

## Investigation of effect of pH and calcination on Synthesis of nanostructured hydroxyapatite (HA) and flour-hydroxyapatite (FHA) by Sol-Gel Method

Zahra Ansari<sup>1</sup>, \*Mehdi Kalantar<sup>2</sup>, Mahshid Kharaziha<sup>3</sup>

1- PhD student, Department of Materials Engineering, Faculty of Mining and materials engineering, Yazd University, Yazd, Iran.

2- Associate professor, Department of Materials Engineering, Faculty of Mining and materials engineering, Yazd University, Yazd, Iran.

3- Assistant professor, Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

**Citation:** Ansari Z, Kalantar M, Kharaziha M. Investigation of effect of pH and calcination on Synthesis of nanostructured hydroxyapatite (HA) and flour-hydroxyapatite (FHA) by Sol-Gel Method. Metallurgical Engineering 2020; 23(1): 49-61 <http://dx.doi.org/10.22076/me.2020.121260.1282>

**doi :** <http://dx.doi.org/10.22076/me.2020.121260.1282>

### **ABSTRACT**

In the past two decades, there has been a growing trend towards the development and use of biomaterials such as hydroxyapatite and fluor-hydroxyapatite. Hydroxyapatite and fluor-hydroxyapatite have good bioactivity in human body and thus have good potential in biological applications. In this study, hydroxyapatite (HA; Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) and flour-hydroxyapatite (FHA; Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(FOH)) nano powders were synthesized with two different methods of adjust pH (without calcinatoion) and calcination by sol-gel processing. The Phase analysis, powder morphology, thermal behaviors, the bonds configuration, functional groups and biological assesment of the sinthesized samples were studied by X-ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Thermo-gravimetric and Differential Thermal Analysis (TG-DTA), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and Cell culture method respectively. The results of XRD analysis and FTIR showed the presence of hydroxyapatite and flour-hydroxyapatite phases. The average crystallite size estimated from XRD patterns using the Scherrer equation increased from 16 and 25 nm at adjust pH method to 34 and 35 nm at 600 C° for hydroxyapatite and flour-hydroxyapatite respectively. The SEM result showed that the nano particle size of the powders increased with fluride substitution. The result of Cell culture indicates that the substitution of fluorine (F) into the hydroxyapatite (HA) crystal has a positive effect on the cell proliferation.

**Keywords:** Hydroxyapatite, Fluor- hydroxyapatite, PH, Nanopowder, Sol-gel.

**Received:** 5 February 2020

**Accepted:** 6 July 2020

\* **Corresponding Author:**

Mehdi Kalantar, PhD

**Address:** Department of Materials Engineering, Faculty of Mining and materials engineering, Yazd University, Yazd, Iran.

**Tel:** +98 (9133513418)

**E-mail:** mkalantar@yazd.ac.ir

## بررسی تاثیر pH و کلسیناسیون بر سنتز نانو کریستال هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت به روش سلزل

زهرا انصاری<sup>۱\*</sup>, مهدی کلانتر<sup>۲</sup>, مهشید خرازیهای اصفهانی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی مواد، دانشکده مهندسی معدن و متالورژی، دانشگاه یزد، یزد، ایران.

۲- دانشیار، گروه مهندسی مواد، دانشکده مهندسی معدن و متالورژی، دانشگاه یزد، یزد، ایران.

۳- استادیار، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

### چکیده

در دو دهه گذشته، توسعه و استفاده از مواد بیولوژیکی مانند هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت روند رو به رشدی داشته است. هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت زیست سازگاری خوبی در بدن انسان‌ها و لذا پتانسیل خوبی در کاربردهای بیولوژیکی دارند. در این پژوهش با به کارگیری روش سلزل، نانو پودر هیدروکسی آپاتیت<sub>(2)</sub> (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>; HA) و فلورهیدروکسی آپاتیت<sub>(2)</sub> (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH, F); FHA) به دو روش متفاوت، تنظیم pH (بدون کلسیناسیون) و انجام عملیات کلسیناسیون سنتز شد. آنالیز فازی، ریخت شناسی پودر، رفتار حرارتی، نوع پیوندها، گروههای عاملی و ارزیابی بیولوژیکی نمونه‌های سنتز شده به ترتیب توسط تفرق اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روشی (SEM)، آنالیز حرارتی (TG-DTA)، آزمون طیف نگاری مادون قرمز (FTIR) و آزمایش کشت سلولی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مطالعات پراش پرتو ایکس و طیف سنجی مادون قرمز نشان دهنده ایجاد فارهای هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت بود. نتایج محاسبات اندازه متوسط بلورک پودرهای سنتز شده نشان داد که برای هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت به ترتیب از ۱۶ و ۲۵ نانومتر برای نمونه‌های تنظیم pH به ۳۴ و ۳۵ نانومتر برای نمونه‌های کلسینه شده در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافته است. نتایج میکروسکوپ الکترونی روشی نیز نشان داد که با جایگزینی یون فلور اندازه متوسط نانوذره‌ها افزایش پیدا کرده است. بر اساس نتایج کشت سلولی نیز جایگزینی یون فلور در کریستال هیدروکسی آپاتیت اثر مثبتی در تکثیر سلول‌ها داشته است.

**واژه‌های کلیدی:** هیدروکسی آپاتیت، فلورهیدروکسی آپاتیت، pH، نانوپودر، سلزل.

دربافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۶ | پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۱۶

### ۱. مقدمه

نقص دندانی، سیستم تحويل دارو و بسته بندی کروماتوگرافی پروتئین / دی ان ای استفاده می‌شود. خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی هیدروکسی آپاتیت بوسیله ترکیب، ساختار، مورفولوژی و اندازه کریستالی آن تعیین می‌شود [۱]. هیدروکسی آپاتیت می‌تواند رشد استخوان را تقویت و بطور مستقیم و قوی با استخوان‌های زنده پیوند و اتصال ایجاد کند [۲]. به عنوان مثال پس از قرار گرفتن ایمپلنت در بدن، با تشکیل لایه‌ای از آپاتیت اتصال شیمیایی قابل قبولی با بافت سخت اطراف تشکیل می‌شود [۳]. جایگزینی آنیون‌های مختلف مانند F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, O<sup>2-</sup> و CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> به جای گروه OH ساختار هیدروکسی آپاتیت را اصلاح می‌کند [۴-۷]. برای مثال جایگزینی یون‌های فلوراید، افزایش درجه کریستالی،

بیوسرامیک‌ها به عنوان انواع بیومواد دندانی، بافت استخوانی و غیره به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است [۸-۱۰]. ظهر و استفاده بالینی از سرامیک‌های زیست فعل موفقیت قابل توجهی است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به فسفات کلسیم، انواع بیوگلاس و انواع سرامیک‌های شیشه ای بخصوص از نوع A-W اشاره نمود. انواع مختلف فسفات کلسیم را می‌توان در پژوهشی استفاده کرد که در این میان هیدروکسی آپاتیت به دلیل شباهت زیاد به ترکیب استخوان و دندان‌ها همواره مورد توجه بوده است [۱۱]. هیدروکسی آپاتیت [HA, Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>] یک ماده زیست فعل است که به دلیل زیست سازگاری خوب در مهندسی بافت استخوانی،

\* نویسنده مسئول:  
دکتر مهدی کلانتر

نشانی: یزد، دانشگاه یزد، دانشکده مهندسی معدن و متالورژی، گروه مهندسی مواد.  
تلفن: ۰۶۲۱ داخلی (۹۱۳۳۵۱۴۱۸) +۹۸  
پست الکترونیکی: mkalantar@yazd.ac.ir

شده است، اما سنتز این دو ماده از طریق تنظیم pH و بدون عملیات کلسینه کردن کمتر مورد توجه پژوهشگران بوده است. اهمیت این موضوع هنگامی نمود پیدا می‌کند که نیاز به سنتز کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت با پلیمرهای طبیعی و یا مصنوعی به صورت درجا باشد (پوشش‌ها و داربست‌های بیوکامپوزیتی) زیرا پلیمرها قابلیت عملیات حرارتی کلسیناسیون در دماهای بالا را ندارند. در پژوهش حاضر از روش سلزل برای سنتز هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت به دو روش متفاوت انجام فرآیند کلسینه کردن و تنظیم pH (بدون کلسینه کردن) استفاده و بصورت پکارچه و منسجم مقایسه‌ای بین پودرهای هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت انجام شد و تاثیر پارامترهایی مثل دما، pH و افزودن یون فلور بر خواص متالورژیکی و بیولوژیکی پودرها بررسی گردید.

