

含银敷料中银的表征和体外释放试验技术共识

编者按：

由于银具有很好的抗菌作用，自古以来人类就在医疗（如外用药品磺胺嘧啶银软膏等）、餐具及食品保藏等领域充分利用银的抗菌作用。随着现代科学技术的发展，特别是纳米科学和纳米技术的发展，各种含纳米银或银化合物产品，如：含纳米银或银化合物敷料或者贴剂、银涂层导管等在我国已作为医疗器械在临床上应用。

在评价这类产品中银的特殊生物效应和潜在风险时，首先需要充分表征含银产品中银的存在形式（纳米银还是化合态银，即：银离子）以及银的释放动态。银释放的量、释放的速率、纳米银还是化合态银等是预测和分析其中的银在体内暴露情况，及其进入体内后各种潜在风险的基础信息。特别是如果有纳米银颗粒物的释放和脱落时，需要进一步评价纳米银颗粒物进入体内的吸收、分布、代谢和排泄，在体内蓄积的靶器官以及可能存在的长期毒性风险。因此，含银敷料中银的表征和银释放动力学研究是该类产品风险评价的基础。

针对产业发展和国家监管的需求，中国食品药品检定研究院（中检院）联合国家纳米科学中心等，起草了《含银敷料中银的表征和体外释放试验技术共识》（以下简称《技术共识》）。《技术共识》中所涉及的敷料中释放试验方法参照了《美国药典》及《中华人民共和国药典》（2015年版）关于药物贴剂的药物释放试验方法。其他表征和银的测定方法都给出了相应的可参考标准。本《技术共识》中给出的方法经过了起草小组不同实验室的验证，充分证实了其可实施性。

2018年6月21日，中检院召开了“纳米技术产品质量检测及临床前评价技术论坛”，有关国内纳米材料和毒理学领域专家、学者，包括医疗器械监管机构及检测机构、相关研究机构、企业、医疗机构代表，及中检院药品、医疗器械及药包材领域相关技术人员对该《技术共识》进行了充分的研讨，形成了专家共识。本《技术共识》供含银敷料类产品研发、检测及技术审评相关人员参考。

Technical Consensus on Characterization and In Vitro Release Kinetics of Silver in Silver-containing Wound Dressing Products

Editor's Note:

Due to silver has a very good antibacterial effect, people have made widely use of silver in medical fields (e.g. the Sulfadiazine Silver ointment for external use), tableware, food preservation and other fields since ancient times. With the development of modern science and technology, especially the development of nanoscience and nanotechnology, many kinds of products containing silver nanoparticles or silver compounds, such as wound dressings or patches and silver-coated catheters, etc. have been applied clinically as medical devices in China.

To evaluate the special biological effects and potential risks of silver in these kinds of products, it is necessary to fully characterize the forms of silver in the silver-containing products (silver nanoparticle or silver compounds,

i.e. silver ions), and the release kinetics of silver. The amount and the rate of released silver from silver-containing products, in the forms of silver particles or the silver compounds, etc. are basic information for predicting and analyzing the exposure of silver and its potential risks in the human body. In particular, it is necessary to further evaluate the absorption, distribution, metabolism and excretion of silver nanoparticles, the target organs accumulating silver nanoparticles and the possible long-term toxicity risks in the body if the silver nanoparticles are released and shed. Therefore, the characterization of silver form in the silver-containing wound dressings and the study of silver release kinetics are the basis of the risk assessment of the products.

In response to the needs of industrial development and national supervision, National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC) worked together with the National Nanoscience and Nanotechnology Center, etc. to draft a "Technical Consensus on Characterization and in Vitro Release Kinetics of Silver in Silver-containing Wound Dressing Products". The experimental methods of silver release test involved in the *Technical Consensus* were referred to the drug release test for drug patches written in *the United States Pharmacopoeia and the Pharmacopoeia of People's Republic of China* (2015 Edition). Corresponding reference standards were recommended for other characterization and determination of silver. These methods in the *Technical Consensus* have been verified to be practicable by different laboratories.

