

高效液相色谱法同时测定医学植入用聚醚醚酮材料中 4,4-二氟二苯甲酮、对苯二酚、二苯砜的迁移量

杨增转, 张公军, 韩莹莹, 公萍, 桑喆, 李莹, 卢焕明

(中国科学院宁波材料技术与工程研究所, 宁波 315201)

摘要: 提出了高效液相色谱法快速同时测定医学植入聚醚醚酮(PEEK)材料中 4,4-二氟二苯甲酮(DFBP)、对苯二酚(HQ)、二苯砜(DPS)迁移量的方法。称取样品 2.0000 g, 加入 10 mL 甲醇, 置于聚四氟乙烯衬层的具盖玻璃试管中, 于 37 °C 浸提 48 h, 过 0.45 μm 滤膜, 滤液在 XBridge C18 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 上分离, 以不同比例的甲醇-水混合液为流动相进行梯度洗脱, 在检测波长 225 nm 下进行检测。结果显示, 4,4-二氟二苯甲酮、对苯二酚、二苯砜在的质量浓度在 1.0~50.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 与对应的峰面积呈线性关系, 测定下限为 0.03~0.05 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 。对空白样品进行 3 个浓度水平的加标回收试验, 回收率为 86.7%~99.3%, 测定值的相对标准偏差 ($n=6$) 为 0.3%~1.7%。

关键词: 高效液相色谱法; 聚醚醚酮材料; 4,4-二氟二苯甲酮; 对苯二酚; 二苯砜

Simultaneous Determination of Migration Amounts of 4,4-Difluorobenzophenone, Hydroquinone, and Diphenyl Sulfone in Polyetheretherketone Materials for Medical Implants by HPLC

YANG Zeng-zhuan, ZHANG Gong-jun, HAN Ying-ying, GONG Ping, Sang Zhe, LI Ying, LU Huan-ming

(Ningbo Institute of Materials Technology and Engineering, Chinese Academy of Sciences, Ningbo 315201, China)

Abstract: A method for rapid and simultaneous determination of migration amounts of 4,4-difluorobenzophenone(DFBP), hydroquinone(HQ), and diphenyl sulfone(DPS) in polyetheretherketone (PEEK) materials for medical implants using high-performance liquid chromatography was proposed. Take a sample of 2.0000 g, add 10 mL of methanol, and place it in a glass test tube with a lid and PTFE lining. Soak at 37 °C for 48 hours, pass through a 0.45 μm filter membrane, and separate the filtrate on an XBridge C18 column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm).

Use methanol water mixture with different volume ratios as the mobile phase for gradient elution, and detect at a detection wavelength of 225 nm. The results showed that the mass concentrations of 4,4-difluorobenzophenone, hydroquinone, and diphenyl sulfone were linearly related to the corresponding peak areas in the range of $1.0 \sim 50.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, with a lower limit of determination of $0.03 \sim 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Perform spiked recovery tests on blank samples at three concentration levels, with recovery rates ranging from 86.7% to 99.3%, and relative standard deviations ($n=6$) of the measured values ranging from 0.3% to 1.7%.

Keywords: HPLC; Polyether ether ketone material; 4,4-Difluorobenzophenone; Hydroquinone; Diphenyl Sulfone

聚醚醚酮 (PEEK) 材料在国际上被认为是未来最有希望取代钛合金材料成为医学植入物原材料的下一代生物材料, 具有耐高温、自润滑性好、较低的弹性模量等众多优异性能^{[1]-[4]}。PEEK 母料常使用 4,4-二氟二苯甲酮 (DFBP)、对苯二酚 (HQ) 为原料, 二苯砜 (DPS) 为溶剂^[5], 采用亲核取代法制备, 这可能产生残留迁移, 具有强烈的毒性、刺激性, 对人体存在巨大的潜在危害, 欧洲化学品管理局对大鼠的毒理研究结果 DFBP、HQ、DPS 的 NOAEL 分别为 6.4、15、8 mg/kg/d, 根据 GB 16886《医疗器械生物学评价》系列标准及增材制造聚醚醚酮植入物注册审查指导原则, 对于 PEEK 母料制备过程中的任何单体或添加剂都应测定其残留水平, 在 T/CAMDI 097-2022《用于医学植入物的增材制造聚醚醚酮材料》中规定 DFBP、HQ、DPS 的容许迁移量最大限值分别为 32、75、40 mg/kg。