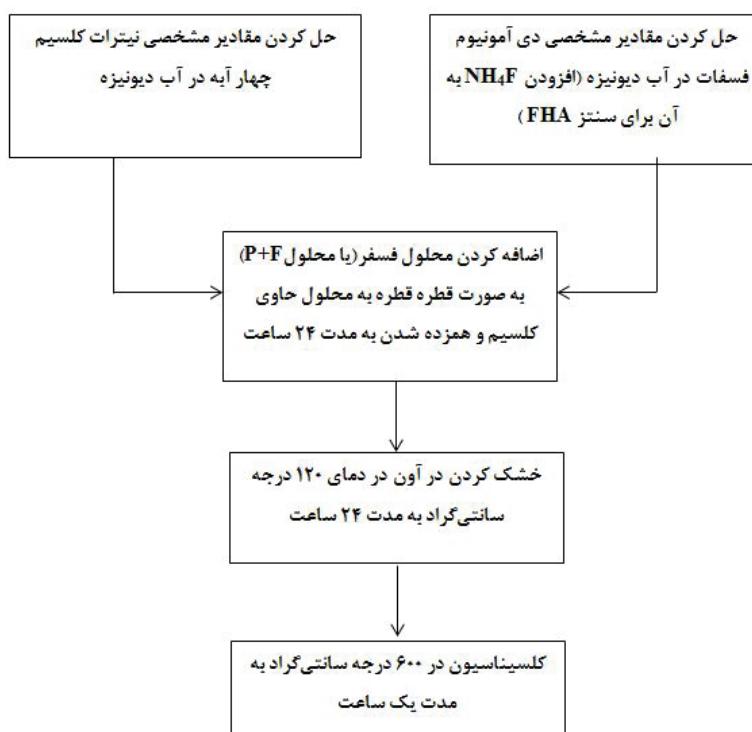
## ۲. مواد و روش تحقیق

نانوذرات هیدروکسی آپاتیت (HA) و فلورهیدروکسی آپاتیت (FHA) به روش سلزل و با استفاده از مواد اولیه پیش‌ساز شامل دی‌آمونیوم‌فسفات ( $\text{NH}_4\text{HPO}_4$ , Merck)، کلسیم‌نیترات‌تتراهیدرات ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Merck), آمونیوم فلوراید ( $\text{NH}_4\text{F}$ , Merck)، آب دیونیزه به عنوان حلال و هیدروکسی آمونیوم ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , Merck) جهت تنظیم pH تهیه شد. پودر هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت به دو روش مختلف، یکی با انجام کلسینه کردن و دیگری بدون کلسینه کردن و فقط با تنظیم pH سنتز شد.

### سنتز پودر هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت با انجام کلسیناسیون

مطابق شکل ۱ جهت سنتز هیدروکسی آپاتیت و دستیابی به نسبت استوکیومتری  $\text{Ca}/\text{P} = ۱/۶۷$  ، ابتدا در دو ظرف جداگانه، مقادیر مشخصی نیترات کلسیم و دی‌آمونیوم فسفات در آب دیونیزه حل شدند. سپس محلول دی‌آمونیوم فسفات قطره قطره به محلول حاوی کلسیم اضافه شد. محلول حاصل در دمای محیط و به مدت ۲۴ ساعت با همزن مغناطیسی هم زده شد تا سل اولیه به ژل با گرانزوی مناسب تبدیل گردید. ژل بدست آمده در دمای  $۱۲۰$  درجه سانتیگراد در آون الکتریکی به مدت ۲۴ ساعت خشک شد تا توده جامدی حاصل شود. ژل خشک شده به صورت دستی در هاون خرد و به صورت پودر درآمد. پودر حاصل به مدت یک ساعت در دمای  $۶۰۰$  درجه سانتیگراد کلسینه شده و پس از آن به کمک آسیاب دستی به ذرات بسیار ریز شکسته شد. جهت تهییه فلورهیدروکسی آپاتیت نیز دقیقاً مشابه روش بالا انجام شد با این تفاوت که مقدار مشخصی از آمونیوم فلوراید در محلول دی‌آمونیوم فسفات به نسبت استوکیومتری

پایداری حرارتی و کاهش بلورک‌ها را باعث می‌شود. آپاتیت بیولوژیکی غیر استوکیومتری بوده و بلورک‌های آن در استخوان در مقیاس نانومتری با میانگین اندازه  $۲۵ \text{ nm}$  در عرض و  $۵۰ \text{ nm}$  نانومتر در طول می‌باشند. در نتیجه، تحقیقات درباره اندازه بلورک و مورفلوژی فلورهیدروکسی آپاتیت مصنوعی  $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH},\text{F})_2)$  در مقیاس نانو برای پیشبرد برنامه‌های کاربردی بیولوژیکی بسیار مهم است [۵]. تجزیه بیولوژیکی هیدروکسی آپاتیت (HA) تحت شرایط فیزیولوژیکی، فصل مشترکی بین هیدروکسی آپاتیت و استخوان ناپایدار ایجاد می‌کند. در فلورهیدروکسی آپاتیت (FHA)، که یون  $\text{F}^-$  به طور ناقص جایگزین گروه هیدروکسیل در هیدروکسی آپاتیت است با حلالت ماده جایگزین جهت ترمیم استخوان استفاده می‌شود [۱۰]. همچنین فلورهیدروکسی آپاتیت در مقایسه با هیدروکسی آپاتیت، پایداری فیزیکی، شیمیایی و مقاومت در برابر انحلال بیشتری در محیط اسیدی از خود نشان می‌دهد [۱۱] علاوه بر این استحکام مکانیکی بالاتر فلورهیدروکسی آپاتیت استفاده از آن را در کاربردهای دندانی افزایش داده است [۱۲]. تحقیقات نشان می‌دهد یون فلور از پوسیدگی دندان در محیط اسیدی حاوی باکتری جلوگیری کرده لذا در مباحث بازسازی دندان به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. علاوه بر این، فلور باعث افزایش کریستالیزاسیون فسفات کلسیم در فرآیند تشکیل استخوان می‌شود [۱۳]. غلظت پایین یون فلوراید برای انسان سمی نیست اما غلظت‌های بالای آن می‌تواند خطرناک باشد و منجر به فلوروزیس دندانی (Dental fluorosis) شود. در حال حاضر، فلوراید یکی از رایج‌ترین مواد ضد باکتری است که به عنوان ماده اولیه در خمیر دندان و دهانشویه موجود است [۱۱]. استفاده گسترده از یون فلوراید در آب آشامیدنی با غلظت حدود  $1 \text{ ppm}$  کاهش پوسیدگی دندان مفید است [۳]. جهت سنتز هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت تکنیک‌های مختلفی مانند سنتز مکانوشیمیایی، سنتز احتراقی، تکنیک‌های مختلف شیمی‌تر، رسوب الکتروشیمیایی، سل ژل، سنتز هیدروترمال و غیره وجود دارد که رایج‌ترین آن‌ها روش سلزل است [۱۴]. از مزایای این روش در مقایسه با سایر روش‌ها، کنترل دقیق ترکیب، دمای کم و همگنی بهتر است. پایین بودن دمای فرآیند باعث می‌شود تا در نانوساختار بدست آمده تغییرات فازی رخ ندهد [۸,۹,۱۵]. روش سلزل و رسوب کلولئیدی فسفات کلسیم می‌تواند پراکندگی یکنواخت ذرات را با کنترل مستقیم اندازه ذرات رسوب شده از طریق اثر متقابل بین پیش ماده‌های کلسیم و فسفر در دمای کنترل شده و یا کنترل pH بهبود بخشد [۶]. هرچند مطالعات گسترده‌ای پیرامون سنتز هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت از طریق فرآیند کلسینه کردن انجام



شکل ۱. نمودار سنتز پودر هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت با انجام کلسیناسیون



شکل ۲. نمودار سنتز پودر هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت بدون انجام کلسیناسیون و از طریق تنظیم pH محلول

در دو ظرف جداگانه، مقدار مشخصی نیترات کلسیم و دی آمونیوم فسفات در آب دیونیزه حل شدند. pH محلول حاوی فسفر با استفاده از هیدروکسید آمونیوم به مقدار ۱۱ رسید. سپس محلول دی آمونیوم فسفات قطره قطره به محلول حاوی کلسیم اضافه شد. محلول حاصل در دمای محیط و به مدت ۲۴ ساعت با همزن مغناطیسی هم زده شد تا سلولیه به زل با

$P/F = 6$  حل و سپس قطره قطره به محلول حاوی کلسیم اضافه شد.

