

Bioactivity behavior of Si and Mg ion-substituted biphasic calcium phosphate powders

Tae-Wan Kim, Dong-Hyun Kim, Hyeong-Ho Jin, Heon-Soo Lee*, Hong-Chae Park and Seog-Young Yoon†

School of Materials Science Engineering, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

*Division of Electrical and Electronic Engineering, Daegu Technical University, Daegu 704-721, Korea

(Received February 27, 2012)

(Revised March 25, 2012)

(Accepted March 30, 2012)

Abstract The co-precipitation technique has been applied to synthesize biphasic calcium phosphate (BCP). $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, TEOS and $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ as the starting materials was used. After the heat treatment of powder crystalline phases HAp and β -TCP analysis showed a mixed phase. The overall spectra appear to have mainly two modes corresponding to characteristic PO_4^{3-} and OH^- groups. After immersion in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) for 1 week a precipitation started to be formed with individual small granules on the specimen surface. An MTT assay indicated that ionic substituted BCP powders had no cytotoxic effects on MG-63 cells, and that they have good biocompatibility.

Key words Biphasic calcium phosphate, Silicon, Magnesium, Co-precipitation

Si 및 Mg 이온이 교환된 biphasic calcium phosphate 분말의 생체활성 거동

김태완, 김동현, 진형호, 이현수*, 박흥채, 윤석영†

부산대학교 재료공학부, 부산, 609-735

*대구공업대학교 전기전자계열, 대구, 704-721

(2012년 2월 27일 접수)

(2012년 3월 25일 심사완료)

(2012년 3월 30일 게재확정)

요약 이온이 첨가된 BCP(biphasic calcium phosphate) 분말을 제조하기 위하여 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 출발 물질로 공침법(co-precipitation process)을 이용하여 합성하였다. Si-BCP 합성을 위하여 TEOS를 Mg-BCP 합성을 위해서는 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 사용하였다. 합성된 분말의 열처리 후 결정상을 분석한 결과 HAp와 β -TCP가 혼재된 상을 관찰할 수 있었다. 분광학적 분석에서도 인산칼슘의 PO_4^{3-} 와 OH^- 그룹에 해당하는 밴드도 관찰되었다. 이온이 첨가된 BCP 분말의 생체활성 거동을 평가하기 위하여 Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS)에 침적시켜 시간에 따라 형상의 변화 및 결정상을 분석한 결과, 두 샘플 모두에서 빠른 표면 활성을 나타내었다. 세포 성장률 평가에서도 대조군에 비하여 세포성장률이 우수함을 관찰하였다.

1. 서론

최근 Hydroxyapatite(HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)와 β -Tricalcium phosphate(β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)의 인산칼슘계 세라믹은 그들의 생체적합성(biocompatibility), 골전도(osteoconduction), 세포와의 친화성 등의 특성으로 인하여 골 수복용 이식 재료로 적용되고 있다[1-4]. 그러나

두 재료들은 HAp의 비분해성과 β -TCP의 분해성의 독립적인 분해특성만으로는 임상 성능을 감소시키고 있다. 그러므로 두 상이 적절히 혼합된 BCP(Biphasic Calcium Phosphate) 세라믹이 생체 내 흡수성이 우수한 물질로 제안되어 연구 중에 있다[5, 6].

다양한 원소가 쉽게 치환될 수 있는 구조를 가지는 인산칼슘계 세라믹은 인체 이식 후 인산칼슘계 세라믹 내에 치환된 여러 가지 이온 성분이 골 조직과의 작용에 의해 골 형성을 촉진한다[7, 8]. 이러한 이온이 첨가된 인산칼슘에서 이온의 종류나 첨가되는 농도는 wt%에서 ppm 단위까지 다양하다[9, 10]. 그럼에도 불구하고 이러

†Corresponding author

Tel: +82-51-510-2487

Fax: +82-51-512-0528

E-mail: syy3@pusan.ac.kr

한 이온의 종류나 양에 있어서 골 조직 내에서의 역할에 대한 연구는 아직 충분하지 못한 실정이며, 이온 성분들이 골 조직 내에서 생체 내 화학적 거동에 영향을 미치는 것으로 받아들여지고 있다[11].

이러한 이온들 중 Si 이온은 뼈 성장에 작용하는 생물학적 과정에 필수적인 요소이며, Si 이온이 첨가된 인산칼슘계 생체재료는 생체활성을 향상시키는 것으로 알려져 있다[12]. Si-HAp의 경우 세포실험에서 골아 세포의 활성을 증가시키며, 인체 내에서 분해 속도를 빠르게 한다는 연구결과가 발표되었다[13-15]. 또한 Mg 이온은 인체 내에서 조골세포(osteoblast)의 증식을 자극하여 뼈 형성 초기 단계에 중요한 역할을 제공하는 것으로 알려져 있다[16, 17]. Mg 이온의 생물학적 특성으로 인하여 인산칼슘 내에 Mg 이온이 치환된 생체 재료는 생체활성을 증가시키는 방법으로 많은 연구가 진행되고 있다[17-19].

