

# 微乳液法制备多孔中空羟基磷灰石微球的研究

薛 辉, 蔡玉荣, 姚菊明

(浙江理工大学先进纺织材料与制备技术教育部重点实验室, 杭州 310018)

**摘 要:** 以自制的纳米羟基磷灰石粉末为原料, 在明胶/水/植物油微乳体系中制得羟基磷灰石/明胶微球, 经高温烧结将明胶去除后, 得到多孔羟基磷灰石微球。采用 TEM、XRD、TG、SEM、压汞仪对产品进行了表征。结果表明: 利用本方法制得的羟基磷灰石微球尺寸较均匀, 约为  $(800 \pm 200) \mu\text{m}$ ; 该微球呈现内部多孔结构, 且孔隙率随微乳体系中明胶含量的增加而增加。当羟基磷灰石/明胶的质量比为 4:6 时, 微球出现空心现象。这种多孔且中空的羟基磷灰石微球在骨修复/填充和药物携带缓释方面具有潜在的应用前景。

**关键词:** 羟基磷灰石; 明胶; 微乳液法; 多孔的空心微球

**中图分类号:** TB383      **文献标识码:** A

## 0 引 言

羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)是人体硬组织的主要无机成分, 具有良好的生物相容性, 在临床上已广泛用于生物硬组织的修复和替换, 如口腔种植、牙槽脊增高、耳小骨替换和脊椎骨替换等<sup>[1-3]</sup>。此外, HA 具有很好的化学稳定性和极强的吸附能力, 与许多药物或蛋白都不起反应, 因此在催化剂载体、生物分离介质、重金属吸附分离介质, 尤其是在药物缓释载体等领域也受到了广泛的关注<sup>[4-8]</sup>。已有研究表明: 羟基磷灰石粉体的物相、结构、粒子大小和形貌等对其性能都有较大的影响, 当其被用作药物载体材料时, 较小的颗粒尺寸、较高的内部孔隙率和中空结构有利于增大材料的比表面积, 从而获得较高的药物负载量<sup>[9]</sup>。因此, 具有中空结构且多孔的 HA 微球被认为是一种理想的药物载体。然而, 关于中空球状 HA 制备方法的报道却较少。目前, 模板法是应用较为广泛的制备中空结构的方法之一。在该法中, 模板的形状、稳定性以及随后模板的去除是中空球制备的关键影响因素, 这种方法通常工艺复杂, 且模板的去除对壳材料的形貌和稳定性会产生较大的影响。

本文利用油包水的微乳液方法<sup>[10-12]</sup>制备 HA 微球, 通过改变 HA 与明胶质量比制备出了多孔空心的 HA 微球, 使之成为一种极具潜能的药物载体。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

明胶(gelatin, GEL, 上海申能博彩生物科技有限公司), 聚丙烯酸钠盐(poly(acrylic acid, sodium salt), PAA, SIGMA 公司),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2$  (均为分析纯, 杭州汇普化工仪器有限公司)。

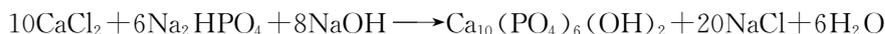
### 1.2 实验仪器

JEM-1230 型高分辨透射电镜(日本 JEOL 公司); ARL X'TRA X-射线粉末衍射仪(美国 Thermo Electron 公司); Pyris Diamond TGA(美国 PE 公司); JSM-5610LV 扫描电子显微镜(日本 JEOL 公司); Auto-

Pore IV 9500 全自动压汞仪(美国 Micromeritics 公司);JX 5024 机械搅拌器(上海申胜生物技术有限公司);KQ 3200 DB 数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司);SX2-10-13 箱式电阻炉(上海实研电路有限公司)。

### 1.3 实验过程

羟基磷灰石按照常规的湿法制备,反应方程式如下:



在室温条件下,将 1 L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  水溶液(60 mmol/L)缓慢滴加到 1 L  $\text{CaCl}_2$ (100 mmol/L)溶液中,用 1 mol/L 的 NaOH 调节溶液 pH 值为 9 左右,在搅拌条件下继续反应 6 h,再将反应体系放置在 37℃ 环境中陈化 4 d,得到 HA 沉淀,将沉淀离心洗涤三次,干燥,研磨,得到干燥 HA 粉。

