

## The Effect of Collagen on the Synthesis of Calcium Phosphate Nanoparticles

H. Salemi <sup>1</sup>, A. Behnamghader <sup>2\*</sup>, M. Baghaban Eslaminejad <sup>3</sup>, M. Ataei <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ph.D student, Biomaterials Department, Faculty of Biomedical Engineering, Science & Research Branch, Islamic Azad University (IAU), Department of biomedical engineering, Tehran, Iran, salemi\_ho\_82@srbiau.ac.ir

<sup>2</sup>Assistant Professor, Biomaterials group, Materials and Energy Research Center, Tehran, Iran.

<sup>3</sup>Professor, Department of Stem Cell and Developmental Biology, at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran, eslami@royaninstitute.org

<sup>4</sup>Associate Professor, Polymer Petrochemical Institute, Tehran, Iran, m.atai@ippi.ac.ir

### Abstract

Collagen and Hydroxyapatite (HA) nanoparticles are significant constituent of the natural bone. In this study, the effect of collagen on the morphological and phase characteristics of calcium phosphate nanoparticles was investigated. The synthesis reaction was initiated by mixing H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> as phosphorous source and CaCl<sub>2</sub> as calcium source in presence of Collagen Type 1. Collagen concentration in suspension and Ca to P ratio was 1% and 1.67 respectively. The morphology and structure of samples (with collagen and without collagen), heat treated at 600 °C were characterized by X-Ray diffraction (XRD), Fourier transformation infrared (FTIR) and Scanning electron microscopy (SEM). More fine and flake-like shape particles were observed in the SEM images of sample synthesized in the presence of collagen compared to the control sample which was constituted of larger granular particles. The XRD results revealed the powders were composed of hydroxyapatite and octacalcium phosphate and the sample synthesized in the presence of collagen was less crystalline. The amide bands of collagen and P-O and OH characteristic peaks were identified in FT-IR spectra.

**Key words:** Collagen, Calcium phosphate component, Hydroxyapatite, nanoparticles, mineralization of collagen.

\*Corresponding author

Address: Materials and Energy Research Center, Tehran, Iran, Postal Code: 14155-4777.

Tel: +982144822436

Fax: +982144474319

E-mail: a-behnamghader@merck.ac.ir

## تأثیر کلاژن بر سنتز نانوذرات کلسیم فسفات

هدا سالمی<sup>۱</sup>، علی اصغر بهنام‌قادر<sup>۲\*</sup>، محمدرضا باغبان اسلامی نژاد<sup>۳</sup>، محمد عطایی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>دانشجوی دکتری مهندسی پزشکی (بیومتریال)، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده مهندسی پزشکی، تهران

salemi\_ho\_82@srbiau.ac.ir

<sup>۲</sup>استادیار، پژوهشگاه مواد و انرژی، گروه بیومواد، تهران.

<sup>۳</sup>استاد، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه

سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران eslami@royaninstitute.org

<sup>۴</sup>دانشیار، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی، تهران atai@ippi.ac.ir

### چکیده

کلاژن و ترکیبات کلسیم فسفاتی، بویژه نانوهیدروکسی آپاتیت ترکیبات اصلی استخوان طبیعی هستند. در سنتز همزمان هیدروکسی آپاتیت در حضور کلاژن، ذرات کلسیم فسفات در امتداد فیبریل کلاژن رشد کرده؛ میکروساختار متفاوتی را ایجاد می‌کنند. از این رو تأثیر کلاژن بر ویژگی‌های میکروساختاری و فازی ذرات کلسیم فسفات، بررسی شد. با توجه به سنتز همزمان هیدروکسی آپاتیت در حضور کلاژن، کلرید کلسیم به عنوان منبع کلسیم به مخلوط کلاژن و اسید فسفریک به عنوان منبع فسفر اضافه شد. و غلظت کلاژن در مخلوط نهایی ۱٪ وزنی/حجمی و نسبت وزنی کلسیم به فسفر ۱/۶۷ بود. فاز معدنی سنتز شده در حضور کلاژن و بدون کلاژن (نمونه کنترل) به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و شکل، ساختار و تغییرات فازی آن با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، تحلیل تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) و پراش اشعه ایکس (XRD) بررسی شدند. نتایج SEM ذرات کلسیم فسفات ریزتر و با ساختاری ورقه‌ای را در نمونه هیدروکسی آپاتیت سنتز شده در حضور کلاژن در مقایسه با نمونه کنترل - که دارای ساختار درشت‌تر و شبه‌کروی است - نشان دادند. تحلیل‌های FTIR و XRD حضور ترکیبات هیدروکسی آپاتیت و اکتاکلسیم فسفات را تأیید کردند. بررسی طیف FTIR نمونه‌ها قبل از عملیات حرارتی، حضور باند هیدروکسیل و باند فسفاتی مشخصه ترکیبات کلسیم فسفاتی و باندهای آمیدی مشخصه کلاژن را نشان داد. بعد از عملیات حرارتی نیز وجود بلورینگی کمتر در طیف XRD مشاهده شد.

