



掺铜介孔生物活性玻璃的制备及其生物活性

郑玉华^a, 刘涛^{a,b}, 王莉^a, 周慧敏^a, 丁新波^a

(浙江理工大学, a.纺织科学与工程学院(国际丝绸学院); b.科技与艺术学院, 杭州 310018)

摘要: 采用溶胶-凝胶法分别以溴化十六烷基三甲铵(CTAB)、正硅酸乙酯(TEOS)、硝酸钙、铜/抗坏血酸复合物作为玻璃前驱体合成掺铜介孔生物玻璃,通过 TEM、FTIR 及氮气吸附法等测试方法表征该玻璃材料的表面形态、化学结构和理化性质,并测定不同剂量掺铜梯度对介孔生物玻璃粉体的生物活性影响。结果表明:选择不同比例的铜/抗坏血酸复合物可以获得可控的掺铜介孔生物玻璃纳米球,其中样品 1Cu-MBG、5Cu-MBG、7Cu-MBG 的孔容分别为 0.62、0.74 m³/g 和 0.78 m³/g,孔径分别为 6.91、7.28 nm 和 10.06 nm,随着 Cu 含量的增加,Cu-MBGs 样品的孔容和平均孔径均增加;所有样品颗粒均表现出较大的比表面积、孔容和孔径,且体外生物活性良好。所制备的玻璃材料有望应用于骨组织再生修复和皮肤缺损愈合。

关键词: 溶胶凝胶;介孔生物玻璃;铜;纳米球;生物活性

中图分类号: TQ127.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2021) 03-0221-06

Preparation of copper-doped mesoporous bioglass and its bioactivity

ZHENG Yuhua^a, LIU Tao^{a,b}, WANG Li^a, ZHOU Huimin^a, DING Xinbo^a

(a. College of Textile Science and Engineering(International Silk Institute);

b. Keyi College, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Copper-doped mesoporous bioglass was synthesized with sol-gel method by using cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), ethyl orthosilicate (TEOS), calcium nitrate, and copper/ascorbic acid composite as glass precursors. And TEM, FTIR and nitrogen adsorption method were used to characterize the surface morphology, chemical structure, physical and chemical properties of the glass material. The effect of different doses of copper doping gradient on the bioactivity of mesoporous bioglass powder was explored. The results showed that controllable copper-doped mesoporous bioglass nanospheres could be obtained by choosing different proportions of copper/ascorbic acid composites. The pore volume of samples 1Cu-MBG, 5Cu-MBG, 7Cu-MBG was 0.62, 0.74 and 0.78 m³/g respectively, and the pore size was 6.91, 7.28, 10.06 nm respectively. As the copper content increased, the pore volume and average pore size of Cu-MBGs samples increased. All sample particles showed large specific surface area, pore volume and pore size, with good in vitro bioactivity. The glass material prepared is expected to be further applied in bone tissue regeneration, repair and skin defect healing.

Key words: sol-gel; mesoporous bioglass; copper; nanosphere; bioactivity

0 引言

介孔生物活性玻璃(Mesoporous bioactive glass, MBG)是一种重要的无机生物活性材料,具有

优异的可降解性、生物相容性和生物活性,能诱导类骨磷灰石形成,与宿主骨骼或软组织发生化学键合,且无炎症等^[1-4]反应,可用于多种生物医学材料人体骨骼修复、创口愈合及牙科治疗,备受材料学、生物

收稿日期:2020-10-15 网络出版日期:2020-11-30

基金项目:国家自然科学基金项目(31900964);浙江理工大学科技与艺术学院科研项目(KY2019002)

