



BIULETYN  
Wydziału Farmaceutycznego  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Biul. Wydz. Farm. WUM, 2013, 7, 48-55  
<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/>

## SYNTEZA I BADANIA STRUKTURALNE HYDROKSYAPATYTÓW WAPNIOWYCH MODYFIKOWANYCH AMINOKWASAMI

Sylwester Krukowski

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej,  
Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

Tel. +(48) 22 5720 753, tel./faks +(48) 22 5720 784, e-mail: [sylwek.krukowski@onet.eu](mailto:sylwek.krukowski@onet.eu)

Otrzymany 19.02.2013, zaakceptowany 25.03.2013, zamieszczony 17.06.2013

### STRESZCZENIE

Modyfikacja apatytów wapniowych cząsteczkami prostych związków organicznych, jakimi są aminokwasy, jest istotną metodą polepszenia biogodności tych biomateriałów. Wyróżnić można dwa rodzaje oddziaływań aminokwasów z syntetycznym apatytem: adsorpcję oraz inkluzję. Rodzaj oddziaływania jest zależny od zastosowanej procedury preparatywnej: przez wybór parametrów syntezy można wpływać na dystrybucję aminokwasu pomiędzy powierzchnię kryształów oraz sieć krystaliczną. Badania strukturalne i analityczne modyfikowanych aminokwasami materiałów apatytowych można efektywnie przeprowadzić metodami instrumentalnymi takimi jak: spektroskopia oscylacyjna w podczerwieni, proszkowa dyfrakcja rentgenowska, termogravimetria oraz mikroskopia elektronowa połączona z mikroanalizą rentgenowską.

**SŁOWA KLUCZOWE:** hydroksyapatyt, aminokwas, biomateriały kośćcozastępcze

### ABSTRACT

#### SYNTHESIS AND STRUCTURAL STUDIES OF CALCIUM HYDROXYAPATITES MODIFIED WITH AMINO ACIDS

Modification of calcium hydroxyapatites with simple organic molecules, such as amino acids, is an important method to improve biocompatibility of those biomaterials. There are two types of amino acid - apatite interactions: adsorption and inclusion. Their occurrence is strongly dependent on the preparative procedure, thus, by appropriate selection of synthesis conditions one can adjust the distribution of amino acid molecules between the apatite surface and the apatite crystal lattice. Structural and analytical studies of the modified apatite materials can be performed using vibrational infrared spectroscopy, powder X-ray diffraction, thermogravimetry, as well as electron microscopy combined with energy dispersive X-ray microanalysis.

**KEYWORDS:** hydroxyapatite, amino acid, biomaterials for bone repair

### 1. Wprowadzenie

Hydroksyapatyt, przedstawiany stechiometrycznie wzorem  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , to minerał z grupy fosforanów wapniowych, który w postaci niestechiometrycznej (z licznymi substytucjami i defektami w sieci krystalicznej) występuje jako podstawowy składnik tkanek twardych - kości i zębów. Ze względu na korzystne właściwości biomechaniczne, wysoką biogodność z tkanką kostną, osteokondukcyjność oraz powolną biodegradację w warunkach *in vivo*, hydroksyapatyty są obecnie obiektami dużego zainteresowania naukowców i inżynierów przygotowujących biomateriały mające zastosowanie w medycynie i farmacji [1].

Jednym z obiecujących i popularnych kierunków badań naukowych dotyczących tych minerałów jest modyfikacja ich struktury cząsteczkami różnych związków bioorganicznych, występujących w macierzy organicznej tkanek twardych. Do wspomnianych związków należą między innymi: aminokwasy biogenne ( $\alpha$ -L-aminokwasy) [2], kwasy organiczne o małej masie cząsteczkowej (szczawinowy, cytrynowy, jabłkowy) [3], polipeptydy oraz białka (kolagen i białka niekolagenowe) [4,5]. Wszystkie te związki w warunkach *in vivo* biorą udział w regulacji zarówno procesu

wzrostu kryształów minerału kostnego, jak również ich dojrzewania i resorpcji. Zakłada się, że modyfikowane biomateriały apatytowe będą wykazywać lepszą biogodność w stosunku do hydroksyapatytu niemodyfikowanego, co pozwoli na ich praktyczne zastosowanie w implantologii.

Zainteresowanie modyfikacją hydroksyapatytów wapniowych aminokwasami biogennymi wynika także z faktu, iż owe biokomponenty są prostymi, bardzo dobrze scharakteryzowanymi związkami organicznymi, co ułatwia preparatykę i badania fizykochemiczne. Poza tym są one elementami budulcowymi wszystkich pozostałych peptydowych składników tkanek twardych. Metody syntezy i struktura samego hydroksyapatytu są obecnie dość dobrze poznane. Teraz należałoby bardziej skupić się na projektowaniu, syntezie, badaniach strukturalnych i aplikacyjnych materiałów kompozytowych zawierających apatyt, w tym apatytów modyfikowanych aminokwasami.

### 2. Modyfikacja struktury hydroksyapatytu aminokwasem

Istnieją dwie podstawowe lokalizacje w jakie wprowadzić można aminokwas do struktury syntetycznego minerału kostnego: powierzchnia kryształów (efekt adsorpcji) oraz

wnętrze sieci krystalicznej (efekt wbudowania). Modyfikacja gotowego, komercyjnego lub wcześniej zsyntetyzowanego czystego hydroksyapatytu polegać może tylko i wyłącznie na wykorzystaniu procesu adsorpcji. Z kolei efekt wbudowania możliwy jest do uzyskania w czasie syntezy proszku hydroksyapatytowego *de novo* w obecności aminokwasu. W tym przypadku inkorporacja cząsteczek aminokwasu do sieci krystalicznej apatytu następuje już na etapie zarodków krystalicznych i wzrostu nanokryształów, kiedy pozwala na to znaczna labilność struktury materiału.

Oba zjawiska są w rzeczywistości na poziomie molekularnym dość złożonymi procesami, co zostanie omówione w dalszej części artykułu.