کلیدواژگان: کلاژن، ترکیبات کلسیم فسفات، هیدروکسی آپاتیت، معدنی کردن کلاژن، نانو ذرات.

\*عهده‌دار مکاتبات

نشانی: تهران، میدان آرژانتین، خیابان الوند، خیابان اهورا مزدا، پلاک ۱۶، دفتر مرکزی پژوهشگاه مواد و انرژی، صندوق پستی: ۷۷۷-۱۴۱۵۵

تلفن: ۰۲۱-۴۴۴۴۰۵۰۶، دورنگار: ۰۲۱-۴۴۴۷۴۳۱۹، پیام‌نگار: behnamghader@merck.ac.ir

## ۱- مقدمه

در سال‌های اخیر معدنی کردن<sup>۱</sup> کلاژن برای سنتز جانشین‌های استخوانی توجه بسیاری را به خود جلب کرده است. استخوان طبیعی شامل ترکیبی از نانوکریستال‌های تیغه‌ای هیدروکسی آپاتیت است که در امتداد فیبر و فیبریل‌های کلاژن به عنوان مهمترین ترکیب فاز آلی استخوان رشد یافته است [۲، ۱]. از آنجایی که کلاژن و کلسیم فسفات‌ها اجزای اصلی استخوان انسان هستند، ایمپلنت‌های استخوانی شامل این مواد، می‌توانند بهترین گزینه برای تأمین یک ماده سنتزی مشابه استخوان انسان باشند [۳].

برای بدست آوردن ویژگی‌هایی مشابه خواص استخوان، ضروری است علاوه بر ترکیب استخوان طبیعی، ساختارش را نیز تقلید<sup>۲</sup> کرد. اخیراً برای ایجاد ساختاری مشابه ساختار استخوان در محیط آزمایشگاهی خارج بدن<sup>۳</sup>، بسیاری از محققان به استفاده از روش تقلید زیستی جهت ساخت کامپوزیت کلاژن-کلسیم فسفات توجه کرده‌اند [۴-۸].

در روش معدنی کردن کلاژن، کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت در محلولی کلاژنی، میکروساختاری یکنواخت را ایجاد می‌کنند [۹-۱۱]. البته ساختار فیبریل کلاژن معدنی شده در محدوده نانومتری هنوز به طور کامل واضح نیست و موضوع مهم تحقیقات حاضر است [۱۲].

در یک ماتریس خارج سلولی شامل کلاژن، فاز معدنی به صورت جوانه‌زنی و رشد کریستال‌های معدنی در امتداد فیبر کلاژنی و همزمان با جمع شدن مجدد<sup>۴</sup> کلاژن، ایجاد می‌شود [۱۳-۱۵].

با توجه به نتایج بدست آمده از بلورسنجی، فرض می‌شود نیروی پیش‌برنده در تشکیل خود به خودی هیدروکسی آپاتیت در راستای فیبریل کلاژنی، برهم‌کنش یونهای کلسیم و باقیمانده‌های هیدروکسیل بر روی مولکول کلاژن باشد [۴].

بر طبق تحقیقات انجام شده، ایجاد فاز معدنی در محیط آزمایشگاهی حیوانی<sup>۵</sup> با تعدادی پروتئین‌های استخوانی از جمله

کلاژن و پروتئین‌های غیر کلاژنی، کنترل می‌شود [۱۶]. پروتئین‌های غیر کلاژنی شامل مقادیر مختلفی از آمینواسیدهای آیونی مثل آسپاراتات و گلوتامات هستند. پلیمرهای این آمینواسیدها، پلی آسپاراتات و پلی گلوتامیک هستند که به عنوان ترکیبات پروتئین‌های غیر کلاژنی بکار می‌روند [۳].

