

# TİTANYUM ALAŞIMININ BİYOMİMETİK YÖNTEMLE KALSİYUM FOSFAT KAPLANMASI

**Bengi YILMAZ\***, **Zafer EVİS\*\***, **Merve GÜLDİKEN\*\*\***

\* Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 06800, Ankara, Türkiye

\*\* Mühendislik Bilimleri Bölümü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 06800, Ankara, Türkiye

\*\*\*Biyoteknoloji Bölümü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 06800, Ankara, Türkiye

\* [ybeni@metu.edu.tr](mailto:ybeni@metu.edu.tr), \*\* [evis@metu.edu.tr](mailto:evis@metu.edu.tr), \*\*\* [mguldiken@gmail.com](mailto:mguldiken@gmail.com)

(Geliş/Received: 06.05.2013; Kabul/Accepted: 21.11.2013)

## ÖZET

Bu çalışmada, biyomedikal alanda sıklıkla kullanılan bir titanium alaşımı olan Ti6Al4V üzerine biyomimetik yöntemle hidroksiapatit kaplanmıştır. Kaplama işlemi için, Ti6Al4V plakalar, sıcaklığı 37°C'de tutulan ve normal iyonik konsantrasyonundan 1,5 kat daha yoğun olarak hazırlanan yapay vücut sıvısı (1,5×SBF) içerisinde bekletilmiştir. Tüm yüzeyin 2 hafta sonrasında kalsiyum fosfat tabakası ile kaplanmış olduğu gözlemlenmiştir. Kaplamanın yüzey morfolojisi alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) ile incelenmiş ve yüzeydeki kalsiyum fosfat birikiminin ilk olarak yarım kürecikler şeklinde başladığı ve 1,5×SBF içerisinde geçen süre arttıkça bu küreciklerin büyüdüğü görülmüştür. Kaplamanın moleküler yapısı Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrometresi (FTIR) ile incelenmiştir. FTIR sonuçlarına göre, 1,5×SBF içerisinde bekleme süresi farklı olan plakaların üzerinde oluşan kaplamaların hepsi karbonatlı hidroksiapatit spektrumu vermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Ti6Al4V; Biyomimetik Kaplama; SBF; SEM; FTIR

## BIOMIMETIC CALCIUM PHOSPHATE COATING OF TITANIUM ALLOY

### ABSTRACT

In this study, hydroxyapatite (HA) was coated on Ti6Al4V, which is a widely used titanium alloy in biomedical applications, via biomimetic method. For the coating process, Ti6Al4V plates were immersed into simulated body fluid (SBF) with an ionic concentration of 1.5 times that of conventional SBF at 37°C. In 1.5×SBF, the entire surface was successfully coated with a calcium phosphate (CaP) layer after 2 weeks. The surface morphology of the coated plates was studied by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) and it was shown that the CaP coating was initiated in the form of half spheres and grew up continuously. The molecular structure of the coatings was determined by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and the coatings showed the IR spectrum of carbonated hydroxyapatite regardless of the soaking time.

**Keywords:** Ti6Al4V; Biomimetic Coating; SBF; SEM; FTIR

### 1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Bir titanyum alaşımı olan Ti6Al4V, yüksek biyoyumluluğu ve optimum mekanik özelliklere sahip olması nedeniyle ortopedik implant üretiminde en çok kullanılan metalik biyomalzemedir [1]. Ancak, titanyum ve alaşımları doğrudan kemikle bağ yapamazlar, bunun yerine bu malzemelerden yapılmış implantlar ile doğal kemiğin arasında fibröz yapıda bir doku oluşur. Oysaki ameliyat sonrası iyileşme sürecindeki riskleri en aza indirmek ve implantın başarılı bir şekilde kemiğe sabitlenmesini sağlamak

için implant yüzeyinin biyoaktif olması büyük önem taşımaktadır.

Hidroksiapatit (HA), insan iskelet sisteminde doğal olarak var olan apatit ile benzer kimyasal bileşime ve kristal yapıya sahiptir. HA bu benzerliği ile her ne kadar mükemmel denebilecek düzeyde biyoyumluluğa sahip olsa da, zayıf mekanik özellikleri açısından, yüke dayanım gerektiren bölgelerde tek başına bir biyomalzeme olarak kullanıma uygun değildir. Bu sebeple, HA genellikle titanyum ve alaşımları gibi metalik implant yüzeylerine kaplanarak kullanılmaktadır [2].

