



جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran

سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران

۱۷۰۵۸-۳

چاپ اول

بهمن ۱۳۹۲

INSO

17058-3

1st.Edition

Feb.2013

کاشتنی‌های جراحی - کلسیم فسفات‌ها -
قسمت ۳: جایگزین‌های استخوانی
هیدروکسی آپاتیت و بتا تری کلسیم فسفات

**Implants for surgery -- Calcium
phosphates -- Part 3: Hydroxyapatite and
beta-tricalcium phosphate bone substitutes**

ICS:11.040.40

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود. پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند در کمیته ملی طرح و بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)^۱، کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)^۲ و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)^۳ است و به عنوان تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی (CAC)^۵ در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفت های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی بهره گیری می شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. سازمان می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) و وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد ایران این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آن ها نظارت می کند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) و وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization

2 - International Electrotechnical Commission

3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legale)

4 - Contact point

5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد
«کاشتنی‌های جراحی - کلسیم فسفات‌ها - قسمت ۳: جایگزین‌های استخوانی هیدروکسی‌آپاتیت و
بتا تری کلسیم فسفات»

رئیس:

صفدریان، سروش
(کارشناسی ارشد مهندسی صنایع)

سمت و / یا نمایندگی

شرکت آتیلا ارتوپد

دبیر:

حق بین نظریاک، معصومه
(دکترای مهندسی پزشکی)

دانشگاه صنعتی امیرکبیر

اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

رضایی راد، عارف
(مهندسی صنایع)

شرکت آتیلا ارتوپد

زارعی نژاد، محمد
(دکترای مهندسی مکانیک)

دانشگاه صنعتی امیرکبیر

صولتی هاشجین، مهران
(دکترای مهندسی مواد)

دانشگاه صنعتی امیرکبیر

فرجی، رحیم
(کارشناسی ارشد شیمی)

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

معینیان، سید شهاب
(کارشناسی ارشد شیمی)

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

نظافتی، نادر
(دکترای مهندسی پزشکی)

پژوهشگاه مواد و انرژی

نیک آئین، زیبا
(دکترای مهندسی مکانیک)

سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ب	آشنایی با سازمان ملی استاندارد
ج	کمیسیون فنی تدوین استاندارد
ه	پیش گفتار
و	مقدمه
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۲	۳ اصطلاحات، تعاریف و نمادها
۴	۴ الزامات

پیش گفتار

استاندارد "کاشتنی‌های جراحی- کلسیم‌فسفات‌ها- قسمت ۳: جایگزین‌های استخوانی هیدروکسی‌آپاتیت و بتا تری کلسیم فسفات" که پیش نویس آن در کمیسیون‌های مربوط توسط موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، تهیه و تدوین شده است و در چهارصد و سیزدهمین اجلاس کمیته ملی استاندارد مهندسی پزشکی مورخ ۹۲/۹/۲۶ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود .

برای حفظ همگامی و هم‌رخی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدید نظر استانداردهای ملی استفاده کرد .

منبع و ماخذی که برای تهیه این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است :

ISO 13175-3:2012, Implants for surgery - Calcium phosphates - Part 3: Hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate bone substitutes

مقدمه

امروزه، جایگزین‌های استخوانی ساخته شده از هیدروکسی‌آپاتیت و بتا تری کلسیم فسفات، جایگزین مناسبی برای آلوگرافت و اتوگرافت در نظر گرفته می‌شوند. به علاوه، منشاء سنتزی این قطعات، تضمین کننده عدم احتمال انتقال آلودگی به بیمار است. همچنین نشان داده شده است که هیدروکسی‌آپاتیت و بتا تری کلسیم فسفات خاصیت هدایت رشد استخوان دارند که به معنای افزایش ترمیم استخوان در سطح ماده کاشتنی می‌باشد (مراجع ۶ و ۷). زیست سازگاری هیدروکسی‌آپاتیت و بتا تری کلسیم فسفات در مراجع متعددی بیان شده است (به مرجع ۸ کتابنامه مراجعه شود).

قطعات مورد اشاره در این استاندارد، به سه گروه طبقه بندی می‌شوند:

جایگزین‌های استخوانی هیدروکسی‌آپاتیت سنتز شده تک فازی یا جایگزین‌های استخوانی بتا تری کلسیم فسفات و جایگزین‌های استخوانی دوفازی هیدروکسی‌آپاتیت/بتا تری کلسیم فسفات. نسبت هیدروکسی‌آپاتیت/بتا تری کلسیم فسفات بر روی نرخ انحلال مواد تاثیر دارد؛ به این ترتیب که هر چه میزان بتا تری کلسیم فسفات بیشتر باشد، میزان انحلال بیشتر خواهد بود (مراجع ۹ تا ۱۱).

فرآیند ترمیم در جایگزین‌های استخوانی نه تنها به توانایی بالقوه هدایت استخوانی ماده بستگی دارد، بلکه به ساختار متخلخل ماده نیز مرتبط است (مراجع ۱۲ تا ۱۶). برای رشد استخوان در کل ساختار کاشتنی، ضروری است که تخلخل‌های ماکرو به اندازه مناسب و با ساختار به هم پیوسته حضور داشته باشند. همچنین تخلخل بر روی نرخ جذب سرامیک‌ها موثر است؛ به این ترتیب که با افزایش ریز تخلخل‌ها، نرخ انحلال ماده افزایش می‌یابد (مرجع ۱۴).

