

纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合微球的原位仿生制备及表征

李 健¹, 韩志军¹, 魏 延¹, 牛璐璐¹, 刘 宇¹, 路国运², 黄 棣¹

(太原理工大学 1. 力学学院, 材料强度与结构冲击山西省重点实验室; 2. 应用力学与生物医学工程研究所, 太原 030024)

摘 要: 为解决纳米羟基磷灰石/壳聚糖(nHA/CS)复合微球中 nHA 团聚及分散不均的问题, 本研究在油包水的乳液体系中, 原位仿生制备了 nHA/CS 复合微球, 并与共混法制备的 nHA/CS 复合微球进行了对比研究。利用扫描电镜(SEM)、X 射线能谱(EDS)、X 射线衍射(XRD)、红外(FTIR)和激光粒度仪等手段对不同微球的理化性能进行表征。结果表明: 相比共混法, 原位仿生制备的 nHA/CS 复合微球形态圆整均匀, 分散性好, 粒径分布较窄, 平均粒径为 8.62 μm , nHA 晶体均匀分布在微球内部及表面, 并与 CS 基质以化学键结合。该复合微球有望用于骨组织工程及药物控制释放。

关 键 词: 原位仿生; 纳米羟基磷灰石; 壳聚糖; 复合微球

中图分类号: TB33 文献标识码: A

In situ Biomimetic Fabrication and Characterization of Nano-hydroxyapatite/Chitosan Composite Microspheres

LI Jian¹, HAN Zhi-Jun¹, WEI Yan¹, NIU Lu-Lu¹, LIU Yu¹, LU Guo-Yun², HUANG Di¹

(1. College of Mechanics, Shanxi Key Laboratory of Material Strength & Structural Impact, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China; 2. Institute of Applied Mechanics & Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

Abstract: To solve the problem that nano-hydroxyapatite (nHA) crystals aggregation and non-uniformly distribution in nano-hydroxyapatite/chitosan (CS) composite microspheres, nHA/CS microspheres were prepared through *in situ* biomimetic method in water-in-oil (W/O) emulsions. The physical and chemical properties of the composite microspheres were investigated by scanning electronic microscopy (SEM), X-ray energy-dispersive spectroscopy (EDS), X-ray diffraction (XRD), fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and laser particle size analyzer. The results indicate that the composite microspheres are spherical with average size of 8.62 μm and disperse uniformly. Moreover, the nHA crystals are dispersed uniformly within composite microspheres and bonded with CS matrix. The composite microspheres have great potential in bone tissue engineering and drug delivery system.

Key words: *in situ* biomimetic; nano-hydroxyapatite; chitosan; composite microspheres

目前无机纳米粒子/高分子复合材料作为骨组织工程材料的报道很多, 但多为粉体材料或块状材

料, 最终表现出生物陶瓷性能, 即脆性大, 弯曲强度低^[1]。为避免这个缺陷, 可利用无机纳米粒子的大

收稿日期: 2014-04-03; 收到修改稿日期: 2014-06-12

基金项目: 国家自然科学基金(11372209, 51203028); 山西省青年科技基金(2013021014-2); 山西省高等学校科技创新项目(2013111)

National Natural Science Foundation of China (11372209, 51203028); Natural Science Foundation of Shanxi Province (2013021014-2); Scientific and Technological Innovation Programs of Higher Education Institutions in Shanxi (2013111)

作者简介: 李 健(1989-), 女, 硕士研究生. E-mail: 18503512013@163.com

通讯作者: 韩志军, 教授. E-mail: hanzj12@126.com; 黄棣, 讲师. E-mail: huangdi@tyut.edu.cn

比表面积和高表面活性与高分子基质活性基团产生化学键结合,获得理想机械性能和生物活性的复合微球。复合微球既可作为可注射型骨填充材料,也可作为药物或因子的载体,因此在骨组织工程和缓释载药领域逐渐引起重视^[2-3]。

