

45S5型生物活性玻璃制备及体外性能表征

常丽¹, 张玉兰¹, 袁源¹, 李湘杰¹, 李次会¹, 温承宇², 文晓宇¹

1. 北京大清生物技术股份有限公司, 北京 100085; 2. 北京刷新活力健康科技有限公司, 北京 100085

【摘要】目的:通过系统性体外研究观测熔融法制备的45S5型生物活性玻璃的生物活性。**方法:**通过熔融法制备生物活性玻璃, 对水合前后的粉体采用傅里叶红外光谱、X射线衍射光谱和场扫描电镜分别比较基团、结晶度和微观结构的变化, 表征羟基磷灰石的形成, 并研究羟基磷灰石含量与水合时间的关系, 进行活性和动态活性的表征。**结果:**采用熔融法制备的45S5型生物活性玻璃在SBF缓冲液中反应1 h后生成羟基磷灰石, 碳酸化羟基磷灰石在3 d以后形成, 新生成的羟基磷灰石晶体在生物活性玻璃表面呈规则致密排列, 随着反应时间延长, 其含量可进一步提高。**结论:**45S5型生物活性玻璃具有很好的生物活性, 是良好的骨修复和口腔修复材料。

【关键词】生物活性玻璃; 熔融法; 羟基磷灰石

【中图分类号】R318.08

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2017)05-0521-06

Preparation and *in vitro* characterization of bioactive glass 45S5

CHANG Li¹, ZHANG Yulan¹, YUAN Yuan¹, LI Xiangjie¹, LI Cihui¹, WEN Chengyu², WEN Xiaoyu¹

1. Beijing Datsing Bio-tech Co., Ltd, Beijing 100085, China; 2. Beijing Refresh Energy Health Technology Co., Ltd, Beijing 100085, China

Abstract: Objective To prepare bioactive glass 45S5 through melting method and to characterize its biological activity in systematical *in vitro* study. **Methods** Bioactive glass 45S5 was prepared through melting method. Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction, and field-emission scanning electron microscopy were applied to analyze the difference in functional groups, crystallinity, and microstructure of bioactive glass 45S5 before and after the hydration, and to characterize the formation of hydroxyapatite, and to examine the relationship between the content of hydroxyapatite and the hydration time, characterizing the activity and dynamic activity of bioactive glass 45S5. **Results** Bioactive glass 45S5 prepared through melting method generated hydroxyapatite after reacting with simulation body fluid for 1 h, and formed carbonated hydroxyapatite after 3 days. Newly formed hydroxyapatite crystal was in well-organized and compact way on the surface of bioactive glass, and the content of hydroxyapatite crystal increased with reaction time. **Conclusion** Bioactive glass 45S5 can be used in orthopedics and dental repair for it has a good biological activity *in vitro*.

Keywords: bioactive glass; melting method; hydroxyapatite

前言

生物活性玻璃(Bioactive Glass, BAG)最早在1969年由Hench教授合成, 其最初的成分为 SiO_2 - Na_2O - CaO - P_2O_5 四元组分, 同时具有骨引导、骨诱导及抑菌等作用^[1], 是一类比其它结晶态生物活性材料性能更为优越的组织修复材料^[2]。其活性主要表现为材料与水或者体液接触, 在表面释放大量钙磷离子, 通过钙磷离子的沉积, 形成纳米级碳酸化羟基磷灰

石晶体^[3], 具有三维空间结构和巨大的比表面积, 利于成骨干细胞的附着生长^[4]。进一步, 生物活性玻璃会释放出生长因子, 促进骨细胞的增殖, 从而更好地修复受损骨组织^[5]。

生物活性玻璃的制备方法通常包括熔融法和溶胶凝胶法。熔融法是通过1 300 ℃以上的高温将原料熔化后放入特定形状的模具制得相应的结构, 或者将热熔料用常温水冷却降温, 得到玻璃态原料^[6], 然后通过机械研磨得到特定粒径范围的精细粉体。溶胶凝胶法是在常温下通过化学合成的方法制备而成, 这种制备方法不依赖于碳酸钠的含量, 可制备三元成分和多孔结构的生物活性玻璃^[7-9]。从临床应用和商业化角度来说, 熔融法制备的45S5型生物活性玻璃已经广泛地应

