

## سنتز و بررسی زیست‌سازگاری نانوذرات کلسیم فسفاتی دارای منیزیم

افسانه ادیب‌فر و علی اصغر بهنام‌قادر\*

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

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۲/۰۱/۰۸، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۲/۰۳/۳۱، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۲/۰۵/۱۱

### چکیده

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. نمونه کنترل ترکیب هیدروکسی آپاتیت انتخاب شد و نسبت  $(Ca+Mg)/P$  برابر  $1/67$  و مقدار منیزیم در محدوده صفر تا  $3\%$  مولی در نظر گرفته شد. تمام نمونه‌ها در دمای  $600^\circ C$  عملیات حرارتی شدند. ترکیب فازی و ساختار شیمیایی، شکل و اندازه ذرات با انجام آزمایش‌های XRD، FTIR، SEM و TEM بررسی گردید. تمام نمونه‌ها دارای دو فاز اصلی  $Mg-HA$  و  $\beta-TCMP$  بودند. با این حال، در مقادیر منیزیم اندک، فاز  $MgHPO_4 \cdot 3H_2O$  و در مقادیر زیاد آن فاز  $MgO$  نیز تشکیل شد. با افزایش مقدار منیزیم مقدار نسبی  $\beta-TCMP$  افزایش و پیک‌های اختصاصی XRD به سوی زوایای بیشتر 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  $180-40\text{ nm}$  بصورت منفرد و گروهی را روشن ساخت. آزمایش‌های زیست‌سازگاری نشان داد که نمونه‌های تهیه شده با مقدار منیزیم کمتر از  $2/5\%$  مولی، از رشد مناسب سلول‌های فیبروبلاست برخوردار بودند.

**واژه‌های کلیدی:** هیدروکسی آپاتیت دارای منیزیم، تری کلسیم فسفات دارای منیزیم، زیست‌سازگاری، نانوذرات.

### ۱- مقدمه

دندان به ترتیب شامل  $0/72$ ،  $0/44$  و  $1/23\text{ wt.}\%$  منیزیم 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].

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

\* عهده‌دار مکاتبات: علی اصغر بهنام‌قادر

نشانی: کرج، مشکین دشت، پژوهشگاه مواد و انرژی

تلفن: ۰۲۶۳-۶۲۰۱۸۸۸، دورنگار: ۰۲۶۳-۶۲۰۱۸۸۸، پست الکترونیکی: [a-behnamghader@merc.ac.ir](mailto:a-behnamghader@merc.ac.ir)

در تحقیق حاضر، با توجه به مقادیر منیزیم استفاده شده در منابع موجود، میزان منیزیم ۳-۰ درصد مولی ( $0 \leq x \leq 3$ )، با توجه به رابطه  $(Ca_{10-x}Mg_x)(PO_4)_6(OH)_2$  به عنوان مقادیر مناسبتر 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  $(C_2H_5O)_3P$ , MERCK، نیترات کلسیم چهارآبه  $(Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O)$ , MERCK و نیترات منیزیم شش آبه  $(Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O)$ , MERCK مورد استفاده قرار گرفت. جهت تهیه سل ابتدا تری‌اتیل 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 نیترات کلسیم چهار آبه به آن اضافه گردید. نسبت  $(Ca+Mg)/P$  ثابت و برابر  $1/67$  و با توجه به فرمول استوکیومتری  $(Ca_{10-x}Mg_x)(PO_4)_6(OH)_2$ ، مقدار منیزیم ( $x$ )، صفر،  $0/5$ ،  $1$ ،  $1/5$ ،  $2$ ،  $2/5$ ،  $3$  (تحت عنوان نمونه‌های  $X0$  تا  $X3$ ) در نظر گرفته شد. محلول‌های 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 کلوییدی شدن، مرحله ژله‌ای شدن و حذف حلال در آون  $80^\circ C$  انجام گرفت. پودرهای حاصل از فرآیند سل-ژل، پس از خشک نمودن، تحت عملیات حرارتی در دمای  $600^\circ C$  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 XRD (Philips, PW3710)، FTIR (Bruker) SEM (S360, Cambridge 1990) انجام گرفت.

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 هیدروکسی آپاتیت می‌تواند باعث بروز بعضی پدیده‌ها مانند کاهش بلورینگی، افزایش الحاق یون فسفات هیدروژن و افزایش میزان حلالیت گردد [۴]. بررسی خواص مکانیکی بدنه‌های  $\beta$ -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 یون‌های موجود در استخوان، حضور آنها تغییرات مهمی را در مشخصات شیمیایی، شیمی فیزیکی، ترکیب فازی، گروه‌های عاملی، شکل و اندازه ذرات و غیره منجر می‌شود 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 پوشش‌ها 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 [۸-۱۰]، استات منیزیم [۱۱] و اتوکساید منیزیم [۱۲] به عنوان پیش ماده دهنده منیزیم در روش سل-ژل به کار رفته‌اند. جدول ۱ بطور خلاصه مقدار منیزیم، پیش ماده 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  $(Ca_{10-x}Mg_x)(PO_4)_6(OH)_2$  استفاده نموده‌اند. در این رابطه هر دو عامل افزایش جایگزینی  $HPO_4^{2-}$  و یا تشکیل نقایص شبکه‌ای مرتبط با افزایش میزان منیزیم را در بر نمی‌گیرد و تنها به عنوان یک تقریب استفاده می‌شود [۴].