## 2.1. Aminokwas jako adsorbent

Adsorpcję aminokwasu poprzedza zwykle otrzymanie czystego proszku hydroksyapatytowego z wykorzystaniem jednej z wielu metod syntezy powszechnie opisywanych w literaturze [6,7]. Możliwe jest również wykorzystanie proszków dostępnych komercyjnie. Kolejnym etapem standardowej procedury adsorpcji jest umieszczenie hydroksyapatytu w wodnym roztworze aminokwasu. Powstała zawiesina jest mieszana lub wytrąsana przez określony czas, po czym zostaje odwirowana (lub przesączona). Osad poddawany jest suszeniu, a oddzielony supernatant może służyć do oznaczeń ilościowych pozostałego niezaadsorbowanego aminokwasu. Te dość proste czynności preparatywne komplikuje mnogość parametrów, jakie należy wziąć pod uwagę i których wartości należy dobrać w czasie optymalizacji procedury adsorpcji. Zostały one zebrane w Tabeli 1 na podstawie danych literaturowych [8-13].

Tabela 1. Czynniki wpływające na adsorpcję aminokwasu na powierzchni hydroksyapatytu [8-13].

Czynnik	Zakres
stosunek molowy Ca/P charakteryzujący odchylenie od stechiometrii	1,33 - 1,67
stosunek masy hydroksyapatytu do objętości roztworu aminokwasu	5 - 200 mg/ml
stężenie aminokwasu	1 - 250 mmol/l
pH	6.5 - 7.4
temperatura utrzymywana w czasie kontaktu hydroksyapatytu z roztworem aminokwasu	4 - 80 °C
czas kontaktu hydroksyapatytu z roztworem aminokwasu	10 - 480 min.
temperatura suszenia	80 - 100 °C
czas suszenia	24 - 72 godz.

Jak pokazują najnowsze badania, już sam stosunek molowy Ca/P wyjściowego hydroksyapatytu ma znaczący wpływ na efekt adsorpcji aminokwasu. Wartość 1,67 jest charakterystyczna dla hydroksyapatytu stechiometrycznego  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ , powszechnie stosowanego jako adsorbent. Okazuje się jednak, że wraz z obniżeniem stosunku molowego Ca/P, skłonność do adsorpcji aminokwasów wzrasta. Zmniejszenie wspomnianego stosunku Ca/P jest realizowane przez spadek zawartości jonów wapnia w stosunku do zawartości fosforu, przy zachowaniu obojętnego

ładunku elektrycznego całej sieci krystalicznej dzięki substytucji jonowej. Jednocześnie wykazano, że efektywność adsorpcji wzrasta wraz ze wzrostem ilości jonów  $\text{HPO}_4^{2-}$  w tak zwanych miejscach B kryształów hydroksyapatytu, czyli pierwotnie zajmowanych przez jony  $\text{PO}_4^{3-}$ . Podstawienie jonu trójujemnego dwuujemnym skutkuje zmianami w strukturze kryształu prowadzącymi do kompensacji ładunku przez lokalne ubytki i/lub inkorporację innych jonów. Najniższa wartość stosunku Ca/P w hydroksyapatycie niestechiometrycznym zastosowanym do adsorpcji aminokwasu wynosiła jak dotąd 1,33, a jego wzór można przedstawić następująco:  $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_{3.5}(\text{HPO}_4)_{2.5}(\text{OH})_{0.5}$ . Wzór ten ma prawidłowy, zerowy sumaryczny ładunek jonowy i wskazuje na sporą zawartość jonów  $\text{HPO}_4^{2-}$ , niezbędnych do efektywnej adsorpcji aminokwasu [8].

Wpływ stosunku masy hydroksyapatytu do objętości roztworu aminokwasu, a także wpływ stężenia aminokwasu w roztworze na efektywność adsorpcji wydają się być oczywiste. Parametry te należy dobierać odpowiednio do znanej powierzchni właściwej kryształów na których prowadzona jest adsorpcja, tak by ilość aminokwasu odpowiadała wysyceniu powierzchni kryształów zawieszonych w roztworze. Oddziaływania aminokwasu z powierzchnią minerału będą zależały od rodzaju oraz jonizacji samego aminokwasu (kation, anion, jon obojętny). Z kolei stopień jonizacji będzie uzależniony od kolejnego czynnika przedstawionego w Tabeli 1, czyli pH roztworu. Jak wynika z Tabeli 1, na zjawisko adsorpcji wpływa wiele czynników, co stwarza problemy przy opracowywaniu warunków procesu modyfikacji. Dlatego też wiele parametrów adsorpcji dobieranych jest empirycznie metodą prób i błędów. Typowym przykładem może być regulacja temperatury utrzymywanej w czasie kontaktu hydroksyapatytu z roztworem aminokwasu.

Zawartość wody w próbce zależy od wybranych parametrów suszenia, co ma przede wszystkim znaczenie przy wykonywaniu badań jakościowych biomateriału (pasma wody są widoczne w widmach FT-IR).

Na poziomie molekularnym zjawisko adsorpcji dowolnego aminokwasu na powierzchni hydroksyapatytu jest w znacznym stopniu uzależnione od rodzaju jego jonizacji, gdyż podstawowym opisywanym rodzajem oddziaływań hydroksyapatyt-aminokwas są oddziaływania elektrostatyczne. Rozważając tę kwestię teoretycznie, można wyróżnić dwa rodzaje tego typu oddziaływań:

- pomiędzy jonami wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ) hydroksyapatytu, a zjonizowanymi grupami karboksylowymi ( $-\text{COO}^-$ ) aminokwasów,
- pomiędzy grupami fosforanowymi ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) hydroksyapatytu, a zjonizowanymi grupami aminowymi ( $-\text{NH}_3^+$ ) aminokwasów [8,14,15].

