

# SYNTEZA I ANALIZA ELEMENTARNA HYDROKSYAPATYTÓW DOMIESZKOWANYCH KRZEMEM

LUKASZ PAJCHEL\*, ALICJA ZAWIAŁOW, JOANNA KOLMAS\*,  
WAŁAW KOŁODZIEJSKI

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ,  
UL. BANACHA 1, 02-091 WARSZAWA, POLSKA

[*Inżynieria Biomateriałów, 128-129, (2014), 23-25*]

## Wprowadzenie

Hydroksyapatyty (HA; o wzorze chemicznym  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) należą do szerokiej grupy minerałów nazywanej apatytami. Apatyty występują w przyrodzie jako minerały geologiczne oraz biologiczne [1]. Hydroksyapatyty biologiczne stanowią składnik nieorganiczny zębów i kości [1].

Krzem jest mikroelementem niezbędnym dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Dzienna zalecana przez FDA dawka krzemu dla kobiet i mężczyzn wynosi odpowiednio 19 i 40 mg. Krzem jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania skóry, włosów i paznokci. Zaleca się jego suplementację w przypadku podwyższonego ryzyka miażdżycy oraz osteoporozy. Pierwsze badania na temat roli krzemu w organizmie człowieka prowadzono już w latach siedemdziesiątych XX w. Wskazują one na dużą rolę krzemu w mineralizacji kości. Jest on również niezbędnym składnikiem w procesach syntezy kolagenu oraz stymulacji podziału komórek kostnych [2,3].

Syntetyczne hydroksyapatyty są wykorzystywane w medycynie i stomatologii jako materiał wypełniający lub pokrywający implanty [1]. Prowadzone badania zmierzają do ciągłego poszukiwania nowych materiałów na bazie hydroksyapatytów, gdyż, szczególnie hydroksyapatyty krzemowe, dają duże nadzieje na podwyższenie bioaktywności i biogodności takich materiałów [4].

Celem prowadzonych badań była synteza serii hydroksyapatytów krzemowych o różnej zawartości krzemu a następnie opracowanie metody oznaczenia zawartości tego pierwiastka w tych związkach metodą fluorescencji rentgenowskiej z dyspersją długości fali (WD-XRF).

## Materiały i metody

W trakcie syntezy poprzez wytrącenie z roztworu wodnego uzyskano serię próbek hydroksyapatytów krzemowych o różnej zawartości krzemu. Jeżeli przyjmiemy wzór ogólny otrzymanych związków jako  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ , to zaplanowano, że  $x = 0; 0.4; 0.6; 0.8; 1.0; 1.2; 1.4$  oraz  $1.8$ . Jony  $\text{SiO}_4^{3-}$  zastępują jony  $\text{PO}_4^{3-}$  oraz grupy  $\text{OH}^-$ .

Następnie otrzymane próbki poddano badaniom w celu oceny ich podobieństwa do stechiometrycznego hydroksyapatytu oraz zakupionego hydroksyapatytu krzemowego o deklarowanej zawartości krzemu (Sigma-Aldrich). Badania strukturalne przeprowadzono metodą dyfraktometrii proszkowej (XRD), spektroskopii w podczerwieni (IR) oraz metodą magnetycznego rezonansu jądrowego w ciele stałym (NMR). Natomiast badania zawartości krzemu wykonano metodą fluorescencji rentgenowskiej z dyspersją długości fali (WD-XRF), a jako metodę porównawczą zastosowano atomową spektrometrię emisyjną z wzbudzeniem plazmowym (ICP-AES).

# SYNTHESIS AND ELEMENTAL ANALYSIS OF SILICON-SUBSTITUTED HYDROXYAPATITES

LUKASZ PAJCHEL\*, ALICJA ZAWIAŁOW, JOANNA KOLMAS\*,  
WAŁAW KOŁODZIEJSKI

MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,  
DEPARTMENT OF INORGANIC AND ANALYTICAL CHEMISTRY,  
1 BANACHA STR., 02-091 WARSAW, POLAND

[*Engineering of Biomaterials, 128-129, (2014), 23-25*]

## Introduction

Hydroxyapatites (HA; chemical formula -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) belong to the group of minerals named apatites. Apatites exist naturally as geological and biological minerals. Biological hydroxyapatites are inorganic components of teeth and bones [1].

Silicon (Si) is a chemical element essential for humans. Daily Si intakes of 40 and 19 mg are recommended by FDA for men and women, respectively. Si is beneficial in the case of arteriosclerosis and osteoporosis, for aging of skin, hair and nails. First studies on the function of Si in higher organisms were carried out in the early 1970s. They showed that Si plays an important role in the calcification of bones. It is also required for the synthesis of collagen and stimulates bone cells division [2,3].

Synthetic HAs are used in medicine and dentistry as materials for bioceramics and implant coatings [1]. Researchers are still looking for better biomaterials based on modified HAs. Silicon-substituted hydroxyapatites (Si-HA) seem to be promising as far their bioactivity and biocompatibility are concerned [4].

