

电沉积制备氧化石墨烯-羟基磷灰石复合涂层

曾永香¹, 贺瑞², 裴锡波¹, 田玲钰¹, 王剑³, 万乾炳³

(1. 四川大学 口腔疾病研究国家重点实验室, 四川 成都 610041)

(2. 杭州师范大学 附属医院口腔科, 浙江 杭州 310015)

(3. 四川大学 华西口腔医院修复科, 四川 成都 610041)

摘要: 采用电沉积方法在钛表面制备氧化石墨烯-羟基磷灰石 (Graphene oxide/Hydroxyapatite, GO/HA) 复合涂层, 通过调整 GO 的浓度, 研究 GO 对所得涂层晶体结构及生物学性能的影响。采用扫描电镜 (SEM)、透射电镜 (TEM)、X 射线衍射 (XRD) 仪、傅里叶变换红外光谱 (FTIR)、拉曼光谱分析所得涂层的表面形貌和物相构成, 用 SEM 观察涂层表面 MG63 成骨样细胞生长情况。结果表明, 电沉积法可在钛表面制备 GO/HA 复合涂层, 且随 GO 浓度增加, HA 结晶度增加。此外, 复合涂层较单纯 HA 涂层更能促进成骨样细胞早期粘附。

关键词: 电沉积; 氧化石墨烯; 羟基磷灰石; 复合涂层

中图分类号: TG76

文献标识码: A

文章编号: 1002-185X(2016)03-0727-05

石墨烯(Graphene)是 2004 年发现的一种新型碳纳米材料。它由一层密集的、包裹在蜂巢晶体点阵上的碳原子组成, 具有优异的电学、力学和热学性质^[1]。自石墨烯问世以来, 相关研究工作主要集中于其物理学、化学和材料学性能的研究, 而在生物医学领域的研究仅始于近几年。作为石墨烯衍生物的氧化石墨烯 (graphene oxide), 由于其化学结构中含有大量的羟基、羧基等含氧基团, 具有较好的亲水性, 近年来在生物复合材料领域得到了大量的研究^[2-4]。

现有的研究发现^[5,6], 氧化石墨烯具有促进羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HA) 成核的作用, 能够促进纳米级 HA 颗粒的形成。同时, 石墨烯具有良好的生物学性能, 不仅能促进成纤维细胞的增殖^[7,8], 还能促进成骨细胞^[9]、骨髓基质干细胞的分化和增殖^[10]。此外, W. Hu^[11]和 S. Liu^[12]等研究发现氧化石墨烯具有抗菌特性, 能有效抑制大肠杆菌的生长。

羟基磷灰石具有与人体骨相近的化学组成和结构, 具有引导骨组织再生的功能, 因而被作为种植体表面涂层以改善纯钛种植材料的生物惰性。涂层的稳定性及生物学活性受羟基磷灰石结晶程度及晶粒大小的影响。结晶度越高, 其性能越稳定。纳米级羟基磷灰石颗粒能促进成骨细胞的早期粘附^[13]。

鉴于氧化石墨烯的以上特性, 可以尝试制备氧化石墨烯-羟基磷灰石复合涂层 (GO/HA composite

coatings), 以改善涂层表面晶体构相, 获得一种生物学性能优良同时兼具抗菌性能的新型种植体。在涂层制备的众多方法中, 电沉积法优点甚多: 能在低温条件下制备, 为非线性工艺, 通过调整电沉积参数可有效调节涂层性能等。目前, 尚未见电沉积法制备氧化石墨烯-羟基磷灰石复合涂层的相关研究。因此, 本研究在电解液中加入不同浓度的氧化石墨烯, 通过电沉积制备了氧化石墨烯-羟基磷灰石复合涂层, 并对其表面结构、物相构成和生物学性能进行了分析, 对石墨烯材料在种植材料表面改性方面的研究进行初探。

1 实验

本实验使用的商业纯钛片由陕西宝鸡有色金属工业公司生产, 氧化石墨烯由南京先丰纳米科技有限公司提供, 试剂均为分析纯, 由成都科龙化工试剂厂生产。

钛片 10 cm×1 cm×0.1 cm, 经 300#~1200#水砂纸逐号打磨, 水洗, 无水乙醇及丙酮超声清洗各 15 min, 4%HF 溶液处理钛片 2 min, 水洗, 聚四氟乙烯带包裹非工作面, 保留 5 cm 长度钛片作为工作端, 钛片边缘砂磨圆钝以避免边缘效应。

