

HA-CaCO₃ 纳米复合凝胶的制备 及性能表征

华晓斌, 徐菊美, 岑 莲*
(华东理工大学, 上海 200237)

摘要: 由于透明质酸(hyaluronic acid, HA)水凝胶的机械强度较弱,使其应用受到一定限制。以 HA 为原料、1,4-丁二醇二缩水甘油醚(1,4-butanediol diglycidyl ether, BDDE)为交联剂对 HA 进行交联制备 HA 凝胶,并在交联的同时用浸泡法在凝胶内复合碳酸钙(CaCO₃),以期形成力学性能优异的 HA-CaCO₃ 复合凝胶。利用扫描电镜、红外光谱仪、热重分析仪和 X 射线衍射仪等对 HA 凝胶和 HA-CaCO₃ 复合凝胶进行表征和分析,考察 CaCO₃ 对 HA 凝胶的影响。结果表明,该方法制备的 HA-CaCO₃ 复合凝胶的断裂伸长率达到 401%,是单纯 HA 凝胶的 2.73 倍。HA-CaCO₃ 复合凝胶中 CaCO₃ 的质量分数为 27.3%,晶型为方解石,尺寸在 30~80 nm,达到了纳米级别。HA-CaCO₃ 复合凝胶以其优异的力学性能进一步拓展了 HA 类凝胶的应用。

关键词: 透明质酸; CaCO₃; 凝胶; 机械强度; 方解石

中图分类号: TQ314.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2019)01-0123-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2019.01.026

Preparation and characterization of HA-CaCO₃ nano composite hydrogel

HUA Xiao-bin, XU Ju-mei, CEN Lian*

(East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Hyaluronic acid (HA) hydrogel is an ideal biomedical material due to its biocompatibility, biodegradability, biological activity and no immunogenicity. However, the application of HA hydrogel has been limited due to its weak mechanical strength. Herein, 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDE) is employed as a crosslinking agent for HA to prepare HA hydrogel. While it is cross linking, CaCO₃ is composited into HA hydrogel through soaking method for the purpose of fabricating HA-CaCO₃ composite hydrogel with excellent mechanical properties. The properties of HA hydrogel and HA-CaCO₃ nanocomposite hydrogel are characterized by scanning electron microscope, infrared spectrometer, thermo gravimetric analyzer and X ray diffractometer to investigate the influence of CaCO₃ on HA hydrogel. The results indicate that the elongation at break of composite hydrogel reaches 401%, 2.73 times that of HA hydrogel. The mass fraction of CaCO₃ in composite hydrogel is 27.3%, CaCO₃ exhibits calcite crystal form with sizes between 30-80 nm. Hence, by means its excellent mechanical properties, HA-CaCO₃ composite hydrogel is expected to further extend the application scope of HA hydrogel.

Key words: hyaluronic acid; CaCO₃; hydrogel; mechanical strength; calcite

水凝胶具有特殊三维网状结构,含有大量水分且质地柔软,力学性能易调且类似于生物体组织,因此在生物医学领域应用广泛。尤其是以可降解天然高分子材料制备的凝胶,作为细胞治疗的载体或者组织再生的支架,在再生医学上具有不可替代的作用,成为目前关注的焦点之一。透明质酸(hyaluronic acid, HA)广泛存在于生物体组织,具有较好的保湿性、黏弹性、润滑性、抑制炎症反应等功能,且无种属及脏器特异性,在植入体内时显示出优良的机体生物相容性和降解性能。由 HA 通过化学交联而形成的 HA 水凝胶具有良好的生物相容性、生物可降解性、生物活性和无免疫原性等优点^[1],

相比其他高分子水凝胶,是更理想的生物医学材料,然而由于 HA 凝胶的机械强度较弱,使其应用受到一定限制^[2-4]。另一方面,无机颗粒如蒙脱石^[5-6]、二氧化硅^[2]、氧化锌^[7-9]、羟基磷灰石^[10-13]、碳酸钙^[14-15]等常常被用作聚合物材料的添加剂,以增强原材料的机械性能^[16-17]。以上几种无机颗粒中,碳酸钙低价^[18]、易得^[19]、无毒^[20]的特点使其成为应用最广泛的无机填料^[21-22]。

