

阿拉伯树胶对胶原-羟基磷灰石复合材料性能的影响

冯文坡¹, 祁元明², 汤克勇¹

(郑州大学 1. 材料科学与工程学院; 2. 生物工程系 郑州 450001)

摘要: 为改善胶原-羟基磷灰石复合材料的界面结合性能, 将阿拉伯树胶引入该体系中, 以 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、酸溶胶原、阿拉伯树胶为原料, 原位合成了胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶复合材料. 采用 FT-IR, XRD, SEM 表征材料的晶相结构、化学组成和微观形貌, 研究了阿拉伯树胶对胶原-羟基磷灰石复合材料结构与性能的影响. 结果表明, 阿拉伯树胶改变了胶原-羟基磷灰石复合材料的界面形态与结构; 随阿拉伯树胶含量的增加, 胶原-羟基磷灰石复合材料的晶粒变小, 结晶度降低; 复合材料的吸水性能和体外酶降解能力都显著下降 ($P < 0.01$), 其机械性能在一定范围内得到提高. 阿拉伯树胶与胶原或胶原-羟基磷灰石之间可能形成了蛋白-多糖复合物, 从而起到了交联作用.

关键词: 复合材料; 胶原-羟基磷灰石复合材料; 阿拉伯树胶; 影响
中图分类号: TB303; TB332 文献标识码: A

Effects of Gum Arabic on Properties of Collagen-hydroxyapatite Composite

FENG Wen-Po¹, QI Yuan-Ming², TANG Ke-Yong¹

(1. College of Materials Science & Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Bioengineering Department, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: In order to improve the interfacial bonding properties of collagen-hydroxyapatite (Col-HA) composite, gum Arabic was introduced in the system. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, acid dissolved collagen, and gum Arabic were used as the raw materials to *in situ* prepare collagen-hydroxyapatite/gum Arabic (Col-HA/Gum A) composite. Crystallite phase, chemical composition, and micro-morphology of the composite were characterized by XRD, FT-IR, and SEM. The effects of gum Arabic on the structure and properties of the collagen-hydroxyapatite composite were analyzed. The results indicate that both the interface structure and the surface morphology of the collagen-hydroxyapatite composite are changed by the introduction of gum Arabic. With increasing the amount of gum Arabic in the system, the sizes of the crystal grain and the crystallinity of the Col-HA composite are decreased. Both the hydrophilic properties and the enzymatic degradation capacity *in vitro* of the composite are decreased significantly ($P < 0.01$), whilst the mechanical properties of the composite are improved in a certain range. Complexes of protein-polysaccharide can be formed between the gum Arabic and the collagen or collagen-hydroxyapatite, and the gum Arabic can act as a cross-linking agent in the new composite.

Key words: comosite; collagen-hydroxyapatite composite; gum Arabic; effects

胶原和羟基磷灰石组成的复合材料是最接近天然骨的骨替代材料, 已成为骨组织工程材料研究的热点之一^[1-3]. 虽然胶原-羟基磷灰石复合材料具有良好的生物活性和生物相容性^[2-3], 但是由于羟基磷灰石晶粒影响胶原凝胶的稳定, 导致这种材料力

学性能差、易溶胀、易降解^[4], 限制了其在骨修复方面的应用. 为此, 人们做了诸多努力, 尝试用多种不同的材料与其复合^[5-7], 制备出多重复合材料, 以改善其性能.

基于天然骨组织可以看作是由胶原、羟基磷灰

收稿日期: 2010-01-22; 收到修改稿日期: 2010-03-12

基金项目: 国家自然科学基金(20676126, 50973097) National Nature Science Foundation of China(20676126; 50973097)

作者简介: 冯文坡(1971-), 男, 博士研究生. E-mail: fwp238@126.com

通讯联系人: 汤克勇, 教授. E-mail: keyongtang@yahoo.com.cn

石及多糖基质组成的一种复合材料, 利用多糖与蛋白质之间自发的 Maillard 反应^[8], 形成蛋白-多糖复合物, 有望增强胶原-羟基磷灰石复合材料中各成份间的结合, 改善其性能. 另外, 阿拉伯树胶含有机体所必需的多种矿质元素, 无毒、细胞相容性好^[9], 且能促进生物矿化^[10]. 因此, 将阿拉伯树胶引入到胶原-羟基磷灰石体系中, 制备出胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶复合材料. 本研究分析了阿拉伯树胶对胶原-羟基磷灰石复合材料各项性能的影响.

