复合材料学报
Acta Materiae Compositae Sinica
第 28 卷 第 4 期 8 月 2011 年
Vol. 28 No. 4 August 2011

文章编号：1000-3851(2011)04-0083-06

Sol－gel 原位相转变矿化制备纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合支架材料

李 波，李立华，赵名艳，周长忍*

（暨南大学 材料科学与工程系，人工器官与材料教育部工程中心，广州 510632）

摘 要： 为了模拟天然骨组织的结构和成分，以羟基磷灰石(HA)为钙磷源，以壳聚糖(CS)为大分子基质材料，在酸性环境中形成均相溶液，通过 Sol－gel 相转变矿化方法和陈化处理，原位构建了纳米 HA/CS 复合多孔支架材料，研究了共沉积时体系的 pH 值和陈化时间对支架压缩强度、晶相组成及形貌等的影响。结果表明体系 pH 为 10 和 11 时，支架的力学强度远高于未矿化壳聚糖支架强度，但是随着体系 pH 的升高强度逐渐下降。XRD 分析结果表明陈化处理有利于磷酸钙盐向 HA 转化，随着陈化时间的延长，纳米 HA 沿 *c* 轴择优生长。SEM 观察显示支架材料具有相互贯穿的多孔结构，纳米级的短棒状或颗粒状 HA 晶体颗粒均匀分散在孔壁上，随着陈化处理以及陈化时间的延长，形成致密的纳米无机/有机均匀复合体。这种快速深度矿化方法为骨支架材料的制备提供了新思路。

关键词： 纳米羟基磷灰石；壳聚糖；原位相转变；矿化；骨组织工程

中图分类号： R318.18 **文献标志码：** A

Preparation of nano-HA/CS composite scaffolds with in situ sol－gel transformation mineralization

LI Bo, LI Lihua, ZHAO Mingyan, ZHOU Changren*

(Engineering Research Center of Artificial Organs and Materials(Ministry of Education), Department of Material Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: To mimic the components and structure of the natural bone, chitosan (CS) and hydroxyapatite (HA) were selected as the macromolecule and the source of the calcium phosphate, respectively. The raw materials were dissolved in an acid solvent to form homogeneous solution, and then underwent sol－gel phase transition and aging procedure to prepare nano-HA/CS porous composite scaffolds in situ. The effects of aging time and pH value on the composition, micromorphology and compressive strength of the HA/CS composites were studied. The results show that the compressive strength and modulus of the scaffolds decrease obviously with the increase of the pH value, and the compressive strength is higher than pure CS scaffolds when the pH is 10 and 11. XRD results indicate that the transition of phosphorus calcium to HA can be impelled with the aging treatment, and the growth of HA crystallites orients along the *c*- axis in the crystal structure. SEM results reveal that the scaffolds possess inter-connected porous structure, and the rod-like or grainy nano-hydroxyapatite crystal particles disperse uniformly in the scaffolds, which formed homogeneous dense organic/inorganic composites. This kind of fast and deep mineralization method for preparation of bone scaffold provides a new way of thinking.

Keywords: nano-hydroxyapatite; chitosan; in situ transformation; mineralization; bone tissue engineering

人体硬组织(如骨和牙齿)是一种由有机和无机纳米杂化体所组成的复合物，其中无机物主要为纳米级羟基磷灰石($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$，Hydroxyapatite，简称 HA)。从仿生学的角度出发，研究具有“结构仿生”的硬组织材料是当今生物医学材料发展的重要方向[1]。

壳聚糖(CS)是一种天然的生物可降解多糖，由甲壳素(Chitin)经脱乙酰化反应而得[2]。它是自然

收到初稿日期： 2010-09-25；**收到修改稿日期：** 2011-01-29
基金项目： 国家自然科学基金(30900307)；国家科技部高技术计划“863”项目(2007AA091603)；教育部博士点基金(200805590001)
通讯作者： 周长忍，博士，教授，主要从事生物材料方向的研究 E-mail：tcrz9@jnu.edu.cn

