

سنتز منیزیم هیدروکسی آپاتیت دارای ساختار نانو به روش بیومیمتیک

مهران صولتی هاشجین^۱؛ فرهاد بخشیⁱⁱ

چکیده

هیدروکسی آپاتیت موجود در بدن دارای ساختار نانومتری است؛ همچنین، در ترکیب هیدروکسی آپاتیت موجود در بدن مقادیر اندکی یون منیزیم (Mg^{2+}) وجود دارد. حضور این یون باعث تغییر ترکیب استوکیومتری هیدروکسی آپاتیت به حالت غیر استوکیومتری می شود. منیزیم هیدروکسی آپاتیت غیر استوکیومتری در مقایسه با هیدروکسی آپاتیت استوکیومتری، از نظر زیستی فعال تر است.

سنتز هیدروکسی آپاتیت استوکیومتری و منیزیم هیدروکسی آپاتیت غیر استوکیومتری به روش رسوبدهی با اضافه کردن محلول دی آمونیوم هیدروژن فسفات به ترتیب به محلول کلسیم نیترات و محلول کلسیم نیترات حاوی منیزیم کلراید انجام شد. به منظور بررسی ریزساختار و ترکیب شیمیایی از آنالیزهای میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، پراش پرتو ایکس (XRD) و طیفسنجی فرسرخ (FTIR) استفاده شد. آزمایشها نشان داد که رسوبهای به دست آمده ترکیب هیدروکسی آپاتیت دارد و منیزیم در ترکیب شیمیایی آن وجود دارد. حضور منیزیم باعث ریزتر شدن دانهها از محدوده اندازه ۵۰-۱۳۰ nm به ۳۰-۸۰ nm می شود و از طرفی میزان بلورینگی را از ۸۰٪ به ۳۰٪ کاهش می دهد. انتظار می رود که چنین ماده ای، به دلیل مشابهت بسیار زیاد با بافت سخت طبیعی، در صورت استفاده به عنوان کاشتنی قادر به تقلید از هیدروکسی آپاتیت طبیعی در بدن است و ضمن برخورداری از ویژگی زیست سازگاری بهتر، رشد سلولهای استخوانی را در محل قرار گرفتن کاشتنی تسریع کند.

کلمات کلیدی

منیزیم هیدروکسی آپاتیت، نانو ساختار، بیومیمتیک، غیر استوکیومتری

Biomimetic Synthesis Of Nanostructured Magnesium Hydroxyapatite Research

M. Solati Hashjin; F. Bakhshi

ABSTRACT

Natural hydroxyapatite is nanostructured. Also, there exists a minute amount of magnesium ion in the composition of natural hydroxyapatite. The presence of this ion changes the stoichiometric hydroxyapatite to more biodegradable nonstoichiometric hydroxyapatite.

Stoichiometric hydroxyapatite and nonstoichiometric magnesium hydroxyapatite were synthesized by precipitation method using magnesium chloride as magnesium source, calcium nitrate as calcium source and diammonium hydrogen phosphate as phosphate source. SEM, XRD and FTIR analyses were used for structural and compositional characterization. Results show that magnesium was incorporated in the composition of synthesized magnesium hydroxyapatite powder. Presence of magnesium ion in the structure of hydroxyapatite results in reduction of crystal size from 50-130nm to 30-80nm and

ⁱ استادیار دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر: solati@aut.ac.ir

ⁱⁱ دانشجوی کارشناسی ارشد بیومتریال، دانشگاه صنعتی امیرکبیر: fbakhshi@aut.ac.ir

crystallinity from 80% to 30%. It seems that low crystallinity of synthetic Mg-doped nonstoichiometric hydroxyapatite makes it more biocompatible and enhances the solubility of the material at the physiological pH values.

KEYWORDS

Magnesium Hydroxyapatite, nanostructure, biomimetic, nonstoichiometric.

