复合材料学报 第27卷 第6期 12月 2010年
Acta Materiae Compositae Sinica Vol. 27 No. 6 December 2010

文章编号：1000-3851(2010)06-0113-07

胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶复合材料的制备与表征

冯文坡[1]，祁元明[2]，汤克勇[1*]

(1. 郑州大学 材料科学与工程学院 郑州 450001；2. 郑州大学 生物工程系 郑州 450001)

摘　要：以硝酸钙、磷酸氢二铵、酸溶胶原和阿拉伯树胶为原料，采用原位合成法制备了胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶(Col-HA/Gum A)复合材料。利用X射线衍射仪(XRD)、扫描电镜(SEM)、傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR)研究与表征了复合材料的结构特征，并研究了其力学性能、吸水性、酶降解性及急性细胞毒性。结果表明，所得到的复合材料中无机相主要是低结晶度的羟基磷灰石，这种羟基磷灰石均匀地分散于胶原-阿拉伯树胶所构成的复合体中，形成了新的界面。力学性能、吸水性能、酶降解性及急性细胞毒性的研究结果表明，该复合材料是一种颇有前途的骨组织替代材料。

关键词：原位合成法；胶原；羟基磷灰石；阿拉伯树胶；复合材料；骨修复材料

中图分类号：TB303；TB332　　**文献标志码：**A

Preparation and characterization of collagen－hydroxyapatite/gum Arabic composite

FENG Wenpo[1]，QI Yuanming[2]，TANG Keyong[1*]

(1. College of Materials Science and Engineering，Zhengzhou University，Zhengzhou 450001，China；
2. Bioengineering Department，Zhengzhou University，Zhengzhou 450001，China)

Abstract：$Ca(NO_3)_2$，$(NH_4)_2HPO_4$，acid dissolved collagen and gum Arabic were used as the raw materials to prepare collagen-hydroxyapatite/gum Arabic (Col-HA/Gum A) composite in situ. The structures of the composite were investigated by XRD，SEM and FTIR. The mechanical properties，water absorption，enzyme degradation and cytotoxicity of the composite were investigated as well. The results show that the inorganic substance in the composite materials is hydroxyapatite，uniformly distributed in the Col－Gum A composite with relatively low crystallinity，and a new interface appeared by the interactions among them. The study on the mechanical properties，water absorption，enzyme degradation and cytotoxicity indicates a potential use in bone replacement for the new composite.

Keywords：in situ synthesis；collagen；hydroxyapatite；gum Arabic；composite；bone repairing material

由于创伤、肿瘤、先天性畸形、感染、病理等因素及人口老龄化的加剧，骨折、骨缺损患者显著增加，每年有数以百万计的骨缺损患者需接受手术治疗[1-2]，但效果并不理想，已成为长期困扰骨科医生的一个棘手问题。“组织工程”概念的提出，为骨缺损修复提供了全新的思路和方法，为患者的康复带来了曙光。

从成分来看，骨组织是由多种细胞和大量钙化的、坚硬的细胞间质组成，可以看作是由胶原蛋白、多糖基质等天然高分子构成的连续相及弥散于天然高分子基质中的羟基磷灰石晶粒复合而成的复合材料。近年来，通过模拟骨组织，以胶原、羟基磷灰石为原料，制备能够替代骨的复合材料已成为人们研究的热点之一[2-6]。研究结果表明，该复合材料有效地模拟了骨的成分，而且具有良好的生物相容性、骨传导性及骨诱导性[5, 7-8]。但是，由于制备的胶原-羟基磷灰石(Col－HA)复合材料存在着力学强度低、溶胀度高、降解快等缺限，限制了其在临床上的应用[9]。

基于骨组织中含有多糖基质，向胶原-羟基磷灰石复合材料中加入多糖可能有助于改善胶原-羟基磷灰石复合材料的性能。为此，一些天然多糖如壳聚糖[9-12]、藻酸盐[13]、骨连接素[14]、硫酸软骨素[15]、卡拉胶[16]、透明质酸[17]等都被用作交联剂或分散剂，利用多糖和蛋白质间自发的Maillard反应，形成蛋白-多糖复合物[18]来提高胶原-羟基磷灰

收稿日期：2009-11-12；**收修改稿日期：**2010-12-24
基金项目：国家自然科学基金资助项目(50973097)
通讯作者：汤克勇，教授，博士生导师，研究方向：天然高分子材料　E-mail：keyongtang@yahoo.com.cn

