

T/CSBM

团 体 标 准

T/CSBM 0052—2024

基于荧光探针监测生物可降解镁基金属 降解的方法

Method for monitoring degradation of biodegradable magnesium based metal
via fluorescent probe

2024 - 11 - 25 发布

2025 - 04 - 01 实施

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 试验设计	1
5 试验方法	2
6 结果评价	3
7 试验报告	3
附录 A（规范性） 荧光探针 PSPA 制备	4
参考文献	7

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。

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、中国食品药品检定研究院、浙江沅沅生物科技有限公司、广州华睿医疗器械有限公司、沪创医疗科技（上海）有限公司、东莞宜安科技股份有限公司、广东省人民医院。

本文件主要起草人：郝丽静、高蒙、童许波、付步芳、边东、程德林、张健、万子义、张志雄、刘芳菲、庞栋、李荣慧、陈军建。

引 言

医用镁基金属具有生物可降解优势，植入体内后逐渐降解，并能引起适当的宿主反应，完成组织愈合后无需二次手术取出。降解一直是医用镁基金属产品监管的重点，如降解速率快，使得产品力学性能与对应组织修复速度不匹配，并且由于腐蚀产物释放过多也可能导致溶骨、炎症等不良组织学反应。目前，镁基金属降解的传统研究方法如电化学分析、失重法和析氢法等，在降解过程的时空分辨率有限，不利于相关产品的质量控制和安全性保障。

利用荧光分子探针对生物可降解镁基金属的主要降解产物氢氧化镁的选择性荧光开启性能，具有易于操作和高时空分辨率的优点，是医用镁基金属降解性能检验的重要方法。本文件给出了基于荧光探针监测医用生物可降解镁基金属降解全过程的定性和定量体外评价的试验方法。

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及到附录A（规范性）荧光探针PSPA制备与一种原位监测镁合金动态腐蚀过程的荧光探针及其制备和应用相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺，他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下，就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：王迎军、高蒙、童许波、郝丽静。

地址：510640 广东省广州市天河区五山路381号。

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

基于荧光探针监测生物可降解镁基金属降解的方法

1 范围

本文件规定了基于荧光探针监测生物可降解镁基金属降解的试验设计、试验方法、结果评价和试验报告。

本文件适用于利用荧光探针监测降解产物包含氢氧化镁的生物可降解镁基金属产品降解全过程的定性和定量体外评价。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

降解 degradation

材料的分解。

[来源：GB/T 16886.9—2022, 3.1]

3.2

降解产物 degradation product

由原始材料化学裂解而产生的颗粒或化学物质。

[来源：GB/T 16886.9—2022, 3.7]

3.3

腐蚀 corrosion

化学或电化学反应引起的对金属材料的侵蚀。

[来源：GB/T 16886.9—2022, 3.4]

3.4

荧光探针 fluorescent probe

荧光性质可随所处环境的性质改变而灵敏地改变的一类荧光性分子。

4 试验设计

4.1 概述

按附录A制备的荧光探针3-(1-(4-(3-溴丙氧基)苯基)-4-氰基-9-氧代-9H-茚并[2,1-c]吡啶-3-基)亚磺酰基)丙酸(3-((1-(4-(3-bromopropoxy)phenyl)-4-cyano-9-oxo-9H-indeno[2,1-c]pyridin-3-yl)sulfinyl)propanoic acid) (PSPA) 在与医用镁合金产品的主要降解产物氢氧化镁 ($Mg(OH)_2$) 结合时,在特定光源激发下会产生明亮的绿色荧光。运用荧光显微镜或紫外灯等原位监测医用镁合金产品的腐蚀情况,以荧光的有无和强弱判定结果。

