

WPLÝW JONÓW SiO_4^{4-} NA STRUKTURĘ CHEMICZNĄ ORAZ WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNE SYNTETYCZNEGO NANOKRYSTALICZNEGO HYDROKSYAPATYTU

JOANNA KOLMAS*, ARKADIUSZ PRZYBYLSKI,
ŁUKASZ PAJCHEL, WACŁAW KOŁODZIEJSKI

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY,
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ,
UL. BANACHA 1, 02-097 WARSZAWA

* E-MAIL: JOANNA.KOLMAS@WUM.EDU.PL

Streszczenie

W pracy przedstawiono badania struktury chemicznej oraz morfologii nanokrystalicznych hydroksyapatytów: niedomieszkowanego oraz domieszkowanego jonami krzemianowymi SiO_4^{4-} . Próbkę do badań uzyskano niekonwencjonalną techniką chemicznej kondensacji w fazie gazowej z wykorzystaniem niskociśnieniowego płomienia (CCVC). Do badań zastosowano mikroskopię elektronową TEM i SEM oraz metody spektroskopii NMR i IR w ciele stałym. Stwierdzono istotny wpływ jonów krzemianowych na strukturę chemiczną hydroksyapatytu.

Słowa kluczowe: krzem, hydroksyapatyt, NMR w ciele stałym, spektroskopia FTIR, mikroskopia elektronowa

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 54-61]

Wprowadzenie

Apatyty ze względu na wysoką bioaktywność, biogodność i osteokonduktywność stosowane są do tworzenia implantów ceramicznych, materiałów wypełniających ubytki kostne (materiały kośćcozastępcze), a także cienkowarstwowych powłok na implantach metalicznych [1-2]. Wzorcowym przedstawicielem apatytów jest hydroksyapatyt wapniowy $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, dalej oznaczany jako HA. Przedstawiony wzór chemiczny dotyczy apatytu stechiometrycznego, jednakże cechą charakterystyczną apatytów jest możliwość występowania różnorodnych podstawień (substytucji) jonowych. Wprowadzenie do sieci krystalicznej innych jonów w miejsce jonów PO_4^{3-} , Ca^{2+} i OH^- będzie wpływało na strukturę chemiczną, a także na właściwości fizykochemiczne oraz biologiczne hydroksyapatytu [3]. Można w ten sposób uzyskać materiał implantacyjny o poszerzonym działaniu biologicznym, polepszonych parametrach mechanicznych czy fizykochemicznych (wytrzymałość, rozpuszczalność, porowatość, trwałość w wysokich temperaturach) [4-5].

Apatyty domieszkowane krzemem od kilku lat są przedmiotem zainteresowań inżynierii materiałowej i chirurgii odtwórczo-naprawczej. Badania wykazały, że krzem odgrywa znaczącą rolę w formowaniu się tkanki kostnej i prawidłowym jej wapnieniu. Okazało się, że zahamowanie namnażania oraz pogorszenie funkcjonowania osteoblastów w osteopenii oraz osteoporozie jest związane ze zmniejszoną zawartością krzemu w tkance kostnej [6,7]. W związku z tym przypuszcza się, że obecność w hydroksyapatycie krzemu może korzystnie wpływać na interfejs implant/kość zwiększając aktywność osteoblastów, a tym samym poprawiając nowotworzenie tkanki kostnej [8].

INFLUENCE OF SiO_4^{4-} IONS ON THE CHEMICAL STRUCTURE AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF SYNTHETIC NANOCRYSTALLINE HYDROXYAPATITE

JOANNA KOLMAS*, ARKADIUSZ PRZYBYLSKI,
ŁUKASZ PAJCHEL, WACŁAW KOŁODZIEJSKI

MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, FACULTY OF PHARMACY,
DEPARTMENT OF INORGANIC AND ANALYTICAL CHEMISTRY,
UL. BANACHA 1, 02-097 WARSAW, POLAND

* E-MAIL: JOANNA.KOLMAS@WUM.EDU.PL

Abstract

This paper reports a systematic investigation on Si-substituted and unsubstituted synthetic hydroxyapatites produced by the NanoSpray™ and combustion chemical vapor condensation (CCVC) process. The studies were focused on structural properties, crystal morphology and chemical composition of the samples. Various analytical methods, such as electron microscopy, high-resolution solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) and infrared spectroscopy were used. A significant effect of silicate ions on the hydroxyapatite structure was found.

Keywords: silicon, hydroxyapatite, solid-state NMR, FT-IR spectroscopy, electron microscopy

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 54-61]

Introduction

Apatites are widely used in reconstructive surgery as bone substitutes, ceramic implants and thin metallic implant coatings because of their beneficial bioactivity, osseointegration and biocompatibility with the bone tissue [1,2]. The main, representative member of the apatite group is calcium hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, hereafter designated by HA. The presented formula is valid for stoichiometric HA, but the characteristic feature of this mineral is its propensity to undergo various ionic substitutions into the crystal lattice. The incorporation of various ions into the crystal lattice for PO_4^{3-} , Ca^{2+} and/or OH^- determines the chemical structure, physicochemical and biological properties of substituted HA [3]. The ionic substitution may improve implantation efficacy, osseointegration or mechanical properties of a ceramic implant, and extend and diversify its properties (mechanical resistance, solubility, porosity and thermal stability) [4,5].

Silicon substituted apatites are the subjects of intense studies in material engineering and reconstructive surgery. Researches proved a crucial role of silicon in the metabolic process and calcification in bone tissue. Recently, it has been demonstrated that silicon deficiency may cause inhibition of osteoblasts proliferation in osteopenia and osteoporosis [6,7]. Accordingly, it can be assumed that the silicon incorporation into the HA material may improve the implant/bone interface by stimulation osteoblasts activity and bone formation [8].

Hydroksyapatyty domieszkowane krzemem można otrzymać na drodze syntezy różnymi metodami, m.in. metodą zol-żel, metodą moką czy też metodą reakcji w ciele stałym [9-11]. Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że metoda syntezy może wpływać na niektóre parametry fizykochemiczne hydroksyapatytu, m.in. na morfologię kryształów i ich wielkość, a także na jego krystaliczność.