Diğer taraftan, HA'nın iç yapısında bulunan kalsiyum iyonlarının yerine  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $La^{3+}$ ,  $Y^{3+}$ ,  $In^{3+}$ ,  $Al^{3+}$  ve  $Bi^{3+}$  gibi [3] farklı katyonlar eklenebilmesi, günümüzde HA'nın farklı dallardan araştırmacıların ilgisini çekmesine sebep olmaktadır. Metalik implantlar üzerine HA kaplama için çeşitli teknikler vardır. Bu tekniklerden bazıları; plazma püskürtme, daldırma, elektrokaplama, darbeli katman biriktirme, püskürtme, sol-jel yöntemi ile kaplamadır [4]. Bu teknikler arasında, plazma püskürtme, uygulama kolaylığı ve ekonomik olması nedeniyle en yaygın kullanılan kaplama yöntemidir. Ancak, bu yöntem ile elde edilen kaplamaların metalle arasındaki bağ gücünde yer yer değişkenlik gösterdiği, kalınlık ve yoğunluk açısından homojen olmadığı, ayrıca HA'nın kristal yapısı ve faz kompozisyonunda lokal farklılıklar olduğu bildirilmiştir [5]. Diğer yandan, fizyolojik sıcaklık ve pH değerinde hazırlanan SBF'ye metalik implantların daldırılması esasına dayanan biyomimetik yöntemin, bu yönüme umut verici bir alternatif sunduğu söylenebilir. Ayrıca, son yıllarda yapılan başarılı çalışmalar, biyomimetik yöntemle HA kaplama yönteminin, metalik implant malzemeleri ile sınırlı kalmadığını, karbon [6] ve polimer [7] gibi farklı yüzeylere de uygulanabildiğini göstermiştir. Titanium ve alaşımlarının biyoaktivitesini arttırmak ve böylelikle biyomimetik kaplamayı hızlandırmak için asitle işleme, alkali ve ısı işlem uygulama, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) uygulama ve mikroark oksitleme gibi çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Alkali ve takiben ısı uygulama yöntemi basit ve ekonomik bir yöntem olmasının yanı sıra, implant düzensiz bir şekilde olsa bile tüm yüzeyde aktif bir titanium oksit tabakası oluşturma açısından başarılı bir yöntemdir.

Bu çalışmada, Ti6Al4V plakalar ön-işlem olarak sodyum hidroksit (NaOH) ve ısı uygulandıktan sonra 1,5×SBF'de bekletilmiş ve yüzeylerinde kalsiyum fosfat kaplaması elde edilmiştir. Plakaların farklı sürelerde bekletilmesi ile elde edilen kaplamaların yüzey morfolojisi ve moleküler yapısı incelenmiştir.

## 2. DENEYSEL YÖNTEMLER (EXPERIMENTAL METHODS)

Boyutları 20mm×20mm×2mm olan Ti6Al4V (Grade-5, ELI, ASTM B265-10) plakalar ilk olarak 400 no'lu silikon karbid (SiC) zımpara kağıdı ile Buehler Metaserv 2000 yatay sulu zımpara makinesi kullanılarak zımparalanmıştır. Burada amaç pürüzlü bir yüzey elde edebilmek ve böylece implant ile kaplama arasında daha iyi bir 'mekanik kilitlenme' sağlayabilmektir.

**Tablo 1.** 1,5×SBF ve insan kan plazmasındaki iyonik konsantrasyonlar (Ionic concentrations of 1.5×SBF and human blood plasma) [8]

İyon(mM)	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
1,5×SBF	212,3	7,5	2,3	3,8	186,8	1,5	0,75	40,5
Kan	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	1,0	0,5	27,0

Plakalar daha sonra sırasıyla %70 etanol, aseton ve saf su kullanılarak on beşer dakika boyunca Bandelin Sonorex RK100 sonikatörde ultrasonik olarak temizlenmiştir. Alkali işlem için, Ti6Al4V plakalar 80°C'de 5M NaOH içerisinde 3 gün boyunca bekletilmiştir. Sonrasında, distile su ile yıkanan plakalar 40°C'de bir gece kurutulmuştur. Isıl işlem içinse, plakalar, yüksek dereceli fırında (Protherm PLF 140/5) 1 saat süreyle 600°C'de ısıya maruz bırakılmıştır.

