

Synthesis and Characterization of Sol-Gel Derived Hydroxyapatite, Fluor-Hydroxyapatite and Fluorapatite Nanopowders

B. Farsadzadeh^{1*}, A.A Behnamghader², S. Joughedoust³

¹ Instructor, Engineering School, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran

² Assistant Professor, Biomaterial Group, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran, a_behnamghader@merc.ac.ir

³ Instructor, Engineering School, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran,
n_joughedoust@yahoo.com

Abstract

In this study hydroxyapatite (HA), fluor-hydroxyapatite (FHA) and fluorapatite (FA) nanopowders synthesized by sol-gel route. These powders are used as biocompatible materials for bone replacement and teeth restoration. Ammonium fluoride (NH₄F; MERK), calcium nitrate [Ca(NO₃)₂·4H₂O; MERK] and triethyl phosphite [TEP, (C₂H₅O)₃P; MERK] were used as F, Ca and P precursors respectively. Triethyl phosphite was first hydrolyzed in ethanol with a small amount of distilled water. To prepare FHA and FA, an appropriate amount of the NH₄F powder was added directly to TEP solution. The appropriate amounts of TEP solution was added dropwise to the calcium nitrate solution to yield a stoichiometric ratio of Ca/P=1.67. The resulted solution stirred for 1 h and aged at 25°C for 24 h and 40°C for 72h afterward. After oven drying at 80°C, the powder samples were heat-treated at 550°C for 1 h in air. Microstructural characteristics, powder morphology, chemical structure and phase analysis and in vitro study were performed by Scanning Electron Microscopy (SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM), X-Ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Infra-Red (FTIR), Zetasizer instrument and cell culture method. Fluoride-substituted hydroxyapatite powders (FHA) and Fluorapatite (FA) were successfully fabricated via a sol-gel technique with the incorporation of different levels of fluoride ions. Nearly complete substitution of the OH⁻ by F⁻ occurred with heat treatment, which was confirmed by FTIR analysis. The particle size distribution of powders evaluated by a zeta-sizer instrument was 100-160nm. The XRD results showed that the crystal size of powders is 20-50nm. The phase stability and crystallinity were different depending on the level of fluoride substitution. Moreover, the crystallinity and crystallite size of the powders increased with fluoride substitution. These improvements in the crystallization and phase stability of the apatite structure, resulting from the fluoride substitution via the sol-gel process, suggest enhanced performance of the FHA powders. The cellular response to the HA, FHA and FA powder was assessed by an in vitro culture method using fibroblastic L929 cells. After culturing for 3 days, the results showed that the number of cells increased with increasing fluoride substitution.

Keywords: Hydroxyapatite, Fluor-hydroxyapatite, Fluorapatite, Nanopowder, Sol-gel.

* Corresponding author

Address: Babak Farsadzadeh, Engineering Department, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Daneshgah Boulevard, Shahrood, Iran

Tel: +98 912 3040789

Fax: +98 21 88825442

E-mail: bfarsad@gmail.com

سنتز و بررسی خواص نانوپودرهای هیدروکسی آپاتیت، فلئوریدروکسی آپاتیت و فلئورآپاتیت تهیه شده به روش سل-ژل

بابک فرساذاده^{۱*}، علی اصغر بهنام قادر^۲، صدیقه جوچه دوست^۳

^۱ مدرس، دانشکده فنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود

^۲ استادیار، پژوهشکده سرمایه، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج a_behnamghader@merc.ac.ir

^۳ مدرس، دانشکده فنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود n_joughehdoust@yahoo.com

چکیده

در این پژوهش پودرهای هیدروکسی آپاتیت (HA)، فلئوریدروکسی آپاتیت (FHA) و فلئورآپاتیت (FA) در ابعاد نانومتری با روش سل-ژل سنتز شدند. این پودرها قابلیت استفاده بالقوه در ترمیم استخوان و دندان را دارند. نیترات کلسیم آبدار [Ca(NO₃)₂·4H₂O; MERK] و تری اتیل فسفیت [TEP, (C₂H₅O)₃P; MERK] به عنوان پیش ماده در اتانل استفاده شدند. برای دستیابی به مقدار استوکیومتری Ca/P برابر با ۱/۶۷، محلول TEP به صورت قطره قطره به محلول نیترات کلسیم آماده شده، اضافه شد. پس از پیرسازی و خشک نمودن نمونه‌ها، عملیات حرارتی در دمای ۵۵۰°C انجام شد. آمونیوم فلوراید نیز به منظور تأمین فلئور برای دست‌یابی به فلئوریدروکسی آپاتیت و فلئورآپاتیت به محلول اضافه شد. تغییرات ساختاری، ریخت‌شناسی پودر، تغییرات شیمیایی و آنالیز فازی و همچنین رفتار *In vitro* پودر به وسیله طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD)، دستگاه زتاسایزر (DLS) و آزمایش کشت سلولی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج مطالعات XRD و FTIR نشان‌دهنده ایجاد ترکیبات آپاتیت در همه نمونه‌هاست. بر اساس نتایج XRD با افزایش مقدار پیش‌ماده دهنده فلئور درصد فاز فلئورآپاتیت، درجه بلورینگی و اندازه بلورک‌ها افزایش یافت. آزمایش FTIR نشان‌دهنده جانشین شدن F⁻ در موقعیت‌های یون OH⁻ و تشکیل فلئوریدروکسی آپاتیت یا فلئورآپاتیت خالص است. نتایج تحلیل SEM نیز بیانگر این است که با افزایش میزان فلئور، تمایل به توده‌ای شدن پودر بیشتر شده است. اندازه ذرات پودر اندازه‌گیری شده با دستگاه زتاسایزر در نمونه‌های مختلف پودر در محدوده ۱۰۰nm تا ۱۶۰nm است. الگوی پراش به دست‌آمده در مطالعات TEM نشان می‌دهد که با افزایش یون فلوراید، درجه بلوری و اندازه بلورک‌ها تا اندازه‌ای افزایش داشته است. اندازه‌گیری مستقیم ابعاد بلورک‌ها در مشاهدات TEM، مقادیری در محدوده ۲۰nm تا ۵۰nm را نشان می‌دهد. نمونه‌های دارای مقادیر بیشتر فلئورآپاتیت، به افزایش تعداد سلول‌ها در آزمایش کشت سلول‌های فیبروبلاست منجر شدند. این امر بیانگر اثر مثبت افزودن فلئور بر رشد سلول‌ها و زیست‌سازگاری پودر فلئوریدروکسی آپاتیت است.