Celem naszej pracy jest analiza struktury chemicznej oraz właściwości fizykochemicznych hydroksyapatytu domieszkowanego krzemem, syntetyzowanego z zastosowaniem połączonych metod NanoSpray™ wraz z procesem kondensacji w fazie gazowej z wykorzystaniem niskociśnieniowego płomienia (ang. combustion flame-chemical vapor condensation, CCVC) [12-14]. Ta niekonwencjonalna metoda stosowana jest do otrzymywania nanokrystalicznego hydroksyapatytu bądź amorficznych fosforanów wapnia. Jej zaletą jest możliwość uzyskania materiału jednorodnego morfologicznie, najczęściej w postaci kulistych cząstek. W celu zbadania wpływu obecności krzemu na strukturę hydroksyapatytu, analizie został poddany również hydroksyapatyt zsyntetyzowany w tych samych warunkach bez dodatku krzemu. Badania fizykochemiczne wykonane zostały następującymi metodami analitycznymi: mikroskopią elektronową TEM oraz SEM, spektrometrią emisyjną z plazmą wzbudzoną indukcyjnie ICP-OES, spektroskopią NMR oraz FTIR. Mikroskopia elektronowa pozwoliła na analizę morfologii i wielkości kryształów badanych hydroksyapatytów, a także na ocenę tendencji do tworzenia aglomeratów. Dzięki metodzie ICP-OES zbadano zawartość krzemu w próbce domieszkowanej. Metody magnetycznego rezonansu jądrowego NMR oraz spektroskopii w podczerwieni FTIR w ciele stałym były narzędziami do oceny struktury chemicznej obydwu materiałów.

Material i metody

W badaniach wykorzystano próbki syntetycznego hydroksyapatytu (HA) oraz syntetycznego hydroksyapatytu domieszkowanego krzemem (Si-HA) (Sigma-Aldrich). Próbki zsyntetyzowano opatentowaną techniką NanoSpray Combustion™ oraz poddano procesowi kondensacji w fazie gazowej (CCVC). Producent nie dostarcza szczegółowych informacji dotyczących metody otrzymania badanych próbek.

Deklarowana przez producenta zawartość krzemu w próbce Si-HA wynosi $2,33 \pm 0,93\%$ wag.

W celu zbadania morfologii kryształów otrzymany materiał badano pod transmisyjnym mikroskopem elektronowym TEM (JEM 1400, Jeol). Kroplę zawiesiny sporządzonej w etanolu umieszczano na miedzianej siateczce pokrytej formvarem, suszono i umieszczano pod mikroskopem. Napięcie przyspieszające wynosiło 80 kV.

Zdolność hydroksyapatytów do tworzenia aglomeratów badano pod skaningowym mikroskopem elektronowym SEM (Quanta 200 ESEM, FEI). Próbki napyłano złotem, napięcie przyspieszające wynosiło 25 kV.

Krystaliczność hydroksyapatytów analizowano metodą XRD korzystając z dyfraktometru D8 Discover Bruker pracującego z lampą miedziową - promieniowanie Cu K α ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$).

Zawartość krzemu została oznaczona metodą ICP-OES (Optima3100, Perkin Elmer) techniką krzywej kalibracji.

Widma w podczerwieni zostały wykonane przy użyciu spektrometru działającego w zakresie średniej podczerwieni od 4000 do 400 cm^{-1} (Spectrum 1000, PerkinElmer) w technice transmisyjnej z pastylki z KBr. Widma wykonano z rozdzielczością 2 cm^{-1} , a liczba wykonanych powtórzeń (skanów) wyniosła 30.

Silicon substituted hydroxyapatite can be synthesized by various methods, i.e. sol-gel methods, wet methods and solid-state reactions [9-11]. Many studies indicate that the way of synthesis may affect various physicochemical properties, such as morphology and sizes of crystals, and material crystallinity.

The present work is focused on the chemical structure and physicochemical properties investigations of two samples: hydroxyapatite and Si-substituted hydroxyapatites. Both samples were synthesized by the NanoSpray and combustion chemical vapor condensation (CCVC) process [12-14]. This unconventional method is used for production of nanocrystalline or amorphous materials. Its great advantage is morphological homogeneity of obtained materials (usual in spherical particles). In order to determine the Si-substitution effect on the HA structure, the unsubstituted sample synthesized in the same conditions was studied as a reference material. This comprehensive study was done using various analytical methods: transmission and scanning electron microscopy (TEM and SEM), inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-OES), FT-IR spectroscopy in the middle infrared range (transmission mode) and high-resolution solid-state NMR (^1H , ^{31}P and ^{29}Si nuclei observed). The electron microscopy provided information on the morphology and crystal sizes, and their tendency to agglomeration. The Si content was analyzed using the ICP-OES method. The solid-state NMR and IR spectroscopy were found suitable for the chemical structural analysis of the apatites.

Materials and methods

Nanocrystalline hydroxyapatite (HA) and nanocrystalline Si-substituted hydroxyapatite (Si-HA) were purchased from Sigma-Aldrich, Poland. The samples were synthesized by the NanoSpray and combustion chemical vapor condensation (CCVC) process. The manufacturer has not provided more detailed information on the synthesis of HA and Si-HA.

The concentration of silicon in Si-HA sample was declared as $2.33 \pm 0.93 \text{ wt}\%$.

Morphology of hydroxyapatite crystals was monitored by transmission electron microscopy TEM (type JEM 1400, Jeol). A drop of sample suspension in EtOH was put on a Cu grid covered with a formvar film, then dried in air. The acceleration voltage was 80 kV.

Agglomeration tendency of crystals was investigated using scanning electron microscopy SEM (Quanta 200 ESEM, FEI). The samples were coated with Au, the accelerating voltage was 25 kV.

Crystallinity of samples was examined by X-Ray powder diffraction (XRD) using D8 Discover Bruker diffractometer with Cu K α ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) radiation.

The silicon content was determined by ICP-OES method (Optima3100, Perkin Elmer) using the calibration curve technique.

FT-IR spectra were recorded between 4000-400 cm^{-1} in the transmission mode from KBr pellets using a Spectrum 1000 spectrometer of Perkin Elmer. The measurements were done with 2 cm^{-1} spectral resolution and with 30 scans.

Widma NMR w ciele stałym wykonano w temperaturze pokojowej na spektrometrze Bruker Avance 400 WB (Bruker) o częstości 400, 160 i 80 MHz, odpowiednio dla ^1H , ^{31}P oraz ^{29}Si . Eksperymenty ^1H wykonano przy użyciu sondy do rotorów o średnicy 2,5 mm. Pozostałe eksperymenty przeprowadzono przy użyciu sondy do rotorów o średnicy 4 mm. Wszystkie pomiary zostały przeprowadzone z wirowaniem pod kątem magicznym (MAS). Dla obydwu próbek, HA oraz Si-HA zostały wykonane konwencjonalne eksperymenty jednoimpulsowe na protonach i jądrach fosforu-31 (tzw. eksperymenty Bloch-decay – BD). Pomiary ^1H BD MAS NMR przeprowadzono z wirowaniem pod kątem magicznym 30 kHz, czas repetycji wynosił 50 s, a liczba powtórzeń 32. Pomiary ^{31}P BD MAS NMR wykonano przy częstości wirowania 7 kHz, czasie repetycji 30 s i liczbie powtórzeń 32. Dla próbki Si-HA przeprowadzono eksperyment ^{29}Si BD MAS NMR przy częstości wirowania 5 kHz, czasie repetycji 40 s oraz liczbie skanów 2000. Ponadto, dla próbki zawierającej krzem wykonano eksperyment z polaryzacją skrośną od protonów do krzemu-29, pozwalający na wzmocnienie sygnałów od jąder krzemu-29 znajdujących się w pobliżu protonów. Eksperyment $^1\text{H}\rightarrow^{29}\text{Si}$ CP MAS NMR wykonano przy częstości wirowania 5 kHz, czasie repetycji 5 s, czasie kontaktu 2 ms i liczbie powtórzeń 14400. Przesunięcie chemiczne dla protonów oraz ^{29}Si mierzono względem TMS, dla fosforu-31 względem 85% H_3PO_4 .

