复合材料学报 第25卷 第6期 12月 2008年
Acta Materiae Compositae Sinica Vol. 25 No. 6 December 2008

文章编号：1000-3851(2008)06-0136-04

“一步法”制备纳米相丝素蛋白/羟基磷灰石生物复合材料

王 刚[1]，姚金波*[1]，周旭光[2]，盛 楠[3]
（1. 天津工业大学 纺织学院，天津 300160；2. 天津工业大学 材料科学与化学工程学院，天津 300160；
3. 天津市德凯化工有限公司，天津 300160）

摘 要： 系统分析了羟基磷灰石(HA)的制备方法和丝素蛋白纤维(SF)的溶解方法，提出一种制备纳米丝素蛋白/羟基磷灰石生物复合材料(SF/HA)的新型反应复合方法——“一步法”。并对由“一步法”制得的SF/HA分别进行了钙磷比测定、红外光谱测试、透射电镜观察和X射线衍射测试。结果表明：SF/HA中的钙磷比是1.6692，与标准HA中的钙磷比1.67一致；SF/HA中同时含有SF和HA中各自的官能团；SF/HA的晶粒横向尺度小于100 nm，SF/HA呈针状或柱状晶粒，SF和HA能够形成复合；SF/HA的晶型属于六方晶系，当SF在SF/HA中所占质量分数为10%时，晶胞参数 $a=b=9.0319$ Å，$c=7.0148$ Å，沿 c 轴方向平均晶粒尺寸是230.7645 Å。“一步法”制备SF/HA具有合理性和可行性。

关键词： 羟基磷灰石；丝素蛋白；生物复合材料
中图分类号： TB383 **文献标志码：** A

Preparation of nano silk fibroin/hydroxyapatite biological composite by “one-step” method

WANG Gang[1], YAO Jinbo*[1], ZHOU Xuguang[2], SHENG Nan[3]
(1. School of Textile, Tianjin Polytechnic University, Tanjin 300160, China; 2. College of Materials Science and Chemical Engineering, Tianjin Polytechnic University, Tanjin 300160, China;
3. Tianjin DEK Chemical Limited Company, Tianjin 300160, China)

Abstract: On the basis of analyzing the preparation method of hydroxyapatite (HA) and the diffluence method of silk fibroin fibre (SF), a “one-step” method that is used to prepare nano hydroxyapatite/silk fibroin biology composite (SF/HA) was put forward. The SF/HA composite was observed and tested by FTIR, TEM and XRD. The ratio of calcium to phosphorus in the SF/HA composite was tested by the chemical method. The results show that the ratio of calcium to phosphorus in the SF/HA composite is 1.6692, which is the same as 1.67 in HA. The function groups in both HA and SF were discovered in the SF/HA composite. The SF/HA composite crystal particle is of spiculate or column configuration. The crystal size of the SF/HA composite is less than 100 nm in the horizontal direction. The HA and SF composite can come into being. The HA/SF composite is hexahedron crystal. When the mass fraction of SF in SF/HA was 10%, the crystal cell parameter of the SF/HA composite crystal is $a=b=9.0319$ Å, $c=7.0148$ Å. The average crystal size of SF/HA along the c axes direction is 230.7645 Å. So the “one-step” method is rational and feasible.

Keywords: hydroxyapatite(HA); silk protein(SF); biological composites

羟基磷灰石(HA，$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)是一种典型的生物材料，具有优良的生物相容性和生物活性[1-2]。羟基磷灰石作为替代骨成型件中的主要成分，其晶体形态、结构尺寸以及是否与其他材料复合对替代骨成型件的力学性能和生物性能有重要影响。一般由单一羟基磷灰石构成的替代骨成型件强度低、脆性大、力学性能较差[2-3]。为此，通常将羟基磷灰石与红骨髓、胶原蛋白、丝素蛋白、甲壳素、

收稿日期： 2008-03-13；**收修改稿日期：** 2008-05-30
基金项目： 天津市自然基金资助(05YFJMJCO4700)
通讯作者： 姚金波，教授，主要研究方向是纳米相生物高分子材料、新型染整技术和功能面料开发 E-mail：jinboyao1964@yahoo.com

