

· 口腔材料学研究 ·

纳米氢氧化钙制备方法的改良及作为根管治疗糊剂的生物安全性初探

王籽明 彭问安 孙青 范伟*

(武汉大学口腔医学院 湖北 武汉 430079)

[摘要] 目的:改良纳米氢氧化钙的制备方法并对其作为根管治疗糊剂的生物安全性进行初步评价。方法:以 CaCl_2 和 NaOH 为沉淀反应物,改良环节包括纳米氢氧化钙的制备系统,改性剂用聚乙二醇,加快反应速度为超声波振动,干燥分散纳米粉体为正丁醇共沸蒸馏干燥法。实验样品制得后分别选用红外线光谱仪、透射电子显微镜检测其组成成分和粒径大小,再将样品与医用碘仿和甘油调制成符合临床根管治疗要求糊剂,用扫描电子显微镜检测其形貌。后将实验分为阴性、阳性对照组和纳米氢氧化钙糊剂组,观察各组红细胞溶血反应及溶血率。结果:改良后制备装置自动化程度更高,操作更准确、安全,能防尘、隔菌,显著缩短制备时间,节省人力和能源,降低成本,制备的粉体颗粒更分散、均匀,不发生软硬团聚。样品由聚乙二醇和氢氧化钙组成,粒径大约在 $100\sim 200\text{ nm}$ 之间,呈球形和链球形。作为根管治疗糊剂,其表面致密、光滑,横截面积大、呈六方体结构,颗粒间隙小,排列紧凑、致密;与阳性对照组比较,纳米氢氧化钙糊剂组不引起溶血反应,其血红蛋白相对值明显低于阳性对照组 ($P < 0.01$),溶血率为 4.54% ,显著小于医用植入材料要求红细胞溶血率 ≤ 5 。结论:本实验改良方法科学合理,其表征为纳米级、分散均匀而无团聚的氢氧化钙,作为根管治疗糊剂初步证实具有生物安全性,值得在临床上推广和开发、具有广泛发展前途。

[关键词] 纳米氢氧化钙及其糊剂 制备方法改良 表征 生物安全性

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2018)04—0428—04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.04.021

Modification of Preparation Method of Nanometer Calcium Hydroxide and Preliminary Assessment of Biological Safety for Root Canal Therapy. WANG Zi-ming, PENG Wen-an, SUN Qing, FAN Wei*. School of Stomatology, Wuhan University, Wuhan 430079, China.

[Abstract] **Objective:** To modify the preparation method of nanometer calcium hydroxide (nano-Ca(OH)_2) and assess the preliminarily biological safety for root canal therapy. **Methods:** Nano- Ca(OH)_2 was prepared by use of synthetic nano-precipitation titration of Ca(OH)_2 materials with the raw materials for CaCl_2 and NaOH as well as polyethylene glycol (PEG). According to modified method, the whole procedure was as following: PEG parceled first CaCl_2 and reacted with NaOH , and ultrasonic wave was used to vibrate reaction so that to accelerate production of nano- Ca(OH)_2 and prevent agglomeration of particles, as well as drying method of heterogeneous azeotropic distillation was made to divergency the nano- Ca(OH)_2 gel. The infrared spectroscopy and transmission electron microscopy were used to detect the physical and chemical characteristics of nano- Ca(OH)_2 . Nano- Ca(OH)_2 paste that was mixed with medical iodoform and glycerol was used as root canal therapy. The scanning electron microscopy was used to observe the shape of specimens. The experiments were divided into negative group, positive group, and Nano- Ca(OH)_2 paste group. **Results:** The modified treatment had higher automaticity, could isolate bacterial and dust particle, and decrease manufacture time, work intensity, and cost. The nano-powder distributed much more evenly without agglomeration. The nano-article of Ca(OH)_2 was about $100\sim 200\text{ nm}$, in the round and hammer shape. As nano- Ca(OH)_2 paste, it had dense structure, compact arrangement, and smooth surface, which was better than ordinary Ca(OH)_2 paste. Furthermore, nano- Ca(OH)_2 paste could not interact with hemoglobin and maintain the morphological integrity and smooth surface of red blood cells. Hemoglobin value was significantly decreased in nano- Ca(OH)_2 paste group compared with positive group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The modified manufacture method was scientific and reasonable. Nano-level and uniform Ca(OH)_2 was produced, which could prevent the hemolytic of human

基金项目 国家大学生创新创业基金(编号:201610486111)

作者简介 王籽明(1996~),女,湖北人,学士,主要从事根管治疗充填材料的研制。

* 通讯作者 范伟, E-mail:fwxj001@163.com

red blood cells and be used as paste for root canal therapy.