قابلیت جذب زیست‌شیمیایی مجدد و کنترل شده، ویژگی بسیار مهمی در توسعه این مواد جدید به شمار می‌آید. دو عامل که به طور اساسی بر حلالیت هیدروکسی‌آپاتیت در شرایط فیزیولوژیک مؤثر هستند، یکی میزان بلورینگی پودرها و دیگری، نوع و مقدار افزودنی‌هایی است که به ساختار آپاتیت اضافه می‌شوند تا آن را قابل مقایسه با بافت طبیعی استخوان نمایند [۲]، [۴].

منیزیم یکی از یون‌های دو ظرفیتی مهم موجود در ساختار آپاتیت‌های بیولوژیک است. بر طبق تحقیقات انجام شده بر روی بافت سخت (calcified tissue)، مقدار منیزیم شرکت‌کننده در فاز آپاتیت با افزایش سخت شدن (calcification) کاهش می‌یابد. یک دلیل محکم‌تر این است که به نظر می‌رسد منیزیم یک عامل مهم در تغییرات کیفی شبکه (matrix) استخوان است که میزان تردی استخوان را مشخص می‌کند. کاهش مقدار منیزیم به قطع رشد استخوان، کاهش فعالیت سلول‌های تشکیل دهنده استخوان و جذب‌کننده کلسیم، ایجاد نقص استخوان (osteopenia) و سرانجام تردی استخوان منجر می‌شود و بر تمام مراحل سوخت و ساز اسکلتی اثر نامطلوب به جا می‌گذارد [۳].

۲- روش تحقیق

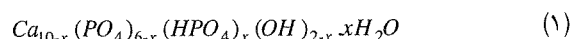
۲-۱- تهیه هیدروکسی‌آپاتیت استوکیومتری

برای سنتز هیدروکسی‌آپاتیت استوکیومتری از نمک‌های دی‌آمونیم‌هیدروژن فسفات (Prolabo Merck eurolab No. 21) و کلسیم‌نیترات ۴ آبه (Prolabo Merck eurolab No. 309.293) استفاده شد. ابتدا محلول‌های نمک فسفاتی (دی‌آمونیم‌هیدروژن فسفات) با غلظت ۰/۲۹ مولال و نمک حاوی کلسیم (کلسیم‌نیترات ۴ آبه) با غلظت ۰/۳۰ مولال تهیه شد؛ به طوری که نسبت مولی بین کلسیم و فسفات برابر با ۱/۷ باشد؛ سپس pH محلول‌ها به وسیله محلول سدیم‌هیدروکسید یک مولار به ۱۱ رسانده شد. آنگاه محلول نمک فسفاتی به آرامی و به صورت قطره قطره در مدت حدود ۲ ساعت به محلول نمک حاوی کلسیم، اضافه و با همزن مغناطیسی هم زده شد. در طی مدت افزودن محلول نمک فسفاتی سعی شد pH محلول با افزودن NaOH در حدود ۱۱ ثابت باقی بماند. بعد از اینکه محلول نمک فسفاتی کاملاً اضافه شد، محلول حاوی

۱- مقدمه

در میان ترکیبات فسفاتی، کلسیم فسفات‌ها به دلیل برخورداری از خواص جالب توجه و کاربردهای گسترده، از اهمیت بسیاری برخوردار هستند. اهمیت اصلی این دسته از مواد از آنجا ناشی می‌شود که بافت سخت بدن انسان و سایر پستانداران عمدتاً از ترکیبات کلسیم فسفات تشکیل شده است؛ به طوری که استخوان‌ها و دندان‌ها حاوی درصد بالایی از کلسیم فسفات‌های بلورین، نظیر کلسیم هیدروکسی‌آپاتیت هستند [۱].

