

## مطالعه ساختار شیمیایی خار دمی سفره‌ماهی *Hemistrygon bennettii* با هدف استخراج هیدروکسی آپاتیت

حمید ارشادی فر<sup>۱</sup>، امیر قاضی‌لو<sup>۱\*</sup>، کمال‌الدین کر<sup>۱</sup>

تاریخ دریافت: مهر ۹۸

تاریخ پذیرش: اسفند ۹۸

### چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی ساختار شیمیایی خار دمی سفره‌ماهی (*Hemistrygon bennettii* Muller and Henle, 1841) به عنوان گزینه‌ای مناسب برای استخراج هیدروکسی آپاتیت صورت پذیرفت. برای این منظور، ساختارسنجی خار دمی ماهیان صید شده از جنگل‌های حرا خلیج چابهار در دو حالت کلسینه (پخته شده در حرارت بالا) و غیرکلسینه به انجام رسید. از روش‌های طیف‌سنجی رامان و پلاسما جفت شده القایی به ترتیب برای سنجش ترکیبات شیمیایی خارها و غلظت عناصر استفاده شد. قوی‌ترین قله در طیف‌های رامان خارهای کلسینه و غیرکلسینه مربوط به پیک ۹۶۲ بر سانتی‌متر (فسفات آپاتیتی) بود که ناشی از ارتعاش کششی متقارن یون‌های فسفات چهاروجهی است. هیدروکسی جذب سطحی شده نیز پیک‌هایی را در محدوده ۳۴۰۰-۳۵۰۰ بر سانتی‌متر در خارهای کلسینه و غیرکلسینه نشان داد. در خارهای غیرکلسینه، پیک‌های مربوط به گروه‌های عمده ترکیبات آلی در محدوده ۳۰۵۰-۲۷۰۰ و ۱۵۰۰-۱۳۰۰ دیده شد که به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی و خمشی گروه‌های CH، CH<sub>2</sub> و CH<sub>3</sub> مربوط به ترکیب‌های آلی است. در محدوده ۱۸۰۰-۱۲۰۰ نیز پیک‌های عمده مربوط به آمین پروتئین‌ها مشاهده شد. وجود مقادیر نسبتاً بالای دو عنصر سدیم و منیزیم در ساختار این خار (در مقایسه با اغلب منابع طبیعی دیگر به کار رفته در استخراج هیدروکسی آپاتیت) می‌تواند زیست‌سازگاری هیدروکسی آپاتیت استخراج شده از آن‌ها را تقویت کند.

**واژگان کلیدی:** ماهیان غضروفی، خار، هیدروکسی آپاتیت، طیف‌سنجی رامان.

۱- استادیار گروه علوم زیستی دریا، پژوهشکده علوم دریایی، پژوهشگاه ملی اقیانوس‌شناسی و علوم جوی، تهران، ایران.

\* نویسنده مسئول: [amir.ghazilou@inio.ac.ir](mailto:amir.ghazilou@inio.ac.ir)

## مقدمه

(Walsh et al., 1988). سپرماهیان از ذخایر قابل توجهی در دریای عمان برخوردار هستند و از جمله ماهیان غیراقتصادی کشور به شمار می‌آیند (Valinassab et al., 2011). با این حال، نرخ بالای تقاضا از جانب کشورهای همسایه شرقی در سال‌های اخیر، این ماهیان را به یک هدف شیلاتی برای صیادان محلی تبدیل کرده است. مشاهدات میدانی نشان داده‌اند که در اغلب موارد، صیادان پس از صید این ماهیان اقدام به قطع خار دمی آن‌ها می‌کنند و خار جدا شده دور ریخته می‌شود.

استخوان در واقع یک کامپوزیت آلی- معدنی است که فاز آلی آن شامل رشته‌های کلاژن و فاز معدنی آن از شبکه درهم پیچیده‌ای از ریزماده‌های میله‌ای تشکیل شده است. هیدروکسی آپاتیت (Hydroxyapatite) با فرمول شیمیایی  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  از نظر شیمیایی بسیار شبیه به فاز معدنی استخوان طبیعی است و مطالعات بسیار زیادی در زمینه امکان به کارگیری آن به عنوان جایگزین استخوان انسان (و بعضاً دندان) صورت گرفته است (Hutmacher et al., 2007; Nosrat et al., 2019). از مزایای دیگر هیدروکسی آپاتیت

سپرماهیان گزنده (راسته Myliobatiformes) از جمله ماهیان غضروفی به شمار می‌آیند که دارای بدنی پهن هستند و باله سینه‌ای آن‌ها به شکل بال درآمده است. محل زندگی این دسته از ماهیان در آب‌های کم‌عمق ساحلی و دریا‌های آزاد است و انواع بسترزی آن‌ها معمولاً در محل زندگی خود در بسترهای نرم نقب می‌زنند به نحوی که صرفاً اسپیراکل و چشم‌های آن‌ها نمایان است. این جانوران از سخت‌پوستان، نرم‌تنان و کرم‌ها تغذیه می‌کنند. ۱۰ خانواده و بیش از ۲۰۰ گونه از سپرماهیان گزنده تا به حال شناسایی شده‌اند (Froese and Pauly, 2019).

