

医疗器械生物学评价 纳米颗粒脱落和释放测量 颗粒跟踪分析法

Biological evaluation of medical devices - Measurement of shed/released nanoparticles - Particle
tracking analysis

编制说明

（征求意见稿）

国家标准编制工作组

2024 年 6 月

一、工作简况

（一）任务来源

项目名称：《医疗器械生物学评价 纳米颗粒脱落和释放测量 颗粒跟踪分析法》。

项目支撑：国家重点研发计划《纳米材料医疗器械质量控制与安全性和有效性评价技术应用研究》（2022YFC2409700）。

任务来源：2023 年国家标准制修订计划（20230027-T-464）。

主要起草单位：国家纳米科学中心、四川大学（四川医疗器械生物材料和制品检验中心有限公司）、中国食品药品检定研究院等。

归口单位：全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会纳米医疗器械生物学评价分技术委员会（SAC/TC 248/SC1）。

（二）工作过程

本标准的编制工作从2021年1月开始，秘书处和起草单位组织成立标准预立项工作小组，提出《医疗器械生物学评价 纳米颗粒脱落和释放测量 颗粒跟踪分析法》的标准立项建议，并起草标准草案。2021年10月秘书处将该项目上报标管中心，于2022年9月1日进行国标委的标准立项答辩，2023年3月获得国家标准立项。2023年7月，秘书处组织标准起草工作组召开标准制定启动会，经过会议讨论后完善标准工作组讨论稿，并确定标准验证方案。此后，标准工作组根据确定的验证方案开展验证工作。2024年5月，标准起草工作组结合已进行的标准验证工作结果，对标准草案进行修改和完善，形成了征求意见稿。于2024年6月向全体委员及全社会进行广泛征求意见。

二、国家标准编制原则和确定标准主要内容的依据

（一）制定背景

纳米材料由于其独特的性质而具有不同于常规材料的特殊用途，在快速发展的二十年中，已经从高精尖领域进入到大众的生活之中，应用纳米材料和技术的产品广泛而深入地进入了世界各地的不同行业，包括生物医药、食品、化妆品、医疗保健、农

业、汽车行业等。但是，在将纳米材料应用到各种产品中的同时，越来越多的研究发现了其与暴露于纯纳米材料形式相关的潜在危害，也有越来越多的人关注和研究纳米材料从纳米复合体中脱落和释放的潜力和条件。作为暴露研究的先决条件以及生物安全性评价的决定性因素，含纳米材料相关产品在环境中以及使用过程中纳米材料的脱落和释放问题成了不容忽视的问题。因此，极其有必要对脱落释放的风险进行重点风险评估。国家药品监督管理局在 2023 年发布的《应用纳米材料医疗器械生物学评价 理化表征》指导原则中，明确指出了在医疗器械审评过程中，应关注纳米材料的脱落释放风险评价。虽然纳米材料的脱落释放风险已经成为广为关注的风险共识，但是目前尚无针对性的、适用的标准化表征和评价方法。本文件针对纳米产品采用相应的模拟磨损脱落释放，然后采用颗粒跟踪分析法（PTA）对脱落释放液中纳米颗粒粒径、粒径分布以及数量浓度进行检测和表征。该标准方法将对应用纳米材料医疗器械的安全性评价起到重要的技术支撑作用，进而促进纳米材料和技术的转化。

（二）编制原则

本标准按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。国际单位遵循 ISO 80000-1《量和单位第 1 部分：总则》的规定和要求。

（三）本标准制定参考的主要依据

应用纳米材料的医疗器械在使用过程中，由于与周围生理环境发生相互作用，存在脱落和释放纳米材料的风险，该风险在纳米医疗器械的安全性评价中是必须考虑的重要评价内容之一[1]。脱落释放纳米颗粒的大小决定了其不同的体内生物学效应，包括透膜方式、细胞转运、体内分布和生物转归等；脱落释放的数量决定了其包括毒性、免疫反应等生物危害的程度。研究表明，较大的纳米材料（介于 500 nm 至 10 μm 之间）可能通过巨胞饮作用进入细胞；较小的纳米材料（通常 <150 nm）可以通过受体介导的胞吞作用进入细胞；而大于 250 nm（最大可到 ~3 μm ）的纳米材料通常会通过特殊细胞的吞噬作用进入细胞 [2]。此外，小尺寸的纳米颗粒更容易通过胞吞（主要方式）或简单的细胞扩散进入细胞，进而穿过血脑屏障、胎盘屏障等生理屏障[3]。纳米材料的体内分布、转运和清除也取决于纳米颗粒的尺寸。一般来说，小于 6 nm 的纳米颗粒更容易被肾脏过滤并清除到尿液中，而大于 6 nm 的纳米颗粒往往被肝脏隔离并长期滞留