取 1.2 g 干燥 HA 粉末加入到 6 mL PAA 溶液(质量分数 0.3%)中(PAA 的加入是为了改善 HA 粉末在水中的分散性),超声处理 3 min,得到分散均匀的 HA 悬浊液;向该悬浊液中添加一定量的明胶,37℃ 搅拌 7 h,得到混合均匀的浆料;室温条件下,将该浆料缓慢注入到 500 mL 植物油中,搅拌 5 min 后,将反应体系温度降至 10℃ 以下,15 min 后停止搅拌,过滤,得到 HA/GEL 复合微球。依次用丙酮和无水乙醇清洗所得微球,室温干燥。对所得复合微球进行高温烧结处理,先在 600℃ 烧结处理 2 h,随后在 1 200℃ 烧结处理 1 h,得到样品。为了研究体系中明胶含量对微球结构的影响,分别选取 HA/GEL 的质量比 4 : 4, 4 : 5, 4 : 6 和 4 : 7。

采用 X-射线粉末衍射仪对材料进行物相和结晶性分析,以  $\text{Cu K}\alpha$  射线( $\lambda = 0.154 \text{ nm}$ )为靶材,管电压 40 kV,管电流 35 mA,扫描速度为  $5^\circ/\text{min}$ ,衍射角  $2\theta = 10 \sim 70^\circ$ 。采用 JEM-1230 透射电子显微镜观察材料微观形貌。采用 Pyris Diamond TGA 测定复合微球的热失重曲线。采用 JSM-5610LV 扫描电子显微镜观察材料微观形貌。采用 AutoPore IV 9500 全自动压汞仪来测试材料的孔隙率及孔径分布。

## 2 结果与讨论

### 2.1 纳米羟基磷灰石的分析

本实验以自制的 HA 粉末为原料进行 HA 微球的合成,因此首先对自制的 HA 粉末进行了形貌和物相分析。由图 1 可知,实验中利用湿法合成的 HA 粉末呈棒状,尺寸较均匀,为  $\phi 20 \text{ nm} \times 50 \sim 100 \text{ nm}$ 。物相分析(图 2)表明:该颗粒的 XRD 曲线上的所有衍射峰均与 HA 标准卡(JCPDS09-432)中的衍射峰相符合,表明所得样品为 HA,且该颗粒具有很好的结晶度。

