



功能性纳米羟基磷灰石的制备及其表征

赵颜忠^{1,2,3}, 杨敏¹, 张海斌², 朱军², 周科朝²

(1. 中南大学 湘雅三医院, 长沙 410013;

2. 中南大学 粉末冶金国家重点实验室, 长沙 410083;

3. 中南大学 医用材料与器械研究中心, 长沙 410013)

摘要:以硝酸钙、磷酸氢二氨等为反应原料,采用水热合成法制备羟基磷灰石(HAP)纳米颗粒,对该HAP颗粒以及添加精氨酸(Arg)或掺杂少量稀土离子铽(Tb)/铕(Eu)对HAP颗粒的形貌修饰等进行研究,采用透射电镜(TEM)、X射线衍射仪(XRD)、傅立叶红外光谱仪(FTIR)等,对制备样品的结晶性、粒度、分散性等进行分析测试。结果表明:精氨酸表面修饰改变HAP纳米颗粒的表面Zeta电位,从而在一定程度上抑制HAP的生长速率;少量稀土离子Eu/Tb掺杂并不影响HAP/Arg纳米颗粒产物的结构,均为单一的HAP物相,所合成产物的粒径也为纳米级。经稀土金属铽/铕掺杂的精氨酸表面修饰的HAP纳米颗粒可作为基因转染载体。

关键词:羟基磷灰石;水热合成;精氨酸修饰;稀土掺杂

中图分类号: R318

文献标志码: A

纳米级羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HAP)首先由美国牙科医师 BROWN 和 CHOW^[1]于 1987 年首先发现,是最常见的一种生物活性材料,与人体硬组织的无机组分相似,具有良好的化学稳定性和生物相容性以及生物活性,对人体无毒副作用,在生物医学领域应用广泛^[2]。随着纳米技术的兴起,人们对羟基磷灰石的研究热点逐渐向纳米领域发展,研究发现,HAP的许多特性与其粒径大小密切相关^[3]。与普通的HAP相比,HAP纳米颗粒表现出独特的生物特性,如比表面积和表面能较大、溶解度较高、以及能够结合抗癌药物、核酸和蛋白质等更强的生物活性^[4-5]。此外,HAP纳米颗粒具有抗癌活性,能抑制癌细胞的生长^[6]。因此,对HAP纳米颗粒的制备及其临床医学应用的研究已越来越受到广大科研工作者的密切关注。同时,国内外研究发现^[7-10],HAP纳米颗粒作为基因载体,还在于制备工艺简单,并易改性修饰、可以负载不同基因、浓缩保护基因并缓慢释放、生物稳定性好等优点。研究表明,HAP纳米颗粒是一种理想的基因载体材料。但是,这种纳米载体材料的基因转染率与其尺寸形貌和表面状态的关系以及基因转染机制仍有待深入研究^[11]。因此,进一步探讨HAP纳米颗粒的

转染机制及改进制备工艺以提高其转染效率是促使HAP纳米颗粒作为基因载体应用于临床基因治疗的关键。

为了阐释HAP纳米颗粒的细胞跨膜转运途径及与细胞相互作用机制,实时动态观察HAP/Arg纳米颗粒在细胞内的跨膜转运入胞过程。本文作者采用硝酸钙、磷酸氢二氨等为反应原料,对水热合成法制备的HAP纳米颗粒以及添加精氨酸(Arginine)对HAP颗粒的形貌修饰等进行了研究,对制备样品的结晶性、粒度、分散性等进行分析测试。同时,探讨通过水热法合成一种新型改性的非病毒载体、稀土金属铽/铕掺杂的精氨酸修饰的HAP纳米颗粒,并进行表征,确认其适用于基因转染载体领域的应用。

1 实验

1.1 实验材料

本实验中采用的实验材料主要如下:硝酸钙 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (AR,中国医药集团上海化学试剂公司生产),磷酸铵 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (AR,中国医药集团上

基金项目:湖南省科技计划重点项目(2013SK2024);教育部博士学科点基金资助项目(20130162120094);中南大学粉末冶金国家重点实验室开放课题

收稿日期: 2015-11-10; **修订日期:** 2016-05-25

通信作者: 赵颜忠,副教授,博士;电话: 0731-88618669; E-mail: yanzhongzhao@163.com

海化学试剂公司生产), 磷酸氢钠 Na_2HPO_4 (AR, 中国医药集团上海化学试剂公司生产), 精氨酸(Arginine, Sigma 公司生产), 氧化铕 Eu_2O_3 (99.995%, 湖南稀土金属研究院生产), 氧化铽 Tb_2O_3 (99.995%, 湖南稀土金属研究院生产), 浓氨水(AR, 山东滕州祥润化工有限公司生产), 浓硝酸(AR, 南京章扬石化有限公司生产), 以及自行配制的磷酸缓冲盐溶液(PBS)和 HEPES 缓冲盐溶液(HBS)。

1.2 HAP 纳米颗粒制备

取 5.900 g 的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 置于烧杯中, 向烧杯中加蒸馏水至 30 mL, 充分搅拌形成澄清透明的溶液, 再添加蒸馏水稀释至 50 mL。称取 1.447 g 质量分数不小于 85% 的磷酸溶液, 用蒸馏水稀释至 30 mL。测得其 pH 值在 1 左右, 用氨水调节其 pH 值至 10, 最后将溶液稀释至 50 mL。将磷酸铵溶液瞬间加入 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液中, 充分搅拌, 溶液呈白色乳浊状, 并用浓氨水调节溶液的 pH 值至 9~10。将溶液倒入三口烧瓶中, 固定在支架台上。烧瓶下部分浸入 80 °C 的水液中, 使外部水面高过烧瓶内部反应液面。调节搅拌器, 以适当的速率使反应液充分混合。刚开始搅拌时液体为乳白色, 此状态维持到整个陈化过程结束。将含混合液搅拌混匀后转入到水热釜中, 然后将密封的高压釜置于恒温干燥箱中, 在 160 °C 下持续反应 3 h。取出高压釜冷却后, 取其中的沉淀, 用去离子水和无水乙醇洗涤数次, 然后真空干燥, 即得到 HAP 纳米颗粒样品。

1.3 精氨酸修饰 HAP 纳米颗粒制备

取 8.710 g 的精氨酸与 5.900 g 的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 置于烧杯中, 加蒸馏水至 30 mL, 充分搅拌, 可使液体分层。下层为澄清透明的溶液, 上层为白色悬浮液。再将磷酸铵溶液瞬间加入含 Ca^{2+} 精氨酸溶液, 充分搅拌, 调节溶液的 pH 值至 9。将混合液倒入三口烧瓶中, 浸入 80 °C 的水液中充分搅拌混合, 此过程进行 16 h。刚开始搅拌时, 反应液面有少量白色泡沫产生, 液体为乳白色。此状态维持到整个陈化过程结束。陈化过后将混合液倒入高压反应釜中, 置于 160 °C 的干燥箱中反应 3 h, 然后取出自然冷却。用去离子水和无水乙醇对反应的沉淀产物洗涤数次, 经过真空干燥并研磨得到精氨酸修饰的 HAP/Arg 纳米颗粒样品。

