

磷酸钙骨粘合剂的研究

杨盛兵, 王 靖, 刘昌胜

(华东理工大学 超细材料制备与应用教育部重点实验室, 教育部生物医用材料工程研究中心, 上海 200237)

摘 要: 在柠檬酸中添加壳聚糖配成的固化液与磷酸钙骨水泥(CPC)调和制备的骨修复材料具有类似口香糖的胶状特性, 可应用于碎骨粘结, 称之为磷酸钙骨粘合剂(CPCBA)。本研究考察了柠檬酸的含量对抗压强度、固化时间、水化产物和粘结强度的影响, 同时对该体系进行了初步的体外生物学评价。结果显示, 加入柠檬酸可以缩短固化时间并且时间可以通过柠檬酸的含量进行调控, 同时也改善了抗水性能。壳聚糖可以与骨水泥中的钙离子发生螯合作用, 可以增加界面的粘结强度。小鼠原成骨细胞(MC3T3-E1)在其表面粘附良好, 该体系骨水泥有望取代 PMMA 成为新的骨粘结剂。

关 键 词: 磷酸钙; 骨粘结; 骨缺损; 固化

中图分类号: R318 **文献标识码:** A

Research on Calcium Phosphate Cement Bone Adhesive

YANG Sheng-Bing, WANG Jing, LIU Chang-Sheng

(Key Laboratory for Ultrafine Materials of Ministry of Education, Engineering Research Center for Biomedical Materials of Ministry of Education, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Using citric acid and chitosan as hardening liquid, and calcium phosphate cement (CPC) as powder, gum-like adhesive bone cement is obtained after mixing the powder and liquid components together, which can be used as calcium phosphate cement bone adhesive (CPCBA). The effect of citric acid concentration on compressive strength, setting time and hydration products were investigated. *In vitro* cytocompatibility of the cements was also researched through cell culture on the cement surface. The results show that setting time is shorten and anti-washout is improved by introducing citric acid. Cohesion strength increases owing to chitosan chelated with calcium ion of CPC. The cements are transformed to hydroxyapatite after incubation 3 d in SBF and osteoblasts (MC3T3-E1) can attach and proliferate on the surface. Results indicate that the calcium phosphate cement bone adhesive is a suitable adhesive material for comminuted fracture.

Key words: calcium phosphate; bone adhesive; bone defect; solidification

随着现代高速交通的发展, 以及社会人口老龄化的加重, 骨折在临床上变得越来越常见。骨折手术治疗的方法主要是切开复位, 配合微型钢板螺丝固定^[1]、髓内钉固定^[2]、骨内尼龙线缝合固定^[3]和骨内钢丝缝合固定^[4]等金属内固定或外固定。但是, 某些特殊部位的骨折, 如关节周围、跟骨等部位的粉

碎性骨折或关节内骨折, 往往因缺乏有效的内固定材料无法对骨折块进行准确的拼接复位和固定。传统的临床治疗主张将部分无法固定的小骨碎块去除或旷置^[5], 但对非关节内骨折, 在有坚强固定的情况下, 将小骨碎块去除后会造成骨缺损, 明显影响骨折愈合速度, 并且不利于维持骨折对位及对线,

收稿日期: 2012-05-15; 收到修改稿日期: 2012-07-17

基金项目: 国家重大科学研究计划(2012CB933600) National Basic Research Program of China (2012CB933600)

作者简介: 杨盛兵(1985-), 男, 博士研究生. E-mail: ysb111820@sohu.com

通讯作者: 刘昌胜, 教授. E-mail: liucs@ecust.edu.cn

使骨折畸形愈合及不愈合的可能性增加;旷置的小骨块往往会在术后移位进入周围软组织,形成异位骨化,从而影响机体功能。

聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)^[6]是目前已获临床使用的骨水泥粘合剂,具有较高的粘接强度,广泛用于人工关节和内固定的加固。但由于其单体的细胞毒性,导致手术中可能出现血压骤降,同时固化时产生的热效应容易对正常组织产生灼伤,另外由于不能降解而不适用于骨粘接。近年来,也有一些骨粘结剂的报道: Bauer 等^[7]报道了磷酸钙体系的骨水泥; Nihouannen 等^[8]研究了多糖类作为骨粘接剂的可能性。然而就目前而言,临床上尚无令人满意的骨粘接剂产品。

