

## 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 flour-hydroxyapatite. Hydroxyapatite and flour-hydroxyapatite have good bioactivity in human body and thus have good potential in biological applications. In this study, hydroxyapatite (HA;  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) and flour-hydroxyapatite (FHA;  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{FOH})$ ) nano powders were synthesized with two different methods of adjust pH (without calcination) and calcination by sol-gel processing. The Phase analysis, powder morphology, thermal behaviors, the bonds configuration, functional groups and biological assesment of the synthesized 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 fluoride 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 فلئورید هیدروکسی آپاتیت به روش سل ژل

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 فلئورید هیدروکسی آپاتیت روند رو به رشدی داشته است. هیدروکسی آپاتیت و فلئورید هیدروکسی آپاتیت زیست سازگاری خوبی در بدن انسانها و لذا پتانسیل خوبی در کاربردهای بیولوژیکی دارند. در این پژوهش با به کارگیری روش سل ژل، نانو پودر هیدروکسی آپاتیت  $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$  و فلئورید هیدروکسی آپاتیت  $(\text{FHA}; \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH},\text{F})_2)$  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 روبشی (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 فازهای هیدروکسی آپاتیت و فلئورید هیدروکسی آپاتیت بود. نتایج محاسبات اندازه متوسط بلورک پودرهای سنتز شده نشان داد که برای هیدروکسی آپاتیت و فلئورید هیدروکسی 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 سانتی گراد افزایش یافته است. نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز نشان داد که با جایگزینی یون فلئورید اندازه متوسط نانوذرها افزایش پیدا کرده است. بر اساس نتایج کشت سلولی نیز جایگزینی یون فلئورید در کریستال هیدروکسی آپاتیت اثر مثبتی در تکثیر سلولها داشته است.

واژه‌های کلیدی: هیدروکسی آپاتیت، فلئورید هیدروکسی آپاتیت، pH، نانو پودر، سل ژل.

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

### ۱. مقدمه

نقص دندانی، سیستم تحویل 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 [۵]. هیدروکسی آپاتیت می‌تواند رشد استخوان را تقویت و بطور مستقیم و قوی با استخوانهای زنده پیوند و اتصال ایجاد کند [۳]. 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 [۶]. جایگزینی آنیونهای مختلف مانند  $\text{F}^-$ ،  $\text{Cl}^-$ ،  $\text{Br}^-$  و  $\text{O}^{2-}$  و  $\text{CO}_4^{2-}$  به جای گروه  $\text{OH}^-$  ساختار هیدروکسی آپاتیت را اصلاح می‌کند [۹-۷]. 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 [۱-۳]. ظهور و استفاده بالینی از سرامیکهای زیست فعال 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 پزشکی استفاده کرد که در این میان هیدروکسی آپاتیت به دلیل شباهت زیاد به ترکیب استخوان و دندانها همواره مورد توجه بوده است [۴]. هیدروکسی آپاتیت  $[\text{HA}, \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  یک ماده زیست فعال 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: ۶۲۱ داخلی (۹۱۳۳۵۱۳۴۱۸) +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 فلوئورهیدروکسی 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 سل‌ژل برای سنتز هیدروکسی آپاتیت و فلوئورهیدروکسی آپاتیت به دو روش متفاوت انجام فرآیند کلسینه کردن و تنظیم pH (بدون کلسینه کردن) استفاده و بصورت پکپارچه و منسجم مقایسه‌ای بین پودرهای هیدروکسی آپاتیت و فلوئورهیدروکسی آپاتیت انجام شد و تاثیر پارامترهایی مثل دما، pH و افزودن یون فلوئور بر خواص متالورژیکی و بیولوژیکی پودرها بررسی گردید.

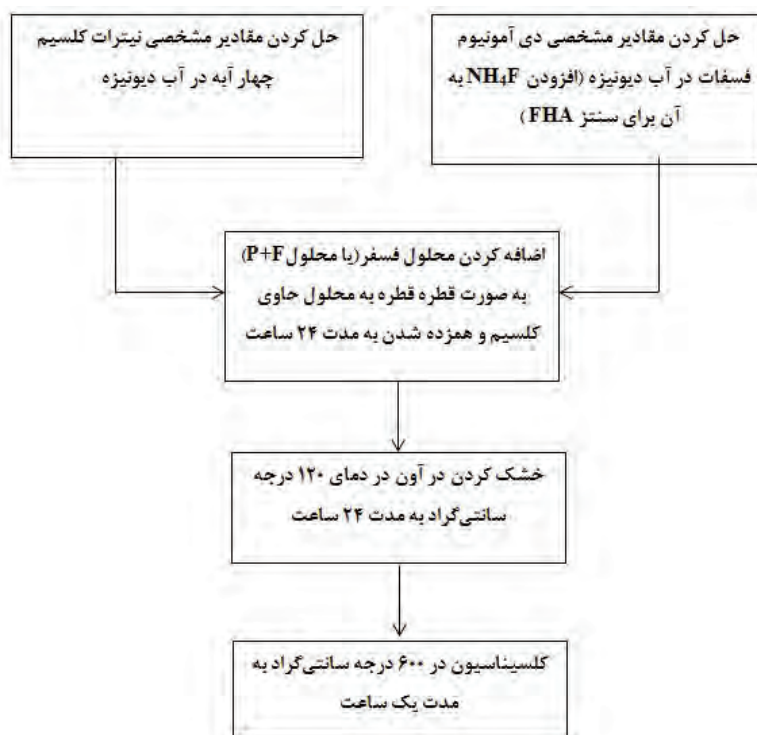
## ۲. مواد و روش تحقیق

نانوذرات هیدروکسی آپاتیت (HA) و فلوئورهیدروکسی آپاتیت (FHA) به روش سل‌ژل و با استفاده از مواد اولیه پیش‌ساز شامل دی‌آمونیم فسفات  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (Merck)، کلسیم‌نیترات تتراهیدرات  $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$  (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 فلوئورهیدروکسی 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 فلوئور هیدروکسی آپاتیت با انجام کلسیناسیون

