

PORÓWNANIE POWŁOK HA OTRZYMANÝCH W METODZIE HYDROTERMALNEJ Z ROZTWORU ZAWIERAJĄCEGO EDTA-Ca²⁺-PO₄³⁻ LUB ROZTWORU HANKA NA CZYSTYM Ti I Ti IMPLANTOWANYM JONAMI Ca

A. STRZAŁA*, B. PETELEZ, J. KWIATKOWSKA, B. RAJCHEL

INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ PAN,
UL. RADZIKOWSKIEGO 152, 31-342 KRAKÓW, POLSKA
* E-MAIL: ALICJA.STRZAŁA@IFJ.EDU.PL

Streszczenie

W celu otrzymania biozgodnej i bioaktywnej warstwy, która poprawi integrację protezy stawu biodrowego z kością, przy użyciu metody hydrotermalnej formowano hydroksyapatyt $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA na podłożach z czystego tytanu oraz tytanu implantowanego jonami Ca. Do syntezy HA użyto dwóch różnych roztworów: jednego zawierającego EDTA, jony wapnia i fosforu oraz drugiego, którym był roztwór Hanka, którego skład i stężenie soli są podobne do składu i stężenia soli osocza krwi ludzkiej. Budowę cząsteczkową tak otrzymanych warstw określono przy użyciu mikrospektroskopii ramanowskiej.

W artykule dyskutowana jest efektywność formowania HA w tych roztworach przy użyciu metody hydrotermalnej i wpływ stanu podłoża na procesy osadzania HA.

Słowa kluczowe: hydroksyapatyt, synteza hydrotermalna, mikrospektroskopia Ramana, implantacja jonowa Ca

[Inżynieria Biomateriałów, 92, (2010), 24-29]

Wprowadzenie

Hydroksyapatyt $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA) jest mineralnym składnikiem kości, więc jego biozgodność jest doskonała [1]. Dlatego syntetyczny HA posiada liczne zastosowania biomedyczne, zarówno w ortopedii jak i stomatologii [2]. Z powodu słabych właściwości mechanicznych [3] HA nie może być stosowany samodzielnie jako materiał na implanty. HA jest więc stosowany jako materiał pokryciowy na protezach metalowych wykonanych np. z tytanu czy jego stopów. Tytan jest jednym z najczęściej stosowanych materiałów do produkcji endoprotez. Sam tytan jest materiałem biozgodnym [4], ale jego osteointegracja jest stosunkowo słaba w porównaniu do materiałów zawierających fosforan wapnia. Dlatego użycie powłok HA na implantach Ti może zredukować ryzyko przedwczesnego poluzowania się protezy.

Stosuje się różne metody formowania powłok HA na Ti i jego stopach: napylenie plazmowe [2,3,5-8], metody hydrotermalne [1,9-20], metody jonowe (implantacja jonowa [4,21], napylenie jonowe [21], mieszanie jonowe [22]), metody chemiczne (np. zol-żel [23]), ablacja laserowa czy pulsowe osadzanie laserowe (PLD) [3,25].

Metody jonowe [4,21,22] pozwalają otrzymać warstwy o grubości kilkudziesięciu nm do kilku μm , stosunku zawartości Ca/P zbliżonym do składu chemicznego naturalnego

COMPARISON OF HA COATINGS OBTAINED BY HYDROTHERMAL METHOD USING EDTA-Ca²⁺-PO₄³⁻ SOLUTION OR HANK'S SOLUTION ON PURE Ti AND ON Ti IMPLANTED WITH Ca IONS

A. STRZAŁA*, B. PETELEZ, J. KWIATKOWSKA, B. RAJCHEL

INSTITUTE OF NUCLEAR PHYSICS,
RADZIKOWSKIEGO 152, 31-342 KRAKÓW, POLAND
* E-MAIL: ALICJA.STRZAŁA@IFJ.EDU.PL

Abstract

In order to obtain a biocompatible and bioactive coating that improves hip joint endoprosthesis integration with bone, hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA, was formed on pure titanium and Ca ions implanted titanium substrates using hydrothermal method. To synthesize HA two different solutions were used: one containing EDTA, calcium and phosphorus ions, and the other which was Hank's solution whose salt composition is similar to the human blood plasma. The molecular composition of as deposited coatings was investigated by means of Raman micro-spectroscopy.

The effectiveness of the solutions in HA forming by the hydrothermal method and the influence of the substrate condition are discussed.

Keywords: hydroxyapatite, hydrothermal synthesis, Raman micro-spectrometry, Ca ion implantation

[Engineering of Biomaterials, 92, (2010), 24-29]

Introduction

Hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA) is the mineral bone component, so, 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. Titanium itself is a biocompatible implant material [4], but its osseointegration is relatively poor, as compared to calcium phosphate materials. Therefore using HA coatings on Ti implants may reduce the risk of premature loosening of the prosthesis.

