

## 古人类骨中羟磷灰石的 XRD 和喇曼光谱分析

胡耀武<sup>1</sup>, 王昌燧<sup>1</sup>, 左健<sup>1,2</sup>, 张玉忠<sup>3</sup>

(1. 中国科学技术大学科技史与科技考古系, 安徽 合肥 230026; 2. 理化科学中心; 安徽 合肥 230026;

3. 新疆文物考古研究所: 新疆 乌鲁木齐 830011)

**摘要:**人骨残骸是生物考古的主要对象,而骨骼污染鉴别是样品选择的依据,也是生物考古的前提。利用 X 射线衍射(XRD)和喇曼光谱相结合的方法,通过对新疆克雅河圆沙古城遗址出土的人类骨骼中羟磷灰石的分析,来辨析骨骼污染程度。研究表明,两种方法的有机结合,准确地反映了骨骼中羟磷灰石结晶度的变化,从而可简单、较为有效地鉴别古代人类骨骼样品的污染。

**关键词:**生物考古; 骨骼污染; 羟磷灰石; XRD; 喇曼光谱

**中图分类号:**Q981 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-6737(2001)04-0621-06

利用古代人类遗留的硬组织—骨骼进行科学研究,已被越来越多的研究者所重视。人们已不满足于只从体质人类学角度,依据类型学和形态学等方法来研究古代人类的骨骼,而迫切希望能够从古代骨骼中获得传统方法所无法揭示的“潜信息”。例如,通过对古代人类骨骼的研究可以进行断代,为文化的产生与发展建立年代序列;进行古代人类食谱研究,揭示古代人类的生活方式、生存环境以及人类的迁徙路线等;利用分子生物学技术,进行 DNA 考古,了解古代人类起源、遗传和个体亲源关系等等。但开展这些科学研究的前提是,经历漫长岁月后,古代人类骨骼必须基本保持最初的化学组成和生物学特性。

骨骼的吸附表面积( $10\text{m}^2/\text{g}$ )极大,易于吸附外来的可溶和不可溶物质,吸附物质可与骨骼的组成成分发生反应。长时间的环境影响,可能会使人体骨骼受到各种侵蚀而发生物理和化学变化,通常称之为骨骼的污染,也被叫作成岩作用。污染的骨骼,将丧失其原有的化学组成和生物学特性,若将它作为研究对象,往往会误入歧途。因此,对于古代人类骨骼污染程度的鉴别,已成为生物考古的首要任务。

骨基质中的无机质又称为骨盐,其组成为磷酸钙(84%)、碳酸钙(10%)、柠檬酸钙(2%),磷酸氢二钠(2%)以及其它盐类等。它们以结晶的羟磷灰石 $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ 和无定形的胶体磷酸钙的形式分布于骨胶中。当骨骼发生污染时,羟磷灰石的晶体结构,因发生离子取代等作用,其晶体微结构将发生改变,以致结晶度也随之发生变化<sup>[1-4]</sup>。这是分析骨骼污染程度的主要依据之一。众所周知,X 射线衍射是研究晶体结构和进行物相分析的最成熟、最有效的方法,而红外光谱、激光喇曼光谱也皆与物质的分子结构相关,因而也被广泛地用于物质结构的研究中。目前,用 X 射线衍射和红外光谱分析古代人类骨骼的污染,已有不少报道<sup>[1,2]</sup>,但

收稿日期:2001-03-21

基金项目:中国科学院知识创新工程项目(KJ CX - No4)和中国科学院资环局重点项目(KZ952-J1-418)

作者简介:胡耀武,1972年生,博士研究生,电话:(0551)3603914, E-mail:yw.hu2001@yahoo.com

通讯作者:王昌燧,1945年生,教授,电话:(0551)3602334

考虑到红外光谱对物质的结晶度及晶格内掺杂原子或离子的影响不如喇曼光谱敏感,而这些正是羟磷灰石污染程度的重要表征<sup>[5]</sup>。因此,有必要介绍采用X射线衍射(XRD)与激光喇曼光谱分析方法,探讨古代人类骨骼污染程度的方法。