본 연구에서는 BCP 조직 내에 생체 활성을 향상시키는 Si 이온과, Mg 이온을 각각 첨가하여 Si-BCP, Mg-BCP 분말을 공침법을 이용하여 합성하였다. 합성된 분말의 결정학적 특성 및 화학적 결합 거동을 측정하기 위하여 XRD 및 FT-IR을 통하여 X-선 회절 분석 및 적외선 분광분석을 실시하였다. 또한 생체활성 거동을 평가하기 위하여 Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS)에 침적시켜 시간에 따른 BCP분말의 표면 활성 및 결정상 변화를 비교 분석하였다. 또한 각각의 분말의 세포와의 친화력을 평가를 위하여 MTT assay를 시행하였다.

2. 실험방법

본 연구에서 이온이 첨가된 BCP 분말을 제조하기 위하여 출발물질로 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Junsei chemical, Japan), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Junsei chemical, Japan)를 사용하였고, 제조공정으로 공침법(co-precipitation process)을 이용하였다. 각각의 이온을 첨가하기 위하여 Si-BCP 분말은 $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (TEOS(tetraethyl orthosilicate))(Sigma Aldrich)를 Mg-BCP 분말은 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Junsei chemical, Japan)를 사용하였다.

Si-BCP 분말을 제조하기 위하여 Ca/(P + Si)의 몰 비율을 1.602로 고정하여 TEOS를 2.6 mM 첨가하여 가수분해 시키고, 가수분해 된 수용액에 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 와 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 각각 첨가하였다. 또한 Mg-BCP 분말을 제조하기 위하여 (Ca + Mg)/P를 1.602로 고정하여 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 1.8 mM 첨가하여 수용액을 제조한 후 제조된 용액에 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 와 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 각각 첨가하였다. 각각의 제조된 수용액에 NH_3 (Junsei chemical, Japan)를 적가하여 pH를 11로 조절하였다. 제조된 수용

액을 2시간 동안 교반한 후 상온에서 24시간 동안 시효처리(Aging)하였다. 반응생성물의 여과 및 미 반응물을 제거하기 위해 증류수로 수회 반복적으로 수세하고, 여분의 수분을 제거하기 위하여 80°C로 고정된 건조기에서 24시간 건조하였다. 건조된 분말을 분쇄하여, 1000°C에서 2시간 동안 열처리 하였다. 열처리 후 분말을 400 mesh 체가름 하였다.

제조된 Si와 Mg가 첨가된 BCP분말의 열처리 전 후의 결정상 변화를 관찰하기 위해 X-선 회절분석장치(XRD, D/max-IIA, Rigaku, Japan)를 이용하여 분석하였다. 측정조건은 $\text{CuK}\alpha$, 30 kV, 25 mA, scanning speed 1°/min, 0.5 Slit계, 측정범위는 25°~45°(2 θ)이었다. 열처리에 따른 탈수 축합 거동을 분석하기 위하여 주파수 400~4000 cm^{-1} 범위에서 FT-IR(Nicolet Magna IR 560, USA)측정하였다. 분말의 형상을 관찰하기 위하여 Osmium 코팅 후 SEM(HITACHI S-4800, Japan)을 이용하여 분석하고 이온 첨가 유무를 확인하기 EDS-mapping하여 관찰하였다.

분말의 생체활성 거동을 비교 평가하기 위해 제조한 분말을 Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS; Sigma-Aldrich, Japan)에서 1주, 2주, 3주간 36.5°C의 인큐베이터에서 침적 테스트하였으며, 일정한 이온 농도를 유지하기 위하여 HBSS를 2일마다 교환해주었다. HBSS 침적 후의 시간에 따른 표면 형상의 변화 및 표면의 결정성 변화를 XRD 및 SEM을 통하여 관찰하였다.

