

制备羟基磷灰石的贝壳种类优选及方法比较

田璐琦^{1,4}, 杨皓月^{1,3}, 邢荣娥^{1,2,3}, 刘松^{1,2,3}, 李克成^{1,2,3}, 于华华^{1,2,3}, 李鹏程^{1,2,3}

(1. 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋药物与生物制品功能实验室, 山东 青岛 266237; 3. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 本研究以 CaO、煅烧后的牡蛎壳、蛤蜊壳、扇贝壳和脉红螺壳为原料, 分别采用反相微乳液法和聚乙二醇(PEG)辅助微波加热法制备了纳米羟基磷灰石(HA), 并从产物的物理化学特性以及形态学参数方面进行比较。利用傅里叶变换红外光谱、X 射线衍射对各组产物进行了化学表征, 扫描电子显微镜观察样品的表面形貌, Zeta 电位仪测定样品表面的电势差。结果表明, 反相微乳液法制备的 HA 尺寸在(104.10±1.95) nm 至(207.90±3.75) nm 范围内, 为近球形颗粒; 而 PEG 辅助微波加热法制备得到的 HA 尺寸在(61.17±3.11) nm 与(182.70±1.05) nm 范围内, 倾向于形成椭圆及棒状的颗粒, 稳定性更高, 且各组样品均表现出完全的亲水性。此外, 对比于 CaO 制备的 HA, 以贝壳为原料制备的 HA 具有更好的纳米结构, 其中利用脉红螺壳制备的 HA 在粒径大小、稳定性以及亲水性等方面均具有优势, 并且具有更接近天然骨的钙磷比。因此脉红螺壳可以作为 PEG 辅助微波加热法制备羟基磷灰石的主要原料。

关键词: 贝壳; 反相微乳液法; 微波加热; 聚乙二醇; 羟基磷灰石

中图分类号: TS209

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2024)3-0095-08

DOI: 10.11759/hyxx20230303001

羟基磷灰石[Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂](hydroxyapatite, HA)是一种钙磷比为 1.67 的钙磷化合物, 因化学组成以及晶体结构与人体骨骼和牙齿极为相似而被广泛研究, 具有很好的生物相容性和骨诱导能力, 可以作为填料^[1]、金属涂层^[2]以及药物载体^[3]应用于骨骼和牙齿的修复过程。研究表明, HA 的生物活性与其形态学参数, 例如形状、大小以及表面电荷密切相关^[4], 而制备方法以及合成原料对这些参数具有有效的调控作用^[5]。

目前, 以贝壳为原料制备 HA 的方法包括固相法^[6]、机械化学法^[7]、化学沉淀法^[8]、水热法^[3]以及微波加热法^[9]等, 不同制备方法得到的 HA 在形态学参数上略有差异, 固相法、机械化学法和化学沉淀法合成的 HA 往往倾向于聚集形成大且无规则的微米级颗粒^[6, 10-11], 水热法制备虽然可以有效地调控颗粒的形态及大小, 但需要高温高压的反应条件, 危险系数高且反应时间较长^[12]。反相微乳液法是利用表面活性剂在水相和油相界面形成稳定的胶束, 反应离子被包覆在胶束中, 通过带不同粒子的胶束之间相互碰撞、融合, 反应随即发生在包覆粒子的微型反应池中, 该方法条件温和, 形成的羟基磷灰石具有可控的形态和大小^[4];微波法则利用高微波功率将

能量迅速地转化为反应物的内能, 加快反应速度, 具有成本低, 生产效率高的特点。贝壳由 95%以上的碳酸钙和 1%~5%的有机质组成^[6, 9, 13], 是自然界天然的“钙库”。长期复杂的生长环境使贝壳结构中掺杂 Zn²⁺、Sr²⁺、Mg²⁺和 CO₃²⁻等多种活性离子, 这些离子的存在使以贝壳为原料制备的羟基磷灰石在晶体结构上发生畸变^[6, 14-15], 加快了其在体内的降解速度, 溶出的活性离子则通过影响细胞黏附、增殖以及分化过程对生物活性产生积极的影响^[16], 相较于化学试剂合成的 HA, 贝壳制备的 HA 更贴近人体骨骼的天然矿物^[15]。

收稿日期: 2023-03-03; 修回日期: 2023-04-03

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0902105); 福建省科技计划项目-STC 计划(2021T3013); 中国科学院海洋大科学研究中心重点部署项目(技术研发类)(COMS2020J04)

[Foundation: The National Key Research and Development Program of China, No. 2019YFD0902105; Fujian science and technology planning project-STC program, No. 2021T3013; Key deployment projects of the Marine Science Research Center of Chinese Academy of Sciences, No. COMS2020J04]

作者简介: 田璐琦(1998—), 女, 山西晋中人, 硕士, 研究方向为海洋生物制品, E-mail: tianluqi20@mails.ucas.ac.cn; 邢荣娥(1975—), 通信作者, 女, 内蒙古牙克石人, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事海洋生物资源高值利用研究, E-mail: xingronge@qdio.ac.cn

本研究以太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)壳、杂色蛤蜊(*Ruditapes variegata*)壳、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)壳以及脉红螺(*Repanavenosa*)壳四种常见的贝壳废弃物以及化学试剂 CaO 为原料,对比了反相微乳液法和微波加热法制备的羟基磷灰石在化学组成、物理特性以及形态学参数等方面的差异,以期获得一种安全可持续的原料和高效的合成方式,从而制备形貌可控的纳米 HA 应用于医学材料等领域。