针对上述应用趋势和 HA 凝胶的性能不足,笔者以透明质酸为原料、1,4-丁二醇二缩水甘油醚(1,4-butanediol diglycidyl ether, BDDE)为交联剂,对 HA 进行交联制备 HA 凝胶支架,并在交联的同

收稿日期:2018-04-25;修回日期:2018-11-18

作者简介:华晓斌(1993-),男,硕士研究生,研究方向为生物医用材料, lsschxb@qq.com;岑莲(1978-),女,博士,教授,研究方向为生物材料化学工程,通讯联系人, liancen@ecust.edu.cn。

时用浸泡法在凝胶内复合碳酸钙(CaCO_3),从而形成力学性能优异的 HA- CaCO_3 复合凝胶,并对其进行分析、X 射线衍射性能、场发射扫描电镜形貌观察及红外光谱等性能评价。

1 实验材料与方法

1.1 仪器与试剂

透明质酸钠(Sodium Hyaluronate, HA),分子质量为 $1 \times 10^6 \sim 1.8 \times 10^6$ Da, 山东福瑞达生物医药有限公司生产; 1,4-丁二醇二缩水甘油醚(1,4-Butanediol diglycidyl ether, BDDE), 美国 Sigma Aldrich 公司生产; 无水氯化钙、氯化钠、无水碳酸钠、氢氧化钠, 分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司生产; 去离子水, 上海和泰实验室净水系统。

HY-U350 万能拉力机, 上海衡翼精密仪器有限公司生产; STA 6000 同步热分析仪, PerkinElmer 公司生产; D8 advance X 射线多晶衍射仪, Bruker AXS 公司生产; Frontier FT-IR 红外光谱仪, Perkin Elmer 公司生产; Nova Nano SEM450 型场发射扫描电镜, FEI 公司生产。

1.2 HA 凝胶的制备

取 HA 粉末于质量分数为 1% 的氢氧化钠溶液中, 配制质量分数为 10% HA 溶液, 搅拌过夜后加入 BDDE 交联剂, 体积分数控制为 0.5%。将上述混合物于 40°C 反应 5 h 后, 在 4°C 下干燥, 直到质量减为反应前质量的 20%。交联反应完全后, 将凝胶置于去离子水中溶胀, 每隔 6 h 换 1 次水, 重复多次以除去其他残留物质, 获得的凝胶于 4°C 下保存。

1.3 HA- CaCO_3 复合凝胶的制备

取 HA 粉末于 1% 的氢氧化钠溶液中, 配制成质

量分数为 10% HA 溶液, 再加入配制好的碳酸钠溶液, 使碳酸钠质量分数为 0.02%。搅拌过夜后加入 BDDE 交联剂, 体积分数控制为 0.5%。将上述混合物置于 40°C 反应 5 h 后, 在 4°C 下干燥, 直到质量减为反应前质量的 20%。交联反应完全后, 将凝胶置于 100 mL 质量分数均为 2% 的氯化钙和氯化钠混合溶液中浸泡 6 h, 接着将凝胶置于去离子水中溶胀, 每隔 6 h 换 1 次水, 重复多次以除去其他残留物质, 获得的凝胶于 4°C 下保存。

1.4 分析与测试方法

1.4.1 扫描电镜

通过 Nova NanoSEM450 型场发射扫描电镜(Scanning electron microscope, SEM) 观察凝胶的断面形貌。在此之前需对凝胶进行预处理。将 HA 凝胶和 HA- CaCO_3 复合凝胶浸入液氮中进行速冻以保持凝胶的三维构型, 待冷冻充分后对其脆断以获得横截面, 立刻将其置于已预冷冻的冷冻干燥机中冷冻干燥 36 h。干燥完成后将样品粘在导电胶上进行喷金处理, 通过 SEM 观察凝胶断面形貌。

1.4.2 机械性能

将 HA 凝胶和 HA- CaCO_3 复合凝胶裁剪为长 50 mm、宽 14 mm 的长方形, 量取厚度并记录后, 用一层薄薄的医用棉包裹凝胶两端后用夹具固定, 夹具间的距离 H 为 25 mm。这里使用棉花是因为 HA- CaCO_3 复合凝胶比较柔软且表面光滑, 为了防止凝胶在实验过程中由于摩擦力过小而出现脱落或滑动现象。预加载速度为 2 mm/min, 测试速度为 10 mm/min, 整个过程在常温下进行。断裂伸长率为凝胶断裂后位移值 ΔL 与夹具间距离 H 的比值,

