

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610100756.9

[51] Int. Cl.

A61B 10/00 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

A61F 2/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 11 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 100560031C

[22] 申请日 2006.6.30

[21] 申请号 200610100756.9

[30] 优先权

[32] 2005.10.25 [33] US [31] 11/257,118

[73] 专利权人 香港理工大学

地址 中国香港

[72] 发明人 郭 霞 林惠玲 郑永平

[56] 参考文献

CN87100784A 1988.9.7

US20020065467A1 2002.5.30

超声波骨组织电镜样品脱钙处理的实验研究. 法京, 沈强, 俞彰, 凌诒萍, 齐玲, 江家碗. 复旦学报(医学版), 第 30 卷第 2 期. 2003

超声造影剂 Levovist 介导质粒 GFP 转染小鼠骨骼肌细胞的实验研究. 王兴华. 中华超声影像学杂志, 第 14 卷第 6 期. 2005

审查员 薛林

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限公司

代理人 杨青 樊卫民

权利要求书 3 页 说明书 10 页 附图 3 页

[54] 发明名称

骨脱钙的方法和试剂

[57] 摘要

脱钙可通过使用酸或其它试剂来进行。现有的方法可能对大骨块脱钙有困难。本发明提供了一种包含溶解骨钙离子的钙溶剂和一种当骨脱钙剂受到超声波振动时产生微泡的起泡剂。已发现，使用本发明的骨脱钙剂可使骨以相对短的时间被脱钙。

1. 一种骨脱钙剂，其包含：
  - a) 用于溶解骨中钙离子的钙溶剂，其中钙溶剂在超声波促进的骨脱钙剂中按重量计含量为 0.0001%-20%；和
  - b) 当骨脱钙剂经受超声波振动时产生微泡的起泡剂，其中起泡剂形成的微泡在超声波促进的骨脱钙剂中按重量计的含量为 0.0001%-50%。
2. 权利要求 1 的骨脱钙剂，其中钙溶剂选自乙二胺四乙酸和甲酸。
3. 权利要求 2 的骨脱钙剂，其中的钙溶剂是乙二胺四乙酸。
4. 权利要求 3 的骨脱钙剂，其中乙二胺四乙酸在超声波促进的骨脱钙剂中按重量计的含量为 5-15%。
5. 权利要求 1 的骨脱钙剂，其中起泡剂形成微泡。
6. 权利要求 5 的骨脱钙剂，其中起泡剂在超声波促进的骨脱钙剂中按重量计的含量为 10-20%。
7. 一种骨脱钙的方法，包括如下步骤：
  - a) 将骨浸入骨脱钙剂中，所述骨脱钙剂包含：
    - 一种用于螯合骨钙离子的钙螯合剂；和
    - 当骨脱钙剂经受超声波振动时产生微泡的起泡剂，其中起泡剂形成的微泡在超声波促进的骨脱钙剂中按重量计的含量为 0.0001%-50%；
  - b) 将骨和骨脱钙剂经受超声波振动足以脱钙的时间以对骨进行脱钙。

8. 权利要求 7 的方法，其中超声波振动的频率为 20kHz 到 2MHz。

9. 权利要求 7 的方法，其中超声波振动是间歇性的。

10. 权利要求 9 的方法，其中超声波振动开启时间达脱钙时间的 80%，关闭时间达脱钙时间的 20%。

11. 一种检测骨标本的羟磷灰石含量的方法，通过将骨浸入一种骨脱钙剂中并将骨和骨脱钙剂经受超声波振动而对所述骨标本脱钙，

其中骨脱钙剂包含：

- 用于溶解骨中钙离子的钙溶剂，其中钙溶剂在超声波促进的骨脱钙剂中按重量计含量为 0.0001%-20%；和
- 当骨脱钙剂经受超声波振动时产生微泡的起泡剂，其中起泡剂形成的微泡在超声波促进的骨脱钙剂中按重量计的含量为 0.0001%-50%；

并且其中所述方法包括如下步骤：

- a) 至少检测一种穿过骨标本的超声波振动的声参数；
- b) 通过将步骤 a) 中已检测的传输速度与预定的已知羟磷灰石含量的骨传输速度进行比较来确定骨标本中羟磷灰石的含量。