There are different methods used for forming HA coatings on Ti and its alloys: plasma spraying [2,3,5-8], hydrothermal methods [1,9-20], ion methods (ion implantation [4,21], ion sputtering [21], ion mixing [22]), chemical methods (i.e. sol-gel [23], laser ablation or pulsed laser deposition (PLD) [3,25]).

Ion methods [4,21,22] enable obtaining coatings which are several tens of nm to several μm , Ca/P ratio close to the chemical composition of natural hydroxyapatite, but they require using commercial HA powders or plates. Also by laser ablation deposition [3,25] as initial material commercial HA powders should be used, and coatings obtained reach the thickness of several μm . Chemical methods [23], as well as hydrothermal method [1,9-20], enable obtaining of HA simple and relatively cheap reagents.

hydroksyapatytu, wymagają jednakże użycia komercyjnie dostępnych proszków i płytek HA. Podobnie przy osadzaniu metodą ablacji laserowej [2,25] jako materiału wyjściowego należy użyć komercyjnych proszków HA, a otrzymane w tym procesie warstwy osiągają grubość kilku μm . Metody chemiczne [23], podobnie jak metoda hydrotermalna [1,9-20] pozwalają na uzyskanie HA z prostych i stosunkowo niedrogich reagentów. Najczęściej jednak metody te są stosowane do otrzymania proszków HA, wykorzystywanych do formowania warstw HA na podłożach metalicznych [26-28].

Obecnie najczęściej stosowaną metodą pokrywania powierzchni metalicznych hydroksyapatytem jest metoda napyłania plazmowego (plasma spraying) [2,3,5-8]. Jednakże metoda ta ma liczne wady [2]: słaba adhezja powłoki HA do podłoża, niska stabilność mechaniczna powłoki i niejednorodność mikrostruktury i krystaliczności powłok. Metoda hydrotermalna z kolei jest stosowana głównie jako metoda wspomagająca krystalizację warstwy HA otrzymanej innymi metodami, bądź jako metoda przygotowania powierzchni [1], bądź jako metoda końcowej obróbki powierzchni [9-15]. Pomimo licznych zalet [16], jak: możliwość otrzymania materiałów wysokiej czystości, jednorodnej krystaliczności, możliwości zastosowania metody dla wielu materiałów, otrzymywania mikro- i nanocząstek o małym rozrzucie rozmiarów, użytkowanie mało skomplikowanej aparatury i niskie zapotrzebowanie energetyczne jest to metoda ciągle rzadko stosowana do syntezy powłok HA na podłożach metalicznych. Niewielu badaczy pokrywa powierzchnię tytanu warstwą hydroksyapatytu używając metody hydrotermalnej jako metody otrzymania hydroksyapatytu i osadzenia go na podłożu w trakcie jednej reakcji. Do otrzymania powłok HA na drodze syntezy hydrotermalnej używane są różne roztwory, jednym z nich jest roztwór zawierający EDTA^{4-} , Ca^{2+} i PO_4^{3-} [20,21], innymi – roztwór Hanka [4] czy sztuczne osocze (SBF, Simulated Body Fluid) [22].

Implantacja jonów wapnia do podłoża Ti może odgrywać znaczącą rolę w promowaniu depozycji HA, poprawie właściwości mechanicznych Ti, odporności na korozję i jego biogodności [29-31]. Zaimplantowane jony Ca umiejscowione blisko powierzchni w obecności SBF czy roztworu Hanka mogą zostać zmienione w CaO , Ca^{2+} , co ułatwia strącanie HA [30,31].

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu przygotowania i modyfikacji zaimplantowanymi jonami Ca powierzchni Ti na skład i parametry formowania powłoki HA metodą hydrotermalną, używając roztworu zawierającego EDTA^{4-} , Ca^{2+} i PO_4^{3-} oraz roztworu Hanka.

Materiały i metody

Wszystkie próbki zostały przygotowane do osadzania HA metodą hydrotermalną w autoklawie umożliwiającym przeprowadzanie reakcji w temperaturze do 300°C i pod ciśnieniami do 20 MPa, który dodatkowo nie wymaga używania dużych objętości używanych roztworów (Autoklaw Laboratorijny Model II, Roth, Niemcy).

Dostępny na rynku czysty (99,9%) tytan pocięto na kawałki i użyto jako podłoża. Zostały one odtłuszczone w kąpeli ultradźwiękowej przez 10 minut w każdym z następujących rozpuszczalników: heksan, aceton i etanol [32]. Po każdym rozpuszczalniku próbki płukano wodą dejonizowaną i suszono na powietrzu. W przypadku osadzania HA z roztworu Hanka, kawałki metalu były dodatkowo trawione w mieszaninie kwasu fluorowodorowego i nadtlenu wodoru ($40\% \text{HF} + 30\% \text{H}_2\text{O}_2 + 3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 10:1:100 v/v/v), a następnie płukane wodą dejonizowaną.