磷酸钙骨水泥是近年来研制的一种以钙磷盐为主要成分的无机骨水泥,与 PMMA 相比,具有成骨活性高、固化过程中放热少等特点,但由于其粘接强度低,不适用于骨与骨的直接粘接。因此,临床上急需一种能够粘接固定骨折块并可随骨折的愈合、新生骨的形成而逐渐降解的生物材料。

本研究在磷酸钙骨水泥工作^[9-10]的基础上,在固化体系中引入壳聚糖和柠檬酸。壳聚糖是一种天然碱性多糖,容易降解,具有优异的生物相容性,被广泛用作药物控释载体和组织工程支架材料^[11-12]。柠檬酸是人体内含有的一种有机酸,是重要的营养成分,它具有可消除人体内自由基和改善血氧大循环的功能,多储存于骨内^[13]。本研究利用壳聚糖和柠檬酸的粘性以及对钙离子的螯合作用,制备了具有粘性的新型磷酸钙基骨修复材料,可用于粉碎性骨折的粘结,称为磷酸钙基骨粘合剂(calcium phosphate cement bone adhesive, CPCBA)。研究了固化液的组成对骨水泥理化性能及粘接性能的影响规律,并初步评价了其细胞亲和性。

1 材料和方法

1.1 材料

磷酸钙骨水泥(CPC)由等摩尔比的磷酸四钙(TECP, 上海瑞邦生物材料有限公司)和无水磷酸钙(DCPA, 上海瑞邦生物材料有限公司)混合而成。

固化液的制备: 分别称取 11.1、25.0 和 66.7 g 柠檬酸(分析纯, 凌峰化学试剂有限公司)添加到 100 g 超纯水(实验室自制)中, 在常温下搅拌 30 min, 配成 10%、20%和 40%质量百分比浓度的柠檬酸溶液, 然后分别称取上述四种溶液 98 g, 加入 2 g 壳聚糖(Sigma-Aldrich, Mn=50 万), 在常温下搅拌 24 h 确

保壳聚糖充分溶解, 获得均匀的柠檬酸壳聚糖固化液。将固化液密封低温保存备用。

模拟体液(SBF)配制^[14]: 将 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、 $NaHCO_3$ 、 $CaCl_2$ 、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、 KCl 、 $NaCl$ 按一定浓度配成溶液, 加入 0.03 mol/L 的 Tris 生物试剂作缓冲液, 再用浓盐酸调节 pH 值至 7.5, 该溶液即为模拟体液。

1.2 磷酸钙骨粘合剂的制备

固化液中柠檬酸含量为 0、10%、20%和 40%; 壳聚糖含量为 2%。将固相 CPC 粉末和固化液按固液比为 0.5~1.0 mL/g 混合均匀, 然后进行粘结剂的测试。

1.3 压缩强度的测定

将粉料与固化液按 0.5~1.0 mL/g 的液固比混合均匀, 填入 $\phi 6 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$ 的不锈钢模具(自制)中, 施压 2 kg 以尽可能去除气泡。样条取出后即放入 100%相对湿度、37℃环境中, 固化 3 d 后取出, 两端面用细砂纸磨平, 然后由万能材料试验机(HY-1080, 上海衡翼公司)测量压缩强度。载荷速度为 1 mm/min, 最大压力为 2000 N, 每组数据至少有 3 个平行试样。

1.4 抗水性测试

将 CPC 粉末与含不同柠檬酸配比的固化液以按 0.5~1.0 mL/g 充分混合后放入模拟体液中, 然后置于振荡箱(100 r/min)中振荡 24 h, 观察其表面是否脱落。振荡 24 h 后将样品取出, 在 60℃烘箱里干燥 24 h, 称重, 以 CPC 的失重情况衡量材料的抗水性能。

