ICS 11.040.40
C 45

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1574—2017

组织工程医疗器械产品 海藻酸盐凝胶固定或微囊化指南

**Tissue engineering medical device products—
Standard guide for immobilization or encapsulation in alginate gels**

2017-08-18 发布　　2018-09-01 实施

国家食品药品监督管理总局　发布

目　　次

前言 …… Ⅰ
1　范围 …… 1
2　规范性引用文件 …… 1
3　术语和定义 …… 1
4　意义和用途 …… 2
5　海藻酸盐凝胶固定或微囊化 …… 2
6　微胶囊或微胶珠的性能 …… 5
7　海藻酸盐凝胶的生物相容性 …… 7
附录 A(规范性附录)　用于活体细胞或组织固定化或微囊化的海藻酸盐微胶珠的制备 …… 8
附录 B(规范性附录)　微胶囊形态、粒径大小及分布的测定 …… 9
附录 C(规范性附录)　微胶囊孔隙率的测定 …… 10
附录 D(规范性附录)　微胶囊的扩散性测定 …… 11
附录 E(规范性附录)　微胶囊的干燥测定 …… 12
附录 F(规范性附录)　微胶囊的机械强度测定 …… 13
参考文献 …… 14

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由国家食品药品监督管理总局提出。

本标准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/TC 110/SC 3)归口。

本标准起草单位:华侨大学、中国食品药品检定研究院。

本标准主要起草人:王士斌、冯晓明、奚廷斐、章娜、刘源岗、陈爱政、叶莉、童粤生。

组织工程医疗器械产品
海藻酸盐凝胶固定或微囊化指南

1 范围

本标准规定了海藻酸盐凝胶固定或微囊化评价的要求，包括海藻酸盐凝胶固定或微囊化、微胶囊或微胶珠的性能及其考察、海藻酸盐凝胶的生物相容性的考察。

本标准适用于海藻酸盐凝胶固定或微囊化的评价。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 16352 一次性医疗用品γ射线辐射灭菌标准

GB 18278.1 医疗保健产品灭菌湿热 第1部分：医疗器械灭菌过程的开发、确认和常规控制要求

GB 18281(所有部分) 医疗保健产品灭菌 生物指示物[ISO 11138(所有部分)]

GB/T 16886.4—2003 医疗器械生物学评价 第4部分：与血液相互作用试验选择(ISO 10993-4：2002，IDT)

GB/T 16886.5—2003 医疗器械生物学评价 第5部分：体外细胞毒性试验(ISO 10993.5：1999，IDT)

GB/T 16886.11—2011 医疗器械生物学评价 第11部分：全身毒性试验(ISO 10993.11—2006，IDT)

GB/T 16886.12—2005 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照样品(ISO 10993.12：2002，IDT)

YY/T 0606.8 组织工程医疗产品 第8部分：海藻酸钠

中华人民共和国药典(2015年版)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

海藻酸盐 alginate

一种从很普通的海藻中提取的多聚糖，可与钙、镁、钠或钾盐等形成不溶性混合物。海藻酸盐来自于褐藻，是褐藻中含量最多的多糖，它主要存在于海藻和海草的细胞壁和细胞间隙中，其主要功能在于维持海草的强度和韧性。海藻酸盐可归类为水胶体。使用最多的海藻酸盐是海藻酸钠。

3.2

APA微胶囊 APA bead

海藻酸盐-聚-*L*-赖氨酸-海藻酸盐微胶珠。

3.3

包封　encapsulation

一种将生物物质如细胞、组织或蛋白质包封在显微镜下或肉眼可视的半透性包覆体中的工艺。

3.4

内毒素　endotoxin

能引起热原反应的脂多糖，来自于细菌细胞壁，若不纯化通常会与膜蛋白结合。内毒素是热原，但并非所有热原都是内毒素。

3.5

凝胶　gel

聚合物分子链相互作用形成的三维网状结构。这些链反应可以是共价的、离子的、氢键的或是疏水的。

3.6

固定化　immobilization

将细胞、组织或蛋白质等物质包覆在基质内或束缚于基质上。

3.7

热原　pyrogen

引起发热的任何物质。

4　意义和用途

本标准的目的是提供用海藻酸盐凝胶进行细胞和组织固定化或包封的相关信息。本标准所包括的海藻酸盐凝胶技术可用于包覆细胞或组织形成生物医疗器械，作为组织工程医疗产品或用于药物投递体系。有生物相容性和物理检测数据的支持，该产品可适合于植入。

将生物物质固定在海藻酸盐凝胶中，需要控制许多参数条件。本标准包括这些参数以及表征和评价的相关实验类型，以确保海藻酸盐凝胶包封体系的性能。本标准的推荐不能理解为保证任何组织工程医疗产品或药物投递体系在临床中取得成功。

