

载不同浓度香丹注射液磷酸钙骨水泥性能研究

李茂红^{1,2}, 屈树新², 姚宁^{2,3}, 郭悦华², 张涛², 翁杰²

(西南交通大学 1. 峨眉校区, 峨眉 614202; 2. 材料科学与工程学院, 材料先进技术教育部重点实验室, 成都 610031; 3. 生命科学与工程学院, 成都 610031)

摘要: 研究载不同浓度香丹注射液(简称香丹)磷酸钙骨水泥(CPC)的理化性能和药物释放, 为优化CPC中载入香丹浓度提供理论依据。将香丹与CPC主要原料之一磷酸氢钙混合烘干代替磷酸氢钙制得一系列载不同浓度香丹的CPC, 香丹浓度范围在0.05~0.5 mL/g。采用Gilmore针、万能材料力学试验机、X射线衍射仪、傅立叶红外光谱仪表征载不同浓度香丹CPC的理化性能, 用扫描电镜观察微观形貌, 测定载不同浓度香丹CPC的药物释放。结果表明CPC凝结时间随香丹浓度的增加而延长, 浓度不高于0.2 mL/g的CPC样品凝结时间符合临床要求; 抗压强度随香丹含量的增加而增加; 香丹加入对CPC转化没有明显影响, 但导致水化产物晶体形貌从颗粒状松散搭接转化为片状交织, 且浓度越高片状晶体越多。在药物释放的最初4h, 载入香丹浓度范围为0.1~0.5 mL/g的CPC其释药量符合临床需要。因此, 载入香丹浓度范围为0.1~0.2 mL/g的CPC凝结时间符合临床要求, 比空白CPC具有更高的抗压强度, 在初阶段药物释放量符合治疗需求。

关键词: 磷酸钙骨水泥; 香丹注射液; 性能; 浓度; 药物释放

中图分类号: TB321; R944

文献标识码: A

Properties of Calcium Phosphate Cement with various Concentrations of Xiangdan Injection

LI Mao-Hong^{1,2}, QU Shu-Xin², YAO Ning^{2,3}, GUO Yue-Hua², ZHANG Tao², WENG Jie²

(1. Emei campus, Southwest Jiaotong University, Emei 614202, China; 2. Key Lab of Advanced Technologies of Materials, Ministry of Education, School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 3. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

Abstract: Effects of the concentrations of Xiangdan injection on properties of calcium phosphate cement (CPC) and the drug release rate were investigated, which would offer the theory evidence for optimizing the concentration of Xiangdan in CPC. Xiangdan and calcium hydrogen phosphate (DCPD) were mixed and dried to prepare Xiangdan-loaded DCPD which was subsequently used to prepare CPCs containing various concentrations of Xiangdan. The properties of CPCs with various Xiangdan concentrations were characterized by Gilmore needles, universal material mechanical machine, X-ray diffraction (XRD), Fourier-transform infrared spectrometer (FT-IR), and Scanning electron microscope (SEM). The *in vitro* drug release was studied. The setting time increased with increasing Xiangdan concentration in CPC, while the setting time at a concentration of or below 0.2 mL/g could meet the clinic requirement. The compressive strength increased with increasing Xiangdan concentration in CPC. No significant difference in the phase component and conversion degree was observed in the hydrated CPC with and without Xiangdan. SEM tests found that the morphology of crystals changed from particles to plates with the increase of Xiangdan concentration in CPC. In the first 4h, the *in vitro* release of Xiangdan from CPC with a Xiangdan concentration of 0.1–0.5 mL/g could satisfy with the clinic requirement. It can be concluded that both the properties of CPC and the *in vitro* release of Xiangdan from CPC could meet the clinical applications in the primary stage when Xiangdan concentrations were in the range of 0.1–0.2 mL/g.

