

无定形磷酸钙的硬脂酸表面改性及其改性后的稳定性研究

李延报^{1,2}, 李怀栋¹, 程新¹, 刘文浩¹, 李东旭¹, 许仲梓¹

(1. 南京工业大学材料科学与工程学院, 材料化学工程国家重点实验室, 南京210009; 2. 东南大学生物科学与医学工程学院, 江苏省生物材料与器件重点实验室, 南京210096)

摘要: 将硬脂酸溶于热乙醇并以乙醇为反应介质在回流的条件下对无定形磷酸钙(ACP)粉末进行表面改性. 利用活化率、接触角、红外谱图和热分析等研究了 ACP 的表面改性效果. 结果表明 ACP 粉末表面有约 4wt% 的硬脂酸存在, 硬脂酸可以与 ACP 以 $-\text{COOCa}$ 和 HPO_4^{2-} 的形式发生化学作用, 并在 ACP 粉末表面形成一层硬脂酸憎水层. 通过红外谱图、热分析和 X 射线衍射等研究了表面改性对 ACP 稳定性的影响. 发现采用乙醇回流法不会引起 ACP 的相转变, 改性 ACP 粉末可存放超过一年而不发生晶相转变, 这表明硬脂酸可以增强 ACP 的稳定性.

关键词: 无定形磷酸钙; 表面改性; 硬脂酸; 稳定性

中图分类号: TP174; R318

文献标识码: A

Surface Modification of Amorphous Calcium Phosphates by Stearic Acid and Their Stability

LI Yan-Bao^{1,2}, LI Huai-Dong¹, CHENG Xin¹, LIU Wen-Hao¹, LI Dong-Xu¹, XU Zhong-Zi¹

(1. State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Materials Science and Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China; 2. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Biomaterials and Biodevices, School of Biological Science and Medical Engineering, Southeast University, Nanjing 210096, China)

Abstract: The precipitated amorphous calcium phosphates (ACP) were modified by stearic acid (SA) at about 78°C for different times, using ethanol as reaction medium in a reflux setup. Modification effects of SA were investigated by activation ratio, contact angle, FTIR and TGA/DTA. The stability of the ACP powders before and after modification was examined by FTIR, XRD and TGA/DTA. The results show that the optimal adding amount of SA is 5 wt%, there are about 4 wt% SA on the surface of the ACP powders, and SA reacts with ACP to form $-\text{COOCa}$ and HPO_4^{2-} groups which leads to a hydrophobic coating form on the ACP surface containing the long alkyl chain of SA. The ethanol mediated reflux method does not induce phase conversion of ACP at about 78°C for 24h, and the modified ACP powders are still amorphous even after stored in air at room temperature for more than one year. It is proposed that SA existing on the surface of the ACP powders has higher ability to retard conversion of ACP into its crystalline polymorphous than β -CD due to the strong steric hindrance of the long alkyl chain of SA.

Key words: amorphous calcium phosphates; surface modification; stearic acid; stability

无定形磷酸钙(amorphous calcium phosphates, 简称 ACP)是骨矿化过程初期形成的一个过渡相,也是湿化学法合成磷灰石时形成的一种先驱体^[1]. ACP 具有优异的生物性能,尤其是生物活性与生物降解性能而广泛地应用于硬组织修复领域,其突出优点是可以根据合成条件有效控制其 Ca/P 比,以便获得合适的理化性能^[1]. 最近有学者将 ACP 用于生物降

解聚合物的填充,以中和后者在降解过程中产生的酸性降解产物,减轻甚至解决其植入体内后发生的无菌性炎症反应^[2-3]. 然而,ACP/聚合物复合材料界面状况不佳导致复合材料的力学性能大幅下降^[3]. 采用表面改性可以有效改变复合材料的相界面,提高后者的力学性能^[4]. 另外,ACP 还是一个在长时间内释放药物的药物载体,若对 ACP 的表面进行改

收稿日期: 2008-10-17, 收到修改稿日期: 2009-02-23

基金项目: 国家自然科学基金(50802042); 江苏省自然科学基金(BK2008379); 南京市医学科技发展重点基金(ZKX07016); 江苏省生物材料与器件重点实验室开放基金

作者简介: 李延报(1975-),男,博士,副教授. E-mail: ybli@njut.edu.cn, liyanbao@163.com

性可使其具有选择负载药物的性能,扩大其在药物载体领域的应用^[1].

