

纳米羟基磷灰石表面接枝聚合左旋丙交酯*

宋晓峰^{1,2**} 凌风光^{1,2} 陈学思^{2**}

(¹长春工业大学化学工程学院 长春 130012) (²中国科学院长春应用化学研究所 长春 130022)

摘要 为了改善 HA 纳米粒子与有机 PLGA 的相容性,分别采用六亚甲基二异氰酸酯加乙二醇、左旋乳酸改性纳米粒子表面后或直接原位接枝聚合左旋丙交酯等 3 种不同方法,制备了表面修饰聚乳酸的纳米羟基磷灰石 (PLLA-g-HA). FTIR、XPS、TEM、TGA 测试表明 PLLA 成功接枝到 HA 的表面. 其中六亚甲基二异氰酸酯加乙二醇改性 HA 纳米粒子所获得的 PLLA 接枝率远高于其它两种方法达 25%,调整有机相和无机相的比例对 PLLA 接枝率的影响较小,其在氯仿中可以稳定分散 2 天以上. 共混电纺丝后的拉伸测试表明 PLLA-g-HA/PLAG 复合纤维膜的力学性能高于 HA/PLGA 膜,当两者之间的比例为 5% 拉伸性能达到最大值.

关键词 羟基磷灰石, 表面改性, 左旋丙交酯, 接枝聚合

羟基磷灰石 [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA] 是脊椎动物骨和齿的主要成分^[1],人体骨骼中 HA 质量百分含量接近 60%,人牙齿的珐琅质表面 HA 质量分数约占 90% 以上. 但是 HA 的脆性较大、成型性差,且其降解产物难以代谢,往往将其与聚合物形成复合材料后才应用于临床. 聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 具有良好的生物相容性和生物降解性,同时其分子量、结晶度等易于控制,成为骨修复首选的高分子材料. HA 与 PLGA 复合后能使复合材料具有很好的韧性,而且它们的酸性降解产物可被 HA 的碱性降解产物中和,因此作为一种最有应用潜力的骨替代和修复材料,HA/PLGA 复合材料得到了许多国家的生理学家和生物材料学家的广泛研究.

然而作为填料,HA 与 PLGA 的界面结合力较差,一旦植入动物体内,HA 与 PLGA 基体的界面将首先被破坏,HA 粒子很快就从 PLGA 基体中脱离出来,使复合材料的机械强度迅速降低. 因此改善 HA 与 PLGA 之间的界面结合力成了制备高性能 HA/PLGA 复合材料的关键.

人们运用了多方法对 HA 粒子表面进行改性,如硅烷偶联剂^[2,3]、聚酸^[4,5]、聚乙二醇^[6]、异氰酸酯^[7~11]、十二烷基醇^[12] 和焦磷酸^[13] 等来处理 HA 表面,或在 HA 粒子表面接枝有接枝有机化合物分子来改变 HA 粒子的表面性质^[14],从而改善羟基磷灰石与 PLGA 的相容性.

因为使用共混法制备均相纳米复合材料时,需要纳米粒子均匀的分散在溶液中. 改性 HA 纳米粒子在溶液中形成胶体的稳定性,可以反映材料在有机材料中的可分散性^[15,16]. 本文中首次使用六亚甲基二异氰酸酯加乙二醇改性 HA 后接枝聚合左旋丙交酯,提高 HA 纳米粒子与 PLGA 的相容性. 与直接原位接枝聚合左旋丙交酯和乳酸改性 HA 后接枝聚合左旋丙交酯比较,本方法的聚乳酸接枝效率提高到 25%. 由于静电纺丝在引导骨再生膜制备中展现出诱人的前景,联合无机纳米粒子和有机物共混纺丝制取复合纳米纤维膜测试拉伸性能,结果表明 PLLA-g-HA/PLGA 纤维膜的力学性能明显高于 HA/PLGA 膜.

1 实验部分

1.1 材料

硝酸钙(分析纯),磷酸氢二铵(分析纯),氨水(分析纯),L-丙交酯(95%,Purac),L-乳酸(分析纯,Purac),甲苯(分析纯,北京化工厂),乙酸乙酯(分析纯,北京化工厂),三氯甲烷(分析纯,北京化工厂),辛酸亚锡(99%,Sigma),氯化钙(98%,上海化工高专化工厂),磷酸钙(分析纯,北京新光化学试剂厂),铜网(碳膜,北京百瑞技术有限公司),二月桂酸二丁基锡(99%,阿拉丁试剂). PLGA ($M_n = 1.2 \times 10^5$) 实验室合成.