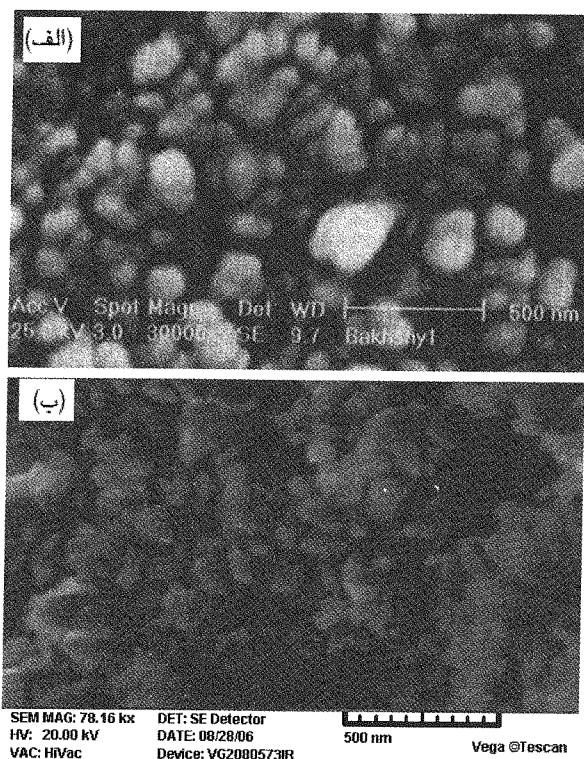
ساختار و ترکیب کلسیم هیدروکسی‌آپاتیت به آسانی تغییر می‌کند؛ زیرا خود عضوی از خانواده بزرگ کلسیم فسفات‌هاست. دیگر اعضای مهم این گروه را تری‌کلسیم فسفات (TCP)، دی‌کلسیم فسفات (DCP)، دی‌کلسیم فسفات دی‌هیدرات (DCPD) و اکتاکلسیم فسفات (OCP) تشکیل می‌دهند. ترکیبات و ساختارهای متفاوت انواع کلسیم فسفات‌ها را می‌توان با استفاده از فرمول عمومی (۱) نشان داد:



که در آن مقدار x بین صفر تا ۲ تغییر می‌کند [۱]. مهم‌ترین عضو گروه آپاتیت‌ها، کلسیم هیدروکسی‌آپاتیت با فرمول $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ است که در حوزه‌های مختلفی از زیست‌شناسی، زمین‌شناسی، علم مواد و پزشکی کاربرد دارد. کلسیم هیدروکسی‌آپاتیت - یا آن‌طور که اغلب از آن نام برده می‌شود هیدروکسی‌آپاتیت - به عنوان جزء اصلی تشکیل دهنده استخوان و دندان از معدود بلورهایی است که به مقدار زیاد در بدن موجودات زنده وجود دارد [۱].

سنتز مواد جدید مشابه با استخوان طبیعی، به عنوان جایگزینی برای آلوگرافت و اُتوگرافت استخوان، هنوز یکی از جالب‌ترین موضوعات تحقیقاتی به شمار می‌رود. امروزه بیشتر توجهات به توسعه آپاتیت‌های بیومیمتیک غیراستوکیومتری جلب شده است که می‌تواند بیشترین سرعت زیست‌تخریب‌پذیری و بیشترین زیست‌فعالی را در مقایسه با هیدروکسی‌آپاتیت استوکیومتری نشان دهد. این به خاطر درک بهتر از نقش عاملی گروه‌های فعال موجود در بافت استخوان طبیعی است [۲]، [۳].

به کلسیم (99 pm) [5]، اندازه دانه‌ها در منیزیم هیدروکسی آپاتیت در محدوده 80-30 nm است که نسبت به هیدروکسی آپاتیت استوکیومتری؛ که در محدوده 130-50 nm است، کوچکتر است (شکل (1)).



شکل (1): تصویر میکروسکوپ الکترونی دانه‌ها:

(الف) هیدروکسی آپاتیت استوکیومتری

(ب) منیزیم هیدروکسی آپاتیت

ترکیب شیمیایی

با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی در حالت back scattered مشخص شد که ترکیب شیمیایی دانه‌ها در منیزیم هیدروکسی آپاتیت همگن است (شکل (2)).
آنالیز خطی EDAX (line scan) نیز نشان داد که منیزیم به طور یکنواخت و همگن در دانه‌ها توزیع شده است (شکل (3)).