12. 权利要求 11 的方法，其中超声波检测方法包括如下步骤：

- a) 使超声波从超声波传感器传输到骨；
- b) 接收穿过骨的超声波；
- c) 分析传输波以获得至少一种声参数。

13. 权利要求 12 的方法，其中声参数选自声速、衰减、散射密度、阻抗、反射率、频谱或其组合。

14. 检测用于骨标本脱钙的骨脱钙剂浓度的方法，通过将骨浸入骨

脱钙剂并将骨和骨脱钙剂经受超声波振动而对所述骨标本脱钙，

其中骨脱钙剂包含：

- 用于溶解骨中钙离子的钙溶剂，其中钙溶剂在超声波促进的骨脱钙剂中按重量计含量为 0.0001%-20%；和
- 当骨脱钙剂经受超声波振动时产生微泡的起泡剂，其中起泡剂形成的微泡在超声波促进的骨脱钙剂中按重量计的含量为 0.0001%-50%；

并且其中所述方法包含下列步骤：

- a)至少检测一种穿过骨脱钙剂的超声波振动的声参数；
- b)通过将步骤 a)中已检测的传输速度与已知浓度的骨脱钙剂的预定传输速度进行比较来确定骨脱钙剂的浓度。

15. 权利要求 14 的方法，其中超声波检测方法包含下列步骤：

- a) 使超声波从超声波传感器传输到骨脱钙剂；
- b) 接收传输穿过骨脱钙剂的超声波；
- c) 分析传输波获得至少一种声参数。

16. 权利要求 15 的方法，其中声参数选自声速、衰减、散射密度、阻抗、反射率、频谱或其组合。

## 骨脱钙的方法和试剂

### 技术领域

本发明涉及骨脱钙，尤其是通过超声波振动骨脱钙的方法和试剂。

### 背景技术

骨是由骨细胞、胶原网状物和胶原纤维表面或内部的羟磷灰石（HA）晶体组成。脱钙是指从胶原纤维中去除 HA 的过程，是一种用于为病理诊断处理骨标本或制造外科移植材料的技术。脱钙可通过使用酸或其它试剂来完成。众所周知，工业清洗过程使用某些清洗剂的同时结合超声波振动，因为超声波振动能促进清洗剂的清洗效果。CN 87100784 描述了这样一种使用 1-1.7MHz 超声波振动的方法，其可在几小时内对薄骨片（厚度小于 0.4cm）状骨进行脱钙。然而，其设计可能不能对大骨块进行脱钙。

### 发明目的

因此，本发明的目的是至少解决现有技术中存在的一个或多个问题。至少，本发明的目的是提供给公众一种有用的选择。

### 发明内容

因此，本发明提供了一种骨脱钙剂，其包含溶解骨中钙离子的钙溶剂，以及一种当骨脱钙剂受到超声波振动时产生微泡的起泡剂。

钙溶剂的优选试剂选自由乙二胺四乙酸和甲酸。

钙溶剂任选在超声波促进的脱钙剂中按重量计可达 0.0001%-20% 量的乙二胺四乙酸，更优选超声波促进的脱钙剂可达 5-15% 的量。

或者，起泡剂形成微泡的量在超声波促进的脱钙剂中按重量计可达 0.0001%-50%，更优选按重量计可达 10-20%。

第二方面，本发明提供了一种骨脱钙的方法，包含下列步骤：

a) 将骨浸入骨脱钙剂中，这种骨脱钙剂包括：

- 一种螯合骨钙离子的钙螯合剂；以及
- 一种当骨脱钙剂受到超声波振动时产生微泡的起泡剂；

b) 使骨和骨脱钙剂经受超声波振动足够脱钙的时间，以对骨进行脱钙。

下列是以上方法的可能选项：

- 超声波振动频率为 20kHz 到 2MHz；
- 超声波振动是间歇性的。更优选，超声波振动在脱钙时间的 80% 是开启的，脱钙时间的 20% 是关闭的。

另一方面，本发明提供了一种检测骨标本中羟磷灰石含量的方法，所述骨标本可通过将骨浸入骨脱钙剂中以及将骨和骨脱钙剂经受超声波振动来进行脱钙，所述方法包含下列步骤：

- a) 至少检测一种穿过骨标本的超声波振动的声参数；
- b) 通过将步骤 a) 中已检测的传输速度与预定的已知羟磷灰石含量的骨传输速度进行比较来确定骨标本中羟磷灰石的含量。

