

脉冲电化学沉积法制备羟基磷灰石/壳聚糖复合涂层的研究*

王英波^{1,2} 鲁 雄^{1**} 李 丹¹ 冯 波¹ 屈树新¹ 翁 杰¹

(¹ 西南交通大学材料先进技术教育部重点实验室 材料科学与工程学院 成都 610031)

(² 新疆师范大学化学化工学院 乌鲁木齐 830054)

摘 要 采用脉冲电化学沉积法在钛金属表面制备出羟基磷灰石(HA/CS)复合涂层,实现 CS 与 HA 在微观尺寸上的复合与杂化. 比较了脉冲电位与恒电位模式下复合涂层的形成,研究了电位高低及壳聚糖浓度对复合涂层性能的影响. 结果表明,与恒电位模式比较,脉冲电位下制备的涂层较均匀、结晶性好、CS 含量高,并且 HA 与 CS 杂化程度高. 脉冲电位的高低影响涂层的结晶、形貌;电位为 -1.3 V 利于复合涂层的沉积. 电解液中 CS 浓度影响复合涂层的形貌及 CS 在复合涂层中的含量,电解液中 CS 浓度为 0.33 g/L 左右比较适合. 抗菌检测表明复合涂层具有良好的抗菌性. 成骨细胞的培养结果表明复合涂层具有良好的生物相容性.

关键词 脉冲电化学, 羟基磷灰石, 壳聚糖, 复合涂层, 生物相容性

羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)具有良好的生物活性和骨诱导性,能诱导周围骨组织的生长,并与宿主骨直接形成化学结合^[1]. 壳聚糖(chitosan, CS)是天然多糖中唯一存在的碱性氨基多糖,能够生物降解,无免疫反应,对人体无毒、无害,具有良好的生物相容性^[2]. 壳聚糖除了优异的生物相容性外,还具有较好的抗菌性能^[3,4]. 近几年壳聚糖在药物缓释^[5]、生物活性骨水泥^[6]、医疗微球^[7]和骨组织工程^[8-10]等方面的应用引起了人们的极大兴趣. 将 HA 和 CS 这两种材料复合形成复合材料可以充分发挥二者的优点^[11-13]. 同时,壳聚糖与钙磷化合物的降解机理不同,酶解型壳聚糖与水解型钙磷化合物的复合可改变单纯无机相的降解性质,并有可能进一步改进植入材料的生物性能^[11].

目前有很多方法用于制备 HA/CS 复合涂层^[14-17]. Cheng 等^[14]采用溶解浇铸法制备 HA/CS 复合膜,首先制备好 HA 粉末,添加到 4% 壳聚糖溶液中混合,然后浇铸在玻璃等平板上,在一定的温度下干燥,溶剂蒸发,最后形成 HA/CS 复合膜. 此方法 HA 粉末分散是一个难点. Pang 等^[15]采用电泳沉积制备了 HA/CS 复合涂层,涂层中的 HA 以粉末的形式存在于电解液中并通过电泳沉

积于基材表面. 该方法同样存在 HA 颗粒在涂层中分散不均匀的问题. 本研究小组^[17]采用原位合成与溶胶-凝胶浸提涂结合制备 HA/CS 复合涂层,较好的解决了 HA 的分散,但是涂层厚度不均匀.

电化学沉积法因其反应条件温和、可获得高生物活性的 HA 晶体、无需预先制备羟基磷灰石粉体、操作简单、可控性强、成本低廉等优点而引起研究者的极大兴趣^[18, 19]. 电化学沉积的基本过程是通过控制电化学反应,调节阴极界面化学环境,使电解液中的离子在阴极表面相对高的 pH 值环境下达到过饱和,进而从溶液中析出沉积在钛金属电极表面^[20]. 电解液组成、基底材料、沉积模式、沉积温度等对电化学沉积产物的性能均有影响^[21-24]. 电化学沉积方法中目前的应用主要以恒电流或恒电压为主. Redepenning 等^[25]是采用恒电流两步法制备出 HA/CS 的复合涂层,首先制备出的是磷酸氢钙/壳聚糖的复合涂层,然后在 NaOH 溶液中浸泡得到 HA/CS. Wang 等^[26]采用恒电流模式,首先在钛合金基底上制备磷化膜,然后以磷酸钙(CaP)和壳聚糖混合溶液作为电解液制备出磷酸钙/壳聚糖的复合涂层. 胡仁等^[13]采用恒电流或控制电压的模式制备了 CaP/CS 复合

* 2010-11-09 收稿,2011-01-10 修稿;国家自然科学基金(基金号 31070851)、教育部新世纪人才基金(基金号 NCET-10-0704)、四川省杰出青年学术技术带头人基金(基金号 2011JQ0010)和中央高校基本科研业务费专项资金(项目号 SWJTU11CX150)资助; ** 通讯联系人, E-mail: luxiong_2004@163.com

doi:10.3724/SP.J.1105.2011.10309

涂层,得到的钙磷盐是 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (DCPD), 制备的复合涂层分布不均,钙磷盐呈微米片状结构. 本研究小组^[27]采用恒电流电沉积的方法制备了磷酸八钙/壳聚糖复合涂层,具有微孔结构,磷酸八钙尺寸为 $20 \sim 30 \mu\text{m}$ 长, $0.1 \sim 1 \mu\text{m}$ 宽,涂层比较疏松. 脉冲电化学沉积磷酸钙/壳聚糖复合涂层的研究却少有报道. 本文采用脉冲电化学沉积法在钛金属表面制备出磷酸盐/壳聚糖的复合涂层,旨在实现壳聚糖与 HA 在微观尺寸上的复合杂化,获得综合性能好的生物医用材料.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (分析纯)、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (分析纯); Alamar Blue (Biosource, USA); TritonX-100 (Sigma-Aldrich, USA); 4-NPP (Sigma-Aldrich, USA); 壳聚糖 (Chitosan, 医用级, 浙江金壳生物化学有限公司, 分子量 50×10^4 , 脱乙酰度 91%); 纯钛 (宝鸡英耐特医用钛有限公司, 纯度 $> 99.9\%$).

