

2005-11-28

## Electrochemical Controllable Preparation of Hydroxyapatite Coating with Different Morphologies and Preliminary in Vitro Tests

Hai-yan SHI

Ren HU

Chang-jian LIN

---

### Recommended Citation

Hai-yan SHI, Ren HU, Chang-jian LIN. Electrochemical Controllable Preparation of Hydroxyapatite Coating with Different Morphologies and Preliminary in Vitro Tests[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2005 , 11(4): 440-445.

DOI: 10.61558/2993-074X.1684

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol11/iss4/17>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

# 羟基磷灰石涂层的电化学可控制备 及生物性能的初步表征

时海燕, 胡 仁, 林昌健\*

(固体表面物理化学国家重点实验室, 厦门大学化学系, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 控制不同沉积条件制备不同结构形貌的羟基磷灰石涂层, 主要获得 3 种由不同尺寸晶粒构成的直立状、花簇状和多孔状典型形貌特征的涂层; XRD 物相分析显示, 该涂层主要由结晶良好的羟基磷灰石组成; FT-IR 组分分析未检测到其他钙磷盐成分的存在. 体外细胞培养试验表明, 以上各种形貌的羟基磷灰石涂层均具有良好的生物相容性, 但其生物活性则因形貌而异, 其中纳米有序多孔状羟基磷灰石涂层表现出最高的生物活性, 而花簇状的涂层生物活性相对较低.

**关键词:** 羟基磷灰石涂层; 结构有序; 电化学沉积; 生物性能

**中图分类号:** O 646

**文献标识码:** A

自然骨是由纳米羟基磷灰石 (HA) 与胶原有序组装而成的无机/有机复合材料. 骨质中, 纳米 HA 长轴 (即  $c$  轴) 沿胶原纤维三维螺旋延伸的方向择优排列, 这一有序结构保证了最大限度的力学性能<sup>[1-3]</sup>. 为了研究具有生物骨基本特征的硬组织替代材料, 必先结构上模拟生物骨, 而纳米有序复合人工骨的仿制是其必经途径. 近年来, 由羟基磷灰石与胶原以及其它生物大分子杂化制备无机/有机复合材料的研究有许多报道<sup>[4,5]</sup>, 但关于有序结构纳米人工骨材料的研究开发才刚刚起步. 在制备生物活性 HA 涂层的众多方法中, 电化学沉积法因其制备条件温和、工艺简单、易于控制的等优点而受到广泛关注, 可望发展成为一种具有应用前景的制备高性能生物材料的新技术.

电化学沉积钙磷盐的基本原理是: 阴极附近电解液的钙磷物种在高 pH 环境下会因达到一定的过饱和度而析出, 而电极材料、电解液组成、沉积模式及其电流、电压参数乃至沉积温度、电极表面传质状况和沉积时间等对这一析晶过程均有影响<sup>[6-8]</sup>, 掌握这些因素的影响规律并在电沉积过程中综合调控这些参数就可制得不同形貌性质的

HA 涂层. 对钙磷盐的电化学沉积, 其可控性主要表现在组分可控, 即: 1) 由金属镍和乙酸乙烯酯、胶原等有机物种<sup>[9-11]</sup>的共沉积制备复合涂层; 2) 先行制备 HA 前驱体, 再经后处理使之转化为纯 HA<sup>[12-17]</sup>, 也可直接从溶液中沉积出纳米相纯 HA<sup>[18,19]</sup>. 本工作主要研究电化学沉积法制备 HA 涂层的形貌可控性, 制备了具有不同有序结构特征的 HA 涂层材料并对其理化性能和生物性能进行初步表征, 以期对电化学沉积构筑有序结构的高性能复合人工骨涂层提供重要的实验参考.

## 1 实验方法

### 1.1 羟基磷灰石 (HA) 涂层的制备

以工业纯钛作工作电极, 表面经打磨、刻蚀处理; 铂片作对电极. 电沉积液是含有一定浓度  $\text{CaCl}_2$  和  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( $\text{Ca}/\text{P}$  为 1.67), 以  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaCl}$  作支持电介质的水溶液, 采用阴极恒电流沉积模式, 按给定制备条件 (见表 1) 调控电流密度、沉积温度、沉积时间和溶液 pH 值, 即可制得不同形貌结构的 HA 涂层.

