0841测定。

5.7 透光率

取200mg GelMA，加入10 mL去离子水，于50℃加热30min至完全溶解，配制2% w/v GelMA溶液，在50℃条件下，用紫外-可见光分光光度计测定其在450nm及620nm下的透光率。

5.8 酸碱度

取200mg GelMA，加入10 mL去离子水，于50℃加热30min至完全溶解，配制2% w/v GelMA溶液。按照GB/T 9724-2007的要求检测pH值。

5.9 电导率

取200mg GelMA，加入10 mL去离子水，于50℃加热30min至完全溶解，配制2% w/v GelMA溶液，立即用电导率仪测定上述溶液的电导率。

5.10 蛋白质含量

蛋白质含量测定方法详见附录B。

5.11 相转变温度

相转变温度可通过旋转流变仪进行测定，试验方法详见附录C。

5.12 光固化储能模量

光固化储能模量可通过旋转流变仪进行测定，试验方法详见附录D。

5.13 生物学评价

按照GB/T 16886.1所述的基本原则进行生物安全性评价。

5.14 降解性能

降解和降解产物的评价试验应按下述一项或多项适用标准的要求进行：GB/T 16886.9、GB/T 16886.13。

5.15 原材料安全性

原材料明胶应符合QB 2354-2005、YY/T 0771.1—2020、YY/T 0771.2—2020 的要求进行安全性评价和质量控制。

6 检验规则

6.1 批检验

6.1.1 产品以同日投料，同一工艺生产的产品为同一批号。

6.1.2 批检验应进行5.1、5.2、5.3、5.6、5.8、5.9 的检测。

6.1 型式检验

6.2.1 型式检验为全性能检验。

6.2.2 型式检验时，若所有检验项目全部合格，则判定为合格，否则判定为不合格。

6.3 抽样检验

抽样方案按照GB/T 2828.1 进行。

7 标识、包装、运输、贮存

7.1 标识

产品的外包装标识上应至少包含以下内容：

- a) 供方名称；
- b) 产品名称；
- c) 牌号；
- d) 批号；
- e) 规格；
- f) 净重；
- g) 生产日期；
- h) 包装日期；
- i) 本文件编号；

j) 必要的危险化学品识别信息。

7.2 包装

产品包装需密封避光，产品瓶选用黄色避光塑料或棕色避光玻璃瓶，应保证瓶口的密封。

7.3 运输

产品运输过程中应使用遮光顶盖运输工具，可室温运输，避免阳光直射、避免雨淋受潮，严禁接近火种及火源，不应与有毒物品混装混运。

7.4 贮存

产品应贮存在干燥避光环境，室温放置有效期为 6 个月，2~8℃放置有效期为 18 个月。

8 质量证明文件

质量证明文件应至少包含以下内容：

- a) 供方名称；
- b) 产品名称；
- c) 牌号；
- d) 批号；
- e) 净重和数量；
- f) 各项分析检验结果；
- g) 质量检验部门印记；
- h) 本文件编号；
- i) 生产日期。

附录 A

(规范性)

甲基丙烯酰化明胶的取代度测试方法

A.1 概述

甲基丙烯酰化明胶的取代度决定着它的许多特性,如力学强度、相转变温度等。由于上述原因以及这些特性的不同对最终用途的影响,采用直接或间接的方法测定甲基丙烯酰化明胶的取代度是十分必要的。可以通过下述方式来测定。

A.2 TNBS 法测定甲基丙烯酰化明胶的取代度

A.2.1 原理

利用三硝基苯磺酸(TNBS)与明胶及GelMA分子上残存的自由氨基(-NH₂)在碱性条件下不可逆反应后生成具有特定光谱吸收结构(图1),中间络合物在 355 nm 和 420 nm 附近有最大吸收值,以不同浓度明胶作为参照,通过半定量的方式确定氨基取代度。

A.2.2 试验方法

1) 10 g/L 明胶溶液的配制

称取0.1 g明胶(该明胶必须为待测批次GelMA的生产原料),移入15 mL离心管中,根据实际称量读数计算并加入去离子水,使明胶浓度为10 g/L,50℃水浴溶解30 min,期间振荡2~3次。

