

تأثیر فرایند هیدروترمال بر خواص فیزیکی و زیستی نانورس آنیونی از نوع کلسیم-آلومینیوم

سیده سارا شفیعی^۱، مهران صولتی هاشجین^۱، رضا کلانتری نژاد^۳، علی صمدی کوچکسرای^۴

^۱ گروه نانوزیست مواد و مهندسی بافت، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک، تهران،

^۲ گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه امیرکبیر، تهران،

^۳ پژوهشگاه هوافضا، تهران،

^۴ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

sarashafiei@aut.ac.ir

چکیده: نانورس‌های آنیونی یا هیدروکسیدهای دوگانه لایه‌ای (layered double hydroxides) موادی نانوساختار با بار مثبت هستند که دارای خصوصیات فیزیکی و شیمیایی بسیار نزدیک به مینرال رسی هیدروتالسیت با فرمول شیمیایی $Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$ هستند که، می‌تواند با بیومولکول‌های دارای بار منفی مانند ویتامین‌ها، داروها و رشته‌های دی‌ان‌ای (DNA) تشکیل نانوبیوهیبرید بدهند.

در این پژوهش، ترکیب شبه هیدروتالسیتی، $Ca/Al-NO_3$ با اندازه ذرات مختلف در فرآیندی شامل هم‌رسوبی و تحت شرایط هیدروترمال سنتز شد. در این روش، دوغاب‌های پایدار و همگن LDH تحت شرایط مختلف هیدروترمال با اندازه ذرات در محدوده ۷/۵ نانومتر تا ۲/۵ میکرون متر تهیه شدند. مشخصه‌یابی نمونه‌های سنتز شده توسط روش‌های پراش پرتو ایکس، طیف‌سنجی فروسرخ، آنالیز حرارتی، میکروسکوپ الکترونی روبشی، میکروسکوپ الکترونی عبوری و نانوسایزر انجام شد. در نهایت مشخص شد که با افزایش مدت زمان هیدروترمال بلورینگی و اندازه ذرات افزایش می‌یابد و همچنین بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که ذرات دارای مرفولوژی هگزاگونال با نسبت طول به عرض بزرگ هستند. در بررسی سمیت سلولی نمونه‌ها که توسط ارزیابی MTT انجام شد، هیچگونه سمیت سلولی تا غلظت $100 \mu g/ml$ مشاهده نشد و تنها در غلظت‌های بالاتر از این مقدار کاهش زیست‌پذیری سلولی مشاهده شد.

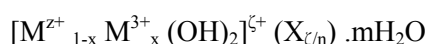
کلید واژه: نانورس آنیونی، هیدروکسید دوگانه لایه‌ای، هیدروترمال، هم‌رسوبی.

۱- مقدمه

امروزه مواد نانوساختار، به علت خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد و کاربردهای بالقوه در حوزه‌های گوناگون توجه بسیاری از دانشمندان و محققان را به خود جلب کرده‌اند. در میان نانوذرات مختلفی که تاکنون مورد بررسی قرار گرفته‌اند، رس‌های آنیونی یا هیدروکسیدهای دوگانه لایه‌ای دوبعدی که به اختصار LDH^۱ نامیده می‌شوند از جمله موادی هستند که به عنوان سامانه‌های هیبریدی برای کاربردهای مختلف از جمله دارورسانی و ژن‌رسانی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. این مواد به دلیل بار مثبت، قابلیت جذب، نگهداری، حمل و رهایش یون‌ها، سطح ویژه زیاد، اثر حافظه داری، تنوع ساختاری و سنتز آسان و کم هزینه در حوزه‌های

^۱ Layered Double Hydroxides

مختلف مورد توجه قرار گرفته‌اند. باید توجه داشت که هیدروکسیدهای دوگانه‌ی لایه‌ای با آنکه اغلب به صورت مصنوعی در آزمایشگاه سنتز می‌شوند مانند رس‌های طبیعی کاملاً زیست سازگارند با این مزیت که خواص آنها را می‌توان با کنترل شرایط سنتز در آزمایشگاه نظیر غلظت، دما، pH و ... به خوبی کنترل کرد. لازم به ذکر است که این مواد به دلیل ذاتاً ساختاری لایه‌ای با ابعاد نانومتری دارند می‌توانند دارو را به صورت نانودارو در میان لایه‌های خود جای داده و ضمن حفظ دارو از تخریب یا تغییر در اثر عوامل فیزیکی، شیمیایی و یا بیولوژیکی؛ انتقال، رهایش و جذب دارو در بدن را بهبود بخشند. اخیراً، رس‌های آنیونی بیشتر از رس‌های کاتیونی مورد توجه قرار گرفته‌اند. رس‌های آنیونی یا هیدروکسیدهای دوگانه لایه‌ای دارای خصوصیات فیزیکی و شیمیایی بسیار نزدیک به مینرال رسی هیدروتالسیت با فرمول شیمیایی $Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$ هستند [۱]. این کانی در سال ۱۸۴۲ در سوئد کشف شد. ساختار پایه لایه‌های LDH بر اساس ساختار بروسیت $Mg(OH)_2$ است و از جانشینی بخشی از کاتیون‌های دوظرفیتی شبکه بروسیت توسط کاتیون‌های سه‌ظرفیتی که موجب ایجاد بار مثبت در ساختار می‌شود به وجود می‌آید. بار مثبت پدیدآمده، با آنیون‌های منفی که در بین لایه‌ها قرار می‌گیرند، خنثی می‌شود. در شکل (۱) ساختار LDH نشان داده شده است. فرمول کلی LDH به صورت زیر است:



M کاتیون فلزی و X آنیون بین لایه‌ای می‌باشد [۳-۱].

پیشینه استفاده از رس‌ها در کاربردهای درمانی به گذشته‌های بسیار دور بازمی‌گردد. امروزه رس‌های آنیونی یا LDH با ظرفیت بالای تعویض آنیون به عنوان سیستم میزبان در حوزه مواد نانوبیوهیبرید مورد استفاده قرار می‌گیرند. از خصوصیات ویژه LDH می‌توان به زیست‌سازگاری بسیار خوب، تمایل شدید به جذب یون کربنات، پایداری شیمیایی وابسته به pH و در دسترس بودن آن اشاره کرد. بسیاری از بیومولکول‌های دارای بار منفی - از جمله ویتامین‌ها، DNA و اسیدهای آلی - می‌توانند با LDH تشکیل بیوهیبرید بدهند [۴-۶]. یکی از روش‌های متداول سنتز LDH، هم‌رسوبی در pH متغیر و یا ثابت است که به دنبال آن مراحل پیرسازی در دما و زمان مشخص انجام می‌شود. مواد سنتز شده در این روش به شدت تمایل به آگلومره شدن دارند و اندازه ذرات ثانویه در حدود ۱ الی ۱۰ میکرون متر است و از آنجائیکه اکثر برهمکنش‌های بیولوژیکی در مقیاس نانومتر صورت می‌گیرد، ضروریست تا سوسپانسیونی پایدار و همگن در ابعاد نانومتری تهیه شود [۷-۸]. بنابراین، کنترل اندازه ذرات در محدوده مشخص یکی از پارامترهای کلیدی در سنتز این دسته از مواد برای کاربردهای بیولوژیکی به خصوص رهایش سلولی است. مطالعات متعددی در این زمینه انجام شده است [۹-۱۰]. اوه و همکاران تأثیر شرایط هیدروترمال بر روی کنترل خواص فیزیکی LDH را ارزیابی کردند و مشخص شد کنترل شرایط دما و زمان در عملیات هیدروترمال می‌تواند اندازه ذرات را در محدوده معین کنترل کند [۱۱]. برخی از محققان از روش هیدرولیز اوره برای سنتز Mg-Al-LDH استفاده کردند که در این روش اندازه ذرات در محدوده ۱ الی ۱۰ میکرون متر تهیه شد که مناسب برای کاربردهای بیولوژیکی نیست [۱۲]. کوواندا نیز پارامترهای مختلف سنتز نظیر دما، مدت زمان پیرسازی، زمان و غلظت به منظور کنترل اندازه ذرات مورد بررسی قرارداد [۱۴]. در این پژوهش، از روش هیدروترمال به منظور تهیه سوسپانسیون‌های پایدار و همگن با اندازه ذرات کنترل شده استفاده شد. همچنین سمیت سلولی نمونه‌ها بر روی سلول‌های L929 فیروپلاست موش برای ارزیابی زیست‌سازگاری انجام شد.

