

Preparation and Properties of Modified Hydroxyapatite/Polycaprolacton Composite Scaffolds

Zhang-yu Zhong, Xiu-feng Xiao, Rong-fang Liu, Shu-qiong Liu, Jian-jin Jiao

Fujian Key Laboratory of Polymer Materials, College of Chemistry and Materials Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

Email:zhongzhangyu2008@126.com

Abstract: In this paper, ultrafine particles of crystalline hydroxyapatite were synthesized by hydrothermal treatment at 180°C, and the surface of hydroxyapatite particles was modified by hexametaphosphate for the excellent dispersion properties of HA in the scaffolds. The phase separation was used to fabricate the scaffolds of polycaprolacton/chitosan and hydroxyapatite/polycaprolacton-chitosan. The effects of hexametaphosphate on the porosity, the hydrophilic properties, the morphology, the structure, the biological activity and mechanical properties of the scaffolds were studied. The results showed that the modified scaffolds had high porosity, good hydrophilicity and the excellent dispersity of HA particles on the modified scaffolds, the interfacial bonding strength of HA and the hydrophobic PCL was improved. The artificial bone scaffolds with good mechanical properties could be prepared through controlling the content of modified HA or PCL in the composites.

Keywords: hydroxyapatite; hexametaphosphate; surface modification; scaffolds

改性羟基磷灰石/聚己内酯复合支架材料的制备及其性能

钟章裕, 肖秀峰, 刘榕芳, 刘淑琼, 焦简金

福建省高分子材料重点实验室; 福建师范大学化学与材料学院, 福建 福州, 350007

Email:zhongzhangyu2008@126.com

摘要: 为了改善羟基磷灰石(HA)在支架中的分散性能,采用六偏磷酸钠(NaP)对水热反应合成的超细微HA进行表面改性处理,用相分离法制备羟基磷灰石/聚己内酯-壳聚糖(HA/PCL-CS)多孔支架,探讨了六偏磷酸钠改性HA前后对支架孔隙率、亲水性能、形貌结构、生物活性和力学性能的影响。实验结果表明HA经NaP改性后,HA和疏水性基材PCL的界面结合力得到了改善,且HA在支架中分散更为均匀,支架具有较高的孔隙率和亲水性能。通过改变HA与PCL的配比,可制备出优良力学性能的骨组织工程支架。

关键词: 羟基磷灰石; 六偏磷酸钠; 表面改性; 多孔支架

1 引言

组织工程学是生物学、医学等学科派生的一门新兴交叉学科。而支架材料作为组织工程研究三大基本要素(种子细胞、生长因子和支架材料)中的重要因素,要求支架具备良好的生物相容性、可降解性、细胞亲和性、稳定的力学性能和机械加工性,以及三维贯穿多孔结构等基本特征^[1],选择合适的生物材料为原料是制备多孔支架的前提^[2]。单一组分的生物材料都存在着这样或那样的缺陷,比如聚己内酯力学性能较低,不能满足皮质骨或完全负重骨固定的需要;羟基磷灰

基金项目: 国家自然科学基金(No.30970887); 卫生部科学研究基金资助(WKJ 2008-02-037)

石(HA)陶瓷的易脆性,一般不能作承重骨置换使用,只能用作非负荷性骨缺损填充使用^[3]。将HA与高聚物复合时,一方面可提高HA的韧性,另一方面,HA粉末对聚合物起了弥散增韧提高抗压强度的作用^[4-6]。但纳米粒子具有高的比表面能,在有机高聚物基料中极易团聚,因此解决HA颗粒的团聚的问题是发挥其特性的关键^[7-8],常见的减少纳米颗粒团聚的方法有物理分散、化学分散和聚电解质分散等方法。

实验中采用六偏磷酸钠((NaPO₃)₆ 简称NaP)为分散剂,壳聚糖为造孔剂,以冰醋酸和水为混合溶剂,通过水热法制备纳米羟基磷灰石微晶,充分利用六偏磷酸钠可与钙离子络合作用和六偏磷酸钠分子空间位

阻的共同作用,在保持HA处于湿溶胶的状态下和高聚合物复合,通过相分离法制备多孔支架。表征HA改性后在支架材料中的分布,以及支架的孔洞结构、亲水性、孔隙率、力学强度和生物活性。

