



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110693724 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(21)申请号 201911071426.5

(22)申请日 2019.11.05

(71)申请人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

(72)发明人 傅柏平 周子淮 吴志芳 张雷青 赵维家

(74)专利代理机构 杭州求是专利事务有限公司 33200

代理人 郑海峰

(51)Int.Cl.

A61K 6/891(2020.01)

A61K 6/838(2020.01)

A61K 6/831(2020.01)

A61K 6/20(2020.01)

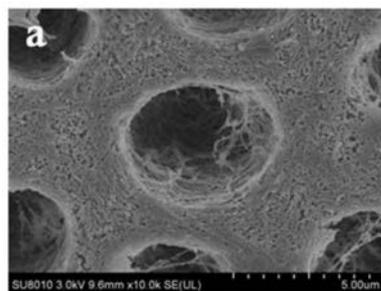
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种牙齿矿化液及其矿化方法

(57)摘要

本发明公开了一种牙齿矿化液及其矿化方法,牙齿矿化液可用于矿化胶原和牙齿。本发明的矿化液成分是分开放置的两部分,即包括含非胶原蛋白类似物与钙盐的复合物的试剂A、含有磷酸盐的试剂B。本发明的牙齿矿化液的制备时需要调节试剂A和试剂B的pH值为5-12。本发明的牙齿矿化液矿化方法为先用试剂A在牙齿表面涂抹静置,再用试剂B在牙齿表面涂抹静置后,根据需要可重复涂布数次,以实现牙齿矿化。此外,该发明的矿化液也可用相同的方法实现胶原的仿生矿化,包括单层重组胶原纤维、胶原凝胶和胶原海绵,浸泡或漂浮于试剂A中,然后取出用滤纸吸干,再浸泡或漂浮于试剂B中,实现仿生矿化,同样也可重复数次。



1. 一种牙齿矿化液,其特征在于,包括试剂A和试剂B;

所述的试剂A为包含非胶原蛋白类似物和钙盐的溶液;所述非胶原蛋白类似物为聚天冬氨酸、聚丙烯酸、聚乙烯基膦酸、聚谷氨酸、羧甲基壳聚糖、三偏磷酸钠、三聚磷酸钠等聚电解质中的一种或多种;钙盐为氯化钙和/或其水合物、氟化钙和/或其水合物、碳酸钙和/或其水合物、硝酸钙和/或其水合物、醋酸钙和/或其水合物中的一种或多种;

所述的试剂B为磷酸盐溶液;所述磷酸盐为磷酸三钠、磷酸三钾、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、磷酸三铵、磷酸二氢铵、磷酸氢二铵中的一种或多种;

所述的试剂A和试剂B的使用剂量体积比为1:(0.1~10),所述试剂A中的钙离子浓度与试剂B中磷酸根、磷酸一氢根及磷酸二氢根的总浓度的摩尔比为(0.1-10):1;试剂A和试剂B必须分开储存。

2. 如权利要求1所述的牙齿矿化液,其特征在于所述的试剂A中非胶原蛋白类似物含量为0.001-20g/L,钙离子浓度为0.001-10mol/L。

3. 如权利要求1所述的牙齿矿化液,其特征在于所述的试剂B中,磷酸盐溶液中的磷酸根、磷酸一氢根及磷酸二氢根的总浓度为0.001-10mol/L。

4. 如权利要求1所述的牙齿矿化液,优选其矿化液的特征在于:所述的试剂A中,非胶原蛋白类似物含量为3-10g/L,钙离子浓度为5.2-10mol/L;所述的试剂B中,磷酸盐溶液中的磷酸根、磷酸一氢根及磷酸二氢根的总浓度为5-10mol/L。

5. 如权利要求1所述的牙齿矿化液,其特征在于所述的非胶原蛋白类似物包括聚天冬氨酸、聚丙烯酸、聚乙烯基膦酸、三偏磷酸钠和三聚磷酸钠。

6. 一种如权利要求1所述的牙齿矿化液的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

将钙盐与非胶原蛋白类似物溶于去离子水中,并调节pH值至5-12,得到试剂A;将磷酸盐溶于去离子水中,并调节pH值至5-12,得到试剂B。

7. 一种基于权利要求1所述牙齿矿化液的牙齿矿化方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 先用试剂A在牙齿表面涂抹3s-30min,然后静置1-60min;再用试剂B在牙齿表面涂抹3s-30min,静置1-60min;