用于生物材料的表面改性剂应满足以下要求:

(1) 无生理毒性;(2) 具有生物相容性;(3) 不能明显改变被改性物质的理化性能和生物性能;(4) 对于生物可降解物质的改性,表面改性剂还必须具有生物降解性.目前应用于生物材料的表面改性剂主要有硅烷偶联剂、钛酸酯偶联剂、磷酸酯以及某些大分子改性剂^[5-11].但是它们均不能很好地满足上述要求.比如,游离的小分子硅烷偶联剂对细胞具有生理毒性^[6];磷酸酯具有的强烈刺激性可能对生物组织不利;大分子虽然没有生理毒性和生物相容性的问题,但是有些大分子(如聚丙烯酸)会严重影响磷酸钙在模拟体液中磷灰石的沉积速率(即抑制了生物活性)^[7].比较成功的是利用 PEG 和 PLA 等表面接枝来改性磷酸钙^[9,11].但是采用表面接枝的实验过程比较复杂,而且反应条件较难控制.

最近,本课题组研究发现硬脂酸(stearic acid,简称 SA)既能有效改变羟基磷灰石粉末的表面极性,又不会改变羟基磷灰石的理化性能和生物活性,是一种良好的生物材料表面改性剂^[12].SA 是存在于人体内的一类脂肪酸,不存在生物相容性问题,而且其在人体内可以分解成二氧化碳和水并通过新陈代谢排出体外^[13].本工作采用 SA 对 ACP 进行表面改性,研究了表面改性效果和表面改性对改性后 ACP 稳定性的影响.

1 实验

1.1 ACP 的制备

ACP 的制备过程如下:先配制含有 20g/L β -环糊精(β -cyclodextrin,简称 β -CD)的 0.200mol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液,形成 Ca^{2+} - β -CD 溶液,然后将 0.133mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 溶液滴加到 Ca^{2+} - β -CD 溶液中,反应过程中用氨水保持 pH 值一直在 10.0 以上,初始 Ca/P 比为 1.500,在室温下反应 30min 后过滤,先水洗 3 次再乙醇洗 3 次,室温自然干燥至不再失重为止,储存备用.

1.2 ACP 的表面改性

先将一定量的 SA 溶解于 100mL 乙醇,再称取 5g 的 ACP 粉末分散在 SA 醇溶液中,将含有 ACP 粉末和 SA 的乙醇悬浮液在磁力搅拌的条件下加热回流至 12h 后,过滤,用热乙醇洗涤 3 次以去除未反应和吸附的 SA,室温干燥备用.

1.3 表征方法

表面改性效果用活化率来表示.活化率根据

HG/T2567-94(《工业活性沉淀碳酸钙》)标准中的规定并作适当修改来表征:称取 1g 改性 ACP 粉末置于 200mL 去离子水中,先利用磁力搅拌 20min,再在超声波作用下分散 15min,以使 ACP 粉末充分分散在水介质中.再将充分分散的 ACP 悬浮液静置约 12h 后,取出漂浮在水面的 ACP 粉末,置于 120℃ 下干燥 24h 后称重,计算即得活化率.具体计算方法参见文献^[12].