2 材料与方法

2.1 材料

壳聚糖(CS,分子量70000),食品级,济南海得贝生物有限公司;聚己内酯(PCL,分子量70000),日本大塞璐(Daicel)化学公司。

2.2 实验部分

2.2.1 水热法制备HA及相分离制备HA/PCL-CS支架

采用水热法制HA,按照 $n(\text{Ca})/n(\text{P})=1.67$ 分别配制25 mL 0.5 mol/L 硝酸钙溶液,25 mL 0.3 mol/L 的磷酸铵溶液,按着NaP/HA质量比为20%,把NaP加入到磷酸铵溶液中,分别用氨水调节 $\text{pH} \geq 11$ 。在持续搅拌的条件下,将磷酸铵溶液缓慢滴加到硝酸钙溶液中,持续搅拌30min后,倒入水热釜中,置于180℃反应6h后抽滤,分别用二次蒸馏水、无水乙醇洗涤3-4次,90℃烘干2h,研磨得到HA粉末,称重计算其产率;采用相同方法另制备一份HA,不经烘干处理,分散在一定体积的乙醇中,用量筒量取一定体积的羟基磷灰石乙醇悬浮液用于支架的制备。

配制质量分数为10% PCL的冰醋酸溶液,然后分别取20g该溶液,加入10wt%的CS,滴入少量水,磁力搅拌直至得到均相溶液。加入一定量的HA粉末或一定体积的羟基磷灰石乙醇悬浮液,再超声波振荡40min,继续磁力搅拌30min。以上溶液在搅拌下缓慢分别倒入盛有55g 30%NaOH的溶液中,静置24h成型。成型后取出,用蒸馏水漂洗,并浸泡48h以上,40℃烘干即得HA/PCL-CS多孔支架材料。

2.2.2 模拟体液浸泡实验

模拟体液的主要成分与人体血浆的无机成分基本相同。若材料具有良好的生物活性,通过浸渍模拟体液(SBF)其表面将较快地诱导生成碳磷灰石(Carbonated hydroxyapatite, CHA)涂层。CHA的形成能力作为衡量该生物材料是否具有生物活性的重要依据之一^[9]。

2.2.3 支架孔隙率的测定

测定过程见文献^[10],选用一个比重瓶装满乙醇称重 W_1 ;把重 W_0 的样品浸入乙醇中,脱气,务必使乙醇

充盈于多孔支架的孔中,然后再加满乙醇,称重为 W_2 ;把浸满了乙醇的样品取出后,剩余的乙醇与比重瓶称重 W_3 。

$$\text{样品支架孔隙率: } \varepsilon = V_p / (V_p + V_s) = (W_2 - W_3 - W_s) / (W_1 - W_3)$$

2.2.4 支架的表征

采用 Philips XL 30 ESEM 环境扫描电子显微镜观察支架的内部形貌、孔径大小以及浸泡 SBF 后,材料上沉积物的形貌;能谱(EDS)分析产物的成分;用 SL200B 型接触角测试仪测试接触角;采用英国 LLOYD 公司 LR5K 型电子材料试样机测定复合材料的抗压强度。