2) 重复步骤1)若干次或者不重复步骤1),然后将牙齿置于人工唾液或去离子水中1天,即可实现牙齿矿化,其中人工唾液或去离子水的pH为5-9。

8. 一种基于权利要求1所述的牙齿矿化液的矿化胶原方法,其特征在于:

1) 将单层重组胶原纤维、胶原凝胶或胶原海绵浸泡或漂浮于试剂A中3s-30min,然后取出用滤纸吸干,再浸泡或漂浮于试剂B中3s-30min;

2) 重复步骤1)若干次或者不重复步骤1);然后在37℃下将胶原置于人工唾液或去离子水中,静置1min-24h,实现仿生矿化,生成矿化胶原。

9. 一种如权利要求1所述的牙齿矿化液用于制备护牙产品的应用,其特征在于,所述护牙产品包括:用于牙齿矿化、预防牙齿腐蚀以及牙齿护理和牙周护理的口腔护理产品。

10. 一种基于权利要求1所述的牙齿矿化液配制成的矿化水凝胶,其特征在于,所述矿化水凝胶由试剂A、试剂B、去离子水、凝胶剂混合而得,所述的矿化水凝胶可用于3D打印制备骨粉、骨水泥或牙修复体。

一种牙齿矿化液及其矿化方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物材料领域,具体涉及一种牙齿矿化液及其应用于牙齿及胶原矿化的方法。

背景技术

[0002] 众所周知,牙齿的结构包含了内部的牙本质层和牙釉质外壳。牙本质是由矿化的胶原的多级、有序排列构成。羟基磷灰石有序地沉积在胶原模板的表面和内间隙区。而这些纤维内的矿物对牙齿和骨的机械性能和生物性能尤为重要。但是结构的复杂性使牙本质矿化一直是仿生矿化的难点。牙本质中还存在着牙本质小管,与牙髓相通。如果酸蚀、磨损或者牙龈退缩等因素引起牙釉质或牙骨质的丧失和牙本质的脱矿,就会导致引起牙本质小管暴露,冷热刺激或者机械刺激就会引起牙本质敏感的酸痛感。

[0003] 目前已用于牙齿矿化或牙本质小管封闭的方法包括氟化物、生物活性玻璃、极固宁脱敏剂、粘接剂等。但是其牙齿矿化和牙本质小管封闭效果不稳定。

[0004] 现有主流的牙本质再矿化模式是,脱矿牙本质浸泡于胶原蛋白类似物稳定的无定型磷酸钙(ACP)矿化液中,ACP进入胶原后转变成羟基磷灰石,实现纤维内矿化。但是ACP因饱和度低,钙磷供给速度较慢,矿化时间长,效果不稳定。生物活性玻璃也可用于牙齿的矿化,但其一过性同时大量释放钙磷离子,且没有非胶原蛋白类似物稳定,牙齿矿化效果也不稳定。现有的牙齿矿化产品如漱口水、护牙素和牙膏等均因与牙齿接触时间短暂,也无法长期提供钙磷来源。

[0005] 专利CN105267046中也提到了一种快速矿化牙本质的方法,需要通过合成非胶原蛋白类似物稳定的无定型磷酸钙溶液,将脱矿牙本质浸泡在矿化液中2天实现矿化。因为受到磷酸钙的溶解度饱和度影响,随着钙磷离子浓度增高,会在快速产生磷酸钙盐沉淀。现有的用于矿化的无定型磷酸钙矿化液中,钙的离子通常不会超过50mmol,所以提供矿化所需钙磷的速度仍较缓慢。

