774

ICS 11.040.40
C 45

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1577—2017

组织工程医疗器械产品 聚合物支架微结构评价指南

Tissue engineering medical device products—Standard guide for microstructure of polymeric scafforlds

2017-08-18 发布　　2018-09-01 实施

国家食品药品监督管理总局　发布

手机发送防伪码至13720982315
网址www.cnfw315.com
电话4006982315
刮涂层 查真伪

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　概要 …… 3
5　意义和用途 …… 3
6　成像 …… 5
7　物理表征 …… 8
8　性能评价 …… 9
附录 A（资料性附录）　组织支架的性能要求 …… 11
附录 B（资料性附录）　孔径的分类 …… 12
参考文献 …… 13

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归口。

本标准起草单位：中国食品药品检定研究院。

本标准主要起草人：陈亮、邵安良、章娜、王春仁。

组织工程医疗器械产品
聚合物支架微结构评价指南

1 范围

本标准给出了用于组织工程医疗产品的聚合物支架多孔材料的评价方法，包括评价孔隙尺寸、孔径分布、孔隙率、连通性，以及通透性等性能指标时可用的试验方法指南。本标准适用于聚合物支架微结构的评价。

注：这些指标对优化特定应用时的材料结构、发展有效的生产工艺路线和提供可靠的质量控制参数是很重要的。

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。

YY/T 0606.5—2007 组织工程医疗产品 第5部分：基质及支架的性能和测试

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

生物活性因子 bioactive agent

器械含有的、器械表面具有的或器械内填充的任何可诱导期望的组织或细胞反应的分子成分。

注：生长因子、抗生素等都是典型的生物活性因子。诱发局部有限生物活性的器械结构成分或降解副产品不属于生物活性因子。

3.2

盲(端)孔 blind(end)-pore

仅通过一个直径小于其深度的孔口与外表面或可外通的内表面相连通的孔隙。

注：示意图见图2b)。

3.3

闭孔 closed cell/closed pore

固体内与外表面不具有任何连通性的空隙。

3.4

水凝胶 hydrogel

聚合物链通过化学交联或物理交联形成的开放式含水网络。

3.5

大孔 macropore

大于100 μm的孔隙(包括空隙空间)。

注：一般可肉眼观察。大孔可允许化学物质、生物分子、病毒、细菌和哺乳动物细胞自由通过。对于具有相互连通孔隙的植入物，大孔提供了植入后组织易于长入和微血管形成的空间。

3.6

微孔　micropore

孔径大于 0.1 μm(100 nm)且小于 100 μm(100 000 nm)的孔隙(包括空隙空间)。

注：这一孔径范围的孔隙一般可通过常规的光学显微镜观察。微孔可允许化学物质、生物分子和病毒自由通过，但控制或减缓细菌、哺乳动物细胞和/或组织通过。通常的微孔孔径包括从细菌到普通哺乳动物细胞可通过的 20 μm 或更小的孔径，以及允许组织长入的 30 μm 以上的孔径。

3.7

纳米孔隙　nanopore/nanoporosity

孔径大于 2 nm(0.002 μm)且小于 100 nm(0.1 μm)的孔隙(包括空隙空间)。

注：纳米孔隙可控制或减缓化学物质、生物分子和病毒通过，但绝大多数细菌、所有哺乳动物细胞不能通过孔隙。通常的纳米孔隙孔径在可通过病毒的 20 nm 或更小的范围内。

3.8

通透性　permeability

允许液体、微粒或者气体通过某一开放孔隙的能力。

3.9

聚合物　polymer

由特定结构单元通过共价键多次重复链接而成的长链分子，包括天然和合成材料。

注：例如胶原和聚己内酯。

3.10

孔隙　pore

在固体或凝胶样材料[例如，由单一或多纤维构成的网状织物(纺织支架)、开孔泡沫塑料、水凝胶]内，可由流体(液体或气体)填充的向外连通的通道、空隙或开放空间。

注：孔隙也可称为开孔、通孔。

3.11

致孔剂　porogen

用于在固体内产生孔隙的物质。

注：例如，在有机溶剂溶解的聚合物中加入水溶性粉末。在溶剂挥发后，通常通过水将致孔剂浸出从而留下多孔结构。致孔剂的比例需要足够高才能确保所有孔隙连通。

3.12

孔隙率　porosity

多孔材料的特性指标，可通过测定多孔材料孔隙体积与表观(总)体积的比率确定，通常以百分比表示。

3.13

孔隙测量法　porometry

通过非挥发的润湿性流体在压力下的位移，测定相对于流体流动方向上的开孔直径分布的方法。

注：孔隙测量法一般采用氮吸附法。

3.14

孔隙率测量法　porosimetry

通过非润湿性液体(代表物汞)在压力下进入有孔材料，测定孔隙体积和孔隙大小分布的方法。

注：孔隙率测量法一般采用压汞法。

3.15

支架　scaffold

用于组织替代、修复或再生组织的细胞或生物活性因子的迁移、结合或输送的一种支持物、运输载体或基质。

3.16

贯通孔 through-pores

允许流体(液体或气体)从支架的一侧流动到另一侧的固有或造成的网状通道和空隙。

4 概要

4.1 聚合物组织支架的微结构、表面化学特性、表面形貌在细胞黏附、迁移、生长和增殖等方面发挥着重要作用。本指南的目的是提供能表征微结构的方法和技术。所述技术涉及的范围反映了对于各种力学性能不同的材料,定量分析其从纳米到亚毫米尺寸范围的孔径和孔径分布,以及孔隙率的实际困难。