Wyniki i dyskusja

Mikroskopia elektronowa, dyfraktometria proszkowa XRD oraz analiza zawartości krzemu

Na RYS. 1 (a oraz b) przedstawiono obrazy badanych materiałów HA oraz Si-HA uzyskane pod mikroskopem elektronowym TEM. Jak widać, obydwie próbki są nanokryształiczne. Kryształy charakteryzują się regularnym, kulistym kształtem, co jest charakterystyczne dla zastosowanej w procesie syntezy techniki CCVC. Średnica kryształów w obydwu materiałach jest dość zróżnicowana i waha się w granicach 20-120 nm.

Zdjęcia uzyskane pod mikroskopem SEM (RYS. 1c i 1d) wskazują jednoznacznie na silną tendencję do tworzenia aglomeratów przez kryształy badanych hydroksyapatytów. Wydaje się, że próbka HA jest bardziej zwarta, kryształy są bardziej zbite, natomiast domieszkowanie hydroksyapatytu krzemem powoduje „rozluźnienie” tej swoistej makrostruktury.

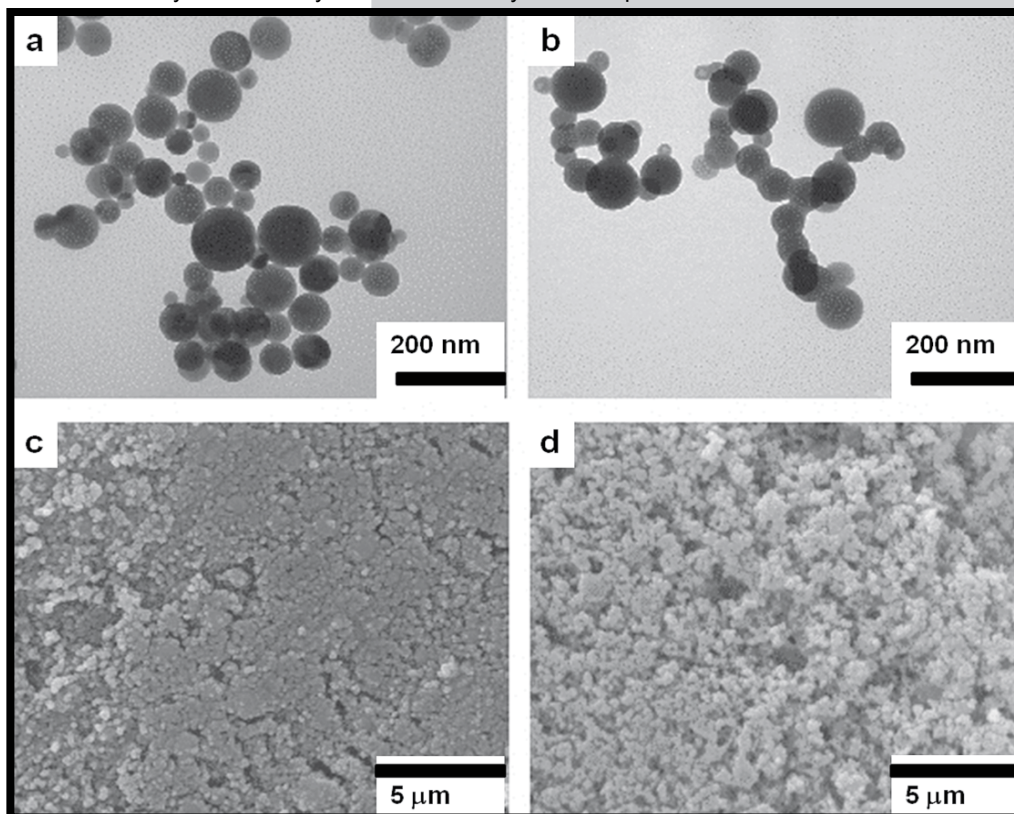
High-resolution solid-state NMR spectra were measured at 298 K using a Bruker Avance 400 WB spectrometer at resonance frequencies of 400, 160 and 80 MHz for ^1H , ^{31}P and ^{29}Si , respectively. The proton spectra were acquired using a 2.5 mm probe. Other spectra were acquired using a 4 mm probe. The experiments were done under magic-angle spinning (MAS) using ZrO_2 rotors driven by dry air. For both HA and Si-HA samples, conventional pulse-acquire experiments (Bloch-decay, acronym BD) were done on protons and phosphorus-31. The proton BD/MAS NMR spectra were recorded with MAS at 30 kHz and a repetition time of 50 s, using 32 scans. The ^{31}P BD/MAS NMR spectra were recorded with MAS at 7 kHz and a repetition time of 30 s, using 32 scans. For Si-HA, the ^{29}Si BD/MAS NMR spectrum was recorded with MAS at 5 kHz and a repetition time of 40 s, using 2000 scans. Moreover, for that sample, we have also done an experiment with cross-polarization (CP) from protons, which enhances signals from ^{29}Si nuclei having nearby protons. The $^1\text{H}\rightarrow^{29}\text{Si}$ CP/MAS NMR spectrum was recorded with MAS at 5 kHz and repetition time of 5 s, using a contact time of 2 ms and 14400 scans. Proton and ^{29}Si chemical shifts were referenced to TMS, while ^{31}P chemical shifts were referenced to 85% H_3PO_4 .

Results and discussion

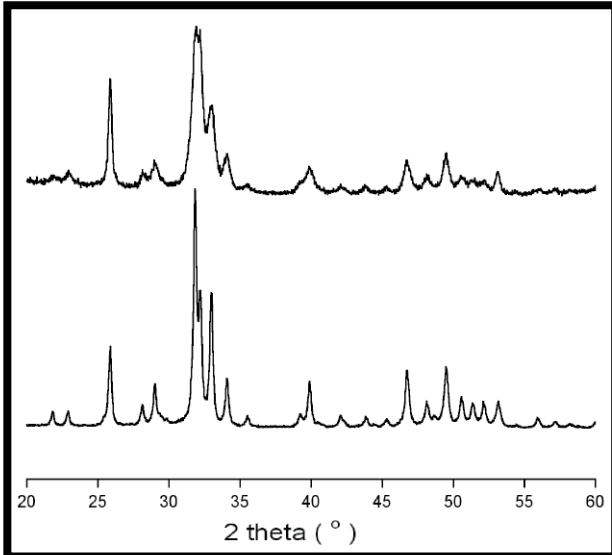
Electron microscopy, X-ray powder diffraction and silicon content analysis

The TEM images of HA and Si-HA materials are presented in FIG. 1a and 1b. Samples are composed of regular, spherical particles, typical of the CCVC synthetic method. The obtained materials are nano-sized powders with 20-120 nm particles (on average).

