

原位沉析法制备可吸收壳聚糖/羟基磷灰石棒材*

李保强 胡巧玲** 钱秀珍 方征平 沈家骢

(浙江大学高分子复合材料研究所 杭州 310027)

摘 要 利用原位沉析法制备出一种以壳聚糖(Chitosan, CS)为基体, 羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA)为填料的新颖的复合材料, 系统研究了 HA 含量对复合材料的力学性能和吸水率的影响. CS/HA 的弯曲强度为 67.8 (MPa), 弯曲模量为 3.3 (GPa), 剪切强度为 21.2 (MPa), 压缩强度为 47.8 (MPa), 均比人的自然骨高 2~3 倍, 基本满足了作为骨折内固定材料的力学性能的要求. HA 加入到 CS 使 CS/HA 复合材料的吸水率下降, 有助于延缓其力学强度在湿态环境下的衰减.

关键词 原位沉析法, 壳聚糖, 羟基磷灰石, 骨折内固定

壳聚糖(Chitosan, CS)是一种天然的生物可降解多糖, 其降解产物为氨基葡萄糖, 有一定的碱性, 对人体及组织无毒、无害. 它除了具有优异的生物相容性外, 还具有天然的药物活性、抗肿瘤活性、消炎作用, 对受损生物体能诱导特殊细胞, 加快创伤愈合. 壳聚糖已经在医学上有广泛的生物医学用途如术后防粘连膜^[1]、透析膜、药物控制释放载体、毒物吸附分离剂、载药微球、骨科齿科修复材料等^[2]. 但是有关 CS 三维棒材、板材研究很少. 张建湘等^[3]曾制备的壳聚糖接骨钉, 其抗张强度为 43.3 MPa, 剪切强度为 46 MPa, 而其他力学性能没有进一步报道.

羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA)是人体自然骨的主要成分(含 60%~70%), 具有极好的生物活性和骨组织生长的引导性. CS/HA 复合物作为骨缺损修复材料能促进骨缺损的修复. 杨军等^[4]发现 CS/HA 复合物植入区的新生组织中钙离子含量略高于 CS 植入区; 而 CS/HA 植入区的磷离子含量远远高于 CS 植入区, 这说明在 CS/HA 复合材料周围新骨形成概率远远大于 CS 材料. 郭晓东等^[5]认为 HA 被肌体吸收时, 释放出来的 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 离子在新骨形成过程中可能被利用, 对骨折愈合有促进作用, 而且 HA 从 CS 基体中的释放是具有缓释特征. 已经证明 HA 种植体能诱导周围骨组织的生长, 并与宿主骨形成牢固的化学结合^[6-8]. 由此可见, 在壳聚糖基体中加入 HA 能提高 CS/HA 材料与骨组织之间形成直接的骨性结合.

CS/HA 复合物作为骨组织修复的材料已经有比较多的研究^[9,10]. 但是这些研究主要是以 HA 为基体, 约占 60 wt%~90 wt%. 在 HA 体系中引入 CS 的主要目的是解决 HA 颗粒成型困难问题. 在 HA 颗粒中加入壳聚糖溶液, 将 HA 颗粒调制成糊状物或膏状物, 这样 HA 就可以被任意塑型. 在这个体系中壳聚糖只是起粘合剂或者赋形剂作用. 最终材料仍表现出生物陶瓷性能, 即脆性大, 弯曲强度低.

制备以 CS 为基体的 CS/HA 复合材料有望能得到不但力学性能好, 又对骨组织生长有促进作用和与骨组织有良好结合能力的骨组织修复材料. 但是传统方法制备的 CS/HA 复合材料力学性能很差. 本文采用原位沉析法制备出以 CS 为基体, HA 为填料的复合材料, 系统地研究了 HA 含量对该复合物体系的弯曲强度及模量、压缩强度及模量和剪切强度等方面的力学性能与其吸水率的影响.

1 实验

1.1 原料

壳聚糖(医用级, 青岛海汇生物工程有限公司, $\bar{M}_n = 56.3 \times 10^4$, 脱乙酰度 = 91%), 羟基磷灰石(HA)(生化试剂, 中国医药集团上海试剂公司, 进口分装), 羟基磷灰石(HA_{100})(实验室自制), 凝固液, (3 wt%~8 wt%) NaOH 溶液. 100 Nikon 数码相机(日本 Nikon 公司).