作者简介:郑玉华(1995-),女,浙江衢州人,硕士研究生,主要从事现代纺织技术及新产品开发方面的研究。

通信作者:刘涛, E-mail: maggie_liu310@163.com

©1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

学及医药学界的关注^[6]。随着 MBG 的不断发展和应用,发 MBG 粉末的力学机械性能并不理想,往往用于修复非承重骨,无法用于承重骨缺损及大段骨缺损的修复,限制了其临床应用^[6]。为了改善玻璃粉末基体结构,研究人员采用不同方法制备可应用于骨修复用的二维/三维支架材料,如静电纺丝技术、冷冻干燥法和 3D 快速打印等^[7]。由于 MBG 具有相对规则的孔道结构、较为集中的孔径分布、较大的比表面积,研究学者将其用于装载药物,MBG 表现出较高的装载率,且在一定程度上具有药物缓释作用^[8]。

铜是维持人体正常生理功能所必需的微量元素,参与人体机体的体液免疫和细胞免疫,具有良好的抗菌、成骨和抗关节炎作用^[9]。铜作为组织中细胞蛋白酶合成的重要组成成分之一,能有效促进软骨形成^[10],因此,将铜掺入生物玻璃基体中以期提高生物玻璃的抗菌性能,并有效促进骨修复再生。由于传统的溶胶-凝胶法合成的掺铜生物玻璃通常采用铜盐(如硝酸铜、氯化铜)作为前驱体^[11-13],因此以 L-抗坏血酸络合物作为抗氧化剂可以防止铜离子被氧化成氧化铜^[14],在 Cu-MBGs 的合成过程中,Cu/L-抗坏血酸络合物可以在碱性环境中转化为铜离子^[15],离子化的铜基络合物可以被中孔二氧化硅基纳米颗粒牢固地吸附,从而提高了 MBGs 中铜离子的吸附量^[16]。

本文以阳离子表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)为软模板剂,结合溶胶-凝胶法,以 Cu/抗坏血酸复合物作为 Cu 前驱体溶液,制备掺铜介孔生物活性玻璃(Cu-MBGs);采用 TEM、FTIR、N₂ 吸附脱附等表征方法研究介孔生物玻璃的表面结构及理化性能,体外模拟体液浸泡 SBF 方法来观察其生物活性,以评估其体外磷灰石生成能力。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB,上海麦克林生化科技有限公司)、氯化铜($\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$,国药集团化学试剂有限公司)、无水乙醇(EtOH ,杭州高晶精细化工有限公司)、去离子水(实验室自制)、氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$,上海麦克林生化科技有限公司)、正硅酸乙酯(TEOS,上海麦克林生化科技有限公司)、四水硝酸钙($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,成都科龙化工试剂厂)、L-抗坏血酸(L-ascorbic acid,上海麦克林生化科技有限公司)、乙酸乙酯(Ethyl acetate,上海麦克

林生化科技有限公司)、浓盐酸(HCl ,杭州双林化工试剂有限公司)、氯化钠(NaCl ,杭州高晶精细化工有限公司)、碳酸氢钠(NaHCO_3 ,杭州高晶精细化工有限公司)、氯化钾(KCl ,杭州高晶精细化工有限公司)、磷酸氢二钾($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$,天津科密欧化学试剂有限公司)、氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,天津科密欧化学试剂有限公司)、无水氯化钙(CaCl_2 ,杭州高晶精细化工有限公司)、无水硫酸钠(Na_2SO_4 ,杭州高晶精细化工有限公司)和三(羟甲基)氨基甲烷(Tris,上海麦克林生化科技有限公司),以上试剂均为分析纯。

1.2 Cu/L-抗坏血酸配合物的制备

根据 Xiong 等^[14]方法制备 Cu/L-抗坏血酸配合物,将 $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶解在 50 mL 去离子水中制备 0.2 mol/L 的氯化铜水溶液,置于油浴锅中加热搅拌,搅拌均匀后逐滴添加 L-抗坏血酸(0.4 mol/L),混合物在 80 °C 搅拌下进一步反应过夜,离心处理,以去除大的聚集物和沉淀,铜/L-抗坏血酸复合物组成的上清液(Cu/L)保存于冰箱中以备用。

