

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek
Zavod za fizikalnu kemiju

Ina Erceg

**POČETNI STADIJ BIOMINERALIZACIJE:
ISTRAŽIVANJE NASTAJANJA AMORFNOG
KALCIJEVOG FOSFATA METODAMA
RASPRŠENJA SVJETLOSTI I LASERSKE
DIFRAKCIJE**

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biokoloide i površinsku kemiju Zavoda za fizičku kemiju instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Maje Dutour Sikirić i mentorstvom prof. dr. sc. Vladislava Tomišića, Zavod za fizikalnu kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017.

§ POPIS KRATICA I SIMBOLA

a	Aktivitet otopljene tvari u prezasićenoj otopini
a_s	Aktivitet otopljene tvari u stabilnoj otopini
ACP	Amorfni kalcijev fosfat
AFM	Mikroskopija atomskih sila (<i>eng. Atomic force microscopy</i>)
AK	Aminokiseline
c	Molarna koncentracija [mol dm^{-3}]
CaP	Kalcijevi fosfati
DA	Kalcij deficijentni apatit
DCPD	Kalcijev hidrogenfosfat dihidrat
FTIR	Fourier-transform infracrvena spektroskopija
HA	Hidroksiapatit
KS	Kontrolni sustav
LDS	Laserska difrakcija (<i>eng. Laser diffraction spectroscopy</i>)
OCF	Oktakalcijev fosfat
S	Prezasićenost
TEM	Transmisijska elektronska mikroskopija (<i>eng. Transmission electron microscopy</i>)
t_{ind}	Vrijeme indukcije
β -TCP	Beta-trikalcijev fosfat
θ	Temperatura pri kojoj je proveden eksperiment
μ	Kemijski potencijal

§ SADRŽAJ

§ 1. Uvod	1
§ 2. Teorijski dio	3
2.1 TALOŽNI PROCESI	3
2.2 BIOMINERALIZACIJA.....	5
2.3 AMORFNI KALCIJEV FOSFAT	7
2.4 RASPRŠENJE SVJETLOSTI.....	8
2.5 LASERSKA DIFRAKCIJA	11
§ 3. Eksperimentalni dio	12
3.1 MATERJALI.....	12
3.2 PRIPREMA ISHODNIH OTOPINA	12
3.3 PRIPREMA TALOŽNIH SUSTAVA	12
3.4 METODE	13
3.4.1 Mjerenje pH.....	13
3.4.2 Određivanje raspodjele veličine čestica dinamičkim raspršenjem svjetlosti.....	13
3.4.3 FTIR spektroskopija	14
3.4.4 Mikroskopija.....	15
3.4.5 Obrada podataka.....	15
§ 4. Rezultati i rasprava	16
4.1 ODREĐIVANJE VREMENA INDUKCIJE	16
4.2 KARAKTERIZACIJA TALOGA.....	18
4.2.1 FTIR spektroskopija	18
4.2.2 Morfologija taloga	20
4.3 PROMJENA VELIČINE ČESTICA ACP	21
4.3.1 DLS mjerenja.....	21
4.3.2 Mjerenja laserske difrakcije.....	23
§ 5. Zaključak	25

§ 6. Literaturni izvori.....	26
§ 7. Sažetak.....	28
§ 8. Summary	29

§ 1. Uvod

Amorfni kalcijev fosfat (ACP) je prva faza koja nastaje tijekom taloženja kalcijevih fosfata iz neutralnih i bazičnih otopina.^{1,2} Sve je više eksperimentalnih dokaza da je ACP i prvi korak u nastajanju čvrstih tkiva u kralježnjaka.^{3,4} Termodinamički je nestabilna vrsta te se stajanjem u matičnici transformira u stabilnije kristalne vrste kalcijevih fosfata. Upravo zbog sklonosti transformaciji, ACP ima važnu ulogu u biomineralizaciji i pripremi biomaterijala za regeneraciju kostiju.¹

Nastajanje ACP-a je u osnovi agregacijski proces. Osnovna strukturalna jedinica je Posnerov klaster, $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$. Veliki broj klastera je gusto pakirani u sfere veličine 30-100 nm koje se agregiraju u lančaste nakupine sferičnih čestica.¹ Uobičajene metode karakterizacije čestica ACP i određivanja njihove veličine su mikroskopija atomskih sila (AFM), transmisijska elektronska mikroskopija (TEM), IR spektroskopija te difrakcija rentgenskog zračenja na polikristalnom uzorku. Prednost mikroskopskih metoda je što se pomoću njih mogu vizualizirati i najmanje čestice prisutne u uzorku no problem je mala količina čestica koja se na ovaj način može vizualizirati. Metode kojima se rješava taj problem su dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS) i laserska difrakcija (LDS). Te dvije metode se široko koriste za određivanje veličine nanočestica u različitim suspenzijama čime se dobiva reprezentativna statistika,⁵ a razlikuju se, osim u fizikalnim principima na kojima se temelje, u rasponu veličine čestica koje se njima mogu odrediti. Iako se te dvije metode široko koriste kako u znanstvenim istraživanjima, tako i u kontroli industrijskih procesa, DLS se tek u posljednje se vrijeme počeo primjenjivati i u istraživanju nastajanja kalcijevih fosfata (CaP),^{6,7} U dostupnoj literaturi nije pronađena primjena laserske difrakcije za praćenje nastajanja CaP.

Cilj ovog rada bio je pratiti proces nastajanja ACP metodama dinamičkog raspršenja svjetlosti i laserske difrakcije kako bi se, praćenjem promjene veličine čestica, omogućio bolji uvid u početne stadije nastajanja ACP na nanoskali.

Za određivanje raspodjele veličine čestice korišteni su Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) i Mastersizer 3000 (Malvern, UK) uređaji čija je osnovna razlika područje veličina čestica koja se njima detektira. Zetasizer Nano ZS određuje čestice veličine od 0,6 nm do 6 μm , dok Mastersizer 3000 određuje veličinu čestica u području od 10 nm do 3,5 mm. Promjena

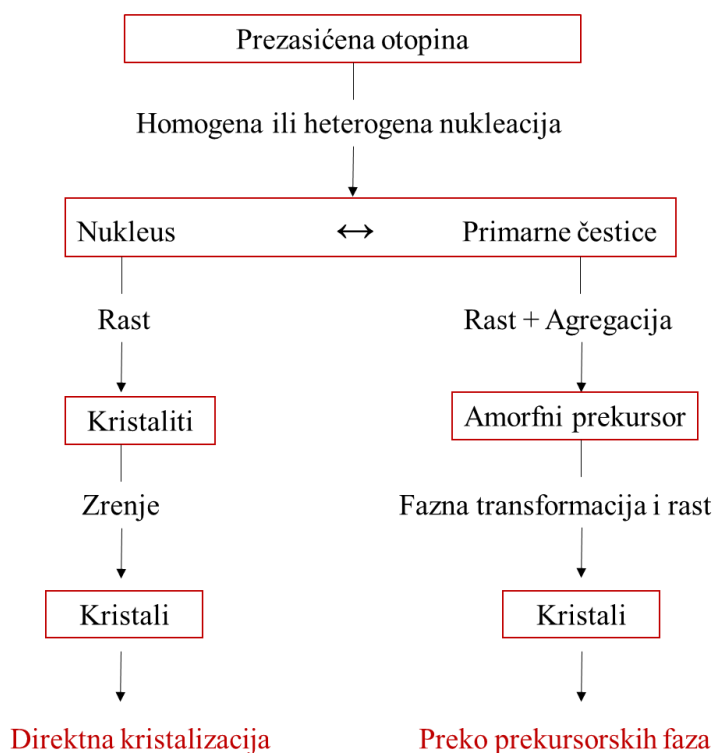
veličine čestica ACP praćena je tijekom vremena indukcije odnosno vremena proteklog od iniciranja taložnog procesa do početka transformacije ACP-a. Vrijeme indukcije određeno je potenciometrijski. Morfologija nastalog taloga određena je pomoću mikroskopije atomskih sila i transmisijske elektronske mikroskopije, dok je njegov sastav određen pomoću infracrvene spektroskopije (FTIR). Dobiveni rezultati osim važnosti za razumijevanje nastajanja amorfnih faza općenito, važni su i za razumijevanje početnih stadija biomineralizacije.

§ 2. Teorijski dio

2.1 TALOŽNI PROCESI

Taloženje je proces nastajanja nove faze iz homogene roditeljske faze kao što je nastajanje kapljica iz pare, mjehurića iz tekućine te krutine iz taline i otopine. Ukoliko je novonastala kruta faza kristalne strukture, proces njezina nastajanja naziva se kristalizacija.^{8,9}

Proces taloženja odvija se u nekoliko koraka (Slika 1.)



Slika 1. Taloženje iz prezasićenih otopina. Konstruirano prema referenci 2.