Key words: calcium phosphate cement; xiangdan injection; property; concentration; drug release

磷酸钙骨水泥 (calcium phosphate cement, CPC) 具有自凝结性、可任意塑型,产物是与骨无机成分类似的羟基磷灰石,是一种优良的骨填充材料. CPC 因在制备过程中无需经受高温,利于药物在制备过程中载入而均匀分布于整个材料,所以它同时又是一种优良的骨科药物载体^[1]. 而合并软组织损伤的范围广泛及程度严重的开放性骨折、严重粉碎性骨折等情况导致的骨不连接,如仅进行骨填充不能满足临床所需,还需辅以药物治疗以促进骨折愈合^[2]. 在传统中医学中,常用不同的中药促进骨折愈合和治疗骨科疾病^[3-4]. 由于局部给药无需通过血液循环直接到达病灶部位利于提高药物疗效,已有一些研究者添加中药至 CPC 原材料或 CPC 中制备具有促进骨折愈合作用的骨填充材料. Lin 等^[5]在磷酸氢钙粉末中载入中药骨碎补以促进骨折愈合. 任鹏宇等^[6]在 CPC 中加入中药丹红注射液以促进骨折愈合. 姜红江等^[7]在 CPC 中加入复方丹参促进骨折愈合. 本课题组也开展了载中药丹参磷酸钙和磷酸钙骨水泥的研究^[8-10].

刘玉荣等^[11]研究发现丹参提取物中的丹酚酸 B 等具有促进成骨细胞增殖、分化和利于提高其碱性磷酸酶活性的作用,有利于促进骨折愈合,并具有剂量依赖关系. 本课题组前期研究选择以丹酚酸 B 为主要成分的香丹注射液 (简称香丹) 载入 CPC 中制备可促进骨折愈合的 CPC,发现香丹载入后会对 CPC 的理化性能产生影响^[10]. 但载入不同浓度的香丹注射液对 CPC 理化性能的影响尚不清楚. 有文献研究表明载入药物浓度不同对 CPC 的性能影响不同,如: Panzavolta 等^[12]研究发现载入不同浓度的阿伦磷酸钠和帕米磷酸钠后, CPC 的理化性能发生变化的程度不同. Young 等^[13]研究发现载洗必太浓度不同的 CPC 具有不同的理化性能. 而载药 CPC 的凝结时间和抗压强度等理化性能及药物释放是决定是否具有临床应用前景的重要因素. 本实验研究添加不同浓度香丹的 CPC 的理化性能和药物释放,为优化载入浓度制备具有临床应用前景的载香丹 CPC 提供理论依据.

1 材料与实验方法

1.1 材料制备

本研究采用 D 型磷酸钙骨水泥 (CPC) 配方,固相配比为 α -磷酸钙 58wt%、磷酸氢钙 (calcium hydrogen phosphate, DCPD) 25wt%、碳酸钙 8.5wt%、羟基磷灰石 (HA) 8.5wt% 的混合粉末^[14],所有粉末原料粒径均小于 75 μm . 骨水泥液相为磷酸氢二钠和磷酸二氢钠浓度均为 0.1mol/L 的混合水溶液;液/固比为 0.25mL/g. 固化前固相先用漩涡混合器振荡 12h,充分混合均匀,固液相混合调和成浆体并充入圆柱形塑料模具中,加一定压力排除气泡后,将样品置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 100% 的恒温培养箱中水化 24h,制

得空白 CPC. 载各种浓度香丹 CPC 的制备是通过 DCPD 与不同量香丹混合烘干代替 DCPD 制得. 香丹添加量与 DCPD 的比例,及按相应比例计算出的 CPC 载香丹浓度和试样编号如表 1 所示.

