

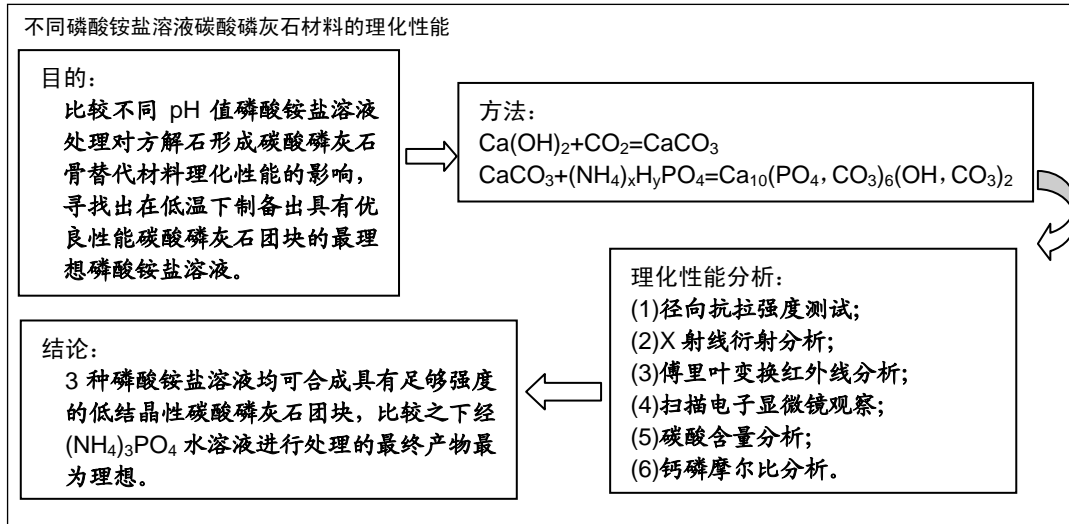
# 比较3种磷酸铵盐溶液制备碳酸磷灰石材料的理化性能

林欣<sup>1</sup>, 侯敏<sup>2</sup>(天津市口腔医院, <sup>1</sup>口腔修复科, <sup>2</sup>整形外科, 天津市 300041)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1349

ORCID: 0000-0001-8064-4954(林欣)

文章快速阅读:



林欣, 女, 1974 年生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 日本九州大学齿学研究院毕业, 博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事口腔修复学、口腔生物材料学研究。

文献标识码:A

稿件接受: 2019-04-01



## 文题释义:

**碳酸钙:** 作为骨代替材料已被研究多年, 珊瑚作为其中的代表材料之一, 主要以文石(aragonite)的形式存在, 在高温条件下, 热力学上相对不稳定的文石可变为较稳定的方解石。有研究发现将珊瑚碳酸钙放入磷酸盐溶液中进行水热处理可使其转变成珊瑚化羟基磷灰石, 并成功应用于整形外科、口腔颌面外科临床。但由于珊瑚来源数量有限, 并且很难获取医疗用途所需的高纯度的文石, 因此无法得以广泛推广。

**碳酸磷灰石:** 人体自然骨中磷灰石矿物主要是非化学计量的磷灰石晶体, 与理论上的磷灰石成分  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  不同, 还含有少量  $\text{CO}_3^{2-}$  与  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{HPO}_4^{2-}$ 、 $\text{F}^-$ 、 $\text{Cl}^-$  等微量元素。因此, 骨成分的更适合的公式应为  $(\text{Ca}, \text{X})_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3, \text{Y})_6(\text{OH}, \text{Z})_2$ , X 替代阳离子, Y 与 Z 替代阴离子, 被称作碳酸磷灰石。

## 摘要

**背景:** 课题组前期研究通过氢氧化钙的碳酸化处理制备了方解石团块, 并在低温磷酸二氢铵盐溶液中处理合成了碳酸磷灰石团块, 其具有良好的理化性能, 但存在碳酸含量偏低等不足, 考虑与磷酸二氢铵盐溶液较低的 pH 值有关。

**目的:** 比较不同 pH 值磷酸铵盐溶液处理对方解石形成碳酸磷灰石骨替代材料理化性能的影响, 寻找出在低温下制备出具有优良性能碳酸磷灰石团块的最理想磷酸铵盐溶液。

**方法:** 将团块状氢氧化钙进行碳酸化处理生成方解石, 分 3 组处理, 分别浸泡于磷酸二氢铵盐、磷酸氢二铵盐、磷酸三铵盐溶液中(浓度均为 1 mol/L, 温度均为 60 °C)。浸泡 1, 4, 7, 14 d 后, 分别进行径向抗拉强度测试、X 射线衍射分析、傅里叶变换红外线分析、扫描电镜观察及碳酸含量、钙磷比等理化性能检测。