رسوب به مدت 24 ساعت روی همزن باقی ماند. رسوب به دست آمده پس از تغلیظ به وسیله سانتریفوژ (DAMON/IEC DIVISION، ساخت آمریکا)، شسته شد و به منظور خشک کردن به مدت 24 ساعت در آون هوا (در دمای 70°C) قرار گرفت. رسوب خشک شده با استفاد از هاون دستی به صورت پودر درآمد.

2-2- تهیه هیدروکسی آپاتیت غیراستوکیومتری حاوی

منیزیم

به منظور وارد کردن یون منیزیم به شبکه بلوری هیدروکسی آپاتیت، به محلول نمک حاوی کلسیم، نمک منیزیم کلراید 6 آبه (Merck No. 105833) افزوده شد، به طوری که نسبت مولی منیزیم به کلسیم قبل از انجام سنتز، حدود 0/18 شود. pH محلول نمک حاوی کلسیم و منیزیم به 11 رسانده شد و محلول نمک فسفاتی مجدداً با همان سرعت قبلی به آن اضافه شد. بقیه مراحل آماده سازی نمونه‌ها مشابه روشی بود که در مورد هیدروکسی آپاتیت استوکیومتری انجام گرفت.

2-3- آزمایش‌های انجام شده بر روی نمونه‌ها

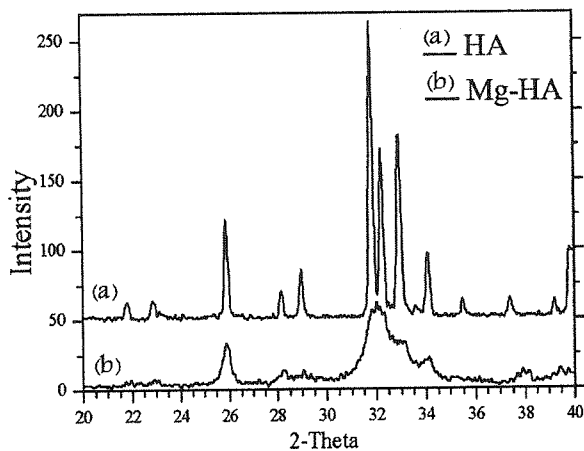
برای تعیین استوکیومتری بودن نمونه‌ها، آزمایش پراش پرتو ایکس (XRD) به وسیله پرتو ایکس Cu-Kα با طول موج 1/5406 آنگستروم به وسیله دستگاه (Bruker Analytical X-ray Systems ساخت آلمان) و نرم‌افزار (Sigma-C GmbH 1991-9) انجام شد و الگوهای به دست آمده با کارت استاندارد هیدروکسی آپاتیت (73-0293 JCPDS) مقایسه شد. برای حصول اطمینان از حضور یون‌های منیزیم در پودر سنتز شده، طیف‌سنجی فرسرخ (FTIR) با دستگاه (Bruker EQUINOX 55 ساخت آلمان) بر روی نمونه‌ها انجام شد. از میکروسکوپ الکترونی روبشی (Tescan Vega 2XMU) برای مشاهده ریزساختار پودرهای به دست آمده و همچنین برای بررسی همگنی ترکیب شیمیایی از تصاویر میکروسکوپ الکترونی در حالت back scattered و EDAX به صورت line scan استفاده شد.