İnsan kan plazması ve 1,5×SBF'nin iyonik kompozisyonları Tablo 1'de verilmiştir. 1,5×SBF hazırlamak için NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> ve Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tuzları Tablo 1'de verilen iyonik derişimlere göre iyon değişimli distile su içerisinde çözülmüştür. Genel olarak, SBF çözeltilerinin son pH değeri 7.40 olarak ayarlanır. Bu çalışmada ise, normal SBF'den daha yoğun olan 1,5×SBF'nin hazırlanma sırasında beklenmedik çökeltiler oluşturmasının önüne geçebilmek için son pH değeri TRIS ve 1.0M HCl kullanılarak 7,2'ye ayarlanmıştır. 1000 ml 1,5×SBF hazırlamak için, 36,5±1,5°C'de tutulan 700 ml iyon değişimli distile suya, sabit devir sayısında karıştırarak kimyasallar tek tek ve her biri bir önceki tamamen çözüldükten sonra eklenmiştir. Kimyasalların tartılmasında kullanılan tartım kapları, birkaç damla iyon değişimli distile suyla yıkanarak çözeltilerin içerisine ilave edilmiştir. TRIS ve HCl, pH ayarlama basamağında kullanılmıştır. Son pH TRIS ve birkaç damla 1M HCl ile tam olarak 7,20'ye ayarlandıktan sonra, hacim iyon değişimli distile suyla 1000ml'ye tamamlanmıştır. Elde edilen 1,5×SBF, bekletilmeden veya stok yapılmadan biyomimetik kaplama için kullanılmıştır. Alkali ve ısı işlem gören plakalar, ağız hava almayacak şekilde vida kapaklı plastik kaplara yerleştirildikten sonra, üzerlerine apatit birikimi için 50 ml/plaka olacak şekilde 1,5×SBF eklenmiştir. Bu kaplar, içerilerinde bulunan 1,5×SBF'nin sıcaklığının sabit olarak 37°C'de tutulabilmesi için apatit birikim süreci boyunca çalkalamalı su banyosu içerisinde tutulmuştur. Plakaların içerisinde buldukları 1,5×SBF çözeltileri her iki günde bir yeniden hazırlanmış ve değiştirilmiştir. Ön-işlem gören ve biyomimetik olarak kaplanan plakaların yüzeylerinde oluşan kalsiyum fosfat tabakanın morfolojisi alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (Field Emission-SEM, Quanta 400F) ile incelenmiştir. Kaplamanın moleküler yapısı ise Fourier değişimli kızılötesi spektrometresi (FTIR, Bruker IFS 66/S) ile belirlenmiştir. Yüzey mid-IR (MIR, 4000-400 cm<sup>-1</sup>) aralığında taranmıştır.

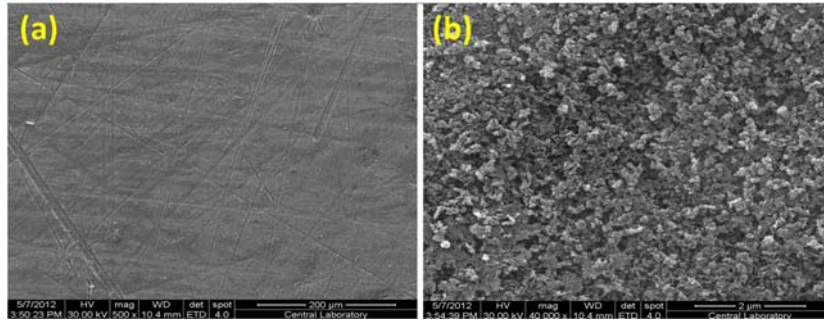
### 3. BULGULAR ve TARTIŞMA (RESULTS and DISCUSSION)

Ti6Al4V plakasının zımparalandıktan ve ön işlem gördükten sonra yüzeyine ait SEM görüntüleri Şekil 1'de verilmiştir.