超声波检测方法可能还包括以下步骤：

- a) 使超声波从超声波传感器传输到骨；
- b) 接收穿过骨的超声波；
- c) 分析传输波以获得至少一种声参数。

任选地，声参数选自声速、衰减、散射密度、阻抗、反射率、频谱或其组合。

另一方面本发明提供了一种检测用于骨标本脱钙的骨脱钙剂浓度的方法，通过将骨浸入骨脱钙剂并将骨和骨脱钙剂经受超声波振动而对所述骨标本脱钙，包含下列步骤：

- a)至少检测一种穿过骨脱钙剂的超声波振动的声参数；
- b)通过将步骤 a)中已检测的传输速度与已知浓度的骨脱钙剂的预定传输速度进行比较来确定骨脱钙剂的浓度。

#### 附图说明

本发明的优选实施例将由通过实施例及参考以下附图来进行说明：

图 1 显示了本发明的超声波脱钙系统的一个实例；

图 2 显示了脱钙剂溶液中的钙浓度和声速之间的关系；以及

图 3 显示了骨中钙浓度和声速之间的关系。

#### 具体实施方式

以下段落中，本发明通过参考附图以实施例的方式进行描述。列表 1 是便于参考附图的附图标记的部分列举。

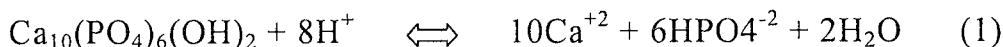
本发明的目的、特征和方面公开在以下描述中或者根据以下描述是显而易见的。所属技术领域的技术人员应该理解的是：本发明的讨论仅仅是示例性实施方案的描述，并不希望限定本发明的较大的范围，所述较大范围体现在示范性的构成中。

图 1 显示了本发明的超声波促进的脱钙系统和脱钙剂。骨标本 1、超声波处理传感器 2 和脱钙剂溶液 3 被置于容器 4 中。附加的超声波传感器 2 可置于容器的侧壁和底部。也可将超声波处理传感器 2 与超声波处理探测器 6 一起浸入脱钙剂溶液 3 中。此外，可将温度传感器 5 浸入脱钙剂溶液 3 中来监控温度。超声波检测探测器 7 和超声波检测传感器可被置于容器 4 内部或外部的不同位置来探测来自超声波传感器的信号。图中传感器的位置仅仅为了说明目的，具体位置可根据需

要进行改变。传感器可安装在容器壁 5 的任一侧。此外，必要时可在每侧都安装传感器 2。传感器 2 可安装在容器壁的外表面或其表面与容器壁内表面在相同的水平。

### 超声波促进的脱钙剂

可以通过在酸液中电离或与螯合剂，比如 EDTA (Gruber and Stasky, 1999, page, 1996) 融合而从骨有机基质中去除 HA，这可由方程 1 来表示。然而，骨标本被完全脱钙需要花费很长时间。



已惊奇地发现，当螯合剂与本发明的微泡、超声波促进的脱钙剂混合并且连同使用超声能时可实现快速脱钙。

超声波促进的脱钙剂可以液体或凝胶形式存在。

在超声波促进的脱钙剂中，按重量计优选螯合剂的有效量范围为 0.0001%-20%，更优选的范围为按重量计 5-15%。螯合剂的 pH 可用酸或碱，包括但不限于盐酸和氢氧化钠溶液调至接近中性，比如 pH 7.4。

在超声波促进的脱钙剂中，按重量计优选微泡的量的范围为 0.0001% 到 50%，更优选范围为 10-50%。微泡可商品名为 Levovist 的产品形成，其中 1g 的 Levovist 包括 999mg 的半乳糖和 1mg 的棕榈酸。利声显 Levovist 微泡的理化性质如下：