1.2 性能测试与结构表征

(1) 凝结时间,测试参照 Khairoun 等^[14]采用的 Gilmore 针进行测试,每组测 3 个样品取平均值. (2) 抗压强度,用 Instron 万能材料力学试验机 (5567 型) 测定,每组测 3 个样品取平均值. (3) 样品的转化,用 Philips X 射线衍射仪 (XRD, χ' Pert Pro 型) 和 Nicolet 红外光谱仪 (FTIR, 5700 型) 进行表征. (4) 微观结构和形貌,采用 Fei 扫描电镜 (SEM, Quanta 200 型) 观察.

1.3 载各种浓度香丹 CPC 体外药物释放

将质量为 0.5g 的载各种浓度香丹 CPC 放入离心试管中,加入 25mL 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer solution, PBS, pH = 7.4 \pm 0.1),置于温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、振荡速率为 100r/min 的恒温水浴振荡器中. 在预定时间点,用相同体积的 PBS 溶液替换试管内的溶液,用紫外-可见分光光度计 (UV-1901 型) 测定各释放液吸光度值 (λ_{max} = 280nm),以 PBS 溶液作空白对照. 根据香丹标准曲线计算其累积释放浓度.

2 结果和讨论

2.1 香丹浓度对 CPC 凝结时间的影响

图 1 出示了载各种浓度香丹 CPC 样品的初凝时间 (I) 和终凝时间 (F),从图中可看出 I 和 F 随香丹浓度的增加而增加. t 检验,发现除最低浓度 0.05mL/g 的载香丹 CPC 样品外,其余样品初凝和终凝时间均与空白样品有显著性差异 ($P < 0.05$). 香丹的主要成分是丹参的水溶性提取物,主要包括丹酚酸 B、原儿茶醛等,这些成分均含有大量的极性基团 (OH、COOH). 黄粤等^[15]研究发现,在 CPC 中载入含有大量极性基团的药物,它会在固-液表面产生正吸附,界面上的药物浓度增加,表面自由能降低,因而增加了体系的热力学稳定性,使整个体系向分散稳定方向进行,使材料的凝结时间延长. 这也可能是香丹浓度增加 CPC 凝结时间延长的原因. 在研究浓

表 1 载各种浓度香丹 CPC 成分和试样编号
Table 1 The code and compositions of the five groups of Xiangdan-loaded CPC samples

Code	DCPD/ g	Xiangdan/ mL	Concentrations of Xiangdan in CPC/(mL \cdot g ⁻¹)
0	10.00	0.00	0.00
1	10.00	2.00	0.05
2	10.00	4.00	0.10
3	10.00	8.00	0.20
4	10.00	20.00	0.50

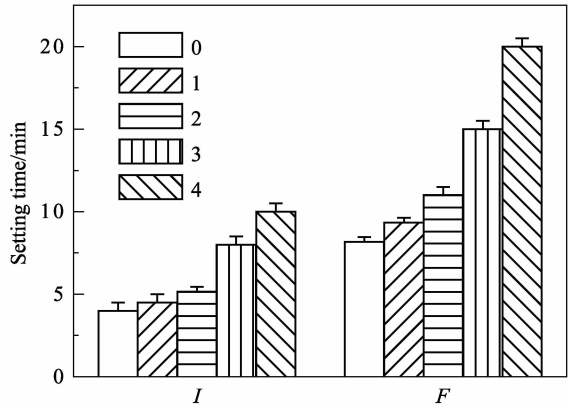


图 1 载各种浓度香丹 CPC 的初凝时间和终凝时间
Fig.1 The initial (*I*) and final (*F*) setting time of CPC with various concentrations of Xiangdan injection
(0) Without Xiangdan injection; (1) 0.05mL/g; (2) 0.1mL/g; (3) 0.2mL/g; (4) 0.5mL/g

度范围内,仅浓度为 0.5mL/g CPC 样品凝结时间大大超出 CPC 临床应用范围,浓度范围 0.05 ~ 0.2mL/g CPC 样品基本符合临床应用需要的初凝时间(*I*)范围 $4 \leq I \leq 8 \text{min}$ 和终凝时间(*F*)范围 $10 \leq F \leq 15 \text{min}$ [16] .

