

利用蛋殼及植物皮萃取物合成奈米級氫氧基磷灰石

何文福^{1,*} 劉書蘋² 吳世經^{3,4} 許學全^{3,4} 許世光^{3,4}

¹大葉大學材料科學與工程學系

²大葉大學機械與自動化工程學系

51591 彰化縣大村鄉學府路 168 號

³中臺科技大學牙體技術暨材料系

⁴中臺科技大學醫學工程暨材料研究所

40601 台中市北屯區廬子里廬子巷 666 號

摘要

氫氧基磷灰石 ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA) 相似於人體骨骼和牙齒的礦物成分,由於其良好的生物相容性和生物活化性,因此廣泛的應用在包括骨填充、表面塗層以及支架上。由於奈米級氫氧基磷灰石比一般的氫氧基磷灰石具有較高的表面能,因此具有更好的生物性質。特別的是,人體內的天然磷灰石含有約 3-8 % (w/w) 的碳酸鹽,此外,也預計奈米級氫氧基磷灰石將有更好的生物活性。本實驗是想要利用仿生法的過程來合成創造新的材料,也就是說,無機物和一個複雜的有機高分子的基質蛋白、多醣或脂類結合,不僅可控制合成粉末顆粒的大小和形狀,同時也能控制粉末顆粒團聚現象發生。本研究係利用水熱法,將碳酸鈣(CaCO_3)和磷酸(H_3PO_4)溶液在密閉的高壓力釜中產生反應。實驗結果發現,添加植物皮萃取物在 150 °C 持溫 48 h, pH 值為 10 的條件下,可以得到單相的棒狀奈米級氫氧基磷灰石結晶相。此外,蛋殼和生物分子的有效利用,可以大大提高經濟效率以及減少對環境的污染。

關鍵詞: 蛋殼, 氫氧基磷灰石, 奈米粒子, 水熱法, 生物分子。

Synthesis of Nanohydroxyapatite Using Eggshell and Plant Peel Extracts

WEN-FU HO^{1,*}, SHU-PING LIU², SHIH-CHING WU^{3,4}, HSUEH-CHUAN HSU^{3,4} and SHIH-KUANG HSU^{3,4}

¹Department of Materials Science and Engineering, Da-Yeh University

²Department of Mechanical and Automation Engineering, Da-Yeh University

No. 168, University Rd., Dacun, Changhua 51591, Taiwan, R.O.C.

³Department of Dental Technology and Materials Science, Central Taiwan University of Science and Technology

⁴Institute of Biomedical Engineering and Materials Science, Central Taiwan University of Science and Technology

No. 666, Buzih Lane, Beitun District, Taichung 40601, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

Hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA) is similar to the mineral constituents of human bone and teeth. Because of its excellent biocompatibility and bioactivity, it is applied widely in bone fillers,



surface coatings, and unloaded scaffolds. Nano-HA particles exhibit enhanced biological properties compared with normal HA particles because of their high surface energy and increased specific area. The natural apatite in the human body contains approximately 3%-8% (w/w) carbonate. Nanostructured HA is expected to have greater bioactivity than HA with coarser crystals does. Creating new synthetic materials by mimicking the processes involves combining minerals with a complex organic macromolecular matrix of proteins, polysaccharides and lipids to control the size and shape of synthesized particles. We used a hydrothermal method to create carbonate (CaCO_3) and phosphoric acid (H_3PO_4) solutions that react with each other and form high pressure in a closed autoclave. A single phase of HA, the nanorod crystalline phase, was obtained when plant peel extracts were added and a temperature of 150 °C and a pH value of 10 were maintained for 48 h. The effective use of eggshell and biomolecule waste greatly enhances economic efficiency and reduces environmental pollution.

Key Words: eggshell, hydroxyapatite(HA), nanoparticle, hydrothermal method, biomolecule.

