



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1532—2017

医疗器械生物学评价 纳米材料 溶血试验

Biological evaluation of medical devices—Nanomaterials—Hemolysis test

2017-03-28 发布

2018-04-01 实施

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。

本标准由中国食品药品检定研究院归口。

本标准起草单位：中国食品药品检定研究院、国家食品药品监督管理局广州医疗器械质量监督检验中心。

本标准主要起草人：邵安良、徐丽明、杨立峰、柯军、郭欢、杨文润、许建霞。

医疗器械生物学评价 纳米材料 溶血试验

1 范围

本标准规定了直接/间接与血液接触的纳米材料及组合在医疗器械中纳米材料的溶血性能试验方法。

本标准适用于直接/间接与血液接触的纳米材料及组合在医疗器械中游离或释放的纳米材料的溶血性能评价。

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/T 16886.1 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 16886.1—2011,ISO 10993-1:2009,IDT)

GB/T 16886.4 医疗器械生物学评价 第4部分:与血液相互作用试验选择(GB/T 16886.4—2003,ISO 10993-4:2002,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(GB/T 16886.12—2005,ISO 10993-12:2002,IDT)

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

GB/T 16886.1、GB/T 16886.4 中界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

高铁血红蛋白 methemoglobin
铁原子已被氧化成高铁离子的血红蛋白。

3.1.2

氰化高铁血红蛋白 cyanmethemoglobin
铁原子被氧化成高铁离子,高铁离子已同氰离子相结合的血红蛋白。

3.1.3

总血红蛋白 total blood hemoglobin
正常存在于人循环血液中的所有血红蛋白衍生物,包括脱氧血红蛋白、氧合血红蛋白、硫化血红蛋白、碳氧血红蛋白和高铁血红蛋白。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。
Cal:校准标准品(Calibration standard)
CMH:氰化高铁血红蛋白(Cyanmethemoglobin)
DPBS:不含钙镁的杜氏磷酸盐缓冲液(Dulbercco's Phosphate Buffered Saline)

YY/T 1532—2017

PEG:聚乙二醇(Polyethylene Glycol)
PFH:血浆游离血红蛋白(Plasma Free Hemoglobin)
QC:质量控制品(Quality Controls)
TBH:总血红蛋白(Total Blood Hemoglobin)
TBHd:稀释到 (10 ± 1) mg/mL 的血红蛋白浓度[Blood sample diluted to (10 ± 1) mg/mL]

4 总则

4.1 本方法描述了直接/间接与血液接触的纳米材料及组合在医疗器械中游离或释放的纳米材料引起的急性体外红细胞破坏(即溶血)的试验方案。本方法的原理是除硫化血红蛋白外,血红蛋白及其衍生物在碱性条件下可被高铁氰化钾氧化成高铁血红蛋白,高铁血红蛋白与氰化钾反应生成 CMH,采用微孔板分光光度计(或酶标仪)在 540 nm 波长处读数测定 CMH 吸光度值。结果用纳米材料与血液接触后释放到血浆中的 PFH 占 TBH 的百分比来表示。

4.2 试验样品可选用纳米材料或组合有纳米材料的复合产品的浸提液。在试验前宜先对样品进行充分的物理、化学表征,以便合理地解释生物学反应。例如颗粒的大小、比表面积和化学特性等会引起不同的试验结果。每次试验应包括阳性对照和阴性对照。

5 试剂、耗材及设备

5.1 试剂

血红蛋白氧化剂(CMH 试剂)、Cal、DPBS、PEG、TRITON X-100。

5.2 耗材

96 孔板、试管、枪头。

5.3 设备

微孔板分光光度计(或酶标仪)、离心机、恒温水浴槽、加样器。

6 样品制备

6.1 纳米材料

将纳米材料样品直接稀释于 DPBS 中,制备不同浓度的稀释液,至少 4 个浓度。
注 1: 所选择浓度宜包括溶血率为 5%时的浓度。
注 2: 若已知纳米材料的最终应用浓度,宜以 9 倍该浓度作为供试品。