کلیدواژگان: هیدروکسی آپاتیت، فلئوریدروکسی آپاتیت، فلئورآپاتیت، نانوپودر، سل-ژل.

*عهده‌دار مکاتبات

نشانی: شاهرود، بلوار دانشگاه، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده فنی و مهندسی

تلفن: ۰۹۱۲۳۰۴۰۷۸۹، دورنگار: ۰۲۱۸۸۸۲۵۴۴۲، پیام‌نگار: bfarsad@gmail.com

۱- مقدمه

در این پژوهش پودرهای HA، FHA و FA به روش سل-ژل و با به کارگیری مقادیر متفاوت فلئوئور تهیه و تغییرات ساختاری، ریخت‌شناسی پودر، تغییرات شیمیایی و آنالیز فازی و همچنین رفتار In vitro پودر به وسیله طیف‌سنجی مادون قرمز^۴ (FTIR)، میکروسکوپ الکترونی روبشی^۵ (SEM)، میکروسکوپ الکترونی عبوری^۶ (TEM)، آنالیز پراش اشعه ایکس^۷ (XRD)، دستگاه زتاسایزر^۸ و آزمایش کشت سلولی مورد بررسی قرار گرفتند.

۲- روش آزمایش:

برای تهیه پودر HA ابتدا تری‌اتیل فسفیت (TEP) $[(C_2H_5O)_3P]$ مرک^۹ در اتانل و مقدار کمی آب مقطر هیدرولیز شد. در ظرف جداگانه‌ای نیز نترات کلسیم آب‌دار $[Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O]$ مرک^۹ در اتانل حل شد و سپس محلول‌های حاصل با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۲۴ ساعت هم‌زده شدند. محلول حاوی کلسیم به صورت قطره‌قطره به محلول حاوی فسفر اضافه گردید ($Ca/P=1/67$) و سل حاصل به مدت ۷۲ ساعت در دمای محیط و ۲۴ ساعت در دمای $40^\circ C$ پیرسازی شد [۱۸]. پس از خشک‌کردن نمونه‌ها در دمای $80^\circ C$ عملیات حرارتی نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای $550^\circ C$ در هوا انجام شد. مشخصات نمونه‌های تهیه‌شده در این تحقیق در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- نمونه‌پودرهای سنتز شده بر حسب نسبت فلئوئور به فسفر

ترکیب	نسبت فلئوئور به فسفر (F/P)	نمونه
۱۰۰٪ HA	۰	HA
۷۵٪ HA، ۲۵٪ FA	$\frac{1}{12}$	HA-25FA
۵۰٪ HA، ۵۰٪ FA	$\frac{1}{6}$	HA-50FA
۲۵٪ HA، ۷۵٪ FA	$\frac{1}{4}$	HA-75FA
۱۰۰٪ FA	$\frac{1}{3}$	FA

ترکیبات کلسیم فسفات‌های از جمله هیدروکسی‌آپاتیت (HA) $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ ، به دلیل شباهت ترکیب شیمیایی و ساختار بلوری با بافت سخت بدن انسان، به طور گسترده‌ای به عنوان کاشتنی و مواد ترمیم‌کننده در استخوان و دندان کاربرد دارند [۱، ۲]. تشابه شیمیایی HA با استخوان عامل مهمی است که تحریک زیست‌فعالی، رشد استخوان و اثرات درمانی را می‌توان به آن نسبت داد [۳]؛ ولی با توجه به خواص مکانیکی ضعیف بدنه‌های HA، این ماده فقط در محل‌هایی استفاده می‌شود که متحمل نیرو نباشند.

هیدروکسی‌آپاتیت به‌عنوان پوشش بر روی کاشتنی‌های فلزی نیز به کار می‌رود. از طرفی جذب و تجزیه HA ممکن است بر عمر و قابلیت اطمینان کاشتنی‌ها اثر بگذارد و در نهایت به شکست آنها منجر شود [۳]. زمانی که یون فلئوئور وارد ساختار هیدروکسی‌آپاتیت می‌شود، با جانشینی F^- با OH^- ترکیباتی نظیر فلئوئوریدروکسی‌آپاتیت (FHA) $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH,F)]$ و فلئوئورآپاتیت (FA) $[Ca_{10}(PO_4)_6(F)_2]$ به دست می‌آیند. یون F^- فرایند کانی‌شدن و بلوری‌شدن کلسیم فسفات را در فرایند تشکیل استخوان تشویق نموده [۴، ۵] و پایداری شیمیایی آن را افزایش می‌دهد [۶]. با وجود مزایای زیاد FA و FHA، تحقیقات کمی در مورد بررسی ویژگی‌های ساختاری، فازی و زیست‌سازگاری آنها صورت گرفته است [۷-۱۰]. بیشتر تحقیقات درباره امکان تهیه پودرهای FA با روش‌های رسوبی و یا فیلم‌های FA با روش‌های اسپری‌حرارتی انجام شده‌اند [۱۱-۱۳]. با وجود این ویژگی‌ها، کیفیت فیلم‌ها و پودرها به دلیل تشکیل مواد ناخواسته و جانبی چندان رضایت‌بخش نیستند [۱۳].

سنتز پودر HA در سال‌های اخیر با روش‌های مختلفی چون هیدروترمال^۱، هم‌رسوبی^۲، سل-ژل^۳ و ... انجام شده است [۱۴-۱۷]. در بین این روش‌ها، سل-ژل از مزایای متعددی نظیر خلوص زیاد، ترکیب همگن، اندازه ذرات کوچک‌تر محصول و دمای سنتز کم نسبت به روش‌های دیگر برخوردار است.

^۱ Hydrothermal^۲ Co-Precipitation^۳ Sol-Gel^۴ Fourier Transform InfraRed^۵ Scanning Electron Microscopy^۶ Transmission Electron Microscopy^۷ X-Ray Diffraction^۸ Zeta Sizer^۹ Merck

اندازه بلورکهای آپاتیت با روش‌های زیر مطالعه شد:

۱. محاسبه تقریبی با استفاده از رابطه شرر^{۱۳} (معادله ۲) [۲۰]:

$$X_G = 0.9 \lambda / FWHM \cdot \cos \theta \quad (۲)$$

در این رابطه X_G اندازه بلورک در مقیاس نانومتر، K عامل شکل برابر با ۰/۹، λ طول موج اشعه ایکس مساوی ۰/۱۵۴۰۵۱ nm، θ زاویه براگ^{۱۴} مربوط به قله ناشی از پراش بر حسب درجه و FWHM^{۱۵} نیز عرض قله پراش در نصف ارتفاع مربوط به نمونه بر حسب رادیان است.

