

水溶液からのハイドロキシアパタイトの合成 に関する基礎的研究

藤野 治、田村浩之、合田四郎

The Basic Study on the Synthesis of Hydroxyapatite in Solution

Osamu Fujino, Hiroyuki Tamura and Shiro Gohda

*Research Institute for Science and Technology, Kinki University,
Kowakae, Higashi-Osaka 577-8502, Japan*

(Received, November 28, 2002)

Abstract

The hydroxyapatite was formed by the extremery slow addition of diammonium hydrogenphosphate to solution of calcium nitrate buffered with etylenediamine at 36.5 . The Ca/P molar ratio in precipitate yielded was measured by ICP-AES, and condition of crystal exasmined by X-ray system. This synthetic apatite compared with mineral apatite, human tooth, bone of cattle and pig. The crystallization condition was inferior to mineral apatite, however, it was extremery similar in crystallization condition and Ca/P molar ratio of human tooth.

Key words: Synthesis hydroxyapatite, ICP-AES, X-ray diffraction pattern, Natural apatite,

1 はじめに

骨や歯を構成している無機主成分は、リン酸カルシウム的一种であるハイドロキシアパタイト(以下 HAp と略記)であり、一般に $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ の化学式で示され、その結晶構造は、六方晶系である¹⁾。

HAp はカルシウムの熱水溶液に、リンの水溶液を滴下することにより HAp の結晶構造を持つ沈殿を生成させることができる^{1) 2)}。

しかし、この系は低温における結晶化

や化学量論的なカルシウム対リンのモル比(以後 Ca/P 比と略記)1.67 を有する沈殿を得ることは極めて難しい。

又一方、放射性核種ストロンチウム - 90 や公害元素カドミウムは、生体の骨に沈着されやすいことで知られる。

そこで著者らは、これらに関する基礎的知見を得るため、実験室系かつ人間の体温である 36.5 におけるアパタイトの生成と微量金属イオンの固-溶液相間分配に

興味を持ち、まずここでは水溶液から HAp を生成する方法について検討した結果を報告する。

2.実験

2.1 試薬および装置

使用した標準溶液、試薬類、有機溶媒はすべて和光純薬株式会社、またはナカライテスク株式会社製の特級および精密分析用を使用した。

また発光測定には、日本ジャーレラッシュ株式会社製の高周波アルゴンプラズマ発光分析装置 ICAP-575 型を使用した。周波数 27.12MHz、定格最大出力 2kW、分光部は焦点距離 0.75m のツェルニターナ型、回折格子は 1800 溝数/mm、入射および出射スリット幅は共に 10 μ m、プラズマトーチは石英ガラス製を、ネブライザーにはクロスフロー型を用い、測定は Table1 の条件に従った。

Table1: Measuring conditions

Element	Wave-length (nm)	RF power (kW)	Carrier gas flow rate (l/min)
Ca	393.366	2.0	0.45
P	213.618	2.0	0.4

X 線構造解析には、理学電気株式会社製の粉末 X 線回折装置(RINT2500)を用い、以下の条件で測定を行った。X 線:Cu K-ALPHA1 /40kV /80mA、ゴニオメーター:RINT2000 広角ゴニオメーター、発散スリット、散乱スリット:1deg、受光スリット:0.15mm、走査モード:連続、スキャンスピード:6°/min、スキャンステップ:0.02°、走査軸:2 θ / θ 、走査範囲:20~60°、 θ オフセット:0°、固定角:0°。

pH メーターは株式会社堀場製作所製カスタニーLAB 型の pH メーターF-22 を、送液ポンプにはヤマト科学株式会社製マスターフレックス送液ポンプ 7520-40 型を使用した。

2.2 HAp 合成操作

HAp の合成は、硝酸カルシウムを含む水溶液に、リン酸水素アンモニウム水溶液をゆっくりと滴下し、HAp の沈澱を生成させる方法、すなわちガラス容器(1 l)に

告する。

0.1mol/l のカルシウムイオンを含む水溶液 200ml を入れ、合成温度(36.5)および pH を一定に保つため、それぞれ恒温槽およびエチレンジアミンを緩衝溶液として用いた。

試料溶液が恒温(36.5)に達した所で、アルゴンガスを吹き込みながら 0.1mol/l のリン酸水素アンモニウム溶液を一定速度で滴下することにより HAp の沈澱を生成させた。

