科学通报 2023 年 第 68 卷 第 32 期: 4281 ~ 4301
国家纳米科学中心成立20周年专辑 评 述
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

纳米生物材料标准化检测和评价的现状与展望

刘颖[1], 吴美玉[2], 刘伊[2], 高洁[3], 王孝平[4], 陈宽[5], 文海若[6], 陈亮[7], 邵安良[7], 肖百全[8], 葛广路[2], 谢黎明[2*]

1. 国家纳米科学中心, 中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室, 北京 100190;
2. 国家纳米科学中心, 中国科学院纳米标准与检测重点实验室, 北京 100190;
3. 国家纳米科学中心, 标准认可战略部, 北京 100190;
4. 国家纳米科学中心, 纳米技术发展部, 北京 100190;
5. 国家药品监督管理局, 医疗器械技术审评中心, 北京 100081;
6. 中国食品药品检定研究院, 国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176;
7. 中国食品药品检定研究院, 医疗器械检定所, 北京 102629;
8. 广东粤港澳大湾区国家纳米科技创新研究院, 广州 510700
* 联系人, E-mail: xielm@nanoctr.cn

2023-05-31 收稿, 2023-09-05 修回, 2023-09-13 接受, 2023-09-14 网络版发表
国家重点研发计划(2022YFC2409700)和中国科学院战略性先导科技专项(B类)(XDB36020200)资助

摘要 近年来, 纳米生物材料被广泛应用于药物靶向递送、医学成像、组织工程、生物传感、化妆品等生物医学领域. 纳米材料的特殊性质使其在提高材料性能的同时也带来潜在的生物安全性风险. 目前, 我国的纳米科技水平已处于世界前沿, 然而纳米技术的转化仍旧是短板. 纳米生物材料要实现生物医药产品的转化应用, 围绕“质量控制”和“安全性评估”两个主要方面, 尚有很多关键问题急需解决. 本文将综述纳米生物材料及其产品的理化性质表征和生物安全性评价的标准化现状、存在的问题及发展趋势等, 为纳米生物材料的转化应用提供参考.

关键词 纳米生物材料, 标准, 理化表征, 生物安全性评价, 转化

我国纳米科技已从最初的“跟跑”时代进入了全球“领跑”时代, 无论是纳米类科技论文的发表, 还是相关标准的制定, 均处于世界先进水平. 但当前我国纳米类产品的数量仍远远落后于美国等国家[1]. 推进我国纳米技术的产品转化, 急需解决诸多关键问题, 如纳米类产品中是否确实含有纳米材料或纳米结构、所含有的纳米材料或纳米结构是否真正有效、纳米类产品是否具有生物安全性风险、纳米类产品是否环境友好等. 解决上述问题主要依赖于纳米材料理化性质的精准表征和测量以及纳米生物安全性评价方法的建立.

本文将基于纳米生物材料及其医药产品应用的现状, 分别从理化性质表征和生物安全性评价两个方面综述检测项目/指标、相关技术方法及其标准化情况, 并重点指出现阶段存在的问题、技术难点及相应的解决方法等, 以期进一步推动纳米生物材料的基础研究和技术转化进程, 为相关医药产品的审评和监管提供参考和支撑, 促进我国纳米医药市场的健康发展.

1 纳米生物材料的研究及应用现状

纳米生物材料是一类基于纳米技术的生物材料, 其尺寸处于纳米尺度(1~100 nm), 结构或组成表现出全新的或明显发生改变的特性[2], 在药物治疗、医学影像诊断和组织工程等方面具有巨大的应用潜力[3~7]. 纳米生物材料的特殊物理效应使其具有优越的磁学、热

引用格式: 刘颖, 吴美玉, 刘伊, 等. 纳米生物材料标准化检测和评价的现状与展望. 科学通报, 2023, 68: 4281–4301
Liu Y, Wu M Y, Liu Y, et al. Research progress and prospects of standardized testing and assessment for nanobiomaterials (in Chinese). Chin Sci Bull, 2023, 68: 4281–4301, doi: 10.1360/TB-2023-0520

© 2023《中国科学》杂志社

学、力学、电学、光学、声学等性能，并赋予其超顺磁、光热转换、高强度、抗菌等新的功能，可应用于高分辨成像剂[8,9]、齿科和骨科植入物[10,11]、抗菌导管或敷料[12]等生物医学领域. 纳米尺度的极大比表面积为其表面功能化和生物相容性修饰提供了可行性，从而能够实现药物分子、基因/蛋白等功能性成分的靶向递送[13]，靶向治疗药物由此得到蓬勃发展.

纵观全球纳米生物领域的研究，2017~2022年期间纳米生物材料相关的论文发表数量高达41000余篇(图1(a))，我国在该领域的论文发表数量位居各国之首(图1(b)). 在纳米生物材料相关标准研制方面，目前国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)发布的相关标准现行90余个(表S1)，美国材料与试验协会(American Society for Testing and Materials, ASTM)发布的相关标准近20个(表S2). 我国自2005年成立全国纳米技术标准化技术委员会(TC279)以来，已发布国家标准140余项，其中可用于纳米生物材料的标准110余项(表S3)，另有30余项相关国家标准计划项目正在研制中(表S4)，为我国纳米技术产业化的健康发展打下了良好的基础. 另外，全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会于2019年成立了纳米医疗器械生物学评价分技术委员会(TC248/SC1)，大力推进纳米医疗器械相关表征、评价等标准研制工作. 总体来看，我国纳米领域的标准研制水平已与国际持平. 专利方面，截至2023年5月，美国已有纳米生物材料相关专利6200余项，而我国专利仅有1700余项[14]. 全球共44个国家的400余家企业研发了1100余种纳米医药产品[14]. 目前，全球纳米医药市场2021年的市场价值为2426亿美元，预计2026年会增长至4935亿美元(数据来源于https://www.bccresearch.com/market-research)[14]. 相较之下，我国目前上市的纳米医药类产品较少，约占所有纳米技术产品的7.6%[1].

在药品领域，近20年来，纳米制药技术的发展进步显著，多种纳米材料作为主、辅材料应用于重大疾病治疗及诊断，给药途径涵盖了口服、静脉注射、鼻腔滴注等多种形式，实现了更加高效、智能且低毒的治疗效果[13]. 利用纳米技术将药物负载到脂质体、磁性或复合纳米颗粒等载体形成纳米药物制剂，其极大的比表面积提高了药物分子的载药量，其小尺寸和表面功能化修饰提高了药物的特异性递送、靶向功能和缓释能力，在增强疗效的同时也减少了对周围健康组织的影响[15~17]. 自1995年美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准了第一例纳米药物(脂质体Doxil®)以来，全球相继有80多种纳米药物被美国FDA及欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)批准上市[13]. 2019年全球新型冠状病毒感染疫情暴发，德国BioNTech公司联合辉瑞公司研制的基于脂质纳米颗粒的新型冠状病毒疫苗于2020年投入临床使用[14]. 我国国家纳米科学中心研究团队于2020年完成纳米技术的重大转化，“盐酸伊立替康(纳米)胶束”获批进入临床试验. 该技术利用相容性好的生物材料实现了盐酸伊立替康纳米化，有效提高了药物包封率，成为我国首个名称冠以“纳米”的药物. 此外，纳米生物材料还可被用于造影剂(如肠道造影剂Lumiren®)、显像剂

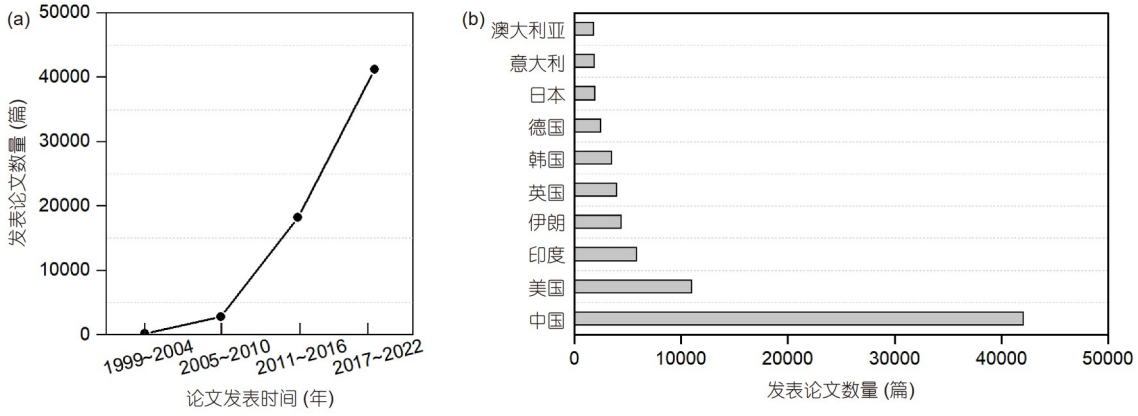


图 1 纳米生物材料领域论文发表数量. (a) 1999~2022年论文发表情况; (b) 前十名国家论文发表情况(数据来源于Web of Science数据库; 检索关键词为nano和biomaterial; 检索时间截至2023年5月)

Figure 1 The number of published papers in the field of nano-biomaterials. (a) The number of published papers from 1999 to 2022; (b) the number of published papers in the top 10 countries (Data source: Web of Science. Key words: Nano, biomaterial. Up to May, 2023)

(如肝脾显像剂FeridexIV®)和指示剂(如降钙素原试剂)等成像及检测试剂，用于磁共振成像(magnetic resonance imaging，MRI)等医学无创成像，在临床诊断中发挥重要作用[18]. 这类纳米材料往往自身具备优异的生物相容性、生物降解性、光致发光能力或者可激发荧光能力，如超顺磁氧化铁纳米颗粒、金纳米颗粒和量子点等[15,19].

在医疗器械领域，鉴于纳米材料的纳米特性，应用纳米材料/技术的医疗器械(后文简称纳米医疗器械)较传统医疗器械在检测灵敏度、抗菌性、生物相容性、机械性和耐磨能力等方面具有更大的优势[20~22]. 如纳米金、纳米银等光活性金属纳米材料，表现出优异的光学性质和较高的靶标结合信号，可实现痕量分析(如生物探针)[23]；石墨烯类二维材料具有特殊的维度结构、高柔性和导电性，可以杀菌并促进神经细胞修复，可应用于抗菌敷料和神经植入物等[24]；纳米羟基磷灰石和纳米仿生硅化物等具有生物活性，被广泛用于骨组织缺损修复[11]. 截至2021年，我国纳米医疗器械产品主要以I类、II类产品为主，III类产品占比少，但均呈显著上涨趋势. 其中，含纳米银敷料占比最大(数据来源于国家药品监督管理局，后文简称“国家药监局”，https://www.nmpa.gov.cn/).

目前我国纳米科技领域的研究及应用仍存在“文章多、转化难”的问题，制约技术转化的瓶颈主要表现在以下几方面.

(1) 纳米材料理化性质的精准测量. 纳米生物材料尺寸小，与很多生物分子尺寸相当，且比表面积大、化学活性高，这些特殊性质赋予它们更多新奇的功能，但也打破了传统的“剂量-效应”关系，其生物效应与尺寸、形状、表面形貌和团聚/聚集状态等很多因素直接相关[25]. 因此，在含纳米生物材料产品的设计、开发和生产的全部阶段均须对纳米材料的理化性质进行精确表征，保障纳米生物材料及其产品的质量可控. 此外，纳米生物材料的这些特殊性质使其在应用过程中易与微环境中的分子或离子等物质发生相互作用，产生结构变化，如离子释放、溶解、聚集、表面吸附等. 这些变化为纳米生物材料的准确表征带来了严峻挑战，进而使描述和预测纳米生物材料在生物系统中的行为及潜在的生物安全性风险极其困难. 因而，纳米技术向生物医药领域的扩展需要发展更多适用于生物环境背景的新技术和新方法，并逐步实现标准化，进而对纳米生物材料的整个生物周期进行准确而全面系统的表征，从而判断风险来源，助力优化纳米功能体系的设计.