电解液为 0.042 mol/L Ca(NO₃)₂·4H₂O、0.025 mol/L NH₄H₂PO₄、0.15 mol/L NaNO₃ 以及 6% 质量比的 H₂O₂, 稀硝酸调节 pH 值至 6.0, 保持溶液中 Ca/P=1.67。片状氧化石墨烯置于超纯水中经 570 W 超声处

收稿日期: 2015-03-20

基金项目: 教育部留学回国科研启动基金 (2013-693-11-8)

作者简介: 曾永香, 女, 1989 年生, 硕士, 四川大学华西口腔医学院, 四川 成都 610041, E-mail: zyx891217@hotmail.com

理 2 h 后, 形成金黄色稳定悬液备用。在电解液中加入不同量的 GO 悬液, 使 GO 浓度分别达到 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。根据 GO 加入量的不同将实验组分为 2 组, 分别用 HA/GO-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以及 HA/GO-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 表示, 未加 GO 的单纯 HA 涂层作为对照组。

电沉积过程在电解槽中进行, 电解液体积为 250 mL, 石墨棒作阳极, 钛片作阴极, 电极间距 2.5 cm, 磁力搅拌器搅拌液体, 搅拌速度为 180 r/min, 保持电解液温度为 15 $^{\circ}\text{C}$, 采用恒电流法进行涂层沉积, 电流密度 $i=0.6 \text{ mA}/\text{cm}^2$, 沉积时间为 30 min。

沉积涂层经超纯水清洗并干燥后, 置于 0.1 mol/L NaOH 溶液中 60 $^{\circ}\text{C}$ 水热处理 48 h, 碱液处理后的试样行 450 $^{\circ}\text{C}$ 真空烧结, 样本制作完成。

用原子力显微镜 (AFM, SPM-9600, Shimadzu, Japan) 对超声处理后获得的 GO 悬液进行表征, 以观察 GO 的形态及粒径。SEM (KYKY-2800 microscope, KYKY Technology Development LTD) 观察涂层表面形貌。涂层从钛片表面刮下后, 置于无水乙醇中, 经超声处理后行 TEM (FEI, Hillsboro, OR, USA) 检测, 以观察 GO 与 HA 晶体的结构。XRD (DX-1000, Dandong Fangyuan Instrument CO., LTD) 分析涂层晶体结构, 测试条件为: Cu 靶/石墨单色器 ($\lambda=0.1542 \text{ nm}$), 管压 42 kV, 管流 110 mA, 扫描速率 0.4 $^{\circ}/\text{s}$, 步长 0.02 $^{\circ}$ 。FTIR 红外光谱仪 (Thermo Nicolet 6700) 及拉曼光谱 (LabRAM HR, HORIBA Jobin Yvon SAS, Longjumeau, France) 测定涂层中化学基团的振动吸收光谱。

将电沉积后的钛片剪成 1 cm \times 1 cm 大小的试样, 高温高压消毒后, 置于 24 孔板内, 用于细胞粘附实验。调整 MG63 成骨样细胞浓度为 $5 \times 10^3/\text{mL}$, 将细胞悬液按每孔 1 mL 滴加到试样表面。置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中培养 24 h 后, 试样表面经磷酸盐缓冲液漂洗, 2.5% 戊二醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存过夜, 乙醇 (30%, 50%, 70%, 80%, 95%, 100%) 梯度脱水后, 醋酸异戊酯置换乙醇, 临界点干燥, 常规喷金, 于扫描电镜下观察涂层表面细胞生长情况。

2 结果与讨论

2.1 表面形貌

购买的氧化石墨烯呈多层重叠片状, 经超声处理后, GO 呈少数层片状。图 1 中 AFM 结果直观的展示了 GO 片层厚度约为 2.0 nm, 粒径宽度为 200~600 nm。S. Stankovich 等认为 1.0 nm 基本就是单层氧化石墨烯的厚度^[14]。可见, 超声处理后的 GO 主要呈双层片状。

