

多孔 β -磷酸三钙骨修复材料的体外测试^{*}

王士斌^① 翁连进^① 郑昌琼^② 冉均国^②

(^① 华侨大学化工学院, 泉州 362011; ^② 四川大学高新技术研究院, 成都 610065)

摘要 通过对骨修复材料进行化学分析, X 光电子能谱、X 射线衍射光谱、扫描电子显微仪、原子吸收光谱仪和电子万能试验仪的测试, 以及溶血、急性毒性和热源的试验等, 测定和评价多孔 β -磷酸三钙骨修复材料的化学组成、物理性能、力学性能和生物安全性. 结果表明: 该材料为单相 β -磷酸三钙, Ca/P 值为 1.50, 平均孔隙率为 42.3%, 抗压强度为 3.41 MPa, 大孔孔径为 400 μm 左右, 小孔孔径为 5 μm 左右. 材料在生理盐水中有一定的微量溶解, 溶血、急性毒性和致热源性均在安全范围内. 该材料可用于修复松质骨缺损, 有利于与可诱导成骨物质复合, 形成复合式杂化人工骨.

关键词 β -磷酸三钙, 理化性能, 生物安全性, 力学性能, 多孔, 生物陶瓷, 人工骨

分类号 TQ 174.758; TQ 174.1

人工合成的骨修复材料必须具备良好的理化性能、力学性能和生物安全性^[1]. 我们用新的粉末制备工艺和适应的成型与烧结工艺, 制得了可用于松质骨修复的多孔 β -磷酸三钙生物陶瓷^[2]. 本文报道对用作骨修复材料的多孔 β -磷酸三钙生物陶瓷的 Ca/P 值、物相、结构形貌、孔径尺寸、溶解度、抗压强度、孔隙率, 以及溶血程度、急性毒性和致热源性等的结果.

1 材料与方法

1.1 材料

多孔 β -磷酸三钙生物陶瓷(β -TCP), 自制^[2].

1.2 分析方法

1.2.1 化学分析 Ca 的含量用 EDTA 容量法测定, P 的含量用磷钼酸喹啉重量法测定.

1.2.2 XPS 分析 用 NP-1 光电子能谱测定 β -TCP 的 Ca/P 值, Mg 靶.

1.2.3 物相分析 用 D/max- 型 X-射线衍射分析仪(XRD)进行物相测试分析, 铜靶.

1.2.4 结构分析 观察 β -TCP 的孔径大小和微观形貌. 样品喷金处理后, 用日立 X-650 型扫描电子显微仪(SEM)分析.

1.2.5 孔隙率测定 根据 Archimedeon 原理, 采用排水称重法测定.

1.2.6 抗压强度测定 用 AG-10TA 电子万能材料试验机测验.

1.2.7 生理注射液中溶解度测定 β -TCP 在生理盐水中溶解析出的 Ca 元素, 用 PE 公司

的 PE 3030 型原子吸收光谱仪进行分析测定, 检测灵敏度为 $0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

1. 2. 8 溶血试验 (1) 新鲜稀释兔血的制备. 抽取 10 mL 新西兰兔血(雄性, 2.5 kg), 加入 0.5 mL, 质量分数为 0.02 的草酸钾, 每 8 mL 兔血稀释入 10 mL 生理盐水. (2) 在 0.2 mL 兔血样本中加入 10 mL 蒸馏水, 用 745 型分光光度计进行测量(波长为 540 nm), 其吸光度为 0.67. 若符合要求, 则标准的吸光度应在 0.8 ± 0.5 范围内. (3) 将 5 g 试验材料(p- β -TCP)切割成 5 mm 大小, 分别浸泡于 10 mL 生理盐水试管内, 在 37℃ 水浴中维持 30 min. 水浴后, 加入 0.2 mL 经稀释的兔血, 缓慢混合, 于 37℃ 水浴中维持 60 min. 阴性对照是通过 10 mL 生理盐水加入 0.2 mL 经稀释的兔血; 阳性对照是 0.2 mL 稀释的兔血加入 10 mL 蒸馏水, 轻轻振动, 使之 100% 溶血. 对照试验需要 3 只试管. 在离心速度为 $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下, 将所有试管离心 5 min. 取上层清液, 于波长 540 nm 测量吸光度, 每种材料取 3 次试验的平均值.

