



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0616—2007

一次性使用医用手套 生物学评价要求与试验

Medical gloves for single use—
Requirements and testing for biological evaluation

(EN 455-3:2000,MOD)

2007-07-02 发布

2008-03-01 实施

国家食品药品监督管理局 发布

目 次

前言	I
引言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 要求	2
5 试验方法	2
6 试验报告	3
附录 A (规范性附录) 用改良 Lowry 分析法测定天然橡胶手套水溶性蛋白质的方法	4
附录 B (资料性附录) 医用手套可溶出蛋白质和过敏原的免疫学测定方法	10
附录 C (资料性附录) 高效液相色谱法(HPLC)测定氨基酸(AAA)	12
附录 D (资料性附录) 术语	16
参考文献	17

前 言

本标准修改采用 EN 455-3:2000《一次性使用医用手套 第 3 部分：生物学评价要求与试验》，与 EN 455-3:2000 无技术性差异，仅将引用的欧洲标准和药典改为我国相应标准和药典。

本标准的附录 A 是规范性附录，附录 B、附录 C 和附录 D 均为资料性附录。

本标准由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：山东省医疗器械产品质量检验中心。

本标准主要起草人：秦冬立、黄经春、由少华、吴平。

引 言

最近几年,常有报道胶乳产品由于含有胶乳蛋白质使医护人员和病人产生不良反应,由于化学物质、润滑剂、灭菌残留物(环氧乙烷)、致热物等残留物产生的不良反应也在科学文献中有所描述。其中报道最多的是天然橡胶胶乳手套产生不良反应,但其他聚合物制成的手套也可以引起一些不良反应。

GB/T 16886 标准给出了有关医疗器械生物学评价指南,并包括了特定试验和其他涉及安全性规范的试验方案。

本标准未涉及使用医用手套所产生的全部不良反应(如速发型超敏反应),存在于手套中的特异性过敏原会引发这些不良反应,导致这些反应的因素有:

- a) 长期、高频次佩戴手套;
- b) 皮肤与黏膜直接与过敏原(又称变应原)接触,特别在皮肤与黏膜有损伤的情况下接触过敏原或吸入微粒;
- c) 常年使用手套,手套紧密贴敷皮肤。

本标准给出了用以评价医用手套生物学安全性的试验方法,作为 YY/T 0316 风险管理过程的一部分。

本标准没有规定胶乳蛋白质和化学物质的可接受水平,因为在这一领域有关安全性评价因素(如过敏原的识别、致敏作用阈和过程控制等)尚不十分清楚。随着对其认知的不断提高,预期本标准将会被修订。目前进一步测定和控制这些过敏原的试验方法还处于研究之中。

一次性使用医用手套 生物学评价要求与试验

1 范围

本标准规定了一次性使用医用手套生物学安全性评价的要求,给出了标示和手套包装的要求以及所用试验方法的信息。本标准还包括用于可溶出蛋白质和过敏原测定的免疫学试验方法综述。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分:评价与试验(GB/T 16886.1—2001, ISO 10993-1:1997, IDT)

GB/T 16886.5 医疗器械生物学评价 第5部分:体外细胞毒性试验(GB/T 16886.5—2003, ISO 10993-5:1999, IDT)

GB/T 16886.7 医疗器械生物学评价 第7部分:环氧乙烷灭菌残留量(GB/T 16886.7—2001, ISO 10993-7:1995, IDT)

GB/T 16886.10 医疗器械生物学评价 第10部分:刺激与迟发型超敏反应试验(GB/T 16886.10—2005, ISO 10993-10:2002, IDT)

GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分:样品制备与参照样品种(GB/T 16886.12—2005, ISO 10993-12:2002, IDT)

YY/T 0316 医疗器械 风险管理对医疗器械的应用(YY/T 0316—2003, ISO 14971-1:2000, IDT)

中华人民共和国药典 二部(2005年版)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

化学物质 chemicals

生产过程的任何工序中或贮存期间添加或形成的物质,包括润滑剂、化学涂层和灭菌剂,这些物质可从最终产品中检出。

3.2

内毒素 endotoxins

来源于革兰氏阴性菌细胞膜外层结构的脂多糖。

注:内毒素来源于原材料、生产过程中的工艺用水和手工处置过程中的细菌污染。

3.3

可溶出蛋白质 leachable proteins

从最终产品中溶出的不同分子量的水溶性蛋白质和肽。

注:蛋白质主要来源于天然橡胶胶乳。蛋白质和其他可能添加的蛋白质会在生产过程中发生变性和降解,水中浸提出的蛋白质可引起I型过敏反应。

3.4

热原 pyrogens

使家兔发热的物质,这些物质也能使人体产生发热反应和其他不良反应。

注:内毒素是热原的一种。

3.5

过程限值 process limit

生产过程中可能产生的最高蛋白质含量。

4 要求

4.1 总则

一次性使用医用手套应按 GB/T 16886 进行评价,并应按照 YY/T 0316 进行风险分析。

4.2 可溶出蛋白质

制造商应按 5.1 规定的方法监测含天然橡胶胶乳成品手套中可溶出蛋白质的过程限值。若有要求,应能提供试验结果和所采用的试验方法。

本标准与风险分析相结合,用以确定污染物和残留物所涉及的生物学风险是否可以接受。

4.3 内毒素

如果手套标示“低内毒素含量”,制造商应按 5.2 规定的方法监测无菌手套内毒素污染。有这种标示的手套,每副手套的内毒素含量应不超过 20EU。

4.4 化学物质

手套应不含有或不涂滑石粉(硅酸镁)。若有要求,制造商应说明生产过程中添加或产品中已知存在的化学成分,如促进剂、抗氧化剂和杀菌剂等依据现有文献资料已知对健康有不良影响的物质。

4.5 标示

除了其他相关规定的标示要求之外,初包装上至少还应给出下列内容:

- a) 由天然橡胶胶乳制成的医用手套应有以下文字或等效说明:
“(产品)含有会引起过敏反应的天然橡胶胶乳。”
- b) 有粉手套应有以下文字或等效说明:
“注意:手术前应采用无菌操作法去除表面粉末,以使组织不良反应的风险降至最小。”
注:该注意事项可在内包装物上给出。
- c) 制造商如标示含有蛋白质,应给出按 5.1 规定测定的过程限值;
注 1:不允许标示蛋白质含量低于 50 $\mu\text{g/g}$ 。
注 2:尚未确定对胶乳过敏的人使用这种手套的安全性。
- d) 不应标示“低变应原性”。
注:注意 YY 0466—2003 给出的符号。

5 试验方法

5.1 可溶出蛋白质

测定可溶出蛋白质的方法应采用附录 A 给出的改良 Lowry 法,或经与改良 Lowry 法比对确认过的方法,详见附录 A。

注 1:现有确认过的用于可溶出蛋白质分析的其他方法(如附录 C 给出的确认过的氨基酸分析法),只要能证明这些方法经过确认,并与本标准规定的标准方法有对应关系就允许采用,但这些方法不适合用于常规质量控制。

