

تهیه نانوذرات هیدروکسیآپاتیت فلئوره و امکانسنجی به کارگیری آن برای دارورسانی ایوپروفن

آزیتا نقاشی^۱، لیلا ترکیان^{۲,۳*} و نگار معتكف کاظمی^۴

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی دارویی، دانشکده شیمی دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- ۲- دانشیار شیمی معدنی، مرکز تحقیقات مدل سازی و بهینه سازی در علوم و مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران جنوب، تهران، ایران
- ۳- دانشیار شیمی معدنی، گروه شیمی کاربردی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران جنوب، تهران، ایران
- ۴- استادیار نانو شیمی، گروه نانوفناوری پزشکی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

دریافت: شهریور ۱۳۹۷، بازنگری: اردیبهشت ۱۳۹۸، پذیرش: خرداد ۱۳۹۸

چکیده: در این پژوهش، ابتدا نانوذرات هیدروکسیآپاتیت تهیه و با استفاده از اتم های فلئور با درصد های متفاوت استخلاف شدند. سپس، بارگذاری و رهایش ایوپروفن به عنوان یک داروی مدل بر نانوذرات تهیه شده در محیط شبیه سازی شده با بدن، مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، سمیت نانوذرات با آزمون دی متیل تیا زول برمید دی فنیل تترازولیم (MTT) بررسی شد. به منظور شناسایی و تعیین ریز ساختار نمونه ها از روش های طیفسنجی پراش پرتو ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و طیفسنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR) و برای بررسی بارگذاری و رهایش دارو، روش های تجزیه وزنسنجی گرمایی (TGA) و طیفسنجی مرئی-فرابنفش (UV-Vis) به کار گرفته شد. برپایه نتایج، افزایش مقدار فلئور در ساختار باعث افزایش اندازه بلورها از حدود ۳۵ تا ۵۳ نانومتر، اندازه ذرات از حدود ۵۰ تا ۷۷ نانومتر و نیز مقدار بارگذاری دارو و آزادسازی می شود. هیدروکسی آپاتیت و فلئور هیدروکسی آپاتیت به تقریب سمیت ندارند. هرچند که با افزایش فلئور مقدار سمیت اندکی افزایش می یابد.

واژه های کلیدی: هیدروکسی آپاتیت، نانوذرات، دارورسانی، ایوپروفن

مقدمه

نمی دهد و تنها در بخش کاربردها، کانی آن را به عنوان منبعی برای تأمین فسفات ذکر می کند [۲]. در سال ۱۹۲۶، مطالعات دی جونگ، بر الگوی پراش پرتو ایکس استخوان، تنها فاز معدنی قابل شناسایی استخوان را آپاتیت معرفی کرد که این امر سبب گشایش فصل جدیدی در پژوهش های دانشمندان مواد و مواد

در سال ۱۸۹۲ ترکیب هیدروکسی آپاتیت^۱ (HAP) برای نخستین بار توسط فوستر با فرمول شیمیایی $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ معرفی شد [۱]. میلوفسکی در کتاب کانی شناسی خود، HAP را جزء خانواده فسفات ها معرفی کرده ولی توجه چندانی به آن نشان

1. Hydroxyapatite

به ابعاد ماکرو می‌شود که در نتیجه منجر به افزایش چقرمگی شکست و ویژگی مکانیکی دیگر شده و کاربردهای زیستی آن را بهبود می‌بخشد [۱۳ تا ۱۵]. از سوی دیگر، به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم، توانایی پوشش‌دهی هیدروکسی‌آپاتیت نیز افزایش می‌یابد [۱۶].

در سال‌های اخیر عناصر متفاوتی مانند فلئوئور، کلر، منیزیم، استرانسیم، آلومینیم، لانتانیم و آهن در سامانه HAP استخلاف شده و گاهی سبب بهبود ویژگی ماکرو و پایداری آن شده است [۱۷ تا ۲۲]. هر چند مطالعات بسیاری بر

به‌کارگیری هیدروکسی‌آپاتیت‌های عامل‌دار نانو ساختار در مهندسی بافت و کاشتینه انجام شده است، ولی گزارش‌های بسیار محدودی در مورد استفاده از این ترکیب زیست‌سازگار به صورت عامل‌دار با فلئوئور به‌عنوان حامل دارو در بدن منتشر شده است [۲۳ تا ۲۸]. بنابراین، در پژوهش حاضر ابتدا سنتز نانو پودر هیدروکسی‌آپاتیت و نیز فلئوئور هیدروکسی‌آپاتیت با دو نسبت وزنی ۵۰٪ (FHAP-50) و ۱۰۰٪ فلئوئور (FHAP-100) انجام شد. سپس، ایوپوروفن به‌عنوان یک داروی مدل در پودرهای نانو ساختار نهایی بارگذاری و مقدار بارگذاری و رهایش دارو در زمان‌های متفاوت و سمیت سلولی آن‌ها بررسی شد.

بخش تجربی

مواد و دستگاه‌ها

در این پژوهش، از کلسیم هیدروکسید (Ca(OH)_2)، فسفریک اسید (H_3PO_4)، آمونیم‌هیدروژن فلئوئورید (NH_4HF_2)، اتانول ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) ۹۸٪ و ایوپوروفن به‌کارگرفته شد. به جز ایوپوروفن که ماده مؤثره خالص آن از شرکت فارماکو شیمی تهیه شد، همه مواد به صورت خالص از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. همچنین، دستگاه‌های پراش پرتو ایکس (PW1800-PHILIPS)، فلئورسانس پرتو ایکس (PW1800-PHILIPS)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (VEGATESCAN-XMU)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (CM120-PHILIPS) و طیف‌سنجی فروسرخ