합성한 분말의 세포와의 친화력을 비교 평가하기 위하여 Human osteosarcoma cell line인 MG-63을 이용하여 MTT assay를 실시하였다. MTT assay는 cell을 penicillin (100 units/ml), streptomycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) solution과 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Gibco, USA) 배지를 사용하여 5% CO_2 , 37°C 배양기에서 배양시켜 사용하였다. 우선 24 well에 MG-63 1×10^4 개를 분주하고, 24시간 뒤에 새 배지로 교체 후 시료를 1 mg/m로 처리하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-dipheyltetrazolium bromide(MTT)(5 mg/ml)을 각 well에 처리하여 4시간 배양한 후 형성된 insoluble formazan을 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹이고 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) reader(Wallac 1420, USA)를 통해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

이온이 첨가된 BCP 공침분말의 X-선 회절 패턴 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Si, Mg 이온의 첨가에 관계없이 제조된 공침 분말은 저결정성 HAp의 회절 패턴을

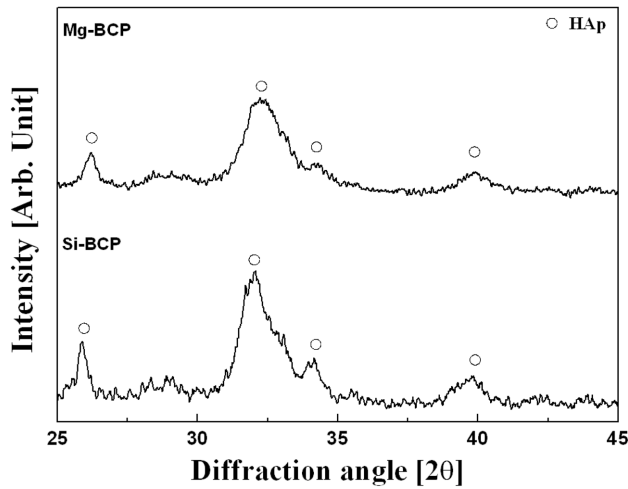


Fig. 1. XRD patterns of the as-synthesized Si and Mg-BCP powders.

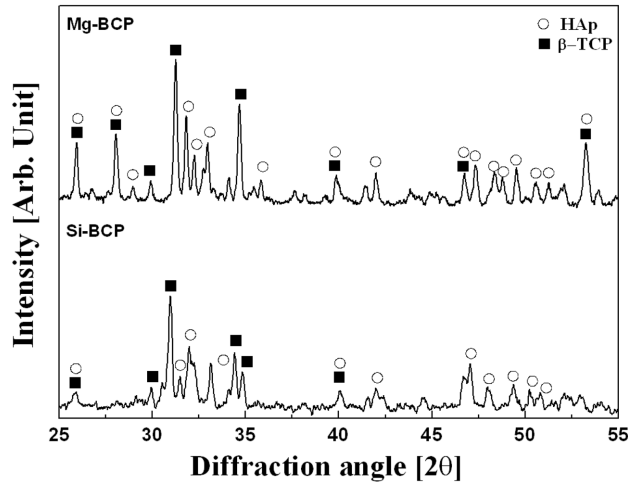


Fig. 2. XRD patterns of the calcined Si and Mg-BCP powders.

나타내었다. 이는 본 연구에서 공침분말의 Ca/P 몰비율이 1.602로 1.67보다 적었지만 공침법에 의한 HAp 분말 합성의 경우에 Ca/P 몰비율이 1.67보다 적어도 공침분말은 HAp 회절 패턴을 나타낸다는 앞선 연구결과와 일치한다[21]. 또한, 각각의 공침 분말의 X-선 회절패턴에서는 첨가된 이온의 피크는 나타나지 않았다. 이러한 경향은 HAp 분말 합성에서도 관찰되었다[22].

Fig. 2는 공침분말을 1000°C 열처리 한 후 생성된 분말의 X-선 회절패턴을 나타낸 결과이다. 각각의 분말에서 β-TCP의 (0210)면(JCPDS #09-0169)과 HAp의 (211)면(JCPDS #74-0566)이 나타남을 관찰할 수 있었다. Si 이온이 첨가된 BCP 분말의 경우, β-TCP의 피크강도는 HAp 피크의 강도보다 크며, HAp의 결정성은 상대적으로 낮은 경향을 나타내었다. 이는 결합되는 원자간의 거리 차이에서 기인한 것으로 판단된다. Si-O 결합의 격자간 결합 길이는 1.66 Å인데 반해 P-O 간의 길이는 1.57 Å

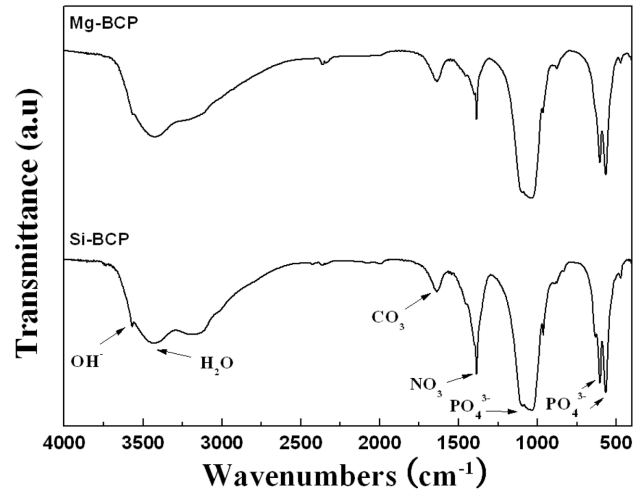


Fig. 3. FT-IR spectra of as-synthesized Si and Mg-BCP powders.

