

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61L 27/40 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

C04B 35/80 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810202165.1

[43] 公开日 2009年4月15日

[11] 公开号 CN 101406711A

[22] 申请日 2008.11.4

[21] 申请号 200810202165.1

[71] 申请人 东华大学

地址 201620 上海市松江区松江新城区人民
北路 2999 号

[72] 发明人 何创龙 邱立军 徐晓红 王红声
莫秀梅

[74] 专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务所
代理人 黄志达 谢文凯

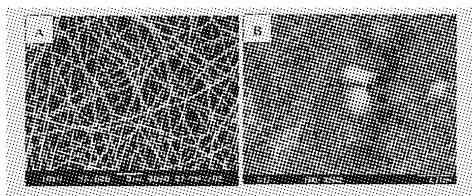
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种电沉积钙磷矿化层超细纤维骨材料的制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种电沉积钙磷矿化层超细纤维骨材料的制备方法，首先采用静电纺丝在金属电极表面制备高聚物超细纤维，并以此为电化学沉积模板，采用恒电压或恒电流沉积技术在纤维表面沉积一层富含钙、磷的骨盐成分，矿化超细纤维经 0.1 ~ 1.0 mol/L NaOH 溶液浸泡 1 ~ 24h，矿化电纺纤维在 10 ~ 40 MPa 压力下模压成块状，采用盐粒沥滤/气体发泡技术加工成孔隙率 50 ~ 90%、孔径 50 ~ 500 μm 的多孔骨材料，经冻干消毒后用于骨缺损修复。本发明所制备的多孔骨材料，具有较好的生物相容性，电化学沉积技术能够在较短的时间内制备出含有较高骨盐成分的有机-无机复合材料，制备时间短且条件温和。



1.一种电沉积钙磷矿化层超细纤维骨材料的制备方法，包括：

(1) 电纺溶液的配制：采用合适的溶剂或溶剂组合溶解聚合物，配制浓度为 6%-15% 的电纺溶液；

(2) 静电纺丝制备超细纤维：将配制的电纺溶液装入静电纺丝装置中，电纺制备聚合物超细纤维，控制电纺参数；用不锈钢电极或铂电极收集超细纤维，电极的极片和支撑部分可拆卸，电极片经抛光和清洗后使用；

(3) 电沉积溶液的配制：将 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 两种物质分别加入到去离子水中混合均匀，以氨水和盐酸调节溶液的 pH 值，得到浓度为 0.01~0.2 mol/L 的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液、浓度为 0.01~0.05 mol/L 的 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 溶液，溶液的 pH 值为 3.1~5.2；

(4) 电纺纤维的电化学沉积：以覆盖超细纤维膜的不锈钢电极为阴极、铂电极为阳极、加入电沉积溶液，恒温水浴控制电沉积温度为 30~70℃，恒电压 -1.5~-3.0V、恒电流 0.1~10 mA/cm^2 沉积，电极距离为 1.5~3cm，沉积时间为 15~120min，制备的矿化超细纤维从电极上取下冲洗干净，经 0.1~1.0 mol/L NaOH 溶液浸泡 1~24 h，使磷酸钙盐部分转化为羟基磷灰石 (HA)，清洗后于空气中晾干；

(5) 多孔骨材料的加工成型：将制备的矿化超细纤维 50-100 层叠加起来，再将粒径在 100~500 μm 摩尔比为 1: 0.5-1 的 NH_4HCO_3 和 NaCl 两种盐的混合物均匀撒布于各层纤维之间，随后置于不锈钢模具中，在室温、10~40MPa 压铸成块状，将材料置于 60~90℃ 的热水中浸泡约 5~30min， NH_4HCO_3 受热分解释放出氨气和二氧化碳从材料中逸出，在材料上形成微米级的孔径，再将块状材料置于 50~70℃ 水浴中浸泡 10~30min，最后骨材料于 -5~-20℃ 下冻干；

(6) 消毒与包装：上述制备的骨材料用双层聚乙烯薄膜封装，环氧乙烷消毒 2~4 小时后保存备用。

2.根据权利要求 1 所述的一种电沉积钙磷矿化层超细纤维骨材料的制备方法，其特征在于：所述步骤 (1) 电纺材料选自各种天然聚合物、合成聚合物中的一种或两种的复合物。

