

# Utjecaj dopanata na kristalizaciju $\beta$ - trikalcijevog fosfata

---

Pendić, Filip

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:222777>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-14**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Filip Pendić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2024.



FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE I  
INŽENJERSTVA MATERIJALA

Filip Pendić

**Utjecaj dopanata na kristalizaciju  $\beta$ - trikalcijevog fosfata**

ZAVRŠNI RAD

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vilko Mandić

Članovi ispitnog povjerenstva:

izv. prof. dr. sc. Vilko Mandić

prof. dr. sc. Krunoslav Žižek

doc. dr. sc. Petar Kassal

Zagreb, srpanj 2024.

## Zahvale

Zahvaljujem se mentoru, izv. prof. dr. sc. Vilku Mandiću na prihvaćenom mentorstvu i prilici za izradu ovoga rada.

Veliko hvala asistentu Florenu Radovanoviću-Periću na pomoći tokom izvedbe eksperimentalnog dijela, te savjetima i naputcima tokom pisanja rada.

Veliko hvala svim prijateljima i kolegama, pogotovo F. M., Z. M., M. C., M. B. i M. Đ.

Hvala puno i roditeljima na dugogodišnjoj podršci i savjetima.

## Sažetak

Izrada biokompatibilne keramike na bazi kalcijevih fosfata povoljnih kemijskih i mehaničkih svojstava u današnje vrijeme je još uvijek izazov. Keramika od  $\beta$ -trikalcijevog fosfata pokazuje svojstva koja zadovoljavaju zahtjeve moderne biokeramike.

Jedan od načina dobivanja  $\beta$ -trikalcijevog fosfata je preko njegovog prekursora kalcij deficitnog hidroksiapatita (CDHA), koji se može pripremiti mokrom precipitacijom. Sinteriranjem na temperaturi višoj od 800 °C dolazi do prijelaza u  $\beta$ -trikalcij fosfat. Tokom reakcije mokre precipitacije dodavanjem soli dvovalentnih kationa moguće je dopirati uzorak čime se mijenjaju svojstva krajnjeg produkta. Ispitivani dopanti su bili dvovalentni stroncijev i magnezijev kation čije su se soli dodale nakon reakcije mokre precipitacije i prije sinteriranja dobivenih prahova. Rendgenskom difrakcijom se pokazalo kako su se ispitivanim uzorcima smanjile veličine kristalne rešetke. Infracrvenom spektroskopijom dokazana je čistoća uzorka uz nastanak manje količine pirofosfata zbog lokalne nestehiometrije. Termografskom i diferencijalnom termalnom analizom određena je temperatura prijelaza CDHA u  $\beta$ -TCP za magnezij dopirani uzorak pri ~750 °C, dok se za stroncij dopirani uzorak prijelaz odvija pri ~775 °C. Pretražnom elektronskom mikroskopijom analizirana je morfologija uzoraka.

Metodom mokre precipitacije moguće je dopirati  $\beta$ -trikalcijev fosfat te povišiti temperaturu njegovog prijelaza u  $\alpha$ -TCP, što je potvrđeno diferencijalnom termalnom analizom pri čemu se magnezij dopiranom uzorku temperatura prijelaza povišila van parametara mjerenja, dok se uzorku dopiranom stroncijem temperatura prijelaza povišila na 1300 °C.

**Ključne riječi:** biokeramika, bioaktivnost,  $\beta$ -trikalcij fosfat, kalcijevi fosfati, dopiranje

# *Dopants' Influence on the crystallisation of $\beta$ -TCP*

## **Summary**

Nowadays, manufacturing of calcium phosphate biocompatible ceramics with favorable chemical and mechanical properties is still a challenge. Ceramics made of  $\beta$ -tricalcium phosphate are showing promises within modern bioceramic requirements.

One of the possible ways of preparing  $\beta$ -tricalcium phosphate is through its precursor, amorphous calcium hydroxyapatite (CDHA) that can be prepared through wet precipitation method. A phase transition to  $\beta$ -tricalcium phosphate happens while sintering CDHA at temperature higher than 800 °C. Doping is possible by adding divalent salts while wet precipitation is occurring, which changes the properties of the final product. Analysed dopants were strontium and magnesium divalent cations whose salts had been added after wet precipitation and before sintering of the powder. X-ray diffraction pointed to shrinkage of the unit cell. Infrared spectroscopy with Fourier transformation proved purity of synthesized sample with minor addition of pyrophosphate caused by local non-stoichiometry. Thermogravimetric and differential thermal analysis determined the temperature of phase transition at ~750 °C for magnesium doped sample, while the temperature for strontium doped sample has been determined at ~775 °C. Scanning electron microscopy was used to analyse sample morphology.

The differential thermal analysis has proven the possibility to use wet precipitation method to dope  $\beta$ -TCP and raise its phase transition temperature to  $\alpha$ -TCP. The phase transition temperature for magnesium doped sample has been raised to the outside of the measuring parameters while for the strontium doped sample the temperature has been raised to 1300 °C.

**Key words:** bioceramic, bioactivity,  $\beta$ -tricalcium phosphate, calcium phosphates, doping

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	<b>3</b>
2.1. Kalcijevi fosfati .....	3
2.2. $\beta$ -trikalcijev fosfat.....	6
2.3. Dopiranje kalcijevih fosfata.....	7
2.3.1. Dopiranje jednovalentnim kationima .....	8
2.3.2. Dopiranje dvovalentnim kationima .....	9
2.3.3. Dopiranje trovalentnim kationima.....	11
2.4. Instrumentalne tehnike .....	12
2.4.1. Skenirajući elektronski mikroskop (SEM).....	12
2.4.2. Rendgenska difrakcija na praškastom uzorku (PXRD) .....	13
2.4.3. Termogravimetrijska i diferencijalna toplinska analiza.....	14
2.4.4. Infracrvena spektroskopija sa Fourierovom transformacijom (FTIR).....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>16</b>
3.1 Materijali .....	16
3.2. Priprava $\beta$ -TCP-a.....	16
3.2.1. Priprava otopina .....	16
3.2.2. Priprava dopiranog $\beta$ -TCP-a .....	16
3.3. Karakterizacija pripremljenih uzoraka .....	17
3.3.1. Pretražna elektronska mikroskopija .....	17
3.3.2. Rendgenska difrakcija na praškastom uzorku.....	18
3.3.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom .....	18
3.3.4. Termogravimetrijska i diferencijalna toplinska analiza.....	19
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>20</b>
4.1. Rendgenska difrakcija na praškastom uzorku .....	20
4.2. Infracrvena spektroskopija sa Fourierovom transformacijom.....	23
4.3. Termogravimetrijska i diferencijalna toplinska analiza .....	25
4.4. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM).....	27
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>30</b>
<b>6. POPIS SIMBOLA</b> .....	<b>31</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>32</b>



# 1. UVOD

Kroz povijest čovječanstva može se primijetiti sve veća raširenost korištenja raznovrsnih materijala u svrhu poboljšanja kvalitete života čovjeka. Keramika je poznata od davnina, ali se tek kroz zadnjih 100 godina primijetio njezin potencijal u medicinske svrhe, te je porast upotrebe i razvitka tehnologije keramike kao biomaterijala kroz tih 100 godina doživio nagli porast [1].

Biomaterijalom se smatra svaki materijal čija je namjera prilikom ugradnje popravak, izmjena ili nadogradnja živog tkiva u medicinske svrhe. Stoga pod biokeramikom kao podvrstom biomaterijala smatramo keramiku, staklokeramiku i staklo koje zadovoljavaju prethodno navedene slučajeve upotrebe. Općenito se biokeramika može podijeliti na bionertnu, bioaktivnu i bioresorbabilnu keramiku[2].

Bionertna keramika, kao što je keramika na bazi aluminijskog oksida ili cirkonijskog oksida, je kemijski stabilna te ju odlikuje velika mehanička čvrstoća i tvrdoća. Zbog svoje velike mehaničke čvrstoće, krutosti i sklonosti pucanju keramika na bazi aluminijskog oksida i cirkonijskog oksida danas se više ne koristi u svrhe zamjene koštanog tkiva nego se upotrebljava u kombinaciji sa drugim biokeramikama i materijalima kao dio proteze ili zamijenjene kosti koja snosi najviše trenja i opterećenja. Primjer ovakve uporabe keramika na bazi cirkonija ili alumine je prilikom zamjene kuka pri čemu se keramika ugrađuje na mjestu ulaska glave bedrene kosti u čašicu zdjelične kosti[2,3].

Bioaktivna keramika izaziva interakciju sa koštanim tkivom u koje je ugrađeno pri čemu se stvara čvrsta veza između ugrađene biokeramike i kosti bez veznog tkiva. Njihovo najznačajnije svojstvo je omogućavanje procesa osteokondukcije. Osteokondukcija je proces pri kojem se osteogeneza, stvaranje koštanog tkiva, odvija uz pomoć ugrađenog biomaterijala koji osigurava stabilnu strukturu za daljnji rast kosti po površini biomaterijala uslijed njegove poroznosti. Točan mehanizam osteokondukcije nije određen, ali se pretpostavlja da dolazi do ulaska migratornih kapilara, fibrovaskularnog tkiva i osteogenih stanica unutar porozne strukture nakon čega dolazi do formacije nove kosti na tom mjestu. Za uspješnu osteokondukciju bitan je sastav, topografija i geometrija (poroznost) površina koje se namjeravaju spojiti. Najvažniji primjeri ovakvih keramika su hidroksiapatit (HA), beta trikalcijski fosfat ( $\beta$ -TCP) te dvofazni kalcijev fosfat (BCP) koji je kombinacija hidroksiapatita i  $\beta$ -TCP-a.[2,4]

Bioresorbabilna keramika sa vremenom degradira pod utjecajem živog tkiva i bioloških procesa te se zamjenjuje sa koštanim tkivom. Za razliku od bioaktivne keramike

primijećeno je da je kontaktna površina između kosti i bioresorbabilne keramike prilikom osteogeneze puno nestabilnija od kontaktne površine osteogeneze kod bioaktivne keramike. Za bioresorbabilnu keramiku je bitna osteoindukcija, proces poticanja stvaranja novog koštanog tkiva uslijed oslobađanja tvari koje pokreću mehanizam lokalne osteogeneze. Primjeri ovakvih keramika su kalcijevi karbonati, gips, karbonatni apatit i beta trikalcijev fosfat[2,4,5].