注 2:蛋白质免疫学测定法还处在发展过程中(参见附录 B)。

5.2 内毒素

除非鲎试剂(LAL)试验中出现无法排除的干扰现象,对方法的选择、确认和使用应符合《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)规定的细菌内毒素检查法或具有相同灵敏度和重现性的 LAL 试

验方法。LAL 试验中如出现无法排除的干扰,不能准确测出细菌内毒素水平,这种情况下可以采用《中国药典》中规定的免热原试验。LAL 试验结果应表示为每副手套含内毒素单位(EU)。

每批产品都应进行试验。推荐的手套最小检验量根据批量确定。批量少于 30 副时,取样量为两副;批量在 30 副~100 副之间时,取样量为 3 副;批量超过 100 副时,取样量为 3%,但最大取样量为 10 副。

每副手套的外表面用 40 mL 无内毒素水(《中国药典》中规定的细菌内毒素检查用水)在 37℃~40℃下浸提 40 min~60 min,浸提过程中要保证手套的整个外表面与浸提介质接触。必要时将浸提液以 2 000g 离心 15 min,以除去微粒。离心后取出浸提液立即进行内毒素试验。

注:其他现有公认的内毒素分析方法,只要经过确认并与本标准所规定的方法具有相关性,也可用来进行常规质量控制。

6 试验报告

试验报告至少应包括下列信息:

- 本标准编号;
- 手套类型和生产批号;
- 制造商或供应商和试验室(如果不同)名称和地址;
- 试验日期;
- 所用试验方法的描述;
- 试验结果。

附录 A

(规范性附录)

用改良 Lowry 分析法测定天然橡胶手套水溶性蛋白质的方法

A.1 范围

本法用于天然橡胶制成的医用手套内水溶性蛋白质总量的测定,本法已经在实验室间进行的比对试验中得到了确认。本法定量测定蛋白质低限值约为每克手套 10 μg (即每毫升浸提液 2 μg 蛋白质)。

像表面活性剂、促进剂和抗氧化剂等在手套生产过程中添加到天然橡胶中的化学物质会对显色过程有干扰作用,有些物质可能会降低显色,而有些物质可能会增强显色。如果在试验中因干扰导致出现误差,则可以采用任何经确认过的氨基酸分析方法(如附录 C 给出的方法)。

注:使用该方法的人员应熟悉实验室一般规程。该方法没有涉及安全问题,如使用方法涉及该类问题,使用者有责任建立相应的安全与卫生规程,并确保与国家规定的要求相一致。

A.2 原理

水溶性蛋白质被浸提到一种缓冲溶液中,然后加入脱氧胆酸钠,用酸使其沉淀、浓缩并将其从水溶性物质(可能对测定有干扰)中分离。沉淀出的蛋白质重新溶解于碱中,并用改良 Lowry 法比色定量。分析的原理是基于蛋白质与铜和 Folin 试剂在碱性介质中反应呈现蓝色的特征,用分光光度计在 600 nm~750 nm 波长范围内测量。

A.3 试剂

A.3.1 总则

试验用水应为二次蒸馏水或相同质量的水,所有试剂应为分析纯。

A.3.2 浸提介质

A.3.2.1 *N*-三(羟甲基)甲基 2-氨基乙烷磺酸(TES),半钠盐(hemisodiumsalt)。

注:英文名称为 *N*-tris-[Hydroxymethyl]-methyl-2-amioethanesulfonic acid(TES)。

A.3.2.2 浸提缓冲液,用水溶解 24 g TES(A.3.2.1)并稀释至 1 L,任何能使手套浸提液的 pH 值保持在 7.4 ± 0.2 的等效的缓冲系统都可以使用。

注:制备足量的手套浸提液(A.3.2)、蛋白质标准液(A.6.3.2)和空白液。

A.3.2.3 染色液,溴酚蓝的钠盐溶液,用水溶解 100 mg 溴酚蓝并稀释至 1 L,保存 4 周。

A.3.3 Lowry 蛋白质分析试剂盒

注:该试剂盒可以采用现用的化学品制备^[19],也可以购买成套试剂。本标准的方法是用成套试剂¹⁾进行确认。

A.3.3.1 试剂 A,铜试剂(碱性酒石酸铜或柠檬酸铜溶液)。

A.3.3.2 试剂 B,稀释的 Folin 试剂。

A.3.4 氢氧化钠溶液, $[c(\text{NaOH})=0.1 \text{ mol/L}]$ 。

A.3.5 脱氧胆酸钠(DOC),用水溶解 0.15 g 脱氧胆酸钠并稀释至 100 mL。溶液制备后保存 4 周。

A.3.6 三氯乙酸(TCA),4.4 mmol/L 水溶液,用水溶解 72 g TCA 并稀释成 100 mL 即得。溶液制备后保存 4 周。

A.3.7 磷钨酸(PTA),用水溶解 72 g PTA 并稀释至 100 mL。溶液制备后保存 4 周。

1) Lowry Micro DC 蛋白质成套分析试剂(分类号为 500-0116)可从 BioRad 实验室购得,地点:2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA9456547, USA。这一信息仅为本标准的使用者提供便利,并不意味着 CEN 对这一产品的认可。