[Key words] Nanometer calcium hydroxide Modification of manufacturing method Physical characterization Biological safety

根管充填材料性能好是根管治疗成功与失败的最终决定因素^[1]。新型纳米氢氧化钙作为根管治疗糊剂,在应用于乳牙根管充填和恒牙根管消毒的实验中,其良好性能明显优于目前临床上常规使用氢氧化钙糊剂,它粒径小而均匀,容易渗透充填到牙本质细微而不规则弯曲小管各个区域;缓慢持续释放 OH^- ,具有长期持久杀菌消毒等理化特性;生物安全性检测可靠、无不良反应^[2,3]。所以,国内外学者利用液相化学滴定沉淀法和临床根管治疗对糊剂的要求制备出实验性纳米氢氧化钙糊剂。但到目前为止,这种材料的制备和表征仍处在实验研发状态,作为根管治疗糊剂还未进入临床应用到人体罹患牙髓病和根尖周病中,提示该材料的制备与应用还需改良与探究^[4]。在此基础上,本实验对已有的制备方法进行改良,对改良后获取的新型材料及其糊剂表征,并与正常人体红细胞反应观察溶血性,旨在为科学合理制备新型纳米氢氧化钙及作为根管治疗糊剂应用于临床提供改进方向和实验证据。

1 材料与方 法

1.1 制备纳米氢氧化钙方法的组成与改良 利用液相化学沉淀法代替传统的化学滴定沉淀法;制备装备用临床上数字控制注射泵及其附件(B. Braun Melsungen Ag,德国),和带有无菌锡纸封口的锥形瓶组成封闭无菌反应体系代替常规使用玻璃滴定装置;防止纳米颗粒团聚改性剂用聚乙二醇 400(polyethylene glycol, PEG400)代替聚乙烯醇 124;滴定过程中加快滴定反应速度辅助外力用磁力搅拌(C-MAG HS7,上海精宏仪器厂),加超声波(KQ-500E,昆山市超声仪器有限公司)振动代替单纯用磁力搅拌器搅拌;干燥方法用正丁醇共沸蒸馏代替无水乙醇溶剂置换。

1.2 纳米氢氧化钙制备 将 150 mmol/L 的 CaCl_2 30 mL 加入锥形瓶,再加入 4.2 mmol/L 的 PEG400 10 mL,超声振动陈化 2 h。用注射器抽取 150 mmol/L 的 NaOH 50 mL,连接延长管并安装到注射泵上,延长管另一端接入锥形瓶。启动注射泵,设置输注速度 20 ml/h、时间 2.5 h、完成后的报警开关,开始输注 NaOH,同时磁力搅拌 1.5 h,速度 2 r/s,后改换超声波震荡 10 min,再换成磁力搅拌 1 h,直至 NaOH 输注结束,改用超声波继续振动

30 min,后离心机(GL-20A,湘西科仪厂)离心 30 min(3000 r/min),弃上清液,再用去离子水洗涤、离心,反复 3 次,获得纳米氢氧化钙湿凝胶。将湿凝胶转移至平底三角烧瓶中,加入 50 mL 正丁醇,磁力搅拌 1 h,后超声振动 30 min,加热回流,温度从正丁醇和水的共沸点 366 K,逐步升到正丁醇的共沸点 399 K,使水和正丁醇挥发,得到粉体放入真空干燥机抽滤,干燥箱加热 24 h,得到实验所需纳米氢氧化钙样品。

1.3 纳米氢氧化钙糊剂的制备 将上述新制备样品 10 g 倒入经过严格消毒 50 mL 烧杯中,再加入医用碘仿和甘油各 3 mL,用无菌牙科调刀调制 5 min,直至符合根管治疗糊剂要求的标准,即:在滴度试验中,该糊剂在 15~20 min 内停留在被挑起的调刀一面而不从边缘滴下;在拉长试验中,糊剂在被调刀的一面粘附垂直缓慢上提后能够拉长 3~5 cm 粗丝而不中断。