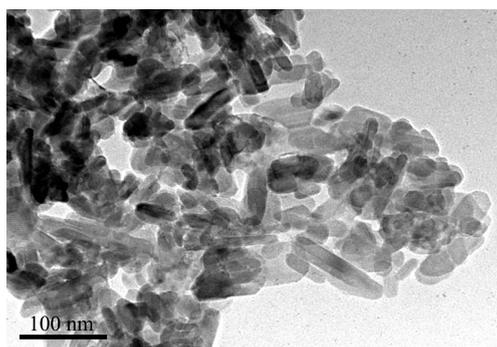


图 1 羟基磷灰石粉末的透射电镜图

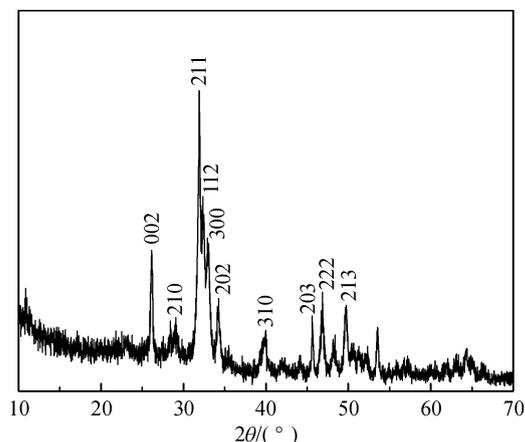


图 2 羟基磷灰石粉末的 X 射线衍射图

### 2.2 微球的制备与分析

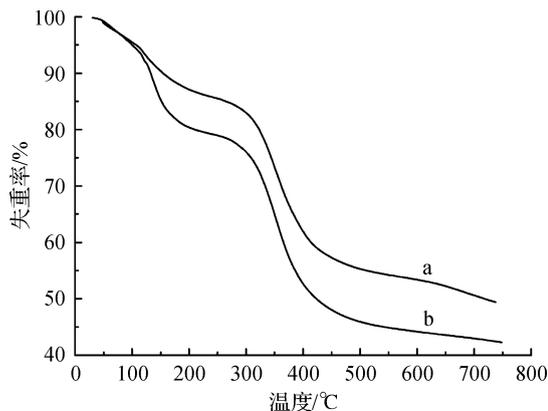
#### 2.2.1 TG 分析

图 3 为 HA/GEL 质量比为 4 : 4 和 4 : 7 的复合微球的 TG 曲线。由图 3 可以看出,该复合微球出现两个明显的失重阶段:第一个阶段是 23~200℃,此阶段是失水阶段,明胶逐渐失去了分子内部所含的水分,这个阶段两种样品的 TG 曲线形状不一致是由于复合微球中明胶的含量不同,因此所吸附的水分不同而导致的;第二个阶段是 300~600℃,在此阶段,明胶大分子多肽链开链断裂,成为小分子,并从复合物中完全脱离

逸出。在  $600^{\circ}\text{C}$  后的轻微的质量损失可能是由于 HA 在加热过程中脱羟基引起的。由于两种复合物微球中明胶含量不同,因此它们的失重率也有所差异,即随着明胶含量的增加,微球的失重率增大。因此在对微球进行热处理时,先保持较慢的升温速度升温到  $600^{\circ}\text{C}$ ,并在  $600^{\circ}\text{C}$  保温一段时间,以便于微球中的明胶能够均匀裂解逸出,保证微球的形貌完整和孔隙的连通。在明胶被彻底排除后,在较高温度继续烧结,以便于 HA 颗粒的弱结晶部分熔融搭接,提高微球的强度。