5　海藻酸盐凝胶固定或微囊化

5.1　概述

大多数海藻酸盐凝胶化包封细胞或组织的方法都主要包括两个步骤。第一步是内相的形成，即将含有生物物质的海藻酸盐溶液分散成小液滴。在第二步里，通过凝胶作用或在液滴表面成膜使液滴固定化。

制备小微胶珠或微胶囊最简单常用的方法是先将含有目标生物物质（细胞、组织或其他大分子）的海藻酸钠溶液形成小液滴，然后将其置于凝胶浴中。凝胶浴可以是含有可以交联的二价阳离子如 Ca^{2+}，Sr^{2+} 或 Ba^{2+} 的溶液。单价阳离子和 Mg^{2+} 不能形成凝胶。微胶珠的大小主要通过调节液滴的形成来控制。制备方法见附录 A。

5.2　海藻酸盐性质

当采用海藻酸盐凝胶包埋生物活性物质时，需要考虑以下有关海藻酸盐的参数。

5.2.1　海藻酸盐浓度

海藻酸盐的浓度对于凝胶化作用影响显著，必须根据海藻酸盐的性质（分子量、单体组成、嵌段结

构)和所需最终产品的性能予以确定。通常海藻酸盐的有效质量浓度范围为0.5%～4.0%(通过海藻酸盐的干物质含量校正)。

5.2.2 海藻酸盐的平均分子量和分子量分布

按照GB/T 16886.12—2005规定方法制备实验样品(用于生物学试验的试验材料或浸提液),然后测定海藻酸盐的平均分子量和分子量分布,测试方法见附录B。

为了保证所有的海藻酸盐分子参与凝胶网络构筑,同时避免低分子量的海藻酸盐从微胶珠中溢出,选择使用分子量分布窄的材料非常重要。

5.2.3 海藻酸盐的组成和M/G段的序列分布

按照GB/T 16886.12—2005规定方法制备实验样品,然后按照YY/T 0606.8规定的方法测定海藻酸盐的组成和M/G段(M段:β-D甘露糖酸,G段:α-L古罗糖酸)的序列分布。

海藻酸盐的凝胶性能主要取决于单体的组成以及聚合物的序列结构。凝胶强度与古洛糖醛酸含量(F_G)以及G段结构中连续古洛糖醛酸单元的平均数相关($N_G>1$)。海藻酸盐凝胶珠的机械强度与膨胀率主要取决于海藻酸盐单体组成、嵌段结构、分子的大小及其分布。

5.2.4 灭菌方法

一般灭菌方法、测试和质量保证应按下述一项或多项适用标准的要求进行:GB 16352、GB 18278.1、GB 18281.1、GB 18281.2、GB 18281.3。

海藻酸盐粉末可通过伽马射线辐射灭菌(海藻酸盐分子链持续降解从而导致其分子量降低)或采用环氧乙烷灭菌。海藻酸盐溶液可通过以下3种方式灭菌:

1) 若海藻酸盐粘度适宜可采用过滤除菌;
2) 伽马射线辐射灭菌,导致粘度减小(分子量减小);
3) 高压蒸汽灭菌也会导致粘度降低(分子量减小)。

根据最终应用所需的粘度和分子量选取灭菌方法。使用环氧乙烷灭菌时需要测定其残余量。无菌溶液或灭菌冷冻干燥后的海藻酸盐产品均已商品化。

5.3 海藻酸盐微胶珠的制备

目前,基于海藻酸盐的微胶囊制备工艺主要有乳化技术和液滴生成技术。前者生产规模易于扩大,但制备的微胶囊粒径分布较宽,机械搅拌产生的高剪切力容易破坏生物物质的活性。而后者制备条件温和,能很好地保持细胞或蛋白质的生物活性。

液滴生成技术是通过海藻酸盐液滴进入凝胶浴中固化形成微胶囊的方法。液滴大小直接决定了微胶囊的粒径大小,其主要由以下几个因素决定:被固定化或包封的材料尺寸(单细胞或细胞团如胰岛)、液滴形成方法和海藻酸盐溶液浓度、粘度。在生物医学应用方面通常要调节液滴大小使得到的微胶珠粒径范围介于100 μm～1 000 μm。单位体积内,微胶珠越小其表面积越大,传质越好,营养物和氧供给越好,从而提高了组织和细胞的存活率。根据动力源不同,液滴生成技术可分为针头挤出法、同轴气流法、静电液滴法、振荡喷嘴法、旋转剪切法等。

5.3.1 针头挤出法

针头挤出法是利用重力作用将海藻酸盐溶液通过合适内径的针头或吸管直接滴入氯化钙凝胶浴中形成凝胶珠,该方法不需要特殊装置,所制备的微胶珠粒径较大,粒径分布较难控制,产率较低。

5.3.2 同轴气流法

同轴气流法是在与针头同轴方向引入气流,克服针孔内壁的黏滞阻力和界面张力的作用,将液滴从

针尖推入凝胶浴中。通过对气流流速的控制来调节液滴的大小。同轴喷气装置[图 1 b)]是一种制备小微胶珠(400 μm 左右)的简单方法,但微胶珠粒径分布通常要比静电法的要宽。