۲- فعالیت‌های تجربی

۲-۱- مواد مصرفی

برای سنتز LDH از نیترات کلسیم چهارآبه $[Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O]$ (کد مرک ۴-۳۴-۱۳۴۷۷)، نیترات آلومینیوم نه آبه $[Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O]$ (کد مرک ۲-۲۷-۷۷۸۴) و هیدروکسید سدیم (کد مرک ۲-۷۳-۱۳۱۰) استفاده شد. تمامی مواد شیمیایی با درجه خلوص آزمایشگاهی و بدون تخلیص ثانویه مورد استفاده قرار گرفتند. از آب کربن زدایی شده و دیونیزه جوشیده در تمامی مراحل آزمایش استفاده شد.

۲-۲- سنتز هیدروکسید دوگانه لایه‌ای

برای تهیه ترکیب شبه هیدروتالسیتی، $Ca-Al-NO_3$ ، با استفاده از روش هم‌رسوبی، ابتدا محلولی از نمک‌های $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O (0.3M)$ و $Ca(NO_3)_2 \cdot 6H_2O (0.6M)$ به نسبت $Mg/Al=2$ تهیه شد. آب دیونیزه و جوشیده در یک واکنشگاه چهار دهانه توسط گاز نیتروژن به مدت یک ساعت کربن‌زدایی شد. از یک دهانه، محلول حاوی نمک‌ها و از دهانه دیگر، $Na(OH)$ دو مولار به صورت قطره قطره با سرعت ۱ قطره در دقیقه به آب در حین هم‌زدن اضافه شدند. افزودن $Na(OH)$ تا رسیدن به $pH=10$ ادامه یافت. پس از اتمام زمان‌های پیرشدگی به مدت ۱۲ ساعت، رسوب نمونه‌ها توسط سانتریفیوژ جمع‌آوری شد و ۳ بار شستشو شد. پس از آخرین مرحله سانتریفیوژ رسوب، مقداری از آن به همراه ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه به محفظه اتوکلاو از جنس فولاد زنگ نزن با پوشش تفلونی منتقل شد. سپس محفظه به آن منتقل و عملیات هیدروترمال در دمای $120^\circ C$ با ۲ درصد وزنی، در زمان‌های ۰، ۴، ۲۴، و ۴۴ ساعت (نمونه‌های S_0 ، S_1 ، S_2 و S_3) انجام شد. پس از اتمام عملیات و سرد شدن محفظه مقداری از سوسپانسیون همگن برای آنالیزهای بیشتر نگهداشته شد و باقی سوسپانسیون در خشک کن انجمادی به منظور تهیه پودر قرار گرفت.

۲-۳- مشخصه‌یابی نمونه‌ها

الگوهای پراش پرتو ایکس (XRD) نمونه‌ها توسط دستگاه پراش سنج مدل PW3710 ساخت شرکت Philips با استفاده از پرتو $CuK\alpha$ با طول موج 0.15406 نانومتر در 40 کیلوولت و 30 میلی‌آمپر بررسی شد. محدوده زوایای اندازه‌گیری 2θ بین 4 تا 70 درجه بود. مورفولوژی و اندازه ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل Cambridge Stereoscan مطالعه شد. به منظور بررسی رفتار حرارتی ترکیبات از دستگاه آنالیز حرارتی همزمان (STA) مدل Polymer Laboratories PL-STA 1640 استفاده شد. نمونه‌ها در دمای اتاق با سرعت 5 درجه بر دقیقه حرارت داده شدند و گرمانگاشت‌های تغییر جرم (TG) و تغییر دما (DTA) با درجه‌حرارت تهیه شدند. برای بررسی تکمیلی نمونه‌ها از دستگاه طیف‌سنجی فروسرخ (FTIR) مدل IFS 48 ساخت شرکت Bruker در محدوده $4000-400$ cm^{-1} استفاده شد. نمونه‌ها با استفاده از KBr به عنوان رقیق‌کننده مورد آزمایش قرار گرفتند. میکروگراف‌های میکروسکوپ الکترونی عبوری از نمونه‌ها توسط دستگاه فیلیپس EM208 در ولتاژ شتاب دهنده 200 کیلو ولت ثبت شدند. برای آماده‌سازی نمونه‌ها، ابتدا مخلوطی از سوسپانسیون LDH با

الکل به مدت ۳۰ دقیقه تحت اولتراسونیکاتور^۱ قرار گرفت. سپس یک قطره از سوسپانسیون یکنواخت برروی گرید مسی^۲ با پوشش کربن قرار داده شد. میانگین اندازه ذرات و گراف توزیع اندازه ذرات^۳ توسط دستگاه Nanosizer Nano ZS, MALVERN ثبت و همچنین از همین دستگاه برای ثبت پتانسیل زتا^۴ نمونه‌ها استفاده شد.

۲-۴- ارزیابی سمیت سلولی

در این پژوهش، از سلول‌های فیبروبلاست موش L929 استفاده شد. سلول‌ها در محیط RPMI-1640 حاوی L-Glutamine به همراه ۱۰٪ سرم گاوی و ۱٪ پنی سلین/استرپتومایسین در یک فلاسک T75 در انکوباتور کشت داده شدند. زمانیکه سلول‌ها در حدود ۷۰ الی ۸۰ درصد کف فلاسک را پوشاندند به یک پلیت ۹۶ خانه به تعداد 5×10^3 عدد در هر چاهک منتقل شدند. پس از طی ۲۴ ساعت از زمان کاشت، سلول‌ها با مقادیر مشخص از نمونه (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰) LDH تیمار شدند. پس از انکوبه شدن در زمان‌های ۱، ۲، ۴ و ۶ روز میزان زیست‌پذیری سلول‌ها توسط آزمون MTT^۵ بررسی شد. به این منظور، ۲۰ μl از محلول MTT به هر چاهک افزوده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس محیط کشت جدا و کریستال‌های زرد رنگ فرمازان توسط ۲۰۰ μl از محلول DMSO حل شدند. میزان جذب توسط دستگاه الیزا ریدر (ElisaReader) در طول موج ۵۷۰ nm اندازه‌گیری شد. در واقع میزان شدت رنگ با تعداد سلول‌هایی که از لحاظ متابولیکی فعال هستند و در نتیجه با میزان زیست‌پذیری سلول‌ها متناسب است.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- سنتز هیدروکسیدهای دوگانه لایه‌ای