However, these methods are mainly used for obtaining of HA powders, used for forming of HA coatings on metallic substrates [26-28].

Nowadays the most widely used method for metallic substrates HA coating is plasma spraying method [2,3,5-8]. This method, however, has numerous disadvantages [2]: weak adhesion between HA coating and the substrate, low mechanical stability of the coating and coating microstructure and crystallinity inhomogeneity. Hydrothermal method is mainly used as HA coating crystallization enhancing method for coatings obtained using other methods, surface preparation method [1] or as a method used for treatment after deposition [9-15]. Despite numerous advantages [16] such as: ability to obtain materials of high purity, homogenous crystallinity, possibility of using the method for various materials, obtaining micro- and nanoparticles of small dimension diversity, using of uncomplicated equipment, low energy demand, it is still rarely used for HA coatings synthesis on metallic substrates.

Not many researchers use the hydrothermal method for HA coating on titanium substrate as a method for synthesising and deposition of HA in one process. Different solutions are used to obtain HA coating, one of them is a solution containing EDTA^{4-} , Ca^{2+} and PO_4^{3-} [20,21], another – Hank's solution [4] or simulated body fluid (SBF) [22].

Implantation of Ca ions into Ti substrates may play an important role in promoting HA deposition, enhancing Ti mechanical properties, corrosion resistance and its biocompatibility [29-31]. The implanted Ca ions which are located near the surface in the presence of SBF or Hank's solution may be converted into CaO , Ca^{2+} [8] which promotes HA precipitation [30,31].

The purpose of the present study was to determine the influence of surface preparation and modification by Ca ion implantation on molecular composition and formation parameters of HA coatings formed by the hydrothermal method, using EDTA^{4-} , Ca^{2+} and PO_4^{3-} solution or Hank's solution.

Materials and Methods

All samples were prepared for HA deposition using the hydrothermal method in an autoclave enabling reactions in temperatures up to 300°C and under pressures up to 20 MPa which additionally does not require using large volumes of solutions used (Laboratory Autoclave Model II, Roth, GE).

Commercially available pure (99.9%) titanium pieces were used as substrates. They were degreased in the ultrasonic bath for 10 minutes in each of the following solvents: hexane, acetone and ethanol [32]. After each solvent use the samples were rinsed with deionised water and dried in ambient air. In the case of HA precipitation from the Hank's solution, the metal pieces were additionally etched in a mixture of hydrofluoric acid and hydrogen peroxide ($40\% \text{HF} + 30\% \text{H}_2\text{O}_2 + 3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 10:1:100 v/v/v) and then rinsed with deionised water.

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

The two solutions used as sources of Ca^{2+} and PO_4^{3-} ions were the following:

(A) Hank's solution (TABLE 1)

(B) a solution containing 0.2 M Na_2EDTA , 0.05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 M $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 1 M NaOH to adjust the solution pH.

The as prepared substrates were then placed in the autoclave containing 50 cm^3 of the appropriate solution and heated to the temperature from 120°C to 150°C (for A) or 200°C (for B) during 0.5 to 7.5 h.

HA używany jako próbka odniesienia został zakupiony od firmy Merck, Niemcy. Wszystkie pozostałe reagenty były czystości do analizy (czda) (POCh, Polska) i zostały użyte bez dalszego oczyszczania.

Dwa roztwory użyte jako źródła jonów Ca^{2+} i PO_4^{3-} były następujące:

(A) roztwór Hanka (TABELA 1)

(B) roztwór zawierający 0,2 M Na_2EDTA , 0,05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 M $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ i 1 M NaOH do osiągnięcia odpowiedniego pH roztworu.

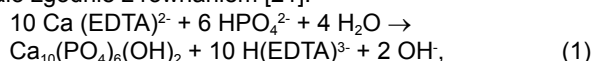
Tak przygotowane substraty umieszczano w autoklawie zawierającym 50 cm^3 odpowiedniego roztworu i podgrzewane do temperatury od 120°C do 150°C (dla A) lub 200°C (dla B) przez 0,5 do 7,5h.

Niektóre próbki tytanu zostały zaimplantowane jonami Ca o koncentracji $5 \cdot 10^{16}$ jonów na cm^2 , na implantatorze jonowym skonstruowanym w IFJ PAN, przy energii implantacji równej 25 keV, a później prowadzono syntezę hydrotermalną w roztworze Hanka w celu określenia wpływu implantacji jonami Ca na szybkość osadzania, jednorodność i wydajność procesu.

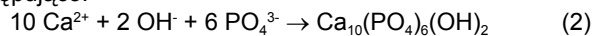
Tak otrzymane próbki były analizowane przy użyciu konfokalnej mikrospektroskopii Ramana o wysokiej rozdzielczości na spektrometrze Nicolet Almega XR oraz przy użyciu dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) na dyfraktometrze Panalytical X'PERT PRO.