4.2 样品的制备

4.2.1 一般要求

样品的物理特性（如形状、表面粗糙度等）可影响材料的降解性能，每一样品都应经过相同的处理和清洁过程。

4.2.2 样品形状

样品宜为圆片状、方片状。

4.2.3 样品尺寸

样品尺寸宜为直径10 mm、厚度1 mm的圆片或边长10 mm、厚1 mm的方片。

4.2.4 结果判定

与镁合金腐蚀产物氢氧化镁有荧光反应，即可判定降解程度。

5 试验方法

5.1 概述

将样品完全浸泡于腐蚀液中，加入适量按附录A制备的荧光探针PSPA用于镁合金主要降解产物氢氧化镁（ $Mg(OH)_2$ ）的荧光成像或特异性响应，在荧光显微镜或紫外灯下监测医用镁合金产品的腐蚀情况。

5.2 仪器与试剂

5.2.1 正置荧光显微镜：配备 405 nm 激光器或紫外激光器。

5.2.2 手持紫外灯：配备 365 nm 光源的紫外灯。

5.2.3 电子天平：精度 0.000 1 g。

5.2.4 pH 计：最小分辨率 0.01 pH。

5.2.5 氯化钠（NaCl）。

5.2.6 二甲基亚砜（DMSO）。

5.3 参考监测条件

5.3.1 参考荧光显微镜观察条件如下：

a) 曝光时间：10 ms~200 ms 之间；

b) 物镜：10×或 20×。

5.3.2 参考手持紫外灯观察条件如下：

a) 紫外灯位置：置于镁合金上方 10 cm±0.5 cm；

b) 紫外灯光源：365 nm。

5.4 溶液制备

5.4.1 腐蚀液

称取0.900 0 g NaCl，超纯水溶解并定容至100 mL，配制成浓度为0.9% NaCl水溶液。

5.4.2 荧光探针溶液

分别取0.005 g 荧光探针PSPA、928 μL DMSO充分溶解作为储备液，再将该溶液用DMSO稀释10倍，配制成浓度为1 mmol/L荧光探针PSPA的DMSO溶液。

5.4.3 供试品溶液

分别取0.9% NaCl水溶液1 980 μL 、浓度为1 mmol/L荧光探针PSPA的DMSO溶液20 μL ，充分混合均匀，配制成含荧光探针PSPA腐蚀液。

6 结果评价

6.1 pH

对浸泡样品的供试品溶液进行pH值测定（ $n=3$ ），pH大于9时荧光强度显著增强。

6.2 降解

6.2.1 定性分析

将样品浸泡于供试品溶液中，在手持紫外灯（365 nm）下观察，根据绿色荧光的分布情况判定该医用镁合金的降解。

注：宜在黑暗中固定角度拍摄照片。

6.2.2 定量分析

利用荧光显微镜采集样品降解后的荧光图像，运用图像分析系统，按式（1）计算样品表面不同区域的平均荧光强度，平均荧光强度随着时间的变化与样品的降解程度成正相关。

$$P = \frac{M}{S} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

P ——平均荧光强度；

M ——该区域荧光强度总和；

S ——该区域面积。

注：宜使用Image J软件进行分析。

7 试验报告

试验报告应包括详细的数据资料，并对结果做出独立评价。试验报告应注明检测机构和检测日期，且应报告下列项目：

- a) 样品：
 - 1) 分别描述样品的外形、尺寸和数量；
 - 2) 样品的处理过程，包括所采用的清洗、处理方式等。
- b) 体外腐蚀：
 - 1) 体外腐蚀液的成分、使用体积；
 - 2) 腐蚀液中荧光探针 PSPA 的浓度。
- c) 手持紫外灯观察：样品和参照样品（若有）在手提紫外灯下的荧光分布情况；
- d) 荧光显微镜观察：分别报告样品的荧光分布及降解层厚度随时间的变化；
- e) 结果评价：对生物可降解镁基金属产品降解定性和定量作出总体体外评价。

附录 A (规范性) 荧光探针 PSPA 制备

A.1 原理

通过Knoevenagel缩合反应制备化合物 (Z)-2-(2-(4-(3-溴丙氧基)亚苄基)-3-氧代-2,3-二氢-1H-茚-1-亚基)丙二腈, 再与巯基丙酸反应得到化合物3-(1-(4-(3-溴丙氧基)苯基)-4-氰基-9-氧代-9H-茚并[2,1-c]吡啶-3-基)硫代)丙酸(3-((1-(4-(3-bromopropoxy)phenyl)-4-cyano-9-oxo-9H-indeno[2,1-c]pyridin-3-yl)thio)propanoic acid) (PTPA), 最后经氧化制备荧光探针PSPA。

