

含磷脂酰胆碱的聚乳酸的诱导矿化研究*

邱永兵¹ 仇植¹ 陈元维¹ 罗祥林^{1,2**}

(¹ 四川大学高分子科学与工程学院 ² 高分子材料工程国家重点实验室(四川大学) 成都 610065)

摘要 分别以甘油磷脂酰胆碱和1,4-丁二醇为引发剂开环丙交酯,制备了含磷脂酰胆碱的聚乳酸(PLA-PC)和聚乳酸(PLA),比较了两者在诱导矿化中的差异.用傅立叶红外光谱仪(FTIR)、X-射线衍射仪(XRD)和扫描电子显微镜(SEM)对PLA-PC膜表面形成的矿化物进行了表征.结果表明,形成的矿化物为羟基磷灰石(HAP),PLA-PC膜有利于成核和生长,晶体呈片状,并随矿化时间延长,HAP晶粒逐渐增大,晶片厚度也逐渐变大.

关键词 聚乳酸, 磷脂酰胆碱, 诱导矿化, 羟基磷灰石

聚乳酸(PLA)是一种可降解的高分子材料,其降解的最终产物是水和二氧化碳,在生物体内不会聚集,作为生物材料受到越来越多的重视^[1,2].但是,聚乳酸分子是疏水性的,生物相容性较差,同时,除末端含有基团外没有其它活性基团,这些缺点又限制了它的广泛应用.本课题组将天然的磷脂酰胆碱引入到聚乳酸中,获得了一种新型的生物降解材料(PLA-PC)^[3].含有磷脂酰胆碱的材料生物相容性好^[4-6],能够形成胶束用作药物载体^[7].尽管已经有聚乳酸膜^[8]和聚乳酸-羟基乙酸膜^[9]进行仿生矿化的研究,以及阳离子化热响应微凝胶的矿化^[10]研究,但是,到目前为止还鲜有关于PLA-PC诱导矿化的研究报道.本文对PLA-PC膜进行了诱导矿化研究,为制备可降解的骨组织工程支架材料提供参考.

1 实验部分

1.1 实验试剂

PLA-PC的合成参考文献[3]所述的方法进行.甘油磷脂酰胆碱,采用文献报道方法从新鲜鸡蛋中分离提取^[9].L-丙交酯,抚顺市天元生物材料有限公司生产,用无水甲苯重结晶.中性氧化铝,分析纯,200~300目.辛酸亚锡为Sigma-Aldrich公司,直接使用.其他所有试剂均为市售分析纯.

模拟生理体液(SBF)溶液的配制参考文献[8]所述的方法进行.

1.2 聚合物的表征

¹H-NMR测试使用高分辨率超导核磁共振仪(ViniyINOVA-400/54型),以CDCl₃为溶剂,四甲基硅烷(TMS)为内标,工作频率为400 MHz.

FTIR测试样品在室温下真空干燥后用溴化钾研磨粉末压片测定,采用Nicolet560傅立叶变换红外光谱仪进行测定,频率区间为400~4000 cm⁻¹.

1.3 膜的制备及矿化

称取PLA-PC溶解在二氯甲烷中,配制成10%的溶液,超声振荡0.5 min,滴加在PET薄片上,自然晾干,形成表面光滑的膜.

将膜放在温度37℃的50 mL模拟生理体液(SBF)或2倍SBF(各组分的比例与SBF一样,但浓度增加1倍)溶液中,每12 h更换一次溶液以确保有足够的离子浓度来使矿物成核和生长.更换溶液时,小心倒入,防止已形成的矿化物被破坏.

1.4 矿化物表征与设备

1.4.1 矿化物阴离子的分析

因为矿物质有明显的厚度,可采用傅立叶红外衰减全反射仪(Nicolet560)进行测定,频率区间为400~4000 cm⁻¹.

1.4.2 矿化层的形态的观察

膜用超纯水轻轻清洗,冷冻干燥.将矿化后的膜表面喷金后使用扫描电子显微镜(INSPECT F型,电压30 kV 超高亮度 Schottky 场发射灯丝)

* 2011-10-25 收稿,2012-01-14 修稿;国家自然科学基金(基金号 50873065)资助项目.

** 通讯联系人, E-mail: luoxl_scu@126.com

doi:10.3724/SP.J.1105.2012.11336

观察膜表面所形成矿物形貌. 采用扫描电子显微镜附带的 X 射线能谱仪 (EDS) 来检测矿化物中的所含元素.