(2) 纳米生物安全性知识体系与标准评价方法的建立. 纳米生物材料的广泛应用得益于其小尺寸效应、表界面效应等特性，而这些特性也导致其潜在的生物安全性隐患，如更容易跨越体内的生物屏障、进入细胞产生炎症反应等[26,27]. 因此，在临床应用前必须对其重要的生物安全性指标进行严格且全面的系统评价，以保证纳米生物材料在应用中实现有效性和安全性的平衡[28]. 但是，现有的很多生物学方法和模型往往大多没有考虑纳米材料本身对评价结果的影响，并且模拟的生物环境也因缺乏生物组织屏障和血液流体学而相对简单，因此并不完全适用于评价纳米材料，致使评价结果与临床试验结果产生较大差异，亟须进一步研究适合纳米材料的生物学评价模型及方法，并逐步实现其标准化，以促进临床转化.

2 理化性质标准化检测

2.1 理化检测参数和方法

经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development，OECD)的人造纳米材料工作组(Working Party on Manufactured Nanomaterials，WPMN)将纳米材料的理化性质表征分成了四大类，即物理表征、化学表征、表面性质以及与环境和暴露相关的性质，具体包括干燥状态和相关介质中的粒度及粒度分布、形貌、团聚/聚集、水溶性及分散性、晶相和晶粒尺寸、比表面积、孔隙率、Zeta电位(表面电荷)、表面化学、氧化还原电位、光催化活性等[29]. 欧盟地平线2020计划(Horizon 2020)中将纳米材料关键特性分析策略分为3个主要特性组(3个阶段)，并对每个阶段中纳米材料的分析重点做了建议性描述，即它是什么：原始纳米材料在成分、尺寸和尺寸分布、形貌、表面特征(化学、功能化、涂层)、表面积、孔隙率等方面的物理和化学性质鉴定；到哪儿去：通过稳定性(水及其他介质中的溶解度、分散性等)、表面活性、纳米生物界面等表征描述其生物(生物分布等)和环境归宿；做什么：它们的反应性、物理危害、生物和环境危害等. 这一观点也成为了近年来科学界的共识[30~32]. 基于被广泛接受的Horizon 2020特性分组和WPMN的理化表征分组，对于纳米生物材料及产品而言，针对纳米生物材料生命周期分阶段进行准确的理化表征是评价的最佳策略. 国家药监局2023年

发布了针对应用纳米材料的医疗器械理化表征的指导原则[33]，该原则提出的理化表征策略与上述理念十分契合，分为3个层次：纳米原材料理化表征、医疗器械终产品中纳米材料的理化表征和生物组织样本中的纳米材料理化表征(图2).

2.1.1 纳米生物材料的基础理化性质表征

纳米生物材料的本征特性，包括粒度、形貌、化学组成、表面性质(含表面功能化)等，是决定其生物安全性的根本．清楚认识纳米材料的这些性质才能更好地识别和理解风险来源，进而规避风险.

(1) 粒度及粒度分布

小尺寸是纳米材料的基本特性，很大程度上决定了它们的物理和化学稳定性、反应活性、进入生物体系的难易程度以及光电学、磁学等其他性能．因此，粒度和粒度分布是鉴定和评估纳米材料的必要参数.

纳米生物材料粒度表征方法主要有沉降法、筛析法、光散射/衍射法、激光成像法、图像分析法、比表面积分析法、电迁移法等，各种方法的测量范围如图3所示[34]．其中，基于溯源性、准确度和便捷性等因素，电子显微术、光散射和激光成像的方法已成为广泛应

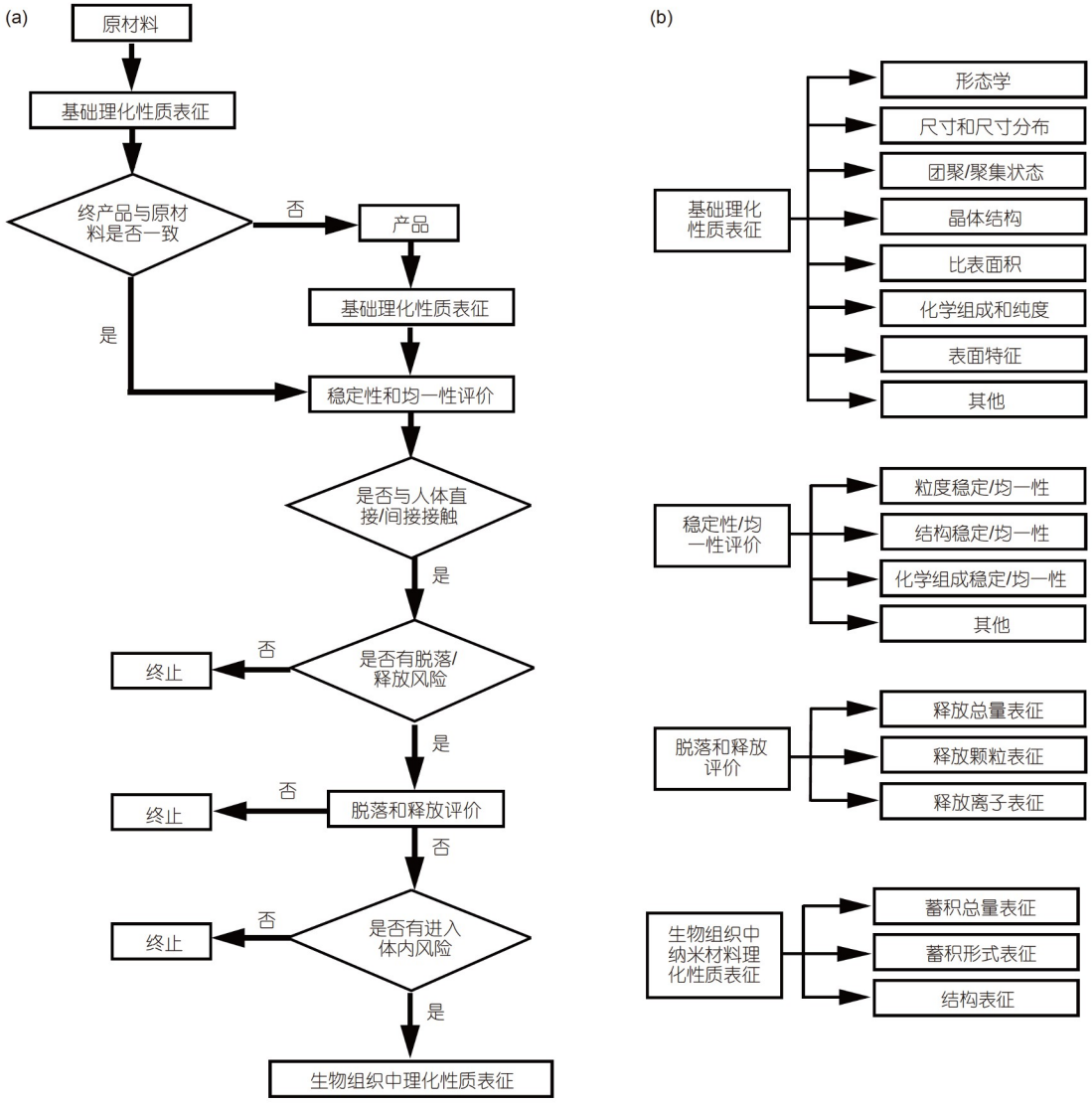


图 2 应用纳米材料的医疗器械理化性质阶段表征. (a) 应用纳米材料的医疗器械理化性质表征流程图; (b) 各阶段理化性质表征的建议检测项目[33]

Figure 2 Staged physicochemical characterization of medical devices containing nanomaterials. (a) The flowchart of physicochemical characterization for medical devices containing nanomaterials; (b) recommended testing items in each stage of physicochemical characterization[33]

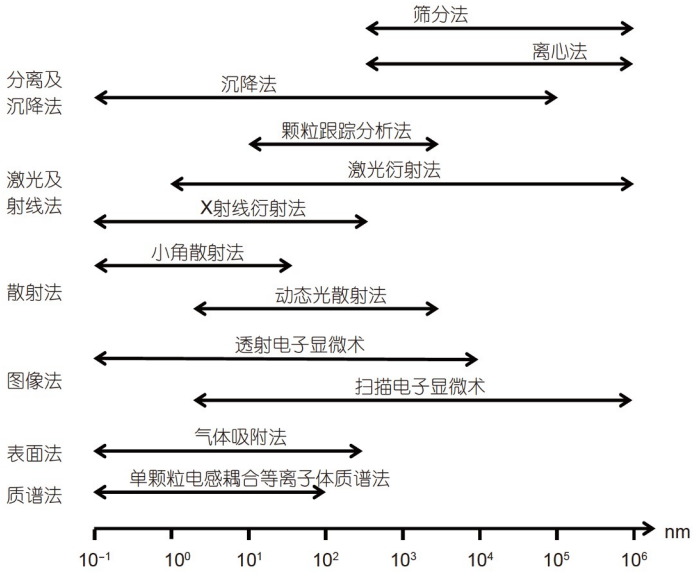


图 3 各种粒径分析方法的粒径测量范围
Figure 3 The ranges of size measurement for various analytical methods

用的粒度分析方法.

电子显微术作为一种测量粒度的绝对方法，其最大优势在于直观、清晰的原位成像以及远高于其他分析方法的极高分辨率(双球差校正电子显微镜的分辨率已经达到了亚埃级), 是一种测量粒度的绝对方法. 光散射法的代表方法是动态光散射(dynamic light scattering, DLS)，它的优势在于兼顾高测量效率、宽测量范围的同时也能够保证测量的准确度和精密度. 当发展新方法时, 上述两种方法通常作为参比方法使用. 激光成像法的代表是颗粒追踪分析法(particle tracking analysis, PTA), 该方法能够同时获得体系中颗粒的粒径分布(可以对分散液中的宽范围粒径分布的颗粒进行粒径区分统计)和数量浓度, 这是优于DLS之处. 近些年发展起来的单颗粒电感耦合等离子体质谱(single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry, spICP-MS)可以同时测量金属纳米颗粒的粒径和数量浓度, 而且仪器灵敏度越高, 可测量的纳米颗粒粒径越小.

但是，粒径测量方法需要基于一系列不同的物理原理来确定粒度和粒度分布，因此每种测量方法都有其局限性. 采用电子显微术测量粒度时要注意电子束能量是否会对纳米材料本身及其所处基质造成损伤从而影响准确度. 透射电子显微术要求样品厚度非常薄, 表征生物组织或其他基质中的纳米材料需要选择合适的制样方式(树脂包埋切片等)，并且需制成厚度小于100 nm的薄片才能进行观察，进而获得高质量的颗粒图片. 图像分析粒径需要采集足够多的颗粒数才具有统计学意义，例如对于符合正态分布、标准偏差为1.6的分布, 需要测量大于6000个颗粒[35]. 光散射方法可获得等效球直径, 且为流体力学直径, 并非真实粒径. PTA的测量偏差约为6%，误差主要来源于颗粒非布朗运动分量造成的偏置误差，因此PTA使用前往往需要修正[36]. spICP-MS则存在样品基质影响和尺寸检测下限方面的挑战. 目前纯金属纳米材料的检测下限仅为20 nm[37], 且这种方法同样需要同类标准品进行校准和方法优化, 以实现基于数量的准确尺寸分布测量.

(2) 团聚/聚集

纳米材料易受体系中pH值、离子强度及组成、有机物等影响而发生团聚或聚集[38,39]. 纳米生物材料的团聚/聚集是影响其在生理系统中转运(沉降、吸附等)和转化(溶解、化学转化等)行为的主要因素[40]. 大部分表征粒径及粒径分布的方法也可用来分析颗粒的团聚/聚集状态，其中常用方法为光学方法(如紫外-可见(ultraviolet and visible spectrophotometry, UV-vis)光谱和DLS)[41,42]和成像方法(如透射电子显微术(transmission electron microscopy, TEM)和扫描电子显微术(scanning electron microscopy, SEM))[43,44].

(3) 化学组成

化学成分是识别纳米材料种类的基本参数. 杂质含量则是纳米材料性能及生物安全性的重要影响因素. 例如，碳纳米管的毒性很大程度上来源于生产和纯化

过程中引入的金属氧化物等催化剂金属污染物[45,46]. 因此, 除主成分分析外, 杂质成分分析也是十分必要的.