* 2002-04-10 收稿, 2002-05-27 修稿; 国家自然科学基金资助项目(基金号 50173023); ** 通讯联系人

1.2 样品制备

称取一定量的壳聚糖粉末加入到 2% (V/V) 乙酸 (HAc) 溶液中制成 4 wt% 壳聚糖溶液, 分别称取 CS/HA (wt/wt) = 100/0, 100/5, 100/10, 100/15, 100/20 量的羟基磷灰石加入到上述溶液中, 剧烈搅拌, 形成均一溶液, 静置脱泡. 取少量 CS/HA 溶液注入模具中先形成一层内膜, 再将模具注满, 然后放入凝固液中并取下模具. 4 h 后将 CS/HA 凝胶棒放入蒸馏水中漂洗至中性, 放入 60℃ 烘箱内烘干.

1.3 X 射线衍射测试

X 射线衍射 (XRD) Rigaku D/Max-3B X-射线衍射仪上用逐进扫描法进行 (CuK α , 40 kV, 40 mA).

1.4 力学性能测试^[11]

CS/HA 复合材料的力学性能测试均在深圳瑞格尔仪器有限公司的微机控制万能材料实验机上进行. 所有试样在测试前, 均在 40℃ 烘箱中烘 4 h, 以消除水份对试样力学性能的影响.

1.4.1 弯曲强度及模量 弯曲测试采用三点弯曲法测试, 跨距 42 mm, 实验速度 2 mm/min, 材料的弯曲强度 σ_b 、弯曲的弹性模量 E_b 通过式 (1)、式 (2) 求得:

$$\sigma_b = \frac{8 F_{\max} L}{\pi d^3} \tag{1}$$

$$E_b = \frac{4 L^3}{3 \pi d^4} \times \frac{\Delta F}{\Delta l} \times \frac{1}{1000} \tag{2}$$

1.4.2 压缩强度及模量 采用 20 mm 长的圆柱体试样, 实验速度 5 mm/min. 记录最大压缩载荷 $F_{\max}$, 根据式 (3) 和式 (4) 求得压缩强度 σ_c 和模量 E_c .

$$\sigma_c = \frac{4 F_{\max}}{\pi d^2} \tag{3}$$

$$E_c = \frac{\sigma}{\epsilon} \tag{4}$$

1.4.3 剪切强度 采用压缩模式来测试试样的剪切强度 (Double shear strength). 试样长度 22 mm, 实验速度 5 mm/min, 从实验中得到最大负荷, 剪切强度 τ 由式 (5) 求得

$$\tau = \frac{2 F_{\max}}{\pi d^2} \tag{5}$$

式中 $F_{\max}$: 最大载荷 (N); L : 跨距 (mm); d : 样品直径 (mm); $\frac{\Delta F}{\Delta l}$: 弯曲测试的载荷-位移曲线上直线部分的斜率; $\frac{\sigma}{\epsilon}$: 压缩的应力-应变曲线中的直线

部分的斜率.

1.5 相形态观察

试样的弯曲断面, 喷金处理后在日立 S-570 附带 EDAX 仪器上测试.

1.6 吸水率测定

样品在 60℃ 真空烘箱中烘 16 h 后称重 W_0 , 再放入 23℃ 恒温蒸馏水中每隔一定时间取出, 用滤纸吸干表面的水后称量 W_1 , 则吸水率 W_s 通过式 (6) 计算.

$$W_s \% = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100\% \tag{6}$$

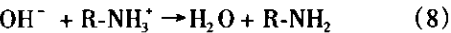
2 结果与讨论

2.1 原位沉析的机理

CS (用 R-NH $_2$ 表示) 在乙酸溶液中进行 CS 质子化反应 (见 7 式).