一、前言

每年都有數百萬個人因意外受傷所引起的骨缺損與骨腫瘤而造成骨骼上的受損，甚至是死亡，原因是由於使用不理想的骨替代物 [2]，目前常用來治療骨缺損或骨替代物的方式包括自體移植與異體移植。然而，這些骨替代物都有一些限制，自體移植需要再進行手術，且會與供體短缺和供體的不健全而失敗，甚是造成骨折，而且無法取得大量的骨組織；而異體移植即使組織已經過病毒篩檢、降低抗原反應，仍是有藉由血液傳播感染疾病和免疫排斥反應的危險 [18]。近年來人工合成的氫氧基磷灰石 (Hydroxyapatite, 簡稱 HA) 受到學者的重視，氫氧基磷灰石為一種磷酸鈣鹽類，鈣與磷之理想莫耳比為 $\text{Ca/P} = 1.67$ ，其化學式為 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ [9]，相似於我們身體內骨骼形態上的結構，可與人體骨骼產生鍵結，並生長出新的骨組織。然而以天然廢棄物所合成的氫氧基磷灰石往往比化學合成的更具有優良的生物相容性 [13]，可降低與人體軟組織如皮膚、肌肉和牙齦的排斥性，使其成為骨科和牙科植入材理想成分之選擇，近年來已被廣泛應用於硬組織修復和運用在包括骨增強、骨修復以及表面塗層應用 [5,17]。因此，對於骨骼的再生為了達到更好的要求，仿生法所合成的氫氧基磷灰石通常是一種方式，可以提供一個合適的環境促進骨細胞增殖和骨骼的成長。隨著人體不同部位有不同的成分與特性，目前氫氧基磷灰石仍是生醫材料中最適合人體的材料，須從氫氧基磷灰石的粉末形貌、粒徑與分佈情形去觀察與探討，研究顯示當氫氧基磷灰石粉末達到奈米等級時，有良好的骨整合能力，證實是一個理想的生醫材料，奈米級氫氧基磷灰石的

形貌突顯粉末的顆粒大小以及晶體形貌控制上的重要性，並與其他無機複合材料粒子的生物醫學材料結合並發展 [23]。

隨著人工替代品品質不斷增加與要求，在生醫材料領域中需要的是創新，然而廢棄物利用是必要的，不僅是因為廢棄物的日積月累，也因為天然原料日益減少的因素，因此這將是有效的廢物再利用，在未來是有發展性的。化學分析證明，一些廢棄物料的成分相似的天然原料和材料，往往具有極佳的相容性，也證明了有利於陶瓷材料的發展，此外，廢棄物還可以運用在生醫材料上，發展合成清潔、環保、無毒的奈米粒子過程 [2,11,16]。奈米級氫氧基磷灰石的合成技術已有許多不同的發展方法，主要可分為液相合成法與固相合成法，液相合成法包含水熱法 [19,21]、溶膠-凝膠 [15]、化學沉澱法 [13]與微乳液法等 [4]，固相合成法包含固相燒結 [6]，其中，以水熱法合成奈米級氫氧基磷灰石是最好的選擇，因為水熱法可使具有良好的結晶相、均勻的粉末大小和形狀，並且可以控制成分和非團聚的晶體結構，且在較低溫度環境下添加有機生物分子便可以控制合成良好的奈米級氫氧基磷灰石結晶相 [9,16]。目前，許多研究指出合成奈米級氫氧基磷灰石可具有不同的形狀，如使用有機凝膠法、沉澱法或是水熱法合成針狀的氫氧基磷灰石，以四水硝酸鈣與磷酸氫鹽添加聚丙烯酸水熱處理合成棒狀的氫氧基磷灰石 [1]。因此，如果我們可以添加有機或無機物控制奈米級氫氧基磷灰石的晶體形貌，如針狀，球狀，板狀等形狀，那麼我們就可以將奈米級氫氧基磷灰石廣泛的應用在生醫材料當中 [13]。



