

衰减全反射-红外成像研究 聚乳酸/生物活性玻璃复合材料的体外矿化过程

王倩 姜小婷 辛韵子 崔俊先 张普敦*

(北京化工大学理学院, 北京 100029)

摘 要 采用衰减全反射-红外成像技术(ATR-FTIR mapping) 对多孔聚乳酸/生物活性玻璃(PLLA/BG) 复合材料在 PBS 缓冲液中的矿化过程进行了研究。光谱分辨率为 8 cm^{-1} , 累加扫描 8 次, 基于 A_{1044}/A_{1755} 的吸光度比值生成红外图像。成像结果表明, 随着矿化进行, 材料表面产生的羟基磷灰石(HA) 也逐渐增多, 当矿化进行到 84 d 后, 材料表面大部分已被 HA 覆盖。但随着矿化时间的继续延长, 矿化不均匀性也逐渐加剧。矿化曲线显示矿化过程存在 4 个阶段: 矿化初期(前 21 d) , 产生的 HA 很少; 矿化增长期(21 ~ 70 d) , BG 逐渐转变为 HA; 快速增长期(70 ~ 91 d) , 矿化加速, 并在 91 d 时达到最大; 矿化后期(91 d 后) , 曲线先显示平稳然后又从 105 d 起出现下降。研究表明, 红外成像技术有望成为骨组织工程支架材料的重要研究工具。

关键词 红外成像; 衰减全反射; 聚乳酸; 生物活性玻璃; 体外矿化

1 引 言

化学成像(Chemical imaging) 与其它成像方法(如电镜、荧光显微镜等) 不同, 主要用于观察样品微区域内各化学成分的分布情况。化学成像技术包括红外成像(FTIR imaging) 和拉曼成像(Raman imaging) , 其中红外成像是近十几年才发展起来的新技术, 是红外光谱技术从“点分析”向“面分析”, 甚至“体分析”的重要延伸。红外成像技术的分析模式有 Mapping、Imaging^[1] 以及衰减全反射(ATR)^[2]。对表面不太光滑的样品, 适合采用 ATR-FTIR mapping 方式采集。该技术自问世以来已在聚合物^[3~6]、生命科学^[7~8]、医药^[9]、考古和文物鉴定^[10] 以及法医学^[11] 等领域获得应用。

生物活性玻璃(Bioactive glass, BG) 是一种骨组织工程修复材料^[12], 是目前唯一能促进生长因子生成、细胞繁衍、活化细胞基因表达的人工合成无机材料^[13]。由于其加工性差, BG 通常与一些无毒的天然或合成聚合物复合制成高孔隙率的多孔支架。多孔结构有利于骨组织培养中的细胞生长、增殖以及细胞外基质的沉积、营养物和氧气的进入, 代谢产物的排出, 血管和神经的长入等^[14]。当聚合物/BG 复合物支架植入体内时, BG 会逐渐转化为羟基磷灰石(HA) , 并与骨形成紧密连接, 同时聚合物逐渐降解。由于活体操作复杂, 在仿生条件下进行体外矿化研究是最常用的研究手段^[15], 体外研究结果可对材料在体内的活性进行较好的预测。

目前, 对矿化过程的主要研究方法有扫描电镜、X 射线能谱、X 射线衍射以及红外光谱法等^[16], 这些方法仅能研究形貌、元素组成、总成分或总结晶状态的变化, 无法表征微区域内化学成分的改变。本研究采用 ATR-FTIR mapping 对矿化不同天数的聚乳酸/生物活性玻璃(PLLA/BG) 支架材料表面进行红外成像, 研究了复合材料在体外矿化过程中的化学组分变化情况, 并结合扫描电镜对矿化过程的材料形貌变化进行了观察。

2 实验部分

2.1 仪器、材料与试剂

Nexus 8700/Continuum XL 红外成像系统(美国 Thermo Fisher 公司) , S-4700 冷场发射扫描电镜(SEM, 日本 Hitachi 公司) , DK-420S 三用恒温水箱(上海精宏实验设备有限公司) 。生物活性玻璃(美

2013-03-26 收稿; 2013-09-22 接受

* E-mail: zhangpd@mail.buct.edu.cn

国 NovaMin 生物公司);左旋聚乳酸(PLLA, $\eta = 1.22$, $M_w \approx 121000$ 济南岱罡生物材料有限公司);二氧六环、乙醇、 AgNO_3 等试剂均为分析纯。

