



Effect of Fabrication Process Parameters on the Size of Gelatin/Nanohydroxyapatite Microspheres

S. Bagheri-Khoulenjani¹, H. Mirzadeh^{2,3*}, and M Etrati-Khosroshahi¹

(1) Department of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology,
P.O. Box: 15875-4413, Tehran, Iran

(2) Iran Polymer and Petrochemical Institute, P.O. Box: 14965-115, Tehran, Iran

(3) Department of Polymer Engineering, Amirkabir University of Technology,
P.O. Box: 15875-4413, Tehran, Iran

Received 6 June 2009, accepted 16 September 2009

ABSTRACT

Nano-hydroxyapatite/gelatin (nHA/Ge) microspheres are currently used in bone tissue engineering as bone filler. In this study, the effect of fabrication process parameters on the particle size of nano-hydroxyapatite/gelatin microspheres was investigated. The nHA/Ge microspheres were fabricated using water in oil emulsion. In order to design an experimental design, a surface response model with 2 factors including the rate of shaking and water to oil volume ratio in 3 levels was applied. Particle size was evaluated by using an optical microscope. The morphology of microspheres and distribution of nano-particles within the microspheres were studied by using scanning electron microscope and Ca elemental map obtained from energy dispersive X-ray analysis (EDX), respectively. Statistical analysis of the results obtained from particle size measurements revealed that the rate of shaking has stronger influence on the particle size of microspheres. Morphological studies showed that the fabricated microspheres were spherical with smooth surface. Ca elemental map of the microspheres showed that nano-hydroxyapatite particles distributed uniformly within the microspheres.

Key Words:

microsphere,
nanocomposite,
gelatin/nanohydroxyapatite,
particle size,
surface response model

(*)To whom correspondence should be addressed.

E-mail: h.mirzadeh@ippi.ac.ir



اثر پارامترهای فرایند ساخت روی اندازه ریزگویی‌های ژلاتین - نانوهیدروکسی آپاتیت

شاداب باقری خولنجانی^۱، حمید میرزاده^{۲،*}، محمد عترتی خسروشاهی^۱

۱- تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، صندوق پستی ۱۵۸۱۷۵-۴۴۱۳

۲- تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، صندوق پستی ۱۴۹۶۵-۱۱۵

۳- تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پلیمر، صندوق پستی ۱۵۸۱۷۵-۴۴۱۳

دریافت: ۸۸۳/۱۶، پذیرش: ۸۸۶/۲۵

چکیده

ریزگویی‌های ژلاتین - هیدروکسی آپاتیت، به تازگی به عنوان پرکننده‌های استخوانی و حامل‌هایی برای دارورسانی به بافت‌های استخوانی مطرح شده‌اند. از آن جا که اندازه این ریزگویی‌ها روی کارایی آنها اثر به‌سزایی دارد، در این پژوهش، اثر پارامترهای فرایند ساخت روی اندازه ریزگویی‌های ژلاتین - نانوهیدروکسی آپاتیت بررسی شده است. برای ساخت ریزگویی‌های ژلاتین - نانوهیدروکسی آپاتیت روش امولسیون آبی - آلی و به دنبال آن استخراج حلال به کار گرفته شده است. مدل رویه پاسخ با دو متغیر سرعت هم‌زن و نسبت حجمی فاز آبی به آلی در سه سطح برای طراحی آزمون‌ها استفاده شده است. اندازه ریزگویی‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری اندازه‌گیری شده است. میکروسکوپ الکترون پویشی برای مطالعه شکل‌شناسی ریزگویی و توزیع نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در ریزگویی و روش تجزیه پراکندگی انرژی پرتو X برای تهیه نقشه عنصری کلسیم به کار گرفته شده است. بررسی آماری نتایج حاصل از اندازه‌گیری اندازه ذرات نشان می‌دهد، سرعت هم‌زن اثر بیشتری در مقایسه با نسبت حجمی فاز آبی به آلی روی اندازه ذرات دارد. بررسی‌های شکل‌شناسی حاکی از تشکیل ریزگویی‌ها با شکل کروی و سطحی صاف است. مطالعات نقشه عنصری کلسیم نشان می‌دهد، نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به طور یکنواخت در ریزگویی توزیع شده‌اند.

واژه‌های کلیدی

ریزگویی،

نانوکامپوزیت،

ژلاتین- نانوهیدروکسی آپاتیت،

اندازه ذرات،

مدل رویه پاسخ

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:

h.mirzadeh@ippi.ac.ir

مقدمه

امروزه پژوهش های زیادی روی کامپوزیت ها به منظور شبیه سازی ترکیب و ساختار بافت های سخت انسان که خود یک نانوکامپوزیت طبیعی متشکل از نانوبلورهای هیدروکسی آپاتیت و پروتئین های کلاژنی است، در مهندسی بافت و ترمیم استخوان انجام شده است [۵-۱]. سامانه های کامپوزیتی مانند پودرها، ساختارهای متراکم و داربست های متخلخل از هیدروکسی آپاتیت و پروتئین های بر پایه کلاژن مانند ژلاتین ساخته شده اند [۱۱-۶]. پژوهش های اخیر نشان می دهد، سامانه های کامپوزیتی پاسخ های سلولی استئوبلاست ها و قابلیت تشکیل استخوان را به شکل داخل بدنی افزایش داده اند [۱۲، ۳]. در مقایسه با کامپوزیت های در مقیاس میکرو، نانوکامپوزیت ها خواص مکانیکی و زیستی بهتری نشان داده اند [۳].