زیست بر هیدروکسی‌آپاتیت شد [۳]. سال ۱۹۳۰، ایوانووا نخستین بار ساختار بلوری هیدروکسی‌آپاتیت را شناسایی کرد [۴]. کالیتا، نخستین کاربرد موفق پزشکی کلسیم فسفات‌ها را، ۱۰ سال پیش از این گزارش، یعنی در سال ۱۹۲۰ از آلبی نقل کرد که به‌طور منطقی باید بررسی‌های ساختاری بر آن انجام شده باشد [۵]. یکی از معروف‌ترین گزارش‌ها در مورد ساختار بلوری آپاتیت مربوط به کار پونسرو همکارانش در سال ۱۹۵۸ است که اندازه عامل‌های شبکه HAP را برابر با ۰٫۹۴۳۲ نانومتر برای a و b و ۰٫۶۸۸ نانومتر برای c تعیین کرد [۶]. در ساختار HAP یون‌های هیدروکسیل در گوشه‌های یک شبکه رومبیک و شش یون کلسیم (II)، با فواصل مساوی از هم، اطراف هر یون هیدروکسیل قرار دارند که سه به سه با هم تشکیل یک مثلث متساوی‌الاضلاع می‌دهند [۷].

ویژگی زیستی مهم‌ترین خاصیت HAP است که آن را برای پژوهشگران جذاب کرده است [۸]. HAP دارای ویژگی مهمی مانند زیست‌سازگاری، زیست‌فعالی و قابلیت هدایت رشد استخوانی است [۹]. به گزارش هوانگ در نشریه Nature، علت این پدیده پروتئین استئوکلسین، مهم‌ترین پروتئین غیر کلاژنی استخوان، است [۱۰]. این پروتئین برای سلول‌های استئوبلاست و استئوکلاست نقش سیگنال‌دهنده را بازی می‌کند. استئوکلسین به دلیل تمایل به ترکیب HAP به آن پیوند می‌خورد. بررسی‌های ساختاری این پروتئین نشان داد که سطح این پروتئین بار منفی دارد و در آن یون‌های کلسیم به صورتی جهت‌گیری کرده‌اند که به صورت دقیق مکمل یون‌های کلسیم موجود در HAP هستند [۱۱].

کاربرد این ترکیب به‌عنوان کاشتینه^۱ و کاشتنی در بدن به دلیل چگالی کمتر نسبت به فلزات، با استخوان طبیعی تطابق بیشتری دارد. اما به دلیل ویژگی مکانیکی به‌طور نسبی کم، به عنوان عامل زیست‌سازگارکننده و پوشش بر کاشتینه‌های فلزی و نیز پرکننده ریزدانه‌ای^۲ برای کاربرد مستقیم داخل بافت بدن انسان به کار می‌رود [۱۲]. تهیه پودر هیدروکسی‌آپاتیت در ابعاد نانو ساختار، باعث بهبود تفجوشی و افزایش تراکم‌پذیری این ماده نسبت

1. Implant 2. Granule

بررسی شدند.

بارگذاری داروی ایوپروفن در نانوذرات HAP- F/HAP

نانوذرات تهیه شده در محلولی حاوی غلظت معینی از ایوپروفن در اتانول بارگذاری شد. بدین منظور از نسبت‌های ۱ به ۱ و ۱ به ۲ از دارو به نانوذرات استفاده شد. مقدار حلالیت ایوپروفن در اتانول ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است که بدین منظور غلظت موردنظر از ایوپروفن در اتانول تهیه شد. سپس، به هر محلول نسبت‌های مشخصی از نانوذرات افزوده و نمونه نهایی به مدت ۴۸ ساعت با هم‌زن مغناطیسی مخلوط شد. پس از ۴۸ ساعت، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه گریزان^۱ قرار گرفتند. لایه‌ی روی هر بالن جدا و نانوذرات بارگذاری شده شسته و در آن خشک شدند. نمونه‌های پودری به‌دست آمده با روش‌های SEM، XRD، FTIR و TGA مورد بررسی قرار گرفت.

رهایش ایوپروفن بارگذاری شده بر نانوذرات در سیال شبیه‌سازی شده بدن

به منظور بررسی رهایش ایوپروفن بارگذاری شده بر نانوذرات در سیال شبیه‌سازی شده بدن (SBF با pH = ۷٫۴)، ابتدا ۱۰ میلی‌گرم از نانوذرات بدون دارو HAP و FHAP-50 و FHAP-100 به دقت وزن و درون یک ظرف نمونه ۲ میلی‌لیتری در دار به‌عنوان شاهد قرار داده شد. در ظرف نمونه دیگر ۱۰ میلی‌گرم از نانوذرات بارگذاری شده با دارو به‌عنوان نمونه قرار داده شد. سپس، ۲ میلی‌لیتر از محیط رهایش SBF به هر یک از دو ظرف شاهد و نمونه افزوده شد. نمونه و شاهد در حمام آب بنماری تکاندهنده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نمونه‌برداری در فواصل زمانی معین با روش رهایش تجمعی انجام شد. بدین ترتیب که ظرف نمونه‌ها از حمام خارج و درون دستگاه گریزان به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس، مقدار جذب لایه رویی ظرف نمونه‌ها بادستگاه طیف‌سنجی مرئی - فرابنفش در طول موج ۲۲۲ نانومتر با در نظر گرفتن شاهد و با ۳ مرتبه تکرار

تبدیل فوریه (SHIMADZU-8400S) برای بررسی ساختار و شکل نانوذرات و نیز دستگاه‌های تجزیه وزن‌سنجی گرمایی (TG₁-METTLER-TOLEDO) و طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش (T80+PG) برای بررسی بارگذاری و رهایش دارو مورد استفاده قرار گرفتند.

سنتر نانوذرات HAP

ابتدا ۷٫۴ گرم کلسیم هیدروکسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب یون‌زدوده حل شد. سپس، محلول حاوی مقدار استوکیومتری لازم از فسفریک اسید با قیف شیردار یا بورت در مدت حدود ۱ ساعت به صورت قطره‌قطره و همراه با هم‌زدن به تعلیق حاوی Ca(OH)₂ افزوده شد. تعلیق به‌دست آمده به مدت ۲ روز در دمای ۵۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس، رسوب صاف و دو بار با آب یون‌زدوده، شسته شد. پس از خشک کردن رسوب در دمای ۵ ± ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت، عملیات کلسینه کردن فراورده در دمای ۸۰۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱ ساعت در کوره الکتریکی انجام شد. نمونه‌های نهایی با روش‌های SEM، TEM، XRD، XRF و FTIR مورد بررسی قرار گرفتند.