2.2 PLLA/BG 多孔复合材料的制备及体外矿化

采用溶剂浇铸-盐析法制备支架复合材料^[17]。简述如下:在室温下将 3 g PLLA 溶于 30 mL 二氧六环,并将 3 g BG 超声分散于相同体积的二氧六环中;将两种溶液混合,搅拌均匀;将已筛好的致孔剂 NaCl 细粉(80~100 目)加入混合液中,继续搅拌 30 min;将混合液浇铸在培养皿中至一定厚度,在自然条件下干燥 24 h;将干燥样片浸泡在去离子水中除去 NaCl,每 12 h 换一次水,直至浸泡液中无残留 Cl^- (用 0.1 mol/L AgNO_3 溶液检验);真空干燥 48 h,即得到 PLLA/BG 多孔复合材料。

将制得的复合材料放入盛有 250 mL PBS 缓冲溶液($\text{pH} = 7.4$)的烧杯中,烧杯置于 37 °C 的恒温水箱进行矿化。每 7 天取出一部分样品,浸泡在去离子水中除去残留 PBS,然后用滤纸除去表面水分,并于 45 °C 下真空干燥 24 h 后备用。PBS 缓冲液也同时每隔 7 天更换一次。

2.3 衰减全反射-红外成像

将浸泡不同天数的 PLLA/BG 样品裁剪成约 1.5 cm × 1.5 cm,并固定在清洁的载玻片上;载玻片置于红外成像系统的样品台上,MCT(汞镉碲)检测器注满液氮。进行 ATR-FTIR mapping 采集前,先将一个可滑动的 Si ATR 附件装在 15 × IR 物镜($N.A. = 0.58$)上,拉开 ATR 晶体,聚焦并采集可见光视场中的照片,选取成像区域(图像采集面积为 100 $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$),然后推入 ATR 晶体,采集红外图像。波长范围 4000 ~ 650 cm^{-1} ,样品扫描 8 次,背景扫描 64 次,分辨率 8 cm^{-1} 。图像的采集、处理及分析均由 Omnic 7.2 软件包(美国 Thermo Fisher 公司)中的 Atlas 完成。

2.4 扫描电镜

取烘干后的样品放入液氮中脆断,用导电胶带固定到样品台并喷镀铂金,然后用扫描电镜观察材料形貌,测试条件为 20 kV,10 μA 。

3 结果与讨论

3.1 原材料和矿化产物的红外光谱

当复合材料浸泡于 PBS 溶液时,PLLA 会降解为乳酸、 CO_2 及 H_2O 等水溶性物,因此不能直接用红外光谱测定;BG 在 PBS 中会逐渐矿化,形成 HA^[12,13],HA 高度结晶且不溶于水(25 °C 下 $\log K_{\text{sp}}(\text{HA}) = -57.5$ ^[18]),是人体骨骼和牙齿的主要无机成分。PLLA、BG 以及 HA 的显微 ATR-FTIR 光谱如图 1 所示,其中 PLLA 的典型吸收谱带^[19]为 1755 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$)、1184 及 1090 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$ 和 $\nu_{\text{s}}(\text{C-O-C})$);1044 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-CH}_3}$) 的肩峰也是其特征吸收。BG 为几种混合物的烧结无定形产物,红外吸收较弱,特征谱带为 1595 cm^{-1} ^[20];1460 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{CO}_3^{2-})$) 和 1035 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{Si-O-Si})$) 的宽谱带由于分别与 PLLA 的 1460 cm^{-1} ($\delta_{\text{C-H}}$)、1044 cm^{-1} 重叠以及与 HA 的 $\nu_{\text{P-O}}$ (1036 cm^{-1}) 重叠而不能用于直接表征 BG。需要强调的是,由于 BG 活性大,1595 cm^{-1} 谱带不是每次都能出现。在 HA 的光谱中,最典型的强吸收是 $\nu_{\text{P-O}}$,该谱带最适合对矿化进行表征。

3.2 红外图像的显示

图 2 显示了矿化 0 天时复合材料红外图像提供的一些典型信息。图 2a 是在可见光视场中的照片,其中红色方框区域用于红外成像。图 2b 和 2c 为该区域分别基于 1755 和 1595 cm^{-1} 谱带的吸光度(A_{1755} 和 A_{1595}) 分布来显示的红外图像,分别表征 PLLA 和 BG 在观察区域内的分布情况。红外图像通常以

