

## سنتز نانوذرات هیدروکسی آپاتیت متخلخل به روش سل-ژل با استفاده از پلیمرهای آلی مختلف

فاطمه زارع دهنو<sup>۱</sup>، راضیه حیاتی<sup>۱\*</sup>، فاطمه حیدری<sup>۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۳۱، ش ص: ۶۲-۴۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۰۲)

### چکیده

در سال‌های اخیر استفاده از نانو ذرات متخلخل هیدروکسی آپاتیت به علت خواص برتر آن‌ها، کاربرد وسیعی در رهایش دارو و مهندسی بافت استخوان پیدا کرده‌اند. در این مطالعه، با استفاده از پلیمرهای ژلاتین، کیتوزان مصنوعی و کیتوزان طبیعی پوست میگو، نانوذرات متخلخل هیدروکسی آپاتیت به روش سل ژل تهیه و زیست فعالی آن‌ها بررسی شد. شناسایی فازی و ریزساختاری با آنالیزهای پراش پرتو ایکس (XRD) و میکروسکوپ‌های الکترونی روبشی (SEM) و گسیل میدان (FE-SEM) انجام شد. اندازه گیری سطح ویژه و توزیع تخلخل‌ها توسط آنالیز BET انجام گردید و داده‌ها بر اساس نمودارهای BJH و ایزوترم‌های جذب/اجذب گزارش شد. زیست فعالی نمونه‌های تف جوشی شده با غوطه‌وری آن‌ها در محلول شبیه‌سازی شده بدن به مدت ۲۸ روز در دمای ۳۷°C ارزیابی شد. طبق نتایج میکروسکوپ الکترونی گسیل میدان، پودرهای سنتز شده بصورت آگلومره‌هایی با ذرات نانومتری در محدوده ۲۵-۱۰ nm بودند. نتایج نشان داد این نانو ذرات عمدتاً بصورت مزوحفره بوده و نمونه هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با ژلاتین در مقایسه با نمونه‌های سنتز شده با استفاده از کیتوزان طبیعی و مصنوعی اندازه ذرات کوچک‌تر و همچنین تخلخل‌های ریزتر و یکنواخت‌تر داشت و بعد از غوطه‌وری نمونه‌ها در محلول SBF بلورهای آپاتیت بیش‌تر و یکنواخت‌تری نسبت به نمونه‌های دیگر روی سطح آن نشسته بود.

**واژه‌های کلیدی:** هیدروکسی آپاتیت، نانو ذرات متخلخل، سل-ژل، ژلاتین، کیتوزان، زیست فعالی.

<sup>۱</sup> - گروه مهندسی مواد، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

\*- نویسنده مسئول مقاله: r.hayati@yu.ac.ir

## پیشگفتار

مهندسی بافت یک دانش بین رشته‌ای است که بر توسعه و تلفیق دانش شیمی، فیزیک، مهندسی و علوم زیستی تمرکز داشته و به دنبال راه حل مشکلات پزشکی همچون از دست دادن بافت‌ها و نارسایی اندام است [۱]. مهمترین هدف مهندسی بافت درک نحوه عملکرد سلول‌ها، ساختار ماتریس خارج سلولی و دانش کافی در مورد ساخت داربست‌ها برای ایجاد محیطی مناسب برای چسبندگی و نگهداری سلول‌ها می‌باشد [۱]. تاکنون انواع مختلفی از داربست‌هایی سرامیکی، پلیمری و کامپوزیتی مورد استفاده قرار گرفته اند و مطالعات جدید بر استفاده از مواد زیستی حاوی مواد زیست فعال تأکید داشته که تحریک کننده مهاجرت سلولی به محل ضایعه هستند. بافت استخوان شامل یک فاز معدنی و یک فاز آلی است و داربست‌های تقلید کننده ماتریس استخوان نیز از دوفاز معدنی (عمدتاً هیدروکسی آپاتیت) و آلی (پروتئین‌هایی نظیر کلاژن یا ژلاتین) تشکیل شده اند [۱]. امروزه استفاده از آپاتیت‌ها مانند هیدروکسی آپاتیت زیست فعال به گونه گسترده در کاربرد پزشکی توسعه یافته است. هیدروکسی آپاتیت با فرمول شیمیایی  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  از نظر ترکیب شیمیایی بسیار شبیه به بخش معدنی استخوان و دندان است و همچنین خواص همبندی خوبی با استخوان از خود نشان می‌دهد [۲، ۳].

یکی از مباحث مهم در جراحی‌های اورتوپدی سیستم‌های رهایش داروی کاشتنی دارو در بافت استخوان می‌باشد [۴]. مزایای هیدروکسی آپاتیت متخلخل برای استفاده در کاربرد رهایش دارو عبارتند از: زیست سازگاری عالی و خواص فیزیکی-شیمیایی مناسب از جمله سطح ویژه بزرگ و حجم حفرات زیاد، وجود گروه های OH- که با برقراری پیوندهای هیدروژنی مولکول‌های دارو را جذب می‌کنند، امکان ایجاد حفره‌هایی با اندازه‌های مختلف با استفاده از روش‌های سنتز مختلف و تنظیم میزان رهایش دارو با کنترل اندازه حفره‌ها و عدم تغییر ترکیب شیمیایی دارو در مجاورت هیدروکسی آپاتیت [۵، ۶]. روش‌های شیمیایی زیادی برای سنتز نانوذرات متخلخل هیدروکسی آپاتیت استفاده شده‌اند، از جمله روش های بیومتریک، رسوب همزمان، هیدروترمال و سل ژل. ویژگی های روش سنتز بر ساختار و توزیع اندازه و مورفولوژی ذرات و حفره

ها و در نهایت ترکیب شیمیایی و خواص مکانیکی، نوری و حرارتی و رفتار زیستی محصول مورد نظر تاثیر زیادی دارد [۷]. علاوه بر انواع روش سنتز شیمیایی، استفاده از سورفکتانت های یونی یا غیر یونی ساده و پیچیده، یکی از روش‌های سنتز نانوذرات متخلخل هیدروکسی آپاتیت می‌باشد.