۲. بررسی مستقیم با TEM (فیلیپس^{۱۶}، CM200FEG).

۳. سنجش اندازه ذرات پخش شده در شرایط عملکرد دستگاه زتاسایزر (مالورن اینسترومنت^{۱۷} HAS300)

برای بررسی ریزساختار پودرهای سنتز شده از SEM (فیلیپس، XL30، ساخت هلند) استفاده شد و تصاویر هر یک از آنها در بزرگنمایی‌های مختلف گرفته شد.

در نهایت برای بررسی رفتار In vitro از سلول‌های فیروبلاست L929 موش به منظور کشت در مجاور پودرهای سنتز شده استفاده شد. سلول‌ها به مدت ۴ روز در مجاور پودرها در بشقاب‌هایی^{۱۸} از جنس پلی‌استایرن کشت داده شدند. محیط کشت شامل RPMI-1640+10% Fetal Bovine serum + 50 mg/ml Streptomycin + 50 IU/ml Penicillin انتخاب شد و از میکروسکوپ معادل^{۱۹} با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر برای مشاهده و بررسی سلول‌ها استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تغییرات فازی

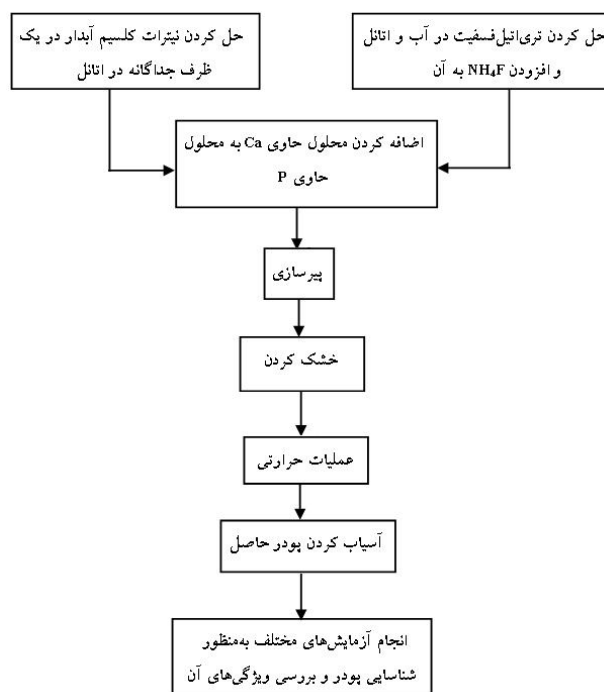
تغییرات فازی پودرهای HA، FHA و FA کلسینه شده در دمای ۵۵۰°C به وسیله آنالیز XRD مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۲). در همه نمونه‌ها اغلب قله‌های اصلی مربوط به فاز آپاتیت از جمله قله‌های (۲۱۱)، (۰۰۲) و (۳۰۰) به وضوح دیده می‌شوند.

به دلیل تشابه زیاد ساختار بلوری و ابعاد واحد شبکه، همه قله‌های HA و FA به طور دقیق قابل تمایز از یکدیگر نیستند [۱]. در مقایسه بین HA خالص و FA خالص مشاهده

نمونه‌های HA-25FA، HA-50FA، HA-75FA و FA با انحلال پیش‌ماده آمونیوم فلوراید (NH₄F؛ مرک) در اتانل بر اساس نسبت مولی فلئوئور به فسفر (F/P) تهیه شدند. نسبت F/P در این نمونه‌ها به ترتیب ۱/۱۲، ۱/۶، ۱/۴ و ۱/۳ در نظر گرفته شد. شکل ۱ مراحل تهیه پودر را نشان می‌دهد. تغییرات ساختاری پودرهای HA، FHA و FA با استفاده از آنالیز FTIR (بروکر، وکتور^{۱۲}، ساخت آلمان) و در محدوده طیف ۴۰۰۰-۵۰۰ cm⁻¹ بررسی شدند. تغییرات فازی پودرها نیز با استفاده از آنالیز XRD (زیمنس^{۱۱}، D5۰۰، ساخت آلمان) بررسی شد و از طول موج اشعه ایکس CuK α برابر با ۱/۵۴۰۵۶ Å با سرعت زاویه‌ای ۲°C/min استفاده شد. درجه بلوری پودر (X_C) نیز بر اساس نتایج XRD و با استفاده از معادله (۱) به دست آمد [۱۹].

$$X_C = 1 - (V_{112/300}/I_{300}) \quad (۱)$$

که در این رابطه X_C درجه بلوری پودر، $V_{112/300}$ شدت عمق بین قله‌های^{۱۲} پراش (۱۱۲) و (۳۰۰) و I_{300} شدت قله (۳۰۰) است.



شکل ۱- نمودار تهیه پودر فلئوئورهیدروکسی آپاتیت به روش

سل-ژل

¹⁰ Bruker, Vector 33

¹⁴ Bragg

¹⁸ Plate

¹¹ Siemens

¹⁵ Full width at half maximum

¹⁹ Invert

¹² Peak

¹⁶ Philips

¹³ Scherrer

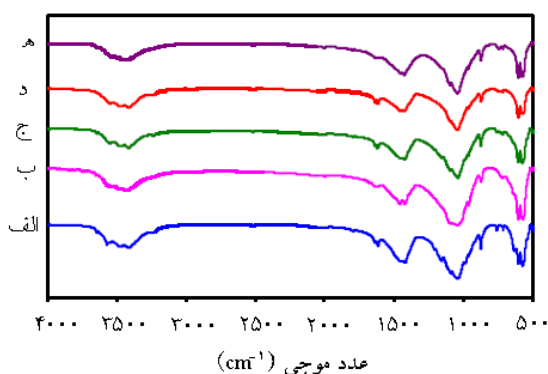
¹⁷ Malvern Instrument Co.

