



1512

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1651.1—2019

医疗器械溶血试验 第1部分:材料介导 的溶血试验

Tests for hemolysis of medical devices—Part 1: Material induced
hemolysis assay

2019-05-31 发布

2020-06-01 实施



国家药品监督管理局 发布

前 言

YY/T 1651《医疗器械溶血试验》，分为以下部分：

- 第1部分：材料介导的溶血试验；
- 第2部分：机械力介导的溶血试验。

本部分为 YY/T 1651 的第1部分。

本部分按照 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。

本部分由国家药品监督管理局提出。

本部分由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会(SAC/TC 248)归口。

本部分起草单位：山东省医疗器械产品质量检验中心、深圳市医疗器械检测中心、中国医学科学院输血研究所、上海松力生物技术有限公司。

本部分主要起草人：赵增琳、侯丽、曹苹、钟锐、李芳娜。

引 言

医疗器械/材料的溶血作用是指医疗器械/材料或其可溶出物导致的红细胞膜破坏,血浆中游离血红蛋白增加,从而产生的毒性生物学作用。医疗器械/材料的溶血作用一般分为材料介导的溶血和机械力介导的溶血两大类。其中,材料介导的溶血试验可分为直接接触法和间接接触法。直接接触法指的是医疗器械/材料表面由于物理和化学因素与红细胞直接接触而导致的溶血,间接接触法是指医疗器械/材料中可溶出物与红细胞接触导致的溶血作用。机械力介导的溶血是指流体动力学因素诸如血液流速、涡流,以及非生理性的剪切力导致的红细胞膜扭曲和破裂。

GB/T 16886.4 中给出了医疗器械/材料血液相容性的试验原则以及试验的选择策略,但标准中未给出具体的试验操作方法。本部分规定的吸光度测定溶血法和血红蛋白浓度测定溶血法。分别包含直接接触溶血和间接接触溶血的测定,是对 GB/T 16886.4 的补充。使用者宜根据器械预期使用选择适宜的溶血评价方法。

医疗器械溶血试验 第1部分:材料介导的溶血试验

1 范围

YY/T 1651的本部分规定了吸光度测定溶血法和血红蛋白浓度测定溶血法。本部分适用于医疗器械/材料介导的溶血作用的评价。

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/T 16886.2 医疗器械生物学评价 第2部分:动物福利要求(GB/T 16886.2—2011, ISO 10993-2:2006, 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:样品制备与参照材料(GB/T 16886.12—2017, ISO 10993-12:2012, IDT)

3 术语和定义

GB/T 16886.2、GB/T 16886.4、GB/T 16886.12界定的术语和定义适用于本文件。

4 血液制备

本实验选择动物为健康成年家兔,常用品系为新西兰白兔,雌雄不限。应符合GB/T 16886.2的要求。

分别从3只家兔中各抽取约5 mL血液,收集在抗凝管中并混合在一起。使用前在 $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下保存,推荐使用4 h内新鲜采集的血液。宜在48 h内用完。

注:根据实际需要可选择人血进行试验。人血要在符合有关健康、安全以及伦理相关强制性要求的前提下满足相应的合格准则。

5 吸光度测定溶血法

5.1 试验原理

将试验样品或其浸提液与新鲜抗凝血液接触后,若发生溶血反应,则红细胞中的血红蛋白释放入血液中,离心后测定上清液的吸光度值,同时测定阴性和阳性对照吸光度值。通过将试验样品减去阴性对照与阳性对照减去阴性对照的比值来计算试验样品的溶血率,用于评价试验样品的溶血作用。

