



生物矿化法制备多孔壳聚糖-聚丙烯酸-磷酸钙复合纳米微粒

陈长敬^{*}, 邓昱, 闫尔云, 胡勇^{*}, 蒋锡群^{*}

南京大学材料科学与工程系, 南京微结构国家实验室, 南京 210093;

南京大学化学化工学院高分子科学与工程系介观化学实验室, 南京 210093;

南京大学分析中心, 南京 210093

^{*} 联系人, E-mail: jiangx@nju.edu.cn; hvyong@nju.edu.cn

2008-11-10 收稿, 2009-03-02 接受

国家自然科学基金(批准号: 50603008, 50625311)、国家高技术研究发展计划(编号: 2007AA100704)和教育部高等院校创新科技工程(编号: 707028)资助项目

摘要 介绍了两种在壳聚糖-聚丙烯酸纳米微粒(CS-PAA NPs)表面进行生物矿化制备聚合物-磷酸钙复合纳米微粒(CS-PAA-CaP NPs)的方法: 氨水滴加法法和尿素热分解法. 氨水滴加法得到的复合纳米微粒形状不规则; 尿素的热分解使磷酸钙在 CS-PAA 粒子表面矿化, 获得形貌规则的复合纳米微粒. 通过动态光散射(DLS)、透射电子显微镜(TEM)、扫描电子显微镜(SEM)、热重分析(TGA)和 X-射线衍射(XRD)对由尿素热分解法得到的复合纳米微粒进行了表征. 实验结果表明, 尿素热分解矿化方法可以避免 CS-PAA 粒子在碱性环境中沉淀, 得到具有多孔结构的复合纳米粒子, 粒径约为 400~600 nm; 此复合粒子中无机成分约占 23%, 其无机成分主要以磷酸氢钙(CaHPO_4)晶体的形式存在. 该复合粒子的多孔结构有望在药物传输以及其他生物医用材料领域有广泛的应用.

关键词
生物矿化
磷酸钙
复合纳米微粒

生物矿化是制备具有复杂结构纳米复合材料的一种简单且有效的方法, 因而一直是科学家们研究的热点课题. 纳米复合材料通常具有突出的光、电、磁以及生物性能, 被广泛地应用于生物医药领域, 如造影剂以及药物载体等^[1]. 自然界中存在大量的无机盐^[2]、二氧化硅^[3]以及金属氧化物^[4]等生物矿化材料, 它们通常具备一定的尺寸和形貌, 在微观上形成有序或者无序排列的结构, 从而能发挥特殊的生理功能. 在这些材料中, 具备多种晶型的磷酸钙由于其具有良好的生物相容性和生物活性而得到了较多的研究. 磷酸钙是天然骨的主要成分, 因此在骨组织的修复和替代^[5]、组织工程药物载体^[6]以及非病毒基因传递^[7]中被广泛地应用. 但是由于其较差的可降解性和机械性能, 单独使用磷酸钙会带来一系列问题. 基于磷酸钙的一些生物复合材料, 特别是磷酸钙/聚合物复

合材料则可以克服这些缺点, 因而引起了科学家的广泛关注. 通过生物矿化作用可以方便地制备此类磷酸钙/聚合物复合材料. 一些可生物降解的高分子, 如蛋白质^[11]、多肽^[8]、胶原^[9]、多羟基烷酸酯^[10]以及壳聚糖等^[11], 被认为是进行磷酸钙生物矿化的首选基材. 这些高分子材料中的官能团通常是矿化的成核点, 能促使矿物在聚合物表面沉积, 因此具备多官能团的聚合物, 其矿化或者钙化的能力也相对较高^[12~14].

壳聚糖是一种优良的生物相容性材料^[15,16]. 薄膜状的壳聚糖及其衍生物为体外生物矿化提供了理想的模板. 曾有报道称在双膜扩散系统中, 磷酸钙可以在壳聚糖溶胶薄膜上成核结晶^[17]. 此类矿化的机理是基于成核后, 磷酸钙晶体在壳聚糖表面继续结晶生长^[18]. 壳聚糖磷酸钙复合材料具有良好的生物

引用格式: 陈长敬, 邓昱, 闫尔云, 等. 生物矿化法制备多孔壳聚糖-聚丙烯酸-磷酸钙复合纳米微粒. 科学通报, 2009, 54: 1322~1329

Chen C J, Deng Y, Yan E Y, et al. Preparation of porous chitosan-poly(acrylic acid)-calcium phosphate hybrid nanoparticles via mineralization. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0259-3

活性, 是一种理想的细胞载体材料, 可以模拟骨组织材料的生成过程^[19]。目前, 已有不少关于壳聚糖薄膜生物矿化的研究报道, 但对壳聚糖形成的纳米粒子的生物矿化却少有报道。

