

团 体 标 准

T/CSBM XXXX-XXXX

生物活性玻璃体外矿化测试方法

In vitro mineralization test method of bioactive glass

(征求意见稿)

(在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 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 实验试剂	1
5 两种常用的体外矿化液的配制	2
5.1 Tris-HCl 缓冲液的配制	2
5.2 SBF 模拟体液的配制	2
6 体外矿化性能的测试	3
6.1 密质薄片材料	3
6.2 粉体材料	3
7 样品测试与表征	4
7.1 扫描电子显微镜	4
7.2 红外光谱分析技术	4
7.3 X-射线衍射技术	4

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、实验试剂、实验方法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 6040-2019 红外光谱分析方法通则

JY/T 0584-2020 扫描电子显微镜分析方法通则

JY/T 0587-2020 转靶多晶体X射线衍射方法通则

3 术语和定义

3.1

生物活性玻璃 bioactive glass

生物活性玻璃是一类能对机体组织进行修复、替代与再生、具有能使组织和材料之间形成键合作用的无机非晶态生物医学材料。

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 实验试剂

实验所用试剂有NaCl、NaHCO₃、KCl、K₂HPO₄·3H₂O、MgCl₂·6H₂O、盐酸溶液(1mol/L)、CaCl₂、Na₂SO₄、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)以及去离子水。所用原料应达到分析纯标准,应是合格供应厂家生产的合格材料,应有检验合格证和原料杂质含量分析报告。

5 两种常用的体外矿化液的配制

5.1 Tris-HCl 缓冲液的配制

Tris英文全名为Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 分子式为(CH₂OH)₃CNH₂, 中文名为三(羟甲基)氨基甲烷。Tris-HCl缓冲液被作为最简单的体外矿化液使用。

5.1.1 Tris-HCl缓冲液配制原料

去离子水: 700 mL; Tris: 6.00±0.50 g; 盐酸溶液 (1 mol/L): 35 mL。

5.1.2 Tris缓冲液配制步骤

- (1) 在搅拌状态下将35 mL 1 mol/L的盐酸溶液加入到700 mL去离子水中;
- (2) 缓慢加入Tris, 并调节pH值为7.25;
- (3) 将调整好pH的溶液定容至1000 mL, 并转移至干净的、内表面光滑的聚四氟乙烯瓶中, 置于4 °C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。

5.2 SBF 模拟体液的配制

SBF模拟体液全称为Simulated Body Fluid, 简称SBF。

5.2.1 SBF模拟体液配制原料

SBF模拟体液配制原料包括NaCl、NaHCO₃、KCl、K₂HPO₄·3H₂O、MgCl₂·6H₂O、CaCl₂、Na₂SO₄、(CH₂OH)₃CNH₂(Tris)及盐酸溶液(1 mol/L), 所用原料应达到分析纯标准, 应是合格供应厂家生产的合格材料, 应有检验合格证和原料杂质含量分析报告。

SBF模拟体液中的离子浓度如下表:

表1. SBF模拟体液与血浆中各离子浓度对比表

离子及pH	SBF (mmol/L)	血浆(mmol/L)
Na ⁺	142.0	142.0
K ⁺	5.0	5.0
Mg ²⁺	1.5	1.5
Ca ²⁺	2.5	2.5
Cl ⁻	147.8	103.0
HCO ₃ ⁻	4.2	27.0
HPO ₄ ⁴⁻	1.0	1.0
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5
pH	7.4	7.2-7.4

5.2.2 SBF模拟体液的配制步骤:

- (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 °C；
- (2) 按表2中所列顺序在 36.5 ± 1.5 °C下逐个溶解试剂1-8；
- (3) 溶液温度恒定在 36.5 ± 1.5 °C，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；
- (4) 在 36.5 °C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。
- (5) 将调整好pH的溶液定容至1000 mL，并转移至干净的、内表面光滑的聚四氟乙烯瓶中，置于4 °C冰箱冷藏备用。

表2 配制SBF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 (1mol/L)	39 mL
7	CaCl ₂	0.292 g
8	Na ₂ SO ₄	0.072 g
9	三(羟甲基)氨丙基甲烷 (Tris)	6.118 g
10	盐酸溶液(1mol/L)	0-5 mL

注：配制过程中不能同时溶解多个试剂，下一个化合物必须在前一化合物完全溶解之后加入。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，倒去溶液洗净仪器重新配制。

6 体外矿化性能的测试

6.1 密质薄片材料

对于密质薄片材料，测出样品尺寸并计算样品表面积。应用以下公式计算出体外矿化液用量：

$$V_s = S_a / 10$$

V_s (mL)是体外矿化液的体积， S_a (mm²)表示样品的表面积。

按照这个比例，得到样品的表面积和矿化液的比例为：10mm²/mL。

将计算好的体外矿化液加入到聚四氟乙烯瓶中，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干燥，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。

6.2 粉体材料

对于粉体材料，按照每克粉体对应200 mL体外矿化液的用量。

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℃，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干燥，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 样品测试与表征

7.1 扫描电子显微镜

按照JY/T 0584-2020扫描电子显微镜分析方法通则进行，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。并判断最终是否生成有利于成骨的矿化层-碳酸羟基磷灰石（HCA）。

7.2 红外光谱分析技术

按照GB/T 6040-2019 红外光谱分析方法通则进行，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碳酸羟基磷灰石（HCA）形成，并定性分析其生成速度和生成量。

7.3 X-射线衍射技术

按照JY/T 0587-2020 转靶多晶体X射线衍射方法通则进行，对不同反应时间矿化产物进行分析，结合其特征衍射峰 (JCPDS: $2\theta=26^\circ(002)$, $32^\circ(211)$, $39^\circ(310)$, $46^\circ(222)$, $49^\circ(213)$, $53^\circ(004)$)进一步明确矿化产物种类，以及结晶程度。结合扫描电子显微镜及红外光谱分析结果，综合评价材料的体外矿化性能。