The SEM images (FIG. 1c and 1d) show crystal aggregation. Both samples, HA and Si-HA, form dense grains. However, the Si-HA powder macrostructure seems to be more fluffy and less packed.



RYS. 1. Zdjęcia TEM (a, b) oraz SEM (c, d) próbki HA (a, c) i Si-HA (b, d).
FIG. 1. TEM (a, b) and SEM (c, d) images of HA (a, c) and Si-HA (b, d).



RYS. 2. Dyfraktogramy proszkowe próbki HA (u dołu) oraz Si-HA (u góry).
FIG. 2. XRD diffractograms of HA (bottom) and Si-HA (top).

W celu potwierdzenia tożsamości analizowanych materiałów wykonano badania metodą dyfraktometrii proszkowej (RYS. 2). Obydwe próbki nie wykazały cech obecności dodatkowej fazy krystalicznej. Dość szerokie, ale dobrze rozdzielone refleksy na dyfraktogramie próbki HA wskazują na obecność fazy słabokrystalicznego hydroksyapatytu. Dyfraktogram próbki Si-HA zawiera znacznie szersze refleksy i słabiej rozdzielone, co świadczy o niższym stopniu krystaliczności próbki domieszkowanej krzemem. Korzystając ze wzoru Scherrera uwzględniającego poszerzenie refleksów na dyfraktogramie można było oszacować wielkość kryształów w badanych materiałach. Średnia wielkość kryształów w próbce niedomieszkowanej krzemem wynosi 31 nm, natomiast w próbce zawierającej jony krzemianowe 20 nm.

W hydroksyapatycie Si-HA została oznaczona zawartość krzemu metodą ICP-OES na poziomie 2,43%. Otrzymana przez nas wartość jest zgodna ze specyfikacją analizowanego materiału, gdzie deklarowana zawartość krzemu wynosi $2,33 \pm 0,93\%$ wag.

Spektroskopia w podczerwieni

Widma IR uzyskane techniką transmisyjną przedstawiono na RYS. 3. W obydwu widmach dominują pasma fosforanów w zakresie $1200-900\text{ cm}^{-1}$ pochodzące od drgań ν_1 i ν_3 oraz w zakresie $650-500\text{ cm}^{-1}$ pochodzące od drgań ν_4 [15]. Należy zauważyć, że widma w tych zakresach różnią się szerokością i rozdzielaniem pasm. Widmo HA charakteryzuje się znacznie węższymi pasmami drgań grup fosforanowych, a w zakresie ν_4 można łatwo wyróżnić dwie składowe. Z dostępnego piśmiennictwa wiadomo, że wąskie pasma ν_1 i ν_3 a także dobrze rozdzielony zakres ν_4 charakteryzują apatyty o wysokim stopniu krystaliczności [16-17]. Widmo próbki Si-HA w zakresie $650-500\text{ cm}^{-1}$ jest praktycznie nierozdzielone, a złożone pasmo w zakresie $1200-900\text{ cm}^{-1}$ jest bardzo szerokie. Świadczyć to może o dużym udziale fazy amorficznej w badanym materiale i/lub o niskiej krystaliczności badanego hydroksyapatytu.

Zakres $3700-2500\text{ cm}^{-1}$ odpowiada draniom rozciągającym wolnych, niezwiązanych wiązaniami wodorowymi strukturalnych grup OH⁻ apatytu oraz od molekuł wody zaadsorbowanej na powierzchni apatytu lub ulokowanych w wakacjach jego sieci krystalicznej [15].

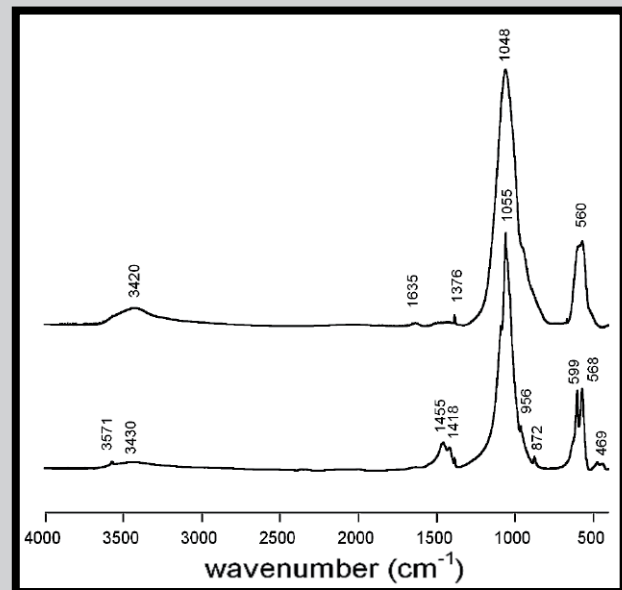
To confirm chemical identity of the analyzed samples, the XRD experiments were performed (FIG. 2). The powder diffraction patterns ruled out the presence of extra crystalline phases. Broad but sufficiently resolved peaks in the HA patterns indicated that the unsubstituted material was poorly crystalline. The Si-HA diffractogram contained broader and poorly resolved peaks giving evidence of even less crystalline material than in the HA sample. The peak broadening of the XRD reflections was used to estimate the crystallite size according to the Scherrer's formula. The average crystal sizes were estimated at 31 and 20 nm in the HA and Si-HA samples, respectively.

In the Si-HA sample, silicon content was determined using the ICP-OES method as 2.43 wt%, which result agrees well with the value declared in the material specification ($2.33 \pm 0.93\%$).

Infrared spectroscopy

The IR spectra recorded in the transmission mode are presented in FIG. 3. Both our spectra contain prominent phosphate ν_1 and ν_3 bands in the $1200-900\text{ cm}^{-1}$ range, and ν_4 bands in the $650-500\text{ cm}^{-1}$ range [15]. Consider that the observed phosphate bands differ in resolution and width, which is indicative of the sample crystallinity. It has been shown that those bands are broader and worse resolved in less crystalline samples [16, 17]. In our case, the phosphate ($\nu_1 + \nu_3$) bands of Si-HA are broader and its ν_4 bands worse resolved (the splitting has disappeared) than those of HA. In accordance with the former XRD results, one may conclude that the Si-HA powder is poorly crystalline and can contain a significant amount of amorphous phase.

The $3700-2500\text{ cm}^{-1}$ region corresponds to stretching vibrations, both from apatite structural hydroxyl groups and from water, the latter adsorbed on the apatite surface and/or located in crystal vacancies. Free structural hydroxyl groups (those uninvolved in hydrogen bonding) give a narrow band at ca. 3570 cm^{-1} . Such band is only detectable in the HA spectrum. In the HA spectrum, the broad water band over 3000 cm^{-1} is very weak and the water bending band at 1640 cm^{-1} is hardly visible. In the Si-HA spectrum we can easily detect both water bands. This fact indicates that the water content is higher in the Si-HA material.