1.4 纳米氢氧化钙及其糊剂的表征 取上述新制备样品 1 mg 2 份,一份进行 KBr 压片,用红外光谱分析仪(NicoletNEXUSB70,日本)测定所含氢氧化钙及 PEG400 红外光谱图,以确定该粉体是经 PEG400 包覆的氢氧化钙;另一份平铺于单晶硅片镜面上进行透射电子显微镜(Hitachi H-600,日本)检测,以确定该粉体的粒径和形态。再将上述新制备糊剂 1 mg 平铺在单晶硅片上,用吹风机从硅片的反面将材料迅速吹干,后将硅片表面染色、镀金,置于扫描电子显微镜(Shimadzu SSX-550,日本)上,观察该糊剂表面和截面的形态及其结构。

1.5 纳米氢氧化钙糊剂溶血反应的测定 实验的分组为 0.9%生理盐水组成的阴性对照组(I组)、蒸馏水形成的阳性对照组(II组)和经固化干燥,研磨成粉末,以后以 2 g 粉末溶于 10 mL 蒸馏水比例制成浸提液的纳米氢氧化钙糊剂组(III组)。实验前将 I、II 和 III 组溶液高压灭菌 1 h。取每组溶液加入 3 支无菌 5 mL 试管中,每支 3 mL,放于 37 °C 恒温水浴锅中孵育 30 min;抽取正常成年人新鲜血液 2 mL(男女不限,抽前签订知情同意书,并征得医院伦理委员会同意),经抗凝后加入到 8~12 mL 生理盐水中,使其血红蛋白含量为 (1.250 ± 0.125) g/L 左右,分别取稀释后血液 0.2 mL 加入到各组试管,

37 ℃ 恒温水浴摇床中孵育 1 h, 离心 (800 r/min) 5 min, 取各管上清液加入 3 个比色杯, 每杯 200 μL , 用分光光度计 (UV-260, 上海天美科学仪器有限公司) 测定血红蛋白 A 值, 波长为 545 nm, 取各组测得 9 个值的平均值作为各组血红蛋白含量的相对值 (A 值) 用于差异性比较。再以溶血率 (%) = $A_{\text{III组}} - A_{\text{I组}} / A_{\text{II组}} - A_{\text{I组}} \times 100\%$ 作为各组生物安全性指标。评判标准: 当溶血率 $\leq 5\%$ 为材料不引起溶血; 溶血率 $> 5\%$ 为引起溶血; 当肉眼观察试管上层液为透明红色, 底部无红细胞沉集为全溶血; 上层液为橙色或茶色, 管底有少量红细胞为部分溶血; 当红细胞全部下沉, 上层液为淡黄色透明状为无溶血, 振摇后不能分散为凝集; 用显微镜观察沉集于管底红细胞形态和分布特点。

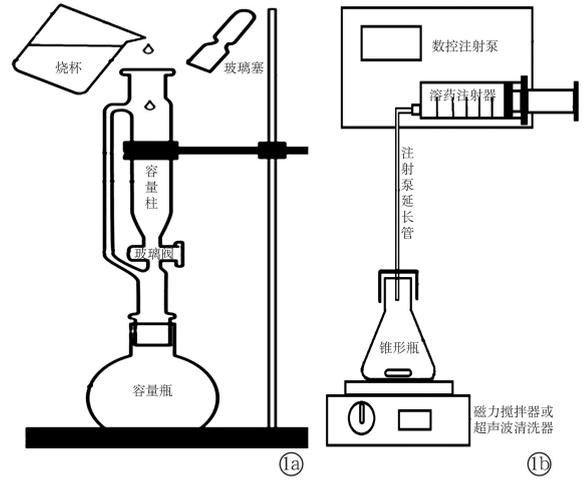
1.6 统计分析 采用 Origin 8.0 软件对多样本比较的单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行统计学分析, 显著性水准 0.05。

2 结果

2.1 制备纳米氢氧化钙实验系统和方法的改良

如图 1 所示, 改良后制备装置自动化程度更高, 密封性相对较好而起到防尘、隔菌, 试剂用量及生成物更准确、对操作人员更安全, 减少了制备人员的劳动强度; 超声波的使用由单纯用磁力搅拌或人工手摇制备纳米氢氧化钙的时间长达 72 h, 缩短到 24 h, 节约了时间和能源, 降低了成本; 选用 PEG400 包覆和正丁醇共沸蒸馏干燥, 能够明显得到分散均匀, 没有任何软或硬团聚的纳米氢氧化钙。