خار موجود در ساقه دمی سپرماهیان گزنده به عنوان وسیله دفاعی آن‌ها به شمار می‌آید که در اغلب موارد علاوه بر تیز بودن سمی نیز است. لبه خار در این ماهیان معمولاً دنداندار است و تعداد دندان‌ها در ماهیان فعال به مراتب بیشتر از گونه‌های کم‌تحرك است (Halstead, 1988). در مواردی طول خار این ماهیان به ۳۷ سانتی‌متر نیز می‌رسد (Halstead, 1988). خار دمی این ماهیان از دو لایه تشکیل شده است. لایه خارجی آن ساختاری شبیه مینای دندان دارد و به لایه داخلی آن در اصطلاح وازو-دنتین

هیدروکسی آپاتیت می توان به ضایعات استخوان دام های اهلی و ماهیان شیلاتی (Hiller et al., 2003; Venkatesan et al., 2011) پوسته تخم ماکیان (Sanosh et al., 2009) و پوسته صدف نرم تنان (Wu et al., 2011) اشاره کرد. پژوهش حاضر با هدف بررسی ساختار شیمیایی خار دمی در گونه *Hemitrygon bennettii* (Muller and Henle, 1841) به عنوان گزینه ای مناسب برای استحصال هیدروکسی آپاتیت صورت پذیرفت.

### مواد و روش ها

#### نمونه برداری

صید نمونه های سفره ماهی *Hemitrygon bennettii* در جنگل های حرا خلیج چابهار و در زمان مد کامل صورت پذیرفت. برای این منظور از تور گوش گیر استفاده شد. تعداد ۱۰ قطعه ماهی تقریباً هم پهن (Disk Width (DW):  $35/3 \pm 4/3$  (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)) صید شدند. خارهای دمی ماهیان بلافاصله با استفاده از انبر سیم بر جراحی (از جنس استیل زنگ نزن) و در فاصله تقریباً یک سانتی متری از محل اتصال آن به بدن ماهی جدا شدند و در داخل یخدان به آزمایشگاه شیمی دریا، مرکز

می توان به نرخ تخریب- تجزیه پذیری زیستی پایین آن اشاره کرد (LeGeros, 1993). با این حال، این ماده از چقرمگی شکست (Fracture Toughness) پایین تری نسبت به استخوان برخوردار است (Suchanek and Yoshimura, 1998). ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت سنتزی دارای خواص هدایت و القای استخوانی هستند و اتصال بسیار قوی با استخوان برقرار می کنند (Rahimzadeh et al., 2014). ولی، استحصال هیدروکسی آپاتیت خالص به روش سنتزی مستلزم فرایندهای پیچیده است و این فرایندها بسیار هزینه بردار هستند و به همین علت استخراج آن از منابع طبیعی از برتری نسبی در صنعت برخوردار است (Akram et al., 2014).

در صنعت پزشکی، هیدروکسی آپاتیت هم به صورت سنتز آزمایشگاهی (پس از پردازش های مختلف) و هم به صورت استحصال از منابع طبیعی استفاده می شود (Mohd-Puad et al., 2019). از جمله موارد استحصال طبیعی صنعتی می توان به استحصال این ماده از مرجان های سخت اشاره کرد که تحت عنوان Interpore International) Interpore (آمریکا) به بازار عرضه شده است (Sivakumar et al., 1996). از منابع طبیعی دیگر استحصال

اقیانوس‌شناسی چابهار منتقل و بلافاصله منجمد شدند.

### سنجش ماده آلی

برای تعیین مقدار ماده آلی خارها از روش پخت حرارتی استفاده شد (جاویدی یونسی و همکاران، ۱۳۸۷). برای این منظور، ۳ عدد خار کامل توسط هاون پودر شد و سپس به مدت ۴ ساعت در کوره الکتریکی (اکسایتون، ایران) در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. اختلاف وزن اولیه و ثانویه به عنوان مقدار ماده آلی موجود در هر خار در نظر گرفته شد.

### سنجش ساختار شیمیایی

از روش طیف‌سنجی رامان (Raman Spectroscopy) برای سنجش ساختار شیمیایی خارهای سفره‌ماهی (در حالت کلسینه و غیرکلسینه) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا خارها به مدت ۱ ساعت در آب مقطر جوشانده شدند و سپس به مدت ۱ ساعت توسط دستگاه اولتراسونیک (Sysmatec، سوئیس) تمیز شدند. سپس، خارهای تمیز شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه به حال خود رها شدند تا خشک شوند و در نهایت توسط آسیاب (به مدت ۱ دقیقه) پودر شدند (Boutinguiza et al., 2012). اساس کار در مورد خارهای

کلسینه شده (پخته شده در دمای بالا) نیز به همان صورت بود با این تفاوت که نمونه‌ها پس از تمیز شدن توسط دستگاه اولتراسونیک به مدت ۴ ساعت در کوره الکتریکی و در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد پخته و سپس پودر شدند. برای آشکارسازی طیف رامان خارها از دستگاه Renishaw Raman Spectroscopy (Renishaw، انگلستان) استفاده شد. انجام آزمون با طول موج لیزر ۵۳۲ نانومتر صورت گرفت (Smith and Rehman, 1994; Galeano and Garcia-Lorenzo, 2014). تعداد ۲ نمونه خار کلسینه و ۲ نمونه خار غیرکلسینه طیف‌سنجی شدند. از نرم‌افزار KnowItAll® برای تحلیل طیف‌های رامان استفاده شد.