### 2.2.2 SEM 分析

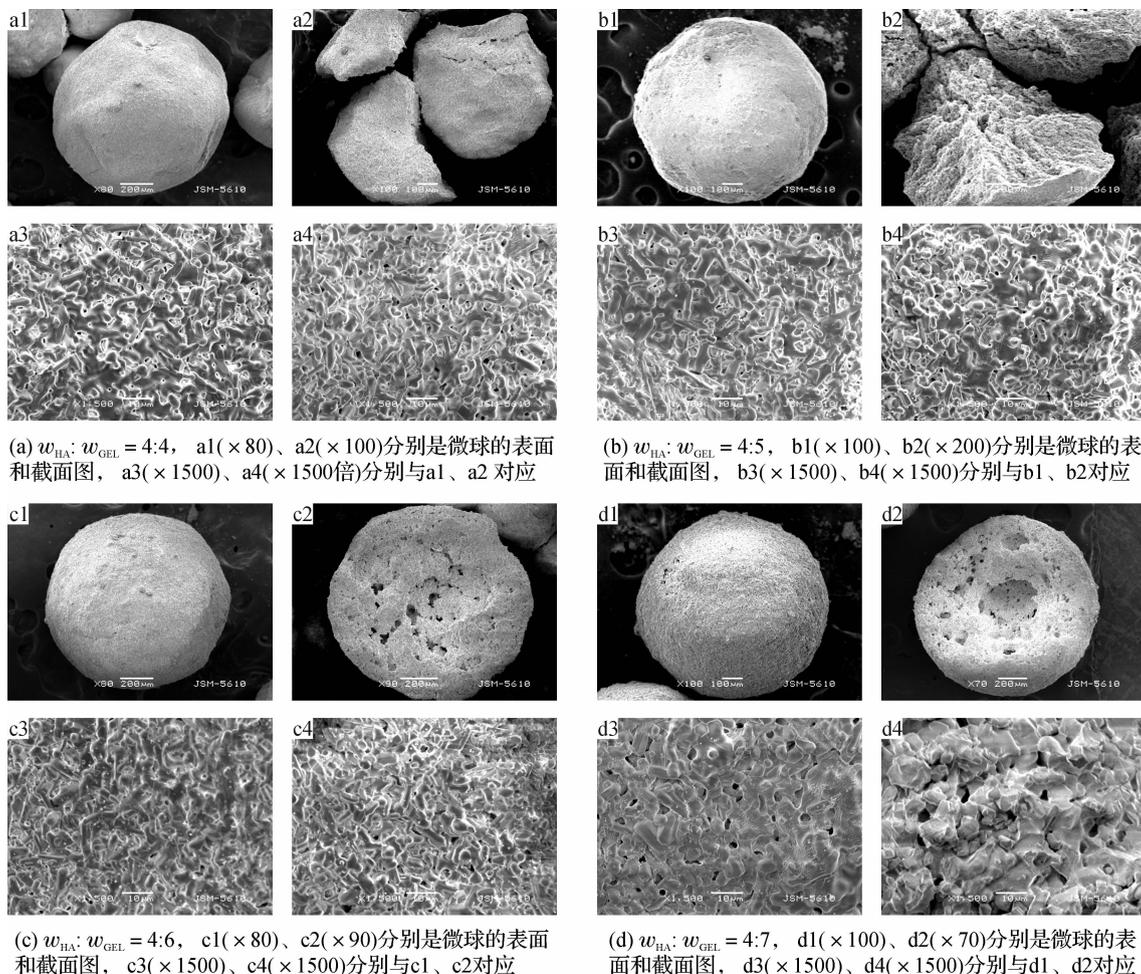
对明胶含量不同的 4 种样品进行烧结处理之后,利用 SEM 观察了微球的整体及内部形貌,结果见图 4。从图 4 可以看出,利用本方法制得的 HA 样品都呈球状,其直径约为  $600\sim 1000\ \mu\text{m}$ 。4 种 HA 微球都具有明显的多孔结构,而且其孔隙随着明胶含量的增多而增加。当  $w_{\text{HA}}:w_{\text{GEL}}$  为  $4:6$  时,微球内部出现较多较大的孔洞,且有中空现象出现;当  $w_{\text{HA}}:w_{\text{GEL}}$  为  $4:7$  时,微球内部的大孔及中空现象更加明显。与样品较为致密的表面相比,样品的内部结构较为疏松,有较多的孔洞。



a.  $w_{\text{HA}}:w_{\text{GEL}}=4:4$ , b.  $w_{\text{HA}}:w_{\text{GEL}}=4:7$

图 3 不同 HA/Gel 质量比复合微球的 TG 曲线

当  $w_{\text{HA}}:w_{\text{GEL}}$  为  $4:6$  时,微球内部出现较多较大的孔洞,且有中空现象出现;当  $w_{\text{HA}}:w_{\text{GEL}}$  为  $4:7$  时,微球内部的大孔及中空现象更加明显。与样品较为致密的表面相比,样品的内部结构较为疏松,有较多的孔洞。



(a)  $w_{\text{HA}}:w_{\text{GEL}}=4:4$ , a1( $\times 80$ )、a2( $\times 100$ )分别是微球的表面和截面图, a3( $\times 1500$ )、a4( $\times 1500$ 倍)分别与a1、a2对应

(b)  $w_{\text{HA}}:w_{\text{GEL}}=4:5$ , b1( $\times 100$ )、b2( $\times 200$ )分别是微球的表面和截面图, b3( $\times 1500$ )、b4( $\times 1500$ )分别与b1、b2对应

(c)  $w_{\text{HA}}:w_{\text{GEL}}=4:6$ , c1( $\times 80$ )、c2( $\times 90$ )分别是微球的表面和截面图, c3( $\times 1500$ )、c4( $\times 1500$ )分别与c1、c2对应

(d)  $w_{\text{HA}}:w_{\text{GEL}}=4:7$ , d1( $\times 100$ )、d2( $\times 70$ )分别是微球的表面和截面图, d3( $\times 1500$ )、d4( $\times 1500$ )分别与d1、d2对应