مطابق شکل ۱ جهت سنتز هیدروکسی آپاتیت و دستیابی به نسبت استوکیومتری  $\text{Ca/P} = 1/67$ ، ابتدا در دو ظرف جداگانه، مقادیر مشخصی نیترات کلسیم و دی‌آمونیم فسفات در آب دیونیزه حل شدند. سپس محلول دی‌آمونیم 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 گرانروی 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 در آمد. 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 تهیه فلوئور هیدروکسی آپاتیت نیز دقیقاً مشابه روش بالا انجام شد با این تفاوت که مقدار مشخصی از آمونیوم فلوراید در محلول دی‌آمونیم فسفات به نسبت استوکیومتری

پایداری حرارتی و کاهش کرنش بلورک‌ها را باعث می‌شود. آپاتیت بیولوژیکی غیر استوکیومتری بوده و بلورک‌های آن در استخوان در مقیاس نانومتری با میانگین اندازه ۲۵ nm در عرض و ۵۰ nm نانومتر در طول می‌باشند. در نتیجه، تحقیقات درباره اندازه بلورک و مورفولوژی فلوئور هیدروکسی آپاتیت مصنوعی  $(\text{FHA}, \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH},\text{F})_2)$  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 فلوئور هیدروکسی آپاتیت (FHA)، که یون  $\text{F}^-$  به طور ناقص جایگزین گروه هیدروکسیل در هیدروکسی آپاتیت می‌شود با حلالیت کمتر و زیست‌سازگاری بهتر به عنوان ماده جایگزین جهت ترمیم استخوان استفاده می‌شود [۱۰]. همچنین فلوئور هیدروکسی 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 فلوئور هیدروکسی آپاتیت استفاده از آن را در کاربردهای دندان‌افزایش داده است [۱۲]. تحقیقات نشان می‌دهد یون فلوئور 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، فلوئور باعث افزایش کریستالیزاسیون فسفات کلسیم در فرایند تشکیل استخوان می‌شود [۱۳]. غلظت پایین یون فلوراید برای انسان سمی نیست اما غلظت‌های بالای آن می‌تواند خطرناک باشد و منجر به فلوروزیس دندان (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 ۱ ppm و در محصولات دندانپزشکی برای کاهش پوسیدگی دندان مفید است [۳]. جهت سنتز هیدروکسی آپاتیت و فلوئورهیدروکسی آپاتیت تکنیک‌های مختلفی مانند سنتز مکانوشیمیایی، سنتز احتراقی، تکنیک‌های مختلف شیمی تر، رسوب الکتروشیمیایی، سل ژل، سنتز هیدروترمال و غیره وجود دارد که رایج‌ترین آن‌ها روش سل‌ژل 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 نانساختار بدست آمده تغییرات فازی رخ ندهد [۸،۹،۱۵]. روش سل‌ژل و رسوب کلونیدی 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 ببخشد [۶]. هرچند مطالعات گسترده‌ای پیرامون سنتز هیدروکسی آپاتیت و فلوئورهیدروکسی آپاتیت از طریق فرآیند کلسینه کردن انجام



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



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

در دو ظرف جداگانه، مقادیر 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 سل اولیه به ژل با

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

سنتز پودر هیدروکسی آپاتیت و فلونور هیدروکسی 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 می‌یابد. 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 فلوئورهیدروکسی آپاتیت است. علاوه بر این با پیرسازی محلول کلسیم فسفات، یکنواختی ترکیب و بلورینگی رسوبات هیدروکسی آپاتیت و فلوئورهیدروکسی آپاتیت افزایش می‌یابد. حضور هیدروکسید آمونیوم به احتمال زیاد در تکمیل فرآیند تشکیل هیدروکسی آپاتیت و فلوئورهیدروکسی 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 فلوئورهیدروکسی آپاتیت افزایش خواهد داشت. pH محلول و تغییرات آن در طی واکنش می‌تواند واکنش‌های رسوب هیدروکسی آپاتیت و فلوئورهیدروکسی آپاتیت را از طریق تغییر قابلیت انحلال و گرایش به آگلومره شدن، تحت تاثیر قرار دهد [۱۶]. مشابه این روند نیز در پروسه سنتز فلوئور هیدروکسی آپاتیت اتفاق می‌افتد.

### مطالعه ساختار فازی به کمک پراش پرتو ایکس

نتیجه آزمون پراش پرتو ایکس بر روی ذرات هیدروکسی آپاتیت و فلوئورهیدروکسی 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 فلوئورهیدروکسی 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 فلوئور هیدروکسی آپاتیت سایر فازهای ناخواسته در ترکیب پودری حضور ندارند. مشخص است که پیک‌ها با ورود یون فلوئور به ساختار آپاتیتی، به سمت زوایای بالاتر (به سمت راست) شیفت پیدا کرده‌اند. شیفت پیک‌ها در اثر حضور یون فلوئور در ساختار آپاتیت با توجه به جدول ۱ ناشی از کاهش پارامتر شبکه a در اثر جایگزینی نسبی یون فلوئور به جای گروه‌های هیدروکسیل، که دارای شعاع یونی بزرگ‌تری نسبت به یون فلوئور هستند، می‌باشد.