当将棒材的模具放入凝固液中, 预先沉积在模具内的 CS/HA 膜是半透性的, 它可以让小分子通过, 而 CS 和 HA 却不能通过. 故该膜将膜内的 CS/HA 混合物与膜外的凝固液隔开, 由于膜外的 OH $^-$ 浓度大于膜内的, 所以 OH $^-$ 就向膜内渗透遇到质子化的壳聚糖发生酸碱中和 (见式 8).



与此同时, Ac $^-$ 也向膜外渗透, Na $^+$ 离子向膜内渗透, 直到膜内外的离子浓度相等.

壳聚糖分子对 pH 值变化很敏感. 当环境的 pH 值大于 6.0 时, 壳聚糖分子就沉积出来^[12]. 用原位沉析方法制备棒材时, 壳聚糖分子的沉积并不是无规的. 膜外的凝固液中的 OH $^-$ 在向膜内渗透时, 聚集在膜外的 OH $^-$ 给膜充上负电荷; 乙酸溶液中的壳聚糖上的氨基被质子化后带有正电荷, 带有正电荷的壳聚糖在遇到 OH $^-$ 沉积时, 在电荷吸引的作用下壳聚糖分子应按照与负电荷有最大接触几率的原则排列, 既壳聚糖的分子链应倾向平铺地沉积模板上. 膜内的 CS/HA 混合物在负电荷的影响下也逐渐按部就班地向膜上靠近, 这样就形成了第一层. 分散在壳聚糖溶液中的 HA 也在壳聚糖被沉积下来的同时沉积下来 (见图 1). 随着 CS/HA 被 NaOH 沉积, 出现了第二层、第三层等等 (见图 2a). 在弯曲断裂实验中 (见图 2b), 可以得到样品有一片被从棒材上剥落下来, 样品的断裂处也有一些花纹, 说明层状结构在干燥后的样品中依然存在.

Table 1 Mechanical properties of CS/HA composite and natural bone of human being

Samples	σ_b (MPa)	E_b (GPa)	τ (MPa)	σ_c^* (MPa)
Natural bone ^[13]	22	1.4	8	17.0
Maria ^[13] (CS/HA = 30/70)	19	1.0	14.4	-
CS/HA (CS/HA = 100/5)	68	3.3	21.2	47.82
CS/HA _{LAB} (CS/HA = 100/5)	101	3.5	36.5	-

* Femur of human being (20 ~ 30 ages)

Table 2 Bending strength and modulus of natural of bone human being (20 ~ 30 ages)

Bone	σ_b (MPa)	E_b (GPa)	$\bar{\sigma}_b$ (MPa)	$\bar{E}_b$ (GPa)
Femur	21.2	1.87	-	-
Shin	21.7	1.22	21.85	1.42
Carple	21.5	1.02	-	-
Ulna	23.0	1.57	-	-

2.4 HA 含量对 CS/HA 复合材料力学性能的影响

2.4.1 HA 含量对弯曲强度及模量影响 随着 HA 含量的增加,其弯曲强度呈现下降的趋势;弯曲模量呈现与弯曲强度相反的变化趋势(见图 4)。随着 HA 含量的增加,复合材料的弯曲强度从 CS/HA = 100/0 的 80.08 MPa 降低到 CS/HA = 100/15 的 59.31 MPa,降低幅度为 26%,同时其模量却从 3.2 GPa 增加到 4.38 GPa,增加幅度为 37%。通过图 4 可以找到既可以保证复合材料的力学性能,又可以提高复合材料与骨组织之间结合力和促进骨组织在复合材料周围生长的 CS/HA 之间合适的比例。

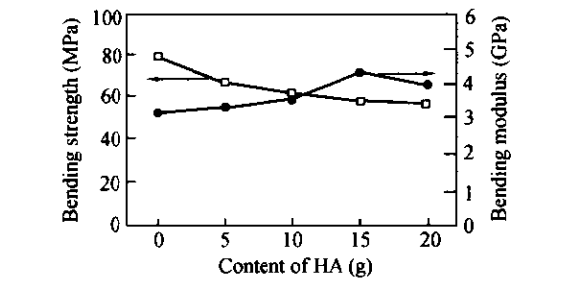


Fig.4 Influence of HA content on bending strength and modulus of CS/HA composite

粒径分析结果显示 HA 的粒径分布宽,粒径比较大,平均粒径为 26.01 μm ,粒径小于 10 μm 的粒子仅占 17.02%;HA_{LAB} 的粒径分布较窄,粒径较小,平均粒径仅为 7.48 μm ,粒径小于 10 μm 的占 75.57%。从表 3 得出,HA 颗粒粒径比较小时,对提高材料的力学性能有益。CS/HA_{LAB} 的弯曲强度和