4.2 这些聚合物支架微结构的表征方法和技术,与其他表征方法联合使用时,例如聚合物化学分析(测定相对分子质量及其分布等指标),将有助于组织工程医疗产品支架的优化。充分的表征也有助于确保支架批次间的一致性,评价不同供应商提供的基本材料,或为产业化建立规范有效的生产工艺。

4.3 应用本指南描述的技术不能保证支架能发挥设计的预期功能,但可能有助于识别成功或失败的原因。

4.4 不必进行本指南所有的试验。技术方法的选择取决于所需获取的数据以及支架的物理特性,例如压汞法用于表征软材料时将因为变形而得不到有效结果,也不能用于测试含水支架。

4.5 对于本指南的使用者,各种不同的用于支架物理表征的测试技术的适用性简介参见表1,但使用者不必局限于列出的技术方法。

表 1 支架物理表征指南

表征技术	可获取数据	相应的标准章条
显微镜	孔隙形状、孔径和孔径分布;孔隙率	6.1(电子显微镜) 6.2(光学显微镜) 6.2.3(共聚焦显微镜) 6.2.4(光学相干断层扫描) 6.2.5(光学相干显微镜)
X-射线显微计算机断层摄影	孔隙形状、孔径和孔径分布;孔隙率	6.3
磁共振成像	孔隙形状、孔径和孔径分布;孔隙率	6.4
密度测定法	孔隙率、孔隙体积	7.2
孔隙率测量法	孔隙率、孔隙总表面积、孔隙直径、孔径分布	7.3
孔隙测量法	平均孔径(假设孔隙几何形状为圆柱形)、贯通孔孔径分布	7.4
核磁共振	孔径及其分布	7.5
标记扩散	通透性	8.2

5 意义和用途

5.1 通过培养的功能化组织来修复体内损伤或病变的组织,这提供了除异种移植或同种异体移植之外的另一种选择。利用患者自身的细胞培养新的组织,这种方式有利于减少因免疫系统引起的排斥反应。其典型的例子是在体外将从受体获取的细胞利用支架进行培养。支架的微结构,即孔隙的孔隙率、平均

孔径和孔径分布，以及其连通性等对细胞的迁移、生长和增殖很重要，可参见附录 A。但支架的优化设计由于可能使用的材料种类、不同的加工方法和处理条件而变得非常复杂。上述这些因素都可能影响支架的表面结构、表面化学性质和微结构。而这些因素的重要性取决于特定类型细胞在特定时期的特性（即细胞行为可因传代次数、力学刺激和培养条件而变化）。

5.2 一般通过总体的支架孔隙率和孔径范围来评价组织支架，而很少测定孔径分布。报告的平均孔径及其分布通常是从支架的电子显微镜图像获取的，数值在微米范围内。支架结构通常很复杂，以孔隙形状和孔径并不能很好说明其结构，特别是在三维尺度上的结构。因此，单独通过支架的电子显微镜图像难以定量评价其批次间的微结构变化，或系统研究平均孔径和孔径分布对细胞生物学的影响。

5.2.1 用于表征多孔支架结构的技术及其测定的尺寸范围见图 1。如果要充分表征支架宜利用各种技术。

5.2.2 由于在不同的应用和行业中术语定义差异巨大（可达 3 个数量级），孔径的分类和术语（见表 2）宜标准化。国际纯粹与应用化学联合会（International Union of Pure and Applied Chemistry，IUPAC）的定义与大多数生命科学（包括植入物和组织工程）通用术语间存在差异，其支持性细节论述见表 2 和附录 B。

由于文献中还有其他一些定义孔隙的术语，因此为了避免混淆，宜对用于描述孔隙的术语进行定义。另外，取决于孔径测定方法（见表 1 和图 1），表 2 中的任何定义都可能变化，因此宜同时描述所用的技术方法。