石复合材料的性能。本研究中，在胶原-羟基磷灰石复合材料中引入了一种新的多糖——阿拉伯树胶(Gum A)。阿拉伯树胶是一种天然的植物多糖，含有钙、镁、钾、铁等多种阳离子，无毒[19]，具有良好的生物相容性[20]，能促进生物矿化[21]，已广泛用于化学、生物、医药、食品等领域[22-23]。

本研究中采用原位合成的方法制备了胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶(Col-HA/Gum A)复合材料，研究与表征了所得到的复合材料的结构与性能。结果表明，该复合材料具有天然骨的结构特征和良好的细胞相容性，是一种颇有前途的骨组织替代材料。

1　实验部分

1.1　材料和仪器

兔皮Ⅰ型胶原，采用[24-25]的方法提取；MTT(Methyl thiazolyl tetrazolium，甲基噻唑基四唑)及Ⅰ型胶原酶(Sigma 公司)；DMEM 培养基(Dulbecco's minimum essential medium，Gibco 公司，美国)；胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)；MEF-WT 细胞(wild-type，mouse embryonic fibroblasts，野生型鼠胚胎成纤维细胞，实验室常规保存)。阿拉伯树胶(天津市光复科技发展有限公司)、$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 及冰醋酸(天津市东丽区天大化学试剂厂)、NaOH 及氨水(天津市化学试剂三厂)、$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$(汕头市金砂化工厂有限公司)、$(NH_4)_2HPO_4$(郑州派尼化学试剂厂)、DMSO(dimethyl sulphoxide，二甲基亚砜，天津市化学试剂一厂)、苯酚(上海昊化化工有限公司)、50%戊二醛(天津大茂化学试剂厂)等均为分析纯。

81-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司)，800B 型离心机(上海安亭科学仪器厂)，THZ-82 型恒温振荡器(金坛市富华仪器有限公司)，Nicolet 200 型傅里叶转换红外光谱仪(Thermo Nicolet 公司，美国)，PW-1710 型 X'Pert 射线衍射仪及 Highscore 分析软件(PHILIPS 公司，荷兰)，FEI-quanta 200 型扫描电镜(FEI 公司，荷兰)，CMT6104 型微机控制电子万能试验机(美特斯工业系统(中国)有限公司)，CP214C 型电子天平(奥豪斯仪器(上海)有限公司)，Mode 680 型酶标仪(Bio-Rad，美国)，MCO-15AC 型 CO_2 培养箱(SANYO，日本)，96 孔板(JET，加拿大)。

1.2　样品制备

1.2.1　中性胶原溶液的制备

将胶原溶于 0.05 mol/L 的醋酸溶液中制备 1%酸性胶原溶液，于低温下(10 ℃以下)添加 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 至 0.02 mol/L，用 2.5 mol/L 的 NaOH 溶液调 pH 至中性，得中性胶原溶液。

1.2.2　复合材料的制备

向中性胶原溶液中加入 10%的阿拉伯树胶溶液，用氨水调 pH 至 7.0 左右，采用磁力搅拌器低温搅拌 20 min，混匀。向胶原-阿拉伯树胶混合溶液(Col/Gum A＝1∶1，质量比)中同时缓慢滴入 1.2 mol/L 的 $Ca(NO_3)_2$ 和 0.72 mol/L 的 $(NH_4)_2HPO_4$ 溶液(1∶1，体积比)，控制反应温度(10 ℃以下，下同)和 pH(pH＝7.2)，磁力搅拌器充分搅拌 2 h 后，于 35 ℃陈化 20 h 以上。弃去上清液，用蒸馏水反复洗涤沉淀，1000 g 离心 5 min，弃去上清液，得半固体浆料。2 mL 一次性注射器，切去针头端，将呈半固体状的浆料挤压到注射器内，推出成型，室温下自然干燥，得到胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶复合材料。同样方法制备胶原-羟基磷灰石复合材料，和不含胶原与阿拉伯树胶溶液的羟基磷灰石。部分材料用 0.25%戊二醛交联[26-27]备用。

1.3　复合材料的结构与性能

采用 PHILIPS 的 X'Pert 射线衍射仪(X-ray diffraction，XRD)研究复合材料的晶相结构和结晶度；采用傅里叶转换红外光谱仪(Fourier Transform Infrared Spectroscope，FTIR)研究与分析复合材料的化学键结构；采用 FEI-quanta 200 型扫描电镜(Scanning electron microscopy，SEM)观察复合材料的微观结构；采用 CMT6104 型微机控制电子万能试验机研究复合材料的力学性能。