界中少见的一种带正电荷的碱性多糖，壳聚糖具有良好的生物降解性和生物相容性，无毒性、无刺激性，并且在一定的条件下可以形成水凝胶[3-4]。CS作为大分子模板在生物矿化中起到了重要作用，而且它跟无机矿物晶体之间的相互作用提供了高度的分子识别点[5]。另外，CS的主要成分是氨基葡聚糖，具有诱导刺激组织再生重建的活性，能够诱导骨与软骨细胞再生[6]，具有优异骨传导性、引导和促进骨形成的能力[7]。因此，成为近年来生物材料的研究热点之一。

生物矿化基于仿生的原理，以大分子为模板，通过自组装或者自组织诱导无机晶体的生长，复制天然骨组织的纳米复合和梯度结构。目前体外矿化制备HA/CS复合材料方法主要是模拟体液矿化法，水溶胶法，共沉淀法及乳化法等[8]，比如将CS膜浸入模拟体液中一定时间可在其表面沉积出HA颗粒，但是这些矿化方法均是在材料的外表面形成一层矿化层，与天然骨组织形态相差甚远。天然骨中的矿化有两个重要步骤，首先是游离的磷酸钙盐与纳米胶原复合，然后这种液态的高分子材料固定的无定形磷酸钙(Amorphous calcium phosphate，ACP)被吸附到原胶原及空隙中，作为HA的前躯体调控磷酸钙的沉积、维度及结构[9-10]，最终形成深度矿化的复合体。

本文中拟探索一种温和、快速并且深度矿化的方法，以HA为钙磷源提供精确的钙磷比(1.67)，以CS为大分子基质材料，在酸性环境中形成均相溶液，通过溶胶-凝胶法(Sol-gel)相转变，以“Bottom-up”方式原位构建纳米HA/CS复合多孔支架材料，探讨共沉积时体系的pH值和陈化时间对体系及矿化程度的影响。

1　实　验

1.1　复合支架材料的制备

CS：食品级(脱乙酰度≥90%，M_r= 100000)，购于济南海得贝生物工程有限公司；HA：华南理工大学提供；本实验中所需其他化学药品皆为分析纯，均购于广州化学试剂厂。

将一定量HA粉末加入去离子水中，高速搅拌形成乳白色悬浮液，逐滴加入HNO_3至HA完全溶解，再滴加氨水调节pH=2，得到A液，备用。按照HA/CS质量比为1/4的比例称取壳聚糖粉末，并将其溶于体积比为1∶100的HNO_3水溶液中，连续搅拌，过滤后得到完全透明的0.03 g/mL CS溶液，为B液。在磁力搅拌下将A液缓慢倒入B液中，混合均匀。混合液在剧烈搅拌下逐滴加入氨水调节pH值分别为10、11、12、13，形成白色凝胶，将每一pH值下的样品在60 ℃下分别陈化0、4、8、12 h，然后冻干、洗至中性并二次冻干，得到一系列不同陈化时间的复合支架材料。

1.2　样品的表征

多孔支架材料制成5.0 mm×5.0 mm×5.0 mm样品，在岛津万能材料试验机(AG-1)上进行压缩强度测试，加载速度5 mm/min，压缩强度为变形50%时所得的数据。支架粉碎后，用XD-2型X射线衍射仪测定样品的晶相组成，测试条件：电压36 kV，管流20 mA，Cu K_α靶，扫描范围(2θ) 5°～70°。取经冷冻干燥后的多孔材料与纯壳聚糖支架材料切面，经喷金处理后置于环境扫描电子显微镜(ESEM，Philips XL-30ESEM，工作电压20.0 kV)下观察其显微结构。样品粉碎后，分散到乙醚中，超声分散10 min，沉积到铜网上，置于透射电子显微镜(TEM，Philips TECAI-10，工作电压100 kV)下观察其显微结构。

2　结果与讨论

2.1　力学性能测试结果与分析

表1为在不同pH值条件下制备的支架材料的压缩强度与压缩模量。可见，pH值为10和11时支架的压缩强度分别达到了59.3 kPa和52.5 kPa，压缩模量分别为148.25 kPa和131.25 kPa，远高于未经矿化的壳聚糖多孔海绵(压缩强度和压缩模量分别为39.1 kPa和97.75 kPa)，说明有效矿化后，壳聚糖多孔支架的力学强度和刚性得到了显著提高。但是随pH值的升高，支架的压缩强度显著减小。因此，本文的研究以pH=11为主。

