

Michał WOJASIŃSKI<sup>1</sup>, Joanna LATOCHA<sup>1</sup>, Paweł SOBIESZUK<sup>1</sup>, Tomasz CIACH<sup>1,2</sup>

e-mail: michal.wojasinski.dokt@pw.edu.pl

<sup>1</sup> Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprocessowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

<sup>2</sup> CEZAMAT, Politechnika Warszawska, Warszawa

## Wpływ temperatury na właściwości nanocząstek hydroksyapatytu otrzymywanych w precypitacji z lecytyną

### Wstęp

Wzrastające zainteresowanie nanocząstkami w zastosowaniach biomedycznych pociąga za sobą potrzebę lepszej charakterystyki stosowanych materiałów, a także wymaga ich kontrolowanej produkcji [Wasiak i in., 2016]. Jednym z przykładów nanocząstek chętnie wykorzystywanych w medycynie jest hydroksyapatyt (nHAp). Chemiczne i strukturalne podobieństwo do komponentów kostnych sprawia, iż znalazł on zastosowanie w materiałach implantacyjnych, pokryciach, cementach kostnych, materiałach dentystycznych, a także jako nośnik leków [Drouet i in., 2009]. Budowa oraz właściwości nHAp sprawiają, że jest dobrze tolerowany przez organizm człowieka, a także posiada zdolność do interakcji z żywą tkanką [Catros i in., 2010]. Zwiększenie biogodności cząstek, kontrola ich morfologii oraz opracowanie procesu produkcji na skalę przemysłową są obecnie wyzwaniem dla badaczy.

Przedstawione badania dotyczyły otrzymywania nanocząstek hydroksyapatytu metodą chemicznej precypitacji w obecności lecytyny (nHAp-PC) w różnych temperaturach procesu. Otrzymany produkt analizowano z użyciem najnowszych metod pomiarowych, które umożliwiły określenie: rozmiaru cząstek, potencjału zeta, morfologii oraz charakterystycznych grup funkcyjnych.

### Badania doświadczalne

#### Precypitacja nanocząstek hydroksyapatytu

Nanocząstki hydroksyapatytu (nHAp-PC) syntezowano z wykorzystaniem metody precypitacji w obecności lecytyny. Metoda ta została szczegółowo opisana w pracy zespołu [Wojasiński i in., 2015], w której lecytyna spełniała rolę surfaktantu do kontroli morfologii cząstek oraz jako środka modyfikującego chemicznie ich powierzchnię. Modyfikacja powierzchniowa ma za zadanie zwiększenie biogodności produktu. Cząstki nHAp-PC otrzymano w reaktorze półkresowym z mieszaniem [Wojasiński i in., 2015]. Do roztworu 0,5 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  i 3% masowych zawiesiny lecytyny (lecytyna sojowa, SERVA) dozowano 0,3 M roztwór  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . Roztwory przygotowano w wodzie ultraczystej. Reakcję prowadzono dla czterech wartości temperatury: temperatura pokojowa ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ,  $60^\circ\text{C}$  i  $80^\circ\text{C}$ ). Pozostałe parametry procesu takie jak: szybkość dozowania, początkowe  $\text{pH}$  oraz szybkość mieszania pozostały niezmiennie. Po oczyszczeniu produktu precypitacji, zgodnie z procedurą opisaną przez Wojasińskiego i in. [2015], produkt został poddany mieleniu w planetarnym młynie kulowym (5 min., 150 obr./min.) do uzyskania proszku.

#### Rozmiar nanocząstek

Rozmiar otrzymanych nanocząstek hydroksyapatytu mierzono dwiema metodami: metodą śledzenia ruchu nanocząstek NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*,) oraz metodą dynamicznego rozproszenia światła DLS (*Dynamic Light Scattering*,). Do pomiarów NTA zastosowano aparat *NanoSight LM10* (Malvern, UK) wraz z oprogramowaniem *NTA 2.3*. Pomiar DLS przeprowadzono w aparacie *Zetasizer Nano ZS* (Malvern, UK). Próbki proszków nHAp-PC do analizy przygotowano w postaci zawiesin o stężeniu cząstek  $1 \text{ mg/dm}^3$  i poddano działaniu ultradźwięków przez 10 minut przed pomiarem, dla obu metod pomiarowych. Wyniki podano jako średnią z trzech pomiarów.