目前, 关于 DFBP、DPS 迁移量的单项测试主要集中于聚苯醚、聚醚砜等材料中^{[6]-[9]}, HQ 在化妆品、反应液中的含量测试已有报道^{[10]-[11]}, 主要采用的有电化学法^[12]、荧光法^[13]、液相色谱法^[14]、气相色谱质谱联用技术等, 在已有的液相色谱法检测 DFBP、HQ 时, 常会在流动相中加入酸^{[9] [14]}, 影响色谱柱的性能和寿命, 对 PEEK 材料中 DFBP、HQ、DPS 含量、迁移量的检测方法未见报道, 严重影响其质量控制及品质评价, 鉴于此, 本工作采用液相色谱法, 建立了 PEEK 原材料中 3 种已知可沥滤物迁移量的同时检测方法, 避免了酸对色谱柱的潜在损害, 方法分析速度快, 精密度、稳定性好。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Waters e2695 型高效液相色谱仪，配光电二极管阵列检测器(PDA)；电子分析天平（Sartorius 公司）；Milli-Q 型超纯水仪；YJY-302 型水浴摇床；MX-S 可调式混匀仪。

混合标准溶液：称取 DFBP、DPS、HQ 标准物质各 25.0 mg，用甲醇溶解稀释，配制成质量浓度均为 $1000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合标准溶液。

混合标准溶液系列：取适量混合标准溶液，用甲醇稀释定容，配制成质量浓度为 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合标准溶液系列。

DFBP、HQ、DPS 标准物质纯度均大于 99%；甲醇、异丙醇、正己烷均为色谱纯；实验用水为超纯水。

1.2 仪器工作条件

XBridge C18 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm ）；柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ ；流动相 A 为水，B 为甲醇，流量 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ，进样量 10 μL ；梯度洗脱程序：0~10.0 min 时，A 由 90%降至 10%；10.0~18.0min 时，A 由 10%升至 90%，保持 2 min；检测波长 225 nm。

1.3 试验方法

参考 GB 16886.12-2017 医疗器械生物学评价第 10 部分：样品制备与参照材料的要求，称取样品 2 g（精确至 0.0001 g），加入 10 mL 甲醇，置于带聚四氟乙烯衬层的具盖玻璃试管中，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 浸提 48 h，过 0.45 μm 滤膜，滤液按照仪器工作条件测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱行为

在优化的实验条件下，3 种物质混合标准溶液的色谱图见图 1。

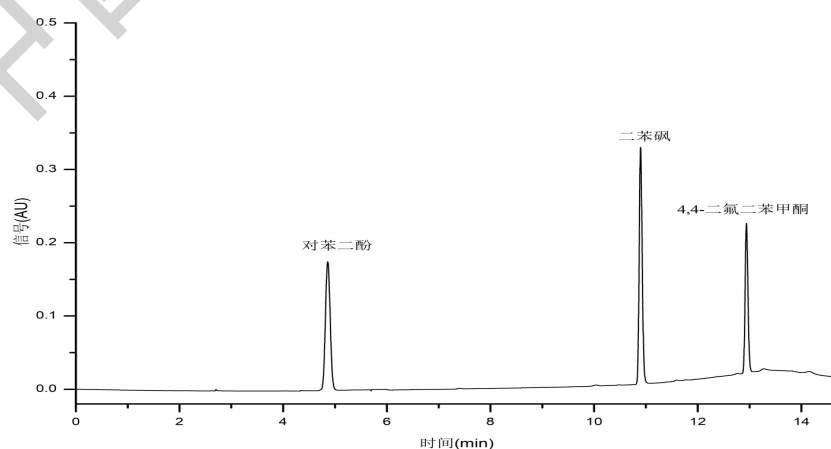


图 1 混合标准溶液的色谱图

2.2 洗脱程序的选择

试验考察了等度洗脱程序（0~10.0 min，A 为 20%）、梯度洗脱程序（1.2 节梯度洗脱程序）对混合标准溶液中 3 种目标物分离效果的影响。结果表明，在等度洗脱时，水对目标物洗脱能力强，保留较弱，目标物 5 min 内全部流出，HQ 则 2.9 min 即出峰，且峰形出现拖尾，降低甲醇比例时，整体分析时间较长，而选取梯度洗脱程序可通过调整流动相比比例调控各组分出峰时间，初始选取低有机相比比例甲醇 10%，使 HQ 峰后移至 4.9 min，峰形尖锐、对称，DPS 在 10.9 min 出峰，DFBP 在 12.9 min 出峰，整体分析时间较短。因此，选取 1.2 节梯度程序进行洗脱。