1.5 凝结时间测试

骨水泥粉料与固化液按 0.5~1.0 mL/g 的液固比混合均匀, 将调和好的浆体填入 $\phi 6 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ 的小玻璃管中(尽量填实), 一头抹平, 然后将两端用塑料薄膜封闭, 放入 100%相对湿度、37℃环境(恒温恒湿箱, 上海一恒实验设备有限公司)中, 采用水泥稠度及凝结时间测定仪(即维卡仪, 无锡建筑材料仪器机械厂)测量凝结时间。测定凝结时间时, 在金属圆棒的下端装上直径 1.1 mm 的试针, 滑动部分总重量为 $(300 \pm 2) \text{ g}$ 。测定时将样品置于底板上使试针与浆体表面接触, 突然松开松紧螺丝, 试针自由沉入浆体, 观察指针指示数值。从加入固化液起, 至试针沉入浆体不超过 1 mm 时, 所需时间即为凝结时间。每组数据重复 3 次。

1.6 X 射线衍射分析

将粉料与固化液按 0.5~1.0 mL/g 的液固比混合均匀, 填入硅胶或不锈钢模具中, 置于 100%相对湿

度、37℃环境中养护 72 h, 即得骨水泥样品。将样品置于 80℃干燥箱(电热恒温鼓风干燥箱, DHG-9203A, 上海精宏实验设备有限公司)内干燥, 然后用玛瑙研钵粉碎至无颗粒感, 再次放入干燥箱内干燥。将样品粉末用“压片法”制成试片, 使用转靶 X 射线多晶衍射仪(D/MAX 2550 VB/PC, 日本 Rigaku 公司)进行广角 X 射线衍射分析(XRD, Cu 靶, 扫描速度 8°/min)。

1.7 粘接强度测定

取新鲜猪骨, 制成 40 mm×25 mm×5 mm 样条。采用剪切强度表征胶粘剂的粘合性能。胶粘剂的剪切强度是反映其胶接强度的主要指标, 用以表征与胶层平面平行方向上抵抗应力的强度。测试其剪切强度方法如图 1 所示。

将骨块一端用细钢丝固定于加力架上, 粘合的另一骨块用细钢丝系于测力计上。先将配置好的骨粘接剂涂抹在小骨块的一端约 1/3, 按压使骨块间多余的凝胶溢出, 两个小骨块充分贴合为一对, 每实验组包括 5 对平行试样。分别测试不同柠檬酸浓度下的剪切强度。于粘合后 6 h 对各组骨块的粘合力进行测试, 记录相应各组的粘合剂抗拉力大小(F); 并用千分尺分别测得各组中每块骨粘合部分的长度和宽度, 计算粘合面积(S)。根据公式 $\sigma = F/S$ 计算出粘合应力的值。

1.8 细胞与材料复合后的扫描电镜观察

固化 72 h 后的材料用环氧乙烷灭菌备用。骨粘接剂固化消毒后放入装有成骨诱导 DMEM 培养液

的培养管中, 置于 37℃、100%相对湿度、5 % CO₂ 培养箱中 24 h, 取出后, 吸干材料表面培养液备用。取第 4 代对数生长期 MC3T3-E1(中科院细胞库), 胰酶消化、离心收集后, 制备成 1×10^6 cells/mL 浓度的细胞悬液, 滴加于材料中至饱和。将吸收细胞悬液的材料置于 37℃、100%相对湿度、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h, 再将培养皿中的培养液加至正常培养用量, 继续置于 37℃、100%相对湿度、5% CO₂ 培养箱中分别培养 8 h。然后将材料和细胞的复合体取出, 以 PBS 轻轻洗涤 3 次, 置于 2%多聚甲醛 - 2.5%戊二醛中固定 30 min, 然后用 50%、70%、90%、100%酒精逐级脱水后, 放入扫描电镜(JSM-6360LV, 日本 JEOL 公司)观察细胞形貌。