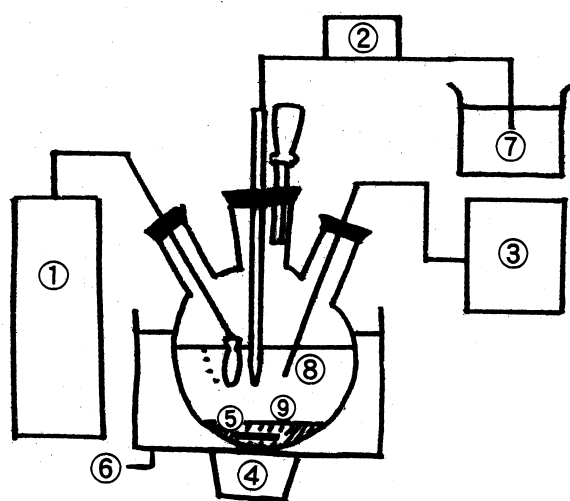


Fig.1 Schematic diagram of the apparatus

for synthesis of hydroxyapatite

- ①Ar-gas, ②pump, ③pH meter and thermometer,
- ④motor, ⑤rotor, ⑥heater, ⑦(NH₄)₂HPO₄,
- ⑧Ca(NO₃)₂ · 4H₂O and NH₂CH₂CH₂NH₂ (Ethylenediamine)
- ⑨precipitation(hydroxyapatite)

Hap 沈澱の同定には上記で得られた沈澱は No.5C のろ紙にて、ろ過、これを 110 恒温槽で乾燥後、その一部を塩酸で溶解させ ICP 発光分析法により、Ca 及び P の濃度を測定し Ca/P 比を求めた。また一方、残った試料は粉末 X 線構造解析に供し、結晶化状態を調べた。

3.結果と考察

3.1 ICP-発光分析法による

Ca と P の測定条件

ICP 発光分析法(以後 ICP-AES と略記)では、測定する条件により発光強度や S/N 比(被検元素とバックグラウンドの発光強度)が大きく異なる。そこで、生成した沈澱の Ca/P を測定する際の測定条件について詳細な検討を行った。

ここでは発光強度に大きく影響すると考えられるキャリアーガス流量とプラズマ出力(RF power)の 2 つのパラメーターについて検討した。

3.1.1 高周波出力の影響

高周波出力(RF power)を変化させたときの Ca と P の発光強度に対する影響を検討した。

キャリアーガス流速を固定し、高周波出力を 0.8 ~ 2.0kW に変化させたときの結果を Fig.2 に示す。

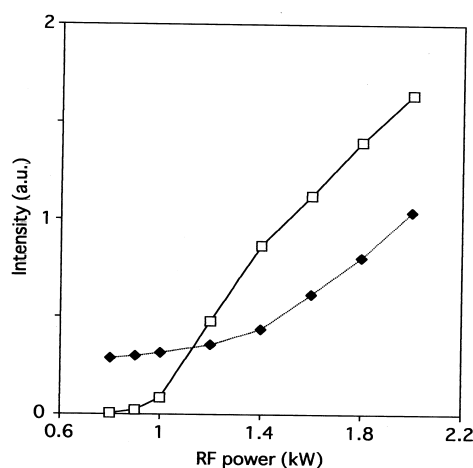


Fig.2 Effect of RF power for intensities of Ca and P

Ca: 4ppm P: 10ppm
Carrier gas flow rate: 0.4 l/min

高周波出力の増加に伴い被検元素の発光強度が上昇することを示している。この現象は、出力を上昇させるとそれに伴ってプラズマ炎の温度が上昇し、励起される原子やイオンの数が増大するためと考えられる。

