

سنتز هیدروژل نانوکامپوزیت آهن و بررسی رهایش داروی ضدسرطان دوکسوروبیسین

قاسم رضانژاد بردجی*⁺، سمانه السادات حسینی

دانشکده شیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده: در این پژوهش برای اولین بار هیدروژل نانوکامپوزیت آهن بر پایه پلی (۲- دی متیل آمینو) اتیلن متاآکریلات پیوند زده شده بر روی پلیمر زیست‌سازگار ثعلب سنتز شد. تکپارهای (۲- دی متیل آمینو) اتیلن متاآکریلات بر روی اسکلت ثعلب پیوند زده می‌شوند و هم زمان با آن، اتصال‌های عرضی نیز ایجاد می‌شوند. در واکنش یاد شده متیلن بیس آکریل آمید (MBA) به عنوان شبکه‌ساز و آمونیوم پرسولفات (APS) به عنوان آغازگر گرمایی عمل می‌کنند. عمل‌های مؤثر بر میزان جذب آب به روش سیستماتیک بهینه‌سازی شدند تا ابرجاذبی با بالاترین ظرفیت تورمی به دست آید. سپس رفتار تورمی ابرجاذب بهینه شده در شرایط گوناگون (محلول‌های نمکی متفاوت، محلول آبی با pHهای متفاوت، مخلوط حلال‌های آلی با آب و...) بررسی شد. سنتیک جذب آب در شرایط عادی و تحت بار نیز مطالعه و در مورد برگشت‌پذیری تعدادی از رفتارهای هوشمندانه آن‌ها پژوهش شد. رهایش داروی دوکسوروبیسین از ساختار هیدروژل نانوکامپوزیت آهن مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌های آزمایش به خوبی نشان داد که رهایش داروی دوکسوروبیسین از هیدروژل سنتز شده به pH محیط حساس است. برای اثبات پیوند خوردن (۲- دی متیل آمینو) اتیلن متاآکریلات بر روی ثعلب از طیف FT-IR استفاده شد. ریخت‌شناسی هیدروژل نیز با دستگاه SEM بررسی شد. قطر نانو ذره‌ها با تصویر TEM و AFM حدود ۹ تا ۱۱ نانومتر تخمین زده شد.

واژه‌های کلیدی: هیدروژل نانوکامپوزیت؛ نانوذره آهن؛ ثعلب؛ رهایش دارو؛ دوکسوروبیسین.

KEYWORDS: Hydrogel nanocomposites; Iron nanoparticles; Salep; Drug release; Doxorubicin.

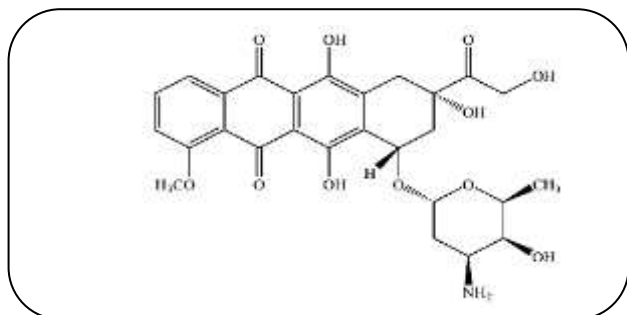
مقدمه

اثر مفید را با کمترین اثرهای جانبی داشته باشند، لازم است که با سرعت مناسب در بافت بدن آزاد شوند که این ویژگی با روش‌های سنتی دارورسانی به بافت‌ها و شیمی درمانی مؤثر نمی‌شود [۱-۴]. در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های چشمگیری در استفاده از هیدروژل‌های قابل تورم در آب به‌عنوان حامل‌های هدفمند برای رهایش دارو انجام گرفته است. در این میان ماهیت، اندازه حفره‌ها، پایداری و پاسخگویی آن‌ها به محرک‌های خارجی

با پیشرفت نانو فناوری در علوم پزشکی، مفهوم تازه‌ای با عنوان دارورسانی کنترل‌شده هم وارد موضوع‌های مطرح در دانش زیستی شد. دارورسانی کنترل‌شده عبارت است از این که یک مقدار مشخصی از دارو در بافت مورد نظر در طول مدت زمان مشخصی و با سرعت مناسب و کنترل‌شده آزاد شود. اهمیت استفاده از این سامانه‌ها، از آنجایی ناشی شده است که بسیاری از داروها (به ویژه داروهای ضد سرطان) برای این که بیش‌ترین

*عهدہ دار مکاتبات

+E-mail: rezanejad@pnu.ac.ir



شکل ۱- ساختار شیمیایی دوکسوروبیسین

ولی فرمول شیمیایی صحیح آن به صورت $FeO \cdot Fe_2O_3$ است [۱۵]. دوکسوروبیسین (شکل ۱) با نام تجاری آدریامايسين یکی از قوی‌ترین و پرمصرف‌ترین داروهای ضد سرطان است که با جلوگیری از تشکیل اسیدهای نوکلئیک در درون سلول‌های سرطان مانند سرطان پستان، مثانه، تخمدان، تیروئید، معده، ریه، استخوان، بافت‌های عصبی، عضله‌ها، مفاصل‌ها، و بافت نرم مورد استفاده قرار می‌گیرد. دوکسوروبیسین همچنین برای درمان بیماری هوچکین و انواع خاصی از سرطان خون استفاده می‌شود [۱۶].

در این پژوهش نانوذره آهن به روش هم‌رسوبی سنتز شد و به عنوان ماده پرکننده و تقویت‌کننده درون ماتریکس هیدروژل قرار گرفت. در این **طرح** متیلن‌بیس‌آکریل‌امید به‌عنوان عامل **تثبیت‌کننده** (۲- دی متیل آمینو) اتیلن متاآکریلات به‌عنوان مونومر حساس به pH، از آمونیوم پرسولفات به‌عنوان آغازگر گرمایی و از پلی‌ساکارید زیست سازگار ثعلب به‌عنوان بستر واکنش **درست‌هیدروژل** **استفاده** شد. متغیرهای مؤثر نسبت به واکنش هم‌بار شدن پیوندی (غلظت مونومر، شبکه‌ساز و آغازگر) برای دستیابی به بیش‌ترین میزان جذب آب بهینه شدند. اثر عامل‌های گوناگون محیطی و آزمایشگاهی مانند اثر زمان، دما، محلول نمک‌های چند ظرفیتی، pH و فشار نیز بر جذب آب هیدروژل نانوکامپوزیت آهن آزمایش شد. سپس ره‌ایش داروی دوکسوروبیسین در دو pH متفاوت (۷٫۴ (pH سلول سالم) و ۵٫۴ (pH سلول سرطانی) از بستر هیدروژل نانوکامپوزیت آهن مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌ها نشان داد که ره‌ایش به pH محیط وابسته است. به‌دلیل زیست سازگاری و زیست تخریب‌پذیری این سامانه، انتظار می‌رود که ویژگی‌های ره‌ایش کنترل‌شده دارو به‌وسیله هیدروژل نانوکامپوزیت آهن تهیه شده در این پژوهش، بهبود چشمگیری را نشان دهد و بتوان از آن در صنایع دارویی و پزشکی استفاده کرد.