Kako bi nastali nukleusi nove faze, mora se prijeći energetska barijera – kritična prezasićenost. Prezasićenost (S) se definira kao razlika kemijskih potencijala prezasićene i stabilne zasićene otopine :

$$S = e^{-[\mu(a) - \mu(a_s)]/RT}$$

gdje je μ kemijski potencijal, dok su a i a_s aktiviteti otopljene tvari u prezasićenoj i stabilnoj zasićenoj otopini. U najjednostavnijem slučaju, pri konstantnom tlaku i temperaturi se jednadžba reducira na:

$$S = \left(\frac{a}{a_s} \right)_{p,T}$$

jer je $\mu(a) = \mu^\circ + RT \ln a$. Za binarni elektrolit prezasićenost iznosi:

$$S = \left(\sqrt{\frac{a_A a_B}{K_{sp}}} \right)_{p,T}$$

gdje je K_{sp} „produkt topljivosti“ odnosno konstanta ravnoteže otapanja. Stoga, kritično prezasićenje ili granica metastabilnosti predstavlja maksimalno stabilno prezasićenje. Velik broj, uglavnom termodinamičkih svojstava, ovisi o prezasićenju, dok druga svojstva, poput kinetičkih i kemijskih, ovise i o odnosu koncentracija reaktanata. Kako bi se dobila pouzdana informacija o taloženju iz otopine potrebno je ispitati široko područje koncentracija reaktanata.⁸ Postoje dvije vrste nukleacije: homogena i heterogena. Do heterogene nukleacije dovode nečistoće u otopini koje služe kao centri kristalnog rasta. Nečistoće imaju katalitičku ulogu, one kataliziraju nukleaciju snižavajući energijsku barijeru. Do nukleacije će doći pri koncentracijama nižim od onih u homogenim otopinama. S druge strane, homogena se nukleacija odvija tek pri vrlo visokim prezasićenjima i uključuje nastanak velikog broja čestica.⁹

Nukleaciju slijedi kristalni rast koji je rezultat niza procesa koji se odvijaju u otopini i na površini kristala: transporta iona ili molekula kroz otopinu, adsorpcije na međupovršini kristal/otopina, difuzije na površini, reakcija na međupovršini (dehidratacija, nukleacija) i ugradnje u kristalnu rešetku. Kristalni rast može biti kontroliran površinskim procesima (mononuklearni i polinuklearni mehanizam) i transportom materijala kroz otopinu (difuzija i konvekcija).⁸

Talog nastao u prethodno opisanim procesima podložan je kemijskim i fizikalnim procesima (sekundarnim procesima) koji se odvijaju bilo da je talog u dodiru s matičnicom, bilo da nije. Neki od važnijih sekundarnih procesa su: agregacija, Ostwaldovo zrenje i transformacija metastabilnih faza. Posljedice agregacije čestica su smanjenje njihova broja i nastajanje čestica većih dimenzija, dok je sama agregacija rezultat djelovanja London – van der Waalsovih privlačnih sila, Coulombovih odbojnih sila i odbojnih sila uzrokovanih solvatacijom, adsorpcijom itd. Agregacijom se smanjuje površina dostupna za rast čime se smanjuje i brzina rasta sve dok u jednom trenutku ne postane beznačajna. Ostwaldovo zrenje je pojava otapanja dijelova kristala koji su veće

energije (bridovi, uglovi, dendritni ogranci) te taloženje viška otopljene tvari na mjestima u kristalu koji su manje energije (stepenice, dislokacije). Tu pojavu je prvi opisao Ostwald koji je prvi opisao i procese nastajanja i transformacije metastabilnih faza. Zaključio je da kada u taložnom procesu može nastati nekoliko faza, prva će se istaložiti faza najveće topljivosti, odnosno ona koja je najnestabilnija. Drugim riječima, faza s najmanjom međupovršinskom energijom će nukleirati prva iz prezasićene otopine.²

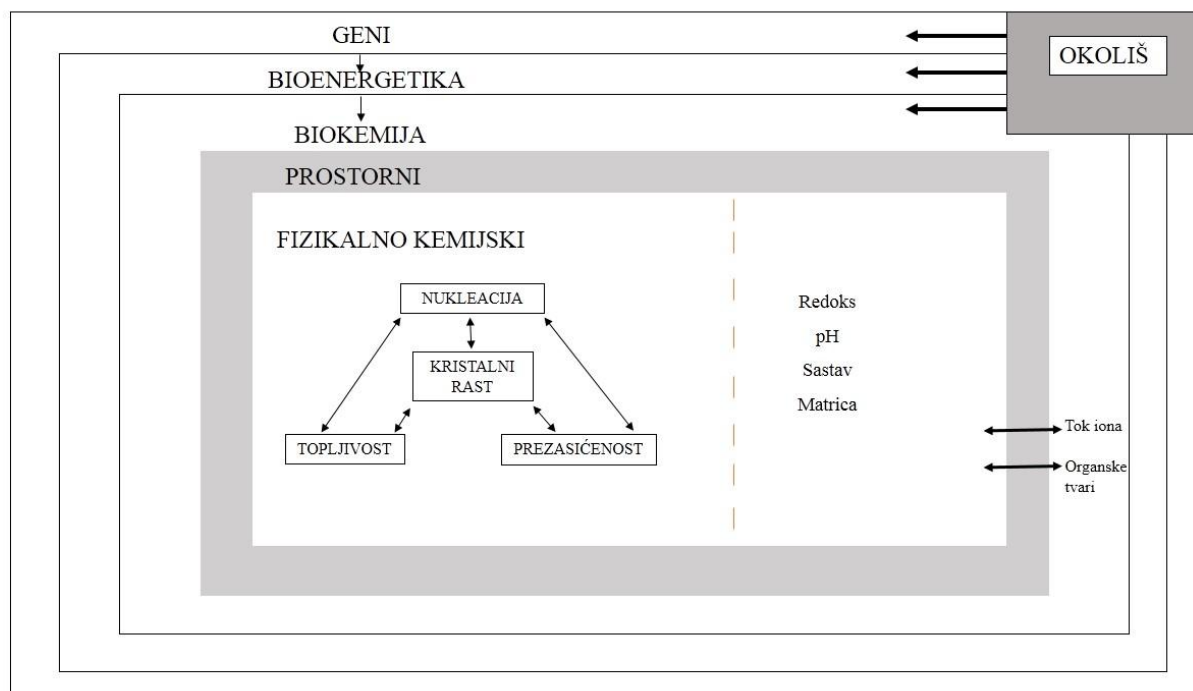
2.2 BIOMINERALIZACIJA

Biom mineralizacija je proces taloženja anorganskih soli iz kompleksnih otopina (poput krvi i mokraće) unutar organske matrice. Na taj se način formiraju zubi, kosti te patološka mineralizirana tkiva kao što su kamenci i karijes. Mineralizirana tkiva su u stalnom kontaktu s tjelesnim tekućinama koje su izuzetno kompleksne, imaju visoku ionsku jakost, sadrže biološke makromolekule, male organske molekule i anorganske ione.¹⁰

Iako su kristalografska struktura, kemijski sastav, većina kemijskih i fizikalnih svojstava biom minerala poznati, fiziološki procesi koji upravljaju njihovim nastajanjem još uvijek nisu do kraja razjašnjeni. Osnovni problem je razlikovanje taložnih procesa in vivo od staničnih i metaboličkih aktivnosti uključenih u nastajanje izvanstanične matrice i razvoj tkiva. Mnogi fizikalno-kemijski principi nukleacije i rasta kristala razjašnjeni su proučavanjem otopina sintetskih analoga biom minerala.¹¹

Postoje dva osnovna načina biom mineralizacije. U biološki induciranoj mineralizaciji organizam modificira svoj mikrookoliš i time stvara uvjete pogodne za kemijsko taloženje izvanstaničnih mineralnih faza. Na taj način proces kristalizacije nije strogo kontroliran pa nastale čestice nemaju jedinstvenu morfologiju, no imaju široku distribuciju veličine čestica. Drugi način biom mineralizacije je na granici čime čestice nastaju unutar ili na nekoj organskoj matrici koju je proizveo organizam. Za razliku od biološki inducirane mineralizacije, ovim se mehanizmom postiže stroga kontrola veličine, morfologije, sastava položaja te kristalografske orijentacije čestica.¹²

Utjecaj organskih makromolekula je važan u regulaciji rasta minerala i rezultirajuće kristalne morfologije i agregacije čestica. Procese biom mineralizacije kontroliraju vanjski (okolišni) te fizikalno-kemijski čimbenici (Slika 2.).

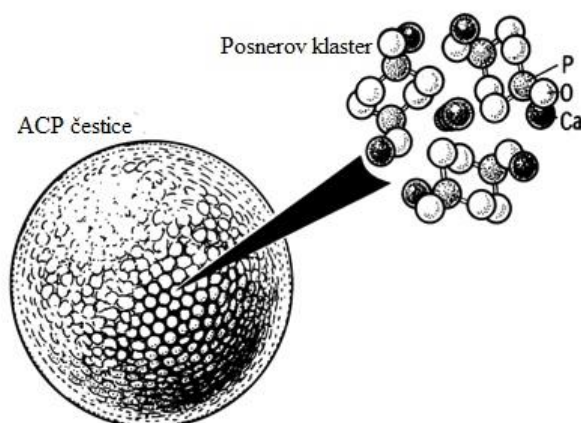


Slika 2. Kontrolni procesi biomineralizacije. Konstruirano prema referenci 13.