(上接第 122 页)

- [9] 冯俊婷, 贺艳, 邹微, 等. HG/T 2527—2011. 工业氨基磺酸[S]. 北京: 化学工业出版社, 2011.
- [10] Wang Xiuli, Deng Xiaofang. Investigation on the influence-factor of preparation of ethyl cellulose ethoce matrix sustained-release tablets for water-soluble drug [J]. Journal of Pharmaceutical Practice, 2014, 32(2): 114-117.
- [11] Omran M F, Suwayeh S A, Helw A M. Taste masking of diclofenac sodium using microencapsulation [J]. Journal of Microencapsulation, 2002, 19(1): 45-52.
- [12] True L Rogers, Dave Wallick. Reviewing the use of ethylcellulose, methylcellulose and hypromellose in microencapsulation [J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2012, 38(2): 129-157.
- [13] 李书国, 薛文通, 李雪梅, 等. 乙基纤维素微胶囊化 VC 工艺参数及其活性保护的研究 [J]. 食品添加剂, 2005, 26(5): 143-148.
- [14] 许时婴, 张晓鸣, 夏书芹. 微胶囊化技术原理与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 65-70.
- [15] Jucelio Kilinski Tavares, Antônio Augusto Ulson de Souza, José Vladimir de Oliveira, et al. Modeling of the controlled release of betacarotene into anhydrous ethanol from microcapsules [J]. Opaen Nano, 2016, 5(1): 25-35.
- [16] Hadi Mohammadi, Walter Herzog. A novel model for diffusion based release kinetics using an inverse numerical method [J]. Medical Engineering & Physics, 2011, 33(8): 893-899.
- [17] Paulo Costa, Jose Manuel Sousa Lobo. Modeling and comparison of dissolution profiles [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001, 13(2): 123-133. ■

即 $\Delta L/H$; 抗拉强度为 F/S , F 为受到的最大力, S 为初始横截面积。

1.4.3 红外光谱

对 HA 凝胶和 HA-CaCO₃ 复合凝胶进行冷冻干燥处理, 获得干燥的膜片。利用红外光谱仪 (Fourier Transform infrared spectroscopy, FT-IR) 自带的衰减全反射 (Attenuated Total Reflection, ATR) 附件进行红外测试, 测试范围为 4 000~650 cm⁻¹。

1.4.4 X 射线衍射

在进行 X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 测试之前, 需要对 HA 凝胶和 HA-CaCO₃ 复合凝胶进行粉碎处理。用均质机将凝胶粉碎, 然后进行冷冻干燥, 在 D8 advance X 射线多晶衍射仪上进行测试。XRD 测试采用步进扫描方式, 扫描角度为 10~80°, 步长为 0.02°, 步进时间为 0.12 s, 记录实验结果。

1.4.5 热重分析

利用均质机对 HA 凝胶和 HA-CaCO₃ 复合凝胶进行粉碎处理, 然后进行冷冻干燥获得粉状样品。每次称取 5~10 mg 的样品, 不超过坩埚的 1/3, 在 20.0 mL/min 氮气氛围下, 用 STA 6000 同步热分析仪对样品进行热重分析 (Thermogravimetric Analysis, TGA), 实验温度为 40~800°C, 升温速率为 20°C/min。

