

# بررسی زیست فعالی نانو کامپوزیت آپاتیت طبیعی - دیوپساید متراکم سازی شده به روش زینترینگ دو مرحله ای جهت مصارف پزشکی

نسرین رفیعی<sup>۱</sup>، ابراهیم کرمان<sup>۲\*</sup>

۱- کارشناسی ارشد، گروه مهندسی مواد سرامیک، واحد شهرضا، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرضا، اصفهان، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات مواد پیشرفته، دانشکده مهندسی مواد، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران

\*[ebkaramian91@gmail.com](mailto:ebkaramian91@gmail.com)

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۳۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۵/۳۱)

## چکیده

در این تحقیق به منظور دستیابی به کامپوزیت مناسب آپاتیت طبیعی - دیوپساید با خواص زیست فعالی مطلوب، ابتدا ترکیبات مختلف هیدروکسی آپاتیت طبیعی و دیوپساید (حاوی ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد وزنی دیوپساید)، تهیه و تحت عملیات حرارتی زینترینگ دو مرحله ای متراکم سازی شدند و سپس استحکام فشاری سرد (CCS) و آپاتیت سازی نمونه ها مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین جهت مشخصه یابی نمونه ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS)، و آزمون پراش پرتو ایکس (XRD) استفاده شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان استحکام (۶۳ MPa) متعلق به نمونه کامپوزیت حاوی ۲۰٪ دیوپساید بود و تصاویر SEM و طیف میکروآنالیز EDS، تشکیل رسوب آپاتیتی بر سطح این نمونه پس از ۲۸ روز غوطه وری در محلول شبیه سازی شده بدن را تایید کردند. همچنین یون سنجی انجام شده بر روی این نمونه، کاهش غلظت یون کلسیم از ۱۰۰ به ۹۳ و یون فسفر از ۳۱ به ۲۸ (ppm) را نشان داد که بیانگر تشکیل آپاتیت بر روی این نمونه می باشد. لذا با توجه به نتایج به دست آمده، نمونه کامپوزیتی حاوی ۲۰ درصد وزنی دیوپساید و ۸۰ درصد وزنی هیدروکسی آپاتیت طبیعی را می توان به عنوان یک نانوبیوسرامیک مطلوب جهت مصارف پزشکی از جمله ارتوپدی معرفی کرد.

## کلمات کلیدی:

دیوپساید، زینترینگ دو مرحله ای، هیدروکسی آپاتیت طبیعی، زیست فعالی.

## ۱- مقدمه

شده از سال ۱۹۷۰ میلادی می باشند که از جمله بیوسرامیک های زیست فعال می توان به هیدروکسی آپاتیت  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  اشاره کرد که پس از کاشت در بدن، بافت استخوانی جدیدی بر روی آن رشد کرده و اتصال محکمی میان این نوع کاشتنی با بدن برقرار می شود. این بیوسرامیک با وجود زیست سازگاری عالی، دارای خواص مکانیکی ضعیف

امروزه استفاده از بیومواد نانوکامپوزیتی جهت دستیابی به خواص متفاوت و کاربردهای چند منظوره از جمله ترمیم، درمان، جایگزینی و بازسازی بافت استخوان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. بیوسرامیک ها دسته ای از بیوموادهای مطرح

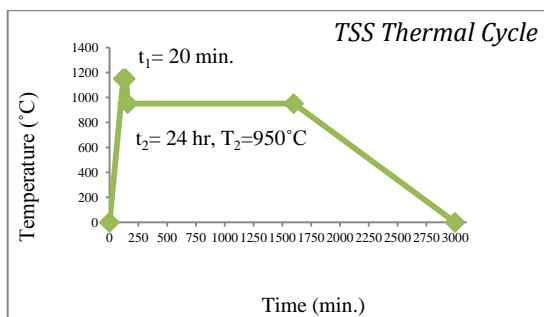
میلادی و به وسیله آلبی گزارش شد. نیم قرن پس از آن لویت و همکاران در سال ۱۹۶۹ میلادی و مونرو و همکاران در سال ۱۹۷۱ میلادی روشی برای آماده سازی آپاتیت سرامیکی ارائه کردند و استفاده از این سرامیک را در کاربردهای پزشکی و دندانپزشکی پیشنهاد نمودند. البته مبدا تاریخی دوره مدرن بیوسرامیک‌ها را می‌توان از سال ۱۹۶۳ با موفقیت اسمیت در تعویض و جایگزینی استخوان با ماده ای به نام سروزوم (ترکیبی از آلومینای متخلخل و رزین اپوکسی) دانست [۴-۵]. در این تحقیق، با توجه به تحقیقات گسترده مواد نانومتری به خصوص نانوکامپوزیت با پایه هیدروکسی آپاتیت طبیعی، دسترسی به ترکیب مناسب کامپوزیت دیوپساید-هیدروکسی آپاتیت طبیعی با خواص زیستی، مکانیکی مناسب جهت مصارف پزشکی پرداخته شده است.

