



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0616.1—2016
代替 YY/T 0616—2007

一次性使用医用手套 第 1 部分：生物学评价要求与试验

Medical gloves for single use—
Part 1: Requirements and testing for biological evaluation

2016-01-26 发布

2017-01-01 实施

国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

YY/T 0616《一次性使用医用手套》，由下列部分组成：

——第1部分：生物学评价要求与试验；

——第2部分：测定货架寿命的要求与试验。

本部分为 YY/T 0616 的第1部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分代替 YY/T 0616—2007《一次性使用医用手套 生物学评价要求与试验》，与 YY/T 0616—2007 相比，主要技术变化如下：

——修改了标准名称；

——修改并补充了“3 术语和定义”；

——增加了“4.4 粉末、4.5 可沥滤蛋白质和 4.6 标示”；

——修改了附录 B 天然橡胶胶乳过敏原的免疫学测定方法；

——修改了附录 C 高效液相色谱法(HPLC)测定氨基酸(AAA)；

——删除了附录 D 术语。

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。

本部分由国家食品药品监督管理局济南医疗器械质量监督检验中心归口。

本部分起草单位：山东省医疗器械产品质量检验中心、北京市医疗器械检验所、江苏省医疗器械检验所。

本部分主要起草人：郝树彬、刘斌、刘肖帅、黄永富、林红赛、高静贤、金梦。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

——YY/T 0616—2007。

引 言

最近几年,常有报道胶乳产品由于含有胶乳蛋白质对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 系列标准规定了医疗器械生物学评价的要求和试验方法。但未涉及使用医用手套所产生不良反应(如速发型超敏反应),这些不良反应主要是由手套中存在的特异性过敏原所引发,导致这些反应风险的因素有:

- a) 皮肤接触手套的时间和频次;
- b) 黏膜和皮肤(尤其是在不完好时)直接接触了过敏原(又称变应原)和吸入微粒;
- c) 手套使用过程中与皮肤贴敷的紧密程度。

美国 FDA 认为,手套中的粉末也是一种危险源,可能导致患者产生异物反应而形成肉芽肿,还可能导致刺激性皮炎、Ⅳ型过敏等,且可作为天然乳胶的空气传播载体而导致使用者过敏。

本部分给出了用以评价医用手套生物学安全性的要求和试验方法,作为按 YY/T 0316 和 GB/T 16886 风险分析过程的一部分。

一次性使用医用手套

第 1 部分：生物学评价要求与试验

1 范围

YY/T 0616 的本部分规定了一次性使用医用手套生物学安全性评价的要求,给出了标签和公开所用试验方法的信息的要求。

本部分适用于一次性使用医用手套生物学安全性评价。

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(所有部分) 医疗器械生物学评价

GB/T 21869 医用手套表面残余粉末的测定

YY/T 0316 医疗器械 风险管理对医疗器械的应用(YY/T 0316—2008,ISO 14971:2007, IDT)

YY/T 0466.1 医疗器械 用于医疗器械标签、标记和提供信息的符号 第 1 部分:通用要求(YY/T 0466.1—2009,ISO 15223-1:2007, IDT)

中华人民共和国药典 二部(2010 年版)

ISO 7000 设备用图形符号 索引和一览表(Graphical symbols for use on equipment—Index and synopsis)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

化学物质 chemicals

生产过程的任何工序中或贮存期间加入或形成的物质,这些物质可从最终产品中检出。

注:这些化学物质包括润滑剂、化学涂层和灭菌剂等。手套加工过程中常使用一些化学成分,它们中一些成分已知可导致Ⅳ型超敏反应。所加入的化学物质的类型和残留量以及最终存在形式是不确定的。

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:内毒素是一种致热原。内毒素可来源于手套原材料、特别是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

粉末 powder

在该试验条件下,手套表面上能用水清洗去除的所有水不溶性物质。

[GB/T 21869—2008,定义 3.1]

注:包括有意添加的粉末和其他加工助剂或非有意随机存在的物质,这些物质能容易地从手套表面分离。本部分规定任何含有小于或等于 2 mg 粉末的手套为无粉末手套,大于 2 mg 粉末的为有粉末手套(要求见 4.4)。

3.4

过程限值 process limit

某一确认过的加工过程可能出现的最大值。

3.5

变应原性蛋白质 allergenic proteins

能够引起 I 型变应反应的蛋白质。

3.6

可沥滤蛋白质 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。

3.7

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。

4 要求

4.1 总则

一次性使用医用手套应按照 GB/T 16886 进行评价,GB/T 16886.1 描述了医疗器械生物学评价的一般原则并用于选择其他部分中描述的适宜试验。应按照 YY/T 0316 进行风险管理。

4.2 化学物质

手套应不含有或不涂滑石粉末(硅酸镁)。

如技术上可行,应避免使用已知具有变应原性的化学物质。只要可行,应使用 GB/T 16886.17 确定可沥滤残留化学物的可允许限量,并符合这些限量。如不可行,该残留化学物水平应是“可行的最低水平”[ALARP (As Low As Reasonably Practicable)——见 YY/T 0316]。

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。

4.3 内毒素

如果手套标示“低内毒素含量”,制造商应按 5.1 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 粉末

对于无粉末手套,根据 5.2 的试验方法测定的残留的粉末总量应不超过每只手套 2 mg。任何粉末含量超过 2 mg 的手套为有粉末手套。

4.5 可沥滤蛋白质

制造商应按 5.3 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。应保留试验结果的文件。应能按要求提供试验结果和所采用的试验方法。

该可沥滤蛋白水平应是“可行的最低水平”(ALARP)。

注:变应原性蛋白质,本部分规定了测量变应原(如可沥滤蛋白质)的近似方法。可沥滤蛋白质与变应原之间无直接相关性。附录 B 描述开发中的变应原性蛋白质的定量检测方法。

4.6 标示

除了 YY/T 0466.1 中给出的相关符号之外,下列要求也适用:

- a) 含天然橡胶胶乳的医用手套其最小包装单元上应至少标有下列符号,见图 1(ISO 7000 的符号 2725 给出了该符号应用的一般要求);



图 1 含天然橡胶胶乳产品的符号

- b) 除符号外,标签中还应包括以下警示声明或等效警示声明:
“(产品)含有会引起过敏反应(包括过敏性响应)的天然橡胶胶乳,”;
- c) 标签应醒目地给出该手套是否含有粉末的陈述;
- d) 无菌有粉末手套应标有以下或等效文字说明:
“注意:手术前应无菌去除表面粉末,以使组织不良反应的风险降至最小。”;
- e) 对于任何含天然橡胶胶乳的医用手套,产品标签不应包含:
——任何表明具有相对安全性的描述,如低变应原性或低蛋白质;
——任何对存在的过敏原的不合理的描述;
- f) 制造商如标示含有蛋白质,应给出按 5.3 规定测定的过程限值。

注 2: 不允许标示蛋白质含量低于 50 $\mu\text{g/g}$ 。因预期的制造过程和实验室间的试验结果具有变异性,标称较低的蛋白质含量被认为是不可信的。

5 试验方法

5.1 内毒素

除非鲎试剂(LAL)试验中出现无法排除的干扰,应按《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对方法进行选择、确认和使用。结果应用每副手套含内毒素单位(EU)表示。

