

# SPEKTROSKOPIA MIKRO-RAMANOWSKA W OCENIE POWŁOK HA NA Ti

ALICJA STRZAŁA\*, MARTA MARSZALEK

INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ IM. HENRYKA NIEWODNICZAŃSKIEGO  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, KRAKÓW, POLSKA

\* E-MAIL: ALICJA.STRZALA@IFJ.EDU.PL

## Streszczenie

*W celu otrzymania powłok biozgodnych i bioaktywnych na substratach z czystego tytanu formowano hydroksyapatyt  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  (HA) przy użyciu metody hydrotermalnej. Przygotowanie tego rodzaju powłok na metalicznych endoprotezach stawu biodrowego powinno poprawić osseointegrację implantu. Aby przyspieszyć strącanie HA na powierzchni metalu oraz w celu zwiększenia jednorodności powłoki zastosowano różne metody przygotowania podłoża: trawienie w kwasie (HF), zanurzenie w zasadzie (NaOH), zanurzenie w roztworze o składzie zbliżonym do osocza krwi ludzkiej (roztworze Hanka) oraz implantację jonową. Otrzymane powłoki zostały zbadane przy użyciu spektroskopii mikro-ramanowskiej, która jest skuteczną metodą określania składu chemicznego cienkich warstw.*

**Słowa kluczowe:** powłoka HA, spektroskopia mikro-ramanowska

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 26-29]

## Wprowadzenie

Hydroksyapatyt  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  (HA) jest mineralnym składnikiem kości, a jego biozgodność i bioaktywność są doskonałe [1]. Z tego powodu syntetyczny HA znajduje liczne zastosowania biomedyczne, zarówno w ortopedii jak i stomatologii [2]. Z powodu słabych właściwości mechanicznych [3] HA nie może być używany jako samodzielny materiał na implanty. Dlatego używa się go jako materiał na powłoki na implantach metalicznych, takich jak tytan i jego stopy. Tytan jest jednym z najszerzej stosowanych materiałów do produkcji endoprotez z powodu swojej wysokiej biozgodności [4], ale Ti wykazuje stosunkowo słabą osseointegrację w porównaniu do materiałów opartych na fosforanach wapnia.

Istnieją różne metody formowania HA na powierzchni Ti i jego stopów. Stosunkowo tanią i prostą techniką jest metoda hydrotermalna [4-7]. Do otrzymania HA stosuje się różne roztwory, jednym z nich jest roztwór zawierający  $EDTA^{4-}$ ,  $Ca^{2+}$  i  $PO_4^{3-}$  [5, 6], innym – roztwór Hanka [4] lub symulowany płyn ustrojowy (SBF) [7].

Spektroskopia ramanowska jest skutecznym i nieniszczącym narzędziem służącym do analizy składu cząsteczkowego badanej powierzchni, jak również do oceny podstawień jonowych. Nie wymaga ona żadnej specjalnej metody przygotowania próbek.

W niniejszej pracy przedstawiono dane uzyskane za pomocą spektroskopii Ramana próbek HA otrzymanych w różnych warunkach na tytanie i przedyskutowano różnice pomiędzy widmami.

# MICRO-RAMAN SPECTROSCOPY IN ASSESSMENT OF HA COATING ON Ti

ALICJA STRZAŁA\*, MARTA MARSZALEK

THE HENRYK NIEWODNICZAŃSKI INSTITUTE OF NUCLEAR PHYSICS,  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES, KRAKOW, POLAND

\* E-MAIL: ALICJA.STRZALA@IFJ.EDU.PL

## Abstract

*In order to obtain biocompatible and bioactive coating, hydroxyapatite  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  (HA) was formed using hydrothermal method on pure titanium substrates. Preparation of such type of coating on metallic hip prosthesis should enhance implant's osseointegration. To accelerate HA precipitation on metal surface and to increase the homogeneity of the coating different surface preparation methods were used: acid etching (HF), alkali treatment (NaOH), immersion in salt solution which composition is near to the composition of human blood plasma (Hank's solution) and ion implantation. The deposited coatings were investigated by Raman microspectroscopy which is a powerful method to determine chemical composition of thin coatings.*

**Keywords:** hydroxyapatite coating, micro-Raman spectroscopy

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 26-29]

## Introduction

Hydroxyapatite  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  (HA) is the mineral bone component, and its biocompatibility and bioactivity is excellent [1]. That is why synthetic HA has numerous biomedical applications, both orthopaedic and dental [2]. Due to its poor mechanical properties [3] HA cannot be used as a bulk implant material. HA is therefore used as a coating material on metallic implants, such as titanium and its alloys. Titanium is one of the most widely used materials in endoprosthesis fabrication because of its high biocompatibility [4], but its osseointegration is relatively poor, as compared to calcium phosphate materials.

