

# 超微牛煨烧骨的制备、 表征和生物相容性评价

杨春瑜<sup>1</sup>, 赫美<sup>1</sup>, 杨春莉<sup>2</sup>, 杨明<sup>1</sup>, 张天君<sup>3</sup>

(1. 哈尔滨商业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150076;

2. 哈尔滨商业大学轻工学院, 黑龙江哈尔滨 150076;

3. 哈尔滨斯达维机械制造有限公司, 黑龙江哈尔滨 150001)

**摘要:**以天然牛骨为原材料,采用化学法脱除有机成分,经过煨烧、超微粉碎制备了超微牛煨烧骨(True Bone Ceramic, TBC)。对超微粉碎前后和不同煨烧温度、煨烧时间条件下的超微TBC进行了扫描电镜(SEM)测试和X射线衍射(XRD)分析,结果表明,温度越高,TBC颗粒粒径越小,同时超微粉碎后TBC颗粒粒径分布更均匀。也证明了制备的超微牛煨烧骨的成分是羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA),对制备的超微TBC进行了溶血实验、全身急性毒性实验,结果表明,制备的超微牛煨烧骨具有良好的生物相容性。

**关键词:**牛煨烧骨,羟基磷灰石,生物相容性

## Preparation, analysis of properties and evaluation of biocompatibility of ultrafine bovine true bone ceramic

YANG Chun-yu<sup>1</sup>, HE Mei<sup>1</sup>, YANG Chun-li<sup>2</sup>, YANG Ming<sup>1</sup>, ZHANG Tian-jun<sup>3</sup>

(1. College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

2. College of Light Industry, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

3. Harbin Starway Mechanical Manufacture Co. Ltd., Harbin 150040, China)

**Abstract:** The ultra-fine bovine true bone ceramic (TBC) was prepared by calcining the raw bovine bone after getting rid of organic component by chemical method, and the TBC particles were smashed and ultrafine ground finally. Then, the ultra-fine bovine TBC prepared under different calcined temperature and times were examined by SEM and XRD, also, the powder before and after ultrafine grinding. The results showed that with the increasing of calcined temperature, the diameter of TBC particles decreased, and the distribution of ultra-fine bovine TBC particles would distributed more homogenously. Also, the component of the ultra-fine bovine TBC was proved to be HA according to XRD results. At last, the biocompatibility was evaluated by detecting the blood resolving rate and overall emergency toxicology, and the ultra-fine bovine TBC particles were proved to have good biocompatibility.

**Key words:** bovine true bone ceramic; hydroxyapatite; biocompatibility

中图分类号: TS251.94

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)01-0114-03

目前,每年有大量天然牛骨资源由于没有被充分利用而浪费,经过脱有机成分、煨烧、超微粉碎等一系列工艺处理后,天然牛骨可以制备成超微牛煨烧骨,作为非承力部位骨缺损修复材料<sup>[1]</sup>。超微牛煨烧骨的主要成分是羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA),HA具有骨传导性和细胞相容性<sup>[2]</sup>。HA与聚

乳酸(Poly L-lactid Acids, PLLA)、壳聚糖(Chitosin, CS)、聚乳酸-丙交酯(Poly Lactic-Glycolic Acid, PLGA)等复合,可以弥补单一材料作为组织工程支架材料的缺陷<sup>[3]</sup>,可以满足非承力部位骨缺损的治疗要求,被广泛地用作三维骨支架材料。支架材料表面复合了生长因子,如骨形态发生蛋白(Bone Morphography Protein, BMP)后,可诱导骨随基质细胞分化增殖,最后形成骨组织<sup>[4-5]</sup>。但由于受到制造过程的影响,工艺需要严格控制,才能使制备的超微牛煨烧骨在成分百分比、孔径、孔隙率、抗压和抗折强度、溶血、急性毒理、细胞相容性等方面满足骨组织

收稿日期: 2009-10-26

作者简介: 杨春瑜(1975-),女,副教授,研究方向:食品 and 生物分离纯化。

基金项目: 黑龙江省科技厅青年科学基金项目(QC07C38)。

替代承力材料在结构、机械性能、生物相容性和生物可降解方面的要求<sup>[6]</sup>。煅烧前脱除有机成分充分,煅烧时温度和时间适宜,并经过适当粉碎,才能保证制备的煅烧骨孔径适宜、孔隙均匀、具有足够的机械强度<sup>[7-8]</sup>。据此,本文以天然牛骨为原料,摸索制备牛煅烧骨(主要成分为 HA)的最优制备工艺,并对相关性能进行了检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

