

# Sonokemijska sinteza nanostrukturiranog hidroksiapatita biološkog podrijetla

---

**Tonković, Martina Eva**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Mechanical Engineering and Naval Architecture / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet strojarstva i brodogradnje**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:235:921957>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-29**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Mechanical Engineering and Naval Architecture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET STROJARSTVA I BRODOGRADNJE

# ZAVRŠNI RAD

**Martina Eva Tonković**

Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET STROJARSTVA I BRODOGRADNJE

**ZAVRŠNI RAD**  
**SONOKEMIJSKA SINTEZA**  
**NANOSTRUKTURIRANOG HIDROKSIAPATITA**  
**BIOLOŠKOG PODRIJETLA**

**Mentor**

**Prof. dr. sc. Lidija Ćurković**

**Martina Eva Tonković**

Zagreb, 2017.

## Sažetak

U ovom radu pripremljeni su uzorci hidroksiapatita (HAp) dobivenog iz ljusaka kokošnjih jaja sonokemijskom metodom.

Ljuske jajeta oprane su, osušene i usitnjene u planetarnom kugličnom mlinu te toplinski obrađivane na temperaturi od 1000 °C. Ta temperatura određena je pomoću TGA i DSC analize (termogravimetrijskom analizom i diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom), kao temperatura na kojoj je sav kalcijev karbonat ( $\text{CaCO}_3$  – kalcit) transformirao u kalcijev oksid ( $\text{CaO}$  – vapno).

Nastali kalcijev oksid pomiješan je s destiliranom vodom pri čemu je reakcijom hidrolize nastao kalcijev hidroksid ( $\text{Ca(OH)}_2$  – portlandit). Miješanjem dobivenog portlandita s odgovarajućom količinom fosfatne kiseline uz podešavanje pH-vrijednosti amonijakom, nakon tretmana ultrazvučnom sondom nastao je hidroksiapatit.

Analiziran je fazni sastav dobivenih uzoraka pomoću XRD analize, te je ispitana morfologija pomoću SEM analize. Veličina kristalita uzoraka hidroksiapatita izračunata je pomoću Scherrerove metode.

Svi sonokemijski obrađeni uzorci rezultirali su potpuno hidroksiapatitnom strukturom s veličinom kristalita u nanometarskom području. Najsitniji kristaliti (12 nm) dobiveni su pri sonokemijskom tretmanu smjese  $\text{Ca(OH)}_2$  i fosfatne kiseline omjera Ca/P od 1,6667 u trajanju od 30 minuta.

## **Izjava i zahvala**

Izjavljujem da sam završni rad na temu “Sonokemijska sinteza nanostrukturiranog hidroksiapatita biološkog podrijetla” izradila samostalno, koristeći navedenu literaturu i znanje stečeno tijekom studija.

Prvenstveno se želim zahvaliti mentorici prof. dr. sc. Lidiji Ćurković na strpljenju, podršci i prilici za pisanje ovog rada. Svojim vodstvom, stručnim savjetima te komentarima značajno je unaprijedila kvalitetu ovog rada.

Također, zahvaljujem se profesoru dr. sc. Stanislavu Kurajici na stručnoj pomoći i savjetima.



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET STROJARSTVA I BRODOGRADNJE



Središnje povjerenstvo za završne i diplomske ispite  
Povjerenstvo za završne ispite studija strojarstva za smjerove:  
proizvodno inženjerstvo, računalno inženjerstvo, industrijsko inženjerstvo i menadžment, inženjerstvo  
materijala i mehatronika i robotika

|                                     |
|-------------------------------------|
| Sveučilište u Zagrebu               |
| Fakultet strojarstva i brodogradnje |
| Datum: 09-02-2017 Prilog            |
| Klasa: 602-04/17-6/4                |
| Ur.broj: 15-9703-17-32              |

## ZAVRŠNI ZADATAK

Student: **Martina Eva Tonković** Mat. br.: 50102556566

Naslov rada na hrvatskom jeziku: **Sonokemijska sinteza nanostrukturiranog hidroksiapatita biološkog podrijetla**

Naslov rada na engleskom jeziku: **Sonochemical synthesis of nanostructured bio-based hydroxyapatite**

Opis zadatka:

Kalcijevi ortofosfati mogu se različitim postupcima sinteze dobiti od biootpada, kao što su ljuske jajeta. Ljuske jajeta se sastoje pretežno od kalcijevog karbonata (oko 94%), kojeg se može određenim postupcima transformirati u neke tipove kalcijevog ortofosfata. U radu je osobit fokus stavljen na hidroksiapatit - oblik kalcijevog ortofosfata kemijske formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  koji je po sastavu najbliži prirodnoj kosti. Mogućnost uporabe biootpada pruža osim jeftinog osnovnog materijala i niže troškove zbrinjavanja otpada. Ljuske jajeta su osobito dobar izvor jer se u prehrambenoj industriji jaja koriste u velikim količinama, a milijuni tona ljusaka završavaju u otpadu svake godine.

U ovom je završnom radu potrebno:

- sintetizirati nanočestice hidroksiapatita sonokemijskim postupkom,
- kao prekursor koristiti kalcij karbonat biološkog podrijetla iz ljusaka kokošnjih jaja i fosfatnu kiselinu,
- sinterirati precipitate na različitim temperaturama,
- odrediti fazni sastav i veličinu kristalita HAP dobivenog toplinskom obradom na različitim temperaturama te prikazati ovisnost veličine čestica o temperaturi toplinske obrade,
- veličinu kristalita izračunati pomoću Scherrerove jednadžbe.

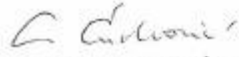
U radu je potrebno navesti korištenu literaturu i eventualno dobivenu pomoć.

Zadatak zadan:  
30. studenog 2016.


Rok predaje rada:  
1. rok: 24. veljače 2017.  
2. rok (izvanredni): 28. lipnja 2017.  
3. rok: 22. rujna 2017.

Predviđeni datumi obrane:  
1. rok: 27.2. - 03.03. 2017.  
2. rok (izvanredni): 30. 06. 2017.  
3. rok: 25.9. - 29. 09. 2017.

Zadatak zadao:

  
Prof. dr. sc. Lidija Čurković

v.d. predsjednika Povjerenstva:

  
Izv. prof. dr. sc. Branko Bauer

## Sadržaj

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| Popis slika.....                                         | 3  |
| Popis tablica.....                                       | 4  |
| 1. Uvod.....                                             | 5  |
| 2. Teorijski dio .....                                   | 6  |
| 2.1. Kalcijevi ortofosfati.....                          | 6  |
| 2.1.1. Opća svojstva.....                                | 6  |
| 2.1.2. Pojavni oblici.....                               | 7  |
| 2.2. Hidroksiapatit .....                                | 9  |
| 2.3. Sinteza kalcijevih ortofosfata .....                | 11 |
| 2.3.1. Prekursor kalcija .....                           | 11 |
| 2.3.2. Prekursor fosfora .....                           | 13 |
| 2.3.3. Puffer .....                                      | 13 |
| 2.4. Metode sinteze.....                                 | 14 |
| 2.4.1. Metoda precipitacijskog taloženja.....            | 14 |
| 2.4.2. Ultrazvučna (sonokemijska) metoda .....           | 15 |
| 2.4.4. Hidrotermalna metoda .....                        | 16 |
| 2.4.5. Sol gel metoda .....                              | 16 |
| 2.5. Metode analize.....                                 | 17 |
| 2.5.1. Termogravimetrijska analiza – TGA.....            | 17 |
| 2.5.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija - DSC..... | 18 |
| 2.5.3. Pretražna elektronska mikroskopija - SEM.....     | 19 |
| 2.5.4. Rendgenska difrakcijska analiza - XRD.....        | 20 |
| 2.5.5. Scherrerova metoda .....                          | 21 |
| 2.6. Morfologija čestica .....                           | 22 |
| 2.7. Veličina čestica.....                               | 23 |
| 3. Eksperimentalni dio.....                              | 24 |

|      |                                                           |    |
|------|-----------------------------------------------------------|----|
| 3.1. | Dobivanje kalcijevog oksida – CaO .....                   | 24 |
| 3.2. | Sinteza kalcijevog hidroksida - Ca(OH) <sub>2</sub> ..... | 27 |
| 3.3. | Sonokemijska sinteza hidroksiapatita.....                 | 28 |
| 4.   | Rezultati i rasprava.....                                 | 30 |
| 4.1. | Rezultati TGA i DSC analize .....                         | 30 |
| 4.2. | Rezultati XRD analize .....                               | 32 |
| 4.3. | Rezultati SEM analize .....                               | 34 |
| 4.4. | Izračun veličine kristalita Scherrerovom metodom.....     | 36 |
| 5.   | Zaključak.....                                            | 38 |
|      | Literatura .....                                          | 39 |



## Popis slika

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1. Kristalna struktura hidroksiapatita. A) Sivom bojom su prikazani koordinacijski poliedri kationa Ca koje povezuju žuti $\text{PO}_4$ tetraedri. B) Plavom bojom prikazani su kationski položaji Ca. Crvenom bojom prikazani su atomi kisika, a ružičastom $\text{X}^-$ anioni [2] ..... | 9  |
| Slika 2. Poprečni presjek ljuske jajeta [8] .....                                                                                                                                                                                                                                                | 12 |
| Slika 3. Fosfatna kiselina [8] .....                                                                                                                                                                                                                                                             | 13 |
| Slika 4. Prikaz jediničnog događaja kavitacijske erozije [15] .....                                                                                                                                                                                                                              | 15 |
| Slika 5. Diferencijalni pretražni kalorimetar Mettler Toledo .....                                                                                                                                                                                                                               | 18 |
| Slika 6. Difraktogrami istog uzorka na različitim uređajima - dolazi do prividnog proširenja peaka uslijed nesigurnosti uređaja [21] .....                                                                                                                                                       | 21 |
| Slika 7. SEM prikaz: a), c), e) sferičnih čestica HAp i b), d), f) igličastih čestica HAp [22] .....                                                                                                                                                                                             | 22 |
| Slika 8. Usitnjavanje osušenih ljusaka jajeta u keramičkom tarioniku .....                                                                                                                                                                                                                       | 24 |
| Slika 9. Usitnjavanje ljusaka jajeta u planetarnom kugličnom mlinu .....                                                                                                                                                                                                                         | 25 |
| Slika 10. Usitnjene ljuske jajeta: (A) $\text{CaCO}_3$ - prije toplinske obrade; (B) $\text{CaO}$ - nakon toplinske obrade pri $1000\text{ }^\circ\text{C}$ .....                                                                                                                                | 25 |
| Slika 11. Dijagram toplinske obrade usitnjenih ljusaka jajeta .....                                                                                                                                                                                                                              | 26 |
| Slika 12. Sinteza kalcijevog hidroksida na magnetnoj miješalici .....                                                                                                                                                                                                                            | 27 |
| Slika 13. Tretiranje smjese kalcijevog hidroksida i fosfatne kiseline ultrazvučnom sondom Hielscher UP400S .....                                                                                                                                                                                 | 29 |
| Slika 14. TGA (plava linija) i DSC (zelena linija) ljusaka jajeta .....                                                                                                                                                                                                                          | 30 |
| Slika 15. XRD analiza uzoraka a) ljusaka jaja; b) $\text{CaO}$ nastalog toplinskom obradom ljusaka jajeta i c) kalcijevog hidroksida .....                                                                                                                                                       | 32 |
| Slika 16. XRD analiza 5 šarži hidroksiapatita sonokemijski tretiranog u različitom trajanju .....                                                                                                                                                                                                | 33 |
| Slika 17. SEM analiza uzorka iz 0. šarže .....                                                                                                                                                                                                                                                   | 34 |
| Slika 18. SEM analiza uzorka iz 4. šarže .....                                                                                                                                                                                                                                                   | 35 |
| Slika 19. Primjer obrade peaka u slučaju uzorka iz 2. šarže .....                                                                                                                                                                                                                                | 37 |

## **Popis tablica**

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| Tablica 1. Pojavni oblici kalcijevih ortofosfata [3, 4] .....    | 7  |
| Tablica 2. Izračun veličine kristalita Scherrerovom metodom..... | 36 |

## 1. Uvod

U današnje vrijeme medicina omogućuje sve duži životni vijek, što dovodi do potrebe za obnavljanjem pojedinih dijelova tijela umjetnim putem jer se oni starenjem sve sporije prirodno obnavljaju. Čovjekov koštano-zglobni sustav je idealan primjer za to.