壳聚糖纳米粒子是一种理想的药物和基因传递载体^[20,21]。这种粒子与磷酸钙相结合, 可以在性质上实现互补, 在药物传送以及组织工程中具有潜在的应用价值。由于磷酸钙晶体一般在碱性溶液中才能获得, 而在相应的条件下, 壳聚糖粒子很容易沉淀。因而壳聚糖磷酸钙复合纳米粒子的制备并不容易实现。在前期的工作中, 我们成功地制备了能在水溶液中稳定存在的壳聚糖-聚丙烯酸(CS-PAA)纳米微粒^[16]。在该体系中, PAA具备一定的缓冲能力, 当溶液的pH值改变时, 它能够维持体系中纳米粒子的稳定性。将CS-PAA纳米粒子溶液调整为碱性后, 粒子仍然能稳定存在。如果此时溶液中同时存在钙离子和磷酸根离子, 就可形成磷酸钙纳米复合物。所得复合纳米粒子的形貌及尺寸受到多方面因素的影响, 最主要的是合成路径的选择以及溶液pH值的控制, 本文将对这一过程进行详细阐述。

1 实验

() 材料。壳聚糖(CS)购自南通双林生物制品有限公司, 经稀醋酸-氢氧化钠溶液循环纯化处理, 干燥, 测得脱乙酰度 88%(酸碱滴定法^[22])、平均分子量 200 kD (黏度法^[23]); 丙烯酸(AA)购自上海光华化学品公司, 氮气保护下减压蒸馏; 戊二醛(GA, 25%)购自Sigma; 氯化钙(CaCl_2)购自上海凌峰化学试剂公司; 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)购自北京化学品公司。

() 壳聚糖-聚丙烯酸纳米微粒(CS-PAA NPs)的制备。根据文献^[16]制备CS-PAA纳米微粒。将 0.5 g 壳聚糖溶解在 50 mL 丙烯酸溶液中(0.06 mol/L), 加热至 70 °C, 获得澄清透明的溶液。在氮气保护下, 加入一定量 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 引发聚合, 持续搅拌约 2 h后反应基本完成, 得到淡黄色悬浮液; 调整体系温度至 40 °C, 加入 0.2 mL GA(25%)对CS-PAA粒子进行部分交联。继续反应 2 h后, 对悬浮液进行过滤, 母液透析 2 天, 除去未反应的残余单体和GA, 获得CS-PAA粒子悬浮液, 粒子产率约为 80%, 并将所得粒子作为钙化的模板。

() CS-PAA 粒子的矿化。氨水滴加法: 0.5 mL (11 mg/mL) CS-PAA 粒子溶液滴加到 2 mL 水中, 再

滴加 0.9 mL CaCl_2 溶液(10 mol/L)、0.54 mL Na_2HPO_4 溶液(10 mol/L)到体系中, 磁力搅拌, 加入一定量的氨水, 得到不同 pH 的悬浮液体系。约 12 h 之后, 过滤, 透析, 除杂。

尿素热分解法: 将 2 mL CaCl_2 溶液(10 mmol/L)、1.2 mL Na_2HPO_4 溶液(10 mmol/L)、1 mL CS-PAA 粒子悬浮液混合均匀, 用 0.2 mL 盐酸调整体系的 pH 值为 2~3, 向其中加入一定量的尿素, 搅拌溶解。将混合物加热到 93 °C (尿素的分解温度), 恒温 8 h, 过滤, 透析纯化。

() 表征。动态光散射 DLS: Brookhaven BI9000AT 动态光散射仪; 所有测试重复 3 次, 取其平均值。数据结果是平均粒径 $\pm$ SD(标准偏差)。

透射电子显微镜 TEM: JEOLTEM-100; 不染色。

扫描电子显微镜 SEM: LEO1530VP 场发射扫描电子显微镜。

原子力显微镜 AFM: SPI3800。

FTIR: Bruke IFS 66V 真空型红外光谱仪; 冻干粒子和溴化钾压片。

XRD: Shimadzu XD-3A 衍射仪; 镍过滤 $\text{CuK}\alpha$ 射线(0.15418 nm); 电压和电流分别为 35 kV 和 20 mA。

XPS: V.G. Escalab MK 系统; 电压和电流分别为 15 kV 和 20 mA; C1s 信号峰(285 eV)为参考峰。

TGA: Perkin Elmer Prisma 热重分析仪; 加热速率为 20 °C/min, 氮气保护, 加热范围 25 °C 到 800 °C。

2 结果与讨论

本文分别采用氨水滴加法和尿素热分解法制备壳聚糖-聚丙烯酸-磷酸钙复合纳米微粒(CS-PAA- CaP NPs)。两种方法都是利用氨水的弱碱性, 调节壳聚糖-聚丙烯酸纳米微粒溶液的 pH 值到一定的范围, 从而实现纳米粒子的矿化。结果显示, 在两种方法中, 当溶液 $\text{pH} < 7$ 时, 用 DLS 跟踪的粒子尺寸都没有明显的变化, 说明 CS-PAA 粒子只能在碱性条件下矿化, 在弱酸性条件下则不能或者缓慢矿化。

在滴加法中, 用不等量的氨水调节溶液的 pH 值, 复合粒子粒径的变化如图 1 所示: 当 $7 < \text{pH} < 8$ 时, 复合粒子的粒径变化很小, 说明在此过程中粒子的矿化并不明显, 溶液的 pH 值不足以促使磷酸钙在 CS-PAA 粒子表面沉积。当 pH 值在 8~10 时, 粒子慢慢增大, 这种粒径的增加显然是由于磷酸钙在粒子表面的沉积引起的。同时, 由于溶液 pH 值的增大,

聚丙烯酸中的羧基大部分转变成 COO^- , 这些羧酸根离子之间的静电排斥力可使粒子涨大, 从而使测出的粒径偏大. 纯 CS-PAA 粒子的粒径变化也证实了这一点.