Możliwe jest także tworzenie się wiązań wodorowych pomiędzy grupami aminowymi aminokwasów, a grupami fosforanowymi hydroksyapatytu [16]. Należy również uwzględnić oddziaływania van der Waalsa. Przechodząc jednak do rozważań praktycznych, analiza danych doświadczalnych pokazuje, że pH mieszaniny reakcyjnej w czasie procedury adsorpcji za każdym razem przekracza wartość punktu izoelektrycznego dla konkretnych aminokwasów. Konsekwencją tego jest występowanie tych aminokwasów w zjonizowanej postaci anionowej w roztworze, co skutkuje przede wszystkim oddziaływaniami opisanymi w punkcie a). Oczywiście nie wyklucza to występowania

wiązań wodorowych i oddziaływań van der Waalsa. Ze względu na to, że hydroksyapatyt w roztworach o  $\text{pH} < 7$  ulega częściowemu lub całkowitemu (przy wysokich stężeniach jonów  $\text{H}^+$ ) rozтворzeniu, niemożliwe jest zbadanie efektu adsorpcji dla zjonizowanej postaci kationowej większości biogennych aminokwasów. Adsorpcję tego typu można byłoby ewentualnie zrealizować dla aminokwasów typowo zasadowych, gdyż ich punkty izoelektryczne przyjmują wysokie wartości. Cenne byłoby w takim przypadku porównanie efektów adsorpcji w postaci kationowej i anionowej, co pozwoliłoby na określenie, które oddziaływania elektrostatyczne aminokwasu z hydroksyapatytem są silniejsze. Kwestia ta wymaga jednak wykonania szczegółowych badań, ponieważ nie była dotąd opisywana w literaturze.

Ostatnim zagadnieniem charakteryzującym aminokwasy jako adsorbaty w stosunku do hydroksyapatytów, jest określenie zależności pomiędzy rodzajem aminokwasu, a jego powinowactwem do minerału. Można tu zauważyć kilka podstawowych prawidłowości:

1. Aminokwasy kwasowe (asparaginian, glutaminian) oraz niepolarnie, obojętne aminokwasy o małych cząsteczkach (glicyna, alanina) wykazują stosunkowo wysokie powinowactwo do hydroksyapatytu, z tym, że aminokwasy kwasowe zdecydowanie wyższe.
2. Wśród aminokwasów kwasowych chętniej niż glutaminian adsorbują się asparaginian (mniejsza cząsteczka - mniejsze zawady przestrzenne).
3. Aminokwasy obojętne polarne (seryna) wykazują pewien niewielki stopień adsorpcji, który znacznie wzrasta, gdy do cząsteczki aminokwasu zostanie wprowadzona grupa fosforanowa (większy stopień jonizacji cząsteczki), np. L-seryna adsorbują się o wiele gorzej niż O-fosfo-L-seryna.
4. Jak dotąd nie jest jasna rola aminokwasów zasadowych jako adsorbatów, trudno jest określić ich powinowactwo do kryształów tylko na podstawie danych literaturowych, dlatego jest to kolejna kwestia wymagająca dalszych badań [10,11,15,17-20].

## 2.2. Udział aminokwasu w syntezie hydroksyapatytu *de novo*

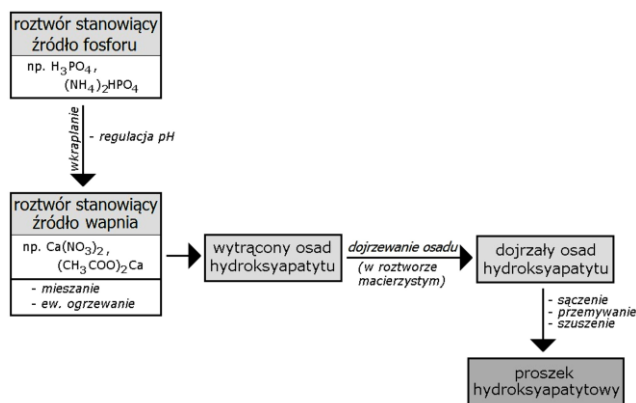
Istnieje wiele metod syntezy czystych proszków hydroksyapatytowych. Ogólny ich podział wyróżnia metody mokre (proces prowadzi się w roztworach wodnych lub wodno-alkoholowych) oraz metody suche. W obydwu grupach metod wykorzystuje się odpowiednie odczynniki (sole, tlenki, wodorotlenki, kwasy) będące źródłami wapnia i fosforu oraz regulatorami pH. Obecnie zarówno na skalę przemysłową, jak i laboratoryjną wykorzystywane są przede wszystkim metody mokre. Uproszczony schemat podstawowej metody mokrej przedstawia Ryc. 1.

Do modyfikacji hydroksyapatytów aminokwasami do tychczas wykorzystywane były metody mokre. Wyróżnić można dwie najważniejsze wersje podstawowej metody mokrej, umożliwiające wykorzystanie aminokwasu w syntezie hydroksyapatytu:

1. Modyfikacja polegająca na rozpuszczeniu aminokwasu w roztworze wybranego substratu będącego źródłem wapnia i przeprowadzeniu podstawowej syntezy mokrej z wykorzystaniem dowolnego związku stanowiącego źródło fosforu, przy  $\text{pH}$  utrzymywanym na poziomie 10-

12 oraz w temperaturze mieszczącej się w granicach  $20-50^\circ\text{C}$  [19,20].

2. Modyfikacja polegająca na sporządzeniu roztworu aminokwasu w buforze octanowym i wkraplaniu wodnych roztworów związków stanowiących źródła wapnia i fosforu. Po rozpoczęciu wkraplania,  $\text{pH}$  jest utrzymywane na poziomie wartości fizjologicznych (wartość  $7,4 \pm 0,1$ ). Substratem dostarczającym wapnia do syntezy jest octan wapnia, a źródłem fosforu jest roztwór diwodorooortofosforanu(V) amonu. Temperatura wygrzewania wynosi  $60-80^\circ\text{C}$ . W niektórych przypadkach osad hydroksyapatytu odmywany jest zbuforowanym roztworem chlorku sodu (PBS), co ma na celu pozbycie się pozostałości aminokwasu niebiorącego udziału w reakcji [17,21-23].



Ryc. 1. Schemat podstawowej mokrej metody syntezy hydroksyapatytu.