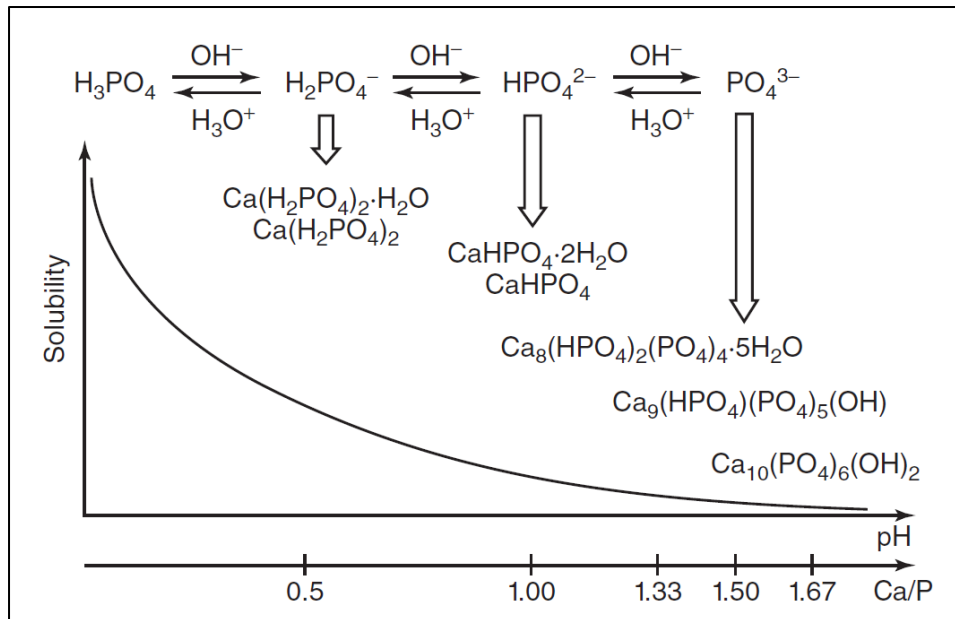
## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Kalcijevi fosfati

Kalcijevi fosfati kao kemijski spojevi su većinski građeni od tri elementa: kalcija, fosfora i kisika. Kalcij se nalazi u spojevima u oksidacijskom stanju +2, fosfor je u oksidacijskom stanju +5, dok je kisik u oksidacijskom stanju -2. Uz ova tri građevna elementa, u spojevima se zna pojaviti vodik u oksidacijskom stanju +1, voda, hidroksidni ion ( $\text{OH}^-$ ) te fluor. Najveći izvor kalcijevih fosfata je zemljina kora gdje se javljaju u obliku ležišta apatita, najčešće kao ion supstituiranog fluorapatita i fosforita. Javljaju se i u živim bićima gdje se sintetiziraju biološkim procesima. Kod primitivnih organizama se smatra da je sintetiziranje kalcijevog fosfata bitno radi pohrane i regulacije kalcija, fosfora i magnezija, dok se kod kralježnjaka kalcijev fosfat javlja kao osnovni građevni sastojak za normalne (kosti, zubi, školjke, rogovi...) i patološke (bubrežni i dentalni kamenac, aterosklerozijske lezije...) tvorevine[5].

Unutar kalcijevih fosfata postoji dvanaest poznatih spojeva određeni molarnim omjerom kalcija i fosfora u spoju – Ca/P koji se kreće u intervalu od 0,5 do 2,0. Ovakav način definiranja kalcijevih fosfata je izuzetno pogodan jer omjer ujedno korespondira sa kiselosti i topljivosti spoja, gdje su niži omjeri kiseliji i lakše topljivi u vodi zbog većeg molarnog udjela fosfatnog iona  $[\text{PO}_4]^{3-}$  u spoju kao što je kalcijev dihidrogenfosfat monohidrat ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; Ca/P=0,5), dok su spojevi većeg omjera manje topljivi i bazičniji kao što je hidroksiapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; Ca/P=1,67)[5].

Primjena kalcijevih fosfata uvelike ovisi o kiselosti i njihovoj topljivosti, pa se tako lakše topljivi i kiseliji pripadnici obitelji kalcijevih fosfata (MCPM, DCPD, DCPA) primjenjuju kao gnojiva (izvor fosfata) ili u prehrambenim industrijama, u mljekarskoj industriji kao izvor kalcija, te u pekarskoj industriji kao aditivi koji poboljšavaju teksturu i obradivost tijesta. Teže topljivi kalcijevi fosfati, kojima je omjer Ca/P iznad 1,33, svoju primjenu više pronalaze u medicini kao razni oblici biokeramike i cemenata na bazi kalcijevih fosfata. Od 12 navedenih kalcijevih fosfata, najkorišteniji u medicini su  $\alpha$ - i  $\beta$ -TCP, CDHA te HAp[5].



Slika 1. Ovisnost topljivosti kalcijevih ortofosfata o njihovom Ca/P molarnom omjeru [5]

Iako  $\alpha$ -TCP i  $\beta$ -TCP imaju istu molekulsku formulu, stoga i isti Ca/P omjer, njihova topljivost je različita zbog razlike u njihovoj strukturi.  $\beta$ -TCP ima stabilniju strukturu na sobnoj temperaturi od  $\alpha$ -TCP-a pa teže podliježe hidrolizi. Hidrolizom  $\alpha$ -TCP prelazi u CDHA. Ova sposobnost brze hidrolize  $\alpha$ -TCP-a nije pogodna za osteogenezu jer je brzina hidrolize značajno brža od osteogeneze, te se time narušava sposobnost stvaranja novog koštanog tkiva prema prethodnoj strukturi ugrađene porozne biokeramike. CDHA nije povoljna kao potencijalna biokeramika zbog toga što njezina amorfna struktura ima loša mehanička svojstva, ali se zato može koristiti kao izvor kalcija i fosfata u obliku praha ili kao sastavni dio biocementa. Amorfna struktura te nejednakost naboja u strukturi CDHA olakšavaju ugradnju vanjskih kationa što olakšava izradu dopiranog  $\beta$ -TCP-a, te time i ion dopirane keramike.

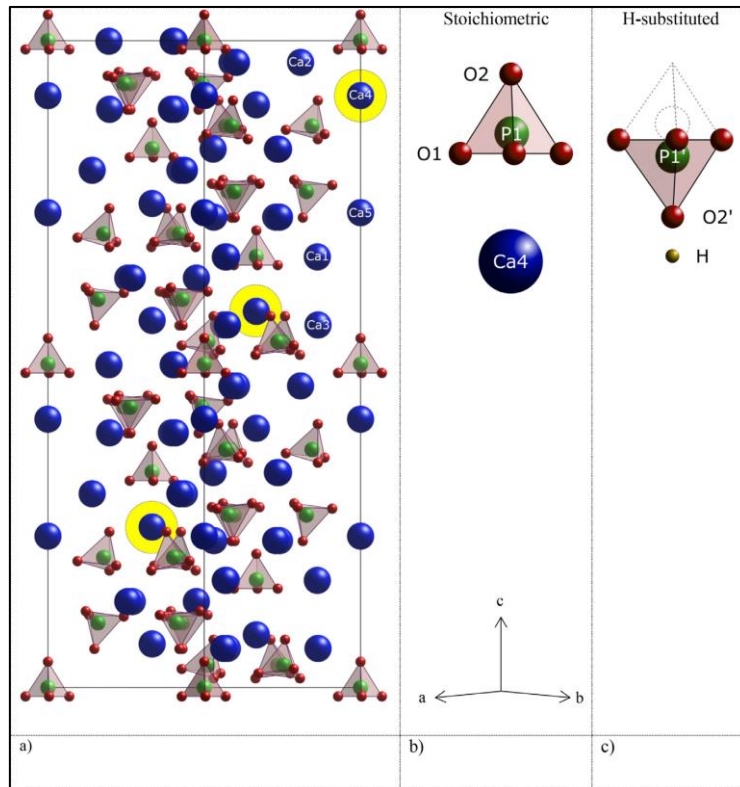
Hidroksiapatit je jedan od najistraživanijih kalcijevih fosfata zbog svoje biokompatibilnosti i biološke sličnosti sa kosti, ali zbog svojih loših mehaničkih svojstava kao što je mala čvrstoća i krtost se njegova uporaba izbjegava za potrebe primjene kao koštanog implantata na mjesta gdje bi morao moći podnositi velika naprezanja ili djelovanja velikih sila. Njegova kristalnost sprječava otapanje i daljnju resorpciju u biološkim fluidima za potrebe vršenja osteogeneze. Kako bi se pospješila njegova bioresorbabilnost te poboljšala njegova mehanička svojstva dopira ga se sa metalnim ionima magnezija, mangana, cinka, stroncija, itd. pri čemu svaki od dopanata ima drugačiji efekt i koristi se u različite svrhe ovisno o njegovom utjecaju na svojstva[5].

Tablica 1. Postojeći kalcijevi ortofosfati sa svojim Ca/P molarnim omjerom[5]

Spoj	Skraćenica	Molekulska formula	Ca/P molarni omjer
<b>Monokalcij fosfat monohidrat</b>	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
<b>Monokalcijev fosfat anhidrid</b>	MCP ili MCPA	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5
<b>Dikalcijev fosfat dihidrat</b>	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
<b>Dikalcijev fosfat anhidrid</b>	DCP ili DCPA	$\text{CaHPO}_4$	1,0
<b>Okotokalcijev fosfat</b>	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
<b><math>\alpha</math>-Tri-kalcij fosfat</b>	$\alpha$ -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
<b><math>\beta</math>-Tri-kalcij fosfat</b>	$\beta$ -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
<b>Amorfni kalcij fosfat</b>	ACP	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ n=3-4.5 15-20 % $\text{H}_2\text{O}$	1,2-2,2
<b>Kalcij deficitni hidroksiapatit</b>	CDHA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ $0 < x < 1$	1,5-1,67
<b>Hidroksiapatit</b>	HA ili HAp	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
<b>Fluorapatit</b>	FA ili FAp	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	1,67
<b>Oksiapatit</b>	OA ili OAp	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$	1,67
<b>Tetrakalcij fosfat</b>	TTCP ili TetCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,0

## 2.2. $\beta$ -trikalcijev fosfat

$\beta$ -trikalcijev fosfat (skraćenicom  $\beta$ -TCP), čija je molekulska formula  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , je jedna od stabilnih bezvodnih faza trikalcijevih fosfata. Kristalizira u rombohedralnom sustavu (prostorna grupa  $R\bar{3}c$ ) sa 21 molekulskom jedinkom  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  po heksagonalnoj ćeliji.



Slika 2. Kristalna struktura  $\beta$ -trikalcijevog fosfata

Nije ga moguće dobiti precipitacijom iz vodenih otopina, ali se može dobiti precipitacijom iz bezvodnih otopina kao što je etilen glikol. On je visoko temperaturna faza koja se dobiva pri  $800\text{ }^\circ\text{C}$  termičkom obradom CDHA ili reakcijom kiselih kalcijevih fosfata sa bazom. Stabilan je na sobnoj temperaturi. Svaki način dobivanja ove faze kalcijevog fosfata zahtjeva da je molarni omjer Ca/P jednak 1,5. Ukoliko molarni omjer Ca/P nije točno jednak 1,5 dolazi do pojavljivanja nečistoća kao što je hidroksiapatit (za  $\text{Ca}/\text{P} > 1,5$ ) ili  $\beta$ -kalcijev pirofosfat (za  $\text{Ca}/\text{P} < 1,5$ ). Na temperaturama iznad  $1125\text{ }^\circ\text{C}$   $\beta$ -TCP prelazi u  $\alpha$ -TCP. Ne hidrolizira pri sobnoj temperaturi, ali može hidrolizirati u vrućoj vodenoj kupelji nakon 24 sata ili pri izlaganju vodenoj pari pri povišenoj temperaturi, pri čemu prelazi u druge apatitne faze.

$\beta$ -trikalcijev fosfat dopiran  $Zn^{2+}$  ili  $Mg^{2+}$  ionima je manje topljiv od čistog, te se pokazalo da vrlo niska količina iona  $Mg^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  u otopini može potpuno zaustaviti otapanje[4].

Biokeramika na bazi  $\beta$ -TCP-a se počela koristiti već 1920. kao koštani implantat upravo zbog svoje stabilnosti pri visokim temperaturama i zbog olakšanog procesa njezinog oblikovanja. Njegova keramika je već odavno komercijalizirana i jedan je od najvažnijih materijala za ortopedske kirurge i zubare. U komercijalnom obliku može se naći kao granule ili kao manji komadići keramike. U takvom obliku pogodan je za široku primjenu od rekonstrukcije urođenih koštanih defekata do ozljeda nakon nesreće u ortopedске svrhe, dok se u zubarstvu može koristiti nakon ili prije vađenja zuba kao kako bi se spriječili trajni defekti uzrokovani operacijom. Osim kao u obliku keramike koristi se i kao sastavni dio ionskog samoočvršćavajućeg cementa na bazi kalcijevog fosfata. Ovakav tip cementa se može injektirati u tekućem obliku nakon čega naknadno očvrstne u tijelu[4].

