

ICS 11.060.10

C 33

备案号:

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T ××××—××××

牙科学 口腔胶原基骨填充及骨增加植入 性材料中胶原纤维内矿化物中钙的测定

Dentistry - Determination of calcium in intrafibrillar mineralized collagen in oral
collagen-based implantable materials for bone filling and augmentation

(草稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

国家药品监督管理局 发布

前 言

本文件按照 GB/T1.1-2020《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。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国口腔材料和器械设备标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：。

本文件主要起草人：

引 言

口腔胶原基骨填充及骨增加植入性材料在口腔医学领域中起到了重要的作用。这些材料主要用于骨缺损的修复和骨组织的再生，通过促进骨细胞的增殖和分化，从而实现缺损部位的骨再生。胶原纤维是这些材料的主要成分之一，其中胶原纤维内矿化的程度对于材料的性能性能和功效具有至关重要的影响。在这些矿化物中，钙是最为重要的元素之一，它不仅是骨组织的主要矿物成分，也是影响骨密度和硬度的关键因素。

在临床应用中，了解和掌握胶原基材料中钙含量的准确测定方法，对于评估材料的质量和效果具有重要意义。钙的测定可以反映材料的矿化程度，从而为材料的生产控制和质量评价提供科学依据。此外，精确的钙含量测定有助于优化材料的配方和改进生产工艺，提高材料的生物相容性和骨结合能力。

目前，口腔胶原基骨填充及骨增加植入性材料中钙的测定方法多种多样，包括化学分析法、物理分析法和生物分析法等。每种方法都有其独特的优缺点和适用范围。因此，制定一套统一的行业标准，对于规范测定方法、提高检测结果的准确性和一致性、推动行业的健康发展具有重要意义。

本文件旨在规范口腔胶原基骨填充及骨增加植入性材料中钙含量的测定方法，提供操作指南和技术要求，以确保测定结果的可靠性和准确性。通过本文件的实施，可以促进口腔医学领域相关材料的研发和应用，为临床治疗提供更为有效和安全的產品。

牙科学 口腔胶原基骨填充及骨增加植入性材料中胶原纤维内矿化物中钙的测定

1 范围

本文件规定了两种口腔胶原基骨填充及骨增加植入性材料中胶原纤维内矿化物中钙的测定方法,适用于口腔胶原基骨填充及骨增加植入性材料。

本文件不适用于口腔非胶原基骨填充及骨增加植入性材料。

注:评价材料时,可选择其中一种方法或两种方法同时使用。

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 9937 牙科学 名词术语

3 术语和定义

GB/T 9937 界定的以及下列术语和定义适用于本文件

3.1 矿化胶原支架材料 mineralized collagen scaffold material

是指矿物相是以类羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HAP) 矿物为主要成分的钙盐,有机相是以具有三螺旋结构的I型胶原蛋白为主要成分的组织工程修复材料。

3.2 胶原纤维内矿化 intrafibrillar mineralization of collagen

按照矿物质与胶原的相对位置关系,这些矿化形式可分为胶原纤维内矿化和胶原纤维外矿化。

胶原纤维内矿化是指 HAP 在纤维内部沿着胶原纤维长轴定向排列。纤维内矿化决定了骨组织优异的力学特性和生物学特征。因此,人工骨修复材料需要尽最大可能模拟天然骨组织的纤维内矿化的结构形式,从而获得结构功能高度仿生的人工骨。

3.3 胶原纤维外矿化 extrafibrillar mineralization of collagen

是指 HAP 仅在于胶原纤维表面或胶原纤维之间无序沉积,取向混乱。

4 方法一 火焰原子吸收分光光度法

4.1 原理

乙二胺四乙酸 (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, EDTA) 是一种钙螯合剂,可以作为一种温和的脱钙剂。天然矿化胶原如牙本质被酸蚀后第一阶段中大约 70-75%的矿物成分快速脱矿,第二阶段剩余的矿物被缓慢地去除。这是由于纤维内矿物占比较少,故其损失速度远慢于纤维外,因此脱钙的过程有个转折期。通过透射电子显微镜观察当脱钙仅剩至胶原纤维内矿化时,此时通过火焰原子吸收分光光度法可测定胶原纤维内矿化物中钙的含量。

火焰原子吸收分光光度法是将试样经干法灰化,分解有机质后,加酸使灰分中的无机离子全部溶解,直接吸入空气—乙炔火焰中原子化,并在光路中分别测定钙原子对特定波长谱线的吸收,由此可测定试样中钙的含量。