1.4 HAP/Arg 纳米颗粒的稀土掺杂

取 2.0711 g 氧化铕(Eu_2O_3)溶于 15 mL 去离子水

中, 用浓硝酸配制体积比 1:1 的硝酸盐溶液中, 加热并搅拌使 Eu_2O_3 完全溶解, 然后加入一定量的去离子水重复加热过程直到得到较为纯净的稀土硝酸铕($\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$)溶液, 然后待 $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 溶液冷却至室温后转入 200 mL 的容量瓶中并定容配置成体积分数为 0.0588 mol/L 的 $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 溶液, 最后将其储存在广口瓶中放于阴凉处保存, 以待后续实验使用。之后制备 Eu 掺杂的 HAP/Arg 纳米粉, 在量取 $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 溶液与 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液前设计 Eu^{3+} 与 Ca^{2+} 为某一固定的摩尔比, 而 $(\text{Ca}^{2+} + \text{Eu}^{3+})$ 与 P 摩尔比为 1.67。制备 Tb 掺杂 HAP/Arg 纳米颗粒的方法也与制备 Eu 掺杂 HAP/Arg 纳米颗粒的方法相同。

1.5 HAP 纳米颗粒混悬液的制备

取制备的 HAP 纳米颗粒样品 0.5 g, 放入离心管, 加去离子水 20 mL, 用超声波分散 60 min (Ultrasonic Homogenizer 24710, USA), 配置成浓度为 25 mg/mL 的混悬液。然后静置观察 2 h, 混悬液应保持无分层, 呈乳状。将纳米颗粒混悬液置入 50 mL 玻璃瓶, 高压灭菌后备用。取 1 mL 纳米颗粒混悬液样本, 超声处理 8 min 后, 用于纳米颗粒粒度与分散状态的透射电镜观察。

2 结果与讨论

2.1 纯 HAP 纳米颗粒的形貌

对水热法合成的颗粒样品进行了 TEM 观察, 其结果如图 1 所示。由图 1 可以看出, 单个颗粒长度在 50~100 nm, 直径为 20~30 nm。但是, 颗粒样品的团聚比较明显, 二次颗粒的粒径为几百纳米甚至达到微米级, 图片中几乎没有见到单独存在的纳米 HAP 颗粒。对颗粒样品进行 TEM 选区电子衍射(SAED)分析(见图 1(b)), 其衍射图符合 HAP 晶面的排列结构。可见, 用水热法合成的粉末为纳米级的 HAP。

2.2 纯 HAP 纳米颗粒 Zeta 电位与 pH 值的关系

HAP 纳米颗粒混悬液的 Zeta 电位与体系 pH 值的关系如图 2 所示。从图 2 可以看出, 当体系 pH 值为 4 左右时, HAP 纳米颗粒 Zeta 电位几乎为 0, 接近体系的等电点; 随着体系 pH 值的升高, Zeta 电位绝对值也相应增大, 在 pH 值为 7 时, Zeta 电位绝对值达到最大值 23.1 mV; pH 值继续增大时, Zeta 电位的绝对值逐渐减小, 但减小幅度趋于逐渐平缓。

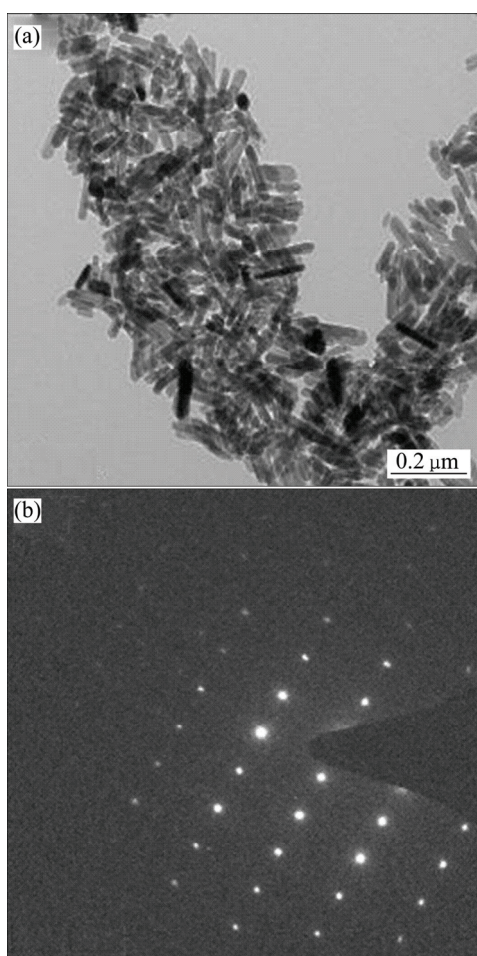


图 1 纳米 HAP 的 TEM 像及样品的选区 SAED 谱

Fig. 1 TEM image(a) and SAED pattern(b) of nano HAP synthesized by hydrothermal method

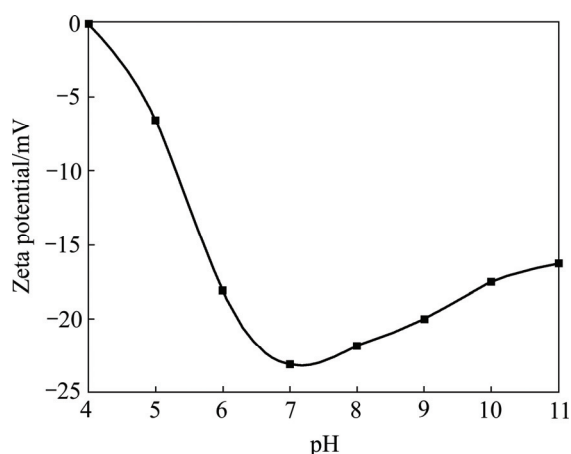


图 2 HAP 颗粒的 Zeta 电位随 pH 的变化

Fig. 2 Changes of pH value with Zeta potential of HAP particle

2.3 纯 HAP 纳米颗粒的粒度与 pH 值的关系

图 3 所示为纳米 HAP 的粒度随混悬液体系 pH 值的变化。

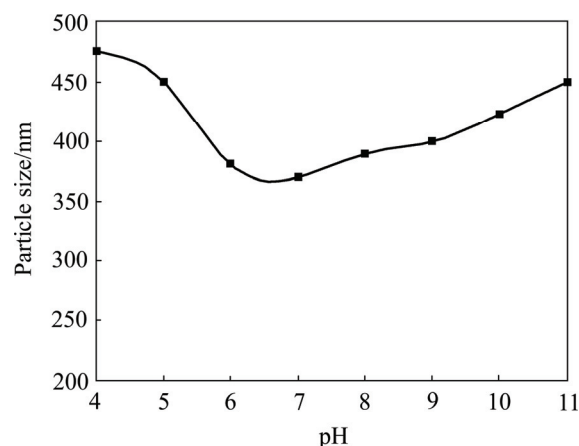


图 3 HAP 颗粒粒度随 pH 的变化

Fig. 3 Changes of pH value on particle size of HAP

从图 3 可以看出, HAP 纳米颗粒的粒度随混悬液体系 pH 值的增加呈先减小后增大的趋势。当体系的 pH 值由 4 增加到 7 时, HAP 颗粒的粒度下降比较明显, 从约 470 nm 下降到 370 nm, pH 值为 7 左右时达到最小值, 表明颗粒的分散性逐渐增加; 当 pH 值由 7 增加到 11 时, HAP 颗粒的粒度逐渐增大, 但趋势比较平缓, 表明混悬液体系中 HAP 的分散效果相对较好。结合 pH 值与 Zeta 电位的关系也可以得出 HAP 颗粒粒度的变化趋势受 Zeta 电位的影响很大, HAP 纳米颗粒在 pH=7 时, Zeta 电位的绝对值最大, 因而体系中的 HAP 颗粒的分散性最好; 当 pH 值在 4 左右时, HAP 纳米颗粒表面电位为零, HAP 颗粒的粒径变得最大。这说明当纳米 HAP 溶胶处于一定的 pH 值时, HAP 颗粒吸附了一定量的电荷形成扩散双电层, 使得溶胶中颗粒之间产生静电排斥作用。然而, 水热合成的纯 HAP 纳米颗粒的分散性仍无法满足基因载体的要求, 因此, 本文作者研究精氨酸对 HAP 纳米颗粒进行修饰改性。