Najveći problem pri sinteriranju  $\beta$ -TCP keramike je u temperaturi njezine tranzicije u  $\alpha$ -TCP, koja se odvija pri 1125 °C za čisti  $\beta$ -TCP. Moguće je povisiti temperaturu tranzicije ukoliko postoje ionske nečistoće kao što je to Mg, Zn ili Fe. Temperature sinteriranja se kreću između 1100 °C i 1250 °C, dok na temperaturama iznad 1250 °C dolazi do rasta zrnaca i prelaska u  $\alpha$ -TCP pri čemu se narušavaju mehanička svojstva dobivene keramike. Temperatura sinteriranja se pokazala kao značajan faktor na mehanička svojstva  $\beta$ -TCP keramike. Povećanjem temperature sinteriranja dolazi do povećanja tvrdoće i Young-ovog modula elastičnosti te su najbolja svojstva određena pri 1300 °C, dok se daljnjim povećanjem temperature smanjuje Young-ov modul[4].

### **2.3. Dopiranje kalcijevih fosfata**

Iako smo sposobni sintetizirati biokeramiku na bazi kalcijevih fosfata, svaki dosadašnji pokušaj sintetiziranja koštanih implantata koji bi osiguravao mehaničku postojanost, biokompatibilnost te dugotrajnu stabilnost ima relativnu uspješnost što ukazuje na kompleksnost i superiornost bioloških struktura koje se pokušavaju replicirati. Naime ljudsko tijelo je izuzetno negostoljubivo okruženje za ugrađene biomaterijale, jer osim što kosti moraju moći podnositi opterećenja u vrijednostima od 3 do 10 puta tjelesne mase, opterećenja koja se javljaju su oscilirajuća i repetativna ovisno o tipu aktivnosti koje tijelo vrši. Osim toga mora se

uzeti u obzir da ljudsko tijelo sadrži fluide čija se pH vrijednost kreće između 1 i 9 ovisno o tkivu u kojem se fluid nalazi što dodatno komplicira ugradnju i postojanost biokeramike[5].

U malim količinama ioni metala mijenjaju parametre kristalne rešetke, kristalnost, te mnoga druga fizička i kemijska svojstva spoja kojeg se dopira. Promjenom fizičkih i kemijskih svojstava ujedno mijenjamo i reakciju biološkog organizma na njegovu prisutnost, što ima utjecaj na bioresorbabilnost i topljivost. Stoga možemo zaključiti kako će dopiranje kalcijevih fosfata dovesti do promjena njihovih mehaničkih i kemijskih svojstava u svrhu poboljšanja istih i time povećati njihovu korisnost za veće područje primjene[6].

### 2.3.1. Dopiranje jednovalentnim kationima

Dopiranje kalcijevih fosfata litijevim ( $\text{Li}^+$ ), natrijevim ( $\text{Na}^+$ ), kalijevim ( $\text{K}^+$ ) i srebrovim ( $\text{Ag}^+$ ) monovalentnim kationima je uvelike istraženo. Od prethodno navedenih, natrij i kalij javljaju se prirodno u biološkom apatitu. Supstitucijom kalcijevih dvovalentnih kationa ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dovodi do neravnoteže u naboju unutar strukture dopiranog kalcijevog fosfata. Ova nejednakost se smanjuje pomoću dodanih vakancija ili usporednim dopiranjem sa više vrsta kationa ili aniona. Utjecaj umetnutih jednovalentnih kationa je višestruk[6].

Natrijevi ioni zbog sličnog ionskog radijusa ( $0,98 \text{ \AA}$ ) sa kalcijevim kationom ( $0,99 \text{ \AA}$ ) se lagano ugrađuju na kalcijeva mjesta unutar kristalne rešetke uz malu promjenu parametara. U primjeru natrij dopiranog TCP-a ioni su doveli do povećanja broja vakancija pri čemu se kinetika rasta kristala tokom sinteriranja mijenja što dovodi do rasta veličine kristala. Dopiranje  $\beta$ -TCP-a sa natrijevim kationima dovodi do smanjenja njegove poroznosti, povećanja gustoće sinteriranog materijala te time i sporijeg otapanja u kiselim otopinama u usporedbi sa čistim  $\beta$ -TCP-om. Bifazna keramika koja se sastoji od hidroksiapatita dopiranog natrijem (Na-HAp) i čistog  $\beta$ -TCP-a pokazuje bolju biološku aktivnost nego njezine individualne komponente[6].

Dopiranjem hidroksiapatita kalijevim kationima može dovesti do smanjenja parametara kristalne ćelije iako je očekivano da bi kalijev kation koji je veći ( $1,33 \text{ \AA}$ ) od kalcijevog uzrokovao istežanje strukture, te posljedično povećanje parametara kristalne ćelije. Hidroksiapatit dopiran kalijevim ionima je pokazao veću termalnu stabilnost u usporedbi sa čistim hidroksiapatitom. Srebrovi kationi su bitni za antimikrobno djelovanje zbog raširene primjene faza kalcijevih fosfata kao koštanih implantata. Potrebno je napomenuti da iako



srebrovi kationi imaju antimikrobno djelovanje, prevelika količina može imati toksičan učinak. Optimalna količina srebrovih iona je oko 2 % masenog udjela kako bi se dobio željeni antimikrobni učinak[6].

### 2.3.2. Dopiranje dvovalentnim kationima

Uz kalcijeve ione u biološkom apatitu se nalaze i magnezijevi ( $Mg^{2+}$ ), stroncijevi ( $Sr^{2+}$ ), manganovi ( $Mn^{2+}$ ), cinkovi ( $Zn^{2+}$ ), te silicijevi ( $Si^{2+}$ ) dvovalentni kationi, stoga je istraživanje njihovog dopiranja na svojstva kalcijevih fosfata od velikog značaja.

Magnezij je izuzetno bitan zbog svoje uloge u mineralizaciji kalcificiranog tkiva pri čemu neizravno utječe na mineralni metabolizam u živim tkivima. Dopiranjem hidroksiapatita dolazi do povećanja njegove topljivosti što omogućuje veću bioresorbabilnost sintetičkog Mg-HAp, ali se mora uzeti u obzir da prevelika količina  $Mg^{2+}$  iona u hidroksiapatitu može dovesti do nestabilnosti apatitne strukture. Ionski radijus magnezijevog kationa (0,86 Å) je manji od kalcijevog kationa (0,99 Å) te se prilikom dopiranja keramika na bazi kalcijevih fosfata zamjećuje smanjenje parametara kristalne ćelije. Dopiranjem  $\beta$ -TCP-a  $Mg^{2+}$  ionima pri visokim temperaturama može dovesti do izdvajanja magnezijevih iona u obliku magnezijevog oksida (MgO). Ovakva inkluzija MgO u strukturi pripomaže kontroli temperature sinteriranja i mikrostrukture za bifazne keramike kao što je HAp/ $\beta$ -TCP, jer omogućava sniženje temperature sinteriranja i daje mikrostrukturu koja se sastoji od malih zrnaca. Dodavanjem prevelike količine magnezijevih kationa, >10 % masenog udjela, dovodi do stvaranja amorfnih faza, gdje se kristaliti aglomeriraju i neravnomjerno formiraju[6].

Stroncijevi ioni se zbog svoje sličnosti kalcijevim ionima prirodno nalaze u kosti, gdje su odgovorni za formaciju nove kosti i sprječavanje resorpcije različitim mehanizmima kojima djeluju na minerale u kosti. Ugradnjom  $Sr^{2+}$  iona u kristalnu rešetku kalcijevih fosfata kao što je hidroksiapatit dovodi do povećanja kristalne ćelije zbog većeg radijusa stroncija od kalcija što izravno utječe formiranje kristala koji zbog dodatka stroncija u strukturi teže amorfnoj strukturi. Cementi na bazi kalcijevog fosfata koji sadrže hidroksiapatit dopiran stroncijem imaju dvostruko veću tlačnu čvrstoću u usporedbi sa čistim cementom izrađenim od kalcijevog fosfata. Dopiranjem bifazne (HAp/ $\beta$ -TCP) keramike stroncijem sol-gel metodom produkt pokazuje veću prisutnost faze  $\beta$ -TCP, što dokazuje stabilizirajući efekt stroncijevih iona na kristalnu ćeliju  $\beta$ -TCP-a. Dodatkom stroncija u kristalnu rešetku  $\alpha$ -TCP-a

je dovelo do povećanja parametara kristalne ćelije dok se ispitivanjem rendgenom zamijetio pomak difrakcijske linije prema nižim kutovima povećanjem količine dopiranog stroncija te širenja pikova difrakcijske linije što ukazuje na nastanak manjih kristalita stroncij dopiranog  $\alpha$ -TCP-a naprema čistom  $\alpha$ -TCP-u[6].

Dodavanjem  $Zn^{2+}$  iona bioimplantatima na bazi hidroksiapatita dovodi do osteogeneze poticanjem stvaranja koštanih stanica. Keramika na bazi TCP-a i hidroksiapatita uz dodatak ZnO pokazuje porast gustoće i veća kristalna zrnca formiranog materijala uz povećanje njezine čvrstoće. Ispitivanjem hidroksiapatita dopiranog cinkom dovodi do smanjenja parametara ćelije zbog manjeg atomskog radijusa cinkovog kationa (0,74 Å) naprema kalcijevom (0,99 Å) te istovremeno omogućava nastajanje većih kristalnih zrnaca uz smanjenje njihove termalne stabilnosti [6].

Dopiranje kalcijevih fosfata sa  $Mn^{2+}$  ionima se vrši sa očekivanjem kako će prisutnost manganovih iona dovesti do poboljšanja mehaničkih i bioloških svojstava. Zagrijavanjem hidroksiapatita dopiranog sa  $Mn^{2+}$  ionima na 600 °C dovodi do pojave  $\beta$ -TCP-a, dok daljnje zagrijavanje na temperaturni interval između 800 i 1000 °C dovodi do transformacije 75 % prisutnog hidroksiapatita u  $\beta$ -TCP. Dopiranje bifaznog kalcijevog fosfata dvovalentnim manganovim kationima dovodi do povećanja njegove kristalnosti u usporedbi sa čistim uzorkom bifaznog kalcijevog fosfata. Rendgenska difrakcija dopiranog  $\beta$ -TCP-a  $Mn^{2+}$  kationima pokazuje kako je došlo do nadomještanja kalcijevih kationa manganovim unutar strukture [6].

Dodavanjem silicijevih kationa u hidroksiapatit i  $\beta$ -TCP dovodi do povećanja udjela amorfne faze i smanjenja veličine kristalita, što omogućava razvijanje materijala sa finim mikrostrukturama. Dodatkom silicija u strukturu hidroksiapatita dovodi do povećanja parametara ćelije, povećanja topljivosti zbog stvaranja defekata unutar strukture te nastanka elektronegativne površine. Ispitivanjem TCP-a dopiranog silicijevim kationima nije pokazalo porast toksičnosti, štoviše njegov dodatak u kalcijeve fosfate dovodi do veće biološke aktivnosti u usporedbi sa čistim kalcijevim fosfatom [6].