1 材料与方法

1.1 试剂

NaOH(天津奥普升化工有限公司,分析纯); Span 80(天津致远化学试剂有限公司,化学纯); 醋酸(天津富宇试剂,分析纯)。氧化钙(分析纯)、正戊醇(分析纯)、环己烷(分析纯)、 Na_2HPO_4 (分析纯)、聚乙二醇 6000(化学纯)均购买自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 贝壳的收集和处理

牡蛎壳、蛤蜊壳、扇贝壳和脉红螺壳均收集自青岛海鲜市场。贝壳经刷洗后在 0.5 mol/L NaOH 溶液中浸泡 48 h 去除表面杂质,冲洗多次后烘干,将贝壳碾压至碎片,用粉碎机进一步粉碎并用 200 目筛网过滤。将得到的贝壳粉在 950 °C 煅烧 2 h 去除有机物。

1.3 反相微乳液法制备 HA

根据 Ma 等^[4]的方法,将 11.7 g Span 80、23.4 g 正戊醇和 100 g 环己烷混合后剧烈搅拌制备油相,其中 Span 80 为表面活性剂,正戊醇为助表面活性剂。将 CaO 和煅烧后的贝壳粉溶解在体积分数为 7% 的醋酸中配制成为 0.5 mol/L 的醋酸钙溶液($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$),同时配制 0.3 mol/L 的 Na_2HPO_4 溶液,取 0.6 mL 配制好的 $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ 溶液和 Na_2HPO_4 溶液分别滴加到 60 mL 的油相中,放入超声粉碎仪(JY92-II,宁波新芝)中进行超声乳化(超声功率 20%;超声时长 3 s;间隔时长 1 s;总超声时长 7 min),得到透明的钙微乳液和磷微乳液。将钙微乳液和磷微乳液按照 1:1 的比例混合并用 1 mol/L NaOH 调节 pH 到 10.0,在磁力搅拌器上搅拌 5 h,反应结束后在 6 000 r/min 下离心 5 min,弃去上清液,先后用无水乙醇和超纯水洗涤白色沉淀 3~5 次,得到的产物在 -80 °C 超低温冷冻 24 h 后在冷冻干燥机(FD-1A-80,北京博医康)中

干燥 24 h。为除净产物中的有机杂质,冻干后的产物在 650 °C 下继续煅烧 3 h 获得 HA。

1.4 微波辅助法制备 HA

实验借鉴 Che^[17]的方法,采用聚乙二醇(PEG 6000)作为模板剂辅助 HA 的合成。将 CaO 和煅烧后的贝壳粉溶解在 50 mL 含质量分数为 6% PEG 的醋酸溶液(体积分数为 7%)中得到 1 mol/L 的 $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$,并配制等体积 0.6 mol/L 的 Na_2HPO_4 溶液,该溶液中同样含有质量分数 6% 的 PEG。将 Na_2HPO_4 溶液逐滴滴加到 $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ 溶液中,并用 1 mol/L NaOH 溶液将 pH 调整到 10.0,得到的白色悬浊液在微波条件下(800 W, 2.45 GHz)反应 15 min,反应结束后在 6 000 r/min 下离心 5 min,弃去上清液,得到的白色沉淀分别用无水乙醇和超纯水洗涤 3 次,冷冻干燥后在马弗炉中煅烧(650 °C, 3 h)。

1.5 样品测试与分析

1.5.1 HA 的化学表征

通过傅里叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectrometer, FTIR)(Nicolet iS10, 美国赛默)和 X 射线衍射仪(X-ray powder diffractometer, XRD)(D8 ADVANCE, 德国布鲁克)对产物进行化学表征。X 射线扫描仪的 Cu 靶波长为 1.540 6 Å,管电流和电压分别为 40 mA 和 40 kV,扫描步长为 0.02°,扫描速率为 3°/min,扫描范围在 20°~60°之间;采用能谱仪(ICPOES730, 美国安捷伦)测定 HA 中的钙磷含量。

1.5.2 HA 的表面形貌

采用扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)(SU8020, 日本日立)观察颗粒的微观形态,扫描电压是 3.0 kV,扫描模式为二次电子扫描。

1.5.3 HA 的表面特征

颗粒表面的 Zeta 电位采用纳米粒度仪(NanoZS90, 英国马尔文)测量,测试前将样品以 1 mg/mL 的浓度分散在超纯水中;颗粒的表面亲水性采用接触角测量仪(JC2000C, 上海中晨)进行测量,测量之前,粉末状样品以固液比 1:50 溶解在无水乙醇中,使用喷枪将悬浮液均匀喷洒在载玻片上,置于室温下 24 h 使溶剂挥发。

1.5.4 数据分析

采用 Origin 2019 b 和 Graphpad 8.0 进行图像的绘制,并使用 Image J 测量颗粒大小;使用 Jade 6 软件分析样品的 X 射线衍射图谱。