2 实验结果与讨论

2.1 HA 凝胶和 HA-CaCO₃ 复合凝胶的形貌分析

HA 凝胶和 HA-CaCO₃ 复合凝胶的 SEM 和能谱图如图 1 所示。由图 1(b) 和图 1(c) 可以看出, 凝胶中心孔隙结构发达、孔径较大、连通性好, 孔壁上可以观察到松散分布的颗粒, 直径在 30~80 nm 之间, 属于纳米级别的颗粒物; 而凝胶外表面孔隙率低、孔径小、连通性低, 孔壁上有大量密集分布的颗粒物, 直径在 100 nm 左右。因为当 HA 凝胶泡入氯化钙和氯化钠混合溶液时, 溶液中钙离子从外表面向凝胶内部渗透, 在这个过程中凝胶内的碳酸根离子与钙离子反应生成 CaCO₃。显然, 越靠近外表面反应的程度越深, 生成的 CaCO₃ 越多, CaCO₃ 的团聚现象也越严重, HA 凝胶表面处原本所具有三维孔隙被 CaCO₃ 充斥。由图 1(c) 和图 1(d) 可以看出, HA 凝胶的孔径比复合凝胶的大, 但孔壁较之更薄。由图 (e) 的能谱图可以看出, 主要元素包含 Ca、O、C, 初步证实图 1(c) 中的白色颗粒为 CaCO₃。

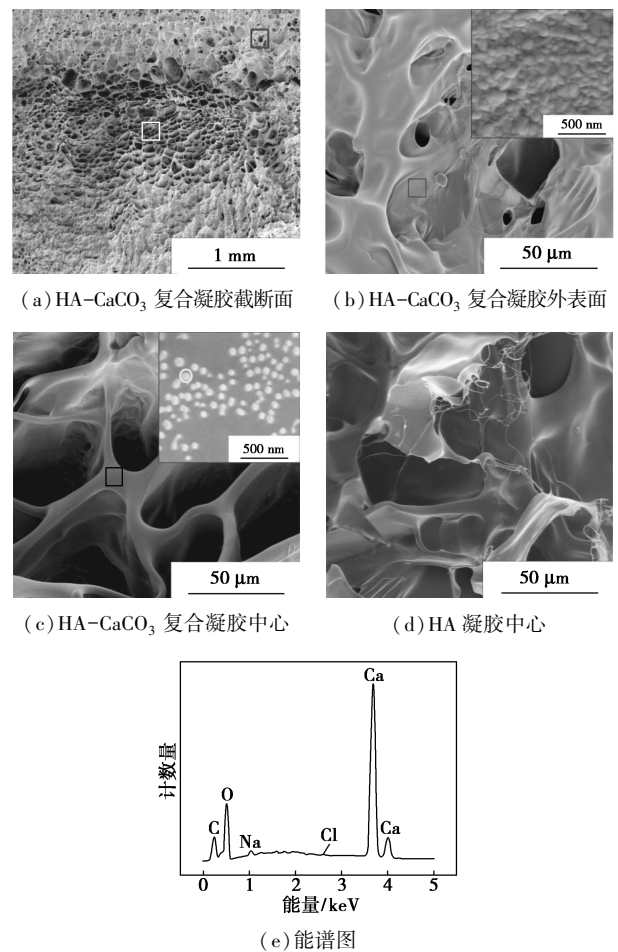


图 1 HA 凝胶和 HA-CaCO₃ 复合凝胶的 SEM 图和能谱图

2.2 HA 凝胶和 HA-CaCO₃ 复合凝胶的机械性能

HA 凝胶和 HA-CaCO₃ 复合凝胶的外观图如图 2 所示。由图 2 可以看出, HA 凝胶为透明固体, HA-CaCO₃ 复合凝胶为白色半透明固体。HA 凝胶的断裂伸长率为 (149±48)%, 而 HA-CaCO₃ 复合凝胶的断裂伸长率增加到 (401±23)%, 为 HA 凝胶的 2.73 倍 ($p < 0.01$)。这是因为 HA-CaCO₃ 复合凝胶

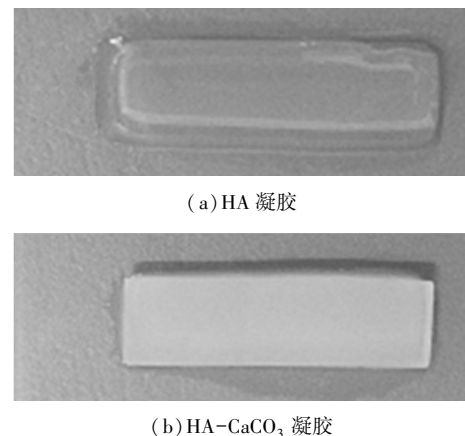
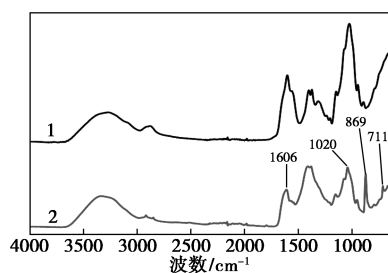