Vanjski čimbenici ponajviše obuhvaćaju genetske učinke koji su pod kontrolom bioenergetskih procesa. Jako malo je poznato o načinu na koji ovi čimbenici djeluju. Fizikalno-kemijski čimbenici se mogu podijeliti u pet kontrolnih mehanizama: kemijski, prostorni, strukturni, morfološki i konstitucijski. Topljivost, prezasićenje, nukleacija te rast kristala su kemijski kontrolirani čimbenici tijekom procesa biomineralizacije. Ova kontrola je omogućena transportom koordiniranih iona i djelovanjem molekulskih inhibitora i promotora. Prostorna kontrola procesa biomineralizacije se odvija supramolekulskom reorganizacijom organskih molekula te utječe na veličinu i oblik mineralnog depozita i mehanizam njihovog transporta. Strukturna kontrola obuhvaća preferiranu nukleaciju određene kristalne plohe ili osi molekularnim prepoznavanjem na površini organske matrice. Kemijska veza na površini nukleusa minerala je prvenstveno ionska stoga organska matrica mora sadržavati područja velikog lokalnog naboja na kojima se tijekom nukleacije mogu stvarati elektrostatske, dipolne i vodikove interakcije. Dva su svojstva organskih matrica bitna za kristalo-kemijsku specifičnost: postojeća organizacija organske matrice i strukturna komplementarnost između anorganskih iona i veznih mjesta na matrici. Kontrola kompleksnih formi biominerala, odnosno morfološka kontrola, je postignuta nizom procesa koji omogućavaju vremenski ovisan vektorski rast.¹³

2.3 AMORFNI KALCIJEV FOSFAT

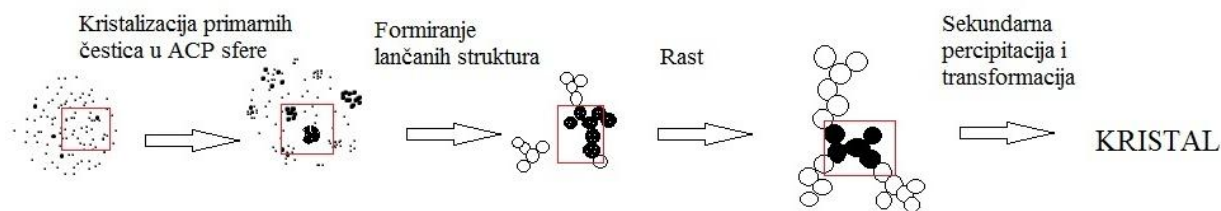
Amorfni kalcijev fosfat (ACP) je prva čvrsta faza koja nastaje miješanjem otopina koje sadrže kalcijeve (Ca^{2+}) i fosfatne (PO_4^{3-}) ione pri $\text{pH} > 7$. Nastajanje kalcijevih fosfata preko amorfne faze odvija se u organizmima, kao i u laboratorijskim uvjetima. Prisutnost ACP-a dokazana je u mitohondrijima i sarkoplazmatskom retikulumu nekih stanica, usnoj šupljini, mlijeku sisavaca, a u morskih beskralježnjaka ga najviše ima u zubima i egzoskeletnoj skrukturi.¹⁴ Zanimanje za procese nastajanja kalcijevih fosfata započinje sredinom 50-tih godina 20-tog stoljeća kada se prvi put uočava nastanak amornog prekursora, no struktura takvih tvari je riješena tek 60-tih godina kada su razvijene metode kojima se moglo analizirati nestabilne krutine. Temeljeći se na relativno konstantnom omjeru Ca/P ACP-a nastalog u različitim uvjetima (različite koncentracije kalcijevih i fosfatnih iona te različite temperature i pH vrijednosti otopina), Posner i Betts su postavili hipotezu da je ACP građen od sferičnih čestica veličine od 30 do 100 nm u promjeru koje sadrže molekule vode (Slika 3). U tim je česticama centralni Ca^{2+} ion koordiniran sa 6 kisikovih atoma fosfatnih skupina koje su nadalje sferično okružene sa drugih 8 iona kalcija. Taj je neutralni ionski klaster, opće formule $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$, nazvan Posnerovim klasterom. Posnerov klaster je stabilan zbog djelovanja elektrostatskih interakcija kalcijevih i fosfatnih iona te hidrofobnih interakcija molekula vode.¹



Slika 3. Model čestice ACP i Posnerov klaster. Konstruirano prema referenci 1.

Zanimljiva je činjenica da je raspored atoma u Posnerovom klasteru analogan onom u nekoliko drugih kalcijevih fosfata, poput hidroksiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA), oktakalcijevog fosfata ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, OCP) i β -trikalcijevog fosfata ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$,

β -TCP).¹⁵ Velik broj Posnerovih klastera su nasumično pakirani u sferične čestice ACP, koje se agregiraju u lančaste strukture (Slika 4.).^{16,17}



Slika 4. Shema taloženja kalcijevih fosfata preko amornog prekursora. Konstruirano prema referenci 18.

ACP je nestabilan te se stajanjem u matičnici transformira u stabilnije oblike, OCP, kalcijdeficijentni apatit ($\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, $0 < x < 1$, DA) ili HA. Stoga, kako bi se uspješno mogao primijeniti, ACP treba biti stabiliziran. U organizmu, ACP je stabiliziran specifičnim proteinima kao što su amelogenin i enamelin u zubima.¹⁷ Posnerovi klasteri nastaju u prvim trenucima taloženja, bez značajnije promjene pH vrijednosti otopine. No, na klasterima paralelno nastaju čestice kristalne strukture reakcijom iona i/ili klastera, otpuštajući protone. Kako raste broj čestica kristalne strukture, dolazi do razaranja Posnerovih klastera, a novonastale kristalne čestice uzrokuju brzo taloženje kalcijevih fosfata što uzrokuje značajno naglo smanjenje pH vrijednosti otopine. Može se zaključiti da kristalizacija unutar amornih faza glavni pokretač procesa taloženja kalcijevih fosfata iz prezasićenih otopina.¹

2.4 RASPRŠENJE SVJETLOSTI

Dinamičko raspršenje svjetlosti jedna je od najčešće primjenjivanih metoda za određivanje veličine čestice u suspenziji. Djelovanjem monokromatskog zračenja, poput lasera, na suspenziju u kojoj se čestice kreću Brownovim gibanjem dolazi do raspršenja svjetlosti. Do raspršenja dolazi u heterogenim sustavima zbog razlike u optičkim svojstvima između dispergiranih čestica i medija u kojemu se one nalaze. Dinamičkim raspršenjem svjetlosti mjeri se brzina Brownovog gibanja koja se povezuje s veličinom čestice u suspenziji (veće čestice se gibaju sporije). Brzina čestica je definirana preko translacijskog difuzijskog

koeficijenta (D) koji se može izračunati pomoću Einstein-Stokesove jednadžbe:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d}$$

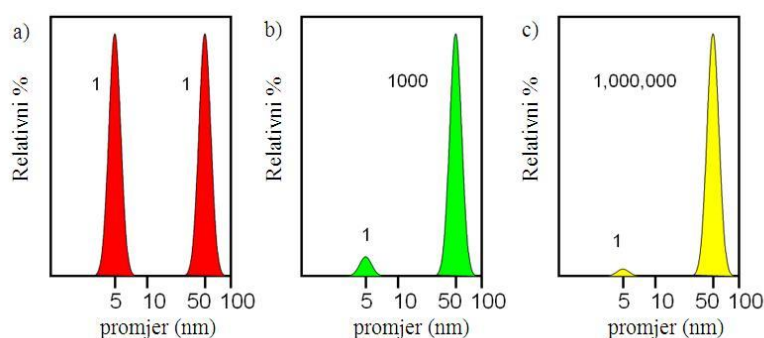
gdje je k_B Boltzmannova konstanta, T apsolutna temperatura, η viskoznost otapala, a d je hidrodinamički promjer čestice.¹⁹

Vrijednosti difuzijskog koeficijenta ovise o veličini same čestice (bez solvacijske sfere), ionskoj jakosti medija, strukturi površine i obliku čestice. Ionska jakost i vrsta iona utječu na brzinu difuzije čestice mijenjajući debljinu međupovršinskog sloja. Niska ionska jakost medija uzrokuje povećanje debljine međupovršinskog sloja zbog čega se smanjuje brzina difuzije pa je i hidrodinamički promjer veći. Velika ionska jakost smanjuje debljinu međupovršinskog sloja i hidrodinamički promjer. Bilo koja promjena površine čestice koja utječe na brzinu difuzije rezultirat će promjenom hidrodinamičkog promjera.

Prilikom određivanja veličine čestica javlja se problem kako izraziti veličinu nesferičnih čestica. Naime, sfera je jedini oblik čestice čija se veličina može izraziti jednim brojem, promjerom ili polumjerom. Hidrodinamički promjer nesferičnih čestica određen DLS-om je u stvari promjer ekvivalentne sfere, tj. sferične čestice čiji je difuzijski koeficijent jednak izmjerenom difuzijskom koeficijentu nesferične čestice. Različite metode mjerenja su osjetljive na različita svojstva čestica (poput gustoće, intenziteta, broja) i općenito će dati različite prosječne veličine i raspodjelu veličina za dani uzorak. Niti jedan od tih rezultata nije u potpunosti točan.