صافی و کریم زاده [۸] با استفاده از روش شیمیایی و بدون استفاده از تمپلیت در یک ظرف نانو ذرات متخلخل توخالی هیدروکسی آپاتیت را سنتز کرده و از آن با موفقیت برای تزریق داروی آنتی بیوتیک در محل کاشتنی در بافت استخوان استفاده نمودند. در مطالعه دیگری، اویی و همکاران [۹] با استفاده از سورفکتانت های غیر یونی به- عنوان تمپلیت، هیدروکسی آپاتیت مزو حفره سنتز نمودند و برای جذب ماده P-Cresel از این نانوذرات استفاده شد. طبق نتایج این محققین، نوع سورفکتانت غیر یونی بر توزیع حفرات و اندازه حفره‌ها و نانوذرات تاثیر گذار بوده و در نهایت بر رفتار جذب دارو موثر می‌باشد. کامینیاک و همکاران [۱۰] نانوذرات متخلخل هیدروکسی آپاتیت را با روش تمپلیت سخت و استفاده از نانو میله های کربنی با سطح ویژه زیاد سنتز و خواص فیزیکی و شیمیایی آن را بررسی کردند. ویجسینگ و همکاران [۱۱] در سال ۲۰۱۸ با استفاده از تمپلیت کربنات کلسیم موفق به سنتز نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت شدند و در این روش با نانوذرات کربنات کلسیم و هیدروکسی آپاتیت همزمان در محلول سنتز گردید. هوانگ و همکاران [۱۲] با استفاده از روش میکرومولسیون نانوذرات متخلخل هیدروکسی آپاتیت را سنتز و اثر دمای کلسیناسیون و pH بر ترکیب شیمیایی بررسی نمودند. طبق نتایج این محققین تا غلظت  $0.1 \mu\text{g/L}$  هیدروکسی آپاتیت در محیط کشت زیست سازگار بوده و در غلظت‌های بیشتر باعث سمیت می‌گردد. لت و همکاران [۱۳] نانو ذرات متخلخل هیدروکسی آپاتیت میله ای شکل را با روش سل ژل و با استفاده از اسیدهای چرب به عنوان اصلاح کننده‌های آلی، سنتز نمودند و از این نانو ذرات با توزیع حفره های باریم برای رهایش دارو استفاده شد. طبق نتایج بدست آمده، در مراحل اولیه رهایش دارو با سرعت و به شکل انفجاری انجام شد و در ادامه به آهستگی پیش رفت که این نوع رفتار، این نانوذرات را برای کاربردهای بهبود سریع بافت

رسانده شد. سپس محلول پلیمر و  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  به صورت قطره قطره به محلول  $\text{NH}_4\text{HPO}_4$  در حین هم زدن اضافه شد. در نتیجه افزودن این محلول سوسپانسیون سفید رنگی با رسوب ژلی شکل بعد از ۴۸ ساعت همزدن حاصل شد. رسوب ها با کاغذ صافی فیلتر شدند و چندین مرتبه با آب مقطر شسته شدند تا pH محلول پس از شست وشو به ۷-۷/۵ برسد. سپس در دمای  $80^\circ\text{C}$  خشک و کلسیناسیون در دمای  $600^\circ\text{C}$  با سرعت گرمایش  $3^\circ\text{C}/\text{min}$  به مدت ۱ ساعت انجام شد.

### ساخت نمونه‌ها

شکل دهی نمونه‌ها با اعمال فشار اولیه  $50\text{ MPa}$  و سپس فشار نهایی  $100\text{ MPa}$  به مدت ۳۰ ثانیه به وسیله پرس همه جانبه سرد (مدل CIP 303K، ساخت کشور ایران) انجام شد و به دیسک‌هایی با قطر  $10\text{ mm}$  و ضخامت  $2\text{ mm}$  تبدیل شدند. در نهایت فرآیند تفجوشی نمونه‌های شکل دهی شده توسط کوره جعبه‌ای با دمای  $1300^\circ\text{C}$  به مدت ۲ ساعت با نرخ گرمایش  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  انجام شد.

### بررسی خواص

سطح ویژه، حجم حفرات و میانگین قطر حفره‌های هر سه نمونه توسط آنالیز BET با استفاده از دستگاه BELL مدل Belsorp mini II -Japan بررسی گردید. بدین منظور نمونه‌ها در دمای  $120^\circ\text{C}$  به مدت ۲ ساعت گاز زدایی شدند. به منظور مشخصه‌یابی فازهای موجود در پودرهای هیدروکسی آپاتیت طبیعی و تیتانات باریم سنتز شده از آنالیز پراش پرتو X (XRD، مدل Bruker D8-Advance) استفاده شد. همچنین سطح شکست و مورفولوژی ذرات تمامی نمونه‌ها به کمک میکروسکوپ های الکترونی روبشی (SEM، مدل TESCAN-Vega 3) و گسیل میدان (FESEM) بررسی شد. جهت ارزیابی زیست‌فعالی، نمونه‌های تفجوشی شده در محلول شبیه‌سازی شده بدن (SBF) تهیه شده به کمک دستور العمل کوکوبو [۱۹] با pH معادل ۷/۵ به مدت ۲۸ روز در دمای  $37^\circ\text{C}$  غوطه‌ور شدند. سپس، وضعیت سطحی و ترکیب شیمیایی بلورهای تشکیل شده بر روی سطح

مناسب می‌سازد. از بین پلیمرهای استفاده شده برای سنتز ذرات هیدروکسی آپاتیت مزو حفره در مورد پلیمرهای آلی کیتوزان و ژلاتین مواردی گزارش نشده است، اما در مطالعات مختلف این دو پلیمر در ساخت کامپوزیت‌های سرامیک پلیمر استفاده شده‌اند [۱۴]. کیتوزان یک پلیمر طبیعی است که دارای خصوصیات فیزیکی و شیمیایی (واکنش گروه‌های OH و گروه‌های NH) و بیولوژیکی (زیست تخریب پذیر بودن و سازگار بودن با محیط زنده) است. کیتوزان از دی استیله شدن کیتین بدست می‌آید و کیتین شامل واحدهای تکراری از linked 2\_acetamido\_2\_deoxy\_βD\_glucopyra است که بعد از سلولز فراوان‌ترین پلیمر زیستی می‌باشد [۱۵]. ژلاتین یک کلاژن بی‌شکل می‌باشد که از حرارت دهی تدریجی کلاژن نوع I ایجاد شده و از مزایای آن می‌توان به ارزان‌تر بودن و تهیه آسان‌تر محلول آن نسبت به کلاژن اشاره کرد [۱۶].

در این مطالعه نانوذرات هیدروکسی آپاتیت متخلخل مزوحفره با استفاده از پلیمرهای ژلاتین، کیتوزان مصنوعی و کیتوزان طبیعی توسط روش سل ژل سنتز شدند. ضمن بررسی خواص فیزیکی-شیمیایی، ساختار فازی و ریزساختار هر سه نمونه پودر سنتز شده، تاثیر استفاده از پلیمرهای مختلف بر اندازه سطح ویژه، اندازه حفره و حجم حفره‌ها و در نهایت رفتار زیست‌فعالی نمونه‌های هیدروکسی آپاتیت بررسی گردید.