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

مقدار منیزیم	(Ca+Mg)/P	Ca/P	ترکیب فاز	پیش ماده	روش سنتز	مرجع
x=۰-۳	ابتدایی: ۱/۶۷ محاسبه شده: ۱/۶۶-۳/۲	محاسبه شده: ۱/۴۶-۱/۶۷	$\beta$ -TCMP HA	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Sol-gel	[۲،۱۳،۱۴]
۵-۱۵ mol%	—	ابتدایی: ۱/۸۰-۳/۴	Mg-BCP	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sol-gel	[۱۵]
۱-۱۰ wt.%	—	ابتدایی: ۱/۶۷-۱/۷ محاسبه شده: ۱/۵-۱/۶۵	$\beta$ -TCMP HA	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NH <sub>4</sub> OH	Precipitation	[۱۶]
۰-۶ wt.%	—	—	$\beta$ -TCP HA	CaCO <sub>3</sub> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> MgO	Wet Mixing	[۱۷]
۰-۱۰ mol%	۱/۵	—	$\beta$ -TCMP	CaCO <sub>3</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> MgO	Solid-state Reaction	[۱۸]
x=۰-۱۰	۱/۶۷	متغیر	$\beta$ -TCMP Mg-HA $\beta$ -Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Ca(OH) <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub>	Mechanochemical Hydrothermal	[۴]

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

x	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۲	۲/۵	۳
(Ca+Mg)/P	۱/۶۷	۱/۶۷	۱/۶۷	۱/۶۷	۱/۶۷	۱/۶۷	۱/۶۷
Ca/P	۱/۶۷	۱/۵۸	۱/۵	۱/۴۱	۱/۳۳	۱/۲۵	۱/۱۶
Mg (wt.%)	۰	۱/۲۱	۲/۴	۳/۵۲	۵	۶/۰۷	۷/۲۹
درجه بلوری آپاتیت (X <sub>c</sub> )	۸۲	۷۰	۸۲	۷۸	۶۰	۷۹	۵۴

گونگون 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. برای این منظور از مقایسه شدت پیک‌های (۲۱۱) HA، (۰۲۱)  $\beta$ -TCMP، (۲۰۰) MgO و (۱۱۳) MgHPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O استفاده شد. در این تصاویر مشاهده می‌شود که با تغییر مقدار منیزیم، شدت نسبی فازها تغییر می‌کند. در مقادیر کم منیزیم (نمونه‌های X0.5 و X1) دو فاز Mg-HA و  $\beta$ -TCMP به همراه مقدار کمی از ترکیب (شماره کسارت Newberyite) MgHPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O (۰۰۳۵۰۷۸۰) بوجود آمده‌اند. در مقادیر زیاد منیزیم (X2.5 و X3) ترکیب Newberyite از بین رفته است. در

همچنین از میکروسکوپ اینورت (Nikon TE-100) جهت ارزیابی نمونه‌های کشت سلول‌های فیبروبلاست استفاده شد. داده‌های پراش پرتو ایکس پودرهای سنتز شده، توسط نرم‌افزار X'Pert 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 P<sub>i</sub> مقدار نسبی فاز i و I<sub>i</sub> شدت پیک بیشینه طیف پراش پرتو ایکس فاز i می‌باشد.