纤维素、聚酯、聚酰胺、聚氨酯、聚乙烯和聚乙烯醇等[4]材料进行复合，来改善提高替代骨成型件的各项性能。

研究发现丝素蛋白/羟基磷灰石复合纳米粒子具有优良的生物性能，与人骨中磷灰石微晶具有相似性、可降解性和优异的骨诱导性能[5]，在骨修复或骨固定材料方面具有潜在的应用价值。通常二者的复合工艺分为 2 个步骤[5-7]，首先采用盐溶剂体系将丝素蛋白纤维溶解，再经过透析、脱盐、提纯、浓缩后得到丝素蛋白溶液；然后在合成羟基磷灰石的同时，将第一步得到的丝素蛋白溶液加入反应体系中来实现复合。由该工艺得到的纳米复合粒子属于简单的物理共混颗粒，在是否混合均匀、是否在纳米尺寸上完成复合的问题上，依然有待进一步研究探讨。另外，在第 1 步的透析、脱盐、提纯、浓缩的过程中，既耗水又耗时，会带来大量盐流失，这与节能减排和绿色加工并不相符。

因此，本文中针对羟基磷灰石与丝素蛋白的复合方法，提出一种既节水、节能、减排，同时又能够在纳米尺寸上完成复合，提高复合均匀度的新型反应复合方法——"一步法"。

1　"一步法"的理论设计

丝素蛋白纤维(SF)属于盐溶性蛋白质，即在一定温度和浓度的 NaSCN 溶液、LiBr－C_2H_5OH 溶液或 $CaCl_2$－C_2H_5OH－H_2O 三元溶液中，丝素蛋白纤维会发生溶胀→解体→溶解的过程，最后形成丝素蛋白溶液[8]。

羟基磷灰石可用 $CaCl_2$、CaO 或 $Ca(OC_2H_5)_2$ 等含钙化合物与 K_2HPO_4、NaH_2PO_4 或 $(CH_3O)_3PO$ 等磷酸盐发生化学沉淀反应而制得，此法称为化学沉淀法。

结合丝素蛋白纤维的溶解方法和羟基磷灰石的化学沉淀制备法，得到制备纳米相丝素蛋白/羟基磷灰石生物复合材料(SF/HA)的新型反应复合方法——"一步法"。其反应复合的原理如图 1 所示。在原理设计上，"一步法"与常法的不同之处在于丝素蛋白溶液中的钙离子与磷酸盐发生沉淀反应生成羟基磷灰石的同时，丝素蛋白分子由于其溶剂体系的改变势必会析出，从而实现生成的羟基磷灰石与丝素蛋白分子在分子级上均匀共混复合；同时也省去了常法中的透析、脱盐、提纯、浓缩过程。

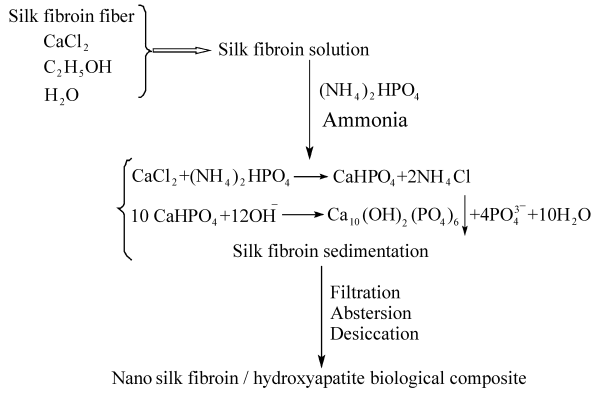


图 1　"一步法"原理图

Fig. 1　Principle of "one-step" method

2　实　验

无水氯化钙、无水乙醇、氨水、磷酸氢二铵，分析纯，天津化学试剂三厂；脱胶桑蚕丝，内蒙古鄂尔多斯羊绒制品技术中心。

"一步法"反应复合工艺：首先于 1000 mL 三口烧瓶中配制一定体积的摩尔比为 1∶2∶8的 $CaCl_2$－C_2H_5OH－H_2O 三元溶液，装搅拌、置于恒温水浴锅，向该溶液中投入计量的脱胶丝素蛋白纤维，于 75℃±5℃下，搅拌溶解 0.5 h，得到丝素蛋白溶液，备用；然后根据丝素蛋白溶液中所含 $CaCl_2$ 的量，按 Ca 与 P 的当量比为 10/6 的原则，配制 500 mL含计量磷酸氢二铵溶液。设定水浴温度，开动搅拌，整个反应复合时间为 4 h，前 2 h 温度恒定为 30℃，后 2 h 温度恒定为 60℃，用氨水随时调节体系 pH 值至 10.5，将磷酸氢二铵溶液通过常压漏斗在前 3 h 内匀速向丝素蛋白溶液中滴加完毕。反应复合结束后，将混合液过滤，用蒸馏水洗涤沉淀物多次，低温烘干沉淀物后，得到丝素蛋白/羟基磷灰石生物复合材料。