收稿日期: 2005-06-16 \*通讯联系人: Fax: (86-592) 2189354, E-mail: cjlin@xmu.edu.cn

国家自然科学基金 (20273055)、教育部博士点基金 (20020384012) 和国家 863 研究计划 (2003AA302230) 资助

表 1 不同形貌 HA 涂层的电化学沉积条件

Tab 1 Deposition parameters of the hydroxyapatite coatings with different topographies

Sample (morphology)	[Ca <sup>2+</sup> ]/mol·L <sup>-1</sup>	Electrochemical pH value	Deposition t/min	Parameters i/mA·cm <sup>2</sup>	T/
a (standing-up)	~4 ×10 <sup>-4</sup>	6.0~7.0	20~60	0.5~1.5	75~100
b (flower-like)	~1 ×10 <sup>-4</sup>	5.5~7.2	30~240	0.1~1.5	~100
c (ordered porous)	~4 ×10 <sup>-4</sup>	6.2~6.5	15~60	0.75~1.25	~100

### 1.2 HA 涂层的表征

XRD 实验使用 D/MAX-RC 转靶 X 射线粉末衍射仪 (日本理学 RIGAKU 公司), 铜靶, 管电压 40 kV, 管电流 30 mA, 狭缝系统 1°DS-1°SS-0.15 mmRS, 以石墨单色器滤波, 扫描速率 6°·min<sup>-1</sup>; FT-R 实验用 AVATAR FT-R 360 红外光谱仪 (美国 Nicolet); LEO 1530 扫描电子显微镜 (德国) 作 SEM 测试。

### 1.3 细胞培养实验

用作体外培养试验的细胞为 MG63 人成骨肉瘤细胞。采用 RPM II640 培养基 (含 15% 胎牛血清, 青霉素 100 U·mL<sup>-1</sup>, 链霉素 100 μg·mL<sup>-1</sup>), 在二氧化碳培养箱 (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, 饱和湿度) 中培养。细胞以 5 ×10<sup>4</sup> cells·cm<sup>-2</sup> 种植密度接种于材料, 于培养箱中培养 2 d 后取出, PBS 清洗, 用 2.5% 戊二醛溶液于 4 °C 下固定 2 h, PBS 清洗, 依次用梯度酒精 (30%、50%、70%、80%、90%、95% 和 100%) 脱水、经临界点干燥和喷金后由扫描电子显微镜观察形貌。

## 2 结果和讨论

### 2.1 HA 涂层结构及组分特征 -XRD 和 FT-R 表征

电沉积钙磷盐涂层的 XRD 谱线如图 1 所示。由图可见, 该涂层的衍射峰位与标准羟基磷灰石卡片的峰位吻合, 又从相对峰强的变化可知, 该电沉积涂层乃为具有特殊择优取向且结晶度较高的羟基磷灰石。一般而言, 出现一定程度上的择优生长是电化学沉积钙磷盐涂层的普遍现象, 而且通常都是沿着 c 轴方向的择优排列。为比较上述择优生长的程度, 定义 c 轴方向的择优相对强度 RI 为 (002) 晶面峰的强度与标准粉末衍射卡片的 (211) (112) (300) 晶面三大衍射峰强度之和的比, 即

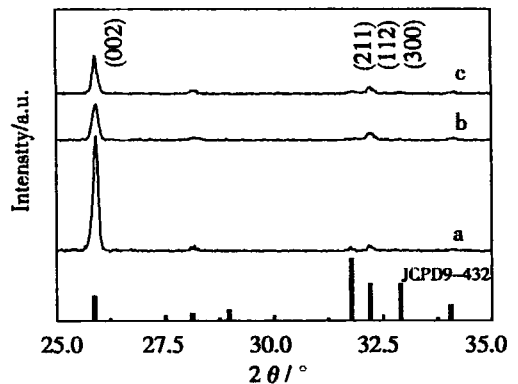


图 1 不同形貌电沉积涂层 XRD 谱

Fig 1 XRD patterns of Ca/P coatings with different topography  
a) standing - up structure, b) flower type structure, c) porous structure