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

گرانروی 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 فلوئور هیدروکسی 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 انجام پذیرفت. این دستگاه به طور همزمان آنالیزهای حرارتی افتراقی و تغییرات وزنی را برای تعیین دمای تحول فازها نشان می‌دهد. پس از تهیه ژل ها، آن‌ها را خشک و به پودر تبدیل کرده، سپس با نرخ گرمایش ۱۰ درجه بر دقیقه از دمای محیط تا دمای ۱۰۰۰ درجه سانتیگراد در اتمسفر هوا تحت آنالیز حرارتی قرار گرفتند. به منظور بررسی تغییرات ساختار و مطالعه فازی هیدروکسی آپاتیت و فلوئورهیدروکسی 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  $4000 \text{ cm}^{-1}$  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 بنیادی 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.

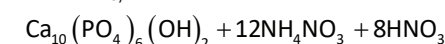
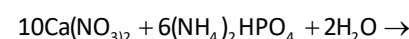
### ۳. نتایج و بحث

#### بررسی تغییرات pH در حین سنتز هیدروکسی آپاتیت و

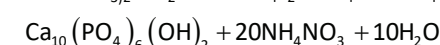
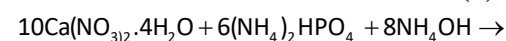
#### فلوئورهیدروکسی آپاتیت به روش تنظیم pH

واکنش تشکیل هیدروکسی آپاتیت به دو روش به صورت زیر است [۱۶]:

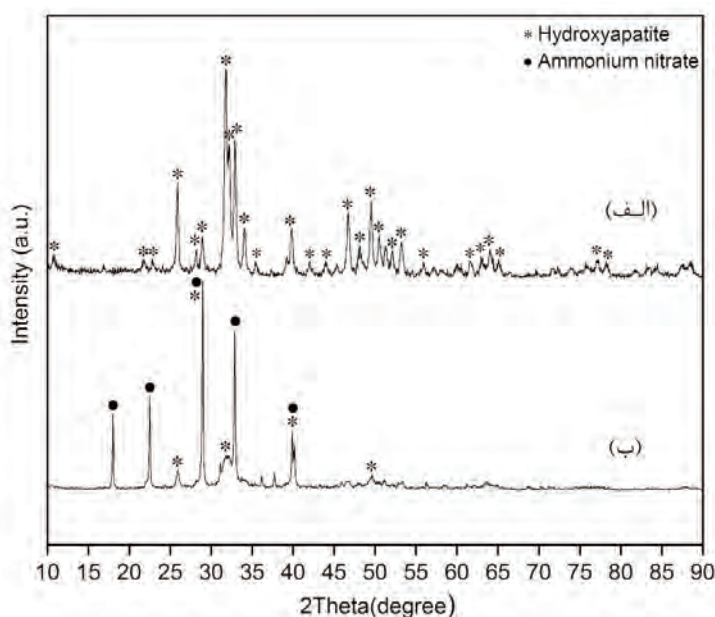
رابطه (۱)



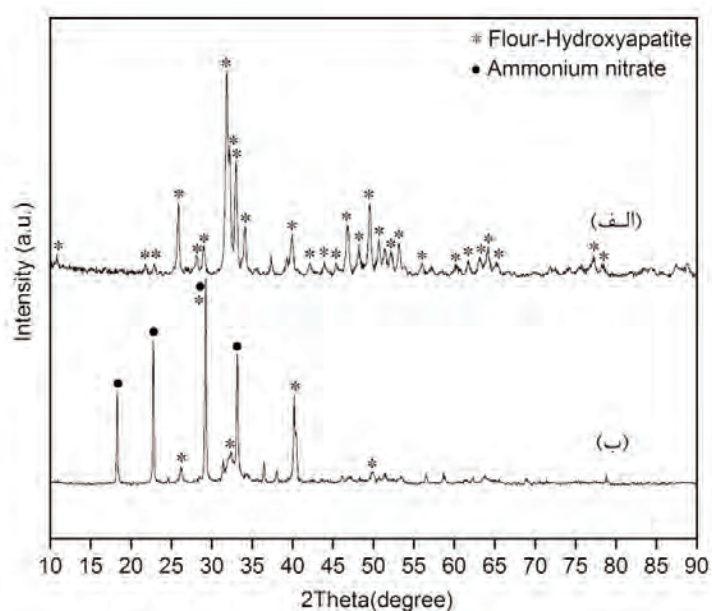
رابطه (۲)







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



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

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

رابطه (۳)