مطالعات دیگر محققان فقط به سنتز جانشین‌های استخوانی با روش معدنی کردن کلاژن پرداخته‌اند [۸، ۷]. در این تحقیق ویژگی‌های مورفولوژی و ساختاری کلسیم فسفات سنتز شده در حضور کلاژن و بدون حضور کلاژن (نمونه کنترل)، مقایسه شده است.

## ۲- مواد و روش‌ها

## ۲-۱- مواد اولیه

کلاژن نوع ۱ از تاندون آشیل گاوی از شرکت زیگما آلدریج<sup>۶</sup> با کد C۴۳۶۷ خریداری شد. اسید فسفریک ۸۵٪ با کد ۱۰۰۵۶۳۲۵۰۰، کلرید کلسیم بدون آب با کد ۱۰۲۳۷۹۱۰۰۰ و سایر مواد استفاده شده از شرکت مرک<sup>۷</sup> تهیه شدند. غلظت کلاژن در مخلوط نهایی ۱٪ وزنی/حجمی و نسبت کلسیم به فسفر ۱/۶۷ در نظر گرفته شد.

## ۲-۲- معدنی کردن کلاژن

با توجه به سنتز همزمان هیدروکسی آپاتیت در حضور فیبریل کلاژن، ابتدا از محلول اسید فسفریک ۰/۵ میلی‌مول به عنوان منبع فسفر، بمنظور باز کردن فیبرهای کلاژنی استفاده شد. سپس محلول کلرید کلسیم ۵۰ میلی‌مول به صورت قطره ای به محلول کلاژن و اسیدفسفریک- که بوسیله همزن و با سرعت ۱۴۰۰ دور بر دقیقه مخلوط می‌شد- اضافه شد.

رسوب بدست آمده از سانتریفیوژ مخلوط کلاژن/ترکیب کلسیم فسفاتی با سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۵ دقیقه، پس از انجماد در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، با روش خشک شدن انجمادی، خشک شد.

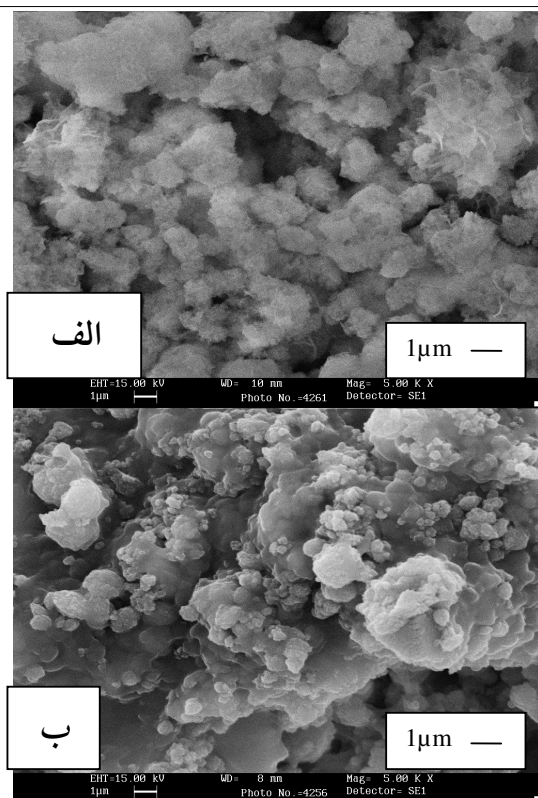
روش فوق بدون حضور کلاژن، برای تهیه پودر هیدروکسی آپاتیت انجام شد. به منظور بدست آوردن کنتراست بهتر در

<sup>۱</sup> Mineralization  
<sup>۵</sup> In vivo

<sup>۲</sup> Mimic  
<sup>۶</sup> Sigma-Aldrich

<sup>۳</sup> In vitro  
<sup>۷</sup> Merck

<sup>۴</sup> Reassembly



شکل (۱)- تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) از ذرات کلسیم فسفات سنتز شده الف) نمونه کنترل، ب) نمونه هیبریدی

نمونه پودر کنترل از دانه‌های درشت به هم چسبیده تشکیل شده است، در حالی که شکل ذرات پودر هیبریدی سنتز شده در حضور کلاژن، ریزتر است و به دلیل نیروی الکتروستاتیک بین ذرات، آگلومره شده‌اند.