1. 2. 9 急性毒性试验 (1) p- β -TCP 粉末经高压灭菌, 称取 12 g 试样, 加蒸馏水 16 mL, 每毫升内含 0.75 g 样品浸出物. 将样品浸泡 4 h, 并经常搅拌, 经 48 h 后用滤纸过滤, 得提取液. (2) 选用健康成年的昆明小鼠 30 只, 体重 25 g, 对每只小鼠用 0.5 mL 提取液灌胃(相当于每千克动物重量给受药量为 15 g), 观察 7 d. (3) 阴性对照选用蒸馏水 0.5 mL 进行灌胃.

1. 2. 10 热源试验 (1) 提取液的制备. 将 p- β -TCP 粉末高压消毒, 用无热源生理盐水配制成质量分数为 0.05 的悬浊液, 在 37℃ 下保持 1 h. (2) 实验动物. 健康成年中国家兔 3 只, 体重为 1.8~2.2 kg. (3) 试验方法. 用肛温计测家兔体温, 每只家兔测 2 次, 每隔 1 h 测 1 次, 以 2 次体温平均值为家兔正常体温. 正常体温测试 10 min 后, 自耳静脉缓慢注入试验材料提取液, 每千克动物重量给受剂量为 10 mL, 液体温度 37℃. 注射后每隔 1 h 测体温 1 次, 共测 3 次, 以 3 次体温中最高一次减去正常体温为该兔体温的升高度数.

2 结果与分析

2.1 XPS 分析与化学分析

XPS 测得的 p- β -TCP 块体的 Ca 和 P 的原子质量分数是 Ca 为 0.661, P 为 0.339, 所以 Ca/P 值为 1.51; 而化学分析结果的 Ca/P 值为 1.50. 因此, p- β -TCP 的 Ca/P 值与化学计量值是一致的.

2.2 XRD 分析

p- β -TCP 的 XRD 图谱特征值(d')与 ASTM (9-169) 标准值(d)对照见表 1. 表 1 表明样品为 β -TCP, 且图谱中无杂相峰存在.

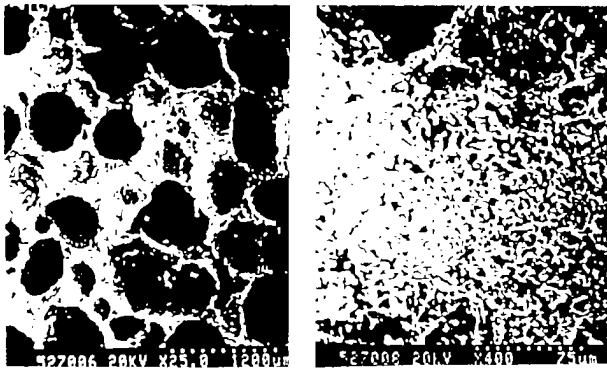
表 1 p- β -TCP 的 XRD 图谱特征值与 ASTM (9-169) 标准值对照

2.3 SEM 分析

图 1 是 p- β -TCP 的 SEM 照片. 图 1(a) 是放大 25 倍条件下, 观察其“宏观”的孔结构. 照片表明: 大孔平均孔径在 $400 \mu\text{m}$ 左右, 大部分孔与孔之间有 $100 \mu\text{m}$ 左右小孔贯通. 这一结构特征与重组异种骨的牛松质骨是相近的(图 2, 放大 40 倍). 图 1(b) 是放大 400 倍下观察其“微观”结构——孔与孔之间壁的结构. 照片表明: 孔壁是由细小颗粒通过数个界面互相连接, 其间均匀分布大量 $3 \sim 10 \mu\text{m}$ 的微孔. 用孔雀绿和溴酚兰染色结果表明, 任一截面染色均匀. 说明孔-孔之间的相通. 同时, 这也说明此结构特性具有 3 点优点. (1) 有利于骨组织长入. (2) 有利于生物降解.

d'	d	hkl
2.88	2.88	217
2.61	2.61	220
3.22	3.22	241
8.16	8.15	012

(3) 有利于骨形态发生蛋白(BMP)等高诱导活性物质复合到陶瓷内部. 制备的 $p\text{-}\beta\text{-TCP}$ 适宜用修复松质骨. $\beta\text{-TCP}$ 陶瓷人工骨与羟基磷灰石(HA)陶瓷人工骨相比, 最显著的是可生物降解性, 大孔/微孔结构使材料表面积增大, 更利于降解. 由于组织液能渗入微孔内, 因而该 $p\text{-}\beta\text{-TCP}$ 植入体与组织和生理环境的接触面积增大, 促进其生物降解.