### 2.3.3. Dopiranje trovalentnim kationima

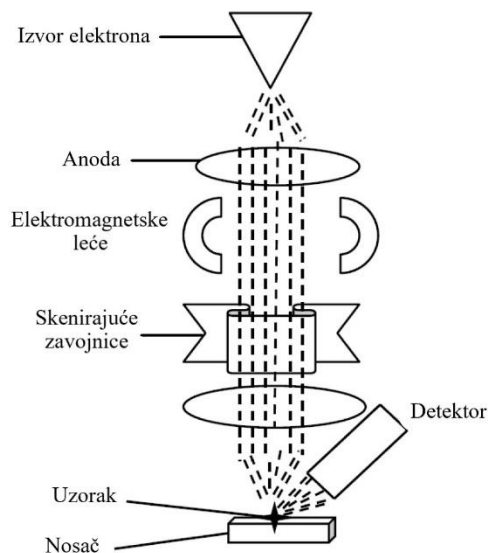
Općenito se uz monovalentne i divalentne ione u ljudskoj kosti nalaze trovalentni metalni ioni poput kromovih ( $\text{Cr}^{3+}$ ), stoga se promatra i njihov utjecaj na svojstva kalcijevih fosfata. Drugi elementi koji pokazuju potencijal za dopiranje uključuju europij ( $\text{Eu}^{3+}$ ) i galij ( $\text{Ga}^{3+}$ ).

Dodatkom kromovih trovalentnih iona u strukturu hidroksiapatita dovodi do povećanja veličina kristalita što dovodi do veće krutosti. Uz veći dodatak kromovih iona dolazi do nastanka nepravilnih čestica uz smanjenje njihove mase zbog prisutnosti veće količine  $\text{OH}^-$  iona koji stabiliziraju kromov trovalentni kation u strukturi. Štoviše topljivost ovako dopiranog hidroksiapatita se u otopinama sa pH ispod 7 značajno snizila. Istraživanjem se ujedno i utvrdilo kako su kromovi trovalentni ioni lakše supstituiraju unutar strukture za razliku od divalentnih iona. Dopiranje europijem se za razliku od dosad spomenutih elemenata ne radi za implantate nego za sustave dostave lijekova. Nanočestice hidroksiapatita dopiranog europijem posjeduju fosfore koji su odgovorni za prijenos i otpuštanje molekula lijekova, posjeduju luminiscentna svojstva te su biokompatibilni. Galij je već od prije povezan sa povećanjem količine kalcija i fosfora u kosti, te se koristi u medicini za sprječavanje resorpcije koštanog tkiva za liječenje osteoporoze i raka. Dodatkom galija u strukturu hidroksiapatita nije dovelo do morfološke promjene dopiranog hidroksiapatita niti do promijene parametara kristalne ćelije [6].

## 2.4. Instrumentalne tehnike

### 2.4.1. Pretražni elektronski mikroskop (SEM)

Osnovna funkcija skenirajućeg elektronskog mikroskopa je je uvećati male značajke ili objekte nevidljive ljudskom oku. Umjesto svjetla koristi se snop visokoenergetskih elektrona koji se skenira nakon odbijanja od promatranog uzorka te se na taj način stvara slika. Zbog svoje manje valne duljine elektroni prikazuju sliku uzorka detaljnije nego što to može svjetlo. Moderni skenirajući elektronski mikroskop je sposoban prikazati detalje dimenzija manjih od 1 nm.

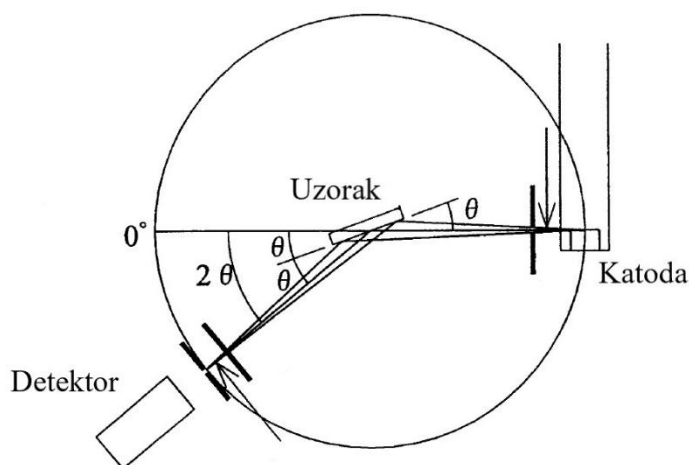


Slika 8. Shematski prikaz elektronskog mikroskopa [8]

Uz sposobnost prikaza malih detalja SEM interagirajući sa uzorcima može emitirati rendgensko zračenje jedinstvene energije koje se mogu detektirati i koristiti za određivanje kompozicije promatranog uzorka. Jedna od bitnijih sposobnosti mu je prikazivanje veliku dubinu polja što omogućava da velike površine uzorka ostanu u fokusu te daje snimljenim slikama 3D karakteristike. Prednosti snimanja uzorka skenirajućim elektronskim mikroskopom su brza i jednostavna priprema uzorka za snimanje, brzi rezultati, nedestruktivna analiza te mogućnost snimanja mokrih i suhih uzorka. Nedostaci ovakve analize je to što je veličina uzorka ograničena, uzorci moraju biti promatrani u vakuumu te se slabo vodljivi uzorci moraju prevlačiti vodljivim materijalom kao što je zlato ili platina[7].

## 2.4.2. Rendgenska difrakcija na praškastom uzorku (PXRD)

Rendgenska difrakcija je nedestruktivna metoda koja se koristi za analizu materijala na atomskoj ili molekularnoj razini. Većinom se koristi za analizu uzoraka koji su kristalinični ili polukristalinični, iako se može koristiti i za amorfne materijale. Rendgenska analiza se zasniva na rendgenskom zračenju odnosno, elektromagnetskim valovima čija je valna duljina na razini od 10 nm do 10 pm.

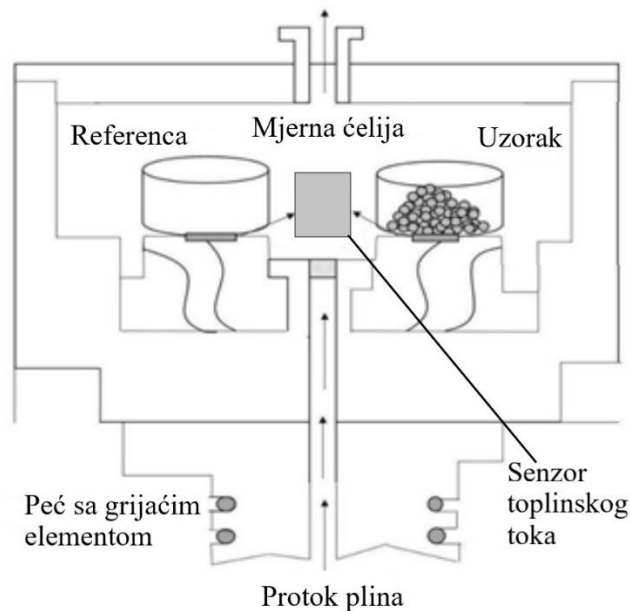


Slika 9. Shematski prikaz goniometra [9]

Kada se rendgensko zračenje rasprši na materijalu čija se struktura nalazi unutar veličine valnih duljina rendgenskog zračenja dolazi do interferencije zraka koje je moguće detektirati. Konstruktivna ili destruktivna interferencija rendgenskog zračenja unutar strukture materijala prema Braggovom zakonu može se kvantitativno detektirati i prikazati, što nam omogućuje i kvalitativnu analizu uzoraka jer se dobiveni odziv razlikuje za svaki tip materijala ovisno o njegovoj strukturi i kemijskom sastavu. Najbitniji dio rendgenskog uređaja je difraktometar koji je odgovoran za detekciju intenziteta raspršenih rendgenskih zraka. Nakon izlaska rendgenskog zračenja iz katode koja ih isijava, difraktometar precizno zakreće nosač uzorka čime se omogućava detekcija raspršenih zraka koje zadovoljavaju Braggov zakon prema svojem intenzitetu i kutu raspršenja[9].

### 2.4.3. Termogravimetrijska i diferencijalna toplinska analiza

Termogravimetrijska analiza (TGA) je analitička tehnika pri kojoj se uslijed promjene temperature unutar određenog vremena mjeri promjena mase ispitivanog uzorka. Ova analitička tehnika se koristi kako bi se odredili fizikalne i kemijske promjene unutar ispitivanog uzorka ili materijala prilikom promjene temperature što se može očitovati promjenom mase uzorka u vremenu. Promjena mase je usko vezana za fizikalne promjene kao što su adsorpcija, desorpcija, fazni prijelazi... i kemijske promjene kao što su oksidiranje na zraku, termalna dekompozicija organskih tvari, heterogene kemijske reakcije...[10]

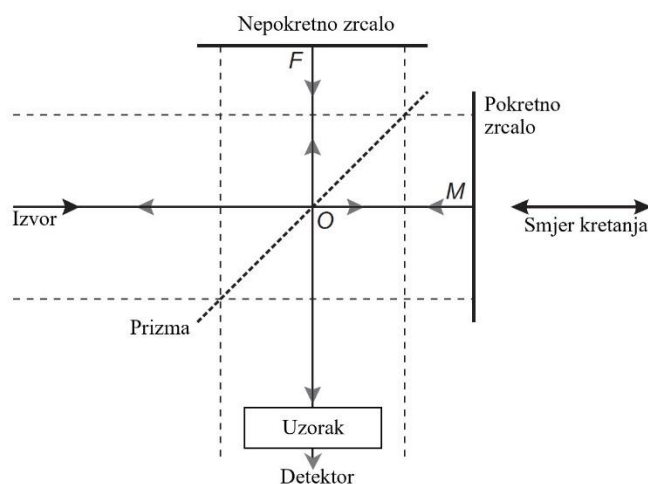


Slika 10. Shematski prikaz TGA/DTA[11]

Diferencijalna toplinska analiza (DTA) je analitička tehnika pri kojoj se mjeri razlika u postignutoj temperaturi tokom ciklusa zagrijavanja i/ili hlađenja između ispitivanog uzorka i referentnog materijala unutar određenog vremena. Samo mjerenje se odvija unutar peći sa grijaćim radnim elementom gdje se nalazi nosač posudica sa referentnim i ispitivanim uzorkom. Unutar peći temperatura se mjeri pomoću termopara koji mjeri temperature posudica uzorka i referentnog materijala. Razlika u temperaturi referentnog uzorka i ispitivanog uzorka se zatim ispisuju u ovisnosti sa vremenom[10].

#### 2.4.4. Infracrvena spektroskopija sa Fourierovom transformacijom (FTIR)

Infracrvena spektroskopija sa Fourierovom transformacijom je analitička metoda kojom služi za kvalitativnu analizu organskih, polimernih i anorganskih materijala. Zasniva se na infracrvenoj radijaciji, elektromagnetskom zračenju koje se nalazi u rasponu valnih duljina od 780 nm do 1 mm.



Slika 11. Shematski prikaz Michelsonovog interferometra [13]

Prilikom isijavanja infracrvenog zračenja na određeni materijal, molekulske kovalentne veze selektivno apsorbiraju radijaciju različitih valnih duljina pri čemu dolazi do promjene vibracijske energije unutar kovalentne veze. S obzirom da različite molekule imaju različite duljine veze i sadrže različite funkcionalne skupine povratno zračenje u obliku transmitancije se može detektirati i analizirati pri čemu nam ta povratna informacija služi za određivanje tipa molekulskih veza i funkcionalnih skupina koje se nalaze u ispitivanom uzorku. Sastavni dio infracrvenog spektrofotometra sa Fourierovom transformacijom je Michelsonov interferometar. Interferometar, čiji je shematski prikaz na slici 10., je uređaj koji dijeli zraku infracrvenog zračenja na dva dijela nakon čega ih ponovo kombinira pri čemu dolazi do interferencije dvaju zraka koja ovisi o putu koje one prelaze od izvora do detektora. Upadna zraka zračenja se dijeli na dva dijela od kojih se jedna zraka odbija od pokretnog ogledala, dok se druga odbija od fiksnog ogledala. Detektor bilježi frekvenciju i valnu duljinu interferirane zrake koja prolazi kroz uzorak nakon čega se ti podaci unutar samog uređaja obrađuju Fourierovom transformacijom i ispisuju na ekranu[12].