There are different methods used for forming HA coatings on Ti and its alloys. The relatively cheap and simple technique is hydrothermal method [4-7]. Different solutions are used to obtain HA coating, one of them is a solution containing  $EDTA^{4-}$ ,  $Ca^{2+}$  and  $PO_4^{3-}$  [5,6], another – Hank's solution [4] or simulated body fluid (SBF) [7].

Raman spectroscopy is a powerful and non-destructive tool for analysis of molecular composition of investigated surface as well as for studying ionic substitutions. It does not require any special sample preparation method.

In this study we are presenting our Raman data of hydroxyapatite samples obtained on titanium in different conditions and discussing differences between the spectra.

## Materiały i metody

Próbki HA przygotowano na dostępnych na rynku płytkach czystego tytanu (99,9%, Koch-Light Laboratory Ltd, Colnbrook). Substraty odtłuszczone w kąpeli ultradźwiękowej przez 10 min w każdym z następujących rozpuszczalników: heksanie, acetonie i etanolu [8]. Po użyciu każdego z rozpuszczalników płytki były płukane wodą dejonizowaną i suszone na powietrzu. Następnie część próbek umieszczono w autoklawie zawierającym 50 cm<sup>3</sup> roztworu zawierającego jony Ca<sup>2+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> i EDTA (grupa HA\_EDTA). Na drugiej partii próbek HA syntetyzowano z roztworu Hanka. W tej grupie tytanowy substrat przygotowywano na różne sposoby przedstawione w TABELI 1.

## Materials and methods

HA samples were prepared on commercially pure titanium plates (99.9%, Koch-Light Laboratory Ltd, Colnbrook). Substrates were degreased in ultrasonic bath for 10 minutes in each of the following solvents: hexane, acetone and ethanol [8]. After each solvent use the sample were rinsed with deionised water and dried in ambient air. Then one part of the samples were placed in an autoclave containing 50 cm<sup>3</sup> of solution containing Ca<sup>2+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> and EDTA ions (HA\_EDTA group). HA on the other part of sample was synthesised from Hank's solution. In this group titanium substrate before HA synthesis was prepared in different ways. Details of the pre-treatment are given in TABLE 1.

**TABELA 1. Wykaz sposobów przygotowania próbek Ti.**  
**TABLE 1. Specification of Ti surface preparation methods.**

Sposób przygotowania próbek / Sample preparation method	
Grupa A / Group A	Brak dalszej modyfikacji / Without further modifications
Grupa B / Group B	Trawienie w 1M NaOH / Etching in 1M NaOH
Grupa C / Group C	Trawienie w kwasie HF / Acid etching in HF
Grupa D / Group D	Zanurzenie w HBSS na 96 h / Immersion in HBSS for 96 h
Grupa E / Group E	Implantacja jonami Ca (E1) / Implantation with Ca ions (E1) Implantacja jonami P (E2) / Implantation with P ions (E2)

Syntezę hydrotermalną przeprowadzano w autoklawach laboratoryjnych umożliwiającym prowadzenie reakcji w temperaturach do 300°C i pod ciśnieniem do 20 MPa, niewymagających użycia dużej objętości roztworów (Autoklaw Laboratoryjny Model II, Roth, DE). Syntezę prowadzono w 50 cm<sup>3</sup> roztworu zawierającego Ca-EDTA albo 100 cm<sup>3</sup> roztworu Hanka w temperaturze 200°C. Czas reakcji zmieniał się w zakresie od 5 h do 11 h 10 min.

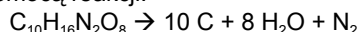
Referencyjny HA został zakupiony od firmy Merck, DE. Wszystkie użyte reagenty były czystości cz.d.a. i nie były poddawane dalszemu oczyszczaniu (POCh, PL).