2.2 香丹浓度对 CPC 抗压强度的影响

图 2 出示了各样品的抗压强度,从图中可看出,抗压强度随药物含量的增加而增高,而且载各种浓度香丹 CPC 样品间均存在显著性差异 ($P < 0.05$) .推测其原因之一为 CPC 流变性随香丹含量的增大而增加,有利于气体的进一步排出,使结构更加致密 [17] .同时因香丹中含有羧基有利于与钙离子发生键接,形成不可溶的三维网络结构从而增强产物的强度 [18] .

2.3 香丹浓度对 CPC 转化的影响

图 3 出示了载各种浓度香丹 CPC 样品在 400 ~

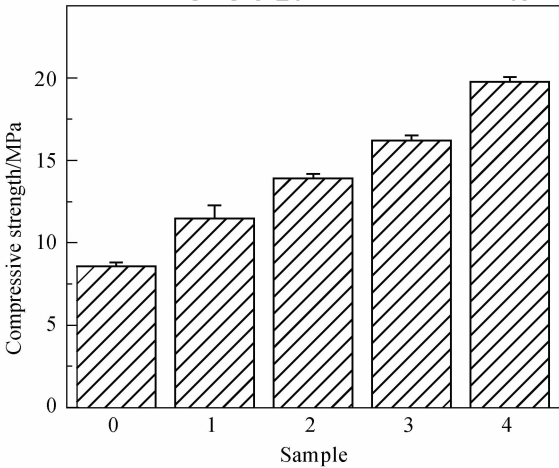


图 2 载各种浓度香丹 CPC 的抗压强度
Fig.2 Compressive strength of CPC with various concentrations of Xiangdan injection
(0) Without Xiangdan injection; (1) 0.05mL/g; (2) 0.1mL/g; (3) 0.2mL/g; (4) 0.5mL/g

4000cm⁻¹范围内的红外吸收图谱.从图中可看出,空白样中主要为 OH⁻、PO₄³⁻、HPO₄²⁻、CO₃²⁻ 等的吸收峰,载药样品中属于 OH⁻、PO₄³⁻、HPO₄²⁻、CO₃²⁻ 的吸收峰依然存在,并未发生红移或蓝移.只是浓度较大的 3 和 4 号样品在 2924cm⁻¹处出现了新的吸收峰,此峰属于香丹中的 CH₂ 峰.综上所述表明香丹加入并未对 CPC 转化后的成分产生明显影响.

图 4 出示了水化 24h 后载各种浓度香丹 CPC 样品的 XRD 图谱.根据图中空白样品的特征衍射峰位置与标准卡片相对应,可看出主要为未转化的 α-TCP 和少量 DCPD 以及新形成的 HA.比较发现载各种浓度香丹 CPC 和空白 CPC 衍射峰位置基本一致,说明药物加入并未对 CPC 的水化产物成分产生影响,这和红外检测结果是一致的.仅有一些衍射峰强度出

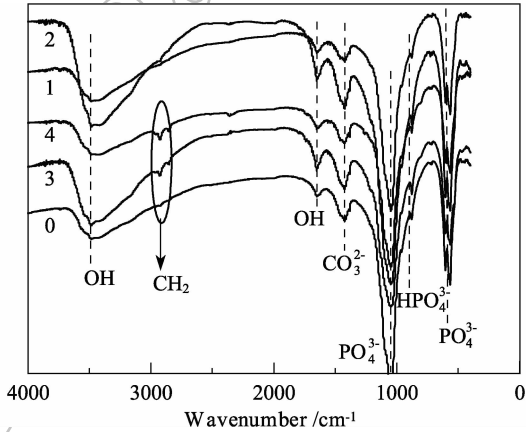


图 3 载各种浓度香丹 CPC 的红外吸收图谱
Fig.3 Fourier-transform infrared spectra (FT-IR) of CPC with various concentrations of Xiangdan injection
(0) Without Xiangdan injection; (1) 0.05mL/g; (2) 0.1mL/g; (3) 0.2mL/g; (4) 0.5mL/g