在众多的复合微球系统中,纳米羟基磷灰石(nano-hydroxyapatite, nHA)和壳聚糖(Chitosan, CS)复合微球因其良好的生物相容性、成骨活性和生物降解性引起人们的关注。nHA在成分和结构上与天然骨组织相似,具有良好的生物活性和骨组织生长的引导性,能够与骨组织形成化学键合,在骨修复材料中具有明显优势^[4-5]。壳聚糖是经甲壳素的脱N-乙酰基产物,是自然界中少见的带正电荷的碱性多糖,具有抗菌性、生物相容性与生物可降解性,其降解产物为具有弱碱性的氨基葡萄糖,对人体及组织无毒、无害,在骨修复方面应用广泛^[6]。将nHA与CS复合不仅可以克服单一CS低强度和快速降解,以及nHA生物力学性能差、脆性大和降解速率低的不足,还能提高骨结合能力,促进类骨磷灰石在植入材料表面的形成,加速骨缺损的修复^[7]。

在nHA/CS复合微球制备方法中,乳化交联法所需设备简单,制备工艺易行。前期报道大多利用乳化交联结合共混原理制备nHA/CS复合微球^[8-9],首先制备出nHA浆料或粉体,然后分散在CS基质中乳化交联复合。由于高表面活性,nHA在高分子基质中易于团聚,分散不均匀,造成两相结合力弱,力学性能下降,进而造成复合微球形状不规则,球形度低。研究表明微球形态和结构是影响微球在人体内活性的主要因素,形状不规则微球植入人体会产生炎症反应,因此如何保证nHA在CS基质中以纳米态均匀分散和高的成球度是目前制备这类材料的重点和难点问题^[8]。本研究在油包水(W/O)乳液体系中,原位仿生制备了nHA/CS复合微球。CS微球作为微反应器, Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 在微反应器内部的化学环境下发生原位反应形成nHA粒子。由于后期化学交联和纳米粒子形成同时进行,最终获得球形度较好、nHA在CS基质中均匀分散的nHA/CS复合微球。同时对比研究原位仿生与共混法制备复合微球的形貌、结晶程度、比表面积和粒径大小等特性,并探讨微球的乳化交联成球机理。

1 实验方法

1.1 试剂

壳聚糖(Chitosan, CS), AR, 济南海得贝公司(分

子量30万,脱乙酰度95%);冰乙酸,AR,天津启邦化工;液体石蜡、戊二醛(50%)、Span 80、石油醚(沸程30~60℃)、异丙醇、四水硝酸钙($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、十二水磷酸钠($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)均为AR,购自天津光复化工;NaOH, AR, 天津北辰方正试剂。

1.2 原位仿生制备nHA/CS复合微球

将0.428 g CS溶于2wt%的乙酸水溶液中,制备出4wt%浓度的CS乙酸溶液,取1.007 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 加入CS乙酸溶液,充分溶解后去除溶液中气泡,待用。将124.742 g 液体石蜡与3.858 g span 80混合置150 mL 锥形瓶中,搅拌30 min后缓慢加入含 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 的CS乙酸溶液。37℃下搅拌乳化3 h,形成白色乳状W/O乳液。逐滴加入一定量50%戊二醛进行交联,搅拌30 min后,滴加NaOH水溶液调节pH≈8,然后缓慢加入0.972 g Na_3PO_4 水溶液,连续搅拌反应6 h,得到混合均匀的乳浊液。静置6 h得到下层沉淀,加入石油醚充分洗涤产物,离心分离后,用异丙醇洗涤沉淀,置电热鼓风干燥箱中50℃下干燥12 h,即得nHA含量为50%的nHA/CS复合微球粉末。

1.3 共混法制备nHA/CS复合微球

参照文献^[10]利用湿法合成制得nHA浆料。按照nHA/CS质量比为1:1将nHA浆料加入到用2wt%乙酸溶液配制的CS溶液中,水浴脱泡,加入到含3.858 g span 80的液体石蜡(124.742 g)中,保持W/O比例与上述相同,37℃下乳化3 h,滴加一定量50%戊二醛进行交联,继续搅拌6 h后停止,静置6 h得到下层沉淀,依次石油醚、异丙醇洗涤沉淀,50℃下干燥12 h,即得复合微球粉末。