سنتز پودر هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت بدون انجام کلسیناسیون و از طریق تنظیم pH محلول مطابق با شکل ۲ جهت تهیه هیدروکسی آپاتیت در ابتدا و

با اضافه کردن مقدار مشخصی هیدروکسی آمونیوم به محلول فسفر pH آن به ۱۱ می‌رسد، سپس با افزودن آن به محلول کلسیم pH کل محلول کاهش می‌باید. pH نهایی محلول پس از ۲۴ ساعت تقریباً به ۸ می‌رسد. کاهش ناگهانی pH در مراحل اولیه به دلیل انجام واکنش بین کلسیم نیترات چهار آبه با هیدروکسید آمونیوم و تشکیل نیترات آمونیوم و  $\text{CaOH}_2$  است. کاهش تدریجی pH در مراحل بعدی به علت رسوب هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت است. علاوه بر این با پیرسازی محلول کلسیم فسفات، یکنواختی ترکیب و بلورینگی رسوبات هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت افزایش می‌باید. حضور هیدروکسید آمونیوم به احتمال زیاد در تکمیل فرآیند تشکیل هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت مفید خواهد بود. از طرفی با اضافه کردن مقدار مشخصی هیدروکسید آمونیوم و تنظیم pH محلول نهایی تا مقدار ۱۰، همگنی توزیع ذرات هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت افزایش خواهد داشت. pH محلول و تغییرات آن در طی واکنش می‌تواند واکنش‌های رسوب هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت را از طریق تغییر قابلیت انحلال و گرایش به آگلومره شدن، تحت تاثیر قرار دهد [۱۶]. مشابه این روند نیز در پروسه سنتز فلورهیدروکسی آپاتیت اتفاق می‌افتد.

### مطالعه ساختار فازی به کمک پراش پرتو ایکس

نتیجه آزمون پراش پرتو ایکس بر روی ذرات هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده به روش کلسیناسیون و تنظیم pH در شکل ۳ و ۴ نشان داده شده است.

نتایج پراش پرتو ایکس نشان می‌دهد که الگوی پراش هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت به دلیل تشابه زیاد ساختار بلوری و ابعاد واحد شبکه بسیار شبیه به هم هستند. در نمونه‌های کلسینه شده به جز فاز هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت سایر فازهای ناخواسته در ترکیب پودری حضور ندارند. مشخص است که پیک‌ها با ورود یون فلورهیدروکسی آپاتیتی، به سمت زوایای بالاتر (به سمت راست) شیفت پیدا کرده‌اند. شیفت پیک‌ها در اثر حضور یون فلورهیدروکسی آپاتیت با توجه به جدول ۱ ناشی از کاهش پارامتر شبکه  $a$  در اثر جایگزینی نسبی یون فلورهیدروکسی آپاتیت به جای گروههای هیدروکسیل، که دارای شعاع یونی بزرگتری نسبت به یون فلورهیدروکسی آپاتیت باشد.

در تحقیقات مشابهی نیز نشان داده شده است جانشینی یون فلورهیدروکسی آپاتیت به جای گروههای هیدروکسیل باعث انقباض و فشردگی در اندازه محور  $a$  شده در صورتی که پارامتر شبکه  $c$  تغییر نمی‌کند. حضور یون فلورهیدروکسی آپاتیت به بلوری شدن ساختار آپاتیت به ویژه در جهت محور  $c$  منجر می‌شود [۱۷]. در الگوی پراش مربوط به هیدروکسی آپاتیت

گرانزوی و pH قلیایی مناسب تبدیل گردید. ژل بدست آمده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور به مدت ۷۲ ساعت خشک شد تا توده جامدی حاصل شود. ژل خشک شده به صورت دستی در هاون خرد و به صورت پودر درآمد. جهت تهیه فلورهیدروکسی آپاتیت نیز دقیقاً مشابه روش بالا انجام شد با این تفاوت که مقدار مشخصی از آمونیوم فلوراید در محلول دی آمونیوم فسفات به نسبت استوکیومتری  $P/F = 6$  حل و سپس قطره قطره به محلول حاوی کلسیم اضافه شد.

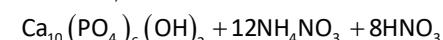
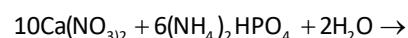
### مشخصه یابی پودرهای سنتز شده

مطالعه رفتار حرارتی و تحولات فازی نمونه‌ها حین زینترینگ، با استفاده از دستگاه آنالیز حرارتی مدل BAHR-Thermoanalyse GmbH-STA504 به طور همزمان آنالیزهای حرارتی افتراقی و تغییرات وزنی را برای تعیین دمای تحول فازها نشان می‌دهد. پس از تهیه ژل، آن‌ها را خشک و به پودر تبدیل کرده، سپس با نخر گرمایش، آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت، از روش پراش پرتو ایکس مدل Philips بهره گرفته شد. جهت مطالعه گروههای عاملی از تبدیل فوریه فروسرخ (6300, JASCO, Japan) در محدوده طیف ۵۰۰ تا ۴۰۰۰ ( $\text{cm}^{-1}$ ) استفاده شد. از میکروسکوپ الکترونی روبشی (FEI ESEM QUANTA 200) به منظور ارزیابی و بررسی مشخصات ظاهری نانو ذرات سنتز شده بهره گرفته شد. در این پژوهش با استفاده از سلول‌های بنيادی مزانشیمی انسانی (human Mesenchymal Stem cells(hMSC)) کشت سلولی بر روی نمونه‌های سنتز شده به روش pH انجام شد، سپس میزان تکثیر و بقای سلول‌ها با استفاده از تست آلامار بلو در ۱، ۳ و ۷ روز بعد از کشت سلولی بررسی گردید.

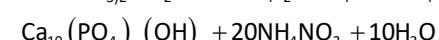
### ۳. نتایج و بحث

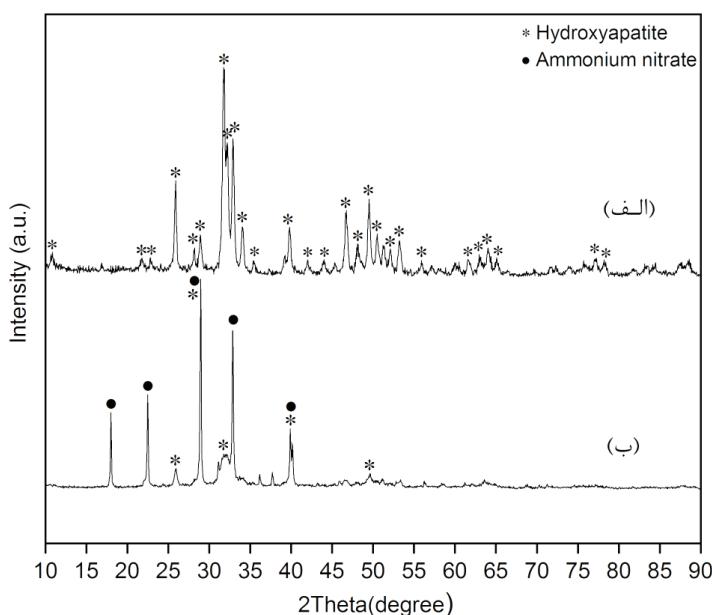
بررسی تغییرات pH در حین سنتز هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت به روش تنظیم pH واکنش تشکیل هیدروکسی آپاتیت به دو روش به صورت زیر است [۱۶]:

رابطه (۱)

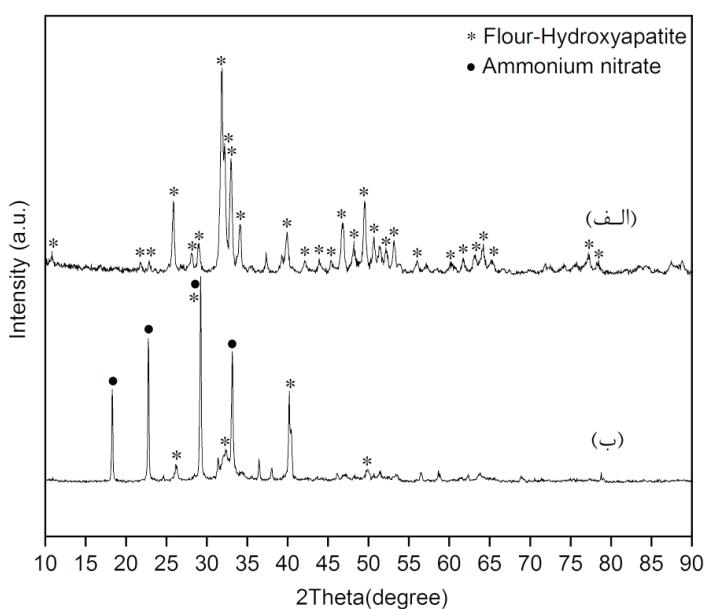


رابطه (۲)





شکل ۳. الگوی پراش پرتو ایکس هیدروکسی آپاتیت (الف) کلسینه شده (ب) تنظیم pH



شکل ۴. الگوی پراش پرتو ایکس فلورهیدروکسی آپاتیت (الف) کلسینه شده (ب) تنظیم pH

جلوگیری کرده است [۱۶]. اندازه متوسط بلورک‌های نانوپودر هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده با کلسیناسیون و تنظیم pH با توجه به اطلاعات مربوط به پراش پرتو ایکس از رابطه شر محسوسه گردید (رابطه ۳) [۴].