肉眼观实验组 GO/HA 复合涂层呈淡黄色, 而对照组单纯 HA 涂层呈白色。

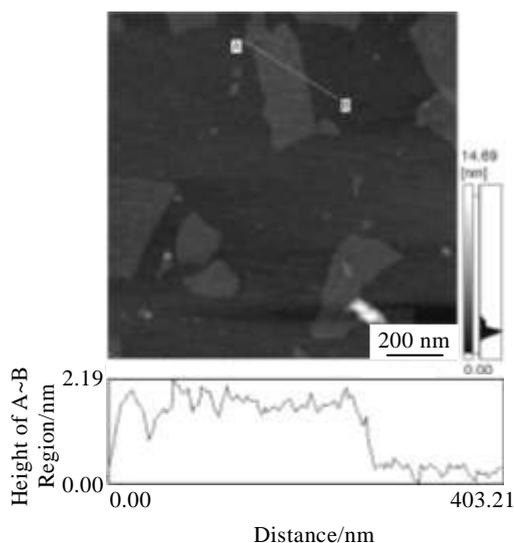


图 1 超声处理后 GO 的 AFM 分析

Fig.1 AFM analysis of the ultrasound-treated GO with uniform height of 2.0 nm and the lateral dimensions ranging from 200 nm to 600 nm

SEM 观察可见, 低倍数下 (图 2a~2c) 对照组 HA 涂层呈重叠片状, 表面起伏不平。随 GO 加入, HA/GO-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 涂层及 HA/GO-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 涂层表面片状结构体积变小, 且表面更均匀, 突起不明显。实验组及对照组表面均未见明显裂纹。高倍数下可见 (图 2d~2f), HA 涂层中羟基磷灰石晶体呈针状, 随 GO 浓度增加, 羟基磷灰石晶体晶粒变细, 呈纳米级, 晶粒呈团簇状分布, 其间存在微孔隙。随 GO 含量的增加, 孔隙分布更显致密且大小均匀。

图 3 为 HA/GO-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 复合涂层 TEM 照片, 其中 GO 呈少数层皱褶片状, HA 晶体 (图中白色箭头) 呈针状、棒状, 晶体长度为 20~50 nm, 直径为 3~5 nm。HA 晶体散在分布于 GO 中。本研究结果与 SEM 观察结果一致, 说明电沉积方法能够制备纳米级羟基磷灰石, 且 HA 与 GO 结合良好。

2.2 XRD, FTIR, 拉曼光谱分析

图 4 为 HA, HA/GO-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 HA/GO-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 涂层的 XRD 图谱。图中可见特征性 HA 衍射峰以及基底 Ti 衍射峰, 未见其它物相衍射峰。通过与 JCPDS 09-0432 标准 HA 衍射图谱比较发现, HA, HA/GO-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 HA/GO-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 涂层中均明显可见 HA 的 (002)、(112)、(300)、(202) 和 (301) 特征峰, 随 GO 含量增加, 峰型变尖锐, HA 特征峰 (002) 半高宽缩小, 结晶度增加。该结果与 S. Liao^[15] 等的研究一致, 说明 GO 能够促进 HA 成核, 提高晶体结晶度。XRD 图谱中未见明显的 GO 衍射峰, 可能是因为 GO