1.4 微球表征

用X射线衍射仪(XRD, DX2500, 中国丹东方圆)对样品进行物相分析;KBr压片法制样,用傅里叶转换红外光谱仪(FIR, Nicolet 6700, 美国Thermofisher)对粉末样品进行红外吸收光谱分析;用场发射扫描电镜(SEM, MIRA3, 捷克Tescan)观察复合微球表面及断面形貌;采用能谱分析(EDS, X-Max, 英国Oxford)定性分析Ca、P元素在微球表面或内部分布情况,激光粒度仪(Mastersizer2000, 英国Malvern)检测复合微球的比表面积及粒径分布情况。

2 结果与讨论

2.1 物相与结构分析

图1为纯CS微球、原位仿生及共混法制备的

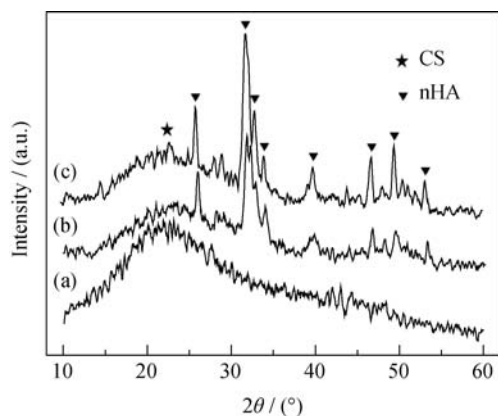


图 1 纯 CS 微球(a)、原位仿生(b)和共混法(c)制备的 nHA/CS 复合微球的 XRD 图谱

Fig. 1 XRD patterns of pure CS microspheres (a), nHA/CS composite microspheres fabricated by *in situ* biomimetic method (b) and co-mixing method (c)

nHA/CS 复合微球的 XRD 图谱。结果显示, 纯 CS 微球(图 1(a))在 22.5°处为强度较低、半峰宽较宽的衍射峰, 表明戊二醛交联的 CS 微球为弱结晶状态^[11]。两种方法制备的 nHA/CS 复合微球中(图 1b, c), CS 的衍射峰均有所降低且更为平坦, 表明 CS 结晶程度下降, 可能是 nHA 晶粒的引入打乱了 CS 基质的结晶规律造成的, 其衍射峰分别移位至 23.2°和 24.1°, 说明引入的 nHA 与 CS 基质发生了化学作用, 影响到了 CS 结晶结构, 原位仿生制备的复合微球移位更大可能是由 nHA 与 CS 之间的化学结合所致。25.9°、31.8°、33.2°、34.7°、39.2°、47.2°、49.4°和 53.8°分别对应 nHA 特征衍射峰, 两谱线位置基本一致, 峰形相似, 且未发现峰值的移动和其它相的出现^[12], 表明两种方法均制备了 nHA/CS 复合微球。但对比共混法, 原位仿生制备的复合微球中 nHA 特征峰强度略低, 说明原位仿生 nHA/CS 复合微球 nHA 结晶度更低, 这更接近于自然骨中 nHA 的弱结晶特性^[5,13]。

图 2 为不同微球的红外光谱图。纯 CS 微球图谱(图 2(a))中, 1635、1564 cm^{-1} 处的吸收峰是 CS 中的氨基与戊二醛的醛基发生交联作用形成 Schiff 碱结构和乙酰残基吸收峰互相叠加而成, 文献报道该吸收峰的位置会随着交联程度的不同而有所变化^[14]。nHA/CS 复合微球的红外光谱中(图 2(b, c)), 3567 cm^{-1} 处为 nHA 的 -OH 伸缩振动吸收峰, 602、562 cm^{-1} 处对应 $-\text{PO}_4^{3-}$ 的弯曲振动吸收峰, 1029 cm^{-1} 为 CS 中 C-O-C 伸缩振动吸收峰和 nHA 中 $-\text{PO}_4^{3-}$ 伸缩振动吸收峰重叠而增宽的多重吸收峰, 表明 nHA 和 CS 为复合微球的主要成分^[15]。相比纯 CS 微球, 复合微球在 1632、1568 cm^{-1} 处均发生了一定位移, 这表明 nHA 的加入会对复合微球中 CS 交联度有一定的影

