DOI: 10.22041/ijbme.2004.13515

Synthesis of Amorphous Calcium Phosphate and Its Solubility Behavior in Simulated Osteoclastic Activity Conditions

A. S. Mesgar[1*], Z. Mohammadi[2]

[1]**Bioceramics Lab, Department of Biomedical Engineering, AmirKabir University of Technology**
[2]**School of Mechanical Engineering, Iran University of Science & Technology**

Received 4 January 2003; received in revised form 5 August 2004; accepted 25 October 2004

Abstract

The conditions for synthesis of amorphous calcium phosphates (ACPs) according to the crystallization principles were described. By selecting reaction parameters correctly (low temperature, high pH, immediate removing of water and using solutions containing calcium cations and phosphate anions at low concentrations), full ACPs can be reproducibly synthesized. The X-ray diffraction patterns of synthesized amorphous specimens were showed a characteristic broad peak. The Ca/P ratio of the resulting precipitates was weakly dependent on the initial Ca/P ratio. Solubility of synthesized specimens in simulated osteoclastic activity conditions was showed that the rate of dissolution would be decreased with increasing crystallinity level. The synthesized amorphous calcium phosphates showed the highest dissolution rate in the simulated solution, and can be a suitable candidate for using in the field of hard tissue engineering applications.

Keywords: Amorphous calcium phosphates; Calcium phosphate cement; Hard tissue engineering; Solubility; Osteoclastic activity; Synthesis of amorphous materials

[*]**Corresponding author**
Address: *Bioceramics Lab, Department of Biomedical Engineering, AmirKabir University of Technology, Hafez St., Tehran, I.R.Iran*
Tel & Fax: *+9821 6495655*
E-mail: *asmesgar@yahoo.com*

DOI: 10.22041/ijbme.2004.13515

سنتز کلسیم فسفات آمورف و بررسی انحلال پذیری در محیط شبیه سازی شده آکتیویته استئوکلاستی

عبدالرضا شیخ مهدی مسگر[۱*]، زهرا محمدی[۲]

[۱]دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی
[۲]دانشگاه علم و صنعت ایران، دانشکده مکانیک

تاریخ ثبت اولیه: ۸۲/۱۰/۱۵، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۸۳/۵/۱۵، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۸۳/۸/۴

چکیده

در این مقاله، شرایط سنتز تکرارپذیر کلسیم فسفات آمورف با رعایت مبانی کریستالیزاسیون تشریح گردیده است. دمای پایین، **pH** بالا، خروج فوری آب و استفاده از محلولهای حاوی کاتیون کلسیم و آنیون فسفات با غلظت مشخص، از جمله شرایط دستیابی به فاز کاملاً آمورف کلسیم فسفات به شمار می رود. الگوی پراش اشعه ایکس نمونه های آمورف تهیه شده نشانگر حضور یک تک پیک پهن مشخصة مواد آمورف است. با افزایش نسبت **Ca/P** در محلول، مقدار این نسبت در محصول افزایش می یابد هر چند که آهنگ افزایش این تغییر نسبت در محصول، در مقایسه با محلول به مراتب کمتر است. بررسی انحلال پذیری کلسیم فسفاتهای سنتز شده در محیط شبیه سازی شده آکتیویته استئوکلاستی حاکی از آن است که کلسیم فسفات آمورف از انحلال پذیری بالایی برخوردار است. با افزایش بلورینگی، میزان انحلال در نمونه های متبلور کاهش می یابد. به کارگیری کلسیم فسفاتهای آمورف سنتز شده می تواند به تنهایی یا همراه با سایر کلسیم فسفاتهای بلورین به شکل سیمان، پاسخ مناسبی به چالش سرعت جذب کم بیومواد در حوزه مهندسی بافت سخت باشد.

واژه های کلیدی: کلسیم فسفات آمورف؛ مهندسی بافت سخت؛ انحلال پذیری؛ آکتیویته استئوکلاستی؛ سنتز مواد آمورف؛ سیمان کلسیم فسفات

*عهده دار مکاتبات
نشانی: دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، آزمایشگاه بیوسرامیک
تلفن: ۶۴۵۴۲۴۹۳ – ۰۲۱، دورنگار: ۶۴۹۵۶۵۵ – ۰۲۱، پیام نگار: asmesgar@yahoo.com

۱- مقدمه

در بین بیومواد گوناگونی که در حوزه گرافت استخوانی مورد تحقیق قرار می گیرند، کلسیم فسفاتها به دلیل برخورداری از ویژگی زیست سازگاری از اهمیت فوق العاده ای برخوردارند به طوری که در سالهای اخیر، تلاشهای پژوهشگران در راستای تهیه بیومواد کلسیم فسفاتی به شکلهای مختلف همچون سرامیک یا سیستم سیمان متمرکز گردیده است [۲،۱]. استفاده از اتوگرافت (پیوند از استخوان بدن خود بیمار) یا در واقع "استاندارد طلایی گرافت" صرف نظر از نتایج کلینیکی فوق العاده عالی، همواره با محدودیتهایی همچون مقادیر محدود و نیاز به عمل جراحی مجدد روبرو بوده است [۳].

