

TỔNG HỢP VÀ NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM “IN VITRO” VẬT LIỆU HYDROXYAPATIT TRONG MÔI TRƯỜNG GIẢ DỊCH THỂ NGƯỜI SBF (SIMULATED BODY FLUID)

• TS. Bùi Xuân Vương^(*), ThS. Võ Thúy Vi^(**), TS. Đặng Tấn Hiệp^(**)

Tóm tắt

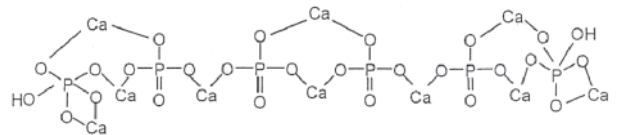
Trong nghiên cứu này, vật liệu y sinh Hydroxyapatit đã được tổng hợp thành công bằng phương pháp kết tủa. Kết quả phân tích XRD khẳng định vật liệu Hydroxyapatit đã tổng hợp được hoàn toàn tương tự như sản phẩm Hydroxyapatit đã được thương mại hóa của hãng Aldrich-Sigma. Phân tích SEM cho thấy Hydroxyapatit tổng hợp có hình thái cấu trúc xốp. Thục nghiệm “in vitro” được tiến hành bằng cách ngâm bột vật liệu trong dung dịch giả dịch thể người SBF (Simulated Body Fluid). Các phân tích lý hóa cho thấy không có sự xuất hiện pha lạ nào trong thành phần vật liệu sau khi ngâm và khẳng định sự hình thành một lớp khoáng Hydroxyapatit mới trên bề mặt vật liệu cũ, lớp khoáng này tương tự như thành phần vô cơ trong xương người, nó như cầu nối gắn liền miếng ghép vật liệu với xương tự nhiên, qua đó xương hỏng được tu sửa và làm đầy.

Từ khóa: Hydroxyapatit, “in vitro”, SBF, hoạt tính sinh học, xương.

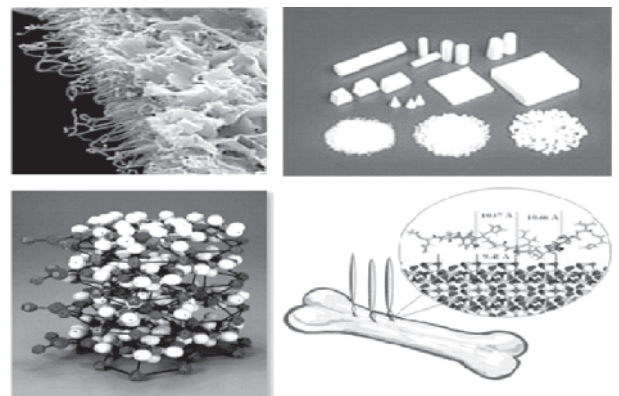
1. Đặt vấn đề

Ngày nay, các vật liệu y sinh đã trở nên thân thuộc trong đời sống của con người như: da nhân tạo, van tim nhân tạo, thủy tinh thể nhân tạo, các loại chỉ khâu trong y học, răng giả, chân tay giả, mạch máu nhân tạo, các vật liệu trám răng, các vật liệu xương nhân tạo dùng trong phẫu thuật chỉnh hình... Theo D. F. Williams “vật liệu y sinh là loại vật liệu có nguồn gốc tự nhiên hay nhân tạo, sử dụng để thay thế hoặc thực hiện một chức năng sống của cơ thể con người” [7]. Có nhiều loại vật liệu y sinh khác nhau, riêng nhóm vật liệu y sinh sử dụng như vật liệu xương nhân tạo có thể kể đến như các vật liệu canxi photphat: tricanxi photphat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3$; hydroxyapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; hỗn hợp hai pha canxi photphat (hỗn hợp $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_3$ và $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), các thủy tinh hoạt tính sinh học ($\text{CaO} - \text{SiO}_2 - \text{Na}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5$...), các xi măng y sinh, các kim loại trơ như Ti, Ni... [3]. Trong đó Hydroxyapatit (HA) là một trong những vật liệu đa năng được ứng dụng rộng rãi trong cấy ghép xương như: chế tạo răng giả và sửa chữa những khuyết tật của răng như trám răng, chế tạo những chi tiết để ghép xương do nó giống với thành phần khoáng vô cơ trong xương