## ۲- مواد و انجام روش تحقیق

جهت تهیه و ساخت کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت طبیعی و دیوپساید ابتدا نمونه‌های کامپوزیت شامل درصدهای مختلف وزنی هیدروکسی آپاتیت طبیعی و دیوپساید را به صورت نمونه‌های قرصی شکل با ابعاد  $10 \times 2 \text{ mm}$  و نمونه‌های استوانه‌ای با ابعاد  $10 \times 20 \text{ mm}$  به ترتیب جهت ارزیابی زیست‌فعالی و بررسی خواص مکانیکی از هر ترکیب آماده گردیده است. ترکیب و کد نمونه‌ها در جدول (۱) قابل مشاهده است و متراکم‌سازی نمونه‌ها در دستگاه پرس با استفاده از قالب سمبه ماتریس و فشار پرس هیدرولیکی ۵۰۰ کیلوگرم نیرو انجام شد [۶]. نمونه‌های بالک تهیه شده جهت زینترینگ در کوره الکتریکی دیجیتال، قرار داده شدند و جهت کنترل رشد دانه‌ها و حفظ نانو ساختار مواد از روش زینترینگ دو مرحله‌ای استفاده گردید [۷]. بدین صورت که ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۱۰۰ درجه سانتیگراد و سپس در دمای ۹۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت تحت عملیات حرارتی قرار داده شده اند. سیکل عملیات حرارتی زینترینگ دو مرحله‌ای در شکل (۱) آورده شده است [۸].

(تردی بالا) بوده که استفاده از آن را به ویژه در قسمت‌هایی از بدن که تحت ضربه و فشار بیشتر هستند، محدود می‌کند لذا جهت بهبود خواص مکانیکی این بیوسرامیک با حفظ خواص زیستی، روش‌هایی از جمله کامپوزیت کردن مطرح می‌گردد. از جمله مواد سرامیکی جهت کامپوزیت نمودن با هیدروکسی آپاتیت که منجر به بهبود خواص مکانیکی آن با حفظ خواص زیستی می‌گردد، دیوپساید (Diopside) می‌باشد. نونامی در سال ۱۹۹۲ و ۱۹۹۹ تحقیقاتی در رابطه با دیوپساید و عناصری که نقش کلیدی در استخوان سازی و تشکیل لایه آپاتیتی بر روی مواد بیومتریال سرامیکی دارد انجام داد از جمله این عناصر Si و Mg است که دیوپساید ( $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ ) محتوی این عناصر دارای خواص بیواکتیویته و قابلیت اتصال مطلوبی با بافت استخوان می‌باشد. نونامی همچنین تحقیقاتی در زمینه کاربرد دیوپساید به عنوان ایمپلنت انجام داد که دیوپساید را به عنوان یک بیوسرامیک مناسب با کاربردهای ویژه معرفی میکند [۱-۲]. ژانگ و لیو در سال ۲۰۱۳ مطلوب بودن رفتار بیواکتیویته این کامپوزیت را در کنار  $\text{AL}_2\text{O}_3$  نشان داد که جهت بررسی نیز از محلول شبیه سازی شده بدن (SBF) استفاده شده است [۳].