2 结果和讨论

2.1 压缩强度

随着水化反应的进行, 羟基磷灰石细小晶体不断长大并相互接触。晶体越大, 接触点数量越多, 固化体越坚硬, 强度越高。磷酸钙骨水泥体系中固化液的作用一是作为固体颗粒间的连接介质, 使其处于粘连状态; 二是作为反应的介质。从抗压强度结果(图 2)可以看出, 抗压强度随着柠檬酸的含量提高而提高。这一结果同 Barralet 等^[15]关于 α -羟基酸对 CPC 抗压强度的影响相符。柠檬酸也属于 α -羟基酸, 羟基酸体系在钙离子的作用下可产生更多的自由离子, 而这些自由离子会吸附在反应物及固化生成物的粒子表面, 进而增大 ζ 势能, 提高了骨水泥流变性能, 在保持骨水泥可操作性的同时降低其固化所需的水含量, 进而导致骨水泥孔隙率下降, 强度提高。

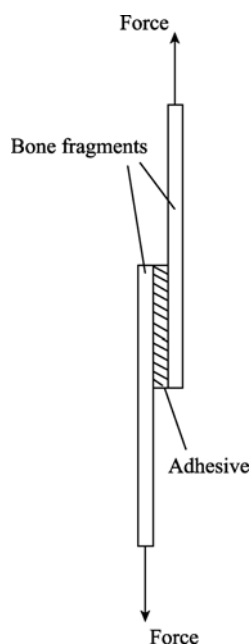


图 1 骨块胶粘强度测试示意图

Fig. 1 Schematic illustration of cohesion test

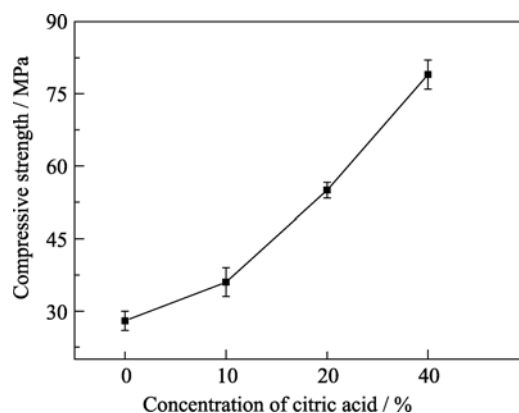


图 2 柠檬酸浓度对 CPCBA 压缩强度的影响

Fig. 2 Effect of citric acid concentration on compressive strength of CPCBA

2.2 抗水性

为避免手术时伤口处渗出的血液将未固化完全的骨水泥粉末冲散, 影响其性能并产生安全隐患, 要求骨粘合剂应具有良好的抗水性能。传统的磷酸钙骨水泥在调和时, 由于水分产生的毛细孔隙的直径一般为几十至几百纳米, 水分子可以自由渗入, 导致尚未固化的骨水泥溃散, 抗水性能不理想。引入抗水剂是提高材料抗水性能的有效手段, 实现堵塞孔隙, 阻止渗水。

图 3 是不同柠檬酸含量的固化液与 CPC 调和后, 浸泡于 SBF 中在振荡箱震荡 24 h 后的照片。从图中可以看出不含柠檬酸的 CPC 有较多的粉末溃散, 添加 10% 柠檬酸的样品有少量掉渣的现象, 而添加 20% 和 40% 的样品几乎没有掉渣的现象, SBF 溶液澄清。

通过试样干燥后称重, 可定量反映抗水性。由图 4 可以看出, 随着柠檬酸的加入, 抗水性得到有效的改善, 不添加柠檬酸的样品失重率达到 14.5%, 添加 10% 的柠檬酸失重率减少到 8.6%, 添加 20% 和 40% 的柠檬酸失重率分别降到 0.44% 和 0.37%。柠檬酸和壳聚糖复合固化液可以改善 CPC 的抗水性能, 柠檬酸含量达到 20% 以上时抗水性能比较显著, 几乎没有掉渣的现象发生。Yokoyama 等^[16]实验结果显示柠檬酸含量为 45% 时能够显著改善骨水泥的抗水性能, 体内实验也显示出良好的生物相容性。