成分分析的方法主要有3类: 质谱法、能谱法和光谱法. 基于质荷比分析的质谱法可以准确判定杂质种类和含量, 尤其对于痕量成分更具优势. 电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS)已被用于量化元素总含量和同位素组成及比率测定, 具有万亿分之一(parts per trillion, ppt)级别的极低检出限, 特别适用于金属元素. 但是ICP-MS通常只能分析固体溶解量小于0.2%的溶液, 且需排除基质效应, 并易受S、Ca等轻元素的影响而使检出限降低. 能谱法属于半定量方法, 可以测量材料中所含元素及其相对含量, 但是要注意区分目标元素和仪器设备体系中的元素. 其中X射线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)通常用于材料的表面分析, 除获得元素组成信息外, 还可得到化学价态等重要信息. 但XPS要求较好的真空度, 且C 1s校准一直存在争议[47]. 不同来源污染碳的成分不尽相同, C 1s峰的位置会有差异. 此外, C 1s峰的位置还与所附样品的表面性质有关. 在X射线照射下, 半导体或绝缘体样品表面可累积荷电, 从而改变来自样品或污染碳的电子电离后的动能, 造成C 1s峰位移动; 若样品表面具有催化碳分解或其他反应的成分, 亦可改变污染碳结构或成分形态, 造成C 1s峰位移动. 因此, 利用XPS进行分析时需根据样品性质谨慎校准. 光谱法主要包含红外光谱、紫外可见光谱、拉曼光谱以及荧光光谱, 通常用于表征有机纳米材料, 通过识别官能团分析分子类型.

纳米生物材料的自身组成和应用环境相对复杂, 对测量过程准确性造成的干扰可能更多, 例如ICP-MS分析中更加严重的基质效应、XPS分析中更复杂的碳成分以及更加严重的荷电. 这就对选择和调整更具实用性的分析方法提出了较高的要求.

(4) 表界面分析

表面化学成分、孔隙率、比表面积及表面电荷等均是与纳米材料表面化学相关的参数. Zeta电位是决定纳米颗粒是否聚集、沉降的关键; 纳米材料极大的比表面积使其表面分子和功能团的特性得到放大, 更有可能主导纳米材料整体的生物界面相互作用. 因此, 表界面化学是决定纳米材料安全性的一个重要因素. 纳米生物材料表界面分析的具体参数及方法总结见表1.

(5) 结构分析

结构分析的主要目的是确定体相组成成分的分布和结构形态(物相结构)以及晶型、晶粒大小、晶体缺陷等(晶体结构), 这些结构信息与纳米生物材料的性能息息相关. 结构的主要分析方法及其特点见表2.

2.1.2 含纳米材料产品的理化表征

纳米材料形成发挥功能的产品是一个多步骤的复杂过程, 生产周期中保持稳定均一是保障产品性能及安全性的重要指标. 对于纳米原材料与其他基质复合形成的产品(如喷涂工艺生产的纳米银敷料、掺杂工艺生产的神经植入物等), 其加工复合工艺是否会对纳米原材料产生影响是必须要考虑的问题, 比如是否会导致颗粒的团聚/聚集, 温度、气氛、残留溶剂等是否导致其表面发生氧化/还原反应等; 对于直接在复合基质中形成纳米颗粒的产品, 更需要鉴别其在产品中的存在状态, 进而评估其生物安全性. 此外, 监控质量稳定性、优化各种工艺参数同样需要在多体相中对纳米材料进行准确的原位表征.

固态体相中的纳米材料受限于样品制备, 检测这些样品多用表面分析方法, 参数和主要方法参考表1和2. 纳米原材料与终产品一致的情况下, 图3中的部分技术方法适用.

表 1 表界面分析的主要参数和方法

Table 1 The main parameters and methods for analyzing surfaces and interfaces

分析参数	主要分析方法	适用对象范围	测量范围
表面化学组成	X射线光电子能谱法、俄歇电子能谱法 二次离子质谱法 拉曼光谱法	固态 固态 固态/液态	深度≈10 nm 深度≈1 nm 测量深度与激发光波长有关
孔隙率/比表面积	气体吸附/解吸等温线法	固态	大于0.001 m^2/g
表面电荷	等电点法 Zeta电位分析法	液态	无数据
表面纳米结构	透射电子显微术、原子力显微术	固态	尺寸范围见图3

表 2 主要的结构分析方法[a)]

Table 2 The main methods for structure analysis

主要分析方法	优势	劣势
X射线衍射法	获得晶粒度、结晶度等信息; 对多相混合物进行物相鉴定及分析各物相的相对含量	高角度区域衍射峰重叠严重, 分析困难
高分辨透射电子显微术	表面高分辨成像、电子衍射分析	需制备成适合TEM观察的超薄样品
扫描隧道显微术	实现单个原子层表面结构分析(表面重构、缺陷等)	非体相表征; 需样品导电
拉曼光谱法	通过化学键振动模分析纳米材料组成	峰位和强度易受光学系统参数等因素影响; 复杂基质易受荧光干扰
扫描电子显微术	实现表面形貌及结构成像	非体相表征; 需样品导电
拓展X射线吸收精细结构谱	样品制备简单; 不依赖晶体结构, 可用于非晶态材料精细结构分析; 对局部原子的位移、元素特征等具有很高的灵敏度	对较大无序体系不敏感; 测得结构参数是所有吸收原子的平均值

a) X射线衍射法(X-ray diffraction, XRD); 高分辨透射电子显微术(high resolution TEM, HRTEM)

2.1.3 生理环境中的纳米材料与生物分子相互作用表征

由于生理环境的高度异质性以及非平衡的动态变化, 纳米生物材料进入生物体系后持续与生物体系内的分子、结构相互作用, 引起表面理化特性的改变, 进而影响其进入细胞的途径、在生物体内的转运行为及其最终的命运[48], 最终影响其体内安全性和有效性. 这种相互作用主要表现为非特异性吸附或者特异性结合获得新的表面分子(如蛋白冠)[49]、表面氧化还原反应[50]等. 因而, 表征纳米材料在生理环境下与周围生物分子之间的相互作用、分析其表面化学变化及其物理形态变化, 对于设计优化安全有效的纳米生物医药产品具有重要的意义.

现有的主要分析技术(表3[49,51~59])是需要将生物分子与纳米材料的复合物分离后检测的非原位表征技术, 生物分子的成分和纳米材料间的动态平衡可能会在分离过程中受到破坏. 因此, 无需分离介质且可监测动态变化过程的原位测量技术是取得原理性突破的关键. 在科研工作者的不断探索中, 原位检测技术取得了一些可喜的进展, 包括利用荧光量子点标记抗体技术结合流式细胞术[60]、利用同位素标记纳米颗粒的核磁共振波谱技术(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)等新技术得到大力发展[61]. 最近, Latreille等人[62]在荧光成像模式下利用差分动态显微镜(differential dynamic microscopy, DDM)实现了纳米材料上吸附蛋白的定量分析, 并同时监测纳米材料的聚集情况, 证实表面蛋白吸附能够触发纳米颗粒的聚集. 然而, 由于分析技术的瓶颈, 目前原位测量技术及其获得的信息量仍然是非常有限的, 还需进一步深入研究.

此外, 纳米材料的脱落和释放也是必须要考虑的风险因素. 对于很多与人体直接或间接接触的纳米生物医药产品, 使用过程可能导致纳米结构成分(如颗粒、纤维等)释放至微环境. 游离的纳米材料或释放的离子是在个体水平、组织水平以及细胞和分子水平上引起不良反应的关键因素. 因此, 需要根据纳米材料脱落/释放的风险评估, 对可能暴露的纳米材料进行分析与表征, 包括测量释放元素的种类与释放元素总量, 以及释放液中可能存在的纳米颗粒与离子浓度[33].

2.1.4 生物组织体系中纳米材料的表征

与人体直接或间接接触的纳米生物材料均可通过直接或磨损/脱落/释放的方式随血液系统或淋巴系统进入体内循环, 并在组织器官中蓄积. 纳米材料在生物组织中的蓄积量、存在形式(颗粒或其降解产物)以及材料结构是否出现缺陷决定了其体内稳定性和潜在生物安全性. 因此, 已发布的指导原则《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》建议, 如果从产品中脱落/释放的纳米材料有进入体内循环系统的风险, 则有必要进行生物组织中纳米材料蓄积量的分析, 并证实其存在形式、结构等理化性质.

目前, 生物样本中纳米材料的表征主要通过ICP-MS分析元素总含量、TEM分析纳米材料的聚集状态/形貌/晶体结构、spICP-MS和PTA分析颗粒数量浓度和粒径分布. 但是这些方法在复杂生物体系中的适用性和准确度均有待进一步研究.

需要指出的是, 对于纳米生物材料, 大多数含有纳米材料的生物基质样品都极其复杂, 通常需要适合的样品制备方法并使用多种测量方法来保证检测结果的

表 3 纳米材料与生物分子相互作用的主要表征方法

Table 3 The main characterization methods for the interaction between nanomaterials and biomolecules

分析参数	主要分析方法	优势	劣势	应用参考案例
粒度变化	动态光散射	测量浓度范围和尺寸范围较广	近似球形的水和粒径	[51,52]
	荧光相关光谱	实现生物分子与纳米材料之间相互作用的原位表征	需要荧光标记	[53]
	差示离心沉降法	具有较高的准确度和分辨率, 能分辨纳米材料表面的薄层吸附变化	分离效果易受分散介质等实验参数和设备操作参数的影响	[54]
表面层厚度和密度	透射电子显微术	实现吸附层的直接观察和测量	无法实现定量分析	[55,56]
	原子力显微术	三维表面轮廓和力学性质测量		[49]
表面分子种类和数量	色谱和质谱	高效率、高通量定性和定量分析	不同生物分子离子化程度不同, 检测灵敏度存在较大差异	[57]
	光谱(红外吸收光谱、拉曼光谱等)	表面生物分子构象分析	难定量	[58,59]
表界面变化	见表2			

准确性. 例如, 在适用的体系中, 纳米材料的晶体结构可以通过XRD、XPS和HRTEM联合确定.

2.2 理化检测标准化

2.2.1 标准化方法

科学统一的标准化测量方法是获得可靠、一致结果的保证. 在纳米产业链中, 质量控制、加工等环节对测量数据的准确性、可重复性、可溯源性的要求很高, 一些关键指标的测量数据还可直接影响贸易额[63]. 所以, 高质量检测标准的发展和完善至关重要.

我国的纳米技术标准化工作开展至今已近20年, 共制修订国家标准140余项, 主要包括纳米材料定义/术语标准、产品/规格标准和检测方法标准等. 其中理化检测相关标准占比60%左右, 大部分为图2中第一阶段的常规基础理化表征方法, 仅有少数标准考虑了生物体系等复杂基质相关的理化表征. 2020年国家标准管理委员会发布的《GB/T 39261 纳米技术 纳米材料毒理学评价前理化性质表征指南》, 对商用人造纳米物体进行毒理学评价之前的理化表征参数和方法进行了描述; 2022年发布的指导性文件《GB/Z 16886.22 医疗器械生物学评价——第22部分: 纳米材料指南》, 用于指导医疗器械相关纳米材料的理化表征. 二者均是指南性标准, 从总体上给出了指导意见, 对于检测方法的具体实施, 意义有限. 《GB/T 33249 纳米技术 活细胞内金纳米棒含量测定 消光光谱法》利用金纳米棒特有的表面等离激元共振吸收, 建立和规范了利用消光光谱法测定活细胞内的金纳米棒含量的方法. 2019年发布的国家标准《GB/T 38261 纳米技术 生物组织中银含量测量 电感耦合等离子体质谱法》对生物样本中金属元素的提取以及测量方法进行了标准化, 对于金属类纳米材料的体内生物安全性评价具有重要意义. 2022年发布的国家标准《GB/T 42208 纳米技术 多相体系中纳米颗粒粒径测量 透射电镜图像法》可用于指导和规范纳米生物材料在生物体系等多体相内分布的定性检测.

对于纳米生物材料, 常规的固有理化性质表征显然是远远不够的. 纳米生物材料的环境稳定性、与生物体系相互作用、生物体暴露等需要明确表征和量化, 这是监管过程中评估其安全性的重点. 以石墨烯为例, 由于制备方法和实验条件的不同, 文献报道的其导电性能和毒性各不相同, 制备成植入型医疗器械应用于人体后是否进入体循环并在组织器官中蓄积更是难以知晓. 然而目前此类用于复杂体系和复杂相互作用中的纳米材料准确表征的方法很少. 可喜的是, 对于纳米材料的脱落和释放表征方法标准化已经得到了重视. 归口于纳米医疗器械分技委的行业标准YY/T 1863《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》已于近期发布. 国家标准项目“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”也已获批立项(NO. 20230027-T-464), 这两项标准工作对于纳米医疗器械的监管起到很大的支撑作用.