RYS. 3. Widma FT-IR próbek HA (u dołu) oraz Si-HA (u góry).
FIG. 3. FT-IR spectra of HA (bottom) and Si-HA (top).

Strukturalne grupy OH⁻ (nie zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych) dają wąskie pasmo przy ok. 3570 cm⁻¹, które widoczne jest wyłącznie w widmie próbki HA. Szerokie pasmo drgań grup OH⁻ wody jest bardzo słabe na widmie HA, niewidoczne jest także pasmo drgań zginających wody przy ok. 1640 cm⁻¹. W widmie Si-HA pasma wody przy 3700-2500 cm⁻¹ oraz 1635 cm⁻¹ są wyraźne, co świadczy o większej zawartości wody w tym materiale. Brak pasma przy 3570 cm⁻¹ w widmie Si-HA może być wynikiem niskiej zawartości strukturalnych grup hydroksylowych. Należy tutaj podkreślić, że wprowadzenie jonów krzemianowych SiO₄⁴⁻ w miejsce jonów fosforanowych wymaga zbilansowania ładunku w sieci krystalicznej hydroksyapatytu. W związku z tym w procesie takiej substytucji może dochodzić do usuwania części jonów hydroksylowych [18].

Warto też zauważyć, że w widmie HA widoczne są dość intensywne pasma w zakresie 1550-1400 cm⁻¹ odpowiadające drganiom jonów węglanowych, podczas gdy w widmie Si-HA są one śladowe. Jony węglanowe są podstawowym „zanieczyszczeniem” w hydroksyapatytach syntetycznych, dość łatwo podstawiają się zarówno w miejsce grup fosforanowych jak i hydroksylowych [19]. Korzystając z metody opisanej przez Clasen i Ruytera [20] możliwe było oszacowanie zawartości węglanów zajmujących miejsce grup OH⁻ (typ A) oraz grup PO₄³⁻ (typ B). Zawartość węglanów typu A w próbce HA wynosi ok. 0,4% wag., natomiast węglanów typu B ok. 2,1% wag. Znaczne obniżenie zawartości jonów CO₃²⁻ w próbce Si-HA może świadczyć o ich konkurencji z jonami SiO₄⁴⁻ w procesie substytucji jonów PO₄³⁻ podczas syntezy tego materiału.

Spektroskopia NMR w ciele stałym

RYS. 4 przedstawia widma ³¹P NMR uzyskane dla obydwu próbek konwencjonalną techniką jednoimpulsową BD NMR. Próbka HA daje niesymetryczny sygnał główny przy ok. 3,2 ppm. Na lewym zboczku widać dodatkowy sygnał niewielkiej intensywności przy ok. 6,7 ppm. Praca Jarbrlinga i in. [21] oraz praca Kolmas i in. [22] pokazują, że główny sygnał pochodzi od fosforu znajdującego się we wnętrzu kryształu hydroksyapatytu, natomiast sygnał po lewej stronie reprezentuje nieprotonowane grupy fosforanowe znajdujące się na powierzchni. Uzyskany sygnał przy 3,4 ppm dla próbki Si-HA jest bardzo szeroki i symetryczny. Jednak bliższa analiza sygnału wskazuje na obecność sygnałów bocznych po obydwu stronach sygnału głównego odpowiadających nieprotonowanym (lewe zbocze) i protonowanym (prawe zbocze) powierzchniowym grupom fosforanowym. Możemy więc przypuszczać, że próbka jest słabo krystaliczna i charakteryzuje się niskim stopniem uporządkowania w sieci krystalicznej i dużą zawartością powierzchniowych grup fosforanowych.

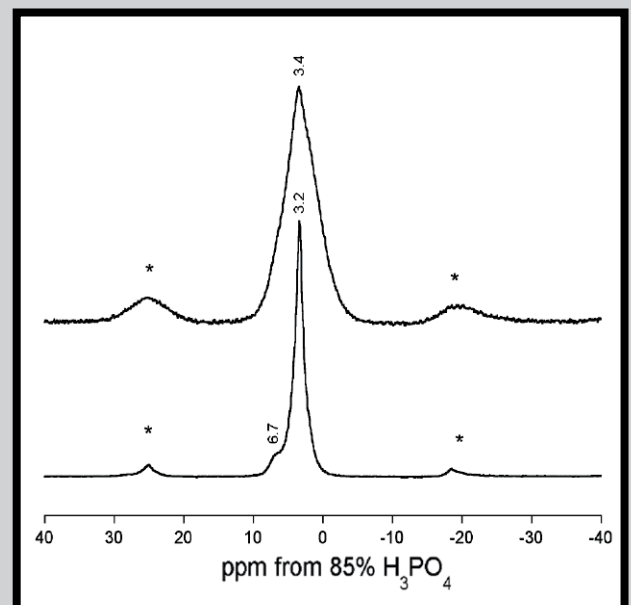
Widma protonowe z zastosowaniem szybkiego wirowania pod kątem magicznym przedstawiono na RYS. 5. Obydwa otrzymane widma są złożone z kilku składowych, niektórych z nich przypisania nadal są dyskutowane w literaturze [23,24]. Należy zauważyć, że sygnał pochodzący od protonów strukturalnych grup hydroksylowych widoczny jest przy ok. 0,1 ppm. Stosując metodę opisaną przez nas w pracy [25] możliwe było oszacowanie zawartości grup OH⁻ w badanych materiałach. Wykonane obliczenia pokazały, że w materiale niedomieszkowanym HA zawartość strukturalnych grup hydroksylowych wynosi ok. 40%, natomiast w próbce zawierającej jony krzemianowe ok. 10% względem stechiometrycznego hydroksyapatytu. Tak mała zawartość grup OH⁻ w hydroksyapatytach badanych może wydawać się zaskakująca. Przede wszystkim należy jednak pamiętać, że badane próbki są nanokrystaliczne. W literaturze można znaleźć hipotezę dotyczącą wpływu wielkości kryształów na zawartość grup OH⁻ [26].

The band from free structural OH⁻ groups of Si-HA has not been detected, probably because of their deficiency in this material. The decreased content of the structural OH⁻ groups is related to the silicon incorporation into the hydroxyapatite. It is simply a matter of a charge balance in the crystal lattice, since the SiO₄⁴⁻ substitution requires simultaneous elimination of the structural OH⁻ groups [18].

Let us focus now on distinctive bands in the 1550-1400 cm⁻¹ region of the HA spectrum. They correspond to carbonate ions, often present as “contamination” of synthetic hydroxyapatites. Carbonates can easily be incorporated into the crystal lattice, both for phosphates and structural OH⁻ groups [19]. Using the Clasen and Ruyter method [20], it was possible to determine contents of carbonate groups in HA, which replaced hydroxyl (A-type carbonates) and phosphate (B-type carbonates) groups. The estimation gave 0.4 and 2.1 wt%, respectively. Consider that for Si-HA the carbonate bands are much lower than for HA. This is a hint that, during the Si-HA synthesis and the concomitant substitution processes, carbonates may compete with silicates for the phosphate sites.