### سنجش غلظت عناصر

دستگاه طیف‌سنجی پلاسمای جفت شده القایی (ICP-OES) (DV 5300، Perkin-Elmer، آمریکا) برای اندازه‌گیری غلظت عناصر در خارهای غیرکلسینه مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور، خارها ابتدا به مدت ۱ ساعت در محلول هیدروژن پراکسید قرار گرفتند و سپس در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. پس از آن، مقدار ۰/۵ گرم از هر نمونه خار توزین شد و با استفاده از

پیک‌های مربوط به مدهای خمشی گروه فسفات (P3 و P4) در محدوده ۴۵۰-۴۲۰ و ۵۸۰-۶۱۰ بر سانتی‌متر مشخص بود. گروه هیدروکسی جذب سطحی شده نیز پیک‌هایی را در محدوده ۳۴۰۰-۳۵۰۰ بر سانتی‌متر نشان داد (شکل ۲). پیک‌های مربوط به گروه‌های عمده ترکیبات آلی نمونه‌های خار نیز در شکل ۲ مشخص شده‌اند. قوی‌ترین نوارها در نمونه غیرکلسینه در محدوده ۳۰۵۰-۲۷۰۰ و ۱۵۰۰-۱۳۰۰ بر سانتی‌متر بود که احتمالاً به علت ارتعاشات کششی و خمشی گروه‌های  $\text{CH}$ ،  $\text{CH}_2$  و  $\text{CH}_3$  مربوط به لیپیدها، آمینواسیدها و کربوهیدرات‌ها است. در این نمونه، پیک‌های عمده مربوط به آمین پروتئین‌ها نیز قابل تشخیص بود.

پیک مشاهده شده در ۲۵۵۰ بر سانتی‌متر نیز احتمالاً مربوط به گروه عاملی S-H در ساختار برخی آمینواسیدها است. منشا پیک‌های متعدد در محدوده ۲۵۰۰-۱۸۰۰ بر سانتی‌متر که برخی در هر دو نمونه خام و کلسینه شده ظاهر شده‌اند، نامشخص است. در نمونه کلسینه شده به نظر می‌رسد قسمت زیادی از ماده آلی موجود در خار گرافیت شده باشد. ظهور دو پیک قوی در محدوده ۱۶۰۰-۱۲۰۰ بر سانتی‌متر و همچنین نوار پهن در محدوده ۲۵۰۰-۳۰۰ بر سانتی‌متر با باندهای D، G، و ناحیه 2D در

محلول حاوی HCl یک مولار و  $\text{HNO}_3$  یک مولار (به نسبت ۲ به ۱) به مدت نیم ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد هضم شد (Amr et al., 2010) و غلظت عناصر در فاز محلول مورد سنجش قرار گرفت. تعداد دو نمونه خار مورد آزمایش قرار گرفت.

### تحلیل آماری

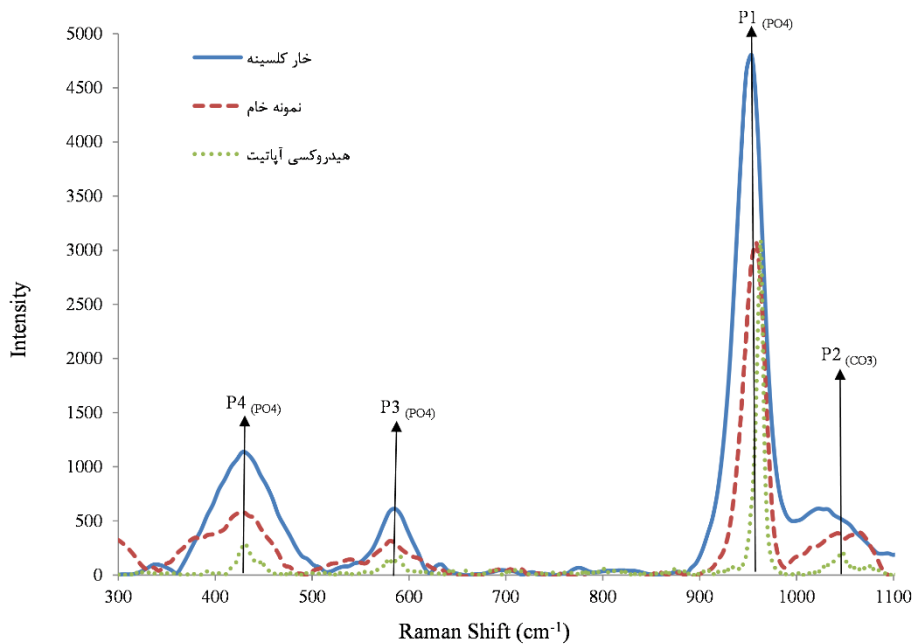
از آزمون همبستگی خطی پیرسون (Pearson Correlation) برای سنجش شباهت ساختاری بین طیف رامان نمونه خار و بلورهای خالص هیدروکسی آپاتیت و نیز برخی از اجزای بافت اسکلتی انسان استفاده شد. کلیه تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار KnowItAll Spectroscopy 2018 صورت پذیرفت.