của cơ thể con người [3]. Cấu tạo và một số hình ảnh ứng dụng của vật liệu HA được chỉ ra trong Hình 1 và Hình 2, trong đó phân tử HA có cấu trúc mạch thẳng, các liên kết Ca-O là liên kết cộng hóa trị, hai nhóm -OH được gắn với nguyên tử P ở hai đầu mạch.



Hình 1. Công thức cấu tạo của phân tử HA [4]



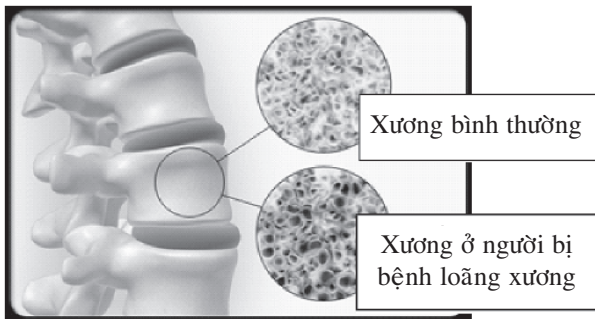
Hình 2. Một số hình ảnh ứng dụng của vật liệu HA [1]

Hiện nay, có nhiều phương pháp khác nhau để tổng hợp vật liệu y sinh HA. Phương pháp kết tủa từ dung dịch chứa các tiền chất ban đầu $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, NH_4OH ,

^(*) Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Thủ Dầu Một.

^(**) Khoa Công nghệ Hóa học, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh.

CaCl_2 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$... Sản phẩm kết tủa được xử lý nhiệt để thu được HA tinh khiết [5]. Cũng có thể tổng hợp HA theo phương pháp sol-gel bằng cách hoà tan các hợp chất như $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ với các hợp chất tạo gel. Gel có chứa hợp chất HA sẽ được tạo thành sau quá trình khuấy và xử lý nhiệt. Sấy gel ở các chế độ nhiệt khác nhau thu được bột HA [6]. Ngoài ra có thể kể đến phương pháp siêu âm hoá học, phương pháp phun sấy, phương pháp điện hoá, phương pháp thủy nhiệt, phương pháp composit hay phương pháp phản ứng pha rắn [4]. Tùy theo điều kiện thiết bị, nhưng mục đích chung của các phương pháp là tổng hợp được vật liệu HA tinh khiết, có hình thái cấu trúc xốp giống như xương tự nhiên của con người (Hình 3).



Hình 3. Hình ảnh xương tự nhiên [1]

Trong nghiên cứu này, vật liệu HA đã được tổng hợp bằng phương pháp kết tủa. Nghiên cứu thực nghiệm “in vitro” được thực hiện bằng cách ngâm các mẫu bột vật liệu HA trong dung dịch giả dịch thể người SBF. Các mẫu bột được ngâm theo hai tỷ lệ khác nhau là 50/100 và 100/100 (mg/ml). XRD và SEM là hai kỹ thuật phân tích đã được sử dụng để đánh giá các mẫu vật liệu trước và sau thực nghiệm “in vitro”.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Hóa chất

Các hóa chất có độ tinh khiết trên 99% được mua từ hãng Sigma-Aldrich: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, HNO_3 , HCl , NaCl , KCl , NaHCO_3 , CaCl_2 .