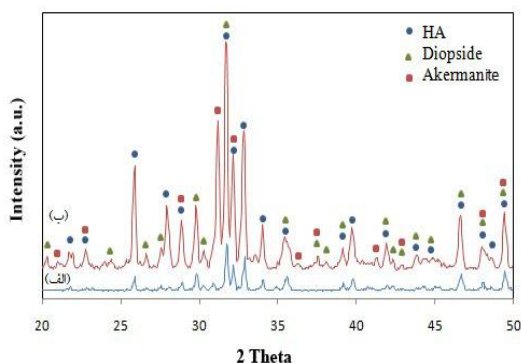
مواد مرکب نانومتری یا نانوکامپوزیت و به خصوص نانوکامپوزیت با پایه هیدروکسی آپاتیت (HA) و کلاژن بیشترین استفاده را در پیوند استخوان یافته‌اند که به دلیل ساختار و ترکیب شیمیایی بسیار نزدیک هیدروکسی آپاتیت به استخوان طبیعی و همچنین خواص بی‌نظیر آن مانند مساحت سطح زیاد و استحکام مکانیکی عالی آنهاست. به علاوه استخوان طبیعی، خود یک نانوکامپوزیت است که متشکل از نانولورهای هیدروکسی آپاتیت در زمینه آلی غنی از کلاژن می‌باشد. قابل ذکر است هیدروکسی آپاتیت در تحقیق حاضر هیدروکسی آپاتیت طبیعی بوده که از استخوان ران گوساله تهیه شده است، که در واقع یک تفاوت عمده این تحقیق با تحقیقات انجام شده دیگر است. اولین ترمیم موفقیت‌آمیز نواقص استخوانی توسط کلسیم فسفات‌ها، در سال ۱۹۲۰



شکل (۱): سیکل عملیات حرارتی زینترینگ دو مرحله ای

### ۳- نتایج و بحث

جهت مشخصه‌یابی، ابتدا الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) نمونه‌های کامپوزیتی حاوی صفر و ۲۰ درصد وزنی دیوپساید به ترتیب در شکل (۲- الف و ب) مورد بررسی قرار گرفته‌اند. انتخاب این نمونه جهت XRD به دلیل دارا بودن بیشترین استحکام فشاری بوده است، با توجه به شکل (۳) و مقایسه نتایج استحکام فشاری سرد (CCS) میزان استحکام ابتدا افزایش یافته (بیشترین مقدار مربوط به نمونه C (۶۳MPa) بوده است) و سپس کاهش استحکام مشاهده می‌گردد، بر همین اساس آنالیز پراش پرتو ایکس نمونه C در مقایسه با نمونه اولیه در شکل (۲) آورده شده است که بر اساس آن حضور فاز آکرمائیت در نمونه C منجر به اتصال بیشتر بین ذرات هیدروکسی آپاتیت و دیوپساید گردیده است در واقع فاز آکرمائیت به عنوان یک باند سیلیکاتی می‌توان، حضور آن را دلیل بر بهینه بودن خواص مکانیکی نمونه C دانست.