#### Potencjał zeta

Potencjał zeta otrzymanych nanocząstek charakteryzujący ich ładunek powierzchniowy zmierzono za pomocą urządzenia *Zetasizer Nano ZS*, z wykorzystaniem metody laserowego pomiaru prędkości cząstek metodą *Dopplera LDV* (*Laser Doppler Velocimetry*,). Badane były zawiesiny nHAp-PC w wodzie ultraczystej o stężeniu  $1 \text{ mg/dm}^3$ , których odczyn  $\text{pH}$  wynosił 5,6 po wcześniejszym podaniu ich działaniu ultradźwięków przez 10 minut. Wykonano trzy pomiary dla każdej próbki.

#### Morfologia nanocząstek

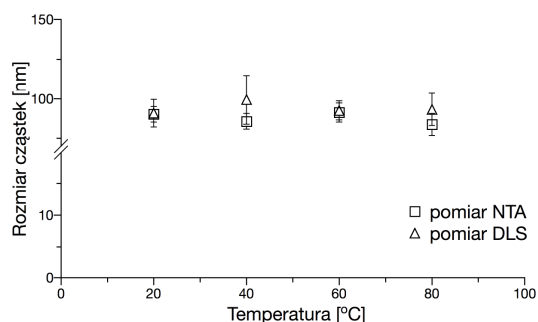
Analizę morfologii otrzymanych nanocząstek przeprowadzono na podstawie zdjęć ze skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM, *Zeiss Ultra Plus*, Niemcy). Próbki proszków nHAp-PC nanoszono na przewodzącą taśmę węglową i poddano napyleniu warstwą przewodzącą węgla w napyłarce próżniowej *BAL-TEC SCD 005* (obecnie *Leica*, Niemcy).

#### Skład chemiczny

Obecność charakterystycznych grup funkcyjnych analizowano na podstawie widm absorpcji FTIR (*Fourier Transform Infrared spectroscopy*) w trybie osłabionego całkowitego odbicia ATR (*Attenuated Total Reflectance*). Do pomiarów widm wykorzystano aparat *Nicolet™ 6700* (*ThermoScientific*, USA) wykonując trzydzieści dwa skany pojedynczej próbki w zakresie wartości liczby falowej od 4000 do  $400 \text{ cm}^{-1}$ .

### Wyniki i dyskusja

Rozmiar uzyskanych nanocząstek hydroksyapatytu modyfikowanych lecytyną w funkcji temperatury przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Rozmiar nanocząstek hydroksyapatytu nHAp-PC zmierzony metodą śledzenia ruchu nanocząstek (NTA) i dynamicznego rozproszenia światła (DLS)

Obie proponowane metody pomiaru dały zbliżone wyniki. Świadczy to o poprawności ich doboru. Ponadto nie stwierdzono wpływu temperatury na rozmiar cząstek nHAp-PC. W badanym zakresie temperatur stosowana metoda syntezy nHAp-PC umożliwia uzyskanie cząstek o rozmiarze około 100 nm. Jest to bardzo korzystny wynik z punktu widzenia medycznego zastosowania syntezowanego hydroksyapatytu.