2 结果与分析

2.1 HA 的傅里叶变换红外光谱

通过 FTIR 对样品进行了表征, 如图 1 所示, 两种方法均成功合成了 HA, 图中 $1\ 018\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 086\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰(ν_3)代表 PO_4^{3-} 的不对称伸缩振动峰, $962\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰(ν_4)归属于 P-O 键的对称伸缩振动峰, $562\ \text{cm}^{-1}$ 和 $599\ \text{cm}^{-1}$ 处的双峰(ν_1)则代表 O-P-O 的不对称弯曲峰^[9, 13]。在以脉红螺壳为原料时, 两种方法制备的 HA 在 $873\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 411\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 455\ \text{cm}^{-1}$ 处都可以看到归属于 CO_3^{2-} 的振动峰(图 1a(2)、b(2)), CO_3^{2-} 的存在有以下三种可能的原因: (1)来自于贝壳原料本身含有的方解石和霏石的掺入; (2)制备过程中样品与空气的接触导致^[18]; (3)煅烧过程产生的含碳物质在 HA 表面

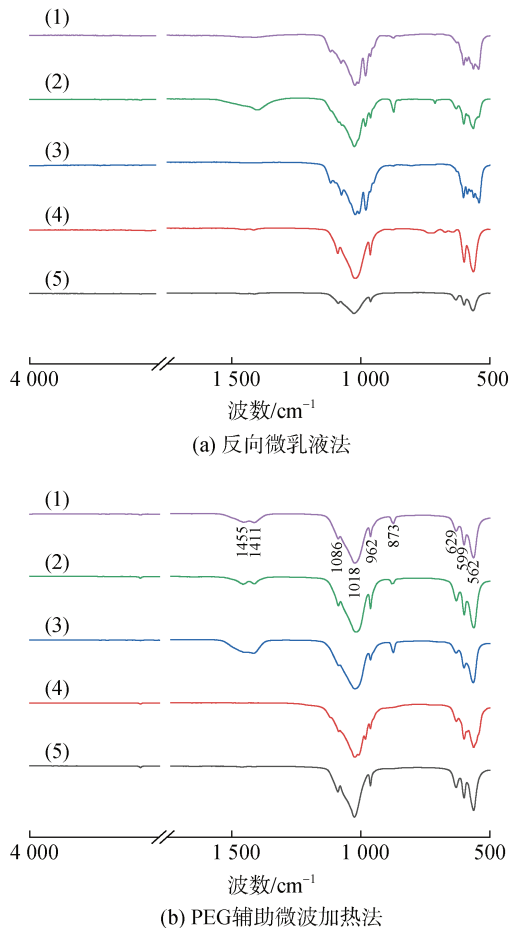


图 1 氧化钙及不同贝壳原料通过不同制备方法合成的羟基磷灰石(HA)傅里叶变换红外光谱图

Fig. 1 Fourier transform infrared spectra of hydroxyapatite synthesized by CaO and different shells through different preparation methods

注: 化学羟基磷灰石(1), 脉红螺壳羟基磷灰石(2); 扇贝壳羟基磷灰石(3); 蛤蜊壳羟基磷灰石(4); 牡蛎壳羟基磷灰石(5)

的掺入, 后两种原因具有加工层面上的偶然性, 但两种方法制备的脉红螺壳 HA 均具有 CO_3^{2-} 的掺杂, 因此原因(1)的可能性更大。需说明的是, CO_3^{2-} 在 HA 晶体中的取代方式包括 A 型取代(取代-OH)和 B 型(取代 PO_4^{3-})取代^[19], 两种取代方式都可以通过出峰位置在图谱中呈现出来, 本实验中 CO_3^{2-} 的取代方式属于典型的 B 型取代, 且 CO_3^{2-} 竞争 PO_4^{3-} 位点的能力往往会影响到 PO_4^{3-} 的峰强^[20], 这使得该原料制备的 HA 与人体骨骼和牙齿中的无机质化学组成和结构更加接近^[21-22]。

2.2 HA 的 X 射线衍射图谱

采用 XRD 进一步检测了样品的化学特性。通过与粉末衍射标准联合委员会(JCPDS)的数据库进行对比, 所有产物的 XRD 图谱与 HA 的标准卡片(JCPDS # 74-0565)高度匹配(图 2), 并具有较强的衍射峰。以反相微乳液法制备时, 各组的产物组成除 HA 外, 均含有