[0006] 而且配置好的钙磷混合矿化液或无定型磷酸钙容易发生相变,在溶液中形成羟基磷灰石等晶体,无法长期有效保存。

[0007] 本发明至少一方面目标是解决或消除至少一种或多种前述存在的问题。

[0008] 本发明至少一方面目标是提供一种能保存较长时间的牙齿矿化液。

[0009] 本发明至少一方面的目标是提供这种牙齿矿化液应用于牙齿及胶原矿化的方法。

发明内容

[0010] 本发明的目的在于克服牙齿及胶原矿化技术上存在的处理时间久、矿化效果不稳定、需持续提供钙磷来源、矿化液难以长期保存等问题,提供一种牙齿矿化液及其应用于牙齿及胶原矿化的方法。

[0011] 本发明提供了一种牙齿矿化液,包括试剂A和试剂B;

[0012] 所述的试剂A包含非胶原蛋白类似物和钙盐溶液;所述非胶原蛋白类似物为聚天

冬氨酸、聚丙烯酸、聚乙烯基膦酸、聚谷氨酸、羧甲基壳聚糖、三偏磷酸钠、三聚磷酸钠等聚电解质中的一种或多种；其平均分子量大约为300-100000。优选的，非胶原蛋白类似物的平均分子量大约300-40000。钙盐为氯化钙和/或其水合物、氟化钙和/或其水合物、碳酸钙和/或其水合物、硝酸钙和/或其水合物、醋酸钙和/或其水合物中的一种或多种；

[0013] 所述的试剂B为磷酸盐溶液；所述磷酸盐为磷酸三钠、磷酸三钾、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、磷酸三铵、磷酸二氢铵、磷酸氢二铵中的一种或多种；优选的，使用磷酸钾盐，还可以提供钾离子，更有效的实现暴露牙本质小管的神经去极化。

[0014] 所述的牙齿矿化液中，可以在试剂A和/或试剂B中还可以添加适量的氟化物，增加材料的防龋性能，如氟化钠、氟化钾、氟化钙、氟化锌、氟化亚锡、氟化锌铵、氢氟化月桂胺、二乙氨基乙基氢氟化辛酰胺中的一种或任意组合，添加量占牙齿矿化液的质量分数为0.1-10%。

[0015] 所述的牙齿矿化液中，也可以添加适量的增甜剂，如糖精、环己烷氨基磺酸盐、蔗糖、葡萄糖和丁磺氨钾等一种或任意组合，添加量占牙齿矿化液的质量分数为0.1-10%。

[0016] 所述的牙齿矿化液中，可添加适量的湿润剂，如聚乙二醇(多种不同的分子量)、丙二醇、丙三醇(甘油) 赤藓醇、木糖醇、山梨醇、甘露糖醇、乳糖醇中的一种或任意混合物，添加量占牙齿矿化液的质量分数为0.1-10%。

[0017] 所述的牙齿矿化液中，也可以添加适量的抗菌剂，增加材料的抑菌和杀菌性能，如苯甲酸、苯甲酸钠、苯甲酸钾、硼酸、酚化合物如β萘酚、氯代百里酚、百里酚、茴香脑、桉树脑、香芹酚、薄荷醇、苯酚、戊基苯酚、己基苯酚、庚基苯酚、辛基苯酚、己基间苯二酚、氯化月桂基吡啶鎓、氯化肉豆蔻基吡啶鎓、氟化十六烷基吡啶鎓、氯化十六烷基吡啶鎓，溴化十六烷基吡啶中的一种或任意混合物，添加量占牙齿矿化液的质量分数为0.1-10%。

[0018] 所述的牙齿矿化液中，也可以添加适量胶原蛋白交联剂，有助稳定胶原纤维网，如1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐盐酸等碳化二亚胺类、D-核糖、环糊精多醛中的一种或任意混合物，添加量占牙齿矿化液的质量分数为0.1-5%。

[0019] 所述的试剂A和试剂B的使用剂量体积比为(1:0.1)~10，所述试剂A中的钙离子浓度与试剂B中磷酸根、磷酸一氢根及磷酸二氢根的总浓度的摩尔比为(1-10):1；试剂A和试剂B分开储存。

[0020] 所述的试剂A中非胶原蛋白类似物含量为0.001-20g/L，钙离子浓度为0.001-10mol/L。

[0021] 所述的试剂B中，磷酸盐溶液中的磷酸根、磷酸一氢根及磷酸二氢根的总浓度为0.001-10mol/L。

[0022] 作为本发明的优选方案，所述的试剂A中非胶原蛋白类似物含量为5-10g/L，钙离子浓度为5.2-10mol/L；所述的试剂B中，磷酸盐溶液中的磷酸根、磷酸一氢根及磷酸二氢根的总浓度为5-10mol/L。