扫描电子显微镜 (SEM, QUANTA 200, FEI, NL); X 射线粉末衍射仪 (XRD, PW3040/60, FEI, NL); FTIR (Nicolet 5700, USA); 热重分析仪 (TG, Vetzsch STA 449C, Germany); 酶标仪 (μ -Quant, Bio-Tek Instruments, USA); X 射线光电子能谱 (XPS, XSAM800, KRATOS, UK); CHI660c 型电化学工作站.

1.2 实验过程

1.2.1 钛表面的预处理

选用医用级钛作为基体,其尺寸为 $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$. 为了提高复合涂层与钛基体的结合力,钛表面的预处理是关键工艺,否则由于钛表面氧化膜的影响,复合涂层容易脱落. 因此,对打磨好的钛板进行除油、刻蚀、活化等预处理. 先用丙酮去油超声清洗 3 次,每次 10 min. 然后用化学侵蚀法 ($V(\text{H}_2\text{SO}_4):V(\text{HCl}):V(\text{H}_2\text{O}) = 1:1:1$) 60°C 下处理 3 ~ 5 h. 最后在活化液 (5 mol/L NaOH 溶液) 中 60°C 下反应 1 h. 以上预处理每一步骤之后均在室温下用去离子水超声清洗. 将处理好的钛片用导线连接到电化学工作站,用绝缘胶将裸露导线及钛片的其它几个面密封,只露出正面进行电沉积.

1.2.2 电沉积步骤

涂层的制备在 37°C 恒温水浴中进行. HA/CS

复合涂层的电解液配置方法如下:称取一定量的壳聚糖粉末加入到质量分数为 2% 的乙酸溶液中,制成质量分数为 1% 的壳聚糖溶液. 同时用 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 配制钙磷比为 1.67,其中钙离子的浓度为 5.0 mmol/L 的钙磷溶液. 将壳聚糖溶液加入到钙磷溶液中,壳聚糖的浓度为 0.33 g/L,剧烈搅拌,用氨水调节 pH 值为 6,静置脱泡. 以钛金属作为工作电极,铂金板作为对电极,饱和甘汞电极作为参比电极,在三电极系统的电解槽中控制电位进行脉冲电沉积. 电化学实验条件:通电时间为 7200 s,脉宽 100 s,脉冲电位 -1.3 V . 沉积完成后立刻用去离子水冲洗样品,自然晾干,待用. 电化学沉积装置见图 1.

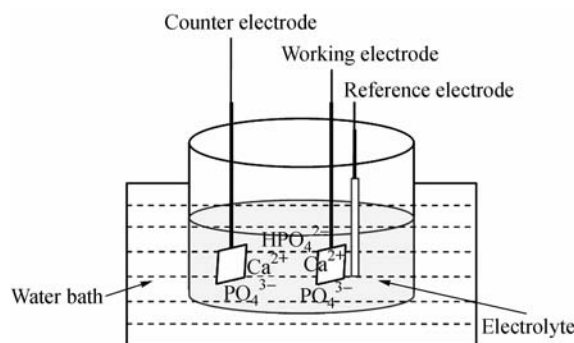


Fig. 1 Schematic drawing of the experiment setup of the electrochemical deposition

1.3 复合涂层的抗菌性测试

采用样品表面粘附的方法测试样品抗菌率. 菌种为大肠杆菌,分为 2 个实验组:a 为 HA/CS 复合涂层;b 为对照组 HA 涂层. 每个实验组有 3 个平行样. 菌株接种于 LB 的培养基中,于 37°C 下培养 12 h,此过程重复 3 次,以得到较纯的菌落. 取单菌落接种于液体培养基在 37°C 、200 r/min 的摇床中培养 12 h. 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 将细菌配制成 $1.8 \times 10^8 \text{ cell/mL}$ 的菌悬液,再用 PBS 稀释 10^3 倍,最终浓度是 $1.8 \times 10^5 \text{ cell/mL}$. 将被测样品放置在培养皿中载玻片上,培养皿底部加入无菌水,以防止菌液蒸发. 取 $50 \mu\text{L}$ 滴于样品表面, 37°C 培养 12 h,将菌液移至 $500 \mu\text{L}$ PBS 溶液中,摇匀,取 $50 \mu\text{L}$ 涂布平板,培养 12 h,即得菌落数 (colony-forming units, CFUs). 样品的抗菌作用可以通过计算样品的抗菌率来表示,抗菌率的计算方法如式 (1) 所示. 进而得到平均抗菌率.

$$\text{抗菌率} = \frac{\text{对照组菌落数} - \text{实验组菌落数}}{\text{对照组菌落数}} \times 100\%$$

(1)

1.4 复合涂层的生物相容性测试

在涂层表面培养大鼠颅盖骨成骨细胞 (MC 3T3-E1) 来考察涂层的生物相容性. 分为 2 个实验组: a 为 HA/CS 复合涂层; b 为 HA 涂层. 每个实验组 6 个平行样. 将试样置于 24 孔培养板内, 再将 MC3T3-E1 细胞接种于试样表面, 接种密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 每孔加入 α -MEM (含 15% 的 FBS) 1.0 mL, CO_2 培养箱中 37°C 培养. 检测以下几项:

(1) 1、3、7 天后, 3 组试样分别用 PBS 漂洗 3 次, 2.5% 的戊二醛溶液中固定, 然后用梯度乙醇溶液脱水, 再用乙酸乙酯脱醇, 临界点干燥后在试样上镀金, 最后用 SEM 观察细胞的形貌.

(2) 在细胞培养 3、7 天两个时间点进行 Alamar Blue 检测考察细胞活性及增殖情况. 首先弃去旧培养基, PBS 清洗一次, 之后每孔加入 0.5 mL 无酚红的培养基 (含 10% Alamar Blue), CO_2 培养箱中 37°C 孵育 3 h, 从每孔吸取 200 μL 培养基放入 96 孔板中, 酶标仪在 570 ~ 600 nm 波长处测光吸收值.