3.1.2 キャリヤーガス流速の影響

試料溶液をプラズマ炎に導入する際の Ca と P の発光強度に対するネブライザーのキャリアーガス流速の影響について検討し、その結果を Fig.3 に示した。

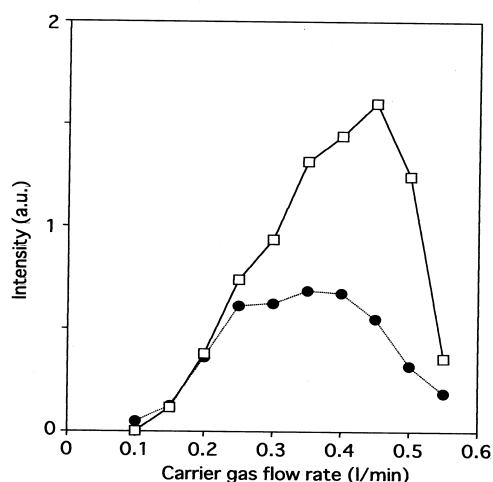


Fig.3 Effect of carrier gas flow rate for intensities Ca and P

Ca: 4ppm P: 10ppm
RF power: 2.0kW

これは高周波出力(RF power)を固定し、キャリアーガス流速を 0.10 ~ 0.55 l/min まで変化させ、各元素ごとに発光強度が最大となる条件を求めたものである。また、このような曲線を示す原因としては、キャリアーガス流速を上昇させると試料の吸い上げ速度が上がり、プラズマ炎内に導入される原子の濃度が最大となり、その最大強度を示す流速、Ca では 0.50 l/min、P では 0.45 l/min 以上になるとプラズマ炎の温度が下がるためと考えられ、それに伴って励起される原子及びイオン濃度が減少し発光線の強度が低下することが考えられる。

3.2 共存塩類の影響

3.2.1 Ca と P との相互干渉について

ICP 発光分析法による定量を行う際に、測定波長において他の共存元素からのスペクトルの重なりによる、分光干渉をはじめ物理および化学干渉などが生じる可能性がある。従って、これらの干渉が生じると、正確な定量値を得ることは困難となるため、ここでは Ca と P の相互干渉について検討した。

Ca についてはその 1ppm の溶液に 0.5 ~ 10 倍の濃度の P を共存させ、P については 100ppm の溶液に対し 0.5 ~ 10 倍の濃度の Ca を共存させ、干渉の有無を検討した。その結果、いずれにおいても影響は認められなかった。

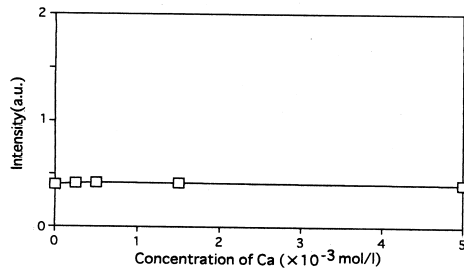


Fig.4 Effect of concentration of Ca for intensities of P

P: 5.0×10^{-5} mol/l RF power: 2.0kW
Carrier gas flow rate: 0.45 l/min
plasma: 0.2 l/min

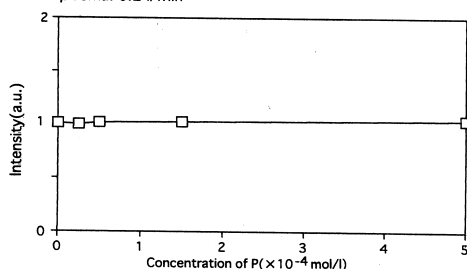


Fig.5 Effect of concentration of P for intensities of Ca

Ca: 5.0×10^{-4} mol/l
RF power: 2.0kW
Carrier gas flow rate: 0.4 l/min
plasma: 0.2 l/min

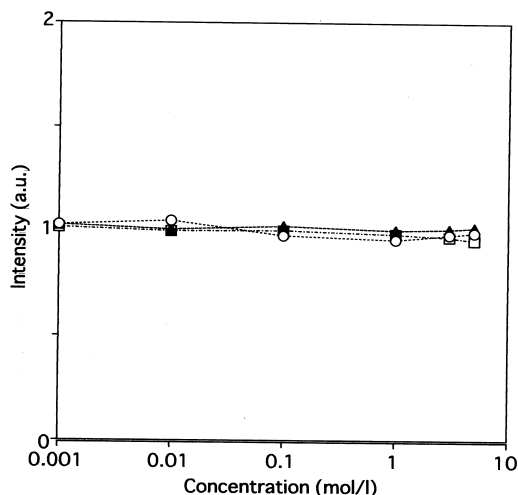


Fig.6 The effect of acid in concentration on the intensities of Ca

Ca: 2ppm
Carrier gas flow rate: 0.45l/min (ultratrace annalysis)
RF power: 2.0kW
plasma: 0.2l/min

---○--- : HCl
---▲--- : HCl
---□--- : HNO₃

3.2.2 無機酸の影響

合成した試料は無機酸を用いて分解を行うために、硝酸と塩酸の Ca(2ppm)の発光強度に対する濃度の影響について検討し、その結果を Fig.6 に示したが、これら 0.001 ~ 5mol/l の濃度範囲では全く干渉が見られなかった。