### نتایج

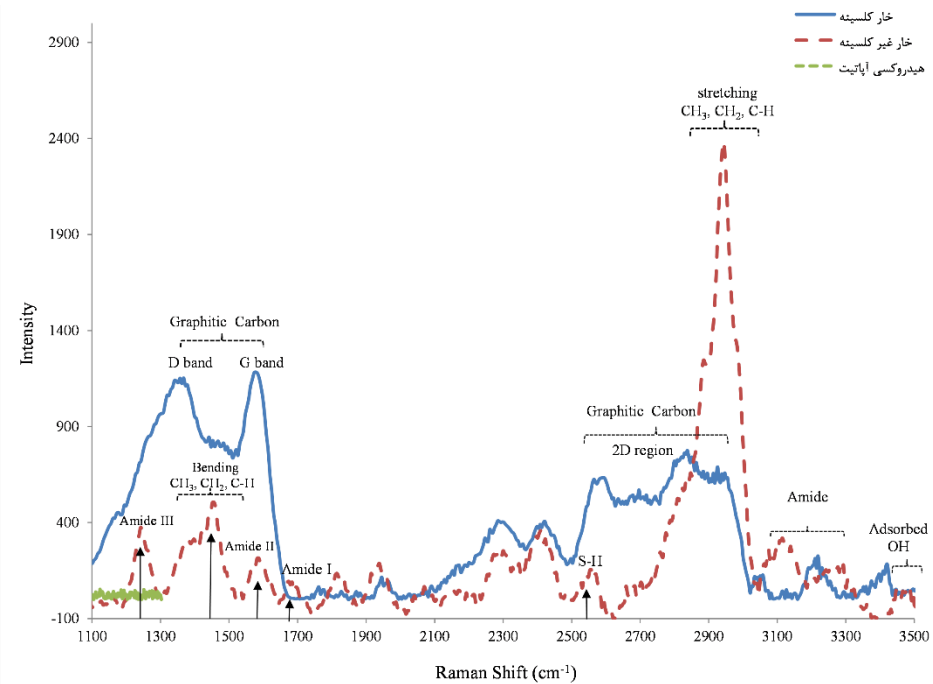
قوی‌ترین قله در طیف رامان خارهای کلسینه و غیرکلسینه جدا شده از سفره‌ماهی *Hemitrygon bennettii* مربوط به یون‌های فسفات چهاروجهی در پیک ۹۶۲ بر سانتی‌متر بود (P1 در شکل ۱). دومین پیک (P2) در محدوده ۱۱۰۰-۱۰۰۰ بر سانتی‌متر دیده شد و احتمالاً مربوط به گروه کربنات بود (شکل ۱).

ترکیبات گرافیتی مطابقت دارد. پیک‌های موجود در ۱۳۸۲ و ۱۳۴۵ بر سانتی‌متر به ترتیب مربوط به ارتعاش کششی C-C و حلقه کربنی است. جابه‌جایی به قرمز (اعداد موجی کمتر) و همچنین پهن‌شدگی پیک‌ها به ویژه در مورد

نمونه کلسینه شده مشاهده شد. در مجموع، شباهت خار غیرکلسینه با هیدروکسی آپاتیت، استخوان و دندان به ۵۰ تا ۶۰ درصد رسید و مقادیر شباهت در خارهای کلسینه کمتر از ۵۰ درصد بود (جدول ۱).



شکل ۱: طیف رامان نمونه خارهای کلسینه و غیرکلسینه جدا شده از سفره ماهی *Hemitrygon bennettii* و هیدروکسی آپاتیت خالص در محدوده ۳۰۰ تا ۱۱۰۰ بر سانتی‌متر



شکل ۲: طیف رامان نمونه خارهای کلسینه و غیر کلسینه جدا شده از سفیده ماهی *Hemitrygon bennettii* و هیدروکسی آپاتیت خالص در محدوده ۱۱۰۰ تا ۳۵۰۰ بر سانتی متر

جدول ۱: میزان شباهت طیف رامان خارهای کلسینه و غیر کلسینه جدا شده از سفیده ماهی *Hemitrygon bennettii* با طیف رامان آپاتیت، هیدروکسی آپاتیت (کربناته و غیر کربناته) و برخی از بافت‌های سخت بدن انسان

خار غیر کلسینه	خار کلسینه	
امتیاز (% همبستگی)	امتیاز (% همبستگی)	
۵۰/۳۶	۴۳/۲۷	هیدروکسی آپاتیت کربناته
۶۰/۱۵	۴۱/۲۴	هیدروکسی آپاتیت
۵۶/۵۲	۴۳/۴۰	آپاتیت
۴۸/۵۲	۳۷/۸۲	دنتین
۵۱/۵۹	۳۸/۲۰	مینای دندان
۶۲/۱۷	۳۷/۱۶	مغز سفید استخوان

تعداد ۹ عنصر در خار سفره ماهی در محدوده تشخیص کمی دستگاه ICP-OES قرار داشتند که از این میان، عنصر کلسیم دارای بیشترین غلظت بود و عنصر سدیم و منیزیم در رتبه‌های بعدی بودند (جدول ۲). نسبت استوکیومتری فسفر با کلسیم ۱/۶۰ برآورد شد.

در جدول ۳ میزان غلظت سدیم و منیزیم در نمونه‌های خار مورد آزمایش با مقادیر این عناصر در برخی از منابع طبیعی مورد استفاده در استحصال آپاتیت مقایسه شده است. بر این اساس به نظر می‌رسد غلظت سدیم در خار ماهی از مقدار آن در پوسته تخم شترمرغ و جلبک‌ها بیشتر باشد، اما از مرجان سخت و صدف *Crassostrea* کمتر بود. مقادیر منیزیم آن نیز در مقایسه با پوسته شترمرغ و مرجان سخت بیشتر بود.

جدول ۲: مقادیر برخی از عناصر موجود در خار دمی سفره ماهی *Hemitrygon bennettii* (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد) و مقایسه آن با دندان و استخوان انسان