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1 Materijali

U ovome radu, za pripravu CDHA, kao prekursora za dobivanje  $\beta$ -TCP-a korištene su soli:

- kalcijev nitrata tetrahidrat,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Alfa Aesar, >99.5 %, Massachusetts, SAD)
- amonijev hidrogenfosfat,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (Alfa Aesar, >99.5 %, Massachusetts, SAD)
- pH unutar otopine je kontroliran dodatkom otopine amonijaka,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , (25 % vol, >99.9 %, Sigma Aldrich, Njemačka)

Soli koje su se koristile kao izvor kationa  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Sr}^{2+}$  su:

- magnezijev klorid,  $\text{MgCl}_2$  (Sigma Aldrich, >99.5 %, Njemačka)
- stroncijev klorid,  $\text{SrCl}_2$  (Sigma Aldrich, >99.5 %, Njemačka)

### 3.2. Priprava $\beta$ -TCP-a

#### 3.2.1. Priprava otopina

Pripremljene su otopine kalcijevog nitrata tetrahidrata,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  i amonijevog hidrogenfosfat,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , koncentracije od 0,15 M, otapanjem odvagane mase soli u vodi. Ovako pripremljene otopine su ostavljene na 24 h kako bi se sva sol uspješno otopila. Otopina za kontrolu pH, pripremila se dodatkom određenog volumena koncentrirane otopine amonijaka, kako bi se dobila 1 % otopina amonijaka.

#### 3.2.2. Priprava dopiranog $\beta$ -TCP-a

U čašu od 250 mL dodano je 90 mL otopine  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , nakon čega se postavlja na magnetsku miješalicu i u nju se uranja pH metar. Pipetom se postupno, u malim količinama, dodava otopina  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  dok se ne doda 60 mL, što odgovara omjeru kalcijevih i fosforovih iona u omjeru od 1,5 ( $\text{Ca}/\text{P}=1,5$ ), uz praćenje pH na pH-metru. Dodatkom amonijevog hidrogenfosfata dolazi do pada pH vrijednosti otopine, pri čemu se mora paziti da ne padne ispod  $\text{pH}=6,5$ . Pipetom se dodaje prethodno pripremljena 1 % otopina amonijakove lužine kako bi se regulirao pH po potrebi. Tokom postupnog dodavanja može se primijetiti



zamućenje otopine bijelim prahom. Za potrebe ovog rada pripremljene su dvije otopine na ovaj način.

U prvu ovako pripremljenu otopinu se dodalo 0,0142 g odvage  $\text{MgCl}_2$ , dok se u drugu otopinu dodalo 0,0151 g  $\text{SrCl}_2$ . Obje odvage odgovaraju 1 % masenom udjelu krajnjeg produkta. Obje otopine se ostavljaju na 24 h prilikom čega se konstantno miješaju magnetskom miješalicom. Nastali talozi se filtriraju vakuum filtracijom, nakon čega ih se stavlja na sušenje u peći na 200 °C tokom 24 h. Dio taloga od svake pripremljene otopine se odvaja za potrebe DTA analize. Ostatak od oba taloga se sinterira u peći 24 h na 900 °C, kako bi se dobio dopirani  $\beta$ -TCP.

### 3.3. Karakterizacija pripremljenih uzoraka

#### 3.3.1. Pretražna elektronska mikroskopija

Praškasti uzorci prije i nakon sinteriranja su mikroskopirani pretražnim elektronskim mikroskopom *Tescan Vega 3* te su snimljene slike pod uvećanjem od 1000, 5000 te 10 000 puta za praškaste uzorke prije i nakon provedbe sinteriranja. Prije analize uzorci su podvrgnuti neparivanju zlatom u struji argonske plazme koja sublimira zlatnu metu na uzorke čime se površina uzoraka prekriva tankim slojem zlata i omogućava bolje električnu provodnost.



Slika 11. *Tescan Vega 3* pretražni elektronski mikroskop [13]

### 3.3.2. Rendgenska difrakcija na praškastom uzorku

Rendgenska analiza na praškastim uzorcima provedena je na uređaju *Shimadzu XRD 6000* s  $\text{CuK}\alpha$  zračenjem. Uzorci su snimljeni u području od  $20^\circ$  do  $70^\circ 2\theta$  koracima po  $0,02^\circ$ .



Slika 12. *Shimadzu XRD 6000* [14]

### 3.3.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

Za potrebe analize dobivenih uzoraka korištena je infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom *Bruker VERTEX 70* sa ATR sondom. Raspon mjernog područja spektara iznosio je od  $4000$  do  $375\text{ cm}^{-1}$  sa rezolucijom od  $0,5\text{ cm}^{-1}$ .



Slika 13. *Bruker VERTEX 70* [15]

### 3.3.4. Termogravimetrijska i diferencijalna toplinska analiza

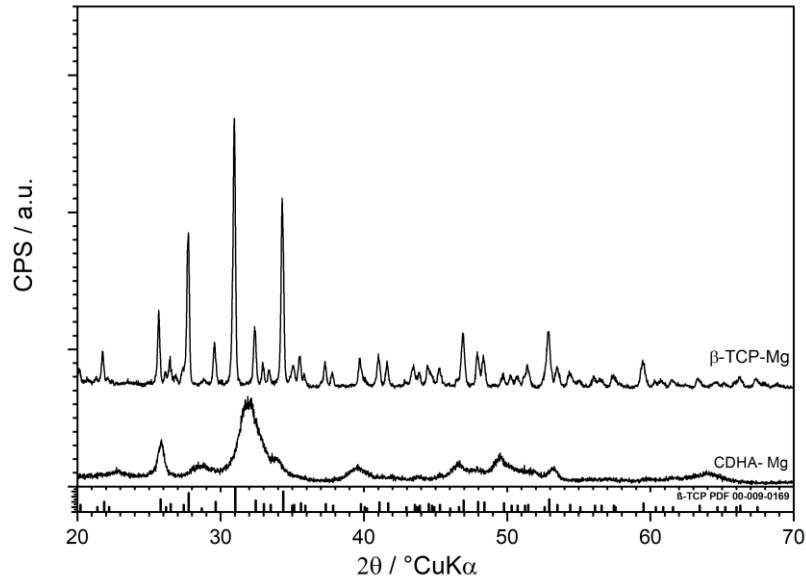
Toplinska svojstva dobivenih uzoraka dopiranog kalcij deficitnog hidroksiapatita su ispitana termogravimetrijskom i diferencijalnom toplinskom analizom istodobno na uređaju *Netsch STA 409*. Za potrebe analize ~60mg uzorka stavljeno je u platinski lončić i zagrijavano brzinom od  $10\text{ °C min}^{-1}$  u struji sintetskog zraka od sobne temperature do  $1300\text{ °C}$ .



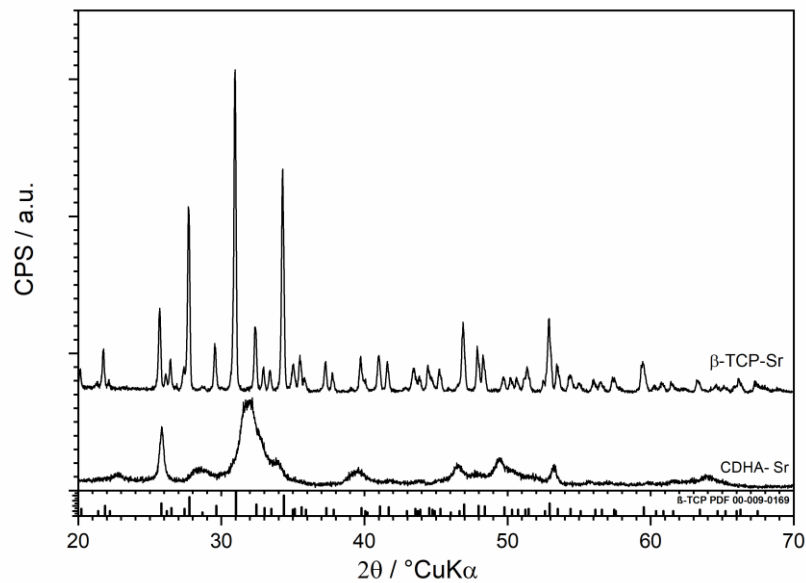
Slika 14. *Netsch STA 40* [16]

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rendgenska difrakcija na praškastom uzorku



Slika 15. Difraktogram CDHA dopiranog sa  $Mg^{2+}$  ionima i  $\beta$ -TCP-a dobivenog njegovim sinteriranjem



Slika 16. Difraktogram CDHA dopiranog sa  $Sr^{2+}$  ionima i  $\beta$ -TCP-a dobivenog njegovim sinteriranjem

Slika 15. i 16. prikazuju difraktograme pripremljenih uzoraka sa dodatkom  $Mg^{2+}$ , tj.  $Sr^{2+}$  iona. Na x-osi se nalaze vrijednosti mjerenog kuta  $2\theta$ , dok je intenzitet zračenja na y-osi te je prikazan u arbitrarnim jedinicama.

Rendgenski difraktogrami pripremljenih prašaka CDHA posjeduju djelomičnu kristalnu strukturu sa amornim elementima koji se prilikom rendgenske difrakcije iskažu kao pikovi visokog intenziteta ali sa značajnim proširenjem. Usporedbom difraktograma sa literaturnim podacima nisu zapažena odstupanja od difraktograma pronađenih u literaturi [17].

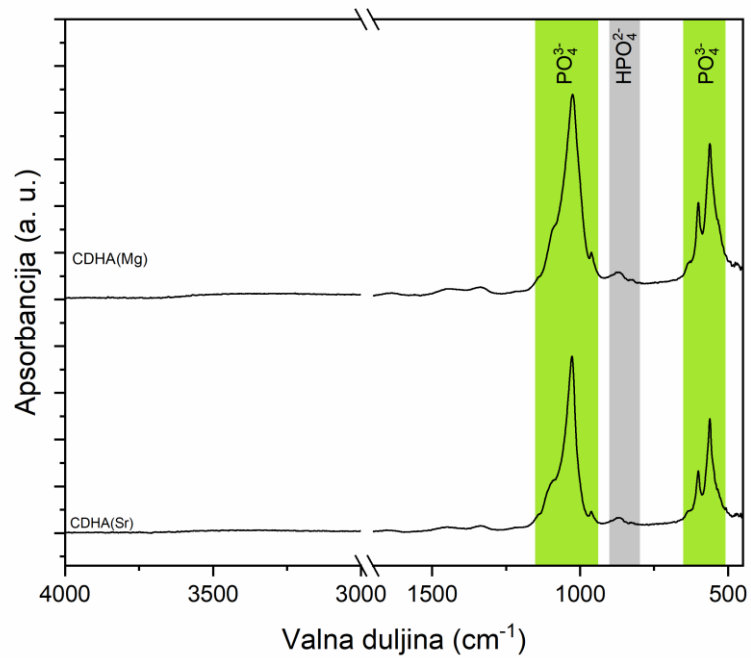
Sintetizirani uzorci  $\beta$ -TCP-a pokazuju velika preklapanja sa referentnom karticom, pogotovo u području pika najvećeg intenziteta koji se nalazi na  $\sim 31,03^\circ$ . Uz preklapanje može se primijetiti i blagi pomak pikova prema lijevo naprema referentnoj kartici u vrijednostima manjim od  $0,1^\circ$  što ukazuje na blagi porast veličine kristalne ćelije zbog ulaska dopanata ( $Mg^{2+}$  i  $Sr^{2+}$  iona) u kristalnu ćeliju. Ulaskom dvovalentnih kationa na mjesta  $Ca^{2+}$  iona dovelo je do naprezanja kristalne ćelije zbog razlike u atomskom radijusu kalcija od radijusa magnezija tj. stroncija. Za očekivati je da je došlo do pomaka pikova prema lijevo u slučaju uzorka dopiranog stroncijevim ionom zbog toga što je stroncijev ionski radijus veći od kalcijevog, pa njegov ulazak u kristalnu rešetku djeluje na veličinu kristalne rešetke uslijed njezinog naprezanja i širenja kako bi se akomodirao ion većeg radijusa, što odgovara Vegardovom zakonu. S obzirom da je rendgenskom analizom primijećeno kako i magnezij dopirani  $\beta$ -TCP pokazuje pomake pikova ulijevo, što je suprotno Vegardovom zakonu, očekivano je da će magnezijev ion zbog manjeg ionskog radijusa od uzrokovati pomake intenziteta zračenja udesno. Pretpostavka je da su magnezijevi kationi zauzeli intersticijska mjesta unutar kristalne rešetke te time doveli do povećanja njezinih parametara što se očituje u pomaku pikova intenziteta zračenja prema lijevo kao i kod Massit i suradnika [18] te kod Saleh i suradnika [19] pri malim količinama dodanog magnezija.