### مواد و روش‌ها

#### سنتز هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین به روش سل-ژل

در این روش  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  و  $\text{NH}_4\text{HPO}_4$  به طور جداگانه در آب دیونیزه شده حل شدند. مقدار ۲۵٪ وزنی پلیمر مورد نظر (ژلاتین و کیتوزان مصنوعی (شرکت سیگما آلد ریچ) و کیتوزان طبیعی پوست میگو [۱۷]) در اسید استیک ۲٪/۷/۷ رقیق شد و در ادامه مطابق کارهای قبلی [۱۸] فرایند سنتز سل ژل انجام شد. به این صورت که محلول رقیق شده پلیمر روی همزن مغناطیسی مقداری دما داده شد تا پلیمر به طور کامل حل شود. محلول پلیمر به محلول  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  اضافه شد و pH هر دو محلول با افزودن مقدار مناسب آمونیوم هیدروکسید به ۱۱

الگوی پراش پرتوی X این نانو ذرات با نتایج سایر محققان نیز هم خوانی دارد [۱۸].

### بررسی ریز ساختار

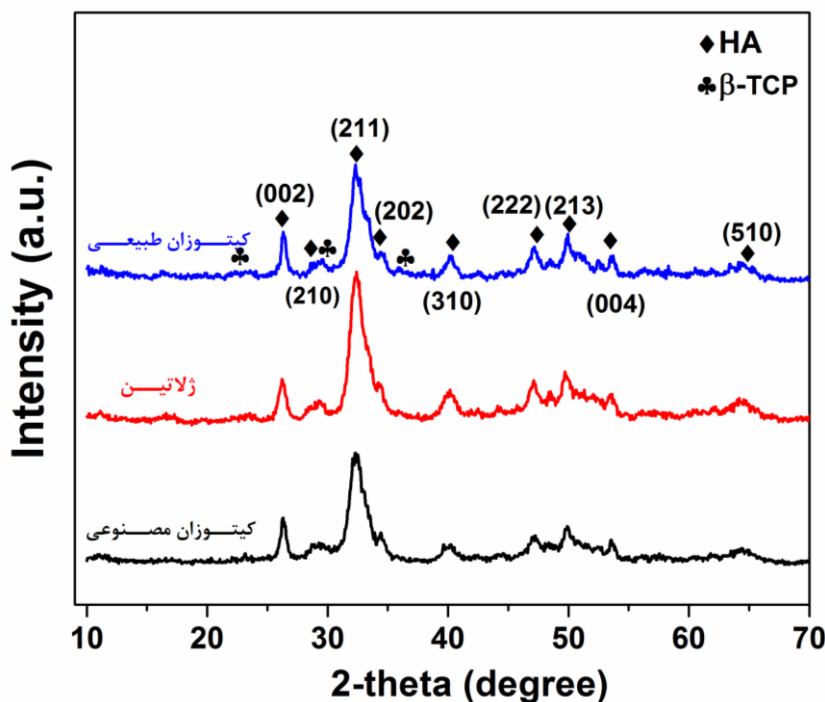
شکل (۲) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشرمیدانی (FE-SEM) مربوط به نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت سنتز شده به کمک الف) کیتوزان مصنوعی، ب) ژلاتین و ج) کیتوزان طبیعی پس از کلسیناسیون در دمای  $600^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ ساعت را نشان می‌دهد.

تمامی نمونه‌ها پس از گذشت مدت زمان ۲۸ روز به کمک آنالیز SEM و EDX مورد بررسی قرار گرفت.

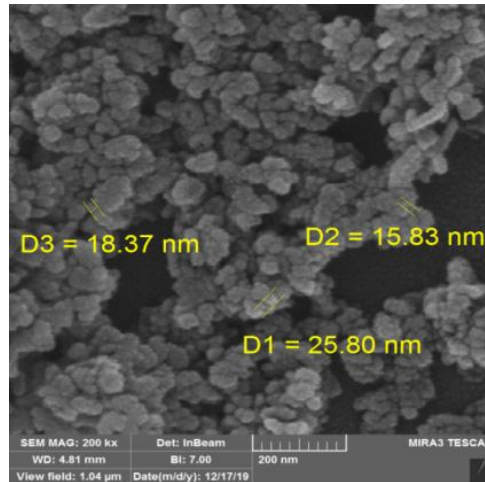
### نتایج و بحث

#### شناسایی فازی

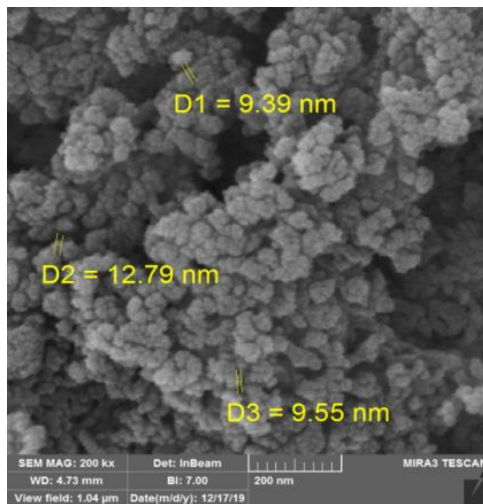
شکل (۱) الگوی پراش پرتوی X مربوط به هیدروکسی آپاتیت-پلیمر به روش سل ژل را نشان می‌دهد. طبق این الگو، پیک‌های مشخصه فاز هیدروکسی آپاتیت در زوایای  $26^{\circ}$  و  $32^{\circ}$  درجه ظاهر شدند. شدت و موقعیت پیک‌های فاز غالب با الگوی پراش اشعه X استاندارد هیدروکسی آپاتیت با شماره کارت ۰۰-۰۰۱-۱۰۰۸ هم خوانی دارد. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود پیک‌های کم شدت زوایای حدود  $20^{\circ}$ ،  $30^{\circ}$  و  $35^{\circ}$  درجه به فاز بتا تری کلسیم فسفات با شماره کارت ۰۰-۰۲۹-۰۳۵۹ مربوط می‌باشند.



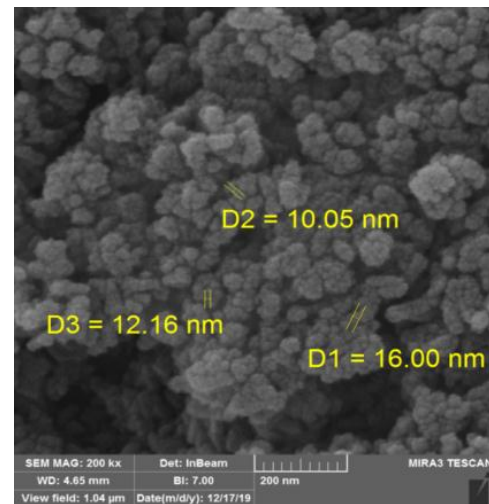
شکل ۱- الگوهای پراش اشعه X مربوط به نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت متخلخل تولید شده به روش سل ژل با استفاده از پلیمرهای آلی مختلف، (۱) کیتوزان مصنوعی، (۲) ژلاتین و (۳) کیتوزان طبیعی، سنتز شده در دمای  $600^{\circ}\text{C}$



الف



ب



ج

شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشرمیدان مربوط به نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با روش سل-ژل با استفاده از پلیمرهای الف) کیتوزان مصنوعی ، ، ب) ژلاتین ، ج) کیتوزان طبیعی پس از کلسیناسیون در دمای  $600^{\circ}\text{C}$

داده های جدول ۱ نشان می دهد که نانو ذرات سنتز شده با استفاده از پلیمر ژلاتین در مقایسه با نانو ذرات سنتز شده با کیتوزان طبیعی و مصنوعی از سطح ویژه بالاتر و در نتیجه ذرات ریزتر برخوردار می باشند که اندازه ذرات تخمین زده شده با نتایج آنالیز FE-SEM همخوانی دارد. از طرفی، حجم حفره های این نانو ذرات نیز در مقایسه با نانو ذرات سنتز شده با کیتوزان کمتر بود. انتظار داریم این تفاوت در اندازه و حجم حفره ها بر زیست فعالی و رفتار رهایش دارو و سایر خواص این نانو ذرات تاثیر گذار باشد.