Wyniki i dyskusja

W roztworze zawierającym EDTA strącanie HA przebiegało zgodnie z równaniem [21]:



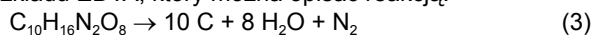
podczas gdy w roztworze Hanka reakcja przebiegała następująco:



Widma ramanowskie powłok HA otrzymanych z roztworu Hanka i roztworu zawierającego EDTA pokazano na RYS. 1.

Pasma pochodzące od wibracji grup cząstek wchodzących w skład hydroksyapatytu są następujące: $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$, $\nu_2 \text{PO}_4^{3-}$, $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$, $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$ i $\nu_1 \text{OH}^-$ [30-37]. W TABELI 2 wymieniono główne pasma ramanowskie dla próbek HA.

We wszystkich przypadkach linia ramanowska przypisana do $\text{PO}_4^{3-} \nu_1$ (~960 cm^{-1}) była bardzo intensywna i ostra. Dla HA otrzymanego z roztworu zawierającego EDTA zaobserwowano dodatkowe piki 1352 i 1600 cm^{-1} . Te piki są charakterystyczne dla wibracji C-C w graficie (odpowiednio: piki D i G). Mogą one pojawiać się w wyniku termicznego rozkładu EDTA, który można opisać reakcją:



W roztworach Ca-EDTA powłoki były formowane stosunkowo szybko (35-90 min), ale zawsze były one zanieczyszczone węglem i wykazywały bardzo słabą adhezję. Ponieważ w trakcie przechowywania powłoki spontanicznie się odłupywały, zrezygnowano z przeprowadzania dalszych badań. R.Z. LeGeros i wsp. [41,42] stwierdzili, że dodatek węgla do powłok HA powoduje niekorzystne zmiany w krystaliczności HA i jego rozpuszczalności, ponieważ wraz ze wzrostem zawartości węgla w powłoce HA zmniejszały się rozmiary krystalitów i zwiększało się tempo uwalniania Ca.

W przypadku roztworu Hanka formowanie się powłoki HA przebiegało wolniej, zaobserwowano zależność szybkości formowania się powłoki od temperatury, czego należało się spodziewać. Powłoki te charakteryzowały się większą trwałością, więc oczekują na testy mechaniczne.

TABELA 1. Skład roztworu Hanka.
TABLE 1. Composition of the Hank's solution.

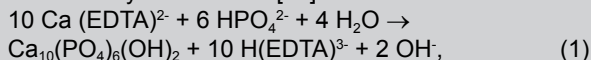
Składnik Component	Ilość [g] Amount [g]
NaCl	8.00
NaHCO ₃	0.35
KCl	0.40
KH ₂ PO ₄	0.06
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.10
CaCl ₂	0.14
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0.06
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.06
Woda / Water	1000

Some of the titanium samples were implanted with $5 \cdot 10^{16}$ ions per cm^2 Ca ions, on the home-made IFJ PAN implanter, at the energy of 25 keV, and then treated with the Hank's solution to determine the influence of Ca ion implantation on precipitation speed, uniformity and efficiency.

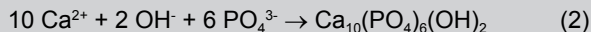
The as received coatings were examined by means of the high resolution, confocal Raman microspectroscopy using a Nicolet Almega XR spectrometer and X-ray diffraction (XRD) using Panalytical X'PERT PRO diffractometer.

Results and Discussion

In the EDTA containing solution, HA precipitation occurred as indicated by the reaction [21]:



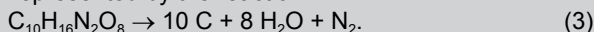
whereas in the Hank's solution the reaction was as follows:



The Raman spectra of hydroxyapatite coatings obtained from the Hank's solution and the solution containing EDTA are shown in FIG. 1.