مطابق شکل ۲، تمامی نمونه‌های سنتز شده از لحاظ ساختاری کاملاً دارای مشابهت هستند و پیک‌های مشخصه LDH در الگوی پراش پرتو ایکس تمامی آن‌ها مشاهده می‌شود. LDH از لایه‌های هیدروکسید فلزات تشکیل شده است که آنیون‌ها و مولکول‌های آب بین این لایه‌ها قرار می‌گیرند و مانند قفسه‌های کتابخانه برروی یکدیگر چیده می‌شوند. لایه‌های هیدروکسیدی کاملاً مشابه لایه بروسیتی $[\text{Mg}^{2+}(\text{OH})]$ است، یعنی یک کاتیون در مرکز یک هشت وجهی یا اکتاهدرال قرار دارد. برای مثال در ترکیب Mg-Al-LDH، یک یون منیزیم توسط ۶ یون OH^- احاطه شده است. زمانیکه یک کاتیون دوظرفیتی با یک کاتیون سه ظرفیتی جایگزین می‌شود، بار مثبتی در ساختار ایجاد می‌شود، که این بار توسط آنیون‌های بین لایه‌ای نظیر کربنات، نترات، کلراید، سولفات و یا آنیون‌های دیگری که در زمان واکنش حضور دارند، خنثی می‌شود. بدین ترتیب ساختار شبه هیدروتالسیت شکل می‌گیرد. این لایه‌ها توسط برهمکنش‌های الکترواستاتیکی و همچنین پیوند هیدروژنی به یکدیگر متصل شده‌اند. در این فرآیند که سنتز مستقیم هم‌رسوبی است، محلول آبی حاوی کاتیون‌های M^{2+} و M^{3+} و آنیون مورد نظر با یکدیگر مخلوط می‌شوند و به عنوان مواد اولیه استفاده می‌شوند.

