

水热法调控羟基磷灰石/壳聚糖的制备 及其对蛋白质吸附性能的研究

陈练练 徐 勇 徐浩伦 田永胜 曾丹林 王光辉*

(武汉科技大学化学与化工学院,湖北省煤转化与新型炭材料重点实验室,武汉 430081)

摘 要 在碱性环境下,以壳聚糖乙酸溶液与羟基磷灰石前驱体为基质,通过水热法成功制备出羟基磷灰石/壳聚糖(HAp/CS)复合材料,采用 X 射线衍射、傅里叶变换红外光谱和场发射扫描电镜等检测方法对复合材料进行表征。考察了壳聚糖掺杂量、吸附时间、 PO_4^{3-} 浓度、pH 对牛血清蛋白(BSA)和溶菌酶(LYS)吸附性能的影响。结果表明:在吸附时间为 24h 时吸附基本保持平衡,pH=4 时对 BSA 吸附效果最好,pH=11 时对 LYS 吸附效果最好,溶液中 PO_4^{3-} 对吸附有抑制作用,复合材料对 LYS 的吸附效果明显优于 BSA,吸附过程符合 Langmuir 模型。

关键词 羟基磷灰石,壳聚糖,水热法,吸附

Preparation of HAp/CS by hydro-thermal method and its adsorption on protein

Chen Lianlian Xu Yong Xu Haolun Tian Yongsheng Zeng Danlin Wang Guanghui

(Wuhan University of Science and Technology, School of Chemistry and Chemical Engineering,
Key Laboratory of Coal Conversion and New Carbon Materials in HuBei Province, Wuhan 430081)

Abstract In the foundation of chitosan ethanoic acid solution and Hydroxyapatite precursor, hydroxyapatite/chitosan(HAp/CS) composite material were prepared successfully in alkaline environment. It also was characterized by XRD, FT-IR and SEM. The effect of chitosan doping content, adsorption time, PO_4^{3-} concentration, pH value on adsorbing BSA and LYS were investigated. It was indicated that adsorption was basically in equilibrium in 24h, adsorption of BSA was the best at pH of 4, and adsorption of LYS was best at pH of 11, otherwise PO_4^{3-} ions were opposed to both BSA and LYS. The adsorption impact of LYS had priority to BSA, as well as adsorption procedure was in accordance with Langmuir isothermal adsorption model.

Key words hydroxyapatite, chitosan, hydro-thermal method, adsorption

随着经济的高速发展,人体对本身的健康越来越来关注。因此对现代药物提出了更高的要求,单一性能的生化材料已经难以满足,具有复合性能(优良的生物相容性和理化性质)的杂化材料逐渐成为现代科研工作者研究的热点之一。羟基磷灰石(HAp)是一种常见的磷酸盐,并且是人体牙齿和骨骼的主要组成部分^[1],具有无毒^[2]、无刺激性^[3]和无生物免疫性^[4]等优异的生物活性。壳聚糖(CS)是一种天然可降解的高分子物质^[5]。在自然界中的存量十分丰富,它是纤维素后第二丰富的多糖^[6],可被

人体吸收、可生物降解、可再生,具有良好的生物相容性^[7]、良好的成膜性^[8]及抗菌性^[9]。对蛋白质有吸附作用,但是根据医学上的基本要求,CS 一般与其他物质复合制得各种性能更加优良的复合材料^[10]。HAp/CS 复合材料既有 HAp 的强度与硬度,同时又综合了 CS 的柔性 with 韧性,是一种很有发展前景的复合材料。牛血清白蛋白(BSA)和溶菌酶(LYS)长期以来作为“蛋白模型”研究^[11-12],许多蛋白质结构和功能构象关系是通过蛋白模型研究得到。

基金项目:国家自然科学基金(21473126);湖北省教育厅基金(B2014094)

作者简介:陈练练(1992-),男,硕士研究生,主要从事纳米材料的研究。

联系人:王光辉,教授。

Kandori 等^[13]用微反应器制备表面积大小不同的片状 HAp,对 BSA 和 LYZ 进行选择吸附。传统研究多以单一材料作为研究对象,本实验采用水热合成法,在不添加任何模板剂的情况下制备出 HAp/CS 复合材料,以 BSA 和 LYS 为模型蛋白,考察了不同实验条件对模型蛋白吸附的影响,为 HAp/CS 用作蛋白药物载体提供理论依据。