注 1: LAL 试验中出现无法排除的干扰时,即不能准确测出细菌内毒素水平。

推荐的供试手套最小副数,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%,但每批最大取样量为 10 副。

每副手套的外表面以确保手套的所有外表面与浸提介质接触的方式用 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 $^{\circ}\text{C}$ ~40 $^{\circ}\text{C}$ 下浸提 40 min~60 min。必要时将浸提液以 2 000 g 离心 15 min,以除去微粒。离心后取出液体成分立即进行内毒素试验。

注 2: 其他现有公认的内毒素分析方法,只要经过确认并与本部分中所规定的基准方法具有相关性,也可用来进行常规质量控制。

5.2 粉末

应使用 GB/T 21869 中描述的方法进行粉末残留的测定。

5.3 可沥滤蛋白质

测定可沥滤蛋白质的方法应采用附录 A 给出的改良后的 Lowry 法,或用该改良后的 Lowry 法确认过的方法。

注 1: 附录 B 中的蛋白质的免疫学测定法目前还没经改良后的 Lowry 法确认,但可与临床反应数据相关联。

注 2: 附录 C 给出了一个确认过的分析方法实例。

试验报告

试验报告至少应包括下列信息:

- 本部分编号;
- 手套类型和生产批号;
- 制造商或供应商和实验室(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)

用改良过的 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中可溶出蛋白质量的测定,本法已经在实验室间进行的协同试验中得到了确认。本法最低检出限约为每克手套 10 μg (即每毫升浸提液 2 μg 蛋白质),取决于手套重量。

像表面活性剂、催化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在测试过程中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错误,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。该方法没有涉及到安全问题,如使用方法涉及到该类问题,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-tris-[Hydroxymethyl]-methyl-2-amioethanesulfonic acid(Tris),N-三(羟甲基)甲基 2-氨基乙烷磺酸(Tris),半钠盐(hemisodiumsalt)。

A.3.2.2 浸提缓冲液,0.1 mol/L,用水溶解 24 g Tris (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 \pm 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.6.2)、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,每 4 周制备新鲜溶液。

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^[1],也可以购买试剂盒。本部分的方法是用试剂盒^[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)。

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

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。溶液制备后超过 4 周不能再使用。

A.3.6 三氯乙酸(TCA)

4.4 mol/L 水溶液, 用水溶解 72 g TCA 并稀释成 100 mL 即得。

A.3.7 磷钨酸(PTA)

用水溶解 72 g PTA 并稀释至 100 mL。溶液制备后超过 4 周不能再使用。

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, 无粉末。

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: A.5 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: A.5 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, 光路长 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, 光路长 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。

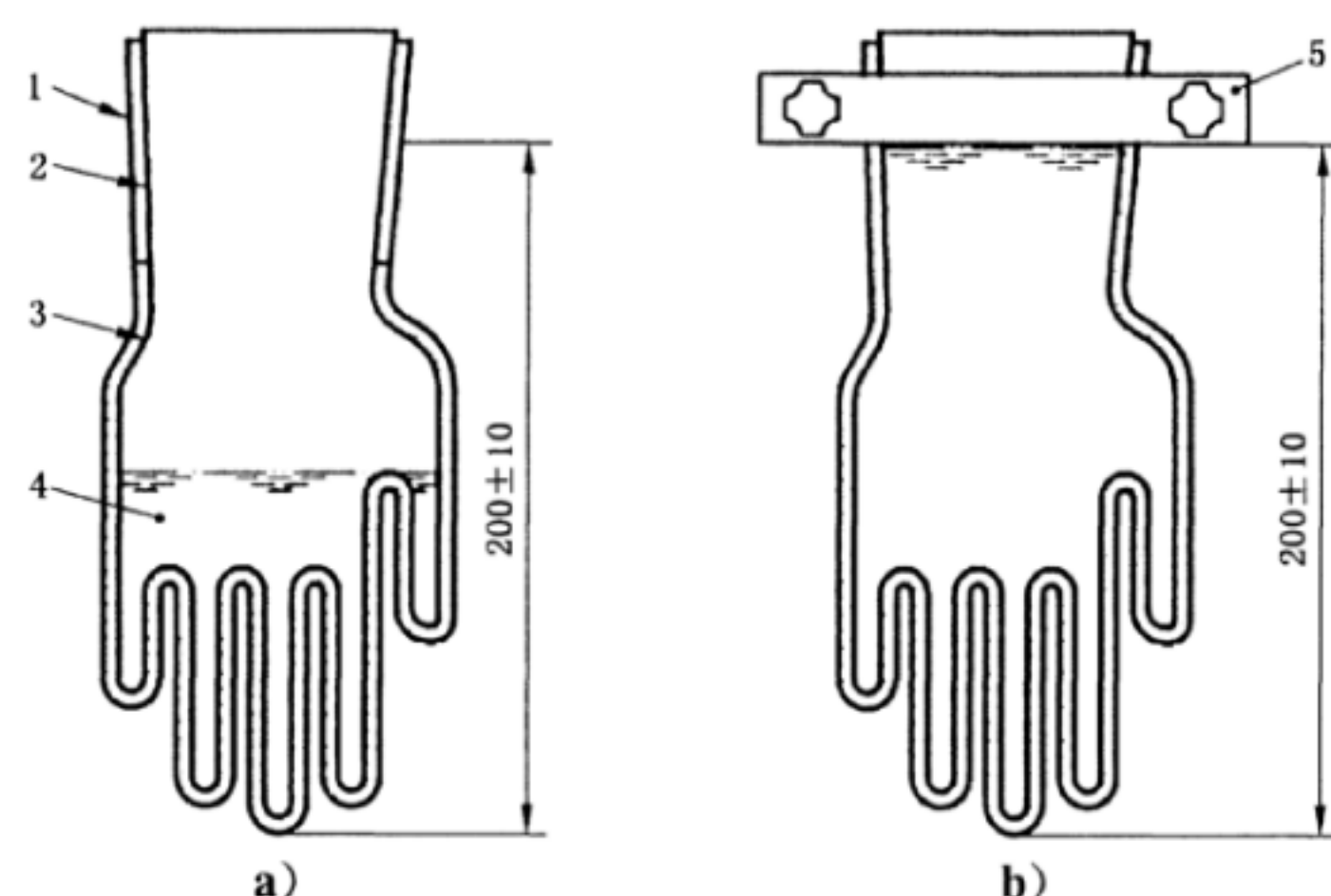
A.4.12 涡旋式混合器。

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。

2) 该卵清蛋白是用鲜鸡蛋蛋白通过在 pH 4.5 下用硫酸铵分馏和反复结晶制得。如 Sigma A5503、鸡蛋蛋白, V 级, 可从 Sigma Chemical Co. P.O. Box 14506, St Louis, MO 63178, USA 购得。这一信息仅为本部分的使用者提供便利, 并不意味着对这一产品的认可。

单位为毫米



说明:

1——外手套(手套 1);
2——内手套(手套 2);
3——浸提缓冲液;

