



**VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS INSTITUTAS
NEORGANINĖS CHEMIJOS KATEDRA**

Gabrielė Klydžiūtė

Chemija

Magistro baigiamasis darbas

**METALŲ JONAIŠ PAKEISTŲ KALCIO HIDROKSIAPATITŲ
SINTEZĖ HIDROTERMINIU BŪDU BEI SAVYBIŲ TYRIMAS**

Darbo vadovas
Prof. habil. dr. Aivaras Kareiva

Vilnius 2023



**VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES
INSTITUTE OF CHEMISTRY
DEPARTMENT OF INORGANIC CHEMISTRY**

Gabrielė Klydžiūtė

Chemistry
Master thesis

**CHARACTERIZATION OF METAL IONS-SUBSTITUTED
CALCIUM HYDROXYAPATITES SYNTHESIZED BY
HYDROTHERMAL METHOD**

Scientific adviser
Prof. Habil. Dr. Aivaras Kareiva

Vilnius 2023

TURINYS

SANTRUMPOS	1
ĮVADAS	2
1. Literatūros apžvalga	3
1.1. Kalcio hidroksiapatito (HA) struktūra	3
1.2. Kalcio pakeitimas kitais katijonais hidroksiapatite.....	5
1.2.1. Kalcio pakeitimas vienvaleščiais katijonais HA.....	6
1.2.2. Kalcio pakeitimas dvivaleščiais katijonais HA.....	7
1.2.3. Kalcio pakeitimas trivaleščiais katijonais HA	9
1.3. HA sintezės metodai	10
1.4. HA savybės ir taikymai.....	13
2. EKSPERIMENTINĖ DALIS	22
2.1. Naudotos medžiagos ir reagentai	22
2.2. HA sintezės procesas	22
2.3. Tyrimo metodai.....	23
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	24
3.1. Pirmtako sintezė ir apibūdinimas.....	24
3.2. HA sintezė ir apibūdinimas.....	27
3.3. Metalų jonais pakeistų HA pavyzdžių sintezė ir apibūdinimas	28
3.3.1. Metalų jonai struktūroje	28
3.3.1.1. Apibūdinimas XRD analizės metodu	29
3.3.1.2. Apibūdinimas SEM metodu.....	30
3.3.1.3. Apibūdinimas FTIR metodu	31
3.3.1.4. ICP-OES tyrimas	32
3.3.1.5. EPR tyrimas	33
3.3.2. Metalų jonai tirpale.....	34
3.3.2.1. Apibūdinimas XRD analizės metodu	34
3.3.2.2. Apibūdinimas SEM metodu.....	38
3.3.2.3. Apibūdinimas FTIR metodu	41
3.3.2.4. ICP-OES tyrimas	43
IŠVADOS	45
LITERATŪROS SĄRAŠAS	46
SANTRAUKA	50
SUMMARY	52

PRIEDAI 55

SANTRUMPOS

ACP	Amorfinis kalcio fosfatas
Ca/P	Kalcio ir fosforo jonų santykis junginyje
CaP	Kalcio fosfatai
CDHA	Kalcio deficitinis hidroksiapatitas
DCPA	Bevandenis dikalcio fosfatas
DCPD	Dikalcio fosfato dihidratas
EPR	Elektronų paramagnetinio rezonanso spektrometrija
FTIR	Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija
HA	Hidroksiapatitas
ICP-OES	Induktyviai susietos plazmos optinės emisijos spektrometrija
OCP	Oktakalcio fosfatas
PAM	Paviršiaus aktyvios medžiagos
ROS	Aktyvios deguonies formos
rpm	Apsisukimai per minutę
SEM	Skenuojanti elektroninė mikroskopija
XRD	Rentgeno spindulių difrakcija
α -TCP	α -Trikalcio fosfatas
β -TCP	β -Trikalcio fosfatas

ĮVADAS

Pastaruoju metu vis didėja susidomėjimas biologiškai suderinamomis medžiagomis dėl plataus taikymo medicinoje bei biotechnologijose. Sintetiniai kalcio fosfatai taip pat pasižymi biosuderinamumu. Kalcio hidroksiapatitas (HA) yra viena termodinamiškai stabiliausių kalcio fosfatų fazių [1]. Kalcio hidroksiapatitas pasižymi geru osteopralaidumu, osteointegracija, inertiškumu audiniams ir žemu toksiškumu [2]. Dėl šių savybių HA gan plačiai naudojamas medicinoje kaip kaulų implantai arba metalinių kaulų implantų paviršiui padengti, odontologijoje žandikauliams atauginti bei biotechnologijoje vaistų pernešimo sistemose [3]. Biomedicininės ir mechaninės HA savybės labai priklauso nuo pavyzdžių paviršiaus morfologijos, dalelių dydžio, formos, dispersiškumo, nuo fazinės sudėties, kristališkumo laipsnio, paviršiaus ploto bei poringumo. Šių hidroksiapatitų savybių modifikavimas įmanomas keičiant sintezės parametrus bei reakcijos vykdymo sąlygas, taip dar labiau praplečiant HA panaudojimo galimybes [1].

Bendroji kalcio hidroksiapatitų formulė atitinka $A_{10}(BO_4)_6C_2$, kur A įprastai yra Ca^{2+} jonai. Dėl specifinės HA kristalinės struktūros yra įmanomas A pakeitimas kitais metalų jonais, tokiais kaip Zn^{2+} , Cu^{2+} ir kt. [4]. Katijoniniai pakeitimai daro įtaką kristalografinėms, cheminėms, biologinėms, morfologinėms, terminėms, mechaninėms ir fizikinėms sintetinamo HA savybėms. Taigi, kalcio jonų pakeitimas kitais jonais yra dar vienas būdas išgauti norimas HA savybes bei jas kontroliuoti [5]. Yra žinoma, kad sintetinėse keraminėse medžiagose vienu jonų pakeitimas kitais metalų jonais, pasižyminčiais antibakterinėmis savybėmis, sustiprina tų medžiagų antibakterinį aktyvumą, suteikia antiuždegiminių savybių bei veikia šių junginių paviršiaus krūvį, tirpumą, stabilumą ir kristališkumą [5]. Biomedžiagos, pasižyminčios antibakterinėmis savybėmis, gali būti sėkmingai pritaikomos ne tik kaulų defektų užpildymui, geresnėms implantų dangoms, bet ir odos infekcijų gydymui, mikrobiologiškai užteršto vandens valymui ir t. t. [6].

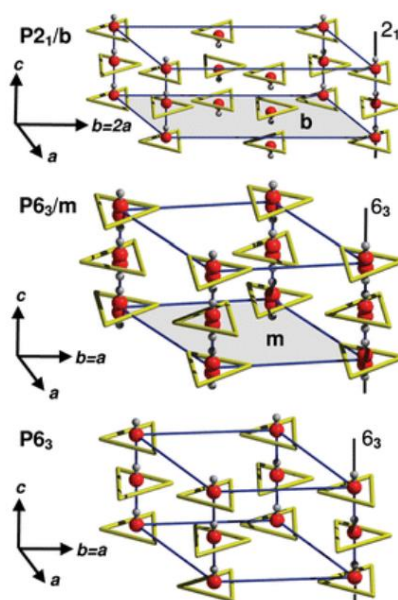
Yra ne vienas metodas sintetinti hidroksiapatitus (zolių-gelių, nusodinimo, kietafazių reakcijų ir t. t.), tačiau ne visi jie leidžia, optimizuojant sintezės vykdymo sąlygas, kontroliuoti minėtas HA savybes. Šio magistro baigiamojo darbo tikslas buvo hidroterminiu būdu susintetinti metalų jonais (Zn^{2+} , Cu^{2+}) legiruotus kalcio hidroksiapatitus, juos apibūdinti ir ištirti kai kurias savybes. Darbo tikslui įgyvendinti iškelti šie pagrindiniai uždaviniai:

- 1) hidroterminiu metodu susintetinti Zn^{2+} ir Cu^{2+} jonais pakeistus kalcio hidroksiapatitus, metalų jonus į hidroksiapatito struktūrą įvedant skirtingais sintezės etapais;
- 2) įvertinti hidroterminės sintezės sąlygų bei į hidroksiapatitų struktūrą įvedamų Zn^{2+} ir Cu^{2+} jonų koncentracijos poveikį galutinio produkto savybėms;
- 3) apibūdinti Zn^{2+} ir Cu^{2+} jonais legiruotų HA pavyzdžių fazinį grynumą, struktūrinius pokyčius, cheminę sudėtį bei paviršiaus morfologiją.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Kalcio hidroksiapatito (HA) struktūra

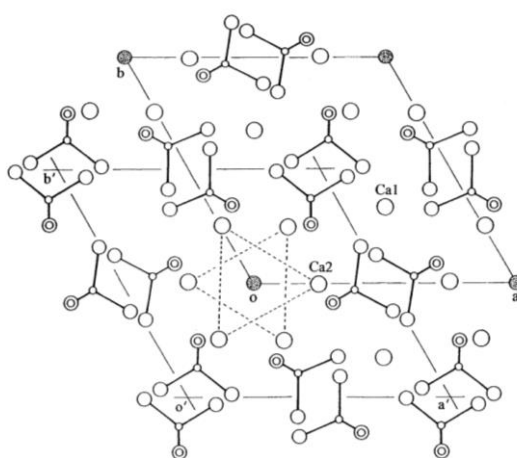
Kalcio hidroksiapatitas (HA; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) yra apatitų šeimos narys, kurių bendroji cheminė formulė $\text{M}_5(\text{ZO}_4)_3\text{X}$ (čia M – metalų jonai, tokie kaip: Ca^{2+} , Cd^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} ar Mg^{2+} ; ZO_4^{3-} – PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , SiO_4^{4-} ar SO_4^{2-} ; X – OH, F, Cl ar CO_3^{2-}). Gryno hidroksiapatito milteliai yra balti, tačiau, priklausomai nuo joninių pakeitimų kristalinėje struktūroje, natūraliai susiformuojantis HA gali būti skirtingų atspalvių – rudos, geltonos ar žalios [7]. HA yra mažai tirpus ir labai stabilus 4,2 – 12,4 pH intervale junginys [8]. Sintetinio HA sudėtis ir struktūra yra gana plačiai išnagrinėta. Yra žinomos dvi HA kristalinės formos: monoklininė struktūra, kuriai būdinga $\text{P}2_1/\text{b}$ erdvinė grupė, bei heksagoninė struktūra, kuriai būdinga $\text{P}6_3/\text{m}$ erdvinė grupė (žr. 1 pav.) [7, 8]. Monoklininės struktūros gardelės parametrai atitinka $a = 9,421 \text{ \AA}$, $b = 2a$, $c = 6,881 \text{ \AA}$ ir $\gamma = 120^\circ$, o heksagoninės struktūros gardelės parametrai – $a = b = 9,432 \text{ \AA}$, $c = 6,881 \text{ \AA}$ ir $\gamma = 120^\circ$ [5, 8].



1 pav. HA kristalinės gardelės struktūros: monoklininė (viršuje), heksagoninė (viduryje), teorinė (apačioje) [11]

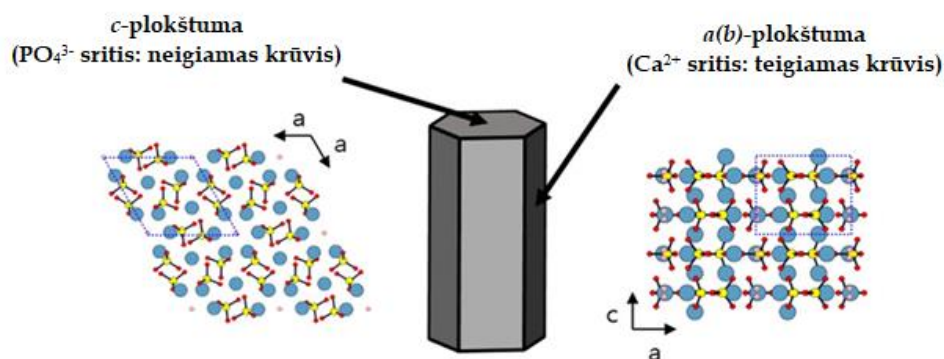
Kalcio hidroksiapatito elementariojoje gardelėje yra 44 atomai. Stechiometrinio (monoklininės struktūros) HA sudėtyje yra 39,68 mol % kalcio ir 18 mol % fosforo, Ca/P santykis atitinka 1,67. Didžiausias skirtumas tarp monoklininės bei heksagoninės struktūros HA yra hidroksilo grupių orientacija. Monoklininės struktūros HA visos vieno stulpelio hidroksilo grupės nukreiptos ta pačia kryptimi, o sekančiame stulpelyje kryptis pasikeičia. Tuo tarpu heksagoninės struktūros HA, dvi gretimos hidroksilo grupės nukreiptos priešingomis kryptimis [12]. Monoklininės struktūros kalcio hidroksiapatitui būdingas tvarkingesnis atomų išsidėstymas bei didesnis termodinaminis stabilumas, tačiau praktiniam pritaikymui jis nėra tinkamas, kadangi jo susiformavimas yra galimas tik esant palankioms terminėms sąlygoms ir vistiek gali būti greitai destabilizuojamas sąveikoje su net ir labai mažais pašalinių jonų kiekiais [13]. Dėl įvairių galimų joninių pakeitimų gardelėje, natūraliai susidaranti HA būdinga heksagoninė struktūra (nestechiometrinis HA) [9].

Stechiometrinio HA elementariosios kristalografinės gardelės formulė yra sudaryta iš dviejų struktūrinių vienetų: $\text{Ca(I)}_4\text{Ca(II)}_6(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (žr. 2 pav.). Anijoniniai HA gardelės struktūriniai vienetai sudaryti iš 6 PO_4^{3-} anijonų, kur kiekvienas P atomas yra susijungęs su 4 deguonies atomais. Kartu jie sudaro lygiakraščius trikampius, kurių centras yra elementariosios gardelės kampai. Kompaktiškas PO_4^{3-} grupių išsidėstymas HA struktūroje sugeneruoja dvi Ca^{2+} jonų padėtis: Ca(I) ir Ca(II). Keturi Ca^{2+} katijonai užima Ca(I) padėtis; šios padėtys yra stulpeliškai lygiagrečios c -ašiai ir apsuptos 9 deguonies atomais iš tetraedrinių PO_4^{3-} . Su 6 deguonies atomais sudaryti ryšiai yra stiprūs (Ca(I) koordinacijos skaičius – 6), o su 3 iš jų silpnesni (vidutinis Ca(I)-O atstumas 0,255 nm). Likusieji šeši Ca^{2+} jonai užima Ca(II) padėtis, taip suformuodami du lygiakraščius trikampius išilgai c -ašies, ties $z = 1/4$ ir $3/4$, ir kiekvienas iš jų susijungia su 6 deguonies atomais iš 5 PO_4^{3-} grupių bei vienu vienvalenčiu anijonu – OH^- (Ca(II) koordinacijos skaičius – 7). Ca(II) srities tūris yra didesnis už Ca(I) [14, 15].



2 pav. Kalcio hidroksiapatito elementarioji kristalografinė gardelė. Gardelės kampuose (pilki apskritimai) yra OH^- grupės [16]

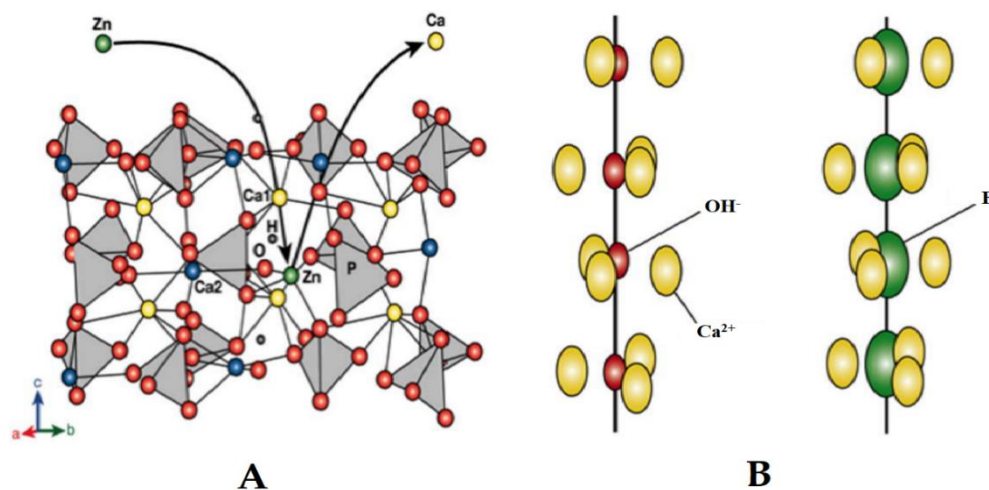
Kalcio hidroksiapatito a ir c plokštumos skiriasi sudėtimi ir atomų išsidėstymu jose (žr. 3 pav.). $a(b)$ plokštuma yra teigiamo krūvio, kadangi joje lokalizuojasi kalcio jonai, o c – fosfatų jonai (neigiamo krūvio) [17].



3 pav. HA kristalinės struktūros plokštumų skirtumai [17]

Tokioje neįprastoje HA kristalinėje struktūroje, elementariojoje gardelėje turinčioje du struktūrinius vienetus, kalcio jonus galima dalinai pakeisti daugeliu kitų metalų jonais, išlaikant pagrindinę apatito struktūrą [7]. Ca^{2+} gali būti pakeistas vienvalečiais (Na^+ , K^+), divalečiais (Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) taip pat ir trivalenčiais (Y^{3+} , Fe^{3+} , Cr^{3+}) katijonais. Vietoje kalcio įvedamų katijonų pasiskirstymas tarp šių dviejų kristalografinių padėčių daugiausiai priklauso nuo joninio spindulio dydžio. Dažniausiai mažesnio joninio spindulio katijonai ar mažos šiek tiek didesnių katijonų koncentracijos yra linkę užimti Ca(I) padėtį, kur yra stipresnės sąveikos su aplinkiniais jonais. Didėsio joninio spindulio katijonai esant didelėmis jų koncentracijomis yra linkę užimti ir Ca(II) poziciją [14].

Įvairūs anijonai gali pakeisti fosfato (CO_3^{2-} , AsO_4^{3-} , VO_4^{3-}) bei hidroksilo (CO_3^{2-} , F^- , Cl^-) grupes. Kartais, norint išlaikyti krūvio balansą, katijoniniai ir anijoniniai pakeitimai vykdomi kartu (pvz., Na^+ pakeičia Ca^{2+} ir CO_3^{2-} pakeičia PO_4^{3-}). Trivalentė anijoninė fosfatų sritis nėra linkusi į vakansijų sudarymą, kadangi tai destabilizuoja gardelę. Priešingai nei anijoninėse srityse, katijoninėse srityse vakansijų susidarymas yra galimas (iki 2 iš 10 padėčių) [14]. Kalcio hidroksiapatito joninių pakeitimų tipai pateikti 4 pav.



4 pav. HA joninių pakeitimų tipai: A – katijoninis pakeitimas, B – anijoninis pakeitimas [18]

Reikia pažymėti, kad HA joninis pakeitimas gali būti būdas keisti pradinės medžiagos fizikines ir chemines savybes: gardelės parametrus, kristalinę struktūrą, kristališkumo laipsnį, dalelių dydį ir formą, mechaninį stiprį, paviršiaus krūvį, poringumą, tirpumą, terminio skilimo kinetiką. Nuo visų šių faktorių priklauso ir sintetinio HA biologinis atsakas [18].

1.2. Kalcio pakeitimas kitais katijonais hidroksiapatite

HA pakeitimų įvairiais katijonais metu yra tikimasi išgauti gautų produktų savybes, kurios siejamos su atitinkamų metalų savybėmis: Ag, Zn, Cu, Co, Ce – antibakterinis poveikis; Sr, Mg, Zn, Ti – osteointegracija; Sr – kaulų rezorbcijos inhibavimas; Fe, Gd – magnetinės savybės; Eu, Tb – luminescencinės savybės; Na – osteopralaidumas; Cu, Co, Mn – osteogenezė; Co – antivėžinis aktyvumas; Y – elektrinis laidumas ir t.t. 1990–2019 metų laikotarpiu daugiausia tyrimų atlikta su Sr-HA (13,24 % dalis visų publikacijų), Ag-HA (11,23 %), Zn-HA (10,06 %) bei Mg-HA (8,50 %) [19]. Jonų, pakeičiančių Ca^{2+} HA gardelėje, savybės (poliarizuotumas, elektroneigiamumas,

joninis spindulys, oksidacijos laipsnis) bei šių jonų koncentracija ir pasirinktas HA sintezės metodas yra faktoriai, nulemiantys HA savybių pokytį [20]. Galimi katijoniniai pakeitimai, kai kalcį HA gardelėje pilnai ar dalinai pakeičia kiti jonai, tokie kaip Mg^{2+} , Zn^{2+} ar Ag^+ [21]. Kadangi HA legiravimas yra chemiškai limituotas, į HA struktūrą įterpiamų jonų koncentracija daro įtaką ir fazės grynumui (pvz., bandymai pakeisti HA dideliais metalų jonų kiekiais gali pasireikšti neapatitinių antrinių kristalinių fazių susidarymu) [16, 18]. Ca^{2+} jonų pakeitimas kitais katijonais, kurių krūvis ar joninio spindulio dydis skiriasi, veikia gardelės parametrus. Vykdam katijoninius pakeitimus dažniausiai pastebimas *a*-ašies sumažėjimas bei *c*-ašies padidėjimas [18]. HA pakeitimas didesniais katijonais gali padidinti kristalinės gardelės užimamą tūrį [14]. Ca^{2+} (jono spindulio dydis, kai jo koordinacijos skaičius lygus 6, 100 pm) pakeitimas, tokio paties krūvio, tačiau mažesnio joninio spindulio katijonais, tokiais kaip Zn^{2+} (74 pm) ar Cu^{2+} (73 pm), gali sumažinti HA gardelės parametrus [14, 23]. Dažniausiai katijonai didesni už Ca^{2+} užima Ca(II) poziciją. Bet yra ir kitų faktorių nulemiančių užimamą poziciją, tokių kaip anijonų krūvis bei ryšio stiprumas, priklausomas nuo jonų elektroneigiamumo, pvz., Mn^{2+} jonas yra linkęs užimti Ca(I) padėtį fluorapatite, bet chlorapatite užima tiek Ca(I), tiek Ca(II) padėtis. Katijono sudaromas ryšys su deguonimi taip pat daro įtaką katijonų užimamai pozicijai. Ca(I) padėtis pasižymi ilgesniu atstumu tarp metalo ir deguonies, dėl šios priežasties didesnio spindulio katijonams (pvz., Sr^{2+} – 118 pm) užimti šią poziciją yra palankiau. Vis dėlto, didelė Sr^{2+} jonų koncentracija padidina jonų tarpusavio atstūmimą ir praplečia *c*-ašį. Šis susidaręs įtempis sumažinamas daliai Sr^{2+} pakeičiant Ca^{2+} jonus Ca(II) srityje [14]. Sekančiuose skyreliuose metalų jonų įtaka hidroksiapatitui aptariama detaliau.

1.2.1. Kalcio pakeitimas vienvalečiais katijonais HA

Dauguma vienvalečių metalų jonų, tokių kaip sidabras (Ag^+ , joninis spindulys – 115 pm), natris (Na^+ , 102 pm), kalis (K^+ , 138 pm) ir litis (Li^+ , 76 pm) geba pakeisti Ca^{2+} jonus HA kristalinėje gardelėje, tačiau jie išbalansuoja bendrą krūvį ir gardelėje sukuria Frenkelio defektų sritis.

Dėl Ca^{2+} jonų pakeitimų Na^+ jonais susidariusios vakansijos kompensuojamos kartu vykstant kitiems anijoniniams ir katijoniniams pakeitimams. Dažniausiai literatūroje pateikiami susintetinto karbonizuoto natriu pakeisto hidroksiapatito tyrimų rezultatai. Atliekant tokių junginių sintezę išvengiama bendro krūvio disbalanso sukeltų pokyčių ir, tuo pačiu, karbonato jonais pagerinamas pakeisto HA bioaktyvumas. Už kalcio joną didesnio joninio spindulio Na^+ katijonas, užimdamas sau palankesnę Ca(II) padėtį, šiek tiek padidina *c*-ašį ir gardelės tūrį, tačiau reikšmingai heksagoninės HA struktūros nepaveikia. Pakeitimas Na^+ sumažina HA kristališkumą, bet padidina terminį stabilumą. Na-HA demonstruoja geresnes osteopralaidumo savybes lyginant su HA. Taip pat dvifaziai Na-HA ir β -trikalčio fosfato mišiniai pasižymi geresnėmis biologinėmis savybėmis nei kaip atskiri komponentai [14].

Kadangi kalio joninis spindulys yra didesnis už kalcio, jis turėtų užimti Ca(II) padėtį, tačiau tyrimai parodė, kad 83 % K^+ jonų užima Ca(I) padėtį, o likusieji 17 % – Ca(II). HA legiravimas K^+ jonais sumažina *a*-ašį, iškreipia *c*-ašies išsidėstymą bei suformuoja vakansijas. Kita dalis tyrimų teigia, kad HA pakeitimas K^+ jonais padidina *a*- ir *c*-ašių parametrus, HA gardelės užimamą tūrį, o patys K^+ jonai užima Ca(I) padėtį. Kalcio jonų pakeitimas K^+ jonais hidroksiapatite, padidina jo biosuderinamumą ir terminį stabilumą [14].

Sidabro jonai pakeičia Ca^{2+} jonus, esančius Ca(I) padėtyje, o jų didesnis joninis spindulys padidina HA gardelės parametrus bei užimamą tūrį. Dėl didesnio Ag^+ joninio spindulio, įtampa kristale padidėja, dėl ko sumažėja kristalo struktūros stabilumas, pasireiškiantis mažesniu terminiu stabilumu ir didesniu tirpumu. Ag-HA su didesniu nei 4 % kiekiu Ag^+ jonų yra linkęs termiškai skilti

žemose temperatūrose. Ag-HA pasižymi stipriomis antibakterinėmis savybėmis. Antigrybelinės Ag-HA savybės priklauso nuo paviršiaus ploto bei kristališkumo laipsnio [14, 22].

Nors ličio jonai yra kur kas mažesni už kalcio, struktūrinių pakeitimų metu šie joninių dydžių skirtumai labai didelės įtakos HA gardelės parametrams neturi. HA legiruojant Li^+ jonais padidėja kristališkumas. Fazinis grynumas išlaikomas pridėdant net ir 40 % Li^+ (gaunamas vienfazis HA). Ličio jonais pakeistas hidroksiapatitas pasižymi mažesniu tirpumu, geresniu terminiu stabilumu lyginant su pvz., Sr-HA, Mg-HA. Taip pat Li-HA yra didesnio tankio už HA [14, 23].

1.2.2. Kalcio pakeitimas divalenčiais katijonais HA

Dvalenčiai metalų jonai, tokie kaip magnis (Mg^{2+} , joninis spindulys – 72 pm), stroncis (Sr^{2+} , 118 pm), cinkas (Zn^{2+} , 74 pm), varis (Cu^{2+} , 73 pm), kobaltas (Co^{2+} , 74,5 pm), manganas (Mn^{2+} , 83 pm) bei geležis (Fe^{2+} , 78 pm), gali pakeisti Ca^{2+} jonus nesutrikdant bendro krūvio balanso.

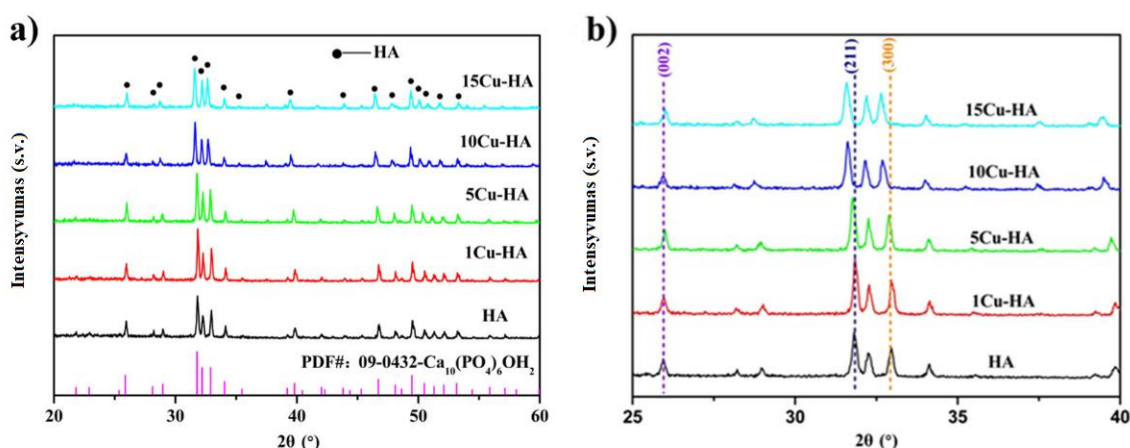
Magniu energetiškai palankiau užimti Ca(I) HA gardelėje, tačiau yra keli tyrimai, patvirtinantys, kad jis gali užimti ir Ca(II) padėtį. Kadangi Mg^{2+} joninis spindulys yra mažesnis nei Ca^{2+} , kalcio pakeitimas magnio jonais HA kristalinėje gardelėje sumažina gardelės parametrus. Kalcio pakeitimas dideliais magnio jonų kiekiais sumažina kristališkumą (gali atsirasti amorfinė fazė) ir destabilizuoja apatito struktūrą, padidina tirpumą bei paskatina terminį HA virtimą β -TCP. HA fazinis grynumas išlaikomas, kol Mg^{2+} jonų kiekis jame neviršija 7,5 % [15]. HA, pakeistas 5,7 mol % Mg^{2+} jonų, morfologija ir kristališkumu stipriai primena biologinį apatitą. Mg-HA (su <1 % Mg^{2+}) atsparumas lūžiams atitinka kaulinio audinio HA. Mg-HA (su <1,8 % Mg^{2+}) tankis, atsparumas spaudimui ir mikrokietumas yra mažesni lyginant su grynu HA. HA legiravimas Mg^{2+} jonais sumažina dalelių dydį, padidina poringumą, dispersiškumą, paviršiaus plotą [14]. Mg-HA pasižymi geru biosuderinamumu [15].