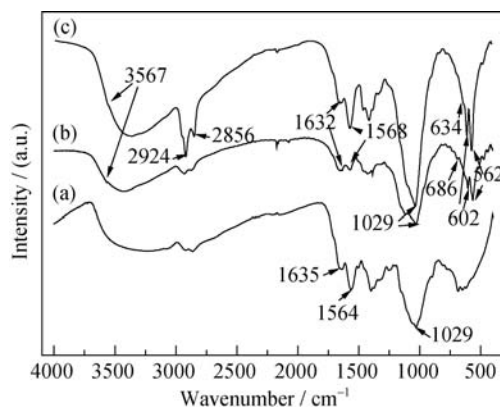


图 2 纯 CS 微球(a)、原位仿生(b)和共混法(c)制备的 nHA/CS 复合微球红外光谱图

Fig. 2 FTIR spectra of pure CS microspheres (a), nHA/CS composite microspheres fabricated by *in situ* biomimetic method (b) and co-mixing method (c)

响。共混法制备的复合微球中, 634 cm^{-1} 处对应 nHA 的 -OH 的振动峰, 其位置未发生变化, 表明该复合微球中 nHA 与 CS 两相之间更多的是物理混合, 缺少化学作用。而利用原位仿生制备的复合微球中, -OH 的振动峰移到了 686 cm^{-1} 处, 表明 nHA 与 CS 之间发生了化学作用, 这可能是 nHA 的 -OH 与 CS 的 $-\text{NH}_2$ 之间形成了氢键, 从而使复合微球两相间的界面结合更为牢固^[12]。

2.2 形貌与组成分析

利用乳化交联法制备的纯 CS 微球 SEM 照片如图 3(a)所示。由图可见, CS 微球球形度较好, 微球粒径均匀, 分散性较好, 微球表面光滑致密。图 3(b)为共混法制备的 nHA/CS 复合微球 SEM 照片, 由图可见 nHA/CS 复合微球形状不规则, 球形度较差, 且粒径分布范围较大。进一步放大观察, 图 3(c)显示微球表面粗糙、凹凸不平, 分布有不规则颗粒。从 EDS 面扫描 Ca(图 3(d))、P(图 3(e))元素分布可以看出, 微球表面不规则小颗粒主要为 Ca、P 元素, 即由 nHA 粒子聚集而成。nHA 粒子在浆料中以纳米态存在, 在与 CS 复合时, 由于 nHA 较高的表面能自发团聚, 形成较大的 nHA 聚集体, 因此在 CS 基质中分散不均。另外, nHA 团聚必然造成其表面活性下降, 继而降低了其与 CS 基质的化学结合几率, 并且 nHA 团聚会阻断 CS 分子内及分子间氢键的形成, 造成 CS 结晶度下降, 较大的 nHA 团簇造成复合微球难以形成圆整规则结构。

原位仿生制备的 nHA/CS 复合微球如图 4 所示。由低倍 SEM 照片(图 4(a))可见, 原位仿生制备的复合微球分散性好、形态圆整均匀。高倍 SEM 照片显示在微球表面针状纳米 HA 晶体均匀嵌入 CS 基体