本研究中固化液体系中除了柠檬酸外, 还加入了天然多糖壳聚糖。普遍认为壳聚糖的作用机理在

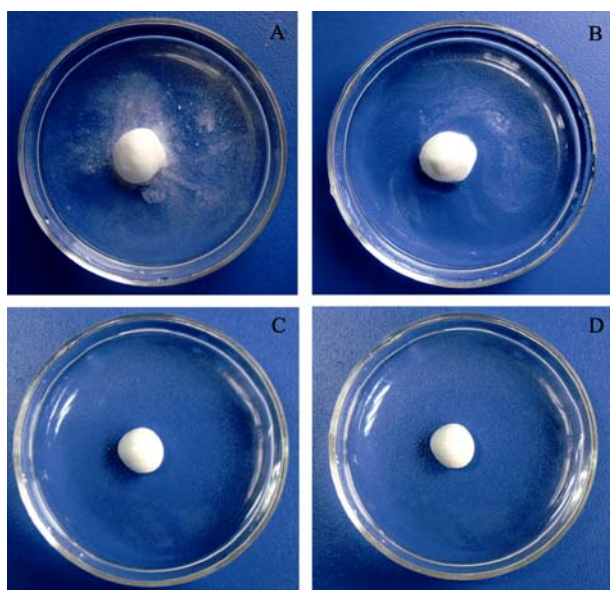


图 3 固化液中柠檬酸含量对抗水性能的影响

Fig. 3 Effect of citric acid concentration on antiwashout (A) No citric acid; (B) 10% citric acid; (C) 20% citric acid; (D) 40% citric acid

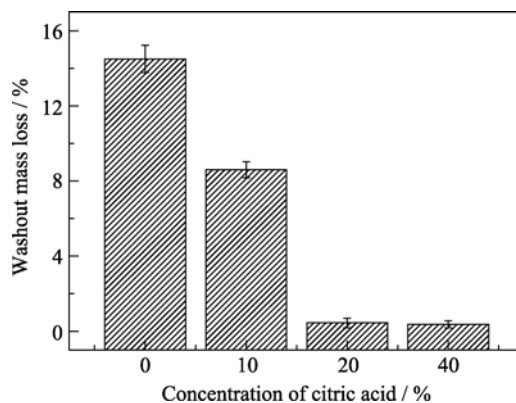


图 4 固化液柠檬酸含量对抗水性能的影响

Fig. 4 Effect of citric acid concentration on washout

于它能够与混合物中溶解的钙离子形成不溶于水的水凝胶^[17-18], 后者能够起到保护作用, 并进入材料的孔隙内部, 掩盖孔口, 有效地阻止调和物不被水侵蚀而溃散, 提高了 CPCBA 的抗水性能。

2.3 固化时间

合理的固化时间是 CPCBA 能否被临床接受的一个关键因素。磷酸钙盐开始溶解后, 骨水泥颗粒间溶液中钙、磷离子浓度不断升高, 达到过饱和状态, 成核析出细小羟基磷灰石晶体。随着水化反应的进行, 羟基磷灰石细小晶体不断长大并相互交联接触, 晶体越大, 接触点数量越多, 固化体越坚硬, 强度越高。从图 5 可以看出柠檬酸可以缩短 CPCBA 的固化时间。不含柠檬酸时固化时间为 22 min, 添加 40% 柠檬酸后固化时间缩短到 5.2 min, 添加 20% 柠檬酸后固化时间为 16 min。文献报道, 适宜手术的最佳固化时间为 10 min。本研究 40% 柠檬酸的固化时间相对较短, 但可以通过调整柠檬酸的含量和固液比来调整固化时间到可以接受的范围。由此可见, 添加柠檬酸可以使得实际手术操作时, 减少手术的时间, 并且固化时间可以通过柠檬酸的含