采用 EDTA 络合法和磷钼酸喹啉容量法[9]测定 SF/HA 中钙和磷的含量；采用美国 BRUKER AXS 公司傅里叶变换红外光谱仪，利用 KBr 压片法，波长范围在 3996 cm^{-1}～399 cm^{-1}，对 HA 、SF 和 SF/HA(10%SF)进行红外光谱测试；采用日立 H7650 型透射电镜对 HA 和 SF/HA(10%SF)的微观形态进行观察；采用美国 BRUKER AXS 公司 X 射线衍射仪对 SF/HA 分析晶型结构[10-11]。

3　结果分析

3.1　SF/HA 中的钙磷比

SF/HA 中的钙、磷含量及钙磷比见表 1，其与标准 HA 中的钙磷比 1.67 一致。

表 1　SF/HA 单位质量中钙、磷摩尔数的测定结果

Table 1　Result of the ratio of calcium to phosphorus in SF/HA

Sample	Mole number/(mmol·g^{-1})		
	n(Ca)	n(P)	n(Ca)/n(P)
10 wt% SF/HA	7.455	4.466	1.6692

3.2　SF/HA 的 FTIR

图 2 是 HA、SF 纤维、SF 膜和 SF/HA(SF%=10 wt%)的 FTIR 图。SF 膜是由丝素蛋白溶液经过透析、脱盐、提纯、浓缩、涂膜，低温烘干后得到。图 2(a)中，1641cm^{-1}为 HA 中 O═P—OH 的吸收峰，1409、1023、878.47、566.46 cm^{-1}为 HA 中 PO_4^{3-} 的振动谱带，605.2 cm^{-1}为 HA 中羟基的振动谱带；图 2(b)中 1621.65、1512.69、1227.46、1163.86 cm^{-1}为 SF 中 O═C—NH 的吸收峰[12]。图 2(c)中吸收峰位与图 2(b)中一致，只是多出 2054.23 cm^{-1}，认为是丝素蛋白纤维转变为丝素蛋白膜后，结构的变化引起的吸收。比较图 2(d)与 2(a)、2(b)、2(c)发现，图 2(d)中出现了 HA、SF 纤维和 SF 膜三者 FTIR 图中各自特有的特征吸收峰，但没有出现新的特征吸收峰，故并未形成新的化学官能团。

3.3　SF/HA 的 TEM

图 3 是 HA 和 SF/HA 的 TEM 照片。HA 和 SF/HA 的微观横向尺度均小于 100 nm，SF/HA 呈针状或柱状晶粒。明显看出 SF/HA 堆积较密集，呈网络结构，说明羟基磷灰石分子与丝素蛋白分子形成复合体。

3.4　SF/HA 的 XRD

图 4 是 SF/HA 和 HA 的 XRD 图。图 4(a)与 4(b)中的出峰位置一致，经计算分析得出，SF/HA 的晶型仍属于六方晶系，晶胞参数 $a=b=9.0319$ Å，$c=7.0148$ Å，沿 c 轴方向平均晶粒尺寸是

