



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET STROJARSTVA I BRODOGRADNJE

Martina Eva Tonković

**Sinteza hidroksiapatita iz ljuske jajeta  
precipitacijskom metodom**

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za materijale Fakulteta strojarstva i brodogradnje Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Lidije Ćurković, te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2015./2016.

## POPIS OZNAKA I MJERNIH JEDINICA

<b>Oznaka</b>	<b>Opis</b>
<i>MCPM</i>	monokalcijev fosfat monohidrat
<i>MCPA</i>	monokalcijev fosfat anhidrid
<i>MCP</i>	monokalcijev fosfat anhidrid
<i>DCPD</i>	dikalcijev fosfat dihidrid
<i>DCPA</i>	dikalcijev fosfat anhidrid
<i>DCP</i>	dikalcijev fosfat anhidrid
<i>OCP</i>	oktokalcijev fosfat
<i><math>\alpha</math>-TCP</i>	$\alpha$ -trikalcijev fosfat
<i><math>\beta</math>-TCP</i>	$\beta$ -trikalcijev fosfat
<i>ACP</i>	amorfni kalcijevi fosfati
<i>CDHA</i>	kalcijem siromašan hidroksiapatit
<i>HA</i>	hidroksiapatit
<i>HAp</i>	hidroksiapatit
<i>FA</i>	fluorapatit
<i>FAp</i>	fluorapatit
<i>OA</i>	oksiapatit
<i>OAp</i>	oksiapatit
<i>TTCP</i>	tetrakalcijev fosfat
<i>TetCP</i>	tetrakalcijev fosfat

# SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I MJERNIH JEDINICA .....	I
SADRŽAJ .....	II
POPIS SLIKA .....	V
POPIS TABLICA.....	VII
1. UVOD .....	1
1.1. Biomaterijali.....	2
1.1.1. Podjela biomaterijala.....	2
1.1.2. Primjena biomaterijala .....	3
1.1.2.1. Biometali.....	3
1.1.2.2. Biokeramika.....	4
1.1.2.3. Biopolimeri .....	4
1.1.2.4. Biokompoziti.....	4
1.2. Kalcijevi ortofosfati.....	5
1.2.1. Opća svojstva kalcijevih ortofosfata .....	5
1.2.2. Pojavni oblici kalcijevih ortofosfata .....	6
1.2.2.1. Monokalcijev fosfat monohidrat (MCPM) - $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....	7
1.2.2.2. Monokalcijev fosfat anhidrid (MCPA ili MCP) - $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ .....	8
1.2.2.3. Dikalcijev fosfat dihidrat (DCPD) - $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	9
1.2.2.4. Dikalcijev fosfat anhidrid (DCPA ili DCP) - $\text{CaHPO}_4$ .....	10
1.2.2.5. Oktokalcijev fosfat (OCP) - $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....	10
1.2.2.6. $\alpha$ -trikalcijev fosfat ( $\alpha$ -TCP) - $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .....	11
1.2.2.7. $\beta$ -trikalcijev fosfat ( $\beta$ -TCP) - $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .....	11
1.2.2.8. Amorfni kalcijev fosfat (ACP) - $\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ , $n = 3\text{--}4.5$ ; 15–20% H <sub>2</sub> O .....	12

1.2.2.9.	Kalcijem osiromašen hidroksiapatit (CDHA) - $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_2$ - $x$ ( $0 < x < 1$ ) .....	12
1.2.2.10.	Hidroksiapatit (HA ili HAp) - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .....	13
1.2.2.11.	Fluorapatit (FA ili FAp) - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ .....	14
1.2.2.12.	Oksiapatit (OA ili OAp) - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$ .....	14
1.2.2.13.	Tetrakalcijev fosfat (TTCP ili TetCP) - $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ .....	15
1.2.3.	Metode sinteze kalcijevih ortofosfata .....	16
1.2.3.1.	Metoda precipitacijskog taloženja .....	16
1.2.3.2.	Hidrotermalna metoda .....	16
1.2.3.3.	Ultrazvučna metoda .....	17
1.2.3.4.	Mehanokemijska metoda .....	17
1.2.3.5.	Metoda mikrovalnim zračenjem .....	17
1.2.3.6.	Sol gel metoda .....	17
2.	OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA .....	18
3.	MATERIJALI I METODE .....	19
3.1.	Toplinska analiza: termogravimetrijska analiza (TGA) i diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) .....	19
3.2.	Rendgenska difrakcijska analiza (XRD) .....	20
3.3.	Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) .....	20
3.4.	Sinteza hidroksiapatita precipitacijskom metodom iz ljusaka jajeta .....	21
3.4.1.	Dobivanje kalcijevog oksida, CaO .....	21
3.4.2.	Sinteza kalcijevog hidroksida, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .....	24
3.4.3.	Precipitacijsko taloženje hidroksiapatita .....	24
3.4.4.	Toplinska obrada hidroksiapatita .....	25
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	26
4.1.	Rezultat toplinske analize .....	26
4.2.	Rezultati rendgenske difrakcijske analize (XRD) .....	28

4.2.1.	Fazni sastav uzoraka nakon svakog koraka sinteze.....	28
4.2.2.	Fazni sastav uzoraka precipitata toplinski obrađenih u različitim uvjetima .....	30
4.2.3.	Fazni sastav uzoraka precipitata HAp toplinski obrađeni na različitim temperaturama.....	32
4.3.	Rezultati SEM-EDS analize uzoraka precipitata HAp nakon toplinske obrade .....	36
5.	ZAKLJUČCI.....	47
6.	ZAHVALE.....	48
7.	POPIS LITERATURE .....	49
8.	SAŽETAK.....	51
9.	SUMMARY .....	52
10.	ŽIVOTOPIS .....	53

## POPIS SLIKA

Slika 1. Prikaz strukture MCPM u 010 ravnini. PO <sub>4</sub> tetraedri prikazani su ljubičastom bojom, narančasta boja predstavlja atome vodika, dok zelena boja predstavlja koordinacijske poliedre oko Ca [11].....	7
Slika 2. Prikaz strukture MCPA u 001 ravnini. PO <sub>4</sub> tetraedri prikazani su žutom bojom, dok zelena predstavlja koordinacijske poliedre oko Ca [11] .....	8
Slika 3. Prikaz strukture DCPD u 001 ravnini. Plava boja predstavlja koordinacijske poliedre oko Ca, dok žuta boja predstavlja PO <sub>4</sub> tetraedre. Crveni krugovi predstavljaju kisik, a plavi vodik [11] .....	9
Slika 4. Prikaz strukture DCPA u 100 ravnini. Žuta boja predstavlja PO <sub>4</sub> tetraedre. Plava predstavlja atome kalcija, dok siva predstavlja vodik [11] .....	10
Slika 5. Prikaz strukture α-TCP u 001 ravnini. Žutom bojom prikazani su tetraedri PO <sub>4</sub> , dok zelena boja predstavlja kalcij [11].....	11
Slika 6. Kristalna struktura hidroksiapatita. A) Sivom bojom su prikazani koordinacijski poliedri kationa Ca koje povezuju žuti PO <sub>4</sub> tetraedri. B) Plavom bojom prikazani su kationski položaji Ca. Crvenom bojom prikazani su atomi kisika, a ružičastom X <sup>-</sup> anioni [11].....	13
Slika 7. Prikaz strukture OCP u 001 ravnini. A) Ljubičastom bojom prikazani su CaO <sub>9</sub> , zelenom poliedri PO <sub>4</sub> , raspoređeni slično apatitnoj strukturi. Crvenom bojom prikazan je kisik [11] .....	14
Slika 8. Prikaz strukture TTCP u 001 ravnini. Plavom bojom prikazani su atomi Ca koji tvore Ca-PO <sub>4</sub> kolone, a zelenom bojom prikazani su atomi Ca koji grade Ca-PO <sub>4</sub> kolone [11] .....	15
Slika 9. Usitnjavanje osušenih ljustica jajeta u keramičkom tarioniku .....	22
Slika 10. Usitnjavanje ljustica jajeta u planetarnom kugličnom mlinu .....	22
Slika 11. Usitnjene ljustice jajeta: (A) CaCO <sub>3</sub> - prije toplinske obrade; (B) CaO - nakon toplinske obrade pri 1000 °C.....	23
Slika 12. Krivulja toplinske obrade usitnjenih ljustica jajeta .....	23
Slika 13. Reaktor za hidrolizu kalcijevog hidroksida, Ca(OH) <sub>2</sub> .....	24
Slika 14. Filtriranje precipitata nakon precipitacijskog taloženja hidroksiapatita .....	25
Slika 15. TGA i DSC krivulja ljustica jajeta .....	26
Slika 16. Difraktogrami uzoraka nakon svakog od 4 koraka sinteze hidroksiapatita .....	29
Slika 17. Fazni sastav uzoraka precipitata toplinski obrađenih na 1100 °C tijekom 1, 3 i 5 sati u atmosferi (A) zraka i (B) vakuuma .....	31

Slika 18. XRD analiza uzorka toplinski obrađenog na 100 °C tijekom 2 h, u prisustvu zraka	33
Slika 19. XRD analiza uzorka toplinski obrađenog na 300 °C tijekom 2 h, u prisustvu zraka	33
Slika 20. XRD analiza uzorka toplinski obrađenog na 500 °C tijekom 2 h, u prisustvu zraka	34
Slika 21. XRD analiza uzorka toplinski obrađenog na 700 °C tijekom 2 h, u prisustvu zraka	34
Slika 22. XRD analiza uzorka toplinski obrađenog na 900 °C tijekom 2 h, u prisustvu zraka	35
Slika 23. XRD analiza uzorka toplinski obrađenog na 1100 °C tijekom 2 h, u prisustvu zraka	35
Slika 24. SEM snimka uzorka precipitata sušenog na 100 °C tijekom 2 sata	36
Slika 25. EDS spektar za analiziranu površinu uzorka prikazanog na slici 24	37
Slika 26. Raspodjela kemijskih elemenata na površini uzorka sa slike 24: (A) kalcij, (B) fosfor, (C) kisik, (D) magnezij, (E) stroncij, (F) kalij	38
Slika 27. SEM snimka uzorka precipitata nakon toplinske obrade na 1100 °C u prisustvu zraka tijekom 2 sata	39
Slika 28. EDS spektar za analiziranu površinu uzorka prikazanog na slici 27	40
Slika 29. Raspodjela kemijskih elemenata na površini uzorka sa slike 27: (A) kalcij, (B) fosfor, (C) kisik, (D) magnezij, (E) stroncij, (F) kalij	41
Slika 30. SEM snimka uzorka precipitata nakon toplinske obrade na 1100 °C u vakuumu tijekom 2 sata	42
Slika 31. EDS spektar za analiziranu površinu uzorka prikazanog na slici 30	43
Slika 32. Raspodjela kemijskih elemenata na površini uzorka sa slike 30: (A) kalcij, (B) fosfor, (C) kisik, (D) magnezij, (E) stroncij, (F) kalij	44
Slika 33. SEM snimka uzorka precipitata HAp toplinski obrađenog na 100 °C u prisustvu zraka tijekom 2 sata	45
Slika 34. SEM snimka uzorka precipitata HAp toplinski obrađenog na 1100 °C u prisustvu zraka tijekom 2 sata	46
Slika 35. SEM snimka uzorak precipitata HAp toplinski obrađen na 1100 °C u vakuumu tijekom 2 sata	46



## **POPIS TABLICA**

Tablica 1. Pojavni oblici kalcijevih ortofosfata ..... 6

## 1. UVOD

S obzirom da medicina u današnje vrijeme omogućuje sve duži životni vijek, javlja se potreba za obnavljanjem pojedinih dijelova tijela umjetnim putem, s obzirom da se starenjem oni sve sporije prirodno obnavljaju. Uzmimo za primjer čovjekov koštano-zglobni sustav.

On je podvrgnut konstantnom trošenju od samog početka našeg života i podložan ozljedama uslijed nesreća i nepravilnog držanja. Obnavlja se relativno sporo, a otprilike iza 40. godine života proizvodnja osteoblasta, koji su zaduženi za obnavljanje, smanjuje se u toj mjeri da obnavljanje ne može pratiti trošenje. Pri tome dolazi do propadanja koštanog tkiva, smanjenja gustoće kosti i povećane krhkosti koja započinje u šezdesetim godinama života. Osim toga, nekada je u slučaju kompliciranih ozljeda, poput lomova, potrebno kost zamijeniti ili iznutra ojačati. S obzirom na to da se prosječna životna dob pomakla na osamdesetak godina, javlja se potreba za umjetnim materijalima koji će osigurati dugotrajnu funkcionalnost koštano-zglobnog sustava [1].

U ovu svrhu se često koriste kalcijevi ortofosfati, koji imaju sastav sličan samoj kosti. Postoji trinaest poznatih pojavnih oblika kalcijevih ortofosfata. Razlike u njihovim svojstvima primarno proizlaze iz razlike u omjeru kalcija i fosfora. U medicinske svrhe primjenjivi su oni oblici čiji je Ca/P omjer između 1 i 2, pri čemu se hidroksiapatit izdvaja kao najpoželjniji oblik s obzirom na omjer jednak kao u prirodnoj kosti.

Od trinaest vrsta kalcijevih ortofosfata se odabire se onaj koji je najprikladniji. Njihova svojstva su uvelike određena omjerom kalcija i fosfora, koji utječe na pH, odnosno topljivost pojedinog kalcijevog ortofosfata. Svojstva su detaljnije objašnjena u daljnjim poglavljima ovog rada. 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 najbližnji prirodnoj kosti.

Kalcijevi ortofosfati mogu se različitim postupcima sinteze dobiti od biootpada, kao što su ljuske jajeta. Ljuske jajeta se sastoje pretežno (oko 94%) od kalcijevog karbonata, kojeg se može određenim postupcima (o kojima će biti riječi u poglavlju 1.2.3 ovog rada) transformirati u neke tipove kalcijevog ortofosfata. Mogućnost uporabe biootpada povoljna je jer osim jeftinog osnovnog materijala smanjujemo trošak odlaganja 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 [2, 3].

## 1.1. Biomaterijali

Jedno od značajnijih područja inženjerstva materijala su materijali za primjenu u medicini. Osobito su osjetljivi materijali za predmete koji dugoročno ostaju u tijelu, kao što su na primjer implantati, šavovi, umjetni zglobovi, pločice, ortopedski vijci itd. Tijelo mora takve materijale prihvatiti da ne bi došlo do komplikacija. S obzirom da čine posebnu kategoriju, nazivamo ih biomaterijalima.

Postoje razne definicije biomaterijala, a donedavno najšire prihvaćena je glasila „biomaterijal je sintetski ili prirodni materijal koji se koristi kao zamjena za dio živog tkiva ili je u produženom kontaktu sa živim tkivom“. Prema radu D.F. Williamsa iz 2009. godine, nova definicija glasi „biomaterijal je tvar načinjena tako da se sama ili kao dio kompleksnog sustava, u kontroliranoj interakciji sa organizmom, može koristiti za regulaciju terapijske ili dijagnostičke procedure u medicini ili veterini“.

Biomaterijali su u odnosu na većinu tehničkih materijala skupi jer moraju osigurati dugotrajan opstanak u uvjetima koji uključuju korozivne slane otopine pri temperaturi od oko 37° pod promjenjivim opterećenjem. S obzirom na to da su rijetki materijali u stanju podnijeti takve uvjete, njihovo stvaranje smatra se bitnim napretkom u svijetu znanosti [4].

### 1.1.1. Podjela biomaterijala

Isto kako materijale dijelimo na 4 osnovne skupine – metale, keramiku, polimere i kompozite, tako i biomaterijale dijelimo na:

- biometale,
- biokeramiku,
- biopolimere,
- biokompozite.

Glavna razlika između materijala i biomaterijala je u njihovoj sposobnosti da opstanu u tijelu bez oštećivanja okolnog tkiva i bez da sami budu oštećeni. U tu kategoriju nisu uključeni materijali od kojih se izrađuju proteze, slušni aparati i slične naprave koje su u kontaktu samo sa površinom kože, jer se ona ponaša kao zaštitna barijera između tijela i vanjskog svijeta. Pod pojmom oštećeni podrazumijevamo da prestaju biti funkcionalni. To je bitno napomenuti jer je u nekim slučajevima bitno svojstvo razgradnje, pri čemu se otpuštaju čestice koje povoljno utječu na okolno tkivo.

Također, bitno je razlikovati biomaterijale i biološke materijale. Biomaterijali su, kako je ranije navedeno, materijali koje tkivo prihvaća i kao takvi mogu se koristiti za zamjenu oštećenog tkiva, dok su biološki materijali produkt raznih bioloških sustava, kao što su na primjer pamuk, drvo, kosti, itd. Osim toga, razlikujemo i pojam biomimetičkih materijala, koji nisu produkt bioloških sustava ali imaju sličnu strukturu i svojstva [4].

### 1.1.2. Primjena biomaterijala

Ranije je spomenuto da je osnovno obilježje biomaterijala njihova kompatibilnost sa organizmom, te im je osnovna primjena u medicini gdje služe kao ojačanje ili zamjena nekog oštećenog tkiva.

#### 1.1.2.1. *Biometali*

Metalni ioni neophodni su za mnoge životne funkcije i njihov nedostatak dovodi do oboljenja, kao što su anemija uslijed nedostatka željeza ili usporen rast uslijed nedostatka cinka. Sa druge strane, povećana količina metalnih iona u tijelu je toksična, osobito kada su u pitanju teški metali poput žive i olova. Čak i ioni željeza, cinka i bakra (esencijalnih elemenata u tijelu) mogu biti otrovni u većim količinama.

Glavnim biometalima smatramo nehrđajući čelik, kobaltove legure te titan i njegove legure. Titan je od nabrojanog najnoviji biometal, ali pokazuje najveći potencijal s obzirom na njegovu otpornost na koroziju, postojanost pri pH tijela, slabu elektrovodljivost te zato što nije sklon tvorenju iona u uvjetima u tijelu. Postoji cijeli niz ostalih poželjnih svojstava titana i njegovih legura, pa se zato često navodi kao idealan biometal.