(a) 24× (b) 400×

图 1 $p\text{-}\beta\text{-TCP}$ 的 SEM 照片

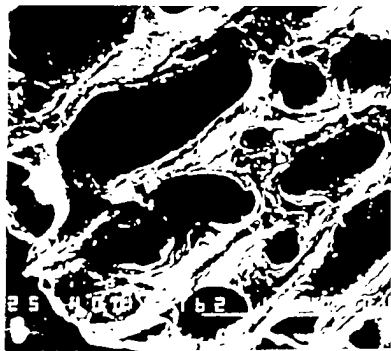


图 2 牛松质骨的 SEM 照片(40×)

2. 4 孔隙率与抗压强度的测定

$p\text{-}\beta\text{-TCP}$ 的孔隙率(φ)和抗压强度(P)的测定结果如图 3 所示. 图 4 给出了用于重组异种骨的, 经处理而尚未重组的牛松质骨——“骨”材料的抗压强度值.

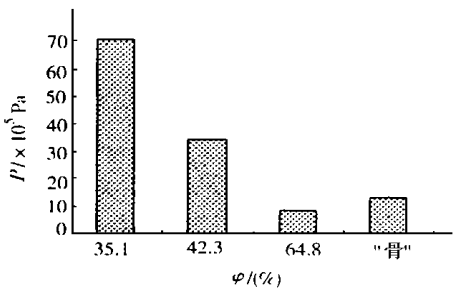


图 3 $p\text{-}\beta\text{-TCP}$ 的孔隙率与抗压强度的关系

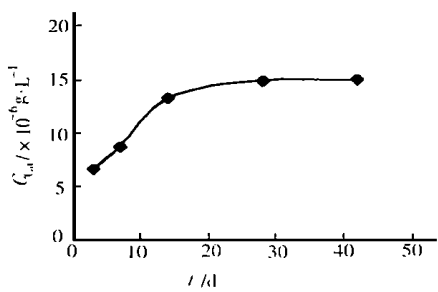


图 4 $p\text{-}\beta\text{-TCP}$ 在生理盐水中的溶解度

从图 3 可以看出, 孔隙率与抗压强度是相关联的. 随孔隙率的增加, 抗压强度减少; 反之, 孔隙率减少, 则抗压强度增大. 孔隙率小, 表明材料相对致密些, 不利于生物降解; 而孔隙率大, 虽有利于生物降解, 却难以保证必要的强度.

有的研究者在材料制备中加入一定量的 Na_2O , MgO , Al_2O_3 等物质, 提高了抗压强度. 但是, 材料结构中形成的玻璃相不利于较彻底的生物降解, 以及应用中可能产生的副作用. 本研究是在热力学和热相变反应分析基础上^[6], 将 $p\text{-}\beta\text{-TCP}$ 力学性能与生物降解性密切并联考虑, 避免杂相.

2. 5 生理注射液中溶解度测定

在 100 mL 浓度为 $0.155 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 生理盐水中, 2 g 的 $p\text{-}\beta\text{-TCP}$ 溶解性测定结果如图 4 所示.

由于 $p\text{-}\beta\text{-TCP}$ 较 HA 有一定的溶解性, Ca 的重新沉积不会生成 $\beta\text{-TCP}$ (溶度积 $K_{\text{sp}} =$

10^{-29}), 而沉积为热力学更稳定的 HA ($K_{sp} = 10^{-59}$). 可以认为, 人体硬组织的组成和结构类似于 HA, 而不是 β -TCP. 这是由化学热力学所决定的, 也是 β -TCP 作为生物降解材料植入后, 逐步为新生骨所取代的化学依据.

2.6 溶血试验

溶血试验结果如表 2 所示. 溶血程度由下式表示为

$$\text{溶血程度} = \frac{(\text{试验材料吸光度} - \text{阴性对照吸光度})}{(\text{阳性对照吸光度} - \text{阴性对照吸光度})} \times 100\% =$$
$$\frac{(0.008 - 0.000)}{(0.498 - 0.000)} \times 100\% = 1.606\%.$$

本实验溶血程度为 1.606%, 符合要求.

2.7 急性毒性试验

急性毒性检测结果如表 3 所示. 给药量、观察时间分别表征为 V, t . 从表 3 可知, 按毒性剂性分级, 本品属无毒级.