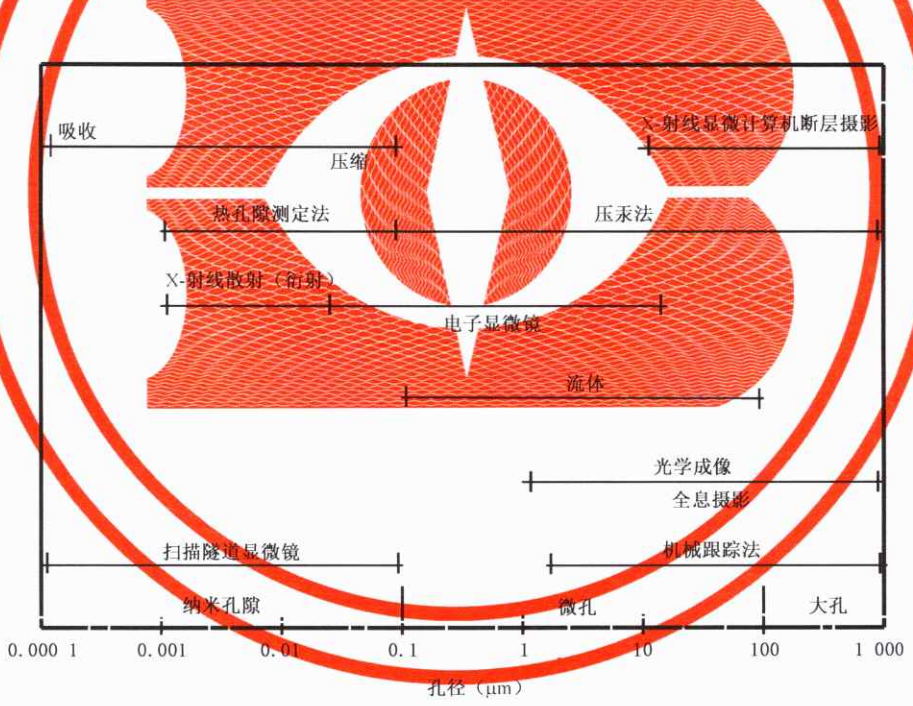

图 1 充分表征多孔材料所需的各种技术

5.2.3 所列出的技术（见表 1）在评价复杂孔隙结构时都有所局限。贯通孔和盲端孔的示意图分别见图 2a）和图 2b）。对于直径有变化的贯通孔，孔隙测量法（见 7.4）仅对最窄处灵敏，因此与其他的测定技术（例如扫描电子显微镜能在孔隙的不同位置取样）相比，孔隙直径的测定值较低。孔隙测量法的物理基础在于气体通过材料，因此该方法不能测量盲端孔或闭孔。基于孔隙测量法获取数据估计的孔隙率与其他方法，例如孔隙率测定法（见 7.3）的不同，后者能测量贯通孔和盲端孔；与密度测定法的也不同，密度测定法能测定贯通孔、盲端孔和闭孔。这些差异的明显程度取决于各种不同类型的孔隙和其孔径所占的比例。进一步的研究将有助于指南的提高。

表 2　孔径命名比较

描述词	IUPAC 定义	生命科学定义
	用于化学(例如固体催化剂)、冶金、地质(例如沸石)	用于组织工程、医用植入物、诊断或生物学过滤处理
纳米孔隙/纳米孔隙率	未定义	0.002 μm～0.1 μm(2 nm～100 nm)
微孔/微孔孔隙率	<2 nm(<20 Å)	0.1 μm～100 μm(一般限定在 0.1 μm～20 μm)
介孔	2 nm～50 nm(20 Å～500 Å)	未定义
大孔/大孔孔隙率	>50 nm(>500 Å)	>100 μm
毛细管	参见 Meyer 等	未定义
大毛细管	参见 Meyer 等	未定义

5.2.4　聚合物支架包括从具力学强度的结构体到柔软的水凝胶。而目前构建多孔支架的方法包括但不限于：

——将溶解在有机溶剂且含有水溶性颗粒致孔剂的聚合物进行浇铸，然后进行浸渍。

——通过融化，混合不易混合的聚合物，然后浸洗出水溶性成分。

——在压力下将超临界二氧化碳融入充分熔化的聚合物，在玻璃化转变温度急剧降低后，由于压力的降低将导致气泡的形成和固化。

——熔化的聚合物可控沉积，以产生限定的三维结构。

——制造三维纤维编织、纺织或非织造结构。

——聚合物基质的化学或离子交联。

5.2.5　这些方法局限性的描述参见附录 A。

5.2.6　本标准聚焦于聚合物多孔支架表征的特定方面，YY/T 0606.5—2007 给出了支架全面表征的要求。

a)　具有变化的孔隙直径的贯通孔　　b)　盲端孔

图 2　不同的孔隙结构

6　成像

6.1　电子显微镜

6.1.1　透射和扫描电子显微镜都能获取支架完整或断裂表面的图像，或支架切面的图像。所得的图像可用图像分析软件包进行解读以产生关于支架孔隙形状、平均孔径及分布的数据。而支架连续切片取样的透射电子显微镜图像产生的三维真实图像可用于估计通透性和弯曲度。

6.1.2 对于柔软或特别是高度含水的聚合物软支架，由于样品制备产生的假象，其电子显微镜图像定量数据的可重复性可能存在高度不确定性。在常规的扫描电子显微镜观察时，高度含水的支架需要在真空下冻干。该过程中如果采用液氮，由于在样品周围形成的液氮气体隔离层将导致相对缓慢的冷冻速率，会产生显著的冰晶损害。采用样品在氮浆中速冻能降低气体隔离层厚度，加快冷冻速率而减少冰晶损害。

6.1.3 可使用相对新的冷冻扫描电镜技术来减少假象。在该方法中，快速冷冻的样品折断后，在冷冻扫描电镜仪器内可保持冷冻状态，经适量消除冰晶后断面再喷涂金铂。升华消除冰晶的数量可通过暴露时间来控制。这一技术的使用使样品的冻干降到最低。但难以试验验证经该技术方法获取的试验结果无人工假象。

6.1.4 聚合物支架通常由于没有足够高的电子密度而不能提供合适的对比度，这能通过使用高电子密度的物质染色来克服，如对碳碳双键有高亲和力的四氧化锇。

6.1.5 绝大多数聚合物支架能经标准操作程序用环氧树脂固定，然后切片进行透射电子显微镜检查。但这一方法不太适合研究可能脱水的水凝胶材料。不过在树脂包埋前通过使用系列浓度酒精进行梯度脱水能在一定程度上解决这一问题。但是这一操作可能降低样品中充满水的孔隙的尺寸。这样获取的孔径定量数据在比较不同样品间的微结构时具有价值。然而由于样品变形，这些结果在表征支架预期的体内微结构时作用降低。