* 2012-05-21 收稿,2012-08-22 修稿;国家自然科学基金(基金号 201115147 和 51021003)资助项目.

** 通讯联系人,E-mail: jlsongx@163.com; xschen@ciac.jl.cn

1.2 实验方法

1.2.1 HA 合成

采用硝酸钙溶液与磷酸氢二铵溶液共沉淀法合成 HA^[17].

1.2.2 HA 表面接枝聚合左旋丙交酯

3 种方法在 HA 表面接枝 PLLA 详述如下:
(1)取 3 g HA 加入到 50 mL 的二甲基甲酰胺中,放入除水除氧的反应瓶中,氮气保护和磁力搅拌条件下加入 1.5 mL 的六亚甲基二异氰酸酯(HMDI)和 0.045 g 二月桂酸二丁基锡,在 50℃ 下反应 8 h,将一定量的乙二醇(EG)加入到反应瓶中,在 60℃ 下反应 12 h,产物记为 E-HA.

分别将 1 g E-HA 和重结晶好的左旋丙交酯按 3/10,1/5,1/10 质量比放入除水除氧的反应瓶中,每个加入 30 mL 除过水的甲苯和 0.015 g 辛酸亚锡,磁力搅拌在 120℃ 下反应 24 h. 反应完成后产物离心分离,用氯仿洗涤后真空干燥,产物记为 EP-HA.

(2)取 3 g HA 加入到 20 mL 的四氢呋喃中,搅拌条件下加入 3 g 的左旋乳酸,在 60℃ 下反应 30 min. 加入 50 mL 的甲苯在 140℃ 下共沸除水反应 12 h,产物记为 L-HA.

分别将 1 g L-HA (表面用左旋乳酸改性的 HA) 和重结晶好的左旋丙交酯按 3/10,1/5,1/10 质量比放入除水除氧的反应瓶中,每个反应瓶加入 30 mL 除过水的甲苯和 0.015 g 辛酸亚锡,磁力搅拌在 120℃ 下反应 24 h. 反应完成后产物离心分离,氯仿洗后真空干燥,产物为 LP-HA.

(3)将 1 g HA 和重结晶好的左旋丙交酯按 3/10 的质量比放入除水除氧的反应瓶中,加入 30 mL 除过水的甲苯和 0.015 g 辛酸亚锡,磁力搅拌在 120℃ 下反应 24 h. 反应完成后产物离心分离,用氯仿洗 5 次后真空干燥,产物记为 DP-HA.

1.3 材料表征

用 Philips 型 X 射线衍射仪测试样品,扫描范围 $2\theta = 10^\circ \sim 80^\circ$; 用 BIO-Rad Win-IR 型红外光谱仪对接枝前后的材料测试,光谱范围 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$; 采用 Axis Kratos Ultra 型光电子能谱仪(XPS)进行表征,以铝靶为激发源,扫描步长为 0.1 eV; 样品分散在氯仿中,制成浓度为 0.1% 的悬浮液,超声分散 1 h,然后将一滴悬浮液滴到表面附有碳膜的铜网上,在室温下自然干燥 24 h 后用 JSM-5610LV 扫描电镜(JEOL, 日本)观察改性前后样品的形态.

PLLA 接枝率使用热失重分析(Perkin-Elmer, TGA-7)进行测定. 在空气氛围中,测试样品从室温以 10 K/min 从室温上升到 600℃. 接枝到羟基磷灰石表面的 PLLA 的接枝量相当于干燥样品在加热过程中所失去的重量. 因此,接枝率 F_g 可以通过以下公式计算:

$$F_g = (W_f - W_0) / W_f \times 100\%$$

其中 W_0 是纳米羟基磷灰石的质量, W_f 是改性接枝后的 HA 的质量.

1.4 力学性能测试

将一定量 EP-HA 和 HA 与适量 PLGA 在氯仿中共混电纺制备纳米纤维膜. 将复合纳米纤维膜按文献[18]提供的方法制备成样条若干,直接在 Instron 1121 型拉力机上测试,拉伸速率为 10 mm/min. 拉伸强度的数据都是从应力-应变曲线中得到,是 5 个平行样品的平均值.