6.2 复合产品中的纳米材料

按照 GB/T 16886.12 规定的浸提比例制备供试品。
注: 必要时宜对供试品中的纳米材料进行表征,如纳米颗粒的浓度、粒径大小等。

7 Cal、QC、对照及血液样品的制备

7.1 Cal 的制备

以 Cal 作为贮备液,然后采用 CMH 试剂作为介质,进行 1:2 倍稀释得到系列校准标准品,标准曲

线的吸光度值应包括样品和对照品的吸光度值(示例参见附录 A)。

7.2 QC 的制备

QC 的配制参见校准标准品,包括高、中、低 3 个浓度,这 3 个浓度应在校准标准品范围内,且与校准标准品的系列浓度不重复(示例参见附录 A)。

7.3 阳性对照的制备

配制 10% TRITON X-100 水溶液作为阳性对照。

注:也可选用 1% 多聚-L-赖氨酸氢溴酸盐水溶液,但宜经验证。

7.4 阴性对照的制备

配制 40% PEG(平均分子质量为 8 000 g/mol)贮存原液作为阴性对照,储存在 $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

7.5 血液样品的制备

收集成年健康家兔的新鲜抗凝全血 5 mL(采用 3.8% 柠檬酸三钠溶液 1:9 稀释)于试管中,取其中 2 mL~3 mL 血液,800 g 离心 15 min,收集上清液,室温放置。

8 血液样本合格判定——血液样本中 PFH 和 TBH 的测定

8.1 向 96 孔板每孔加入 200 μL 空白 CMH 试剂、Cal、QC。加样模板可参见附录 B、附录 C。

8.2 TBH 样本加样:将 20 μL 全血与 5 mL CMH 试剂混合 15 min,向 96 孔板中每孔加入 200 μL ,共 6 孔。

8.3 PFH 样本加样:向每孔加入 6.5 中制备的 100 μL 血浆,共 6 孔,再加入 100 μL CMH 试剂。

8.4 将 96 孔板密封后,置于平板振荡器上轻轻振荡 1 min~2 min(中速,可设定为 2 档~3 档,如 250 次/min)。

8.5 于 540 nm 波长处读取各孔吸光度值,然后根据标准曲线回归方程[见式(1)]计算得到 PFH 和 TBH 的浓度。PFH 样本的最终浓度要乘以稀释因子 2;TBH 样本的最终浓度要乘以稀释因子 251。若 PFH 浓度低于 1 mg/mL,继续下一个试验步骤;若高于 1 mg/mL,则当前血液样本不适合检测,需重新采血。

9 试验材料与血液的接触方式

9.1 采用 DPBS 稀释全血,将 8.5 中 TBH 浓度调整至 $10\text{ mg/mL} \pm 1\text{ mg/mL}$ 。

9.2 纳米材料:取 100 μL 试验样品(见 6.1)至试管中。每一试验样品制备 6 管,其中 3 管用于空白对照。向每管中加入 700 μL DPBS。

9.3 复合产品中的纳米材料:取 800 μL 试验样品(见 6.2)至试管中。每一试验样品制备 6 管,其中 3 管用于空白对照。

9.4 对照样品:取 100 μL 阳性对照(见 7.3)和阴性对照(见 7.4)至试管中。每一样品制备各 2 管。向每管中加入 700 μL DPBS。

9.5 向试验样品组的空白对照 3 管内加入 100 μL DPBS,作为“阴性血样”对照,用于评价纳米材料对方法的潜在干扰;其余每管中加入 100 μL 步骤 9.1 中制备的稀释全血。

9.6 盖紧试管,轻轻转动混合。每隔 30 min 观察试验样品在试验过程中是否有絮结、分散、下沉或悬浮。

注:涡旋可能会破坏红细胞,宜尽量避免。

YY/T 1532—2017

9.7 将试管置于 37 ℃±1 ℃水浴箱中孵育 3 h±15 min,每 30 min 转动以混合样品。或者将试管放入带试管转动器的孵箱内 37 ℃±1 ℃孵育。

注：颠倒混合样品使试管底部沉淀的所有红细胞悬浮于溶液中,宜避免剧烈震荡。

9.8 从水浴箱或孵箱中取出试管。若采用水浴,则用吸水纸拭干试管。

9.9 将试管 800 g 离心 15 min,取上清备用。

注 1：离心结束后,检查试管并记录上清的任何异常现象和(或)颗粒物沉淀。异常现象意味着红细胞或血红蛋白额外破坏或颗粒吸附血红蛋白。有颗粒物沉淀时宜对其进一步表征,了解蛋白质吸附情况,以便讨论对检测结果的影响。