Osadzone próbki były analizowane przy użyciu konfokalnego mikrospektroskopu Ramana o wysokiej rozdzielczości Nicolet Almega XR wyposażonego w laser o długości fali 532 nm i zakresie spektralnym od 100 do 4000 cm<sup>-1</sup>.

## Wyniki i dyskusja

Referencyjne widma HA zostały przedstawione na RYS 1. Widoczne są cztery piki powiązane z drganiami wiązań PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, pik przy 963 cm<sup>-1</sup> pochodzący od drgań ν<sub>1</sub> jest najsilniejszy, pozostałe piki (433, 588 i 1049 cm<sup>-1</sup>) są dużo słabsze. Łatwy do zaobserwowania jest również pik przy 3574 cm<sup>-1</sup> odpowiadający wiązaniom OH<sup>-</sup>.

Widmo ramanowskie powłoki HA otrzymanej z roztworu zawierającego EDTA-Ca<sup>2+</sup> oraz PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> pokazano na RYS. 2. Poza pikami charakterystycznymi dla czystego HA występują również piki przy 1330 i 1573 cm<sup>-1</sup>. Te piki są typowe dla drgań C-C w graficie (odpowiednio piki D i G). Może to być wynikiem termicznego rozkładu EDTA opisanego za pomocą reakcji:



W roztworach Ca-EDTA powłoki formowały się stosunkowo szybko, ale zawsze były zanieczyszczone węglem i wykazywały słabą adhezję do podłoża. Ponieważ spontanicznie łuszczyły się podczas przechowywania, nie poddano ich dalszym badaniom. R.Z. LeGeros et al. [9,10] wykazali, że dodatek węgla w powłokach HA powoduje niekorzystne zmiany w krystaliczności i rozpuszczalności HA, ponieważ wraz ze wzrostem stężenia węgla w warstwach HA maleje rozmiar krystalitów oraz zwiększa się szybkość uwalniania jonów Ca.

Hydrothermal synthesis was performed in laboratory autoclaves that enable reactions at temperature up to 300°C and under pressure up to 20 MPa, without using large volume of solutions (Laboratory Autoclave Model II, Roth, GE). The synthesis was carried on in 50 cm<sup>3</sup> Ca-EDTA solution or 100 cm<sup>3</sup> of Hank's solution at the temperature of 200°C and the reaction time varied from 5 h to 11 h 10 min.

The reference HA was purchased from Merck, DE. All reagents of analytical grade were used without further purification (POCh, PL).

The deposited samples were analysed using high resolution confocal Raman microspectrometry Nicolet Almega XR equipped with laser of wavelength of 532 nm in spectral range from 100 to 4000 cm<sup>-1</sup>.

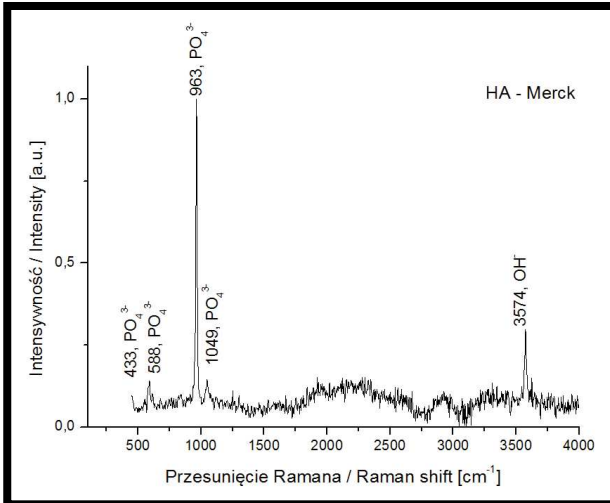
## Results and discussion

Raman spectrum of reference HA is shown in FIG. 1. There are four peaks related to vibrations of PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> bonds, peak at 963 cm<sup>-1</sup> deriving from ν<sub>1</sub> vibrations is the strongest, other peaks (at 433, 588 and 1049 cm<sup>-1</sup>) are much weaker. Also peak at 3574 cm<sup>-1</sup> related to OH<sup>-</sup> bonds can be clearly seen.