2 结果与讨论

2.1 L-丙交酯在 HA 表面的接枝

不同的方法对获得的 HA 进行表面改性接枝聚合左旋丙交酯,红外谱图结果如图 1 所示. 图 1(a)可见,与 HA 比较,用 HMDI 处理 HA 表面后产物(HA-HMDI),红外光谱在 1580 和 1620 cm^{-1} 处多了一 NHCO — 的吸收峰,并在 2257 cm^{-1} 处出现了异氰酸基的吸收峰. 这证明了 HMDI 的一端与 HA 通过化学键结合,另一端仍然具有活性可以与乙二醇(EG)结合. 在 EP-HA 的红外光谱中,在 1759 cm^{-1} 处有一个羰基的强吸收峰,证明 EP-HA 中聚乳酸的存在. 图 1(b)中可知,LP-HA 的红外光谱同 HA 相比在 1587 和 1317 cm^{-1} 处多了 2 个吸收峰,这与乳酸钙在 1583 和 1316 cm^{-1} 处的 2 个红外吸收峰非常相似. 这 2 个峰为羧酸盐中羧酸根的特征吸收峰,说明经乳酸处理后在 HA 表面形成了类似乳酸钙的结构. 在 LP-HA 的红外光谱图中,对应 L-HA 的 1587 cm^{-1} 处的吸收峰强度相对减弱并位移到 1614 cm^{-1} 处,同时在 1759 cm^{-1} 处有一个羰基的强吸收峰,证明 LP-HA 中聚乳酸的存在. 而 DP-HA 在 1759 cm^{-1} 处有一个羰基的强吸收峰,证明了在羟基磷灰石表面聚乳酸的生成(如图 1(c)).

图 2 表明了 HA 和 3 种不同方法接枝低聚乳酸的 HA 的 XPS 宽扫描图谱. 3 个接枝改性的 HA 不但有 Ca, P 和 O 峰等,而且有较强的 C 峰存在,也说明 PLLA 成功接枝到 HA 表面. 然而在纯 HA

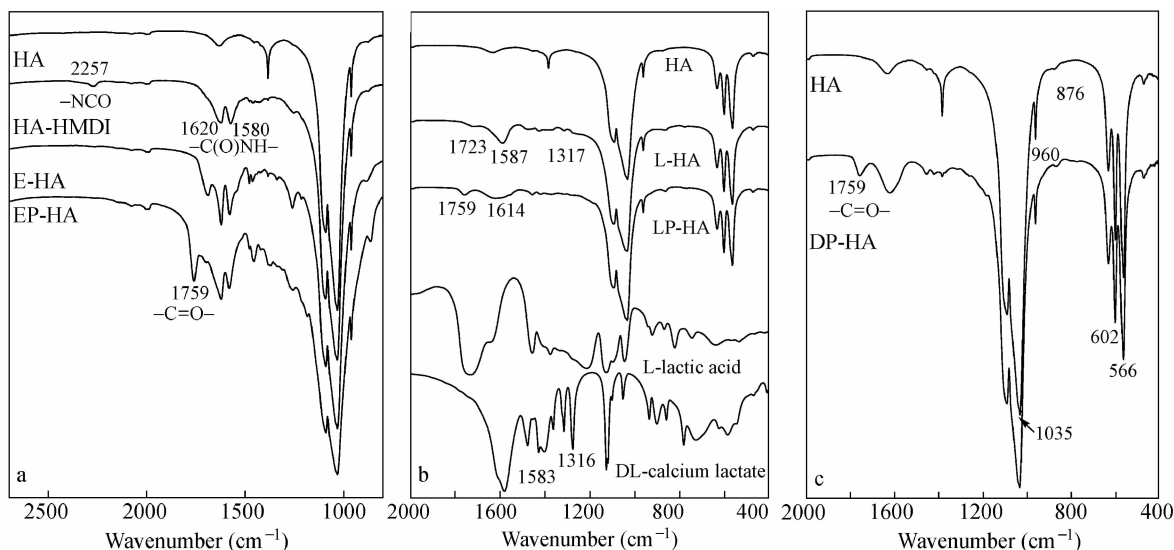


Fig. 1 FTIR spectra of (a) HA, HA-HMDI, E-HA, EP-HA, (b) HA, L-HA, P-HA, L-lactic acid and DL-calcium lactate, and (c) HA and P-HA

的 XPS 图谱中也发现弱的 C 峰存在,结合红外光谱结果可知,其 C 峰主要来自于 HA 中的 CO_3^{2-} 基团^[19]. 3 种表面接枝聚合左旋丙交酯的反应过程可归结示意式 1.