NIFDC held a forum on quality assessment and preclinical evaluation technology of nanotechnology products on June 21, 2018. Experts and scholars from the fields of nanomaterials and toxicology, including medical device regulatory agencies, testing institutions, related research institutions, industries, medical institutions, as well as relevant technical personnel in the fields of drugs, medical devices and pharmaceutical packaging materials of NIFDC discussed thoroughly the draft document of *Technical Consensus* and reached an expert consensus finally. The *Technical Consensus* provide technical references for people related to the research and development, testing and technical review of silver-containing wound dressing products.

1 引言

随着纳米科学和纳米技术的发展,越来越多的纳米技术产品被广泛应用于医疗保健等各个领域,如药品、医疗器械、药包材,甚至食品、化妆品等。纳米材料独特的小尺寸、大比表面积、极强的活性和量子隧道效应使其在影像诊疗、纳米药物、药物缓释载体、靶向诊疗、抗菌产品等方面均显示了独到的优势。然而,纳米技术是一把双刃剑,纳米材料可能引起的特殊生物效应和潜在毒性风险需要科学地认识和评估。只有在判定其受益大于风险的基础上才能推动这类创新产品造福于人类。因此,建立针对纳米材料特性的全面的材料表征,生物样本中纳米材料的检测及其稳定性评价技术等,是对其进行特殊生物效应和潜在毒性风险评价的基础。

鉴于传统的评价技术、方法,如《中国药典》中登载的适用于药品的方法,医疗器械通用的

各类国家标准及行业标准等,可能不适用,或者不完全适用于纳米技术产品。因此,需要根据产业发展需求和国家监管的需要有序地推进针对纳米材料特性的检测与评价技术、方法和标准的研究和建立,为纳米生物医用产品准入前的全面评价提供依据,为该产品的市场准入和国家的科学监管提供有力的技术支持。

2 适用范围

本文件适用于对各种含银敷料(或贴剂)中银的表征和体外释放试验。本文件中,含银敷料(silver-based wound dressing)的定义:指含有纳米银颗粒和/或银化合物的编织布或无纺布等敷料。敷料是用于覆盖和保护创面的材料,敷料中含有纳米银颗粒和/或银化合物是为了控制敷料和/或创面的微生物环境,为创面的愈合创造有利条件。纳米银颗粒(简称纳米银)指三维空间尺度中至少有一维处于纳米量级(在1~100 nm)的单质银颗

粒。银化合物如氧化银、氯化银等。

3 含银敷料的表征

3.1 银含量测定

银含量的表示方法可根据需要以单位面积 ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) 或者单位质量 ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) 或者单位体积 ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) 中的含量表示。

敷料中含银量(装量,单位面积或者单位质量或者单位体积的含银总量)的测定可以用原子吸收法(Atomic Absorption Spectroscopy, AAS)、或者电感耦合等离子体质谱法(Inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS)、或者应用电感耦合等离子体发射光谱法(Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, ICP-OES)。具体可参考《中华人民共和国药典》(2015版)^[1]《GB/T 223.81-2007 钢铁及合金 总铝和总硼含量的测定 微波消解-电感耦合等离子体质谱法》《GB 11907-1989 水质 银的测定 火焰原子吸收分光光度法》《GB/T 23942-2009 化学试剂 电感耦合高频等离子体原子发射光谱法通则》《GB/T36083-2018 纳米技术 纳米银材料 生物学效应相关的理化性质表征指南》《GB/T 30903-2014 无机化工产品杂质元素的测定 电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)》《HJ 700-2014 水质 65种元素的测定 电感耦合等离子体质谱法》进行测定。测定前将含银敷料用硝酸等进行消解,完全消解后得到澄清溶液用于测定。

消解方法可参考《HJ 677-2013 水质 金属总量的消解 硝酸消解法》《HJ 678-2013 水质 金属总量的消解 微波消解法》。

注:根据不同检测方法的灵敏度和最低检测限,结合待测样品消解后的银浓度范围选择适宜的方法,并给出必要的合理性说明或者验证。必要时进行基质干扰效应验证,或增加检测回收率试验。