或逐渐被肝胆清除。毋庸置疑，纳米颗粒的暴露剂量是引起生物安全风险的关键因素。因而，评估应用纳米材料的医疗器械的生物安全性，准确获得其脱落释放纳米颗粒的粒径和数量浓度是必须考虑的关键问题。

对于粒径和粒径分布的检测，有扫描和透射电子显微术（SEM 和 TEM）、扫描探针显微术（SPM）、动态光散射（DLS）、离心液体沉降（CLS）等多种检测技术。但是基于电子显微镜的技术的主要缺点是样品通量低、分析计数的颗粒数量相对较少导致统计采样效果差、测量时间和成本高等问题；DLS、CLS 则存在粒径分辨率差、无法获得准确的数量信息等问题。

颗粒跟踪分析法（PTA）是一种能够克服上述几个限制的测量分析技术。该技术设备将光散射与光学显微镜相结合，并配备有摄像机，用于记录正在进行布朗运动的单个颗粒的散射光。软件跟踪在显微镜视野中检测到的粒子的布朗运动轨迹，并确定它们的均方位移[4]，然后根据以下修改后的斯托克斯-爱因斯坦方程计算每个跟踪粒子的平移扩散系数并将其转换为等效球形流体动力学直径。

$$d = \frac{K_B T}{3\pi\eta D_x} = \frac{2K_B T t}{3\pi\eta \langle x \rangle^2} \dots\dots\dots (1)$$

$$d = \frac{K_B T}{3\pi\eta D_{xy}} = \frac{4K_B T t}{3\pi\eta \langle x, y \rangle^2} \dots\dots\dots (2)$$

$$d = \frac{K_B T}{3\pi\eta D_{xyz}} = \frac{2K_B T t}{\pi\eta \langle x, y, z \rangle^2} \dots\dots\dots (3)$$

PTA 测量是逐个对颗粒进行分析，因此除能在获得粒径信息的同时获得数量浓度信息外，对于分布较宽的异质样品体系，不易受到附聚物或较大颗粒的干扰；对于单次测量，其测量的粒子数量较其他方法也显著增加。此外，该方法在灵敏度和分辨率方面表现出比 DLS 更优越的性能[5]。因此，该技术成为 SEM 和 TEM 等分析方法的经济、高效的替代方案。基于以上的 PTA 方法优势，该技术已成为对合成颗粒以及细胞外囊泡（EV）等进行粒径和数量分析的流行方法。

近些年来，出于生物安全评价的考虑，纳米材料在使用过程中以及诸如生物体等复杂环境体系中的表征需求急剧增加，PTA 技术在这些条件下应用的规范性和准确度等问题面临着挑战。本标准采用 PTA 方法对脱落释放液中纳米颗粒的粒径和数量浓度进行表征，在遵循现有 GB/T 42348《粒度分析 颗粒跟踪分析法（PTA）》国家标准中在仪器使用规则要求的基础上，优化脱落释放液制备方法，关注释放液黏度等关键参数对检测准确度的影响，制定适用于医疗器械安全性评价的粒径和数量浓度检测标准

方法。

参考文献:

- [1] 国家药品监督管理局. 应用纳米材料的医疗器械安全性和有效性评价指导原则 第二部分: 理化表征, 2021.
- [2] Peng Y, Yang Z, Sun H, et al. Nanomaterials in Medicine: Understanding Cellular Uptake, Localization, and Retention for Enhanced Disease Diagnosis and Therapy. Aging and Disease, 2024. Epub ahead of print. PMID: 38421835.
- [3] Cameron, S; Hosseini, F; Willmore, W.G. A Current Overview of the Biological and Cellular Effects of Nanosilver. Int. J. Mol. Sci. 2018; 19(7): 2030.
- [4] Qian H, Sheetz MP, Elson EL. Single particle tracking—analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. Biophys J. 1991;60:910 – 921.
- [5] Vikram Kestens, corresponding author¹ Vassili Bozatzidis,¹ Pieter-Jan De Temmerman,² Yannic Ramaye,¹ and Gert Roebben. Validation of a particle tracking analysis method for the size determination of nano- and microparticles. J Nanopart Res. 2017; 19(8): 271.