کلسیم فسفاتهای سنتزی به دلیل برخورداری از ویژگیهای زیست سازگاری، عدم سمیت، عدم پاسخ ایمونولوژیک یا تحریک زایی می توانند مواد مناسبی جهت جایگزینی بافت سخت باشند [۴]. در این راستا، انواع کلسیم فسفاتها مانند هیدروکسی آپاتیت، بتا تری کلسیم فسفات، کلسیم فسفاتهای دوفازی یا سیمان توسعه یافته اند. حاصل پژوهشهای انجام شده حاکی از آن است که سرعت جذب این مواد در بافت سخت، پایین بوده در حالی که مینرال استخوان از انحلال-پذیری بالایی برخوردار است [۶،۵]. این ویژگی مینرال استخوان به ترکیب و ساختار کریستالی آن نسبت داده می شود. در حقیقت مینرال استخوان که معروف به "آپاتیت بیولوژیکی" است، می تواند به عنوان نوعی هیدروکسی آپاتیت غیراستوکیومتری با بلورینگی ضعیف و اندازه نانومتری در نظر گرفته شود. چنین خصوصیاتی سبب می گردد تا استئوکلاستها بتوانند به سهولت عمل جذب را انجام دهند [۷].

اعتقاد بر این است در هنگام تشکیل استخوان در شرایط *in vivo*، اولین فاز ایجاد شده کلسیم فسفات آمورف است. این فاز غیربلوری دارای ماهیت ناپایدار بوده و در اثر استحاله به آپاتیت بیولوژیکی تبدیل می گردد. در نتیجه می توان مینرال استخوان را مخلوطی از"هیدروکسی آپاتیت غیراستوکیومتری با بلورینگی ضعیف" و کلسیم فسفات آمورف در نظر گرفت [۸].

در سالهای اخیر توجه ویژه ای نسبت به شناخت ویژگیهای کلسیم فسفات آمورف معطوف گشته است تا از این طریق بتوان از چنین فاز جالب توجهی از کلسیم فسفاتها به طور منفرد و/ یا همراه با سایر کلسیم فسفاتها مثلاً در سیستم سیمانها به عنوان ماده جایگزین استخوان در حوزه مهندسی بافت سخت استفاده نمود [۹].

سنتز کلسیم فسفات آمورف، به دلیل ماهیت ناپایدار همواره با چالش روبرو بوده است. در این تحقیق تلاش گردیده تا علاوه بر سنتز این ماده به طور تکرارپذیر، عوامل مؤثر بر فرآیند سنتز و همچنین ویژگی انحلال پذیری آن در محیط شبیه سازی شده آکتیویته استئوکلاستی در مقایسه با هیدروکسی آپاتیت کاملاً بلوری و نوع رسوب داده شده مورد بررسی قرار گیرد.

۲- مواد و روش بررسی

به منظور تهیه کلسیم فسفات آمورف از ترکیبهای کلسیمی و فسفاتی حل شونده در آب استفاده گردید. نیترات کلسیم و دی سدیم هیدروژن فسفات به ترتیب به عنوان مواد واردکننده کلسیم و فسفات به کار برده شد. درجه خلوص ترکیبهای مورد استفاده، analytical grade بود. "هیدروکسی آپاتیت رسوبی" با استفاده از نیترات کلسیم و آمونیوم دی هیدروژن فسفات تهیه گردید. برای دستیابی به pH بالا از محلول هیدروکسید سدیم (برای کلسیم فسفات آمورف) و آمونیاک (برای هیدروکسی آپاتیت رسوبی) استفاده شد.

روند تهیه کلسیم فسفات آمورف بدین قرار است: ابتدا دو محلول کلسیمی و فسفاتی با توجه به نسبت مولی Ca/P و غلظت $[PO_4]^{3-}$ با استفاده از آب یون زدا شده تهیه گردید و در یخچال در دمای ۳ °C نگهداری شد. پس از رساندن pH محلول فسفاتی به ۱۰/۵، با افزودن محلول هیدروکسید سدیم، محلول کلسیمی به داخل ظرف حاوی محلول فسفاتی ریخته شد و بلافاصله عمل فیلتراسیون توسط پمپ خلاء (مدل Rugger Vaccum Pump, Reax 2000) و قیف بوخنر در فشار ۶۰ cmHg انجام پذیرفت. به منظور

جلوگیری از کریستالیزاسیون احتمالی، پس از شستشو با آب، ماده روی فیلتر در اتانول غوطه ور گردید. جهت خروج آب و الکل باقیمانده از سیستم تغلیظ کننده تحت خلاء (مدلEppendorf Concentrator 5301) در دمای ۴۵ °C به مدت ۰/۵ ساعت استفاده شد. سپس ماده حاصله در فریزر ۸۰°C- (مخصوص نگهداری مواد بیولوژیکی) نگهداری گردید و نهایتاً عمل خشک کردن انجمادی در دمای ۴۰ °C- و در فشار $۲ * ۱۰^{-۲}$ Torr توسط خشک کن انجمادی مدل EDWARDS، به مدت ۸ ساعت صورت پذیرفت. در جدولهای ۱ و۲، پارامترهای ثابت و متغیر در نظر گرفته شده برای سنتز کلسیم فسفات آمورف مشاهده می شود. انواع نمونه های سنتز شده در جدول ۳ ارائه شده است.