3.2 含银敷料微观形貌表征

可通过显微镜检测技术获得敷料的表面微观形貌和结构,颗粒物形态等信息,如有纳米银颗粒物,同时应测定颗粒粒径及粒径分布。

3.2.1 扫描电子显微镜(Scanning electron microscope, SEM)

按照《GB/T 19267.6-2008 刑事技术微量物证的理化检验 第6部分:扫描电子显微镜/X射线能谱法》《GB/T 2679.11-2008 纸和纸板 无机填料和无机涂料的定性分析 电子显微镜/X射线能谱法》

中规定的方法,进行电子显微镜观察及X射线能谱分析。扫描电子显微镜将给出敷料的表面微观形貌和结构,包括基质材料的形貌、尺寸、编织结构和纳米银的形貌、尺寸、表面分布。制备样品时,需要将单层敷料纤维固定于导电胶带或其他导电基底上,对于不导电或导电性差的材料可按照《GB/T 28873-2012 纳米颗粒生物形貌效应的环境扫描电子显微镜检测方法通则》的规定,选择环境电子扫描电镜(Environmental Scanning Electron Microscope, ESEM)进行观察。将制备好的样品在电子显微镜下观察,测定含银敷料中纳米银的粒径,要求随机的在不同观察区域,拍取多张照片,累计观测到的银颗粒数量应在100个以上。统计计算纳米银粒径,并做分布图,给出粒径分布曲线。

选取部分含纳米银区域进行表面元素组分分析(X射线能量色散光谱仪, Energy dispersive X-ray spectroscopy, EDX),给出定性能谱图,确定银组分。

注1:对于有些含银敷料表面含有非功能性薄膜,则需要去膜后观察。为了消除假象,可以对测试样品表面进行无损清洗,具体方法因材料而异。

注2:由于含银敷料的基质材料通常是不导电的高分子,喷镀的金膜通常为直径20 nm左右的颗粒,若敷料中纳米颗粒直径小于20 nm,则不能喷金,可考虑以喷钛代替或喷碳代替。

3.2.2 透射电子显微镜(Transmission electron microscope, TEM)

按照《GB/Z 21738-2008 一维纳米材料的基本结构 高分辨透射电子显微镜检测方法》中规定的方法,使用透射电子显微镜进行高分辨率成像。透射电子显微镜要求样品的厚度不能超过100 nm。对于含银敷料,在制备TEM样品时,需要对样品进行树脂包埋、超薄切片,再置于铜网上,进行电镜观察。若含银敷料含水,还要在树脂包埋前进行脱水处理。在不同观察区域随机拍取多张照片,累计观测到的纳米银数量应在100个以上。选取部分含纳米银区域进行表面元素组分分析(X射线能量色散光谱仪, EDX),给出定性能谱图,确定银组分。

注:如果SEM-EDX检测已经获得了足够的信息,可不进行TEM-EDX检测;但是,如果纳米银小于10~20 nm时,除了进行SEM分析外,建议用

TEM进行确认。

3.3 含银敷料的银价态分析

在EDX确认材料表面含有银时,按照《GB/T 19500-2004 X射线光电子能谱分析方法通则》标准,使用X射线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)进行银的价态分析,以区分单质银和化合态的银,如可能为氧化银、氯化银、或其他银化合物。在光电子能谱中,Ag 3d_{5/2}和Ag 3d_{3/2}最大结合能在368.2 eV和374.2 eV指示Ag⁰;最大结合能在367.8 eV和373.8 eV指示Ag⁺;若XPS结果表明只有Ag⁰,则说明是纳米单质银;若为Ag⁺或含有Ag⁺,则需确认银化合物形式^[2]。

3.4 含银敷料的银晶体分析

参照《GB/T 6609.32-2009 氧化铝化学分析方法和物理性能测定方法 第32部分: a-三氧化二铝含量的测定 X-射线衍射法》,应用X-射线衍射技术(X-ray diffraction, XRD)进行纳米银成分确认。纳米单质银、纳米氧化银、纳米氯化银等具有不同的XRD衍射图谱^[2-5]。