عناصر	خار دمی <i>H. bennettii</i>	مغز دندان انسان	عاج دندان انسان	مینای دندان انسان	استخوان انسان
(mg/Kg) Al	$0.0001 \pm 0.0006$	۰/۱۰۰	-	-	-
(mg/Kg) Ba	$0.0005 \pm 0.0006$	۰/۰۰۱۸	-	-	-
(mg/Kg) Ca	$28.0 \pm 81.37$	۸/۲۳	۲۶/۹۶	۳۴/۹۱	۲۲/۵۰
(mg/Kg) Fe	$0.00027 \pm 0.0004$	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۵۰	۰/۰۰۶۰	-
(mg/Kg) K	$0.00014 \pm 0.0002$	-	۰/۰۰۲۵	۰/۰۰۲۸	۰/۰۰۸۹
(mg/Kg) Mg	$0.00044 \pm 0.0003$	۰/۰۰۲۷	۰/۰۰۷۱	۰/۰۰۲۹	۰/۰۰۲۶
(mg/Kg) Mn	$0.0002 \pm 0.0001$	۰/۰۰۰۲	-	-	-
(mg/Kg) Na	$0.00056 \pm 0.00010$	۰/۰۰۱۷	۰/۰۰۹۰	۰/۰۰۸۱	۰/۰۰۵۲
(mg/Kg) Sr	$0.00017 \pm 0.00015$	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۲۱	۰/۰۰۲۵	-
(mg/Kg) P	$13.46 \pm 0.58$	-	۱۳/۸۱	۱۷/۲۲	۱۰/۳
Ca/P (نسبت مولی)	$1/60 \pm 0.055$	-	۲/۰۱	۲/۱۵	۲/۱۸
منبع	مطالعه حاضر	Amr و همکاران (۲۰۱۰)	Teruel و همکاران (۲۰۱۵)	Teruel و همکاران (۲۰۱۵)	Zipkin (۱۹۷۰)



جدول ۳: مقایسه مقادیر سدیم و منیزیم در خار دمی سفره‌ماهی *Hemitrygon bennettii* با مقادیر آن‌ها در برخی از منابع طبیعی که عموماً برای استخراج هیدروکسی آپاتیت مورد استفاده قرار می‌گیرند

خار دمی <i>H. bennettii</i>	پوسته تخم شتر مرغ	مرجان سخت	صدف <i>Crassostrea</i>	<i>Corallina pilulifera</i> (نوعی جلبک)
۰/۵۶	۰/۴	۰/۴-۰/۶	۱۱/۱۹	۱/۳
۰/۴۴	۰/۶۱	۱-۲	۶/۱۹	۴۳/۷۰
مطالعه حاضر	Adeyeye (۲۰۰۹)	Swart (۱۹۸۱)	Mary و John (۲۰۱۶)	Yan (۱۹۹۹)

### بحث

استخوان دام و ماکیان، مرجان‌های سخت، صدف‌های نرم‌تنان، پوسته تخم ماکیان و جلبک‌ها از مرسوم‌ترین منابع طبیعی استخراج هیدروکسی آپاتیت ب به شمار می‌آیند (Nabavi et al., 2017; Wu et al., 2017; Teymouri et al., 2018; Bee and Hamid, 2019). در مطالعه حاضر از روش طیف‌سنجی رامان برای بررسی شباهت ساختار شیمیایی خار دمی سفره‌ماهی *Hemitrygon bennettii* با هیدروکسی آپاتیت استفاده شد و نتایج به دست آمده نیز تایید کننده حضور هیدروکسی آپاتیت در ساختار خار دمی این ماهی بود. طیف‌سنجی رامان یک فن قدرتمند برای بررسی ساختار، ترکیب و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آپاتیت سنتزی و زیست‌ساخت است (Penel et al., 1998). در پژوهش حاضر،

در صنعت، هیدروکسی آپاتیت از دو روش سنتز از مواد معدنی و استخراج از منابع طبیعی قابل استحصال است. انواع هیدروکسی آپاتیت استخراج شده از مواد طبیعی معمولاً غیراستوکیومتریک است (Hiller et al., 2003; Akram et al., 2014). از طرفی دیگر، هزینه هیدروکسی آپاتیت سنتزی خالص (بدون هرگونه افزودنی از عناصر دیگر) بالا است و این نوع هیدروکسی آپاتیت از خواص بیوشیمیایی ایده آلی در کاربری‌های پزشکی برخوردار نیست. این عوامل منجر شده است که انواع هیدروکسی آپاتیت استخراج شده از مواد طبیعی از برتری نسبی ترجیحی در صنعت پزشکی برخوردار باشند (Akram et al., 2014).

نشان داد که نسبت مساحت پیک‌های ۹۶۲ به ۱۰۷۰ بر سانتی‌متر در هیدروکسی آپاتیت (متناظر با نسبت P1 به P2) به شدت وابسته به مقدار کربنات است (Awonusi et al., 2007). به علاوه موقعیت و پهنای پیک P1 به شدت وابسته به مشخصات ترکیبی و مقدار نظم سلول‌های واحد آپاتیت است (Pasteris et al., 2004). پیک‌های مربوط به مدهای ارتعاش کششی هیدروکسی در هیدروکسی آپاتیت معمولاً در مقادیر بالاتر از ۳۵۰۰ بر سانتی‌متر ظاهر می‌شوند (Gomez-Morales et al., 2015; Michelot et al., 2013) که در طیف مشاهده شده در مطالعه حاضر پوشش داده نشد. با این حال، هیدروکسی جذب سطحی شده، پیک‌هایی را در محدوده ۳۴۰۰-۳۵۰۰ بر سانتی‌متر نشان داد.