1.3 Cu-MBGs 的合成

微乳液辅助溶胶-凝胶法合成 Cu-MBGs 的方法参考文献^[17]。具体如下:将 0.56 g 的 CTAB 加入 26 mL 去离子水中,搅拌至完全溶解后,加入乙酸乙酯持续搅拌 30 min,加入 5.6 mL $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 继续搅拌,随后每隔 30 min 依次加入 TEOS 和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$;分别将 1.5 mL 和 7 mL 的 Cu/L 溶液加入到混合物中,反应 4 h。用去离子水、乙醇离心洗涤多次,置于 60 °C 条件下干燥 12 h,将得到的粉末置于马弗炉中,以 2 °C/min 的速度升温至 700 °C,煅烧 4 h,获得白色粉末用以后续测试分析。根据添加的 Cu/L 溶液的量,分别标记为 1Cu-MBG、5Cu-MBG 和 7Cu-MBG。

1.4 表征

1.4.1 理化特性

采用场发射扫描电子显微镜(Ultra55 型,德国 Carl Zeiss 公司)分析样品的表面形态及分散情况,加速电压 3 kV。采用透射电子显微镜(JEM-1400Flash 型,日本 Jeol 公司)观察样品内部微观结构,加速电压 120 kV。采用 X 射线粉末衍射仪(D8 discover 型,德国 Bruker AXS 有限公司)分析样品的元素组成,测试范围 2θ 为 10°~70°之间。采用傅里叶红外光谱仪(Nicolet 5700 型,美国 Thermo Electron 公司)检测样品的化学组成,将样品与 KBr

以 1:100 重量比混合,在 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 范围内进行测量。采用物理吸附仪 (ASAP2020 型,美国 Micromeritics 仪器有限公司)测定样品的比表面积和孔径分布,在 $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下对样品进行氮气吸附-脱附测试。

1.4.2 体外生物活性研究

通过颗粒浸入模拟体液 (SBF) 中来评估 Cu-MBGs 的体外磷灰石的生物活性,根据 Kokubo 等^[18]方法制备 SBF 溶液,将各个样品以 15 mg/mL 的浓度浸入 SBF 中,并在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以 90 r/min 摇动的恒温箱中保持 5 d。每隔 24 h 更换新鲜的 SBF,5 d 后收集样品并用去离子水冲洗,在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下干燥过夜,通过 SEM、FTIR 和 XRD 表征颗粒上形成的磷灰石。

2 结果与讨论

2.1 Cu-MBG 的理化性能表征

图 1 为 Cu-MBGs 的 SEM 图和 TEM 图。由图 1(a)可知,所有样品颗粒均呈球形,表面光滑,粒径较为均匀,大小在 $100\sim 300\text{ nm}$ 的范围内,与文献中类似方法合成的粒子的形态相吻合^[19-20]。Cu/L-抗坏血酸复合物添加量的多少不会显著影响颗粒的形态。由图 1(b)可知,所有颗粒均表现出树枝状结构,且孔径分布均一,内部介孔结构较为疏松;对比样品颗粒的介孔形貌,并无显著区别,表明添加 Cu/L-抗坏血酸复合物不会显著影响生物玻璃的介孔结构。