로 실리콘이 치환되어 단위격자의 부피를 증가시켜, HAp의 결정성이 감소하며, 이로 인해 HAp 구조의 안정성이 감소되고, 생체활성이 증가 되는 것으로 사료되어진다[23]. Mg 이온이 첨가된 경우, β-TCP의 피크가 HAp 피크보다 상대 강도가 높으며, Si 이온이 첨가된 경우보다 결정성이 높다. 이는 HAp상 합성 시 Mg 이온이 Ca 이온의 자리에 치환되어 나타난 거동으로, calcium deficient HAp[d-HAp, $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$; $0 \leq x \leq 1$] 격자 내에 마그네슘을 치환시키면 Mg^{2+} 가 격자 내에서 아파타이트의 결정성을 감소시키고 β-TCP 형성에 영향을 주게 되어 나타나는 현상으로 사료되어진다[24]. (Eq. (1)).

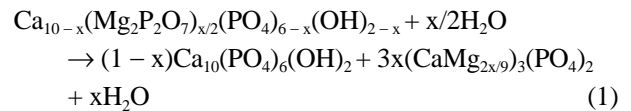


Fig. 3은 열처리 전 공침분말의 분광학적 특성을 알아보기 위하여 측정한 FT-IR 결과이다. 두 공침 분말 모두에서 FT-IR의 스펙트럼 분석에서 574, 603 그리고 1020~1120 cm^{-1} 의 진동모드에서 PO_4 그룹과 603, 3570 cm^{-1} 의 진동모드에서 OH 그룹의 HAp 상을 관찰할 수 있었다[25]. 이는 앞선 XRD 결과에서와 같이 공침분말이 저결정성 HAp 상을 나타낸다는 것을 보여준다. 또한, 3300~3600 cm^{-1} 의 진동모드는 수분흡착에 의한 것이며, 1660과 1385 cm^{-1} 의 진동모드는 공침분말에 잔류하는 탄산염과 질산염의 존재로 사료되어진다. Fig. 4의 열처리 후 FT-IR의 스펙트럼은 두 합성 분말에서 전체적으로 PO_4^{3-} 와 OH 그룹에 해당하는 632와 3570 cm^{-1} 의 진동모드를 관찰할 수 있었다. 이는 열처리 후 BCP 분말이 HAp와 β-TCP의 혼재된 상이 나타나는 XRD 결과를 뒷받침 해주는 결과로 판단되어진다. 그리고, Si 이온이 첨가된 BCP 분말의 경우 Mg 이온이 첨가된 BCP

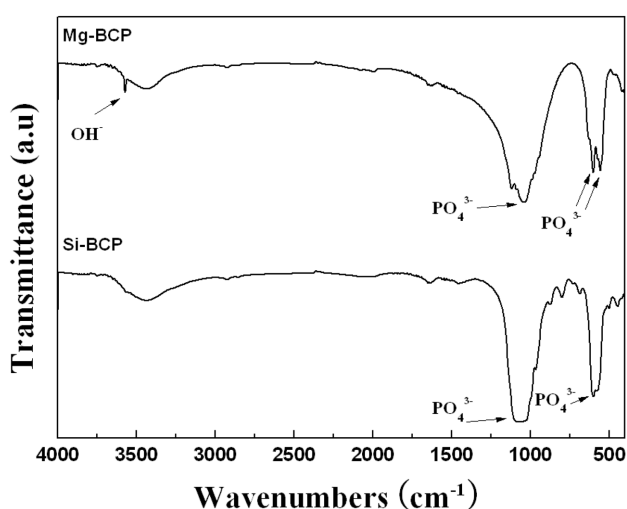


Fig. 4. FTIR spectra of calcined Si and Mg-BCP powders.

분말과 비교하여 PO_4^{3-} 와 OH^- 그룹의 결합력이 약함을 관찰할 수 있었는데, 이는 앞선, XRD 결과에서 나타났듯이 Si-BCP의 경우 HAp의 결정성이 Mg-BCP에 비하여 낮기 때문에 나타나는 현상이라고 사료되어진다.