[0023] 本发明的牙齿矿化液体系A液必须先与胶原反应，在微量的聚电解质的存在下，形成聚电解质钙复合物，快速地运送钙离子先进入胶原，然后吸引磷酸根离子进入胶原。这不同于用合成好的无定形磷酸钙，因为高浓度下，需要稳定无定形的磷酸钙就需要加入大量的非胶原带白类似物。根据已发表的专利文献(CN1488574)，其最高的钙浓度为5M，与磷液混合配制ACP，因而，其实际最终的钙浓度低于5M，其矿化胶原纤维的效果不稳定。这与本发

明存在着本质的差别,本发明用的是聚电解质-钙复合物引导的先钙后磷的仿生矿化模式。现有矿化模式是采用非胶原蛋白类似物稳定的无定型磷酸钙作为矿化前驱体诱导仿生矿化。

[0024] 作为本发明的优选方案,所述的非胶原蛋白类似物包括三偏磷酸钠、三聚磷酸钠。通常在矿化领域,使用三偏磷酸钠和三聚磷酸钠这些小分子的低聚物的目的是先去磷酸化修饰胶原,再用高聚物稳定的无定形磷酸钙溶液矿化胶原。这些低聚物是目前尚未用于稳定无定形磷酸钙。本发明是通过小分子低聚物与钙形成了复合物,完全不需要添加其他的聚电解质,就可以获得良好的矿化效果。

[0025] 本发明还公开了所述的牙齿矿化液的制备方法,包括如下步骤:

[0026] 将钙盐与非胶原蛋白类似物溶于去离子水中,并调节pH值至5-12,得到试剂A;将磷酸盐溶于去离子水中,并调节pH值至5-12,得到试剂B。

[0027] 本发明还公开了所述牙齿矿化液的牙齿矿化方法,包括以下步骤:

[0028] 1) 先用试剂A在牙齿表面涂抹3s-30min,然后静置1-60min;再用试剂B在牙齿表面涂抹3s-30min,静置1-60min;

[0029] 2) 重复步骤1)若干次或者不重复步骤1),然后将牙齿置于人工唾液或去离子水中1天,即可实现牙齿矿化,其中人工唾液或去离子水的pH为5-9。

[0030] 进一步优选,两种试剂的表面涂抹时间为大约5-10min,两种试剂的静置时间为大约3-5min。通过牙齿矿化液处理,可以快速封闭牙本质小管,而且形成的羟基磷灰石可以达到200-300 μ m深处的牙本质小管,在人工唾液中静置大约1天,还获得全层脱矿牙本质的胶原纤维内矿化。

[0031] 本发明还公开了所述的牙齿矿化液的胶原矿化方法:1)将单层重组胶原纤维、胶原凝胶或胶原海绵浸泡或漂浮于试剂A中3s-30min,然后取出用滤纸吸干,再浸泡或漂浮于试剂B中3s-30min;2)重复步骤1)若干次或者不重复步骤1);然后在37 $^{\circ}$ C下将胶原置于人工唾液或去离子水中,静置1min-24h,实现仿生矿化,生成矿化胶原。即所述的牙齿矿化液试剂A中加入胶原纤维后,与试剂B混合,也可以用于制备矿化的胶原纤维材料。I型胶原作为牙本质主要的有机成分,同样可以用牙齿矿化液矿化胶原。其中人工唾液是用来模拟口腔内环境,即使置于去离子水中仍然可以获得胶原矿化。

[0032] 本发明还公开了所述的牙齿矿化液用于制备护牙产品的应用,所述护牙产品包括:用于牙本质小管封闭和牙齿脱敏的药物、用于预防或者治疗牙齿腐蚀的药物、以及用于牙齿护理和牙周洁治的口腔护理产品。