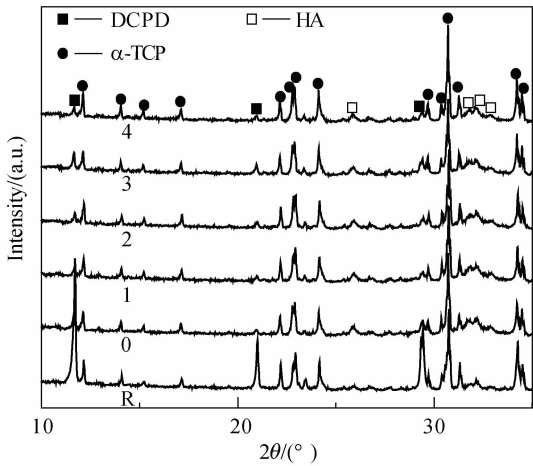


图 4 水化 24h 后载各种浓度香丹 CPC 的 XRD 图谱
Fig.4 XRD patterns of 24h-hydrated CPC with various concentrations of Xiangdan injection
(R) Solid powder of CPC; (0) Without Xiangdan injection; (1) 0.05mL/g; (2) 0.1mL/g; (3) 0.2mL/g; (4) 0.5mL/g

现微弱差异,说明香丹对 CPC 转化程度和产物结晶度等影响不明显.

由于本研究液/固比较低导致 CPC 转化率较低^[19],同时 CPC 中起始原料 α -TCP 通过高温烧结合备而结晶度高,并且是 CPC 起始原料中含量最高的成分,因此其衍射峰锐而高;而 HA 占起始原料比例很低,CPC 水化产物产生的 HA 由于是在室温条件下形成结晶度较低,因此 HA 衍射峰较低.另外对比 CPC 水化前固相混合物和水化 24h 后的 XRD 图谱,可以发现,DCPD 衍射峰强度明显下降,而 α -TCP 的衍射峰强度微弱下降,HA 衍射峰有一定增加,这是因 DCPD、碳酸钙溶度积($K_{sp}=1\times 10^{-7}$ 、 2.8×10^{-9})较大易溶解而沉积形成低结晶的 HA;而 α -TCP 溶度积($K_{sp}=2.0\times 10^{-29}$)较小相对不易溶解^[20],所以转化较少而衍射峰强度下降有限,这与 Doi^[21]和 Yokoyama 等^[22]的研究结果是一致的.而 CPC 植入体内后,在生理环境下将进一步转化为与人体骨无机成分类似的羟基磷灰石.

2.4 香丹浓度对 CPC 微观形貌的影响

图 5 示出了各 CPC 样品截面的 SEM 照片,从图中可以看出空白样 CPC 其晶体呈小颗粒状;颗粒间呈松散的搭接,颗粒间存在孔隙,故抗压强度相对较低.而添加药物后出现了片状晶体结构,并随丹参添加量的增加,片状、柱状晶体逐渐增加,且进一步增多、增厚.随之,晶体间形成交织状的相互缠结,使

得晶体间的接触位点增多,从而使抗压强度增大,这和宋志国等^[23]的研究结果是一致的.晶体形貌主要受成核剂、晶体成核和生长环境等因素的影响.邵慧芳等^[24]研究发现一些晶体生长调节剂具有诱导晶体定向生长的作用而导致强度增大;当液/固比较小时,晶体的生长不是在完全的溶液环境中自由生长,而主要是在固态环境中生长,易受周围环境的影响而使晶体微观形貌受到影响^[25].结合本研究,香丹主要包括丹参的水溶性成分如丹酚酸 B、原儿茶醛等,这些成分可能起到类似晶体生长调节剂的作用,另由于 CPC 的液/固比较低,导致水化后的 CPC 的晶体形貌发生改变,从而提高其强度,具体的机理还有待进一步研究.当 CPC 中香丹浓度达到 0.5mL/g 时,产物形成的片状晶体已经搭接成一个整体,将利于进一步增强 CPC 的抗压强度.这可能是 CPC 抗压强度随香丹浓度增加而增大的原因之一.