در مطالعه حاضر، طیف مربوط به بخش آلی خارهای کلسینه و غیر کلسینه از تفاوت عمده‌ای برخوردار بود. از جمله این تفاوت‌ها می‌توان به ظهور دو پیک قوی در محدوده ۱۶۰۰-۱۲۰۰ بر سانتی‌متر و همچنین نوار پهن در محدوده ۲۵۰۰-۳۰۰ بر سانتی‌متر در نمونه کلسینه شده اشاره کرد که احتمالاً به گرافیتی شدن ساختار خار در حرارت بالا دلالت دارد (John et al., 2011). از طرفی دیگر، نوارهایی بسیار قوی در

طیف رامان نمونه خارهای کلسینه و غیر کلسینه سفره‌ماهی *H. bennettii* با طیف رامان هیدروکسی آپاتیت مرجع (Lafuente et al., 2015) در دو محدوده طیفی ۱۱۰۰-۳۰۰ و ۱۱۰۰-۳۵۰۰ بر سانتی‌متر مقایسه شد. قوی‌ترین قله در طیف هیدروکسی آپاتیت معمولاً مربوط به پیک ۹۶۲ بر سانتی‌متر (متناظر با پیک P1 در نمونه‌های خار) بود که ناشی از ارتعاش کششی متقارن یون‌های فسفات چهاروجهی است (Mondal et al., 2019). در نمونه‌های دارای مقادیر غیراستوکیومتری فسفات معمولاً یک پیک کوچک در ۹۵۵ بر سانتی‌متر ظاهر می‌شود (Antonakos et al., 2007) که در مورد نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. تشخیص حضور مقادیر کم کربنات در آپاتیت معمولاً با مشاهده پیک مربوط به ارتعاش کششی متقارن گروه کربنات در ۱۰۷۰ بر سانتی‌متر (تقریباً متناظر با پیک P2 در نمونه‌های خار) به صورت یک شانه، امکان‌پذیر است (Awonusi et al., 2007). حضور کربنات موجود در آپاتیت همچنین با حضور پیک‌های مربوط به مد ارتعاشی در محدوده ۷۲۰-۶۰۰ بر سانتی‌متر نیز قابل تشخیص است که البته در مطالعه حاضر شدت این پیک‌ها بسیار ضعیف بود. نتایج این مطالعه

کلسیم به فسفر کمک کند (Kusrini and Sontang, 2012). از طرفی دیگر، نتایج تحلیل عنصری نشان دهنده حضور مقادیر عمده‌ای سدیم و منیزیم در ساختار خار *H. bennettii* بود. حضور یون سدیم و منیزیم در ساختار هیدروکسی آپاتیت می‌تواند زیست‌سازگاری آن را تقویت کند و به رشد استخوان در کنار قطعه پیوندی کمک کند (Heaney, 2006; Landi et al., 2008; Palmer et al., 2008).

در مجموع، به نظر می‌رسد خار دمی سفره ماهی *Hemistrygon bennettii* می‌تواند به عنوان یک منبع طبیعی مناسب برای استخراج هیدروکسی آپاتیت به شمار آید. خار سفره ماهی در حال حاضر به عنوان دورریز شیلاتی تلقی می‌شود و امکان استحصال هیدروکسی آپاتیت از آن از اهمیت دوچندانی برخوردار است. به نظر می‌رسد به ازای هر کیلوگرم خار ماهی بیش از ۷۰۰ گرم هیدروکسی آپاتیت قابل استحصال باشد. مطالعات بعدی در زمینه بهینه‌سازی شرایط استخراج این ماده از خار ماهی (مثل دمای پخت) می‌تواند به تولید بهینه آن منجر شود.

۳۰۵۰-۲۷۰۰ و ۱۵۰۰-۱۳۰۰ بر سانتی‌متر در نمونه‌های غیرکلسینه می‌تواند بازتابی از ارتعاشات کششی و خمشی گروه‌های آلکانی مواد آلی باشد (Gremlich and Yan, 2000). در این نمونه‌ها پیک‌های عمده مربوط به آمین I (۱۶۷۵ بر سانتی‌متر)، آمین II (۱۵۷۵ بر سانتی‌متر)، و آمین III (۱۲۴۲ بر سانتی‌متر) نیز می‌تواند تایید کننده حضور انواع پروتئین‌ها باشد (Gremlich and Yan, 2000).

در مطالعه حاضر، میانگین میزان نسبت مولی کلسیم به فسفر در خارهای حرارت دیده ۱/۶۰ برآورد شد. در انواع هیدروکسی آپاتیت استخراج شده از ضایعات استخوان دام، این مقادیر بین ۱/۴۶ تا ۲/۰۱ متغیر است (Bahrololoom et al., 2009) و در انواع استخراج شده از فلس ماهی در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به ۱/۶۷ می‌رسد (Kongsri et al., 2013). در انواع هیدروکسی آپاتیت سنتزی نیز این مقدار برابر با ۱/۶۷ بود و بالاترین درجه زیست‌سازگاری نیز در همین نسبت دیده شده است (Smolen et al., 2013). افزایش دمای پخت حرارتی می‌تواند به بالا رفتن نسبت