4 银体外释放试验

将含银敷料按规定方法在适宜的释放介质中进行释放试验,分析各时间点释放液中的银释放总量,可绘制时间-释放量曲线,分析动力学释放特征。

根据各国药典的登载和文献研究,药物透皮贴剂的释放度试验方法有往复支架法、桨碟法和转筒法等。含银敷料中纳米银和银离子的释放可以参考这些方法,但是,需要增加区别测定纳米银与银离子的方法。选择不同的方法时应分析其对于含银敷料中纳米银和银离子释放试验的适用性。

4.1 试验方法的选择

4.1.1 往复支架法

《美国药典》(USP)^[6]规定了往复支架法(reciprocating holder)用于药物透皮贴剂的释放度研究。该试验装置由一系列样品支架,玻璃或其他适宜的惰性材料制成的溶出杯,以及可往复垂直移动支架并可定时定点水平移动支架的驱动装置构成。试验时将样品支架固定在往复垂直移动架上,使样品持续浸没在释放介质(温度为32℃±0.5℃)内并以规定频率和幅度往复垂直移动,通常移动幅度选择2 cm,往复频率为每分钟30次。

该试验装置的优点之一是在设定的时刻可以

自动水平移至新的溶出杯,上一时点的溶出杯可取出进行处置,利于含纳米银及银离子溶液的均匀取样和减少取样损失。因纳米银或者银离子具有较强的吸附特性和纳米银易团聚、沉淀,因此,推荐使用往复支架法进行含银敷料的体外释放试验。

4.1.2 桨碟法

可参照《中国药典》(2015年版),操作方法为将溶出介质加入各溶出杯内,待溶出介质预温至32±0.5℃,将样品固定于两层碟片之间或网碟上,释放面朝上,再将网碟水平置于溶出杯下部,并使网碟与桨底旋转面平行,两者相距25 mm±2 mm,按规定转速启动装置。在规定取样时间点,吸取溶出液适量,及时补充相同体积的温度为32℃±0.5℃的溶出介质。

4.1.3 转筒法

可参照《中国药典》(2015年版),操作方法为将溶出介质加入各溶出杯内,待溶出介质预温至32℃±0.5℃,可将样品粘附于一片铜纺上,铜纺的边比样品的边至少宽1cm。将样品的铜纺覆盖面朝下放置于干净的表面,涂布适宜的胶黏剂于多余的铜纺边,如需要可将胶黏剂涂布于样品背面。将样品涂胶黏剂的面安装于转筒外部,使样品的长轴通过转筒的圆心。挤压铜纺面除去引入的气泡。将转筒安装在仪器中,试验过程中保持转筒底部距溶出杯杯内底部25 mm±2 mm,按规定转速启动装置。在规定取样时间点,吸取溶出液适量,及时补充相同体积的温度为32℃±0.5℃的溶出介质。

由于《中国药典》(2015年)中没有给出样品和溶出介质的比例要求,而是根据具体方法中使用的溶出杯体积有各自的使用要求。因此,在试验结果中应说明样品和溶出介质的比例,并讨论所设比例与预期临床使用(结合敷料面积与创面微环境)的相关性。

4.2 试验条件的确定

4.2.1 介质的选择

根据试验的目的和产品预期使用的部位、创面环境等,尽可能模拟机体的体液环境选择释放介质,如模拟体液等。

4.2.2 其他试验条件

根据试验的目的和产品预期使用的部位、创面环境等,尽可能模拟机体的温度条件,通常选择32℃±0.5℃。

同时,根据试验方法的不同规定一定的转速或者一定的往复速度;检测终点的设计可根据含银敷料的工艺、含银量等,设计涵盖释放初期、上升期、平台期和下降期的不同时间点。释放试验的最长时间点应能反映产品临床预期使用的最长时间。

4.3 释放液中银的测定

4.3.1 银含量测定方法

可以选择下列方法进行测定,以电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)为仲裁法。可选择:(1)电感耦合等离子体反射光谱法(ICP-OES);(2)石墨炉原子吸收法(AAS);(3)电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)。