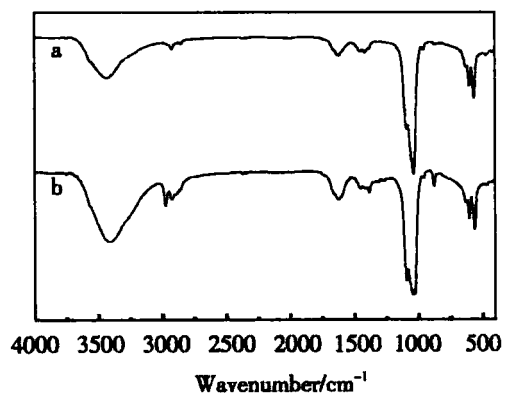


图 2 纯羟基磷灰石和电沉积 HA 涂层的 FTIR 谱

Fig 2 FTIR spectra of Ca/P coatings  
a) pure hydroxyapatite, b) hydroxyapatite coatings by electrochemical deposition

$$RI = \frac{I_{002}}{I_{211} + I_{112} + I_{300}}$$

并定义 c 轴方向择优度 P 为:

$$P = \frac{RI - RI_s}{RI_s}$$

$$RI_s = 182$$
 是标准卡片 c 轴择优的相对强度。

据图 1,算得不同形貌 HA 涂层样品的 c 轴方向择优度,分别为:直立状,  $P = 43.3$ ;花簇状,  $P = 10.3$ ;孔状,  $P = 15.8$  其中直立状的择优度最高,其它两种择优度较低。

图 2 为纯羟基磷灰石和电沉积 HA 涂层样品的红外谱图,显示两谱线的 R 峰形非常一致,几乎没有任何的红移和蓝移现象,进一步证实了 XRD 的表征结果,即电沉积钙磷盐涂层是结晶度较高的纯 HA 涂层。

### 2.2 涂层形貌特征 - SEM 表征

图 3 为在不同电沉积条件下制备的 3 种较有代表性的 HA 涂层即直立状、花簇状和多孔状形貌的 SEM 照片。

如图 3 可见,3 种 HA 膜层的基本构造单元均为针状晶体,但晶粒尺寸及其形貌却随着制备条件而呈现有趣变化,有正六边形横截面较大的偏柱状晶体 (图 3b),也有横截面很小 (约几十 nm) 的线状晶体 (如图 3a 和 3c);并且 HA 晶粒的柔韧性随着晶粒尺寸的减小逐渐出现柔韧交联增强的现象。形貌上,则从比较规整的细针直立状 (a) 到成簇的散花状 (b) 乃至部分排列成微米级孔的交联多孔状纳米 HA 涂层 (c)。研究表明<sup>[20,21]</sup>,涂层的晶粒尺寸及其表面拓扑结构对表面细胞的生长行为有很大影响,但可以通过实验参数的严格调控制备不同形貌的 HA 涂层。在以上制备的 3 种具有代表性的 HA 涂层中,由纳米级 HA 有序排列构筑的微米级多孔结构对涂层生物学性能的改善具有重要意义。图 3c 显示,这种交联多孔状纳米 HA 涂层的

晶须为纳米尺寸,且晶须互相交联形成均匀有序排列的空间网格状形貌,其孔径一般在 0.8~3.5μm 之间,具有更大的比表面积,更有利于植入有机体后细胞和组织的附着和生长;因而最有希望大幅度提高钛基底表面的生物活性。

### 2.3 涂层生物性能初步评价 —— 体外细胞培养的生长形态观察

体外细胞培养实验表明,细胞在不同形貌的 HA 涂层上贴附性都比较好,这和 HA 优良的生物相容性密切相关的。HA 涂层具备了细胞贴附与伸展所必须的钙离子条件,而涂层表面的粗糙度等物理因素又为细胞的贴附提供了接触点。图 4 是 3 种形貌 HA 涂层上 MG63 细胞生长形态的 SEM 照片,显然在不同形貌的 HA 涂层上细胞贴附后的伸展形态及其吸附生长量差别都很大。