图 2 凝胶的外观图

是将碳酸钠预先与 HA 混合均匀,在浸入含钙离子的溶液时,溶液中均匀分布的钙离子同时向凝胶中各个方向扩散,因此在一定程度上做到了纳米碳酸钙的均匀分布,较高的表面活性能使 Ca^{2+} 与 $-\text{COO}^-$ 螯合^[23-24],使 HA 分子链的缠绕更加复杂,抵抗外力的能力增强,表现为 HA- CaCO_3 复合凝胶的断裂伸长率出现增长。

2.3 HA 凝胶和 HA- CaCO_3 复合凝胶的 FT-IR 谱图

HA 凝胶和 HA- CaCO_3 复合凝胶的 FT-IR 谱图如图 3 所示。从图 3 中可以看出,HA- CaCO_3 复合凝胶 869 cm^{-1} 和 711 cm^{-1} 处的 2 个吸收峰对应 CaCO_3 方解石晶型的特征峰^[23,25],说明复合凝胶中生成了碳酸钙,且晶型为方解石。 1606 cm^{-1} 处吸收峰是由 HA 分子上羧基的对称振动引起^[26], 1020 cm^{-1} 处吸收峰是碳氧单键伸缩振动引起,复合凝胶中这 2 处的峰的相对强度较 HA 凝胶有所减弱,这是由部分 $-\text{COO}^-$ 和 Ca^{2+} 的螯合造成。

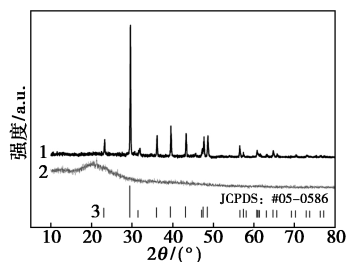


1—HA 凝胶;2—HA/ CaCO_3 复合凝胶

图 3 HA- CaCO_3 复合凝胶的红外光谱图

2.4 HA 凝胶和 HA- CaCO_3 复合凝胶的 XRD 谱图

利用 XRD 探究复合凝胶中纳米碳酸钙的晶体结构,XRD 谱图如图 4 所示。由图 4 中谱线 2 可以看出,在 $2\theta=20^\circ$ 左右有 1 个衍射宽峰,说明 HA 凝胶无晶体结构,为无定形态;由图 4 中谱线 1 和谱线 3 可以看出,HA- CaCO_3 复合凝胶的衍射峰与方解



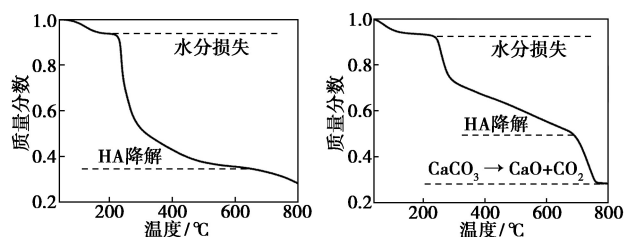
1—HA- CaCO_3 复合凝胶;2—HA 凝胶;3—方解石

图 4 HA- CaCO_3 复合凝胶的 X 射线衍射图

石的衍射峰完全一致,可见复合凝胶中碳酸钙的晶型为方解石,与 FT-IR 数据相符。Xiao 等^[27]和 Pouget 等^[28]的实验结果表明,直径在 100 nm 以下的碳酸钙也存在方解石纳米晶体结构,并非人们传统印象中认为的那样——有晶体结构的碳酸钙直径普遍为微米级。

2.5 HA 凝胶和 HA- CaCO_3 复合凝胶的 TGA 谱图

HA 凝胶和 HA- CaCO_3 复合凝胶的 TGA 谱图如图 5 所示。由图 5(a)可以看出,HA 凝胶的 TGA 曲线中第 1 阶段为 150°C 之前的凝胶脱水;第 2 阶段为 230°C 左右开始的 HA 降解,可细分为支链降解、主链降解和炭分解。 610°C 之后下降是因为炭分解还在进行,最后的产物为黑色的块状物。这与 Elella 等^[29]的实验结果一致。由图 5(b)可以看出,比 HA 凝胶多出了 CaCO_3 的分解阶段,从图 5 中可以计算出水分、HA 和 CaCO_3 的质量分数分别为 6.7% 、 66% 、 27.3% 。2 种凝胶在 230°C 以下都能保持热稳定性,确保进行常规高温灭菌的可行性。