1.4.3 Ca/P 比值的测定

取 5 片已经矿化的膜,用去离子水清洗膜片共两次,冷冻干燥,放在塑料杯中,使用 5 mL 浓盐酸溶解膜片上的羟基磷灰石. 使用电感耦合等离子体发射光谱 (ICP) 测定溶液中的 Ca 和 P 含量.

1.4.4 矿化层的定性分析

采用 X'Pert MPD 型 X-射线衍射分析仪,将矿化后的薄膜材料直接在 X-射线衍射仪下扫描,测试条件为铜靶, $K\alpha$ 线, $\lambda = 0.1541\text{ nm}$, $P = 40\text{ kV}/50\text{ mA}$.

2 结果与讨论

2.1 聚合物合成和表征

含磷脂酰胆碱的聚乳酸 (PLA-PC) 的合成用开环聚合的方法,具体参见文献[3]. 在本研究中合成的 PLA-PC, 分子结构如¹H-NMR 谱图 (图 1) 中所示,平均每条链的乳酸单体单元与磷脂酰胆碱的摩尔比例 LA: PC = 40: 1 (由 $\delta = 1.55$ 处聚乳酸侧甲基特征峰的峰面积与 $\delta = 3.25$ 处甘油磷脂酰胆碱— $N^+(\text{CH}_3)_3$ 的特征单峰峰面积的积分值比值得到). 在 FTIR 谱图 (图 2) 中除了含有聚乳酸各类基团的特征吸收峰 (2998.7 和 1457.0 cm^{-1} 分别为— CH_3 伸缩振动吸收峰和弯曲振动吸收峰,2998.7,2948.4 以及 1361.5 cm^{-1} 为 C—H 伸缩振动吸收峰和弯曲振动吸收峰,1757.7 cm^{-1} 为酯 C=O 伸缩振动吸收峰,1271.3 和 1186.8 cm^{-1} 分别为 C—O 的反对称伸缩振动吸收峰和对称伸缩振动吸收峰),还有磷脂酰胆碱基团的特征吸收峰,即,磷酸根基团在

1188.3 cm^{-1} 处的吸收峰以及指纹区 969 cm^{-1} 处三甲铵— $N^+(\text{CH}_3)_3$ 特征吸收峰.

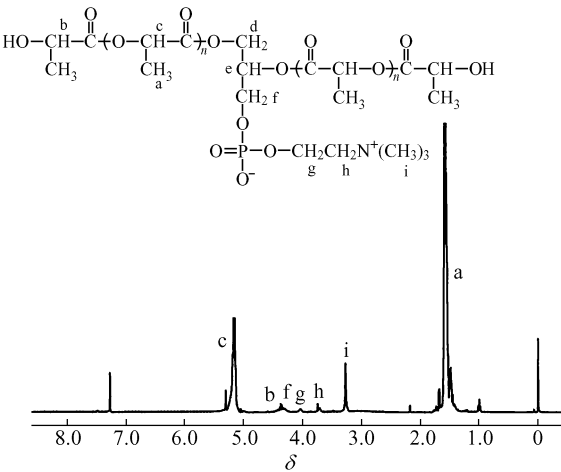


Fig. 1 ¹H-NMR spectrum of PLA₄₀PC

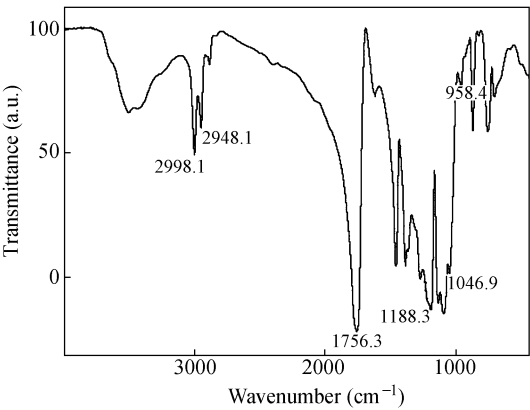


Fig. 2 FTIR spectrum of PLA₄₀PC

为了对比在相同情况下纯聚乳酸的矿化情况,以 1,4-丁二醇为引发剂合成了除末端羟基外不含官能团的 PLA₄₀OH. 表 1 给出了 2 种聚合物的分子量.