目前正确表征复杂生物基质中的纳米材料仍是一项艰巨的任务, 需要配合更加完备且使用方便、针对

于生物体以及环境相互作用的高质量检测标准，包括检测复杂体系引起的纳米材料结构和化学性质变化，电学、磁学、力学和光学等性能变化，与其他基质材料相互作用过程等方面的标准，以推动纳米生物材料的深入研究，构筑基础知识体系以及最终实现安全可靠的应用和产业化. 具体来说，可以从以下几个方面布局并补充完备的纳米生物材料技术标准体系.

第一，对纳米生物材料生命周期管理过程中的稳定状态进行检测，监控其理化性质在环境或生物暴露过程中发生的变化，包括团聚/聚集、表面吸附、降解等. 例如，由于纳米材料具有极大的比表面积，在复杂的介质中很容易形成团聚体和聚合体，因此需要在参考现有ISO标准方法的基础上研制关于复杂体系中分散与聚集的新实验方法或准则，对体系中的主要颗粒数目、粒径及粒径分布等进行测定.

第二，若不考虑新设备研制，大多数纳米生物材料理化表征的关键挑战在于样品制备过程，需在不引起材料变化(氧化/还原、溶解、团聚、吸附损失等)的情况下将其从样品基质中提取或处理为能够满足仪器测量的状态(悬浮液、固态薄膜等). 目前，纳米颗粒的提取方法主要有酶消化、化学消化、萃取等[64~66]. 但是迄今为止，很少有考虑这些因素的标准方法. 当然，这些方法和技术需要建立在扎实的基础研究工作之上.

第三，建立体外替代测试方法，如模拟脱落释放、模拟体内降解等，可避免因制样引起的样品变化，也可规避体内生理环境带来的不确定干扰因素.

第四，推进高新技术方法的规范化应用. 随着科技的飞速发展，纳米领域也涌现出了很多的先进技术(表4)[67]，这些先进技术对于无法使用现有标准方法进行表征的某些特定性质和行为的表征很有优势，因此可以将其用于特别是新兴材料应用转化时的检测评估，在研究资料中体现，为纳米生物材料领域发展提供极大的助力，并逐步推进这些高新技术方法的标准化进程.

另外，目前对于理化性质与其特定生物学效应的关联性并不明确，针对不同种类的纳米生物材料制定出相应的理化性质表征清单具有非凡的意义，这同样需要更加深入细致的基础研究作为支撑.

2.2.2 标准化工具

(1) 仪器和设备

纳米科技的迅速发展对检测设备和技术的灵敏度和分辨率提出了更高的要求. 灵敏度能够改善检测效率，且在一定程度上决定了商业化产品质量. 对于纯物质的分析，质谱类仪器的灵敏度可以达到fmol级别，但是对于复杂体系，其灵敏度通常会大打折扣. 物性测量的空间分辨率、时间分辨率、力分辨率、能量分辨率等制约着对纳米材料结构、纳米现象原理的认知和理解. 在固态样品的粒度和结构测量方面，双球差校正透射电子显微镜的分辨率已达到亚埃级，不但能满足极限小颗粒的粒径测量，同时可以实现从原子尺度研究材料的表界面、晶界、层错等结构及化学成分信息[68]. 国家纳米科学中心近期利用双球差校正电子显微镜实现了对月壤中2~12 nm纳米晶粒的分析，并结合高分辨原子像及衍射图谱确认铁橄榄石表面非晶层内部纳米晶粒为面心立方方铁矿氧化亚铁(FeO)，而非体心立方金属Fe[69]. 对于液态体系的原位测量，DLS的粒径测量范围也可达到1 nm以下，但是对多分散体系的粒径分辨能力较差；PTA能够满足多分散体系的粒径分辨测量，但是粒径检测下限仅为20 nm左右. 而且，基于布朗运动的测量方法与分散体系的黏度息息相关，所以在复杂基质样品中的适用性和准确度有待进一步验证. 因此，如何在更小、更复杂的体系中提高仪器性能、改善测量不确定度、实现原位准确测量，还需要大量深入细致的研究工作. 如果未来可以在纳米检测的关键原理和方法上取得重要突破，并自主研制出相应的先进设备，必将对我国纳米科技的发展产生重大影响.

除此之外，检测链中众多的检测设备需要有效规范和校准才能获得有效比较的结果. 为避免同一类设备测量结果不具可比性的情况，应保证所有测量的物理量具有良好的溯源性，以标准样品/标准物质体系做支撑，并建立统一的方法对设备进行调试、校正和操纵，从而获得可比、可重复的测量结果.

(2) 标准物质

标准物质是检测量量值溯源、设备检定/校准的重要工具，其提供的标称值准确可靠. 目前，单分散纳米颗粒标准物质的研制和粒径测量已成为各国在纳米粒度计量中发展的重点. 美国国家标准与技术研究院(National Institute of Standards and Technology, NIST)共研制了包括二氧化钛纳米颗粒、二氧化硅纳米颗粒等在内的7种纳米颗粒粒度标准物质(数据来源于https://www.nist.gov/srm). 定值方法多采用TEM和DLS. 我国在该领域也做了很多工作(表S5)，除聚苯乙烯球纳米颗粒外，还研制了包括各种粒径的金纳米颗粒、银纳米

颗粒、二氧化钛纳米颗粒、二氧化硅纳米颗粒等粒度标准物质以及纳米氧化铝比表面积标准物质、纳米二氧化钛带宽标准物质等(数据来源于https://www.ncrm.org.cn/). 据统计, 仅国家纳米科学中心研制的标准物质就已被ISO国际标准组织和国内超过40家单位采用, 并被用于多项国家重大研究计划项目研究. 但是我国研制的纳米粒度标准物质的尺寸偏大, 难以满足高精尖测量校准需求, 因此还需研制粒径更小的国家标准物质. 另外, 我国纳米粒度标准物质在量值传递及不确定度评估方法等方面的工作仍有欠缺, 需进一步发展具有国际先进水平、可溯源至我国国家长度标准的粒度标准物质, 从而促进我国纳米科技和技术标准化的持续发展. 此外, 目前大多数纳米生物材料及其医药产品的生物安全性评价中使用的对照样品依然是传统化学品, 存在结果可比性较差等问题, 需要进一步开发适用于安全性和有效性评价的纳米材料标准物质, 以提高生物安全性评价结果的可信度.

3 生物安全性评价

3.1 生物安全性评价指导原则

3.1.1 纳米药物指导原则

基于纳米材料和纳米技术的纳米药物, 对多种疾病领域的治疗显示出巨大的优势和潜力. 纳米药物种类繁多、情况复杂, 因此不同类型纳米药物的制备工艺、药代特征和潜在安全性风险等都存在较大差异. 目前, 全球虽有多个纳米药物上市, 但纳米药物这个年轻的市场仍存在很多问题, 如纳米药物尚未形成统一的概念或分类、未建立完整的研究和评价体系等. 国际药监机构对纳米药物的概念尚无统一认识且未形成统一的监管要求, 仍持谨慎态度[70]. 在全球纳米药物市场的大背景下, 国家药监局于2019年4月启动了中国药品监管科学行动计划, “纳米类药物安全性评价及质量控制研究”成为首批重点项目之一. 在该重点项目的支持下和国内多家纳米药物研究的科研/监管单位及相关专家的共同努力下, 国家药监局于2021年8月25日重磅发布了《纳米药物质量控制研究技术指导原则(试行)》《纳米药物非临床药代动力学研究技术指导原则(试行)》和《纳米药物非临床安全性评价研究技术指导原则(试行)》. 3个指导原则形成一个有机整体, 在普通药物常规技术要求的基础上对纳米药物的质量控制、非临床安全性评价和药代动力学提出了特殊要求, 以满足药品安全性、有效性、质量可控性要求. 近期, 药品审评中心又发布了《脂质体药物质量控制研究技术指导原则》和《脂质体药物非临床药代动力学研究技术指导原则》的征求意见稿.

已发布的3项纳米药物相关指导原则(试行)中所述的纳米药物, 指利用纳米制备技术将原料药等制成的具有纳米尺度的颗粒或以适当载体材料与原料药结合形成的具有纳米尺度的颗粒等及其最终制成的药物制剂. 指导原则建议了纳米药物最终产品或载体材料的外部尺寸、内部结构或表面结构具有纳米尺度(100 nm及以下), 或最终产品/载体材料的粒径通常在1000 nm以下, 且具有明显的尺度效应, 并进一步将纳米药物分为3类: 药物纳米粒、载体类纳米药物和其他类纳米药物, 仅前两种纳米药物适用于这3项指导原则[71~73].

由于安全、有效、质量可控性是药物研发和评价所遵循的基本原则, 因此《纳米药物质量控制研究技术指导原则(试行)》的整体思路是基于药物评价的风险评估策略, 重点关注纳米药物的质量属性对安全性和有效性的影响. 在纳米药物的研发过程中, 应对纳米药物和纳米材料质量相关的性能指标进行系统评价和考察. 性能指标可分为纳米相关特性和制剂基本特性两大类. 该指导原则特别指出, 细菌内毒素/无菌属于制剂基本特性相关的质量控制指标, 应根据纳米药物的特性和处方组成, 选择适宜的无菌检测方法和检验条件, 并证明方法的适用性[71].

在药物非临床安全性评价指导原则的一般原则基础上, 《纳米药物非临床安全性研究技术指导原则(试行)》指出纳米药物应基于其特性开展针对性的非临床安全性研究. 特别是针对试验系统的选择(敏感性等)、受试物(纳米特性/分散稳定性测定等)、试验设计(给药剂量/对照组设置/检测时间和频率/结果分析和风险评估等)提出了特殊要求. 例如, 对于包含新药物活性成分的纳米药物, 建议设计单独的药物活性成分组; 对于包含新纳米载体的纳米药物, 一般应设计单独的无药纳米载体组. 该指导原则还提出, 纳米药物非临床安全性研究需重点关注免疫原性/免疫毒性、神经系统毒性、遗传毒性、致癌性、生殖毒性、制剂安全性、毒代动力学等, 并特别关注不同给药途径带来的不同影响因素[70,72].

纳米药物的药代动力学特征与普通药物可能存在较大差异. 因此, 《纳米药物非临床药代动力学研究技

术指导原则(试行)》特别针对载体类纳米药物的药代动力学研究提出了相关要求. 纳米粒药物与载体类纳米药物有一定的相似性, 因此其药代动力学研究可参考载体类纳米药物的研究思路, 并根据药物纳米粒的特征进行相应调整. 该指导原则指出, 在体内信息尚无法准确获得的情况下, 体外模拟可以对某些体内相关行为进行预测性分析, 开展的体外试验包括但不限于以下内容: 生物样本中的稳定性、血浆蛋白吸附、蛋白冠研究、细胞摄取与转运等. 对于体内试验, 载体类纳米药物由于其功能单位"载药粒子"的存在, 需要分别测定血液中游离型药物和负载型药物的浓度, 并建议对血液中载体材料和载药粒子的浓度(以质量计)进行测定, 以进一步获得体内药物释放动力学及载体解聚/降解动力学的相关重要信息; 应进行不同组织中总药物分布研究, 并应进一步确定其活性药物和载体材料的主要代谢/降解途径, 对其代谢/降解产物进行分析; 应确定给药后活性药物的排泄途径、排泄速率及物质平衡. 该指导原则建议评估载体类纳米药物对代谢酶及转运体的抑制或诱导作用. 该指导原则还提出, 针对载体类纳米药物在体内的各种不同形态及活性药物的性质, 建立合适的分析方法及组织样品预处理与分离方法, 并进行方法学验证[73].