$$P_i = \frac{I_i}{\sum_{i=1}^n I_i} \quad (1)$$

### ۳- نتایج و بحث

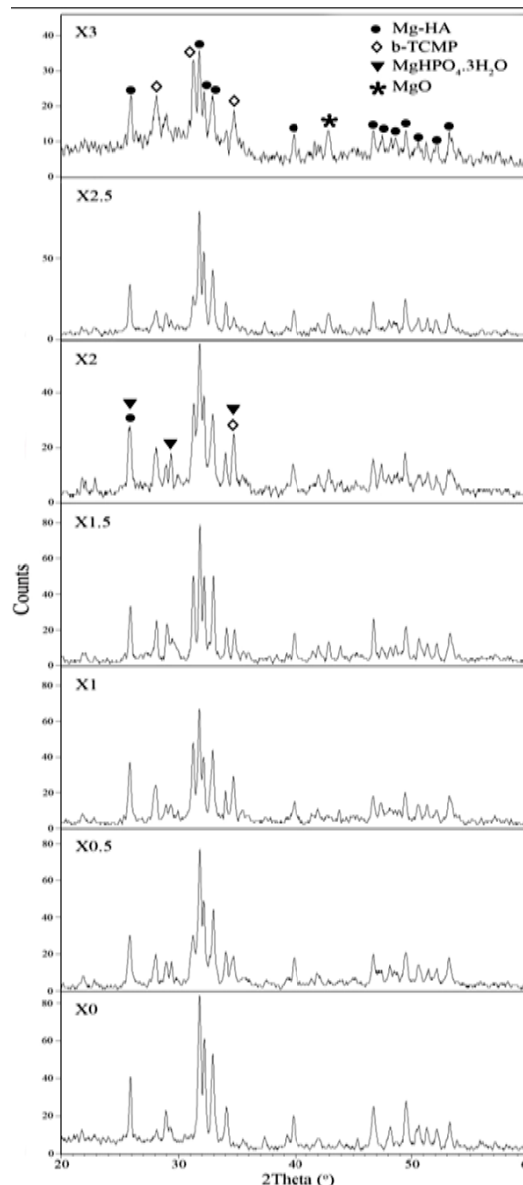
شکل‌های ۱ و ۲ به ترتیب طیف‌های پراش پرتو ایکس و شدت نسبی فازهای مختلف نمونه‌های دارای مقادیر

گزارش نموده‌اند که اضافه کردن مقادیر زیاد منیزیم منجر به کلوخه‌های شدن این ترکیب (MgO) می‌گردد [۲۷]. با توجه به شکل ۲ شدت نسبی فاز  $\beta$ -TCMP با افزایش منیزیم افزایش یافته است. بر طبق جدول ۲ نیز نسبت Ca/P در نمونه‌های تهیه شده با افزایش مقدار منیزیم کاهش می‌یابد. برخلاف برخی گزارش‌ها [۲۱] مبنی بر اثر منیزیم بر افزایش تشکیل  $\beta$ -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 با افزایش منیزیم از ۱/۶۷ (نمونه X0) تا ۱/۱۶ (نمونه X3) کاهش می‌یابد. به بیان دیگر مقدار این نسبت با افزایش مقدار منیزیم، به نسبت استوکیومتری فاز  $\beta$ -TCP نزدیک می‌شود و افزایش نسبی مقدار این فاز را می‌توان به کاهش نسبت استوکیومتری Ca/P نسبت داد. نتایج سایر محققان نیز حاکی از افزایش نسبت  $\beta$ -TCMP/Mg-HA با افزایش میزان منیزیم می‌باشد [۱۶، ۲۸، ۲۹]. نتایج محاسبه درجه بلوری و اندازه بلورک‌های فاز هیدروکسی آپاتیت نمونه‌های دارای مقادیر گوناگون منیزیم نیز نشان داد که بطور نسبی با افزایش مقدار منیزیم درجه بلوری کاهش یافته است (جدول ۲). درجه بلوری فاز آپاتیت با استفاده از رابطه ۲ [۲۱، ۳۰] اندازه‌گیری شد. در این رابطه  $X_C$  درجه بلوری پودر،  $V_{112}/I_{300}$  شدت عمق بین پیک‌های پراش (۱۱۲) و (۳۰۰) و  $I_{300}$  شدت پیک (۳۰۰) است.

$$X_C = 1 - \frac{V_{112}}{I_{300}} \quad (2)$$

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 افزایش مقدار منیزیم در تحقیق سایر محققان نیز گزارش شده است [۴، ۲۱]. کاهش درجه بلوری به کاهش اندازه بلورک‌ها 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) [۳۲، ۳۳] و تحقیق سایر محققان بر انواع جایگزینی‌های یونی در ساختار آپاتیت، استفاده شد.

گزارش قبلی مربوط به مشخصات ترکیبی و فازی این مواد در دماهای ۱۲۰۰-۲۰۰ °C، نیز به موضوع تشکیل این ترکیبات به عنوان فاز ثانویه، اشاره شده است [۲۶].



شکل ۱: طیف‌های پراش پرتو ایکس نمونه‌های دارای مقادیر گوناگون منیزیم در دمای ۶۰۰ °C.