Prowadzenie syntezy hydroksyapatytu *de novo* w obecności aminokwasu oznacza, że zarodki krystaliczne powstają w roztworze z aminokwasem. Skutkiem tego może być wbudowanie się aminokwasu w sieć krystaliczną hydroksyapatytu, co jest zgodne ze labilnością tego minerału - jego skłonnością do podstawień jonowych i tworzenia wakancji w sieci krystalicznej. Należy jednak pamiętać o etapie dojrzenia (maturacji) wytrąconego osadu. Wtedy zawiązane krystality hydroksyapatytowe pozostają w kontakcie z roztworem macierzystym zawierającym aminokwas, dlatego nie można wykluczyć efektu adsorpcji. Odmywanie otrzymanego osadu skutkuje utratą aminokwasu z powierzchni. Jednak przy zastosowaniu odpowiednich technik badawczych (spektroskopia NMR ciała stałego), porównanie próbek odmytej z nieodmywaną, mogłoby wg autora dostarczyć ciekawych informacji dotyczących oddziaływań molekularnych aminokwasu w obydwu lokalizacjach w mineralu (wnętrze sieci krystalicznej i powierzchnia kryształu). Takie porównanie pozwalałoby również na stwierdzenie, czy zgodnie z oczekiwaniami doszło do wbudowania aminokwasu, czy może tylko zaszła jego adsorpcja, gdyż istnieją jedynie nieliczne doniesienia na temat efektu inkluzji aminokwasu i dotyczą one tylko glicyny i kwasu asparaginowego [21,23,24].

Niezależnie od tego, czy nastąpi wbudowanie aminokwasu do kryształu hydroksyapatytowego, czy też nie, sam fakt obecności aminokwasu w roztworze, w którym prowadzona jest synteza może wpłynąć na kształt oraz wielkość powstających kryształów. Dodatkowo wzrost kryształów w trakcie syntezy jest uzależniony od rodzaju samego aminokwasu:

1. Obojętne aminokwasy niepolarne (glicyna, alanina) powodują wzrost ilości zarodków krystalizacyjnych, a także hamują wzrost kryształów na etapie maturacji, co skutkuje obniżeniem ich wielkości [15,20,21].
2. Obojętne aminokwasy polarne działają w różny sposób. Przykładowo, według danych literaturowych asparagina obniża wielkość kryształów, ale już tyrozyna stymuluje ich rozrost [15,19].
3. Aminokwasy kwasowe (kwas asparaginowy, kwas glutaminowy), najprawdopodobniej ze względu na to, że wykazują duże powinowactwo do hydroksyapatytu, powodują znaczną inhibicję wzrostu kryształów [15,20-22].
4. Aminokwasy zasadowe (arginina, lizyna), podobnie jak aminokwasy kwasowe obniżają wielkość kryształów, ale w mniejszym stopniu [19,20].

Hydroksyapatyt jest minerałem praktycznie nierozpuszczalnym w wodzie. Okazuje się, że apatyt otrzymywany w obecności aminokwasów wykazuje o wiele wyższą rozpuszczalność. Z badań Matsumoto i wsp. przeprowadzonych na czterech aminokwasach wynika, że wśród modyfikowanych hydroksyapatytów rozpuszczalność rośnie odpowiednio: HAp-Gly < HAp-Glu < HAp-Ser < HAp-Asp. Nie wiadomo jednak, czy mamy do czynienia z efektem inkluzji aminokwasu, czy też nie, lecz samo przeprowadzenie syntezy minerału w obecności tych aminokwasów powoduje opisane zmiany rozpuszczalności [17].

Na etapie produkcji niektórych rodzajów biomateriałów implantacyjnych zawierających hydroksyapatyt wykorzystuje się proszki silnie rozdrobnione. Istnieje możliwość otrzymania wyjściowo osadu o rozproszeniu koloidalnym. Takie rozproszenie uzyskać można przy zastosowaniu odpowiednio niskich stężeń źródeł wapnia i fosforu, niskiej temperatury utrzymywanej w czasie syntezy (wraz ze wzrostem temperatury rosną rozmiary kryształów) oraz dzięki zastosowaniu aminokwasów jako stabilizatorów koloidalnego rozproszenia. Stosowane są w tym przypadku aminokwasy takie jak: lizyna, glicyna, asparagina, arginina, kwas asparaginowy i glutaminowy, seryna, alanina, walina oraz leucyna [25].

Opisano syntezę hydroksyapatytu w obecności aminokwasu w której otrzymano kryształy z nanoporami [21]. Synteza przebiega w sposób standardowy z dodatkiem aminokwasu, jak opisano wyżej. Otrzymany proszek z wbudowanymi cząsteczkami aminokwasu poddawany jest obróbce termicznej w temperaturze 800°C, w której hydroksyapatyt jest nadal stabilny, natomiast aminokwas zostaje wypalony, a produkty rozkładu ulatniają się pozostawiając nanopory. Opisano także inny interesujący sposób otrzymywania nanoporów w zmodyfikowanych aminokwasem kryształach [21]. Wiąże się on z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM), w którym obraz powstaje po przejściu wiązki elektronów przez próbkę. Odkrycie miało charakter przypadkowy, ponieważ stwierdzono, że kryształy hydroksyapatytu z wbudowanym do sieci krystalicznej aminokwasem zmieniają się w trakcie obserwacji TEM - powstają w nich nanopory powiększające się w czasie badania, co wiąże się ze stopniowym ulatnianiem się wbudowanego aminokwasu. Zastosowanie w eksperymencie wiązki elektronów o różnym natężeniu pozwoliło stwierdzić, że wielkość porów zależna jest od owego natężenia wiązki, to znaczy im jest ono większe, tym większa jest średnica powstałych porów.

Pojawienie się możliwości otrzymywania kryształów hydroksyapatytowych z nanoporami nie pozostaje bez znaczenia dla rozwoju nauk medycznych, bowiem tego typu porowate kryształy mogą stać się w przyszłości doskonałymi nośnikami dla substancji leczniczych, w szczególności stosowanych w leczeniu schorzeń tkanek twardych. Poza tym sam fakt, że możliwe jest wprowadzenie prostych cząsteczek organicznych (aminokwasów) do hydroksyapatytu w czasie jego syntezy, może dawać nadzieję na możliwość analogicznego wprowadzania do wnętrza kryształów molekuł substancji leczniczych o małej masie cząsteczkowej [21].

### 3. Metody badań hydroksyapatytów modyfikowanych aminokwasami

Do najczęściej stosowanych metod badań modyfikowanych hydroksyapatytów należy spektroskopia w podczerwieni (FT-IR), rentgenowska dyfraktometria proszkowa (PXRD), termogravimetria (TGA) oraz mikroskopia elektronowa transmisyjna (TEM) i skaningowa (SEM).