[0033] 所述矿化水凝胶由试剂A、试剂B、凝胶剂、去离子水混合而得,所述的矿化水凝胶可用于3D打印制备骨粉、骨水泥或牙修复体。根据需要还可以在矿化水凝胶混合过程中加入固化剂、发泡剂和聚电解质;凝胶剂为甲基纤维素、海藻酸钠、羧甲基纤维素钠、羧丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、壳聚糖、聚戊二酸丙二酯、聚己内酯中的一种或任意多种的混合。

[0034] 本发明相对于现有技术而言,具有以下有益效果:

[0035] 本发明中的牙齿矿化液,不同于原先的低浓度的磷酸钙矿化液,通过提高浓度并且将钙磷分离,可以增强牙齿矿化液在牙本质小管中和胶原纤维的渗透作用。通过在牙齿矿化液试剂A中添加聚天冬氨酸等非胶原蛋白类似物,稳定钙离子,减缓与磷酸根离子接触

时形成羟基磷灰石晶体的速度,有利于试剂B的渗透,到达深层的牙本质小管。另外在高浓度条件下,可以生成大量的羟基磷灰石,严密地封闭牙本质小管,而且与天然牙本质中的羟基磷灰石成分接近,具有更好的生物相容性。克服了目前技术中封闭深度浅,容易脱落和磨损,制备成本高,需要反复长期坚持使用的缺陷,有效的隔绝外界对牙本质小管的刺激,而且有利于长期储存,具有广阔的市场前景。另外,牙齿矿化液快速处理,可以为脱矿牙本质胶原快速提供大量的钙磷离子,作为牙本质胶原矿化的矿物来源,并且在模拟口腔环境的人工唾液中静置1天左右就可以达到全层矿化,也解决了现有的脱矿牙本质矿化时间长、矿化效果不稳定、需要持续提供钙磷来源的问题。

[0036] 本发明的牙齿矿化液将会是极为有用的,不仅可以用于口腔,还可以通过处理几分钟即可在1天内实现胶原纤维内矿化,使用的合成原料不包含有毒性的材料,生物安全性好,也具有合成骨移植相关材料的前景。

附图说明

[0037] 图1a为脱矿牙本质表面的扫描电镜(SEM)图;;

[0038] 图1b为脱矿后的牙本质小管纵断面的扫描电镜(SEM)图;

[0039] 图2为实施例1中牙齿矿化液处理后牙本质样品的SEM图;

[0040] 其中,图2a为牙齿矿化液处理后牙本质样品表面形貌;图2b为牙齿矿化液处理后牙本质样品纵断面形貌;图2c为图2b中接近表面的牙本质小管放大图。

[0041] 图3为实施例1中矿化处理后重组I型胶原的TEM图;

[0042] 其中,图3a为实施例1中矿化处理后重组I型胶原5000倍镜下TEM图;图3b为实施例1中矿化处理后重组I型胶原10000倍镜下TEM图;图3c为实施例1b中矿化处理后重组I型胶原的SAED图。

具体实施方式

[0043] 下面结合附图和具体实施方式对本发明做进一步阐述和说明。本发明中各个实施方式的技术特征在没有相互冲突的前提下,均可进行相应组合。

[0044] 实施例1

[0045] 将30g氯化钙和3g聚天冬氨酸溶于20ml水中,并调节pH至7,配制成试剂A。按照钙磷比1.67的比例配制试剂B,并调节pH至7。

[0046] 制备脱矿牙本质片:制备大小约3*3*2mm的牙本质片,用37%的磷酸酸蚀15s,去离子水冲洗30s。用试剂A在牙本质表面涂抹20min,静置10min。然后用试剂B涂抹20min,静置10min。

[0047] 制备单层重组I型胶原的模型:取8 μ L鼠尾I型胶原纤维原液溶于0.5mL缓冲液(50mM甘氨酸,200mM氯化钾,PH=9.2)。吸取3 μ L胶原溶液滴在镊网上,放在37 $^{\circ}$ C恒温箱10小时以上,取出后0.05%的戊二醛交联1小时后,冲洗多余的戊二醛溶液备用。

[0048] 单层重组胶原的矿化:将负载重组I性胶原的镍网漂在试剂A上10分钟,取出后吸干多余的试剂A,再漂浮在试剂B上处理10分钟,取出后干燥。然后在37 $^{\circ}$ C条件下将镍网放入提前配制好的pH在6-8的人工唾液中静置1小时。将镍网用去离子水、50%酒精水溶液、无水酒精梯度脱水后,用TEM及SAED观察。