**结果与结论:** ①X 射线衍射、傅里叶变换红外线、扫描电镜、径向抗拉强度结果显示: 经过 3 种磷酸铵盐溶液处理 14 d 后,  $\text{CaCO}_3$  均已完全转化为碳酸磷灰石, 经  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  水溶液处理的反应最快, 最终样本达到最高的机械强度(10 MPa), 但碳酸含量相对最低(4.80±0.5)%; 经  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  与  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  水溶液处理的最最终样本径向抗拉强度值均约为 6 MPa, 可满足低负重部位骨缺损重建材料的机械强度要求; ②化学分析结果显示:  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  水溶液处理最终样本的碳酸含量最高(7.25±0.81)%, 与骨极其接近。并且 B 型碳酸磷灰石含量最高; ③结果显示: 3 种磷酸铵盐溶液均可合成具有足够强度的低结晶性碳酸磷灰石团块, 比较之下经  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  水溶液进行处理的最最终产物最为理想。

## 关键词:

碳酸磷灰石; 磷酸铵盐溶液; 人工骨; 径向抗拉强度; B 型碳酸磷灰石; 生物吸收性; pH 值; 碳酸含量

中图分类号: R459.9; R318.08

## Physical and chemical properties of carbonate apatite monolith treated by three ammonium phosphate solutions

Lin Xin<sup>1</sup>, Hou Min<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Department of Prosthodontics, <sup>2</sup>Department of Orthographic Surgery, Tianjin Stomatological Hospital, Tianjin 300041, China)

Lin Xin, MD., Associate professor, Associate chief physician, Department of Prosthodontics, Tianjin Stomatological Hospital, Tianjin 300041, China

## Abstract

**BACKGROUND:** In our previous study, we prepared calcite monolith by carbonation of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  and then synthesized dahllite agglomerates with encouraging physical and chemical properties after treatment with  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  solution at low temperature. But it had low carbonic acid content, which is considered to be associated with the low pH values of ammonium dihydrogen phosphate solution.

**OBJECTIVE:** To compare the effects of ammonium phosphate solutions at different pH values on the physical and chemical properties of the carbonate apatite bone substitute material prepared by calcite and find the optimal ammonium phosphate solution for fabrication of carbonate apatite monolith with excellent performance at low temperature.

**METHODS:** The agglomerated calcium hydroxide was carbonated to form calcite. The prepared calcite was soaked in three 1 mol/L ammonium phosphate solutions ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ) at  $60^\circ\text{C}$  respectively. After 1, 4, 7 and 14 days of soaking, diametral tensile strength determination, X-ray diffraction analysis, Fourier transform infrared spectroscopy studies, and scanning electron microscopy were performed. The results were analyzed by comparison.

**RESULTS AND CONCLUSION:** X-ray diffraction analysis, Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, and diametral tensile strength determination results showed that after 14 days of treatment with three ammonium phosphate solutions,  $\text{CaCO}_3$  had completely transformed into carbonate apatite. The reaction rate was fastest in the  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  solution, with the highest diametral tensile strength of 10 MPa, but relative lower carbonate content ( $4.80\pm 0.5\%$ ). The diametral tensile strength of final product was 6 MPa after treatment by both  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  and  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  solution. It is adequate for bone substitute used in the low-bearing parts. Chemical analyses showed that the carbonate content of the product treated by  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  solution was ( $7.25\pm 0.81\%$ ), which was extremely similar to that of bone. In addition, there was a high amount of B-type carbonate apatite. These results suggest that carbonate apatite with sufficient diametral tensile strength. By comparison, the carbonate apatite produced with  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  solution is the most ideal product.

**Key words:** carbonate apatite; ammonium phosphate solution; bone substitute; diametral tensile strength; B-type carbonate apatite monolith; biodegradation; pH value; carbonate content

## 0 引言 Introduction

生物活性材料用于人工骨材料已有近50年的历史, 其中最具有代表性的是羟基磷灰石, 其具有良好的机械强度、生物学特性, 一直以来被广泛研究与应用, 但因其与人体骨矿物质成分不同, 不含有碳酸根, 难以在体液中被吸收降解, 无法满足临床上对骨移植材料的广泛需求。而通过人工方法制备出与人体骨同样含有4%~8%碳酸根的磷灰石材料是比较理想的, 因此碳酸磷灰石作为骨主要成分的生物磷灰石, 具有优异的生物吸收性, 有利于骨再建, 从而备受关注<sup>[1-6]</sup>。

碳酸磷灰石的化学式为 $\text{Ca}_5[\text{PO}_4, \text{CO}_3(\text{OH})]_3(\text{F}, \text{OH})$ , 由化学成分上可分为2种, 一种是碳酸根离子可置换 $\text{OH}^-$ 成为A型碳酸磷灰石 $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3]$ , 一般在高温烧结中完成; 另一种是碳酸根离子置换 $\text{PO}_4^{3-}$ 成为B型碳酸磷灰石 $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-a}(\text{CO}_3)_{3/2a}(\text{OH})_2]$ , 一般在低温合成中出现。在体内与体外实验中, B型碳酸磷灰石会导致磷灰石的尺寸变小、结晶性降低、比表面积与有效表面活性增高、溶解度升高<sup>[7]</sup>, 因此在低温下合成B型碳酸磷灰石是较理想的。