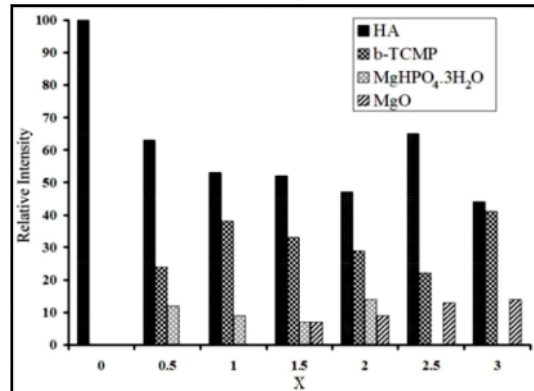
با افزایش مقدار منیزیم از نمونه X1.5 تا X3 فاز MgO (شماره کارت ۰۱۰۸۷۰۶۵۱) تشکیل شده است. با توجه به پایداری این اکسید از دیدگاه انرژی آزاد، تشکیل آن در شرایط سنتز امری بدیهی است. به عبارت دیگر یون‌های منیزیم اضافی در ساختار بلوری وارد نمی‌شوند و فاز پایداری چون MgO تشکیل می‌گردد. سایر محققان نیز

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{4}{3} \left( \frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad (۴)$$

در این صورت می‌توان دو سری منحنی (خط)، یک خط با استفاده از روابط ۲ و ۳ با احتساب مقدار منیزیم  $0 \leq x \leq 3$  و خط دیگر بر اساس رسم داده‌های 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 می‌باشد. از طرف دیگر مشاهده می‌شود که نتایج حاصل از محاسبه پارامتر  $a$  توسط رابطه ۴ به صورت تقریباً خطی هستند اما بطور کلی مقدار آنها از مقدار محاسبه شده توسط روابط ۲ و ۳ در حدود  $A$   $0.04-0.05$  بیشتر می‌باشد. 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  $\beta$ -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  $\beta$ -TCMP می‌باشد.

در شکل ۵ بطور خلاصه جابجایی پیک بیشینه  $\beta$ -TCMP در مورد نمونه  $X1$  نشان داده شده است. در این شکل طیف پراش پرتو ایکس نمونه  $X1$  با طیف پراش پرتو ایکس ترکیب تری‌کلسیم فسفات  $\beta$ -TCP:Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (شماره کارت: ۰۰۰۰۳۰۶۸۱) و طیف پراش پرتو ایکس ترکیب تری‌کلسیم فسفات  $\beta$ -TCMP:Ca<sub>2.589</sub>Mg<sub>0.411</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (شماره کارت: ۰۱۰۸۷۱۵۸۲) مقایسه شده است. با توجه به جابجایی پیک بیشینه  $\beta$ -TCMP متناظر با صفحه کریستالی (۰۲۱) می‌توان نتیجه گرفت که مقداری از یون‌های منیزیم اضافه شده در ساختار تری‌کلسیم فسفات ( $\beta$ -TCMP) وارد شده و ترکیب تری‌کلسیم فسفات را بوجود آورده‌اند.



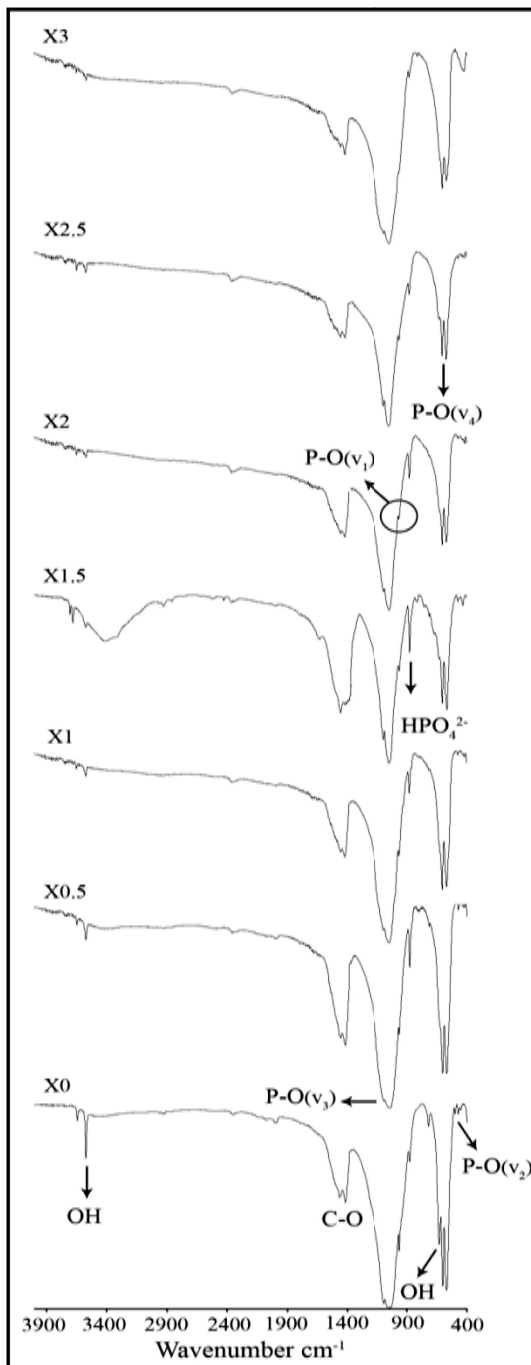
شکل ۲: شدت نسبی فازهای موجود در نمونه‌های دارای مقادیر گوناگون منیزیم کلسینه شده در دمای ۶۰۰ °C.

