



سنتز و بررسی زیستسازگاری نانوذرات کلسیم فسفاتی دارای منیزیم

افسانه اديبفر و علىاصغر بهنام قادر*

گروه بیومواد، پژوهشکده نانوفناوری و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی

تاريخ ثبت اوليه: ١٣٩٢/٠١/٠٨، تاريخ دريافت نسخه اصلاح شده: ١٣٩٢/٠٣/٣١، تاريخ پذيرش قطعي: ١٣٩٢/٠٥/١١

چکیدہ

هدف اصلی این تحقیق، بررسی حضور منیزیم در مقادیر گوناگون بر مشخصات ترکیب و ساختار شیمیایی، شبکه کریستالی و زیستسازگاری کلسیم فسفاتها بود. بدین منظور، با توجه به اهداف تحقیق، روش سل- ژل برای سنتز مورد استفاده قرار گرفت. نمونـه کنترل ترکیب هیدروکسی آپاتیت انتخاب شد و نسبت P/(Ca+Mg) برابر ۱/۶۷ و مقدار منیزیم در محدوده صفر تا ۳٪ مولی در نظر گرفته شد. تمام نمونهها در دمای C° ۶۰۰ عملیات حرارتی شدند. ترکیب فازی و ساختار شیمیایی، شکل و اندازه ذرات با انجام آزمایشهای Mg-HA نمونهها در دمای C Mg+D7 بررسی گردید. تمام نمونهها دارای دو فاز اصلی Mg-HA و Mg-H بودند. با این حال، در آزمایشهای Mg-HA، نمونهها در دمای C Mg+D4 و در مقادیر زیاد آن فاز MgO نیز تشکیل شد. با افزایش مقدار منیزیم مقدار نسبی مقادیر منیزیم اندک، فاز MgHPO4.3H2 و MgHPO4.3H2 و در مقادیر زیاد آن فاز MgO نیز تشکیل شد. با افزایش مقدار منیزیم مقدار نسبی مقادیر منیزیم اندک، فاز MgHPO4.3H2 و در مقادیر زیاد آن فاز MgO نیز تشکیل شد. با افزایش مقدار منیزیم مقدار نسبی مقادیر منیزیم اندک، فاز MgHPO4.3H2 و در مقادیر زیاد آن فاز MgO نیز تشکیل شد. با افزایش مقدار منیزیم مقدار نسبی مقادیر منیزیم اندک، فاز زی MgHPO4.3H2 و در مقادیر زیاد آن فاز MgO نیز تشکیل شد. با افزایش مقدار منیزیم مقدار نسبی مقادیر منیزیم اندک، فاز رایش مقدار منیزیم مقدار منیز میل نمود. علاوه بر این مقدار فاز آپاتیت و نیز درجه بلوری و ابعاد شبکه آن نیز کاهش یافت. بررسیهای میکروسکوپ الکترونی عبوری، حضور ذراتی با اندازه منیزیم کمتر از ۲/۵٪ مولی، از رشد مناسب روشن ساخت. آزمایشهای زیستسازگاری نشان داد که نمونههای تهیه شده با مقدار منیزیم کمتر از ۲/۵٪ مولی، از رشد مناسب

واژههای کلیدی: هیدروکسی آپاتیت دارای منیزیم، تریکلسیم فسفات دارای منیزیم، زیستسازگاری، نانوذرات.

۱– مقدمه

در سالهای اخیر، جایگزینی یونهای موجود در استخوان بدن در ساختار آپاتیت به منظور تقلید از استخوان طبیعی و دستیابی به نقش این یونها در بهبود متابولیسم و کنترل عملکردهای بیولوژیکی استخوان، مورد توجه زیادی قرار گرفته است [۱]. منیزیم یکی از مهمترین یونهای دو ظرفیتی است که در آپاتیتهای بیولوژیکی وجود دارد. استخوان، مینا و عاج

دندان به ترتیب شامل ۱/۲۳ ۴٬۰٬۷۲ و ۱/۲۳ سنیزیم میباشند [۲]. این یون با بخش معدنی بافتهای سخت اتصال برقرار میکند و بطور غیرمستقیم بر روی سوخت و ساز ماده معدنی اثر میگذارد. مطالعات اپیدمیولوژی نشان داده است که میان منیزیم مصرف شده در رژیم غذایی افراد و دانسیته استخوان، رابطه مستقیمی وجود دارد. تخریب رشد استخوان، کاهش تشکیل استخوان، افزایش تخلخل و شکنندگی استخوان در اثر کمبود منیزیم در رژیم غذایی موشها مشاهده شده است [۳].

نشانی: کرج، مشکین دشت، پژوهشگاه مواد و انرژی

a-behnamghader@merc.ac.ir ، دورنگار: ۰۲۶۳-۶۲۰۱۸۸۸ ، پست الکترونیکی: sight sis sight sight sight sight sight