Postoje tri teorije kojima se opisuje raspršenje svjetlosti: Rayleigheva aproksimacija, Mieova i Reyleigh-Gans-Debye teorija. Rayleigheva aproksimacija vrijedi za čestice koje su u usporedbi s valnom duljinom lasera male $\left(d = \frac{\lambda}{10}\right)$ i pokazuje da je $I \sim d^6$ i $I \sim \frac{1}{\lambda^4}$, gdje je I intenzitet raspršenog zračenja, d je promjer čestice, a λ valna duljina lasera. Proporcionalnost intenziteta i veličine čestica ukazuje na mogućnost da raspršenje većih čestica prekrije raspršenje manjih. Reyleigh-Gans-Debye teorija se primjenjuje za nešto veće čestice koje imaju mali relativan indeks loma svjetlosti. Ta teorija omogućuje transformaciju izmjerene podjele veličine po intenzitetu u raspodjelu po volumenu, a može se smatrati modifikacijom Rayleigheve aproksimacije. Mieova se teorija primjenjuje za čestice čija je veličina približno jednaka valnoj duljini lasera ($d \approx \lambda$).

Kada zraka svjetlosti padne na nepomičnu česticu dolazi do raspršenja svjetlosti u svim smjerovima, a raspršena svjetlost ima jednaku frekvenciju kao i upadna zraka. Budući da se u realnom sustavu čestice uvijek gibaju, dolazi do pomaka u frekvenciji tj. do Dopplerovog efekta. U suspenziji se čestice gibaju Brownovim gibanjem pa dolazi do pojave nasumičnih fluktuacija raspršene svjetlosti koja pada direktno na fotomultiplikator. Fluktuacije intenziteta raspršene svjetlosti se s vremenom pretvaraju u električni impuls iz kojeg se na korelatoru konstruira vremenski ovisna korelacijska funkcija. Iz korelacijskih se funkcija zatim različitim algoritmima mogu izračunati veličine čestica. Primarne informacije dobivene DLS-om su izražene kao raspodjela veličine po intenzitetu. Ako takva raspodjela daje više pikova ili je asimetrična, pomoću Mieove teorije se pretvara u raspodjelu po volumenu ili broju. Ovakve raspodjele tada omogućuju bolji uvid u važnost drugog pika i asimetričnosti raspodjele. Općenito vrijedi : $d(\text{intenzitet}) > d(\text{volumen}) > d(\text{broj})$. Razlika je posljedica toga što npr. dvije čestice različitih veličina jednako doprinose ukupnom broju čestica, ali različito volumenu čestica ili dinamičkom raspršenju, kao što je prikazano na slici 5.



Slika 5. Shematski prikaz raspodjele preko a) broja čestica, b) promjera i c) intenziteta.

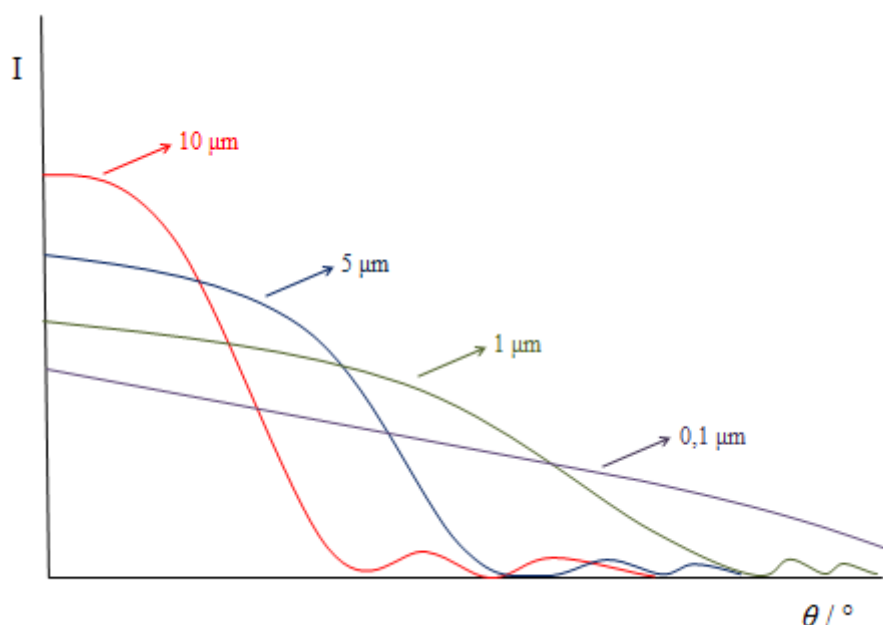
Konstruirano prema referenci 20.

Ako se u sustavu nalaze dvije čestice veličine 10 i 100 nm, raspodjela po broju daje dva pika omjera 1:1. Kada se raspodjela za isti sustav prikaže po volumenu, omjer postaje 1:1000 jer je volumen sfere proporcionalan s d^3 . Ako se pak prikaže po intenzitetu, omjer pikova je 1:100 000 jer je intenzitet proporcionalan s d^6 .

2.5 LASERSKA DIFRAKCIJA

Laserska difrakcija, LDS (*eng. Laser Diffraction Spectroscopy*), je spektroskopska metoda koja proučava interakciju laserske zrake i dispergiranih čestica uzorka. Tom se metodom mjeri ovisnost intenziteta upadne zrake o kutu raspršenog zračenja. Laserska difrakcija se temelji na Fraunhoferovoj difrakcijskoj teoriji koja pretpostavlja da je intenzitet raspršenog zračenja direktno proporcionalan veličini čestice, dok je kut raspršenog zračenja obrnuto proporcionalan. Za čestice se pretpostavlja da su sferičnog oblika veličine mnogo manje od valne duljine svjetlosti.

Stoga, velike čestice raspršuju zračenje pri malim kutovima u odnosu na upadnu zraku, dok male čestice zračenje raspršuju pri većim kutovima (Slika 6.).²¹



Slika 6. Ovisnost intenziteta o kutu raspršenog zračenja za čestice različite veličine.

Metoda laserske difrakcije se koristi prvenstveno za određivanje raspodjele veličine čestica u uzorcima kao što su sedimenti (glina i blato), ušća rijeke, mokro tlo itd.^{22,23}

Ta metoda omogućava relativno brzo izvođenje mjerenja, daje dobru rezoluciju te omogućava analizu velikog raspona veličine čestica. Osnovni problem korištenja ove metode je ograničena mogućnost usporedbe s drugim metodama za određivanje veličine čestice, kao što su optičko oslikavanje.

§ 3. Eksperimentalni dio

3.1 MATERJALI

Korištene su analitički čiste kemikalije, kalcijev klorid dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) i natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), Sigma Aldrich, Njemačka, koje su prethodno osušene 24 sata u eksikatoru sa silika gelom.

3.2 PRIPREMA ISHODNIH OTOPINA

Ishodne otopine kalcijevog klorida i natrijevog hidrogenfosfata ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) pripremljene su otapanjem točne odvage $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ili Na_2HPO_4 u Mili Q vodi ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$). Otopini fosfata podešen je pH na 7,4 upotrebom klorovodične kiseline (Kemika).

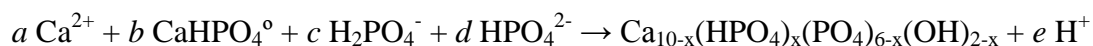
3.3 PRIPREMA TALOŽNIH SUSTAVA

Za pripremu taložnih sustava korištene su otopine anionske i kationske komponente dobivene razrjeđivanjem ishodnih otopina natrijevog dihidrogenfosfata i kalcijevog klorida na dvostruko veće koncentracije od koncentracije reaktanata u taložnom sustavu. U otopinama anionske komponente pH je provjeren i prema potrebi ponovno podešen na 7,4 upotrebom klorovodične kiseline (Kemika). Taložni sustavi dobiveni su brzim miješanjem jednakih volumena otopina anionske i kationske komponente tako da su početne koncentracije reaktanata iznosile $c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 0,0035 \text{ mol dm}^{-3}$. Svi eksperimenti provedeni su na $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Taložni sustavi nisu dodatno miješani tijekom potenciometrijskih mjerenja.

3.4 METODE

3.4.1 Mjerenje pH

Taloženje kalcijevih fosfata praćeno je promjenom pH, što je prikazano reakcijom:



praćenje promjene pH omogućava praćenje napredovanja reakcije. Za mjerenje pH taložni sustavi pripremljeni su u termostatiranoj posudi kako bi se omogućila kontrola temperature. Promjena pH praćena je u sustavima bez miješanja i uz mehaničko miješanje što odgovara uvjetima DLS mjerenja, odnosno mjerenja laserske difrakcije. Promjena pH pratila se pomoću Metrohm 701 pH/ion metra baždarenog s Metrohm puferima pH 4, 7 i 9. Za svaki taložni sustav mjerenja su ponovljena najmanje 3 puta.

3.4.2 Određivanje raspodjele veličine čestica dinamičkim raspršenjem svjetlosti

a.) Mjerenja na Zetasizer Nano ZS uređaju

Nakon pripreme taložnih sustava, alikvot od 1 mL prenesen je u kivetu za mjerenje dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS). Raspodjela veličine čestica određena je pomoću Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) opremljenog zelenim laserom (532 nm). Za određivanje veličine čestica intenzitet raspršenog svjetla mjeren je pri kutu od 173°. Mjerenje je ponovljeno 3 puta. Kao hidrodinamički promjer uzeta je vrijednost u maksimuma pikova dobivenih u raspodjeli po volumenu.