Si, Mg 이온이 각각 첨가된 분말의 열처리 후 분말의 형상과 SEM-EDS mapping을 통해 이온 첨가 유무를 Fig. 5에 나타내었다. 이온의 종류와 무관하게 생성된 분

말의 형상은 열처리 과정을 통해서 전체적으로 응집된 형태를 나타내었다. mapping을 통해 BCP 분말 내 이온의 분산 정도를 관찰한 결과 전체적으로 각각의 이온 spot이 잘 분산된 형태를 나타내어 공침법을 이용한 이온 첨가 BCP 분말 합성 시 이온이 첨가된 것을 확인할 수 있었다.

이온이 첨가된 BCP 분말의 생체활성 거동을 평가하기 위해 Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS)에 침적 후 시간에 따른 표면의 형상 변화를 관찰한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Si-BCP, Mg-BCP 분말 모두 침적 1주 후 표면의 활성이 관찰 되었으며, Si-BCP의 경우 Mg-BCP보다 표면활성이 되어 새로 생겨난 조직이 상대적으로 큰 형상을 나타내었다. Si-BCP 분말의 경우 침적 2주 후 저결정 HAp 형상으로 판단되어지는 휘스커 타입의 입자가 생성됨을 관찰할 수 있었으며, 침적 3주 후 표면의 생성 입자가 성장함을 관찰할 수 있었다. Mg-BCP의 경우 침적 2주 후 표면의 활성이 더 활발하게 일어나며 3주 후 저결정 HAp로 보이는 휘스커 타입의 입자가 표면에 생성됨을 확인하였다. 이러한 결과는 Si-BCP의 경우 XRD 측정결과, HAp의 결정성이 낮았고 β -TCP의 분해거동에 의해 생체활성이 증가한 것으로 사료되어진다. 또한 Mg-BCP 분말의 경우 Mg 이온이 Ca 이온의 자리에 치환되어 생체활성이 증가된 것으로 판단

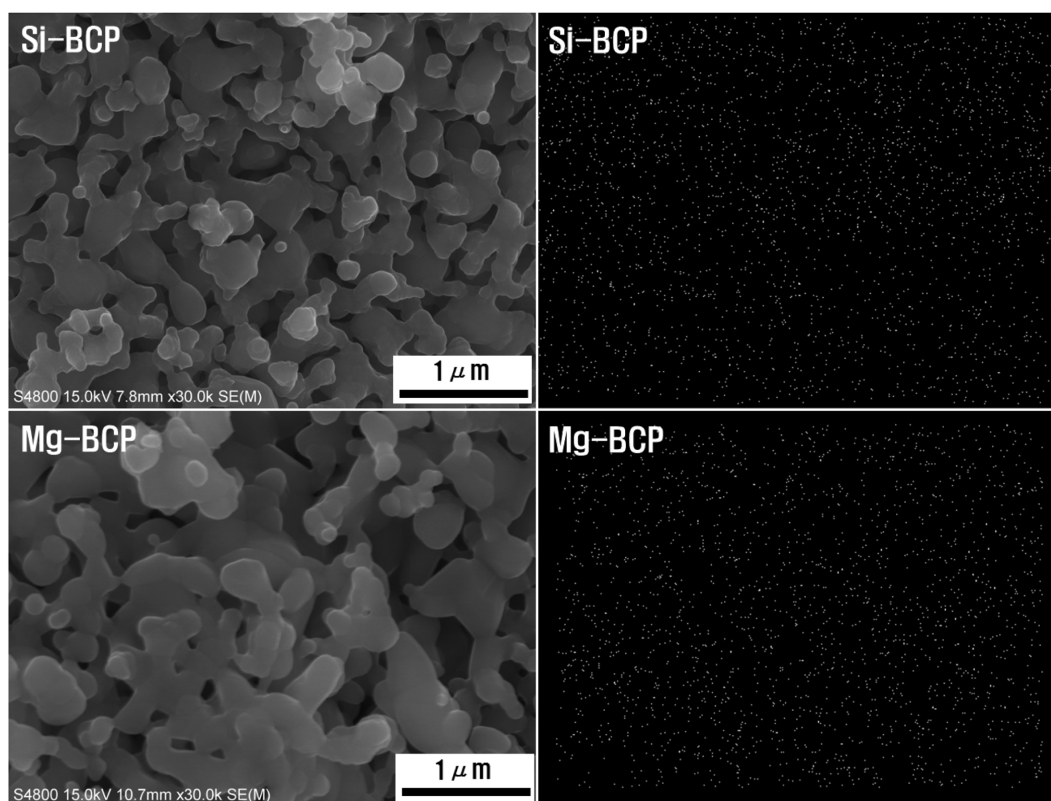


Fig. 5. SEM micrographs and EDS ion mapping of calcined Si and Mg-BCP powders.

