

以贻贝贝壳为原料制备的无定形磷酸钙及其性质

韩义忠^a,崔正阳^b,陈 岑^b,叶 婷^b,孔祥东^{a,b}

(浙江理工大学,a.材料与纺织学院;b.生命科学学院,杭州 310018)

摘 要:以废弃的贻贝贝壳资源为原料,将贝壳简单粉碎后作为钙源制备出了无定形磷酸钙(ACP)。在反应过程中先后加入磷酸、三聚磷酸钠及尿素,快速制备了直径为250~450 nm的球形亚微米颗粒,该颗粒粒径分布范围窄,尺寸均一,表面积大,颗粒表面电位(Zeta 电位)为27.5 mV。该无定形磷酸钙颗粒与量子点结合性良好,MTT试验表明该无定形磷酸钙颗粒对成骨细胞(MC3T3-E1)不显示毒性,生物相容性良好。

关键词:无定形磷酸钙;贻贝贝壳;生物相容性

中图分类号:Q279 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-3851(2016)06-0849-06 **引用页码:**110209

0 引 言

无定形磷酸钙(amorphous calcium phosphate, ACP)是一种短程有序,长程无序磷酸钙的总称^[1],ACP可以被归为具有可变化学组成(Ca/P 比范围可在1.0~2.0之间变化)、化学性质与玻璃相似的一类磷酸钙盐^[2]。ACP是在中性或酸性条件下合成羟基磷灰石(HAp)过程中发现的一种磷酸钙的无定形中间相,所以X衍射分析显示非晶特征^[3]。

贻贝(mussel)俗称青口、海红,其干制品称淡菜。贻贝属于软体动物门(Mollusca),瓣鳃纲(Lanellibranchia),异柱目(Anisomyaria),贻贝科(Mytidea),是一种营足丝附着生活的双壳类软体动物^[4]。贻贝贝壳约占贻贝总质量的55%,贻贝贝壳的主要无机成分为碳酸钙(95%),还有一些有机物质(蛋白质和多糖)和镁、钾、锶、氮、硫、磷等微量元素^[5]。贻贝贝壳中的CaCO₃主要组成为方解石和霏石^[6]。随着我国海洋养殖业的发展,在沿海地区产生了大量废弃的贻贝贝壳,贝壳堆积既占用大量的土地,又容易造成环境污染,还是一种生物资源的浪费。

以贻贝贝壳为原料制备无定形磷酸钙时,贝壳中

的镁、钾、锶等离子可进入到颗粒中,天然骨中除了钙离子外还含有多种与贝壳中相同的金属元素,所制备的无定形磷酸钙具有更好的生物相容性。贝壳中的镁、锶、碳酸根等离子还可以有效地抑制晶态磷酸钙晶粒的形成和生长,从而促进ACP的形成^[2]。无定形磷酸钙的生物降解速率可控、骨传导性能优异,具有良好的细胞粘附性、生物活性,可以用作骨科材料、组织工程支架、牙科材料和释放载体等^[2]。

本研究充分利用了废弃的贻贝贝壳资源,既有助于缓解环境问题,还可以提高废弃资源的附加值,变废为宝。

1 实验部分

1.1 试剂与材料

贻贝贝壳(取自舟山市嵊泗县),丙酸(分析纯,上海展云化工有限公司),三聚磷酸钠(分析纯,天津市永大化学试剂有限公司),尿素(分析纯,无锡市展望化工试剂有限公司),无水乙醇(分析纯,杭州高品精细化工有限公司),去离子水由millipore纯水仪制备。

1.2 仪 器

AK-98流水式超细中药粉碎机(奥力中药机械有限公司),HL-2B恒流泵(上海嘉鹏科技有限公

收稿日期:2015-12-26

基金项目:国家自然科学基金项目(51272236,51002139)