本實驗不需高成本及繁雜的實驗步驟就可以成功合成出奈米級的氫氧基磷灰石粉末，因此水熱法在近年來被認定為是重要的合成方式之一 [11,19]。本實驗研究是在利用廢棄物料中萃取物的生物分子或是一些醫藥用的植物材料，經過水熱處理來合成不同形貌的奈米級的氫氧基磷灰石。不同萃取物具有不同的生物分子，其中一個較顯卓的影響是控制原有的成分來合成奈米級氫氧基磷灰石，研究證實無機粒子的仿生製程是利用已知的基礎來合成，然而，其中只有少數研究使用萃取出來天然的混合物 [11]。

二、材料與實驗方法

(一) 材料準備

本實驗合成奈米級氫氧基磷灰石的鈣來源是以蛋殼中的碳酸鈣為原料，磷的來源為市售的試藥級磷酸 (H_3PO_4 ，濃度 85 % (w/w)，藥理化學工業株式會社，日本)，以氨水 (NH_4OH ，濃度 28.0 % (w/w)，藥理化學工業株式會社，日本) 調整 pH 值，以鹽酸 (HCl，濃度 36.5 % (w/w)，藥理化學工業株式會社，日本) 溶解蛋殼，果皮萃取物之種類分別為柚子皮、葡萄皮以及地瓜皮的萃取物 (分別將 80 g 的葡萄皮、地瓜皮以及柚子皮放入 1000 ml 的水中煮沸 10 min 後過濾)。

(二) 實驗方法

將清洗好乾燥研磨後的蛋殼粉末以 2 g 的重量，添加鹽酸 (HCl:DI water = 5 ml:15 ml) 溶解後，將 5 ml 的植物皮萃取物添加至由鹽酸溶解的蛋殼水溶液中，此時混和物需徹底的攪拌均勻，接著以滴加的方式添加 0.85 ml 的磷酸，其 Ca/P 莫爾比以化學劑量為 1.67 混合，再以氨水調整混合液的 pH 值等於 10，待混和溶液均勻攪拌混合後，放入鐵氟龍高壓罐中以水熱處理溫度為 150 °C，水熱處理時間為 48 h，待鐵氟龍高壓罐冷卻至室溫時取出，以去離子水重覆清洗水熱處理後的混合液兩至三次，最後放入烘箱中以 45 °C、24 h 乾燥後得到合成之粉末試樣。

(三) 實驗分析

本實驗使用 X 光繞射分析儀 (XRD-6000, SHIMATSU, Japan) 之設定為銅靶，操作電壓為 30 kV，電流為 30 mA，掃描速度為 2 °/min，角度範圍 $2\theta = 20^\circ-50^\circ$ ，分別對三種萃取物所合成之粉末試樣在水熱處理溫度為 150 °C，水熱處理時間為 48 h 下進行 XRD 結晶相分析，透過 XRD 結晶相圖觀察粉末的繞射峰位置，並使用 JCPDS 卡標準規範所得的

標準 XRD 結晶相圖與合成之粉末試樣做對照；以場發射掃描式電子顯微鏡 (FE-SEM; JSM-6700F, JEOL, Japan) 觀察原始蛋殼粉末及合成後的奈米級氫氧基磷灰石其分佈型態以及顆粒的大小，由於合成之粉末試樣為非導體，所以放入真空鍍金機中鍍金使之導電率增加以利進行 FE-SEM 照片分析觀察；以能量分散光譜儀 (EDS) 進行表面化學分析，每個樣品取 10 的點後計算其平均值及標準差；將粉末試樣做晶粒大小計算，根據 Scherrer's 公式計算出奈米級氫氧基磷灰石的晶粒大小；以傅利葉轉換紅外線光譜分析儀 (FT-IR; Bio-Rad, FTS-40, USA) 進行官能基分析，掃描範圍為 $4000-600\text{ cm}^{-1}$ ，對照相關文獻找出所在範圍內的官能基。