1 实验部分

1.1 试剂

二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、四水硝酸钙 $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 、壳聚糖(CS,生化试剂,分子量为 97000,脱乙酰度 80%~95%)、牛血清白蛋白(BSA)、溶菌酶(LYS)、氢氧化钠(NaOH)、无水乙醇($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$),均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验方法

首先将 2.145g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶于蒸馏水配成 50mL Na_2HPO_4 溶液;并用 1mol/L NaOH 溶液调节上述溶液 $\text{pH}=11.5$;将 2.360g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于 10mL 蒸馏水配制成一定浓度的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液;将 0.112g CS 溶于 20mL 乙酸溶液中,并将刚配制好的一定浓度的 10mL $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液与其进行混合;将配制好的混合溶液以一定速率滴加到 Na_2HPO_4 溶液中,边滴加边磁力搅拌,并添加 5mol/L NaOH 溶液使之保持碱性环境,滴加完得到前驱体;将前驱体装入内衬为聚四氟乙烯的不锈钢水热釜中,在不同水热温度(80℃、100℃、120℃和 140℃)中恒温 8h,后取出并冷却至室温;用蒸馏水和乙醇各洗涤 3 次,每次洗涤后离心 5min;洗涤离心后在 100℃干燥箱中干燥 6h 后得到样品,所得样品记做 HAp/CS-80、HAp/CS-100、HAp/CS-120 和 HAp/CS-140。

1.3 HAp/CS 体外吸附蛋白质的实验

本实验配制初始浓度为 1.0mg/mL BSA (LYS)溶液,利用紫外吸收法考察吸附液中蛋白质 BSA(LYS)浓度变化。配制 1.0mg/mL BSA 溶液 50mL 于锥形瓶中,量取 5mL BSA 初始溶液并用紫外分光光度计测定其吸光度 A_0 ,将样品称重后倒入锥形瓶中,密封,放在 37℃下的生物摇床中震荡进行吸附实验。24h 后取出,用紫外分光光度计测量吸附后的 BSA 溶液的吸光度 A_1 ,根据式(1)计算吸附量 q (mg/g)。

$$q = \frac{(C_0 - C_1) \times V}{W} \quad (1)$$

式中, C_0 为 BSA 溶液初始浓度,mg/mL; C_1 为样品吸附后 BSA 溶液浓度,mg/mL; V 为 BSA 溶液体积,mL; W 为加入样品质量,g。

LYS 吸附量同样按式(1)计算,所有参数换成 LYS 即可。

2 结果与讨论

2.1 XRD 和 FT-IR 分析

图 1(a)为 HAp/CS-80、HAp/CS-100、HAp/CS-120 和 HAp/CS-140 的 XRD 谱图。由图可知,4 种样品的衍射峰位置与标准谱图相同,同样出现了 10 个明显的衍射峰,对应的衍射晶面为(002)、(111)、(211)、(112)、(300)、(202)、(310)、(222)、(213)和(004),所得产物为六方晶系结构,谱线中没有出现其他杂峰,说明 HAp 与 CS 成功复合。通过对比纯 HAp 的 XRD 谱图,复合材料在 2θ 为 26°和 32°处的峰强明显增强,说明水热环境有利于样品中 HAp 沿 C 轴方向的择优生长。分析 4 种样品不同波线的相同峰,发现峰型由宽变窄,越来越尖锐,因此,随着水热反应温度的升高,所制样品的结晶度越来越高,这更有利于吸附反应。

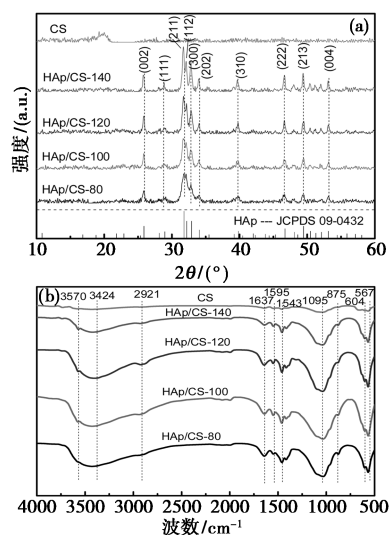


图 1 HAp/CS-80、HAp/CS-100、HAp/CS-120 和 HAp/CS-140 的 XRD(a)和 FT-IR(b)谱图

图 1(b)为 CS、HAp/CS-80、HAp/CS-100、HAp/CS-120 和 HAp/CS-140 的 FT-IR 谱图。由图可知,在 2921cm^{-1} 、 1637cm^{-1} 、 1595cm^{-1} 和 1543cm^{-1} 处观察到的吸收带分别归属于 CS 中的亚甲基($-\text{CH}_2-$)、酰胺 I ($\text{C}=\text{O}$)、氨基($-\text{NH}_2$)和酰胺 II ($-\text{NH}$)。通常可以通过 FT-IR 检测到磷酸根