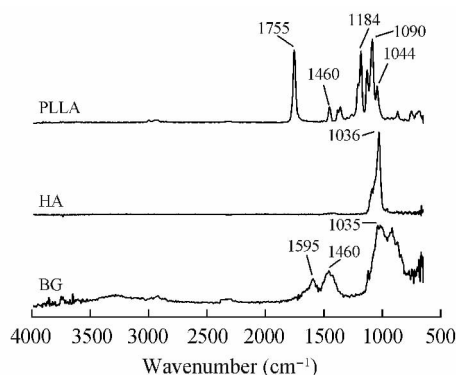


图1 聚乳酸、生物活性玻璃和羟基磷灰石的红外光谱图

Fig. 1 IR spectra of poly(L-lactic acid) (PLLA), bioactive glass (BG) and hydroxyapatite (HA)

RGB图(红绿蓝彩色图像)显示,不同颜色代表了相应波数下谱带的红外吸收强弱。本研究中,从蓝到红渐变的吸光度顺序为蓝<青绿<绿<黄<红。相应地,为获取不同空间位置处的光谱,可将光标放在该位置处,即可实时显示光谱。图2d和2e表明不同位置处的光谱明显不同。

图2b和2c中存在较大的蓝色区域,其光谱无特征吸收(如图2e),表明该区域为复合材料的孔隙,其它有特征吸收的区域为孔壁。红外图像表明,PLLA和BG的分布大致相同,说明两种组分在复合材料中分布较均匀。

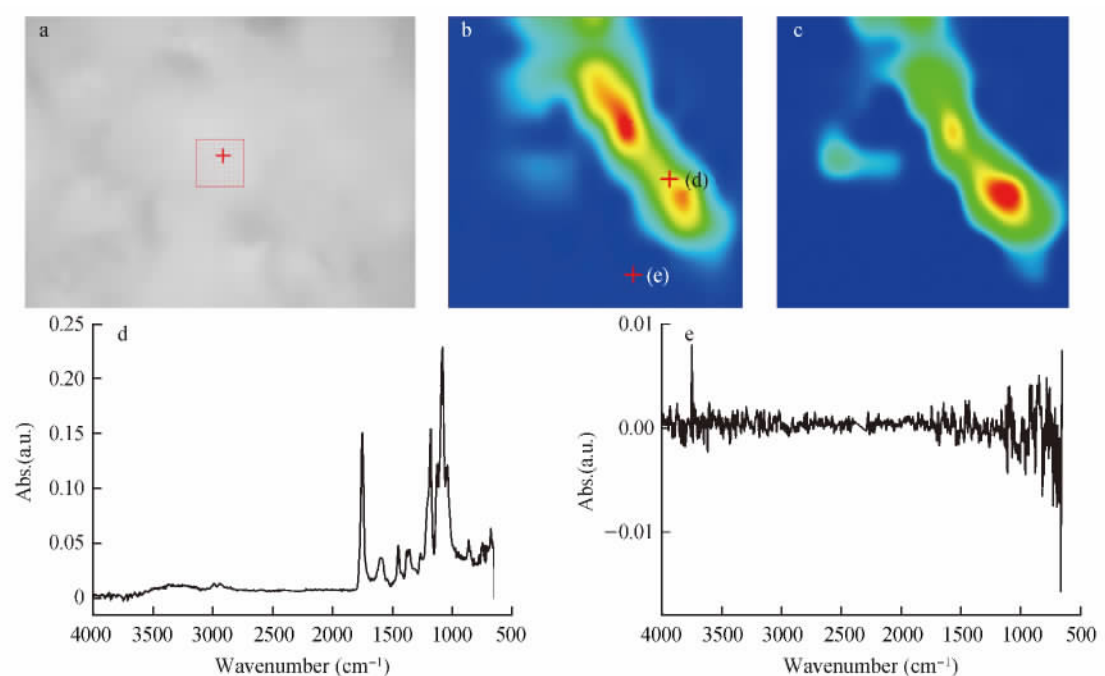


图2 PLLA/BG复合材料矿化0天时的红外图像及提供的典型信息。a. 亮场光学照片; b和c分别为基于1755 cm⁻¹和1595 cm⁻¹吸光度的红外图像; d和e分别为图像中不同位点(孔壁和孔隙区)的红外光谱

Fig. 2 FTIR images of non-mineralizing PLLA/BG composite and the provided information. (a) image at bright field, (b) and (c) are the FTIR images based on A_{1755} and A_{1595} , respectively, (d) and (e) are the FTIR spectra at varied sites, respectively.