3 结果与讨论

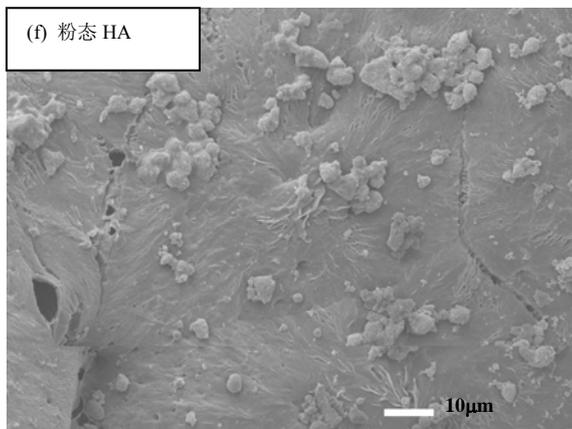
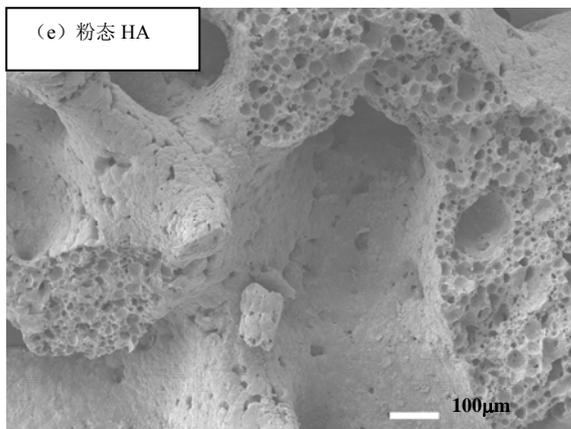
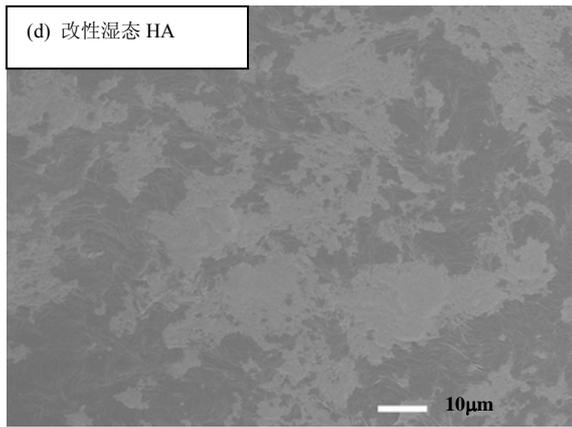
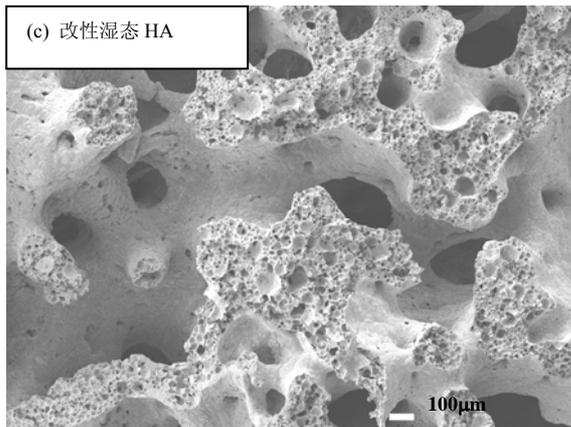
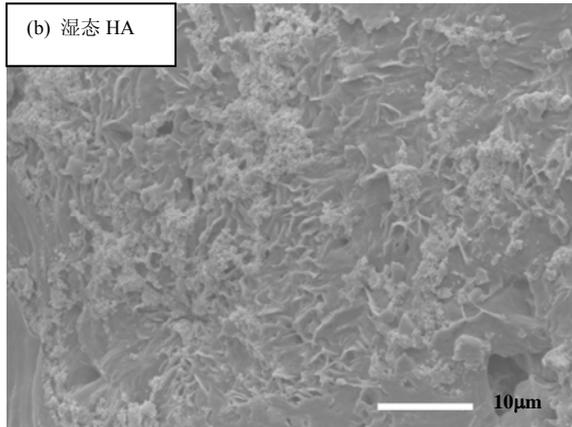
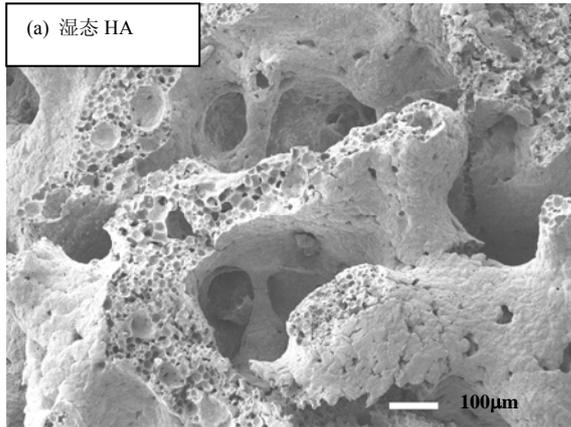
3.1 SEM 分析

图1为复合20wt%不同状态下HA所制备的HA/PCL-CS支架断面形貌图,可以看到,支架呈二级多孔结构,由相互交织形成的纤维间孔洞为一级孔结构,孔洞直径约为100-500 μm ;由纤维表面及纤维里面含有的许多小孔为二级孔结构,孔洞直径约为2-50 μm 。支架总体表现出孔洞贯穿性好、大孔数量多、小孔尺寸大的特点。