4——染色溶液;
5——手套夹具。

图 A.1 手套浸提

A.4.15 振荡器。

A.5 蛋白质吸附量(protein binding capacity)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吸附量)。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吸附量。该试验应在 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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)稀释蛋白质贮备液(A.6.3.1)。

A.5.2.2 移取两份 10 mL 卵清蛋白溶液(A.5.2.1)至两只新的离心试管中,在振荡器(A.4.15)上振荡两个试管。确保试管所有表面被溶液浸润,静置 30 min 后再将两管溶液移至另外两个试管中振荡。重复以此步骤,直到每个 10 mL 溶液浸润 5 支试管。贮备剩余的试验液。

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:

$$O = \frac{10(R - T)}{5} \dots\dots\dots (A.1)$$

$$= 2(R - T)$$

式中:

O ——每只试管吸附的卵清蛋白量,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,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
 T ——流过试管后的试验液中卵清蛋白含量的平均值(即,六个测量值的平均值),单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

每只试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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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)稀释蛋白质贮备液(A.6.3.1)。

A.5.3.2 准备两叠滤膜(A.4.4),每叠五张,每叠各过滤 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)计算吸附的卵清蛋白平均吸附量:

$$O = \frac{10(R - T)}{5} \dots\dots\dots (A.2)$$

$$= 2(R - T)$$

式中:

O ——每只滤膜吸附的卵清蛋白量,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,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

T ——流过滤膜后试验液中卵清蛋白含量的平均值(即,六个测量值的平均值),单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

每只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 对浸提液提纯浓缩。用同法浓缩的标准蛋白质溶液制作校准曲线,依据校准曲线测定浸提液中蛋白质含量。

采用的浸提程序是,取两只手套,一只浸提内部和另一只同时浸提外部。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:其他浸提程序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 D5712 把手套剪成碎片再在 pH 值为 7.4 的 TES 缓冲液中 25 $^{\circ}\text{C}$ 下浸提 2 h 的测定结果与本法相当。

A.6.2 浸提程序

A.6.2.1 戴合成手套(A.4.1)操作用于浸提的手套样品。

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指尖至腕部(200 \pm 10)mm 处做一标记,对其称重(m_1),精确到 0.1 g。再将每对手套中的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.1a)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 \pm 5) $^{\circ}\text{C}$ 的浸提缓冲液(A.3.2.2)25 mL。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.1b)所示用夹具(A.4.14)在 20 cm 标记处密封,以封闭液体。

A.6.2.3 将手套置于振荡器(A.4.15)上于(25 \pm 5) $^{\circ}\text{C}$ 下振荡(120 \pm 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,在不低于 2 000 *g* 条件下离心 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 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 下冷藏并在 48 h 内测定,也可在分析前 -18 $^{\circ}\text{C}$ 以下冷冻,不超过两个月。

A.6.2.6 将浸提过的外手套 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,称重(m_2),精确到 0.1 g,按式(A.3)计算该手套浸提部分的质量:

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

A.6.3 蛋白质标准液

A.6.3.1 蛋白质贮备液

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 $^{\circ}\text{C}$ 以下冷冻可稳定两个月。解冻需加在 45 $^{\circ}\text{C}$ 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)稀释贮备液制成系列标准液(A.6.3.1)。使溶液浓度约为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。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 $^{\circ}\text{C}$ 以下冷冻可稳定两个月。解冻需在 45 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 15 min。

A.6.4 蛋白质的沉淀与浓缩

A.6.4.1 在(25 \pm 5) $^{\circ}\text{C}$ 下做平行试验。

A.6.4.2 分别精确移取 1 mL 空白液、蛋白质标准液(A.6.3.2)和四个手套浸提液(A.6.2.5)至(6个)微型试管(A.4.6)中。(各管)加 0.1 mL DOC(A.3.5),涡旋混合后放置 10 min,(各管)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,并将各离心管倒置于吸水纸上 5 min。

A.6.4.4 向包括空白在内的各试管中(各)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再次溶解。确保使蛋白质完全溶解成清澈液。有些手套有时需在(5 \pm 3) $^{\circ}\text{C}$ 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。

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具有重复性的。

A.6.5 显色

A.6.5.1 本部分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孵育时间。

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各加 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 μL 孔中注入 490 μL 。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(译注:按前面的原量和仪器,应该

3) 假定分子量为 43 000 D,280 nm 和 30 745 的摩尔消光(molar extinction),且在 pH 7.4 下 1 cm 比色池下 pH 7.4 的 0.1 mol/L TES 缓冲液中 1 mg/mL 卵清蛋白的消光是 0.715。