Nadalje, usporedbom mjerenja sa referentnom karticom dolazi i do pojave porasta intenziteta rendgenskog zračenja pri određenim kutovima  $2\theta$  gdje se nisu prethodno nalazili takvi intenziteti. Uz pojavu novih intenziteta zamijećeno je da je došlo i do povećanja i smanjenja određenih pikova koji su karakteristični za čisti  $\beta$ -TCP. Ovakva mjerenja ukazuju na promjenu unutrašnje strukture same kristalne ćelije, s obzirom da nastajanje novih intenziteta zračenja pri kutovima gdje se oni nisu prethodno javljali nam govori da se dodatkom dopanata unutar kristalne ćelije uz njezino širenje odvija i stvaranje novih simetrija ravnine. S obzirom na količinu dodanih dopanata koja iznosi 1 % masenog udjela, promjene koje se mogu zamijetiti

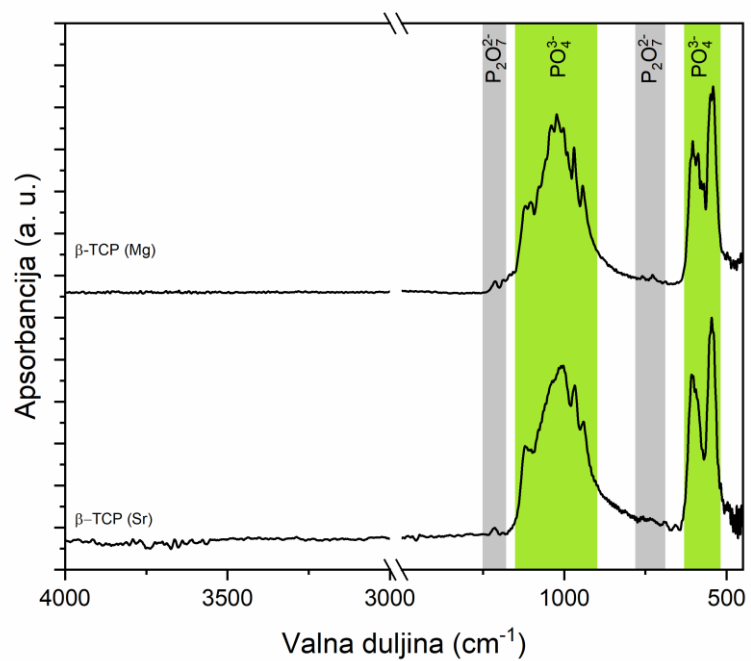
u difraktogramu nisu velike, ali ukazuju na to da su kationi dopanata uspješno smješteni unutar kristalne ćelije s obzirom na vidljive promjene rendgenskog difraktograma [6].

Analizom difraktograma sinteriranog uzorka dopiranog sa  $Mg^{2+}$  ionom novi intenziteti zračenja koji ne pripadaju ortofosfatu se pojavljuju pri kutovima  $20,66^\circ$ ,  $23,52^\circ$ ,  $26,88^\circ$  te  $29,96^\circ$ . Svi novonastali pikovi su relativno niskog intenziteta zračenja te se kao takvi mogu pripisati djelovanju  $Mg^{2+}$  iona na simetrije ravnine unutar kristalne rešetke  $\beta$ -TCP-a, tj., smanjenju njezine kristaliničnosti. Ti pikovi se mogu većinski pripisati  $\beta$ -kalcij pirofosfatnoj fazi, čija je kristalizacija uzrokovana lokalnom nestehiometrijom [20]. Osim pojave novih pikova zapaženi su i smanjeni intenziteti pikova karakterističnih za  $\beta$ -TCP, ovakvo smanjenje intenziteta se može pripisati ulasku manjeg magnezijevog kationa unutar kristalne rešetke, kao što su primijetili Saleh i sur. [19]. Nadalje, uz smanjenja određenih pikova došlo je i do povećanja pikova intenziteta pri kutovima difrakcije od  $26,12^\circ$  i  $28,82^\circ$ . Povećanje intenziteta zračenja pri ovim kutovima difrakcije se isto može pripisati djelovanju ulaska manjeg magnezijevog kationa na strukturu kristalne rešetke. Difraktogram sinteriranog uzorka dopiranog  $Sr^{2+}$  pokazuje novonastali pik intenziteta zračenja samo pri kutu od  $26,9^\circ$ . Uz novonastali pik na difraktogramu uzorka se ujedno i povećao intenziteti zračenja pri kutu difrakcije  $26,12^\circ$ . Ujedno je došlo i do smanjenja pika intenziteta zračenja pri  $42,88^\circ$ . Značajnija smanjenja ili povećanja intenziteta pikova karakterističnih za  $\beta$ -TCP, osim prethodno spomenutih pikova za ovaj uzorak, nisu zapažena. Difraktogramom nije pokazano širenje intenziteta zračenja za uzorke dopiranog  $\beta$ -TCP-a stoga je moguće zaključiti da kristalnost ovakvim načinom dopiranja nije narušena, te svi dostupni podaci nagovještaju da su dodani kationi,  $Mg^{2+}$  i  $Sr^{2+}$  prilikom mokre precipitacije uspješno ugrađeni u kristalnu rešetku [20, 21].

## 4.2. Infracrvena spektroskopija sa Fourierovom transformacijom



Slika 17. FTIR spektar sintetiziranih CDHA praškastih uzoraka sa dodanim dopandom



Slika 18. FTIR spektar sintetiziranih uzoraka  $\beta$ -TCP-a

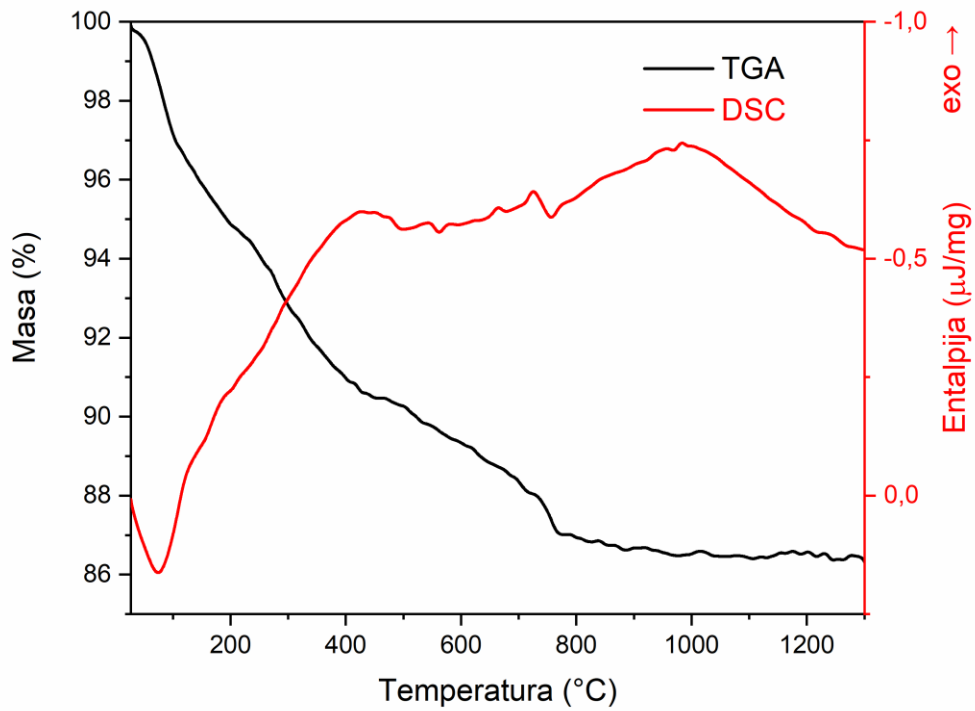
Slikama 17. i 18. su prikazani ATR-FTIR spektri za praškaste uzorke prekursora te sinteriranog  $\beta$ -TCP-a. Na x-osi su vrijednosti valnog broja u  $\text{cm}^{-1}$ , a na y-osi je apsorbancija u arbitrarnim jedinicama. Zasebno su objedinjeni spektri nesinteriranih i sinteriranih uzoraka radi lakše preglednosti.

Na slici 17. prikazani su ATR-FTIR spektri za uzorke dobivenih prahova CDHA dopiranih sa  $\text{Mg}^{2+}$  tj.  $\text{Sr}^{2+}$  ionima. Iz priloženog se može vidjeti da nema razlike u ATR-FTIR spektrima ovih dvaju uzoraka. Spektri pokazuju signale značajnog intenziteta u području  $560\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ ,  $1020\text{-}1120\text{ cm}^{-1}$  te pri  $960\text{ cm}^{-1}$  (označeni zelenom bojom na slici 17.) što odgovara karakterističnim signalima za grupu kalcij deficitnih apatita. Signal pri  $875\text{ cm}^{-1}$  se pojavljuje zbog istežanja  $\text{HPO}_4^{2-}$  veza u hidrogenfosfatnim grupama (označen sivom bojom na slici 17.). Slabi signali u području od  $1350$  do  $1450\text{ cm}^{-1}$  su tipični za karbonatnu grupu [21]. Pojava karakterističnih signala u prethodno spomenutim područjima valne duljine ukazuje na nastanak te visoku čistoću kalcij deficitnog hidroksiapatita, što potvrđuje rendgensku analizu pripremljenih uzoraka.