جاننشینی F^- با OH^- باعث انقباض و فشردگی در اندازه محور a شده ولی تغییر قابل توجهی را در اندازه محور c به همراه ندارد [۸، ۲۱، ۲۲]. در تحقیقات مشابهی نیز نشان داده شده است که در نمونه FA خالص حاوی فلوئور با نسبت فسفر به فلوئور برابر ۳، اندازه محور a از $9/42A^\circ$ در HA خالص به $9/37A^\circ$ کاهش می‌یابد [۲۲، ۲۳]. درجه بلوری هر یک از نمونه‌ها نیز با استفاده از معادله (۱) محاسبه شد که نتایج آن در جدول ۲ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش میزان فلوئور و متعاقباً درصد فلوئورآپاتیت، درجه بلوری نیز افزایش می‌یابد که احتمالاً به این دلیل است که همسایگی نزدیک‌تر F^- (شکل متقارن) در مقایسه با OH^- (شکل نامتقارن، دو اتمی) به کلسیم میسر می‌شود [۲۵]. به طور تجربی نیز مشاهده شده است که افزایش درجه بلورینگی به ویژه در جهت محور c در ساختار آپاتیتی که از مقدار یون فلوئور بیشتری برخوردار است در مراجع دیگر نیز گزارش شده است [۱۰، ۱۹، ۲۴].

حضور یون فلوئور در ساختار آپاتیت، به بلوری شدن ساختار آپاتیت به‌ویژه در جهت محور c منجر می‌شود [۱۰، ۱۱]. افزایش درجه بلوری منجر به پایداری بیشتر و حلالیت کمتر در محیط‌های بیولوژیکی می‌شود [۲۱].

۲-۳- تغییرات ساختاری

تغییرات ساختاری نمونه پودرها به وسیله FTIR بررسی شد که در شکل ۳ مشاهده می‌شود.

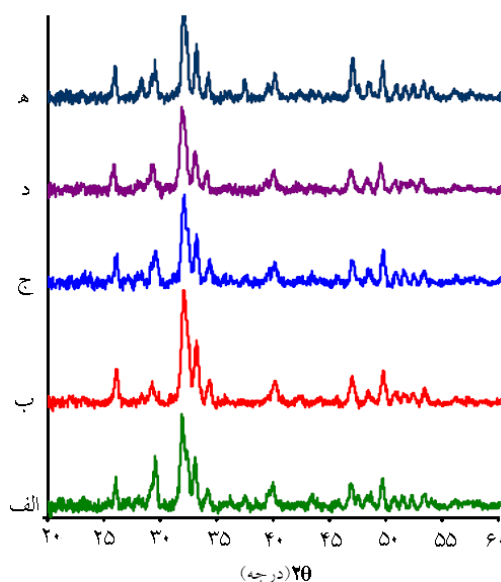


شکل ۳- FTIR از نمونه پودرهای: الف) HA؛ ب) HA-25FA؛ ج) HA-50FA؛ د) HA-75FA؛ ه) FA

می‌شود که قله FA نسبت به HA به سمت راست منتقل شده است. طیف‌های XRD نشان می‌دهند که در دمای عملیات ($550^\circ C$)، تنها فازهای فلوئورآپاتیت و هیدروکسی‌آپاتیت به دست‌آمده است (جدول ۲). همان‌طور که در شکل ۲ مشخص است قله‌های ویژه فلوئورآپاتیت با افزایش مقدار فلوئور افزایش یافته است. اندازه بلورک‌های محاسبه‌شده (X_s) با استفاده از معادله شرر (معادله ۲) در جدول ۲ آورده شده است. هر چند که این محاسبه تقریبیست ولی همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود اندازه بلورک‌ها با افزایش میزان فلوئور به سمت فلوئور هیدروکسی‌آپاتیت و فلوئورآپاتیت تا اندازه‌ای بزرگ‌تر می‌شود.

جدول ۲- ترکیب فازی، اندازه بلورک‌ها و درجه بلوری نمونه‌ها

نمونه	هیدروکسی آپاتیت (%)	فلوئورآپاتیت (%)	اندازه بلورک (nm)	درجه بلوری (%)
HA	۹۸/۲	-	۹/۷۲	۷۲/۱۴
HA-25FA	۷۴/۸	۲۴/۲	۱۲/۰۳	۷۲/۷۷
HA-50FA	۵۲	۴۸	۱۲/۵۴	۷۷/۶۰
HA-75FA	۲۶/۳	۷۳	۱۳/۷۷	۸۲/۱۷
FA	-	۹۸/۹	۱۶/۵۴	۹۲/۱۲



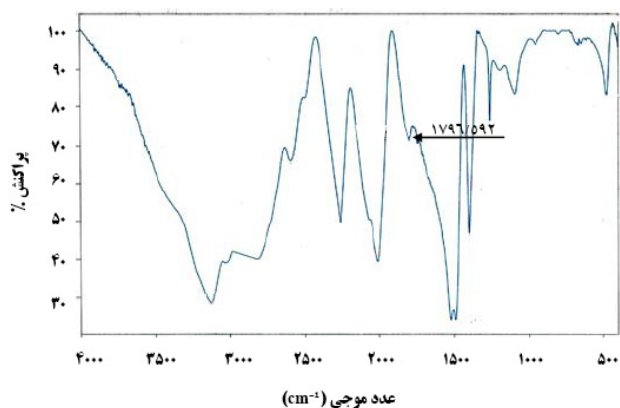
شکل ۲- منحنی‌های پراش اشعه ایکس نمونه‌های: الف) HA؛ ب) HA-25FA؛ ج) HA-50FA؛ د) HA-75FA؛ ه) FA

هیدروکسیل است. حضور گروه‌های هیدروکسیل به دلیل پیوند هیدروژنی با یون‌های فلئور است. این قله تأییدکننده ساختار بلور اصلی فلئورآپاتیت با آثار جانیشینی گروه‌های هیدروکسیل است [۱].

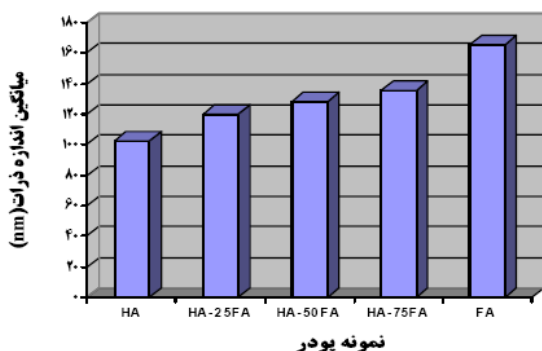
با مقایسه طیف‌های نمونه‌ها با طیف آمونیوم فلوراید خالص (شکل ۴)، این نتیجه به دست آمد که در بعضی نمونه‌ها فقط مقدار بسیار اندکی پیش‌ماده آمونیوم فلوراید باقی‌مانده بود که در قله 1796cm^{-1} قابل مشاهده است.