Uporaba u medicini uključuje umjetne zglobove, pločice za kosti, vijke za stabilizaciju prijeloma te primjenu pri izradi pacemakera i umjetnih dijelova za srce. Također se koriste u dentalnoj medicini za razne primjene, najčešće implantate i mostove pri čemu dolazi do izražaja svojstvo osteointegracije [5, 6].

#### 1.1.2.2. *Biokeramika*

Biokeramika se sastoji od raznih polikristalnih materijala – stakla, staklokeramike te bioaktivnih kompozita sa keramikom kao ojačalom. Svi oni se mogu, po potrebi, proizvoditi u poroznom ili neporoznom (u formi praška, granulata ili prevlake) stanju.

Biokeramiku definiramo kao biomaterijal keramičkog podrijetla. Najčešće se koriste kao zamjenski zglobovi, a također se mogu koristiti za stvaranje prevlake na (najčešće) metalnim implantatima, sa svrhom poboljšanja biokompatibilnosti. U posljednje vrijeme se ispituje njihova sposobnost otpuštanja lijekova, za što neki tipovi biokeramike imaju velik potencijal.

Njihova glavna karakteristika je površinska reaktivnost, koja uzrokuje vezanje s kosti što poboljšava formaciju iste. To se svojstvo koristi za popravak ili rekonstrukciju oštećene ili ostarjele kosti koja nije u stanju samostalno ispunjavati svoju funkciju [4].

#### 1.1.2.3. *Biopolimeri*

Polimeri imaju široku primjenu u medicini, gdje su se ustalili zbog svojih izuzetnih svojstava po kojima se razlikuju od drugih skupina biomaterijala. Njihove su prednosti što su brojni, dobro su oblikovljivi te se često koristi njihova sposobnost bubrenja i topivosti u vodi pri izradi biološki aktivnih materijala i pripravaka. Biopolimeri se koriste također i za izradu medicinskih implantata, materijala za šavove te tvorevina za tretiranje ozljeda, pri čemu se, ovisno o namjeni, koriste biološki razgradivi ili biološki nerazgradivi tipovi materijala [7].

#### 1.1.2.4. *Biokompoziti*

Kompozitni materijali sastoje se od matrice (kontinuirane faze) i punila (diskontinuirane, tj. dispergirane faze). Biokompoziti se u većini slučajeva sastoje od polimerne matrice i anorganskih čestica kao punila, pri čemu se u dentalnoj medicini koriste pretežno biometali, a pri zahvatima na kostima uglavnom koristi biokeramika. U slučaju korištenja biokompozita bitno je, osim odnosa obje komponente sa okolnim tkivom, razmotriti i međusobni odnos punila i matrice, koji moraju biti kompatibilni [8].

## 1.2. Kalcijevi ortofosfati

Kalcijevi ortofosfati su vrsta biokeramike. U prirodi se pojavljuju u veoma različitim formama – kao amorfne strukture (uglavnom kao sferulitne nakupine – male polikristalne strukture) ili minerali. 15% ukupne količine prirodnih kalcijevih ortofosfata čine apatiti, a preostalih 85% fosforiti. Veliki kristali su rijetki, uglavnom kristalne strukture apatita (heksagonalna rešetka). Neki golemi kristali mogu imati i po nekoliko metara i težiti nekoliko tona.

Prirodni oblici uvijek sadrže nečistoće – ioni kalcija su djelomično zamijenjeni ionima stroncija, barija, magnezija, mangana, kalija, natrija ili željeza, a ioni fosfata najčešće s  $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  ili  $\text{VO}_4^{3-}$ . Zbog nečistoća su u prirodi najčešće obojeni.

Kalcijevi ortofosfati biološkog podrijetla čine glavnu komponentu svih kalcificiranih tkiva kod sisavaca, te sa ostalim kalcijevim ortofosfatima prirodnog podrijetla čine većinu sirovine za proizvodnju fosfatnih goriva [9].

### 1.2.1. Opća svojstva kalcijevih ortofosfata

Kalcijevi ortofosfati su slabo topljivi u vodi, netopljivi u bazičnim otopinama i lako topljivi u kiselim otopinama. To je bitno svojstvo jer je ljudsko tijelo blago bazičnog pH (oko 7.4).

U čistom stanju su svi bijele boje i umjerene tvrdoće (neznatno manje od ljudske kosti), dok su u prirodi uslijed nečistoća gotovo uvijek obojeni.

Poroznost je važna kod apatita jer je povezujemo sa njegovom sposobnošću da u svoj atomski sastav uključi veći dio periodnog sustava, što bi moglo biti korisno u slučaju trovanja teškim metalima, a moguće ga je i obogaćivati ionima potrebnima za obnovu okolnog tkiva.

Osteokonduktivnost je svojstvo da čine podlogu za stvaranje nove kosti i podržavaju stvaranje osteoblasta [4, 9, 10].

Apatitna struktura (koju imaju HAp, FAp i OAp) može se opisati kao heksagonalna mreža  $\text{PO}_4$  tetraedara sa kalcijem u intersticijskim položajima i kolonama  $X^-$  ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ) iona orijentiranim duž kristalografske osi  $c$ . Vrstom i mjestom tih aniona određen je tip apatita [11].

## 1.2.2. Pojavni oblici kalcijevih ortofosfata

Tablica 1 - Pojavni oblici kalcijevih ortofosfata [4, 9]

Molarni omjer Ca/P	Spoj	Formula	Topljivost pri 25 °C, g/L, -log(Ks)	Topljivost pri 25 °C, g/L	Raspon stabilne pH vrijednosti u vodenim otopinama 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	$\alpha$ -trikalcijev fosfat ( $\alpha$ -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2,5	~0,0025	[a]
1,5	$\beta$ -trikalcijev fosfat ( $\beta$ -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28,9	~0,0005	[a]
1,0-2,2	Amorfni kalcijev fosfat (ACP)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ , 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]	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (0 < x < 1)	~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

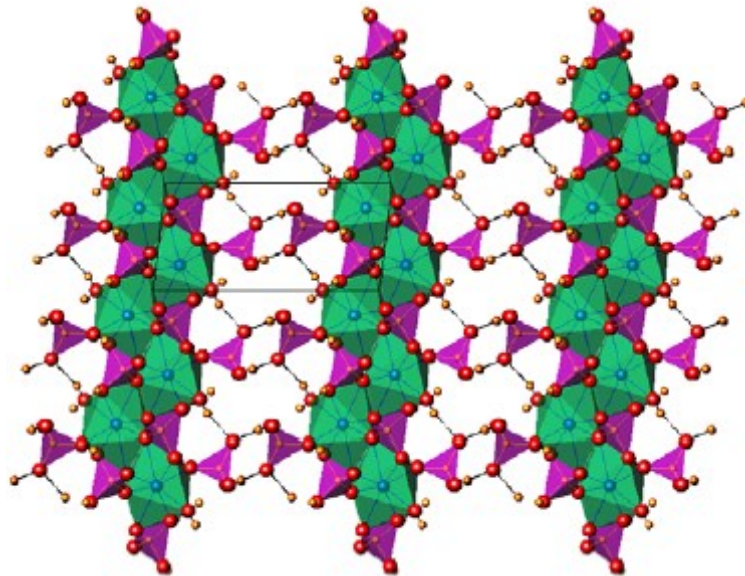
[f] U slučaju kada je x=1 (granični slučaj gdje je Ca/P=1,5) kemijska formula CDHA glasi:  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$ .

Postoji 13 poznatih pojavnih oblika kalcijevih ortofosfata, kako prikazuje tablica 1.

Razlike u njihovim svojstvima primarno proizlaze iz razlike u omjeru kalcija i fosfora, o čemu ovisi njihova topljivost. U medicinske svrhe primjenjivi su oni oblici čiji je Ca/P omjer između 1 i 2, pri čemu se hidroksiapatit izdvaja kao najpoželjniji oblik s obzirom na omjer jednak kao u prirodnoj kosti.

#### 1.2.2.1. Monokalcijev fosfat monohidrat (MCPM) - $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Monokalcijev fosfat monohidrat je najkiseliji i najtopljiviji u vodi. Nastaje iz jako kiselih otopina, najčešće pri proizvodnji fosfatnih gnojiva te nije biokompatibilan sa kostima. Ima primjenu u medicini kao sastojak samoočvršćujućeg cementa od kalcijevih ortofosfata (u nastavku teksta – cement), te se također koristi u prehrambenoj industriji, kao aditiv E341 (najčešće u suhom prašku za pecivo) [4, 9].

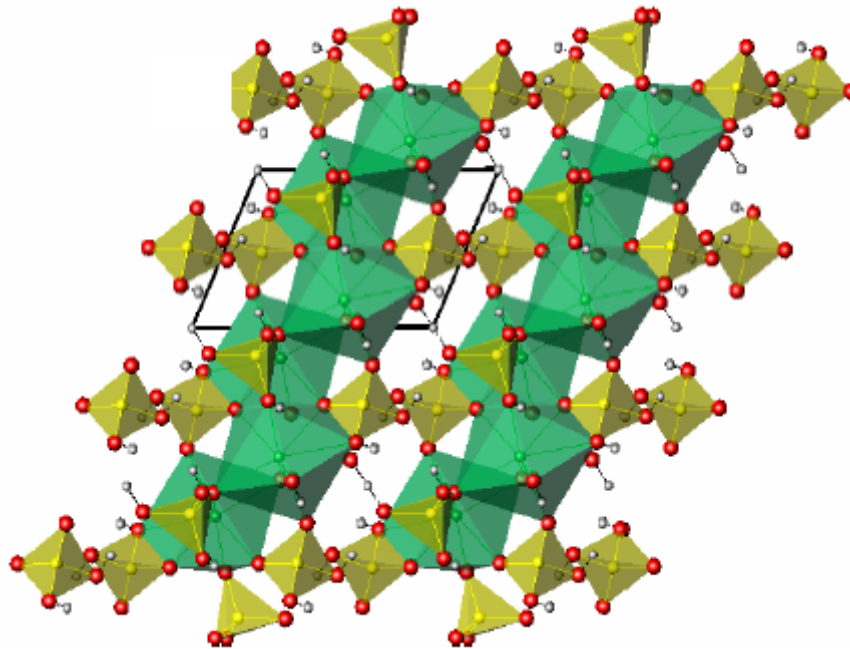


Slika 1. Prikaz strukture MCPM u 010 ravnini.  $\text{PO}_4$  tetraedri prikazani su ljubičastom bojom, narančasta boja predstavlja atome vodika, dok zelena boja predstavlja koordinacijske poliedre oko Ca [11]



1.2.2.2. Monokalcijev fosfat anhidrid (MCPA ili MCP) -  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$

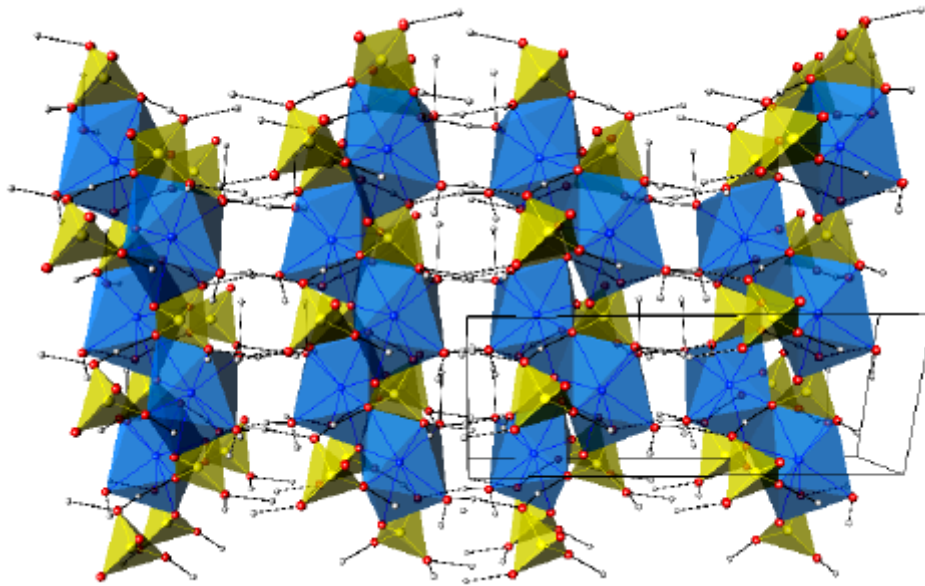
Monokalcijev fosfat anhidridni je oblik MCPM i kristalizira pod istim uvjetima, samo pri višoj temperaturi (preko 100 °C). Također se nikada ne pojavljuje u kalcificiranim tkivima i nije biokompatibilan. Za razliku od MCPM, nema primjenu u medicini, te se rijetko koristi u komercijalne svrhe [4, 9].



Slika 2. Prikaz strukture MCPA u 001 ravnini.  $\text{PO}_4$  tetraedri prikazani su žutom bojom, dok zelena predstavlja koordinacijske poliedre oko Ca [11]

### 1.2.2.3. Dikalcijev fosfat dihidrat (DCPD) - $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

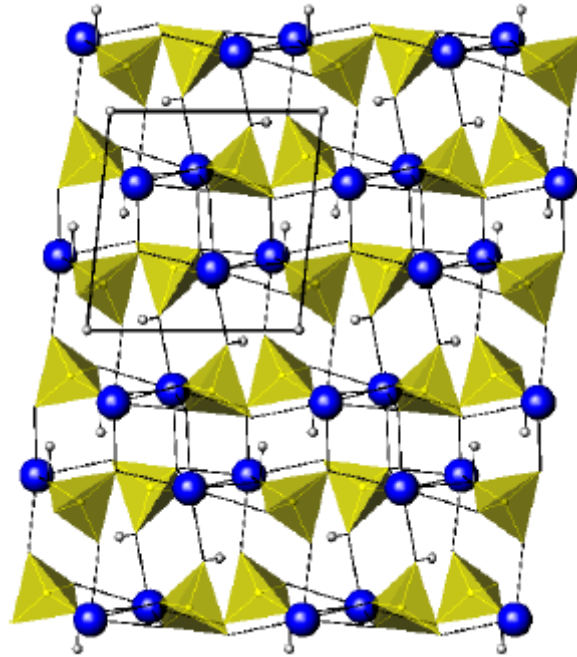
Dikalcijev fosfat dihidrat je poznat kao mineral brushit. Njegova struktura se sastoji od lanaca  $\text{CaPO}_4$ , između kojih se nalaze slojevi molekula vode. Značajan je u medicini jer se često nalazi u patološkim kalcifikacijama (bubrežni i zubni kamenac, hondrocalcinoze i kristalurija). Koristi se za remineralizaciju zubi i dodaje se pastama kao zaštita od karijesa. U prehrambenoj industriji koristi se kao aditiv E341 za poboljšavanje teksture, a osim toga ima primjenu u gnojivima, proizvodnji stakla te u baznim bojama [4, 9].



Slika 3. Prikaz strukture DCPD u 001 ravnini. Plava boja predstavlja koordinacijske poliedre oko Ca, dok žuta boja predstavlja  $\text{PO}_4$  tetraedre. Crveni krugovi predstavljaju kisik, a plavi vodik [11]

1.2.2.4. *Dikalcijev fosfat anhidrid (DCPA ili DCP) - CaHPO<sub>4</sub>*

Dikalcijev fosfat anhidrid je poznat kao mineral monetit. Zbog nedostatka vode manje je topljiv od DCPD. Sintetizira se na isti način, ali pri višim temperaturama. Ne pojavljuje se u prirodnim kalcifikacijama. Primjenjuje se kao sredstvo za poliranje i sastojak zubne paste, te u prehrambenoj industriji kao izvor kalcija i fosfata (često u brašnu i tjestenini) [4, 9].



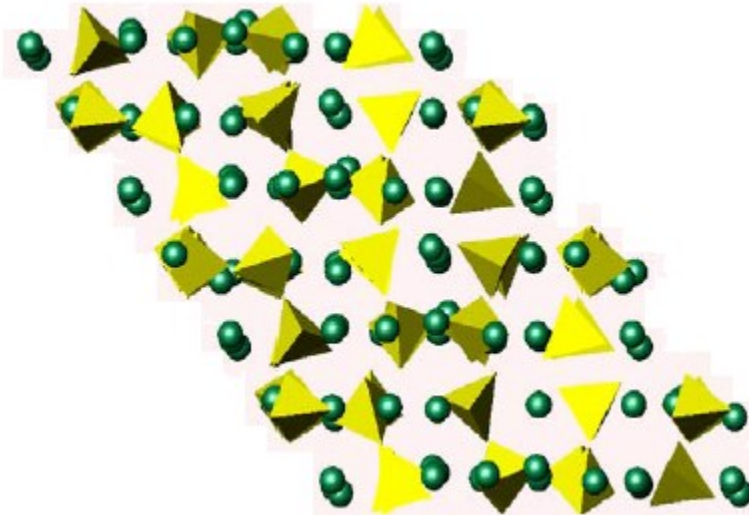
Slika 4. Prikaz strukture DCPA u 100 ravnini. Žuta boja predstavlja PO<sub>4</sub> tetraedre. Plava predstavlja atome kalcija, dok siva predstavlja vodik [11]

1.2.2.5. *Oktokalcijev fosfat (OCP) - Ca<sub>8</sub>(HPO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O*

Oktokalcijev fosfat pojavljuje se uglavnom kao nestabilna međufaza prilikom precipitacije nekog stabilnijeg kalcijevog ortofosfata, a kao stabilna komponenta se pojavljuje u zubnom i bubrežnom kamencu. U medicini se koristi kao implantat na mjestima oštećenja kosti [4, 9].