ریزگویی های ژلاتین - نانوهیدروکسی آپاتیت را می توان به شکل پرکننده، به تنهایی یا در ترکیب با یک زمینه پلیمری دیگر، در کاربردهای مهندسی بافت استخوان استفاده کرد [۱۲]. افزون بر این، ریزگویی ها قابلیت بارگذاری مواد زیستی و زیست فعال را دارند و می توانند در رهایش کنترل شده این مواد طی فرایند بازسازی استخوان استفاده شوند [۱۷-۱۳]. یکی از خواص مهم ریزگویی ها که روی خواص آنها اثر زیادی دارد، اندازه ذرات و شکل شناسی آنهاست. در حال حاضر، پژوهش هایی روی روش های ساخت ریزگویی های ژلاتین حاوی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت انجام شده است. هدف اصلی این پژوهش، توزیع یکنواخت نانوذرات در زمینه ژلاتین بوده است [۱۹، ۱۸]. اما بر اساس اطلاعات موجود، اثر پارامترهای ساخت روی اندازه ریزگویی های حاصل، تاکنون بررسی نشده است. در پژوهش حاضر، اثر سرعت هم زن و نسبت حجمی فاز آبی به آلی با استفاده از مدل رویه پاسخ روی اندازه ریزگویی های ژلاتین - نانوهیدروکسی آپاتیت بررسی شده است.

تجربی

مواد

ژلاتین نوع A و استون از شرکت Merck و نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و روغن زیتون از شرکت Sigma کشور آلمان خریداری شدند و به محض دریافت، مورد استفاده قرار گرفتند.

دستگاه ها

در این طرح، هم زن مکانیکی ساخت شرکت IKA آلمان، میکروسکوپ

الکترون پویشی مدل XMU Tescan II ساخت جمهوری چک، هم زن فراصوت (کاونده)، پراش سنج ساخت شرکت Rontec آلمان و میکروسکوپ نوری ساخت شرکت Nikon با دوربین رقمی (CCD) متصل به آن به کار گرفته شده است.

روش ها

ساخت ریزگویی ها

برای ساخت ریزگویی ها ابتدا ۷۵g نانوهیدروکسی آپاتیت با ۱۰ mL آب مخلوط شده و به منظور پراکندن نانوذرات در داخل ساختار کامپوزیت به شکل یکنواخت، از امواج فراصوت به مدت ۱ min در توان ۵۰ W و بسامد ۰/۶ Hz استفاده شده است. سپس، مقدار ۳g ژلاتین به مخلوط آب و نانوهیدروکسی آپاتیت اضافه و در دمای ۶۰°C مخلوط شدند. پس از آن، ۶ mL محلول نانوهیدروکسی آپاتیت - ژلاتین به شکل قطره قطره در حجم های مختلف روغن زیتون اضافه شد و به مدت ۳۰ min با سرعت های مختلف هم زن مخلوط شدند. محلول ژلاتین و روغن زیتون، هر دو تا دمای ۶۰°C پیش گرم شدند. پس از هم زدن، مخلوط به سرعت سرد و به دمای ۵°C رسانده شد و به مدت ۳۰ min هم زده شد. سپس، با اضافه کردن ۱۵۰ mL استون با دمای ۵°C به مدت ۳۰ min دیگر هم زده شد. ریزگویی ها به روش صاف کردن جمع آوری و با استون چند مرتبه شسته شدند تا باقی مانده روغن حذف شود [۲۰].

طراحی آزمون ها

در این پژوهش، طراحی آزمون ها با استفاده از روش رویه پاسخ با دو متغیر (سرعت هم زن و نسبت فاز آبی به آلی) و در سه سطح با استفاده از نرم افزار Design Expert 6 انجام شده است. برای از بین بردن اثر عوامل محیطی، نمونه ها به طور تصادفی ساخته شده اند [۲۲، ۲۱]. در جدول ۱ آزمون های طراحی شده، آمده است.

به منظور بررسی آماری نتایج که شامل بررسی معتبر بودن مدل پیشنهادی برای تخمین اندازه ذرات در محدوده آزمون، تعیین مقدار اثر هر کدام از متغیرها روی پاسخ و نیز بررسی اثر اصلی و متقابل متغیرها روی پاسخ است، از تحلیل واریانس شامل بررسی R^2 ، R^2 ، P value، تطبیقی، R^2 تخمینی و کفایت دقت مدل (adequate precision) استفاده شده است.

بررسی اندازه ریزگویی های ژلاتین - نانوهیدروکسی آپاتیت

اندازه ریزگویی ها به کمک میکروسکوپ نوری اندازه گیری شده است. از هر نمونه چند اسلاید تهیه و از هر اسلاید بین ۱۰ تا ۳۰ تصویر گرفته شده است. تصاویر حاصل با استفاده از نرم افزار Image Pro Plus

اندازه ریزگویی ها مشاهده می شود. با افزایش سرعت هم زن، اندازه ریزگویی ها به مقدار قابل ملاحظه ای کاهش یافته است. شکل ۲ اثر نسبت حجمی فاز آبی به آلی را نشان می دهد. با افزایش نسبت حجمی فاز آبی به آلی تغییرات اندکی در اندازه ریزگویی ها مشاهده می شود و با افزایش نسبت حجمی فاز آبی به آلی اندازه آنها به طور مختصری کاهش یافته است.