از مهم‌ترین رفتارهای این شبکه‌ها به شمار می‌روند [۵]. هیدروژل‌ها بسیاری از آب‌دوست، با شبکه‌ی سه‌بعدی و در دارای اتصال‌های عرضی هستند. به‌عبارت دیگر بسیاری از گروه‌های آب‌دوست (مانند OH، NH_2 ، COOH، SO_3H ، COONa و ...) است، هیدروژل نامیده می‌شود. ابرجاذب‌ها بسیاری به شدت آب‌دوست هستند [۶] که به‌دلیل وجود پیوندهای عرضی، به‌میزان اندک در ساختار آن‌ها، در آستانه حل شدن، به شکل متورم در می‌آیند و مقدار زیادی آب را جذب و حتی تحت فشار، در خود نگه می‌دارند [۸، ۷].

کامپوزیت از چند ماده متمایز ساخته شده است، به‌طوری که این اجزا به آسانی قابل شناسایی هستند. نانوکامپوزیت نیز همان کامپوزیت است که یک یا چند جزء آن، اندازه‌ی کمتر از ۱۰۰ نانومتر را دارند. نانوکامپوزیت‌ها از دو فاز ساخته شده‌اند، فاز اول یک ساختار بلوری است که در واقع پایه یا پیکره‌ی نانوکامپوزیت به‌شمار می‌رود و ممکن است از جنس پلیمر، فلز یا سرامیک باشد. فاز دوم نیز ذره‌هایی در مقیاس نانومتر می‌باشند که به‌عنوان پرکننده و برای هدف‌های ویژه‌ای مانند افزایش سختی، مقاومت، رسانش الکتریکی، ویژگی‌های مغناطیسی و ... درون فاز پایه توزیع می‌شوند. استفاده از نانوذره‌ها در کامپوزیت‌ها می‌تواند استحکام آن‌ها را افزایش و وزن آن‌ها را کاهش دهد، مقاومت شیمیایی و گرمایی آن‌ها را نیز افزایش دهد و ویژگی‌های جدیدی مانند رسانش الکتریکی پدید آورد [۹]. حضور ذره‌ها و الیاف در ساختار نانوکامپوزیت‌ها استحکام ماده پایه را افزایش می‌دهد [۱۰].

به‌منظور شیمی درمانی تومورهای سرطانی، یکی از بزرگ‌ترین چالش‌ها، انتقال دقیق مقدار مشخصی از دارو به محل خاصی از بدن و نگهداری مقدار مشخصی از آن برای زمان مناسب در بافت یاد شده است. استفاده از هیدروژل‌های نانوکامپوزیت پارامغناطیس روش هدف‌گیری فیزیکی - شیمیایی را برای دارورسانی فراهم کرده است. در این روش دارو می‌تواند با اتصال به سطح نانوذره در یک سامانه مناسب به بدن بیمار تزریق شود و با کمک میدان مغناطیسی خارجی به بافت بیمار هدایت شود [۱۱-۱۴].

مگنتیت (Fe_3O_4) یکی از معروف‌ترین اکسیدهای آهن است که سیاه رنگ است و متشکل از آهن (II) و (III) است. مگنتیت $72/3$ درصد وزنی آهن و $27/3$ درصد اکسیژن دارد و شبکه‌ی بلوری آن به صورت مکعبی است. مگنتیت شامل یون‌های دو و سه ظرفیتی آهن است و اگرچه آن را به صورت Fe_2O_3 می‌نویسند

بخش تجربی**مواد و روش****آنالیزهای دستگاهی**

برای آماده‌سازی و آنالیز نمونه از دستگاه‌هایی مانند: همزن مغناطیسی، به منظور بررسی غلظت از دستگاه Shimadzu UV-Visible 1650 PC و برای گرفتن طیف‌های زیرقرمز نمونه‌ها، از دستگاه Jasco 4200 FT-IR در بستر قرص پتاسیم برمید استفاده شده است. برای مطالعه ریخت شناسی سطوح ابرجاذب‌ها از تصویرهای میکروسکوپ الکترون روبشی (SEM) مدل Philips, XL30 استفاده شده است. برای به دست آوردن اندازه ذره‌ها از تصویرهای میکروسکوپ الکترون عبوری (TEM) مدل Zeiss TEM استفاده شد. برای به دست آوردن تصویری مجازی از سطح با قدرت تفکیک نانومتری از دستگاه میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) مدل DS-95-50E ساخت کمپانی DME استفاده شد. برای بررسی رفتار نمونه‌ها در pHهای گوناگون از دستگاه pH متر مدل Company AZ استفاده شده است. از میدان مغناطیسی برای جدا نمودن جاذب پس از فرایند جذب استفاده شد.

مواد اولیه

آمونیم پرسولفات (APS)، متیلن بیس آکریل آمید (MBA)، (۲- دی متیل آمینو) اتیلن متاآکریلات (DMA) و آمونیاک از شرکت مرک آلمان تهیه شده اند. آهن (II) کلرید تتراهیدرات و آهن (III) کلرید هگزا هیدرات از شرکت لوبا شیمی خریداری شده است. تمام مواد اولیه به همان صورتی که دریافت شده‌اند، بدون خالص‌سازی مورد استفاده قرار گرفته است. برای تهیه و اندازه‌گیری مقدار جذب هیدروژل نانوکامپوزیت آهن از آب دو بار تقطیر استفاده شده است.

سنتر هیدروژل نانوکامپوزیت آهن**سنتر نانوذره آهن**

در یک بالن مجهز به ورودی و خروجی گاز نیتروژن، مقدار ۱ گرم $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ و $2/6$ گرم $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ در آب مقطر حل و دمای واکنش را روی ۷۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر آمونیاک به صورت قطره قطره به محیط افزوده شد. واکنش به مدت ۱/۵ ساعت ادامه پیدا کرد. فراورده به دست آمده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس در آون قرار گرفت تا خشک شود [۱۵].

سنتر هیدروژل نانوکامپوزیت آهن

در این مرحله، از APS به عنوان آغازگر و از DMA به عنوان مونومر استفاده شد. از MBA به عنوان شبکه‌ساز و از ثعلب به عنوان بستری برای سنتر نانوکامپوزیت آهن استفاده شده است. مقدار ۱ گرم ثعلب درون بشر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر با دمای ۷۰ درجه سلسیوس به آن افزوده شد. بشر درون حمام آب گرم، با دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفت و توسط همزن مکانیکی با سرعت ۶۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شد. بعد از گذشت این مدت، محلولی از ۰/۰۵ گرم نانوذره آهن و داروی دوکسوروبیسین که پیش‌تر به مدت ۱۰ دقیقه با هم همگن شده‌اند را به بشر دارای ثعلب اضافه می‌کنیم و ۲۰ دقیقه توسط همزن مکانیکی مخلوط شدند MBA و DMA پس این زمان افزوده شد سرانجام پس از همگن شدن، APS را اضافه می‌کنیم. پس از گذشت نیم ساعت، بشر از حمام بیرون آورده شد تا دمای بشر به دمای محیط برسد. نانوکامپوزیت آهن با اتانول آب‌گیری شد، پس از گذشت ۲۴ ساعت ژل صاف شد و در آون خلاء قرار گرفت تا به طور کامل خشک شود. سپس ژل خشک با آسیاب به پودر تبدیل می‌شود و از الک مش شماره ۶۰ برای تعیین میزان تورم رد می‌شوند [۱۷].