رابطه (۳)

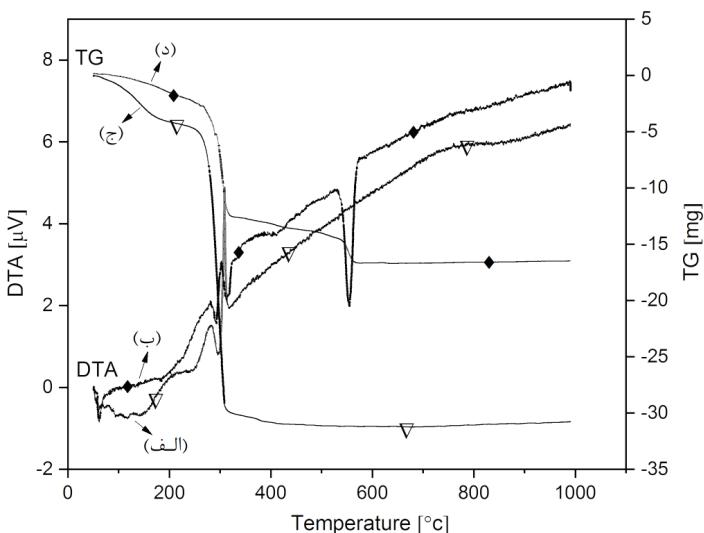
$$L = 0.89\lambda / \beta \cos\theta$$

در این رابطه، L اندازه بلورک کریستال،  $\lambda$  طول موج اشعه

و فلورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده با تنظیم pH، مشابه با پژوهش دایرون چوی و همکارانش علاوه بر فازهای هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت (طبق واکنش ۳) فاز نیترات آمونیوم نیز حضور دارد همچنین هیچ پیک دیگری مربوط به حضور فازهای ثانویه مانند کلسیم هیدروژن فسفات  $(\text{Monetite}, \text{CaHPO}_4)$  و بتا تری کلسیم فسفات  $(\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$  مشاهده نمی‌شود زیرا pH محلول در طول کل فرآیند بالاتر از ۸ نگه داشته شده و لذا از تشکیل این فازها

جدول ۱. مقادیر مربوط به هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده به روش کلسیناسیون و تنظیم pH.

نام	اندازه متوسط بلورک (nm)	a	اندازه c	درصد بلورینگی
هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با تنظیم pH	۱۶	۴۱۸۰/۹	۸۸/۶	۳۵٪.
هیدروکسی آپاتیت کلسینه شده	۳۴	۴۱۸۰/۹	۸۸/۶	۵۸٪.
فلورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده با تنظیم pH	۲۵	۴۱۴۸/۹	۸۸/۶	۴۰٪.
فلورهیدروکسی آپاتیت کلسینه شده	۳۵	۹/۴۱۴۸	۶/۸۸	۶۷٪.



شکل ۵. نتایج حاصل از آزمون آنالیز حرارتی (الف،ج) ژل خام هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با تنظیم pH (ب،د) ژل خام هیدروکسی آپاتیت سنتز شده بدون تنظیم pH.

محصول فرآیند سلیل با و بدون کلسیناسیون یک ساختار نانوکریستالی است. از طرفی مطابق جدول ۱ با افزودن یون فلور و متعاقباً تشكیل فلورهیدروکسی آپاتیت، اندازه بلورکها و درجه بلورینگی نسبت به هیدروکسی آپاتیت نیز افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد یون فلور نیروی محرکه جهت رشد کریستال آپاتیت را افزایش می‌دهد و همچنین یون فلور تمایل به کاهش کرنش روی شبکه آپاتیت را دارد و در نتیجه، ثبات ساختار آپاتیت را افزایش می‌دهد [۲۰].

ایکس (برای تیوب مس برابر با  $154 \text{ نانومتر}$ )،  $\beta$  پهنهای پیک بیشینه در نصف ارتفاع (رادیان) و  $\theta$  زاویه بر حسب درجه می‌باشد.

همچنین درجه بلورینگی پودرهای سنتز شده نیز بر اساس نتایج پراش پرتو ایکس و با استفاده از معادله (۴) به دست آمد [۱۸].

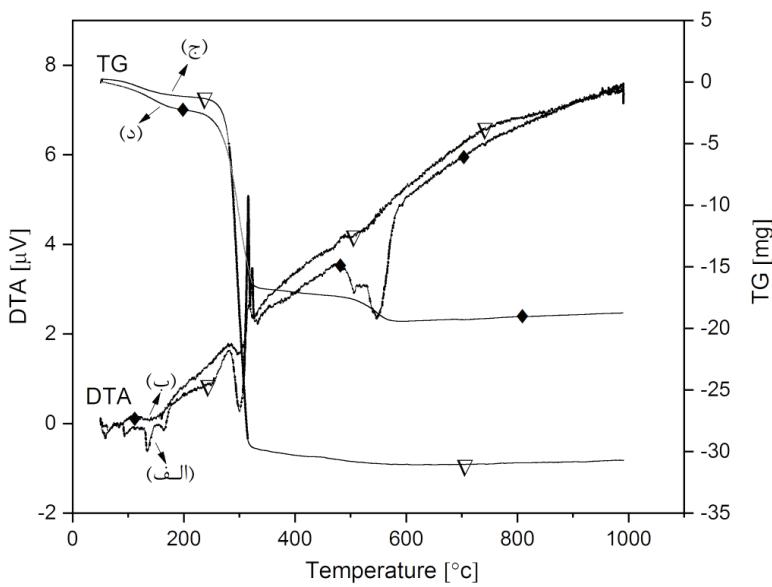
رابطه (۴)

$$X_c = 1 - \left( \frac{V_{112/300}}{V_{300}} \right)$$

در این رابطه  $X_c$  درجه بلورینگی،  $V_{112/300}$  شدت عمق بین قله‌های پراش (۱۱۰) و (۳۰۰) و  $V_{300}$  شدت قله (۰۰۳) است. پس از انجام محاسبات، اندازه متوسط بلورک و درصد بلورینگی هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده به هر دو روش بدست آمد که نتایج آپاتیت در جدول (۱) آمده است. نتایج بدست آمده به خوبی نشان می‌دهد که با انجام عملیات کلسیناسیون اندازه دانه‌ها و بلورینگی افزایش یافته است [۱۹]. با وجود این

### آنالیز حرارتی افتراقی و تغییرات وزنی

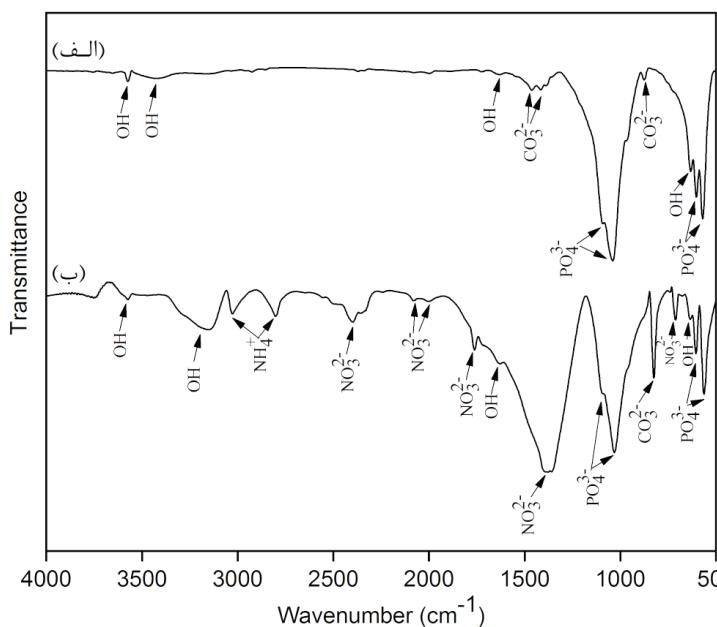
شکل‌های (۵) و (۶) تغییرات فیزیکوشیمیایی و تغییرات وزنی پودرهای هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده با تنظیم pH، ژل خام هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده بدون تنظیم pH را نسبت به دما در یک فرآیند حرارت دهنی در اتمسفر هو نشان می‌دهد.