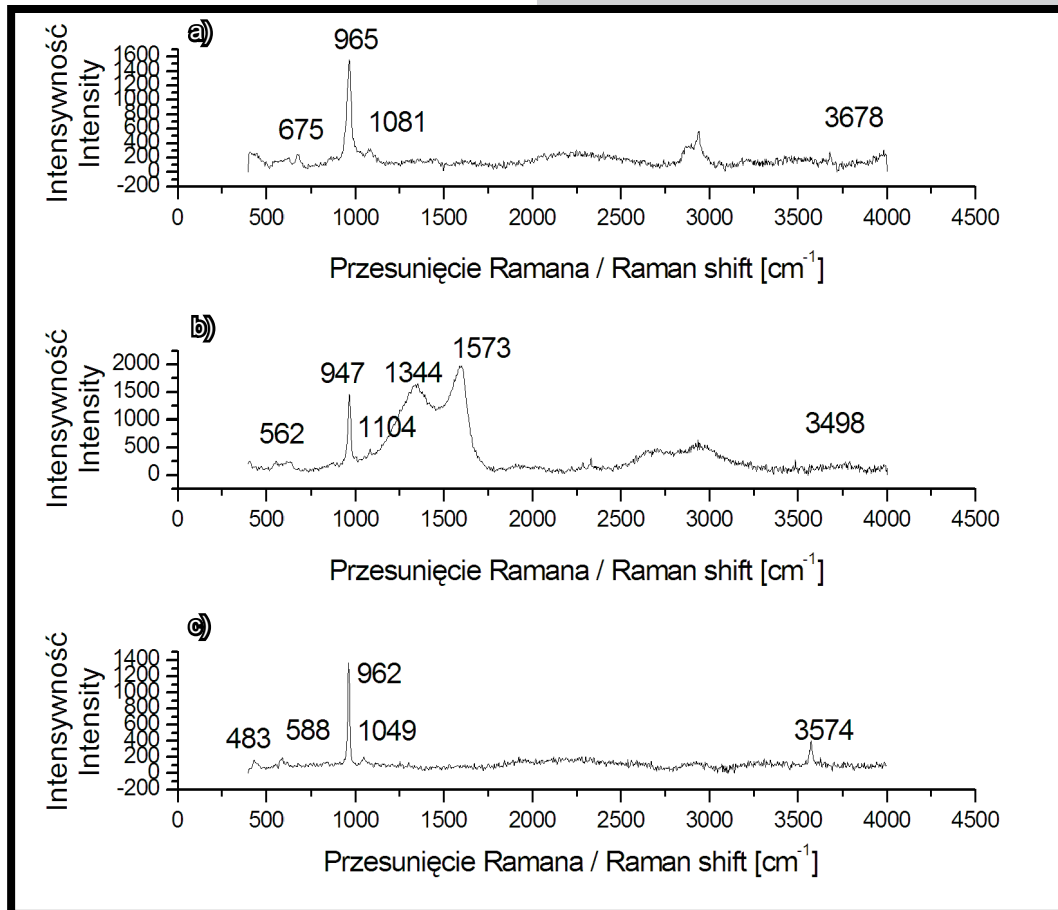
The bands associated with the vibrations of the molecular groups occurring in hydroxyapatite are: $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$, $\nu_2 \text{PO}_4^{3-}$, $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$, $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$ and $\nu_1 \text{OH}^-$ [9-16]. In TABLE 2 the main Raman lines from the HA samples are listed.

In all cases the Raman line assigned to the $\text{PO}_4^{3-} \nu_1$ (~960 cm^{-1}) was very intense and sharp. For HA obtained from the solution containing EDTA additional peaks at 1352 and 1600 cm^{-1} were observed. 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 represented by the reaction:



In the Ca-EDTA solutions the coatings were formed relatively fast (35-90 min) but they were always carbon-contaminated and showed very poor adhesion. Since they were spontaneously peeling off during the storage, they were not examined further. R.Z. LeGeros et al. [41,42] claim 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.

In the case of the Hank's solution, HA coating formation proceeded more slowly, with the expected dependence of the formation rate on the temperature. The coatings showed better durability than in the former case, so the samples are waiting for mechanical tests.



RYS. 1. Widma ramanowskie dostępnego na rynku HA (a), HA otrzymanego z roztworu Hanka (b), HA otrzymanego z roztworu zawierającego EDTA (c).
 FIG. 1. Raman spectra of the commercially available HA (a), HA obtained from Hank's solution (b), HA obtained from solution containing EDTA (c).

TABELA 2. Linie ramanowskie obserwowane dla próbek HA; vw – pasmo bardzo słabe, w – pasmo słabe, m – pasmo o średniej intensywności, s – pasmo o wysokiej intensywności.

TABLE 2. Raman lines observed for the HA samples; vw – very weak line, w – weak line, m – medium intensity line, s – strong line.