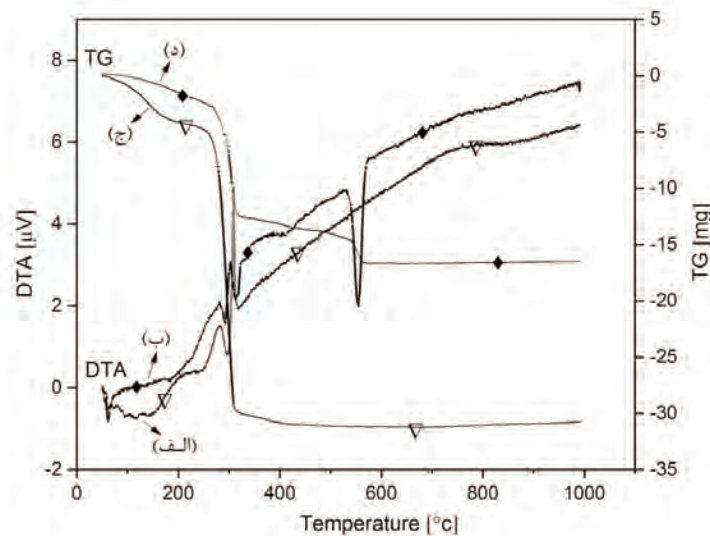
$$L = 0.89\lambda / \beta \cos\theta$$

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

و فلوئور هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با تنظیم pH، مشابه با پژوهش دایوون چوی و همکارانش علاوه بر فازهای هیدروکسی آپاتیت و فلوئور هیدروکسی آپاتیت (طبق واکنش ۲) فاز نیترات آمونیوم نیز حضور دارد همچنین هیچ پیک دیگری مربوط به حضور فازهای ثانویه مانند کلسیم هیدروژن فسفات (Monetite,  $\text{CaHPO}_4$ ) و بتا تری کلسیم فسفات ( $\text{B-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) مشاهده نمی شود 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 فلوئورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده به روش کلسیناسیون و تنظیم pH.

نمونه	اندازه متوسط بلورک (nm)	اندازه 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٪
فلوئورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده با تنظیم pH	۲۵	۴۱۴۸/۹	۸۸/۶	۴۰٪
فلوئورهیدروکسی 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 سل ژل با و بدون کلسیناسیون یک ساختار نانوکریستالی است. از طرفی مطابق جدول ۱ با افزودن یون فلوئور و متعاقباً تشکیل فلوئورهیدروکسی آپاتیت، اندازه بلورکها و درجه بلورینگی نسبت به هیدروکسی آپاتیت نیز افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد یون فلوئور نیروی محرکه جهت رشد کریستال آپاتیت را افزایش می‌دهد و همچنین یون فلوئور تمایل به کاهش کرنش روی شبکه آپاتیت را دارد و در نتیجه، ثبات ساختار آپاتیت را افزایش می‌دهد [۲۰].

#### آنالیز حرارتی افتراقی و تغییرات وزنی

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

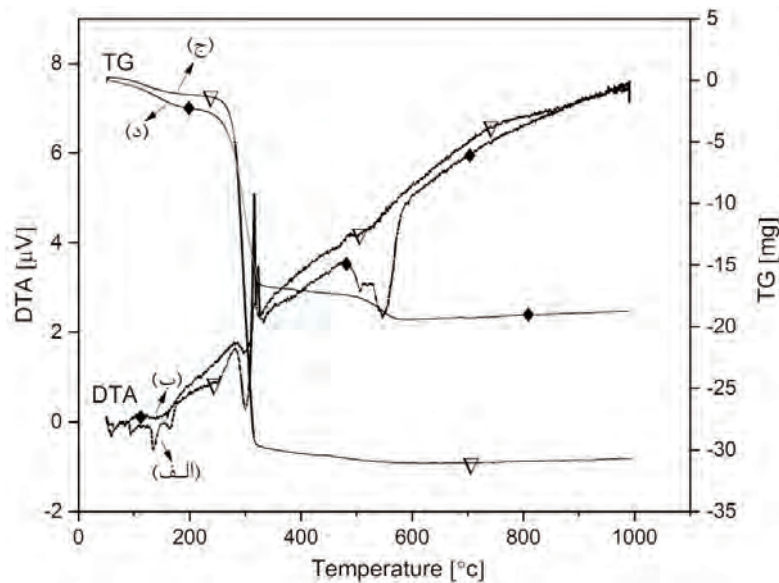
ایکس (برای تیوب مس برابر با ۰/۱۵۴ نانومتر)،  $\beta$  پهنای پیک بیشینه در نصف ارتفاع (رادیان) و  $\theta$  زاویه بر حسب درجه می‌باشد.

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)

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

در این رابطه  $X_c$  درجه بلورینگی،  $V_{112/300}$  شدت عمق بین قله‌های پراش (۱ ۲) و (۳ ۰ ۰) و  $I_{300}$  شدت قله (۰ ۰ ۳) است. پس از انجام محاسبات، اندازه متوسط بلورک و درصد بلورینگی هیدروکسی آپاتیت و فلوئورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده به هر دو روش بدست آمد که نتایج حاصل 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

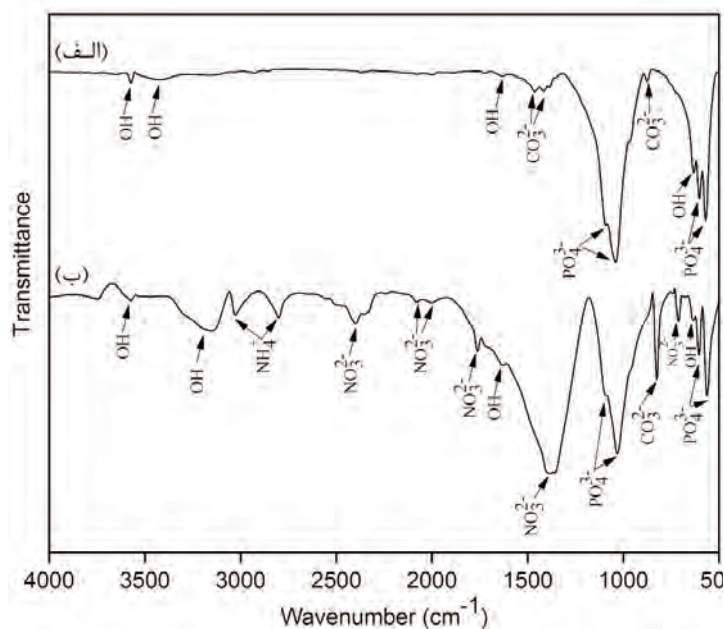


شکل ۶. نتایج حاصل از آزمون آنالیز حرارتی (الف،ج) ژل خام فلونور هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با تنظیم pH (ب،د) ژل خام فلونور هیدروکسی آپاتیت سنتز شده بدون تنظیم pH.