با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی در بزرگنمایی‌های بیشتر، اندازه ذرات معدنی نمونه هیبریدی حدود ۵۰ تا ۹۰ نانومتر تخمین زده می‌شود.

ترکیبات فازی از پودر نمونه کنترل و کلاژن معدنی شده بعد از حرارتی شدن (نمونه هیبریدی)، با استفاده از تحلیل پراش اشعه ایکس بررسی شد (شکل ۳). قله‌های ویژه هیدروکسی آپاتیت در محدوده (۲۵-۳۵ = ۲θ) در نمونه کنترل [بخش الف شکل (۳)] و در نمونه هیبرید [بخش ب شکل (۳)] مشاهده می‌شود. وجود فاز آلی در سنتز هیدروکسی آپاتیت موجب آمورف شدن فاز معدنی شده است.

بررسی ساختار ترکیب کلسیم فسفات بدست آمده، به منظور ایجاد کنتراست بهتر در بررسی شکل و ساختار ترکیبات کلسیم فسفات بدست آمده، نمونه‌های پودری هیدروکسی آپاتیت/کلاژن (هیبریدی) و نمونه‌های کنترل (هیدروکسی آپاتیت)، به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد، حرارتی شدند.

### ۲-۳- بررسی مشخصات و ویژگی‌ها

ترکیب فازی پودر نمونه هیبریدی بعد از عملیات حرارتی، بوسیله پراش اشعه ایکس با مدل بروکر<sup>۸</sup> با طول موج اشعه ایکس مس<sup>۹</sup> (برابر با ۱/۵۴ آنگستروم) و ولتاژ ۴۰ کیلو ولت و در محدوده (۶۰ ≤ ۲θ ≤ ۵) بررسی شد.

بمنظور مشاهده شکل و میکروساختار پودرهای بدست آمده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) با مدل لئو-۴۴۰<sup>۱۰</sup> استفاده شد. همچنین نسبت کلسیم به فسفر نمونه‌ها با تحلیل نقطه‌ای ایدکس<sup>۱۱</sup> به طور تقریبی بدست آمد.

تغییرات ساختار شیمیایی پودرهای کنترل و هیبریدی و کلاژن بدون عملیات حرارتی، با استفاده از تحلیل طیف‌سنجی مادون قرمز ترمونیکولت<sup>۱۲</sup> و در محدوده طیف ۴۰۰۰-۴۰۰ cm<sup>-1</sup> انجام شد.

### ۳- نتایج و بحث

میکروساختار و شکل نمونه پودرهای هیدروکسی آپاتیت (کنترل) و هیدروکسی آپاتیت/کلاژن (هیبریدی) در شکل (۱) مشاهده می‌شود.

ساختار تقریباً سوزنی شکل ذرات معدنی نمونه کنترل و همچنین ساختار شبه‌کروی نمونه هیبریدی، با بزرگنمایی یکسان در شکل (۱) قابل رویت است. این اختلاف ظاهری تأثیر حضور کلاژن را در سنتز هیدروکسی آپاتیت نشان می‌دهد.

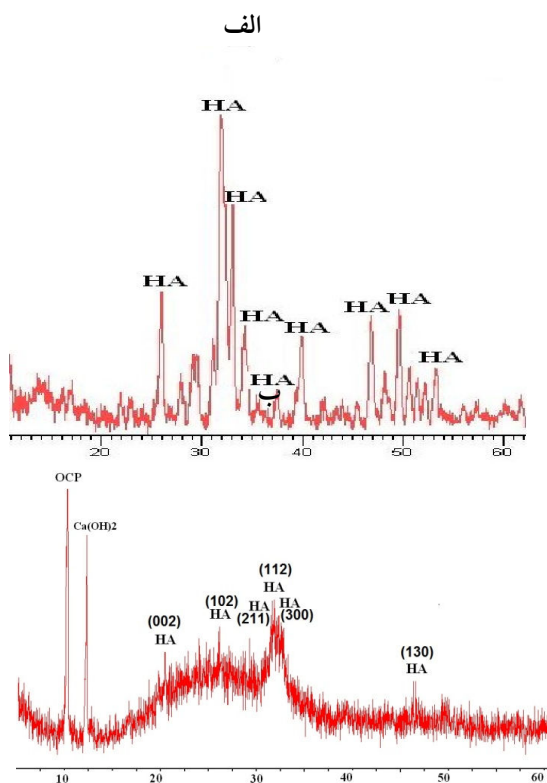
حضور کلاژن همچنین می‌تواند باعث کاهش کنتراست در بررسی اجزای تصاویر SEM از نمونه هیبریدی شود. بنابراین برای حل این مشکل، نمونه‌ها (بدون کلاژن و با کلاژن) در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارتی شدند [شکل (۲)].