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 بطور جداگانه بررسی شود. پژوهشگرانی که بر صدق این قانون بر ترکیب مورد نظر خود تحقیق کرده‌اند، هر یک رابطه‌ای خطی بر حسب  $x$  ارائه داده‌اند که می‌توان از آن استفاده نمود. به عبارت دیگر رابطه خطی میان پارامترهای شبکه (تبعیت از قانون وگارد) به معنای جایگزینی یون در ساختار بلوری یا تشکیل محلول جامد می‌باشد [۳۵،۳۴]. در مورد ترکیب حاضر (BCP دارای منیزیم) گزارشی بر صدق قانون وگارد یا بررسی آن به ثبت نرسیده است اما Babayevskaya و 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 محدوده منیزیم  $0 < x < 7/5$  صادق هستند.

$$a(\text{\AA}) = 9.37 - 0.0032x \quad (۲)$$

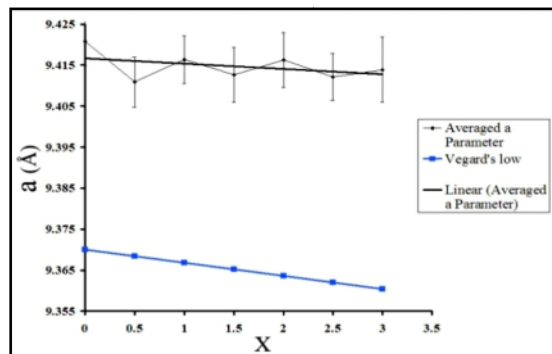
$$c(\text{\AA}) = 6.89 - 0.0036x \quad (۳)$$

با این فرض که تغییر ابعاد شبکه در اثر وجود فلور OH تفاوتی با وجود  $(Ca_{10-x}Mg_x(PO_4)_6F_2)$  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 (۳۰۰) و (۰۰۲) هیدروکسی آپاتیت را می‌توان با استفاده از رابطه ۴ [۳۷،۳۸] محاسبه نمود.

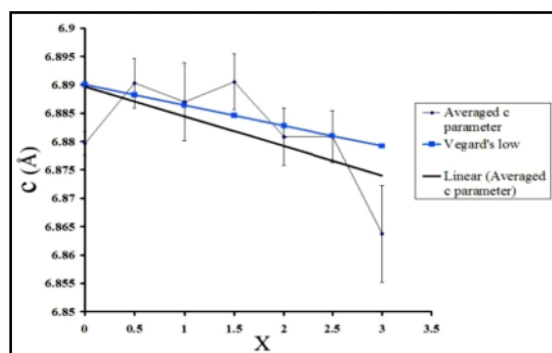


شکل ۶: طیف‌های FTIR نمونه‌های دارای مقادیر گوناگون منیزیم.

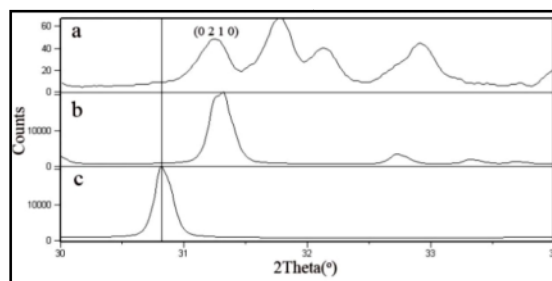
شدت مد  $\nu_1$  با افزایش مقدار منیزیم روند نزولی دارد. مد  $\nu_2$  نیز در  $470-4 \text{ cm}^{-1}$ ، با شدت بسیار کم در طیف‌ها مشخص می‌باشد [۲۹،۳۹]. حضور پیک مشخصه مربوط به بنیان پیروفسفات  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$  در محدوده  $740-20 \text{ cm}^{-1}$  در طیف‌های مربوط به نمونه X0 و نمونه‌های دارای مقادیر کمتر منیزیم مشاهده می‌شود و با افزایش منیزیم از شدت این پیک کاسته شده است [۲۹،۴۰]. پیک مشاهده شده



شکل ۳: مقایسه پارامتر شبکه  $a$  محاسبه شده توسط قانون وگارد و رابطه ۴.



شکل ۴: مقایسه پارامتر شبکه  $c$  محاسبه شده توسط قانون وگارد و رابطه ۴.