三、 主要验证实验

1、 粒度标准物质验证 PTA 方法的准确度

1.1 验证目的

为了确保特定条件下 PTA 测量技术的准确性、可溯源性、重现性，并建立最佳操作条件，利用标准物质对 PTA 方法粒径和数量浓度测量的准确性进行验证，并开展粒径检测方法间验证比对实验。

1.2 验证方法

1.2.1 采用动态光散射（DLS）和透射电子显微镜（TEM）两种不同的检测方法 with PTA 方法进行粒径测量比对。

1.2.2 验证 PTA 方法在模拟体液（SBF）分散体系中的适用性。由于 SBF 离子浓度较高，无法获得透射电镜测量所需的透光度，所以，在 SBF 体系中仅与 DLS 进行方法间比对。

1.3 实验材料

标准银纳米颗粒：标称值 42.5 nm（GBW(E)120192）；标称值 69.9 nm（GBW(E)120193）。

标准纳米二氧化硅颗粒：标称值 131 nm（GBW(E)120059a）。

二氧化硅纳米颗粒：80 nm（市售非标物）。

1.4 实验步骤

1.4.1 样品制备

(1) 水溶液样品制备

将固态粉末样品（纳米银标物）用超纯水配制成浓度为 1mg/mL 的标准纳米颗粒储备液，稀释后用于 PTA 和 DLS、TEM 检测。固物含量分别为 1%和 2.5%的 131nm 和 80nm 的纳米二氧化硅样品同样经稀释后用于 PTA 检测和 DLS、TEM 检测。

(2) SBF 溶液样品制备

将上述纳米银及二氧化硅储备液，以 SBF 溶液按照上述步骤进行稀释和制备 PTA 和 DLS 样品。

1.4.2 上机检测

- a) DLS: 按照 GB/T 29022 中规定的方法测试，获得平均水合粒径和分散指数。
- b) TEM: 按照 JY/T 011 中规定的方法，获取被测样品的透射电子显微镜图像。按照 GB/T 21649.1 中静态图像分析方法，获得样品的平均粒径和粒径分布。
- c) PTA: 按照 7.2.1 中规定的方法测试，获得颗粒粒径。