Slika 7. Zetasizer Nano ZS uređaj.

b.) Mjerenja na Mastersizer 3000 uređaju

Pripremljeno je 500 mL otopine anionske i kationske komponente koje su pomiješane u čaši od 1000 mL. Raspodjela veličine čestica određena je pomoću Mastersizer 3000 uređaja opremljenog crvenim (He-Ne) laserom (632,8 nm) i plavim (LED) izvorom (470 nm). Intenzitet raspršenog svjetla mjeren je u rasponu kutova od 0,015° do 144°. Taložni sustav bio je mehanički miješan, a mjerenje je ponovljeno 3 puta. Kao hidrodinamički promjer uzeta je vrijednost u maksimuma pikova dobivenih u raspodjeli po volumenu.



Slika 8. Mastersizer 3000 uređaj.

3.4.3 FTIR spektroskopija

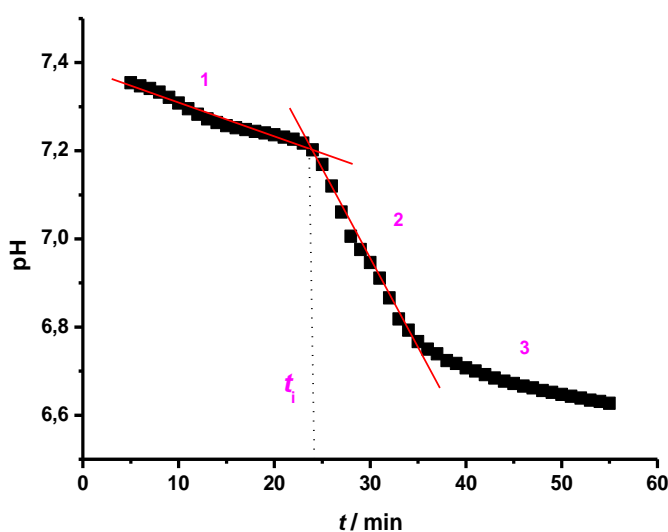
Nastali talozi odfiltrirani su na Milipore filter papiru promjera pora 0,45 μm , isprani 3 puta s mili Q vodom, etanolom, osušeni u struji dušika i čuvani u eksikatoru do daljnje analize. Mala količina uzorka je pomiješana s KBr prahom i usitnjena u tarioniku pomoću tučka. Smjesa je sprešana u pastilu hidrauličkom prešom. FTIR spektri pripremljenih KBr pastila snimljeni su na Perkin-Elmer Spectrum RX I FTIR System.

3.4.4 Mikroskopija

Uzorci za analizu mikroskopijom atomskih sila pripremljeni su depozicijom kapi suspenzije na tinjac. Supernatant je uklonjen filter papirom. Talozi su isprani s kapi deionizirane vode, a suvišak vode je uklonjen pomoću filter papira. Ispiranje je ponovljeno još dva puta. Uzorci su osušeni na zraku. AFM mikrografije su snimljene mikroskopom atomskih sila Multimode Scanning Probe Microscope. TEM mikrografije uzoraka dobivene su koristeći Zeiss TEM 20A (Oberkochen, Germany) koji radi pri 80 kV. Za analizu transmisijom elektronskom mikroskopijom, kap suspenzije je postavljena na bakrenu mrežicu presvučenu Formvar membranom. Supernatant je uklonjen filterpapirom, a talozi su isprani tri puta deioniziranom vodom. Nakon uklanjanja viška vode, talozi su osušeni u struji dušika i čuvani u eksikatoru do daljnje analize

3.4.5 Obrada podataka

Vrijeme indukcije, vrijeme proteklo od iniciranja taloženja do početka transformacije ACP u kristalne kalcijeve fosfate, određeno je praćenjem promjene pH vrijednosti taložnih sustava s vremenom. Takva krivulja je sigmoidalnog oblika, a vrijeme indukcije je određeno iz presjecišta pravaca dobivenih linearnom regresijom dijelova krivulja različitog nagiba 1 i 2.



Slika 9. Potenciometrijsko određivanje vremena indukcije.

§ 4. Rezultati i rasprava

4.1 ODREĐIVANJE VREMENA INDUKCIJE

Na slici 10. prikazane su pH krivulje dobivene prilikom taloženja kalcijevih fosfata u izabranim taložnim sistemima. Sigmoidalni oblik tih krivulja karakterističan je za reakcije koje uključuju nukleaciju i nastajanje kristala. Tri karakteristična područja na krivuljama odgovaraju:

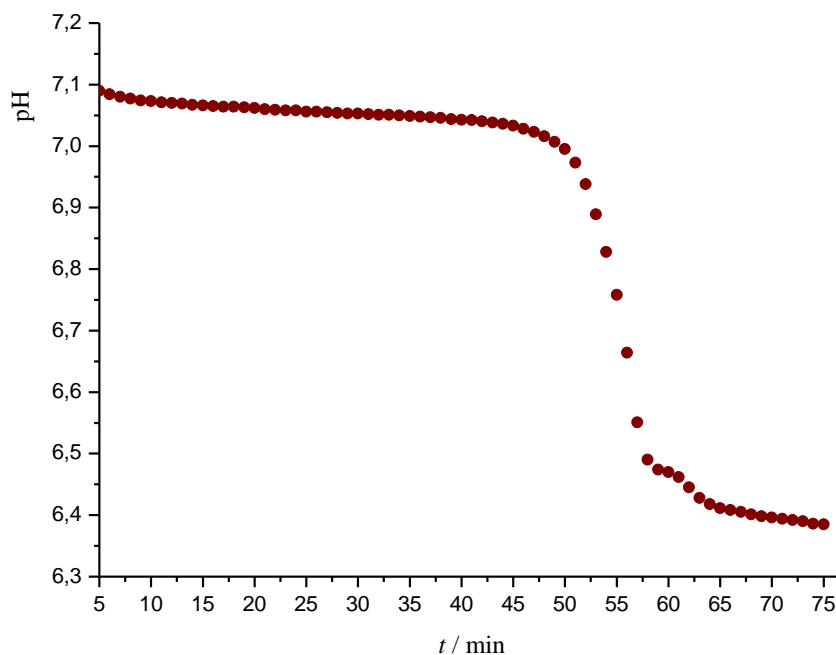
1. nastajanju ACP tijekom kojeg ne dolazi do značajnije promjene pH,
2. sekundarnom taloženju kristalne faze na ACP-u praćeno značajnom promjenom pH
3. kristalnom rastu i transformaciji putem otopine pri kojima se pH također značajnije ne mijenja.

Vremena indukcije određena su iz presjecišta pravaca dobivenih linearnom regresijom na prva dva dijela krivulje (Tablica 1). Potenciometrijska mjerenja su provedena bez miješanja, što odgovara uvjetima mjerenja dinamičkog raspršenja svjetlosti i uz mehaničko miješanje što odgovara uvjetima mjerenja laserske difrakcije. Očekivano, mehaničko miješanje ubrzava proces transformacije ACP te je dobiveno vrijeme indukcije kraće od onoga određenog bez miješanja (Tablica 1. i Slika 11.) .

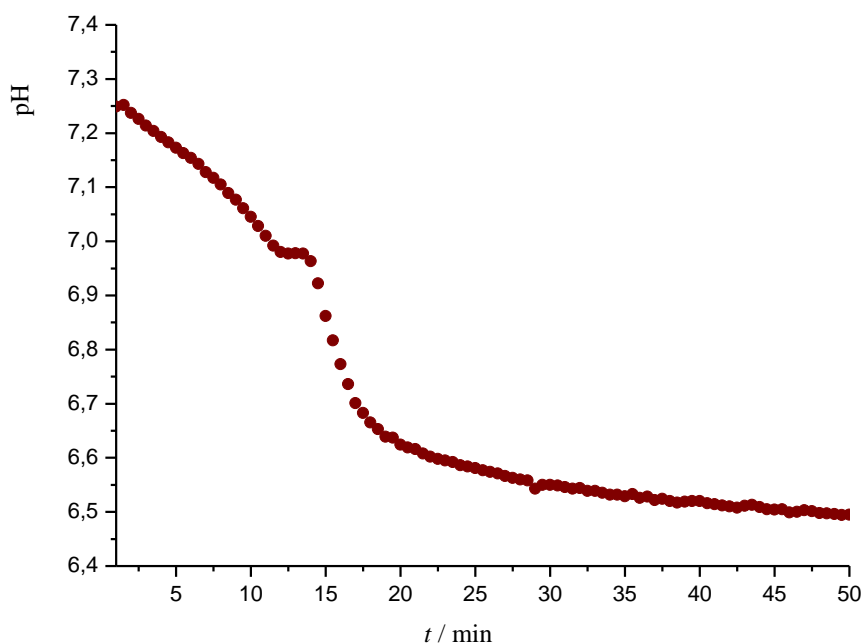
Na temelju dobivenih vremena indukcije, određena su vremena tijekom kojih su vršena mjerenja dinamičkog raspršenja svjetlosti (40 min) i mjerenja laserske difrakcije (10 min) te nakon kojih je analiziran talog. Izabrana reakcijska vremena bila su nešto kraća od vremena indukcije, kako bi se osiguralo da se analizira amorfni, a ne kristalinični talog.