2.4 HAP/Arg 颗粒的显微形貌

采用 TEM 观察了所制备的 HAP/Arg 颗粒晶体形貌、颗粒粒度及分散状态, 其结果如图 4 所示。

从图 4(a)可以看出, 没有加入精氨酸时, 水热法合成的 HAP 颗粒呈短柱状与等轴状。短棒状颗粒长约 60~180 nm, 同一颗粒的横截面尺寸均匀, 约为 30~70 nm, 短棒状颗粒的长径比约 2~4; 等轴状颗粒的直径约为 30 nm。HAP 为密排六方结构, 从颗粒的形状也能反映出 HAP 生长成棒状和针状颗粒的习性。加入 0.01 mol/L 精氨酸后, 合成的 HAP 较没添加精氨酸合成的 HAP 在颗粒的大小上稍有减小, 形貌上大致相

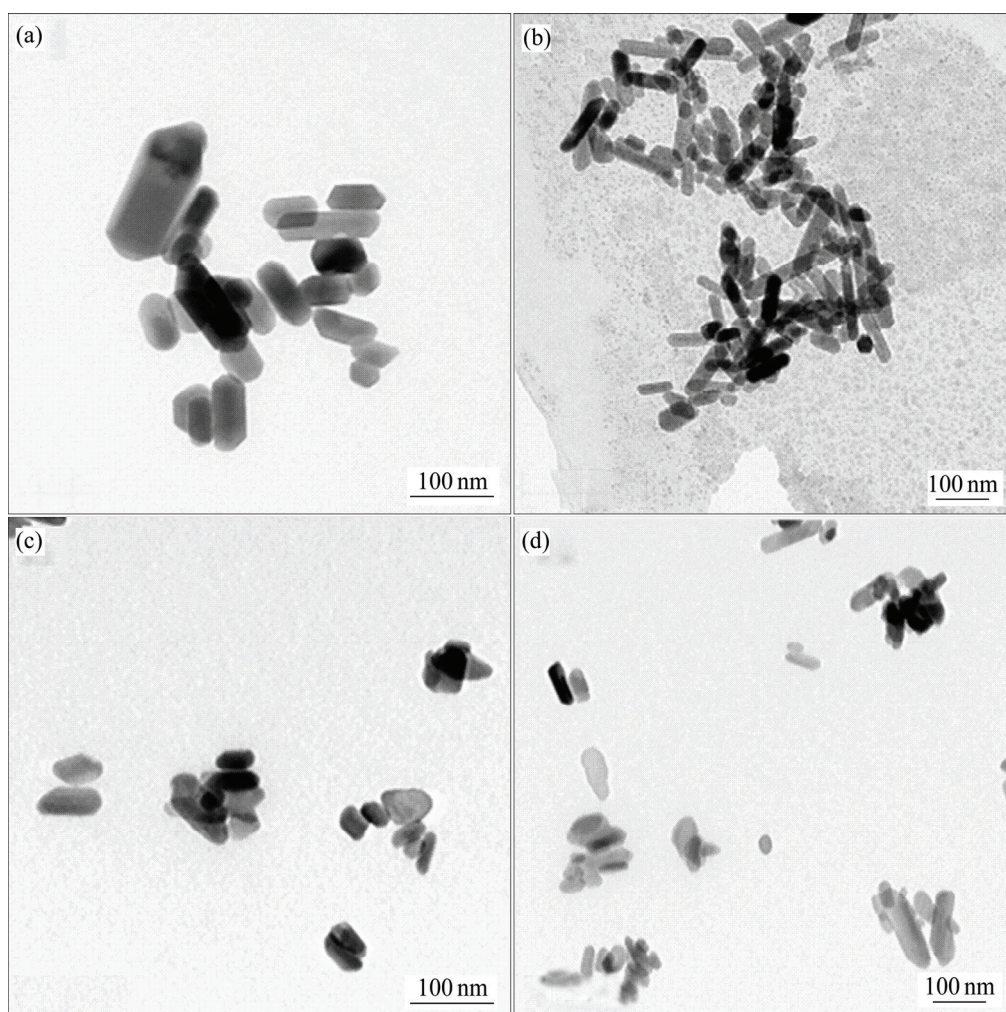


图 4 水热合成 HAP 颗粒的 TEM 像

Fig. 4 TEM images of HAP crystal synthesized by hydrothermal method: (a) Without arginine; (b) With 0.01 mol/L arginine; (c) With 0.05 mol/L arginine; (d) With 0.10 mol/L arginine

当,团聚现象也比较明显(见图4(b))。而加入 0.05 mol/L 精氨酸后,同样条件下合成的 HAP 颗粒也为纳米级,较没加精氨酸修饰的 HAP 颗粒尺寸明显减小,短棒状颗粒的长度缩短至 50~80 nm,各方向的尺寸差异变小,其外形不如 HAP 颗粒规则,但颗粒的分散性更好(见图 4(c))。当精氨酸的添加浓度增加至 0.10 mol/L 时,同条件下合成的 HAP 颗粒形貌如图 4(c)所示,可以看出, HAP 颗粒的尺寸有进一步减小的趋势,但是颗粒的大小和形状的均匀性有所降低。

单纯的 HAP 纳米颗粒在酸性环境下 Zeta 电位一般为正,可通过静电作用与荷负电的 DNA 结合,但结合能力较低;在体内外中性或弱碱性的转染环境下 Zeta 电位为负,难以结合 DNA。在本研究中, pH=7.4 时, HAP 粉末的 Zeta 电位为 (-23.1 ± 3.5) mV, 其与荷负电的 DNA 难以结合。本实验中选取精氨酸(分子结

构如图 5 所示)作为修饰物,一方面是由于亲水性的精氨酸为碱性氨基酸,带有胍基基团 $-(CH_2)_3NHC(NH_2)^+$, 其等电点约 10.76, 高于水热合成实验中反应液的 pH 值, 因此,在整个水热反应过程中精氨酸荷正电;另一方面,研究发现精氨酸和胍基

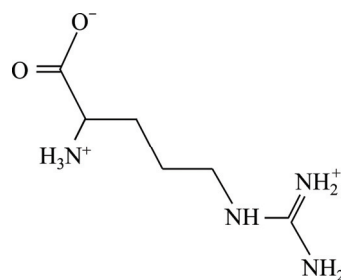


图 5 精氨酸分子结构图

Fig. 5 Structural formula of arginine

官能团能有效穿透细胞膜^[12], 可在 DNA 转运到细胞内的过程中发挥非常重要的作用, 暗示富精氨酸短肽可能会有效提高基因转染效率, 但富精氨酸短肽介导基因转染的机理仍不太清楚, 明显有别于受体介导的内吞机制^[13]。