37°C下的最大重量摩尔渗透压浓度

200mg/mL 的溶液大约 1175 mOsm/Kg

300mg/mL 大约 1965 mOsm/Kg

400mg/mL 大约 2894 mOsm/Kg

### 25°C下的“有效”重量摩尔渗透压浓度

现成的悬浮液的滤出液 200mg/mL 大约 910 mOsm/Kg

300mg/mL 大约 980 mOsm/Kg

400mg/mL 大约 950 mOsm/Kg

### 25°C下的粘度

现成的悬浮滤出液 200mg/mL 1,4mPa.s

300mg/mL 1,4mPa.s

400mg/mL 1,4mPa.s

现成的悬浮液 200mg/mL 大约 1,4mPa.s

300mg/mL 大约 3.6mPa.s

400mg/mL 大约 8,0mPa.s

本发明之前，这种“Levovist”微泡被用作造影剂，当注射进表皮静脉后，可临时导致心室和血管的强化超声回波。

脱钙剂的余量是水，优选蒸馏水或去离子水。

从理论上来说，充气微泡受到超声波的撞击时会产生一种能增强试剂-骨界面的机械力的声效，由此增强脱钙作用。

超声波促进的脱钙剂的实例可以包含：

- EDTA（乙二胺四乙酸），含量（重量体积比）5-15%，优选10%，pH 5.0-8.5，优选约7-7.4；或
- 9% (v/v) 的甲酸，含量（重量体积比）1-20%，优选9%；

或

- 可商业获得的脱钙剂。

商业获得的微泡的商品名为 Levovist (Schering, 柏林, 德国)。微泡可以 10-50% (w/v)，更优选为约 10-20% 的量存在，因此微泡的

的存在量约为 300 个微泡/mL。

### 超声波脱钙装置

超声波脱钙装置包括产生超声波的声波能发生器。该超声波发生器包括产生可调幅值，频率（优选在 20 KHz 到 2 MHz 之间）以及开关持续时间（优选 80% 开-20% 关的周期以免由超声波处理引起高温）的正弦或方形电信号的电路。该电路可被进一步分为信号发生器、开关持续时间控制电路和功率放大器。发生器也包括一个或多个超声波传感器，从而将电能转换成超声波。传感器可安装在标本容器的外侧，其波束朝向标本，或形成能插入标本容器的探测器。超声波发生器也包含一个温度传感器和温度控制装置，可以是制冷/加热装置、风扇、水循环，等等。所述发生器还包括微处理器、装置控制面板上的小键盘、显示器（优选 LCD）、扬声器（用于报警和通知），以及其它为装置提供整体控制的辅助电路。超声波频率、强度、信号开-关持续时间、处理时间、溶液温度等可通过小键盘进行设置，显示在 LCD 上，并由微处理器模块来进行控制。

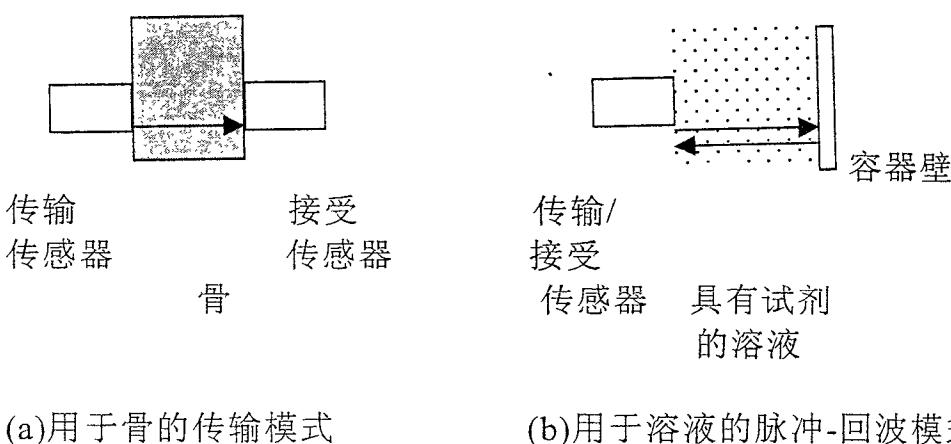
声波脱钙装置也包括能检测骨标本中 HA 含量和/或脱钙剂中的充气微泡含量的检测器。所述检测器包含产生脉冲电信号的电路、一个或多个传输/接收超声波信号的检测超声波的传感器、放大已接收的检测超声波的接收电路、一个信号处理模块及算法计算脱钙的水平。优选的超声波检测频率在 100 kHz 与 10 MHz 之间，取决于标本的类型和大小以及准确度的要求。检测超声波传感器可安置于标本容器底部的侧壁。也可形成可插入到脱钙液中，并让超声波束指向标本的探测器。骨标本中 HA 的含量和/或脱钙剂中充气微泡的含量可以脉冲回波模式或传输模式进行检测。在脉冲回波模式中，超声波传感器用于将超声波信号传输进溶液和/或标本中，反射或散射的超声波信号由相同的传感器或传输传感器同侧的另一传感器记录。在传输模式中，超声波传感器用于将超声波信号传输进溶液和/或标本中，另一超声波传感器被安置于反侧来接收穿过溶液和/或标本的超声波信号。两种情况下，均