【收稿日期】2016-12-21

【作者简介】常丽, 硕士, 工程师, 研究方向: 生物医学材料开发及应用, E-mail: changli@datsing.com

【通信作者】文晓宇, E-mail: wenxy@datsing.com

用于临床治疗,包括脊柱融合修复、骨缺损修复、牙槽骨修复、牙齿过敏^[10]、植入材料涂层^[11]等,也是目前使用范围最广的、科学研究最全面的一种生物活性玻璃。本文主要研究了熔融法制备45S5型生物活性玻璃的方法,并对其进行性能表征。

1 资料和方法

1.1 熔融法制备生物活性玻璃

2014年2月在北京大清生物技术有限公司研发实验室完成熔融法制备生物活性玻璃。需要的试剂及仪器:二氧化硅(SiO_2)、碳酸钙(CaCO_3)、碳酸钠(Na_2CO_3)、五氧化二磷(P_2O_5)均为分析纯,马弗炉(TM-3014P,北京强安美晨公司),坩埚(100 mL,氧化锆)。按45:24.5:24.5:4配比定量称取 SiO_2 、 CaCO_3 、 Na_2CO_3 、 P_2O_5 。将原料充分混合后放入坩埚,每个坩埚的装量高度不超过坩埚总高度的2/3。将载料坩埚放入陶瓷纤维马弗炉,关闭炉门,按表1设定升温曲线,最高温度为1 300 ℃,保温2 h。开启炉门,将坩埚中液体迅速倒入常温水中降温,得到生物活性玻璃。100 ℃烘干3 h后机械研磨,并用500目不锈钢网筛至粒径为20 μm 以下,制备成生物活性玻璃。

表1 熔融法制备生物活性玻璃升温曲线

Tab.1 Heating curve of bioactive glass prepared with melting method

Temperature/℃	Heating rate/℃·h ⁻¹	Time/h
0-400	400	1
400-900	500	1
900-1 300	400	2
1 300 preserve heat	-	2

1.2 生物活性玻璃成分及粒径表征

根据GB/T 1347-2008《钠钙硅玻璃化学分析方法》,采用氟硅酸钾容量法检测 SiO_2 含量,采用等离子发射光谱(赛默飞,ICAP6000,美国)检测 CaO 、 Na_2O 和 P_2O_5 含量。并采用激光粒度分析仪(马尔文3000,英国)分析粉体的粒径分布,设置颗粒折射率为2.13,散射模型为Mie。

1.3 水合样品制备

按照Ebisawa^[12]的方法配置pH值为7.4的SBF缓冲液,取50 mg上述生物活性玻璃,分散于100 mL SBF溶液中。根据实验设计要求在37 ℃恒温摇床中震荡一定时间。真空过滤出粉体,用丙酮充分清洗后,在电热恒温鼓风干燥机(精宏,DHG-9246A,中国)中45 ℃干燥2 h,制得水合样品。

1.4 傅里叶红外光谱检测生物活性玻璃活性表征

按1.2方法制备的水合24 h的样品,分别称取一定量的生物活性矿物原粉体(以下简称“原粉体”)和水合样品,置于傅里叶红外光谱检测设备(PE公司,Frontier-TTIR型号,美国)中,采用金刚池ATR方法,扫描波长范围为550~4 000 cm^{-1} 。对比水合前后粉体的羟基和磷酸根吸收峰,定性表征水合前后粉体中的基团变化。

1.5 X射线衍射光谱表征晶体形成

使用X射线衍射仪(布鲁克公司,D8-Advance型,德国)研究生物活性玻璃水合前后结构和晶型变化。按照上述1.2的方法制备生物活性玻璃水合样品,分别制得水合1、3、7、10 d的样品。设备工作电压30 kV,工作电流40 mA,Cu靶波长1.54 nm,2 θ 角扫描范围3~40°,步长为0.02°/步,停留时间0.1 s/步。进一步使用X射线衍射定量检测样品的结晶度。