实验数据表明, 水热合成时添加精氨酸能够明显改变 HAP 颗粒的形貌, 且浓度增加时这种差别也会更明显, 其主要原因是 HAP 晶体的生长过程会由于精氨酸的介入会产生变化。在合成 HAP 的过程中, 由于精氨酸在结晶析出 HAP 晶粒表面的吸附存在晶面的选择性, 影响 HAP 晶粒长大的行为。热力学平衡条件下, HAP 晶体的择优生长方向为[001]。由 HAP 的晶体结构可知, [001]方向上存在 *P* 点的吸附位置, 由于 *P* 点偶尔会出现 Ca^{2+} 离子空缺而带有负电荷, 在水热介质中精氨酸带正电性的胍基基团 $(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{NH}_2)^+$ 可与 HAP(001)面裸露的负电性羟基 $(-\text{OH})$ 发生静电作用, 导致精氨酸倾向于吸附在 HAP 的(001)面。因此, 精氨酸的吸附更大程度地阻碍了溶液合成产物在 HAP(001)面的析出, 使得 HAP 各晶体方向的生长速度差异减小, 晶体各方向的尺寸差异降低。

另一方面, 精氨酸的 $-\text{NH}_2$ 基团能与 HAP 的各晶面以氢键的形式结合, 研究表明, 在没有精氨酸的溶液体系中, HAP 晶体表面会被一层水膜包覆, 然而, HAP 晶体与精氨酸之间的相互作用力比 HAP 晶体与水分子之间的作用力更强, 或者说 HAP 晶体与精氨酸的作用能更低。因此, 精氨酸加入以后易于吸附在 HAP 颗粒样品表面, 尤其是在 HAP 晶体的(001)面, 水分子的吸附将被精氨酸所取代。当 HAP 各个晶面吸附了一定数量的精氨酸之后, 晶体生长受阻, 要求更多的 HAP 新颗粒形核析出, 以降低溶液的过饱和度。形核密度的提高有利于获得更细小的 HAP 颗粒。因此, 当精氨酸的浓度增加到一定程度后, HAP 各晶面都将吸附不同数量的精氨酸, 可能导致图 4(d)出现的颗粒在大小和形状的均匀性上的差异。

2.5 HAP/Arg 颗粒的 Zeta 电位

对分别添加 0.05 mol/L 和 0.10 mol/L 精氨酸合成的 HAP/Arg 颗粒样品在 pH 值为 7.4 时进行了 Zeta 电位测试, 其结果如图 6 所示。由图 6(a)可看出, 在弱碱性的条件下(pH=7.4), 添加 0.05 mol/L 精氨酸合成的 HAP/Arg 纳米颗粒的 Zeta 电位为 (30.9 ± 8.2) mV, 而未修饰的 HAP 纳米颗粒的 Zeta 电位为 (-23.1 ± 6.5) mV。表明合成 HAP 的过程中加入精氨酸使得颗粒表面的 Zeta 电位由常规 HAP 的负值变为 HAP/Arg 纳米

颗粒的正值。添加 0.10 mol/L 精氨酸合成的 HAP/Arg 纳米颗粒在 pH=7.4 弱碱性的条件下的 Zeta 电位为 (32.1 ± 8.1) mV, 如图 6(b)所示, 虽然较添加 0.05 mol/L 精氨酸合成的 HAP/Arg 颗粒的 Zeta 电位稍有增加, 但增加不明显, 可能是本实验条件下合成 HAP 的过程中, 精氨酸的含量相对过于饱和。从以上测试结果得出水热法制备 HAP 颗粒过程中引入一定量的精氨酸可使合成的 HAP/Arg 颗粒表面的荷电状态发生根本性的改变, 而且 Zeta 电位的绝对值更大, 表明本实验制备的 HAP/Arg 颗粒具有较好的分散性, 将更有利于 HAP 纳米颗粒与 DNA 的静电结合。这一变化是因为 HAP/Arg 颗粒表面吸附了精氨酸或精氨酸残留物。

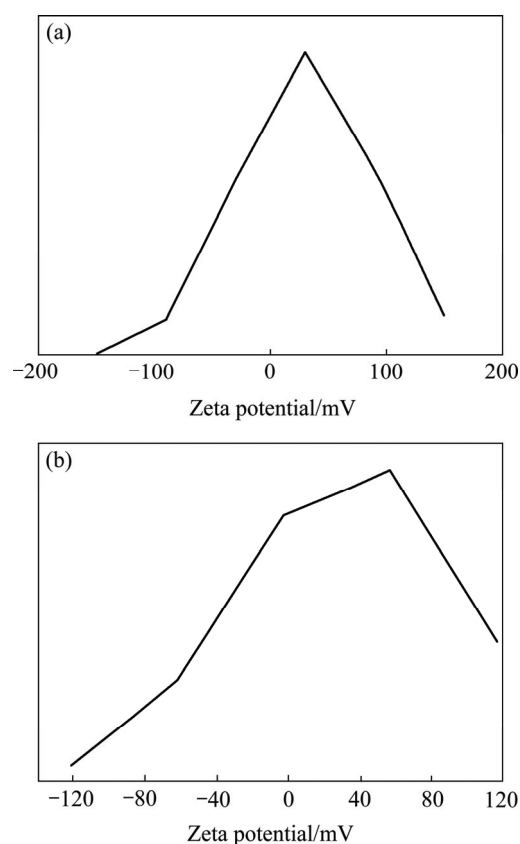


图 6 HAP/Arg 颗粒的 Zeta 电位图

Fig. 6 Zeta potential of HAP/Arg particles: (a) With 0.05 mol/L arginine; (b) With 0.10 mol/L arginine

2.6 HAP/Arg 颗粒物相组成

对水热法制备的 HAP/Arg 颗粒样品用 XRD 进行物相分析, 扫描角度为 $25^\circ \sim 55^\circ$, 速度采用 $2.4 (^\circ)/\text{min}$ 。图 7 所示为在反应过程中是否加入精氨酸样品的 XRD 谱。从图 7 可以看出, 添加 0.05 mol/L 精氨酸合成的 HAP/Arg 颗粒与没有加入添加精氨酸的 HAP 颗粒样品的 XRD 谱基本相同, 其特征峰尖锐, 表明所制备颗粒的结晶程度较高。对主要特征峰所代表的晶面进

行标定发现,所制备的 HAP/Arg 颗粒样品能很好地符合 HAP 国际标准粉末卡片 JCPDs 9-432,从而表明所制备的样品是结晶完整的羟基磷灰石颗粒。但不同样品间主要特征峰相对强度存在细微差异,相对于(002)晶面的衍射峰, HAP/Arg 颗粒样品的(300)晶面衍射峰的强度较 HAP 样品有所增大,而 HAP/Arg 颗粒样品的(002)晶面的衍射峰与(211)晶面的衍射峰强度的比值较 HAP 颗粒样品有所降低。

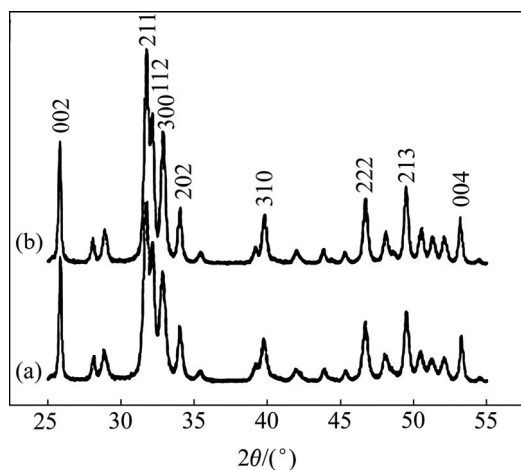


图7 160 °C水热法合成的HAP颗粒的XRD谱

Fig. 7 XRD patterns of HAP particles synthesized by hydrothermal method at 160 °C: (a) Without arginine; (b) With arginine