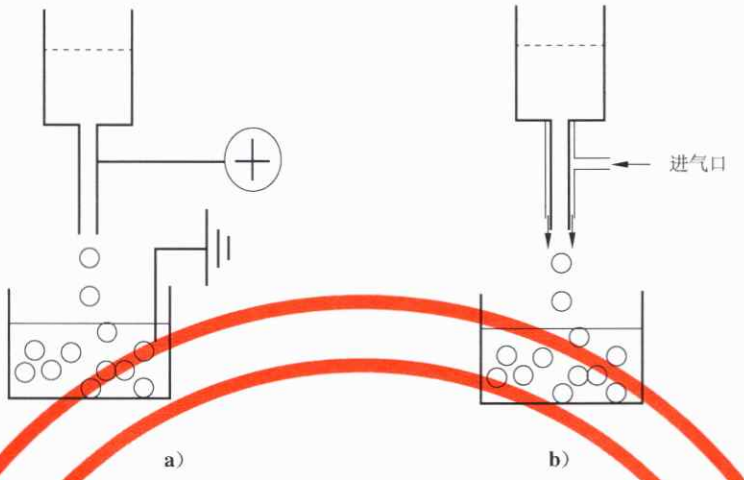

图 1 静电液滴同轴气流微胶珠发生器原理

5.3.3 静电液滴法

静电液滴法的过程实质是带电液滴在电场中受到电场力、重力等共同作用产生静电雾化的现象。静电电势的最主要作用是使液滴表面分子带电从而削弱其表面张力。静电液滴法制备海藻酸盐微胶珠具有生物物质活性损失少、包封率高、操作简单等优点而被普遍采用。这类装置[图 1 a)]可制备出粒径小于 200 μm、且粒径分布窄的微胶珠,通过调节电压可以得到所需大小的微胶珠。

静电液滴法制备海藻酸盐微胶珠有单通道静电液滴法和多通道静电液滴法。相比较,多通道静电液滴法微胶珠产量更大,各通道带电液滴受均匀电场力作用,更易形成粒径均一的微胶珠。以纯净的压缩空气为物料推进动力,使特定浓度的海藻酸盐通过高压强制电场发生器的多通道锐孔,形成射流滴入凝胶浴中固化形成海藻酸钙微胶珠。

5.3.4 振荡喷嘴法

采用振荡喷嘴法制备海藻酸盐微胶囊,在喷嘴上连接一个振荡器,当流体从加压容器经过振荡喷嘴时施加扰动,进而形成液滴并喷出,制备的海藻酸盐微胶珠粒径范围为 100 μm～1 000 μm,最大产率可达 5 000 mL/h,但该装置不适于高粘度(大于 200 MPa·s)溶液。

5.3.5 旋转剪切法

利用旋转剪切装置将从针头喷出的连续液柱剪切形成圆柱形片断,由于表面张力的作用,液滴滴入凝胶浴中固化形成微胶珠。

5.4 凝胶化工艺

5.4.1 离子浓度

凝胶化离子的浓度取决于所需凝胶的强度、所用海藻酸盐的类型(G 段富集型或 M 段富集型)和凝胶溶液的等渗性。凝胶化离子的浓度一般使用 50 mol/L～150 mol/L。

5.4.2 离子类型

常用的凝胶化离子除 Ca^{2+} 外,还可使用其他的凝胶离子如 Sr^{2+} 或 Ba^{2+},Ba^{2+} 能引发细胞毒性,因

此，要根据最终凝胶所需的特性、相关规定和毒性来考虑使用 Ba^{2+} 的浓度。

5.4.3 非凝胶化离子浓度

非凝胶离子是指凝胶溶液中不能参与交联反应的各种添加离子。这些离子包括可以用于形成均相凝胶的 Na^+、细胞培养基中的离子(若存在于凝胶浴中)和其他离子。

5.4.4 溶剂类型

常用的溶剂有细胞生长培养液或水。海藻酸盐分子的构象随着溶质离子强度的改变而改变，因此，海藻酸盐溶液的表观粘度会随着溶剂(水或含盐的媒介)的不同而不同。当使用液滴发生器时，所形成的微胶珠的粒径和球形度将取决于海藻酸盐溶液的浓度和液滴到液面的距离。此外，微胶珠最终的粒径大小还取决于凝胶化过程的条件。

5.4.5 生物物质(细胞或其他物质)的浓度

在固定化细胞的应用中，微胶珠内不同分子的扩散性能取决于细胞的负载量。由于受扩散的限制，微胶珠网络内的细胞很大程度上受到周围细胞新陈代谢的影响。因此，被包围的细胞会陷于缺少必需营养物质如氧气的微环境中，这将导致微胶珠中心细胞死亡而外围细胞却存活。