在现有的研究中, 碳酸磷灰石多通过中和法或共沉淀法等方法制备, 但多为关于粉体、颗粒与可注射糊状碳酸磷灰石材料的研究<sup>[8-13]</sup>。而作为骨移植材料, 以上3种碳酸磷灰石材料均不能提供足够的机械强度, 无法满足骨缺损患者的临床实际需要, 因此需要制备具有一定机械强度的团块状碳酸磷灰石骨移植材料。磷灰石团块可通过在 $600^\circ\text{C}$ 以上高温中烧结合成, 然而此过程将导致碳酸基团流失, 影响磷灰石移植材料的生物行为, 特别是会导致比人体骨低得多的生物降解率<sup>[14]</sup>。因此, 一直期待能在低温液体环境中合成碳酸磷灰石团块。

如何在低温下成功制备出具有优良理化性能的团块状碳酸磷灰石, 并保留碳酸基一直是骨替代材料研究领

域内的一大难题<sup>[15-19]</sup>。课题组前期研究将氢氧化钙粉末通过模具加压成形为氢氧化钙团块, 并碳酸化合成为方解石团块<sup>[20-21]</sup>。通过将方解石团块浸泡在 $60^\circ\text{C}$ 、1 mol/L的磷酸二氢铵盐溶液中合成了碳酸磷灰石团块, 并对其进行了抗张强度测试、X射线衍射分析、傅里叶红外吸收光谱测定、扫描电子显微镜观察及化学成分分析, 得到具有良好理化性能的B型碳酸磷灰石团块, 但存在碳酸含量偏低等不足<sup>[22]</sup>, 考虑与磷酸二氢铵盐溶液较低的pH值有关<sup>[23]</sup>。因此, 此次研究尝试通过另外2种具有较高pH值的磷酸氢二铵盐、磷酸三铵盐溶液对方解石进行处理, 并对处理过程中各时间点的样本进行抗拉强度测试、X射线衍射分析、傅里叶变换红外线分析、扫描电子显微镜观察及碳酸含量、钙磷比等理化性能检测进行比较分析, 探索能制备出具有更优良性能的B型碳酸磷灰石团块的磷酸铵溶液。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 材料学人工合成实验。

1.2 时间及地点 实验于2009年1月至2017年12月在日本九州大学齿学研究院与天津市口腔医院完成。

1.3 材料 氢氧化钙 $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ , Nacalai Tesque, 日本; 磷酸二氢铵( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , Wako, 日本); 磷酸氢二铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ , Wako, 日本; 磷酸三铵 $[(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4]$ , Wako, 日本; 二氧化碳气体(福冈气体公司, 日本)。

**实验用仪器和设备:** 生物力学实验机(岛津, 日本); RINT 2500V XRD 分析仪(Rigaku, 日本); Spectrum 2000LX FT-IR 分析仪(JSM 5400LV, Perkin-Elmer, 日本); JEOL型扫描电子显微镜(JEOL, 日本); Analyst 300 原子吸收分析仪(Perkin-Elmer); Ubest-50 UV/VIS 比色分析仪(JAS, 美国); CHN coder-MT-6 CHN含量分析仪(Yanako, 日本)。

#### 1.4 实验方法 实验方法基本同于之前研究方法<sup>[20-22]</sup>。

**磷酸铵盐水溶液配制:** 将磷酸二氢铵、磷酸氢二铵、磷酸三铵3种试剂分别制成1 mol/L的水溶液。

**CaCO<sub>3</sub>样本的制备与化学处理:** 将Ca(OH)<sub>2</sub>粉末通过模具, 在2 MPa的压强下制备成75个样本, 并置于二氧化碳气体与饱和水蒸气中, 72 h后制备成CaCO<sub>3</sub>样本。将上述配制的溶液分别在DO-300电热恒温干燥箱中加热至60 °C后, 分别放入25 mL 60 °C磷酸二氢铵、磷酸氢二铵、磷酸三铵溶液中, 每种溶液中5个CaCO<sub>3</sub>试件, 依次在1, 4, 7, 14 d后取出样本并清洗, 37 °C恒温箱中干燥24 h。

**1.5 主要观察指标 径向抗拉强度测试:** 测量样本尺寸, 在生物力学实验机上对样本施加轴向正向负载, 加载速度为1 mm/min, 测试5个样本, 取平均值。

**X射线衍射分析:** 用X射线衍射分析仪对粉末状样本进行连续扫描与物象分析。

**傅里叶变换红外光谱测定:** 以KBr压片用FT-IR分析仪进行化学基团分析, 波数范围为400-4 000 cm<sup>-1</sup>。

**扫描电镜观察:** 将处理前及处理1, 7, 14 d后样本表面进行喷金处理后, 在15 kV的加速压下对样本的表面及断面进行扫描电镜晶体形貌分析。

**化学分析:** 使用原子吸光分析仪进行钙元素分析, 使用比色分析仪进行磷元素分析, 计算出各样本的钙磷元素摩尔比值。进一步通过CHN含量分析仪根据各样本的测量结果计算出碳酸含量(表示为占CO<sub>3</sub>质量百分比)。用pH电子测试仪测量反应前后溶液的pH值。每3个样本取其平均值。