Kalcio jonai gali būti pilnai pakeičiami stroncio jonais. Sr^{2+} jonai gali užimti tiek Ca(I), tiek Ca(II) padėtis HA struktūroje. Dėl didesnio už kalcio jonus joninio spindulio, stroncio jonai, kai jų koncentracija nėra didelė (1,0-3,5 %), linkę užimti Ca(I) padėtį. Padėties selektyvumas sumažėja, kai padidėja Sr^{2+} jonų koncentracija – dalis jų užima ir Ca(II) padėtį. Sr^{2+} jonai pakeičia HA gardelės parametrus: abi *a*- ir *c*-ašys didėja, didėjant šių jonų kiekiui. Didesni Sr^{2+} jonų kiekiai stipriai veikia kristališkumą, destabilizuoja hidroksiapatito struktūrą ir padidina tirpumą. HA pakeitimo Sr^{2+} jonais (0,3-1,5 mol %) produktas yra vienfazis. Didelės Sr^{2+} jonų koncentracijos (15 mol %) sumažina kristališkumą bei palengvina HPO_4^{2-} ir CO_3^{2-} jonų įsiterpimą. Sr-HA pasižymi didesniu terminiu stabilumu, atsparumu spaudimui. Sr^{2+} jonų pridėjimas į biomedžiagas pagerina jų biosuderinamumą ir bioaktyvumą, dėl padidėjusio tirpumo yra skatinami osteointegracijos procesai [14].

Dėl Zn^{2+} jonų įtakos gardelės parametrams vieningai nėra sutariama. Literatūroje pateikiami skirtingi rezultatai: vienur teigiama, kad didinant Zn^{2+} jonų kiekį HA struktūroje, gardelės parametras *a* – padidėja, o *c* – sumažėja, tačiau kitur teigiama, kad šių katijonų koncentracijos didinimas hidroksiapatite sumažina abiejus (*a* ir *c*) gardelės parametrus. Tokie neatitikimai gali atsirasti dėl skirtingų sintezės metodų ar duomenų apdorojimo būdų [20]. Zn^{2+} jonai lengviau pakeičia kalcio jonus HA sintetinant cheminio nusodinimo metodu nei, pavyzdžiui, hidroterminiu. Didžiausia tikimybė, kad Zn^{2+} keičia Ca(II), kadangi pakeisti fosfatų ar hidroksilo grupių nėra linkę dėl didesnių skirtumų, tokių kaip krūvis bei joninis spindulys, o pakeisti oktaedrinę struktūrą sudarantį Ca(I) reikalauja daugiau energijos nei tetraedrinės struktūros Ca(II) [74]. Didesnės cinko jonų koncentracijos HA struktūroje, sumažina kristališkumą ir paskatina pašalinių fazių formavimąsi. Difraktogramose tai pasireiškia smailių praplatėjimu ir jų intensyvumo mažėjimu [25]. Literatūroje pateikta maksimali galima Zn^{2+} jonų koncentracija HA kristale taip pat prieštaringa. Vienur teigiama,

kad įvedamų Zn^{2+} jonų riba, iki pašalinės fazės susiformavimo, yra apie 9,4 mol %, kitur pakeitimo riba siekia 15 ar net 25 mol %. In vitro tyrimų rezultatai pademonstravo pagerėjusias Zn-HA bioaktyvumo ir antimikrobinio aktyvumo savybes [14].

Maksimalus galimas Ca^{2+} pakeitimas hidroksiapatite Cu^{2+} jonais yra apie 15 mol % [14]. Kadangi vario joninis spindulys yra mažesnis už kalcio, būtų galima tikėtis, kad šių jonų įterpimas į HA struktūrą turėtų sumažinti gardelės parametrus, o difraktogramos smailės pasislinkti į didesnių kampų pusę. Kai kurie atlikti tyrimai tai ir patvirtina – didinant vario jonų koncentraciją, abu HA gardelės parametrai, kartu ir kristališkumas, nuosekliai mažėja. Vis dėlto, kai kurie tyrėjai yra pastebėję, jog didinant Cu^{2+} jonų koncentraciją hidroksiapatite, HA gardelės a ir c parametrai didėja, o difraktogramų smailės pasislinkusios į mažesnių kampų pusę (žr. 5 pav.).



5 pav. Cu-HA difraktogramos: a) kampų intervalas – 20-60 °, b) 25-40 ° [4]

Tai indikuoja, kad vario jonai yra labiau linkę užimti hidroksiapatito OH^- grupių padėtis nei Ca^{2+} ($Ca_{10}(PO_4)_6Cu_xO_yH_z$). Vario jonai HA struktūroje dažnai būna dvejose (Cu^+ ir Cu^{2+}) oksidacinėse būsenose. Vario jonų buvimas hidroksiapatite kaitinimo metu skatina antrinių fazių (trikalčio fosfatų, vario oksidų) formavimąsi [4, 25]. Hidroterminiu būdu susintetinti Cu-HA mėginiai dažnai pasižymi mikro- / nanostruktūrinėmis morfologijomis, o poringumas mažėja didinant vario jonų kiekį [14]. Dėl pokyčių mikrostruktūroje ir vario gebėjimo inhibuoti kristalizacijos ir kristalo augimo procesus Cu-HA pasižymi didesniu atsparumu spaudimui. Lyginant Ag-HA, Zn-HA bei Cu-HA antibakterinį poveikį prieš *S. aureus* bakterijas, Cu-HA pasižymi geriausiomis savybėmis [4, 14].

Didinant Mn^{2+} jonų kiekį HA struktūroje, susidaro vis didesni kristalitai. Į HA struktūrą pridėjus 5 % Mn^{2+} , susidaro pašalinės fazės [27]. Mn-HA pasižymi žemesniu kristališkumo laipsniu, termiškai lengviau virsta β -TCP nei HA. Mn^{2+} jonų kiekis kristalinėje HA gardelėje veikia morfologiją: didesni kiekiai (1,23 mol %) skatina lazdelių pavidalo dalelių formavimąsi, o mažesni kiekiai (0,73 mol %) – plokštelių formavimąsi. HA legiravimas Mn^{2+} katijonais nesutrikdo HA biosuderinamumo [14].

Geležies jonų įterpimas į HA struktūrą nepakeičia stochiometrijos, tačiau skatina gardelės relaksaciją, kadangi Fe^{2+} krūvio tankis yra didesnis už Ca^{2+} . Fe^{2+} -O ryšio ilgis svyruoja nuo 1,94 iki 2,27 Å, kai Ca^{2+} -O ryšio ilgis yra tarp 2,36 ir 2,51 Å. Fe^{2+} jonams energetiškai palankesnė Ca(I) padėtis, tačiau stabiliausia geometrija išlaikoma Ca(II) srityje. Fe^{2+} jonai, būdami mažesnio joninio spindulio už Ca^{2+} , pakeičia HA gardelės parametrus – sumažina c -ašį, o a -ašį – padidina. Geležies jonai sumažina HA kristališkumą, suteikia jam stiprių paramagnetinių savybių (kai Fe^{2+} jonų

koncentracija nuo 10 iki 50 %) bei silpnas feromagnetines savybes (kai Fe^{2+} jonų koncentracija 30 %). Fe-HA magnetinės savybės priklauso nuo mikrostruktūros, anizotropijos ir orientacijos [15].

Kobaltu pakeisti HA gali būti susintetinami su iki 15 % Co^{2+} . Co-HA pasižymi sumažėjusiu c gardelės parametru, kristalo dydžiu ir kristališkumu. Kobalto jonai HA struktūroje pagerina antibakterines savybes bei suteikia paramagnetinių savybių, taip praplečiant panaudojimo galimybes biotechnologijose (vaistų pernešimo sistemose), magnetiniame atvaizdavime, vėžio, hipertermijos gydyme. Kobalto jonai labai lėtai pasišalina iš Co-HA [14, 15].

1.2.3. Kalcio pakeitimas trivalenčiais katijonais HA

HA gali būti legiruojamas trivalenčiais katijonais (p-, d-, ir f-elementai; pvz., aliuminis (Al^{3+} , 53,5 pm), galis (Ga^{3+} , 62 pm), bismutas (Bi^{3+} , 103 pm), geležis (Fe^{3+} , 64,5 pm), itris (Y^{3+} , 90 pm), lantanai (La^{3+} , 103,2 pm) ir kt.). Tokių joninių pakeitimų metu, atsiradęs krūvio disbalansas kompensuojamas vakansijų sričių susidarymu. Tris Ca^{2+} jonus pakeičiant dvejais M^{3+} jonais išlaikomas nepakitęs krūvio balansas [14].

Maži aliuminio kiekiai nepakeičia HA kristalinės gardelės dydžio, neišprovokuoja antrinių fazių susidarymo. HA legiravimas Al^{3+} jonais gali padidinti specifinį paviršiaus plotą apie 10 %. Skirtingomis aliuminio jonų koncentracijomis (0,5-2,5 mol %) legiruotas hidroksiapatitas pasižymėjo biosuderinamumu ir žemu citotoksiškumu. Al-HA gali būti sėkmingai naudojami vėžinių ląstelių naikinimui [14, 28].

Nustatyta, kad į struktūrą įvedami Fe^{3+} jonai turi įtakos HA gardelės parametrams. Fe^{3+} -O ryšio atstumas kinta tarp 1,80 ir 2,14 Å, o HA kristalinės gardelės dydis sumažėja. Didinant geležies jonų koncentraciją hidroksiapatite, krūvio balanso išlaikymui didėja vakansijų kiekis kalcio padėtyse ($\text{Ca}_{10-x}\text{Fe}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-x}\text{v}_x$, kur v – vakansija, x – geležies kiekis). Pakeitimas Fe^{3+} jonais sumažina HA kristališkumą, inhibuoja kristalo augimą c -ašies kryptimi ir skatina a -ašies augimą. Pakeistas HA yra stabilesnės geometrijos, kai Fe^{3+} jonai užima Ca(I) padėtį. Grynas HA yra diamagnetinė medžiaga, o Fe^{3+} -HA yra paramagnetinė medžiaga, todėl jo pritaikymo galimybės yra platesnės. 10 mol % Fe^{3+} jonais pakeistas HA pasižymi pagerėjusiu bioaktyvumu, biosuderinamumu, geromis antibakterinėmis savybėmis. Mažesni geležies jonų kiekiai pagerina HA mechanines savybes [14, 15].

Pastebėta, kad galio jonų įterpimas (iki 11 mol %) į HA struktūrą nesukelia ryškių pakitimų gardelėje. Biologinės Ga-HA savybės nėra plačiai išnagrinėtos. Bismutas hidroksiapatitų struktūroje taip pat yra linkęs pakeisti kalcį ($\text{Ca}_{10-x}\text{Bi}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). HA legiravimas Bi^{3+} jonais leidžia kontroliuoti feromagnetines savybes [29]. Bi-HA pasižymi geru osteopralaidumu, biosuderinamumu, antibakterinėmis savybėmis prieš *S. aureus* ir *E. coli* [14]. Pakeitimai Y^{3+} jonais yra galimi iki 7 mol %. Y^{3+} įterpimas į HA struktūrą sumažina a ir c gardelės parametrus. Y-HA pasižymi didesniu elektriniu laidumu, hidrofiliškumu ir biosuderinamumu, taip pat kur kas geresnėmis mechaninėmis savybėmis ir faziniu stabilumu [14].

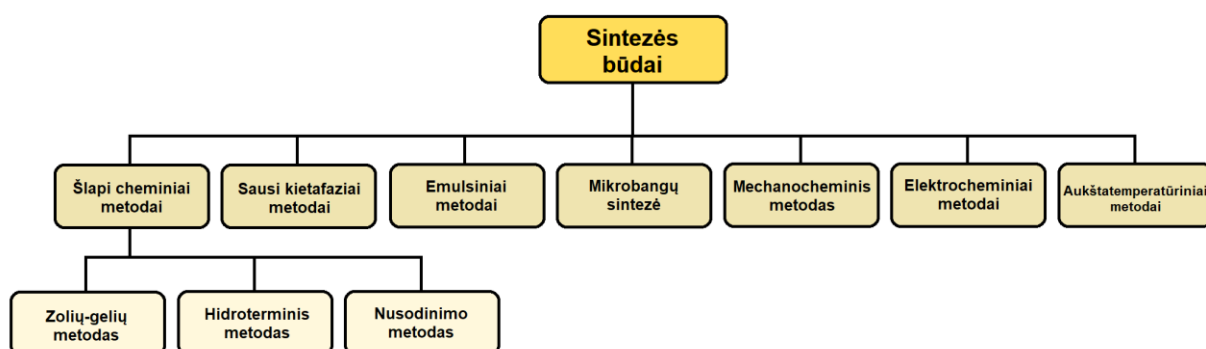
Dėl siaurų emisijos juostų ir ilgos liuminescencijos gyvavimo trukmės, lantanoidai (Ln) plačiai naudojami kaip kontrastinės medžiagos magnetiniam rezonansui, biojutiklių liuminescenciniams zondams. Ln pasižymi aukštu bioaktyvumu ir gebėjimu pakeisti kalcio jonus fosfatuose [15]. Lantanu pakeistas HA pasižymi geru biosuderinamumu bei didesniu paviršiaus plotu, sumažėjusiu kristališkumu [14, 29]. Europio ir cerio (101 pm) joniniai spinduliai yra panašūs į Ca^{2+} , dėl to HA gardelėje geba jį lengvai pakeisti. Eu-HA gali būti gaunami maksimaliu $\text{Eu}/(\text{Eu} + \text{Ca})$ santykiu – 2 %. Kai Ce^{3+} koncentracija yra iki 10 %, ceris lengvai pakeičia kalcio jonus HA. Ceris paskatina kristalitų mažėjimą, nežymų c gardelės parametro padidėjimą. Ce-HA pasižymi mažesniu kristališkumu, adatu

formos morfologija ir antibakterinės savybės [15]. Samariu pakeistuose hidroksiapatituose ($\text{Ca}_{10-x}\text{Sm}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), kur $x = 0,01-0,1$) stebimi šiek tiek pakitę HA gardelės parametrai bei kristalų dydžiai [15]. HA įgauna magnetinių bei liuminescencinių savybių, ją legiruojant La^{3+} , Eu^{3+} bei Dy^{3+} . Eu-Dy-HA pasižymi ir geru biosuderinamumu. Į HA įvedus trivalenčių katijonų (In^{3+} , Y^{3+} , Bi^{3+} , La^{3+}), gaunami junginiai dažnai pasižymi mažesniu vidutiniu HA dalelių dydžiu [14].

Taigi, nuo hidroksiapatito struktūroje vykdomų katijoninių pakeitimų priklauso gaunamo produkto savybės. Reikia atsižvelgti į tai, kad Ca^{2+} pakeitimas divalenčiais katijonais HA gardelėje nekeičia bendro krūvio, o vienvalečiai ar trivalenčiai katijonai išbalansuoja bendrą krūvį, kurio išlaikymui atitinkamai gardelėje susidaro defektai bei vakansijos [14]. Kartu su vakansijų susidarymu įvyksta vakansijos aplinkos deformacija, o toje aplinkoje esančių atomų virpesių dažnis pasikeičia – nuo to priklauso medžiagos terminis stabilumas [31]. Kiekvienas metalas turi jam būdingas savybes, kurias jis gali perteikti junginiui. Nors jonų kiekis, kurį galima įterpti į HA struktūrą yra ribotas, parenkant jų tipą ir kiekį, HA struktūros legiravimo ar pakeitimų metu galima išgauti specifiskas biologines funkcijas, kadangi net maži jonų kiekiai gali pakeisti produkto biologines ir fizikochemines savybes [32].

1.3. HA sintezės metodai

Norint kalcio hidroksiapatitą taikyti medicinoje, aplinkosaugoje, katalizėje ar kitur, jis turi pasižymėti tam tikromis savybėmis. Jos dažnai priklauso nuo medžiagos morfologinių ypatumų, kurie gali būti keičiami pasirenkant atitinkamus sintezės metodus [33]. HA fizikinės, cheminės bei biologinės savybės (biosuderinamumas, bioaktyvumas) taip pat stipriai priklauso nuo fazinio grynumo, dalelių dydžio, formos bei orientacijos, polinkio į aglomeraciją, homogeniškumo, kristališkumo, stechiometriškumo [15, 27, 21]. Iki šiol skiriama daug dėmesio įvairiems HA sintetinio būdams, jų modifikavimui (sąlygų optimizavimui) bei naujų metodų kūrimui. Kai kurie kalcio hidroksiapatitų sintezės metodai pateikti 6 pav.



6 pav. HA sintezės metodai [18]

Visi HA sintezės metodai turi tiek privalumų, tiek trūkumų (žr. 1 lentelę). Skirtingų sintezės metodų produktai pasižymi skirtinga morfologija (sferinės, lazdelių, plokštelių ar kt. formos). Tirpiklių, PAM, stabilizatorių, aukštos kaitinimo temperatūros, brangių reagentų naudojimas, HA sintezės metodus paverčia neekonomiškais ir kenksmingais aplinkai [35]. Norint paruošti biomedžiagas su reikalingomis savybėmis yra labai svarbu atrasti ir vystyti paprastus, ekonomiškus,

efektyvius ir kuo ekologiškesnius sintezės metodus, leidžiančius kontroliuoti sintetinamų HA morfologiją bei kitas savybes.

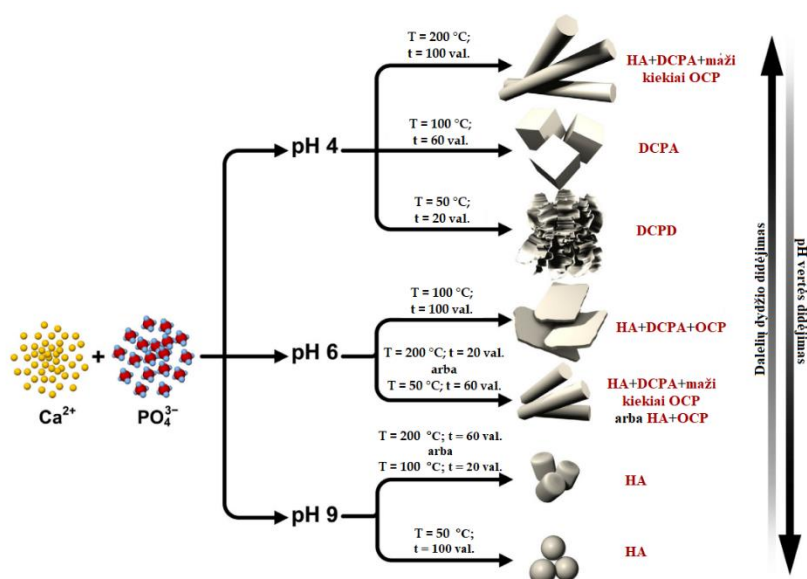
1 lentelė

HA sintezės metodų privalumai bei trūkumai [24, 26, 27]

Sintezės metodas	Privalumai	Trūkumai
Kietafazių reakcijų metodas	Nebrangus, paprastas. Susiformuojantis HA pasižymi stochiometrine sudėtimi (Ca/P santykis 1,667).	Reikalinga aukšta kaitinimo temperatūra, ilga reakcijos vykdymo trukmė. Produktai turi polinkį aglomeruotis.
Cheminis nusodinimas	Nėra brangus, gera išeiga, galima taikyti pramoninėje gamyboje. Produktai pasižymi didesniu paviršiaus plotu ir mažesniu dalelių dydžiu (galima išgauti HA nanodaleles).	Produkto sudėtis nukrypsta nuo stochiometrinio HA. Norint išvengti Ca^{2+} jonų trūkumo (CDHA susiformavimo) reikalingos aukštos pH vertės, o norint išgauti kristalinę HA fazę, reikalinga aukšta kaitinimo temperatūra. Kaitinimo metu nestochiometrinis HA yra linkęs sudaryti antrines fazes, tokias kaip trikalcio fosfatai ar kalcio oksidai. Galutinis produktas stipriai priklausomas nuo reakcijos vykdymo sąlygų, tokių kaip pH, maišymo greitis, džiovavimo temperatūra ir t.t.
Zolių-gelių metodas	Maišymas molekuliniam lygmenyje vyksta homogeniškai. Galima išgauti HA nanodaleles bei kontroliuoti fazės grynumą.	Brangios pradinės medžiagos (bevandenis zolių-gelių sintezės metodas). Reikalinga aukšta kaitinimo temperatūra, o keliant temperatūrą pastebima polinkio sudaryti didesnius aglomeratus tendencija.
Hidroterminis metodas	Išgautas produktas pasižymi geru kristališkumu, homogeniškumu. Galima išgauti HA nanodaleles.	Dažnas HA miltelių aglomeracijos pasitaikymas, reikalingi dideli slėgiai.

Hidroterminė sintezė – tai fizikinių-cheminių procesų vykdymas uždaroje sistemoje (hermetiškame inde, autoklave), kai temperatūra viršija tirpiklio (vandens) virimo temperatūrą, o slėgis >1 atm. Metodas pagrįstas vandens (reakcijos terpės) gebėjimu hidroterminėmis sąlygomis ištirpinti normaliose sąlygose praktiškai netirpius junginius ir juos perkristalizuoti [39]. Hidroterminis metodas yra aplinkai draugiškas procesas, atliekamas sąlyginai žemoje temperatūroje, o reakcijos vykdymui reikalinga įranga bei sąlygos ganėtinai paprastos [40]. Šis metodas leidžia susintetinti fiziškai gryno HA miltelius, pasižyminčius geru kristališkumu, homogeniškumu. Autoklave susidaręs slėgis sugeneruoja mažesniu dydžiu bei minimaliu poringumu pasižyminčias struktūras [29, 30]. Hidroterminės sintezės metu reguliuojant reakcijos vykdymo laiką, temperatūrą, pradinių medžiagų koncentracijas ar pridėdant įvairių priedų (M^{n+} jonų, tirpiklių ar kt.), skatinančių kristalų orientuotą augimą arba inhibuojančių kristalų augimą kažkuria kryptimi, galima kontroliuoti

kristalų formą bei dydį, taip išgaunant specifinės formos nedidelio dydžio daleles. Viena iš pageidaujamų HA savybių jo platesniam taikymui yra didesnis paviršiaus plotas. Kristalų morfologija turi įtakos ir HA kristalų paviršiaus krūviui. Lazdelių formos hidroksiapatitai susiformuoja vykstant anizotropiniam kristalų augimui *c*-ašyje, kai kalcio jonais praturtinta teigiamo krūvio *a*-ašis yra nukreipta į išorę. HA kristalams augant *a*-ašies kryptimi, į išorę nukreiptas neigiamai įkrautas *c*-ašies paviršius [40, 41]. Galimybė sintezės metu kontroliuoti HA kristalų anizotropinį augimą, gali būti labai naudinga naujose taikymo srityse. Reikia atsižvelgti į tai, jog šiuo metodu lazdelių formos HA susidarymas gan dažnas (lengviau išgaunamas), o heksagoninės formos ir ilgų juostelių formos susidarymas yra kur kas retesnis [40]. Hidroterminės sintezės vykdymo parametrai (pH, kaitinimo temperatūra, reakcijos trukmė, aušinimo greitis, slėgis, pradinių medžiagų prigimtis bei koncentracija) labai veikia HA fazinį grynumą, kristališkumą bei morfologiją (žr. 7 pav.) [18, 22, 29, 30].



7 pav. Hidroterminės sintezės parametrai: pH, temperatūros, reakcijos vykdymo trukmės įtaka HA faziniam grynumui, morfologijai bei dalelių dydžiui [34]

Pradinis reakcijos terpės pH yra vienas svarbiausių parametrai, nulemiančių galutinio produkto morfologiją. Didėjant terpės pH, HA dalelių dydis bei ilgio ir skersmens santykis smarkiai sumažėja [40]. pH – jonų balanso išlaikymo indikatorius. Keičiant OH^- jonų koncentraciją, kinta ir Ca^{2+} , PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} jonų koncentracijos. Svarbu paminėti, kad HA sintezės reakcijos vykdymas stipriai šarminėje terpėje gali paskatinti nusodinimo procesus [41]. Temperatūra ir terpės pH yra svarbiausi parametrai, nulemiantys HA kristališkumą. Žemose temperatūrose sintetintas HA yra heksagoninės struktūros. Monoklininė HA struktūra dažniausiai išgaunama tik aukštesnėse nei $1000\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūrose. Vis dėlto, yra keletas publikacijų, kuriose teigiama, jog monoklininę HA struktūrą išgauti pavyko ir žemesnėse sintezės vykdymo temperatūrose [41]. Žemesnėje temperatūroje kaitintas HA pasižymi didesniu osteopralaidumu, kuris siejamas su didesniu faziniu grynumu bei dalelių ir susidariusių porų dydžiu [44]. Pastebėta, jog hidroterminės reakcijos vykdymo laiko, temperatūros, pradinių medžiagų koncentracijos didinimas skatina HA kristalo augimą bei jo ilgio ir skersmens santykio padidėjimą [40]. Literatūroje pateikiamos įvairios hidroterminės sintezės vykdymo sąlygos. Dažniausiai HA sintezė hidroterminiu metodu vykdoma $100\text{--}250\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūrų intervale, reakcijos vykdymo laikas svyruoja tarp 15 min. ir 24 val., o pH vertė – $10\text{--}12$ [40]. Labai svarbi HA sintezei naudojamo pirmtako prigimtis. Dažnai hidroterminiu būdu sintetinamam kalcio

hidroksiapatitui pirmtakais naudojami įvairiais metodais paruošti kalcio fosfatai, kuriuose Ca/P jonų santykis yra tarp 1,50 ir 1,67 [45]. Hidroterminis procesas sėkmingai vykdomas tik tada, kuomet tinkamai parenkamos pradinės medžiagos, kontroliuojami visi minėti sintezės parametrai [66]. Optimalios reakcijos vykdymo sąlygos kiekvienam HA sintezės atvejui gali būti parenkamos individualiai ir gali stipriai kisti, priklausomai nuo pageidaujamo galutinio produkto savybių.

1.4. HA savybės ir taikymai

Nors kalcio hidroksiapatitas jau kurį laiką gan sėkmingai yra naudojamas medicinoje, grynas HA vistiek turi nemažai trūkumų – mažas atsparumas lūžiams, yra sunkiai formuojamas, trapus, turi ribotą atsparumą fiziologinei aplinkai – dėl šių priežasčių nėra patenkinami visi biologinio ir medicininio pritaikymo poreikiai [40]. Sintetinio hidroksiapatito pritaikymo galimybės priklauso nuo jo glaudžiai susijusių biologinių, fizikinių, mechaninių bei magnetinių savybių. Dėl to nuolatos yra kuriami ir tiriama nauji būdai HA savybių pagerinimui.

1.4.1. Fizikinės savybės

Fizikinės HA savybės stipriai priklauso nuo HA sintezės būdo. Susintetintas laboratorijoje HA pasižymi mažu kristališkumu bei dideliu paviršiaus plotu. Taip pat, priklausomai nuo pasirinkto sintezės metodo, gali pasižymėti ir aukštu poringumu. Labiausiai stabili HA forma yra, kai Ca/P molinis santykis – 1,67, įprastai susidarantis, kai $\text{pH} \geq 10$. Vis dėlto, tiek biologinių, tiek sintetinių apatitų fizikinės savybės skiriasi dėl nukrypimų nuo idealaus stochiometrinio santykio HA, galinčių atsirasti vykstant joniniams pakeitimams. Įvairūs joniniai pakeitimai HA struktūroje veikia gardelės parametrus, kristalinę struktūrą, morfologiją, tirpumą bei terminį stabilumą. Pavyzdžiui, F^- jonai HA struktūroje dar labiau sumažina jo tirpumą, tačiau kartu su F^- jonais struktūroje esantys Mg^{2+} , CO_3^{2-} , Ti^{4+} , Zn^{2+} jonai padidina HA tirpumą, sumažina kristališkumą, kartais susidaro net amorfinės fazės [8, 38]. Skirtingais metodais susintetintų, įvairiais jonais legiruočių HA kai kurių savybių skirtumų santrauka pateikta 1 priede.

1.4.2. Mechaninės kalcio hidroksiapatitų savybės

Mechaninės kalcio hidroksiapatitų savybės stipriai priklauso nuo tankio, porų formos ir dydžio, kristališkumo, dalelių dydžio bei fazinio grynumo [46]. Didėjant Ca/P santykiui, HA kietumas, tamprumo modulis bei atsparumas lūžiams didėja, kol pasiekia ~1,67. Viršijus 1,67 Ca/P santykį, šios savybės pradeda staigiai silpnėti. Mechaninės HA savybės eksponentiškai mažėja didėjant poringumui [47]. Tankis, tamprumo modulis, kietumas, atsparumas lūžiams, atsparumas spaudimui, trapumas ir sukibimo stiprumas yra pagrindinės mechaninės savybės, kuriomis nusakoma HA keraminių medžiagų kokybė. Mechaninės savybės yra stipriai priklausomos nuo pasirinkto sintezės būdo ir galutinės fazinės sudėties [48]. Kai kurių skirtingais metodais susintetintų HA ir Zn-HA mechaninių savybių palyginimas pateiktas 2 lentelėje.