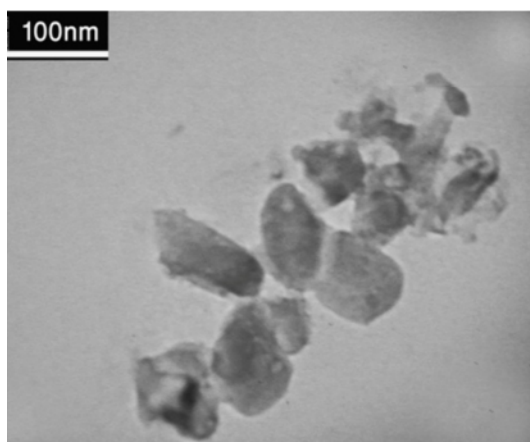
شکل ۵: طیف‌های پراش پرتو ایکس، (a) نمونه بودر X1 تهیه شده، (b) کارت تری کلسیم منیزیم فسفات و (c) کارت تری کلسیم فسفات.

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 می‌باشند ( $\nu_1$  تا  $\nu_4$ ) که در تمام طیف‌ها مشاهده می‌شوند. مد  $\nu_4$  در عدد موج  $563-7 \text{ cm}^{-1}$  و  $601-3 \text{ cm}^{-1}$ ، مد  $\nu_3$  در عدد موج  $1049-37 \text{ cm}^{-1}$  و  $1076-80 \text{ cm}^{-1}$  و مد  $\nu_1$  در عدد موج  $960-2 \text{ cm}^{-1}$  ظاهر شده‌اند.

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

پیک مشخصه‌های OH آپاتیت در دو فرکانس ۶۳۰ و  $3566 \text{ cm}^{-1}$  ظاهر می‌گردند [۴۳-۴۸] پیک  $630 \text{ cm}^{-1}$  در طیف‌های شکل ۶ تنها در نمونه X0 به صورت واضح وجود دارد و در نمونه‌های دارای منیزیم تقریباً از میان رفته است. پیک  $3566 \text{ cm}^{-1}$  نیز، علی‌رغم شدت بیشتر آن نسبت به پیک  $630 \text{ cm}^{-1}$ ، با افزایش میزان منیزیم بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته است. سایر محققان نیز گزارش نموده‌اند که شدت پیک فسفات و OH آپاتیت با افزایش مقدار منیزیم، کاهش می‌یابد [۲۱]. Cacciotti و همکاران [۲۱] گزارش نموده‌اند که با افزایش مقدار منیزیم پیک مشخصه  $\text{HPO}_4^{2-}$  افزایش و پیک مشخصه OH در  $630 \text{ cm}^{-1}$  و  $3570 \text{ cm}^{-1}$  به دلیل جایگزینی  $\text{HPO}_4^{2-}$  ایجاد نقص شبکه‌ای کاهش می‌یابد.

اصولاً 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 ۱۰۰ nm در بررسی با بزرگنمایی‌های گوناگون تایید می‌شود.

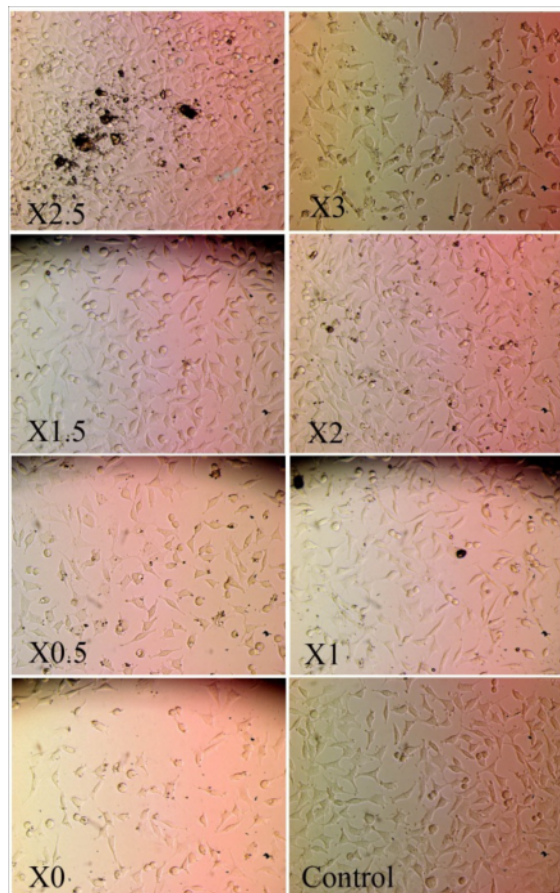


شکل ۷: تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نمونه X1 کلسینه شده در دمای  $600^\circ\text{C}$  به مدت یک ساعت.