برای تهیه "هیدروکسی آپاتیت رسوبی"، ابتدا دو محلول کلسیمی و فسفاتی با توجه به نسبت مولی Ca/P برابر ۱/۶۷ با استفاده از آب یون زدا شده تهیه گردید و pH محلولها با افزودن آمونیاک به ۱۰/۵ رسانده شد. سپس محلول فسفاتی به آرامی در حین کنترل pH ۱۰/۵ داخل ظرف حاوی محلول کلسیمی ریخته شد. این عمل در دمای مداوم ۶۰ °C همراه با همزدن محلول کار به کمک همزن مغناطیسی صورت گرفت. پس از اتمام اختلاط، محلول کار در دمای ۴۰ °C به مدت ۲ روز نگهداری شد و سپس با فیلتر کردن محلول حاصله، پودر باقیمانده در خشک کن ۱۱۰ °C خشک گردید.

به منظور مقایسه نتایج، پودر تجاری هیدروکسی آپاتیت با بلورینگی بالا (Biotal, CAPTAL 60®) ساخت شرکت Plasma Biotal Limited, England مورد استفاده قرار گرفت.

جهت اندازه گیری نسبت کلسیم به فسفر در محصول از سیستم ICP-AES[1]، مدل ARL 3410, Switzerland استفاده شد.

بررسی ویژگی آمورف بودن نمونه ها توسط دستگاه پراش اشعه ایکس (XRD)، مدل PW 1410 و PW 3710 صورت گرفت. با توجه به مشخص بودن نوع ماده مورد بررسی، از آنجایی که اساساً تشخیص حضور احتمالی هیدروکسی آپاتیت مورد نظر بود لذا آزمایش پراش اشعه به ایکس صرفاً در زوایای حضور پیکهای اصلی هیدروکسی آپاتیت انجام شد.

جدول ۱- پارامترهای ثابت فرآیند سنتز

درجه حرارت °C	pH	مقدار محلول حاصل از اختلاط جهت فیلتراسیون ml	زمان نگهداری پس از اختلاط
۳	۱۰/۵	۵۰	۰

جدول ۲- پارامترهای متغیر فرآیند سنتز

$[PO_4]^{3-}$ mol /l	Ca /P در محلول
۰/۰۵	۱/۶۷
۰/۱	۱/۵
	۱

جدول ۳- نمونه های سنتز شده

نمونه	Ca/P	$[PO_4]^{3-}$ mol /l	T (°C)
A_1	۱/۶۷	۰/۰۵	۳
A_2	۱/۶۷	۰/۱	۳
A_3	۱/۵	۰/۰۵	۳
A_4	۱/۵	۰/۱	۳
A_5	۱	۰/۰۵	۳
A_6	۱	۰/۱	۳
A_7	۱	۰/۰۵	۹

به منظور بررسی انحلال پذیری در شرایط آکتیویته استئوکلاستی از محیط آبی با pH ۴/۴ استفاده گردید. سه گروه آزمایش در دوره های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت صورت پذیرفت. pH در فواصل زمانی ۸ ساعتی به کمک محلول اسیدی (محلول اسید نیتریک) و توسط pH متر(مدلHANNA Instruments, pH 211 Microprocessor) تنظیم شد. اندازه ذرات نمونه های مورد بررسی در محدوده ۲۱۲-۷۵ میکرومتر قرار داشت (عبور کرده از الک با مش ۷۰ و باقی مانده روی الک با مش ۲۰۰). مقدار یک گرم از نمونه در ۱۰۰ میلی لیتر محلول با pH ۴/۴ قرار داده شد و پس از گذشت زمان لازم در دمای ۳۷ °C، تغییر وزن ثبت گردید.

[1]Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry

۳- بحث

به طور کلی تشکیل یک ماده جامد می تواند به صورت دو فرآیند رسوب از محلول (تشکیل یک فاز جامد) و کریستالیزاسیون جامد تشکیل شده (ایجاد نظم برد بلند) در نظر گرفته شود [۱۰]. در خصوص ایجاد رسوب از محلولهای آبی حاوی کاتیون کلسیم و آنیون فسفات این دو مرحله را می توان به صورت روابط ۱ و ۲ نشان داد:

$$x\,Ca^{2+}_{(aq)} + y\,PO_4^{3-}_{(aq)} \rightarrow [Ca_x(PO_4)_y][H_2O]_{n\,(Amorphous)} \quad (۱)$$

$$[Ca_x(PO_4)_y][H_2O]_{n\,(Amorphous)} \rightarrow [Ca_x(PO_4)_y][H_2O]_{n\,(Crystalline)} \quad (۲)$$

خواص محصول از طریق نسبت سرعت این دو فرآیند تعیین می شود. این نسبت با تغییر سه عامل "درجه فوق اشباع"، زمان متوسط کریستالیزاسیون و دما قابل تنظیم است. تغییر درجه فوق اشباع به عواملی همچون غلظت محلولهای اولیه کلسیم و فسفات، pH و همزدن وابسته است.

در سیستم کلسیم و فسفات، تاکنون شرایط تشکیل فاز آمورف در مقایسه با سایر فازهای بلورین کلسیم فسفاتها، بخوبی تشریح نشده است. ماهیت ناپایدار این فاز و عدم امکان تثبیت در شرایط مرسوم مورد استفاده در سنتز سایر کلسیم فسفاتها و همچنین ویژگی ساختاری خاص آن سبب گردیده است اطلاعات محدودی در خصوص کلسیم فسفات آمورف در دسترس باشد.

