

LATVIJAS UNIVERSITĀTE

ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**DAĻĒJI AR STRONCIJU AIZVIETOTU HIDROKSIL-  
PEROKSIAPATĪTU ANALĪTISKA RAKSTUROŠANA  
UN ANTIBAKTERIĀLO ĪPAŠĪBU IZPĒTE**

MAGISTRA DARBS

Autore: Valda Valkovska

Studenta apliecības Nr.: vv11093

Darba vadītāja: docente Dr. chem. Agnese Osīte

RĪGA

2018

## ANOTĀCIJA

**Daļēji ar stronciju aizvietotu hidroksil-peroksiapatītu analītiska raksturošana un antibakteriālo īpašību izpēte.** Valkovska V., darba vadītāja docente, Dr. chem. Osīte A. Maģistra darbs, 72 lappuses, 26 attēli, 15 tabulas, 126 literatūras avoti, 8 pielikumi. Latviešu valodā.

Darbā ir apkopota informācija par hidroksilapatītu un hidroksil-peroksiapatītu iegūšanu, fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām, izmantošanu, analīzes metodēm, kalcija fosfātu biomateriālu mikrobioloģiskajām īpašībām, to antibakteriālās aktivitātes un toksicitātes novērtēšanu, stabilo izotopu sastāvu bioloģiskajā apatītā.

Eksperimentālajā daļā veiktas kalcija hidroksilapatīta un daļēji ar stronciju aizvietotu hidroksilapatītu sintēzes, izmantojot nogulsņēšanas metodi. Hidroksilapatīti hidrotermiski apstrādāti ūdeņraža peroksīda šķīduma klātbūtnē. Kvantitatīvā sastāva noteikšanai izmantota rentgenfluorescences spektrometrija un permanganometrija. Apatīti raksturoti ar pulvera rentgendifraktometriju, izotopu attiecību masspektrometriju, Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopiju un Ramana spektroskopiju. Antibakteriālā aktivitāte noteikta izmantojot *Staphylococcus aureus* un *Pseudomonas aeruginosa* baktērijas ar mikroatšķaidījuma metodi.

HIDROKSIL-PEROKSIAPATĪTI, STAPHYLOCOCCUS AUREUS, PSEUDOMONAS AERUGINOSA, IZOTOPU ATTIECĪBU MASSPEKTROMETRIJA, PULVERA RENTGENDIFRAKTOMETRIJA, FURJĒ TRANSFORMĀCIJAS INFRASARKANĀ SPEKTROSKOPIJA, RAMANA SPEKTROSKOPIJA.

## ABSTRACT

**Analytical characterization and investigation of antibacterial properties of partially substituted strontium hydroxy-peroxyapatite.** Valkovska V., supervisor docent, Dr. chem. Osīte A. Master's thesis, 72 pages, 26 figures, 15 tables, 126 literature references, 8 appendices. In Latvian.

The research contains the information about obtaining, physical and chemical properties, application, analysis methods of hydroxyapatites and hydroxy-peroxyapatites, microbiological properties of calcium phosphate biomaterials, their antibacterial activity and toxicity assessment, stable isotope composition of biological apatite.

Calcium hydroxyapatite and partially substituted strontium hydroxyapatites synthesis were performed experimentally using aqueous precipitation method. Hydroxyapatites were hydrothermal treated in the presence of a hydrogen peroxide solution. X-ray fluorescence spectrometry and permanganometry was used to determine the quantitative composition. Apatites were characterized by X-ray powder diffraction, isotope ratio mass spectrometry, Fourier transform infrared spectroscopy and Raman spectroscopy. The antibacterial activity was determined using *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacterial strains by microdilution method.

HYDROXY-PEROXYAPATITE, STAPHYLOCOCCUS AUREUS, PSEUDOMONAS AERUGINOSA, ISOTOPE RATIO MASS SPECTROMETRY, X-RAY POWDER DIFFRACTION, FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY, RAMAN SPECTROSCOPY.

# SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS .....	6
IEVADS .....	8
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	9
1.1. Hidroksilapatīti (HAp).....	9
1.2. Stroncija hidroksilapatīti (SrHAp).....	12
1.3. Hidroksil-peroksiapatīti (HPerAp) .....	13
1.4. Kalcija fosfātu biomateriālu mikrobioloģiskās īpašības .....	15
1.5. Antibakteriālās aktivitātes noteikšana .....	18
1.6. Toksicitātes novērtēšana .....	20
1.7. Stabīlie izotopi .....	22
1.8. Vieglo stabīlo izotopu attiecību masspektrometrija (IRMS) .....	23
1.9. Pulvera rentgendifraktometrija (PXR).....	26
1.10. Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija (FTIR).....	28
1.11. Ramana spektroskopija .....	30
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA .....	32
2.1. Izmantotie reaģenti, aparātūra un trauki .....	32
2.2. Šķīdumu pagatavošana .....	34
2.3. Hidroksilapatītu (HAp) sintēzes .....	34
2.4. Paraugu analīze ar WD-XRF metodi .....	35
2.5. Hidroksil-peroksiapatītu (HPerAp) hidrotermiskā apstrāde .....	35
2.6. Permanganatometriskā H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> noteikšana HPerAp paraugos.....	36
2.7. Antibakteriālo īpašību noteikšana.....	37
2.8. Paraugu analīze ar TC/EA-IRMS metodi .....	38
2.9. Paraugu analīze ar PXR metodi .....	38
2.10. Paraugu analīze ar FTIR metodi .....	38
2.11. Paraugu analīze ar Ramana spektroskopijas metodi.....	39
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS .....	40
3.1. Sintezēto apatītu raksturojums.....	40
3.2. Peroksīdjonu saturs hidrotermiski apstrādātajos apatītu paraugos .....	41
3.3. Antibakteriālo īpašību izvērtējums .....	44
3.4. δ <sup>18</sup> O vērtību izvērtējums hidroksil-peroksiapatītos un to sintēžu izejvielās.....	45
3.5. Sintezēto apatītu kvalitātes novērtējums, izmantojot PXR.....	50
3.6. Apatītu funkcionālo grupu raksturošana ar FTIR metodi.....	53

3.7. Apatītu funkcionālo grupu raksturošana, izmantojot Ramana spektroskopiju .....	55
SECINĀJUMI .....	60
IZMANTOTĀ LITERATŪRA .....	61
PATEICĪBAS .....	71
Pielikumi.....	72
1. pielikums. GHS piktogrammu atšifrējums .....	1
2. pielikums. WD-XRF spektri .....	2
3. pielikums. Tēzes LU 75. Starptautiskajā konferencē .....	4
4. pielikums. Tēzes LU 76. Starptautiskajā konferencē .....	5
5. pielikums. Tēzes RTU 58. Starptautiskajā zinātniskajā konferencē „MSAC 2017” .....	6
6. pielikums. Stenda referāts .....	8
7. pielikums. Publikācija .....	9
8. pielikums. Tēzes „EcoBalt2018” .....	14

## APZĪMĒJUMU SARAKSTS

- $a, b, c, \gamma$  – kristālrežģa parametri;  
ACP – amorfais kalcijs fosfāts;  
CF-IRMS – nepārtrauktas plūsmas izotopu attiecību masspektrometrija;  
CaHAp – kalcijs hidroksilapatīts;  
CaHPerAp – kalcijs hidroksil-peroksiapatīts;  
CaP – kalcijs fosfāti;  
25%-CaSrHAp – ar 25% stronciju aizvietots hidroksilapatīts;  
25%-CaSrHPerAp – ar 25% stronciju aizvietots hidroksil-peroksiapatīts;  
CuHAp – ar varu aizvietots hidroksilapatīts;  
DI-IRMS – divkārģas iepļudes izotopu attiecību masspektrometrija;  
DTGS – deiterēts triglicīna sulfāts;  
EA-IRMS – elementu analģzes izotopu attiecību masspektrometrija;  
*FWHM* – pilnais platums pusaugstumā (*full width at half maximum*);  
FTIR – Furģe transformāģijas infrasarkanā spektroskopija;  
GC – gāzu hromatogrāģija;  
HAp – hidroksilapatīts;  
HPerAp – hidroksil-peroksiapatīts;  
IAEA – Starptautiskā Atomenerģijas Aģentūra (*International Atomic Energy Agency*);  
ICP-MS – induktģvi saistģtģs plazmas masspektrometrija;  
IR – infrasarkanais starojums;  
ISO – Starptautiskā Standartizāģcijas organizāģcija;  
IRMS – izotopu attiecību masspektrometrija;  
kvv – kolonģju veidoģģģs vienģbas;  
*MBC* – minimālģ baktericģdģ koncentrāģcija;  
MCT – dzģvsudraba kadmģja telurģds;  
*MIC* – minimālģ inhibģģģģ koncentrāģcija;  
MRSA – meticģlģnrezistentais *Staphylococcus aureus*;  
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolģja bromģds;  
m/z – masas un lģdģģa attiecģba;  
N – neģtronu skaģts;  
OP – oksidģģģnģģ pakģpe;  
PXRD – pulvera rentģendifraktometrija;  
rel. v. – relatģvģģs vienģbas;