表2为pH=11时不同陈化时间所得的支架材料的压缩强度与压缩模量。可知，随着陈化时间的延长，支架的压缩强度逐渐减小，这是因为长时间的温湿环境(60 ℃)对原有相对致密的多孔结构造成破坏，导致支架力学强度下降。但是从表2也可以看出陈化时间对支架压缩强度的影响应小于pH值的影响，陈化时间为8 h时强度与未处理的多孔支架持平。

表 1　不同 pH 下 HA/CS 支架材料的压缩强度与压缩模量

Table 1　Effects of pH values on the compressive strength and compressive modulus of the HA/CS composite scaffolds

pH values	Samples aged 4 h		Pure CS scaffolds	
	Compressive strength/kPa	Compressive modulus/kPa	Compressive strength/kPa	Compressive modulus/kPa
10	59.3±0.045	148.25±0.112	39.1±0.073	97.75±0.183
11	52.5±0.060	131.25±0.150		
12	38.9±0.086	97.25±0.215		
13	30.3±0.079	75.75±0.198		

表 2　pH＝11 时不同陈化时间对 HA/CS 支架材料的压缩强度与压缩模量的影响

Table 2　Effects of aging time on the compressive strength and compressive modulus of HA/CS composite scaffolds at pH＝11

Aging time/h	Compressive strength/kPa	Compressive modulus/kPa
0	63.8±0.034	159.5±0.085
4	52.5±0.060	131.25±0.15
8	39.8±0.074	99.5±0.185
12	23.7±0.083	59.25±0.2075

2.2　XRD 结果分析

图 1 为 pH＝11 条件下制备的 HA/CS 复合材料的 XRD 图谱。由曲线 b 可知，未陈化处理时样品的晶相组成有多种磷酸钙盐，对照标准 PDF 卡片，确认主要杂质为磷酸四钙（$Ca_4(PO_4)_2O$，Tetracalcium Phosphate，TTCP）和磷酸氢钙（$CaHPO_4$，Dicalcium Phosphate，DCP）。随着陈化时间的延长，TTCP 和 DCP 逐渐消失，转化为具有一定结晶度的 HA。但与标准的 HA 的衍射峰（曲线 f）相比，复合材料中 HA 的三强主基衍射峰（约 32°，对应 HA 的（211）、（112）、（300）晶面）仍出现明显的衍射峰宽化弥散现象，表明样品中 HA 的晶体尺寸较小，生成的 HA 呈非化学计量的弱结晶状态。采用内标法，曲线中 26°的衍射峰（对应 HA 的（002）晶面）的峰强与 32°的三强主基衍射峰的峰强之比明显随着陈化时间的延长而增大，说明陈化处理有利于样品中 HA（002）晶面的生长，即 HA 晶体在陈化处理时出现沿 *c* 轴方向优先生长的趋势（曲线 c、d、e）。从曲线 b、c 看出，CS 的衍射峰比较宽而弥散，峰强呈不同程度的弱化，说明 CS 呈弱结晶状态。从曲线 c、d、e 可看出，随陈化时间的延长，CS 峰宽而弥散，峰强越来越弱，结晶度越来越低，因此不出现衍射峰。

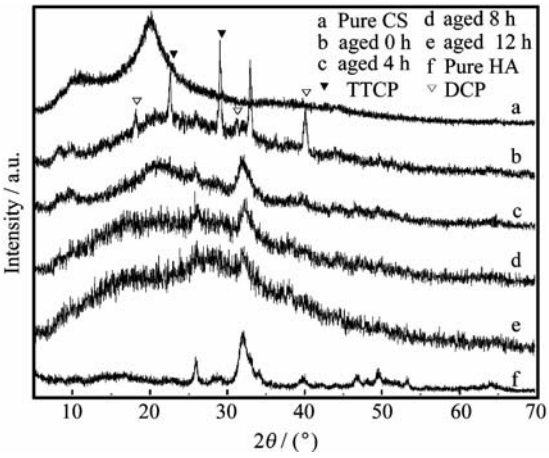
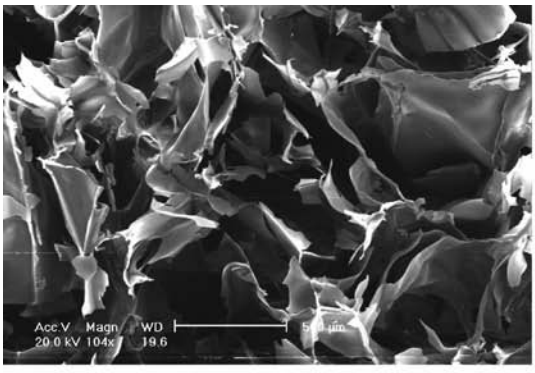