离子4种类型的振动模式,碳酸根的两种振动模式。由图还可见,在 1095cm^{-1} 、 963cm^{-1} 、 604cm^{-1} 和 587cm^{-1} 处观察到的吸收带对应于HAp中的磷酸基,而 3570cm^{-1} 处的吸收带与HAp中的羟基一致。 1453 和 875cm^{-1} 处对应于碳酸盐带,证明通过水热法制备的HAp/CS复合材料含有碳酸根离子。 3424cm^{-1} 左右的宽带是水的吸收带,可以得出,除了HAp和CS之外,复合材料还含有水分。

2.2 SEM分析

图2为HAp/CS-80、HAp/CS-100、HAp/CS-120和HAp/CS-140的SEM图。由图可知,HAp/CS-80呈絮状,较蓬松;HAp/CS-100为小颗粒,分布较开,并有少许片层状;HAp/CS-120具有明显的片层状,小颗粒聚集较为密集,其晶体结构更为突出;HAp/CS-140具有大范围的片层状结构,并有结块的趋势,其聚集形式更为密集。因此,随着水热反应温度的升高,复合材料由蓬松到聚集密集,由小颗粒到块状,其结晶性随之而增强,这与XRD分析结果一致。当水热反应温度高于 140°C 时,CS变性,因此水热实验温度应小于等于 140°C 。

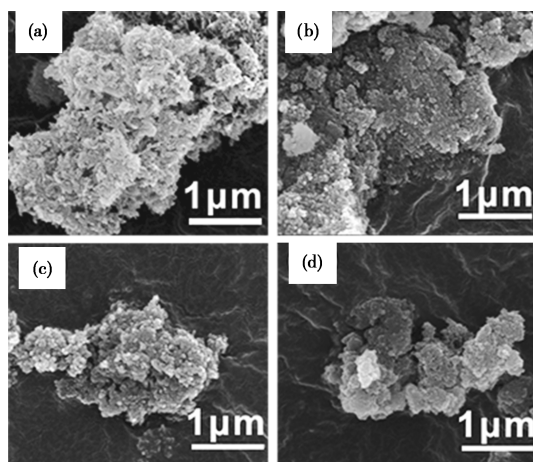


图2 HAp/CS-80(a)、HAp/CS-100(b)、HAp/CS-120(c)和HAp/CS-140(d)的SEM图

2.3 各因素对HAp/CS吸附性能的影响

2.3.1 CS掺杂量

CS掺杂量对HAp/CS吸附性能的影响见图3。由图可知,当CS掺杂量逐渐增多时,复合材料对BSA、LYS的吸附量先增加后减少,并且在HAp:CS为9:1时吸附性能达到最强,其中对LYS的吸附量明显高于BSA,因此后续选取CS掺杂量为9:1。一般的有机酸都能离子化成 A^{x-} 形式,CS在有机酸中溶解后,它的自由氨基会被离子化形成 NH_3^{+} [14]。带负电荷的 A^{x-} 会与CS分子链上的 NH_3^{+} 结合形

成 chiot^+-A^{x-} 。另一方面,有机酸能整合钙离子形成 $\text{Ca}^{2+}-A^{x-}$ 复合离子,本实验采用的是乙酸, $x=1$,与钙离子形成了带正电荷的复合离子 $\text{Ca}^{2+}-A^{x-}$,随着CS掺杂量的增加, A^{x-} 与 Ca^{2+} 结合的越多,这样导致C位吸附位点减少,吸附蛋白质量减少。但是与纯HAp相比,HAp/CS(9:1)复合材料的吸附性能明显增强,这是因为掺杂CS后会使HAp/CS(9:1)复合材料形貌复杂,颗粒粒径变小(SEM图中可以看出),从而使其比表面积增大,吸附性能增强。