是 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。

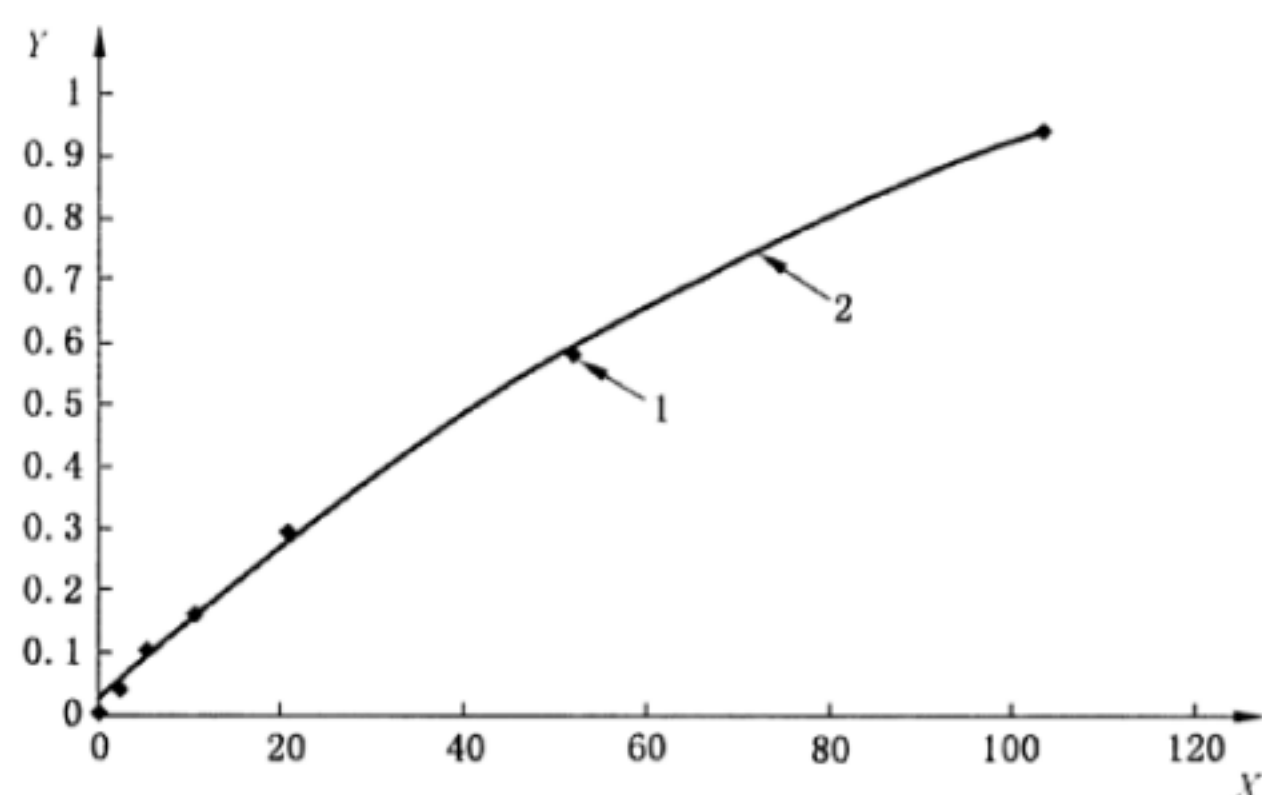
A.7 结果表示

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内校准曲线宜为线性。

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。



说明：

Y——750 nm 处的吸收度；

X——卵清蛋白浓度，单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$)；

1——吸收度；

2——计算机生成的最佳曲线。

$$Y = -4E - 0.5X^2 + 0.013X + 0.0247$$

浓度	吸收值
2.1	0.036
5.2	0.099
10.4	0.159
20.8	0.291
52.0	0.583
104.0	0.945

图 A.2 分光光度计用 1 cm 池在 750 nm 处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更具可操作性。

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

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($\mu\text{g/mL}$);

F ——稀释系数;

注: F 是再次溶解蛋白质所用的 NaOH 溶液的实际体积(单位为毫升)除以 0.2。

m ——被浸提手套的质量,单位为克(g)(A.6.2.6)。

报告四个手套浸提液测定的平均蛋白质含量。

A.7.3 统计学信息

在 1996 年到 1998 年间,9 个实验室参与了 EU 主办的实验室间的协同实验研究,研究结果发表在欧盟通用指令 XII 最终报告 MAT 1-CT 940060 上。在该实验中测试了 Lowry 方法的精密度和整个浸提过程的精密度。该方法还包含了手套之间蛋白含量的变异程度,在某些情况下它比该方法的变异程度更高。结果汇总见表 A.1。

表 A.1 数据信息

供试物	测量数量	浸提液的数量	天数	平均值/($\mu\text{g/mL}$)	重复性变异系数/% (实验室内)	再现性变异系数/% (实验室间)
手套浸提液	8 组 一式三份	1 所有试验者共用	1	63.9	4.9	9.6
手套浸提液	15 一式三份		5	61.7	6.8	6.3
手套 A	5 一式三份	5	1	88.8	7.9	22.5
手套 A	5 一式三份	5	5	84.5	6.1	20.3
手套 B	3 一式三份	3	1	109	20.2	23.3
手套 C	3 一式三份	3	1	727	8.3	23.0
手套 D	3 一式三份	3	1	46.5	10.1	31.8
无浸提程序的平均浸提					5.0	8.0
整个程序(手套 A 到 D)的平均					10.5	24.2

蛋白质含量在 $1 \mu\text{g/g} \sim 5 \mu\text{g/g}$ 之间,取决于手套的厚度(重量)。检出限设为 $10 \mu\text{g/g}$ 。

附录 B

(资料性附录)

天然橡胶胶乳过敏原的免疫学测定方法

B.1 引言

天然橡胶胶乳(NRL)蛋白引起的速发型过敏反应是一个重要的医学和职业健康问题。胶乳手套中提取出的蛋白质和多肽被认为是引发致敏反应的一个主要原因[1]。

虽然手套中可浸提出总蛋白与用皮肤点刺试验(SPT)或人 IgE 试验测量出的过敏性物质具有良好的相关性[2][3][4][5],但总蛋白法的检测结果中同时也包括了与 NRL 致敏无关的非过敏性蛋白质。因此,需要有专门针对 NRL 手套中过敏原的准确测量方法。大家一致认为,专门针对过敏原特定的试验可为监管和加工过程监视提供更加准确和可靠的信息。但专门针对过敏原的试验方法一直很少。况且,对 NRL 过敏原广泛意义上的认知还不够全面,因此难以确定 NRL 源材料中都存在哪些过敏原。

使用人 IgE 抗体的半定量的方法,如 RAST 抑制和 IgE ELISA 抑制,已在研究实验室中使用多年。这些方法的缺点是难以标准化并且因不易获取含有临床相关的胶乳特异性 IgE 抗体的人血清而易于推广。另外,宜注意所使用的标准不仅仅适用于手套蛋白质。最近,欧盟[6][7]和美国[8]的标准化工作中已采纳并同意了评定 NRL 制品过敏潜能理想试验宜是基于只对过敏原定量的原则。

最近,专门针对 NRL 过敏原的量化的分析已取得了实质性进展[9][10]。这些基于酶免疫分析(EIA)原理并使用单克隆抗体和纯化/重组过敏原新的试验都是针对过敏原的;可使这些方法适当的标准化并具有足够的灵敏度和再现性。本资料性附录中对 NRL 过敏原测量的现行方法进行了评审。

B.2 橡胶制品中的天然橡胶胶乳过敏原

在 NRL 源材料、橡胶树(*Hevea brasiliensis*)的液态胶乳中有多达 250 种不同的蛋白质或多肽,大约 1/5~1/4 显示出可与 IgE 结合并表现为过敏原[11][12]。源材料中植物蛋白混合物反映了橡胶树对创口(采胶过程)的压力反应。这些蛋白质中的一些是防御性蛋白质,在植物的进化过程中被很好地储存起来。这些蛋白质在结构上的异体同形性为胶乳过敏的患者的 IgE 抗体对不同植物蛋白质发生一般性交叉反应提供了分子基础。如上所述,在评定 NRL 制品过敏特性中,液态 NRL 中可能存在的主要过敏原与 NRL 源材料中存在的多数蛋白和多肽可能是不相关的。世界卫生组织/国际免疫学联合会的过敏原命名委员会列出了 13 个(2004 年 3 月)表征到分子水平的 NRL 过敏原(www.allergen.org),其中多数已经被克隆并可通过重组 DNA 技术获得。

最佳的试验宜设计成能准确测量橡胶制品中所有过敏原。这可能包括天然蛋白质上存在的表位,以及由橡胶加工过程中切断面形成的新表位。迄今为止,已经证实 NRL 产品中的过敏原数量有限。当前的文献支持至少 Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 和 Hev b 6.02,和/或它们的碎片或聚合物携有能与 IgE 结合的表位,会存在于制造的产品中 [13],[14],[15],[16],[17],[18]。是否有其他的过敏原被证明是重要的橡胶产品特异性过敏原,如 Hev b 2, Hev b 7 或 Hev b 13[19]仍然需要确认。

B.3 天然橡胶胶乳过敏原的测定方法

B.3.1 定性方法

20 世纪九十年代广泛使用的免疫电泳方法和免疫印迹技术,证明和技术性表征了几种与 NRL 过

敏性患者血清 IgE 结合的 NRL 蛋白质。然而,当今认为仅用这些方法识别过敏原是不够充分的 [11],[12],[20],[21]。

B.3.2 半定量方法

B.3.2.1 胶乳过敏受试志愿者中皮肤点刺试验

可用 SPT 在具有统计意义数量的 NRL 过敏患者中进行半定量评定 NRL 浸提液的变应原性。反应的大小取决于与患者 IgE 抗体结合的变应原的数量并与其成比例[2]。从生物学的观点来看,SPT 是评定临床相关变应原性的理想试验,但是出于伦理方面的限制,该方法不能常规用于监测 NRL 手套中的变应原。