Koštano-zglobni sustav podvrgnut je konstantnom trošenju od samog početka života i podložan je ozljedama uslijed nepravilnog držanja i nesreća. Čak i u mladosti, obnavlja se relativno sporo, a ponekad uopće ne može obnoviti ozlijeđeni dio. Oko 40. godine života proizvodnja stanica zaduženih za obnavljanje – osteoblasta – opada toliko da ne može pratiti trošenje. To tokom narednih godina dovodi do smanjenja gustoće koštanog tkiva, njegovog propadanja te povećane krhkosti, koja se javlja oko 60. godine života.

Kada uzmemo u obzir da je prosječna životna dob dosegla osamdesetak godina, jasna je potreba za umjetnim materijalima koji mogu osigurati dugotrajniju funkcionalnost koštano-zglobnog sustava [1].

U tu svrhu često se koriste titanske proteze i vijci, ali sve je popularnija uporaba kalcijevih ortofosfata – tvari sastava sličnog kosti, koje potpomažu prirodnu obnovu kosti i stvaranje osteoblasta. Također su česte i kombinacije – plazmatski nanešeni slojevi kalcijevih ortofosfata (osobito hidroksiapatita) na titanske proteze.

## 2. Teorijski dio

### 2.1. Kalcijevi ortofosfati

Kalcijevi ortofosfati su vrsta biokeramike koja se u prirodi pojavljuje u različitim formama – kao amorfne strukture ili minerali. 85% prirodnih kalcijevih ortofosfata su fosforiti, a ostalih 15% apatiti. Apatiti (Hap, Fap i Oap) imaju strukturu koju se može opisati kao heksagonalnu mrežu  $PO_4$  tetraedara sa kalcijem u intersticijskim položajima i kolonama  $X^-$  ( $OH^-$ ,  $F^-$  i  $Cl^-$ ) iona orijentiranim duž kristalografske osi  $c$ . Ti anioni položajem i vrstom određuju tip apatita. [2, 3]

Kalcijevi ortofosfati biološkog podrijetla su glavna komponenta kalcificiranih tkiva kod sisavaca, te čine većinu sirovine za proizvodnju fosfatnih goriva [4].

#### 2.1.1. Opća svojstva

Slabo su topljivi u vodi i netopljivi su u bazičnim otopinama (bitno kod primjene u ljudskom tijelu, koje ima blago bazičan pH oko 7,4). Lako su topljivi u kiselinama. U čistom stanju su bijele boje (dok su u prirodi uglavnom obojeni uslijed nečistoća).

Za primjenu u medicini bitna su svojstva poroznost i osteokonduktivnost. Poroznost je sposobnost apatita da u sastav uključi veći dio periodnog sustava, po potrebi što omogućuje obogaćivanje okolnog tkiva potrebnim ionima. Osteokonduktivnost je svojstvo stvaranja podloge za nastanak nove kosti i podržavanje stvaranja osteoblasta [4, 5].

## 2.1.2. Pojavni oblici

Tablica 1. Pojavni oblici kalcijevih ortofosfata [3, 4]

| Molarni omjer Ca/P | Spoj                                                        | Formula                                                                                                       | Topljivost g/L, pri 25 °C, $-\log(K_s)$ | Topljivost pri 25 °C, g/L | Stabilna pH vrijednost i vodenih otopina pri 25 °C |
|--------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------|
| 0,5                | Monokalcijev fosfat monohidrat (MCPM)                       | $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$                                                  | 1,14                                    | ~18                       | 0,0-2,0                                            |
| 0,5                | Monokalcijev fosfat anhidrid (MCPA)                         | $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$                                                                          | 1,14                                    | ~17                       | [c]                                                |
| 1,0                | Dikalcijev fosfat dihidrat (DCPD), mineral brushit          | $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$                                                                    | 6,59                                    | ~0,088                    | 2,0-6,0                                            |
| 1,0                | Dikalcijev fosfat anhidrid (DCPA), mineral monetit          | $\text{CaHPO}_4$                                                                                              | 6,9                                     | ~0,048                    | [c]                                                |
| 1,33               | Oktokalcijev fosfat (OCP)                                   | $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$                                        | 63,6                                    | ~0,0081                   | 5,5-7,0                                            |
| 1,5                | $\alpha$ -trikalcijski fosfat ( $\alpha$ -TCP)              | $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$                                                                           | 2,5                                     | ~0,0025                   | [a]                                                |
| 1,5                | $\beta$ -trikalcijski fosfat ( $\beta$ -TCP)                | $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$                                                                            | 28,9                                    | ~0,0005                   | [a]                                                |
| 1,0-2,2            | Amorfni kalcijev fosfat (ACP)                               | $\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ,<br>$n = 3-4,5; 15-20\% \text{H}_2\text{O}$ | [b]                                     | [b]                       | ~5-12 [d]                                          |
| 1,5-1,67           | Kalcijem osiromašen hidroksiapatit (CDHA) [e]               | $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ [f]                                    | ~85,1                                   | ~0,0094                   | 6,5-9,5                                            |
| 1,67               | Hidroksiapatit (HA, HAp ili OHAp)                           | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$                                                                  | 116,8                                   | ~0,0003                   | 9,5-12                                             |
| 1,67               | Fluorapatit (FA ili FAp)                                    | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$                                                                     | 120                                     | ~0,0002                   | 7,0-12,0                                           |
| 1,67               | Oksiapatit (OA ili OAp)                                     | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$                                                                       | ~69                                     | ~0,087                    | [a]                                                |
| 2,0                | Tetrakalcijev fosfat (TTCP ili TetCP), mineral hilgenstokit | $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$                                                                          | 38-44                                   | ~0,0007                   | [a]                                                |

[a] Navedene spojeve nije moguće precipitirati iz vodenih otopina

[b] Nije moguće precizno izmjeriti. Pronađene su sljedeće vrijednosti: 25,7±0,1 (pH=7,40), 29,9±0,1 (pH=6,00), 32,7±0,1 (pH=5,28). Komparativnom analizom topljivosti u kiselom puferu dobiveno je: ACP>> $\alpha$ -TCP>> $\beta$ -TCP>CDHA>>HA>FA

[c] Stabilan na temperaturama preko 100 °C

[d] Uvijek metastabilan

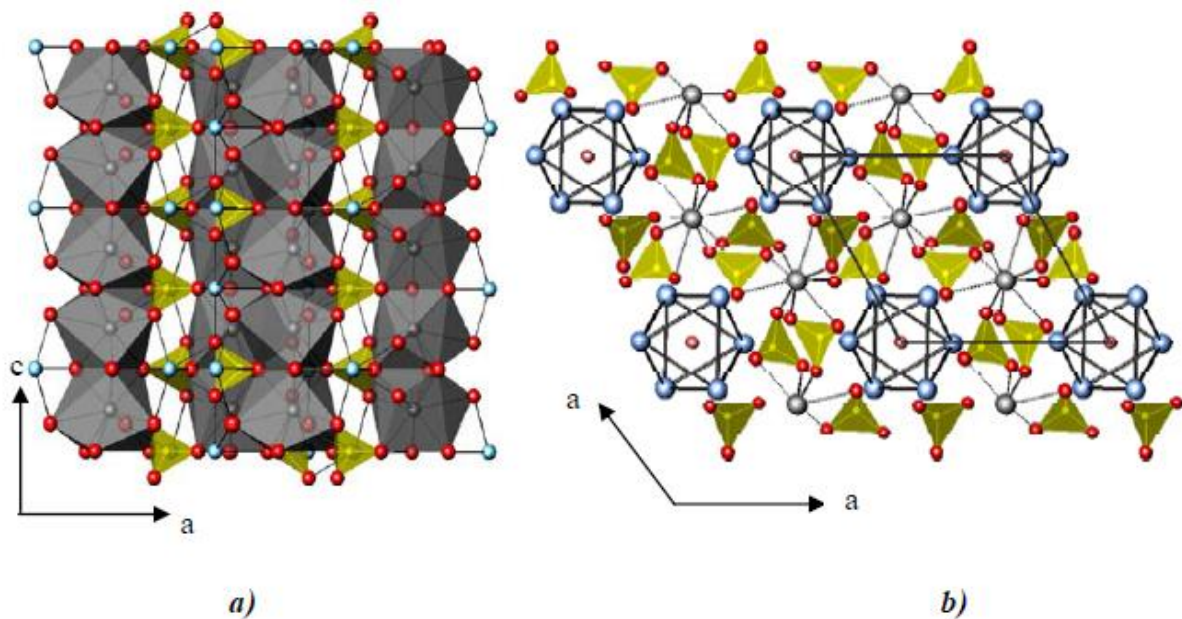
[e] Ponekad se umjesto CDHA koristi naziv precipitirani HAp

[f] U slučaju kada je x=1 (granični slučaj gdje je Ca/P=1,5) kemijska formula CDHA glasi:  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$ .

Postoji trinaest poznatih pojava oblika kalcijevih ortofosfata (Tablica 1). Razlike u njihovim svojstvima primarno proizlaze iz omjera kalcija i fosfora – takozvanog Ca/P omjera. Ca/P omjer u prirodnoj kosti je 1,66 tako da najbližnja svojstva kosti ima hidroksiapatit (kemijske formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , sa istim Ca/P omjerom što ga čini najpoželjnijim oblikom. Osim hidroksiapatita, u medicinske svrhe su upotrebljivi svi oblici čiji je Ca/P omjer između 1 i 2. Taj omjer je bitno poznavati jer utječe na pH, odnosno topljivost pojedinog kalcijevog ortofosfata. [4, 6]

## 2.2. Hidroksiapatit

Kemijska formula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (ispravnija, ali rjeđe korištena formula je  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  – proširena verzija koristi se da bi se naznačilo da se kristalna jedinica sastoji od dvije molekule), u literaturi često označavan kao HA ili HAp, hidroksiapatit je drugi po redu najstabilniji (iza fluorapatita) i najmanje topljiv oblik kalcijevih ortofosfata. Za razliku od fluorapatita, ni u većim količinama nije otrovan za živa bića te je najbližnji kemijskom sastavu anorganskog dijela kosti.