گزارشهای برخی از پژوهشگران مؤید آن است که در هنگام تهیه کلسیم ارتوفسفاتها از طریق رسوب دهی از محلولهای آبی کلسیم و فسفات در pH بیشتر از ۸/۵، اولین فاز جامد از ویژگی آمورف بودن برخوردار است [۸]. بر این اساس و همچنین بر مبنای اصول کریستالیزاسیون در محلولها می توان نتیجه گرفت به منظور سنتز کلسیم فسفات آمورف باید شرایطی همچون استفاده از محلولهای بسیار رقیق کلسیم و فسفات، pH بالا، دمای پایین، زمان کریستالیزاسیون تا حد ممکن کوتاه و خروج فوری آب، به شیوه ای غیر از تبخیر معمولی در حین سنتز، رعایت گردد.

در سال ۲۰۰۲، نتایج سنتز پیوسته (مداوم) کلسیم فسفات کربناتی آمورف منتشر شده است [۱۰]، هر چند که در این گزارش, صرفاً از یک نسبت مولی مشخص Ca/P و غلظت معین محلولهای کلسیم و فسفات استفاده شده است. از جمله شرایط به کار رفته می توان به دمای پایین، pH بالا و دوره زمانی کوتاه اختلاط دو محلول حاوی کلسیم و فسفات تا هنگام خروج آب از طریق فیلتراسیون اشاره نمود [۱۰].

در مقاله حاضر دما، pH، مقدار محلول مورد استفاده جهت فیلتراسیون و زمان نگهداری پس از اختلاط به عنوان پارامترهای ثابت فرآیند سنتز معرفی شده اند (جدول ۱). از آنجایی که تاکنون تأثیر غلظت کلسیم و فسفات در محلولها و همچنین نسبت Ca/P بر سنتز کلسیم فسفات آمورف مورد بررسی قرار نگرفته است لذا در این مقاله دو عامل فوق به عنوان پارامتر متغیر منظور شده اند (جدول ۲).

انجام غوطه وری در الکل و تغلیظ کردن محلول در خلاء و نهایتاً خشک کردن انجمادی اساساً به منظور جلوگیری از کریستالیزاسیون از طریق حذف آب در دمای کمتر از ۱۰۰ °C اتخاذ شده است. این سلسله فعالیتها سبب خواهد شد تا شرایط بهینه و قابل تکراری برای بدست آوردن فاز آمورف حاصل شود.

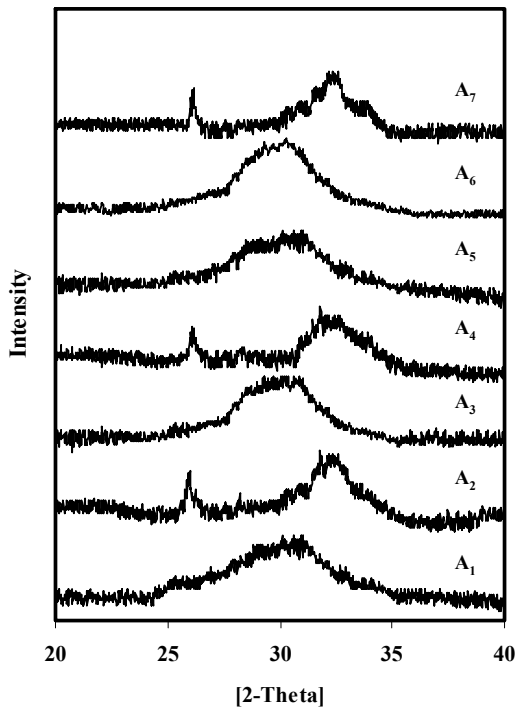
همانطور که در جدول ۳ مشاهده می شود تفاوت نمونه های سنتز شده A_1 تا A_6 در دو پارامتر نسبت مولی Ca/P و غلظت فسفات می باشد. نمونه A_7 به منظور بررسی تأثیر افزایش دما بر محصول، سنتز گردیده است. جهت سنتز کلسیم فسفات آمورف از حجمهای مساوی دو محلول کلسیمی و فسفاتی استفاده شد. بنابر این در هر یک از نمونه های مورد بررسی، با در نظر گرفتن مقدار $[PO_4]^{3-}$ در محلول فسفاتی می توان با توجه به نسبت کلسیم به فسفر مورد نظر، مقدار مول بر لیتر کلسیم را بدست آورد. شایان ذکر است به دلیل غلظت پایین محلولهای کلسیمی و فسفاتی، انجام سنتز همواره با کسب مقادیر بسیار محدودی از محصول همراه بود که سبب می شد تا جهت دستیابی به مقدار کافی محصول، کل فرآیند چندین بار تکرار شود. بر این اساس اذعان می گردد سنتز کلسیم فسفات آمورف،

کاری وقت گیر و نیازمند کنترل شدید پارامترهای مؤثر می باشد.