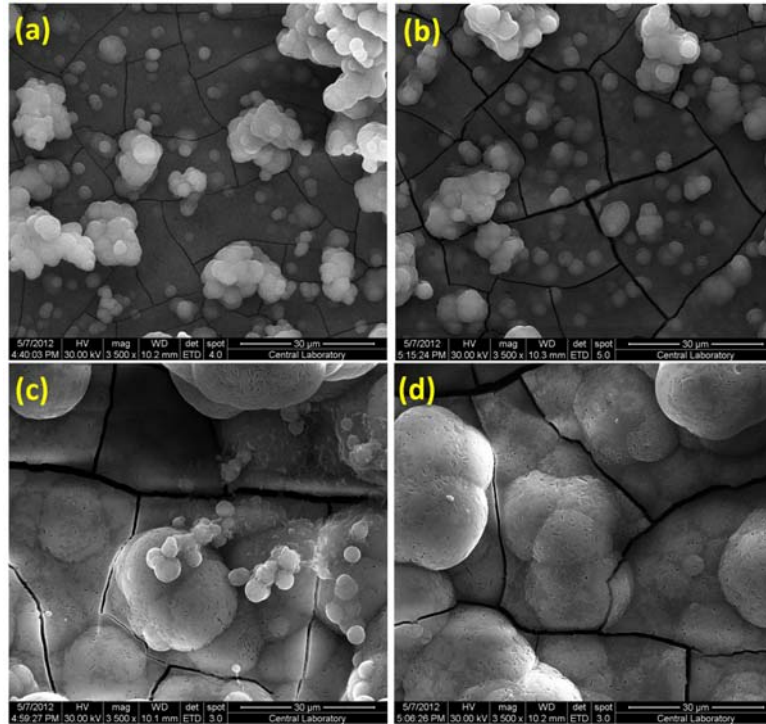
Böylelikle alkali işleminde oluşan amorf yapıdaki tıtanat jel tabakası kristal bir yapı kazanır. Ancak, ısıl işlem sırasında plakalara, 600°C'den yüksek sıcaklıklar uygulandığında, yüzeyin apatit oluşumunu tetikleyebilme özelliğini kaybetmeye başladığı yani biyoaktivitenin düştüğü gözlemlenmiştir [10]. Bu görüntülerden, yüzeyin ön-işlem sonrası mikro-gözenekli ve gevşek bir yapı kazandığı görülmektedir. Bir ön-işlem olarak uygulanan alkali ve ısıl işlemin, titanyum ve alaşımlarının biyoaktivitesini arttırdığı ve böylece bu malzemelerden yapılan implantların

kemiğe bağlanabilme özelliğini geliştirdiği bilinmektedir [9]. Plakalara alkali uygulanmasının amacı, apatitin üzerinde oluşabileceği, gözenekli bir ağ yapısına sahip sodyum titanat tabakası elde etmektir. Oluşan bu tabakanın kararlılığını arttırmak için alkali işlemi takiben plakalara ısı uygulanmaktadır. Bunun nedeni, apatit birikimi sürecinde, SBF içerisine bırakılan plakaların yüzeyindeki sodyum titanattan ortama salınan Na<sup>+</sup> iyonunun miktarının azalması ve yüzeyde daha az TiOH grubunun oluşumuna sebep olmasıdır. Bu sebeple, ısıl işlem sırasında plakalara daha yüksek sıcaklıklar uygulanmamıştır.

Ön-işlem gören Ti6Al4V plakaların, 1,5×SBF içerisinde 7, 10, 14 ve 21 gün bekletildikten sonra yüzeylerinden alınan SEM görüntüleri Şekil 2'de verilmiştir.



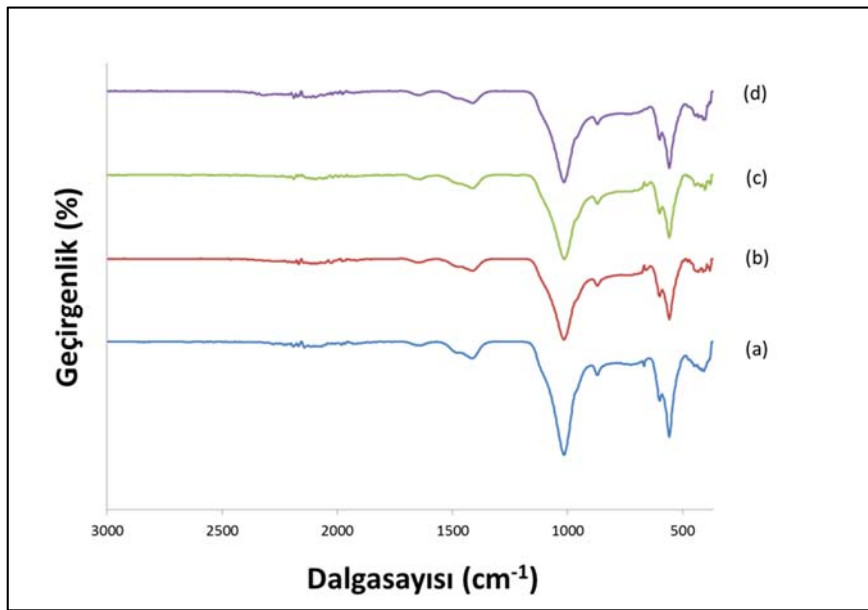
Şekil 1. Zımparalanmış ve alkali-ısıl işlem görmüş Ti6Al4V plakalara ait SEM görüntüleri. Büyütme: a) 500×; b) 40.000× (SEM micrographs of abraded and alkali-heat treated Ti6Al4V plates. Magnification: a) 500×; b) 40.000×)