1.6 动态活性表征

按照上述1.2的方法分别制备水合时间为10、30、60、120 min的水合样品。使用傅里叶红外光谱(PE公司,Frontier-TTIR型号,美国)定性检测样品中羟基磷灰石成分。

1.7 扫描电镜表征微观结构

使用高倍场发射扫描电镜(FEI公司,Quanta-650型号,美国)观察水合前后粉体表面的微观结构变化。按照上述1.2的方法制备生物活性玻璃水合样品,水合时间为24 h。将生物活性矿物原粉体和按上述方法制备的水合样品固定于样品架,采用溅射镀膜仪(Leica,EM SCD 500,德国)进行表面喷金处理,放大倍数为2万~20万,观察粉体微观结构。

2 结果

2.1 生物活性玻璃成分及粒径表征

生物活性玻璃中各物质含量结果如表2所示。主要成分与标准45S5型生物活性玻璃成分一致。制备过程中由于原料或坩埚引入微量杂质。粒径分布如图1所示,最大粒径不高于12 μm , D_{90} 为7 μm 。

2.2 傅里叶红外光谱活性表征

羟基和磷酸根吸收峰的变化是表征生物活性玻璃活性的重要标志。与生物活性玻璃原粉体相比,水合样品具有明显的羟基磷灰石吸收峰,主要表现为3 450 cm^{-1} 附近的羟基吸收峰和560~600 cm^{-1} 附近出现的磷酸根吸收峰。从图2a中可以看出原粉体在3 450 cm^{-1} 附近有相对较弱吸收峰,560~600 cm^{-1} 附近无吸收峰,说明原粉体中已经形成了微量羟基,但未形成磷酸根。从图2b可以看出水合样品在3 450 cm^{-1}

表2 生物活性玻璃成分分析(%)
Tab.2 Component analysis of bioactive glass (%)

Sample	SiO ₂	CaO	Na ₂ O	P ₂ O ₅	Others
Standard 45S5	45.00±5.00	24.50±3.00	24.50±3.00	6.00±2.00	
Test values	44.32	23.33	23.62	5.88	2.83

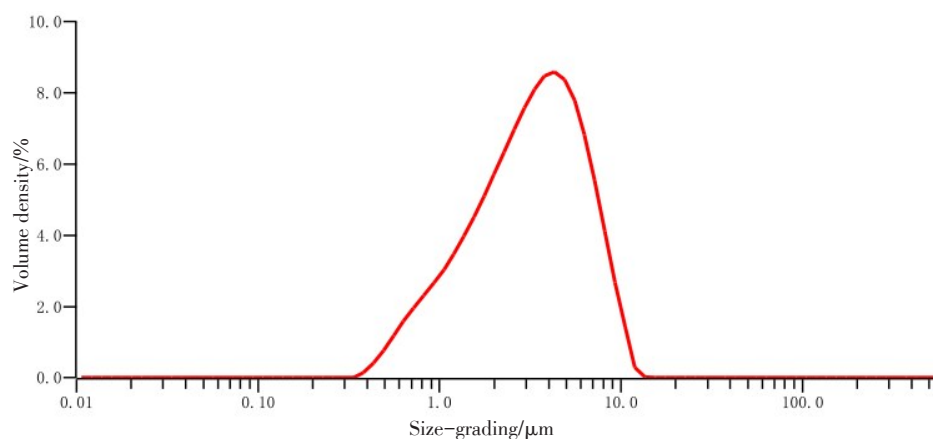


图1 生物活性玻璃粒径分析

Fig.1 Particle size analysis of bioactive glass

附近出现较大吸收峰,并在 572.59 cm^{-1} 出现明显磷酸根的吸收峰,说明水合反应24 h后,生物活性玻璃中已经形成了羟基磷灰石。

2.3 X射线衍射光谱表征晶体

图3显示生物活性玻璃在SBF溶液中分别水合0、1、3、7、10 d的XRD衍射图谱。从图中可以看出,熔融法制备的生物活性玻璃原粉体为无定形态,水合1 d以后(B线)可以检测到羟基磷灰石在 $2\theta=31.5^\circ$ 附近的特征峰,表明羟基磷灰石的形成。水合3、7、10 d以后,同时可以看到在 $2\theta=26^\circ$ 和 $2\theta=31.5^\circ$ 出现特征峰,说明粉体中已经形成了碳酸化的羟基磷灰石,并且特征峰面积进一步增加,说明其含量也有一定提高。通过峰面积计算其结晶度,水合0、1、3、7、10 d后的结晶度分别为2.11%、10.36%、16.68%、17.58%、20.03%。