3.根据权利要求 1 所述的一种电沉积钙磷矿化层超细纤维骨材料的制备方法，其特征在于：所述的天然聚合物为天然蛋白、壳聚糖或其复合材料，天然蛋白选自胶原蛋白、弹性蛋白、明胶、丝素蛋白、纤维蛋白原、植物蛋白、透明质酸、细菌纤维素中的一种或几种；合成聚合物选自聚乙交酯、聚丙交酯、聚己内酯、聚原酸酯、聚酸酐、聚乙醇酸中的一种或几种的共聚物。

4.根据权利要求 1 所述的一种电沉积钙磷矿化层超细纤维骨材料的制备方法，其特征在于：

所述步骤(1)溶剂选自四氢呋喃、无水乙醇、乙酸、六氟异丙醇、丙酮、三氟乙醇、二氯甲烷、三氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺中的一种或几种的混合溶剂。

5.根据权利要求1所述的一种电沉积钙磷矿化层超细纤维骨材料的制备方法,其特征在于:所述步骤(2)电纺方法为采用单喷头静电纺丝、同轴共纺和混合电纺技术,制备单组分、皮-芯型、复合型超细纤维。

6.根据权利要求1所述的一种电沉积钙磷矿化层超细纤维骨材料的制备方法,其特征在于:所述步骤(2)电纺参数为电压为16.0-25KV,接收距离为15.0 cm -20.0cm,供液速率为1.2ml/h-2 ml/h,30min-1h后电极表面覆盖厚约0.1mm的左旋聚乳酸 PLLA 纤维膜,换电极另一面接收同样厚度的 PLLA 纤维膜。

7.根据权利要求1所述的一种电沉积钙磷矿化层超细纤维骨材料的制备方法,其特征在于:所述步骤(5)多孔骨材料的孔隙率控制在50~90%,孔径范围控制为50~500 μ m。

8.根据权利要求1所述的一种电沉积钙磷矿化层超细纤维骨材料的制备方法,其特征在于:所述的钙磷矿化层超细纤维骨材料内部可添加生物活性成分,包括各种治疗性药物、抗生素、生长因子、寡核苷酸、多核苷酸。

9.根据权利要求1所述的一种电沉积钙磷矿化层超细纤维骨材料的制备方法,其特征在于:所述的钙磷矿化层的主要成分为透钙磷石和羟基磷灰石。

10.根据权利要求1所述的一种电沉积钙磷矿化层超细纤维骨材料的制备方法,其特征在于:上述制备的钙磷矿化层超细纤维骨材料采用盐粒沥滤/气体发泡技术加工成多孔骨支架材料,用于临床上骨缺损修复。

一种电沉积钙磷矿化层超细纤维骨材料的制备方法

技术领域

本发明属电纺超细纤维骨材料的制备领域，特别是涉及一种电沉积钙磷矿化层超细纤维骨材料的制备方法。

背景技术

因各种原因引起的骨缺损，尤其是大范围骨缺损的治疗仍然是临床医学面临的一大难题。传统的自体或异体骨移植存在如供骨量有限、成骨能力低、易引起免疫反应和传播疾病等缺点，无法满足临床治疗的要求。

天然骨的主要成分是由胶原纤维和羟基磷灰石（HA）晶体组成的生物矿化体系。在结构上，天然骨是由胶原纤维贯穿于 HA 形成的具有复杂分级结构的有机-无机复合材料，以直径为 100~2000nm 的胶原纤维按一定的排列取向形成骨的主体构架，超细级 HA 晶体充填其间，其结晶方向沿胶原纤维的长轴分布。天然骨独特的多级结构使其具有高强度、高韧性等力学性能。因此模拟天然骨的形成机制，采用仿生方法制备成分、结构与天然骨相似的有机-无机复合骨材料一直是骨材料研究的热点。