作者简介:韩义忠(1988-),男,山东聊城人,硕士研究生,主要从事生物材料方面的研究。

通信作者:孔祥东,E-mail:Kongxiangdong@gmail.com

司),磁力搅拌器(杭州惠创仪器设备有限公司),ZEISS-ULTRA55 扫描电子显微镜,JEM-2100 透射电子显微镜,ARL-X' TRA X 射线粉末衍射仪,Nicolet 5700 傅里叶红外光谱(Thermo Electron),Pyris Diamond TGA 热重分析仪(PerkinElmer),ZEN3600 动态光散射仪(马尔文仪器有限公司),DNA export 酶标仪(TECAN),Nano Drop 2000 超微量分光光度计(Thermo Scientific),F-4500 荧光分光光度计(日本日立公司)。

1.3 无定形磷酸钙的制备

贻贝贝壳从舟山市嵊泗县采集,将贻贝贝壳清洗干净,干燥后粉碎,置于干燥环境中备用。取少量样品进行 XRD、FTIR、TG 分析。

取 0.5 g 贻贝贝壳粉于 100 mL 的烧杯中,加入 40 mL 浓度为 5% 的丙酸,使其充分反应,离心后取上清液,将得到的溶液稀释至 50 mL,然后将浓度为 0.06 M 的磷酸溶液 50 mL 滴加到烧杯中,滴加完成后向烧杯中加入 0.6 mmol 的三聚磷酸钠,反应 30 min 后加入 6 g 尿素,搅拌使尿素充分溶解后,将烧杯置于 90 °C 的水浴中,搅拌 3 min 后静置至出现沉淀。将沉淀离心,用去离子水洗涤 2 次,乙醇洗涤 2 次,将其在 70 °C 下干燥 24 h,得到 ACP 白色粉末。

1.4 材料表征

1.4.1 透射电子显微镜(TEM)观察

取适量颗粒于无水乙醇中,超声使颗粒均匀分散到无水乙醇中,用毛细管取分散液滴于碳膜上,然后放到红外灯下干燥 10 min,用 JEM-2100 型透射电镜观察颗粒形貌、颗粒尺寸。

1.4.2 场发射扫描电子显微镜(FE-SEM)观察

取适量颗粒于无水乙醇中,超声使颗粒均匀分散到无水乙醇中,然后滴加到清洗干净的硅片表面,待无水乙醇挥发后将硅片粘贴到导电胶上,采用 FE-SEM(加速电压为 3.0 kV)对颗粒形貌进行观察。

1.4.3 X 射线粉末衍射仪(XRD)分析

将颗粒均匀地置于载玻片表面,用 X 射线粉末衍射仪(管电压 40 kV,管电流 35 mA,扫描速度为 5°/min,扫描范围 $2\theta=20^\circ\sim 60^\circ$)对颗粒进行结晶性能分析。

1.4.4 傅里叶红外光谱仪(FTIR)分析

将颗粒与溴化钾研磨混合均匀,采用溴化钾压片法,质量比为 1:100,研磨后将混合物进行压片(30 MPa,45 s)。利用傅立叶红外光谱仪(扫描范围

为 4000~400 cm^{-1} ,分辨率为 4 cm^{-1})对样品中的化学基团进行分析。

1.4.5 动态光散射(DLS)

取适量颗粒于无水乙醇中,超声使颗粒均匀分散到无水乙醇中,取分散好的颗粒悬液于样品池中,将样品池插入动态光散射仪中,测量颗粒的大小、分布与 Zeta 电位。

1.4.6 热重分析(TG)

热重分析(Pyris Diamond TGA, PerkinElmer)在氮气的气氛下(氮气流量为 20 mL/min),温度范围为室温至 800 °C,升温速率为 20 °C/min。

1.5 ACP 颗粒与量子点的结合

取 1 mg/mL 的无定形磷酸钙悬液与 1 mL 纯化后的量子点混合;然后将混合溶液在 100 W 超声振荡 20 min,在转速为 8000 rpm 离心 3 min,吸去上清液;将得到的沉淀用去离子水洗涤 2 遍,得到纯净量子点与无定形磷酸钙结合后的颗粒。使用 Nano Drop 2000 超微量分光光度计测量得到的颗粒激发波长,使用荧光分光光度计测量颗粒的发射荧光光谱。