در فرکانس  $3-871 \text{ cm}^{-1}$  طیف‌های FTIR نشان دهنده حضور بنیان‌های کربنات  $\nu_2$  یا  $\text{HPO}_4^{2-}$  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 می‌یابد. شدت زیاد پیک مربوط به بنیان  $\text{HPO}_4^{2-}$  را می‌توان به ترکیب  $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  شناسایی شده در طیف پراش پرتو ایکس این نمونه نیز نسبت داد. افزایش جایگزینی بنیان  $\text{HPO}_4^{2-}$  در شبکه آپاتیت یکی از آثار افزایش غلظت منیزیم در ساختار Mg-HA معرفی شده است [۴].

باند  $874$  و بنیان  $\text{HPO}_4^{2-}$  پیک مشخصه هیدروکسی آپاتیت با کمبود کلسیم (CDHA) می‌باشد [۴۲]. هیدروکسی آپاتیت با کمبود کلسیم، ترکیبی مشابه هیدروکسی آپاتیت بیولوژیکی است که دارای حلالیت، زیست‌فعالی و زیست‌سازگاری بالاتری در مقایسه با هیدروکسی آپاتیت استوکیومتری می‌باشد. این ترکیب خصوصیات جذب بهتر در جداسازی‌های کروماتوگرافی پلیمرهای مواد زیستی-آلی و فعالیت کاتالستی قابل توجهی را دارا می‌باشد. گروه‌های  $\text{HPO}_4$  جایگزین گروه‌های فسفات در شبکه هیدروکسی آپاتیت می‌شوند. در صورتی که حضور این پیک را بوجود بنیان کربنات نسبت دهیم، روند تغییر آن همانند تغییرات پیک‌های اصلی بنیان کربنات در محدوده فرکانس  $1415$  و  $50-1445 \text{ cm}^{-1}$  می‌باشد که در نمونه‌های X0.5 و X1.5 از شدت نسبتاً بیشتری برخوردار است و با افزایش مقدار منیزیم کاهش می‌یابد به گونه‌ای که شدت آن در نمونه X0 و X3 تقریباً برابر می‌باشد.

حضور دو پیک  $1460$  و  $1420 \text{ cm}^{-1}$  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 خصوصیات مانند



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.

مولکول‌های بیولوژیکی مانند پروتئین‌های محلول، امکان برقراری اتصال شیمیایی با یون‌های کلسیم و منیزیم را ایجاد کرده و واکنش‌های منجر به ساخته شدن بافت جدید در بدن با مکانیسم‌های سیستماتیک و موضعی، تشویق می‌گردند. باید به این نکته نیز اشاره نمود که حضور فاز  $\beta$ -TCP حتی در ترکیبات استوکیومتری دارای

به منظور بررسی زیست‌سازگاری نانوپودرهای تهیه شده، از فیبروبلاست (Mouse C<sub>34</sub>/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  $\mu$ g/ml Streptomycin
- 50 Iu/ml Penicillin

ابتدا سلول‌ها به صورت انبوه در محیط کشت RPMI-1640 دارای ۵۰ واحد پنسیلین و ۵۰ میکروگرم استرپتومایسین در میلی‌لیتر محیط کشت تکمیل شده با ۱۰٪ سرم جنین گوساله در فلاسک کشت در انکوباتور دمای ۳۷ °C و ۵٪ گاز کربنیک با رطوبت ۸۵٪ کشت داده شدند. بعد از مدت ۳ الی ۴ روز (تشکیل لایه سلولی) سلول‌ها بوسیله آنزیم تریپسین (۰/۲۵٪) از سطح فلاسک کنده شدند و به صورت سوسپانسیون با غلظت  $1 \times 10^5$  سلول در میلی‌لیتر برای آزمایش زیست‌سازگاری آماده شدند.

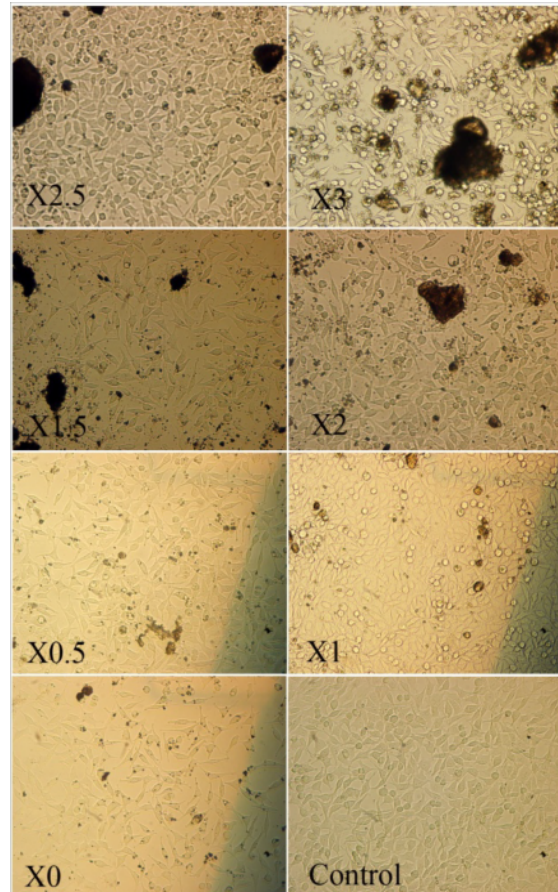
از طرفی نمونه‌های پودری در غلظت‌های مختلف منیزیم بوسیله اتوکلاو استریل شد. حدود ۵ میلی‌گرم از هر پودر در شرایط کاملاً استریل در ظروف ۶ خانه‌ای قرار داده شدند در ضمن یک خانه بدون نمونه به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس به هر یک از خانه‌ها دقیقاً ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی ریخته شد. در انتها ظروف در 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 یافته است.