注 2：由于某些纳米材料在 540 nm 波长处有吸收,建议将含纳米材料的溶液在 540 nm 波长处进行预试验,若有明显吸收,可采用高速离心法使颗粒形成球状以去除干扰(将上清转移至新试管中,40 000 r/min 离心 30 min);若离心法不适宜,颗粒与血液共同孵育后测得的结果通过扣除相同颗粒“阴性血样”对照来进行校正。

10 溶血的测定

10.1 按照 7.1 和 7.2 新鲜制备系列 Cal 和 QC。

10.2 向新 96 孔板中加入 200 μL 空白 CMH 试剂、Cal、QC 及 9.1 中制备的 400 μL 全血与 5 mL CMH 试剂混合 15 min 后的 TBH。加样模板可参照附录 C。

10.3 每孔加入 9.9 制备的试验样品、阳性和阴性对照各 100 μL,每一试验样品 6 孔(共 3 个平行样),每一试验样品的空白对照 6 孔(共 3 个平行样),对照品 4 孔(阳性和阴性对照各 2 个平行样,每个 2 孔)。

10.4 试验样品组和对照组每孔加入 100 μL CMH 试剂,Cal、QC 及 TBHd 不加 CMH 试剂。

10.5 将 96 孔板密封后,置于平板振荡器上轻轻振荡 1 min~2 min(中速,可设定为 2~3 档,如 250 次/min)。

10.6 在 540 nm 波长处读取各孔吸光度值,然后根据标准曲线方程[见式(1)]计算得到所有样品的血红蛋白浓度。

11 结果计算

11.1 利用吸光度值为纵坐标(Y),Cal 浓度(mg/mL)为横坐标(X),绘制标准曲线,获得回归方程,见式(1):

$$Y = aX + b \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

Y ——吸光度值;

a ——常数;

X ——Cal 浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

b ——常数。

11.2 根据式(1),由 Cal 和 QC 的吸光度值(Y),得到 Cal 和 QC 的实际浓度(mg/mL),然后根据式(2)计算理论偏差。

$$PDFT(\%) = \frac{A - B}{B} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

PDFT ——理论偏差;

A ——实际浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

B ——理论浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL)。

11.3 根据式(1),由试验样品和 TBHd 的吸光度值 Y,得到其血红蛋白浓度(mg/mL)。试验样品及对

照品的最终 PFH 浓度要乘以稀释因子 18,TBHd 要乘以稀释因子 13.5。根据式(3)计算样品的溶血百分率。

$$HR = \frac{PFH_{sample}}{TBHd} \times 100\%$$

.....(3)

式中：

- HR
- 溶血百分率；
- PFH_{sample}
- 样品 PFH 浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL)；
- TBHd
- 稀释到(10±1)mg/mL 的血红蛋白浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL)。

12 接受准则

- 12.1
- 除最低浓度的 Cal 外,每一 Cal 的 PDFT 应在 20%之内,最低浓度 Cal 的 PDFT 在 30%之内可接受。QC 的 CV 应在 20%之内。若 3 个 QC 中有 2 个或每一个 QC 的至少一个平行孔的 PDFT 在 20%之内,则试验体系可接受,否则需重新试验。
- 12.2
- 每一阳性对照、阴性对照及试验样品的 CV 应在 20%之内。
- 12.3
- 若阳性对照与阴性对照的 2 个平行样不能满足 11.2 中的可接受标准,需重复试验。
- 12.4
- 在试验成立的前提下,若试验样品 3 个平行样中有 2 个不能满足 11.2 中的可接受标准,则该试验样品需重新分析。

13 结果分析

当试验样品的溶血百分率>5%时,表明试验材料会引起红细胞的破坏。对于纳米材料溶液,需计算试验样品引起溶血百分率为 5%时对应的浓度。

附 录 A
(资料性附录)
Cal 与 QC 的制备示例

Cal 与 QC 的制备见表 A.1、表 A.2。

表 A.1 Cal 的制备

Cal	浓度 mg/mL	制备方法
Cal ₁	0.8	2 mL 贮备液
Cal ₂	0.4	1 mL Cal ₁ + 1 mL CMH 试剂
Cal ₃	0.2	1 mL Cal ₂ + 1 mL CMH 试剂
Cal ₄	0.1	1 mL Cal ₃ + 1 mL CMH 试剂
Cal ₅	0.05	1 mL Cal ₄ + 1 mL CMH 试剂
Cal ₆	0.025	1 mL Cal ₅ + 1 mL CMH 试剂