1.6 生物相容性实验

将 ACP 颗粒在紫外灯照射下灭菌 12 h,使用 PBS 配置成不同浓度的悬液。铺 MC3T3-E1 细胞 96 孔板,每孔细胞数为 5×10^5 个,将 96 孔板置于 37 °C、5% CO_2 的细胞培养箱中培养,待细胞贴壁后每孔加入 10 μL 的不同浓度 ACP 悬液,置于培养箱中培养不同时间(24 h、48 h、72 h)后,每孔加入 20 μL 的 MTT(3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐),培养 4 h 后使用真空安全吸液器(VACOSAFE 158 3XX, INTEGRA)吸出培液,每孔加入 150 μL 的 DMSO(二甲基亚砷),震荡 10 min 后,使用酶标仪在 OD 490 nm 处读取各孔的吸光值,使用公式:细胞生存率/% = $(\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{调零孔}})/(\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{调零孔}}) \times 100$,计算出细胞成活率并作图。

2 结果与讨论

2.1 贻贝贝壳的结构表征

由贻贝贝壳粉的 XRD 图谱可以看出,贻贝壳的主要无机成分为方解石((012)、(104)、(110)、(113)、(202)、(018)、(116)、(122))和球霏石((110)、(112)、(114))组成,结晶性比自然矿物中的碳酸钙要好^[8]。

由公式: $f_v = \frac{I_{110V} + I_{112V} + I_{114V}}{I_{110V} + I_{112V} + I_{114V} + I_{104C}} \times 100\%$ 与 $f_c = 1 - f_v$ (其中 f_v 、 f_c 分别为贻贝贝壳中球霏石和方解石的含量百分比, I_{110V} 、 I_{112V} 、 I_{114V} 和 I_{104C} 分别代

表碳酸钙晶体中晶面(110), (112), (114)和(104)的衍射强度), 计算出贻贝壳中球霏石的含量为 51.34%, 方解石的含量为 48.66%。由贻贝壳粉的 FTIR 图

谱可以看出: 在 1444、1083、873 cm^{-1} 出现的特征吸收峰均为球霏石中的特征吸收峰; 在 1444、873、713 cm^{-1} 处出现的特征吸收峰分别为方解石的特征吸收峰^[9]。