比较图 4 上方各 SEM 照片 (放大 500 倍的细胞生长形态) 可知,当细胞贴附于涂层后,其进一步伸展生长受 HA 涂层形貌的影响很大。在直立状 (a) 和多孔状 (c) HA 涂层上贴附的细胞已由种植前的圆状和梭状铺展散开,而且各细胞周围又伸出许多大小不一、粗细不等的伪足,尤以交联多孔状 HA 涂层表面为甚。又因这两种 HA 涂层的晶须与细胞的伪足尺度相当,故而呈现交联融合的生长趋势。显然这两种形貌的 HA 涂层均有较高的生物活性,能较好地促进细胞分化、增殖。但粗略比较,对交联多孔状 HA 涂层,其单位面积的细胞吸附生长量远大于细针状 HA 涂层表面的。其原因可能是前者的纳米尺度晶须为细胞伪足提供了更多的附着接触点,而且其有序排列的网格状形貌又可大幅度地增加实际比表面积,从而提高该涂层对细胞的吸附能力。对直立状的 HA 涂层,因其晶体尺寸小,

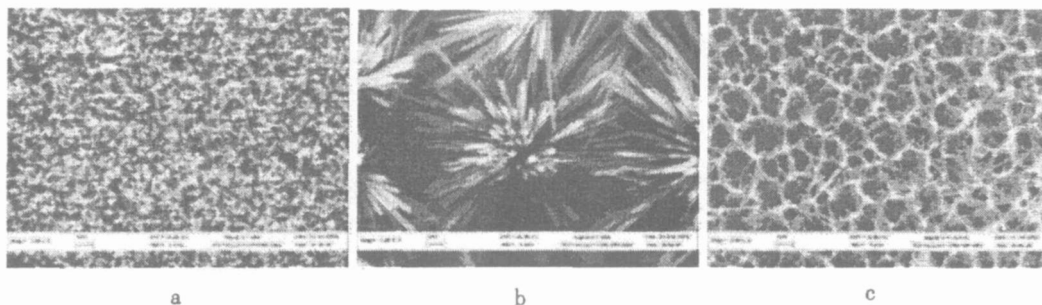


图 3 电化学沉积具有不同表面形貌的 HA 涂层 SEM 照片

Fig 3 SEM images of the HA coatings by electrochemical deposition with different topography a) standing-up, b) flower-like, c) ordered porous