2) 1 g/L 明胶溶液的配制

用移液枪取1 mL(步骤1)配制的10 g/L明胶溶液,加入15 mL离心管中,再加入9 mL去离子水,混匀,待用。

3) 0 g/L、0.2 g/L、0.4 g/L、0.6 g/L、0.8 g/L、1 g/L 明胶溶液的配制

取6只5 mL离心管,依次加入0 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1 mL步骤2)配制的1 g/L明胶溶液,然后依次向其中再加入1 mL、0.8 mL、0.6 mL、0.4 mL、0.2 mL、0 mL去离子水,混匀,标记明胶0 g/L、0.2 g/L、0.4 g/L、0.6 g/L、0.8 g/L、1 g/L。

4) 10 g/L GelMA 溶液的配制

称取0.1g GelMA,移入15 mL离心管中,根据实际称量读数计算并加入去离子水,使GelMA浓度为10 g/L,40℃水浴溶解15 min,期间振荡2~3次。

5) 1 g/L GelMA 溶液的配制

取1mL（步骤4）配制的10 g/L的GelMA溶液，加入到15 mL离心管中，再加入9 mL去离子水，混匀，标记GelMA 1 g/L；取1只5 mL离心管，加入1 mL刚配好的1 g/L GelMA溶液，标记GelMA 1 g/L。

6) 4 % (w/v) 碳酸氢钠溶液的配制

称取1.6 g碳酸氢钠，移入到50 mL离心管中，计算并加入适量去离子水使碳酸氢钠浓度为4 % w/v，混匀，标记4 % NaHCO₃。

7) 1 g/L TNBS 溶液的配制（从本步骤开始在暗光下操作）

用移液枪取1 mL 5 % TNBS溶液，加入到15 mL棕色离心管中，再加入49 mL去离子水，混匀，标记TNBS 1 g/L。

8) 显色反应

向含有1 mL的0 g/L、0.2 g/L、0.4 g/L、0.6 g/L、0.8 g/L、1 g/L明胶溶液（步骤3配制）和1 g/L GelMA溶液（步骤5配制）的离心管中分别依次加入1 mL 4 %的碳酸氢钠溶液、1 mL 1 g/L的TNBS溶液。40℃水浴反应2 h。

9) 吸光度测定

将上述制备的溶液加入96孔板中，每孔100 μL，每组6个平行样。用酶标仪，在420 nm波长下测吸光度。

A.2.3 数据处理

- 1) 将6组平行样中最高和最低吸光度值剔除后取剩余4组数据的平均值为此次试样吸光度值。
- 2) 对明胶数据整理作取代度-吸光度散点图，然后线性拟合得到标准曲线。明胶浓度及取代度关系如下表：

明胶浓度 (g/L)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
对应取代度 (%)	100	80	60	40	20	0

- 3) 将 GelMA 样品吸光度带入步骤 2 所得标准曲线计算出取代度。

A.3 核磁共振氢谱法测定甲基丙烯酰化明胶的取代度

A.3.1 原理

化学位移5.2~5.7 ppm出现的两个峰对应GelMA分子烯烃上两个质子，化学位移~2.8 ppm处的峰对应为赖氨酸与氨基相邻亚甲基上两个质子。对相应质子峰进行面积积分后可用以下公式计算：

$$DS = \frac{S_{5.2-5.7}}{S_{5.2-5.7} + S_{2.8}} \times 100\%$$

A.3.2 试验方法

溶剂为氘代水，配制浓度0.5~1% (w/v)，室温测试，按照《中华人民共和国药典》2020年版四部通 0441 则核磁共振氢谱法测定。

附录 B

(规范性)

甲基丙烯酰化明胶蛋白质含量测试方法

B.1 原理

通过测定样品的总氮含量，计算GelMA中蛋白质含量。

B.2 样品中总氮含量的测定

取约10mg GelMA，按照2020年版《中华人民共和国药典》四部通则0704 氮测定法第二法进行测定。

B.3 结果计算

按照以下公式计算样品中蛋白质含量：

$$C = \frac{A \times F}{\left(1 - \frac{m}{100}\right)}$$

式中：

C-样品中蛋白质含量（质量分数），%；

A-样品中总氮含量（质量分数），%；

m-样品的干燥失重，%；

F-换算系数，其根据生产甲基丙烯酰化明胶的明胶原料来源，碱法明胶其F=5.51，酸法明胶其F=5.46。若采用其他制备工艺，如酸碱混合或酶法，应按照制造商规定的换算系数计算。