The aim of our study was to synthesize various Si-HA materials and determine their Si concentrations using wavelength-dispersive x-ray fluorescence spectroscopy (WD-XRF).

## Materials and methods

The Si-HA samples with various concentrations of Si were synthesized by precipitation in aqueous solutions. Chemical formulas of those samples were  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ , with  $x = 0; 0.4; 0.6; 0.8; 1.0; 1.2; 1.4$  and  $1.8$ . The  $\text{SiO}_4^{3-}$  ions were introduced instead of  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{OH}^-$  groups ( $0 \leq x < 2$ ). The Si-HA samples were compared with stoichiometric HA and commercial Si-HA (Sigma-Aldrich). Structural differences were analyzed using powder X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (IR) and nuclear magnetic resonance (NMR). The Si concentrations were measured using WD-XRF and compared to those obtained using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP - AES). Crystals were visualized using transmission electron microscopy (TEM).

## Procedure

### Wavelength dispersive X-ray fluorescence spectroscopy

The Si content was determined using a Thermo Advant'x WD-XRF spectrometer and the Si  $K\alpha$  line. Calibration curve were prepared on 9 points in the range from 0 to 5.5 wt. %.

W celu oceny kształtu kryształów wykonano zdjęcia metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM).

## Wykonanie badań

### Fluorescencja rentgenowska z dyspersją długości fali

Oznaczenie zawartości krzemu wykonano na aparacie WD-XRF firmy Thermo model Advant'x wykorzystując linię emisyjną krzemu K $\alpha$ . Wykorzystano linię kalibracyjną opartą na 9 punktach w zakresie od 0 do 5.5% krzemu. Tabletki uformowano przy użyciu prasy hydraulicznej firmy Specac używając matrycy o średnicy 13 mm przy nacisku 10 ton przez 10 minut. Do wykonania krzywej wzorcowej użyto talku jako źródła krzemu, mieszaniny kwasu borowego jako lepszczka oraz hydroksyapatytu. Tabletki z próbek badanych przygotowano w identyczny sposób mieszając kwas borowy i badane hydroksyapatyty domieszkowane krzemem.

### Atomowa spektrometria emisyjna z wzbudzeniem plazmowym

Badane próbki były również oznaczane z użyciem aparatu ICP-AES Perkin Elmer OPTIMAL 3100 XL. Roztwory wzorcowe przygotowano rozcieńczając roztwór wzorcowy krzemu (1000 mg/ml  $\pm$  4mg/l, Sigma-Aldrich, wzorzec krzemu dla AAS, c(NaOH)=2% ) w zakresie od 10 do 50 ppm. Badane próbki zostały rozpuszczone w stężonym kwasie azotowym i rozcieńczone wodą.

### Transmisyjna mikroskopia elektronowa

W celu oceny kryształów hydroksyapatytów krzemowych wykonano zdjęcia TEM z użyciem mikroskopu Jeol JEM 1400. Kropla próbki zawieszona w etanolu została naniesiona na niklową siatkę pokrytą błoną z formvaru. Po wyschnięciu siatki były oglądane przy napięciu 80kV.

The measurements were done on tablets formed with a hydraulic Specac press (a 13 mm pellet die, pressure of 10 tons applied during 10 min). The tablets used for the calibration were made of talc as a source of Si and a mixture of boric acid with HA. The boric acid was used as a binder. The tablets containing samples were prepared in a similar way – they included boric acid and Si-HA. Each analysis was repeated 6 times.

### Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy

The Si content was also measured using a Perkin Elmer OPTIMAL 3100 XL apparatus. For the calibration, solutions containing from 10 to 50 ppm of Si were prepared by dilution of a standard Si solution (1000 mg/ml  $\pm$  4mg/l, Sigma-Aldrich, Si standard for AAS, c(NaOH)=2% w/w). The studied samples were dissolved in concentrated nitric acid and diluted with water.

### Transmission electron microscopy

The studied Si-HA crystals were observed using a Jeol JEM 1400 microscope. A drop of sample suspension in ethanol was placed on a Ni grid covered with a formvar film, allowed to dry and analyzed under the accelerating voltage of 80kV.

## Results and discussion

The recorded XRD, NMR and IR spectra were typical for hydroxyapatites [7]. This proves that the synthesis was correct and successful.

The Si concentrations determined using WD-XRF and ICP-AES are presented in the TABLE 1. The results for the commercial material (WD-XRF 2.33 wt.%; ICP-AES 2.16 wt.%) were similar to that declared by the producer (2.33 wt.%). Generally, the Si concentrations determined using ICP-AES were lower than those from the WD-XRF method.

The HA and Si-HA crystals were observed on the TEM images. The images were of very good quality and clearly showed that the HA crystals were much larger than the Si-HA crystals.