Slika 1. Kristalna struktura hidroksiapatita. A) Sivom bojom su prikazani koordinacijski poliedri kationa Ca koje povezuju žuti  $\text{PO}_4$  tetraedri. B) Plavom bojom prikazani su kationski položaji Ca. Crvenom bojom prikazani su atomi kisika, a ružičastom  $\text{X}^-$  anioni [2]

Čisti HAp nikada se ne pojavljuje u prirodi jer zbog apatitne strukture ima veliku sposobnost uključivanja drugih elemenata u svoj sastav. Stoga se u prirodi pojavljuje kao obojeni mineral koji sadrži druge elemente. Zbog te sposobnosti hidroksiapatit biološkog podrijetla ima prednost pred savršeno čistim proizvodom – većina bioloških prekursora sadrži neke elemente u tragovima koji u manjoj količini poboljšavaju svojstva hidroksiapatita dok bi u većim količinama u tijelu izazvali negativne reakcije.

Svi literaturni izvori slažu se oko 4 najbitnija svojstva hidroksiapatita, a to su:

- **biokompatibilnost** – svojstvo uklapanja u organizam bez negativne reakcije
- **bioaktivnost** – svojstvo reagiranja s okolinom u organizmu – spajanje s postojećim tkivom
- **osteokonduktivnost** – svojstvo pomaganja obnavljanja prirodne kosti
- **netoksičnost** – svojstvo da ne izaziva upale [2-7]

S obzirom na nabrojana svojstva, područje primjene je široko. Osim prevlaka na titanskim protezama i umjetnim zglobovima, hidroksiapatit primjenjuje se kao ispuna pri oštećenjima kostiju kod ortopedskih i maksilofacijalnih operacija, te kod zahvata na kralježnici i pri popravku zuba. Koristi se i u zubnim pastama za remineralizaciju zuba, te za obnavljanje nakon izbjeljivanja zuba. Upotrebljava se i za dostavu lijekova ili genske terapije do željenog mjesta u tijelu.



## 2.3.Sinteza kalcijevih ortofosfata

Za sintezu kalcijevih ortofosfata, potrebni su prekursor kalcija, prekursor fosfora te pufer, koji služi za prilagodbu pH vrijednosti tokom sinteze.

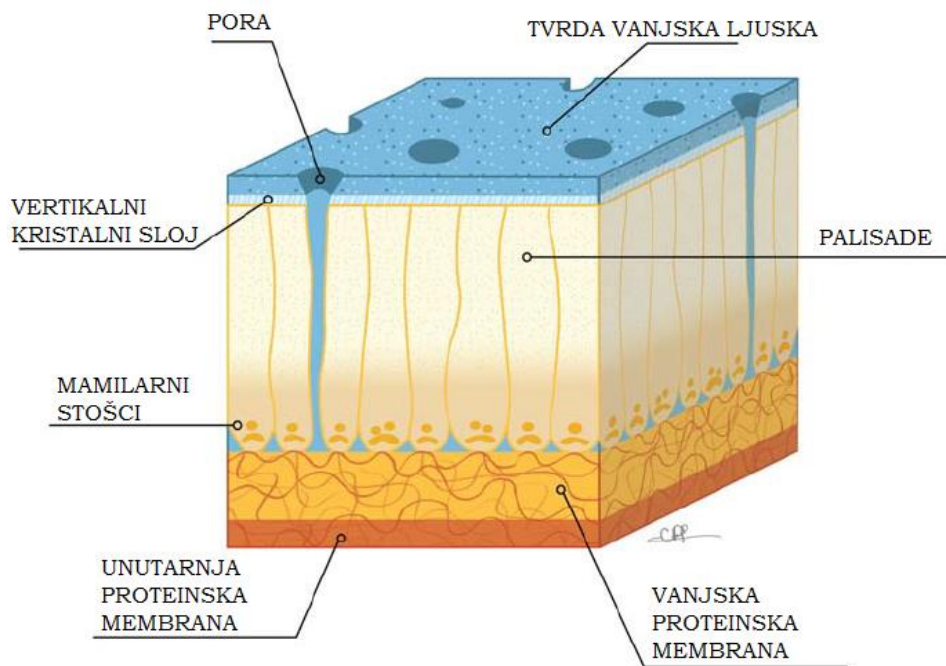
### 2.3.1. Prekursor kalcija

Prednost kalcijevih ortofosfata je što ih je moguće različitim postupcima sinteze dobiti iz većine tvari koje sadrže kalcij, kao što su na primjer ljuske jajeta, školjke, koralji ili goveđe kosti. To su prekursori kalcija, koji se sastoje se pretežno od kalcijevog karbonata, kojeg se uz određene postupke transformacije i dodatak fosfora može transformirati u kalcijev ortofosfat. Postignuti tip kalcijevog ortofosfata ovisi o omjeru kalcija i dodanog fosfora te o korištenom postupku. Prije sinteze potrebno je kalcijev karbonat prevesti u kalcijev hidroksid ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) postupkom hidrolize.

Korištenje ljusaka jaja također smanjuje troškove njihovog odlaganja, a lako su dostupne – u prehrambenoj industriji jaja se koriste u velikim količinama i milijuni tona ljusaka završavaju u otpadu svake godine [6, 7].

Ljuska jajeta se, prema literaturnim podacima, sastoji od:

- 94% kalcijevog karbonata ( $\text{CaCO}_3$ )
- 1% magnezijevog karbonata
- 1% kalcijevog fosfata
- 4% organske tvari
- Kationa  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  te  $\text{Si}^{2+}$  u tragovima [6]

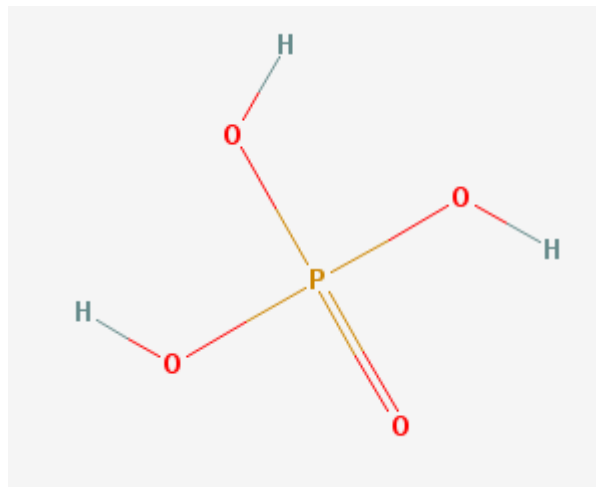


Slika 2. Poprečni presjek ljuske jajeta [8]

Slika 1 prikazuje poprečni presjek ljuske jajeta. Tvrda vanjska ljuska obično se ukloni tokom mehaničkog pranja jajeta prije uporabe, dok su mamilarni stošci te unutarnja i vanjska membrana većim dijelom proteinskog sastava. To znači da je većina kalcija koji je moguće upotrijebiti pohranjena u palisadama i vertikalnom kristalnom sloju. Elementi u tragovima javljaju se u omjerima ovisnim o podrijetlu jajeta, tj. prehrani kokoši [8].

### 2.3.2. Prekursor fosfora

Također je potreban prekursor fosfora, za koji se često koristi fosfatna kiselina ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). To je prozirna viskozna tekućina koja se lako otapa u vodi i dobro veže dvovalentne katione, kao što je kalcij –  $\text{Ca}^{2+}$ . Lako je dostupna jer ima široku uporabu, od obrade metala (gdje se koristi za čišćenje od oksidnih slojeva) do medicine (osobito u ortodontiji, gdje se koristi pri plombiranju, te u farmaciji) te u prehrambenoj industriji (poglavito kao sastojak gaziranih pića). Iako korozivna, nije otrovna. [9]



Slika 3. Fosfatna kiselina [8]

### 2.3.3. Puffer

Kao puffer, u literaturi se često navodi amonijak, odnosno amonijev hidroksid ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). To je bezbojna vodena otopina jakog i neugodnog mirisa, koja iritira oči. Koristi se zbog dostupnosti i bazičnosti, koja je bitna pri sintezi svih kalcijevih ortofosfata. Njegova pH vrijednost je oko 11. [10]

## 2.4. Metode sinteze

Osim izbora prekursora i pufera te omjera u kojem se miješaju kalcij i fosfor, na rezultat sinteze utječu i odabrana metoda te atmosfera i temperatura obrade. Neke metode daju znatno bolje rezultate od drugih u smislu veličine i oblika čestica, pri čemu se teži što sitnijim česticama – u nanometarskom području.

Najčešće korištene metode sinteze hidroksiapatita su:

- Metoda precipitacijskog taloženja,
- Ultrazvučna (sonokemijska) metoda,
- Hidrotermalna metoda,
- Metoda mikrovalnim zračenjem,
- Sol gel metoda [11].

### 2.4.1. Metoda precipitacijskog taloženja

Trenutno najpopularnija metoda sinteze hidroksiapatita (HAp), o kojoj je napravljeno najviše istraživanja. Također se naziva metodom mokre precipitacije. Ova metoda je popularna jer je brza, jednostavna, jeftina i njome je moguće u relativno kratkom roku proizvesti relativno velike količine HAp.

Variranjem parametara pri sintezi moguće je utjecati na veličinu i oblik čestica, te njihovu sklonost sljepljivanju. Ova metoda je korištena u prethodnom radu (Martina Eva Tonković – Sinteza hidroksiapatita iz ljuske jajeta precipitacijskom metodom, 2016) pri čemu su postignuti dobri rezultati – pločaste aglomerirane čestice hidroksiapatita u sub-mikrometarskom području.

Metoda se sastoji od dva koraka – prvi je miješanje prekursora kalcija i fosfora, uz održavanje konstantne pH vrijednosti u baznom području, pri čemu dolazi do nukleacije i precipitacije. Drugi korak je kalcinacija uslijed toplinske obrade precipitata na željenoj temperaturi. [4, 6, 11, 12]

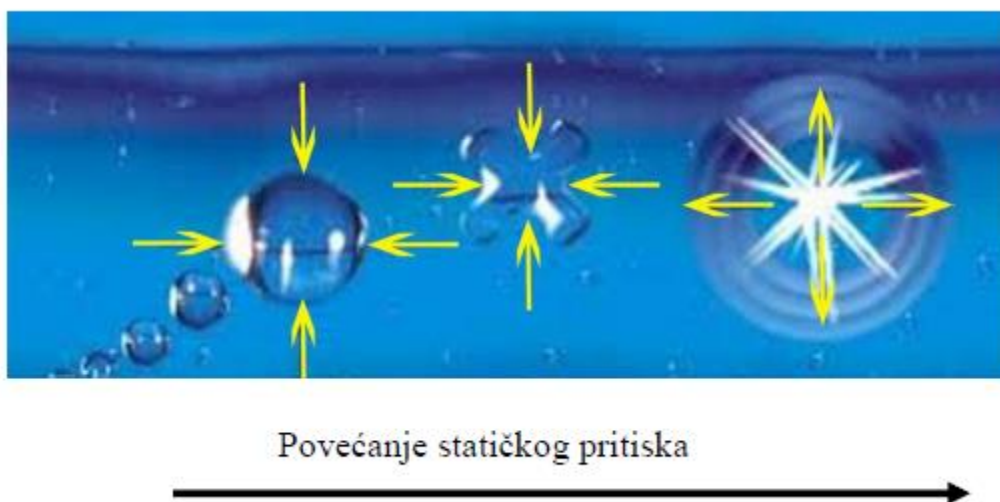
### 2.4.2. Ultrazvučna (sonokemijska) metoda

Ultrazvučna metoda temelji se na izazivanju kavitacije u vodenom mediju u kojem dolazi do formiranja, rasta i implozije sitnih mjehurića (slika 4). Ovaj proces stimulira reaktivnost tvari i rezultira ubrzavanjem heterogenih reakcija između krutih i tekućih reaktanata. Dio procesa su također i otapanje i precipitacija krutina, smanjenje veličine čestica reaktanata i površinska aktivacija intenzivnim miješanjem.