6.2 光学显微镜方法

6.2.1 假若样品的结构和周围介质之间有足够高的对比度，使得最低处理条件下或天然状态(即样品不需染色或切片)的样品表面特征也能被研究，那么可应用光学显微镜方法。该方法的不足在于光线对样品的穿透有限，特别是由于散射，光线对多孔基质的穿透更为有限。实际上，这限制了共聚焦显微镜和光学相干断层技术的应用深度一般低于 0.5 mm。

6.2.2 通过光学显微镜能获取支架表面图像。改变焦距可以获得半透明样品不同景深的图像。这些深度图像可用于样品内连通孔隙的路径追踪。

6.2.3 共聚焦显微镜利用支架材料的天然荧光特性或诸如荧光素蛋白等荧光染料，能实质性地提高样品的光学成像质量。由于其较窄的景深和消除焦点外光线，共聚焦显微镜能拍摄不同深度的清晰图像。通常优先用激光做点光源而不用通常的照明光源，现代绝大多数的仪器使用多个激光光源。这能提高图像对比度，激发与不同的结构成分结合的染料，发射不同波长的荧光。激光扫描共聚焦显微镜能利用反射或透射模式。针孔的尺寸和目镜的数值孔径在很大程度上决定了其厚度或轴向的分辨率。通常小针孔具有更好的分辨率，但牺牲了强度。激光扫描共聚焦显微镜已用于进行一些支架表征的研究工作。

6.2.4 光学相干断层扫描是一种光学反射成像技术，通过对不同深度层面散射光的干涉抑制来确定轴向分辨率，而不是激光扫描共聚焦显微镜使用的针孔。简单地说，光学相干断层扫描技术使用带宽在 30 nm～200 nm 间的低相干光和干涉仪(通常是 Michelson 型)，可产生任一横截面的背向反射剖面图。对光学相干断层扫描技术及其应用的完整描述可见。类似的技术是 A 型超声扫描。在迈克逊图像中，材料是干涉仪的信号臂而不是参照反光镜，低数值孔径的透镜用来获取更大的轴向取样体积，将样品的反射光按照位置的深度进行绘图。如同激光扫描共聚焦显微镜，横向分辨率由光束的几何尺寸决定，不同的是轴向分辨率与光源的带宽呈反比，典型的轴向分辨率为 10 mm。

光学相干断层扫描技术的优势在于其高灵敏性，达 90 dB，已广泛用于人体视网膜、皮肤和血管，以及活体小动物的循环系统的功能显像。在 20 世纪 90 年代末期，首次预见了光学相干断层扫描技术用于材料科学领域的潜能。第一次发表的组织工程支架的光学相干断层扫描图像是关于水凝胶材料的，该研究证实了图像获取的深度。图像的探测深度受来自于材料孔隙和微晶的散射的限制。探测深度能从约 100 μm 到若干毫米，取决于材料与其周围反射指数的差异、孔隙率和孔径分布。用反射指数与支架材料相近的液体填充孔隙能提高穿透深度。实际上，通常用水替代空气，或油替代水。但这一操作因

润湿性不足和留有空气可能导致其他问题。由于信号来源中大量的散射光子，多孔材料的光学相干断层扫描图像会有噪声。而光学相干显微镜技术，可以克服相关的组织工程支架成像失真问题。

6.2.5 光学相干显微镜是光学相干断层扫描和共聚焦显微镜的组合，很适合组织工程支架等不透光材料的成像，能获得微米级的轴向和横向分辨率同时保持较高的背景抑制。通常以加入高数值孔径的目镜和针孔来达到共聚焦的增强，而针孔一般为参考臂光纤上的开孔。该技术的关键是共焦和相干技术的轴向点扩散函数。对共焦而言，Lorentzian 轴向点扩散函数即使远离焦平面时也是有限收敛的，这限制了其在组织工程医疗产品等高度散射介质上的应用。对相干而言，Gaussian 点扩散函数在远离焦平面时的下降比共焦显微镜的更为迅速。因此，共焦有助于在焦点附近的高分辨率，而相干有助于高度背景抑制，这两种特性为组织工程医疗产品的有效成像所需。

6.3 X-射线显微计算机断层扫描

6.3.1 X-射线能用来产生支架材料的三维图像，从而获取孔径和形状、孔隙率和连通性等信息。该方法的原理是将支架定位于 X-射线源与检测器之间。旋转标本，同时在多个不同角度记录 X-射线的衰减。这些数据通过重建运算法则进行分析，产生支架二维截面图像。在标本不同高度位置获得的一系列二维截面图像能形成完整的三维图像。典型的图像分辨率在 5 μm～10 μm，但分辨率达 50 nm 的仪器已经商品化。该技术的成功依赖于固体材料和填充在其孔隙内的流体(空气或水)间因电子密度差异而产生的高对比度。

6.3.2 该技术不受限于光学断层扫描方法所受的穿透深度的限制，可提供支架结构更完整的图像。更多的信息参见 ASTM E1441 指南。这一非破坏性的方法已用于研究骨和其他材料，确认骨组织支架的设计，以及研究聚合物支架。