2.5 载各种浓度香丹 CPC 体外药物释放

图 6 示出了载各种浓度香丹 CPC 的体外累积释放图,其中纵坐标为香丹的体积浓度(V/V).从图中可看出,随载入香丹浓度增加,香丹释放速率和释放量也增加.而载各种浓度香丹的 CPC 均在释放初阶段即最初的 48h 释放速率较大,这可能主要是表面 CPC 和表面附近的香丹释放;而释放 48h 后香丹释放则进入平缓期,这可能是距离表面较远的香丹从 CPC 中逐渐缓慢释放.根据刘玉荣等^[26]的研究

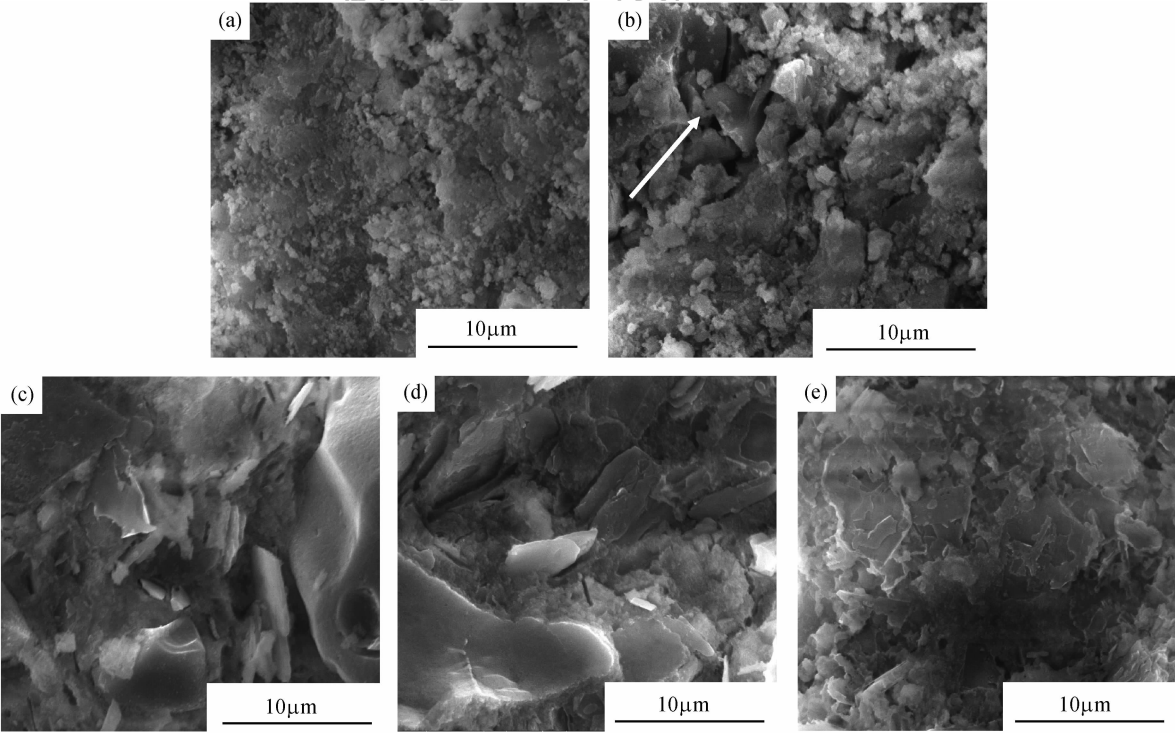


图 5 载各种浓度香丹 CPC 的 SEM 照片

Fig. 5 SEM images of CPC with various concentrations of Xiangdan

(a) Without Xiangdan injection; (b) 0.05mL/g; (c) 0.1mL/g; (d) 0.2mL/g; (e) 0.5mL/g