可在不同方向使用更多的传感器设置来检测标本的多余一个的方向。用这种方法，可获得较好的估算。

在脉冲回波模式或在传输模式中，接收信号可被放大、过滤从而去除非必要的噪音并以模拟或数字方式进行处理从而获得标本和/或溶液的声参数。声参数包括声速、衰减、散射、阻抗、反射率、频谱或其组合。这些参数可用模拟电路或将超声波信号数字化并输入微处理器模块后用数字信号处理来获得。因为骨标本中的 HA 含量和脱钙剂中的充气微泡含量会影响这些参数的值，所以这些含量可通过测量声参数来估算。骨标本的声参数和 HA 含量以及脱钙剂中的充气微泡含量之间的关系需要一种标准程序。

超声波检测可在超声波处理中断期间周期性进行，以免检测受处理期间存在的强声能的影响。此外，脱钙液中的螯合剂也可在脱钙期间使用已测定的声参数来估算。

#### 脱钙和试剂浓度水平的确定



(a) 中，超声波从传输传感器中被传输。其传播穿过骨标本并到达接收传感器，可获得超声波从传输传感器到接收传感器的飞行时间。已知两个传感器之间的距离，故可计算骨中的声速。已有文献报道骨

中的声速与骨标本的 HA 含量相关。这种依赖性可通过利用超声波测定具有不同石灰化水平的骨标本的声速和利用其他标准方法测定具有不同石灰化水平的骨标本的 HA 含量被进一步校准。脱钙过程中，通过查寻描述骨 HA 含量和声速之间的关系的表或曲线，从测定的超声波的飞行时间来估算骨标本的 HA 含量。

除了声速，也可使用其它声参数，包括超声波衰减、散射密度、阻抗、反射率、频谱或其组合。这些参数可从界面或内部结构的传输或反射回波中提取。

(b) 显示了溶液中脱钙剂的脉冲-回波测量方法。同样地，超声波从传感器被传输，该传感器既可用于传输也可用于接收。从容器壁或其它界面反射波，然后可再次被传感器接收。可以获得超声波的往返飞行时间。根据传感器和容器壁表面之间的已知距离，可计算出溶液中的声速。溶液的超声波速度依赖于脱钙剂的浓度。实验前通过校准它们的关系，用脱钙过程中溶液中已测的声速，可以估算溶液的脱钙剂的浓度。

### 实施例

#### 校准溶液中声速和钙浓度之间的关系。

1. 首先用以上提到的标准方法制备具有不同钙浓度的溶液。
2. 利用超声波脉冲-回波或传输方法测量每种溶液中的声速。
3. 溶液中钙浓度和其声速之间的关系可做成图 2 所示的图。
4. 由所述关系获得线性（或其它类型）回归，因此可从声速来预测溶液中的钙浓度，声速在实际应用中可被测量。

#### 校准骨中声速和钙浓度之间的关系。

1. 首先通过对骨标本进行不同程度的脱钙来制备具有不同钙浓度的骨标本。
2. 利用超声波脉冲-回波或传输方法测量每种骨标本中的声速。

3. 然后用传统方法，比如 micro-CT 来测量骨标本中的钙含量。
4. 骨中钙浓度及其声速之间的关系可做成图 3 所示的图。
5. 由所述关系获得线性（或其它类型）回归，因此可从声速来预测骨中的钙浓度，声速在实际应用中可被测量。

实验方法 1:

装置：如上所述的超声波脱钙装置

脱钙液：350ml 10% EDTA (w/v), pH=7.4

脱钙水平的检测：通过使用定量计算机断层扫描 (QCT) 和普通 x-射线来确定。

结果：

a. 骨片

骨标本	100% 脱钙的时间
疏松骨 $2 \times 2 \times 0.4\text{cm}$	~ 3 小时
皮层骨 $2 \times 0.5 \times 0.4\text{cm}$	~ 4 小时

b. 全大鼠股骨 (长 4.5cm, 直径 0.55cm)

脱钙方法	24 小时的脱钙 %	100% 脱钙的时间
用超声波	32%	4 天
未用超声波	15%	10 天

实验方法 2:

装置：如上所述的超声波脱钙装置

脱钙液：350ml 10%EDTA (w/v) + 10% 微泡形成剂 (w/v)  
(Levovist, Schering, 柏林, 德国), pH=7.4

脱钙水平的探测：定量计算机断层扫描 (QCT) 和普通 x-射线。

结果：

a. 骨片

骨标本	100%脱钙的时间
疏松骨 $2 \times 2 \times 0.4\text{cm}$	~1.8 小时
皮层骨 $2 \times 0.5 \times 0.4\text{cm}$	~3 小时

b. 全大鼠股骨 (长 4.5cm, 直径 0.55cm)

脱钙方法	24 小时的脱钙%	100%的脱钙时间
用超声波	45%	2.7 天
未用超声波	15%	10 天

以上实验表明，本发明的脱钙方法能以更快速、更有效的方式对骨进行脱钙。

虽然本发明的优选实施例已通过实施例进行了详细描述，然而，很显然本领域技术人员可对本发明进行修改和调整。此外，本发明的实施方案不应该被理解为仅仅收到实施例或附图的限制。然而，应清楚了解这种修改和调整在本发明下列权利要求所列举的范围之内。例如，作为实施方案一部分显示或描述的特征可用于另一实施例中，产生一个新的实施方案。因而，希望本发明如以下权利要求的范围及其等价物一样包括了这种修改和改变。