تعیین مدلی برای تخمین اندازه ریزگویی ها

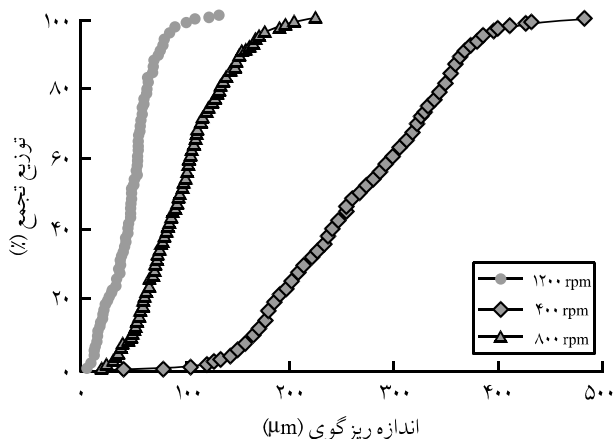
برای ارزیابی و تخمین اندازه ریزگویی ها در محدوده آزمون از مدل درجه دوم استفاده شده است که به شکل معادله (۱) است [۲۱، ۲۲]:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 \quad (1)$$

در این معادله b میانگین عددی پاسخ های ۱۲ مجموعه آزمون و b_1 و b_2 به ترتیب ضرایب تخمینی برای عوامل x_1 و x_2 هستند. اثر اصلی نشان گر میانگین نتایج حاصل از تغییرات یک عامل از سطح پایین تا سطح بالاست. برهم کنش نشان گر تغییرات در پاسخ هم زمان با تغییر یک یا چند عامل دیگر است [۲۱].

مدل پیشنهادی برای تخمین اندازه ریزگویی ها (y) بر حسب سرعت هم زن (x_1) و نسبت حجمی فاز آبی به آلی (x_2) با استفاده از نتایج حاصل از اندازه گیری ریزگویی های تهیه شده به شکل معادله (۲) است:

$$y = 644/7 - 70/73x_1 - 43/3x_2 + 0/318x_1x_2 + 4/5 \times 10^{-4}x_1^2 - 762/5x_2^2 \quad (2)$$



شکل ۱- نمودار تجمعی اندازه ریزگویی های ژلاتین - نانو هیدروکسی آپاتیت تهیه شده با سرعت های مختلف هم زن.

جدول ۱- طراحی آزمون انجام شده و اندازه ریزگویی های مشاهده شده و تخمینی به کمک مدل برای هر آزمون.

کد نمونه	دور هم زن (rpm)	نسبت فاز آبی به آلی	
		اندازه ذرات (μm)	مقدار مشاهده شده
۱	۴۰۰	۰/۲	۲۶۴
۲	۴۰۰	۰/۱	۲۹۶
۳	۸۰۰	۰/۲	۸۴
۴	۸۰۰	۰/۲	۱۰۲
۵	۱۲۰۰	۰/۲	۴۹
۶	۸۰۰	۰/۲	۱۰۵
۷	۸۰۰	۰/۳	۶۸
۸	۸۰۰	۰/۲	۹۱
۹	۱۲۰۰	۰/۱	۴۷
۱۰	۸۰۰	۰/۱	۸۳
۱۱	۴۰۰	۰/۳	۲۵۰
۱۲	۱۲۰۰	۰/۳	۵۲

تحلیل شده است. به طور متوسط از هر نمونه، اندازه ۱۰۰۰ ریزگویی بررسی و سپس نمودار تجمع اندازه آنها رسم شده است. برای گزارش اندازه ریزگویی ها از میانه اندازه آنها (D_{50}) استفاده شده است.

بررسی شکل شناسی ریزگویی های ژلاتین - نانوهیدروکسی آپاتیت

شکل شناسی ریزگویی های ساخته شده با استفاده از میکروسکوپ الکترون پویشی بررسی شده است. سطح ریزگویی ها پیش از تصویربرداری با طلا پوشش دهی شده است.

بررسی توزیع نانوذرات در ریزگویی های ژلاتین - نانوهیدروکسی آپاتیت

برای بررسی نحوه توزیع نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در داخل ریزگویی های از نقشه عنصری کلسیم استفاده شد که به کمک روش تجزیه پراکندگی انرژی پرتو X تهیه شده است.

نتایج و بحث

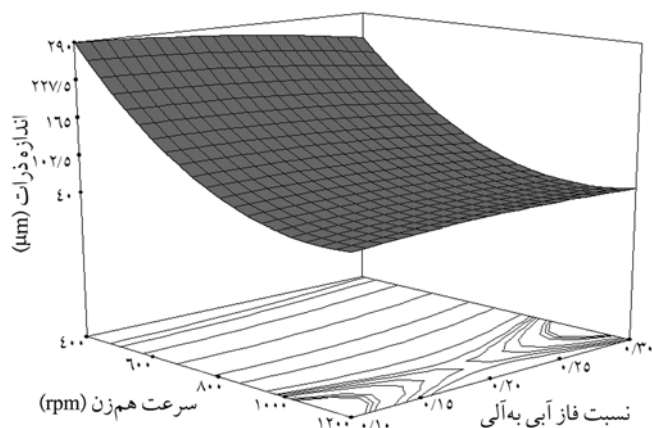
اندازه ریزگویی ها و توزیع آنها با استفاده از میکروسکوپ نوری و تحلیل تصاویر حاصل بررسی شده است. نمودار تجمعی اندازه ریزگویی ها در شکل های ۱ و ۲ ارائه شده است. در شکل ۱، اثر سرعت هم زن روی

و نتایج تخمینی به کمک مدل وجود دارد. P value عدم تطبیق مدل از داده های مشاهده شده $0/3632$ است که نشان گر معنی دار نبودن انحراف مدل تطبیقی از این داده هاست. تمام این نتایج نشان دهنده معتبر بودن مدل پیشنهادی است. در شکل ۳ رویه پاسخ حاصل از مدل پیشنهادی برای تخمین اندازه ریزگویی ها مشاهده می شود.