در حال حاضر، ساده ترین راه تشخیص وجود ماده آمورف، پراش اشعه ایکس است. به طور کلی، الگوي پراش مواد کریستالین متشکل از تعدادی پیکهای مشخص است. با مروری بر منابع و همچنین الگوی پراش اشعه ایکس نمونه هیدروکسی آپاتیت کاملاً بلوری می توان نتیجه گرفت که سه پیک اصلی این ماده در شرایط انتخابی برای دستگاه اشعه ایکس در محدوده ۲۰-۴۰ درجه قرار دارند. این سه پیک به ترتیب مربوط به انعکاسهای ۲۱۱، ۱۱۲ و ۰۰۲ می باشد [۱۱].

از سوی دیگر، به طور کلی مواد آمورف در الگوی پراش اشعه ایکس از خود الگویی به شکل تک پیک پهن نشان می دهند [۱۲]. در نتیجه راه شناخت حضور کلسیم فسفات آمورف، دستیابی به تک پیک پهن در الگوی پراش اشعه ایکس حاصله می باشد. در شکل ۱، الگوی پراش اشعه ایکس نمونه های سنتز شده مشاهده می گردد. ملاحظه می شود در نمونه های A_1، A_3، A_5 و A_6 تنها یک پیک بسیار پهن قابل رؤیت است که نشان دهنده آمورف بودن ماده می باشد. حضور دو پیک در نمونه های سنتز شده A_2، A_4 و A_7 مؤید تشکیل فاز کریستالین است هر چند که به نظر می رسد پهن شدگی پیکها حاکی از اندازه بسیار کم کریستالها است به این معنی که کریستالهای حاصله در حد نانومتر هستند [۱۴،۱۳]. شایان توجه است بحث پهن شدگی خطوط در پراش اشعه ایکس از جمله راههای تشخیص مواد نانومتری به شمار می رود.

به طور کلی، حضور این دو پیک در الگوی پراش اشعه ایکس محصول در محدوده زوایای پیکهای اصلی هیدروکسی آپاتیت قرار دارد. بنابراین می توان نتیجه گرفت نمونه های A_2، A_4 و A_7 از هیدروکسی آپاتیت با اندازه کریستال در حد نانومتری تشکیل گردیده اند. به منظور مقایسه، الگوی پراش اشعه ایکس دو نمونه هیدروکسی آپاتیت رسوبی سنتز شده و هیدروکسی آپاتیت کاملاً بلوری (شکلهای ۲ و ۳) نشان می دهد پهن شدگی پیکها در نمونه



شکل ۱- الگوی پراش اشعه ایکس نمونه های سنتز شده

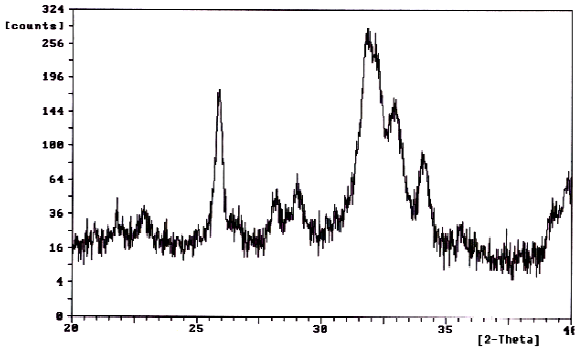
سنتز شده بیشتر از نمونه کاملاً بلوری است و ملاحظه می گردد به غیر از نمونه A_6 که در آن نسبت کلسیم به فسفر برابر یک است در سایر نمونه ها، هنگامی که غلظت فسفات برابر ۰/۱ باشد، محصول کاملاً آمورف نخواهد بود.

جهت پاسخ به این سؤال که آیا نسبت کلسیم به فسفر در محلول حاصل از اختلاط، ارتباط مستقیمی با همین نسبت در محصول دارد، نسبت کلسیم به فسفر در محصول اندازه-گیری شد (شکل ۴). همانطور که از این شکل مستفاد می شود با کاهش نسبت کلسیم به فسفر در محلول حاصل از اختلاط، این نسبت در محصول نیز کاهش می یابد هر چند که میزان این کاهش در محصول، در مقایسه با محلول حاصل از اختلاط به مراتب کمتر است، به عنوان مثال در نمونه های A_1 و A_3، کاهش ۲% در نسبت کلسیم به فسفر محلول حاصل از اختلاط با کاهش ۱۰% این نسبت در محصول همراه خواهد بود. این مسئله به این معنی است که در شرایط انتخاب شده برای سنتز (دما و pH) نسبت کلسیم به فسفر محصول همواره در حد کمتر از ۱/۵ خواهد بود. از سوی دیگر، دو مقدار در نظر گرفته شده برای فسفات (۰/۰۵ و ۰/۱) اساساً به منظور پاسخ به این سؤال بود که اگر غلظت