图 1　pH＝11 时不同陈化时间制备的 HA/CS(1/4) 复合支架的 XRD 图谱

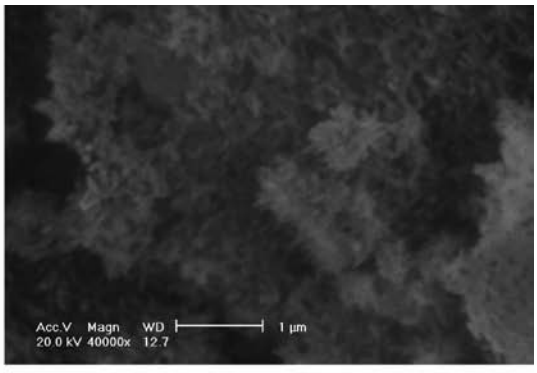
Fig. 1　XRD patterns of the HA/CS(1/4) composite scaffolds prepared with different aging times at pH＝11

2.3　SEM 结果分析

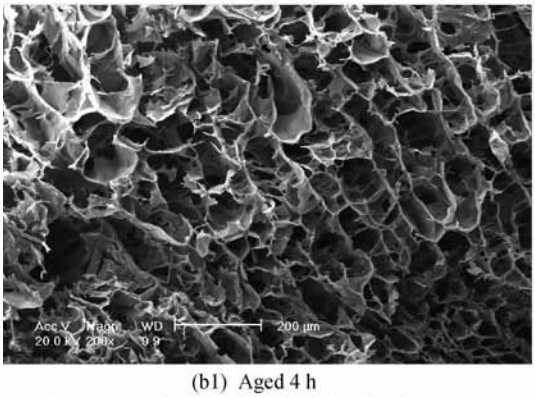
图 2 为 HA/CS 复合支架的 SEM 照片。纯壳聚糖溶液冻干形成的海绵形态为外表面孔洞致密，内部呈层状或者片状不规整结构（图 2(a1)）。从图 2(b1)～2(d1)可看出，由 Sol-gel 相转变及陈化处理得到孔隙率高，孔洞呈较规整圆形且相互贯穿的多孔支架，有利于细胞迁移、营养传输及代谢产物的排出。陈化时间 4 h 时，支架的孔洞比较均匀，孔壁较薄，随着陈化时间的延长，孔壁变厚，支架的规整性变差。这与压缩测试所得的结果相吻合。经进一步的高倍观察，从图 2(a2)可以发现未陈化处理时纳米级的短棒状或颗粒状磷酸钙盐晶体颗粒（平均粒径约 90 nm）均匀分散在基质上；由于陈化处理以及陈化时间的延长，磷酸钙盐转变为 HA，大量细小的 HA 晶体连续、均匀而致密分布，犹如“铺路石”般紧密铺展在孔壁上（图 2(b2)、2(c2)、2(d2)）。从这些可以推测出陈化处理有利于纳米级 HA 晶体的生成与长大。