#### 1.2.2.6. $\alpha$ -trikalcijev fosfat ( $\alpha$ -TCP) - $\alpha$ - $Ca_3(PO_4)_2$

$\alpha$ -trikalcijev fosfat obično nastaje zagrijavanjem  $\beta$ -TCP iznad 1125 °C što ga čini visokotemperaturnom fazom  $\beta$ -TCP ili pri temperaturama 800-1000 °C uz prisustvo nekih silikata, u kojem slučaju ga nazivamo silicijem stabiliziranim  $\alpha$ -TCP. Manje je stabilan od  $\beta$ -TCP i nikada se ne pojavljuje u prirodnoj kalcifikaciji. U medicini se rijetko koristi [4, 9].



Slika 5. Prikaz strukture  $\alpha$ -TCP u 001 ravnini. Žutom bojom prikazani su tetraedri  $PO_4$ , dok zelena boja predstavlja kalcij [11]

#### 1.2.2.7. $\beta$ -trikalcijev fosfat ( $\beta$ -TCP) - $\beta$ - $Ca_3(PO_4)_2$

$\beta$ -trikalcijev fosfat nastaje kao visokotemperaturna faza (iznad 800 °C) i nije moguća precipitacija iz vodene otopine. Idealna struktura (kojoj se teži u praksi) sadrži mikrošupljine premalene za kalcijeve ione, ali dovoljne za magnezijeve ione, koji stabiliziraju strukturu. Kao ni  $\alpha$ -TCP, ne pojavljuje se u prirodnoj kalcifikaciji (osim magnezijem stabiliziranog oblika, koji se pojavljuje u bubrežnom i zubnom kamencu, artritičnim hrskavicama i nekim naslagama u mekom tkivu). U medicini se koristi za cemente i kao komponenta biokeramika za umjetne kosti. Kao i DCPD, koristi se kao sredstvo za poliranje i sastojak zubne paste, te u prehrambenoj industriji kao dodatak protiv zgrušavanja suhoj hrani u prahu (na primjer, u brašnu, kakau i mlijeku u prahu) [4, 9].

1.2.2.8. *Amorfni kalcijev fosfat (ACP) -  $Ca_xH_y(PO_4)_z \cdot nH_2O$ ,  $n = 3-4.5$ ; 15–20%  $H_2O$*

Pod nazivom amorfni kalcijev fosfat podrazumijevamo skupinu kalcijevih ortofosfata koji imaju različitu kemijsku strukturu ali jednaku staklastu fizikalnu strukturu. ACP je čest prekursor pri precipitaciji drugih kalcijevih ortofosfata. U medicini se koriste u cementima te zubnim ispunama. U nekim slučajevima se dodaju hranjivim podlogama za mikroorganizme koji ih mogu konzumirati. Koriste se u prehrambenoj industriji za pročišćavanje sirupa [4, 9].

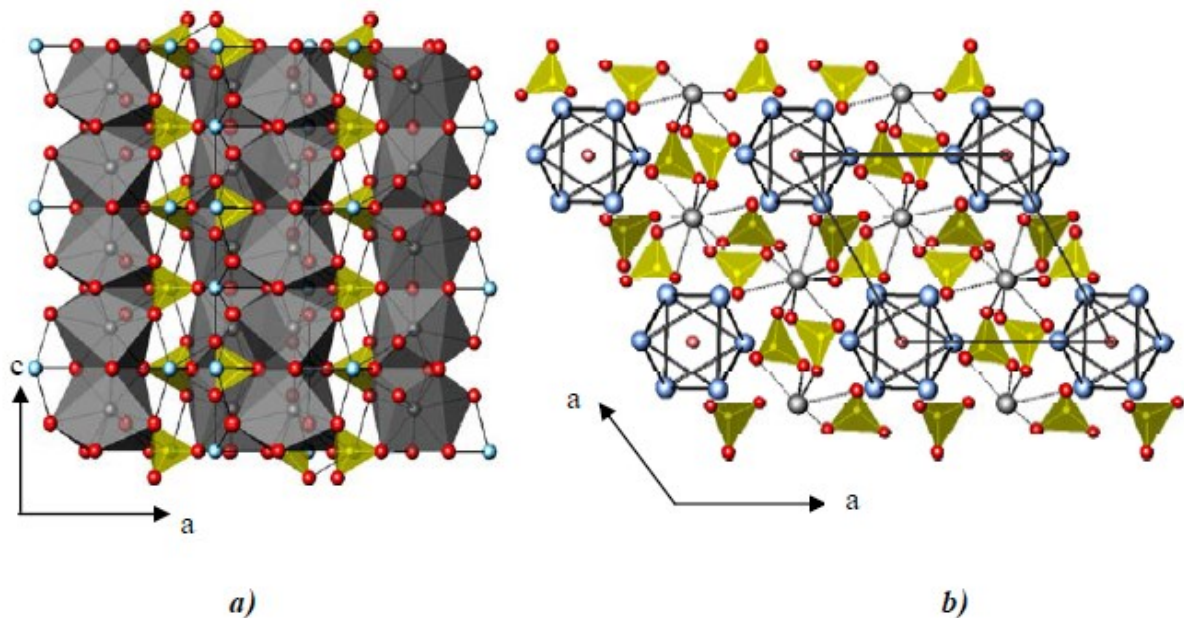
1.2.2.9. *Kalcijem osiromašen hidroksiapatit (CDHA) -  $Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$  ( $0 < x < 1$ )*

Kalcijem osiromašen hidroksiapatit moguće je pripremiti istovremenim dodavanjem otopina koje sadržavaju kalcij i otopina koje sadržavaju ortofosfat u kipuću vodu i prokuhavanjem tijekom nekoliko sati. Ca/P omjer varira, te CDHA najčešće sadrži strane ione na mjestima gdje nedostaju ioni kalcija za potpunu hidroksiapatitnu strukturu. Što je veći nedostatak kalcija, mehanička svojstva su lošija tako da može doći i do 80% smanjenja modula elastičnosti i tvrdoće te do 75% smanjenja čvrstoće pločastih kristala HA. CDHA ima svojstva slična hidroksiapatitu te se istražuju mogućnosti korištenja u svrhu izrade umjetnih kostiju. Katalitička aktivnost CDHA bitna je za izradu biogoriva [4, 9].

### 1.2.2.10. Hidroksiapatit (HA ili HAp) - $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$

Hidroksiapatit je drugi po redu najstabilniji i najmanje topljiv oblik kalcijevih ortofosfata (iza fluorapatita). Oblik i veličina nanočestica ovise o metodi korištenoj za sintetiziranje HA, pri čemu se teži kristalastoj strukturi. Metode su opisane u nastavku poglavlja. Cilj ovog rada je bio postići što veći udio hidroksiapatitne strukture u pripravku.

Čisti HA se nikada ne pojavljuje u prirodi, ali umjetno sintetiziran ima široku primjenu zbog svoje kemijske sličnosti sa mineralima od kojih su načinjeni zubi i kosti. Koristi se za zubne implantate, premaze na protezama, kromatografiju nukleinskih kiselina i proteina, za kontrolu otpuštanja lijekova itd. Najbitnije svojstvo mu je da podržava obnavljanje kosti na mjestu gdje je proteza ili nadopuna ugrađena [2-4, 9-15].



Slika 6. Kristalna struktura hidroksiapatita. A) Sivom bojom su prikazani koordinacijski poliedri kationa Ca koje povezuju žuti  $PO_4$  tetraedri. B) Plavom bojom prikazani su kationski položaji Ca. Crvenom bojom prikazani su atomi kisika, a ružičastom  $X^-$  anioni [11]

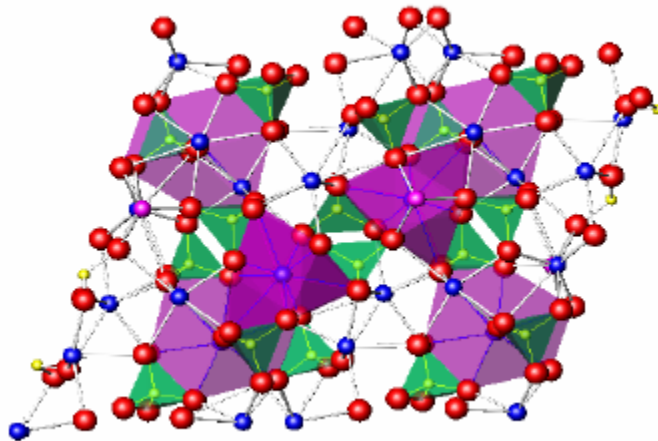
1.2.2.11. Fluorapatit (FA ili FAp) -  $Ca_{10}(PO_4)_6F_2$

Fluorapatit je najstabilniji, najtvrdi i najmanje topljiv oblik kalcijevih ortofosfata. Također je jedini kalcijev ortofosfat koji prirodno tvori velike nakupine koje je moguće komercijalno koristiti. Lako tvori čvrste otopine sa hidroksiapatitom, pri bilo kojem traženom molarnom omjeru F i OH. Takve otopine nazivamo fluorhidroksiapatitima.

FA se ne pojavljuje u biološkim tkivima (osim cakline zubi morskog psa i puževe kućice), prvenstveno zato što je toksična doza fluora u organizmu oko 5 mg/kg tjelesne mase, dok FA sadrži 3,7% masenog udjela fluora. U ljudskim kostima i caklini nalazi se fluor, ali ne u dovoljnoj količini da bi tvorio FA [4, 9].

1.2.2.12. Oksiapatit (OA ili OAp) -  $Ca_{10}(PO_4)_6O$

Oksiapatit je najmanje proučavan tip kalcijevog ortofosfata i, po nekim izvorima, upitno je postoji li [9]. S obzirom da nije zasebno pripremljen, svojstva su mu nepoznata. Smatra se da nastaje u slučaju dehidracije HA pri temperaturama preko 900 °C, ali je nestabilan i pri dodiru s vodom prelazi u HA [4, 9].

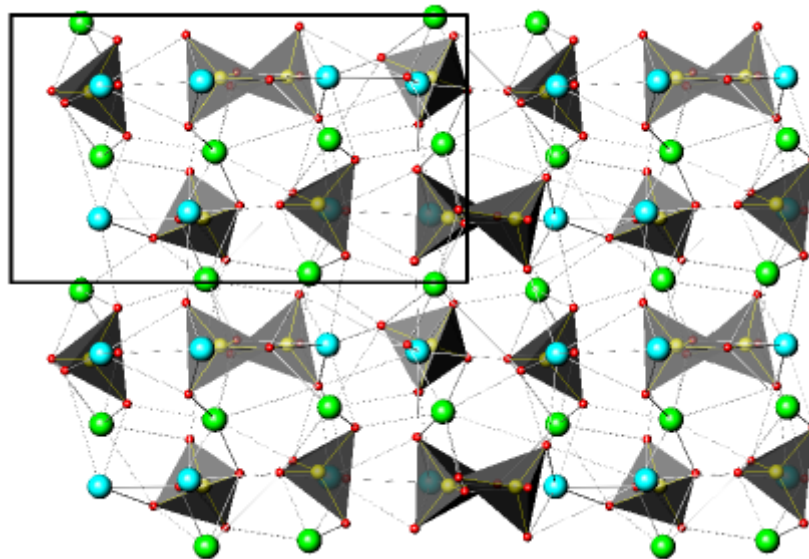


Slika 7. Prikaz strukture OCP u 001 ravnini. A) ljubičastom bojom prikazani su  $CaO_9$ , zelenom poliedri  $PO_4$ , raspoređeni slično apatitnoj strukturi. Crvenom bojom prikazan je kisik [11]



1.2.2.13. *Tetrakalcijev fosfat (TTCP ili TetCP) -  $Ca_4(PO_4)_2O$*

Tetrakalcijev fosfat je također poznat kao mineral hilgenstokit. Najosnovniji je kalcijev ortofosfat. Nastaje pri reakcijama u krutom stanju na temperaturama iznad 1300 °C, najčešće kao nepoželjan nusprodukt pri HA premazima nanošenim plazmom, kada se HA razlaže na  $\alpha$ -TCP, TTCP i CaO. Ne pojavljuje se u biološkim kalcifikacijama te ima široku primjenu u cementima [9].



Slika 8. Prikaz strukture TTCP u 001 ravnini. Plavom bojom prikazani su atomi Ca koji tvore  $Ca-PO_4$  kolone, a zelenom bojom prikazani su atomi Ca koji grade  $Ca-PO_4$  kolone [11]



### 1.2.3. Metode sinteze kalcijevih ortofosfata

Ljudska kost sastoji se od 20% kolagenskih vlakana, 9% od vode i 69% od anorganskih nanokristala. Ti kristali su po strukturi veoma slični hidroksiapatitu, te im dimenzije variraju između 40 nm i 60 nm dužine, 10 nm i 20 nm širine te 1 nm i 3 nm debljine.

HAp je pogodan kao nadomjestak spomenute faze zbog svojih kemijskih i strukturalnih sličnosti, te zbog svojstva osteokonduktivnosti i brzog vezanja sa susjednim kostima. Ta svojstva uvelike ovise o dimenzijama čestica HAp, na što utječu uvjeti pripreme uzoraka poput metode sinteze, temperature obrade i atmosfere.

Najčešće korištene metode sinteze hidroksiapatita su:

- Metoda precipitacijskog taloženja,
- Hidrotermalna metoda,
- Ultrazvučna metoda,
- Mehanokemijska metoda,
- Metoda mikrovalnim zračenjem,
- Sol gel metoda [12].

#### 1.2.3.1. Metoda precipitacijskog taloženja

Jedna je od najčešće korištenih metoda, upotrijebljena je i u ovom radu.

Karakteriziraju je jednostavnost, brza priprema i jednostavna kontrola veličine i kompozicije čestica, te je moguće na različite načine utjecati na homogenost produkta. Istovremeno dolazi do nukleacije i rasta kristala, koji je potrebno držati na minimumu.

Postoje dva glavna koraka – u prvom se miješaju otopine koje sadrže ione kalcija sa izvorom fosfora, uz održavanje konstantne pH vrijednosti, preko 13. Pri tome dolazi do nukleacije i precipitacije, nakon čega je produkt potrebno filtrirati. U drugom koraku dolazi do kalcinacije uslijed grijanja nastalog precipitata na željenoj temperaturi [2, 9, 12].

#### 1.2.3.2. Hidrotermalna metoda

Koristi vodu kao otapalo grijano u zatvorenom sustavu.

Do sinteze nanočestica HAp dolazi miješanjem željenih kalcijevih i fosfornih prekursora u omjeru Ca/P od 1,67 u hidrotermalnom reaktoru. Mješavinu se ostavi da dozrije, nakon čega se ispire, filtrira i suši u peći, te kalcinira korištenjem električne peći.

Korištenjem ove metode moguće je bolje kontrolirati rast i oblik kristala [12].

#### 1.2.3.3. *Ultrazvučna metoda*

Ovom metodom HAp se sintetizira iz smjese otopine izvora kalcija i fosfora korištenjem ultrazvučne sonde različite frekvencije i snage. Fizikalna i kemijska svojstva HAp ovise o frekvenciji i snazi ultrazvučne sonde te trajanju postupka tretiranja ultrazvučnom sondom.

Prilikom miješanja prekursora potrebno je održavati omjer Ca/P na 1,67 te održati konstantnu vrijednost pH. HAp dobiven ovom metodom visoke je čistoće [12].

#### 1.2.3.4. *Mehanokemijska metoda*

Koristi se kombinacijom mehaničkih i kemijskih utjecaja na nanomaterijale.

Sinteza se započinje mehaničkim podražajem, korištenjem kugličnog mlina koji izlaže mješavinu prahova (izvora Ca i P, pomiješanih u omjeru Ca/P od 1,67) velikoj količini energije, što uzrokuje kemijsku transformaciju. Nakon toga, produkt se toplinski obrađuje.

Bitni parametri pri korištenju ove metode su materijal i masa kuglice u mlinu, te brzina i trajanje obrade. Problemi do kojih dolazi su kontaminacija, dugotrajan postupak, nemogućnost utjecanja na morfologiju čestice i slično [12, 14].

#### 1.2.3.5. *Metoda mikrovalnim zračenjem*

Ova metoda se smatra jednom od naprednijih metoda pripreme HAp jer je efikasna, ekonomična i ne zagađuje okolinu. Produkt je u obliku praha, sa homogenom strukturom i visoke je čistoće. Do reakcije dolazi zbog povećanja kinetike reakcije uslijed naglog zagrijavanja na početku i smanjenog trajanja reakcije u odnosu na ostale metode. Kao prekursori se koriste izvori Ca i P, u omjeru 1,67 [12, 15].

#### 1.2.3.6. *Sol gel metoda*

Sol gel je metoda novijeg datuma kojoj raste popularnost zbog specifičnih obilježja poput niske cijene, homogenog produkta, jednostavnosti i niže temperature obrade. Rezultat je HAp homogene strukture i visoke čistoće.

Pri provedbi ove metode potrebno je odabrati Ca i P prekursore te ih pomiješati uz korištenje amonijaka za stabilizaciju pH vrijednosti. Pripravak zatim odstoji, filtrira se, osuši te termički obradi [12].

## 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Cilj istraživanja je sintetizirati hidroksiapatit iz ljuske kokošjeg jajeta metodom precipitacijskog taloženja, te karakterizirati nastale čestice. Odrediti fazni sastav dobivenog kalcijevog ortofosfata, te morfologiju čestica.

Specifični ciljevi ovog rada su:

- toplinskom analizom: termogravimetrijskom analizom (TGA) i diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC) odrediti temperaturu pri kojoj se ljuske jajeta transformiraju u CaO,
- CaO reakcijom hidrolize prevesti u Ca(OH)<sub>2</sub>,
- za precipitacijsko taloženje HAp kao prekursor koristiti Ca(OH)<sub>2</sub> i fosfatnu kiselinu (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), za podešavanje pH vrijednosti koristiti otopinu amonijaka (NH<sub>4</sub>OH),
- dobiveni precipitat HAp toplinski obraditi na različitim temperaturama u prisustvu zraka i u vakuumu,
- rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD) odrediti fazni sastav ljusaka jajeta prije i poslije toplinske obrade, Ca(OH)<sub>2</sub>, uzoraka HAp toplinski obrađenih pri različitim temperaturama i atmosferama toplinske obrade,
- morfologiju sintetiziranih uzoraka čestica HAp analizirati pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM),
- uzorcima HAp SEM-om u kombinaciji s energetske disperznom analizom rendgenskim zrakama (SEM–EDS) mapiranjem odrediti raspodjelu kemijskih elemenata kalcija, fosfora, kisika, magnezija, stroncija i kalija.