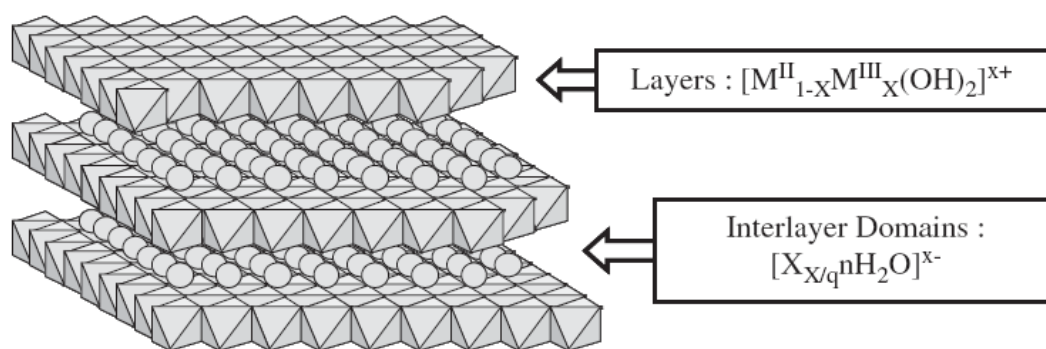
¹ Ultrasonicator

² Copper grid

³ Particle size distribution

⁴ Zeta potential

⁵ (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide



شکل ۱- ساختار و چیدمان لایه‌ها در LDH

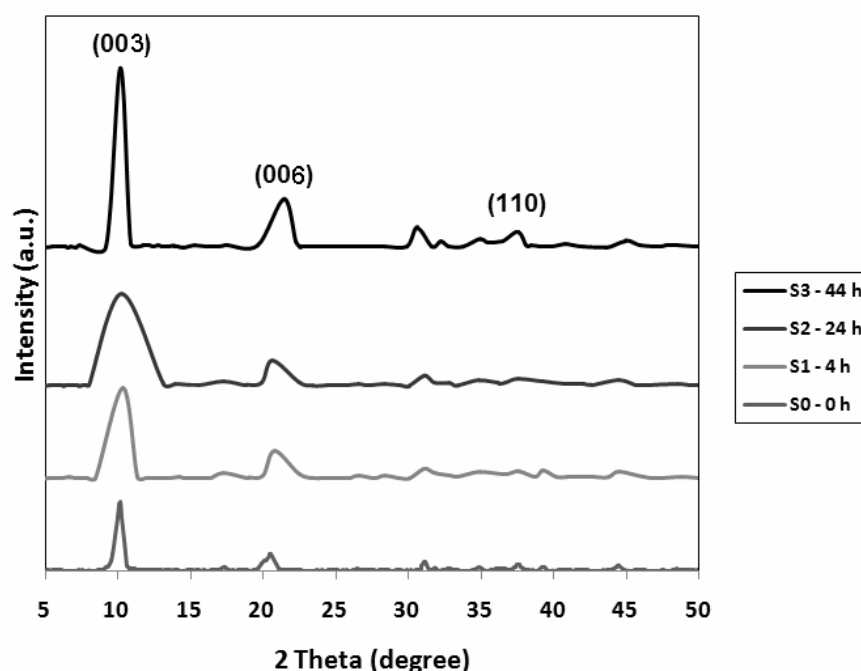
۳-۲- پراش پرتو ایکس

شکل ۲ الگوهای پراش پرتو ایکس نمونه‌های S_0 ، S_1 ، S_2 و S_3 مشاهده می‌شود. همانطور که در شکل مشخص است، XRD تمام نمونه‌ها از الگوی شبه‌هیدروتالسیتی تبعیت می‌کند و دارای پیک‌های مشخصه LDH می‌باشد. این الگوها شامل یک طیف با تعداد پیک‌های کم، پیک‌های تیز و متقارن در زوایای کم و پیک‌های نسبتاً پهن و نامتقارن در زوایای بالا هستند، که این خصوصیات ویژگی‌های اصلی الگوی XRD کانی‌های رسی با ساختار لایه‌ای هستند [۱۵]. برای بررسی و مقایسه بلورینگی مواد سنتز شده طبق منابع، شدت و پهنای پیک‌های (003) و (006) را می‌توان مبنای مقایسه بلورینگی مواد قرار داد. به عبارت دیگر، هرچه بلورینگی افزایش می‌یابد، پیک‌ها تیز تر، شدت آن‌ها بیشتر و پهنای نصف ارتفاع پیک بیشینه کمتر می‌شود. در ناحیه بین زوایای 2θ ، $11/0$ و $14/5$ درجه و همچنین $24/5$ و $29/5$ درجه مربوط به محل قرار گیری پیک‌های (003) و (006) است. در تمامی نمونه‌های LDH غیر کلسیمی می‌توان پهن شدن پیک‌ها را در محدوده (011) مشاهده کرد. این پهن شدن یکی از مشخصه‌های اصلی کریستال‌های لایه‌ای بخصوص LDH است که بر اثر ایجاد عیوب لایه‌ای^۱ در ساختار پدید می‌آید، در این حالت لایه‌ها به صورت دوبعدی ایده‌آل اما در حالت سه بعدی به علت قرار نگرفتن صحیح بر روی همدیگر از حالت ایده‌آل منحرف می‌شوند و بدین ترتیب پیک‌های متقارن در زوایای کم به زوایای بزرگتر به علت تقارن کم منتقل می‌شوند. [۱۶]. با توجه به الگوهای پراش نمونه‌ها، نمونه‌های هیدروترومال شده دارای بلورینگی بیشتری هستند و در زوایای 2θ کوچکتر متقارن و در زوایای 2θ بزرگتر نامتقارن هستند که این الگو با توجه به خصوصیات رس‌ها می‌باشد در منابع شدت پیک‌ها، به بلورینگی کریستال‌ها نسبت داده شده است. برای بررسی کمی شدت بلورینگی، پهنای نصف ارتفاع پیک‌ها (FWHM)^۲ در (003) و (006) محاسبه شد. در نمونه‌های S_0 ، S_1 ، S_2 و S_3 برای پیک (003) ، به ترتیب $0/89$ ، $0/86$ ، $0/71$ و $0/46$ و برای پیک (006) ، به ترتیب $1/42$ ، $1/23$ ، $0/96$ و $0/83$ محاسبه شد. همانطور که مشخص است با افزایش زمان هیدروترومال پیک در نصف ارتفاع ماکزیمم کاهش می‌یابد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود با افزایش زمان هیدروترومال شدت پیک‌ها افزایش یافته است و در نمونه S_3 با زمان هیدروترومال ۴۴ ساعت شدت پیک افزایش ۲ برابری نسبت به نمونه S_0 داشته است. اندازه

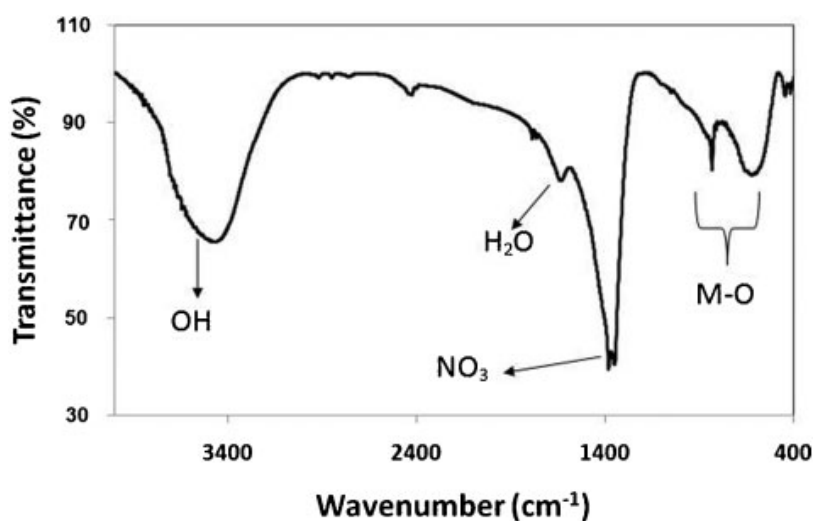
¹ Stacking faults

² Full width at half maximal

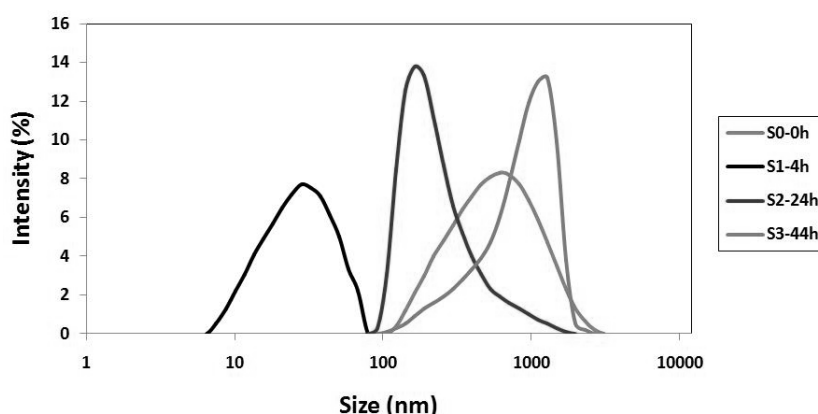
ذرات و پراکندگی آن‌ها به شدت به مدت زمان هیدروترمال وابسته است. با افزایش زمان هیدروترمال پراکندگی ذرات بشدت افزایش می‌یابد که البته به دما و مدت زمان عملیات نیز وابسته است که البته این نتیجه در بخش بررسی میکروسکوپی در شکل ۴ مشاهده می‌شود. زیرا مکانیزم‌های مختلفی برای پدیده انحلال و رشد مجدد کریستال‌ها وجود دارد که در قسمت مکانیزم به آن پرداخته خواهد شد. در هنگام عملیات هیدروترمال هرگونه فاز آمرف و یا ناخالصی که ممکن است به وجود آمده باشد، حل و کریستالیزاسیون مجدد رخ می‌دهد و کریستالیت‌ها فرصت رشد کردن پیدا می‌کنند. عملیات هیدروترمال منجر به افزایش شدت پیک‌ها به ترتیب در نمونه‌های S_1 ، S_2 و S_3 می‌شود. بیشترین شدت پیک مربوط به نمونه S_3 با ۴۴ ساعت زمان پیرشدگی است.



شکل ۲- الگوی پراش پرتو ایکس نمونه‌ها با ۰، ۴، ۲۴ و ۴۴ ساعت عملیات هیدروترمال



شکل ۳- طیف FTIR نمونه Ca/Al-LDH



شکل ۴- نمودار توزیع اندازه ذرات نمونه‌ها پس از عملیات هیدروترمال

۳-۳- طیف سنجی فرورسرخ تبدیل فوریه

طیف FTIR تمامی نمونه‌های LDH کاملاً مشابه هستند. در شکل ۳ مشاهده می‌شود که با توجه به این طیف می‌توان وجود گروه‌های مختلف و ساختار را شناسایی کرد. طیف مربوط به نمونه Ca-Al-LDH دارای پیک پهن در 3475 cm^{-1} است که مربوط به قرارگیری پیک‌های لرزشی آب‌های جذب شده سطحی، گروه‌های OH^- و لرزش باندهای $\text{HO}\cdots\cdots\text{OH}$ بر روی هم می‌باشد. پیک 1636 cm^{-1} مربوط به آب‌های جذب شده بین لایه‌ای است [۱۲]

ارتعاش پیک‌های 1474 را می‌توان به کربنات جذب شده از هوا توسط سیستم در حین سنتز یا آماده سازی نسبت داد. باندهای 717 cm^{-1} و 668 نیز از پیک‌های مشخصه ساختار شبه هیدروتالسیتی می‌باشند. در مورد نمونه‌های حاوی نیترات مانند نمونه کلسیمی و منیزیمی پیک در محدوده 1384 مربوط به لرزش نامتقارن کششی (ν_3) یون نیترات می‌باشد [۱۶]. حضور مشخص این پیک نشان دهنده جای گیری یون نیترات در ساختار است. به طور کلی می‌توان پیک‌های مشخصه LDH را به گروه‌های زیر تقسیم کرد:

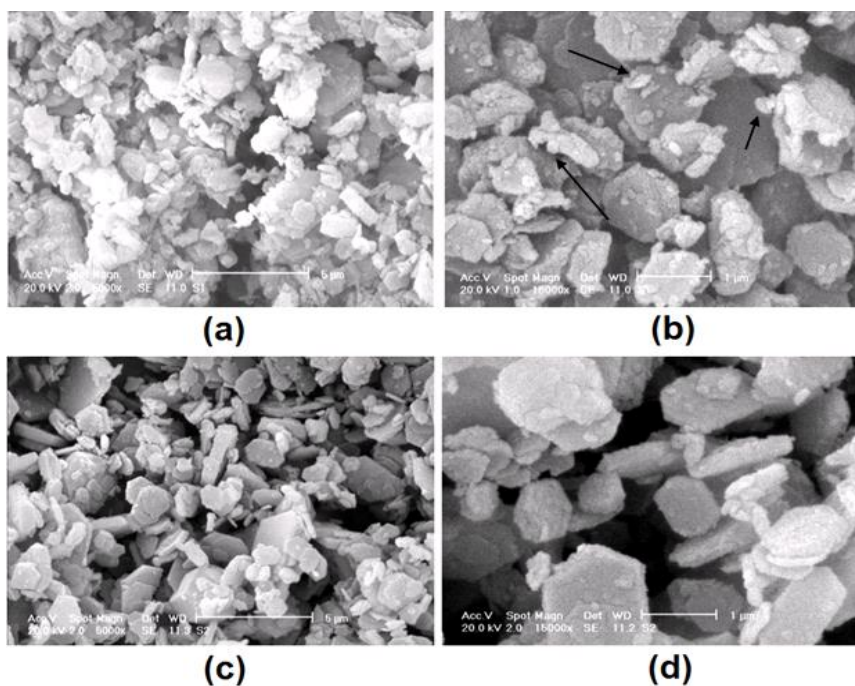
۱. پیک‌های در محدوده 3500 cm^{-1} که مربوط به حالت کشیدگی و لرزشی پیوند OH است.
۲. پیک‌های در محدوده 1380 cm^{-1} که مربوط به گروه نیترات هستند.
۳. پیک مربوط به جذب H_2O که در حدود 1600 cm^{-1} قرار دارد.
۴. مجموعه پیک‌هایی که زیر 1000 cm^{-1} قرار دارند و مربوط به حالت کشیدگی پیوندهای کاتیون فلزی-OH هستند.

۳-۴- اندازه ذرات

توزیع اندازه ذرات به شدت به دما و مدت زمان عملیات هیدروترمال وابسته است. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، در نمونه S_0 بدون عملیات هیدروترمال نمودار توزیع اندازه ذرات پهن و از 100 الی 2669 نانومتر گسترده شده است زیرا در حین فرآیند هم‌رسوبی سریع، کریستالیت‌ها به شدت به هم می‌چسبند و آگریگت تشکیل می‌دهند. در این حالت بین آنیون‌های سطحی بین لایه‌های دو صفحه یک کریستالیت، با کریستالیت‌های دیگر برهمکنش ایجاد می‌شود و همدیگر را جذب می‌کنند و منجر به تولید آگریگت‌ها می‌شوند. در مقابل ذرات نمونه‌های S_2 و S_3 یکنواخت هستند و نمودار توزیع اندازه ذرات آن‌ها نیز

باریک است. مشاهده می‌شود که ۴ ساعت عملیات هیدروترمال در نمونه S₁ منجر به به وجود آمدن ذرات ریزتر در مقایسه با نمونه‌های S₂ و S₃ است (توزیع اندازه ذرات بین ۷/۵ تا ۷۸ نانومتر است). این نتایج با میکروگراف‌های TEM مطابقت دارد. در ابتدای عملیات هیدروترمال، آگریگت‌ها پراکنده می‌شوند و تبدیل به کریستالیت‌های منفرد می‌شوند. اما با افزایش زمان هیدروترمال کم کم پدیده آگریگت مجدد رخ می‌دهد و کریستالیت‌ها به هم می‌چسبند و دوباره رشد می‌کنند تفاوت آن با دوره پیرسازی در این است که بلورینگی هم در عملیات هیدروترمال افزایش می‌یابد و ذرات دارای عیوب کریستالی کمتری هستند. با افزایش زمان هیدروترمال صفحات رشد می‌کنند، اما نمودار توزیع اندازه ذرات آن‌ها همچنان باریک می‌ماند. همچنین نمونه S₁ با ۴ ساعت هیدروترمال دارای نمودار توزیع باریک‌تری است در مقایسه با نمونه S₀ با ۴۴ ساعت زمان عملیات اندازه ذرات بزرگتری دارد (۱۰۵ تا ۲۳۰۵ نانومتر). این پدیده نشان می‌دهد که رشد پیوسته صفحات با زمان نسبت دارد و پدیده آگریگت مجدد رخ می‌دهد

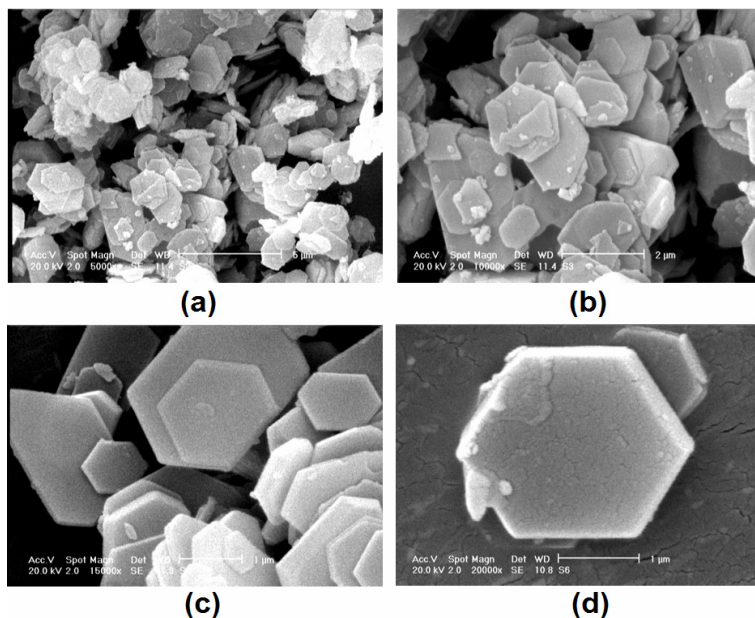
۳-۵- مشاهدات میکروسکوپی



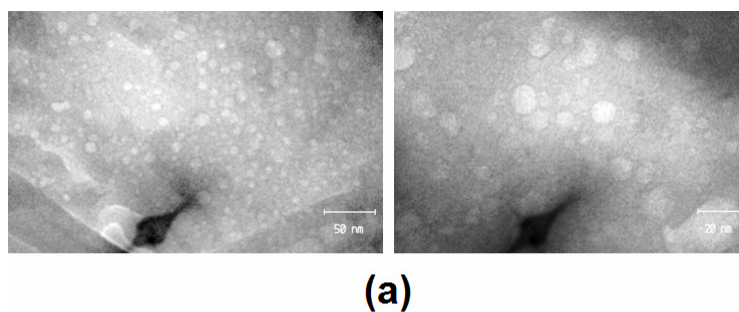
شکل ۵- (a,b) میکروگراف‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه S₀ و (c,d) میکروگراف‌های نمونه S₂