2.4 动态活性表征

动态活性表征的目的是研究生物活性玻璃在SBF溶液中的反应过程以及羟基磷灰石形成速度。生物活性玻璃与水发生反应的过程基本可以分为以下阶段:首先在粉体表面形成Si-OH,大量的Si-OH聚集在粉体表面通过聚合形成富硅凝胶层(Si-O-Si),同时粉体中释放的大量 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 和 CO_3^{2-} 离子吸附聚集在粉体表面晶化生成碳酸化羟基磷灰石。从图4可以看出,生物活性玻璃与水反应10和30 min时, 3450 cm^{-1} 附近出现羟基特征吸收峰, $560\sim 600\text{ cm}^{-1}$ 未出现磷酸根吸收峰,结构与上述原粉体谱图相似

(图3A)。反应60 min时,同时出现羟基和磷酸根特征吸收峰,说明生物活性玻璃与SBF反应60 min时可表达出其活性,即反应形成羟基磷灰石。实验结果与Peitlfilho等^[13]的研究结果一致。

2.5 扫描电镜表征生物活性玻璃活性表达

通过扫描电镜可以直观观察生物活性玻璃微观表面。从图5a可以看出,原粉体表面呈镜面状光滑,棱角清晰,具有明显的机械破碎无机物的断面结构。水合24 h以后(图5b),可以观察到新生成的绒毛状晶体结构完全包覆粉体全表面,粉体表面棱角变模糊。在10万倍(图5c)和20万倍(图5d)视野下观察到新晶体呈连续均匀有规律的分布,与粉体表面结合紧密无脱落。表明水合24 h以后,通过离子在粉体表面的释放和沉积,已经生成了大量的羟基磷灰石晶体,而且随着时间延长,新晶体的生长结构更加致密,含量进一步增加。

3 讨论

大量的临床和体外实验研究结果表明,相比于其他生物陶瓷,生物活性玻璃对人体骨骼的修复效果更好,尤其以45S5型生物活性玻璃的应用性能较为优越^[13]。除了对骨组织进行修复,45S5型生物活性玻璃能够在周围形成弱碱性环境,释放大量钙磷离子,从而有效杀灭多种口腔致病菌,并且在软组织表面形成富硅凝胶层,实现对受损的软组织进行保