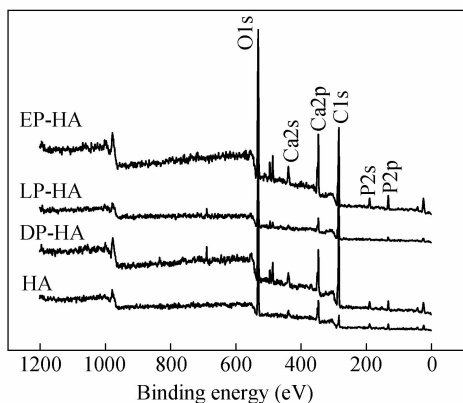


Fig. 2 XPS wide scan spectrum of HA, DP-HA, LP-HA and EP-HA

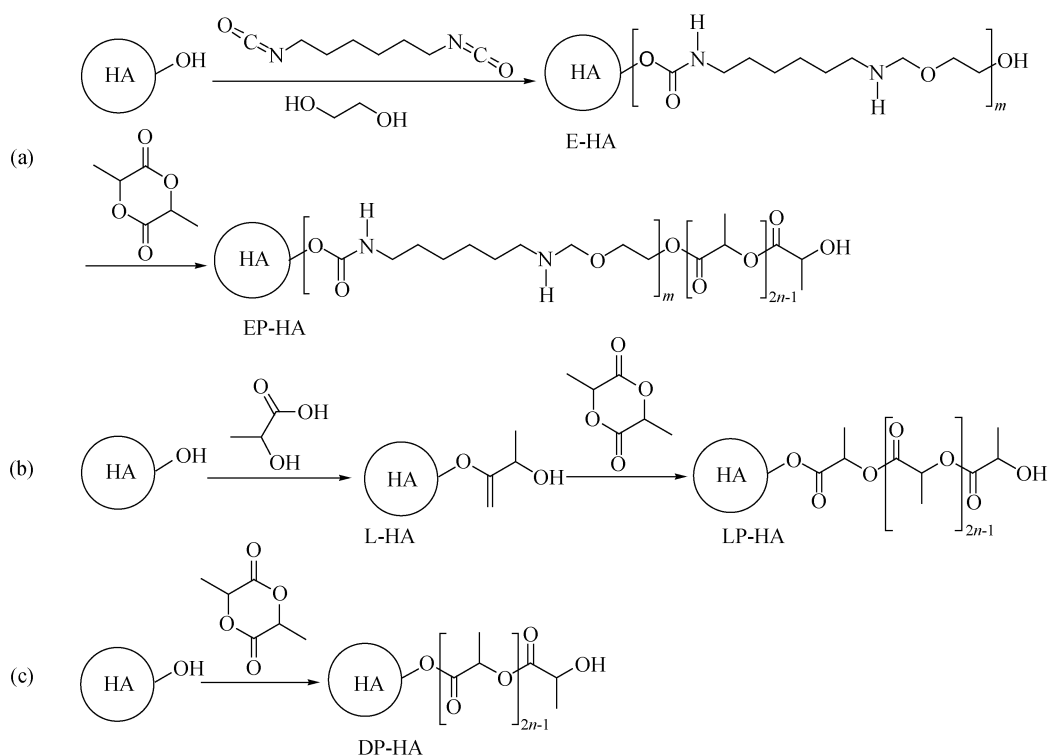
图 3(a)~3(c) 还给出了 HA, DP-HA 和 EP-HA 纳米粒子的透射电镜照片. 如图所示,未改性的羟基磷灰石为长 50~100 nm,直径 20~30 nm 的短棒状粒子. 改性后 HA 粒子仍然保持短棒状形态,长度几乎没有变化,但直径都略有增大,其中 EP-HA 为 30~50 nm,间接说明 HA 粒子表面生成了新的物质. 图 3(d) 为 HA, DP-HA 和 EP-HA 的 XRD 图谱. 图中可见,3 个样品的 XRD 图谱与标准数据库 (JCPDS090432) 是一致的,3 个强特征峰 (211), (112) 和 (002) 均有出现. XRD 图谱中衍射峰尖而强,说明 3 个样品结晶良好,接

枝改性没有影响 HA 晶体,但是与纯 HA 相比,接枝改性后样品的衍射强度有所减弱.