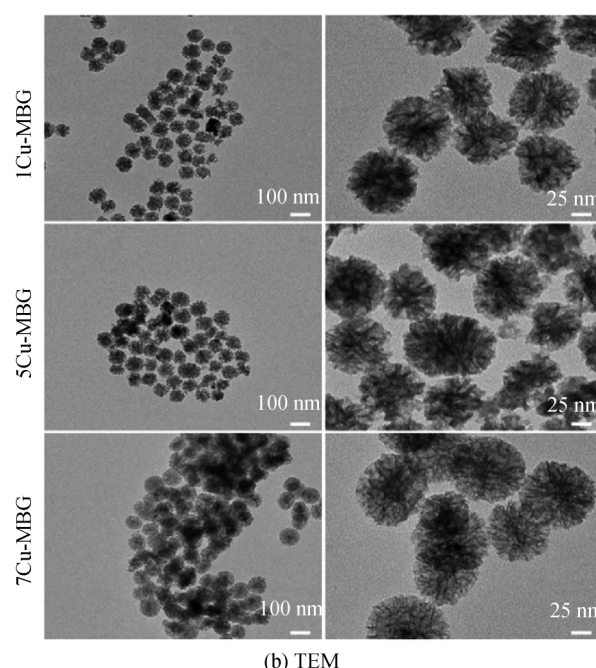
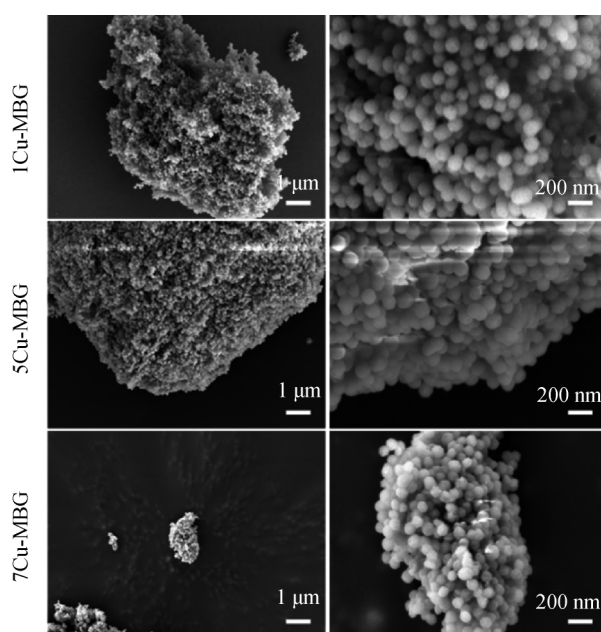


图 1 不同掺铜量的 Cu-MBGs 的 SEM 图和 TEM 图

图 2 为 Cu-MBGs 的 N_2 吸附-脱附等温线,由图 2 可知,样品曲线均为 IV 型等温线,由毛细血管凝聚引起相对压力在 $0.5\sim 1.0$ 处出现 B 型滞后回线,表明 Cu-MBGs 样品为介孔材料。图 3 中 Cu-MBGs 的孔径分布图显示,介孔的分布曲线主要呈高尖分布,Cu-MBGs 颗粒的整体孔径大小主要集中在 $3\sim 5\text{ nm}$ 范围。表 1 为 Cu-MBGs 样品的比表面积,平均孔径和孔容的相关参数,由表 1 可知,样品 1Cu-MBG、5Cu-MBG、7Cu-MBG 的比表面积分别为 379.96 、 $432.63\text{ m}^2/\text{g}$ 和 $341.70\text{ m}^2/\text{g}$,其孔容分别为 0.62 、 $0.74\text{ m}^3/\text{g}$ 和 $0.78\text{ m}^3/\text{g}$,平均孔径分别为 6.91 、 7.28 nm 和 10.06 nm 。以上结果表明,随着 Cu 含量的增加,Cu-MBGs 样品的孔容和平均孔径均有所增加。基于其介孔结构,所有样品颗粒均表现出较大的比表面积、孔容和孔径,后期有望促进药物吸附缓释。