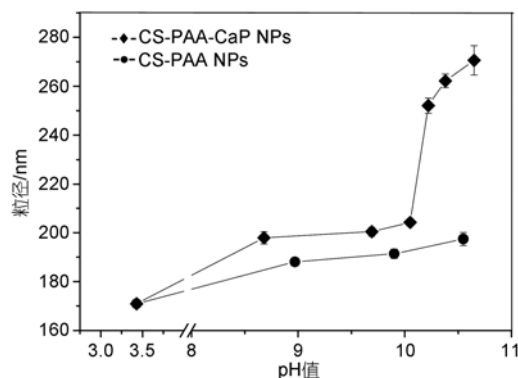


图1 氨水滴加法制备的 CS-PAA-CaP(◆)及纯 CS-PAA(●)粒子在不同 pH 值溶液中矿化的粒径变化

当 $\text{pH} > 10$ 时, 复合粒子的尺寸迅速增加到 280 nm, 这比初始值(170.9 nm)以及相应 pH 值下的 CS-PAA 粒子(~190 nm)都要大很多. 我们认为这是磷酸钙在 CS-PAA 粒子的表面沉积形成复合粒子所引起的.

为了证明这一观点, 我们用 TEM 表征了粒子的形貌和表面结构(图 2). 相同 pH 值条件下, 复合粒子(图 2(c))与氨水处理后的 CS-PAA 粒子(图 2(a), (b), pH 10)的尺寸与形貌有很大的区别, 氨水处理过的纯 CS-PAA 粒子显示有清晰的核壳结构. 根据本课题组前期的工作^[24], 这些 CS-PAA 粒子在酸性介质中具备中空结构: 质子化的壳聚糖链段成为壳层的外部, 聚丙烯酸则与壳聚糖形成复合聚电解质形成壳层内部. 当该粒子浸到碱性溶液中时, 聚电解质发生相分离, 壳聚糖由于去质子化而变得疏水, 从而进入到粒子的内部形成疏水核部分; 另一方面, 由于壳聚糖氨基的部分交联, 阻止了离子化的聚丙烯酸链全部向外部扩散, 残余的聚丙烯酸形成溶胀的壳层. 因此, CS-PAA 粒子在碱溶液中形成清晰的核壳结构, 并在表面吸附羟基使其保持稳定^[25,26]. 原子力显微镜照片同样清晰的证实了这种核壳结构的存在(图 2(b)). 而在图 2(c)中, 我们发现复合粒子的形貌不再是规则的球形, 并且表面有一些针状结晶. 此外, 在溶液中还可以发现一些游离的针状磷酸钙结晶^[27]. 这个结果表明纳米复合粒子是以 CS-PAA 为核, 以磷酸钙结晶为壳. 当氨水滴加到溶液中时, 由于局部 pH 值的

剧烈变化, CaCl_2 与 Na_2HPO_4 迅速形成磷酸盐晶体, 但是大部分晶体并不能马上覆盖 CS-PAA 粒子或进入 CS-PAA 粒子的内部, 只有很少的一部分沉积到粒子的表面形成复合物, 其他的一些晶体则游离在溶液中. 在实验中我们还发现容器底部有一些沉淀下来的磷酸钙固体. 这些结果都说明滴加法不能有效地实现粒子的矿化.

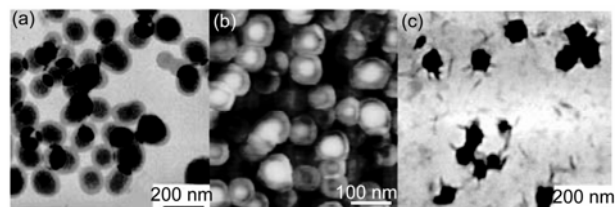
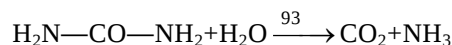


图2 氨水处理的 CS-PAA 粒子 TEM 照片(a)和 AFM 照片(b); 氨水滴加法制备的复合微粒 TEM 照片(c)

有研究表明: 体系的 pH 值对于磷酸钙的晶体结构与形貌有很大影响^[28]. 因此, 调节介质的 pH 值就成为矿化过程的一个关键因素. 如果溶液的 pH 值可控, 那么磷酸钙的结晶与沉积过程将会得到调控, 就可能制备出结构规则的纳米复合物. 众所周知, 尿素是热不稳定的, 加热到一定温度, 尿素分解产生二氧化碳和氨气^[29]:



而在溶液中, 氨形成氨水, 具有弱碱性, 因此可以用尿素作为引发剂来调控介质的 pH 值以制备人造骨仿生材料^[30]. 我们也利用尿素热分解产生氨气来调节溶液的 pH 值, 从而实现 CS-PAA 粒子的可控矿化.