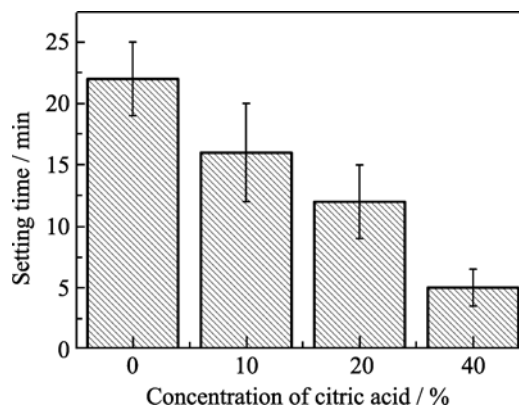


图 5 柠檬酸含量对 CPCBA 固化时间的影响

Fig. 5 Effect of citric acid concentration on setting time of CPCBA

量以及固液比的比例来进行调节。传统的 CPC 骨水泥在添加了抗水剂后往往导致固化延迟, 无法满足临床需求。本研究的固化体系中由于柠檬酸的存在, 可有效缩短固化时间。Gbureck 等^[19]认为柠檬酸在 CPCBA 调和初期可作为触变剂, 柠檬酸加入到 CPCBA 浆体中能够影响和降低骨水泥粒子之间的联系, 尤其是离子之间的静电吸引力, 并最终影响到骨水泥的物理和化学性质, 尤其是提高流变性, 使得粉末颗粒之间相互接触更容易, 从而减少固化时间。

2.4 固化产物分析

利用 XRD 对采用不同固化液组成的 CPCBA 固化体的组成进行了初步的分析。图 6 为采用不同柠檬酸含量的固化液的磷酸钙骨水泥固化体的 XRD 图谱, 均具有明显的羟基磷灰石特征峰。这表明水化反应已进行, 并生成了水化产物羟基磷灰石。四个产物的固化体没有明显区别, 最终产物里都只有很少量的 CaHPO_4 , 表明该体系 DCPA 和 TECP 基本反应完全。

2.5 粘结强度

图 7 为 CPCBA 和 40%柠檬酸固化液调和后的状态, 调和后骨水泥类似于口香糖状, 有较强的粘性。本实验进一步考察其对猪骨的粘结强度。从图 8 的粘结强度可以看出, 骨水泥的粘结强度随着柠

檬酸含量的提高而增强, 不含柠檬酸粘结强度为 24.5 N/cm^2 , 加入 10%、20%和 40%柠檬酸粘结强度分别达到 35.7 N/cm^2 、 59.9 N/cm^2 和 72 N/cm^2 。

含壳聚糖和柠檬酸的固化液可以提高磷酸钙骨水泥的力学强度, 壳聚糖与金属离子有螯合作用(图9)^[20], 固化液与 CPCBA 调和后涂抹在猪骨上, 壳聚糖与猪骨中的钙离子螯合作用, 增加了界面的粘结强度。同时, 随着柠檬酸含量的增加粘结强度提高, 其原因可能是柠檬酸促进壳聚糖的螯合强度。