### 3. MATERIJALI I METODE

Ispitivanja u okviru ovog rada provedena su u Laboratoriju za analizu metala Zavoda za materijale pri Fakultetu strojarstva i brodogradnje Sveučilišta u Zagrebu. Toplinska analiza (termogravimetrijska i diferencijalna pretražna kalorimetrija) i rendgenska difrakcijska analiza su provedene na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

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

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

#### 3.1. Toplinska analiza: termogravimetrijska analiza (TGA) i diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Temperatura potrebna za prevođenje  $\text{CaCO}_3$  (ljušaka jaja) u  $\text{CaO}$  određena je termogravimetrijskom analizom (TGA) i diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC).

Termogravimetrijskom analizom (TGA) mjere se količina i brzina promjene mase materijala kao funkcije temperature ili vremena u kontroliranim uvjetima. Mjerenja se koriste prvenstveno radi određivanja sastava materijala i predviđanja njihove termostabilnosti na temperaturama do 1200 °C. Upotrebljava se u slučaju kada kod materijala dolazi do gubitka ili povećanja mase uslijed dekompozicije, oksidacije ili dehidracije.

Osim termostabilnosti, pomoću TGA moguće je odrediti postojanost na oksidaciju, sastav višekomponentnih sustava, tok dekompozicije, utjecaj korozivnih ili reaktivnih atmosfera na uzorak te udio vlage i nečistoća u materijalu.

Oblik TGA krivulja ovisi, osim o samoj temperaturi, i o drugim parametrima – trajanju držanja na temperaturi, materijalu, obliku i veličini posudice za uzorak, vrsti korištene plinske atmosfere, protoku plina kraj uzorka te masi, obliku i morfologiji uzorka. Karakteristična krivulja pokazuje dvije značajne temperature – temperaturu pri kojoj još ne dolazi do promjene mase uzorka i temperaturu kada gubitak mase doseže maksimalnu vrijednost [16].

Kalorimetrija je tehnika mjerenja toplinskih svojstava materijala radi utvrđivanja veze između temperature i fizikalnih svojstava uzorka. Također je jedini način mjerenja entalpije procesa. Diferencijalni pretražni kalorimetar je među najčešće korištenim kalorimetrima sa tom svrhom.

Tijekom promjene temperature, DSC mjeri količinu topline koju uzorak prima ili otpušta. Tipično se koristi za praćenje faznih promjena materijala, na način da se energija dovodi referentnom materijalu i uzorku te se mjeri razlika u temperaturi radi identifikacije procesa kao egzotermnog ili endotermnog. Pokusi se odvijaju u kontroliranoj atmosferi i rezultat – toplinski tok - se izražava kao funkcija temperature ili vremena. Uređaj ima široko temperaturno područje (u pravilu od -196 °C do 700 °C)

U slučaju ispitivanja nanočestica, kao što su kalcijevi ortofosfati, DSC se koristi za otkrivanje udjela amorfnog ili kristalnog faze. Pomoću DSC je u tom slučaju moguće saznati endotermu -staklište ili egzotermu – točku kristalizacije amorfne sadržaja [2, 3, 10, 12-15].

### **3.2. Rendgenska difrakcijska analiza (XRD)**

Rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD) određen je fazni sastav ljusaka jajeta prije i nakon toplinske obrade te uzorka toplinski obrađenog sintetiziranog HAp.

XRD se koristi za analizu pojedinog kristala ili materijala s kristalnom strukturom. Rendgenska zraka se usmjerava prema uzorku i način na koji je atomi na koje naiđe raspršuju se proučava. Raspršene rendgenske zrake interferiraju jedne s drugima te se za analizu nastale interferencije koristi Braggov zakon, čime se određuju karakteristike ispitivanog materijala. Rezultati mjerenja se izražavaju u Angströmima, te vrijedi 1 Angström = 0,1 nm.

Rezultati se prikazuju u difraktogramima, iz čega je moguće iščitati kristalnu i molekulnu strukturu uzorka, u što se ubrajaju dužine veza između atoma, kutovi koje veze čine te apsolutne konformacije [18].

### **3.3. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)**

Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) jedna je od najčešćih metoda kod karakterizacije površine materijala jer omogućuje povećanje čak i do 500 000 puta.

Uzorak se podvrgava vakuumu od  $10^{-2}$  do  $10^{-8}$  Pa, te se generira snop primarnih elektrona energije koja varira od 100 eV do 50 keV i usmjerava ih se u površinu promjera oko 5 nm. Dolazi do neelastičnog rasipanja, pri čemu primarni elektroni predaju dio energije

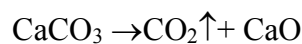
elektronima u materijalu te dolazi do stvaranja signala koji se detektira. Kvaliteta snimke ovisi o energiji sekundarnih elektrona.

### 3.4. Sinteza hidroksiapatita precipitacijskom metodom iz ljustaka jajeta

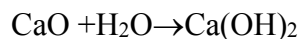
Prema literaturnim podacima ljustake jajeta sastoje se od 94% kalcijevog karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ), 1% magnezijevog karbonata, 1% kalcijevog fosfata i 4% organske tvari. Osim toga, u tragovima se pojavljuju elementi poput  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  i  $\text{Si}^{2+}$  [2].

Sinteza hidroksiapatita odvija se u sljedeća 4 koraka:

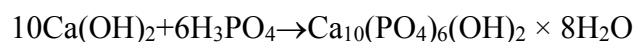
1. Dobivanje kalcijevog oksida,  $\text{CaO}$  transformacijom  $\text{CaCO}_3$  iz ljustaka jajeta, mljevenjem i toplinskom obradom na  $1000\text{ }^\circ\text{C}$ . Transformacija  $\text{CaCO}_3$  u  $\text{CaO}$  može se prikazati sljedećom reakcijom:



2. Sinteza kalcijevog hidroksida ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) reakcijom hidrolize iz  $\text{CaO}$ , tj. miješanjem  $\text{CaO}$  sa destiliranom vodom, prema sljedećoj reakciji:



3. Precipitacijskog taloženja hidroksiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) miješanjem kalcijevog hidroksida ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) i fosfatne kiseline ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) u odgovarajućem molarnom omjeru uz podešavanje pH vrijednosti s otopinom amonijaka, prema reakciji:



4. Toplinska obrada hidroksiapatita dobivenog precipitacijskim taloženjem.

#### 3.4.1. Dobivanje kalcijevog oksida, $\text{CaO}$

Ljustake kokošnjih jaja bilo je potrebno pripremiti prije daljnje sinteze. Priprema se sastoji od:

- prikupljenih ljustaka jajeta, usitnjavanja u tarioniku (slika 9) te ispiranja u destiliranoj vodi,

- sušenja ljusaka jajeta na temperaturi od 100 °C do konstantne mase,
- usitnjavanja u planetarnom kugličnom mlinu, proizvođača Retsch model PM100 (slika 9),
- toplinske obrade na temperaturi od 1000 °C (prema rezultatima toplinske analize) uz postepeno grijanje u električnoj peći, Nabertherm P310.



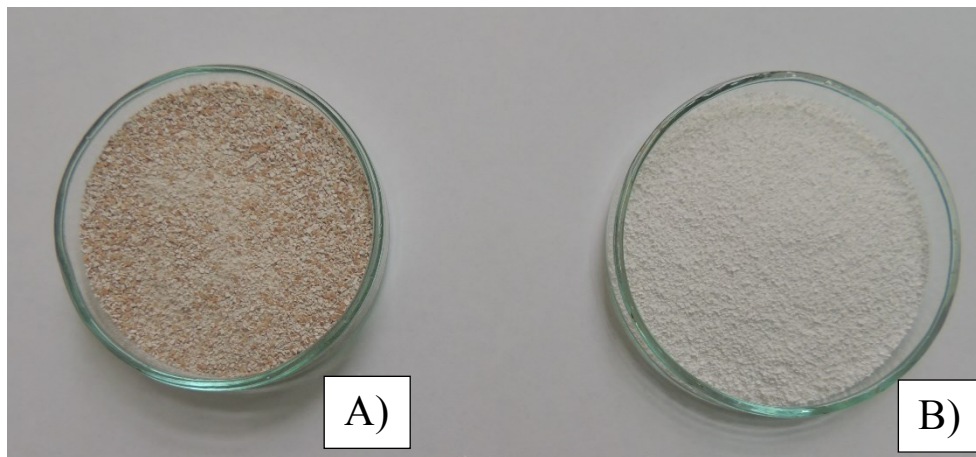
Slika 9. Usitnjavanje osušenih ljusaka jajeta u keramičkom tarioniku

Posuda za homogenizaciju i kuglice korištene za homogenizaciju (slika 10) izrađene su od materijala  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Ljuske jajeta su usitnjavane 60 minuta pri 300 okretaja u minuti.



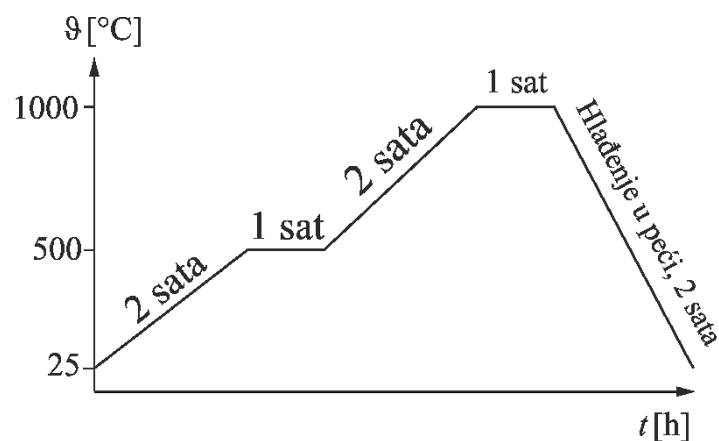
Slika 10. Usitnjavanje ljusaka jajeta u planetarnom kugličnom mlinu

Toplinskom obradom organske tvari iz ljusaka jajeta se razgrađuju, a  $\text{CaCO}_3$  prekristalizira u kalcijev oksid ( $\text{CaO}$ ). Toplinskom analizom određene su temperature pri kojima se odvijaju navedeni procesi, a rendgenskom difrakcijom određen je mineralni sastav ljusaka jajeta prije i nakon toplinske obrade. Slika 11A prikazuje usitnjene ljuske jajeta prije toplinske obrade, a slika 11B prikazuje stanje nakon toplinske obrade pri  $1000\text{ }^\circ\text{C}$ . Krivulja toplinske obrade usitnjenih ljusaka jajeta je grafički prikazana na slici 11 [3].



Slika 11. Usitnjene ljuske jajeta: (A)  $\text{CaCO}_3$  - prije toplinske obrade; (B)  $\text{CaO}$  - nakon toplinske obrade pri  $1000\text{ }^\circ\text{C}$

Usitnjene ljuske jajeta najprije se 2 sata toplinski obrađuju do temperature od  $500\text{ }^\circ\text{C}$  (slika 12), te se izotermno 1 sat toplinski obrađuju tijekom sat vremena. Idućih 2 sata se toplinski obrađuju do temperature od  $1000\text{ }^\circ\text{C}$ , potom se 1 sat izotermno toplinski obrađuju na  $1000\text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon toga slijedi hlađenje u peći do sobne temperature.



Slika 12. Krivulja toplinske obrade usitnjenih ljusaka jajeta



### 3.4.2. Sinteza kalcijevog hidroksida, $\text{Ca}(\text{OH})_2$

Kalcijev hidroksid dobiva se reakcijom hidrolize kalcijevog oksida ( $\text{CaO}$ ) s destiliranom vodom.

Postupak sinteze kalcijevog hidroksida:

U reaktor, prikazan na slici 13, dodano je 5,0000 g  $\text{CaO}$  i 100 mL destilirane vode. Reakcija hidrolize  $\text{CaO}$  provedena je pri konstantnoj temperaturi od  $25 \pm 0,1$  °C tijekom 24 sata uz homogenizaciju na magnetnoj miješalici (Tehtnica MM-530) pri 1000 okretaja/minuti. Temperatura hidrolize održavana je termostatom vodenom kupelji (Lauda, Eco Silver).



Slika 13. Reaktor za hidrolizu kalcijevog hidroksida,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$

### 3.4.3. Precipitacijsko taloženje 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 1,66. pH-vrijednost suspenzije održavana je iznad 11 dodatkom odgovarajuće količine amonijaka. Molarni omjer kalcija i fosfora 1,66 odgovara omjeru Ca/P u hidroksiapatitu.

Precipitacijsko taloženje HAp provedeno je tijekom 24 sata na temperaturi od  $25 \pm 0,1$  °C. Nakon homogenizacije precipitat je filtriran filter papirom crne vrpce, kako je prikazano na slici 14.



Slika 14. Filtriranje precipitata nakon precipitacijskog taloženja hidroksiapatita

#### 3.4.4. Toplinska obrada hidroksiapatita

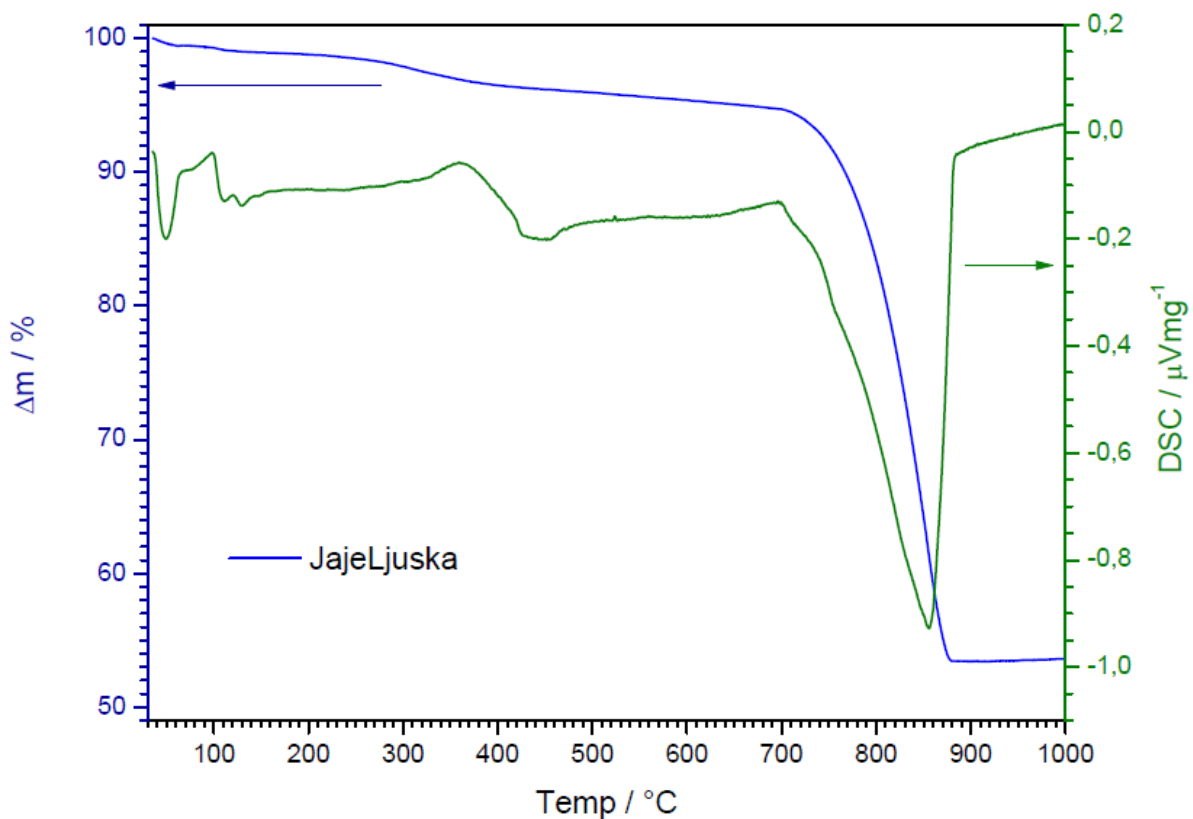
Nakon filtriranja precipitata i ispiranja destiliranom vodom slijedi sušenje na 100 °C do konstantne mase. Osušeni uzorak je podijeljen na 7 jednakih dijelova koji su toplinski obrađeni na različite temperature i u atmosferi kako slijedi:

- 100 °C u prisustvu zraka, tijekom 2 sata
- 300 °C u prisustvu zraka, tijekom 2 sata
- 500 °C u prisustvu zraka, tijekom 2 sata
- 700 °C u prisustvu zraka, tijekom 2 sata
- 900 °C u prisustvu zraka, tijekom 2 sata
- 1100 °C u prisustvu zraka, tijekom 1, 3 i 5 sati
- 1100 °C u vakuumu, tijekom 1, 3 i 5 sati

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultat toplinske analize

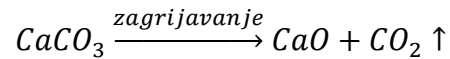
Na slici 15 prikazani su rezultati TGA i DSC analize ljusaka jajeta. Ljuske su bile zagrijavane od sobne temperature do 1000 °C u kontroliranim uvjetima u prisustvu zraka.



- postepeni gubitak mase između sobne temperature i 700 °C,
- nagli pad mase između 700 °C i 880 °C,
- nakon 880 °C nema promjene mase.

Prvi dio krivulje, postepeni gubitak mase, odvija se zbog razgradnje organske tvari i isparavanju vlage. Na krivulji je vidljivo da on iznosi oko 4%, što je ranije navedeno kao udio organske tvari i vlage u ljusci jajeta.