5.2 试验仪器和试剂

5.2.1 试验仪器

分光光度计、恒温水浴锅、离心机等。

5.2.2 试剂及耗材

0.9%氯化钠注射液(SC)、蒸馏水、离心管、枸橼酸钠(0.109 mol/L/3.2%)抗凝采血管,如选用其他抗凝采血管,宜论证其适用性。

5.3 稀释血液制备

将 8 mL 抗凝血加入到含 10 mL SC 的容器中,轻轻摇晃混匀制备稀释血液。

5.4 样品制备

5.4.1 直接接触法

应根据 GB/T 16886.12 的原则制备试验样品,取适量的试验样品放入试管中,加入适量的 SC 完全浸没试验样品。

注:可以使用其他比例,只要能模拟临床应用条件或测定潜在危害即可。

5.4.2 间接接触法

应根据 GB/T 16886.12 的原则,选择适宜的样品浸提比例和浸提条件制备浸提液。

注:如采用模拟临床使用的条件,则宜对潜在危害进行识别并论证其适宜性。

5.5 试验方法

5.5.1 直接接触法是将适量的试验样品分别加 10 mL SC 备用。平行制备 3 管。

5.5.2 间接接触法是将浸提液充分混匀并转移 10 mL 浸提液至对应新的试管中备用。平行制备 3 管。

注:若试验样品的本底颜色影响试验结果,则应同时设试验样品本底颜色对照组,试验样品组的实际吸光度值为吸光度测得值减去本底吸光度值。

5.5.3 阴性对照组每管加入 10 mL SC;阳性对照组每管加入 10 mL 蒸馏水。平行制备 3 管。同时制备 1 管空白管,加入 10 mL SC。

5.5.4 将全部试管放入恒温水浴中(37±1)℃孵育 30 min 后,按 0.2 mL 稀释血液/10 mL SC 的比例,在每个试管中(除空白管外)加入稀释血液,轻轻混匀。所有试验管置于(37±1)℃水浴中继续孵育(60±5)min。

注:每 30 min 轻轻上下颠倒试管 2 次,使血液与材料或浸提液完全接触。

5.5.5 孵育后轻轻混匀试管,将各管溶液转移至另一相应标记的离心管中,800 g 离心 5 min。吸取上清液移入比色皿内,用空白管溶液调零,在分光光度计 545 nm 波长处测定吸光度。

5.6 结果计算

试验组和对照组均取 3 支试管的吸光度平均值。按式(1)计算溶血率(HI)。

$$HI = \frac{A - B}{C - B} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

A —— 试验组吸光度;

B —— 阴性对照组吸光度;

C —— 阳性对照组吸光度。

5.7 结果判定

阴性对照组的吸光度应不大于 0.03, 阳性对照组的吸光度应为 0.9 ± 0.2 。否则应重新试验。溶血率的测定结果大于 5% 表明试验样品具有溶血作用。

6 血红蛋白浓度测定溶血法

6.1 试验原理

当医疗器械/材料或其浸提液与血液接触后, 医疗器械/材料本身或其可溶出物可能导致红细胞膜破坏, 血红蛋白释放, 从而使游离血浆血红蛋白增加。通过测定游离血红蛋白含量与总血红蛋白含量来计算溶血率, 从而评价医疗器械/材料介导的溶血作用。

6.2 试验仪器和试剂

6.2.1 试验仪器

分光光度计、恒温水浴锅、离心机等。

6.2.2 试剂

不含钙镁离子的磷酸盐缓冲溶液 (CMF-PBS) 或 0.9% 氯化钠注射液 (SC)、血红蛋白标准品¹⁾、文齐氏液²⁾、枸橼酸钠抗凝采血管 (0.109 mol/L), 如选用其他抗凝采血管, 宜论证其适用性。