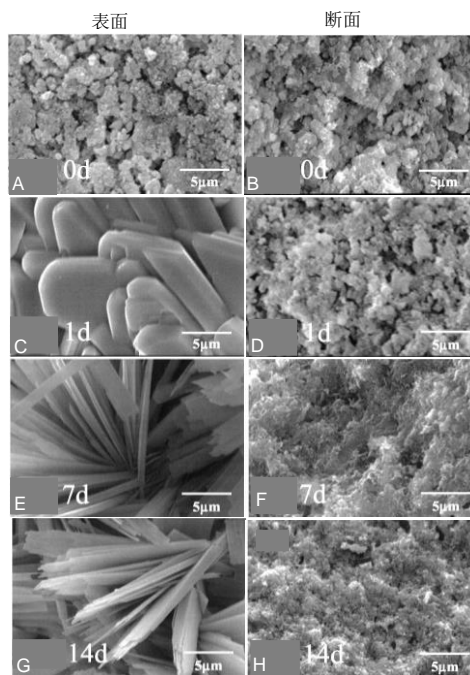
**1.6 统计学分析** 采用SPSS 19.0统计软件, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并进行组间单因素方差分析(ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 各组样本扫描电镜观察结果** 图1-3依次为经NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液、(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>溶液处理前及处理1, 7, 14 d后样本的表面与断面扫描电镜照片。处理前样本的表面可见直径在1-5 μm的颗粒状结晶, 而断面颗粒状结晶直径与表面相比稍小。从图1可看出, 经NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液处理后样本表面与断面的变化有明显差异, 1 d后样本的表面可见较大片状结晶, 但断面未见明显变化; 7 d后样本表面可见针状结晶, 而断面也可见微小针状结晶。图2显示经过(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液处理1 d后, 样本表面可见球状结晶中掺杂少量微小的针状结晶, 而直至7 d后断面才见小针状结晶。图3显示经过(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>溶液处理后1 d后, 样本表面可见球状结晶并逐渐增大, 断面在处理7 d后开始可见微小的针状结晶。

**2.2 各组样本测试径向抗拉强度结果** 图4为分别经过3种磷酸铵盐溶液处理前及处理1, 4, 7, 14 d后径向抗拉强度值的变化, 处理前样本的强度为3.3 MPa, 无论何种溶液, 处理2 d后的样本径向抗拉强度开始增大, 经NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

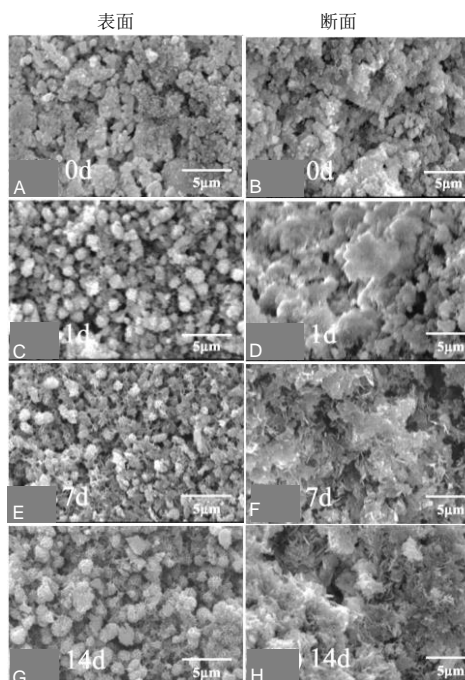
溶液处理的样本强度不断增大至14 d, 达到约10 MPa; 经(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>与(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>溶液处理的样本变化趋势基本一致, 在7 d后强度达到5.0-6.0 MPa后不再增强, 明显低于前者。



图注: 图中A, B为处理前, C, D为处理1 d后, E, F为处理7 d后, G, H为处理14 d后。样本表面与断面的变化有明显差异, 1 d后样本的表面可见较大片状结晶, 但断面未见明显变化; 7 d后样本表面可见针状结晶, 而断面也可见微小针状结晶。

图1 碳酸钙经NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液处理前后样本的表面与断面扫描电镜照片(x5 000)

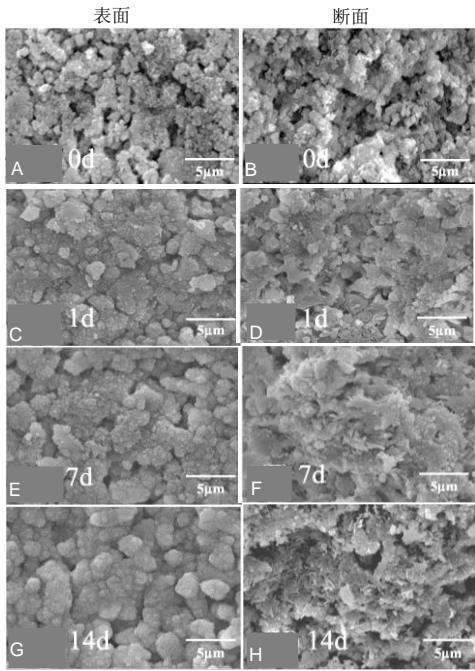
Figure 1 Scanning electron micrographs of surface and cross-section of calcite monolith before and after treatment with NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution (x5 000)