6.4 磁共振成像

6.4.1 许多聚合物含有磁共振活性核(如^{1}H、^{13}C)，但聚合物骨架上原子核的弛豫对常规的成像来说时间太短。因此，要研究聚合物支架的三维结构，孔隙内部要填充在磁共振成像中可见的流体。理想的流体要富有磁共振活性原子核，有高可感受性，有高清晰的核磁共振线谱。而且，黏度要较低以能进入孔隙，具有合适的弛豫特性以能在梯度成像中提供强信号。幸运的是，绝大多数聚合物支架在水中浸渍即能满足。

6.4.2 一般磁共振成像空间分辨率的理论限值是水分子在获取磁共振成像信号的时间内的扩散距离(～10 μm)。因此用此技术对具较大孔隙(50 μm～100 μm)的聚合物支架能进行空间分辨。在磁共振图像上，水填充的孔隙显示为亮点而支架显示为黑色网络。在合适的图像分析处理后，聚合物网络的高对比图像能用来估计孔径和孔径分布。

6.4.3 对于孔隙小于磁共振成像分辨率限值的支架，其孔隙率能通过饱和含水支架与纯水的信号均一后的信号强度估计。如果排除测定信号中聚合物的因素，标化后的信号强度反映了聚合物支架内水的体积分数。对于水凝胶，聚合物体积分数的更准确估计来源于定量横向弛豫图。这一方法可用于分析作为辐射剂量测试模型的水凝胶的交联密度。孔隙尺寸与细胞(10 μm～20 μm)相当的聚合物支架，孔隙内流体扩散的磁共振图像可估计孔径和孔径分布。该方法的局限性是需要通过假设几何模型来获得相关结构信息。

6.4.4 磁共振成像技术的其他局限性包括较低的空间分辨率，研究支架结构时孔隙中需要填充流体，使该技术只能检测流体填充的孔隙。实际上，磁共振成像不能检测闭孔或填塞有空气的孔隙(盲端孔)，或由于表面张力难以润湿的孔隙。虽然由于填塞的空气、固体聚合物或未润湿的小尺寸孔隙引起某些区域的信号缺乏，但是支架孔隙内流体的分布能作为细胞能达到的孔隙体积的潜在指标。

6.4.5 磁共振成像技术的优势在于能无损的研究聚合物支架的三维结构，不需要使用各种染料。对支架材料的光学透过性和制样技术没有特殊要求，后者可能导致聚合物支架形状改变。另外，这一成像技

术能用于从空间和时间上监测细胞和细胞外基质蛋白在支架内的分布。而且，磁共振成像能用于组织支架在体内的性能，以及机体对支架材料的生物反应。

6.5 图像分析

不管用何种技术进行组织支架的成像，必须关注关键结构指标的定量测定。通常，通过图像分析软件内的标准设定来选择数字图像内的多孔区域。包括孔隙数量、孔隙面积(和孔隙体积)和总孔隙率等基本的结构指标测量都出自于这些选定的区域。关于图像获取、贮存和解释的详细信息可参见ASTM F2603。

7 物理表征

7.1 概要

支架通透性能用来评价细胞迁移时在支架结构上的可达到性，或测定支架结构满足功能细胞群体的能力。已描述的所有技术对聚合物支架而言都有局限性和适用范围。

7.2 密度测定法

7.2.1 通过密度和体积间的关系能估计支架孔隙的体积，假定支架材料的密度已知。在这一过程中，支架的体积能通过测量支架的尺寸获得，然后测定样品的质量。某些情况下，为排除水分的影响，称重前可能需要将样品干燥恒重。对于凝胶或其他已知显著含水的材料，以及吸湿的材料都宜如此处理。支架孔隙的体积 VP 按式(1)计算，孔隙率百分比为按式(2)计算。

$$V_P = V_T - m_s/\rho_s \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

V_P ——支架孔隙体积，单位为立方厘米(cm^3)；

V_T ——支架体积，单位为立方厘米(cm^3)；

m_s ——支架质量，单位为克(g)；

ρ_s ——支架材料的密度，单位为克每立方厘米(g/cm^3)。

$$P = V_P/V_T \times 100\% \quad \cdots\cdots(2)$$

式中：

P ——支架孔隙率，%；

V_P ——支架孔隙体积，单位为立方厘米(cm^3)；

V_T ——支架体积，单位为立方厘米(cm^3)。

7.2.2 孔隙率的测定提供了对样品内总的空隙空间的估计，这有一定作用，但由于它由开放孔隙、闭孔和盲端孔组成，除非与其他更特异的孔隙表征测定方法共同使用，其在实际应用中有局限性。

7.2.3 不规则几何形状样品的尺寸测定可能很困难。在这种情况下可使用 Archimedes 定律，通过样品排除的液体体积来测定样品的体积。需要注意，浮力方法对闭孔并不灵敏，贯通孔或盲端孔可能未被充分润湿。对不易润湿的疏水性材料(例如聚己内酯)，这一方法的实验操作还是挑战。然而，这样的问题能通过使用少量的促湿剂(例如 1%的乙醇)，或像氦比重瓶一样用惰性气体代替液体来解决。

7.2.4 这一测定方法的可靠性还需要从测定样品尺寸和质量，以及固体材料密度的不确定性中确定。对于聚合物材料，由于交联和结晶的影响，材料密度的测定可能很复杂。

7.3 孔隙率测量法(液体侵入)