支架纤维和小孔壁上可以明显看到附着大量的HA。图1a,e分别为复合未改性的湿态和粉态的HA制备的支架,可以看到支架纤维表面和小孔壁上附着大量的HA,从其高倍率图1b,f来看,湿态的HA是铺在支架的纤维表面和小孔壁上的,而粉态的HA是以粒状的形式附着在支架的纤维表面和小孔壁上的;但是HA都不能均匀的分布在支架上,存在着团聚的现象。图1c,g分别为NaP改性后湿态和NaP改性后粉态的HA制备的支架,支架的孔洞结构和图1a,e相比基本变化不大,其纤维表面和小孔壁上附着大量的HA,从其高倍率图1d,h来看,用NaP改性后的HA,不论是湿态或粉态的HA制得的支架,支架上的HA分布都比未改性好,表现出HA粒径尺寸小,分布均匀;并且湿态制备的支架相比粉态制备的支架,HA分布更均匀,以平铺着粘附在支架纤维和小孔壁上。这是因为湿态的HA在乙醇中呈均匀分布、弥散的纳米级状态,避免了制备粉态HA过程中洗涤、干燥和加热处理等环节,使得HA的-OH之间脱水形成化学键,造成硬团聚;其次,采用NaP

改性的HA, 由于NaP是长链型结构, 它极易与 Ca^{2+} 络合而吸附在HA粉体粒子表面, 由于其长链的空间位阻作用使得粒子之间不能靠得太近, 同时使HA表面上的电荷始终为负, 在静电斥力和空间位阻作用的共同作用下, 减小HA团聚的可能性^[11]。但是当NaP加入过多

时, 长链型的NaP不能充分伸展, 可能会交缠在一起, 反而促进团聚的形成, 因此实验中采用NaP对HA改性的最佳分散点为20%^[12]。过剩的NaP可以水解形成 NaPO_3 相, 并可以通过水洗的方法去除, 不会影响HA的品质^[13]。



