www.ptcer.pl/mccm

MATERIAŁY CERAMICZNE /CERAMIC MATERIALS/, 63, 4, (2011), 773-778

Mikrostruktura, skład fazowy i wytrzymałość mechaniczna nowych substytutów kostnych opartych na hydroksyapatycie, fosforanie magnezu i siarczanie(VI) wapnia

Dawid Pijocha*, Joanna Czechowska, Mirosław M. Bućko, Zofia Paszkiewicz, Anna Ślósarczyk

Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków
*e-mail: dav_p@o2.pl

Streszczenie

Z powodu znakomitej biokompatybilności i bioaktywności fosforany wapnia takie jak hydroksyapatyt ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) oraz β-TCP ($Ca_3(PO_4)_2$) są z powodzeniem stosowane jako substytuty kostne w ortopedii, chirurgii twarzoczaszki i stomatologii. Jednak, zastosowanie tych materiałów w medycynie ogranicza się do miejsc nie przenoszących znacznych obciążeń ze względu na ich kruchość i niską wytrzymałość mechaniczną. Ich niedostatkiem jest także niezadowalająca poręczność chirurgiczna utrudniająca założenie do ubytków kostnych. Praca dotyczy opracowania i oceny kompozytu złożonego z hydroksyapatytu (HA), cementu magnezowo–fosforanowego (MPC) oraz półwodnego siarczanu(VI) wapnia (CSH) o parametrach optymalnych dla zastosowań medycznych.
Słowa kluczowe: bioceramika, cement kostny, hydroksyapatyt, siarczan(VI) wapnia

MICROSTRUCTURE, PHASE COMPOSITION AND MECHANICAL STRENGTH OF NOVEL BONE SUBSTITUTES BASED ON HYDROXYAPATITE, MAGNESIUM PHOSPHATE AND CALCIUM SULPHATE

Because of excellent biocompatibility and bioactivity, calcium phosphates such as hydroxyapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) and β-TCP ($Ca_3(PO_4)_2$) are successfully used as bone substitutes in orthopaedics, maxillofacial surgery and dentistry. However, due to low mechanical strength and brittleness, the application of these biomaterials in medicine is limited to places not loaded significantly. Limited surgical handiness is also a disadvantage of calcium phosphates, what makes difficult to place the material into bone voids. This study is focused on development of composites containing hydroxyapatite (HA), magnesium–phosphate cement (MPC) and calcium sulphate hemihydrate (CSH), and showing the optimum parameters for medical applications.
Keywords: Bioceramics, Bone cement, Hydroxyapatite, Calcium sulphate

1. Wprowadzenie

Fosforany wapnia (*calcium phosphates* - CaPs) w ortopedii, chirurgii twarzoczaszki i stomatologii cenione są przede wszystkim za doskonałe właściwości biologiczne takie jak bioaktywność, biokompatybilność i osteokonduktywność [1]. Głównymi przedstawicielami CaPs są hydroksyapatyt (HA, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), β- i α-TCP ($Ca_3(PO_4)_2$) [2, 3] oraz kompozyty HA-TCP (BCPs, *biphasic calcium phosphates*) [4]. W większości przypadków fosforany wapnia stosowane są w formie porowatych bloków lub granul. Interesującą grupę wśród kościozastępczych preparatów implantacyjnych opartych na CaPs stanowią cementy kostne CPCs (*calcium phosphate cements*) [5, 6]. Zwykle składają się one z dwóch różnych fosforanów wapnia i płynu do zarabiania, który może stanowić woda destylowana lub roztwór soli fosforanowej takiej jak NaH_2PO_4 lub Na_2HPO_4 [7]. Jako fazę ciekłą stosuje się także roztwory substancji organicznych w celu uplastycznienia otrzymywanej masy i zapobieżenia dezintegracji cementu [8]. Produktami wiązania klasycznych CPCs są amorficzny i/lub krystaliczny HA oraz bruszyt ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$) [9]. Podstawowymi wadami tych cementów są niska wytrzymałość mechaniczna oraz niedostosowanie szybkości resorpcji materiału do resorpcji kości [7]. Cement magnezowo-fosforanowy (MPC) jest cementem stosowanym głównie w budownictwie ze względu na jego specyficzne właściwości, a przede wszystkim zdolność do wiązania w bardzo krótkim czasie oraz szybkie uzyskiwanie maksymalnej wytrzymałości mechanicznej po związaniu. Ze względu na korzystne właściwości, od pewnego czasu budzi on zainteresowanie także implantologów. Proszkowy składnik MPC stanowi zwykle diwodorofosforan amonu ($NH_4H_2PO_4$) lub wodorofosforan amonu, ($(NH_4)_2HPO_4$) zmieszany w różnych proporcjach z tlenkiem magnezu. Po związaniu, podstawowym, krystalicznym składnikiem tego materiału jest struwit ($NH_4MgPO_4 \cdot 6H_2O$), obok którego obecne są także inne,