(a) HA 凝胶的热重曲线

(b) HA- CaCO_3 复合凝胶的热重曲线

图 5 HA/ CaCO_3 复合凝胶的热重曲线

3 结论

HA 凝胶具有良好的生物性能,常被用作生物医用材料,然而其机械性能往往限制其应用。通过在 HA 凝胶的制备过程中生成 CaCO_3 ,显著地提高了 HA 凝胶的机械性能。HA- CaCO_3 复合凝胶的断裂伸长率为 401% ,为 HA 凝胶的 2.73 倍。由 FT-IR 和 XRD 分析结果可得,HA- CaCO_3 复合凝胶中 CaCO_3 的晶型为方解石;TGA 结果表明,HA- CaCO_3 复合凝胶中 CaCO_3 的质量分数为 27.3% ;SEM 分析表明,HA- CaCO_3 复合凝胶是一种具有三维网状结构的物质,且外表面比中心处孔径小、孔隙率低,复合凝胶中心处 CaCO_3 的尺寸在 $30\sim 80\text{ nm}$ 之间,达到了纳米级别。

参考文献

- [1] Knudson C B, Knudson W. Hyaluronan-binding proteins in develop-

- ment, tissue homeostasis, and disease [J]. The FASEB Journal, 1993, 7(13): 1233-1241.
- [2] Valles-lluch A, Poveda-Reyes S, Amoros P, *et al.* Hyaluronic acid-silica nanohybrid gels [J]. Biomacromolecules, 2013, 14(12): 4217-4225.
- [3] Bhattacharyya S, Guillot S, Dabboue H, *et al.* Carbon nanotubes as structural nanofibers for hyaluronic acid hydrogel scaffolds [J]. Biomacromolecules, 2008, 9(2): 505-509.
- [4] Domingues R M A, Silva M, Gershovich P, *et al.* Development of injectable hyaluronic acid/cellulose nanocrystals bionanocomposite hydrogels for tissue engineering applications [J]. Bioconjugate Chemistry, 2015, 26(8): 1571-1581.
- [5] Haraguchi K, Takehisa T. Nanocomposite hydrogels: A unique organic-inorganic network structure with extraordinary mechanical, optical, and swelling/de-swelling properties [J]. Advanced Materials, 2002, 14(16): 1120.
- [6] 王杰, 王梦雪, 沈睦贤, 等. 聚甲基丙烯酸/Laponite 纳米复合水凝胶的制备及其黏接性能 [J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2016, 42(3): 297-300.
- [7] Sharma N, Tiwari A. Nano-ZnO-loaded poly (acrylamide-co-itaconic acid) hydrogel as adsorbent for effective removal of iron from contaminated water [J]. Desalination and Water Treatment, 2016, 57(14): 6463-6476.
- [8] Sudheesh Kumar P T, Lakshmanan V K, Anilkumar T V, *et al.* Flexible and microporous chitosan hydrogel/nano zno composite bandages for wound dressing: In vitro and in vivo evaluation [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2012, 4(5): 2618-2629.
- [9] Kumar P T S, Lakshmanan V K, Biswas R, *et al.* Synthesis and biological evaluation of chitin hydrogel/nano zno composite bandage as antibacterial wound dressing [J]. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2012, 8(6): 891-900.
- [10] Jiang Y Y, Zhu Y J, Li H, *et al.* Preparation and enhanced mechanical properties of hybrid hydrogels comprising ultralong hydroxyapatite nanowires and sodium alginate [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2017, 497: 266-275.
- [11] Jiang X, Wu H, Zheng L, *et al.* Effect of synthesized nano-hydroxyapatite/collagen composite hydrogel on osteoblasts growth [J]. Journal of Biomaterials and Tissue Engineering, 2015, 5(7): 523-531.
- [12] Huang Y, Zhang X, Wu A, *et al.* An injectable nano-hydroxyapatite (n-HA)/glycol chitosan (G-CS)/hyaluronic acid (HyA) composite hydrogel for bone tissue engineering [J]. RSC Adv, 2016, 6(40): 33529-33536.
- [13] Sa Y, Wang M, Deng H, *et al.* Beneficial effects of biomimetic nano-sized hydroxyapatite/antibiotic gentamicin enriched chitosan-glycerophosphate hydrogel on the performance of injectable polymethylmethacrylate [J]. RSC Adv, 2015, 5(110): 91082-91092.