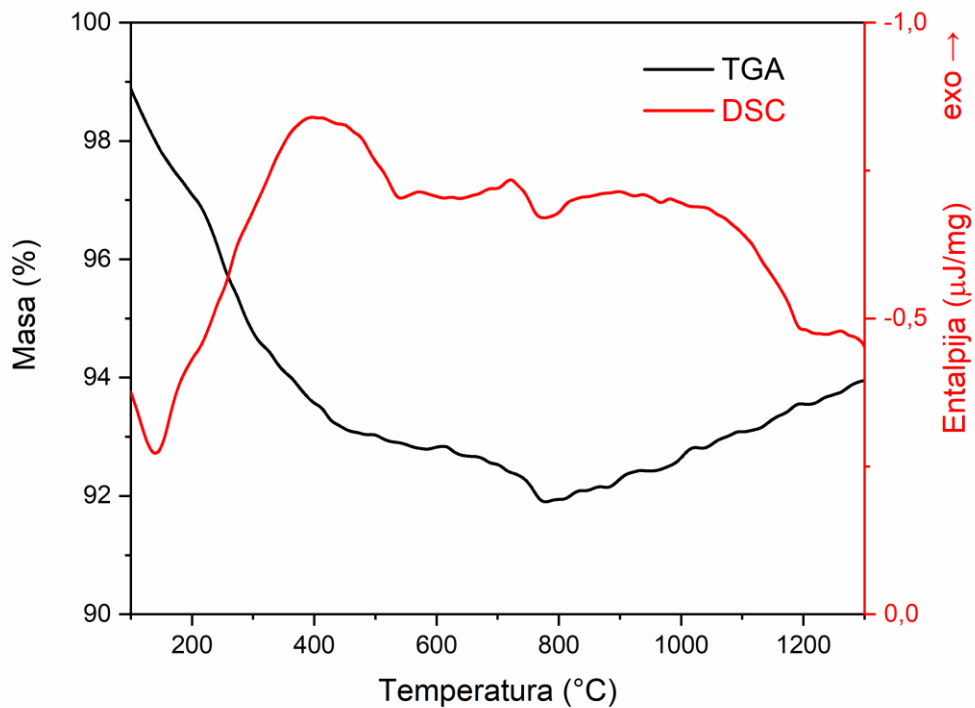
ATR-FTIR spektri na slici 18. pripadaju analiziranim uzorcima sinteriranih prašaka CDHA dopiranih sa  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionima. Njihovom usporedbom se ne može primijetiti značajna međusobna razlika spektara. Oba spektra pokazuju intenzitete u rasponu od  $1120\text{-}960\text{ cm}^{-1}$ , te  $610\text{-}540\text{ cm}^{-1}$  koji odgovaraju tetraedarskoj strukturi  $\beta$ -TCP-a [21]. Intenziteti u rasponu od  $1050$  do  $1100\text{ cm}^{-1}$  odgovaraju antisimetričnom vibracijskom istežanju trostruko degenerirane  $\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$ , dok intenzitet pri  $960\text{ cm}^{-1}$  odgovara simetričnom istežanju  $\text{PO}_4^{3-}$ . Intenziteti u rasponu od  $610$  do  $540\text{ cm}^{-1}$  se pripisuju  $\nu_4$  antisimetričnom istežanju  $\text{PO}_4^{3-}$ . Zamijećeni su i intenziteti pri  $\sim 725\text{ cm}^{-1}$  te pri  $\sim 1215\text{ cm}^{-1}$  koji odgovaraju pirofosfatnoj,  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$  grupi [18]. S obzirom da su intenziteti relativno niskog intenziteta može se pretpostaviti da je količina pirofosfatne grupe u sintetiziranom uzorku mala. Svi prisutni intenziteti ukazuju na uspješnu sintezu  $\beta$ -trikalcijevog fosfata, uz prisutnost pirofosfata u tragovima.



### 4.3. Termogravimetrijska i diferencijalna toplinska analiza



Slika 19. TGA i DTA krivulje  $Mg^{2+}$  dopiranog uzorka CDHA



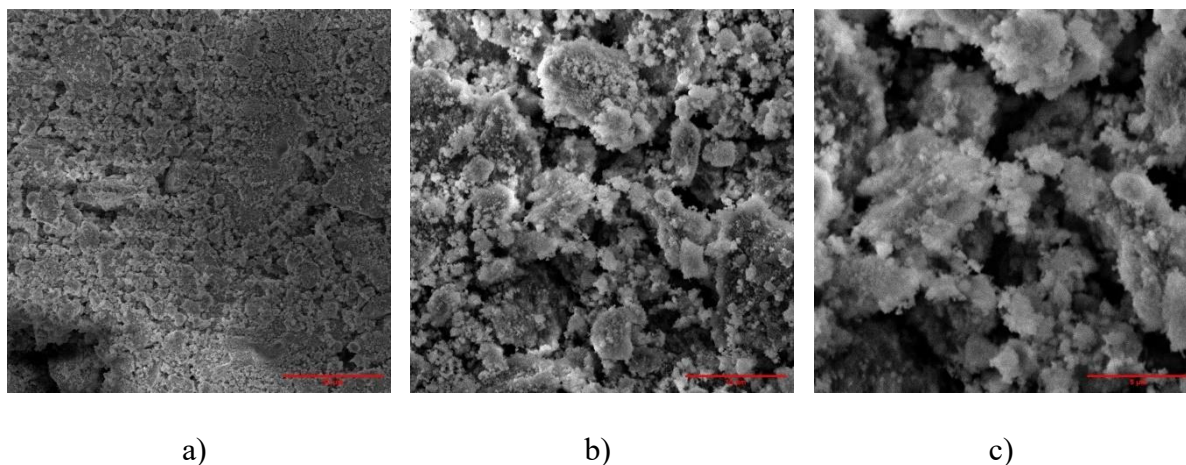
Slika 20. TGA i DTA krivulje  $Sr^{2+}$  dopiranog uzorka CDHA

Sintetizirani prašci CDHA podvrgnuti su termografskoj i diferencijalnoj toplinskoj analizi u rasponu temperature od sobne temperature 25 °C do 1300 °C. Mjerenja prikazana za CDHA dopiran sa  $Mg^{2+}$  ionima su spojena u jedan prikaz, isto kao i mjerenja za CDHA dopiran sa  $Sr^{2+}$  ionima, radi lakše preglednosti. Na x-osi je prikazana temperatura u stupnjevima Celzijusa. Na y-osi sa lijeve strane prikaza nalazi se postotna masa, dok se na y-osi sa desne strane nalazi entalpija izražena u  $\mu J/mg$ . Pripadni rezultati mjerenja su u istoj boji kao i y-os.

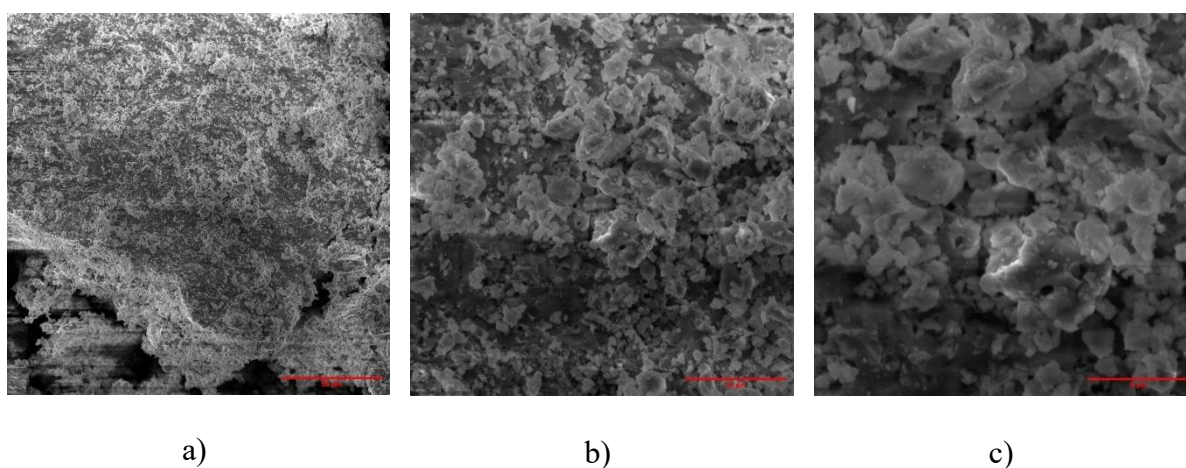
Prva zamjetna promjena se pri oba mjerenja primjećuje pri temperaturi od  $\sim 80$  °C što odgovara uslijed isparivanja vode koji je endoterman proces, stoga je krivulja diferencijalne termalne analize značajno upuštena pri toj temperaturi. Unutar ovog temperaturnog intervala zamijećena je i najveća promjena mase uslijed isparavanja adsorbirane i molekularne vode. U temperaturnom intervalu od 200 do 400 °C promjena mase uzrokovana je isparavanjem kristalne vode. Od 165-500 °C odvija se promjena mase uzrokovana isparavanjem zaostataka kemikalija sinteze - amonijaka i amonijevog nitrata [22]. Unutar temperaturnog intervala od 220 °C do 470 °C moguća je i djelomična transformacija CDHA u kalcijev pirofosfat,  $Ca_2P_2O_7$ , objašnjava prethodno zapažanja na postojanje intenziteta valnih duljina koji odgovaraju pirofosfatnoj skupini na ATR-FTIR spektru. Na DTA prikazu se unutar temperaturnog intervala od 470 do 620 °C primjećuje endotermni brijeg koji se može objasniti unutarnjom reorganizacijom strukture uzrokovanom temperaturnom promjenom. Nagla promjena mase u intervalu od 730 do 770 °C može se objasniti dekarboksilacijom postojeće apatitne strukture pri čemu se izdvaja  $CO_2$  te dolazi i do izbacivanja intersticijske vode iz kristalne strukture. Unutar tog intervala u oba slučaja može se primijetiti i nagli endotermni porast energije uzrokovan prelaskom kalcij deficitnog hidroksiapatita u  $\beta$ -trikalcijev fosfat [23]. S obzirom da literaturni podaci pokazuju da se ta promjena za čisti CDHA odvija pri 800 °C [4], ovakvo ponašanje dopiranih uzoraka govori da je temperatura prelaska dopiranih CDHA u  $\beta$ -TCP niža. Početak prelaska CDHA u  $\beta$ -TCP kod uzorka dopiranog sa  $Mg^{2+}$  ionom započinje pri  $\sim 750$  °C dok kod uzorka dopiranog sa  $Sr^{2+}$  ionom početak prijelaza se odvija pri  $\sim 775$  °C, što se iskazuje sa endotermnom promjenom pri tim temperaturama. Ispitivanjem uzorka dopiranog  $Mg^{2+}$  nije zamijećena endotermna promjena nakon prijelaza u  $\beta$ -TCP što označuje da se daljnji prijelaz  $\beta$ -TCP-a u  $\alpha$ -TCP ne odvija prema teoretskoj temperaturi, već se može pretpostaviti da se temperatura prijelaza pomiče pri temperaturama višim od 1300 °C što je van parametara provedenog mjerenja. Kod uzorka dopiranog sa  $Sr^{2+}$  dolazi do endotermne

promjene pri 1200 °C uz porast mase uzorka, što ukazuje na prijelaz  $\beta$ -TCP-a u  $\alpha$ -TCP na višoj temperaturi od literaturne koja iznosi 1125 °C [4].