三、結果與討論

圖 1 為蛋殼外層表面及內層表面之 FE-SEM 照片。蛋殼主要是由蛋白質纖維所構成的基質以及蛋白質纖維基質上的鈣質結晶物，而蛋殼的礦物質元素成分主要由無機物組成，由碳酸鈣 (94%)，磷酸鈣 (1%)，有機物 (4%) 和碳酸鎂 (1%) 組成 [14]。由 FE-SEM 照片可觀察到其蛋殼外表面是不規則的凹凸面，蛋殼的內表面則是網狀結構。

為了得到均勻的奈米級氫氧基磷灰石粉末，添加一些生物萃取物做為模板是必要的 [11]。圖 2 為添加不同植物皮萃取物合成奈米級氫氧基磷灰石，水熱處理溫度為 150 °C，水熱處理時間分別為 48 h，pH 值為 10 之 XRD 繞射圖。由 XRD 繞射圖發現，經水熱處理合成奈米級氫氧基磷灰石，並沒有發現蛋殼 ($CaCO_3$) 的繞射峰，而主繞射峰角度在 25.9° 、 31.9° 、 32.9° 及 34.1° 為奈米級氫氧基磷灰石的繞射峰位，證實添加植物皮萃取物並不會阻礙合成單相的奈米級氫氧基磷灰石，其晶體結構為 $A = B = 9.4240$ ， $C = 6.8790$ 的六方晶體結構 [22]。

表 1 為合成奈米級氫氧基磷灰石粉末之平均粒徑，是根據 Scherrer's 公式 [3] 計算出奈米粒子的晶粒尺寸大小，本實驗的晶粒大小計算公式如下列方程式所示 ($2\theta = 26.04^\circ$):

$$X_s = \frac{0.9\lambda}{FWHM \cos \theta} \quad (1)$$

X_s = 晶粒大小 (nm)

λ = X 光波長 (銅靶 $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$)

Full Width at Half Maximum (FWHM) = 繞射峰的半高寬

θ = 繞射峰角度



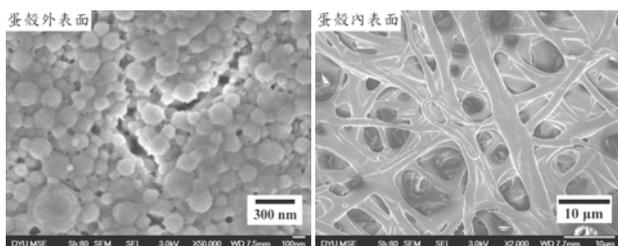


圖 1. 蛋殼外層表面及內層表面之 FE-SEM 照片

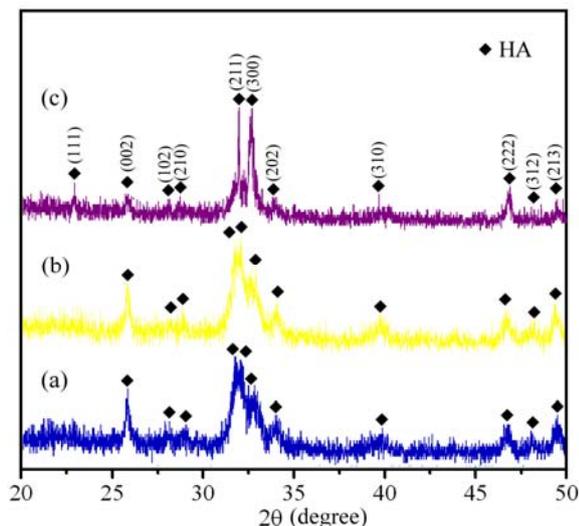


圖 2. 添加 (a) 葡萄皮、(b) 地瓜皮、(c) 柚子皮萃取物，合成奈米級氫氧基磷灰石，水熱處理溫度為 150 °C，水熱處理時間為 48 h，pH 值為 10 之 XRD 繞射圖