<sup>8</sup> D4-Brucker  
<sup>12</sup> Thermo Nicolet

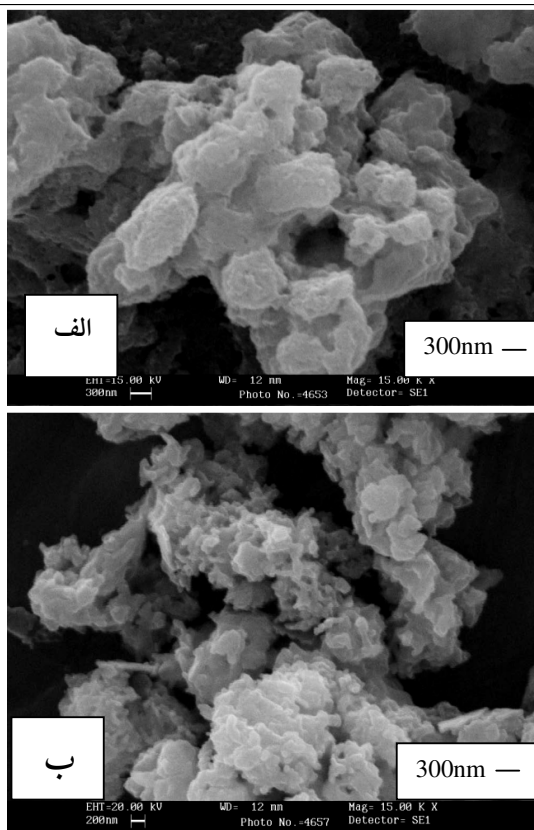
<sup>9</sup> CuKα

<sup>10</sup> Scanning Electron Microscopy (LEO-4401)

<sup>11</sup> EDAX



شکل (۳) - منحنی پراش اشعه ایکس از پودر الف (کنترل و ب) هیبریدی کلسیم فسفات/کلاژن بعد از عملیات حرارتی



شکل (۲) - تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از پودر کلسیم فسفاتی بعد از عملیات حرارتی در ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد، نمونه (الف) کنترل، (ب) نمونه هیبریدی

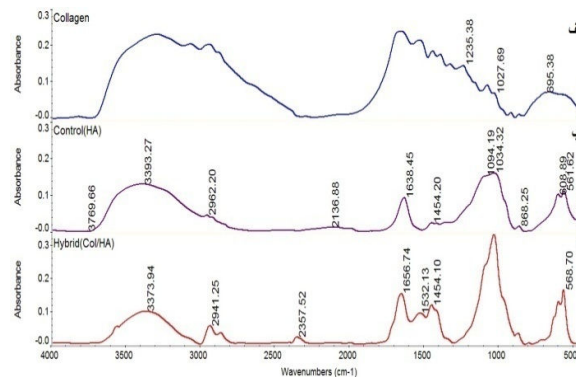
در نمونه هیبرید علاوه بر فاز HA قله مربوط به هیدروکسید کلسیم و اکتاکلسیم فسفات نیز دیده می‌شود. بر اساس گزارش سایر محققان، فاز اکتاکلسیم فسفات فازی موقتی است که می‌تواند در طول سنتز مواد کلسیم فسفاتی تشکیل شده؛ سپس به فاز هیدروکسی آپاتیت تبدیل شود [۱۷]. فاز هیدروکسید کلسیم در کاربردهای بافت سخت، فازی مطلوب و قابل توجه نیست. نسبت کلسیم به فسفر بدست آمده از تحلیل نقطه‌ای ایدکس برای پودر هیبریدی در حدود ۱/۹ است. به نظر می‌رسد این میزان زیاد نسبت کلسیم به فسفر می‌تواند متأثر از حضور فاز هیدروکسید کلسیم باشد. البته باید توجه شود که این تحلیل به عنوان روشی کمی چندان دقیق نیست. رشد جهت‌دار هیدروکسی آپاتیت در مکان‌های هیدروکسیل و کربوکسیل با قله‌های پراش اشعه ایکس، تأیید می‌شود.