2.2. Quy trình tổng hợp HA

Cho 500 ml $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,12 mol) vào 500 ml $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,2 mol) (chứa trong bercher

1000 ml) với tốc độ 3 ml/phút, khuấy ở nhiệt độ phòng. pH được điều chỉnh đến 10 bằng dung dịch NH_3 25% và được duy trì trong suốt quá trình tiến hành. Hỗn hợp phản ứng hình thành một lớp keo sau 6 giờ khuấy liên tục ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp keo được lọc rồi cho vào tủ sấy, sấy khô ở 120°C trong 8 giờ. Sau đó đem đi nghiền thành bột rồi nung ở nhiệt độ 1000°C , lưu trong 5 giờ.

2.3. Thực nghiệm “in vitro”

Vật liệu HA tổng hợp được tiến hành thực nghiệm “in vitro” để kiểm tra xem có đạt yêu cầu của một vật liệu y sinh trước khi dùng cấy ghép trong cơ thể sống “in vitro”. Thực nghiệm “in vitro” được tiến hành bằng cách ngâm vật liệu trong dung dịch mô phỏng dịch thể người SBF để khảo sát khả năng hình thành khoáng xương mới sau ngâm. Dung dịch SBF là dung dịch giả dịch thể người có thành phần các ion tương tự như máu trong cơ thể con người (Bảng 1). Dung dịch này được tổng hợp trong phòng thí nghiệm theo phương pháp của Kokubo [2].

Bảng 1. Nồng độ các ion trong dung dịch SBF (10^{-3} mol/l) [2]

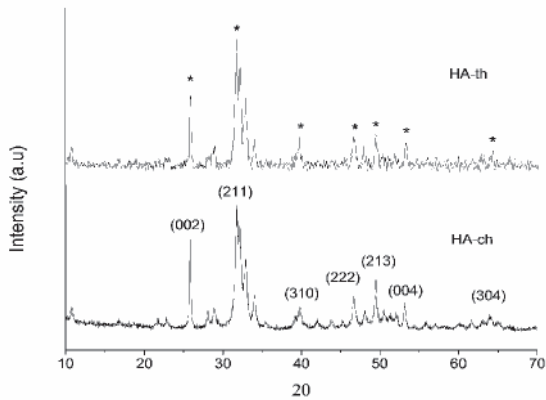
| Ion | Na^+ | K^+ | Ca^{2+} | Mg^{2+} | Cl^- | HCO_3^- | HPO_4^{2-} | SO_4^{2-} |
|--------------------------------------|---------------|--------------|------------------|------------------|---------------|------------------|---------------------|--------------------|
| SBF | 142,0 | 5,0 | 2,5 | 1,5 | 147,8 | 4,2 | 1,0 | 0,5 |
| Human Body Plasma (máu cơ thể người) | 142,0 | 5,0 | 2,5 | 1,5 | 103,0 | 27,0 | 1,0 | 0,5 |

2.4. Phương pháp phân tích vật liệu

Đặc tính lý hóa của vật liệu HA tổng hợp trước và sau thực nghiệm “in vitro” trong dung dịch giả dịch thể người SBF đã được nghiên cứu bằng các phương pháp phân tích hiện đại như XRD và SEM. Phương pháp nhiễu xạ tia X được sử dụng để xác định thành phần cấu trúc pha của vật liệu. Các phổ nhiễu xạ được đo bằng máy Bruker, Advance D8, Đức. Dữ liệu phổ được xử lý bằng phần mềm origin 6.1. Hình thái và cấu trúc bề mặt vật liệu được xác định bằng kính hiển vi điện tử quét SEM, Hitachi, JEOL 5, Nhật Bản.

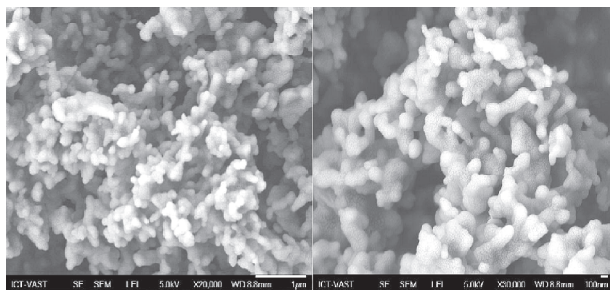
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Đặc trưng HA tổng hợp