用模具在 4MPa 下将改性 ACP 粉末压制成 $\phi 10\text{mm}$ 的薄片样品,使用德国产 Krüss DSA100 润湿角测量仪测量水对改性 ACP 粉末的接触角,水滴大小为 $2\mu\text{L}$.红外光谱采用 VECTORTM 22 型傅立叶变换红外光谱仪(Bruker 公司, KBr 压片法,扫描次数为 20,分辨率为 2cm^{-1} ,扫描范围 $400 \sim 4000\text{cm}^{-1}$)测量,改性前后 ACP 的物相采用 ARL X'TRA 型 X 射线衍射仪(美国热电公司, $\text{K}\alpha$ 铜靶,波长为 0.1542nm ,固体探测器,步进 0.01° ,电压 45kV,电流 35mA,扫描速度 $10^\circ/\text{min}$)表征.

2 结果和讨论

2.1 ACP 的改性效果

经过表面改性后的粉末由于其表面由极性转变为非极性状态,改变了其与水的表面张力而漂浮在水面.活化率愈大则说明具有非极性表面的粉末的量愈大,表明改性效果愈好.由图 1 可知,加入 1wt% 的 SA 时,改性效果不理想,活化率仅为 5%;当加入 3wt% 的 SA 后,活化率急剧增加到 60%,并在 SA 为 5wt% 时达到最大值为 65%,此后活化率不再增加.由此可见,SA 的最佳添加量为 3wt% 或 5wt%.

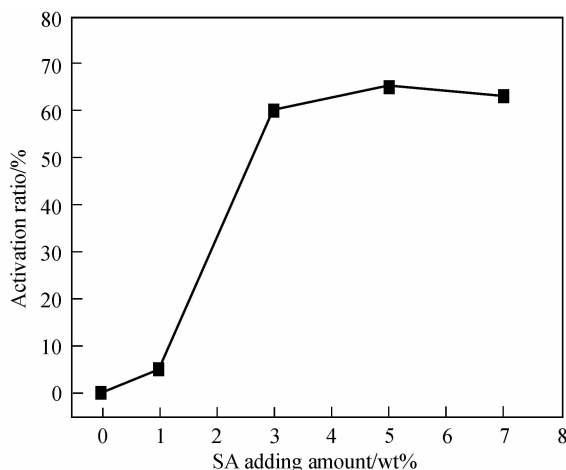


图1 经不同添加量的 SA 表面改性后 ACP 粉末的活化率

Fig.1 Activation ratios of the ACP powders after modified by different amounts of SA

表面接触角的变化可从宏观上对活化率的结果进行验证. 由于采用粉末压片的方法, 在添加 SA 量少时, 这时粉末表面仍是亲水的, 滴加在样品表面的水滴很快进入粉末中而无法测得接触角. 当 SA 添加量为 3wt% 时(见图 2), 接触角为 76°; 当 SA 添加量为 5wt% 时, 接触角增大幅度较大, 变为 116°; 当 SA 添加量为 7wt% 时, ACP 粉末接触角与 5wt% 时相比变化较小, 其值为 122°. 由此可见, SA 可以有效地改变 ACP 粉末的接触角. 综合活化率和接触角结果可知, SA 的最佳添加量为 5wt%.

图 3 是经过不同添加量 SA 改性后的 ACP 粉末的 FTIR 谱图. 随着 SA 添加量的增加, 2922、2850、1462 和 1417cm⁻¹ 处的吸收峰的强度逐渐增强, 这些振动峰位属于甲基和亚甲基基团^[14], 这表明在 ACP 粉末的表面有 SA 存在. 1036 和 565cm⁻¹ 处是 PO₄³⁻ 的特征吸收峰位^[12]. 值得指出的是, 在 1550 和 873cm⁻¹ 处出现了纯 SA 和未改性 ACP 粉末中均未出现的二个新的吸收峰, 且它们的吸收强度随着 SA 添加量的增加而逐渐增强. 根据文献报道, 前者属于羧酸钙(-COOCa)基团的特征吸收峰^[14], 后者是磷酸氢根(HPO₄²⁻)的特征吸收峰^[12]. -COOCa 基团应是

由 Ca²⁺ 与 -COOH 基团发生反应所得, HPO₄²⁻ 基团是由 PO₄³⁻ 与 -COOH 基团电离产生的 H⁺ 反应而得. 由此可见, SA 与 ACP 粉末发生了化学作用, 且经过热乙醇洗涤后仍然有 SA 存在其表面. 图 4 给出了典型的表面改性后 ACP 粉末的热失重曲线. 从图中可以看出, 在 200 ~ 500℃ 区间内有 8wt% 的失重是有机物的烧失所致. 这部分的失重由合成 ACP 时残存的 β-CD 和改性时留下的 SA 组成. 未改性的 ACP 中存在约 4wt% 的 β-CD^[15], 因此, 改性 ACP 粉末表面上的 SA 的量约为 4wt%.