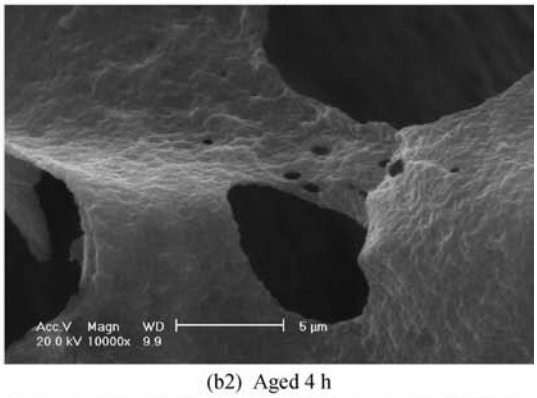
(a1) Pure CS scaffold



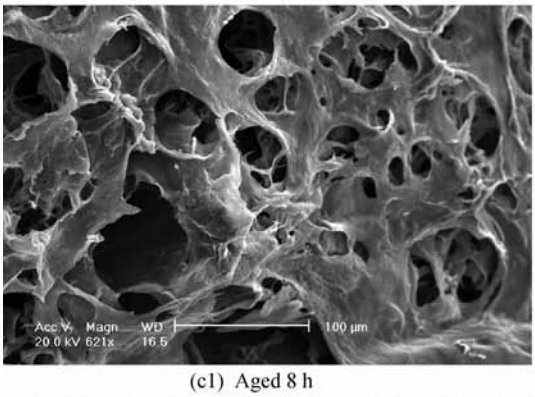
(a2) Aged 0 h



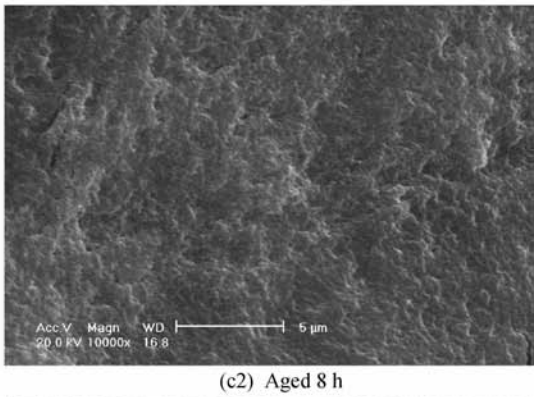
(b1) Aged 4 h



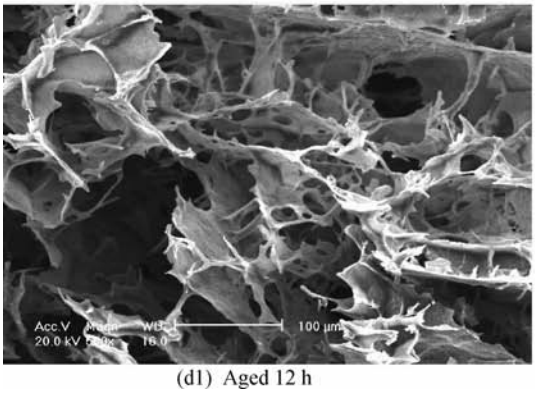
(b2) Aged 4 h



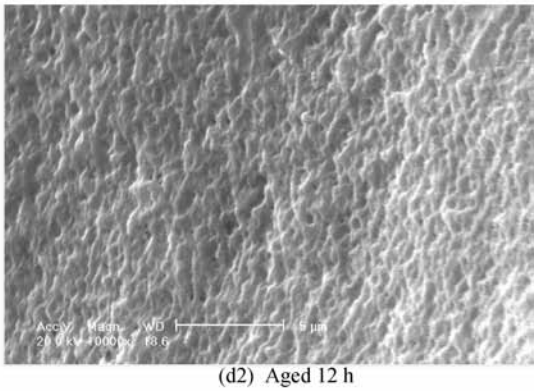
(c1) Aged 8 h



(c2) Aged 8 h



(d1) Aged 12 h



(d2) Aged 12 h

图 2　pH＝11 时制备的 HA/CS 复合支架的 SEM 照片

Fig. 2　SEM photographs of the HA/CS composite scaffolds prepared at pH＝11

2.4　TEM 结果分析

陈化处理 12 h 后 HA /CS 复合支架材料的透射电镜照片如图 3 所示。可以看出 HA 呈纳米级的纤细的梭状或针状晶体，其平均尺寸大约为 20 nm×

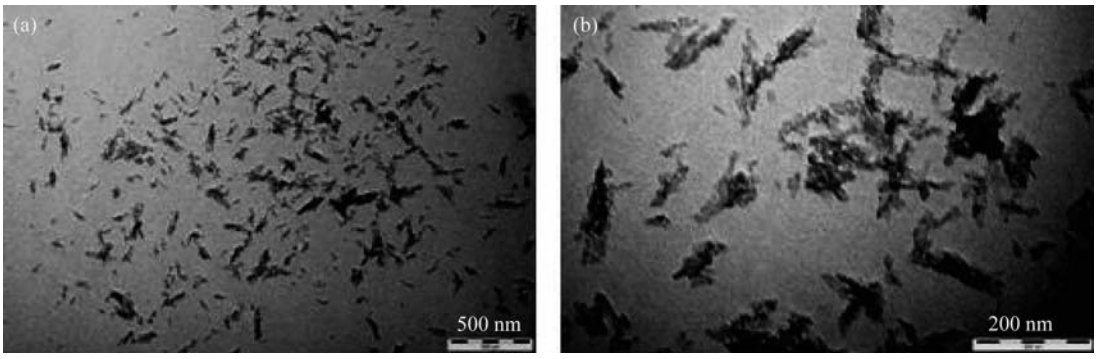


图 3　陈化处理 12 h 时 HA/CS 复合支架的 TEM 照片

Fig. 3　TEM photographs of the HA/CS composite scaffolds aged 12 h

200 nm，与骨质中的羟基磷灰石(长度为 200～400 nm，直径为 15～30 nm 的针状结晶[11])结构及尺寸非常接近。这些 nano-HA 颗粒具有较好的分散性，表现出相对均匀的形貌。

3　矿化机制

当体系 pH 大于 6.7 时，CS 能从其溶液中沉淀出来[12]。CS 中—NH_2 与 Ca^{2+} 络合能力较强，形成壳聚糖-金属螯合物。当 pH 为 9～11 时，络合能力最强[13]。故在碱性溶液中，在共沉淀过程中，CS 与钙离子发生络合反应，使 HA 以 CS 中胺基为活性位点生长，这就有效克服了 HA 在 CS 基体中分布不均匀的问题，并最终使 nano-HA 在 CS 分子上均匀附着。