Table 1 Composition data of polymers for mineralization

Polymers	Initiator	M_w			Conv ^a
		$M_{n, th}$	$M_{n, NMR}$	M_η	
PLA ₄₀ OH	1,4-Butanediol	5850	5272	7080	83%
PLA ₄₀ PC	Glycerin phosphorylcholine	6017	6449	9545	81%

^aCalculated by¹H-NMR peak area ratio

2.2 聚合物诱导矿化比较

图 3 是 PLA 和 PLA-PC 在 pH = 6.8 的 2 倍 SBF 溶液中矿化 5 天后扫描电子显微镜图. 可以看到具有相同聚合单元数的 PLA 与 PLA-PC,前者形成的矿化球没有后者密集,放大后的图片显

示在 PLA 上形成的晶片密集程度和厚度也不如 PLA-PC 的. 尽管本研究中的 PLA₄₀PC 含有的磷脂酰胆碱基团的比例较小,但这种差异也体现出来了,其原因是磷脂酰胆碱基团在水环境中容易向表面发生迁移^[3,11]. 这就导致了两者的矿化机

理有差异. PLA 的矿化主要是由于酯基、水解产生的少量羟基以及羧基等极性官能团^[12], 而 PLA-PC 除此之外还通过磷酸根负离子的静电作用吸附 SBF 中的 Ca^{2+} , 形成 $\text{P}-\text{O}-\text{Ca}$ 结构, Ca^{2+} 的聚集将导致局部电荷不平衡, 又能进一步吸附溶液中的 PO_4^{3-} 和 OH^- , 这样阴离子和阳离子之间

的相互吸附, 重复聚集, 便形成局域的过饱和度, 从而降低核形成自由能, 形成具有一定尺寸晶核. 远离晶核的 Ca^{2+} , PO_4^{3-} 和 OH^- 经过扩散, 促使了晶核的进一步生长. 在 PLA 中引入官能团羧基及其它的官能团也观察到了促进矿化物成核和生长的现象^[13].

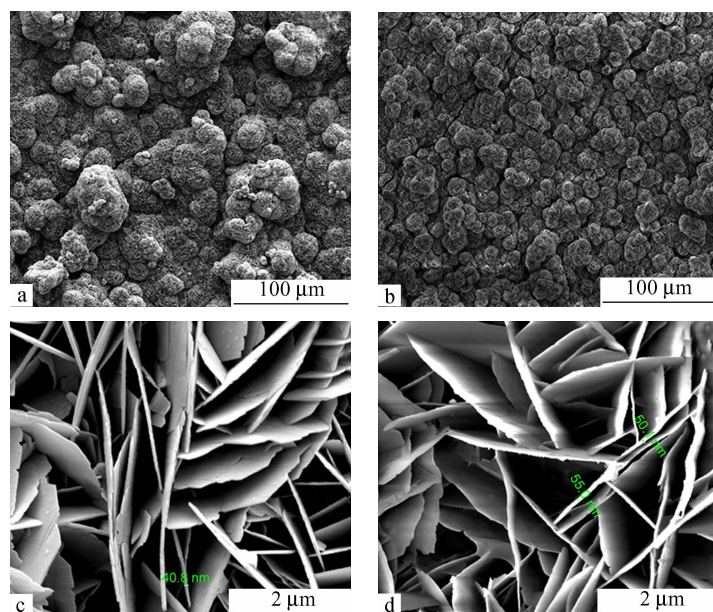


Fig. 3 The morphology of mineralized products on the surfaces of films after 5 days in $2 \times \text{SBF}$ of $\text{pH} = 6.8$
(a) and (c) for PLA; (b) and (d) for PLA-PC

2.3 矿化物的组成和结构

PLA-PC 矿化后的表面衰减全反射红外如图 4(a). $3300 \sim 3350 \text{ cm}^{-1}$ 、 1600.4 cm^{-1} 分别是羟基的伸缩振动吸收峰和弯曲振动吸收峰; 1020.5 cm^{-1} 是 PO_4^{3-} 伸缩振动吸收峰. 1405.6 和 853.6 cm^{-1} 是 CO_3^{2-} 的伸缩振动和弯曲振动吸收峰, 表明有 CO_3^{2-} 进入磷灰石晶格结构中. 而且在 1405.4 cm^{-1} 附近处的 CO_3^{2-} 特征吸收峰出现了

分裂, 说明 CO_3^{2-} 进入羟基磷灰石晶体结构, 而不是游离态 CO_3^{2-} 或碳酸盐中 CO_3^{2-} , 因为后者的特征峰为单峰, 这是区别两者的重要标志^[14]. 总体来看, 矿化物中 PO_4^{3-} 的峰积分面积远远大于 CO_3^{2-} 的峰积分面积, 因此可以断定矿化物所含阴离子主要是 PO_4^{3-} .