سنتر نانوذرات F/HAP

ابتدا ۱٫۰۴۶ گرم هیدروکسی آپاتیت و ۰٫۵۷۰ گرم آمونیم‌هیدروژن فلوئورید در ۵۰ میلی‌لیتر آب یون‌زدوده حل شد. محلول در حالت بازروانی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ثابت ۸۰ درجه سانتی‌گراد و سپس، یک روز بدون گرمادهی هم‌زده شد. رسوب به‌دست آمده صاف و در دمای اتاق خشک شد. فراورده به مدت ۱ ساعت در دمای ۹۰۰ درجه سانتی‌گراد در درون کوره الکتریکی کلسینه شد. این روش برای تهیه فراورده فلوئوردار شده ۱۰۰ درصد نیز استفاده شد. برای تهیه فراورده فلوئوردار شده ۵۰ درصد از ابتدا وزن آمونیم‌هیدروژن فلوئورید نصف شد. نمونه‌های نهایی با روش‌های SEM، EDX، XRD و FTIR شناسایی و

1. Centrifug

خوانده شد.

در این پژوهش، برای بررسی مقدار تکثیر سلولی ابتدا 1×10^4 سلول به همراه 100 میکرولیتر محیط کشت درون هر چاهک پلیت کشت سلولی 96 چاهکی، ریخته شد و سپس، به مدت 24 ساعت در گرم‌خانه 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از اطمینان از چسبیدن سلول‌ها، محیط کشت سلول‌ها تا حد امکان جداسازی و 90 میکرولیتر عصاره گرفته شده از هر نانوذرات و همچنین عصاره‌های رقیق شده به همراه 10 میکرولیتر FBS به هر چاهک کشت افزوده شد. سپس، سلول‌ها برای مدت 24 ساعت دیگر در مجاور این عصاره‌ها قرار گرفتند. پس از آن، محیط کشت خارج و 100 میکرولیتر MTT با غلظت 0.5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در هر چاهک ریخته شد و به مدت 4 ساعت در گرم‌خانه قرار گرفت. در مرحله بعدی، محلول روی سلول‌ها خارج شد و ایزوپروپانول به آن‌ها افزوده تا بلورهای بنفش رنگ ایجاد شده حل شود. برای حل شدن بهتر رسوب MTT، پلیت به مدت 15 دقیقه بر دستگاه تکاننده قرار گرفت. سپس، مقدار غلظت ماده حل شده در ایزوپروپانول با دستگاه تجزیه‌گر (STATFAX2100, USA) در طول موج 545 نانومتر محاسبه شد. چاهک دارای سلول‌های بیشتر چگالی نوری (OD) بالاتری نسبت به چاهک با سلول کمتر نشان می‌دهد. بنابراین، می‌توان از معادله زیر، چاهک دارای مقدار سلول بیشتر را مشخص کرد و با نمونه شاهد مقایسه کرد.

$$\text{درصد سمیت} = (1 - \text{OD شاهد/میانگین OD نمونه}) \times 100$$

$$\text{درصد سمیت} = 100 - \text{درصد زیست‌پذیری}$$

نتیجه‌ها و بحث

تجزیه پودر نانوهیدروکسی آپاتیت
بررسی الگوی XRD هیدروکسی آپاتیت
ترکیب فازی فراورده به دست آمده با روش پراش پرتو ایکس با لامپ مسی با ولتاژ 40 کیلوولت، جریان 100 میلی‌آمپر و زمان شمارش در هر گام نیم ثانیه و زاویه پراش 2θ از 4 تا 90 درجه بررسی شد. شکل ۱ الگوی پراش پرتو ایکس نمونه پودر کلستین شده در 800

آزمون دی‌متیل تیاژول برمید دی‌فنیل تترازولیم (MTT) تکثیر سلول‌های فیبروبلاست

در این پژوهش، از رده سلولی MG-63 (NCBIC555) مأخوذ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران استفاده شد. سلول‌ها ابتدا یخ زدایی شده و سپس، به فلاسک حاوی محیط کشت (RPMI) به همراه 10% FBS منتقل و در گرم‌خانه 37 درجه سانتی‌گراد، رطوبت 90% و غلظت اکسیژن 5% قرار داده شدند. لازم به ذکر است که محیط کشت هر 3 تا 4 روز تعویض شد.

عصاره‌گیری

به منظور بررسی سمیت نانوذرات و تأثیر آن‌ها بر رشد و تکثیر سلول‌ها، فرایند عصاره‌گیری بر پایه استاندارد ایزو $5-10993$ انجام شد. مطابق این استاندارد ابتدا نانوذرات با پرتوگاما سترون شده و سپس، به هر نمونه به ازای هر 0.1 گرم، یک میلی‌لیتر محیط کشت افزوده شد. پس از آن در فواصل زمانی مشخص سلول‌ها به محیط افزوده شد. مقدار مشخصی محیط کشت (RPMI) نیز به عنوان شاهد (کنترل) در نظر گرفته شد.