6.3 试验对照材料

6.3.1 阴性对照材料

选取适宜的阴性对照材料 (如聚乙烯)。阴性对照应不产生或产生较小的溶血作用。与空白对照相比, 阴性对照的溶血率应小于 2%。

6.3.2 阳性对照材料

选取适宜的阳性对照材料 (如丁腈手套)。阳性对照应能够产生稳定的溶血作用。与空白对照相比, 阳性对照的溶血率应大于 5%。

6.4 试验前准备

6.4.1 血红蛋白 (Hb) 标准曲线的制作

将 Hb 标准品用文齐氏液在 0.03 mg/mL ~ 0.70 mg/mL 范围内至少稀释成六个系列浓度 (平行 3 管), 每次试验前新鲜配制标准品稀释液。用文齐氏液调零, 540 nm 测定吸光度, 以 Hb 标准品浓度为 Y 轴, 540 nm 处吸光度 (A_{540}) 为 X 轴, 绘制标准曲线。曲线的斜率记为校准系数 (F), Y 轴截距应接近 0 点。

- 1) 宜采用符合国际血液学标准化委员会 (International Committee of Standardization in Hematology) 规范的血红蛋白标准品。
- 2) 文齐氏液中的氰化钾为剧毒物质, 实验室应具有相应的生物安全防护和处理措施。可选用都氏试剂代替文齐氏液, 推荐的反应时间为 15 min。

6.4.2 血浆游离血红蛋白(PFH)测定

取 3 mL 新鲜制备的抗凝兔血放置离心管中,700 g~800 g 离心 15 min。取 1 mL 血浆加入到含有 1 mL 文齐氏液的离心管中(稀释因子,DF=2),混匀,避光放置 5 min。用文齐氏液调零,在 540 nm 波长处测定吸光度(A^{PFH})。计算血浆游离血红蛋白浓度(C^{PFH})。

注:若血浆游离血红蛋白浓度超过 2 mg/mL,则应重新采集血液进行试验。

6.4.3 全血血红蛋白(C)测定

取 2 支试管,分别加入 20 μ L 新鲜抗凝兔血,再加入 5 mL 文齐氏液,室温避光放置 5 min,用文齐氏液调零,在 540 nm 波长处测定吸光度值 A^c 。计算全血血红蛋白浓度(C)。

6.4.4 稀释的全血血红蛋白浓度(T)和吸光度(A^T)测定

用 CMF-PBS 或 SC 将 C 调整为(10 \pm 1)mg/mL。取 3 支试管,将稀释的全血 300 μ L 加入 4.5 mL 文齐氏液中(DF=16),室温避光放置 5 min。用文齐氏液调零,在 540 nm 波长处测定吸光度(A^T)和稀释的全血血红蛋白浓度(T)。

注:若 3 管全血血红蛋白平均浓度(T_{avg})不在(10 \pm 1)mg/mL 内,则宜通过稀释获得合适的浓度范围,重新进行上述过程,使 T 在(10 \pm 1)mg/mL 内。

6.5 样品制备

6.5.1 直接接触法

应根据 GB/T 16886.12 的原则,取适量的试验样品放入试管中,加入适量的 CMF-PBS 或 SC 完全浸没试验样品。对照材料组和空白对照组同法处理。每组平行制备 3 管。

注:可以使用其他比例,只要能模拟临床应用条件或测定潜在危害即可。

6.5.2 间接接触法

应根据 GB/T 16886.12 的原则,取适量的试验样品放入试管中,加入适量的 CMF-PBS 或 SC 完全浸没试验样品,选择合适的温度和时间制备浸提液。对照材料组和空白对照组同法处理。每组平行制备 3 管。

注:可以使用其他比例,只要能模拟临床应用条件或测定潜在危害即可。

6.6 试验步骤

6.6.1 直接接触法

按照 1 mL 稀释全血加入 7 mL 液体的比例,每支试管中加入血红蛋白浓度为(10 \pm 1)mg/mL 的稀释兔血,于恒温水浴中(37 \pm 1) $^{\circ}$ C 孵育 3 h,每隔 30 min 上下颠倒混匀两次以确保血液与试验样品或材料充分接触。倒出管内液体,700 g~800 g 离心 15 min。记录上清液颜色并取 1 mL 上清液加入 1 mL 文齐氏液,混匀,室温避光放置 5 min。用文齐氏液调零,用分光光度计在 540 nm 波长处测定吸光度(A^s)。