تحلیل مادون قرمز (FTIR) از نمونه کنترل و هیبرید، قبل از عملیات حرارتی و نمونه کلاژن در شکل (۴) آمده است. بخش الف شکل (۴) باندهای آمیدی کلاژن مانند آمید A, B, I, II, III را نشان می‌دهد. باند آمید A در محدوده  $3310-3290\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش کششی باند هیدروژن-نیتروژن (N-H) است و باند آمید B در حدود  $2941\text{ cm}^{-1}$  باند کششی ارتعاشی هیدروژن-کربن (C-H) را نشان می‌دهد. این دو به ساختار شاخه اصلی کلاژن بستگی ندارند، اما به استحکام باند هیدروژنی حساس هستند.

کلاژن معدنی شده (هیبریدی) قبل از عملیات حرارتی نشان می‌دهد. در این نمونه علاوه بر باندهای آمیدی مربوط به کلاژن، باندهای فسفاتی هیدروکسی آپاتیت نیز مشاهده می‌شود. باندهای فسفاتی در عدد موجی  $900-1200\text{ cm}^{-1}$  در مدهای  $\nu_1$  و  $\nu_3$  دیده می‌شوند. امید  $V$  در  $625\text{ cm}^{-1}$  ممکن است با مد  $\nu_2$  همپوشانی کند.

باندهای فسفاتی مشتق شده از مد  $\nu_3$  شامل ارتعاش کششی نامتقارن فسفر-اکسیژن ( $P-O$ ) بوده؛ در محدوده  $1032\text{ cm}^{-1}$  و  $840\text{ cm}^{-1}$  دیده می‌شوند. حضور مد  $\nu_2$  کربنات در  $840\text{ cm}^{-1}$  و  $1417\text{ cm}^{-1}$  نشان می‌دهد دی‌اکسیدکربن جذب شده، و با هیدروکسیل در شکل سطحی کربناتی واکنش داده است. [۲۵،۲۲].

حضور باند  $1342\text{ cm}^{-1}$  در کلاژن گروه کربونیل را نشان نمی‌دهد؛ اما یکی از چندین قله در محدوده  $1260-1400\text{ cm}^{-1}$  است که به حضور کلاژن نوع ۱ در بافت بیولوژیک و غالباً به ارتعاش و گینگ<sup>۱۴</sup> زنجیر جانبی پرولین نسبت داده می‌شود. پیچیدگی منحنی امید  $I$  نتیجه اتصال<sup>۱۵</sup> بین دو یا چند مد ارتعاشی کربونیل و یا میزان همگنی گروه‌های کربونیل زنجیر اصلی است [۲۰]. جابجایی قله از فرکانس  $1347\text{ cm}^{-1}$  در نمونه کلاژن (شکل (۴)) به فرکانس کمتر  $1342\text{ cm}^{-1}$  در نمونه هیبرید (کلاژن معدنی شده)، وجود ارتعاش و گینگ از طریق تشکیل باند کوالانت با یونهای کلسیم نانوذرات هیدروکسی آپاتیت را نشان می‌دهد. آمینواسید باقیمانده هر مولکول کلاژن، حدود ۲۰ درصد گروه کربوکسیل و گروه آمینو روی زنجیرهای جانبی خود دارد، در نتیجه بایونهای کلسیم و فسفات سطح نانوذرات هیدروکسی آپاتیت واکنش الکتروستاتیک داده؛ موجب جابجایی قله به فرکانس کمتر می‌شوند [۲۰، ۲۶].