**TABELA 1. Zawartość procentowa krzemu w komercyjnym Si-HA oraz zsyntetyzowanych Si-HA**  
**TABLE 1. Concentration of Si in the commercial Si-HA and synthesized Si-HA.**

x	Zawartość % krzemu wyliczona na podstawie reagentów syntezy Concentration of Si expected from synthesis (% wt.)	Zawartość % krzemu oznaczona metodą XRF Concentration of Si determined using XRF	Zawartość % krzemu oznaczona metodą ICP Concentration of Si determined using ICP
		% Si	% Si
0,4	1,12	0,03	0,07
0,6	1,69	0,66	0,65
0,8	2,27	0,60	0,47
1,0	2,85	2,25	1,46
1,2	3,43	2,70	1,86
1,4	4,02	2,29	2,42
1,8	5,21	4,38	2,67
Komercyjny commercial Si-HA	2,33	2,33	2,16

## Dyskusja wyników

Widma otrzymane metodami XRD, NMR i IR są zgodne z doniesieniami literaturowymi i potwierdzają otrzymanie hydroksyapatytów domieszkowanych krzemem [7]. W TABELI 1 zaprezentowano procentowe zawartości krzemu oznaczone metodami WD-XRF oraz ICP-AES. Dla zakupionego hydroksyapatytu domieszkowanego krzemem uzyskano wartości bardzo zbliżone do deklarowanej przez producenta. Zaobserwowano również zależność, iż wyniki otrzymane metodą ICP-AES są niższe niż wyniki otrzymane metodą WD-XRF.

Analizując zdjęcia wykonane metodą TEM zauważono, że kryształy hydroksyapatytów domieszkowanych krzemem są znacznie mniejsze niż kryształy hydroksyapatytu stechiometrycznego.

## Wnioski

1. Udało się uzyskać serię hydroksyapatytów krzemowych o różnej zawartości krzemu. Ich strukturę potwierdzono metodami spektroskopowymi (IR i NMR)
2. Potwierdzono możliwość wykorzystania metody WD-XRF do oznaczania zawartości krzemu w hydroksyapatytach domieszkowanych tym pierwiastkiem.
3. Zaobserwowano, że wielkość kryształów hydroksyapatytów krzemowych maleje wraz ze zwiększaniem się zawartości krzemu w próbce.

## Podziękowania

*Autorzy składają serdeczne podziękowanie dr Marzenie Kuras (WUM) za pomoc w analizie zawartości krzemu metodą ICP-AES. Przedstawione w pracy badania zostały sfinansowane ze środków Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego: grant Młodego Naukowca FW23/PM32/13. 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.*

## Conclusions

1. We have successfully synthesized hydroxyapatites (Si-HA) containing various concentrations of Si. Their structure was confirmed using MAS NMR and IR spectroscopies.
2. We have proved that the WD-XRF spectroscopy can be used to estimate the Si content in the Si-HA samples.
3. It has been shown that the Si-HA crystals become smaller with increasing Si content.

## Acknowledgments

*The authors are grateful to dr Marzena Kuras (WUM) for their help in the ICP-AES analyses, respectively. This work was supported Medical University of Warsaw: Young Scientist grant number FW23/PM32/13. The TEM studies were performed in the Laboratory of Electron Microscopy, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland Electron microscope JEM 1400 (JEOL Co., Japan, 2008) equipped with energy-dispersive full range X-ray microanalysis system (EDS INCA Energy TEM, Oxford Instruments, Great Britain), tomographic holder and high resolution digital camera (CCD MORADA, SiS-Olympus, Germany). The above mentioned equipment was 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

## References

- [1] E. Bogyá, R. Barabás, A. Csavdári, V. Dejeu, I. Bâldea. Hydroxyapatite modified with silica used for sorption of copper(II). *Chemical Papers* 63 (5) (2009) 568–573.
- [2] J.D. Kirschmann, Ed., *Nutrition Almanac*, McGraw-Hill, New York, 2007.
- [3] E. Carlisle, Silicon: An Essential Element for the Chick, *Science* 178 (1972) 619-621.
- [4] E. S. Thian, J. Huang, S. M. Best, Z. H. Barber, W. Bonfield. A new way of incorporating silicon in hydroxyapatite (Si-HA) as thin films. *Journal Of Materials Science: Materials In Medicine* 16 (2005) 411– 415.
- [5] E. O. Stejskal, J. D. Memory, *High-Resolution NMR in the Solid State. Fundamentals of CP/MAS*, Oxford University Press, Oxford, 1994.
- [6] W. Kolodziejski, J. Klinowski, "Kinetics of Cross-Polarization in Solid-State NMR: A Guide for Chemists" *Chemical Reviews*, 102 (2002) 613.
- [7] J. Kolmas, A. Jaklewicz, A. Zima, M. Budko, Z. Paszkiewicz, J. Lis, A. Ślósarczyk, W. Kolodziejski, Incorporation of carbonate and magnesium ions into synthetic hydroxyapatite: The effect on physicochemical properties, *Journal of Molecular Structure* 987 (2011) 40-50