amorficzne fosforany magnezu [10]. Struwit jest biokompatybilnym minerałem występującym naturalnie w organizmie ludzkim [11, 12]. Wadą cementu MPC jest egzotermiczny przebieg jego wiązania, co jednak można wyeliminować lub ograniczyć stosując substancje opóźniające proces wiązania takie jak pirofosforan sodu ($Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$), siarczany(VI) wapnia ($2CaSO_4 \cdot H_2O$ i $CaSO_4 \cdot 2H_2O$), boran sodu itp. Siarczany(VI) wapnia o różnym stopniu uwodnienia (CSH) znane są w medycynie implantacyjnej jako materiały do wypełniania ubytków kostnych ulegające szybkiemu procesowi degradacji. Stosowane są także jako regulatory czasu wiązania oraz resorpcji [13]. Substytuty kostne oparte wyłącznie na dwuwodnym siarczanie(VI) wapnia (CSD) wykazują jednak zbyt szybką resorpcję, co wyklucza ich użycie jako jednofazowych materiałów implantacyjnych mających stanowić rusztowanie dla nowotworzącej się kości.

Celem niniejszej pracy było opracowanie, wytworzenie oraz przeprowadzenie podstawowych badań mikrostruktury, porowatości, składu fazowego oraz wytrzymałości na ściskanie nowego, kompozytowego materiału implantacyjnego wiążącego *in situ*, którego składnik proszkowy stanowią, hydroksyapatyt, cement MPC oraz półwodny siarczan(VI) wapnia (CSH), zmieszane w różnych ilościach. Wytypowano optymalny skład proszkowy substytutu kierując się wymaganiami stawianymi tego typu biomateriałom.

2. Eksperyment

Fazy proszkowe badanych materiałów HCM składały się z hydroksyapatytu, półwodnego siarczanu(VI) wapnia i cementu MPC. Proszek hydroksyapatytu otrzymano metodą mokrą [14] z tlenku wapnia (cz.d.a, POCH, Polska) oraz kwasu fosforowego(V) (cz.d.a., Lach-Ner, Czechy). Składnikami wyjściowymi cementu MPC były MgO, otrzymany poprzez wyprażanie w temperaturze 1300°C zasadowego węglanu magnezu ($4MgCO_3 \cdot Mg(OH)_2 \cdot 5H_2O$, cz.d.a., Chempur, Polska) oraz diwodorofosforan amonu ($NH_4H_2PO_4$, cz.d.a., POCH, Polska). Proszek CSH stanowił $2CaSO_4 \cdot H_2O$ (cz.d.a, Across Organics, USA). We wszystkich przypadkach używano wody destylowanej jako cieczy do zarabiania. Składy ilościowe badanych zestawów przedstawiono w Tabeli 1. Dwa spośród nich stanowiły układy dwuskładnikowe: próbki HC i HM, pozostałe 3 z serii HCM to układy trójskładnikowe.

Dla każdego wyjściowego zestawu proszków ustalono optymalny stosunek wody do proszku oraz zmierzono przy użyciu aparatu Gillmore'a czasy wiązania: początkowy, t_0, i końcowy, t_k. Próbki 24 godziny po związaniu i stwardnieniu poddano analizie XRD stosując dyfraktometr rentgenowski X'Pert Pro firmy Panalytical. Analizę ilościową faz krystalicznych przeprowadzono metodą Rietvelda. Zmierzono porowatość otwartą badanych materiałów metodą porozymetrii rtęciowej na aparacie Autopore IV firmy Micromeritics. Wytrzymałość na ściskanie wszystkich materiałów po stwardnieniu określono za pomocą aparatu INSTRON 3345. Do badań wytrzymałościowych wykorzystano serie po 10 próbek. Obserwacje mikrostruktury przełamów SEM i analizę EDS w mikroobszarach przeprowadzono za pomocą mikroskopu skaningowego Nova Nanosem 200 (Fei Company) po 24. godzinach od przygotowania próbek.