矿化物的 X 射线能谱 (EDS) 如图 4(b). 可以清晰的看到矿化物中含有 Ca 和 P 2 种元素. 采用

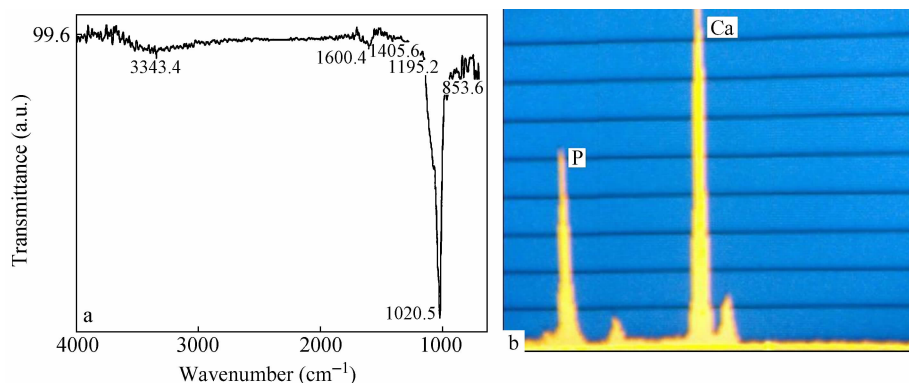


Fig. 4 (a) FTIR spectrum of the mineralized products; (b) X-ray energy spectrum of the mineralized products

电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP),能够精确测定 Ca/P 比值,比值为 1.57,略低于 HAP 的理论比值 1.67.这主要是因为矿化物在形成过程中有少量其它离子进入 HAP 和 ICP 测定阴离子时检测器对阴离子存在较低的灵敏度.因此,可以推断矿化物的主要组成是羟基磷灰石.

矿化物的 X 射线衍射图(图 5)显示在 $d = 25.8^\circ, 27.9^\circ, 31.3^\circ, 32.7^\circ, 33.3^\circ, 40.9^\circ, 45.5^\circ, 49.0^\circ, 53.4^\circ$ 各有一处衍射峰,通过与 HAP 标准

卡片对比,分别与 HAP 各个晶面的衍射峰匹配,只有晶面(300)特征峰衍射峰与附近晶面(112)的峰重叠,几乎成为一个峰.这些峰与 PLA-碳酸钙形成的 HAP 的特征峰衍射峰类似^[15].综合 FTIR,EDS,XRD 以及 Ca/P 比值,可以再次判断形成的矿化物为 HAP.从峰形上还可以看出,代表各晶面的特征峰底部较宽峰形不尖锐,说明 HAP 结晶度不是很高.