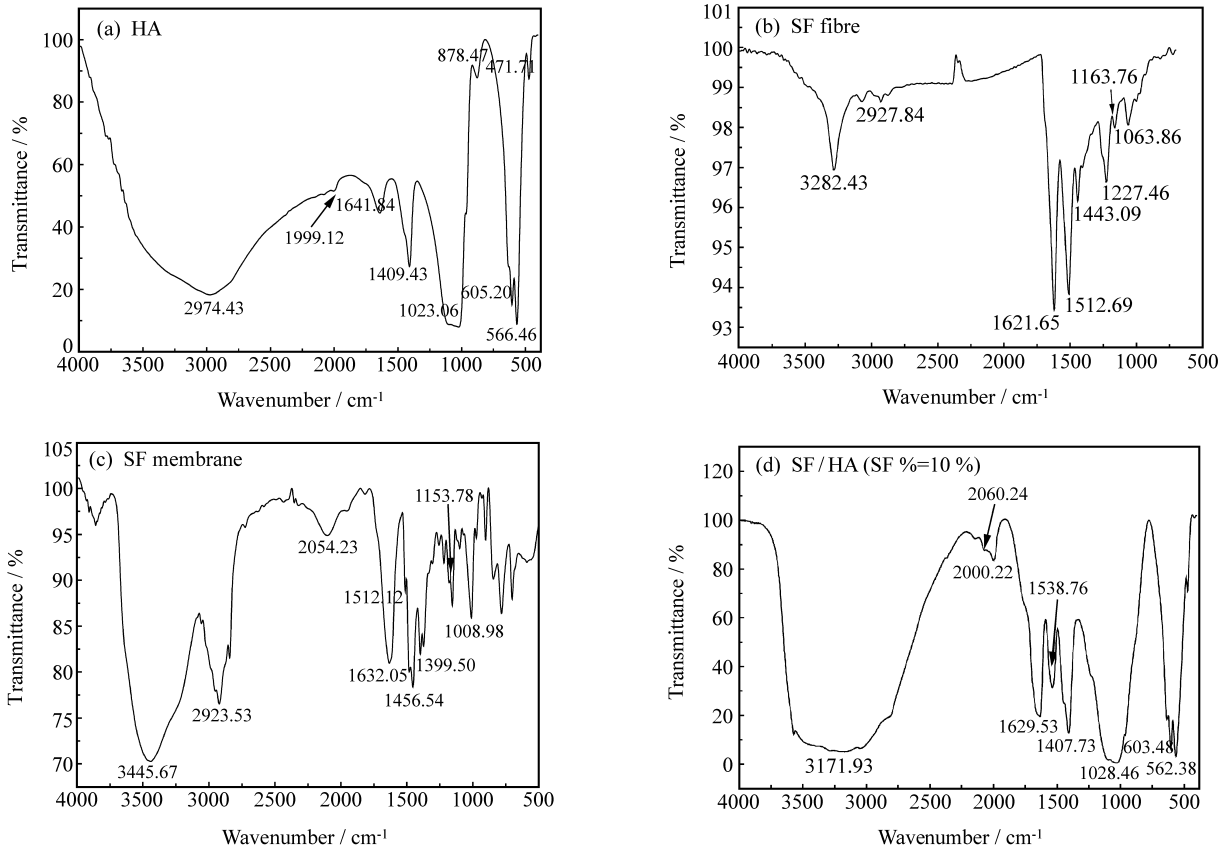
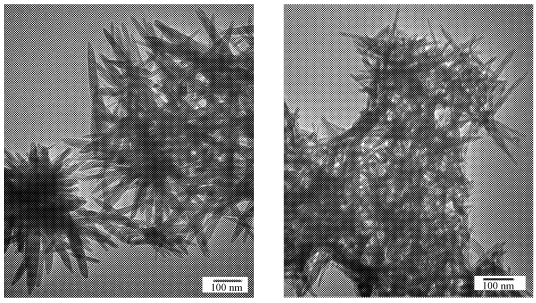


图 2　HA、SF、SF/HA(10%SF)的 FTIR 图

Fig. 2　FTIR of HA, SF, SF/HA(10%SF)



(a) HA　　(b) SF / HA (10 % SF)

图 3　HA、SF/HA(10%SF)的 TEM 照片

Fig. 3　TEM pictures of HA, SF/HA(10%SF)

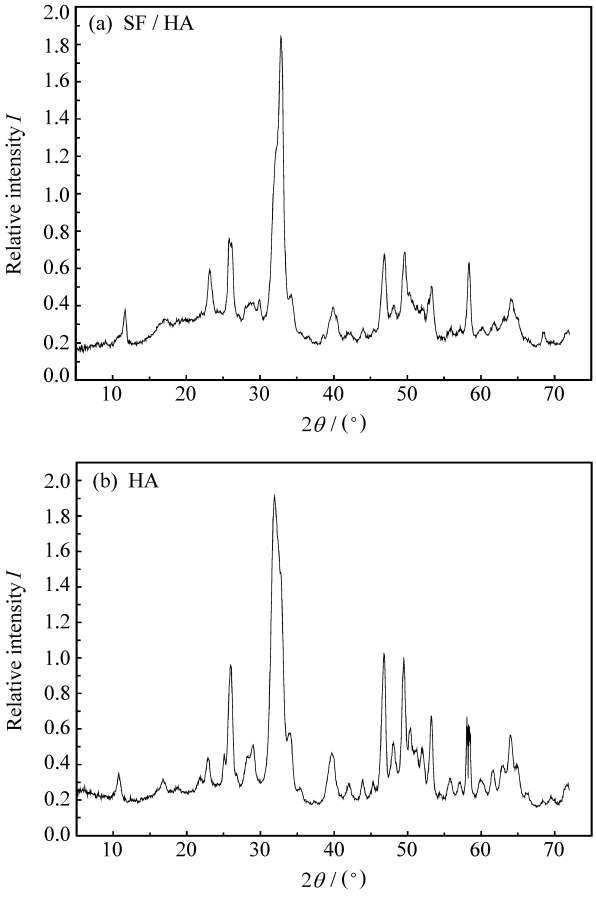


图 4　HA、SF/HA(10 wt%SF)的 XRD 图谱

Fig. 4　XRD patterns of HA, SF/HA (10 wt%SF)