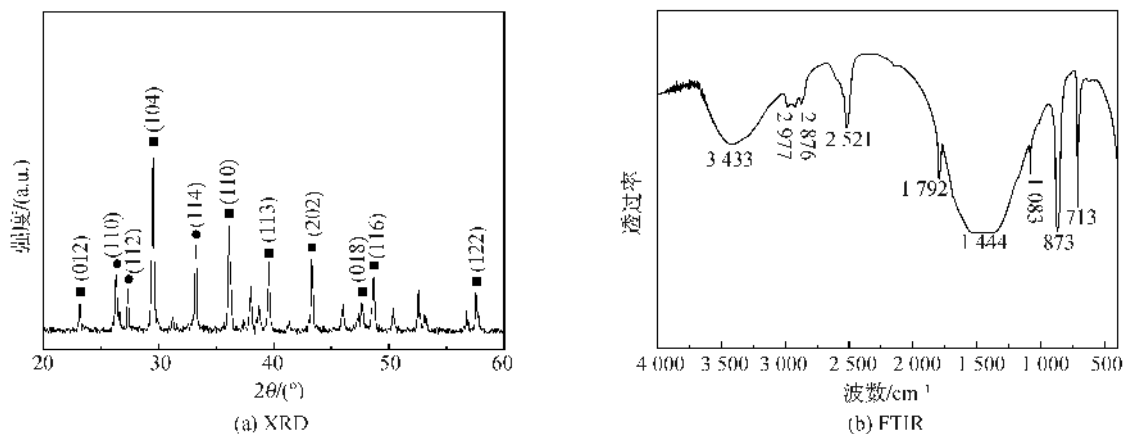


图1 贻贝壳粉的 XRD 和 FTIR 图谱

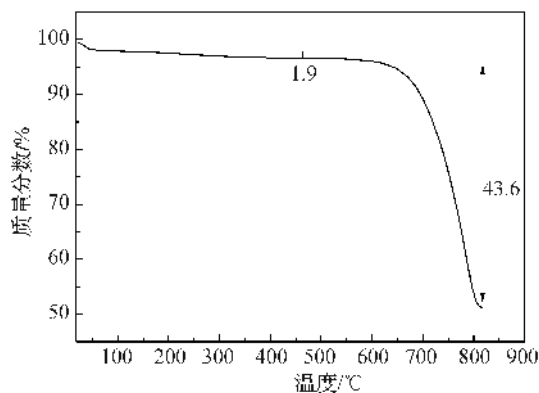


图2 贻贝壳粉的热重分析曲线

由热重曲线可以看出, 在 200~475 $^{\circ}\text{C}$ 之间贻贝壳粉失重率为 1.9%, 该失重是由有机物的分解造成的。在 610~817 $^{\circ}\text{C}$ 之间又发生了一次明显的失重现象, 失重率为 43.6%, 说明占贻贝壳的主要无机成分(CaCO_3)开始了分解, 分解的化学方程式为: $\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{CaO} + \text{CO}_2 \uparrow$ 。自然界中大部分碳酸钙矿物在 800 $^{\circ}\text{C}$ 以上的温度下才能分解(方解石在 898 $^{\circ}\text{C}$ 分解, 文石和球霏石分别在 825 $^{\circ}\text{C}$ 和 800 $^{\circ}\text{C}$ 分解为氧化钙和二氧化碳), ZHAO 等人利用丝胶蛋白调控生物矿化法制备的碳酸钙在 800 $^{\circ}\text{C}$ 左右分解^[10], 而贝壳生物矿物的分解温度则较低, 在 600 $^{\circ}\text{C}$ 附近已分解。贻贝壳的分解温度低于不含有有机成分的碳酸钙矿物, 原因可能是贻贝壳在加热的过程中, 有机质逐步分解, 与有机物键合的钙离子被游离出来, 以有机物为模板的碳酸钙晶粒更易受到破坏, 从而导致碳酸钙在较低的温度下分解。

2.2 ACP 颗粒的表征

2.2.1 ACP 颗粒的形貌表征

由图 3 中的 SEM 图(图 3a)可以看出, 本研究制备的磷酸钙产物为球状颗粒, 直径为 250~450 nm, 具有较大的比表面积, 有轻微的团聚现象。由 TEM 图(图 3b)也佐证了该颗粒的直径尺度范围, 由于 ACP 为不稳定相, 因此在电子显微镜拍摄时, 长期将样品暴露在电子束下, ACP 颗粒会相互融合。由选区电子衍射图(图 3b)可以看出并未出现衍射斑和衍射环, 说明该颗粒为非晶体, 具有无定形结构的典型性质。三聚磷酸钠具有络合钙离子的作用, 当未加入三聚磷酸钠时溶液中不出现沉淀颗粒, 当加入 0.06 mmol 的三聚磷酸钠后可以得到球状颗粒, 说明三聚磷酸钠可以影响合成 ACP 的形貌, 同时三聚磷酸钠可以作为合成 ACP 的稳定剂, 使 ACP 颗粒能够在水溶液中稳定的存在, 并且可以阻止 ACP 向羟基磷灰石(HAp)的转变。在加热过程中尿素会分解为 NH_4^+ 和 OH^- , 使溶液中的 pH 值上升, 并且在加热的过程中尿素会产生 CO_2 气泡, CO_2 气泡在反应过程中起到模板的作用, 从而使产物生长为球状的颗粒。

由粒径分布图(图 3c)可以看出颗粒的粒径分布范围窄, 颗粒直径大部分位于 250~450 nm, 大小均一, 与图 3 中的 SEM 图和 TEM 图相对应。动态光散射仪测出所制备颗粒表面电位为 27.5 mV。Kandori K 等^[11]研究认为颗粒表面化学本质决定了