2.7 HAP/Arg 颗粒红外光谱特征

采用傅立叶红外光谱仪测试了所制备 HAP/Arg 颗粒样品的红外光谱特征,结果如图8所示。从图8可以看出,没有加入精氨酸与加入精氨酸合成 HAP 纳米颗粒具有相似的红外光谱,谱中主要峰的位置相同。较强的峰线出现在 565.25、604.21、1035.78、3441.75 cm^{-1} 等位置,并在 1106.57、1420.30、1631.24 和 3570.12 cm^{-1} 等位置出现强度较弱或位置较宽的峰线。理论上,磷酸根(PO_4^{3-})的4种振动方式对应峰的位置分别如下: ν_1 峰在 960 cm^{-1} 附近, ν_2 峰位于 470 至 440 cm^{-1} 区域, ν_3 峰位于 1190 至 976 cm^{-1} 区域, ν_4 峰位于在 600 至 560 cm^{-1} 区域。因此,565.25、604.21 和 1035.78 cm^{-1} 的强峰以及 1106.57 cm^{-1} 的弱吸收峰是由 HAP 的 PO_4^{3-} 产生的。晶格中水分子的特征峰出现在 3550~3200 cm^{-1} 区域,因此,3441.75 和 3570.12 cm^{-1} 位置的峰是晶格水和磷灰石羟基(OH^-)的反映。1631.24 cm^{-1} 处的特征峰是 H_2O 的振动峰,表明颗粒样品表面吸附少量的水分。氨基($-\text{NH}_2$)的特征峰出现在 1400~1420 cm^{-1} 区间,1420.30 cm^{-1} 峰可能是少量

来自于原料磷酸氢二氨的铵根(NH_4^+)、氨基酸的残留物吸附在 HAP 的反映。对于加入精氨酸的样品,该峰强度有所增强(见曲线 b),说明存在精氨酸的残留物。通过红外光谱的比较,发现加入精氨酸合成 HAP 纳米粉末的吸收峰符合 HAP 的特征,表明在结构上与通常的 HAP 基本一致。

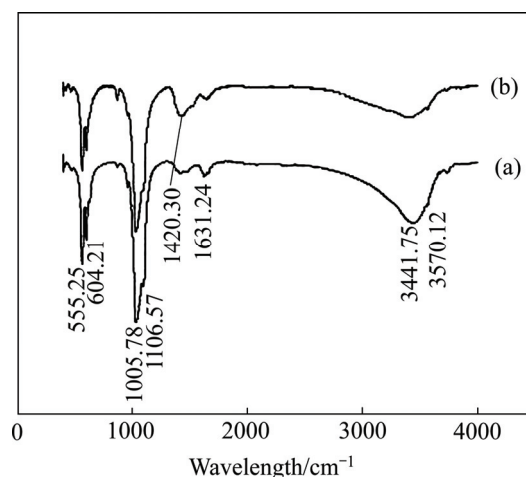


图8 水热合成HAPFTIR谱

Fig. 8 FTIR spectra of HAP prepared by hydrothermal synthesis: (a) Without arginine; (b) With arginine

2.8 稀土掺杂 HAP/Arg 颗粒样品的物相

采用 X 射线衍射测试了掺杂不同含量 Eu 合成的 HAP/Arg 颗粒样品,结果如图9所示。由图9可以看出,不同 Eu 掺杂含量下 HAP/Arg 纳米颗粒样品具有基本相同的 XRD 谱,各样品的主要衍射峰峰形尖锐,其它衍射峰明显,且能与 HAP 国际标准粉末卡片 JCPDs 9-432 中晶体衍射峰位置完全对应,但与 EuPO_4 及 $\text{Eu}(\text{OH})_3$ 标准图谱中的主要峰位对应不上,说明所合成的产物为单一物相的 HAP。此外,随着 Eu 掺杂含量的增加,产物的主要衍射峰位向高角度方向逐渐有微小的移动,说明 Eu 的掺杂改变了 HAP 的晶格常数。 Eu^{3+} 离子的半径(0.095 nm)与的 Ca^{2+} 离子的半径(0.099 nm)相当^[14],在掺杂过程中较容易占据 Ca^{2+} 的位置,但由于其离子半径略小, Eu^{3+} 离子进入 Ca^{2+} 格位后使得 HAP 的晶格常数减小。根据 X 射线衍射的布拉格公式 $2d\sin\theta=n\lambda$,在满足衍射的条件下,晶格常数的减小即衍射晶面间距的减小,将导致衍射角的增大,这与实验观察到的结果一致,而且进入 Ca^{2+} 格位的 Eu^{3+} 离子增多,HAP 晶格常数的改变相对越大,因此衍射峰位移动也越明显。采用电感耦合原子发射光谱(ICP-AES)对 Eu 掺杂的 HAP/Arg 颗粒样品中 Eu 的浓度进行了检测,得到在较低的掺杂浓度(1%,摩尔

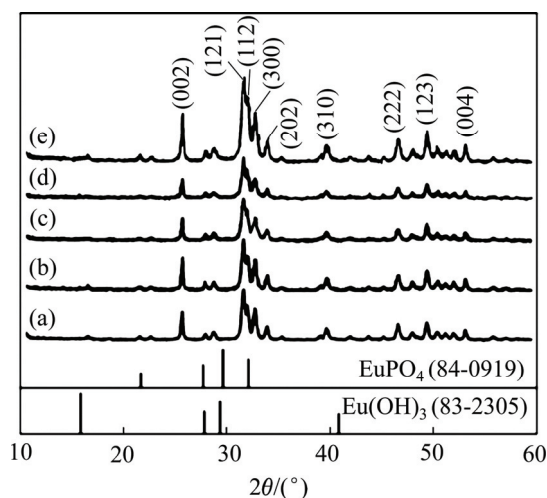


图 9 不同 Eu 掺杂量 HAP/Arg 颗粒的 XRD 谱

Fig. 9 XRD patterns of HAP/Arg particles with different dopants of Eu: (a) 0; (b) 1%; (c) 3%; (d) 5%; (e) 7.5%

分数)下, Eu^{3+} 在 HAP 晶格中的分凝系数可到 0.9; 然而掺杂浓度较高时($\geq 3\%$), Eu 的分凝系数下降至 0.75 左右。

由于图中不同浓度 Eu 掺杂的 HAP/Arg 颗粒各主要衍射峰的峰形比较尖锐, 说明产物结晶程度较高, 因此对各样品(002)和(300)晶面衍射峰的半高宽分别进行了测量, 然后根据谢乐(Scherrer)公式计算了相应的晶粒尺寸:

$$D_{(hkl)} = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta_{(hkl)}} \quad (1)$$

式中: $D_{(hkl)}$ 为计算得到的晶粒尺寸(nm); k 为宽化常数(取 0.9); λ 为 X 射线的波长(为 0.154056 nm); β 为衍射峰的半高宽(FWHM, rad)。经过计算得出 Eu 掺杂的 HAP/Arg 纳米颗粒沿 c 轴方向尺寸稍大于 100 nm, a 轴方向尺寸约为 33 nm, 说明所得到的产物的仍为纳米级。