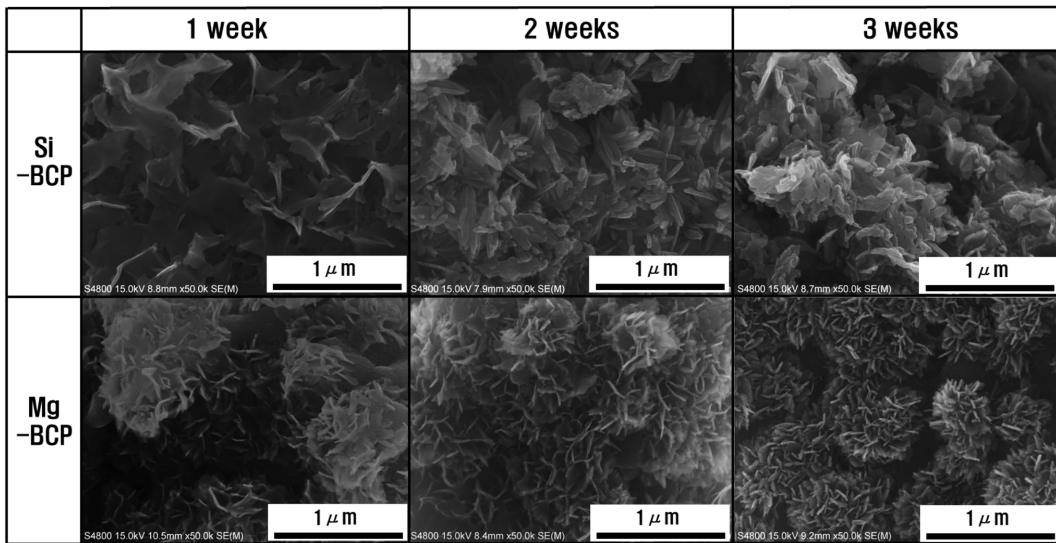


Fig. 6. SEM micrographs of calcined Si and Mg-BCP powders after immersion in HBSS for 1, 2 and 3 weeks.

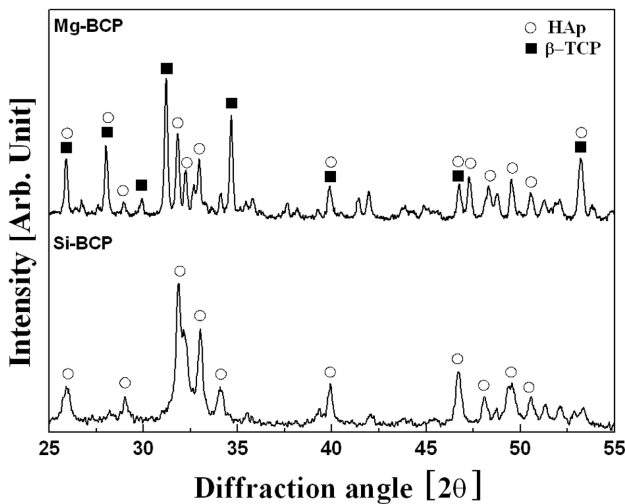


Fig. 7. XRD patterns of Si and Mg-BCP powders after immersion in HBSS for 3 weeks.

되어진다. 이는 Fig. 7의 침적 3주 후의 X선 회절 패턴 결과에서도 확인할 수 있다. Si-BCP 분말의 경우, 침적 3주 후 β-TCP의 피크가 관찰되지 않아 Si 이온의 영향으로 β-TCP의 빠른 분해를 촉진하여 표면에 형성되는 HAp 생성을 활성화 시킨 결과로 보여진다[26, 27]. Mg-BCP 분말의 경우, 침적 3주 후 β-TCP와 HAp 피크가 모두 존재하는 것으로 판단되며, Mg 이온이 인산칼슘 내에서 Ca 이온과의 치환 거동에 의해 생체활성을 증가시킨 것이며 β-TCP의 분해에 의한 결과는 아닌 것으로 사료되어진다.