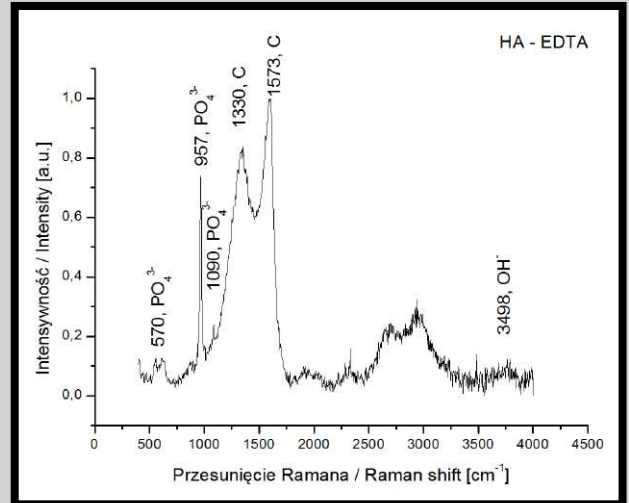
Raman spectrum of HA coatings obtained from solution containing EDTA-Ca<sup>2+</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> is shown in FIG. 2. Besides the peaks characteristic for commercially pure HA, peaks at 1330 and 1573 cm<sup>-1</sup> are also present. These peaks are typical of C-C vibrations in graphite (D and G peaks, respectively). They may result from thermal decomposition of EDTA which can be described by the reaction:



In the Ca-EDTA solutions the coatings were formed relatively fast but they were always carbon-contaminated and showed very poor adhesion. Since they spontaneously peeled off during the storage, they were not examined further. R.Z. LeGeros et al. [9,10] showed that the addition of carbon to the HA coatings causes disadvantageous changes in HA crystallinity and solubility because the higher the carbon concentration in the HA coating is, the smaller the crystallites and the higher the Ca release rate.



**RYS. 1. Widmo ramanowskie dostępnego na rynku HA.**  
**FIG. 1. Raman spectrum of the commercially available HA.**



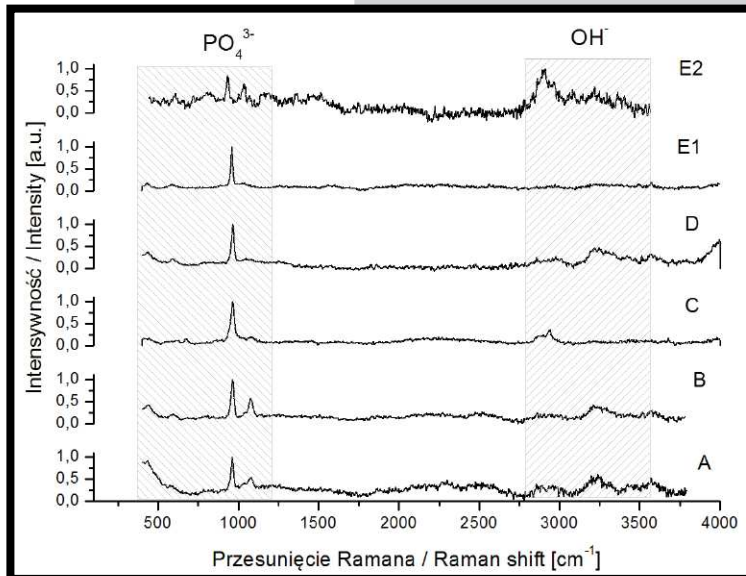
**RYS. 2. Widmo ramanowskie HA otrzymanego z roztworu zawierającego jony Ca, PO₄²⁻ i EDTA.**  
**FIG. 2. Raman spectrum of HA obtained from the solution containing jony Ca, PO₄²⁻ i EDTA ions.**

Widma ramanowskie powłok HA otrzymanych z roztworu Hanka przedstawiono na RYS. 3. Dla HA strąconego na niemodyfikowanym Ti (RYS. 3A) obecne są tylko piki typowe dla HA. Choć powłoka była złożona z czystego HA, osadzanie warstwy ograniczone było do kilku wysp. Nie zaobserwowano różnic pomiędzy powłokami HA otrzymanymi na tytanie trawionym w 5M NaOH przez 24 h w temperaturze pokojowej (RYS. 3B) oraz w mieszaninie 4% HF i 4% H₂O₂ (RYS. 3C), a także na Ti implantowanym jonami Ca (RYS. 3E1) a czystym HA. Piki pojawiają się w tych samych miejscach, a stosunki pomiędzy intensywnościami pików również są zbliżone. Pasma typowe dla PO₄³⁻ v₂ zarejestrowane dla HA strąconego na Ti po zanurzeniu w HBSS (RYS. 3D) jest przesunięte o ok.