شکل (۲) الگوی پراش پرتو ایکس نمونه: (الف): صفر درصد دیوپساید و

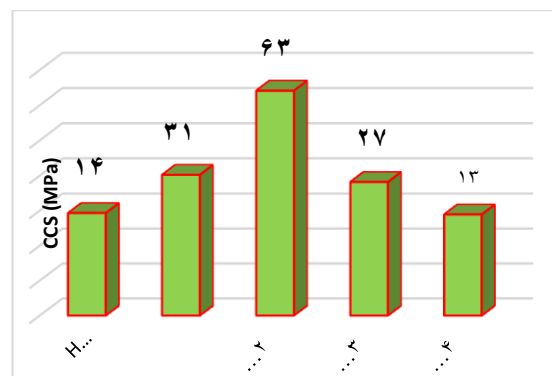
(ب): ۲۰ درصد وزنی دیوپساید بعد از TSS

در ادامه جهت ارزیابی زیست‌فعالیت نمونه‌ها از محلول شبیه سازی شده بدن (SBF) استفاده گردیده است. این محلول به طور گسترده توسط محققین به منظور شبیه‌سازی شرایط محیط بدن موجود زنده استفاده شده است [۹]. به منظور انجام آزمون آزمایشگاهی زیست‌فعالیت نمونه‌ها در محلول شبیه‌سازی شده بدن از ظروف پلاستیکی به نام فالکون استفاده شد. میزان محلول SBF مورد نیاز برای هر نمونه با توجه به رابطه  $V_s = S_a / 10$  که توسط کوکوبو و تاکاداما ارائه شده است، مشخص می‌شود [۱۰]. در این رابطه  $V_s$  حجم محلول شبیه‌سازی شده بدن بر حسب میلی‌لیتر و  $S_a$  مساحت سطح پوشش بر حسب میلی‌متر مربع است. با توجه به سطح نمونه، حدود ۲۵ سی سی از این محلول در هر فالکون استفاده شد. پس از ریختن حجم SBF محاسبه شده در هر فالکون نمونه مورد نظر نیز به آن اضافه گردید و سپس تمامی لوله‌های فالکون محتوی محلول SBF و نمونه‌ها داخل حمام بن ماری قرار گرفتند. سپس در بازه‌های ۱، ۳، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز، میزان pH و تغییرات وزنی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری تغییرات وزنی، نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در خشک‌کن در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نهایتاً نمونه‌هایی که به مدت ۲۸ روز در محلول SBF غوطه‌ور شده بودند از لوله فالکون خارج شده و جهت بررسی میزان آپاتیت رسوب یافته بر روی سطح آن‌ها، از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. همچنین جهت بررسی میزان کلسیم و فسفر آزاد شده از نمونه‌ها در محلول SBF از روش جذب اتمی (ASS) استفاده گردید [۱۱].

جدول (۱): نام و ترکیب مواد اولیه تشکیل دهنده

ترکیب کامپوزیت	کد نمونه
هیدروکسی آپاتیت خالص (HA)	A
Diopside %۱۰ + HA %۹۰	B
Diopside %۲۰ + HA %۸۰	C
Diopside %۳۰ + HA %۷۰	D
Diopside %۴۰ + HA %۶۰	E

با استفاده از محلول SBF انجام داد که نتایج بدست آمده در تحقیقات نونامی با نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر نزدیک می باشد [۱۲]. در سال ۲۰۱۱ ژانگ و لیو رفتار بیواکتیویته کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت و دیوپساید را در محلول شبیه سازی شده بدن مورد بررسی قرار دادند که نتایج بدست آمده تایید کننده این کامپوزیت جهت مصارف پزشکی می باشد [۱۳]. در تحقیق حاضر هیدروکسی آپاتیت، طبیعی بوده که از استخوان ران گوساله تهیه شده است و در واقع تفاوت عمده این تحقیق با تحقیقات انجام شده دیگر است. همچنین نتایج آزمون یون سنجی برای تعیین غلظت یون های کلسیم و فسفر در محلول شبیه سازی شده بدن، بعد از ۲۸ روز غوطه وری در شکل های (۴) و (۵) نشان داده شده است. در شکل (۴) کمترین مقدار یون کلسیم  $[Ca^{2+}]$  مربوط به محلول SBF حاوی نمونه کامپوزیتی ۲۰٪ دیوپساید است که بیانگر این موضوع است که مقداری از کلسیم هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح نمونه تشکیل شده است. لذا این موضوع نیز تایید می کند که نمونه کامپوزیتی حاوی ۲۰٪ دیوپساید، دارای بیشترین آپاتیت سازی در میان سایر نمونه ها می باشد. در نمونه C، کمترین غلظت یون کلسیم مشاهده می شود که نشان دهنده بیشترین جذب سطحی کلسیم می باشد، همچنین با توجه به شکل (۵)، افت میزان فسفر در نمونه C (۲۸ درصد وزنی) نسبت به نمونه A (۳۵ درصد وزنی) بیانگر آپاتیت سازی بیشتر در این نمونه بوده است.



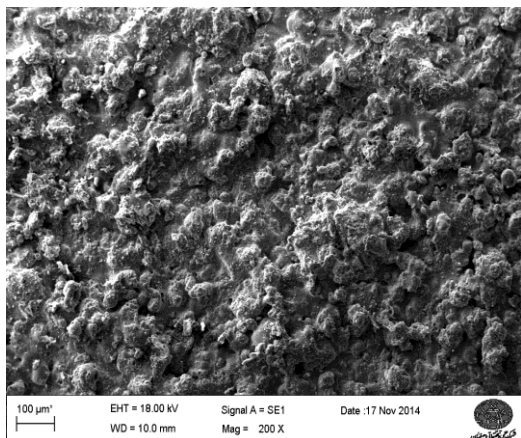
شکل (۳): مقایسه نتایج استحکام فشاری نمونه های کامپوزیتی