شکل ۶. نتایج حاصل از آزمون آنالیز حرارتی (الف،ج) ژل خام فلورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده بدون تنظیم pH و سنتز شده با تنظیم pH (ب،د)

وزنی ۱/۵ درصد برای فلورهیدروکسی آپاتیت (شکل ۶(د)) همراه است. پیک گرمایی بعدی در شکل‌های ۵ (ب) و ۶ (ب) قبل از دمای ۲۰۰ درجه سانتیگراد مربوط به حذف آب جذب شده ساختاری می‌باشد به طوری که منحنی تغییرات وزنی (شکل ۵ و ۶(د)), کاهش وزن ۵ درصد برای هیدروکسی آپاتیت و ۵/۵ درصد را برای فلورهیدروکسی آپاتیت نشان می‌دهد. در شکل‌های ۵ (ب) و ۶ (ب) پیک گرمایزا در محدوده ۲۵۰ تا ۳۰۰ درجه سانتیگراد مربوط به تجزیه حرارتی  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  تشکیل شده در حین فرآیند سنتز است که در نمودار تغییرات وزنی با کاهش شدید ۲۳ درصد وزنی برای هیدروکسی آپاتیت (شکل ۵(د)) و با کاهش ۲۵ درصد وزنی برای فلورهیدروکسی آپاتیت (شکل ۶(د)) همراه است، پیک گرمایزا بعدی در منحنی‌های ۵ و ۶ (ب) در دمای حدود ۳۲۵ درجه سانتیگراد مربوط به از دست رفتن پیوندهای آلی در ماده می‌باشد که همراه با ۱۳ درصد کاهش وزنی برای هیدروکسی آپاتیت (شکل ۵(د)) و ۱۸ درصد کاهش وزنی برای فلورهیدروکسی آپاتیت (شکل ۶(د)) است. از ۳۲۵ تا ۵۵۰ درجه سانتیگراد نیز کاهش وزن ۱۲ درصدی را برای هیدروکسی آپاتیت (شکل ۵(د)) و ۸ درصد را برای فلورهیدروکسی آپاتیت (شکل ۶(د)) داریم، این کاهش وزن به دلیل شکل گیری هیدروکسی آپاتیت در دمای حدود ۵۵۵ درجه سانتیگراد و فلورهیدروکسی آپاتیت در دمای ۵۴۷ درجه سانتیگراد است. با توجه به تحقیقات ساهو و همکارانش [۱] در دماهای بالاتر تا ۱۰۰۰ درجه سانتیگراد دیگر کاهش وزنی مشاهده نمی‌شود و منحنی‌های ۵ و ۶ (د) تقریباً در این محدوده دمایی پایدار است که پایداری حرارتی فاز هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت را

با توجه به شکل‌های ۵ (الف) و ۶ (الف)، یک پیک گرمایی حدود ۱۲۰ درجه سانتیگراد وجود دارد که نشانده‌نده تبخیر مواد فرار باقیمانده در ساختار مثل آب می‌باشد که با کاهش وزنی ۳ درصدی در منحنی تغییرات وزنی برای هیدروکسی آپاتیت (شکل ۵(ج)) و کاهش وزنی ۲ درصد برای فلورهیدروکسی آپاتیت (شکل ۶(ج)) همراه است [۱۶]. پیک گرمایی بعدی در شکل‌های ۵ (الف) و ۶ (الف) در دمای حدود ۱۶۵ درجه سانتیگراد می‌تواند مربوط به ذوب  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  باشد که از قبل حضور آن در آنالیز پراش پرتو ایکس (شکل‌های ۳ و ۴) و تحقیقات داییون چوی [۱۶] نشان داده شد، پیک گرمایزا در محدوده ۲۵۰ تا ۳۰۰ درجه سانتیگراد در همین دو شکل مربوط به تجزیه حرارتی  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  تشکیل شده در حین فرآیند سنتز است که در نمودار تغییرات وزنی با کاهش شدید ۳۷ درصد وزنی برای هیدروکسی آپاتیت (شکل ۵(ج)) و با کاهش ۳۸ درصد وزنی برای فلورهیدروکسی آپاتیت (شکل ۶(ج)) همراه است. در تحقیقات مشابهی پیک گرمایزا در دمای ۲۸۰ درجه سانتیگراد را مربوط به تجزیه حرارتی  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  دانسته‌اند [۲۱]. پیک گرمایی بعدی در دمای ۳۲۵ درجه سانتیگراد در شکل‌های ۵ (الف) و ۶ (الف) مربوط به از دست رفتن پیوندهای آلی در ماده می‌باشد [۹]. شبیث مثبت منحنی DTA در برابر دما برای محدوده دمایی بالاتر از ۳۵۰ درجه سانتیگراد مربوط به کریستالیزه شدن هیدروکسی یا فلورهیدروکسی آپاتیت می‌باشد. با توجه به شکل‌های ۵ (ب) و ۶ (ب) یک پیک گرمایی قبل از ۱۰۰ درجه سانتیگراد وجود دارد که نشان دهنده تبخیر هیدروکسی آپاتیت می‌باشد. با توجه سطحی می‌باشد که با کاهش وزنی ۵/۰ درصدی در منحنی تغییرات وزنی برای هیدروکسی آپاتیت (شکل ۵(د)) و کاهش



شکل ۷. طیف سنجی فروسرخ با تبدیل فوریه هیدروکسی آپاتیت (الف) کلسینه شده (ب) بدون کلسیناسیون (تنظیم pH)

(cm<sup>-1</sup>) برای پیک ارتعاشی  $\nu_4$  در ترکیب اپاتیت قابل تشخیص هستند. باندهای مرتبط با گروههای هیدروکسیل شبکه‌ای در عدد موجی‌های ۶۳۰ و در ۳۵۷۰ (cm<sup>-1</sup>) برای هر دو نمونه قابل رویت می‌باشد که در نتایج سایر پژوهش‌ها نیز حضور این پیک‌ها گزارش شده است [۱۶]. پیک موجود در ۱۶۳۵ (cm<sup>-1</sup>) پیک پهنه ۳۳۰۰ (cm<sup>-1</sup>) نیز مربوط به آب ساختاری می‌باشد [۱۸]. در شکل ۷ (الف) پیک‌ها در ۸۷۶، ۱۴۲۰ و ۱۴۵۴ (cm<sup>-1</sup>) گروه کربناتی را نشان می‌دهند که به دلیل جایگزینی گروه فسفات با کربنات است همچنانی پیک نیترات (NO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) نیز در عدد موجی ۱۴۱۰ (cm<sup>-1</sup>) نیز با گروه کربنات همپوشانی دارد. در شکل ۷ (ب) پیک ۸۴۰ (cm<sup>-1</sup>) و پیک پهنه در ۱۴۰۰ (cm<sup>-1</sup>) به ترتیب نشان‌دهنده گروه‌های کربناتی و نیتراتی است که حضور این پیک‌ها را کوستسکو و همکارانش [۲۳] در پژوهش خود گزارش کرده‌اند. این مقدار جایگزینی گروه فسفات با گروه کربنات با افزایش pH محلول محدوده عدد موجی ۲۸۰۰ تا ۳۰۰۰ (cm<sup>-1</sup>) مربوط به گروه NH<sub>4</sub><sup>+</sup> است و همچنانی پیک‌ها در عدد موجی‌های ۲۵۴۵، ۲۴۰۳، ۲۴۰۱، ۲۰۸۱، ۲۰۰۶، ۱۷۸۳ و ۷۱۳ (cm<sup>-1</sup>) مربوط به گروه نیترات می‌باشد [۲۴]. نتیجه بررسی ساختاری طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ هیدروکسی آپاتیت سنتز شده به دو روش تنظیم pH و کلسینه شدن در شکل ۷ ارائه شده است.