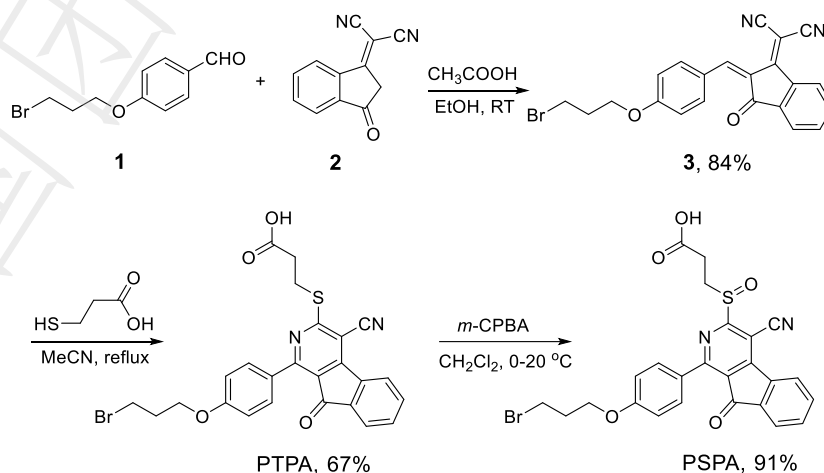
A.2 仪器与试剂

- A.2.1 油浴锅。
A.2.2 真空干燥箱。
A.2.3 4-(3-溴丙氧基)苯甲醛。
A.2.4 3-(二氰基亚甲基)茚-1-酮。
A.2.5 乙酸。
A.2.6 乙醇。
A.2.7 3-巯基丙酸。
A.2.8 乙腈。
A.2.9 3-氯过氧苯甲酸 (CPBA)。
A.2.10 二氯甲烷 (CH₂Cl₂)。

A.3 制备

A.3.1 合成路线

荧光探针PSPA的合成路线见图A.1。



图A.1 荧光探针 PSPA 的合成路线

A.3.2 中间产物制备

A. 3. 2. 1 分别称取 146 mg 4-(3-溴丙氧基)苯甲醛、97 mg 3-(二氰基亚甲基)茚-1-酮、30 mg 乙酸，依次加入双口瓶中，加入 5 mL 无水乙醇，于室温下搅拌 4 h。经过滤，用无水乙醇洗涤 3 次，得到橙色固体化合物 ((Z)-2-(2-(4-(3-溴丙氧基)亚苄基)-3-氧代-2,3-二氢-1H-茚-1-亚基)丙二腈。

A. 3. 2. 2 称取 117 mg (Z)-2-(2-(4-(3-溴丙氧基)亚苄基)-3-氧代-2,3-二氢-1H-茚-1-亚基)丙二腈，溶于 10 mL 乙腈中，加入 89 mg 3-巯基丙酸，在回流条件下加热 12 h。反应完成后，将混合物冷却至室温，沉淀物经过滤并用乙腈洗涤，真空干燥得到黄色固体化合物 PTPA。

A. 3. 3 终产物制备

称取 21 mg PTPA，溶于 5 mL CH_2Cl_2 中，加入 10 mg m-CPBA，在 0 °C 下搅拌 2 h，沉淀物经过滤、 CH_2Cl_2 洗涤净化后真空干燥得到荧光探针 PSPA。