مقادیر تغییرات pH با گذشت زمان ۲۸ روز برای نمونه های غوطه ور شده در محلول شبیه سازی شده بدن در جدول (۲) قابل مشاهده است، در نمونه C در هفته اول و دوم میزان pH از ۷/۴۲ به ۷/۴۷ و ۷/۴۹ افزایش یافته است در واقع انحلال، بیشتر از رسوب زدایی رخ داده است و به علت انحلال بخشی از هیدروکسی آپاتیت زمینه نمونه C، مقداری از یون های هیدروکسیل آزاد شده و به همین دلیل میزان کلسیم افزایش یافته است. در صورتی که در این نمونه در هفته سوم و چهارم مقدار  $OH^-$  به حد اشباع رسیده و فرآیند آپاتیت سازی (رسوب گذاری آپاتیت) شروع می شود که این فرآیند همراه با مصرف  $OH^-$  می باشد و همان گونه که در جدول (۲) قابل مشاهده است، میزان pH از ۷/۴۹ به ۷/۴۵ و ۷/۴۱ کاهش می یابد که رسوب گذاری آپاتیتی را تایید می کند. نونامی در سال ۲۰۱۲ به همراه یک گروه تحقیقاتی، در مورد ترکیباتی که مانند دیوپساید، آکرمایت و فورستریت که شامل عناصر  $CaO-MgO-SiO_2$  بود تحقیقاتی را جهت ارزیابی زیست فعالی

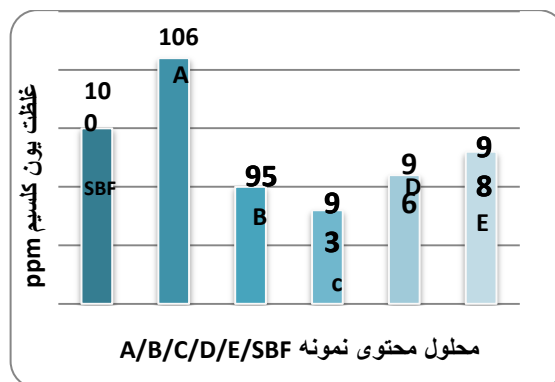
جدول (۲) تغییرات pH در ۲۸ روز غوطه وری در محلول SBF

کد نمونه	ترکیب نمونه	PH روز ۱	PH روز ۳	PH روز ۷	PH روز ۱۴	PH روز ۲۱	PH روز ۲۸
A	HA خالص	۷/۴۰	۷/۴۱	۷/۴۵	۷/۴۸	۷/۴۵	۷/۴۲
B	۱۰٪ دیوپساید	۷/۴۱	۷/۴۳	۷/۴۹	۷/۵۰	۷/۴۶	۷/۴۱
C	۲۰٪ دیوپساید	۷/۴۲	۷/۴۵	۷/۴۷	۷/۴۹	۷/۴۵	۷/۴۱
D	۳۰٪ دیوپساید	۷/۴۱	۷/۴۱	۷/۴۵	۷/۴۶	۷/۴۴	۷/۴۳
E	۴۰٪ دیوپساید	۷/۴۰	۷/۴۱	۷/۴۵	۷/۴۵	۷/۴۴	۷/۴۳

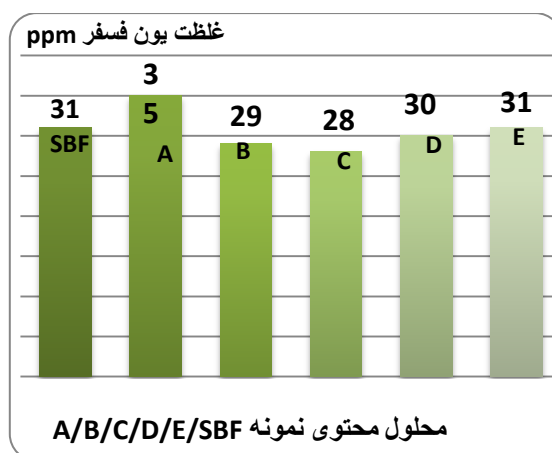
غوطه‌ور شده در محلول شبیه‌سازی شده بدن را نشان می‌دهد که وجود فازهای P و Ca با نسبت‌های وزنی به ترتیب ۱۶ و ۴۳، تشکیل رسوب آپاتیتی را تایید می‌کند،