به منظور مشاهده تأثیر عملیات هیدروترمال بر روی مرفولوژی LDH، از تکنیک SEM استفاده شد. شکل ۵ (a,b) مرفولوژی نمونه S₀ را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود در غیاب عملیات هیدروترمال، ذرات به شدت آگلومره شده‌اند و فازهای آمورف (کانگومراسیون) مشاهده می‌شود (با پیکان مشکی در تصویر مشخص شده است). زمانی که نمونه‌ها در محفظه اتوکلاو تحت فشار و حرارت قرار می‌گیرند، مناطق آمورف از بین می‌رود و اندازه ذرات افزایش می‌یابد. همانطور که در شکل ۵ (c,d) دیده می‌شود اندازه ذرات با ۲۴ ساعت عملیات از نمونه بدون عملیات بزرگتر است. با افزایش زمان هیدروترمال در نمونه ۳، شکل ۶ صفحات بیشتر رشد می‌کنند و شکل هگزاگونال ذرات منظم‌تر می‌شود و نسبت طول به عرض زیاد می‌شود.

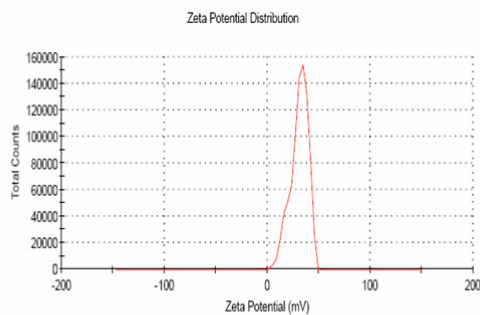
این پدیده به خوبی برای نمونه S_3 در مقایسه با نمونه‌های دیگر دیده می‌شود. در تصاویر TEM شکل (a) کریستالیت‌های نمونه S_1 به خوبی پراکنده، از هم جدا و یکنواخت هستند همچنین از شکل، کریستالیت‌های هگزاگونال با اندازه ۱۰ نانومتر مشاهده می‌شود. پتانسیل زتا مربوط به نمونه S_1 ، $+30\text{ mV}$ اندازه‌گیری شد (شکل (b)). این بار زیاد سطحی LDH، باعث می‌شود تا نانوذرات LDH به راحتی به سطح منفی سلول بچسبند و وارد سلول شود.



شکل ۶- میکروگراف‌های نمونه S_3 با بزرگنمایی‌های مختلف



(a)



(b)

شکل ۷- (a) تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی عبوری از نمونه S_1 و (b) زتا پتانسیل اندازه‌گیری شده از نمونه S_1

۳-۶- آنالیز حرارتی

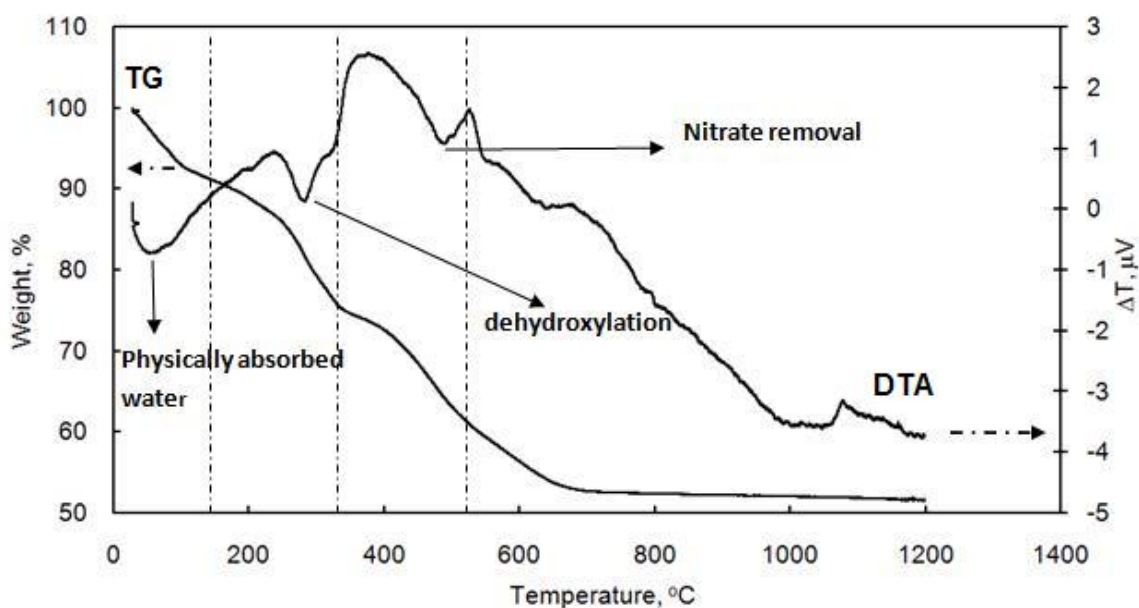
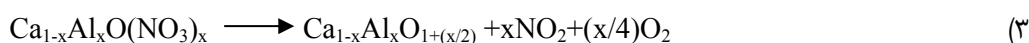
در بررسی گرمانگاشت نمونه Ca-Al-NO_3 LDH (شکل ۸). در کل سه ناحیه گرماگیر از روی نمودارها مشهود است. اولین فرآیند تا دمای 150°C مربوط به خروج مولکول‌های آب سطحی و مولکول‌های آب بین لایه‌ای است. دومین فرآیند که تا دمای 330°C ادامه دارد مربوط به دهیدروکسیلاسیون ساختار و کاهش نیترات به یون نیتريت است. سومین پیک گرماگیر که تا 530°C ادامه دارد مربوط به خروج بیشتر یون‌های هیدروکسیل و تجزیه نیتريت است. نمودار کاهش وزن TG نشان دهنده تجزیه کامل نمونه تا دمای 600°C است و کل کاهش وزن تقریباً 48% می‌باشد. از روی نمودار TG نیز مشابه نمودار قبلی سه ناحیه مشخص است. در مرحله اول تا دمای $9/9\%$ از وزن اولیه خود را از دست می‌دهد. در مرحله دوم که تا 330°C است ترکیب 24% از وزن را از دست می‌دهد. در آخرین مرحله که در بین 330°C تا 600°C است تجزیه آنیون‌های نیترات اتفاق می‌افتد که کاهش وزن در این مرحله مربوط به خروج کامل NO_2 از سیستم است. حرارت دادن نمونه‌ها تا بالای 600°C باعث تخریب ساختار لایه‌ای LDH و تشکیل فازهای جدید بلوری می‌گردد [۱۶-۱۸].

