

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
A61L 27/12 (2006.01)  
A61L 27/22 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810050858.3

[43] 公开日 2008 年 11 月 12 日

[11] 公开号 CN 101301489A

[22] 申请日 2008.6.23

[21] 申请号 200810050858.3

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625 号

[72] 发明人 陈学思 魏俊超 刘爱学 庄秀丽  
景遐斌

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公  
司

代理人 马守忠

权利要求书 1 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

一种表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料的制备方法

[57] 摘要

本发明提供了一种表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料及其制备方法。首先,利用含有氨基的硅烷偶联剂  $\gamma$ -氨基丙基三乙氧基硅烷处理纳米羟基磷灰石,在纳米羟基磷灰石表面引入氨基;然后,利用表面含有氨基的纳米羟基磷灰石引发  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸 N-羰基环内酸酐开环聚合,得到表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料。该方法具有很大的通用性,利用含有氨基的纳米羟基磷灰石引发其它氨基酸的 N-羰基环内酸酐,可以很容易地把不同功能的多肽通过化学键连接到羟基磷灰石表面,赋予其新的生物学性能,因此具有很好的应用价值。

1、一种表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料的制备方法，其特征在于，步骤和条件如下：1) 将硅烷偶联剂  $\gamma$ -氨基丙基-三乙氧基硅烷溶于体积比为 95:5~70:30 的乙醇和水的混合溶剂，室温搅拌 30 分钟，将是  $\gamma$ -氨基丙基-三乙氧基硅烷质量 0.5~3 倍的纳米羟基磷灰石加入到  $\gamma$ -氨基丙基-三乙氧基硅烷的溶液中，室温反应 3 小时，然后用氢氧化钠或氨水调节体系 pH 值为 9~10，室温反应 3 小时，抽滤，得到粗产物，于 130℃ 烘箱中烘 2 小时，然后再用乙醇洗涤，干燥，得到表面含有氨基的纳米羟基磷灰石；

2) 在氮气或氩气保护下将表面含有氨基的纳米羟基磷灰石加入到干燥的反应容器中，然后在氮气或氩气保护下把氯仿或二氧六环、或二甲基甲酰胺加入反应容器，超声 5~30 分钟，使表面含有氨基的纳米羟基磷灰石充分分散；所用有机溶剂都经无水处理；

3) 在氮气或氩气保护下，将 0.5~5 倍于表面含有氨基的纳米羟基磷灰石质量的氨基酸-N-羰基环内酸酐，溶解于氯仿、二氧六环或二甲基甲酰胺中；所用有机溶剂都经无水处理；

4) 将步骤 3) 配制的氨基酸-N-羰基环内酸酐溶液加入到步骤 2) 装有表面含有氨基的纳米羟基磷灰石的反应容器中，室温反应 12~72 小时，离心分离，去除上层清液，并用氯仿、二氧六环或二甲基甲酰胺洗涤，干燥，获得表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料。

2、如权利要求 1 所述的一种表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料的制备方法，其特征在于，所述的氨基酸-N-羰基环内酸酐为  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸-N-羰基环内酸酐、N<sup>o</sup>-苄氧羰基-赖氨酸-N-羰基环内酸酐或 L-苯丙氨酸-N-羰基环内酸酐。

## 一种表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料的制备方法

### 技术领域

本发明涉及一种表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料的制备方法

### 技术背景

羟基磷灰石具有优良的生物相容性和骨传导性，是脊椎动物骨和齿的主要成分，例如，人体骨中羟基磷灰石质量百分含量接近 60%，人牙齿的珐琅质表面羟基磷灰石质量分数约占 90%以上。因此，羟基磷灰石是理想的骨组织替代材料，但是羟基磷灰石脆性大、韧性不足、力学性能差。近年来，羟基磷灰石/聚合物复合材料有效地结合了羟基磷灰石的骨传导性和聚合物的韧性，可生物降解性等优点而成为骨修复材料的热点 (*Biomaterials*, 12, 841-847. *Biomaterials*, 15, 1197-1200. *Composites Science and Technology*, 65, 2385-2406. )。羟基磷灰石/聚合物复合材料的力学性能在很大程度上取决于无机粒子与聚合物的界面结合力,单纯的羟基磷灰石纳米粒子易团聚，与聚合物界面粘附力差，降低了复合材料的力学性能。因此对羟基磷灰石表面进行化学修饰引入有机分子，从而制备羟基磷灰石杂化材料具有重要意义 (*Chem. Mater.* , 18, 5111-5118)。通过硅烷偶联剂 (*J. Biomed. Mater. Res.*, 30, 231-238.)、聚乳酸 (*Polymer*, 45, 6699-6706.)、异腈酸酯 (*J. Biomed. Mater. Res.*, 40, 358-364.) 等对羟基磷灰石进行表面处理，制备杂化材料已有报道，但是通过开环聚合，制备表面接枝多肽的羟基磷灰石杂化材料还没有报道。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料的制备