B.3.2.2 IgE-ELISA 抑制(又称 RAST-抑制)测定法

ELISA 抑制测定法(ELISA=酶联免疫吸附试验)因有市售或使用自行制备,可用于特异性 IgE 抗体的测定。以前常用的 RAST(放射性吸附试验)使用放射性标记代替酶标记检测抗体。

ELISA 抑制测定法一直用来评价多种医疗产品和消费品中 NRL 过敏原[3][4][22][23]。

在该方法中,最佳数量的 NRL 过敏原结合于固相(如纸或聚苯乙烯)。将未知样品和标准品与从 NRL 过敏个体来源 IgE 血清混合并一起孵育。当 IgE 抗体与该可溶性过敏原结合时,就阻止了其与其固相过敏原结合。孵育后,将该混合物转移至固定于固相上无结合 IgE 抗体的过敏原的过敏原制剂中,用酶标记抗 IgE 抗体测量特异性结合。抑制的程度与浸提液中可溶性过敏原的量成比例。

关键试剂是固化过敏原、人混合血清和标准过敏原。

在参考文献[4]的自制分析试验中,使用非氮化的 NRL 覆盖并被作为过敏原标准品。标准品中浓度为 10 mg/mL 的蛋白被主观设定为 100 000 单位。将系列稀释度的手套浸提液和 NRL 标准品与由 NRL-过敏患者来源的经表征的高滴度血清组成的最适稀释度的 IgE 血清混合物一起孵育[4]。

B.3.3 专用定量方法

B.3.3.1 对 NRL 过敏原定量的捕获酶免疫分析(EIA)

B.3.3.1.1 背景

已达成共识的原则是,最佳的试验宜设计成只检测那些制品中已知存在的 NRL 过敏原。到目前为止,在 NRL 手套的浸提液中能得到确切证实的只有四个 NRL 过敏原,即 Hev b 1、Hev b 3、Hev b 5 和 Hev b 6.02 [13][15][16][17][24]。成人受试者中两个最重要的过敏原是 Hev b 5 和 Hev b 6.02 (橡胶蛋白)[15][17][25]。Hev b 1 和 Hev b 3 则是患有脊柱裂的儿童的重要过敏原[26][27]。最近开发出的专门用于这四个 NRL 过敏原的捕获酶免疫分析(EIA)的方法已于近年开发出来。自 2001 年 12 月以来,已经可以从市场上购买到测量这些过敏原的试剂盒。试剂和设备也可单独购买。

B.3.3.1.2 捕获 EIA 方法的描述⁴⁾

捕获 EIA 方法使用专用单克隆抗体和纯化的过敏原或用重组 DNA 技术生产的蛋白质作为标准品。每个试验中,用专用单克隆抗体涂盖试验微孔,用其与待测样品中的期望的过敏原结合。孵育后,通过清洗去除未结合的物质。在第二次孵育中,酶标记[通常是辣根过氧化物酶(HRP)]的过敏原特异性单克隆抗体与第一次孵育中结合于微孔板上的过敏原分子相结合。清洗后,加入该酶的底物。反应

4) 根据试剂盒厂商提供的信息(FITkit Insert leaflets, www.quattromed.com),过敏原的检出限的范围为 0.1 μg/L (Hev b 6.02) 到 2.3 μg/L (Hev b 3)。重复性的变异系数范围为 2.8%~5.8%,再现性的变异系数范围为 2.6%~7.6%。该信息仅为本部分的使用者提供便利,并不意味着 CEN 对这一产品的认可。

终止后,在合适的波长处测量吸光度值。产生的颜色强度与样品中过敏原的浓度成正比。

B.3.3.1.3 捕获 EIA 方法与 IgE 过敏原分析之间的性能比较

现在已经开展了多组评定医用手套的过敏原性试验的系列研究。显然,最能反应给定浸提液过敏潜能的试验是用对 NRL 过敏的患者进行皮刺试验(SPT)。在一项系列研究中,22 个 NRL 手套的 4 个过敏原(用市售的捕获 EIA 试剂盒测量)的总量与人 IgE 抑制试验的结果相比较时,两者之间出现了高度意义的相关性[10]。在手套中该 4 个过敏原的总量与 20 位 NRL 过敏性志愿者的 SPT 试验间的相关性为最高($r=0.95$),其次是该总量与 IgE ELISA 抑制结果间的相关性($r=0.90$)。改良后的 Lowry 法测量的总蛋白质(与 SPT)的相关性非常低($r=-0.11$)。在与[10]相同的文献杂志中,报道了另一项系列研究,58 个 NRL 手套的 4 个过敏原的总量与 IgE ELISA 抑制试验的得出的总过敏原活性之间的相关性为 0.84。最近的一项 FDA 组织的国际间多中心研究[28],在七个试验室展开来测量 30 个手套中 NRL 过敏原,结果显示,用单克隆 EIAs 测量的 4 个过敏原的总量与使用人 IgE RAST/ELISA 抑制测量的结果之间具有极高的相关性($r^2=0.91-0.95$)。尽管还需要用大量手套开展进一步研究来进一步确认过敏原特异性 EIAs 方法的适用性,但是,这 4 个过敏原已经可以从生物学角度反映手套浸提液中过敏原总含量。当前所开展的研究是想搞清楚是否还有其他过敏原以及它们是否影响评定的结果。

B.4 结论

测量可浸提的总的蛋白质并非控制医用手套的 NRL 过敏原的理想方法。然而,在本部分发布时,用于测量过敏原的特异性人 IgE 方法尚未得到确认,尚未实现标准化,并且受限于所需试剂的缺乏。因此,它仍然是本部分的规范性部分所描述的内容。用于 NRL 过敏原定量的捕获 EIA 法,通过使用经表征的高纯度过敏原以及 NRL 产品中已存在的 NRL 过敏原特异性单克隆抗体,克服了先前方法的诸多局限性。该方法具有高的特异性,不受其他蛋白质或 NRL 产品加工过程中产生的化学物质的影响,并具有高灵敏性。该试验在技术上相对容易操作,并能在短时间内获得试验结果(<2 h)。缺点有当前费用高,并且至今尚不能对这几种已知的 NRL 过敏原给出推荐和安全限量。同时也需要大量的单克隆抗体来确保检出所有相关过敏原。目前,可以购买用于捕获 EIA 法中测量四个 NRL 过敏原的试验方法和/或试剂。可以依据现有框架开发新试剂和试剂盒,用来检测橡胶制品中存在的其他显著量的过敏原。

2002 年,CEN/TC 205/WG 3 进行了一项实验室间试验,用于评定医用手套中 NRL 蛋白和过敏原定量的三种试验方法。这三种试验方法是:

- 特异性过敏原的测量[见 B.3.3.3 的脚注 4];
- ASTM D6499(抗原性蛋白)[29];
- 氨基酸分析(总蛋白)。

本次试验未得出推荐以上方法作为本标准的规范性内容的结论。

进一步的研究需要收集目前欧洲市场销售的有代表性的手套和用对所含认定的过敏原浓度精确赋值的标准样品来进一步确认该新的过敏原特异性试验方法的性能和可用性。

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结构基团的显色反应,这些基团在不同的蛋白质中呈现出不规则分布[1][2][3][4][5]。因此,不同蛋白质的显色反应有很大差异[2][4]。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要么产生非特异性反应,要么抑制显色。

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”计划[8]中一次性手套中过敏原相关化学物-化学物、过敏原性和免疫学数据的关联的研究结果所证实。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[6]。

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)[7]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 材料

C.3.1 左旋正缬氨酸

C.3.2 30%盐酸,高纯度

C.3.3 氨基酸标准品(含 L-丙氨酸、氯化铵、L-精氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、氨基乙酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯基丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸各 0.5 mmol/L 和 L-胱氨酸 0.25 mmol/L)

C.3.4 测序级甲醇蛋白(Methanol protein sequencing grade)

C.3.5 O-酞二醛(OPA)

C.3.6 硼酸

C.3.7 乙二胺四乙酸(EDTA)

C.3.8 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)

C.3.9 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)

C.3.10 磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)

C.3.11 3-巯基丙酸

C.3.12 分离柱:海波西尔 ODS 3 μm , $150 \times 4.6 \text{ mm}$, 用于 OPA 的预试验

C.3.13 前置柱:海波西尔 ODS 3 μm , $5 \times 4.6 \text{ mm}$

C.3.14 超纯(Milli-Q)或相同等级的水

C.3.15 0.2 μm 孔径的滤膜

C.3.16 用于液相级别的四氢呋喃(THF)

C.3.17 用于液相级别的氯乙腈

C.3.18 2 mL 螺纹盖聚丙烯容器

C.3.19 碳酸钠

C.3.20 氢氧化钠或氢氧化钾片

C.4 缓冲液和溶液

用于 OPA-1 柱(Herrenberg, Germany)的溶剂 1 和溶剂 2。如使用其他柱子,可能需要进行相应的修改。

C.4.1 缬氨酸-100

11.7 mg 缬氨酸(C.3.1)溶于 1 mL 水中(C.3.14)=100 mmol/L 缬氨酸

C.4.2 缬氨酸-1

100 μL 缬氨酸-100 (C.4.1)溶于 10 mL 水中=1 mmol/L 缬氨酸,8 $^\circ\text{C}$ 条件下贮存不超过 4 周。

C.4.3 O-酞二醛(OPA)

50 mg O-酞二醛(C.3.5),4.5 mL 甲醇(C.3.4),50 μL 巯基丙酸(C.3.11)。

C.4.4 硼酸盐缓冲液

400 mmol/L 硼酸盐,5 mmol/L EDTA, pH 10.4

将 1.24 g 硼酸和 85 mg EDTA 溶于 30 mL 水中(C.3.14),用 2 mol/L NaOH 调节 pH 至 10.4,加水(C.3.14)定容至 50 mL。经 0.2 μm 滤膜(C.3.15)过滤,室温贮存不超过 2 周。避免冻存以防产生不溶性沉淀物。

C.4.5 终止液

将 1.36 g KH_2PO_4 (C.3.8)溶于水(C.3.14)中,经 0.2 μm 滤膜(C.3.15)过滤,室温贮存不超过 4 周。

C.4.6 磷酸盐缓冲液

将 7.15 g Na_2HPO_4 (C.3.9) 和 3.45 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (C.3.10) 溶于 1.5 L 水 (C.3.14) 中。

C.4.7 溶剂 1

20 mL 四氢呋喃 (C.3.16) 加 1 L 磷酸盐缓冲液 (C.4.6)。

C.4.8 溶剂 2

250 mL 氯乙腈 (C.3.17) 和 100 mL 四氢呋喃 (C.3.16) 用磷酸盐缓冲液 (C.4.6) 加至 1 L。

C.4.9 碳酸钠溶液 (0.1 mol/L)

将 2.12 g 碳酸钠 (C.3.19) 溶于 10 mL 水中 (C.3.14)。

C.5 水解**C.5.1 样品溶液**

400 μL 浸提液 (溶于 TES 缓冲液) + 10 μL 缬氨酸-1 (C.4.2) + 700 μL 盐酸 (C.3.2)。

C.5.2 标准溶液

380 μL 水 (C.3.14) + 20 μL 氨基酸标准品 (C.3.3) + 10 μL 缬氨酸-1 (C.4.2) + 700 μL 盐酸 (C.3.2)。

C.5.3 孵育 (水解)

将样品溶液和标准溶液密封于螺纹盖聚丙烯容器 (C.3.18) 中, 同时在 100 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 48 h。聚丙烯容器宜用一个螺栓固定架固定, 以避免盖子的破裂。为了得到相同的温度和时间条件, 同时对标准溶液和样品溶液水解非常重要。

冷却样品溶液和标准溶液, 并将其在真空浓缩离心机或在干燥器中置于 NaOH 或 KOH 上方真空干燥。

盐酸需完全去除; 否则硼酸盐缓冲液对衍生物的缓冲能力可能不充分。

C.5.4 游离氨基酸

从每一浸提液和标准溶液中制备一个非水解样品溶液:

——400 μL 浸提液 + 10 μL 缬氨酸-1 (C.4.2);

——380 μL 水 (C.3.14) + 20 μL 氨基酸标准品 (C.3.3) + 10 μL 缬氨酸-1 (C.4.2)。

C.6 分析 (HPLC)**C.6.1 样品制备**

样品制备包括以下步骤:

——在干燥后的样品中加入 20 μL 碳酸钠溶液 (C.4.9)。

——充分混合或超声乳化处理样品。

——室温孵育 15 min, 再次混合去除 CO_2 。

——加入 180 μL 硼酸盐缓冲液 (C.4.4)。

C.6.2 衍生

衍生步骤依据时间和温度；宜使用自动加样器在 20 ℃~25 ℃ 温度条件下进行试验。

将 25 μL 硼酸盐缓冲液(C.4.4)、12 μL OPA (C.4.3) 和 8 μL 样品混合。

2.5 min 后,加入 25 μL 终止液(C.4.5)终止反应。

C.6.3 HPLC

可使用具有分级系统和荧光检测器的任一 HPLC 设备进行 HPLC 分析。

下面举出了一个成功的实例,但是这些条件需要与所使用的系统和柱子相适应。

0 min~2.5 min	0%溶剂 2	100%溶剂 1
2.5 min~3.0 min	0%~12.5%溶剂 2	87.5%~100%溶剂 1
3.0 min~9.0 min	12.5%溶剂 2	87.5%溶剂 1
9.0 min~13.0 min	12.5%~42%溶剂 2	58%~87.5%溶剂 1
13.0 min~24.0 min	42%溶剂 2	58%溶剂 1
24.0 min~26.0 min	42%~80%溶剂 2	20%~58%溶剂 1
26.0 min~30.0 min	80%溶剂 2	20%溶剂 1
30.0 min~31.0 min	0%~80%溶剂 2	20%~100%溶剂 1