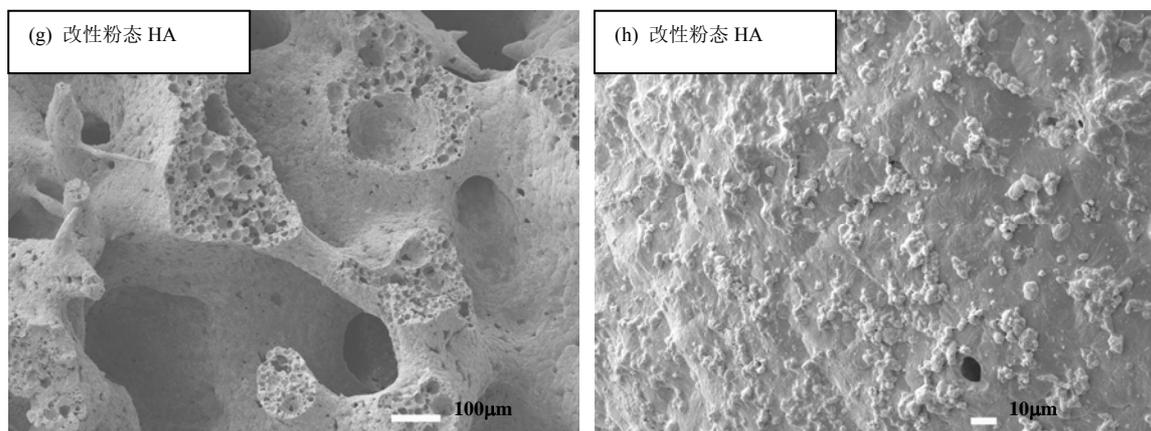


Fig.1. SEM of scaffold composites with different HA states

图1. 复合不同状态 HA 支架 SEM

3.2 孔隙率分析

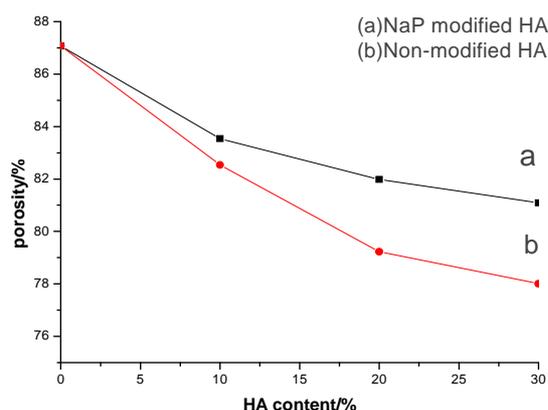


Fig.2. Porosity of scaffold composites with gel state HA

图2. 复合湿态HA改性前后支架的孔隙率

图2为复合湿态HA改性前后支架的孔隙率，结果表明，复合HA后支架的孔隙率明显低于复合HA前支架的孔隙率，但支架仍保持着较高的孔隙率，约为78%以上。支架拥有高的孔隙率，可能是在相分离中，搅拌的剪切力和空气的混入产生密集的相互交织的纤维结构形成的空位，成型后支架的空位就成为了大孔；同时，CS在冰醋酸逐渐被中和过程中遇碱液析出，原本CS溶胀球线团形成蜂窝状，形成了二级微孔贯穿结构。随着HA含量的增加，支架的孔隙率也随之下降，相比图2a,b支架孔隙率，采用NaP改性HA的支架孔隙率下降的幅度比较小，由此我们可以推测支架内部HA的分布影响着支架的孔隙率，从SEM也可看到，未用

NaP改性的HA粘附在纤维表面和小孔壁上，明显使纤维变粗，部分小孔不能贯通。因此，通过复合湿态改性HA制得的支架具有较高的孔隙率，其孔洞结构有利于细胞的黏附、繁殖和营养物质的运输等。

3.3 力学性能分析

图3为复合湿态改性前后HA支架的应力-应变曲线。从复合支架的应力-应变曲线图3A,B来看，随着HA的加入，支架的抗压性能都得到了提高，并且随着HA量的增加，支架的抗压性能也随着增大；应变在12%左右时，支架都出现了较小的屈服区，抗压性能迅速提高。随着HA的加入，HA会粘附在支架的纤维表面和小孔壁上，并随着HA量的增加而增多，从而发挥了HA的增强的作用；其次，HA含量的加大，支架的孔隙率也随着HA含量的加大而下降，如孔隙率图2，其孔隙率下降了6%-10%，使得支架孔洞结构更加致密，力学性能得到了提高。相比图3A,B力学性能，NaP改性后的支架抗压性能会好于未改性的支架抗压性能，在HA含量为30wt%时，应力分别为0.48Mpa和0.60Mpa；这可能由于NaP改性后的HA，其弥散状态更具有流动性，使HA中的-OH更容易与聚合物中CS的-NH₂形成氢键作用，或是HA中的Ca(II)与CS中的-NH₂形成了螯合作用^[14]。这些化学键的作用改善了HA与聚合物材料界面粘结力等力学强度，增强了支架的力学性能。由此可见，支架的力学性能是由HA含量、孔隙率、HA与聚合物界面粘结力等所共同决定的。