当尿素、CS-PAA 纳米微粒、 CaCl_2 、 Na_2HPO_4 混合溶液被加热到一定温度后, 氨分子被持续释放到溶液中, 溶液的 pH 值也随之缓慢升高, 磷酸根离子和钙离子结合生成磷酸钙. 这个过程避免了溶液中氨的局部浓度突然变化, 从而可以使磷酸盐能够缓慢地沉积到 CS-PAA 纳米微粒的表面. 图 3 显示了这一过程中复合粒子的平均粒径和 Zeta 电位随着溶液 pH 值的变化: 当 $\text{pH} > 7$ 时, 粒径增加得非常快, 最终达到 700 nm 左右(pH 8.5), 远大于滴加法所得到的复合粒子的粒径. 显然, 通过这一方法制备的复合粒子的矿化程度更彻底. 此外, 体系的 Zeta 电位从 45 mV 降到了 -30 mV. 由于在酸性介质中 CS-PAA 粒子表面壳聚糖的质子化, 致使其表面带正电, 测出的 Zeta 电位也是正的^[16]; 当介质变为碱性, 比如 pH 8.5 时, 氨

基去质子化,且溶液中的一些羟基会吸附到粒子表面,从而使粒子表面带负电,其他文献里也有类似的报道^[25,26].因此,负的Zeta电位主要是由吸附在CS-PAA粒子表面的氢氧根与磷酸根造成的.

图4所示的是用尿素热分解法制备的复合粒子的电镜图(TEM & SEM, pH 8.5).从图中可以看到,粒子的尺寸从400 nm到600 nm不等,比DLS测出的结果略小,这是因为后者测量的是粒子在溶液中的水合粒径,比干燥状态下的粒子要略大.这些粒子呈不规则的球形形态,并且表面有多孔结构.尿素热分解是一个持续、缓慢的过程,所以溶液pH值也经历了一个持续缓慢增加的过程.在这一过程中,壳聚糖中质子化的氨基被产生的羟基慢慢中和掉,一些过剩的羟基吸附到CS-PAA粒子的表面,使得CS-PAA纳米微粒表面带有负电荷;溶液中游离的 Ca^{2+} 受静电作用被吸附到CS-PAA粒子周围,磷酸根离子又被富集的钙离子吸附,形成磷酸钙晶体.这些磷酸钙晶体作为成核点诱发无机物进一步结晶,最

终缓慢完成整个矿化过程.由于磷酸钙晶体的生长是各向异性的,所以得到的纳米复合粒子表面并不光滑,且呈多孔结构(TEM,图4(a)).图4(a)的插图也清晰显示了粒子的这种结构特征.类似的形貌同样可以从SEM图中观察到(图4(b)).SEM的放大图显示这些孔结构实际上是由多层磷酸钙晶体弯曲、叠加形成的.

有研究指出,当磷酸钙晶体具备大孔或者微孔结构时,在药物输送领域具有特殊用途^[31].在油包水乳液中可以制备多孔结构的溶胶/羟基磷灰石纳米复合物,针状羟基磷灰石纳米晶体能够规则地排列在溶胶基板的内部^[32].这些纳米复合物可以包裹一些药物以及生物大分子,比如蛋白质和生长因子等等.复合物表面的孔可以增加药物负载量,并且可以使这些药物向周围骨组织中持续释放.这些孔也可以增强细胞的增殖能力,形成新的骨组织,替代原有组织^[33].因此,我们认为,本实验中所获得的纳米复合物有可能在药物输送或者组织工程中发挥作用.

磷酸钙有多种结晶形式,包括羟基磷灰石($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAP)、透钙磷石($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 二水合磷酸氢钙, DCPD)以及 β -磷酸钙(β -TCP)等等.它们的形成主要与结晶的条件有关,比如溶液pH值和温度等.为了确定复合物中磷酸钙的成分,我们将样品进行XRD测试,所得结果如图5所示.