在共沉积的过程中，提供的 OH^- 有限，在既要满足 CS 的沉析，又要满足 HA 晶体形成的条件下，导致 CS 与 HA 晶体之间相互竞争，相互抑制，最终导致结晶度较低、尺寸较小的 nano-HA 晶体和结晶度很低的 CS 分子出现在复合材料中。更重要的是，HA 晶体结构中相邻 Ca 的距离($d_{Ca}=0.344\times3=1.03$ nm)与 CS 分子中 c 轴的晶胞参数(1.03 nm)非常相近[14]，导致在陈化过程中，HA 晶体的生长出现沿 c 轴择优取向生长。

4　结　论

(1) 采用 Sol－gel 相转矿化法，经过不同陈化时间，制备了深度矿化的 nano-HA/CS 复合多孔支架材料。

(2) 陈化处理有利于促进 HA 晶体沿 c 轴择优生长，形成梭状或针状 nano-HA 晶体，均匀而致密地如“铺路石”般铺展在 CS 支架内外表面，大大提高了材料的力学强度。

(3) 以“Bottom-up”方式原位构建的纳米 HA/CS 复合多孔支架材料在骨组织修复上将有很大的应用前景。

参考文献：

[1] 卢晓英，王秀红，刘　治，翁　杰. 反应 pH 值对原位水热沉积法制备纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合材料的影响[J]. 复合材料学报，2009，26(4)：53-58.
Lu Xiaoying，Wang Xiuhong，Liu Zhi，Weng Jie. Effect of pH value on the nano-hydroxyapatite/chitosan composites via in-situ hydrothermal precipitation[J]. Acta Materiae Compositae Sinica，2009，26(4)：53-58.

[2] 吕彩霞，姚子华. 纳米羟基磷灰石/壳聚糖-硫酸软骨素复合材料的制备及其性能研究[J]. 复合材料学报，2007，24(1)：110-115.
Lü Caixia，Yao Zihua. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan－chondroitin sulfate composite materials[J]. Acta Materiae Compositae Sinica，2007，24(1)：110-115.