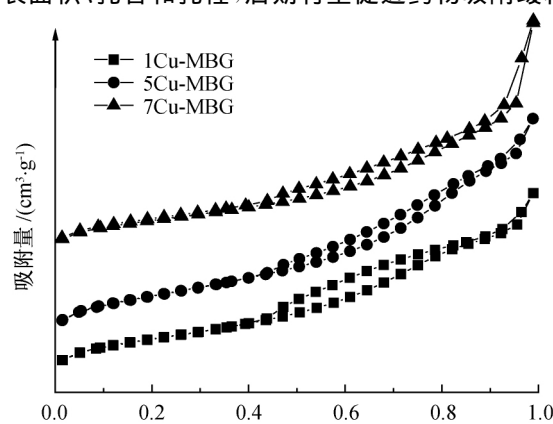


图 2 Cu-MBGs 的 N_2 吸附-脱附等温线

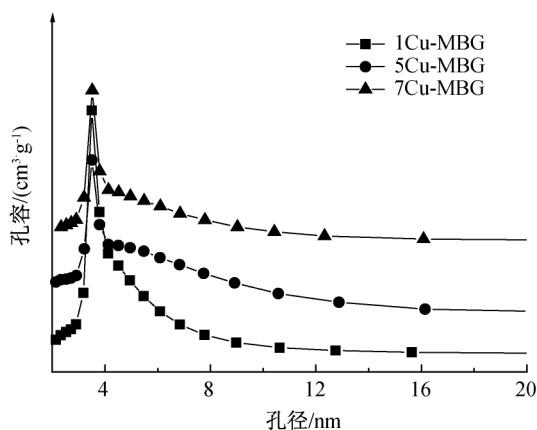


图3 Cu-MBGs的孔径分布曲线

表1 Cu-MBGs的相关结构参数

样品	比表面积/ ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	孔体积/ ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	平均孔 径/nm
1Cu-MBG	379.96	0.62	6.91
5Cu-MBG	432.63	0.74	7.28
7Cu-MBG	341.70	0.78	10.06

通过X射线衍射仪分析 $x\text{Cu-MBG}$ ($x=1, 5, 7$)的结晶相组成结果如图4所示,由图4可知,整个图谱中的衍射峰较宽,没有尖锐的特征衍射峰,表明经过高温烧结后得到的生物玻璃都是无定形态的无机材料,在 $2\theta=23^\circ$ 的位置存在一个馒头峰,经分析发现这个馒头峰对应于玻璃中二氧化硅的无定形结构,Cu/L溶液体积低于5 mL的样品中未观察到氧化铜(CuO)的特征衍射峰,表明掺入的铜离子在生物玻璃中没有形成氧化物晶体,以游离态的形式存在于生物玻璃的结构中。随着Cu含量增加,7Cu-MBG在 $2\theta=35.55^\circ, 38.73^\circ$ 和 48.76° 处出现较为明显的特征峰,对应于 CuO 的 (-111) 、 (111) 、 (-202) 晶面(JCPDS 05-0661),表明铜成功负载介孔生物骨架。

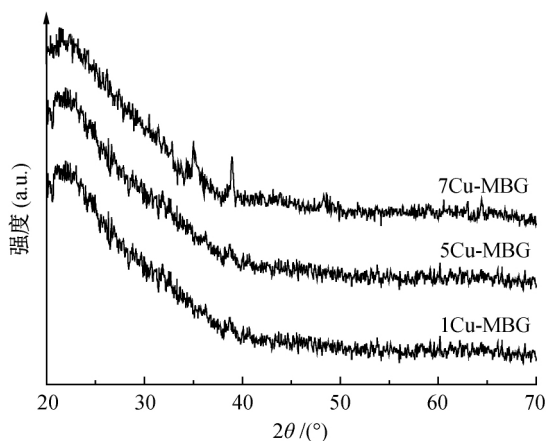


图4 Cu-MBGs的XRD图谱

图5为Cu-MBGs的FTIR图,图5显示,位于 1640 cm^{-1} 处出现明显的吸收峰为样品表面吸附的 OH ,位于 467 cm^{-1} 和 805 cm^{-1} 的两个特征峰分别为 Si-O 弯曲振动和 Si-O-Si 对称拉伸振动,而位于 $1299\sim 900\text{ cm}^{-1}$ 的特征峰为 Si-O-Si 非对称拉伸振动。随着Cu含量的增加, Si-O 弯曲振动、 Si-O-Si 对称拉伸振动和 Si-O-Si 非对称拉伸振动均无位移,说明掺杂的MBG符合生物玻璃结构特征,掺铜之后其生物玻璃基体的化学组成本身没有明显改变。