表 1. 合成奈米級氫氧基磷灰石之晶粒大小 (150 °C, 48 h)

| 萃取物種類 | 晶粒大小 (nm) |
|-----------------|-----------|
| 葡萄皮萃取物 (β-胡蘿蔔素) | 45 ± 13 |
| 地瓜皮萃取物 (各種氨基酸) | 63 ± 29 |
| 柚子皮萃取物 (檸檬烯油) | 14 ± 2 |

隨著添加不同的植物皮萃取物，可觀察到晶粒尺寸有明顯的差距，且經 Scherrer's 公式 [3]計算證實晶粒尺寸為奈米等級，其中又以添加柚子皮萃取物 (檸檬烯油)，水熱處理時間為 48 h，得到最小的晶粒尺寸為 14 ± 2 nm。根據 Nayar 等人 [11]研究顯示，因為萃取物中含有檸檬烯油，所以在合成奈米級氫氧基磷灰石時，可以有效的控制粒子的形狀和大小。

圖 3 為添加不同植物皮萃取物合成奈米級氫氧基磷灰石，水熱處理溫度為 150 °C，水熱處理時間為 48 h，pH 值為 10 之 FE-SEM 照片 (倍率：×30000; ×200000)。由圖中可

以發現，添加葡萄皮萃取物合成的粉末顆粒會嚴重的聚集在一起，且顆粒形貌也顯得較大顆，由圖 3 (d) 中已可以觀察到粉末是以針狀堆疊的形貌存在；而添加地瓜皮萃取物，合成之群集是由許多統一形狀的顆粒所組成，且粉末表面形態較為分散，可觀察到表面形貌均為圓形的不規則凹凸面；以添加柚子皮萃取物所合成之奈米級氫氧基磷灰石，粉末的顆粒大小較大顆，且粉末堆疊在一起的情況較明顯，粉末表面凹凸面的情形也比添加其他兩種萃取物明顯，發現粉末由許多長條形棒狀的顆粒形貌所組成，同時發現粉末的表面積比較大，根據 Kalita 等人[7]的研究提出，表面積增大使奈米 HA 粒子具有很高的表面能，使粒子具有更佳生物活性，可促進成骨細胞的黏附與增值、利於進行骨整合和使燒結溫度降低以避免異常的晶粒成長和裂縫情形的產生。

圖 4 為添加不同植物皮萃取物合成奈米級氫氧基磷灰石，水熱處理溫度為 150 °C，水熱處理時間為 48 h，pH 值為 10 之 FT-IR 官能基分析。由圖中發現吸收峰在 2360 cm⁻¹ 為水氣含量的背景值 [8,20]，吸收峰在 1031 cm⁻¹ 處代表磷酸鹽離子 (PO₄³⁻)，而吸收峰在 3580 cm⁻¹ 和 631 cm⁻¹ 處分別代表拉伸與彎曲模式的氫氧基 (OH⁻)，吸收峰在 2920 cm⁻¹ 和 2851 cm⁻¹ 處分別代表 CH₃ 和 CH₂ [10]而吸收峰在 1434 cm⁻¹ 和 864 cm⁻¹ 處可發現以碳酸根離子 (CO₃²⁻) 取代磷酸根離子 (PO₄³⁻) 的 B 型 (B-type) 替換磷灰石結構而吸收峰在 1550 cm⁻¹ 處可以發現碳酸根離子 (CO₃²⁻) 取代氫氧根離子 (OH⁻) 的 A 型 (A-type) 替換磷灰石結構 [10]，發現衍生的試樣是 AB 型的碳酸氫氧基磷灰石，且是由於氨水的分解而得 [12]。