HA 标准品 分子量 20 万, Sigma 公司;天然牛松质骨。

S-3400N 扫描电镜、7000S/L XRD 衍射仪 日本岛津;WD-210 万能材料测试机 普惠检测设备公司;XA-II 制冷粉碎机 上海思尔达仪器公司;721 可见分光光度计 上海光谱仪器公司;PB-10 数字酸度计 北京赛多利斯仪器公司;AP-01P 微膜过滤器 天津奥特赛恩斯仪器有限公司;ND7-4L 型球磨机 南京南大天尊电子有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 天然牛骨中有机成分的脱除 取新鲜牛松质骨部分,锯成骨条,将所取得骨条分成八组,每组 20g 左右,在烘箱中烘至恒重。用无水乙醚采用索式提取法回流脱脂 6h,挥干乙醚后烘干至恒重,取八组平均值。将脱脂后恒重的骨头浸在 pH7~9 的 500mL 5mol/L NaOH 溶液中,放于 80℃ 的水浴中,脱糖 2h 后放于烘箱中烘干至恒重,测八组平均值。沸水浴脱蛋白 4h,烘干至恒重,去除大部分有机成分。以上每次烘干至恒重后,分别取八组平均值。

1.2.2 牛骨的煅烧和超微粉碎 为使脱有机成分牛骨在马福炉中煅烧时更充分,煅烧前先在电炉上初步煅烧 1h 左右,在通风橱中排放烟雾后再放入马福炉充分煅烧 1h。注意浓硝酸有助于初步充分煅烧,但由于其溶解了骨中的钙,因此切记不能使用浓硝酸。将八组骨头分别在 250、300、350、400、450、500、600、800℃ 条件下在马福炉中各煅烧 4h。取出后置于恒温干燥箱内干燥至恒重,在制冷粉碎机内初步粉碎后,在球磨机内超微粉碎。

### 1.2.3 超微 TBC 形态和机械性能检测

1.2.3.1 扫描电镜形态观察和孔径的检测 材料表面处理后,通过扫描电镜观察形态,测量孔径大小。

1.2.3.2 XRD 检测 取 250、300、350、400、450、500、600、800℃ 条件下煅烧的牛煅烧骨及超微牛煅烧骨各 1g,进行扫描电镜形态观察和 XRD 等检测。

### 1.2.4 生物相容性初步评价

1.2.4.1 溶血实验 称取 10g 煅烧骨,置入 50mL 生理盐水中,70℃ 水浴中浸提 24h,微量薄膜滤器滤过后,制备得浓度为 200mg/mL 的浸提液。取小白鼠眼球血清 10mL,加入等量生理盐水稀释后备用。将浸提液各取 5mL 放入试管中,阳性对照管中加入蒸馏水 5mL,阴性对照管加入等量生理盐水,每组 3 管。各试管中加入 0.1mL 稀释鼠血,37℃ 水浴 60min,1000r/min 离心 5min,取上清液在波长 540nm 处测定各管的光密度(A)。按下式计算溶血率:

$$\text{溶血率}(\%) = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{阴性对照}}) / (A_{\text{阳性对照}} - A_{\text{阴性对照}}) \times 100\%$$

1.2.4.2 全身急性毒性实验 选健康小鼠 6 只,分成两组,每只体重 20~24g,雌雄各半,将其中一组作为实验组,其每只小鼠腹腔注射浸提液 0.5mL/10g 体重,另一组小鼠作为对照组,注射后观察 1 周,主要观察神经系统、呼吸、步态、活动等症状以及有无死亡。

## 2 结果与讨论

### 2.1 有机成分脱除实验结果

八组牛骨平均质量 20.33g,索式提取法脱脂后八组平均质量为 15.42g,脱掉脂肪平均为 24.16%;将烘干后牛骨在 NaOH 溶液里脱糖后八组平均值为 15.06g,脱掉糖平均为 2.32%;沸水浴除蛋白后平均值为 14.56g,脱蛋白平均为 3.33%;最后脱掉有机成分和水分,占总重量的 29.71%。

### 2.2 扫描电镜形态观察及孔径测定结果

结果如图 1 所示,由于不同煅烧温度、时间、不同放大倍数和超微粉碎前后的 TBC 照片过多,只选取了部分典型的照片。700℃ 和 800℃ 样品煅烧效果明显优于其它温度样品,其它样品效果相似,如图 1 中 300℃ (e) 所示。煅烧时温度越高,则制备的 TBC 颗粒的粒径越小。