方法。其具体技术方案如下：

1) 将硅烷偶联剂  $\gamma$ -氨基丙基-三乙氧基硅烷溶于体积比为 95:5~70:30 的乙醇和水的混合溶剂，室温搅拌 30 分钟，将是  $\gamma$ -氨基丙基-三乙氧基硅烷质量 0.5~3 倍的纳米羟基磷灰石加入到  $\gamma$ -氨基丙基-三乙氧基硅烷的溶液中，室温反应 3 小时，然后用氢氧化钠或氨水调节体系 pH 值为 9~10，室温反应 3 小时，抽滤，得到粗产物，于 130℃烘箱中烘 2 小时，然后再用乙醇洗涤，干燥，得到表面含有氨基的纳米羟基磷灰石。

2) 在氮气或氩气保护下将表面含有氨基的纳米羟基磷灰石加入到干燥的反应容器中，然后在氮气或氩气保护下把氯仿或二氧六环、或二甲基甲酰胺加入反应容器，超声 5~30 分钟，使表面含有氨基的纳米羟基磷灰石充分分散；所用有机溶剂都经无水处理。

3) 在氮气或氩气保护下，将 0.5~5 倍于表面含有氨基的纳米羟基磷灰石质量的氨基酸-N-羧基环内酸酐；优选氨基酸-N-羧基环内酸酐为  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸-N-羧基环内酸酐、N<sup>ε</sup>-苄氧羰基-赖氨酸-N-羧基环内酸酐或 L-苯丙氨酸-N-羧基环内酸酐，溶解于氯仿、二氧六环或二甲基甲酰胺中；所用有机溶剂都经无水处理。

4) 将步骤 3) 配制的氨基酸-N-羧基环内酸酐溶液加入到步骤 2) 装有表面含有氨基的纳米羟基磷灰石的反应容器中，室温反应 12~72 小时，离心分离，去除上层清液，并用氯仿、二氧六环或二甲基甲酰胺洗涤，干燥，获得表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料。

本发明涉及的反应条件温和，在室温即可进行。与纳米羟基磷灰石相比，表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料表现出良好的生物相容性，在相同条

件下进行成骨细胞培养，培养 48 小时的结果表明，在表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石表面贴壁生长的细胞数量是在纳米羟基磷灰石表面贴壁生长细胞数量的 10 倍，由此可见表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料在骨修复方面有着很好的应用前景。

## 具体实施方式

### 实施例 1

1) 首先将 2.21 g  $\gamma$ -氨基丙基-三乙氧基硅烷溶于 100 mL 体积比 90:10 的乙醇/水混合溶剂中搅拌 30 分钟，然后加入 6.63 g 纳米羟基磷灰石，反应 3 小时，用氨水调节反应体系 pH 值到 9~10，继续搅拌 3 小时。离心分离，收集固体物，并于 130℃烘箱中烘 2 小时，然后用乙醇洗涤 3 次，干燥，得到表面含有氨基的纳米羟基磷灰石，利用热重分析的方法测得表面  $\gamma$ -氨基丙基-三乙氧基硅烷接枝量为 2.5%。

2) 氩气保护下将 0.2 g 表面含有氨基的纳米羟基磷灰石加到反应瓶中，再用注射器加入 20 mL 二氧六环。搅拌 5 分钟，然后超声 30 分钟，使表面含有氨基的纳米羟基磷灰石充分分散。

3) 氩气保护下将 0.2 g  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸-N-羰基环内酸酐加入到反应瓶中，再加入 20 mL 二氧六环，搅拌 5 分钟，使  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸-N-羰基环内酸酐溶解。

4) 用注射器将 3) 配制的  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸-N-羰基环内酸酐溶液加入到 2) 配制的表面含有氨基的纳米羟基磷灰石浊液中，室温反应 24 小时。离心分离回收固体产物，并用二氧六环洗涤产物 3 次，真空干燥，得到表面接枝聚多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料。其接枝率为 26.9%。