注:如果吸光度超过 2,需要重新进行试验和确认。

6.6.2 间接接触法

浸提后分别转移 7 mL 浸提液至另一相应标记的试管中。按照 6.6.1 步骤进行试验。

注:若上清液有背景颜色,需记录其吸光度,并用于校正浸提液最终吸光度。

6.7 结果计算

6.7.1 游离血红蛋白浓度(PFH)计算

按式(2)计算 PFH 浓度:

$$C^{PFH} = A^{PFH} \times F \times DF1 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

C^{PFH} ——游离血红蛋白浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

A^{PFH} ——血清吸光度;

F ——Hb 标准曲线校准系数;

DF1——稀释因子 1,缺省值为 2。

6.7.2 全血血红蛋白浓度(C)计算

按式(3)计算全血血红蛋白浓度:

$$C = A^C \times F \times DF2 \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

C ——全血血红蛋白浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

A^C ——全血血红蛋白吸光度;

DF2——稀释因子 2,缺省值为 251。

6.7.3 稀释后血红蛋白浓度(T)和试验样品的血红蛋白浓度(S)计算

分别按式(4)和式(5)计算稀释后血红蛋白浓度(T)和试验样品的血红蛋白浓度(S):

$$T = A^T \times F \times DF3 \quad \dots\dots\dots(4)$$

式中:

T ——稀释后血红蛋白浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

A^T ——稀释后血红蛋白吸光度;

F ——Hb 标准曲线校准系数;

DF3——稀释因子,缺省值为 16。

$$S = A^S \times F \times DF4 \quad \dots\dots\dots(5)$$

式中:

S ——试验样品血红蛋白浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

A^S ——试验样品血红蛋白吸光度;

F ——Hb 标准曲线校准系数;

DF4——稀释因子,缺省值为 2。

6.7.4 校准溶血率(HR)测定

按式(6)计算与空白对照相比的校准溶血率:

$$HR = \frac{A^S - A^B}{A^T - A^B} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(6)$$

式中:

HR——与空白对照相比的校准溶血率,%;

A^B ——空白对照吸光度。

注:所用 A^T 和 A^B 为平均值,分别计算每管的溶血率。

将此校准溶血率(HR)减去阴性对照组的校准溶血率即为与阴性对照相比的校准溶血率(HR')。

6.8 结果判定

阴性对照材料的 HR 应 $<2\%$,阳性对照材料的 HR 应 $>5\%$,否则应重新进行试验。宜结合医疗器械预期临床用途和器械材料的特性,按如下分级判定试验结果:

- a) 试验样品的 HR': $0\%<HR'<2\%$,视为非溶血;
- b) 试验样品的 HR': $2\%\leq HR'\leq 5\%$,视为轻度溶血;
- c) 试验样品的 HR': $HR'>5\%$,视为溶血。

如果三管平行试验样品溶血率结果 $\leq 5\%$,但有一管或多管试验样品溶血率结果 $>5\%$,那么需要加倍的试验样品量进行复试。

参 考 文 献

- [1] National Institutes of Health. Evaluation of hemodialyzers and dialysis membranes. Chapter two. In vitro characterization of hemodialyzers. *Artif Organs* 1977;1(2) : 59-77
- [2] ASTM F 756-13 Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials.
-

中华人民共和国医药
行业标准
医疗器械溶血试验 第1部分:材料介导
的溶血试验

YY/T 1651.1—2019

*

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

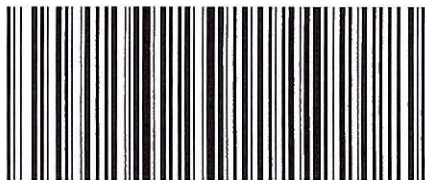
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字
2019年6月第一版 2019年6月第一次印刷

*

书号: 155066·2-34060 定价 18.00 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 1651.1—2019