(3) 在细胞培养 7 天后进行碱性磷酸酶 (ALP) 检测考察细胞分化能力. (2) 节中 Alamar Blue 检测完后, 弃去带有 Alamar Blue 的培养液, 再用 PBS 冲洗 3 次, 后在每孔中加入 1% 的 TritonX-100 1 mL 破坏材料上的细胞, 将其放入 -20°C 冰箱中冷冻 10 min, 取出细胞破碎液放于预先加入 200 μL 的 4-NPP 溶液的 96 板中, 酶标仪在 405 ~ 510 nm 波长处测光吸收值.

2 结果与讨论

2.1 脉冲电位与恒电位比较

采用不同的制备方法可获得不同微观形貌的涂层. 在总的通电时间为 7200 s, 脉宽 100 s, pH 值为 6, 37°C 恒温加热条件下制备的复合涂层形貌见图 2. 恒电位 -1.3 V 条件制备的复合涂层呈纳米网状结构 (图 2(a)), 可以看到 Ti 基底表面凹凸痕迹. 脉冲电位 -1.3 V 条件制备的复合涂层呈也是纳米网状结构, 堆积成半球状 (图 2(b)). XRD 图谱可知, 恒电位下涂层中磷酸盐成分是 DCPD (图 3(a)), 复合涂层中 DCPD 的衍射峰为 29.3° 处, 对应的晶面为 (112), 与标准谱 (JCPDS #72-0713) 相吻合; 脉冲电位下涂层磷酸盐成分为 HA (图 3(b)), 复合涂层中 HA 的衍射峰为 31.7° 处 {对应晶面为 (211)} 和 25.8° 处 {对应晶面为 (002)}, 与标准谱 (JCPDS #74-

0566) 相吻合.

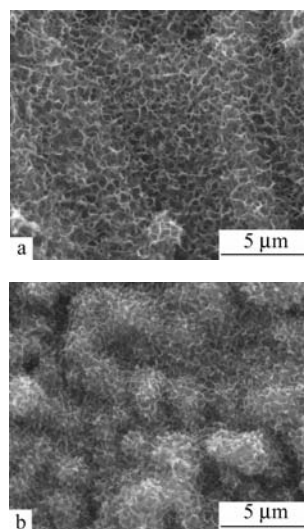


Fig. 2 SEM micrographs of the HA/CS composite coatings prepared by different electrochemical deposition methods (a) constant voltage and (b) pulsed voltage

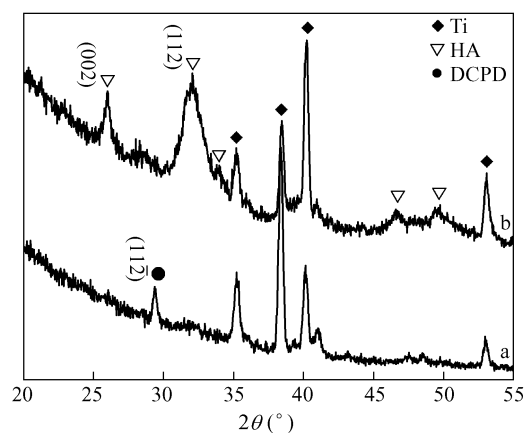


Fig. 3 XRD spectra of the HA/CS composite coatings prepared by different electrochemical deposition methods (a) constant voltage and (b) pulsed voltage

红外结果表明壳聚糖大分子在复合涂层中保持完整, 并未引入任何的不纯相, 但电化学沉积可能使磷酸盐和 CS 发生杂化, 我们在后面从 XPS 结果进一步分析. 图 3 为脉冲电位和恒电位下制备的复合涂层 FTIR 谱图. 纯壳聚糖各峰归属为 (图 4(a)): 纯壳聚糖脂肪链中 CH_2 、 CH_3 中的 C—H 的伸缩振动峰在 2932 、 2896 cm^{-1} [28] 处, 特征基团 $-\text{NH}_2$ 吸收峰在 1599 cm^{-1} [12] 处. 电化学共沉积制备的 HA/CS 复合涂层中各峰归属为 (图 4(b)、(c)): 1087 、 1035 cm^{-1} 是 PO_4^{3-} 的伸缩振动产生的, 963 、 603 、 567 cm^{-1} 处是 PO_4^{3-} 弯曲振

动产生的;壳聚糖特征官能团 —NH_2 出现在 1571 cm^{-1} 处. 与纯壳聚糖对比可知,复合涂层中壳聚糖特征基团 —NH_2 吸收峰的位置发生了蓝移. 这可能是由于 N 与其它元素发生杂化所致. 壳聚糖的 FTIR 谱图中乙酰基团(1730 cm^{-1})没有出现,表面壳聚糖的脱乙酰度较高^[29]. FTIR 数据显示,脉冲沉积制备的复合涂层中出现的吸收峰较多,且吸收峰较强.

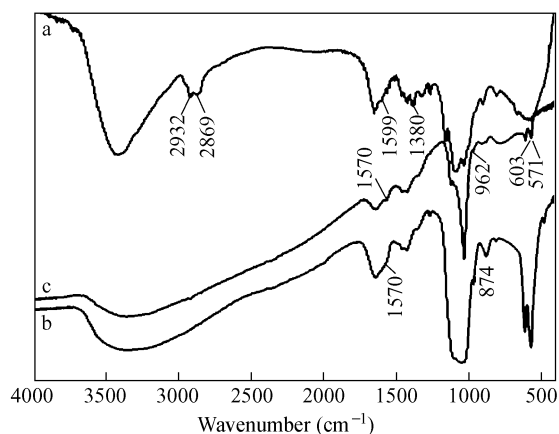


Fig. 4 FTIR spectra of the HA/CS composite coatings prepared by different electrochemical deposition methods: (a) pure chitosan, (b) pulsed voltage and (c) constant voltage

热重分析表明恒电位条件下复合涂层中 CS 含量较少(0.9%)(图 5(a));脉冲电位条件下复合涂层中 CS 含量较多(5.9%)(图 5(b)). 这是因为脉冲电沉积条件下当关断电流时,阴极界面微反应区域的 CS 离子能及时从本体溶液中得到补充,恢复到初始浓度,当接通电流时保证了大量的离子沉积,这样周而复始的进行沉积,最终得到的涂层中 CS 含量较高. 上述分析可知脉冲电位比恒电位沉积的复合涂层均匀、结晶性好、CS 含量高,所以选择脉冲电位做下一步的研究.