对复合材料的亲水性能的评价方法为：取干燥材料，精确称重(W_d)后，25℃条件下于 PBS(pH＝7.4)中浸泡 24 h，取出后，用吸水纸吸干，置管底垫有吸水纸的离心机中 1000 g 离心 10 min 后，称量(W_h)。测 5 个平行试样，通过公式(1)[28]计算复合材料的吸水率(W_a)：

$$W_a = \frac{W_h - W_d}{W_d} \times 100\% \tag{1}$$

对复合材料的体外酶解稳定性的评价方法为：将精确称量的材料(W_0)浸于一定浓度的胶原酶/PBS(50 U/mL，pH＝7.4)溶液中，摇床 37 ℃、

20 r/min消化 4 h 后，干燥称重(W_t)，每个样品平行测 3 次，通过公式(2)[28-29]计算复合材料的酶降解率(R_d)：

$$R_d=\frac{W_0-W_t}{W_0}\times 100\% \quad (2)$$

采用 SPSS10.0 软件作数理统计，独立样本 t 检验，$p<0.05$ 为有统计学意义。

1.4 急性细胞毒性

急性细胞毒性是评价生物医用材料生物相容性的指标之一。本研究中按照 GB/T 16886.5－2003/ISO 10993－5：1999[30] 及 GB/T 16175－1996[31]的规定，采用细胞生长抑制法，即 MTT 比色法进行。

1.4.1 浸提液的制备

取一定量的交联复合材料，浸入到 70% 的酒精中瞬间灭菌，无菌工作台上用紫外线照射、鼓风直至干燥。将干燥的复合材料浸入到无血清的 DMEM 培养基(含青霉素及链霉素各 10 万 U/L)中，复合材料与浸提介质(DMEM 培养基)比为 0.2 g/mL。置 37 ℃培养箱中 24 h，提取浸提介质即为浸提液，加血清至终浓度为 10%(体积比，下同)，4 ℃贮藏备用。

1.4.2 细胞培养

本研究用的 MEF-WT 细胞为实验室常规保存。37 ℃下，5% CO_2 的细胞培养箱中，DMEM 培养基常规培养。培养基中含 10% 胎牛血清，4.5 g/L葡萄糖，25 mg/mL 抗坏血酸，青霉素及链霉素各 10 万 U/L。每两天换一次液。

1.4.3 细胞活性

取 96 孔板加入 200 μL 浓度为 5000/mL 的细胞悬液，正常培养 1 d 后换成含 10%血清的浸提液继续培养，分别处理 1、3、6 d 后再换成正常培养基并加入 20 μL 的 MTT (含 0.5% MTT 的 PBS 溶液)，4 h 后弃去，加入 200 μL 的 DMSO，振荡 10 min至溶解，酶标仪于 570 nm 处测 OD (optical density) 值。正常培养为正常对照(阴性对照)，培养基中添加苯酚溶液(64 g/L) 为阳性对照，不加细胞培养为空白对照以消除背景。通过公式(3)[31]计算细胞的相对增殖度(R_g)：

$$R_g=\frac{\text{实验组吸光度}}{\text{正常对照组吸光度}}\times 100\% \quad (3)$$

采用 6 级毒性分级法[31](表 1)评价材料的毒性程度。反应结果为 0 级或 1 级即为合格。

表 1 细胞毒性的分级标准

Table 1 Quantitative scores used in the cytotoxicity tests

Scores(Grade)	R_g/%
0	≥100
1	75～99
2	50～74
3	25～49
4	1～24
5	0

2 结果与讨论

2.1 XRD 分析

图 1 为自然骨(鸡骨)与所制备试样的 XRD 图谱。经 Highscore 分析软件分析处理比对可知，图 1中 HA、Col-HA 及 Col-HA/Gum A 的衍射峰与标准羟基磷灰石晶体的衍射峰图谱一致，表明合成试样中的无机相主要为羟基磷灰石。与纯品羟基磷灰石的衍射峰相比明显宽化、重叠，表明所合成的羟基磷灰石晶粒的结晶度较低。比较图 1 中 Col-HA、Col-HA/Gum A 和 Bone 3 个图谱，发现复合材料和天然骨的衍射峰的位置、数量一致，说明复合材料中的无机相与天然骨无机相相似，但复合材料中羟基磷灰石的(002)、(211)、(004)晶面的衍射峰比天然骨的衍射峰高，表明其结晶度存在差异，也表明体外重建的胶原在一定程度上会影响羟基磷灰石晶体的取向。