از آنجا که جایگزین‌های استخوانی برای تحمل بارهای سنگین به کار نمی‌روند، خواص مکانیکی برای آن‌ها ضروری نیست. به هر حال، جراح بیشترین زمان را صرف شکل‌دهی مجدد قطعه متناسب با شکل حفره استخوانی می‌کند. جایگزین‌های استخوانی باید خواص مکانیکی کافی برای تحمل ماشین‌کاری داشته باشند.

کاشتنی‌های جراحی - کلسیم فسفات‌ها - قسمت ۳: جایگزین‌های استخوانی هیدروکسی‌آپاتیت و بتا تری کلسیم فسفات

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین ویژگی‌های جایگزین‌های استخوانی هیدروکسی‌آپاتیت تک فازی، بتا تری کلسیم فسفات تک فازی و جایگزین‌های استخوانی دوفازی هیدروکسی‌آپاتیت/بتا تری کلسیم فسفات به شکل بلوک^۱ یا گرانول می‌باشد.

این استاندارد، در مورد پرکننده‌های حفره‌های استخوانی کشت سلولی شده، سیمان‌های کلسیم فسفاتی یا پرکننده‌های حفره‌های استخوانی که حاوی مواد دیگری به غیر از هیدروکسی‌آپاتیت و بتاتری کلسیم فسفات باشند، کاربرد ندارد.

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب می‌شود. در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدید نظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدید نظر و اصلاحیه‌های بعدی آن‌ها مورد نظر است. استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

۱-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۴۳۰۰: سال ۱۳۷۶، راهنمای گزینش آزمون جهت ارزیابی بیولوژیک یا زیست‌شناسی وسایل پزشکی

۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۴۶-۳: سال ۱۳۸۷، کاشتنی‌های جراحی - کاشتنی هیدروکسی‌آپاتیتی - قسمت سوم: آنالیز شیمیایی و تعیین مشخصات حالت بلوری و خلوص فازی

۳-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۱۹۹: سال ۱۳۸۴، الک کردن - قسمت اول: روش‌های بکار بردن الک‌های آزمون با تور سیمی بافته شده و صفحه فلزی مشبک

۴-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۹۸۱۹: سال ۱۳۸۹، کمیت‌ها و یکاها - قسمت ۱ - اصول کلی

۵-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۱۰۷۳۸: سال ۱۳۸۶، توزیع اندازه حفره و تخلخل مواد جامد توسط تخلخل سنجی جیوه و جذب گاز - قسمت اول - تخلخل سنجی جیوه

2-6 ISO 13320, Particle size analysis - Laser diffraction methods¹)

2-7 ISO 13383-1, Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) — Microstructural characterization - Part 1: Determination of grain size and size distribution²)

۳ اصطلاحات، تعاریف و نمادها

در این استاندارد اصطلاحات، تعاریف و نمادهای زیر به کار می‌رود:

۱-۱-۳

آلفا تری کلسیم فسفات^۱ (α -TCP)

ترکیب شیمیایی با فرمول $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ و ساختار بلورین تعیین شده در ICDD PDF^۱ 09-0348 می‌باشد.

۲-۱-۳

بتا تری کلسیم فسفات^۳ (β -TCP)

ترکیب شیمیایی با فرمول $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ و ساختار بلورین تعیین شده در ICDD PDF 09-0169 می‌باشد.

۳-۱-۳

جایگزین استخوانی

قطعه‌ای است که به منظور پرکردن فضای خالی استخوانی که در اثر جراحی یا آسیب به وجود آمده است، به کار می‌رود.

۴-۱-۳

هیدروکسی آپاتیت (HA)

ترکیب شیمیایی با فرمول $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ و ساختار بلورین تعیین شده در ICDD PDF 09-0432 یا ICDD PDF 72-1243 می‌باشد.

1 - α tricalcium phosphate

2 - International Centre for Diffraction Data Powder Diffraction File

3 - β tricalcium phosphate

۵-۱-۳

حفره به هم پیوسته

حفره‌ای که با یک یا چند حفره دیگر در ارتباط است.

۶-۱-۳

حفره ماکرو^۱

حفره‌ای که یکی از ابعادش بزرگتر از ۱۰ میکرومتر باشد.

۷-۱-۳

حفره میکرو^۲

حفره‌ای که هیچ یک از ابعادش بزرگتر از ۱۰ میکرومتر نباشد.

۸-۱-۳

تخلخل

نسبت حجم کلی حفره‌ها به حجم ظاهری بلوک یا گرانول را تخلخل می‌گویند.

۹-۱-۳

تترا کلسیم فسفات^۳ (TTCP)

ترکیب شیمیایی با فرمول $Ca_4(PO_4)_2O$ و ساختار بلورین تعیین شده در ICDD PDF 25-1137 یا ICDD PDF 70-1379 می‌باشد.

۱۰-۱-۳

مواد هدایت کننده رشد استخوان^۴

-
- 1 -Macropore
 - 2 -Micropore
 - 3 -Tetracalcium phosphate
 - 4 -Osteoconductive

موادی با توانایی عملکرد نظیر یک داربست هستند که سلول‌های استخوانی می‌توانند روی آن بچسبند، مهاجرت کنند، رشد نموده و تقسیم شوند.

یادآوری ۱- هدایت رشد استخوان یک خصوصیت غیرفعال^۱ است.