7.3.1 通过测定填充所有连通开放表面的孔隙所需的非润湿性液体(通常是水银)的体积，能估计支架

的孔隙体积。这一技术方法参见测试方法标准 ASTM D4404 和 ASTM D2873。

7.3.2 压汞法可以产生下列数据：孔隙总体积、孔隙总表面积、平均孔隙直径和孔径分布。明显的，对于多孔软支架，由于水银进入造成支架变形，将会产生错误信息。目前，对于支架变形和支架壁硬度方面的关系尚不清楚。本技术不能用于测定水凝胶的孔隙率。由于液体只能填充连通外表面的孔隙（即盲端孔和贯通孔），孔隙率测定法评估的孔隙率通常低估了孔隙体积。由于理论（Washburn 方程）假设孔隙平行，宜认识到本技术得到的孔隙尺寸分布是一个等同化的结构。因此沿长度方向直径有变化的孔隙经测定将会产生不同的孔隙直径，这些数据组成了孔径分布的直方图。

7.4 孔隙测量法

7.4.1 气流孔隙测量法可以用来表征贯通孔的特性。本技术方法是通过增加气体压力，从要表征的支架空隙处推动非挥发的润湿性液体。测量在施加的压力下通过干燥和润湿支架的气流。然后假设孔隙形貌为圆柱形，这些数据用来估计贯通孔的分布和孔隙平均直径（mm）。试验方法的细节参见 ASTM E128、ASTM E1294 和 ASTM F316。

7.4.2 本方法得出的贯通孔直径代表了孔隙最窄处的直径。由于此限制，气流孔隙测量法得到的平均孔隙直径比其他方法测定的小。本方法不能提供闭孔和盲端孔的信息。软支架或水凝胶的贯通孔将会变形。而为最小化相关误差，对支架硬度宜有最低水平要求，但目前尚无相关规定。

7.4.3 为克服导致气泡形成的多孔支架与流体间的相互作用，所需的压力将受润湿性液体表面张力、多孔材料表面能、被吸收或吸附的液体或气体、孔隙表面的粗糙度和孔隙直径影响。随着孔隙直径减小，毛细管现象将显著增加。目前尚无指南关注这一来源的误差，也无指南考虑可检测的最小孔隙直径，或在测试压力下，支架对人为变形的敏感性。

7.5 核磁共振

7.5.1 多孔材料内的流体与支架材料表现出不同的行为，可利用这一点通过核磁共振来获取结构信息。原则上，以水为例，氢原子核的纵向 T_1 和 T_2 弛豫时间将会随着孔隙直径降低而减少。可从多孔材料的弛豫时间谱推断出平均孔隙直径和孔隙尺寸分布。弛豫测定法这一相对较新的技术可以用来研究纳米尺度内的孔隙直径。

7.5.2 孔隙内含有的纳米级的液体，其熔点按与其直径成反比的方式减小，基于这一观察有一项补充方法。液体的熔点降低是由于孔隙内晶体尺寸的减小和巨大的比表面积。熔点的降低通过 Gibbs-Thompson 式(3)计算。

$$T_m = k/a \qquad \cdots\cdots(3)$$

式中：

T_m ——熔点温度，单位为摄氏度（℃）；

k ——常数；

a ——典型孔隙尺寸，单位为微米（μm）。

7.5.3 本方法为冷冻孔隙测量法。核磁共振可以用来检测晶体在零度下的熔解。从这些数据能获得块体样品的平均孔隙尺寸和孔隙尺寸分布，或电动台上样品在不同三维部位的孔隙数据。冷冻孔隙测量法可检测从几纳米到近 1 mm 的孔隙直径，是一种不需借助染料的非破坏性方法，已被用来研究黏土、多孔陶瓷和砂岩的结构。

8 性能评价

8.1 从热量测定数据和光谱数据能获得纳米级孔隙的尺寸分布。分子探针的扩散能用来研究更大尺寸的孔隙，可到毫米尺度。

8.2 分子探针扩散，即标记扩散能用来评价支架的通透性，特别是水凝胶。这些探针可能从小分子（相对分子质量范围在 1 kDa 以下）到例如蛋白的大分子，后者的相对分子质量范围一般在 10 kDa～200 kDa。

使用简单的扩散室能监测通过基质的被动扩散，或通过应用跨基质的电压差——凝胶电泳，来推动探针通过基质。原则上，分子的扩散性能用作质量控制工具来评价生产过程的重复性，或研究表面电荷对通透性的影响。对具有毫米级大孔的材料，在测量其分子扩散时存在一些实际操作问题，这些问题随路径长度的降低而增加。对于孔隙路径长度较短的样品，为了维持探针分子的均匀浓度而在样品两侧搅动液体时，容易影响其被动扩散率。通过引入暂时的压力梯度和（或）暂时的流体来移除试样，也可能会影响对扩散无屏障作用的样品中的分子扩散率。通过改变样品几何形状来增加路径长度可能减少这些实际操作问题的影响。

附 录 A
（资料性附录）
组织支架的性能要求

A.1 组织工程医疗产品的商品化成功和产品改进部分有赖于建立规范有效的生产工艺，这能保障不同批次支架的微结构具有可接受的重复性。这一要求不仅可确保引入支架的细胞的生物学功能，而且在新生组织能发挥功能前的这段特定时期内，降解的支架能维持其力学结构完整性。能可靠地及可重复地制造多孔支架，将增强对支架体内降解行为的预测性和支架降解的一致性。