3.1.2 应用纳米材料的医疗器械指导原则

纳米材料独特的理化性质为医疗器械的突破性发展提供了新机遇, 同时也给其安全性评价带来了新挑战. 当前, 全球普遍认为含有纳米材料的医疗器械进入市场前, 评估其安全性是十分必要的. 现有的医疗器械中应用的纳米材料包括添加到医疗器械中的游离态纳米材料、利用纳米材料特性增加生物学活性或者预防感染的固化纳米材料以及利用纳米技术设计制备成纳米结构等(纳米医疗器械). 2021年, 国家药监局在第二批监管科学行动计划研究项目中, 专门设立了纳米医疗器械监管科学研究项目. 《应用纳米材料的医疗器械安全性和有效性评价指导原则》系列正是重点实验室和国家药监局监管科学研究项目研究的重点任务. 2021年8月23日发布的《应用纳米材料的医疗器械安全性和有效性评价指导原则——第一部分: 体系框架》中指出, 本系列指导原则适用于与人体直接或间接接触、由纳米材料组成或包含纳米材料的医疗器械的安全性和有效性评价. 针对纳米医疗器械安全性评价问题, 该体系框架指出, 虽然GB/T 16886(采标ISO 10993)系列医疗器械生物学评价标准总体也适用于纳米医疗器械, 但具体到某一类纳米医疗器械, 应针对医疗器械的结构特征、预期用途、与人体的接触途径、所含纳米材料的种类和形态等因素, 设计一系列用于验证测试系统适用性的试验, 建立适合该纳米产品特点的生物安全性评价试验方案. 该框架建议在兼顾常规器械评价内容的基础上, 还需要重点考虑与纳米材料有关的其他问题, 如样品制备, 吸收、分布、代谢和排泄/清除、全身毒性、中枢神经毒性和免疫毒性等,

表 4 代表性先进技术

Table 4 The representative advanced technologies

技术	纳米材料形态	参数	优势	劣势
原位液相透射电子显微术和原子分辨透射电子显微术	溶液	粒径(原子级~100 nm); 二维成像	单颗粒和原子分辨率, 实现动态过程成像	通量极低、成本极高、操作技术要求极高
冷冻电子显微术	新鲜冷冻溶液	粒径(检测下限可低于1 nm); 二维成像和三维重构	样品无需干燥和染色, 对电子束敏感的材料同样适用	信噪比很低、成本高、操作技术要求高
电子断层成像技术	干燥样品和溶液	粒径(检测下限可低于1 nm); 三维成像	单颗粒三维成像	通量极低、成本极高、操作技术要求极高
核磁共振低温多孔法和差示扫描量热多孔法	溶液	孔径和孔体积	在溶液体系中研究孔体积和溶剂可及体积	通量较低, 属于集成方法
超分辨显微术	干燥样品和溶液	表面包被物分析、纳米结构和行为分析	通过荧光标记实现选择性特征分析, 实现动态分析	有限的光学分辨率(>30 nm)和时间分辨率(50~100 ms)
单分子荧光显微术	溶液	孔结构和孔功能化分析	获得材料内部多孔结构信息	主材料必须具有较低的自发荧光, 染料分子必须能够在多孔结构内部扩散
纳米机械谐振器法	干燥样品和悬浮液	质量、密度、尺寸	获得纳米材料组成、大小、与溶剂相互作用信息	通量低, 不一定能获得单颗粒特征

并提出了采用阶段法进行应用纳米材料医疗器械的风险评估. 近期, 国家药监局医疗器械技术审评中心正在组织编写该系列指导原则的第三部分《应用纳米材料的医疗器械安全性和有效性评价指导原则——第三部分: 生物相容性/毒理学评价》, 该部分将对纳米医疗器械的生物学评价做出进一步建议和指导[74].

3.2 现有生物安全性评价项目、测试方法及相关标准

目前, 绝大多数的纳米生物材料及其相关医药产品的生物安全性评价项目及测试方法, 尚可参考一般化学品、药物及医疗器械的评价项目进行评价, 但评价前均需进行相关的方法学验证, 以证明方法的适用性. 如国家标准GB/T 16886.1中“作为风险管理组成部分的医疗器械生物学评价的系统方法框架图”, 指出了医疗器械生物学评价的基本原则. 该标准在附录A中分别按照器械与人体接触性质(接触方式和接触部位)和接触时间(短期、长期、持久)给出了生物学风险评定的终点, 指出对于某些特定的医疗器械, 实际评价终点可能与预期终点不同, 但改变终点建议做出相应的论证[75]. GB/T 16886.1中给出的系统框架以及实施指南, 均可以用于纳米医疗器械的生物学评价. 如因纳米材料的特殊性而需要改变评价终点, 可通过使用已有数据、附加的终点特定试验或说明不需要附加数据组评价终点的理由. 表S6汇总了现有的纳米生物材料及其医药产品的生物安全性评价的主要项目、评价指标、评价方法及可参考的标准. 纳米生物材料及纳米技术的应用是一个方兴未艾的新兴领域, 因此表S6中所列并非穷举.

3.3 现有生物安全性评价方法存在的问题

3.3.1 专属标准方法不多、标准体系尚未建立

目前, 针对纳米生物材料及其产品专属的生物安全性评价方法的标准不多, 发布的国家标准近20个, 行业标准4个. 而针对普通材料及其产品的评价方法标准, 其适用性还需在使用前进行合理的验证. 在验证的过程中, 除需考虑剂量、物种/性别以及接触途径外, 还需特别考虑纳米材料本身的理化特性. 可喜的是, 一些之前发布实施的标准, 在最新修订的版本中已经考虑到了纳米材料存在的可能性并添加了相关的描述, 例如GB/T 16886. 9-2022和GB/T 16886. 15-2022等. 另外, 对于一些已确定不适用的方法, 需要进一步改进或者发展新方法、新工具、新标准, 以满足纳米生物材料及其产品的生物安全性评价需求.

虽然近些年一些纳米专属的生物安全性评价标准陆续发布实施, 但仍未形成系统的评价标准体系. 因此, 在对纳米生物材料及其产品进行生物安全性评价时, 无论是生产企业、检测机构还是审评监管部门, 都会感到缺少实用的标准方法或流程. 非专属的评价方法要先进行大量的验证才能使用, 这无形中增加了很多工作量和成本. 因此现阶段, 急需包括研究院所在内的各方共同努力, 建立系统的生物安全性评价标准体系, 针对各个不同的评价项目, 将纳米专属方法及经验证适合纳米生物材料及产品评价的方法标准全部纳入该体系. 该评价标准体系的建立, 将为研发企业提供可行的研究方法, 为检测机构提供标准的检测方法, 为审评监管机构提供准确的理论依据, 极大地推动纳米生物医药产业的健康快速发展.

3.3.2 评价过程存在很多干扰因素

(I) 来自生物分子的干扰及排除干扰的方法

生物环境中存在的各种蛋白分子往往会被纳米材料迅速吸附到表面, 形成“蛋白冠”, 而蛋白冠实际上是一种由强结合蛋白和外层快速交换分子组成的双层动态系统[76,77]. 进入生物体内的纳米材料, 实际上是以“蛋白冠”的形式存在的, 从而改变了纳米材料的原有尺寸、聚集/团聚状态以及表界面性质, 因此可能改变其被吞噬细胞识别和摄取的程度以及在体内的转运、蓄积、毒性等生物学行为. 另外, 其他生物分子如脂质分子等, 也会因纳米材料表面修饰成分的不同而被不同程度地吸附到材料或产品表面. 因此, 在进行生物安全性评价前, 需对纯纳米材料以及介质中的纳米材料进行充分的理化表征, 以确保对纳米材料的表面性质有充分而正确的认识, 准确判断风险来源[76,78]. 这样在生物安全性评价的介质选择以及结果判定时, 才可能做出科学而准确的判断.

(II) 来自纳米材料本身的干扰

(1) 待测样品稳定性(尺寸、结构、化学特性等)

在制备含纳米材料的待测样品时, 由于纳米材料的周围环境发生改变(如通过浸提方式进入溶液体系等), 纳米材料本身可能会发生各种变化, 包括物理变化(聚集、团聚、沉淀等)、化学变化(溶解、氧化)以及生物变化(生物降解、生物转化等)[79,80]. 而纳米材料在待测样品中的稳定性变化, 可能会改变其进入细胞或体内的途径和效率, 进而影响其与生物效应分子相互作用的方式以及体内的代谢过程, 最终对其生物安全

性评价结果产生不可忽视的影响. 如生物介质溶液中存在大量的水分子以及其他离子或蛋白分子, 因此分散在溶液中的纳米材料通常不会以原尺寸存在, 而会形成聚集体或团聚体, 较大尺寸的聚集体或团聚体会降低其被细胞摄入以及外排的效率, 进而影响其生物学效应[68,80]. 并且, 溶液样品中纳米材料的分散情况及尺寸分布都是随时间动态变化的. 对于一些化学性质较活泼的金属氧化物或金属纳米材料, 在溶液中易发生化学变化. 如模拟体液通常会作为医疗器械生物学评价中的浸提液, 制备溶液样品. 纳米银材料中释放的银离子会与模拟体液中的氯离子形成难溶的氯化银(AgCl)沉淀, 导致生物活性大大降低[81,82]. 研究表明, 一些酶类蛋白可以使纳米材料发生生物降解或生物转化, 如一些过氧化物酶可以导致碳纳米材料发生生物降解[83,84]. 因此, 在生物安全性评价前制备浸提液或配制储备液样品时, 需选择适合的生物介质, 并通过分析确定该纳米材料在规定的制备和储存条件下其样品的稳定性, 确保生物安全性评价可以获得代表性和可重复性的结果[67]. 必要时, 需对不同的生物介质及相应的制备和储存条件进行验证, 以选择最适合的介质和条件, 避免因上述原因对后续生物安全性评价结果的准确性和可重复性造成不良影响.

(2) 光学特性(吸光度等)

如果一些纳米材料在检测波长(或激发波长)附近具有光吸收(或荧光等), 则测得吸光值(荧光强度等)就比反应产物的实际吸光值(荧光强度等)大[85]. 这类干扰可以将仅含纳米材料的对照组测量值作为背景值扣除, 或者在测量产物之前将纳米材料通过过滤或离心的方法去除, 以排除纳米材料自身光吸收(或荧光等)的干扰[86,87]. 但如果纳米材料与试验体系中的其他物质发生物理吸附或化学反应等相互作用, 则过滤或离心的排除干扰方法就不适用了.

(3) 物理吸附或化学反应特性(与被测物等发生相互作用)

如果一些纳米材料(如纳米银材料)自身或其表面修饰的分子可与试验体系中的反应物或产物发生物理吸附或化学反应等相互作用, 则会导致测量结果失真[80,88]. 因此, 在测试前, 均需进行相应的验证实验, 确认此类干扰的存在. 如国标GB/T 41309-2022规定, 纳米材料内毒素测试前, 要进行方法验证, 并在附录中给出了验证指导步骤, 通过合理的设计抑制/增强对照样品, 可以判断纳米材料对于鲎试剂(limulus amebocyte lysate, LAL)法测试的干扰[86,89]. 国标GB/T 41915-2022也规定了在给出最终细胞毒性测试结果之前, 需进行二者相互作用的对照实验[90]. 体外遗传毒性的细菌回复突变试验中, 如果纳米材料(如纳米银)具有一定抑菌作用, 则可能会得到假阴性的结果, 因此需提供试验条件下细菌对于纳米材料的摄取、是否抑菌等相关数据[91].

这类干扰通常不能通过在测试前去除纳米材料而排除干扰, 目前可采用稀释的方法. 但不能无限稀释, 即不能超过其最大有效稀释倍数, 这个倍数通常由测试方法的灵敏度决定, 如检测内毒素通常使用的LAL法, 其动态浊度测试法的最大有效稀释倍数为1:500, 而终点显色测试法的最大有效稀释倍数为1:5[87].

(III) 来自杂质/添加剂/各种离子等的干扰

合成纳米材料或生产相应的医疗器械过程中引入的添加剂、催化剂等物质, 如有残留, 则也会存在干扰测试和影响结果判定的风险. 另外, 浸提介质中的一些离子, 可能会影响反应物, 干扰最终的测试结果[89]. 国标GB/T 41309-2022附录A中给出了一些LAL测试的潜在干扰(盐[92,93]、肝素[94~96]、金属离子[97~99]、纤维素酯[100]等), 在LAL测试前应采取必要的措施抑制这些干扰. 但目前在表S6中所列的现有评价方法中, 仍有大量潜在的干扰尚未被明确, 所以需要测试者在测试前进行必要的方法验证, 以便最大限度地减少结果的不确定性.