同样, 对掺杂 2% Tb 合成的 HAP/Arg 颗粒样品也进行了 XRD 分析, 结果如图 10 所示。从图 10 可以看出, 样品的主要衍射峰尖锐明显, 与 HAP 的国际标准粉末卡片 JCPDs 9-432 中晶体衍射峰位置完全对应, 且没有出现 TbPO_4 与 Tb(OH)_3 等其他物相的衍射峰, 说明所合成的产物也为单一物相的 HAP。

通过对 2% Tb 掺杂的颗粒衍射数据的计算分析, 得到晶格常数 a 为 0.9437 nm, c 为 0.6899 nm, 而未掺杂的 HAP/Arg 纳米颗粒晶格常数 a 为 0.9454 nm, c 为 0.6903 nm。可见, 稀土 Tb^{3+} 离子掺杂也使 HA 的晶格常数减小。这是由于 Tb^{3+} 离子的半径(0.092 nm)小于

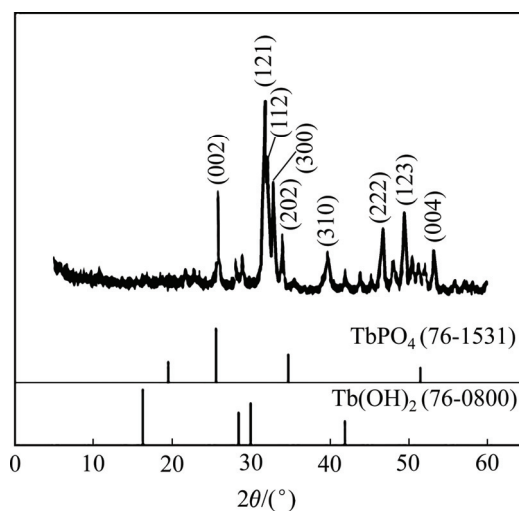


图 10 Tb 掺杂 HAP/Arg 颗粒的 XRD 谱

Fig. 10 XRD patterns of HAP/Arg particles doped with Tb

Ca^{2+} 的离子半径^[15], Tb^{3+} 离子替换部分 Ca^{2+} 离子后使得 HAP 的晶格常数和晶胞体积减小。采用 ICP-AES 对 Tb 的浓度进行了检测, 得到 Tb^{3+} 离子在 HAP 晶格中的分凝系数约为 0.96, 可见离子半径更小的 Tb^{3+} 更易掺杂进入 HAP 晶格。

2.9 稀土掺杂 HAP/Arg 颗粒样品红外光谱特征

对 Eu 掺杂 HAP/Arg 颗粒样品的 FTIR 光谱特征进行了测试与分析, 结果如图 11 所示。从图 11 可以看出, Eu 掺杂 HAP/Arg 颗粒与未掺杂 HAP/Arg 颗粒样品的红外光谱特征基本一致, 谱线中主要峰位相同。其中, 564 和 602 cm^{-1} 属于 PO_4^{3-} 的 ν_4 吸收峰、

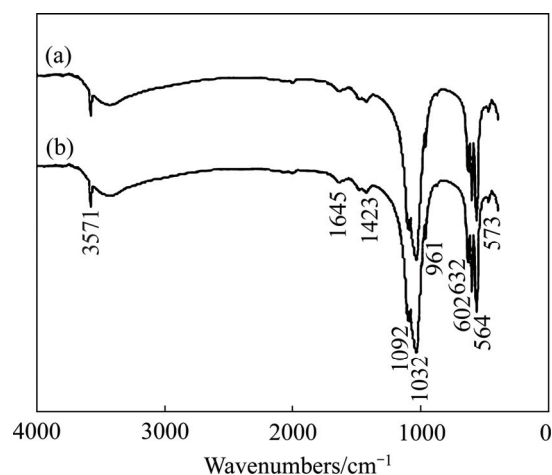


图 11 HAP/Arg 颗粒的 FTIR 谱

Fig. 11 FTIR spectra of HAP/Arg particles: (a) Without Eu doping; (b) With Eu doping

573 cm^{-1} 为 PO_4^{3-} 的 ν_2 吸收峰, 961 cm^{-1} 为 PO_4^{3-} 的 ν_1 吸收峰, 1032 和 1092 cm^{-1} 为 PO_4^{3-} 的 ν_3 吸收峰, 1432 cm^{-1} 处的特征峰是 H_2O 的振动峰, 3571 cm^{-1} 位置的峰是晶格水和磷灰石羟基(OH^-)的反映。此外, 1645 cm^{-1} 可能是 CO_3^{2-} 的吸收峰^[16]。图 9 所示为 HAP/Arg 纳米颗粒中掺杂 Eu 未带来特征峰的明显位移以及其他吸收峰等变化, 说明掺杂 Eu 对 HAP/Arg 纳米颗粒的结构无影响。

同样, 对 Tb 掺杂的 HAP/Arg 颗粒样品也进行了 FTIR 测试, 结果如图 12 所示。与 Eu 掺杂 HAP/Arg 颗粒样品的 FTIR 光谱特征相同, Tb 掺杂也未给 HAP/Arg 颗粒的结构带来影响。

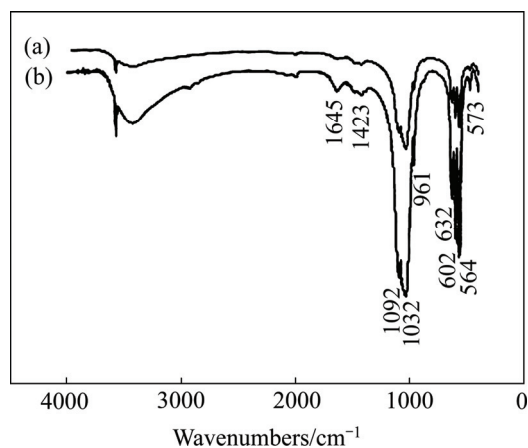


图 12 HAP/Arg 颗粒的 FTIR 谱

Fig. 12 FTIR spectra of HAP/Arg particles: (a) Without Tb doping; (b) With Tb doping

2.10 稀土掺杂 HAP/Arg 粉末的 TEM 观察

图 13 所示为 160 $^{\circ}\text{C}$ 下水热反应 3 h 制得的稀土掺杂的 HAP/Arg 颗粒的 TEM 像。由图 13(a)可以看出, Eu 掺杂 HAP/Arg 颗粒以短柱状为主, 也有少量等轴状颗粒, 短柱状颗粒大小比较均匀, 长度约为 100 nm 左右, 长径比 3~4, 表明为纳米级的颗粒, 这也与采用 XRD 数据计算的结果比较接近。而 Tb 掺杂的 HAP/Arg 颗粒也主要呈短柱状, 并含有少量等轴状颗粒, 颗粒大小与 Eu 掺杂 HAP/Arg 纳米颗粒相近, 如图 13(b)所示。由于 Eu 与 Tb 同属于镧系元素, 具有相似的物理与化学性质, 因此, 在水热法合成 HAP/Arg 纳米颗粒过程中这两种元素的掺杂对颗粒生长的影响比较接近。

