

# ساخت، مشخصه‌یابی و ارزیابی مقایسه‌ای زیست فعالی هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار

محمد حسین فتحی\*، آرش حنیفی\*\* و سید ایمان روحانی اصفهانی\*\*  
گروه پژوهشی بیومواد، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان

(دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۹/۲۸ - دریافت نسخه نهایی: ۱۳۸۹/۹/۱۷)

چکیده -

(XRD) (FTIR) (TEM) (AAS) (SBF)

( )

واژگان کلیدی :

# Synthesis, characterization, and comparative bioactivity evaluation of nano structured hydroxyapatite

M.H. Fathi, A. Hanifi and S.I. Roohani Esfahani

Biomaterials Research Group, Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology

**Abstract:** Due to its biocompatibility, bioactivity and high durability properties, hydroxyapatite (HA) has a wide range of applications in medical cases such as bone defect treatment and bone tissue regeneration. Biological apatite as the most important integrity of the mineral part of hard tissues consists of tiny hydroxyapatite crystals in nanoregime. It seems that using the artificial hydroxyapatite with similar structure and chemical composition to biological apatite could increase its durability inside the natural hard tissues. The aim of the present work was the synthesis of nano structured hydroxyapatite via different routes, comparison of their characterization and enhancement of the bioactivity and bioresorbability of prepared hydroxyapatite by controlling its crystal size and chemical composition. Nano structured hydroxyapatite was prepared by mechanical activation and sol-gel routes. X-ray diffraction technique (XRD), Fourier transform infra red spectroscopy (FTIR) and transmission electron microscopy (TEM) were used to characterize the prepared hydroxyapatite powders. The synthesized powder was soaked in simulated body fluid (SBF) for various periods of time in order to evaluate its bioresorbability and bioactivity after immersion in SBF. Atomic absorption spectroscopy (AAS) was used to determine the dissolution rate of calcium ions in SBF media. Results showed that the mechanical activation prepared HA powder had nano scale structure with mean size of 29 nm and the sol gel prepared HA powder had nano scale structure with mean size of 25 nm. Ionic dissolution rate of prepared nano structured powders was higher than the conventional HA (with micron size) and were similar to biological apatite. It could be concluded that bioactivity behavior of hydroxyapatite powder is affected by its crystalline size. By using the nano structure HA powder with less than 50 nm crystalline size, the optimum bioactivity and bioresorbability would be achieved.

**Keywords:** Hydroxyapatite, Nano structure, Mechanical activation, Sol-gel, Bioactivity, Bioresorbability.

## ۱- مقدمه

به دلیل ایجاد لایه آپاتیت شبه استخوانی بیولوژیکی<sup>۱</sup> بر روی بیومواد زیست فعال<sup>۲</sup>، این گونه بیومواد می توانند پیوندهای زیستی بسیار مناسب و قابل اطمینانی را با بافت استخوانی زنده ایجاد کنند [۱-۴]. هیدروکسی آپاتیت<sup>۳</sup> ماده ای زیست فعال و مهمترین جزء معدنی استخوان و دندان است. هیدروکسی آپاتیت در بدن هیچ گونه تأثیر سمی بر جای نمی گذارد و سازگاری زیستی<sup>۴</sup> بسیار مناسبی با بافتهای سخت برقرار می سازد. علاوه بر این، هیدروکسی آپاتیت توانایی ایجاد پیوند مستقیم با استخوان را دارد [۵-۹]. پودر هیدروکسی آپاتیت نانومتری عمدتاً به دو روش کلی؛ واکنشهای حالت جامد و واکنشهای شیمی تر ساخته می شود. فرایندهای فعالسازی مکانیکی<sup>۵</sup> و ساخت مکانیکی شیمیایی در گروه واکنشهای حالت جامد قرار می گیرند. در فرایندهایی همچون سل-زل، رسوب گذاری و نیز هایدروترومال از یک واکنش شیمیایی برای ساخت پودر نانومتری هیدروکسی آپاتیت استفاده می شود [۱۰].

با استفاده از واکنشهای حالت جامد، نرخ تولید بالاتر و میزان کریستالی شدن بالاتر حاصل می شود. در حالی که به دلیل شرایط حاکم بر این فرایندها، میزان خلوص نهایی در محصول تولید شده از خلوص محصولات فرایندهای شیمیایی کمتر است و همچنین عموماً اندازه دانه بزرگتری فراهم می شود [۱۱]. به تازگی، فرایند فعالسازی مکانیکی به عنوان روشی مناسب برای ساخت هیدروکسی آپاتیت [۱۲-۱۵]، کربنات هیدروکسی آپاتیت و نیز فلئوئورآپاتیت مطالعه شده است [۱۶-۲۰]. بر اساس پارامترهای به کار رفته در روش مورد استفاده، محصول دارای مورفولوژی، استوکیومتری، اندازه دانه و میزان کریستالی شدن متفاوتی خواهد بود.

فرایند سل-زل یکی از روشهای شیمی تر برای تولید هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار است و با اینکه نرخ تولید پایبندی در مقایسه با روشهای حالت جامد دارد ولی محصول به دست آمده با این روش، خلوص بالاتری دارد و از ذرات نانومتری تشکیل شده است [۲۱].

شد. واکنشهای فعالسازی مکانیکی در آسیاب گلوله‌ای سیاره‌ای با سرعت ۵۳۰ دور در دقیقه انجام شد. نسبت وزنی گلوله به مواد واکنش دهنده یک به ۲۰ و جرم کلی گلوله‌ها ۱۶۰ گرم بود. فعالسازی مکانیکی با اجرای عملیات آسیاکاری در مدت زمانهای ۲، ۴، ۶، ۹، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۴۰ ساعت صورت پذیرفت.

## ۲-۲- ساخت پودر هیدروکسی آپاتیت نانوساختار به

### روش سل-ژل

فرایند ساخت پودر نانومتری هیدروکسی آپاتیت به روش سل-ژل مشابه آنچه که در گزارشهای پیشین نیز آورده شده است [۶ و ۷] به اجرا درآمد. در این روش از کلسیم نترات تتراهیدرات ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Merck) و پنتا اکسید فسفر ( $\text{P}_2\text{O}_5$ , Merck) به عنوان مواد اولیه استفاده شد. مقدار مشخصی از مواد اولیه بر روی همزن مغناطیسی با یکدیگر مخلوط شده و سل پایدار و شفاف تهیه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت و در دمای محیط، واکنشهای تراکم و پلیمریزاسیون تکمیل شده و ژل به دست آمد. ژل تهیه شده به مدت زمان ۲۴ ساعت و در دمای محیط تحت عملیات خشک کردن قرار گرفت. محصول مرحله خشک کردن پودر کلسیم فسفات آمورف بود که به منظور کریستالی کردن آن از فرایند کلسینه کردن در دمای ۶۰۰ درجه سانتی گراد استفاده شد.