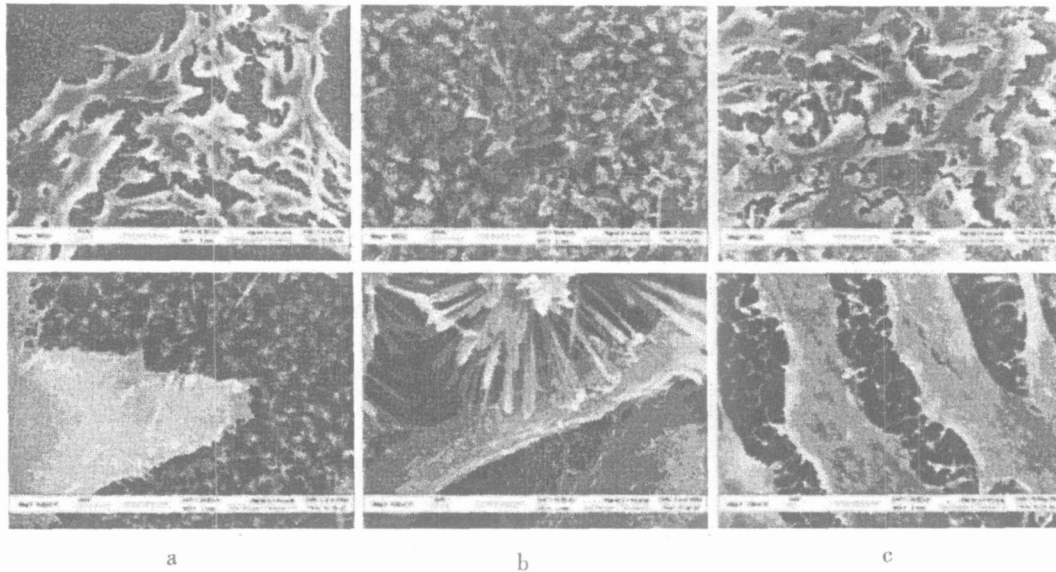


图 4 不同形貌 HA 涂层表面 MG63 细胞生长状态的 SEM 图像

Fig 4 SEM images of MG63 cells cultured on HA coatings with different morphology

a) standing-up, b) flower-like, c) ordered porous

晶粒分布较紧密,导致该涂层的比表面积远远小于多孔状 HA 涂层的,从而降低了其对细胞的吸附能力.从较高倍数的 SEM 照片还可看出,多孔状 HA 涂层的晶须与细胞伪足交联生长的程度,也比直立状涂层的大很多,而在晶须与细胞伪足呈现有机融合生长状态的地方,很难分辨出两者之间的界线.对花簇状 HA 涂层,其表面的细胞生长形态仍呈饱满的梭形,没有铺展散开(b),微绒毛和伪足都比较少.只有极少数的细胞附着于该涂层表面,且倾向于贴附在晶簇的间隙中.从较高倍数的 SEM 照片可观察到该涂层表面贴附细胞的生长细节,由于这种花簇状 HA 晶粒尺寸较大、晶须较挺直脆硬,很难与细胞柔软的伪足交联融合生长.因而其生物活性也较低.

### 3 结 论

1)应用电化学沉积法可在钛表面获得结晶度较好的纯羟基磷灰石(HA).调控不同的电沉积条件可制备不同结构形貌的羟基磷灰石涂层,其中,较有代表性的是由不同尺寸晶粒构成的直立状、花簇状和多孔状等 3 种典型形貌的 HA 涂层.这些具有特征形貌的涂层形成主要依赖于电极/溶液界面的化学微环境.

2)不同形貌 HA 涂层的生物相容性都较好,而其生物活性则因形貌不同而异,多孔状 HA 涂层的

生物活性最高,即具有最佳的引导细胞生长的能力.这是由于该 HA 涂层的纳米尺度晶须可为细胞伪足提供更多的附着接触点,其有序排列的多孔形貌结构,不仅大幅度地增加了涂层实际比表面积,也为细胞生长过程提供更加充足的营养.

### 参考文献 (References):

- [1] Themistocleous GS, Katopodis H, Sourla A, Three - dimensional type collagen cell culture systems for the study of bone pathophysiology [J]. *In Vivo*, 2004 (18) 6: 687 - 696
- [2] Verdonk PCM, Wang J, A mgvist KF, et al Chondrogenic differentiation of adult human bone marrow derived mesenchymal stem cell cultured on a collagen scaffold or as micropellet [J]. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2003 (62) Suppl: 129.
- [3] Mieno H, Kuroda K, Tajima S Bone morphogenetic protein - mediated type II collagen expression in pir kmatricoma and cutaneous mixed tumor [J]. *Journal of Cutaneous Pathology* 2005 (32) 3: 206 - 211.
- [4] Feng QL, Cui FZ, Zhang W, Nano-hydroxyapatite/collagen composite for bone repair [J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae (Chinese)*, 2002, 24: 124
- [5] Fei Chen, Zhoucheng Wang, Changjian Lin Preparar-