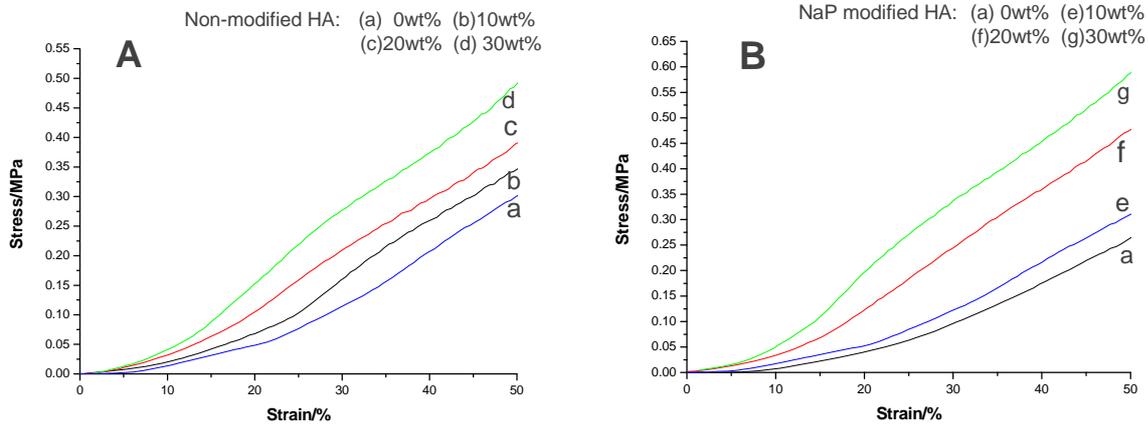


Fig.3. Stress-strain curve of scaffold composites with gel state HA

图3. 复合湿态HA改性前后支架的应力-应变曲线

3.4 亲水性能分析

接触角测试结果表明,未加入HA时,由于支架里面含有大量的疏水性基团的PCL和大量-OH的CS,使的支架仍有一定的亲水性,材料的平均接触角为78.37°。当支架中逐渐加入HA后,由于HA是极性分子,含有大量吸水性的-OH,当复合20wt% HA时,平均接触角分别61.68°、60.77°,NaP改性后支架材料略好于

未改性的支架材料。当复合30wt% HA时,材料的平均接触角达到了50.18°。这说明添加复合NaP改性的HA可以提高复合支架材料的亲水性,而材料亲水性的提高有利于细胞的黏附生殖和营养物质的扩散。

3.5 生物活性分析

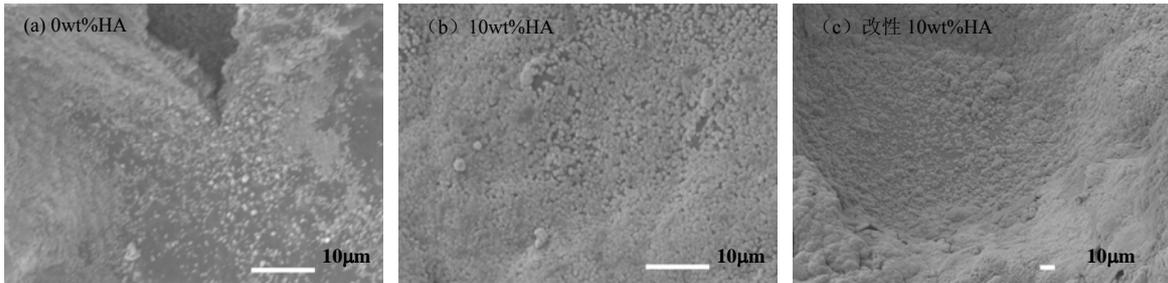


Fig.4. SEM of scaffold composites with gel state HA after immersion in SBF

图4. 复合湿态HA支架材料浸泡模拟体液后的SEM

图4为支架材料浸泡模拟体液14天后的形貌图,未复合HA的支架上有少量细小的颗粒沉积物,粒径约0.2-1µm;而复合10wt%HA的支架可看到更多的沉积物,相互堆积在支架上,并且在支架局部上有裂纹,通过高倍率下观察粒径约1-10µm,而NaP改性后支架上沉积物略均匀于未改性支架。说明复合HA后支架具有良好的生物活性。

持HA湿溶胶的状态下避免洗涤、干燥和加热处理等容易造成团聚的环节,与聚己内酯、壳聚糖复合制得多孔支架材料。结果表明NaP的改性对支架中的HA分布形式和孔隙率影响较大,并且NaP改性后的HA改善了和疏水性基材PCL的界面结合力,使HA充分发挥了增强的作用,提高了多孔支架的力学性能。

4 结论

采用高聚物作为基体制备HA/高聚物复合支架材料,以HA作为增强相是一种常见的方法。实验中通过水热法制备高度弥散的纳米级NaP改性HA,在保

References (参考文献)

[1] Rong Lu, Shipu Li, Yuhua Yan. The Fabricating Techniques of Polymeric Porous Scaffolds for Tissue Engineering [J]. Orthopaedic Biomechanics Materials and Clinical Study, 2005, 2(3): 37-41.
陆蓉, 李世普, 阎玉华. 组织工程用聚合物多孔支架的制备