آزمون سمیت MTT

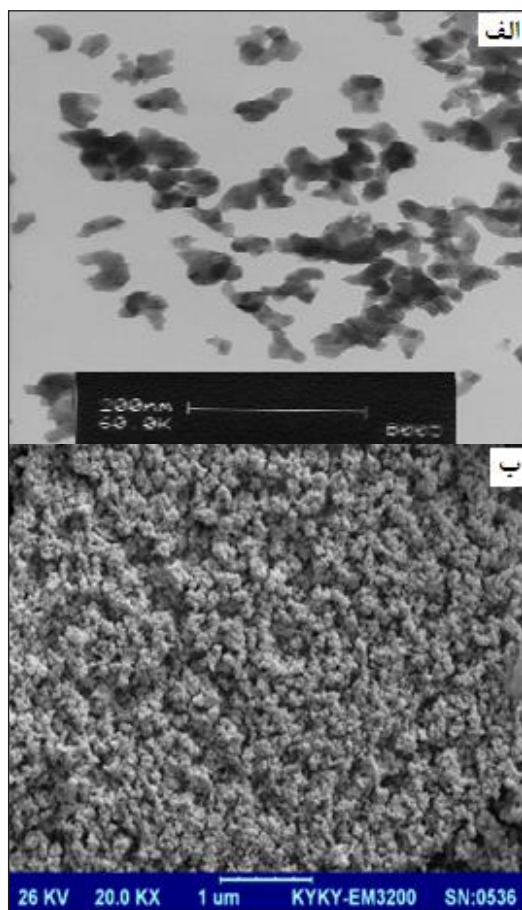
یکی از بهترین روش‌های غیرمستقیم موجود برای تعیین ازدیاد سلول‌ها آزمون دی‌متیل تیاژول برمید دی‌فنیل تترازولیم (MTT, Sigma, USA) بر پایه تغییر پودر زرد رنگ تترازولیم به بلورهای نامحلول بنفش مایل به سیاه فورمازان است. این پدیده تنها در سلول‌های زنده و با آنزیم موجود در میتوکندری آن‌ها به نام سوکسینات دهیدروژناز اتفاق می‌افتد. بلورهای فورمازان با استفاده از حلال آلی مثل ایزوپروپانول قابل حل شده و چگالی نوری (OD) به دست آمده از آن با دستگاه تجزیه‌گر خوانده شد. مقدار چگالی نوری نسبت مستقیم با غلظت فورمازان دارد که آن هم متناسب با فعالیت متابولیکی سلول‌های زنده است [۲۹].

1. Incubator

بررسی تصاویر TEM و SEM هیدروکسی آپاتیت

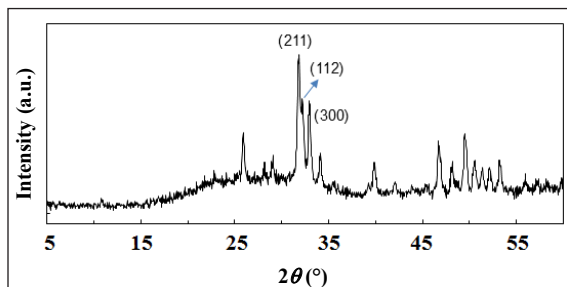
تصویر TEM نانو پودر هیدروکسی آپاتیت کلسینه شده در ۸۰۰ درجه سانتی‌گراد در شکل ۳-الف نشان داده شده است. اندازه ذرات در حدود ۵۰ تا ۷۰ نانومتر است. نتایج به دست آمده از این پژوهش، به خوبی نشان می‌دهد که فرایند اسید و باز و عملیات گرمایی به دنبال آن می‌تواند منجر به دستیابی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت شود.

تصویر SEM نانوپودر هیدروکسی آپاتیت کلسینه شده در ۸۰۰ درجه سانتی‌گراد در شکل ۳-ب نشان داده شده است. در این تصویر مرز دانه‌ها به صورت کامل قابل تشخیص بوده و شکل ریزساختار به‌طور تقریبی کروی و یکنواخت است. اندازه ذرات مشاهده شده نیز با تصویر TEM مطابقت دارد.



شکل ۳ تصاویر TEM (الف) و SEM (ب) هیدروکسی آپاتیت

درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد. الگوهای ویژه آپاتیت در گستره ۲θ از ۲۵ تا ۳۵ درجه دیده می‌شوند. ده پیک پرشدت اصلی در الگوی نمونه با مقایسه با کارت استاندارد مربوط (JCDPS No.: 09-0432)، بیانگر تشکیل فاز هیدروکسی آپاتیت خالص است.

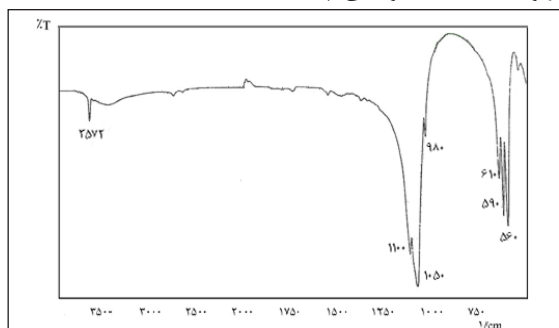


شکل ۱ الگوی XRD هیدروکسی آپاتیت سنتز شده

با استفاده از رابطه شرر و برپایه پهنای پیک مربوط به صفحه بلوری (۲۱۱) در محل نیم ارتفاع میانگین اندازه بلورهای هیدروکسی آپاتیت ۳۴/۹۷ نانومتر پیش‌بینی شد.

بررسی طیف FTIR هیدروکسی آپاتیت

طیف فروسرخ تبدیل فوریه نمونه کلسینه شده در شکل ۲، در دمای ۸۰۰ درجه سانتی‌گراد، با قرص KBr در گستره ۴۰۰ تا 4000 cm^{-1} انجام شد. نوارهای معرف هیدروکسی آپاتیت شامل گروه‌های CO_3^{2-} ، PO_4^{3-} و OH^- هستند که با حالت‌های ارتعاشی P-O، در گستره‌های ۵۶۰ تا 610 cm^{-1} و ۹۵۰ تا 1100 cm^{-1} مشاهده می‌شوند. نوار شدید و پهن بین ۹۰۰ تا 1100 cm^{-1} مربوط به یون PO_4^{3-} است. حالت‌های کششی و خمشی PO_4^{3-} در ۵۶۰، ۵۹۰ و 610 cm^{-1} به صورت نوارهای شدید ظاهر شده است. نوار 3570 cm^{-1} در هیدروکسی آپاتیت خالص مربوط به OH هیدروکسی آپاتیت است [۳۰].