Kavitacijski mjehurići su vakuumski mjehurići, kod kojih vakuum stvaraju površina koja se brzo kreće s jedne strane i inertna tekućina sa druge. Tokom kolapsa kavitacijskih mjehurića, oslobađa se energija koja se manifestira kao intenzivno lokalno grijanje popraćeno ogromnim brzinama zagrijavanja i ohlađivanja, visok lokalni tlak i struje fluida velike brzine.

Postupak se sastoji od miješanja prekursora kalcija i fosfora te ultrazvučnom tretmanu određenog trajanja.

Fizikalna i kemijska svojstva sintetiziranog HAp ovise o frekvenciji i snazi ultrazvučne sonde, te trajanju postupka. Nastali HAp je visoke čistoće i veoma sitnih kristalita [4, 13, 14].



Slika 4. Prikaz jediničnog događaja kavitacijske erozije [15]

### **2.4.3. Metoda mikrovalnim zračenjem**

Prilikom tretiranja uzorka mikrovalnim zračenjem, sam uzorak postaje izvor topline, koja se generira unutar materijala uslijed titranja čestica. Toplina se razvija naglo, te omogućuje kraće trajanje sinteze i dublje prodiranje topline u materijal od metoda sa vanjskim izvorom topline. Ovisno o frekvenciji uređaja te trajanju obrade, moguće je postići različite veličine i oblike kristalita hidroksiapatita. [4]

### **2.4.4. Hidrotermalna metoda**

Hidrotermalna metoda sinteze materijala nastala je u 20. stoljeću, kao važna tehnologija sinteze keramičkih materijala direktno iz otopina.

Ova metoda sastoji se od miješanja prekursora u omjeru 1.667, dodavanjem pufera te držanja nastale otopine tokom određenog perioda na željenoj temperaturi u peći [11, 12].

### **2.4.5. Sol gel metoda**

Sol gel metoda je učinkovita za sintezu nanočestica hidroksiapatita zbog mogućnosti stroge kontrole parametara procesa. Moguće je postići miješanje kalcija i fosfora na molekularnoj razini, čime se znatno poboljšava kemijska struktura i čistoća nastalog hidroksiapatita. Istraživanja pokazuju da je hidroksiapatit sintetiziran sol-gel metodom veoma učinkovit u ostvarivanju stabilnosti između umjetne i prirodne kosti.

Sol se priprema otapanjem prekursora kalcija i fosfora u deioniziranom otapalu (npr. deioniziranoj vodi), zatim dozrijeva, te se nakon toga nastali gel suši i nakon toga kalcinira [4, 12].

## 2.5. Metode analize

### 2.5.1. Termogravimetrijska analiza – TGA

Termogravimetrijska analiza koristi se za mjerenje količine i brzine promjene mase materijala kao funkcije temperature ili vremena u kontroliranim uvjetima. Koristi se kada kod materijala dolazi do povećanja ili smanjenja mase uslijed reakcija poput oksidacije, dehidracije ili dekompozicije.

Sukladno tome, upotrebljava se kada je potrebno predvidjeti termostabilnost materijala na temperaturama do 1200°C, a moguće je odrediti i sastav. Iz TGA krivulje moguće je očitati postojanost materijala na oksidaciju i tok dekompozicije, udio vlage i nečistoća u uzorku, sastav višekomponentnih sustava i utjecaj reaktivnih i korozivnih medija na materijal.

Postoje dvije značajne temperature koje je moguće očitati iz TGA krivulje, a to su maksimalna temperatura na kojoj ne dolazi do gubitka mase uzorka i temperatura maksimalnog gubitka mase.

Oblik krivulje ovisi o raznim parametrima:

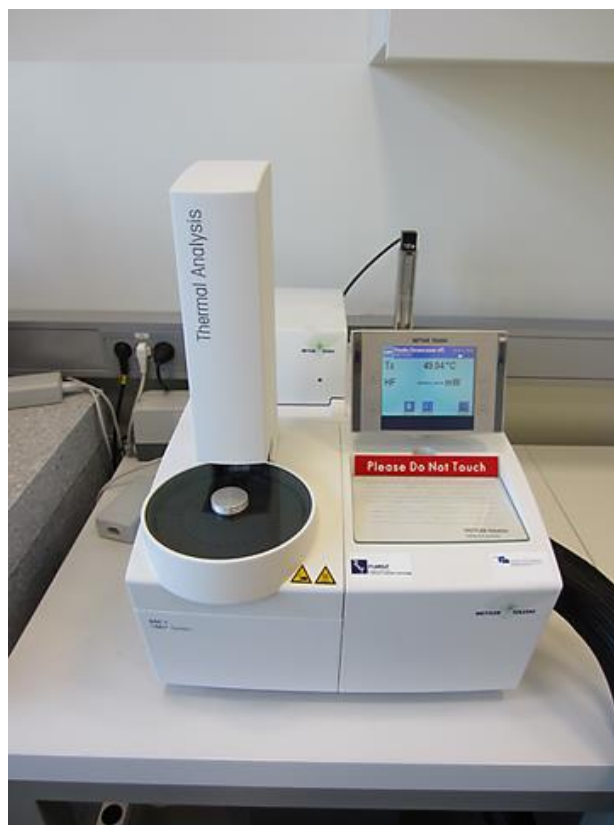
- temperaturi
- trajanju toplinske obrade
- plinskoj atmosferi pri kojoj se uzorak tretira
- protoku plina
- posudici u kojoj je uzorak – oblik, dimenzije i materijal od kojeg je izrađena mogu biti utjecajan faktor
- morfologiji i obliku uzorka [16]

### 2.5.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija - DSC

Kalorimetrija je jedina tehnika mjerenja entalpije procesa. Njome je moguće utvrditi vezu između temperature i fizikalnih svojstava uzoraka mjerenjem toplinskih svojstava materijala.

Za kalorimetrijska mjerenja najčešće se koristi diferencijalni pretražni kalorimetar, koji tijekom promjene temperature mjeri količinu topline koju uzorak prima ili otpušta. Dovođenjem energije uzorku i referentnom materijalu, njime se mjeri temperaturna razlika što omogućuje identifikaciju procesa kao endotermnog ili egzotermnog. DSC krivulja prikazuje toplinski tok izražen kao funkciju vremena ili temperature. Pokuse je bitno vršiti u kontroliranoj atmosferi da ne bi došlo do reakcije.

Kod nanočestica, DSC se najčešće koristi za određivanje endotermne točke, to jest staklišta ili egzotermne točke, to jest točke kristalizacije amorfnog materijala. Koristi se i za određivanje udjela amorfne i kristalne faze [5 6, 7, 11].



Slika 5. Diferencijalni pretražni kalorimetar Mettler Toledo



### 2.5.3. Pretražna elektronska mikroskopija - SEM

Pretražni elektronski mikroskop nastao je uslijed potrebe za uređajem kojim će se moći ispitivati relativno debeli uzorci, kroz koje nije moguće odaslati snop elektrona ili svjetlosti, ali s boljom rezolucijom nego metalurški svjetlosni mikroskop. Današnji SEM uređaji mogu doseći povećanje i do 1 000 000 puta, tj. doseći maksimalnu rezoluciju od 0,2 nm.

Funkcionira po principu skeniranja površine uzorka precizno fokusiranim elektronskim snopom. Katoda (izvor elektrona) i anoda nalaze se pod visokim naponom te se stoga između njih primarni elektroni ubrzavaju. Pritom prolaze kroz magnetske leće koje ih fokusiraju na površinu uzorka. Postupak se vrši u vakuumu.

Većina SEM uređaja koristi jedan od 3 najčešća principa prikupljanja podataka:

- SE - detekciju sekundarnih elektrona
- BSE - detekciju povratnog raspršenja (backscatter)
- EDS - energijsko disperzivnu spektrometriju

U slučaju detekcije sekundarnih elektrona, uređaj prikuplja podatke o elektronima otpuštenim sa površine uzorka uslijed energije dovedene elektronskim snopom. Detektor povratnog raspršenja prikuplja podatke o odbijenim elektronima iz početnog snopa. Energijska disperzivna spektrometrija bavi se mjerenjem energije koju elektroni emitiraju pri skoku iz ljuske više energije u ljusku niže energije, gdje popunjavaju mjesto izbijenog (sekundarnog) elektrona.

SEM analiza je bitna kod nanomaterijala jer je njome moguće dobiti podatke o morfologiji kristalita (veličina i oblik čestica), površini uzorka i raspodjeli elemenata (homogena ili heterogena raspodjela). Kod ispitivanja nanomaterijala obično je riječ o praškastim uzorcima, koje je potrebno fiksirati prije vakuumiranja komore [17, 18, 19].

#### **2.5.4. Rendgenska difrakcijska analiza - XRD**

Rendgenska difrakcijska analiza važna je disciplina koja govori o unutarnjem stanju (preciznije – o kemijskoj i kristalnoj strukturi) materijala. Koristi princip raspršivanja rendgenske zrake (koja je po prirodi elektromagnetski val – EMV) na svakom pojedinom atomu trodimenzijske kristalne rešetke.

Kod pravilno raspoređenog niza atoma u kristalnoj rešetki, dolazi do formiranja kuglastog vala za svaki atom u rešetki, pri čemu ti valovi međusobno interferiraju i izlaze iz materijala paralelno.

Kao rezultat ispitivanja nastaje difraktogram, koji primarno prikazuje. Analizom difraktograma pomoću Braggove jednadžbe određuju se razmaci između strukturnih dijelova kristala, a analizom pomoću Scherrerove metode određuje se veličina ispitivanih kristalita (ukoliko su manji od 500 nm).

XRD analiza koristi se pri identifikaciji elemenata i spojeva te određivanju njihovog udjela u smjesi, određivanju razmaka i prostornog rasporeda atoma (također i nepravilnosti u kristalnoj strukturi), određivanju veličine, oblika i orijentacije kristalita u uzorku te određivanju fazne pretvorbe uzorka [20].

### 2.5.5. Scherrerova metoda

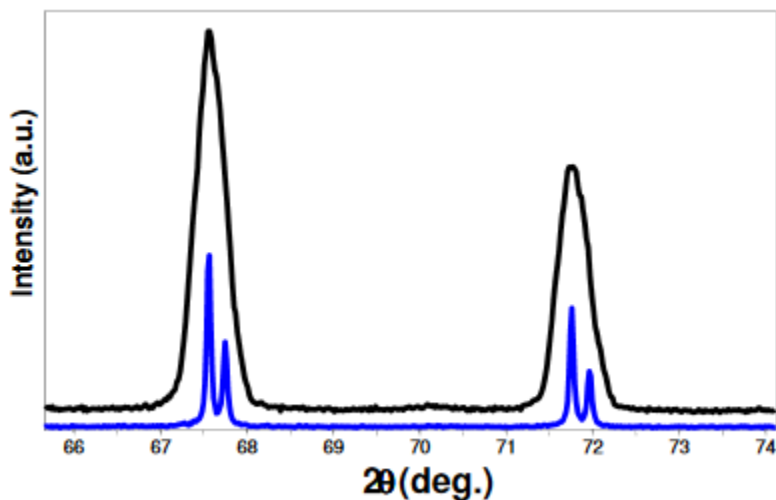
Scherrerova jednađba glasi  $B(2\theta) = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$ .