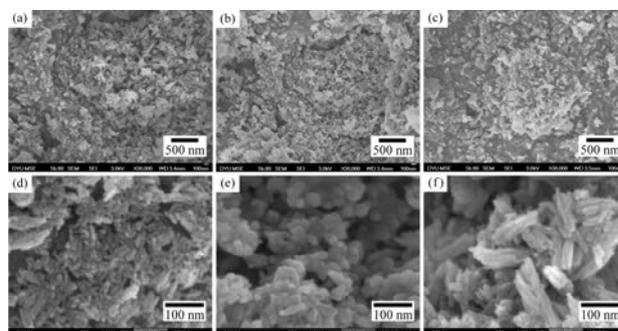


圖 3. 添加 (a, d) 葡萄皮、(b, e) 地瓜皮、(c, f) 柚子皮萃取物，合成奈米級氫氧基磷灰石，水熱處理溫度為 150 °C，水熱處理時間為 48 h，pH 值為 10 之 FE-SEM 照片 (倍率：×30000; ×200000)



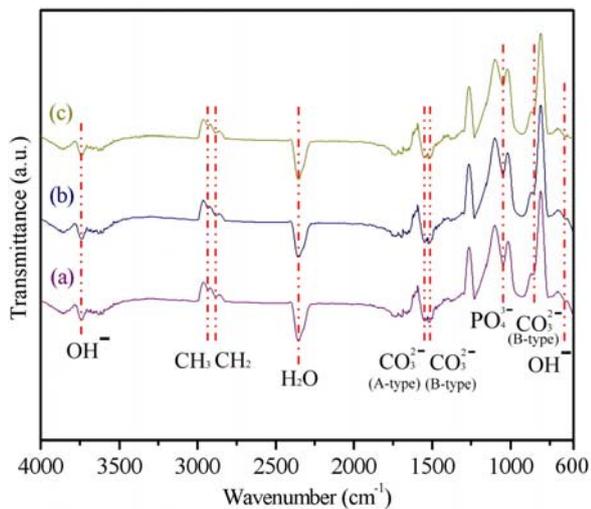


圖 4. 添加 (a) 葡萄皮、(b) 地瓜皮、(c) 柚子皮萃取物，合成奈米級氫氧基磷灰石，水熱處理溫度為 150 °C，水熱處理時間為 48 h，pH 值為 10 之 FT-IR 分析

四、結論

本實驗的研究顯示，利用回收的廢棄蛋殼以及使用植物皮萃取物（葡萄、地瓜和柚子皮）在 150 °C 水熱反應後，成功地製備了奈米級尺寸的氫氧基磷灰石，實驗結果如以下幾個要點所示：

- (1) 使用三種不同植物皮萃取物所合成的奈米級氫氧基磷灰石具有相似的 X 射線衍射圖譜，並且只觀察到氫氧基磷灰石結晶相。
- (2) 由 FT-IR 分析中，觀察到以不同植物皮萃取物合成的奈米級氫氧基磷灰石有相似的光譜，同時發現 A 型和 B 型碳酸鹽，這可能有助於合成結晶度低的氫氧基磷灰石。
- (3) 以添加柚子皮萃取物顯示出具有良好的長寬比與物理形狀，均類似於天然骨的氫氧基磷灰石結晶結構。

誌謝

本研究承蒙大葉大學與台中榮民總醫院之研究經費補助，謹此致謝 (TCVGH-DYU1028304)。

參考文獻

1. Alexeev, V. L., E. A. Kelberg and G. A. Evmenenko (2000) Improvement of the mechanical properties of chitosan films by the addition of poly(ethylene oxide). *Polymer Engineering and science*, 40(5), 1211-1215.