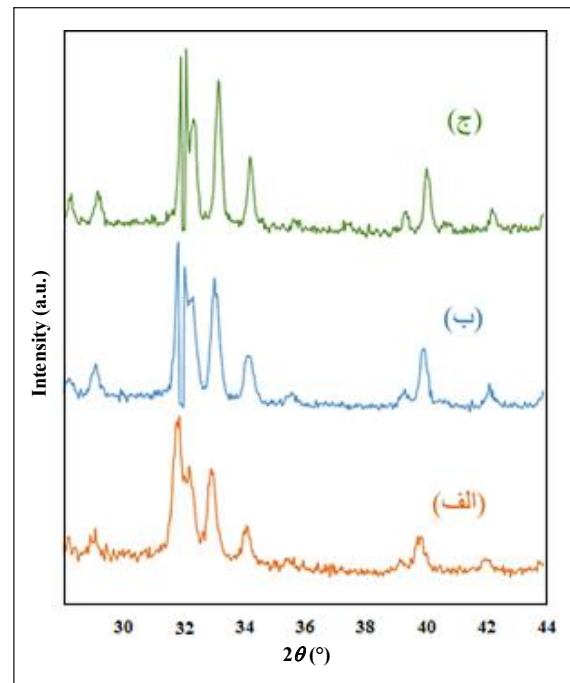
شکل ۲ طیف FTIR هیدروکسی آپاتیت

تجزیه پودر نانو فلئوره هیدروکسی آپاتیت FHAP-100 و FHAP-50

بررسی الگوی XRD فلئوره هیدروکسی آپاتیت

شکل های ۴-ب و ۴-ج الگوهای پراش پرتو ایکس مربوط به فلئوره آپاتیت کلسینه شده در ۹۰۰ درجه سانتی گراد را نشان می دهد. پیک های اصلی فاز آپاتیتی مربوط به صفحات (۲۱۱)، (۰۰۲) و (۳۰۰) هستند. با مقایسه الگوی پراش موجود در این شکل با کارت استاندارد (JCPD01-087-2462) حضور فاز فلئوره هیدروکسی آپاتیت اثبات می شود. با ورود یون فلئوره به ساختار آپاتیتی، صفحات بلوری اندکی به سمت زوایای بالاتر جابهجا می شوند که این جابهجایی برای نمونه

FHAP-100 چشمگیرتر است. میانگین اندازه بلورهای FHAP-100 و FHAP-50 با رابطه شرر به ترتیب ۵۲/۴۹ و ۳۵/۲۸ نانومتر به دست آمد. بنابراین، برپایه این نتایج افزایش مقدار فلئوره با افزایش نسبی اندازه بلورها همراه است. این نتایج مشابه گزارشی است که پیش از این توسط گیتا^۱ به چاپ رسیده است [۳۱].



شکل ۴ الگوهای پراش پرتو ایکس HAP (الف)، FHAP-50 (ب) و FHAP-100 (ج)

بررسی طیف سنجی FTIR فلئوره هیدروکسی آپاتیت

طیف فروسرخ تبدیل فوریه نمونه های کلسینه شده FHAP در دمای ۹۰۰ درجه سانتیگراد، در شکل ۵ نشان داده شده است. به طور کلی در هر دو نمونه، ساختار آپاتیت با جذب هایی در گستره های ۵۶۰ تا ۶۱۰ cm^{-1} و ۹۵۰ تا ۱۱۰۰ cm^{-1} که به ترتیب مربوط به ارتعاشات خمشی و کششی P-O است، مشخص می شود. در واقع آنچه ساختار هیدروکسی آپاتیت را از ساختار فلئوره هیدروکسی آپاتیت متمایز می کند، نوارهای مرتبط با گروه های هیدروکسیل شبکه ای (آب شبکه ای) در ۶۱۰ cm^{-1} و ۳۵۷۱ cm^{-1} است که این ارتعاشات در فلئوره هیدروکسی آپاتیت با افزایش مقدار فلئوره کوتاه تر می شوند. همچنین، نوار مشاهده شده در موقعیت ۷۵۰ cm^{-1} تأییدی بر جایگزینی گروه های هیدروکسیل در ساختار آپاتیت فلئوره است [۳۲].

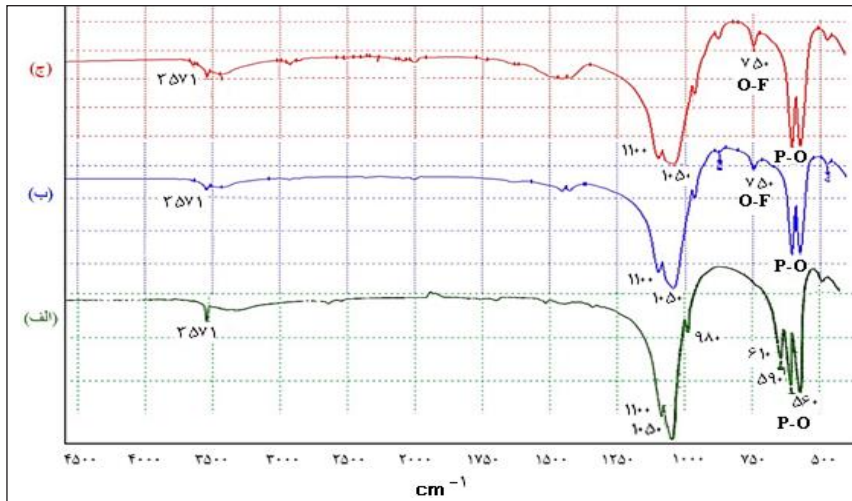
بررسی تصویرهای SEM فلئوره هیدروکسی آپاتیت

تصویرهای SEM نانوپودرهای فلئوره هیدروکسی آپاتیت ۱۰۰ و ۵۰ درصد، کلسینه شده در دمای ۹۰۰ درجه سانتی گراد به ترتیب در شکل های ۶-الف و ۶-ب نشان داده شده اند. همان طور که در این تصاویر مشاهده می شود نانوذرات دارای شکل کروی، همگن و یکنواختی هستند. همچنین، میانگین اندازه نانوذرات FHAP-100، FHAP-50 کمتر از ۱۰۰ نانومتر است که با نتایج TEM سازگار است.