4.2 试剂

除非另有规定，本方法所用试剂均为优级纯，水为 GB/T 6682 规定的二级水。

- 4.2.1 盐酸。
- 4.2.2 硝酸（ HNO_3 ）。
- 4.2.3 氧化镧（ La_2O_3 ）。
- 4.2.4 碳酸钙：分子量 100.05，光谱纯。
- 4.2.5 盐酸 A（2%）：取 2 mL 盐酸（4.1），用水稀释至 100 mL。
- 4.2.6 盐酸 B（20%）：取 20 mL 盐酸（4.1），用水稀释至 100 mL。
- 4.2.7 硝酸溶液（50%）：取 50 mL 硝酸（4.2），用水稀释至 100 mL。
- 4.2.8 镧溶液（50 g/L）：称取 29.32 g 氧化镧（4.3），用 25 mL 去离子水湿润后，缓慢添加 125 mL 盐酸（4.1）使氧化镧溶解后，用去离子水稀释至 500 mL。
- 4.2.9 钙标准溶液（1000 $\mu\text{g/mL}$ ）：称取干燥的碳酸钙（4.6）2.4963 g，用盐酸 B（4.13）100 mL 溶解，并用水定容于 1000 mL 容量瓶中。可以直接购买该元素的有证国家标准物质作为标准溶液。
- 4.2.10 钙元素的标准储备液
钙标准储备液：准确吸取钙标准溶液（4.18）10.0 mL，用盐酸 A（4.12）分别定容到 100 mL 石英容量瓶中，得到钙元素的标准储备液。质量浓度为 100.0 $\mu\text{g/mL}$ 。
- 4.2.11 乙二胺四乙酸（0.1 mol/L）

4.3 主要设备

- 4.3.1 透射电子显微镜
- 4.3.2 原子吸收分光光度计。
- 4.3.3 钙空心阴极灯。
- 4.3.4 分析用钢瓶乙炔气和空气压缩机。
- 4.3.5 石英坩埚或瓷坩埚。
- 4.3.6 马弗炉。
- 4.3.7 天平：感量为 0.1 mg。

4.4 试验步骤

4.4.1 胶原纤维内矿化物的制备

吸取 200 μL 的 0.1 M EDTA 对 1.5 g 胶原基骨填充及骨增加植入性材料进行脱矿，脱矿的时间为 1-3 min。取脱钙试样约 10 μg 滴至 400 目碳支撑膜覆盖的铜网上，确保样品于铜网表面均匀铺展后，室温通风条件下待其干燥，使用透射电子显微镜（4.3.1）评估样品至仅剩胶原纤维内矿化。

4.4.2 试样处理

称取混合均匀的脱钙试样约 15 g（精确到 0.0001 g）于坩埚（4.3.5）中，在电炉上微火炭化至不再冒烟，再移入马弗炉（4.3.6）中，490 $^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 灰化约 5 h。如果有黑色炭粒，冷却后，则滴加少许硝酸溶液（4.2.7）湿润。在电炉上小火蒸干后，再移入 490 $^{\circ}\text{C}$ 高温炉中继续灰化成白色灰烬。冷却至室温后取出，加入 5 mL 盐酸 B（4.2.6），在电炉上加热使灰烬充分溶解。冷却至室温后，移入 50 mL 容量瓶中，用水定容，同时处理至少两个空白试样。

4.4.3 试样待测液的制备

从 50 mL 的试液（4.4.2）中准确吸取 1.0 mL 到 100 mL 容量瓶中，加 2.0 mL 镧溶液（4.2.8），用水定容。同样方法处理空白试液。

4.4.4 标准系列使用液的配制

分别按 2.0 mL、4.0 mL、6.0 mL、8.0 mL、10.0 mL 的体积准确吸取钙元素标准储备液于 100 mL 容量瓶中，配制钙使用液，用盐酸 A（4.2.5）定容。配制钙使用液时，在准确吸取标准储备液的同时吸取 2.0 mL 镧溶液（4.2.8）于各容量瓶，用水定容。此为钙元素的不同浓度的标准使用液，其质量浓度分别为 2.0 µg/mL、4.0 µg/mL、6.0 µg/mL、8.0 µg/mL、10.0 µg/mL。

4.4.5 标准曲线的绘制

按照仪器说明书将仪器工作条件调整到测定各元素的最好状态，选用灵敏吸收线 Ca 422.7 nm，将仪器调整好预热后，测定测定钙时先吸取镧溶液（4.2.8）2.0 mL，用水定容到 100 mL，并用毛细管吸喷盐酸 A（4.2.5）调零。测定钙元素标准工作液的吸光度。以标准系列使用液浓度为横坐标，对应的吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

4.4.6 试样待测液的测定

调整好仪器最好状态，测钙、镁先时，先吸取镧溶液（4.2.8）2.0 mL，用水定容到 100 mL，并用盐酸 A（4.2.5）调零。分别吸喷试样测液测试液的吸光度及空白试液的吸光度。查标准曲线得对应的质量浓度。