剪切强度比 CS/HA 的提高了 49% 和 72%,而弯曲模量略有提高。这是因为颗粒粒径越小,其比表面积越大,表面能越高,HA 与 CS 之间的界面结合越紧密。

Table 3 Effect of size of particle on mechanical properties of CS/HA composite

Sample	Diameter (μm)	σ_b (MPa)	E_b (GPa)	τ (MPa)
CS/HA (100/5)	26.01	68	3.3	21.2
CS/HA _{LAB} (100/5)	7.48	101	3.5	36.5

2.4.2 压缩强度及模量 HA 对压缩强度和模量的影响趋势基本相同。随着 HA 含量增加,CS/HA 的压缩强度及模量都有所降低。当 CS/HA = 100/10 时,CS/HA 有比较大的压缩强度和压缩模量(见图 5)。Zhang 等^[14]通过加入 β -磷酸钙(β -TCP)增强 CS,随着 TCP 的含量增加,压缩模量也提高。但是,HA 加入 CS 基体内并没有明显的提高复合材料的压缩模量,这可能由于 HA 与 CS 基体之间的界面结合力比较弱以及 HA 在 CS/HA 中所占比例较小有关。

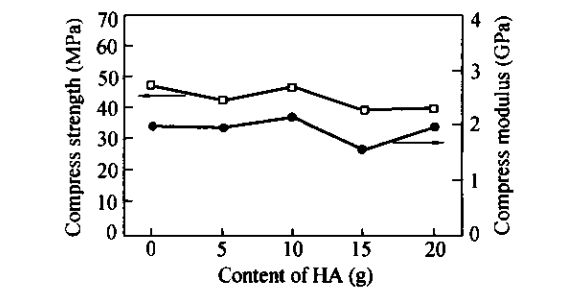


Fig.5 Influence of HA content on compress strength and modulus of CS/HA composite

2.4.3 剪切强度 HA 加入到 CS 体系中使 CS/HA 复合材料的剪切强度急速减小,降低幅度高达 42%。但是随着 HA 的含量的增加,剪切强度变化基本不变(图 6)。但是其性能仍比自然骨的高 1.65 倍(表 1),特别是 CS/HA_{LAB} 复合材料的剪切强度比自然骨高了 3.56 倍(表 3)。

HA 加入到 CS 基体中除了增加了 CS/HA 复合材料的弯曲模量外,使其它力学性能都下降。从图 7 中的 a 和 b 得出,HA 的加入导致在弯曲断面上有许多小的应力裂纹,特别是在 HA 填料中间有小的裂缝,即 CS 基体与 HA 颗粒之间的界面粘接力较弱,材料的破坏首先发生在 HA 颗粒周围。