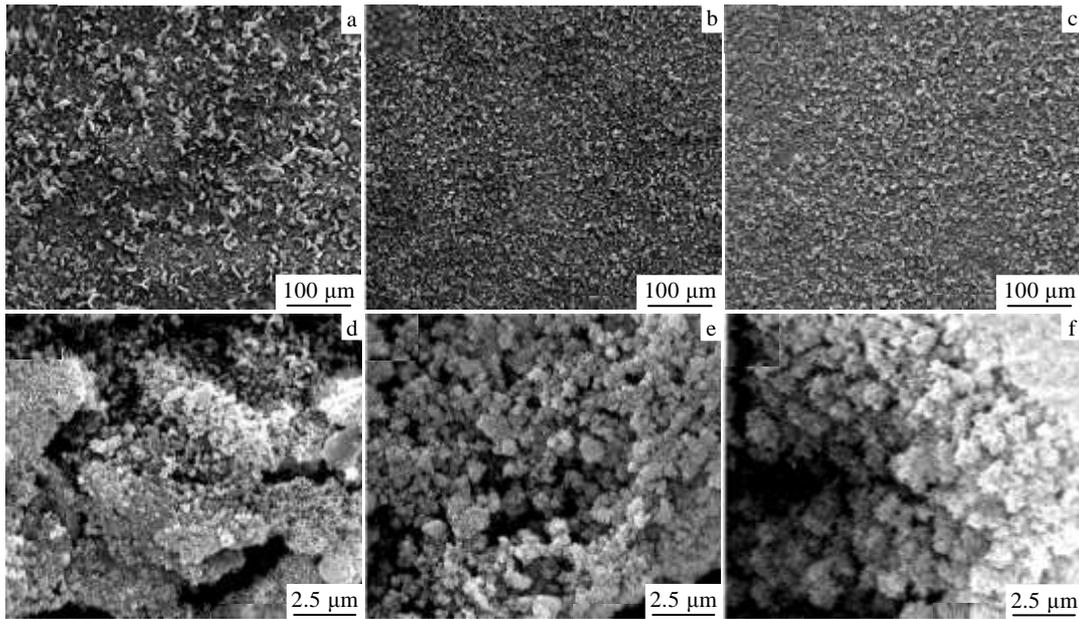


图 2 不同 GO 含量涂层表面的 SEM 照片

Fig.2 SEM images of the coatings obtained with different GO concentrations in electrolyte: (a, d) HA, (b, e) HA/GO-50 μg/mL, and (c, f) HA/GO-100 μg/mL

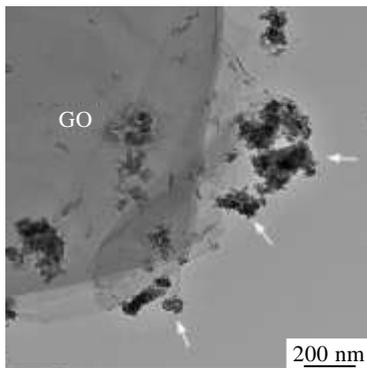


图 3 HA/GO-50 μg/mL 复合涂层 TEM 照片

Fig.3 TEM image of the HA/GO-50 μg/mL composite coatings: the white arrows indicate the rodshaped nano-sized HA (with a length of 20~50 nm and a width of 3~5 nm) embedded in the wrinkled-paper-like GO sheets

为单层片状二维结构，为弱结晶物质，其原子分布轴向不规律^[15]。

由 FTIR 结果（图 5）可知，在实验组和对照组涂层中均可见羟基磷灰石化学基团的振动峰。其中，1041、962、603 和 566 cm^{-1} 为 PO_4^- 的振动吸收峰，而 3438~3446 cm^{-1} ，1632~1635 cm^{-1} 为 H_2O 的吸收峰。同时可见位于 877、1415 和 1455 cm^{-1} 属于 CO_3^{2-} 的振动吸收峰^[16]，可能是由于制备过程中混入了微量空气中的二氧化碳。此外，在 HA/GO 复合涂层的 FTIR 光谱

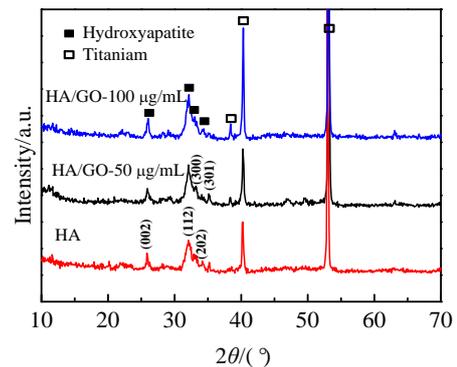


图 4 HA、HA/GO-50 μg/mL 和 HA/GO-100 μg/mL 涂层的 XRD 图谱

Fig.4 XRD patterns of the coatings with different GO concentrations

中，可见 2853 和 2926 cm^{-1} 处属于 $\text{C}=\text{H}_2$ 的振动峰，S. Liao^[15]等认为该振动峰来自于 GO 中的亚甲基。