۱۱-۱-۳

اکسید کلسیم (CaO)

ترکیب شیمیایی با ساختار بلورین مشخص شده توسط ICDD PDF 4-0777 یا ICDD PDF 82-1690 می‌باشد.

۱۲-۱-۳

چگالی بتا تری کلسیم فسفات ($d_{\beta\text{TCP}}$)

چگالی تئوری بتا تری کلسیم فسفات متراکم برابر 3.07 g cm^{-3} می‌باشد.

۱۳-۱-۳

چگالی هیدروکسی آپاتیت (d_{HA})

چگالی تئوری هیدروکسی آپاتیت متراکم برابر 3.15 g cm^{-3} می‌باشد.

۲-۳ نمادها

d_r چگالی توده‌ای جایگزین استخوان مصنوعی

d_{th} چگالی تئوری جایگزین استخوان مصنوعی

m جرم جایگزین استخوان مصنوعی

V حجم جایگزین استخوان مصنوعی

۴ الزامات

۴-۱ عناصر کمیاب

محدوده مجاز عناصر کمیاب برای هیدروکسی آپاتیت و بتا تری کلسیم فسفات در جدول ۱ ارائه شده است. روش‌های پلاسمای جفت شده القایی / طیف سنجی نشر اتمی^۱ (ICP/AES)، طیف سنج جرمی / پلاسمای جفت شده القایی^۲ (ICP/MS)، طیف سنجی جذب اتمی^۳ (AAS) یا روش‌های تعیین شده در استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۴۶-۳ باید برای تعیین مقدار عناصر کمیاب به کار روند. باید روش به کار رفته مشخص شود.

جدول ۱- محدوده مجاز عناصر کمیاب

عناصر	حداکثر محدوده mg/kg
آرسنیک	۳
کادمیم	۵
جیوه	۵
سرب	۳۰
فلزات سنگین	۵۰

توصیه می‌شود روش ۱ بیان شده در فارماکوپه آمریکا "فلزات سنگین <۲۳۱>" برای تعیین فلزات سنگین به کار رود. همچنین ممکن است یکی از روش‌های فوق الذکر برای تعیین عناصر کمیاب برای ارزیابی فلزات سنگین به کار روند؛ با در نظر گرفتن اینکه مقدار کلی فلزات سنگین شامل مجموع عناصر سرب، جیوه، بیسموت، آرسنیک، آنتیموان، قلع، کادمیم، نقره، مس و مولیبدن می‌باشد. باید روش به کار رفته مشخص شود.

باید تاثیر هر ناخالصی کمی بیش از ۱۰۰۰ mg/kg بر روی فرآیند ترمیم استخوان ارزیابی شود. باید تاثیر این ناخالصی‌ها بر روی زیست سازگاری بر طبق استاندارد ملی ایران شماره ۴۳۰۰ بررسی شود.

باید هر افزودنی اضافی تشخیص و تعیین شده و تاثیر آن بر روی فرآیند ترمیم استخوان و زیست سازگاری بر طبق استاندارد ملی ایران ۴۳۰۰ بررسی شود.

1 - Inductively coupled plasma/atomic emission spectrometry

2 - Inductively coupled plasma/mass spectroscopy

3 - Atomic absorption spectroscopy

۲-۴ تعیین کمی و کیفی فازهای بلورین

۱-۲-۴ کلیات

باید ترکیب و خلوص فازی به روش پراش پرتو ایکس^۱ (XRD) بر طبق استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۴۶-۳ کنترل شود.

۲-۲-۴ جایگزین‌های استخوان هیدروکسی آپاتیت تک فازی

کسر جرمی^۲ هیدروکسی آپاتیت نباید کمتر از ۹۵٪ فازهای بلورین باشد. کسر جرمی CaO نباید بیشتر از یک درصد فازهای بلورین باشد.

کسر جرمی هیدروکسی آپاتیت بر طبق فرمول (۱) محاسبه می‌شود:

$$MF_{HA} = 100\% - MF_{\beta TCP} - MF_{\alpha TCP} - MF_{TTCP} - MF_{CaO} \quad (1)$$

که در آن:

MF_{HA} کسر جرمی هیدروکسی آپاتیت بلورین (HA)

$MF_{\beta TCP}$ کسر جرمی بتا تری کلسیم فسفات (β -TCP)

$MF_{\alpha TCP}$ کسر جرمی آلفا تری کلسیم فسفات (α -TCP)

MF_{TTCP} کسر جرمی تترا کلسیم فسفات (TTCP)

MF_{CaO} کسر جرمی اکسید کلسیم (CaO)

هنگامی که مقدار کسر جرمی هر فاز زیر آستانه تشخیص باشد، باید صفر در نظر گرفته شود.

۳-۲-۴ جایگزین‌های استخوان دوفازی

باید نسبت هیدروکسی آپاتیت و بتا تری کلسیم فسفات با رواداری (مطلق) ± 5 درصد کسر جرمی فازهای بلورین تعیین شود.

1 - X-ray diffraction

2 - Mass fraction

مثال- ترکیبی شامل ۶۰ درصد HA و ۴۰ درصد β TCP به این معناست که ترکیب ممکن است از (۶۵٪ HA و ۳۵٪ β TCP) تا (۵۵٪ HA و ۴۵٪ β TCP) باشد.

تعیین کیفی کسر جرمی سایر فازهای بلورین: اگر فاز آلفا تری کلسیم فسفات (α TCP) تشخیص داده شد، این اطلاعات باید در گزارش ارائه شود.