Pri tome je:

- B – širina na polovici visine peaka, odnosno vrha
- $\beta$  - veličina kristalita
- K – Scherrerova konstanta koja se koristi pri računanju veličine kristalita pojedinog materijala, varira od 0,62 do 2,08
- $\lambda$  - Valna duljina od 0,15405 nm – duljina Cu-K $\alpha$  radijacije koja se standardno koristi pri XRD

Veličina kristalita definirana je kao treći korijen volumena kristalita i pretpostavlja se da su svi kristaliti u uzorku istog oblika i veličine. Najčešće se pri korištenju Scherrerove metode pretpostavlja sferični oblik. Ukoliko je oblik poznat iz neke druge analize, moguće je prilagoditi Scherrerovu konstantu K radi dobivanja točnijeg rezultata.

Pri računanju je potrebno uzeti u obzir i instrumentalno proširenje pika, do kojeg dolazi uslijed nesavršenosti korištenog uređaja. Određuje ga se prilikom umjeravanja uređaja, ne tijekom analize uzorka. [21]



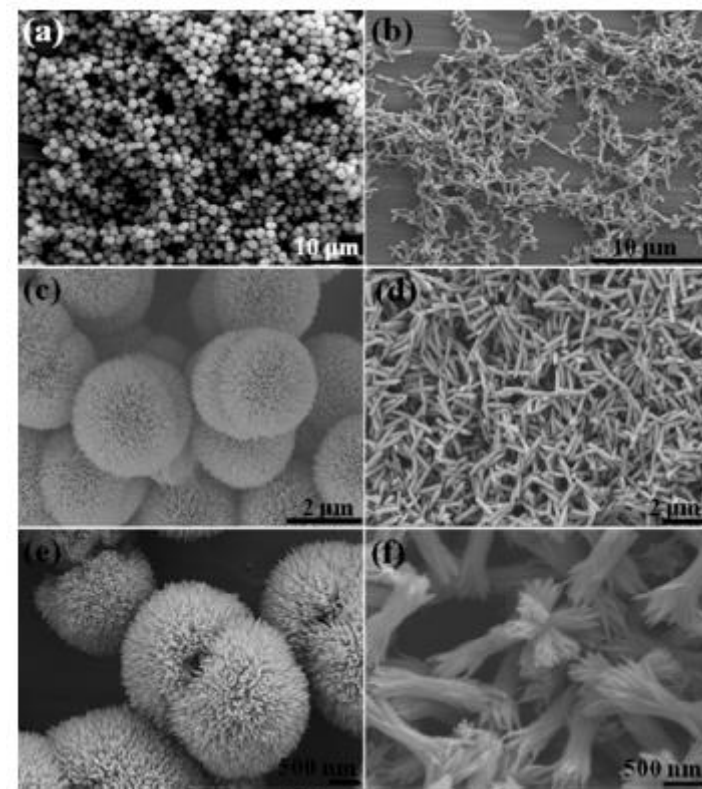
Slika 6. Difraktogrami istog uzorka na različitim uređajima - dolazi do prividnog proširenja pika uslijed nesigurnosti uređaja [21]

## 2.6. Morfologija čestica

Kako je ranije navedeno, hidroksiapatit ima odličnu biokompatibilnost zbog sličnosti svojeg kemijskog sastava anorganskom dijelu kosti. Eksperimentalna istraživanja pokazuju da se čestice, ovisno o obliku, u tijelu ponašaju donekle različito.

Dva glavna oblika nanočestica su sferični i igličasti (slika 7). Na slici se vidi da su čestice sklone aglomeriranju, te da su unutar pojedine šarže veoma slične veličine.

Čestice igličastog oblika nešto su češće povezane s upalnim procesima u tijelu. Sferične čestice su nešto uspješnije kod poticanja osteogeneze i rjeđe povezane s upalnim procesima. Ispitivanja pokazuju da se obnova prirodnog tkiva podržava samo kada se čestice HAp pojavljuju u nižim koncentracijama, dok pri višoj koncentraciji mogu taj proces usporiti [22].



Slika 7. SEM prikaz: a), c), e) sferičnih čestica HAp i b), d), f) igličastih čestica HAp [22]

## 2.7. Veličina čestica

Veličina čestica ovisi o metodi sinteze hidroksiapatita i njenim parametrima. Nano čestice pokazuju bolja svojstva pri primjeni jer, unatoč tome što su koštane stanice u mikrometarskom području, na njihovo obnavljanje bolje djeluju sitnije čestice.

Dokazano je da je sonokemijskom metodom moguće postići veoma fine nano čestice HAp. Kod precipitacijske metode, rezultat ovisi o temperaturi kalcinacije nakon sušenja uzorka – što je viša temperatura kalcinacije, rezultat su sitnije čestice. Kod sinteze mikrovalnim zračenjem, variranje snage uređaja nije dovelo do različite veličine čestica [23].

### 3. Eksperimentalni dio

Za pripremu kalcijevih ortofosfata korištene su sljedeće polazne tvari - prekursori:

- ljuske jajeta iz komunalnog otpada,
- fosfatna kiselina (Kemika, ortofosforna kiselina 85%, p.a.)
- amonijak (Alkaloid, amonijak otopina 25% p.a.)

#### 3.1. Dobivanje kalcijevog oksida – CaO

Kalcijev oksid dobiven je direktno iz ljusaka kokošnjih jaja, kao prvi korak eksperimentalnog dijela rada.

Ljuske kokošnjih jaja su prikupljene, usitnjene u tarioniku, te isprane u destiliranoj vodi. Nakon toga, sušene su na temperaturi od 100 °C do konstantne mase, te zatim usitnjene u planetarnom kugličnom mlinu Retsch, model PM100.



Slika 8. Usitnjavanje osušenih ljusaka jajeta u keramičkom tarioniku

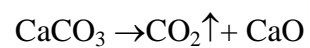
Prvi korak usitnjavanja (u tarioniku) bio je potreban jer prema uputama proizvođača, za usitnjavanje u planetarnom kugličnom mlinu PM100, čestice trebaju biti veličine ispod 10 mm. Usitnjavanjem u planetarnom kugličnom mlinu moguće je postići čestice veličine manje od 1  $\mu\text{m}$ , što pozitivno utječe na daljnju sintezu, pri kojoj se teži nastanku čestica u submikrometarskom ili nanometarskom području [24].

Posuda za homogenizaciju i kuglice korištene za homogenizaciju (slika 9) izrađene su od materijala  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ . Ljuske jajeta su usitnjavane 60 minuta pri 300 okretaja u minuti.



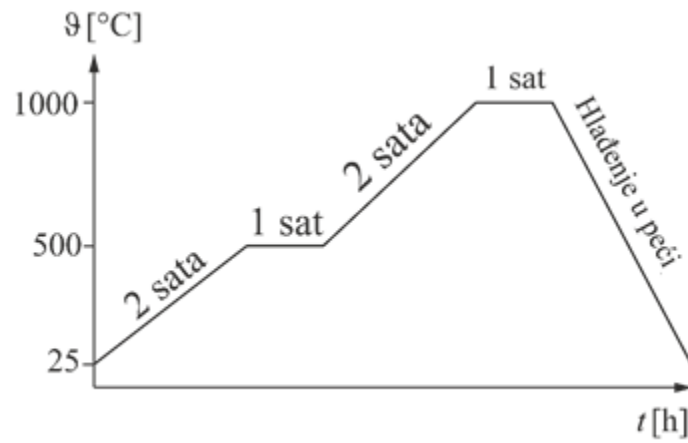
Slika 9. Usitnjavanje ljusaka jajeta u planetarnom kugličnom mlinu

Toplinska obrada je vršena na temperaturi od 1000 °C prema rezultatima toplinske analize, iz kojih slijedi da na toj temperaturi sav kalcijev karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) transformira u kalcijev oksid ( $\text{CaO}$ ), a organske tvari se razgrađuju, prema jednadžbi:



Slika 10. Usitnjene ljuske jajeta: (A)  $\text{CaCO}_3$  - prije toplinske obrade; (B)  $\text{CaO}$  - nakon toplinske obrade pri 1000 °C

Usitnjene ljuske jajeta tijekom 2 sata su zagrijavane od sobne temperature do 500 °C te izotermno termički obrađivane na toj temperaturi sat vremena. Idućih 2 sata su zagrijavane od 500 °C do 1000 °C, te ponovno izotermno toplinski obrađene 1 sat na toj temperaturi. Nakon toga uslijedilo je hlađenje u peći do sobne temperature (slika 11).

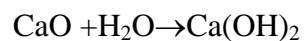


Slika 11. Dijagram toplinske obrade usitljenih ljusaka jajeta



### 3.2.Sinteza kalcijevog hidroksida - Ca(OH)<sub>2</sub>

Kalcijev hidroksid dobiva se reakcijom hidrolize kalcijevog oksida (CaO) s destiliranom vodom, prema jednadžbi:



Rađeno je 5 jednakih šarži kalcijevog hidroksida, u 5 staklenih čaša. U svaku čašu dodano je 5,0000 g CaO i 250 mL destilirane vode. Čaše su prekrivene parafilmom i smjesa je homogenizirana na magnetnoj miješalici pri sobnoj temperaturi tijekom 24 sata.



Slika 12. Sinteza kalcijevog hidroksida na magnetnoj miješalici

### 3.3. Sonokemijska sinteza hidroksiapatita

Nakon 24 sata hidrolize  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  iz  $\text{CaO}$  u reaktor je dodana odgovarajuća količina 84%-tne fosfatne kiseline ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) uz konstantno miješanje na magnetnoj miješalici pri 1000 okretaja/minuti, tako da molarni omjer kalcija i fosfora bude 1,667. pH-vrijednost suspenzije održavana je iznad 11 dodatkom odgovarajuće količine amonijaka.

Molarni omjer kalcija i fosfora od 1,667 odgovara omjeru Ca/P u hidroksiapatitu, kako je ranije navedeno.

Fosfatna kiselina dodavana je polaganim kapanjem (kap po kap) uz konstantno miješanje na magnetnoj miješalici. Nakon dodavanja fosfatne kiseline, smjesa je kratko miješana na magnetnoj miješalici i zatim sonokemijski tretirana uređajem Hielscher UP400S snage 400 W, pri frekvenciji 24 kHz, sondom sa  $\phi 14$ . Svaka šarža precipitata je tretirana tokom različitog perioda, kako slijedi:

0. šarža – precipitat hidroksiapatita ne tretirana ultrazvučnom sondom
1. šarža – precipitat hidroksiapatita tretiran ultrazvučnom sondom 5 minuta
2. šarža – precipitat hidroksiapatita tretiran ultrazvučnom sondom 30 minuta
3. šarža – precipitat hidroksiapatita tretiran ultrazvučnom sondom 60 minuta
4. šarža – precipitat hidroksiapatita tretiran ultrazvučnom sondom 120 minuta

Nakon ultrazvučne obrade, precipitat hidroksiapatita je filtriran filter papirom crne vrpce te sušen na  $100\text{ }^\circ\text{C}$  do konstantne mase.