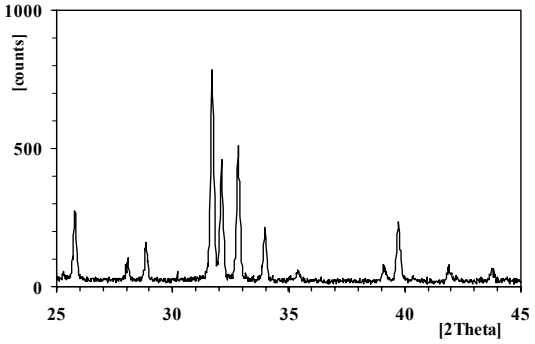
محلولها افزایش یابد (برای دستیابی به مقدار بیشتری محصول) آیا ویژگی های محصول دچار تغییر خواهد شد یا نه. غلظت ۰/۰۵ به عنوان حد پایین در نظر گرفته شده است یعنی اگر غلظت در کمتر از این مقدار انتخاب شود بر اساس نتایج بدست آمده و شرایط انتخابی، محصول حتماً آمورف خواهد بود. از آنجایی که نسبت کلسیم به فسفر در محصول برای نمونه های مورد بررسی تغییر قابل ملاحظه ای نمی کند لذا علت اختلاف در نوع فازی نمونه ها را صرفاً می توان در غلظت محلولهای اولیه جستجو کرد. بررسی ها نشان می دهد غلظت mol/l ۰/۱، حد بالایی است به این معنی که اگر غلظت فسفات بیشتر از این مقدار انتخاب شود محصول حتماً غیرآمورف خواهد بود.

خصیصه جالب توجه نمونه A_6 در این است که حتی در غلظت ۰/۱، محصول از ویژگی آمورف بودن برخوردار می باشد. این موضوع بدین علت است که چون نسبت کلسیم به فسفر در محصول با تغییر این نسبت در محلول تغییر چندانی نمی کند لذا در نمونه A_6 در حقیقت از ابتدا، غلظت کلسیم موجود در محلول کمتر از نمونه های دیگر بوده است. بنابراین، هر چه نسبت کلسیم به فسفر در محلول کمتر انتخاب شود امکان استفاده از محلولهای غلیظ تر وجود خواهد داشت هر چند که در نهایت میزان محصول بدست آمده تغییری نخواهد کرد. بنابراین در هنگام سنتز کلسیم فسفات آمورف صرفاً انتخاب نسبت کلسیم به فسفر نمی تواند منجر به محصول آمورف شود. این نسبت باید با در نظر گرفتن غلظت محلولهای اولیه ارائه گردد. رفتار فوق ناشی از آن است که در نمونه A_6 نسبت کلسیم به فسفر برابر ۱/۴۰۱ است در نتیجه باید ۰/۱ مول بر لیتر کلسیم با ۱/۴۰۱ : ۰/۱ مول بر لیتر فسفات وارد واکنش شود. در این صورت غلظت فسفات برابر ۰/۰۷ خواهد بود که در مقایسه با سایر نمونه ها کمتر از ۰/۱ است.

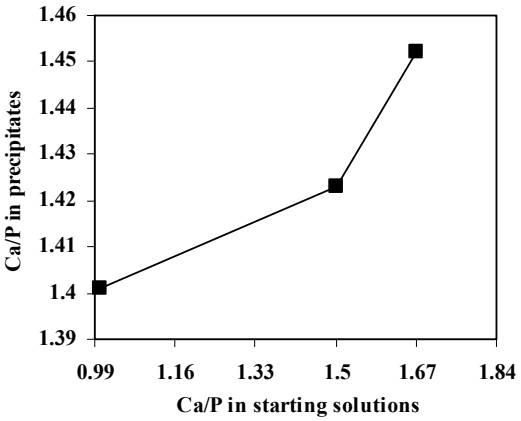
Kanzaki و همکاران پیشنهاد کرده اند نسبت کلسیم به فسفر کلسیم فسفات آمورف در محدوده ۰/۰۵ ± ۱/۴۵ قرار دارد [۱۵]. این ماده از کلاسترهای $Ca_9(PO_4)_6$ تقریباً کروی معروف به "کلاستر پوزنر"[۲] فشرده شده به هم تشکیل گردیده



شکل ۲- الگوی پراش اشعه ایکس هیدروکسی آپاتیت سنتز شده (عملیات حرارتی نشده)



شکل ۳- الگوی پراش اشعه ایکس هیدروکسی آپاتیت کاملاً بلوری (عملیات حرارتی شده)



شکل ۴- ارتباط بین نسبت مولی Ca/P در محلول اولیه و همین نسبت در محصول (رسوب)

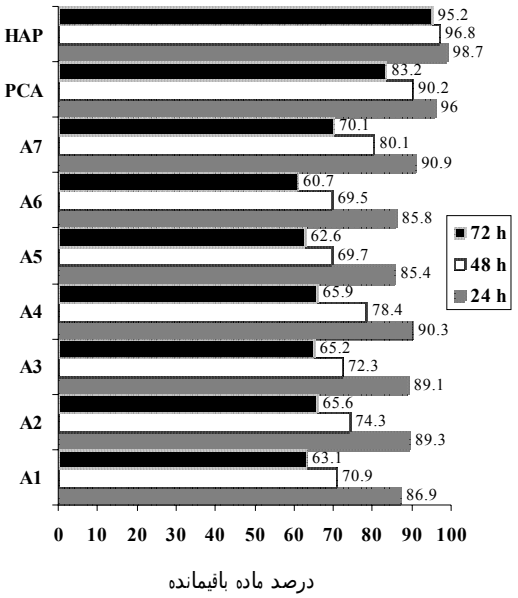
که در بین فضاهای خالی آن آب وجود دارد. البته این مدل ساختاری صرفاً از تابع توزیع شعاعی اشعه ایکس بدست آمده است. از آنجایی که به دلیل ماهیت ساختاری کلسیم فسفات آمورف، شناسایی ساختار آن در آینده ای نزدیک قابل انجام نیست لذا برخی از پژوهشگران جهت پاسخ به