وزنی ۱/۵ درصد برای فلونور هیدروکسی آپاتیت (شکل ۶(د)) همراه است. پیک گرماگیر بعدی در شکل های ۵ (ب) و ۶ (ب) قبل از دمای ۲۰۰ درجه سانتیگراد مربوط به حذف آب جذب شده ساختاری می باشد به طوری که منحنی تغییرات وزنی (شکل ۵ و ۶ (د))، کاهش وزن ۵ درصد برای هیدروکسی آپاتیت و ۵/۵ درصد را برای فلونور هیدروکسی آپاتیت نشان می دهد. در شکل های ۵ (ب) و ۶ (ب) پیک گرمازا در محدوده ۲۵۰ تا ۳۰۰ درجه سانتیگراد مربوط به تجزیه حرارتی  $NH_4NO_3$  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 فلونور هیدروکسی آپاتیت (شکل ۶(د)) همراه است، پیک گرمازای بعدی در منحنی های ۵ و ۶ (ب) در دمای حدود ۳۲۵ درجه سانتیگراد مربوط به از دست رفتن پیوندهای آلی در ماده می باشد که همراه با ۱۳ درصد کاهش وزنی برای هیدروکسی آپاتیت (شکل ۵(د)) و ۱۸ درصد کاهش وزنی برای فلونور هیدروکسی 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 فلونور هیدروکسی آپاتیت (شکل ۶(د)) داریم، این کاهش وزن به دلیل شکل گیری هیدروکسی آپاتیت در دمای حدود ۵۵۵ درجه سانتیگراد و فلونور هیدروکسی 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 نمی شود و منحنی های ۵ و ۶ (د) تقریباً در این محدوده دمایی پایدار است که پایداری حرارتی فاز هیدروکسی آپاتیت و فلونور هیدروکسی آپاتیت را

با توجه به شکل های ۵ (الف) و ۶ (الف)، یک پیک گرماگیر حدود ۱۲۰ درجه سانتیگراد وجود دارد که نشان دهنده تبخیر مواد فرار باقیمانده در ساختار مثل آب می باشد که با کاهش وزنی ۳ درصدی در منحنی تغییرات وزنی برای هیدروکسی آپاتیت (شکل ۵(ج)) و کاهش وزنی ۲ درصد برای فلونور هیدروکسی آپاتیت (شکل ۶(ج)) همراه است [۱۹]. پیک گرماگیر بعدی در شکل های ۵ (الف) و ۶ (الف) در دمای حدود ۱۶۵ درجه سانتیگراد می تواند مربوط به ذوب  $NH_4NO_3$  باشد که از قبل حضور آن در آنالیز پراش پرتو ایکس (شکل های ۳ و ۴) و تحقیقات دایوون چوی [۱۶] نشان داده شد، پیک گرمازا در محدوده ۲۵۰ تا ۳۰۰ درجه سانتیگراد در همین دو شکل مربوط به تجزیه حرارتی  $NH_4NO_3$  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 فلونور هیدروکسی آپاتیت (شکل ۶(ج)) همراه است. در تحقیقات مشابهی پیک گرمازا در دمای ۲۸۰ درجه سانتیگراد را مربوط به تجزیه حرارتی  $NH_4NO_3$  دانسته اند [۲۱]. پیک گرمازای بعدی در دمای ۳۲۵ درجه سانتیگراد در شکل های ۵ (الف) و ۶ (الف) مربوط به از دست رفتن پیوندهای آلی در ماده می باشد [۹]. شیب مثبت منحنی DTA در برابر دما برای محدوده دمایی بالاتر از ۳۵۰ درجه سانتیگراد مربوط به کریستالیزه شدن هیدروکسی یا فلونور هیدروکسی آپاتیت می باشد. با توجه به شکل های ۵ (ب) و ۶ (ب) یک پیک گرماگیر قبل از ۱۰۰ درجه سانتیگراد وجود دارد که نشان دهنده تبخیر رطوبت سطحی می باشد که با کاهش وزنی ۰/۵ درصدی در منحنی تغییرات وزنی برای هیدروکسی آپاتیت (شکل ۵(د)) و کاهش