4.3.2 释放液中银总量的测定

由于释放液中可能含有纳米银颗粒,因此需对释放液进行消解,消解方法参见“2.1”节下方法。根据“4.3.1”节列出的方法测定释放液中银的总含量,计算单位面积或单位质量或单位体积含银敷料中总的银释放量;根据敷料中含银总量(见“2.1”节)计算银释放率;根据不同时间的银释放量绘制时间-释放量动力学曲线,分析动力学变化及释放速率。

由于纳米银或者银离子具有较强的吸附特性和银颗粒易沉淀的特性,特别是浓度较低时会造成检测值与真值的显著误差。因此,建议予以说明是否取样会影响结果的解释,必要时增加取样回收率的测定。宜配置与释放液银浓度(纳米银浓度和银离子浓度)相近的溶液作为回收率测定溶液,可通过小样本预实验确定释放液银浓度,或者在测定了预实验释放液的银浓度后,将其作为后续试验的回收率测定溶液。

注:如果释放液(如模拟体液)对检测方法有干扰,则需要采取排除干扰的措施,必要时增加方法学验证。

4.3.3 释放液中纳米银和银离子的分离和测定

由于释放液中可能含有纳米银,因此,有必要对释放液中的“含银物质”进行表征,对纳米银和银离子进行分离和分别测定。

取适量释放液,用可截留纳米颗粒物的超滤管(如3~10 kDa滤膜)进行离心分离。对下层滤过的银离子溶液进行含量测定;通过银释放总量减去银离子释放量即可得到纳米银的释放量,详见“5”节下附录A。分别计算并绘制纳米银和

银离子的时间-释放量动力学曲线。

注:在采用模拟体液作为释放介质时,模拟体液中的氯元素会与释放液中的银离子反应,形成不溶性氯化银颗粒物,其粒径约在20 nm~40 nm。因此,在此种情况下有必要区分氯化银颗粒和纳米银颗粒。排除氯化银颗粒物干扰的方法可参照5节下附录A。

对上层截留的纳米银进行形貌观察,方法参见“3.2”节。适宜时,可参考《GB/T 19627-2004 粒度分析 光子相关光谱法》,用去离子水洗脱并收集超滤管中截留的纳米银,取适量洗脱液,利用动态光散射(DLS)来测试粒径分布情况。

4.4 银释放试验结果的表示

银释放试验结果的表示:(1)总银释放量和释放率;(2)总银的时间-释放量动力学曲线;(3)纳米银的释放量和时间-释放量动力学曲线;(4)银离子的释放量和时间-释放量动力学曲线;(5)纳米银的表征资料。

5 附录A 模拟体液释放液中纳米银和银离子的分离及测定方法

5.1 概述

含银敷料在模拟体液(SBF)介质中进行体外释放试验时,可采用纳米级滤膜(如:3~10 kDa的滤膜,可截流1.0~1.5 nm以上的颗粒物),经超滤离心有效地分离纳米银和银离子后,对银离子进行定量测定,通过用释放液中总银的释放量减去银离子的释放量,从而得到纳米银的释放量。

5.2 可溶性氯化银平衡条件的确定

在模拟体液介质中,由于SBF中含有氯离子,氯离子会与敷料中释放的银离子发生反应,生成氯化银(AgCl)。而氯化银也可以形成粒径大约为20 nm~40 nm的不溶性颗粒物,很难与纳米银颗粒区别。

理论上一般认为,在反应体系中当氯离子与银离子的摩尔比超过一定的比例之后, AgCl 沉淀会形成可溶性的阴离子银络合物(AgCl_2^- 、 $\text{AgCl}_{(2,3)}^-$ 、 $\text{AgCl}_{(3,4)}^-$)。因此,需要首先考察氯离子与银离子的摩尔比对氯化银颗粒物稳定性的影响,确定氯化银的可溶浓度阈值。

可溶性氯化银平衡条件的确定:利用氯元素和银元素的动态反应原理 $[\text{Cl}^- + \text{Ag}^+ = \text{AgCl}(\text{不溶})]$