附图标记	说明
1	骨标本
2	超声波传感器
3	脱钙剂
4	容器
5	温度传感器
6	超声波处理探测器
7	超声波检测探测器
8	超声波探测传感器

列表 1

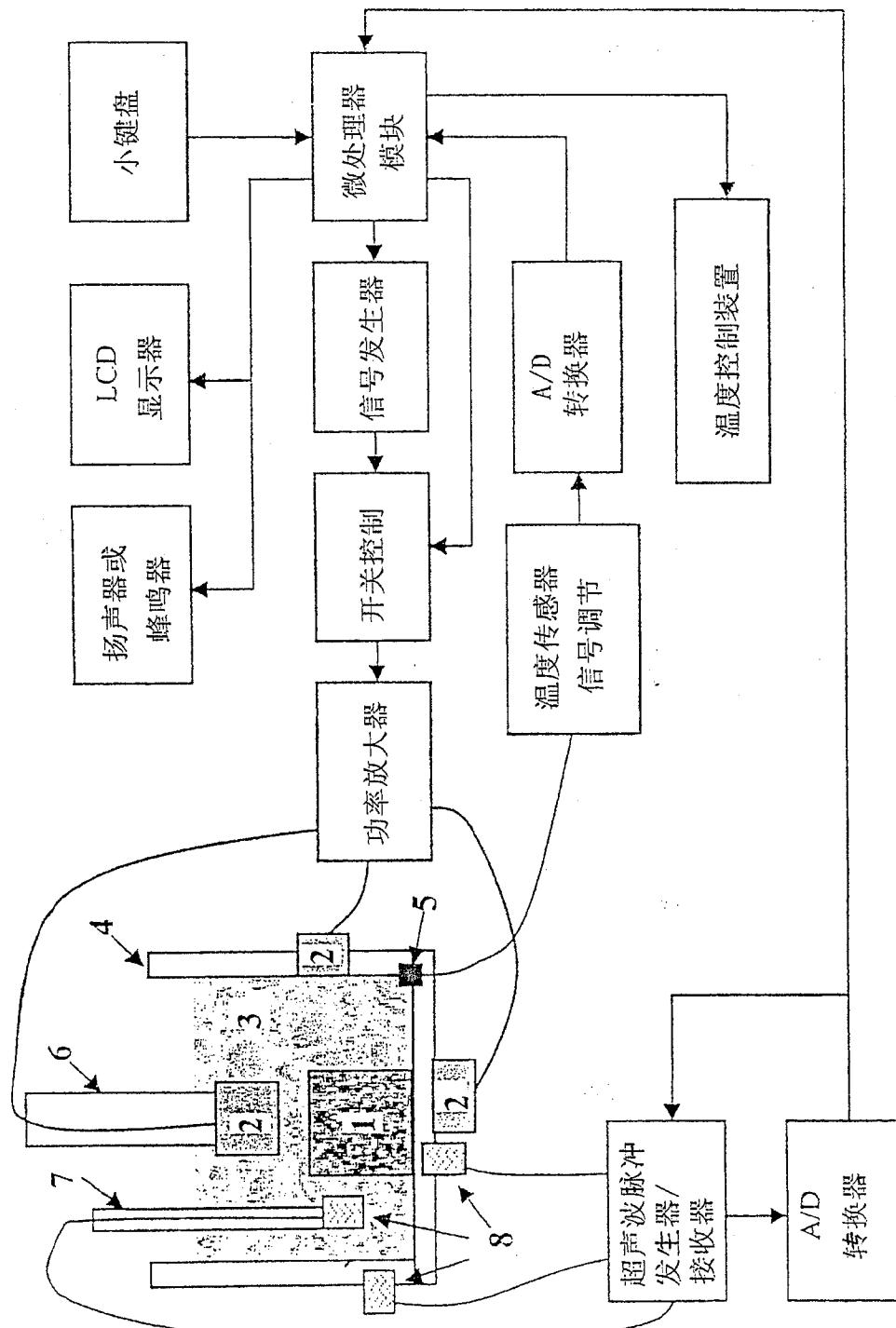