## ۲-۳- مشخصه‌یابی محصول تهیه شده با دو روش ساخت

ترکیب فازی محصول به دست آمده به وسیله روش پراش پرتو ایکس<sup>۸</sup> (XRD) دارای لامپ مسی با ولتاژ ۴۰ کیلو ولت، جریان ۱۰۰ میلی آمپر و سرعت روبش ۰/۰۲ °/s ارزیابی شد. با استفاده از الگوهای پراش پرتو ایکس، اندازه دانه‌های پودر هیدروکسی آپاتیت تولیدی با استفاده از روش ویلیامسون - هال<sup>۹</sup> [۲۷] تعیین شد. برای انجام محاسبات به روش ویلیامسون - هال از پیکهای مربوط به صفحات کریستالی با اندیسه‌های میلر (۰۰۲)، (۲۲۲) و (۲۰۱) استفاده شد. از تکنیک طیف سنجی

با کنترل خواص فیزیکی هیدروکسی آپاتیت همچون اندازه دانه‌ها، چگونگی توزیع ذرات و میزان آگلومره شدن، می‌توان خواص بیولوژیکی آن را بهبود بخشید. هیدروکسی آپاتیت نانوساختار، زیست‌فعالی و زیست‌اضمحلالی مناسبتری نشان می‌دهد و در نتیجه، پیوند قابل اطمینان‌تری را با استخوان ایجاد می‌کند [۲۲-۲۵].

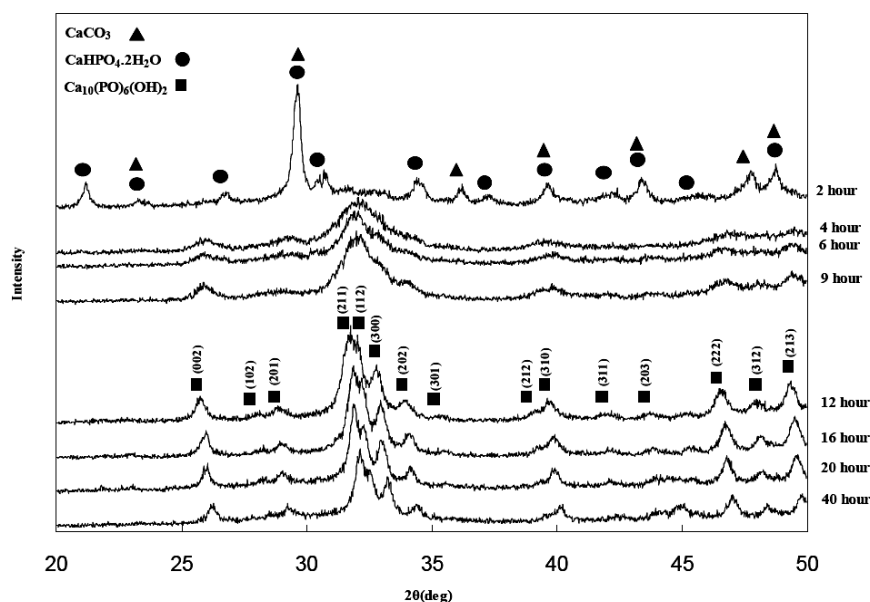
آپاتیت بیولوژیکی که به طور طبیعی در بدن ساخته می‌شود حاوی بنیانهای جانمایی کربنات در ساختار است و به صورت نانومتری با ابعاد کمتر از ۵۰ نانومتر در بافت سخت بدن وجود دارد. بنابراین، استفاده از کربنات هیدروکسی آپاتیت نانوساختار مصنوعی در بدن، موجب نزدیک شدن رفتار زیستی و از جمله زیست‌فعالی و زیست‌اضمحلالی<sup>۶</sup> هیدروکسی آپاتیت مصنوعی به آپاتیت بیولوژیکی<sup>۷</sup> می‌شود [۲۶]. در این پژوهش تلاش شد تا ابتدا هیدروکسی آپاتیت نانوساختار به دو روش؛ فعالسازی مکانیکی (فرایند حالت جامد) و نیز سل-ژل (روش شیمی‌تر) با ابعاد کمتر از ۵۰ نانومتر و با خلوص مناسب تولید شود و پس از مشخصه‌یابی پودرهای تهیه شده، رفتار زیستی و خواص زیست‌اضمحلالی<sup>۶</sup> محصول به دست آمده از این دو روش، با آپاتیت بیولوژیکی<sup>۷</sup> بدن مقایسه شود.

## ۲- مواد و روش تحقیق

### ۲-۱- ساخت پودر هیدروکسی آپاتیت نانوساختار به

#### روش فعالسازی مکانیکی

برای ساخت هیدروکسی آپاتیت نانوساختار به روش فعالسازی مکانیکی از دی کلسیم فسفات دی هیدرات ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Merck >98%) با میانگین اندازه دانه ۱۰ میکرومتر و کربنات کلسیم ( $\text{CaCO}_3$ , Merck >98%) میانگین اندازه دانه ۵ میکرومتر به عنوان مواد اولیه استفاده شد. مقدار مناسبی از مواد اولیه به نسبت مولی ۳:۲ با یکدیگر مخلوط شد. سپس مخلوط به دست آمده به همراه گلوله‌هایی از جنس فولاد زنگ نزن به قطر ۲۰ میلی متر در ظرفهای فولادی ریخته



شکل ۱- الگوی پراش پرتو ایکس مخلوط پودری پس از عملیات آسیا کاری در زمانهای مختلف.

آمده، با مقادیر اندازه گیری شده برای آپاتیت بیولوژیکی مقایسه شد.