这些材料的表面 Zeta 电位并进而决定其蛋白吸附能力。

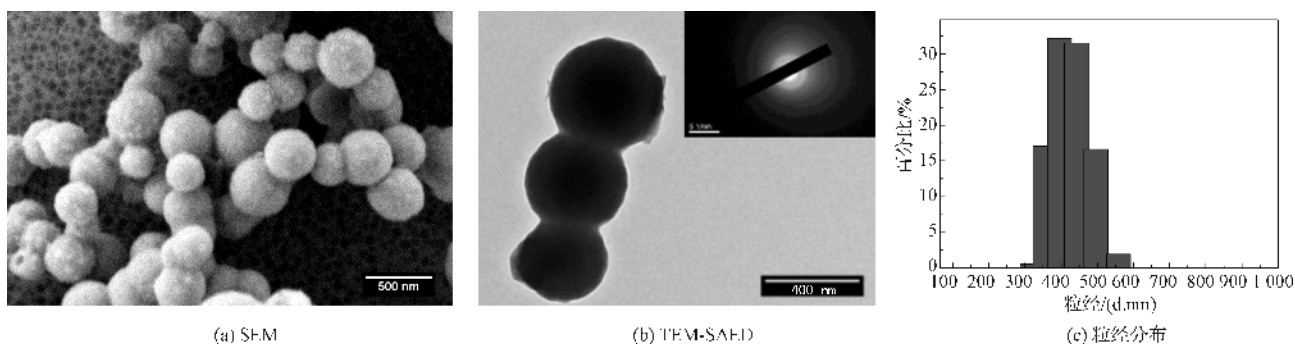


图3 制得 ACP 颗粒的形态

2.2.2 ACP 颗粒的 X 射线衍射分析

由 XRD 图谱可以看出在 $2\theta=30^\circ$ 附近有个馒头峰^[12],表明所制备的颗粒主要为无定形状态,进一步证明得到的产物为 ACP。在 XRD 图谱中没有发现其他物质的衍射峰,说明得到的 ACP 为纯相,而且为无定形相。与 TEM 中的选区电子衍射相对应,表明成功的合成了 ACP 颗粒。

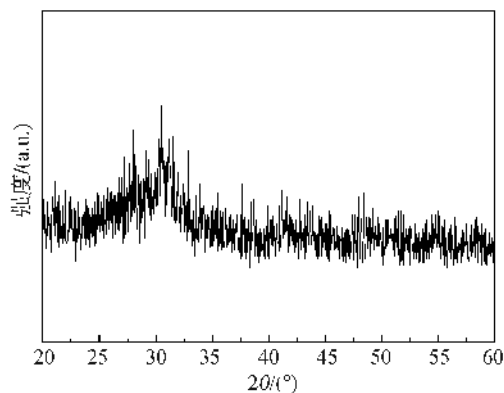


图4 制得颗粒的 XRD 图谱

2.2.3 ACP 颗粒的傅里叶红外光谱分析

由图 5 可以看出在 550 cm^{-1} 和 1129 cm^{-1} 处的吸收峰是由 PO_4^{3-} 引起的,其中在 550 cm^{-1} 处为单

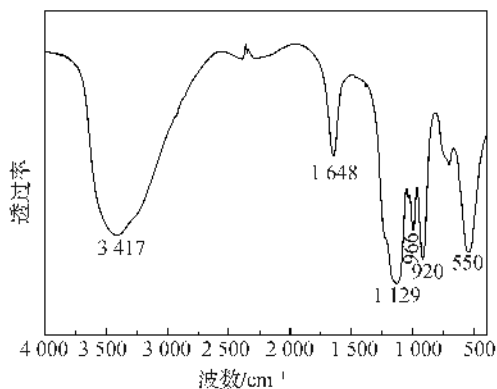


图5 制得颗粒的 FTIR 图谱

峰,为 PO_4^{3-} 的 ν_4 弯曲振动峰,并未分裂成双峰,说明合成的颗粒未结晶,为无定形磷酸钙,这与选区电子衍射图谱和 XRD 图谱相吻合。 3417 cm^{-1} 和 1648 cm^{-1} 处为颗粒中水的吸收峰,由液相法合成的 ACP 含有部分水分子是无可避免的^[13]。