- 技术[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2005, 2(3): 37-41.
- [2] Huaguo Liu, Yingjun Wang, Chengyun Ning, Huade Zheng. Preparation of Poly(ϵ -caprolactone) Tissue Engineering Scaffold by Freeze-drying/Particle-leaching Method [J]. Materials Review, 2007, 21(2): 125-127.
刘华国, 王迎军, 宁成云, 郑华德. 冷冻干燥/粒子沥滤复合法制备聚己内酯组织工程支架[J]. 材料导报, 2007, 21(2): 125-127.
- [3] S F Hulbert, J C Bokros, L L Hench, et al. Ceramics in clinical applications, past, present and future[A]. In: Vincenzini P, ed. High Tech Ceramics[M]. Italy: Milan Press. 1986. 189-190.
- [4] Yonggang Yan, Yubao Li, Jianxin Wang, et al. Study on preparation and properties of polyamide 66/nano-apatite composites [J]. China Plastics Industry, 2000, 28(3): 38-40.
严勇刚, 李玉宝, 汪建新, 等. 聚酰胺-66/羟基磷灰石复合材料的制备及性能研究[J]. 塑料工业, 2000, 28(3): 38-40.
- [5] Yonggang Yan, Yubao Li, Li Zhang, et al. In vitro bioactivity of PA6 and nano-HA/PA6 composite [J]. Acta Materiae Compositae Sinica, 2004, 21(2): 147-152.
严勇刚, 李玉宝, 张利, 等. 纳米HA/PA6复合材料的体外生物活性[J]. 复合材料学报, 2004, 21(2): 147-152.
- [6] Tao Fu, Demei Yu. Compounding techniques of bioactive ceramic and polymer biomaterials [J]. Journal of Biomedical Engineering, 2002, 19(1): 108-111.
付涛, 于德梅. 生物活性陶瓷-聚合物生物材料的复合技术[J]. 生物医学工程学杂志, 2002, 19(1): 108-111.
- [7] D X Cui, H J Gao. Advance and prospect of bio-nano-materials [J]. Bulletin Chinese Academy Science, 2003, 2(1): 21-24.
- [8] D R Dinger, J E Funk. Particle-packing phenomena and their application in materials processing [J]. Mater Res Soc Bull, 1997, 22(12): 19-23.
- [9] Deping Wang, Rui Yu. Surface change of calcium phosphate glass ceramics in simulated body fluid [J]. Journal of the Chinese Ceramic Society, 2004, 32(11): 1441-1444.
王德平, 于睿. 生理模拟液中的磷酸钙微晶玻璃的表面变化[J]. 硅酸盐学报, 2004, 32(11): 1441-1444.
- [10] Guixin Shi, Shenguo Wang, Jianzhong Bei. Preparation of Porous cell Scaffolds of Poly(L-lactic acid) and Poly(L-lactic-co-glycolic acid) and the Measurement of their Porosities [J]. Journal of Functional Polymers, 2001, 14(1): 7-11.
石桂欣, 王身国, 贝建中. 聚乳酸与聚乳酸-羟基乙酸多孔细胞支架的制备及孔隙的表征[J]. 功能高分子学报, 2001, 14(1): 7-11.
- [11] Xuan Mao, Peizhu Wu, Shunqing Wu, et al. Influence of sodium hexametaphosphate on dispersion behavior of nano hydroxyapatite in water [J]. Journal of Materials Science and Engineering, 2004, 22(5): 726-729.
毛萱, 吴佩珠, 吴顺清, 等. 六偏磷酸钠对纳米羟基磷灰石水中分散行为的影响[J]. 材料科学与工程学报, 2004, 22(5): 726-729.
- [12] Chengxiang Wang, Musen Li, Ning Cao, et al. Experimental preparation of nano-sized hydroxyapatite [J]. Journal of Shandong University, 2007, 37(1): 15-18.
王成祥, 李木森, 曹宁, 等. 纳米羟基磷灰石制备的实验研究[J]. 山东大学学报, 2007, 37(1): 15-18.
- [13] Xiang Shen, Musen Li, Ning Cao, et al. The dispersant effect on HA powder prepared by chemical precipitation method [J]. Journal of Shandong University, 2006, 36(3): 5-8.
沈翔, 李木森, 曹宁, 等. 化学沉淀法制备HA粉体过程中水中分散效果的试验研究[J]. 山东大学学报, 2006, 36(3): 5-8.
- [14] M. Kikuchi, T. Ikoma, S. Itoh, et al. Biomimetic synthesis of bone-like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen [J]. Composite Sci Technol, 2004, 64: 819-825.