همان گونه که در تصاویر مشخص است این ذرات در این بزرگنمایی بصورت آگلومره هایی هستند که از ذرات نانومتری تشکیل شده اند. میانگین اندازه ذرات این سه نمونه در محدوده ۱۰-۲۵ nm و اندازه بزرگترین ذرات تقریباً ۲۶ nm است که برای فرایندهای فشرده سازی و تفجوشی مطلوب است. با توجه به این تصاویر، اندازه ذرات نمونه پودری هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین از بقیه نمونه ها کوچک تر است.

بررسی سطح ویژه

جدول ۱- داده های مربوط به ذرات و حفره های نانو پودرهای هیدروکسی آپاتیت با استفاده از نمودار BJH

نام نمونه	سطح ویژه (m <sup>2</sup> /g)	شعاع میانگین حفرات (nm)	حجم حفرات (cm <sup>3</sup> /g)
هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با کیتوزان مصنوعی	۷۱/۷۷۴	۲۵/۵۰	۰/۶۴۸۵
هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با ژلاتین	۱۱۸/۲۲	۹/۲۳	۰/۴۴۵۹
هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با کیتوزان طبیعی	۵۴/۶۸۴	۲۵/۵۵	۰/۴۶۰۶

شکل منحنی هیستریزیس متفاوت از دو نمونه دیگر در گروه H<sub>1</sub> قرار می گیرد که پیش بینی می شود این گروه شامل ذرات آگلومره یا توده ای شکل تقریباً کروی باشند.

این ساختار متفاوت حفره ها در نمونه های سنتز شده با ژلاتین و کیتوزان احتمالاً بر رفتار زیست فعالی این نمونه ها تاثیرگذار خواهد بود که این موضوع در قسمت بعدی بررسی می شود. طبق نتایج محققین، هیدروکسی-آپاتیت نانوکریستالی با مورفولوژی کروی در مقایسه با مورفولوژی های نامنظم در فرایند استخوان سازی از اهمیت بیشتری برخوردار است [۲۱]، بنا بر این انتظار داریم نانو ذرات سنتز شده با ژلاتین نسبت به هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با کیتوزان زیست فعالی بهتری از خود نشان دهد.

#### بررسی زیست فعالی

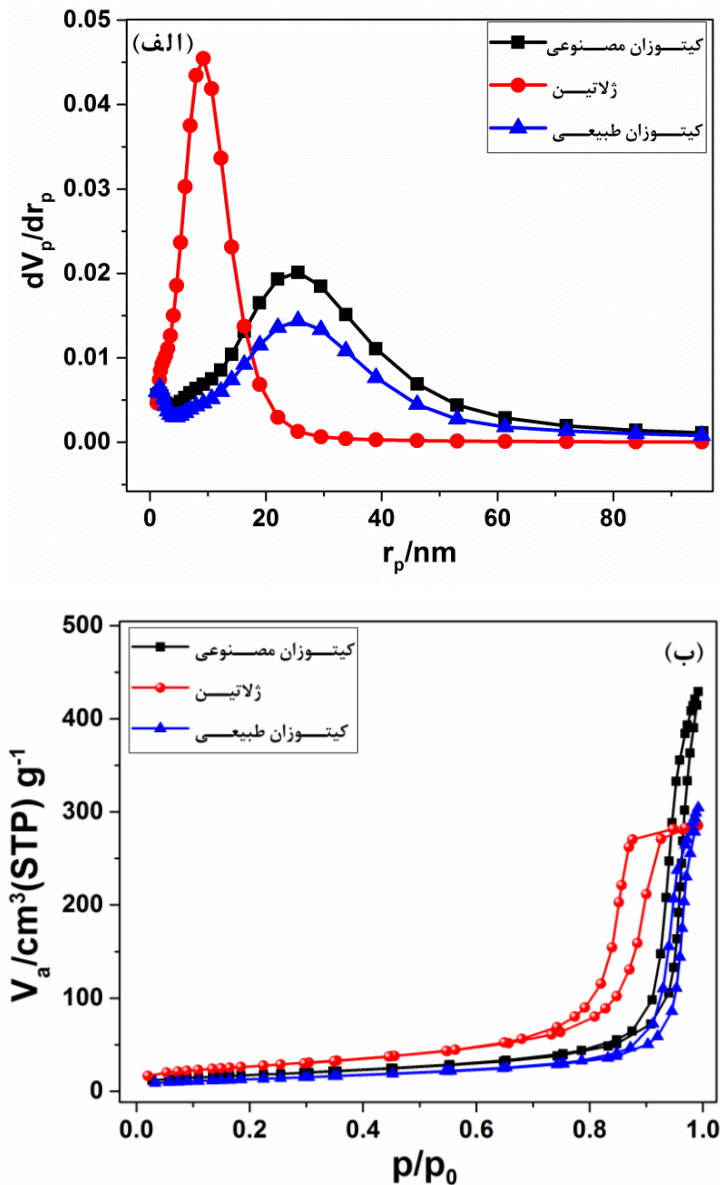
شکل (۴) تصاویر SEM مربوط به نمونه های هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با استفاده از پلیمرهای مختلف پس از تف جوشی در دمای ۱۳۰°C به مدت ۲ ساعت را نشان می دهد. این نمونه ها به مدت ۲۸ روز در محلول شبیه سازی شده بدن با pH معادل ۷/۵ در دمای ۳۷°C قرار داده شدند.