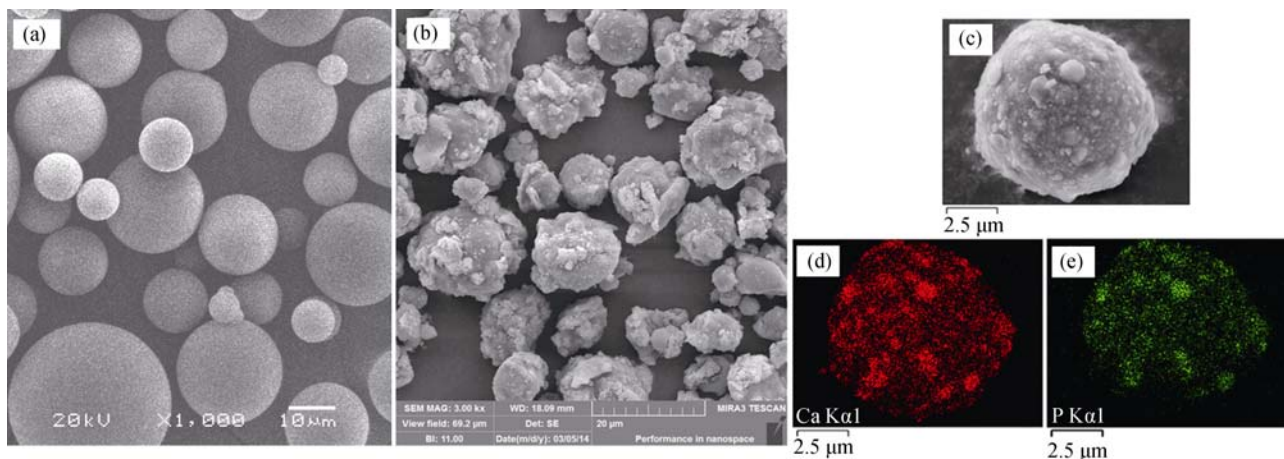


图 3 纯 CS 微球(a)、共混法制备的 nHA/CS 复合微球 SEM 照片(b); 复合微球放大照片(c); Ca(d)和 P(e)元素面扫描图
Fig. 3 SEM images of CS microspheres (a) and nHA/CS composite microspheres fabricated by co-mixing method: in the low magnification (b) and in the high magnification (c); EDS map-scanning analysis of Ca and P element (d, e) corresponding to (c)

中, 未见明显的团聚现象。对其表面进行 EDS 面扫描分析(图 4(c, d)), 发现 Ca、P 元素在复合微球表面均匀分布, 即 nHA 以纳米态均匀分布在复合微球表面。

为进一步研究 nHA 在复合微球内部的分布, 利用 SEM 和 EDS 对复合微球断面进行分析。由图 5(a)可见, 无机纳米粒子均匀分散在复合微球内部, 未

见明显团聚现象。对局部放大发现(图 5(b)), 无机纳米粒子呈针状, 分散良好。对复合微球内部进行 EDS 面扫描分析(图 5(c, d)), 发现 Ca、P 元素在复合微球内部均匀分散。与在复合微球表面分布规律类似, nHA 以纳米态均匀分布在复合微球内部, 有效避免了 nHA 粒子团聚及分散不均现象。