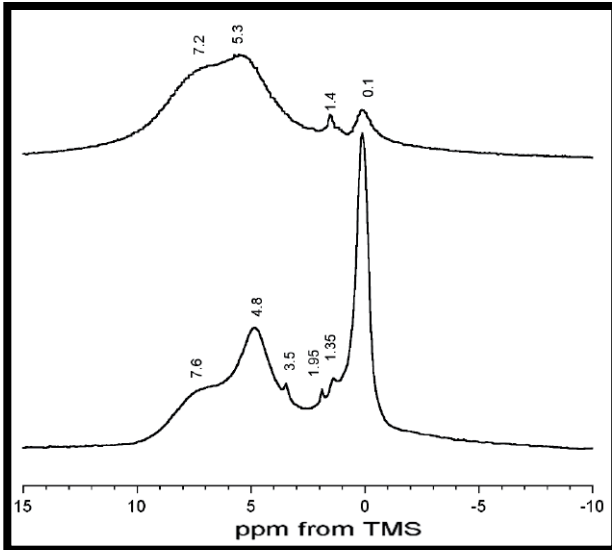
Solid-state NMR spectroscopy

FIG. 4 shows the ³¹P MAS NMR spectra recorded using conventional pulse-acquire (BD) technique. The HA sample gives one central peak at ca. 3.2 ppm with a minor high-frequency component at ca. 6.7 ppm. According to Jarbrling et al. and our previous work [21,22] the main peak comes from bulk phosphate groups buried in the crystal interior, whereas the left-side peak can be assigned to unprotonated phosphate groups on the crystal surface. The Si-HA signal at ca. 3.4 ppm is significantly broader and for this reason looking quite symmetric. However, a closer inspection suggests that within the base this signal contains side peaks from unprotonated (left slope) and protonated (right slope) surface phosphate groups [21,22]. Thus, we can assume that the Si-containing sample is poorly crystalline, with substantial disorder in the crystal lattice and rich in unprotonated and protonated surface phosphate groups.



RYS. 4. Widma ³¹P BD/MAS NMR próbek HA (u dołu) oraz Si-HA (u góry). Gwiazdki oznaczają rotacyjne pasma boczne.

FIG. 4. ³¹P BD/MAS NMR spectra of HA (bottom) and Si-HA (top). Asterisks denote rotational sidebands.



RYS. 5. Widma ^1H BD/MAS NMR próbek HA (u dołu) oraz Si-HA (u góry).
FIG. 5. ^1H BD/MAS NMR spectra of HA (bottom) and Si-HA (top).

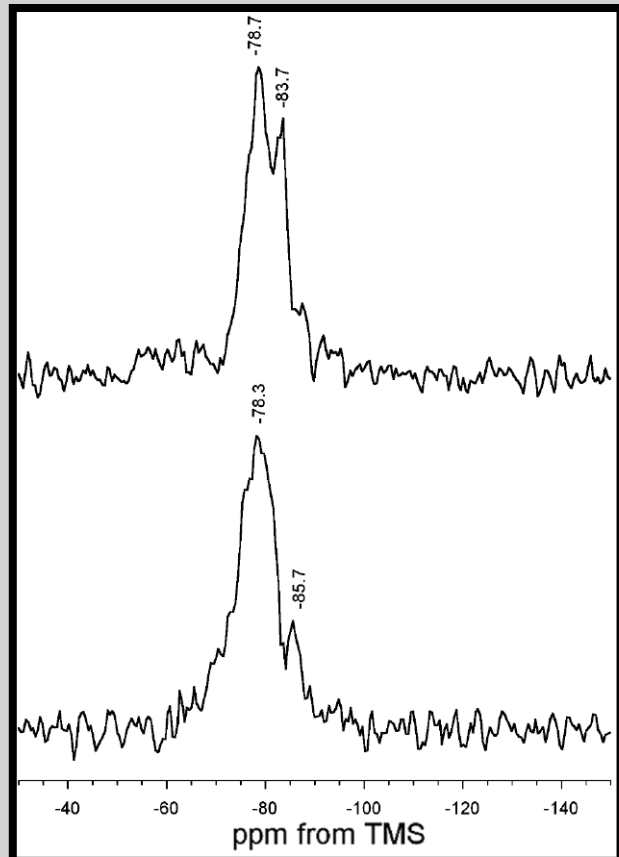
Dodatkowo wpływ może również mieć niekonwencjonalna metoda syntezy CCVC. Badany materiał oprócz fazy krystalicznej może zawierać fazę amorficzną, zubożoną w strukturalne grupy hydroksylowe. Obniżenie zawartości grup OH^- w próbce Si-HA wynika dodatkowo z usuwania ich z sieci krystalicznej podczas substytucji jonów fosforanowych jonami krzemianowymi.

Warto zauważyć, że w obydwu próbkach obecne są „średnio” kwaśne grupy wodorofosforanowe (na widmach widoczne są sygnały w zakresie 7,2-7,6 ppm). Grupy P-OH mogą znajdować się na powierzchni kryształów hydroksyapatytu, bądź też jony HPO_4^{2-} mogą zajmować wakacje w zaburzonej sieci krystalicznej [27]. Na widmach obydwu materiałów HA oraz Si-HA widoczny jest sygnał pochodzący od wody (odpowiednio przy ok. 4,8 oraz 5,3 ppm). Znacząca różnica w przesunięciu chemicznym sygnału wody może wynikać z różnego stopnia związania wody w badanych próbkach. Wydaje się, że hydroksyapatyt niedomieszkowany krzemem zawiera przede wszystkim wodę silnie związaną (sygnał przy 4,8 ppm), natomiast hydroksyapatyt krzemowy również wodę słabiej zaadsorbowaną na powierzchni [23].

W celu oceny lokalizacji jonów krzemianowych w próbce domieszkowanej krzemem wykonano eksperymenty ^{29}Si NMR dwiema technikami: standardową jednoimpulsową oraz techniką z polaryzacją skrośną (RYS. 6). Ogólnie można powiedzieć, że eksperyment jednoimpulsowy daje informacje o całej puli jąder krzemu-29 w materiale, natomiast eksperyment z polaryzacją skrośną promuje jądra krzemu znajdujące się w pobliżu protonów. Na widmie Si-HA wykonanym techniką BD (RYS. 6) obecne są dwa sygnały przy -78,3 ppm oraz przy -85,7 ppm (wykonane dopasowanie linii pokazało, że jądra krzemu-29 dające sygnał przy -78,3 ppm stanowią ok. 90% całej puli jąder krzemu w próbce). Zgodnie z danymi z literatury sygnał przy -78,3 ppm można przypisać grupom krzemianowym podstawionym w miejsce grup fosforanowych [28,29]. Trudno przypisać drugi sygnał przy -85,7 ppm. W widmie wykonanym techniką CP (RYS. 6) jest on bardziej intensywny i przesuwają się w stronę wyższych przesunięć chemicznych (-83,7 ppm). Można więc przypuszczać, że sygnał ten pochodzi od krzemu na powierzchni kryształów apatyty. Jądra te mogą polaryzować się od protonów wody zaadsorbowanej na powierzchni materiału i stąd wzmocnienie tego sygnału w widmie CP.