شکل (۴-الف) مربوط به نمونه هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با استفاده از کیتوزان مصنوعی می باشد که پس از غوطه وری در محلول SBF مقدار کمی رسوب روی آن تشکیل شده است. شکل (۴-ب) مورفولوژی بلورهای آپاتیت تشکیل شده بر روی سطح نمونه هیدروکسی آپاتیت-

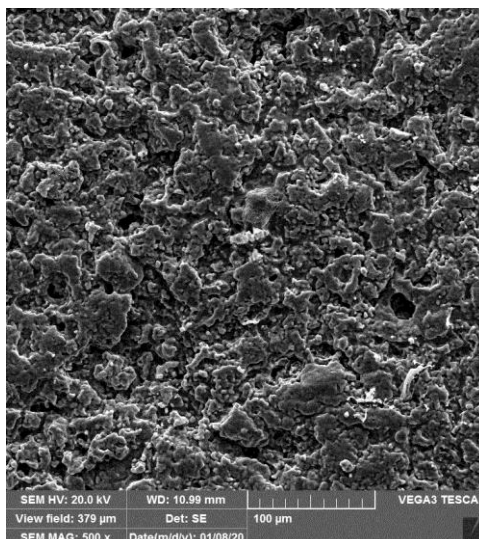
شکل (۳-الف) نمودار توزیع اندازه حفرات بدست آمده با استفاده از مدل BJH در روش BET را نشان می دهد. طبق این نمودارها نانو ذرات سنتز شده با ژلاتین بصورت مزوحفره می باشند، اما نانوذرات سنتز شده با کیتوزان ترکیبی از مزوحفره و ماکروحفره ها هستند. بعلاوه، توزیع اندازه حفره ها برای نانو ذرات سنتز شده با ژلاتین باریک بوده و میانگین اندازه حفره کوچکتر از نانو پودرهای سنتز شده با کیتوزان می باشد. همچنین می توان با توجه به نوع و شکل ایزوترم های نمودارهای جذب/واجذب انواع حفره ها و مورفولوژی و ساختار آن ها را بصورت تقریبی تخمین زد. شکل (۳-ب) نمودارهای جذب/واجذب بر حسب فشار نسبی مربوط به نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با پلیمرهای مختلف را نشان می دهد. سینگ و همکاران [۲۰] در بررسی داده های جذب فیزیکی در سیستم های جامد/گاز ۴ نوع منحنی هیستریزیس مختلف H<sub>1</sub> تا H<sub>4</sub> را برای انواع ساختارهای حفره در مواد متخلخل تعریف کردند.

سینگ و همکاران [۲۰] در بررسی داده های جذب فیزیکی در سیستم های جامد/گاز ۴ نوع منحنی هیستریزیس مختلف H<sub>1</sub> تا H<sub>4</sub> را برای انواع ساختارهای حفره در مواد متخلخل تعریف کردند. بر این اساس، نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با کیتوزان طبیعی و مصنوعی که مطابق شکل ۳-ب دارای هیستریزیس های مشابه می باشند در گروه H<sub>3</sub> قرار دارند که پیش بینی می شود ذرات آن بصورت توده های صفحه ای شکل بوده و دارای حفره هایی به شکل شکاف یا درز می باشد. از طرفی، نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با ژلاتین با

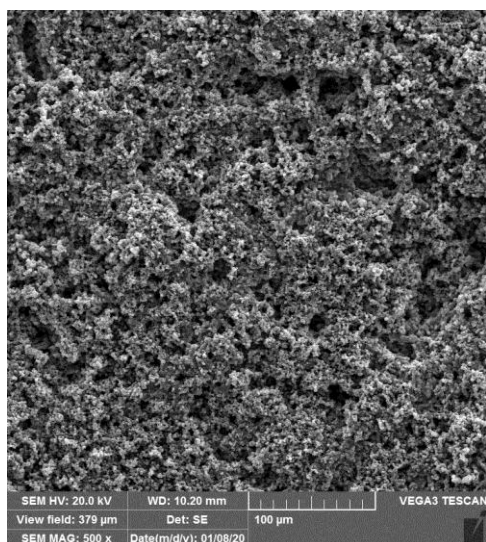
ژلاتین را نشان می‌دهد که با توجه به تصویر به دست آمده سطح نمونه مذکور با یک لایه سطحی یکنواخت پوشیده شده است. شکل (۴-ج) تصویر SEM نمونه سنتز شده با کیتوزان مصنوعی پس از غوطه‌وری در محلول SBF را نشان می‌دهد که ساختار آن از بلورهای مکعبی یکپارچه به همراه ذرات توده‌ای شکل تشکیل شده است. ترکیب شیمیایی این رسوبات در بخش بعدی توسط آنالیز EDX شناسایی می‌شود.



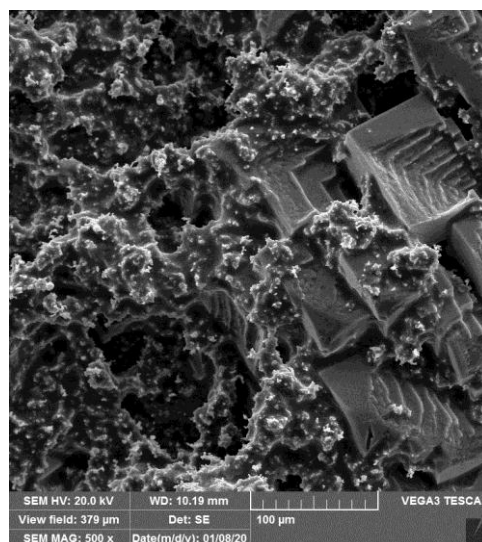
شکل ۳- (الف) نمودار توزیع اندازه حفره‌ها و (ب) منحنی‌های هیستریزس جذب/وا جذب برای نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با روش سل-ژل با استفاده از پلیمرهای آلی مختلف



الف



ب



ج

شکل ۴- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطوح نمونه‌های هیدروکسی آپاتیت تف جوشی شده در دمای  $130^{\circ}\text{C}$  بعد از غوطه وری در SBF. الف) هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با کیتوزان مصنوعی، ب) هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با ژلاتین، ج) هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با کیتوزان طبیعی

نمونه می باشد. با توجه به ذرات و حفره‌های کوچکتر و ساختار متفاوت نانوپودرهای سنتز شده به ژلاتین نسبت به نمونه‌های سنتز شده با کیتوزان، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اندازه ذرات و مورفولوژی حفره‌ها بر میزان رسوبدهی ترکیبات کلسیم فسفات روی نمونه‌های ساخته شده تاثیرگذار می‌باشد.