Tabela 1. Składy ilościowe badanych mieszanin proszków.
Table 1. Quantitative compositions of the studied powder mixtures.

Symbol próbki	HA [% mas.]	MPC [% mas.]	CSH [% mas.]
HC	40	-	60
HCM1	40	15	45
HCM2	40	30	30
HCM3	40	45	15
HM	40	60	-

3. Wyniki i dyskusja

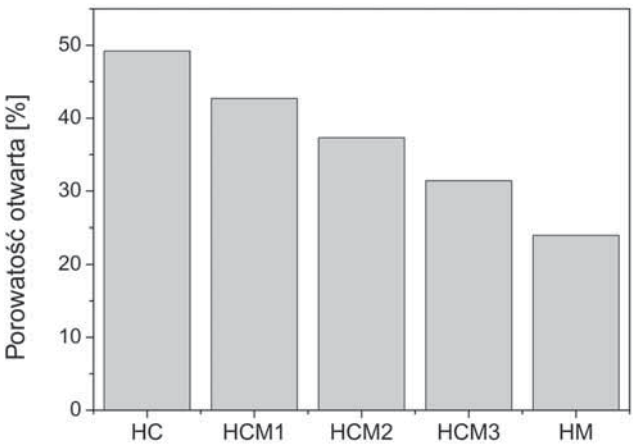
Tabela 2 przedstawia ustalone stosunki cieczy (wody) do proszku (*L*/*P*) oraz czasy wiązania odpowiadające poszczególnym materiałom. Stosunek wody do proszku ustalono tak, aby konsystencja każdego materiału po zarobieniu odpowiadała konsystencji płynnej pasty. Po dodaniu wody zaobserwowano znaczącą zmianę płynności pasty w trakcie pierwszych minut wiązania i gęstnienia materiału. Przy ustalaniu *L*/*P* kierowano się zasadą, aby czas wiązania odpowiadał optymalnemu czasowi potrzebnemu na umiejscowienie potencjalnego preparatu kościozastępczego w miejscu implantacji. Po dodaniu wody do mieszaniny proszków HM zaobserwowano wydzielanie się dużych ilości ciepła i prawie natychmiastowe wiązanie (< 1 min.). W pozostałych materiałach obecna faza CSH pełniła funkcję zarówno fazy wiążącej zgodnie z reakcją:

$$2CaSO_4 \cdot H_2O + 3H_2O \rightarrow 2(CaSO_4 \cdot 2H_2O), \qquad (1)$$

Tabela 2. Stosunki cieczy do fazy stałej, L/P, oraz początkowe, t_0, i końcowe, t_k, czasy wiązania badanych materiałów.
Table 2. Liquid to powder ratios, L/P, and initial, t_0, and final, t_k, setting times of the studied materials.

Symbol próbki	*L*/*P* [ml·g^{-1}]	t_0 [min.]	t_k [min.]
HC	0,54	4	9
HCM1	0,56	6	13
HCM2	0,42	8	16
HCM3	0,48	6	12
HM	0,26	< 1*	< 1*