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

$(\text{cm}^{-1})$  برای پیک ارتعاشی  $\nu_4$  در ترکیب آپاتیت قابل تشخیص هستند. باندهای مرتبط با گروه‌های هیدروکسیل شبکه‌ای در عدد موجی‌های  $630$  و  $3570$   $(\text{cm}^{-1})$  برای هر دو نمونه قابل رویت می‌باشد که در نتایج سایر پژوهش‌ها نیز حضور این پیک‌ها گزارش شده است [۱۶]. پیک موجود در  $1635$   $(\text{cm}^{-1})$  پیک پهن  $3300$   $(\text{cm}^{-1})$  نیز مربوط به آب ساختاری می‌باشد [۱۸]. در شکل ۷ (الف) پیک‌ها در  $876$ ،  $1420$  و  $1454$   $(\text{cm}^{-1})$  گروه کربناتی را نشان می‌دهند که به دلیل جایگزینی گروه فسفات با کربنات است همچنین پیک نیترات ( $\text{NO}_3^-$ ) نیز در عدد موجی  $1410$   $(\text{cm}^{-1})$  نیز با گروه کربنات هم‌پوشانی دارد. در شکل ۷ (ب) پیک  $840$   $(\text{cm}^{-1})$  و پیک پهن در  $1400$   $(\text{cm}^{-1})$  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 در طی واکنش افزایش می‌یابد [۱۶]. تمامی پیک‌ها در محدوده عدد موجی  $2800$  تا  $3000$   $(\text{cm}^{-1})$  مربوط به گروه  $\text{NH}_4^+$  است و همچنین پیک‌ها در عدد موجی‌های  $2545$ ،  $2403$ ،  $2081$ ،  $2006$ ،  $1763$  و  $713$   $(\text{cm}^{-1})$  مربوط به گروه نیترات می‌باشد [۲۴]. نتیجه بررسی ساختاری طیف سنجی تبدیل فوری فروسرخ فلوئورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده به دو روش تنظیم pH و کلسیناسیون در شکل ۸ نشان داده شده است.

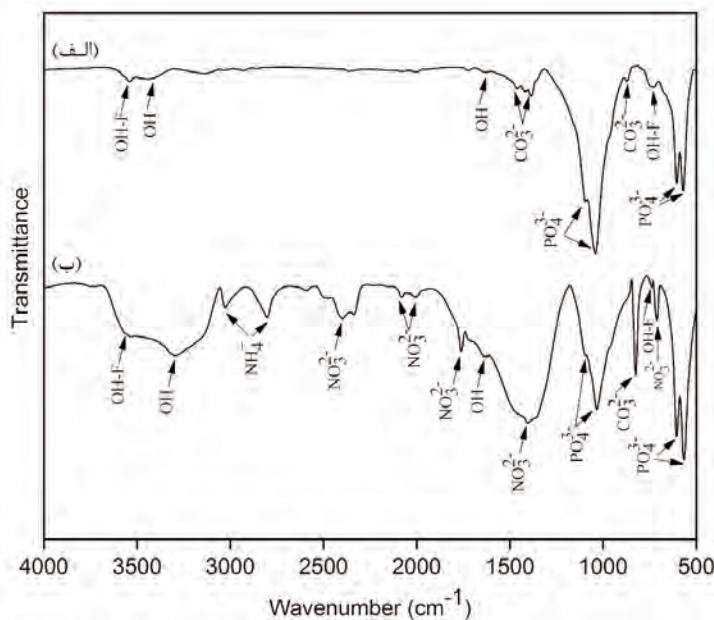
تمایز ساختار هیدروکسی آپاتیت و فلوئورهیدروکسی آپاتیت به دلیل نزدیکی و شباهت ساختاری آن‌ها بسیار مشکل است. همانند شکل ۷ در هر دو نمونه شکل ۸ نیز، سه

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 شکل‌گیری فلوئورهیدروکسی آپاتیت نسبت به هیدروکسی آپاتیت کاهش می‌یابد (از  $555$  درجه سانتیگراد برای هیدروکسی آپاتیت به  $547$  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 همچنین ساختار کریستالی فشرده تری را ایجاد می‌کند [۹] و پایداری حرارتی و شیمیایی بهتری را نسبت به هیدروکسی آپاتیت از خود نشان می‌دهد [۲۲].

#### ارزیابی ترکیب به کمک طیف سنجی تبدیل فوری فرو سرخ (FTIR)

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

طیف سنجی تبدیل فوری فروسرخ برای نمونه هیدروکسی آپاتیت سنتز شده با عملیات کلسیناسیون، پیک اضافه ای که بیان‌کننده 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 ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) به ترتیب در عدد موجی  $960$   $(\text{cm}^{-1})$  برای پیک ارتعاشی  $\nu_1$ ، در عدد موجی‌های  $1040$   $(\text{cm}^{-1})$  و  $1100$  برای پیک ارتعاشی  $\nu_3$  و در عدد موجی‌های  $560$ ،  $600$



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

(الف) پیک‌های ۸۷۰، ۱۴۲۵ و ۱۴۶۰  $(\text{cm}^{-1})$  گروه کربناتی را نشان می‌دهند که به دلیل جایگزینی گروه فسفات با کربنات است همچنین پیک نیترات ( $\text{NO}_3^-$ ) نیز در عدد موجی ۱۴۱۰  $(\text{cm}^{-1})$  نیز با گروه کربنات همپوشانی دارد. در شکل ۸ (ب) پیک ۸۴۰  $(\text{cm}^{-1})$  و پیک پهن در ۱۴۰۰  $(\text{cm}^{-1})$  نشان‌دهنده گروه‌های کربناتی و نیتراتی است [۲۳]. تمامی پیک‌ها در محدوده عدد موجی ۲۸۰۰ تا ۳۰۰۰  $(\text{cm}^{-1})$  مربوط به گروه  $\text{NH}_4^+$  است. پیک‌ها در عدد موجی‌های ۲۴۰۰، ۲۵۸۰، ۲۰۸۱، ۲۰۰۶، ۱۷۶۳ و ۷۱۳  $(\text{cm}^{-1})$  مربوط به گروه نیترات می‌باشد [۲۴].