Hình 4. Giải đồ phổ XRD của HA chuẩn và HA tổng hợp

Hình 4 trình bày hai phổ nhiễu xạ tia X của vật liệu HA tổng hợp và vật liệu HA chuẩn của hãng Aldrich Sigma (sử dụng như phổ so sánh) [8]. HA tổng hợp được ký hiệu: HA-th; HA chuẩn được ký hiệu: HA-ch. Kết quả phân tích phổ XRD cho thấy vị trí và hình dạng các pic nhiễu xạ của HA đã tổng hợp trong nghiên cứu này không khác biệt so với các pic của HA do hãng Aldrich-Sigma sản xuất. Điều này khẳng định sự thành công của phương pháp điều chế HA bằng kết tủa.

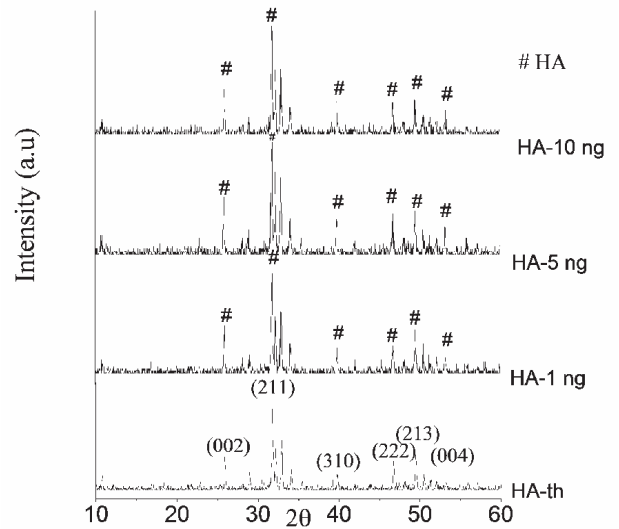


Hình 5. Ảnh SEM của HA tổng hợp với độ phóng đại a) X20000 và b) X30000

Quan sát ảnh SEM (Hình 5) cho thấy vật liệu HA tổng hợp có dạng hình que kết nối lại với nhau khá đồng đều tạo ra những khe hở và độ xốp của vật liệu. Vật liệu HA tổng hợp có cấu trúc gần giống như xương người về độ xốp cũng như về hình dạng.

3.2. Đánh giá hoạt tính sinh học vật liệu HA sau thực nghiệm “in vitro”

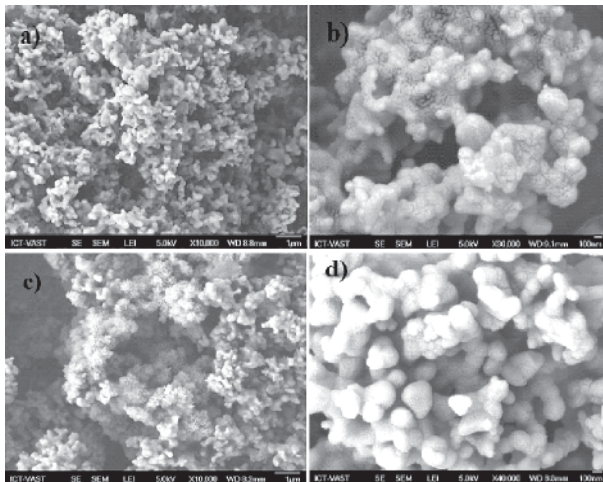
3.2.1. Với tỷ lệ ngâm 50 mg bột HA trong 100 ml dung dịch SBF



Hình 6. Phổ XRD của HA thường, HA sau 1 ngày, 5 ngày và 10 ngày ngâm trong dung dịch SBF