采用与天然骨成分相近的钙、磷无机盐与高分子材料复合的方法是当前制备仿生骨材料的主要思路。如采用相分离技术和快速成型技术将 HA 和高聚物材料通过一定的制备方法加工成 HA 和高聚物的复合材料。但这种通过直接复合制备的材料只是两种材料的机械混合，难以形成无机物和有机物在分子水平上的紧密键合，只能从成分上而不能从结构上进行仿生。另一种是原位复合法，通过钙盐和磷酸盐在高聚物基体内部或表面发生化学反应直接制备 HA 与高聚物的复合材料，可克服直接复合时 HA 在高聚物基体中分散不均和复合物结构难以控制的缺点。如中国专利（申请号 01136246.4）公开了一种用于骨修复的纳米晶磷酸钙胶原基复合材料的制备方法，但这种单纯由自组装形成的复合材料力学强度偏低，难以获得广泛的临床应用，需添加新的组份以改善材料的生物学性能和力学强度。如中国专利（专利号 01141901.6、01129699.2）在自组装 nHA/胶原材料中分别加入海藻酸盐和 PLGA，制成多孔框架材料，在保留自组装材料优良生物相容性的同时，提高了材料的力学强度，具有较好的临床应用前景。

静电纺超细纤维能够模拟天然细胞外基质的超微结构，被认为是一种理想的组织替代材料。近年来，国内外不少研究尝试采用不同的方法制备有机-无机复合超细纤维骨材料。一种方法是将 HA 等骨矿成分加入到聚合物溶液中，直接电纺出 HA 复合超细纤维。这种方法虽然能够将生长因子等生物活性分子复合到材料中，但亲水的无机成分和疏水的聚合

物相容性较差，需要选用特别的溶剂或借助表面活性剂，无机成分在复合纤维中可能团聚或分散不均，无机成分的含量也由于受可纺性限制而难以提高（Kim HW, et al. J Biomed Mater Res A 2006; 79(3): 643-649.），材料的力学强度也无法达到临床应用的要求（Sui G, et al. J Biomed Mater Res A 2007; 82(2): 445-454.）；另一种方法是先电纺出聚合物超细纤维膜，再将其置于 SBF 中浸泡一段时间，使 HA 沉积在超细纤维表面制备出复合纤维膜（Chen J, et al. J Biomed Mater Res A 2006; 79(2):307-17.）。这种方法能够克服混合电纺引起的无机成分分布不均的问题，也可提高矿物成分的含量。但矿化过程需要较长的时间，容易引起复合纤维的降解，不适合生物活性成分负载。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是提供一种电沉积钙磷矿化层超细纤维骨材料的制备方法，本发明所制备的多孔骨材料，在某种程度上类似于天然骨形成过程产生的骨矿成分，具有较好的生物相容性。

本发明的一种电沉积钙磷矿化层超细纤维骨材料的制备方法，包括：

- （1）电纺溶液的配制：用溶剂和电纺材料配制浓度为 6%-15% 的电纺溶液；
- （2）静电纺丝制备超细纤维：将配制的电纺溶液装入静电纺丝装置中，电纺制备聚合物超细纤维，控制电纺参数，使制备的纤维表面均匀光滑；用不锈钢电极或铂电极收集超细纤维，电极的极片和支撑部分可拆卸，电极片经抛光和清洗后使用，确保矿化超细纤维易于从极片上分离；
- （3）电沉积溶液的配制：将适量的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 两种物质分别加入到去离子水中混合均匀，以氨水和盐酸调节溶液的 pH 值，得到浓度为 0.01~0.2 mol/L 的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液、浓度为 0.01~0.05 mol/L 的 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 溶液，溶液的 pH 值为 3.1~5.2；
- （4）电纺纤维的电化学沉积：以覆盖超细纤维膜的不锈钢电极为阴极、铂电极为阳极、加入电沉积溶液，恒温水浴控制电沉积温度为 30~70℃，恒电压-1.5~-3.0V、恒电流 0.1~10 mA/cm² 沉积，电极距离为 1.5~3cm，沉积时间为 15~120min，使生成的钙磷盐形貌均匀致密、结构有序，制备的矿化超细纤维从电极上取下冲洗干净，经 0.1~1.0 mol/L NaOH 溶液浸泡 1~24 h，使磷酸钙盐部分转化为羟基磷灰石（HA），清洗后于空气中晾干；
- （5）多孔骨材料的加工成型：将制备的矿化超细纤维 50-100 层叠加起来，再将摩尔比为 1: 0.5-1 的 NH_4HCO_3 和 NaCl 两种盐（粒径控制在 100~500 μm）的混合物均匀撒布于各层纤维之间，随后置于不锈钢模具中，在室温、10~40MPa 压铸成块状，将材料置于 60~90℃ 的热水中浸泡约 5~30min， NH_4HCO_3 受热分解释放出氨气和二氧化碳从材料中逸出，在