SrCaHAp – daļēji ar stronciju aizvietots hidroksilapatīts;  
SrCaHPerAp – daļēji ar stronciju aizvietots hidroksil-peroksiapatīts;  
SrHAp – stroncija hidroksilapatīts;  
75%-SrCaHAp – ar 75% stronciju aizvietots hidroksilapatīts;  
75%-SrCaHPerAp – ar 75% stronciju aizvietots hidroksil-peroksiapatīts;  
100%-SrHClAp – pilnīgi ar stronciju aizvietots hidroksihlorapatīts;  
100%-SrPerClAp – pilnīgi ar stronciju aizvietots peroksihlorapatīts;  
SrHPerAp – stroncija hidroksil-peroksiapatīts;  
ROS – aktīvās skābekļa formas (*Reactive oxygen species*);  
TC/EA-IRMS – termiskās konversijas elementu analīzes izotopu attiecību masspektrometrija;  
TCP – trikalcija fosfāts;  
WD-XRF – viļņu dispersā rentgenfluorescences spektrometrija;  
 $x(\text{OH}^- \rightarrow \text{O}_2^-)$  – procentuālais  $\text{O}_2^-$  jonu daudzums, kas aizvietojis  $\text{OH}^-$  jonus;  
Z – protonu skaits.

## IEVADS

Katru gadu Eiropas Savienībā vairāk nekā 4 miljoni pacientu iegūst infekciju veselības aprūpes procesā, tas skar 10% pacientu. Iegūtās infekcijas palielina veselības aprūpes izmaksas, pacientu mirstību un rada jaunas saslimšanas. Medicīnā biomateriālu pieprasījums aizvien turpina pieaugt, līdz ar to iespējams inficēties, izmantojot dažādus metālu, keramikas, polimēru un kompozītmateriālus. To bioloģiskās īpašības var uzlabot, novēršot baktēriju adhēziju un biofilmu veidošanos, pievienojot vielas, kurām piemīt antibakteriālas īpašības. Lokālai antibiotisko vielu izdālei no biomateriāla ir vairāk priekšrocību, salīdzinot ar sistēmisko antibiotisko vielu izmantošanu pirms un pēc implantācijas operācijām.

Hidroksilapatīts ir kaulaudu minerālās fāzes galvenā sastāvdaļa, kam raksturīga antibakteriālā aktivitāte, kuru var uzlabot, aizvietojot  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $(\text{PO}_4)^{3-}$  vai  $\text{OH}^-$  jonus. Aizvietojot  $\text{OH}^-$  ar  $\text{O}_2^-$  joniem, var palielināt apatīta bioloģiskās īpašības un tā izmantošanas iespējas, pateicoties ūdeņraža peroksīda dezinficējošām īpašībām.

Zinātniskajos pētījumos peroksīdjonu raksturošanai hidroksil-peroksiapatītos galvenokārt izmanto permanganometriju un Ramana spektroskopiju. Izotopu attiecību masspektrometrijas metodes popularitāte un izmantošanas iespējas ik gadu strauji palielinās, līdz šim stabilo izotopu pētījumos izmantoti galvenokārt bioloģiskā apatīta materiāli. Sintētisko apatītu pētīšana ar šo metodi ir novitāte, kas LU ĶF aizsākās 2016. gadā. Lai varētu raksturot sintezēto apatītu skābekļa izotopu variāciju atšķirības, nepieciešams izvērtēt katras izejvielas ieguldījumu tajā.

**Darba mērķis:** izvērtēt peroksīdjonu saturu iegūtajos hidroksil-peroksiapatītos atkarībā no  $\frac{\text{Sr}}{(\text{Sr}+\text{Ca})}$  molārās attiecības apatītā un tos analītiski raksturot.

### **Darba uzdevumi:**

1. sintezēt amorfu kalcija hidroksilapatītu un daļēji ar stronciju aizvietotus hidroksilapatītus;
2. 100 °C – 150 °C temperatūras intervālā hidrotermiski ūdeņraža peroksīda klātbūtnē apstrādāt sintezētos hidroksilapatītus;
3. noteikt peroksīdjonu saturu hidroksil-peroksiapatītos;
4. izvērtēt sintezēto paraugu antibakteriālās īpašības;
5. raksturot sintezēs izmantoto izejvielu un iegūto apatītu  $\delta^{18}\text{O}$  vērtības;
6. novērtēt sintezētos apatītus un salīdzināt kristāliskuma pakāpes, izmantojot PXRD;
7. raksturot apatītu funkcionālās grupas, izmantojot FTIR un Ramana spektroskopiju.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Hidroksilapatīti (HAp)