## 1 骨骼中的羟磷灰石

骨骼中的羟磷灰石,具有其特有的生物学性质,不同于矿物学上的羟磷灰石。这种羟磷灰石,结晶度较差,晶体尺寸在c轴方向上为15-79nm,a轴方向仅为5nm。除晶体羟磷灰石以外,骨骼中还含有一定量的非晶体羟磷灰石<sup>[6]</sup>。新鲜骨中的非晶体羟磷灰石含量较高,致使骨羟磷灰石的总体上表现出弱结晶状态。

Sillen认为,人体的骨骼在埋藏过程中,非晶态的羟磷灰石,将逐渐转变为晶体结构,导致结晶度的增加<sup>[7]</sup>。由此可见,埋藏过程中骨骼羟磷灰石结晶度的改变,一方面来自相态的变化,即非晶态羟磷灰石转变为晶体羟磷灰石;另一方面缘于离子取代、置换等作用,它改变了羟磷灰石中的化学组成,造成晶体微结构的变化,后者是造成骨骼污染的主要原因。

## 2 样品处理与测试

### 2.1 样品来源

样品为出土于新疆克里雅河圆沙古城遗址(战国时期,公元前475-221年)的古代人类6块骨骼,并选取一块现代猪的肋骨作为对照样品。出土人类骨骼的原编号依次为96DKM14A、96DKMB5、96DKMB3A、96DKMD5A、96DKMD9、96DKMCIS。为叙述方便,将其改编为1、2、3、4、5、6。

### 2.2 样品处理

2.2.1 古代样品处理:祛除骨样上的褪色物质、皮质及骨髓,经去离子水浸泡后,于超声波水浴中反复清洗至清洗液无色为止。换用5%乙酸在超声波水浴中清洗10分钟,倒去洗液,用5%乙酸浸泡过夜(15小时以上)。再经去离子水清洗数次后,弃去洗液,725℃灰化8小时。冷却后研磨成粉末,装入称量瓶,密封,置干燥器中备用。

2.2.2 现代骨对照样的处理:祛除附在骨上的残余肉及皮质,置去离子水水浴中,用超声波清洗数次,除去血污等杂物。再经去离子水中浸泡数小时后取出,80℃干燥过夜。用切割机切割成两片,祛除附在内表面的骨髓部分。一部分切割成碎片,用玛瑙研钵研磨成粉末,装入称量瓶,编号为CK1;另一部分,取出2.0g骨样,725℃灰化8小时,研磨成粉末,编号为CK2。

### 2.3 样品测试分析

2.3.1 X射线衍射:仪器为D/max-ra型转靶X射线衍射仪。工作条件:电压、电流分别为40kV、100mA,DS、SS和RS依次为 $1^\circ$ 、 $1^\circ$ 、0.15mm,衍射角范围是 $10^\circ$ - $60^\circ$ 。

2.3.2 激光喇曼光谱:仪器为SPEX 1403激光喇曼光谱仪,工作条件:激发波长514.5nm,激光输出功率200mW,扫描间隔 $2\text{cm}^{-1}$ ,积分时间1s。

### 2.4 标样的喇曼分析

选择钾长石和钠长石混合物的标准样品,按上述条件对其作激光喇曼光谱分析。

## 3 分析与讨论

### 3.1 骨样灰化处理的影响

一般说来,所有哺乳动物的钙化组织,即骨骼和牙齿等,为了完成相似的功能,必然具有

相似的化学组成和晶体结构。事实上,现代生物组织中的磷灰石都为羟磷灰石,且结晶度都较差<sup>[7]</sup>,因此,在难以得到现代人骨样品的情况下,用现代猪骨代替现代人骨作为对照,应该是切实可行的。

CK1的XRD和喇曼光谱如图1、2所示。由XRD图可以看出,(002)晶面的衍射峰较为宽化,强度较小;(211)、(112)、(300)晶面的衍射峰严重宽化,连接成一体,成为漫射峰。喇曼光谱上,也仅见一个较为宽化、波数为 $960\text{cm}^{-1}$ 的 $\text{PO}_4^{3-}$ 的主要特征峰。XRD和喇曼光谱结果皆表明,未灰化骨样中羟磷灰石的结晶度较差。