表 A.2 QC 的制备

QC	浓度 mg/mL	制备方法
QC ₁	0.625	1.5 mL 贮备原液 + 0.42 mL CMH 试剂
QC ₂	0.125	200 μL QC ₁ + 800 μL CMH 试剂
QC ₃	0.0625	100 μL QC ₁ + 900 μL CMH 试剂

附 录 B
(资料性附录)
96 孔板加样模板示例 1

Blank	Cal ₁	Cal ₂	Cal ₃	Cal ₄	Cal ₅	Cal ₆	QC ₁	QC ₂	QC ₃	PFH	PFH
Blank	Cal ₁	Cal ₂	Cal ₃	Cal ₄	Cal ₅	Cal ₆	QC ₁	QC ₂	QC ₃	PFH	PFH
PFH	TBH	TBH	TBH	Blank	QC ₁	QC ₂	QC ₃				
PFH	TBH	TBH	TBH	Blank	QC ₁	QC ₂	QC ₃				

附 录 C
(资料性附录)
96 孔板加样模板示例 2

Blank	Cal ₁	Cal ₂	Cal ₃	Cal ₄	Cal ₅	Cal ₆	QC ₁	QC ₂	QC ₃	TS ₁	TS ₁
Blank	Cal ₁	Cal ₂	Cal ₃	Cal ₄	Cal ₅	Cal ₆	QC ₁	QC ₂	QC ₃	TS ₁	TS ₁
TS ₁	TS ₂	TS ₂	TS ₂	TS ₃	TS ₃	TS ₃	TS ₄	TS ₄	TS ₄	TS ₁ (no blood)	TS ₁ (no blood)
TS ₁	TS ₂	TS ₂	TS ₂	TS ₃	TS ₃	TS ₃	TS ₄	TS ₄	TS ₄	TS ₁ (no blood)	TS ₁ (no blood)
TS ₁ (no blood)	TS ₂ (no blood)	TS ₂ (no blood)	TS ₂ (no blood)	TS ₃ (no blood)	TS ₃ (no blood)	TS ₃ (no blood)	TS ₄ (no blood)	TS ₄ (no blood)	TS ₄ (no blood)	PC	PC
TS ₁ (no blood)	TS ₂ (no blood)	TS ₂ (no blood)	TS ₂ (no blood)	TS ₃ (no blood)	TS ₃ (no blood)	TS ₃ (no blood)	TS ₄ (no blood)	TS ₄ (no blood)	TS ₄ (no blood)	PC	PC
NC	NC	TBHd	TBHd	TBHd	Blank	QC ₁	QC ₂	QC ₃			
NC	NC	TBHd	TBHd	TBHd	Blank	QC ₁	QC ₂	QC ₃			

参 考 文 献

- [1] ASTM E 2524-08 Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles
 - [2] ASTM F 748 Practice for Selecting Generic Biological Test Methods for Materials and Devices
 - [3] ASTM F 756 Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials
 - [4] ASTM F 1877 Practice for Characterization of Particles
 - [5] ASTM F 1903 Practice for Testing for Biological Responses to Particles in vitro
 - [6] NCL Method ITA-1 Analysis of Hemolysis Properties of Nanoparticles
-

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
医疗器械生物学评价 纳米材料 溶血试验
YY/T 1532—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

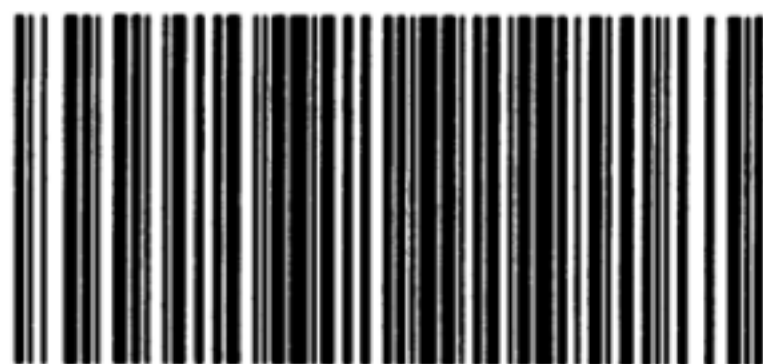
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 20 千字
2017 年 10 月第一版 2017 年 10 月第一次印刷

*

书号: 155066·2-32095 定价 24.00 元



YY/T 1532-2017