Şekil 2. Zımparalanmış ve alkali-ısıl işlem görmüş Ti6Al4V plakaların 1,5×SBF'de farklı sürelerle bekletilmelerinden sonra SEM görüntüleri (Büyütme: 3500×) a) 7 gün; b) 10 gün; c) 14 gün; d) 21 gün (SEM micrographs of abraded and alkali-heat treated Ti6Al4V plates after soaking in 1,5×SBF for different time periods (Magnification: 3500×) a) 7 days; b) 10 days; c) 14 days; d) 21 days)

SEM görüntülerinden, 1,5×SBF içerisinde 7. günde kalsiyum fosfat kristallerinin çekirdeklenmiş olduğu ve yeni kristallerin bu çekirdekler üzerinde büyümekte olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, oluşan kalsiyum fosfat tabakanın morfolojisinde 1,5×SBF’de bekleme süresi arttıkça önemli ölçüde bir değişiklik görülmemiştir. Ancak, Şekil 2(a)’da görüldüğü gibi kalsiyum fosfat birikimi küçük parçacıklar şeklinde başlamış ve ilerleyen günlerde daha büyük yarım kürecikler halini almıştır. 1,5×SBF’de 14. günde yan yana büyük globüllerin oluşmuş olduğu, bu yapının 21. günde ise daha da büyüdüğü görülmüştür.

Ön-işlem gören Ti6Al4V plakaların, 1,5×SBF içerisinde 7, 10, 14 ve 21 gün bekletilmesi ile elde edilen kaplamaların FTIR spektrumları Şekil 3’de verilmiştir.



**Şekil 3.** Zımparalanmış ve alkali-ısıtılmış Ti6Al4V plakaların 1,5×SBF’de farklı sürelerle bekletilmelerinden sonra FTIR spektrumları a) 7 gün; b) 10 gün; c) 14 gün; d) 21 gün  
(FTIR spectra of abraded and alkali-heat treated Ti6Al4V plates after soaking in 1.5×SBF for different time periods a) 7 days; b) 10 days; c) 14 days; d) 21 days)

1,5×SBF içerisinde bekleme süresinden bağımsız olarak tüm plakaların tipik HA spektrumuna sahip olduğu anlaşılmıştır. Tüm kaplamalarda, HA yapısındaki fosfat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) iyonunun  $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$  gerilim moduna ait  $1015\text{ cm}^{-1}$  bandı ve  $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$  bükme moduna ait maksimumu  $557\text{ cm}^{-1}$  ve omuz değeri  $600\text{ cm}^{-1}$  olan bant ortak olarak görülmektedir.  $870$  ve  $1412\text{ cm}^{-1}$  bantları ise doğal kemiğin ve dentinin de yapısında bulunan karbonat ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) iyonunun  $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$  moduna aittir [11]. Ayrıca,  $1640\text{ cm}^{-1}$ ’deki zayıf bandın ise kaplamalar tarafından atmosferden absorbe edilen neme ait OH-kaynaklı olduğu düşünülmektedir [12].

#### 4. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

Ti6Al4V plakalar alkali ve ısıtılmış işlem gördükten sonra hızlı ve başarılı bir şekilde 1,5×SBF içerisinde biyomimetik olarak kaplanmıştır.