2.2 表面改性对 ACP 稳定性的影响

由于 ACP 是一个不稳定相, 在水溶液中很容易通过溶解-再结晶的方式向晶态磷酸钙转变, 为此实验选择有机介质进行表面改性. 升高温度也有利于 ACP 向晶态的转变, 由于实验温度是在乙醇的沸点(约 78℃)下进行的, 因此, 有必要研究表面改性过程对 ACP 稳定性的影响.

有研究指出, 红外光谱技术在研究无定形物质的相转变时比 X 射线衍射技术更为有用和灵敏^[16-17]. 因此, 采用红外光谱仪研究了 ACP 粉末在

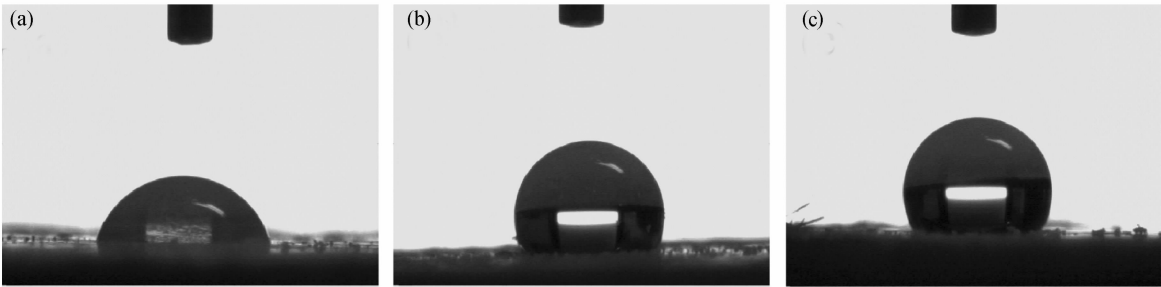


图 2 经不同添加量的 SA 表面改性后 ACP 粉末的接触角照片
Fig. 2 Contact angles of the ACP powders after modified by different amounts of SA
(a) 3wt%, 76°; (b) 5wt%, 116°; (c) 7wt%, 122°

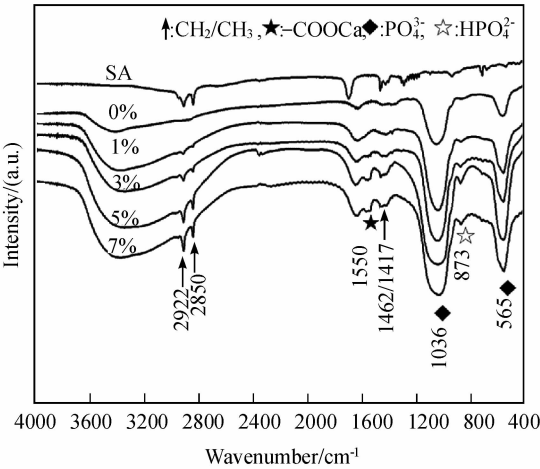


图 3 不同添加量的 SA 改性后 ACP 粉末的 FTIR 谱图
Fig. 3 FTIR spectra of the ACP powders after modified by different amounts of SA

