



TỔNG HỢP VÀ ĐÁNH GIÁ THỰC NGHIỆM *IN VITRO* VẬT LIỆU HYDROXYAPATIT TRONG MÔI TRƯỜNG GIẢ DỊCH THỂ NGƯỜI SBF

*Bùi Xuân Vương**

Trường Đại học Tôn Đức Thắng

Ngày Tòa soạn nhận được bài: 25-10-2016; ngày phân biện đánh giá: 06-3-2017; ngày chấp nhận đăng: 24-3-2017

TÓM TẮT

Vật liệu y sinh Hydroxyapatit (HA) được tổng hợp thành công bằng phương pháp kết tủa. Phân tích XRD khẳng định vật liệu tổng hợp tương tự như sản phẩm HA đã được thương mại hóa của hãng Aldrich-Sigma. Ảnh SEM cho thấy vật liệu HA có hình thái cấu trúc xốp. Thực nghiệm *in vitro* được tiến hành bằng cách ngâm bột vật liệu trong dung dịch giả dịch thể người SBF (Simulated Body Fluid). Sau thực nghiệm, phân tích phổ XRD chỉ ra sự tương tác giữa vật liệu và dung dịch SBF cũng như sự không xuất hiện pha lạ nào trong thành phần của vật liệu HA. Vật liệu HA đã tan ra trong dung dịch SBF và hình thành lớp khoáng HA mới trên bề mặt vật liệu cũ, lớp khoáng này chính là 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, hoạt tính sinh học, *in vitro*, SBF, xương.

ABSTRACT

Synthesizing and evaluating experiments in vitro study of hydroxyapatite material in simulated body fluid SBF

In this study, the biomaterial hydroxyapatite (HA) has been successfully synthesized by precipitation method. XRD analysis confirmed HA synthetic material completely similar to the HA material commercialized by Aldrich-Sigma company. SEM analysis showed that the HA synthetic material has porous structure morphology. Experimental *in vitro* was conducted by soaking the HA powder in the Simulated Body Fluid (SBF) solution. The physico-chemical analyses showed the non-appearance of strange phase in the composition of material after soaking in SBF solution and confirmed the formation of a new HA layer on its surface. This hydroxyapatite layer is similar to chemical composition of the inorganic phase in human bone. It plays important role as a bridge to connect chemical bonding between bio-implant and natural bone. Consequently, the bone framework is repaired and restored.

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

* Email: buixuanvuong@tdt.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Những vật liệu thay thế như: da, van tim; mạch máu, thủy tinh thể nhân tạo; các loại chi khâu trong y học, răng giả, chân tay giả, các vật liệu trám răng, các vật liệu xương dùng trong phẫu thuật chỉnh hình gọi chung là vật liệu y sinh. 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” [1]. Dựa vào tương tác giữa vật liệu và môi trường cơ thể, L. L. Hench đã chia vật liệu y sinh ra 2 loại chính là vật liệu hoạt tính sinh học và vật liệu trơ sinh học [2]. Vật liệu hoạt tính sinh học là loại vật liệu khi cấy ghép trong cơ thể con người sẽ xảy ra các tương tác hóa học giữa vật liệu với môi trường sống. Ngược lại, vật liệu trơ sinh học là vật liệu khi đưa vào cơ thể con người chúng không có bất cứ một tương tác hóa học nào. Trong nhóm vật liệu hoạt tính sinh học, Hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA) được sử dụng với mục đích cấy ghép xương do nó giống với thành phần khoáng vô cơ trong xương của cơ thể con người. HA đã và đang được nghiên cứu và phát triển vì những tính chất quan trọng của nó như tính tương thích và hoạt tính sinh học. Tính tương thích sinh học của HA được giải thích bởi tỉ lệ Ca/P trong phân tử HA đúng như tỉ lệ của Ca/P trong xương và răng của người. Hoạt tính sinh học của HA thể hiện ở chỗ sau khi ngâm trong một dung dịch giả dịch thể người hoặc khi cấy ghép trực tiếp trong cơ thể người, vật liệu sẽ tan ra do tương tác với môi trường, sau đó các ion Ca^{2+} , PO_4^{3-} và OH trong môi trường sẽ kết tủa trên bề mặt vật liệu để hình thành một lớp khoáng HA mới làm cầu nối cho sự gắn kết miếng ghép nhân tạo và xương tự nhiên, qua đó xương hỏng được tu sửa và làm đầy [3-4]. HA có thể tổng hợp bằng phương pháp kết tủa từ dung dịch chứa các tiền chất $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, NH_4OH , CaCl_2 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Sản phẩm kết tủa được xử lí nhiệt để thu vật liệu tinh khiết [5]. Cũng có thể tổng hợp HA theo phương pháp sol-gel, siêu âm hóa học, phương pháp phun sấy, phương pháp điện hóa, phương pháp thủy nhiệt, phương pháp composit hay phương pháp phản ứng pha rắn [6]-[7]. Trong nghiên cứu này, vật liệu HA được tổng hợp bằng phương pháp kết tủa. Đây là phương pháp có thể thực hiện được trong điều kiện phòng thí nghiệm ở Việt Nam. Phương pháp này cũng cho phép tổng hợp một lượng lớn HA, mở ra hướng ứng dụng tổng hợp vật liệu với quy mô sản xuất. Vật liệu HA được thử nghiệm *in vitro* bằng cách ngâm các mẫu bột trong dung dịch SBF để đánh giá hoạt tính và tính tương thích sinh học, tức là kiểm tra khả năng hình thành một lớp khoáng xương HA mới cũng như sự không xuất hiện pha lạ khác HA trên bề mặt vật liệu sau ngâm. XRD và SEM là hai phương pháp được sử dụng để đánh giá các mẫu vật liệu trước và sau thực nghiệm *in vitro*.