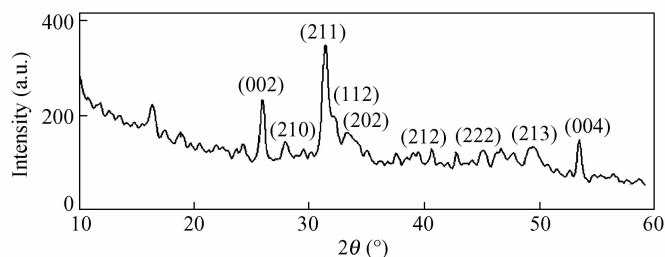


Fig. 5 X-ray diffraction spectrum of the mineralized products

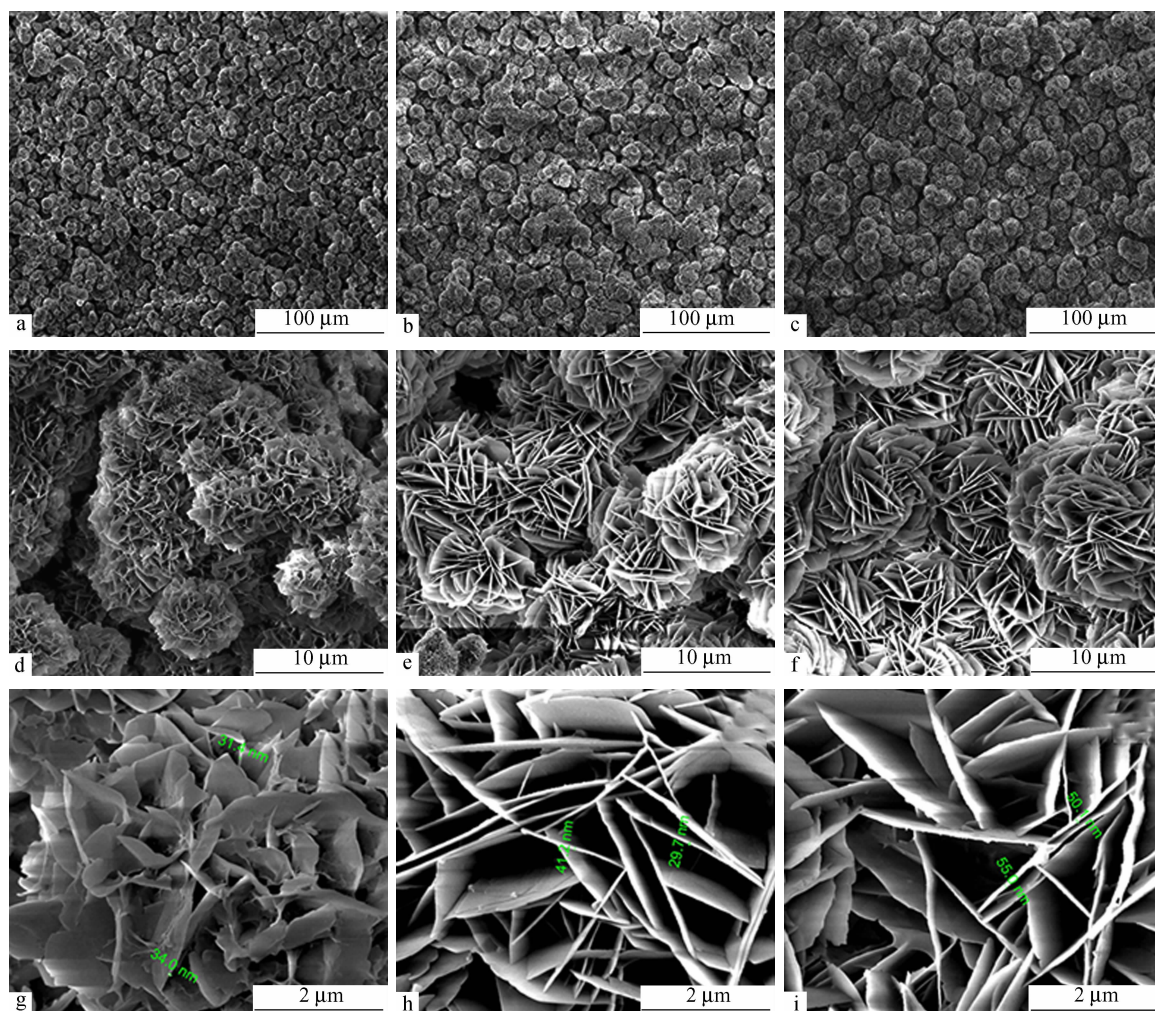


Fig. 6 The morphology of mineralized products on the surface of PLA40PC films in different time in $2 \times$ SBF of pH = 6.8 after 1 day: (a), (d) and (g); after 3 days: (b), (e) and (h); after 5 days: (c), (f) and (i)

2.4 矿化完善过程

PLA₄₀PC 表面矿化物随时间的变化如图 6 所示. 结果说明 PLA₄₀PC 很容易诱导羟基磷灰石成核和生长. 形成的羟基磷灰石呈球形颗粒, 直径几乎一致; 1 天、3 天、5 天的球形颗粒大约为 5, 8 和 10 μm , 颗粒间紧密程度随着时间的增长增大. 放大后可以看到随着时间的增长晶片由薄、参差不齐变宽、变厚.

3 结论

含磷脂酰胆碱的聚乳酸 (PLA-PC) 与聚乳酸

(PLA) 一样可诱导矿化. 在链长相同的情况下, PLA-PC 由于分子中磷脂酰胆碱存在, 有利于晶核的形成和晶体的生长, 诱导矿化优于 PLA. 在 PLA-PC 表面形成的矿化物为羟基磷灰石 (HAP), HAP 呈球形, 片状晶体组成, 其组成和结构与天然的 HAP 类似, 但结晶度较低. 并随矿化时间延长, HAP 晶粒逐渐增大, 晶片厚度也逐渐变大. PLA-PC 材料有潜力作为可降解的骨组织工程支架.