- [14] Wu W, Zhang X, Chen J, *et al.* Synthesis of nano-CaCO₃ composite particles and their application [J]. Journal of University of Science and Technology Beijing, Mineral, Metallurgy, Material, 2008, 15(1): 67-73.
- [15] Zhang H, Chen J F, Zhou H K, *et al.* Preparation of nano-sized precipitated calcium carbonate for PVC plastisol rheology modification [J]. Journal of Materials Science Letters, 2012, 21(16): 1305-1306.
- [16] Guo T, Wang L, Zhang A, *et al.* Effects of nano calcium carbonate modified by a lanthanum compound on the properties of polypropylene [J]. Journal of Applied Polymer Science, 2005, 97(3): 1154-1160.
- [17] Jin F L, Pang Q Q, Zhang T Y, *et al.* Synergistic reinforcing of poly (lactic acid)-based systems by polybutylene succinate and nano-calcium carbonate [J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2015, 32: 77-84.
- [18] Yuan S, Xu H, Gu H. Fractal analysis of polypropylene composite filled with nano-calcium carbonate [J]. Journal of Applied Polymer Science, 2008, 110(4): 1955-1960.
- [19] Wu D Y, Svazas A. Micro- and nano-sized calcium carbonate toughened polystyrene [J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2006, 6(12): 3919-3922.
- [20] Maurya S D, Purushothaman M, Krishnan P S G, *et al.* Effect of nano-calcium carbonate content on the properties of poly (urethane methacrylate) nanocomposites [J]. Journal of Thermoplastic Composite Materials, 2014, 27(12): 1711-1727.
- [21] Jiang J, Liu J, Liu C, *et al.* Roles of oleic acid during micropore dispersing preparation of nano-calcium carbonate particles [J]. Applied Surface Science, 2011, 257(16): 7047-7053.
- [22] Fang Q, Song B, Tee T T, *et al.* Investigation of dynamic characteristics of nano-size calcium carbonate added in natural rubber vulcanizate [J]. Composites Part B: Engineering, 2014, 60: 561-567.
- [23] Sun S, Mao L B, Lei Z, *et al.* Hydrogels from amorphous calcium carbonate and polyacrylic acid: Bio-inspired materials for "mineral plastics" [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2016, 55(39): 11765-11769.
- [24] Li A, Jia Y, Sun S, *et al.* Mineral-enhanced polyacrylic acid hydrogel as an oyster-inspired organic-inorganic hybrid adhesive [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(12): 10471-10479.
- [25] Gebauer D, Gunawidjaja P N, Ko J Y P, *et al.* Proto-calcite and proto-vaterite in amorphous calcium carbonates [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2010, 49(47): 8889-8891.
- [26] Anirudhan T S, Vasantha C S, Sasidharan A V. Layer-by-layer assembly of hyaluronic acid/carboxymethylchitosan polyelectrolytes on the surface of aminated mesoporous silica for the oral delivery of 5-fluorouracil [J]. European Polymer Journal, 2017, 93: 572-589.
- [27] Xiao J, Yang S. Bio-inspired synthesis: Understanding and exploitation of the crystallization process from amorphous precursors [J]. Nanoscale, 2012, 4(1): 54-65.
- [28] Pouget E M, Bomans P H H, Goos J A C M, *et al.* The initial stages of template-controlled CaCO₃ formation revealed by cryo-TEM [J]. Science, 2009, 323(5920): 1455-1458.
- [29] Abu Elella M H, Mohamed R R, Sabaa M W. Synthesis of novel grafted hyaluronic acid with antitumor activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 189: 107-114. ■