سه مرحله تجزیه LDH را می‌توان به صورت فرمول نوشت:

۱- در مرحله اول آب زدایی اتفاق می‌افتد:



۲- در مرحله دوم و سوم دهیدروکسیلاسیون شروع می‌شود و تبدیل نیترات به نیتريت و خروج یون نیترات:



شکل ۸- گرمانگاشت نمونه Ca/Al-LDH

۳-۷- ارزیابی سمیت سلولی

ارزیابی سمیت سلولی بر روی سلول‌های L929 انجام شد. پس از گذشت ۴ روز از انکوباسیون سلول‌ها و تیمار آن‌ها با غلظت‌های 0 ، 100 ، 200 و 500 $\mu\text{g/ml}$ از نمونه، زیست‌پذیری بالای 80% گزارش شد. اما در روز ششم کاهش زیست‌پذیری در غلظت‌های 100 ، 200 و 500 $\mu\text{g/ml}$ مشاهده شد که این کاهش برای غلظت 500 $\mu\text{g/ml}$ بیشینه بود. یکی از دلایل افت زیست‌پذیری را می‌توان به طولانی شدن مدت زمان کشت نسبت داد که باعث اسیدی شدن محیط کشت می‌شود و در نهایت بر روی نتایج نهایی در روز ششم تأثیر می‌گذارد. اما با تمام این تفاسیر می‌توان نتیجه گرفت که Ca-Al-LDH می‌تواند ماده‌ای زیست‌سازگار تا غلظت 100 $\mu\text{g/ml}$ باشد و در کاربردهای زیستی مورد استفاده قرار گیرد.

۳-۸- مکانیزم واکنش

در کل، در طول عملیات هیدروترمال، مجموعه‌ای از فرآیندها شامل جداسازی آگریگت‌ها^۱، رشد مجدد^۲ و آگریگت مجدد^۳ اتفاق می‌افتد. تفکیک^۴، رسوب^۵ و نفوذ^۶ (انتشار آگریگت‌ها) از وقایع مهم در ۲-۴ ساعت ابتدایی عملیات هیدروترمال است. در مرحله تفکیک، فاز آمورف LDH حل می‌شود. بنابراین اثر چسبندگی فاز آمورف که منجر به چسبیده شدن ذرات بهم می‌شود، کاهش می‌یابد. در مرحله نفوذ، کاتیون‌های فلزی مانند کلسیم و آلومینیوم در لایه‌ها پراکنده^۷ می‌شوند تا عیوب ساختاری به حداقل ممکن برسد و بلورینگی LDH، افزایش یابد. از طرف دیگر با افزایش دمای هیدروترمال حرکت براونی^۸ ذرات افزایش می‌یابد که باعث گریز کریستالیت‌های کوچک LDH از تجمع و آگریگت شدن مجدد می‌شود [۹]. می‌توان فرض کرد که بعد از گریز کریستالیت‌های LDH، آن‌ها تمایل به دفع یکدیگر را بر اثر دافعه الکترواستاتیکی بار مثبت ذرات (پتانسیل مثبت زتا) دارند. بنابراین یک سوسپانسیون پایدار و هموزن پس از ۴ ساعت عملیات هیدروترمال به وجود می‌آید. به دنبال جداسازی آگریگت‌ها، فاز رشد کریستالیت‌های LDH آغاز می‌شود. این نکته قابل ذکر است که فاز رشد کریستالیت‌های LDH به موازات جداسازی آگریگت‌ها در مراحل ابتدایی عملیات هیدروترمال شروع می‌شود (۲-۴ ساعت اول). پس از جداسازی آگریگت‌ها به صورت کامل انحلال کریستالیت‌های کوچک و رسوب کاتیون‌های کلسیم و آلومینیوم بر روی کریستالیت‌های بزرگتر انجام می‌شود که منجر به بهبود بلورینگی LDH می‌شود. در نتیجه رشد متناوب ذرات منجر به آگریگت شدن مجدد ذرات می‌شود زیرا ذرات بزرگتر قادر به غلبه بر نیروهای دافعه الکترواستاتیکی هستند. بعلاوه، مدت زمان عملیات هیدروترمال، به شدت بر روی نمودار توزیع اندازه ذرات و حالت پراکندگی آنها تأثیر می‌گذارد. در ضمن، افزایش مدت زمان هیدروترمال از ۴ تا ۴۴ ساعت منجر به ایجاد ذرات بزرگتر می‌شود. دوغاب نمونه کلسیمی بدون عملیات متشکل از توزیع اندازه ذرات پهن از 122 nm تا $2/7$ μm است.

¹ Disaggregation

² Re-growth

³ Re-aggregation

⁴ Dissociation

⁵ Deposition

⁶ Diffusion

⁷ Disperse

⁸ Brownian motion

همرسوبی سریع^۱ و اشتراک سطوح^۲ آنیون‌ها در بین لایه‌های دو کریستالیت LDH منجر به چسبیدن سریع کریستالیت‌های LDH می‌شود. در این فرآیند حضور فاز آمورف LDH، اشتراک گذاری آنیون‌های سطحی بین دو صفحه کریستالیت‌ها، و به اشتراک گذاری لبه‌های بر روی هم افتاده^۳ به این آگریگت شدن کمک می‌کند. در حقیقت، همرسوبی سریع منجر به ایجاد تعداد زیادی جوانه‌های یکنواخت می‌شود که این جوانه‌ها و کریستالیت‌ها با به اشتراک گذاری لبه‌ها و پیوند با یکدیگر آگریگت‌ها را پدید می‌آورند. در مقایسه با دوغاب هیدروترمال نشده، دوغاب LDH که تحت ۴ ساعت عملیات قرار گرفته است دارای ذرات با اندازه کوچکتری در حدود ۷/۵ nm الی ۷۰ nm است که نشان می‌دهد ذرات به کریستالیت‌های منفرد^۴ پراکنده شده‌اند اما فرصت دوباره بهم چسبیدن و تشکیل آگریگت را نداشته‌اند [۲۰].

اینگونه می‌توان باور داشت که وقتی زمان هیدروترمال افزایش یابد فشار زیاد داخل محفظه، رشد جهت دار (در طول محور C) را برای کریستالیت‌های جوان محدود می‌کند و کریستالیت‌ها در طول محورهای a و b رشد می‌کنند زیرا تشکیل باندهای والنس m—OH به صورت ترمودینامیکی نسبت به رشد لایه‌ها در جهت c ارجح است. در این حالت اکسید فلزات حل می‌شوند و نیترات‌ها در بین فضای بین لایه‌ای LDH جای گیر می‌شوند. متعاقباً، بلورینگی مجدد رخ می‌دهد. در واقع در زمان‌های ابتدایی عملیات، جداسازی آگریگت‌ها رخ می‌دهد. سپس رشد کریستالیت‌های منفرد آغاز می‌شود اما در بین ساعات ابتدایی واکنش پدیده آگریگت شدن مجدد رخ نمی‌دهد. برای مثال، ۴ ساعت عملیات هیدروترمال در دمای ۱۰۰°C منجر به پراکنده شدن آگریگت‌ها شده در حالیکه عملیات در همان دما ولی به مدت ۲۴ ساعت منجر به افزایش اندازه ذرات در مقیاس میکرومتری شد. با افزایش زمان هیدروترمال تا ۴۴ ساعت نمودار توزیع اندازه ذرات به مقادیر بزرگتر منتقل شد که نشان دهنده رشد متناسب ذرات با زمان می‌باشد. پتانسیل زتا اندازه‌گیری شده نمونه بهینه، ۳۰ mV + اندازه‌گیری شد. این بار زیاد سطحی LDH، باعث می‌شود تا نانوذرات LDH به راحتی به سطح منفی سلول بچسبند و وارد سلول شود و همچنین دوغاب پایدار مناسب در زمان تیمار کردن^۵ سلول‌ها با فرمولاسیون داشته باشند [۲۱-۲۳].