材料上形成微米级的孔径，再将块状材料置于 50~70℃ 水浴中浸泡 10~30min，除去残余的 NaCl 粒子，最后骨材料于 -5~-20℃ 下冻干；

(6) 消毒与包装：上述制备的骨材料用双层聚乙烯薄膜封装，环氧乙烷消毒 2~4 小时后保存备用。

所述步骤 (1) 电纺材料包括各种天然、合成聚合物及两者的复合物。

所述的天然聚合物包括胶原蛋白、弹性蛋白、明胶、丝素蛋白、纤维蛋白原、植物蛋白、透明质酸、壳聚糖、细菌纤维素等天然蛋白、多糖及其复合材料；合成聚合物包括聚乙交酯、聚丙交酯、聚己内酯、聚原酸酯、聚酸酐、聚乙醇酸及其各种共聚物。

所述步骤 (1) 溶剂选自四氢呋喃、无水乙醇、乙酸、六氟异丙醇、丙酮、三氟乙醇、二氯甲烷、三氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺中的一种或几种的混合溶剂。

所述步骤 (2) 电纺方法包括采用单喷头静电纺丝、同轴共纺和混合电纺技术，制备单组分、皮-芯型、复合型超细纤维。

所述步骤 (2) 电纺参数为电压为 16.0-25KV，接收距离为 15.0 cm -20.0cm，供液速率为 1.2ml/h-2 ml/h，30min 后电极表面覆盖厚约 0.1mm 的左旋聚乳酸 (PLLA) 纤维膜，换电极另一面接收同样厚度的 PLLA 纤维膜。

所述步骤 (5) 多孔骨材料的孔隙率控制在 50~90%，孔径范围控制为 50~500 μ m；

所述的钙磷矿化层的主要成分为透钙磷石和羟基磷灰石。

上述制备的钙磷矿化层超细纤维骨材料采用盐粒沥滤/气体发泡技术加工成多孔骨支架材料，用于临床上骨缺损修复。

本发明中涉及的电纺超细纤维是指采用医学上可接受的任何材料电纺制备的纳米、亚微米或微米级（直径0.1纳米至10微米）纤维，根据电纺加工方式的不同可获得单组份、皮-芯型、复合型等不同组成和精细结构的超细纤维。

本发明所制备的多孔骨材料，因骨盐在电化学沉积过程中具有特殊的择优取向性，在某种程度上类似于天然骨形成过程产生的骨矿成分，具有较好的生物相容性。将电化学沉积技术用于电纺超细纤维的生物矿化，能够在较短的时间内制备出含有较高矿物成分的有机-无机复合材料，由于制备时间短且条件温和，不会引起加载于超细纤维中的生物活性成分提前释放和失活。为达到治疗和加速愈合的目的，在电纺纤维中可添加各种生物活性成分，包括各种治疗性药物、抗生素、生长因子、寡核苷酸、多核苷酸等。

有益效果

(1) 本发明制备的多孔骨材料在某种程度上类似于天然骨形成过程产生的骨矿成分，具

有较好的相容性；

(2) 本发明这边的多孔骨材料具有合适孔隙结构和力学性能；

(3) 本发明制备时间短且条件温和，不会引起加载于超细纤维中的生物活性成分提前释放和失活。

附图说明

图1为制备的 PLLA 超细纤维的 SEM 形貌照片，A 为静电纺所得 PLLA 超细纤维；B 为 -2.0V 工作电压下电沉积 60min 后，形成的蜂窝状钙磷盐覆盖于纤维膜表面；