Fig. 8은 합성된 이온 첨가 BCP분말의 MTT assay 결과이다. DMEM 배지에 아무것도 첨가하지 않은 샘플을 대조군으로 설정하여 Si-BCP, Mg-BCP 분말을 첨가

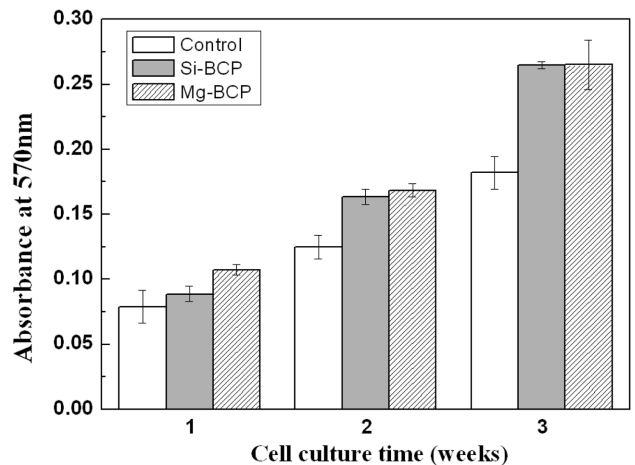


Fig. 8. Effect of Si and Mg ion substituted BCP powders on cell viability in human osteosarcoma MG-63 cells.

한 샘플과의 MG-63 세포의 성장률을 비교하여 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) reader(Wallac 1420, USA)를 통해 570 nm에서 흡광도를 측정된 결과를 나타내었다. 1주 후 대조군에 비하여 이온이 첨가된 BCP 분말의 세포의 성장률이 높으며, 또한 Mg-BCP의 경우 Si-BCP의 세포 성장률이 1주, 2주까지 높은 것으로 나타나 Mg 이온이 생체 조직에서 활성을 증가시키는 물질임을 판단할 수 있었다. MTT assay 3주 후 대조군에 비하여 두 샘플 모두 월등히 높은 성장률을 나타내었으며, 초기에 성장률이 차이가 났던 두 이온이 첨가된 분말이 3주 후 비슷한 성장률을 나타낸 것을 확인할 수 있었다. 이는 HBSS 침적 3주 후 두 샘플 모두에서 저결정성 HAp로 보이는 입자가 생성되어 HAp가 생체 활성을 가지는 물질임을 확인하는 결과로 사료되어진다.

이상의 결과로 BCP 조직 내에 이온의 첨가는 생체활성을 강화시키는 것으로 판단할 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 Si, Mg 이온이 각각 첨가된 BCP 분말을 공침법을 이용하여 합성하였다. 합성된 분말의 열처리 전 후의 X-선 회절 패턴과 FT-IR의 분광학적 특성을 관찰한 결과 Si-BCP 분말의 경우 Si 이온 첨가의 영향으로 낮은 HAp의 결정성을 나타내었으며, Mg-BCP 분말의 경우 Si-BCP 분말에 비하여 높은 결정성의 HAp 피크를 관찰할 수 있었다. 두 샘플 모두에서 HAp와 β -TCP상이 혼재된 BCP 조직을 확인하였다, 생체활성 거동을 평가하고자 HBSS에 침적 후 표면의 형상 변화를 관찰한 결과, Si 이온을 첨가한 경우 Mg 이온을 첨가한 경우에 비하여 침적 후 표면에 저결정 HAp로 사료되어지는 입자의 형상이 빠르게 나타남을 확인하였다. 또한, Si 이온의 첨가는 침적 후 X-선 회절 패턴 결과에서 β -TCP의 분해를 촉진시키며, Mg 이온의 경우 세포 성장을 평가에서 초기에 빠른 생체 활성을 나타내어 세포의 성장률을 증가시켰다. 세포 실험 3주 후 두 샘플 모두에서 대조군에 비하여 우수한 세포 성장률을 나타내어 BCP 조직 내에 이온의 첨가는 생체활성을 증가시킨다고 판단되어진다.

감사의 글

이 과제는 2010학년도 부산대학교 교수 국외 장기파견지원비에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