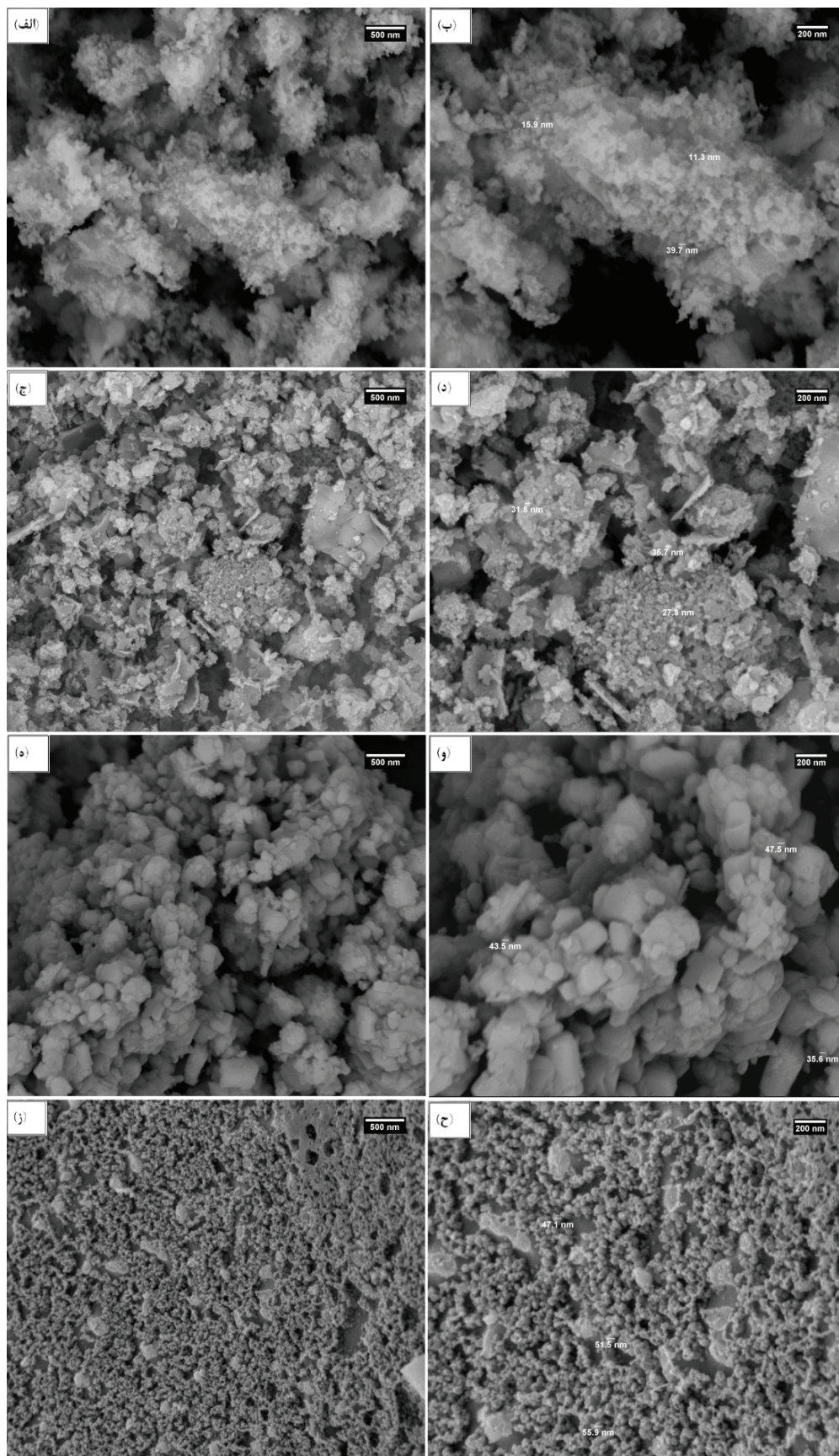
### بررسی شکل و اندازه ذرات به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی

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

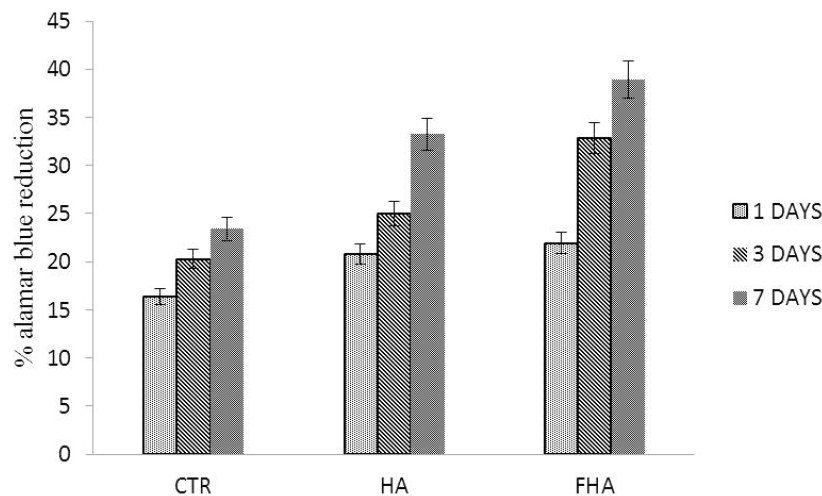
در این تصاویر مشاهده می‌شود که ذرات کروی و شبه کروی با اندازه ذرات کمتر از ۵۰ نانومتر هستند که در بعضی نقاط به صورت توده‌ای شکل درآمده اند و نشان می‌دهد که ذرات تمایل به آگومره شدن دارند. نتایج بدست آمده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز نتایج روش شر را تایید می‌نماید. همچنین تصاویر به خوبی نشان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