3.3 アパタイトの合成

3.3.1 市販品アパタイトの分析

アパタイトを合成するにあたり、合成したアパタイトを評価するため、ここでは市販されているアパタイトやアパタイト鉱石を粉末にしたものを用いて Ca/P 比および粉末 X 線構造解析における回折パターンを測定し、結晶化状態を比較した。

Table2: Molar ratio of Ca/P in various apatite in each manufacture

Apatite	Ca/P molar ratio
Stantard apatite {Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ }	1.67
China(Mineral)	1.42 ± 0.02
Aldrich(HAp)	1.17 ± 0.06
Nacalai tesque (HAp)	1.20 ± 0.03
Wako (FAp)	1.35 ± 0.01
Wako (HAp)	1.38 ± 0.06

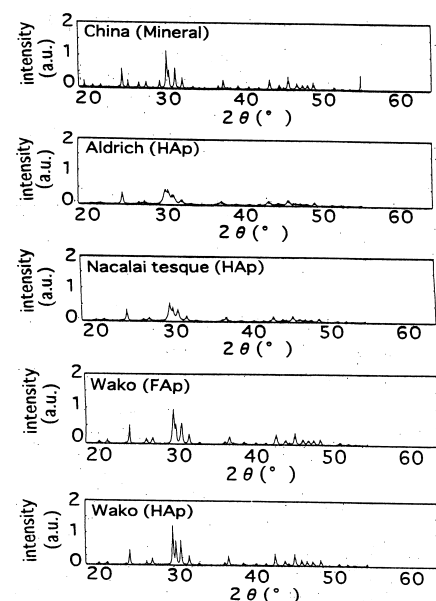


Fig.7 The condition of crystal at various apatite

その結果、X線回折のピークは強度に差は認められるが、それぞれの面間隔を示すピーク位置は文献値^{1),2)}による標準アパタイトとほぼ一致した。しかし、Ca/P比が、Table2に示すように、理論値1.67に比べ、全体的に低い値であった。これは合成時におけるリンの滴下速度および適下量が大いため十分反応出来ず、リン過剰のアパタイトが合成されたと考えられる。また、鉱石アパタイトのCa/P比も1.67より低い値を示した。これは鉱石であるため、鉱物中のアルカリ土類金属や重金属イオンが含まれていたためであると考えられる。

以上のことより市販アパタイトは結晶化の状態は良好な製品もあったが、Ca/P比はいずれの製品も理論値には程遠くアパタイトとは言い難いものがほとんどであった。

3.3.1 沈殿率および温度の影響

HApを合成する際の水溶液中のカルシウムの各沈殿率(10~100%)に対するCa/P比および結晶化状態を合成温度20~80の範囲で検討した。

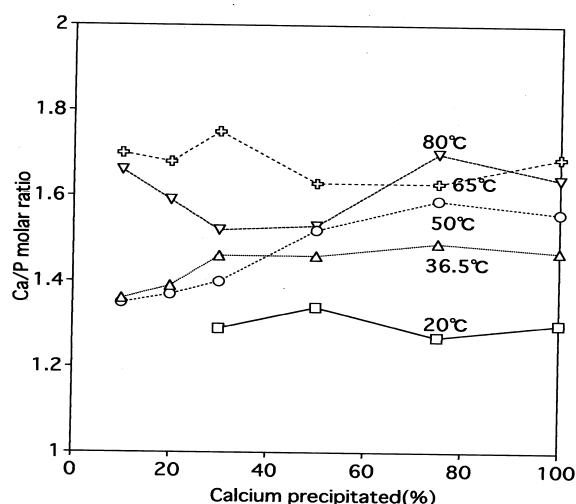


Fig.8 The Ca/P ratio in the precipitates formed at various temperature

Synthesis condition
Ca: 0.04M P: 0.1M
Dropping velocity of phosphate: 10ml/h
pH 7.5 36.5°C

—□— : 20°C
—△— : 36.5°C
—○— : 50°C
—▽— : 65°C
—◇— : 80°C

Fig.8の結果より、Ca/P比は、温度の上昇に伴ってCa/P比も上昇することが判明した。これは温度の上昇に伴い、反応速度が早まるためである。従って20のような低温状態ではカルシウムが不足しているアパタイトが生成するとともに、結晶の熟成が十分になされなかったためと考えられる。また、各温度においての沈殿率変化がもたらす影響を見ると、沈殿率の上昇に伴いCa/P比もやや上昇する傾向があった。