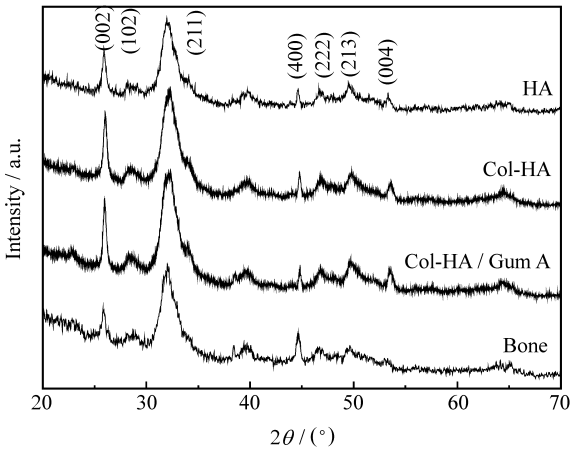

图 1 所制试样与天然骨的 X 射线衍射图谱

Fig. 1 XRD patterns of the samples and the natural bone

2.2 红外光谱(FTIR)分析

采用 FTIR 对比分析了胶原、胶原-羟基磷灰石及胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶复合材料的分子

构成(图 2)。图 2 中可以看出，胶原(Col)中酰胺 A 带及氢键的复合峰在 3410 cm^{-1} 处[32-33]；2930 cm^{-1} 处的宽峰为酰胺 B 带[32-33]，是蛋白质的游离氨基的伸缩振动峰。随着羟基磷灰石的合成及阿拉伯树胶的加入，酰胺 A 带蓝移至 3430 cm^{-1} 处及 3440 cm^{-1} 附近，而酰胺 B 带在复合材料中消失，说明体系中氨基、氢键数量逐步减少。1640 cm^{-1}、1543 cm^{-1}、1237 cm^{-1} 分别归属于酰胺Ⅰ带、Ⅱ带和Ⅲ带[32-34]，在胶原-羟基磷灰石及胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶复合材料中分别出现消失、削弱或蓝移。1110～1040 cm^{-1} 处则与磷酸基有关[35]，在复合材料中出现红移。所有这些都说明羟基磷灰石与胶原、阿拉伯树胶之间存在着相互作用。由此可以推断，复合材料中产生了新的界面，各相间结合得比较紧密。由于这些生物高分子中的 C═O 对 Ca^{2+} 的配位和—OH 的氢键作用，使得生成的羟基磷灰石被胶原蛋白和阿拉伯树胶吸附和包裹。另外，胶原中酰胺 B 带、Ⅱ带是蛋白质的自由氨基的吸收峰，它们的消失提示该位点可能是生物矿化时晶核的成核位点。1400 cm^{-1}、876 cm^{-1} 为 CO_3^{2-} 的吸收峰[36-37]，提示在复合材料的合成过程中，羟基磷灰石的某些—OH 被 CO_3^{2-} 所取代，这在天然骨中普遍存在[2,38]。复合材料中的 CO_3^{2-} 可能是在合成过程中，来自空气中的 CO_2 溶于溶液中形成的。

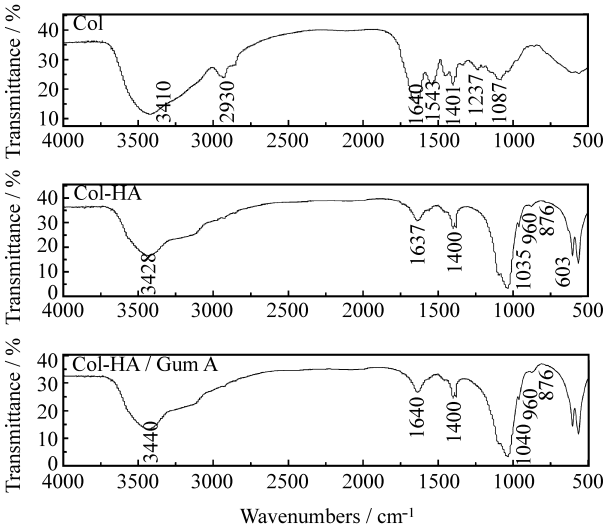

图 2　所制试样的 FTIR 图谱

Fig. 2　FTIR spectra of the samples

2.3　扫描电镜(SEM)分析

图 3 为胶原-羟基磷灰石及胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶复合材料的 SEM 图。从图中可以看出，在胶原-羟基磷灰石复合材料中形成了较为光滑的界面结构；胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶形成细小的颗粒状结构，颗粒与颗粒之间有大量的孔隙存在。