骨骼灰化,不仅可以烧除骨中的有机成分,而且可明显改善骨中晶态羟磷灰石的结晶度,并使非晶态的羟磷灰石转变为晶态结构<sup>[8]</sup>。图3、4是CK2的XRD和喇曼光谱图。喇曼光谱的各峰所表示的振动模式见表1。由图4和表1可见,灰化后,羟磷灰石的衍射峰又锐又强;从喇曼光谱也可见波数为 $960\text{cm}^{-1}$ 的最大锐峰,并在432、444、580、590、608、1028、1048、1076 $\text{cm}^{-1}$ 处出现较小锐峰。二者都表明,灰化后的骨样主要由结晶甚好的羟磷灰石组成。

生物体的羟磷灰石晶体通常存在离子取代现象,其中 $\text{CO}_3^{2-}$ 离子对 $\text{PO}_4^{3-}$ 离子的取代,称为B型取代<sup>[9]</sup>。一般认为这种取代基本不破坏羟磷灰石的晶体结构,对羟磷灰石晶体无污染作用,可以看作正常取代。换句话说,未经污染骨骼的喇曼光谱图上也可以出现 $\text{CO}_3^{2-}$ 的特征频移峰,例如新鲜猪骨样CK2的喇曼光谱图上就有 $\text{CO}_3^{2-}$ 的特征频移峰。

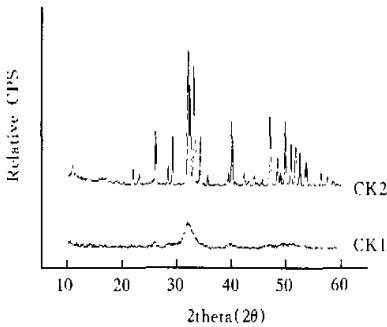


Fig.1 The XRD pattern of CK

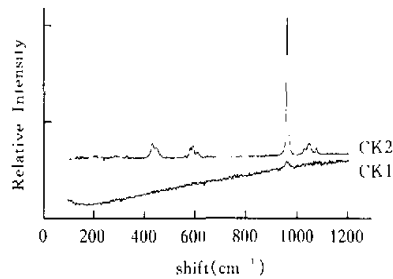


Fig.2 The Raman spectra of CK

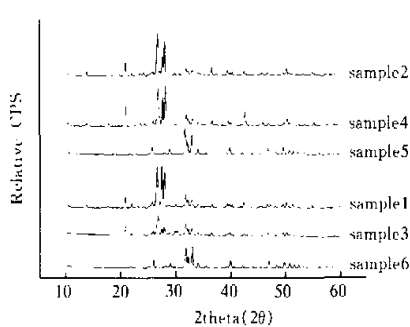


Fig.3 XRD pattern of samples

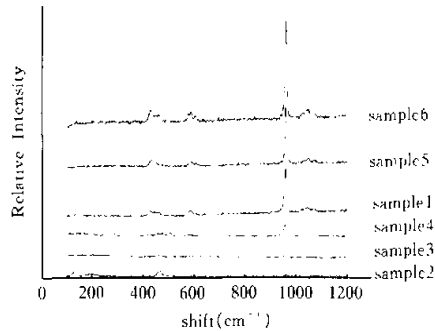


Fig.4 The Raman spectra of samples

对古代样品而言,羟磷灰石相态的变化及其微结构的变化可导致羟磷灰石结晶度的改变。经灰化处理后,可消除因羟磷灰石相态造成结晶度的影响,因而,如灰化处理后,羟磷灰石结晶度仍然较差,则表明骨骼已受污染。

### 3.2 骨样的 XRD 分析

骨骼具有极大的吸附表面积,易于吸附外来的可溶和不可溶物质。具体说来,骨样的吸附物质,可分为两部分:1) 吸附在羟磷灰石晶体表面上,不影响晶体结构;2) 吸附物质的原子、离子或离子团等与晶体中的原子、离子或离子团互为置换,使羟磷灰石产生晶格畸变。