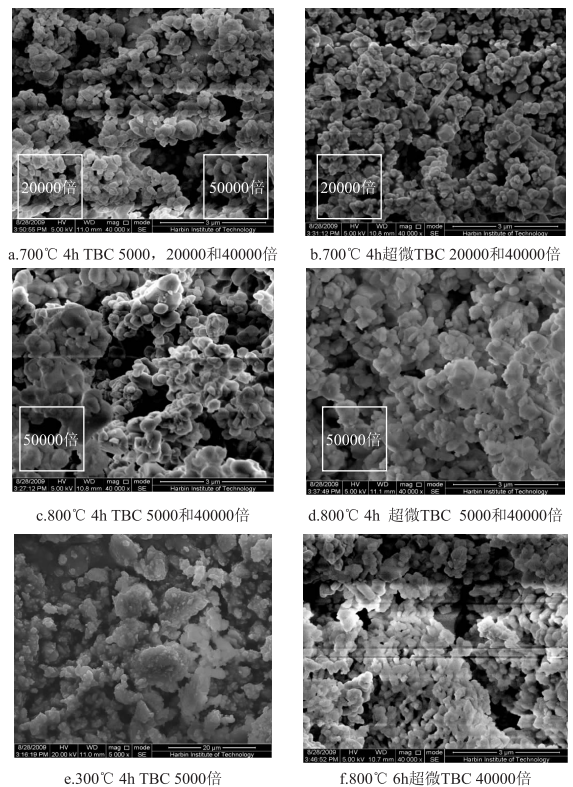


图 1 粉碎前后不同煅烧温度、时间和不同放大倍数煅烧后 TBC 形态、孔径及孔隙分布

因此,重点仔细比较了 700℃ (图 1a、b) 和 800℃ (图 1c、d、f) 样品。从电镜 40000 倍下视野更加清晰可见 800℃ 样品 (图 1c、d) 效果优于 700℃ (图 1a、b),同是 800℃ 样品,煅烧 6h (图 1f) 效果优于 4h (图 1d),经过球磨超微粉碎后效果优于未粉碎样品。最后确定 800℃ 煅烧 6h,经过超微粉碎后 TBC 粒径小

(下转第 274 页)

2.6.2 理化指标 总固形物  $\geq 13\%$ ; 蛋白质  $\geq 1\%$ ; 铅(以 Pb 计)  $\leq 0.3\text{mg/L}$ ; 砷(以 As 计)  $\leq 0.2\text{mg/L}$ ; 铜(以 Cu 计)  $\leq 0.5\text{mg/L}$ ; 食品添加剂: 按 GB2760 规定。

2.6.3 卫生指标 细菌总数  $< 100$  个/mL; 大肠菌群数  $< 6$  个/100mL; 致病菌不能检出。

### 3 结论

将切成  $3\text{mm} \times 3\text{mm} \times 3\text{mm}$  左右的仙人掌粒在  $85\sim 90^\circ\text{C}$ ,  $0.35\text{g/L}$  醋酸铜溶液中热烫 12min, 再用  $1.0\text{g/L}$  L-抗坏血酸和  $0.3\text{g/L}$  柠檬酸对仙人掌粒协同护色, 可以保持仙人掌粒的碧绿。产品配方为: 仙人掌粒 5%, 糖 8.5%, 奶粉 4%, 柠檬酸 0.32%, TKM21G-I 0.8%, 0.005% 乙基麦芽酚, 0.05% 朵美仙人掌香精, 0.02% 朵美酸奶油香精, 0.01% 朵美奶油香精,

(上接第 115 页)

而分布均匀(按图片中尺寸测定在  $200\sim 850\mu\text{m}$  之间), 孔隙相对更大, 更接近要求, 确定该工艺为最优煅烧参数。

### 2.3 XRD 检测结果

图 2 和图 3 分别是 Sigma 公司标准品和  $800^\circ\text{C}$  条件下煅烧 6h 制备的 TBC 的 XRD 图谱, 从图中可以看出, 超微牛煅烧骨呈现了 HA 的特征衍射峰, 因此为纯 HA 相。也就是说, XRD 的结果表明超微牛煅烧骨的主要成分为 HA。