A. 3.8 卵清蛋白,从冻干的鸡蛋²⁾中提取,无盐。

A. 4 仪器

A. 4.1 合成手套,无粉。

A. 4.2 离心机,离心力至少可达到 6 000 *g*。

A. 4.3 离心试管,30 mL 或 50 mL 聚丙烯试管,试管的蛋白质吸附量每管不超过 10 μg ,不要使用玻璃器具,因其表面吸附蛋白质。

注:第 A.5 章给出了一种测定蛋白质吸附量的方法。

A. 4.4 滤膜,一次性使用,孔径为 0.22 μm ,每个滤膜的蛋白质吸附量不超过 10 μg 。

注:第 A.5 章给出了一种测定蛋白质吸附量的方法。

A. 4.5 注射器,一次性使用,20 mL,用聚乙烯或聚丙烯材料制造。

A. 4.6 微型试管,2 mL,用聚丙烯材料制造。

A. 4.7 石英比色池,1 cm。

A. 4.8 酶标板,96 孔,平底,用聚苯乙烯材料制造,或一次性板池(A. 4.9)。

A. 4.9 一次性板池,1.5 mL 半微型,1 cm,用聚苯乙烯材料制造。

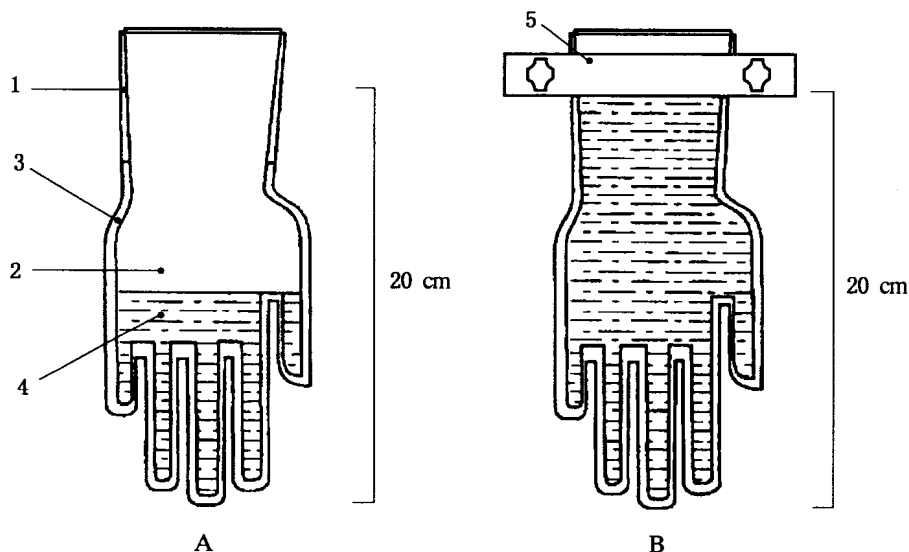
A. 4.10 酶标仪,波长范围 600 nm~750 nm。

A. 4.11 分光光度计,波长范围 230 nm~750 nm。

A. 4.12 涡旋式混合器。

A. 4.13 微量移液器,带有一次性聚丙烯吸头。

A. 4.14 夹具,用于浸提过程中密封手套防止漏水。推荐使用衬有泡沫橡胶可旋紧的铝质夹具(见图 A.1),或 170 mm 长的血液透析塑料夹具。



- 1——外手套;
2——内手套;
3——浸提缓冲液;
4——染色溶液;
5——手套夹具。

图 A.1 手套浸提

2) 该卵清蛋白是用鲜鸡蛋白通过在 pH4.5 下用硫酸铵分馏和反复结晶制得。如 Sigma A5503、鸡蛋白, V 级, 可从 Sigmar Chemical Co. P. O. Box 14506, St Louis, MO63178, USA 购得。这一信息仅为本标准的使用者提供便利, 并不意味着 CEN 对这一产品的认可。

A. 4. 15 振荡器。

A. 5 蛋白质吸附量测定

A. 5. 1 总则

推荐使用一次性聚丙烯器具(聚丙烯被认为具有低蛋白质结合力)。在使用一批新的离心试管或过滤装置以前,应使用下列方法检查其蛋白质结合力。试验应在 1 d 之内进行。

A. 5. 2 离心试管的蛋白质吸附量

A. 5. 2. 1 在离心试管(A. 4. 3)中加 30 mL 含 10 μg/mL 卵清蛋白的标准溶液,标准溶液的配制方法是用浸提缓冲液(A. 3. 2. 2)稀释蛋白质储备液(A. 6. 3. 1)。

A. 5. 2. 2 移取 10 mL 卵清蛋白溶液(A. 5. 2. 1)至新的离心试管中,在振荡器(A. 4. 15)上振荡。确保试管所有表面被溶液浸润,30 min 后再将此管溶液移至另外一个试管中振荡。以此步骤浸润 5 支试管后收集剩余试验液。同法操作平行管。

A. 5. 2. 3 用 A. 6. 4~A. 6. 6 所给方法分别测定标准溶液和两份试验液中蛋白质浓度,各测量三次。

A. 5. 2. 4 按式(A. 1)计算每管卵清蛋白平均吸附量:

$$O = 10(R - T)/5 \dots\dots\dots(A. 1)$$

$$= 2(R - T)$$

式中:

- O——吸附的卵清蛋白量,单位为微克(μg);
- R——标准溶液卵清蛋白含量三次测量的平均值;
- T——试验液卵清蛋白含量的平均值(即六个测量值的平均值)。

每管吸附的卵清蛋白量(O)应小于 10 μg。否则,这些试管不适合用于测量。

A. 5. 3 过滤装置的蛋白吸附量测定

A. 5. 3. 1 在离心试管(A. 4. 3)中加 30 mL 含 10 μg/mL 卵清蛋白的标准溶液,标准溶液的配制方法是用浸提缓冲液(A. 3. 2. 2)稀释蛋白质储备液(A. 6. 3. 1)。

A. 5. 3. 2 准备两叠滤膜(A. 4. 4),每叠五张,每叠过滤 10 mL 标准溶液至一离心试管中(A. 4. 3)。

A. 5. 3. 3 用 A. 6. 4~A. 6. 6 所给方法分别测定标准溶液和两份试验液中蛋白质浓度,各测量三次。

A. 5. 3. 4 按式(A. 2)计算每管卵清蛋白平均吸附量:

$$O = 10(R - T)/5 \dots\dots\dots(A. 2)$$

$$= 2(R - T)$$

式中:

- O——吸附的卵清蛋白量,单位为微克(μg);
- R——标准溶液卵清蛋白含量三次测量的平均值;
- T——试验液卵清蛋白含量的平均值(即六个测量值的平均值)。

每滤膜吸附的卵清蛋白量(O)应小于 10 μg。否则,这些滤膜不适合用于测量。

A. 6 步骤

A. 6. 1 总则

步骤包括了手套浸提,然后以系数 5 对浸提液浓缩,使其纯化。用同法浓缩的蛋白标准液制作校准曲线,依据校准曲线测定浸提液中蛋白质含量。

取两只手套,同时浸提一只的内部和另一只的外部。这可使浸提体积最小至 25 mL,且由于浸提缓冲液只与手套接触,避免了与容器表面接触所引起的蛋白质损失。

注:其他浸提步骤只要参比本方法经过确认也可以使用。在欧洲和美国与所选定的一些实验室中所进行的实验室间的比对试验表明,按 ASTM D 5712 标准把手套剪成碎片再在 pH 值为 7.4 的 TES 缓冲液中 25℃ 下浸提 2 h 的测定结果与本法相当。

A.6.2 浸提步骤

A.6.2.1 戴合成手套(A.4.1)操作手套样品。

取8只同规格、同批手套样品,并分成4对。若手套是分左右手的,则择选4只右手样品、4只左手样品,分成两对右手和两对左手。

先在每对手套中选一只自中指尖向腕部取20 cm处做一标记,称量(m_1),精确到0.1 g。再将另一只手套插入到做了标记的手套内,使其完全吻合,如图A.1所示。

注:将一只手套插入另一只的方法对试验并不十分重要,但其操作要尽可能简化。为此可以先向内手套的拇指和小拇指插入一圆棒帮助将其插入外手套的相应的手指内,同样用圆棒将其他三个指插入。

A.6.2.2 将足量的染色液(A.3.2.3)充满内手套的五个手指内。在内外手套之间注入温度为(25±5)℃的浸提缓冲液(A.3.2.2)。对于规格较大的手套,加入的缓冲液体积可增加至50 mL。排出大多数空气泡,并按图A.1所示用夹具(A.4.14)在20 cm标记处密封,以防止液体漏出。