2.2 脉冲电位对复合涂层的影响

在脉冲电化学沉积过程中,在不同脉冲电位

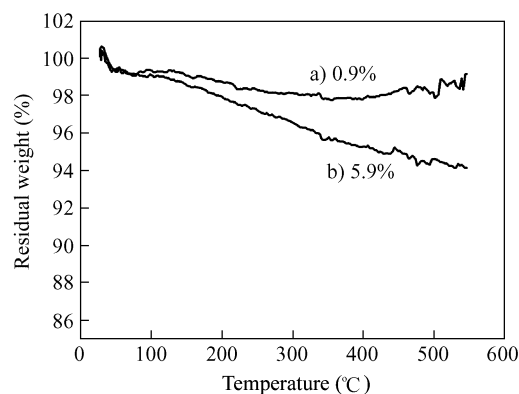


Fig. 5 TG analysis reveals the CS contents in the HA/CS composite coatings prepared under different deposition conditions (a) constant voltage and (b) pulsed voltage

下制备的涂层的成分、形貌及结晶情况不同. 图 6 是不同脉冲电位下制备的复合涂层形貌. 脉冲电位 -1.3 V 时涂层呈纳米网状结构,分布均匀(图 6(a));脉冲电位 -2.0 V 时涂层呈微米球状,涂层较疏松(图 6(b));脉冲电位 -3.0 V 时呈纳米网状结构,分布不均匀(图 6(c)). XRD 分析可知在低脉冲电位 -1.3 V 时(图 7(a))得到的磷酸盐是 HA,涂层结晶较好,基底衍射峰较弱,表明涂层沉积量较多;脉冲电位增加到 -2 V 时(图 7(b))得到的磷酸盐也是 HA,但结晶较差;当脉冲电位继续增大 -3.0 V 时(图 7(c)),几乎检测不到磷酸钙涂层. Zhang 等^[30]以及 Ban 等^[31]研究表明,钙磷的沉积依赖阴极产生的 OH^- ,在电位(电流)较小的情况下,随着阴极表面电化学反应的进行, OH^- 不断产生,造成阴极附近溶液过饱和和度大幅度增加,相应的钙、磷离子沉积形成钙磷盐. 如果电位较强,反应进行地比较强烈,即阴极不断产生大量的 OH^- 从而扩散到阴极附近的区域,从而导致钙、磷离子未扩散到阴极表面就发生沉积,沉积过程也逐渐由原来电极表面的异相成核、生长变为溶液中均相成核. 均相成核使涂层沉

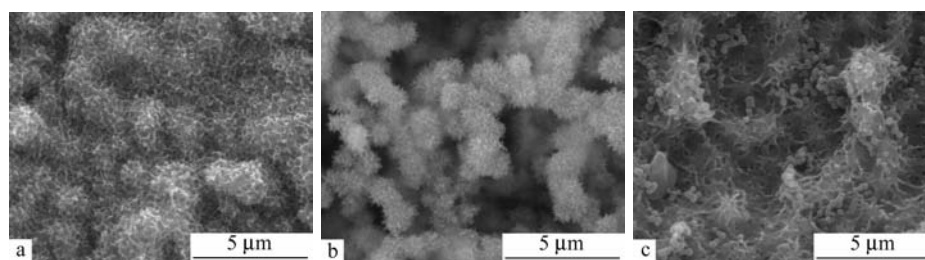


Fig. 6 SEM micrographs of the HA/CS composite coatings prepared under different pulsed voltages: (a) $0 \sim -1.3\text{ V}$, (b) $0 \sim -2.0\text{ V}$ and (c) $0 \sim -3.0\text{ V}$

积效率下降. 另一个影响涂层沉积的因素是阴极析氢. 在较高脉冲电位的条件下, 阴极发生水电解反应较为剧烈; 在阴极与电解液的界面上, 氢气泡的生长和附着也很剧烈, 阻止钙磷涂层的沉积, 并影响涂层的形貌、结晶. 以上分析可知, 在低脉冲电位下制备的涂层均匀、结晶性好, 所以选择 $0 \sim -1.3$ V 作为下一步研究的参数.

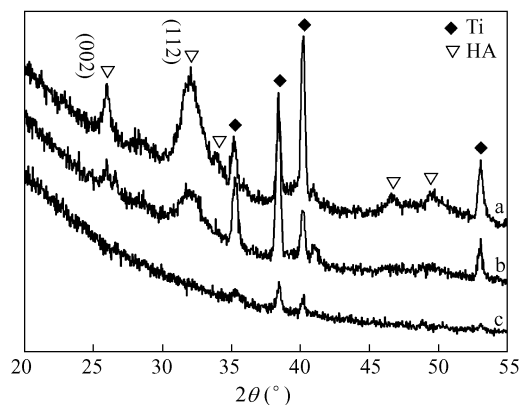


Fig. 7 XRD spectra of the HA/CS composite coatings prepared under different pulsed voltages: (a) $0 \sim -1.3$ V, (b) $0 \sim -2.0$ V and (c) $0 \sim -3.0$ V

2.3 电解液中壳聚糖浓度对复合涂层的影响

电解液中壳聚糖浓度对复合涂层中 CS 含量有较大的影响. 采用热重(TG)分析涂层中壳聚糖含量. 壳聚糖浓度为 0.17 g/L 时复合涂层中 CS 的含量为 4.0% (图 8(a)), 壳聚糖浓度为 0.33 g/L 时复合涂层中 CS 的含量相对最多为 5.9% (图 8(b)), 壳聚糖浓度为 0.67 g/L 时复合涂层中 CS 的含量降低为 2.3% (图 8(c)). 该结果表明低浓度壳聚糖对电沉积的影响较小, 原因是此

时电解液的黏度影响较小, 不影响 CS 大分子沉积; 高浓度壳聚糖对复合涂层的沉积影响较大, 因为高浓度的 CS 溶液具有较大的黏稠性, 不利于 CS 沉积^[23]. 因此配制电解液时, 要保证壳聚糖在一定的浓度范围内, 以减少对沉积的影响.