图 6 为涂层拉曼光谱分析。在 1362 cm^{-1} 可见 GO 的 D 峰，在 1598 cm^{-1} 可见 G 峰，皆为 GO 的特征峰。同时在 447 和 961 cm^{-1} 处可见 PO_4^- 的吸收峰，为 HA 的特征峰^[17]。

XRD、FTIR 及拉曼光谱分析结果说明，通过电沉积的方法获得了羟基磷灰石晶体，且氧化石墨烯的加入促进了 HA 的成核，提高了其结晶度。同时，该方法获了 GO/HA 复合涂层，涂层中含有 GO 和 HA 的特

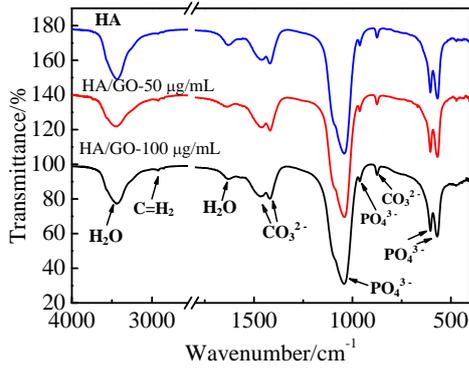


图 5 HA、HA/GO-50 µg/mL 和 HA/GO-100 µg/mL 涂层的 FTIR 图谱

Fig.5 FTIR patterns of the coatings with different GO concentrations

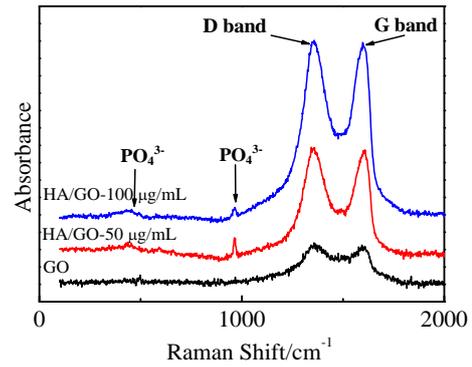


图 6 GO、HA/GO-50 µg/mL 和 HA/GO-100 µg/mL 涂层的拉曼光谱分析

Fig.6 Raman spectra patterns of GO and the coatings with different GO concentrations

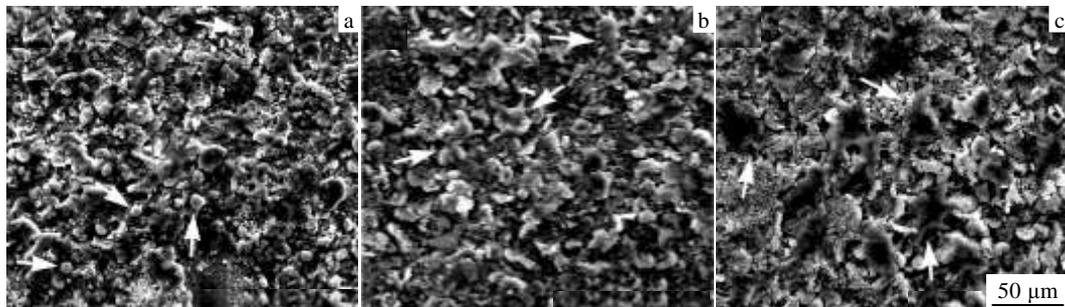


图 7 涂层表面 MG63 (图中白色箭头) 培养 24 h 后细胞形态

Fig.7 Cell morphologies of MG63 (white arrows) cultured on pure HA (a), HA/GO-50 µg/mL(b), and HA/GO-100 µg/mL (c) composite coating after 24 h of incubation

征性化学基团振动吸收光谱。

2.3 生物学特性

通过在涂层表面培养 MG63 成骨样细胞, 研究其生物学性能。由图 7 可见, 细胞培养 24 h 后 HA 涂层表面细胞 (白色箭头) 仍团缩, 呈圆球形。相比之下, 在复合涂层表面, 细胞呈多边形, 细胞边缘可见多个触角粘附于涂层表面。且随 GO 浓度增加, 细胞铺展更加明显。由此, 可以认为 GO 的加入能够促进 MG63 细胞的早期粘附和铺展。这可能是由于 GO 表面含有大量含氧基团, 具有良好的亲水性, 能更好的吸附粘连蛋白, 诱导成骨细胞的早期粘附。同时材料表面的纳米结构和纳米级粗糙度也促进了涂层表面蛋白吸附, 利于细胞早期粘附^[18]。