图注: 图中A, B为处理前, C, D为处理1 d后, E, F为处理7 d后, G, H为处理14 d后。处理1 d后, 样本表面可见球状结晶中掺杂少量微小的针状结晶, 而直至7 d后断面才见小针状结晶。

图2 碳酸钙经(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液处理样本的表面与断面扫描电镜照片(x5 000)

Figure 2 Scanning electron micrographs of surface and cross-section of calcite monolith before and after treatment with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> solution (x5 000)



图注：图中A, B 为处理前, C, D 为处理 1 d 后, E, F 为处理 7 d 后, G, H 为处理 14 d 后。处理 1 d 后, 样本表面可见球状结晶并逐渐增大, 断面在处理 7 d 后开始可见微小的针状结晶。

图 3 碳酸钙经 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 溶液处理前后样本的表面与断面扫描电镜照片( $\times 5\,000$ )

Figure 3 Scanning electron micrographs of surface and cross-section of calcite monolith before and after treatment with  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  solution ( $\times 5\,000$ )

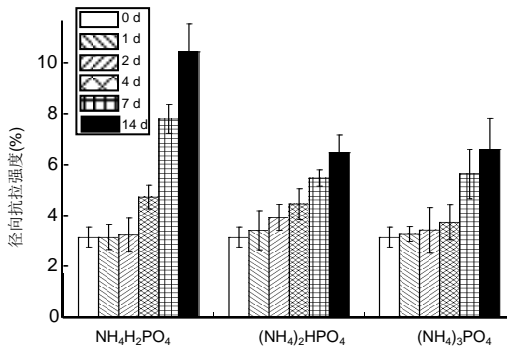


图 4 经过 3 种磷酸铵盐溶液处理前及处理 14 d 过程中碳酸钙样本的径向抗拉强度

Figure 4 Changes in diametral tensile strength of calcite monolith before and 14 days after treatment with three ammonium phosphate solutions

2.3 各组样本X射线衍射分析结果 图5显示各组样本在经过各时间处理后的X射线衍射测试结果。标志 $\text{CaCO}_3$ 特征峰的(01-4)与(110)处峰值随着时间逐渐降低, 而标志磷灰石峰的(211)(112)(300)与(202)处在 1 d 后出现并随着时间逐渐增强, 显示 $\text{CaCO}_3$ 逐渐转化成为磷灰石, 并在 7 d 后基本完全转化。

表1显示不同时间点在3种溶液中生成产物的结晶相, 并按其生成量进行排序表示, 可看出经 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 溶液处理后 1 d, 二水磷酸氢钙与磷灰石生成, 而且 2 d 后少量 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 也生成。在反应 4 d 后可看到二水磷酸氢钙消失, 磷灰石生成量不断增加, 而 7 d 后方解石基本完全转化, 虽然仍有少量 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 残存, 主要是磷灰石; 经 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 溶液处理后的样本, 磷灰石作为主要生成物, 只在反应 2 d

后时生成少量的二水磷酸氢钙, 并无 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 生成, 但在反应 7 d 后可见微量方解石残留, 与前两者反应溶液相比较, 可看到经 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 溶液处理后未见二水磷酸氢钙与 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 两者生成, 只有磷灰石一种生成物。

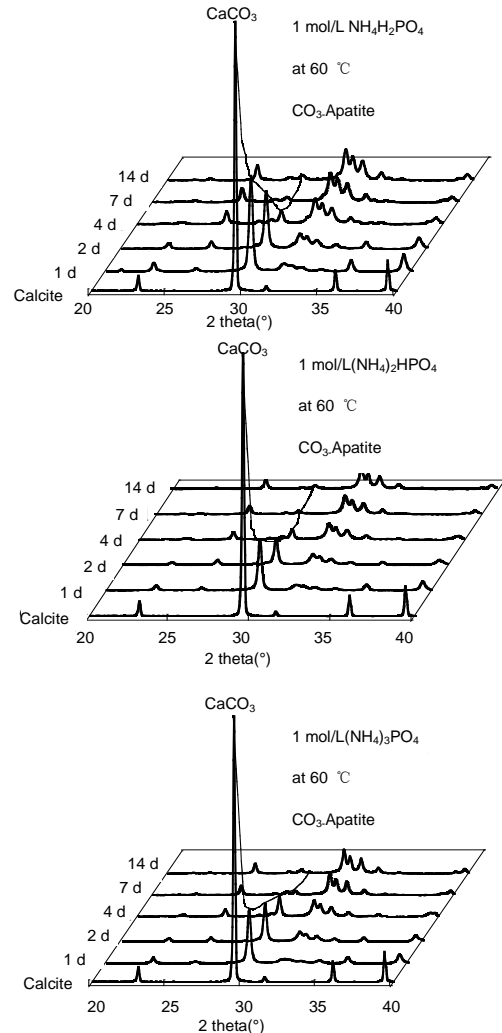


图 5 经过 3 种磷酸铵盐溶液处理前及处理 14 d 过程中碳酸钙样本 X 射线衍射分析

Figure 5 X-ray diffraction analysis patterns of calcite monolith before and after 14 days of treatment with three ammonium phosphate solutions