۳-۳- توزیع اندازه ذرات

برای تعیین توزیع اندازه DLS ذرات از دستگاه زتاسایزر (مالورن اینسترومنت ۳۰۰۰، HAS) استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده، میانگین اندازه ذرات پودر با افزایش مقدار یون فلئور از 102nm تا 166nm افزایش را نشان می‌دهد (شکل ۵).



شکل ۴- طیف FTIR از آمونیوم فلوراید خالص



شکل ۵- نمودار میانگین اندازه ذرات پودر در نمونه‌های مختلف

ساختار آپاتیت در همه نمونه‌ها با پیوند ارتعاشی P-O (610cm^{-1} - 560cm^{-1} و 1100cm^{-1} - 1000cm^{-1}) مشاهده می‌شود. قله پهن مشاهده شده در محدوده 3800cm^{-1} و 2600cm^{-1} مربوط به پیوند کششی OH است. همان‌طور که مشاهده می‌شود این قله به تدریج با افزایش میزان فلئور در ترکیب، اندکی کوچک‌تر و پهن‌تر می‌شود و همچنین کمی به سمت فرکانس‌های بالاتر جابه‌جا می‌شود. می‌توان گفت با افزایش میزان فلئور، F جانشین OH در ساختار هیدروکسی آپاتیت شده و عامل این تغییر است. قله کوچک مابین 3536cm^{-1} - 3545cm^{-1} در FA مربوط به تشکیل باند OH-F (پیوند غیرهیدروژنی کششی OH) است که نشان‌دهنده نفوذ یون F به داخل شبکه آپاتیت است. همچنین قله 1635cm^{-1} مربوط به پیوند خمشی آب است که با افزایش میزان فلئور کوچک‌تر و ضعیف‌تر می‌شود. قله مربوط به OH آپاتیت در 627cm^{-1} در HA خالص به وضوح مشخص است که به تدریج با افزایش F در ساختار آپاتیت در نمونه‌های FHA تقریباً محو شده و در کاملاً از بین رفته است. با توجه به نتایج تحقیقات رودریگو [۲۵] که اختلاف اصلی بین هیدروکسی آپاتیت و فلئور آپاتیت را در محدوده 365cm^{-1} - 350cm^{-1} می‌داند، قله 3570cm^{-1} در نمونه HA خالص مربوط به باند ν_1 OH هیدروکسی آپاتیت و قله‌های مشاهده شده در 3536cm^{-1} - 3545cm^{-1} در ترکیب FHA مربوط به باند ν_1 OH است. قله بزرگ و پهن بین 1100cm^{-1} و 900cm^{-1} مربوط به PO_4^{3-} است. پیوندهای کششی و خمشی PO_4^{3-} در 561 ، 572 ، 560 و 600cm^{-1} به صورت قله‌های بزرگی ظاهر شده‌اند. قله 956cm^{-1} را نیز می‌توان به ارتعاش $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ در فلئور هیدروکسی آپاتیت و فلئور آپاتیت نسبت داد [۲۶].

مشاهده دقیق طیف نشان می‌دهد قله‌هایی در حدود 1400cm^{-1} - 1500cm^{-1} دیده می‌شوند که مربوط به گروه کربنات‌ها هستند. به نظر می‌رسد که به سمت FA کمی عمق آن کمتر شده و همچنین در نمونه HA-75FA مشاهده می‌شود که در این سیستم کربنات بیشتری از پیش‌ماده‌ها و یا به دلیل جذب شیمیایی CO_2 محیط وجود دارد. در قله 3545cm^{-1} پیوند کششی مشاهده می‌شود که تعیین‌کننده حضور گروه‌های

²⁰ Rodrigo

²¹ Dynamic Light Scattering

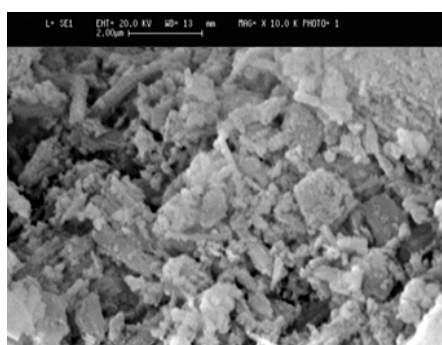
بررسی و با یکدیگر مقایسه شدند. شکل ۶ تصاویر SEM از پودرها را در بزرگنمایی ۱۰۰۰۰ برابر نشان می‌دهد. در این تصاویر مشاهده می‌شود که ذرات تشکیل شده‌اند. این ذرات به شکل کروی هستند که در بعضی نقاط به صورت توده‌ای شکل درآمده‌اند. همان‌طور که مشاهده می‌شود ذرات کروی شکل آپاتیت در برخی نقاط توده‌ای هستند که با افزایش میزان فلوئور و درصد فلوئورآپاتیت، میزان توده‌ای شدن پودر بیشتر شده است. شایان ذکر است که ذرات ریز و ذرات بزرگ متشکل از ذرات ریزتر در شرایط آزمایش زتاسایزر به خوبی از یکدیگر جدا شده‌اند.

با مقایسه تصاویر TEM و اندازه ذرات حاصل از این روش، افزایش اندازه ذرات را می‌توان به تمایل بلورک‌ها به تشکیل خوشه‌های بزرگ‌تر نسبت داد. از سوی دیگر باید اشاره کرد که با توجه به توزیع بسیار یکنواخت اندازه ذرات، چسبندگی آنها به یکدیگر یکسان بوده و در شرایط این آزمایش به طور تقریباً برابر از یکدیگر جدا شده‌اند.

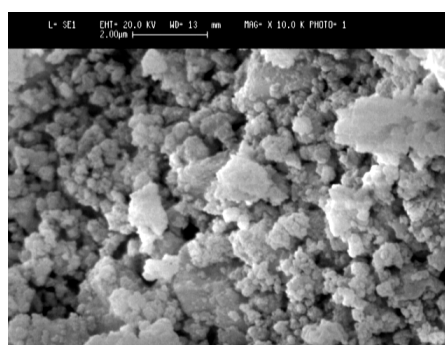
۳-۴- ریخت‌شناسی پودر

۳-۴-۱- میکروسکوپ الکترونی روبشی

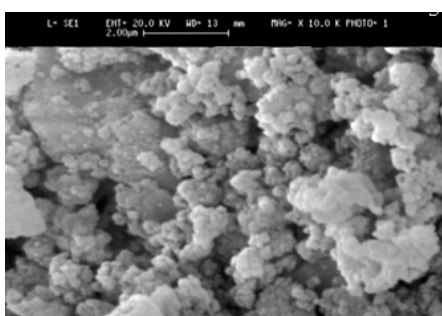
برای بررسی ریخت‌شناسی نمونه‌ها، تصاویر SEM از پودرها تهیه شد و هر یک از نمونه‌ها در بزرگنمایی‌های مختلف