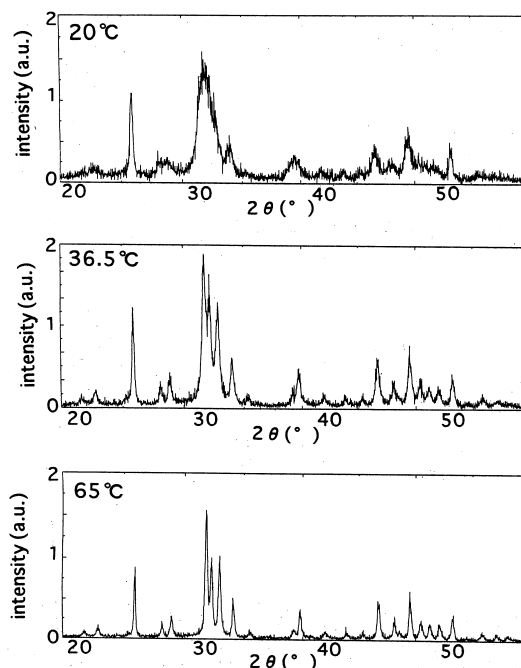


Fig.9 The condition of crystal in the precipitates formed at various temperatures

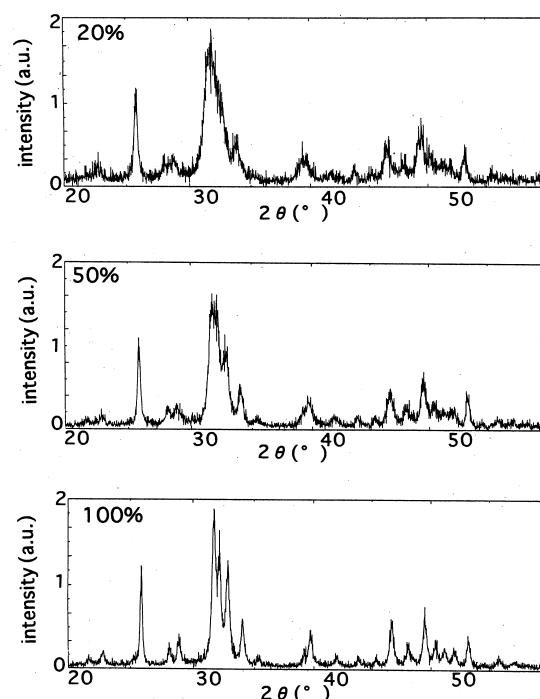


Fig.10 The condition of crystal in the precipitates formed at various precipitation rates

一方、Fig.9~10が示すX線回折パターンの測定結果では、低温で合成されたアパタイトよりも高温で合成されたアパタイトのほうが結晶化が進んでいることが明らかであった。また沈殿率が低いと結晶化も進んでおらず、アモルファスが多く生成されている。しかし沈殿率が大きくなるに従って結晶化が進むことを示している。これら

の理由として高温であるほど、結晶の熟成時間が短くなり、安定な結晶が迅速に多く析出されるためである。また沈殿率増加に伴って、結晶が熟成されるが、これは沈殿生成後の時間に比例し、結晶化状態が良好となったと考えられる。

3.3.2 リン酸塩適下速度変化による影響
リン酸塩適下速度を 5~100ml/h まで変化させたときの各 HAp の Ca/P 比および結晶化状態を調べ、最適条件を検討した。

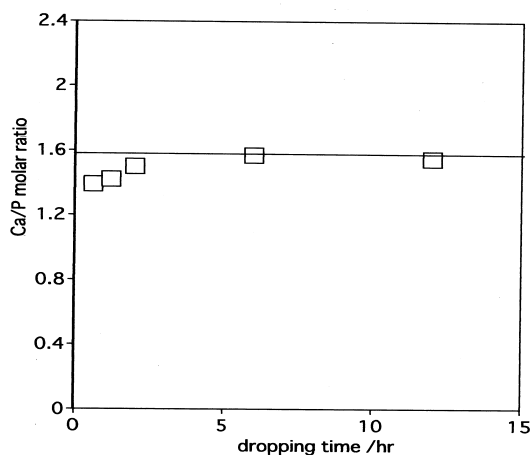


Fig.11 The Ca/P ratio in the various dropping time

synthesis condition
Ca, P: 0.1mol/l pH8
36.5°C Dropping volume of
phosphate: 60ml precipitation: 50%