3- نتایج و بررسی

3-1- نتایج SEM

ریز ساختار

همان‌طور که انتظار می‌رفت با افزایش منیزیم به هیدروکسی آپاتیت، به دلیل جانشینی برخی از یون‌های منیزیم به جای کلسیم در ساختار بلوری هیدروکسی آپاتیت و از طرفی کوچکتر بودن شعاع یونی منیزیم (66 pm) نسبت



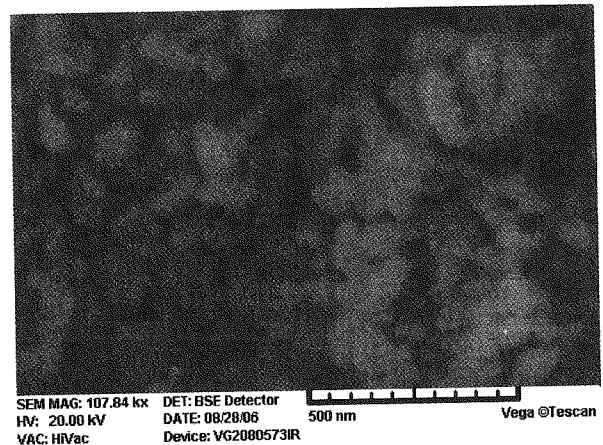
شکل (۴): آنالیز XRD هیدروکسی آپاتیت استوکیومتری (بالا) و منیزیم هیدروکسی آپاتیت (پایین)

که X_c میزان بلورینگی، I_{300} ارتفاع پیک (۳۰۰)، و $V_{112/300}$ ارتفاع دره بین دو پیک (۱۱۲) و (۳۰۰) است [۹]، [۱۰]. با استفاده از این رابطه میزان درصد بلورینگی هیدروکسی آپاتیت استوکیومتری حدود ۸۰٪ و منیزیم هیدروکسی آپاتیت حدود ۳۰٪ به دست می آید. درصد بلورینگی کمتر باعث می شود آپاتیت سنتز شده از نظر بیولوژیک شباهت بیشتری به بدن داشته باشد و سرعت حل شدن آن در pH فیزیولوژیک بدن افزایش یابد [۲].

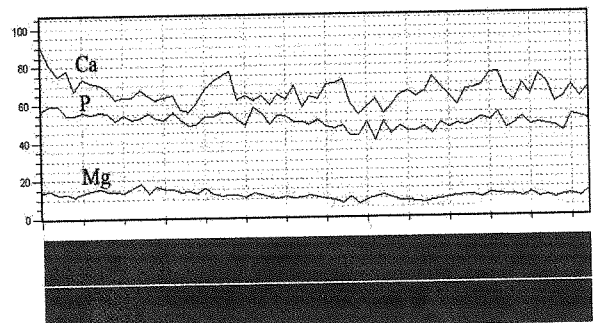
۳-۳- نتایج FTIR

نتیجه آنالیز FTIR نمونه منیزیم هیدروکسی آپاتیت در شکل (۵) مشخص شده است. پیک های مربوط به گروه های عاملی بر روی شکل نمایش داده شده است [۱۱]-[۱۸]. پیک های PO_4 و OH به ترتیب نشان دهنده گروه های فسفات و هیدروکسیل موجود در ساختار هیدروکسی آپاتیت هستند. همان طور که مشاهده می شود در ساختار، CO_3 و آب وجود دارند. وجود CO_3 به دلیل اتمسفر کنترل نشده محیط سنتز است که مقداری CO_2 از طریق هوا وارد محلول شده و به صورت CO_3 در ساختار ظاهر شده است.

پیک های موجود در 1637 cm^{-1} و 2440 cm^{-1} نشان دهنده گروه عاملی OH و مربوط به آب محبوس شده در ساختار می باشند. وجود آب، هم به دلیل خشک نشدن کامل پودرهای حاصل و هم به دلیل سطح ویژه ی زیاد و قدرت جذب آب بسیار بالای آن است.