表 3 小鼠急性毒性实验观察表^①

动物分组	动物数	给药途径	V / mL	t / h							
				24	48	72	96	100	120	144	168
中剂量	10	灌胃	0.50	-	-	-	-	-	-	-	-
低剂量	10	灌胃	0.50	-	-	-	-	-	-	-	-
阴性对照	10	灌胃	0.50	-	-	-	-	-	-	-	-

① 表中“-”表示未死亡, “+”表示死亡

2.8 热源试验

给药前后动物体温检测结果如表 4 所示. 从表 4 可知, 体温升高均在 0.6 以下, 3 只家兔体温升高总数在 1.4 以下, 符合热源检查规定.

表 4 给药前后兔子体温() 体检测结果

编 号	给药前			给药后			给药前后体温 改变值
	1 h	2 h	平均值	1 h	2 h	3 h	
1	39.20	39.30	39.25	39.50	39.70	39.60	0.35
2	39.20	39.20	39.20	39.40	39.60	39.60	0.40
3	39.30	39.30	39.30	39.90	39.90	39.70	0.60

3 结束语

β -TCP 在体内降解除化学溶解的原因外, 体内环境的综合作用也是不可忽视的. 生物材料植入体内后, 存在材料对机体和机体对材料两个方面的影响. β -TCP 降解可能包括巨噬细胞对材料微粒的吞噬、细胞对材料微粒的运输、体液循环带走溶解的 Ca, P 等因素. 这些因素使 β -TCP 处于热力学动平衡不断更新, 有利于其溶解的环境. 此种降解速率远远超出体外溶解速率, 从而逐步降解, 为新生骨取代. 这就是当今国际上将 β -TCP 作为硬组织修复材料给以

极大关注的原因之一. 制备多孔 β -磷酸三钙的主要性能有单一 β -TCP 相, Ca/P 值为 1.50, 孔隙率为 42.4%, 大孔孔径为 400 μm 左右, 小孔孔径为 5 μm 左右, 抗压强度为 3.41 MPa. 同时, 其在生理盐水中有一定的微量溶解, 溶血、急性毒性和致热源性均在安全范围内. 该材料可用于修复骨松质骨缺损, 利于可诱导成骨物质(骨形态发生蛋白, 转化生长因子或成骨细胞等)复合, 以形成新型可诱导成骨和生物降解的复合或杂化人工骨^[1].

参 考 文 献

- 1 Doremus D H. Review bioceramics. J. Mater. Sci., 1992, 27(2): 285 ~ 297
- 2 王士斌, 翁连进, 郑昌琼等. 多孔 β -磷酸三钙骨修复材料的制备. 华侨大学学报(自然科学版), 1999, 20(3): 287 ~ 290
- 3 王士斌, 胡亮, 郑昌琼等. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 和 H_3PO_4 制备 $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 生物陶瓷粉末的研究. 昆明理工大学学报, 1999, 24(3): 92 ~ 96
- 4 王士斌, 翁连进, 郑昌琼等. 骨形态发生蛋白/多孔 β -磷酸三钙陶瓷复合人工骨. 四川联合大学学报(工程科学版), 1999, 3(5): 76 ~ 82

In Vitro Testing the Porous Bioceramics of beta-Tricalcium Phosphate as Material for Repairing Bone Defect

Wang Shibin^① Weng Lianjin^①
Zheng Changqiong^② Ran Junguo^②

(^① College of Chem. Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou;

^② Inst. of High Tech. Res., Sichuan Univ., 610065, Chengdu)

Abstract The porous bioceramics of beta-tricalcium phosphate as the material for repairing bone defect is tested and evaluated, with emphasis on its chemical composition, physical performance, mechanical performance and biological safety. The methods include chemical analysis, photoelectron spectroscopy, X-ray diffraction spectrum, scanning electron microscopy, atomic absorption spectrum and electronic universal testing as well as tests of hemolysis, acute toxicity and source of fever. As shown by results, this material consists of monophasic beta-tricalcium phosphate, with a Ca/P ratio of 1.50, an average porosity of 42.3%, a compressive strength of 3.41 MPa, a macropore diameter around 400 μm , a micropore diameter around 5 μm , a traceful solubility in normal saline, a test result of hemolysis, acute toxicity and source of fever within safety range. This material can be used in repairing spongy bone defect. It helps to recombine the bone defect with inducible osteogenic substance so as to form hybridized artificial bone of recombination type.

Keywords beta-tricalcium phosphate, physicochemical performance, biological safety, mechanical performance, porous, bioceramics, artificial bone