Mechaninių HA savybių palyginimas [48]

Mechaninės savybės	HA		Zn-HA	
	Kietafazių reakcijų metodu	Drėgnojo nusodinimo metodu	Zn ²⁺ - 5 mol %	Zn ²⁺ - 2 mol %
			Kietafazių reakcijų metodu	Drėgnojo nusodinimo metodu
Santykinis tankis, %	97,2 ± 0,004	91,9	96,1 ± 0,005	96,8
Kietumas, GPa	13,60 ± 2,20	2,05 ± 0,2	5,83 ± 0,06	5,76 ± 0,17
Tamprumo modulis, GPa	173 ± 17	58 ± 2	-	
Atsparumas lūžiams, MPa·m ^{1/2}	0,50 ± 0,10	1,50 ± 0,50	1,12 ± 0,16	1,05 ± 0,10
Trapumo indeksas, μm ^{-1/2}	25,60 ± 4,10	1,33 ± 0,40	-	

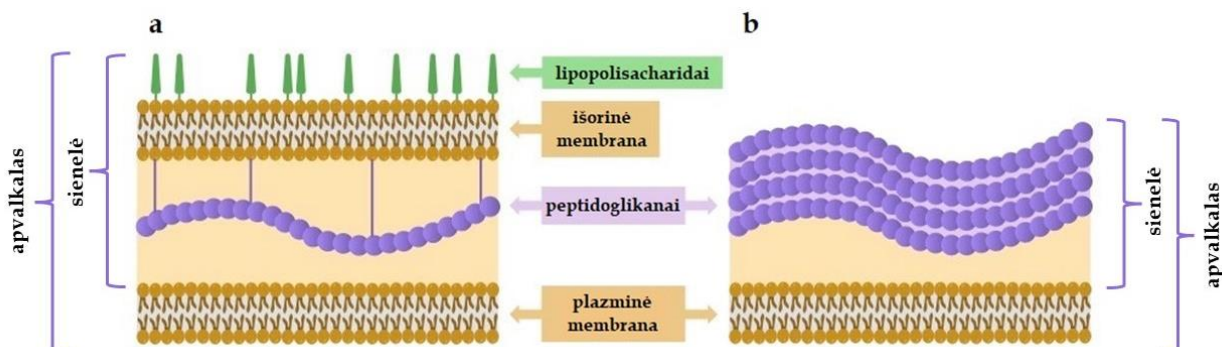
Gryno HA tankis – 3,16 g/cm³. Pašalinės fazės, pvz., β-TCP (3,11 g/cm³), atsiradimas mažina tankį. Sausuoju metodu sintetinant HA, stochiometrinis Ca/P santykis išlaikomas geriau, pašalinės fazės susidarymas yra mažiau tikėtinas nei drėgnojo nusodinimo sintezės metu. Didelė į HA struktūrą įterpiamų jonų koncentracija taip pat daro įtaką faziniam grynumui, tuo pačiu ir tankiui – didesnė katijonų koncentracija gali sumažinti tankį (dėl susidariusių antrinių fazių), o mažesnė – jį padidinti. Medžiagos atsparumas lūžiams taip pat priklauso nuo fazinio grynumo. β-TCP pasižymi didesniu atsparumu lūžiams nei HA, taigi β-trikalčio fosfato fazės padidėjimas mišinyje padidina atsparumą lūžiams. Mažėjant atsparumui lūžiams, didėja trapumo indeksas. Trapumo indeksas didėja susiformuojant papildomoms fazėms (pvz., legiruojuojant didelėmis metalų jonų koncentracijomis). Mikrokietumas – tai dar vienas mechaninis parametras koreliuojantis su dalelių dydžiu. Dalelių dydžiui didėjant, HA mikrokietumas mažėja. Zn²⁺ jonų įterpimas į HA struktūrą sukelia dalelių augimą, dėl ko mažėja kietumas. HA legiravimas Zn²⁺ jonais padidina atsparumą spaudimui. Sukibimo stiprumas yra svarbus parametras užtikrinant kokybiškas dangas – Zn²⁺ jonai šį parametru padidina. Tačiau didesnių nei 10 mol % Zn²⁺ koncentracijų HA struktūroje pasekmė – sumažėjęs kristališkumas, dėl ko sumažėja sąsajos sąveikos ir kartu mažėja sukibimo su padėklu stiprumas. Į HA struktūrą pridėjus Zn²⁺ jonų, tamprumo modulis ir tempiamasis stipris pakinta nežymiai, tačiau drastiškai sumažėja pridėjus daugiau nei 5 % Zn²⁺ [48].

Prastos mechaninės HA savybės riboja jo pritaikymą, tačiau atsižvelgiant į poreikį, mechaninės hidroksiapatitų savybės gali būti modifikuojamos, pasirenkant atitinkamą sintezės metodą bei reakcijos vykdymo sąlygas [18].

1.4.3. Biologinės kalcio hidroksiapatitų savybės

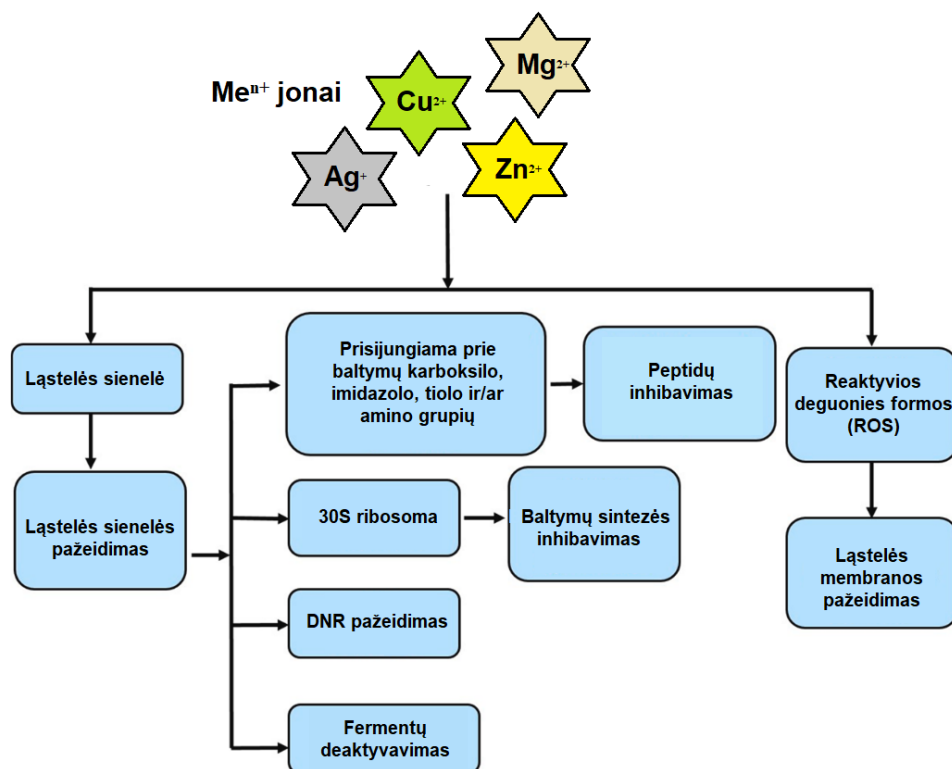
Kai kurių metalų jonų antibakterinis poveikis pastebėtas jau labai seniai – jie naudoti žaizdoms, kraujavimo, uždegimų, odos sudirginimų, skrandžio ir žarnyno ligoms gydyti [49]. Yra žinoma, kad antibakterinėmis savybėmis pasižymi Zn²⁺, Ag⁺, Cu²⁺, Mg²⁺ bei kiti metalų jonai. Nors dauguma šių metalų yra didelės svarbos organizmo mikroelementai, pasiekus tam tikrą koncentracijos ribą, šie elementai tampa toksiški [50]. Viena iš infekcinių kaulų ligų, pavyzdžiui osteomielito, atsiradimo priežasčių yra mikroorganizmai, dažniausiai bakterijos, tokios kaip *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. epidemidis*, *E. coli*. *S. aureus* yra net 45 % osteomielito bei su kaulų implantais susijusių infekcijų atvejų priežastis [50]. Plačiausiai ištirtas antibakterinis metalų poveikis prieš *E. coli* (gramneigiamą

bakterijų atstoves) bei *S. aureus* (gramteigiamas bakterijas) [48]. Gramneigiamų bakterijų kultūros turi geresnę inhibavimo zoną nei gramteigiamos bakterijos. Gramteigiamos bakterijos turi storą ląstelės sienelę susidarančią iš kelių dešimčių peptidoglikanų sluoksnių, o gramneigiamų bakterijų ląstelių sienelės turi ir papildomą sluoksnį – išorinę membraną, kurią supa peptidoglikanų bei liposacharidų sluoksniai (žr. 8 pav.) [51].



8 pav. Bakterijų tipai bei jų ląstelių apvalkalų sandara: a) gramneigiamų bakterijos apvalkalo sandara, b) gramteigiamos bakterijos apvalkalo sandara [52]

Antibakterinės savybės nusakomos atsižvelgiant į šiuos parametrus: inhibicijos greitis, inhibicijos plotas, bakterijų ląstelių gyvybingumas [48]. Metalų antibakterinis stiprumas priklauso nuo jų fizikocheminių savybių, tirpumo. Pavyzdžiui, gerai tirpios vandenyje cinko druskos pasižymi stipriu antibakteriniu aktyvumu. Terpės pH yra dar vienas faktorius veikiantis metalų antibakterinį aktyvumą. Priklausomai nuo metalo prigimties, oksidacijos-redukcijos reakcijų metu, kinta terpės pH. Kai susidaro hidroksilo jonų perteklius (padidėja terpės šarmingumas), susidaro bakterijoms toksiška aplinka ir jos žūsta [53]. Antibakterinėmis savybėmis pasižyminčių metalų jonų veikimo principas skiriasi nuo įprastų antibiotikų, dėl to atitinkamų metalų jonais legiruotos medžiagos yra labai patrauklus variantas ilgalaikiam antimikrobiniam veikimui, ypač kovojant prieš antibiotikams atsparias bakterijas, norint išvengti žymesnės organizmui daromos žalos [54]. Yra keli pagrindiniai mechanizmai, pagal kuriuos metalų jonai veikia biocidiškai (žr. 9 pav.). Metalų jonai gali sąveikauti su bakterijų membranomis, taip sukeldami struktūrinius pokyčius. Metalų jonai gali sudaryti stiprius ryšius su baltymais ir taip juos deaktivuoti. Bakterijų replikacija sutrikdoma metalams sąveikaujant su jų aminorūgštimis. Kiti biocidinio veikimo mechanizmai apima jonų prasiskverbimo metu sukeltą ATP gamybos reguliavimo, DNR replikacijos pakitimus, aktyvių deguonies formų (ROS) sugeneravimą ląstelės viduje, sutrikdantį normalų jos funkcionavimą [48].



9 pav. Metalų jonų antibakterinio veikimo mechanizmo schema [50]

Biologinės HA savybės priklauso nuo cheminės ir fazinės sudėties, mikrostruktūros, porų dydžio ir tūrio. Nors hidroksiapatitai nepasižymi dideliu biocidiniu aktyvumu ar atsparumu bakterijų kolonijų susidarymui, nemaža atliktų tyrimų dalis patvirtina Zn-HA pagerėjusį bioaktyvumą lyginant su grynu HA. Zn-HA antibakterinis veikimas pagrįstas stipriomis elektrostatinėmis sąveikomis – kristalų paviršiuje esantys Zn^{2+} jonai suformuoja stiprius ryšius su tiolo, imidazolo, amino ir karboksilo grupėmis, esančiomis mikroorganizmų membranų baltymuose, taip sukeldami struktūrinius pokyčius, paverčiant mikroorganizmų ląsteles negebančiomis tinkamai reguliuoti transporto per plazminę membraną ir galiausiai sukeldami ląstelių mirtį. Kadangi HA legiravimas Zn^{2+} jonais sumažina kristališkumą ir padidina paviršiaus plotą, susiformuoja daugiau sričių, kuriose galimos sąveikos su baltymais. Svarbu pažymėti, kad Zn-HA pasižymi ir antigrybeliniu poveikiu. 3 lentelėje pateiktas Zn-HA biocidinio poveikio efektyvumas [48].

Zn-HA biocidinio poveikio efektyvumas [48]

Bakterijos tipas		Zn ²⁺ kiekis HA	Inhibavimo efektyvumas
Gramteigiamos bakterijos	<i>B. cereus</i>	1,3-4,8 %	+
	<i>B. subtilis</i>	5-15 mol %	+
	<i>M. luteus</i>	1,3-4,8 %	+
	<i>S. epidermidis</i>	9,49 mol %	+
	<i>S. aureus</i>	0,043-20 mol %	+
	<i>S. mutans</i>	~11,5 mol %	+
Gramneigiamos bakterijos	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	~11,5 mol %	+
	<i>E. coli</i>	0,043-20 mol %	+
	<i>F. nucleatum</i>	~11,5 mol %	+
	<i>K. pneumonia</i>	5-15 mol %	+
	<i>S. flexneri</i>	1,3-4,8 %	+
	<i>P. aeruginosa</i>	1,3-4,8 %	-
Grybai	<i>A. niger</i>	5-15 mol %	+
	<i>C. albicans</i>	0,043-15 mol %	+

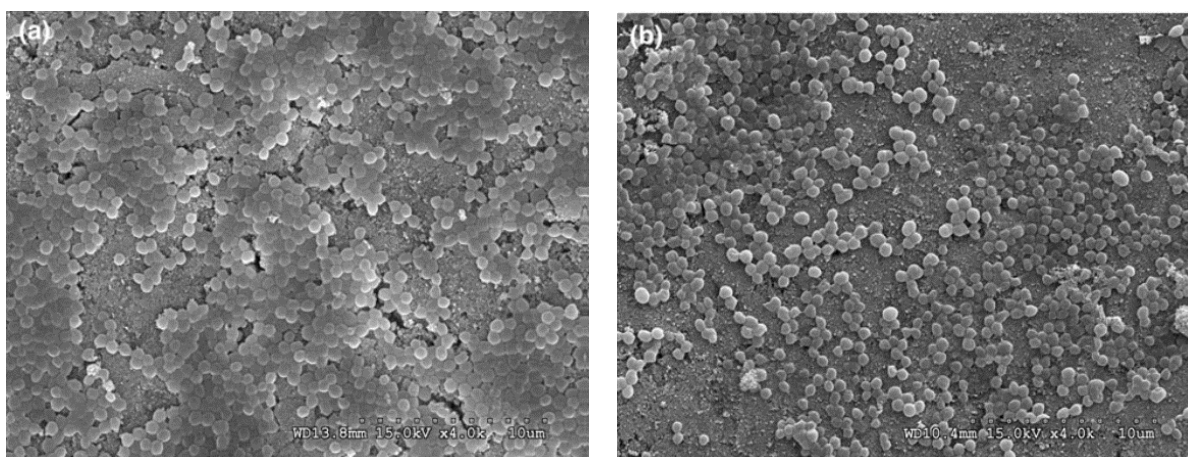
Dėl papildomos ląstelės išorinės membranos, gramneigiamų bakterijų (pvz., *E. coli*) kultūros sąlytyje su Zn-HA turi platesnę inhibavimo zoną nei gramteigiamos bakterijos (pvz., *S. aureus*) (žr. 6 pav.). Vis dėlto, kai kurie tyrimai teigia, kad būtent *S. aureus* pasižymi didesne inhibavimo sritimi nei *E. coli*. Abiejų šių bakterijų tipų kolonijos geba sudaryti bioplėveles – organizuotus mikroorganizmų agregatus, esant palankioms sąlygoms prisitvirtinančius prie paviršių. *S. aureus* ir *E. coli* bioplėvelių susidarymas atitinkamai sutrikdomas 75 % ir 15 % esant sąlytyje su Zn-HA (kai Zn²⁺ kiekis lygus 2,5 mol %). Zn²⁺ jonų sukeltas stresas sutrikdo *E. coli* ląstelių Cu ir Fe elementų homeostazę – padidėja Fe poreikis, o tolerancija Cu toksiškumui sumažėja [53]. 4 lentelėje pateikti antibakterinio poveikio rezultatai prieš *E. coli* gramneigiamas bakterijas.

Zn²⁺ jonų koncentracijos įtaka Zn-HA antimikrobiniam aktyvumui prieš *E. coli* bakterijas [55]

Eil. Nr.	Mėginys	Kolonijas sudarančių vienetų skaičius (KSVS/ml)
1	Kontrolė	$(3,96 \pm 0,62) \times 10^7$
2	Zn _{0,1} HA	$(3,40 \pm 0,30) \times 10^7$
3	Zn _{0,5} HA	$(2,15 \pm 0,28) \times 10^7$
4	Zn _{0,9} HA	$(8,31 \pm 0,91) \times 10^6$
5	Kontrolė	$(1,98 \pm 0,91) \times 10^{10}$
6	HA	$(1,01 \pm 0,49) \times 10^{10}$

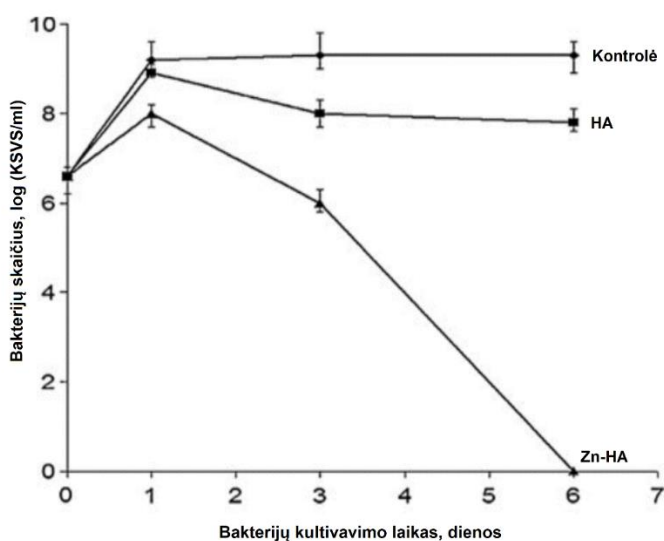
Kalcio hidroksiapatito struktūroje esantys 0,1 mol % Zn^{2+} neturėjo inhibuojančio poveikio *E. coli* bakterijoms – jų kiekis mėginio terpėje buvo mažesnis nei kontroliniame mėginyje, bet statistškai svarbių skirtumų nenustatyta. Su 0,5 ir 0,9 mol % Zn^{2+} pastebimas antibakterinis aktyvumas, tai matoma lyginant bakterijų kiekį esantį kontroliniame mėginyje ir mėginiuose su Zn-HA (Eil Nr. 3 ir 4). 0,9 mol % Zn^{2+} turėjo didžiausią antibakterinį poveikį, bakterijų kiekį sumažinant beveik 5 kartais. Grynas HA taip pat turi nežymų antibakterinį poveikį. Jo antibakterinis aktyvumas ir citotoksiškumas in vivo tyrimuose apytiksliai lygus mėginiui su $Zn_{0,1}HA$ [55].

Atliekant tyrimą su gramteigiamomis *S. aureus* bakterijomis, pirmąją dieną pastebimas bakterijų skaičiaus padidėjimas tiek mėginiuose su HA, tiek su Zn-HA (pradinis bakterijų skaičius visuose mėginiuose – 4×10^6 KSVS/ml) (žr. 10 pav.).



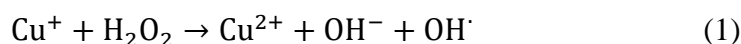
10 pav. SEM nuotraukos gyvybingų *S. aureus* bakterijų prisitvirtinimo ant: a) HA, b) Zn-HA, dangų 1-ąją dieną [56]

3-ąją dieną pastebimas bakterijų kiekio mažėjimas lyginant su kontroliniu mėginiu (žr. 11 pav.). Po 6 dienų, mėginyje su Zn-HA (Zn^{2+} kiekis – 1,6 %) matomas žymus bakterijų kiekio sumažėjimas – jų praktiškai nebeliko, palyginimui mėginyje su grynu HA – bakterijų skaičius praktiškai nepakito [56]. Šie du antibakteriniai tyrimai pademonstravo kalcio hidroksiapatito bioaktyvumo bei antimikrobinio veikimo savybių pagerinimą į jo struktūrą įterpiant cinko jonų.

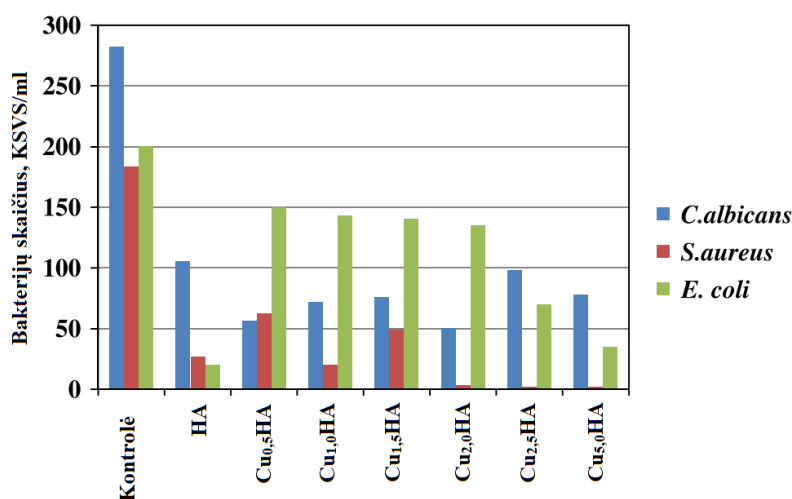


11 pav. *S. aureus* bakterijų atsparumas biocidinėms savybėms [56]

Vario jonais pakeisto HA antibakterinio aktyvumo mechanizmas nėra pilnai išaiškintas. Manoma, kad vario jonai suformuoja stiprius ryšius su baltymų tiolu, imidazolo, amino ir karboksilo grupėmis, taip sukeldami struktūrinius pakitimus ir padidindami ląstelės membranos pralaidumą, o vėliau ir ląstelės mirtį. Vario jonai taip pat geba suformuoti ryšius su amino ir amido grupėmis, disulfidiniais bakterijų baltymų ir fermentų tilteliais, šių ryšių pasekmė – DNR ir RNR pažeidimai, reprodukcijos inhibavimas, bakterijų ląstelių mirtis [57]. Vario jonų biocidinis efektas dažnai aiškinamas Fentono tipo reakcija (1), kurios metu sugeneruojamas labai reaktyvus hidroksilo radikalas OH[·], ląstelei sukeliantis papildomą oksidacinį stresą. ROS pagrindiniai taikiniai yra membrana, baltymai ir DNR [58].



Metaloproteinų aktyviuosiuose centruose esančius pereinamuosius metalus gali pakeisti didesniu afiniškumu pasižymintys vario jonai (esant jų pertekliui mikrobinėje ląstelėje) ir taip juos deaktyvuoti. Cu⁺ yra labiau toksiškas bakterijų ląstelėms už Cu²⁺. Taip yra dėl kelių priežasčių: bakterijų plazminė membrana yra pralaidesnė Cu⁺ jonams, Cu⁺ jonai geba pakeisti ir / ar sunaikinti geležies-sieros klasterius [58]. Cu²⁺ jonai gali pažeisti išorinę ląstelės membraną, taip pakeičiant ląstelės pralaidumą [32]. Vario jonai taip pat veiksmingi ir prieš virusus (pažeidžiama RNR), ir prieš grybus (pažeidžiama membrana ir DNR) [59]. Vario jonai pagerina HA bioaktyvumą (žr. 12 pav.). Cu_{2,0}HA antibakterinis veiksmingumas prieš *S. aureus* gramteigiamas bakterijas viršija 98 %. Cu-HA turi ir antigrybelinių savybių – Cu_{5,0}HA sumažina *C. albicans* kiekį 72,3 %. Mažiausias Cu-HA antibakterinis veiksmingumas pasireiškia prieš *E. coli* bakterijas. Šiame tyrime pastebimas ir gryno susintetinto HA antibakterinis bei antigrybelinis veiksmingumas [60].



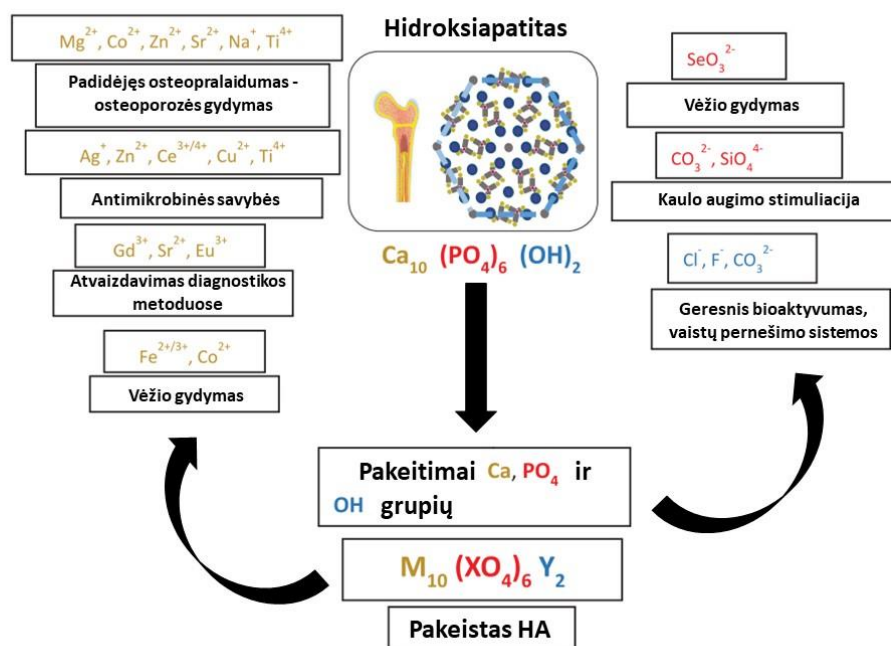
12 pav. Biocidinis Cu-HA veiksmingumas [60]

Antimikrobinio veiksmingumo tyrimų rezultatai taip pat nėra vieningi. Kitoje literatūroje teigiama, kad variu pakeistas HA (Cu²⁺ – 0,8 %) pasižymi stipriu antimikrobinu efektu inhibuojant *S. aureus*, *E. coli* ir *C. albicans*, išlaikant žemą citotoksiškumą [32]. Tuo tarpu 0,66 % Cu²⁺ jonų nėra pakankama koncentracija jų inhibavimui. Kai kuriuose šaltiniuose teigiama, kad Cu²⁺ kaip tik negeba inhibuoti *S. aureus* bakterijų, o tai aiškinama jų prigimtimi (gramteigiamos bakterijos) [57]. Nepaisant šių visų nesutikimų, įrodymas, kad Cu-HA turi antibakterinių savybių yra akivaizdus.

1.4.4. Kalcio hidroksiapatitų taikymai

Medicinoje kaulinės medžiagos pakaitais kalcio hidroksiapatitai yra naudojami dėl panašios cheminės sudėties, kristalografinės struktūros, biologinio suderinamumo, mažo tankio, cheminio stabilumo, atsparumo nusidėvėjimui bei osteopralaidumo (kaulinės medžiagos atsinaujinimo) [61]. Bioaktyvios sintetinės medžiagos yra klasifikuojamos remiantis jų tirpumu in vivo. Hidroksiapatitas yra lėčiau besirezorbuojanti medžiaga nei trikalcio fosfatas. Implantuotas į organizmą, TCP reaguoja su kūno skysčiais ir pavirsta hidroksiapatium. Dėl tokio skirtingo tirpumo medicinoje dažnai naudojami dvifaziniai mišiniai, pavyzdžiui 60 % HA ir 40 % TCP. Dažniausios hidroksiapatitų (ar hidroksiapatitų mišinių) pritaikymo sritys medicinoje – tai periodontinių defektų taisymas, kaulinio audinio atauginimas (pavyzdžiui, žandikaulių augmentacija bei stabilizavimas, žandikaulių-veido rekonstrukcija), dantų protezavimas ir didelių kaulų trūkumų (pvz., auglių sukeltų defektų) taisymas. HA taip pat yra naudojamas kaip pagrindas kaulinių bei dantino audinių regeneracijai. Hidroksiapatitai gali būti naudojami injekcinių rišamųjų medžiagų forma arba dangos ant titano (ar titano lydinių) pavidalu, taip suderinant geriausias dviejų komponentų savybes – HA biosuderinamumą ir metalo stiprumą – ir sukuriant geresnių savybių odontologijos bei ortopedijos implantus [7, 43]. Biotechnologijose HA taikomas kaulinio, jungiamojo audinio, riebalų bei raumenų audinių inžinerijai [41].

Hidroterminiu metodu susintetintų metalais pakeistų HA taikymo galimybės sparčiai išauga dėl galimybės išgauti norimų savybių produktus (žr. 13 pav.).