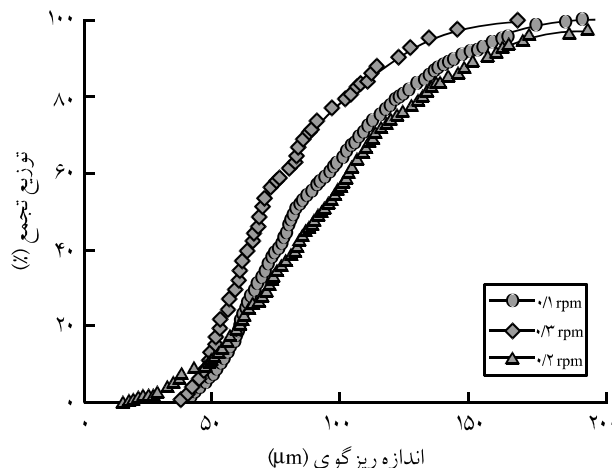
در شکل ۴ - الف اثر سرعت هم زن در نسبت های مختلف نسبت حجمی فاز آبی به آلی روی اندازه ریزگویی ها مشاهده می شود. همان طور که در جدول ۳ مشاهده می شود، سرعت هم زن به شکل معنی داری روی این اندازه ریزگویی ها اثر دارد (P value کمتر از $0/001$) و با افزایش سرعت هم زن، اندازه ریزگویی ها کاهش می یابد. این مسئله می تواند به دلیل افزایش نیروی برشی وارد بر میکروقطره های فاز آبی تشکیل شده در فاز آلی در داخل امولسیون باشد که باعث تشکیل میکروقطره های کوچک تر و در نتیجه ریزگویی با اندازه کوچک تر می شود. این نتایج در تطابق با نتایج گزارش شده توسط دیناروند و همکاران است [۲۳، ۲۴].

اثر نسبت حجمی فاز آبی به آلی در سرعت های مختلف هم زن در شکل ۴ - ب مشاهده می شود. همان طور که در جدول ۳ مشاهده می شود، نسبت حجمی فاز آبی به آلی در محدوده آزمون به تنهایی اثر معنی داری روی اندازه ریزگویی ها ندارد. اما با تغییر سرعت هم زن، اثر این پارامتر از لحاظ آماری تقریباً معنی دار می شود (P value برابر با $0/059$).

همان طور که در شکل ۴ - ب مشاهده می شود، نسبت فاز آبی به آلی در سرعت های مختلف هم زن، اثر متفاوتی بر اندازه ریزگویی ها دارد. نسبت فاز آبی به آلی در سرعت های کم هم زن اثر منفی و در سرعت های زیاد هم زن اثر مثبت روی اندازه ریزگویی ها دارد. با افزایش



شکل ۳ - رویه پاسخ اندازه ریزگویی های ژلاتین - نانوهیدروکسی آباتیت بر حسب نسبت حجمی فاز آبی به آلی و سرعت هم زن.



شکل ۲ - نمودار تجمعی اندازه ریزگویی های ژلاتین - نانوهیدروکسی آباتیت تهیه شده با نسبت های حجمی مختلف فاز آبی به آلی.

برای بررسی معتبر بودن مدل پیشنهادی در محدوده آزمون از تعیین R^2 , R^2 , P value تطبیقی و تخمینی و مقدار کفایت دقت استفاده شده است.

همان طور که در جدول ۲ مشاهده می شود، P value مدل پیشنهادی کمتر از $0/001$ است و بیان گر معنی دار بودن مدل پیشنهادی است. مقادیر R^2 تطبیقی و تخمینی به ترتیب برابر با $0/98$ ، $0/99$ و $0/96$ است. مقادیر R^2 همگی به یک نزدیک بوده و مقدار R^2 تطبیقی و تخمینی نیز با یک دیگر هم خوانی دارد. یکی دیگر از پارامترهایی که بیان گر معتبر بودن مدل است، مقدار کفایت دقت مدل است که مقدار علامت به نوبه را در سامانه نشان می دهد و مقادیر بیشتر از ۴ بیان گر مطلوب بودن مدل است [۲۲].

مقدار کفایت دقت مدل پیشنهادی 376 است که نشان دهنده معتبر و مطلوب بودن این مدل است. در جدول ۱، مقدار تطابق داده های مشاهده شده و تخمینی به کمک مدل برای آزمون های مختلف ارائه شده است. همان طور که مشاهده می شود، تطابق خوبی بین داده های مشاهده شده

جدول ۲ - تحلیل واریانس مدل پیشنهادی برای تخمین اندازه ریزگویی ها.

کفایت دقت	R^2		R^2	P value مدل	کمیت
	تخمینی	تطبیقی			
$376/1$	$0/96$	$0/985$	$0/99$	$0/001 >$	مدل درجه دوم
-	-	-	-	$0/3632$	عدم تطابق مدل

جدول ۳ - P value جمله های مختلف در مدل پیشنهادی.

جمله	x_1	x_2	x_1^2	x_2^2	$x_1 x_2$
P value	< ۰/۰۰۰۱	۰/۰۸۳۲	< ۰/۰۰۰۱	۰/۳۰۱۳	۰/۰۵۹۸

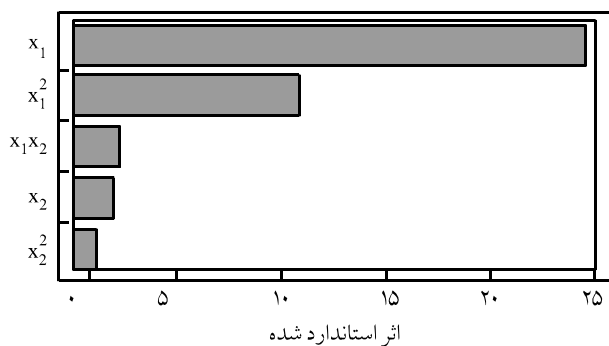
که در آن η ، η_c و η_d به ترتیب گرانیوی امولسیون، فازهای پیوسته و پراکنده و Φ کسر حجمی فاز آبی است. افزایش گرانیوی امولسیون باعث افزایش اندازه ریزگویی حاصل می شود.