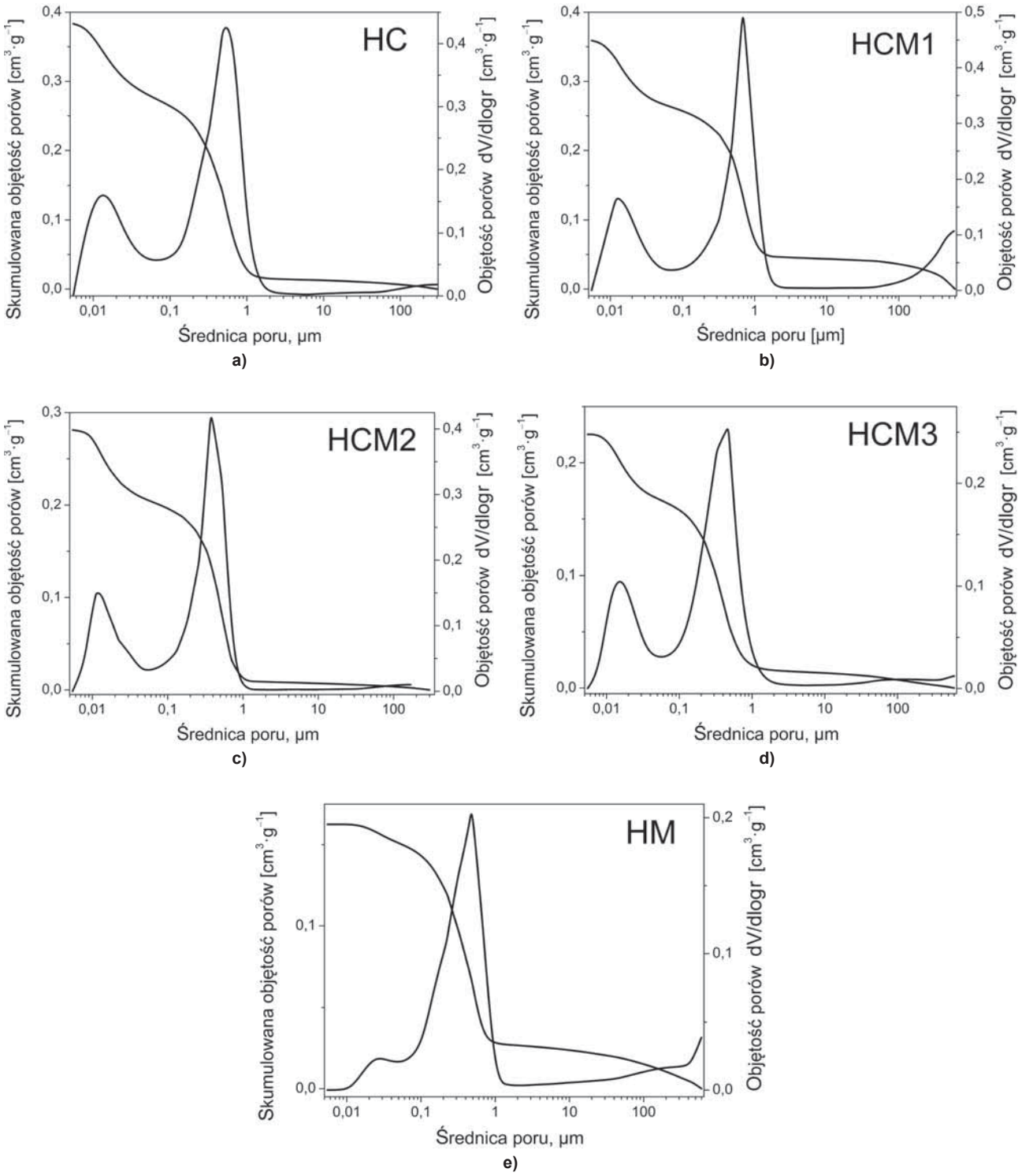
** - wydzielanie dużej ilości ciepła.*



Rys. 1. Porowatość otwarta próbek po związaniu i stwardnieniu.
Fig. 1. Open porosity of the samples after setting and hardening.

Tabela 3. Składy fazowe badanych materiałów po związaniu i stwardnieniu.
Table 3. Phase compositions of the studied biomaterials after setting and hardening.

Symbol próbki	HA [% mas.]	Struwit [% mas.]	Gips [% mas.]	Bassanit [% mas.]	Bruszyt [% mas.]
HC	33,0	-	67,0	-	-
HCM1	22,0	11,4	62,4	-	4,2
HCM2	23,0	30,8	36,9	4,8	4,5
HCM3	40,4	44,9	6,8	-	7,9
HM	45,9	54,1	-	-	-



Rys. 2. Rozkłady wielkości porów w badanych próbkach po związaniu i stwardnieniu: a) HC, b) HCM1, c) HCM2, d) HCM3, e) HM.
Fig. 2. Pore size distributions in the studied samples after setting and hardening: a) HC, b) HCM1, c) HCM2, d) HCM3, e) HM.

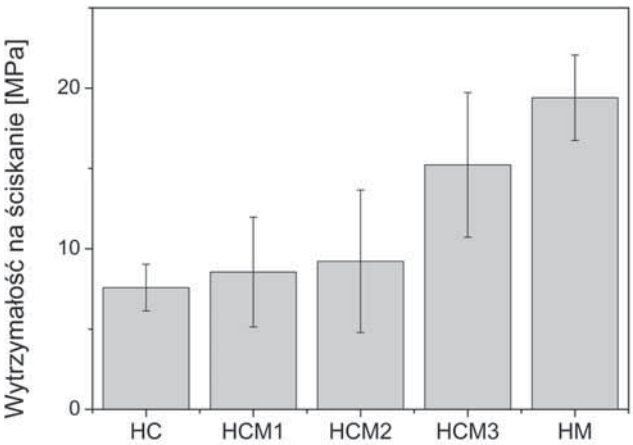
jak i opóźniacza reakcji wiązania cementu MPC, która zachodzi zgodnie z reakcją:

$$NH_4H_2PO_4 + MgO + 5H_2O \rightarrow NH_4MgPO_4 \cdot 6H_2O. \quad (2)$$

Analiza rentgenowska próbek HCM1-3 po związaniu wykazała obecność trzech faz krystalicznych: hydroksyapatytu, CSD ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$) i struwitu ($NH_4MgPO_4 \cdot 6H_2O$) (por. Tabela 3). Ponadto zawierały one niewielkie ilości (< 8 % mas.) bruszytu ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$), a materiał HCM2 również uwodnionego siarczanu(VI) wapnia o nieustalonej ilości wody - bassanitu ($CaSO_4 \cdot xH_2O$, $1/2 \leq x \leq 3/2$). W tworzywie HC obecny był jedynie HA oraz CSD, zaś w tworzywie HM jedynie HA i struwit. W żadnym z preparatów nie stwierdzono obecności wolnego MgO, w przeciwieństwie do doniesień literaturowych [15]. Bruszyt jest fosforanem wapnia stabilnym przy pH < 4,2 [16]. Jest on także produktem wiązania cementów opartych na fosforanach wapnia, w których stosunek molowy Ca/P wynosi poniżej 1,5 [17]. Można więc założyć, że obecność niewielkich ilości fazy bruszytowej w produkcie wiązania jest wynikiem lokalnego obniżenia się pH zaczynu cementowego wskutek rozpuszczania się siarczanów(VI) wapnia (będących źródłem jonów Ca^{2+}) oraz diwodorofosforanu sodu (źródło jonów fosforanowych). Obecność niestechiometrycznego, uwodnionego siarczanu(VI) wapnia w próbce HCM2 jest spowodowana najprawdopodobniej niską wartością stosunku *L/P* (0,42). Przy takim stosunku *L/P*, ilość wprowadzonej wody może być niewystarczająca do przeprowadzenia fazy CSH w CSD.

Porowatość otwarta badanych próbek mieściła się w zakresie 24,0-49,2 % (Rys. 1). Stwierdzono, że wzrost zawartości CSH w wyjściowej fazie proszkowej materiału powoduje wzrost jego porowatości. Rozkłady wielkości porów w badanych materiałach przedstawiono na Rys. 2 i w Tabeli 4. Rozkład ten dla wszystkich próbek jest dwumodalny i mieści się w zakresie od 0,005 do 3 μm.

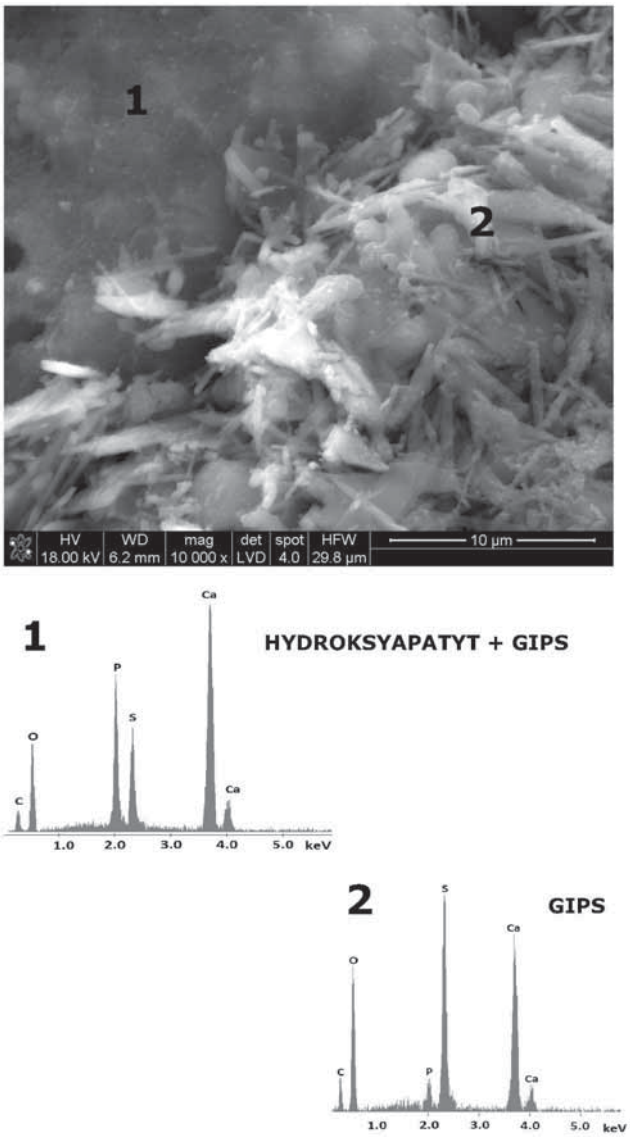
Wytrzymałość na ściskanie badanych kompozytów po stwardnieniu koreluje z ich porowatością (Rys. 3). Najwyższą wytrzymałość wykazywał materiał HM (19,4 MPa), jednakże z uwagi na zbyt szybki proces wiązania i towarzyszący mu efekt cieplny związany z zajściem reakcji zobojętniania i hydratacji, nie można go zastosować jako materiał do wypełnienia ubytków kostnych. Najniższą wytrzymałość na ściskanie wykazywał materiał HC składający się po związaniu jedynie z gipsu i hydroksyapatytu (7,6 MPa).