A.6.2.3 将手套置于振荡器(A.4.15)上于(25±5)℃下振荡(120±5) min。

A.6.2.4 取下夹具,仔细分开手套。注意不要使染色液污染浸提液,如果浸提液呈蓝色,应弃之用新手套重新浸提。

A.6.2.5 将浸提液移入离心试管(A.4.3)中,不低于2 000 g离心15 min,或用一次性使用滤膜(A.4.4)过滤,也可两种方法并用,使之澄清。制得的清澈液可在2℃~8℃下冷藏并在48 h内测定,也可在-18℃以下冷冻,不超过两个月内测定。

A.6.2.6 从浸提过的外手套20 cm标记以上的腕部切下,用吸水纸擦去表面液体,室温下晾干,称量(m_2),精确到0.1 g,按式(A.3)计算该手套浸提部分的质量:

$$m = m_1 - m_2 \quad \dots\dots\dots (A.3)$$

A.6.3 蛋白质标准液

A.6.3.1 蛋白质储备液

将25 mg卵清蛋白溶解于25 mL浸提缓冲液(A.3.2.2),制备标称浓度为1 mg/mL卵清蛋白溶液。用0.22 μm滤膜(A.4.4)过滤,用UV分光光度计在280 nm处用石英池(A.4.7)测定吸光度,计算实际卵清蛋白浓度。吸光度除以0.715³⁾即是实际的浓度值(mg/mL)。该溶液在冷藏条件下可稳定2 d,在-18℃以下冷冻可稳定两个月。解冻需在45℃下加热15 min。

A.6.3.2 蛋白质标准液

用浸提缓冲液(A.3.2.2)稀释储备液制成系列标准液。使溶液浓度约为100 μg/mL、50 μg/mL、20 μg/mL、10 μg/mL、5 μg/mL和2 μg/mL。用浸提缓冲液作空白。这些溶液在冷藏条件下可稳定2 d,在-18℃以下冷冻可稳定两个月。解冻需在45℃下加热15 min。

A.6.4 蛋白质的沉淀与浓缩

A.6.4.1 在(25±5)℃下做平行试验。

A.6.4.2 精确移取空白液、蛋白质标准液(A.6.3.2)和三个手套的浸提液(A.6.2.5)各1 mL至微型试管(A.4.6)中。加0.1 mL DOC(A.3.5),涡旋混合后放置10 min,加0.1 mL TCA(A.3.6)和0.1 mL PTA(A.3.7),涡旋混合后放置30 min。

A.6.4.3 在6 000 g下离心15 min。倒出上清液,并将各试管倒置于吸水纸上5 min。

A.6.4.4 向包括空白在内的各试管中加0.1 mol/L的氢氧化钠溶液(A.3.4)0.2 mL。在涡旋混合器上混合使沉淀出的蛋白质溶解。确保使蛋白质完全溶解成清澈液。有些手套有时需在(5±3)℃下过夜冷藏。如果仍有沉淀物,以0.20 mL为单位,逐步加入标定过的氢氧化钠溶液,最多至总量为1 mL,以后步骤均用0.2 mL的整数倍。沉淀前稀释这种样品浸提液可能是有效的。

3) 假定分子量为43 000 Da, 280 nm和pH7.4下30 745的摩尔消光(molar extinctoin), 1 cm比色池下pH7.4的0.1 mol/L TES缓冲液中1 mg/mL卵清蛋白的消光是0.715。

注：将蛋白质沉淀后再溶解的目的是使蛋白质纯化，排除干扰物。这一过程中难免会有一些量的蛋白质损失。本试验假定蛋白质标准液损失与样品浸提液中损失的百分比相同，但尽管如此，宜使损失为最小，因为过量的损失是不能补偿的。

A. 6.5 显色

A. 6.5.1 本标准所描述的方法是采用市售的用于确认的试剂盒，其他试剂盒或自行制备的试剂可能需要采用不同的体积和培养时间。

A. 6.5.2 向含有再次溶解的蛋白质溶液和空白微型试管中加 0.125 mL 试剂 A(A. 3.3.1)，充分混合。加 1 mL 试剂 B(A. 3.3.2)，加盖。涡旋混合 30 min，使显色完全。这一阶段会产生沉淀，测量吸光度前离心或滤除沉淀物。

A. 6.6 测量

A. 6.6.1 酶标仪

移取一定量的溶液(A. 6.5.2)至酶标板(A. 4.8)的孔中，充满孔，如 500 μ L 孔中注入 490 μ L。在 600 nm~750 nm 规定波长范围内以空白作参比测量吸光度。

注：标准液和手套浸提液在显色稳定后 1 h 内进行分析，这样做的结果具有一致性。

A. 6.6.2 分光光度计

移取溶液(A. 6.5.2)至一次性板池(A. 4.9)，在 600 nm~760 nm 规定波长范围内以空白作参比测量吸光度。

注：标准液和手套浸提液在显色稳定后 1 h 内进行分析。这样做的结果具有一致性。

A. 7 结果表示

A. 7.1 计算

A. 7.1.1 校准曲线法

计算平行测量的平均吸收度。如果个值超出均值的 20%，重新测量。绘制平均吸光度对应于原蛋白质标准液的实际浓度校准曲线，如图 A. 2 所示。在蛋白质标准液含量为 0 μ g/mL ~100 μ g/mL 的范围内校准曲线应为线性。

注：在浓缩过程中损失一部分蛋白质，假定浓缩过程中蛋白质标准液损失与样品浸提液中损失的百分比相同。

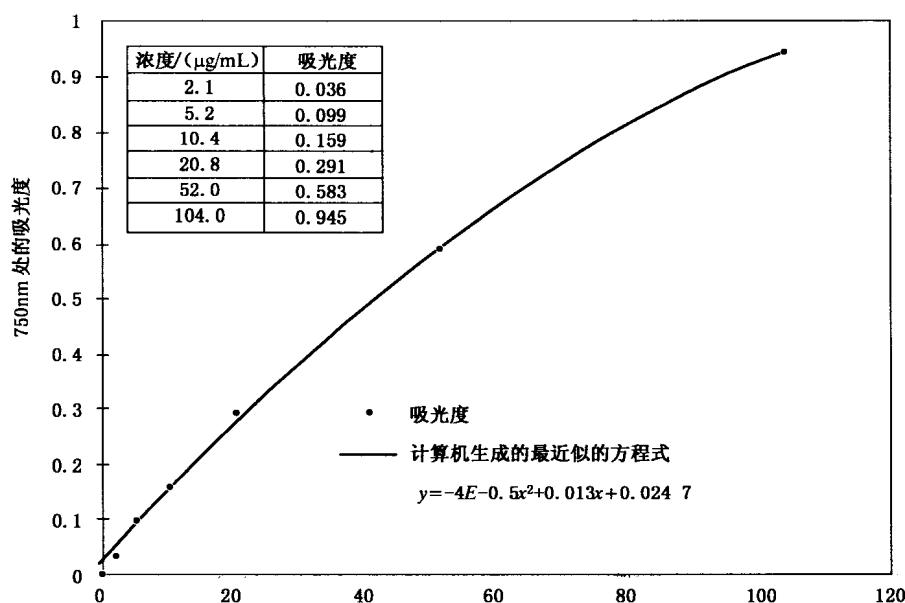


图 A. 2 分光光度计用 1 cm 池在 750 nm 下测得的典型标准曲线

A.7.1.2 浸提液浓缩

分别计算四份浸提液中两次平行测量的平均值(见 A.6.4.1)。如果个值超出均值的 20%，重新测量。从曲线的线性部分直接读出浸提样品中的浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