در سرعت های کم، احتمال برخورد ریزگویی ها به یک دیگر کاهش می یابد. از طرف دیگر، با افزایش نسبت فاز آبی به آلی، مقدار اثرگذاری نیروی تششی وارد شده به میکروقطره ها افزایش یافته و میکروقطره هایی با اندازه کوچک تر در امولسیون تشکیل می شود که این مسئله باعث کاهش اندازه ریزگویی ها می شود. Jeyanthi و همکاران [۲۶] و Sah و همکاران [۲۷] نیز نتایج مشابهی را در تهیه ریزگویی پلیمری گزارش کرده اند.

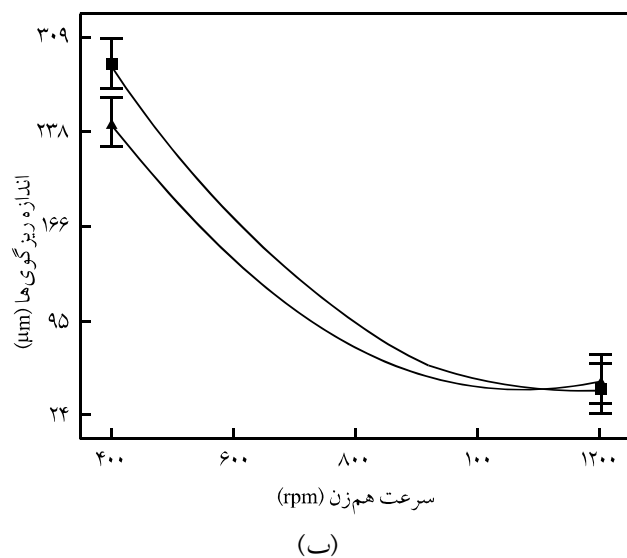
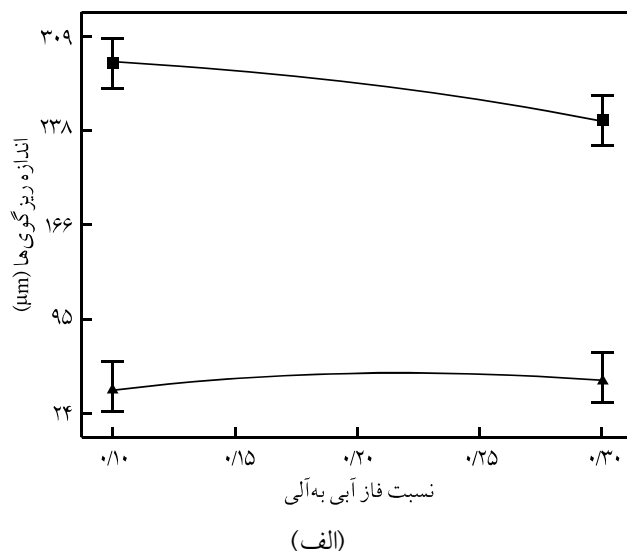
در شکل ۵، نمودار پارتو که نشان دهنده مقدار اثرگذاری پارامترهای اصلی و برهم کنش آنها روی پاسخ است، ارائه شده است. همان طور که در شکل مشاهده می شود، سرعت هم زن و برهم کنش بین سرعت هم زن و نسبت حجمی فاز آبی به آلی اثر معنی داری روی اندازه ریزگویی ها دارند. هم چنین، سرعت هم زن بیشترین اثر را روی اندازه ریزگویی ها دارد.

بررسی شکل شناسی ریزگویی های ژلاتین - نانوهیدروکسی آپاتیت

در شکل های ۶ و ۷ مشاهده می شود، ریزگویی های ساخته شده در سرعت های مختلف هم زن و نسبت های حجمی مختلف فاز آبی به آلی کروی شکل هستند و چسبندگی بین ریزگویی ها مشاهده نمی شود.



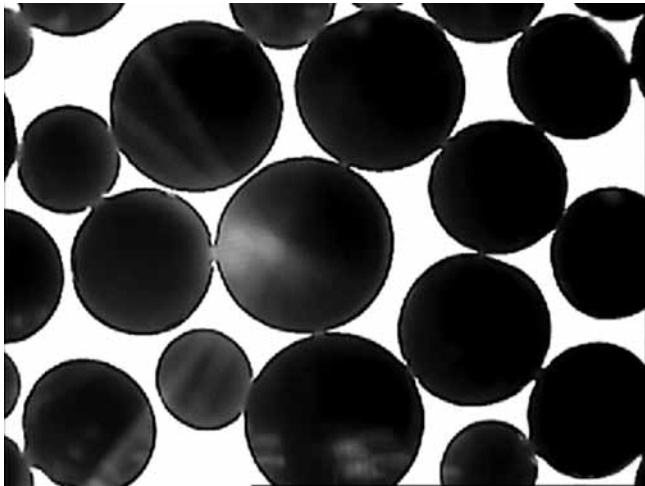
شکل ۵ - نمودار پارتو و بررسی مقدار اثرگذاری سرعت هم زن (x_1) و نسبت حجمی فاز آبی به آلی (x_2) و برهم کنش آنها ($x_1 x_2$) روی اندازه ریزگویی های ژلاتین - نانو هیدروکسی آپاتیت.



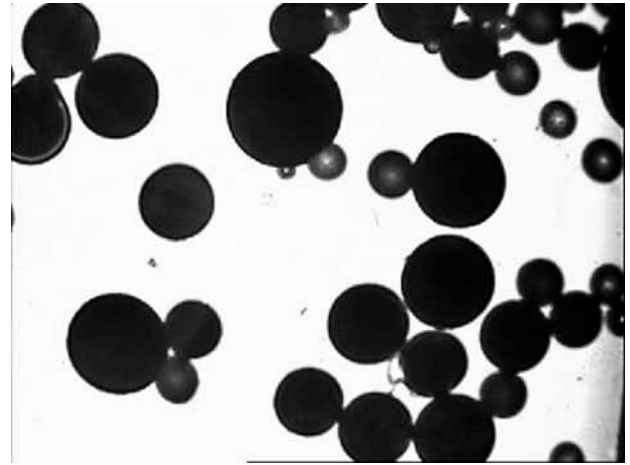
شکل ۴ - (الف) اثر سرعت هم زن در نسبت حجمی مختلف فاز آبی به آلی: ۰/۱ (■) و ۰/۳ (▲) و (ب) اثر نسبت حجمی فاز آبی به آلی روی اندازه ریزگویی ها در سرعت های مختلف هم زن: ۴۰۰ rpm (■) و ۱۲۰۰ rpm (▲).