^{*} **عهدەدار مكاتبات:** علىاصغر بهنام قادر

بررسیهای انجام شده نشان میدهد که افزودن منیزیم در مقادیر اندک ممکن است جانشین آن در جایگاههای کلسیم نوع دو را موجب شود اما شواهدی نیز نشان داده است که به کلاستر شدن آنها در ساختار منجر میشود. جانشینی کامل منیزیم در هیدروکسی آپاتیت اثری سمی بر روی سلولهای استخوان دارد. افزایش غلظت منیزیم در هيدروكسي آپاتيت ميتواند باعث بروز بعضي پديدهها مانند كاهش بلورينكي، افزايش الحاق يون فسفات هیدروژن و افزایش میزان حلالیت گردد [۴]. بررسی خواص مکانیکی بدنههای β-TCP تهیه شده از پودرهای هیدروکسی آپاتیت با کمبود کلسیم دارای منیزیم نشان داده است که نمونههای زینتر شده دارای منیزیم دارای خواص مکانیکی بهتری در مقایسه با نمونه بدون منیزیم میباشند [۵]. غیر از نقش بیولوژیکی یون، ای موجود در استخوان، حضور آنها تغییرات مهمی را در مشخصات شیمیایی، شیمی فیزیکی، ترکیب فازی، گروههای عاملی، شکل و اندازه ذرات و غیره منجر می شود که سهم هر یک از آنها بر اساس شیوه انتقال ماده متفاوت است. در این راستا، باید به تمایل فراوان محققین برای بررسی اثر افزودن یونها به ترکیبات زیست فعال در اشکال گوناگون طراحی، اشاره نمود. از جمله این موارد گرافتهای استخوانی، خمیرها و سیمانها و بویژه یوششها و داربستها مورد توجه قرار گرفته است [۶]. بطور کلی و صرف نظر از محصول بدست آمده، استیل استونات منیزیم آبدار [۷]، نیترات منیزیم شش آبه [۱۰–۸]، استات منیزیم [11] و اتوکساید منیزیم [1۲] به عنوان پیش ماده دهنده منیزیم در روش سل- ژل به کار رفتهاند. جدول ۱ بطور خلاصه مقدار منیزیم، پیش مواد به کار رفته، روش تهیه، نسبت استوکیومتری ترکیب ابتدایی و محصول در برخی از تحقیقات انجام شده بر سنتز این ترکیب را نشان میدهد. اکثر محققان برای بیان و توضیح مقدار منیزیم به کار رفته در تهیه هیدروکسی آپاتیت دارای منیزیم Mg-HA از رابطه Ca_{10-x}Mg_x)(PO₄)₆(OH)₂ استفاده نمودهاند. در این رابطه هـر دو عامـل افـزایش جـایگزینی ⁻² HPO و یا تشکیل نقایص شبکهای مرتبط با افزایش میزان منیزیم را در بر نمی گیرد و تنها به عنوان یک تقریب استفاده می شود [۴].

در تحقیق حاضر، با توجه به مقادیر منیزیم استفاده شده در منابع موجود، میزان منیزیم ۳-۰ درصد مولی (Ca_{10-x}Mg_x)(PO₄)₆(OH)₂ (OH))(Ca_{10-x}Mg_x) به عنوان مقادیر مناسب تر میزان منیزیم در تهیه ترکیب کلسیم فسفاتی دارای این یون انتخاب گردید.

۲- فعالیتهای تجربی

۲-۱- آمادهسازی نمونهها

بر اساس تجارب قبلی، پیش مواد تریاتیل فسفیت ((C₂H₅O₆)₃P, MERCK))، نیترات کلسیم چهار آبه (Ca(NO₃)₂.4H₂O, MERCK) و نيترات منيزيم شش آبه (Mg(NO₃).6H₂O, MERCK) مورد استفاده قرار گرفت. جهت تهیه سل ابتدا تری اتیل فسفیت در آب دو بار تقطیر هیدرولیز شد و سپس اتانول به آن اضافه گردید. در ظرف جداگانهای نیترات منیزیم شش آبه در اتانول حل و سپس نيترات كلسيم چهار آبه به آن اضافه گرديد. نسبت (Ca+Mg)/P) ثابت و برابر ۱/۶۷ و با توجه به فرمول استوکیومتری دار منیزیم، مقدار منیزیم، Ca_{10-x}Mg_x(PO₄)₆(OH) (x)، ص_فر، ۵/۰، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ (تح_ت عن_وان نمونههای X0 تـا X3) در نظـر گرفتـه شـد. محلـولهـای حاصل به مدت ۲۴ ساعت توسط همزن مغناطیسی همزده شد. پس از طی این زمان، محلول حاوی کلسیم و منیزیم به محلول حاوی فسفر اضافه شد و سل بدست آمده در دمای محیط پیرسازی شد. بر اساس تجارب اولیه در مورد لزوم کنترل دقیق فرآیند کلوئیدی شدن، مرحله ژلهای شدن و حذف حلال در آون C° ۸۰ انجام گرفت. پودرهای حاصل از فرآیند سل- ژل، یس از خشک نمودن، تحت عملیات حرارتی در دمای C° ۶۰۰ به مدت یک ساعت قرار گرفتند. جدول ۲ نسبت Ca/P و درصد وزنی منیزیم (با احتساب راندمان واکنش) در هر نمونه را نشان میدهد.

۲-۲- روشهای ارزیابی خواص

بررسی تغییرات فازی و ساختاری و همچنین ریزساختار پودرهای سنتز شده توسط RMX (Philips, PW3710) XRD)، FTIR (Bruker) و SEM و SS60, Cambridge (1990) SEM) انجام گرفت.



مقدار منيزيم	(Ca+Mg)/P	Ca/P	ترکیب فاز	پیش مادہ	روش سنتز	مرجع			
x=∙-٣	ابتدایی: ۱.۶۷ محاسبه شده: ۱/۶۶-۳/۲	محاسبه شده: ۱/۴۶-۱/۶۷	$ \begin{array}{c} & \beta \text{-TCMP} \\ \mu \text{A} \end{array} \begin{array}{c} Ca(\text{NO}_3)_2 \cdot 4H_2\text{O} \\ Mg(\text{NO}_3)_2 \cdot 6H_2\text{O} \\ P_2\text{O}_5 \end{array} \end{array} \text{Sol-gel} $		[7.17.14]				
۵–۱۵ mol%	_	ابتدایی: ۱/۸۰۳۴	Mg-BCP	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O (NH ₄) ₂ HPO ₄	Sol-gel	[١۵]			
۱-۱• wt.%	_	ابتدایی: ۱/۶۷–۱/۷ محاسبه شده: ۱/۵–۱/۶۵	β-ТСМР НА	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O (NH ₄) ₂ HPO ₄ NH ₄ OH	Precipitation	[19]			
• - ۶ wt.%	_	_	β-TCP ΗΑ	CaCO ₃ H ₃ PO ₄ MgO Wet Mixing		[\Y]			
•-)• mol%	۱/۵	_	β-ΤСМР	CaCO ₃ (NH ₄) ₂ HPO ₄ MgO	Solid-state Reaction	[١٨]			
x=•-1•	١/۶٧	متغير	β-TCMP Mg-HA β-Ca ₂ P ₂ O ₇	Ca(OH) ₂ (NH ₄) ₂ HPO ₄ Mg(OH) ₂	Mechanochemical Hydrothermal	[4]			

جدول ۱: میزان منیزیم و پیش مادههای به کار رفته در تهیه کلسیم فسفاتهای دارای منیزیم.