图 4 不同 HA/GEL 质量比的微球的扫描电镜图

明胶在较高温度下可以完全溶解于水中,在  $35^{\circ}\text{C}$  以下时会出现凝胶现象,随着温度的持续降低,凝胶态多于溶胶态,明胶开始凝固。本实验利用明胶的这种性质,在高温下制得明胶/HA 浆料,并将其分散在植物油中,形成油包水的均匀 HA/GEL 液滴,随后在较低温度环境下明胶开始凝固成形,并将 HA 纳米颗粒镶嵌在其间,得到了 HA/GEL 微球。随后的烧结后处理可将明胶全部排出,明胶占据的空间则形成了孔或贯

穿性孔道,起到了致孔剂的作用。明胶含量较高的样品出现了中空现象,这可能是由于微球中的明胶为三维网状结构,在干燥过程中,表面明胶吸附的水分挥发较快,经过一定时间的干燥后,内部水分的含量相对高于表面,这样导致了内部的空隙多于外部,因此在高温烧结过程中出现塌陷,形成了内部空心形貌。

### 2.2.3 烧结后微球的孔隙率分析

利用压汞仪对 4 种 HA 微球的孔隙率和孔径分布进行分析,结果见图 5 和表 1。表 1 可知,当复合微球中  $\omega_{\text{HA}} : \omega_{\text{GEL}}$  分别由 4 : 4、4 : 5 增加到 4 : 6 和 4 : 7 时,微球孔隙率分别从 11%、15% 增加到 23% 和 42%。可见随着微乳体系中 GEL 含量的增加,HA 微球的孔隙率有一定程度的增加。后两种样品的孔隙率有较大幅度的增加可能是由于 GEL 被烧结排除后形成的内部较大的空腔结构导致的。图 5 可见,4 个样品的孔径都存在两个分布区间,即 6~200 nm 之间和 5~90  $\mu\text{m}$  之间。在 6~200 nm 之间 4 个样品的孔径分布曲线基本重合,究其原因可能是晶粒在烧结处理时未完全溶解,所以导致微孔被保留下来,另外 100 nm 以下的孔径分布存在的两条进汞体积的积分曲线,这是由于微孔存在瓶颈所导致。4 个样品中都存在 5~90  $\mu\text{m}$  之间的孔径分布,而且随着明胶含量的提高,峰值也变大,由此可知此范围的孔洞是由于明胶烧结分解而导致的。这种多孔的结构一方面可以增大颗粒的比表面积,有利于提高蛋白、药物等成分的吸附,另一方面里外连通的孔洞可为药物的负载提供便利的通道。此外,微球的空心结构可以容纳更多的蛋白、药物,使其成为一种更加理想的药物载体。

## 3 结 论

以羟基磷灰石纳米颗粒为原材料,采用微乳液法制备了羟基磷灰石/明胶复合微球,利用明胶热分解制孔,得到多孔中空的羟基磷灰石微球,且其孔隙率和中空结构的大小可通过改变体系中明胶添加量而加以调节。与传统的模板法相比,本方法简单易行,是一种比较理想的多孔中空微球制备方法,制备的多孔中空微球在骨缺损填充和药物载体等领域具有潜在应用价值。

### 参考文献:

- [1] Oonishi H. Orthopaedic applications of hydroxyapatite[J]. Biomaterials, 1991, 12: 171-178.
- [2] Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics[J]. Journal of Artificial Organs, 2005, 8: 131-136.
- [3] Boer F C Den, Wippermann B W, Blokhuis T J, et al. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow[J]. Journal of Orthopaedic Research, 2003, 21: 521-528.
- [4] Mori K, Hara T, Mizugaki T, et al. Hydroxyapatite-bound cationic ruthenium complexes as novel heterogeneous lewis acid catalysts for diels-alder and aldol reactions[J]. Journal of the American Chemical Society, 2003, 125(38): 11460-11461.
- [5] Suen R B, Lin S C, Hsu W H. Hydroxyapatite-based immobilized metal affinity adsorbents for protein purification[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1048: 31-39.
- [6] Vitorino R, Lobo M J, Duarte J, et al. In vitro hydroxyapatite adsorbed salivary proteins[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 320: 342-346.