图2为实施例1中样品的 XRD 衍射谱图，A 为购买的商业化 HA 颗粒的 XRD 衍射图谱；B 为静电纺所得 PLLA 超细纤维在电解液中浸泡 60min 的 XRD 衍射图谱；C 为 PLLA 超细纤维在 -2.0V 工作电压下电沉积 60min 的后 XRD 衍射图谱。60 分钟后，谱图上 $2\theta = 11.8^\circ$ 可见明显尖锐峰，为磷酸氢钙盐的特征峰，在 25.8° 、 32° ，HA 特征峰处为不定型峰，结合 FTIR 图谱可知 60min 后生成了部分 HA。故其纤维矿化层为磷酸氢钙盐与 HA 混合盐；

图3为实施例1中样品的 FTIR 谱图，A 为购买的商业化 HA 颗粒的 FTIR；B 为静电纺所得 PLLA 超细纤维在电解液中浸泡 60min 的 FTIR；C 为 PLLA 超细纤维模板在 -2.0V 工作电压下电沉积 60min 后的 FTIR。在 $1000\sim 1100(\text{cm}^{-1})$ 其峰尖锐明显，为 PO_4^{3-} 、 H_2PO_4^- 、 HPO_4^{2-} 的吸收范围，结合 $870(\text{cm}^{-1})$ 处峰及 XRD 结果可确定含磷酸氢钙盐。在 3510cm^{-1} 处可见 HA 的羟基特征吸收峰，结合图二的 XRD 表征结果，表明钙磷层中含有部分 HA。

具体实施方式

下面结合具体实施例进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解，在阅读了本发明讲授的内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

实施例 1

- (1) 以体积比为 3:1 的氯仿/丙酮为溶剂，配制 6 % (w/v) PLLA (分子量 13 万) 电纺溶液；
- (2) 选取 $2\text{cm} \times 2\text{cm}$ 的铂电极，表面经抛光和清洗后用作电纺收集装置，在电极表面采用单喷头电纺技术制备 PLLA 超细纤维。采用 21G 注射针 (内径 0.51mm) 为喷丝头，高压静电发生器提供直流高压，微量注射泵输送电纺溶液；电纺参数为：电压为 16.0KV，接收距离为 15.0cm，供液速率为 1.2ml/h，30min 后电极表面覆盖厚约 0.1mm 的 PLLA 纤维膜，换电极另一面接收同样厚度的 PLLA 纤维膜；

- (3) 配制 100ml 电解液，其中 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液的浓度为 0.042 mol/L、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 溶液的浓度为 0.025 mol/L，溶液中钙磷比为 1.67，调节 pH 值为 4.7。以双面收集有 PLLA 纳米纤维的铂电极为阴极，另一只铂电极为阳极，使用恒电压方式进行电化学沉积；沉积条件：电压为 -2.0V，电极距离为 2.5cm，沉积时间为 60min；制备的矿化纳米纤维样品经 0.1mol/L NaOH 浸泡 2h，清洗后于空气中自然晾干备用；相同条件下制备 50 块同样尺寸的矿化纤维膜；
- (4) 将制备的 50 块矿化超细纤维多层叠加起来将含 NH_4HCO_3 和 NaCl 两种盐（粒径 200~300 μm ）组成的混合物均匀散布于各层纤维之间，随后将支架置于自制不锈钢模具中，在室温、20MPa 左右压铸成块状。块状材料采用盐粒沥滤/气体发泡技术制成多孔材料。即先将块状材料置于 80~90℃ 的热水中浸泡约 10min，再将支架置于 60℃ 水浴中浸泡 20~30min，除去残余的 NaCl 粒子，最后支架于 -20℃ 下冻干；
- (5) 制备的材料用双层聚乙烯薄膜封装，环氧乙烷消毒 2 小时后保存备用。