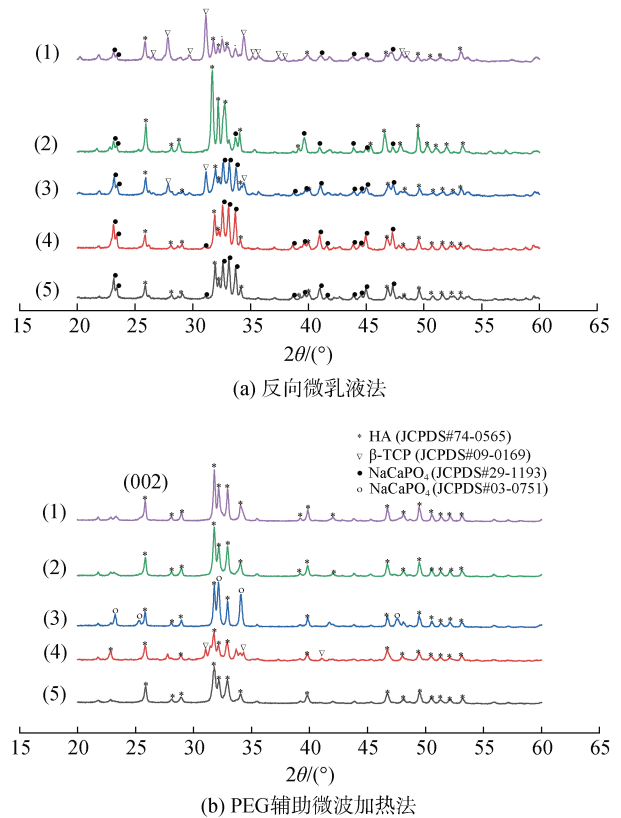


图 2 氧化钙及不同贝壳原料通过不同制备方法合成的羟基磷灰石(HA) X 射线衍射图谱

Fig. 2 X-ray diffraction spectra of hydroxyapatite synthesized by CaO and different shells through different preparation methods

注: 化学羟基磷灰石(1); 脉红螺壳羟基磷灰石(2); 扇贝壳羟基磷灰石(3); 蛤蜊壳羟基磷灰石(4); 牡蛎壳羟基磷灰石(5)

β -磷酸钙(β -tri calcium phosphate, β -TCP)和 NaCaPO_4 的存在(图 2a); 采用 PEG 辅助微波加热法制备时, 以扇贝壳和蛤蜊壳制备的 HA 中也存在杂质 β -TCP 和 NaCaPO_4 , 但 CaO 、脉红螺壳和牡蛎壳得到的产物均为纯净的 HA(图 2b), 相较于微波加热法, 反相微乳液法制备 HA 时更需要关注 β -TCP 向 HA 的完全转化。 NaCaPO_4 的存在有两方面的原因: 一是贝壳原料本身存在的钠元素的掺杂^[15, 23], 二是制备过程中 pH 调节剂的不完全去除。值得一提的是, 与其他各组相比, 两种方法制备的脉红螺壳 HA 在(002)表现出高于其他组别的衍射强度, 强调了该原料合成的 HA 更倾向于沿 c 轴方向生长^[24]。

2.3 HA 的表面形貌分析

通过 SEM 对产物进行微观形态学观察, 根据图 3, 两种制备方法得到的 HA 均可以达到纳米级别。其中, 反相微乳液法得到的产物倾向于形成近球形的颗粒, 部分晶粒融合形成大且不规则的颗粒, 而微波辅助法得到的 HA 则更倾向于形成尺寸更小的棒状和椭圆状颗粒, 形态的变化在以贝壳为原料制

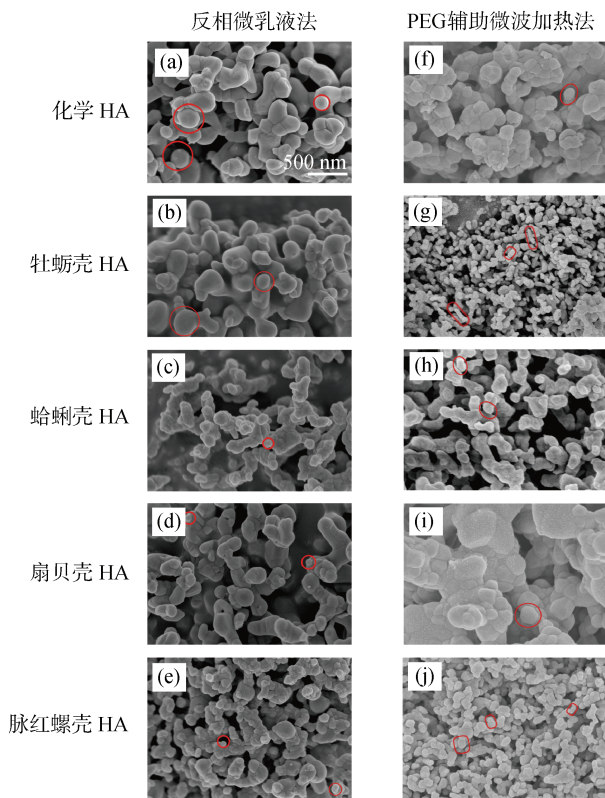


图 3 氧化钙及不同贝壳原料通过不同制备方法合成的羟基磷灰石(HA)微观形貌

Fig. 3 Morphology of hydroxyapatite synthesized by CaO and different shells through different preparation methods

备的 HA 中更加显著。进一步测量了颗粒的粒径大小, 如图 4 所示, 采用反相微乳液法制备的 HA 颗粒大小在 (104.10 ± 1.95) nm 与 (207.90 ± 3.75) nm 之间变化, 而 PEG 辅助微波加热法制备的 HA 颗粒大小在 (61.17 ± 3.11) nm 与 (182.70 ± 1.05) nm 之间变化(图 4a)。同时, 相较于 CaO 合成的 HA, 贝壳在向 HA 的转化过程中似乎更容易保持纳米结构, 且粒径大小均与化学 HA 具有显著性差异(图 4b), 其中以蛤蜊壳为原料制备的 HA 在两种制备方法下均表现出最小的粒径分布, 分别为 (104.10 ± 1.95) nm(反相微乳液法)和 (61.17 ± 3.11) nm(微波加热法), 其次是脉红螺壳, 在两种方法下制备得到的产物粒径均低于 110 nm。