3.3 基于红外成像的 PLLA/BG 复合材料矿化过程

当复合材料浸入37℃的PBS溶液时,即发生矿化。随着矿化的进行,HA逐渐增多,同时PLLA逐渐降解;由于HA与PLLA会发生氢键相互作用^[21],使HA特征谱带 ν_{P-O} 蓝移,从而与PLLA的 ν_{C-CH_3} 谱带重叠,其表观效果使1044 cm⁻¹谱带的吸光度增加。因此可通过1044与1755 cm⁻¹的吸光度比值(A_{1044}/A_{1755})反映矿化的进展,采用吸光度比值法还能消除不同采样点处ATR晶体与样品接触压力变化而引起的吸光度变化。在复合材料降解中采用吸光度比代替某一谱带的吸光度来获取红外图像(图3a和3b)能更真实地反映不同矿化时间下图像中的化学成分变化。多孔样品的红外图像经这样处理后,在一些本来为孔隙的区域总会出现极红(图3b),这是不正常的现象。这是因为在这些区域,无论1044 cm⁻¹还是1755 cm⁻¹均只有光谱噪

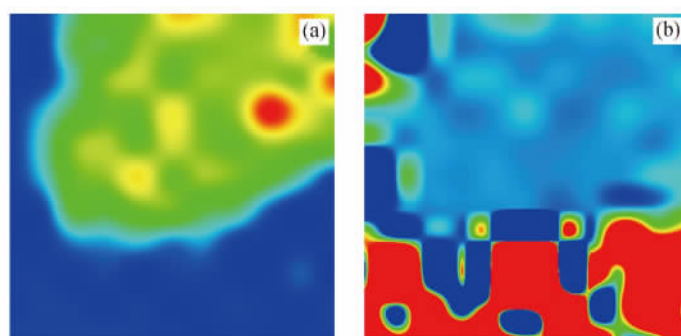


图3 实际采集的ATR-FTIR图像,其中(a)基于 A_{1044} , (b)基于 A_{1044}/A_{1755} , (b)中的红色区域实际为孔隙

Fig. 3 ATR-FTIR images of PLLA/BG composite based on (a) A_{1044} and (b) A_{1044}/A_{1755} . The red areas in (b) are actually the pores.

声,而无特征谱带(图 2e),因此导致某些区域的吸光度比值出现极大,红外图像失真。由于矿化均发生在复合材料的孔壁上,为了能真实地反映矿化过程,对每个时间点的图像均选取有代表性的孔壁区域进行上述吸光度相比,即得到图 4。从图 4 可见,随着矿化的进行,红外图像的颜色也由蓝向红逐渐过渡,表明 A_{1044}/A_{1755} 越来越大,说明复合材料表面上的 HA 越来越多;当达到 84 d 后,复合材料孔壁表面大部分已被 HA 覆盖。