2.5 HA 对 CS/HA 复合材料吸水率的影响

由于 CS 是一种高吸水性高分子材料,含水率

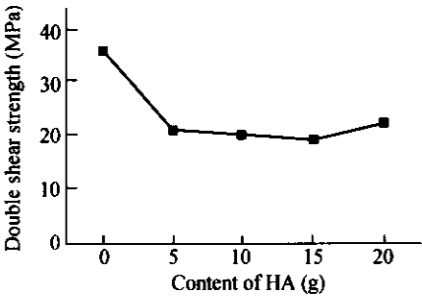


Fig.6 Influence of HA content on double shear strength of CS/HA composite

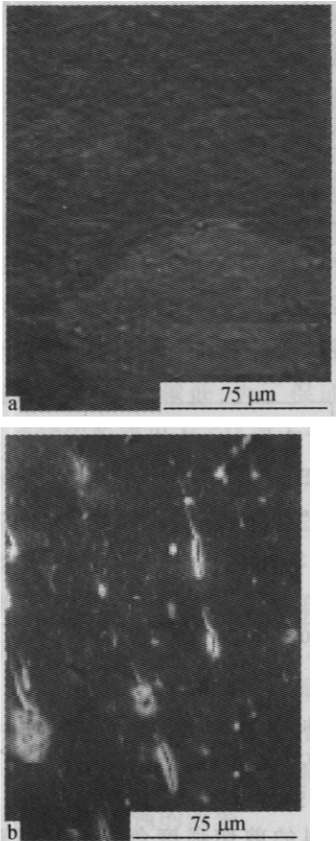


Fig.7 SEM photographs of pure chitosan (a, × 400), CS/HA = 100/5(b, × 400)

对 CS 制品的力学性能影响很大.提高 CS 制品的疏水能力正在成为研究的热点和难点.在 CS 体系中加入 HA 中可以在一定程度上降低 CS/HA 复合

材料的吸水率.在 CS 基体中加入 HA,分散在壳聚糖中的 HA 可以形成一层阻止水进入内层的物理屏障.从图 8 可以得出,CS/HA 复合材料的吸水率都低于 CS 的吸水率.其中在 CS/HA = 100/10 时,其平衡吸水率最小.随着水份的被吸收到 CS/HA 内部,其体积逐渐膨胀.这种膨胀就使骨折内固定物和骨钻孔之间结合非常紧密,这种膨胀力对受损的骨组织有应力刺激作用,从而促进骨组织迅速自发修复缺损处;而非膨胀体系的骨折内固定物和骨钻孔之间的结合就不是很紧密.该植入物与骨钻孔之间的结合不紧密的界面就形成应力集中区.在受载时,应力集中区阻碍应力在整个骨头上的均匀分布,导致宿主骨的强度降低,容易诱发二次骨折^[15].

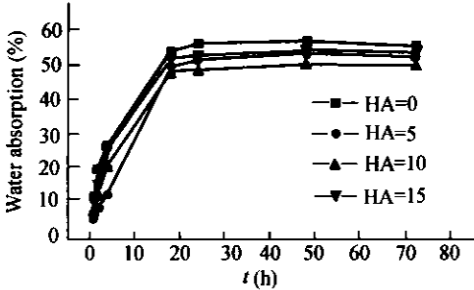


Fig.8 Dependence of water absorption on time

通过对原位沉析法制备了以 CS 为基体,HA 为填料的复合材料进行系统的力学性能评价可以得出如下结果:(1)用原位沉析法制备的 CS/HA 复合材料是经过缓慢地凝固过程从而实现了壳聚糖分子在模板上逐层、有序地沉积,故样品中壳聚糖分子在轴向上有一定得取向;(2)用原位沉析法制备的 CS/HA 复合材料的力学性能比自然骨的高 2~3 倍,而且高于目前所报道的 CS/HA 复合材料的力学性能数据;(3)HA 粒径小对提高复合材料的弯曲强度、剪切强度有利;(4)HA 可以形成临时的疏水屏障,延缓 CS/HA 复合材料的力学强度在湿态环境下的衰减.