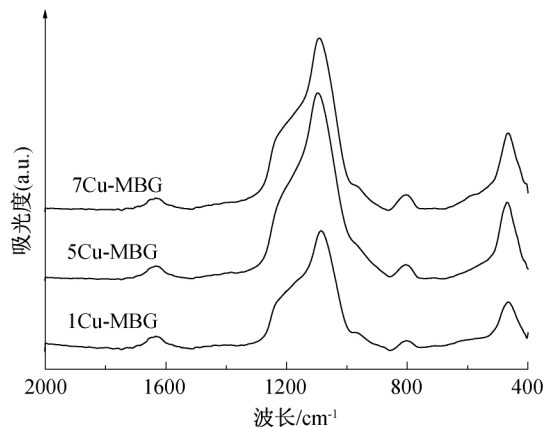


图5 Cu-MBGs的FTIR图谱

2.2 体外生物活性

图6为浸泡5 d的Cu-MBGs的XRD图谱,图6显示,1Cu-MBG、5Cu-MBG和7Cu-MBG中在 $2\theta=31.8^\circ$ 处均出现结晶性羟基磷灰石的特征衍射峰(JCPD 09-0432)对应着 (211) 晶面,表明不同掺铜量的生物玻璃都具有诱导羟基磷灰石沉积能力。不同掺铜量的生物玻璃矿化生成羟基磷灰石的能力不同,浸泡5 d后,1Cu-MBG、5Cu-MBG样品在 $2\theta=25.8^\circ, 31.8^\circ$ 和 47° 处均出现明显的羟基磷灰石特征衍射峰,对应着 (002) 、 (310) 和 (213) 晶面,而7Cu-MBG中在 $35.55^\circ, 38.73^\circ$ 和 48.76° 处出现 CuO 的特征峰,在 31.8° 出现羟基磷灰石的特征峰,且衍射峰强度相比于1Cu-MBG、5Cu-MBG有所减弱,表明掺铜量过高可能会影响羟基磷灰石层的形成,降低生物玻璃的生物活性。

图7为浸泡5 d的Cu-MBGs的FTIR图谱,由图7可知,Cu-MBGs位于 $440, 812\text{ cm}^{-1}$ 和 1043 cm^{-1} 处的特征峰,表明颗粒的玻璃骨架结构得以保留,所有颗粒均出现了新的双肩峰吸收带,分别位于 560 cm^{-1} 和 604 cm^{-1} 处,1Cu-MBG的 P-O 弯曲振动红外吸收峰相对更强,与XRD结果相一致,Cu-MBGs具有生物活性,可促进羟基磷灰石的形成。

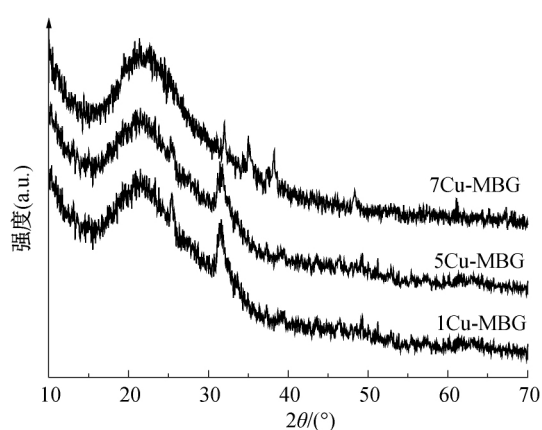


图6 Cu-MBGs样品在 SBF 浸泡 5 d 中的 XRD 图谱

图8为1Cu-和5Cu-MBGs分别在SBF中浸泡5 d的FESEM图,由图8可知,随着浸泡时间的增加,针状磷灰石晶体逐渐增多,在颗粒表面可以看到针状晶体,形成的羟基磷灰石晶体的特征形态,并且针状磷灰石晶体逐渐增多。1Cu-MBG和5Cu-MBG形成