[0049] 图1为脱矿牙本质样品的SEM图片,图1a为脱矿后的牙本质表面形貌,图1b为脱矿后的牙本质小管纵断面形貌。上述图片证明了脱矿可以使牙本质小管完全暴露,而且牙本质小管内没有矿物质填充。

[0050] 图2为牙齿矿化液处理脱矿牙本质样品后SEM图。其中图2a表明了脱矿牙本质表面用本发明的牙齿矿化液处理后,可以在牙本质小管的表面覆盖一层致密均匀的羟基磷灰石。图2b显示牙齿矿化液可以渗透到牙本质小管的深度约为200 μm 。图2c为图2b中牙本质小管的放大图,显示牙本质小管管腔被羟基磷灰石致密地封闭。其中牙本质小管中充填矿物的元素原子数百分比为1.69。

[0051] 图3为单层重组I形胶原的TEM图,发现胶原纤维内外都发生了明显的矿化(图3a、图3b),SAED结果(图3c)表示胶原内外的晶体为羟基磷灰石。

[0052] 以上所述的实施例只是本发明的一种较佳的方案,然其并非用以限制本发明。有关技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,还可以做出各种变化和变型。因此凡采取等同替换或等效变换的方式所获得的技术方案,均落在本发明的保护范围内。

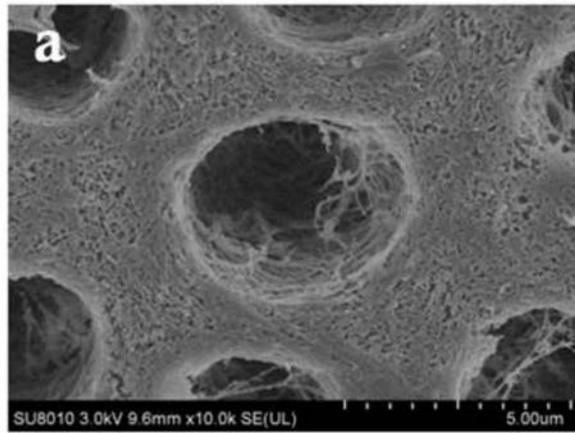


图1a

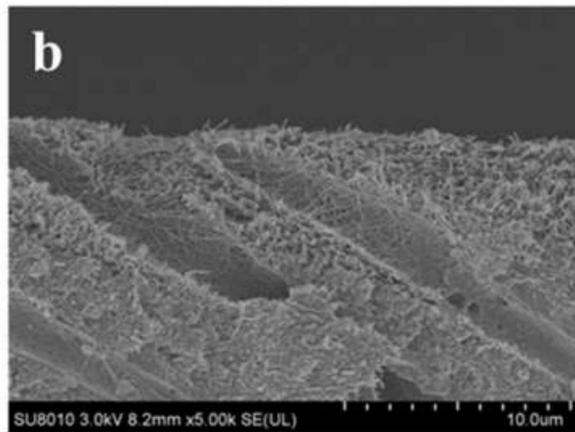


图1b

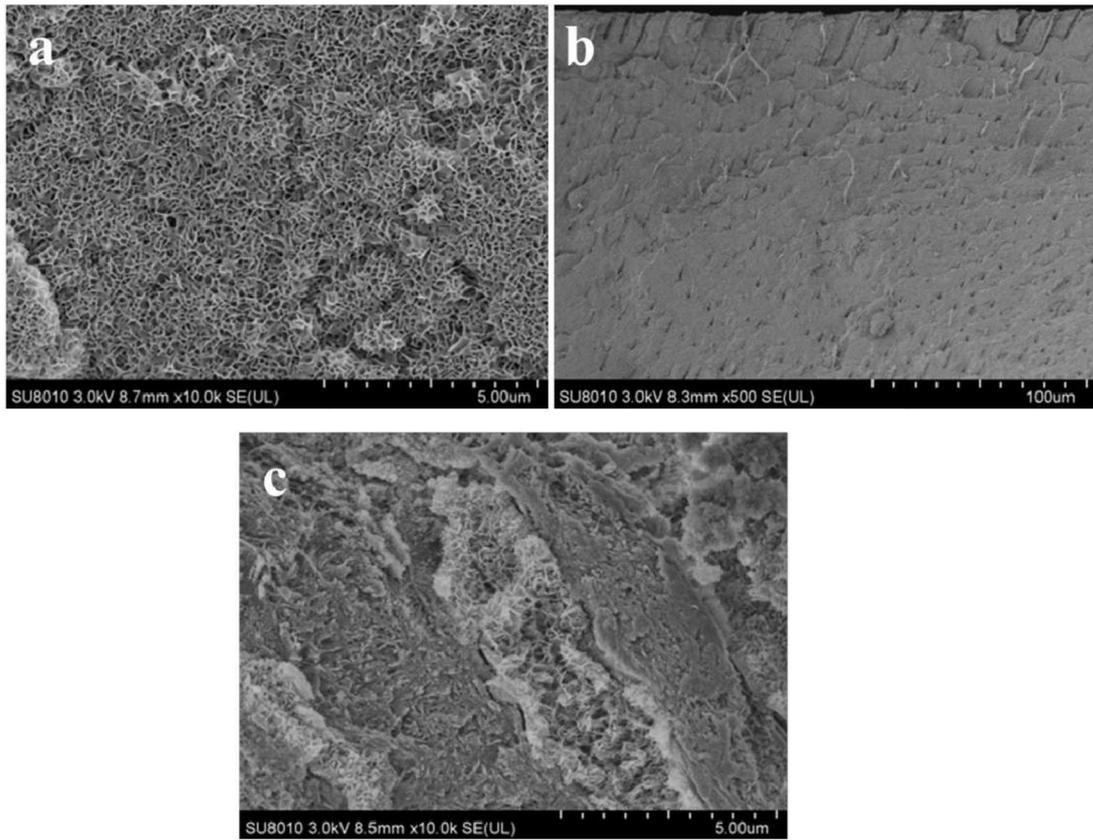


图2

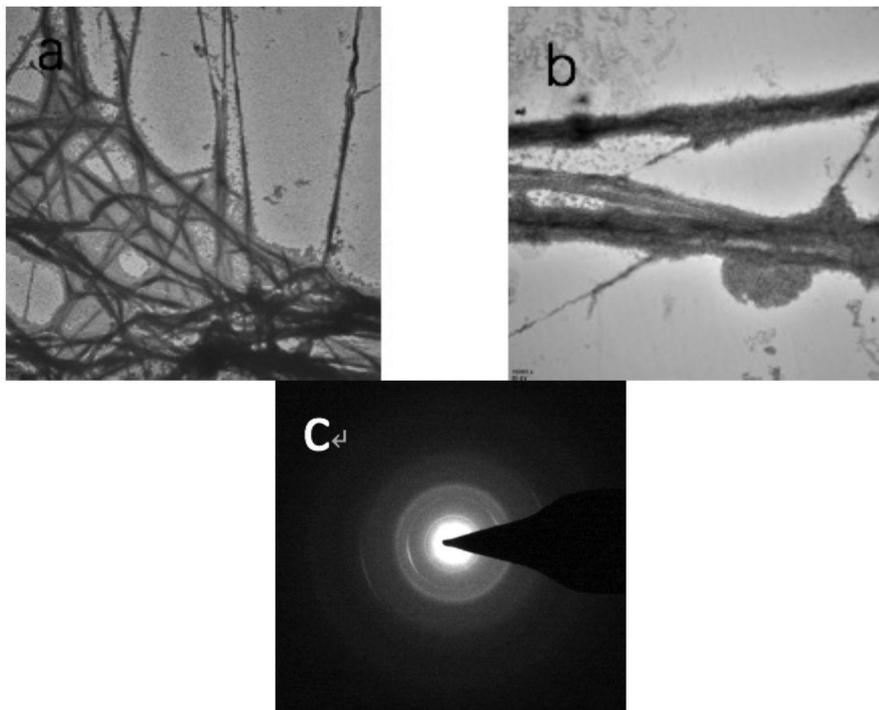


图3