2.2 PLLA 接枝率

PLLA 在 HA 粒子表面的接枝是在催化剂辛酸亚锡 ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) 的作用下,由 HA 表面的羟基引发 L-LA 单体的开环聚合来完成的. 反应前的 HA 粉末必须在真空烘箱中完全除去物理吸附在粒子表面上的水分,避免接枝率的降低. PLLA 的接枝率是在 TGA 测试基础上统计的. 未进行表面接枝的 HA 有近 1% 的微量失重,是由 HA 中物理吸附的水分蒸发带来的. 而接枝的 DP-HA 在 250~500℃ 范围内有较大的失重现象出现 (如图 4 所示),这是由接枝在 HA 表面上的 PLLA 的分解和燃烧引起的.

为了考察用 HMDI 与 EG 改性纳米粒子表面方法对 PLLA 接枝率的影响,在纳米粒子与左旋丙交酯的比例为 3/10 的情况下,图 5 给出了不同方法与 PLLA 接枝率的关系. 由图可见,DP-HA 的接枝率为 6.1% 略低于 LP-HA 的接枝率 6.7%. 分析这是因为 HA 表面的羟基在攻击左旋丙交酯开环时空间位阻较大,虽然利用左旋乳酸改性 HA,使其表面羟基接上了一个短链段,改善了空间位阻,使接枝率略有提高,但还是无法克服接枝聚合左旋丙交酯的空间位阻. 而 EP-HA 有机分子接枝率达到 25.4% 左右这样高的接枝率根据机理可解释为改性后的 E-HA 有了一个长链段,链段末端的羟基空间位阻减小了,可以较为容易的接枝聚合左旋丙交酯.



Scheme 1 Reaction for grafting polymerization on HA

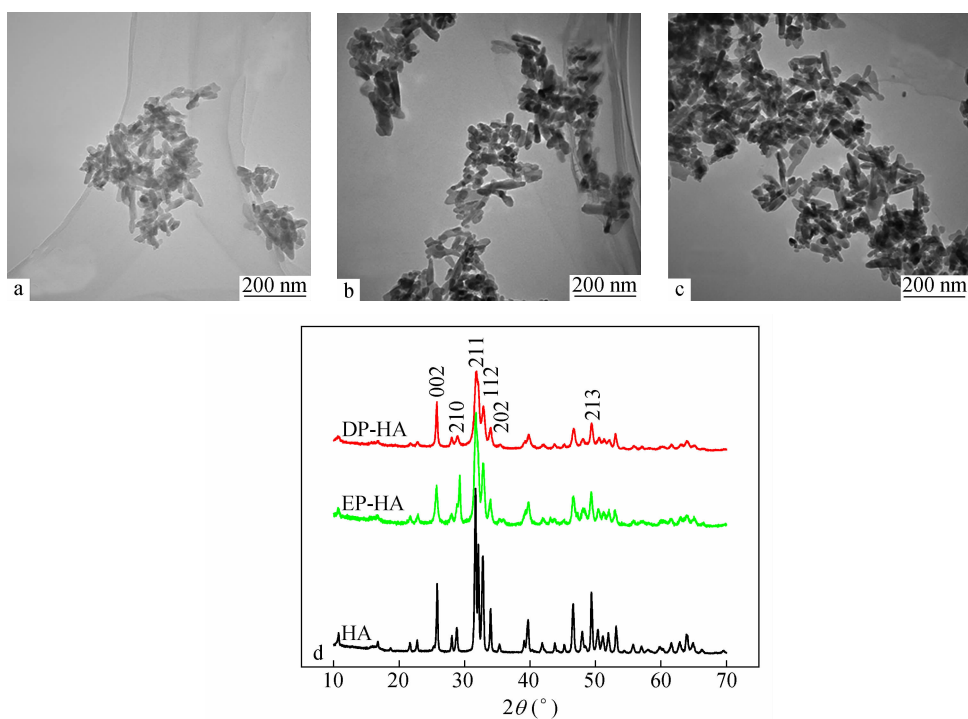


Fig. 3 TEM images of (a) HA, (b) DP-HA, (c) EP-HA, and (d) XRD spectrum of the three samples

此外,图 6 还表明了表面修饰后 HA 和左旋丙交酯的质量比与接枝率之间的关系. 由图可以看到,当 L-HA 与左旋丙交酯的质量比为 3/10,1/5,1/10 时,其 PLLA 的接枝率分别为 6.1%,

7.6%,5.9%. E-HA 也呈现出相同趋势,有机分子接枝率分别为 25.4%,27%,24.7%. 二者之比在 3/10 的基础上,调整左旋丙交酯的用量,PLLA 接枝率的变化很小.