A. 4 测定

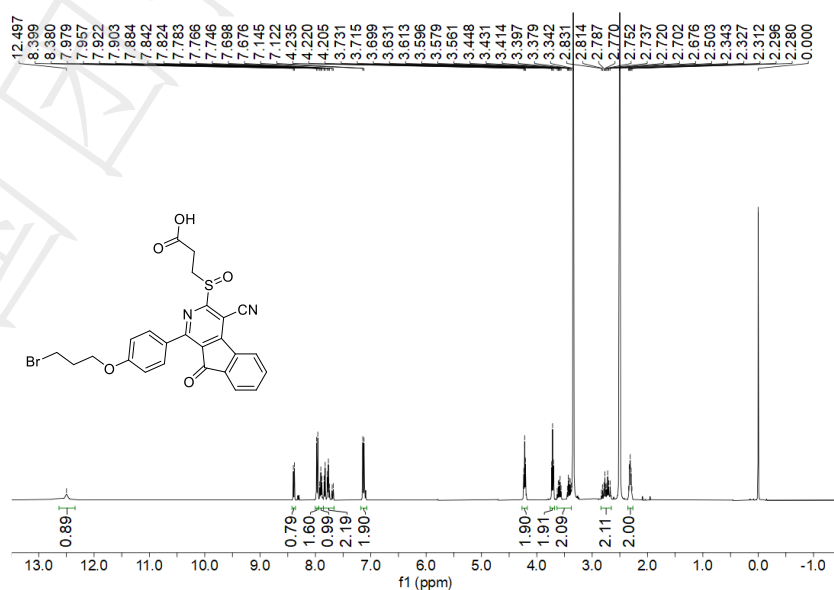
A. 4. 1 测定方法

称取 0.008 g PSPA 探针溶于氘代 DMSO 中 ($\text{DMSO}-d_6$)，用核磁共振波谱仪进行核磁氢谱和碳谱表征。用高分辨质谱进行分子量表征。

A. 4. 2 核磁氢谱和碳谱

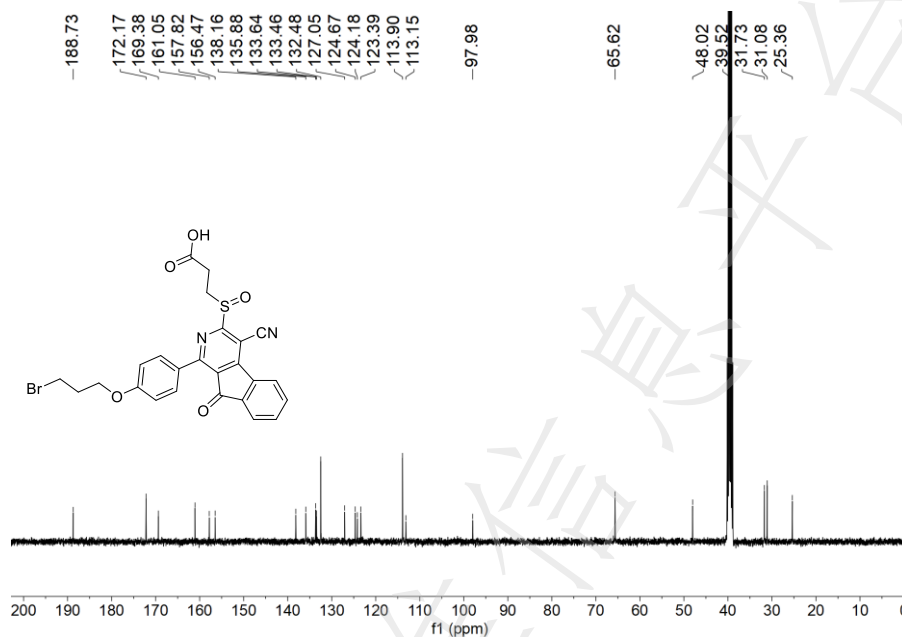
A. 4. 2. 1 测试条件与结果： ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 12.50 (s, 1H), 8.38 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.90 (t, $J_1 = 15.2$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz, 1H), 7.84–7.68 (m, 2H), 7.12 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 4.22 (t, $J_1 = 12.0$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz, 2H), 3.72 (t, $J_1 = 12.8$ Hz, $J_2 = 6.4$ Hz, 2H), 3.63–3.38 (m, 2H), 2.83–2.68 (m, 2H), 2.34–2.28 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 188.7, 172.2, 169.4, 161.1, 157.8, 156.5, 138.2, 135.9, 133.6, 133.5, 132.5, 127.1, 124.7, 124.2, 123.4, 113.9, 113.2, 98.0, 65.6, 48.0, 39.5, 31.7, 31.1, 25.4.