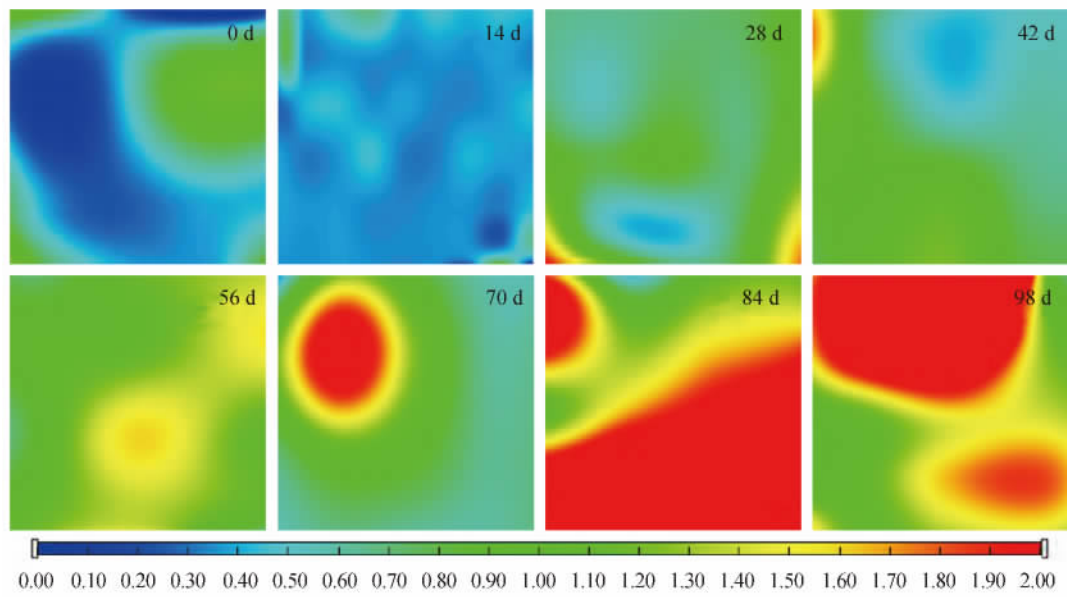


图 4 不同矿化天数下多孔复合材料孔壁的红外图像(基于 A_{1044}/A_{1755})

Fig. 4 ATR-FTIR images of the pore walls of PLLA/BG composites at different mineralization days based on the ratio of A_{1044} to A_{1755}

随着矿化继续进行,红外图像显示矿化的不均匀性在逐渐增加。由矿化进行到 119 d 时不同采集部位的图像(图 5)可见,即使在同一矿化天数下复合材料的红外图像差异也较大,某些图像显示 HA 较多,另一些图像显示 HA 较少;而在矿化的前期及中期这种差异较小。

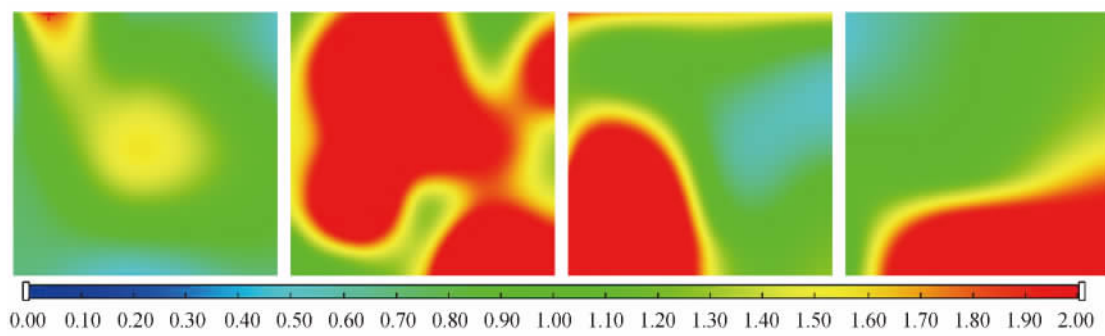


图 5 矿化 119 d 时不同采集部位的复合材料孔壁的红外图像(基于 A_{1044}/A_{1755})

Fig. 5 ATR-FTIR images of the pore walls of PLLA/BG composites of different sites after mineralizing 119 days based on the ratio of A_{1044} to A_{1755}

为了更直观地考察矿化情况,对每幅图像的光谱进行平均化处理,并以平均谱的 A_{1044}/A_{1755} 为纵坐标对矿化时间作图,得到矿化曲线(图 6)。图 6 表明,矿化过程存在 4 个阶段:矿化初期(前 21 d),HA 的产生量很少,PLLA 也几乎不降解;矿化增长期(21 ~ 70 d),随着矿化进行,BG 逐渐转变为 HA,同时 PLLA 也逐渐开始降解,矿化曲线呈现上升趋势;快速增长期(70 ~ 91 d),当矿化进行到第 70 d 时,矿化速度加快,矿化曲线快速上升,至 91 d 时达到最大,表明此时复合材料表面大部分为 HA 所覆盖;在矿化后期(91 d 后),曲线显示平稳后又开始下降。这是由于随着矿化深入,PBS 溶液浸入到复合材料内

部,使材料深处的聚合物出现降解,导致表面一部分生成的 HA 又出现脱落,使后期矿化不均匀性增加(图5),而矿化曲线是对所有图像光谱的平均统计,因而最终导致曲线出现下降。类似的不均匀矿化在文献[22]中也有报道。