注：在校准曲线不是线性的情况下，其值可以用回归方程来计算。建议用适用的市售计算机曲线软件计算未知浓度。

A.7.2 结果

每个样品的蛋白质含量用式(A.4)给出：

$$P = VcF/m \quad \dots\dots\dots (A.4)$$

式中：

P ——可提取蛋白质含量,单位为微克每克($\mu\text{g}/\text{g}$)；

V ——所用浸提介质的体积,单位为毫升(mL)；

c ——浸提液的蛋白质浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$)；

F ——稀释系数；

注： F 是再次溶解蛋白质所用的 NaOH 溶液的体积(mL)除以 0.2。

m ——被浸提手套的质量,单位为克(g)。

报告四个手套浸提液测定的平均蛋白质含量。

附录 B

(资料性附录)

医用手套可溶出蛋白质和过敏原的免疫学测定方法

B.1 关于天然橡胶胶乳中有临床意义过敏原的当前认识

免疫介导的对天然橡胶胶乳的超敏性反应(IgE介导的I型超敏反应)是胶乳制品中洗提出的蛋白质和多肽引发的。两维免疫印迹技术已证实,在新鲜采集的天然橡胶胶乳中有多达240种不同的多肽,其中至少有57种由于能结合胶乳过敏症患者血清中IgE抗体而被确认为过敏原^[8]。目前已充分证实,天然橡胶胶乳中的几种蛋白质能与IgE结合,并可以引发胶乳过敏症患者免疫介导的超敏反应^[5,6,7,8,25,26]。最近对其中一部分蛋白质在基本结构水平上进行了定性研究,得出了大部分有意义过敏原的基本结构数据:prohevein 20kDa、hevein C区 14kDa、橡胶伸长系数(REF)14.6kDa、36kDa蛋白质(大概是一种橡胶树endo-1,3-葡糖苷酶),以及从未定性过的、表观分子量约为27kDa和45kDa的天然橡胶胶乳蛋白质^[9,10,11,13]。

当前对不同手套浸提出的特异性过敏原的认知甚少,但越来越多的迹象表明,携带抗原决定簇的小分子量的肽可能起关键作用。有多种因素会明显影响溶出蛋白质的总量和性质,这些因素如原材料的处置、加工过程中添加的化学物质和其他物质、制造过程中加工工艺(如合成、硫化、滤取等)的改变。

在考虑具体的免疫学分析方法时,重要的一点是该方法应能区分开过敏原(能结合IgE)和抗原。以下条文简要介绍了测定天然橡胶胶乳特异性过敏原的文献方法。

B.2 天然橡胶胶乳过敏原的免疫学测定方法

B.2.1 定性/半定量方法

B.2.1.1 免疫印迹技术

一维和两维免疫印迹技术是具有较高价值的方法,已从几方面提供了有关具有临床意义的天然橡胶胶乳过敏原的大量重要信息。然而,从这些研究中获取的手套浸提液方面的结果对于实际分析相关过敏原存在与否(更为重要)的研究并没有太大的帮助。尤其应注意的是,用标准的Western印迹技术可能检测不出小分子量的肽,而这些溶出的小分子量肽大部分都具有过敏原活性。

B.2.1.2 免疫斑点

这是最近建立的一个半定量方法,用于测定IgE结合过敏原^[21,22]。将标本置于硝化纤维纸上,加上胶乳过敏症患者的血清,经放射自显影后可检出与IgE结合的过敏原。这种方法虽然简单,但比较耗时,而且对于低过敏原活性的标本来说不够灵敏。像这种在实验室为每一受检标本制备一个固相过敏原的方法,一般很难达到理想的标准化。

B.2.1.3 火箭免疫电泳(RIE)、火箭放射免疫电泳(RRVE)、双向免疫电泳(CIE)、双向放射免疫电泳(CRIE)

RIE/RRVE是一维电泳,CIE/CRIE是二维电泳,这些方法使用兔抗胶乳抗体使抗原发生沉淀,经蛋白质染色后可识别,过敏原经IgE测定和放射自显影步骤可被检出^[20]。为了获取可靠的结果,试验所用的动物(一般采用兔)的抗血清应含有与全部胶乳过敏原相对应的抗体。这些方法也相当耗时,因此仅推荐用于研究目的。

B.2.2 定量方法

使用标记继发抗体的IgE抗体抑制测定法:在放射性过敏原吸附试验(RAST)抑制测定法中,将过敏原固定在一适宜的固相载体上,用特异性IgE抗体进行识别。在剂量依赖方式下,相同的过敏原或抗原决定簇能抑制参照血清中的IgE抗体的结合。将溶出物系列稀释液测定结果与已知标准品进行比

较,可以对抑制程度进行定量。该测定法的两个重要的先决条件是:固相载体格子内应有全部相关过敏原,且参照血清应含有全部相关特异性 IgE 抗体。RAST 抑制法的一大优点是对过敏原的测定已实现标准化^[24],同时该法灵敏性高,试验所需的设备和必要的专业技能方面的要求在许多进行过敏原试验的专业临床实验室中都是可以达到的。RAST 抑制试验的主要问题是目前 IgE 抗体的来源要依赖于人血清,而且该法也被认为耗时、费用较高。

在标准酶联免疫吸附试验(ELISA)抑制测定中,将天然橡胶胶乳蛋白固定在酶标板孔的表面,方法原理与 RAST 抑制法完全相同,而且 ELISA 抑制测定所用的 IgE 抗体也来源于人血清。与 RAST 法比较,ELISA 法试验费用低廉,但由于过敏原至固相载体的非共价粘附,使得 ELISA 法很难实现精确的标准化。

在天然橡胶胶乳致敏性方面,已有多个研究小组采用 RAST 抑制法测定天然橡胶胶乳制品中的过敏原活性^[27]。到目前尚无关于 RAST 抑制法已由 NRL 刺皮试验(skin prick testing)进行了确认的报道,但从一项尚未公布的 RAST 抑制法中得出的数据已显示了该法与刺皮试验有显著的相关性。目前尚未见有用确认过的 ELISA 抑制法来对橡胶制品可溶出过敏原进行定量的报道数据。但在一项参照上述方法进行的未发表的研究中发现,最近发展的 ELISA 抑制法与刺皮试验和 RAST 抑制法都有显著的相关性。与皮肤试验相同,IgE 抗体抑制试验结果表示了包括各种过敏原的蛋白质(每个浓度是未知的)在内的总含量。