## 实施例 2

1) 首先将 2.21 g  $\gamma$ -氨基丙基-三乙氧基硅烷溶于 100 mL 体积比为 95:5 的乙醇/水混合溶剂中搅拌 30 分钟, 然后加入 6 g 纳米羟基磷灰石, 反应 3 小时, 然后用氢氧化钠调节反应体系 pH 值到 9~10, 继续搅拌 3 小时。离心分离, 收集固体物, 并于 130℃ 烘 2 小时, 然后用乙醇洗涤 3 次, 干燥, 得到表面含有氨基的纳米羟基磷灰石, 利用热重分析的方法测得其表面  $\gamma$ -氨基丙基-三乙氧基硅烷接枝量为 3.1%。

2) 同“实施例 1”中操作 2)

3) 同“实施例 1”中操作 3)

4) 用注射器将 3) 配制好的  $\gamma$ -苜蓿基-L-谷氨酸-N-羰基环内酸酐加入到表面含有氨基的纳米羟基磷灰石浊液中, 室温反应 48 小时。离心分离, 收集固体产物, 并用二氧六环洗涤产物 3 次, 干燥, 得到表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料。其接枝率为 29.5%。

## 实施例 3

1) 操作与“实施例 1”中的 1) 相同。

2) 操作与“实施例 1”中的 2) 相同。

3) 操作与“实施例 1”中的 3) 相同。

4) 用注射器将 3) 配制好的  $\gamma$ -苜蓿基-L-谷氨酸-N-羰基环内酸酐溶液加入到 2) 配制的表面含有氨基的纳米羟基磷灰石浊液中, 室温反应 72 小时。离心分离, 收集固体产物, 并用二氧六环洗涤产物 3 次, 真空干燥, 得到表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料。其接枝率为 33.5%。

## 实施例 4

1) 操作与“**实施例 1**”中的 1) 相同。

2) 操作与“**实施例 1**”中的 2) 相同。

3) 氩气保护下将 0.4 g  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸 N-羰基环内酸酐加入到反应瓶中，再加入 30 mL 二氧六环，搅拌 5 分钟，使  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸-N-羰基环内酸酐溶解。

4) 用注射器将操作 3) 配制的  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸-N-羰基环内酸酐溶液加入到 2) 配制的表面含有氨基的纳米羟基磷灰石浊液中，室温反应 72 h。离心分离，回收固体产物，并用二氧六环洗涤产物 3 次，干燥，得到表面接枝聚多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料。其接枝率为 43.1%。

### 实施例 5

1) 首先将 2.21 g  $\gamma$ -氨基丙基-三乙氧基硅烷溶于 100 mL 体积比为 70:30 的乙醇/水混合溶剂中，搅拌 30 分钟，然后加入 1.1 g 纳米羟基磷灰石，反应 1 小时，然后用氢氧化钠调节反应体系 pH 值到 9~10，继续搅拌 6 小时。离心分离，回收固体产物，并于 130°C 烘箱中烘 2 小时，然后用乙醇洗涤 3 次，干燥，得到表面含有氨基的纳米羟基磷灰石，利用热重分析的方法测得其表面  $\gamma$ -氨基丙基-三乙氧基硅烷接枝量为 3.9%。

2) 氩气保护下将 0.11 g 表面含有氨基的纳米羟基磷灰石加到反应瓶中，再用注射器加入 20 mL 二氧六环。搅拌 5 分钟，然后超声 30 分钟，使表面含有氨基的纳米羟基磷灰石充分分散。

3) 氩气保护下将 0.22 g  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸-N-羰基环内酸酐加入到反应瓶中，再加入 20 mL 二氧六环，搅拌 5 分钟，使  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸-N-羰基环内酸酐溶解。

4) 用注射器将 3) 配制的  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸羰-N-基环内酸酐加入到 2) 配制的表面含有氨基的纳米羟基磷灰石浊液中, 室温反应 24 小时。离心分离, 收集固体产物, 并用二氧六环洗涤产物 3 次, 干燥, 得到表面接枝聚多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料, 其接枝率为 34.2 %。