1.5 验证结果和结论

1.5.1 水溶液中，PTA 测量纳米颗粒标准物质的平均粒径和数量浓度。

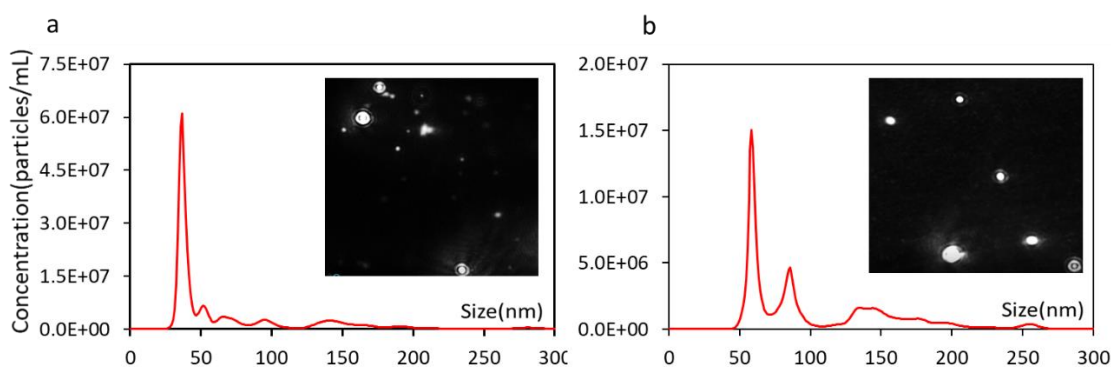


图 1. 水溶液中，标称值 42.5nm (a) 和 69.9nm (b) 的标准纳米银颗粒的 PTA 测量结果。

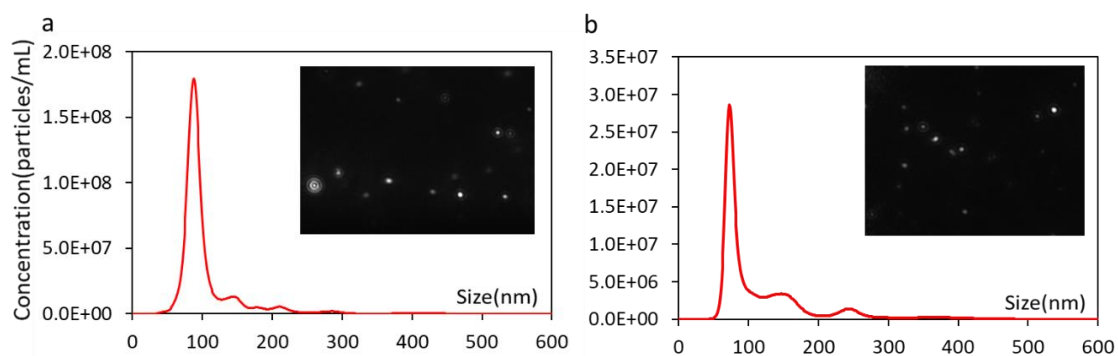


图 2. 水溶液中，标称值 131 nm (a) 和示值 80 nm (b) 的纳米二氧化硅颗粒的 PTA 测量结果。

其平均粒径和数量浓度汇总在表 1 中。可见，无论是平均粒径还是数量浓度均与标称值具有较高的一致性。

表1 水溶液中纳米颗粒PTA测量结果

纳米颗粒类型	Ag 42.5 nm	Ag 69.9 nm	SiO ₂ 131 nm	SiO ₂ 80 nm
平均粒径 (nm)	49.4±0.9	72.3±3.2	150.1±8.0	103.5±1.9
数量浓度 (个/mL)	2.2×10^{12}	1.0×10^{12}	7.4×10^{12}	8.4×10^{12}