به منظور اثبات رسوب ذرات بر روی سطح نمونه‌های هیدروکسی آپاتیت، تغییرات وزنی تمامی نمونه‌ها قبل و بعد از غوطه‌وری در محلول SBF و درصد تغییرات وزن نمونه‌ها محاسبه شد و نتایج در جدول (۲) آورده شده است. طبق این نتایج، مقدار رسوب‌های تشکیل شده بر روی سطح نمونه حاوی ژلاتین نسبت به نمونه‌های دیگر بیشتر بوده است که تایید کننده زیست سازگاری بالاتر این



جدول ۲- تغییرات وزنی نمونه‌های هیدروکسی آپاتیت تفجوشی شده در دمای ۱۳۰۰°C پس از غوطه‌وری در محلول SBF

نمونه	وزن قبل از غوطه‌وری (g)	وزن بعد از غوطه‌وری (g)	تغییرات وزن (g)	درصد تغییرات وزن (%)
هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با کیتوزان مصنوعی	۰/۱۹۹	۰/۲۰۳	۰/۰۰۴	۲/۰۱٪
هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با ژلاتین	۰/۱۸۰	۰/۲۷۰	۰/۰۹	۵۰٪
هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با کیتوزان طبیعی	۰/۱۹۷	۰/۲۰۶	۰/۰۰۹	۴/۵۷٪

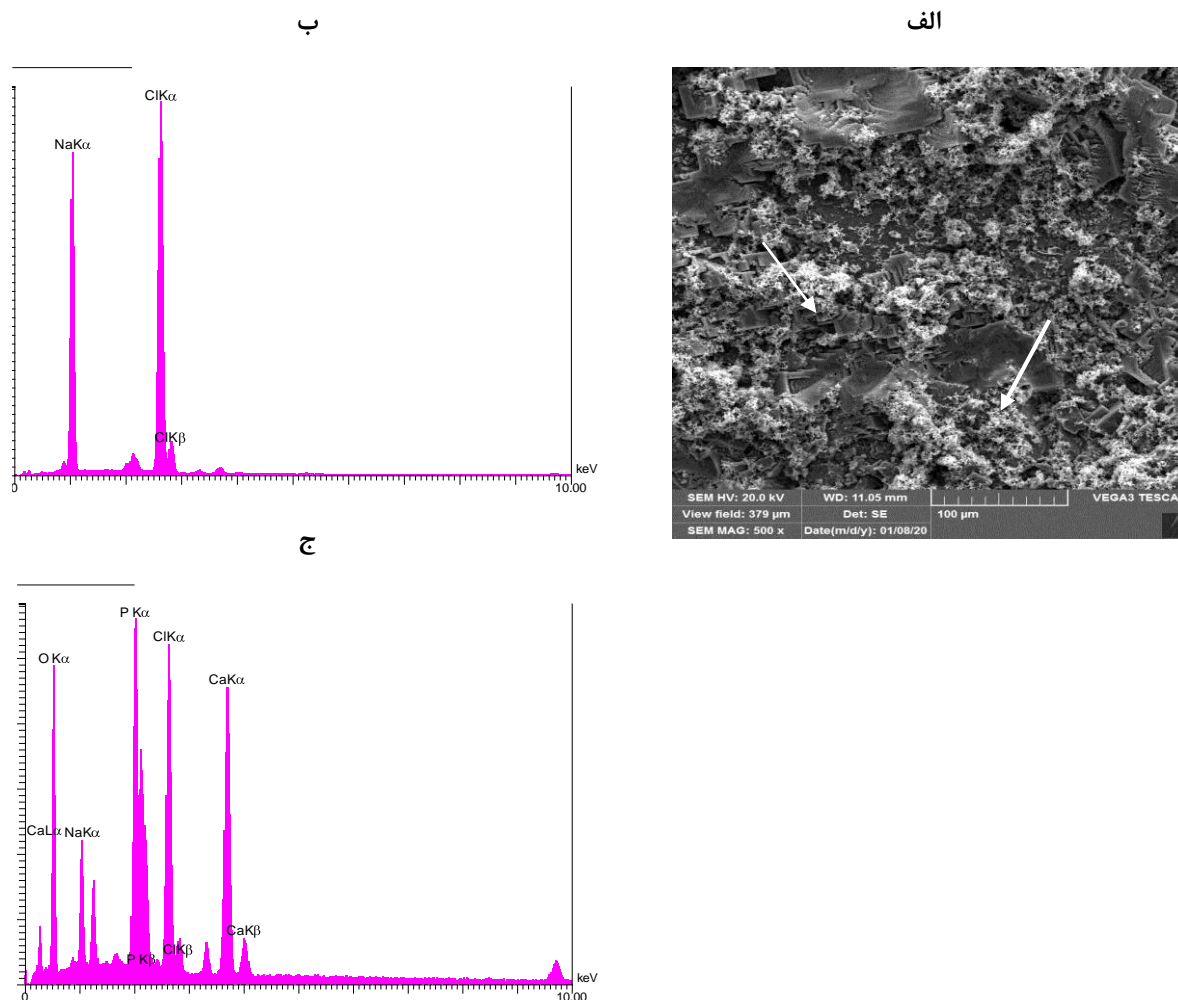
### آنالیز EDX

برای شناسایی فازها و درک بهتر ترکیب شیمیایی رسوب‌های تشکیل شده بر روی سطح نمونه‌های ذکر شده، آنالیز EDX برای نمونه‌های هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با پلیمرهای کیتوزان و ژلاتین تفجوشی در دمای ۱۳۰۰°C پس از غوطه‌وری در محلول SBF انجام شد.

شکل (۵) طیف آنالیز EDX دو نقطه مختلف از تصویر SEM هیدروکسی آپاتیت سنتز شده بوسیله کیتوزان طبیعی (شکل ۵-الف) را نشان می‌دهد. طبق نتایج بدست آمده از شکل ۵-ب، بلورهای مکعبی حاوی عناصر سدیم و کلر و احتمالاً مربوط به نمک NaCl بوده و ذرات ریز پراکنده روی سطح آن‌ها طبق آنالیز EDX شکل ۵-ج یک ترکیب کلسیم فسفاتی می‌باشد. علت تشکیل رسوبات نمک NaCl بر روی سطح نمونه عدم انحلال و ورود یون

های SBF به درون سطح نمونه می‌باشد که در این صورت مکان‌های آماده برای تشکیل هسته و جوانه‌های آپاتیت کاهش می‌یابد [۲۲-۲۴] و این امر زیست‌فعالی نمونه را تضعیف می‌کند. این رسوبات نمکی بر روی سطوح نمونه سنتز شده به وسیله ژلاتین به وضوح مشاهده نشد.

شکل ۶ تصویر SEM و طیف آنالیز EDX و Map‌های مربوط به عناصر مختلف موجود در ساختار نمونه هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با استفاده از ژلاتین را نشان می‌دهد. طبق نتایج آنالیز EDX و Map مربوطه از این نمونه، عناصر مربوط به ترکیبات کلسیم فسفاتی با درصد-های وزنی مربوط به فاز آپاتیت و همچنین عناصر سدیم و کلر مربوط به محلول SBF در آن مشاهده می‌شود. با توجه به این که بلورهای مکعبی NaCl در این نمونه مشاهده نشده است، این نمونه زیست‌فعالی مناسبی داشته و قابلیت استخوان‌سازی آن در مقایسه با سایر نمونه‌ها بیشتر می‌باشد.