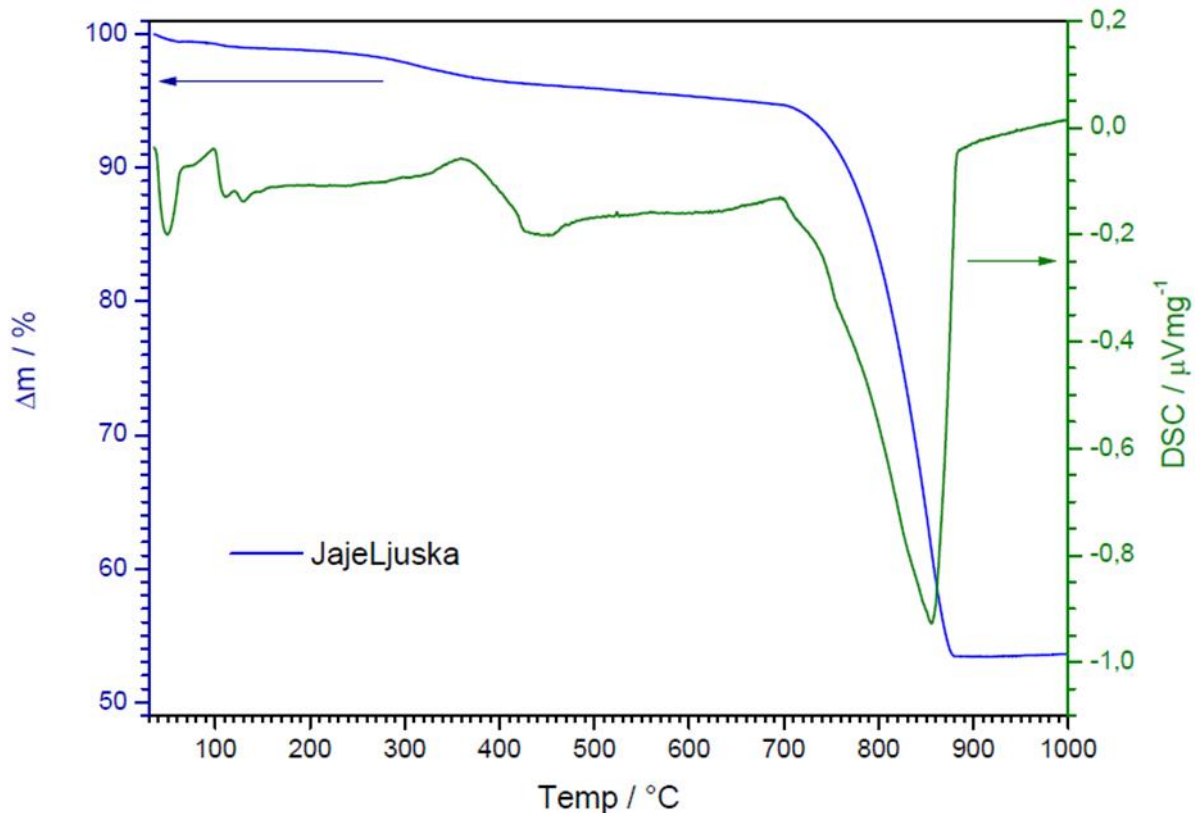


Slika 13. Tretiranje smjese kalcijevog hidroksida i fosfatne kiseline ultrazvučnom sondom Hielscher UP400S

## 4. Rezultati i rasprava

### 4.1. Rezultati TGA i DSC analize

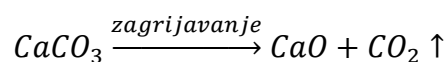
Slika 14 prikazuje rezultat TGA i DSC analize korištenih ljusaka jajeta. One su bile zagrijavane od sobne temperature do 1000 °C u kontroliranim uvjetima u prisustvu zraka.



Slika 14. TGA (plava linija) i DSC (zelena linija) ljusaka jajeta

Plavu krivulju, koja prikazuje TGA analizu, moguće je podijeliti u tri cjeline, a to su:

- Postupan gubitak mase od sobne temperature do 700 °C uslijed isparavanja vlage i razgradnje organskih tvari. Gubitak mase iznosi oko 4%, što je približno jednako udjelu organske tvari u ljusci jajeta [6]
- Nagli gubitak mase od 700 °C do 880 °C uslijed raspada kalcijevog karbonata od kojeg se ljuska sastoji na kalcijev oksid i ugljikov dioksid, koji isparava. Kemijska jednažba reakcije glasi:



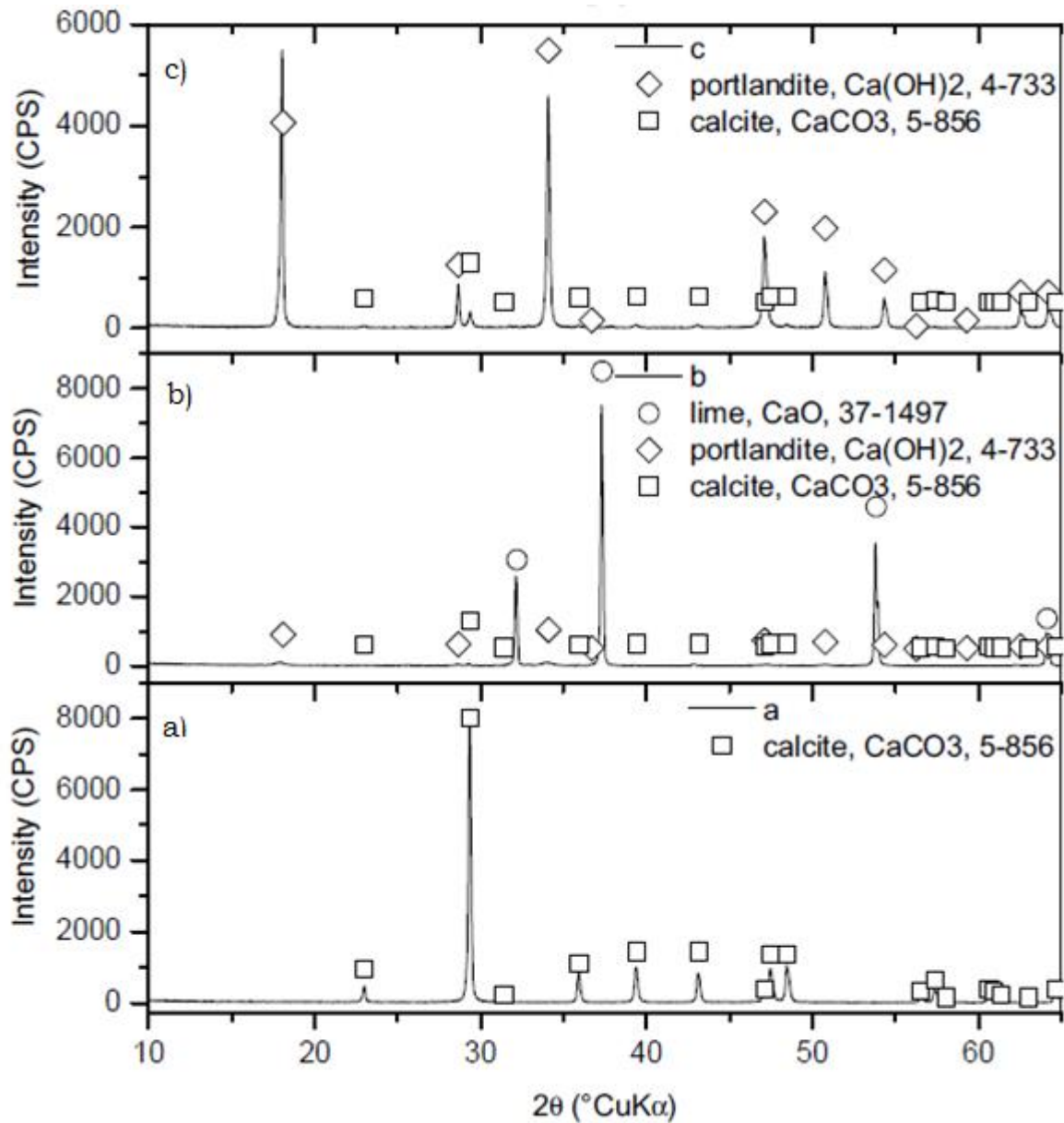
- Konstantna masa od 880 °C nadalje, što označava da nema daljnjih kemijskih reakcija.

Na temelju rezultata termogravimetrijske analize, za toplinsku obradu ljusta jaja odabrana je temperatura od 1000 °C na kojoj će sa sigurnošću  $\text{CaCO}_3$  transformirati u  $\text{CaO}$  i  $\text{CO}_2$ .

Rezultat diferencijalne pretražne kalorimetrije, prikazan zelenom linijom, govori da je reakcija egzotermna. Značajna je temperatura oko 850 °C na kojoj se nalazi veliki egzotermni vrh koji korespondira s padom mase opisanim na TGA dijagramu i izražava otpuštanje najveće količine energije. Skok oko 900 °C označava kraj reakcije i prevođenje svog  $\text{CaCO}_3$  u  $\text{CaO}$  i  $\text{CO}_2$ .

## 4.2. Rezultati XRD analize

XRD analiza je izvršena na uzorcima usitnjenih ljusaka jaja, kalcijevog oksida nastalog toplinskom obradom ljusaka jaja i kalcijevog hidroksida nastalog hidrolizom kalcijevog oksida s destiliranom vodom.