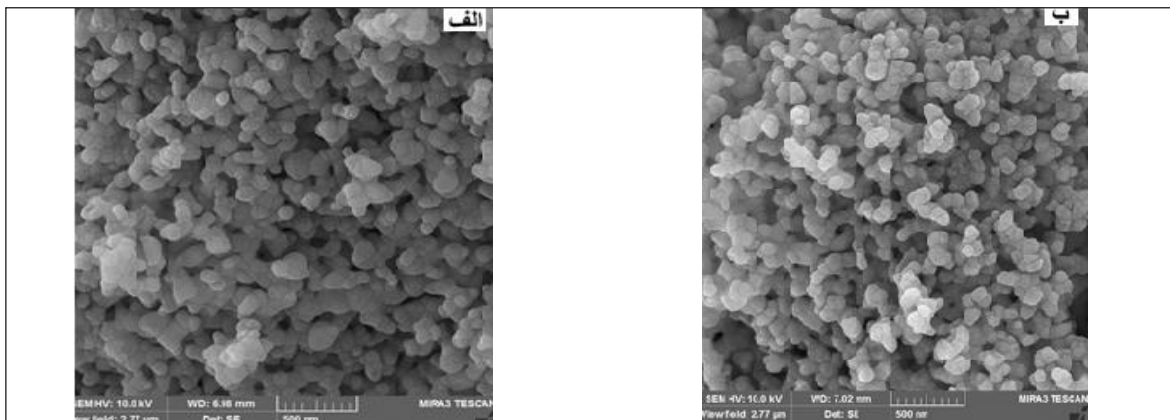
بررسی بارگذاری داروی ایبوپروفن بر نانوذرات

برای بررسی بارگذاری داروی ایبوپروفن بر نانوذرات HAP، FHAP-50 و FHAP-100 روش تجزیه گرمایی به کار گرفته شد. نتایج تجزیه گرمایی نانوذرات پس از بارگذاری با داروی ایبوپروفن در شکل ۷ نشان داده شده است. با توجه به دمای تخریب داروی ایبوپروفن می توان دریافت که مقدار بارگذاری این دارو برای نانوذرات HAP، FHAP-50 و FHAP-10 به ترتیب ۰/۷، ۰/۸ و ۱/۸۲ درصد است. این نتایج نشان دهنده افزایش بازده بارگذاری دارو بر نانوذرات آپاتیتی، با افزایش مقدار فلئوره استخلاف شده در ساختار نانوذرات است.

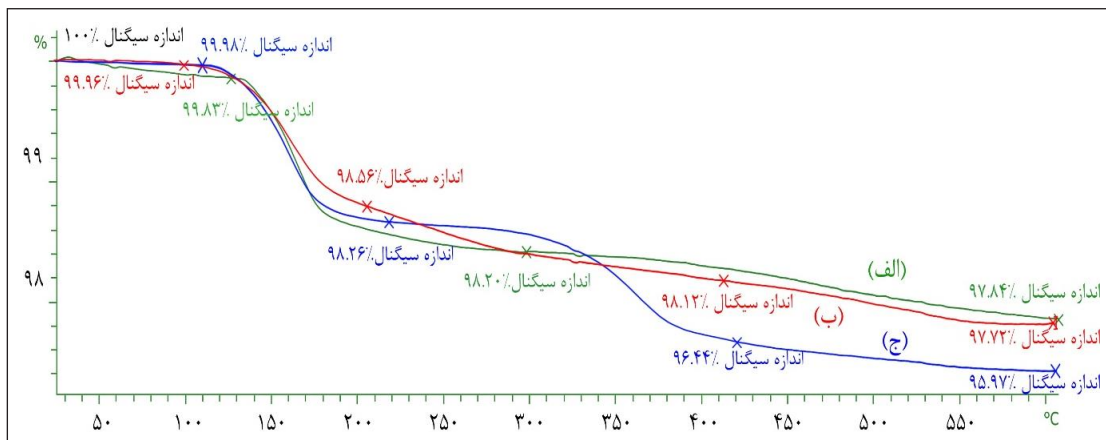
1. Geeta



شکل ۵ طیف‌های FTIR نمونه‌های HAP (الف)، FHAP50% (ب) و FHAP100% (ج)



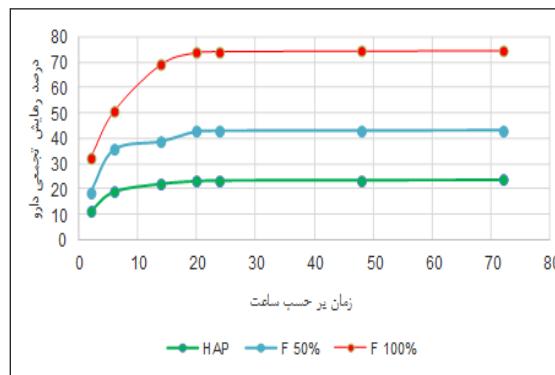
شکل ۶ تصویرهای SEM هیدروکسی آپاتیت فلئوره ۱۰۰ (الف) و ۵۰ درصد (ب)