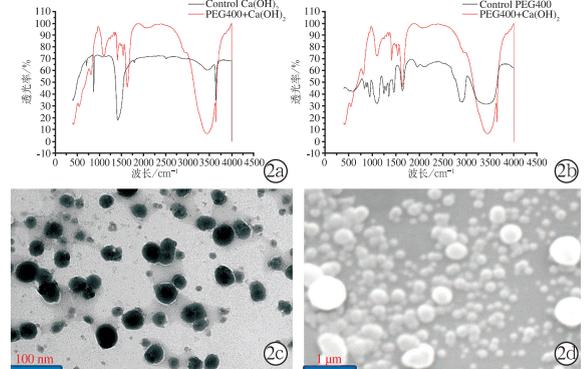
2.2 纳米氢氧化钙及其糊剂的表征 如图 2 所示, 经红外光谱检测, 本样品在 872.49 cm^{-1} 、 1433.18 cm^{-1} 、 1640.74 cm^{-1} 和 3655.58 cm^{-1} 附近有明显吸收峰, 此为氢氧化钙存在表征; 在 1098.13 cm^{-1} 、 1463.20 cm^{-1} 、 1652.03 cm^{-1} 、 3444.48 cm^{-1} 附近有非常强的振动吸收波峰, 为 PEG400 存在表征。透射电子显微镜检测样品粒径大约在 100~200 nm 之间, 呈球形和链球形等形态, 分散性好。扫描电子显微镜观察糊剂的表面致密、光滑, 横截面积大、呈六方体结构, 颗粒间隙小, 排列紧凑、致密。



1a: 简易手工操作玻璃滴定装置; 1b: 数控注射泵和磁力搅拌以及超声波振动的输注装置

图 1 制备纳米氢氧化钙的实验装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of nano-Ca(OH)₂ preparation method.



2a 和 2b 为红外光谱图显示样品含有氢氧化钙和 PEG400; 2c: 透射电镜观察样品粒径大小; 2d: 扫描电镜观察糊剂的形貌

图 2 纳米氢氧化钙及其糊剂的表征

Fig. 2 The physical characterization of nano-Ca(OH)₂.

2.3 纳米氢氧化钙糊剂对红细胞溶血的影响 肉眼观察发现, I 组试管中上层液体为浅黄色, 底部沉集红细胞; II 组上层液体为浅红色, 底部无红细胞沉集; III 组液体颜色为黄色, 底部聚集着红细胞。显微镜下, I 组和 III 组试管底部红细胞形态完整, 没有破裂状况出现, II 组试管底部没有发现完整红细胞; 经检测, III 组 A 值明显低于 II 组 A 值 ($P < 0.01$), 而高于 I 组 A 值 ($P < 0.05$); III 组的溶血率为 4.54%,

表 1 各组血红蛋白 A 值测量结果及比较

Table 1 Comparison and detected value of optical density of hemoglobin in each group

| 分组 | 第一管 | | | 第二管 | | | 第三管 | | | 平均值 |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------------------|
| | 第 1 杯 | 第 2 杯 | 第 3 杯 | 第 1 杯 | 第 2 杯 | 第 3 杯 | 第 1 杯 | 第 2 杯 | 第 3 杯 | |
| I 组 | 0.0454 | 0.0450 | 0.0442 | 0.0406 | 0.0380 | 0.0407 | 0.0417 | 0.0439 | 0.0451 | 0.043 ± 0.003 |
| II 组 | 0.6315 | 0.6729 | 0.6885 | 0.6987 | 0.7017 | 0.6823 | 0.7041 | 0.6591 | 0.6209 | 0.673 ± 0.030 |
| III 组 | 0.0709 | 0.0698 | 0.0717 | 0.0726 | 0.0710 | 0.0694 | 0.0721 | 0.0712 | 0.0734 | 0.071 ± 0.001 * 1 * 2 |