PLLA 超细纤维的 SEM 形貌照片见图 1。

实施例 2

- (1) 所用材料为从四川铭让生物技术有限公司购买的 I 型胶原（分子量 0.8~1.0 $\times 10^5$ ），采用六氟异丙醇为溶剂，配制浓度为 8%(w/v) 的电纺溶液；
- (2) 在铂电极上双面接收电纺胶原纤维。电纺参数为：电压为 15KV，接收距离为 10cm，供液速率为 0.8ml/h，单面电极接收时间为 30min。待电极双面均收集好胶原纤维后置于真空干燥箱中室温下抽真空 12h 除去残余溶剂；
其余同实施例 1，制备出矿化胶原多孔骨材料。

实施例 3

同实施例 1，所不同的是采用同轴共纺（coaxial electrospinning）技术在铂电极上双面制备皮-芯型电纺超细纤维。本实施例中的同轴共纺装置采用 21G 注射针为内针（内径 0.51mm，外径 0.8mm），外喷针内径为 1.6mm。内喷针口向内缩进约 5mm。皮层材料采用 10%(w/v) PLLA 电纺溶液、芯质采用添加重组人骨形态发生蛋白-2(rhBMP-2)(80~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 电纺液)的 3%PEO，分别以氯仿和无菌生理盐水为溶剂配制皮、芯层电纺溶液。同轴共纺时控制输出电压为 18KV，皮、芯层溶液的供液速度分别为 3ml/h 和 0.4ml/h，接收距离为 12cm。

其余同实施例（1），制备出多孔骨材料。

实施例 4

同实施例 1，所不同的是采用混合电纺（mixing electrospinning）技术在铂电极上双面制备胶原/PLLA 复合超细纤维。在混合电纺中，8%(w/v) I 型胶原和 10%(w/v) PLLA 溶液分别从两个喷口同时沉积到铂电极上，获得了两种材料交叉编织的复合纤维膜。电纺参数为：电压为 16KV，接收距离为 10cm，供液速率均为 1.5 ml/h。