SEM 观察表明复合涂层中 CS 含量对形貌影响较大. 图 9 是脉冲电位为 -1.3 V, 电解液中壳聚糖浓度不同条件下制备的复合涂层 SEM 图. 复合涂层中 CS 含量最少时涂层表面裂纹最多(图 9(c)), 增加到 (4.0%) 涂层表面的裂纹减少(图 9(a)), 增加到 5.9% 时涂层表面呈纳米网状结构, 裂纹消失(图 9(b)). 这是因为磷酸钙较脆, 易出现裂纹, CS 大分子起到桥接的作用, 将钙磷盐很好的连接到一起. 以上分析可知, 壳聚糖浓度为 0.33 g/L 时制备的涂层均匀、CS 含量高, 所以选择电解液中 CS 浓度为 0.33 g/L 作为下一步研究的参数.

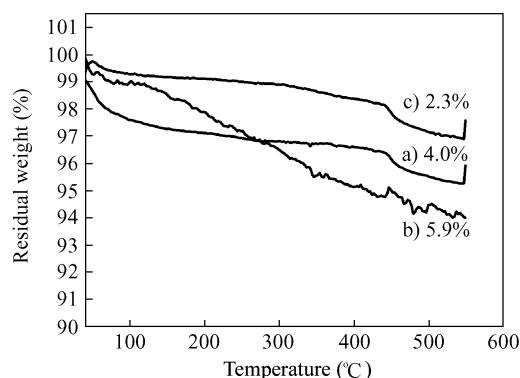


Fig. 8 TG analysis reveals the CS content in the composite HA/CS coatings prepared with different CS concentration in the electrolyte: (a) 0.17 g/L, (b) 0.33 g/L and (c) 0.67 g/L

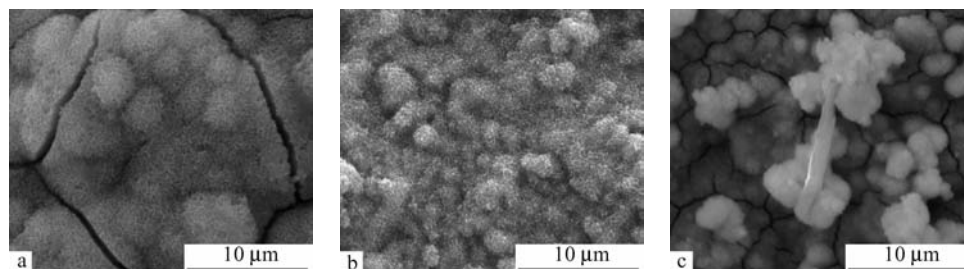


Fig. 9 SEM micrographs of the HA/CS composite coatings prepared with different CS concentration in the electrolyte: (a) 0.17 g/L, (b) 0.33 g/L and (c) 0.67 g/L

2.4 复合涂层抗菌性能测试

上述分析可知, 制备 HA/CS 复合涂层较优化的实验条件为: 脉冲电位 -1.3 V、壳聚糖浓度 0.33

g/L. 我们采用薄膜表面黏附法对该优化条件下制备的 HA/CS 复合涂层进行抗菌研究, 表 1 是按式 (1) 对复合涂层定量抗菌分析的结果. 结果表明

HA/CS 复合涂层对大肠杆菌有较好的抗菌效果,抗菌率为 95.8%,HA/CS 复合涂层具有抗菌性,是因为 CS 具有抗菌性. CS 的抗菌原理是 CS 上的氨基正离子能与磷脂膜上的磷酸根通过静电作用生成复合物,即与大肠杆菌的细胞外膜反应,使外膜呈锯齿状,失去其功能,最终造成整个细胞膜的完整性被破坏,DNA 等物质渗漏而死亡^[32].

Table 1 CFUs of antibacterial tests and the bactericidal ratio of the coatings (*n* = 3)

Specimen	E. coli	Bactericidal ratio
HA/CS	22.7 ± 2.5	95.8%
HA	358.0 ± 11.5	—

2.5 复合涂层的生物相容性评价

细胞培养结果表明复合涂层具有较好的生物相容性. 图 10 显示大鼠颅盖骨成骨细胞 MC3T3-E1 附着于 HA/CS 复合涂层、HA 涂层表面 1、3、7 天后的细胞形态. 细胞培养 1 天后,HA/CS 复合涂层样品表面细胞生长较好,黏附较多,呈梭形,多数细胞已经铺展在材料表面(图 10(a1)). HA 涂层样品表面细胞也生长较好,已完全铺展在样品表面(图 10(b1)). 表明细胞培养 1 天时复合涂

层中 CS 的加入不影响细胞的黏附及铺展. 细胞培养 3 天后,HA/CS 复合涂层表面细胞生长较好,多数细胞铺展在材料表面,黏附数量比 1 天时明显增多(图 10(a2)). HA 涂层表面细胞粘附数量较 1 天时也明显增多(图 10(b2)). 细胞培养 7 天后,HA/CS 复合涂层的细胞黏附数量比 1、3 天明显增加,细胞完全铺满材料的表面,细胞与材料之间黏附好(图 10(a3)). HA 涂层表面细胞数量也明显增加,但细胞呈浮起状态(图 10(b3)),这是由于 HA 涂层表面较疏松同时有较多的裂纹,不利于细胞的黏附. 表明细胞培养 7 天时 HA/CS 复合涂层更利于细胞的黏附、铺展.