一般来讲,用于测定过敏原的免疫测定法还必须用体内试验来予以证实,以确证所测定出的过敏原也能在体内引发变态性反应。

B.3 未来展望

将来的研究有必要对全部有意义的天然橡胶胶乳过敏原的基本分子结构进行定性分析,并对免疫显性过敏原的抗原决定簇进行测定。在建立可靠的过敏原免疫测定方法并实现标准化之前,这些信息是必需的。在这些研究中,重点应放在对手套浸提出的过敏原分子定性分析方面,实际上目前在这方面知之甚少。有几个实验室正在建立特异性免疫学测定方法,这些方法采用提纯的天然橡胶胶乳过敏原和特异性多克隆或单克隆抗体,以有意义的过敏原决定簇来定性各识别孔。当提纯的天然橡胶胶乳蛋白质和对应的单特异性抗体能够保证其有效性时,这些过敏原特异性测定法在经过适当的确认后,便可作为常规过敏原试验。由于各种过敏原数目估计较多,可能多于 20 个,这样将有必要进行主要过敏原的筛选。将来最终的目标是,在过敏原特异性免疫测定法中不再需要人血清作为参照抗体的来源。

B.4 建议

对于验证和测定手套浸提液中天然橡胶胶乳过敏原的具体方法还有待于进行确认并标准化,这些方法的有效性也需要整理和证实。在过去几年期间,很多事例表明,采用适当标准化并确认过的方法测定可溶出蛋白质的总量是适宜的临时性过渡方法,在大多数情况下,可对天然橡胶胶乳手套的致敏性给出有效的评估^[28]。

附录 C (资料性附录)

高效液相色谱法(HPLC)测定氨基酸(AAA)

C.1 背景

通常蛋白质的测定是基于某些特殊基团的显色反应,这些基团在不同的蛋白质中呈现出不规则分布^[12,17,18,19,23]。因此,不同蛋白质的显色反应有很大差异^[17,19]。此外,有许多物质对显色反应有干扰,其原因是它们与显色剂产生各种反应或阻碍显色。

氨基酸分析可避免上述问题,这一结论已被欧洲委员会“测定与试验”^[28]计划的研究结果所证实。在这项研究中,采用氨基酸分析法测量蛋白质的浓度,临床试验数据(prick test)与化学分析之间呈现出良好的一致性^[16]。

然而,在测定天然橡胶手套中蛋白质含量时,宜采用改良 Lowry 法作为标准方法。因为氨基酸分析法不常用,将其作为标准方法过于复杂,但可用于对改良 Lowry 法的结果进行验证。氨基酸分析法虽然不宜作为蛋白质的标准测定方法,但有助于消除制造商在用标准方法测定蛋白质时导致错误测定的物质。

C.2 高效液相色谱法(HPLC)测定蛋白质的原理

将蛋白质在 6 mol/L 盐酸溶液中水解为游离的氨基酸,然后用高效液相色谱(HPLC)^[14]进行分离并检测。通过一种内标物(正缬氨酸)并累加各种氨基酸来定量测定蛋白质总量。这一方法不受任何有机聚合分子结构的影响,且至今未发现任何干扰物质,同时 TES 盐类的存在还可避免氨基酸的损失(如:屏蔽效应)。

C.3 蛋白质测定具体步骤

C.3.1 水解

取已注入 5 nmol 正缬氨酸的蛋白质样品,其含量在 0.4 μg~10 μg 之间,在一密闭的聚丙烯管中用 6 mol/L 盐酸溶液在 110℃下水解 48 h。宜使用所能得到的最高纯度的盐酸,水解前用氮气流将氧气排出。水解后将试样蒸干(例如使用高速真空浓缩器),然后重新溶解于衍生缓冲液中。

在盐酸水解过程中,各氨基酸的分解速率不同,因此水解必须是在相同条件下同时对每套样品中期望存在的所有氨基酸的等摩尔混合液中进行。

C.3.2 柱前衍生

因未改变的氨基酸具有不同的光学响应,在检测前须将其转化成可检测的衍生物^[14]。推荐使用常用的 *o*-肽二醛(OPA)和 3-巯基丙酸(MPA)柱前衍生法,在高效液相色谱柱中将形成的荧光异构吡啶衍生物分离出来,并通过荧光检测器进行检测。该衍生过程取决于时间和温度,因此宜自动进行(如使用自动制样器)。

C.3.3 高效液相色谱分离

在高效液相色谱分析中推荐使用微机控制的二元高效梯度系统。所有 19 种氨基酸的分离条件取决于反相柱的材料,这种材料的批间差很大,因此最好使用测试过的专用色谱柱。

C.4 计算

通过计算氨基酸与内标物质(正缬氨酸)之比得出氨基酸浓度,用各氨基酸之和求得蛋白质总含量的浓度。有些手套浸提液中游离氨基酸的量较高,因此有必要进行两次高效液相色谱检测。一次用盐

酸水解,另一次不用盐酸水解,水解后的游离氨基酸总量减去未水解的氨基酸总含量,求得胶乳蛋白质的浓度。

聚合蛋白质的水解需要向每一肽键加入一分子的水。假设是等分子分布且列出的氨基酸(表 C. 1)的平均分子量为 147,这就会导致在蛋白质浓度检测时有 12% 的误差。不过,这一误差基本上被色氨酸、胱氨酸和脯氨酸的损失所补偿。使用卵清蛋白的高效液相色谱氨基酸分析法的准确度和精密度见表 C. 2。

表 C. 1 标准溶液[图 C. 1a)]与经水解的手套浸提液[图 C. 1b)]
的液相色谱分析中发现的氨基酸一览表

氨基酸	保留时间/min		注 释
	标准溶液	样品分析溶液	
天门冬氨酸(ASP)	2.52	2.52	
天门冬酰胺(ASN)			转化成 ASP
谷氨酸(GLU)	3.23	3.24	
谷氨酰胺(GLN)			转化成 GLU
丝氨酸(SER)	6.83	6.85	
组氨酸(HIS)	8.50		
甘氨酸(GLY)	9.25	9.25	
苏氨酸(THR)	9.84	9.82	
精氨酸(ARG)	11.24	11.21	
丙氨酸(ALA)	12.30	12.29	
		14.23	TES(浸提缓冲液)
酪氨酸(TYR)	17.7		
缬氨酸(VAL)	20.95	21.07	
甲硫氨酸(MET)	21.75	21.90	
正缬氨酸(NORVAL)	22.42	22.55	内标物
		24.08	TES(浸提缓冲液)
异亮氨酸(ILE)	25.15	25.32	
苯丙氨酸(PHE)	25.48	25.64	
亮氨酸(LEU)	26.61	26.74	
赖氨酸(LYS)	28.41	28.44	
	30.65	30.60	
色氨酸(TRY)			水解消失
胱氨酸,半胱氨酸(CYS)			水解消失
脯氨酸(PRO)			检测不出