古代骨样灰化后的 XRD 图谱如图 3 所示。显然,各骨样均出现了羟磷灰石的特征衍射峰。经 PDF 标准数据检索,发现 1,2,3,4 号样品除羟磷灰石外,还有相当数量的石英、钠长石和钾长石成分;而 5,6 号样品仅含羟磷灰石,与 8 号样品基本无差异。

### 3.3 骨样的喇曼光谱分析

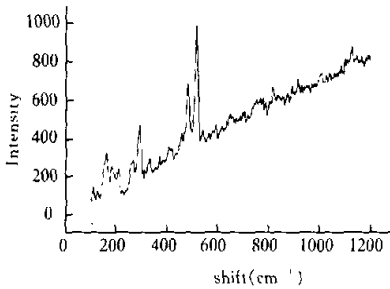


Fig.5 Raman spectra of feldspar

8 个样品的喇曼光谱图如图 4 所示,羟磷灰石的各喇曼光谱峰及振动模式见表 1。不难发现,样品 5,6,CK2 的谱图基本相同,仅由羟磷灰石的特征喇曼峰组成,这与 XRD 的分析结果一致。这一结果表明样品 5,6 保存较好,基本未受污染。样品 1,2,3,4 的喇曼谱图上,除羟磷灰石的特征喇曼光谱峰外,466 $\text{cm}^{-1}$  左右处出现一个锐峰,结合 XRD 分析结果,并对照标准喇曼光谱图<sup>[10]</sup>,可知该峰为石英的特征喇曼光谱峰,这表明四个样品

内存在相当数量的石英杂质。另一方面,钾、钠长石混合物标准样品的喇曼光谱谱图(图 5)表明波数为 510 $\text{cm}^{-1}$  喇曼峰为钾、钠长石的特征峰。结合样品的喇曼光谱图,发现 1,2,3,4 号样品均在 508 $\text{cm}^{-1}$  处出现微弱的喇曼峰,从而证实了样品内混有长石类物质。

Table 1 Raman Shift of Hydroxyapatite ( $\text{cm}^{-1}$ )

频移	样品号								振动模式
	CK1	CK2	1	2	3	4	5	6	
1071		1076	1068				1072	1074	$\nu_2(\text{CO}_3^-)$
1045		1048	1044				1048	1048	$\nu(\text{CO}_3^-)$
1032		1028							$\nu_3(\text{PO}_4)$
960	960	960	962	964	958	958	962	962	$\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$
609		608						610	$\nu_2(\text{PO}_4)$
590		590	588				586	590	$\nu_3(\text{PO}_4)$
581		580	580			584	580	580	$\nu_4(\text{PO}_4)$
448		444							$\nu(\text{PO}_4)$
430		432	432				428	432	$\nu_2(\text{PO}_4)$

8个样品羟磷灰石特征喇曼峰中,样品1、5、6、CK2的谱峰较锐,Rutt H.N.等指出<sup>[1]</sup>,喇曼谱峰的展宽与掺杂原子有关。羟磷灰石的特征喇曼峰较锐,意味着其晶格内几乎不含掺杂原子或离子,或者含量较小。这里不仅进一步表明样品5、6污染较轻外,还说明样品1虽因污染掺杂了石英、长石类成分,但其羟磷灰石的结晶较好。若能将其羟磷灰石分离出来,将其提纯,或许可当作未受污染的样品使用。与上述样品不同,样品2、3、4的羟磷灰石特征喇曼峰明显展宽,且强度也较低,说明此三个样品内不仅混入了石英、长石类成分,而且羟磷灰石的晶体结构也因原子或离子的掺杂而发生畸变,污染已十分严重。

如前所述,XRD和喇曼光谱的有机结合,可以为我们提供古代人类骨骼污染的信息,了解古代人类骨骼污染程度,为我们选择样品提供了一个定性的依据。同时,样品1的XRD和喇曼光谱也给了我们一个十分有益的启示:污染的骨骼中,其羟磷灰石仍可能保存完好,应可作为某些生物考古的研究对象,同样含有古代人类生活活动的潜信息。