Tablica 1. Vrijeme indukcije (t_{ind}) u taložnim sustavima s početnim koncentracijama reaktanata $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 3,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri 25°C i početnoj pH vrijednosti 7,4.

$c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = 3,5 \text{ mmol dm}^{-3}$	
Miješanje	t_{ind} / min
Ne	50,71
mehaničko	13,71



Slika 10. Promjena pH vrijednosti u ovisnosti o vremenu u taložnom sustavu s početnim koncentracijama reaktanata $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 3,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri 25°C i početnoj pH vrijednosti 7,4. Sustav nije miješan.

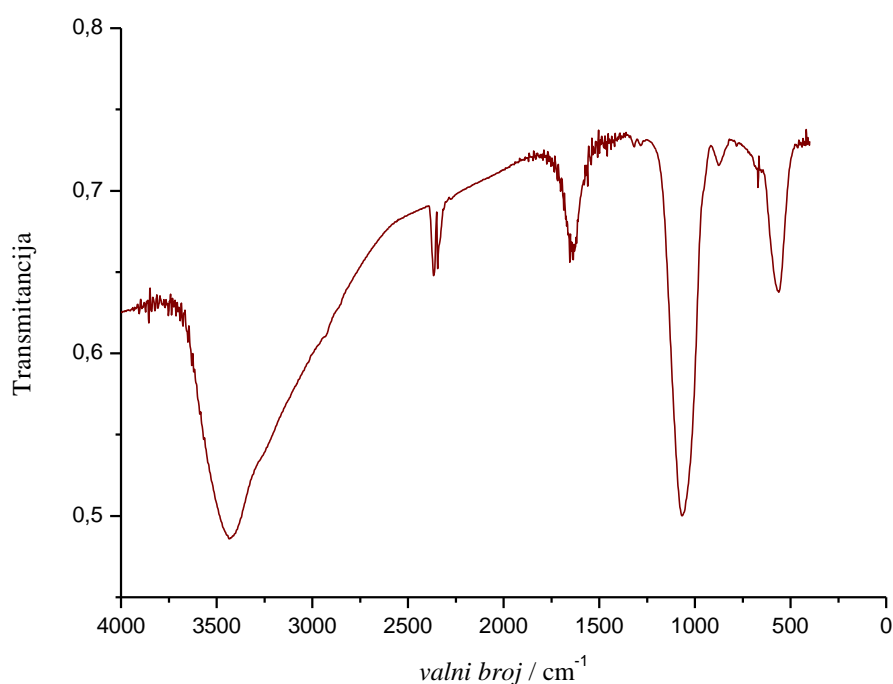


Slika 11. Promjena pH vrijednosti u ovisnosti o vremenu u taložnom sustavu s početnim koncentracijama reaktanata $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 3,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri 25°C i početnoj pH vrijednosti 7,4. Sustav je mehanički miješan.

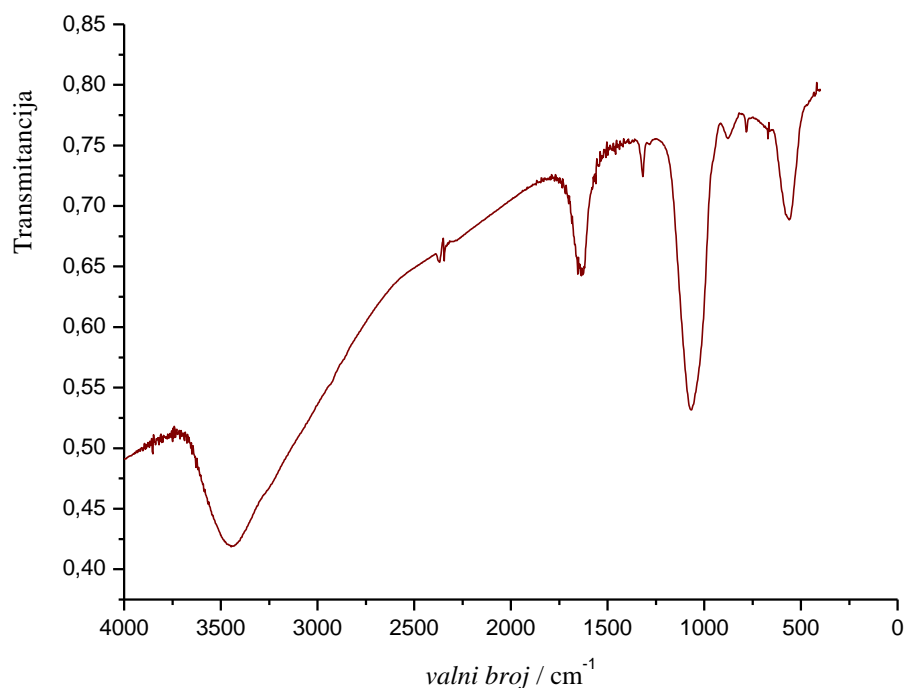
4.2 KARAKTERIZACIJA TALOGA

4.2.1 FTIR spektroskopija

Na slikama 12. i 13. prikazani su FTIR spektri taloga nastalih u istraživanim taložnim sustavim dobiveni nakon 40 min u uvjetima bez miješanja, odnosno nakon 10 min uz mehaničko miješanje. Oba FTIR spektra sadrže vibracijske vrpce fosfatnih, karbonatnih i hidroksilnih skupina karakteristične za amorfni kalcijev fosfat.^{1,6} Može se uočiti da dvije vrpce koje pripadaju PO_4^{3-} istezanju (oko 1000 i 550 cm^{-1}) nisu pocijepane što je pokazatelj da je u sustavu nastao amorfni kalcijev fosfat, odnosno da njegova transformacija u kristalnu fazu nije započela. S obzirom da spektri taloga nastalih u istraživanom taložnom sustavu koji je mehanički miješan kao i u onome koji nije miješan sadrže jednake vibracijske vrpce, kao primjer je asigniran spektar sa Slike 12.



Slika 12. FTIR spektri taloga nastalog nakon 40 minuta bez miješanja u taložnom sustavu s početnim koncentracijama reaktanata $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 3,5\text{ mmol dm}^{-3}$ pri 25°C i početnoj pH vrijednosti 7,4.



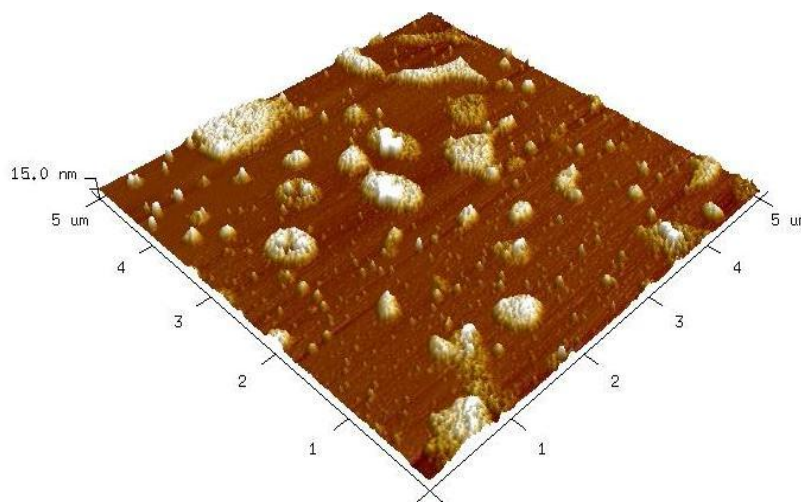
Slika 13. FTIR spektri taloga nastalog nakon 10 minuta uz mehaničko miješanja u taložnom sustavu s početnim koncentracijama reaktanata $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 3,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri 25°C i početnoj pH vrijednosti 7,4.

Tablica 2. Asignacija FTIR spektra taloga nastalog nakon 40 minuta bez miješanja u taložnom sustavu s početnim koncentracijama reaktanata $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 3,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri 25°C i početnoj pH vrijednosti 7,4.

