附件：

一次性使用聚氯乙烯输血器中可沥滤物邻苯二甲酸二（2-乙基己基）酯（DEHP）增塑剂的研究

一、概述

DEHP，是Di-(2-ethylhexyl) phthalate的缩写，全名为邻苯二甲酸二（2-乙基己基）酯。

分子式：C24H38O4

结构式：

 

分子量：390.6

CAS编号：117- 81-7

物理状态：常温下为无色无臭液体。不溶于水，溶于乙醚、乙醇、矿物油等。

熔点：-50℃ 或-55℃

沸点:在5mm Hg时大约230℃ (BASF1994b;Clayoton 1981,in HSDB 2005)

在1013hP时385℃

蒸汽压：0.000034 Pa在20℃

水溶性：0.003mg/L在20℃

醇溶性：>100mg/mL( 95%乙醇， 22℃)

密度：0.986g/cm³at20℃( IARC1982，in HSDB 2005)

由于聚氯乙烯（PVC） 材料本身质地较硬且加工难度较大，为了使PVC制品柔软往往加入大量的增塑剂。在常用的增塑剂中，DEHP由于其与优异的增塑性能、易获得性以及和PVC 的良好相容性，使得其在成为输血器中最常见的增塑剂。

DEHP一般先与PVC树脂以及其他添加剂通过共混等方式制备含有DEHP的PVC粒料，在此共混过程中，其不以共价键结合而是物理结合于PVC 分子上。一般来说，在软质PVC粒料中DEHP的质量百分比可高达20%~50%。

注：材料组成及牌号等信息可能涉及企业专利等信息，此处省略。但在正式的递交文件中应予以明确（如适用）。

二、浸提液制备的论述

2.1总则

由于输血器中的DEHP为脂溶性物质，易溶于乙醇，其输血器中含量可高达21.60%-33.37%。一次性使用输血器在临床上为只接触血液的器械，对于材料中可沥滤物DEHP的研究，原则上应选择血液作为浸提介质，采用临床相同使用条件进行滴注。由于难以收集足够的血液或招募足够的志愿者用于研究，因此使用血液或血液成分作为浸提介质来评估器械释放的DEHP不是很实际。因而需选择一个合适的替代溶剂，本研究拟选择密度为0.9373至0.9378g/mL的乙醇/水混合溶液作为替代浸提溶剂，为了验证乙醇/水混合溶液的浸提能力严于血液，进行了以下试验验证。同时一次性使用塑料血袋的国际标准（ISO 3826-1）中采用密度为0.9373-0.9378g/mL的乙醇水混合物作为血液替代溶剂测定血袋中DEHP的释放量。

2.2浸提能力的验证

为了验证乙醇/水混合溶液的浸提能力严于血液，收集来自三名健康志愿者的血液样品，用EDTA盐抗凝并储存在玻璃容器中。这些血样作为第一组用于模拟实际使用情况。第二组采用密度（ρ）为0.9378g/mL（20℃）的水/乙醇混合物在相同条件下浸提DEHP（相同的提取介质体积，相同的滴落速率和相同的滴度、相同环境温度）。测定结果见表1。

表1血液和水/乙醇混合物提取能力比较

| 血液 (DEHP 释放量, mg) | 乙醇/水 (DEHP 释放量, mg) |
| --- | --- |
| 1a | 2a | 3a |
| 0.110 | 0.068 | 0.073 | 2.84 |

a: 数字1,2和3对应于来自三名志愿者的全血样品。

由上述结果可以看出乙醇/水混合溶液的提取能力远高于血液。因而，对该产品选择乙醇/水混合溶液作为浸提溶液。

解读：应结合器械临床使用情况选择合适的浸提方式，若选择使用替代溶剂进行浸提，适用时，应结合可沥滤物的性质通过论述或试验方式证明，替代溶剂的浸提能力严于临床接触的介质。