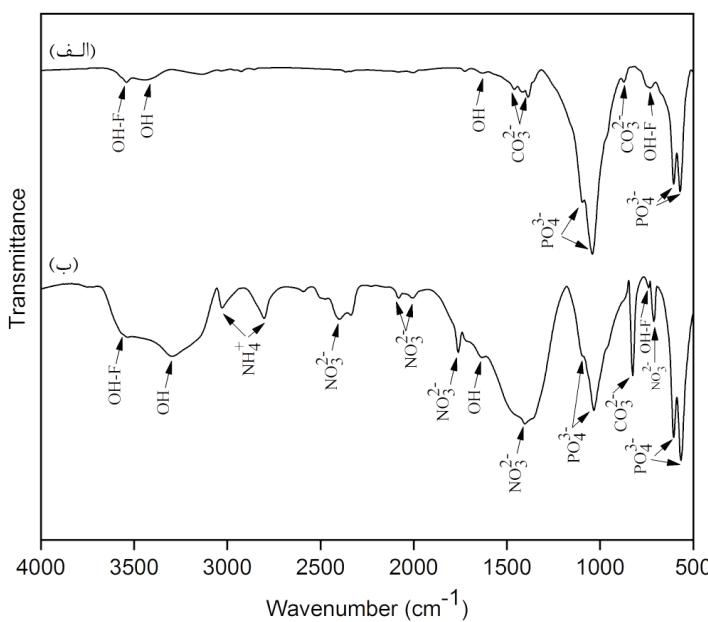
تمایز ساختار هیدروکسی آپاتیت و فلوئورهیدروکسی آپاتیت به دلیل نزدیکی و شباهت ساختاری آن‌ها بسیار مشکل است. همانند شکل ۷ در هر دو نمونه شکل ۸ نیز، سه

تایید می‌کند. نتایج آنالیز حرارتی در شکل‌های ۵ و ۶ (ب) برای نمونه‌های کلسینه شده (بدون تنظیم pH) به ترتیب برای HA و FHA نشان می‌دهد با ورود یون فلوئور به ساختار آپاتیتی دمای شکل گیری فلوئورهیدروکسی آپاتیت نسبت به هیدروکسی آپاتیت کاهش می‌یابد (از ۵۵۵ درجه سانتیگراد برای هیدروکسی آپاتیت به ۵۴۷ درجه سانتیگراد برای فلوئورهیدروکسی آپاتیت)، تحقیقات از قبل انجام شده نیز تایید می‌نماید که ساختار فلوئور هیدروکسی آپاتیت راحت‌تر کریستاله می‌شود از این رو دمای کریستالیزاسیون کمتری دارد و همچنانی ساختار کریستالی فشرده تری را ایجاد می‌کند [۹] و پایداری حرارتی و شیمیابی بهتری را نسبت به هیدروکسی آپاتیت از خود نشان می‌دهد [۲۲].

### ازیابی ترکیب به کمک طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR)

نتیجه بررسی ساختاری طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ هیدروکسی آپاتیت سنتز شده به دو روش تنظیم pH و کلسینه شدن در شکل ۷ ارائه شده است.

طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ برای نمونه هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با عملیات کلسیناسیون، پیک اضافه‌ای که بیان کننده جایگزینی گروه‌های عاملی ناخواسته در ترکیب آپاتیت یا حضور ناخالصی‌ها باشد را نشان نمی‌دهد. به طور کلی برای هر دو نمونه، سه پیک مرتبط با ارتعاشات  $\nu_1$ ،  $\nu_3$  و  $\nu_4$  از گروه فسفاتی (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) به ترتیب در عدد موجی (cm<sup>-1</sup>) ۹۶۰، برای پیک ارتعاشی  $\nu_1$  در عدد موجی‌های (cm<sup>-1</sup>) ۱۰۴۰ و ۱۱۰۰ برای پیک ارتعاشی  $\nu_3$  و در عدد موجی‌های ۵۶۰، ۶۰۰



شکل ۸. طیف سنجی فروسرخ با تبدیل فوریه فلورهیدروکسی آپاتیت (الف) کلسینه شده (ب) بدون کلسیناسیون (تنظیم pH)

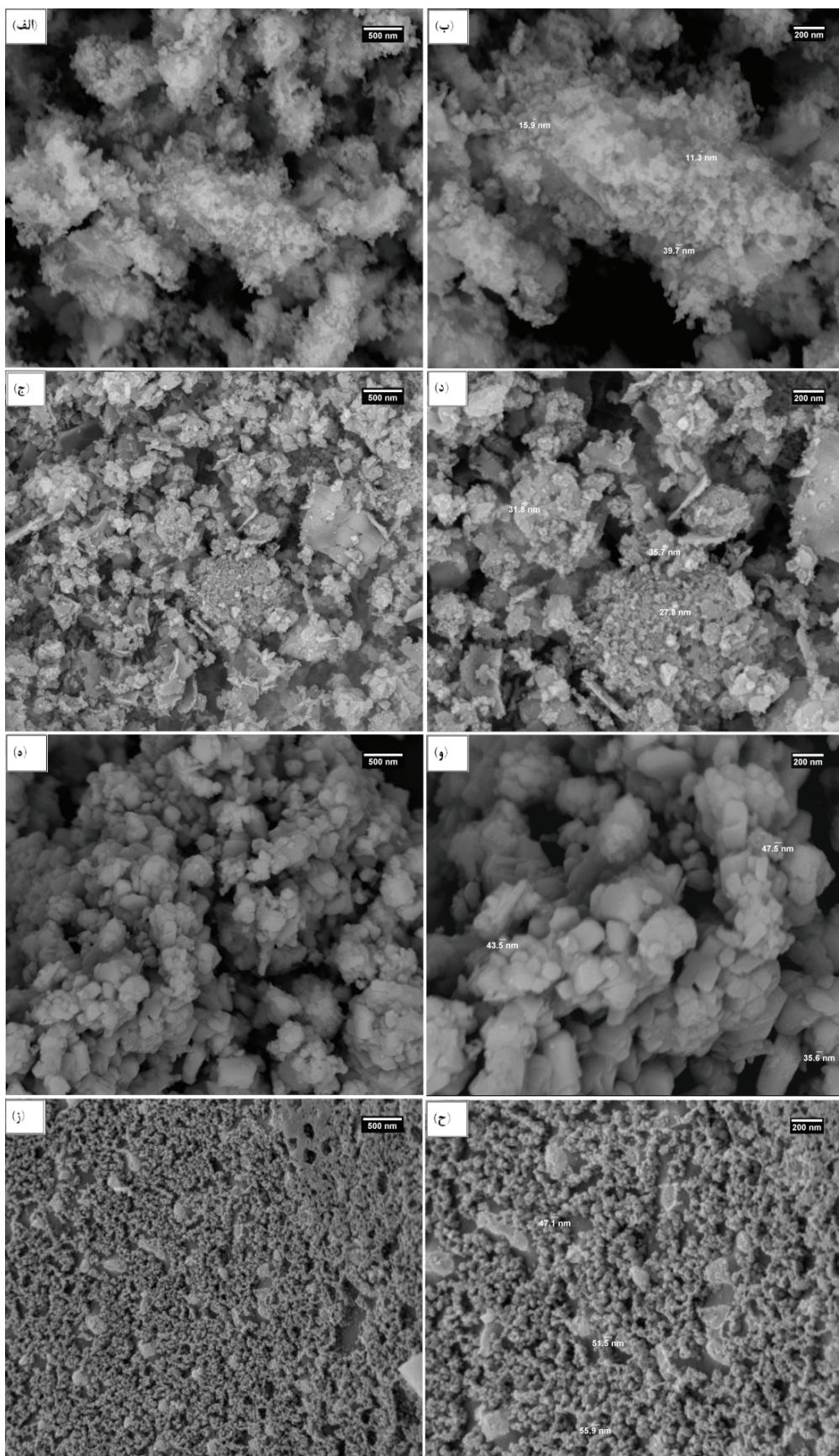
(الف) پیک‌های ۸۷۰، ۱۴۲۵ و ۱۴۶۰ (cm<sup>-1</sup>) گروه کربناتی را نشان می‌دهند که به دلیل جایگزینی گروه فسفات با کربنات است همچنین پیک نیترات (NO<sub>3</sub><sup>-2</sup>) نیز در عدد موجی ۱۴۱۰ (cm<sup>-1</sup>) نیز با گروه کربنات همپوشانی دارد. در شکل ۸ (ب) پیک ۸۴۰ (cm<sup>-1</sup>) و پیک پهن در ۱۴۰۰ (cm<sup>-1</sup>) نشانده‌نده گروه‌های کربناتی و نیتراتی است [۲۲]. تمامی پیک‌ها در محدوده عدد موجی ۲۸۰۰ تا ۳۰۰۰ (cm<sup>-1</sup>) مربوط به گروه NH<sub>4</sub><sup>+</sup> است. پیک‌ها در عدد موجی‌های ۲۵۸۰، ۲۵۸۰، ۲۴۰۰، ۲۰۸۱، ۲۰۰۶، ۱۷۶۳ و ۷۱۳ (cm<sup>-1</sup>) مربوط به گروه نیترات می‌باشد [۲۴].