表 1 不同磷酸铵盐溶液处理各时间点碳酸钙样本生成的结晶相  
Table 1 Crystallization phase of calcite monolith treated at different time points by different ammonium phosphate solutions

处理时间	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	$(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$
1 d	方解石, 磷酸氢钙, 磷灰石	方解石, 磷灰石	方解石, 磷灰石
2 d	方解石, 磷酸氢钙, 磷灰石, 磷酸三钙	方解石, 磷灰石, 磷酸氢钙	方解石, 磷灰石
4 d	磷灰石, 方解石, 磷酸三钙	磷灰石, 方解石	磷灰石, 方解石
7 d	磷灰石, 磷酸三钙	磷灰石, 微量方解石	磷灰石, 微量方解石
14 d	磷灰石, 磷酸三钙	磷灰石	磷灰石

表注: 按生成量排序。

表 2 碳酸钙样本在 3 种磷酸铵盐溶液处理 14 d 后最终产物的 A 型与 B 型碳酸磷灰石所占比例

Table 2 Ratio of Type A to Type B apatite in the final product of calcium carbonate sample after 14 days of treatment with three ammonium phosphate solutions

溶液	A-CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> 质量百分比(%)	B-CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> 质量百分比(%)	B/A	化学分子式
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.666	2.134	0.800	Ca <sub>9.855</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>5.717</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>0.283</sub> (OH) <sub>1.29</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>0.355</sub>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.459	3.191	0.923	Ca <sub>9.789</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>5.579</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>0.421</sub> (OH) <sub>1.086</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>0.457</sub>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	2.459	4.791	1.948	Ca <sub>9.835</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>5.671</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>0.329</sub> (OH) <sub>0.719</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>0.641</sub>

表注: B 型碳酸磷灰石含量组间两两比较差异均有显著性意义( $P < 0.05$ )。

2.4 傅里叶红外吸收光谱分析结果 图6显示以压片法测得的红外光谱图在1 410, 1 455与875 cm<sup>-1</sup>处为B-CO<sub>3</sub>基团的特征性增强峰, 显示经3种磷酸铵盐溶液处理的最终生成物中均含有B-CO<sub>3</sub>基团。表2显示根据3种磷酸铵盐溶液处理 14 d 后最终产物傅里叶红外光谱分析结果计算出了产物中A型与B型碳酸磷灰石各所占的比例, 并由此推算出的化学分子式, 可看出经(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>溶液处理后最终产物中碳酸磷灰石含量最高, 而且其中B型碳酸磷灰石含量最高, 经两两比较差异均有显著性意义( $P < 0.05$ )

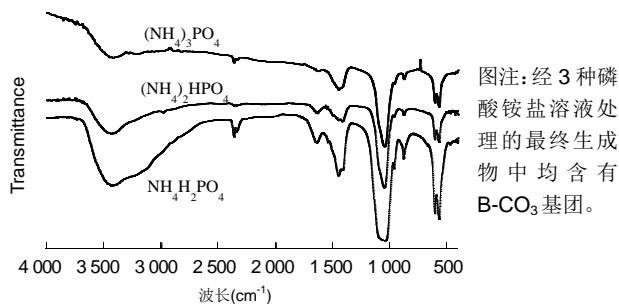


图 6 经过 3 种磷酸铵盐溶液处理前及处理 14 d 过程中碳酸钙样本的傅里叶红外光谱分析结果

Figure 6 Fourier transform infrared spectra of the calcite monolith before and after 14 days of treatment with three ammonium phosphate solutions

2.5 碳酸含量分析与钙磷摩尔比结果 如表3结果所示, 3 种磷酸铵盐溶液处理的最终反应物的碳酸含量分别为经 NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液处理后最终生成物的(4.80±0.5)%, 经 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液处理后最终生成物的(6.65±0.57) % 与经 (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 溶液处理后最终生成物的(7.25±0.81)%, 组间两两比较差异均有显著性( $P < 0.05$ )。

最终反应物的钙磷摩尔比分别为经 NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液处理后最终生成物的1.63, 经 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液处理后最终生成物的1.74, 经 (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 溶液处理后最终生成物的1.75, 组间两两比较差异均有显著性( $P < 0.05$ )。

表 3 碳酸钙样本在 3 种磷酸铵盐溶液处理 14 d 后最终产物的碳酸含量与钙磷摩尔比值 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 3 The molar ratio of carbonic acid to calcium and phosphorus of the final product after 14 days of treatment with three ammonium phosphate salt solutions