1.5.2 SBF 溶液中 PTA 测量纳米颗粒标准物质的平均粒径和数量浓度

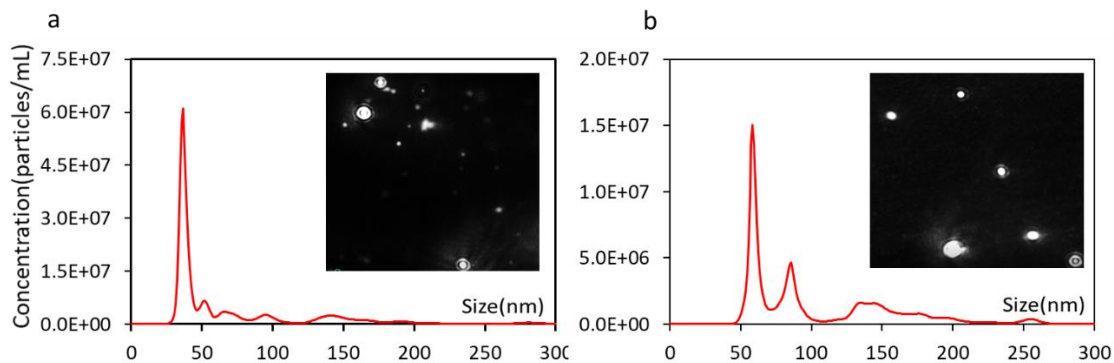


图 3. SBF 溶液中，标称值 42.5nm (a) 和 69.9nm (b) 的标准纳米银颗粒的 PTA 测量结果。

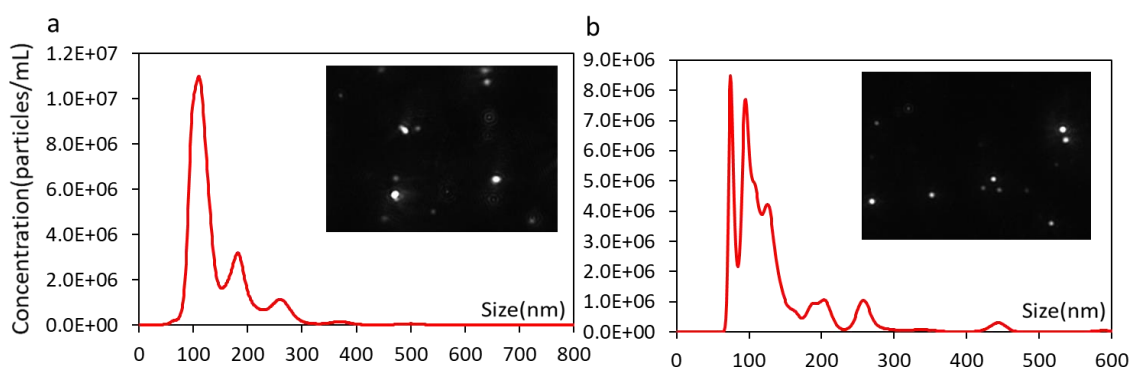


图 4. SBF 溶液中，标称值 131 nm (a) 和示值 80 nm (b) 的纳米二氧化硅颗粒的 PTA 测量结果。

其平均粒径和数量浓度汇总在表 2 中。分散介质 SBF 导致纳米颗粒表面水化层变化以及轻微聚集，粒径增大，数量浓度降低。

表2 SBF溶液中纳米颗粒PTA测量结果

纳米颗粒类型	Ag 42.5 nm	Ag 69.9 nm	SiO ₂ 131 nm	SiO ₂ 80 nm
平均粒径 (nm)	69.2±3.9	105.4±6.8	146.8±5.1	135.2±4.3
数量浓度 (个/mL)	6.9×10 ¹¹	2.6×10 ¹¹	6.6×10 ¹²	4.4×10 ¹²

1.5.3 PTA 方法和 TEM、DLS 的方法比对

粒径比对结果汇总在表 3 和表 4 中。TEM 和 DLS 的结果同样证实了 PTA 方法粒径测量的可靠性。而且，相比于 DLS、TEM，PTA 测量的优势在于更准确地粒径分布测量和可测量数量浓度。

表3 水溶液中，各种不同粒径纳米材料的粒径比对结果

方法 \ 纳米材料	AgNPs		SiO ₂	
	标称 42.5 nm	标称 69.9 nm	示值 80 nm	标称 130 nm
PTA	49.4±0.9 nm	72.3±3.2 nm	103.5±1.9 nm	150.1±2.1 nm
TEM	41.7 ±5.7 nm	69.2±5.0 nm	85.3±5.3 nm	132.5±7.0 nm
DLS	63.2±4.3 nm	99.9±0.8 nm	128.1±5.2 nm	147.9±1.9 nm

表4 SBF溶液中，各种不同粒径纳米材料的粒径比对结果

纳米材料	AgNPs	SiO ₂
------	-------	------------------

方法\	标称 42.5 nm	标称 69.9 nm	示值 80 nm	标称 130 nm
PTA	69.2±3.9 nm	105.4±6.8 nm	135.2±4.3nm	146.8±5.1 nm
DLS	135.3±3.1 nm	224.3±10.1 nm	175.3±2.3 nm	178.1±3.2 nm

2、方法的实验室间验证

2.1 验证目的

验证本文件中 PTA 方法在实验室间的可重现性。

2.2 验证单位

国家纳米科学中心、四川大学（四川医疗器械生物材料和制品检验中心有限公司）。

2.3 材料和方法

两单位根据本文件中规定的 PTA 方法，对 1.3 中所描述的同一二氧化硅纳米颗粒在水溶液中的平均粒径和数量浓度进行测量。

2.4 验证结果

两单位的 PTA 测量结果汇总在表 5 中。可见，粒径和数量浓度的测量结果均有较高的一致性，证明本文件中的 PTA 方法在平均粒径测量和数量浓度测量方面的可操作性和可重复性。

表 5 纳米二氧化硅颗粒的实验室间验证结果

材料	结果 1		结果 2	
	平均粒径（nm）	数量浓度（个/mL）	平均粒径（nm）	数量浓度（个/mL）
SiO ₂ 80	110.3±2.3	8.0×10 ¹²	103.5±1.9	8.4×10 ¹²
SiO ₂ 130	146.8±2.1	8.8×10 ¹²	150.1±8.0	7.4×10 ¹²

3、示例——含纳米银敷料中脱落释放纳米颗粒的PTA测量

3.1 验证目的

探究PTA方法在应用纳米材料医疗器械中脱落释放纳米颗粒表征的适用性。

3.2 实验材料

一种市售的纳米银敷料。

3.3 实验步骤

3.3.1 脱落释放液制备

将市售的纳米银抗菌敷料裁剪成7 cm×5 cm大小后固定于样品支架上，在溶出杯中量入200 mL的超纯水或SBF模拟体液，在32℃温度条件下，以30 dpm（Displacement Per Minute，每分钟排量）的往复速度进行脱落释放实验，往复行程2 cm。72 h后，取样5 mL用于PTA检测。