图 11 为不同时间点 Alamar Blue 检测的成骨细胞增值率. 细胞培养 3 天的结果显示,两种涂层表面细胞黏附数量相当,无显著性差异. 7 天时 HA/CS 复合涂层细胞增值能力略高于 HA 涂层表面细胞的增值能力. 这个结果表明 HA/CS 复合涂层利于细胞黏附、增值. 图 12 是成骨细胞平均碱性磷酸酶(ALP)活性,表征单个细胞在涂层表面的分化能力. 7 天后,HA/CS 复合涂层和 HA 涂层表面细胞的分化能力无显著差别.

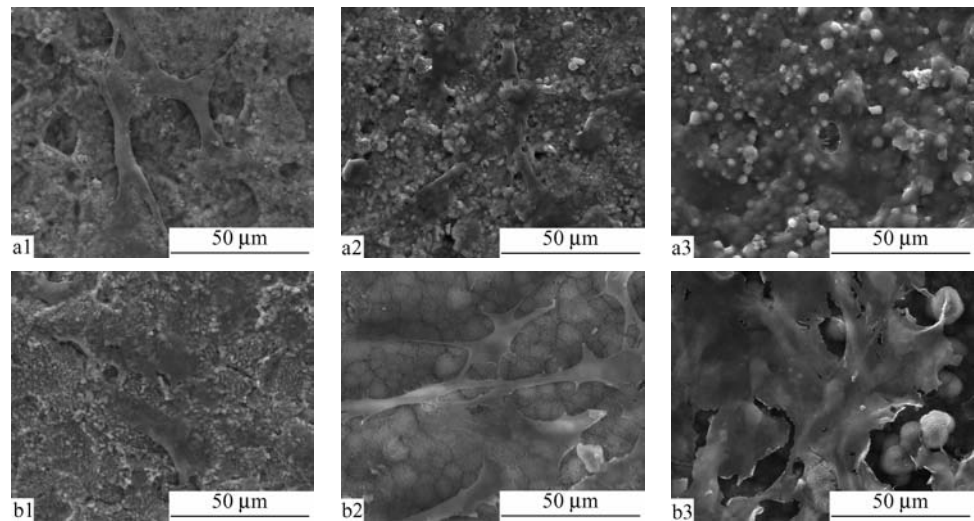


Fig. 10 SEM micrographs of osteoblasts on HA/CS after 1 day (a1), 3 days (a2) and 7 days (a3); on pure HA surfaces after 1 day (b1), 3 days (b2) and 7 days (b3)

2.6 复合涂层形成机理讨论

2.6.1 脉冲电沉积制备复合涂层机理

研究中发现脉冲电沉积条件下复合涂层中 CS 的含量比恒电位要高,其原因分析如下. HA/CS 复合涂层是由 HA 的电化学反应沉积和壳聚糖的电泳沉积共同作用而形成的. 一方面,由于水

电解在钛金属电极表面产生 OH⁻:
$$2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- = \text{H}_2 \uparrow + 2\text{OH}^-$$

OH⁻和磷酸根离子反应如下:
$$\text{OH}^- + \text{H}_2\text{PO}_4^- \rightarrow \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{O}$$

$$\text{OH}^- + \text{HPO}_4^{2-} \rightarrow \text{PO}_4^{3-} + \text{H}_2\text{O}$$

使得下列平衡反应向右移动,在钛金属电极表面

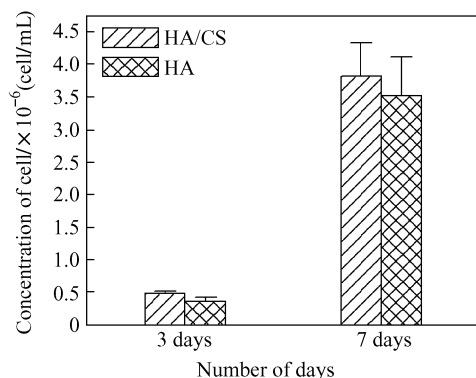


Fig. 11 Alamar Blue tests for cell proliferation

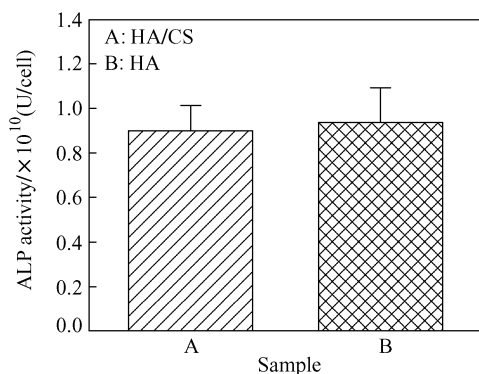
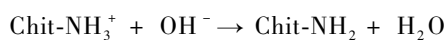


Fig. 12 ALP results for cell differentiation after 7 days

生产 HA 涂层.



另一方面,壳聚糖在酸性电解质中是带正电荷,在电场的作用下向阴极移动,并与 HA 共沉积形成复合涂层.



控制反应条件,使得 CS 和 HA 的沉积速度能够互相匹配,对提高 CS 在涂层中的含量有重要影响.本研究采用脉冲电沉积获得较好的复合沉积效果.这是由于施加脉冲信号时,电解槽中不断地重复进行“供电-断电-供电”的脉冲过程,电极上的反应时断时续,有利于扩散、降低浓差极化,使沉积效率得到大幅度地提高,达到较好的沉积效果.从电泳的方面考虑,壳聚糖大分子在电场作用下向阴极移动速度较慢,脉冲电位给壳聚糖分子电泳扩散提供了充分的时间,大大提高了壳聚糖在复合涂层中的含量.