表 C.2 280 nm 处(蛋白质最大吸收)改良 Lowry 法与 AAA(HPLC)法
对 pH7.4 的 TES 缓冲液中卵清蛋白的分析结果

蛋白质	含量/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	UV280 nm/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Lowry		HPLC	
			$\mu\text{g}/\text{mL}$	CV(%) ¹⁾	$\mu\text{g}/\text{mL}$	CV(%)
卵清蛋白	10.0	10.0	10.6	8.6	10.1	8.1
卵清蛋白	25.0	25.0	25.8	8.3	25.4	6.3

¹⁾ CV 是连续 20 天测量的变异系数(%)。

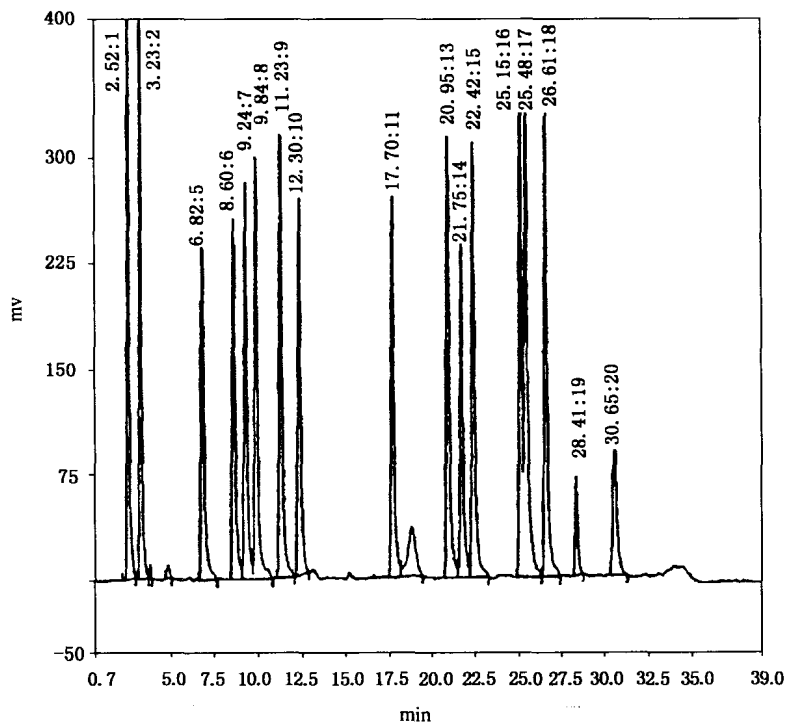
C.5 样品测试

C.5.1 标准溶液[图 C.1a)]

含有 19 种氨基酸的等摩尔浓度标准水解液的典型色谱图如图 C.1a)所示,这些预期出现的氨基酸列于表 C.1 中。完全转化成天门冬氨酸和谷氨酸的天门冬酰胺和谷氨酰胺不包含在该标准溶液中,正缬氨酸(不能自然形成)被用作内标物质。色氨酸和胱氨酸存在于未水解的标准液中,但可被盐酸水解破坏。脯氨酸因缺少初级氨基基团而不会与 OPA/MPA 发生反应,因此在这些衍生过程条件下不能检出。赖氨酸常有双峰出现,因为它的一个或两个氨基基团可能会与 OPA/MPA 反应。这些双峰出现的几率受反应条件(温度和 OPA 溶液的放置时间)的影响而导致各检测之间有所变化,但若用双峰面积就不会影响检测结果。

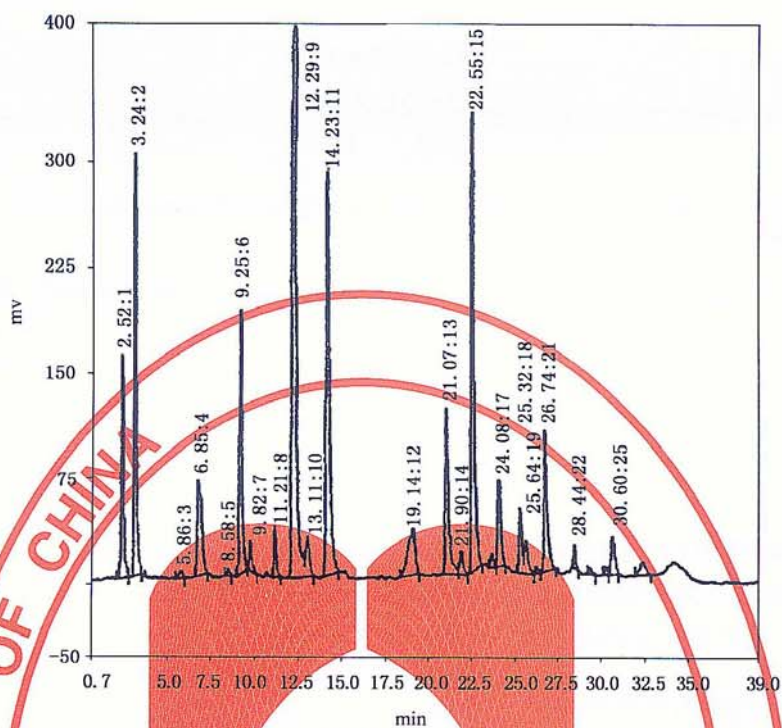
C.5.2 手套浸提液[图 C.1b)]

经水解的手套浸提液(按附录 A 进行制备)的色谱图如图 C.1b)所示。这种胶乳蛋白质水解液的分析结果与表 C.1 中列出的所预期出现的氨基酸完全吻合。在 14.23 min 和 24.08 min 时发现另外两个色谱峰,被鉴定为是 TES 的衍生产物,这两个峰与所有氨基酸的峰都能完全区分开,因此不会影响分析结果。



a) 氨基酸标准

图 C.1 氨基酸标准和手套浸提液分析图谱



b) 手套浸提液

图 C.1(续)

C.6 高效液相色谱分析法的优缺点

C.6.1 优点:

- 1) 不受蛋白质聚合结构的影响;
- 2) 与临床数据(prick test)有良好的—致性;
- 3) 没有干扰物质;
- 4) 较比色法更加灵敏;
- 5) 对蛋白质有针对性。

C.6.2 缺点:

