

ICS 11.040.40

C45



中华人民共和国国家标准

GB/T ××××—××××

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

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

2021 年 6 月

××-×-× 发布

××-×-× 实施

国家市场监督管理总局 发布
中国国家标准化管理委员会

目 次

前言 II

引言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 符号和缩略语 3

5 原理 4

6 仪器与试剂 4

7 实验步骤 5

8 质量控制 7

9 测试报告 7

附录 A（资料性）粒径检测下限..... 8

附录 B（资料性）实验流程图..... 9

附录 C（资料性）方法验证..... 10

附录 D（资料性）示例 1：骨科医疗器械磨损实验 12

前 言

本文件按照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。

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。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由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/TC248/SC1）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引 言

纳米尺寸的羟基磷灰石、氧化锆、氧化锌、银等材料普遍用于人工关节、义齿、组织修补材料、敷料等医疗器械产品。这些材料在体内应用过程中随磨损或腐蚀会有脱落和释放纳米颗粒的风险，而引起生物安全性隐患。临床医学中，医疗器械中材料的颗粒脱落和释放的表征，如数量浓度、粒径及粒径分布、元素组成及含量等，是评估其机械性能和生物安全性的重要参考数据。因此，表征体内应用过程中脱落和释放的颗粒至关重要。但是目前医疗器械的评价缺乏脱落和释放的纳米颗粒的评估，尚无医疗器械中脱落和释放的纳米颗粒数量浓度、粒径和粒径分布的标准化检测方法，因此特制订本文件。

本文件拟采用颗粒跟踪分析（PTA）技术，同时对颗粒的粒径以及颗粒数量浓度进行测量和量化分析。

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

1 范围

本文件规定了医疗器械脱落和释放的纳米颗粒的数量浓度及其粒径的测量方法。

本文件适用于可脱落和释放纳米颗粒的医疗器械。脱落或释放其他尺寸颗粒的医疗器械也可以参考本标准检测。

本文件的粒径测量范围为 10 nm–2000 nm。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 22235 液体黏度的测定

GB/T 30544.6 纳米科技 术语 第6部分：纳米物体表征

ISO 19430-1 Particle size analysis – Particle tracking analysis (PTA) method

3 术语和定义

GB/T 30544.6、YY/T 0528 和 ISO 19430-1 界定的术语和定义适用于本文件。

3.1

颗粒 particle

有明确物理边界的微小物质，又称粒子。

注1：物理边界也可以描述为界面。

注2：颗粒能够作为一个整体移动。

注3：该通用颗粒定义使用与纳米物体。

[GB/T 30544.6-2016，定义 2.9]

3.2

纳米颗粒 nanoparticle

三个维度的外部尺寸都在纳米尺度的纳米物体。

注：如果纳米物体最长轴和最短轴的长度差别显著（大于3）时，应当用纳米棒或纳米片来表示纳米颗粒。

[GB/T 32269-2015, 定义 4.1]

3.3

粒度 particle size

在指定测量条件下用特定的测量方法确定的颗粒的线性尺寸。

注：不同的粒度分析方法基于对不同物理性质的测量。无论试剂测量的物理性质为何，结果给出的是颗粒的线性尺寸。例如，等效球形直径。

[GB/T 30544.6-2016, 定义 3.1.1]

3.4

光散射 light scattering

在具有不同光学性质的两个介质的界面上，光传播行为的变化。

[GB/T 30544.6-2016, 定义 3.2.5]

3.5

流体力学直径 hydrodynamic diameter

与真实颗粒在该流体中具有相同扩散系数的颗粒的等效直径。

[GB/T 30544.6-2016, 定义 3.2.5]

3.6

颗粒跟踪分析 PTA

激光照射到悬浮液中做布朗运动的颗粒，并利用单个颗粒的位置变化测量粒度的方法。

注 1：通过分析颗粒位置随时间的变化得到平移扩散系数，进而通过斯托克斯-爱因斯坦（Stokes-Einstein）方程计算流体力学直径作为粒径。

注 2：纳米颗粒跟踪分析（NTA）常被称作 PTA，NTA 是 PTA 的一部分，因为 PTA 涵盖了大粒度范围不仅仅是纳米尺度（3.1）范围

[ISO/TS 80004-6:2013, definition 3.2.8, 修改内容：删除术语中“Nanoparticle tracking analysis”，修改了注 1 和注 2]

3.7

纳米材料 nanomaterial

任一外部维度、内部或表面结果处于纳米尺度的材料。

[GB/T 30544.1-2011, 定义 2.4, 修改内容: 删除了注 1 和注 1]

3.8

黏度 viscosity

液体流动或变形的阻力的量

注: 粒度分布可表示为积累分布或分布密度 (在某尺寸区间内材料的分布除以该尺寸区间的宽度)。

[ISO 3104:1994]