### ۳- یافته ها و بحث

#### ۳-۱ ترکیب فازی و اندازه دانه های هیدروکسی آپاتیت

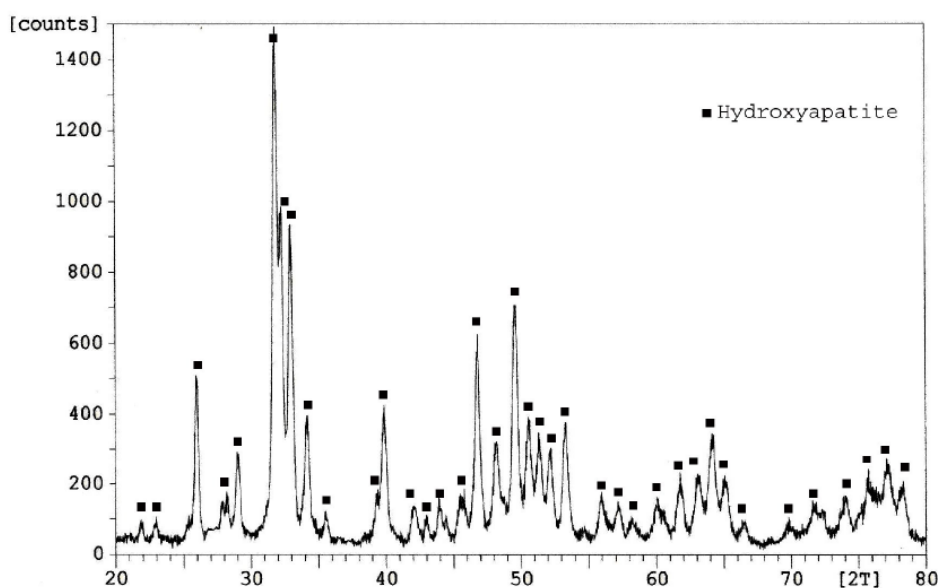
شکل (۱) الگوی پراش پرتو ایکس مخلوط پودری  $\text{CaCO}_3$  و  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  را که در زمانهای مختلف (۲ تا ۴۰ ساعت) تحت عملیات فعالسازی مکانیکی قرار گرفته است، نشان می دهد. در مخلوط پودری که دو ساعت آسیاکاری شده است، تنها پیکهای مربوط به  $\text{CaCO}_3$  و  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  دیده می شود. با افزایش زمان آسیاکاری، پیکهای پراش پرتو ایکس پهن تر شده و از شدت پیکها کاسته می شود. افزایش پهنای پیکها به دلیل ریز شدن اندازه دانه هاست. این روند تا زمان آسیاکاری ۱۲ ساعت ادامه می یابد. در این مرحله، هیچ گونه پیک دیگری از ترکیبات  $\text{CaCO}_3$  و  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  دیده نمی شود و بر اساس کارتهای استاندارد JCPDS شماره 09-432، تنها فاز موجود، هیدروکسی آپاتیت است.

تبدیل فوریه فرسوخ<sup>۱۰</sup> (FTIR) برای تعیین گروههای عاملی پودر به دست آمده و از میکروسکوپ الکترونی عبوری<sup>۱۱</sup> (TEM) برای بررسی شکل و اندازه ذرات و دانه های محصول استفاده شد.

#### ۲-۴ ارزیابی زیست فعالی و زیست اضمحلالی

##### هیدروکسی آپاتیت تهیه شده با دو روش ساخت

آزمونهای آزمایشگاهی برون بدنی<sup>۱۲</sup> در محلول شبیه سازی شده بدن<sup>۱۳</sup> (SBF) در محیط با  $\text{pH}=7.4$  و با نسبت پودر به محلول معادل ۱ میلی گرم بر میلی لیتر در حمام بخار آب با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد. نمونه هایی از هیدروکسی آپاتیت تهیه شده با دو روش در محلول شبیه سازی شده بدن در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. تغییرات درجه اسیدی (pH) در محلول شبیه سازی شده بدن در زمانهای ۲ تا ۱۴ روز و با فاصله زمانی ۲ روز اندازه گیری شد. به کمک طیف سنجی جذب اتمی<sup>۱۴</sup> (AAS) تغییر غلظت یون کلسیم در محیط محلول شبیه سازی شده بدن، به عنوان معیاری از زیست اضمحلالی پودر هیدروکسی آپاتیت، ارزیابی شد. نتایج به دست



شکل ۲- الگوی پراش پرتو ایکس پودر هیدروکسی آپاتیت نانومتری تولید شده به روش سل- ژل.

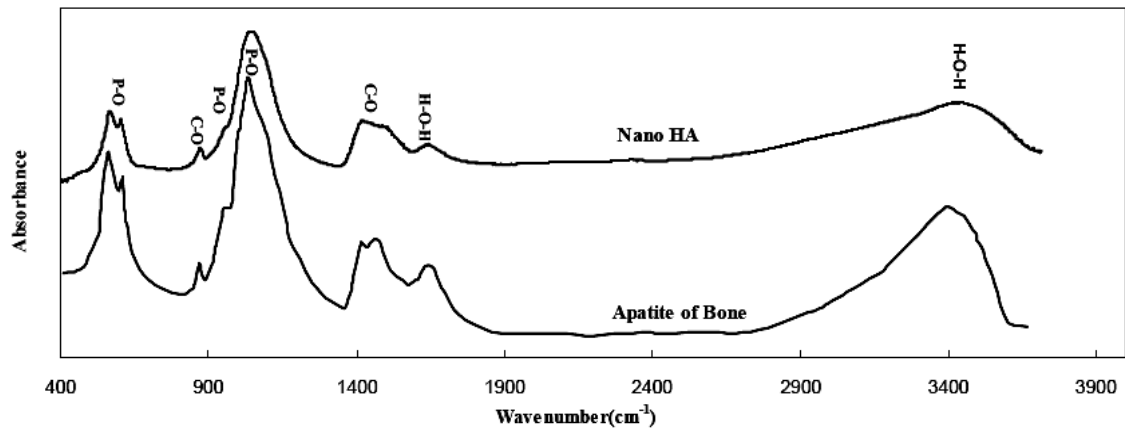
دانه پودر هیدروکسی آپاتیت معادل ۲۵ نانومتر است [۲۸]. مقایسه شکل‌های (۱) و (۲) نشان می‌دهد که در هر دو روش، پودر هیدروکسی آپاتیت با خلوص مناسب تولید شده است. یکی از مهمترین مشکلات مطرح در مورد فرایند فعالسازی مکانیکی، آلودگی ایجاد شده در محصول در حین انجام واکنشها در ظرف آسیاکاری است [۱۱]. الگوهای پراش پرتو ایکس شکل ۱ نشان می‌دهد که با کنترل پارامترهای فرایند تولید، کاهش زمان آسیاکاری و نیز انتخاب ظرف و گلوله مناسب در آسیاکاری می‌توان تا حد زیادی آلودگی محصول به دست آمده را کاهش داد. علاوه بر این، کاهش زمان عملیات آسیاکاری موجب شده است که تنشهای باقیمانده کمتری در پودر حاصل تجمع یابد. نزدیک بودن میانگین اندازه دانه‌ها و نانومتری بودن آنها در دو روش فعالسازی مکانیکی و سل- ژل نشانگر اعمال کنترل دقیق بر پارامترهای فرایندهای تولید در این پژوهش است.

