

Joanna LATOCHA, Michał WOJASIŃSKI, Radosław JEŻAK, Krzysztof MATUSIAK, Tomasz CIACH, Paweł SOBIESZUK

e-mail: pawel.sobieszuk@pw.edu.pl

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprosesowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Zastosowanie metody ChZT do oznaczania stężenia lecytyny w syntetycznym hydroksyapatycie

Wstęp

Syntetyczny hydroksyapatyt (HAp) posiada wiele zalet m.in. jest biozgodny, nietoksyczny, osteoindukcyjny [Lu i in., 2018]. Ze względu na swoje chemiczne i strukturalne podobieństwo do naturalnego hydroksyapatytu obecnego w kościach znalazł szerokie zastosowanie w medycynie, szczególnie w medycynie regeneracyjnej [Habracken i in., 2016]. W literaturze opisanych jest wiele metod jego syntezy [Sadat-Shojai i in., 2013]. Jednak mając na uwadze jego potencjalne zastosowanie w ludzkim organizmie warto skupić się na prostych procesach pozwalających otrzymać cząstki o korzystnych właściwościach. Ciekawym podejściem do otrzymywania nanocząstek hydroksyapatytu jest precypitacja w obecności lecytyny pełniącej rolę surfaktantu promującego powstawanie nanocząstek. Ponadto jest dodatkiem służącym do modyfikacji powierzchni otrzymywanych cząstek. Lecytyna powszechnie występuje w błonach komórkowych. Jest nietoksycznym związkiem, który wpływa na morfologię otrzymanego HAp. W świetle tych zalet lecytyna może być uważana za odpowiedni modyfikator potencjalnie zwiększający biozgodność końcowego produktu.

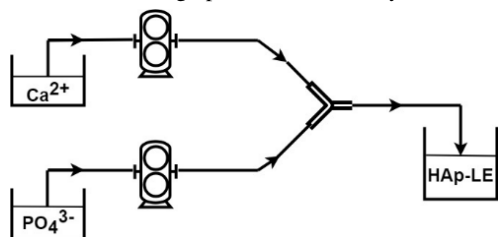
Przedstawione badania dotyczyły precypitacji nanocząstek hydroksyapatytu z różną zawartością lecytyny (HAp-LE) w reaktorze o geometrii Y oraz wyznaczenia ilości lecytyny w końcowym produkcie. W tym celu wykorzystano znaną metodę analityczną jaką jest ChZT (*Chemiczne Zapotrzebowanie Tlenu*). Wykonano krzywą wzorcową lecytyny. Następnie w celu weryfikacji poprawności metody, wykorzystując otrzymaną krzywą, przeprowadzono bilans tlenu zużytego do całkowitego utlenienia lecytyny związanej z syntetyzowanym HAp. Bilans wykonano dla mieszaniny poreakcyjnej, osadu oraz supernatantu. Ostatecznie wyznaczono procentową zawartość lecytyny związanej z hydroksyapatytem w przeprowadzonych syntezach HAp-LE. Ponadto stwierdzono, że metoda ChZT z powodzeniem pozwala zarówno na oznaczenie lecytyny w roztworach wodnych z zawieszonym hydroksyapatytem, jak i w przypadku, gdy lecytyna jest związana z HAp

Badania doświadczalne

Precypitacja hydroksyapatytu w obecności lecytyny

Syntezę hydroksyapatytu przeprowadzono na podstawie metody opracowanej i opisanej przez Wojasińskiego i in. [2015].

Jako źródło jonów wapniowych Ca^{2+} oraz fosforanowych PO_4^{3-} wykorzystano roztwory wodne odpowiednio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ i $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Syntezę prowadzono w reaktorze przepływowym Y o długości wylotu 10 mm. Lecytyna (Lipoid S PC-3) w ilości 1 g/L; 3 g/L; 5 g/L; 15 g/L została dodana do roztworu z jonami Ca^{2+} . Schemat układu badawczego przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Schemat otrzymywania hydroksyapatytu z dodatkiem lecytyny (HAp-LE) w procesie ciągłej precypitacji w reaktorze Y.

Otrzymaną zawiesinę poreakcyjną poddawano wirowaniu, oczyszczaniu oraz suszeniu w temperaturze 50°C przez 24 h. Uzyskany proszek poddano analizie przy użyciu spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR, Nicolet™ 6700 firmy Thermo Scientific) w celu potwierdzenia obecności lecytyny

Oznaczenie zawartości lecytyny w HAp-LE

ChZT jest wskaźnikiem określającym ilość tlenu (wyrażoną w mg O_2/L) potrzebną do całkowitego utlenienia związków organicznych zawartych w próbce. Lecytyna będąca związkiem organicznym wykazuje odpowiedź ChZT, z kolei hydroksyapatyt jako związek nieorganiczny nie przedstawia odpowiedzi ChZT. Zawartość lecytyny w próbkach HAp-LE wyznaczono stosując procedurę oznaczania ChZT metodą dwuchromianową wg normy [PN-ISO 6060, 2006]