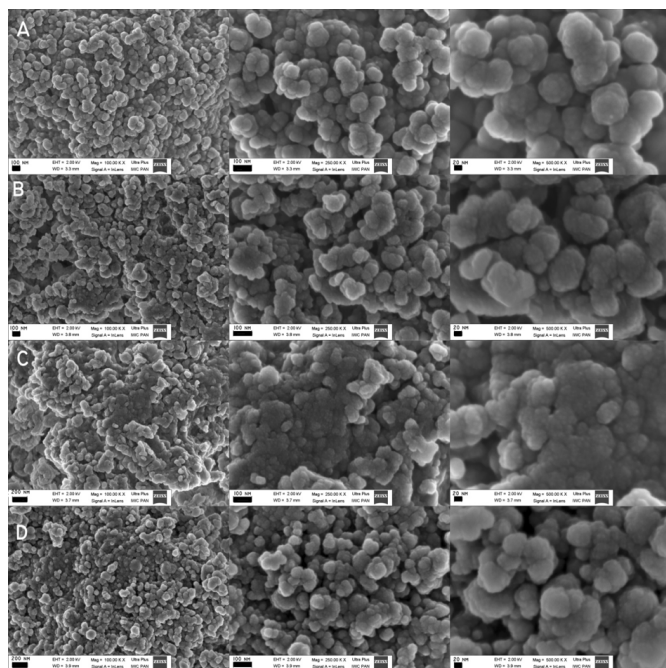
W tab. 1 podano wartości potencjału zeta cząstek, jakie uzyskano w zakresie stosowanych temperatur. Wartość potencjału zeta silnie zależy od  $\text{pH}$  zawiesiny. W związku z tym porównanie wartości potencjału zeta różnych zawiesin należy wykonywać tylko przy tej samej wartości  $\text{pH}$ . Jak wynika z tab. 1 wszystkie badane zawiesiny miały taki sam odczyn  $\text{pH}$ . Dzięki temu zmierzone wartości potencjału zeta są tylko funkcją temperatury precypitacji.

Tab. 1. Wyniki pomiaru potencjału zeta zawiesin nanocząstek hydroksyapatytu otrzymanych w różnych temperaturach

Temperatura, [°C]	pH zawiesiny, [-]	Potencjał zeta ± SD [mV]
20 ± 2	5,6	-0,327 ± 0,379
40	5,6	0,104 ± 0,450
60	5,6	-0,381 ± 0,451
80	5,6	-0,047 ± 0,318

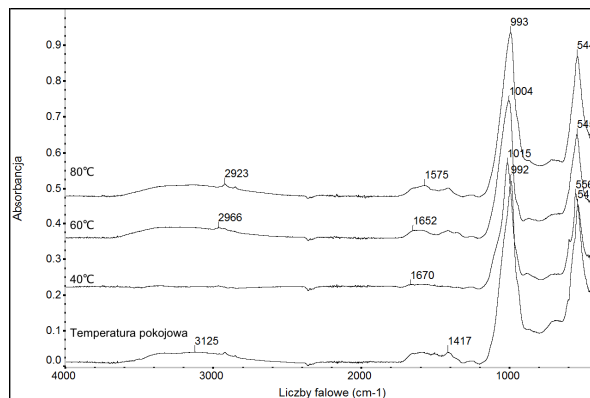
Wartość potencjału zeta ma istotne znaczenie w procesie agregacji cząstek. Układ uważany jest za stabilny, gdy potencjał zeta jest mniejszy od -30 mV lub większy od 30 mV [Pomastowski i in., 2012]. W prezentowanej pracy wartości potencjału zeta oscylują w pobliżu wartości 0, bez względu na temperaturę procesu (Tab. 1). Otrzymany zatem nHAp-PC jest złożony z cząstek, które mogą ulegać agregacji i rozpadowi. Potwierdziły to wyniki pomiarów morfologii cząstek nHAp-PC prezentowane poniżej.

Na rys. 2 przedstawiono obrazy uzyskane za pomocą mikroskopii elektronicznej nanocząstek hydroksyapatytu po syntezie w czterech badanych temperaturach. Jak wspomniano wyżej cząstki nHAp-PC wyraźnie tworzą aglomeraty. Cząstki wykazują morfologię kulistą o rozmiarze rzędu 100 nm, co jest spójne z wynikami pomiarów NTA i DLS. Ponadto tworzące się aglomeraty nanocząstek przypominają strukturę kalafiora, co było wcześniej raportowane [Wojasiński i in., 2015]. Jednocześnie analiza zdjęć skaningowej mikroskopii elektronicznej również potwierdza niewielki wpływ temperatury precypitacji na morfologię uzyskiwanych nanocząstek hydroksyapatytu.