230.7645 Å。

4　结　论

（1）"一步法"能够成功制得纳米相丝素蛋白/羟基磷灰石生物复合材料，其钙磷比为 1.6692，与标准羟基磷灰石的钙磷比 1.67 一致。

（2）由"一步法"制得的纳米相羟基磷灰石/丝素蛋白生物复合材料中同时含有羟基磷灰石和丝素蛋白各自的官能团，并未形成新的化学官能团。

（3）由"一步法"制得的纳米相羟基磷灰石/丝素蛋白生物复合材料的晶粒横向尺度小于 100 nm，呈针状或柱状晶粒、形成复合、呈网络结构。

（4）由"一步法"制得的纳米相羟基磷灰石/丝素蛋白生物复合材料的晶型属于六方晶系。晶胞参数 $a=b=9.0319$ Å，$c=7.0148$ Å，沿 c 轴方向平均晶粒尺寸是 230.7645 Å。

参考文献：

[1]　姚秀敏，谭寿洪，江东亮. 多孔羟基磷灰石陶瓷的制备 [J]. 无机材料学报，2000，15(3)：468-472.
Yao Xiumin, Tan Shouhong, Jiang Dongliang. Preparation of porous hydroxyapatite ceramics [J]. Journal of Inorganic Materials, 2000, 15(3): 468-472.

[2]　Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite - based biomaterials for use as hard tissue replacement implants [J]. Mater Res, 1998, 13(1): 94-117.

[3]　Crane G M, Ishaug S L, Mikos A G. Bone tissue engineering [J]. Nat Med, 1995, 12(1): 1322.

[4]　张阳德，赵梓屹. 羟基磷灰石/聚合物复合材料的研究进展 [J]. 中国医学工程，2005，13(6)：603-608.
Zhang Yangde, Zhao Ziyi. Progress of hydroxyapatite/polymeric materials composites [J]. China Medical Engineering, 2005, 13(6): 603-608.

[5]　卢神州，李明忠，白　伦. 羟基磷灰石/丝素蛋白纳米复合颗粒的制备 [J]. 丝绸，2006，17(2)：17-19.
Lu Shenzhou, Li Mingzhong, Bai Lun. Fabrication of hydroxyapatite and silk fibroin nanometer complex powders [J]. Silk Monthly, 2006, 17(2): 17-19.

[6]　杨　辉，张　林，张　宏，徐可为. 丝素蛋白/羟基磷灰石复合材料的制备及性能表征 [J]. 复合材料学报，2007，24(3)：141-146.
Yang Hui, Zhang Lin, Zhang Hong, Xu Kewei. Preparation and characterization of the silk fibroin/hydroxyapatite composites [J]. Acta Materiae Cmpositae Sinica, 2007, 24(3): 141-146.

[7]　刘佳佳，李明忠，卢神州. 羟基磷灰石/丝素蛋白复合材料的制备 [J]. 高分子材料科学与工程，2006，24(5)：245-248.
Liu Jiajia, Li Mingzhong, Lu Shenzhou. Preparation of HA/SF composite [J]. Polymer Materials Science and Engineering, 2006, 24(5): 245-248.

[8]　陈国强. 丝素溶解性与再生膜结构的研究 [J]. 苏州丝绸工学院学报，1986(2)：45-52.
Chen Guoqiang. A Study on the solubility of silk fibroin and the structure of the regenerated fibroin film [J]. Journal of Suzhou Institute of Silk Textile Technology, 1986(2): 45-52.

[9]　王志锋，宋邦才，张　军. 化学分析法精确测定羟基磷灰石中的 Ca 和 P 含量 [J]. 硅酸盐通报，2007，26(1)：186-189.
Wang Zhifeng, Song Bangcai, Zhang Jun. Precise measurement of Ca and P content in hydroxyapatite by chemical analysis [J]. Bulletin of the Chinese Ceramic Society, 2007, 26(1): 186-189.

[10]　刘粤惠，刘平安. X 射线衍射分析原理与应用[M]. 北京：化学工业出版社，2003：216-220.

[11]　马礼敦. 近代 X 射线多晶体衍射——实验技术与数据分析 [M]. 北京：化学工业出版社，2004：16-90.

[12]　Pretsch E, Buhlmann P, Affolter C. 波谱数据表—有机化合物的结构解析 [M]. 荣国斌，译. 上海：华东理工大学出版社，2002：245-309.