15 cm⁻¹, co jednak w dalszym ciągu mieści się w zakresie widma dla drgań v₂ wiązań PO₄³⁻. Dla powłok HA otrzymanych na Ti implantowanym 5x10¹⁶ jonów/cm² jonami fosforu (RYS. 3E2) zaobserwowano mniej intensywny pik przy 960 cm⁻¹ (PO₄³⁻ v₁). Intensywność tego pików zależy od krystaliczności HA [11]. Intensywność tego pików maleje wraz ze zmniejszeniem rozmiarów krystalitów. To pasmo ramanowskie jest wrażliwe na temperaturę [12], co potwierdza fakt, że niestechiometryczny HA rozkłada się w temperaturze ok. 1000°C.

Intensywność pasm fosforanowych pochodzących od modów v₂ i v₃ oraz pasmo drgań rozciągających OH⁻ silnie zależą od orientacji krystalitów względem kierunku padającej wiązki laserowej [13].

W TABELI 2 zestawiono główne linie ramanowskie dla próbek HA.



**RYS. 3. Widma ramanowskie HA otrzymanego na Ti bez dodatkowej obróbki (A), po trawieniu w NaOH (B), po trawieniu w HF (C), po moczeniu w HBSS (D), po implantacji jonami Ca (E1) i P (E2).**

**FIG. 3. Raman spectra of HA obtained on non-modified Ti (A), Ti after etching in NaOH (B), etching in HF (C), soaking in HBSS (D), implantation with Ca (E1) or P (E2) ions.**

Raman spectra of HA coatings obtained from Hank's solution are shown in FIG. 3. For HA precipitated on non-modified titanium (FIG. 3A) only peaks typical for HA are present. Although the coating was pure HA the precipitation was limited to several splats. There are no differences between HA coating obtained on titanium etched in 5M NaOH for 24 h at room temperature (FIG. 3B) or in mixture of 4% HF and 4% H₂O₂ (FIG. 3C) or on Ti after implantation of Ca ions (FIG. 3E1) and pure HA. The peaks occur in the same places and relations between peak intensities are also similar.

Band typical for PO₄³⁻ v₂ recorded for HA precipitated on Ti after soaking in HBSS (FIG. 3D) is shifted about 15 cm⁻¹, which still fits spectral range for v₂ vibrations of PO₄³⁻ bonds. For HA coatings obtained on titanium implanted with 5x10¹⁶ ions/cm² of phosphorus ions (FIG. 3E2) less intense peak at 960 cm⁻¹ (PO₄³⁻ v₁) is seen. The intensity of this peak depends on HA crystallinity [11]. The lower the crystal size is the weaker is the peak. This Raman band is also reported to be temperature sensitive [12], which is supported by the fact that non-stoichiometric HA decomposes at about 1000°C.

Intensity of phosphate bands due to v₂ and v₃ modes as well as OH⁻ stretch band strongly depend on crystal orientation regarding laser beam direction [13].

In TABLE 2 the main Raman lines from the HA samples are listed.

**TABELA 2. Linie ramanowskie obserwowane dla próbek HA (oznaczenia jak w Tabeli 1).**  
**TABLE 2. Raman lines observed for the HA samples (symbols as in Table 1).**

Wibracja / Vibration	Czysty HA / Pure HA Merck	HA-EDTA	A	B	C	D	E1	E2
$\text{PO}_4^{3-} \nu_2$	433	--	423	442	433	448	438	--
$\text{PO}_4^{3-} \nu_4$	588	570	579	589	589	593	583	582
$\text{PO}_4^{3-} \nu_1$	963	957	962	962	963	964	963	964
$\text{PO}_4^{3-} \nu_3$	1049	1090	1080	1079	1050	1049	1040	1070
$\text{OH} \nu_1$	3574	3498	3588	3548	3529	3601	3508	3487
C-C D	--	1330	--	--	--	--	--	--
C-C G	--	1573	--	--	--	--	--	--