[3] 黄琼瑜，佘厚德，肖秀峰，刘榕芳. 羟基磷灰石/聚己内酯-壳聚糖复合材料的制备与表征[J]. 复合材料学报，2009，26(1)：24-30.
Huang Qiongyu，She Houde，Xiao Xiufeng，Liu Rongfang. Preparation and characterization of hydroxyapatite/polycaprolacton－chitosan composites[J]. Acta Materiae Compositae Sinica，2009，26(1)：24-30.

[4] 肖秀峰，丁晓红，刘淑琼，钟章裕，刘榕芳. 壳聚糖/聚己内酯-聚乳酸多孔支架制备和表征[J]. 复合材料学报，2010，27(6)：100-105.
Xiao Xiufeng，Ding Xiaohong，Liu Shuqiong，Zhong Zhangyu，Liu Rongfang. Fabrication and characterization of chitosan/poly(ε-caprolactone)－poly(lactide)porous scaffolds[J]. Acta Materiae Compositae Sinica，2010，27(6)：100-105.

[5] Danilchenko S N，Koropov A V，Sulkio－Cleff B，et al. Thermal behavior of biogenic apatite crystals in bone：An X-ray diffraction study[J]. Crystal Research and Technol，

2006，41(3)：268-275.

[6] 王海斌，赫淑倩，赵冬梅，孙康宁，刘爱红. 羧甲基壳聚糖/纳米羟基磷灰石复合支架材料的制备及生物安全性[J]. 复合材料学报，2008，25(6)：88-92.
Wang Haibin，He Shuqian，Zhao Dongmei，Sun Kangning，Liu Aihong. Preparation and biology security of the porous carboxymethyl chitosan/nano hydroxyapatite scaffold biocomposites[J]. Acta Materiae Compositae Sinica，2008，25(6)：88-92.

[7] 陈景帝，王迎军，陈晓峰，尹诗衡. 利用冷冻干燥原位构筑仿生型纳米羟基磷灰石、壳聚糖多孔支架材料[J]. 稀有金属材料与工程，2009，38(增刊 3)：271-273.
Chen Jingdi，Wang Yingjun，Chen Xiaofeng，Yin Shiheng. Biomimetic synthesis of porous composite scaffold composed of nano-hydroxyapatite and chitosan by freeze-drying technology[J]. Rare Metal Materials and Engineering，2009，38(Suppl 3)：271-273.

[8] 徐　挺，何　狄，周银银，汪　涛. 羟基磷灰石/壳聚糖生物复合材料的制备研究进展[J]. 生物骨科材料与临床研究，2008，5(1)：44-48.
Xu Ting，He Di，Zhou Yinyin，Wang Tao. Progress of hydroxyapatite /chitosan biomedical composite[J]. Opaedic Biomechanics Materials and Clinical Study，2008，5(1)：44-48.

[9] Crane N J，Popescu V，Morris M D，Steenhuis P，Ignelzi M A，Jr. Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization[J]. Bone，2006，39(3)：434-442.

[10] Tsuji T，Onuma K，Yamamoto A，Iijima M，Shiba K. Direct transformation from amorphous to crystalline calcium phosphate facilitated by motif-programmed artificial proteins[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America，2008，105(44)：16866-16870.

[11] 徐　挺，何　狄，周银银，等. 羟基磷灰石/壳聚糖生物复合材料的制备研究进展[J]. 生物骨科材料与临床研究，2008，5(1)：44-48.
Xu Ting，He Di，Zhou Yinyin，et al. Progress of hydroxyapatite/chitosan biomedical composite[J]. Opaedic Biomechanics Materials and Clinical Study，2008，5(1)：44-48.

[12] Chen Fei，Wang Zhoucheng，Lin Changjian. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials[J]. Materials Letters，2002，57(4)：858-861.

[13] 李　红，朱敏鹰，李立华，周长忍. 原位沉析羟基磷灰石-壳聚糖骨组织工程支架材料的研制[J]. 功能材料，2006，37(6)：909-911.
Li Hong，Zhu Minying，Li Lihua，Zhou Changren. Preparation of in situ-deposited hydroxyapatite on chitosan scaffold[J]. Journal of Functional Materials，2006，37(6)：909-911.

[14] Okuyamaa K，Noguchia K，Kanenaria M，Egawa T，Ogawa K. Structural diversity of chitosan and its complexes[J]. Carbohydrate Polymers，2000，41(3)：237-247.