三、分析方法

3.1 仪器及参数：

气相色谱质谱联用仪：安捷伦7890 GC和配备电子电离（EI）源和四极杆分析仪的安捷伦 5975C质谱仪。

色谱柱:HP-5MS（30m×0.25mm×0.25μm，Agilent J＆W GC柱，USA）；

扫描方式：溶剂延迟时间3.5min，全扫模式45-450amu（定性）和选择离子扫描m / z = 149（定量）；

分流模式：分流比5:1；流速:1.5mL / min；进样量：1μL/样品；

柱温箱条件：起始温度150℃，保持0.5分钟，然后将以20℃/分钟升至280℃，保持7分钟。

3.2方法学验证

3.2.1专属性

分别取DEHP标准溶液、乙醇/水空白对照和正己烷溶剂进行分析。色谱图如下：



图1 SIM模式下DEHP标准溶液（10μg/ mL）的色谱图



图2 SIM模式下乙醇/水空白对照的色谱图



图3在SIM模式下筛选的正己烷试剂的色谱图

由于各种邻苯二甲酸酯的广泛使用，使得其在环境中广泛分布，如空气、水、土壤、灰尘、沉积物、海产品和人体组织。在测试过程中，乙醇/水的空白对照有DEHP的响应，但是因其响应值较低不会对结果测定造成干扰。

解读：确认试验中所用到的溶剂体系及浸提液基质均未对DEHP的测定产生影响。

3.2.2线性及范围

以正己烷作为溶剂时，DEHP的线性范围为0.1-200μg/ mL。 相关系数大于0.999。实际工作中应根据待测物浓度选择合适的工作标准曲线范围。

解读：DEHP血液接触途径TI值为0.6mg/kg/day，由于输血器可用于婴儿，按临床最严格应用人群计算，根据GB/T 16886.17，取婴儿的默认体重为3.5kg, 则婴儿的可耐受暴露量=2.1mg/day（0.6mg/kg/天\*3.5）。婴儿一天最大输血量按临床最差情况350mL计，则溶液中最低浓度为6μg/ mL。线性最低点0.1 μg/ mL可以满足最具挑战性人群的评价要求。

3.2.3重复性

为了验证重复性，使用具有四种不同浓度水平的样品溶液来表示0.1-200μg/ mL的线性范围内的高，中，低和极低浓度，并且在每种浓度重复测定3次。结果见表2。

表2 重复性验证结果

| 浓度 (μg/mL) | 乙醇/水（n=3）RSD（%） | 血液（n=3）RSD（%） |
| --- | --- | --- |
| 极低 (0.1) | 2.33 | 3.88 |
| 低 (1.0) | 4.51 | 6.71 |
| 中 (10) | 8.80 | 0.57 |
| 中（100） | 7.16 | 2.24 |
| 高 (180,200a) | 5.02 | 7.86 |

a: 乙醇/水和血液样本中DEHP加入量分别为180μg/ mL和200μg/ mL

解读：覆盖线性范围内高、中、低三种浓度。

注：乙醇/水和血液样本中部分较高浓度水平的3份样品的测定RSD值在5.02%-8.80%之间，该结果来自乙醇/水和血液样本的浸提溶液，样本本底较为复杂，除此之外，该RSD值还涵盖了样本的真空干燥、复溶等复杂处理过程。同时考虑到对某些医疗器械，已知可沥滤物的浸提结果本身存在个体差异，因而，本指导原则在考虑方法精密度时，描述为“同一份均匀供试品溶液，经多次取样测定所得结果之间的接近程度”，重点考察在“同一均匀供试品检验液”下，检验方法能够达到的精密度。