اندازه‌گیری میزان جذب آب

به منظور بررسی مقدار جذب هیدروژل نانوکامپوزیت از روش کیسه چای استفاده می‌شود. مقداری از نمونه، که به طور معمول ۰/۰۲ گرم از هیدروژل است، در توری پارچه‌ای مانند کیسه چای قرار می‌گیرد (سوراخ‌های توری باید کوچک باشد) و در مقدار ۲۰۰ میلی‌لیتر آب غوطه‌ور می‌شود. پس از تورم هیدروژل در توری، کیسه را آویزان کرده تا آب فزونی آن خارج شود. ظرفیت تورم با فرمول زیر محاسبه می‌شود. وزن هیدروژل متورم شده (W_2) و وزن هیدروژل (W_1) است.

$$ES(g/g) = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \quad (1)$$

بررسی اثرهای گوناگون محیطی و آزمایشگاه بر روی جذب آب**هیدروژل نانوکامپوزیت آهن****بررسی اثر زمان**

برای بررسی مقدار جذب هیدروژل نانوکامپوزیت آهن با گذشت زمان مقدار ۰/۰۲ گرم از هیدروژل نانوکامپوزیت آهن درون توری کیسه چای ریخته شد و در بشر محتوی ۲۰۰ میلی‌لیتر آب

اثر فشار (AUL)

برای بررسی جذب آب در فشاری برابر با ۰/۳ psi، یک وزنه با جرم معین (۴۵ گرم) همراه با استوانه تفلون بر روی ذره‌های هیدروژل قرار گرفت، به طوری که استوانه تفلون به آسانی در استوانه شیشه‌ای حرکت کند. در مرحله بعد مقداری از محلول NaCl با غلظت ۰/۹٪ به پتری شیشه‌ای افزوده شد. سپس مقدار جذب آن در مدت زمان‌های مشخص اندازه‌گیری شد.

بررسی رهایش داروی دوکسوروبیسین در pHهای متفاوت

مقدار ۰/۲ گرم از هیدروژل نانوکامپوزیت آهن درون توری قرار گرفت و توری درون ۵۰ میلی‌لیتر از محلول‌های با pHهای متفاوت قرار داده شد. در مدت زمان‌های معین، مقدار ۳ میلی‌لیتر از نمونه محلول برداشته شد و طیف UV آن گرفته شد و ۳ میلی‌لیتر محلول تازه محیط رهایش جایگزین آن شد. مقدار داروی آزاد شده به وسیله طیف‌سنجی UV اندازه‌گیری شد.

نتیجه‌ها و بحث**سنتر هیدروژل نانو کامپوزیت آهن**

آمونیم پرسولفات (APS) به‌عنوان آغازگر، تحت تأثیر گرما تجزیه می‌شود و رادیکال‌های آنیون سولفات را تولید می‌کند. رادیکال آنیون سولفات به گروه‌های هیدروژن کربن انومری یا هیدروکسیل موجود در پلی ساکارید ثعلب حمله می‌کند و پیوند C-H یا O-H زنجیر پلی ساکارید شکسته می‌شود. سامانه اکسایش و کاهش پرسولفات-ساکارید، سبب ایجاد واکنش پلیمریزاسیون با آغازگر رادیکالی می‌شود که طی آن مونومر (۲-دی متیل آمینو) اتیلن متاآکریلات (DMA) به پلی (۲-دی متیل آمینو) اتیلن متاآکریلات (PDMA) تبدیل می‌شود و همزمان به زنجیر پلی ساکارید پیوند می‌خورد. در حضور عامل شبکه ساز متیلن بیس آکریل آمید (MBA)، اتصال‌های عرضی در ساختار کوپلیمر شبکه‌ای شده ثعلب - پلی (۲-دی متیل آمینو) اتیلن متاآکریلات ایجاد شده و ابرجاذب نانوکامپوزیت آهن ساخته می‌شود.

بهینه سازی هیدروژل نانوکامپوزیت

همان‌گونه که در شکل ۲ (الف) دیده می‌شود با افزایش غلظت DMA تا حد معینی، به دلیل افزایش سرعت واکنش پلیمری شدن، تعداد گروه‌های عاملی آب‌دوست DMA در طول زنجیر هیدروژل افزایش می‌یابد و در نتیجه جذب آب بیش‌تر می‌شود

مقدر قرار دادیم. سپس مقدار جذب آن در مدت زمان‌های مشخص اندازه‌گیری شد.

بررسی اثر دما

برای بررسی اثر دما بر مقدار جذب آب هیدروژل، مقدار ۰/۲ گرم از هیدروژل درون توری کیسه چای ریخته شد و در بشری محتوی ۲۰۰ میلی‌لیتر آبی که در حمام با دمای مورد نظر است قرار داده شد و جذب آب طبق جدول، پس از سه ساعت بررسی شد.

اثر آب و حلال آلی

روش کار همانند پیش بود. تنها با این تفاوت که از مخلوط آب حلال‌های آلی (اتانول و استون) با درصد‌های حجمی - حجمی گوناگون ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ به جای آب دوبار تقطیر استفاده شده و جذب آب هیدروژل نانوکامپوزیت پس از سه ساعت بررسی شده است.

اثر نمک‌های تک ظرفیتی، دو ظرفیتی و سه ظرفیتی

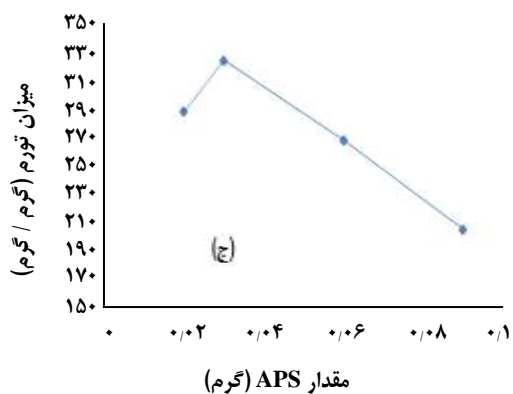
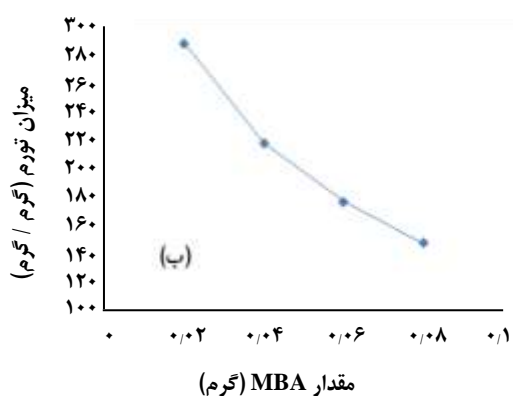
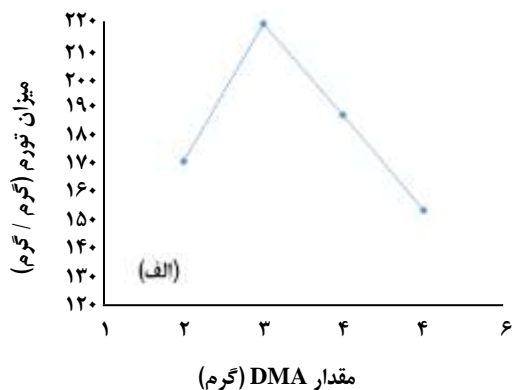
برای بررسی جذب آب در محلول نمک‌های تک ظرفیتی، سدیم کلرید (NaCl)، پتاسیم کلرید (KCl) استفاده شده است. برای تعیین جذب آب در محلول نمک‌های دو ظرفیتی، کلسیم کلرید (CaCl₂) استفاده شده است. همچنین از آلومینیم کلرید (AlCl₃) برای بررسی جذب آب در محلول نمک سه ظرفیتی استفاده شده است. محلول‌هایی با مولاریته‌های گوناگون از نمک‌ها تهیه شده و مقدار جذب آب آن پس از سه ساعت بررسی شد.