A.2 不管在体内组织支架可吸收或不可吸收，其主要作用是容纳细胞或生物分子。构建支架的材料可以是金属、陶瓷、聚合物及复合物；其中，高度水化的聚合物软支架的表征最具挑战。预期用于细胞培养物时，组织支架表面要有利于细胞黏附，要有相互连通分布的孔隙，孔径要大到能容纳细胞并可使细胞在支架内生长。而且，支架内的培养条件要能为生长中的细胞提供充足的氧及充分的营养供应以避免低氧状况，能维持生长的细胞群体，保持稳定的 pH 及移除代谢废物。这可通过精心选择培养介质和培养条件部分达成，如在体外培养中，对构建组织施加适宜的力学刺激有助于物质双向的自然扩散。然而，孔隙率、孔径分布和孔隙连通性（弯曲度）等在扩散过程的效率方面起着关键作用。氧的缺乏是发展功能化 TEMPs 过程中遇到的重大问题。除了肿瘤细胞系，大多数细胞离氧供应距离 100 μm 以上就将发生缺氧状况。这使得发展出了具有多孔孔壁的多孔支架，以此来降低氧的扩散距离。这一技术方法还需谨慎采用，因为这可能限制了支架的力学结构完整性，也影响支架的降解行为。

附 录 B
（资料性附录）
孔径的分类

B.1 背景

B.1.1 由于在不同的应用中术语定义差异巨大(可达 3 个数量级)，表 2 中给出的孔径的分类仍需标准化。在许多行业，孔径是在化学分子的水平上进行测量，通常是亚微米(即纳米)水平，通过渗透性滤过介质内涉及的气体脱附发现。国际纯粹和应用化学联合会为适合化学分子级别的应用，发展了相关的分级和术语：微孔定义为小于 2 nm，介孔定义为 2 nm～50 nm，大孔定义为大于 50 nm。

B.1.2 与此相对应的是，从 19 世纪 60 年代开始，对作为过滤或外科敷料应用的“微孔”膜或海绵，已经将其“微孔”描述为在 0.1 μm～200 μm，而且定义大孔为 200 μm～2 000 μm。

B.1.3 后者的这些定义和孔径范围接近当前在颗粒和生物过滤应用中的术语。但不管这些历史上还是目前的应用，都未建立标准化的术语学，强调除去细菌(约 0.5 μm)或颗粒，或两者的过滤应用。由于多孔植入物和组织工程的应用，都主要关注隔离和/或支持哺乳动物细胞(一般＞5 μm)，而定位于生物学和过滤方面的使用和定义，与上限为 50 nm(0.05 μm)的 IUPAC 分级系统相比，与植入物和组织工程应用更具有相关性。

B.1.4 已有文献讨论，并用表格总结了文献中广泛存在的术语矛盾和定义冲突。这样的矛盾强调了在科学领域内，需要制定标准术语以促进更为一致的语言的使用。

B.2 应用在生命科学中的术语

B.2.1 一般在生命科学中，认为纳米尺度是 100 nm(0.1 μm)或更小，这一定义与其他领域一致，如应用物理学、材料科学、界面和胶体科学、元器件物理、超分子化学(关注分子的非共价结合相互作用的化学领域)、自复制机器和机器人、化学工程、机械工程、生物工程以及电子工程等。

B.2.2 在通过多孔介质这一意义范畴内，在生命科学应用中，对生物分子或病毒的通过，倾向于使用术语纳米孔隙。如第 3 章(定义)的讨论，对细菌、哺乳动物细胞和组织的通过，通常使用微孔。在生命科学领域内，通常不使用术语微毛细管、毛细管和大毛细管来描述孔径，因为这些术语很可能与连接动静脉间的血管相混淆。

B.2.3 第 3 章术语中规定了在生命科学领域内适用的孔隙率的相关定义。但取决于孔径测定方法，这些定义都可能发生变化(见表 1 和图 1)，因此宜同时对所用的技术方法进行描述。

参 考 文 献

[1] ASTM D2873 Test Method for Interior Porosity of Poly(Vinyl Chloride)(PVC) Resins by Mercury Intrusion Porosimetry

[2] ASTM D4404 Test Method for Determination of Pore Volume and Pore Volume Distribution of Soil and Rock by Mercury Intrusion Porosimetry

[3] ASTM E128 Test Method for Maximum Pore Diameter and Permeability of Rigid Porous Filters for Laboratory Use

[4] ASTM E1294 Test Method for Pore Size Characteristics of Membrane Filters Using Automated Liquid Porosimeter

[5] ASTM E1441 Guide for Computed Tomography(CT) Imaging

[6] ASTM F316 Test Methods for Pore Size Characteristics of Membrane Filters by Bubble Point and Mean Flow Pore Test

[7] ASTM F2603 Guide for Interpreting Images of Polymeric Tissue Scaffolds

[8] Tomlins, P.E., Grant, P., Vadgama, P., James, S. Mikhalovsky, S., "Structural Characterisation of Polymer-Based Tissue Scaffolds," National Physical Laboratory, United Kingdom, Measurement Note DEPC-MN-002, May 2004