2. Vật liệu và phương pháp

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

Trên cơ sở tài liệu [5], chúng tôi xây dựng quy trình tổng hợp HA như sau:

Cho 500ml $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,12 mol) vào 500ml $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,2 mol) (chứa trong bercher 1000ml) với tốc độ 3 mL/phút, khuấy ở nhiệt độ phòng. pH được điều chỉnh lên 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. Thục 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 để cấy ghép trong cơ thể con người. Thục nghiệm *in vitro* được tiến hành bằng cách ngâm bột vật liệu trong dung dịch SBF. 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 [4].

Bảng 1. Thành phần dung dịch SBF (10^{-3} mol/L)

Ion	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Cl^-	HCO_3^-	HPO_4^{2-}
SBF	142	5	2,5	1,5	148,8	4,2	1
Plasma	142	5	2,5	1,5	103,0	27,0	1

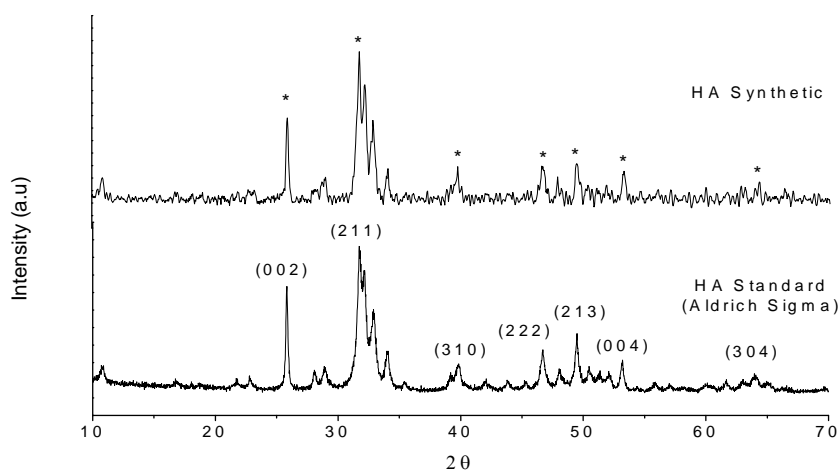
2.4. Phương pháp phân tích vật liệu

Vật liệu HA tổng hợp trước và sau thực nghiệm *in vitro* được đặc trưng lí hóa bằng các phương pháp phân tích hiện đại. Nhiễu xạ tia X (X-ray diffraction XRD) được sử dụng để xác định thành phần cấu trúc pha của vật liệu. Kính hiển vi điện tử quét (Scanning electron microscope SEM) được sử dụng để quan sát hình thái và cấu trúc bề mặt vật liệu.