۴-۲-۴ جایگزین‌های استخوان بتا تری کلسیم فسفات تک فازی

کسر جرمی بتا تری کلسیم فسفات نباید کمتر از ۹۵٪ فازهای بلورین باشد.

کسر جرمی بتا تری کلسیم فسفات بر طبق فرمول (۲) محاسبه می‌شود:

$$MF_{\beta TCP} = 100\% - MF_{HA} \quad (۲)$$

اگر کسر جرمی هیدروکسی آپاتیت زیر آستانه تشخیص باشد، باید صفر در نظر گرفته شود.

تعیین کیفی کسر جرمی سایر فازهای بلورین: اگر فاز آلفا تری کلسیم فسفات (α TCP) تشخیص داده شد، این اطلاعات باید در گزارش ارائه شود.

حضور سایر فازها باید به روش طیف سنجی مادون قرمز^۱ (FTIR) بر طبق استاندارد ملی ایران شماره ۳-۷۴۴۶ بررسی شود.

۴-۳ فرم و شکل

فرم فیزیکی جایگزین استخوان (گرانول‌ها یا بلوک از قبل شکل داده شده) باید تعیین شود.

باید ویژگی‌های ابعادی کلیه شکل‌های قطعات به شرح زیر ارائه شوند:

ابعاد برای قطعات (بلوک‌ها).

ابعاد گرانول‌ها: باید روش پراش لیزر^۲ بر طبق استاندارد ISO 13320 یا روش‌های الک کردن طبق استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۱۹۹ برای تعیین ابعاد گرانول‌ها به کار روند.

باید پارامترهای D10، D50 و D90 (برای پراش لیزر) یا حداقل و حداکثر ابعادی (برای الک کردن) گرانول تعیین شوند.

حجم جایگزین استخوان باید بر روی بسته بندی مشخص گردد.

1 - Infrared spectroscopy

2 - Laser diffraction method

۴-۴ تخلخل

۱-۴-۴ نسبت تخلخل کلی

کمترین و بیشترین نسبت تخلخل جایگزین استخوان باید تعیین و بر اساس فرمول (۳) محاسبه شود.

$$P = 100 - \left(\frac{d_r}{d_{th}} \cdot 100 \right) \quad (۳)$$

که در آن:

P نسبت تخلخل بر حسب درصد می باشد.

باید d_r با اندازه گیری ابعاد و جرم یک جایگزین استخوانی متوازی السطوح با حداقل حجم 2 cm^3 تعیین شود. جرم باید به وسیله یک ترازو با قابلیت توزین با دقت 0.02 گرم و ابعاد با یک کولیس با قابلیت اندازه گیری با دقت حداقل 0.02 میلی متر اندازه گیری شود. سپس باید حجم جایگزین استخوانی V با استفاده از ابعاد اندازه گیری شده و d_r بر طبق فرمول (۴) محاسبه شود:

$$d_r = \frac{m}{V} \quad (۴)$$

باید d_{th} با استفاده از فرمول (۵) محاسبه شود.

$$d_{th} = \frac{\frac{MF_{HA}}{d_{HA}}}{\frac{MF_{HA}}{d_{HA}} + \frac{MF_{\beta TCP}}{d_{\beta TCP}}} \cdot d_{HAP} + \frac{\frac{MF_{\beta TCP}}{d_{\beta TCP}}}{\frac{MF_{HA}}{d_{HA}} + \frac{MF_{\beta TCP}}{d_{\beta TCP}}} \cdot d_{\beta TCP} \quad (۵)$$

اگر گرانولها با خرد کردن قطعات متخلخل به دست آمده است، بهتر است تخلخل گرانولها از روی قطعات قبل از خرد کردن قطعات با استفاده از روش فوق محاسبه گردد.

در غیر این صورت باید تخلخل گرانولها با استفاده از تخلخل سنجی جیوه محاسبه شود.

۴-۴-۲ اندازه میکرو حفره‌ها و ماکرو حفره‌ها

۴-۴-۲-۱ میکرو حفره‌ها

برای انجام برش متالوگرافی^۱ بر روی ماده، ممکن است در برخی موارد پیش از برش، غوطه‌وری ماده در یک رزین ضروری باشد.

باید قطر میکرو حفره‌ها با استفاده از اندازه‌گیری قطر میکرو حفره‌ها در تصاویر SEM یک مقطع از ماده با استفاده از یکی از روش‌های ذکر شده برای میکرو حفره‌ها در استاندارد ISO 13383-1 تعیین گردند. همچنین در مواردی که حفره‌ها با یکدیگر در تماسند، یک خط فرضی بین حفره‌ها رسم نمایید.

۴-۴-۲-۲ ماکرو حفره‌ها

۴-۴-۲-۱ کلیات

باید قطر ماکرو حفره‌ها تعیین شود. مشخصه‌یابی می‌تواند طبق روش الف یا ب انجام پذیرد.

۴-۴-۲-۲-۲ روش الف SEM

به منظور تهیه برش‌های متالوگرافی، ممکن است در برخی موارد پیش از برش، غوطه‌وری ماده در یک رزین ضروری باشد.

قطر ماکرو حفره‌ها را با استفاده از تصاویر SEM حاصل از مقاطع ماده با استفاده از روش‌های ذکر شده در استاندارد ISO 13383-1 برای ماکرو حفره‌ها تعیین نمایید. همچنین در مواردی که حفره‌ها با یکدیگر در تماسند، یک خط فرضی بین حفره‌ها رسم نمایید.