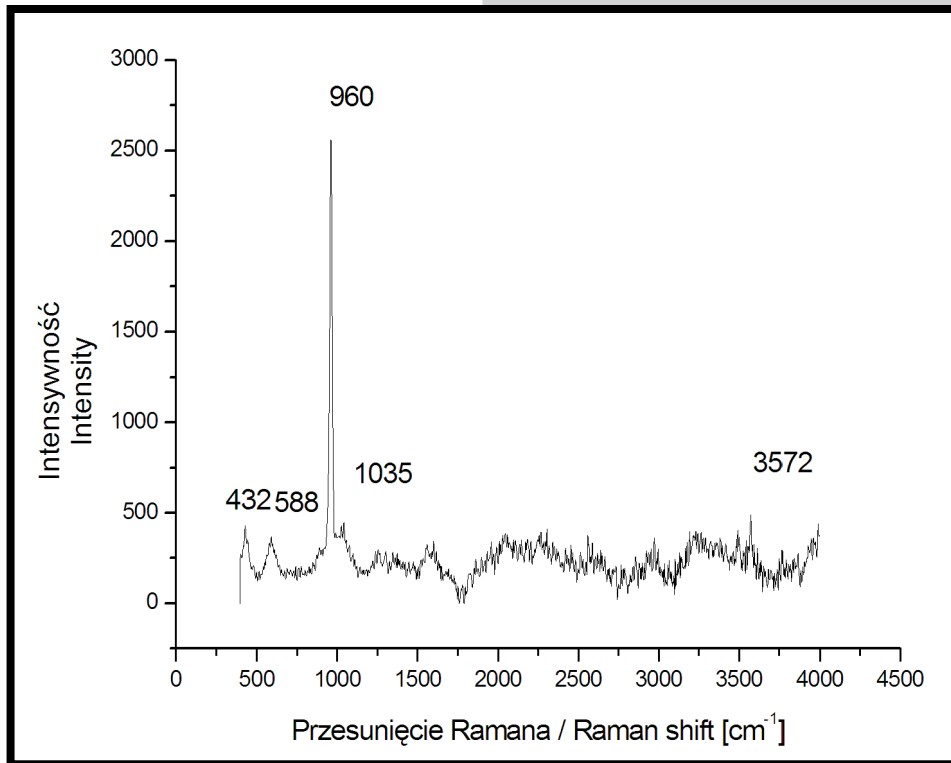
Wibracja Vibration	Odnosnik literaturowy References	Czysty HA Pure HA (Merck)	HA otrzymany z roztworu Hanka po implantacji jonami Ca HA obtained from Hank's solution after Ca ions implantation	HA otrzymany z roztworu Hanka HA obtained from Hank's solution	HA otrzymany z roztworu EDTA-Ca HA obtained from EDTA-Ca solution
$\text{PO}_4^{3-} \nu_2$	[33-40]	431 w	430 w	-	-
$\text{PO}_4^{3-} \nu_4$	[33-40]	591 w	588 w	-	526 vw
$\text{PO}_4^{3-} \nu_1$	[33-40]	962 s	960 s	966 s	967 s
$\text{PO}_4^{3-} \nu_3$	[33-40]	1049 w	1035 vw	1081 w	-
$\text{OH}^- \nu_1$	[34,35,37]	3575 m	3573 vw	3678 w	3565 vw

Chemiczne zaburzenie powłoki pasywacyjnej TiO_2 było korzystne z punktu widzenia procesu formowania powłoki – kiedy powierzchnia Ti była wytrawiana w mieszaninie HF i H_2O_2 , depozycja była bardziej wydajna (pod względem szybkości depozycji, grubości i jednorodności warstwy), chociaż jednorodność powłoki (obserwowana pod mikroskopem spektrometru Ramana) wciąż nie była satysfakcjonująca. Analiza XRD wykazała, że grubość i jednorodność warstw nie była wystarczająca, ponieważ główny przyczynik do widm XRD pochodził od substratu Ti.

Implantacja jonami Ca również zdaje się wspierać depozycję HA. Widmo ramanowskie HA otrzymanego z roztworu Hanka na substracie Ti implantowanym jonami Ca zostało pokazane na RYS. 2.

Chemical disturbance of the TiO_2 passivation layer was favourable for the coating process – when the Ti surface was etched in the HF and H_2O_2 mixture the deposition was more efficient (in terms of the deposition rate, coating thickness and uniformity), although coating uniformity (observed under the microscope of the Raman spectrometer) was still not satisfactory. The XRD analysis showed that the thickness and uniformity of the layers were not satisfactory as the main contribution to the XRD patterns arised from Ti substrate.

Ca ion implantation also seems to promote the HA deposition. The Raman spectrum of HA obtained from the Hank's solution on Ca ions implanted Ti substrate is shown in FIG. 2.



RYS. 2. Widmo ramanowskie HA otrzymanego z roztworu Hanka na substracie Ti imlantowanym wapniem.

FIG. 2. Raman spectrum of HA obtained from the Hank's solution on Ca ions implanted Ti substrate.

Wszystkie piki pojawiające się w przypadku analizy czystego HA pojawiają się w przypadku powłoki HA otrzymanej z roztworu Hanka na Ti implantowanym jonami Ca. Powłoki były bardziej jednorodne (oceniając na podstawie obrazu z mikroskopu optycznego), grubość powłok również wzrosła w porównaniu do syntezy na czystym Ti.

Wnioski

1. Przygotowanie substratu Ti odgrywa istotną rolę w osadzaniu HA. Implantacja jonami Ca wspiera formowanie powłok – ich jednorodność i grubość. Co więcej, częściowy rozkład pasywnej warstwy TiO_2 wspomaga strącanie HA na podłożu tytanowym.