附录 C

(规范性)

甲基丙烯酰化明胶相转变温度的测试方法

C.1 概述

甲基丙烯酰化明胶的相转变温度对增材制造中的挤出式3D打印工艺调控非常重要,采用直接或间接的方法测定甲基丙烯酰化明胶的相转变温度是十分必要的。可以通过以下方法来测定。

C.2 设备与耗材

旋转流变仪、电子天平、去离子水

C.3 溶液制备

称取0.1 g甲基丙烯酰化明胶移入5 mL棕色离心管中,加入2 mL 去离子水室温条件下振荡以充分浸润,随后于50 °C、避光条件下加热15 min,期间振荡2~3次。上样测试前GelMA溶液始终于50 °C避光保温。

C.4 测定步骤

1) 流变仪开机并安装 40 mm 夹具

2) 流变仪参数设置

夹具: 直径40 mm铝制平行板。

测试程序: 轴向力控制为0 N。

振荡-快速模式: 应变1%, 角频率2 rad/s。温度扫描范围40至5 °C, 变温速率为5 °C/min。

振荡-快速模式: 应变1%, 角频率2 rad/s。温度扫描范围5至40 °C, 变温速率为5 °C/min。

3) 上样操作

用移液枪取约300 μ L GelMA溶液滴于流变仪样品台中心位置,保证无气泡。使用流变仪软件精确控制夹具下降至高度为150 μ m。用手轻旋夹具,使样品充满夹具与底板间缝隙,并将多余样品用纸吸走。在夹具周围一圈滴加2~3滴液体石蜡,进行封边锁定夹具转轴。启动流变仪测试程序。

4) 数据读取

直接在流变仪软件中利用分析工具得出储能模量 G' 与损耗模量 G'' 交点处温度,读数精确到小数点后1位。

附录 D

(规范性)

甲基丙烯酸酯化明胶光固化储能模量的测试方法

D.1 概述

甲基丙烯酸酯化明胶的光固化储能模量对增材制造中的投影式 3D 打印工艺调控非常重要,采用直接或间接的方法测定甲基丙烯酸酯化明胶的光固化储能模量是十分必要的。可以通过以下方法来测定。

D.2 设备与耗材

旋转流变仪、电子天平、去离子水、光引发剂:苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP),DAS:85073-19-4,该光引发剂具有良好的水溶性和生物相容性,可被365~405nm波段光源激发。

D.3 溶液制备

称取0.1 g甲基丙烯酸酯化明胶移入5 mL棕色离心管中,加入 0.0125 g LAP,室温条件下振荡以充分浸润,随后于50 °C、避光条件下加热15 min,期间振荡2~3次。上样测试前GelMA溶液始终于50 °C避光保温。

D.4 测定步骤

- 1) 流变仪开机并安装 40 mm 夹具
- 2) 将光固化底座固定到流变仪底座上。
- 3) 调整光源光照时间为 30 s,光强为 30 mW/cm²。
- 4) 以光固化底座为基准对流变仪进行夹具高度校零。
- 5) 流变仪参数设置:

夹具:直径40 mm铝制平行板。

测试程序:轴向力控制为0 N。

振荡-快速模式:温度25 °C,应变1%,角频率5 rad/s,持续时间120 s。

6) 上样操作

用移液枪趁热吸取300 μL Ge1MA溶液滴于光固化底座样品台中心位置，保证无气泡；使用流变仪软件精确控制夹具下降至高度为150 μm ；用手轻旋夹具，使样品充满夹具与底板间缝隙，并将多余样品用纸吸走；锁定夹具转轴，开启光源完成固化；启动流变仪振荡测试程序；测量凝胶的储能模量 G' 。

7) 数据读取

直接在流变仪软件中利用分析工具得出储能模量 G' ，读数精确到小数点后1位。