شکل (۳) طیف تحلیل طیف سنجی تبدیل فوریه فرو سرخ<sup>۱</sup> (FTIR) را برای پودر هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار، آسیاکاری شده به مدت زمان ۱۲ ساعت، نشان می‌دهد. طیف تبدیل فوریه فرو سرخ آپاتیت بیولوژیکی [۳۰] نیز برای مقایسه آورده شده است. طیف هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار تمامی پیکهای

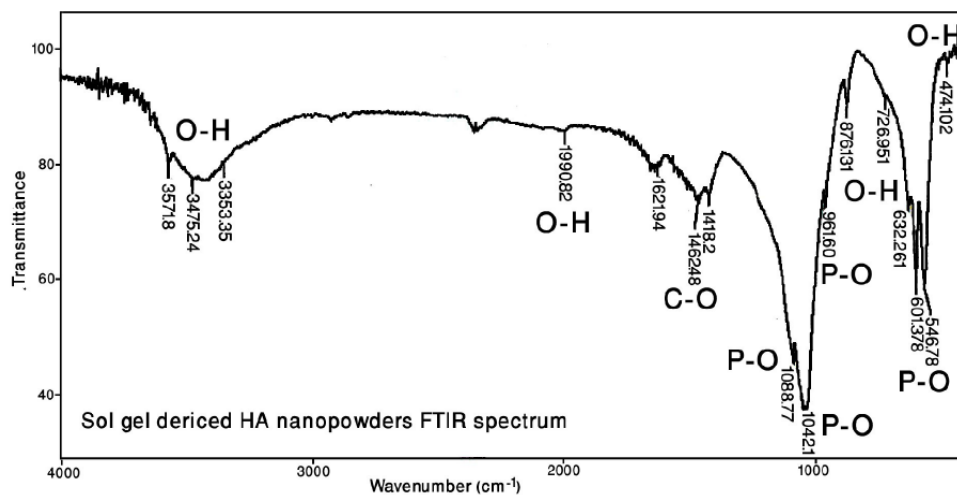
الگوی پراش پرتو ایکس پس از ۴۰ ساعت آسیاکاری، انتقال محسوسی را به اندازه  $2\theta = 0.5^\circ$  نشان می‌دهد. ساییش محفظه آسیاب و ورود آنها به ساختار، تغییراتی در پارامترهای شبکه ایجاد کرده و این انتقال پیکها را موجب می‌شود.

میانگین اندازه دانه‌های پودر آسیاکاری شده به مدت زمان ۱۲ ساعت که ساختار تک فاز هیدروکسی آپاتیت را دارد و به روش ویلیامسون - هال تعیین شده، معادل ۲۹ نانومتر است.

در شکل (۲) الگوی پراش پرتو ایکس پودر حاصل از فرایند سل- ژل دیده می‌شود. با توجه به کارتهای استاندارد JCPDS شماره T09-432 و مقایسه لازم، هیدروکسی آپاتیت تک فاز تولید شده است. خلوص پودر به دست آمده در این فرایند با توجه به محاسبات انجام شده و نیز اطلاعات گزارش پژوهش پیشین [۲۸ و ۲۹] بالاتر از ۹۵ درصد است و با توجه به استاندارد شماره F-1185 - 1188 سازمان مواد و آزمونهای آمریکا<sup>۱۵</sup> (ASTM)، چنین پودر هیدروکسی آپاتیتی با خلوص بالاتر از ۹۵ درصد می‌تواند به عنوان هیدروکسی آپاتیت تجارتي مورد استفاده قرار گیرد [۲۸ و ۲۹]. محاسبه تعیین اندازه دانه‌ها که با استفاده از روش ویلیامسون - هال برای پودر حاصل از فرایند سل- ژل انجام شد نشان داد که میانگین اندازه



شکل ۳- طیف تبدیل فوریه فروسرخ هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار. طیف تبدیل فوریه فروسرخ آپاتیت بیولوژیکی نیز برای مقایسه آورده شده است.



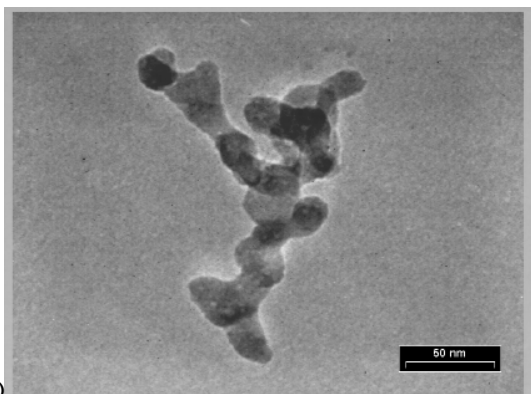
شکل ۴- طیف تبدیل فوریه فروسرخ پودر هیدروکسی آپاتیت نانومتری تولید شده به روش سل- ژل.

دست آمده، تمامی پیکهای مشخصه پودر هیدروکسی آپاتیت وجود دارد. علاوه بر این، پیکهای مربوط به گروه عاملی کربنات نیز حضور یافته اند. بنابراین، می توان نتیجه گرفت که با استفاده از فرایند سل- ژل نیز کربنات هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار تولید شده است.

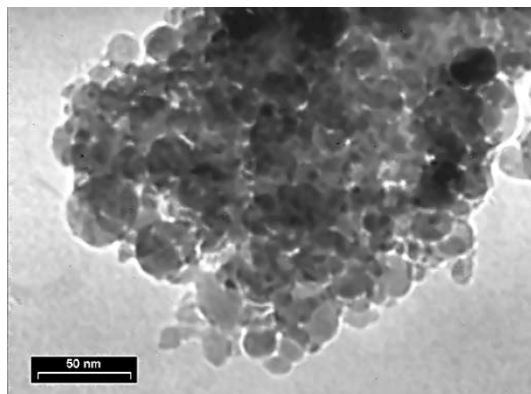
بخش معدنی استخوان (هیدروکسی آپاتیت) حاوی چهار تا شش درصد وزنی کربنات در ساختار است [۳۱]. استفاده از آزمون طیف سنجی تبدیل فوریه فرو سرخ نیز روشی عمومی برای نشان دادن حضور بنیادهای کربناتی در ساختار هیدروکسی آپاتیت است. طیفهای تبدیل فوریه فرو سرخ به دست آمده

مشخصه گروههای عاملی هیدروکسی آپاتیت خالص را نشان می دهد و علاوه بر این، پیک گروه عاملی کربنات ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) نیز در  $873 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1454 \text{ cm}^{-1}$  و  $1769 \text{ cm}^{-1}$  دیده می شود. آپاتیت بیولوژیکی استخوان نیز دارای گروه جانشینی کربنات است که حضور پیکهای این گروه عاملی در طیف مربوط به آپاتیت نانو ساختار تهیه شده، شباهت ترکیب فازی آن را به آپاتیت بیولوژیکی بیشتر می کند.

طیف حاصل از تحلیل طیف سنجی تبدیل فوریه فرو سرخ برای پودر هیدروکسی آپاتیت تولید شده به روش سل- ژل در شکل (۴) نشان داده شده است. مشاهده می شود که در طیف به



(ب)



(الف)

شکل ۵- تصویر میکروسکوپی الکترونی عبوری از پودر هیدروکسی آپاتیت تولید شده؛ الف) تهیه شده با روش فعالسازی مکانیکی، ب) تهیه شده با روش سل-ژل.

مساحت فصل مشترک بین ذرات پودر زیاد می‌شود. ریز شدن ساختار همراه با افزایش چگالی عیوب، مسافت نفوذ را کاهش داده و سرعت آن را زیاد می‌کند.