13 pav. Jonais pakeistų HA taikymas [32]

HA yra naudojamas katalizatoriumi Michaelio prisijungimo reakcijose, Klaizeno-Šmito kondensacijai, selektyviai alkoholių oksidacijai, alkanų oksidacinei dehidrogenacijai. Katijoniniai pakeitimai pagerina HA katalizinį aktyvumą. Pavyzdžiui, Cu-HA pasižymi stipresniu kataliziniu aktyvumu [21]. HA pakeisti lantanoidais gali būti geriau pritaikomi lazerių, fluorescencinių medžiagų gamyboje, gali būti naudojami joniniais laidininkais ar dujų jutikliais [41]. Galimi ir HA taikymai

aplinkosaugoje – vandeniui bei nuotekoms valyti. Kalcio hidroksiapatitas pasižymi puikia adsorbcine talpa bei gebėjimu dalyvauti jonų mainų reakcijose [62, 63]. Dėl to HA ir jo modifikuotos formos plačiai naudojamos sunkiųjų metalų, dažų ir organinių teršalų adsorbentais. Pakeisti Cu^{2+} , Ag^+ , Co^{2+} ar Fe^{3+} HA pasižymi efektyvesne adsorbcija bei pagerintomis antimikrobinėmis ir mechaninėmis savybėmis [64]. Dėl šios priežasties metalais pakeistas HA taikomas ir mikrobiologiškai užterštam vandeniui valyti. Cinko bei vario jonai pasižymi priešuždegiminėmis, antibakterinėmis bei antigrybelinėmis savybėmis. Maži Cu^{2+} jonų kiekiai skatina kai kurių fermentų aktyvumą, dalyvauja ląstelių aktyvacijos energijos gamybos procesuose, elastino gamyboje, padeda susieti kolageną bei elastiną kauluose. Vario jonai dalyvauja žaizdų gijimo procese, sumažina infekcijų atsiradimo tikimybę, paskatina kraujagyslių atsinaujinimą žaizdos vietoje. Kolageno sintezės ir ląstelių pasidalijimo procesai, vykstantys žaizdų gijimo metu, yra priklausomi nuo cinko. Zn^{2+} jonai, pasižymintys netoksiškumu, antibakteriniu poveikiu, dažnai yra naudojami dermatologijoje kaip astringentai, drėkikliai, antimikrobiniai agentai. Antibakterinėmis savybėmis pasižyminčių, netoksiškų metalų įterpimas į HA struktūrą, gali būti labai efektyvus ir paprastas būdas vėžinių ląstelių inhibavimui, implantų atmetimo tikimybės sumažinimui bei infekcijų atsiradimo prevencijai. Galimybė kontroliuoti vario bei cinko kiekį yra labai svarbu, siekiant subalansuoti antibakterinį aktyvumą [17, 22, 47].

Kalcio hidroksiapatitas yra labai perspektyvi medžiaga, o jo pritaikymo galimybės galėtų būti dar platesnės, nustatius įvairių metalų, sintezės vykdymo sąlygų poveikį HA savybėms.

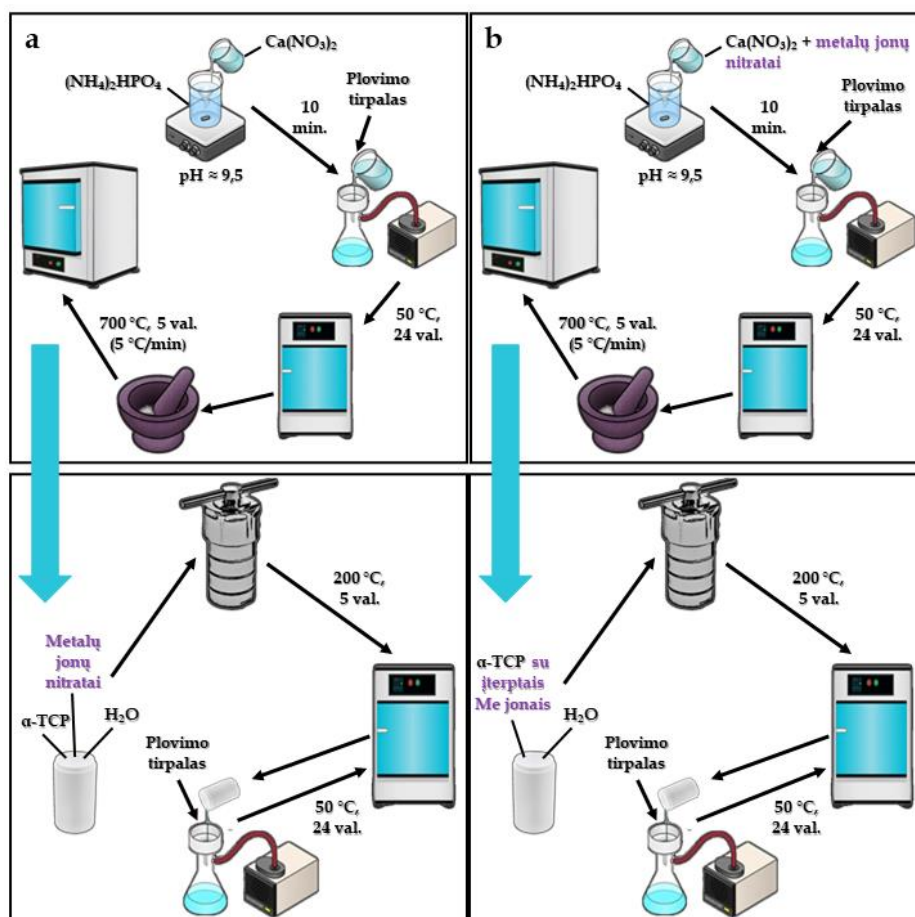
2. EKSPERIMENTINĖ DALIS

2.1. Naudotos medžiagos ir reagentai

- Kalcio nitrato tetrahidratas, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99\%$, Roth, $M = 236,15$ g/mol)
- Diamonio hidrofosfatas, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($\geq 99\%$, Roth, $M = 132,06$ g/mol)
- Cinko nitrato heksahidratas, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 98\%$, Roth, $M = 297,47$ g/mol)
- Vario(II) nitrato trihidratas, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99,5\%$, Roth, $M = 241,60$ g/mol)
- Vandeningis amoniako tirpalas, NH_4OH ($\geq 25\%$, Roth, $M = 35,03$ g/mol)
- 2-propanolis, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ($\geq 99,5\%$, Roth, $M = 60,10$ g/mol)
- Etanolis, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ($\geq 99,8\%$, Honeywell, $M = 46,00$ g/mol)

2.2. HA sintezės procesas

Kalcio hidroksiapatito sintezės metu hidrolizės reakcija vykdoma hidroterminėmis sąlygomis ($120\text{-}230^\circ\text{C}$, 1-16 val.). Metalais pakeisti HA gali būti ruošiami dvejais skirtingais būdais: metalų katijonus įterpiant į pirmtako (ACP) struktūrą jo sintezės metu arba hidroterminės reakcijos metu įvedant juos į vandeninę hidrolizės reakcijos vykdymo terpę. Schema iliustruojanti metalais pakeistų hidroksiapatitų hidroterminės sintezės eigą pateikta 14 pav.



14 pav. Metalais pakeistų HA hidroterminės sintezės vykdymo schemas: a) katijonus įvedant į vandeninę hidrolizės vykdymo terpę, b) katijonus įterpiant į pirmtako struktūrą jo sintezės metu [aut.]

Šiame diplominiame darbe hidroterminiu būdu susintetinti bei apibūdinti metalų jonais (Zn^{2+} , Cu^{2+}) legiruoti kalcio hidroksiapatitai. Susintetinti metalais pakeisti mėginiai yra perduoti jų antibakterinio aktyvumo nustatymui.

2.3. Tyrimo metodai

2.3.1. Rentgeno spindulių difrakcinė analizė (XRD)

Rentgeno spindulių difrakcinės analizės duomenys buvo gauti atlikus susintetintų mėginių matavimus, naudojant Ni-filtro $Cu K_{\alpha}$ ($\lambda Cu K_{\alpha} = 1,5418 \text{ \AA}$) spinduliuotės Rigaku MiniFlex II difraktometrą (detektorius – D-Tex Ultra). Pasirinktos matavimų atlikimo sąlygos: matavimo intervalas – $10\text{--}60^{\circ} 2\theta$, matavimo žingsnis – $0,01^{\circ}$, o greitis – $5^{\circ}/\text{min}$. Medžiagos fazinis grynumas buvo vertinamas Match! 3 bei Origin 2023 programine įranga.

2.3.2. Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių (FTIR) spektroskopija

FTIR analizė buvo atlikta Bruker ALPHA ATR spektrometru (skiriamoji geba – 4 cm^{-1}). Analizuojama infraraudonojo spektro sritis nuo 3000 iki 400 cm^{-1} . Duomenų apdorojimas vykdytas OPUS ir Origin 2023 programine įranga.

2.3.3. Skenuojanti elektroninė mikroskopija (SEM)

SEM morfologiniai tyrimai atlikti Hitachi SU-70 FE-SEM mikroskopu. Didinimas $5000\text{--}50000$ kartų, greitinanti įtampa – 10 kV , darbinis atstumas tarp bandinio ir paskutinės elektrooptinės linzės briaunos – $5,6\text{--}6,0 \text{ mm}$, detektorius – SE. Matavimams paruošti suspensijų pavidalo mėginiai paskleisti ant silicio dioksido plokštelių, kurios dvipuse angline juostele pritvirtintos prie aliuminio padėklo. Paviršiaus nuotraukos leidžia įvertinti medžiagų dydį, formą, išsidėstymą ir aglomeracijos laipsnį.

2.3.4. Induktyviai susietos plazmos optinės emisijos spektrometrija (ICP-OES)

ICP-OES analizė atlikta Perkin Elmer Optima 7000 DV spektrometru ($40,68 \text{ MHz}$ dažnio RF generatorius, galia nuo 750 iki 1500 W , dvigubo stebėjimo optinė sistema, Echelle difrakcinė gardelė (79 linijų/mm), emisijos bangų ilgių intervalas nuo 165 iki 900 nm , CDD detektorius). Mėginiai elementinės analizės atlikimui paruošti juos ištirpinant 5% azoto rūgštyje ir praskiedžiant distiliuotu vandeniu.

2.3.5. Elektronų paramagnetinio rezonanso (EPR) spektrometrija

Elektronų paramagnetinio rezonanso tyrimai atlikti Bruker ELEXSYS-II E500 CW-EPR spektrometru. Tyrimai atlikti kambario temperatūroje. Spektrų užrašymui parinkti parametrai: mikrobangų spinduliavimo dažnis – $9,83 \text{ GHz}$, mikrobangų galia – 10 mW , o magnetinio lauko moduliacijos amplitudė – $0,2 \text{ mT}$. Duomenų apdorojimas vykdytas Origin 2023 programine įranga.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Pirmtako sintezė ir apibūdinimas

HA sintezei pirmtaku naudojamų α -trikalčio fosfato (α -TCP) miltelių paruošimas vyksta keliomis stadijomis: pirmiausia susintetinamas amorfinis kalcio fosfatas, tik tuomet, jį termiškai apdorojant, gaunamas α -TCP.

3.1.1. Amorfinio kalcio fosfato sintezė

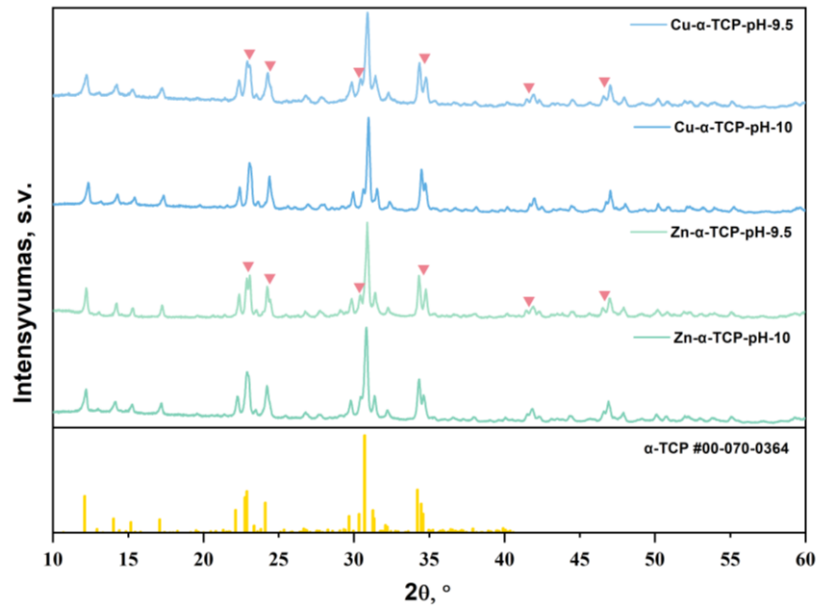
Pirmtako sintezės metu pradinėmis medžiagomis naudotos $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ir $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ druskos, kurios sumaišomos taip, kad Ca/P santykis atitiktų 1,5. Į 15 ml 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ tirpalo, įpilami 5 ml koncentruoto NH_4OH tirpalo ir maišoma (200 rpm) 1 min. Mišinio pH vertė apytiksliai lygi 9,5. Po minutės iš karto greitai supilama 20 ml 0,75 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ tirpalo ir toliau maišoma dar 10 min (400 rpm). Susidariusios baltos nuosėdos filtruojamos, plaunamos su 100 ml distiliuoto H_2O , tuomet – 150 ml 2-propanolio. Sintezės produktas (amorfinis kalcio fosfatas, ACP) džiovinamas džiovinimo spintoje 24 val. 50 °C temperatūroje [65]. Pirmtako ruošimo su į struktūrą įterptais Zn^{2+} ar Cu^{2+} katijonais atvejais, ACP sintezės eiga šiek tiek skiriasi (žr. 14 pav.). Metalų katijonai į kalcio jonų padėtis pereina iš jų nitratų druskų tirpalų, todėl atsiranda papildomos pradinės medžiagos – metalų jonų donorai, kuriais buvo naudotos druskos: $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ bei $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Metalų druskų kiekiai parinkti taip, kad būtų gaunamos 0,8 mol % metalų jonų koncentracijos susintetintuose metalais pakeistuose kalcio hidroksiapatituose. Cinko ir vario nitratai ištirpinami $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ tirpale. Tolimesnė procedūros eiga analogiška.

3.1.2. α -Trikalčio fosfato sintezė

Pagal 3.1.1 punktą susintetinti sausi amorfinės prigimties kalcio fosfato milteliai sutrinami agatinėje grūstuvėje ir kaitinami 5 val. 700 °C temperatūroje (temperatūros kėlimo žingsnis – 5 °C/min) – gaunamas α -trikalčio fosfatas [65].

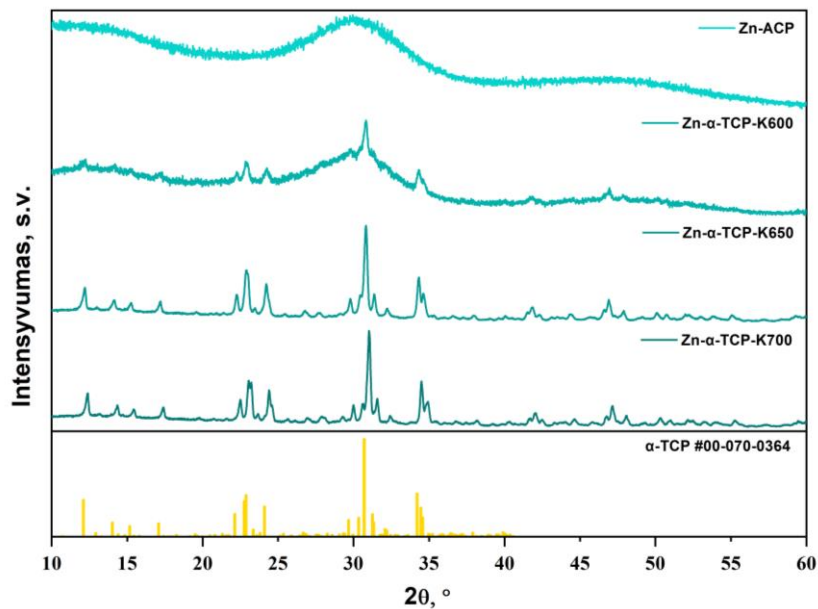
3.1.3. Pirmtako apibūdinimas

ACP sintezės galutinio produkto susidarymas priklauso nuo mišinio pH. Esant aukštesnei pH vertei nei 10, Zn^{2+} ir Cu^{2+} jonai yra linkę sudaryti patvarius hidroksido kompleksinius junginius (pvz., $\text{Zn}(\text{OH})_3^-$, $\text{Zn}(\text{OH})_4^{2-}$, $\text{Cu}(\text{OH})_3^-$, $\text{Cu}(\text{OH})_4^{2-}$) arba išsėda mažai tirpūs hidroksidai ($\text{Zn}(\text{OH})_2$, $\text{Cu}(\text{OH})_2$). Tuomet jonų perėjimo į pirmtako struktūrą procesas yra inhibuojamas. pH įtakos metalų perėjimui į pirmtako struktūrą nustatymui, Cu^{2+} ir Zn^{2+} jonais pakeisti mėginiai buvo sintetinti esant skirtingoms pH vertėms (9,5 ir 10), kai parinktos katijonų koncentracijos buvo 1 mol %. ACP sintezės reakcijos mišinio pH vertei esant 9,5, pirmtako difraktogramose pastebimi smailių suskilimai, o kai jo vertė artima 10, difraktogramos šių smailių skilimų nėra. Galima daryti išvadą, kad reikšmingos katijonų dalies α -TCP struktūroje įterpti nepavyko (žr. 15 pav.). ICP-OES analizės rezultatai patvirtino, jog mėginiuose, susintetintuose esant aukštesnei pH vertei, yra kur kas mažesni pašalinių katijonų kiekiai nei jų buvo įterpta į reakcijos mišinį sintezės metu. Dėl efektyvesnio jonų įsiterpimo į pirmtako struktūrą, mėginius pasirinkta sintetinti pH vertę išlaikant artimą 9,5.



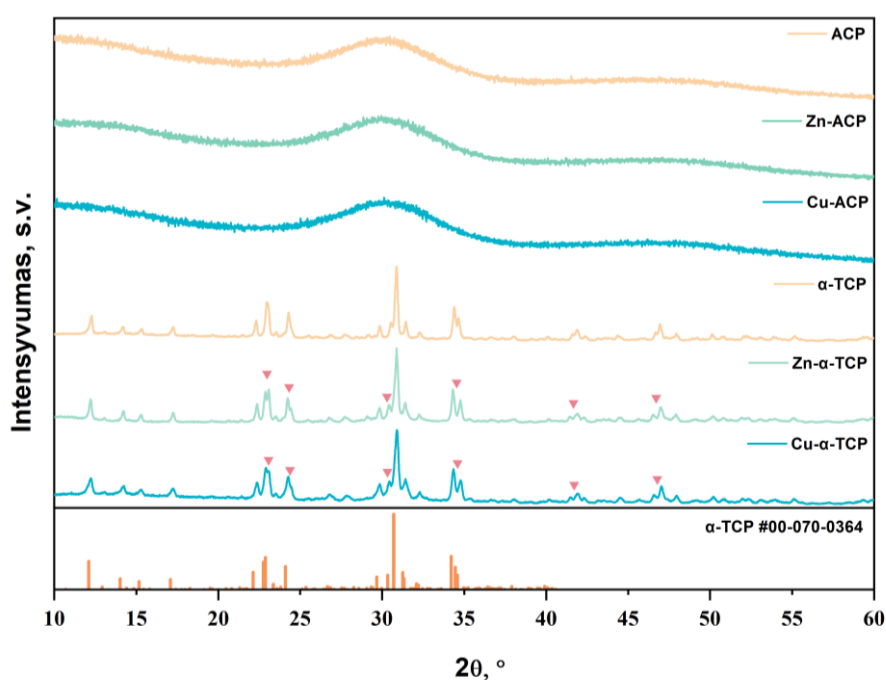
15 pav. Sintezės produktų, kai pirmtakai su į struktūrą įterptais M^{2+} jonais buvo sintetinami esant skirtingoms pH vertėms, difraktogramos. ▼ žymi suskilusias difrakcijos smailes [aut.]

ACP kaitinimo temperatūra nulemia α -TCP bei HA kristališkumą. Kaitinimo temperatūros įtaka pirmtako, su į struktūrą įterptais Zn^{2+} jonais (1 mol %), kristališkumui pavaizduota 16 pav. CP kristalinė fazė pradeda išryškėti tik pasiekus 600 °C, toliau keliant temperatūrą kristališkumas didėja – susiformuoja α -TCP. Viršijus 700 °C temperatūrą (800-1000 °C), α -TCP pradeda virsti β -TCP, tačiau pasiekus 1200 °C temperatūrą susiformavusi β -TCP struktūra ir vėl pavirsta α -TCP [66]. Dėl labiausiai išreikšto kristališkumo buvo pasirinkta mėginius kaitinti 700 °C temperatūroje.



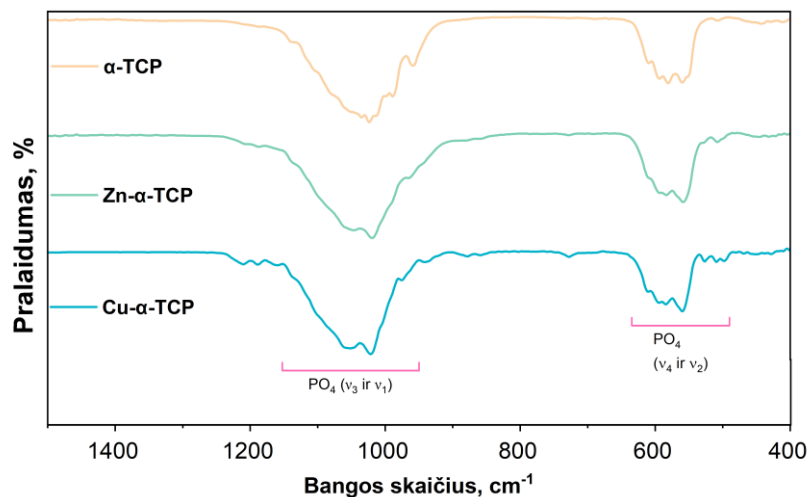
16 pav. Skirtingose temperatūrose kaitintų pirmtakų, su į struktūrą įterptais Zn^{2+} jonais, difraktogramos. Zn^{2+} jonų koncentracija pirmtakų mėginiuose atitinka 1 mol % [aut.]

Gautų medžiagų fazinis grynumas įvertintas atliekant rentgeno spindulių difrakcinę analizę. Gautų miltelių (tiek gryno kalcio fosfato (ACP), tiek ACP su į struktūrą įterptais katijonais) difraktogramos patvirtina susintetintų kalcio fosfatų amorfinę prigimtį. Difraktogramose nėra pastebimų ryškių smailių, galinčių indikuoti kristalinę medžiagos prigimtį, yra tik platūs kreivių suapvalėjimai 30° srityje, kurie būdingi amorfiniam kalcio fosfatui (žr. 17 pav.). Visi paruošti ACP milteliai atitinka amorfinę prigimtį, nepaisant jų cheminės sudėties. Po terminio apdorojimo gautos fazės kristališkumas ir grynumas taip pat charakterizuojamas atliekant XRD analizę. Difraktogramos labai gerai atitinka smailes būdingas monoklininės kristalinės struktūros α -trikalčio fosfatui (#00-070-0364) (žr. 17 pav.). Į mėginius įterpus po 0,8 mol % Zn^{2+} ir Cu^{2+} jonų išlaikoma monoklininė α -TCP struktūra, pašalinės fazės, tokios kaip rombinės struktūros β -TCP, neišryškėja. Pastebimi struktūriniai pakitimai α -TCP mėginiuose su į struktūrą įterptais Zn^{2+} ir Cu^{2+} jonais. Suskilusios difrakcijos smailės, esančios ties $23,0; 24,3; 30,5; 34,5; 41,8$ ir $46,8^\circ$, indikuoja pašalinių metalų įsiterpimą į kristalinę gardelę.



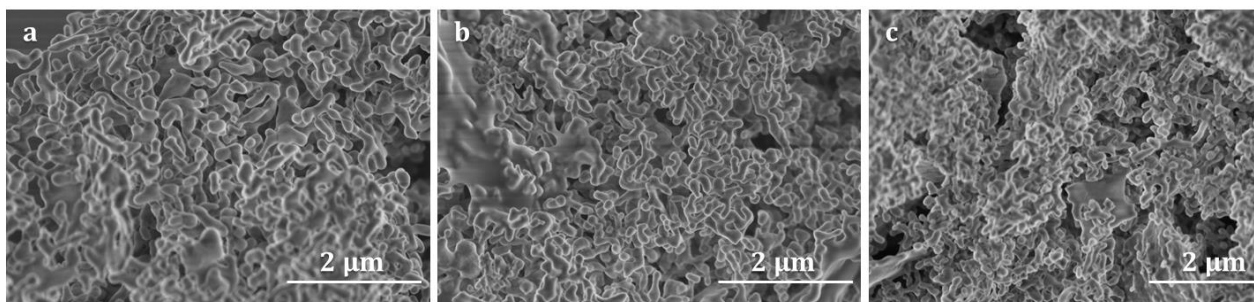
17 pav. Susintetintų (grynų ir su į struktūrą įterptais 0,8 mol % M^{2+} jonais) ACP ir α -TCP junginių difraktogramos. ▼ žymi suskilusias difrakcijos smailes [aut.]

5 valandas 700°C temperatūroje kaitintų ACP ir M-ACP mėginių FTIR spektrai pateikti 18 pav. Visuose analizuotuose mėginiuose $1200\text{-}990\text{ cm}^{-1}$ (ν_3 ir ν_1) bei $660\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ (ν_4 ir ν_2) ruožuose pastebimos kelios skirtingos juostos, atitinkančios α -TCP fosfatų grupės P-O ryšio virpesius. FTIR spektruose matomos virpesių juostos ties $1055, 1039, 1025, 1013, 995$ ir 985 cm^{-1} , atitinka α -TCP fazės P-O ryšių asimetrinius tempimosi virpesius (ν_3), o ties 955 cm^{-1} – P-O simetrinius tempimosi virpesius (ν_1). Taip pat šiuose spektruose pastebimos juostos esančios ties $563, 585, 597, 613\text{ cm}^{-1}$ indikuoja α -TCP P-O ryšių asimetrinius lenkimosi virpesius (ν_4) [63]. Mėginių FTIR spektrai tarpusavyje šiek tiek skiriasi dėl skirtingos į struktūrą įterptų metalų jonų prigimties ir jų sąveikos su aplinkiniais jonais. FTIR spektrai patvirtina α -TCP fazės susiformavimą mėginiuose.



18 pav. Susintetintų (grynų ir su į pirmtako struktūrą įterptais 0,8 mol % M^{2+} jonais) α -TCP junginių FTIR spektrai [aut.]

Zn^{2+} ir Cu^{2+} jonų įvedimas į pirmtako struktūrą veikia jo morfologiją (žr. 19 pav.). Visų mėginių dalelės pasižymi netaisyklinga sferine forma. Metalų jonų įterpimas į pirmtako struktūrą šiek tiek sumažina dalelių dydį bei padidina jų polinkį į aglomeraciją.

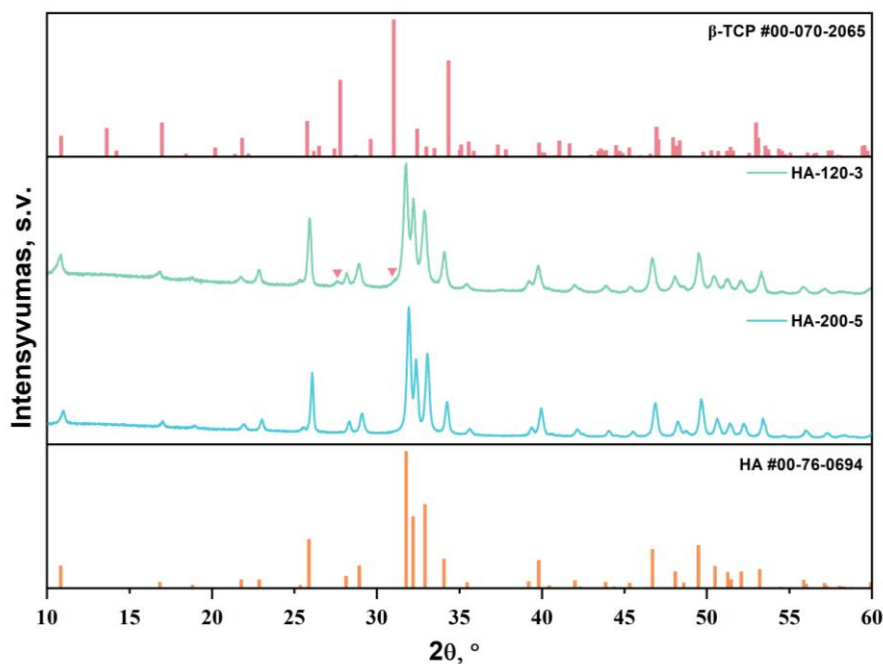


19 pav. (a) Gryno α -TCP, (b) α -TCP su į pirmtako struktūrą įterptų 0,8 mol % Zn^{2+} jonų ir (c) α -TCP su į pirmtako struktūrą įterptų 0,8 mol % Cu^{2+} jonų SEM nuotraukos [aut.]