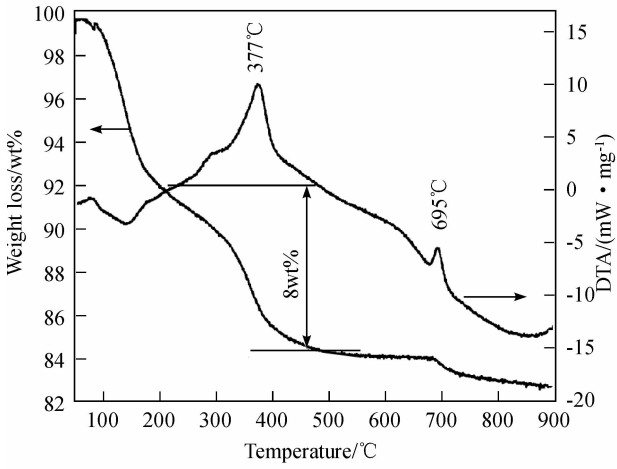


图 4 5wt% SA 改性后 ACP 粉末的 TG/DTA 曲线
Fig. 4 TGA/DTA curves of the ACP powders modified by 5 wt% SA

含有 5wt% SA 的乙醇介质中回流不同时间后的 FTIR 谱. 由图 5 可见, 随着回流时间的延长, 甲基、亚甲基基团 (\uparrow 标示) 的吸收强度逐渐增强. 1036 和 565cm^{-1} (\blacklozenge 标示) 处分别有一个未分裂的强吸收峰, 这是处于无定形环境下 PO_4^{3-} 的特征吸收峰位, 若 ACP 发生晶化则这两个吸收峰尤其是 565cm^{-1} 处的吸收峰会发生分裂^[16]. 这表明 ACP 在经过 24h 乙醇回流处理后仍然保持无定形结构. 图 4 所示的 DTA 曲线中在 695°C 处有个明显的放热峰, 这是由无定形物质结晶放热所致, 而且该结晶峰明显高于未改性 ACP 的结晶温度 (653°C)^[15], 这可能与改性后 ACP 粉末的稳定性增强有关. 由图 4 和图 5 可见, DTA 和 FTIR 的结果相互印证. 进一步研究了经过表面改性和未表面改性的 ACP 粉末放在室温条件下空气中存

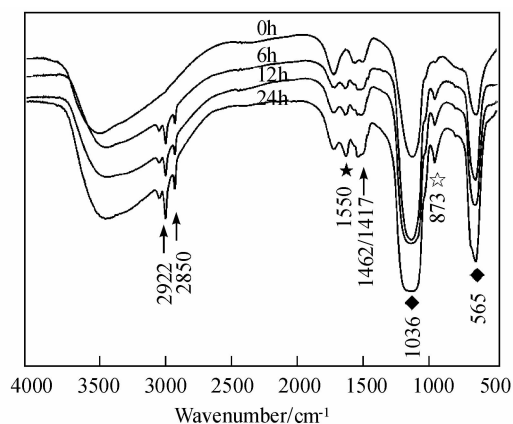


图5 ACP 粉末在含有 5wt% SA 的乙醇中回流不同时间后的 FTIR 谱图

Fig. 5 FTIR spectra of the ACP powders after modified by 5wt% SA in ethanol medium using reflux setup for different times

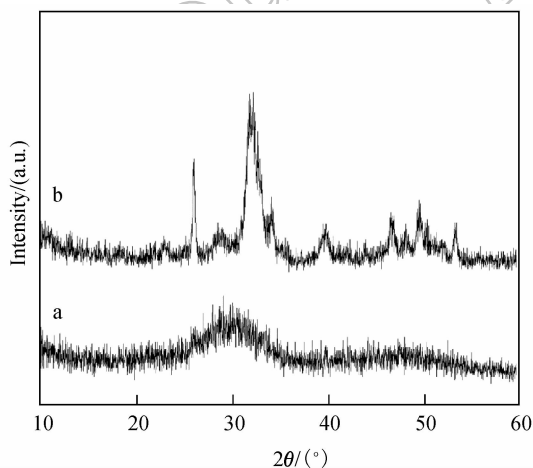


图6 经 5 wt% SA 改性前后的 ACP 粉末分别在室温条件下空气中存放一年后的 XRD 谱图

Fig. 6 XRD patterns of the ACP powders modified (a) and unmodified (b) by 5 wt% SA in ethanol medium using reflux setup for 12h and stored in air at room temperature for more than 1 year

放一年后的 XRD 谱图 (见图 6). 经过 SA 表面改性后的 ACP 粉末在存放一年后仍然保持无定形相, 而未改性 ACP 粉末已转变为磷灰石相.