The proton spectra recorded under fast magic angle spinning (MAS) are shown in FIG. 5. Both spectra contain several peaks, some of them with uncertain assignments still discussed in the literature [23,24]. The signal originating from structural hydroxyl groups was found at ca. 0.1 ppm. According to the procedure described in our previous work [25], we have estimated contents of the structural OH^- groups in the HA and Si-HA samples at 40 and 10%, respectively, comparing to the stoichiometric hydroxyapatite. Such low OH^- concentrations may be surprising, but one has to consider that the studied samples were nanocrystalline. Some authors postulate that the OH^- group content in hydroxyapatite decreases with the crystals size [26]. Moreover, in this case, the effect of the unconventional CCVC synthetic process may be of the crucial importance. The studied materials could probably comprise an amorphous calcium phosphate phase deficient in structural hydroxyl groups. We would like to emphasize that the significant decrease of the OH^- content in the Si-HA sample may be caused by the silicate incorporation.

In the both proton spectra (FIG. 5), there are clearly visible signals at 7.2-7.6 ppm from moderately acidic hydrogenophosphate groups. The P-OH groups can protrude from the crystal surface of hydroxyapatite, whereas HPO_4^{2-} ions can be located in vacancies of the disordered crystal lattice [27]. The proton signal of water is present in the HA and Si-HA spectra at ca. 4.8 and 5.3 ppm, respectively. This noticeable difference in chemical shifts may result from different types of water, contributing to those resonances. It seems that the unsubstituted HA predominantly contains strongly adsorbed water (signal at ca. 4.8), whereas the Si-HA sample has more loosely-adsorbed liquid-like water on the crystal surface [23].



RYS. 6. Widma ^{29}Si MAS NMR próbki Si-HA zarejestrowane techniką BD (u dołu) oraz CP (u góry).
FIG. 6. ^{29}Si MAS NMR spectra of Si-HA recorded using BD and CP techniques.

Podsumowanie i wnioski

W pracy wykonano badania strukturalne nanoapatytów, niedomieszkowanego (HA) i domieszkowanego krzemem (Si-HA), zsyntetyzowanych kompleksową metodą NanoSpray™ CCVC. Wyniki tych badań można podsumować następująco:

- próbki HA oraz Si-HA są morfologicznie do siebie zbliżone. Charakteryzują się kulistymi, regularnymi kryształami o wielkości 20-120 nm. Kryształy wykazują tendencję do tworzenia gęstych skupisk,
- zawartość krzemu w materiale domieszkowanym Si-HA jest zgodna z deklarowaną przez producenta i wynosi ok. 2,42 % wag.,
- krzem zlokalizowany jest zarówno na powierzchni (ok. 10%), jak i wewnątrz kryształów hydroksyapatytu,
- hydroksyapatyty HA oraz Si-HA cechują się słabą krystalicznością, podstawienie jonów fosforanowych jonami krzemianowymi powoduje obniżenie stopnia krystaliczności,
- obydwa materiały różnią się znacznie zawartością strukturalnych grup hydroksylowych od stechiometrycznego hydroksyapatytu (HA – 40%, Si-HA – 10% względem stechiometrycznego hydroksyapatytu),
- podstawienie jonów fosforanowych jonami krzemianowymi powoduje obniżenie zawartości grup OH w sieci krystalicznej, co wynika najprawdopodobniej z usuwania tych grup w celu zbilansowania ładunku,
- wyłącznie próbka niedomieszkowana krzemem zawiera jony węglanowe, jony te prawdopodobnie konkurują z jonami krzemianowymi w podstawianiu jonów fosforanowych,
- obydwa analizowane materiały zawierają „średnio” kwaśne grupy wodorofosforanowe ($\delta^H = 7,2-7,6$ ppm),
- materiał domieszkowany krzemem zawiera więcej wody niż próbka HA.

Podziękowania

Autorzy składają serdeczne podziękowanie dr Marzenie Kuras (WUM) za pomoc w analizie zawartości krzemu metodą ICP-OES, a także dr Mirosławowi Salamończykowi (Laboratorium Badań Strukturalnych UW) za pomiary metodą XRD. Przedstawione w pracy badania zostały sfinansowane ze środków MNiSW (1270/B/H03/2009/37). Badania TEM zostały przeprowadzone w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej IBD PAN w Warszawie. Mikroskop TEM JEM 1400 (Jeol Co., Japan, 2008) został zakupiony z funduszy strukturalnych UE w ramach projektu CZT BIM - Wyposażenie Laboratorium Obrazowania Biologicznego i Medycznego.

In order to obtain information on the location of the SiO_4^{4-} ions in Si-HA, the ^{29}Si NMR experiments were performed (FIG. 6). The spectra were measured using two different techniques: conventional pulse-acquire (BD) and cross-polarization (CP) pulse sequences. Generally, the BD lines are from all the ^{29}Si nuclei in the samples, while the CP lines come from the ^{29}Si nuclei located close to protons. In the BD spectrum, two signals at ca. -78.3 and -85.7 ppm are observed, with the area ratio 9:1 (curve-fitting not shown). According to the literature, the signal at ca. -78.3 ppm originates from silicates substituted for phosphates into the apatite crystal lattice [28,29]. The assignment of the -85.7 ppm peak is not trivial. Consider that in the CP spectrum this line is relatively stronger than in the BD spectrum and shifted to -83.7 ppm. Thus we can assume that this signal corresponds to the silicon nuclei located at the crystal surface. Such species cross-polarize from protons of adsorbed water, so they give enhanced peaks in the CP spectrum.

Summary and conclusions

We have carried out comprehensive structural examination of nanoapatites, regular (HA) and Si-doped (Si-HA), both synthesized using the combined NanoSpray™ - CCVC method. The main conclusions of our studies can be summarized as follows:

- The HA and Si-HA samples were morphologically similar. They contained regular spherical crystals of the 20-120 nm size. The crystals in both apatites were agglomerated into dense grains.
- The measured silicon content in the Si-HA sample (2.42 wt%) was in good agreement with the specification value.
- In Si-HA, silicate ions were present on the crystal surface (ca. 10%) and were incorporated into the crystal lattice.
- The HA and Si-HA samples were poorly crystalline; the crystallinity (reflecting crystal size and lattice order) decreased with the silicate substitution.
- The concentrations of the structural hydroxyl groups in the HA and Si-HA samples were estimated at 40 and 10%, respectively, in reference to stoichiometric hydroxyapatite.
- The silicate substitution for phosphates significantly reduced concentration of the structural hydroxyl groups. This was probably caused by the requirement to maintain electric charge balance in the crystal lattice, disturbed by such substitution.
- The HA sample contained carbonate ions, while in Si-HA they were practically absent. Carbonates may compete with silicates for the phosphate sites.
- Both studied materials contained moderately acidic hydrogenphosphate groups (proton chemical shifts in the range 7.2-7.6 ppm).
- The water content in Si-HA was higher than in HA.