5.4.6 杂质的影响

研究表明，使用高纯度的海藻酸盐能制备出球形度和表面光滑度较好的微胶珠。

6 微胶囊或微胶珠的性能

6.1 微胶珠的均一性

通过比较分析微胶囊或微胶珠的形态、粒径大小及分布，可知海藻酸盐凝胶的性能受制备方法的影响很大。静电液滴法在固定或微囊化活细胞或组织时较为常用，电场的分布、电压、频率及液体流量、推进速度、针头内径、液面距是影响微胶珠表面光滑度、粒径、均一性的重要因素。

当微胶珠是由钙离子向海藻酸盐液滴内扩散而形成时，其内部聚合物的分布是不均匀的。这是由于凝胶化离子进入微胶珠的扩散速度和海藻酸盐分子向凝胶区域扩散速度不同而造成的。非凝胶离子如 Na^+ 或 Mg^{2+} 的存在也是影响微胶珠均一性的另一因素。在凝胶化过程中，这些离子会和凝胶离子互相竞争，从而使微胶珠的均一性提高。微胶珠的均一性越好，其机械强度和孔隙率也越高。例如：加入 NaCl 和 $CaCl_2$ 可以制备出更加均一的微胶珠。使用高分子量的海藻酸盐与高浓度的凝胶和非凝胶离子进行凝胶化可得到均一性最高的微胶珠。

6.2 微胶珠的多孔性和扩散性

在很多应用中，尤其是包封某些特殊溶质，如免疫性抗体时，了解扩散性能、孔径大小以及孔径大小分布是很重要的。可使用各种电子显微镜和反向体积排阻色谱法来研究藻酸盐凝胶的多孔性，测试方法见附录 C。也可用 X 射线光电子能谱(XPS)表面表征技术研究微胶囊膜表面化学组成。研究表明，孔径的大小范围为 5 nm～200 nm。当凝胶由富含 G 段的海藻酸盐制备时，孔隙结构更为开放，蛋白分子的扩散速率最大，扩散系数随海藻酸盐浓度的降低而增大，与表面富集海藻酸盐的非均质微胶珠相比，均质微胶珠的蛋白质扩散速度更快，凝胶网络对小分子的扩散影响较小，测试方法见附录 D。

不完全干燥可导致海藻酸盐微胶珠的孔隙率降低，测试方法见附录 E。将富含 G 段海藻酸盐制得的微胶珠干燥后重置水中，会发生轻微溶胀，由此导致海藻酸盐浓度增大从而减小了平均孔径。凝胶网络对小分子的扩散影响较小。葡萄糖和乙醇在凝胶中的扩散系数达到它们在水中扩散系数的 90%。

研究发现，分子量低于 2×10^4 的溶质在海藻酸钙凝胶珠中的扩散系数与在水中的扩散系数相当。

凝胶网络中的扩散不仅取决于孔隙率，由于凝胶基质带负电荷，凝胶网络与离子型基质间的静电作用也需予以考虑。例如，随 pH 的增加，海藻酸盐微胶珠中牛血清白蛋白向外的扩散速率增大。海藻酸盐基质中负电荷的存在也会对分子的流入和流出造成影响。pH 为 7.0 时，大多数蛋白质带负电荷，难以向基质内扩散。当这些蛋白包埋于凝胶内时，相互间的静电排斥会导致蛋白质外流，该外流速率大于其自由分子的扩散速率。

其他因素也会影响分子在微胶珠内外的扩散。药物或其他分子的扩散性能，以及凝胶网络自身的临界分子量都需要通过实验测定，它们对组织工程医疗产品的功能研究具有重要意义。

6.3 微胶珠的强度和稳定性

微胶珠的机械强度主要受其粒径和膜强度的影响，测试方法见附录 F。减小微胶珠粒径可降低微胶珠破碎率，提高机械强度。膜强度的影响因素主要包括：海藻酸盐与交联剂的种类和浓度，包覆材料如聚赖氨酸、壳聚糖等的分子量、浓度、成膜时间及核心液化时间等。研究表明，由于海藻酸盐组成不同，凝胶珠的机械性能差别很大。当海藻酸盐 G 段含量超过 70%且 G 段的平均序列长度为 15 时，微胶珠机械强度最高。当分子量高于某一特定值，微胶珠机械强度主要取决于其化学组成和嵌段结构，而不受分子量的影响。然而，生物医学应用中经常采用的是低分子量的海藻酸盐，因为它们容易通过膜过滤的方式除菌。当分子量低于某一临界值时，海藻酸盐的凝胶能力也随之降低，同时由于聚合物分子的缠绕折叠作用，凝胶能力也受到海藻酸盐浓度的影响。