4 符号和缩略语

4.1 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PTA 颗粒跟踪分析 (particles tracking analysis)

SOP 标准操作程序 (standard operating procedure)

CV 变异系数 (variable coefficient)

4.2 符号

下列符号适用于本文件。

d ——流体力学直径, 单位为米 (m);

K_B ——玻尔兹曼常数, 单位为平方米千克每二次方秒每开尔文 ($\text{m}^2\text{kg s}^{-2}\text{K}^{-1}$);

η ——分散介质黏度, 单位为帕·秒 ($\text{Pa}\cdot\text{s}$);

T ——绝对温度, 单位为开尔文 (K);

t ——时间, 单位为秒 (s);

D_x ——一维扩散系数, 单位为平方米每秒 (m^2/s);

D_{xy} ——二维扩散系数, 单位为平方米每秒 (m^2/s);

D_{xyz} ——三维扩散系数, 单位为平方米每秒 (m^2/s);

$\overline{(x)}^2$ ——一维均方位移，单位为米的平方（ m^2 ）；

$\overline{(x,y)}^2$ ——二维均方位移，单位为米的平方（ m^2 ）；

$\overline{(x,y,z)}^2$ ——三维均方位移，单位为米的平方（ m^2 ）；

C ——颗粒浓度，单位为个每毫升（particles/mL）；

N ——分析样品溶液中跟踪分析的颗粒数，单位为个（particles）；

l ——采样水平长度，单位为厘米（cm）；

w ——采样水平宽度，单位为厘米（cm）；

h ——采样深度，单位为厘米（cm）。

5 原理

颗粒跟踪分析（PTA）技术利用激光光源照射颗粒悬浮液，通过光学显微镜观察和收集颗粒的散射光信号，对每一个颗粒的布朗运动进行轨迹追踪和记录分析，根据单位时间内颗粒的平均空间位移，不同仪器可分别获得样品溶液中颗粒的一维、二维和三维扩散系数，根据斯托克斯-爱因斯坦（Stokes-Einstein）方程，依据式（1）、（2）和（3）获得流体力学直径，进而得到整个样品体系的粒径分布信息，并由追踪颗粒数和已知的采样体积，根据公式（4）估算出颗粒的浓度。

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

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

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

$$C = \frac{N}{l \times w \times h} \dots\dots\dots (4)$$

6 仪器与试剂

6.1 仪器

本标准所用测试仪器如下：

- a) 颗粒跟踪分析仪；
- b) 超声波清洗设备；
- c) 磨损实验用设备；
- d) 移液器：量程 2.5 μL ，量程 10 μL ，量程 200 μL ，量程 1000 μL 。

6.2 试剂

除非另有说明，分析使用的实验用水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。磨损试验中的试验介质应根据医疗器械选用适合的介质。

7 实验步骤

7.1 脱落和释放液制备通则

医疗器械种类繁多，本标准的使用者可根据特定类型医疗器械的临床使用方式设计相应的模拟脱落和释放实验，包括选择对应的模拟生理环境和其他条件，如模拟脱落和释放的试验介质、温度、往复频率、力度、角度、时间等。当有标准化的模拟脱落和释放模型可供参考时，可直接参照其规定执行；在没有标准方法参考的情况下，需对自行设计的实验方法的适用性进行论证。一些相关标准如 YY/T 1426.1、YY/T 1426.2、YY/T 1426.3 等已经给出了涉及全膝关节模拟临床使用时磨损试验设计的参考，在获得相应骨科材料模拟脱落和释放实验液时可以遵照采用；YY/T XXXX 等已经给出了涉及敷料模拟临床使用时的模拟脱落和释放试验设计，在获得敷料类材料的脱落和释放液时可以参考采用。为确保所测样品试验样品的代表性，应至少制备 3 件试验样品。

7.1.1 试验介质

PTA 法测量颗粒粒径分布和浓度需要脱落和释放的颗粒样品均匀分散在适宜的、且与颗粒具有不同折射率的分散介质中。分散介质在满足相应医疗器械模拟脱落和释放条件的同时，应为不引起显著透射光衰减的透明介质，且应与 PTA 装置相容。

选定的试验介质在进行磨损实验前应经过 $2\mu\text{m}$ 的滤膜过滤。

7.1.2 干扰颗粒排除

达到试验周期后收集的脱落和释放液需经 $2\mu\text{m}$ 的滤膜过滤去除大颗粒后用于 PTA 上机检测。

若模拟脱落和释放的介质溶液中存在其他种类干扰颗粒，可通过物理、化学或生物的手段去除干扰颗粒后进行 PTA 测量。

7.2 样品检测

7.2.1 待测样品准备

将 7.1 中制备的待测样品超声分散均匀，并用相应的分散介质适当稀释。为使样品有足够数量的颗粒能够被定位和跟踪，同时避免样品浓度过高导致测量干扰以及清洗困难，应制备两个浓度以上的样品稀释液至少各 1 mL，平衡至室温后待测。