- 1) 不普及,只有少数实验室配备;
- 2) 用时较长;
- 3) 对数据进行评估时需有丰富的经验。

附 录 D
(资料性附录)
术 语

D.1 过敏原 allergen

诱发变态反应的抗原。

D.2 抗体 antigen

接触过具有诱发特异性抗原以后,被激活的 B 细胞和浆细胞所形成的免疫球蛋白。

D.3 抗原 antigen

任何能被带有抗原受体的淋巴细胞所识别的化合物。抗原引起免疫反应或免疫耐受。在 T 细胞的参与下才能引起免疫反应的抗原为 T 依赖性抗原,而不需 T 细胞辅助的抗原为 T 非依赖性抗原。所有免疫原都是抗原,但抗原未必都是免疫原(见免疫原)。

D.4 抗原决定簇 antigenic determinant

抗原决定簇是存在于抗原表面的一个抗原位点(表位)。表位被 T 细胞或 B 细胞上的抗原受体识别(T 细胞表位或 B 细胞表位)。

D.5 超敏反应 hypersensitivity

对刺激物的异常过强的免疫介导反应。

D.6 速发型超敏反应(杰尔-库姆斯 I 型反应) immediate type hypersensitivity

接触抗原后数分钟至数小时内产生的抗体介导的免疫反应,该反应需要有先期的接触。比如,花粉抗原引起的过敏性鼻炎。

D.7 免疫原 immunogen

一种能诱导特异性免疫反应(特异性抗体形成和/或特别是有淋巴细胞参与)的物质。为了诱导抗体反应,免疫原必须具有结构和功能上激活 B 细胞和 T 细胞的决定簇。

D.8 淋巴细胞 lymphocyte

来源于骨髓的细胞,具有较少的细胞质,能够在循环和组织之间迁移和交换,并能与抗原接触的部位滞留,也能在这些部位被抑制,是唯一能对抗原进行特异性识别并产生应答的细胞(主要在辅佐细胞的参与下)。淋巴细胞按其功能和产物分为不同的亚群(如 B 淋巴细胞、辅助性 T 细胞和细胞毒性 T 细胞)。

D.9 致敏作用 sensitization

个体与抗原接触诱发特异性免疫记忆。

参 考 文 献

- [1] YY 0466—2003 医疗器械 用于医疗器械标签、标记和提供信息的符号(ISO 15223:2000, IDT).
- [2] EN 455-1 Medical gloves for single use-Part 1: Requirements and testing for freedom form holes.
- [3] EN 455-2 Medical gloves for single use-Part 2: Requirements and testing for physical properties.
- [4] ATSM D 5712 Standard test method for analysis of protein in natural rubber and its products.
- [5] Akasawa A, Hsieh L-S, Lin Y, Serum reactivities to latex proteins (*Hevea brasiliensis*) . J Allergy Clin Immunol 1995;95:1196-1205.
- [6] Alenius H, Palosuo T, Kelly K, et al. IgE reactivity to 14-kD and 27-kD natural rubber proteins in latex-allergic children with spina bifida and other congenital anomalies. Int Arch Allergy Immunol 1993;102:61-66.
- [7] Alenius H, Turjanmaa K, Mäkinen-Kiljunen S, Reunala T, Palosuo T, IgE immune response to rubber proteins in adult patients with latex allergy. J Allergy Clin Immunol 1994; 93:859-863.
- [8] Alenius H, Kurup V, Kelly K, Palosuo T, Turjanmaa K, Fink J, Latex allergy: Frequent occurrence of IgE antibodies to a cluster of 11 latex proteins in patients with spina bifida and histories of anaphylaxis. J Lab Clin Med 1994;123:712-720.
- [9] Alenius H, Kalkinen N, Lukka M, et al. Purification and partial amino acid sequencing of a 27-kD natural rubber allergen recognized by latex allergic children with spina bifida. Int Arch Allergy Immunol 1995;106:258-262.
- [10] Alenius H, Kalkinen N, Lukka M, Reunala T, Turjanmaa K, Mäkinen-Kiljunen S, Yip E, Palosuo T, Prohevein from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major latex allergen. Clin Exp Allergy 1995;24:659-661.
- [11] Beezold D, Sussmann G, Kostyal D, Chang N-S, Identification of a 45-kD latex protein allergen in health care workers. Clin Exp Immunol 1994;98:408-413.
- [12] Bradford M, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-255.
- [13] Czuppon AB, Chen Z, Rennert S, et al. The rubber elongating factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) is the major allergen in latex. J Allergy Clin Immunol 1993;92:690-670.
- [14] Graser TA, Godel HG, Albers S, Foldi P, Furst P, An ultra rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for determination of tissue and plasma free amino acids. Anal Biochem 1985;151:142-152.
- [15] Kidwai SA, Ansari AA, Salahuddin, Effect of succinylation (3- carboxypropionylation) on the conformation and immunological activity of ovalbumin. Biochem J 1976; 155: 171-180.
- [16] Koch HU, Regulatory aspects of latex allergy (CEN: extractable protein and allergen assay for latex gloves) . Rev Fr Allergol 1997;37:1201-1210.
- [17] Langheinrich U, Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen Teil 1; Chemie in

- Labor und Biotechnik 1995;46:82-85.
- [18] Langheinrich U, Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen Teil 2: Chemie in Labor und Biotechnik 1995;46:135-136.
- [19] Lowry OH, Rosebrough, NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein measurement with Folin Phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-275.
- [20] Mäkinen-Kiljunen S, Turjanmaa K, Palosuo T, Reunala T, Characterization of latex antigens and allergens in surgical gloves and natural rubber by immunoelectrophoretic methods. J Allergy Clin Immunol 1992;90:230-235.
- [21] Mäkinen-Kiljunen S, Detection and characterization of atopic allergens. Ann Med 1994; 26:283-288.
- [22] Mäkinen-Kiljunen S. Banana allergy in patients with immediate type hypersensitivity to natural rubber latex. Characterization of cross-reacting antibodies and allergens. J Allergy Clin Immunol 1994;93:990-996.
- [23] Petersen GL, Determination of total protein. In Methods of Ezymology, Academic Press, Inc. , New York 91,95-118.
- [24] Schröder H, Yinan L, Standardization of the RAST inhibition assay. Allergy 1980;35: 234-236.
- [25] Slater JE, Chhabra SK, Latex antigens, J Allergy Clin Immunol 1992;89:673-678.
- [26] Slater JE, Trybul DE, Affinity purification of latex antigens. J Allergy Clin Immunol 1994;93:644.
- [27] Yunginger JW, Jones RT, Fransway AF, Kelso JM, Warner MA, Hunt LW, Extractable latex allergens and proteins in disposable medical gloves and other rubber products. J Allergy Clin Immunol 1994;93:836-842.
- [28] MATI-CT 940060 European Commission Study-Determination of allergological relevant compounds in disposable gloves-Correlation of chemical allergological and immunological data.
-

中华人民共和国医药
行业标准
一次性使用医用手套
生物学评价要求与试验
YY/T 0616—2007

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

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 1.5 字数 39 千字
2007年12月第一版 2007年12月第一次印刷

*

书号: 155066·2-18317 定价 20.00 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)68533533



YY/T 0616-2007