如上面提到一些简单的方法均不能有效地排除干扰, 则考虑使用其他测试方式或测试方法对该生物学指标进行评价. 如LAL测试有3种测试形式, 当待测样品对一种形式的LAL测试产生的干扰无法通过简单方法去除时, 就应考虑采用另一种LAL测试形式[71]. 美国纳米技术表征实验室(Nanotechnology Characterization Laboratory, NCL)的McNeil[101]撰写的*Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*一书中, 给出了对纳米制剂进行内毒性测试的流程图. 如果纳米材料干扰显色测试, 则可同时使用浊度法和凝胶法进行测试. 这两种测试中的加标回收率在50%~200%之间, 则可以报告LAL测试结果, 否则需要另外进行单核细胞激活测试和家兔热原测试. 一般来说, 单一的检测方法不足以充分说明纳米颗粒的毒性. 因此, 通常一种检测方法的测量结果应与其他检测方法相结合, 以便更好地理解毒性作用机制, 并将数据用于风险评估模型.

3.4 纳米生物安全性评价中的实验动物模型选择

纳米材料理化特性多种多样，目前尚无标准化的实验动物评价模型. 低等动物包括秀丽隐杆线虫[102]、黑腹果蝇[103]、斑马鱼[104]等，小型哺乳动物包括小鼠[105]、大鼠[106]、家兔[107]等，以及大型哺乳动物包括犬[108]、非人灵长类动物[109]等均可用于纳米生物材料生物安全性风险评价与研究. 秀丽隐杆线虫体型小、成本低，可用来评估生态系统中金属氧化物纳米颗粒的影响[102]. 黑腹果蝇的基因组结构相较于哺乳动物而言更简单，对纳米材料的反应与在哺乳动物模型中的观察结果相似，故在纳米材料毒性评价中也占据一席之地. 斑马鱼是常用的模式脊椎动物，可弥补哺乳动物的不足，在纳米材料高通量筛选方面具有广阔的应用前景. 小鼠和大鼠作为最常用的啮齿类哺乳动物实验动物模型，研究技术相对成熟，因此也成为纳米生物安全性评价中最常用的实验动物模型. 基于动物模型中获得的数据外推至人临床应用的可靠性，非临床安全性评价通常要求获得啮齿类和非啮齿类动物中的毒理学研究. 比格(Beagle)犬是最常见非啮齿类动物模型，遗传背景清楚，常用于单次和重复给药毒性研究及安全药理学研究. 此外，食蟹猴为非临床安全性评价中最常见的非人灵长类动物种属，国内外相关背景资料丰富，与人的基因同源性高，免疫排斥反应相对较小，对毒性研究的干扰较小.

但是，近些年的部分研究提示，使用正常的动物作为实验动物模型研究纳米生物材料时也存在一定问题，如纳米材料在正常动物模型体内可检出其分布和续存特性的改变，但不一定会伴随显著的毒性效应[110]. 研究表明，患有慢性疾病的动物模型对纳米材料比较敏感，纳米材料可放大模型导致的活性氧(reactive oxygen species，ROS)水平升高和炎症反应[111]. 纳米材料可能与疾病动物体内的生理病理微环境产生一定协同作用，导致疾病动物对纳米材料的易感性，其组织分布及作用靶器官也可能与健康动物不同[112~114]. 近年，利用疾病动物模型研究纳米材料生物安全性的概念在支气管哮喘模型上确实得到了广泛的验证和发展[112,115]. 因此，Chrishtop等人[116]提出了评价纳米材料生物安全性的动物模型选择的特殊要求，即需明确纳米材料在体内蓄积是否与毒性作用存在直接联系. 因此在选择动物模型时，除了根据纳米材料的预期应用选择合适的实验动物模型以及给药途径外，还需考虑以下几个方面: (1) 从生化及解剖学角度判断纳米材料进入动物和人体器官的途径的一致性; (2) 从生化及解剖学角度判断纳米材料在动物和人体内排泄途径的一致性; (3) 器官的代偿机制; (4) 抗氧化系统被抑制的动物模型; (5) 模型暴露于纳米材料的持续时间[116]. 未来，对于正常动物模型中无明显毒性反应的纳米生物材料，可能需要考虑将其在慢性疾病(如该材料蓄积靶器官的慢性疾病)动物模型中进行进一步生物安全性评价. 此外, 随着动物福利伦理和替代理念的推广，人体组织芯片等新的模型和技术有可能在未来替代动物实验[117,118]. 本文总结了几种可用于纳米材料生物安全性评价的常用动物模型(表S7), 为纳米生物材料的生物安全性评价提供参考.

4 总结与展望

纳米生物材料是具有生物医药应用前景的纳米材料，是全球各国战略性和前沿性材料，发展前景广阔. 但是，目前成功应用于临床的纳米生物材料仅限于简单体系的纳米脂质体、高分子聚合物、纳米银等，与科学研究中浩繁的纳米生物材料存在很大差距. 在研纳米材料难以实现应用转化的原因，除体内纳米尺度相互作用机制等关键科学问题尚不十分明确外，还包括动物实验模型等导致的临床前研究结果与临床试验结果之间存在差异、多体相纳米复合体系的系统稳定性较差、规模化可重复生产难等工程技术问题以及纳米材料从临床前研究到临床开发和商业化过程中的监管要求不够明确等诸多因素. 因此，如何合理化设计纳米体系以增加其体内外的系统稳定性、如何突破体内的各种生物屏障提高靶向性和生物功能、如何进行大规模可重复制备和筛选等一系列关键科学和技术问题亟需解决. 而如何保障所设计纳米产品生物安全性评价的准确性是串联这一系列关键问题的桥梁，也是决定其是否能成功走向临床最重要的一道门槛，无论是科研人员、企业还是监管部门都必须给予最大程度的重视.

尽管我国纳米科学基础研究已跻身世界前列，但是纳米材料/技术的发展要满足国家“从科技前沿向产品应用转化”的需求，还有很长一段路要走. 纳米生物材料从基础科研走向医药产品，面临的主要挑战包括: (1) 复杂体系对纳米材料性质影响较大，表征指标较多，纳米检测技术的标准化研究不足，很多已有标准方法的适用性还需进一步验证，标准化体系不完备; (2)

纳米尺度上测量方法的准确性要求较高，相应的检测技术和设备相对滞后，基础科研相对薄弱；(3) 纳米知识体系依然在发展中，特别是纳米生物安全性知识体系相对匮乏，纳米生物材料因其特性导致其生物安全性评价困难, 应用风险较高.

现阶段，标准化已成为国家战略布局中的中坚力量，是创新驱动发展的重要桥梁. 为顺应我国“质量强国”的发展方向，未来纳米生物材料标准化检测应从新标准、新方法、新工具、新机制等几个方面持续发展, 以保证我国未来的纳米医药产品做到结构明确、质量可控、安全有效、环境友好.

(1) 提高标准质量，提升标准检测和验证的能力, 积极开展国内国际比对实验, 促进标准实施, 保证纳米生物材料及其产品的质量，夯实纳米医药产业的质量基础; 推进新标准制定, 特别是建立复杂多相体系检测和多生物学指标评估的相关标准方法，完善标准化体系.

(2) 发展新工具. 研制尖端设备，完善标准物质种类, 满足纳米生物材料及其产品高精尖检测的需求; 发展新的体外替代模型、动物模型等安全性评估工具, 尽量减小或排除纳米生物材料带来的干扰，提高生物安全性评价可靠性的同时降低安全性评价的复杂性.

(3) 继续加强基础科学研究, 实现纳米高新技术相关理论的重要突破，深入挖掘纳米生物材料的体内作用机制.

(4) 从更大的范围、更深的程度、更高的水平上推动纳米生物医药的产学研检深度融合，促进与监管部门的沟通合作，并大力发展纳米医药领域的监管科学，加速纳米科技成果转化和纳米医药产品的上市步伐, 更好地满足公众健康需要.

参考文献

1 Talebian S, Rodrigues T, das Neves J, et al. Facts and figures on materials science and nanotechnology progress and investment. ACS Nano, 2021, 15: 15940–15952

2 Yang L, Zhang L, Webster T J. Nanobiomaterials: State of the art and future trends. Adv Eng Mater, 2011, 13: B197–B217

3 Xu J, Cai R, Zhang Y, et al. Molybdenum disulfide-based materials with enzyme-like characteristics for biological applications. Colloids Surfs B-Biointerfaces, 2021, 200: 111575

4 Li L, Li S, Wang H Y, et al. Review on the detection technology of nanomaterials in cosmetics (in Chinese). China Pharma, 2019, 22: 522–526 [李莉, 李硕, 王海燕, 等. 化妆品中纳米材料检测技术的研究进展. 中国药师, 2019, 22: 522–526]

5 Sims C M, Hanna S K, Heller D A, et al. Redox-active nanomaterials for nanomedicine applications. Nanoscale, 2017, 9: 15226–15251

6 Wang J, Li H, Tian L, et al. Nanobiomaterials: State of the art. In: Wang X, Ramalingam M, Kong X, et al, eds. Nanobiomaterials: Classification, Fabrication and Biomedical Applications. Hoboken: Wiley, 2018, 3–35

7 Song Z M, Wang L, Chen N, et al. Biological effects of agglomerated multi-walled carbon nanotubes. Colloids Surfs B-Biointerfaces, 2016, 142: 65–73

8 Wang X, Wang C, Cheng L, et al. Noble metal coated single-walled carbon nanotubes for applications in surface enhanced raman scattering imaging and photothermal therapy. J Am Chem Soc, 2012, 134: 7414–7422

9 Wang D W, Zhu X M, Lee S F, et al. Folate-conjugated Fe_3O_4@SiO_2@gold nanorods@mesoporous SiO_2 hybrid nanomaterial: A theranostic agent for magnetic resonance imaging and photothermal therapy. J Mater Chem B, 2013, 1: 2934–2942

10 Choi S, Noh S H, Lim C O, et al. Icariin-functionalized nanodiamonds to enhance osteogenic capacity *in vitro*. Nanomaterials, 2020, 10: 2071–2084

11 Fu Y, Cui S, Luo D, et al. Novel inorganic nanomaterial-based therapy for bone tissue regeneration. Nanomaterials, 2021, 11: 789–806

12 Zhou X, Zheng Y F, Jia Q L, et al. Study on the antibacterial properties and biological safety of Ti_3C_2/Co two-dimensional nanomaterials (in Chinese). J Biol, 2022, 39: 30–35 [周璇, 郑云飞, 贾绮林, 等. 新型二维纳米材料Ti_3C_2/Co的抗菌及生物安全性研究. 生物学杂志, 2022, 39: 30–35]

13 Halwani A A. Development of pharmaceutical nanomedicines: From the bench to the market. Pharmaceutics, 2022, 14: 106–126

14 Yang F, Tong Y, Gu N. Research progress and development trend of nanobiomaterials (in Chinese). China Basic Sci, 2022, 24: 46–56 [杨芳, 童杨, 顾宁. 纳米生物材料的研究进展与发展趋势. 中国基础科学, 2022, 24: 46–56]

15 Sun C, Lee J S H, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. Adv Drug Deliver Rev, 2008, 60: 1252–1265

16 Sun Y, Kim H S, Kang S, et al. Magnetic resonance imaging-guided drug delivery to breast cancer stem-like cells. Adv Healthcare Mater, 2018, 7: 1800266

17 Singh A P, Biswas A, Shukla A, et al. Targeted therapy in chronic diseases using nanomaterial-based drug delivery vehicles. Sig Transduct Target