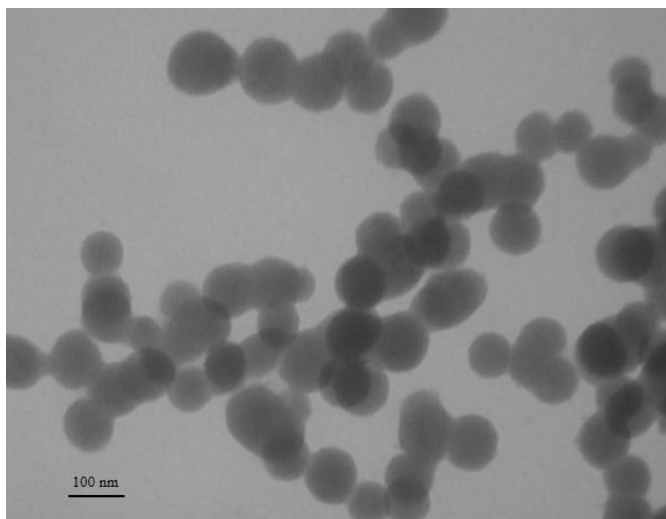
ν/cm^{-1}	Vibracija
3430	O-H (H_2O)
1634	vibracija vode
1070	Trostruko degenerirano simetrično istezanje PO_4^{3-} (P-O veza)
876	HPO_4^{2-}
562	Trostruko degenerirano istezanje PO_4^{3-} (O-P-O veza)

4.2.2 Morfologija taloga

Zbog kratkog vremena indukcije i načina pripreme uzoraka za AFM i TEM, morfologija taloga određena je samo u sustavu koji nije bio miješan (Slike 14 i 15). Rezultati pokazuju da je dobiveni talog vrlo heterogen s obzirom na veličinu nastalih čestica ACP. Na AFM mikrografijama vidljive su pojedinačne sferične čestice ACP veličina od 1-2 nm do 10 – 15 nm (Slika 14). TEM omogućava vizualizaciju većih sferičnih čestica ACP i njihovih lančastih agregata (Slika 15). Morfologija dobivenog taloga karakteristična je za ACP i u skladu s opažanjima drugih autora.^{2,6,16,17}



Slika 14. AFM mikrografija taloga nastalog nakon 40 minuta bez miješanja u taložnom sustavu s početnim koncentracijama reaktanata $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 3,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri 25°C i početnoj pH vrijednosti 7,4.

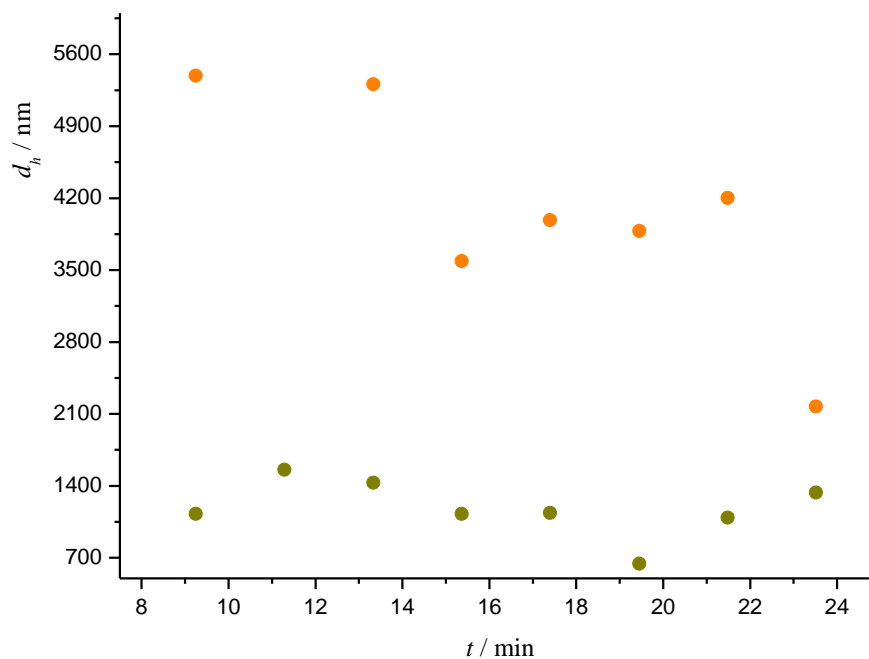


Slika 15. TEM mikrografija taloga nastalog nakon 40 minuta bez miješanja u taložnom sustavu s početnim koncentracijama reaktanata $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 3,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri 25°C i početnoj pH vrijednosti 7,4.

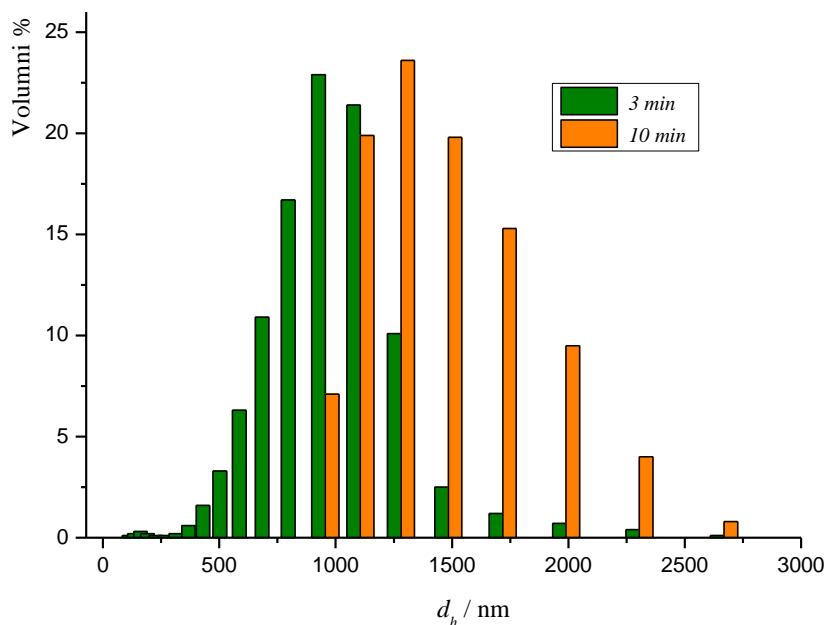
4.3 PROMJENA VELIČINE ČESTICA ACP

4.3.1 DLS mjerenja

Rezultati DLS mjerenja promjene veličine čestica ACP tijekom vremena indukcije u sustavu bez dodatnog miješanja prikazani su na slici 16. U prvim trenucima taloženja raspodjela veličine čestica je monomodalna, no nakon 10 min postaje bimodalna. Veličina manjih čestica se ne mijenja se značajno s vremenom i kreće se oko 1000 nm, dok se veličina većih čestica s vremenom smanjuje s oko 5500 nm na oko 2000 nm. S obzirom na izmjerene veličine čestica, može se zaključiti da se u oba slučaja radi o lančastim agregatima sferičnih čestica ACP. Veće čestice mogu biti ili duži lančasti agregati sferičnih čestica ili lančasti agregati većih sferičnih čestica.



Slika 16. Promjena hidrodinamičkog promjera (d_h) čestica ACP s vremenom (t) u sustavu početnih koncentracija reaktanata $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 3,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri 25°C , početnoj pH vrijednosti 7,4 bez miješanja. Zelene točke na grafovima predstavljaju hidrodinamički promjer populacije manjih čestica, a narančaste hidrodinamički promjer populacije većih čestica.

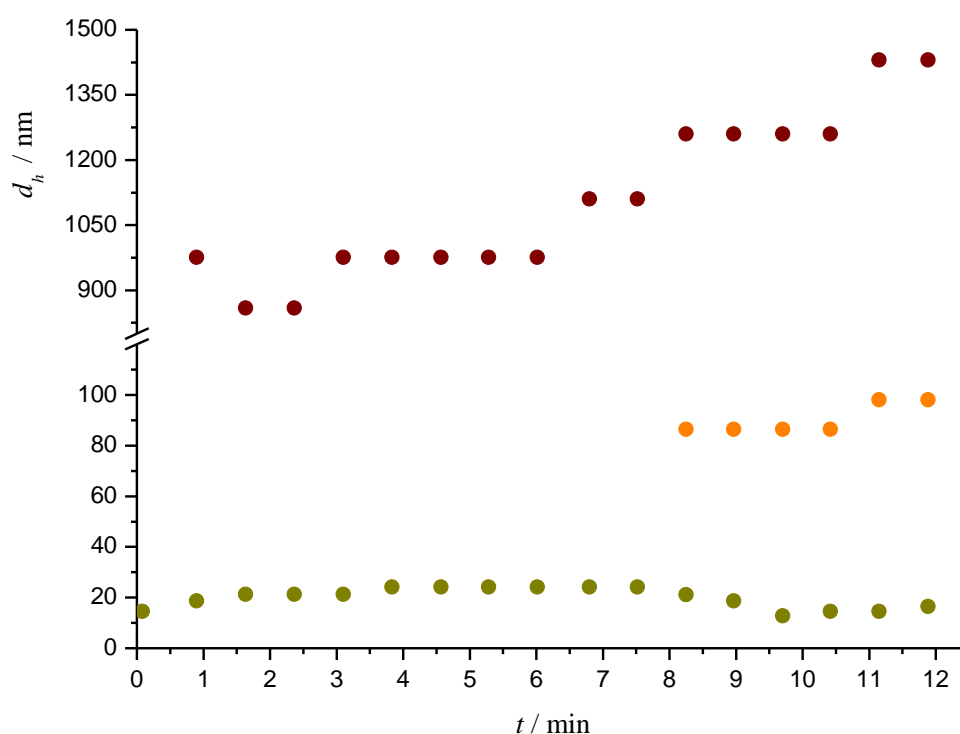


Slika 17. Raspodjela veličine čestica ACP dobivenih u sustavu početnih koncentracija reaktanata $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 3,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri 25°C i početnoj pH vrijednosti 7,4 nakon 3 i 10 min reakcije bez miješanja.

Raspodjele veličine čestica ACP dobivenih nakon 3 i 10 minuta, prikazane na slici 17., pokazuju da je raspodjela veličine čestica vrlo široka, potvrđujući nastajanje vrlo heterogenog sustava.