Skābeklis, kalcijs un fosfors ir izplatīti elementi, to procentuālais sadalījums Zemes garozā attiecīgi ir 47%, 3,4% un 0,1%. Tie ir pamatelementi, kas veido kalcija fosfātus (CaP), kuriem CaP savienojumos raksturīgas oksidēšanās pakāpes (OP) ir +2, +5 un -2. Dabā to kristāli atrodas iežos [1, 2]. Tos pēta dažādās zinātņu nozarēs – ģeoloģijā, ķīmijā, bioloģijā un medicīnā, pateicoties to pieejamībai dabā un dzīvajos organismos [3]. Hidroksilapatīts (HAp) ir viens no pētītākajiem un medicīnā izmantotākajiem CaP savienojumiem.

Zīdītājiem kaulu minerālo daļu galvenokārt veido bioloģiskais apatīts, tas sastāda 65% no kopējā kaulaudu sastāva, atlikušo daļu veido kolagēns un ūdens. Bioloģiskais apatīts ir HAp, kas ir bagātināts ar  $Mg^{2+}$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $Cl^-$  un citiem joniem, bet tam raksturīgs  $OH^-$  deficīts [4]. 1.1. tabulā apkopots un salīdzināts bioloģiskā apatīta un sintētiskā HAp sastāvs. Apatīta uzdevums ir nodrošināt cietību un stabilitāti cīpslām, kauliem un zobiem [2].

1.1. tabula

**Pieauguša cilvēka audu un sintētiski iegūta HAp sastāva salīdzinājums**

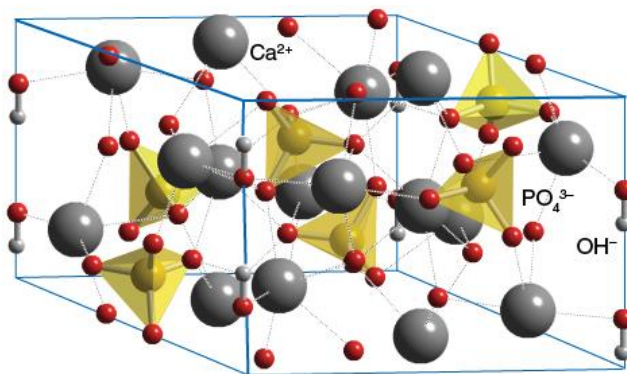
Sastāvs	Zobu emalja	Dentīns	Kauli	HAp
$\omega_{Ca}$ , %	36,5	35,1	34,8	39,6
$\omega_P$ , %	17,7	16,9	15,2	18,5
$\omega_{Na}$ , %	0,5	0,6	0,9	0
$\omega_{Mg}$ , %	0,44	1,23	0,72	0
$\omega_{Cl}$ , %	0,30	0,01	0,13	0
$\omega_{CO_3^{2-}}$ , %	3,5	5,6	7,4	0
$\omega_{H_2O}$ , %	1,5	10	10	0
Kopējā minerālā daļa, %	97	70	65	100

Apatītu vispārīgā formula ir  $M_{10}(AO_4)_6X_2$ , tajā M ir relatīvi liels metāla katjons, kuram raksturīga OP no +1 līdz +3 (parasti –  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ag^+$  vai  $Ce^{3+}$ ). A – metāls vai nemetāls ar augstāku OP, tas ir, no +3 līdz +6, kas veido tetraedrisko  $AO_4$  anjonu (visbiežāk –  $PO_4^{3-}$ ,  $VO_4^{3-}$ ,  $BO_3^{3-}$  vai  $CO_3^{2-}$ ). X ir vienvērtīgs anjons –  $OH^-$ ,  $Cl^-$ ,  $F^-$ ,  $Br^-$ . No struktūrā esošā anjona tiek veidots apatīta nosaukums, attiecīgi hidroksilapatīts, hlorapatīts, fluorapatīts, bromapatīts [5, 6]. Apatītu struktūras īpašības garantē gan daļēju, gan pilnīgu katjonu vai anjonu aizvietošanu. Šādi tiek mainītas materiālu bioloģiskās, fizikālās, ķīmiskās vai mehāniskās īpašības [7].

**Fizikālās un ķīmiskās īpašības.** HAp krāsa atkarīga no aizvietotājiem, tā variē no bezkrāsainas līdz dzeltenai un pelēkai, biežāk sastopami balti kristāli. Kalcija hidroksilapatīta (CaHAp) blīvums ir  $3,16 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  un minerāla cietība pēc Mosa skalas atbilst 5, mehāniskas iedarbības rezultātā tas pietiekami viegli salūzt [2, 8]. Ķīmiski tīram CaHAp raksturīga Ca/P molārā attiecība – 1,67, zobu emaljai un dentīnam Ca/P attiecība ir mazāka, bet kauliem lielāka nekā CaHAp. Apatītu minerāli slikti šķīst ūdenī, CaHAp šķīdības konstante ir  $1,6\cdot 10^{-58}$ . Tas ir stabilākais kalcija ortofosfātu minerāls neitrālā un bāziskā vidē [9, 10, 11].