[2]Posners cluster

این مهم از شیوه های نظری بهره گرفته اند. به عنوان مثال، روشهای *ab initio* (بر مبنای شیمی کوانتوم) به کار برده شده است [۱۵]. حاصل چنین فعالیتهایی ارائه این نظریه بوده است که کلسیم فسفات آمورف را می توان با فرمول $[Ca_3(PO_4)_2]_n [H_2O]_m$ فرض نمود. در واقع کلسیم فسفات آمورف از مجموعه های تجمع یافته ای از انواع کلاسترها با n مختلف تشکیل شده است. به ادعای این محققین [۱۵]، محاسبه انرژی چنین مجموعه های تجمع یافته ای از انواع کلاسترها با توجه به امکانات موجود رایانه ای به ۲۰ سال زمان نیاز دارد. البته این سؤال همچنان باقی است که آیا این مجموعه های تجمع یافته توسط عوامل مؤثر بر سنتز تحت تأثیر قرار می گیرند و آیا کلسیم فسفاتهای آمورف با نسبت معین کلسیم به فسفر می توانند دارای ساختار کلاستری متفاوتی باشند یا نه.

نمونه A_7 به منظور بررسی یکی از عوامل مهم در بحث سنتز مطرح گردید. تفاوت دو نمونه A_6 و A_7 صرفاً در دمای سنتز است. الگوی پراش اشعه ایکس نمونه A_7 حاکی از آن است که در دمای ۹ °C حتی نمونه A_7 دچار کریستالیزاسیون خواهد شد لذا حفظ دمای پایین از جمله عوامل مهم سنتز شناخته می شود.

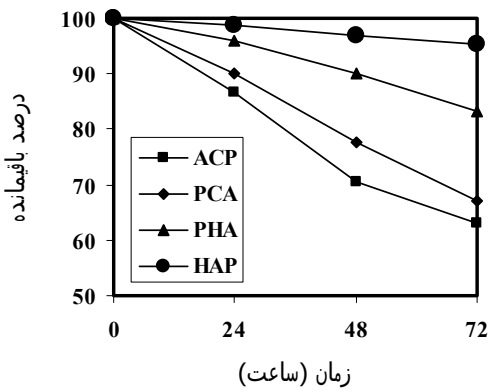
به منظور بررسی انحلال پذیری نمونه ها از محیط شبیه سازی شده آکتیویته استئوکلاستی استفاده شد. استئوکلاستها، سلولهای چندهسته ای هستند که وظیفه جذب بافت مینرالیزه شده را به عهده دارند. این سلولها با قطر ۵۰ تا ۱۰۰ میکرومتر عمل جذب را از طریق ایجاد منطقه ای با pH ۴-۵ انجام می دهند [۱۶]. در نتیجه، به منظور بررسی انحلال پذیری و تخریب کلسیم فسفاتها در محیط شبیه سازی شده آکتیویته استئوکلاستی می توان از محلولهای با pH ۴-۵ در شرایط بیولوژیکی ۳۷ °C استفاده نمود. برای انجام این آزمایش، سه گروه آزمون در نظر گرفته شد که هر یک به صورت مجزا صورت پذیرفت. این سه گروه آزمون در دوره زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. درصد تغییر وزن ماده پس از طی زمان مربوطه در شرایط در نظر گرفته شده به عنوان شاخص انحلال پذیری انتخاب گردید.



شکل ۵- انحلال پذیری نمونه های سنتز شده در محیط شبیه سازی شده آکتیویته استئوکلاستی
(PCA: هیدروکسی آپاتیت سنتز شده، HAP: هیدروکسی آپاتیت کاملاً بلوری)

تمام نمونه ها از محدوده اندازه ذرات یکسانی برخوردار بودند. به دلیل محدودیت دستگاهی، امکان بررسی در شرایط کاملاً دینامیک وجود نداشت. از آنجایی که با انحلال کلسیم فسفاتها، pH محلول از مقدار۴/۴ بیشتر می شود در نتیجه باید مجدداً pH به مقدار ۴/۴ رسانده شود (با افزودن محلول اسیدی). در این بررسی این کار در هر ۸ ساعت انجام شد. در شکل ۵، نتایج درصد تغییر وزن کلسیم فسفاتهای سنتز شده و همچنین دو نوع هیدروکسی آپاتیت در زمانهای مختلف ارائه شده است. ملاحظه می گردد نمونه های کاملاً آمورف کلسیم فسفات از انحلال پذیری بسیار بالایی برخوردارند. این انحلال پذیری با افزایش بلورینگی کاهش می یابد. بر این اساس کلسیم فسفات آمورف بسیار واکنش-پذیر خواهد بود. در نتیجه همانطور که ملاحظه می شود پس از گذشت ۷۲ ساعت، حدود۴۰% کلسیم فسفات آمورف در محیط pH ۴-۵ حل خواهد شد و این در حالی است که در مورد هیدروکسی آپاتیت بلوری میزان انحلال پذیری فقط ۴% است. از سوی دیگر، در انواع کلسیم فسفات با بلورینگی

ضعیف میزان انحلال پذیری در حدود ۳۰% است. در حقیقت این نوع کلسیم فسفات تقریباً شبیه به کلسیم فسفاتی است که در بافت سخت به عنوان مینرال وجود دارد.