۴-۴-۲-۳ روش ب آنالیز میکرومترکز^۲ CT

نمایش تصویری ساختار سه‌بعدی ماکرو حفره‌ها (شکل حفره، ضخامت دیواره، ایزوتروپی و همگنی)، ماکروتخلخل و هیستوگرام توزیع قطر حفره‌ها را می‌توان با استفاده از آنالیز میکرومترکز CT تعیین نمود. ماکروتخلخل باید با اندازه‌گیری حفره‌ها در یک دامنه مشاهده^۳ (FOV) با قطر ۳ میلی متر و ارتفاع ۱/۵ میلی متر در آنالیز میکرومترکز CT تعیین شود. باید انحراف میانگین و استاندارد ماکروتخلخل چندین FOV محاسبه شود. باید

1 -Metallographic cuts

2 -Micro-focus CT analysis

3 -Field of view

هیستوگرام قطر حفره‌ها با شمارش تعداد حفره‌ها در هر محدوده قطر به دست آید. قدرت تفکیک‌پذیری فضایی^۱ $6 \mu\text{m}/\text{pixel}$ توصیه می‌شود. اندازه نمونه به قطر ۵ میلی‌متر و ارتفاع ۱۰ میلی‌متر توصیه می‌شود.

۴-۳-۴ اتصالات داخلی^۲

ماکرو تخلخل‌ها بهتر است عمدتاً باز و به هم پیوسته باشند. باید قطر اتصالات داخلی بین ماکروتخلخل‌ها با استفاده از روش تخلخل‌سنجی جیوه بر طبق استاندارد ملی ایران شماره ۱-۱۰۷۳۸ تعیین شود.

منشاء این اندازه‌گیری، اعمال نفوذ جیوه در داخل حفره‌ها با اعمال فشار نسبتاً زیاد است. فشارهای پایین، نفوذ در اتصالات داخلی با قطر زیاد را فراهم می‌کند و فشار بالا، نفوذ در اتصالات داخلی با قطر کم را فراهم می‌کند. حجم جیوه نفوذ کرده در نمونه، متناسب با حجم حفره‌ها است که در اثر اتصالات داخلی به دست می‌آید (که اندازه آن بستگی به فشار اعمالی دارد).

باید قطر اتصالات داخلی در حداکثر ارتفاع اصلی نفوذ جیوه تعیین شود. باید حجم تخلخل در دسترس با قطر بیشتر از ۵ میکرومتر تعیین شود.

تصاویر میکرومترکز CT شامل تصاویر دو و/یا سه بعدی بازسازی شده، می‌تواند اطلاعات تکمیلی درباره اتصالات داخلی ماکرو حفره‌ها، به خصوص برای مواد با اتصالات داخلی بیشتر از ۱۰۰ میکرومتر ارائه نماید که در آن‌ها تخلخل‌سنجی جیوه محدودیت دارد.

اگر رواداری مشخصات تخلخل در قطعات بیشتر از $2\% \pm$ باشد، باید آزمون بر روی نمونه‌های دارای تخلخل بیشتر و کمتر انجام پذیرد.

۴-۵ انحلال و تغییرات pH

نرخ انحلال جایگزین استخوان در برون‌تنی می‌تواند برای مقایسه توانایی جذب جایگزین‌های استخوان مختلف در درون تنی به کار رود؛ حتی اگر مکانیسم‌ها با انحلال درون‌تنی متفاوت باشند. تغییرات قابل توجه pH بعد از قرارگیری کاشتنی می‌تواند هدایت رشد استخوان را در سطح جایگزین استخوان تضعیف نماید. هدف آزمون‌های زیر، اندازه‌گیری نرخ انحلال جایگزین استخوان در برون‌تنی و تغییرات pH در محیط انحلال است.

باید انحلال و حلالیت نمونه‌ها آزمون شود. سه نمونه جایگزین استخوانی باید در سه فلاسک حاوی محلول بافر تریس^۱ در (7.3 ± 0.1) pH و دمای $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ قرار گیرد. باید سه فلاسک محلول بر روی همزن صفحه‌ای^۲ با سرعت چرخش ۲۰۰ rpm به ترتیب به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار گیرند.

1 - Spatial resolution

2 - Interconnections

باید نرخ انحلال در شرایطی که نسبت جرم اولیه مواد به حجم کلی محیط انحلال ثابت است، اندازه‌گیری شود. نسبت جرم مواد آزمون به حجم محیط انحلال، باید بین (۰/۱ - ۴/۰) mg/ml باشد.

pH باید بعد از ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت غوطه‌وری اندازه‌گیری شود. pH نباید در طی آزمون بیش از ۰/۳ از مقدار اولیه تغییر کند.

محتوای کلسیم محلول باید به روش ICP/AES یا AAS یا ICP/MS یا بوسیله یک پروب یونی به روش پتانسیومتری ارزیابی شود. باید نمودار غلظت-زمان رسم شود.

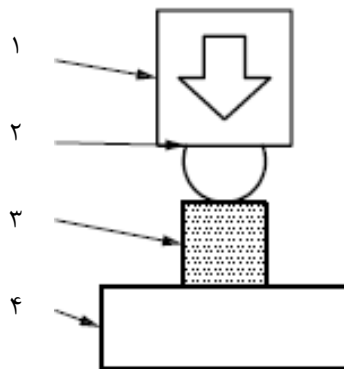
۴-۶ اندازه‌گیری استحکام مکانیکی ماده

۴-۶-۱ کلیات

استحکام مکانیکی یک جایگزین استخوان به شکل قطعه باید با آزمون سختی سنجی کروی^۳ (شکل ۱) و/یا آزمون استحکام فشاری (شکل ۲) ارزیابی شود.