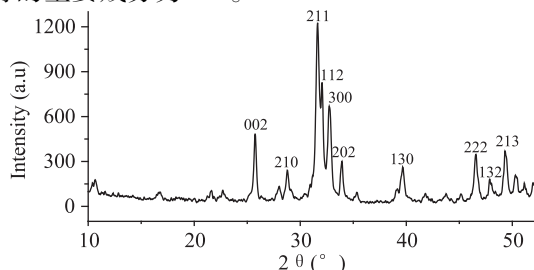


图 2 Sigma 公司 HA 标准品 XRD 图谱

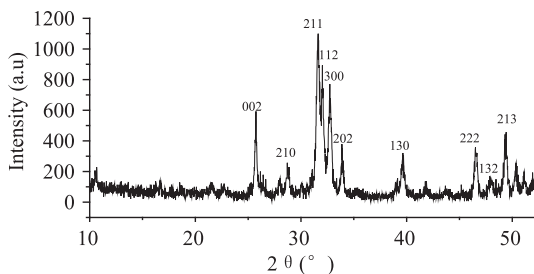


图 3 制备的超微 TBC 的 XRD 图谱

### 2.4 溶血实验

测定的 A 值分别为: 实验组 A 值 0.299, 阴性对照 A 值 0.388, 阳性对照 A 值 0.138。检测结果显示, 溶血率为 35.6%, 属于允许范围, 说明该材料具有良好的血液相容性。

### 2.5 全身急性毒性实验

1 周内小鼠无死亡, 期间小鼠无毒性反应表现。实验前平均体重  $22.9 \pm 1.1\text{g}$ , 实验后平均体重  $24.3 \pm 1.5\text{g}$ , 体重无显著性变化。

### 3 结论

采用无水乙醚索式提取法脱脂 6h, pH7~9 的

$70^\circ\text{C}$  下 20MPa 均质,  $85^\circ\text{C}$  杀菌 15min, 所得产品酸甜适口, 悬浮均匀, 稳定性良好, 保质期在 6 个月以上。

### 参考文献

- [1] 江苏省植物研究所, 中国医学科学院药物研究所, 中国科学院昆明植物研究所. 新华本草纲要[M]. 上海: 上海科技出版社, 1998: 51.
- [2] 薛颖, 宋曙辉, 武兴德, 等. 食用仙人掌的营养成分分析[J]. 天然药物研究与开发, 1999(12): 8-13.
- [3] 董颖苹, 黄琼, 黄先群. 药用植物仙人掌的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2001, 29(2): 63-65.
- [4] 助农. 蔬菜汁生产中的变色问题及对策. 北京农业信息网, 2003-12-26.

$5\text{mol/L}$  NaOH 溶液中  $80^\circ\text{C}$  水浴脱糖 2h, 沸水浴脱蛋白 4h 工艺条件, 可以脱去天然牛骨中 29.7% 的有机成分。

在  $800^\circ\text{C}$  条件下煅烧 6h, 初步制冷粉碎后再经过球磨超微粉碎制备的超微 TBC 粉, 经过 SEM 检测超微 TBC 粉孔径小 ( $200\sim 850\mu\text{m}$ ) 而分布均匀, 优于未粉碎样品。XRD 检测证明与标准品 HA 出峰位置和峰值相似, 证明主要成分是 HA, 纯度高。制备的超微 TBC 粉溶血率为 35.6%, 无全身急性毒理反应。

因此, 采用本工艺从天然牛骨中制备的超微 TBC 生物相容性良好。

### 参考文献

- [1] 陆伟. 以煅烧骨为支架材料的骨组织工程研究[D]. 第四军医大学硕士学位论文, 2003.
- [2] 李亚军, 阮建明. HA-Ti 和 HA-BG-Ti 复合生物材料的力学性能和微观结构[J]. 中南工业大学学报, 2002, 33(3): 261-265.
- [3] Zarana S Patel, Masaya Yamamoto, Hiroki Ueda, et al. Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2[J]. Acta Biomaterialia, 2008(4): 1126-1138.
- [4] Henning Schliephake, Herbert A Weich, Christian Dullin, et al. Mandibular bone repair by implantation of rhBMP-2 in a slow release carrier of polylactic acid—An experimental study in rats[J]. Biomaterials, 2008(29): 103-110.
- [5] Y Liu, L Enggist, A F Kuffer, et al. The influence of BMP-2 and its mode of delivery on the osteoconductivity of implant surfaces during the early phase of osseointegration[J]. Biomaterials, 2007(28): 2677-2686.
- [6] 王育才. 牛煅烧骨 bBMP 骨水泥复合材料的实验研究[D]. 第四军医大学硕士学位论文, 2003.
- [7] F Rosso, G Marino, A Giordano, et al. Smart materials as scaffolds for tissue engineering[J]. Journal of Cellular Physiology, 2005(203): 465-470.
- [8] Zandonella C. Tissue engineering: the beat goes on[J]. Nature, 2003, 421(6926): 884-886.