Ther, 2019, 4: 33–53
18 Kim C S, Tonga G Y, Solfiell D, et al. Inorganic nanosystems for therapeutic delivery: Status and prospects. Adv Drug Deliver Rev, 2013, 65: 93–99
19 Cho E C, Glaus C, Chen J, et al. Inorganic nanoparticle-based contrast agents for molecular imaging. Trends Mol Med, 2010, 16: 561–573
20 Fiorilli S, Pagani M, Boggio E, et al. Sr-containing mesoporous bioactive glasses bio-functionalized with recombinant ICOS-Fc: An *in vitro* study. Nanomaterials, 2021, 11: 321–343
21 Ma D C, Liu L, Ma X L, et al. Research status and prospect of orthopedic nanobiomaterials (in Chinese). Chin J Tissue Eng Res, 2015, 19: 7698–7702 [马德春, 刘莉, 马新利, 等. 骨科纳米生物材料的研究现状与展望. 中国组织工程研究, 2015, 19: 7698–7702]
22 Rahmati M, Mozafari M. Biological response to carbon-family nanomaterials: Interactions at the nano-bio interface. Front Bioeng Biotechnol, 2019, 7: 4–25
23 Liang S, Pierce D T, Amiot C, et al. Photoactive nanomaterials for sensing trace analytes in biological samples. Synt React InOrg Metal-Org Nano-Metal Chem, 2005, 35: 661–668
24 Rajzer I, Kurowska A, Jabłoński A, et al. Scaffolds modified with graphene as future implants for nasal cartilage. J Mater Sci, 2019, 55: 4030–4042
25 EFSA Scientific Committee. Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. EFSA J, 2011, 9: 2140–2175
26 Xia C, Jin X, Garalleh H A, et al. Optimistic and possible contribution of nanomaterial on biomedical applications: A review. Environ Res, 2023, 218: 114921
27 Asmatulu E, Andalib M N, Subeshan B, et al. Impact of nanomaterials on human health: A review. Environ Chem Lett, 2022, 20: 2509–2529
28 Patel G, Patra C, Srinivas S P, et al. Methods to evaluate the toxicity of engineered nanomaterials for biomedical applications: A review. Environ Chem Lett, 2021, 19: 4253–4274
29 Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Guidance manual for the testing of manufactured nanomaterials: OECD's sponsorship programme. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on the Safety of Manufactured Nano-materials. Paris: OECD, 2009
30 Stone V, Pozzi-Mucelli S, Tran L, et al. ITS-NANO-Prioritising nanosafety research to develop a stakeholder driven intelligent testing strategy. Part Fibre Toxicol, 2014, 11: 9–20
31 International Organization for Standardization Member Bodies. ISO/TR 13014: 2012 Nanotechnologies-guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment. Geneva: ISO, 2012
32 Oomen A, Bleeker E, Bos P, et al. Grouping and read-across approaches for risk assessment of nanomaterials. Int J Environ Res Public Health, 2015, 12: 13415–13434
33 National Medical Products Administration. Guiding Principles for Evaluating the Safety and Effectiveness of Medical Devices Using Nanomaterials. Part II: Physical and Chemical Characterization (in Chinese). Beijing: Standards Press of China, 2021 [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2部分: 理化表征. 北京: 中国标准出版社, 2021]
34 Li H, Li J, Bodycomb J, et al. Experimental methods in chemical engineering: Particle size distribution by laser diffraction—PSD. Can J Chem Eng, 2019, 97: 1974–1981
35 State Administration for Market Regulation, Standardization Administration. GB/T 21649.1-2008 Granularity Analysis Image Analysis. Part 1: Static Image Analysis (in Chinese). Beijing: Standards Press of China, 2008 [国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. GB/T 21649.1-2008 粒度分析 图像分析法 第1部分: 静态图像分析法. 北京: 中国标准出版社, 2008]
36 International Organization for Standardization Member Bodies. ISO 19430-2016 Particle size analysis-particle tracking analysis (PTA) method. Geneva: ISO, 2016
37 International Organization for Standardization Member Bodies. ISO/TS 19590-2017 Nanotechnologies-size distribution and concentration. Geneva: ISO, 2017
38 Christian P, Von der Kammer F, Baalousha M, et al. Nanoparticles: Structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. Ecotoxicology, 2008, 17: 326–343
39 Phenrat T, Saleh N, Sirk K, et al. Aggregation and sedimentation of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions. Environ Sci Technol, 2007, 41: 284–290
40 Lowry G V, Gregory K B, Apte S C, et al. Transformations of nanomaterials in the environment. Environ Sci Technol, 2012, 46: 6893–6899
41 Vilela D, González M C, Escarpa A. Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: Chemical creativity behind the assay. A review. Anal Chim Acta, 2012, 751: 24–43
42 Baalousha M, Nur Y, Römer I, et al. Effect of monovalent and divalent cations, anions and fulvic acid on aggregation of citrate-coated silver nanoparticles. Sci Total Environ, 2013, 454-455: 119–131

43 Manthiram K, Surendranath Y, Alivisatos A P. Dendritic assembly of gold nanoparticles during fuel-forming electrocatalysis. J Am Chem Soc, 2014, 136: 7237–7240

44 Allen S L, Sharma J N, Zamborini F P. Aggregation-dependent oxidation of metal nanoparticles. J Am Chem Soc, 2017, 139: 12895–12898

45 Pulskamp K, Diabate S, Krug H. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. Toxicol Lett, 2007, 168: 58–74

46 Francis A P, Devasena T. Toxicity of carbon nanotubes: A review. Toxicol Ind Health, 2018, 34: 200–210

47 Greczynski G, Hultman L. Compromising science by ignorant instrument calibration—Need to revisit half a century of published XPS data. Angew Chem Int Ed, 2020, 59: 5002–5006

48 Nel A E, Mädler L, Velegol D, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. Nat Mater, 2009, 8: 543–557

49 Ge C, Du J, Zhao L, et al. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108: 16968–16973

50 Wang L, Zhang T, Li P, et al. Use of synchrotron radiation-analytical techniques to reveal chemical origin of silver-nanoparticle cytotoxicity. ACS Nano, 2015, 9: 6532–6547

51 Bhattacharya P, Kim S H, Chen P, et al. Dendrimer-fullerenol soft-condensed nanoassembly. J Phys Chem C, 2012, 116: 15775–15781

52 Cui M, Liu R, Deng Z, et al. Quantitative study of protein coronas on gold nanoparticles with different surface modifications. Nano Res, 2014, 7: 345–352

53 Gao S, Cui M, Li R, et al. Quantitative deconvolution of autocorrelations and cross correlations from two-dimensional lifetime decay maps in fluorescence lifetime correlation spectroscopy. Sci Bull, 2017, 62: 9–15

54 Pitek A S, O'Connell D, Mahon E, et al. Transferrin coated nanoparticles: Study of the bionano interface in human plasma. PLoS One, 2012, 7: e40685

55 Lee Y K, Choi E J, Webster T G, et al. Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. Int J Nanomed, 2015, 10: 97–112

56 Sasidharan A, Riviere J E, Monteiro-Riviere N A. Gold and silver nanoparticle interactions with human proteins: Impact and implications in biocorona formation. J Mater Chem B, 2015, 3: 2075–2082

57 Bigdeli A, Palchetti S, Pozzi D, et al. Exploring cellular interactions of liposomes using protein corona fingerprints and physicochemical properties. ACS Nano, 2016, 10: 3723–3737

58 Vaishanav S K, Chandraker K, Korram J, et al. Protein nanoparticle interaction: A spectrophotometric approach for adsorption kinetics and binding studies. J Mol Structure, 2016, 1117: 300–310

59 Radic S, Geitner N K, Podila R, et al. Competitive binding of natural amphiphiles with graphene derivatives. Sci Rep, 2013, 3: 2273–2280

60 Lo Giudice M C, Herda L M, Polo E, et al. *In situ* characterization of nanoparticle biomolecular interactions in complex biological media by flow cytometry. Nat Commun, 2016, 7: 13475–13484

61 Padro D, Cienskowski P, Lopez-Fernandez S, et al. Toward diffusion measurements of colloidal nanoparticles in biological environments by nuclear magnetic resonance. Small, 2020, 16: e2001160

62 Latreille P, Rabanel J, Le Goas M, et al. *In situ* characterization of the protein corona of nanoparticles *in vitro* and *in vivo*. Adv Mater, 2022, 34: e2203354

63 Siu C H, Chiang K S, Swift H. Characterization of cytoplasmic and nuclear genomes in the colorless alga Polytoma. Chromosoma, 1974, 48: 19

64 Loeschner K, Navratilova J, Købler C, et al. Detection and characterization of silver nanoparticles in chicken meat by asymmetric flow field flow fractionation with detection by conventional or single particle ICP-MS. Anal Bioanal Chem, 2013, 405: 8185–8195

65 Tiede K, Boxall A B A, Tiede D, et al. A robust size-characterisation methodology for studying nanoparticle behaviour in "real" environmental samples, using hydrodynamic chromatography coupled to ICP-MS. J Anal At Spectrom, 2009, 24: 964–972

66 Loeschner K, Brabrand M S J, Sloth J J, et al. Use of alkaline or enzymatic sample pretreatment prior to characterization of gold nanoparticles in animal tissue by single-particle ICPMS. Anal Bioanal Chem, 2014, 406: 3845–3851

67 Modena M M, Rühle B, Burg T P, et al. Nanoparticle characterization: What to measure? Adv Mater, 2019, 31: e1901556

68 Gambinossi F, Mylon S E, Ferri J K. Aggregation kinetics and colloidal stability of functionalized nanoparticles. Adv Colloid Interfac, 2015, 222: 332–349

69 Guo J G, Ying T, Gao H, et al. Surface microstructures of lunar soil returned by Chang'E-5 mission reveal an intermediate stage in space weathering process. Sci Bull, 2022, 67: 1696–1701

70 Huang F H, Shao X, Geng X C, et al. Technical guidelines for non-clinical safety evaluation of nanomedicine (Interpretation) (in Chinese). Acta Pharma Sin, 2023, 58: 805–814 [黄芳华, 邵雪, 耿兴超, 等. 纳米药物非临床安全性评价研究技术指导原则(解读). 药学学报, 2023, 58: 805–814]

71 National Medical Products Administration. Technical Guidelines for Quality Control Research of Nanomedicine (Trial) (in Chinese). Beijing: Standards Press of China, 2021 [国家药品监督管理局. 纳米药物质量控制研究技术指导原则(试行). 北京: 中国标准出版社, 2021]

72 National Medical Products Administration. Technical Guidelines for Non-Clinical Safety Research of Nanomedicines (Trial) (in Chinese). Beijing: Standards Press of China, 2021 [国家药品监督管理局. 纳米药物非临床安全性研究技术指导原则(试行). 北京: 中国标准出版社, 2021]

73 National Medical Products Administration. Technical guidelines for Non-Clinical Pharmacokinetic Research of Nanomedicines (Trial) (in Chinese). Beijing: Standards Press of China, 2021 [国家药品监督管理局. 纳米药物非临床药代动力学研究技术指导原则(试行). 北京: 中国标准出版社, 2021]

74 National Medical Products Administration. Guidelines for the Evaluation of Safety And Effectiveness of Medical Devices Applying Nanomaterials. Part 1: System Framework (in Chinese). Beijing: Standards Press of China, 2021 [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1部分: 体系框架. 北京: 中国标准出版社, 2021]

75 State Administration for Market Regulation, Standardization Administration. GB/T 16886.1-2022 Biological Evaluation of Medical Devices. Part 1: Evaluation and Testing in Risk Management Processes (in Chinese). Beijing: Standards Press of China, 2022 [国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. GB/T 16886. 1-2022 医疗器械生物学评价——第1部分: 风险管理过程中的评价与试验. 北京: 中国标准出版社, 2022]

76 State Administration for Market Regulation, Standardization Administration. GB/Z 16886.22-2022 Biological Evaluation of Medical Devices. Part 22: Guidance on Nanomaterials (in Chinese). Beijing: Standards Press of China, 2022 [国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. GB/Z 16886. 22-2022 医疗器械生物学评价——第22部分: 纳米材料指南. 北京: 中国标准出版社, 2022]

77 Tomak A, Cesmeli S, Hanoglu B D, et al. Nanoparticle-protein corona complex: Understanding multiple interactions between environmental factors, corona formation, and biological activity. Nanotoxicology, 2021, 15: 1331–1357

78 State Administration for Market Regulation, Standardization Administration. GB/T 39261-2020 Nanotechnology—A Guide to Characterization of Pre-Physicochemical Properties for Toxicological Evaluation of Nanomaterials (in Chinese). Beijing: Standards Press of China, 2020 [国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. GB/T 39261-2020 纳米技术 纳米材料毒理学评价前理化性质表征指南. 北京: 中国标准出版社, 2020]

79 Lead J R, Batley G E, Alvarez P J J, et al. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects—An updated review. Environ Toxicol Chem, 2018, 37: 2029–2063

80 Rösslein M, Elliott J T, Salit M, et al. Use of cause-and-effect analysis to design a high-quality nanocytotoxicology assay. Chem Res Toxicol, 2015, 28: 21–30