برای مواد دارای تخلخل بالا (تخلخل کلی بزرگتر یا مساوی ۴۰٪) باید استحکام مکانیکی جایگزین استخوان با آزمون سختی سنجی کروی ارزیابی شود.

استفاده از استحکام فشاری به جای آزمون فرورفتگی در مواد دارای تخلخل بالا قابل قبول است، لیکن نشان داده شده است که آزمون سختی سنجی کروی در مواد دارای تخلخل بالا تکرار پذیری بیشتری دارد.



راهنما

۱ پیستون

۲ کره

۳ نمونه آزمون

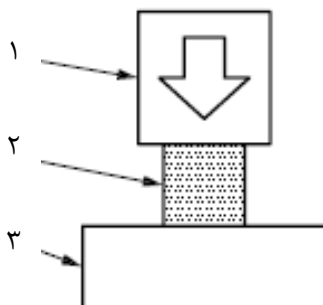
۴ پایه

شکل ۱- شمای آزمون سختی سنجی کروی

¹ -TRIS buffer solution

² - Plate agitator

³ -Sphere indentation



راهنما

۱ پیستون

۲ نمونه آزمون

۳ پایه

شکل ۲- شمای آزمون استحکام فشاری

برای نمونه‌های دارای تخلخل کمتر (کوچکتر از ۴۰٪) باید استحکام مکانیکی جایگزین استخوان با استفاده از آزمون استحکام فشاری ارزیابی شود.

۴-۶-۲ دستگاه، نمونه برداری و نمونه آزمون

۴-۶-۲-۱ دستگاه

۴-۶-۲-۱-۱ ماشین آزمون

ماشین آزمون باید طوری ساخته شود که بتواند تنش فشاری را با سرعت ثابت بر روی نمونه آزمون اعمال کند. دستگاه آزمون باید به وسیله‌ای برای ثبت بار با دقت ۱٪ بار حداکثر مجهز باشد.

۴-۶-۲-۱-۲ کره

باید یک کره فولادی با قطر ۹٫۵۲ میلی‌متر به عنوان وسیله اعمال نیرو^۱ به کار رود.

۴-۶-۲-۱-۳ پیستون

برای آزمون استحکام فشاری، باید پیستون اعمال کننده نیرو از فولاد با سختی HV ۳۰۰ یا بالاتر (HRC ۳۰ یا بالاتر) ساخته شده باشد. باید ضخامت پیستون حداقل ۱۰ میلی‌متر باشد و سطح ویژه بالایی پیستون حداقل

چهار برابر مقطع برش عرضی پیستون باشد. زبری Ra سطح پیستون که در تماس با نمونه است باید در حد اکثر $0.40 \mu\text{m}$ و موازی بودن^۱ باید در حد اکثر 0.01 میلی متر باشد. در آزمون سختی سنجی کروی^۲، پیستون باید طوری طراحی شود که کره در مرکز محور پیستون قرار گرفته باشد.

۴-۶-۲-۱-۴ پایه

پایه که در زیر نمونه قرار می گیرد باید از فولاد با سختی HV ۳۰۰ یا بالاتر (۳۰ HRC یا بالاتر) ساخته شده باشد. باید ضخامت پایه حداقل ۱۰ میلی متر باشد و مساحت سطح بالایی پایه حداقل چهار برابر مساحت سطح مقطع برش عرضی آزمون باشد. زبری Ra سطح پایه که در تماس با نمونه است باید در حد اکثر $0.40 \mu\text{m}$ و موازی بودن^۳ باید در حد اکثر 0.01 میلی متر باشد.

۴-۶-۲-۲-۴ روش کار

۴-۶-۲-۲-۱ کلیات

اگر رواداری مشخصات تخلخل بیشتر از ± 2 درصد باشد، باید استحکام فشاری نمونه ها با کمترین و بیشترین تخلخل اندازه گیری شود.

۴-۶-۲-۲-۴ روش غوطه وری

باید بافر فسفات عاری از کلسیم و منیزیم [PBS(-)] به عنوان محلول غوطه وری به کار رود. نمونه به وسیله پمپ خلاء در یک محفظه مناسب قرار داده شده در اتاقک خلاء هواگیری^۴ می شود و PBS(-) وارد محفظه نمونه ها می شود. مقدار PBS(-) باید حداقل ده برابر بیشتر از حجم ظاهری نمونه باشد. درجه خلاء استاندارد 10^{-2}Pa (۲ تا ۳) است. زمان غوطه وری (1 ± 24) ساعت و دما $(3 \pm 25)^\circ\text{C}$ می باشد. رطوبت نمونه آزمون قبل از آزمون با دستمال برداشته می شود. به علاوه، آزمون ها باید در شرایط خشک انجام گیرند.

۴-۶-۲-۲-۳ روش قرارگیری نمونه و اعمال بار

نمونه در مرکز پایه قرار داده می شود. محور مرکزی پایه، نمونه آزمون، کره و پیستون در امتداد خط اعمال بار تراز می شوند.

باید سرعت کراس هد^۵ $0.5 \pm 0.5 \text{ mm/min}$ باشد.