注 1：超声条件建议设置为功率 200 W，1 min。

注 2：建议样品稀释液颗粒浓度范围为 10^6 – 10^9 particles/mL。不同样品的最佳颗粒测量浓度不同，可在保证测量数量准确的同时通过对样品进行系列稀释获得最佳颗粒数量浓度范围。

7.2.2 仪器初始化

检查仪器各个组件是否连接正常。依次打开仪器电源和检测软件，为尽可能提供稳定的检测条件，仪器应达到热平衡，保持测量过程中样品温度为 (25 ± 3) ℃。根据待测样品的理化性质初设适合的捕获参数。

7.2.3 进样

将 7.2.1 中的待测样品溶液从低浓度向高浓度进行测试。将样品以自动或手动方式注入样品池。样品池内的样品应尽量保持稳定，避免较大的颗粒漂移，进样过程中应避免产生气泡，以免引起对体积和数量的估算偏差。

7.2.4 检测参数设置

打开激光照射样品。在测试软件中根据样品分散介质和待测颗粒的最佳对比度选择最适激光波长、捕获次数和单次捕获时间，根据分散介质选择相应的介质黏度，若自动进样则设置泵速参数，形成本次检测的标准操作程序（SOP）。

注：可根据待测样品的理化性质对检测参数进行相匹配的调整。粒径小、散射弱、多分散的颗粒需要设置较长的捕获时间、捕获次数和激光强度，以获取足够的信号实现颗粒跟踪。而对于粒径大、散射强、单分散的颗粒则相反。

7.2.5 焦点调节

在视野内，将激光强度调节至最佳。在此激光强度下，利用焦点调节按钮调节显微镜视野焦点至最佳。

注：激光强度及焦点调节以视野内可见颗粒亮度最大、背景干扰最小、可见尽可能多的颗粒为最佳。

7.2.6 采样

运行 SOP，对标准样品进行至少 3 次的重复采样和跟踪记录。

7.2.7 颗粒轨迹跟踪分析

采样结束后，根据待测样品的粒径和散射强度设置合适的分析检测阈值，对捕获图像中的颗粒轨迹进行逐一跟踪分析。

注：检测阈值设置值以在不采集背景噪音的条件下能够跟踪最多的颗粒数为最佳。

7.2.8 粒径及浓度计算

本标准利用颗粒在 x 和 y 平面的均方位移 $\overline{(x,y)^2}$ ，根据公式 2 获得样品中颗粒的流体力学直径 d 。依据式（4）获得颗粒浓度 C 。式中分散介质的黏度值 η 通常可查表获得，对于无法查表获得的黏度值可根据 GB/T 22235 中规定的方法进行测量。

7.2.9 导出结果报告

导出的结果报告中需包括 PTA 测量和分析的关键参数，包括激光的类型、波长和强度、相机的类型、帧目数、温度、黏度、检测阈值等。

7.2.10 测量流程图

参见附录 B 中图 B.1。

8 质量控制

8.1 样品浓度

本方法中，仪器采样体积内的颗粒数量决定了对其粒径和浓度统计结果的质量。跟踪的颗粒数目过少所获得的颗粒分布结果不具有代表性；过多则颗粒路径相互影响，单个颗粒的独立跟踪能力下降，同样会是颗粒分布结果产生较大偏差。因此，可通过对待测样品溶液进行系列稀释获得最佳颗粒数量浓度范围。对于多分散样品，应统计尽可能多的数量以确保测量精确性。

8.2 准确度

8.2.1 系统准确度

温度变化范围： $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ；操作温度变化范围内，分散剂黏度变化小于 $\pm 2\%$ 。

8.2.2 样品测量结果准确度

每一个独立样品的粒径和浓度平均值标准偏差小于 $\pm 25\%$ 。

同一分析样品平行样的粒径和浓度平均值标准偏差小于 $\pm 25\%$ 。

9 测试报告

本标准检测后出具的测试报告含有但不限于以下内容：

- a) 待测样品信息：样品名称、样品编号、委托单位信息等；
- b) 使用的 PTA 设备、仪器信息：名称、型号或设备编号、序列号等；
- c) 样品前处理方法：包括模拟释放方法、样品分散条件、稀释条件等；
- d) PTA 仪器测量条件：包括相机的类型、激光的类型和强度、相机增益值、帧目数、温度、黏度(cP)、检测阈值等；
- e) 测试结果：粒径、浓度值及其准确度等；
- f) 本部分中未提及的、可选的、任何可影响结果的其他实验细节。