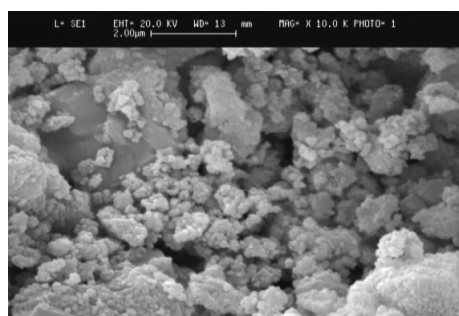
ب



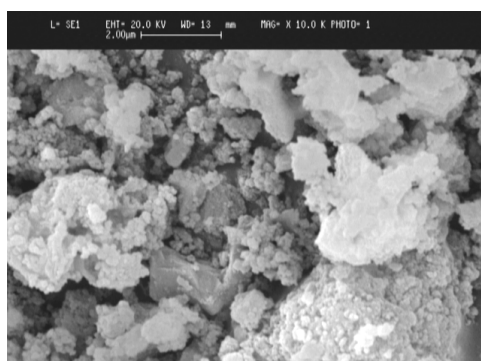
الف



د



ج



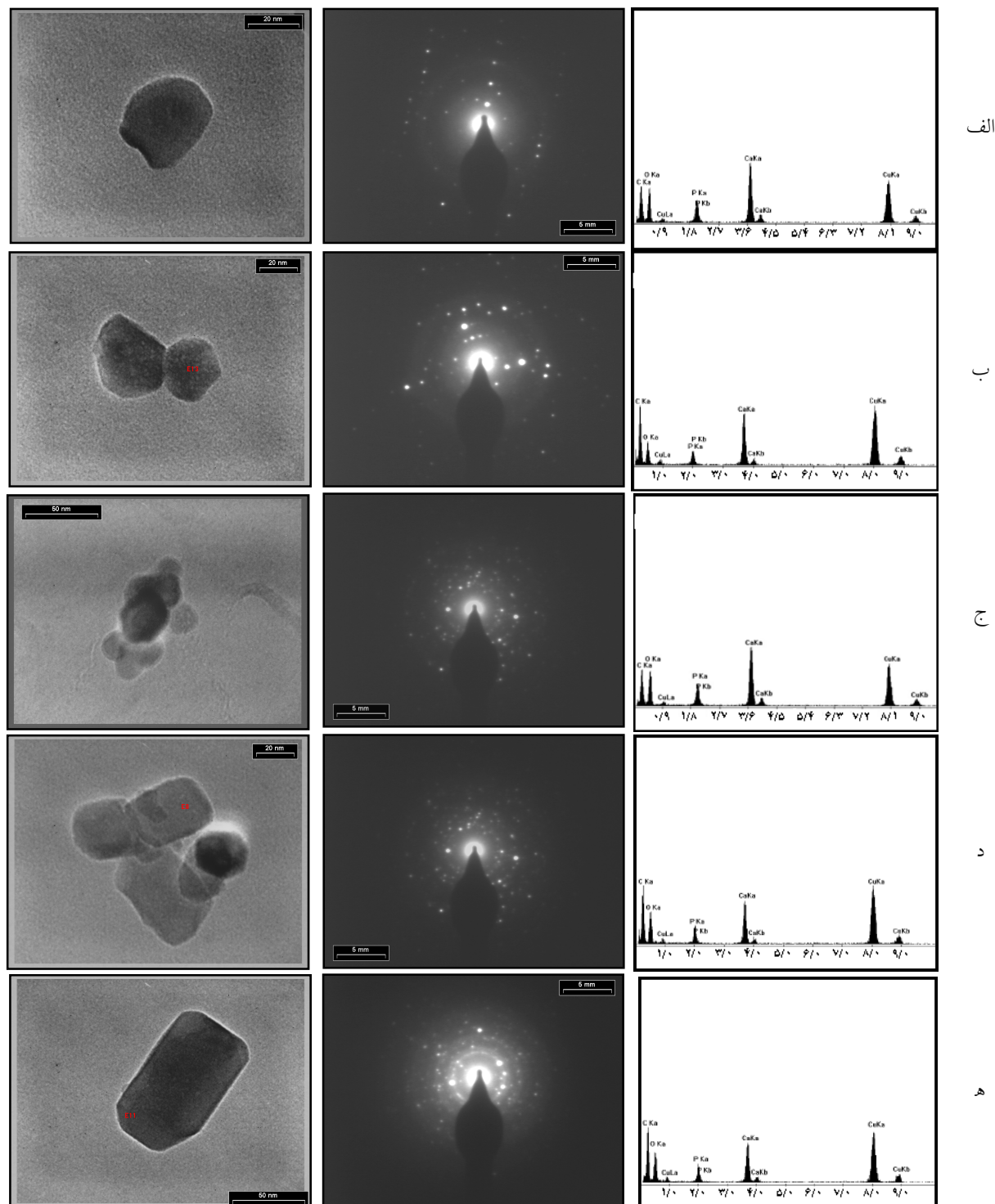
ه

شکل ۶- تصاویر SEM با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰ برابر از نمونه‌های: الف) HA؛ ب) HA-25FA؛ ج) HA-50FA؛ د) HA-75FA؛ ه) FA

۲-۴-۳- میکروسکوپ الکترونی عبوری

شکل ۷ (الف تا ه) به ترتیب تصاویر TEM، الگوی پراش و ^{۲۲}EDXA نمونه پودرهای HA، HA-25FA، HA-50FA و HA-75FA را نشان می‌دهد. بر اساس تصاویر

میکروسکوپ الکترونی عبوری با افزایش یون فلوراید، درجه بلوری و اندازه بلورک‌ها تا اندازه‌های افزایش داشته است. اندازه‌گیری مستقیم ابعاد ذرات در مشاهدات TEM، مقادیری در محدوده ۲۰nm تا ۵۰nm را نشان می‌دهد.