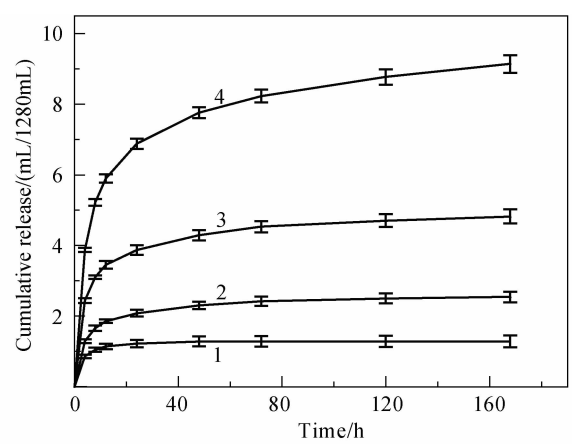


图6 载各种浓度香丹 CPC 的体外累积释放图
Fig.6 *In vitro* cumulative release of Xiangdan from CPC with various concentrations of Xiangdan with time
(1) 0.05mL/g; (2) 0.1mL/g; (3) 0.2mL/g; (4) 0.5mL/g

结果发现,当香丹注射液的体积浓度为 1/160 和 1/320 时可促进骨髓细胞的增殖.当体积浓度为 1/640 和 1/1280 时可促进骨髓细胞的增殖和分化,而体积浓度超过 1/160 则反而对细胞具有毒性.从图 6 中可看出,香丹载入浓度在 0.1~0.5mL/g 范围的 CPC,其在最初的 4h 释放出的药物量均在利于细胞增殖的范围内.而后期阶段,因药物释放进入体液后会发生分解,而且植入体内还需考虑香丹在体内的代谢作用;因此有必要对香丹主要成分的分解动力学和植入体内后的药物动力学进行研究才能确定达到治疗所需载入 CPC 中的香丹浓度.

3 结论

- 1) 通过在骨水泥固相成分之一中加载香丹,可制备载入不同浓度香丹的 CPC,并可在较大范围调控其浓度;
- 2) 结果表明,随香丹含量增加,骨水泥凝结时间延长,抗压强度增大,但并未对骨水泥转化产生明显影响,只是影响了产物的结晶形貌;
- 3) 载入香丹浓度范围在 0.1~0.2mL/g 的 CPC 具有适宜的凝结时间和较高的抗压强度,在初阶段药物释放量符合治疗需求,具有临床应用潜能.

参考文献:

[1] Ginebra M P, Traykova T, Planell J A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems; a review. *J. Control Release*, 2006, **113**(2): 102-110.
[2] 时述山,胥少汀.实用骨与软骨移植.北京:人民军医出版社,2002:189.
[3] 黄兆胜,华碧春,冼建春.骨伤中草药与验方.福州:福建科学技术出版社,2004:6-182.
[4] 刘向前.骨伤科常用中药配伍运用.北京:人民军医出版社,