#### 3.1. Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR)

W badaniach metodą FT-IR stosuje się metody pomiarowe typowe dla ciał stałych. Najczęściej wykorzystywana jest metoda tabletki z KBr należąca do technik transmisyjnych (TRANS) oraz technika fotoakustyczna (PAS). Widma obejmują zakres średniej podczerwieni (zakres liczby falowej 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) i są wykonywane z rozdzielczością 2-4  $\text{cm}^{-1}$ . Liczba elementarnych eksperymentów, tzw. „skanów”, koniecznych do otrzymania widma wynosi 30-50. W widmach widoczne są przede wszystkim pasma pochodzące od drgań grup fosforanowych, hydroksylowych oraz wody krystalizacyjnej hydroksyapatytu. Ryc. 2 przedstawia widma FT-IR czystego, komercyjnego hydroksyapatytu wykonane metodą tabletki z KBr (TRANS) oraz techniką PAS. W Tabeli 2 zostały opisane najważniejsze pasma. Widma zostały zarejestrowane na spektrometrze Perkin Elmer, model Spectrum 1000, techniką TRANS przy użyciu detektora MCT, oraz techniką PAS z zastosowaniem przystawki fotoakustycznej MTEC Photoacoustic.

Dzięki technice PAS FT-IR możliwe jest wyeksponowanie pasm o małych intensywnościach, co widoczne jest wyraźnie na Ryc. 2. Jest to szczególnie istotne przy analizie obecności aminokwasu w próbce modyfikowanego hydroksyapatytu, ponieważ pasma samego minerału maskują większość pasm aminokwasów. Wadą techniki PAS FT-IR jest to, że w widmach pojawiają się zniekształcenia (tłumienie) pasm o dużych intensywnościach. Widoczne jest to na Ryc. 2 dla pasm ortofosforanów w zakresie 1200-960  $\text{cm}^{-1}$ .

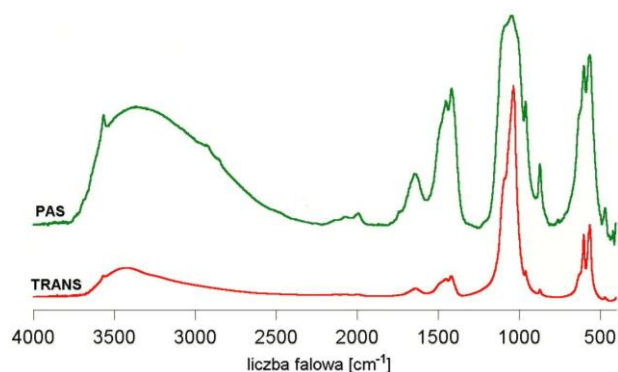
Okazuje się, że kluczowym obszarem widmowym PAS FT-IR umożliwiającym stwierdzenie obecności aminokwasu w próbce jest zakres liczby falowej 2000-1200  $\text{cm}^{-1}$ , gdzie wyeksponowanie pasm o małych intensywnościach wydaje się być szczególnie korzystne [24]. W zakresie tym obecność aminokwasu można potwierdzić w dwojaki sposób:

1. Przy niewielkiej zawartości aminokwasu w próbce biomateriału, przez zastosowanie widm różnicowych. Widmo różnicowe otrzymuje się przez odjęcie widma próbki odnośnikowej czystego hydroksyapatytu od widma próbki modyfikowanej aminokwasem. Uzyskane widmo różnicowe jest zbiorem nowych pasm pochodzą-

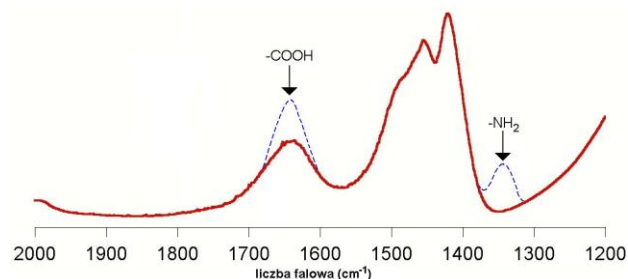
cych od aminokwasu, którym próbka została zmodyfikowana.

- Przy dużej zawartości aminokwasu w próbce biomateriału, przez ewidentne stwierdzenie obecności pasm od charakterystycznych grup funkcyjnych aminokwasu. W takim przypadku pojawiają się wyraźne pasma drgań grup karboksylowych i aminowych aminokwasów (Ryc. 3). Pasma grupy aminowej jest dobrze widoczne przy ok.  $1340\text{ cm}^{-1}$ , gdyż nie nakrywa się z innymi pasmami. Pasma grupy karboksylowej pokrywa się z „pasmem zginającym” wody, dlatego jego obecność można wykryć na podstawie znacznego wzrostu absorbancji w zakresie  $1635\text{-}1645\text{ cm}^{-1}$ .

Teoretycznie, metoda FT-IR umożliwia, poza samym potwierdzeniem obecności aminokwasu w próbce, odróżnienie rodzaju modyfikacji hydroksyapatytu (adsorpcja/wbudowanie). Apatyt, w którym aminokwas zaadsorbował się jedynie na powierzchni można odróżnić przez badanie FT-IR próbki odmytej. Po odmyciu aminokwasu znikną poprzednio widoczne jego pasma. Z kolei w biomateriale zawierającym aminokwas wbudowany w sieć krystaliczną, zarówno przed, jak i po jego odmyciu, pasma aminokwasu powinny pozostać widoczne [21,22]. W praktyce lokalizacja molekuł aminokwasu w apatycie może być trudna do zbadania tylko na podstawie widm FT-IR, gdyż możliwe jest, że biomateriał zawierający aminokwas wbudowany będzie zawierał także aminokwas zaadsorbowany. Perspektywicznie, dobrą metodą badawczą do szczegółowej analizy tego typu zagadnień mogłaby być wysokorozdzielcza spektroskopia NMR w ciele stałym.



Ryc. 2. Widma FT-IR czystego hydroksyapatytu wapniowego wykonane techniką fotoakustyczną (PAS) oraz transmisyjną (TRANS).