A. 4. 2. 2 荧光探针 PSPA 在氘代 DMSO ($\text{DMSO}-d_6$) 的核磁氢谱见图 A. 2。



图A. 2 荧光探针 PSPA 在氘代 DMSO ($\text{DMSO}-d_6$) 的核磁氢谱图

A. 4. 2. 3 荧光探针 PSPA 在氘代 DMSO (DMSO- d_6) 的核磁共振谱见图 A. 3。

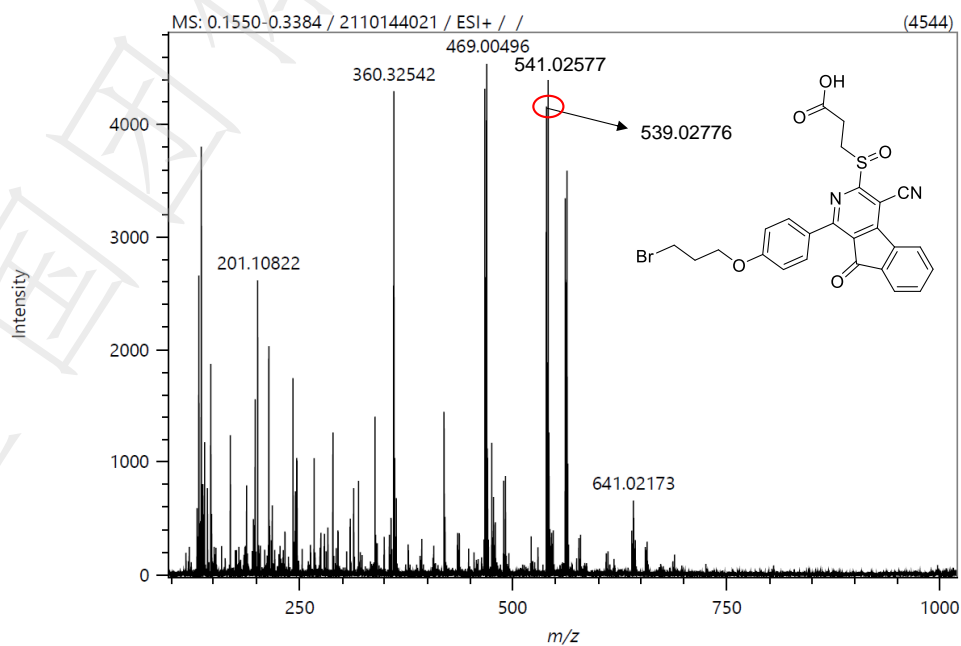


图A. 3 荧光探针 PSPA 在氘代 DMSO (DMSO- d_6) 的核磁共振谱图

A. 4. 3 高分辨质谱

A. 4. 3. 1 测试条件与结果: HRMS (ESI) m/z : $[M + H]^+$ calcd for $C_{25}H_{20}N_2O_5SBr^+$: 539.0271, found: 539.0278.

A. 4. 3. 2 荧光探针 PSPA 的高分辨质谱图见图 A. 4。



图A. 4 荧光探针 PSPA 的高分辨质谱图

参 考 文 献

- [1] GB/T 16886.9—2022 医疗器械生物学评价 第9部分：潜在降解产物的定性和定量框架
- [2] GB/T 16886.15—2022 医疗器械生物学评价 第15部分：金属与合金降解产物的定性与定量
- [3] ASTM F3268 – 18a Standard Guide for in vitro Degradation Testing of Absorbable Metals
- [4] UENO, Tasuku; NAGANO, Tetsuo. Fluorescent probes for sensing and imaging. *Nature methods*, 2011, 8. 8: 642-645.
- [5] TONG, Xubo, et al. Fluorescent in situ 3D visualization of dynamic corrosion processes of magnesium alloys. *ACS Applied Bio Materials*, 2022, 5. 5: 2340-2346.
-