海藻酸盐凝胶作为固定化基质，对一些螯合剂（例如磷酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐）以及一些抗凝胶化的阳离子（如 Na^+、Mg^{2+}）具有敏感性。为了避免这些物质的作用，凝胶珠可以保存于几毫摩尔含量的 Ca^{2+} 溶液中，其中对于富含 G 段的海藻酸盐微胶珠，Na^+ ：Ca^{2+} 的摩尔比应低于 25：1，对于 G 段含量少的海藻酸盐微胶珠，Na^+ ：Ca^{2+} 的摩尔比应低于 3：1。此外，也可采用与海藻酸盐亲和性更高的二价阳离子替代 Ca^{2+}。研究发现，凝胶珠的强度与二价离子的关系伴随如下规律：$Pb^{2+}>Cu^{2+}=Ba^{2+}>Sr^{2+}>Cd^{2+}>Ca^{2+}>Zn^{2+}>Co^{2+}>Ni^{2+}$。

6.4 海藻酸盐凝胶珠的包覆

海藻酸盐可与阳离子型聚合物如聚氨基酸、壳聚糖、多肽等形成稳定的复合物，因此可利用这些物质来稳定凝胶。海藻酸盐凝胶珠经过这些化合物包覆以后，孔隙率会降低。该凝胶系统在大多数有机溶剂中稳定存在，因此，相比其他水凝胶，海藻酸盐凝胶在非水相体系的酶的包埋上具有潜在优势。

海藻酸盐凝胶网络中高的孔隙率促进了包覆技术的发展。在一些体内的应用中，未包覆的微胶珠相对包覆微胶珠而言较为脆弱。目前广泛使用的包覆材料主要是一些多肽材料，如各种聚氨基酸，也可使用其他一些阳离子型聚合物如壳聚糖等。

制备海藻酸盐凝胶层/聚阳离子膜和固化凝胶核心微囊时，工艺流程多种多样，适用材料也较广泛，主要分为两类方法：一种叫做一步法，即将海藻酸盐溶液直接滴入阳离子型聚合物溶液中，在两种溶液的界面形成一层复合的凝聚膜，从而产生海藻酸盐/聚阳离子复合膜所包裹的内部为液态核心的微胶囊结构。通过在阳离子型聚合物溶液中加入 $CaCl_2$ 或者在形成膜以后将微胶囊用含 $CaCl_2$ 的溶液处理，可以将液态核心逐步固化。另一种更常用的方法叫两步法，首先是将海藻酸盐溶液滴入 $CaCl_2$ 溶液中制备出海藻酸盐凝胶珠，然后将微胶珠移入含阳离子型聚合物的溶液中，最终在微胶珠表面形成一层厚度约 10 μm～30 μm 的聚阳离子膜。如果用于植入，微胶囊表面必须再包一层海藻酸盐以覆盖阳离子型聚合物，防止它们（如聚赖氨酸）自身所具有的细胞毒性和免疫原性诱导宿主产生免疫排斥反应。

使用 Ca^{2+} 螯合剂（柠檬酸盐或 EDTA）或抗凝胶的阳离子可以使已固化的微胶囊内部的海藻酸盐溶解，从而使微胶囊表面的聚阴离子-聚阳离子复合物具有半透膜的特性。目前这种方法较为常用，然而会对一些微胶囊产生破坏。

7 海藻酸盐凝胶的生物相容性

7.1 考察海藻酸盐凝胶生物相容性的实验方法

7.1.1 体外细胞毒性实验

在 GB/T 16886.5—2003 中对试验的主要步骤、细胞株和细胞培养基、阴性和阳性对照都作了原则要求。

7.1.2 全身毒性实验

采用外科手术法，将材料植入动物的皮下、肌肉或骨组织内，定期通过肉眼观察和显微技术，评价材料对机体全身反应及局部病理作用。须指出材料使实验动物发生中毒效应的快慢和剧烈的程度。可参考 GB/T 16886.11—2011。

7.1.3 血液相容性实验

通过体外和体内试验从凝血、血小板、血栓形成、免疫学或血液学等其他方面对生物材料的作用进行评价。可参考 GB/T 16886.4—2003。

7.2 海藻酸盐凝胶的生物相容性的影响因素

7.2.1 细胞密度

囊内细胞接种密度可直接影响细胞的生长。细胞密度过大，随着细胞的不断增殖，凝胶网络会出现一定程度瓦解；细胞密度过小，细胞间连接缺乏，生长缓慢，生长周期长且面临细胞老化现象。研究表明，采用对数生长期的细胞进行包囊，微胶囊内细胞生长较良好。

7.2.2 微胶珠大小

微胶囊的体积大小对囊内细胞的生长代谢有明显的影响。体积较小的微胶囊生物相容性较好。因为小微胶囊膜厚度和强度较大，膨胀率小，不易破裂，体积小的微胶囊移植后形成的结缔组织包绕较少。而且小微胶囊具有较高的比表面积，有益于囊内外物质的交换及囊内移植物的存活。

7.2.3 阳离子的包覆

胶珠表面如果包覆有阳离子聚合物（如聚赖氨酸）会导致免疫反应，故需在聚阳离子表面包覆一层非免疫原性材料（即藻酸盐）。如果第二层包覆不完全，阳离子会暴露于宿主的免疫系统，则导致免疫排斥反应。同时聚赖氨酸对周围的细胞有很高的细胞毒性。