1 实验方法

1.1 主要材料和仪器

兔皮 I 型胶原, 依据文献[11-12]进行材料制备; I 型胶原酶(Sigma 公司); 阿拉伯树胶(天津光复科技发展有限公司). $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 等均为分析纯.

Nicolet 200 型 FT-IR(Thermo Nicolet 公司, 美国), PW-1710 型 X 射线衍射仪(PHILIPS 公司, 荷兰), FEI-quanta 200 型扫描电子显微镜(FEI 公司, 荷兰), CMT6104 型微机控制电子万能试验机(美特斯工业系统(中国)有限公司), CP214C 型电子天平(奥豪斯仪器(上海)有限公司)等.

1.2 样品的制备

将胶原溶于 0.05 mol/L 的醋酸溶液中制备 1% 酸性胶原溶液, 低温下 (10°C 以下) 添加 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 至 0.02 mol/L, 用 2.5 mol/L 的 NaOH 溶液调 pH 至中性备用.

向上述胶原溶液中加入 10% 的阿拉伯树胶溶液 ($w(\text{胶原}):w(\text{阿拉伯树胶})=4:1, 1:1, 1:4$, 分别标记为 b, c, d), 氨水调 pH 至 7.0 左右, 磁力搅拌器低温 (10°C 以下) 搅拌 20 min. 向胶原-阿拉伯树胶混合溶液中, 分别缓慢滴入 1.2 mol/L 的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 0.72 mol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 溶液 ($V(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2)/V((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)=1:1$), 使有机物总量与无机物的理论质量比为 2:8. 控制反应温度 (10°C 以下) 和 pH 7.2, 磁力搅拌器充分搅拌 2 h, 于 35°C 陈化 20 h. 蒸馏水反复洗涤沉淀, 1000 g 离心 5 min, 弃上清液得半固体浆料. 2 mL 一次性注射器挤压成型, 室温自然干燥, 得胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶复合材料. 采用同样方法制备胶原-羟基磷灰石复合材料(标记为 a).

1.3 复合材料的结构与性能表征

采用傅立叶转换红外光谱仪(FT-IR) 研究与分析复合材料的化学键结构; 采用 XRD 分析复合材料的晶相结构和结晶度; 采用 FEI-quanta 200 型扫

描电子显微镜(SEM) 观察复合材料的微观结构; 依据国家标准 GB/T 1041-92^[13], 采用 CMT6104 型微机控制电子万能试验机研究复合材料的力学性能; 采用如下方法评价所得到的材料的亲水性能和体外酶解稳定性.

取干燥至恒重的试样, 精确称重 (W_d), 25°C 条件下于 PBS(pH 7.4) 中浸泡 24 h; 取出, 吸水纸吸干, 置管底垫有吸水纸的离心机中 1000 g 离心 5 min, 称重 (W_h). 测 5 个平行样, 以公式(1) 计算^[7] 试样的吸水率 (W_a).

$$W_a = \frac{W_h - W_d}{W_d} \times 100\% \quad (1)$$

将精确称重(干燥至恒重)的试样 (W_0) 浸入胶原酶/PBS(50 U/mL, pH 7.4) 溶液中, 20 r/min 摇床 37°C 消化 4 h. 取出, 蒸馏水清洗三次. 干燥至恒重称重 (W_t). 测 3 个平行样, 以公式(2) 计算试样的酶降解率 (R_d)^[7, 14].

$$R_d = \frac{W_0 - W_t}{W_0} \times 100\% \quad (2)$$

采用 SPSS 10.0 软件作数理统计, 独立样本 t 检验, $p < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果与讨论

2.1 红外光谱分析

图 1 为不同试样的 FT-IR 图谱. 图 1a 中, 3428cm^{-1} 为胶原蛋白的酰胺 A 带, 1637cm^{-1} 为胶原蛋白的酰胺 I 带的特征峰, 1035cm^{-1} 为磷酸基的吸收峰^[14]; 在图 1b 中, 它们都出现了蓝移. 可以认为, 加入阿拉伯树胶后, 增加了胶原-羟基磷灰石体系中的 -OH 基团, 而 Ca^{2+} 很容易对其进行攻击, 形成 Ca-O 键或 O-Ca-O 键, 使 C-O 键极性增大, 化学