تصویر میکروسکوپی الکترونی عبوری از هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار تولید شده به روش سل-ژل در شکل (۵-ب) ارایه شده است. مشاهده می‌شود که اندازه ذرات در ابعاد نانومتری بوده و در گستره ۲۵ تا ۳۰ نانومتر است. تصویر گویای آن است که اکثر ذرات هیدروکسی آپاتیت به صورت منفرد بوده و پدیده آگلومره شدن نسبتاً کمی روی داده است.

محصول به دست آمده از فرایندهای شیمی تر دارای اندازه ذرات کوچکتری نسبت به محصولات تولید شده با فرایند حالت جامد است [۱۱ و ۲۱]. در توافق با دستاوردهای پژوهشگران قبلی [۳۵ و ۳۶]، ملاحظه می‌شود که پودر تهیه شده با روش فعالسازی مکانیکی در پژوهش حاضر، با وجود این که ساختار نانومتری دارد ولی آگلومراسیون ذرات مانع از تشکیل ذرات نانومتری شده است، شکل (۵-الف)، در حالی که پودر هیدروکسی آپاتیت حاصل از فرایند سل ژل، علاوه بر ساختار نانومتری از ذرات با ابعاد نانومتری نیز برخوردار است، شکل (۵-ب). اختلاف مشاهده شده در مرفولوژی ذرات تولیدی با دو روش مذکور موجب تغییراتی در رفتار زیست اضمحلالی می‌شود.

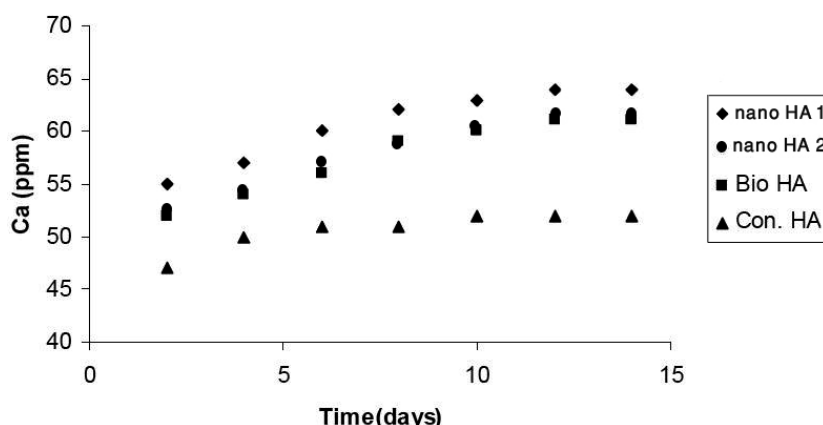
انرژی سطحی بالاتر موجود در محصول فرایند فعالسازی مکانیکی موجب شده که پودر حاصل از این فرایند، دچار

برای هر دو پودر تهیه شده به دو روش مختلف نشانگر حضور کربنات در ساختار است. علاوه بر این در توافق با پژوهشهای انجام شده توسط امرسون [۳۲] و الیوت [۳۳]، مکان واقع شدن پیکهای مشخصه بنیان کربنات در طیفهای به دست آمده نشان می‌دهد که گروه کربنات از نوع جانیشینی نوع B است. در این نوع گروه جانیشینی، بنیان کربناتی جانشین بنیانهای فسفاتی می‌شود. در آپاتیت بیولوژیکی نیز اتفاق مشابهی روی می‌دهد [۳۳].

### ۳-۲- ارزیابی با میکروسکوپ الکترونی عبوری

شکل و اندازه پودر هیدروکسی آپاتیت تولید شده پس از ۱۲ ساعت آسیاکاری در تصویر میکروسکوپی الکترونی عبوری، شکل (۵-الف) نشان داده شده است. همانگونه که ملاحظه می‌شود، پودر هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار با اندازه دانه کمتر از ۵۰ نانومتر با روش فعالسازی مکانیکی تولید شده است. تصویر حاکی از آگلومره شدن ذرات در ابعاد نانومتری به علت افزایش سطح ذرات و انرژی سطحی آنهاست. این افزایش سطح موجب افزایش نفوذ و واکنش در حالت جامد می‌شود [۳۴]. علت این آگلومره شدن شدید و نفوذ اتمها در دمای محیط آن است که در اثر اعمال نیرو از طرف گلوله‌ها به ذرات پودر، ذرات دچار تغییر شکل شده و مرتباً به هم چسبیده و شکسته می‌شوند. در اثر به هم چسبیدن و شکستهای مکرر،

### Ca Concentration



شکل ۶- نمودار تغییرات غلظت یون کلسیم محلول شبیه‌سازی شده بدن حاوی هیدروکسی آپاتیت نانوساختار تهیه شده به روش سل-ژل (nano HA1)، هیدروکسی آپاتیت نانوساختار تهیه شده به روش فعالسازی مکانیکی (nano HA2)، آپاتیت بیولوژیکی (Bio HA) و هیدروکسی آپاتیت تجارتي (Con. HA).

نانوساختار تولید شده با هر دو روش در محلول شبیه‌سازی شده بدن تا ۱۴ روز، میزان رهایش یون کلسیم نیز افزایش می‌یابد. علاوه بر این، میزان رهایش یون کلسیم از هیدروکسی آپاتیت نانوساختار در محلول شبیه‌سازی شده بدن، بیشتر از رهایش یون کلسیم از هیدروکسی آپاتیت تجارتي با اندازه دانه میکرونی است ولی شباهت بسیار زیادی به آپاتیت بیولوژیکی [۳۷] دارد. هیدروکسی آپاتیت نانوساختار تولیدی رفتار انحلالی جالب توجهی شبیه آپاتیت بیولوژیکی نشان داده و این امر نشانگر آن است که اندازه دانه، تأثیر بسیار با اهمیتی بر رفتار هیدروکسی آپاتیت می‌گذارد.