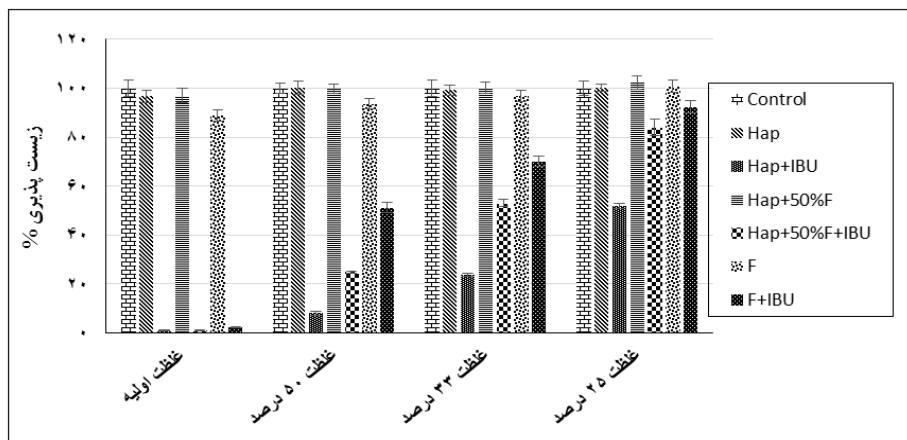
شکل ۷ نمودار TGA نمونه‌های HAP بارگذاری شده با ایوپروفن (الف)، FHAP-5 بارگذاری شده با ایوپروفن (ب) و FHAP-100 بارگذاری شده با ایوپروفن (ج)

بررسی سمیت سلولی نانوذرات بارگذاری شده با داروی ایبوپروفن شده با بدن
 با توجه به نمودار شکل ۸، در غلظت اولیه تهیه شده (۰٫۱ گرم در ۱ میلی‌لیتر) از نانوذرات FHAP-50 و HAP سمیت متفاوتی با یکدیگر ندارند و نسبت به کنترل (نمونه شاهد) به مقدار جزئی سمیت نشان داده است. اما نانوذرات FHAP-100 درصد سمیت بیشتری را در همان غلظت اولیه نشان داده است. در مقابل نانوذرات موردبررسی، پس از بارگذاری با ایبوپروفن سمیت شدیدی را از خود نشان داده‌اند. در غلظت بعدی که مربوط به نمونه ۵۰ درصد رقیق شده است (۰٫۰۵ گرم در ۱ میلی‌لیتر) نانوذرات FHAP-50 و HAP سمیت متفاوتی با یکدیگر ندارند و نسبت به کنترل سمیت نشان نداده اما نانوذرات FHAP-100 درصد سمیت جزئی از خود نشان داده است. همچنین، این نمونه‌ها همراه با ایبوپروفن به‌ویژه در خصوص نانوذرات FHAP-100

بررسی سینتیک رهایش ایبوپروفن از نمونه‌ها در سیال شبیه‌سازی شده با بدن
 رهایش ایبوپروفن از نانوذرات در سیال شبیه‌سازی شده بدن (pH= ۷٫۴ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) با دستگاه طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد که رهایش دارو از نانوذرات در محیط شبیه‌سازی شده با بدن به‌تقریب پس از ۲۴ ساعت تکمیل می‌شود (شکل ۸). در این میان، FHAP-100 مقدار رهایش بالاتری نسبت به HAP و FHAP-50 دارد. همان‌طور که مشاهده می‌شود ۷۴ درصد از دارو پس از ۲۴ ساعت از نانوذرات FHAP-100 آزاد شده است. مقدار رهایش دارو در این مدت برای نانوذرات FHAP-50 و HAP، به ترتیب برابر ۴۳ و ۲۳ درصد است، که می‌تواند به دلیل افزایش مقدار بارگذاری دارو همراه با افزایش نسبت فلئوئور در ساختار نانوذرات باشد.



شکل ۸ نمودار رهایش تجمعی ایبوپروفن



شکل ۹ نمودار آزمون MTT برای نمونه‌ها

یک داروی مدل در محیط شبیه‌سازی شده با بدن استفاده شد. نتایج به‌دست آمده از الگوی پراش پرتو ایکس و روش شرر و نیز تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان می‌دهند که با افزایش مقدار فلئور در ساختار، اندازه بلورها از حدود ۳۵ تا ۵۳ نانومتر و اندازه ذرات از حدود ۵۰ تا ۸۰ نانومتر افزایش می‌یابد. بر اثر افزایش فلئور در هیدروکسی آپاتیت مقدار بارگذاری دارو و مقدار آزادسازی آن افزایش می‌یابد. درخصوص هیدروکسی آپاتیت و فلئور هیدروکسی آپاتیت به صورت تقریبی سمیت ندارند، هرچند که با افزایش فلئور مقدار سمیت اندکی افزایش می‌یابد. داروی ایوپروفن دارای سمیت است. این دارو تنها با غلظت ۲۵ درصد، برای بارگذاری و آزادسازی با هیدروکسی آپاتیت و فلئور هیدروکسی آپاتیت در بدن استفاده شد.

درصد سمیت کمتری نشان داده‌اند و این نانوذرات حدود ۵۰ درصد مرگ سلولی داشته است. در غلظتی که نمونه ۲۵ درصد رقیق شده است (۰/۰۲۵ گرم در ۱ میلی‌لیتر) نانوذرات نسبت به کنترل فاقد سمیت دارند و حتی همراه با ایوپروفن نیز مرگ سلولی اندکی را نشان داده است (بالای ۵۰ درصد از سلول‌ها زنده مانده‌اند). این نتایج نشان می‌دهند که در این غلظت نانوذرات بارگذاری شده با ایوپروفن سمیت نداشته و در وضعیت بهینه هستند.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، ابتدا نانوذرات HAP، FHAP-50 و FHAP-100 با روش ساده و با موفقیت تهیه شدند. سپس، از نانوذرات تهیه‌شده برای بارگذاری و رهایش ایوپروفن به‌عنوان