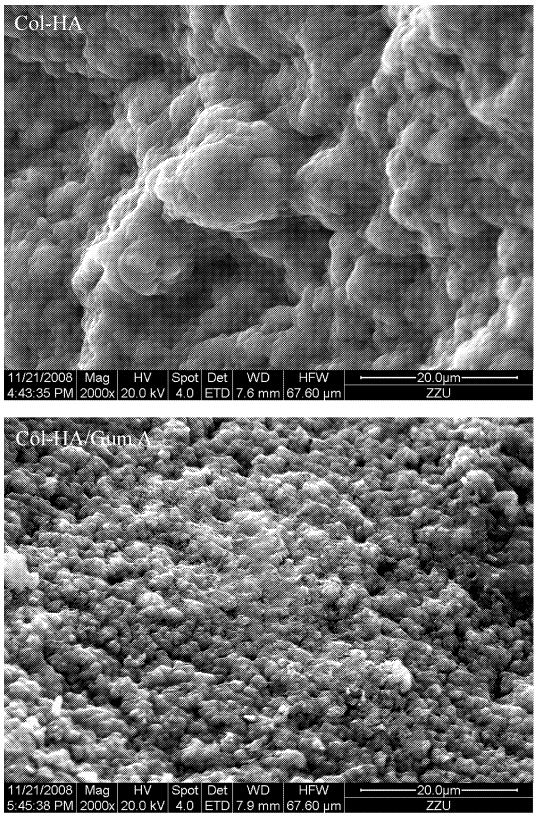

图 3　Col－HA/及 Col－HA/Gum A 复合材料的 SEM 图

Fig. 3　SEM of Col－HA and Col－HA/Gum A composites

中性条件下，胶原能够很容易地形成 45～60 nm的胶原纤维，形成一种网状的自组装结构，随着胶原浓度的增加，在它的自组装结构上还能够逐级组装成更粗更长的微纤维[39-40]。由此可以认为，在胶原-羟基磷灰石复合材料合成过程中，羟基磷灰石晶核在胶原的纤维束中形成；而在合成胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶复合材料的混合体系中，一方面存在着胶原与阿拉伯树胶之间 Maillard 反应；另一方面，还存在着胶原的自组装，形成胶原纤维；同时，还有羟基磷灰石晶粒的合成。在它们的共同作用下，胶原-阿拉伯树胶复合体将羟基磷灰石颗粒紧紧地包裹起来，形成了细小的胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶晶粒。

2.4　力学性能

复合材料和各种硬组织的力学特性见表 2，其中硬组织数据引用于文献[41]。

表 2 各种材料的力学性能

Table 2 Mechanical properties of various materials

Samples	Compression modulus/GPa	Compressive strength/MPa
Dense bone	7～30	100～230
Spongy bone	0.05～0.5	2～12
Col-HA/Gum A	2.74±0.25*	15.95±0.71*
Col-HA	2.21±0.21	10.37±1.04

* $p<0.01$

由表可知，所合成的复合材料的压缩模量和压缩强度都介于松质骨和密质骨之间，因此该复合材料具有一定的支撑能力，而且添加阿拉伯树胶，提高了材料的力学性能。

2.5 亲水性

表 3 是胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶及胶原-羟基磷灰石复合材料的吸水率。经浸水后，Col－HA/GumA 和 Col－HA 复合材料的吸水率分别为 37.53%及 41.76%，$p<0.01$。从以上结果可以看出，在加入阿拉伯树胶后，复合材料的吸水率明显下降。这可能是因为阿拉伯树胶通过与胶原之间的 Maillard 反应，实现了胶原与羟基磷灰石、阿拉伯树胶之间的结合，使材料各成分之间结合得更为紧密，降低了复合材料中供液体进入的有效空间，同时也减少了材料表面的极性基团[9, 26]。而极性基团的多少是影响材料亲水性的一个重要因素。因此胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶复合材料比胶原-羟基磷灰石复合材料具有更低的吸水率，即其溶胀性下降。

表 3 试样的吸水率

Table 3 Water absorption of samples

Samples	Mean/%	SD/%	SE/%
Col-HA/Gum A	37.53	0.722 0	0.322 9
Col/HA	41.76	0.432 6	0.193 5

SD：Standard deviation；SE：Standard error.

2.6 体外酶降解性

表 4 为胶原-羟基磷灰石及胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶复合材料的体外酶降解性能。由表 4 可知，其体外酶解稳定性在 Col－HA/Gum A(a) 与 Col－HA (a) 间、Col－HA/Gum A(b)与 Col－HA (b)间，a 与 b 间差异显著($p<0.01$)，具有统计学意义。

表 4 复合材料的酶降解性能

Table 4 Biodegradation degree of the composites

Samples	Mean/%	SD/%	SE/%
Col－HA/Gum A(a)	11.52	0.1815	0.1048
Col－HA (a)	14.63	0.3905	0.2254
Col－HA/Gum A(b)	1.596	0.1669	0.0964
Col－HA (b)	2.319	0.2028	0.1171

a：Non-crosslinked；b：Crosslinked with glutaraldehyde.