HAp kristāliem raksturīga monoklīnā un heksagonālā singonija. Biežāk HAp sastopams ar heksagonālo singoniju,  $P6_3/m$  simetrijas klasi un kristāliskā režģa parametriem:  $a=b=9,432 \text{ \AA}$ ,  $c=6,881 \text{ \AA}$  un  $\gamma=120^\circ$ . Ķīmiski tīrs HAp kristalizējas monoklīnajā singonijā –  $P2_1/b$  ( $a=9,42 \text{ \AA}$ ,  $b=2a$ ,  $c=6,88 \text{ \AA}$ ,  $\gamma=120^\circ$ ), tas ir termodinamiski stabilāks, salīdzinot ar heksagonālo singoniju. Monoklīnās singonijas pāreja uz heksagonālo notiek temperatūrā, kas ir augstāka par  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  [2, 11, 12].

1.1. attēlā ar zilu līniju attēlota CaHAp elementāršūna, to veido tetraedri, kas sastāv no fosfora un četriem skābekļa atomiem. Tetraedri stabilizē apatīta struktūru un tie atrodas starp kalcija atomiem [12, 13]. Elementāršūnā ir desmit  $\text{Ca}^{2+}$  joni, kas izvietoti divās pozīcijās: no tiem četri Ca (I) atomi atrodas kolonnā, kuriem apkārt ir deviņi skābekļa atomi, un seši Ca (II) atomi, kas veido vienādmalu trijstūrus, tiem apkārt ir septiņi skābekļa atomi.  $\text{OH}^-$  joni izvietoti kolonnās – šūnas malās, tie nodrošina materiāla struktūras porainību un virsmas aktivitāti [14].



1.1. att. Kalcija hidroksilapatīta uzbūve [15]

**Izmantošana medicīnā.** 1.1. tabulā redzams, ka sintētiskā HAp un zīdītāju klases pārstāvju kaulaudu neorganiskās fāzes ķīmiskais sastāvs ir līdzīgs, rezultātā savstarpēji tiek nodrošināta bioloģiskā saderība un aktivitāte. Materiālu izmanto ortopēdijā un stomatoloģijā cieto audu aizstāšanai, metālu implantu pārklāšanai un medikamentu piegādes sistēmās [4]. CaHAp izmantošanu medicīnā ierobežo tā trauslums, stabilitātes un adsorbcijas īpašības. Lai uzlabotu šīs un citas īpašības, pētnieki pēdējā desmitgadē ir pievērsušies CaHAp modificēšanai, izmantojot katjonu un anjonu aizvietošanu [13].

**HAp sintēzes metodes.** HAp iegūšanai izmanto dažādas sintēzes metodes. Laboratorijās visbiežāk izmanto nogulsnešanas metodi.  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  suspensijai pievienojot pa pilienam  $\text{H}_3\text{PO}_4$  un ar  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  nodrošinot nepieciešamo  $\text{pH} > 9$ , nogulsnē HAp [16]. Produkta īpašības ietekmē sintēzes parametri: temperatūra, laiks, pH, skābes pievienošanas ātrums, suspensijas maisīšanas ātrums. HAp iegūšanai bieži izmanto metodi, kurā vispirms tiek atsevišķi pagatavoti  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  un  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  šķīdumi. Šajā metodē nepieciešams attīrīt reakcijas produktu no  $\text{NH}_4^+$  un  $\text{NO}_3^-$  jonu piemaisījumiem [17].

Aizvien populārāka kļūst sola-gēla metode, jo ar to var uzlabot produkta homogenitāti, ietekmējot tā struktūras veidošanos molekulārā līmenī. Izejvielas HAp iegūšanai ir dažādi kalcija sāļi ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ) un fosfātu prekursori ( $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ). Prekursorus lēni un nepārtraukti pievieno reakcijas maisījumam. Metodi bieži izmanto porainas keramikas iegūšanai un HAp pārklājumu veidošanai, taču jutības dēļ sola-gēla metodi ir grūti mērogot – no mazas sintēzes pārnest uz liela apjoma ražošanu, salīdzinot ar citām zemas temperatūras metodēm [7, 18, 19].