2. Synteza hydrotermalna z użyciem roztworu zawierającego Ca-EDTA umożliwia uzyskanie warstwy HA w stosunkowo krótkim czasie. Jakkolwiek rozkład EDTA, którego w naszym eksperymencie nie można kontrolować, jak również słaba jakość otrzymanych powłok HA powodują, że ta metoda (A) nie jest rekomendowana do stosowania. Rozkład EDTA może skutkować zwiększoną rozpuszczalnością warstwy, co jest niekorzystne z punktu widzenia wszczepiania endoprotez stawowych.

3. Bardziej obiecująca jest metoda (B) otrzymywania warstw HA, więc dopracowanie jej warunków (temperatury, ciśnienia par, stężenia soli w roztworze) w celu poprawy jakości powłok będzie przedmiotem dalszych badań.

Podziękowania

Niniejsza praca była częściowo finansowana w ramach następujących projektów: ERA NET MNT/90/2006, 117/ERA/2006/2, „Nowa generacja biomateriałów opartych na tytanie”; SPO WKP_1/1.4.3/1/2004/90/90/186, „Nanotechnologia złożonych powłok dla specjalnych zastosowań medycznych i przemysłowych”.

All peaks appearing for pure HA can be observed for HA coating obtained from the Hank's solution on Ti implanted with Ca ions. The coatings were more uniform (assessing from optical microscope view) and the coating thickness also improved in comparison with synthesis on pure Ti.

Conclusions

1. Ti substrate preparation played an important role in HA deposition. Ca ion implantation promotes the HA coating formation – its uniformity and thickness. Moreover, TiO_2 passivation layer partial decomposition facilitates HA precipitation on titanium substrate.

2. Hydrothermal synthesis using Ca-EDTA solution enables obtaining HA coating in relatively short time. However, the decomposition of EDTA which could not be controlled in our experiment, as well as poor quality of the obtained HA coating, make the method (A) not recommendable. EDTA decomposition may result in increased solubility of the HA coating which is unfavourable for the prostheses implantation purpose.

3. The method (B) of HA deposition seems much more promising, so that adjusting its conditions (temperature, vapour-phase pressure, salt concentration in solution) to improve the quality of the coatings will be the subject of further investigations.

Acknowledgements

This work was partly supported by the following projects: ERA NET MNT/90/2006, 117/ERA/2006/2, „New generation of titanium based biomaterials”; SPO WKP_1/1.4.3/1/2004/90/90/186, „Nanotechnology of complex coatings for special medical and industrial application”.