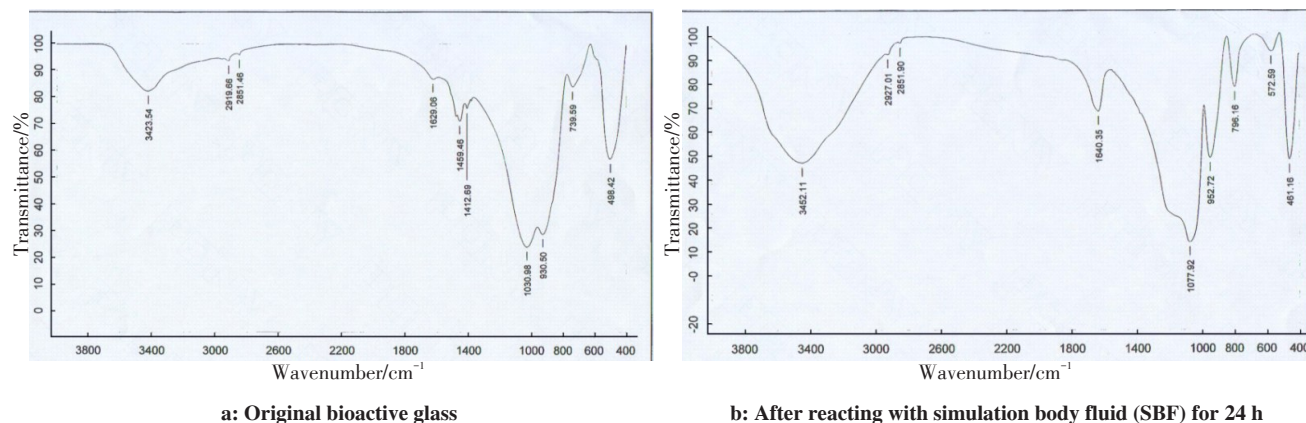
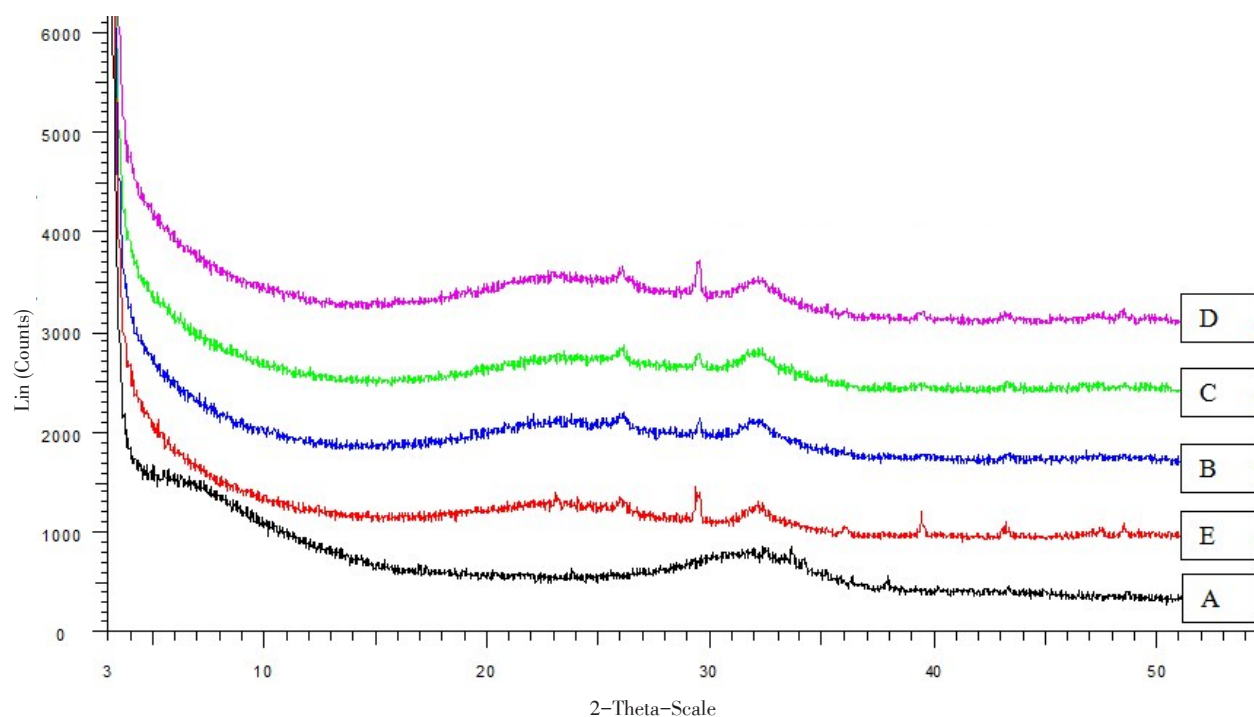


图2 水合前后生物活性玻璃红外光谱分析

Fig.2 Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of bioactive glass before and after hydration reaction



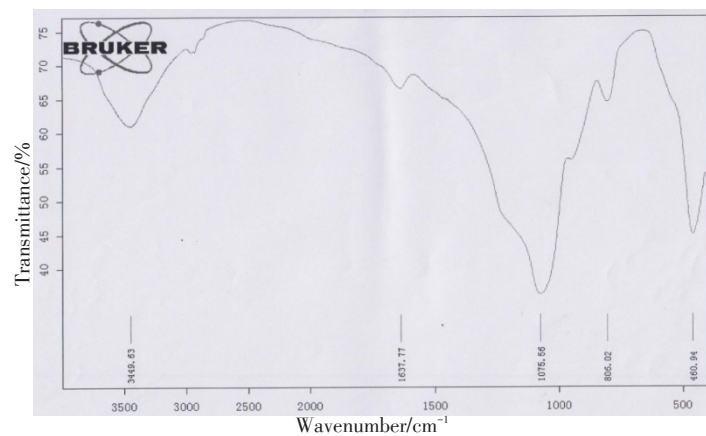
Line A is the XRD spectrogram of original bioactive glass; line B is the XRD spectrogram after bioactive glass reacts with SBF for 1 d; line C is the XRD spectrogram after bioactive glass reacts with SBF for 3 d; line D is the XRD spectrogram after bioactive glass reacts with SBF for 7 d; line E is the XRD spectrogram after bioactive glass reacts with SBF for 10 d.