可以看出，在加入阿拉伯树胶后，复合材料的耐酶降解稳定性得到提高。结合红外光谱(图 2)及吸水性能测试(表 3)结果，可以认为，阿拉伯树胶在胶原与羟基磷灰石之间起到了交联作用。因此，可以通过改变阿拉伯树胶及戊二醛的用量来控制胶原-羟基磷灰石复合材料的耐酶降解性能。

2.7 急性细胞毒性

正常对照组与实验组中的细胞都能正常贴壁生长，呈长梭形，胞浆透亮。所测 OD 值与相对增殖度如表 5 所示。

表 5 MEF-WT 细胞培养 2 d、4 d、7 d 后的吸光度及相对增殖度

Table 5 OD values and R_g of MEF-WT cell being cultured for 2, 4 and 7 days

Groups	2 d		4 d		7 d	
	OD values	R_g(%)	OD values	R_g(%)	OD values	R_g(%)
Normal control	0.1058±0.006	100	0.3857±0.058	100	0.4200±0.053	100
Positive control	0.0335±0.004	31.7	0.1580±0.031	41.0	0.1110±0.030	26.4
Col－HA(a)	0.0807±0.005	76.3	0.3797±0.013	98.4	0.3937±0.010	93.7
Col－HA(b)	0.0867±0.013	81.9	0.3787±0.017	98.2	0.4047±0.028	96.4
Col－HA/Gum A(a)	0.0807±0.006	76.3	0.3267±0.006	84.7	0.3433±0.025	81.7
Col－HA/Gum A(b)	0.0943±0.018	89.1	0.3367±0.007	87.3	0.3897±0.056	92.8

a：100% composite extraction solution；b：50% composite extraction solution.

根据 GB/T 16175－1996[31]中规定的细胞毒性分级标准(0～5 级)及结果评价可知，该实验材料的细胞相对增殖度均大于 75%，结果诊断为 1 级。提示该复合材料仅具有轻微细胞毒性，结果合格。同时也提示，在添加阿拉伯树胶后，所得到的胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶复合材料仍具有良好的细胞相容性。

3 结　论

根据生物矿化原理，在胶原和阿拉伯树胶有机溶液中，借助胶原体外自组装的特性，通过原位合成的方法制备了胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶三元复合材料。扫描电镜和 XRD 研究表明低结晶度的羟基磷灰石等无机相均匀地分散于有机材料中；红外光谱分析表明胶原、阿拉伯树胶、羟基磷灰石之间不是简单的叠加，而是存在强烈的键合作用。力学性能、吸水性和降解性能的研究及急性细胞毒性评价说明，该复合材料有望用于骨组织工程。

参考文献：

[1] Kanczler J M, Oreffo R O. Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone [J]. European Cells & Materials, 2008, 15: 100-114.

[2] Wahl D A, Czernuszka J T. Collagen - hydroxyapatite composites for hard tissue repair [J]. European Cells & Materials, 2006, 11: 43-56.

[3] Tcacencu I, Wendel M. Collagen - hydroxyapatite composite enhances regeneration of calvaria bone defects in young rats but postpones the regeneration of calvaria bone in aged rats [J]. Journal of Materials Science, 2008, 19(5): 2015-2021.

[4] Yunoki S, Ikoma T, Monkawa A, Marukawa E, Sotome S, Shinomiya K, Tanaka J. Three-dimensional porous hydroxyapatite/collagen composite with rubber - like elasticity [J]. Journal of Biomaterials Science, 2007, 18(4): 393-409.

[5] Chang S H, Hsu Y M, Wang Y J, Tsao Y P, Tung K Y, Wang T Y. Fabrication of pre - determined shape of bone segment with collagen - hydroxyapatite scaffold and autogenous platelet - rich plasma [J]. Journal of Materials Science, 2009, 20(1): 23-31.

[6] 王振林，闰玉华，万　涛. 羟基磷灰石/胶原类骨仿生复合材料的制备及表征 [J]. 复合材料学报，2005，22(2)：83-86.
Wang Zhenlin, Yan Yuhua, Wan Tao. Preparation and characterization of hydroxyapatite/collagen bone - like biomimetic composite [J]. Acta Materiae Compositate Sinica, 2005, 22(2): 83-86.

[7] Rodrigues C V, Serricella P, Linhares A B, Guerdes R M, Borojevic R, Rossi M A, Duarte M E, Farina M. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering [J]. Biomaterials, 2003, 24(27): 4987-4997.