2.2.4 ACP 的热重分析

图 6 为利用贻贝壳制得无定形磷酸钙的热重(TG)分析曲线,由图可以看出制得的无定形磷酸钙在加热过程中不稳定,在室温加热到 800°C 的过程中总的失重为 34.5%。ACP 的失重主要分为两个过程,第一个过程在 $25\sim150^\circ\text{C}$ 之间有个明显的失重现象,为无定形磷酸钙团簇间的分子水,失重率约为 17.1%,符合无定形磷酸钙含 10%~20% 的分子水范围。第二个过程 $150\sim800^\circ\text{C}$ 可能是由于 ACP 中结合水分解以及 ACP 相变导致的重量损失。

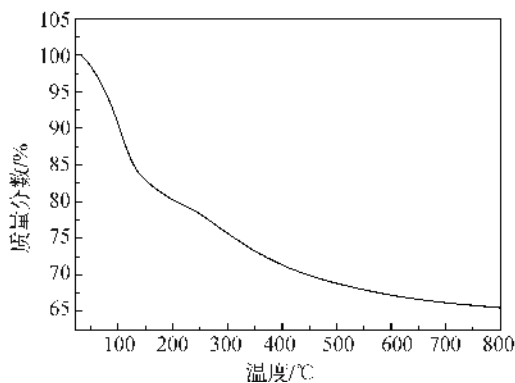


图6 制得颗粒的热重分析曲线

2.3 ACP 颗粒与量子点的结合性

量子点材料是涉及多种学科的交叉领域,量子点荧光稳定、明亮,激发光谱宽,发射光谱窄。由于其不同于块体材料的许多性质,因此在很多方面具有潜在的应用价值,目前量子点最有前途的应用领域是作为生物体系中作荧光标记物^[14]。为了更好

地应用制备的 ACP 颗粒,使用 CdTe 量子点与制得 ACP 颗粒结合。图 7 中的(a)、(b)为 ACP 颗粒与 CdTe 量子点结合后的荧光显微镜图,由荧光显微镜图可以看出 ACP 颗粒与量子点有着良好的结合。图 7 中的(c)图为 ACP 颗粒与 CdTe 量子点结合后

的发射光谱图,在激发波长为 219 nm 下,在 437 nm 处有最强的荧光强度,峰宽为 67.6 nm。由此可以说明当本实验制得的 ACP 被用作药物载体时,可以使用 CdTe 量子点标记,从而可以直观观察 ACP 颗粒与细胞的相互作用。