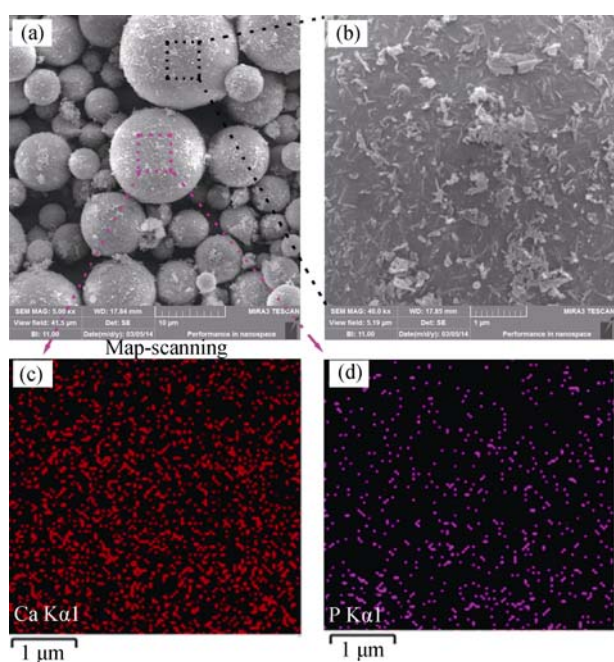


图 4 原位仿生制备的 nHA/CS 复合微球 SEM 照片(a), 复合微球放大照片(b), Ca (c)和 P (d)元素面扫描图
Fig. 4 SEM images and EDS map-scanning analysis of nHA/CS composite microspheres fabricated by *in situ* biomimetic method: low magnification of the sample (a); higher magnification of the sample (b) and map-scanning analysis of Ca and P element (c, d) corresponding to the bottom rectangle region in (a)

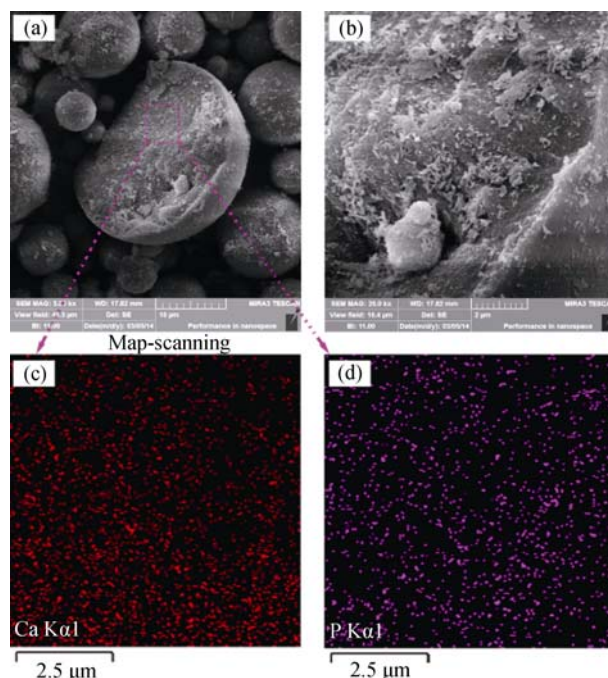


图 5 原位仿生制备的 nHA/CS 复合微球断面 SEM 照片(a), 复合微球断面放大图(b), Ca (c)和 P (d)元素面扫描图
Fig. 5 SEM images and EDS map-scanning analysis of the fracture surface of nHA/CS composite microspheres fabricated by *in situ* biomimetalization method: low magnification of the sample (a); higher magnification of the sample (b) and map-scanning analysis of Ca and P element (c, d) corresponding to the pink rectangle region in (a)

2.3 比表面积及粒度分析

图 6 分别为纯 CS 微球、共混法和原位仿生制备的 nHA/CS 复合微球的粒度分布图。由图可见, 纯 CS 微球粒径范围约 2~35 μm , 平均粒径为 11.98 μm 。共混法制备的复合微球粒径范围较宽, 呈双峰分布, 这与 SEM 观察结果一致。而原位仿生制备的复合微球粒径范围较窄, 约 2~30 μm , 平均粒径为 8.62 μm 。激光粒度仪测试结果显示, 纯 CS 微球比表面积为 0.673 m^2/g , 共混法复合微球下降为 0.243 m^2/g , 而原位仿生复合微球最大, 为 0.97 m^2/g 。可见采用原位仿生技术可获得高比表面积和粒径集中分布的复合微球。

2.4 nHA/CS 复合微球形成机理

原位仿生制备的 nHA/CS 复合微球形成机理如图 7 所示。在原位仿生制备复合微球过程中, 首先钙元素以离子态存在于 W/O 乳液体系 CS 乙酸溶液液滴中, 当引入交联剂后, Schiff 碱交联反应形成 C=N 结构, CS 初步交联固化, 钙离子液被固定在网络结构中, 形成微泡胶囊。当 PO_4^{3-} 通过 W/O 界面扩散进入微泡胶囊后与网络内的 Ca^{2+} 原位反应形成均匀分布的 nHA 粒子。因此 nHA 与 CS 通过表面化学作用达到良好结合。CS 胶质包裹 Ca^{2+} 的微泡体系仿生自然骨形成过程中的基质小泡, 在微泡体系中含 Ca^{2+} 位点原位形成微小的 nHA 结晶^[16]。由于高表面活性, Ag^+ 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 等抗菌离子能进入 nHA 晶格内部钙三角形成的离子通道, 并且 nHA 晶体表面对某些蛋白具有特异的吸附性^[17-18]。因此可