2.3 ACP 的表面改性机理

一般地, 有机物通过物理吸附、化学吸附和化学反应等三种方式来实现对无机粉末的表面改性. 从改性效果来看, 化学反应通过化学键合将有机物和无机物链接起来, 比物理吸附和化学吸附具有更强的界面性能. 从图 1 和 2 可以看出 SA 可以有效地改变 ACP 的表面状态, 使其由亲水性向憎水性转变. 通过 FTIR 可以研究化学基团的状态以及它们之间的作用. FTIR 谱图 (图 3 和图 5) 中新出现的振动吸收峰是新产生的 $-\text{COOCa}$ 基团和 HPO_4^{2-} 基团所产生的, 它们可能是由图 7 所示的反应所得. 表面改性剂 SA 中的 $-\text{COOH}$ 基团先电离为 $-\text{COO}^-$ 和 H^+ , 然后 $-\text{COO}^-$ 与 ACP 粉末表面结构中的 Ca^{2+} 发生作用而形成 $-\text{COOCa}$ 键, H^+ 进入 ACP 粉末表面结构中, 与 PO_4^{3-} 形成 HPO_4^{2-} . 在 ACP 粉末的表面会形成一层由 $-\text{COOCa}$ 和 HPO_4^{2-} 组成的表面层 (如图 7 中的浅色部分, 深色部分代表 ACP 未受 SA 改性影响的部分), 而在表面层外则由 SA 的脂肪链组成的憎水层, 起到表面改性的目的.

为了去除 ACP 粉末表面存有的物理吸附的 SA, 在回流改性后, 经 3 次热乙醇溶解、洗涤后, ACP 粉末表面仍然存有约 4wt% 的 SA. 利用 SA 改性羟基磷灰石粉末可以获得 80% 左右的最佳活化率^[12], 而 SA 改性 ACP 粉末只有 65% 的最佳活化率, 这与 ACP 结构中的水有关. 活化率的测量采用水为介质, 则 ACP 结构中的水会较容易引导悬浮液中的水与 ACP 粉末浸润, 这导致活化率较羟基磷灰石的小.

2.4 表面改性对 ACP 稳定性的影响机理

ACP 是热力学上不稳定的亚稳定相, 在室温下极易向热力学稳定的磷灰石相转变. 一般采用添加适当的物质来延缓或是阻止 ACP 的相转变^[1]. ACP 的相转变机理存在两方面的观点: 有学者认为是溶解-再结晶的过程, 也有学者认为是其组成离子或是离子团发生空间扭转、迁移和排布的有序化过程^[1]. 未改性的 ACP 虽然在合成时加入了 $\beta\text{-CD}$ 作为稳定剂, 但其稳定作用是短暂的, 存放一年后已转变为

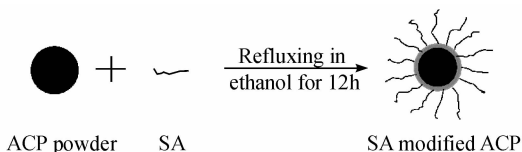


图7 ACP 粉末的表面改性机理示意图

Fig. 7 Schematic diagram of modification mechanism of the ACP powders by SA in ethanol