-
- 1 -Parallelism
 - 2 -Spherical indentation test
 - 3 -Parallelism
 - 4 -Deaerated
 - 5 -Cross head

بار باید از ابتدای آزمون تا هنگام شکست نمونه ثبت شود.
برای آزمون سختی سنجی کروی، باید اندازه وسیله اعمال نیرو روی نمونه، کوچکتر از قطر استوانه یا طول افقی و طول عمودی مکعب باشد.

برای آزمون استحکام فشاری، اگر متوازی‌السطوح مستطیلی به کار می‌رود، نیرو بر روی سطح $10\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ اعمال می‌شود (به بند ۴-۶-۲-۴-۱ مراجعه کنید).

۴-۶-۲-۴ استفاده مجدد پیستون، پایه و کره

هنگامی که پیستون، پایه و کره دوباره استفاده می‌شوند، باید بررسی شود که هیچ فرورفتگی یا ترک بر روی سطح تماس وجود نداشته باشد. اگر بر روی سطح تماس، فرورفتگی یا ترک وجود دارد و نمی‌توان آنرا برطرف نمود، استفاده مجدد این اجزاء مجاز نیست.

۴-۶-۲-۳ آزمون سختی سنجی کروی

۴-۶-۲-۱ نمونه برداری و نمونه آزمون

تعداد نمونه‌ها باید حداقل ۱۰ عدد باشد.

معمولا باید شکل و اندازه یک نمونه آزمون، استوانه قائم باشد. باید ابعاد استاندارد نمونه استوانه‌های به قطر $10 \pm 0.1\text{ mm}$ و ارتفاع $10 \pm 0.1\text{ mm}$ باشد. لیکن ممکن است نمونه آزمون یک مکعب به اضلاع $10 \pm 0.1\text{ mm}$ باشد. انحراف موازی بودن سطوح بالایی و پایینی نمونه نباید بیشتر از 0.1 mm باشد. انحراف مربع بودن سطوح بالایی و پایینی نمونه و سطح جانبی نمونه نباید بیشتر از 0.1 mm باشد. قطر یا قطر اصلی مکعب^۱ در نمونه آزمون نباید بیشتر از ده برابر قطر بزرگترین تخلخل نمونه باشد. هنگامی که ابعاد با ابعاد استاندارد متفاوت باشند، باید در گزارش آزمون بیان شود.

۴-۶-۲-۲ نتایج آزمون

برای آزمون سختی سنجی کروی، باید از ابتدای آزمون تا لحظه شکست نمونه، نمودار بار بر حسب جابجایی رسم شود. باید در هر نمودار بار-جابجایی، حداکثر بار اعمالی و جابجایی در حداکثر بار ثبت شود. حداکثر بار، P_{Si} ، باید استحکام سختی‌سنجی کروی باشد. باید مقدار میانگین^۲ و انحراف معیار استحکام در سختی سنجی کروی بر طبق فرمول‌های (۶) و (۷) محاسبه شده و به شکل معنی‌داری گرد شود.

1 -Square base diagonal

2 -Mean

$$\bar{P}_S = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n P_{Si} \quad (6)$$

$$SD_S = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(\bar{P}_S - P_{Si})^2}{n-1}} \quad (7)$$

که در آن:

\bar{P}_S بار فشاری متوسط (N)؛

P_{Si} بار وسیله اعمال نیرو بر هر نمونه (N)؛

SD_S انحراف معیار از بار فشاری (N)؛

n تعداد نمونه‌ها.

۴-۲-۶-۴ آزمون استحکام فشاری

۴-۲-۶-۴-۱ نمونه برداری و نمونه آزمون

تعداد نمونه‌ها باید حداقل ۱۰ عدد باشد.

معمولا باید شکل و اندازه نمونه آزمون استوانه قائم باشد. ابعاد استاندارد نمونه استوانه‌ای باید قطر (10 ± 0.1) mm و ارتفاع (15 ± 0.1) mm باشد. لیکن ممکن است نمونه آزمون یک متوازی السطوح مکعبی با پایه مستطیل به ابعاد طول (10 ± 0.1) mm، عرض (10 ± 0.1) mm و ارتفاع (15 ± 0.1) mm باشد. انحراف از موازی بودن سطوح بالایی و پایینی نمونه نباید بیشتر از 0.1 mm باشد. انحراف از مربع بودن سطوح بالایی و پایینی نمونه و سطح جانبی نمونه نباید بیشتر از 0.1 mm باشد. قطر یا قطر اصلی مکعب^۱ نمونه آزمون نباید بیشتر از ده برابر قطر بزرگترین تخلخل نمونه باشد. در مواردی که ابعاد با ابعاد استاندارد متفاوت باشند، باید در گزارش آزمون بیان شود.

۴-۲-۶-۴-۲ نتایج آزمون

برای آزمون استحکام فشاری، باید از ابتدای آزمون تا شکست نمونه، نمودار بار بر حسب جابجایی رسم شود. در هر نمودار بار-جابجایی باید حداکثر بار اعمالی و جابجایی در حداکثر بار ثبت شود. حداکثر بار، P_{Ci} ، باید برای محاسبه استحکام فشاری بر طبق فرمول (۸) به کار رود.

$$\sigma_{Ci} = \frac{P_{Ci}}{A_i} \quad (8)$$

که در آن:

σ_{Ci} استحکام فشاری نمونه i (Pa)؛

P_{Ci} بیشینه بار در هر آزمون (N)؛

A_i سطح فشاری هر نمونه (m^2)؛

A_i برای نمونه‌های استوانه‌ای از فرمول (۹) محاسبه می‌شود.

$$A_i = \frac{\pi \cdot \delta_i^2}{4} \quad (9)$$

که در آن:

δ_i قطر هر نمونه آزمون (m) است؛

یا بر طبق فرمول (۱۰) در نمونه‌های متوازی السطوح

$$A_i = a_i^2 \quad (10)$$

که در آن:

a_i ضلع مربع پایه هر نمونه آزمون (m) می‌باشد.