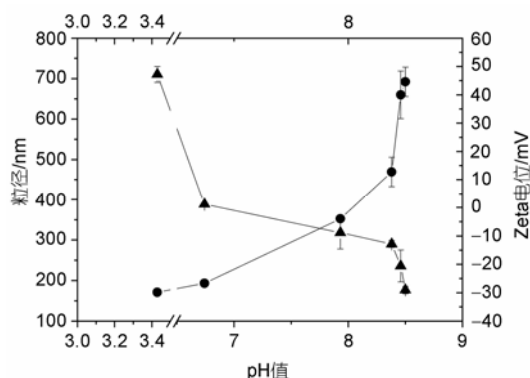


图3 尿素热分解法所得的复合微粒在矿化过程中粒径(●)和Zeta(▲)电位随pH值的变化

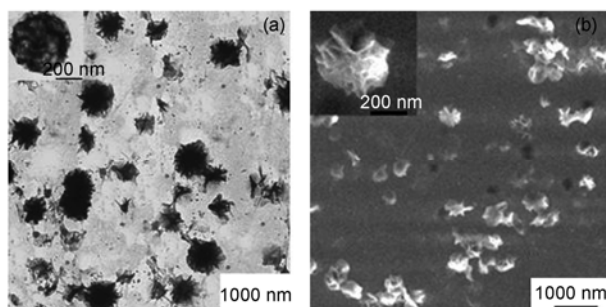


图4 尿素热分解法制得的纳米复合粒子TEM照片(a)和SEM照片(b)
左上方插图是单个微粒的放大图

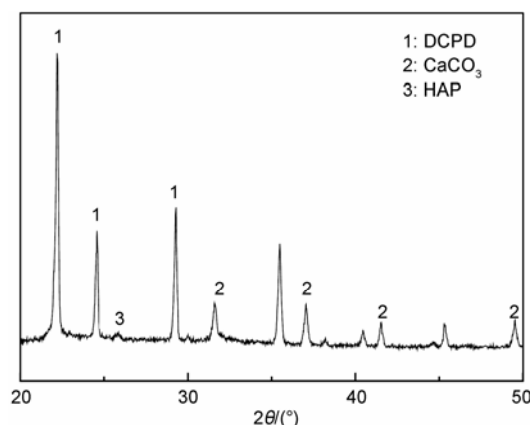


图5 纳米复合粒子的XRD衍射图

图中 22° 、 24.5° 和 29° 处的衍射峰是二水合磷酸氢钙(DCPD)的特征峰.由于这三个衍射峰强且尖锐,我们认为CS-PAA粒子外部包裹的是一层DCPD外壳.由于羟基磷灰石需要在碱性更强的条件下才能稳定

存在(pH 11~12)^[34], 而CS-PAA粒子处于一个中等的碱性环境中($8 < \text{pH} < 10$), 因此, 磷酸钙将倾向于形成DCPD晶体, 而不会向羟基磷灰石转化. 图5中, 羟基磷灰石特征衍射峰(002)几乎可以忽略, 也直接证明了产物中羟基磷灰石晶体的含量较少. 在图中同时也发现了碳酸钙的四个特征衍射峰, 这主要是由于尿素分解产生的二氧化碳引入的, 但是它们的强度要比DCPD弱得多, 因此DCPD是矿化产物的主要成分.

图6是CS-PAA粒子与尿素热分解矿化获得的复合粒子的红外谱图. 壳聚糖与聚丙烯酸的特征峰没有明显的变化, 只是略有一点位移. 聚丙烯酸基中的碳氧伸缩振动峰从 1722 cm^{-1} 移到 1683 cm^{-1} , 这是因为在碱性条件下, $-\text{COOH}$ 变成了 $-\text{COO}^-$. 1154 cm^{-1} 和 510 cm^{-1} 处新出现的两个峰是 PO_4^{3-} 的特征峰, 说明有磷酸盐的存在. 值得注意的是, 在 2500 cm^{-1} 附近本属于CS-PAA粒子中 $-\text{NH}_3^+$ 的吸收峰^[35], 在复合粒子中消失了, 说明 $-\text{NH}_3^+$ 转变成了中性 $-\text{NH}_2$. 因为晶体是在溶液中形成的, 所以这里的产物应该是 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (DCPD), 且 3300 cm^{-1} 到 3500 cm^{-1} 之间宽而强的吸收峰就是DCPD中的结晶水引起的. 1465 cm^{-1} 处的吸收峰是由碳酸根引起的, 说明复合粒子中确实有碳酸钙. 根据以上结果可以断定, 利用尿素热分解, 我们成功地制备了矿化CS-PAA-CaP纳米复合粒子.

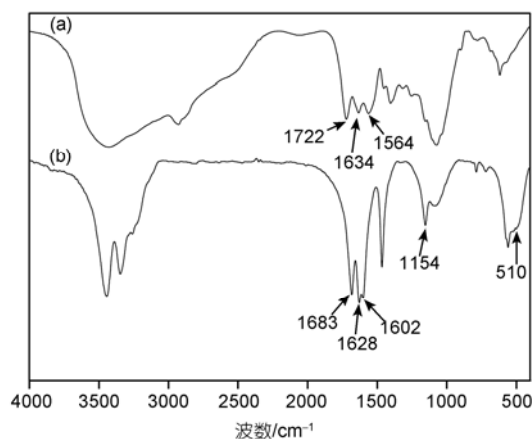


图6 CS-PAA(a)和CS-PAA-CaP(b)粒子的红外光谱

CS-PAA-CaP复合微粒中的Ca, P的比例可用X射线光电电子能谱来确定. 在图7中结合能(BE)在292 eV处的峰属于碳元素, 我们以此为基准来测定其他

元素的相对含量. 540 eV和539 eV处的两个峰属于氧元素, 分别对应氧原子在本体系中的两种结合态(壳聚糖中的 $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ 和聚丙烯酸中的 $-\text{C}=\text{O}$). 407 eV处的单峰是氨基中的氮元素的峰. Ca, P两元素的结合能分别在354 eV和140 eV处(图7的插图), 它们的比例大约是1.93:1, 比起始的加入量(1:1)要高. 这可能是由于两方面的原因造成的: (1) 反应过程中由于尿素分解产生二氧化碳, 从而引入了碳酸钙, 增加了钙的含量, 这一结果与XRD的结果相对应; (2) 因为样品接触到空气, 空气中的二氧化碳使粒子表面的一些DCPD会转化成为碳酸钙, 降低了表面磷元素的含量. 另外, XPS测量的只是物质表面元素的组成, 因而与本体的含量存在一定的偏差.