Analizę ChZT prowadzono poprzez ogrzewania próbki przez 2 h w środowisku kwasu siarkowego (VI) i ze znaną ilością dwuchromianu (VI) potasu $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ w obecności katalizatora – siarczanu (VI) srebra AgSO_4 oraz z dodatkiem siarczanu (VI) rtęci jako związku maskującego jony chlorkowe. Dwuchromian był redukowany przez substancje organiczne zawarte w próbce, zaś nadmiar niezredukowanego dwuchromianu był odmiareczkowany za pomocą roztworu heksahydratu siarczanu (VI) amonu i żelaza (II) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ wobec ferroiny jako wskaźnika. Wartość ChZT obliczono z ilości zredukowanego dwuchromianu (VI). Zgodnie z normą, 1 mol dwuchromianu (VI) $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ odpowiada 1,5 mola tlenu O_2 . Wszystkie potrzebne odczynniki: kwas siarkowy (VI) 4mol/l; siarczan (VI) srebra w kwasie siarkowym (VI); dwuchromian (VI) potasu 0,040 mol/l; siarczan (VI) amonu i żelaza (II) ok. 0,12 mol/l; wodoroftalan potasu 2,082 mmol/l były przygotowane z użyciem wody ultraczystej Mili-Q.

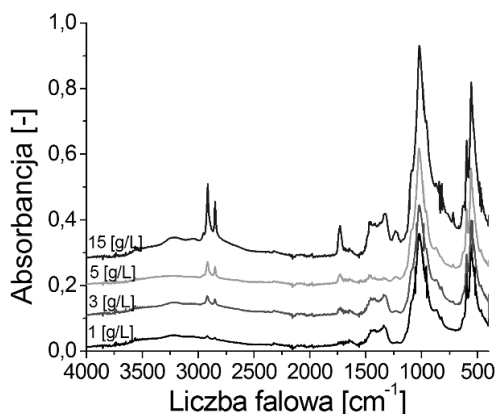
W celu wykonania krzywej wzorcowej przygotowano roztwory lecytyny o stężeniach 0,25 g/L, 0,2 g/L, 0,15 g/L, 0,1 g/L i 0,05 g/L z dodatkiem komercyjnego HAp w ilości 5 g/L, a następnie oznaczano ChZT zgodnie z wyżej przedstawioną procedurą i wykreślono krzywą wzorcową. Każdy punkt na krzywej przedstawia średnią z 6 pomiarów. Próbki HAp-LE wykorzystane do oznaczenia lecytyny zostały odpowiednio rozcieńczone, tak aby uzyskane wartości ChZT mieściły się w zakresie oznaczalności metody.

Wyniki i dyskusja

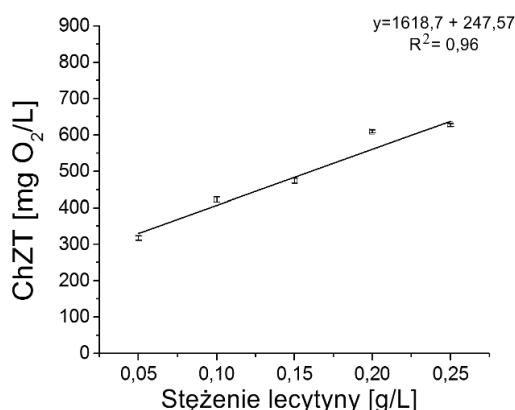
Analiza FTIR (Rys. 2) otrzymanych proszków wykazała, że otrzymano piki odpowiadające grupie fosforanowej PO_4^{3-} pojawiającej się przy liczbie falowej: 1020 cm^{-1} , 960 cm^{-1} , 600 cm^{-1} , 560 cm^{-1} . Piki te są charakterystyczne dla hydroksyapatytu. Ponadto otrzymano również piki przy liczbach falowych 2852 cm^{-1} , 2921 cm^{-1} , 1737 cm^{-1} , 1376 cm^{-1} oraz 1227 cm^{-1} , które standardowo nie występują w widmie HAp. Są to piki pochodzące od wiązań estrowych oraz długich łańcuchów tłuszczowych występujących w lecytynie.

Ponadto na rys. 2 widoczna jest zwiększająca się intensywność pików pochodzących od lecytyny wraz ze zwiększającą się ilością lecytyny użytą w czasie precypitacji HAp-LE.

Otrzymana krzywa wzorcową dla roztworów lecytyny z dodatkiem komercyjnego HAp została przedstawiona na rys. 3. Zgodnie z oczekiwaniami obecność czystego HAp nie wpłynęła na oznaczenie ChZT. Jak widać, w stosowanym zakresie stężeń uzyskano zależność liniową ChZT od stężenia lecytyny ze współczynnikiem korelacji bliskim Y.