## Wnioski

Przedstawiono widma ramanowskie powłok HA na Ti przygotowanych na różne sposoby. Spektroskopia mikro-ramanowska potwierdziła, że otrzymane powłoki były zbudowane z hydroksyapatytu. Jednorodność warstw oceniana na podstawie obrazu z mikroskopu optycznego różniła się w zależności od sposobu przygotowania próbki, ale widma ramanowskie powłok były bardzo podobne. Intensywność niektórych pasm fosforanowych oraz pasma OH zależy od orientacji kryształów HA względem padającej wiązki laserowej.

## Podziękowania

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki.

## Conclusions

We presented Raman spectra of HA coating on Ti prepared in different ways. Micro-Raman spectroscopy verified the obtained coatings as hydroxyapatite. Coating uniformity assessed by optical microscopy varied depending on the sample preparation method but Raman spectra of the coatings are very similar. Intensity of some phosphate bands and OH band depends on HA crystal orientation regarding laser beam direction.

## Acknowledgements

The project was partially supported by the grant of National Science Centre.

## Piśmiennictwo

- [1] Zhang Y., Fu T., Han Y., Wang Q., Zhao Y., Xu K.: In vitro and in vivo tests of hydrothermally synthesised hydroxyapatite coating. *Biomolecular Engineering* 19 (2002) 57-61.
- [2] Chang C., Huang J., Xia J., Ding C.: Study on crystallization kinetics of plasma sprayed hydroxyapatite coating. *Ceramics International* 25 (1999) 479-483.
- [3] Sato M., Slamovich E., Webster T.: Enhanced osteoblast adhesion on hydrothermally treated hydroxyapatite/titania/poly(lactide-co-glycolide) sol-gel titanium coatings. *Biomaterials* 26 (2005) 1349-1357.
- [4] Hamada K., Kon M., Hanawa T., Yokoyama K., Miyamoto Y., Asaoka K.: Hydrothermal modification of titanium surface in calcium solutions. *Biomaterials* 23 (2002) 2265-2272.
- [5] Fujishiro Y., Nishino M., Sugimori A., Okuwaki A., Sato T.: Coating of hydroxyapatite on various substrates via hydrothermal reactions of  $\text{Ca}(\text{edta})^{2-}$  and phosphate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 12 (2001) 333-337.
- [6] Fujishiro Y., Fujimoto A., Sato T., Okuwaki A.: Coating of hydroxyapatite on titanium plates using thermal dissociation of calcium-EDTA chelate complex in phosphate solutions under hydrothermal conditions. *Journal of Colloid and Interface Science* 173 (1995) 119-127.

## References

- [7] Calixto de Andrade M., Tavares Filgueiras M., Ogasawara T.: Hydrothermal nucleation of hydroxyapatite on titanium surface. *Journal of the European Ceramic Society* 22 (2002) 505-510.
- [8] Raikar G., Geregory J., Ong J., Lucas L., Lemons J., Kawakara D., Nakamura M.: Surface characterization of titanium implants. *Journal of Vacuum Science and Technology A* 13 (1995) 2633-2637.
- [9] LeGeros R.Z., Trautz O.R., LeGeros J.P., Klein E., Shirra W.P.: Apatite Crystallites: Effects of Carbonate on Morphology. *Science* 155 (1967) 1409-1411.
- [10] Yao F., LeGeros J.P., LeGeros R.Z.: Simultaneous incorporation of carbonate and fluoride in synthetic apatites: Effect on crystallographic and physico-chemical properties. *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 2169-2177.
- [11] Li H., Ng B.S., Khor K.A., Cheang P., Clyne T.W.: Raman spectroscopy determination of phases within thermal sprayed Hydroxyapatite splats and subsequent in vitro dissolution examination. *Acta Materialia* 52 (2004) 445-453.
- [12] Aminzadeh A.: Fluorescence bands in the FT-Raman spectra of some calcium minerals. *Spectrochimica Acta Part A* 53 (1997) 693-697.
- [13] Tsuda H., Arends J.: Orientational micro-Raman spectroscopy on Hydroxyapatite single crystals and human enamel crystallites. *Journal of Dental Research* 73 (1994) 1703-1710.