نسبت فاز آبی به آلی، حجم فاز داخلی افزایش یافته و فاصله بین میکروقطره ها در داخل امولسیون کاهش می یابد. در سرعت های زیاد هم زن، این مسئله می تواند باعث افزایش برخورد میکروقطره ها با یک دیگر و در نتیجه افزایش اندازه ریزگویی حاصل شود. افزون بر این، Dan و همکاران [۲۵] نشان داده اند که افزایش کسر حجمی فاز آبی در امولسیون بر اساس معادله (۳) می تواند باعث افزایش گرانیوی امولسیون شود:

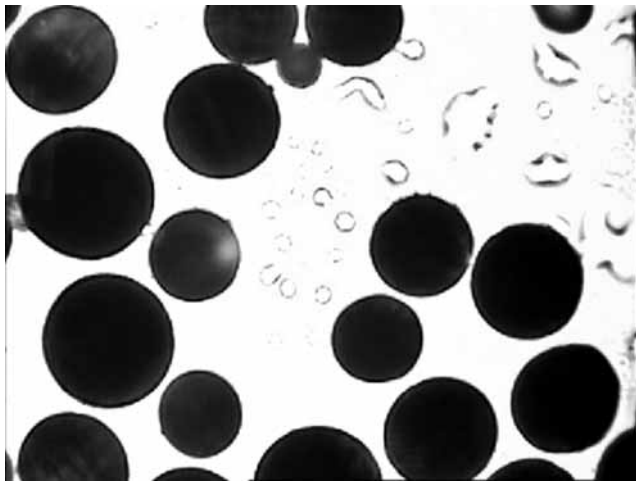
$$\eta = \eta_c [1 + 2.5 \times \Phi \left(\frac{\eta_d + 0.4\eta_c}{\eta_d + \eta_c} \right)] \quad (3)$$



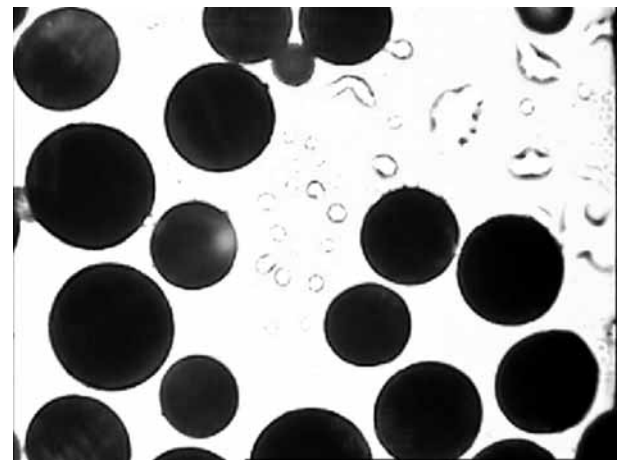
(الف)



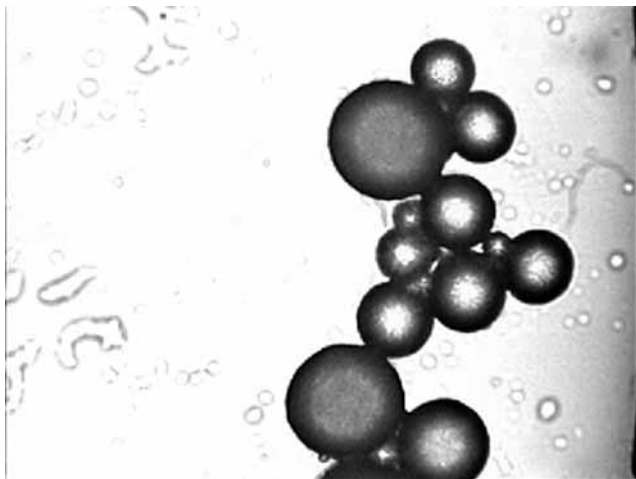
(الف)



(ب)



(ب)



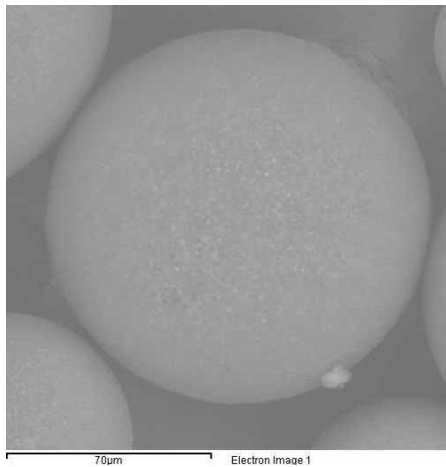
(ج)



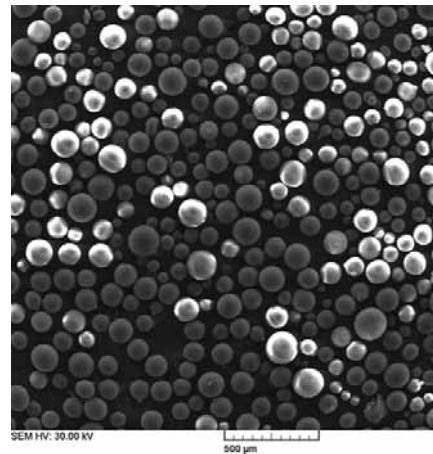
(ج)

شکل ۷ - تصاویر میکروسکوپ نوری ریزگویی های ساخته شده (با بزرگ نمایی ۲۰۰) در سرعت ثابت هم زن ۸۰۰ rpm و نسبت های حجمی مختلف فاز آبی به آلی: (الف) ۰/۱، (ب) ۰/۲ و (ج) ۰/۳.