7.2.4 制备方法

采用优化的制备条件及处理方式制备微胶珠，可提高膜强度及生物相容性，避免免疫细胞附着在微胶囊表面，避免使固定化材料直接暴露于免疫系统。可优化的制备条件及处理方式主要包括：针对微胶囊制备装置或方法进行改造，也可针对微胶囊制备条件进行优化，如提高藻酸盐纯度等，还可将两种及两种以上细胞共微囊化，或将细胞与其他物质共微囊化，以提高微胶囊内细胞的存活率及代谢活性。

7.2.5 内源性物质的分泌

海藻酸盐微胶珠内的免疫原性物质会刺激免疫系统，从而影响海藻酸盐微胶珠的生物相容性。这些分泌物包括蛋白或其他细胞成分，也包括具有免疫原性的包覆材料或免疫原性的海藻酸盐，如海藻酸盐中的杂质，从而导致免疫排斥反应的产生。

附 录 A
（规范性附录）
用于活体细胞或组织固定化或微囊化的海藻酸盐微胶珠的制备

A.1 材料与设备

材料与设备包括：

——材料：海藻酸盐（浓度范围为：0.5%～4.0%，通过海藻酸盐的干物质含量校正），用于凝胶化的交联剂包括但不限于 $CaCl_2$、$SrCl_2$、$BaCl_2$（Ca^{2+}，Sr^{2+}，Ba^{2+}浓度范围 50 mmol/L～150 mmol/L），用于固定化或包封的细胞包括但不限于：肝细胞，胰岛细胞，肾上腺嗜铬细胞等；用于微胶珠的包覆材料包括但不限于：聚氨基酸、壳聚糖、纤维素等；

——设备：过滤器，静电微胶囊发生仪，微量注射泵，倒置显微镜，CO_2 培养箱等。

A.2 实验方法

固定化或包封活体细胞或组织的海藻酸盐微胶囊的制备方法为：

a) 对数生长期的细胞在微囊化前 12 h 换液；细胞用胰酶消化后，计数调整为适当浓度；

b) 将细胞悬液与无菌海藻酸盐溶液混合，吹打混匀；

c) 海藻酸盐和细胞悬液经静电微胶囊发生仪滴入到交联剂溶液，形成固定化或包封细胞的海藻酸盐微胶珠；

d) 海藻酸盐微胶珠悬浮于包覆性溶液中，如聚赖氨酸、聚精氨酸、壳聚糖等，使微胶珠表面的海藻酸盐与包覆材料络合，稳定凝胶结构；

e) 将络合有包覆材料的海藻酸盐微胶珠再悬浮于低浓度的海藻酸盐溶液中；

f) 用 Ca^{2+} 螯合剂（柠檬酸盐或 EDTA）浸泡微胶珠，使微胶珠内的海藻酸盐凝胶液化，以利于微胶囊内细胞的生长，制备好的微囊化细胞置于 37 ℃，饱和湿度，5% CO_2 培养箱中培养。

A.3 实验结果表征

用于活体细胞或组织固定化或包封的海藻酸盐微胶囊形态可用倒置显微镜观察。微胶囊内细胞可用 MTT 法检测。

附 录 B
（规范性附录）
微胶囊形态、粒径大小及分布的测定

B.1 材料与设备

材料与设备包括：

——材料：海藻酸盐微胶囊；

——设备：光学显微镜，电子显微镜，激光粒度分析仪。

B.2 实验方法

用光学显微镜观察海藻酸盐微胶囊。采用电子显微镜分析微胶囊的表面形态。利用激光粒度分析仪测定微胶囊的粒径分布，或根据2015年版《中华人民共和国药典》中关于粒径及其分布的测量方法测量。

B.3 实验结果表征

由平均粒径、粒径分布直方图或粒径分布曲线可知微胶囊粒径大小及分布。

附 录 C
（规范性附录）
微胶囊孔隙率的测定

C.1 材料与设备

材料与设备包括：

——材料：海藻酸盐微胶囊；

——设备：扫描电子显微镜，透射电子显微镜，液相色谱仪。

C.2 实验方法

采用扫描电子显微镜可在高倍镜下观察测量微胶囊表面的孔隙大小分布；采用透射电镜可分析藻酸盐凝胶形态结构；采用排阻色谱法也可测量出微胶囊孔隙率。排阻色谱法是根据不同组分的分子体积大小的差异进行分离的方法。

C.3 实验结果表征

根据扫描电镜、透射电子显微镜和排阻色谱法可测定微胶囊表面形态结构、孔隙大小及分布。

附 录 D
（规范性附录）
微胶囊的扩散性测定

D.1 材料与设备

材料与设备包括：

——材料：常用的微胶囊扩散性研究材料包括但不限于：异硫氰酸酯（FITC）荧光素标记的不同分子量葡聚糖；不同分子量蛋白质：γ-球蛋白、牛血清白蛋白、胰蛋白酶等；海藻酸盐微胶囊；