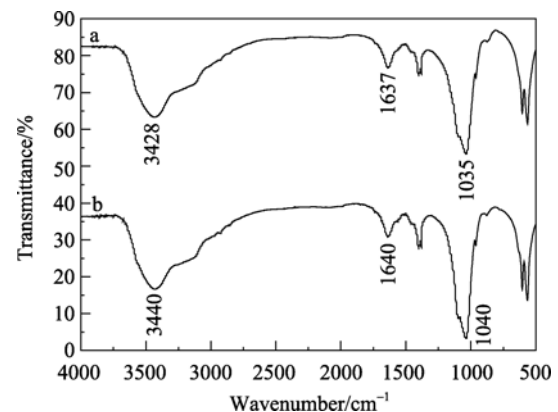


图 1 不同试样的 FTIR 图谱

Fig. 1 FT-IR spectra of different samples

a-- $w(\text{Col}):w(\text{HA})=2:8$; b-- $w(\text{Col}):w(\text{Gum A}):w(\text{HA})=1:1:8$

键增强, 而红外图谱中峰的波数与化学键强弱成正比, 振动峰向高波数移动^[15], 因此出现蓝移. 另一方面, 蛋白质的 ϵ -氨基和多糖之间存在着自发的 Maillard 反应, 可以将蛋白质与多糖耦联成一体, 形成蛋白-多糖复合物, 使蛋白质发生交联^[8]. 有证据表明^[16-17], 机体组织中, 这种蛋白-多糖复合物会随着年龄的增长而增加. 同样, 作为一种表面活性多糖, 阿拉伯树胶也可能与两性蛋白胶原或胶原-羟基磷灰石复合材料之间发生耦联作用, 形成蛋白-多糖复合物, 从而起到交联的作用.

2.2 XRD 分析

由各试样的 XRD 图谱(图 2)及表 1 可知, 随着阿拉伯树胶含量的增加, 羟基磷灰石在(002)和(202)这两个方向上的衍射峰半高宽增大, 峰高降低. 所形成的羟基磷灰石的晶粒变小, 结晶度降低.

由于在胶原与阿拉伯树胶之间的 Maillard 反应, 使胶原与胶原之间或胶原与阿拉伯树胶之间发生交联作用. 较高度度的交联, 使材料的结构致密, 不

利于羟基磷灰石的结晶^[18]. 同时, 交联也削减了胶原蛋白的 ϵ -氨基, 游离出更多的 $-\text{COO}^-$; 而且, 阿拉伯树胶的加入, 也增加了 $-\text{OH}$ 基团, 都消耗了较多的 Ca^{2+} , 而 Ca^{2+} 的减少, 降低了材料的结晶度^[18]. 因此, 当阿拉伯树胶含量高时, 复合材料中的羟基磷灰石结晶度降低, 这将对复合材料的生物降解产生一定的影响.

2.3 扫描电镜分析(SEM)

图 3 为试样的 SEM 照片. 从图中可以看出, 胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶复合材料中形成了微米级的颗粒状结构, 颗粒与颗粒之间有大量孔隙存在. 胶原-羟基磷灰石复合材料中则为光滑的界面结构.

中性条件下, 胶原能够很容易地形成 45~60nm 的胶原纤维, 形成一种网状的自组装结构, 随着胶原浓度的增加, 在它的自组装结构上还能够逐级组装成更粗更长的微纤维^[19-20]. 因此, 在胶原-羟基磷灰石的混合体系中, 随着胶原的自组装, 羟基磷灰

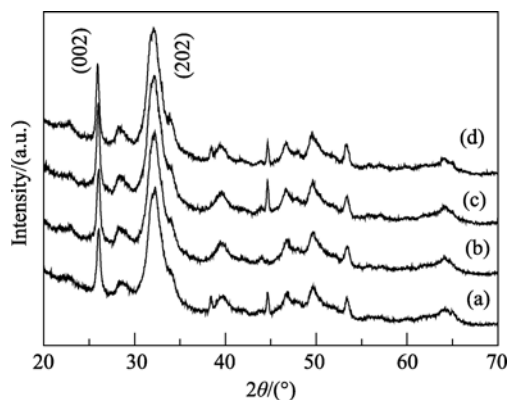


图 2 不同试样的 XRD 图谱

Fig. 2 XRD patterns of different samples

(a) $w(\text{Col}):w(\text{HA})=2:8$; (b) $w(\text{Col}):w(\text{Gum A}):w(\text{HA})=1.75:0.25:8.00$; (c) $w(\text{Col}):w(\text{Gum A}):w(\text{HA})=1:1:8$; (d) $w(\text{Col}):w(\text{Gum A}):w(\text{HA})=0.25:1.75:8.00$