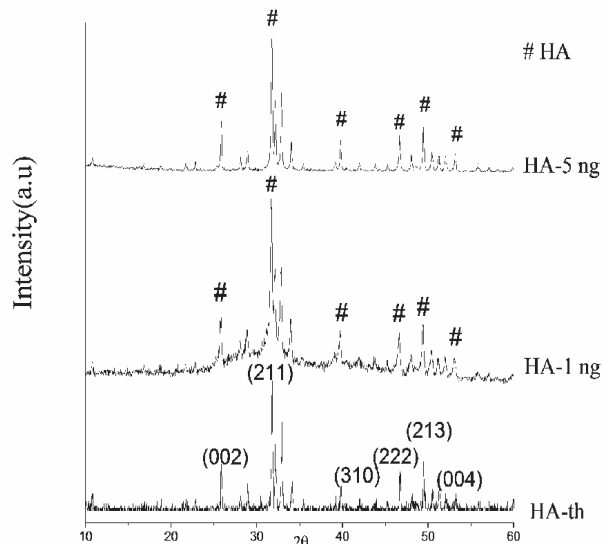
Hình 6 trình bày kết quả XRD của HA trước và sau khi ngâm 1 ngày (HA-1 ng), 5 ngày (HA-5 ng) và 10 ngày (HA-10 ng) trong dung dịch SBF theo tỷ lệ 50/100 (mg/ml). Sau khi ngâm trong dung dịch SBF, số lượng pic nhiễu xạ trên HA vẫn giữ nguyên như cũ, không có pic lạ nào xuất hiện, điều này đảm bảo tính tương thích sinh học của vật liệu HA tổng hợp. Trong cấy ghép xương nếu vật liệu ghép biến đổi thành một vật liệu khác không giống cấu trúc của xương tự nhiên thì sẽ dẫn tới sự đào thải khỏi cơ thể. Tức là vật liệu không có tính tương thích sinh học.

Bên cạnh đó, quan sát bằng ảnh SEM cho thấy sự biến đổi hình thái bề mặt vật liệu HA sau ngâm để hình thành một lớp vật liệu mới trên bề mặt HA cũ (Hình 7). Các kết quả này chứng tỏ có sự tương tác giữa HA và dung dịch SBF. Vì phổ XRD của HA sau ngâm không thu được pic lạ nào nên lớp vật liệu mới như quan sát bằng ảnh SEM chính là lớp HA mới được hình thành trên bề mặt HA cũ sau khi ngâm. Lớp khoáng HA mới này chính là cầu nối gắn liền miếng ghép vật liệu xương vào xương tự nhiên. Qua đó, xương hỏng được tu sửa và tái tạo lại.



Hình 7. Ảnh SEM của HA sau a) 0 ngày, b) 1 ngày, c) 5 ngày, d) 10 ngày ngâm trong dung dịch SBF

3.2.2. Với tỷ lệ ngâm 100 mg bột HA trong 100 ml dung dịch SBF



Hình 8. Phổ XRD của HA thường, HA sau 1 ngày và 5 ngày ngâm trong dung dịch SBF

Hình 8 trình bày giản đồ nhiễu xạ XRD sau 1 ngày và 5 ngày ngâm trong dung dịch SBF. Kết quả đạt được với tỷ lệ ngâm 100/100 (mg/ml) cho

thấy sự khác biệt quan trọng so với kết quả đạt được khi ngâm 50/100 (mg/ml). Kết quả này thể hiện sự ảnh hưởng của tỷ lệ ngâm đối với sự tương tác của vật liệu HA với môi trường giả dịch thể người SBF. Sau 1 ngày ngâm, phổ XRD của HA xuất hiện quầng nhiễu xạ, các pic nhiễu xạ trở nên tù hơn. Kết quả này chứng tỏ sự tương tác hóa học giữa vật liệu và môi trường. Sau 5 ngày, XRD của HA có pic nhọn hơn và tương tự như HA ban đầu. Kết quả này được giải thích bằng sự kết tinh lại của HA trên bề mặt vật liệu để tạo một lớp khoáng xương HA mới.