Drugi dio krivulje, nagli pad, može se opisati reakcijom:



Reakcija prikazuje raspad kalcijevog karbonata (prekristalizacija) uslijed povišene temperature na čvrsti kalcijev oksid i ugljikov dioksid u plinovitom stanju. Gubitak mase iznosi oko 45%.

Treći dio krivulje počinje oko 880 °C bez daljnje promjene mase, što potvrđuje da se kalcijev karbonat transformirao u kalcijev oksid. Za toplinsku obradu ljsaka jajeta odabrali smo nešto veću temperaturu (1000 °C).

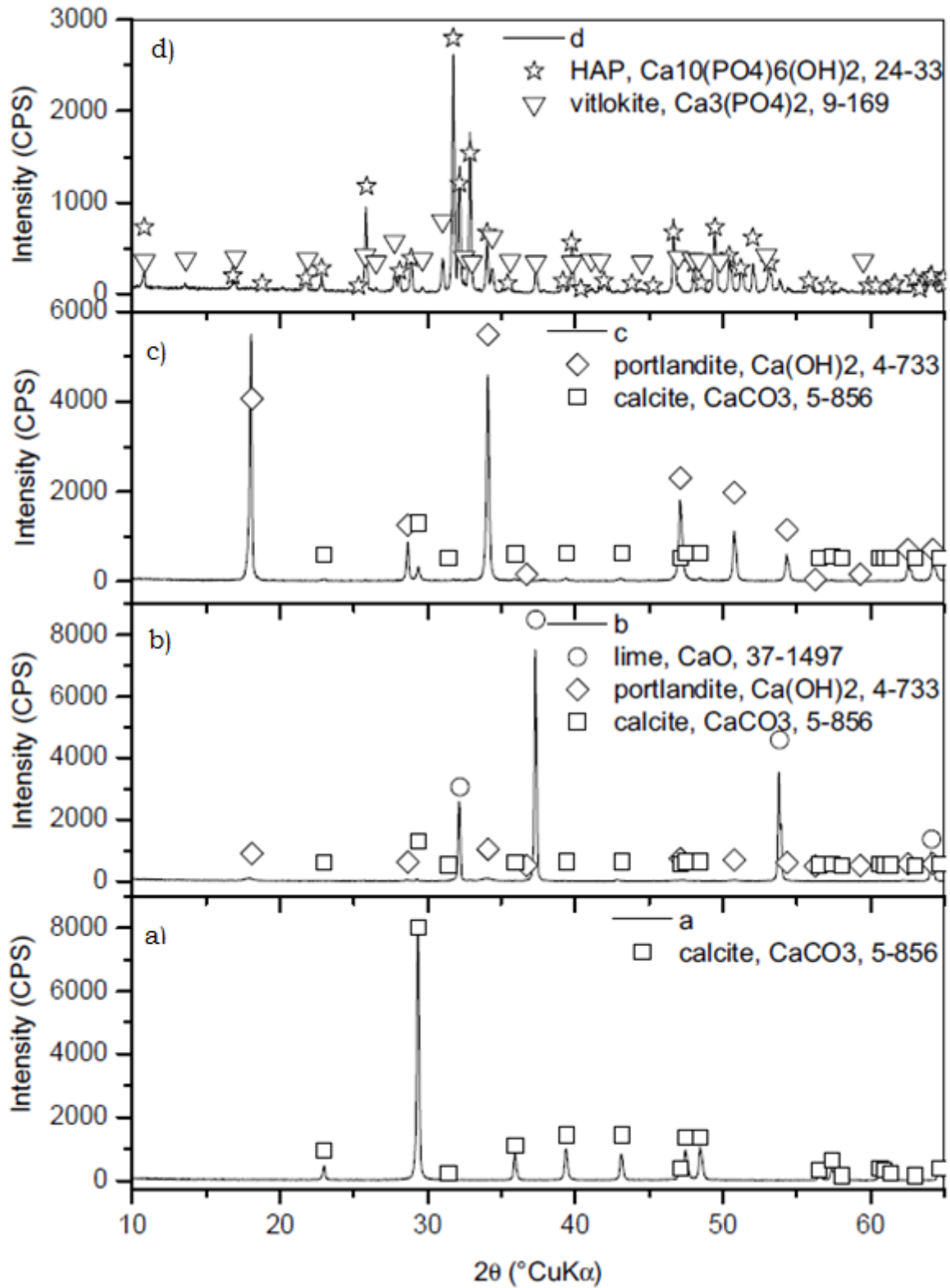
Zelena krivulja na slici 15 prikazuje DSC analizu. Na njoj je značajan egzotermni vrh oko 850 °C te skok oko 900 °C, iz čega slijedi da je reakcija završena i sav  $\text{CaCO}_3$  je preveden u  $\text{CaO}$ .

## 4.2. Rezultati rendgenske difrakcijske analize (XRD)

### 4.2.1. Fazni sastav uzoraka nakon svakog koraka sinteze

Na slici 16 prikazani su rezultati XRD analizu uzorka nakon svakog koraka sinteze:

- Na slici 16a prikazan je difraktogram prvog koraka – samljevene ljuske jajeta, prije toplinske obrade. Dobiveni rezultati pokazuju da se ljuske jajeta sastoje od kalcijevog karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ) - kalcita.
- Na slici 16b prikazan je difraktogram idućeg koraka sinteze, to jest sastav produkta toplinske obrade ljusaka jajeta. Dobiveni rezultati pokazuju da se kalcijev karbonat (kalcit) toplinskom obradom na  $1000\text{ }^\circ\text{C}$  prekristalizirao u kalcijev oksid ( $\text{CaO}$ ) – vapno, a jako mali dio kalcijevog karbonata se nije prekristalizirao u  $\text{CaO}$ . Također, u maloj količini prisutan je i kalcijev hidroksid ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) - portlandit.
- Na slici 16c prikazan je difraktogram trećeg koraka precipitacijskog taloženja HAp – uzorak nakon hidrolize kalcijevog hidroksida iz kalcijevog oksida. Uzorak se uglavnom sastoji od kalcijevog hidroksida ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) – portlandita i jako male količine kalcita.
- Na slici 16d prikazan je difraktogram sintetiziranog HAp, to jest nakon sinteze hidroksiapatita iz kalcijevog hidroksida uz fosfatnu kiselinu i amonijak precipitacijskim taloženjem te toplinski obrađenog na  $1000\text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 2 sata. Struktura se sastoji pretežno od hidroksiapatita, te male količine vitlokita -  $\beta$ -trikalcijevog fosfata ( $\beta$ -TCP) koji je, kako je navedeno u poglavlju 1.2.2., također kalcijev ortofosfat.



Slika 16. Difraktogrami uzoraka nakon svakog od 4 koraka sinteze hidroksiapatita

#### 4.2.2. Fazni sastav uzoraka precipitata toplinski obrađenih u različitim uvjetima

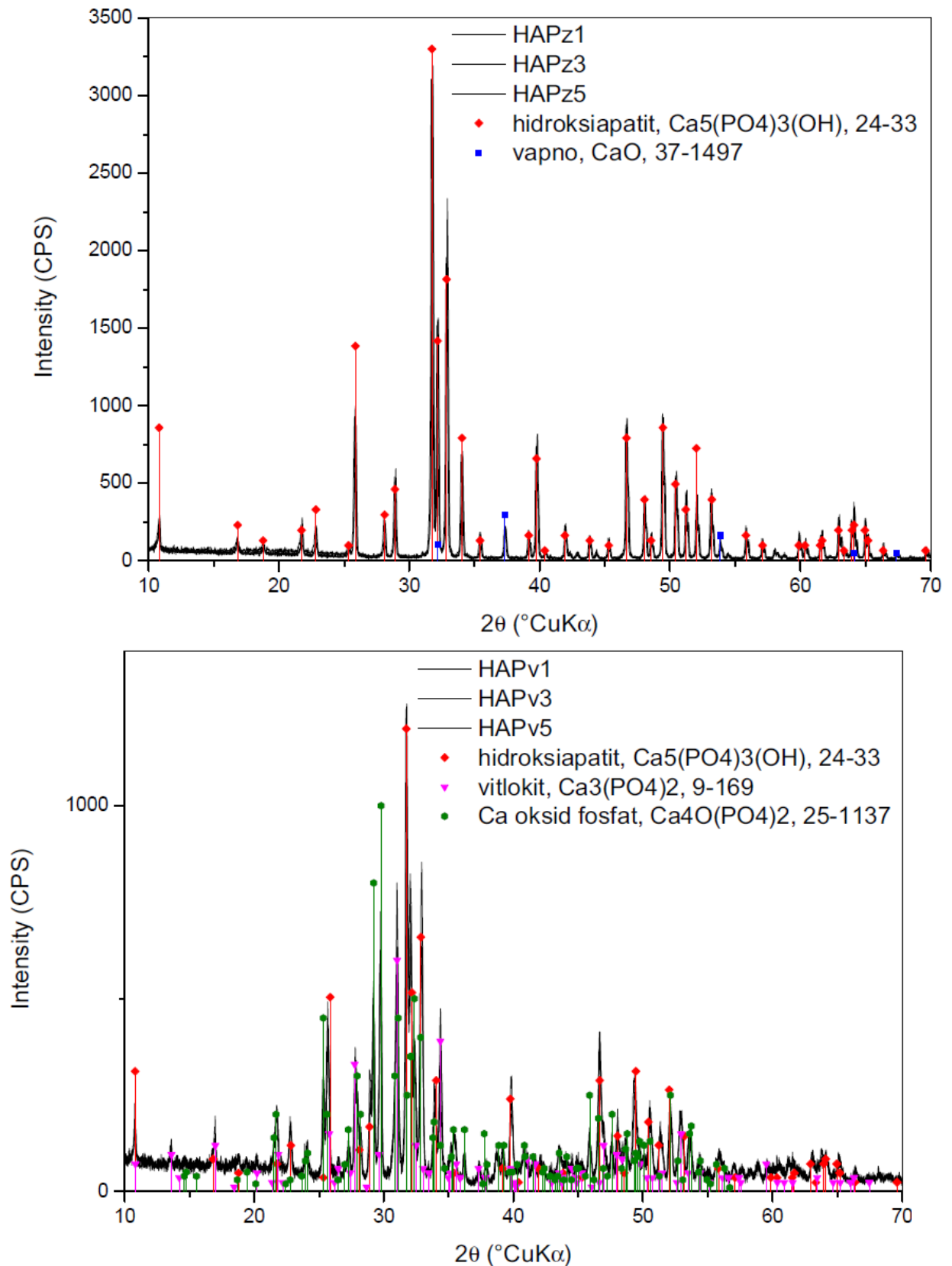
U svrhu određivanja utjecaja vremena i atmosfere toplinske obrade precipitata, uzorak dobiven precipitacijskim taloženjem toplinski je obrađen na 1100 °C tijekom 1, 3 i 5 sati u prisustvu zraka i vakuumu.

Na slici 17A prikazani su preklopljeni difraktogrami uzoraka precipitata toplinski obrađenih tijekom 1, 3 i 5 sati na 1100 °C u prisustvu zraka, a na slici 17B prikazani su preklopljeni difraktogrami uzoraka toplinski obrađenih na 1100 °C tijekom 1, 3 i 5 sati u vakuumu.

Na slici 17A vidi se da uzorci precipitata toplinski obrađeni na 1100 °C u prisustvu zraka kao glavnu mineralnu fazu sadrže hidroksiapatit (za sva tri vremena toplinske obrade: 1, 3 i 5 sati), uz prisutnost male količine vapna, koje je zaostalo iz ranijih koraka obrade.

Iz slike 17B vidljivo je da prilikom toplinske obrade precipitata na 1100 °C u vakuumu, uz hidroksiapatit kao glavnu mineralnu fazu nastaju u maloj količini dvije dodatne faze – vitlokit ( $\beta$ -TCP) i tetrakalcijev fosfat (TTCP).

Dobiveni rezultati pokazuju da vrijeme toplinske obrade (1, 3 i 5 sati) ne utječe na fazni sastav, dok atmosfera toplinske obrade utječe.



Slika 17. Fazni sastav uzoraka precipitata toplinski obrađenih na 1100  $^{\circ}\text{C}$  tijekom 1, 3 i 5 sati u atmosferi (A) zraka i (B) vakuuma



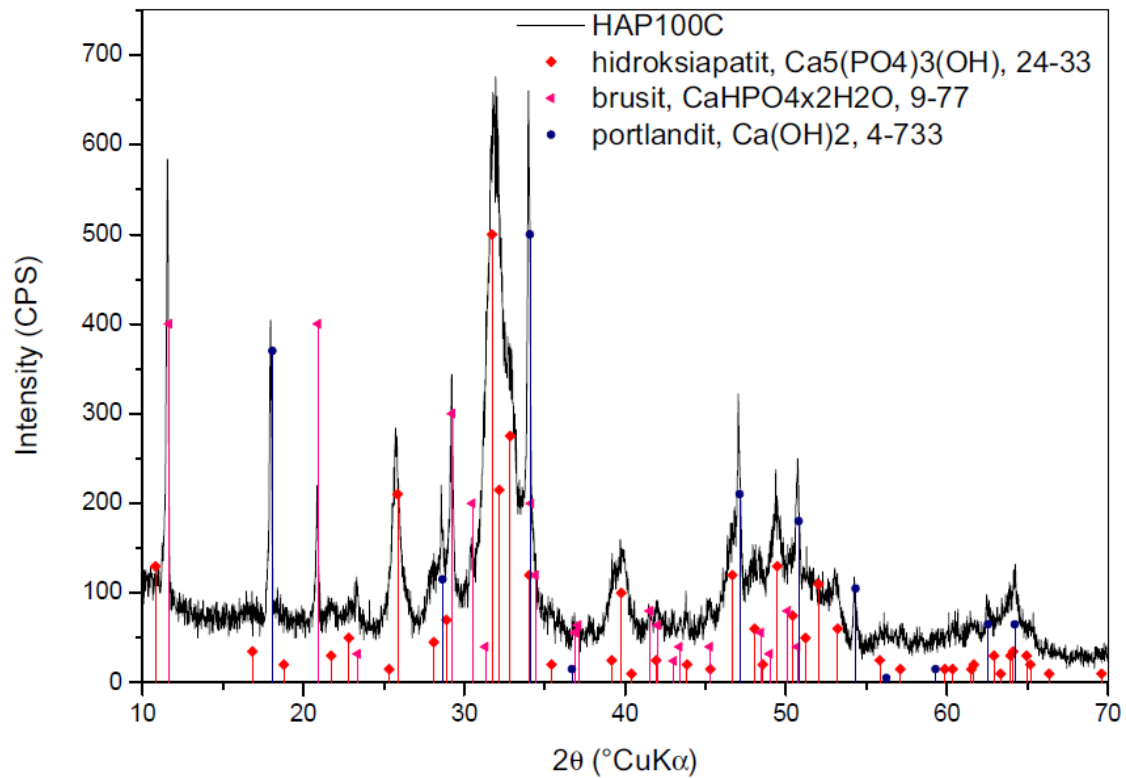
#### 4.2.3. Fazni sastav uzoraka precipitata HAp toplinski obrađeni na različitim temperaturama

Kako je ranije spomenuto, uzorak precipitata HAp je toplinski obrađen na 100 °C, 300 °C, 500 °C, 700 °C, 900 °C i 1100 °C u prisustvu zraka tijekom 2 sata. Svim navedenim uzorcima određen je fazni sastav u svrhu određivanja utjecaja temperature toplinske obrade na fazni sastav. Difraktogrami navedenih uzoraka prikazani su na slikama 18, 19, 20, 21 i 22.

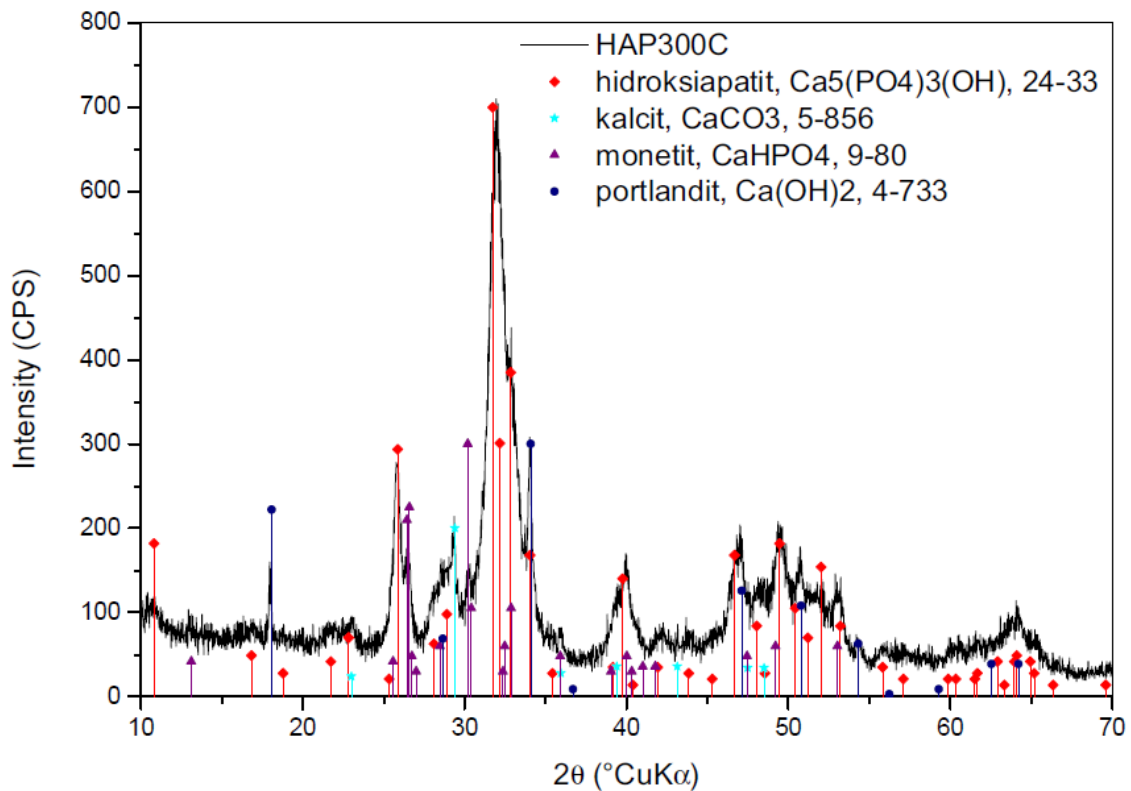
Analizirani uzorci sastoje se od faza kako slijedi:

- uzorak sušen na 100 °C (slika 18) sadrži kao glavnu mineralnu komponentu hidroksiapatit, a kao sporedne faze brushit (DCPD) i portlandit ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ),
- uzorak toplinski obrađen na 300 °C (slika 19) sadrži kao glavnu mineralnu komponentu hidroksiapatit, a kao sporedne faze kalcit ( $\text{CaCO}_3$ ), monetit (DCPA) i portlandit,
- uzorak toplinski obrađen na 500 °C (slika 20) sadrži kao glavnu mineralnu komponentu hidroksiapatit, a kao sporedne faze kalcit i vapno ( $\text{CaO}$ ),
- uzorak toplinski obrađen 700 °C (slika 21) sadrži kao glavnu mineralnu komponentu hidroksiapatit, a kao sporedne faze vitlokit ( $\beta$ -TCP) i vapno.
- uzorak toplinski obrađen 900 °C (slika 22) sadrži kao glavnu mineralnu komponentu hidroksiapatit, a kao sporedne faze vitlokit ( $\beta$ -TCP) i vapno.
- uzorak toplinski obrađen 1100 °C (slika 23) sadrži kao glavnu mineralnu komponentu hidroksiapatit, a kao sporedne faze vitlokit ( $\beta$ -TCP) i vapno.