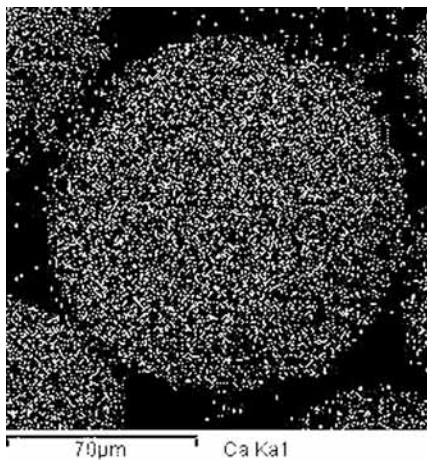
شکل ۶ - تصاویر میکروسکوپ نوری ریزگویی های ساخته شده در نسبت حجمی فاز آبی به آلی ثابت ۰/۲ و سرعت های مختلف هم زن: (الف) ۴۰۰ rpm با بزرگ نمایی ۱۰۰، (ب) ۸۰۰ rpm با بزرگ نمایی ۲۰۰ و (ج) ۱۲۰۰ rpm با بزرگ نمایی ۴۰۰.



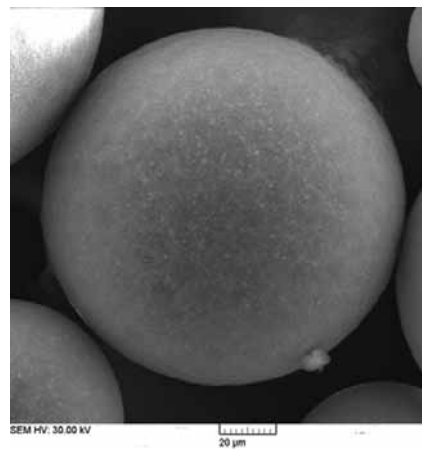
(الف)



(الف)



(ب)



(ب)

شکل ۹ - نقشه عنصری کلسیم روی ریزگویی های ساخته شده در سرعت هم زن ۸۰۰ rpm و فاز آبی به آلی ۰/۲: (الف) تصویر الکترونی سطح ریزگویی و (ب) نقشه عنصری کلسیم سطح.

شکل ۸ - تصاویر میکروسکوپ الکترونی ریزگویی های ژلاتین - نانوهیدروکسی آپاتیت در دو بزرگ نمایی مختلف.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی نیز حاکی از تشکیل ریزگویی هایی با سطح صاف و کروی شکل است (شکل ۸).

برای بررسی توزیع نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در داخل و روی سطح ریزگویی ها از نقشه عنصری کلسیم استفاده شده است. کلسیم یکی از عناصر تشکیل دهنده هیدروکسی آپاتیت است و تنها در نانوذرات هیدروکسی آپاتیت وجود دارد. وجود کلسیم در ریزگویی ها نشان گر وجود نانوذرات هیدروکسی آپاتیت است. همان طور که در شکل های ۹- الف و ب مشاهده می شود، نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به طور یکنواخت روی سطح ریزگویی توزیع شده است. این مسئله نشان می دهد، استفاده از امواج فراصوت روش مناسبی برای توزیع نانوذرات در محلول ژلاتین بوده است.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهد، با افزایش سرعت هم زن، اندازه ریزگویی های تهیه شده کاهش می یابد. هم چنین، افزایش نسبت حجمی فاز آبی به آلی در سرعت های زیاد هم زن باعث افزایش و در سرعت های کم به طور مختصری باعث کاهش اندازه ریزگویی ها شده است. بررسی های آماری نشان می دهد، مدل پیشنهادی در این پژوهش مدل مناسبی برای پیش بینی اندازه ذرات در محدود طراحی شده آزمون است و اثر سرعت هم زن روی اندازه ذرات قابل ملاحظه تر از اثر نسبت فاز آبی به آلی بوده است. بررسی شکل شناسی ریزگویی ها حاکی از

قدردانی

از پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران برای پشتیبانی مالی و فنی از این طرح تشکر و قدردانی می شود.