C.6.4 计算

应使用一个内部的标准方法通过减去游离氨基酸来计算各氨基酸的浓度。氨基酸的总量等于总蛋白含量。

C.7 实例

C.7.1 标准溶液

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.7.2 手套浸提液

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。

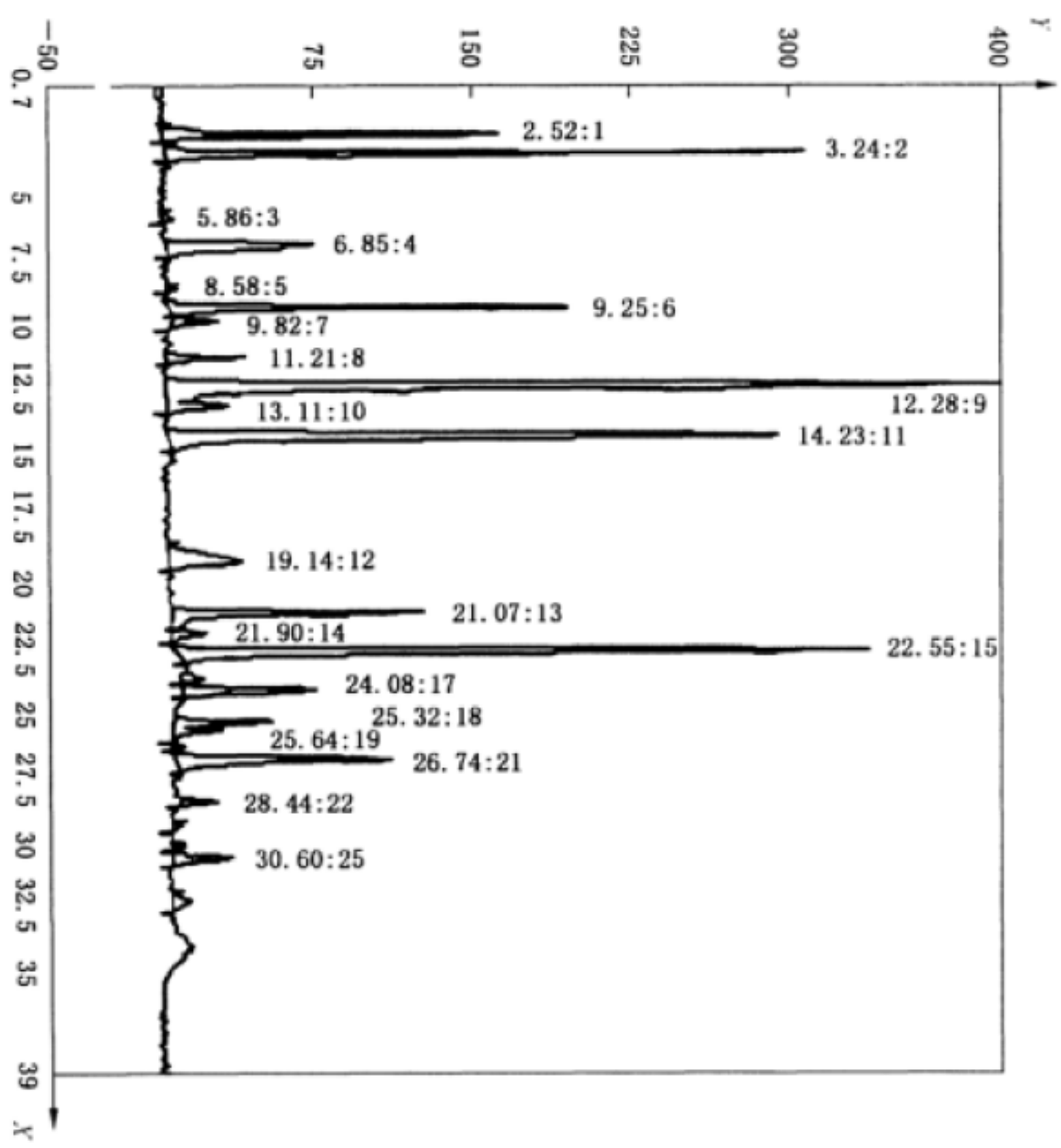
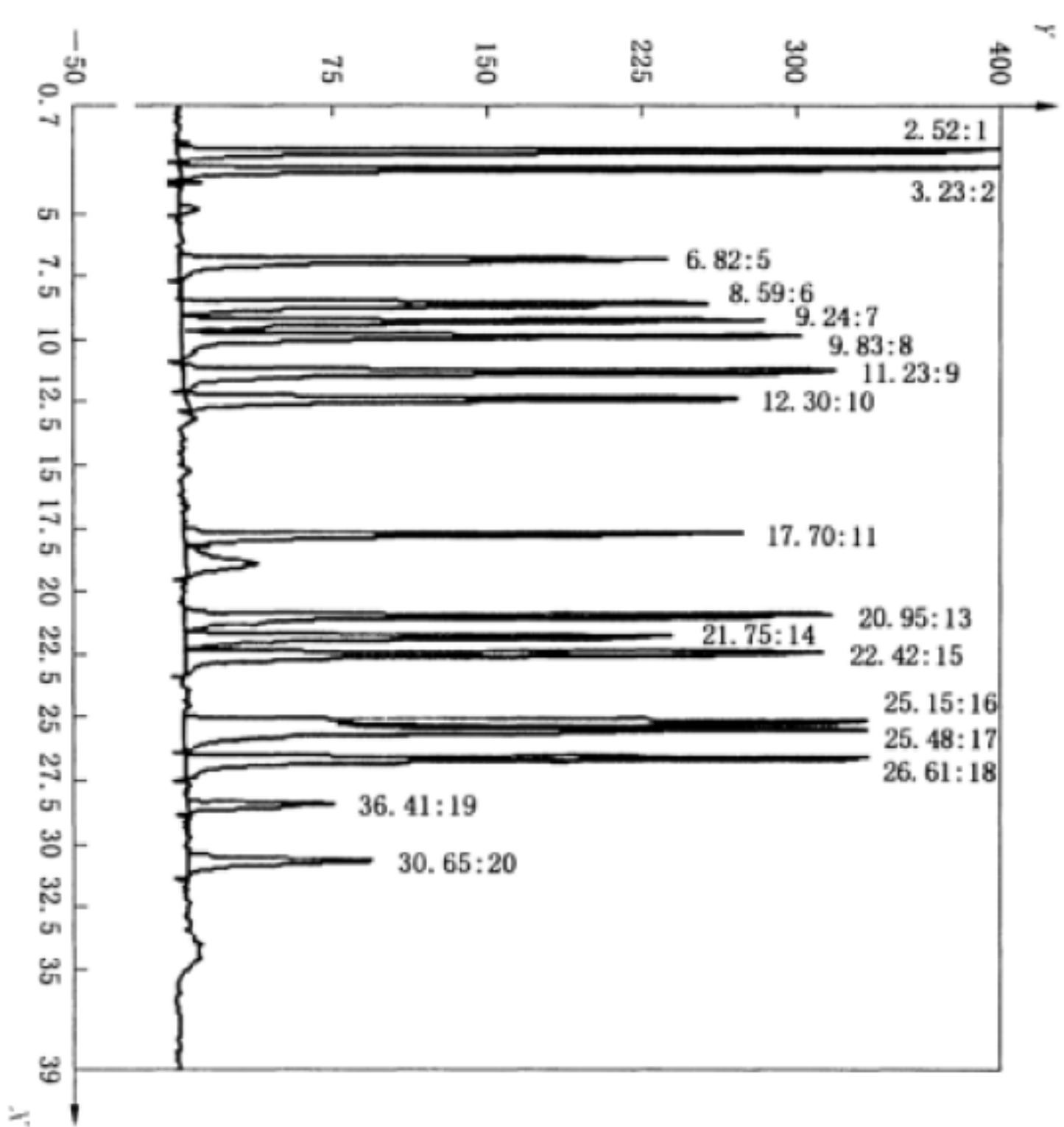