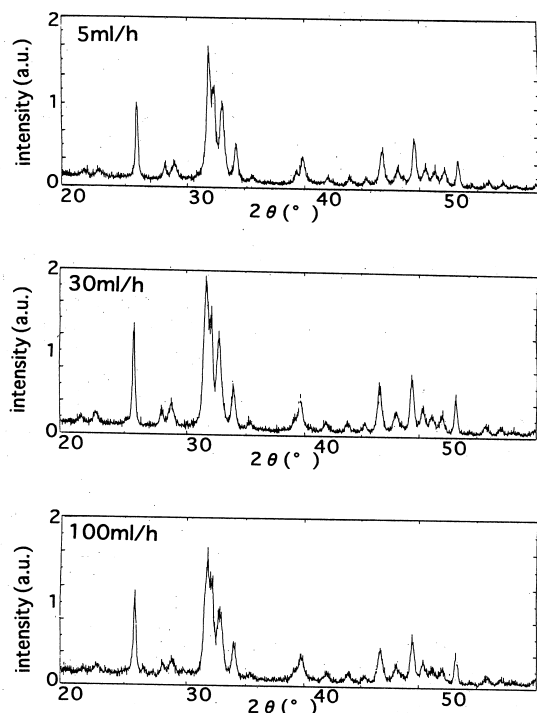


Fig.12 The condition of crystal in the precipitates formed at various dropping velocity of phosphate

Fig.11 が示す結果を見ると、滴下速度が速いときでは Ca/P 比は低い値をとり、適下速度が遅くなって行くにつれて Ca/P 比は上昇していく結果となった。しかし、適下速度が 10ml/h 以下になると Ca/P 比はほぼ一定化した。適下速度が速いと単位時間あたりの滴下量も増加する。このことから溶液中の大量のリン酸イオンとカルシウムイオンが反応し、OH⁻と反応し難くなったのではないかと推測される。

次に結晶化状態は、Fig.12 の結果より適下速度が速いと生じるアモルファスの量も多く X 線回折パターンにおける各ピークの高さがかなり低い値を示した。これは Ca/P 比の影響で述べた事と同様に、瞬時に沈殿が生じるが、結晶化速度は遅いため大量のアモルファスを生じさせたと考えられる。逆に適下速度が遅くなるにつれ、結晶化状態が良好となることは実験的にも認められた。

以上の結果より X 線回折パターンや Ca/P 比は適下速度が 5ml/h と 10ml/h において、ほとんど変化がなく、以後のリン酸塩適下速度は 10ml/h に決定した。

3.3.3 pH の影響

カルシウム溶液中の pH を 4.5~11 まで変化させたとき、合成した HAp の Ca/P 比及び結晶化状態を調べ、最適条件を検討し、それらの結果を Fig.13 と Fig.14 に示した。

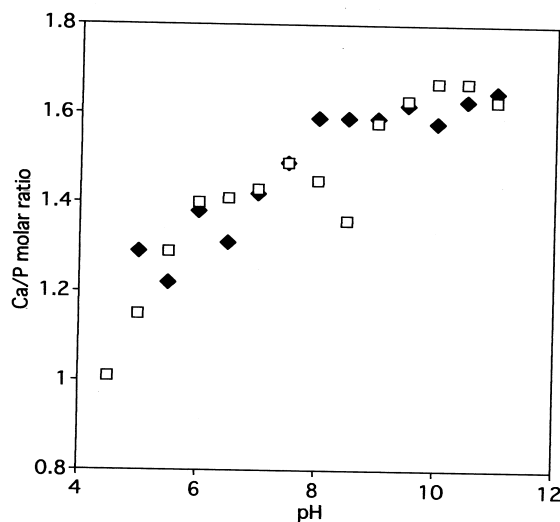


Fig.13 The pH effect of Ca/P ratio

Synthesis condition
Ca, P: 0.1mol/l
Dropping velocity of phosphate: 10ml/h
precipitation rates: 50% 36.5°C