۴- نتیجه‌گیری

به طور خلاصه در این پژوهش LDH توسط روش همرسوبی سنتز شد و عملیات هیدروترمال در زمان‌های مشخص در دمای ۱۲۰°C بر روی نمونه انجام شد. از این روش برای کنترل اندازه ذرات در محدوده ۱۰ nm تا ۲/۵ μm و تهیه سوسپانسیون پایدار ذرات استفاده شد. همچنین نانوذرات LDH در مقیاس نانومتری توسط روش هیدروترمال با زمان ۴ ساعت سنتز شد. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت، با افزایش زمان عملیات هیدروترمال اندازه ذرات بزرگتر می‌شوند و بلورینگی آن‌ها نیز افزایش می‌یابد در واقع با کنترل دما و زمان عملیات می‌توان بلورینگی و سایز ذرات را کنترل کرد. دوغاب پایدار تهیه شده نانوذرات LDH مناسب برای کاربردهای بیولوژیک و سلولی در ژن درمانی و رهایش دارو می‌باشد.

¹ Fast co-precipitation

² Surface sharing

³ Edge overlapping

⁴ Individual

⁵ Treatment

1. J. H. Choy, S. Y. Kwak, Y. J. Jeong and J. S. Park: 'Inorganic layered double hydroxides as nonviral vectors', *Angew. Chem.*, 2000, 22, 4042–4045.
2. J. H. Choy, J. S. Park, S. Y. Kwak, Y. J. Jeong and Y. S. Han: 'Layered double hydroxide and gene reservoir', *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 2000, 341, 425–429.
3. A. I. Khan and D. O'Hare: 'Intercalation chemistry of layered double hydroxides: recent developments and applications', *J. Mater. Chem.*, 2002, 12, 3191–3198.
4. S. Y. Kwak, W. M. Kriven, M. A. Wallig and J. H. Choy: 'Inorganic delivery vector for intravenous injection', *Biomaterials*, 2004, 25, 5995–6001.
5. K. M. Tyner, S. R. Schiffman and E. P. Giannelis: 'Nanobiohybrids as delivery vehicles for camptothecin', *J. Controlled Release*, 2004, 95, 501–514.
6. J. H. Choy, J. S. Jung, J. M. Oh, M. Parka, J. Jeong, Y. K. Kang and O. J. Han: 'Layered double hydroxide as an efficient drug reservoir for folate derivatives *Biomaterials*', *Biomaterials*, 2004, 25, 3059–3064.
7. P. S. Braterman, Z. P. Xu and F. Yarberrry: 'Handbook of Layered Materials', 373; 2004, New York, Marcel Dekker.
8. Y. Zhao, F. Li, R. Zhang, D. G. Evans and X. Duan: 'Preparation of layered double-hydroxide nanomaterials with a uniform crystallite size using a new method involving separate nucleation and aging steps', *Chem. Mater.*, 2002, 14, 4286–4291.
9. Z. P. Xu, G. Stevenson, C. Lu and G. Lu: 'Dispersion and Size Control of Layered Double Hydroxide Nanoparticles in Aqueous Solutions', *J. Phys. Chem.*, 2006, 110, 16923–16929.
10. Q. Tao, Y. Zhang, X. Zhang, P. Yuan and H. He: 'Synthesis and characterization of layered double hydroxides with a high aspect ratio', *J. Solid State Chem.*, 2006, 179, 708–715.
11. J. M. Oh, S. H. Hwang and J. H. Choy: 'The effect of synthetic conditions on tailoring the size of hydrotalcite particles *Solid State Ionics*', *Solid State Ionics*, 2002, 151, 285–292.
12. M. Ogawa and H. Kaiho: 'Homogeneous precipitation of uniform hydrotalcite particles', *Langmuir*, 2002, 18, 4240–4242.
13. M. Adachi-Pagano, C. Forano and J. Besse: 'Synthesis of Alrich hydrotalcite-like compounds by

- using the urea hydrolysis reaction-control of size and morphology', *J. Mater. Chem.*, 2003, 13, 1988–1993.
15. F. Kovanda, D. Kolousek, Z. Cilova and V. Hulinsky: 'Crystallization of synthetic hydrotalcite under hydrothermal conditions', *Appl. Clay Sci.*, 2005, 28, 101–109.
16. R. Rojas Delgado, C. P. De Pauli, C. Barriga Carrasco and M. J. Avena: 'Influence of MII/MIII ratio in surface-charging behavior of Zn-Al layered double hydroxides', *Appl. Clay Sci.*, 2008, 40, 23–27.
17. Z. P. Xu and H. C. Zeng: 'Decomposition Pathways of Hydrotalcite-like Compounds $Mg_{1-x}Al_x(OH)_2(NO_3)_x \cdot nH_2O$ as a Continuous Function of Nitrate Anions', *Chem. Mater.*, 2001, 13, 4564–4572.
18. L. Raki, J. J. Beaudoin and L. Mitchell: 'Layered double hydroxide-like materials: nanocomposites for use in concrete', *Cem. Concr. Res.*, 2004, 34, 1717–1724.
19. E. Lopez-Salinas, M. E. Llanos Serrano, M. A. Cortes Jacome and I. Schifter Secora: 'Characterization of synthetic hydrocalumitetype $[Ca_2Al(OH)_6]NO_3 \cdot mH_2O$: effect of the calcination temperature', *J. Porous Mater.*, 1996, 2, 291–297.
20. Z. P. Xu and G. Q. Lu: 'Hydrothermal synthesis of layered double hydroxides (LDHs) from mixed MgO and Al_2O_3 : LDH formation mechanism', *Chem. Mater.*, 2005, 17, 1055–1082.
21. L. Albiston, K. R. Franklin, E. Lee and J. B. A. F. Smeulder: 'Rheology and microstructure of aqueous layered double hydroxide dispersions', *J. Mater. Chem.*, 1996, 6, 871–877.
22. S. Miyata: 'The syntheses of hydrotalcite-like compounds and their structures and physico-chemical properties I: 'The systems $Mg_{z+}Al_{3+}NO_3$, $Mg_{z+}Al_{3+}Cl$, $Mg_{2+}Al_{3+}ClO$, $Ni_{2+}Al_{3+}Cl$ -AND $Zn_{2+}Al_{3+}Cl$ -', *Clays Clay Miner.*, 1975, 23, 369–375.
23. L. Hickey, J. T. Klopogge and R. L. Frost: 'the effects of various hydrothermal treatments on magnesium-aluminium hydrotalcites', *J. Mater. Sci.*, 2000, 11, 4347–4355.
24. V. R. L. Constantino and T. J. Pinnavaia: 'Basic properties of $Mg_{2+1-x}Al_{3+x}$ layered double hydroxides intercalated by carbonates, hydroxide, chloride, and sulfate anions', *Inorg. Chem.*, 1995, 34, 883–892.