图 C.1 氨基酸标准和手套浸提液分析图谱

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)	8.60		
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

C.8 高效液相色谱分析法的优缺点

C.8.1 优点

优点如下所示:

- 不受蛋白质聚合结构的影响。
- 与临床数据(prick test)有良好的一致性。
- 没有干扰物质。
- 较比色法更加灵敏。

——对蛋白质有针对性。

C.8.2 缺点

缺点如下所示：

——不普及，只有少数实验室配备。

——用时较长。

——对数据进行评估时需有丰富的经验。

参 考 文 献

- [1] GB/T 21869—2008 医用手套表面残余粉末的测定
- [2] Lowry OH, Rosebrough, NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein measurement with Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
- [3] ASTM D 5712;1995 Standard test method for analysis of protein in natural rubber and its products
- [4] Kidwai SA, Ansari AA, Salahuddin, Effect of succinylation (3-carboxypropionylation) on the conformation and immunological activity of ovalbumin. *Biochem J* 1976;155:171-180.
- [5] Turjanmaa, K. et al., Natural rubber latex allergy (review), *Allergy*, 51, 593, 1966.
- [6] Turjanmaa, K., et al, Rubber contact urticaria. Allergenic properties of 19 brands of latex gloves, *Contact Dermatitis*, 19, 362, 1988.
- [7] Yunginger, J. W., et al., Extractable latex allergens and proteins in disposable medical gloves and other rubber products, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 93, 836, 1994.
- [8] Palosuo, T. et al., Measurement of natural rubber latex allergen levels in medical gloves by allergenspecific IgE-ELISA inhibition, RAST inhibition, and skin prick test. *Allergy*, 53, 59, 1998.
- [9] Yip, E., et al., Allergic responses and levels of extractable proteins in NR latex gloves and dry rubber products. *J. Nat. Rubber Res.*, 9, 79, 1994.
- [10] CEN/STAR Document N 409-Endorsement by star of research proposal on immunological test to measure allergens in natural rubber latex (document CEN/TC 205 N 1187), European Committee for Standardisation, Brussels, 2002.
- [11] Scientific committee on medicinal products and medical devices. Opinion on Natural rubber latex allergy. European Commission, http://europa.eu.int/comm/foods/fs/sc/scmp/out31_en.pdf, 2000.
- [12] Hamilton, R.G., Palosuo, T., Minutes of the ASTM meeting on Immunoenzymetric assay (IEMA) task group (D11.40.08), Denver, CO, June, 2003.
- [13] Turjanmaa, K., et al., Recent developments in latex allergy, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2, 407, 2002.
- [14] Palosuo, T., Alenius, H. and Turjanmaa, K., Quantitation of latex allergens, *Methods*, 27, 52, 2002.
- [15] Alenius, H., et al., 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.*, 123, 712, 1994.
- [16] Posch, A. et al., Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein micro sequencing, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 99, 385, 1997.
- [17] Czuppon, A.B. et al., The rubber elongation factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) is the major allergen in latex. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 92, 690, 1993.
- [18] Lu, L-J. et al., Characterization of a major latex allergen associated with hypersensitivity in spina bifida patients, *J. Immunol.*, 155, 2721, 1995.
- [19] Alenius, H., et al., The main IgE-binding epitope of a major latex allergen, prohevein, is present in its Nterminal 43-amino acid fragment, hevein. *J. Immunol.*, 156, 1618, 1996.
- [20] Akasawa, A., et al., A novel acidic allergen, Hev b5, in latex: purification, cloning and

characterization, *J. Biol. Chem.*, 271, 25389, 1996.

[21] Sutherland, M. F., et al., Specific monoclonal antibodies and human immunoglobulin E show that Hev b 5 is an abundant allergen in high protein powdered latex gloves. *Clin. Exp. Allergy*, 32, 583, 2002.

[22] Palosuo, T., et al., The Major Latex Allergens Hev b 6.02 (hevein) and Hev b 5 are regularly detected in medical gloves with moderate or high allergen content. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 107, S321 (abstract), 2001.

[23] Yeang HY, Arif SA, Raulf-Heimsoth M, Loke YH, Sander I, Sulong SH, Lau CH, Hamilton RG. Hev b 5 and Hev b 13 as allergen markers to estimate the allergenic potency of latex gloves. *J. Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 593-8.

[24] Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 77, 680, 685, 1970.

[25] O'Farrell, P. H., High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021, 1975.

[26] Yman, L., Ponterius, G. and Brandt, R., RAST-based allergen assay methods. *Dev. Biol. Stand.*, 29, 151, 1975.

[27] Crippa, M., et al., Prevention of latex allergy among health care workers: evaluation of the extractable latex protein content in different types of medical gloves. *Am. J. Ind. Med.*, 44, 24, 2003.

[28] Baur, X., et al., Protein and allergen content of various natural latex articles. *Allergy*, 52, 661, 1997.

[29] Ylitalo, L., et al., IgE antibodies to prohevein, hevein, and rubber elongation factor in children with latex allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, 659, 1998.

[30] Alenius, H., Palosuo, T., Kelly, K., Kurup, V., Reunala, T., Mäkinen-Kiljunen, S., Turjanmaa, K., Fink, J. 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.

[31] Yeang, H. Y., et al., The 14.6 kD rubber elongation factor (Hev b 1) and 24 kD (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*; 98, 628, 1996.

[32] Tomazic-Jezic V. J., et al., Performance of methods for the measurement of natural rubber latex (NRL) proteins, antigens and allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*; 113, S78 (abstract), 2004.

[33] ASTM D 6499, Standard Test Method for the Immunological Measurement of Antigenic Protein in Natural Rubber and its Products.

[34] 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.

[35] Langheinrich U, Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen Teil 1; *Chemie in Labor und Biotechnik* 1995 ; 46 ; 82-85.

[36] Langheinrich U, Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen Teil 2; *Chemie in Labor und Biotechnik* 1995 ; 46 ; 135-136.

[37] Lowry OH, Rosebrough, NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein measurement with Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 1951 ; 193 ; 265-275.

[38] Petersen GL, Determination of total protein. In *Methods of Ezymology*, Academic Press, Inc., New York 91, 95-118.

[39] Koch HU , Regulatory aspects of latex allergy (CEN ; extractable protein and allergen

assay for latex gloves). *Rev Fr Allergol* 1997;37 :1201-1210.

[40] 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.

[41] MATL_CT 940064 European Commission Study—Determination of allergological relevant compounds in disposable gloves—Correlation of chemical allergological and immunological data.