### 实施例 6

1) 操作与“**实施例 5**”中 1) 相同。

2) 操作与“**实施例 5**”中 2) 相同。

3) 氩气保护下将 0.55g  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸-N-羰基环内酸酐加入到反应瓶中, 再加入 30 mL 氯仿, 搅拌 5 分钟, 使  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸羰-N-基环内酸酐溶解。

4) 用注射器将 3) 配制的  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸羰-N-基环内酸酐溶液加入到 2) 配制的表面含有氨基的纳米羟基磷灰石浊液中, 室温反应 72 小时。离心分离, 收集固体产物, 并用氯仿洗涤产物 3 次, 干燥, 得到表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料。其接枝率为 70%

### 实施例 7

1) 操作与“**实施例 5**”中 1) 相同。

2) 操作与“**实施例 5**”中 2) 相同。

3) 氩气保护下将 0.11 g  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸-N-羰基环内酸酐加入到反应瓶中, 再加入 10 mL 氯仿, 搅拌 5 分钟, 使  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸羰-N-基环内酸酐溶解。

4) 用注射器将 3) 配制的  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸羰-N-基环内酸酐溶液加入到 2) 配制的表面含有氨基的纳米羟基磷灰石浊液中, 室温反应 12 小时。离心分离, 收集固体产物, 并用氯仿洗涤产物 3 次, 干燥, 得到表面接枝多肽的纳米羟基



磷灰石杂化材料。其接枝率为 12.1%

### 实施例 8

1) 操作与“**实施例 5**”中 1) 相同。

2) 氩气保护下将 0.2 g 表面含有氨基的纳米羟基磷灰石加到反应瓶中，再用注射器加入 20 mL 二氧六环。搅拌 5 分钟，然后超声 30 分钟，使表面含有氨基的纳米羟基磷灰石充分分散。

3) 氩气保护下将 0.1 g  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸-N-羰基环内酸酐加入到反应瓶中，再加入 10 mL 氯仿，搅拌 5 分钟，使  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸-N-羰基环内酸酐溶解。

4) 用注射器将 3) 配制的  $\gamma$ -苄基-L-谷氨酸-N-羰基环内酸酐溶液加入到 2) 配制的表面含有氨基的纳米羟基磷灰石浊液中，室温反应 12 小时。离心分离，收集固体产物，并用氯仿洗涤产物 3 次，干燥，得到表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料。其接枝率为 5%。

### 实施例 9

1) 同**实施例 1**中操作 1)

2) 氩气保护下将 0.3 g 表面含有氨基的纳米羟基磷灰石加到反应瓶中，再用注射器加入 15 mL 二甲基甲酰胺。搅拌 5 分钟，然后超声 30 分钟，使表面含有氨基的纳米羟基磷灰石充分分散。

3) 氩气保护下将 0.3 g  $N^{\epsilon}$ -苄氧羰基-赖氨酸-N-环内酸酐加入到反应瓶中，再加入 15 mL 二甲基甲酰胺，搅拌 5 分钟，使  $N^{\epsilon}$ -苄氧羰基-赖氨酸-N-环内酸酐溶解。

4) 用注射器将操作 3) 溶解好的  $N^{\epsilon}$ -苄氧羰基-赖氨酸-N-环内酸酐加入到 2) 配制的表面含有氨基的纳米羟基磷灰石浊液中，室温反应 4 天。离心分离，收

集固体产物，并用二甲基甲酰胺洗涤产物 3 次，干燥，得到表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料。其接枝率为 17.3%。

### 实施例 10

1) 同**实施例 1** 中操作 1)

2) 氩气保护下将 0.3 g 表面含有氨基的纳米羟基磷灰石加入到反应瓶中，再用注射器加入 15 mL 氯仿。搅拌 5 分钟，然后超声 30 分钟，使表面含有氨基的纳米羟基磷灰石充分分散。

3) 氩气保护下将 0.3 g L-苯丙氨酸-N-羧酸酐加入到反应瓶中，再加入 15 mL 氯仿，搅拌 5 分钟，使 L-苯丙氨酸-N-羧酸酐溶解。

4) 用注射器将操作 3) 溶解好的 L-苯丙氨酸-N-羧酸酐加入到 2) 配制的表面含有氨基的纳米羟基磷灰石浊液中，室温反应 4 天，离心分离，收集固体产物，并用氯仿洗涤产物 3 次，干燥，得到表面接枝多肽的纳米羟基磷灰石杂化材料。其接枝率为 15.3%。