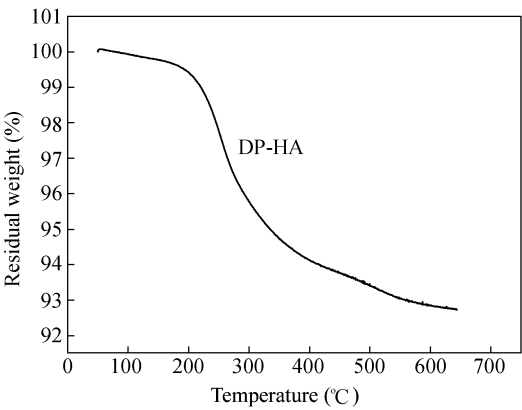


Fig. 4 TGA curves of DP-HA powders

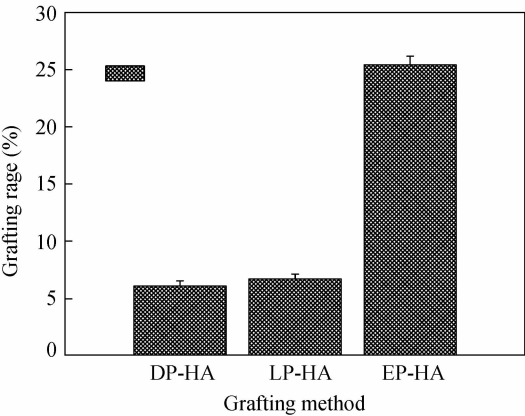


Fig. 5 The effect of grafting methods on grafting rate determined by TGA

2.3 接枝改性 HA 的分散性

PLLA-*g*-HA 的分散性能. 接枝改性 HA 可以很容易地分散到氯仿溶剂中,形成均匀的 HA 氯仿悬浮液,然而由纯 HA 制成的氯仿悬浮液,在静止的前提下放置几分钟后羟基磷灰石就会完全沉淀出来. 图 7 表明胶体的稳定性随接枝率的增加而明显的提高. DP-HA, LP-HA 和 EP-HA 形成的胶体可以在 48 h 内保持稳定. 48 h 之后, DP-HA 和 LP-HA 胶体溶液开始分层,而 EP-HA 稳定性

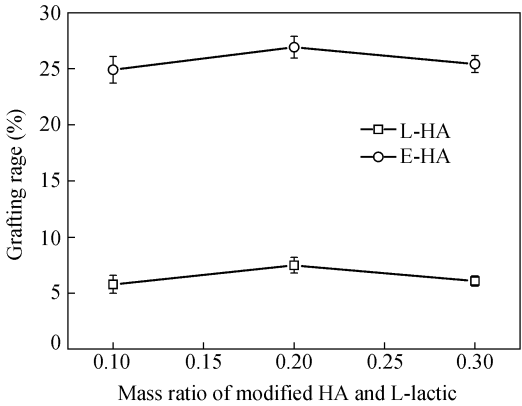


Fig. 6 The mass ratio of L-HA or E-HA with L-lactic as a function of grafting rate

显然更好一些. 这可以解释为表面未接枝低聚物的无机材料很难克服粒子间的相互作用而引发的团聚^[20]. 说明有机相的接枝率越高,无机材料在有机溶剂中的胶体稳定性越好,与有机相的相容性越好.