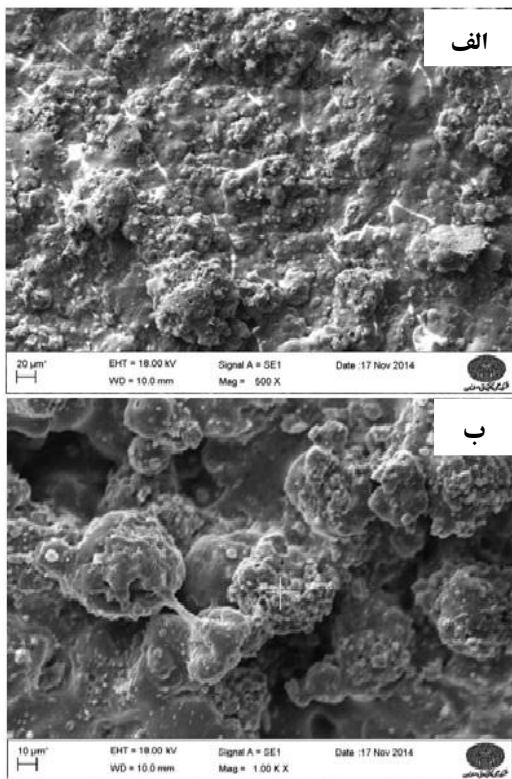
شکل (۶): تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی بعد از ۲۸ روز غوطه‌وری نمونه با صفر درصد دیوپساید



شکل (۴): غلظت یون کلسیم در محلول SBF حاوی نمونه‌ها بعد از ۲۸ روز



شکل (۵): غلظت یون فسفر در محلول SBF حاوی نمونه‌ها بعد از ۲۸ روز



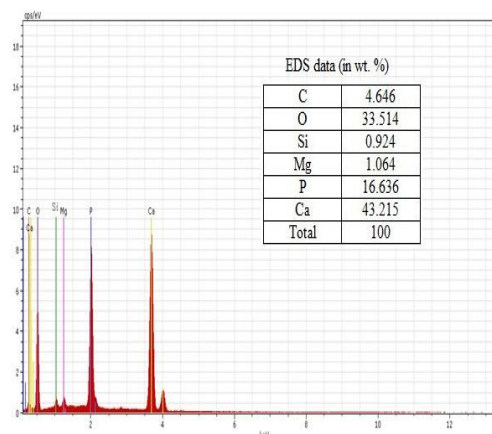
شکل (۷): تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه حاوی ۲۰٪ درصد دیوپساید در بزرگنمایی‌های مختلف بعد از ۲۸ روز غوطه‌وری در محلول SBF: (الف): بزرگنمایی ۱۰۰۰، (ب): بزرگنمایی ۲۰۰۰۰

جهت بررسی مورفولوژی سطح نمونه C، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و همچنین میکروآنالیز (EDS) استفاده شده است. شکل (۶) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی بعد از ۲۸ روز غوطه‌وری نمونه صفر درصد دیوپساید را جهت مقایسه با شکل (۷) که تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه حاوی ۲۰٪ درصد دیوپساید در بزرگنمایی‌های مختلف بعد از ۲۸ روز غوطه‌وری در محلول SBF است را نشان می‌دهد. تصاویر تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی، افزایش رسوبات کلسیم فسفاتی را در مدت زمان ۲۸ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن نشان می‌دهد که با زیست فعالی ذرات ترکیب نانو دیوپساید هماهنگی دارد همچنین شکل (۸) میکرو آنالیز (EDS) رسوب نمونه کامپوزیت حاوی ۲۰ درصد وزنی دیوپساید بعد از ۲۸ روز

خواص مکانیکی و زیست فعالی مطلوب، جهت مصارف پزشکی مناسب می داند.