或 $\text{AgCl}^{-[2]}$ 、 $\text{AgCl}^{-[2-3]}$ 、 $\text{AgCl}^{-[3-4]}$ (可溶)], 用SBF配制10 mL浓度为0.125、0.25、0.5、1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 银离子溶液, 取5 mL测量其总银含量, 另取4 mL, 用截留分子量为3~10 kDa或者截留更小分子量的离心超滤管, 7500 g 离心20 min, 测量下层溶液可溶性银含量, 两者相比计算并分析氯化银溶解性, 确定氯化银的可溶阈值。每组至少3个平行样。

5.3 模拟体液中氯化银干扰的排除

在确定了氯化银的可溶阈值之后, 通过调整银离子和模拟体液中氯离子的摩尔比, 即利用模拟体液稀释含银模拟体液释放液, 可有效地排除氯化银颗粒对分离纳米银颗粒物的干扰。

5.4 模拟体液中纳米银和银离子的分离测定

1) 测定模拟体液释放液中银的浓度, 计算总银释放量。

2) 若模拟体液释放液中银的浓度低于氯化银的可溶阈值(验证试验中确定银的可溶阈值为0.5 ppm), 直接取4 mL释放液, 使用截留分子量为3~10 kDa滤膜的超滤管进行离心过滤, 测定滤液中银离子含量, 即为释放的银离子含量; 利用释放液的总银含量减去银离子含量, 即可得到所释放的纳米银含量。

3) 若模拟体液释放液中银的浓度高于氯化银的可溶阈值(即释放液中总银含量大于0.5 ppm), 可用SBF稀释, 使银浓度低于0.5 ppm, 再按照“4.3.3”节下方法进行分离测定。

4) 模拟体液释放液中银的测定方法按“4.3.1”节下方法。

参考文献:

- [1] 中国药典: 四部[S]. 2015.
- [2] Maolin Pang, Jianguo Hu, Hua Chun Zeng. Synthesis, Morphological Control, and Antibacterial Properties of Hollow/Solid $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$ heterodimers[J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 10771-10785.
- [3] Taylor PL, Omotoso O, Wiskel JB, et al. Impact of Heat on Nanocrystalline Silver Dressings Part II: Physical

Properties[J]. *Biomaterials*, 2005, 26: 7230-7240.

- [4] Thawatchai Maneerung, Seiichi Tokura, Ratana Rujiravanit. Impregnation of Silver Nanoparticles into Bacterial Cellulose for Antimicrobial Wound Dressing[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 72: 43-51.
- [5] Varun Sambhy, Megan M. MacBride, et al. Silver Bromide Nanoparticle/Polymer Composites: Dual Action Tunable Antimicrobial Materials[J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 9798-9808.
- [6] United States Pharmacopoeia (35) [S]. 2004.
- [7] NIST-NCL. PCC-8 Determination of Gold in Rat Tissue with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Nanotechnology Characterization Laboratory, National Cancer Institute[EB/OL]. (2018-7-14). <https://ncl.cancer.gov/>
- [8] NIST-NCL. PCC-9 Determination of Gold in Rat Blood with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Nanotechnology Characterization Laboratory, National Cancer Institute[EB/OL]. (2018-7-14). <https://ncl.cancer.gov/>
- [9] 程祥, 赵玉云, 邵安良, 等. 含银敷料的表征和银的体外释放实验方法研究及其应用[J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(3): 491-499.
- [10] Liming Xu, Ru Bai, Xiang Cheng, et al. A Tiered Experimental Approach for Characterization and Silver Release of Silver-containing Wound Dressings[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14: 564-574.

起草单位及起草人:

中国食品药品检定研究院: 陈亮、徐丽明、邵安良、段晓杰、魏利娜、王健

中国科学院国家纳米科学中心: 蒋兴宇、陈春英、白茹、谢黎明、刘颖、吴晓春、葛广路

四川省食品药品检验检测院 安全评价中心: 程祥

西南交通大学材料科学与工程学院: 屈淑新

(收稿日期 2018年7月14日 编辑 范玉明)