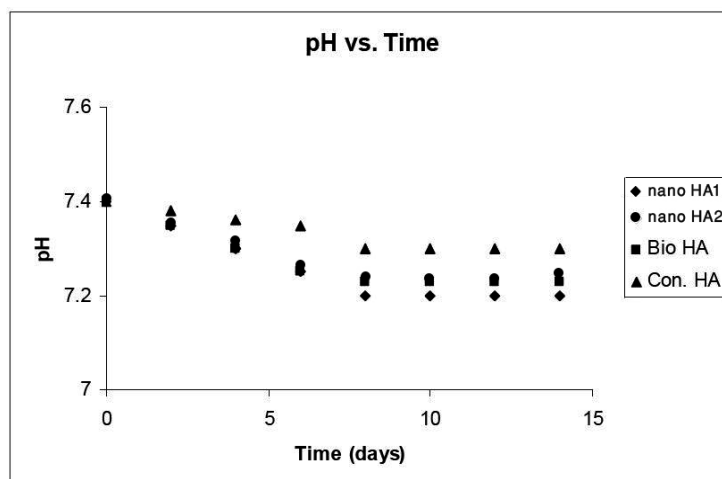
نکته قابل توجه در نمودارهای شکل ۶، مشاهده تفاوت اندک موجود بین میزان رهایش یون کلسیم در محلول حاوی هیدروکسی آپاتیت نانوساختار تولید شده به روش فعالسازی مکانیکی با محلول حاوی هیدروکسی آپاتیت به دست آمده از فرایند سل-ژل است. همان گونه که در شکل ۵ نیز دیده می‌شود، هیدروکسی آپاتیت تولید شده در فرایند فعالسازی مکانیکی دارای ابعاد نانومتری است ولی میزان آگلومراسیون آن بیش از هیدروکسی آپاتیت به دست آمده از فرایند سل ژل است. مهمترین پارامتر تأثیر گذار بر رهایش یون کلسیم در

آگلومراسیون شدیدتری نسبت به پودر حاصل از فرایند سل ژل (شکل ۵). با این حال در هر دو فرایند، محصول نهایی نانوساختار با ابعاد دانه کمتر از ۵۰ نانومتر به دست آمده است. در پژوهش حاضر، پودر کربنات هیدروکسی آپاتیت نانوساختار با اندازه دانه کمتر از ۵۰ نانومتر با هر دو روش حالت جامد و شیمی تر به دست آمد و دستاوردها با نتایج به دست آمده از پژوهشهای دیگر محققان [۱۰، ۱۱، ۳۵ و ۳۶] قابل مقایسه است. کنترل پارامترهای فرایند و بهینه‌سازی آن و همچنین عدم استفاده از مواد افزودنی و عدم نیاز به کنترل درجه اسیدی (pH) در فرایند سل ژل از مهمترین مزایای فرایندهای اجرا شده در این پژوهش در مقایسه با روشهای مورد استفاده توسط دیگر محققان [۱۰ و ۲۱] است.

### ۳-۳- ارزیابی زیست اضمحلالی با آزمونهای آزمایشگاهی

رهایش یون کلسیم از هیدروکسی آپاتیت نانوساختار تولید شده با هر دو روش فعالسازی مکانیکی و سل-ژل در محلول شبیه‌سازی شده بدن<sup>۱۳</sup> به منظور بررسی رفتار زیست اضمحلالی آن مورد ارزیابی کمی قرار گرفت، شکل (۶). نتایج نشان می‌دهد که با افزایش زمان حضور هیدروکسی آپاتیت





شکل ۷- نمودار تغییرات درجه اسیدی (pH) محلول شبیه‌سازی شده بدن حاوی پودر هیدروکسی آپاتیت نانوساختار تهیه شده به روش سل-ژل (nano HA1)، پودر هیدروکسی آپاتیت نانوساختار تهیه شده به روش فعالسازی مکانیکی (nano HA2)، آپاتیت بیولوژیکی (Bio HA) و هیدروکسی آپاتیت تجارتهای (Con. HA).

است. مقدار درجه اسیدی (pH) به میزان انحلال و اضمحلال هیدروکسی آپاتیت بستگی دارد. بر این اساس، با توجه به نمودارهای شکل (۷) به راحتی می‌توان دریافت که زیست اضمحلالی پودر هیدروکسی آپاتیت نانوساختار بیشتر از هیدروکسی آپاتیت تجارتهای بوده و بسیار نزدیک به آپاتیت بیولوژیکی است.

همانند آنچه که در نمودارهای شکل (۶) ملاحظه شد، نتایج ارایه شده در نمودارهای شکل (۷) مربوط به زیست اضمحلالی ذرات هیدروکسی آپاتیت تهیه شده با روش سل-ژل و روش فعالسازی مکانیکی نیز باهم اختلاف دارد. دلیل این مطلب حضور ذرات نانومتري تهیه شده با فرایند سل-ژل است در حالی که در پودر حاصل از فرایند فعالسازی مکانیکی ذرات نانومتري دیده نمی‌شود و آگلومرهایی نانوساختار تشکیل شده است، شکل (۵-الف). سطح زیاد ذرات نانومتري در مقایسه با آگلومرهایی نانوساختار سبب بروز چنین اختلافی در رفتار زیست اضمحلالی است که در نمودارهای شکل (۷) قابل شناسایی است. واضح است که میزان انحلال پذیری و اضمحلال هیدروکسی آپاتیت می‌تواند با توجه به نوع کاربرد کلینیکی مورد انتظار از آن، از طریق تغییر اندازه دانه کنترل شود.

محلول شبیه‌سازی شده بدن، میزان سطح ذرات در تماس با محلول است. پس واضح است که هیدروکسی آپاتیت تولید شده به روش سل-ژل به دلیل وجود ذرات نانومتري در آن، سطح بیشتری را در تماس با محلول دارد و در نتیجه میزان رهایش یون کلسیم از آن اندکی بیشتر خواهد بود.

شکل (۷) نمودار تغییرات درجه اسیدی (pH) را بر حسب زمان ماندگاری در محلول شبیه‌سازی شده بدن برای هیدروکسی آپاتیت نانوساختار، هیدروکسی آپاتیت تجارتهای و آپاتیت بیولوژیکی نشان می‌دهد. تغییرات درجه اسیدی (pH) مقیاسی برای اندازه‌گیری میزان انحلال هیدروکسی آپاتیت در محلول است. زیرا با انحلال یون کلسیم در محلول و تشکیل ترکیب هیدروکسید کلسیم، یون  $H^+$  در محیط آزاد شده و در نتیجه درجه اسیدی (pH) محلول کاهش می‌یابد.

مشاهده می‌شود که درجه اسیدی (pH) محلول حاوی هیدروکسی آپاتیت تجارتهای تغییر چندانی نکرده است که به دلیل عدم انحلال آن در محلول است. هیدروکسی آپاتیت تجارتهای پایداری زیادی در محیطهای فیزیولوژیکی دارد. در نقطه مقابل، هیدروکسی آپاتیت نانوساختار تغییراتی در مقدار درجه اسیدی (pH) نشان می‌دهد که نشانگر انحلال سریعتر آن

با ضریب اطمینان بالایی به کار برده شود [۴۱ - ۴۳]. استفاده از هیدروکسی آپاتیت نانومتری همچنین موجب بهبود واکنش بافت و پایداری فصل مشترک بافت / کاشتنی در کاربردهای پزشکی خواهد شد [۲۸ و ۲۹].