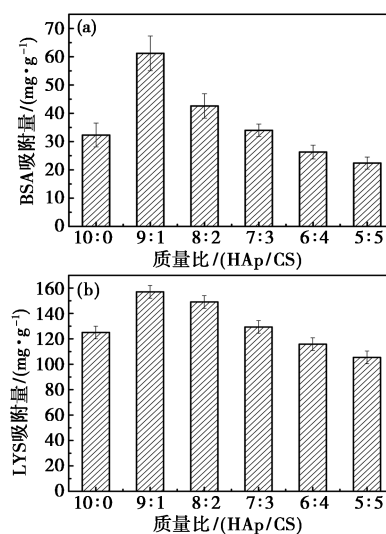


图3 CS掺杂量对HAp/CS吸附性能的影响
[(a)BSA;(b)LYS]

2.3.2 吸附时间

吸附时间对HAp/CS吸附性能的影响见图4。由图可知,HAp/CS在0~5h内对BSA/LYS的吸

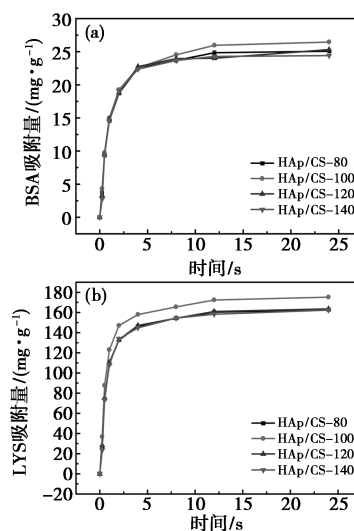


图4 吸附时间对HAp/CS吸附性能的影响
[(a)BSA;(b)LYS]

附迅速,在 5~24h 内缓慢增加,之后基本保持不变。且水热反应温度为 100℃ 时,HAp/CS 的吸附效果最好,因此后续实验均采用水热反应温度为 100℃。HAp/CS 前期吸附蛋白质速率较快,这是因为前期既有物理吸附也有化学吸附,而后期吸附速率较慢,主要是因为单层吸附趋近于饱和,进行双层吸附而达到吸附动态平衡,这与后面的热力学分析保持一致。

2.3.3 吸附溶液中 PO_4^{3-} 浓度

吸附溶液中 PO_4^{3-} 浓度对 HAп/CS 吸附性能的影响见图 5。由图可知,随着 PO_4^{3-} 浓度的增加,HAп/CS 对 BSA 的吸附量逐渐降低,这是由于在 HAп 中存在着 Ca 桥,BSA 在吸附液中显负电^[15],易与 Ca^{2+} 结合,当 PO_4^{3-} 浓度增大时,相比 BSA,HAп 中的 Ca 桥更易吸附 PO_4^{3-} ,所以导致吸附性能降低。另外,当环境溶液中 PO_4^{3-} 浓度为 0 时,HAп/CS 对 LYS 的吸附量较小,而当 PO_4^{3-} 浓度大于 0 时,HAп/CS 对 LYS 的吸附量先剧烈增加后逐渐减小。这是由于在 HAп 中存在着 Ca 桥,LYS 在吸附液中显正电^[16],易与 PO_4^{3-} 结合,当 PO_4^{3-} 浓度增大时,LYS 吸附量会随之增加,当吸附达到饱和后,HAп 中的 Ca^{2+} 会与 LYS 竞争 PO_4^{3-} ,形成排斥 LYS 现象,导致 LYS 吸附量逐渐下降。

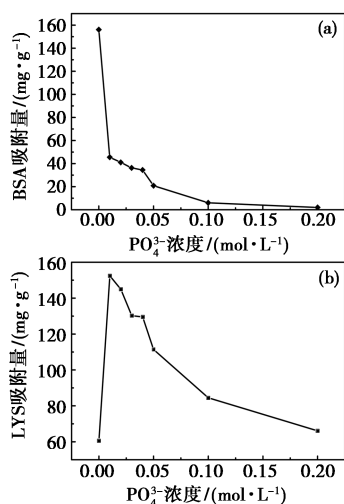


图 5 PO_4^{3-} 浓度对 HAп/CS 吸附性能的影响
[(a)BSA;(b)LYS]