REFERENCES

- 1 Hu Qiaoling, Fang Zhengping, Zhao Ying, Xu Chengwei. Chinese Journal of Polymer Science, 2001, 19(5): 467 ~ 470
- 2 Chandy T, Sharma C P. Proceeding of the 1995 Fourteenth Southern Biomedical Engineering Conference. Shreveport: Louisiana, 1995. 282 ~ 285
- 3 Zhang Jianxiang(张建湘), Tang Jian(汤健), Xu Bin(许斌), Cai Keqin(蔡克勤), Ma Weidong(马卫东), Fang Yue'e(方月娥), Shi Tianyi(史天义), Wei Jun(魏俊). Journal of Biomedical Engineering (生物医学工程学杂志), 1998, 15(2): 179 ~ 182
- 4 Yang Jun(杨军), Chen Zhiqing(陈治清). Journal of Comprehensive Stomatology(口腔医学纵横), 1992, 8(1): 6 ~ 8
- 5 Guo Xiaodong(郭晓东), Zheng Qixin(郑启新), Du Jingyuan(杜靖远), Quan Daping(全大萍), Yan Yuhua(闫玉华), Li Shipu(李世普), Li Xiangliang(李香亮). Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2001, 20(1): 23 ~ 27
- 6 Chu Chenglin(储成林), Zhu Jingchuan(朱景川), Yin Zhongda(尹钟大), Wang Shidong(王世栋). Materials Review(材料导报), 1999, 13(2): 51 ~ 54
- 7 Sabokbar A, Paney R, Diaz J, Quinn J M W, Murray D W, Athanasou N A. Journal of Materials Science: Materials In Medicine, 2001, 12: 659 ~ 664
- 8 Luan Chengguang(栾晨光), Yang Qingming(杨庆铭). The Orthopedic Journal China, 2001, 8(4): 378 ~ 380
- 9 Yang Jun(杨军), Chen Zhiqing(陈治清). Journal of Practical Stomatology(实用口腔医学杂志), 1993, 9(1): 29 ~ 31
- 10 Menon P R, Napper S A, Mukherjee D P. Proceeding of the 1995 Fourteenth Southern Biomedical Engineering Conference. Shreveport: Louisiana, April 1995, 95 ~ 97
- 11 Hu Yushan, Zhang Zhengpu, Song Dong, Bai Dongren, Wang Yongmei. Chinese Journal of Polymer Science, 2001, 19(4): 351 ~ 357
- 12 Viala S, Freche M, Lacout J L. Annals De Chimie-Science Des Materiaux, 1998, 23: 69 ~ 72
- 13 Maria L S, Marian G Mc. Proceeding of the 1997 Sixteenth Southern Biomedical Engineering Conference. Piscataway N J: IEEE, 1997. 257 ~ 259
- 14 Zhang Y, Zhang M Q. Journal of Non-Crystalline Solids, 2001, 282: 159 ~ 164
- 15 Wang Yijin(王以进), Wang Jielin(王介麟). Biomechanical of Orthopedics(骨科生物力学). Beijing(北京): Peoples Military Medical Press(人民军医出版社), 1989. 179 ~ 180; 201 ~ 202

BIOABSORBABLE CHITOSAN/HYDROXYAPATITE COMPOSITE ROD PREPARED BY *in-situ* PRECIPITATION FOR INTERNAL FIXATION OF BONE FRACTURE

LI Baoqiang, HU Qiaoling, QIAN Xiuzhen, FANG Zhengping, SHEN Jiacong

(Institute of Polymer Composite, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract Chitosan (CS), an *N*-deacetylation product of chitin, consists of glucosamine and *N*-acetylglucosamine units linked through 1 ~ 4 glycosidic bonds. CS rod is selected as a potential material for bone fracture internal fixation of human being due to its biodegradability and inherent wound healing. Incorporation of hydroxyapatite (HA), the mineral component of bone, could improve the bioactivity and the bone-bonding ability. A HA filled CS rod was prepared by *in-situ* precipitation. The mechanical properties were characterized and evaluated for suitability as a bone graft substitute. X-Ray Diffraction (XRD) was performed to determine the change of the structure of HA in the before and after processing. Scanning electron microscopy (SEM) was carried out to investigate the microstructure of CS/HA composite. Effect of HA content on the mechanical properties and water absorption of CS/HA composite were also investigated. It was observed that the mechanical properties of the composite in the dry condition improved as the percentage of CS content increased. Mechanical properties of such CS/HA composite rod are much better than that prepared via traditional method. Bending strength, bending modulus, double shear strength and compress strength of CS/HA composite are 67.8 MPa, 3.3 GPa, 21.2 MPa and 47.8 MPa, respectively. All of these material properties are twice or three times stronger compared with that of nature bone of human being, indicating that such a novel bioabsorbable CS/HA composite could be used as internal fixation of bone fracture. Furthermore, the water absorption of CS/HA composite decreased when addition of HA powders into CS matrix, which contributes to postponing the attenuation of mechanical properties of CS/HA composite under moisture condition.

Key words *in-situ* Precipitation, Chitosan, Hydroxyapatite, Internal fixation