2.4 力学性能

为了评价 HA 接枝改性对复合材料力学性能的影响,将 EP-HA 和 HA 分别与 PLGA 共混纺丝制备复合纳米纤维膜,拉伸测试. 图 8 给出了复合纤维膜的拉伸强度与填料的含量之间的关系. 所有配比 PLGA/EP-HA 复合纤维膜的拉伸强度均大于相应配比的 PLGA/HA 复合纤维膜. 二者的拉伸强度随着填料含量的增加,表现出了一个先增加后降低的趋势,当纤维中填料的含量为 5 wt% 时,2 种复合纤维膜表现出最大的拉伸强度. 内插图 20 wt% PLLA-*g*-HA/PLGA 复合纳米纤维 TEM 图片,可以看到纤维直径分布在 100 ~ 400 nm 之间, PLLA-*g*-HA 在纤维中分布不均匀,伴有团聚现象,甚至形成结点. 因此,适量 PLLA-*g*-HA 可以更好地改善 PLGA 复合纤维膜的力学性能,拓展纳米纤维膜在生物医学领域的应用.

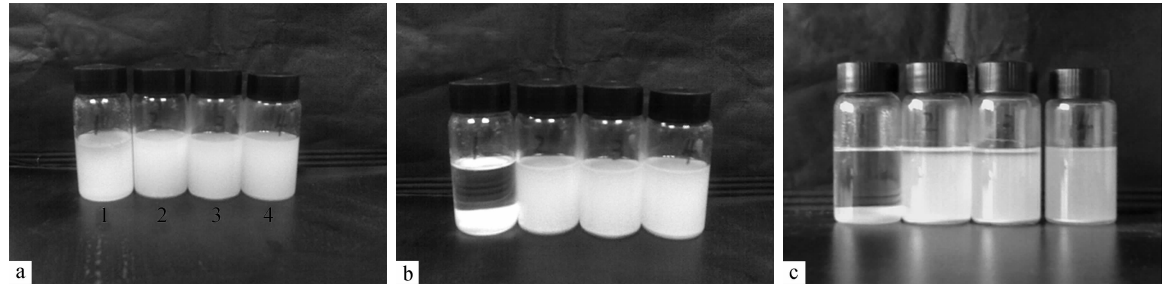


Fig. 7 Monitoring of time-dependent colloidal stability of HA, P-HA, LP-HA and EP-HA in methylene chloride (from left to right): (a) 0 h, (b) 0.5 h and (c) 48 h

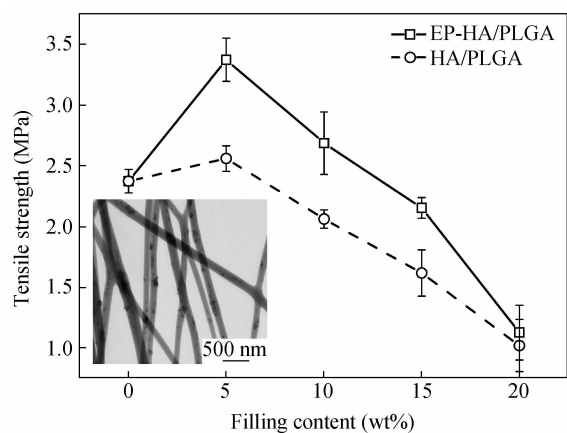


Fig. 8 Tensile strength as a function of filling content, and the inset TEM of 20 wt% PLLA-*g*-HA/PLGA nanofibers

3 结论

(1) 分别以 (HMDI + EG)、左旋乳酸改性 HA 纳米粒子表面后或直接原位接枝聚合左旋丙交酯等 3 种不同方法, 制备了 PLLA-*g*-HA.

(2) (HMDI + EG) 改性 HA 后 PLLA 的接枝率远高于其它两种方法, 达到 25% 以上. 同时, 调整有机相和无机相的比例对 PLLA 接枝率的影响较小.

(3) PLLA-*g*-HA 具有良好的胶体分散性, 特别是用 (HMDI + EG) 改性 HA 后接枝聚合左旋丙交酯进一步改善了在有机溶剂中的胶体稳定性. 其与 PLGA 共混纺丝膜的力学性能优于 HA/PLGA 纤维膜, 这将使 PLGA/无机粒子复合纳米纤维膜在生物医学领域展现出更大的应用价值.