3. Kết quả và thảo luận

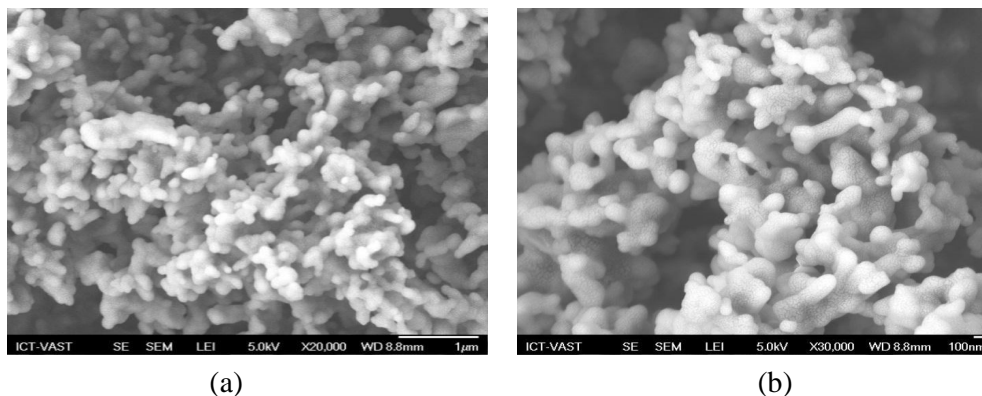
3.1. Phân tích lý hóa vật liệu tổng hợp

Hình 1 là giản đồ nhiễu xạ tia X của vật liệu HA tổng hợp (HA synthetic), được đo bằng máy Bruker, Advance D8. Phổ HA chuẩn của hãng Aldrich Sigma được sử dụng như phổ so sánh (HA standard) [8]. Phân tích phổ XRD cho thấy các pic nhiễu xạ của HA tổng hợp trùng với các pic của HA chuẩn. Kết quả này khẳng định sự thành công của phương pháp tổng hợp.

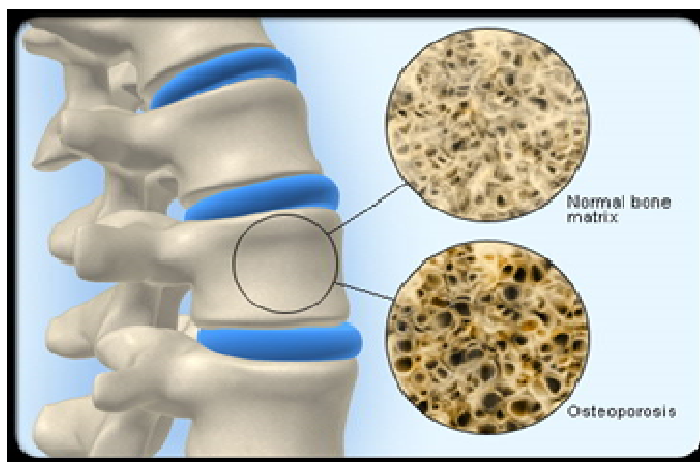


Hình 1. Phổ XRD của HA tổng hợp

Hình 2 trình bày ảnh SEM của HA được đo bằng kính hiển vi điện tử quét SEM, Hitachi, JEOL 5. Vật liệu HA thu được có dạng hình que kết nối khá đồng đều và đan xen vào nhau tạo ra những khe hở, độ xốp cho vật liệu. Vật liệu HA có cấu trúc gần giống như xương người về hình dạng cũng như độ xốp (Hình 3).



Hình 2. Ảnh SEM của HA tổng hợp với độ phóng đại a) X 20.000 và b) X 30.000



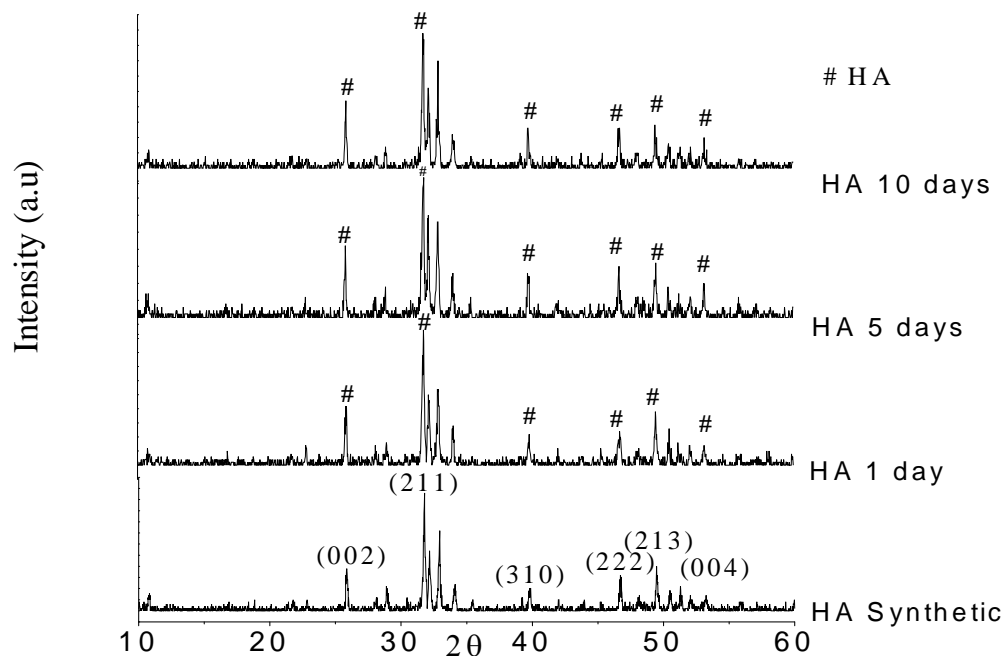
Hình 3. Hình ảnh xương tự nhiên (Normal bone matrix)