Određujući veličinu čestica kalcijevih fosfata dinamičkim raspršenjem svjetlosti, Selmani i suradnici⁶ te Wang i suradnici⁷ su došli do sličnih rezultata. Zanimljivo, ni u jednom od istraživanja DLS-om nisu detektirane manje, pojedinačne čestice ACP.

4.3.2 Mjerenja laserske difrakcije



Slika 18. Promjena hidrodinamičkog promjera (d_h) s vremenom (t) u sustavu početnih koncentracija reaktanata $c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 3,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri 25°C i početnoj pH vrijednosti 7,4 uz mehaničko miješanje.

Određivanje veličine čestica kalcijevih fosfata metodom laserskog raspršenja još nije opisano u literaturi, iako se ta metoda koristi za *in situ* praćenje taloženja pogotovo kao kontrola u industrijskim procesima.²¹

U početnim trenucima taloženja, do 8 min , raspodjela veličine čestica ACP je bimodalna. Veličina manjih čestica se ne mijenja značajnije s vremenom i iznosi oko 24 nm što odgovara veličini pojedinačnih sferičnih čestica ACP. Veličina većih čestica, koja odgovara veličini lančastih agregata sferičnih čestica, s vremenom raste od 859 do 1110 nm . Nakon 8 min veličina tih čestica se povećava na oko 1400 nm, a detektirana je i treća populacija čestica, veličine oko 90-100 nm, što odgovara manjim lančastim agregatima sferičnih čestica ACP.

Obje metode, dinamičko raspršenje svjetlosti (Slika 16.) i laserska difrakcija (Slika 18.), detektiraju lančaste agregate sferičnih čestica ACP-a. Veličine čestica određene DLS metodom nešto su veće od onih dobivenih laserskom difrakcijom.

§ 5. Zaključak

U ovom radu istraženo je nastajanje amorfnog kalcijevog fosfata, prvog koraka u nastajanju kalcijevih fosfata *in vitro* i *in vivo*, metodama dinamičkog raspršenja svjetlosti i laserske difrakcije *in situ*. Rezultati su pokazali da već u početnim trenucima taloženja nastaje vrlo heterogen sistem, koji se sastoji od više populacija čestica različitih veličina, od pojedinačnih čestica ACP do njihovih lančastih agregata različitih veličina. Pri tome se laserska difrakcija pokazala kao osjetljivija metoda za određivanje veličine manjih čestica u tako složenim sustavima. Razlozi mogu biti osim u različitim fizikalno-kemijskim principima metoda i u različitoj eksperimentalnoj izvedbi samih mjerenja. Mehaničko miješanje i značajno veći volumen uzorka ,omogućuje dobivanje reprezentativnijih rezultata metodom laserske difrakcije. Mikroskopija atomskih sila i transmisijska elektronska mikroskopija potvrdile su rezultate dobivene tim dvjema metodama određivanja raspodjele veličine čestica.

§ 6. Literaturni izvori

1. S. Dorozhkin, *Acta Biomaterialia*, **6** (2010) 4457-4475.
 2. M. Dutour Sikirić, H. Füredi-Milhofer, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **128-130** (2006) 135-158.
 3. J. Mahamid, A. Sharir, L. Addadi, S. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105** (2008) 12748-12753.
 4. E. Beniash, R.A.Metzler, R.S. K. Lam, P. U. P. A Gilbert, *J. Struct. Biol.*, **166** (2009) 133-143
 5. R. F. Domingos, M. A. Baalousha, Y. Ju-Nam, M. M. Reid, N. Tufenkji, J. R. Lead, G. G. Leppard, K. J. Wilkinson, *Environ. Sci. Technol.*, **43** (2009) 7277-7284.
 6. A. Selmani, I. Cocha, K. Magdić, B. Čolović, V. Jokanović, S. Šegota, S. Gajović, A. Gajović, D. Jurašin, M. Dutour Sikirić, *Cryst. Eng. Comm.*, **17** (2015) 8529-8548.
 7. G. Wang, J. Liao, B. Gou, J. Huang, R. Tang, J. Tao, T. Zhang, K. Wang, *Cryst. Growth Des.*, **9** (2009) 2620-2626.
 8. J. W. Mullin, *Crystalization*, Butterworth Heinmann, Oxford, 2001, str. 181-288.
 9. W. Stumm, J. J. Morgan, *Aquatic Chemistry*, John Wiley and Sons, New York, 1981, str. 800-903.
 10. H. Füredi-Milhofer, *Croat. Chem. Acta*, **56** (1983) 721-740
 11. E. D. Eans, *Dynamics of Calcium Phosphate Precipitation, in: Calcification in Biological System*, Ed.E. Bpnnuci, CRC Press. Boca Raton, 1992., 1-17
 12. H. A. Lowenstam, S. Weiner, *On Biomineralization*, Oxford Univeristy Press, New York, 1989.
 13. S. Mann, *Biomineralization Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*, Oxford University Press, New York, 2001., 30-34.
 14. L.B. Gower, *Chem. Rev.*, **108** (2008) 4551-4627.
 15. V. Babić-Ivančić, M. Dutour Sikirić, *Serb. Dent. Jour.*, **59** (2012) 7-21.
-

-
16. P. Bar-Yosef Ofir, R. Govrin-Lippman, N. Garti, H. Füredi-Milhofer, *Cryst. Growth Des.*, **4** (2004) 177-183
 17. M. Iijima, D. Fan, K. M. Bromley, Z. Sun, J. Moradian-Oldak, *Cryst. Growth Des.*, **10** (2010) 4815-4822.
 18. Lj. Brečević, V. Hlady, H. Füredi-Milhofer, *Colloids Surf.*, **28** (1987) 301-313
 19. A. Hassan, S. Rana, G. Verma, *Langmuir*, **31** (2015) 3-12.
 20. M. Kaszuba, *Zetasizer nano series and HPPS training course*, Malvern, 2012.
 21. <http://www.malvern.com/en/products/product-range/mastersizer-range/mastersizer-3000/>, 21.4.2017.
 22. I. N. Mccave, *Jour. Sed. Res.*, **56** (1986), 561-564.
 23. A. J. Bale, *Estuarine, Estuar. Coast. Shelf. Sci.*, **24** (1987), 253-263.
-

§ 7. Sažetak

POČETNI STADIJI BIOMINERALIZACIJE: ISTRAŽIVANJE NASTAJANJA AMORFNOG KALCIJEVOG FOSFATA METODAMA RASPRŠENJA SVJETLOSTI I LASERSKE DIFRAKCIJE

INA ERCEG

Amorfni kalcijev fosfat (ACP) prva je faza koja nastaje pri taloženju kalcijevih fosfata (CaP) *in vivo* i *in vitro*. Nastajanje ACP-a je u osnovi agregacijski proces. Osnovna strukturalna jedinica ACP je Posnerov klaster, $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$. Veliki broj tih klastera je gusto pakirani u sfere koje se agregiraju u lančaste nakupine sferičnih čestica. Iako je nastajanje ACP vrlo istraživani proces, zbog njegove uloge u biomineralizaciji, njegovo odvijanje na nanoskali nije do kraja razjašnjeno.

Cilj ovog rada je primjenom dviju uobičajenih metoda određivanja veličina nanočestica, dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) i laserske difrakcije, pratiti početne stadije nastajanja ACP i doprinijeti razumijevanju procesa na nanoskali.

Rezultati su pokazali da već u početnim trenucima taloženja ACP nastaje vrlo heterogen sistem, koji se sastoji od više populacija čestica različitih veličina, od pojedinačnih čestica ACP do njihovih lančastih agregata različitih veličina. Pri tome se laserska difrakcija pokazala kao osjetljivija metoda za određivanje veličine manjih čestica u tako složenim sustavima.

Ključne riječi: amorfni kalcijev fosfat, dinamičko raspršenje svjetlosti, laserska difrakcija.

§ 8. Summary

INSIGHT INTO THE INITIAL STAGES OF BIOMINERALIZATION: INVESTIGATION OF AMORPHOUS CALCIUM PHOSPHATE FORMATION BY DYNAMIC LIGHT SCATTERING AND LASER DIFFRACTION

INA ERCEG

Amorphous calcium phosphate (ACP) is the initial phase formed during calcium phosphate (CaP) precipitation both in vivo and in vitro. ACP formation is basically an aggregation process. The basic structural unit of ACP is Posner's cluster, $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$. A large number of these clusters are close packed in spheres, which in turn assemble into chain-like spherical aggregates. Although the formation of ACP continues to receive attention, due to its role in biomineralization, its formation on nanoscale is still not completely elucidated.

The aim of this work was to monitor initial steps of formation ACP particles and contribute to the understanding of these processes in nanoscale by using two common methods for nanoparticles size determination, dynamic light scattering (DLS) and laser diffraction.

The results showed that already in initial stages of precipitation, a heterogenous system is formed. This system consists of several population of particles of different sizes, from individual ACP particles to chain-like spherical aggregates of different sizes. Thereby, laser diffraction proved to be a more sensitive method for determining the size of smaller particles in such complex systems.

Key words: Amorphous calcium phosphate, dynamic light scattering, laser diffraction.