#### ۴- نتیجه گیری

کربنات هیدروکسی آپاتیت نانوساختار از طریق فرایند فعالسازی مکانیکی با ۱۲ ساعت آسیابکاری و نیز روش سل-ژل تولید شد. پودر کربنات هیدروکسی آپاتیت به دست آمده از فرایند فعالسازی مکانیکی، دارای میانگین اندازه دانه ۲۹ نانومتر و محصول فرایند سل-ژل دارای میانگین اندازه دانه ۲۵ نانومتر بود. زیست اضمحلالی و زیست فعالی پودر کربنات هیدروکسی آپاتیت در آزمونهای آزمایشگاهی برون تنی بستگی بسیار زیادی به اندازه دانه داشت. پودر کربنات هیدروکسی آپاتیت نانوساختار با اندازه دانه کمتر از ۵۰ نانومتر زیست اضمحلالی و زیست فعالی زیاد و مشابه آپاتیت زیستی نشان داد. بر اساس یافته‌های این پژوهش، کنترل اندازه دانه‌ها پارامتر بسیار سودمند برای تنظیم رفتار و فعالیت زیستی هیدروکسی آپاتیت تولیدی برای کاربردهای پزشکی است.

هیدروکسی آپاتیت نانومتری برای برخی کاربردهای پیشرفته در پزشکی استفاده می‌شود. نتایج مطالعه پاسخ بافت در مقابل هیدروکسی آپاتیت نانومتری / کلاژن نشان داده که نانو ذرات موجب تسریع عملکرد می‌شوند. هیدروکسی آپاتیت نانومتری در رهایش دارو و انتقال داروهایی مثل انسولین و آنتی بیوتیک استفاده می‌شود و به تازگی در مورد درمان برخی تومورهای خاص به کمک ذرات هیدروکسی آپاتیت نانومتری بررسی و مطالعه شده است. کامپوزیتهایی که با سایر مواد مثل کلاژن و یا سایر پلیمرها تولید می‌شوند موجب افزایش همبندی با بافت استخوان و رشد آن می‌شود و داربستهای مناسبی برای مهندسی بافت فراهم می‌شود [۳۸]. به تازگی توجه به استفاده از نانوذرات کلسیم فسفاتی و هیدروکسی آپاتیت با کاتیونهای جایگزین شده نیز برای ژن درمانی متمرکز شده است [۳۹ و ۴۰].

هیدروکسی آپاتیت نانوساختار تولید شده در این پژوهش به دلیل حضور یون کربنات در ساختار آن و تشکیل کربنات هیدروکسی آپاتیت و همچنین به دلیل ساختار نانومتری به دست آمده، زیست فعالی و زیست اضمحلالی مشابه به آپاتیت بیولوژیکی نشان می‌دهد و می‌تواند در کنار بافتهای سخت مثل استخوان برای درمان نقص و یا بازسازی و خلق دوباره بافت

#### واژه نامه

1. biological bone-like apatite
2. bioactive
3. hydroxyapatite
4. biocompatibility
5. mechanical activation
6. biodegradation
7. biological apatite
8. X-ray diffraction (XRD)

9. Williamson – Hall
10. Fourier transform infra red spectroscopy (FTIR)
11. transmission electron microscopy (TEM)
12. in vitro tests
13. simulated body fluid (SBF)
14. atomic absorption spectroscopy (AAS)
15. american society for testing and materials (ASTM)

#### مراجع

1. Kokubo, T., Kim, H. M., and Kawashita, M., "Novel Bioactive Materials with Different Mechanical Properties," *Biomaterials*, Vol. 24, p. 2161, 2003.
2. Siriphannon, P., Kameshima, Y., Yasumori, A., Okada, K., and Hayashi, S., "Formation of Hydroxyapatite on CaSiO<sub>3</sub> Powders in Simulated Body Fluid," *J. Eur. Ceram Soc.*, Vol. 22, p. 511, 2002.
3. Oyane, A., Onuma, K., Ito, A., Kim, H. M., Kokubo, T., and Nakamura, T., "Formation and Growth of Clusters in Conventional and New Kinds of Simulated Body Fluids," *J. Biomed. Mater Res*,