拉力测试表明 HA/CS 复合涂层结合强度约为 (7.4 ± 0.47) MPa,纯 HA 涂层的结合强度约为 (1.1 ± 0.23) MPa.复合涂层的结合强度明显高于纯 HA 涂层的结合强度.纯钙磷涂层和钛是物理

吸附结合,结合强度较低. HA 涂层中加入 CS 后提高了结合强度.这是因为 CS 大分子起到桥接的作用,将钙磷盐很好的连接到一起.并且 CS 大分子与碱处理后充满羟基的钛表面有静电吸附,因此提高了 HA 涂层的结合强度.

2.6.2 HA 与壳聚糖杂化分析

本研究的另外一个发现是脉冲电位下 HA 与壳聚糖杂化程度高.图 13 是壳聚糖中的 N1s 谱图.从 XPS 谱图可知,(1)与 CS 谱图对比,恒电位和脉冲电位两种沉积条件下壳聚糖中质子化 NH_3^+ 消失,在低结合能处出现新峰.可以归因于 N 与 Ca 发生杂化.同时发现复合涂层中 $\text{Ca}2p_{3/2}$ 结合能 (346.7 eV) 比羟基磷灰石 (347.3 eV) ^[33] 的减少 0.6 eV ,进一步说明了 N 与 Ca 杂化的可能性.(2)脉冲电位与恒电位对比可知,脉冲电位下在低结合能处出现的新峰是主峰,表明脉冲电位下 HA 与壳聚糖杂化程度高,其原因是在脉冲关闭的过程中,CS 与 HA 能有充分的时间相互作用.

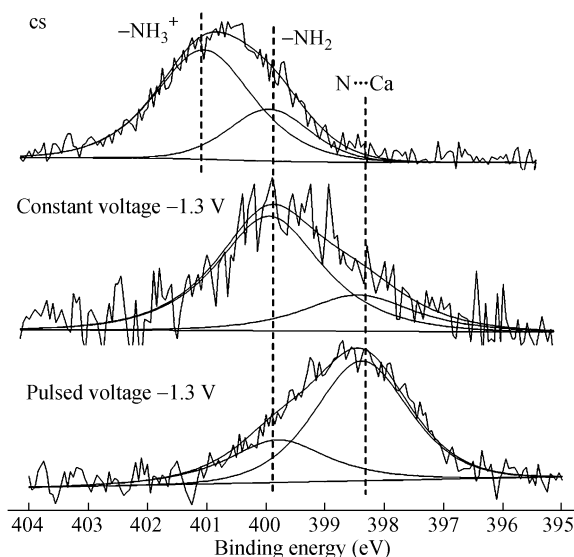


Fig. 13 XPS spectra of N1s of pure CS and composite coatings

3 结论

采用脉冲电化学原位共沉积法在生物医用钛金属表面制备了 HA/CS 复合涂层.研究结果表明,(1)脉冲电位比恒电位下制备的涂层均匀、结晶性好、CS 含量高.脉冲电沉积优于恒电位沉积.(2)脉冲电位的高低不影响涂层成分,但影响涂层的结晶、形貌.随着电位的升高,涂层中钙磷盐结晶变差,涂层变得疏松.脉冲低电位 -1.3 V 左

右更有利于复合涂层的沉积。(3) 电解液中壳聚糖浓度对复合涂层中 CS 含量有较大的影响,壳聚糖浓度为 0.33 g/L 时制备的复合涂层的壳聚糖含量相对较高(5.9%),此时的涂层均匀,没有