3.2. HA sintezė ir apibūdinimas

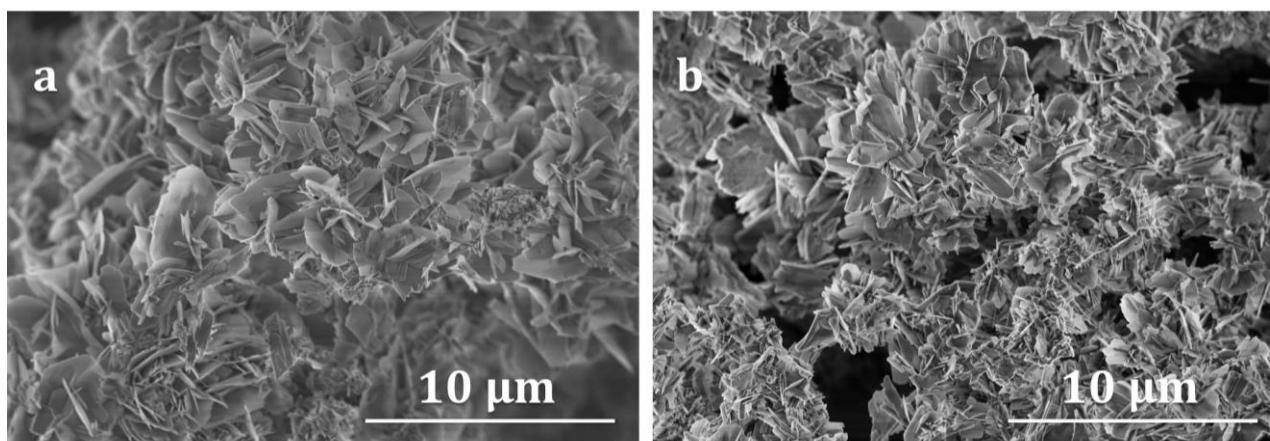
0,3 g susintetinto pirmtako – α -TCP (žr. 3.1.2 skyrelį) patalpinami į 90 ml talpos autoklavą, įpilama 20 ml distiliuoto H_2O . Hidroterminės reakcijos buvo vykdomos keliomis skirtingomis sąlygomis: 120 °C, 3 val. ir 200 °C, 5 val. Praėjus reakcijos vykdymo laikui, mišinys iš karto filtruojamas, nuosėdos praplaunamos 10 ml etanolio. Susintetintas produktas džiovinamas 24 val. 50°C temperatūroje. Gauta medžiaga sutrinama agatinėje grūstuvėje ir analizuojama.

Skirtingos hidroterminės sintezės vykdymo sąlygos veikia gaunamo kalcio hidroksiapatito fazinį grynumą bei kristališkumą. Vykiant hidroterminę reakciją skirtingomis sąlygomis, susidarė kalcio hidroksiapatito (#00-76-0694) dominuojanti fazė (žr. 20 pav.). Visgi, žemesnė temperatūra ir trumpesnis reakcijos vykdymo laikas skatina pašalinių fazių formavimąsi (β -TCP ties 27,6 ir 31,1°) bei nulemia mažesnį kristališkumą, todėl optimalesnės reakcijos vykdymo sąlygos yra 200 °C, 5 val.



20 pav. Skirtingomis hidroterminės sintezės sąlygomis susintetintų kalcio hidroksiapatitų difraktogramos. ▼ žymi β -TCP fazės smailes [aut.]

Hidroterminės sintezės vykdymo sąlygų skirtumai neturi žymios įtakos galutinio produkto (kalcio hidroksiapatito) morfologijai (žr. 21 pav.). Abejais būdais gautų sintezės produktų dalelės yra plokštelių pavidalo.



21 pav. Skirtingomis hidroterminės sintezės sąlygomis susintetintų kalcio hidroksiapatitų SEM nuotraukos: a) 120 °C, 3 val., b) 200 °C, 5 val [aut.]

3.3. Metalų jonais pakeistų HA pavyzdžių sintezė ir apibūdinimas

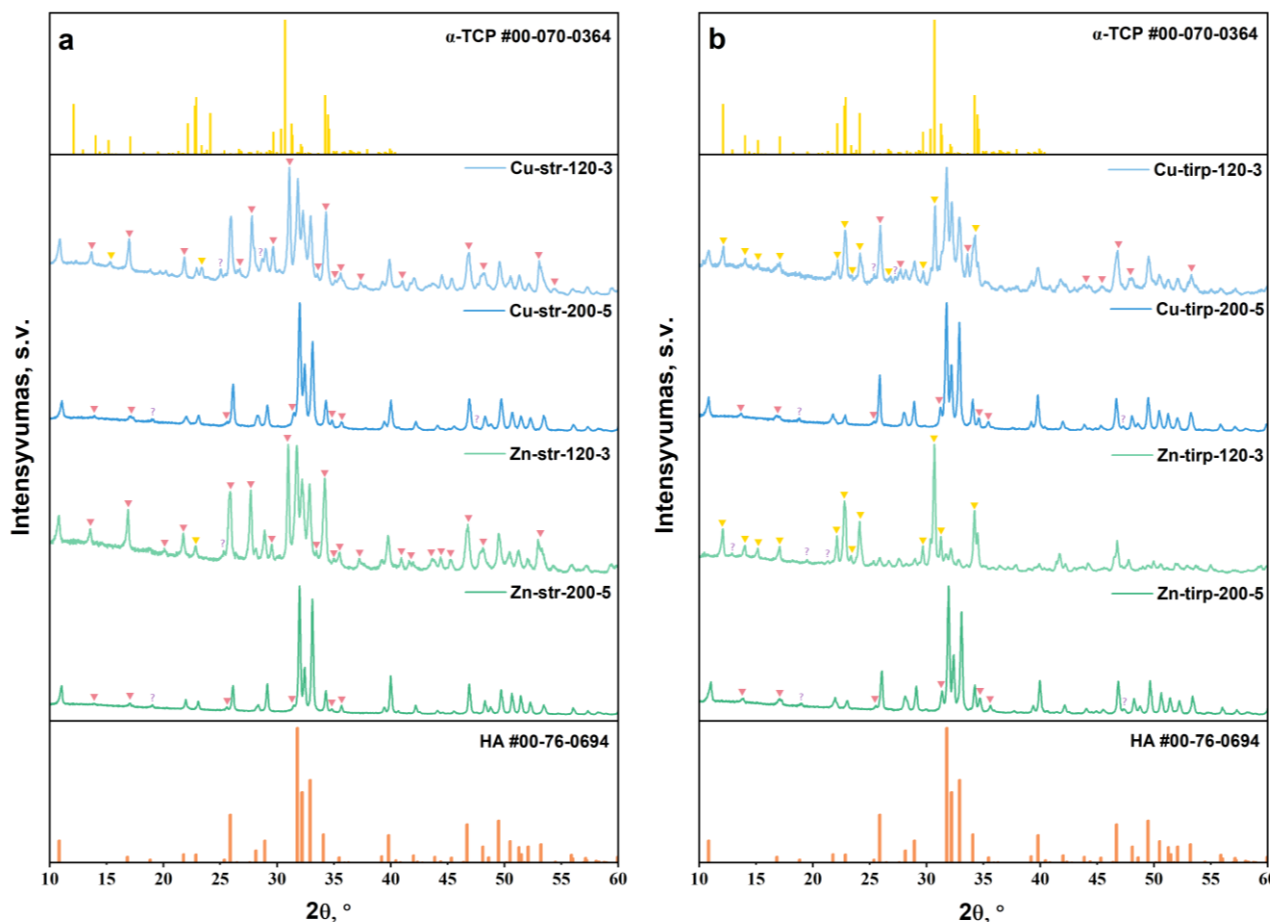
3.3.1. Metalų jonai struktūroje

Kai metalų jonai įterpiami į pirmtako struktūrą amorfinio kalcio fosfato sintezės metu (žr. 3.1. skyrelį), 0,3 g α -TCP, su jau į struktūrą įterptais metalų katijonais, autoklave užpilami 20 ml distiliuoto H_2O . Hidroterminės reakcijos sąlygos buvo vykdomos skirtingomis sąlygomis: 120 °C,

3 val. ir 200 °C, 5 val. Praėjus reakcijos vykdymo laikui, mišinys iš karto filtruojamas, nuosėdos praplaunamos 10 ml etanolio. Susintetintas produktas džiovinamas 24 val. 50°C temperatūroje (žr. 14 pav.). Gauta medžiaga sutrinama agatinėje grūstuvėje ir analizuojama.

3.3.1.1. Apibūdinimas XRD analizės metodu

22 paveiksle pateiktos hidroksiapatitų mėginių, paruoštų skirtingomis hidroterminės sintezės sąlygomis, difraktogramos. Cu^{2+} bei Zn^{2+} druskų kiekis reakcijos mišinyje (drėgnojo nusodinimo arba hidroterminės sintezės) atitinka HA pakeitimą 0,8 mol %.



22 pav. Skirtingomis hidroterminės sintezės sąlygomis (120 °C, 3 val. ir 200 °C, 5 val.) susintetintų Cu^{2+} bei Zn^{2+} jonais pakeistų kalcio hidroksiapatitų difraktogramos: a) katijonus įterpiančią pirmtako struktūrą jo sintezės metu, b) katijonus įvedant į vandeninę hidrolizės vykdymo terpę, kur: ▼ žymi β -TCP, ▼ – α -TCP, o ? – neidentifikuotas kristalines fazes.

M^{2+} jonų koncentracija mėginiuose atitinka 0,8 mol % [aut.]

Iš difraktogramų matoma, kad galutinio produkto fazinis grynumas labai priklauso nuo hidroterminės reakcijos vykdymo sąlygų (laiko ir temperatūros) bei pašalinių jonų. Nors hidroterminės sintezės 120 °C temperatūroje 3 valandas metu α -TCP hidrolizės produktas buvo beveik vienfazis HA (žr. 20 pav.), tomis pačiomis sąlygomis vykdytų hidrolizių produktai, reakcijos mišinyje esant pašalinių katijonų, nėra faziškai gryni. Akivaizdu, kad pašaliniai jonai, esantys vandeninėje reakcijos vykdymo terpėje, pasižymi didesniu inhibuojančiu efektu α -TCP hidrolizei. Tai ryškiausiai matoma švelnesnėmis sąlygomis (120 °C, 3 val.) susintetintų galutinių produktų

difraktogramose (žr. 22 pav.). Cu^{2+} jonais pakeistų hidroksiapatitų mėginiai (Cu-str-120-3 bei Cu-tirp-120-3) yra CDHA, β -TCP, α -TCP ir neidentifikuotos fazės mišiniai. Be to, Cu-tirp-120-3 mėginyje yra didesnis kiekis nesureagavusios α -TCP fazės. Zn^{2+} jonais pakeistas hidroksiapatito mėginys (Zn-str-120-3) taip pat yra CDHA, β -TCP, α -TCP ir neidentifikuotos fazės mišinys, tačiau Zn-tirp-120-3 mėginys yra beveik grynas α -TCP (ICDD 00-070-0364). Įvairių pašalinių katijonų buvimas reakcijos tirpale veikia α -TCP hidrolizės proceso efektyvumą bei skatina pašalinių fazių formavimąsi. Taip pat galima teigti, kad Zn^{2+} jonai labiau lėtina α -TCP hidrolizės procesą nei Cu^{2+} .

Prailginus sintezės trukmę bei pakėlus temperatūrą susidaro CDHA dominuojanti fazė. Tačiau visais atvejais susidaro ir pašalinės β -TCP fazės pėdsakai. β -TCP struktūros stabilizacija yra susijusi su termodinaminiu legiruotų α - ir β -TCP stabilumu. Yra įrodyta, jog mažesnio dydžio katijonų įvedimas į α -TCP kristalinės gardelės Ca padėtis yra ribotas. Atliekant mažų katijonų pakeitimus Ca-5 srityse, β -TCP struktūrai yra būdinga žema defektų susiformavimo energija, dėl to M^{2+} katijonai yra stabilesni β -TCP gardelėje [67]. Vykiant hidroterminę sintezę su 0,8 mol % Cu^{2+} ar Zn^{2+} jonų pakeistais pirmtakais, gebantis atsilaisvinti iš α -TCP struktūros pašalinių katijonų kiekis yra ribotas, dėl šios priežasties pasireiškia kur kas mažesnė pašalinių jonų įtaka, lyginant su tais pačiais jonų kiekiais hidroterminės reakcijos tirpale. Metalų jonų įtaka, juos įvedant į α -TCP hidrolizės reakcijos vykdymo vandeninę terpę, galutinio produkto savybėms detalčiau aptariama 3.3.2 skyrelyje.

Nors į mėginių struktūrą įvestų katijonų koncentracijos santykiniai nedidelės, jos pakankamos jų daromo poveikio kristalinės gardelės parametrams nustatyti. Tam tikslui buvo atlikta didesniu faziniu grynumu pasižyminčių pavyzdžių Rietveld analizė (žr. 5 lentelė). Nepriklausomai nuo pasirinkto sintezės būdo, tiek Cu^{2+} , tiek Zn^{2+} jonų įvedimas į HA struktūrą šiek tiek sumažino $a(b)$ bei c gardelės parametrus. Atliekant Rietveld analizę pastebėta, kad Cu^{2+} jonai yra labiau linkę užimti Ca(I) padėtį, o Zn^{2+} jonai – Ca(II). Visgi, norint gauti statistiškai patikimus rezultatus, keliami specialūs reikalavimai rentgeno spindulių difraktogramoms (ilgas užrašymo laikas, mažas žingsnis ir t.t.). Dalis šaltinių patvirtina šiuos Cu^{2+} ir Zn^{2+} jonais pakeistų HA gardelės parametrų pakitimus (jų sumažėjimą) bei aprašo tokias pačias kalcio padėčių užėmimo tendencijas.

5 lentelė

Rietveld analizės rezultatai. Katijonų įtaka HA gardelės parametrams [aut.]

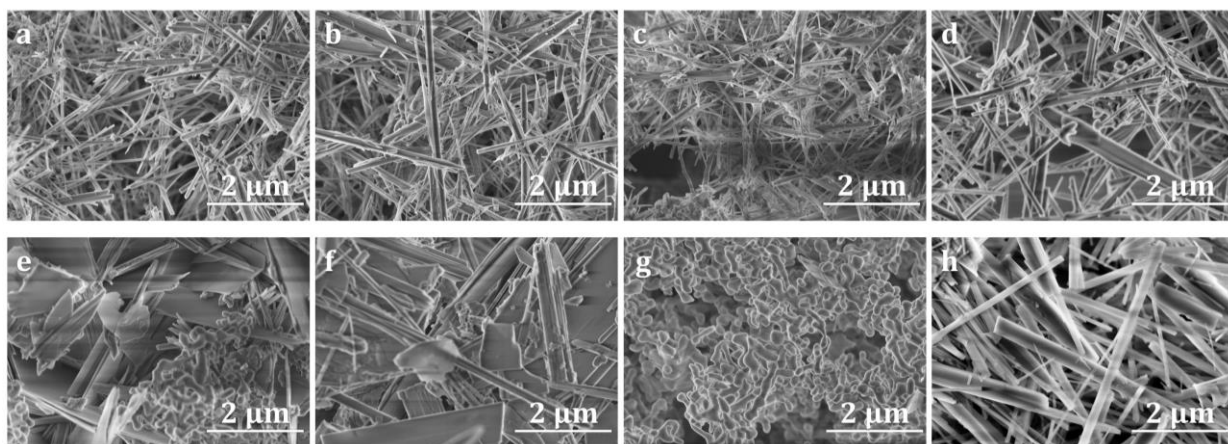
Mėginys	Gardelės parametrai	
	$a(b)$, Å	c , Å
HA	9,432	6,881
Cu-str-200-5	9,43157 ↓	6,88065 ↓
Zn-str-200-5	9,43020 ↓	6,87832 ↓
Cu-tirp-200-5	9,42084 ↓	6,87335 ↓
Zn-tirp-200-5	9,42657 ↓	6,87942 ↓

3.3.1.2. Apibūdinimas SEM metodu

SEM nuotraukos įrodo, kad hidroterminės sintezės vykdymo sąlygos bei pašalinių katijonų buvimas reakcijos mišinyje gali reikšmingai paveikti mėginių morfologiją. SEM nuotraukose matoma, kad Cu-tirp-120-3 mėginys yra nesureagavusio pirmtako ir / ar β -TCP sferinių dalelių bei plokštelių pavidalo hidroksiapatito mišinys, o Zn-tirp-120-3 mėginyje žymių morfologijos pokyčių, lyginant su pirmtaku, išvis nėra pastebima. Tiek Cu^{2+} , tiek Zn^{2+} jonų įterpimas į hidroksiapatito struktūrą paskatino lazdelių formos dalelių susiformavimą. Zn-tirp-200-5 mėginyje šis katijonų

poveikis pastebimas kur kas akivaizdžiau (žr. 23 pav. f, h). Mėginys Cu-tirp-200-5 yra plokštelių, lazdelių ir sferinių dalelių mišinys, o Zn-tirp-200-5 susideda tik iš lazdelių.

Pašalinių jonų įterpimo į pirmtako struktūrą, prieš hidroterminės reakcijos vykdymą, atvejais visi galutiniai produktai pasižymi lazdelių formos morfologija su pastebimomis sferinių dalelių priemaišomis (žr. 23 pav. a-d). Visų šių mėginių lazdelių formos dalelės yra mažesnės, taip pat jos pasižymi didesniu sulipimu tarpusavyje ir mažesniu grynumu lyginant su Zn-tirp-200-5 mėginiu.



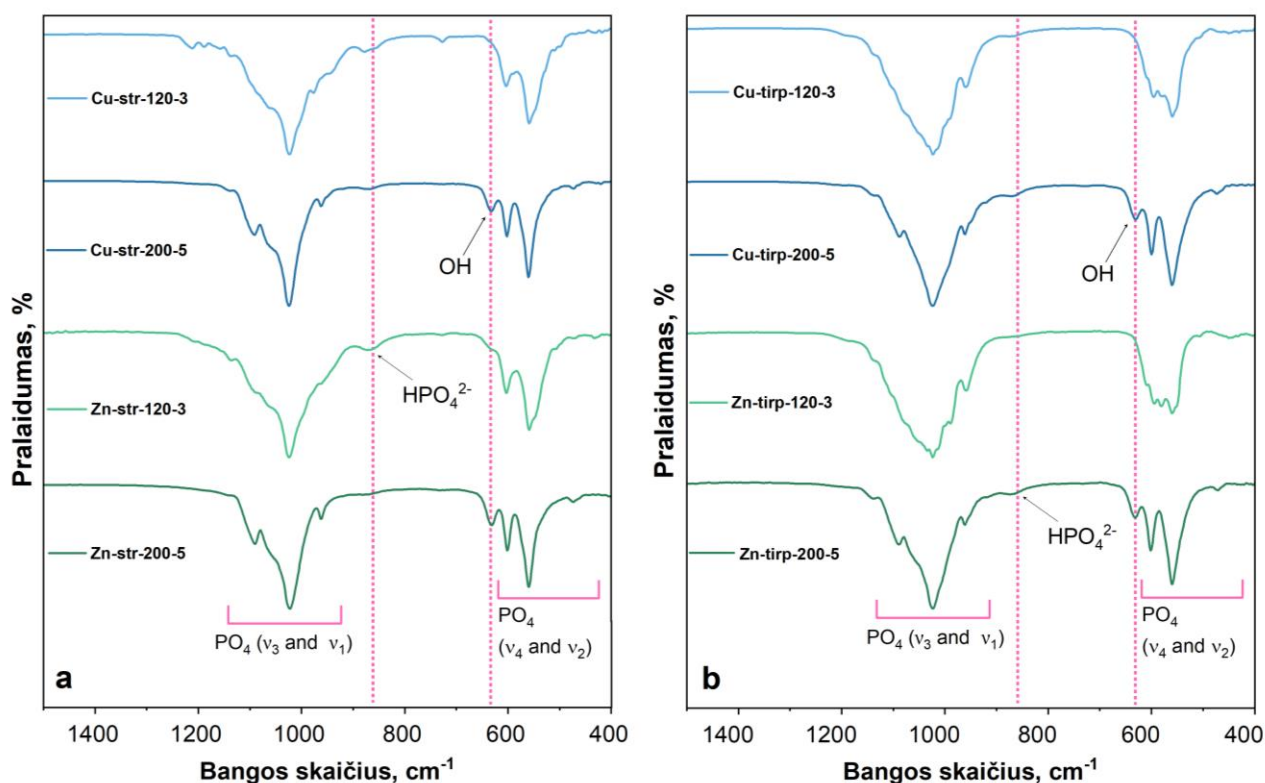
23 pav. Skirtingomis hidroterminės sintezės sąlygomis (120 °C, 3 val. ir 200 °C, 5 val.) susintetintų Cu^{2+} bei Zn^{2+} jonais pakeistų kalcio hidroksiapatitų SEM nuotraukos: a) Cu-str-120-3, b) Cu-str-200-5, c) Zn-str-120-3, d) Zn-str-200-5, e) Cu-tirp-120-3, f) Cu-tirp-200-5, g) Zn-tirp-120-3, h) Zn-tirp-200-5. M^{2+} jonų koncentracijos mėginiuose atitinka 0,8 mol % [aut.]

3.3.1.3. Apibūdinimas FTIR metodu

24 paveiksle pavaizduoti hidroterminiu metodu susintetintų metalais pakeistų hidroksiapatitų mėginių FTIR spektrai (1500-400 cm^{-1}). Spektuose yra stebimos PO_4^{3-} grupei būdingos absorbcijos juostos ties 1200-940 cm^{-1} ir 660-500 cm^{-1} , atitinkančios tempimosi (ν_3 ir ν_1) bei lenkimosi (ν_4 ir ν_2) virpesių dažnius. FTIR spektrų skirtumai šių PO_4^{3-} grupės absorbcijos juostų srityse atspindi skirtingas susintetintų medžiagų savybes. HA fosfatų grupei charakteringos virpesių juostos stebimos 1086 ir 1021 cm^{-1} (ν_3), 962 cm^{-1} (ν_1) bei 600 ir 560 cm^{-1} (ν_4), atitinkančios asimetrinius P-O ryšių tempimosi, simetrinius P-O tempimosi bei P-O lenkimosi virpesius [68]. Mėginių, susintetintų 200 °C, 5 val. sąlygomis, FTIR spektruose matomos intensyviausios HA fosfatų grupei būdingos virpesių juostos. Šiuose mėginiuose pastebimos ir hidroksilo grupės (-OH) – lenkimosi virpesių dažniai identifikuoti 633 cm^{-1} srityje.

Mėginių Cu-tirp-120-3 ir Zn-tirp-120-3 spektruose matomos virpesių juostos ties 1055, 1039, 1025, 1013, 995 ir 985 cm^{-1} atitinka α -TCP fazės P-O ryšių asimetrinius tempimosi virpesius (ν_3), o ties 955 cm^{-1} – P-O simetrinius tempimosi virpesius (ν_1). Taip pat šiuose spektruose pastebimos juostos esančios ties 563, 585, 597, 613 cm^{-1} indikuoja α -TCP P-O ryšių asimetrinius lenkimosi virpesius (ν_4) [63].

Mėginių Cu-str-120-3 ir Zn-str-200-5 spektrų virpesių juostos esančios ties 1083 cm^{-1} gali būti priskiriamos β -TCP fazės P-O ryšių asimetriniams tempimosi virpesiams (ν_3), o signalas esantis ties 972 cm^{-1} – β -TCP simetriniams P-O ryšių tempimosi virpesiams (ν_1). Visa tai labai gerai atitinka XRD rezultatus (žr. 22 pav.).



24 pav. Skirtingomis hidroterminės sintezės sąlygomis (120 °C, 3 val. ir 200 °C, 5 val.) susintetintų Cu^{2+} bei Zn^{2+} jonais pakeistų kalcio hidroksiapatitų FTIR spektrai: a) katijonus įterpiančią pirmtako struktūrą jo sintezės metu, b) katijonus įvedant į vandeninę hidrolizės vykdymo terpę. M^{2+} jonų koncentracija mėginiuose atitinka 0,8 mol % [aut.]

3.3.1.4. ICP-OES tyrimas

ICP-OES tyrimas buvo atliktas norint nustatyti galutinių produktų elementinę sudėtį, įsitikinti, kad įvedami katijonai perėjo iš reakcijos tirpalo į gautų miltelių struktūrą ir įvertinti jonų įsiterpimo efektyvumą lyginant su pradiniais M/Ca santykiais. 6 lentelėje pateikti šio tyrimo rezultatai.

6 lentelė

Hidroterminės sintezės produktų ICP-OES analizės rezultatai [aut.]

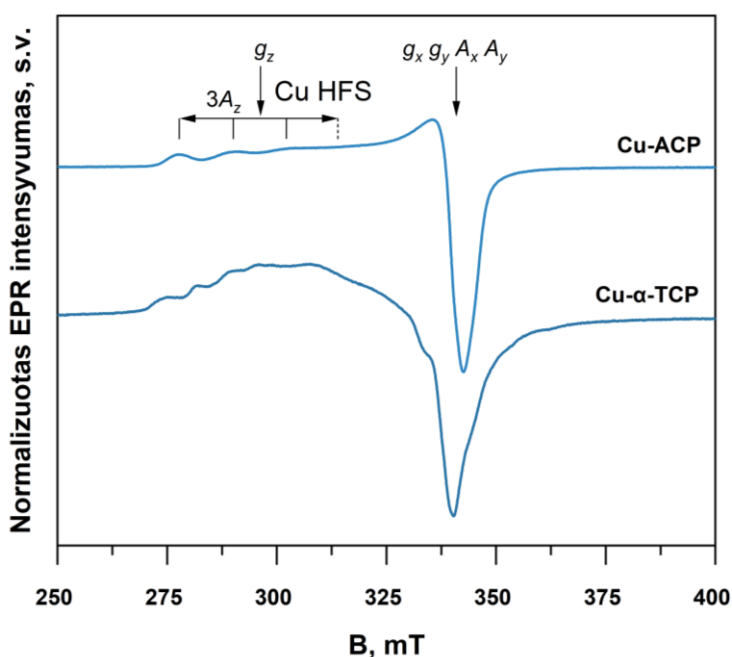
Metalo jonas	Sintezės būdas	Teorinis M^{2+} kiekis, mol %	Nustatytas M^{2+} kiekis, mol %	
			120 °C, 3 val.	200 °C, 5 val.
Cu^{2+}	M^{2+} struktūroje	0,8	0,88	0,86
	M^{2+} tirpale		0,82	0,75
Zn^{2+}	M^{2+} struktūroje		0,84	0,87
	M^{2+} tirpale		0,79	0,83

ICP-OES analizės rezultatai demonstruoja sėkmingą, efektyvų Cu^{2+} ir Zn^{2+} katijonų įsiterpimą į mėginių struktūrą. Cu^{2+} ir Zn^{2+} jonų kiekis galutiniuose produktuose beveik atitinka pradinius katijonų santykius reakcijos mišiniuose. Vis dėlto, kadangi galutiniai gauti sintezės produktai nėra fiziškai gryni, galima daryti prielaidą, kad dalis katijonų gali būti ne hidroksiapatitų struktūroje, o,

pavyzdžiui, β -TCP struktūroje. Detalesniam jonų išsidėstymui suprasti, papildomai buvo atlikti elektronų paramagnetinio rezonanso (EPR) tyrimai.

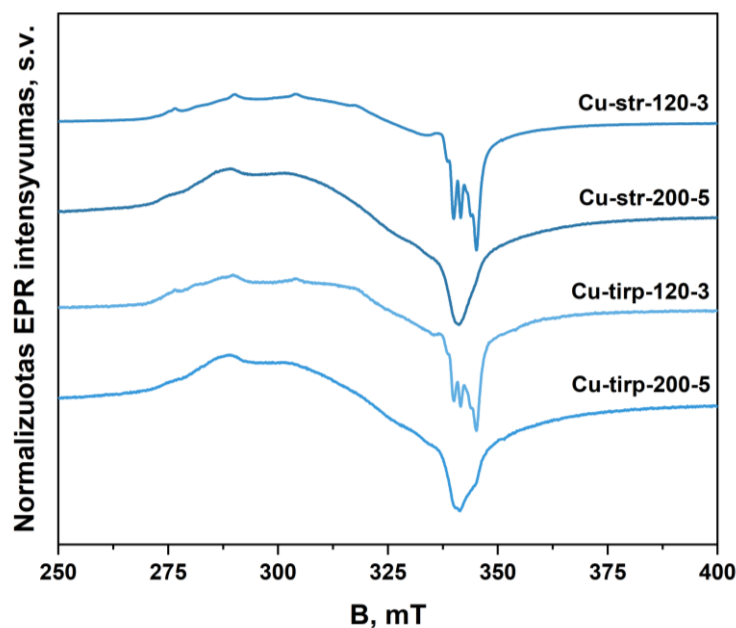
3.3.1.5. EPR tyrimas

EPR spektro signalai suteikia papildomos informacijos apie aplinką, supančią paramagnetinius jonus. Dėl šios priežasties EPR spektroskopija yra tinkama skirtingų sintezės būdų sukeltų struktūrinių pokyčių stebėjimui. Cu^{2+} jonais pakeisto ACP ir α -TCP EPR spektrai pateikti 25 pav.



25 pav. Susintetintų pirmtakų (ACP ir α -TCP), su į struktūrą įterptais 0,8 mol % Cu^{2+} jonais, EPR spektrai [aut.]