2.11 稀土掺杂 HAP/Arg 颗粒的荧光特性

对不同量 Eu 掺杂 HAP/Arg 颗粒的荧光光谱进行

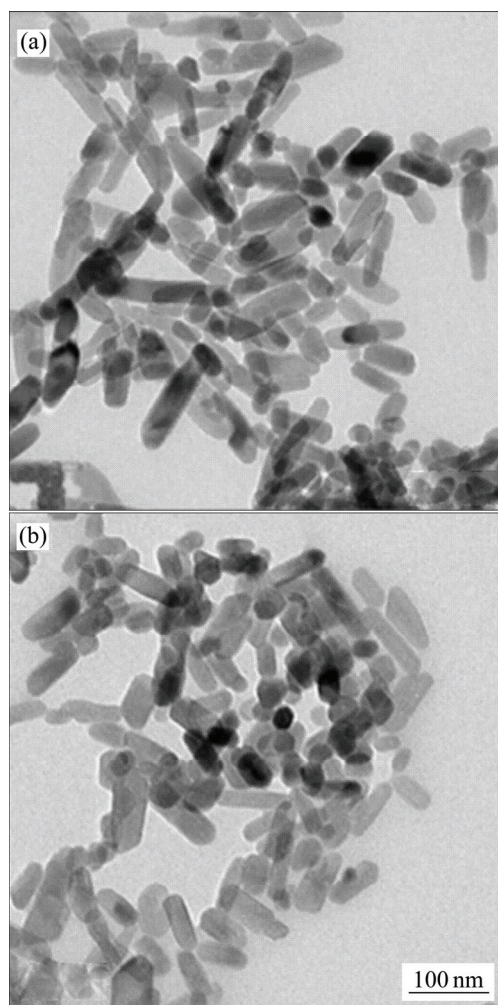


图 13 稀土掺杂 HAP/Arg 颗粒的 TEM 像

Fig. 13 TEM images of HAP/Arg particles doped with Eu(a) and Tb(b)

了测试与分析, 结果如图 14 所示。图 14(a)所示为 Eu 掺杂 HAP/Arg 纳米颗粒的激发光谱, 监测波长为 612 nm, 可以看出在 361.2、381.0 及 394.4 nm 有 3 个特征激发峰, 其中, 最强的激发峰位于 394.4 nm 附近。HAP/Arg 纳米颗粒中 Eu 的掺杂浓度增加, 激发峰的强度也随之增大, 未掺杂 Eu 的 HAP/Arg 纳米颗粒样品没有出现相应的激发吸收。图 14(b)所示为 Eu 掺杂 HAP/Arg 纳米颗粒在波长为 394 nm 的激发光激发下的发射光谱。可以看出, 未掺杂 Eu 的 HAP/Arg 纳米颗粒样品没有发射特征峰, 而掺杂 Eu 的 HAP/Arg 纳米颗粒样品分别在 580~600 nm 及 605~625 nm 波段范围内出现发射特征峰, 峰位在 588.8 和 612.6 nm, 分别对应于 Eu^{3+} 的 $^5\text{D}_0-^7\text{F}_1$ 与 $^5\text{D}_0-^7\text{F}_2$ 跃迁。随掺杂量的增加, Eu^{3+} 的发射特征峰的强度也相应地增加, 表明 Eu^{3+} 掺杂进入了 HAP 晶格。

此外, 612.6 nm 的发光峰在激光共聚焦显微镜的扫描发射滤波器检测范围内, 激发最强的 394.4 nm 的激发光接近可见光波段。然而, 有一个激发波段在 464.8 nm 附近, 接近于激光共聚焦显微镜的激发光波长(488 nm)。因此, 在这个激发波长下可在可见光范围内观察到活细胞。

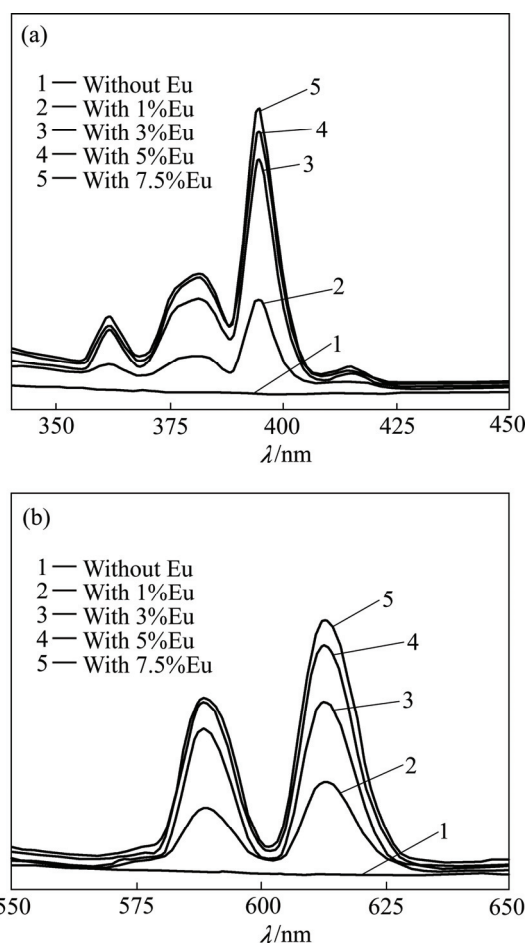


图 14 Eu 掺杂 HAP/Arg 颗粒的荧光光谱

Fig. 14 Excitation(a) and emission(b) spectra of HAP/Arg particles sample with different dopants of Eu

图 15 所示为 Tb 掺杂 HAP/Arg 纳米颗粒的光致发光光谱, 激发光波长为 272 nm。从图可以看出, 未掺杂 Tb 的 HAP/Arg 纳米颗粒不具有特征发光峰, 而掺杂 2%(摩尔分数)Tb 的 HAP/Arg 纳米颗粒在 488.6、542.4、583.4 和 619.0 nm 附近出现光致发光峰, 分别对应于 Tb^{3+} 离子的 $^5D_4-^7F_6$ 、 $^5D_4-^7F_5$ 、 $^5D_4-^7F_4$ 和 $^5D_4-^7F_3$ 跃迁^[17]。其中, 542.4 nm 处的发光峰具有最大的发光强度, 在绿光范围内, 可以用于观察 HAP/Arg 纳米颗粒对细胞的各种作用及其在细胞中的分布等。由此可见, Tb^{3+} 离子可以掺入 HAP/Arg 纳米颗粒中, 实现 HAP/Arg 纳米颗粒的光致发光。

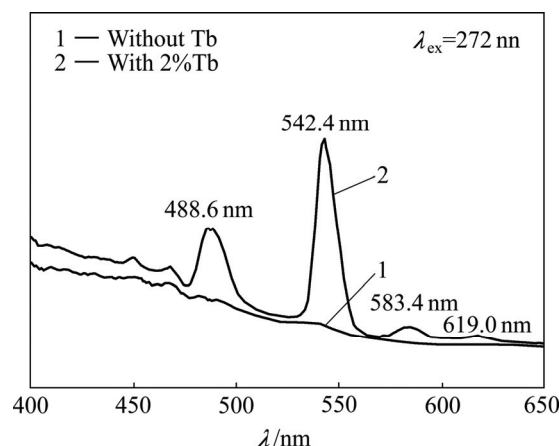


图 15 Tb 掺杂 HAP/Arg 颗粒的荧光光谱

Fig. 15 Emission spectra of HAP/Arg particles sample with different dopants of Tb

3 结论

1) 制备了结晶程度比较高、晶形完整的 HAP 纳米颗粒, 通过精氨酸表面的修饰改变了 HAP 纳米颗粒的表面 Zeta 电位, 达到 (30.9 ± 8.2) mV, 为提高 HAP 纳米颗粒作为基因转染载体的效能奠定了基础; 研究发现精氨酸的加入在一定程度上抑制了 HAP 的生长速率。在同样合成条件下, 加入精氨酸修饰的 HAP 短棒状颗粒的长度为 50~80 nm, 小于没加精氨酸修饰 HAP 纳米颗粒的 60~180 nm, 且长径比也有所减小, 外形不如 HAP 纳米颗粒规则。