2.6 细胞粘附

从前面的结果可以看出, 固化液含 40%柠檬酸固化速度快, 抗水性好, 粘结强度高。选取该柠檬酸浓度下固化的骨水泥固化体进行细胞培养实验,



图 7 口香糖状粘性骨水泥

Fig. 7 Gum-like adhesive bone cement

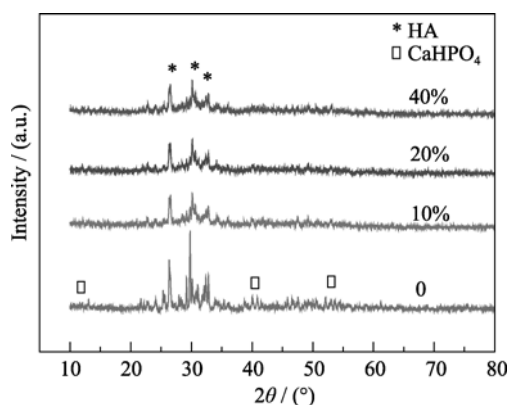


图 6 不同柠檬酸含量 CPCBA 的 XRD 分析

Fig. 6 XRD patterns of CPCBA with different citric acid concentration

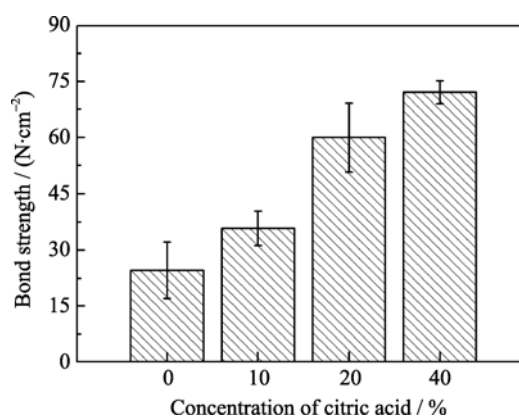


图 8 不同柠檬酸含量的 CPCBA 粘结强度

Fig. 8 Cohesion strength of CPCBA with different citric acid concentration

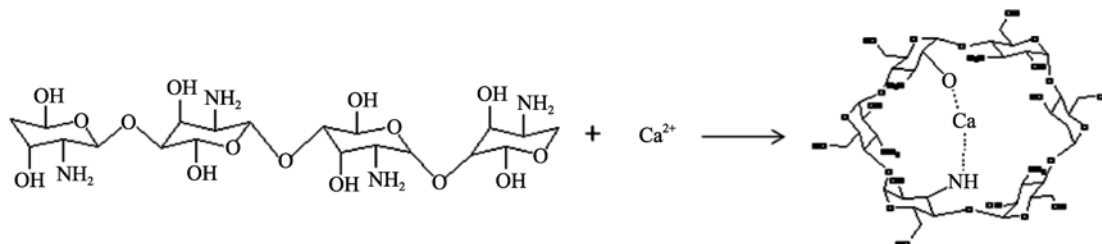


图 9 壳聚糖与钙离子螯合示意图

Fig. 9 Schematic illustration of Ca^{2+} complex with CS

并通过扫描电镜观察成骨细胞在材料表面的粘附。结果(图 10)显示, MC3T3-E1 成骨细胞接种于含 40% 柠檬酸骨水泥表面 12 h 后, 细胞在材料表面已完全伸展并在材料表面粘附良好, 表明, 成骨细胞在该体系骨水泥材料表面的粘附性能良好。

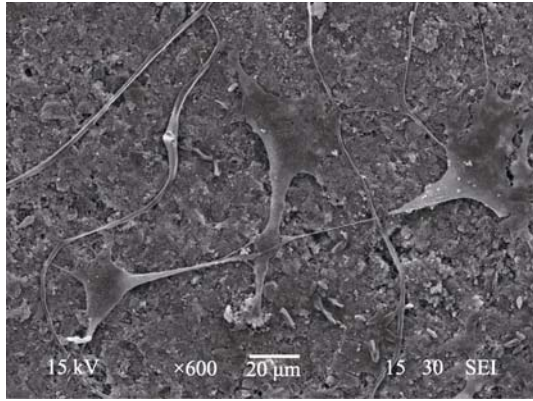


图 10 成骨细胞(MC3T3-E1)接种于含 40% 柠檬酸骨水泥表面 12 h 后的表面形貌

Fig. 10 SEM image of osteoblast (MC3T3-E1) cultured for 12 h on the CPCBA surface with 40% citric acid

3 结论

本研究在 CPC 骨水泥的基础上, 通过在固化液里添加柠檬酸和壳聚糖, 制备了具有粘性的骨粘合材料, 柠檬酸的加入可以缩短固化时间并且固化时间可以通过柠檬酸的含量调控, 同时改善了抗水性能。壳聚糖可以与骨水泥中的钙离子发生螯合作用, 可以增加界面的粘结强度。本研究探讨了 CPC 基粘合剂固化液组成对固化时间, 固化产物, 抗水性以及对猪股骨干皮质小骨块粘结强度的影响。研究表明: 该体系骨水泥具有一定的粘合性, 能够自行固化, 可任意塑型, 抗压强度高, 抗水性好。这些性能的有机结合, 克服了其它材料的缺陷, 有希望取代传统的内固定和 PMMA 水泥而成为新型的骨粘结材料。