بررسی رفتار هوشمندانه هیدروژل نانوکامپوزیت آهن

در این مرحله از HCl و NaOH برای تهیه محلول‌هایی با pH=۲، pH=۴، pH=۶، pH=۷، pH=۹، pH=۱۱ استفاده شد. سپس جذب آب هیدروژل نانوکامپوزیتی آهن در هر یک از این محلول‌ها پس از سه ساعت اندازه‌گیری شد.

بررسی رفتار برگشت‌پذیری هیدروژل نانوکامپوزیتی آهن (On-Off)

برای بررسی رفتار برگشت‌پذیری هیدروژل نانوکامپوزیت آهن، میزان تورم آن را در pH که هیدروژل بیش‌ترین میزان تورم را داشته و در pH که کم‌ترین میزان تورم را داشته، در فاصله‌های زمانی مشخص اندازه‌گیری شده است.



شکل ۲- الف: اثر مقدار DMA (شرایط واکنش: ثعلب = ۱ گرم، نانوذره آهن = ۰/۰۵ گرم، g MBA=۰/۰۴ و APS=۰/۰۲)، ب: اثر مقدار MBA (شرایط واکنش: ثعلب = ۱ گرم، نانوذره آهن = ۰/۵۰ گرم، APS=۰/۰۲ و DMA=۳mL) و ج: اثر مقدار APS (شرایط واکنش: ثعلب = ۱ گرم، نانوذره آهن = ۰/۵۰ گرم، g MBA=۰/۰۲ و DMA=۳mL).

و سپس میزان جذب آب کاهش می یابد. علت این کاهش می تواند افزایش احتمالی جوربسیارش DMA، افزایش گرانیوی محیط واکنش و کند شدن حرکت رادیکال های آزاد و مولکول های DMA باشد [۱۸].

در شکل ۲ (ب) اثر تغییر غلظت MBA بر روی جذب آب هیدروژل نانوکامپوزیتی، دیده می شود با افزایش غلظت شبکه ساز، مقدار شبکه بندی زنجیرهای بسیاری افزایش یافته و فضاهای خالی قابل دسترس برای مولکول های آب کاهش می یابد. این پدیده باعث کاهش جذب آب هیدروژل نانوکامپوزیتی در غلظت های بالای MBA می شود [۱۹].

در شکل ۲ (ب) اثر تغییر غلظت APS دیده می شود. با افزایش مقدار APS جذب آب هیدروژل نانوکامپوزیتی کاهش می یابد. ظرفیت جذب آب در ابتدا به دلیل افزایش تعداد مراکز فعال (کربوکسیلیک اسید) بر روی اسکلت ثعلب افزایش می یابد. این افزایش مراکز فعال باعث آب دوست تر شدن هیدروژل نانوکامپوزیت شده و ظرفیت جذب آب افزایش می یابد. کاهش میزان جذب پس از مقدار بیشینه را می توان تا حدودی به افزایش درصد شبکه های شدن با برخوردهای دو زنجیر رادیکالی در واکنش های پایانی رادیکالی (خود شبکه های شدن) نسبت داد [۲۰، ۲۱]. بیشترین مقدار جذب آب مربوط به نمونه با ۳ میلی لیتر DMA، ۰/۰۲ گرم MBA و ۰/۰۳ گرم APS است. همه آزمایش ها و بررسی های بعدی را روی این نمونه انجام داده شد.

شناسایی ساختار و بررسی ریخت شناسی هیدروژل نانوکامپوزیت آهن طیف FT-IR

در طیف مربوط به نانوذره آهن، پیک موجود در 588 cm^{-1} مشخصه نانوذره های آهن است و پیک موجود در 3380 cm^{-1} می تواند به دلیل ارتعاش های کششی آب جذب شده روی سطح نانوذره ها باشد. در طیف هیدروژل نانوکامپوزیت آهن پیک در 1710 cm^{-1} و 1680 cm^{-1} می تواند به ارتعاش های کششی گروه کربونیل (C=O) در پلی ساکارید ثعلب و مونومر DMA نسبت داد که به طور همزمان در هیدروژل نانوکامپوزیت آهن وجود دارند. پیک گسترده در 3270 cm^{-1} به ارتعاش کششی OH در PDMA و پلی ساکارید ثعلب نسبت داده می شود. در ضمن پیک ظاهر شده در ناحیه 592 cm^{-1} ثابت می کند که نانوذره آهن در ساختار نانوکامپوزیت قرار گرفته است.

اثرهای گوناگون محیط تورم بر روی جذب آب هیدروژل نانوکامپوزیت آهن اثر زمان

همان‌گونه که در شکل ۵ نشان داده شده‌است، میزان جذب آب هیدروژل نانوکامپوزیت با گذشت زمان افزایش یافته و سرانجام به مقدار ثابت می‌رسد [۲۲].

اثر دما

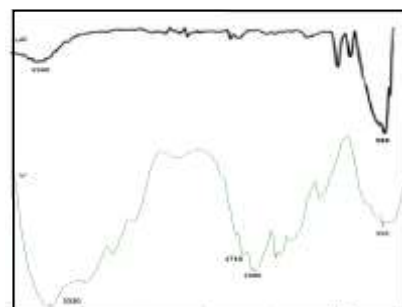
با توجه به اینکه هدف ما در این بررسی سنتز هیدروژل نانو متخلخل بوده‌است که مقاومت فیزیکی در برابر شرایط محیطی را داشته‌باشد، پس بررسی اثر دما بر میزان جذب آب این هیدروژل هم ضروری به نظر می‌رسید. همان‌گونه که در شکل ۶ مشخص است نخست با افزایش دما، انعطاف مولکول‌ها بیشتر می‌شود و در نتیجه تورم بیشتر می‌شود ولی با افزایش بیشتر دما پیوند هیدروژنی بین هیدروژل و آب می‌شکند و تورم کاهش می‌یابد. [۲۳].

اثر حلال آلی

در این مرحله مقدار جذب آب هیدروژل نانوکامپوزیت آهن در مخلوطی از آب و حلال‌های آب‌دوست مثل اتانول و استون به‌عنوان دو حلال آلی متداول و قابل امتزاج در آب، بررسی شده‌است. مطابق شکل ۷ با افزایش درصد حلال آلی از صفر به ۱۰۰، جذب آب هیدروژل نانوکامپوزیت کاهش می‌یابد. این پدیده می‌تواند به تغییر حلالیت ابرجاذب در مخلوط آب و استون (یا اتانول) نسبت داده شود. به‌طور کلی ظرفیت تورمی ابرجاذب‌ها در محیط‌های دارای حلال‌های آلی به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد. زیرا گروه‌های یونی به راحتی توسط مولکول‌های آب حلال‌پوشی می‌شوند. ولی حلال‌های آلی مانند اتانول و استون به خوبی نمی‌توانند گروه‌های یونی را حلال‌پوشی کنند و در نتیجه جذب آب کاهش می‌یابد [۲۴].