جدول ۲: نسبت استوکیومتری، درصد وزنی منیزیم و نیز درجه بلوری فاز آپاتیت در نمونههای مختلف.

Х	•	۰/۵	١	۱/۵	٢	۲/۵	٣
(Ca+Mg)/P	١/۶٧	1/87	1/87	1/94	1/84	١/۶٧	١/۶٧
Ca/P	۱/۶۷	۱/۵۸	۱/۵	1/41	١/٣٣	۱/۲۵	۱/۱۶
Mg (wt.%)	·	1/11	۲/۴	۳/۵۲	۵	۶/۰۷	٧/٢٩
درجه بلوري آپاتيت (X _c)	٨٢	٧٠	۸۲	۷۸	۶۰	٧٩	54

همچنین از میکروسکوپ اینورت (Nikon TE-100) جهت ارزیابی نمونههای کشت سلولهای فیبروبلاست استفاده شد. دادههای پراش پرتو ایکس پودرهای سنتز شده، توسط نرمافزار YPert HighScore بررسی گردید. با استفاده از آنالیز شبه کمی دادههای XRD توسط طریق رابطه ۱ [۲۴–۵]، شدت نسبی فازهای موجود در هر نمونه تخمین زده شد. در این رابطه ۲ مقدار نسبی فاز i و i شدت پیک بیشینه طیف پراش پرتو ایکس فاز i میباشد.

$$P_i = \frac{I_i}{\sum_{i=1}^n I_i} \tag{1}$$

۳- نتايج و بحث

شکلهای ۱ و ۲ به ترتیب طیفهای پراش پرتو ایکس و شدت نسبی فازهای مختلف نمونههای دارای مقادیر

گوناگون منیزیم را نشان میدهند. لازم به ذکر است به منظور بررسی شدت پیکها توسط طیفهای XRD، از استاندارد Si استفاده شد [۲۵]. با توجه به تیزی و ارتفاع پیکها، نسبت دادن شدت نسبی پیک اصلی هر فاز را به مقدار نسبی آن فاز تخمینی دور از واقع نمینمایاند و از اینرو در ادامه با عنوان شدت نسبی فاز، از آن یاد میشود. HA (۲۱۱) ین منظور از مقایسه شدت پیکهای (۲۱۱) HA برای این منظور از مقایسه شدت پیکهای (۲۱۱) MgHP04.3H2 (۲۱۱) میزیم، شدت نسبی فازه از آن یاد میشود. استفاده شد. در این تصاویر مشاهده میشود که با تغییر مقدار منیزیم، شدت نسبی فازها تغییر میکند. در مقادیر مقدار منیزیم، شدت نسبی فازها تغییر میکند. در مقادیر استفاده شد. در این تصاویر مشاهده میشود که با تغییر مقدار منیزیم، شدت نسبی فازها تغییر میکند. در مقادیر استفاده شد. در این ای کار ۲۰۰۹ و این دو از ترکیب کم منیزیم (Newberyite) بوجود آمدهاند. در مقادیر زیاد منیزیم (۲۷۸۰ میت. در که است. در کی کار ۲۷۸۰ از بین رفته است. در

JR.

(٢)

گزارش نمودهاند که اضافه کردن مقادیر زیاد منیزیم منجر به کلوخهای شدن این ترکیب (MgO) می گردد [۲۷]. با توجه به شکل ۲ شدت نسبی فاز β-TCMP با افزایش منیزیم افزایش یافته است. بر طبق جدول ۲ نیز نسبت Ca/P در نمونههای تهیه شده با افزایش مقدار منیزیم کاهش می یابد. برخلاف برخی گزارشها [۲۱] مبنی بر اثر منیزیم بر افزایش تشکیل β-TCMP در مخلوط دو فازی، به نظر میرسد که ترکیب فازی مخلوط دو فازی بیشتر از منیزیم، تحت اثر نسبت Ca/P ابتدایی باشد. این نسبت بـا افزایش منیزیم از ۱/۶۷ (نمونه X0) تـا ۱/۱۶ (نمونـه X3) کاهش می یابد. به بیان دیگر مقدار این نسبت با افزایش مقدار منیزیم، به نسبت استوکیومتری فاز β-TCP نزدیک می شود و افزایش نسبی مقدار این فاز را می توان به کاهش نسبت استوكيومترى Ca/P نسبت داد. نتايج ساير محققان نیز حاکی از افزایش نسبت β-TCMP/Mg-HA با افزایش میزان منیزیم میباشد [۱۶،۲۸،۲۹]. نتایج محاسبه درجـه بلوری و اندازہ بلورکھای فاز ہیدروکسے آیاتیت نمونههای دارای مقادیر گوناگون منیزیم نیز نشان داد که بطور نسبی با افزایش مقدار منیزیم درجه بلوری کاهش يافته است (جدول ۲). درجه بلوری فاز آپاتیت با استفاده از رابطه ۲ [۲۱،۳۰] اندازه گیری شد. دراین رابطه X_c درجه بلوری یودر، V₁₁₂/I₃₀₀ شدت عمق بین پیکھای پراش (۱۱۲) و (۳۰۰) و I₃₀₀ شدت پیک (۳۰۰) است.

$$X_C = 1 - \frac{V_{112}}{I_{300}}$$

کاهش درجه بلوری فاز آپاتیت را نیز میتوان نه تنها به حضور منیزیم بلکه به کاهش مقدار نسبی این فاز با افزایش مقدار منیزیم نسبت داد. کاهش درجه بلوری با فزایش مقدار منیزیم در تحقیق سایر محققان نیز گزارش شده است [۴،۲۱]. کاهش درجه بلوری به کاهش اندازه بلور کها و افزایش نقصهای شبکهای هیدروکسی آپاتیت با افزایش میزان منیزیم، نسبت داده میشود [۴،۵،۳۱]. به منظور بررسی جایگزینی منیزیم در ساختار بلوری هیدروکسی آپاتیت از قانون وگارد (Vegard Law) هیدروکسی آپاتیت، استفاده شد. گزارش قبلی مربوط به مشخصات ترکیبی و فازی این مواد در دماهای C^o ۲۰۰۰–۲۰۰، نیز بـه موضـوع تشـکیل ایـن ترکیبات به عنوان فاز ثانویه، اشاره شده است [۲۶].