Rys. 3. Wytrzymałość na ściskanie badanych próbek 24 godziny po związaniu i stwardnieniu.
Fig. 3. Compressive strength of the studied samples 24 hours after setting and hardening.

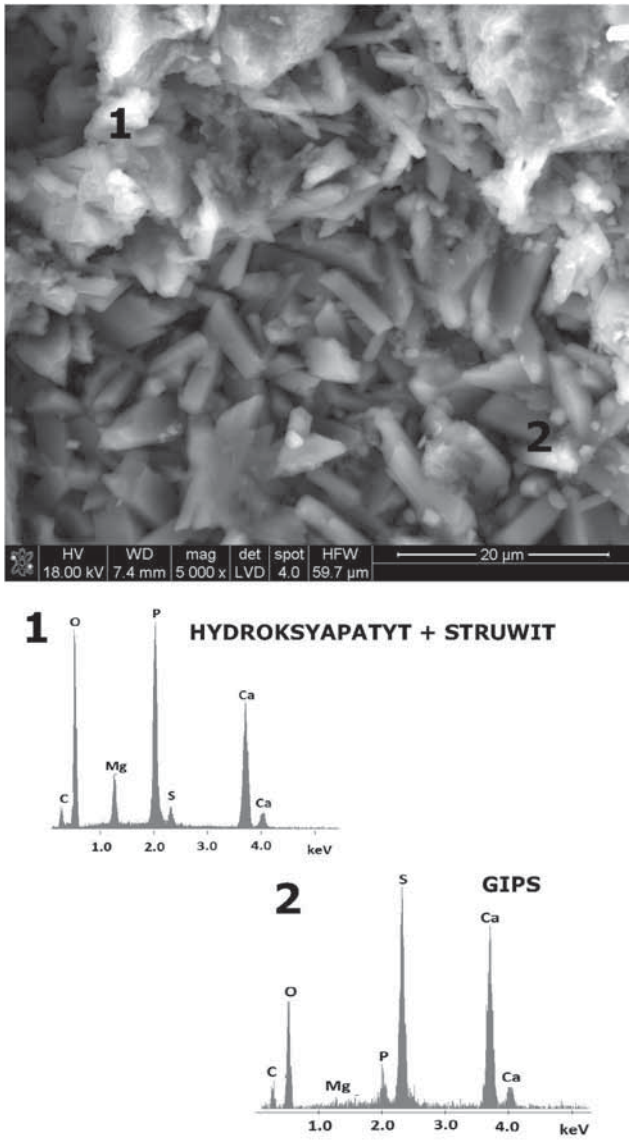
Tabela 4. Parametry rozkładów wielkości porów w badanych próbkach 24 godziny po związaniu i stwardnieniu.
Table 4. Parameters of pore size distributions in the studied materials 24 hours after setting and hardening.