磷灰石相(见图6a),而SA表面改性后的ACP粉末存放一年后仍然保持无定形结构(见图6b),这与SA与ACP发生的化学作用有关。

由前面讨论可知,ACP粉末表面形成一层由 $-\text{COOCa}$ 和 HPO_4^{2-} 组成的表面层和SA的长脂肪链组成的憎水层(见图7所示)。这样的独特表面结构可能通过下述两个方面的途径来稳定ACP相:一方面,憎水层可以有效地阻止存放环境中的水进入ACP结构中,妨碍了ACP的溶解,阻止了ACP的相转变所需要的溶解-再结晶过程;另一方面,硬脂酸与ACP发生作用后形成的长脂肪链的亲水性的一 COOH 与钙离子发生化学作用,憎水性的长脂肪链的强大空间位阻效应强烈地阻碍了ACP结构单元 $[\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6]$ 团簇中离子或是离子团的扭转、迁移和排布,进而使 $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ 团簇不能发生有序化过程。这也是表面改性ACP粉末的结晶温度升高的原因所在。 β -CD可以溶于水,其亲水性比SA好得多,无法有效阻止环境中的水进入ACP结构中;另外,未改性ACP粉末中仅含有约4wt% β -CD,而改性ACP粉末中含有8wt%的有机物(4wt% SA + 4wt% β -CD),更多的有机物更有利于ACP的稳定。

3 结论

以乙醇为介质反应、在回流的条件下对ACP粉末进行表面改性。SA有效地改变了ACP粉末的表面极性。根据活化率和接触角结果可知,SA的最佳添加量为5wt%。SA与ACP粉末以 $-\text{COOCa}$ 和 HPO_4^{2-} 的形式发生化学作用,并在ACP粉末的表面形成含SA长脂肪链的憎水层,改性后ACP粉末的接触角可达 122° 。改性ACP粉末存放超过一年后仍然保持无定形结构,ACP表面中的SA对ACP具有良好的长效稳定作用。SA改性是否会影响ACP的其他理化性能需要

进一步研究,以便其应用于生物材料领域。

参考文献:

- [1] 李延报,李东旭,翁文剑(LI Yan-Bao, *et al.*),无机材料学报(Journal of Inorganic Materials), 2007, **22**(5): 775-782.
- [2] Linhart W, Peters F, Lehmann W, *et al.* J. Biomed. Mater. Res., 2001, **54**(2): 162-171.
- [3] 李延报. 可生物降解磷酸钙及复合材料的制备及性能研究. 杭州:浙江大学博士论文, 2004.
- [4] Wang M. Biomaterials, 2003, **24**(13): 2133-2151.
- [5] 廖建国,王学江,左奕,等(LIAO Jian-Guo, *et al.*),无机材料学报(Journal of Inorganic Materials), 2008, **23**(1): 145-149.
- [6] Dupraz A M P, Meer S A T, Wijn J R, *et al.* J. Mater. Sci.: Mater. Med., 1996, **7**(12): 731-738.
- [7] Kamitakahara M, Kawashita M, Kokubo T, *et al.* Biomaterials, 2001, **22**(23): 3191-3196.
- [8] Vaz C M, Reis R L, Cunha A M. Biomaterials, 2002, **23**(2): 629-635.
- [9] Liu Q, de Wijn J R, de Groot K, *et al.* Biomaterials, 1998, **19**(11/12): 1067-1072.
- [10] Tanaka H, Yasukawa A, Kandori K, *et al.* Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp., 1997, **125**(1): 53-62.
- [11] Hong Z K, Zhang P B, He C L, *et al.* Biomaterials, 2005, **26**(32): 6296-6304.
- [12] Li Y B, Weng W J. J. Mater. Sci.-Mater. Med., 2008, **19**(1): 19-25.
- [13] Zhang Q, Yie G Q, Li Y, *et al.* Int. J. Pharm., 2000, **200**(2): 153-159.
- [14] Kimura F, Umemura J, Takenaka T. Langmuir, 1986, **2**(1): 96-101.
- [15] 李延报,李东旭,张熙之,等. 无机化学学报, 2008, **24**(6): 986-989.
- [16] Li Y B, Wiliana T, Tam K C. Mater. Res. Bull., 2007, **42**(5): 820-827.
- [17] Addadi L, Raz S, Weiner S. Adv. Mater., 2003, **15**(12): 959-970.