شکل (۴) - مقایسه طیف‌های مادون قرمز در نمونه‌های الف) کلاژن، ب) کنترل، ج) هیبرید

در محدوده  $1700-1600\text{ cm}^{-1}$  باند ارتعاشی کششی گروه کربونیل ( $C=O$ ) امید  $I$  و در  $1580-1510\text{ cm}^{-1}$  ارتعاشات خمشی هیدروژن-نیترژن ( $N-H$ ) را برای امید ۲ نشان می‌دهد. امید  $III$  باند پیچیده‌ای است که به طبیعت زنجیرهای جانبی و باند هیدروژنی بستگی دارد. باند امید ۱ در مقایسه با باندهای امید ۲ و ۳ قوی‌تر بوده و به ساختار ثانویه پپتیدها بسیار حساس است.

ساختار آپاتیت در نمونه پودر کنترل (قسمت ب شکل (۴))، دارای مدهای ارتعاشی فسفاتی در فرکانس‌های  $610-560\text{ cm}^{-1}$  و  $1100-1000\text{ cm}^{-1}$  است. قله پهن در محدوده  $370\text{ cm}^{-1}$  و  $2600\text{ cm}^{-1}$  مربوط به مد کششی گروه هیدروکسیل است. همچنین قله با شدت بسیار کم در  $3769\text{ cm}^{-1}$  مربوط به مد کششی هیدروکسیل فاز هیدروکسید کلسیم است. رودریگو ( $Rod$ )<sup>۱۳</sup> و همکارانش قله مختص هیدروکسی آپاتیت را در محدوده  $3650-3400\text{ cm}^{-1}$  تعیین کردند [۱۸]. باندهای فسفاتی در  $470\text{ cm}^{-1}$  مربوط به مد  $\nu_2$ ، در  $1034\text{ cm}^{-1}$  و  $968\text{ cm}^{-1}$  مربوط به مد  $\nu_3$  و در  $608$  و  $561\text{ cm}^{-1}$  مربوط به مد  $\nu_4$  هستند.

قله حدود  $840\text{ cm}^{-1}$  و  $1417\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش کششی گروه کربناتی است که احتمالاً ناشی از حضور پیش‌ماده‌ها و یا به دلیل جذب شیمیایی دی‌اکسیدکربن محیط است [۱۹-۲۴].

قسمت (ج) شکل (۴)، منحنی مادون قرمز را برای نمونه

<sup>13</sup> Rodrig

<sup>14</sup> Wagging

<sup>15</sup> Coupling

- [6] Du C., Cui F. Z., Zhu X. D., de Groot K., Three-dimensional nano-Hap/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture; *J Biomed Mater Res*, 1999; 44: 407-415.
- [7] Hilmar Bradt J., Mertig M., Biomimetic mineralization of collagen by combined fibril assembly and calcium phosphate formation; *Chem. Mater*, 1999; 11: 2694-2701.
- [8] DA W, Czernuszka JT. Collagen-Hydroxyapatite composites for hard tissue repair; *European Cells and Materials*, 2006; 11: 43-56.
- [9] Li H., Xie Y., Photo-crosslinking polymerization to prepare polyanhydride/needle-like hydroxyapatite biodegradable nanocomposite for orthopedic application; *MaterLett*, 2003; 57: 28-48.
- [10] Lin X., Li X., Fan H., In situ synthesis of bone-like apatite/collagen nano-composite at low temperature; *MatLett*, 2004; 58: 3569-3572.
- [11] Lowenstam H., Weiner S., on biomineralization. Oxford: Oxford University Press, 1989.
- [12] Gelinsky M., Welzel P. B., Porous three-dimensional scaffolds made o mineralised collagen: preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone; *Chemical Engineering Journal*, 2008; 137 :84-96.
- [13] Murphy W. L., Messersmith P. B., Compartmental control of mineral formation: adaption of a biomineralization strategy for biomedical use; *Polyhedron*, 2000; 19: 357-363.
- [14] Iannotti J.P., Goldstein S., Kuhn J., Lipiello L., Growth plate and bone development. In Simon S. R (ed). *Orthopedics Basic Science*; American Academy of orthopedics Surgeons, Rosemont. IL., 1992:185-217.
- [15] Pederson A. W., Ruberti J. W., Messersmith P. B., Thermal assembly of a biomimetic mineral/collagen composite; *Biomaterials*, 2003; 24: 4881-4890.
- [16] Gelinsky M, et al. Influence of osteocalcin on in vitro mineralization of collagen type1, 8th ICCBMT, Banff, Alberta, Canada. October 17-22, 2004: 230-233.
- [17] Stephan G, Paul W.B, Reaction of octacalcium phosphate to form hydroxyapatite; *Journal of Crystal Growth*, 1996; 165: 106-115.
- [18] Prageeth Rodrigo C, Synthesis and characterization of strontium Fluorapatite, Master of Science Degree in chemistry department of chemistry college of science; graduate college university of Nevada, Las Vegas, 2005.
- [19] H. Aoki H., Science and medical applications of hydroxyapatite; Takayama Press System Center, Tokyo, 1991.
- [20] Chang M. C., Tanaka J., FTIR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde; *Biomaterials*, 2002; 23: 4811-4818.
- [21] Payne K. J., Veis A., Fourier transforms IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies; *Biopolymers*, 1988; 27: 1749-1760.