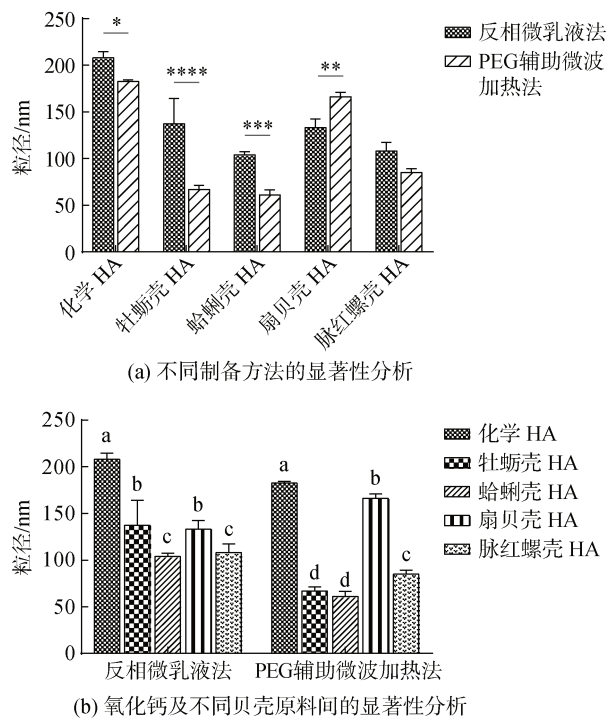


图 4 氧化钙及不同贝壳原料通过不同制备方法合成的羟基磷灰石(HA)粒径大小

Fig. 4 Particle size of hydroxyapatite synthesized by CaO and different shells through different preparation methods

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; 采用邓肯分析, 字母“a”代表的是均值最大的组别, 从“a”到“d”平均值依次下降, 字母相同的两组间无显著差异。不同字母组间差异有统计学意义, $P \leq 0.05$

2.4 HA 的表面特性

Zeta 电位指分散介质与覆盖在颗粒表面的流体稳定层之间的电势差^[25], 可以反映颗粒的带电性以及稳定性。如图 5 所示, 所有样品的 Zeta 电位都呈现负数, 数值在 -12.37 mV 与 -39.63 mV 之间变化。

其中,采用微波加热法制备的 HA 的 zeta 电位绝对值均显著高于同原料条件下采用反相微乳液法制备的 HA,且牡蛎壳 HA 的电位绝对值可以高达 39.63 mV,其他原料制备的 HA 的 zeta 电位绝对值虽然低于该值,但仍大于 25 mV。

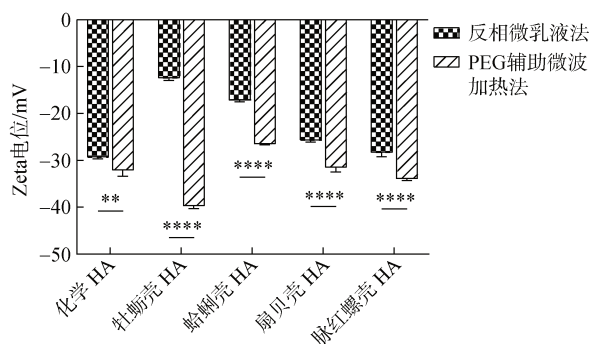


图 5 氧化钙及不同贝壳来源通过不同方法合成的羟基磷灰石(HA) Zeta 电位

Fig. 5 Zeta potential of hydroxyapatite synthesized by CaO and different shells through different preparation methods

注: ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$

通过测量 HA 的接触角判断其亲水性,实验结果表明,PEG 辅助微波加热法制备得到的 HA 接触角均为 0° ,表现出完全的亲水性,而采用反相微乳液法制备的 HA 在各组之间表现出差异性,其中脉红螺壳 HA 表现出完全的亲水性,其他各组的接触角则分别为 3.33° (化学 HA), 11.67° (牡蛎壳 HA), 3.67° (扇贝壳 HA), 2° (蛤蜊壳 HA)。

通过上述多方面的材料评估,以 PEG 辅助微波加热法制备的 HA 具有更加显著的应用优势,在此基础上,利用能谱仪测定了不同原料制备得到的 HA 的钙磷含量并计算钙磷比。如图 6 所示,脉红螺壳制备的 HA 钙磷比高于理论值 1.67,为 1.69,接近天然骨的钙磷比 1.71^[26],而其他各组 HA 的钙磷比均低于 1.67。

3 讨论

制备方法可以直接影响 HA 的形态学参数这一论点在本文中得到了充分论证,两种方法均可以得到纳米 HA 晶体,但在进一步的形貌分析和表面特性分析中表现出了显著的差异。反相微乳液法的条件温和,反应不需要高温或高压即可形成规则的纳米 HA,不同的表面活性剂通过形成形状和大小不同的胶束直接影响颗粒的形态学参数^[5],在该方法中,由于煅烧过程中分子内部的结构发生破坏并重结晶,