مراجع

- [1] Yu, J.; Chu, X.; Cai, Y.; Tong, P.; Yao, J.; Mater. Sci. Eng. C 37, 54-59, 2014.
- [2] Mucalo, M.; "Hydroxyapatite for Biomedical Applications, Wood head Publishing series in Biomaterials, Cambridge", UK, 143-159, 2015.
- [3] Liu, Q.; Huang, S.; Matinlinna, J.P.; Chen, Z.; Pan, H.; Biomed. Res. Inter. 20, 1-13, 2013.
- [4] Hermann-Muñoz, J.A.; Rincón-López, J.A.; Clavijo-Mejía, G.A.; Giraldo-Betancur, A.L.; Muñoz-Saldaña J., Surf. Coat. Technol., 353, 299-307, 2019.
- [5] Peng, F.; Veilleux, E.; Schmidt, M.; Wei, M.; J. Nanosci. Nanotechnol. 12(3), 2774-2782, 2012.
- [6] Šupova, M.; Ceram. Int. 41, 9203-9231, 2015.
- [7] Kolmas, J.; Groszyk, E.; Kwiatkowska-Różycka, D.; Biomed. Res. Inter. 178, 1-14, 2014.
- [8] Sassoni, E.; Materials 11(4), 557-604, 2018.
- [9] Vrinda, T.; Mhir, J.; Int. J. Appl. Ceram. Technol. 15, 148-160, 2018.
- [10] Karthik, A.; Vinita, V.; Gobi, S.; IOP Publishing Ltd Ma. Res. Exp., 5-12, 2018.
- [11] Ginebra, M.P.; Canal, C.; Pastorino, M.D.; Montufar, E.B.; Adv. Drug Deliv. Rev. 64, 1090-1110, 2012.
- [12] Bose, S.; Tarafder, S.; Edgington, J.; Bandyopadhyay A. JOM 63(4), 93-98, 2011.
- [13] He, Q.; Pan, L.; Wang, Y.; Meldrum, F.C.; Cryst. Growth. Des. 15, 723-731, 2015.
- [14] Bosco, R.; Iafisco, M.; Tampieri, A.; Jansen, J.A.; Leeuwenburgh, S.C.G.; Appl. Surf. Sci. 328, 516-524, 2015.
- [15] Li, D.; Zhu, Y.; Liang, Z.; Mater. Res. Bull. 48, 2201-2204, 2013.
- [16] Kolmas, J.M.; Sobczak, E.; Ołędzka, G.; Nałęcz-Jawecki, C.; Int. J. Mol. Sci. 15, 16831-16847, 2014.
- [17] Marques, A.; Ficai, J.M.F.; Ferreira, D.; Int.

- J. Nanomed. 9(1), 2713-2725, 2014.
- [18] Venkatesan, R.; Pallela, I.; Bhatnagar, S.K.; Int. J. Biol. Macromol. 51(5), 1033-1042, 2012.
- [19] Betsiou, G.; Bantsis, I.; Zoi, C.; Ceram. Int. 38, 2719-2724, 2012.
- [20] Watanabe, Y.; Nishio, R.; Makiura, A.; Nakahira, C.; Int. J. Pharm. 446,81-86, 2013.
- [21] Hoffman, R.; Amoh, Y.; Prog. Mol. Bio. Trans. Sci. 160, 23-28, 2018.
- [22] Yu, K.; Zhou, Z.; Li, D.; Mater. Sci. Eng. C 45, 306-312, 2014.
- [23] Guo, T.; Long, W.; Chen, C.Q.; Ning, Z.A.; Mater. Sci. Eng. C 33, 3583-3591, 2013.
- [24] Belcarz, A.; Zima, G.L Int. J.Pharm. 454, 285-295, 2013.
- [25] Loca, M.; Sokolova, J.; Loes, A.; Smirnova, Z.; Mater. Sci. Eng. C 49, 106-113, 2015.
- [26] Jiang, Y.F.; Li, T.L.; Fang, J.; Zhou, X.L.; Li, Y.C.; Wang, J.; Inflamm. Res. 61, 207-215, 2012.
- [27] Zhang, C.; Wang, J.; Wang, Y.; Qu, G.; Drug Deliv. 19, 264-269, 2012.
- [28] Yu, X.; Chu, Y.; Cai, P.; Tong, J.; Mater. Sci. Eng. C. 37, 54-59, 2014.
- [29] Martinez-Vazquez, M.V.; Cabanas, J.L.; Paris, D.; Lozano, M.; Acta Biomater. 15, 200-209, 2015.
- [30] Ebrahimi, R.; Nasiri-Tabrizi, B.; Chami, A.; Sol. State Sci. 12, 1645-1651, 2015.
- [31] Hyehyun, K.; Sudip, M.; Bian, J.; Junghwan, O.; Ceram. Int. 44, 20490-20500, 2018.
- [32] Pastorino, C.; Canal, M.P.; Acta Biomater. 12, 250-259, 2015.

Preparation of fluorinated hydroxyapatite nanoparticles and study the possibility of its application to ibuprofen drug delivery

Azita Naghashi¹, Leila Torkian^{2,3,*}, Negar Motakef Kazemi⁴

1. Department of pharmaceutical chemistry, Faculty of pharmaceutical chemistry, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Research Center of Modeling and Optimization in Science and Engineering, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran
3. Department of Applied Chemistry, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran
4. Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: August 2018, Revised: April 2019, Accepted: May 2019

Abstract: In this paper, hydroxyapatite nanoparticles were synthesized and substituted by fluorine atoms. Then the prepared nanoparticles were applied for loading and releasing of ibuprofen as a drug model in a body stimulated system. At last, toxicity of nanoparticles was investigated through MTT studies. In order to study the morphology and characterizing the structures of nanoparticles Scanning Electron Microscopy and FT-IR spectroscopy were applied. Drug loading and releasing processes were investigated via TGA and UV-Visible instruments. Higher amounts of fluorine resulted in increasing crystallite sizes from 35 to 53 nm and particle sizes from 50 to 77 nm. It also enriches the drug loading and releasing amounts. HAP and FHAP are not toxic but show light toxicity by fluorine amount increasing. Ibuprofen is utilizable for loading and releasing from HAP and FHAP in body only by 25 percent concentration.

Keywords: Hydroxyapatite, Nanoparticles, Drug delivery, Ibuprofen