2007:251-318.
[5] Lin F H, Dong G C, Chen K S, *et al.* Immobilization of Chinese herbal medicine onto the surface-modified calcium hydrogenphosphate. *Biomaterials*, 2003, **24**(3): 2413-2422.
[6] 任鹏宇,刘娟,刘彦宁,等.丹红注射液-磷酸钙骨水泥释放体系的力学性能、显微结构及体外释放.中国组织工程研究与临床康复,2009, **13**(3): 487-492.
[7] 姜红江,黄相杰,谭远超,等.磷酸钙骨水泥复方丹参缓释体的制备及性能评价.中国修复重建外科杂志,2007, **21**(10): 1113-1117.
[8] Qu S X, Weng J, Feng B, *et al.* Preliminary study of calcium phosphate immobilized with Chinese medicine. *J. Mater. Sci.* 2005, **40**(11): 3035-3037.
[9] Li M H, Qu S X, Shen R, *et al.* Study on synthesis of calcium phosphate biomaterials containing SMB. *Key Eng. Mat.*, 2007, **330-332**(2): 1033-1036.
[10] 李茂红,屈树新,姚宁,等.含丹参磷酸钙骨水泥的制备和表征.生物医学工程与临床,2005, **9**(3): 132-135.
[11] Liu Y R, Qu S X, Maitz M F, *et al.* The effect of the major components of *Salvia Miltiorrhiza* Bunge on bone marrow cells. *J. Ethnopharmacol.* 2007, **111**(3): 573-583.
[12] Panzavolta S, Torricelli P, Bracci B, *et al.* Alendronate and Pamidronate calcium phosphate bone cements: setting properties and *in vitro* response of osteoblast and osteoclast cells. *J. Inorg. Biochem.*, 2009, **103**(1): 101-106.
[13] Young A M, Ng P Y J, Gbureck U, *et al.* Characterization of chlorhexidine-releasing, fast-setting, brushite bone cements. *Acta. Biomater.*, 2008, **4**(4): 1081-1088.
[14] Khairoun I, Driessens F C M, Boltong M G, *et al.* Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 1999, **20**(4): 393-398.
[15] 黄粤,刘昌胜,邵慧芳,等.妥布霉素对磷酸钙骨水泥性能的影响.中国生物医学工程学报,2002, **21**(5): 417-421.
[16] Ginebra M P, Fernández E, Boltong M G, *et al.* Compliance of an apatitic calcium phosphate short-term cement with the short-time clinical requirements in bone surgery, orthopaedics and dentistry. *Clin. Mater.*, 1994, **17**(2): 99-104.
[17] 邵成堂,叶建东.磷酸钙骨水泥负载庆大霉素的制备与表征.材料导报,2008, **22**(3): 151-154.
[18] Dos Santos L A, de Oliveira L C, Rigo E C S. Influence of polymeric additives on the mechanical properties of α -tricalcium phosphate cement. *Bone*, 1999, **25**(2Suppl): 99S-102S.
[19] Takechi M, Miyamoto Y, Ishikawa K, *et al.* Effects of added antibiotics on the basic properties of anti-washout-type fast-setting calcium phosphate cement. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998, **39**(2): 308-316.
[20] 浙江大学化学系分析化学教研室.分析化学手册第一分册.北京:化学工业出版社,1979:55.
[21] Doi Y, Shimizu Y, Moriwaki Y, *et al.* Development of a new calcium phosphate cement that contains sodium calcium phosphate. *Biomaterials*, 2001, **22**(8): 847-854.
[22] Yokoyama Atsuro, Yamamoto Satoru, Kawasaki Takao, *et al.* Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials. *Biomaterials*, 2002, **23**(4): 1091-1101.
[23] 宋志国,周大利,尹光福,等.含盐酸四环素 α -TCP 骨水泥的理化性能.功能材料,2004, **35**(1): 111-113.
[24] 邵慧芳,刘昌胜,黄粤,等(SHAO Hui-Fang, *et al.*).羟基磷灰石晶种的形貌控制及其对磷酸钙骨水泥的原位增强研究.无机材料学报(Journal of Inorganic Materials), 2001, **16**(5): 933-939.
[25] 王文魁,王继扬,赵珊茸.晶体形貌学.武汉:中国地质大学出版社,2001:120.
[26] 刘玉荣.多孔磷酸钙骨水泥及丹参/磷酸钙骨水泥复合物的研究.成都:西南交通大学硕士论文,2006.