3.4 矿化过程的 SEM 表征

矿化过程中复合材料的形貌变化采用 SEM 进行观察。从图7可见,矿化前复合材料的孔壁未见任何 HA 晶体;矿化初期(21 d),孔壁出现少量针状 HA 聚集体;矿化增长期(63 d),复合材料孔壁上已分布较多的针状 HA;而在快速增长期(84 d),HA 的量明显增多,而且增长的 HA 结晶逐渐形成网络结构;到矿化后期(105 d),网络结构已很明显,这种网络结构有助于增强矿化后支架材料的强度。SEM 和 FT-IR 成像分析表明,PLLA/BG 多孔复合材料在体外矿化过程中,除了形貌发生变化外,化学成分也发生了改变。

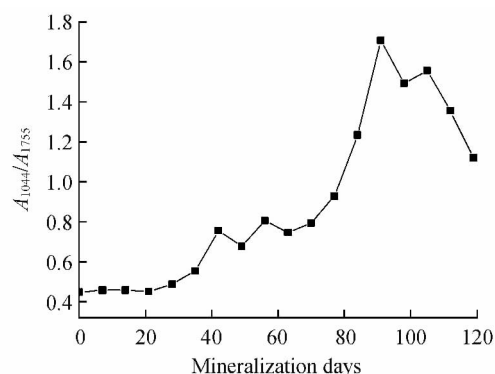


图6 基于平均谱 A_{1044}/A_{1755} 的矿化曲线

Fig. 6 Curve of A_{1044}/A_{1755} of average spectra versus mineralization days

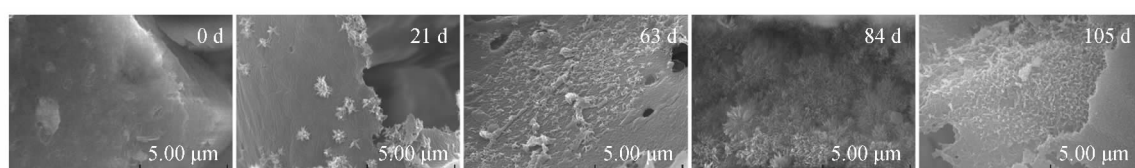


图7 复合材料矿化0,21,63,84以及105 d时的SEM照片

Fig. 7 SEM images of PLLA/BG composites after mineralizing 0, 21, 63, 84 and 105 days

4 结 论

本研究采用 ATR-FTIR 成像对 PLLA/BG 多孔生物复合材料的矿化过程进行了研究。和直接采用单谱带吸光度法成像相比,基于 A_{1044}/A_{1755} 的吸光度比值法成像能更真实地反映矿化过程中 HA 的产生情况。红外成像研究表明,随着矿化进行,材料表面的 HA 越来越多,当矿化进行到 84 d 后,材料表面大部分已被 HA 覆盖。随着矿化时间的延长,矿化不均匀性逐渐加剧。矿化曲线也清楚表明:从 70 d 起,矿化开始加速,并在 91 d 时达到最大,但大于 105 d 后矿化曲线又出现下降。研究结果表明,红外成像技术在骨组织工程支架材料的研究中能发挥重要作用。

References

- 1 Bhargava R, Wall B G, Koenig J L. *Appl. Spectrosc.*, **2000**, 54: 470 - 479
- 2 Kazarian S G, Chan K L A. *Appl. Spectrosc.*, **2010**, 64: 135A - 152A
- 3 Zhou X, Zhang P D, Jiang X T, Rao G Y. *Anal. Sci.*, **2007**, 23 (7): 877 - 880
- 4 Zhou X, Zhang P D, Jiang X T, Rao G Y. *Vib. Spectrosc.*, **2009**, 22(1): 17 - 21
- 5 ZHENG Ai-Guo, ZHAO Ying, XU Yi-Zhuang, WANG Du-Jin, ZHANG Xiu-Qin, ZHOU Yong, WENG Shi-Pu, WU Jin-Guang, XU Rui-Fu. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, **2004**, 24(7): 803 - 805
- 6 Zhou Y M, Li B B, Zhang P D. *Appl. Spectrosc.*, **2012**, 66(5): 566 - 573
- 7 Hackett M J, Lee J, El-Assaad F, McQuillan J A, Carter E A, Grau G E, Hunt N H, Lay P A. *ACS Chem. Neurosci.*, **2012**, 3: 1017 - 1024
- 8 Beljebbar A, Dukic S, Amharref N, Bellefqih S, Manfait M. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(22): 9247 - 9256
- 9 Chan K L A, Kazarian S G, Vassou D, Gionis V, Chrysikos G D. *Vib. Spectrosc.*, **2007**, 43: 221 - 226