### ۵- مراجع

- [1] T. Nonami, "Developmental Study of diopside for use as Implant Materials", Materials Research Society Proceeding, Vol. 252, pp. 87-92, 1992.
- [2] T. Nonami & S. Tsutsumi, "Study of diopside ceramics for biomaterials", Journal of materials Science: Materials in Medicine, Vol. 10, pp. 475-479, 1999.
- [3] M. Zhang & Ch.Liu. "Hydroxyapatite /AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/ Diopside Ceramic Compositions and their behaviour in simulated body fluid", Materials Science and Technology, Vol. 5, pp. 378-382, 2013.
- [4] م. ح. فتیحی، آ. حنیفی و ب. مستغاثی، "خواص و کاربرد پزشکی بیوسرامیکها"، انتشارات ارکان دانش ۱-۴۸-۱۸۳-۲۰۷، ۱۳۸۸.
- [5] L. Hench & J. Wilson, "An Introduction to bioceramics, Advanced Series in Ceramics", World Scientific, Vol. 17, 1993.
- [6] S. Ni, J. Chang & L. Chou, "In vitro studies of novel CaO-SiO<sub>2</sub>-MgO system composite bioceramics, Journal Materials Science", Materials.Medical, Vol. 19, pp. 359-67, 2008.
- [7] G. B. P. Ferreira, J. F. Silva, R. M. Nascimento, U. U. Gomes & A. E. Martinelli, "Two-step sintering applied to ceramics Sintering of Ceramics", New Emerging Techniques, 2012.
- [8] P. Feng, M. Niu, C. Gao, S. Peng & C. Shuai, "A novel two-step sintering for nano-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering", Scientific reports, 2014.
- [9] A. Binnaz & H. Yoruc, "Preparation and in vitro bioactivity of CaSiO<sub>3</sub> Powders", Ceramics International, Vol. 33, pp. 687-692, 2007.
- [10] T. Kokubo & H. Takadam, "How useful in SBF in predicting in vivo bone bioactivity", Biomaterials, Vol. 27, pp. 2907-2915, 2006.
- [11] T. Nonami, "In vivo and in vitro testing of diopside for biomaterial", Journal of the society of



شکل (۸) میکروآنالیز (EDS) زمینه نمونه کامپوزیت حاوی ۲۰٪ دیوساید غوطه‌ور شده بعد از ۲۸ روز.

### ۳- نتیجه گیری

- ۱- بیشترین استحکام (۶۳MPa) مربوط به نمونه C با ۲۰ درصد وزنی دیوساید و ۸۰ درصد وزنی هیدروکسی آپاتیت طبیعی بوده است.
  - ۲- تغییرات میزان pH (در هفته اول و دوم افزایش و هفته سوم و چهارم کاهش) در محلول SBF شامل نمونه C بیانگر فرآیند آپاتیت سازی (رسوب گذاری آپاتیت) می باشد.
  - ۳- یون سنجی محلول SBF شامل نمونه C کمترین غلظت یونهای کلسیم و فسفر (به ترتیب ۹۳ و ۲۸) را بعد از ۲۸ روز نشان می دهد که نشان دهنده بیشترین آپاتیت سازی در میان سایر نمونه ها می باشد.
  - ۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، افزایش رسوبات کلسیم فسفاتی را در مدت زمان ۲۸ روز غوطه وری در محلول شبیه سازی شده بدن شامل نمونه C را نشان می دهد که با زیست فعالی ذرات ترکیب نانو دیوساید هماهنگی دارد.
  - ۵- میکروآنالیز (EDS) رسوب نمونه C، وجود فازهای Ca و P با نسبت های وزنی ۱۶ و ۴۳ را نشان می دهد که بیانگر تشکیل رسوب آپاتیتی است.
- تمامی موارد ذکر شده نمونه C (کامپوزیت ۲۰ درصد دیوساید و ۸۰ درصد هیدروکسی آپاتیت طبیعی) را به دلیل بهینه بودن

materials for resource of Japan, Vol. 8, No. 2, pp.12-18, 1995.

- [12] S. Yamamoto & T. Nonami, "Fundamental Study on apatite precipitate ability of CaO-MgO-SiO<sub>2</sub> Compounders employed pseudo body solution of application for biomaterials", Journal of Australian Ceramic Society, Vol. 48, No. 12, pp. 180-184, 2012.
- [13] M. Zhang & Ch. Liu, "Hydroxyapatite /Diopside Cerami Compostions and their behaviour in Simulated body fluid", Ceramics International, 2025-2029, 2011.