اثر نمک‌های تک ظرفیتی، دو ظرفیتی و سه ظرفیتی

برای مطالعه اثر نمک بر روی میزان جذب هیدروژل نانو کامپوزیت، از محلول‌های نمکی گوناگون استفاده شده‌است. همان‌گونه که در شکل ۸ دیده می‌شود، میزان جذب هیدروژل نانوکامپوزیتی در محلول‌های نمکی، در مقایسه با مقدار بیشینه اندازه‌گیری شده در آب دو بار تقطیر، به شدت کاهش می‌یابد. این کاهش ناخواسته

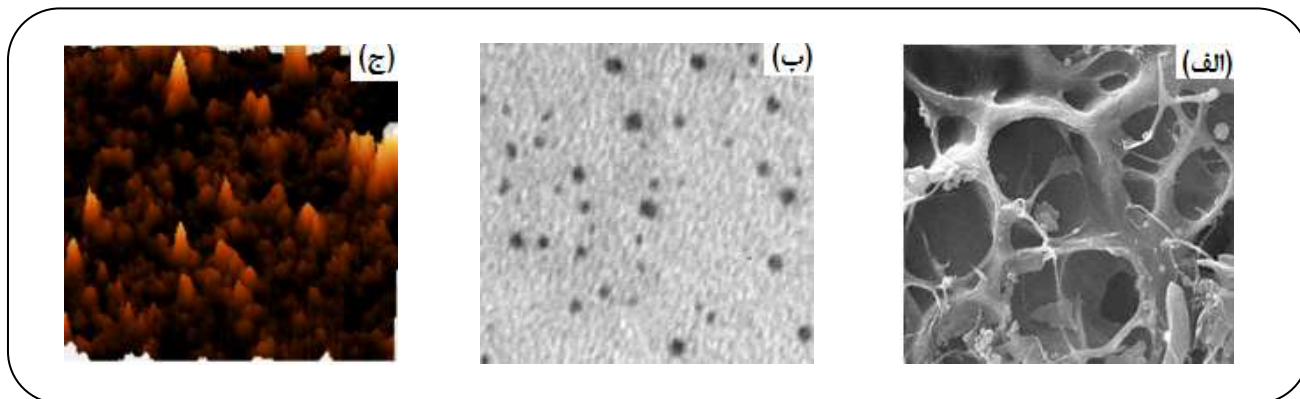


شکل ۳ - طیف FT-IR مربوط به الف: نانوذره آهن و ب: هیدروژل نانوکامپوزیت آهن.

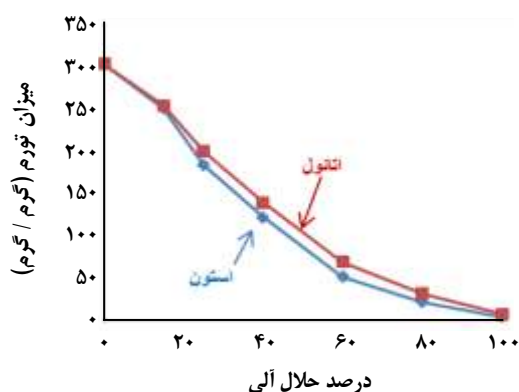
نتیجه‌های به دست آمده از تصویرهای SEM و TEM

برای بررسی ریخت شناسی سطوح هیدروژل نانوکامپوزیت آهن، تصویرهای SEM مورد استفاده قرار گرفته‌است. همان‌گونه که شکل ۴ (الف) نشان می‌دهد، هیدروژل نانوکامپوزیت سنتز شده در شرایط بهینه دارای یک ساختار نسبتاً متخلخل است. خلل و فرج شبکه‌های هیدروژل در سطح آن، یکی از عامل‌های جذب در هیدروژل می‌باشد. به گونه‌ای که سرعت تورم هیدروژل را می‌توان به ساختار آن نسبت داد. اندازه نانو ذره‌های آهن، توسط TEM مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۴ (ب)، سطح نمونه هیدروژل نانوکامپوزیت آهن سنتز شده در شرایط بهینه را نشان می‌دهد. این تصویر به‌خوبی پراکندگی نانو ذره‌های آهن در سطح هیدروژل را نشان می‌دهد. با اندازه‌گیری نانوذره‌ها در تصویر TEM و تبدیل آن‌ها به نانومتر با استفاده از مقیاس تصویر، میانگین اندازه نانو ذره‌ها در شبکه پلیمری ۹ تا ۱۱ نانومتر است.

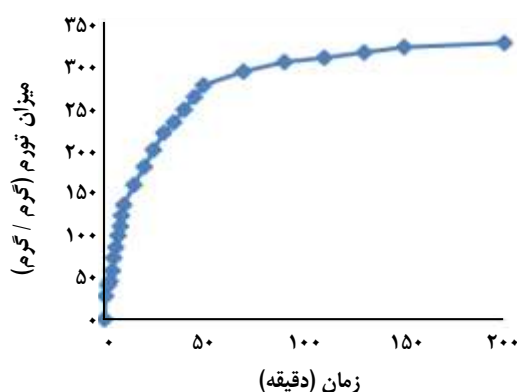
برای بررسی ویژگی‌ها و ساختار سطحی مواد در اندازه نانومتری از میکروسکوپ نیروی اتمی استفاده می‌کنیم. ویژگی‌های قابل اندازه‌گیری با این دستگاه شامل ریخت شناسی هندسی، ناخالصی سطحی و حبس نقطه‌های سطح است که در عمل این قابلیت‌ها برای یکنواختی توزیع ذره‌ها، زبری، خوردگی و اندازه ذره‌ها استفاده می‌شود. شکل ۴ (ج) تصویر AFM از هیدروژل نانوکامپوزیت آهن است. یکنواختی توزیع ذره‌ها، ریخت شناسی هندسی سطح و حفره‌های موجود در ساختار هیدروژل نانوکامپوزیت دیده می‌شود. اندازه میانگین نانو ذره‌های آهن به کمک دستگاه AFM برابر با ۹،۱۵ نانومتر تخمین زده شده‌است.



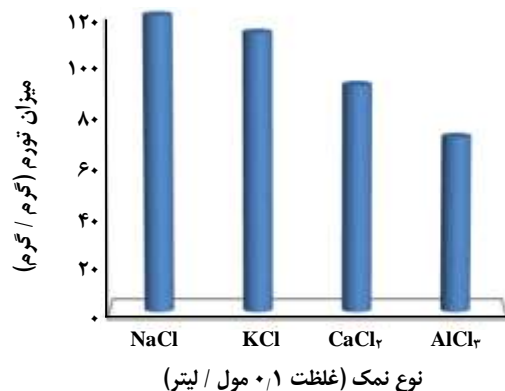
شکل ۴- الف: تصویر SEM، ب: تصویر TEM، ج: تصویر AFM هیدروژل نانوکامپوزیت آهن.



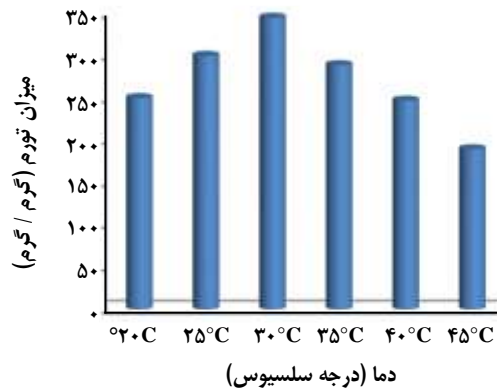
شکل ۷- اثر حلال بر میزان در جذب آب توسط هیدروژل نانوکامپوزیت آهن.



شکل ۵- اثر زمان در جذب آب هیدروژل نانوکامپوزیت آهن.