3.2. Đánh giá vật liệu HA sau thực nghiệm in vitro

3.2.1. Với tỉ lệ ngâm 50 mg bột HA trong 100 mL dung dịch SBF

Hình 4 trình bày kết quả XRD của HA trước và sau khi ngâm 1, 5 và 10 ngày trong dung dịch SBF theo tỉ lệ 50/100 (mg/mL). Sau khi ngâm trong dung dịch SBF, số lượng pic nhiễu xạ trên HA vẫn giữ nguyên như cũ, tuy nhiên cường độ các pic lại có sự khác biệt. Theo thời gian ngâm từ 1 đến 10 ngày, chúng ta ghi nhận sự lớn lên về cường độ của các pic.

Sự tương tác giữa HA và dung dịch SBF dẫn tới sự thay đổi về cường độ pic nhiễu xạ nhưng không dẫn tới sự xuất hiện của pha lạ nào khác HA chứng tỏ có sự kết tủa của lớp HA mới trên nền HA cũ [2,5]. Lớp khoáng HA mới này chính là cầu nối gắn liền miếng ghép vật liệu với xương tự nhiên, giúp cho xương hỏng được tu sửa và tái tạo lại. Ngoài ra, việc không quan sát được pic lạ nào ngoài HA đảm bảo tính tương thích sinh học của vật liệu. Vật liệu cấy ghép không biến đổi thành vật liệu khác vì nếu biến đổi thành vật liệu khác thì lại không giống cấu trúc của xương và khi đó nó sẽ bị đào thải, tức là không có tính tương thích sinh học.

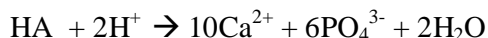
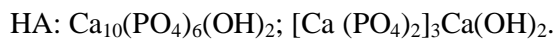


Hình 4. Phổ XRD của HA sau 1, 5 và 10 ngày ngâm trong dung dịch SBF

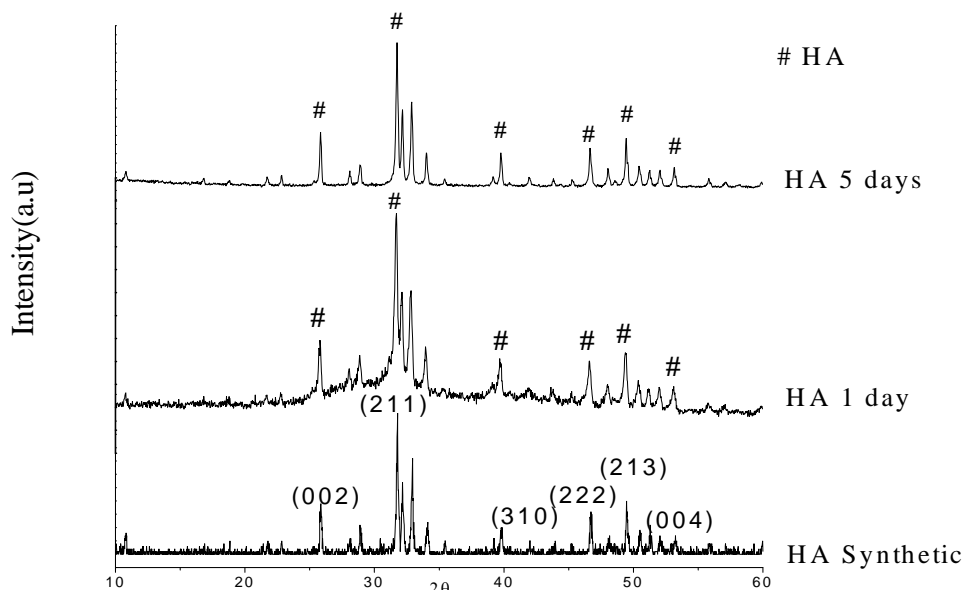
3.2.2. Với tỉ lệ ngâm 100 mg bột HA trong 100 mL dung dịch SBF