- [1] K. de Groot, "Clinical applications of calcium phosphate biomaterials; A review", *Ceram. Int.* 19 (1993) 363.
- [2] M. Jarcho, "Biological aspects of calcium phosphates: Properties and applications", *Dent. Clin. North. Am.* 30 (1986) 25.
- [3] R.W. Bucholz, A. Carlton and R.E. Holmes, "Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes", *Orthop. Clin. North. Am.* 18 (1987) 323.
- [4] L.L. Hench, "Bioceramics", *J. Am. Ceram. Soc.* 81 (1998) 1705.
- [5] S. Yamada, D. Heyman, J.K. Bouler and G. Daculsi, "Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios", *Biomaterials* 18 (1997) 1037.
- [6] J.M. Bouler, R.Z. LeGeros and G. Daculsi, "Biphasic calcium phosphates: Influence of three synthesis parameters on the HA/ β -TCP ratio", *J. Biomed. Mater. Res. A* 51 (2000) 680.
- [7] S.G. Dahl, P. Allain, P.J. Marie, Y. Mauras, G. Boivin, P. Ammann, Y. Tsouderos, P.D. Delmas and C. Christiansen, "Incorporation and distribution of strontium in bone", *Bone* 28 (2001) 446.
- [8] R.S. Lee, M.V. Kayser and S.Y. Ali, "Calcium phosphate microcrystal deposition in the human intervertebral disc", *J. Anat.* 208 (2006) 13.
- [9] N.C. Blumenthal, F. Betts and A.S. Posner, "Precipitation of calcium phosphates from electrolyte solutions III. Radiometric studies of the kinetics of precipitation and aging of calcium phosphates", *Calcif. Tissue. Int.* 18 (1975) 81.
- [10] A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, A. Ripamonti, N. Roveri, M. Romanello, K. Noris Suarez and L. Moro, "Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone", *J. Inorg. Biochem.* 68 (1997) 45.
- [11] R.Z. Le Geros, "Calcium phosphates in oral biology and medicine", *Monogr. Oral. Sci.* 15 (1991).
- [12] I.R. Gibson, S.M. Best and W. Bonfield, "Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite", *J. Biomed. Mater. Res. A.* 44 (1999) 422.
- [13] N. Patel, S.M. Best, W. Bonfield, I.R. Gibson, K.A. Hing, E. Damien and P.A. Revell, "Novel bioresorbable and bioactive composites based on bioactive glass and polylactide foams for bone tissue engineering", *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 13 (2002) 1199.
- [14] A.E. Porter, N. Patel, J.N. Skepper, S.M. Best and W. Bonfield, "Effect of sintered silicate-substituted hydroxyapatite on remodelling processes at the bone-implant interface", *Biomaterials* 25 (2004) 3303.
- [15] C.W. Song, T.W. Kim, D.H. Kim, H.C. Park and S.Y. Yoon, "Synthesis and characterization of silicon ion substituted biphasic calcium phosphate", *J. Kor. Cry. Grow. Cry. Tech.* 20 (2010) 243.
- [16] K.J. Lilley, U. Gbureck, J.C. Knowles, D.F. Farrar and J.E. Barralet, "Cement from magnesium substituted hydroxyapatite", *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 16 (2005) 455.
- [17] W.L. Suchanek, K. Byrappa, P. Shuk, R.E. Riman, V.F. Janas and K.S. TenHuisen, "Effect of sintered silicate-substituted hydroxyapatite on remodelling processes at the bone-implant interface", *Biomaterials* 25 (2004) 4647.
- [18] I. Cacciotti, A. Bianco, M. Lombardi and L. Montanaro, "Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sintering behaviour", *J. Eur. Ceram. Soc.* 29 (2009) 2969.
- [19] H.S. Lee, T.W. Kim, D.H. Kim, H.C. Park and S.Y. Yoon, "Suitability evaluation of magnesium substituted biphasic calcium phosphates prepared by coprecipitation method", *J. Kor. Cry. Grow. Cry. Tech.* 20 (2010) 237.
- [20] I. Cacciotti and A. Bianco, "High thermally stable Mg-substituted tricalcium phosphate via precipitation", *Ceram. Intern.* 37 (2011) 127.
- [21] S.R. Kim, J.H. Lee, Y.T. Kim, D.H. Riu, S.J. Jung, Y.J.

- Lee, S.C. Chung and Y.H. Kim, "Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors", *Biomaterials* 24 (2003) 1389.
- [22] I.R. Gibson, I. Rehman, S.M. Best and W. Bonfield, "Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to β -tricalcium phosphate", *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 12 (2000) 799.
- [23] J. Pena and M. Vallet-Regi, "Hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by a liquid mix technique", *J. Eur. Ceram. Soc.* 23 (2003) 1687.
- [24] A. Mortier, J. Lemaitre and P.G. Rouxhet, "Temperature-programmed characterization of synthetic calcium-deficient phosphate apatites", *Thermochimica Acta* 143 (1989) 265.
- [25] S. Kannan, I.A.F. Lemos, J.H.G. Rocha and J.M.F. Ferreira, "Synthesis and characterization of magnesium substituted biphasic mixtures of controlled hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios", *J. Solid. State. Chem.* 178 (2005) 3190.
- [26] L.H. Long, L.D. Chen, S.Q. Bai, J. Chang and K.L. Lin, "Preparation of dense β -CaSiO₃ ceramic with high mechanical strength and HAp formation ability in simulated body fluid", *J. Eur. Ceram. Soc.* 26 (2006) 1701.
- [27] C.W. Song, T.W. Kim, D.H. Kim, H.H. Jin, K.H. Hwang, J.K. Lee, H.C. Park and S.Y. Yoon, "In situ synthesis of silicon-substituted biphasic calcium phosphate and their performance in vitro", *J. Phys. Chem. solid.* 73 (2012) 39.