پیک مرتبط با ارتعاشات  $\nu_1$ ،  $\nu_3$  و  $\nu_4$  از گروه فسفاتی ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) به ترتیب در عدد موجی ۹۶۰  $(\text{cm}^{-1})$  برای پیک ارتعاشی  $\nu_1$ ، در عدد موجی‌های ۱۰۴۰ و ۱۱۰۰  $(\text{cm}^{-1})$  برای پیک ارتعاشی  $\nu_3$  و در عدد موجی‌های ۵۷۰، ۶۱۰  $(\text{cm}^{-1})$  برای پیک ارتعاشی  $\nu_4$  در ترکیب آپاتیت قابل تشخیص هستند. بی‌آزار و همکارانش [۱۸] نشان دادند آنچه ساختار هیدروکسی آپاتیت را از ساختار فلئور هیدروکسی 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 ۶۳۰  $(\text{cm}^{-1})$  در هیچکدام از نمودارهای مربوط به فلئور هیدروکسی آپاتیت (شکل ۸) ظاهر نشده است. پیک پهن از ۳۰۰۰ تا ۳۵۰۰  $(\text{cm}^{-1})$  مربوط به گروه هیدروکسیل می‌باشد و یک پیک کوچک در ۳۵۵۰  $(\text{cm}^{-1})$  مربوط به پیوند بین OH و F است که نشان دهنده نفوذ یون فلئور به داخل شبکه آپاتیت است. این مشاهدات برای پودر فلئور هیدروکسی آپاتیت به دلیل تشکیل پیوند هیدروژنی بین یون فلئور و هیدروکسیل است که نشان دهنده جایگزین شدن یون‌های فلئور به جای یون‌های هیدروکسیل در ساختار آپاتیت است. با این حال، با تجزیه و تحلیل طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ مقدار دقیق جایگزینی یون‌های فلئور با یون‌های هیدروکسیل قابل محاسبه نیست. همچنین حضور پیک در ۷۳۵  $(\text{cm}^{-1})$  نشان دهنده پیوند (OH-F) و جایگزینی گروه‌های فلئور با گروه‌های هیدروکسیل در ساختار آپاتیت است [۵]. جایگزینی یون‌های مختلف در ساختار آپاتیت موجب کاهش تقارن و بنابراین جذب باند در طیف IR می‌شود. پیک موجود در ۱۶۳۵  $(\text{cm}^{-1})$  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) فلوئور هیدروکسی آپاتیت با تنظیم pH (ز، ح) فلوئور هیدروکسی آپاتیت کلسینه شده



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

#### ۴. نتیجه‌گیری

در این پژوهش با استفاده از روش سل ژل نانو پودر هیدروکسی آپاتیت و فلئور هیدروکسی 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 فرسرخ و آنالیز حرارتی حصول هیدروکسی آپاتیت و فلئور هیدروکسی آپاتیت با ترکیب و ساختار مطلوب را در هر دو روش تایید کرد. جانشینی یون فلئور با هیدروکسیل توسط نتایج طیف سنجی تبدیل فوریه فرسرخ در نمونه‌های فلئور هیدروکسی آپاتیت به اثبات رسید. بررسی و مشاهده ذرات هیدروکسی آپاتیت و فلئور هیدروکسی آپاتیت سنتز شده به هر دو روش توسط میکروسکوب الکترونی روبشی و همچنین محاسبه اندازه متوسط بلورکها به کمک روش شرر نیز نشان داد که ذرات کروی و شبه کروی ابعاد کمتر از ۵۰ نانومتر دارند همچنین با انجام عملیات کلسیناسیون و افزودن یون فلئور اندازه دانه‌ها و درجه بلورینگی پودرها افزایش یافته است. در نهایت بر اساس نتایج آزمایش کشت سلولی و آلامار بلو، سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی بر روی نمونه‌های هیدروکسی آپاتیت و فلئور هیدروکسی آپاتیت سنتز شده به روش pH تکثیر سلولی مناسبی داشته و جایگزین شدن یون فلئور در ساختار هیدروکسی آپاتیت منجر 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 گرازا راشی انجام شد.

#### رفتار بیولوژیکی

به منظور بررسی تاثیر یون فلئور بر رفتار بیولوژیکی پودرهای سنتز شده دو پودر هیدروکسی آپاتیت و فلئور هیدروکسی 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 پودرها کشت داده شدند و سپس جهت بررسی رشد و تکثیر سلول‌ها از روش رنگ سنجی آلامار بلو استفاده شد. شایان ذکر است قبل از انجام آزمایش نمونه‌ها چندین بار متوالی با آب دیونیزه شستشو داده شدند تا ترکیبات نیترا تی 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 فلئور هیدروکسی آپاتیت نسبت به نمونه شاهد تکثیر سلولی مناسبی داشته‌اند و نمونه فلئور هیدروکسی آپاتیت به علت جایگزینی یون فلئور در ساختار خود تکثیر سلولی بیشتری از خود نشان داده است.

افزایش مقادیر کاهش درصد آلامار بلو (Alamar blue reduction) در طول دوره کشت سلولی نشان دهنده افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی می‌باشد. این امر بیانگر اثر مثبت افزودن فلئور بر تکثیر و زنده ماندن سلول‌ها و افزایش زیست سازگاری فلئور هیدروکسی آپاتیت است. هاوون کیم و همکارانش [۲۵] نیز در تحقیقات مشابهی نشان دادند که در پوشش فلئور هیدروکسی آپاتیت، یون فلئور تاثیر مثبتی بر بر بقا 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. Sundrarajan, "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.Rauci, 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 fluoride 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.Barandehfard, 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.