2.3.4 吸附溶液 pH

吸附溶液 pH 对 HAп/CS 吸附性能的影响见图 6。由图可知,随着 pH 升高,HAп/CS 对 BSA 的吸附量呈先增加后减小的趋势,在 pH=4 时达到最大。pH 是影响蛋白质吸附的一个重要因素,由于 BSA 的等电点在 pH=4.9 左右^[17],随着 pH 的

增大,特别是大于 4.9 之后,BSA 具有负电荷,BSA 与复合材料间存在静电排斥,使 BSA 不易吸附。但 HAп/CS 对 LYS 吸附呈持续增加的趋势,溶菌酶是一种小分子碱性蛋白,在酸性环境下,化学性质稳定,即使当 pH 在 1.2~11.3 之间剧烈变化,其酶结构仍维持不变,活性也不受影响,其等电点 pH=11.5,而作为碱性蛋白,随着 pH 的增大,其与 HAп/CS 之间的静电作用力越来越小,吸附量快速增加。而当 pH>11.5 时,LYS 结构会遭到破坏,蛋白质发生变性,在 pH=11.5 时,HAп/CS 对 LYS 的吸附量达到最大。

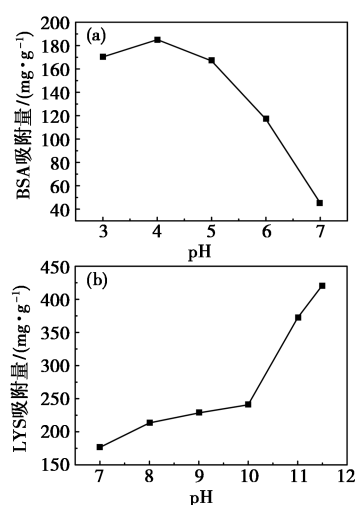


图 6 吸附溶液 pH 对 HAп/CS 吸附性能的影响
[(a)BSA;(b)LYS]

综上,当 pH=4 时,HAп/CS 对 BSA 吸附最优,可达到 185.0301mg/g;而当 pH=11.5 时,HAп/CS 对 LYS 吸附最优,可达到 421.2650mg/g。

2.4 动力学模型

通过对不同浓度的蛋白质的吸附量进行测定,得出的一系列点,对各个点分别进行了两种吸附模型 Langmuir 模型和 Freundlich 模型的拟合,得到图 7。Langmuir 模型和 Freundlich 模型的拟合公式分别为式(2)和式(3)。

$$\frac{c_e}{q_e} = \frac{c_e}{Q_m} + \frac{1}{K_l \cdot Q_m} \quad (2)$$

$$\ln(q_e) = \ln(K_f) + \frac{\ln(c_e)}{n} \quad (3)$$

式中, c_e 为 BSA (LYS) 溶液的平衡浓度,mg/mL; q_e 为平衡时吸附量,mg/g; Q_m 为理论最大吸附量,mg/g; K_l 为解离常数; K_f 为 Freundlich 常数; n 为经验常数。

由图可知,Langmuir 模型拟合的线性相关系数 $R_{\text{BSA}}^2=0.998$ 和 $R_{\text{LYS}}^2=0.998$,Freundlich 模型拟合

的线性相关系数 $R^2_{\text{BSA}} = 0.9782$ 和 $R^2_{\text{LYS}} = 0.9466$ 。比较可知,Langmuir 模型的拟合程度更高,说明 HAp/CS 对 BSA、LYS 的吸附更符合 Langmuir 模型。

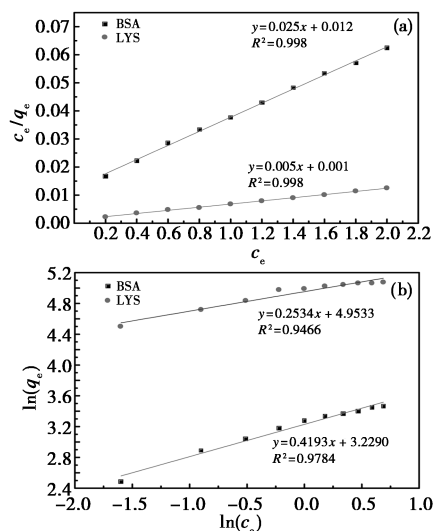


图7 Langmuir(a)和 Freundlich(b)模型拟合图

3 结语

本实验以 CS 乙酸溶液与羟基磷灰石前驱体为基质,通过水热法成功制备出沿着(0 0 2)和(2 1 1)衍射晶面方向择优生长的 HAp/CS,并对其进行吸附 BSA 和 LYS 研究,结论如下:

(1)HAp/CS 对 BSA 和 LYS 的吸附性能与 CS 掺杂量、吸附时间、pH 和 PO_4^{3-} 浓度有关。实验结果表明,在水热反应为 100°C 、CS 掺杂量为 9:1 条件下制备的样品吸附蛋白性能最佳,当用此样品吸附 BSA, $\text{pH}=4$, PO_4^{3-} 浓度为 0 时吸附效果最好。当用此样品吸附 LYS, $\text{pH}=11$, PO_4^{3-} 浓度为 0.01mg/mL 时吸附效果最好,复合材料对 LYS 的吸附效果明显优于 BSA。

(2)研究 HAp/CS 的热力学吸附模型。用 Langmuir 和 Freundlich 模型探究 BSA 吸附机理时发现,HAp/CS 对 BSA 和 LYS 的等温吸附更符合 Langmuir 模型。

参考文献

[1] 陈景草.壳聚糖/羟基磷灰石杂化膜的结构与性能研究[D].上海:东华大学,2015.
[2] An L, Li W, Xu Y, et al. Controlled additive-free hydrothermal synthesis and characterization of uniform hydroxyapatite nanobelts[J]. Ceramics International, 2015, 42(2): 3104-3112.

[3] Hu Q, Li B, Wang M, et al. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture[J]. Biomaterials, 2004, 25(5): 779-785.
[4] Wang K, Wang M H, Wang Q G, et al. Computer simulation of proteins adsorption on hydroxyapatite surfaces with calcium phosphate ions[J]. Journal of the European Ceramic Society, 2017, 37(6): 2509-2520.
[5] 张利, 李玉宝, 魏杰, 等. 纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合骨修复材料的共沉淀法制备及其性能表征[J]. 功能材料, 2005, 36(3): 441-444.
[6] 郭开宇, 赵谋明. 甲壳素/壳聚糖的研究进展及其在食品工业中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(1): 59-63.
[7] 朱晨华, 沈鹤柏, 徐瑞云, 等. 磁性壳聚糖微球对牛血清白蛋白的吸附性能[J]. 物理化学学报, 2007, 23(10): 1583-1588.
[8] Nagasaki T, Nagata F, Sakurai M, et al. Effects of pore distribution of hydroxyapatite particles on their protein adsorption behavior[J]. Journal of Asian Ceramic Societies, 2017, 5(2): 88-93.
[9] Yu Y D, Zhu Y J, Qi C, et al. Hydroxyapatite nanorod-assembled porous hollow polyhedra as drug/protein carriers[J]. Journal of Colloid & Interface Science, 2017, 496: 416-424.
[10] 徐翠香, 仓理, 高强, 等. 复合磁性壳聚糖微球对 BSA 的吸附机理研究[J]. 云南化工, 2008, 35(1): 12-16.
[11] 陈艳, 江明锋, 叶煜辉, 等. 溶菌酶的研究进展[J]. 生物学杂志, 2009, 26(2): 64-66.
[12] Laurents D V, Baldwin R L. Characterization of the unfolding pathway of hen egg white lysozyme[J]. Biochemistry, 1997, 36: 1496-1500.
[13] Kandori K, Hamazaki H, Matsuzawa M, et al. Selective adsorption of acidic protein of bovine serum albumin onto sheet-like calcium hydroxyapatite particles produced by microreactor[J]. Advanced Powder Technology, 2014, 25(1): 354-359.
[14] Morsy R, Ali S S, El-Shetehy M. Development of hydroxyapatite-chitosan gel sunscreen combating clinical multidrug-resistant bacteria[J]. Journal of Molecular Structure, 2017, 1143: 251-258.
[15] Viala S, Freche M, Lacout J L. Preparation of a new organic-mineral composite: chitosan-hydroxyapatite[J]. 1998, 23(1-2): 69-72.
[16] 万容兵. 载体表面化学组成对蛋白质吸附行为的影响[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2009.
[17] 许永娟, 胡鹏程, 胡玲玲, 等. 载体材料表面化学组成对蛋白质吸附行为的影响研究进展[J]. 化工进展, 2013, 32(12): 2916-2921.