图3 生物活性玻璃水合XRD衍射光谱图

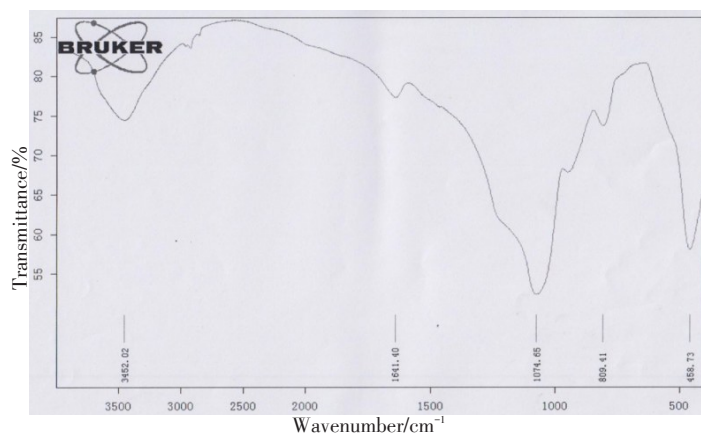
Fig.3 X-ray diffraction (XRD) spectrogram of bioactive glass

护和修复,是一种既可以与骨组织键合修复骨组织缺损的材料,同时也能够有效地修复皮肤和黏膜等软组织结构的生物陶瓷。人体口腔是骨组织(牙齿、牙槽骨)和软组织(牙龈、口腔黏膜)在结构和功能方面的有机结合,从而可以同时发挥生物活性玻璃对于骨组织和软组织的修复效果,因而生物活性玻璃在口腔治疗和修复领域具有独特优势,也是目前临床应用最广泛、效果最好的方向。本文通过熔融法合成45S5型生物活性玻璃制备微米级粉体,通过一

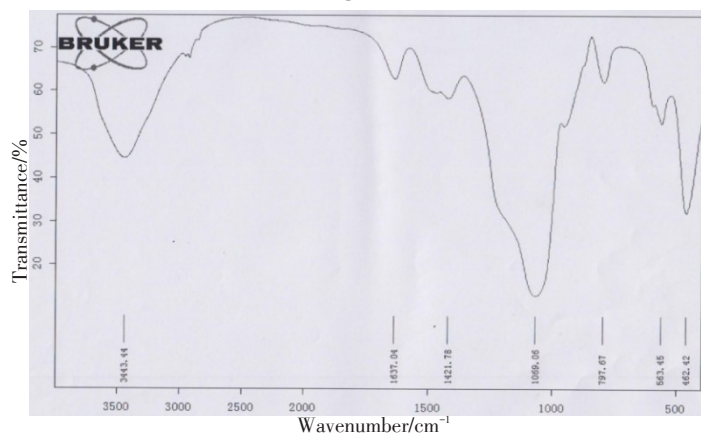
系列体外实验方法表征其活性,证明本材料具有良好的生物活性,但本文仅局限于对生物活性玻璃进行理化性质的检测,缺少相关的生物相容性检测结果,这也是我们接下来对生物活性玻璃的重点研究方向。虽然本研究取得了较好的成果,但通过熔融法制备的生物活性玻璃主要为粉状或者颗粒状,由于会发生结晶,因而无法制备未结晶的多孔支架材料^[6],从而限制了在需要一定力学支撑的结构骨移植等方面的应用。通过改变制备方法和成分^[14],如采