□ Ca/P No.1
◆ Ca/P No.2

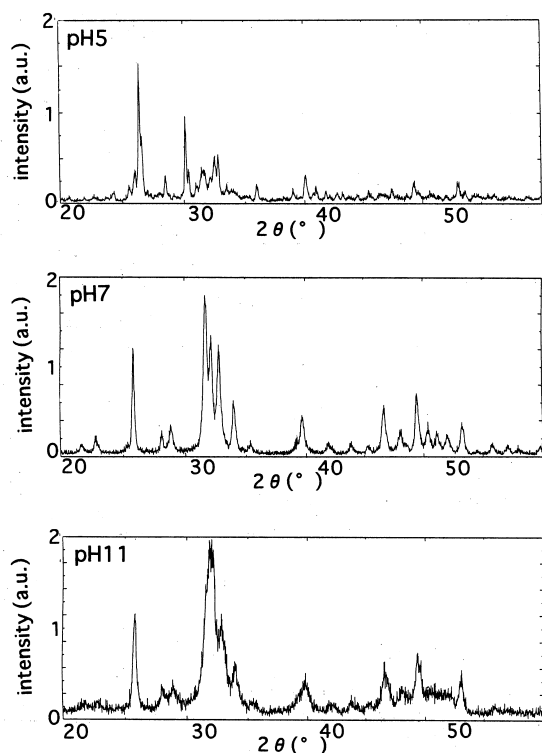


Fig.14 The condition of crystal in the precipitates formed at various pH

Ca/P 比については pH が高くなると Ca/P 比も上昇することを示した。これは pH の値が上昇するほど OH⁻ の濃度が急増するため、生成する HAp に混入されやすくなるのであろう。

また結晶化状態をみると、pH7 がもっとも良い結晶化状態を示しており、pH 上昇に伴ってバックグラウンドも上昇し、結晶化状態は低化していった。これは pH が上昇すると、溶液中の OH⁻ 濃度が極めて高くなるため、アパタイト結晶が形成されにくくなったのではないかと推測される。

逆に pH6 以下になると Ca/P 比が急激に下降していく。このとき、それぞれの結晶化状態を調べると、pH が低くなるにつれて X 線回折パターンがアパタイトの回折パターンとやや異なった回折パターンを示すようになり、pH5 や 4.5 になるとアパタイトではなく、他のカルシウムのリン酸塩の回折パターンを示した。この回折パターンを同定すると、一般的なリン酸カルシウムであることが判明した。またこの結晶の Ca/P 比を調査すると、1.01 であったことから pH5、4.5 で合成された結晶はリン酸水素カルシウム(CaHPO₄: Ca/P 比 = 1.00)であると考えられる。

以上の結果より、結晶化されやすく、Ca/P 比も比較的理論値に近く、アパタイトの沈殿生成の再現性があることなどを考慮し、以後 pH9 を最適条件と決定した。

3.3.4 実試料との比較

以上の合成実験結果をもとに、現段階

での最適条件、すなわち Ca: 0.1mol/ℓ, P: 0.1mol/ℓ, 36.5℃, pH9, リン酸塩適下速度: 10ml/h, カルシウム沈殿率: 50%において合成したアパタイトと、鉱物アパタイト、人歯、牛骨、豚骨の結晶化状態および Ca/P 比の比較検討をおこなった。