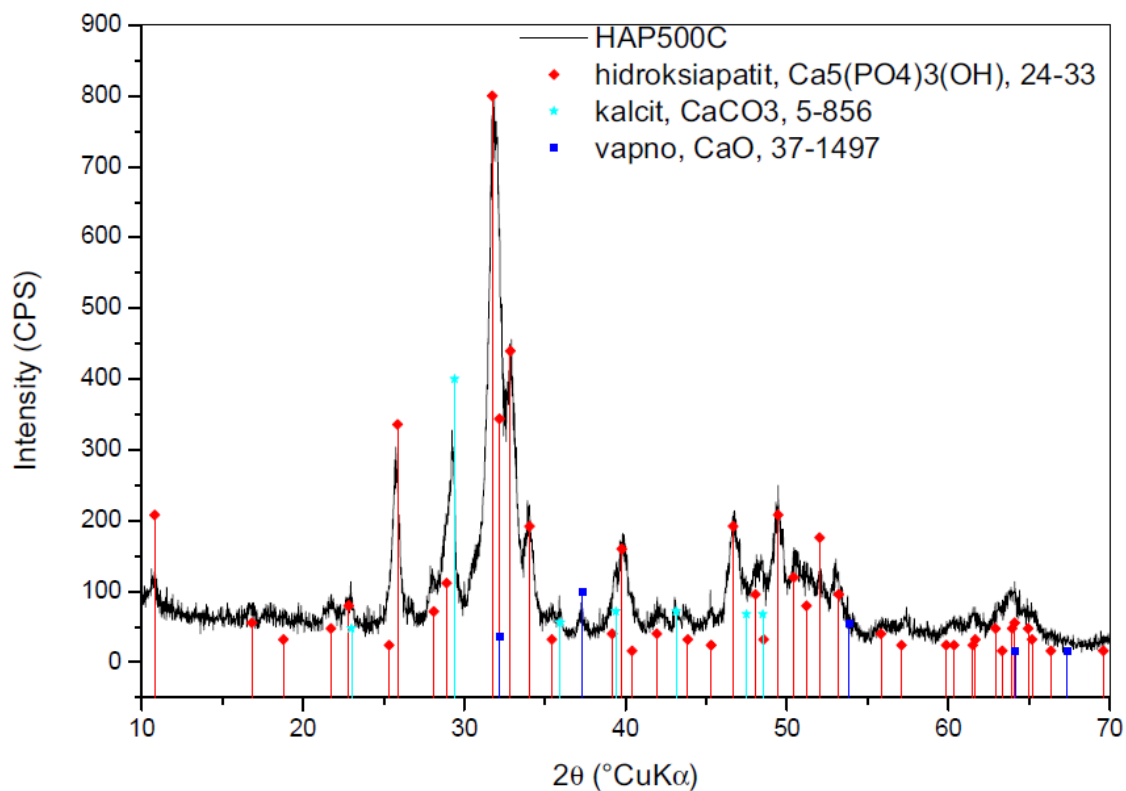
Iz rezultata je vidljivo da toplinskom obradom precipitata na visokim temperaturama (iznad 700 °C) nastaju iste tri faze – hidroksiapatit kao glavna mineralna faza, te vitlokit i vapno (kao sekundarne mineralne faze).



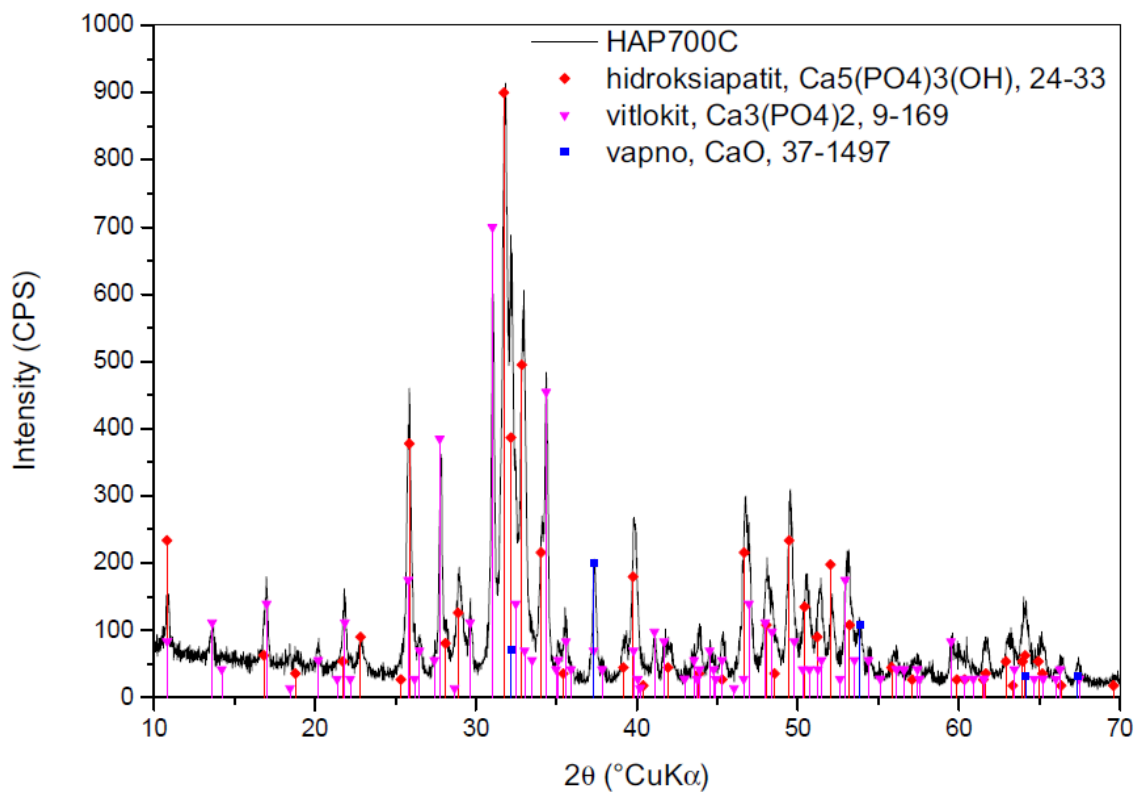
Slika 18. XRD analiza uzorka toplinski obrađenog na 100 °C tijekom 2 h, u prisustvu zraka



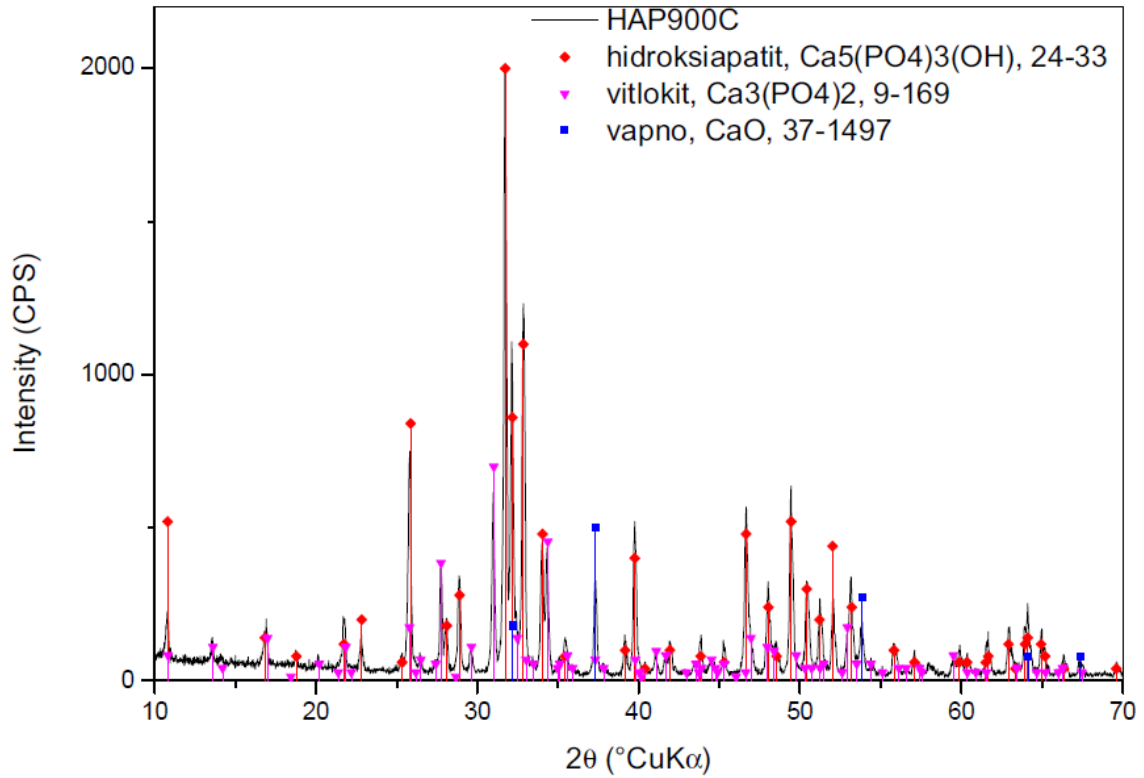
Slika 19. XRD analiza uzorka toplinski obrađenog na 300 °C tijekom 2 h, u prisustvu zraka



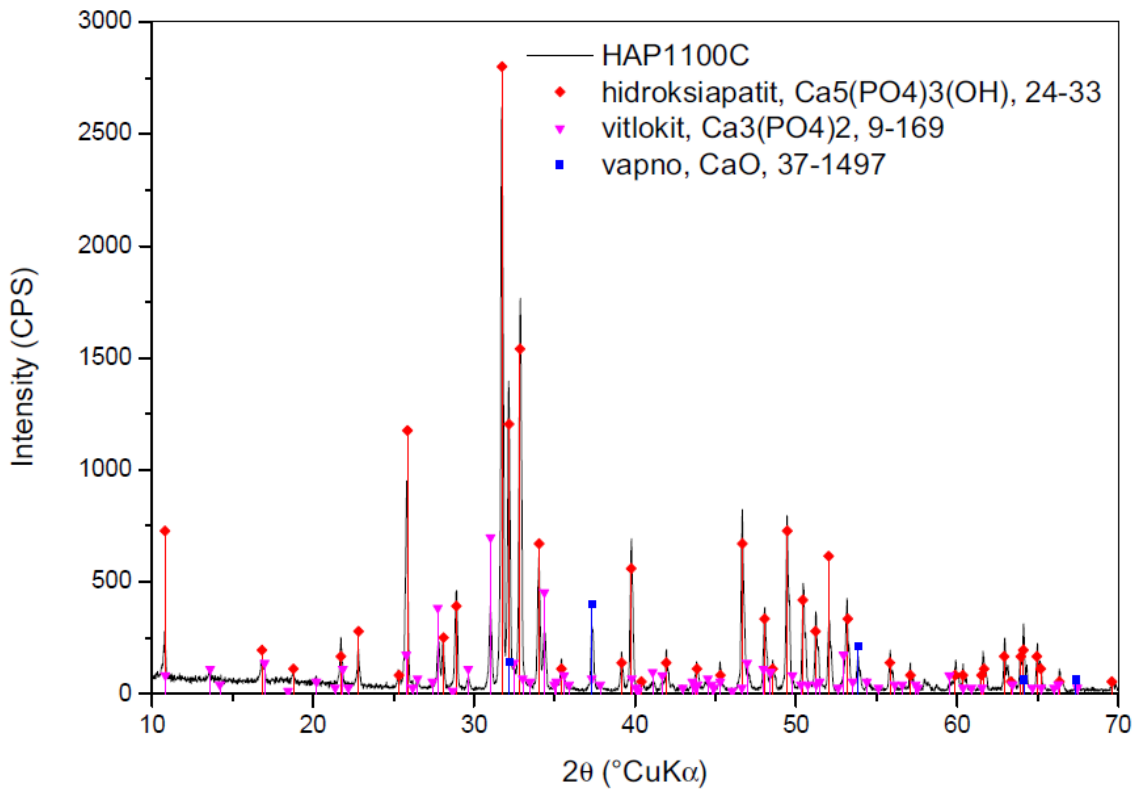
Slika 20. XRD analiza uzorka toplinski obrađenog na 500 °C tijekom 2 h, u prisustvu zraka



Slika 21. XRD analiza uzorka toplinski obrađenog na 700 °C tijekom 2 h, u prisustvu zraka



Slika 22. XRD analiza uzorka toplinski obrađenog na 900 °C tijekom 2 h, u prisustvu zraka

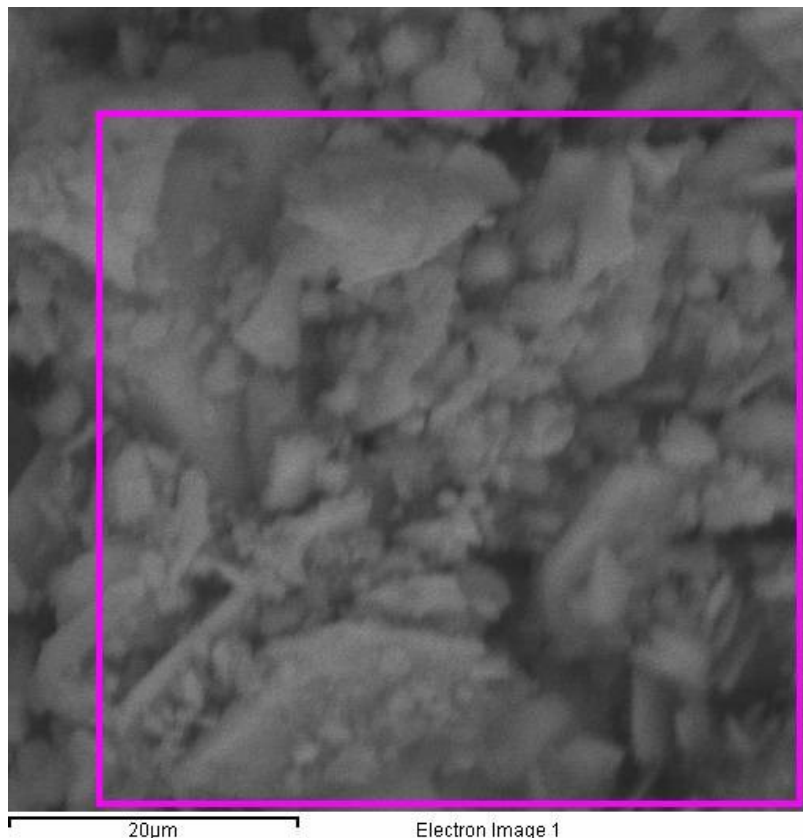


Slika 23. XRD analiza uzorka toplinski obrađenog na 1100 °C tijekom 2 h, u prisustvu zraka

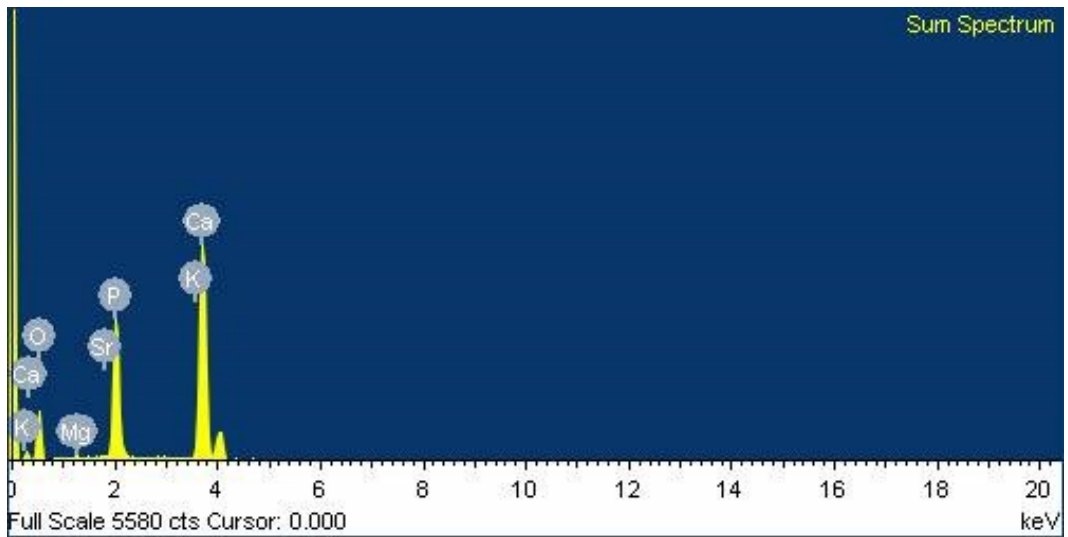
### 4.3. Rezultati SEM-EDS analize uzorka precipitata HAp nakon toplinske obrade

Na slici 24 prikazana je morfologija čestica uzorka precipitata nakon sušenja na 100 °C tijekom 2 h.