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.



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 می‌باشد. 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 جایگزینی 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 ترکیبات کلسیم فسفاتی و نتایج بدست آمده در این تحقیق عمدتاً 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 قوی میان منیزیم و اکسیژن و حتی ایجاد تجمعات منیزیمی درون ساختار کریستالی ترکیبات کلسیم فسفاتی [۴۹،۵۰] و بویژه تشکیل ترکیبات بسیار پایدار شیمیایی مانند اکسید منیزیم (با انرژی پیوند ۴ MJ/mol) 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 توجه به شرایط خاص کشور برای انجام فعالیت‌های پژوهشی موارد زیر قابل توجه می‌باشد. بررسی حضور یون منیزیم از دیدگاه آثار علم و مهندسی بیومواد توجیه‌پذیر و لازم است. زیرا ارتقای کیفی محصول هم از نظر خواص عمومی ماده و هم از نقطه نظر کارایی آن در جریان جراحی و عملکرد آن درون بدن می‌تواند قابل توجه باشد. با این 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 نمی‌توان آنرا با جرات به اثر مستقیم این یون مربوط دانست. همانگونه که ذکر شد آنچه که در منابع علمی و گزارش‌های تحقیقاتی یافت

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  $600^{\circ}\text{C}$ ، دارای دو فاز اصلی  $\text{Mg-HA}$  و  $\beta\text{-TCMP}$  بودند. در مقادیر زیاد و کم منیزیم به ترتیب فازهای  $\text{MgO}$  و  $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  تشکیل شد. بررسی‌های انجام گرفته در مورد تغییرات پارامترهای شبکه آپاتیت و جابجایی پیکها در طیف‌های پراش پرتو ایکس، تأیید کننده حضور منیزیم در ساختار بلوری  $\beta\text{-TCP}$  و  $\text{HA}$  بود. بررسی زیست‌سازگاری نمونه‌ها نشان داد که منیزیم اثر منفی بر رشد سلول‌های فیبروبلاست نداشته و می‌توان نتیجه

- [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.
- [۲۵] افسانه گوزلیان، "سنتز نانوذرات کلسیم فسفاتی حاوی منیزیم به روش سل-ژل و بررسی خواص آن"، پایان نامه کارشناسی ارشد، پژوهشگاه 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.
- [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. Boulter, *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 für Kardiologie*, **90**, 2001, 116.
- [46] K. Salma, N. Borodajenko, A. Plata, L. Berzina-Cimdina,

می شود بهبود واکنش های بافت و ایمپلنت از طریق تاثیر این یون بر سایر عوامل واسطه ای از جمله ایجاد فازهای زیست فعال، تشکیل ترکیبات بیولوژیکی فعال شده با جزء معدنی، تغییر رفتار الکتروشیمیایی و غیره می باشد. بر این اساس به نظر می رسد که نقش این یون در بازسازی بافت آسیب دیده در رقابت با سایر مسیرهای بیولوژیکی جذب این یون از برتری خاصی برخوردار نیست. از اینرو افزودن آن به این منظور چندان توجیه پذیر نیست. فراموش نکنیم که اصولاً چنین هدفی نیز برای این امر، در مهندسی بافت پیش بینی نشده است ولی اغلب مشاهده می گردد که محققین محترم از این امر غافل مانده اند. با این حال نباید نقش کاتالیزوری و برانگیختگی این یون در واکنش های بیولوژیکی را از نظر دور داشت، هر چند که این مورد توسط عوامل بیولوژیکی مانند هورمون های تنظیم کننده سطح یون ها بطور طبیعی تحت کنترل است و تغییرات غیرطبیعی آن نیز از طرق دیگری غیر از افزودن یون منیزیم به بیومواد قابل تنظیم مجدد می باشد.

## سپاسگزاری

محققین از همکاری آزمایشگاه های مختلف پژوهشگاه مواد و انرژی و نیز پژوهشگاه ژنتیک و زیست فناوری 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. Phadare, 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.