Rys. 2. Widma FTIR hydroksyapatytu modyfikowanego lecytyną (HAp-LE)



Rys. 3. Krzywa wzorcowa lecytyny z dodatkiem hydroksyapatytu

Warto wspomnieć, iż krzywa wzorcowa była wykonana na podstawie roztworów lecytyny do których dodano czysty HAp. Warunki przeprowadzania analizy ChZT (kwaśne środowisko oraz wysoka temperatura) zapewniają całkowite utlenienie obecnych w próbce związków organicznych. Ponadto warunki prowadzenia reakcji pozwalają przypuszczać, że będzie obserwowane całkowite utlenienie lecytyny zarówno wolnej, jak i związanej powierzchniowo z HAp, a także zamkniętej w nanocząstkach hydroksyapatytu. Autorzy pracy uważają, że proponowana metoda jest odpowiednia do oznaczenia zawartości lecytyny związanej z HAp po procesie mokrej precipitacji hydroksyapatytu i z powodzeniem może być wykorzystana w przypadku stosowania innych związków organicznych.

Dokładność oraz poprawność metody do oznaczania zawartości lecytyny zawartej w HAp-LE potwierdzono na podstawie sporządzenia bilansu tlenu zużytego do całkowitego utlenienia lecytyny zawartej w mieszaninie poreakcyjnej, osadzie oraz supernatancie (Tab. 1). Z przeprowadzonych obliczeń wynika, że masa tlenu zużyta do całkowitego utlenienia związków organicznych, których źródłem jest lecytyna, jest porównywalna dla mieszaniny poreakcyjnej i dla sumy masy tlenu z osadu i supernatantu. Na podstawie wykonanego bilansu tlenu można uznać, że zaproponowana metoda analityczna jest właściwa do oznaczenia ilości lecytyny związanej z hydroksyapatytem. Ponadto stwierdzono, że po odwirowaniu prawie cała ilość dodanej lecytyny jest zawarta w osadzie, natomiast ilość lecytyny zawarta w supernatancie jest niewielka. Oznacza to, że lecytyna użyta do syntezy HAp-LE niemal w całości wiąże się z hydroksyapatytem (Tab. 1).

Tab. 1. Bilans tlenu w mieszaninie poreakcyjnej, osadzie i supernatancie

Ilość lecytyny użyta do syntezy [g/L]	ChZT mieszaniny poreakcyjnej [mg O ₂ /L]	ChZT osadu [mg O ₂ /L]	ChZT supernatantu [mg O ₂ /L]
5	699,72	704,48	12,68
3	609,00	579,60	10,93

Wyniki procentowej zawartości lecytyny w uzyskanych proszkach zostały przedstawione w tab. 2.

Tab. 2. Procentowa zawartość lecytyny w proszkach HAp-LE

Ilość lecytyny użyta do syntezy [g/L]	Zawartość lecytyny w proszku HAp-LE [%]
1	1,01
3	2,98
5	18,43
15	27,14

Z przeprowadzonych analiz jasno wynika, że wraz ze zwiększającą się ilością lecytyny użytej do syntezy rośnie jej zawartość w końcowym produkcie w zakresie od 1% do ok. 30% masowych.

Wnioski

W wyniku przeprowadzonych badań doświadczalnych stwierdzono, że metoda pomiaru *Chemicznego Zapotrzebowania Tlenu* oparta na *Polskiej Normie [PN-ISO 6060]* może być z powodzeniem stosowana do oznaczenia stężenia lecytyny.

Otrzymano liniową krzywą wzorcową w przypadku roztworów lecytyny z dodatkiem hydroksyapatytu. Współczynnik korelacji otrzymanej krzywej jest bliski jedności.

Metoda ChZT z powodzeniem nadaje się zarówno do oznaczania lecytyny w roztworach z zawieszonym hydroksyapatytem, jak i w przypadku, gdy lecytyna jest związana z HAp. Przewagą zaproponowanej metody ChZT nad innymi technikami oznaczania zawartości lecytyny jest fakt, że za jej pomocą oznaczana jest cała lecytyna zawarta w hydroksyapatycie, a nie tylko ta związana powierzchniowo.

Kolejną jej zaletą jest niski koszt i dobra powtarzalność wyników. Zaproponowana oryginalna metoda w przyszłości może również być wykorzystana w przypadku stosowania innych związków organicznych w różnych syntezach związków nieorganicznych.

LITERATURA

- Habraken W., Habibovic P., Epple M., Böhner M., (2016). Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? *Mater. Today* 19, 69-87. DOI: 10.1016/J.MATTOD.2015.10.008
- Lu J., Yu H., Chen C., (2018). Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: a review. *RSC Adv.*, 8, 2015-2033. DOI: 10.1039/C7RA11278E
- PN – ISO 6060, (2006). *Jakość wody - Oznaczenie chemicznego zapotrzebowania tlenu*
- Sadat-Shojai M., Khorasani M.-T., Dinpanah-Khoshdargi E., Jamshidi A., (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *ActaBiomaterialia*, 9, 7591-7621. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.04.012
- Wojasiński M., Duszyńska E., Ciach T., (2015). Lecithin-based wet chemical precipitation of hydroxyapatite nanoparticles, *Colloid Polym. Sci.*, 293, 1561-1568. DOI: 10.1007/s00396-015-3557-0

Badania finansowane z Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego NCBiR/POIR w ramach umowy nr POIR.04.01.04-00-0133/15