2) 少量稀土离子 Eu 或 Tb 掺杂不影响合成的 HAP/Arg 纳米颗粒产物的结构, 均为单一的 HAP 物相, 所合成产物的粒径也为纳米级。Eu 掺杂的 HAP/Arg 纳米颗粒在 580~601 nm 和 601~625 nm 两个可见光波段范围内有发射特征峰, 而 Tb 掺杂的 HAP/Arg 纳米颗粒主要荧光特征发射峰位于 488.6 nm 与 542.4 nm。

3) 经稀土金属铽/铕掺杂的精氨酸表面修饰的 HAP 纳米颗粒可作为基因转染载体被运用。

REFERENCES

- [1] BROWN W E, CHOW L C. A new calcium phosphate, water-setting cement[J]. American Ceramic Society, 1986, 4: 352-379.
- [2] ZHU W, WANG D, XIONG J, LIU J, YOU W, HUANG J, DUAN L, CHEN J, ZENG Y. Study on clinical application

- of nano-hydroxyapatite bone in bone defect repair[J]. *Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology*, 2015, 43(6): 361–365.
- [3] NORDSTROM T, SENKAS A, ERIKSSON S, PONTYNEN N, NORDSTROM E, LINDQVIST Ch. Generation of a new protein purification matrix by loading ceramic hydroxyapatite with metal ions-demonstration with poly-histidine tagged green fluorescent protein[J]. *J Biotechnol*, 1999, 69(2/3): 125–133.
- [4] LEGEROS R Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates[J]. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2002, 395: 81–98.
- [5] AOKI H, KUTSUNO T. An in vivo study on the reaction of hydroxyapatite-sol injected into blood[J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2000, 11(2): 67–72.
- [6] LIU Z S, TANG S L, AI Z L. Effects of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of human hepatoma BEL-7402 cells[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2003, 9(9): 1968–1971.
- [7] 臧丽格. 不同羟基磷灰石纳米颗粒基因载体性能的比较研究[D]. 长沙: 中南大学, 2008.
- ZANG Li-ge. Comparison of the vector capacity of different modified hydroxyapatite nanoparticles as gene vectors[D]. Changsha: Central South University, 2008.
- [8] DO T N, LEE W H, LOO C Y, ZAVGORODNIY A V, ROHANIZADEH R. Hydroxyapatite nanoparticles as vectors for gene delivery[J]. *Therapeutic Delivery*, 2012, 3(5): 623–632.
- [9] 毛岳峰. 基于壳聚糖修饰纳米羟基磷灰石基因载体的转染率研究[D]. 长沙: 中南大学, 2009.
- MAO Yue-feng. Study on the transfection efficiency of chitosan modified nano hydroxyapatite as gene transfer carrier[D]. Changsha: Central South University, 2009.
- [10] ZUO G, WAN Y, ZHANG Y. Preparation and characterization of a novel laminated magnetic hydroxyapatite for application on gene delivery[J]. *Materials Letters*, 2012, 68: 225–227.
- [11] 李燕, 阳俊, 刘桂英, 张欣. 基因治疗药物递送系统的研究现状及发展趋势[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 44(10): 998–1007.
- LI Yan, YANG Jun, LIU Gui-ying, ZHANG Xin. Research situation and development trend of gene therapy for drug delivery system[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2013, 44(10): 998–1007.
- [12] 陶显东, 钟镭, 薛磊, 赵学维. 载顺铂的纳米羟基磷灰石对 A549 肺腺癌细胞体外胀亡的影响[J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2012, 8(1): 14–17.
- TAO Xian-dong, ZHONG Lei, XUE Lei, ZHAO Xue-wei. Necrosis of the lung cancer cell line A549 treated with hydroxyapatite nanoparticles carried cisplatin in vitro[J]. *Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery*, 2012, 8(1): 14–17.
- [13] 李湘南, 陈晓明, 彭志明, 李世普. 纳米羟基磷灰石/壳聚糖载药微球的制备及性能[J]. *中南大学学报(自然科学版)*, 2011, 42(5): 1232–1237.
- LI Xiang-nan, CHEN Xiao-ming, PENG Zhi-ming, LI Shi-pu. Preparation and performance of drug-loaded nano-hydroxyapatite/chitosan microspheres[J]. *Journal of Central South University (Science and Technology)*, 2011, 42(5): 1232–1237.
- [14] LIN H Y, FANG Y Ch, HUANG X R, CHU Sh Y. Luminescence and site symmetry studies of new red phosphors (Ca, Ba)₃(VO₄)₂:Eu³⁺ under blue excitation[J]. *Journal of the American Ceramic Journal of the American Ceramic Society*, 2010, 93(1): 138–141.
- [15] 张若桦. 稀土元素化学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1987: 1–2.
- ZHANG Ruo-hua. Rare earth element chemistry[M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 1987: 1–2.
- [16] TERNANE R, PANCZER G, COHEN-ADAD M Th, GOUTAUDIER C, BOULON G, KBIR-ARIGUIB N, TRABELSI-AYEDI M. Relationships between structural and luminescence properties in Eu³⁺-doped new calcium borohydroxyapatite[J]. *Optical Materials*, 2001, 16: 291–300.
- [17] RAMBABU U, AMALNERKAR D P, KALE B B, BUDDHUDU S. Optical properties of LnPO₄:Tb³⁺ (Ln=Y La and Gd) powder phosphors[J]. *Materials Chemistry and Physics*, 2001, 70(1): 1–6.

Preparation and characteristics of functional nano-hydroxyapatite

ZHAO Yan-zhong^{1,2,3}, YANG Min¹, ZHANG Hai-bin², ZHU Jun², ZHOU Ke-chao²

(1. The Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China;

2. State Key Laboratory of Powder Metallurgy, Central South University, Changsha 410083, China;

3. Research Center for Medical Material and Instruments, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: Nano-hydroxyapatite(HAP) was prepared by a hydrothermal method with calcium nitrate, diammonium hydrogen phosphate as raw material, and to study its characteristics for morphology modification of arginine-functionalized and doped with rare earth, such as Eu^{3+} or Tb^{3+} . The crystallization, grain size and dispersibility of the sample HAP were analyzed and discussed. The results show that the surface Zeta potential of arginine-functionalized HAP is changed, and the growth rate of HAP is inhibited to a certain extent during the synthesis. The structure of HAP/Arg is not affected during the synthesis doped by a small amount of rare earth ions, such as Eu^{3+} or Tb^{3+} . All these samples have single phase of HAP with good dispersibility. The synthesized HAP is also nano-sized level. Nano-hydroxyapatite with arginine functionalized and rare earth doped, such as Eu^{3+} or Tb^{3+} , is suitable for the application of gene delivery as a gene carrier.

Key words: hydroxyapatite; hydrothermal synthesis; arginine modification; rare-earth doping

Foundation item: Project(2013SK2024) supported by the Key Project in Social Development Pillar Program of Hunan Province, China; Project(20130162120094) supported by Special Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China; Project supported by Open Project of State Key Laboratory of Power Metallurgy of Central South University, China

Received date: 2015-11-10; **Accepted date:** 2016-05-25

Corresponding author: ZHAO Yan-zhong; Tel: +86-0731-88618669; E-mail: yanzhongzhao@163.com

(编辑 龙怀中)