Ryc. 3. Widmo FT-IR hydroksyapatytu w zakresie  $2000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ . Strzałkami oznaczono pasma pojawiające się przy wysokich stężeniach aminokwasu w próbce.

Tabela 2. Interpretacja najważniejszych pasm widm IR czystego hydroksyapatytu przedstawionych na Ryc. 2.

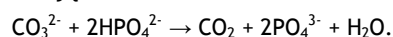
Zakres liczby falowej [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Interpretacja	Rodzaj drgania
560 - 630	ortofosforany ( $\text{PO}_4^{3-}$ )	rozciągające ( $\nu_{\text{PO}}$ )
870	węglany ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), wodorortofosforany ( $\text{HPO}_4^{2-}$ )	zginające ( $\delta_{\text{CO}}$ ) rozciągające ( $\nu_{\text{PO}}$ )
960 - 1200	ortofosforany ( $\text{PO}_4^{3-}$ )	rozciągające ( $\nu_{\text{PO}}$ )
1410 - 1560	węglany ( $\text{CO}_3^{2-}$ )	rozciągające ( $\nu_{\text{CO}}$ )
1635 - 1645	woda	zginające ( $\delta_{\text{OH}}$ )
2500 - 3450	woda	rozciągające ( $\nu_{\text{OH}}$ )
3570	strukturalne grupy hydroksylowe hydroksyapatytu	rozciągające ( $\nu_{\text{OH}}$ )

### 3.2. Rentgenowska dyfraktometria proszkowa (PXRD)

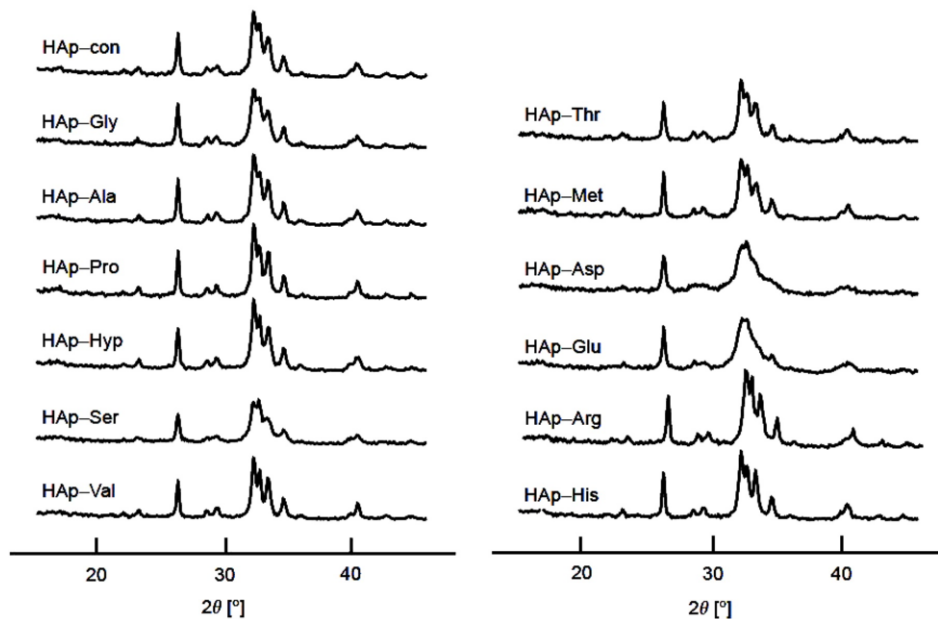
Badanie dyfraktometryczne biomateriałów hydroksyapatytowych modyfikowanych aminokwasami umożliwia przede wszystkim analizę wpływu tych aminokwasów na sieć krystaliczną minerału (krystaliczność, parametry komórki elementarnej). Można się spodziewać, że sam efekt adsorpcji aminokwasu nie zmieni krystaliczności próbki, lub zmieni ją w sposób nieznaczny. Jednak synteza hydroksyapatytu w obecności aminokwasu prowadzi do otrzymania próbek hydroksyapatytów o różnej krystaliczności (zwykle obniżonej), jak opisano w Rozdziale 2.2. Znajduje to odzwierciedlenie w dyfraktogramach próbek modyfikowanych aminokwasami (Ryc. 4). Widać tu wyraźnie obniżone, poszerzone i rozmyte refleksy dyfrakcyjne dla próbek modyfikowanych seryną, asparaginanem, glutaminianem, a także, choć w mniejszym stopniu, glicyną. Można stwierdzić zatem, że wymienione aminokwasy charakteryzuje duże powinowactwo do hydroksyapatytu, gdyż wpływając inhibycyjnie na wzrost kryształów powodują spadek ich krystaliczności (obniżenie wielkości, wzrost naprężeń i ilości defektów w sieci), co przejawia się na dyfraktogramach. Im bardziej poszerzone są refleksy dyfrakcyjne, tym powinowactwo aminokwasu do apatytu jest większe [17].

### 3.3. Termogravimetria (TGA)

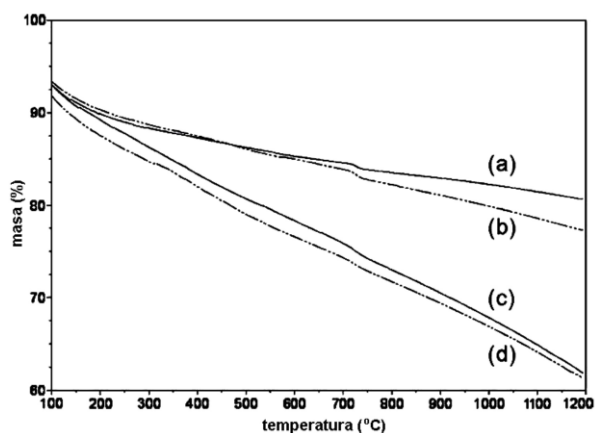
Badanie z wykorzystaniem analizy termogravimetrycznej próbek modyfikowanych hydroksyapatytów prowadzone jest w funkcji wzrastającej temperatury w przedziale  $20\text{-}1200^\circ\text{C}$ . Próbkę ogrzewać można w powietrzu lub argonie. Sam hydroksyapatyt w czasie ogrzewania traci wodę (z powierzchni kryształów oraz z sieci krystalicznej), a także, jeżeli zawiera domieszki węglanowe, traci ditlenek węgla zgodnie z reakcją:



Zwykle powyżej  $1200^\circ\text{C}$  materiał staje się termostabilny [26,27]. Hydroksyapatyt zmodyfikowany charakteryzuje dodatkowy ubytek masy związany z utratą aminokwasu w trakcie ogrzewania. Przykładowe krzywe termogravimetryczne biomateriałów przedstawia Ryc. 5.