溶液	碳酸质量百分比(%)	钙磷摩尔比值
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.80±0.50	1.63±0.01
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.65±0.57	1.74±0.02
(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	7.25±0.81	1.75±0.01

表注: 碳酸质量百分比与钙磷摩尔比值, 组间两两比较差异均有显著性意义( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论 Discussion

此次实验X射线衍射分析结果显示, CaCO<sub>3</sub>经过以上3种磷酸铵盐溶液处理后均逐渐转化成为磷灰石, 并在7 d后基本完全转化, 可看出反应速度与反应过程有一定的差异, 考虑是由于3种磷酸铵盐溶液的pH值差异造成了差异。结果显示三者中样本在NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液中的反应速度最快, 可能归结于它的pH值最低, 因此溶解碳酸钙的速度相应也最快。然而由于二水磷酸氢钙在pH值低于4.2的环境中更加稳定, 低pH值也导致了二水磷酸氢钙的快速形成。同时有学者称pH值在4-7的环境中, 二水磷酸氢钙比磷灰石更易形成。有研究报道碳酸钙经磷酸钠盐与磷酸钾盐处理后生成了碱性碳酸磷灰石, 发现增大溶液的pH值会增大磷灰石的碳酸含量, 此次实验结果与该发现相一致。

碳酸含量分析显示生成的磷灰石均含有碳酸离子, 即碳酸磷灰石。有研究显示, 碳酸含量的增加可相应增加羟基磷灰石的溶解度, 与碳酸磷灰石生物降解速度密切相关<sup>[7]</sup>。实验中与经(NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液处理后最终生成物相比, 经(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>溶液处理后最终生成物的碳酸含量最高( $P < 0.05$ ), 为(7.25±0.81)%, 与人体骨碳酸含量的4%-8%相吻合。

傅里叶红外光谱分析显示, 生成物中PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>格子位置分别被CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>或OH<sup>-</sup>所占据, 生成A型与B型碳酸磷灰石。而经(NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液处理后最终生成物中, A型碳酸磷灰石的含量均低于B型碳酸磷灰石, 只有经(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>溶液处理后最终生成物中B型碳酸磷灰石的含量接近A型碳酸磷灰石的2倍( $P < 0.05$ ), 显示生成的是以B型为主的碳酸磷灰石。

Mayer等<sup>[23]</sup>曾报道可将碳酸磷灰石傅里叶红外光谱分析结果中碳酸基团V3吸收带在1 415 cm<sup>-1</sup>处的吸收强度与磷酸基团V4吸收带在575 cm<sup>-1</sup>处的吸收强度, 按以下公式计算出其所含碳酸含量: CO<sub>3</sub>含量(%)=16.1×(A<sub>1415</sub>/A<sub>575</sub>)-0.2, 通过傅里叶红外光谱结果与以上公式, 计算出经(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>溶液处理后的最终生成物的碳酸质量百分比依次为5%, 7%, 8%, 此结果与通过碳酸含量分析所得结果很好地吻合。

通过扫描电镜观察可看出, 每种样本都呈现出表面要早于断面发生变化, 直至7 d后变化几乎完成, 提示反应是由样本表面开始向其内部逐步进行的。曾有报道, 随着磷灰石中碳酸含量的增加, 碳酸根离子将会破坏羟基磷灰石稳定的晶体结构, 抑制其晶体增长, 因此晶体尺寸变小、结晶度降低, 形状会由针状转化为棒状, 直至球状<sup>[24]</sup>。因

此,从处理14 d后样本表面的晶体形态和尺寸扫描电镜比较可推断,经3种磷酸铵盐处理14 d后的生成物碳酸含量依次为:  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 < (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 < (\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ,与通过CHN含量分析仪测量计算得出的碳酸含量及傅里叶红外光谱分析计算所得的结果均相吻合。

各组样本的径向抗张强度在经过处理2 d后均开始增大,与经 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 溶液处理后最终样本的10 MPa相比较,其余2种溶液处理后最终样本的强度为5.0-6.0 MPa,虽然偏低,但还是可满足作为低负重区域骨替代材料的机械强度要求。通过对X射线衍射分析与抗张强度结果进行比较,可看出随着磷灰石的不形成,生成物的抗张强度也在不断增加。

此次实验中通过 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 团块碳酸化生成的 $\text{CaCO}_3$ 团块,分别浸泡在60 °C浓度均为1 mol/L的3种磷酸铵盐中直至14 d, X射线衍射、傅里叶红外光谱分析、扫描电镜、化学分析结果显示该方法是未经烧结即能合成具有足够强度低结晶性B型碳酸磷灰石团块的简单可行方法,原材料成本低且易获得,适合产业化。与其余2种溶液处理的碳酸磷灰石团块相比较,通过 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 溶液处理的碳酸磷灰石团块因无其他需处理的副产物生成,并且最终生成物含有最高的碳酸含量与最高的B型碳酸磷灰石含量,而被考虑为研究中最理想的磷酸铵处理液,为今后应用于口腔颌面外科、整形外科临床提供了思路。为了观察其在体内外可能发生的生物学反应,并为今后尝试合成多样化碳酸磷灰石团块,今后还需开展进一步的生物学实验探讨。