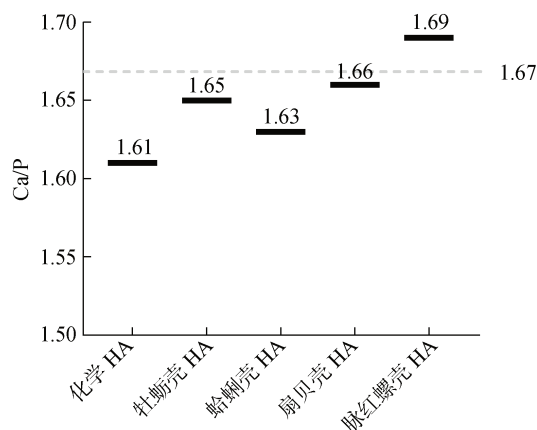


图 6 氧化钙及不同原料制备得到的羟基磷灰石(HA)钙磷比(PEG 辅助微波加热法)

Fig. 6 Ca/P ratio of hydroxyapatite synthesized by CaO and different shells (microwave method)

导致颗粒间发生相对融合从而增大了颗粒的粒径^[6],微波加热法是通过微波能向分子内能的快速转化加速 HA 的结晶过程, Mohd^[27]的综述中提出微波加热结合高温煅烧可以增加反应的动力学,从而有效改善产物的物理特性,使产物具有更小更均一的粒径分布,这与本文得到的结论相一致,然而,微波条件下离子的高速运动往往使离子无定形的结合导致颗粒间的聚合^[28],本研究添加的 PEG 通过 PEG-OH 与 Ca^{2+} 的结合降低了离子在体系中的运动速率^[5],缓解了颗粒间的融合和聚集,另一方面,PEG 在反应过程中的降解进一步控制了颗粒的粒径大小。据报道,颗粒的粒径越小,一定程度上反映了颗粒具有更大的比表面积和表面能,这为细胞的黏附提供了足够的空间和作用力^[5, 29]。相较于反相微乳液法,PEG 辅助微波加热法制备的 HA 更倾向于沿 c 轴方向生长,形成类似棒状的形态,这种形态的变化在以贝壳为原料制备的 HA 中更加显著。棒状 HA 为成骨细胞的黏附和增殖提供了充足的空间,使细胞活动可以扩散至整个支架,而不只是集中在颗粒的顶部^[24],更重要的是棒状 HA 更加接近人体骨骼和牙齿中磷灰石的形态^[30-32],因此被认为具有比其他形状 HA 更大的应用潜力^[33]。

Zeta 电位的测试结果显示采用两种方法得到的 HA 表面都带有负电荷, Smith 等人^[34]验证了带负电荷的 HA 在细胞黏附、 Ca^{2+} 沉积等方面具有巨大的利用优势,更适用于作为骨修复材料应用于医学领域^[35]。通常认为, Zeta 电势的绝对值与颗粒的稳定性有关,绝对值越大,颗粒越稳定^[36],越容易抵

抗聚集的发生,且更有利于细胞的黏附^[37],相反,较低的 Zeta 电位绝对值意味着颗粒之间的吸引力大于排斥力,颗粒之间容易发生聚集^[12]。本文中 PEG 辅助微波加热法制备的 HA 在溶剂中更加稳定,其中牡蛎壳 HA Zeta 电位绝对值最大,稳定性最好,其他三种贝壳 HA 的 Zeta 电位绝对值虽然低于牡蛎壳 HA,但仍然维持在较高的水平。此外,通过测试样品的接触角评估了样品的亲水性,接触角越小,样品的亲水性越强,对于植入性的材料,高亲水性有助于提高细胞在其表面的黏附性^[14, 38],本研究采用 PEG 辅助微波加热法制备的 HA 表现出完全的亲水性,而反相微乳液法制备的 HA 中,只有脉红螺壳 HA 表现出完全的亲水性。此外,在所有 HA 样品中,脉红螺壳 HA 的钙磷比(1.69)更加接近天然骨的钙磷比 1.71^[26, 39]。

4 结论

本研究以化学试剂 CaO、牡蛎壳、蛤蜊壳、扇贝壳和脉红螺壳为原料,分别采用反相微乳液法和 PEG 辅助微波加热法制备了纳米 HA。其中,以反相微乳液法制备的 HA 形成了(104.10±1.95) nm~(207.90±3.75) nm 的近球形颗粒,PEG 辅助微波加热法制备的 HA 则形成了(61.17±3.11) nm~(182.70±1.05) nm 的椭圆以及棒状颗粒。PEG 辅助微波加热法制备的 HA 尺寸更小,比表面积更大,稳定性好且具有完全的亲水性,更适用于在医学材料领域的应用。此外,四种贝壳均可以制备出接近化学计量值 1.67 的 HA,且产物相较于 CaO 制备的 HA 更倾向于维持纳米结构,在两种制备方法中,以脉红螺壳为原料制备的 HA 粒径始终维持在 110 nm 以下,具完全的亲水性且 Zeta 电位绝对值始终维持较高水平,钙磷比更接近天然骨,在医用材料领域具有更大的应用优势。

参考文献:

- [1] DU M, CHEN J, LIU K, et al. Recent advances in biomedical engineering of nano-hydroxyapatite including dentistry, cancer treatment and bone repair[J]. *Composites Part B: Engineering*, 2021, 215: 108790.
- [2] HUSSAIN S, SHAH Z A, SABIRUDDIN K, et al. Characterization and tribological behaviour of Indian clam seashell-derived hydroxyapatite coating applied on titanium alloy by plasma spray technique[J]. *Journal of the Mechanical Behavior Biomedical Materials*, 2023, 137: 105550.
- [3] HUANG H, DU M, CHEN J, et al. Preparation and characterization of abalone shells derived biological mesoporous hydroxyapatite microspheres for drug delivery[J]. *Materials Science Engineering C Materials Biological Applications*, 2020, 113: 110969.
- [4] MA X, CHEN Y, QIAN J, et al. Controllable synthesis of spherical hydroxyapatite nanoparticles using inverse microemulsion method[J]. *Materials Chemistry and Physics*, 2016, 183: 220-229.
- [5] SADAT-SHOJAI M, KHORASANI M T, DINPANAH-KHOSH DARGI E, et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures[J]. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9(8): 7591-7621.
- [6] HUSSAIN S, SABIRUDDIN K. Effect of heat treatment on the synthesis of hydroxyapatite from Indian clam seashell by hydrothermal method[J]. *Ceramics International*, 2021, 47(21): 29660-29669.
- [7] CHEN T Y, HUANG H C, CAO J L, et al. Preparation and characterization of alginate/HACC/oyster shell powder biocomposite scaffolds for potential bone tissue engineering applications[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(42): 35577-35588.
- [8] ŞAHIN Y M, GÜNDÜZ O, BULUT B, et al. Nano-bio-ceramic synthesis from tropical sea snail shells (Tiger Cowrie - *Cypraea Tigris*) with simple chemical treatment[J]. *Acta Physica Polonica A*, 2015, 127(4): 1055-1058.
- [9] KUMAR G S, GIRIJA E K, VENKATESH M, et al. One step method to synthesize flower-like hydroxyapatite architecture using mussel shell bio-waste as a calcium source[J]. *Ceramics International*, 2017, 43(3): 3457-3461.
- [10] RAMESH S, NATASHA A N, TAN C Y, et al. Characteristics and properties of hydroxyapatite derived by sol-gel and wet chemical precipitation methods[J]. *Ceramics International*, 2015, 41(9): 10434-10441.
- [11] WU S C, HSU H C, HSU S K, et al. Preparation and characterization of hydroxyapatite synthesized from oyster shell powders[J]. *Advanced Powder Technology*, 2017, 28(4): 1154-1158.
- [12] CHEN J, WEN Z, ZHONG S, et al. Synthesis of hydroxyapatite nanorods from abalone shells via hydrothermal solid-state conversion[J]. *Materials & Design*, 2015, 87: 445-449.
- [13] CASTRO M A M, PORTELA T O, CORREA G S, et al. Synthesis of hydroxyapatite by hydrothermal and microwave irradiation methods from biogenic calcium source varying pH and synthesis time[J]. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 2022, 61(1): 35-41.
- [14] PAL A, NASKER P, PAUL S, et al. Strontium doped hydroxyapatite from Mercenaria clam shells: Synthesis,