Symbol próbki	Parametry rozkładu wielkości porów [μm]			
	Zakres I	Moda I	Zakres II	Moda II
HC	0,005-0,070	0,017	0,070-3,000	0,400
HCM1	0,006-0,330	0,018	0,330-1,200	0,710
HCM2	0,006-0,250	0,013	0,025-0,980	0,510
HCM3	0,008-0,056	0,014	0,056-1,200	0,440
HM	0,012-0,052	0,024	0,052-0,970	0,480

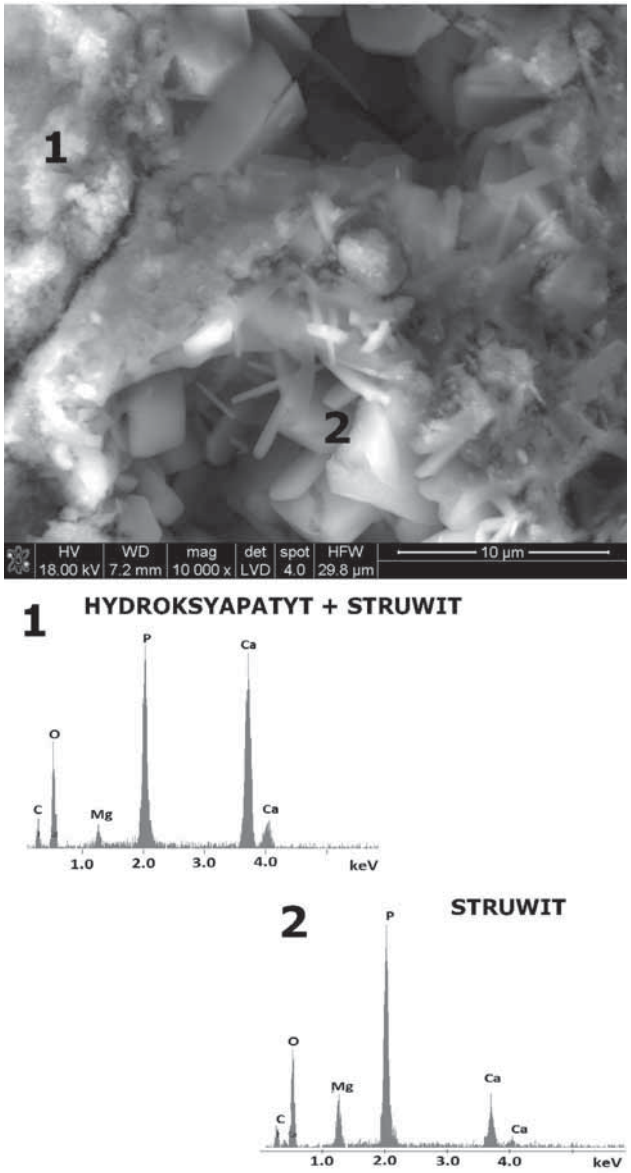


Rys. 4. Obraz SEM i analizy EDS w mikroobszarach próbki HC 24 godziny po związaniu i stwardnieniu.
Fig. 4. SEM image and EDS analysis in microareas of the HC sample 24 hours after setting and hardening.

Obrazy mikrostruktury przełamów próbek HC, HCM2 i HM przedstawiono na Rys. 4-6. Widoczne są na nich podłużne kryształy gipsu (CSD), a także blaszkowate kryształy struwitu otaczające ziarna hydroksyapatytu. Rys. 5 przedsta-



Rys. 5. Obraz SEM i analiza EDS w mikroobszarach próbki HCM2 24 godziny po związaniu i stwardnieniu.
Fig. 5. SEM image and EDS analysis in microareas of the HCM2 sample 24 hours after setting and hardening.



Rys. 6. Obraz SEM i analiza EDS w mikroobszarach próbki HM 24 godziny po związaniu i stwardnieniu.
Fig. 6. SEM image and EDS analysis in microareas of the HM sample 24 hours after setting and hardening.

wia obraz przełamu próbki, gdzie występują dwie fazy wiążące: gips i struwit. Analiza EDS w mikroobszarach potwierdza obserwację mikroskopową.

4. Podsumowanie i wnioski

Otrzymano kościozastępczy, kompozytowy materiał implantacyjny HCM o dobrej poręczności chirurgicznej oparty na hydroksyapatycie, siarczanie(VI) wapnia oraz cemencie magnezowo–fosforanowym MPC.

Wykazano, że preparaty dwuskładnikowe oparte na HA i MPC oraz HA i CSH wykazują wprawdzie właściwości wiążące, jednakże z uwagi na zbyt intensywne wydzielanie ciepła w trakcie wiązania (materiał HM) oraz zbyt niską wytrzymałość na ściskanie (materiał HC) nie rokują nadziei na możliwość zastosowania w medycynie.