- Vol. 64, pp. 339, 2003.
4. Leng, Y., Chen, J. Y., and Qu, S. X., "TEM Study of Calcium Phosphate Precipitation on HA/TCP Ceramics", *Biomaterials*, Vol. 24, p. 2125, 2003.
  5. Fathi, M.H., Azam, F., "Novel Hydroxyapatite/Tantalum Surface Coating for Metallic Implant," *Materials letters*, Vol. 61, pp. 1238-1241, 2007.
  6. Fathi, M.H., and Hanifi, A., "Evaluation and Characterization of Nanostructure Hydroxyapatite Powder Prepared by Simple Sol-Gel Method," *Materials Letters*, Vol. 61, pp. 3978-3983, 2007.
  7. Fathi, M.H., Hanifi, A., and Mortazavi, V., "Preparation and Bioactivity Evaluation of Bone Like Hydroxyapatite Nanopowder," *Journal of Materials Processing Technology*, Vol. 202, p. 536-542, 2008.
  8. Fathi, M.H., and Mohammadi Zahrani, E., "Mechanical Alloying Synthesis and Bioactivity Evaluation of Nanocrystalline Fluoridated Hydroxyapatite," *Journal of Crystal Growth*, Vol. 311, pp. 1392-1403, 2009.
۹. فتحی، م.ح، حنیفی، آ. و مستغاثی، ب، خواص و کاربرد پزشکی بیوسرامیکها، انتشارات ارکان دانش، اصفهان، تابستان ۱۳۸۸.
10. Banerjee, A., Bandyopadhyay, A., and Bose, S., "Hydroxyapatite Nanopowders: Synthesis, Densification and Cell-Materials Interaction," *Materials Science and Engineering C*, Vol. 27, pp. 729-735, 2007.
  11. Zahi, S., Daud, A. R., Hashim, H., "A Comparative Study of Nickel-Zinc Ferrites by Sol-Gel Route and Solid-State Reaction," *Materials Chemistry and Physics*, Vol. 106, pp. 452-456, 2007.
  12. Kim, W., and Saito, F., "Mechanochemical Synthesis of Hydroxyapatite from Constituent Powder Mixtures by Dry Grinding," *J Chem. Eng. Jpn.*, Vol. 35, p. 768, 2000.
  13. Yeong, B., Juamin, X., and Wang, J. J., "Mechanochemical Synthesis of Hydroxyapatite from Calcium Oxide and Brushite," *J. Am. Ceram. Soc.*, Vol. 84, p. 465, 2000.
  14. Kim, W., Zhang, Q., and Saito, F., "Mechanochemical Synthesis of Hydroxyapatite from Ca(OH)<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and CaO-Ca(OH)<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Mixtures," *J Mater. Sci.*, Vol. 35, p. 5401, 2000.
  15. Silva, C. C., Pinheiro, A. G., and Miranda, AMR., "Structural Properties of Hydroxyapatite Obtained by Mechanosynthesis," *Solid State Sci.*, Vol. 5, p. 553, 2003.
  16. Suchanek, W. L., Shuk, P., Byrappa, K., Riman, R.E., Ten Huisen K. S., Janas V.F., "Mechanochemical-Hydrothermal synthesis of Carbonated Apatite Powders at Room Temperature," *Biomaterials*, Vol. 23, pp. 699, 2002.
  17. Riman, R. E., Suchanek, W. L., Byrappa, K., Chena, C. W., Shuka, P., Oakesa, C. S., "Solution Synthesis of Hydroxyapatite Designer Particulates," *Solid State Ionic*, Vol. 151, p. 393, 2002.
  18. Rhee, S. H., "Synthesis of Hydroxyapatite via Mechanochemical Treatment," *Biomaterials*, Vol. 23, p. 1147, 2002.
  19. Fathi, M.H., and Mohammadi Zahrani, E., "Fabrication and Characterization of Fluoridated Hydroxyapatite Nanopowders Via Mechanical Alloying," *Journal of Alloys and Compounds*, Vol. 475, pp. 408-414, 2009.
  20. Mohammadi Zahrani, E., and Fathi, M.H., "The Effect of High-Energy Ball Milling Parameters on the Preparation and Characterization of Fluorapatite Nanocrystalline Powder," *Ceramics International*, Vol. 35, pp. 2311-2323, 2009.
  21. Liu, D. M., Troczynski, T., Tseng, W. J., "Water-Based Sol-Gel Synthesis of Hydroxyapatite: Process Development," *Biomaterials*, Vol. 22, pp. 1721-1730, 2001.
  22. Stupp, S.I., and Ciegler G.W., "Organoapatites: Materials for Artificial Bone. I. Synthesis and Microstructure," *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 26, pp. 169, 1992.
  23. Webster, T. J., Ergun, C., Doremus, R. H., Siegel, R. W., and Bizios, R., "Enhanced Osteoclast-Like Cell Functions on Nanophase Ceramics," *Biomaterials*, Vol. 22, pp. 1327, 2002.
  24. Vasconcelos, I. F., "Optical Properties of Bi<sub>12</sub>SiO<sub>20</sub> (BSO) and Bi<sub>12</sub>TiO<sub>20</sub> (BTO) obtained by Mechanical Alloying," *J. Mat. Sci.*, Vol. 36, pp. 578, 2001.
  25. Murugan, R., Rao, K. P., and Kumar, TS. S., "Heat-Deproteinized Xenogeneic Bone from Slaughterhouse Waste: Physico-Chemical Properties," *Bull. Mater. Sci.*, Vol. 26, p. 523, 2003.
  26. Silva, G. A., *Introduction to Nanotechnology and Its Applications to Medicine*, Elsevier Inc., 2004.
  27. Williamson, G. K., and Hall, W. H., "X-ray Line Broadening from Filled Aluminum and Wolfram," *Acta Metall.*, Vol. 1, p. 22, 1953.
  28. Fathi, M.H., and Hanifi, A., "Fabrication of Hydroxyapatite Nano Powders by Sol Gel Method", *Proceeding of NanoEurope 2006 Conference & Fair*, Abstract No.17, 12-14 September 2006, St. Gallen, Swiss, 2006.
  29. Hanifi, A., and Fathi, M.H., "Sol-Gel Derived Nanostructure Hydroxyapatite Powder and Coating-Aging Time Optimisation", *Advances in Applied Ceramics: Structural, Functional and Bioceramics*, Vol. 108, p. 363-368, 2009.
  30. Kokubo, T., and Takadama, H., "How Useful is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity?," *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 2907, 2006.
  31. Sinha, A., Ingle, A., Munim, K. R., Vaidya, S. N., Sharma, B. P., and Bhisey, A. N., "Development of

- Calcium Phosphate Based Bioceramics,” *Bull. Mater. Sci.*, Vol. 24, pp. 653–657, 2001.
32. Emerson, W. H., Fischer, E. E., “The Infrared Absorption Spectra of Carbonate in Calcified Tissues,” *Arch Oral Biol.*, Vol. 7, pp. 671-683, 1962.
  33. Elliott, J. C., Holcom, D. W., and Young, R. A., “Infrared Determination of the Degree of Substitution of Hydroxyl by Carbonate Ions in Human Dental Enamel,” *Calcif. Tissue Int.*, Vol. 37, pp. 372- 375, 1985.
  34. Roohani, S. I., and Fathi, M. H., “In Vitro Characterization of Bone Like Nanocrystalline Hydroxyapatite,” *Proceeding of First International Congress on Nanoscience and Nanotechnology 2006*, Tehran, Iran, pp. 101-104, 2006.
  35. Comby, S., Gummy, F., Bünzli, G., Saraidarov, T., and Reisfeld, R., “Luminescent Properties of an Yb Podate in Sol–Gel Silica Films, Solution, and Solid State,” *Chemical Physics Letters*, Vol. 432, pp. 128-132, 2006.
  36. Kalita, S. J., Bhardwaj, A., and Bhatt, H. A., “Nanocrystalline Calcium Phosphate Ceramics in Biomedical Engineering,” *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 27, pp. 441-449, 2007.
  37. Muragan, R., and Ramakrishna, S., “Aqueous Mediated Synthesis of Bioresorbable Nanocrystalline Hydroxyapatite,” *J. Crystal Growth*, Vol. 274, pp. 209, 2005.
۳۸. فتحی، م. ح.، حنیفی، آ.، *نانو بیوسرامیکها*، انتشارات ارکان دانش، اصفهان، پاییز ۱۳۸۶.
39. Hanifi, A., Fathi, M.H., and Mirmohammad Sadeghi, H., “Effect of Strontium ions Substitution on Gene Delivery Related Properties of Calcium Phosphate Nanoparticles,” *J of Mat Sci: Mat in Med*, Vol. 21, pp. 2601-2609, 2010.
  40. Hanifi, A., Fathi, M.H., Mirmohammad Sadeghi, H., and Varshosaz, J., “Mg<sup>2+</sup> Substituted Calcium Phosphate Nano Particles Synthesis for Non Viral Gene Delivery Application,” *J of Mat Sci: Mat in Med*, Vol. 21, pp. 2393-2401, 2010.
  41. Webster, T. J., Siegel, R. W., and Biozios, R., “Enhanced Surface and Mechanical Properties of Nanophase Ceramics to Achieve Orthopaedic/ Dental Implant Efficacy,” *Key Eng Mater*, Vol. 192, p. 321, 2001.
  42. Webster, T. J., Ergun, C., Doremus, R. H., Siegel, R. W., and Biozios, R., “Enhanced Functions of Osteoblasts on Nanophase Ceramics,” *Biomaterials*, Vol. 21, pp. 1803, 2000.
  43. Webster, T. J., “Specific Proteins Mediate Enhanced os-. Teoblast Adhesion on Nanophase Ceramics,” *J. Biomed Mater Res*, Vol. 51, p. 475, 2000.