Variu legiruotų mėginių EPR spektrai yra Cu^{2+} jonų (elektrono sukiny $S = 1/2$) atspindys. Signalų forma gali būti aiškinama rombinės simetrijos g -faktoriumi ($g_x \neq g_y \neq g_z$) ir anizotropine hipersmulkiąja sąveika su ^{63}Cu ir ^{65}Cu branduoliais ($I = 3/2$). Iš spektro mažų laukų srities galima apskaičiuoti g - ir A -faktorijų z sudedamąsias – Cu-ACP mėginio $g_z \approx 2.37$, o $A_z \approx 12$ mT. Šios parametrų vertės panašios į literatūroje pateikiamas, būdingas Cu^{2+} jonais pakeistiems HA ir β -TCP [67–71]. x ir y sudedamųjų nustatymas yra sudėtingas dėl spektrų persiklojimo. α -TCP spektras pasižymi poslinkiu mažesnių laukų verčių link – tai indikuoja didesnę g_z vertę. Be to, šiame spektre pastebimos daugiau nei keturios hipersmulkiosios sandaros (HFS) linijos, liudijančios apie Cu^{2+} jonų užimamas skirtingas kalcio padėtis α -TCP struktūroje. 26 paveiksle pateikti skirtingomis sąlygomis susintetintų Cu^{2+} jonais pakeistų HA EPR spektrai.



26 pav. Skirtingomis hidroterminės sintezės sąlygomis (120 °C, 3 val. ir 200 °C, 5 val.) susintetintų Cu^{2+} jonais pakeistų (katijonus įterpiančių pirmtako struktūrą jo sintezės metu ir katijonus įvedant į vandeninę hidrolizės vykdymo terpę) kalcio hidroksiapatitų EPR spektrai Cu^{2+} jonų koncentracija mėginiuose atitinka 0,8 mol % [aut.]

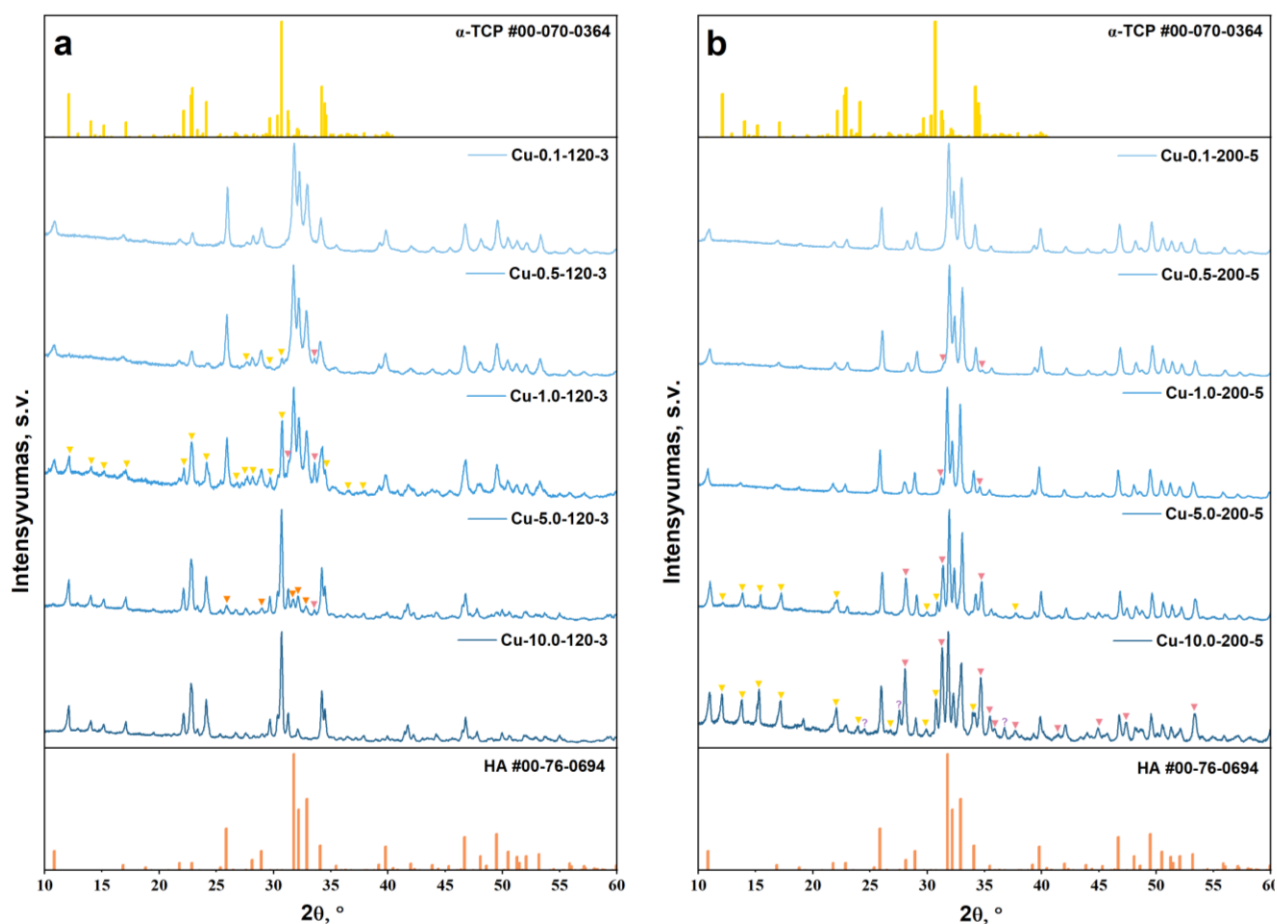
Iš EPR spektrų matomas hidroterminės sintezės sąlygų poveikis galutiniams produktams. 200 °C 5 val. susintetintų mėginių EPR spektrai sutampa su literatūroje pateikiamais Cu-HA spektrais [67–69]. Dviejų skirtingų Cu^{2+} jonų koordinacijų EPR signalai yra stipriai persiklojantys, sunkiai diferencijuojami. Sintezę vykdant švelnesnėmis sąlygomis, papildomi Cu^{2+} signalai persidengia su eksperimentiniu spektru. Šių mėginių EPR spektruose matomi signalai būdingi Cu^{2+} jonams esantiems β -TCP struktūroje. EPR spektrų duomenys patvirtina XRD ir FTIR analizės rezultatus.

3.3.2. Metalų jonai tirpale

Metalais pakeistų hidroksiapatitų sintezei hidroterminėmis sąlygomis pradinėmis medžiagomis buvo naudotas susintetintas grynas α -trikalčio fosfatas (žr. 3.1.2 skyrelį) bei įvedamų metalų nitratai. Metalų druskų kiekiai parinkti taip, kad gautos metalų jonų koncentracijos susintetintuose metalais pakeistuose kalcio hidroksiapatituose atitiktų 0,1; 0,5; 1; 5 ir 10 mol %. Hidroterminės reakcijos vėl buvo vykdomos 120 °C, 3 val. ir 200 °C, 5 val.

3.3.2.1. Apibūdinimas XRD analizės metodu

27 ir 28 paveiksluose pateiktos metalais pakeistų hidroksiapatitų mėginių difraktogramos. Lyginant mėginių difraktogramas galima stebėti įvedamų pašalinių katijonų koncentracijos reakcijos vykdymo vandeninėje terpėje bei reakcijos vykdymo sąlygų daromą įtaką α -TCP hidrolizės procesui.

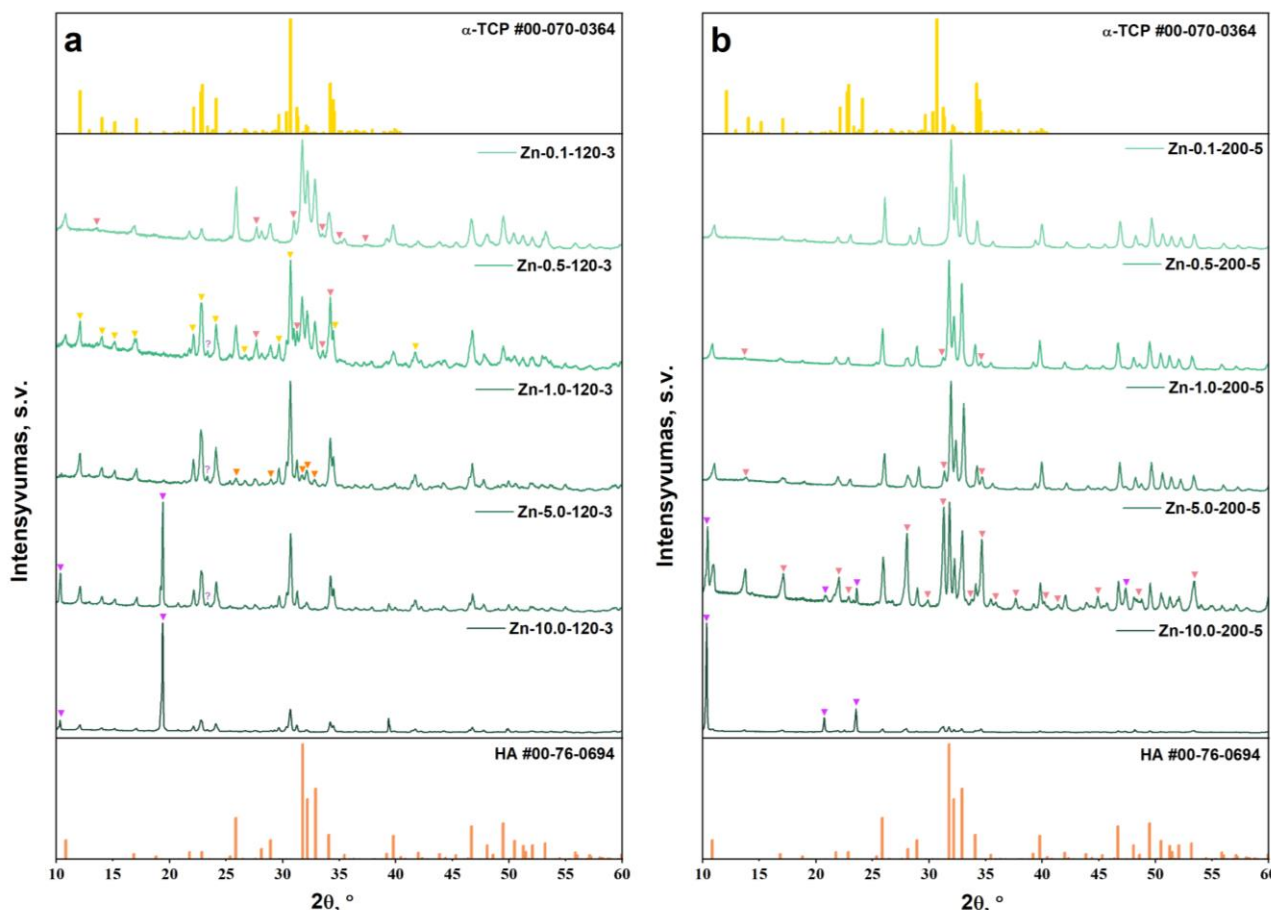


27 pav. Skirtingomis hidroterminės sintezės sąlygomis susintetintų Cu^{2+} jonais pakeistų (katijonus įvedant į vandeninę hidrolizės reakcijos vykdymo terpę) kalcio hidroksiapatitų difraktogramos: a) 120 °C, 3 val., b) 200 °C, 5 val., kur: \blacktriangledown žymi β -TCP, \blacktriangledown – α -TCP, \blacktriangledown – HA, o ? – neidentifikuotas kristalines fazes. Cu^{2+} jonų koncentracijos mėginiuose – 0,1-10,0 mol % [aut.]

Difraktogramose pastebimas didelis hidroterminės reakcijos vykdymo sąlygų (laiko bei temperatūros) ir pašalinių jonų daromas poveikis galutinio produkto faziniam grynumui bei pačiam pirmtako virsmui į HA. 0,1 mol % Cu^{2+} jonų nelétino galutinio produkto susidarymo – reakcijas vykdant ir 120 °C 3 val., ir 200 °C 5 val. – abejais atvejais susidarė grynas HA. Cu-0.1-200-5 pasižymi didesniu kristališkumu nei Cu-0.1-120-3. Padidinus Cu^{2+} jonų kiekį tirpale iki 0,5 mol %, jau pastebimas pašalinės fazės (β -TCP) formavimasis, tačiau dominuojanti fazė vis dar lieka HA. Hidroterminės sintezės sąlygų įtaka ryškiausiai matoma į reakcijos mišinį pridėjus 1 mol % Cu^{2+} . Reakciją vykdant 200 °C 5 val., pagrindinė fazė yra HA (su β -TCP priemaišomis), o 120 °C 3 val. – mišinys susidedantis iš CDHA, α -TCP bei šiek tiek β -TCP. Tolimesnis vario jonų kiekio reakcijos mišinyje didinimas vis labiau lėtina α -TCP hidrolizę (žr. 27 pav., a) arba stipriai skatina pašalinių fazių formavimąsi (žr. 27 pav., b).

Mėginiuose su Zn^{2+} jonais pastebima intensyvesnė pašalinių katijonų įtaka (žr. 28 pav.). Hidroterminę sintezę vykdant 200 °C 5 val., 0,1 mol % Zn^{2+} jonų nelétina α -TCP hidrolizės. Zn-0.1-120-3 mėginio vyraujanti pagrindinė fazė yra CDHA, tačiau mėginyje yra ir pašalinės β -TCP fazės pėdsakų. Lyginant Zn-0.1-120-3 ir Zn-0.1-200-5 mėginius, pastarasis pasižymi didesniu kristališkumu. Hidroterminę reakciją vykdant 120 °C 3 val. ir padidinant Zn^{2+} jonų kiekį tirpale iki 0,5 mol %, pradeda ryškėti inhibuojantis poveikis α -TCP hidrolizės procesui, o katijonų koncentraciją

didinant toliau (5 ir 10 mol %), mėginių difraktogramose stipriai pasireiškia susidariusi pašalinė fazė – šolzitas (smailės ties 10,4 ir 19,4°) (žr. 28 pav., a). Hidroterminę reakciją vykdant 200 °C 5 val ir padidinant Zn²⁺ jonų kiekį tirpale iki 0,5-1,0 mol %, pasireiškia pašalinės fazės formavimasis (β-TCP). Toliau didinant pašalinių katijonų koncentraciją hidrolizės reakcijos vykdymo terpėje, Zn-5.0-200-5 mėginyje padaugėja β-TCP priemaišų, atsiranda ir šolzito pėdsakų, o mėginyje Zn-10.0-200-5 – šolzito fazė yra pagrindinė (žr. 28 pav., b).



28 pav. Skirtingomis hidroterminės sintezės sąlygomis susintetintų Zn²⁺ jonais pakeistų (katijonus įvedant į vandeninę hidrolizės reakcijos vykdymo terpę) kalcio hidroksiapatitų difraktogramos: a) 120 °C, 3 val., b) 200 °C, 5 val., kur: ▼ žymi β-TCP, ▼ – α-TCP, ▼ – HA, ▼ – šolzito, o ? – neidentifikuotas kristalines fazes. Zn²⁺ jonų koncentracijos mėginiuose – 0,1-10,0 mol % [aut.]

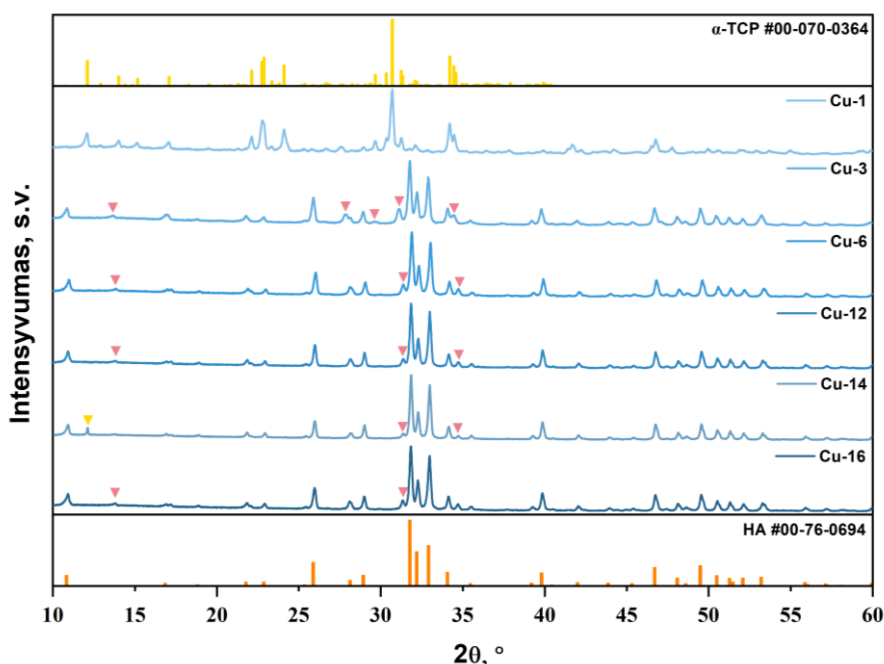
Norint ištirti į hidroksiapatito struktūrą įvedamų katijonų koncentracijos poveikį gardelės parametrams, atlikta Rietveld analizė. Analizės rezultatai pateikti 7 lentelėje.

Rietveld analizės rezultatai. Katijonų įtaka HA gardelės parametrams [aut.]

Mėginys	Gardelės parametrai	
	$a(b)$, Å	c , Å
HA	9,432	6,881
Cu-0.1-200-5	9,42673 ↓	6,87633 ↓
Cu-0.5-200-5	9,42648 ↓	6,87643 ↓
Cu-1.0-200-5	9,42084 ↓	6,87335 ↓
Zn-0.1-200-5	9,43072 ↓	6,87838 ↓
Zn-0.5-200-5	9,42286 ↓	6,87550 ↓
Zn-1.0-200-5	9,42657 ↓	6,87942 ↓

Vėlgi, nepriklausomai nuo katijonų prigimties ar jų koncentracijos, visais atvejais gardelės parametrai šiek tiek sumažėjo. Rietveld analizės atlikimo metu pastebėta, kad visais atvejais Cu^{2+} jonai buvo linkę užimti Ca(I) poziciją, o Zn^{2+} jonai – Ca(II).

Siekiant susintetinti vienfazį HA ir geriau suprasti Cu^{2+} jonų daromą įtaką CDHA formavimuisi, buvo keičiamos hidroterminės reakcijos sąlygos. Fazinio grynumo priklausomybė nuo reakcijos vykdymo laiko pateikta 29 pav., o priklausomybė nuo reakcijos vykdymo temperatūros – 30 pav.

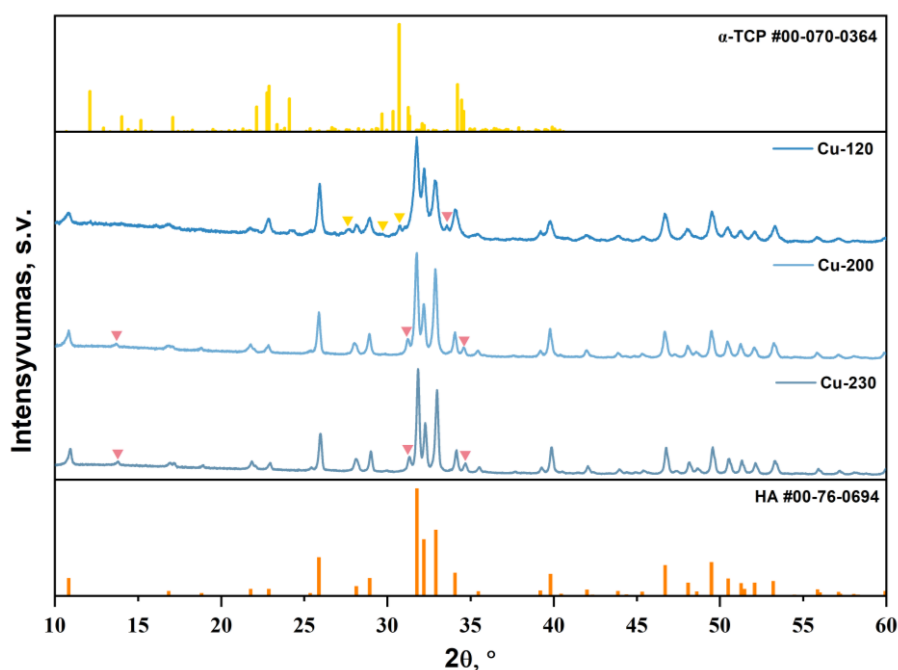


29 pav. Skirtingą laiką sintetintų Cu^{2+} jonais pakeistų (katijonus įvedant į vandeninę hidrolizės reakcijos vykdymo terpę) kalcio hidroksiapatitų difraktogramos, kur: ▼ žymi β -TCP, o ▼ – α -TCP fazes. Cu^{2+} jonų koncentracija mėginiuose atitinka 1,0 mol % [aut.]

Analizuojant reakcijos vykdymo trukmės įtaką faziniam galutinių produktų grynumui, visais atvejais sintezė buvo vykdoma 200 °C temperatūroje į reakcijos mišinį pridedant tuos pačius Cu^{2+} jonų kiekius (1,0 mol %), o reakcijos vykdymo laikas buvo ilginamas nuo 1 iki 16 val. Kaip matoma iš 29 pav. pateiktų difraktogramų, hidrolizės reakcija po 1 val. dar neprasideda, o jau po 3 val.

susiformuoja pagrindinė HA fazė su papildoma pašaline β -TCP faze. Toliau ilginant sintezės trukmę, susidaro labiau kristališkas galutinis produktas. Visiškai gryno HA gauti nepavyko net prailginus reakcijos vykdymo laiką iki 16 val. – difraktogramose išlieka β -TCP atspindžiai.

Keičiant sintezės temperatūrą, visais atvejais sintezė buvo vykdoma tą patį laiką – 5 val. Į reakcijos mišinį buvo pridedami tie patys Cu^{2+} jonų kiekiai (1,0 mol %), o reakcijos temperatūra buvo keičiama nuo 120 iki 230 °C. Deja, nei vienu atveju nebuvo gautas grynas HA – visų mėginių difraktogramose pastebimos ir β -TCP fazei būdingos smailės (žr. 30 pav.). Mėginyje Cu-120 taip pat yra ir likusio nesureagavusio pirmtako, dėl to galima daryti išvadą, kad 120 °C yra per žema temperatūra pilnam hidrolizės procesui įvykti, kai reakcijos vykdymo laikas yra 5 val. Temperatūros didinimas gerina mėginių kristališkumą.



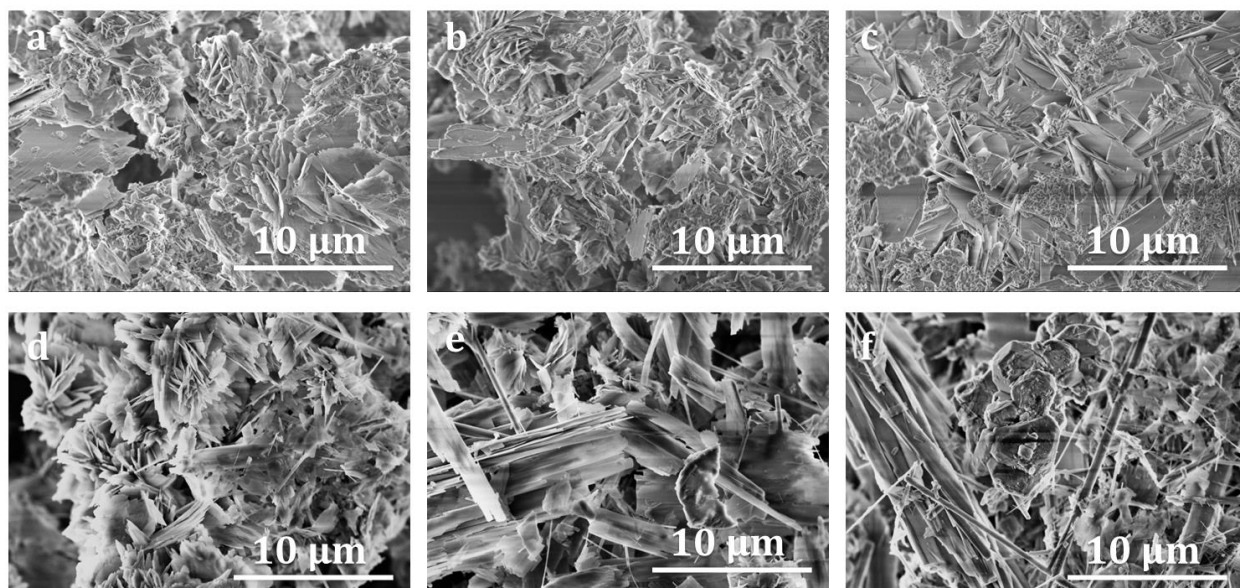
30 pav. Skirtingose temperatūrose sintetintų Cu^{2+} jonais pakeistų (katijonus įvedant į vandeninę hidrolizės reakcijos vykdymo terpę) kalcio hidroksiapatitų difraktogramos, kur: ▼ žymi β -TCP, o ▼ – α -TCP fazes. Cu^{2+} jonų koncentracija mėginiuose atitinka 1,0 mol % [aut.]

Esant ilgesnei hidroterminės sintezės trukmei ir aukštesnei temperatūrai galima susintetinti grynesnį HA. Visgi, pašalinių katijonų įvedimas į HA struktūrą gali inhibuoti pirmtako vartimo HA procesą, todėl atsižvelgiant į tai reikėtų sintezę vykdyti ilgiau bei aukštesnėje temperatūroje. Taip pat pašaliniai katijonai, ypač didesniais kiekiais, stipriai skatina pašalinių fazių susidarymą. Optimalios hidroterminės reakcijos vykdymo sąlygos, atsižvelgiant į efektyvumą, laiko sąnaudų bei ekonominius aspektus, pagal gautus tyrimų rezultatus gali būti 200 °C, 5 ar 6 val.

3.3.2.2. Apibūdinimas SEM metodu

SEM nuotraukos įrodo, kad hidroterminės sintezės vykdymo sąlygos bei pašalinių katijonų įvedimas į vandeninę hidrolizės reakcijos vykdymo terpę ir jų koncentracijos stipriai veikia produktų morfologiją (žr. 31 ir 32 pav.). Hidroterminę reakciją vykdant 120 °C 3 val., kai Cu^{2+} jonų koncentracija didinama iki 1,0 mol %, susidaro plokštelių formos dalelės (CDHA) bei formuojasi vis didesnis sferinių dalelių kiekis mėginyje (likusio nesureagavusio α -TCP ir / ar β -TCP mišinys).

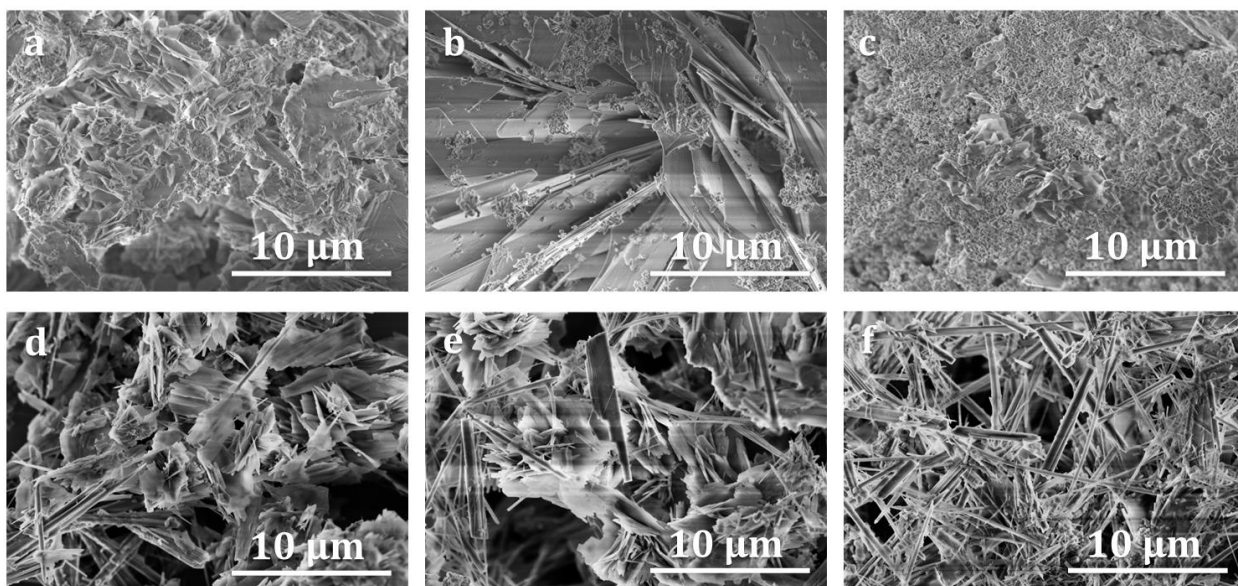
Cu-0.1-120-3 mėginys pasižymi tik hidroksiapatitams būdinga plokštelių morfologija (žr. 31 pav. a). Tokios pačios Cu^{2+} jonų koncentracijos mėginys Cu-0.1-200-5 yra sudarytas iš plokštelių ir trupučio labai smulkių lazdelių pavidalo dalelių. Lazdelių formos dalelių formavimasis stebimas aukštesnėje temperatūroje ir ilginant sintezės trukmę.



31 pav. Skirtingomis hidroterminės sintezės sąlygomis (120 °C, 3 val. ir 200 °C, 5 val.) susintetintų Cu^{2+} jonais pakeistų (katijonus įvedant į vandeninę hidrolizės reakcijos vykdymo terpę) kalcio hidroksiapatitų SEM nuotraukos: a) Cu-0.1-120-3, b) Cu-0.5-120-3, c) Cu-1.0-120-3, d) Cu-0.1-200-5, e) Cu-0.5-200-5, f) Cu-1.0-200-5.