شکل (۲): تصویر میکروسکوپ الکترونی از پودر منیزیم هیدروکسی آپاتیت (در حالت back scattered)



شکل (۳): آنالیز خطی EDAX پودر منیزیم هیدروکسی آپاتیت

۳-۲- نتایج XRD

شناسایی فازها

شناسایی فازهای موجود در پودرها با استفاده از کارت (JPDCS 73-0293) [۶]-[۸] انجام شد. شکل (۴) گراف XRD مربوط به منیزیم هیدروکسی آپاتیت و هیدروکسی آپاتیت استوکیومتری را نشان می دهد. پیک های به دست آمده در هر دو نمونه با هیدروکسی آپاتیت استوکیومتری مطابقت دارد. هر دو نمونه علاوه بر هیدروکسی آپاتیت، حاوی کلسیم اکسید هستند. یک دلیل عمده حضور کلسیم اکسید این است که نسبت مولی کلسیم به فسفر (Ca/P) مواد اولیه حدود ۱/۷ - کمی بیش از ۱/۶۷ که در حالت استوکیومتری برقرار می باشد - در نظر گرفته شده است.

محاسبه درصد بلورینگی (Crystallinity)

با استفاده از (۲) می توان درصد بلورینگی پودرهای سنتز شده را به کمک الگوی پراش پرتو ایکس آنها به دست آورد:

$$X_c = 1 - (V_{112/300} / I_{300}) \quad (2)$$

[۶] Mobasherpour, I.; Solati-Hashjin, M.; Kazemzadeh, A.; "Synthesis of Nanocrystalline Hydroxyapatite By Using Precipitation Method", Journal of Alloys and Compounds (in press).

[۷] Orlovskii, V., P.; Komlev, V., S.; Barinov, S., M.; "Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics", INORGANIC MATERIALS, Vol. 38, No. 10, p.p. 1159-1172, 2002.

[۸] Korbas, M.; Rokita, E.; Meyer-Klaucke, W.; Ryczek, J.; "Bone tissue incorporates in vitro gallium with a local structure similar to gallium-doped brushite", J Biol Inorg Chem, Vol. 9, p.p. 67-76, 2004.

[۹] Bao, X.; Pang, Y., X.; "Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles", Journal of the European Ceramic Society, Vol. 23, p.p. 1697-1704, 2003.

[۱۰] Dorozhkin, S., V.; "Mechanism of solid state conversion of non_stoichiometric hydroxyapatite to diphasic calcium phosphate", Russian Chemical Bulletin, International Edition, Vol. 52, No. 11, p.p. 2369-2375, November, 2003.

[۱۱] Gibson, I., R.; Bonfield, W.; "Preparation and characterization of magnesium/carbonate co-substituted hydroxylapatite", Journal of Materials Science, Materials in Medicine, Vol. 13, p.p. 685-693, 2002.

[۱۲] Thamaraiselvi, T., V.; Prabakaran, K.; Rajeswari, S.; "Synthesis of Hydroxyapatite that Mimic Bone Mineralogy", Trends Biomater. Artif. Organs, Vol. 19, No. 2, p.p. 81-83, 2006.

[۱۳] Philips, M., J.; DARR, J., A.; LUKLINSKA, Z., B.; REHMAN, I.; "Synthesis and characterization of nanobiomaterials with potential osteological applications", Journal of Materials Science, Materials in Medicine, Vol. 14, p.p. 875-882, 2003.

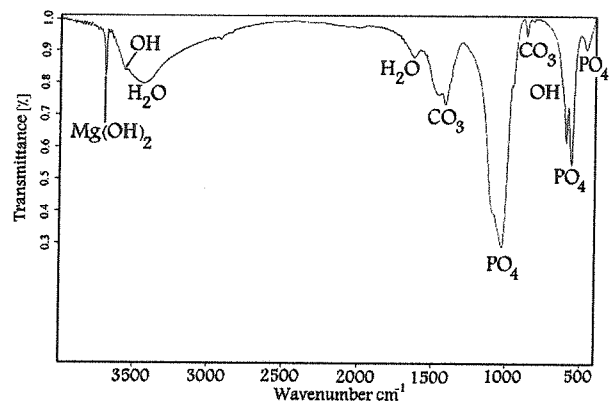
[۱۴] Panda, R., N.; Hsieh, M., F.; Chung, R., J.; Chin, T., S.; "FTIR, XRD, SEM and solid state NMR investigations of carbonate-containing hydroxyapatite nano-particles synthesized by hydroxide-gel technique", Journal of Physics and Chemistry of Solids, Vol. 64, p.p. 193-199, 2003.