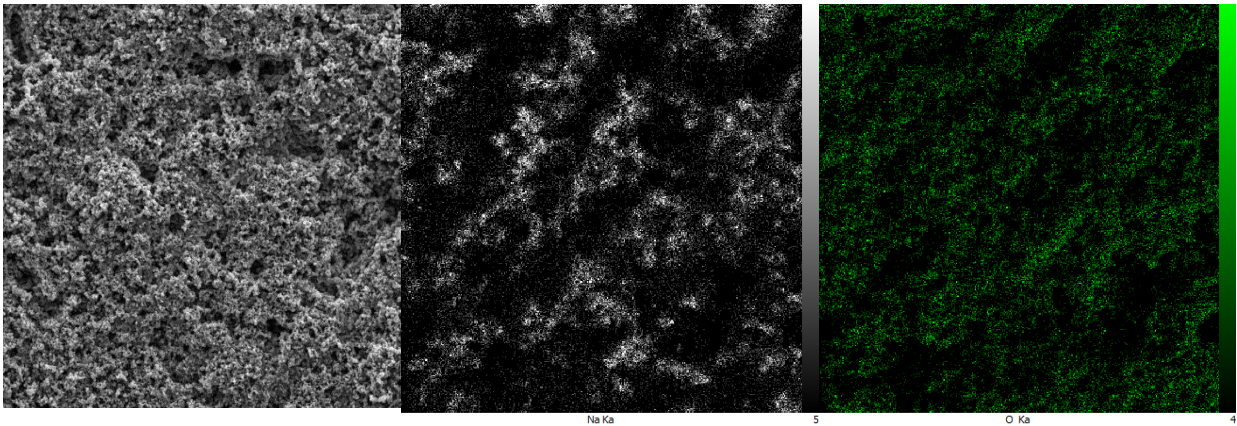


شکل ۵-الف) مورفولوژی بلورهای آپاتیت تشکیل شده بر روی نمونه هیدروکسی آپاتیت-کیتوزان، به همراه الگوی EDX از دو نقطه مختلف از تصویر (ب-ج)

## نتیجه گیری

روی نمونه سنتر شده با ژلاتین بیشتر و یکنواخت تر بود و بلورکهای مکعبی نمک طعام که باعث تضعیف زیست فعالی می شوند، روی این نمونه مشاهده نشد. همچنین تغییرات وزن بیشتر این نمونه قبل و بعد از غوطه وری نشانگر رسوب بیشتر بلورکهای آپاتیت نسبت به سایر نمونه ها بود. نتایج بدست آمده نشان می دهد نوع پلیمر استفاده شده در سنتر بر مورفولوژی و اندازه ذرات و حفره-ها تاثیر گذار بوده که همین امر بر رفتار زیست فعالی و احتمالاً رهایش دارو تاثیر بسزایی دارد. بعلاوه، نانوذرات هیدروکسی آپاتیت متخلخل بدست آمده در این پژوهش از نظر خواص فیزیکی و شیمیایی با سایر مقالات قابل مقایسه بوده و به دلیل ساده و ارزان بودن روش سنتر، این نانو-ذرات برای کاربرد رهایش دارو کاندیدای مناسبی می باشند که این موضوع در ادامه بررسی خواهد شد.

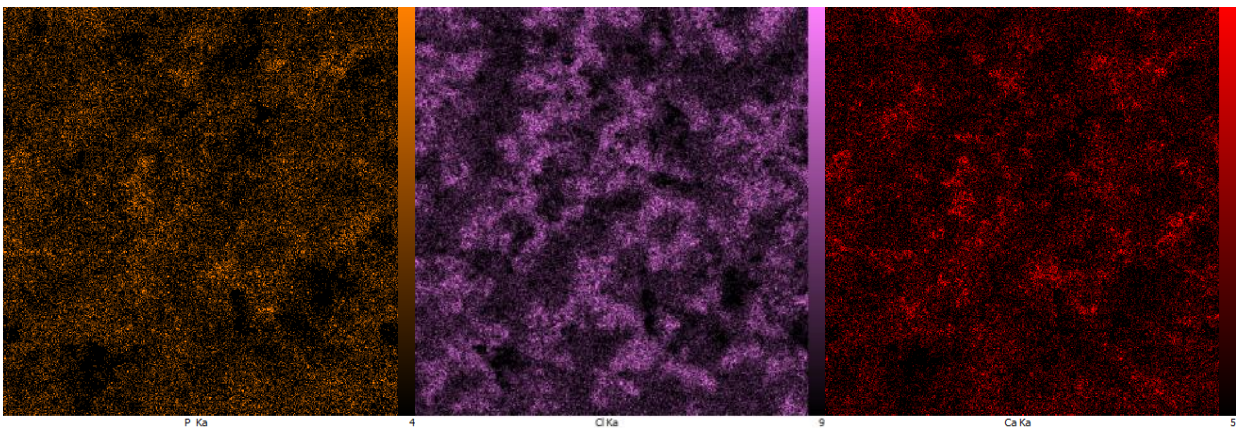
در این تحقیق نانوذرات هیدروکسی آپاتیت متخلخل با استفاده از سه پلیمر متفاوت کیتوزان مصنوعی، ژلاتین و کیتوزان طبیعی سنتر و زیست فعالی آنها بررسی شد. طبق نتایج آنالیز BET، نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت سنتر شده با ژلاتین علاوه بر سطح ویژه بالاتر، بصورت مزو حفره‌هایی با مورفولوژی احتمالاً کروی شکل و نمونه های سنتر شده به کمک کیتوزان بصورت ترکیبی از مزو حفره و ماکرو حفره بوده و ذرات آن ها بصورت صفحه ای با حفره های شکافی شکل تخمین زده شد. در مقایسه با نانوذرات سنتر شده با کیتوزان، در نمونه های سنتر شده با ژلاتین توزیع حفره‌ها باریک تر و میانگین اندازه حفره‌ها کمتر بود. نتایج حاصل از تصاویر SEM، نمونه ها بعد از غوطه‌وری در محلول SBF نشان داد که مقدار آپاتیت رسوب داده شده