3 结论

1) 采用电化学沉积法在钛表面制备了氧化石墨烯-羟基磷灰石复合涂层, 涂层中 HA 晶体达到纳米级, 呈针状、棒状, 涂层表面呈粗糙多孔状。

2) 氧化石墨烯-羟基磷灰石复合涂层的晶体结构与电解液中加入 GO 的浓度有关。随 GO 的增加, 所得复合涂层中羟基磷灰石晶粒减小, 结晶度增加。

3) 体外细胞实验证明氧化石墨烯-羟基磷灰石复合涂层较单纯 HA 涂层有更好的生物学性能, 能够促进 MG63 细胞的早期粘附和铺展。

参考文献 References

[1] Qiao Feng(乔峰), Zhu Haitao(朱海涛). *New Chemical Materials*(化工新型材料)[J], 2010, 38(10): 15
 [2] Stankovich S, Dikin D A, Dommett G H B et al. *Nature*[J], 2006, 442(7100): 282
 [3] Yang X, Tu Y, Li L et al. *ACS Appl Mater Interfaces*[J], 2010, 2(6): 1707
 [4] Wan C, Frydrych M, Chen B. *Soft Matter*[J], 2011, 7(13): 6159
 [5] Fan Z, Wang J, Wang Z et al. *J Phys Chem C*[J], 2013, 117(20): 10375
 [6] Liu H, Xi P, Xie G et al. *J Phys Chem C*[J], 2012, 116(5):

- 3334
- [7] Qi W, Xue Z, Yuan W *et al. J Mater Chem B*[J], 2014, 2(3): 325
- [8] Ryoo S R, Kim Y K, Kim M H *et al. ACS Nano*[J], 2010, 4(11): 6587
- [9] Kalbacova M, Broz A, Kong J *et al. Carbon*[J], 2010, 48(15): 4323
- [10] Nayak T R, Andersen H, Makam V S *et al. ACS Nano*[J], 2011, 5(6): 4670
- [11] Hu W, Peng C, Luo W *et al. ACS Nano*[J], 2010, 4(7): 4317
- [12] Liu S, Zeng T H, Hofmann M *et al. ACS Nano*[J], 2011, 5(9): 6971
- [13] Owen G R, Jackson J, Chehroudi B *et al. Biomaterials*[J], 2005, 26(35): 7447
- [14] Stankovich S, Dikin D A, Piner R D *et al. Carbon*[J], 2007, 45(7): 1558
- [15] Liao S, Xu G, Wang W *et al. Acta Biomaterialia*[J], 2007, 3(5): 669
- [16] Cao H, Zhang L, Zheng H *et al. J Phys Chem C*[J], 2010, 114(43): 18 352
- [17] Li M, Liu Q, Jia Z J *et al. Carbon*[J], 2014, 67: 185
- [18] Liu Y, Dang Z H, Wang Y Y *et al. Carbon*[J], 2014, 67: 250

Synthesis of Graphene Oxide/Hydroxyapatite Composite Coatings by Electrochemical Deposition

Zeng Yongxiang¹, He Rui², Pei Xibo¹, Tian Lingyang¹, Wang Jian³, Wan Qianbing³

(1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

(2. Department of Stomatology, the Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310015, China)

(3. Department of Prosthodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Graphene oxide/hydroxyapatite (GO/HA) composite coatings have been fabricated by a modified electrodeposition technique on titanium substrate. The microstructure and phase constituents of the composite coatings were characterized by scanning electron microscope (SEM), transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and Raman spectra. The in vitro cellular response was detected by the morphology of MG63 cells which were inoculated onto the coatings. Results show that the addition of GO into HA coatings increases the crystallinity of hydroxyapatite. In addition, in vitro cell culture assessment shows a better biocompatibility of the composite coatings compared with the pure HA coating.

Key words: electrodeposition; graphene oxide; hydroxyapatite; composite coating

Corresponding author: Wang Jian, Ph. D., Associate Professor, Department of Prosthodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, P. R. China, Tel: 0086-28-85501450, E-mail: fero@scu.edu.cn