[۱۵] Kim, Il-Seok; N., Kumta, Prashant; "Sol-gel synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite powder", Materials Science and Engineering B, Vol. 111, p.p. 232-236, 2004.

[۱۶] Kim, H., W.; Kim, H., W.; Kim, H., E.; Salih, V.; "Stimulation of osteoblast responses to biomimetic anocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds", Biomaterials, Vol. 26, p.p. 5221-5230, 2005.

[۱۷] Kannan, S.; Lemos, I., A., F.; Rocha, J., H., G.; Ferreira, J., M., F.; "Synthesis and characterization of magnesium substituted biphasic mixtures of controlled hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios", Journal of Solid State Chemistry, Vol. 178, p.p. 3190-3196, 2005.

[۱۸] Kuriakose, T., A.; Kalkura, S., N.; Palanichamy, M.; Arivuoli, D.; Dierks, K.; Bocelli, G.; Betzel, C.; "Synthesis of stoichiometric nano crystalline hydroxyapatite by ethanol-based sol-gel technique at low temperature", Journal of Crystal Growth, Vol. 263, p.p. 517-523, 2004.



شکل (۵): الگوی FTIR پودر منیزیم هیدروکسی آپاتیت

۴- نتیجه

پودرهای هیدروکسی آپاتیت استوکیومتری و منیزیم هیدروکسی آپاتیت غیراستوکیومتری به روش رسوبدهی سنتز شد. نمونه هیدروکسی آپاتیت حاوی منیزیم دارای ساختاری دانه ریزتر با محدوده اندازه دانه ۸۰-۳۰ nm نسبت به هیدروکسی آپاتیت استوکیومتری با محدوده اندازه دانه ۱۳۰-۵۰ nm است. بررسی‌ها نشان داد که منیزیم به طور همگن در دانه‌ها توزیع شده است. از طرفی میزان بلورینگی منیزیم هیدروکسی آپاتیت حدود ۳۰٪ است و از میزان بلورینگی به دست آمده برای هیدروکسی آپاتیت استوکیومتری؛ که حدود ۸۰٪ می‌باشد، کمتر است و از نظر بیولوژیکی به آپاتیت بدن شبیه‌تر می‌باشد.

۵- مراجع

- [۱] صولتی هاشجین، مهران؛ "تأثیر روش سنتز پودر بر ریزساختار و خواص هیدروکسی آپاتیت"، رساله دکتری، پژوهشگاه مواد و انرژی، ص ۲۲ تا ۳۰، ۱۳۷۶.
- [۲] Landi, E.; Tampieri, A.; Mattioli-Belmonte, M.; Celotti, G.; Sandri, M.; Gigante, A.; Fava, P.; Biagini, G.; "Biomimetic Mg- and Mg,CO₃-substituted hydroxyapatites: synthesis characterization and in vitro behaviour", Journal of the European Ceramic Society, Vol. 26, p.p. 2593-2601, 2006.
- [۳] Kim, S., R.; Lee, J., H.; Kim, Y., T.; Riu, D., H.; Jung, S., J.; Lee, Y., J.; Chung, S., C.; Kim, Y., H.; "Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors", Biomaterials, Vol. 24, p.p. 1389-1398, 2003.
- [۴] Cüneyt Tas, A.; "Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids", Biomaterials, Vol. 21, p.p. 1429-1438, 2000.
- [۵] ون ولک، لارنس اچ؛ اصول مهندسی و علم مواد، اشرفی زاده، فخرالدین؛ مرکز نشر دانشگاهی، ص ۶۳۴، ۱۳۷۹.