其余同实施例（1），制备出多孔骨材料。

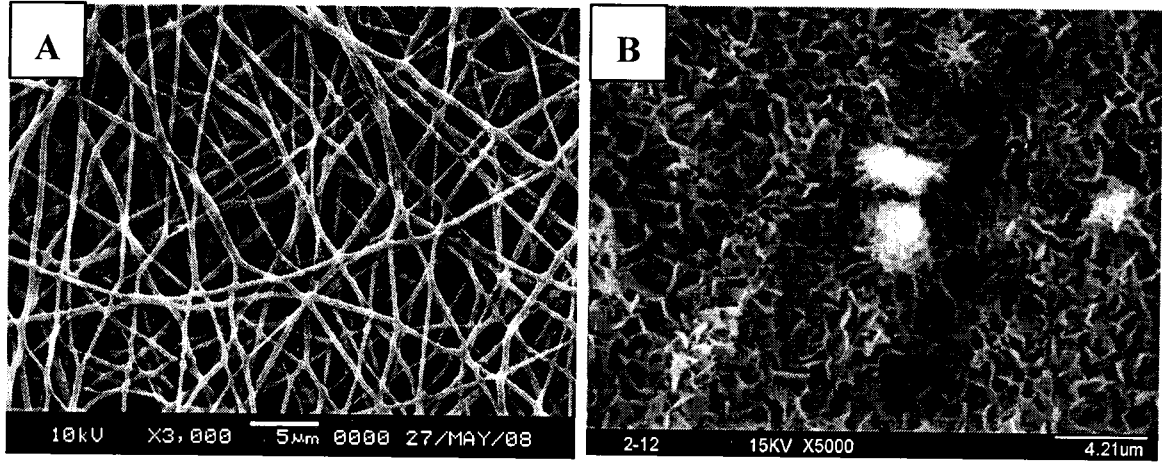


图 1

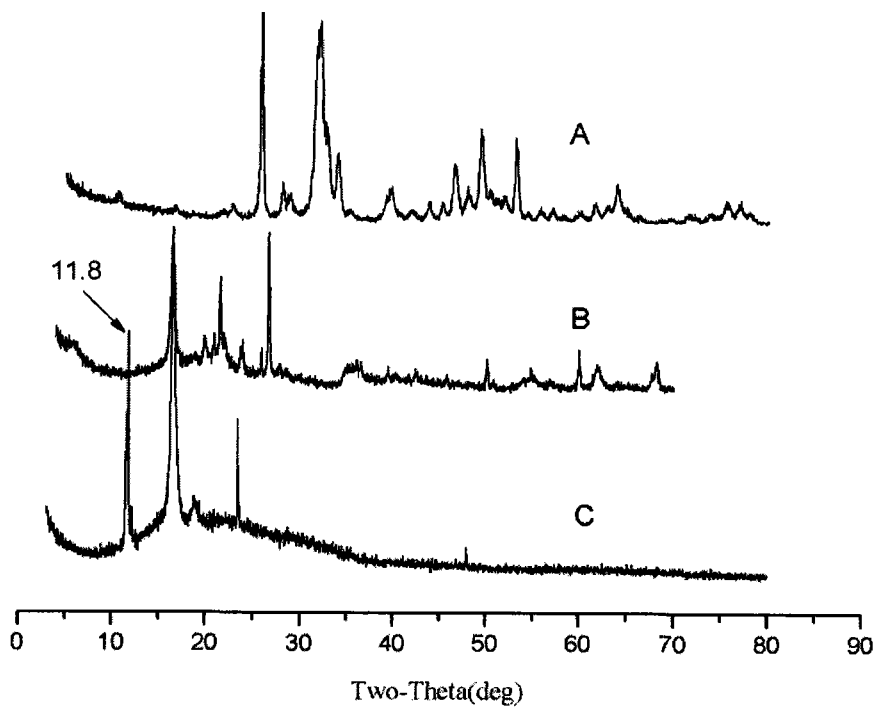


图 2

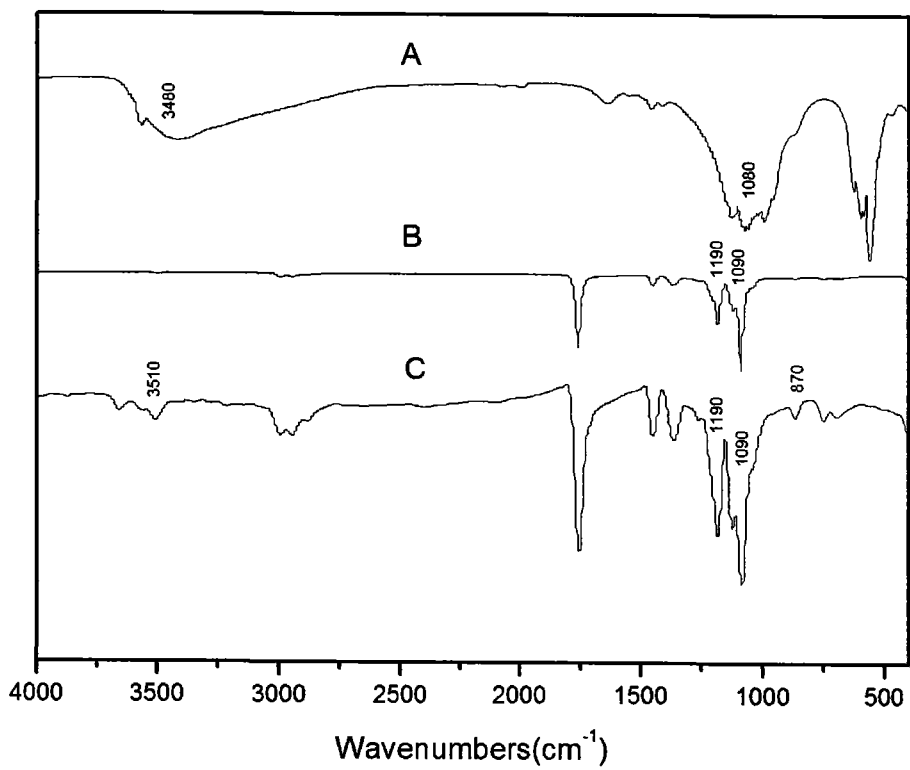


图 3