## ۴- نتیجه گیری

در این مطالعه تأثیر کلاژن بر شکل نانوذرات کلسیم فسفاتیی ایجاد شده در فرایند سنتز هیدروکسی آپاتیت به روش زیست تقلیدی بررسی شد. نانوذرات هیدروکسی آپاتیت با ساختاری ریزتر و با شکل متفاوت در نمونه هیدروکسی آپاتیت سنتز شده در حضور فاز آلی کلاژن بدست آمد. بر اساس نتایج طیف سنجی پراش اشعه ایکس پودر کلسیم فسفاتیی سنتز شده ترکیبی از هیدروکسی آپاتیت و اکتا کلسیم فسفات است. همچنین منحنی مادون قرمز نمونه کلاژن معدنی شده علاوه بر وجود باندهای آمیدی کلاژن و باندهای فسفاتیی هیدروکسی آپاتیت، اتصالاتی الکتروستاتیک را بین ذرات معدنی به فیبر کلاژنی نشان داد. در نهایت براساس نتایج بدست آمده، به نظر می رسد حضور کلاژن در تشکیل ساختاری مشابه استخوان مؤثر بوده؛ شکل و ساختار شیمیایی متفاوتی را از فاز معدنی تشکیل شده بدون حضور کلاژن نشان می دهد.

## سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از کارکنان آزمایشگاه بیومتریال دانشکده مهندسی پزشکی (دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران) و پژوهشگاه مواد و انرژی به خاطر همکاری صمیمانه در این تحقیق اعلام می دارند.

## ۵- مراجع

- [1] Murugan R., Ramakrishna S., Development of nanocomposite for bone grafting; *Composites Science and Technology*, 2005; 65: 2385-2406.
- [2] Green D, Walsh D, and Mann S, The potentials of biomimesis in bone tissue engineering: lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons; *Bone*, 2002; 30: 810-815.
- [3] Jens-Hilmar B, et al. Biomimetic mineralization of collagen by combined fibril assembly and calcium phosphate formation; *Chem Mater* 1999; 11: 2694-2701.
- [4] Kikuchi M., IKoma T., Itoh S., et al., Biomimetic synthesis of bone-like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen; *Compos. Sci. Technol*; 2004; 64:819-825.
- [5] Miyamoto Y., Ishikawa K., Takechi M., et al, Basic properties of calcium phosphate cement containing atelocollagen in its liquid or powder phases; *Biomaterials*, 1998; 19: 707-715.

- in urea-containing synthetic body fluids; Journal of the Ceramic Society, 1999; 19: 2573-2579.
- [25] Chang M. C., Ko C.-C., Douglas W. H., Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite; Biomaterials, 2003; 24: 2853-2862.
- [26] Roveri N, Falini G, Biologically inspired growth of hydroxyapatite nanocrystals inside self- assembled collagen fibers; Mater ScieEng C, 2003; 23:441-446.
- [22] Santos M. H., Dias Heneine L. G., Mansur H. S., Synthesis and characterization of calcium phosphate /collagen biocomposites doped with Zn<sup>2+</sup>; Mater SciEng C, 2008; 28: 563-571.
- [23] Maisara S. M, Pat M. Lee, Lee Kong H., Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles and  $\beta$ -TCP particles; 2nd International conference on Biotech and Food Sci 7, 2011.
- [24] Defne B, Cuneyt T, Chemical preparation of carbonated calcium hydroxyapatite powders at 37°C