表 1 试样的结晶学参数

Table 1 Crystallographic parameters of different samples

Sample		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>
002	FWHM/(°)	0.301	0.301	0.368	0.402
	Size/nm	33.8	33.8	26.5	23.8
202	FWHM/(°)	0.401	0.468	0.535	1.140
	Size/nm	24.3	20.3	17.5	7.7
Crystallinity /%		3.90	3.78	3.49	2.00

FWHM- Full Wave at Half Maximum

a-- $w(\text{Col}):w(\text{HA})=2:8$;

b-- $w(\text{Col}):w(\text{Gum A}):w(\text{HA})=1.75:0.25:8.00$;

c-- $w(\text{Col}):w(\text{Gum A}):w(\text{HA})=1:1:8$;

d-- $w(\text{Col}):w(\text{Gum A}):w(\text{HA})=0.25:1.75:8.00$

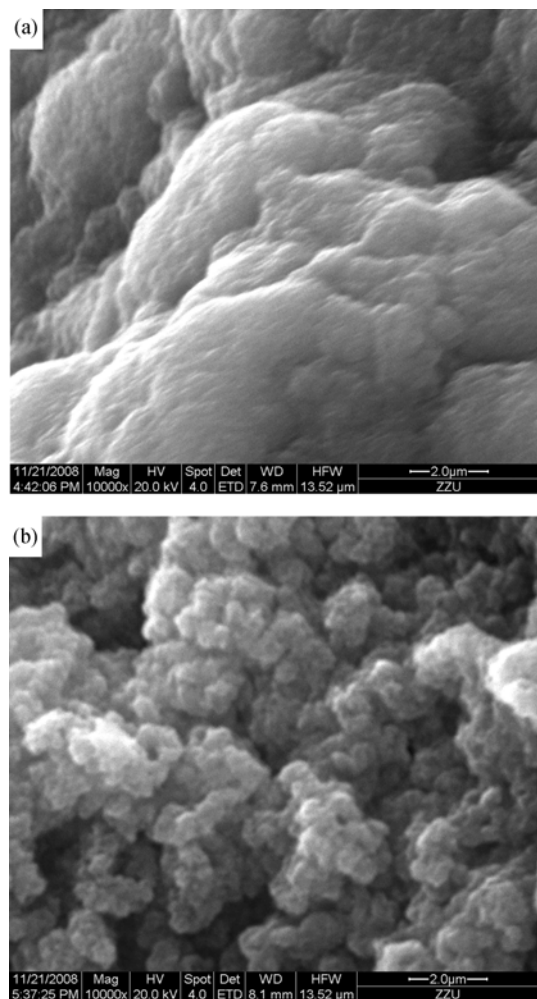


图 3 不同试样的 SEM 照片

Fig. 3 SEM images of different samples

(a)-- $w(\text{Col}):w(\text{HA})=2:8$; (b)-- $w(\text{Col}):w(\text{Gum A}):w(\text{HA})=1:1:8$

石均匀地分散在胶原基质中, 形成了良好的界面结构. 而在胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶的混合体系中, 既存在着胶原与阿拉伯树胶之间的 Maillard 反应, 也存在着胶原的自组装以形成胶原纤维, 还有羟基磷灰石晶粒的合成. 在它们的共同作用下, 胶原-阿拉伯树胶复合体将羟基磷灰石颗粒紧紧地包裹起来, 形成了细小的胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶晶粒.

2.4 力学性能

表 2 为所制备试样的力学性能. 由表 2 可知, 试样 a 与 b、c、d 压缩模量差异显著($P < 0.01$), 有统计学意义; 试样 b、c、d 彼此之间没有明显差异($P > 0.05$). 试样 a 与 c 的压缩强度差异显著($P < 0.05$), 有统计学意义. 说明随着阿拉伯树胶含量的增加, 胶原-羟基磷灰石复合材料的力学性能得以提高; 当胶原与阿拉伯树胶的含量基本相等(试样 c)时, 所制备试样的机械性能最高.

羟基磷灰石是无机晶粒, 而无无机晶粒堆积在一起只是松散的堆积体, 有机质的引入增加了它们之间的粘合. 而阿拉伯树胶的交联作用, 提高了材料界面结合能力, 结构致密. 因此, 随着阿拉伯树胶含量的增加, 胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶复合材料的机械性能随之提高.

2.5 亲水性

由表 3 可知, 向胶原-羟基磷灰石复合体系中加入阿拉伯树胶时, 其吸水性能明显降低(试样 a 与 b 之间, 试样 a 与 c 之间, 试样 a 与 d 之间, 试样 b 与 c 之间), 差异显著, 有统计学意义($P < 0.01$). 随着阿拉伯树胶含量的增多(试样 c 与 d 之间), 这种差异不再明显.

在胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶的混合体系中, 存在着胶原与阿拉伯树胶之间 Maillard 反应, 也存在着胶原的自组装以形成胶原纤维, 还有羟基磷灰

表 2 不同试样的力学性能
Table 2 Mechanical properties of different samples (n=5)

Samples	Compression modulus /MPa	Compressive strength /MPa
a	367.40±11.58*	4.053±1.076
b	934.10±31.28	4.456±1.552
c	967.40±43.85	5.768±1.276**
d	843.000±7.307	5.398±1.280

a-- w(Col):w(HA)=2:8;
b-- w(Col):w(Gum A):w(HA)=1.75:0.25:8.00;
c-- w(Col):w(Gum A):w(HA)=1:1:8;
d-- w(Col):w(Gum A):w(HA)=0.25:1.75:8.00
* $P < 0.01$ (compared with samples b, c, and d)
** $P < 0.05$ (compared with sample a)

表 3 不同试样的亲水性
Table 3 Water absorption of different samples (n=5)

Sample	Mean /%	SD /%	SE /%
a	41.76	0.4326	0.1935
b	39.91	0.4723	0.2112
c	37.53	0.7219	0.3229
d	37.34	1.179	0.5271

a-- w(Col):w(HA)=2:8;
b-- w(Col):w(Gum A):w(HA)=1.75:0.25:8.00;
c-- w(Col):w(Gum A):w(HA)=1:1:8;
d-- w(Col):w(Gum A):w(HA)=0.25:1.75:8.00
* $P < 0.01$ (compared with samples b, c, and d)
** $P < 0.01$ (compared with sample c)

石晶粒的合成等三重反应. 这些反应, 在胶原、羟基磷灰石、阿拉伯树胶之间形成交联桥, 形成了网状结构, 降低了复合材料中供液体进入的空间^[21]. 复合材料中可供小分子进入的空间越小, 其溶胀度越小, 从而降低了其吸水性. 同时, 它们之间的键合作用, 减少了材料表面的极性基团. 而极性基团的多少, 也是影响材料亲水性的一个重要因素^[4]. 因此, 当向胶原-羟基磷灰石复合材料中加入阿拉伯树胶后, 复合材料的吸水性能降低, 达到一定程度后, 其吸水率将达到平衡值.

2.6 体外酶降解性

表 4 为试样的酶降解性能. 由表 4 可知, 阿拉伯树胶的存在与否, 复合材料的体外酶解稳定性之间差异显著($P < 0.01$), 而由阿拉伯树胶含量不同所引起的差异没有统计学意义($P > 0.05$). 这是因为, 在胶原蛋白与阿拉伯树胶之间的 Maillard 反应, 使胶原与胶原之间或胶原与阿拉伯树胶之间发生交联. 而交联程度的高低也体现在试样的亲水性和酶降解性能上. 这也解释了无论是在亲水性方面还是在酶降解性能方面, 胶原-羟基磷灰石复合材料比胶原-羟基磷灰石/阿拉伯树胶复合材料更亲水, 也更容易被降解.

表 4 不同试样的酶降解性能
Table 4 Biodegradation rates of different samples (n=3)

Samples	Mean /%	SD /%	SE /%
a*	14.63	0.391	0.225
b	11.54	0.328	0.189
c	11.52	0.182	0.105
d	11.54	0.318	0.183

a-- w(Col):w(HA)=2:8;
b-- w(Col):w(Gum A):w(HA)=1.75:0.25:8.00;
c-- w(Col):w(Gum A):w(HA)=1:1:8;
d-- w(Col):w(Gum A):w(HA)=0.25:1.75:8.00
* $P < 0.01$ (compared with samples b, c, and d)

3 结论

1) 向胶原-羟基磷灰石体系中加入阿拉伯树胶, 改变了胶原-羟基磷灰石体系的界面形态与结构.

2) 随阿拉伯树胶含量的增加, 胶原-羟基磷灰石复合材料的晶粒变小, 结晶度下降.

3) 随阿拉伯树胶含量的增加, 胶原-羟基磷灰石复合材料的亲水性及体外酶降解能力显著降低 ($P < 0.01$).

4) 随阿拉伯树胶含量的增加, 胶原-羟基磷灰石复合材料的机械性能在一定范围内得到提高.