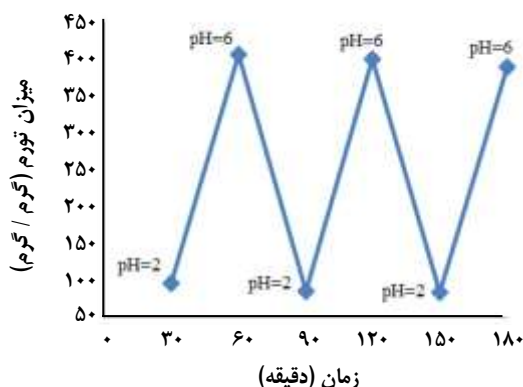
شکل ۸- اثر نمک‌های چند ظرفیتی در جذب آب هیدروژل نانوکامپوزیت آهن.



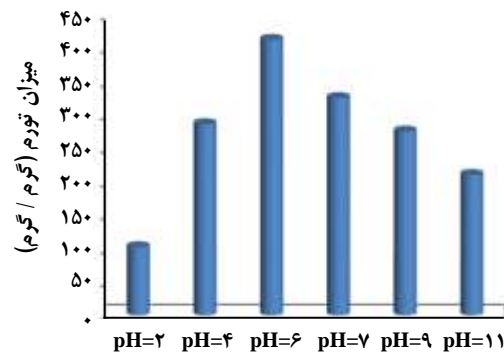
شکل ۶- اثر دما در جذب آب هیدروژل نانوکامپوزیت آهن.

موجب کاهش ظرفیت تورمی هیدروژل می‌شود. کاهش در مقدار جذب هیدروژل نانوکامپوزیت، به نوع و غلظت نمکی که به محیط واکنش اضافه می‌شود، بستگی دارد [۲۶، ۲۷]. با افزایش بار کاتیون میزان شبکه‌ای شدن یونی زیاد شده، و در نتیجه مقدار جذب هیدروژل نانوکامپوزیت کاهش می‌یابد.

در میزان جذب هیدروژل نانوکامپوزیتی بیش‌تر به اثر پوششی بار نسبت داده می‌شود که موجب ضعیف شدن دافعه الکتروستاتیک می‌شود [۲۵]. همچنین با کاهش اختلاف فشار اسمزی میان ژل و محیط آبی، مقدار جذب آب کاهش می‌یابد. در مورد محلول نمک‌هایی که کاتیون‌های چند ظرفیتی دارند، شبکه‌ای شدن یونی



شکل ۱۰ - رفتار برگشت پذیری هیدروژل نانوکامپوزیت آهن در pH=۲ و pH=۶



شکل ۹ - اثر pH در جذب آب هیدروژل نانوکامپوزیت آهن.

بهداشتی و کشاورزی مطرح باشند، بررسی شود. از آنجا که جذب تحت فشار با قدرت مکانیکی هیدروژل نانومتخلخل متورم شده متناسب است، این پارامتر می‌تواند به‌عنوان تابعی از استحکام هیدروژل نانومتخلخل در نظر گرفته شود. بنابراین تلاش شده است که هیدروژلی که جذب زیر فشار بیش‌تر و در نتیجه استحکام بیش‌تری داشته باشد، تولید شود [۲۸].

برای تعیین استحکام هیدروژل نانو متخلخل نمونه بهینه زیر فشار ۰٫۳ psi (وزنه ۴۵ گرم) قرار گرفت و سینتیک جذب هیدروژل نانو متخلخل در محلول ۰٫۹٪ نمک NaCl ثبت شده است. نتیجه‌های مطالعه‌های جذب تحت بار نشان داد که هیدروژل سنتز شده قادر به جذب آب تحت بار است و در نتیجه استحکام مکانیکی هیدروژل نانوکامپوزیت آهن خوب است (شکل ۱۱).

رهایش دارو

ابر جاذب سنتز شده به دلیل داشتن گروه‌های حساس به pH نسبت به محیط‌هایی با pH متفاوت حساس می‌باشد در نتیجه ابرجاذب در این محیط‌ها متورم می‌شود. انتظار می‌رود زمانی که هیدروژل بارگذاری شده درون محلول‌هایی با pH گوناگون قرار می‌گیرد و با نسبت‌های متفاوت متورم می‌شود و داروی حبس شده در شبکه هیدروژل به درون محلول راه یابد. در واقع یکی از عامل‌های اصلی رهایش دارو تماس آن با آب است. برای داروی انحلال‌پذیر در آب، رهایش آن پس از نفوذ آب به درون شبکه پلیمری هیدروژل صورت می‌گیرد [۲۹].

رهایش داروی دوکسوروبیسین را در pHهای متفاوت ۷/۴ (pH سلول سالم) و ۵/۴ (pH سلول سرطانی) مورد بررسی قرار گرفت

بررسی رفتار هوشمندانه هیدروژل نانوکامپوزیت آهن

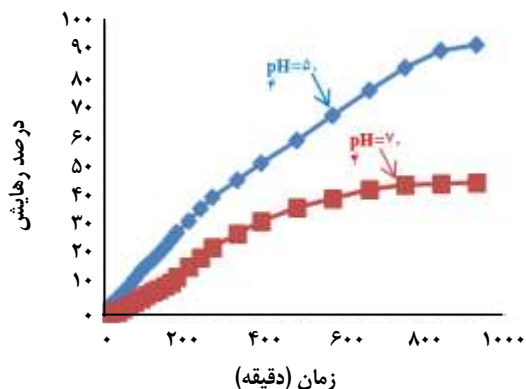
برای بررسی حساسیت جذب آب هیدروژل نانوکامپوزیت، میزان جذب آب آن در محلول‌هایی با pHهای ۲ تا ۱۱ اندازه‌گیری شده است. برای تنظیم pHهای گوناگون، از محلول‌های HCl و NaOH استفاده شد. مطابق شکل ۹ بیش‌ترین میزان جذب آب در محلولی با pH برابر با ۶ به دست آمده است. در pH=۶ جفت الکترون‌های نیتروژن مربوط به گروه‌های آمینی مونومر بیش‌ترین دافعه را دارند که باعث کاهش میزان جذب آب می‌شود. در pHهای خیلی پایین و خیلی بالا به دلیل اثر قدرت یونی بالا، کاهش فشار اسمزی بین هیدروژل و محیط ایجاد شده و در نتیجه جذب پایین می‌آید. [۱۸].

رفتار برگشت‌پذیری هیدروژل نانوکامپوزیت آهن (On-Off)

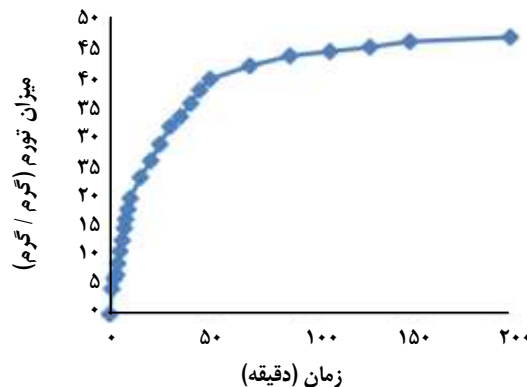
مطابق شکل ۱۰ که رفتار جذب و واجذب هیدروژل نانوکامپوزیت آهن را در pHهای متفاوت در فاصله‌های زمانی متفاوت نشان می‌دهد، در pH=۶ میزان جذب هیدروژل نانوکامپوزیت افزایش می‌یابد. علت آن، افزایش نیروی دافعه بین جفت الکترون‌های نیتروژن است. در pH=۲ به دلیل قدرت یونی بالا و کاهش فشار اسمزی بین هیدروژل و محیط، مقدار جذب کاهش می‌یابد.