Hidrotermiskās metodes pamatā ir sintēze ūdens šķīdumā, nodrošinot paaugstinātu temperatūru un spiedienu. Līdzīgi kā nogulsnešanas metodē – sākumā atsevišķi pagatavo  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  un  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  šķīdumus, tos sajauc un pārnes noslēgtā traukā, karsē 24 stundas  $200\text{ }^\circ\text{C}$  temperatūrā [20]. Metodei raksturīgi produkti ar augstu kristāliskuma pakāpi. Salīdzinot ar sola-gēla un nogulsnešanas metodi, iegūst liela izmēra daļiņas [21].

Cietvielu reakcijas – balstās uz 2 izejvielu ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{CaP}_2\text{O}_7$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  vai  $\text{CaHPO}_4$ ) samalšanu un karsēšanu augstā temperatūrā, kas veicina daļiņu aglomerāciju, bet samazina iegūtā produkta tīrību. Sintēzes produkta daļiņu izmēri ir vairākkārt lielāki nekā citās HAp iegūšanas metodēs. 1.1. tabulā apkopotas HAp sintēzes metodes un to raksturīgie apstākļi [21, 22, 23].

1.2. tabula

**HAp sintēzes metožu raksturojums**

Metode	Sintēzes apstākļi		Daļiņu izmērs, $\mu\text{m}$
	Temperatūra, $^\circ\text{C}$	Laiks, h	
Nogulsnešanas	25 – 90	$\leq 24 \leq$	> 0,1
Sola-gēla	37 – 90	$\geq 24$	> 0,001
Hidrotermiskā	150 – 400	$\leq 24$	> 0,05
Cietvielu reakcijas	1050 – 1250	$\geq 24$	> 2,0

## 1.2. Stroncija hidroksilapatīti (SrHAp)

Ķīmisko elementu periodiskās tabulas 2. grupas elementu fizikālo un ķīmisko īpašību līdzība dara iespējamu  $\text{Ca}^{2+}$  aizvietošanu ar  $\text{Sr}^{2+}$  joniem. Ar daļēju vai pilnīgu katjonu aizvietošanu iespējams modificēt materiālu īpašības, šajā gadījumā – uzlabot HAp mehāniskās un antibakteriālās īpašības [16]. Pēdējās desmitgadēs interese par stronciju ir ievērojami palielinājusies, pateicoties stroncija ranelāta iedarbībai un pieprasījumam. Sr ranelātu izmanto osteoporozes un citu kaulu slimību ārstēšanā. Sr ir viens no ķīmiskajiem elementiem, kas 99% no kopēja elementa daudzuma organismā atrodams kaulos – tajos apvidos, kur ir augstāka vielmaiņas aktivitāte. Vairākos pētījumos secināts, ka, cilvēkiem novecojot, Sr saturs kaulos samazinās līdz pat trim reizēm. Kopējais tā daudzums kaulaudos ir neliels, tikai 3,5% no kopējā Ca daudzuma [16, 24, 25].

Klīniski pārbaudīts, ka stroncijam piemīt labvēlīga iedarbība uz kaulaudiem. Sr nelielās koncentrācijās kavē un samazina kaulaudu noārdīšanos – palielinot osteoklastu apoptozi (šūnu bojāeju, kas, izdalot enzīmus, rada skābu vidi un noārda kaulaudus), uzlabo osteoblastu (šūnas, kas sintezē kaulaudus) veidošanos, kolagēna sintēzi un novērš zobu kariesu [25, 26, 27]. Lielākas stroncija koncentrācijas organismā samazina kalcija uzsūkšanos un nelabvēlīgi ietekmē kaulu mineralizācijas procesu [16, 28].

**Fizikālās un ķīmiskās īpašības.** Tāpat kā CaHAp, stroncija hidroksilapatīta (SrHAp) kristāliem raksturīga heksagonālā singonija,  $P6_3/m$  simetrijas klase. Aizvietojot  $\text{Ca}^{2+}$  ar  $\text{Sr}^{2+}$  joniem, apatīta kristāliskā režģa parametri ( $\text{Ca}_9\text{Sr}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ :  $a=9,451 \text{ \AA}$ ,  $c=6,901 \text{ \AA}$ ;  $\text{Ca}_5\text{Sr}_5(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ :  $a=9,630 \text{ \AA}$ ,  $c=7,103 \text{ \AA}$ ;  $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ :  $a=9,764 \text{ \AA}$ ,  $c=7,280 \text{ \AA}$ ) un kristāliskuma pakāpe palielinās, pieaugot stroncija saturam. Režģa parametru izmaiņu ietekmē atšķirīgie katjonu rādiusu lielumi [5, 14, 24, 26, 29, 30]. Izpētīts, ka Sr var iekļaut abās Ca pozīcijās kristāliskajā režģī. Ca (I) pozīcija ir piemērotāka, ja Sr saturs ir ~1%, Ca (II) pozīcija – ja Sr saturs ir vairāk nekā 5%. Sr iekļaušana Ca (II) pozīcijā izraisa kristāliskā režģa deformācijas – mainās saišu garumi un leņķis starp atomiem [31]. Pētījumā novērots, ka daļēji ar stronciju aizvietotu hidroksilapatītu (SrCaHAp) šķīdība samazinās, palielinoties Sr saturam [32].