### بررسی شکل و اندازه ذرات به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی

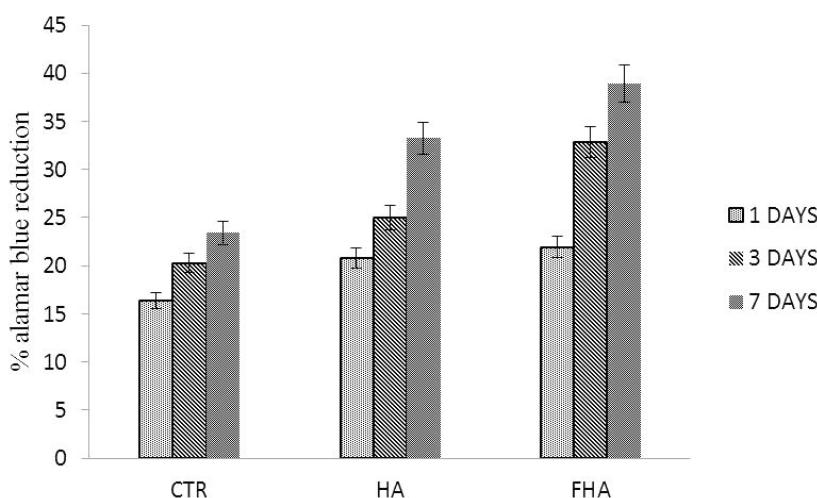
شکل ۹ تصاویر تهیه شده به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی از ذرات هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده از طریق کلسیناسیون و تنظیم pH را نشان می‌دهد.

در این تصاویر مشاهده می‌شود که ذرات کروی و شبه کروی با اندازه ذرات کمتر از ۵۰ نانومتر هستند که در بعضی نقاط به صورت توده‌ای شکل درآمده اند و نشان می‌دهد که ذرات تمایل به آلگومره شدن دارند. نتایج بدست آمده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز نتایج روش شر را تایید می‌نماید. همچنین تصاویر به خوبی نشان می‌دهد که با انجام عملیات کلسیناسیون اندازه دانه‌ها افزایش یافته و افزودن یون فلور و متعاقباً تشکیل فلورهیدروکسی آپاتیت، اندازه ذره‌ها را نسبت به هیدروکسی آپاتیت افزایش داده است.

پیک مرتبط با ارتعاشات v<sub>1</sub>, v<sub>3</sub> و v<sub>4</sub> از گروه فسفاتی (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) به ترتیب در عدد موجی (cm<sup>-1</sup>) ۹۶۰ برای پیک ارتعاشی v<sub>1</sub> در عدد موجی‌های (cm<sup>-1</sup>) ۱۰۴۰ و ۱۱۰۰ برای پیک ارتعاشی v<sub>3</sub> و در عدد موجی‌های (cm<sup>-1</sup>) ۵۷۰, ۶۱۰ و ۱۴۰۰ برای پیک ارتعاشی v<sub>4</sub> در ترکیب آپاتیت قابل تشخیص هستند. بی‌آزار و همکارانش [۱۸] نشان دادند آنچه ساختار هیدروکسی آپاتیت را از ساختار فلورهیدروکسی آپاتیت متمایز می‌سازد باندهای مرتبط با گروه‌های هیدروکسیل شبکه‌ای است. مطابق با شکل ۷ پیک مربوط به گروه هیدروکسیل برای هیدروکسی آپاتیت در عدد موجی (cm<sup>-1</sup>) ۶۳۰ در هیچ‌کدام از نمودارهای مربوط به فلورهیدروکسی آپاتیت (شکل ۸) ظاهر نشده است. پیک پهن از ۳۰۰۰ تا ۳۵۰۰ (cm<sup>-1</sup>) مربوط به گروه هیدروکسیل می‌باشد و یک پیک کوچک در ۳۵۵۰ (cm<sup>-1</sup>) مربوط به پیوند بین OH و F است که نشان دهنده نفوذ یون فلور به داخل شبکه آپاتیت است. این مشاهدات برای پودر فلورهیدروکسی آپاتیت به دلیل تشکیل پیوند هیدروژنی بین یون فلور و هیدروکسیل است که نشان دهنده جایگزین شدن یون‌های فلور به جای یون‌های هیدروکسیل در ساختار آپاتیت است. با این حال، با تجزیه و تحلیل طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ مقدار دقیق جایگزینی یون‌های فلور با یون‌های هیدروکسیل قبل محاسبه نیست. همچنین حضور پیک در ۷۳۵ (cm<sup>-1</sup>) نشان دهنده پیوند (OH-F) و جایگزینی گروه‌های فلور با گروه‌های هیدروکسیل در ساختار آپاتیت است [۵]. جایگزینی یون‌های هیدروکسیل در ساختار آپاتیت موجب کاهش تقارن و بنابراین جذب باند در طیف IR می‌شود. پیک موجود در ۱۶۳۵ (cm<sup>-1</sup>) نیز مربوط به آب ساختاری (Water bending mode) است. در شکل ۸



شکل ۹. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (الف،ب) هیدروکسی آپاتیت با تنظیم pH (ج،د) هیدروکسی آپاتیت کلسینه شده (ه،و) فلورهیدروکسی آپاتیت با تنظیم pH (ز،ح) فلورهیدروکسی آپاتیت کلسینه شده



شکل ۱۰. ارزیابی تست آلاماربلو بعد از ۱، ۳ و ۷ روز کشت سلولی بر روی نمونه‌های هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده به روش تنظیم pH

#### ۴. نتیجه‌گیری

در این پژوهش با استفاده از روش سلزل نانو پودر هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت به دو روش متفاوت، تنظیم pH و انجام عملیات کلسیناسیون سنتز شد. مشخصه یابی کامل ذرات ساخته شده با استفاده از آنالیزهای پراش پرتو اشعه ایکس، طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ و آنالیز حرارتی حصول هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت با ترکیب و ساختار مطلوب را در هر دو روش تایید کرد. جانشینی یون فلورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده به روش رنگ سنجی تبدیل فوریه فروسرخ در نمونه‌های فلورهیدروکسی آپاتیت به اثبات رسید. بررسی و مشاهده ذرات هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده به هر دو روش توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی و همچنین محاسبه اندازه متوسط بلورکها به کمک روش شر نیز نشان داد که ذرات کروی و شبه کروی ابعاد کمتر از ۵۰ نانومتر دارند همچنین با انجام عملیات کلسیناسیون و افزودن یون فلورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده به روش pH تکثیر سلولی مناسب داشته و درجه بلورینگی پودرهای افزایش یافته است. در نهایت بر اساس نتایج آزمایش کشت سلولی و آلاماربلو، سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی بر روی نمونه‌های هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده به روش pH تکثیر سلولی مناسب داشته و جایگزینی یون فلورهیدروکسی آپاتیت به افزایش تکثیر سلولی در آزمایش کشت سلولی شد.

#### تشکر و قدردانی

این تحقیق با همکاری موسسه پژوهشی ملی ایتالیا (CNR) انجام گردید و تست‌های بیولوژیکی در آزمایشگاه تخصصی بیومتریال این موسسه تحت نظر دکتر ماریا گرازیا راشی انجام شد.