## منابع

- کاربردهای ارتوپدی: شناسایی و آنالیز شیمیایی و فیزیکی. دومین همایش مشترک انجمن مهندسين متالورژی و انجمن ریخته‌گری ایران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ص: ۲۳-۱۱.
- Adeyeye E.I. 2009.** Comparative study on the characteristics of egg shells of some bird species. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 32(2): 159–166.
- Akram M., Ahmed R., Shakir I., Ibrahim W.W. and Hussain R. 2014.** Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources. *Journal of Materials Science*, 49: 1461–1475.
- Amr M., Fattah A. and Helal A. 2010.** Analysis of trace elements in teeth by ICP-MS: Implications for caries. *Zeitschrift für Naturforschung a*, 21: 1–12.
- Antonakos A., Liarakis E. and Leventouri T. 2007.** Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials*, 28: 3043–3054.
- Awonusi A., Morris M.D. and Tecklenburg M.M.J. 2007.** Carbonate assignment and calibration in the Raman spectrum of apatite. *Calcified Tissue International*, 81: 46–52.
- Bahrololoom M.E., Javidi M., Javadvour S. and Ma J. 2009.** Characterization of natural hydroxyapatite extracted from bovine cortical bone ash. *Journal of Ceramic Processing Research*, 10(2): 129–138.
- Bee S.L. and Hamid Z.A.A. 2019.** Characterization of chicken bone waste-derived hydroxyapatite and its functionality on chitosan membrane for guided bone regeneration. *Composites Part B: Engineering*, 163: 562–573.
- Boutinguiza M., Pou J., Comesana R., Lusquinos F., De Carlos A. and Leon B. 2012.** Biological hydroxyapatite obtained from fish bones. *Materials Science and Engineering*, 32: 478–486.
- Froese R. and Pauly D. 2019.** FishBase. Fisheries Centre, University of British Columbia, British Columbia. Retrieved February 22, 2021, from <https://www.fishbase.de>.
- Galeano S. and Garcia-Lorenzo M.L. 2014.** Bone mineral change during experimental calcination: An X-ray diffraction study. *Journal of Forensic Sciences*, 59: 1602–1606.
- جاویدی یونسی م.، بحر العلوم م. و جوادی پور س. ۱۳۸۷. تولید پودر سرامیکی هیدروکسی آپاتیت از خاکستر استخوان گاو به منظور استفاده در

- Gomez-Morales J., Iafisco M., Delgado-Lopez J.M., Sarda S. and Drouet C. 2013.** Progress on the preparation of nanocrystalline apatite and surface characterization: Overview of fundamental and applied aspects. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 59: 1–46.
- Gremlich H. and Yan B. 2000.** Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials, Vol. 24. CRC Press, USA. 600P.
- Halstead B.W. 1988.** Poisonous and Venomous Marine Animals of the World, Vol. 1. Darwin Press, Princeton. 1168P.
- Heaney R.P. 2006.** Role of dietary sodium in osteoporosis. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(sup3): 271–276.
- Hiller J.C., Thompson T.J.U., Evison M.P., Chamberlain A.T. and Wess T.J. 2003.** Bone mineral change during experimental heating: An X-ray scattering investigation. *Biomaterials*, 24: 5091–5097.
- Hutmacher D.W., Schantz J.T., Lam C.X.F., Tan K.C. and Lim T.C. 2007.** State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1: 245–260.
- John R., Ashokreddy A., Vijayan C. and Pradeep T. 2011.** Single- and few-layer graphene growth on stainless steel substrates by direct thermal chemical vapor deposition. *Nanotechnology*, 22(16): 1–22 (165701).
- John A.T. and Mary J. 2016.** Chemical composition of the edible oyster Shell *Crassostrea madrasensis* (Preston 1916). *Journal of Marine Biology and Aquaculture*, 2(2): 1–4.
- Kongsri S., Janpradit K., Buapa K., Techawongstien S. and Chanthai S. 2013.** Nanocrystalline hydroxyapatite from fish scale waste: Preparation, characterization and application for selenium adsorption in aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 215: 522–532.
- Kusrini E. and Sontang M. 2012.** Characterization of x-ray diffraction and electron spin resonance: Effects of sintering time and temperature on bovine hydroxyapatite. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(2): 118–125.
- Lafuente B., Downs R.T., Yang H. and Stone N. 2015.** The power of databases: The RRUFF project. P: 1–30. In: Armbruster T., Danisi R.M. (Eds.). *Highlights in Mineralogical Crystallography*. De Gruyter, Germany.
- Landi E., Logroscino G., Proietti L., Tampieri A., Sandri M. and**

- Sprio S. 2008.** Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: From synthesis to in vivo behaviour. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(1): 239–247.
- LeGeros R.Z. 1993.** Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clinical Materials*, 14: 65–88.
- Michelot A., Sarda S., Audin C., Deydier E., Manoury E., Poli R. and Rey C. 2015.** Spectroscopic characterization of hydroxyapatite and nanocrystalline apatite with grafted aminopropyltriethoxysilane: Nature of silane-surface interaction. *Journal of Materials Science*, 50: 5746–5757.
- Mohd-Puad N.A.S., Koshy P., Abdullah H.Z., Idris M.I. and Lee T.C. 2019.** Syntheses of hydroxyapatite from natural sources. *Heliyon*, 5(5): 1–14 (e01588).
- Mondal S., Hoang G., Manivasagan P., Moorthy M.S., Kim H.H., VyPhan T.T. and Oh J. 2019.** Comparative characterization of biogenic and chemical synthesized hydroxyapatite biomaterials for potential biomedical application. *Materials Chemistry and Physics*, 228: 344–356.
- Nabavi S.M.B., Shushizadeh M.R., Behfar A. and Ghayem-Ashrafi M. 2017.** Persian Gulf corals: A new hydroxyapatite bioceramics in medicine. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 7: 59–64.
- Nosrat A., Kolahdouzan A., Khatibi A.H., Verma P., Jamshidi D., Nevins A.J. and Torabinejad M. 2019.** Clinical, radiographic, and histologic outcome of regenerative endodontic treatment in human teeth using a novel collagen-hydroxyapatite scaffold. *Journal of Endodontics*, 45: 136–143.
- Palmer L.C., Newcomb C.J., Kaltz S.R., Spoerke E.D. and Stupp S. I. 2008.** Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chemical Reviews*, 108(11): 4754–4783.
- Pasteris J.D., Wopenka B., Freeman J.J., Rogers K., Valsami-Jones E., Van Der Houwen J.A.M. and Silva M.J. 2004.** Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: Implications for bone and biomaterials. *Biomaterials*, 25: 229–238.
- Penel G., Leroy G., Rey C. and Bres E. 1998.** MicroRaman spectral study of the PO<sub>4</sub> and CO<sub>3</sub> vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcified Tissue International*, 63: 475–481.
- Rahimzadeh R., Nazem Zomorodi P. and Tajavanchi M.F. 2014.**