图1

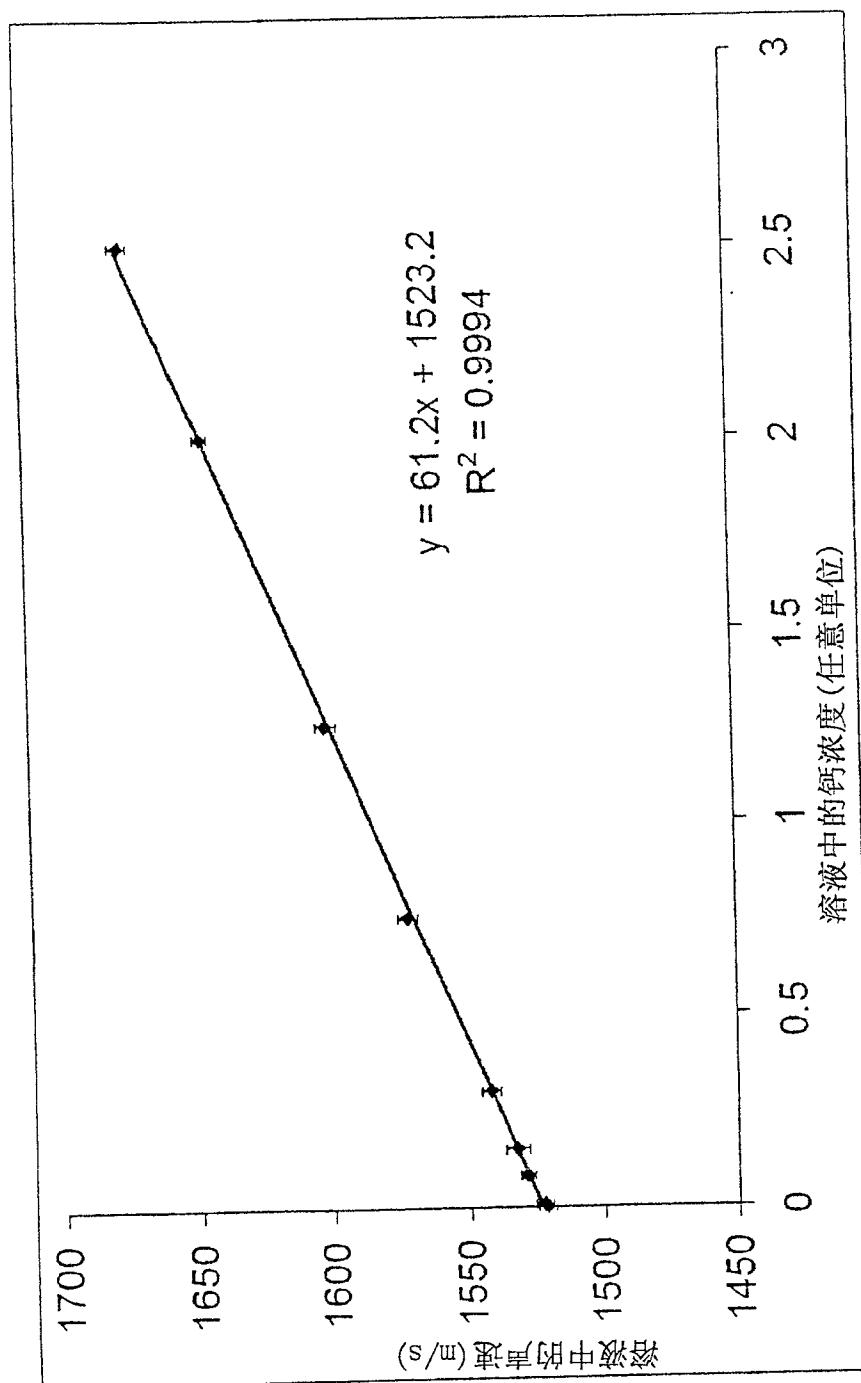


图2

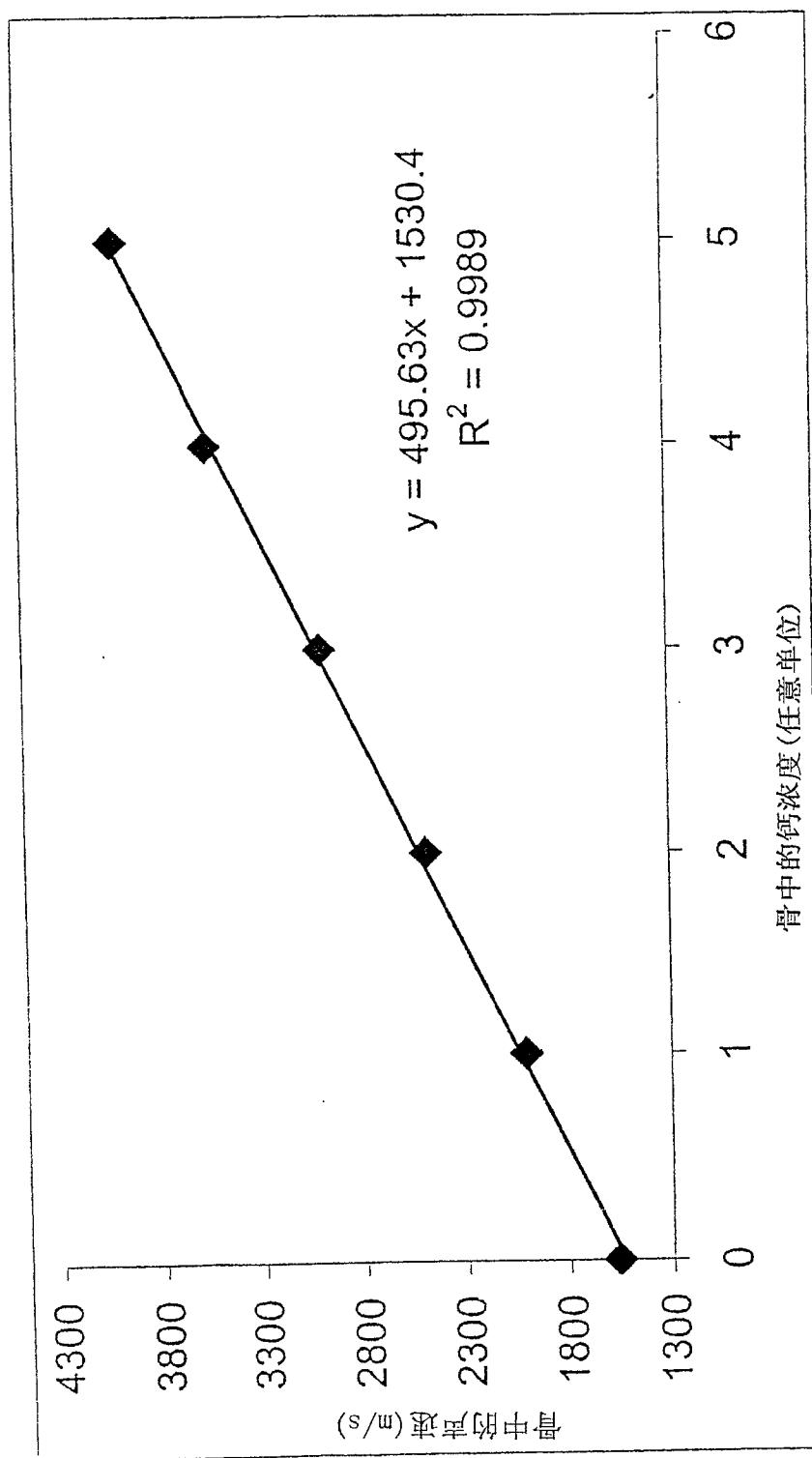


图3