——设备：紫外可见分光光度计，激光共聚焦显微镜。

D.2 实验方法

分别称取定量不同分子量的FITC-葡聚糖或蛋白质，配制成不同浓度的标准溶液，测定出蛋白浓度与OD值对应值。将FITC-葡聚糖或蛋白质溶液加入微胶囊中，在不同时间点测定上清OD值；采用激光共聚焦显微镜在不同时间观察微囊内外荧光强度。

D.3 实验结果表征

做出FITC-葡聚糖或蛋白质浓度与OD值对应的标准曲线；根据标准曲线作蛋白质浓度随时间变化曲线；对比微囊内外荧光强度分析微胶囊蛋白扩散性。

附 录 E
（规范性附录）
微胶囊的干燥测定

E.1 材料与设备

需用到的材料与设备：

——材料：海藻酸盐微胶囊，乙醇；

——设备：冷冻干燥机，显微镜。

E.2 实验方法

乙醇梯度脱水-真空冷冻干燥：将海藻酸盐微胶囊分别在浓度 20%～100%（体积分数）的乙醇中洗脱；洗脱后的微胶珠转在－20 ℃下预冻 30 min，然后将微胶囊置于冷冻干燥机中进行真空冷冻干燥。

E.3 实验结果表征

将干燥的微胶珠用显微镜拍照，观察微胶珠的表面形态。

附 录 F
（规范性附录）
微胶囊的机械强度测定

F.1 材料与设备

所用的材料与设备如下：

——材料：海藻酸盐微胶囊；

——设备：强度测定仪器设备包括但不限于：离心机，振荡仪，玻璃珠，液态流体，水银柱，水平探头。

F.2 实验方法

将微胶囊置于各种作用力场中，可将微胶囊置于离心管中，在离心力场的不同转速和时间下统计微胶珠破损率；可将微胶囊置于离心管内，在恒温震荡仪上低速水平振荡一定时间，测定微胶囊破损率；可将微胶囊与玻璃珠混合，在外界摩擦力场的作用下测定微胶珠破碎率；可将微胶囊置于一定流速流体中，在剪切力场下测定微胶珠破损率；可采用水银柱作为引力场，将与水银柱相连通的微量滴管伸到悬浮在水中的微胶囊表面上，通过改变汞柱高度的方法产生引力而将膜吸入微量滴管内，测定膜表面张力来表征膜的机械强度；可采用水平探头作为压力场，将微胶囊置于两水平探头间，施加单轴载荷，测定破碎微胶囊所需的外力。

F.3 实验结果表征

求出在不同力场作用下的微胶囊破损率或破碎微胶囊所需的外力。

参 考 文 献

[1] Dulieu, C., Poncelet, D., and Neufeld, R.J., "Encapsulation and Immobilization Techniques," Cell Encapsulation Technology and Therapeutics, W. M. Kühtreiber, R. P. Lanza, and W. L. Chick, eds., Boston: Birkhäuser, 1999, pp. 3-17

[2] Sutherland, I. W., "Alginates," Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources, D. Byrom, eds., New York, 1991, pp. 309-331

[3] Goosen, M. F. A., O'Shea, G. M., and Gharapetian, H. M., "Optimization of Microencapsulation Parameters: Semipermeable Microcapsules as a Bioartificial Pancreas," Biotechnol. Bioeng., 27, 1985, pp. 146-150

[4] Yang, H. and Wright, J.R.J., "Calcium Alginate," Cell Encapsulation Technology and Therapeutics, W. M. Kürtreiber, R. P. Lanza, and W. L. Chick, eds., Boston: Birkhäuser, 1999, pp. 3-17

[5] Skjåk-Bræk, G., Grasdalen, H., and Smidsrød, O., "Inhomogeneous Polysaccharide Ionic Gels," Carbohydr. Res., 10, 1989, pp. 31-54

[6] Martinsen, A., Storrø, I., and Skjåk-Bræk, G., "Alginate as Immobilization Material: III. Diffusional Properties," Biotechnol. Bioeng., 39, 1992, pp. 186-194

[7] Klein, J., Stock, J., and Vorlop, K. D., "Pore Size and Properties of Spherical Ca-alginate Biocatalysts," Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 18, 1983, pp. 86-91

[8] Smidsrød, O., "Molecular Basis for Some Physical Properties of Alginates in the Gel State," Faraday Discussions of the Chemical Society, 57, 1974, pp. 263-274

[9] Andersen, I. L., Skipnes, O., Smidsrød, O., *et al.*, ACS Symp. Ser., 48, 1977, pp. 361-381

[10] Martinsen, A., Skjåk-Bræk, G., and Smidsrød, O., "Alginate as an Immobilization Material: I. Correlation between Chemical and Physical Properties of Alginate Gel Beads," Biotechnol. Bioeng., 33, 1989, pp. 79-89