Ryc. 4. Dyfraktogramy biomateriałów hydroksyapatytowych zmodyfikowanych aminokwasami. *HAp-con* - czysty hydroksyapatyt (dyfraktogram odnośnikowy) [17].



Ryc. 5. Krzywe termogravimetryczne: a - czysty HA, b - HA modyfikowany alaniną, c - HA modyfikowany argininą, d - HA modyfikowany asparaginianem [20].

Wynik badania metodą TGA przedstawiony na Ryc. 5 pokazuje, że szybkość utraty masy w czasie ogrzewania zależy od obecności aminokwasu. Końcowa masa próbki czystego apatyty (krzywa *a*) jest wyższa niż apatyty modyfikowanych aminokwasami (krzywe *b-d*), co wiąże się z udziałem aminokwasów w całkowitej masie odważek wziętych do badania. Widać też wyraźnie, że aminokwasy takie jak arginina i kwas asparaginowy wykazują o wiele wyższe powinowactwo do hydroksyapatytu niż alanina. Próbkę zawierające te aminokwasy (krzywe *c* i *d*) tracą znaczną część swojej masy ze względu na wysoki udział ilościowy aminokwasu w ich składzie.

### 3.4. Mikroskopia elektronowa

Zarówno skaningowa, jak i transmisyjna mikroskopia elektronowa są badaniami dostarczającymi ogólnych informacji dotyczących cech morfologicznych biomateriałów hydroksyapatytowych. Dzięki tym metodom można głównie określić stopień krystaliczności minerału, kształt pojedynczych kryształów i stopień ich agregacji. W praktyce badania te służą do oceny wpływu aminokwasu na wielkość

kryształów hydroksyapatytu otrzymywanego *de novo*, a także do wstępnej selekcji próbek czystych minerałów, na których prowadzona jest adsorpcja. Dobór odpowiedniego stopnia krystaliczności hydroksyapatytu spełniającego rolę adsorbenta jest istotny ze względu na to, że adsorpcja zachodzi tym efektywniej, im większą powierzchnię właściwą posiada adsorbent. Poza tym, można się spodziewać, że podczas adsorpcji, przy dostatecznie wysokich stężeniach aminokwasu wykrystalizuje on w postaci warstwy na powierzchni kryształów hydroksyapatytu lub też pojawi się jako autonomiczna faza krystaliczna. Są to zjawiska niekorzystne, których obecność stwierdzić można dzięki mikroskopii elektronowej.

Ciekawą techniką towarzyszącą badaniom z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego jest mikroanaliza rentgenowska, oznaczana skrótem EDX (*energy dispersive X-ray microanalysis*). Wysoka czułość metody pozwala na wykonywanie analiz jakościowych oraz ilościowych. Ogólna zasada pomiaru polega na rejestracji wyemitowanego przez próbkę promieniowania X, które powstaje na skutek wzbudzenia badanego materiału wiązką elektronów. Promieniowanie X rejestruje odpowiedni detektor, a następnie analizuje je spektrometr rentgenowski. Wynik przedstawiany jest w postaci zawartości procentowej poszczególnych pierwiastków w tym punkcie próbki, z którego dokonywany jest pomiar. Na podstawie wyników badania EDX można zatem zbadać typ hydroksyapatytu (stosunek Ca/P charakteryzujący odchylenie hydroksyapatytu od stechiometrii), a także stwierdzić obecność lub brak aminokwasu. W przypadku, gdy próbka zawiera aminokwas, w wyniku badania EDX pojawia się udział procentowy azotu (w przypadku aminokwasów siarkowych dodatkowo udział siarki). Zawartość węgla nie jest wyznacznikiem obecności aminokwasu, gdyż hydroksyapatyt może zawierać nieorganiczne domieszki węglane.

### 4. Podsumowanie

Otrzymywanie modyfikowanych aminokwasami biomateriałów hydroksyapatytowych o polepszonej biogodności

jest złożonym procesem, w którym mnogość parametrów wymagających kontroli utrudnia z pozoru proste czynności preparatywne. Opisane badania jakościowe dostarczają informacji o tym, czy modyfikacja hydroksyapatytu aminokwasem ma miejsce w konkretnej próbce, jednak efekt adsorpcji aminokwasu trudno jest odróżnić od efektu wbudowania. Autor przypuszcza, że dokładniejsze wyniki uzyskać można wykorzystując wysokorozdzielczą spektroskopię NMR w cieple stałym [24], choć jak dotąd brak jest na ten temat doniesień literaturowych. Badania nad modyfikacją apatytów aminokwasami, w szczególności nad ich inkorporacją do sieci krystalicznej, mają duże znaczenie aplikacyjne.