الف

ب

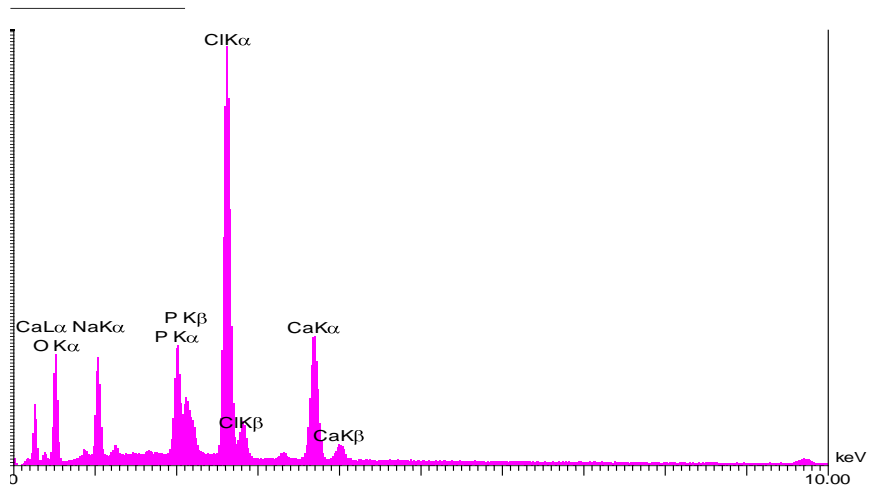
ج



د

ه

ی



و

شکل ۶- الف) مورفولوژی بلورهای آپاتیت تشکیل شده بر روی نمونه هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین سنتز شده به همراه MAP های مربوط به عناصر ب) Na ، ج) O ، د) P ، ه) Cl ، ی) Ca و (و) طیف EDX نمونه

**References:**

- 1- I. Armentano., et al., "Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability*", Vol. 95, pp. 2126-2146, 2010.
- 2- Szcześ, A., L. Hołysz, and E. Chibowski, "Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*", Vol. 249, pp. 321-330, 2017.
- ۳- مهدیه مظفری، نرگس جوهری، محمدحسین فتحی، "داربست کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون - هیدروکسی آپاتیت: بررسی تاثیر درصد ذرات هیدروکسی آپاتیت و مقایسه ذرات با سایز نانومتری و میکرومتری و اثر آن ها بر خواص مکانیکی و زیست تخریب پذیری داربست"، مجله مواد نوین، جلد ۳، شماره ۴، ص ۱۳۲، تابستان ۱۳۹۴.
- 4-M. Vallet-Regí, F. Balas, and D. Arcos, "Mesoporous Materials for Drug Delivery. *Angewandte Chemie International Edition*", Vol. 46(40), pp. 7548-7558, 2007.
- 5- Z. Namazi, et al., "Facile Synthesis and Characterization of Ibuprofen-mesoporous Hydroxyapatite Nanohybrid as a Sustained Drug Delivery System. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*", Vol. 18(3), pp. 1196-1211, 2019.
- 6- N. F. Mohammad, R. Othman, and F.Y. Yeoh, "Controlling the pore characteristics of mesoporous apatite materials: Hydroxyapatite and carbonate apatite. *Ceramics International*", Vol. 41(9, Part A), pp. 10624-10633, 2015.
- 7- J. Rojas-Trigos, et al., "Sol-Gel Synthesis of Calcium-Deficient Hydroxyapatite: Influence of the pH Behavior during Synthesis on the Structural, Chemical Composition and Physical Properties, in powder technology", 2018.
- 8- S. Safi, F. Karimzadeh, and S. Labbaf, "Mesoporous and hollow hydroxyapatite nanostructured particles as a drug delivery vehicle for the local release of ibuprofen. *Materials Science and Engineering*", Vol. 92, pp. 712-719, 2018.
- 9- C.-H. Ooi, et al., "Mesoporous hydroxyapatite derived from surfactant-templating system for p-Cresol adsorption: Physicochemical properties, formation process and adsorption performance. *Powder Technology*", Vol. 342, pp. 725-734, 2019.
- 10- J. Kamieniak, et al., "Novel synthesis of mesoporous hydroxyapatite using carbon nanorods as a hard-template. *Ceramics International*", Vol. 43(7), pp. 5412-5416, 2017.
- 11- W. P. S. L. Wijesinghe, et al., "Preparation and characterization of mesoporous hydroxyapatite with non-cytotoxicity and heavy metal adsorption capacity. *New Journal of Chemistry*", Vol. 42(12), pp. 10271-10278, 2018.
- 12- A. Huang, et al., "Synthesis and characterization of mesoporous hydroxyapatite powder by microemulsion technique. *Journal of Materials Research and Technology*", Vol. 8(3), pp. 3158-3166, 2019.
- 13- J. Anita Lett, et al., "Tailoring the morphological features of sol-gel synthesized mesoporous hydroxyapatite using fatty acids as an organic modifier. *RSC Advances*", Vol. 9(11), pp. 6228-6240, 2019.
- ۱۴- نازنین معروف، فاطمه کریم آقالو، الهه وحید دست رنجی، حمید نظریان، هانیه نوجه دهیان، "بررسی خواص فیزیک و شیمیایی داربست کامپوزیتی کیتوسان-ژلاتین-هیدروکسی آپاتیت تهیه شده به روش خشکاندن انجمادی"، مجله دانشکده دندان پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دوره ۲۹، ویژهنامه، ص ۳۸۵-۳۹۳، زمستان ۱۳۹۰.
- 15- F. Croisier, and C. Jérôme, "Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*", Vol. 49(4), pp. 780-792, 2013.
- 16- N.-C. Cheng, et al., "Genipin-Crosslinked Cartilage-Derived Matrix as a Scaffold for Human Adipose-Derived Stem Cell Chondrogenesis. *Tissue engineering. Part A*", Vol. 19(3-4), pp. 484-496, 2012.

۱۷- بازرگان لاری، ر.، "تهیه کایتوسن از پوست میگو جهت جذب یون های فلزات سنگین از محلول های آبی توسط کایتوسن و هیدروکسی آپاتیت"، پایان نامه دکتر، دانشگاه شیراز، شیراز، ۱۳۹۰.

18- M. Tavangar, et al., "Manufacturing and characterization of mechanical, biological and dielectric properties of hydroxyapatite-barium titanate nanocomposite scaffolds. *Ceramics International*", Vol. 46(7), pp. 9086-9095, 2020.

19- T. Kokubo, et al., "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res*", Vol. 24(6), pp. 721-34, 1990.

20- Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems, in *Handbook of Heterogeneous Catalysis*. p. 1217-1230.

21- A. Ruksudjarit, et al., "Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite from natural bovine bone. *Current Applied Physics*", Vol. 8(3), pp. 270-272, 2008.

22- T. Kokubo, and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*", Vol. 27(15), pp. 2907-2915, 2006.

۲۳- محمد رضا فروغی، مرتضی صادقی، محسن رادمهر، سعید کرباسی، علی اصغر بهنام قادر، عباس سعادت، "ارزیابی خواص فیزیکی داربست کامپوزیت نانوکریستال هیدروکسی آپاتیت / پلی هیدروکسی بوتیرات برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان"، فصل نامه فرآیندهای نوین در مهندسی مواد، سال ششم، شماره اول، ص ۲۱-۱۷، بهار ۱۳۹۱.

24- F. Mohandes, and M. Salavati-Niasari, "Influence of morphology on the in vitro bioactivity of hydroxyapatite nanostructures prepared by precipitation method. *New J. Chem*", Vol. 38, 2014.