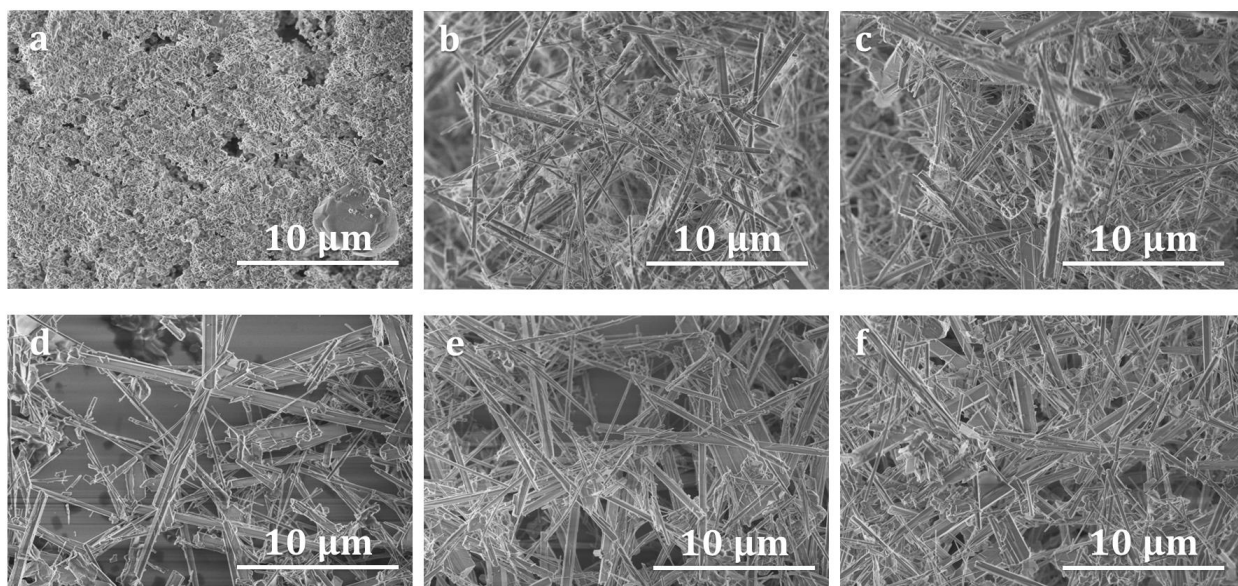
Cu^{2+} jonų koncentracijos mėginiuose – 0,1-1,0 mol % [aut.]

Mėginių su Zn^{2+} jonais SEM nuotraukose dar ryškiau matoma hidroterminės sintezės vykdymo sąlygų bei pašalinių katijonų įtaka morfologijai. Hidroterminę reakciją vykdant 120 °C 3 val. bei keičiant Zn^{2+} jonų koncentraciją reakcijos tirpale, susidarančių HA būdingų plokštelių formos bei TCP sferinių dalelių santykis kinta taip: didinant katijonų koncentraciją plokštelių kiekis mažėja, o sferinių dalelių kiekis didėja (žr. 32 pav. a-c). Zn^{2+} jonais pakeistų mėginių, susintetintų 200 °C, 5 val. sąlygomis, kaip ir mėginių su Cu^{2+} jonais atveju, aukštesnė temperatūra bei ilgesnė trukmė skatina lazdelių formos dalelių formavimąsi. Mėginio Zn-1.0-200-5 SEM nuotraukoje šios lazdelių formos, kurios yra nežymiai aglomeruotos, matomos ryškiausiai.



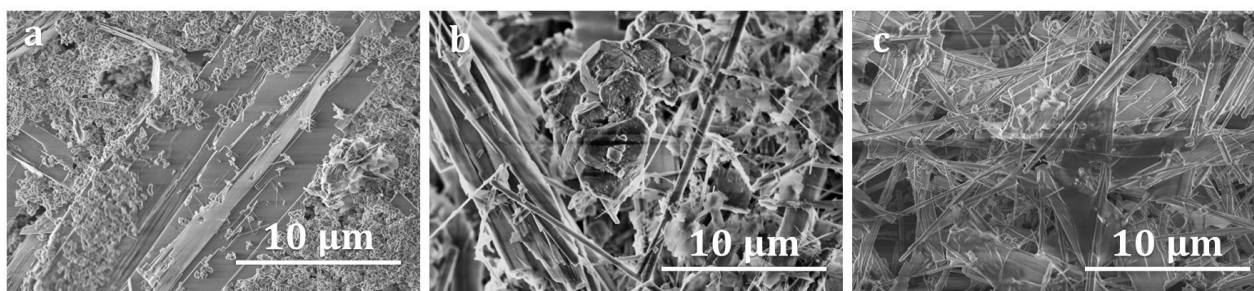
32 pav. Skirtingomis hidroterminės sintezės sąlygomis (120 °C, 3 val. ir 200 °C, 5 val.) susintetintų Zn²⁺ jonais pakeistų (katijonus įvedant į vandeninę hidrolizės reakcijos vykdymo terpę) kalcio hidroksiapatitų SEM nuotraukos: a) Zn-0.1-120-3, b) Zn-0.5-120-3, c) Zn -1.0-120-3, d) Zn -0.1-200-5, e) Zn -0.5-200-5, f) Zn -1.0-200-5. Zn²⁺ jonų koncentracijos mėginiuose – 0,1-1,0 mol % [aut.]

Cu²⁺ jonais pakeisto HA morfologiniai ypatumai gerai koreliuojasi su XRD rezultatais. Praėjus 1 val., sintezės produktas yra sudarytas iš sferinių dalelių (tipiška α -TCP morfologija). Toliau ilginant laiką visais atvejais gauti produktai yra CDHA, sudarytas iš lazdelių formos dalelių bei nedaug β -TCP būdingų sferinių dalelių (žr. 33 pav.). Reakcijos trukmės poveikis mėginių morfologijai yra nežymus.



33 pav. Skirtingą laiką sintetintų Cu²⁺ jonais pakeistų (katijonus įvedant į vandeninę hidrolizės reakcijos vykdymo terpę) kalcio hidroksiapatitų SEM nuotraukos: a) 1, b) 3, c) 6, d) 12, e) 14, f) 16 val. Cu²⁺ jonų koncentracija mėginiuose atitinka 1,0 mol % [aut.]

Reakcijos temperatūros kėlimas Cu²⁺ jonais pakeistuose mėginiuose, skatina lazdelių formos dalelių formavimąsi (žr. 34 pav.).



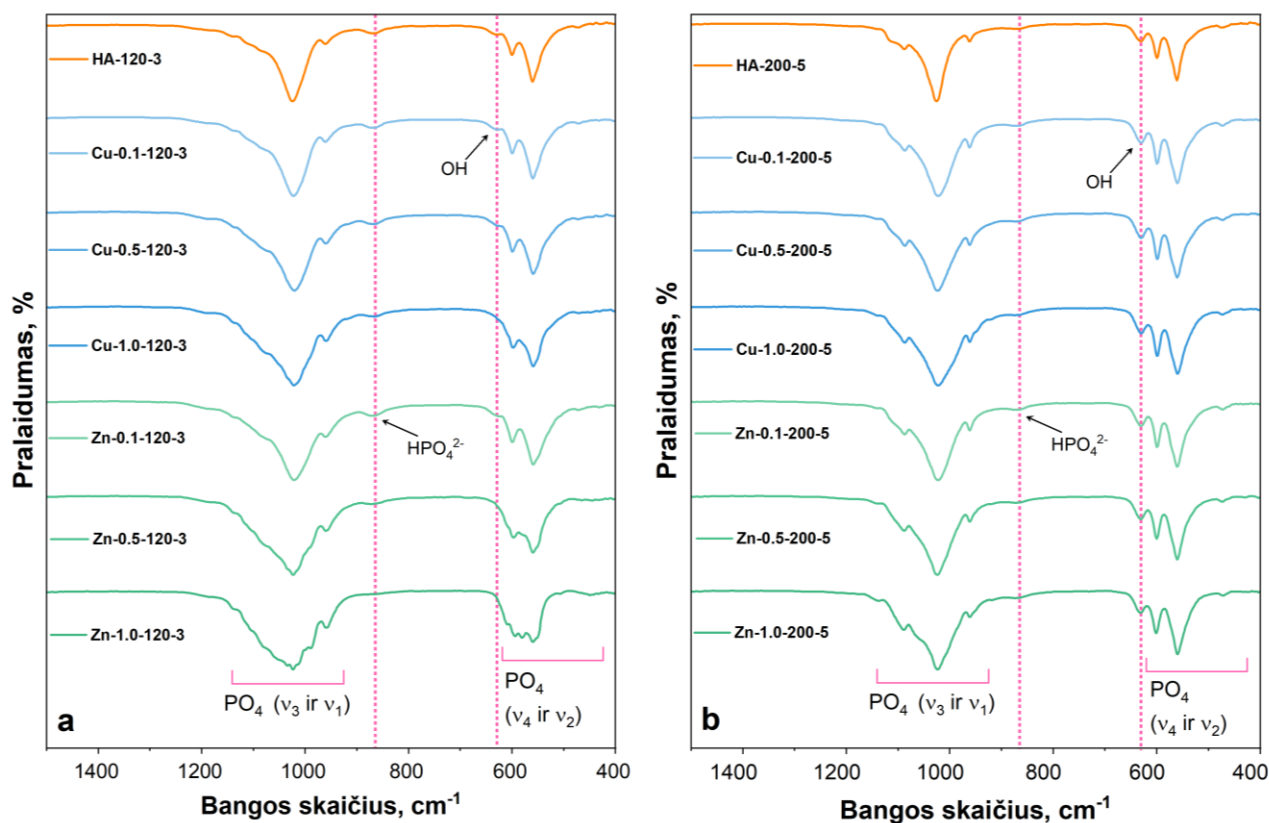
34 pav. Skirtingose temperatūrose susintetintų Cu^{2+} jonais pakeistų (katijonus įvedant į vandeninę hidrolizės reakcijos vykdymo terpę) kalcio hidroksiapatitų SEM nuotraukos: a) 120, b) 200, c) 230 °C. Cu^{2+} jonų koncentracija mėginiuose atitinka 1,0 mol % [aut.]

3.3.2.3. Apibūdinimas FTIR metodu

35 ir 36 paveiksluose pavaizduoti hidroterminiu metodu, katijonus įvedant į vandeninę hidrolizės reakcijos terpę, susintetintų metalais pakeistų hidroksiapatitų mėginių FTIR spektrai ($1500\text{-}400\text{ cm}^{-1}$). 35 paveiksle pateikti FTIR spektrai, liudijantys į HA struktūrą įterpiamų metalų jonų (Cu^{2+} ir Zn^{2+}) koncentracijos poveikį susintetintų medžiagų savybėms. Visuose spektruose stebimos PO_4^{3-} grupei būdingos absorbcijos juostos ties $1200\text{-}940\text{ cm}^{-1}$ (ν_3 ir ν_1) ir $660\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ (ν_4 ir ν_2). HA fosfatų grupei charakteringos virpesių juostos stebimos 1086 ir 1021 cm^{-1} (ν_3), 962 cm^{-1} (ν_1) bei 600 ir 560 cm^{-1} (ν_4), atitinkančios asimetrinius P-O ryšių tempimosi, simetrinius P-O tempimosi bei P-O lenkimosi virpesius [68]. Pastebima ir tai, kad priklausomai nuo hidroterminės reakcijos vykdymo sąlygų, grynų susintetintų hidroksiapatitų spektrai taip pat skiriasi. Mėginių, susintetintų 200 °C , 5 val. sąlygomis, FTIR spektruose nepriklausomai nuo metalų jonų prigimties ar jų koncentracijos matomos intensyviausios HA fosfatų grupei būdingos virpesių juostos. Šiuose mėginiuose pastebimos ir hidroksilo grupės (-OH) – lenkimosi virpesių dažniai identifikuoti 633 cm^{-1} srityje.

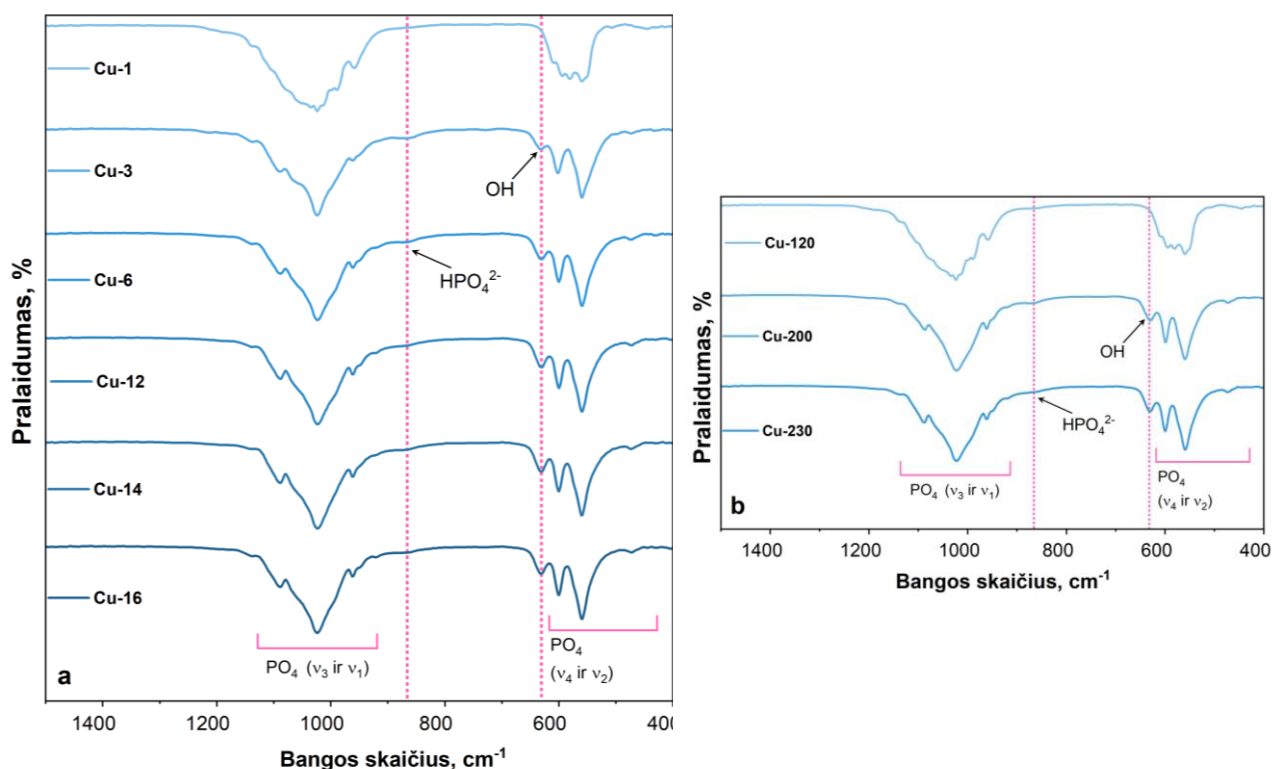
Hidroterminės sintezės vykdymo 120 °C 3 val. produktų FTIR spektruose HA fosfatų grupei būdingos virpesių juostos ne taip stipriai išreikštos (žr. 35 pav. a). Tarp šių spektrų pastebimi didesni skirtumai tik keičiant įterptą joną bei jo koncentraciją. Cu-0.1-120-3 bei Cu-0.5-120-3 mėginių spektruose esančios virpesių juostos atitinka HA. Į mėginio struktūrą įterpus 1,0 mol % Cu^{2+} jonų, atsiranda daugiau labai mažo intensyvumo virpesių juostų ir spektras pamažu pradeda panašėti į α -TCP FTIR spektrą.

Zn-0.1-120-3 FTIR spektras pasižymi tik HA fosfatų grupei charakteringomis virpesių juostomis. Visgi, Zn^{2+} jonų koncentracijos didinimas (0,5 ir 1,0 mol %) mėginiuose pasireiškia dar stipresne įtaka galutiniams produktams lyginant su HA mėginiais struktūroje turinčiais tokias pačias Cu^{2+} jonų koncentracijas. Mėginio su 0,5 mol % Zn^{2+} spektre jau pastebimos α -TCP būdingos virpesių juostos, o su 1,0 mol % Zn^{2+} – spektras tampa itin panašus į pirmtako FTIR spektrą. Spektruose atsiranda papildomos virpesių juostos ties 1055 , 1025 , 1013 , 995 bei 985 cm^{-1} ir 955 cm^{-1} , atitinkančios α -TCP fazės P-O ryšių asimetrinius tempimosi virpesius (ν_3) ir P-O simetrinius tempimosi virpesius (ν_1). Taip pat spektruose stebimos juostos, esančios ties 613 , 597 , 585 , 563 cm^{-1} , demonstruoja α -TCP P-O ryšių asimetrinių lenkimosi virpesių buvimą (ν_4) [63]. Pastebimų β -TCP būdingų juostų FTIR spektruose nėra.



35 pav. Skirtingomis hidroterminės sintezės sąlygomis susintetintų Cu^{2+} bei Zn^{2+} jonais pakeistų (katijonus įvedant į vandeninę hidrolizės reakcijos vykdymo terpę) kalcio hidroksiapatitų FTIR spektrai: a) 120 °C, 3 val., b) 200 °C, 5 val. M^{2+} jonų koncentracijos mėginiuose – 0,1-1,0 mol % [aut.]

Cu^{2+} jonais (1,0 mol %) pakeistų HA mėginių sudėties priklausomybės nuo reakcijos vykdymo laiko bei reakcijos vykdymo temperatūros FTIR spektrai pateikti atitinkamai 36 paveikslo a ir b. Visuose spektruose matomos PO_4^{3-} grupei būdingos absorbcijos juostos ties 1200-940 cm^{-1} (ν_3 ir ν_1) ir 660-500 cm^{-1} (ν_4 ir ν_2). Visų mėginių (išskyrus Cu-1 bei Cu-120) FTIR spektruose pastebimos HA fosfatų grupei charakteringos virpesių juostos ties 1086, 1021 cm^{-1} (ν_3), 962 cm^{-1} (ν_1) bei 600 ir 560 cm^{-1} (ν_4), atitinkančios asimetrinius P-O ryšių tempimosi, simetrinius P-O tempimosi bei P-O lenkimosi virpesius. Ties 633 cm^{-1} esančios virpesių juostos priskiriamos OH^- grupės lenkimosi virpesiams [68]. Cu-3 mėginyje ryškiausiai pastebima mažo intensyvumo plati absorbcijos juosta esanti ties 1066 cm^{-1} , priskiriama β -TCP fosfatų grupės asimetriniams P-O ryšių tempimosi virpesiams (ν_3) (žr. 36 pav. a) [63]. Cu-1 mėginyje vyrauja α -TCP būdingos absorbcijos juostos, esančios ties 1055, 1039, 1025, 1013, 995 bei 985 cm^{-1} ir 955 cm^{-1} , kurios atitinka P-O ryšių asimetrinius tempimosi virpesius (ν_3) ir P-O simetrinius tempimosi virpesius (ν_1). Taip pat šio mėginio spektre pastebimos juostos esančios ties 613, 597, 585, 563, 551 cm^{-1} (α -TCP P-O ryšių asimetriniai lenkimosi virpesiai (ν_4)) [63]. Cu-120 mėginio FTIR spektre esančios absorbcijų juostos būdingos HA PO_4^{3-} grupei yra ties 1095 ir 1024 cm^{-1} (ν_3), 960 cm^{-1} (ν_1) bei 560 cm^{-1} (ν_4), α -TCP PO_4^{3-} grupei būdingos absorbcijų juostos yra ties 1055, 1039, 1013, 995 ir 985 cm^{-1} (ν_3) bei ties 613, 597, 585, 563, 551 cm^{-1} (ν_4), o β -TCP būdinga juosta yra ties 1066 cm^{-1} (ν_3) [63]. Visa tai patvirtina XRD analizės bei SEM rezultatus. Pilnai hidrolizės reakcijai įvykti reikalinga ilgesnė nei 1 val. trukmė, reakciją vykdant 200 °C temperatūroje, bei aukštesnė nei 120 °C temperatūra, reakciją vykdant 5 val., o gautuose HA produktuose yra β -TCP priemaišų.



36 pav. Skirtingomis hidroterminės sintezės sąlygomis susintetintų Cu^{2+} jonais pakeistų (katijonus įvedant į vandeninę hidrolizės reakcijos vykdymo terpę) kalcio hidroksiapatitų FTIR spektrai: a) sudėties priklausomybė nuo reakcijos vykdymo laiko, 200 °C, X val., b) sudėties priklausomybė nuo reakcijos vykdymo temperatūros, (X °C, 5 val.). Cu^{2+} jonų koncentracija mėginiuose atitinka 1,0 mol % [aut.]

3.3.2.4. ICP-OES tyrimas

ICP-OES tyrimas buvo atliktas norint nustatyti galutinių produktų elementinę sudėtį, įsitikinti kad pašaliniai katijonai perėjo iš hidrolizės tirpalo į gautų miltelių struktūrą bei įvertinti jonų įsiterpimo efektyvumą lyginant su pradiniais M/Ca santykiais. 8 lentelėje pateikti šio tyrimo rezultatai.

8 lentelė

Hidroterminės sintezės produktų ICP-OES analizės rezultatai [aut.]

Metalo jonas	Teorinis M^{2+} kiekis, mol %	Nustatytas M^{2+} kiekis, mol %	
		120 °C, 3 val.	200 °C, 5 val.
Cu^{2+}	0,1	0,09	0,11
	0,5	0,47	0,48
	1,0	0,94	1,02
Zn^{2+}	0,1	0,09	0,09
	0,5	0,51	0,49
	1,0	0,98	0,97

Kadangi skirtumai tarp pradinių ir galutinių molinių santykių nėra reikšmingi, galima daryti išvadą, jog hidroterminės sintezės metu į hidrolizės reakcijos vandeninę terpę įvestų katijonų

sėkmingas bei efektyvus perėjimas į mėginių struktūrą nepriklauso nuo reakcijos vykdymo sąlygų (120 °C, 3 val. ar 200 °C, 5 val.), katjonų prigimties (Cu^{2+} , Zn^{2+}) ar įvedamų metalų jonų kiekio (0,1-1,0 mol %).

IŠVADOS

1. Zn^{2+} ir Cu^{2+} jonais pakeisti kalcio hidroksiapatitai buvo sėkmingai susintetinti hidroterminiu metodu, metalų jonus į HA struktūrą įvedant skirtingais etapais: metalų katijonus įterpiant į pirmtako struktūrą jo sintezės metu bei hidroterminės reakcijos metu įvedant juos į vandeninę hidrolizės reakcijos vykdymo terpę. Pasirinktas Zn^{2+} ir Cu^{2+} jonais pakeistų hidroksiapatitų sintezės būdas, metalų jonų prigimtis bei jų koncentracija ir hidroterminės sintezės vykdymo sąlygos turėjo įtakos galutinių produktų savybėms.

2. Tiriant į HA struktūrą įvedamų pašalinių katijonų koncentracijos daromą įtaką α -TCP hidrolizės procesui, pastebėta, kad beveik visais atvejais mažiausia jonų koncentracija (0,1 mol %) nepaveikė galutinio produkto fazinio grynumo – į struktūrą įterpiant tiek Cu^{2+} , tiek Zn^{2+} buvo gauti vienfaziai HA. Zn^{2+} jonų koncentracijos didinimas hidrolizės reakcijos vykdymo terpėje palaiapsniui skatino β -TCP susidarymą, visiškai nuslopino HA formavimąsi, kol galiausiai vyraujančia faze tapo šolzitas. Cu^{2+} jonai turėjo panašų poveikį faziniams virsmams. Cu^{2+} jonų koncentracijos didinimas taip pat paskatino β -TCP formavimąsi ir slopino α -TCP hidrolizės procesus. Tyrimo metu nustatytos optimalios hidroterminės reakcijos vykdymo sąlygos yra 200 °C, 5 ar 6 val.

3. XRD analizės rezultatai leido teigti, kad didesniu faziniu grynumu pasižymintys metalais pakeisti hidroksiapatitai buvo gauti hidroterminę reakciją vykdant 200 °C temperatūroje 5 valandas. Vykdant hidroterminę sintezę su 0,8 mol % Cu^{2+} ar Zn^{2+} jonais pakeistais pirmtakais, pastebėta, kad gebantis atsilaisvinti iš α -TCP struktūros pašalinių katijonų kiekis buvo ribotas, dėl šios priežasties pasireiškė kur kas mažesnė pašalinių jonų įtaka, lyginant su tais pačiais jonų kiekiais hidroterminės reakcijos tirpale. Pašalinių katijonų buvimas vandeninėje reakcijos vykdymo terpėje pasireiškė α -TCP hidrolizės inhibavimu ir pašalinių fazių susidarymo skatinimu. Zn^{2+} jonai stipriau slopino HA susiformavimą nei Cu^{2+} . SEM analizė atskleidė, kad pašaliniai katijonai gali būti taikomi HA morfologijos reguliavimui hidroterminės sintezės metu. Pastebėta, kad Cu^{2+} ar Zn^{2+} jonais pakeistų pirmtakų hidrolizės produktai pasižymėjo didesniu polinkiu suformuoti lazdelių pavidalo HA daleles. Cu^{2+} ir Zn^{2+} pakeistų HA, susintetintų 200 °C, 5 val. sąlygomis, FTIR spektruose identifikuotos HA fosfatų grupei būdingos virpesių juostos, patvirtinančios HA buvimą pagrindine kristaline faze. ICP-OES analizės rezultatai patvirtino efektyvų Cu^{2+} ir Zn^{2+} katijonų įsiterpimą į mėginių struktūrą. 200 °C, 5 val. sąlygomis susintetintų Cu-HA mėginių EPR tyrimo rezultatai patvirtino Cu^{2+} jonų įsiterpimą į HA struktūrą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. K. Chuprunov, A. Yudin, D. Leybo ir kt., The hydrothermal synthesis duration influence on calcium phosphate and hydroxyapatite phase composition, *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, **731**, 1–7 (2020).
2. E. A. Ofudje, A. I. Adeogun, M. A. Idowu, ir S. O. Kareem, Synthesis and characterization of Zn-doped hydroxyapatite: scaffold application, antibacterial and bioactivity studies, *Heliyon*, **5**, e01716, 1–12 (2019).
3. A. K. Nayak, Hydroxyapatite synthesis methodologies: an overview, *International Journal of ChemTech Research*, **2**, 903–907 (2010).
4. F. Ai, L. Chen, J. Yan ir kt., Hydroxyapatite scaffolds containing copper for bone tissue engineering, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **95**, 168–179 (2020).
5. K. Ijaz, H. Khalid, ir A. A. Chaudhry, Zinc-substituted hydroxyapatite, Elsevier Ltd, 217–236 (2019).
6. V. Stanić, S. Dmitrijević ir kt., Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders, *Applied Surface Science*, **256**, 6083–6089 (2010).
7. S. Jain, Processing of hydroxyapatite by biomimetic process, *Ceramic Engineering*, 1–46 (2010).
8. T. Suchý, M. Šupová, M. Žaloudková, ir kt., Support for the initial attachment, growth and differentiation of MG-63 cells: a comparison between nano-size hydroxyapatite and micro-size hydroxyapatite in composites, *International Journal of Nanomedicine*, **9**, 3687–3706 (2014).
9. K. Pajor, L. Pajchel ir J. Kolmas, Hydroxyapatite and fluorapatite in conservative dentistry and oral implantology - a review, *Materials*, **12**, 2683, 1–16 (2019).
10. Q. Liu, S. Huang, J. P. Matinlinna, Z. Chen ir H. Pan, Insight into biological apatite: physicochemical properties and preparation approaches, *BioMed Research International*, **2013**, 1–13 (2013).
11. M. Corno, C. Busco, B. Civalieri ir P. Ugliengo, Periodic *ab initio* study of structural and vibrational features of hexagonal hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **8**, 2464–2472 (2006).
12. G. Ma ir X. Y. Liu, Hydroxyapatite: hexagonal or monoclinic?, *Crystal Growth & Design*, **9**, 7, 2991–2994 (2009).
13. V. Uskoković, The role of hydroxyl channel in defining selected physicochemical peculiarities exhibited by hydroxyapatite, *RSC Advances*, **5**, 36614–36633 (2015).
14. A. S. Khan, A. A. Chaudry, Handbook of ionic substituted hydroxyapatites, Woodhead Publishing (2020).
15. I. V. Antoniac, Handbook of bioceramics and biocomposites, 1st, ed., Springer (2016).
16. M. Mathew ir S. Takagi, Structures of biological minerals in dental research, **106**, 6, 1035–1044 (2001).
17. Y. In, U. Amornkitbamrung, M. H. Hong ir H. Shin, On the crystallization of hydroxyapatite under hydrothermal conditions: role of sebacic acid as an additive, *ACS Omega*, **5**, 27204–27210 (2020).
18. J. T. B. Ratnayake, M. Mucalo ir G. J. Dias, Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: a review of current trends, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, **105B**, 1–15 (2016).
19. V. Uskoković, Ion-doped hydroxyapatite: an impasse or the road to follow?, *Ceramics International*, **46**, 11443–11465 (2020).
20. M. Nouri-Felekori, M. Khakbiz ir N. Nezafati, Synthesis and characterization of Mg, Zn and Sr-incorporated hydroxyapatite whiskers by hydrothermal method, *Mater. Lett.*, **243**, 120–124 (2019).
21. M. Othmani, H. Bachoua, Y. Ghandour, A. Aissa ir M. Debbabi, Synthesis, characterization and catalytic properties of copper-substituted hydroxyapatite nanocrystals, *Mater.*

Res. Bull. (2017).