3.3.2 SBF溶液黏度测量

SBF 溶液的黏度暂时无法查表获得，因此根据 GB/T 22235 中规定的方法进行测量。利用乌氏黏度计，通过测量 3 次相同体积溶液的流出时间，测得 SBF 溶液在 25℃ 温度下的黏度为 0.89 mPa.s。

3.3.3 检测方法和条件

按照本文件7.2中规定的PTA方法流程测量水体系及SBF体系的脱落释放液中纳米颗粒的粒径和数量浓度。测试在25℃温度下进行，重复测量3次，每次的颗粒运动轨迹捕获时长为40s，激光强度设置为12，检测阈值设置为5（表6）。然后将测得的 SBF溶液黏度代入公式4获得SBF体系中纳米颗粒的粒径结果。

表6 PTA主要检测条件

参数	温度	颗粒运动轨迹捕获时长	重复测量次数	激光强度	检测阈值
数值	25℃	40 s	3	12	5

3.4 验证结果

根据本文件“7.3 数据分析”的规定进行脱落释放液中纳米颗粒粒径和数量浓度计算，并进行粒径分布分析。粒径检测结果如下图所示。总颗粒数量浓度分别为 $3.3\times10^8\pm9.1\times10^7$ 个/mL和 $1.0\times10^8\pm 2.0\times10^7$ 个/mL。