热重分析(TGA)是研究复合材料, 特别是有机-无机复合材料组成的重要手段. 图8所示的是CS-PAA-CaP复合纳米微粒的热失重曲线. 我们可以看到, 曲线上有两个失重过程, 分别对应复合粒子的两

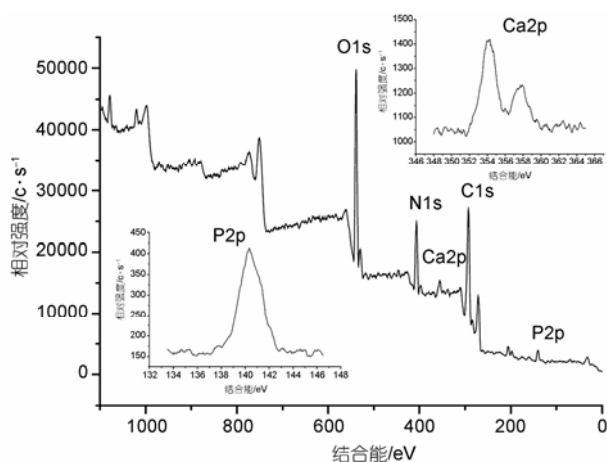


图7 复合粒子的XPS能谱

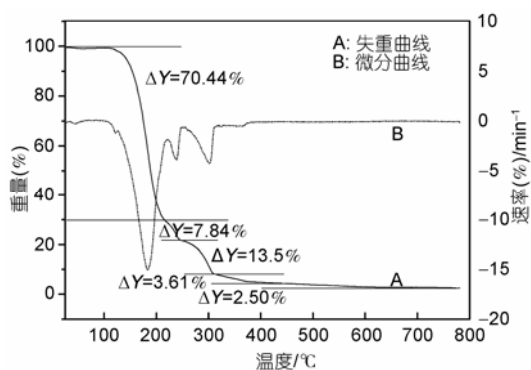


图8 CS-PAA-CaP复合纳米粒子的TGA谱图
实线部分是失重曲线, 虚线部分是复合粒子失重速率曲线

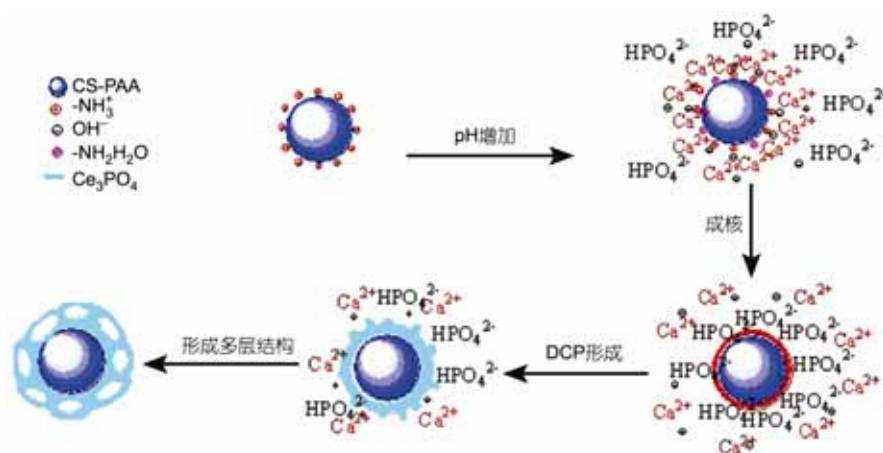


图9 CS-PAA粒子的矿化机理

个热分解过程。第一个过程集中在 100~240 之间, 主要是复合粒子失去结晶水和自由水所致。我们可以看到, 这个过程中曲线下落很快, 这是因为粒子中的主要官能团都是亲水的, 结合的水分很多。第二过程集中在 240~500 之间, 这一过程主要是高分子聚合物链的热分解。壳聚糖的热分解温度相对较低, 在 320 就开始分解^[36], 而聚丙烯酸热分解温度略高些, 约在 390^[37]。失重曲线在 250 处的失重速率突变归因于聚丙烯酸分解时会形成酸酐, 脱去一部分水^[37]。到 800 时, 有机物基本上全部分解完毕, 剩余物质以无机磷酸钙为主。