شکل ۷- به ترتیب از راست به چپ تصاویر EDXA، الگوی پراش و میکروسکوپ الکترونی عبوری از نمونه پودرهای: الف) HA؛ ب) HA-25FA؛ ج) HA-50FA؛ د) HA-75FA؛ ه) FA

سلول‌های فیروبلاست موش از نوع L929 به مدت ۴ روز بر روی پودرها در بشقاب‌هایی از جنس پلی‌استایرن کشت داده شدند که پس از بررسی با میکروسکوپ معادل نتایج شایان توجهی به دست آمد (شکل ۸). شایان ذکر است قبل از انجام آزمایش ابتدا تمام پودرها به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل شدند و سپس مورد کشت قرار گرفتند. به منظور تهیه نمونه شاهد نیز، از کشت سلول‌ها در محیط کشت بدون حضور پودر استفاده شد.

نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهند که سلول‌های فیروبلاست بر روی تمام نمونه‌های پودر به دست آمده با هر میزان فلئوئر در ترکیب، نسبت به نمونه شاهد رشد مناسبی داشته‌اند و نمونه‌های دارای مقادیر بیشتر فلئوئرآپاتیت به افزایش تعداد سلول‌ها در آزمایش کشت سلول‌های فیروبلاست منجر شدند. این امر بیانگر اثر مثبت افزودن فلئوئر بر رشد بیشتر سلول‌ها و افزایش زیست‌سازگاری پودر فلئوئرویدروکسی‌آپاتیت و فلئوئرآپاتیت است. کیو چنگ^{۳۳} و همکاران نیز طی تحقیقات مشابهی نشان دادند که در پوشش‌های HA/FA با افزایش میزان فلئوئر و متعاقباً فلئوئرآپاتیت، سلول‌ها رشد بیشتری را نشان می‌دهند که این امر با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد [۲۴].

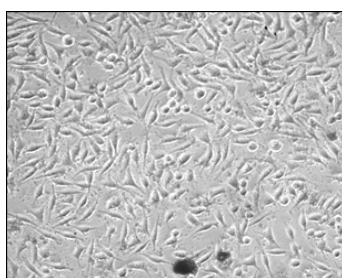
همچنین مشاهده می‌شود که در الگوی پراش پودرها با افزایش مقدار فلئوئر شدت پراش نور از صفحات بلوری بیشتر شده که نشان‌دهنده افزایش درجه بلوری پودرهاست. طبق مشاهدات، اندازه بلورک‌ها در نمونه‌های حاوی فلئوئر اندکی بزرگ‌تر از HA است. نتایج به دست آمده از آنالیز XRD و همچنین آنالیز زتاسایزر نیز این ادعا را تأیید می‌کنند. بنابراین بر اساس نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری، اندازه بلورک‌ها و میزان درجه بلوری نمونه‌ها در مقایسه به صورت زیر است:



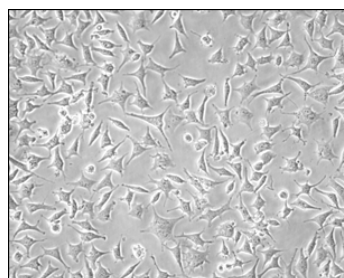
نتایج EDXA نیز در همه نمونه‌ها حاکی از حضور عناصر کلسیم و فسفر است به طوری که در کلیه نمونه‌ها نسبت مقدار فلئوئر به فسفر بین ۱/۶۵ تا ۱/۶۷ به دست آمد (شکل ۶). شایان ذکر است اصولاً نتایج آزمایش EDXA حاصل از TEM را نمی‌توان به‌عنوان ترکیب شیمیایی دقیق ماده در نظر گرفت. بر اساس نتایج آزمایش شیمی تر، نسبت کلسیم به فسفر در همه نمونه‌ها در حدود ۱/۶۷ به دست آمد.

۵-۳- رفتار *In vitro*

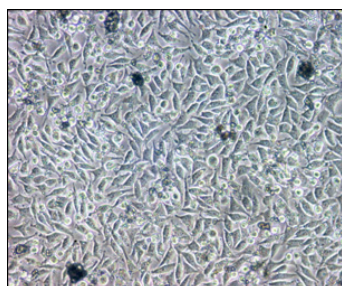
به منظور بررسی رفتار *In vitro* پودرهای حاصل و مقایسه آنها با یکدیگر در نسبت‌های مختلف فلئوئر به فسفر،



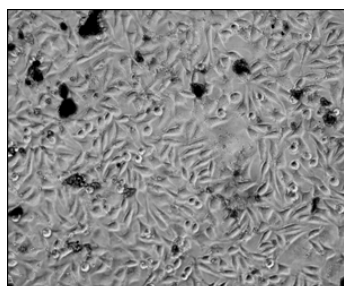
ب



الف



د



ج

شکل ۸- تصاویر (در بزرگنمایی ۲۰۰ برابر) حاصل از کشت سلول‌های فیروبلاست موش (L929) روی پودرهای سنتز شده در مقادیر

متفاوت فلئوئر که ۱۵ دقیقه استریل شده‌اند: الف) نمونه شاهد؛ ب) HA؛ ج) HA-50FA؛ د) FA