#### رفتار بیولوژیکی

به منظور بررسی تاثیر یون فلورهیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده دو پودر هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده به روش تنظیم pH جهت آزمون کشت سلولی انتخاب شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی به مدت ۱، ۳ و ۷ روز بر روی پودرهای کشت داده شدند و سپس جهت بررسی رشد و تکثیر سلول‌ها از روش رنگ سنجی آلاماربلو استفاده شد. شایان ذکر است قبل از انجام آزمایش نمونه‌ها چندین بار متوالی با آب دیونیزه شستشو داده شدند تا ترکیبات نیتراتی خارج شده سپس به مدت یک ساعت در اتوکلاو استریل شدند و سپس مورد کشت سلولی قرار گرفتند. به منظور تهیه نمونه شاهد (CTR) (کنترل) نیز از کشت سلول‌ها در محیط بدون حضور پودر استفاده شد. نمودار ۱۰ نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی نمونه‌های پودری هیدروکسی آپاتیت و فلورهیدروکسی آپاتیت نسبت به نمونه شاهد تکثیر سلولی مناسبی داشته‌اند و نمونه فلورهیدروکسی آپاتیت به علت جایگزینی یون فلورهیدروکسی آپاتیت به افزایش تکثیر سلولی بیشتری از خود نشان داده است.

افزایش مقدار کاهش درصد آلاماربلو (Alamar blue reduction) در طول دوره کشت سلولی نشان دهنده افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی می‌باشد. این امر بیانگر اثر مثبت افزودن فلورهیدروکسی آپاتیت و زنده ماندن سلول‌ها و افزایش زیست سازگاری فلورهیدروکسی آپاتیت است. هاوون کیم و همکارانش [۲۵] نیز در تحقیقات مشابهی نشان دادند که در پوشش فلورهیدروکسی آپاتیت، یون فلورهیدروکسی آپاتیت بر برقا و تکثیر سلولی دارد و سلول‌ها رشد بیشتری از خود نشان می‌دهند که این امر با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد.

## References

- [1] S.Sahu, D.Mehra, "Characterization and Thermal Analysis of Hydroxyapatite Bioceramic Powder Synthesized by Sol-Gel Technique", International Journal of Advanced Scientific Research and technology, Vol. 3, pp. 281-289, 2012.
- [2] M.Kharaziha, M.H.Fathi, "Improvement of mechanical properties and biocompatibility of forsterite bioceramic addressed to bone tissue engineering materials", Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, Vol. 3, pp. 530-537, 2010.
- [3] J.N.Hart, K.A.Gross, "Influence of fluorine in the synthesis of apatites. Synthesis of solid solutions of hydroxy-fluorapatite", Biomaterials, Vol. 24, pp. 3777-3785, 2003.
- [4] M.M.Sebdani, M.H.Fathi, "Preparation and characterization of hydroxyapatite - forsterite - bioactive glass nanocomposite coatings for biomedical applications", Ceramics International, Vol. 38, pp. 1325-1330, 2012.
- [5] S.Jegatheeswaran, S.Selvam, V.S.Ramkumar, M. Sundararajan, "Novel strategy for f-HAp / PVP / Ag nanocomposite synthesis from fluoro based ionic liquid assistance : Systematic investigations on its antibacterial and cytotoxicity behaviors", Materials Science & Engineering C, Vol. 67, pp. 8-19, 2016.
- [6] M.G.Raucci, V.Guarino, L.Ambrosio, "Hybrid composite scaffolds prepared by sol-gel method for bone regeneration", Composites Science and Technology, Vol. 70, pp. 1861-1868, 2010.
- [7] H.W.Kim, Y.M.Kong, C.J.Bae, Y.J.Noh, H.E.Kim, "Sol-gel derived fluor-hydroxyapatite biocoatings on zirconia substrate", Biomaterials, Vol. 25, pp. 2919-2926, 2004.
- [8] Y.Cai, S.Zhang, X.Zeng, Y.Wang, M.Qian, W.Weng, "Improvement of bioactivity with magnesium and fluorine ions incorporated hydroxyapatite coatings via sol - gel deposition on Ti6Al4V alloys", Thin Solid Films, Vol. 517, pp. 5347-5351, 2009.
- [9] C.J. Tredwin, A.M.Young, G.Georgiou, S. Shin, H.Kim, J.C.Knowles, "Hydroxyapatite, fluor-hydroxyapatite and fluorapatite produced via the sol-gel method. Optimisation, characterisation and rheology", Dental Materials, Vol. 29, pp. 166-173, 2012.
- [10] G.Tyagi, A.Roy, "Synthesis And Characterization of Hydroxyfluorapatite Nanocomposite", International journal of scientific research and education, Vol. 4, pp. 5959-5964, 2016.
- [11] S.Dimitrijevi, G.Antonovi, "Synthesis of fluorine substituted hydroxyapatite nanopowders and application of the central composite design for determination of its antimicrobial effects", Applied Surface Science, Vol. 290, pp. 346-352, 2014.
- [12] M.Wei, J.H.Evans, "Synthesis and characterization of hydroxyapatite , fluoride-substituted hydroxyapatite and fluorapatite", Journal of materials science:Materials in medicine, Vol. 14, pp. 311-320, 2003.
- [13] H.Kim, J.C. Knowles, "Fluor-hydroxyapatite sol - gel coating on titanium substrate for hard tissue implants", Biomaterials, Vol. 25, pp. 3351-3358, 2004.
- [14] W.Feng, L.Mu-sen, L.Yu-peng, Q.Yong-xin, "A simple sol - gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders", Materials Letters, Vol. 59, pp. 916-919, 2005.
- [15] A.Abrishamchian, T.Hooshmand, M.Mohammadi, F.Naja, "Preparation and characterization of multi-walled carbon nanotube / hydroxyapatite nanocomposite film dip coated on Ti - 6Al - 4V by sol - gel method for biomedical applications : An in vitro study", Materials Science and Engineering C, Vol. 33, pp. 2002-2010, 2013.
- [16] D.Choi, K.G.Marra, P.N.Kumta, "Chemical synthesis of hydroxyapatite / polycaprolactone composites", Materials Research Bulletin, Vol. 39, pp. 417-432, 2004.
- [17] H.Kim, Y.Koh, B.Yoon, H.Kim, "Reaction Sintering and Mechanical Properties of Hydroxyapatite - Zirconia Composites with Calcium Fluoride Additions", Communications of the American Ceramic Society, Vol. 36, pp. 1634-1636, 2002.
- [18] E.Biazar, "Synthesis of fluorapatite - hydroxyapatite nanoparticles and toxicity investigations", International Journal of Nanomedicine, Vol. 6, pp. 197-201, 2011.
- [19] M.Darroudi, H.Eshtiagh-Hosseini, M.R.Housaindokht, "Synthesis of nano-fluorohydroxyapatite thin films by sol-gel method", Malaysian Journal of Science, Vol. 28, pp. 97-104, 2010.
- [20] N.Rameshbabu, T.S.S.Kumar, K.P.Rao, "Synthesis of nanocrystalline fluorinated hydroxyapatite by microwave processing and its in vitro dissolution study", Mater. Sci, Vol. 29, pp. 611-615, 2006.
- [21] E.Y.George, "On the Thermal Decomposition of Ammonium Nitrate. Steady-state Reaction Temperatures and Reaction Rate", Vol. 76, pp. 5860-5863, 1954.
- [22] F.Barandehfar, M.K.Rad, A. Hosseinnia, K.Khoshroo, M.Tahriri, H.E.Jazayeri, "The Addition of Synthesized Hydroxyapatite and Fluorapatite Nanoparticles to a Glass-Ionomer Cement for Dental Restoration and its Effects on Mechanical Properties", Ceramics International, Vol. 42, pp. 17866-17875, 2016.
- [23] A.Costescu, I.Pasuk, F.Ungureanu, A. Dinischiotu, F.Huneau, S.Galaup, P.L.E.Coustumer, D.Predoi, "Physico-Chemical Properties Of Nano-Sized Hexagonal Hydroxyapatite Powder Synthesized By Sol-Gel", Journal of Nanomaterials and Biostructures, Vol. 5, pp. 989-1000, 2010.
- [24] H.B.Wu, M.N.Chan, C.K.Chan, "FTIR Characterization of Polymorphic Transformation of Ammonium Nitrate FTIR Characterization of Polymorphic Transformation of Ammonium Nitrate", Aerosol Science and Technology, Vol. 41, pp. 581-588, 2007.
- [25] H.Kim, Y.Kong, C.Bae, Y.Noh, H. Kim, "Sol - gel derived fluor-hydroxyapatite biocoatings on zirconia substrate", Biomaterials, Vol. 25, pp. 2919-2926, 2004.