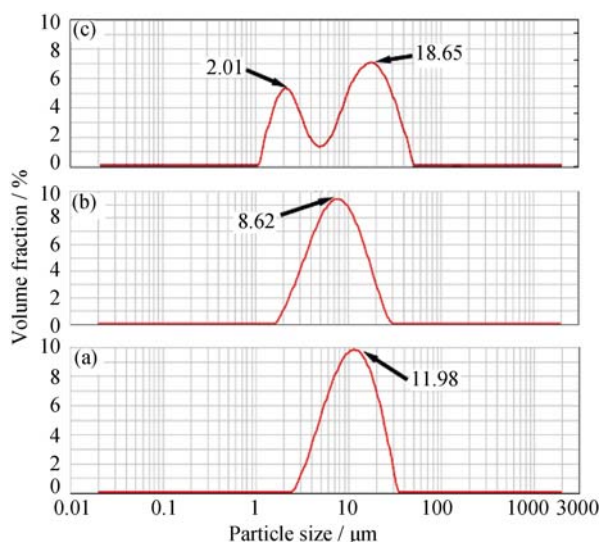


图 6 纯 CS 微球(a)、原位仿生(b)和共混法(c)制备的 nHA/CS 复合微球的粒径分布图

Fig. 6 Size distribution of CS microspheres (a), nHA/CS composite microspheres fabricated by *in situ* biomimetic method (b) and co-mixing method (c)

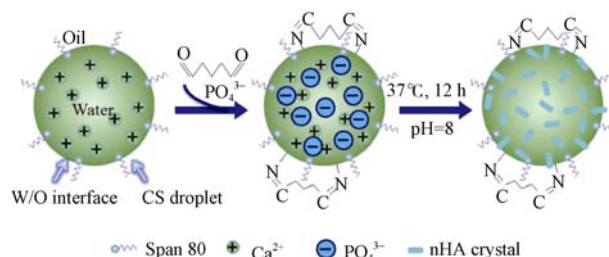


图 7 原位仿生 nHA/CS 复合微球形成机理图

Fig. 7 The growth process of nHA/CS composite microspheres fabricated *in situ* biomimetic method

以预期, 原位仿生制备的 nHA/CS 复合微球具有良好的生长因子或抗菌药物存储性能及控制释放性能, 同时纳米态 nHA 具有良好的生物活性, 能加速新骨生成。结合二者优点, 原位仿生制备的复合微球有望在骨组织重建及药物控释方面发挥优良作用。

3 结论

本研究采用仿生法, 在 CS 胶质微泡体系中原位形成 nHA 制备了 nHA/CS 复合微球, 改善了 nHA/CS 复合微球中 nHA 团聚和分散不均的问题。相比常规的共混法, 原位仿生制备的 nHA/CS 复合微球形态圆整均匀, 分散性好, 粒径分布范围较窄 (2~30 μm), 平均粒径为 8.62 μm , 比表面积较大 (0.97 m^2/g), 复合微球中两相间界面融合充分, nHA 针状晶体均匀分布在 CS 内部及表面, 并与 CS 基质以氢键结合, 提高了 nHA 与高分子基质的结合力。原位仿生制备的复合微球有望在骨组织重建及药物控释方面发挥积极作用。

参考文献:

- [1] WANG LI, LI YU-BAO, ZUO YI, *et al.* Porous bioactive scaffold of aliphatic polyurethane and hydroxyapatite for tissue regeneration. *Biomedical Materials*, 2009, **4**(2): 025003.
- [2] LIU HAO-HUAI, ZHANG JIAN-HUA, XU QING-LING, *et al.* Studies on hydroxyapatite/polyurethane scaffold containing drug-loaded microspheres for bone tissue engineering. *Journal of Inorganic Materials*, 2011, **26**(10): 1073–1077.
- [3] DAVIS H, BINDER B, SCHAECHER P, *et al.* Enhancing osteoconductivity of fibrin gels with apatite-coated polymer microspheres. *Tissue Engineering Part A*, 2013, **19**(15/16): 1773–1782.
- [4] TENG S, LEE E, YOON B, *et al.* Chitosan/nanohydroxyapatite composite membranes via dynamic filtration for guided bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, **88**(3): 569–580.
- [5] HUANG DI, ZUO YI, LI JI-DONG, *et al.* Bioactive composite

- gradient coatings of nano-hydroxyapatite/polyamide66 fabricated on polyamide66 substrates. *Journal of The Royal Society Interface*, 2012, **9(72)**: 1450–1457.
- [6] HUANG DI, ZUO YI, ZOU QIN, *et al.* Reinforced nanohydroxyapatite/polyamide 66 scaffolds by chitosan coating for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2012, **100B(1)**: 51–57.
- [7] ZHANG LI, LI YU-BAO, ZHOU GANG, *et al.* Setting mechanism of nano-hydroxyapatite/chitosan bone cement. *Journal of Inorganic materials*, 2006, **21(5)**: 1197–1202.
- [8] SIVAKUMAR M, MANJUBALA I, PANDURANGA RAO K. Preparation, characterization and *in-vitro* release of gentamicin from coralline hydroxyapatite–chitosan composite microspheres. *Carbohydrate Polymers*, 2002, **49(3)**: 281–288.
- [9] LI XIANG-NAN, CHEN XIAO-MING, PENG ZHI-MING, *et al.* Preparation and performance of drug-loaded nano-hydroxyapatite/chitosan microspheres. *Journal of Central South University*, 2011, **42(5)**: 1232–1237.
- [10] HUANG DI, ZUO YI, ZOU QIN, *et al.* Antibacterial chitosan coating on nano-hydroxyapatite/polyamide66 porous bone scaffold for drug delivery. *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*, 2011, **22(7)**: 931–944.
- [11] ZOU QIN, LI YU-BAO, ZHANG LI, *et al.* Antibiotic delivery system using nano-hydroxyapatite/chitosan bone cement consisting of berberine. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, **89A(4)**: 1108–1117.
- [12] LU XIAO-YING, WANG XIU-HONG, QU SHU-XIN, *et al.* Preparation of nano-hydroxyapatite/chitosan hybrids. *Journal of Inorganic Materials*, 2008, **23(2)**: 332–336.
- [13] ZHANG Y, VENUGOPAL J, EL-TURKI A, *et al.* Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2008, **29(32)**: 4314–4322.
- [14] SKOP N, CALDERON F, LEVISON S, *et al.* Heparin crosslinked chitosan microspheres for the delivery of neural stem cells and growth factors for central nervous system repair. *Acta Biomaterialia*, 2013, **9(6)**: 6834–6843.
- [15] SHEN S, FU D, XU F, *et al.* The design and features of apatite-coated chitosan microspheres as injectable scaffold for bone tissue engineering. *Biomedical Materials*, 2013, **8(2)**: 025007–1–5.
- [16] TENG S, CHEN L, GUO Y, *et al.* Formation of nano-hydroxyapatite in gelatin droplets and the resulting porous composite microspheres. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2007, **101(4)**: 686–691.
- [17] CIOBANU G, ILISEI S, LUCA C. Hydroxyapatite-silver nanoparticles coatings on porous polyurethane scaffold. *Materials Science and Engineering: C*, 2014, **35**: 36–42.
- [18] MOTOHIRO T, TOSHIYUKI I, NOBUTAKA H, *et al.* Reusable hydroxyapatite nanocrystal sensors for protein adsorption. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2010, **11(4)**: 045002–1–9.