مراجع

1. Bigi A., Boanini E., Panzavolta S., Roveri N., and Rubini K., Bonelike Apatite Growth on Hydroxyapatite-Gelatin Sponges from Simulated Body Fluid, *J. Biomed. Mater. Res.*, **59**, 709-714, 2002.
2. Hsu F.Y., Tsai S.W., Lan C.W., and Wang Y.J., An In Vivo Study of a Bone Grafting Material Consisting of Hydroxyapatite and Reconstituted Collagen, *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, **16**, 341-345, 2005.
3. Zandi M., Mirzadeh H., Mayer C., Urch H., Baghban Eslaminejad M., and Bagheri F., Biocompatibility Evaluation of Nano-rod Hydroxyapatite/Gelatin Coated with Nano-HAp as a Novel Scaffold Using Mesenchymal Stem Cells, *J. Biomed. Mater. Res., In Press*, 2009.
4. Mohamadi Y., Mirzadeh H., Moztaarzadeh F., Soleimani M., and Jabbari E., Bone Differentiation of the Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells Using Beta-Tricalcium Phosphate/Alginate/Gelatin Hybrid Scaffolds, *J. Tissue. Eng. Regen. Med.*, **1**, 417-424, 2007.
5. Mohamadi Y., Mirzadeh H., Moztaarzadeh F., Soleimani M., and Jabbari E., Design and Fabrication of Biodegradable Porous Chitosan/Gelatin/Tricalcium Phosphate Hybrid Scaffolds for Tissue Engineering, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (In Persian)*, **20**, 297-308, 2007.
6. Pradeesh T.S., Sunny M.C., Varma H.K., and Ramesh P., Preparation of Microstructured Hydroxyapatite Microspheres Using Oil in Water Emulsions, *Bull. Mater. Sci.*, **28**, 383-390, 2005.
7. Hsu F.Y., Chueh S.C., and Wang Y.J., Microspheres of Hydroxyapatite/Reconstituted Collagen as Supports for Osteoblast Cell Growth, *Biomaterials*, **20**, 1931-1936, 1999.
8. Chang S.H., Hsu Y.M., Wang Y.J., Tsao Y.P., Tung K.Y., and Wang T.Y., Fabrication of Pre-determined Shape of Bone Segment with Collagen-Hydroxyapatite Scaffold and Autogenous Platelet-rich Plasma, *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, **20**, 23-31, 2009.
9. Zandi M., Mirzadeh H., and Mayer C., Effect of Temperature and pH on Chain Mobility of Gelatin During Early Stages of Gelation, *Iran. Polym. J.*, **16**, 861-870, 2007.
10. Chang M.C., Douglas W.H., and Tanaka J., Organic-Inorganic Interaction and the Growth Mechanism of Hydroxyapatite Crystals in Gelatin Matrices Between 37 and 80°C, *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, **17**, 387-396, 2006.
11. Askarzadeh K., Orang F., and Moztaarzadeh F., Fabrication and Characterization of a Porous Composite Scaffold Based on Gelatin and Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering, *Iran. Polym. J.*, **14**, 511-520, 2005.
12. Kim H.W., Yoon B.H., and Kim H.E., Microsphere of Apatite-Gelatin Nanocomposite as Bone Regenerative Filler, *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, **16**, 1105-1109, 2005.
13. Sivakumar M., Manjubala I., and Panduranga Rao K., Preparation, Characterization and In Vitro Release of Gentamicin from Coralline Hydroxyapatite-Chitosan Composite Microspheres, *Carbohydr. Polym.*, **49**, 281-288, 2002.
14. Sivakumar M. and Panduranga Rao K., Preparation, Characterization and In Vitro Release of Gentamicin from Coralline Hydroxyapatite-Gelatin Composite Microspheres, *Biomaterials*, **23**, 3175-3181, 2002.
15. Wei H.J., Yang H.H., Chen C.H., Lin W.W., Chen S.C., Lai P.H., Chang Y., and Sung H.W., Gelatin Microspheres Encapsulated with a Nonpeptide Angiogenic Agent, Ginsenoside Rg1, for Intramyocardial Injection in a Rat Model with Infarcted Myocardium, *J. Control. Rel.*, **120**, 27-34, 2007.
16. Liang H.C., Chang W.H., Lin K.J., and Sung H.W., Genipin-Crosslinked Gelatin Microspheres as a Drug Carrier for Intramuscular Administration: In Vitro and In Vivo Studies, *J. Biomed. Mater. Res.*, **65A**, 271-282, 2003.
17. Wang Y.J., Lin F.H., Sun J.S., Huang Y.C., Chueh S.C., and Hsu F.Y., Collagen-Hydroxyapatite Microspheres as Carriers for Bone Morphogenic Protein-4, *Artificial Organs*, **27**, 162-168, 2003.
18. Teng S., Chen L., Guo Y., and Shi J., Formation of Nano-

- Hydroxyapatite in Gelatin Droplets and the Resulting Porous Composite Microspheres, *J. Inorgan. Biochem.*, **101**, 686-691, 2007.
19. Li J., Chen Y., Yin Y., Yao F., and Yao K., Modulation of Nano-hydroxyapatite Size via Formation on Chitosan-Gelatin Network Film In Situ, *Biomaterials*, **28**, 781-790, 2007.
 20. Adhirajan N., Shanmugasundaram N., and Babu M., Gelatin Microspheres Cross-Linked with EDC as a Drug Delivery System for Doxycycline: Development and Characterization, *J. Microencapsulat.*, **24**, 659-671, 2007
 21. Bhavsar M.D., Tiwari S.B., and Amiji M.M., Formulation Optimization for the Nanoparticles-in-Microsphere Hybrid Oral Delivery System Using Factorial Design, *J. Control. Rel.*, **110**, 422- 430, 2006.
 22. Montgomery D.C., *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley and Sons, New York, Chap. 11, 2000.
 23. Dinarvand R., Mahmoodi S., Farboud E., Salehi M., and Atyabi F., Preparation of Gelatin Microspheres Containing Lactic Acid-Effect of Cross-linking on Drug Release, *Acta Pharm.*, **55**, 57-67, 2005.
 24. Dinarvand R., Mahmoodi S., and Farboud E., Effect of Process Variables on Particle Size of Gelatin Microspheres Containing Lactic Acid, *Pharm. Develop. Technol.*, **9**, 291-299, 2004.
 25. Dan D. and Jing G., Apparent Viscosity Prediction of Non-Newtonian Water-in-Crude Oil Emulsions, *J. Petro. Sci. Eng.*, **53**, 113-122, 2006.
 26. Jeyanthi R., Mehta R.C., Thanoo B.C., and DeLuca P.P., Effect of Processing Parameters on the Properties of Peptide-containing PLGA Microspheres, *J. Microencapsul.*, **14**, 163-174, 1997.
 27. Sah H., Microencapsulation Techniques Using Ethyl Acetate as a Dispersed Solvent: Effects of Its Extraction Rate on the Characteristics of PLGA Microspheres, *J. Control. Rel.*, **47**, 233- 245, 1997.