REFERENCES

- 1 Jukka V, Antti O, Harri K. *Macromol Biosci*, 2004, 4: 208 ~ 217
- 2 Wei J C, Sun J R, Wang H J, Chen X S, Jing X B. *Chinese J Polym Sci*, 2010, 28 (4): 499 ~ 507
- 3 Chen N C, Chen Y W, Wang L J, Luo X L. *J Mater Sci*, 2009, 44 (23): 6317 ~ 6324
- 4 Zong M M, Gong Y K. *Chinese J Polym Sci*, 2011, 29 (1): 53 ~ 64
- 5 Iwasaki Y, Tojo Y, Kurosaki T, Nakabayashi N. *J Biomed Mater Res*, 2003, 65 A: 164 ~ 169
- 6 Luo Juan (罗娟), Wang Lijian (王立坚), Chen Yuanwei (陈元维), Luo Xiangling (罗祥林), Chen Niancao (陈年超), Wan Changxiu (万昌秀), Zhang Xiaohua (张小华). *Journal of Biomedical Engineering (生物医学工程学杂志)*, 2008, 25 (6): 1344 ~ 1348
- 7 Cao J, Chen Y W, Chen N C, Luo X L. *e-Polymers*, 2010, no. 074
- 8 Tian Ye (田冶). *Fabrication and Cytocompatibility Evaluation of Surface Functionalization for PLA Film (表面功能化聚乳酸膜的构建及其细胞相容性评价)*. Doctoral Dissertation of Jinan University, 2008
- 9 Zhao Ming (赵铭), Zheng Qixin (郑启新), Guo Xiaodong (郭晓东), Quan Daping (全大萍), He Jie (郝杰), Wang Yuntao (王运涛). *Chinese Journal of Biomedical Engineering (中国生物医学工程学报)*, 2005, 24 (2): 145 ~ 149
- 10 Chai Shigai (柴仕淦), Zhang Jinzhi (张金枝), Pi Mengwei (皮蒙唯), Yang Tingting (杨婷婷), Yuan Jianjun (袁建军), Chen Shiyuan (程时远). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2010, (2): 178 ~ 184
- 11 Watanabe J, Norderberg F, Atthoff B, Bowden T, Hilborn J, Ishihara K. *Mater Sci Eng C*, 2007, 27: 227 ~ 231
- 12 Shi X, Jiang J, Sun L, Gan Z H. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 85 (1): 73 ~ 80
- 13 Cui W G, Li X H, Xie C Y, Zhuang H H, Zhou S B, Weng J. *Biomaterials*, 2010, 31 (17): 4620 ~ 4629
- 14 Huang Zhiliang (黄志良), Wang Dawei (王大伟), Liu Yu (刘羽). *Chinese Journal of Inorganic Chemistry (无机化学学报)*, 2002, 18 (5): 469 ~ 473
- 15 Maeda H, Kasuga T, Nogami M, Hibino Y, Hata K L, Ueda M, Ota Y. *J Mater Res*, 2002, 17 (4): 727 ~ 730

STUDY ON INDUCING MINERALIZATION OF POLYLACTIDE CONTAINING PHOSPHORYLCHOLINE

Yong-bing Qiu¹, Zhi Qiu¹, Yuan-wei Chen¹, Xiang-lin Luo^{1,2}

(¹ College of Polymer Science and Engineering of Sichuan University,

² National Key Laboratory of Polymer(Sichuan University), Chengdu 610065)

Abstract Polylactide containing phosphorylcholine (PLA-PC) and polylactide (PLA) were synthesized with lactide (LA) as monomer, glycerophosphorylcholine and 1,4-butanediol as ring-opening initiators respectively. The comparison investigation of inducing mineralization on PLA-PC and PLA films was conducted. The result demonstrated that mineralized products could form on the film of PLA-PC as well as on the film of PLA in the simulated body fluid (SBF) of pH 6.8. Moreover, formation of the mineralized products was easier on the film of PLA-PC than on the film of PLA. The reason for that is phosphorylcholines can migrate to the surfaces of polymers when PLA-PC contacts with water, and PLA-PC can combine with more Ca^{2+} than PLA because phosphoryl in PLA-PC can combine with Ca^{2+} owing to the interaction between negative charge and positive charge. Fourier-transform infrared (FTIR), X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM) were used to characterize the mineralized products formed on the surface of PLA-PC films. The results showed that the mineral crystal was hydroxylapatite (HAP) and the crystal had a laminated structure. PLA-PC films are good for nucleation and development of crystals. The crystalline grains and crystalline thickness grew with increasing mineralization time. Therefore, PLA-PC is a promising biodegradable scaffolds material for bone tissue engineering.

Keywords Polylactide, Phosphorylcholine, Inducing mineralization, Hydroxylapatite