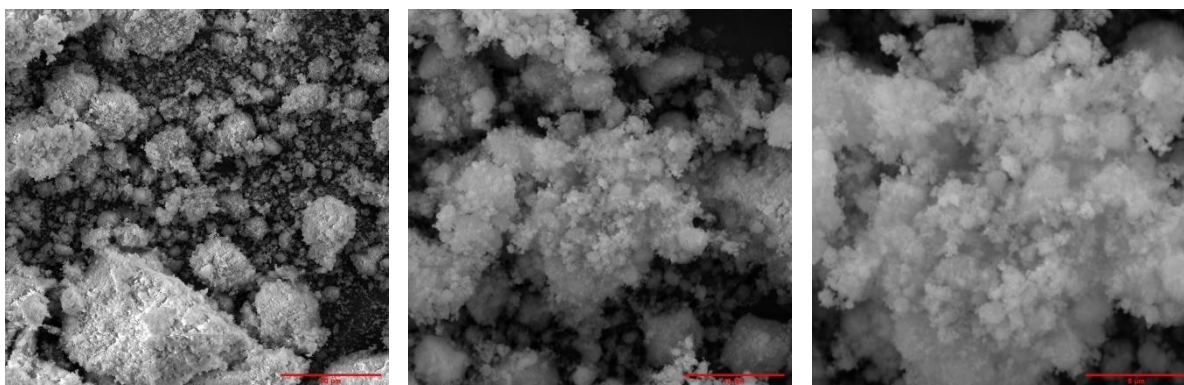
#### 4.4. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)



Slika 21. Mikrografije uzorka CDHA dopiranog  $Mg^{2+}$  ionom prije sinteriranja pri raznim uvećanjima: a) 1000x, b) 5000x i c) 10000x



Slika 22. Mikrografije uzorka  $\beta$ -TCP-a dopiranog  $Mg^{2+}$  ionom nakon sinteriranja pri raznim uvećanjima: a) 1000x, b) 5000x i c) 10000x

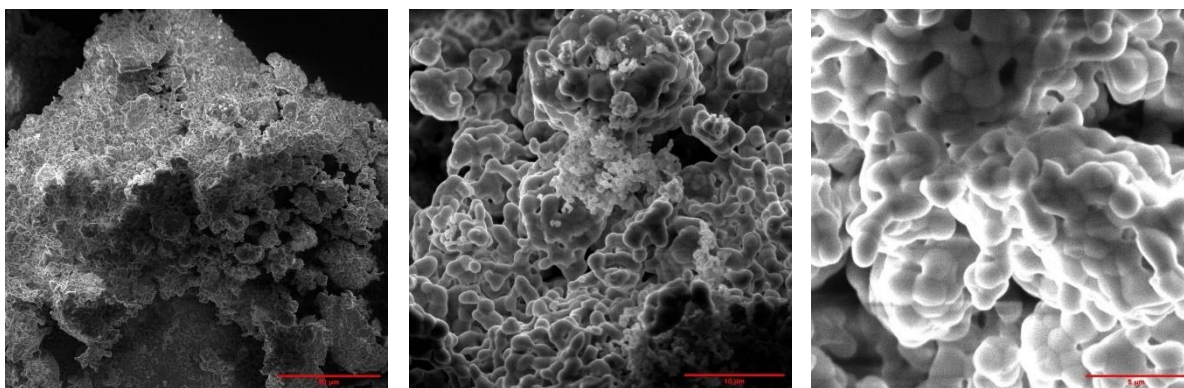


a)

b)

c)

Slika 23. Mikrografije uzorka CDHA dopiranog  $\text{Sr}^{2+}$  ionom prije sinteriranja pri raznim uvećanjima: a) 1000x, b) 5000x i c) 10000x



a)

b)

c)

Slika 24. Mikrografije uzorka  $\beta$ -TCP-a dopiranog  $\text{Sr}^{2+}$  ionom nakon sinteriranja pri raznim uvećanjima: a) 1000x, b) 5000x i c) 10000x

Na slikama od 21. do 24. prikazane su snimljene mikrografije pri različitim povećanjima na skenirajućem elektronskom mikroskopijom. Na slikama koje prikazuju mikrografije dopiranih uzoraka CDHA (slike 21. i 23.) može se primijetiti kako su čestice sitne i neuređene strukture sa oštrim rubovima bez naznake lokalne uređenosti sustava što je tipično za tvari niske kristalnosti. Mikrografske slike sinteriranih uzoraka pokazuju određenu uređenost

sustava te je vidljivo da je procesom sinteriranja provedeno srastanje odvojenih kristalita u veće kontinuirane aglomerate koji se odlikuju poroznošću. Veća poroznost se može primijetiti kod uzorka dopiranog stroncijevim kationom gdje se na slici 24. dijelu b) vide i naznake lokalne sekundarne nukleacije u obliku manjih čestica naslaganih na veće čestice. Ujedno se može primijetiti i veći stupanj koalescencije uslijed sinteriranja kod uzorka dopiranog stroncijevim ionom naprema sinteriranom uzorku dopiranog magnezijem čije čestice pokazuju manji stupanj srastanja te su bliže po morfologiji njegovog prekursora nego uzorku dopiranog stroncijem.

## 5. ZAKLJUČAK

Mokrom precipitacijom sintetizirani su uzorci CDHA uz dodatak  $Mg^{2+}$  i  $Sr^{2+}$  iona, kako bi se ispitao utjecaj dodatka dvovalentnih kationa na kristalizaciju i temperaturu prijelaza CDHA u  $\beta$ -trikalcijev fosfat, te daljnji prijelaz u  $\alpha$ -trikalcijev fosfat. Uzorci CDHA su sintetizirani u prahu te okarakterizirani rendgenskom difrakcijom, infracrvenom spektroskopijom, pretražnom elektronskom mikroskopijom te termogravimetrijskom i diferencijalnom toplinskom analizom. Uzorci sinterirani na  $900\text{ }^{\circ}\text{C}$  su podvrgnuti rendgenskoj difrakciji, infracrvenoj spektroskopiji te pretražnoj elektronskoj mikroskopiji. Analizom uzoraka utvrđeno je da je sinteza dopiranog kalcij deficitnog hidroksiapatita jednostavna sinteza koja daje materijale visoke čistoće i precizno definirane kristalne strukture što je potvrđeno rendgenskom difrakcijom na praškastom uzorku te pretražnom elektronskom mikroskopijom. Dopanti koji su korišteni u ovoj sintezi su doveli do širenja kristalne rešetke, što je potvrđeno analizom difraktograma. Stroncijev kation je doveo do značajnijeg povećanja parametara jedinične ćelije u odnosu na magnezijev ion, što je u skladu sa očekivanim zbog potrebe akomodacije većeg stroncijevog iona unutar kristalne rešetke. Širenje kristalne rešetke magnezijevim kationom je neočekivano s obzirom na njegov manji ionski radijus od kalcijevog te je ostvarivo samo prilikom njegovog zauzimanja intersticijskih mjesta unutar strukture. Diferencijalna termalna analiza je provedena kako bi se analizirao prijelaz  $\beta$ -trikalcijevog fosfata u  $\alpha$ -trikalcijev fosfat te je ustanovljeno da dopanti povisuju temperaturu prijelaza.

## 6. POPIS SIMBOLA

$\beta$ -TCP	beta trikalcijev fosfat (engl. beta tricalcium phosphate)
$\alpha$ -TCP	alfa trikalcijev fosfat (engl. alpha tricalcium phosphate)
ATR	tehnika prigušene totalne refleksije (engl. attenuated total reflectance)
BCP	dvofazni kalcijev fosfat (engl. biphasic calcium phosphate)
CDHA	kalcij deficitni hidroksiapatit (engl. amorphous calcium phosphate)
DCPA	dikalcijev fosfat anhidrid (engl. anhydrous dicalcium phosphate)
DCPD	dikalcijev fosfat dihidrat (engl. dicalcium phosphate dihydrate)
DTA	diferencijalna termalna analiza (engl. differential thermal analysis)
FTIR	infracrvena spektroskopija sa Fourierovom transformacijom (engl. Fourier-transform infrared spectroscopy)
HA	hidroksiapatit
MCPM	monokalciij fosfat monohidrat (engl. monohydrated monocalcium phosphate)
PXRD	rendgenska difrakcija na praškastom uzorku (engl. powder X-ray diffraction)
SEM	pretražna elektronska mikroskopija (engl. scanning electron microscopy)
TGA	termogravimetrijska analiza (engl. thermogravimetric analysis)

## 7. LITERATURA

- [1] Heimann, R.B. and Lehmann, H.D. (2015). Bioceramic coatings for medical implants : trends and techniques. Weinheim, Germany: Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co. Kga.
- [2] Milne, Ritchie, R.O. and B Karihaloo (2003). Comprehensive structural integrity. Volume 9, Bioengineering. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Pergamon.
- [3] Poitout, D.G. (2016). Biomechanics and Biomaterials in Orthopedics. London Springer.
- [4] T Kokubo (2008). Bioceramics and their Clinical Applications. Elsevier.
- [5] Dorozhkin, S.V. (2016). Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics and Biocomposites. John Wiley & Sons.
- [6] Sharifah Adzila, Mardziah Che Murad and Iis Sopyan (2012). Doping Metal into Calcium Phosphate Phase for Better Performance of Bone Implant Materials. 5(1), pp.18–47. doi:<https://doi.org/10.2174/1874465611205010018>.
- [7] Anwar Ul-Hamid (2018). A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy. Cham Springer International Publishing.
- [8] Tare, M. et al. (2009) “Drosophila adult eye model to teach Scanning Electron Microscopy in an undergraduate cell biology laboratory”
- [9] Yoshio Waseda, Eiichiro Matsubara, Kozo Shinoda and Springerlink (Online Service (2011). X-Ray Diffraction Crystallography : Introduction, Examples and Solved Problems. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- [10] Wagner, M. (2018) Thermal analysis in practice : fundamental aspects. Cincinnati, Ohio: Hanser Publications.
- [11] C S, S., (2017) Synthesis of silver nanoparticles using silk fibroin : characterization and potential antibacterial properties.
- [12] Griffiths, P.R. and De, J.A. (2007). Fourier Transform Infrared Spectrometry. John Wiley & Sons.
- [13] <https://www.tescan.com/product/sem-for-materials-science-tescan-vega/>
- [14] [https://www.fkit.unizg.hr/en/science/scientific\\_equipment](https://www.fkit.unizg.hr/en/science/scientific_equipment)



- [15] <https://www.era.ac.uk/facilities-database/drift-vertex-70-ft-ir-spectrometer/>
- [16] <https://speciation.net/Database/Instruments/NetzschGeraetebau-GmbH/STA-409-CD-Simultaneous-thermal-analyzer-;i2007>
- [17] Sampath Kumar, T.S., Madhumathi, K., Rubaiya, Y. and Doble, M. (2015). Dual Mode Antibacterial Activity of Ion Substituted Calcium Phosphate Nanocarriers for Bone Infections. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3. doi:<https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00059>.
- [18] Massit, A., Fathi, M., Yacoubi, A. E., Kholtei, A., & Idrissi, B. C. E. (2018). Effect of physical and chemical parameters on the  $\beta$ -Tricalcium phosphate synthesized by the wet chemical method. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 7(3), 234–242. <https://doi.org/10.13171/mjc7310268-elidrissi>
- [19] Saleh, A., Lee, S., and Hussain, R. 2016. Injectable magnesium-doped brushite cement for controlled drug release application. *Journal of Materials Science*, 51.
- [20] Gars, L., Niggli, L., Dolder, S., Loeffel, O., Sblendorio, G.A., Heuberger, R., Y. Maazouz, C. Stähli, N. Döbelin, Bowen, P., Hofstetter, W. and Bohner, M. (2022). Effect of minor amounts of  $\beta$ -calcium pyrophosphate and hydroxyapatite on the physico-chemical properties and osteoclastic resorption of  $\beta$ -tricalcium phosphate cylinders. *Bioactive materials*, 10, pp.222–235. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.09.003>.
- [21] XRD and FTIR Analysis of Magnesium Substituted Tricalcium Calcium Phosphate Using a Wet Precipitation Method. (2020). *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(1), 8034–8042. <https://doi.org/10.33263/briac111.80348042>
- [22] Somers, N. et al. (2021) ‘Influence of dopants on thermal stability and densification of  $\beta$ -tricalcium phosphate powders’, *Open Ceramics*, 7, p. 100168. doi: 10.1016/j.oceram.2021.100168.
- [23] Zahra, Gandou & Nounah, Abderrahmane & Nouneh, Khalid & Yahyaoui, Adil. (2016). Effect of time of microwave activation synthesis on crystallite size of spheroid  $\beta$  Tricalcium Phosphate nanopowders. *JMES*. 7. 1653-1662.