**SrHAp sintēzes metodes.** SrCaHAp un SrHAp iegūšanai izmanto nogulsnešanas, solagēla un hidrotermisko metodes. Sintēzes metodes, to priekšrocības un trūkumi, ir līdzīgas CaHAp iegūšanas metodēm, kas papildinātas ar  $\text{Sr}^{2+}$  jonu saturošiem reaģentiem [18, 24].

SrCaHAp nogulsnešanai izmanto:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  vai  $\text{SrCl}_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  un amonjaka ūdens šķīdumu, lai nodrošinātu bāzisku vidi ( $\text{pH}>9$ ). Zinātniskajā literatūrā sintēžu temperatūras variē no 25 °C līdz 100 °C, ilgums – 10 minūtes līdz 48 stundām,

produktu žāvēšanas temperatūras no 37 °C līdz 130 °C. Metodes priekšrocības: zemas izmaksas un iespējams iegūt maza izmēra daļiņas ( $>0,05 \mu\text{m}$ ) [9, 26, 33, 34].

Dažāda izmēra un formu daļiņas var iegūt ar sola-gēla metodi. SrCaHAp vai SrHAp iegūšanai izmanto  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  un amonjaka ūdens šķīdumu, lai nodrošinātu  $\text{pH} \sim 11$ . Maisījumu karsē un stundu maisa 60 °C temperatūrā. Pēc tam nofiltrē, nogulsnes mazgā ar dejonizētu ūdeni un diennakti žāvē 80 °C temperatūrā. Sintēzē iegūtajam produktam ir augsta kristāliskuma pakāpe un tīrība [18, 23, 33].

Izmantojot cietvielu reakcijas, SrCaHAp iegūst ar augstu kristāliskuma pakāpi, tā daļiņas ir lielākas, salīdzinot ar nogulsnešanas metodē iegūtajām. Ahāta pietā sajauc  $\text{CaCO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  un  $\text{SrCO}_3$ , iegūto pulveri karsē 12 stundas 450 °C, pēc tam 12 stundas 700 °C un 24 stundas 1000 °C temperatūrā [26].

### 1.3. Hidroksil-peroksiapatīti (HPerAp)

Cilvēku organismā fagocīti izdala superoksīdjonus ( $\text{O}_2^-$ ), kuri cīnās ar infekcijām. Aktīvo skābekļa formu (ROS) veidošana ir antibiotiku darbības pamatā, piemēram, fluorhinolona. Šī iemesla dēļ peroksīdu saturošus materiālus izmanto kā antibakteriālos līdzekļus. Specifiskie enzīmi, piemēram, superoksīda dismutāzes un peroksidāzes, nodrošina antioksidējošu iedarbību, organismā samazinot aktīvās skābekļa formas. Tas pierāda, ka ROS iekļaušana HAp struktūrā var pildīt antibakteriālo lomu, papildinot medicīnas tirgū esošo biomateriālu izmantošanas iespējas. Šādus implantus var uzskatīt kā „reaģējošu” biokeramiku, taču līdz šim to attīstība medicīnā nav bijusi pietiekama. SrCaHAp anjonu aizvietošana ar peroksīdjonu varētu uzlabot apatītu antibakteriālās īpašības [35].

Hidroksiljonu aizvietošana ir mazāk pētīta, salīdzinot ar HAp plašajām katjonu aizvietošanas iespējām. Daži zinātnieki pētījuši  $\text{OH}^-$  jonu aizvietošanu, izmantojot skābekli vai tā savienojumus ar dažādām OP ( $\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{O}_2^{2-}$ ,  $\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{O}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [33, 35].