- mechanical and bioactivity study[J]. *Journal of Mechanical Behavior Biomedical Materials*, 2019, 90: 328-336.
- [15] ZULIANTONI Z, SUPRAPTO W, SETYARINI P H, et al. Extraction and characterization of snail shell waste hydroxyapatite[J]. *Results in Engineering*, 2022, 14: 100390.
- [16] KARUNAKARAN G, CHO E B, THIRUMURUGAN K, et al. Mesoporous Mn-doped hydroxyapatite nanorods obtained via pyridinium chloride enabled microwave-assisted synthesis by utilizing *Donax variabilis* seashells for implant applications[J]. *Material Science Engineering C Material Biological Applications*, 2021, 126: 112170.
- [17] CHE Y, MIN S, WANG M, et al. Biological activity of hydroxyapatite/poly (methylmethacrylate) bone cement with different surface morphologies and modifications for induced osteogenesis[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2019, 136(47): 48188.
- [18] WIBISONO Y, PRATIWI A Y, OCTAVIANI C A, et al. Marine-derived biowaste conversion into bioceramic membrane materials: contrasting of hydroxyapatite synthesis methods[J]. *Molecules*, 2021, 26(21): 6344.
- [19] PERMATASARI H A, SARI M, AMINATUN, et al. Nano-carbonated hydroxyapatite precipitation from abalone shell (*Haliotis asinina*) waste as the bioceramics candidate for bone tissue engineering[J]. *Nanomaterials and Nanotechnology*, 2021, 11: 18479804211032851.
- [20] LEMOS A F, ROCHA J H G, QUARESMA S S F, et al. Hydroxyapatite nano-powders produced hydrothermally from nacreous material[J]. *Journal of the European Ceramic Society*, 2006, 26(16): 3639-3646.
- [21] WANG H, YAN K, CHEN J. Preparation of hydroxyapatite microspheres by hydrothermal self-assembly of marine shell for effective adsorption of Congo Red[J]. *Materials Letters*, 2021, 304: 130573.
- [22] SURESH KUMAR C, DHANARAJ K, VIMALATHITHAN R M, et al. Hydroxyapatite for bone related applications derived from sea shell waste by simple precipitation method[J]. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 2020, 8(2): 416-429.
- [23] GRIGORAVICIUTE-PURONIENE I, ZARKOV A, TSURU K, et al. A novel synthetic approach for the calcium hydroxyapatite from the food products[J]. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 2019, 91(1): 63-71.
- [24] HEMBRICK-HOLLOMAN V, SAMUEL T, MOHAMMED Z, et al. Ecofriendly production of bioactive tissue engineering scaffolds derived from egg- and sea-shells[J]. *Journal of Materials Research and Technology*, 2020, 9(6): 13729-13739.
- [25] WANG H, XING H, YAN K, et al. Oyster shell derived hydroxyapatite microspheres as an effective adsorbent for remediation of Coomassie brilliant blue[J]. *Advanced Powder Technology*, 2022, 33(2): 103425.
- [26] SARI M, HENING P, CHOTIMAH, et al. Porous structure of bioceramics carbonated hydroxyapatite-based honeycomb scaffold for bone tissue engineering[J]. *Materials Today Communications*, 2021, 26: 102135.
- [27] MOHD PU'AD N A S, KOSHY P, ABDULLAH H Z, et al. Syntheses of hydroxyapatite from natural sources[J]. *Heliyon*, 2019, 5(5): e01588.
- [28] DHANARAJ K, SURESH G. Conversion of waste sea shell (*Anadara granosa*) into valuable nanohydroxyapatite (nHAp) for biomedical applications[J]. *Vacuum*, 2018, 152: 222-230.
- [29] CAI Y, LIU Y, YAN W, et al. Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2007, 17(36): 3780-3787.
- [30] BRICHA M, BELMAMOUNI Y, ESSASSI EL M, et al. Surfactant-assisted hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders[J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2012, 12(10): 8042-8049.
- [31] KLINKAEWNARONG J, UTARA S. Ultrasonic-assisted conversion of limestone into needle-like hydroxyapatite nanoparticles[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2018, 46: 18-25.
- [32] WANG Z, JIANG S, ZHAO Y, et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite nano-rods from oyster shell with exogenous surfactants[J]. *Material Science Engineering C Materials Biological Applications*, 2019, 105: 110102.
- [33] DHANARAJ K, SURESH KUMAR C, SOCRATES S H, et al. A comparative analysis of microwave assisted natural (*Murex virgineus* shell) and chemical nanohydroxyapatite: structural, morphological and biological studies[J]. *Journal of the Australian Ceramic Society*, 2020, 57(1): 173-183.
- [34] SMITH I O, BAUMANN M J, MCCABE L R. Electrostatic interactions as a predictor for osteoblast attachment to biomaterials[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2004, 70(3): 436-441.
- [35] ZHONG S, WEN Z, CHEN J, et al. Effects for rapid conversion from abalone shell to hydroxyapatite nanosheets by ionic surfactants[J]. *Material Science Engineering C Materials Biological Applications*, 2017, 77: 708-712.
- [36] LI Q, WEN Z, CHEN J, et al. Preparation of controllable hydroxyapatite nanoparticles with abalone shells[J]. *Materials Letters*, 2019, 236: 562-565.
- [37] MOCIOIU A M, TUTUIANU R, CURSARU L M, et al. 3D structures of hydroxyapatite obtained from *Rapanavenosa* shells using hydrothermal synthesis fol-

lowed by 3D printing[J]. *Journal of Materials Science*, 2019, 54(22): 13901-13913.

- [38] JAAFAR A, SCHIMPF C, MANDEL M, et al. Sol-gel derived hydroxyapatite coating on titanium implants: Optimization of sol-gel process and engineering the interface[J]. *Journal of Materials Research*,

2022, 37(16): 2558-2570.

- [39] PERMATASARI H A, SARI M, AMINATUN, et al. Nano-carbonated hydroxyapatite precipitation from abalone shell (*Haliotis asinina*) waste as the bioceramics candidate for bone tissue engineering[J]. *Nanomaterials and Nanotechnology*, 2021, 11: 18479804211032851.

Comparison of raw materials and preparation methods for seashell hydroxyapatite

TIAN Luqi^{1, 4}, YANG Haoyue^{1, 2, 3}, XING Rong^{1, 2, 3}, LIU Song^{1, 2, 3}, LI Kecheng^{1, 2, 3}, YU Huahua^{1, 2, 3}, LI Pengcheng^{1, 2, 3}

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. National Laboratory of Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China; 3. Marine Research Center, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Mar. 3, 2023

Key words: sea shells; microemulsion method; microwave heating; polyethylene glycol; hydroxyapatite

Abstract: In the present study, we used CaO and calcined oyster, clam, scallop, and snail shells as raw materials to synthesize nanohydroxyapatite (HA) using the reverse-phase microemulsion method and polyethylene glycol (PEG)-assisted microwave heating and compared the physicochemical characteristics and morphological parameters of HA. Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray powder diffraction were used to characterize the product, scanning electron microscopy was employed to observe the surface morphology, and a Zeta potential analyzer was utilized for potential determination. The results showed that HA fabricated using the reverse-phase microemulsion method had a particle size between (104.10 ± 1.95) and (207.90 ± 3.75) nm and a sphere-like morphology; however, HA prepared using the PEG-assisted microwave method presented a smaller particle size that varied from (61.17 ± 3.11) to (182.70 ± 1.05) nm and tended to have an oval-like and rod-like shape, while showing better stability and hydrophilicity. In addition, compared with chemically synthesized HA, HA derived from seashells had a better nanostructure, and HA derived from snail shells outperformed others in terms of particle size, stability, and wettability. Furthermore, the Ca/P ratio of snail-shell HA was closer to that of the natural bone. Therefore, snail shells can be used as the main raw material for synthesizing HA using the PEG-assisted microwave method.

(本文编辑: 杨 悦)