- Nano-hydroxyapatite-coated cancellous bone graft in bone-defect repair (an animal study). *Iranian Journal of Orthopaedic Surgery*, 12: 132–139.
- Sanosh K.P., Chu M., Balakrishnan A., Kim T.N. and Cho S. 2009.** Utilization of biowaste eggshells to synthesize nanocrystalline hydroxyapatite powders. *Materials Letters*, 63: 2100–2102.
- Sivakumar M., Kumar T.S.S., Shantha K.L. and Rao K.P. 1996.** Development of hydroxyapatite derived from Indian coral. *Biomaterials*, 17: 1709–1714.
- Smith R. and Rehman I. 1994.** Fourier transform Raman spectroscopic studies of human bone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5: 775–778.
- Smolen D., Chudoba T., Malka I., Kedzierska A., Lojkowski W., Swieszkowski W. and Lewandowska-Szumiel M. 2013.** Highly biocompatible, nanocrystalline hydroxyapatite synthesized in a solvothermal process driven by high energy density microwave radiation. *International Journal of Nanomedicine*, 8: 653–668.
- Suchanek W. and Yoshimura M. 1998.** Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *Journal of Materials Research*, 13: 94–117.
- Swart P.K. 1981.** The strontium, magnesium, sodium composition of recent scleractinian coral skeletons as standards for palaeoenvironmental analysis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 34: 115–136.
- Teruel J.D.D., Alcolea A., Hernandez A. and Ruiz A.J.O. 2015.** Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Archives of Oral Biology*, 60: 768–775.
- Teymouri A., Stuart B.J. and Kumar S. 2018.** Hydroxyapatite and dittmarite precipitation from algae hydrolysate. *Algal Research*, 29: 202–211.
- Valinassab T., Dehghani R., Kamali E. and Behzadi S. 2011.** Biomass estimation of demersal resources in the Persian Gulf and Oman Sea by Swept Area Method. *Iranian Fisheries Science Research Institute, Iran*. 256P.
- Venkatesan J., Qian Z.J., Ryu B., Thomas N.V. and Kim S.K. 2011.** A comparative study of thermal calcination and an alkaline hydrolysis method in the isolation of hydroxyapatite from *Thunnus obesus* bone. *Biomedical Materials*, 6(3): 1–12 (035003).
- Walsh M.T., Beusse D., Bossart G.D., Young W.G., Odell D.K. and Patton G.W. 1988.** Ray

encounters as a mortality factor in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Marine Mammal Science*, 4: 154–162.

- Wu S., Hsu H., Wu Y. and Ho W. 2011.** Hydroxyapatite synthesized from oyster shell powders by ball milling and heat treatment. *Materials Characterization*, 62: 1180–1187.
- Wu S.C., Hsu H.C., Hsu S.K., Tseng C.P. and Ho W.F. 2017.** Preparation and characterization of hydroxyapatite synthesized from oyster shell powders. *Advanced Powder Technology*, 28: 1154–1158.
- Yan X. 1999.** Assessment of calcareous alga *Corallina pilulifera* as elemental provider. *Biomass and Bioenergy*, 16(5): 357–360.
- Zipkin I. 1970.** The inorganic composition of bones and teeth. P: 69–103. In: Schraer H. (Ed.). *Biological Calcification: Cellular and Molecular Aspects*. Springer, Germany.





Research Paper

## A study on chemical composition of caudal spines in stingray *Hemirhynchus bennettii* aimed to hydroxyapatite extraction

Hamid Ershadifar<sup>1</sup>, Amir Ghazilou<sup>1\*</sup>, Kamalodin Kor<sup>1</sup>

Received: October 2019

Accepted: March 2019

### Abstract

This study was performed to investigate the chemical composition of the caudal spine in *Hemirhynchus bennettii* (Muller and Henle, 1841) as a source for hydroxyapatite (HA) extraction. Therefore, the chemical structure of caudal spines of fish sampled from the mangrove swamps at Chabahar Bay was determined at calcined (baked at high temperature) and uncalcined conditions. The Raman spectroscopy and ICP-OES were used for structural and elemental analyses, respectively. The sharpest peaks in the Raman were observed at  $962\text{cm}^{-1}$  which was probably due to the symmetric stretching vibrations of apatite phosphates. The adsorbed OH ions also indicated peaks at  $3400\text{-}3500\text{cm}^{-1}$  of both calcined and uncalcined samples. The presence of organic residue in uncalcined samples was highlighted by several peaks at  $2700\text{-}3050$  and  $1300\text{-}1500\text{cm}^{-1}$  which may be due to both stretching and bending vibrations of CH, CH<sub>2</sub> and CH<sub>3</sub> groups. Some peaks at  $1200\text{-}1800\text{cm}^{-1}$  may also be related to amine residues of proteins. In terms of ion concentrations, high amounts of sodium and magnesium contents in the spine structure (compared to other natural resources of HA extraction) may improve the biocompatibility of extracted HA.

**Key words:** *Chondrichthyes, Spine, Hydroxyapatite, Raman Spectroscopy.*

1- Assistant Professor in Department of Marine Sciences, Ocean Sciences Research Center, Iranian National Institute for Oceanography and Atmospheric Science, Tehran, Iran.

\*Corresponding Author: [amir.ghazilou@inio.ac.ir](mailto:amir.ghazilou@inio.ac.ir)