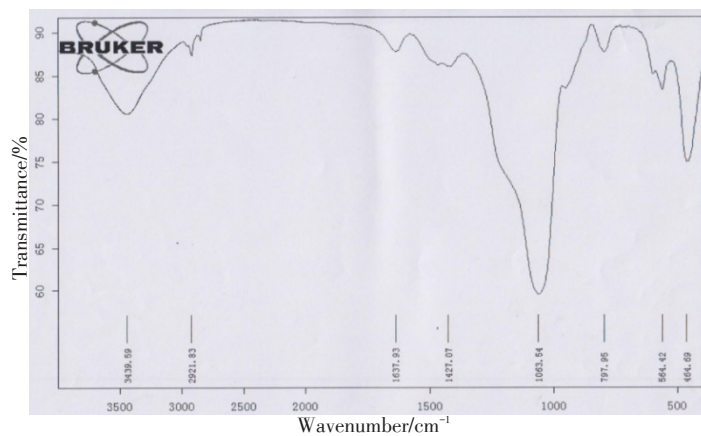
a: After reacting with SBF for 10 min



b: After reacting with SBF for 30 min



c: After reacting with SBF for 60 min



d: After reacting with SBF for 120 min

图4 生物活性玻璃动态活性红外光谱检测

Fig.4 FTIR spectroscopy of bioactive glasses after reacting with SBF for different time

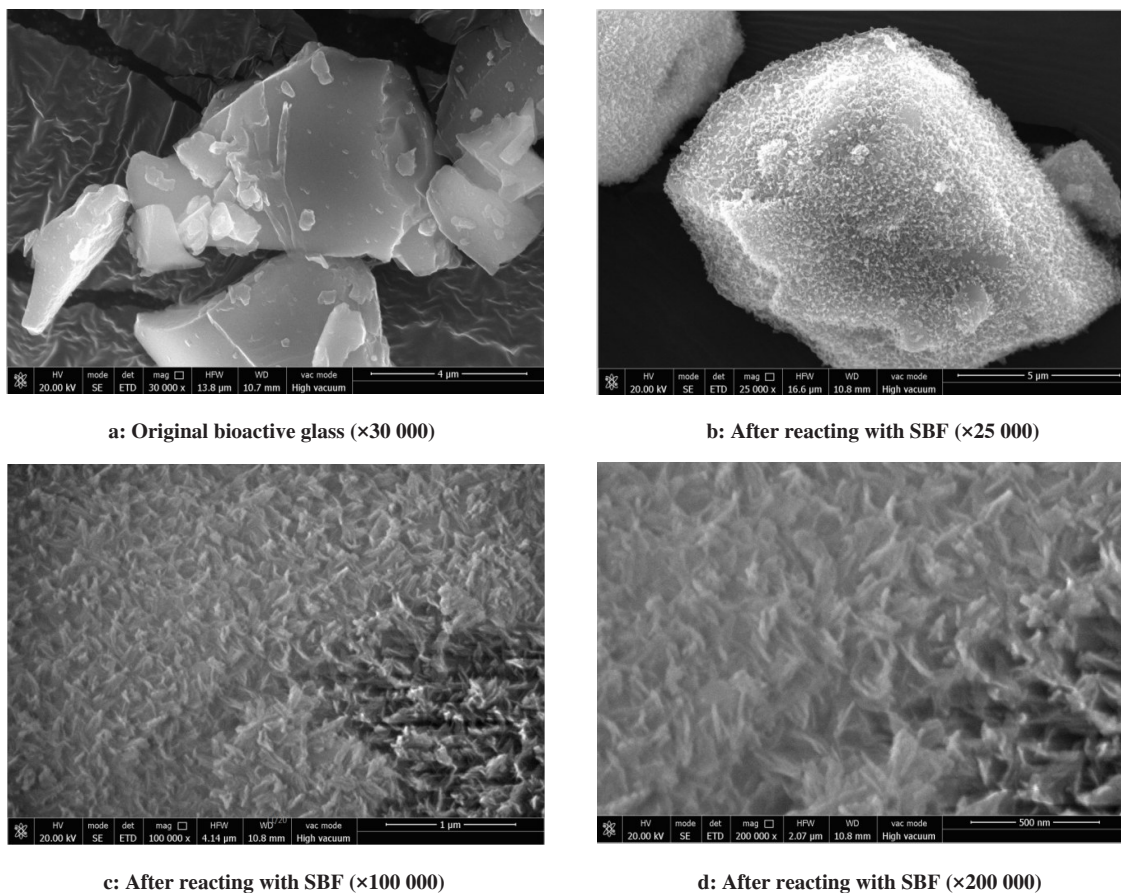
a: Original bioactive glass ($\times 30\,000$)b: After reacting with SBF ($\times 25\,000$)c: After reacting with SBF ($\times 100\,000$)d: After reacting with SBF ($\times 200\,000$)