با افزایش مقدار منیزیم از نمونه X1.5 تا X3 فاز MgO (شماره کارت ۱۰۸۷۰۶۵۱) تشکیل شده است. با توجه به پایداری این اکسید از دیدگاه انرژی آزاد، تشکیل آن در شرایط سنتز امری بدیهی است. به عبارت دیگر یونهای منیزیم اضافی در ساختار بلوری وارد نمی شوند و فاز پایداری چون MgO تشکیل می گردد. سایر محققان نیز





شکل ۲: شدت نسبی فازهای موجود در نمونههای دارای مقادیر گوناگون منیزیم کلسینه شده در دمای ℃۶۰۰۰

قانون وگارد یک رابطه تجربی میان پارامتر شبکه بلوری یک مخلوط و اجزاء آن را بیان میکند. صحت و اعتبار این قانون برای هر ترکیبی باید بط ور جداگانه بررسی شود. پژوهشگرانی که بر صدق این قانون بر ترکیب مورد نظر خود تحقیق کردهاند، هر یک رابطهای خطی بر حسب x دیگر رابطه خطی میان پارامترهای شبکه (تبعیت از قانون وگارد) به معنای جایگزینی یون در ساختار بلوری یا تشکیل محلول جامد میباشد [۳۶،۳۴]. در مورد ترکیب ماضر (BCP دارای منیزیم) گزارشی بر صدق قانون وگارد همکاران [۳۶] در تحقیق خود بر فلورآپاتیت دارای منیزیم رابطههای ۲ و ۳ را برای تخمین پارامترهای شبکه بلوری فلورآپاتیت دارای منیزیم ارائه کردهاند. این دو رابطه برای فلورآپاتیت دارای منیزیم ارائه کردهاند. این دو رابطه برای

a(A) = 9.37 - 0.0032x (Y)

$$c(Å) = 6.89 - 0.0036x$$
 (°)

با این فرض که تغییر ابعاد شبکه در اثر وجود فلوئور OH تفییر (Ca_{10-x}Mg_x(PO₄)₆F₂) تفیاوتی بیا وجود و (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) نداشته باشد، روابط ذکر شده را میتوان در مورد نمونههای تهیه شده (X0 تا X3) به کار برد. همچنین پارامترهای شبکه مربوط به دو صفحه برد. (۳۰۰) و (۰۰۲) هیدروکسی آپاتیت را میتوان با استفاده از رابطه ۴ [۳۷،۳۸] محاسبه نمود.

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2}$$
(f)

در این صورت می توان دو سری منحنی (خط)، یک خط با استفاده از روابط ۲ و ۳ با احتساب مقدار منیزیم x≤r و خط دیگر بر اساس رسم داده های حاصل از محاسبه پارامترهای شبکه توسط رابطه ۴ رسم نمود. شکلهای ۳ و ۴ نتیجه محاسبه پارامترهای شبکه آپاتیت توسط روابط ۲ و ۳ در مقایسه با رابطه ۴ را نشان میدهد. در این تصاویر تغییرات پارامتر c محاسبه شده از رابطه ۴ بطور تقریبی در نمونههای X0.5 تا X2 نزدیک به نتایج حاصل از روابط ۲ و ۳ می باشد. از طرف دیگر مشاهده می شود که نتایج حاصل از محاسبه پارامتر a توسط رابط ه ۴ به صورت تقریبا خطی هستند اما بطور کلی مقدار آنها از مقدار محاسبه شده توسط روابط ۲ و ۳ در حدود A ۰/۰۵–۰/۰۴ بیشتر می باشد. همانگونه که بیان شد در نمونههای تهیه شده، در هر مقدار منیزیم، نسبت فاز آپاتیت و تریکلسیم فسفات تشکیل شده متفاوت میباشد. در این حالت در صورت جایگزینی Mg در شبکه آپاتیت، در هر میزان منیزیم، مقدار آن متفاوت خواهد بود.

بررسی جابجایی پیک اصلی β-TCMP در طیفهای پراش پرتو ایکس نمونهها نیز انجام گرفت. نتیجه حاصل شده، با توجه به موقعیت پیکهای اصلی این ترکیب در طیفهای پراش پرتو ایکس (شکل ۵)، حاکی از حضور فاز β-TCMP می اشد.

در شـکل ۵ بط ور خلاص مجابجایی پیک بیشینه β-TCMP در مورد نمونه X1 نشان داده شده است. در این شکل طیف پراش پرتو ایکس نمونه X1 با طیف پراش پرتو ایکس ترکیب تری کلسیم فسفات β-TCP:Ca₃(PO₄)₂ (شماره کارت: ۲۰۰۳۶۸۱) و طیف پراش پرتو ایکس ترکیب تری کلسیم منیزیم فسفات پیک بیشینه ۲CMP:Ca_{2.589}Mg_{0.411} (PO₄) پیک بیشینه ۲۰۰۸ متناظر با صفحه کریستالی پیک میتوان نتیجه گرفت که مقداری از یون های منیزیم اضافه شده در ساختار تری کلسیم فسفات را بوجود آوردهاند.

JR)





شکل ۶: طیفهای FTIR نمونههای دارای مقادیر گوناگون منیزیم.