参考文献:

- [1] Prevel C D, Eppley B L, Jackson J R, *et al.* Mini and micro plating of phalangeal and metacarpal fractures: a biomechanical study. *J. Hand. Surg. Am.*, 1995, **20**(1): 44–49.
- [2] Gonzalez M H, Hall R F. Intramedullary fixation of metacarpal and proximal phalangeal fracture of the hand. *Clin-Orthop*, 1996, **327**: 47–54.
- [3] Haas S B, Savage R C. Metacarpal fracture fixation with interosseous nylon suture in a patient with metal allergies. *J. Hand. Surg.*

- Am.*, 1989, **14**(1): 107–110.
- [4] Gorosh J, Page B J. Treatment of phalangeal fractures of the hand with introoscons wire fixation. *Orthop. Rev.*, 1989, **18**(7): 800–806.
- [5] Zhou Y J, Liu S C, Li X, *et al.* Surgical treatment of comminuted fracture near joints. *Journal of Practice Orthoedics*, 2001, **7**(4): 291–292.
- [6] Spicer P P, Mikos A G. Fibrin glue as a drug delivery system. *J. Controlled Release*, 2010, **148**(1): 49–55.
- [7] Bauer N B, Brinke N, Heiss C, *et al.* Biodegradable beta-Tri-calciumphosphate/hydroxyethyl methacrylate enhanced three component bone adhesive demonstrates biocompatibility without evidence of systemic toxicity in a rabbit model. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2009, **90B**(2): 767–777.
- [8] Nihouannen D L, Saffarzadeh A, Gauthier O, *et al.* Bone tissue formation in sheep muscles induced by a biphasic calcium phosphate ceramic and fibrin glue composite. *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, 2008, **19**(2): 667–675.
- [9] 刘昌胜. 新型骨修复材料-磷酸钙骨水泥的制备及其应用基础研究. 上海: 华东理工大学博士论文, 1996.
- [10] Zhu M G. New technics preparation of HAp bone cement material with Sol-Gel method. *Metallic Functional Materials*, 2002, **9**(1): 33–35.
- [11] Buranapanitkit B, Srinilta V, Ingvinga N, *et al.* The efficacy of a hydroxyapatite composite as a biodegradable antibiotic delivery system. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2004, **424**: 244–252.
- [12] Xu H K, Simon C G. Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials*, 2005, **26**(12): 1337–1348.
- [13] Brown W E, Chow L C. A new calcium phosphate water-setting cement. *Cem. Res. Prog.*, 1986, **4**: 352–379.
- [14] Kokubo T, It O S, Huang I, *et al.* CaO-SiO₂-P₂O₅ as a bioactive bone cement. *J. Am. Ceram Soc.*, 1991, **74**: 1739–1741.
- [15] Barralet J E, Hofmann M, Grover L M, *et al.* High-strength apatitic cement by modification with α -hydroxy acid salts. *Advanced Materials*, 2003, **15**(24): 2091–2094.
- [16] Yokoyama A, Yamamoto S, Kawasaki T, *et al.* Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials. *Biomaterials*, 2002, **23**(4): 1091–1101.
- [17] Liu H, Li H, Cheng W J, *et al.* Novel injectable calcium phosphate/chitosan composites for bone substitute materials. *Acta Biomaterialia*, 2006, **2**(5): 557–565.
- [18] Xu H K, Simon C G. Fast seting calcium phosphate chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials*, 2005, **26**(12): 1337–1348.
- [19] Gbureck U, Barralet J E, Spatz K, *et al.* Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part1: hypodermic injection and strength improvement of apatite cement. *Biomaterials*, 2004, **11**: 2187–2195.
- [20] Webster A, Halling M D, Grant D M. Metal complexation of chitosan and its glutaraldehyde cross-linked derivative. *Carbohydrate Research*, 2007, **342**: 1189–1201.