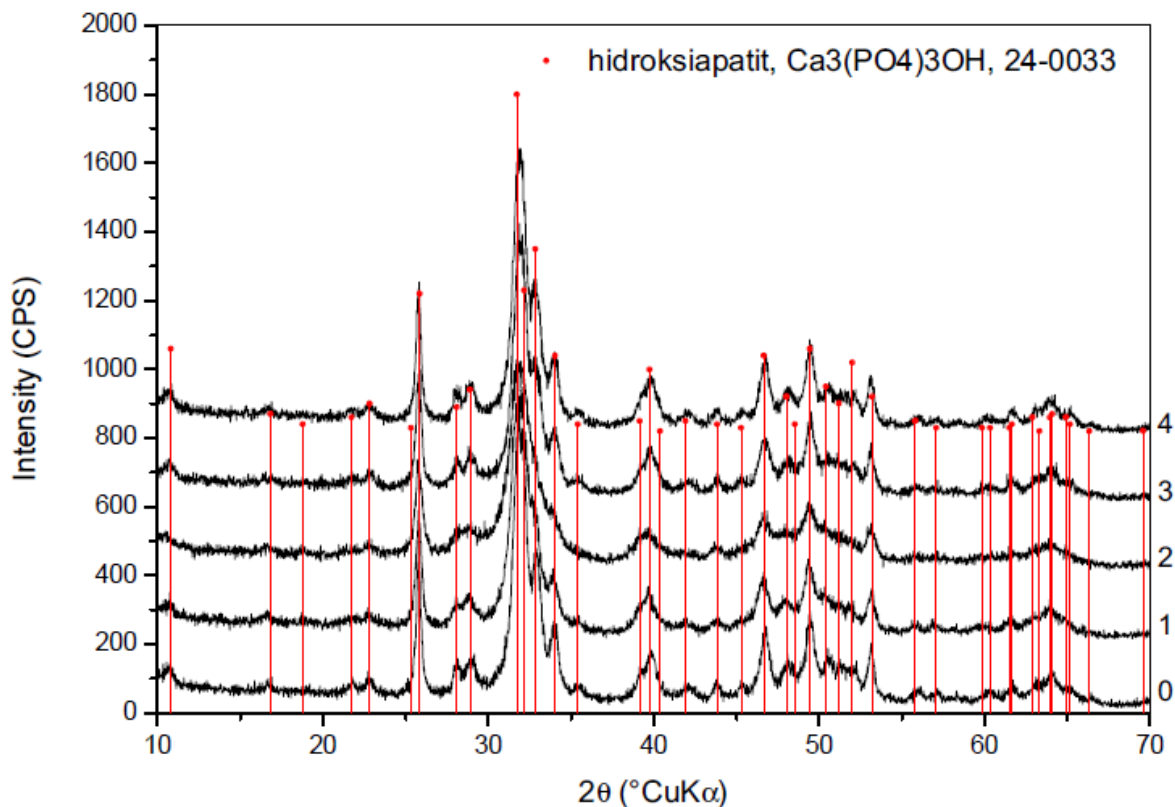


Slika 15. XRD analiza uzoraka a) ljusaka jaja; b)  $\text{CaO}$  nastalog toplinskom obradom ljusaka jajeta i c) kalcijevog hidroksida



- Slika 15a, koja prikazuje difraktogram usitnjenih ljusaka jaja, potvrđuje literaturne podatke da se ljuska jajeta sastoji od kalcijevog karbonata – kalcita.
- Slika 15b prikazuje difraktogram nakon toplinske obrade ljusaka jaja. Iz njega slijedi da je toplinskom obradom na 1000 °C najveći dio kalcita prekrystalizirao u kalcijev oksid –vapno. Kalcit se pojavljuje u tragovima, a također se u uzorku nalazi i mala količina kalcijevog hidroksida – portlandita.
- Slika 15c prikazuje uzorak nakon hidrolize kalcijevog oksida i destilirane vode. Rezultati pokazuju da je većina vapna reagirala s vodom i uzorak se većinski sastoji od portlandita, a u maloj količini se pojavljuje i vapno.

Nakon sonokemijske sinteze hidroksiapatita opisane u poglavlju 3.3, također je napravljena XRD analiza uzoraka (slika 16).

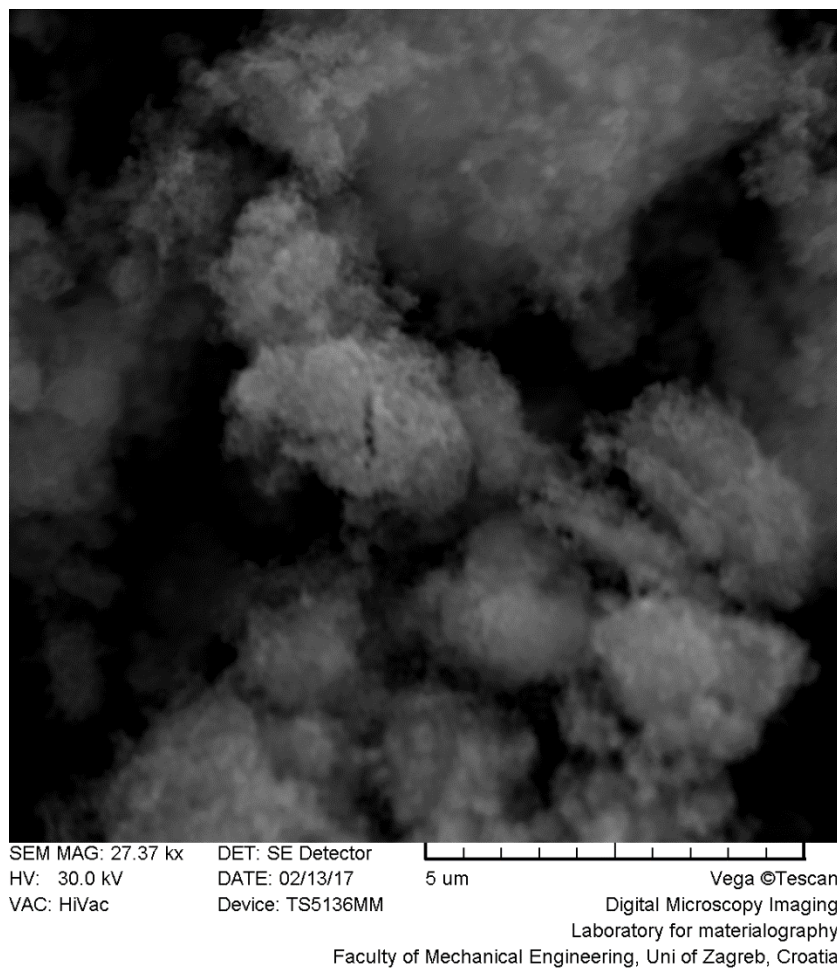


Slika 16. XRD analiza 5 šarži hidroksiapatita sonokemijski tretiranog u različitom trajanju

Na slici 16 vidljivo je da je čisti hidroksiapatit dobiven u svih 5 uzoraka.

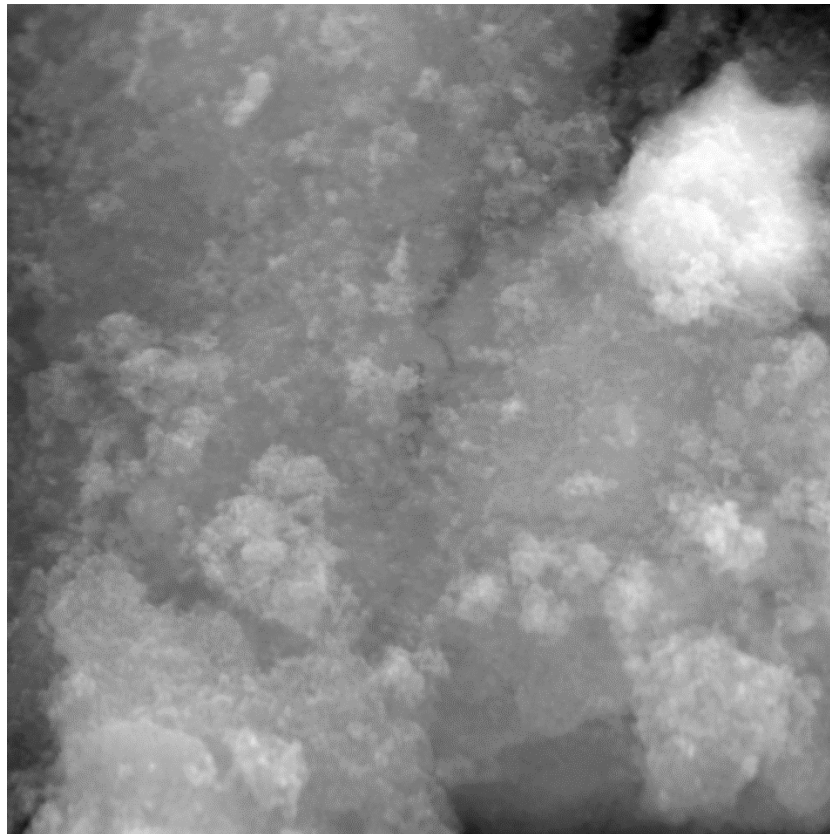
### 4.3. Rezultati SEM analize

SEM analiza je obavljena na uzorcima iz 0. - precipitat hidroksiapatita netretiran ultrazvučnom sondom (slika 17) i 4. šarže – precipitat hidroksiapatita tretiran ultrazvučnom sondom 120 minuta (slika 18). Uslijed ograničenja SEM uređaja nije bilo moguće postići dovoljno veliko povećanje za analizu morfologije nanostrukturiranih čestica (veličine kristalita uzoraka hidroksiapatita koja je su dobivene XRD analizom je od 21 nm do 24 nm). Iz dobivenih SEM snimaka morfologije uzoraka HAp može se jedino zaključiti da su sitne čestice uzoraka hidroksiapatita grupirane u kompaktne agregate mikronskih dimenzija.



Slika 17. SEM analiza uzorka iz 0. šarže – precipitat hidroksiapatitane tretiran ultrazvučnom sondom





SEM MAG: 21.30 kx    DET: SE Detector    5 um    Vega ©Tescan  
HV: 30.0 kV    DATE: 02/13/17    Digital Microscopy Imaging  
VAC: HiVac    Device: TS5136MM    Laboratory for materialography  
Faculty of Mechanical Engineering, Uni of Zagreb, Croatia

Slika 18. SEM analiza uzorka iz 4. šarže - precipitat hidroksiapatita tretiran ultrazvučnom sondom 120 minuta