Acknowledgements

The authors are grateful to dr Marzena Kuras (WUM) and to dr Mirosław Salamończyk (UW) for their help in the ICP-OES and XRD analyses, respectively. This work was supported by Polish Ministry of Science and Higher Education: grant number 1270/B/H03/2009/37. The TEM studies were performed in the Laboratory of Electron Microscopy, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland. We used equipment installed within the project sponsored by the EU Structural Funds: Centre of Advanced Technology BIM – Equipment purchase for the Laboratory of Biological and Medical Imaging.

Piśmiennictwo

- [1] Dorozhkin S.V.: Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine, *Materials*, 2, 2009, 399-498.
- [2] Ślósarczyk A.: Bioceramika hydroksyapatytowa, *Biuletyn Ceramiczny* 13, *Ceramika*, 51, Polskie Towarzystwo Ceramiczne, Kraków, 1997.
- [3] Boanini E., Gazzano, M., Bigi, A., Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature, *Acta Biomaterialia*, 6, 2010, 1882-1894.
- [4] Cazalbou S., Eichert D., Ranz X., Drouet C., Combes C., Harmand M.F., Rey C., Ion exchanges in apatites for biomedical applications, *J Mater Sci Mater Med*, 16, 2005, 405-409.
- [5] Veiderma M., Tonsuaadu K., Knubovets R., Peld M., Impact of anionic substitutions on apatite structure and properties, *J Organomet Chem*, 690, 2005, 2638-2643.
- [6] Carlisle E.M., The nutritional essentiality of silicon, *Nutr Rev*, 40(7), 1982, 193-198.
- [7] Schwarz K., Significance and function of silicon in warm blooded animals. Review and outlook. In: Bendz G., Lindqvist I., editors. *Biochemistry of silicon and related problems*, Plenum Press, New York, 1978.
- [8] Gibson I.R., Best S.M., Bonfield W., Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite, *J Biomed Mater Res*, 44, 1999, 422-428.
- [9] Kim S.R., Lee J.H., Kim Y.T., Riu D.H., Jung S.J., Lee Y.J., Chung S.C., Kim Y.H., Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors, *Biomaterials*, 24, 2003, 1389-1398.
- [10] Bianco A., Cacciotti I., Lombardi M., Montanaro L., Si-substituted hydroxyapatite nanopowders: synthesis, thermal stability and sinterability, *Mater Res Bull*, 44, 2009, 345-354.
- [11] Palard M., Champion E., Foucaud S., Synthesis of silicate hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$, *J Solid State Chem*, 181, 2008, 1950-1960.
- [12] Swihart M.T., Vapor-phase synthesis of nanoparticles, *Curr Opin Colloid Interf Sci*, 8, 2003, 127-133.
- [13] Chang W., Skandan G., Danforth S.C., Kear B.H., Hahn H., Chemical vapor processing and applications for nanostructured ceramic powders, *Nanostruct Mater*, 4, 1994, 507-520.
- [14] Loher S., Stark W.J., Maciejewski M., Baiker A., Pratsinis S.E., Reichardt D., Maspero F., Krumeich F., Günter D., Fluoroapatite and calcium phosphate nanoparticles by flame synthesis, *Chem Mater*, 17, 2005, 36-42.
- [15] Koutsopoulos S., Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods, *J Biomed Mater Res*, 62(4), 2002, 600-612.

References

- [16] Rey C., Shimizu M., Collins B., Glimcher M.J., Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium-phosphate in bone and enamel, and their evolution with age. I: Investigations in the epsilon 4 PO4 domain, *Calcif Tissue Int*, 46(6), 1990, 384-394.
- [17] Termine J.D., Posner A.S., Infra-red determination of the percentage of crystallinity in apatitic calcium phosphates, *Nature*, 211, 1966, 268-270.
- [18] Tian T., Jiang D., Zhang J., Lin Q., Synthesis of Si-substituted hydroxyapatite by a wet mechanochemical method, *Mater Sci Eng C*, 28, 2008, 57-63.
- [19] Brown P.W., Brent C., *Hydroxyapatite and related materials*, CRC press, Boca Raton, 1994.
- [20] Clasen A.B.S., Ruyter I.E., Quantitative determination of type A and type B carbonate in human deciduous and permanent enamel by means of Fourier Transform Infrared Spectrometry, *Adv Dent Res*, 11(4), 1997, 523-527.
- [21] Jarlbring M., Sandström D.E., Antzutkin O.N., Forsling W., Characterization of active phosphorus surface sites at synthetic carbonate-free fluorapatite using single-pulse ^1H , ^{31}P , and ^{31}P CP MAS NMR, *Langmuir*, 22, 2006, 4787-4792.
- [22] Kolmas J., Ślósarczyk A., Wojtowicz A., Kolodziejki A., Estimation of the specific surface area of apatites in human mineralized tissue using ^{31}P MAS NMR, *Solid State NMR*, 32, 2007, 53-58.
- [23] Kafak-Hachulska A., Samoson A., Kolodziejki W., ^1H MAS and $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ CP/MAS NMR study of human bone mineral, *Calcif Tissue Int*, 73(5), 2003, 476-486.
- [24] Wilson E.E., Awonusi A., Morris M.D., Kohn D.H., Tecklenburg M.M.J., Beck L.W., Three structural roles of water in bone observed by solid-state NMR, *Biophys J*, 90(10), 2006, 3722-3731.
- [25] Kolmas J., Kolodziejki W., Concentration of hydroxyl groups in dental apatites: a solid state ^1H MAS NMR study using inverse $^{31}\text{P} \rightarrow ^1\text{H}$ cross polarization, *Chem Comm*, 2007, 4390-4392.
- [26] Wopenka B., Pasteris J.D., A mineralogical perspective on the apatite in bone, *Mater Sci Eng C*, 25, 2005, 131-143.
- [27] Young R.A., Holcomb D.W., Role of acid phosphates in hydroxyapatite lattice expansion, *Calcif Tissue Int*, 36(1), 1984, 60-63.
- [28] Gillespie P., Wu G., Sayer M.J., Si complexes in calcium phosphate biomaterials, *J Mater Sci Mater Med*, 21, 2010, 99-108.
- [29] Gasqueres G., Bonhomme C., Maquet J., Babonneau F., Hayakawa S., Kanaya T., Osaka A., Revisiting silicate substituted hydroxyapatite by solid state NMR, *J Mag Res Chem*, 46(4), 2008, 432-346.