مطالعه‌های جذب تحت بار

هنگامی که هیدروژل‌ها تحت فشار قرار می‌گیرند، ظرفیت تورمی آن‌ها به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد. بنابراین ضروری است که جذب زیر فشار برای آن‌ها به‌ویژه وقتی کاربردهای



شکل ۱۲ - رهایش داروی دوکسوروبیسین در pHهای ۷/۴ و ۵/۴.



شکل ۱۱ - اثر زمان در جذب آب هیدروژل نانوکامپوزیت آهن تحت فشار.

با توجه به معادله (۲) نمودار $\log(M_t/M_\infty)$ بر حسب $\log t$ در شکل ۱۳ برای هیدروژل نانو کامپوزیت آهن رسم شده است. توان نفوذ برای هیدروژل نانو کامپوزیت آهن ۰٫۹۰۹ است. بنابراین مکانیسم رهایش دارو از هیدروژل کنترل شده آرام است.

نتیجه گیری

در این پژوهش هیدروژل ابرجاذب کامپوزیت نوبنی با پیوندزنی رادیکالی تکپار (۲- دی متیل آمینو) اتیلن متاآکریلات بر روی ثعلب در حضور شبکه ساز متیلن بیس آکریل آمید با آغازگر آمونیوم پرسولفات سنتز شد.

ظرفیت جذب آب در محلول‌های گوناگون اندازه‌گیری شد. نتیجه این بررسی‌ها نشان داد تورم نشانه مهم کیفیت ابرجاذب‌ها است، که با دستکاری ماهرانه در عامل‌های ساختاری دخیل در این واکنش می‌توان ابرجاذب‌هایی با ظرفیت جذب بالا، استحکام مناسب و سرعت تورم بالا تهیه کرد.

جذب آب هیدروژل نانوکامپوزیت، در محیط‌های گوناگون اندازه گرفته شد و برگشت‌پذیری هیدروژل در محیط قلیایی و اسیدی به خوبی نشان داده شد. همچنین میزان جذب تحت بار برای هیدروژل نانوکامپوزیت گرفته شد و به خوبی نشان داده شد که هیدروژل سنتز شده، استحکام مکانیکی هیدروژل قابل‌پذیرشی دارد.

سپس رهایش کنترل شده داروی دوکسوروبیسین هیدروکلرید مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی میزان رهایش دارو از دستگاه UV-Visible استفاده شد و مشخص شد که آزادسازی داروی دوکسوروبیسین از بستر هیدروژل نانوکامپوزیت به pH محیط وابسته است و در محیط اسیدی (محیط شبیه سلول سرطانی) بیشترین میزان رهایش داروی دوکسوروبیسین دیده می‌شود.

و همان‌گونه که در شکل ۱۲ مشخص است در pH سلول سرطانی بهترین رهایش را رخ می‌دهد.

در رابطه با مکانیسم رهایش می‌توان این‌گونه توجیه کرد که رهایش در هیدروژل بدون ذره آهن از مکانیسم نفوذ پیروی می‌کند. در این حالت آب به داخل هیدروژل نفوذ می‌کند و باعث تورم آن می‌شود. سپس داروی موجود در بخش متورم شده در آب حل می‌شود و به فاز سیال آب نفوذ کرده و به سوی محیط بیرون نفوذ می‌کند و به این ترتیب رهایش اتفاق می‌افتد.

مکانیسم رهایش

به‌منظور نشان دادن مکانیسم رهایش دوکسوروبیسین از هیدروژل نانوکامپوزیت آهن، نتیجه‌های رهایش با استفاده از معادله (۲) مورد بررسی قرار گرفت [۳۰].

$$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \log K + n \log t \quad (2)$$

M_t و M_∞ جرم (بر حسب گرم) نفوذ در زمان t هستند، K (ثابت سرعت) و n مشخصه توان نفوذ مکانیسم رهایش است. به ترتیب n و K را میتوان از شیب و عرض از مبدا نمودار $\log(M_t/M_\infty)$ بر حسب $\log t$ محاسبه نمود.

اگر مقدارهای n برابر ۰٫۴۵ یا کم‌تر باشد تنها به مکانیسم نفوذ فیلیکان مربوط می‌شود.

مقدارهای n بزرگ‌تر از ۰٫۸۹ یک مکانیسم کنترل شده آرام را نشان می‌دهد.

مقدارهای n بین ۰٫۴۵ تا ۰٫۸۹ یک مکانیسم انتشار غیر عادی را نشان می‌دهد.

مورد بررسی قرار گرفت که نتیجه‌های تصویر SEM و TEM را مورد تأیید قرار داد.

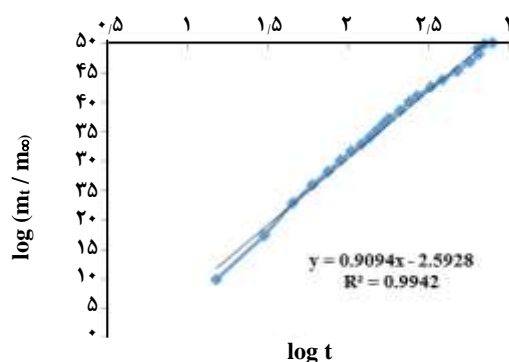
به دلیل زیست سازگاری و زیست تخریب‌پذیری این سامانه، انتظار می‌رود که ویژگی‌های ره‌ایش کنترل‌شده دارو به وسیله هیدروژل نانوکامپوزیت تهیه شده در این پژوهش، بهبود چشمگیری را نشان دهد و بتوان از آن در صنایع دارویی و پزشکی استفاده کرد.

فهرست نمادها

DMA	(۲ - دی متیل آمینو) اتیلن متاآکریلات
MBA	متیلن‌بیس‌آکریل‌آمید
APS	آمونیم پرسولفات
SEM	میکروسکوپ الکترون روبشی
TEM	میکروسکوپ الکترون عبوری
AFM	میکروسکوپ نیروی اتمی
ES	جذب آب

قدردانی

از دانشگاه پیام نور به خاطر حمایت‌های مالی برای انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.



شکل ۱۳ - مکانیسم ره‌ایش دارو از هیدروژل نانوکامپوزیت آهن.

با محاسبه مکانیسم ره‌ایش، نشان داده شد که ره‌ایش داروی دوکسوروبیسین از مکانیسم کنترل‌شده آرام پیروی می‌کند. مطالعه ریخت‌شناسی سطح هیدروژل نانوکامپوزیت، با استفاده از دستگاه SEM، انجام شد. در تصویرهای SEM روزه‌های شبکه‌های هیدروژل قابل دیدن هستند، که نشان‌دهنده میزان بالای جذب آب هیدروژل می‌باشند. اندازه نانوذره آهن با استفاده از TEM تعیین شده است و همچنین سطوح توزیع یکنواخت نانو ذره‌های آهن در داخل شبکه هیدروژل و اندازه ذره‌ها با AFM

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۶

مراجع

- [1] Nayak S., Lyon L. A., *Soft Nanotechnology with Soft Nanoparticles, Angewandte Chemie International Edition*, **44**(47): 7686-7708 (2005).
- [2] M Christe Sonia Mary., S Sasikumar., *Sodium Alginate/Starch Blends Loaded with Ciprofloxacin Hydrochloride as a Floating Drug Delivery System - In Vitro Evaluation, Iran. J. Chem. Chem. Eng (IJCCE)*, **34**(2): 25-31 (2015).
- [۳] نبی‌تیر، معصومه؛ آقامیری، سید فواد؛ طلائی خوزانی، محمدرضا؛ بررسی آزمایشگاهی تأثیر پوشش‌دهی کیتوسان در کاهش تجمع نانولوله‌های کربنی به عنوان حامل داروی ضد سرطان کوئرستین، *نشریه شیمی و مهندسی شیمی*، (۳) ۳۲: ۹۳ تا ۱۰۲ (۱۳۹۶).
- [۴] اکبرزاده، حامد؛ مهرجویی، عصمت؛ عباسپور، محسن؛ سالمی، سیروس؛ نفوذ نانواپار نقره به درون نانولوله‌ی کربنی: یک روش مؤثر برای ره‌ایش داروی ضد سرطان، *نشریه شیمی و مهندسی شیمی*، (۴) ۳۶: ۱۸۹ تا ۱۹۹ (۱۳۹۶).