شدت مد v_1 با افزایش مقدار منیزیم روند نزولی دارد. مد v_2 نیز در v_1 با افزایش مقدار منیزیم روند نزولی دارد. مد v_2 نیز در v_1^{-1} (۲۹،۳۹). حضور پیک مشخصه مربوط به مشخص میباشد [۲۹،۳۹]. حضور پیک مشخصه مربوط به بنیان پیروفسفات $P_2O_7^4$ در محدوده V^{-1} cm در مطیفهای مربوط به نمونه X0 و نمونههای دارای مقادیر کمتر منیزیم مشاهده میشود و با افزایش منیزیم از شدت این پیک کاسته شده است [۲۹،۴۰]. پیک مشاهده شده



شکل ۵: طیفهای پراش پر تو ایکس، a) نمونه پودر X1 تهیه شده، b) کارت تریکلسیم منیزیم فسفات و c) کارت تریکلسیم فسفات.

شکل ۶ نتایج طیفسنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) نمونههای دارای مقادیر گوناگون منیزیم را نشان میدهد. پیکهای مشخصه گروههای فسفات هیدروکسی آپاتیت دارای چهار مد متمایز ارتعاشی-کششی نامتقارن می باشند (v_1 تا v_2) که در تمام طیفها مشاهده می شوند.

 v_3 مد v_4 در عدد موج ¹-۵۶۳-۷ cm⁻¹ و ۶۰۱-۳ cm⁻¹ مـد v_4 مـد v_4 مد در عـد مـوج ۱۰۲۹-۲۹ cm⁻¹ و ۱۰۴۹-۲۰ و مـد v_1 در عـد موج v_1 -۱۰۶۹-۲۷ cm⁻¹ و ۸۰ cm⁻¹ و v_1



شده است [۴].

در فرکانس ^۱-۳ مرا¹ طیفهای FTIR نشان دهنده حضور بنیانهای کربنات v_2 یا ⁻² HPO4 در ساختار شیمیایی میباشد [۳۰،۴۱]. در صورتی که حضور این پیک را بوجود بنیان هیدروژن فسفات نسبت دهیم، میتوان نتیجه گرفت علاوه بر بنیان فسفاتی، بنیان فسفات هیدروژن نیز در ساختار هیدروکسی آپاتیت نمونههای تهیه شده وجود دارد که شدت آن با افزایش میزان منیزیم از X0 تا X1.5 شدیدتر شده است و با افزایش بیشتر منیزیم کاهش میبابد. شدت زیاد پیک مربوط به بنیان منده در طیف پراش پرتو ایکس این نمونه نیز نسبت داد. افزایش جایگزینی بنیان ⁻²HPO4 در شبکه آپاتیت یکی از آثار افزایش غلظت منیزیم در ساختار MgHPO معرفی

بانـد ۸۷۴ و بنیـان⁻² HPO پیـک مشخصـه هیدروکسـی آپاتیت با کمبود کلسیم (CDHA) میباشد [۴۲]. هيدروكسي آياتيت با كمبود كلسيم، تركيبي مشابه هیدروکسی آپاتیت بیولوژیکی است که دارای حلالیت، زیست فعالی و زیستسازگاری بالاتری در مقایسه با هيدروكسي آپاتيت استوكيومتري مياشد. اين تركيب خصوصیات جذب بهتر در جداسازی های کروماتو گرافی یلیمرهای مواد زیستی- آلی و فعالیت کاتالیستی قابل تـوجهی را دارا مـیباشـد. گـروههـای HPO₄ جـایگزین گروههای فسفات در شبکه هیدروکسی آپاتیت میشوند. در صورتی که حضور این پیک را بوجود بنیان کربنات نسبت دهيم، روند تغيير آن همانند تغييرات پيکهاي اصلی بنیان کربنات در محدوده فرکانس ۱۴۱۵ و ۵۰ cm⁻¹ می باشد که در نمونههای X0.5 و X0.5 از شدت نسبتا بیشتری برخوردار است و با افزایش مقدار منیزیم کاهش می یابد به گونهای که شدت آن در نمونه X3 و X0 تقريبا برابر مىباشد.

حضور دو پیک ۱۴۶۰ و ^۱-۱۴۲۰ در طیفهای FTIR نشان دهنده جایگزینی جزئی گروههای فسفات با کربنات در شبکه آپاتیت میباشد [۴۳،۴۴]. میزان این جایگزینی بطور مستقیم به میزان نسبت کربنات به فسفات در محلول وابسته است. جایگزینی یونهای گوناگون، بویژه گروههای چند جزئی در شبکه آپاتیت خصوصیاتی مانند

اندازه بلورک، مورفولوژی، ابعاد شبکه و حلالیت را تغییر میدهد [۴۵].

پیک مشخصههای OH آپاتیت در دو فرکانس ۶۳۰ در ^{۱-} ۲۵۶۶ ظاهر می گردند [۲۸–۴۳] پیک ^{۱-} ۶۳۰ ۳۵۰ در طیفهای شکل ۶ تنها در نمونه X0 به صورت واضح وجود دارد و در نمونههای دارای منیزیم تقریبا از میان رفته است. پیک ^{۱-} ۲۵۶۶ نیز، علی رغم شدت بیشتر آن نسبت به پیک ^{۱-} ۲۵۶۶ نیز، علی رغم شدت بیشتر آن قابل ملاحظهای کاهش یافته است. سایر محققان نیز گزارش نمودهاند که شدت پیک فسفات و OH آپاتیت با افزایش مقدار منیزیم، کاهش می یابد [۲۱]. Cacciotti و افزایش مقدار منیزیم، کاهش می یابد [۲۱]. Cacciotti و منیزیم پیک مشخصه ⁻²ها افزایش و پیک مشخصه OH در ۶۳۰ و ¹⁻ ۲۵۷۰ به دلیل جایگزینی ⁻² HPO و ایجاد نقص شبکهای کاهش می یابد.