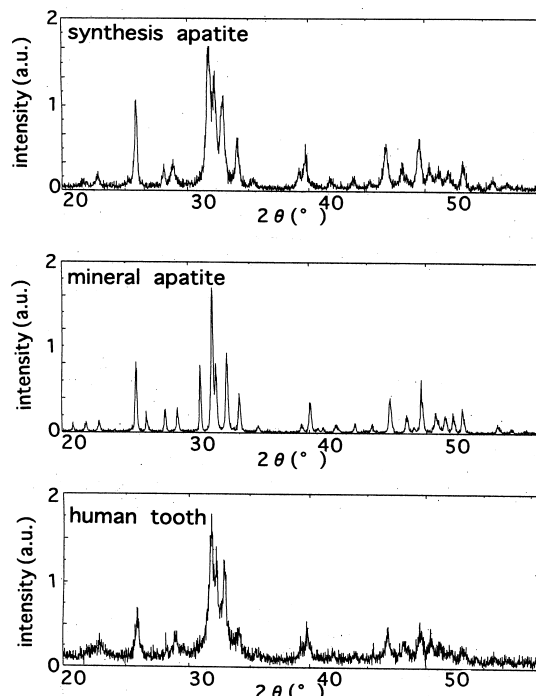


Fig.15 The condition of crystal in the various apatite

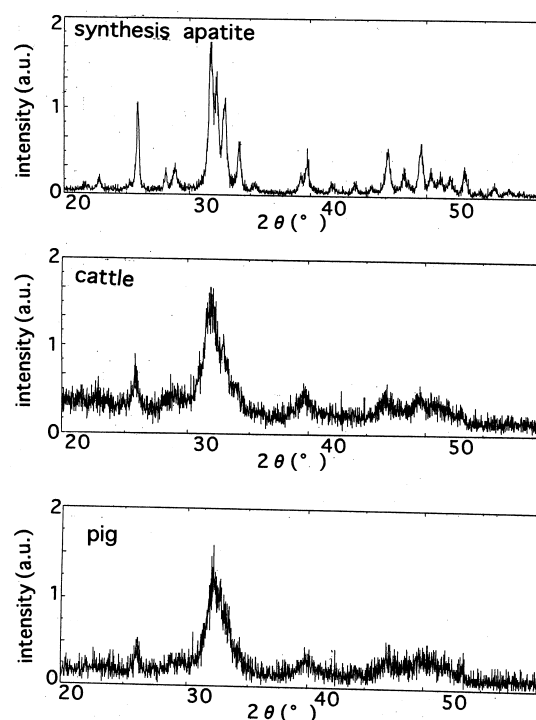


Fig.16 The condition of crystal in the various apatite

Table3: The Ca/P molar ratio
of various apatite

Apatite	Ca/P molar ratio
Standard apatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67
Synthesis apatite	1.53
Mineral apatite	1.49
Human tooth	1.51
Cattle bone	1.56
Pig bone	1.49

まず X 線回折パターン測定結果より、
 鉍物アパタイトは合成したアパタイトより
 も結晶化状態は極めて良好であった。また
 人歯と合成アパタイトが極めて類似した回
 折パターンを示した。しかし、牛骨、豚骨
 の回折パターンは、バックグラウンドが高
 く、結晶化状態はあまり良好ではなかった。
 この原因の一つとして、骨の中に含まれる
 有機物、つまり脂肪やコラーゲンが測定を
 阻害した可能性が考えられ、また一方では、
 これら有機物により、アパタイトの結晶化
 が不十分となったのではないかと考えら
 れる。

しかし、人歯の Ca/P 比は 1.53 であり、
 著者らが合成したアパタイトの Ca/P 比も
 1.51 であったことから、人歯成分と極めて
 類似した HAp 結晶が合成されたと考えら
 れる。

さらに動物の体内で合成されたアパタイ
 トは、Ca/P 比が示しているように、カル
 シウム欠損型のものと考えられる¹⁾。

3.4 まとめ(3.3.2 ~ 3.3.4)

以上のようにアパタイト合成における
 諸条件について検討を行った。

その結果、カルシウムの各温度におけ
 る沈殿率の影響では、沈殿率において、Ca/P
 比には一定の傾向は得られなかった。しか
 し沈殿率上昇に伴い結晶化状態が向上する
 ことが判明した。また、温度の上昇に伴い
 Ca/P 比は増大し、結晶化状態は向上した。

次にリン酸塩適下速度の影響では、適
 下速度が遅くなるにつれて Ca/P 比が増大
 し、結晶化状態も向上することが判明した。
 また適下速度が 10ml/h 以下になると、そ
 の結晶状態は、ほぼ一定となるとの知見を
 得た。

また pH 変化に対する影響では、pH が
 大きくなるにつれ Ca/P 比は増大していく
 傾向にあった。一方、結晶化状態は pH7
 をピークに pH の大小を問わず、結晶化状
 態は徐々に低下していく、また pH6 から pH
 が下がるにつれて、アパタイトは徐々に合
 成され難くなり、その代わりにリン酸水素
 カルシウム(CaHPO_4)が合成されはじめる
 という結果が得られた。

最後に実試料と合成アパタイトを比較し
 た結果、鉍物アパタイトに比べ結晶化状態
 が劣るが、人歯とは極めて類似した結晶状
 態を有することが明らかとなった。

4 参考文献

- 1) 岡崎正之：“歯と骨をつくるアパタイ
 トの化学”(1992), (東海大学出版会) .
- 2) O.Fujino,: Bull, Chem, Soc, Japan, 48,
 1455(1975).
- 3) 原口紘矢, 久保田正明, 森田昌敏,
 宮崎 章, 不破敬一郎, 古田直紀
 : "ICP 発光分析法"日本分析化学会編,
 (1988), (共立出版) .