شکل ۶- مقایسه انحلال پذیری نمونه های آمورف و بلورین (با میزان بلورینگی متفاوت) در pH ۴/۴
(ACP: کلسیم فسفاتهای آمورف، PCA: هیدروکسی آپاتیت با بلورینگی ضعیف، PHA: هیدروکسی آپاتیت رسوب داده شده، HAP: هیدروکسی آپاتیت با بلورینگی بالا (تجاری))

به منظور مقایسه، در شکل ۶ نتایج تغییر وزن نمونه ها پس از قرارگیري در محیط شبیه سازی شده در زمانهای مختلف نشان داده شده است. ارقام ارائه شده برای نمونه های کاملاً آمورف و انواع با بلورینگی ضعیف، متوسط ارقام بدست آمده از نمونه های سنتز شده با ساختار مشابه می باشد.
بنابراین در صورت امکان استفاده از نوع آمورف به عنوان یکی از اجزاي سازنده سیمان کلسیم فسفاتی، محصول حاصل از گیرش می تواند ماده ای با ساختار کلسیم فسفات با بلورینگی ضعیف باشد.

۴- نتیجه گیری

از بررسیهای انجام شده می توان نتیجه گرفت:
۱- سنتز تکرارپذیر کلسیم فسفات آمورف با رعایت اقداماتی همچون دمای پایین، pH بالا و خروج آب به روش غیرحرارتی امکان پذیر است.
۲- با افزایش نسبت کلسیم به فسفر در محلول سنتز، این نسبت در محصول نیز افزایش می یابد هر چند که میزان این افزایش نسبت در محصول، در مقایسه با محلول بسیار کمتر است.
۳- در سنتز کلسیم فسفات آمورف نسبت کلسیم به فسفر باید با توجه به میزان غلظت فسفات و کلسیم در محلولهای اولیه در نظر گرفته شود. بنابراین از طریق تنظیم نسبت کلسیم به فسفر در محلول سنتز نمی توان به کلسیم فسفات آمورف دست یافت.
۴- انحلال پذیری کلسیم فسفاتها در شرایط آکتیویته استئوکلاستی به میزان بلورینگی آنها ارتباط دارد. کلسیم فسفات آمورف از انحلال پذیری بالایی برخوردار است.

مراجع

[1] Suchaneck W, Yoshimura M; Processing and properties of hydroxyapatite – based biomaterials for use as hard replacement implants; Journal of Materials Research Jan 1998; 13(1):95-117.
[2] Temenoff JS, Mikos AG; Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering; Biomaterials 2000; 21:2405-2412.
[3] Vaccaro AR; The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft; Orthopedics May 2002; 25(5):571-578.
[4] Oonishi H, Oomamiuda K; Degradation/resorption in bioactive ceramics in orthopedics, in Handbook of Biomaterial Properties ed by Black J; Chapmann & Hall 1998; 406-419.
[5] Ramselaar MMA, Driessens FCM, Kalk W, De Wijn JR, Van Mullem PJ; Biodegradation of four calcium phosphate ceramics: *in vivo* rates and tissue interaction; Journal of Materials Science: Materials in Medicine 1991; 2:63-70.
[6] Koerten H, van der Meulen J; Degradation of calcium phosphate ceramics; Journal of Biomedical Materials Research 1999; 44:78-86.
[7] Ravaglioli A, Krajewski A, Celotti GC, Piancastelli A, Bacchini B, Montanari L, Zama G, Piombi L; Mineral evolution of bone; Biomaterials 1996; 17:617-622.
[8] Dorozhkin SV, Epple M; Biological and medical significance of calcium phosphates; Angew Chem Int Ed 2002; 41:3130-3146.
[9] Fernandez FJ, Gil FJ, Driessens FCM, Planell JA, Best SM; Calcium phosphate bone cements for clinical applications Part II; Journal of Materials Science: Materials in Medicine 1999; 10:177-183.
[10] Tadic D, Peters F, Epple M; Continuous synthesis of amorphous carbonated apatite; Biomaterials 2002; 23: 2553-2559.
[11] Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D, Thoams P; Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio Part I; Biomaterials 2002; 23:1065-1072.
[۱۲] آشوری حسین؛ بلورشناسی؛ جهاد دانشگاهی صنعتی اصفهان ۱۳۶۵، ۱۶۹ - ۱۵۹.
[13] Krill CE, Birringer R; Estimating grain – size distribution in nanocrystalline materials from X – ray diffraction

profile analysis; Philosophical Magazine A 1998; 77(3) :621-640.

[14] Danilchenko SN, Ukharenko OG, Moseke C, Protsenko IY, Sukhodub LF, Sulkio - Cleff B; Determination of the bone mineral crystallite size and lattice strains from diffraction line broadening; Crystal Research Technology 2002; 37(11):1234-1240.

[15] Kanzaki N, Treboux G, Onuma K, Tsutsumi, Ito A; Calcium phosphate clusters; Biomaterials 2001; 22:2921-2929.

[16] Minkin C, Marinho VC; Role of the osteoclast at the bone – implant interface; Adv Dent Res June 1999; 13:49-56.