اصولا روش مشاهده مستقیم با کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری مبتنی بر کیفیت آمادهسازی نمونهها میباشد و بر این اساس بر حسب شیوه پراکندهسازی انجام شده، تجمعات گوناگونی بدست میآید. شکل ۷ تصویر TEM نمونه X1 را نشان میدهد. همچنان که در این تصاویر مشاهده میشود هر چند ذرات از یکدیگر جدا شدهاند اما تمایل نسبی آنها برای حضور گروهی و تجمعی نیز آشکار است. به علاوه حضور ذرات متمایل به شکل هگزاگونال با ابعاد ۴۰ تا m ۱۰۰ در بررسی با بزرگنماییهای گوناگون تایید میشود.



شکل ۷: تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نمونه X1 کلسینه شده در دمای ℃ ۶۰۰ به مدت یک ساعت.

به منظور بررسی زیستسازگاری نانوپودرهای تهیه شده، از فیبروبلاست (Mouse C₃₄/connective tissue-L929) تهیه شده برای موش از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران استفاده گردید. محیط کشت مناسب جهت کشت و رشد سلولها به صورت زیر انتخاب شد:

- RPMI-1640

- 10% Fetal Bovine Serum (FBS)

- 50 µg/ml Streptomycin

- 50 Iu/ml Penicillin

ابت دا سلول ها به صورت انبوه در محیط کشت RPMI-1640 دارای ۵۰ واحد پنیسیلین و ۵۰ میکرو گرم استرپتومایسین در میلیلیتر محیط کشت تکمیل شده با ۱۰٪ سرم جنین گوساله در فلاسک کشت در انکوباتور دمای ۲۵ ۷۳ و ۵٪ گاز کربنیک با رطوبت ۸۵٪ کشت داده شدند. بعد از مدت ۳ الی ۴ روز (تشکیل لایه سلولی) سلول ها بوسیله آنزیم تریپسین (۲۵/۰٪) از سطح فلاسک کنده شدند و به صورت سوسپانسیون با غلظت ۱۰^۸ ۱۰ سلول در میلیلیتر برای آزمایش زیستسازگاری آماده شدند.

از طرفی نمونههای پودری در غلظتهای مختلف منیزیم بوسیله اتوکلاو استریل شد. حدود ۵ میلی گرم از هر پودر در شرایط کاملا استریل در ظروف ۶ خانهای قرار داده شدند در ضمن یک خانه بدون نمونه به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس به هر یک از خانهها دقیقا ۵ میلیلیتر سوسپانسیون سلولی ریخته شد. در انتها ظروف در انکوباتور قرار داده شد. بررسی تعداد سلولهای زنده و مرده در نمونههای دارای مقادیر مختلف منیزیم در مقایسه با هیدروکسی آپاتیت خالص (X0) نشان میدهد که با افزایش مقدار منیزیم تعداد سلولهای زنده نیز افزایش

این نتیجه برای نمونههای X1.5 تا X2.5 در هر دو تصویر بطور قابل ملاحظهای مشاهده میشود. همچنین مقایسه تصاویر میکروسکوپ اینورت (شکلهای ۸ و ۹) نشان میدهد که منیزیم اثر منفی بر رشد سلولها نداشته و میتوان نتیجه گرفت نمونههای تهیه شده با مقدار منیزیم کمتر از ۲/۵٪ مولی زیستسازگار میباشند.



شکل ۸: تصاویر میکروسکوپ اینورت نمونههای کشت داده شده پس از ۲۴ ساعت.

با توجه به کیفی بودن آزمایش، حداقل نتیجه قطعی این میباشد که حضور منیزیم نه تنها مانعی برای تکثیر سلولی و پهن شدن آنها ایجاد نکرده است بلکه تا اندازه قابل ملاحظهای نسبت به نمونه کنترل، وضعیت بهتری بدست آمده است. در صورت استفاده از این مواد به عنوان مواد سازنده گرفتهای سنتزی، داربستهای مهندسی بافت استخوان و پوششهای بیواکتیو، میتوان انتظار داشت که محیط خارج سلول، ترکیب شیمیایی بسیار نزدیک به استخوان را دارا میباشد.

مولکول های بیولوژیکی مانند پروتئین های محلول، امکان برقراری اتصال شیمیایی با یون های کلسیم و منیزیم را ایجاد کرده و واکنش های منجر به ساخته شدن بافت جدید در بدن با مکانیسم های سیستماتیک و موضعی، تشویق می گردند. باید به این نکته نیز اشاره نمود که حضور فاز TCP-β حتی در ترکیبات استوکیومتری دارای



JR)

منیزیم از دیدگاه مهندسی بافت قابل قبول و حتی مطلوب نیز میباشد. زیرا این ترکیب به جذب بیومواد پایه کلسیم فسفاتی در موضع کارگذاری کمک مینماید.



شکل ۹: تصاویر میکروسکوپ اینورت نمونههای کشت داده شده پس از ۴۸ ساعت.

۴- نتیجهگیری

بطور کلی نمونههای دارای منیزیم در دمای C° ۶۰۰ بطور کلی نمونههای دارای منیزیم در دمای Mg-۲C و Mg-TCMP و Mg-LA بودند. در مقادیر زیـاد و کـم منیـزیم بـه ترتیـب فازهـای MgO و MgO منود تغییرات پارامترهای شد. بررسیهای انجام گرفته در مورد تغییرات پارامترهای شبکه آپاتیت و جابجایی پیکها در طیفهای پراش پرتو ایکس، تائید کننده حضور منیزیم در سـاختار بلـوری β-TCP و HA بـود. بررسـی در منفی بر رشد سلولهای فیبروبلاست نداشته و میتوان نتیجه