注: 与 I 组比较, * 1 $P < 0.05$; 与 II 组比较, * 2 $P < 0.01$

小于医用植入材料要求红细胞溶血率 ≤ 5 的允许范围,见表 1。

3 讨论

用于根管治疗的自制氢氧化钙糊剂的抗菌效果和生物安全性显著强于临床上常用根管消毒剂。而根管治疗糊剂纳米氢氧化钙无论在理论上,还是实验研究中均提示优于临床上普遍使用的氢氧化钙糊剂。为此,本实验利用当今较前沿的频率为 $2 \times 10^4 \sim 10^9$ Hz 超声波产生空穴效应与化学沉淀反应相结合的液相声化学沉淀法制备出纳米氢氧化钙。在此制备方法中将一些关键环节改进,结果提示经改良的制备装置自动化程度高、无菌、防尘效果好,减少了人力;超声波效应充分利用,显著减少了制备时间,节约了能源消耗和人力浪费,符合临床根管治疗对制备糊剂的要求^[5]。本实验用 PEG400 作为改性剂,是因为 PEG400 主要应用在医学眼科、牙科以及美容材料的添加剂中。作为旧材料新用途,它是一种含有羧基大分子聚合物,微溶于水,能有效控制粒径和比表面积、防止制备过程出现团聚,它不与 Ca^{2+} 发生强烈络合作用,使氢氧化钙的 OH^- 解离更多,碱性增强,消毒杀菌作用更持久,也有利于损伤的牙本质小管修复密封。本实验利用正丁醇共沸法,使纳米氢氧化钙分散性更好,颗粒更趋均匀,洗脱彻底而不会残留于表面,造成样品软团聚^[6]。

在对本样品表征中,发现其组成为带有 PEG400 的氢氧化钙;粒径大约在 $100 \sim 200$ nm 之间,达到纳米级范围;由其调制的糊剂形貌和分散性与形成之前的特征没有明显变化,说明本样品是经过改性分散均匀纳米级氢氧化钙^[7]。本实验对纳米氢氧化钙糊剂的生物相容性进行了初步探讨,因为糊剂置入根管将与牙髓和根尖周组织长期接触,需经毒性试验确认无毒,才能应用于人体^[8]。溶血试

验是一项特别急性毒性反应试验,是糊剂应用临床前粗筛的体外试验。本实验制备纳米氢氧化钙糊剂与人体红细胞接触后不会出现急性溶血反应,溶血率为 4.54% ,显著低于临床要求医用材料溶血率 $\leq 5\%$ 范围,符合国家医药行业对生物医学植入材料相关规定标准,初步确认可以作为根管治疗糊剂应用于临床^[9]。总之,本实验为纳米氢氧化钙的研发提供了一种新的思路和方法,为其早日应用于临床根管治疗提供了实验和理论依据。

参考文献

- [1] 惠志飞,景双林,周洲,等.百年根管治疗的成与败[J].口腔医学,2016,36(6):561-569
- [2] Asgary S, Nosrat A, Seifi A. Management of inflammatory external root resorption by using calcium-enriched mixture cement: a case report [J]. J Endod, 2011, 37(3): 411-413
- [3] 刘明,李泽,刘红娟,等.纳米氢氧化钙根管充填材料对乳牙根管治疗的安全性研究[J].中国实用医药,2014,9(8):107-108
- [4] Xu Q, Cheung GSP, Deng WJ, et al. Sucrose as a stable tracer for quantifying endodontic leakage [J]. J Dent Sci, 2012, 7(3): 267-271
- [5] Liang YH, Li G, Shemesh H, et al. The association between complete absence of post-treatment periapical lesion and quality of root canal filling [J]. Clin Oral Investig, 2012, 16(6): 1619-1626
- [6] 庞桂花,程志强,李俊锋.纳米羟基磷灰石的制备及改性[J].中国组织工程研究,2013,17(16):2989-2993
- [7] 韩向娜,黄晓,张乘坚,等.纳米氢氧化钙的制备及其在文物保护中的应用[J].自然杂志,2016,38(1):23-32
- [8] 张琛.根管充填的难点和误区[J].华西口腔医学杂志,2017,35(3):232-238
- [9] 车彤.根管治疗中不同充填材料的应用效果及其生物相容性[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(21):3927-3930

[收稿日期:2017-12-20]

(本文编辑 李四群)

关于《口腔医学研究》启用在线投稿系统的启事

《口腔医学研究》杂志网址为 www.kqxyj.com,网站主要包括投稿与查询系统、编辑加工系统、专家远程审稿系统 3 部分。作者可以通过网站投稿并查询稿件处理情况,审稿专家可实现网上审稿。

作者投稿的步骤:登录《口腔医学研究》网站→点击左侧“作者投稿系统”→注册→填写个人资料→登陆“作者投稿系统”即可。初次注册可能需要花费一定时间,但注册成功后投稿和查询便可节约大量时间和精力,今后投稿无需再次注册。

此外,编辑部的有关公告和通知也将通过网站发布,编辑部联系电话:027-87686117, E-mail: kqxyj@163.com。