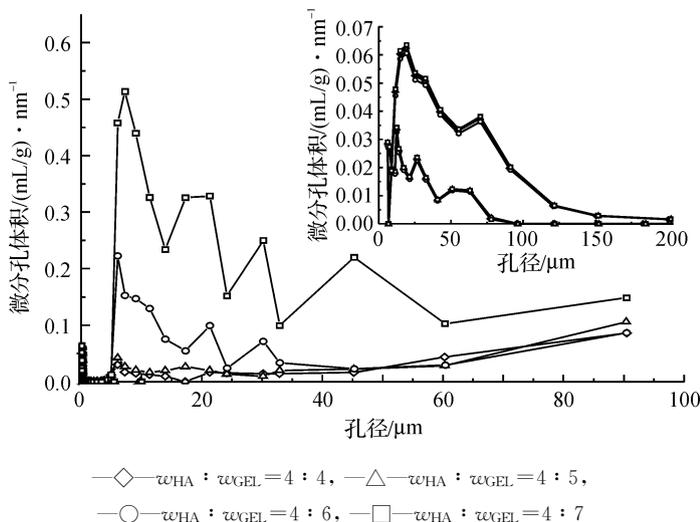


图 5 4 种微球的孔径分布

注:右上角图为孔径 0~200 nm 放大图

表 1 不同 HA/GEL 质量比的微球的孔隙率

HA 与 GEL 质量比	4 : 4	4 : 5	4 : 6	4 : 7
孔隙率/%	11	15	23	42

- [7] Lee Y J, Elzinga E J, Reeder R J. Sorption mechanisms of zinc on hydroxyapatite: systematic uptake studies and EXAFS spectroscopy analysis[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39: 4042-4048.
- [8] Cosijns A, Vervaeke C, Luyten J, et al. Porous hydroxyapatite tablets as carriers for low-dosed drugs[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007, 67: 498-506.
- [9] Hadinoto K, Zhu K, Tan R B H. Drug release study of large hollow nanoparticulate aggregates carrier particles for pulmonary delivery[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 341: 195-206.
- [10] Komlev V S, Barinov S M, Koplek E V. A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release[J]. *Biomaterials*, 2002, 23: 3449-3454.
- [11] Lee J S, Park J K. Processing of porous ceramic spheres by pseudo-double-emulsion method[J]. *Ceramics International*, 2003, 29: 271-278.
- [12] Hong S J, Yu H S, Kim H W. Preparation of porous bioactive ceramic microspheres and in vitro osteoblastic culturing for tissue engineering application[J]. *Acta Biomaterialia*, 2009, 5: 1725-1731.

## Study on Porous Hydroxyapatite Microsphere with an Internal Cavity by Emulsion Method

XUE Hui, CAI Yu-rong, YAO Ju-ming

(The Key Laboratory of Advanced Textile Materials and Manufacturing Technology  
(Zhejiang Sci-Tech University), Ministry of Education, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Using self-synthesizing hydroxyapatite as raw materials, the hydroxyapatite and gelatin composite microsphere is prepared in a gelatin/water/oil system via an emulsion method. Porous hydroxyapatite microsphere is fabricated after the gelatin is eliminated from the composite microsphere through sintering treatment. HA raw material and obtained microsphere are characterized by TEM, XRD, TG, SEM and Mercury determination. The results show that prepared HA raw materials are nanorod and HA microspheres are porous and have an average diameter of 800 nm or so. With the increase of gelatin content in the emulsion system, porosity of HA microsphere increases. An internal cavity appears in the microsphere when the weight ratio of HA and gelatin in the emulsion system reaches 4:6. These porous hydroxyapatite microspheres with an internal cavity are promising candidates for filler of skeletal defects and drug carrier.

**Key words:** hydroxyapatite; gelatin; emulsion method; porous microsphere with an internal cavity

(责任编辑: 张祖尧)