在本体系中, 我们认为CS-PAA粒子表面的矿化是一个层层吸附的过程(图9)。开始时, CS-PAA粒子悬浮液显酸性, 表面带有正电荷(图3 Zeta电位), 即粒子表面主要是壳聚糖中质子化的氨基。当体系中尿素分解, 悬浮液的pH值随之升高, $-\text{NH}_3^+$ 被 $-\text{OH}^-$ 中和形成氨基($-\text{NH}_2$), 最终在 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{OH}^-$ 之间形成电离平衡。由于 $-\text{NH}_2$ 被固定在粒子上, 因此在粒子表面形成一层 $-\text{OH}^-$ 层。 $-\text{OH}^-$ 通过静电作用又会进一步吸引溶液中的 Ca^{2+} 离子, 形成钙离子层。钙离子层又会继续吸引溶液中的磷酸根, 慢慢形成磷酸钙结晶。在一些多羟基化合物中, 比如琼脂糖表面的磷酸钙形成, 也可以用类似的机制来解释^[38]。伴随

着阴阳离子的相互吸引以及在粒子表面的沉淀, 微粒逐渐被磷酸钙层所包覆。当微粒被完全包覆后, 原来的成核点又会很快发生二次结晶, 慢慢形成多孔复杂结构, 正如TEM和SEM图中所示的那样。

关于聚丙烯酸在矿化过程中所起的作用, 尚不很明确。羧酸根对于矿化是起促进作用还是钝化作用, 文献中都有报道^[39]。并且, 羧甲基化壳聚糖只有用氢氧化钙预处理后才能进行钙化^[40]。因此, 我们认为羟基在矿化过程中起主要作用。此外, 氨基对于矿化也有一定的促进作用, 因为氨基中氮原子的孤对电子可以吸附正离子(如 Ca^{2+})形成配位化合物。

3 结论

通过氨水滴加法和尿素热分解法, 成功制备了壳聚糖-聚丙烯酸复合纳米微粒。尿素热分解制备的复合粒子矿化过程更完全, 所得的粒子形貌较为复杂, 具有多孔结构, 粒径为 400~600 nm。矿化过程的驱动力来源于CS-PAA微粒表面的一些官能团如氨基、羟基和溶液中存在的无机离子之间的相互作用, 所得复合纳米微粒的化学结构和溶液的pH值有关。因此, 控制溶液的pH值是调控矿化的一个重要因素。复合纳米微粒表面的多孔结构可以大大扩展它在骨修复、组织工程以及载药系统等医学领域的应用。

参考文献

- 1 Subburaman K, Pernodet N, Kwak S Y, et al. Templated biomineralization on self-assembled protein fibers. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 14672—14677[DOI]

- 2 Perkin K K, Turner J L, Mann S. Fabrication of hybrid nanocapsules by calcium phosphate mineralization of shell cross-linked polymer micelles and nanocages. *Nano Lett*, 2005, 5: 1457—1461[DOI]
- 3 Ma D, Li M, Mann S. Fabrication of protein/silica core-shell nanoparticles by microemulsion-based molecular wrapping. *Adv Mater*, 2004, 16: 1838—1840[DOI]
- 4 Espi R M, Qi Y, Wegner G. Surface-functionalized latex particles as controlling agents for the mineralization of zinc oxide in aqueous medium. *Chem Eur J*, 2006, 12: 118—129[DOI]
- 5 Durucan C, Brown P W. Biodegradable hydroxyapatite-polymer composites. *Adv Eng Mater*, 2001, 3: 227—231[DOI]
- 6 Barroug A, Glimcher M J. Interactions of cisplatin with calcium phosphate nanoparticles: in vitro controlled adsorption and release. *J Orthop Res*, 2001, 20: 274—280[DOI]
- 7 Kakizawa Y, Miyata K, Furukawa S, et al. Size-controlled formation of a calcium phosphate-based organic-inorganic hybrid vector for gene delivery using poly(ethylene glycol)-block-poly(aspartic acid). *Adv Mater*, 2004, 16: 699—701[DOI]
- 8 Pouget E, Dujardin E, Cavalier A, et al. Hierarchical architectures by synergy between dynamical template self-assembly and biomineralization. *Nat Mater*, 2007, 6: 434—439[DOI]
- 9 Sokolsky-Papkov M, Domb A J. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, 59: 187—206[DOI]
- 10 Ueda H, Tabata Y. Polyhydroxyalkanoate derivatives in current clinical applications and trials. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55: 501—518[DOI]
- 11 Rinaudo M. Characterization and properties of some polysaccharides used as biomaterials. *Macromolecular Symposia*, 2006, 245: 549—557[DOI]
- 12 Grassmann O, Lobmann P. Biomimetic nucleation and growth of CaCO_3 in hydrogels incorporating carboxylate groups. *Biomaterials*, 2004, 25: 277—282[DOI]
- 13 Sugawara A, Yamane S. Nanogel-templated mineralization: Polymer-calcium phosphate hybrid nanomaterials. *Macromol Rapid Commun*, 2006, 27: 441—446[DOI]
- 14 Schmidt H T, Gray B L, Ostafin A E. Assembly of aqueous-cored calcium phosphate nanoparticles for drug delivery. *Chem Mater*, 2004, 16: 4942—4947[DOI]
- 15 Murugan R, Ramakrishna S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. *Biomaterials*, 2004, 25: 3829—3835[DOI]
- 16 Hu Y, Jiang X Q, Ding Y, et al. Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles. *Biomaterials*, 2002, 23: 3193—3201[DOI]
- 17 Ehrlich H, Krajewska B, Hanke T, et al. Chitosan membrane as a template for hydroxyapatite crystal growth in a model dual membrane diffusion system. *J Membr Sci*, 2006, 273: 124—128[DOI]
- 18 Aimoli C G, Torres M A, Beppu M M. Investigations into the early stages of "in vitro" calcification on chitosan films. *Mater Sci Eng C*, 2006, 26: 78—86[DOI]
- 19 Yokogawa Y, Nishizawa K, Nagata F, et al. Bioactive properties of chitin/chitosan-calcium phosphate composite materials. *J Sol-Gel Sci Technol*, 2001, 21: 105—113[DOI]
- 20 Hu Y, Ding Y, Chen Y, et al. Hollow chitosan/poly(acrylic acid) nanospheres as drug carriers. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 1069—1076[DOI]
- 21 Mao H Q, Roy K, Troung-Le V L, et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Controlled Release*, 2001, 70: 399—421[DOI]
- 22 Pourjavadi A, Mahdavinia G R, Zohuriaan-Mehr M J, et al. Modified chitosan. I. optimized cerium ammonium nitrate-induced synthesis of chitosan-graft-polyacrylonitrile. *J Appl Polym Sci*, 2001, 88: 2048—2054[DOI]
- 23 Qurashi M T, Blair H S, Allen S J. Studies on modified chitosan membranes .1. Preparation and Characterization. *J Appl Polym Sci*, 1992, 46: 255—261[DOI]
- 24 Hu Y, Jiang X Q, Ding Y, et al. Core-template-free strategy for preparing hollow nanospheres. *Adv Mater*, 2004, 16: 933—937[DOI]
- 25 Liu F T, Eisenberg A. Preparation and pH triggered inversion of vesicles from poly(acrylic acid)-block-polystyrene-block-poly(4-vinyl pyridine). *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 15059—15064[DOI]
- 26 Luo L B, Eisenberg A. One-step preparation of block copolymer vesicles with preferentially segregated acidic and basic corona chains. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41: 1001—1004[DOI]
- 27 Teng S H, Chen L J, Guo Y C, et al. Formation of nano-hydroxyapatite in gelatin droplets and the resulting porous composite microspheres. *J Inorg Biochem*, 2007, 101: 686—691[DOI]