[11] Buchholz, K., "Effective Diffusion Coefficients," Dechema Monograph, 84, 1979, pp. 98-102

[12] Smidsrød, O. and Skjåk-Bræk, G., "Alginate as Immobilization Matrix for Cells," TIBTECH, 8, 1990, pp. 71-78

[13] Wang S. B., Chen A. Z., Chen M. Y., *et al.*, "Effect of drug-loading methods on drug load, encapsulation efficiency and release behavoir of alginate/poly-*L*-arginine-chitosan complex microcapsules." Macromolecular Bioscience, 4, 2004, pp. 27-30

[14] Chen, J. P., Chu, I. M., Shiao, M. Y., *et al.*, "Microencapsulation of Islets in PEG-Amine Modified Alginate-Poly(L-Lysine)-Alginate Microcapsules for Constructing Bioartificial Pancreas," J. Ferm. Bioeng., 86, 1998, pp. 185-190

[15] Bugarski, B., Sajc, L., Plavsic, M., *et al.*, "Semipermeable Alginate-PLO Microcapsules as a Bioartificial Pancreas," Animal Cell Technology, 8th ed., K. Funatsu, ed., Kluwer Academic Publishers, 1997, pp. 479-486

[16] Gåserød, O., Jolliffe, I. G., Hampson, F. C., *et al.*, "The Enhancement of the Bioadhesive Properties of Calcium Alginate Gel Beads by Coating With Chitosan," Int. J. Pharm., 175, 1998, pp. 237-246

[17] Gåserød, O., Sannes, A., and Skjåk-Bræk, G., "Microcapsules of Alginate-Chitosan: II. A Study of Capsule Stability and Permeability," Biomaterials, 20, 1999, pp. 773-783

[18] Gåserød, O., Smidsrød, O., and Skjåk-Bræk, G., "Microcapsules of Alginate and Chitosan: I. A Quantitative Study of the Interaction Between Alginate and Chitosan," Biomaterials, 19, 1998, pp. 1815-1825

[19] Huguet, M. L., Groboillot, A., Neufeld, R. J., *et al.*, "Hemoglobin Encapsulation in Chitosan/Calcium Alginate Beads," J. Appl. Polymer Sci., 51, 1994, pp. 1427-1432

[20] Hu WS, Meier J, Wang DIC, "A Mechanistic Analysis of The Inoculum Requirement For The Cultivation of Mammalian Cells on Microcarriars," Biotechnol Bioeng, 28, 1984, pp. 585- 595

[21] Hu WS, Wang DIC, "Selection of Microcarrier Diameter For The Cultivation of Mammalian Cells on Microcarriers," Biotechnol Bioeng, 30, 1986, pp. 548 - 557

[22] Arús L, Orive G, Hernández R, *et al.*, "The Influence of Cellular Seeding Density in The Microencapsulation of Hybridoma Cells," J Biomater Sci Polymer Edn, 16, 2005, pp. 521 - 529

[23] Robert Robitaille, Jean-Francois Pariseau, Francois A. Leblond, *et al.*, "Studies on Small (<350 μm) Alginate-poly-L-lysine Microcapsules. III. Biocompatibility of Smaller Versus Standard Microcapsules," Technical Note, 99, 1998, pp. 116-120

[24] B. Thu, P. Bruheim, T. Espevik, *et al.*, "Alginate Polycation Microcapsules I. Interaction Between Alginate and Polycation", Biomaterials, 17, 1996, pp. 1031-1040

[25] Julie Dusseault, Francois A. Leblond, Robert Robitaille, *et al*, "Microencapsulation of Living Cells in Semi-permeable Membranes with Covalently Cross-linked Layers," Biomaterials, 26, 2005, pp. 1515-1522

[26] T. Zekorn, A. Horcher, U. Siebers, *et al.*, "R Barium-cross-linked alginate beads_a simple, one-step method for successful immunoisolated transplantation of islets of Langerhans," Diabetologica, 29, 1992, pp. 99-106

[27] Hongmei Chen, Wei Ouyang, Mitchell Jones, *et al.*, "Preparation and Characterization of Novel Polymeric Microcapsules", Cell Biochemistry and Biophysics, 47, 2007, pp. 159-167

[28] D. R. Cole, M. Waterfall, M. McIntyre, *et al.*, "Microencapsulated Islet Grafts in The BB/E Rat: A Possible Role for Cytokines in Graft Failure", Diabetologia, 35, 1992, pp. 231-237

[29] P. De Vos, B. J. De Haan, G. H. J. Wolters, *et al.*, "Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets", Diabetologia, 40, 1997, pp. 262-270

中华人民共和国医药
行业标准
组织工程医疗器械产品
海藻酸盐凝胶固定或微囊化指南
YY/T 1574—2017
*
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 1.25 字数 36 千字
2017年11月第一版 2017年11月第一次印刷
*
书号:155066·2-32565 定价 26.00 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 1574-2017