- tion and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials [J]. *Mater Lett*, 2002, 57: 858
- [6] S Ban, S Maruno Effect of temperature on electrochemical deposition of calcium phosphate coatings in a simulated body fluid [J]. *Biomaterials*, 1995, 16: 977.
- [7] Xianghui Hou, Xin Liu, Jianmin Xu, et al A self-optimizing electrodeposition process for fabrication of calcium phosphate coatings [J]. *Mater Lett*, 2001 (50): 103 - 107.
- [8] Hu R, Shi HY, Lin CJ, et al The crystal growth behavior of hydroxyapatite coating on titanium substrate under electrochemical deposition conditions [J]. *Acta Physico-Chimica Sinica (Chinese)*, 2005 (21) 2: 197 - 201.
- [9] Liu Rongfang, Xiao Xiufeng, Zuo Yousong, Study on electrodeposited Ni-HA composite coatings [J]. *Materials Protection (Chinese)*, 2003, 36 (8): 28 - 30
- [10] Haobing Hu, Changjian Lin, Ren Hu, et al A Study on HH hybrid bioceramic coatings of HA/Poly (Vinyl Acetate) Co-deposited electrochemically on Ti-6Al-4V alloy surface [J]. *Materials Science and Engineering C*, 2002, 20 (1 - 2): 209 - 214.
- [11] Chen Jida, Wang Yuanliang, Cai shaoxi, et al Study on preparation for nano-hydroxyapatite/collagen composite [J]. *Acta Biophysica Sinica (Chinese)*, 2001, 17 (4): 778 - 785.
- [12] Redepinning, J. Mc Issac, J P. Electrocrystallization of brushite coatings on prosthetic alloys [J]. *Chem. Mater*, 1990, 2: 625.
- [13] Kuo, M C. Yen, S K The process of electrochemical deposited hydroxyapatite coatings on biomedical titanium at room temperature [J]. *Materials Science and Engineering C*, 2002 (20): 153.
- [14] Huang Liye, Han Yong, Xu Kewei, Experimental study of fabrication of hydroxyapatite biocoatings by electrochemical deposition and hydrothermal synthesis [J]. *Journal of the Chinese Ceramic Society (Chinese)*, 1998 (26): 87 - 91.
- [15] Shirkhazadeh, M. Bioactive calcium phosphate coatings prepared by electrodeposition on titanium and titanium alloy [J]. *J. Mater Sci Lett*, 1991 (10): 1 415 - 1 417.
- [16] Shirkhazadeh, M. Calcium phosphate coatings prepared by electrocrystallization from aqueous electrolytes [J]. *J. Mater Sci Mater Med*, 1995 (6): 90 - 95.
- [17] Shirkhazadeh, M. Electrochemical Preparation of bioactive calcium phosphate coatings on porous substrates by the periodic pulse technique [J]. *Mater Lett*, 1993, 12: 16 - 19
- [18] Shirkhazadeh Direct formation of nanophase hydroxyapatite on cathodically polarized electrodes [J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1998 (9): 67 - 72
- [19] Hu Hao-bing, Lin Chang-jian, Chen Fei, et al Pure HAP film prepared by direct electrodeposition on metallic surface and its mechanism [J]. *Electrochemistry (Chinese)*, 2002 (8) 3: 288 - 294
- [20] Montanaro L, Arciola C R, Campoccia D, et al, In vitro effects on MG63 osteoblast-like cells following contact with two roughness-differing fluorohydroxyapatite-coated titanium alloys, [J]. *Biomaterials*, 2002 (23): 3651 - 3659.
- [21] Liu Yanping, Rong Li, Meng Xiangcai, et al Observation of surface ultramicrostructure and quantitative analysis of bone density in implant - bone interface after surface modification of titanium implant [J]. *Heilongjiang Medicine And Pharmacy (Chinese)*, 2000, 2: 2 - 5.

## Electrochemical Controllable Preparation of Hydroxyapatite Coating with Different Morphologies and Preliminary in Vitro Tests

SHI Hai-yan, HU Ren, LI N Chang-jian\*

(State Key Laboratory for Physical Chemistry of Solid Surfaces, Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** The Controllable electrochemical deposition has been developed to prepare the hydroxyapatite (HA) coatings on Ti substrate with different morphologies and structures. Three kinds of typical topography of HA coatings, i.e. standing-up, flower and ordered porous structures have been obtained. The XRD and FTIR results demonstrate high crystallinity of the coating and exclusion of other forms of calcium phosphates. In vitro tests reveal that the biological property is largely dependent on the structure and morphology of the HA coating. It has been found that all pure HA coating show good biocompatibilities, while only the HA coating with ordered porous structures exhibits best bioactivities.

**Key words:** HA coating, Different morphology, Electrochemical deposition, Bioproperty

## 第 14 届全国分子光谱学学术会议征文通知

### 14<sup>th</sup> National Conference on Molecular Spectroscopy

“第 14 届全国分子光谱学术会议”由中国化学会和中国光学会联合举办, 预定于 2006 年 7 月 8 日到 11 日在长春召开, 届时将邀请国内外著名学者到会作报告, 同时进行专题讨论和论文交流. 会议涉及的领域为: 分子光谱理论; 红外光谱、拉曼光谱、紫外光谱、荧光光谱等在各个领域的创造性应用和基础研究.

详情请查询: <http://supramol.jlu.edu.cn> 或: E-mail: zhaobing@mail.jlu.edu.cn

来稿请寄: 吉林省长春市前卫路 10 号, 吉林大学超分子结构与材料教育部重点实验室, 赵冰收. 邮政编码: 130012 电话: 0431 - 5168504, 5168473

中国化学学会物理化学委员会  
中国光学会光谱委员会  
吉林大学超分子结构与材料教育部重点实验室

2005 年 8 月