[8] Kikuchi M, Matsumoto H N, Yamada T, Koyama Y, Takakuda K, Tanaka J. Glutaraldehyde cross - linked hydroxyapatite/collagen self - organized nanocomposites [J]. Biomaterials, 2004, 25(1): 63-69.

[9] 黄志娟，张其翼，石　碧. 羟基磷灰石/胶原/植物多酚复合材料的研究 [J]. 化学研究与应用，2008，20(12)：1601-1604.
Huang Zhijuan, Zhang Qiyi, Shi Bi. The preparation and characterization of hydroxyapatite/collagen/plant polyphenol composites [J]. Chemical Research and Application, 2008, 20(12): 1601-1604.

[10] Wang X, Wang X, Tan Y, Zhang B, Gu Z, Li X. Synthesis and evaluation of collagen-chitosan-hydroxyapatite nanocomposites for bone grafting [J]. Journal of Biomedical Materials Research, 2009, 89(4): 1079-1087.

[11] Wang Y, Zhang L, Hu M, Liu H, Wen W, Xiao H, Niu Y. Synthesis and characterization of collagen-chitosan-hydroxyapatite artificial bone matrix [J]. Journal of Biomedical Materials Research, 2008, 86(1): 244-252.

[12] Teng S H, Lee E J, Wang P, Shin D S, Kim H E. Three-layered membranes of collagen/hydroxyapatite and chitosan for guided bone regeneration [J]. Journal of Biomedical Materials Research, 2008, 87(1): 132-138.

[13] 兰小勇，周初松，田　京，吕志德，徐启飞，冯庆玲，黄　智. 海藻酸钙/纳米羟基磷灰石/胶原复合材料修复兔桡骨缺损 [J]. 中国医学科学院学报，2009，31(4)：459-463.
Lan Xiaoyong, Zhou Chusong, Tian Jing, Lv Zhide, Xu Qifei, Feng Qingling, Huang Zhi. Repair of radius bone defect with the nano - hydroxyapatite/collagen/calcium alginate [J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 2009, 31(4): 459-463.

[14] Liao S, Ngiam M, Chan C K, Ramakrishna S. Fabrication of nano-hydroxyapatite/collagen/osteonectin composites for bone graft applications [J]. Biomedical Materials (Bristol, England), 2009, 4(2): 25019.

[15] Schneiders W, Reinstorf A, Ruhnow M, Rehberg S, Heineck J, Hinterseher I, Biewener A, Zwipp H, Rammelt S. Effect of chondroitin sulphate on material properties and bone remodelling around hydroxyapatite/collagen composites [J]. Journal of Biomedical Materials Research, 2008, 85(3): 638-645.

[16] 甘少磊，冯庆玲. 卡拉胶/纳米羟基磷灰石/胶原可注射骨修复材料的制备与表征 [J]. 中国医学科学院学报，2006，28(5)：710-713.
Gan Shaolei, Feng Qingling. Preparation and characterization of a new injectable bone substitute - carrageenan/nano - hydroxyapatite/collagen [J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 2006, 28(5): 710-713.

[17] Bakos D, Soldan M, Hernandez-Fuentes I. Hydroxyapatite - collagen - hyaluronic acid composite [J]. Biomaterial, 1999, 20(2): 191-195.

[18] 庄海宁，冯　涛. Maillard 反应合成蛋白质-多糖复合物及其

应用［J］. 中国食品添加剂，2007(6)：136-141.
Zhuang Haining，Feng Tao. Protein-polysaccharide conjugates by Maillard reaction and their applications［J］. China Food Additives，2007(6)：136-141.

［19］Anderson D M，Ashby P，Busuttil A，Eastwood M A，Hobson B M，Ross A H，Street C A. Subchronic effects of gum arabic (Acacia) in the rat［J］. Toxicology Letters，1982，14(3/4)：221-227.

［20］Anderson D M. Evidence for the safety of gum arabic (Acacia senegal (L.) Willd.) as a food additive—a brief review［J］. Food Additives and Contaminants，1986，3(3)：225-230.

［21］Onishi T，Umemura S，Yanagawa M，Matsumura M，Sasaki Y，Ogasawara T，Ooshima T. Remineralization effects of gum arabic on caries-like enamel lesions［J］. Archives of Oral Biology，2008，53(3)：257-260.

［22］王卫平. 阿拉伯胶的种类及性质与功能的研究［J］. 中国食品添加剂，2002(2)：22-28.
Wang Weiping. Functional and structural difference on gum arabic from different botanic sources［J］. China Food Additives，2002(2)：22-28.