22. R. Ghosh, O. Swart, S. Westgate, B. L. Miller ir M. Z. Yates, Antibacterial copper-hydroxyapatite composite coatings via electrochemical synthesis“, *Langmuir*, **35**, 5957–5966 (2019).
23. Database of ionic radii [interaktyvus]. Atomistic Simulation Group in the Materials Department of Imperial College [žiūrėta 2023 m. balandžio 11 d.]. Prieiga per internetą: abulafia.mt.ic.ac.uk/shannon/ptable.php?fbclid=IwAR2UXzaXA2ftMlc2bFNH-hisZsU0-wqY99woeyKneG8Dk5BEyy8a1FX3eAs
24. H. Badran, I. S. Yahia, M. S. Hamdy ir N. S. Awwad, Lithium-doped hydroxyapatite nano-composites: synthesis, characterization, gamma attenuation coefficient and dielectric properties, *Radiat. Phys. Chem.*, **130**, 85–91 (2017).
25. M. Li, X. Xiao, R. Liu, C. Chen ir L. Huang, Structural characterization of zinc-substituted hydroxyapatite prepared by hydrothermal method, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **19**, 2, 797–803 (2008).
26. T. Bazin, A. Magnaudeix, R. Mayet, P. Carles ir kt., Sintering and biocompatibility of copper-doped hydroxyapatite bioceramics, *Ceram. Int.*, **47**, 10, 13644–13654 (2021).
27. C. Paluszkiwicz, A. Ślósarczyk, D. Pijocha ir kt., Synthesis, structural properties and thermal stability of Mn-doped hydroxyapatite, *Journal of Molecular Structure*, **976**, 301–309 (2010).
28. Q. Fan, F. Fan, W. Xu, H. Zhang ir N. Liu, The structural and surface properties of Al-doped hydroxyapatite (Ca₅(PO₄)₃OH) nanorods and their applications for pH-induced drug delivery, *J. Alloys Compd.*, **879**, 160414 (2021).
29. F. E. Al-hazmi, Synthesis and electrical properties of Bi doped hydroxyapatite ceramics, *J. Alloys Compd.*, **665**, 119–123 (2016).
30. A. A. Hendi, Hydroxyapatite based nanocomposite ceramics, *J. Alloys Compd.*, **712**, 147–151 (2017).
31. A. R. West, *Solid State Chemistry*, 2nd ed., John Wiley & Sons (2014).
32. Y. Jiang, Z. Yuan ir J. Huang, Substituted hydroxyapatite: a recent development, *Mater. Technol.*, **35**, 785–796 (2019).
33. A. Chetty, I. Wepener, M. K. Marei, Y. El Kamary ir R. M. Moussa, Hydroxyapatite: synthesis, properties, and applications (2016).
34. M. Sadat-Shojai, M. T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi ir A. Jamshidi, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomater.*, **2680**, 7591–7621 (2013).
35. M. Karimi, S. Hesaraki, M. Alizadeh ir A. Kazemzadeh, Synthesis of calcium phosphate nanoparticles in deep-eutectic choline chloride-urea medium: investigating the role of synthesis temperature on phase characteristics and physical properties, *Ceramics International*, **42**, 2780–2782 (2016).
36. V. P. Orlovskii, V. S. Komlev ir S. M. Barinov, Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics, *Inorganic Materials*, **38**, 10, 1159–1172 (2002).
37. K. Lin, C. Wu ir J. Chang, Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape, *Acta Biomater.* (2014).
38. N. D. Pinchuk ir L. A. Ivanchenko, Making calcium phosphate biomaterials, *Powder Metall. Met. Ceram.*, **42**, 7–8, 357–371 (2003).
39. A. Rabenau, The role of hydrothermal synthesis in preparative chemistry, *Angewandte Chemie International*, **24**, 12, 1026-1040 (1985).
40. G. Ma, Three common preparation methods of hydroxyapatite, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, **688**, 033057 1–12 (2019).
41. S. López-Ortiz, D. Mendoza-Anaya ir kt., The pH effect on the growth of hexagonal and monoclinic hydroxyapatite synthesized by the hydrothermal method, *J. Nanomater.*, **2020**, 1–10 (2020).
42. R. Foroutan, S. J. Peighambaroust, H. Aghdasinia ir kt., Modification of bio-hydroxyapatite generated from waste poultry bone with MgO for purifying methyl violet-laden liquids, *Environmental Science and Pollution Research*, **27**, 44218–44229 (2020).

43. M. Ibrahim, M. Labaki, J. Giraudon ir J. Lamonier, Hydroxyapatite, a multifunctional material for air, water and soil pollution control: a review, *J. Hazard. Mater.*, **383**, 121139 (2020).
44. K. Ishikawa, Bone substitute fabrication based on dissolution-precipitation reactions, *Materials*, **3**, 1138–1155 (2010).
45. S. V. Dorozhkin, Synthetic amorphous calcium phosphates (ACPs): preparation, structure, properties, and biomedical applications, *Biomater. Sci.*, **9**, 7748–7798 (2021).
46. M. V. Oliveira, M. M. Schaerer, R. P. Pereira ir kt., Influence of processing on mechanical properties of hydroxyapatite, *Key Eng. Mater.*, **396–398**, 587–590 (2009).
47. W. Suchanek ir M. Yoshimura, Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants, *J. Mater. Res.*, **13**, 1, 94–117 (1998).
48. I. Uysal, B. Yilmaz ir Z. Evis, Zn-doped hydroxyapatite in biomedical applications, *J. Aust. Ceram. Soc.*, **57**, 3, 869–897 (2021).
49. G. Özdemir, M. Ho ir S. Yapar, The antibacterial effect of heavy metal and cetylpridinium-exchanged montmorillonites, **48**, 319–323 (2010).
50. R. Ghosh, S. Das, S. P. Mallick ir Z. Beyene, A review on the antimicrobial and antibiofilm activity of doped hydroxyapatite and its composites for biomedical applications, *Mater. Today Commun.*, **31**, 103311 (2022).
51. T. J. Silhavy, D. Kahne ir S. Walker, The bacterial cell envelope, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a00414 (2010).
52. Gram-negative versus gam-positive cell walls [interaktyvus]. Gram staining [žiūrėta 2023 m. balandžio 24 d.]. Prieiga per internetą: ib.bioninja.com.au/options/untitled/b1-microbiology-organisms/gram-staining.html
53. M. Yasuyuki, K. Kunihiro, S. Kurissery ir kt., Antibacterial properties of nine pure metals: a laboratory study using *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, **26**:7, 851–858 (2010).
54. L. Sukhodub, M. Kumeda, L. Sukhodub, V. Bielai ir M. Lyndin, Metal ions doping effect on the physicochemical, antimicrobial, and wound healing profiles of alginate-based composite, *Carbohydr. Polym.*, **304**, 120486 (2023).
55. D. Lytkina, A. Gutsalova, D. Fedorishin ir kt., Synthesis and properties of zinc-modified hydroxyapatite, *J. Funct. Biomater.*, **11**, 1–12 (2020).
56. E. S. Thian, T. Konishi, Y. Kawanobe ir kt., Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **24**, 437–445 (2013).
57. J. Kolmas, E. Groszyk ir D. Kwiatkowska-Różycka, Substituted hydroxyapatites with antibacterial properties“, *BioMed Research International*, **2014**, 1–15 (2014).
58. E. Dauvergne ir C. Mullié, Brass alloys: copper-bottomed solutions against hospital-acquired infections?, *Antibiotics*, **2021**, 10, 286 (2021).
59. I. Salah, I. P. Parkin ir E. Allan, Copper as an antimicrobial agent: recent advances, *RSC Adv.*, **11**, 18179–18186 (2021).
60. S. Shanmugam ir B. Gopal, Copper substituted hydroxyapatite and fluorapatite: synthesis, characterization and antimicrobial properties“, *Ceram. Int.*, **40**, 15655–15662 (2014).
61. S. J. Kalita, A. Bhardwaj ir H. A. Bhatt, Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering, **27**, 441–449 (2007).
62. J. S. Al-Sanabani, A. A. Madfa ir F. A. Al-Sanabani, Application of calcium phosphate materials in dentistry“, **2013**, 876132 (2013).
63. R. G. Carrodegua ir S. De Aza, α -Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications, *Acta Biomater.*, **7**, 3536–3546 (2011).
64. P. Phatai, N. Prachumrak, S. Kamonwannasit ir kt., Zinc-silver doped mesoporous hydroxyapatite synthesized via ultrasonic in combination with sol-gel method for increased antibacterial activity, *Sustain.*, **14**, 11756 (2022).
65. L. Sinusaite, I. Grigoraviciute-Puroniene, A. Popov, K. Ishikawa, A. Kareiva, ir A. Zarkov, Controllable synthesis of tricalcium phosphate (TCP) polymorphs by wet precipitation: effect

of washing procedure, *Ceram. Int.*, **45**, p. 12423–12428 (2019).

66. I. E. Glazov, V. K. Krut'ko, O. N. Musskaya ir A. I. Kulak, Calcium phosphate apatites: wet formation, thermal transformations, terminology, and identification“, *Russ. J. Inorg. Chem.*, **67**, 173–182 (2022).

67. K. Matsunaga, T. Kubota, K. Toyoura ir A. Nakamura, First-principles calculations of divalent substitution of Ca^{2+} in tricalcium phosphates, *Acta Biomater.*, **23**, 329–337 (2015).

68. D. Gopi, E. Shinyjoy, A. Karthika ir kt., Single walled carbon nanotubes reinforced mineralized hydroxyapatite composite coatings on titanium for improved biocompatible implant applications, *RSC Adv.*, **5**, 36766–36778 (2015).

69. B. Gabbasov, M. Gafurov, A. Starshova ir kt., Conventional, pulsed and high-field electron paramagnetic resonance for studying metal impurities in calcium phosphates of biogenic and synthetic origins, *J. Magn. Magn. Mater.*, **470**, 109–117 (2019).

70. B. Sutter, T. Wasowicz, T. Howard, L. R. Hossner ir D. W. Ming, Characterization of iron, manganese, and copper synthetic hydroxyapatites by electron paramagnetic resonance spectroscopy“, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **66**, 1359–1366 (2002).

71. M. Misono ir W. K. Hall, Oxidation-reduction properties of copper- and nickel-substituted hydroxyapatites, *J. Phys. Chem.*, **77**, 6, 791–800 (1973).

72. K. Szyszka, S. Targońska, A. Lewińska, A. Watras ir R. J. Wiglusz, Quenching of the Eu^{3+} luminescence by Cu^{2+} ions in the nanosized hydroxyapatite designed for future bio-detection, *Nanomaterials*, t. **11**, 464 (2021).

73. I. Mayer, S. Gdalya, O. Burghaus ir D. Reinen, A spectroscopic and structural study of $\text{M}(3d)^{2+}$ -doped β -tricalcium phosphate – the binding properties of Ni^{2+} and Cu^{2+} in the pseudo-octahedral $\text{Ca}(5)\text{O}_6$ host-sites, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **635**, 2039–2045 (2009).

74. I. Uysal, F. Severcan, A. Tezcaner ir Z. Evis, Co-doping of hydroxyapatite with zinc and fluoride improves mechanical and biological properties of hydroxyapatite. *Progress in Natural Science: Materials International*, **24**, 340–349 (2014).

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

GABRIELĖ KLYDŽIŪTĖ

Metallų jonais pakeistų kalcio hidroksiapatitų sintezė hidroterminiu būdu bei savybių tyrimas

Kalcio hidroksiapatitai (Ca-HA) pasižymi bioaktyvumu ir biosuderinamumu, dėl to dažnai yra naudojami sintetinėmis medžiagomis biomedicinoje [56]. Dėl specifinės Ca-HA kristalinės struktūros yra įmanomas Ca^{2+} pakeitimas kitais metallų jonais. Kalcio jonų pakeitimas kitais katijonais, tokiais kaip Zn^{2+} ar Cu^{2+} , yra būdas išgauti norimas HA savybes [60]. Biomedžiagos, pasižyminčios antibakterinėmis savybėmis, gali būti sėkmingai pritaikomos ne tik kaulų defektų užpildymui, geresnėms implantų dangoms, bet ir odos infekcijų gydymui, mikrobiologiškai užteršto vandens valymui ir t. t. [6] Norint paruošti biomedžiagas su reikalingomis savybėmis yra labai svarbu atrasti ir vystyti paprastus, ekonomiškus, efektyvius ir kuo ekologiškesnius sintezės metodus, leidžiančius kontroliuoti sintetinamų HA morfologiją bei kitas savybes.

Šiame tyrime nagrinėjamos cinko ir variu pakeistų hidroksiapatitų savybės taip pat nustatytos optimalios hidroterminės sintezės sąlygos. Zn^{2+} ir Cu^{2+} jonais legiruoti kalcio hidroksiapatitai buvo paruošti dvejais skirtingais būdais: metallų katijonus įterpiant į pirmtako struktūrą jo sintezės metu arba hidroterminės reakcijos metu įvedant juos į vandeninę hidrolizės reakcijos vykdymo terpę. HA sintezės metu hidrolizės reakcija vykdyta hidroterminėmis sąlygomis (120-230° C, 1-16 val.). Metallų jonų koncentracijos mėginiuose atitiko HA pakeitimus 0,1-10,0 mol %. Hidrolizės produktų fazinis grynumas, struktūra, morfologija, elementinė sudėtis bei jonų pasiskirstymas išanalizuoti atitinkamai XRD, FTIR, SEM, ICP-OES ir EPR metodais.

Miltelių ištyrimas XRD, FTIR ir SEM metodais patvirtino, kad drėgnojo nusodinimo metodu (terpės pH esant 9,5) susintetinti, 700 °C, 5 val. iškaitinti gryni bei metallais-legiruoti pirmtakai gauti vienfaziai.

Vykdam hidroterminę sintezę su 0,8 mol % Cu^{2+} ar Zn^{2+} jonais pakeistais pirmtakais, pastebėta, kad gebantis atsilaisvinti iš α -TCP struktūros pašalinių katijonų kiekis yra ribotas, dėl šios priežasties pasireiškė kur kas mažesnė pašalinių jonų įtaka, lyginant su tais pačiais jonų kiekiais hidroterminės reakcijos tirpale. Pašalinių katijonų buvimas vandeninėje reakcijos vykdymo terpėje inhibavo α -TCP hidrolizę ir skatino pašalinių fazių susidarymą. Zn^{2+} jonai labiau lėtino α -TCP hidrolizės procesą nei Cu^{2+} .

Tiriant į HA struktūrą įvedamų pašalinių katijonų koncentracijos daromą įtaką α -TCP hidrolizės procesui, pastebėta, kad beveik visais atvejais mažiausia jonų koncentracija (0,1 mol %) nepaveikė galutinio produkto fazinio grynumo. Į struktūrą įterpiant tiek Cu^{2+} , tiek Zn^{2+} buvo gauti vienfaziai HA. Zn^{2+} jonų koncentracijos didinimas (0,5; 1 mol %) skatino β -TCP formavimąsi. Toliau didinant Zn^{2+} koncentraciją hidrolizės reakcijos vykdymo terpėje, HA fazės formavimasis buvo visiškai nuslopintas (Zn^{2+} – 5 mol %), o šolcito fazė tapo pagrindine (Zn^{2+} – 10 mol %). Cu^{2+} jonai turėjo panašų poveikį faziniams virsmams. Cu^{2+} jonų koncentracijos didinimas (0,5; 1 mol %) taip pat paskatino β -TCP formavimąsi. Dar didesnės Cu^{2+} koncentracijos reakcijos tirpale (5; 10 mol %) slopino α -TCP hidrolizės procesus.

Tyrimo metu, atsižvelgiant į efektyvumo, laiko sąnaudų bei ekonominius aspektus, pagal gautus tyrimų rezultatus nustatytos optimalios hidroterminės reakcijos vykdymo sąlygos yra 200 °C, 5 ar 6 val.

Remiantis Rietveld analizės rezultatais, visais atvejais Cu^{2+} ir Zn^{2+} jonų įterpimas į HA struktūrą nulėmė gardelės parametrų sumažėjimą. Taip pat buvo pastebėta, kad Cu^{2+} jonai yra labiau linkę užimti Ca(I) padėtį, o Zn^{2+} jonai – Ca(II).

Mėginių FTIR spektruose pastebėtos panašios tendencijos kaip ir XRD difraktogramose, liudijančios į HA struktūrą įterpiamų Cu^{2+} ir Zn^{2+} jonų daromą poveikį galutinio produkto savybėms. Kai kuriais sintezės atvejais pastebėtas katijonų sukeliamas pirmtako hidrolizės proceso slopinimas bei pašalinių fazių susidarymo skatinimas. Cu- ir Zn-legiruotų HA, susintetintų 200 °C, 5 val. sąlygomis, FTIR spektruose matomos intensyviausios HA fosfatų grupei būdingos virpesių juostos, patvirtinančios HA buvimą pagrindine kristaline faze.

Cu^{2+} ir Zn^{2+} turėjo įtakos galutinio produkto morfologijai. Šių katijonų koncentracijos didinimas koreliavo su lazdelių pavidalo dalelių kiekio didėjimu. Taip pat buvo pastebėta, kad Cu- ir Zn-legiruoti pirmtakai hidrolizės metu pasižymėjo didesniu polinkiu suformuoti lazdelių formos HA daleles. SEM tyrimai įrodė, kad pašaliniai katijonai gali būti taikomi HA morfologijos reguliavimui hidroterminės sintezės metu.

ICP-OES analizės rezultatai pademonstravo sėkmingą, efektyvų Cu^{2+} ir Zn^{2+} katijonų įsiterpimą į mėginių struktūrą. Tačiau, kadangi galutiniai gauti sintezės produktai nėra faziškai gryni, buvo iškelta hipotezė, kad dalis katijonų gali būti ne hidroksiapatitų struktūroje, o, pavyzdžiui, β -TCP struktūroje. Detalesniam jonų išsidėstymui suprasti, papildomai buvo atlikti elektronų paramagnetinio rezonanso (EPR) tyrimai. Cu-legiruotų HA mėginių, susintetintų 200°C, 5 val., EPR spektrai labai gerai atitiko literatūroje nurodytus, Cu-HA būdingus spektrus. Tuo tarpu mėginių, susintetintų 120°C, 3 val. EPR spektruose matomi signalai priskiriami Cu^{2+} jonams esantiems β -TCP struktūroje. EPR duomenys patvirtina XRD ir FTIR analizės rezultatus.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

GABRIELĖ KLYDŽIŪTĖ

Characterization of Metal Ions-Substituted Calcium Hydroxyapatites Synthesized by Hydrothermal Method

Calcium hydroxyapatite (Ca-HA) is mostly seen as a synthetic material for biomedical applications due to its bioactivity and biocompatibility [56]. Ca-HA ion exchange ability against various cations makes it highly biocompatible with inherent bioactivity properties [2]. Because of the flexibility in the structure of Ca-HA, various cations, such as zinc or copper, can substitute Ca^{2+} in Ca-HA in order to improve the desirable properties [60]. Biomaterials having antibacterial activity within their structures could be applied not only for bone defects and implant's coating in orthopedic surgery but also for the treatment of skin infections, for microbiologically polluted water, etc. [6]. To prepare biomaterials with desirable properties, it is essential to develop cost-effective and efficient synthesis methods which would at the same time provide the possibility to control morphology of the products.

This study investigates the properties of zinc- and copper-substituted hydroxyapatites, as well as finds the most favorable hydrothermal synthesis conditions. For this purpose, metals-doped hydroxyapatites were obtained by introducing divalent cations (Cu^{2+} or Zn^{2+}) to the hydrolysis aqueous solutions or by inserting them directly into the structure of the precursor during its synthesis using the wet precipitation method. Hydrolysis reactions were performed in aqueous solutions under hydrothermal conditions (120-230 C; 1-16h). The concentration of the metal ions corresponded to HA substitution levels of 0.1-10.0 mol%. The phase purity, structural properties, morphology, elemental composition, and ion distribution of hydrolysis products were investigated with XRD, FTIR, SEM, ICP-OES and EPR respectively.

Powder XRD, FTIR and SEM analysis confirmed that single-phase metal-doped and undoped precursors were successfully formed by wet precipitation method at a pH value of 9.5 and sintering them at 700°C for 5 hours.

Hydrothermal synthesis with 0.8 mol% Cu- and Zn- doped precursors exhibited limited release of foreign cations from the α -TCP structure. Therefore, the influence of extraneous ions incorporated into the structure of the precursors is much lower compared to that in hydrolysis aqueous solutions with the same ion concentration. The presence of various foreign cations in the hydrothermal reaction solution affects the efficiency of α -TCP hydrolysis and promotes the formation of extraneous phases. Furthermore, it can be inferred that the effectiveness of the α -TCP hydrolysis process is significantly reduced by the presence of Zn^{2+} ions rather than Cu^{2+} ions.

In terms of assessing the influence of cation concentrations in the solution on the final products of hydrolysis, it was found that in most cases the lowest concentration (0.1 mol%) of the foreign cations did not affect phase purity of the final product. Single-phase HA was obtained using both Cu^{2+} and Zn^{2+} . The increased concentration of Zn^{2+} (0.5; 1 mol%) induced formation of β -TCP. The formation of HA phase was completely inhibited when higher concentration of Zn^{2+} (5 mol%) was introduced to the reaction solution. When Zn^{2+} concentration was 10 mol%, the phase composition of the precipitate was almost entirely composed of Scholzite. Cu^{2+} had a similar effect on phase

transformation: an increased concentration of Cu^{2+} (0.5; 1 mol%) had also induced formation of β -TCP. At the higher concentrations of Cu^{2+} , hydrolysis of α -TCP was slightly hindered, and some remaining α -TCP was left after the hydrothermal treatment.

Moreover, it was determined that the optimal conditions for hydrothermal synthesis that yield the best results were at 200°C for a duration of 5 to 6 hours.

According to the Rietveld analysis, in all cases, the incorporation of Cu^{2+} and Zn^{2+} ions into the HA structure caused a reduction in the lattice parameters. It was also observed that Cu^{2+} ions tend to occupy the Ca(I) position in the HA lattice, while Zn^{2+} ions occupy the Ca(II) position.

The FTIR spectra exhibit similar tendencies as observed in the XRD diffractograms, indicating that in some cases, the incorporation of ions into the HA structure has an inhibitory effect on the hydrolysis of the precursor and promotes the formation of extraneous phases. In the FTIR spectra of Cu- and Zn-doped HA synthesized under 200°C for 5 hours, the most intense vibrational bands characteristic of the HA phosphate group is observed. It confirms the formation of HA as the main crystalline phase.

Zn^{2+} and Cu^{2+} had an impact on the morphology of the final product: increasing concentrations of these cations correlated with an increasing fraction of rod-like crystals. It has also been noted that the hydrolysis products of the Cu- and Zn-doped precursors tend to increase the likelihood of forming rod-shaped particles of HA as well as provides an increased surface area. The results of this study show that foreign ions could be applied as HA morphology-controlling additives during the hydrothermal synthesis.

The results of the ICP-OES analysis indicate that the incorporation of Zn^{2+} and Cu^{2+} ions into the structure of the samples was successful and efficient in all cases. Nevertheless, due to the lack of phase purity in the final synthesized products, some of the cations may not be incorporated into the structure of hydroxyapatite but may be incorporated into structures such as β -TCP.

In order to gain a more detailed understanding of ion distribution, further analysis using EPR was conducted. The EPR spectra of Cu-doped HA samples synthesized at 200°C for 5 hours match well those reported in literature for Cu-HA, while the spectra of samples synthesized at 120°C for 3 hours exhibit signals attributed to Cu^{2+} ions located in the β -TCP structure. The EPR data confirms the findings of the XRD and FTIR analysis.

Padėka

Nuoširdžiai dėkoju moksliniam vadovui prof. habil. dr. Aivarui Kareivai už įvairiapusę pagalbą.

Nuoširdžiai dėkoju dr. Evai Raudonytei-Svirbutavičienei už pagalbą sintetinant hidroksiapatitą bei atliekant XRD ir FTIR matavimus.

Nuoširdžiai dėkoju prof. dr. Aleksej Žarkov už atliktus ICP-OES matavimus.

Nuoširdžiai dėkoju Andriui Pakalniškiui už atliktus SEM matavimus.

Nuoširdžiai dėkoju dr. Andris Antuzevičs už atliktus EPR matavimus.

Nuoširdžiai dėkoju prof. dr. Ramūnui Skaudžiui už pagalbą atliekant Rietveld analizę.

Nuoširdžiai dėkoju visiems Vilniaus universiteto Chemijos ir Geomokslų fakulteto Neorganinės chemijos katedros „zolių-gelių“ chemijos mokslinės grupės kolegoms už pagalbą ir patarimus.

PRIEDAI

1. 1 priedas. Skirtingais metodais susintetintų įvairiai jonais pakeistų HA savybių pokyčių santrauka.

SKIRTINGAIS METODAIS SUSINTETINTŲ ĮVAIRIAI JONAIŠ PAKEIŠTŲ HA SAVYBIŲ
POKYČIŲ SANTRAUKA¹ [15, 18]

Mn ²⁺	Mg ²⁺	Ag ⁺	K ⁺	Na ⁺	HA	Jonas
Ca _{10-x} Mn _x (PO ₄) ₆ OH ₂	Ca _{10-x} Mg _x (PO ₄) ₆ OH ₂	Ca _{10-x} Ag _x (PO ₄) ₆ OH ₂	Ca _{10-x} K _x (PO ₄) ₆ OH ₂	Ca _{10-x} Na _x (PO ₄) ₆ OH ₂	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ OH ₂	Empirinė formulė
Ca²⁺						
Kietafazių reakcijų bendrojo nusodinimo	Nusodinimo, hidrolizė	Bendrojo nusodinimo, zolių-gelių, mikrobangų	Nusodinimo	Hidrolizė, kietafazių reakcijų, nusodinimo	Zolių-gelių, drėgnojo nusodinimo, mechanocheminiu, mikrobangų	Sintezės metodas
↑	↓	↑	↓	↓	9,421	Gardelės parametrai
↑	↓	↑	↓	↑	6,884	
↑	↑	↑	↑	↓		Mechaninės savybės
Stabilus iki 800° C. Aukštesnėje temperatūroje Mn-HA suskyla į dvifazį mišinį (Mn-HA ir β-TCP)	Stabilus iki 660-700° C, priklausomai nuo Mg ²⁺ jonų koncentracijos	Stabilus iki 600-700° C	Stabilus iki 650-700° C	Stabilus iki 700° C. Virš 700° C Na-HA susiformuoja dvifazis mišinys (HA ir β-TCP)	Stabilus 800-1200° C intervale, priklausomai nuo stochiometrijos. Virš 1000° C yra linkęs skilti, susiformuoja β-TCP, α-TCP bei CaO fazės	Terminis stabilumas

¹ Lentelėse pateikta informacija yra apibendrinta ir gali skirtis priklausomai nuo įterptamų jonų koncentracijos ir sintezės vykdymo sąlygų.

CO ₃ ²⁻ (A tipo) CO ₃ ²⁻ (B tipo)	La, Bi, Y, In Ca _{10-x} La _x (PO ₄) ₆ OH ₂ Ca _{10-x} Bi _x (PO ₄) ₆ OH ₂ Ca _{10-x} Y _x (PO ₄) ₆ OH ₂ Ca _{10-x} In _x (PO ₄) ₆ OH ₂	Cu ²⁺ Ca _{10-x} Cu _x (PO ₄) ₆ OH ₂	Ba ²⁺ Ca _{10-x} Ba _x (PO ₄) ₆ OH ₂	Fe ²⁺ Ca _{10-x} Fe _x (PO ₄) ₆ OH ₂	Zn ²⁺ Ca _{10-x} Zn _x (PO ₄) ₆ OH ₂	Sr ²⁺ Ca _{10-x} Sr _x (PO ₄) ₆ OH ₂	Jonas	
							Empirinė formulė	Pakeičiamas jonas
PO ₄ ³⁻ OH ⁻	Ca²⁺						Zolių-gelių, drėgnojo cheminio nusodinimo, bendrojo nusodinimo, hidrotterminės reakcijos, impulsinio nusodinimo lazeriu, plazmos pūrkimo	Gardelės parametrai
	A tipo – HA kaitinimo CO ₂ atmosferoje (900-1000) 15-144 val. ir HA mirkymo CO ₂ prisotintame vandenyne rūpale 2 mėn. B tipo – nusodinimo	Zolių-gelių, drėgnojo nusodinimo	Nusodinimo	Drėgnojo cheminio nusodinimo	Jonų mainų metodų	Zolių-gelių, drėgnojo cheminio nusodinimo, mikrobangų		
↑ ↓	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↑
↓ ↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↑
↑ ↓	La, Y – ↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	Mechaninės savybės
Skyla aukštesnėje nei 700° C temperatūroje	Stabilūs iki 800-900° C	Stabilūs iki 600-700° C	Stabilūs iki 600-700° C	Stabilūs iki 900° C. Aukštesnėje temperatūroje Fe ²⁺ jonai oksiduojasi iki Fe ³⁺ jonų, susiformuoja TCP, hematitas	Stabilūs iki 800-900° C	Stabilūs iki 1000-1200° C	Terminis stabilumas	