附 录 A
(资料性)
粒径检测下限

A. 1 不同种类单分散纳米颗粒的已知检测下限

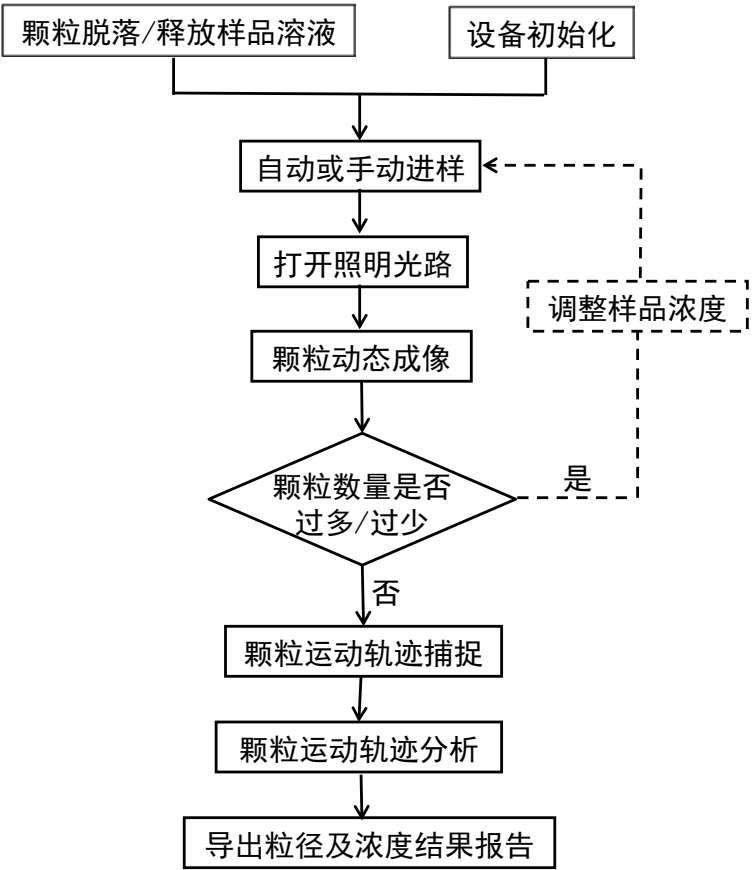
表 A. 1 不同种类单分散纳米颗粒的检测下限^[1]

颗粒种类	流体力学直径检测下限（nm）
金	15
聚苯乙烯	45
二氧化硅	75
生物材料	60
其他金属或金属氧化物	25

附 录 B

(资料性)
实验流程图

B. 1 PTA测量流程图



图B. 1PTA测量流程图

附录 C
(资料性)
方法验证

C.1 实验目的

为了确保特定条件下 NPA 测量技术的可溯源性、重现性，并建立最佳操作条件，利用标准物质开展了粒径检测方法间验证比对实验。比对实验显示，在优化后的测试条件下，可获得可靠的粒径和浓度结果，能够满足含纳米材料医疗器械中脱落和释放的颗粒的粒径测量。

C.2 实验方法选择

采用三种不同的实验方法进行比对，分别是动态光散射（DLS），透射电子显微镜（TEM），颗粒跟踪分析（PTA）。

C.3 实验材料

100 nm 和 200 nm 标准 TiO₂ 纳米颗粒。

C.4 实验步骤

C.4.1 样品制备

将样品温度保持在室温，制样或测试前 300 W 功率超声分散 60s。用于 DLS 和 TEM 检测的样品浓度为 20μg/mL，用于 PTA 检测的样品浓度为 1 μg/mL。

C.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多分散指数。
- 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。

C.4.3 质量控制

各方法的主要条件控制汇总于表 C.1 中。

表C.1 方法条件控制

DLS	PDI < 0.2
TEM	统计颗粒数> 250个
NTA	Camera Level: 14; Number of Frames: 1499;Temperature: 25° C±3° C Viscosity (Cp): water (0.836-0.958);Number of captures: 5; Capture duration (s): 60; Detect threshold: 4; Screen gain: 8

C.5 实验结果

方法粒径比对研究结果汇总见表 C.2。

表C.2 粒径比对结果

方法	标称	DLS	TEM	PTA
粒径(nm)	100	151.3 ± 2.1	105.3 ± 9.5	113.9±1.9
	200	267.3 ± 3.3	200.0 ± 17.2	202.3±7.6

GB/T XXXXX—XXXX

附 录 D
(资料性)

示例 1：骨科医疗器械磨损实验