Hình 5 trình bày giản đồ nhiễu xạ XRD sau 1 và 5 ngày ngâm trong dung dịch SBF. Kết quả đạt được với tỉ 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 tỉ lệ ngâm đối với hoạt tính sinh học của vật liệu. Sau 1 ngày ngâm, XRD của HA xuất hiện quãng nhiễu xạ, các pic nhiễu xạ trở nên tù hơn. Điều này chứng tỏ có sự phá vỡ cấu trúc tinh thể của HA tổng hợp do các 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 do sự kết tinh lại của HA trên bề mặt vật liệu để tạo một lớp khoáng xương HA mới. So sánh với tỉ lệ ngâm 50/100 ở trên (phổ XRD sau 1 ngày ngâm không thể hiện quãng nhiễu xạ như trong trường hợp này), có thể giải thích sự khác nhau này là do trong trường hợp ngâm 50 mg bột HA trong 100 mL dung dịch SBF, HA tương tác với một lượng lớn dung dịch SBF, dẫn tới sự tương tác hóa học mạnh giữa HA và SBF làm phá vỡ cấu trúc HA, tuy nhiên vì tương tác này nhanh hơn nên kéo theo sự kết tinh lại tạo lớp khoáng HA mới cũng nhanh hơn, do đó chúng ta không quan sát quãng nhiễu xạ đặc trưng cho sự mất cấu trúc tinh thể như trong trường hợp ngâm 100 mg bột HA trong 100 mL dung dịch SBF.

Dựa vào các tài liệu [3], [4] công bố về tính chất hoạt tính sinh học của vật liệu HA cũng như các kết quả phân tích, cơ chế phân hủy HA trong dung dịch SBF được mô tả như sau:



Sau khi phá vỡ cấu trúc, sự kết tinh lại của các ion sẽ tạo một lớp khoáng xương HA mới trên bề mặt vật liệu HA cũ.



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

4. Kết luận

Vật liệu HA đã được tổng hợp thành công bằng phương pháp kết tủa. XRD và SEM khẳng định vật liệu tổng hợp có chất lượng tốt so với sản phẩm chuẩn. Vật liệu tổng hợp được ngâm trong dung dịch SBF (Simulated Body Fluid) theo các tỉ lệ khác nhau để kiểm tra và nghiên cứu về hoạt tính sinh học. Kết quả khẳng định hoạt tính sinh học của vật liệu HA qua sự hình thành một lớp khoáng HA mới trên bề mặt vật liệu HA sau khi ngâm. Tương tác hóa học của vật liệu HA và dung dịch SBF trong cơ chế hình thành lớp khoáng xương mới HA tùy thuộc vào tỉ lệ bột vật liệu và thể tích dung dịch SBF, nhưng cơ chế chung là sự phá hủy HA cũ trong dung dịch SBF sau đó là sự kết tinh lại của các ion hình thành nên lớp HA mới trên bề mặt HA cũ. Lớp HA mới này chính là cầu nối gắn kết vật liệu nhân tạo và xương tự nhiên trong phẫu thuật chỉnh hình xương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D.F. Williams, “Definitions in Biomaterials,” *Consensus Conference for the European Society for Biomaterials*, vol.4, pp. 1-72, Jan.1986.
- [2] L.L. Hench, “Bioceramics: From Concept to Clinic,” *Journal of the American Ceramic Society*, vol.74, pp. 1487-1510, Jul.1991.
- [3] E. Dietrich, H. Oudadesse, A.L. Girot and M. Mami, “*In vitro* bioactivity of melt-derived glass 46S6 doped with magnesium,” *Journal of Biomedical Materials Research*, vol.88A, pp. 1087-1096, Apr.2008.
- [4] T. Kokubo and H. Takadama, “How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity,” *Journal of Biomaterials*, vol.27, pp. 2907-2915, Jan.2006.
- [5] M. Markovic, B.O. Fowler and M.S. Tung, “Preparation and Comprehensive Characterization of a Calcium Hydroxyapatite Reference Materials,” *Journal of research of the National Institute of Standards and Technology*, vol.9, pp. 552-568, May.2004.
- [6] L. Sopyan, R. Singh and M. Hamdi, “Synthesis of nano sized hydroxyapatite powder using sol - gel technique and its conversion to dense and porous bodies,” *Indian Journal of Chemistry*, vol.47A, pp. 1626-1631, Nov.2008.
- [7] A.K. Nayak, “Hydroxyapatite Synthesis Methodologies: An Overview,” *International Journal of ChemTech Research*, vol.2, pp. 903-907, Apr.2010.
- [8]. XRD pattern of HA: JCPDS PDF no. 09-432.