REFERENCES

- Wan Y Q, Wang Y, Liu Z M. *Biomaterials*, 2005, 26(21): 4453 ~ 4459
- Borum L, Wilson J O C. *Silica Biomaterials Part II*, 2003, 24(21): 3681 ~ 3688
- Dupraz AMP, Joost R. De Wijn, Meer S, De Groot K. *Biomed Mater Res*, 1996, 30(12): 231 ~ 238
- Liu Q, Joost R De Wijn, Bakker D, van Blitterswijk C A. *Mater Sci Mater Med*, 1996, 7(11-12): 551 ~ 557
- Liu Q, Joost R De Wijn, van Toledo M, van Blitterswijk C A. *Mater Sci Mater Med*, 1998, 9(1): 23 ~ 30
- Wang X, Li Y, Wei J, de Groot K. *Biomaterials*, 2002, 23(24): 4787 ~ 4791
- Liu Q, van Blitterswijk C R. *Biomed Mater Res*, 1998, 40(3): 358 ~ 364
- Liu Q, Joost R de Wijn, Klaas de Groo, van Blitterswijk C A. *Biomaterials*, 1998, 19(11-12): 1067 ~ 1072
- Liu Q, Joost R de Wijn, van Blitterswijk C A. *Biomed Mater Res*, 1998, 40(3): 490 ~ 497
- Liu Q, Joost R de Wijn, van Blitterswijk C A. *J Biomed Mater Res*, 1998, 40(2): 257 ~ 263
- Dong G C, Sun J S, Yao C H, Jiang G J, Huang C W, Lin F H. *Biomaterials*, 2001, 22(23): 3179 ~ 3189
- Borum L, Wilson J O C. *Biomaterials*, 2003, 24(21): 3671 ~ 3679
- Tanaka H, Futaoka M, Hino R. *Colloid Interf Sci*, 2004, 269(2): 358 ~ 363
- Qiu X Y, Hong Z K, Hu J L, Chen L, Chen X S, Jing X B. *Biomacromolecules*, 2005, 6: 1193 ~ 1199
- Hong Z K, Qiu X Y, Sun J R, Deng M X, Chen X S, Jing X B. *Polymer*, 2004, 45(19): 6699 ~ 706
- Hong Z K, Zhang P B, He C L, Qiu X Y, Liu A X, Chen L, Chen X S, Jing X B. *Biomaterials*, 2005, 26(32): 296 ~ 304
- Fujishiro Y, Yabaki H, Kawamura K, Tsugio S, Akitsugu O. *Chem Tech Biotechnol*, 1993, 57(4): 349 ~ 353
- Huang C B, Chen S L, Reneker D H, Lai C L, Hou H Q. *Adv Mater*, 2006, 18: 668
- Lim G K, Wang J, Ng S C, Gan L M. *J Mater Chem*, 1999, 9: 1635 ~ 1639
- Ciappetti G, Ambrosio L, Savarino L, Granchi D, Cenni E, Baldini N, Pagani S, Guizzardi S, Causa F, Giunti A. *Biomaterials*, 2003, 24(21): 3815 ~ 3824

GRAFTING POLYMERIZATION OF L-LACTIDE ON HYDROXYAPATITE NANOPARTICLES

Xiao-feng Song^{1, 2}, Feng-guang Ling^{1, 2}, Xue-si Chen²

(¹ School of Chemical Engineering, Changchun University of Technology, Changchun 130012)

(² Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

Abstract Poly(lactid-glycolide acid)/hydroxyapatite (PLGA/HA) materials, as a class of composites, which have good bioactivity, absorbability and biodegradability, show promising applications in biomedical and tissue engineering fields. To improve the compatibility of HA and PLGA, the ring-opening polymerizations of L-lactic acid on three types of HA surfaces with different surface hydroxyl functionality: unmodified HA, HA modified with L-lactic acid, and HA modified with hexamethylene diisocyanate tethered ethylene glycol were carried out to produce poly(L-lactide acid) grafted hydroxyapatite (PLLA-g-HA). The results of FTIR, XPS, TEM and TGA show that PLLA was successfully grafted onto surface of HA by the above three methods. And the grafting rate of PLLA was dependent on the nature and steric environment of the hydroxyl groups on the HA surfaces, among which HA modified with (HMDI + EG) presented the best grafting percentage of 25%. The proportional change between inorganic and organic phase brought about little influence on PLLA grafting rate. The PLLA-g-HA can stably disperse in chloroform over 2 days without deposition. To investigate practicability of the composites used as bone guided regeneration membranes, tensile test after co-electrospinning shows that PLLA-g-HA/PLAG nanofibrous membrane has better mechanical performance compared to HA/PLGA membrane, and its tensile force reaches maximum at 5% filling content.

Keywords Hydroxyapatite, Surface modification, L-lactide, Grafting polymerization