- 28 Shkilnyy A, Friedrich A, Tiersch B, et al. Poly(ethylene imine)-controlled calcium phosphate mineralization. *Langmuir*, 2008, 24: 2102—2109[DOI]
- 29 Boschini F, Robertz B, Rulmont A, et al. Preparation of nanosized barium zirconate powder by thermal decomposition of urea in an aqueous solution containing barium and zirconium, and by calcination of the precipitate. *J Eur Ceram Soc*, 2003, 12: 3035—3042[DOI]
- 30 Song J, Saiz E, Bertozzi C R. A new approach to mineralization of biocompatible hydrogel scaffolds: An efficient process toward 3-dimensional bonelike composites. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 1236—1243[DOI]
- 31 Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 2005, 26:5474—5491[DOI]
- 32 Teng S, Chen L J. Formation of nano-hydroxyapatite in gelatin droplets and the resulting porous composite microspheres. *J Inorg Biochem*, 2007, 101: 686—691[DOI]
- 33 John A, Abiraman S, Varma H K, et al. Bone growth response with porous hydroxyapatite granules in a critical sized lapine tibial-defect model. *Bull Mater Sci*, 2002, 25: 141—154[DOI]
- 34 Rusu V M, Ng C H. Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic-in organic composite materials. *Biomaterials*, 2005, 26: 5414—5426[DOI]
- 35 Nam S Y, Lee Y M. Pervaporation and properties of chitosan poly(acrylic acid) complex membranes. *J Membr Sci*, 1997, 135: 161—171[DOI]
- 36 Hong P Z, Li S D, Ou C Y. Thermogravimetric analysis of chitosan. *J Appl Polym Sci*, 2007, 105: 547—551[DOI]
- 37 Greenberg A R, Kamel I. Kinetics of anhydride formation in poly(acrylic acid) and its effect on properties of a PAA-alumina composite. *J Polym Sci*, 1977, 15: 2137—2149
- 38 Kaneko T, Ogomi D, Mitsugi R, et al. Mechanically drawn hydrogels uniaxially orient hydroxyapatite crystals and cell extension. *Chem Mater*, 2004, 16: 5596—5601[DOI]
- 39 Chirila T V, Zainuddin. Calcification of synthetic polymers functionalized with negatively ionizable groups: A critical review. *Reactive & Functional Polymers* 2007, 67:165—172[DOI]
- 40 Kawashita M, Nakao M, Minoda M, et al. Apatite-forming ability of carboxyl group-containing polymer gels in a simulated body fluid. *Biomaterials*, 2003, 24: 2477—2484[DOI]