#### 4.4. Izračun veličine kristalita Scherrerovom metodom

Tablica 2. Izračun veličine kristalita Scherrerovom metodom

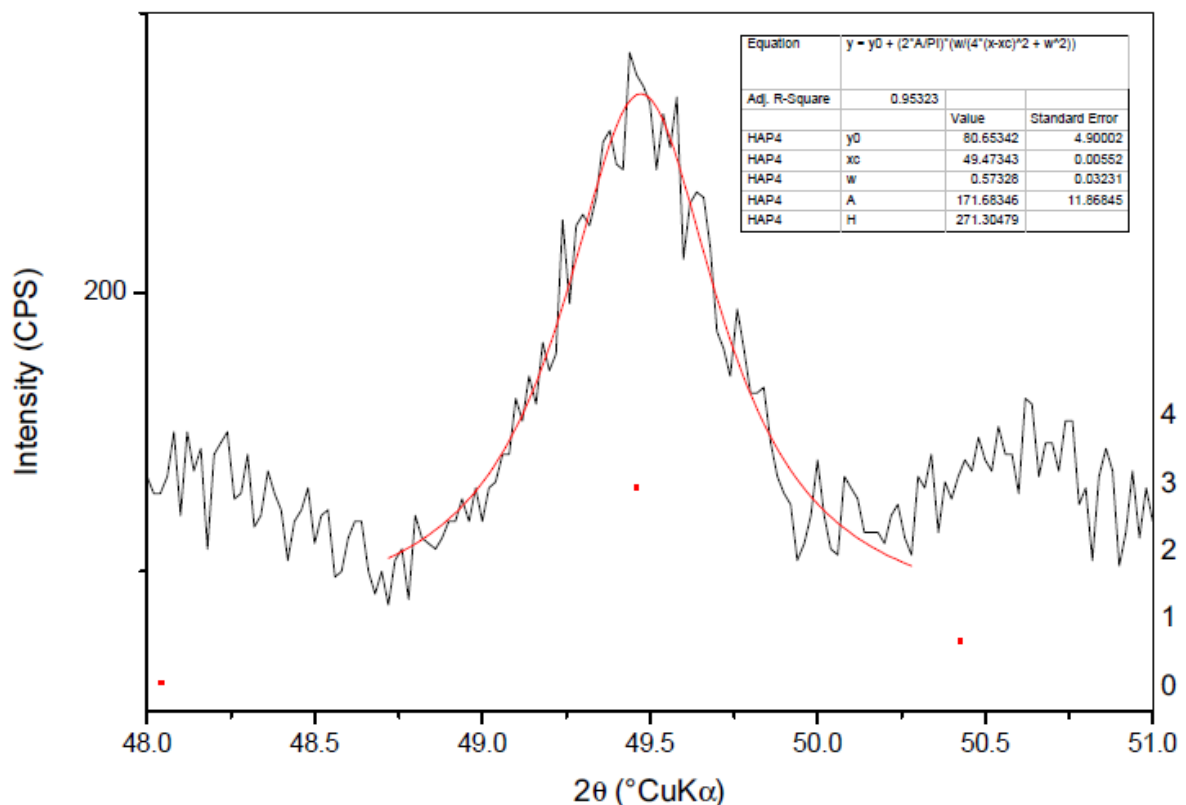
| Uzorak | $\theta$ [°] | $\theta$ [rad] | $\cos(\theta)$ | $\beta$ [°] | $\beta_{err}$ [°] | $\beta_0$ [°] | $\beta-\beta_0$ [°] | $\beta-\beta_0$ [rad] | $\beta_{err}$ [rad] | veličina kristalita [nm] | veličina uz pogrešku [nm] | pogreška veličine [nm] |
|--------|--------------|----------------|----------------|-------------|-------------------|---------------|---------------------|-----------------------|---------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------|
| 0      | 24,75        | 0,43197        | 0,90814        | 0,54        | 0,04              | 0,18          | 0,36                | 0,00628               | 0,00070             | 24,31816                 | 27,35793                  | 3,03977                |
| 1      | 24,75        | 0,43197        | 0,90814        | 0,67        | 0,06              | 0,18          | 0,49                | 0,00855               | 0,00105             | 17,86640                 | 20,35939                  | 2,49299                |
| 2      | 24,75        | 0,43197        | 0,90814        | 0,90        | 0,13              | 0,18          | 0,72                | 0,01257               | 0,00227             | 12,15908                 | 14,83820                  | 2,67912                |
| 3      | 24,75        | 0,43197        | 0,90814        | 0,67        | 0,06              | 0,18          | 0,49                | 0,00855               | 0,00105             | 17,86640                 | 20,35939                  | 2,49299                |
| 4      | 24,75        | 0,43197        | 0,90814        | 0,57        | 0,03              | 0,18          | 0,39                | 0,00681               | 0,00052             | 22,44753                 | 24,31816                  | 1,87063                |

Scherrerovom metodom izračunata je veličina kristalita. Korištena je ranije navedena formula

$$- \text{Scherrerova jednadžba: } B(2\theta) = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Za analizu je odabran peak na  $2\theta = 49,5^\circ$ , koji se pojavljuje u svim difraktogramima. Iz toga su izračunati u stupnjevima i radijanima te  $\cos(\theta)$  navedeni u tablici 2.

Kut  $\beta$  određen je prema širini na polovici visine odabranog peaka. On je fitan po Lorentzovom modelu i programom Origin, čime je relativno precizno određena polovica visine i izračunata je greška –  $\beta_{err}$ . Primjer postupka prikazan je na slici 19.



Slika 19. Primjer obrade peaka u slučaju uzorka iz 2. šarže - precipitat tretiran ultrazvučnom sondom 5 minuta

Iznos koeficijenta  $K$  određen je kao 0.9, koji se u literaturi obično koristi za hidroksiapatit.  $\lambda$  iznosi 0,15405 nm, koliko je valna duljina Cu- $K\alpha$  radijacije.

## 5. Zaključak

Termogravimetrijska analiza sugerira da pretvorba  $\text{CaCO}_3$  u  $\text{CaO}$  završava oko  $880\text{ }^\circ\text{C}$  te kasnije nema promjene mase, dok DSC analiza sugerira da je pretvorba gotova oko  $900\text{ }^\circ\text{C}$ . Prema tim rezultatima, temperatura od  $1000\text{ }^\circ\text{C}$  odabrana je kao temperatura toplinske obrade ljusaka jaja radi potpune transformacije u  $\text{CaO}$ .

XRD analizom ustanovljeno je:

- Ljuske jaja sastoje se od kalcijevog karbonata – kalcita.
- Nakon toplinske obrade na  $1000\text{ }^\circ\text{C}$ , veći dio kalcita se raspada na kalcijev oksid – vapno i ugljikov dioksid koji isparava. Također, pojavljuje se i manja količina kalcijevog hidroksida – portlandita.
- Miješanjem vapna i destilirane vode uzorak se sastoji pretežno od portlanditne faze s manjim udjelom vapna.
- Reakcijom portlandita i fosfatne kiseline uz prilagođavanje pH-vrijednosti otopine amonijakom, nakon sonokemijskog tretmana nastaje čisti hidroksiapatit u svim šaržama. One su tretirane kako slijedi:
  - 0. šarža – precipitat hidroksiapatita netretiran ultrazvučnom sondom
  - 1. šarža – precipitat hidroksiapatita tretiran ultrazvučnom sondom 5 minuta
  - 2. šarža – precipitat hidroksiapatita tretiran ultrazvučnom sondom 30 minuta
  - 3. šarža – precipitat hidroksiapatita tretiran ultrazvučnom sondom 60 minuta
  - 4. šarža – precipitat hidroksiapatita tretiran ultrazvučnom sondom 120 minuta

SEM analizom ustanovljeno je da sitne su čestice uzoraka hidroksiapatita grupirane u kompaktne agregate mikronskih dimenzija.

Računanjem veličine čestica prema Scherrerovoj jednadžbi određene su veličine kristalita prema šarži, kako slijedi:

- 0. šarža – precipitat hidroksiapatita netretiran ultrazvučnom sondom - oko 24 nm
- 1. šarža – precipitat hidroksiapatita tretiran ultrazvučnom sondom 5 minuta - oko 18 nm
- 2. šarža – precipitat hidroksiapatita tretiran ultrazvučnom sondom 30 minuta - oko 12 nm
- 3. šarža – precipitat hidroksiapatita tretiran ultrazvučnom sondom 60 minuta - oko 18 nm
- 4. šarža – precipitat hidroksiapatita tretiran ultrazvučnom sondom 120 minuta - oko 24 nm

Iz toga je moguće zaključiti da se najsitniji kristaliti hidroksiapatita (oko 12 nm) dobivaju sonokemijskom tretmanom precipitata u trajanju od 30 minuta.

## Literatura

- [1] Datta, B.N.: *Textbook of Pathology*. Jaypee Brothers Publishers, New Delhi (2004).
- [2] Veselinović, Lj.: *Rendgenska analiza nanostrukturnih prahova kalcijum fosfata dobijenih novim postupcima sinteze*. Magistarski rad, Beograd (2010).
- [3] Dorozhkin, S.V.: *Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art*. Journal of Functional Biomaterials, **1**(1) (2010) 22-107.
- [4] Dorozhkin, S.: *Calcium Orthophosphate: Applications in Nature, Biology and Medicine*. Pan Stanford Publishing, Boca Raton (2012).
- [5] Wu, S.C., Tsou, H.K., Hsu, H. C., Hsu, S.K., Liou, S.P., Ho, W.F.: *A hydrothermal synthesis of eggshell and fruit waste extract to produce nanosized hydroxyapatite*. Ceramics international, **39** (2013) 8183-8188.
- [6] Naga, S.M., El-Maghraby, H.F., Sayed, M. and Saad, E.A.: *Highly Porous Scaffolds Made of Nanosized Hydroxyapatite Powder Synthesized from Eggshells*. Journal of Ceramic Science and Technology, **6**(3) (2015) 237-244.
- [7] Rivera, E.M., Araiza, M., Brostow, W., Castano, V.M., Diaz-Estrada, J.R., Hernandez, R. and Rodriguez, J.R.: *Synthesis of hydroxyapatite from eggshells*. Material letters, **41** (1999) 128-134.
- [8] Hincke, M.T., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., Rodriguez-Navarro, A.B. and McKee, M.D.: *The eggshell: structure, composition and mineralization*. Frontiers in Bioscience, **17** (2012) 1266-1280.
- [9] PubChem – Open Chemistry Database: *Phosphoric acid*.  
[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phosphoric\\_acid#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phosphoric_acid#section=Top)
- [10] PubChem – Open Chemistry Database: *Ammonium Hydroxide*  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14923#section=IDLH>
- [11] Anitha, P. and Pandya, H.M.: *Comprehensive Review of Preparation Methodologies of Nano Hydroxyapatite*. Journal of Environmental Nanotechnology, **3**(1) (2014) 101-121.
- [12] Nayak, A.K.: *Hydroxyapatite Synthesis Methodologies: An Overview*. International Journal of ChemTech Research, **2**(2) (2010) 903-907.
- [13] Wantae, K., Fumio, S.: *Sonochemical synthesis of hydroxyapatite from H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution with Ca(OH)<sub>2</sub>*. Ultrason. Sonochem., **8**(2) (2001) 85-8.

- [14] Hassan, T.A., Rangari, V.K., Jeelani, S.: *Sonochemical synthesis and characterisation of bio-based hydroxyapatite nanoparticles*. Int. J. Nano and Biomaterials, 2(5) (2014) 103-112.
- [15] Grilec, K., Jakovljević, S.: *Tribologija - Autorizirana predavanja*. Fakultet strojarstva i brodogradnje, Zavod za materijale, Zagreb (2015)
- [16] Dean, D.: *Thermal Gravimetric Analysis*. University of Alabama at Birmingham, preuzeto 20.3.2016. sa [https://www.uab.edu/engineering/home/images/downloads/TGA\\_UAB\\_TA\\_MAY\\_absolute\\_final\\_2014.pdf](https://www.uab.edu/engineering/home/images/downloads/TGA_UAB_TA_MAY_absolute_final_2014.pdf).
- [17] Egerton, R.F.: *Physical principles of electron microscopy: an introduction to TEM, SEM, and AEM*. Springer (2005)
- [18] Smith, D.J.: *Chapter 1: Characterization of Nanomaterials Using Transmission Electron Microscopy*. Nanocharacterisation (2) (2015)
- [19] Šimeg, L.: *Primjena elektronske mikroskopije u karakterizaciji prirodnih materijala*. Fakultet strojarstva i brodogradnje, Zagreb (2014)
- [20] Tonejc, A.: *Metode pripreme i karakterizacije materijala*. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb (2010)
- [21] Speakman, S.A.: *Estimating Crystallite Size Using XRD*. MIT Center for Materials Science and Engineering (2008)
- [22] Yang H., Zeng, H., Hao, L., Zhao, N., Du, C., Liao, H., Wang, Y.: *Effects of hydroxyapatite microparticle morphology on bone mesenchymal stem cell behavior*. J. Mater. Chem. 2 (2014) 4703-4710
- [23] Poinern, G.J.E., Brundavanam, R., Thi Le, X., Djordjevic, S., Prokic, M., Fawcett, D.: *Thermal and ultrasonic influence in the formation of nanometer scale hydroxyapatite bio-ceramic*. International Journal of Nanomedicine, (6) (2011) 2083-2095.
- [24] Retsch: *Planetary Ball Mill PM 100*. <http://www.retsch.com/products/milling/ball-mills/planetary-ball-mill-pm-100>