گرفت نمونههای تهیه شده با مقدار منیزیم کمتر از ۲/۵٪ مولی، زیستسازگار میباشند. پر واضح است که تایید کامل چگونگی تاثیر یون منیزیم بر ساختار کریستالی سیستمهای چند فازی نیازمند بررسیهای دقیقتر و امکانات پیشرفتهتر می باشد. باید متذکر شد که عدم مشاهده تشکیل این فاز اکسیدی و سایر فازهای میانی در نمونههای دارای مقدار کمتر منیزیم به معنی عدم تشکیل آنها و یا در اولویت نبودن آن نسبت به جایگزنی در ساختارهای کلسیم فسفاتی نیست بلکه به احتمال فراوان ناشی از مقدار ناچیز آن نسبت به کمترین مقدار قابل تشخیص روش مورد مطالعه است. نکته دیگری که نباید از آن غافل ماند حضور مقادیر اندک منیزیم در ساختار تركيبات كلسيم فسفاتي و نتايج بدست آمده در اين تحقیق عمدتا از دیدگاه علمی و موشکافی در حوزه علم مواد در این ترکیبات سنتز شده حائز اهمیت است و حداکثر انتظار از آن برقراری نوعی ارتباط میان آنها و مینرالهای بیولوژیکی است. ایجاد پیوندهای قـوی میان منیزیم و اکسیژن و حتی ایجاد تجمعات منیزیمی درون ساختار كريستالي تركيبات كلسيم فسفاتي [۴۹،۵۰] و بویژه تشکیل ترکیبات بسیار پایدار شیمیایی مانند اکسید منیزیم (با انرژی پیوند MJ/mol ۴) این سوال را به ذهن میآورد که حضور این یون درون یک ترکیب در بیومواد چگونه میتواند در تشکیل پیوند با اجزای آلی محیط ECM همچون اسیدهای آمینه موجود در پروتئینهای محلول و پروتئینهای مستقر بر سطوح سلولی همچون اینتگرین (آلفا) نقش بازی نماید. بر این اساس و با توجـه به شرایط خاص کشور برای انجام فعالیتهای پژوهشی موارد زیر قابل توجه می باشد. بررسی حضور یون منیزیم از دیدگاه آثار علم و مهندسی بیومواد توجیه پذیر و لازم است. زیرا ارتقای کیفی محصول هم از نظر خواص عمومی ماده و هم از نقط ه نظر كارايي أن در جريان جراحي و عملكرد آن درون بدن ميتواند قابل توجه باشد. با اين حال، تئوریهای مرتبط به بهبود واکنشهای بافت و ایمپلانت در اثر حضور این یون باید مورد بررسی مجدد قرار گیرد و بر اساس آنچه گفته شد نمی توان آنرا با جرات به اثر مستقیم این یون مربوط دانست. همانگونه که ذکر شد آنچه که در منابع علمی و گزارشهای تحقیقاتی یافت

www.SID.ir

- [12] M.E. Manriquez, T. Lopez. R. Gomez, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **26**, 2003, 853.
- [13] G. Qi, S. Zhang, K.A. Khor, C. Liu, X. Zeng, W. Weng, M. Qian, *Thin Solid Films*, **516**, 2008, 5176.
- [14] G. Qi, S. Zhang, K.A. Khor, W. Weng, X. Zeng, C. Liu, *Thin Solid Films*, **516**, 2008, 5172.
- [15] A.R. Toibah, I. Sopyan, M. Hamdi, S. Ramesh, *Biomed Proceedings*, **21**, 2008, 314.
- [16] I.V. Fadeev, L.I. Shvorneva, S.M. Barinov, V.P. Orlovskii, *Inorganic Materials*, **39**, 2003, 947.
- [17] Z. Zyman, M. Tkachenk, M. Epple, M. Polyakov, M. Naboka, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech*, **37**, 2006, 474.
- [18] C. Tardei, F. Grigore, I. Pasuk, S. Stoleriu, J.
- Optoelectronics and Advanced Materials, **8**, 2006, 568.
- [19] W. Weng, L. Huang, G. Han, Appl. Organometal. Chem., 13, 1999, 555.
- [20] A. Behnamghader, N. Bagheri, B. Raissi, F. Moztarzadeh, J. Mater. Sci: Mater. Med., 19, 2008, 197.
- [21] I. Cacciotti, A. Bianco, M. Lombardi, L. Montanaro, Journal of the European Ceramic Society, **29**, 2009, 2969.
- [22] J. Ramirez-Salgado, E. Djurado, P. Fabry, *Journal of the European Ceramic Society*, **24**, 2004, 2477.
- [23] B. Lothenbach, F. Winnefeld, Cement and Concrete Research, 36, 2006, 209.
- [24] F. Kusmanto, G. Walker, Q. Gan, P. Walsh, F. Buchanan, G. Dickson, M. McCaigue, C. Maggs, M. Dring, *Chemical Engineering Journal*, **139**, 2008, 398.
- [٢۵] افسانه گوزلیان، "سنتز نانوذرات کلسیم فسفاتی حاوی منیزیم به
- روش سل- ژل و بررسی خواص آن"، پایاننامه کارشناسـی ارشـد، پژوهشـگاه مواد و انرژی، ۱۳۸۹.
- [26] A. Gozalian, A. Behnamghader, M. Daliri, A. Moshkforoush, *Scientica Iranica*, 6, 2011, 1614.
- [27] M.A. Fanovich, M.S. Castro, J.M. Porto Loa Pez, *Ceramics International*, **25**, 1999, 517.
- [28] O.L. Kubarev, S.M. Barinov, V.S. Komlev, *Doklady Chemistry*, **418**, 2008, 44.
- [29] S. Kannan, I.A. Lemos, J.H. Rocha, J.M. Ferreira, *Journal of Solid State Chemistry*, **178**, 2005, 3190.
- [30] E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, S. Sprio, *J. Eur. Ceram. Soc*, **20**, 2000, 2377.
- [31] S.N. Danilchenko, A.N. Kulik, A.N. Bugai, P.A. Pavlenko, T.G. Kalinichenko, N.V. Ulyanchich, L.F. Sukhoduba, *Journal of Applied Spectroscopy*, **72**, 2005, 899.
- [32] M.J. Lambregts, S. Frank, *Talanta*, **62**, 2004, 627.
- [33] A. Onda, S. Ogo, K. Kajiyoshi, K. Yanagisawa, *Materials Letters*, **62**, 2008, 1406.
- [34] M. Mehnaoui, G. Panczer, R. Ternane, M. Trabelsi-Ayedi, G. Boulon, *Optical Materials*, **30**, 2008, 1672.
- [35] Y. Zhu, X. Zhang, F. Long, H. Liu, M. Qian, N. He, Materials Letters 63, 2009, 1185
- Materials Letters, 63, 2009, 1185. [36] N.V. Babayevskaya, Y.N. Savvin, A.V. Tolmachev, Inorganic Materials, 43, 2007, 873.
- [37] S. Koutsopoulos, J. Biomed. Mater. Res., 62, 2002, 600.
- [38] Z.Y. Li, W.M. Lam, C. Yang, B. Xu, G.X. Ni, S.A. Abbah, K.M. Cheung, K.D. Luk, W.W. Lu, *Biomaterials*, 28, 2007, 1452.
- [39] S. Kannan, J.M. Ventura, J.M. Ferreira, *Ceramics International*, **33**, 2007, 637.
- [40] L. Obadia, T. Rouillon, B. Bujoli, G. Daculsi, J.M.
- Bouler, J. Biomed. Mater. Res.: Appl. Biomater. B, 80, 2007, 32. [41] D.M. Liu, Q. Yang, T. Troczynski, W.J. Tseng,
- Biomaterials, 23, 2002, 1679.
- [42] R.M. Wilson, J.C. Elliott, S.E. Dowker, L.M. Rodriguez-Lorenzo, *Biomaterials*, **26**, 2005, 1317.
- [43] Y.Z. Wan, Y. Huang, F. He, Y.L. Wang, Z.G. Zhao, H.F.
- Ding, Surface & Coatings Technology, **201**, 2006, 2904. [44] Z. Yang, Y. Jiang, L.X. Yu, B. Wen, F. Li, S. Suna, T.
- Hou, Journal of Materials Chemistry, 15, 2005, 1807.
- [45] R.Z. Legeros, Zeitschrift fur Kardiologie, 90, 2001, 116.
- [46] K. Salma, N. Borodajenko, A. Plata, L. Berzina-Cimdina,