81 Xu L, Bai R, Cheng X, et al. A tiered experimental approach for characterization and silver release of silver-containing wound dressings. J Biomed Nanotechnol, 2018, 14: 564–574

82 Zhang W, Xiao B, Fang T. Chemical transformation of silver nanoparticles in aquatic environments: Mechanism, morphology and toxicity. Chemosphere, 2018, 191: 324–334

83 Mokhtari-Farsani A, Hasany M, Lynch I, et al. Biodegradation of carbon-based nanomaterials: The importance of “biomolecular corona” consideration. Adv Funct Mater, 2021, 32: 2105649

84 Chen M, Qin X, Zeng G. Biodegradation of carbon nanotubes, graphene, and their derivatives. Trends Biotechnol, 2017, 35: 836–846

85 Li Y, Italiani P, Casals E, et al. Optimising the use of commercial LAL assays for the analysis of endotoxin contamination in metal colloids and metal oxide nanoparticles. Nanotoxicology, 2015, 9: 462–473

86 Dobrovolskaia M A, Neun B W, Clogston J D, et al. Ambiguities in applying traditional *Limulus* Amebocyte Lysate tests to quantify endotoxin in nanoparticle formulations. Nanomedicine, 2010, 5: 555–562

87 Oostingh G J, Casals E, Italiani P, et al. Problems and challenges in the development and validation of human cell-based assays to determine nanoparticle-induced immunomodulatory effects. Part Fibre Toxicol, 2011, 8: 8

88 Liang L, Cui M, Zhang M, et al. Nanoparticles’ interference in the evaluation of *in vitro* toxicity of silver nanoparticles. RSC Adv, 2015, 5: 67327–67334

89 State Administration for Market Regulation, Standardization Administration. GB/T 41309-2022 Nanotechnology Endotoxin Test *In Vitro* for Nanomaterials Limulus Reagent Method (in Chinese). Beijing: Standards Press of China, 2022 [国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. GB/T 41309-2022 纳米技术 纳米材料的内毒素体外测试 鲎试剂法. 北京: 中国标准出版社, 2022]

90 State Administration for Market Regulation, Standardization Administration. GB/T 41915-2022 Nanotechnology MTS Method Was Used to Determine the Cytotoxicity of Nanoparticles (in Chinese). Beijing: Standards Press of China, 2022 [国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. GB/T 41915-2022 纳米技术 MTS法测定纳米颗粒的细胞毒性. 北京: 中国标准出版社, 2022]

91 State Administration for Market Regulation, Standardization Administration. GB/Z 42246-2022 Nanotechnology—A Guide to Testing Methods for Genotoxicity of Nanomaterials (in Chinese). Beijing: Standards Press of China, 2022 [国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. GB/Z 42246-2022 纳米技术 纳米材料遗传毒性试验方法指南. 北京: 中国标准出版社, 2022]

92 Bohrer D, Hörner R, do Nascimento P C, et al. Interference in the limulus amebocyte lysate assay for endotoxin determination in peritoneal dialysis fluids and concentrates for hemodialysis. J Pharm BioMed Anal, 2001, 26: 811–818

93 Bihari P, Vippola M, Schultes S, et al. Optimized dispersion of nanoparticles for biological *in vitro* and *in vivo* studies. Part Fibre Toxicol, 2008, 5: 14–27

94 Dey R S, Raj C R. Polyelectrolyte-functionalized gold nanoparticle scaffold for the sensing of heparin and protamine in serum. Chem Asian J, 2012, 7: 417–424

95 Cao R, Li B. A simple and sensitive method for visual detection of heparin using positively-charged gold nanoparticles as colorimetric probes. Chem Commun, 2011, 47: 2865–2867

96 Zhang C, Qi S, Meng J, et al. Selective and efficient extraction of heparin by arginine-functionalized flowered mesoporous silica nanoparticles with high capacity. Separation Purification Tech, 2021, 276: 119321–119329

97 Fujita Y, Nabetani T. Iron sulfate inhibits *Limulus* activity by induction of structural and qualitative changes in lipid A. J Appl Microbiol, 2014, 116: 89–99

98 Moretti S, Smets W, Hofman J, et al. Human inflammatory response of endotoxin affected by particulate matter-bound transition metals. Environ Pollution, 2019, 244: 118–126

99 Ongkudon C M, Danquah M K. Analysis of selective metal-salt-induced endotoxin precipitation in plasmid DNA purification using improved Limulus Amoebocyte lysate assay and central composite design. Anal Chem, 2011, 83: 391–397

100 Douwes J, Versloot P, Hollander A, et al. Influence of various dust sampling and extraction methods on the measurement of airborne endotoxin. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 1763–1769

101 McNeil S E. Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. New York, Humana Press, 2011

102 Wu T, Xu H, Liang X, et al. Caenorhabditis elegans as a complete model organism for biosafety assessments of nanoparticles. Chemosphere, 2019, 221: 708–726

103 Chifiriuc M, Ratiu A, Popa M, et al. Drosophotoxicology: An emerging research area for assessing nanoparticles interaction with living organisms. Int J Mol Sci, 2016, 17: 36–49

104 Haque E, Ward A. Zebrafish as a model to evaluate nanoparticle toxicity. Nanomaterials, 2018, 8: 561–578

105 Ruiz P A, Morón B, Becker H M, et al. Titanium dioxide nanoparticles exacerbate DSS-induced colitis: Role of the NLRP3 inflammasome. Gut, 2017, 66: 1216–1224

106 Pujalté I, Dieme D, Haddad S, et al. Toxicokinetics of titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles after inhalation in rats. Toxicol Lett, 2017, 265: 77–85

107 Leonardi A, Bucolo C, Drago F, et al. Cationic solid lipid nanoparticles enhance ocular hypotensive effect of melatonin in rabbit. Int J Pharm, 2015, 478: 180–186

108 Axiak-Bechtel S, Upendran A, Lattimer J, et al. Gum arabic-coated radioactive gold nanoparticles cause no short-term local or systemic toxicity in the clinically relevant canine model of prostate cancer. Int J Nanomed, 2014, 9: 5001–5011

109 Zhang N N, Li X F, Deng Y Q, et al. A thermostable mRNA vaccine against COVID-19. Cell, 2020, 182: 1271–1283.e16

110 Chrishtop V V, Mironov V A, Prilepskii A Y, et al. Organ-specific toxicity of magnetic iron oxide-based nanoparticles. Nanotoxicology, 2021, 15: 167–204

111 Mourabit S, Fitzgerald J A, Ellis R P, et al. New insights into organ-specific oxidative stress mechanisms using a novel biosensor zebrafish. Environ Int, 2019, 133: 105138–105146

112 Ihrie M D, Bonner J C. The toxicology of engineered nanomaterials in asthma. Curr Environ Health Rpt, 2018, 5: 100–109

113 Apte U, Krishnamurthy P. Detoxification Functions of the Liver. In: Monga S P S, ed. Molecular Pathology of Liver Diseases. Boston: Springer, 2011. 147–163

114 Kermanizadeh A, Powell L G, Stone V. A review of hepatic nanotoxicology—Summation of recent findings and considerations for the next generation of study designs. J Toxicol Environ Health Part B, 2020, 23: 137–176

115 Abdulnasser Harfoush S, Hannig M, Le D D, et al. High-dose intranasal application of titanium dioxide nanoparticles induces the systemic uptakes and allergic airway inflammation in asthmatic mice. Respir Res, 2020, 21: 168–180

116 Chrishtop V V, Prilepskii A Y, Nikonorova V G, et al. Nanosafety vs. nanotoxicology: Adequate animal models for testing *in vivo* toxicity of nanoparticles. Toxicology, 2021, 462: 152952–152967

117 Lozano O, Torres-Quintanilla A, García-Rivas G. Nanomedicine for the cardiac myocyte: Where are we? J Control Release, 2018, 271: 149–165

118 Saorin G, Caligiuri I, Rizzolio F. Microfluidic organoids-on-a-chip: The future of human models. Semin Cell Dev Biol, 2023, 144: 41–54

补充材料

表S1 纳米生物材料相关的ISO国际标准
表S2 纳米生物材料相关的美国ASTM标准
表S3 纳米生物材料相关的中国国家标准
表S4 研制中的纳米生物材料相关国家标准计划项目
表S5 我国研制的部分纳米标准物质
表S6 纳米生物材料及其应用产品生物安全性评价项目/方法/标准(指南/指导原则)
表S7 纳米生物材料生物安全性评价主要可用的动物模型

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “纳米生物材料标准化检测和评价的现状与展望”

Research progress and prospects of standardized testing and assessment for nanobiomaterials

Ying Liu[1], Meiyu Wu[2], Yi Liu[2], Jie Gao[3], Xiaoping Wang[4], Kuan Chen[5], Hairuo Wen[6], Liang Chen[7], Anliang Shao[7], Baiquan Xiao[8], Guanglu Ge[2] & Liming Xie[2*]

[1] *CAS Key Laboratory for Biomedical Effects of Nanomaterials and Nanosafety, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China;*
[2] *CAS Key Laboratory of Standardization and Measurement for Nanotechnology, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China;*
[3] *Standard Accreditation Strategy Department, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China;*
[4] *Division of Nanotechnology Development, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China;*
[5] *Center for Medical Device Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100081, China;*
[6] *Key Laboratory of Beijing for Nonclinical Safety Evaluation Research of Drugs, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China;*
[7] *Institute for Medical Devices Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China;*
[8] *The GBA National Institute for Nanotechnology Innovation, Guangzhou 510700, China*
* Corresponding author, E-mail: xielm@nanoctr.cn

Nanobiomaterials, as nanotechnology-derived biomaterials, are referred to those biomaterials whose structures or components exhibit novel and significantly changed properties when their dimensions are at the nanoscale (1–100 nm). Hence, due to the unique features, nanobiomaterials have been extensively applied to targeted drug delivery, medical imaging, tissue engineering, biosensing as well as cosmetics over the past few decades. Meanwhile, the new characteristics of nanobiomaterials can also bring potential risks in biological safety together with performance. Currently, China has played a large role in the development of nanoscience and nanotechnology in the world in quite a lot of benefits related fields since there are the most abundant nano-related publications. Additionally, since National Technical Committee 279 on Nanotechnology of Standardization Administration of China was founded in 2005, China has released more than 100 national standards in the field of nanobiomaterials and over 30 related national standard plans are under development. Moreover, the industry standards for medical devices containing nanomaterials in China have been vigorously pushed forward. In the past China tended to publish scientific papers for original research, but now analytic data have shown an exponential growth in the nanobiomaterials related patents, about more than 1700 cases.

However, nanotechnology translation is far behind in our country. There are very few real nano-products in the biomedical field. As for the translation from nanobiomaterials to biomedical applications, there are still so many critical issues which need to be addressed urgently, mainly including quality control and biosafety evaluation. The major challenges consist in the accurate measurement of physicochemical properties for nanobiomaterials and the setup of nano-biosafety knowledge system. Although some advanced techniques can give a valuable understanding of nanobiomaterials, especially for some special scenarios involving the presence of nanobiomaterials in complex matrices to confirm nano-content labeling as well as nanobiomaterial release from medical devices and so on. The repeatability and applicability of these measurements based on advanced techniques are still limited so far, which can be improved by standardized testing. In addition, there is still a lack of standardized biological assays as well as experimental animal models for biosafety evaluation. Standardization is the bridge of innovation-driven development as an indispensable way to achieving the repeatability and reproducibility of new technologies and large-scale production. It can also push the marketization and internationalization of these new advanced technologies and be very helpful to promote China transformation from “Made in China” to “Chinese Standards”. Therefore, the standardized testing will definitely provide much more accurate and reliable information regarding the characterization of physicochemical properties and risk-benefit evaluation of nanobiomaterials.

In order to offer a strong support and reference for nanobiomaterial development and nanotechnology translation in our country, this review summarizes the current situation of standardized testing, existing issues and development trend of physicochemical characterization and biosafety evaluation for nanobiomaterials as well as the related products. As new strategic and cutting-edge materials around the world, the development and application of nanobiomaterials will be bound to further improve the overall medical efficiency and support the national strategy of healthy in China in the future.

nanobiomaterials, standard, physicochemical characterization, biosafety evaluation, conversion

doi: 10.1360/TB-2023-0520