2.3 检测波长的选择

在色谱条件下，采用 PDA 全波长扫描，结果显示 DFBP 的最大吸收波长为 256 nm，DPS 的最大吸收波长为 235 nm，HQ 的最大吸收波长为 289 nm，但在 220 nm 也有一吸收区，综合选择 225 nm 为检测波长，检出限及灵敏度满足检测要求。如果仪器具备不同时间段不同波长采集功能，则可设置为各物质最大吸收波长采集。

2.4 提取溶剂、温度、时间的选择

选取空白样品进行加标试验，在 37 °C，24 h 条件下，考察了正己烷、水、异丙醇、甲醇对 3 种目标物的提取效果，结果见表 1。由表 1 可知采用甲醇提取时目标物的回收率均为 90.0%以上，提取效果更好，因此，实验选择甲醇提取。测试中发现，当使用正己烷提取时，HQ 色谱峰前沿，可能是与流动相不互溶的原因，当使用异丙醇提取时，HQ 峰偏移，这与异丙醇的洗脱能力较强有关。

表 1 提取溶剂对目标物回收率的影响

化合物	回收率/%			
	正己烷	水	异丙醇	甲醇
HQ	47.1	67.8	56.2	93.3
DPS	85.0	87.5	89.7	94.3
DFBP	88.3	84.8	89.8	94.0

参考 GB 16886.12-2017 医疗器械生物学评价第 10 部分浸提条件的要求，首先对温度进行筛选，在甲醇提取 24 h 条件下，考察 37 °C、50 °C、70 °C 时的回收效果，结果如图 2 所示，温度升高，HQ 有下降的趋势，考虑到温度升高可能导致聚合作用增强，故选取 37 °C 为试验温度。随后，在 37 °C、甲醇提取 24 h 条件下，对浸提时间 24 h、48 h、72 h 进行考察，

在 24 h 时，三种物质的回收率为 93.3~94.3%，48 h 时，三种物质的回收率为 95.2~97.1，72 h 时，三种物质的回收率为 95.3~97.8，差异较小。综合考虑，选取提取温度 37℃，提取时间 48 h。

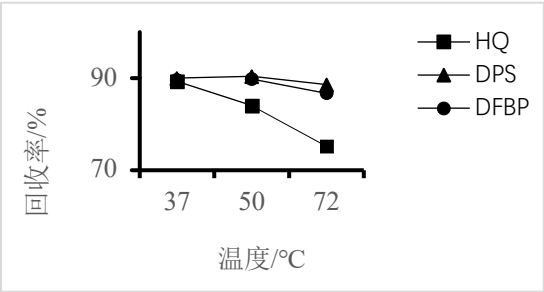


图 2 温度对目标物回收率的影响

2.5 标准曲线和检出限

按照仪器工作条件测定混合标准溶液系列，以目标物的质量浓度为横坐标,对应的峰面积为纵坐标，绘制工作曲线。结果表明，DFBP 、DPS、HQ 的质量浓度在 1.0 ~ 50.0 mg·L⁻¹ 与对应的峰面积呈线性关系，线性回归方程和相关系数见表 2。

表 2 保留时间、线性参数和测定下限

化合物	保留时间 /min	线性回归方程	相关系数	测定下限 ρ/ (mg·L ⁻¹)
HQ	4.90	$y = 2.59 \times 10^4 x$	0.9999	0.05
		- 4.8		
		$\times 10^3$		
DPS	10.86	$y = 2.99 \times 10^4 x$	0.9999	0.03
		+ 3.7		
		$\times 10^3$		
DFBP	12.91	$y = 1.65 \times 10^4 x$	0.9999	0.05
		+ 3.18		
		$\times 10^3$		

以 10 倍信噪比(S/N)计算测定下限（10S/N）结果见表 2，满足 T/CAMDI 097-中规定DFBP 、HQ 、DPS 的容许迁移量最大限值要求。

2.6 精密度和回收试验

按照试验方法，称取空白 PEEK 母料样品进行低、中、高 3 个浓度水平的加标回收试验，每个浓度水平平行测定 6 次，计算回收率和测定值的相对标准偏差（RSD），结果见表 3。