- [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] Greenspan D.C.: Bioactive ceramic implant materials. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 4 (1999) 389-393.
- [6] Ducheyne P., Qiu Q.: Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 20 (1999) 2287-2303.
- [7] Ozeki K., Aoki H., Fukui Y.: Effect of pH crystallization of sputtered hydroxyapatite film under hydrothermal conditions at low temperature. *Journal of Material Science* 40 (2005) 2837-2842.
- [8] Choi J.-M., Kim H.-E., Lee I.-S.: Ion-beam-assisted deposition (IBAD) of hydroxyapatite coating layer on Ti based metal substrate. *Biomaterials* 21 (2000) 469-473.
- [9] Huang Y., Qu Y., Yang B., Li W., Zhang B., Zhang X.: In vivo biological responses of plasma sprayed hydroxyapatite coatings with an electric polarized treatment in alkaline solution. *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 2411-2416.
- [10] d'Haese R., Pawlowski L., Bigan M., Jaworski R., Martel M.: Phase evolution of hydroxyapatite coatings suspension plasma sprayed using variable parameters in simulated body fluid. *Surface and Coatings Technology* 204 (2010) 1236-1246.
- [11] Bai X., Sandukas S., Appleford M.R., Ong J.L., Rabiei A.: Deposition and investigation of functionally graded calcium phosphate coatings on titanium. *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 3563-3573.
- [12] Chen X-B, Li Y-C., Du Plessis J., Hodgson P.D., Wen C.: Influence of calcium ion deposition on apatite-inducing ability of porous titanium for biomedical applications. *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 1808-1820.
- [13] Ioku K., Kawachi G., Sasaki S., Fujimori H., Goto S.: Hydrothermal preparation of tailored hydroxyapatite. *Journal of Materials Science* 41 (2006) 1341-1344.
- [14] Liu F., Song Y., Wang F., Shimizu T., Igarashi K., Zhao L.: Formation characterization of hydroxyapatite on titanium by microarc oxidation and hydrothermal treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100 (2005) 100-104.
- [15] Liu F., Wang F., Shimizu T., Igarashi K., Zhao L.: Formation of hydroxyapatite on Ti-6Al-4V alloy by microarc oxidation and hydrothermal treatment. *Surface and Coatings Technology* 199 (2005) 220-224.
- [16] Liu F., Wang F., Shimizu T., Igarashi K., Zhao L.: Hydroxyapatite formation on oxide films containing Ca and P by hydrothermal treatment. *Ceramics International* 32 (2006) 527-531.
- [17] Huang P., Xu K., Han Y.: Hybrid process of microarc oxidation and hydrothermal treatment of titanium implant. *Journal of Porous Materials* 11 (2004) 41-45.
- [18] Byrappa K., Adschiri T.: Hydrothermal technology for nanotechnology. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* 53 (2007) 117-166.
- [19] Najdoski M.Z., Majhi P., Grozdanov I.S.: A simple chemical method for preparation of hydroxyapatite coatings on Ti_6Al_4V substrate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 12 (2001) 479-483.
- [20] 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.
- [21] Fujishiro Y., Nishino M., Sugimori A., Okuwaki A., Sato T.: Coating of hydroxyapatite on various substrates via hydrothermal reactions of $Ca(edta)^{2-}$ and phosphate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 12 (2001) 333-337.
- [22] 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.
- [23] Cui F.Z., Luo Z.S., Feng Q.L.: Highly adhesive hydroxyapatite coatings on titanium alloy formed by ion beam assisted deposition. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 8 (1997) 403-405.
- [24] Yoshinari M., Ohtsuka Y., Derand T.: Thin hydroxyapatite coating produced by the ion beam dynamic mixing method. *Biomaterials* 15 (1994) 529-535.
- [25] Cleries L., Fernandez-Pradas J.M., Sardin G., Morenza J.L.: Application of dissolution experiments to characterize the structure of pulsed laser-deposited calcium phosphate coatings. *Biomaterials* 20 (1999) 1401-1405.
- [26] Oliveira G.M., Ferraz M.P., Gonzalez P.G., Serra J., Leon B., Perez-Amor M., Monteiro F.: PLD bioactive ceramic films: the influence of $CaO-P_2O_5$ glass additions to hydroxyapatite on the proliferation and morphology of osteoblastic like-cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19 (2008) 1775-1785.
- [27] Cleries L., Martinez E., Fernandez-Pradas J.M., Sardin G., Esteve J., Morenza J.L.: Mechanical properties of calcium phosphate coatings deposited by laser ablation. *Biomaterials* 21 (2000) 967-971.
- [28] Hu J., Russell J.J., Ben-Nissan B.: Production and analysis of hydroxyapatite from Australian corals via hydrothermal process. *Journal of Materials Science Letters* 20 (2001) 85-87.
- [29] Pham M. T., Reuther H., Matz W., Mueller R., Steiner G., Oswald S., Zyganov I.: Surface induced reactivity for titanium by ion implantation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 11 (2000) 383-391.
- [30] Krupa D., Baszkiewicz J., Kozubowski J. A., Barcz A., Sobczak J. W., Biliński A., Lewandowska-Szumiel M., Rajchel B.: Effect of calcium-ion implantation on the corrosion resistance and biocompatibility of titanium. *Biomaterials* 22 (2001) 2139-2151.
- [31] Pecheva E. V., Pramatarova L. D., Maitz M. F., Pham M. T., Kondyuirin A. V.: Kinetics of hydroxyapatite deposition on solid substrates modified by sequential implantation of Ca and P ions Part I. FTIR and Raman spectroscopy study. *Applied Surface Science* 235 (2004) 176-181.
- [32] 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.
- [33] Aminzadeh A.: Fluorescence bands in the FT-Raman spectra of some calcium minerals. *Spectrochimica Acta Part A* 53 (1997) 693-697.
- [34] Cusco R., Guitian F., de Aza S., Artus L.: Differentiation between hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate by means of μ -Raman spectroscopy. *Journal of the European Ceramic Society* 18 (1998) 1301-1305.
- [35] Penel G., Leroy G., Rey C., Sombret B., Huvenne J.P., Bres E.: Infrared and Raman microspectrometry study of fluor-fluor-hydroxy and hydroxy-apatite powders. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 8 (1997) 271-276.
- [36] Shimoyama M., Ninomiya T., Ozaki Y.: Nondestructive discrimination of ivories and prediction of their specific gravity by Fourier-transform Raman spectroscopy and chemometrics. *Analyst* 128 (2003) 950-953.
- [37] de Mul F.F.M., Hottenhuis M.H.J., Bouter P., Greve J., Arends J., ten Bosch J.J.: Micro-Raman line broadening in synthetic carbonated apatite. *Journal of Dental Research* 65 (1986) 437-440.
- [38] 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.
- [39] Silva C.C., Sombra A.S.B.: Raman spectroscopy measurements of hydroxyapatite obtained by mechanical alloying. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 65 (2004) 1031-1033.
- [40] Penel G., Delfosse C., Descamps M., Leroy G.: Composition of bone and apatitic biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy. *Bone* 36 (2005) 893-901.
- [41] 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.
- [42] 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.