**致谢:** 感谢日本九州大学齿学研究生院体材料工学研究室石川邦夫教授与福冈齿科大学齿科理工工学研究室松家茂树教授在实验过程中提供的帮助。

**作者贡献:** 第一作者进行实验设计、实验实施、资料收集与成文,对文章负责。

**经费支持:** 该文章未接受任何经费支持。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 该文统计学方法已经天津市口腔医院生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

[1] LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev*.2008;108(11):4742-4753.  
[2] Toru T, Toshiyuki, Tomohiko Y, et al. Crystal structure refinement of A-type carbonate apatite by X-ray powder diffraction. *J Mater Sci Mater M*.2010;45:2419-2426.

[3] Nagai H, Kobayashi-Fujioka M, Fujisawa K, et al. Effects of low crystalline carbonate apatite on proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow cells. *J Mater Sci Mater Med*.2015;26(2):99.  
[4] Yuki S, Kanji T, Kunio I. Fabrication of arbitrarily shaped carbonate apatite foam based on the interlocking process of dicalcium hydrogen phosphate dihydrate. *J Mater Sci Mater M*. 2017; 28:122.  
[5] Zakaria MN, Cahyanto A, El-Ghannam A. Calcium release and physical properties of modified carbonate apatite cement as pulp capping agent in dental application. *Biomater Res*. 2018; 22:35.  
[6] Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, et al. Carbonate Apatite Containing Statin Enhances Bone Formation in Healing Incisal Extraction Sockets in Rats. *Materials (Basel)*.2018;11(7). pii: E1201. doi: 10.3390/ma11071201.  
[7] Barralet J, Akao M, Aoki H, et al. Dissolution of dense carbonate apatite subcutaneously implanted in Wistar rats. *J Biomed Mater Res*.2000;49(2):176-182.  
[8] 朱庆霞, 吴建青. 碳酸羟基磷灰石粉体的热处理研究[J]. *功能材料*, 2007,38(12):2055-2058.  
[9] 张群, 朱虹, 刘晓红, 等. 气体扩散法合成花状碳酸化羟基磷灰石微球[J]. *硅酸盐通报*, 2011,30(5):1177-1181.  
[10] 朱万华, 张群, 汪小红, 等. 碳酸钙为模板微波水热合成碳酸羟基磷灰石微球[J]. *安庆师范学院学报(自然科学版)*, 2014,(3):92-97.  
[11] 陈继伟, 沈娟, 胡文远, 等. 以碳酸钙为模板制备空心羟基磷灰石微球及其表征[J]. *功能材料*, 2016,47(4):4169-4173.  
[12] 钟奇伟, 蔡玉荣. 球形碳酸钙/羟基磷灰石的制备及药物控释[J]. *浙江理工大学学报(自然科学版)*, 2016,35(5):685-690.  
[13] 唐佩福, 王继芳, 卢世璧, 等. 可注射性多孔碳酸化羟基磷灰石骨水泥的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2005,19(12):952-955.  
[14] Gibson IR, Bonfield W. Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res*.2002;59(4):697-708.  
[15] Del Fabbro M, Bortolin M, Taschieri S, et al. Effect of autologous growth factors in maxillary sinus augmentation: a systematic reviews. *Clin Implant Dent Relat Res*.2013;15(2):205-216.  
[16] Wallace SS, Tamow DP, Froum SJ, et al. Maxillary sinus elevation by lateral window approach: evolution of technology and technique. *J Evid Based Dent Pract*.2012;12(3 suppl): 161-171.  
[17] Palmer I, Nelson J, Schatton W, et al. Biocompatibility of calcium phosphate bone cement with optimized mechanical properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016;104(2): 308-315.  
[18] Liu W, Zhang J, Weiss P, et al. The influence of different cellulose ethers on both the handling and mechanical properties of calcium phosphate cements for bone substitution. *Acta Biomater*. 2013; 9(3):5740-5750.  
[19] Krtiger R, Seitz JM, Ewald A, et al. Strong and tough magnesium wire reinforced phosphate cement composites for load-bearing bone replacement. *Mechan Behav Biomed Mater*. 2013;20:36-44.  
[20] Matsuya S, Lin X, Udoh K, et al. Fabrication of porous low crystalline calcite block by carbonation of calcium hydroxide compact. *J Mater Sci Mater M*.2007;18:1361-1367.  
[21] Lin X, Matsuya S, Udoh K, et al. Effect of molding pressure on fabrication of low-crystalline calcite block. *J Mater Sci Mater M*. 2008;19:479-484.  
[22] 林欣. 方解石制备碳酸磷灰石骨替代材料的研究[J]. *口腔医学研究*, 2013,29(6):555-558.  
[23] Mayer I, Schlam R, Featherstone JD. Magnesium-containing carbonate apatites. *Inorg Biochem*.1997;66(1):1-6.  
[24] LeGeros RZ. Apatites in biological systems. *Crystal Growth Charact*. 1981;4:1-45.