

T/CSBM

团 体 标 准

T/CSBM 0026—2022

生物活性玻璃体外矿化测试方法

In vitro mineralization test method of bioactive glass

(报批稿)

2022 - 04 - 12 发布

2022 - 10 - 01 实施

中国生物材料学会 发 布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 1

5 试验试剂和测试器具 1

 5.1 试验试剂 1

 5.2 测试器具 2

6 两种常用的体外矿化液的配制 2

 6.1 Tris-HCl 缓冲液..... 2

 6.2 模拟体液 2

7 材料的体外矿化 3

 7.1 密质薄片材料 3

 7.2 粉体材料 3

8 样品测试与表征 4

 8.1 扫描电子显微镜分析 4

 8.2 红外光谱分析 4

 8.3 X-射线衍射分析 4

参考文献 5

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专利的责任。

本文件由中国生物材料学会提出。

本文件由中国生物材料学会团体标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：华南理工大学、佛山今兰生物科技有限公司。

本文件主要起草人：陈晓峰、曹晓东、王刚、陈筱宇、田婷、杨振、戴翔。

本文件首次发布。

生物活性玻璃体外矿化测试方法

1 范围

本文件规定了生物活性玻璃体外矿化测试方法的术语和定义、试验试剂和测试器具、两种常用的体外矿化液的配制、材料的体外矿化以及样品测试与表征。

本文件适用于生物活性玻璃体外矿化性能测试。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 6040 红外光谱分析方法通则

JY/T 0584 扫描电子显微镜分析方法通则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

生物活性玻璃 bioactive glasses

采用高温熔融法制备的一类具有良好生物相容性和生物活性的无机非晶态硅酸盐基生物医学材料。

3.2

体外矿化 mineralization in vitro

材料的体外矿化是指材料在体外矿化液中溶出的钙、磷等无机离子在没有生物调控的情况下通过化学反应在材料表面形成难溶性盐的过程。

3.3

体外矿化液 mineralized solution in vitro

体外矿化液是人为配制的用于检测材料体外矿化性能的缓冲液。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

HCA: 碳酸化羟基磷灰石 (Carbonated Hydroxyapatite)

Tris: 三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris (Hydroxymethyl) Methyl Aminomethane)

Tris-HCl: 三(羟甲基)氨基甲烷-盐酸盐 (Tri (Hydroxymethyl) Amino Methane Hydrochloride)

JCPDS: 粉末衍射标准联合委员会 (Joint Committee on Powder Diffraction Standards)

5 试验试剂和测试器具

5.1 试验试剂

试验所用试剂有：

- a) NaCl（分析纯）；
- b) NaHCO₃（分析纯）；
- c) KCl（分析纯）；
- d) K₂HPO₄·3H₂O（分析纯）；
- e) MgCl₂·6H₂O（分析纯）；
- f) 盐酸溶液（分析纯）：浓度 1 mol/L；
- g) CaCl₂（分析纯）；
- h) Na₂SO₄（分析纯）；
- i) Tris（分析纯）；
- j) 去离子水。

5.2 测试器具

试验所用测试器有：

- a) 集热式磁力搅拌器；
- b) pH 计；
- c) 电子分析天平：精度 0.001 g；
- d) 烧杯：2 L；
- e) 量筒：50 mL、1 L；
- f) 容量瓶：1 L；
- g) 聚四氟乙烯瓶：1 L。