图5 扫描电镜观察水合前后生物活性玻璃微观结构

Fig.5 Micro-structure of bioactive glass before and after reacting with SBF observed by electron microscope

用溶胶凝胶法可制得模拟骨的多孔支架材料,但其强度仍需进一步提高。随着科技发展,有望通过合成有机-无机混合物来实现承重的大块骨修复,从而进一步推动生物活性玻璃在临床医学方面的应用^[15]。

【参考文献】

- [1] WALTIMO T, BRUNNER T J, VOLLENWEIDER M, et al. Antimicrobial effect of nanometric bioactive glass 45S5[J]. J Dent Res, 2007, 86(8): 754-757.
- [2] HENCH L L. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration[J]. J Biomed Mater Res, 1998, 41(4): 511-518.
- [3] REGINA M, FILGUEIRAS T, LATORRE G, et al. Solution effects on the surface reaction of three bioactive glass composition[J]. J Biomed Mater Res, 1993, 27: 1485-1493.
- [4] HENCH L L. Bioactive materials for gene control[M]//New materials and technologies for healthcare. Singapore: World Scientific, 2011: 25-48.
- [5] OJANSIVU M, VANHATUPA S, BJORKVIK L, et al. Bioactive glass ions as strong enhancers of osteogenic differentiation in human adipose stem cell[J]. Acta Biomater, 2015, 21: 190-203.
- [6] JONES J R. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids[J]. Acta Biomater, 2015, 23: S53-S82.
- [7] LI R, CLARK A E, HENCH L L. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing[J]. J Appl Biomater, 1992, 2(4): 231-239.
- [8] SARAVANPAVAN P, JONES J R, PRYCE R S, et al. Bioactivity of gel-glass powders in the CaO-SiO₂ system: a comparison with ternary (CaO-P₂O₅-SiO₂) and quaternary glasses (SiO₂-CaO-P₂O₅-Na₂O)[J]. J Biomed Mater Res A, 2003, 66(1): 110-119.
- [9] HENCH L L. The future of bioactive ceramics[J]. J Mater Sci: Mater Med, 2015, 26: 86.
- [10] 史舒雅, 陈亚明. 生物活性玻璃在口腔医学中的应用[J]. 口腔生物医学, 2013, 4(1): 44-47.
- [10] SHI S Y, CHEN Y M. Application of Bioglassess in dental field[J]. Oral Biomedicine, 2013, 4(1): 44-47.
- [11] MISTRY S, KUNDU D, DATTA S, et al. Comparison of bioactive glass coated and hydroxyapatite coated titanium dental implants in the human jaw bone[J]. Aust Dent J, 2011, 56: 68-75.
- [12] EBISAWA Y, KOKUBO T, KUSHITANI H, et al. Bioactivity of CaO-SiO₂-based glasses: *in vitro* evaluation[J]. J Mater Sci Mater Med, 1990, 14: 239-243.
- [13] PEITLFILOHO O, LATORRE G P, HENCH L L. Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5[J]. J Biomed Mater Res, 1996, 30(4): 509-514.
- [14] COCCHI M, DURANTE C, LUSVARDI G, et al. Evaluation of the behaviour of fluorine-containing bioactive glasses: reactivity in a simulated body fluid solution assisted by multivariate data analysis[J]. J Mater Sci Mater Med, 2012, 23: 639-648.
- [15] HENCH L L. Genetic design of bioactive glass[J]. J Eur Ceram Soc, 2009, 29: 1257-1265.

(编辑:黄开颜)