2. Chen, F., Z. C. Wang and C. J. Lin (2002) Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials. *Materials Letters*, 57(4), 858-861.
3. Fathi, M. H., A. Hanifi and V. Mortazavi (2008) Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder. *Journal of Materials Processing Technology*, 202(1-3), 536-542.
4. Guo, G., Y. Sun, Z. Wang and H. Guo (2005) Preparation of hydroxyapatite nanoparticles by reverse microemulsion. *Ceramics International*, 31(6), 869-872.
5. Hu, Y. and X. Miao (2004) Comparison of hydroxyapatite ceramics and hydroxyapatite/borosilicate glass composites prepared by slip casting. *Ceramics International*, 30(7), 1787-1791.
6. Herliansyah, M. K., M. Hamdi, A. Ide-Ektessabi, M. W. Wildan and J. A. Toque (2009) The influence of sintering temperature on the properties of compacted bovine hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering C*, 29(5), 1674-1680.
7. Kalita, S. J. and S. Verma (2010) Nanocrystalline hydroxyapatite bioceramic using microwave radiation: Synthesis and characterization. *Materials Science and Engineering C*, 30(2), 295-303.
8. Liu, J., X. Ye, H. Wang, M. Zhu, B. Wang and H. Yan (2003) The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method. *Ceramics International*, 29(6), 629-633.
9. Monma, H. and T. Kamiya (1987) Preparation of hydroxyapatite by the hydrolysis of brushite. *Journal of Materials Science*, 22(12), 4247-4250.
10. Murugan, R. and S. Ramakrishna (2006) Production of ultra-fine bioresorbable carbonated hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia*, 2(2), 201-206.
11. Nayar, S. and A. Guha (2009) Waste utilization for the controlled synthesis of nanosized hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering C*, 29(4), 1326-1329.
12. Prabakaran, K. and S. Rajeswari (2009) Spectroscopic investigations on the synthesis of nano-hydroxyapatite from calcined eggshell by hydrothermal method using cationic surfactant as template. *Spectrochimica Acta Part A*, 74(5), 1127-1134.
13. Qiu, C., X. Xiao and R. Liu (2008) Biomimetic synthesis



- of spherical nano-hydroxyapatite in the presence of polyethylene glycol. *Ceramics International*, 34(7), 1747-1751.
14. Rivera, E. M., M. Araiza, W. Brostow, V. M. Castaño, J. R. Díaz-Estrada, R. Hernández and J. R. Rodríguez (1999) Synthesis of hydroxyapatite from eggshells. *Materials Letters*, 41(3), 128-134.
 15. Sanosh, K. P., M. C. Chu, A. Balakrishnan, T. N. Kim and S. J. Cho (2009) Utilization of biowaste eggshells to synthesize nanocrystalline hydroxyapatite powders. *Materials Letters*, 63(24-25), 2100-2102.
 16. Sears, K. J., J. E. Alleman and W. L. Gong (2005) Feasibility of using ultrasonic irradiation to recover active biomass from waste activated sludge. *Journal of Biotechnology*, 119(4), 389-399.
 17. Teng, S., L. Chen, Y. Guo and J. Shi (2007) Formation of nano-hydroxyapatite in gelatin droplets and the resulting porous composite microspheres. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101(4), 686-691.
 18. Wei, G. and P. X. Ma (2004) Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 25(19), 4749-4757.
 19. Yoshimura, M. and W. Suchanek (1997) In situ fabrication of morphology controlled advanced ceramic materials by Soft Solution Processing. *Solid State Ionics*, 98(3-4), 197-208.
 20. Yoshimura, M., P. Sujaridworakun, F. Koh, T. Fujiwara, D. Pongkao and A. Ahniyaz (2004) Hydrothermal conversion of calcite crystals to hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering C*, 24(4), 521-525.
 21. Zhang, G., J. Chen, S. Yang, Q. Yu, Z. Wang and Q. Zhang (2011) Preparation of amino-acid-regulated hydroxyapatite particles by hydrothermal method. *Materials Letters*, 65(3), 572-574.
 22. Zhang, H., M. Liu, H. Fan and X. Zhang (2012) An efficient method to synthesize carbonated nano hydroxyapatite assisted by poly (ethylene glycol). *Materials Letters*, 75, 26-28.
 23. Zhou, H. and J. Lee (2011) Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 7(7), 2769-2781.

收件：102.06.05 修正：102.07.09 接受：102.08.15