裂纹。(4) 抗菌实验显示 HA/CS 复合涂层具有良好的抗菌效果。(5) 成骨细胞培养实验表明 HA/CS 复合涂层具有较好的生物相容性。

REFERENCES

- 1 Li Baoqiang(李宝强), Hu Qiaoling(胡巧玲), Wang Mang(汪茫), Shen Jiacong(沈家骢). Chem J Chinese Univ(高等学校化学学报), 2004, 25(10): 1949 ~ 1952
- 2 Huang Zhihai(黄志海), Li Jihong(李纪宏), Lin Pinghua(林萍华), Dong Yansheng(董寅生), Guo Chao(郭超), Sheng Xiaobo(盛晓波), Chu Cenglin(储成林). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2009, (3): 273 ~ 277
- 3 Wang J H, Wei C W, Liu H C, Young T H. J Biomed Mater Res, 2003, 64A(4): 606 ~ 615
- 4 Li Baoqiang(李保强), Hu Qiaoling(胡巧玲), Qian Xiuzhen(钱秀珍), Fang Zhengping(方征平), Shen Jiachong(沈家骢). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2002, (6): 828 ~ 833
- 5 Sivakumar M, Manjubala I, Panduranga R K. Carbohydr Polym, 2002, 49(3): 281 ~ 288
- 6 Kim S B, Kim Y J, Yonn T L, Park S A, Cho I H, Kim E J, Kim I A, Shin J W. Biomaterials, 2004, 25(26): 5715 ~ 5723
- 7 Denkba E B, Kiliçay E, Birlikseven C, Oztürk E. React Funct Polym, 2002, 50(3): 225 ~ 232
- 8 Yang Hong(杨洪), Fu Shangong(傅山岗). Chinese J Appl Chem(应用化学), 2005, 22(1): 87 ~ 90
- 9 Zhang K, Zhao Man, Cai L, Wang Z K, Sun Y F, Hu Q L. Chinese J Polym Sci, 2010, 28(4): 555 ~ 561
- 10 Wang Z K, Hu Q L, Cai L. Chinese J Polym Sci, 2010, 28(5): 801 ~ 806
- 11 Sun F, Pang X, Zhitomirsky I. J Mater Process Technol, 2009, 209(3): 1597 ~ 1606
- 12 Jin H H, Lee C H, Lee W K. Mater Lett, 2008, 62(10-11): 1630 ~ 1633
- 13 Hu Ren(胡仁), Hu Haobing(胡皓冰), Lin Changjian(林昌健). Chem J Chinese Univ(高等学校化学学报), 2002, 23(11): 2142 ~ 2146
- 14 Cheng X M, Li Y B, Zuo Y, Zhang L, Li J D, Wang H A. Mater Sci Eng C, 2009, 29(1): 29 ~ 35
- 15 Pang X, Zhitomirsky I. Mater Charact, 2007, 58(4): 339 ~ 348
- 16 Lu X, Wan Y B, Liu Y R. Mater Lett, 2007, 61(18): 3970 ~ 3973
- 17 Wang Yingbo(王英波), Lu Xiong(鲁雄), Feng Bo(冯波), Qu Shuxin(屈树新), Weng Jie(翁杰), Chen Jianmin(陈建敏). Journal of Inorganic Materials(无机材料学报), 2008, 23(6): 1241 ~ 1245
- 18 Manara S, Paolucci F, Palazzo B, Marcaccio M, Foresti E, Tosi G, Sabbatini S, Sabatino P, Altankov G, Roveri N. Inorg Chim Acta, 2008, 361(6): 1634 ~ 1645
- 19 Wang Yingbo(王英波), Lu Xiong(鲁雄), Feng Bo(冯波), Qu Shuxin(屈树新), Weng Jie(翁杰). Chem J Chinese Univ(高等学校化学学报), 2010, 31(2): 253 ~ 259
- 20 Kuo M C, Yen S K. Mater Sci Eng C, 2002, 20(1-2): 153 ~ 160
- 21 Ban S, Maruno S. Biomaterials, 1995, 16(13): 977 ~ 981
- 22 Wang Yingbo(王英波), Lu Xiong(鲁雄), Zhao Jing(赵婧), Feng Bo(冯波), Wang Jingxin(汪建新), Qu Shuxin(屈树新), Weng Jie(翁杰), Chen Jianmin(陈建敏). Rare Metal Materials and Engineering(稀有金属材料与工程), 2009, 38(6): 1071 ~ 1075
- 23 Liu Rongfang(刘榕芳), Xiao Xiufeng(肖秀峰), Lin Lanfeng(林岚云), Chen Guyong(陈古镛). Chem J Chinese Univ(高等学校化学学报), 2004, 25(2): 304 ~ 308
- 24 Hou X H, Liu X, Xu J M, Shen J, Liu X H. Mater Lett, 2001, 50(2-3): 103 ~ 107
- 25 Redepenning J, Venkataraman G, Chen J, Stafford N. J Biomed Mater Res, 2003, 66A(2): 411 ~ 416
- 26 Wang J W, Apeldoorn A V, de Groot K. J Biomed Mater Res, 2006, 76A(2): 503 ~ 511
- 27 Lu X, Yang L, Zhang Q Y. Surf Coat Tech, 2008, 202(13): 3142 ~ 3147
- 28 Shanmugasundaram N, Ravichandran P, Reddy P, Ramamurty N, Pal S, Rao K P. Biomaterials, 2001, 22(14): 1943 ~ 1951
- 29 Pawlak A, Mucha M. Thermochim Acta, 2003, 396(1-2): 153 ~ 166
- 30 Zhang J M, Shi Q Z, Yang C C, Xu J M. Chem Res, 2002, 13: 5 ~ 7
- 31 Ban S J, Shigeo M. Biomaterials, 1998, 19: 1245 ~ 1253
- 32 Liu Hui(刘慧). Antimicrobial Activity and Mechanism of Chitosan and Its Combinations with Surfactants(壳聚糖及其表面活性剂复合物的抗菌性与抗菌机理的研究). Doctoral Dissertation of Wuhan University(武汉大学), 2004. 118 ~ 119
- 33 Zhou Jianlue(周建略), Chen Shuzi(陈树滋), Zuo Changming(左长明), Ji Xiaojiang(吉晓江). Acta Physico-Chimica Sinica(物理化学学报), 1990, 6(5): 629 ~ 632

HYDROXYAPATITE/CHITOSAN COMPOSITE COATINGS ON TITANIUM SURFACES BY PULSED ELECTROCHEMICAL DEPOSITION

WANG Yingbo^{1,2}, LU Xiong¹, LI Dan¹, FENG Bo¹, QU Shuxin¹, WENG Jie¹

(¹ Key Laboratory of Advanced Technologies of Materials (Ministry of Education), School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031)

(² College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinjiang normal university, Wulumuqi 830054)

Abstract A pulsed electrochemical deposition (ED) method was employed to produce hydroxyapatite (HA)/chitosan (CS) composite coatings on Ti substrates. HA dispersed uniformly in the CS network. There was nano-scale hybridization between HA and CS due to *in situ* co-precipitation. ED was conducted in the cell that had three electrodes: a Ti plate as the working electrode, a platinum plate as the counter electrode and a saturated calomel electrode (SCE) as the reference electrode. Electrolytes were aqueous solution of 5 mmol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 3 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and CS aqueous solutions with different concentrations (0.17 g/L, 0.33 g/L, 0.67 g/L). The coatings were prepared under constant voltage and pulsed voltage modes. The experiment results indicated that the pulsed voltage mode can improve the CS content in the coatings and obtain uniform coatings, compared with the constant voltage mode. The pulsed voltage mode also promoted the interaction between Ca and CS according to XPS analysis. Pulsed voltage affected the morphology of the coatings and improved the efficiency of the deposition. The suitable pulsed voltage was -1.3 V . The concentration of CS in the electrolyte affected the CS content in the coatings and the efficiency of the deposition. The suitable concentration was 33.1 g/L. The antibacterial test indicated that HA/CS coatings had good bactericidal ability. Osteoblasts were cultured on the coatings to evaluate the biocompatibility of coatings and the results indicated that the composite coatings favored the attachment and proliferation of the osteoblasts. The results of present study provided valuable references for the further research in developing composite coatings for biomedical applications.

Keywords Pulsed electrochemical deposition, Hydroxyapatite, Chitosan, Composite coatings, Biocompatibility