Rys. 2. Zdjęcia ze skaningowej mikroskopii elektronicznej nanocząstek hydroksyapatytu (nHAp-PC) otrzymanych w temperaturze: A – pokojowej; B – 40°C; C – 60°C; D – 80°C

Pomiar FTIR umożliwia określenie występujących w produkcie precypitacji grup funkcyjnych. Ponadto w przypadku stosowania lecytyny jako surfaktantu, analiza FTIR daje informację na temat jej obecności w otrzymanyim hydroksyapatycie. Typowe widmo nHAp zawiera dwa piki (liczba falowa około 1000 i 550  $\text{cm}^{-1}$ ), które charakteryzują grupy fosforanowe [Ślósarczyk in., 2005]. W przypadku stosowania lecytyny jej obecność w nHAp-PC jest charakteryzowana pikami dla liczb falowych około 3000 i 1600  $\text{cm}^{-1}$ . Na rys. 3 pokazano widma FTIR w czterech badanych temperaturach.



Rys. 3. Widma FTIR-ATR proszków nanocząstek hydroksyapatytu (nHAp-PC) otrzymanych w temperaturze 20±2, 40, 60 i 80°C

Jak widać stosowanie różnych temperatur nie wpływa znacząco na kształt pików związanych z grupą fosforanową. Jednakże piki odpowiedzialne za obecność lecytyny się różnią. Oznacza to, że synteza hydroksyapatytu w stosowanym zakresie temperatur zależy od ilości lecytyny, która wiąże się z produktem. Dalsze badania syntezy nHAp-PC są ukierunkowane na oznaczenie zawartości lecytyny w produkcie oraz jej wpływu na jakość produktu końcowego

## Podsumowanie i wnioski

W pracy przedstawiono wyniki precypitacji hydroksyapatytu zmodyfikowanego lecytiną w reaktorze półkresowym. Proces prowadzono w czterech temperaturach.

Rozmiar otrzymanych cząstek wyniósł około 100 nm, co jest korzystne z punktu widzenia zastosowań medycznych. Co więcej, ta cecha produktu nie zależy od temperatury. Również niezależne od temperatury są wartość powierzchniowego potencjału zeta oraz kulista morfologia otrzymanych cząstek.

Analiza chemiczna produktu wskazuje na otrzymanie hydroksyapatytu zmodyfikowanego lecytiną. Jednakże, obecność lecytyny w cząstkach hydroksyapatytu jest różna dla różnych temperatur precypitacji. Zjawisko to będzie przedmiotem dalszych badań w celu określenia dokładnego stężenia lecytyny w nHAp-PC. Umożliwi to określenie wpływu zawartości lecytyny w hydroksyapatycie na jego właściwości biologiczne.

## LITERATURA

- Catros S., Guillemot F., Lebraud E., Chanseau C., Perez S., Bareille R., Amédée J., Fircaïn J.C., (2010). Physico-chemical and biological properties of a nano-hydroxyapatite powder synthesized at room temperature. *IRBM*, 31, 226-233. DOI: 10.1016/j.irbm.2010.04.002
- Drouet C., Bosc F., Banu M., Largeot C., Combes C., Dechambre G., Estoumès C., Raimbeaux G., Rey C., (2009) Nanocrystalline apatites: From powders to biomaterials. *Powder Technol.*, 190, 118-122. DOI: 10.1016/j.powtec.2008.04.041
- Pomastowski P., Dziubakiewicz E., Buszewski B., (2012). Potencjał zeta, jego rola i znaczenie. *Analityka Nauka i Praktyka*, 2, 19-23
- Ślósarczyk A., Paszkiewicz Z., Paluszkiwicz C., (2005). FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *J. Mol. Struct.*, 744-747, 657-661. DOI: 10.1016/j.molstruc.2004.11.078
- Wasiak I., Kulikowska A., Janczewska M., Michalak M., Cymerman I.A., Nagalski A., Kallinger P., Szymanski W.W., Ciach T., (2016). Dextran nanoparticle synthesis and properties. *PLoS ONE* 11(1): e0146237. DOI: 10.1371/journal.pone.0146237
- 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**