4.5 数据处理和结果表示

试样中钙的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{(c_1 - c_2) \times V \times f}{m \times 1000} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中钙元素的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

c_1 ——测定液中钙元素的浓度，单位为微克每毫升（µg/mL）；

c_2 ——测定空白液中钙元素的浓度，单位为微克每毫升（µg/mL）；

V ——样液体积，单位为毫升（mL）；

f ——样液稀释倍数；

m ——试样的质量，单位为克（g）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

4.6 精密度

在重复性条件下获得两次独立测定结果的绝对差值，不得超过算术平均值的 10 %。

5 方法二 电感耦合等离子体原子发射光谱测定方法

5.1 原理

乙二胺四乙酸（Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, EDTA）是一种钙螯合剂，可以作为一种温和的脱钙剂。天然矿化胶原如牙本质被酸蚀后第一阶段中大约 70-75%的矿物成分快速脱矿，第二阶段剩余的矿物被缓慢地去除。这是由于纤维内矿物占比较少，故其损失速度远慢于纤维外，因此脱钙的过程有个转折期。通过透射电子显微镜观察当脱钙仅剩至胶原纤维内矿化时，此时通过火焰原子吸收分光光度法可测定胶原纤维内矿化物中钙的含量。

电感耦合等离子体原子发射光谱测定方法是将试样经干法灰化消解，稀释至合适体积后用电感耦合等离子体原子发射光谱仪测定，外标法定量。

5.2 试剂

除非另有规定，本方法所用试剂均为优级纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2.1 盐酸。

5.2.2 硝酸(HNO₃)。

5.2.3 硝酸溶液(50%)：取 50 mL 硝酸(10.2)，用水稀释至 100 mL。

5.2.4 盐酸 A(4%)：取 4 mL 盐酸(10.1)，用水稀释至 100 mL。

5.2.5 盐酸 B(40%)：取 40 mL 盐酸(10.1)，用水稀释至 100 mL。

5.2.6 钙元素标准储备溶液：单元素标准储备溶液可按 GB/T 602 方法配制，也可使用有证国家标准物质，其质量浓度为 1.0 mg/mL(或 0.5 mg/mL)。

5.2.7 乙二胺四乙酸(0.1 mol/L)

5.3 主要设备

5.3.1 透射电子显微镜

5.3.2 电感耦合等离子体原子发射光谱仪。

5.3.3 天平：感量为 1 mg。

5.3.4 马弗炉。

5.3.5 电炉：1 kW~2 kW。

5.3.6 瓷坩埚。

5.4 试验步骤

5.4.1 胶原纤维内矿化物的制备

吸取 200 μl 的 0.1 M EDTA 对 ..g 胶原基骨填充及骨增加植入性材料进行脱矿，脱矿的时间为 1-3 min。取脱钙试样约 10 μ 滴至 400 目碳支撑膜覆盖的铜网上，确保样品于铜网表面均匀铺展后，室温通风条件下待其干燥，使用透射电子显微镜(5.3.1)评估样品至仅剩胶原纤维内矿化。

5.4.2 试样处理

称取 5 g 试样(精确至 0.001 g)于瓷坩埚中，在电炉上微火炭化至不冒烟，移入马弗炉中 550 °C 加热 2 h，如有黑色炭粒，冷却后加少许硝酸溶液(5.2.3)湿润，小火蒸干后再移入马弗炉中 550 °C 加热半小时，取出冷却，加盐酸 B(5.2.5) 5 mL，在电炉上小心加热使灰分充分溶解，冷却后转移至 25 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，若有沉淀需过滤。待测。

5.4.3 平行试验

按以上步骤，对同一试样进行平行试验测定。

5.4.4 空白试验

除不加试样外，其它均按试样处理和测定步骤进行。

5.4.5 仪器参考操作条件

功率：1.20 kW，等离子气流量：15 L/min，雾化器压力：200 kPa，辅助气流量：1.50 L/min，仪器稳定延时：15 s，进样延时：20 s，读数次数：3 次，钙元素推荐使用分析谱线波长为 315.887， 317.933 nm。

5.4.6 混合标准溶液的配制

由储备液用盐酸 A(5.2.4)逐级稀释配成 0 μg/mL, 10.0 μg/mL, 15.0 μg/mL, 20.0 μg/mL, 25.0 μg/mL 浓度系列的混合标准溶液。

5.4.7 测定

参考 5.4.5 的条件对仪器进行优化后，依次测定标准溶液、空白溶液和试样溶液。若试样溶液中元素浓度超出工作曲线范围，可用盐酸 A（5.2.4）对试样溶液进行适当稀释后再测定。

5.5 数据处理和结果表示

按式（2）计算钙元素的含量：

$$X = \frac{100 \times (c_1 - c_2) \times V \times f}{m \times 1000} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X ——被测钙元素含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

c_1 ——试样溶液中钙元素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

c_2 ——空白溶液中钙元素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——试样溶液体积，单位为毫升（mL）；

f ——试样溶液稀释倍数；

m ——试样的质量，单位为克（g）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

5.6 精密度

在重复性条件下获得两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10 %。