［23］王卫平. 树胶分泌物的非食品应用［J］. 林产化学与工业，1994，14(3)：67-76.
Wang Weiping. Non-food applications of tree gum exudates［J］. Chemistry and Industry of Forest Products，1994，14(3)：67-76.

［24］Song E，Yeon Kim S，Chun T，Byun H J，Lee Y M. Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility［J］. Biomaterials，2006，27(15)：2951-2961.

［25］刘苏锐，王坤余，琚海燕. 猪皮Ⅰ型胶原蛋白的提取及其结构表征［J］. 中国皮革，2007，36(7)：43-46.
Liu Surui，Wang Kunyu，Ju Haiyan. Isolation and characterization of type Ⅰ collagen from pigskins［J］China Leather，2007，36(7)：43-46.

［26］林晓艳，范红松，张兴栋. 戊二醛交联纳米羟基磷灰石/胶原复合材料作用机理研究［J］. 四川大学学报：自然科学版，2005，42(1)：93-97.
Lin Xiaoyan，Fan Hongsong，Zhang Xingdong. Mechanism of glutaraldehyde crosslinked nano-hydroxyapatite/collagen composites［J］. Journal of Sichuan University：Natural Science Edition，2005，42(1)：93-97.

［27］殷海荣，李 阳，余 森，唐保军，吕承珍，张春香. 戊二醛对羟基磷灰石/胶原复合材料性能的影响［J］. 化工新型材料，2007，35(12)：35-36.
Yin Hairong，Li Yang，Yu Sen，Tang Baojun，Lv Chengzhen，Zhang Chunxiang. Effect of glutaraldehyde on properties of hydroxyapatite/collagen composite［J］. New Chemical Materials，2007，35(12)：35-36.

［28］Mao J S，Zhao L G，Yin Y J，Yao K D. Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds［J］. Biomaterials，2003，24(6)：1067-1074.

［29］Liao S，Watari F，Zhu Y，Uo M，Akasaka T，Wang W，Xu G，Cui F. The degradation of the three layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane in vitro［J］. Dent Mater，2007，23(9)：1120-1128.

［30］国家食品药品监督管理局济南医疗器械质量监督检验中心. GB/T 16886.5－2003/ISO 10993－5：1999. 医疗器械生物学评价. 第5部分：体外细胞毒性试验［S］. 北京：中国标准出版社，2003.

［31］国家医药管理局医用高分子产品质量检测中心、上海生物材料研究测试中心. GB/T 16175－1996. 中华人民共和国国家标准：医用有机硅材料生物学评价试验方法［S］. 北京：中国标准出版社，1996.

［32］Li D，Mu C，Cai S，Lin W. Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen［J］. Ultrasonics Sonochemistry，2009，16(5)：605-609.

［33］Muyonga J H，Cole C G B，Duodu K G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (Lates niloticus)［J］. Food Chemistry，2004，86(3)：325-332.

［34］Bonnier F，Rubin S，Debelle L，Venteo L，Pluot M，Baehrel B，Manfait M，Sockalingum G D. FTIR protein secondary structure analysis of human ascending aortic tissues［J］. Journal of Biophotonics，2008，1(3)：204-214.

［35］Krafft C，Codrich D，Pelizzo G，Sergo V. Raman and FTIR imaging of lung tissue：Methodology for control samples［J］. Vibrational Spectroscopy，2008，46(2)：141-149.

［36］Chang M C，Tanaka J. FTIR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde［J］. Biomaterials，2002，23(24)：4811-4818.

［37］Manso-Silván M，Langlet M，Jiménez C，Fernández M，Martínez-Duart J M. Calcium phosphate coatings prepared by aerosol-gel［J］. Journal of the European Ceramic Society，2003，23(2)：243-246.

［38］Fanghanel J，Gedrange T，Proff P. Bone quality，quantity and metabolism in terms of dental implantation［J］. Biomedizinische Technik，2008，53(5)：215-219.

［39］Banos C C，Thomas A H，Kuo C K. Collagen fibrillogenesis in tendon development：current models and regulation of fibril assembly［J］. Birth Defects Res C Embryo Today，2008，84(3)：228-244.

［40］Iwasaki S，Hosaka Y，Iwasaki T，Yamamoto K，Nagayasu A，Ueda H，Kokai Y，Takehana K. The modulation of collagen fibril assembly and its structure by decorin：An electron microscopic study［J］. Archives of Histology and Cytology，2008，71(1)：37-44.

［41］Evans F G. The mechanical properties of bone［J］. Artificial Limbs，1969，13(1)：37-48.