## 5. Wykaz skrótów

Ca/P	( <i>Calcium to Phosphorus molar ratio</i> ) - stosunek molowy wapnia do fosforu
EDX	( <i>Energy Dispersive X-ray microanalysis</i> ) - mikroanaliza rentgenowska
FT-IR	( <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> ) - spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
HA	( <i>hydroxyapatite</i> ) - hydroksyapatyt
HAp-Ala	( <i>hydroxyapatite modified with alanine</i> ) - hydroksyapatyt modyfikowany alaniną
HAp-Arg	( <i>hydroxyapatite modified with arginine</i> ) - hydroksyapatyt modyfikowany argininą
HAp-Asp	( <i>hydroxyapatite modified with aspartic acid</i> ) - hydroksyapatyt modyfikowany kwasem asparagininowym
HAp-con	( <i>hydroxyapatite pure, control</i> ) - czysty hydroksyapatyt, próbka kontrolna
HAp-Glu	( <i>hydroxyapatite modified with glutamic acid</i> ) - hydroksyapatyt modyfikowany kwasem glutaminowym
HAp-Gly	( <i>hydroxyapatite modified with glycine</i> ) - hydroksyapatyt modyfikowany glicyną
HAp-His	( <i>hydroxyapatite modified with histidine</i> ) - hydroksyapatyt modyfikowany histydyną
HAp-Hyp	( <i>hydroxyapatite modified with hydroxyproline</i> ) - hydroksyapatyt modyfikowany hydroksyproliną
HAp-Met	( <i>hydroxyapatite modified with methionine</i> ) - hydroksyapatyt modyfikowany metioniną
HAp-Pro	( <i>hydroxyapatite modified with proline</i> ) - hydroksyapatyt modyfikowany proliną
HAp-Ser	( <i>hydroxyapatite modified with serine</i> ) - hydroksyapatyt modyfikowany seryną
HAp-Thr	( <i>hydroxyapatite modified with threonine</i> ) - hydroksyapatyt modyfikowany treoniną
HAp-Val	( <i>hydroxyapatite modified with valine</i> ) - hydroksyapatyt modyfikowany walina
NMR	( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> ) - magnetyczny rezonans jądrowy
PAS	( <i>Photoacoustic technique</i> ) - technika fotoakustyczna

PBS	( <i>Phosphate Buffered Saline</i> ) - zbuforowany roztwór chlorku sodu
PXRD	( <i>Powder X-Ray Diffraction</i> ) - proszkowa dyfrakcja rentgenowska
SEM	( <i>Scanning Electron Microscopy</i> ) - skaningowa mikroskopia elektronowa
TEM	( <i>Transmission Electron Microscopy</i> ) - transmisyjna mikroskopia elektronowa
TGA	( <i>Thermogravimetric Analysis</i> ) - termogravimetria
TRANS	( <i>Transmission technique</i> ) - technika transmisyjna

## 6. Bibliografia

1. S.V. Dorozhkin, *Materials* 2009, 2, 399-498.
2. Z. Chen, Y. Fu, Y. Cai, J. Yao, *Materials Letters* 2012, 68, 361-363.
3. W. Wei, X. Zhang, J. Cui, Z. Wei, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2011, 392, 67-75.
4. Y. Zhai, F.Z. Cui, *Journal of Crystal Growth* 2006, 291, 202-206.
5. T. Matsumoto, M. Okazaki, M. Inoue, S. Yamaguchi, T. Kusunose, T. Toyonaga, Y. Hamada, J. Takahashi, *Biomaterials* 2004, 25, 3807-3812.
6. Z. Knyszalska-Karwan, A. Ślósarczyk, Wydawnictwo Krakmedia, Kraków 1996.
7. A. Sobczak, Z. Kowalski, *Czasopismo Techniczne* 2008, z. 1-Ch, 125-131.
8. A. El Rhilassi, M. Mourabet, H. El Boujaady, M. Bennani-Ziatni, R. Hamri, A. Taitai, *Applied Surface Science* 2012, 259, 376-384.
9. G.M.S. El Shafei, N.A. Moussa, *Journal of Colloid and Interface Science* 2001, 238, 160-166.
10. M.W. Neuman, W.F. Neuman, F.G. Burton, *Currents in Modern Biology* 1969, 3, 69-73.
11. M. Kresak, E.C. Moreno, R.T. Zahradnik, D.I. Hay, *Journal of Colloid and Interface Science* 1977, 59, 283-292.
12. L. Benaziz, A. Barroug, A. Legrouri, C. Rey, A. Lebugle, *Journal of Colloid and Interface Science* 2001, 238, 48-53.
13. T. Matsumoto, M.H. Uddin, S.H. An, K. Arakawa, E. Taguchi, A. Nakahira, M. Okazaki, *Materials Chemistry and Physics* 2011, 128, 495-499.
14. S. Koutsopoulos, E. Dalas, *Journal of Crystal Growth* 2000, 217, 410-415.
15. R. Sharma, R.R. Pandey, A.A. Gupta, S. Kar, M. Dhayal, *Materials Chemistry and Physics* 2012, 133, 718-725.
16. H. Zhou, T. Wu, X. Dong, Q. Wang, J. Shen, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007, 361, 91-96.
17. Przedruk z: T. Matsumoto, M. Okazaki, M. Inoue, Y. Hamada, M. Taira, J. Takahashi, *Crystallinity and solubility characteristics of hydroxyapatite adsorbed amino acid*, *Biomaterials* 2002, 23, 2241-2247, Copyright, za zgodą Elsevier.
18. L. Benaziz, A. Barroug, A. Legrouri, Ch. Rey, A. Lebugle, *Journal of Colloid and Interface Science* 2001, 238, 48-53.
19. Z. Chen, Y. Fu, Y. Cai, J. Yao, *Materials Letters* 2012, 68, 361-363.
20. Przedruk z: B. Palazzo, D. Walsh, M. Iafisco, E. Foresti, L. Bertineti, G. Martra, C.L. Bianchi, G. Cappelletti, N. Roveri, *Amino acid synergetic effect on structure, morphology and surface properties of biomimetic apatite nanocrystals*, *Acta Biomaterialia* 2009, 5, 1241-1252, Copyright, za zgodą Elsevier.
21. T. Matsumoto, M.H. Uddin, S.H. An, K. Arakawa, E. Taguchi, A. Nakahira, M. Okazaki, *Materials Chemistry and Physics* 2011, 128, 495-499.
22. T. Matsumoto, M. Okazaki, M. Inoue, J.-I. Sasaki, Y. Hamada, J. Takahashi, *Dental Materials Journal* 2006, 25, 360-364.
23. M.H. Uddin, T. Matsumoto, S. Ishihara, A. Nakahira, M. Okazaki, T. Sohmura, *Journal of Dental Research* 2010, 89, 488-492.

24. S. Krukowski, Praca magisterska, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa 2012.
25. United States Patent Application 20040170699.
26. S. Masmoudi, A. Larbot, H. El Feki, R. Ben Amar, *Ceramics International* 2007, 33, 337-344.
27. M. Ashok, N. Meenakshi Sundaram, S. Narayana Kalkura, *Materials Letters* 2003, 57, 2066-2070.