$80^\circ\text{C}$ ’deki 5M sodyum hidroksitte 3 gün bekletildikten sonra 1 saat süreyle  $600^\circ\text{C}$  ısıya tabi tutarak gerçekleştirilen alkali ve ısıtılmış ön-işleminin, Ti6Al4V malzeme yüzeyinde apatit çökme sürecini hızlandırmak için etkili bir yöntem olduğu görülmüştür. Kaplamaların, nispeten küçük apatit kristalleri halinde başlayan ve 1,5×SBF’de bekleme süresi uzadıkça yarım küreler halini alan bir morfolojide olduğu gözlemlenmiştir. FTIR sonuçlarından, daldırma süresinden bağımsız olarak tüm kaplamaların karbonatlı HA yapısında olduğu anlaşılmıştır. Buradan, 1,5×SBF içerisinde bekletilerek biyomimetik yöntemle elde edilen kaplamanın vücutta doğal yöntemle oluşan HA ile benzer özelliklere sahip olduğu söylenebilir.

**Teşekkür:** Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 111M262 no’lu proje ile desteklenmektedir.

#### KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. Mavis, B. ve Taş, A.C., “Dip-Coating of Calcium Hydroxyapatite on Ti-6Al-4V Substrates”, *Journal of The American Ceramic Society*, Cilt 83, No 4, 989–991, 2000.
2. Wang, D., Chen, C., He, T. ve Lei, T., “Hydroxyapatite Coating on Ti6Al4 V Alloy by a Sol-Gel Method”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Cilt 19, 2281–2286, 2008.
3. Evis, Z., “ $\text{Cu}^{2+}$  Eklenmiş Hidroksiapatitlerin Yüksek Sıcaklıkta Sinterlenmesi ve İç Yapı İncelemesi”, *Gazi Üniversitesi Mühendislik*

- Mimarlık Fakültesi Dergisi**, Cilt 24, No 4, 569–573, 2009.
4. You, C., Oh, S. ve Kim, S., “Influences of Heating Condition and Substrate-Surface Roughness on the Characteristics of Sol-Gel-Derived Hydroxyapatite Coatings”, **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, Cilt 21, 49–54, 2001.
  5. Yang, Y., Kim, K.H. ve Ong, J.L., “A Review on Calcium Phosphate Coatings Produced Using a Sputtering Process–An Alternative to Plasma Spraying”, **Biomaterials**, Cilt 26, 327–337, 2005.
  6. Hoppe, A., Will, J., Detsch, R., Boccaccini, A.R. ve Greil P., “Formation and In Vitro Biocompatibility of Biomimetic Hydroxyapatite Coatings on Chemically Treated Carbon Substrates”, **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Çevrimiçi Yayın: 7 Mayıs 2013. DOI: 10.1002/jbm.a.34685.
  7. Cai, Q., Feng, Q., Liu, H. ve Yang, X., “Preparation of Biomimetic Hydroxyapatite by Biom mineralization and Calcination Using Poly(L-lactide)/Gelatin Composite Fibrous Mat as Template”, **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, Cilt 101B, No 1, 173–186, 2013.
  8. Bigi, A., Boanini, E., Panzavolta, S. ve Roveri, N., “Biomimetic Growth of Hydroxyapatite on Gelatin Films Doped with Sodium Polyacrylate”, **Biomacromolecules**, Cilt 1, No 4, 752–756, 2000.
  9. Nishiguchi, S., Kato, H., Fujita, H., Kim, H.M., Miyaji, F., Kokubo, T. ve Nakamura, T., “Enhancement of bone-bonding strengths of titanium alloy implants by alkali and heat treatments”, **Journal of Biomedical Materials Research**, Cilt 48, 689–696, 1999.
  10. Kim, H.M., Miyaji, F. ve Kokubo, T. “Effect of Heat Treatment on Apatite-Forming Ability of Ti Metal Induced by Alkali Treatment”, **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Cilt 8, 341–347, 1997.
  11. Silva, C.C., Pinheiro, A.G., Miranda, M.A.R., Góes, J.C. ve Sombra, A.S.B., “Structural Properties of Hydroxyapatite Obtained by Mechano synthesis”, **Solid State Sciences**, Cilt 5, 553–558, 2003.
  12. Suchanek, W.L., Shuk, P., Byrappa, K., Riman, R.E., TenHuisen, K.S. ve Janas, V.F., “Mechanochemical-Hydrothermal Synthesis of Carbonated Apatite Powders at Room Temperature”, **Biomaterials**, Cilt 23, No 3, 699–710, 2002.