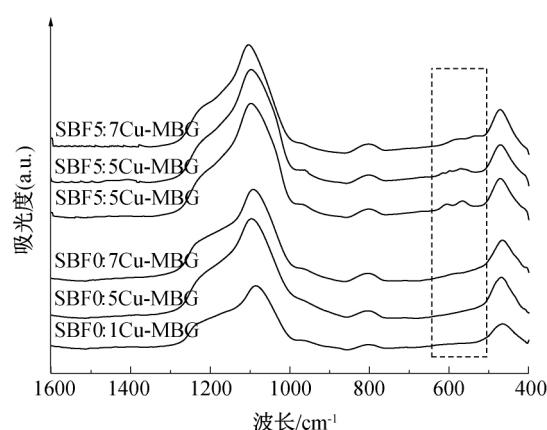


图7 Cu-MBGs浸泡 5 d 的 FTIR 图谱

的磷灰石晶体较多,7Cu-MBG羟基磷灰石减弱,其原因可能是由于经模拟体液浸泡后掺入多量的铜可能会抑制羟基磷灰石的形成。在浸入 SBF 过程中可以快速形成磷灰石,表明其具有很高的生物活性,有望于进一步用于骨组织修复及药物缓释系统。

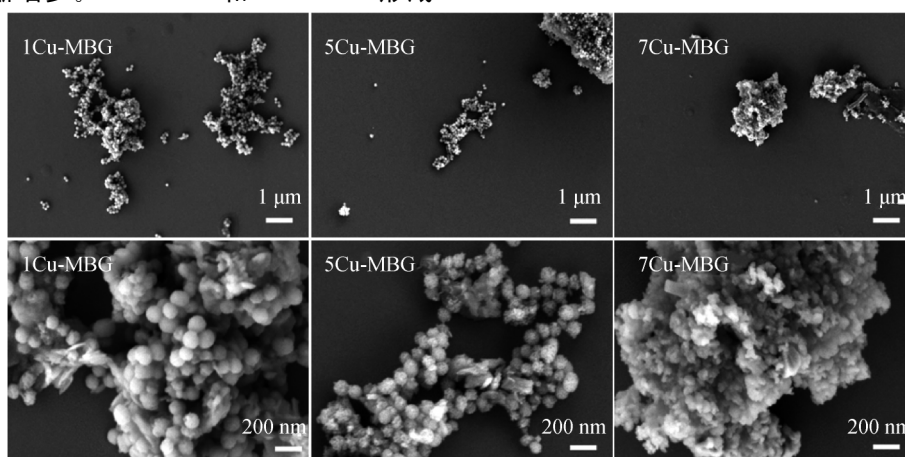


图8 浸泡 SBF 中 5 d 的 Cu-MBGs 的 FESEM 图

3 结论

本文采用溶胶-凝胶法制备掺铜介孔生物玻璃,通过改变铜/抗坏血酸复合物的加入量来调控生物玻璃中的掺铜量,并对掺铜介孔生物玻璃的生物活性进行研究,所得主要结论如下:

a) 分别选择不同比例的铜/抗坏血酸复合物前驱体溶液制备掺铜生物玻璃纳米球,随着前驱体的增加,生物玻璃中铜含量也随之增加,以达到对 Cu-MBGs 的可控掺杂。

b) 随着 Cu 含量的增加,Cu-MBGs 样品的比表面积、孔容和平均孔径均增加,Cu-MBGs 的最大比表面积为 $432.63 \text{ m}^2/\text{g}$,最大孔容为 $0.78 \text{ m}^3/\text{g}$,最大孔径为 10.06 nm ,所有样品颗粒均表现出较大的比表面积、孔容和孔径。

c) 浸泡 SBF 的生物玻璃表面长出明显的针状晶体,且存在羟基磷灰石特征峰,羟基磷灰石的生成能力较好,具有良好的生物活性。

参考文献:

- [1] Wu C T, Miron R, Sculean A, et al. Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds [J]. Biomaterials, 2011, 32(29): 7068-7078.
- [2] Zheng K, Balasubramanian P, Paterson T E, et al. Ag modified mesoporous bioactive glass nanoparticles for enhanced antibacterial activity in 3D infected skin model [J]. Materials Science and Engineering C, 2019, 103 (10): 109764.
- [3] Lalzawmliana V, Akrity A, Kumar V, et al. Potential

- of growth factor incorporated mesoporous bioactive glass for in vivo bone regeneration [J]. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2019, 91 (3): 182-192.
- [4] 康静, 骆菁菁, 熊杰. 氧化锆@生物活性玻璃/碳纳米纤维复合膜的制备及其性能[J]. *浙江理工大学学报(自然科学版)*, 2020, 43(5): 609-617.
- [5] Zhu M, Wang H X, Zhang Y J, et al. Synthesis of monodispersed mesoporous bioactive glass nanospheres for bone repair[J]. *Materials Letters*, 2016, 171(10): 259-262.
- [6] 杨立, 汪鹏生, 张浩, 等. 生物活性玻璃骨材料力学性能及成骨作用改性的研究进展[J]. *材料导报*, 2019, 33 (S2): 553-558.
- [7] 孙阳, 袁峰. 骨修复 3D 打印支架材料的研究进展[J]. *江苏医药*, 2020, 46(1): 87-91.
- [8] 朱林, 王聿栋, 董艳梅, 等. 缓释米诺环素的介孔纳米生物玻璃载药系统[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2018, 50 (2): 249-255.
- [9] Alexander H, Nusret S G, Aldo R B. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(11): 2757-2774.
- [10] Giannoulitou V, Theodorou G S, Zorba T, et al. Magnesium calcium silicate bioactive glass doped with copper ions; synthesis and in-vitro bioactivity characterization[J]. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2018, 500: 98-109.
- [11] Zheng K, Dai X Y, Lu M, et al. Synthesis of copper-containing bioactive glass nanoparticles using a modified Stöber method for biomedical applications[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, 150(2): 159-167.
- [12] Mostafa M, Shaimaa A E, Sayed H K, et al. Novel, cost-effective, Cu-doped calcium silicate nanoparticles for bone fracture intervention; Inherent bioactivity and in vivo performance [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2019, 107(2): 388-399.
- [13] 张丽香, 刘涛, 任旭, 等. 掺铜中空生物玻璃纳米球的制备及可控掺杂[J]. *浙江理工大学学报(自然科学版)*, 2019, 41(4): 433-439.
- [14] Xiong J, Wang Y, Xue Q J, et al. Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using L-ascorbic acid[J]. *Green Chemistry*, 2011, 13(4) 900-904.
- [15] Ji P, Atherton J H, Michale I P. Copper(I)-Catalyzed Amination of Aryl Halides in Liquid Ammonia [J]. *Journal of Organic Chemistry*, 2012, 77(17): 7471-7418.
- [16] Ren M M, Han Z, Li J, et al. Ascorbic acid delivered by mesoporous silica nanoparticles induces the differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes[J]. *Materials Science and Engineering C*, 2015, 56(11): 348-355.
- [17] Liang Q, Hu Q, Miao G, et al. A facile synthesis of novel mesoporous bioactive glass nanoparticles with various morphologies and tunable mesostructure by sacrificial liquid template method [J]. *Materials Letters*, 2015, 148(6): 45-9.
- [18] Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(15): 2907-2915.
- [19] 鞠凤宇, 刘涛, 张丽香, 等. 介孔镂空生物玻璃微球调控及形成机制[J]. *浙江理工大学学报(自然科学版)*, 2018, 39(2): 171-175.
- [20] Nawaz Q, Rehman M A U, Burkovski A, et al. Synthesis and characterization of manganese containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications[J]. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 2018, 29(5): 64.

(责任编辑: 廖乾生)