5) 阿拉伯树胶可能与胶原或胶原-羟基磷灰石形成了蛋白质-多糖复合物, 从而起到交联作用.

参考文献:

- [1] Tcacencu I, Wendel M. Collagen-hydroxyapatite composite enhances regeneration of calvaria bone defects in young rats but postpones the regeneration of calvaria bone in aged rats. *Journal of Materials Science*, 2008, **19(5)**: 2015–2021.
- [2] Fukui N, Sato T, Kuboki Y, *et al.* Bone tissue reaction of nano-hydroxyapatite/collagen composite at the early stage of implantation. *Bio-medical Materials and Engineering*, 2008, **18(1)**: 25–33.
- [3] 徐俊华, 朱丽琴, 王慧明. 纳米羟基磷灰石/Ⅰ型胶原复合人工骨组成结构及成骨活性的实验研究. *生物医学工程学杂志*, 2008, **25(3)**: 567–570.
- [4] Zhang L, Tang P, Zhang W, *et al.* Effect of chitosan as a dispersant on collagen-hydroxyapatite composite matrices. *Tissue Engineering*, 2010, **6(1)**: 71–79.
- [5] Ngiam M, Liao S, Patil A J, *et al.* The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone*, 2009, **45(1)**: 4–16.
- [6] 甘少磊, 冯庆玲. 卡拉胶/纳米羟基磷灰石/胶原可注射骨修复材料的制备与表征. *中国医学科学院学报*, 2006, **28(5)**: 710–713.
- [7] Liao S, Watari F, Zhu Y, *et al.* The degradation of the three layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane *in vitro*. *Dent. Mater.*, 2007, **23(9)**: 1120–1128.
- [8] 庄海宁, 冯涛. Maillard 反应合成蛋白质-多糖复合物及其应用. *中国食品添加剂*, 2007(6): 136–141.
- [9] Schmitt D, Tran N, Riefler S, *et al.* Toxicologic evaluation of modified gum acacia: mutagenicity, acute and subchronic toxicity. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, **46(3)**: 1048–1054.
- [10] Onishi T, Umemura S, Yanagawa M, *et al.* Remineralization effects of gum arabic on caries-like enamel lesions. *Archives of Oral Biology*, 2008, **53(3)**: 257–260.
- [11] 刘苏锐, 王坤余, 琚海燕. 猪皮 I 型胶原蛋白的提取及其结构表征. *中国皮革*, 2007, **36(7)**: 43–46.
- [12] Song E, Yeon Kim S, Chun T, *et al.* Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials*, 2006, **27(15)**: 2951–2961.
- [13] GB/T 1041-1992, 塑料压缩性能试验方法, 1993. 04. 01.
- [14] 蒋柳云, 李元宝, 张利, 等(JIANG Liu-Yun, *et al.*) 纳米羟基磷灰石/壳聚糖-羧甲基纤维素复合支架材料的研究. *无机材料学报(Journal of Inorganic Materials)*, 2008, **23(1)**: 135–140.
- [15] 陈文娟, 周丽赞, 王德平, 等. 生物玻璃的原位复合及其生物活性. *材料研究学报*, 2007, **21(06)**: 649–653.
- [16] Foerster A, Henle T. Glycation in food and metabolic transit of dietary AGEs (advanced glycation end-products): studies on the urinary excretion of pyrraline. *Biochemical Society Transactions*, 2003, **31**: 1383–1385.
- [17] Sjoberg J S, Bulterijs S. Characteristics, formation, and pathophysiology of glucosepane: a major protein cross-link. *Rejuvenation Research*, 2009, **12(2)**: 137–148.
- [18] 殷海荣, 李阳, 余森, 等. 戊二醛对羟基磷灰石/胶原复合材料性能的影响. *化工新型材料*, 2007, **35(12)**: 35–36, 62.
- [19] Banos C C, Thomas A H, Kuo C K. Collagen fibrillogenesis in tendon development: current models and regulation of fibril assembly. *Birth. Defects Res. C Embryo. Today*, 2008, **84(3)**: 228–244.
- [20] Iwasaki S, Hosaka Y, Iwasaki T, *et al.* The modulation of collagen fibril assembly and its structure by decorin: an electron microscopic study. *Archives of Histology and Cytology*, 2008, **71(1)**: 37–44.
- [21] 林晓艳, 范红松, 张兴栋. 戊二醛交联纳米羟基磷灰石/胶原复合材料作用机理研究. *四川大学学报: 自然科学版*, 2005, **42(1)**: 93–97.