3.2.4回收率

此外，采用回收率来评估方法的准确。回收率测定为测定5个不同浓度水平的加标样品，每个浓度水平重复3次， 结果见表3。

表3 回收率验证结果

| 加标浓度 μg/mL | 回收率 |
| --- | --- |
| 乙醇/水 (n = 3) | 血液 (n = 3) |
| 回收率 (%) | RSD (%) | 回收率 (%) | RSD (%) |
| 0.1 | 94.23 | 2.33 | 92.43 | 3.88 |
| 1 | 94.23 | 4.51 | 91.04 | 6.71 |
| 10 | 101.53 | 8.80 | 98.90 | 0.57 |
| 100 | 89.58 | 7.16 | 98.15 | 2.24 |
| 180，200a | 94.60 | 5.02 | 95.35 | 7.86 |

a: 乙醇/水和血液样本中DEHP加入量分别为180μg/mL和200μg/mL

解读：覆盖线性范围内高、中、低三种浓度，并同时获得样本中精密度验证结果。

3.2.5检测限（LOD）和定量限（LOQ）

由于环境背景中存在的DEHP 背景水平影响LOD和LOQ评估。当使用经过筛选并发现几乎没有背景DEHP的正己烷时，制备一系列极低浓度水平的DEHP标准品，采用信噪比法3：1和10：1估计LOD和LOQ，SIM模式下方法的LOD和LOQ分别约为1ng/mL和2.5ng/mL。然而由于乙醇/水中存在DEHP采用信噪比法评估可能不是很准确。因此本研究中关于LOD和LOQ值评估参考ICH Q2（R1）6.3和7.3中规定的方法，并分别使用如下计算公式：

 

其中δ=响应的标准偏差，S =校准曲线的斜率

本研究通过进样空白样品（乙醇/水混合物和全血），每种空白样本重复10次计算响应的标准偏差来获得δ值。 本研究中计算的LOD和LOQ值分别为：血液样本为3.08ng/mL和9.35ng/mL，乙醇/水混合物为2.91ng/mL和8.81ng/mL。

试剂筛选结果表明，相同级别试剂可能存在不同的DEHP背景水平。 因此，可能需要在供应商变更甚至批号更改时逐个报告DEHP的 LOD和LOQ值。

解读：血液样本和乙醇/水样本中检测限均可满足临床最挑战应用人群的毒理学评估要求。

3.3样品测定结果

使用乙醇/水混合溶液和血液分别模拟临床使用方式进行样品制备，采用所建立的GC-MS方法测定对浸提液进行测定，测定结果见表5。

表5 样品测定结果

| 产品名称 | 浸提溶剂 | DEHP释放量，mg |
| --- | --- | --- |
| 一次性使用输血器 | 乙醇/水混合溶液 | 2.84 |
| 血液 | 0.068-0.073 |

注：使用100mL提取介质（水/乙醇混合物和血液）。试验用血液来自三名健康志愿者

解读：根据乙醇/水样品液中浓度为：28.4 μg/mL，血液样本中浓度为：0.68-0.73 μg/mL，线性范围0.1 μg/mL -200 μg/mL，供试品溶液中测定浓度在线性范围内。

四、结论

本研究建立了GC-MS方法用于测定替代溶剂和全血中DEHP的量，产品中DEHP 的释放量为2.84mg/套（乙醇/水混合溶液）。根据FDA DEHP安全性评估文件，肠外途径的DEHP耐受摄入量（TI）值为0.6 mg / kg（体重）/天，取成人体重70 kg，儿童10公斤，新生儿3.5公斤（ISO 10993-17 2002）作为默认值。计算人体DEHP可耐受暴露量分别为：成人42毫克/天（0.6mg/kg/天\*70），儿童6毫克/天（0.6mg/kg/天\*10）和新生儿2.1毫克/天（0.6mg/kg/天\*3.5）。测定结果均低于成人的可耐受暴露量，替代溶剂的结果大于新生儿的可耐受暴露量值。

解读：如果选择使用替代溶剂获得的结果超过了可耐受暴露量值，则应考虑使用临床接触的介质重新进行研究。当然，在可行的情况下，也可以直接采用临床接触介质进行可沥滤物溶出量研究。