مقادیر میانگین و انحراف معیار استحکام فشاری باید بر طبق فرمول‌های (۱۱) و (۱۲) محاسبه شوند و باید به شکل معنی داری بر طبق استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۱۹-۱ گرد شوند.

$$\bar{\sigma}_C = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \sigma_{Ci} \quad (11)$$

$$SD_C = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(\bar{\sigma}_C - \sigma_{Ci})^2}{n-1}} \quad (12)$$

که در آن:

$\bar{\sigma}_C$ استحکام فشاری میانگین (Pa)؛

SD_C انحراف معیار از استحکام فشاری (Pa).

n تعداد نمونه‌ها.

۴-۷ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید برای هر آزمون یا گروه آزمون تهیه شود و باید حاوی اطلاعات زیر باشد:

الف- روش آزمون؛

ب- ارجاع به نمونه‌های آزمون (نام، مرجع، شکل فیزیکی نمونه، ابعاد در صورت لزوم، شماره بهر)؛

پ- تعداد نمونه‌های به کار رفته در هر آزمون؛

ت- مراجع و کالیبراسیون دستگاه‌های آزمون؛

ث- نام و تائیدیه آزمایشگاه آزمون؛

ج- نتایج خام؛

چ- روش‌های محاسبه به کار رفته؛

ح- نتایج نهایی و رواداری‌ها؛

خ- در مواردی که روش‌های آزمون دیگری در این استاندارد مجاز است، روش آزمون به کار رفته ذکر شود؛

د- تنظیمات دستگاه آزمون؛

ذ- خصوصیات اجزای به کار رفته در ترکیب با دستگاه آزمون (نظیر اندازه حفره‌ها به کار رفته در تخلخل سنجی

جیوه، ماده پیستون، پایه و کره در آزمون مکانیکی)؛

ر- تامین کننده و شماره بهر مصرفی به کار رفته در طی آزمون (نظیر PBS، محلول بافر)، هر گونه انحراف از

روش‌های توصیف شده در این استاندارد.

پیوست الف

(اطلاعاتی)

کتابنامه

[۱] استاندارد ملی ایران شماره ۱۳۴۸۵، وسایل پزشکی - سیستم های مدیریت کیفیت - الزامات برای تعیین

مقررات

[2] ISO 5961: 1995, Water quality — determination of cadmium- Flame atomic absorption spectrometric methods.

[3] ISO 8288: 1986, Water quality — Determination of cobalt, nickel, copper, zinc, cadmium and lead -Flame atomic absorption spectrometric method.

[4] ICDD cards 9-432, 9-348, 9-169, 25-1137, 37-1497, 9-80, 9-77, 14-1475, 5-586 X-ray diffraction standards for hydroxyapatite, α -tri-calcium orthophosphate, β -tri-calcium orthophosphate, tetra-calcium phosphate, calcium oxide, monetite, brushite, aragonite, calcite.

[5] ASTM F 1185: 2003, Standard Specification for Composition of Hydroxylapatite for Surgical Implants.

[6] ASTM F 1088-04a, Standard Specification for Beta-Tricalcium Phosphate for Surgical Implantation

[7] European Pharmacopoeia 5.0: Tribasic calcium phosphate

[8] Daculsi G. et al. Spongiuous and Cortical bone substitution kinetics at the expense of the macroporous biphasic calcium phosphate: animal and human evidence. *Bioceramics*. 1999, 12 pp. 287–290

[9] Ransford A.O. et al. Synthetic porous ceramic compared with autograft in scoliosis surgery, *The journal of Bone and Joint Surgery (Br)*, 80-B, n°1, 1998, pp 13-18.

[10] Daculsi G. et al. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2003, 14 pp. 195–200.

[11] Ducheyne P. et al. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vivo behaviour. I. Dissolution. *J. Biomed. Mater. Res.* 1993, 27 pp. 25–34.

[12] Daculsi G. et al. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: Ultrastructural and physicochemical characterization. *J. Biomed. Mater. Res.* 1989, 23 pp. 883–894.

[13] Raynaud S. et al. Calcium phosphate apatities with variable Ca/P atomic ratio. III. Mechanicals properties and degradation in solution of hot pressed ceramics. *Biomaterials.*, 23 (4) pp. 1081–1089.

[14] Gautier O. et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials*. 1998, 19 pp. 133–139.

[15] Lu J.X. et al. Role of the interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1999, 10 pp. 111–120.

[16] Liu D.-M. Influence of porous microarchitecture on the in-vitro dissolution and biological behaviour of porous calcium phosphate ceramics. *Mater. Sci. Forum*. 1997, 250 pp. 183–208.

[17] Bignon A. Optimisation de la structure poreuse d'implants en phosphate de calcium pour application de comblement osseux et relargage in situ d'un principe actif, Thesis, 2002.

[18] Bignon A. et al. Effect of micro and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2003, 14 pp. 1089–1097.

[19] USP Heavy metals <231> Method 1.