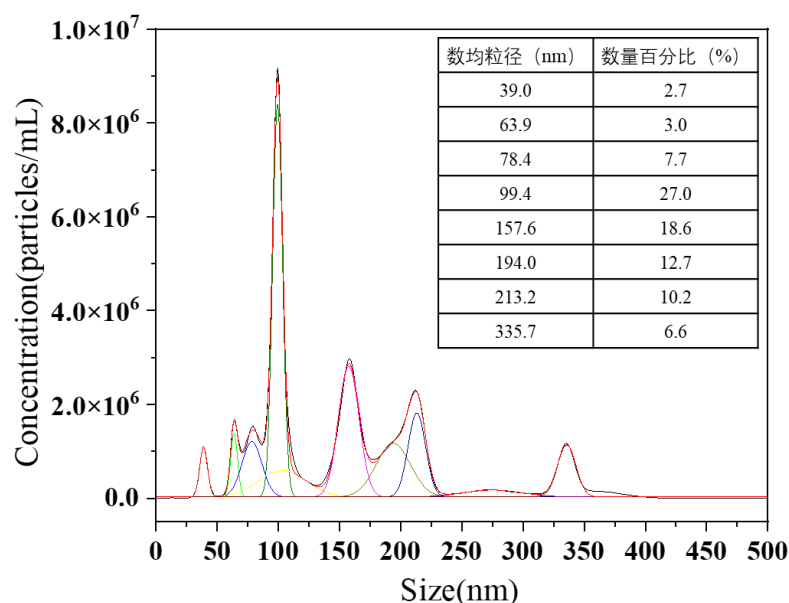


图 5. 水体系敷料释放液中纳米颗粒的 PTA 检测结果。插表为粒径分析的分峰拟合结果。

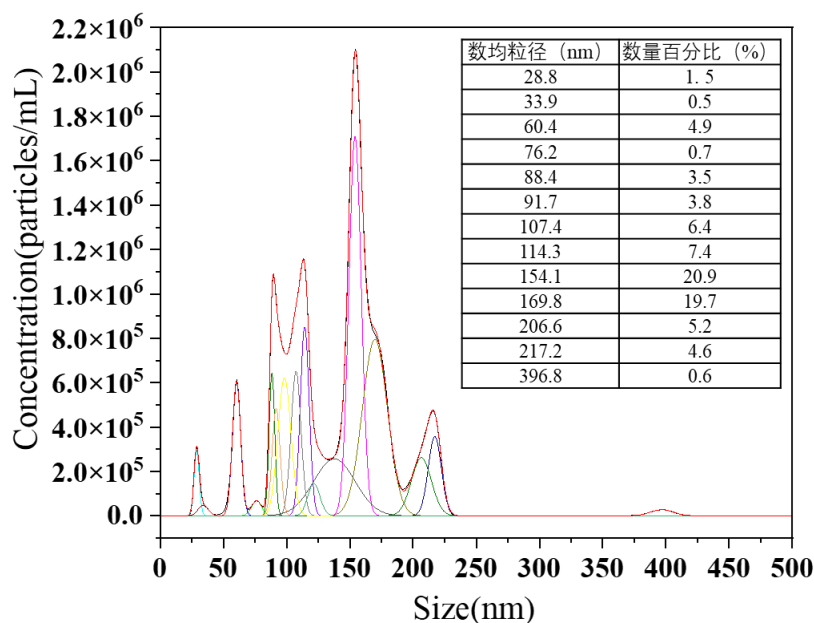


图6. SBF体系敷料释放液中纳米颗粒的PTA检测结果。插表为粒径分析的分峰拟合结果。

4、验证结论

根据本文件给出的分散液中纳米颗粒的测量方法，方法间比对验证了PTA方法对于溶液中纳米颗粒粒径和数量浓度测量的准确性和可行性，证实了该方法相对于TEM、DLS方法的优越性。对于纳米二氧化硅材料的实验室间验证结果显示，同一标称值纳米颗粒粒径和数量浓度的实验结果非常接近，证明了此标准方法的可靠性和可重复性。此外，我们采用往复支架法对一种市售的纳米银敷料产品进行模拟脱落释放实验，然后利用本文件中规定的PTA方法对脱落释放液中的纳米颗粒进行了粒径和数量浓度检

测，结果显示该脱落释放体系为异质性多分散体系，PTA方法不但能够获得体系中纳米颗粒的总体平均粒径和数量浓度，基于该方法的高粒径分辨率，经过去卷积拟合后可以获得脱落释放液中精确的纳米颗粒粒径分布信息，这对于准确评估其生物安全性风险十分重要。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比的情况。

目前，国内外对纳米材料在医疗器械领域的应用研究十分活跃，已经有纳米银敷料、纳米羟基磷灰石骨填充物等多种产品上市，与此同时，纳米颗粒从相关产品中的脱落和释放风险问题也引起了业内的广泛关注。其中，脱落释放纳米颗粒的大小和数量与其发挥功能和产生生物安全的风险息息相关。但是，目前尚无针对医疗器械中纳米颗粒脱落释放实验方法和脱落释放液中纳米颗粒粒径和数量表征的国际和国家标准发布。针对纳米银敷料中纳米银颗粒和离子释放的表征，我国发布了一项行业标准YYT 1863-2023《纳米医疗器械生物学评价 含纳米银敷料中纳米银颗粒和银离子的释放与表征方法》，规定了形貌、粒径、银含量等指标表征方法的常规要求，应用范围有限且不涉及方法准确性操作规定。针对溶液体系中纳米颗粒的粒径和数量测量，有两项国家标准发布：GB/T 42732-2023《纳米技术 水相中无机纳米颗粒的尺寸分布和浓度测量 单颗粒电感耦合等离子体质谱法》和GB/T 42348-2023《粒度分析 颗粒跟踪分析法(PTA)》。GB/T 42732是基于元素荷质比的方法，对于有机纳米颗粒以及轻元素纳米颗粒并不适用；GB/T 42348是指南性标准，给出了PTA测试的通用规则，为本标准的制定提供技术参考。本标准针对医疗器械脱落释放纳米颗粒的风险，在遵循GB/T 42348中对于仪器使用规则要求的基础上，优化脱落释放液制备方法，关注释放液黏度等关键参数对检测准确度的影响，提高对生理性释放介质等复杂体系中纳米颗粒粒径、粒径分布和数量浓度的测量准确度，制定适用于医疗器械安全性评价的粒径和数量浓度检测标准方法。本标准的制定，是对医疗器械领域中纳米材料相关标准的重要补充，对纳米材料应用转化具有重要的促进作用。

五、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

本标准按照《中华人民共和国标准化法》和相关医疗器械标准制修订法规的要求进行编写，符合相关法律、法规。与现有的强制性国家标准不冲突。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

无。

七、作为强制性国家标准或推荐性国家标准的建议

本文件规定了医疗器械中脱落和释放纳米颗粒粒径、粒径分布和数量浓度的 PTA 测试方法。本标准属于技术方法标准，没有技术指标要求。考虑到纳米技术新兴领域仍在发展中，经分技委按相关程序，全体委员讨论通过，建议本标准按推荐性标准实施。

八、贯彻国家标准的要求和措施建议

本标准发布后一年内根据标准使用者需要组织对标准中主要技术内容的宣贯和讲解。

九、废止现行有关标准的建议

无。

十、其他应予说明的事项

无。

全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会
纳米医疗器械生物学评价分技术委员会秘书处

2024年6月3日