6 两种常用的体外矿化液的配制

6.1 Tris-HCl 缓冲液

6.1.1 所需试剂

Tris-HCl 缓冲液配制所需试剂如下：

- a) 去离子水：700 mL；
- b) Tris：(6.00±0.50) g；
- c) 盐酸溶液：35 mL，浓度为 1 mol/L。

6.1.2 配制步骤

6.1.2.1 搅拌状态下将 35 mL，浓度为 1 mol/L 的盐酸溶液加入到 700 mL 去离子水中。

6.1.2.2 缓慢加入 Tris，使其 pH 不超过 7.45，并调节 pH 值为 7.40。

6.1.2.3 将调整好 pH 的溶液定容至 1 000 mL，并转移至干净、内表面光滑的聚四氟乙烯瓶中，置于 4 ℃ 冰箱冷藏备用。

注：使用时，应检查并保证 Tris-HCl 溶液处于澄清状态，若浑浊则不能再使用，应重新配制，并且使用有效期为 30 天。

6.2 模拟体液

6.2.1 所需试剂

配制模拟体液所需试剂及用量见表1。

表1 配制模拟体液所需试剂及用量

加入次序	试剂	加入量
1	NaCl	8.035 g
2	NaHCO ₃	0.355 g
3	KCl	0.225 g
4	K ₂ HPO ₄ • 3H ₂ O	0.231 g
5	MgCl ₂ • 6H ₂ O	0.311 g
6	盐酸溶液 ^a	39 mL
7	CaCl ₂	0.292 g
8	Na ₂ SO ₄	0.072 g
9	Tris	6.118 g
10	盐酸溶液	0 mL~5 mL
^a 盐酸溶液浓度为 1 mol/L。		

6.2.2 配制步骤

- 6.2.2.1 向烧杯中加入 700 mL 去离子水，搅拌并调节水温至（36.5±1.5）℃。
- 6.2.2.2 按表 1 中所列顺序在（36.5±1.5）℃下逐个溶解试剂 1~8。
- 6.2.2.3 溶液温度恒定在（36.5±1.5）℃，称取试剂 9 后，少量多次的缓慢加入至混合溶液中，搅拌至完全溶解。
- 6.2.2.4 在（36.5±1.5）℃的条件下，保持搅拌并逐滴加入试剂 10，精确调整 pH 值至 7.40。
- 6.2.2.5 将调整好 pH 的溶液定容至 1 000 mL，并转移至干净、内表面光滑的聚四氟乙烯瓶中，置于 4℃~8℃冰箱冷藏备用。

注：配制过程中不能同时溶解多个试剂，下一个试剂必须在前一试剂完全溶解之后加入。称量吸湿性试剂动作要尽量快，整个配制过程需要确保溶液无色、透明、容器表面无沉淀出现，如果过程中产生沉淀，倒去溶液洗净器具重新配制。

7 材料的体外矿化

7.1 密质薄片材料

7.1.1 对于密质薄片材料，测出样品尺寸并计算样品表面积。应用式（1）计算出体外矿化液用量：

$$V_S = \frac{S_a}{10} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

V_S ——体外矿化液的体积，单位为毫升（mL）；

S_a ——样品的表面积，单位为平方毫米（mm²）。

- 7.1.2 按照这个比例，得到样品的表面积和矿化液的比例为 10 mm²/mL。
- 7.1.3 将计算好的体外矿化液加入到聚四氟乙烯瓶中，预热至 37℃，放入样品并置于 37℃、100 rpm 的恒温摇床中震荡。在规定时间取出样品，样品以去离子水和丙酮交替淋洗，之后置于电热恒温干燥箱中 105℃干燥 24 h，得到矿化后的样品进行后续测试。

注：若有需要，可收集上清液用于检测矿化相关离子的浓度变化。

7.2 粉体材料

7.2.1 对于粉体材料，按照每克粉体对应 100 mL 体外矿化液的用量。

7.2.2 将计算好的体外矿化液加入到聚四氟乙烯瓶或玻璃锥形瓶中，封口，预热至 37 °C，放入样品并置于 37 °C、100 rpm 的恒温摇床中震荡。在规定时间取出样品，样品以去离子水和丙酮交替淋洗，之后置于电热恒温干燥箱中 105 °C 干燥 24 h，得到矿化后的样品进行后续测试。

注：若有需要，可收集上清液用于检测矿化相关离子的浓度变化。

8 样品测试与表征

8.1 扫描电子显微镜分析

按照 JY/T 0584 进行，对不同反应时间的样品表面及其矿化产物形貌进行观察，有针状或者叶片状钙磷矿化产物生成。通过比较不同浸泡时间的扫描电镜图，判断矿化产物 HCA 的生成量是否不断增加。

8.2 红外光谱分析

按照 GB/T 6040 进行，观察浸泡不同时间的矿化产物的特征吸收峰，并用来判断最终是否有低结晶度的 HCA 形成，并定性分析其生成。

8.3 X-射线衍射分析

按照《中华人民共和国药典》（2020年版 四部）通则中 0451 的 X 射线衍射法进行，对不同反应时间矿化产物进行分析，结合其特征衍射峰：JCPDS: $2\theta = 25.9^\circ$ (002), 31.8° (211), 39.8° (310), 46.7° (222), 49.5° (213), 53.1° (004) 进一步明确矿化产物种类以及结晶程度。

参 考 文 献

中华人民共和国药典（2020年版 四部）