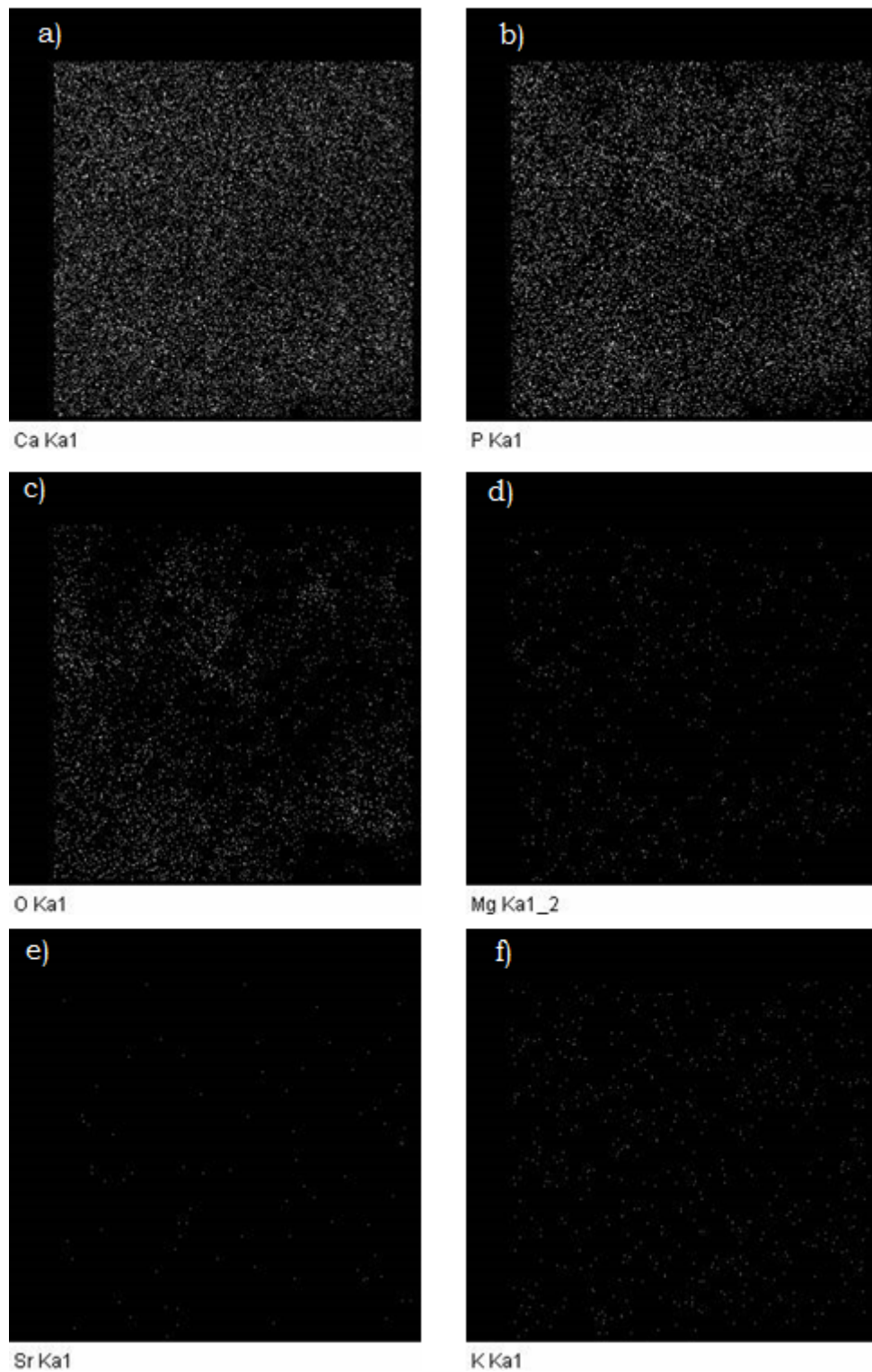
SEM-om u kombinaciji s energetske disperznom analizom rendgenskim zrakama (SEM–EDS) mapiranjem je određena raspodjela kalcija (Ca), fosfora (P), kisika (O), magnezija (Mg), stroncija (Sr) i kalija (K) na površini uzorka prikazanog na slici 24. EDS spektar analizirane površine (slika 24) prikazan je na slici 25, a rezultati raspodjele navedenih kemijskih elemenata prikazani su na slici 26. EDS analizom nađeno je da u analiziranom uzorku su prisutni sljedeći kemijski elementi: Ca, P, O, Mg, Sr i K. Dobiveni rezultati analize raspodjele navedenih kemijskih elemenata (slika 26) pokazuju da su homogeno raspoređeni u analiziranom uzorku.



Slika 24. SEM snimka uzorka precipitata sušenog na 100 °C tijekom 2 sata

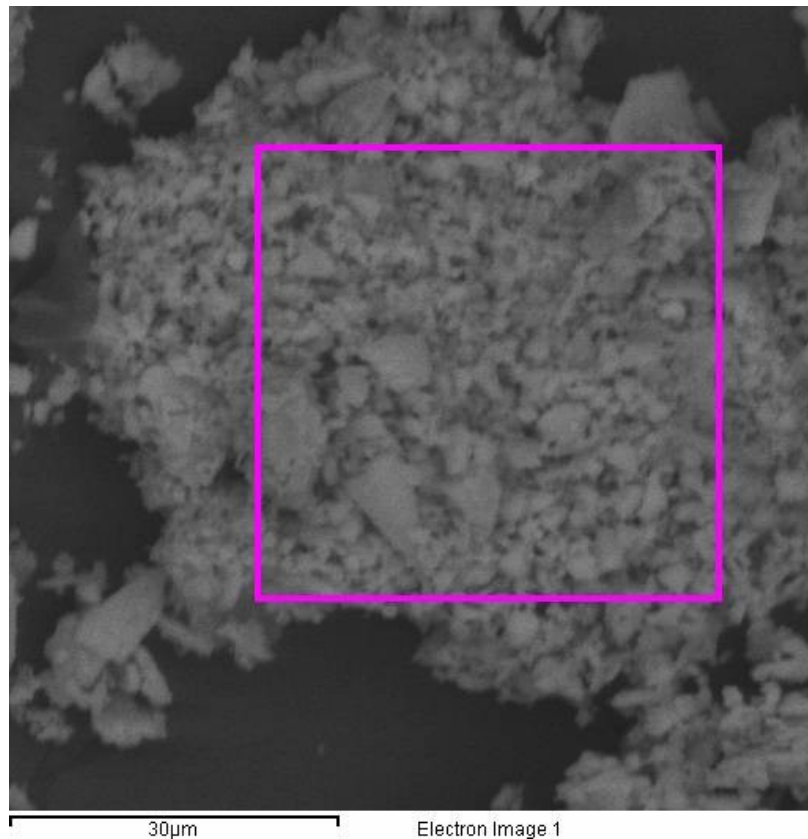


Slika 25. EDS spektar za analiziranu površinu uzorka prikazanog na slici 24



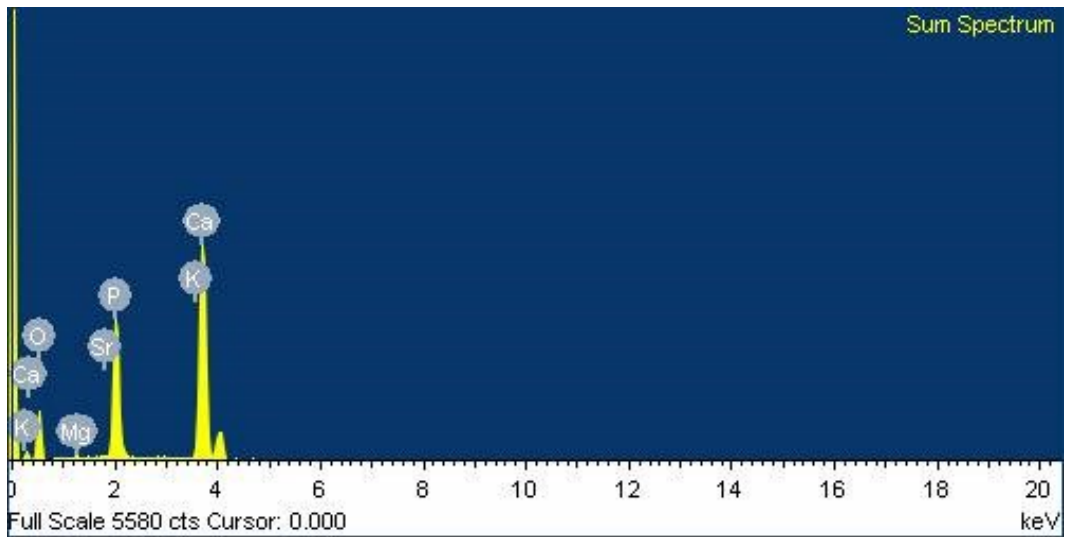
Slika 26. Raspodjela kemijskih elemenata na površini uzorka sa slike 24: (A) kalcij, (B) fosfor, (C) kisik, (D) magnezij, (E) stroncij, (F) kalij

Na slici 27 prikazana je morfologija površine uzorka precipitata nakon toplinske obrade na 1100 °C u prisustvu zraka, tijekom 2 sata. EDS spektar analizirane površine (slika 27) prikazan je na slici 28, a rezultati raspodjele navedenih kemijskih elemenata prikazani su na slici 29. EDS analizom nađeno je da su u analiziranom uzorku prisutni sljedeći kemijski elementi: Ca, P, O, Mg, Sr i K. Dobiveni rezultati analize raspodjele navedenih kemijskih elemenata (slika 29) pokazuju da su homogeno raspoređeni u analiziranom uzorku.

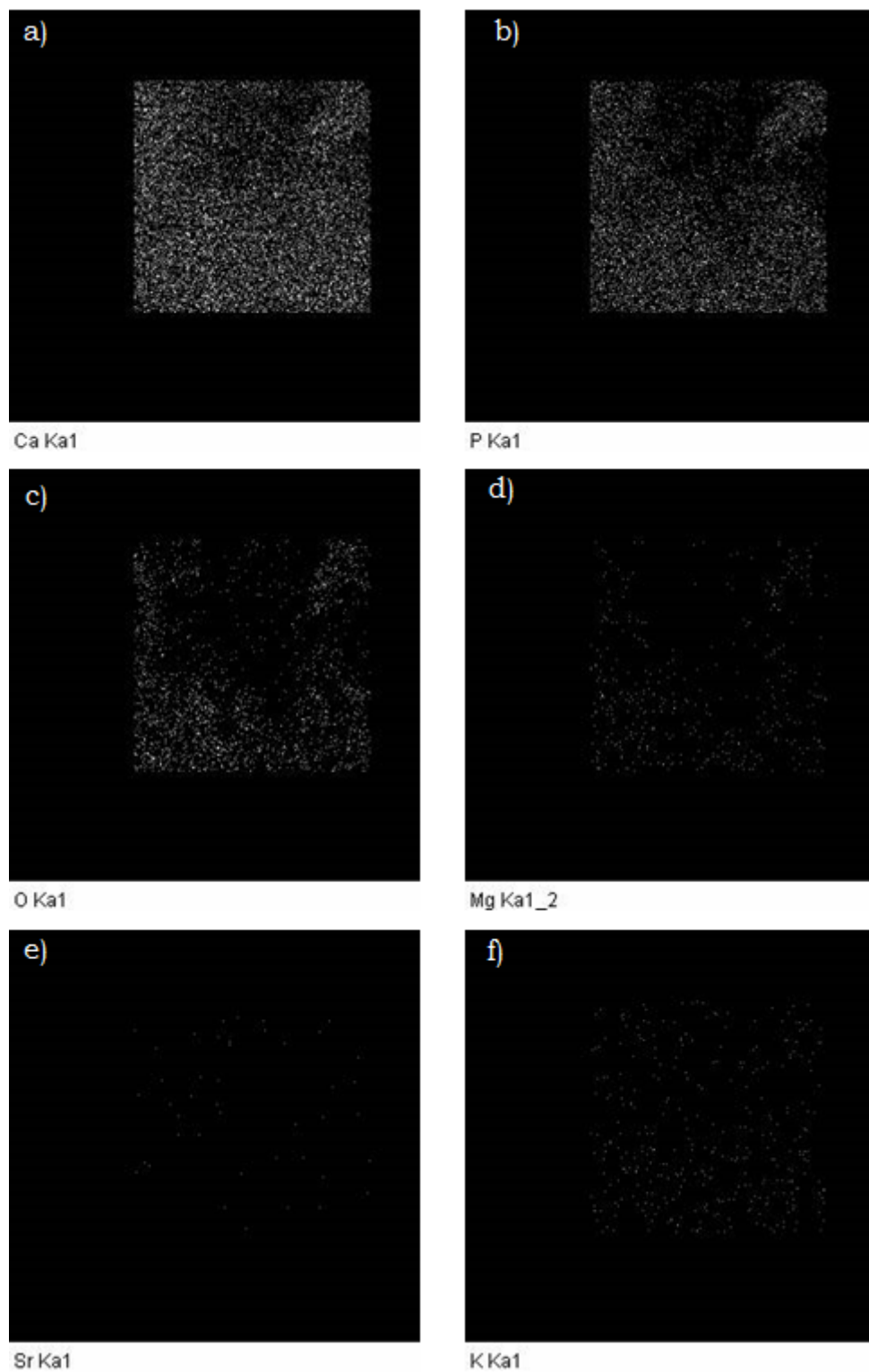


Slika 27. SEM snimka uzorka precipitata nakon toplinske obrade na 1100 °C u prisustvu zraka tijekom 2 sata.



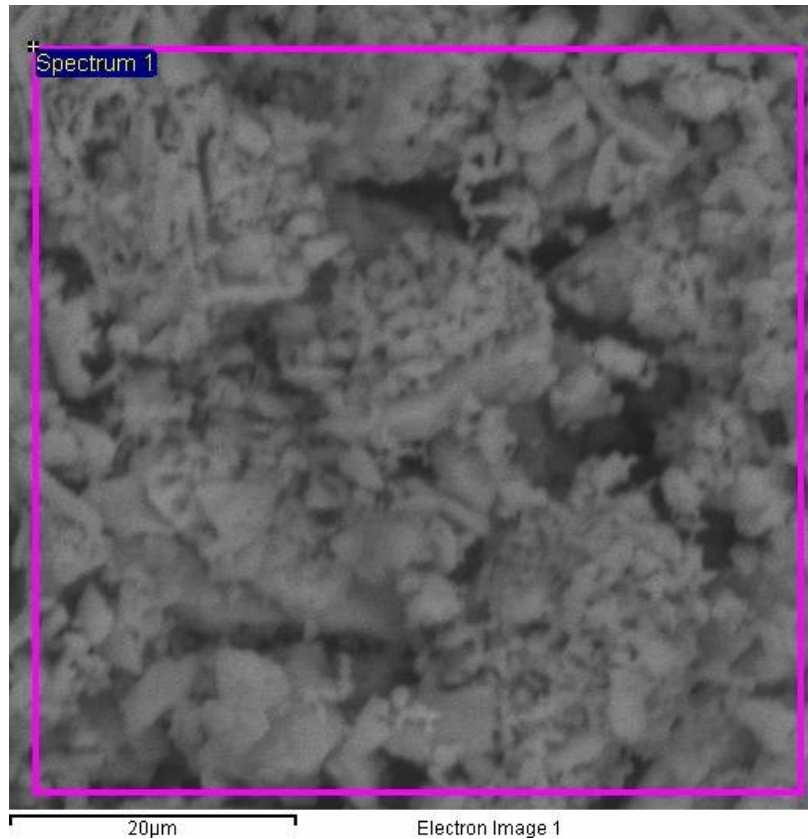


Slika 28. EDS spektar za analiziranu površinu uzorka prikazanog na slici 27

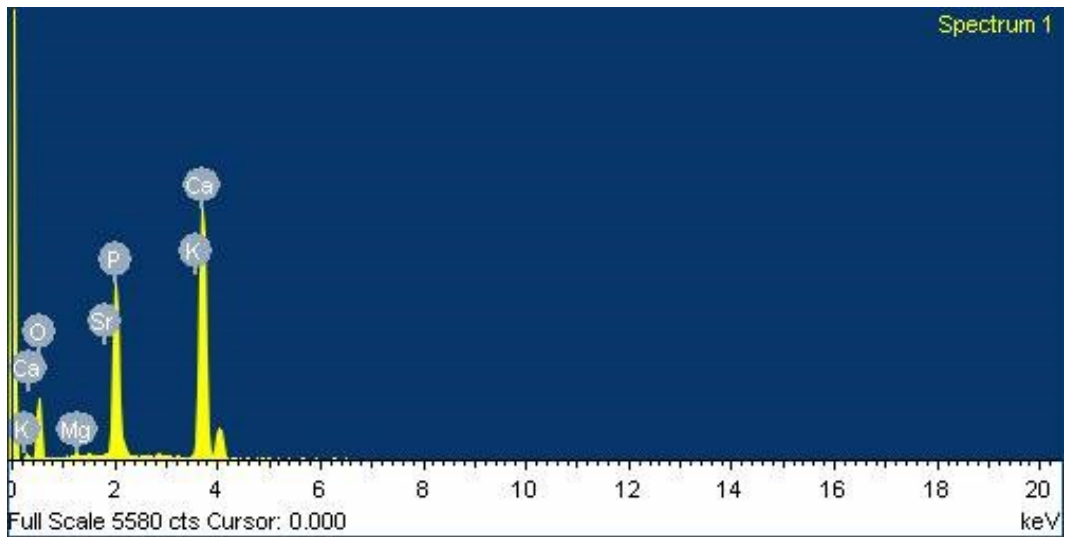


Slika 29. Raspodjela kemijskih elemenata na površini uzorka sa slike 27: (A) kalcij, (B) fosfor, (C) kisik, (D) magnezij, (E) stroncij, (F) kalij