W zależności od składu proszku (udział faz HA, MPC i CSH) oraz stosunku fazy ciekłej do proszku (*L*/*P*), preparaty HCM wiążą w czasie pozwalającym na ich umieszczenie podczas implantacji w ubytku kostnym.

Otrzymane materiały implantacyjne po związaniu składają się głównie z trzech faz krystalicznych: hydroksyapatytu, struwitu ($NH_4MgPO_4 \cdot 6H_2O$) oraz gipsu dwuwodnego ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$). Stwierdzono w nich także obecność niewielkich ilości bassanitu ($CaSO_4 \cdot xH_2O$, $1/2 \leq x \leq 3/2$) oraz bruszytu ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$).

W obrazach SEM tworzyw HCM dominują dobrze wykształcone kryształy struwitu. Obok nich widoczne są iglaste kryształy gipsu oraz drobnoziarnisty hydroksyapatyt. Gips i struwit stanowią fazy wiążące.

Wytrzymałość na ściskanie wszystkich badanych materiałów dwu- i trójskładnikowych po związaniu i stwardnieniu zawiera się w przedziale od 7,6 MPa (tworzywo HC) do 19,4 MPa (tworzywo HM) i koreluje z wynikami badań porozymetrycznych; porowatość otwarta osiąga wartości od 24,0 % (HM) do 49,2 % (HC).

Za optymalny z punktu widzenia potencjalnych aplikacji medycznych uznano kompozyt składający się z 40 % mas. HA, 15 % mas. $2CaSO_4 \cdot H_2O$ i 45 % mas. MPC.

W celu pełnej oceny otrzymanych biomateriałów niezbędne jest ich przetestowanie biologiczne w testach *in vitro* i *in vivo*.

Podziękowania

Prace zostały wykonane w ramach projektu UDA-POIG.01.03.01-00-005/09 współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

Składamy serdeczne podziękowania Pani mgr inż. Barbarze Trybalskiej za przeprowadzenie badań SEM.

Literatura

[1] Detsch R., Mayr H., Ziegler G.: Acta Biomater., 4, (2008), 139.
[2] LeGeros R.Z.: Clin. Orthop. Relat. Res., 395, (2002), 81.
[3] Li B., Chen X., Guo B., Wang X., Fan H., Zhang X.: Acta Biomater., 5, (2009), 134.
[4] Zhu Z.L., Yu H.Y., Zeng Q., He H.W.: Appl. Surf. Sci., 255, (2008), 552.
[5] Driessens F.C.M., Fernandez E., Ginebra M. P., Boltong M. G., Planell J.A.: Anales de Quimica International Editio, 93, (1997), 538.
[6] Pina S., Olhero S.M., Gheduzzi S., Miles A.W., Ferreira J.M.F.: Acta Biomater., 5, (2009), 1233.
[7] Julien M., Khairoun I., LeGeros R.Z., Delplace S., Pilet P., Weiss P., Daculsi G., Bouler J. M., Guicheux J.: Biomaterials, 28, (2007), 956.
[8] Dickens S.H., Flaim G.M.: Dental Materials, 24, (2008), 1273.
[9] Grover L.M., Knowles J.C., Fleming G.J.P., Barralet J.E.: Biomaterials, 24, (2003), 4133.
[10] Soudée E., Péra J.: Cem. Conc. Res., 30, (2000), 315.
[11] Yua Y., Wang Y., Liu C., Zhang B., Chen H., Guo H., Zhong G., Qu W., Jiang S., Huang H.: Colloids Surf. B, 76, (2010), 496.
[12] Tamimi F., Nihouannen D., Bassett D.C., Ibasco S., Gburek U., Knowles J., Wright A., Flynn A., Komarova S. V., Barralet J.E.: Acta Biomater., 7, (2011), 2678.
[13] Bohner M.: Biomaterials, 25, (2004), 741.
[14] Ślósarczyk A., Stobierska E., Paszkiewicz Z., Gawlicki M.: J. Am. Ceram. Soc., 79, (1996), 2539.
[15] Metres G., Ginebra M.P.: Acta Biomater., 7, (2011), 1853.
[16] Cama G., Barberis F., Botter R., Cirillo P., Capurro M., Quarto R., Scaglione S., Finocchio E., Mussi V., Valbus U.: Acta Biomater., 5, (2009), 2161.
[17] Arifuzzaman S.M., Rohani S.: J. Cyst. Growth, 267, (2004), 624.

♦

Otrzymano 11 października 2011, zaakceptowano 17 listopada 2011