۴- نتیجه گیری

مراجع

- [1] Hench L.L. and Ethridge E. C., *Biomaterials: An Interfacial Approach*. Academic Press, New York, 1982.
- [2] Legeros R. Z., *Apatites in Biological Systems*, Prog. Cryst. Growth Charact., 1981; 4: 1-45 .
- [3] Denissen H. W., Kalk W., Nieuport H. M., Mangano C., and Maltha J. C., *Preparation-Induced Stability of Bioactive Apatite Coatings*, Int. J. Prosthodont., 1991; 4: 432-39.
- [4] Legeros RZ., Silverstone LM., Daculsi G., Kerebel LM., *In vitro caries-like lesion formation in F-containing tooth enamel*, J Dent Res, 1985; 62: 138-44.
- [5] Aoba T., *The effect of fluoride on apatite structure and growth*, Crit Rev Oral Biol, 1997; 8 (2):136-53.
- [6] Moreno E. C., Kresak M., and Zahradnik R. T., *Fluoridated Hydroxyapatite Solubility and Caries Formation*, Nature (London), 1974; 247: 64-65.
- [7] Hae-Won Kim, Long-Hao Li, Young-Hag Koh, Jonathan C. Knowles, and Hyoun-Ee Kim, *Sol-Gel Preparation and Properties of Fluoride-Substituted Hydroxyapatite Powders*, J. Am. Ceram. Soc., 2004; 87: 1939-1944.
- [8] Kim H.-W., Koh Y.-H., Yoon B.-H., and Kim H.-E., *Reaction Sintering and Mechanical Properties of Hydroxyapatite-Zirconia Composite with CaF₂ Additions*, J. Am. Ceram. Soc., 2002; 85 (6): 1634-36.
- [9] H.-W. Kim, Y.-M. Kong, Y.-H. Koh, H. E. Kim, H.-M. Kim, and J. S. Ko, *Pressureless Sintering, Mechanical and Biological Properties of Fluorhydroxyapatite Composites with Zirconia*, J. Am. Ceram. Soc., 2003; 86 (12): 2019-26.
- [10] Okazaki M., Miake Y., Tohda H., Yanagisawa T., and Takahashi J., *Differences in Solubility of Two Types of Heterogeneous Fluoridated Hydroxyapatites*, Biomaterials, 1998;19: 611-16.
- [11] Joa L. J., Best S. M., Knowles J. C., Rehman I., Santos J. D., and Bonfield N., *Preparation and Characterization of Fluoride-Substituted Apatites*, J. Mater. Sci. Mater. Med., 8: 185-91.
- [12] Schwarz James A., Contescu Cristian I., Putyera K., *Dekker Encyclopedia of nanoscience and Nanotechnology*, 2004; 13: 1797-2676.
- [13] Overgaard S., Lind M., Grundvig H., Biinger C., and Soballe K., *Hydroxyapatite and Fluorapatite Coatings for Fixation of Weight Loaded Implants*, Clin. Orthop. Rel. Res., 1997; 336: 286-96.
- [14] Slosarczyk A., Stobierska E., Paszkiewicz Z., and Gawlick M., *Calcium Phosphate Materials Prepared from Precipitates with Various Calcium: Phosphorus Molar Ratios*, J. Am. Ceram. Soc., 1996; 79 (10): 2539-44.
- [15] Yoshimura M., Suda H., Okamoto K., and Ioku K., *Hydrothermal Synthesis of Biocompatible Whiskers*, J. Mater. Sci., 1994; 29: 3399-402.
- [16] Weng W. and Baptista J. L., *Sol-Gel Derived Porous Hydroxyapatite Coatings*, J. Mater. Sci. Mater. Med., 1998; 9: 159-63.
- [17] Liu D.-M., Troczynski T., and Tseng W. J., *Water-Based Sol-Gel Synthesis of Hydroxyapatite: Process Development*, Biomaterials, 2001; 22: 1721-30.
- [18] Joughedoust S., Behnamghader A., and Manafi S., *Effect of Aging Temperature on Formation of Sol-Gel Derived Fluor-Hydroxyapatite Nanoparticles*, J. Nanosci and Nanotech, 2010; 10: 2892-96.

پودرهای هیدروکسی آپاتیت، فلئوئور هیدروکسی آپاتیت و فلئوئور آپاتیت به طور موفقیت آمیزی به وسیله روش سل-ژل و با استفاده از مقادیر مختلف یون فلئوئور به دست آمدند. جانشینی یون F^- با OH^- توسط نتایج FTIR در دمای $550^\circ C$ برای نمونه‌های مختلف به اثبات رسید. نتایج XRD، دستیابی به فازهای هیدروکسی آپاتیت، فلئوئور هیدروکسی آپاتیت و فلئوئور آپاتیت را نشان می‌دهند. اندازه بلورکها و درجه بلوری پودرها با افزایش میزان جانشینی یون F^- در ساختار به جای OH^- ، افزایش می‌یابد که نتایج حاصل از آزمایش XRD و TEM نیز این مطلب را تأیید می‌کنند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان می‌دهند که با افزایش یون فلوراید، درجه بلوری و اندازه بلورکها تا اندازه‌ای افزایش داشته است و اندازه‌گیری مستقیم ابعاد بلورکها در مشاهدات میکروسکوپی الکترونی عبوری، مقداری در محدوده 20nm تا 50nm را نشان می‌دهد. در آزمایش SEM مشاهده شد که با افزایش میزان فلئوئور و درصد فلئوئور آپاتیت، اندازه دانه‌ها تا اندازه‌ای بزرگ‌تر شده و همچنین میزان توده‌ای شدن پودر نیز افزایش یافته است.

بر اساس نتایج آزمایش کشت سلولی، سلول‌های فیبروبلاست بر روی تمام نمونه پودرهای به دست آمده با هر میزان فلئوئور در ترکیب، رشد مناسبی داشته و مقادیر بیشتر فلئوئور آپاتیت منجر به افزایش تعداد سلولها در آزمایش کشت سلول‌های فیبروبلاست شدند.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان این تحقیق از همکاری‌های ارزشمند متخصصان و مسئولان پژوهشگاه مواد و انرژی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، سازمان زمین شناسی و اکتشافات معدنی کشور، آزمایشگاه تخصصی بیومتریال دانشکده مهندسی پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و همچنین از حمایت‌های ستاد ویژه توسعه فناوری نانو کمال تشکر و قدردانی را ابراز می‌دارند.

- [24] Landi E., Tampieri A., Celotti G., and Sprio S., Densification Behaviour and Mechanisms of Synthetic Hydroxyapatites, *J. Eur. Ceram. Soc.*, 2000; 20: 2377–87.
- [25] Luis M., Rodriguez L, Judy N. H., and Gross K. A., *J. Phys. Chem.*, B107 8316, 2003.
- [26] Chirantha P. R., synthesis and characterization of strontium fluorapatite, Master of Science Degree in Chemistry, Department of Chemistry College of Sciences, Graduate College University of Nevada, Las Vegas, August 2005.
- [27] Cheng K., Weng W., Qu H., Piyi Du., Shen G., Han G., Yang J., F. Ferreira J. M., Sol-gel preparation and in vitro test of fluorapatite/hydroxyapatite films, Department of Material Science and Engineering, Zhejiang University Hangzhou, 310027, China, August 2003.
- [19] Landi E., Tampieri A., Celotti G., and Sprio S., Densification Behaviour and Mechanisms of Synthetic Hydroxyapatites, *J. Eur. Ceram. Soc.*, 2000; 20: 2377–87.
- [20] Jenkins R. and Snyder R. L., *Introduction to X-ray Powder Diffractometry*. John Wiley & Sons, New York, 1996.
- [21] Z. LeGeros R., and P. Legeros J., New York University College of Dentistry, *An introduction to bioceramics*, chapter 9, 2004; 139-14.
- [22] Smith D. K., Calcium Phosphate Apatites in Nature, in *Hydroxyapatite and Related Materials*. Edited by Brown P. W. and Constantz B., CRC Press, London, U.K., 1994: 29–44.
- [23] Elliott J. C., *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1994: 2-8.