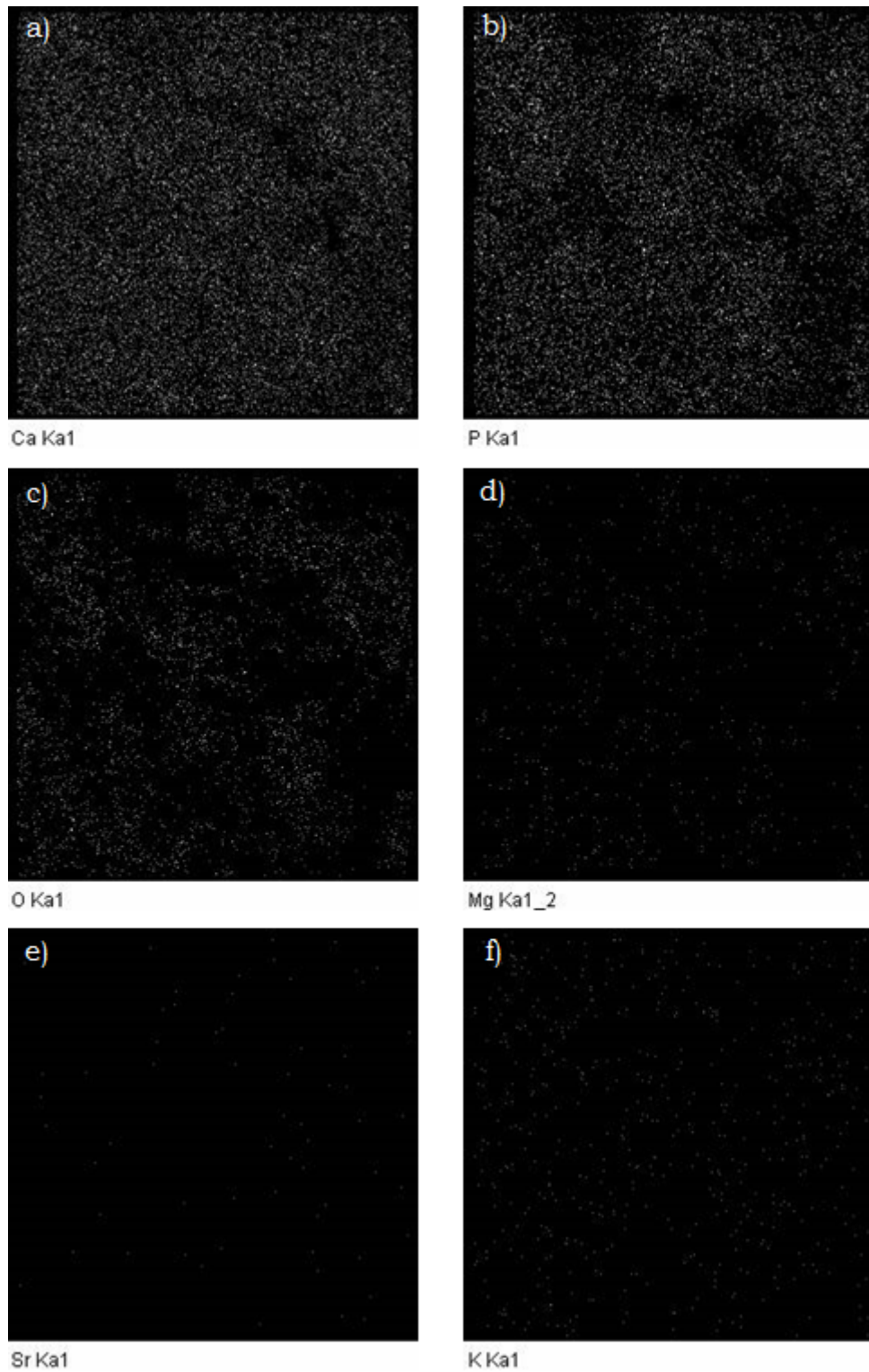
Na slici 30 prikazana je morfologija površine uzorka precipitata nakon toplinske obrade na 1100 °C u vakuumu tijekom 2 sata. EDS spektar analizirane površine (slika 30) prikazan je na slici 31, a rezultati raspodjele navedenih kemijskih elemenata prikazani su na slici 32. EDS analizom nađeno je da su u analiziranom uzorku prisutni sljedeći kemijski elementi: Ca, P, O, Mg, Sr i K. Dobiveni rezultati analize raspodjele navedenih kemijskih elemenata (slika 32) pokazuju da su homogeno raspoređeni u analiziranom uzorku.



Slika 30. SEM snimka uzorka precipitata nakon toplinske obrade na 1100 °C u vakuumu tijekom 2 sata

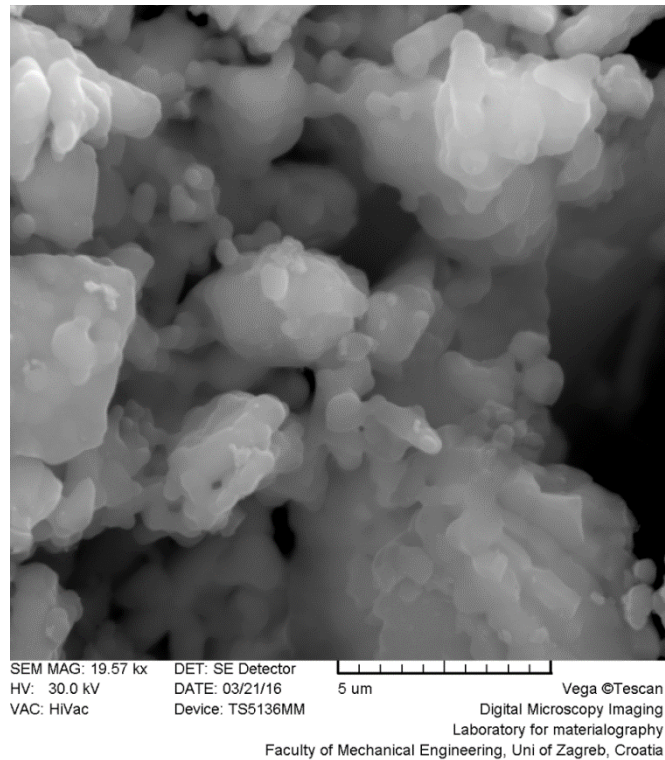


Slika 31. EDS spektar za analiziranu površinu uzorka prikazanog na slici 30

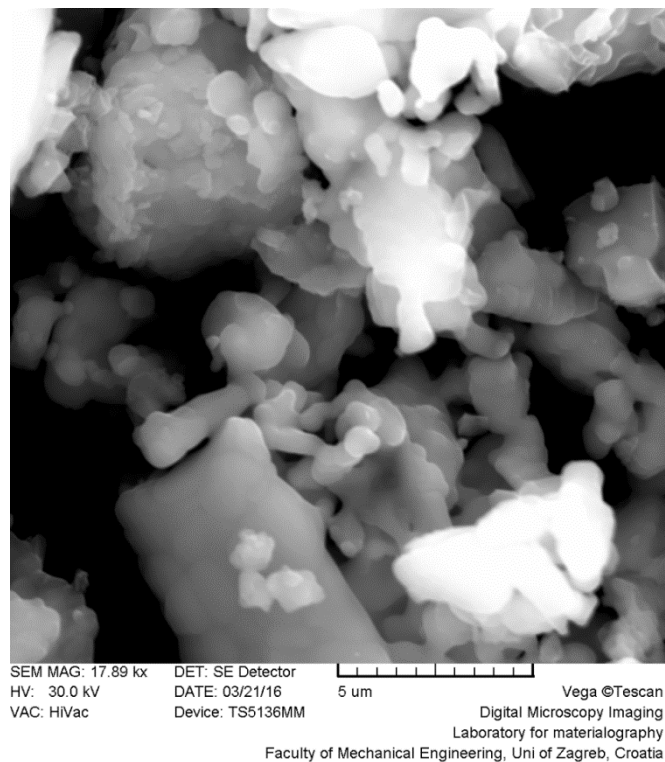


Slika 32. Raspodjela kemijskih elemenata na površini uzorka sa slike 30: (A) kalcij, (B) fosfor, (C) kisik, (D) magnezij, (E) stroncij, (F) kalij





Slika 34. SEM snimka uzorka precipitata HAp toplinski obrađenog na 1100 °C u prisustvu zraka tijekom 2 sata



Slika 35. SEM snimka uzorak precipitata HAp toplinski obrađen na 1100 °C u vakuumu tijekom 2 sata

## 5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- Pretvorba  $\text{CaCO}_3$  iz ljusaka jajeta u  $\text{CaO}$  završava oko  $900\text{ }^\circ\text{C}$  (što slijedi iz rezultata termogravimetrijske analize (TGA) i diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC)), stoga su ljuske jajeta toplinski obrađene na temperaturi od  $1000\text{ }^\circ\text{C}$  da bi se osigurala potpuna transformacija.
- Rendgenska difrakcijska analiza (XRD) daje podatke o faznom sastavu, kako slijedi:
  - Ljuske jajeta sastavljene su od kalcita –  $\text{CaCO}_3$ ,
  - Nakon toplinske obrade na  $1000\text{ }^\circ\text{C}$  većina kalcita transformirala se u vapno ( $\text{CaO}$ ) te manju količinu portlandita ( $\text{Ca(OH)}_2$ ),
  - Nakon miješanja produkta iz prethodnog koraka s vodom na konstantnoj temperaturi od  $20\text{ }^\circ\text{C}$ , svo vapno je prevedeno u portlandit,
  - Nakon reakcije portlandita i fosfatne kiseline uz podešavanje pH-vrijednosti s amonijaka, dobiveni precipitat kao glavnu mineralnu fazu sadrži hidroksiapatit, s manjim udjelom vitlokita.
- XRD analizom nađeno je da su još dvije nove faze (TTCP ( $\text{Ca}_4\text{O(PO}_4)_2$ ) i  $\beta$ -TCP ( $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )) u malim količinama prisutne uz HAp kod uzoraka koji su toplinski obrađeni u vakuumu. Kod uzoraka toplinski obrađenih u prisustvu zraka glavna mineralna faza također je hidroksiapatit sa tragovima vapna ( $\text{CaO}$ ). Iz toga slijedi da je toplinska obrada na zraku efikasnija za postizanje hidroksiapatitne strukture.
- Iz XRD analize precipitata HAp toplinski obrađenog na različitim temperaturama relativni udio nastalog HAp raste proporcionalno s porastom temperature toplinske obrade.
- SEM-EDS analizom potvrđeno je da su u svim uzorcima prisutni magnezij, stroncij i kalij u tragovima, uz kalcij, fosfor i kisik. Njihov raspored je, neovisno o temperaturi toplinske obrade i atmosferi, homogen. Dobiveni rezultati pokazuju da se struktura svih uzoraka sastoji od aglomerata jako sitnih čestica HAp. Uzorci su pločaste strukture.



## 6. ZAHVALE

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.

Zahvaljujem Zrinki Šokčević, mag. ing. na trudu uloženom tijekom sinteze uzoraka, strpljenju i susretljivosti.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Stanislavu Kurajici na TGA, DSC i XRD analizama uzoraka.

Martina Eva Tonković

## 7. POPIS LITERATURE

- [1] Datta, B.N.: *Textbook of Pathology*. Jaypee Brothers Publishers, New Delhi (2004).
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Dorozhkin, S.V.: *Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art*. Journal of Functional Biomaterials, **1**(1) (2010) 22-107.
- [5] Bertini, I., Gray, H.B., Lippard, S.J. and Selverstone Valentine, J.: *Bioinorganic Chemistry*.  
In: Lippard, S.J.: *Metals in Medicine*. University Science Books, Mill Valley (1994).
- [6] Elias, C.N., Lima, J.H.C., Valiev, R. and Meyers, M.A.: *Biomedical Applications of Titanium and its Alloys*. Biological Materials Science, **60**(3) (2008) 46-49.
- [7] Mešić, D.: *Aditivni postupci u medicini*. Fakultet strojarstva i brodogradnje, Zagreb (2014).
- [8] Štefanac, I.: *Kompozitni materijali u stomatologiji*. Polimeri, **32**(1) (2011) 3-4,
- [9] Dorozhkin, S.: *Calcium Orthophosphate: Applications in Nature, Biology and Medicine*. Pan Stanford Publishing, Boca Raton (2012).
- [10] 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.
- [11] Veselinović, Lj.: *Rendgenska analiza nanostrukturnih prahova kalcijum fosfata dobijenih novim postupcima sinteze*. Magistarski rad, Beograd (2010).
- [12] Anitha, P. and Pandya, H.M.: *Comprehensive Review of Preparation Methodologies of Nano Hydroxyapatite*. Journal of Environmental Nanotechnology, **3**(1) (2014) 101-121.
- [13] Fadli, A., Akbar, F., Putri, P., Pratiwi, D.I. and Muhara, I.: *Hydroxyapatite Powder Prepared by Low Temperature Hydrothermal Method from Sea Shells*. The 1st Conference on Ocean, Mechanical and Aerospace (2014).
- [14] Gergely, G., Balazsi, C. and Lukacs, I.E.: *Preparation and characterization of hydroxyapatite from eggshell*. Ceramics international **36** (2010) 803-806.

- [15] Rivera, J.A., Fetter, G. and Bosch, P.: *New hydroxyapatite–hydroxalcite composites II. microwave irradiation effect on structure and texture*. **16** (2009) 409-418.
- [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] Gill, P., Moghadam, T.T., and Ranjbar, B.: *Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience*.  
*Journal of Biomolecular Techniques*, **21**(4) (2010) 167-193.
- [18] Cullity, B.D.: *Elements of X-ray diffraction*..Reading: Addison-Wesley (1978).

## 8. SAŽETAK

**Autor:** Martina Eva Tonković

**Naslov rada:** Sinteza hidroksiapatita iz ljuske jajeta precipitacijskom metodom

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

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 s amonijakom precipitacijski se taloži hidroksiapatit. Nastali hidroksiapatit toplinski je obrađen na različitim temperaturama u različitoj atmosferi (u prisustvu zraka ili u vakuumu).

Analiziran je fazni sastav dobivenih uzoraka pomoću XRD analize, te su ispitani sastav i morfologija pomoću SEM-EDS analize.

XRD analizom zaključeno je da toplinska obrada na višim temperaturama daje čistiju hidroksiapatitnu strukturu te da je pogodnija toplinska obrada u prisustvu zraka, s obzirom na to da obradom u vakuumu nastaju dvije dodatne faze - vitlokit ( $\beta$ -TCP) i tetrakalcijev fosfat (TTCP).

Zaključak nakon SEM-EDS analize je da je raspored atoma (Ca, P, O od kojih se HAp sastoji te Mg, Sr i K u tragovima) u svim uzorcima homogen, neovisno o temperaturi i atmosferi obrade. Dobiveni rezultati pokazuju da se struktura svih uzoraka sastoji od aglomerata jako sitnih čestica HAp. Uzorci su pločaste strukture.

**Ključne riječi:** ljuske jajeta, hidroksiapatit, kalcijevi ortofosfati, biokeramika

## 9. SUMMARY

**Author:** Martina Eva Tonković

**Title:** Synthesis of hydroxyapatite from eggshells using precipitation method

In this thesis hydroxyapatite samples were synthesized from chicken eggshells using precipitation method.

Eggshells were washed, dried, and ground in a planetary ball mill, and then annealed at the temperature of 1000 °C. The annealing temperature was determined by means of TGA and DSC (thermogravimetric analysis and differential scanning calorimetry), as the temperature of total transformation of calcium carbonate ((CaCO<sub>3</sub> – calcite) into calcium oxide (CaO – lime).

Calcium oxide was then mixed with distilled water, which created calcium hydroxide (Ca(OH)<sub>2</sub> – portlandite). Portlandite was further mixed with phosphatic acid, which lead to co precipitation of hydroxyapatite. HAp made this way was then split into samples which were heated at different temperatures, in different atmospheres (on air or in vacuum).

The composition of these samples was analysed using XRD analysis, while SEM-EDS was used to determine composition and morphology.

XRD analysis lead to conclusion that calcification on higher temperatures results in higher purity of hydroxyapatite structure, and that calcification in vacuum results in two additional phases – whitlockite (β-TCP) and tetracalcium phosphate (TTCP), while calcification in air atmosphere provides structure mostly made of hydroxyapatite, with lime in traces.

SEM-EDS analysis has shown that atoms (Ca, P and O from which HAp is made of and Mg, Sr and K in traces) are distributed evenly, not depending on temperature or atmosphere of calcification. Obtained results indicated that structure of all investigated samples consist of flat-plated agglomerated fine particles of HAp.

**Keywords:** eggshell, hydroxyapatite, calcium ortophosphates, bioceramics

## **10. ŽIVOTOPIS**

Martina Eva Tonković rođena je 22. rujna 1993. godine u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole upisuje XV. gimnaziju u Zagrebu. Maturirala je 2012. godine s vrlo dobrim uspjehom. Iste godine upisuje preddiplomski studij na Fakultetu strojarstva i brodogradnje u Zagrebu. Studentica je preddiplomskog studija strojarstva na smjeru inženjerstvo materijala i od 2015. godine demonstrator na Katedri za mjerenje i kontrolu. Sudjeluje u programu pod nazivom Studenti demonstratori u postupku mobilnosti kao student mentor od 2015. godine. Izvrsno se služi engleskim jezikom u govoru i pismu.