表 3 精密度和回收试验结果（ $n = 6$ ）

化合物	加标量 $\rho/$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%
HQ	2.0	99.3	1.7
	20.0	94.0	0.9
	40.0	96.9	1.2
DPS	2.0	91.5	0.9
	20.0	95.4	1.2
	40.0	96.9	1.0
DFBP	2.0	86.7	0.3
	20.0	94.0	1.3
	40.0	97.9	0.3

由表 3 可知，DFBP、DPS、HQ 的回收率为 86.7%~99.3%，测定的 RSD 为 0.3%~1.7%，说明本方法具有良好的准确度和精密度。

2.7 样品测定

采用上述建立的方法，对 6 批产线下来的 PEEK 母料进行目标物残留量测试。结果显示，均未检出 DFBP、DPS、HQ 三种物质，可以投入使用，进行下一步处理，有效的控制了产品质量。

本工作采用高效液相色谱法建立了同时检测 PEEK 材料中 DFBP、HQ、DPS 含量的检测方法，该方法操作简单，无需特殊条件设置，分析速度快，精密度高，满足 T/CAMDI 097-2022《用于医学植入物的增材制造聚醚醚酮材料》中对 DFBP、HQ、DPS 的迁移量限值要求，满足实际检测需求，可为企业内部质量控制及产品评价提供有力的技术支持。

参考文献:

- [1] Qin L, Yao S, Zhao J, et al. Review on Development and Dental Applications of Polyetheretherketone-Based Biomaterials and Restorations[J]. Materials 2021, 14, 408.
- [2] 张上达. 3D 打印聚醚醚酮在植入性医疗器械中的应用进展[J]. 中国医疗器械杂志, 2024, 48(3): 251-256.
- [3] 高亮, 白钰, 高军鹏, 等. 聚醚醚酮复合材料制备技术在医疗领域中的应用进展[J]. 复合材料科学与工程, 2024(1): 111-118.
- [4] 张永恒, 刘吕花, 李梦琦, 等. PEEK 口腔生物材料的应用现状及前景[J]. 工程塑料应用, 2024, 52(3): 179-185.
- [5] 刘运生. PEEK 的合成技术进展及其经济性分析[J]. 合成树脂及塑料, 2023, 40(3): 78-82.
- [6] 罗忻, 牛增元, 汤志旭, 等. 加速溶剂萃取-高效液相色谱法测定高分子食品接触材料中二苯砜和 4,4'-二氯二苯砜[C]. //2011 食品安全技术与标准国际研讨会暨 AOAC 中国区年会论文集. 2011: 333-337.
- [7] 出口食品接触材料 高分子材料 二苯砜和 4,4'-二氯二苯砜的测定 高效液相色谱法: SN/T 2810-2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [8] 许华, 王朝晖. 气相色谱-质谱法测定聚醚砜奶瓶中二苯砜的含量及迁移量[J]. 分析测试学报, 2010, 29(11): 1194-1197.
- [9] 刘冰. 一种塑料制品中 4,4'-二氯二苯甲酮的检测方法: CN 114755339 A[P]. 2022-07-15.
- [10] 化妆品中邻苯二酚、间苯二酚、对苯二酚的测定 高效液相色谱法: DB37/T 3036-2017[S]. 山东: 山东省质量技术监督局, 2017.
- [11] 王桂丽. 高效液相色谱法测定羟化反应液中苯酚、邻苯二酚及对苯二酚质量分数[J]. 淮海工学院学报(人文社会科学版), 2001, 14(2): 8-9.
- [12] 何家洪, 徐强, 丁武泉等. L-组氨酸-赤藓红复合膜修饰电极同时检测对苯二酚、邻苯二酚 [J]. 环境科学, 2015, 36(4): 1365-1373.
- [13] 李淮芬, 谢成根, 宗佳佳, 周汉坤. 同步荧光法同时测定苯二酚中邻苯二酚和对苯二酚[J]. 冶金分析, 2009, 29(9): 31-35.
- [14] Galimany-Rovira F, Pérez-Lozano P, García-Montoya E, et al. Optimization and validation of a fast UPLC method for simultaneous determination of hydroquinone, kojic acid, octinoxate, avobenzone, BHA, and BHT [J]. Journal of AOAC International, 2016, 100(1): 1-7.