- [5] Bhattacharyya D., Singh S., Satnalika N., Khandelwal A., Jeon, S. H., [Nanotechnology, Big Things from a Tiny World: A Review](#), *Nanotechnology*, 2(3): 29-38 (2009).
- [۶] نوبخت اصل، فاطمه؛ کردتبار، مهران؛ سنتز و شناسایی هیدروژل‌های ابر جاذب نانوکامپوزیت مغناطیسی آهن بر پایه صمغ زانتان اصلاح شده با استفاده از اکریلیک اسید، *نشریه شیمی و مهندسی شیمی*، (۴): ۳۵: ۳۳ تا ۳۸ (۱۳۹۵).
- [7] Ang K.L., Venkatraman S., Ramanujan R.V., [Magnetic PNIPA Hydrogels for Hyperthermia Applications in Cancer Therapy](#), *Materials Science and Engineering: C*, 27(3): 347-351 (2007).
- [8] Gupta P., Vermani K., Garg S., [Hydrogels: from Controlled Release to pH-Responsive Drug Delivery](#), *Drug Discovery Today*, 7(10): 569-579 (2002).
- [9] Huang Y., Liu M., Chen J., Gao C., Gong, Q., [A Novel Magnetic Triple-Responsive Composite Semi-IPN Hydrogels for Targeted and Controlled Drug Delivery](#), *European Polymer Journal*, 48(10): 1734-1744 (2012).
- [10] Reddy N.N., Varaprasad K., Ravindra S., Reddy G.S., Reddy K.M.S., Reddy K.M., Raju K.M., [Evaluation of Blood Compatibility and Drug Release Studies of Gelatin Based Magnetic Hydrogel Nanocomposites](#), *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 385(1): 20-27 (2011).
- [11] Ferrari M., [Cancer Nanotechnology: Opportunities and Challenges](#), *Nature Reviews Cancer*, 5(3): 161-171 (2005).
- [12] Vrignaud S., Benoit J.P., Saulnier P., [Strategies for the Nanoencapsulation of Hydrophilic Molecules in Polymer-Based Nanoparticles](#), *Biomaterials*, 32(33): 8593-8604 (2011).
- [13] Sun C., Lee J.S., Zhang M., [Magnetic Nanoparticles in MR Imaging and Drug Delivery](#), *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11): 1252-1265 (2008)
- [14] Grief A.D., G. Richardson., [Mathematical Modelling of Magnetically Targeted Drug Delivery](#), *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293(1): 455-463 (2005).
- [15] Ma X., Tao H., Yang K., Feng L., Cheng L., Shi X., Liu Z., [A Functionalized Graphene Oxide-Iron Oxide Nanocomposite for Magnetically Targeted Drug Delivery, Photothermal Therapy, and Magnetic Resonance Imaging](#), *Nano Research*, 5(3): 199-212 (2012).
- [16] Haley B., Frenkel E., [Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Treatment](#), *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 2: 57- 64 (2008).
- [17] Bardajee G.R., Mizani F., Hosseini S.S., [pH Sensitive Release of Doxorubicin Anticancer Drug from Gold Nanocomposite Hydrogel Based on Poly \(Acrylic Acid\) Grafted onto Salep Biopolymer](#), *Journal of Polymer Research*, 24(3): 48 (2017).
- [18] Kabiri K., Zohuriaan-Mehr M.J., [Superabsorbent Hydrogel Composites](#), *Polymers for Advanced Technologies*, 14(6): 438-444 (2003).

- [19] Chen J., Zhao, Y., [Relationship between Water Absorbency and Reaction Conditions in Aqueous Solution Polymerization of Polyacrylate Superabsorbents](#), *Journal of Applied Polymer Science*, **75**(6): 808-814 (2000).
- [20] Odian G., "Principle of Polymerization", 2nd Ed. Wiley-Interscience, New York, (1981).
- [21] Pourjavadi A., Ghasemzadeh H., Soleyman, R., [Synthesis, Characterization, and Swelling Behavior of Alginate-g-Poly \(Sodium Acrylate\)/Kaolin Superabsorbent Hydrogel Composites](#), *Journal of Applied Polymer Science*, **105**(5): 2631-2639 (2007).
- [22] Zohuriaan-Mehr M.J., Motazed Z., Kabiri K., Ershad-Langroudi A., Allahdadi I., [Gum Arabic-Acrylic Superabsorbing Hydrogel Hybrids: Studies on Swelling Rate and Environmental Responsiveness](#), *Journal of Applied Polymer Science*, **102**(6): 5667-5674 (2006).
- [23] Jianqi F., Lixia G., [Swelling/Deswelling Behavior of Thermally Induced PVA/PAA Hydrogel Fiber in Aqueous Salt Solutions](#), *Journal of Polymer Materials*, **19**(1): 103-112 (2002).
- [24] Flory P.J., "Principles of Polymer Chemistry", [Cornell University Press](#) (1953).
- [25] Pass G., Phillips G.O., Wedlock D. J., [Interaction of Univalent and Divalent Cations with Carrageenans in Aqueous Solution](#), *Macromolecules*, **10**(1): 197-201 (1977).
- [26] Pourjavadi A., Ghasemzadeh H., Mojahedi F., [Swelling Properties of CMC-g-Poly \(AAm-co-AMPS\) Superabsorbent Hydrogel](#), *Journal of Applied Polymer Science*, **113**(6): 3442-3449 (2009).
- [27] Pourjavadi A., Ayyari M., Amini-Fazl M. S., [Taguchi Optimized Synthesis of Collagen-g-Poly \(Acrylic Acid\)/Kaolin Composite Superabsorbent Hydrogel](#), *European Polymer Journal*, **44**(4): 1209-1216 (2008).
- [28] Kabiri K., Zohuriaan-Mehr M.J., [Superabsorbent Hydrogel Composites](#), *Polymers for Advanced Technologies*, **14**(6): 438-444 (2003).
- [29] Slowing I. I., Vivero-Escoto J. L., Wu C. W., Lin V.S.Y., [Mesoporous Silica Nanoparticles as Controlled Release Drug Delivery and Gene Transfection Carriers](#), *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60**(11): 1278-1288 (2008).
- [30] Serra L., Doménech J., Peppas N.A., [Drug Transport Mechanisms and Release Kinetics from Molecularly Designed Poly \(Acrylic Acid-g-Ethylene Glycol\) Hydrogels](#), *Biomaterials*, **27**(31): 5440-5451 (2006).