So sánh với tỷ lệ ngâm 50/100 bên trên, phổ XRD sau 1 ngày ngâm không thể hiện quầng nhiễu xạ như trong trường hợp này. Điều đó có thể giải thích do trong trường hợp ngâm 50 mg bột HA trong 100 ml dung dịch SBF, lượng HA tương tác trong một lượng lớn dung dịch SBF, tạo nên sự tương tác hóa học mạnh giữa HA và SBF, dẫn tới sự kết tinh tạo lớp khoáng HA mới cũng nhanh hơn. Do đó chúng ta không quan sát được quầng nhiễu xạ như trong trường hợp ngâm 100 mg bột HA trong 100 ml dung dịch SBF.

4. Kết luận

Vật liệu HA đã được tổng hợp thành công bằng phương pháp kết tủa. Các đặc trưng lý hóa hiện đại: XRD và SEM khẳng định vật liệu tổng hợp có chất lượng tốt so với sản phẩm chuẩn đang được lưu hành trên thị trường. Thực nghiệm “in vitro” được thực hiện bằng cách ngâm bột vật liệu trong dung dịch SBF theo các tỷ lệ và thời gian khác nhau. Kết quả phân tích khẳng định sự hình thành một lớp khoáng HA mới trên bề mặt vật liệu HA sau khi ngâm. Lớp HA mới này chính là cầu nối gắn kết vật liệu xương nhân tạo và xương tự nhiên trong cấy ghép xương, trám răng. Kết quả phân tích cũng chỉ ra động học sự hình thành lớp khoáng xương mới HA phụ thuộc vào tỷ lệ ngâm bột vật liệu và thể tích dung dịch SBF./.

Tài liệu tham khảo

- [1]. G. S. Franz, B. Vera and P. Burkhard (2008), “Uranium removal from groundwater using hydroxyapatite”, *Applied Geochemistry*, 23 (8), p. 2137-2145.
- [2]. Tadashi Kokubo and Hiroaki Takadama (2006), “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity”, *Journal of Biomaterials*, (27), p. 2907-2915.

- [3]. Larry L. Hench (1991), "Bioceramics: From Concept to Clinic", *Journal of the American Ceramic Society*, (74), p. 1487-1510.
- [4]. Đỗ Ngọc Liên (2005), *Nghiên cứu qui trình tổng hợp bột và chế thử gốm xốp hydroxyapatit*, Báo cáo tổng kết đề tài khoa học công nghệ cấp Bộ, Bộ Khoa học và Công nghệ.
- [5]. Milenko Markovic, Bruce O. Fowler and Ming S. Tung (2004), "Preparation and Comprehensive Characterization of a Calcium Hydroxyapatite Reference Materials", *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol*, (9), p. 552-568.
- [6]. Lis Sopyan, Ramesh Singh and Mohammed Hamdi (2008), "Synthesis of nano sized hydroxyapatite powder using sol - gel technique and its conversion to dense and porous bodies", *Indian Journal of Chemistry*, (47A), p. 1626-1631.
- [7]. David Franklyn Williams (1986), *Definitions in Biomaterials*, *Consensus Conference for the European Society for Biomaterials*, p. 72.
- [8]. JCPDF Card No. 09-432.

SYNTHESIS AND "IN VITRO" EXPERIMENT ON HYDROXYAPATITE MATERIAL IN SIMULATED BODY FLUID (SBF) SOLUTION

Summary

In this study, the biomaterial hydroxyapatite (HA) has been successfully synthesized by precipitation method. XRD analysis confirmed that HA synthetic material is virtually like the one commercialized by Aldrich-Sigma Company. SEM analysis showed the HA synthetic material of porous composition. The "in vitro" experiment was conducted by soaking the HA powder in the Simulated Body Fluid (SBF) solution. The physio-chemical analyses showed the non-appearance of strange phase in the composition of the soaked material and confirmed the formation of a new HA layer on its surface, whose chemicals are like those of the inorganic phase in human bone. This new layer serves as a linking bridge between bio-implant and natural bone, by which the disfunctional bone is repaired and modified.

Keywords: Hydroxyapatite, "in vitro", SBF, bioactivity, bone.