## 4 结 论

以现代骨为参照标准,运用X射线衍射和喇曼光谱方法,分析古代人骨的残骸,结果表明,新疆克里雅河圆沙古城遗址的古代人类骨样96DKMCIS、96DKMD9基本上未受污染,保存较好,符合进一步测试要求;96DKMD4A骨样的羟磷灰石晶体结构未受影响,只是在晶体表面吸附了石英、长石类外来物质,若能将其中的羟磷灰石分离出来,或许仍可当作未受污染的样品使用;而骨样96DKMBS、96DKMB3A、96DKMD5A除吸附了石英、长石类外来物质以外,羟磷灰石晶体微结构也有了较大的改变,污染十分严重。

上述结果表明,结合X射线衍射与喇曼光谱分析,是鉴别古代人骨样品污染程度的简便而较为有效的方法。

## 参考文献:

- [1] Baraybar J P. Diet and death in a fog oasis site in central coastal Peru: a trace element study of tomb 1 malanche 22[J]. *Journal of Archaeological Science*. 1999,26:471-482.
- [2] Sillen A. Diagenesis of the inorganic phase of cortical bone[A]. In:T.D. Price Ed. The Chemistry of Prehistoric Human Bone[C]. Cambridge:Cambridge University Press. 1989.211-229.
- [3] Spinheimer M, Lee-Thorp JA. Alteration of enamel carbonate environments during fossilization[J]. *Journal of Archaeological Science*. 1999,26:143-150.
- [4] Kirchmer MJ, Edwards GM, Lucy D, et al. Ancient and modern specimens of human teeth: a Fourier-transform Raman spectroscopic study[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*. 1997,28:171-178.
- [5] Grenlich HU, Yan B. Infrared and Raman spectroscopy of biological materials[M]. New York:Marcel Dekker, Inc. 2001.424.
- [6] Jackson SA, Cartwright AG, Lewis D. The morphology of bone mineral crystals[J]. *Calcified Tissue Research*. 1978,25:217-222.
- [7] 周玲隽,刘永康,周国富. 现代生物磷灰石及化石磷灰石研究[J]. *矿物学报*, 1999,19(1):41-48.
- [8] 王大志,杨兰,罗毅. 猪骨羟基磷灰石的结构稳定性[J]. *生物物理学报*, 1998,14(4):104-108.
- [9] Rey C, Renugopalakrishnan V, Shimizu M, et al. A resolution enhanced Fourier transform infrared spectroscopic study of the environment of the CO<sub>3</sub> ion in the mineral phase of enamel during its formation and maturation[J]. *Calcified Tissue International*, 1991,49:259-268.

- [10] 郑顺旋. 激光喇曼光谱学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1989:162.
- [11] Rutt HN, Nicola JA. Raman spectra of carbonates of calcite structure[J]. *Journal of Physics C: Solid State Physics*, 1974,7:4522-4528.

### ANALYSIS OF HYDROXYAPATITE IN ANCIENT HUMAN BONE USING RAMAN SPECTRA AND XRD

HU Yao-wu<sup>1</sup>, WANG Chang-sui<sup>1</sup>, ZUO Jian<sup>1,2</sup>, ZHANG Yu-zhong<sup>3</sup>

(1. Department of Scientific History and Archaeometry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

2. Structure Research Laboratory, University of Science and Technology of China, Academia Sinica, Hefei 230026, China;

3. Institute of Relics and Archaeology of Sinkiang, Urumchi 830011, China)

**Abstract:** The skeleton remains of ancient people are the main materials for bioarchaeological research. The identification of bone contamination is not only the basis to pick out the samples but also one of prerequisites for bioarchaeometry. The identification of the bone contamination degree was investigated through analysis of ancient human bone from the Keyaheyuansha site in Sinkiang Uigur Autonomous Region by use of methods of X-ray diffraction (XRD) and Raman Spectra. The results showed that the incorporation of the two techniques accurately revealed the change of crystallinity of hydroxyapatite and could briefly and effectively distinguish the contamination of the ancient human bone.

**Key Words:** Bioarchaeometry; Bone contamination; Hydroxyapatite; XRD; Raman Spectra