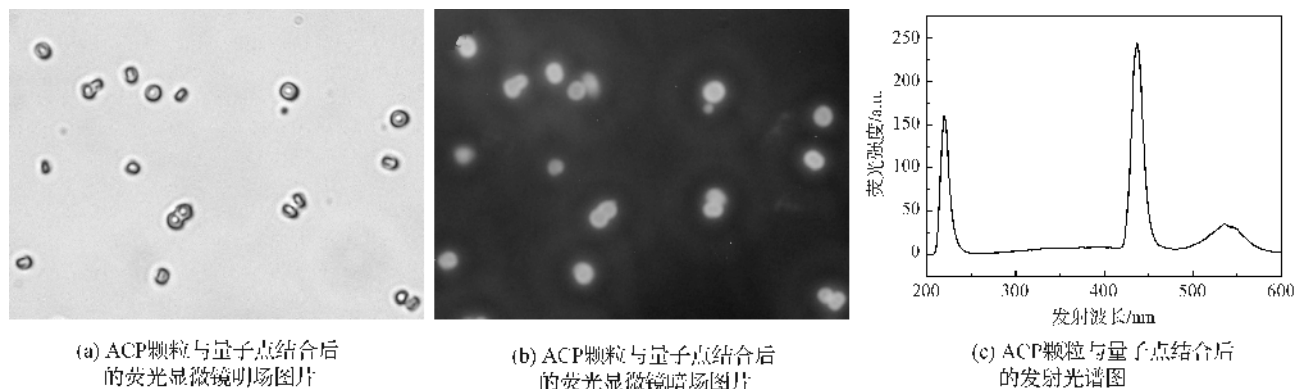


图 7 ACP 与量子点结合图片

2.4 制得 ACP 的生物相容性实验

为了检测本研究合成的 ACP 颗粒是否具有毒性,本实验采用成骨细胞(MC3T3-E1)作为研究对象,设置不同浓度的 ACP 悬液(0、0.001、0.01、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)检测它们对成骨细胞活性的影响。由图 8 可以看出,不同浓度的 ACP 悬液与成骨细胞共培养不同时间(24、48、72 h)后,细胞的成活率都在 90%以上。随着 ACP 悬液浓度的增加细胞的成活率有增加的趋势,在 ACP 悬液的浓度较高时(0.6、0.8、1.0 mg/mL)成骨细胞的成活率在 100%以上,表明所合成的 ACP 颗粒具有促进细胞增殖的特性。由图 8 还可以看出随着培养时间的延长,ACP 颗粒可以加快细胞的生长。利用贻贝壳为钙源制备的无定形磷酸钙,会有镁、钾等离子进入到其中,这使其和骨的成分更为相似,具有良好的生物相容性。图 8 可以说明利用贻贝壳粉制备的 ACP 颗粒对成骨细胞不具毒性,安全性高,有良好的生物相容性,可以用作药物载体和骨修复材料。曹俊等^[15]研究了纳米磷酸钙对 MG63 细胞增殖过程的影响作用,结果表明纳米磷酸钙对 MG63 细胞增殖具有促进作用。

无定形磷酸钙具有良好的生物相容性,已被用作生物陶瓷、药物载体、组织工程支架等。王皓宇等^[16]利用无定形磷酸钙负载重组人骨形态发生蛋白-2(rhBMP-2)制备了纳米缓释体,对制得的材料进行体外和体内试验,表明纳米缓释体具有良好的生物相容性和安全性,可适用于骨缺损修复的治疗。贺文慧等^[17]研究了空心纳米无定形磷酸钙,并

且以牛血清蛋白(BSA)为模型体系研究了材料的载药和释放性能,发现所制备的纳米磷酸钙不仅具有良好的蛋白质负载量而且还具有优异的可释放性,明显优于传统的羟基磷灰石体系。本研究利用贻贝壳为原料合成的无定形磷酸钙亚微粒,具有良好的生物相容性,在医用材料或药物载体领域有潜在的应用前景。本研究可以利用废弃的贻贝壳资源,使其变废为宝,缓解环境污染问题,有很大的实际意义。

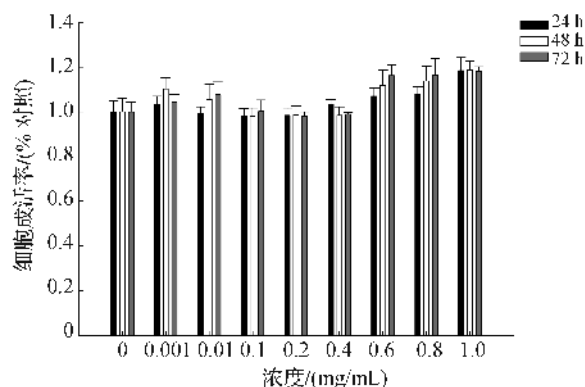


图 8 不同浓度的 ACP 悬液对成骨细胞(MC3T3-E1)的毒性检测

3 结 论

以贻贝壳粉为原料制备了无定形磷酸钙颗粒,颗粒粒径为 250~450 nm 亚微粒,颗粒粒径分布范围窄,大小均一,表面积大,表面电位(Zeta 电位)为 27.5 mV。三聚磷酸钠可以络合溶液中的 Ca^{2+} ,从而影响无定形磷酸钙的形貌。CdTe 量子点

与制得 ACP 颗粒与 CdTe 量子点具有良好的结合性,在激发波长为 219 nm 下,复合颗粒在 437 nm 处有最强的荧光强度,峰宽为 67.6 nm。所制备的无定形磷酸钙颗粒对成骨细胞(MC3T3-E1)有着良好的生物相容性,显示了该材料在医用材料或药物载体领域有潜在的应用前景。

参考文献:

- [1] DOROZHUKIN S V. Amorphous calcium (ortho) phosphates[J]. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(12): 4457-4475.
- [2] 李延报,李东旭,翁文剑. 无定形磷酸钙及其在生物医学中的应用[J]. *无机材料学报*, 2007(5): 775-782.
- [3] PETERS F, SCHWARZ K, EPPLER M. The structure of bone studied with synchrotron X-ray diffraction, X-ray absorption spectroscopy and thermal analysis[J]. *Thermochimica Acta*, 2000, 361(1): 131-138.
- [4] HUANG X, YANG D, YAN W, et al. Osteochondral repair using the combination of fibroblast growth factor and amorphous calcium phosphate/poly (L-lactic acid) hybrid materials[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(20): 3091-3100.
- [5] 段伟文,罗伟,段振华,等. 贻贝的加工利用研究进展[J]. *渔业现代化*, 2013(3): 51-55.
- [6] 孙会玲,陈庆国,刘梅,等. 天然材料贻贝壳的应用研究[J]. *安徽农业科学*, 2014, 13: 4069-4071.
- [7] SECO-REIGOSA N, PEÑA-RODRÍGUEZ S, NÓVOA-MUÑOZ J C, et al. Arsenic, chromium and mercury removal using mussel shell ash or a sludge/ashes waste mixture [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20: 2670-2678.
- [8] KAPLAN D L. Mollusc shell structures: novel design strategies for synthetic materials[J]. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 1998, 3(3): 232-236.
- [9] ANDERSEN F A, BRECEVIC L, BEUTER G, et al. Infrared spectra of amorphous and crystalline calcium carbonate [J]. *Acta Chemica Scandinavica*, 1991, 45(10): 1018-1024.
- [10] ZHAO Z B, HAN H F, DING S, et al. Effect of silk sericin on morphology and structure of calcium carbonate crystal [J]. *Frontiers of Materials Science*, 2013, 7(2): 177-183.
- [11] KANDORI K, SHIMIZU T, YASUKAWA A, et al. Adsorption of bovine serum albumin onto synthetic calcium hydroxyapatite: influence of particle texture [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1995, 5(1): 81-87.
- [12] URCH H, VALLET-REGI M, RUIZ L, et al. Calcium phosphate nanoparticles with adjustable dispersability and crystallinity [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2009, 19(15): 2166-2171.
- [13] 张鹏,邱淑璇,杨兆钰,等. 无定形磷酸钙的制备及表征[J]. *西南民族大学学报*, 2012, 38(2): 273-276.
- [14] 徐海娥,闫翠娥. 水溶性量子点的制备及应用[J]. *化学进展*, 2005(5): 800-808.
- [15] 曹俊,蔡玉荣,马寅孙,等. 纳米磷酸钙对 MG63 细胞生物学行为的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 29: 5341-5344.
- [16] 王皓宇,吴小涛,张绍东,等. 无定形磷酸钙负载 rhBMP-2 纳米缓释体的生物相容性及安全性[J]. *中国矫形外科杂志*, 2008, 22: 1720-1723.
- [17] 贺文慧,唐睿康,徐旭荣. 纳米磷酸钙载药体系的制备与表征[J]. *无机化学学报*, 2011, 27(7): 1233-1238.

Synthesis and Properties of Amorphous Calcium Phosphate Microspheres with Mussel Shells

HAN Yizhong^a, CUI Zhengyang^b, CHEN Cen^b, YE Ting^b, KONG Xiangdong^{a, b}

(a. College of Materials and Textiles; b. College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Amorphous calcium phosphate (ACP) was successfully synthesized by utilizing the calcium precursor of mussel shell powder. Phosphoric acid, sodium tripolyphosphate and urea were added during the reaction To fast prepare spherical submicron particles with the diameter of 250~450 nm. Particle size distribution range is narrow. The size is uniform and the superficial area is large. Potential of particle surface (Zeta potential) is 27.5 mV. The amorphous calcium phosphate microspheres can well bond with quantum dots. The MTT test results indicate that the ACP microspheres are not toxic to osteoblasts cells (MC3T3-E1), and have good biocompatibility.

Key words: amorphous calcium phosphate; mussel shells; biocompatibility

(责任编辑:唐志荣)