- می شود بهبود واکنش های بافت و ایمیلنت از طریق تاثیر این یون بر سایر عوامل واسطهای از جمله ایجاد فازهای زیست فعال، تشکیل ترکیبات بیولوژیکی فعال شدہ با جزء معدنی، تغییر رفتار الکتروشیمیایی و غیره میباشد. بر این اساس به نظر می رسد که نقش این یون در بازسازی بافت آسیب دیده در رقابت با سایر مسیرهای بیولوژیکی جـذب این یون از برتری خاصی برخوردار نیست. از اینرو افزودن آن به این منظور چندان توجیه پذیر نیست. فراموش نکنیم که اصولا چنین هدفی نیز برای این امر، در مهندسی بافت پیش بینی نشدہ است ولے اغلب مشاہدہ می گردد کہ محققین محترم از این امر غافل ماندهاند. با این حال نباید نقش کاتالیزوری و برانگیختگی این یون در واکنشهای بیولوژیکی را از نظر دور داشت، هر چند که این مورد توسط عوامل بيولوژيكي مانند هورمونهاي تنظيم كننده سطح يونها بطور طبيعي تحت كنترل است و تغييرات غیرطبیعی آن نیـز از طـرق دیگـری غیـر از افـزودن یـون منبزيم به يبومواد قابل تنظيم مجدد مي باشد.
 - سپاسگزاری

محققین از همکاری آزمایشگاههای مختلف پژوهشگاه مواد و انرژی و نیز پژوهشگاه ژنتیک و زیستفناوری کمال تشکر را دارند.

مراجع

- [1] I. Bianco, A. Cacciotti, M. Lombardi, L. Montanaro, *Materials Research Bulletin*, **44**, 2009, 345.
- [2] G. Qi, S. Zhang, K.A. Khor, S.W. Lye, X. Zeng, W. Weng, C. Liu, S.S. Venkatraman, L.L. Ma, *Applied Surface Science*, **255**, 2008, 304.
- [3] R.K. Rude, H.E. Gruber, L.Y. Wei, A. Frausto, B.G. Mills, *Calcif Tissue Int*, **72**, 2003, 32.
- [4] W.L. Suchanek, K. Byrappa, P. Shuk, R.E. Riman, *Biomaterials*, **25**, 2004, 4647.
- [5] S. Kannan, A.F. Lemos, J.H. Rocha, J.M. Ferreira, *J. Am. Ceram. Soc*, **89**, 2006, 2757.
- [6] Y. Liu, J. Lim, S. Teoh, *Biotechnology Advances*, **31**, 2013, 688.
- [7] M.C. Kao, C.M. Wang, M.S. Lee, H.Z. Chen, Y.C. Chen, *Appl. Phys. A*, **78**, 2004, 705.
- [8] T. Chartier, L. Lostec, C. Gault, C. Chatillon, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **23**, 2002, 27.
- [9] V.M. Khot, A.B. Salunkhe, M.R. Phadatare, S.H. Pawar, *Materials Chemistry and Physics*, **132**, 2012, 782.
- [10] A. Douy, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 24, 2002, 221.
- [11] M.C. Kao, S.Y. Lee, H.Z. Chen, S.L. Young, *Thin Solid Films*, **516**, 2008, 8441.



[49] D. Laurencin, N. Almora-Barrios, N.H. de Leeuw, C. Gervais, C. Bonhomme, F. Mauri, W. Chrzanowski, J.C. Knowles, R.J. Newport, A. Wong, Z. Gan, M.E. Smith, *Biomaterials*, **32**, 2011, 1826.

[50] N. Ohtsu, S. Hiromoto, M. Yamane, K. Satoh, M. Tomozawa, *Surface and Coatings Technology*, **218**, 2013, 114.

A. Stunda, Springer-Verlag Berlin Heidelberg Proceedings, 20, 2008, 68.

[47] L. Bertinetti, A. Tampieri, E. Landi, G. Martra, *Journal of the European Ceramic Society*, **26**, 2006: 987.

[48] N.V. Kitikova, I.L. Shashkova, Y.G. Zonov, O.A. Sycheva, A.I. Ratko, *Inorganic Materials*, **43**, 2007, 1119.