[9] Meyer, K., Lorenz, P., Bohl-kuhn, B. and Klobes, P., "Porous Solids and Their Characterisation," Cryst.Res.Tech., Vol.29(7), 1994, 903-930

[10] Perret, P., Prasher, S.O., Kantzas, A. and Langford, C., "Three-Dimensional Quantification of Macropore Networks in Undisturbed Soil Cores," Soil Sci.Soc.Am., 63, 1999, p.1530

[11] Tjia, J. and Moghe, P., "Analysis of 3-D Microstructure of Porous Poly(lactide-glycolide) Matrices using Confocal Microscopy," J.Biomed.Mat.Res., Vol.43, No.3, 1998, pp.291-299

[12] Birla, R. and Matthew, H.W.T., "3-Dimensional Imaging & Analysis of Smooth Muscle Colonization of Porous Chitosan Scaffolds," Proc.1st Joint BMES/EMBS Conf., 1999, p.119

[13] Hee, M., Izatt, J., Swanson, E., Huang, D., Schuman, J., lin, C., Puliafito, C. and Fujimoto, J. G., "Optical Coherence Tomography of the Human Retina," Archives of Opthalmology, 113, 1995, p.325

[14] Barton, J., Milner, T., Pfefer, T., Nelson, J. and Welch, A. "Optical Low Coherence Reflectometry to Enhance Monte Carlo Modeling of Skin," J.of Biomed.Opt.2(2), 1997, p.226

[15] Boppart, S., Brezinski, M., Bouma, B., Tearney G. and Fujimoto, "Investigation of Developing Embryonic Morphology Using Optical Coherence Tomography," J.Developmental Biology 177, 1996, p.54

[16] McDonough, W. G., Amis, E. J., Kohn, J., "Critical Issues in the Characterization of Polymers for Medical Applications", NISTIR-6535(NIST, Gaithersburg, MD, 2000)

[17] Dunkers, J., Cicerone, M. and Washburn, N., "Collinear Optical Coherence and Confocal Fluorescence Microscopies for Tissue Engineering," Optics Express, 2003

[18] Müller, R., Hahn, M., Vogel, M., Delling, G. and Rüegsegger P., "Morphometric Analysis of Noninvasively Assessed Bone Biopsies: Comparison of High-Resolution Computed Tomography and Histologic Sections," Bone, 18, 1996, pp.215-220

[19] Müller, R., Matter, S., Neuenschwander, P., Suter, U.W. and Rüegsegger P., "3-D Micro-Tomographic Imaging and Quantitative Morphometry for the Nondestructive Evaluation of Porous Biomaterials," In R.M. Briber, D.G. Pfeiffer, C.C. Han, editors, Morphological Control in Multiphase

Polymer Mixtures, Mat.Res.Soc., Vol.461, 1997, pp.217-222

[20] Van Oosterwi jck, H., Duyck, J., Vander Sloten, J., Van Der Perre, G., Jansen, J., Wevers M.and Naert, I., "The Use of Microfocus Computerized Tomography as a New Technique to Characterize Bone Tissue Around Oral Implants," Journal of Oral Implantology, 26, 2000, pp.5-12

[21] Maspero, F. A., Ruffieux, K., Muller, B., Wintermantel, E., "Resorbable Defect Analog PLGA Scaffolds using CO_2 as Solvent: Structural Characterization," J Biomed Mater Res., Oct; 62(1), 2002, pp.89-98

[22] Lin, A.S., Barrows, T.H., Cartmell, S.H., Guldberg, R.E., "Microarchitectural and Mechanical Characterization of Oriented Porous Polymer Scaffolds," Biomaterials, Feb; 24(3), 2003, pp. 481-489

[23] Scaglione, S., Beltrame, F., Diaspro, A., Usai, C.and Mastrogiacomo, M., "Tissue Engineering: Methods for Bone Quantification and Scaffolds Geometric Properties Analysis," Proc. Focus on Microscopy 2003, 2003

[24] Prado, P.J., Balcom, B.J., Beyea, S.D., Bremner, T.W., Armstrong, R.L., Pishe, R.and Gratten-Bellew, P.E., "Spatially Resolved Relaxometry and Pore Size Distribution by Single-Point NMR Methods: Porous Media Calorimetry," J.Phys.D: Appl.Phys., 31, 1998, pp.2040-2050

[25] Strange, J.H., Webber, J.B., Schmidt, S.D., "Pore Size Distribution Mapping," Magn Reson Imaging, 14(7-8), 1996, pp.803-805

[26] Strange, J.H., Rahman, M.and Smith E.G., "Characterisation of Porous Solids by NMR," Physical Review Letters, 71, No.21, 1993, pp.3589-3591

[27] Song Y.Q., "Pore Sizes and Pore Connectivity in Rocks Using the Effect of Internal Field," Magn Reson Imaging., 19(3-4), 2001, pp.417-421

[28] The Handbook of Optical Coherence Tomography, edited by Bouma and Tearney, Marcel Dekker, Inc., 2002 Pure & Appl.Chem, Vol 66, No.8, 1994, pp.1739-1758

中华人民共和国医药
行业标准
组织工程医疗器械产品
聚合物支架微结构评价指南
YY/T 1577—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 30 千字
2017年11月第一版　2017年11月第一次印刷
*
书号:155066·2-32547　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 1577-2017