- 10 Mazzeo R , Joseph E , Prati S , Millemaggi A. *Anal. Chim. Acta* , **2007** , 599(1) : 107 – 117
- 11 Ricci C , Bleay S , Kazarian S G. *Anal. Chem.* , **2007** , 79(15) : 5771 – 5776
- 12 Rahaman M N , Day D E , Bal B S , Fu Q , Jung S B , Bonewald L F , Tomsia A P. *Acta Biomater.* , **2011** , 7: 2355 – 2373
- 13 Jones J R. *Acta Biomater.* , **2013** , 9: 4457 – 4486
- 14 Armentano I , Dottori M , Fortunati E , Mattioli S , Kenny J M. *Polym. Degrad. Stabil.* , **2010** , 95: 2126 – 2146
- 15 Varila L , Fagerlund S , Lehtonen T , Tuominen J , Hupa L. *J. Eur. Ceram. Soc.* , **2012** , 32(1) : 2757 – 2763
- 16 El-Kady A M , Saad E A , El-Hady B M A , Farag M M. *Ceram. Int.* , **2010** , 36: 995 – 1009
- 17 JIANG Xiao-Ting , WANG Qian , ZHANG Pu-Dun. *Chemical Research and Application* , **2011** , 23 (6) : 755 – 760
姜小婷 , 王倩 , 张普敦. *化学研究与应用* , **2011** , 23 (6) : 755 – 760
- 18 Oliva J , Cama J , Cortina J L , Ayora C , De Pablo J. *J. Hazard. Mater.* , **2012** , 213-214: 7 – 18
- 19 Nejati E , Firouzdor V , Eslaminejad M B , Bagheri F. *Mater. Sci. Eng. C* , **2009** , 29: 942 – 949
- 20 Kazarian S G , Chan K L A. *Biomaterials* , **2004** , 25: 3931 – 3938
- 21 Zhou S , Zheng X , Yu X , Wang J , Weng J , Li X , Feng B , Yin M. *Chem. Mater.* , **2007** , 19(2) : 247 – 253
- 22 Murphy W L , Mooney D J. *J. Am. Chem. Soc.* , **2002** , 124(9) : 1910 – 1917

Characterization of In vitro Mineralization of Porous Poly(*L*-Lactic Acid) /Bioactive Glass Composites by Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Mapping

WANG Qian , JIANG Xiao-Ting , XIN Yun-Zi , CUI Jun-Xian , ZHANG Pu-Dun^{*}
(School of Science , Beijing University of Chemical Technology , Beijing 100029 , China)

Abstract Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) mapping was used to characterize the mineralization of porous poly (*L*-lactic acid) / bioactive glass (PLLA/BG) composite in PBS solution. FTIR images were generated based on the ratio of the absorbance of the band at 1044 cm⁻¹ to the one at 1755 cm⁻¹ (A_{1044}/A_{1755}) at a resolution of 8 cm⁻¹ with 8-coadded scans. The imaging results show that the amount of hydroxyapatite (HA) on the surface of the composites increases with soaking time and most of the surface area are covered by HA after being mineralized for 84 days. However , the heterogeneous mineralization increases with more time. The mineralization curve from the average spectra further suggests that there are four stages during mineralization. At the initial one (less than 21 days) , the amounts of HA are small; at the growth one (from 21 to 70 days) , BG is gradually converted to HA; at the rapid growth one (from 70 to 91 days) , the mineralization is accelerated and reached up to the maximum at 91 day; and at the late stage (larger than 91 days) , the curve becomes steady at first and then declines from 105 days. Our results suggest that ATR-FTIR mapping is promised to be an important tool for study of the scaffold in bone tissue engineering.

Keywords Fourier transform infrared mapping; Attenuated total reflection; Poly(*L*-lactic acid) ; Bioactive glass; In vitro mineralization

(Received 26 March 2013; accepted 22 September 2013)