Ūdeņraža peroksīds ir viens no izmantotākajiem biocīdiem pretmikrobu līdzekļos, ko izmanto medicīnā, veterinārijā un rūpniecībā. Zinātnieki noformulējuši vēlamās prasības ideālam antibakteriālam līdzeklim, kas būtu piemērots izmantošanai dezinfekcijas un sterilizācijas vajadzībām: iedarbojas uz konkrētu vai uz daudzveidīgiem mikroorganismiem, ātra iedarbība (izņemot uzglabāšanu), t. sk., citu materiālu klātbūtnē, zems toksiskuma (kairinājuma, kancerogenitātes, mutagenitātes) risks, droša izmantošana, materiālu savietojamība, stabilitāte, videi draudzīgs.  $\text{H}_2\text{O}_2$  šķīdums atbilst vairākām prasībām, tā piemērotība ir atkarīga no koncentrācijas, ekspozīcijas laika un izmantošanas veida [36, 37].

**Fizikālās un ķīmiskās īpašības.** Kalcija hidroksil-peroksiapatīta (CaHPerAp) krāsa ir balta, retāk gaiši rozā, stroncija hidroksil-peroksiapatīta (SrHPerAp) – dzeltena, iegūstot to līdz 350 °C temperatūrai, augstākā temperatūrā SrHPerAp kļūst balts. Iekļaujot peroksīdjonus hidroksilapatīta struktūrā, kristāliem saglabājas heksagonālā singonija, bet kristāliskā režģa šķautņu garumi samazinās. Tas skaidrojams ar to, ka hidroksiljonu kolonnas diametrs un tilpums samazinās līdz ar peroksīdjonu saturu, taču telpa, ko aizņem atomi ārpus kolonnas, paliek nemainīga. Apatītu režģu parametri apkopoti 1.3. tabulā.  $O_2^{2-}$  jonu iekļaušana HAp struktūrā rada kolonnu platuma,  $PO_4$  tetraedru novietojuma, katjonu pozīciju (I) un (II) koordinācijas izmaiņas, kas atkarīgas no aizvietošanas pakāpes. Peroksīdjonu izvietojas  $OH^-$  jonu kolonnas vidusdaļā [5, 17, 38, 39].

1.3. tabula

**CaHAp, CaHPerAp, SrHAp un SrHPerAp kristālisko režģu parametru salīdzinājums**

Paraugi	$a$ , Å	$c$ , Å
$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	9,432	6,881
$Ca_{10}(PO_4)_6(O_2)_{0,33}(OH)_{1,34}$	9,395	6,869
$Sr_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	9,760	7,279
$Sr_{10}(PO_4)_6(O_2)_{0,24}(OH)_{1,52}$	9,753	7,269
$Sr_{10}(PO_4)_6(O_2)_{0,68}(OH)_{0,64}$	9,725	7,244

Hidroksil-peroksiapatīti (HPerAp) nav stabili, tajos peroksīdjonu koncentrācija pirmajā nedēļā pēc sintēzes strauji samazinās – līdz pat 60%, uzglabājot paraugus 4 °C temperatūrā. Nākamajās nedēļās  $O_2^{2-}$  jonu koncentrācijas samazinājums ir neliels – ap 1%. Trīs mēnešu laikā kopējais  $O_2^{2-}$  jonu daudzums samazinās ap 70% [40, 41]. Tas norāda, ka HPerAp ir piemērots izmantošanai medicīnā, jo nelielā koncentrācijā  $O_2^{2-}$  joni nerada kaitējumu veselībai un sākotnēji tas varētu nodrošināt antibakteriālu iedarbību.

**Hidroksil-peroksiapatītu sintēzes metodes.** HPerAp iegūšanas metodes var sadalīt divās grupās: HAp karsēšana augstās temperatūrās un ūdeņraža peroksīda izmantošana, karsējot salīdzinoši zemās temperatūrās. Līdz šim eksperimentāli nevienam nav izdevies sintēzes ceļā iegūt pilnīgi aizvietotu peroksiapatītu. HPerAp sintēzē netiek pilnīgi aizvietotas  $OH^-$  jonu kolonnas, tādēļ veidojas hidroksil-peroksiapatīts ( $Sr_{10}(PO_4)_6(O_2)_x(OH)_{2-2x}$ ) [5].

Karsējot HAp augstā temperatūrā (900 °C – 1450 °C), nodrošinot dažādu gāzu plūsmu (skābeklis, gaiss, inertās gāzes), iegūst kristālisku HPerAp. Sintēzes ilgums variē no 10 minūtēm līdz pat 48 stundām. HAp ieber kvarca vai stikla laiviņā un ievieto krāsnī, noslēdz sistēmu un pievada nepieciešamo gāzi [38, 39, 40, 42]. Metodēs, kurās HPerAp iegūst augstās temperatūrās, hidroksiljonu kolonnas tiek daļēji aizvietotas ar peroksīdjoniem. Literatūrā

norādīts, ka zinātnieks P. Kazin un raksta līdzautori SrHAp aizvietojuši 68% OH<sup>-</sup> ar O<sub>2</sub><sup>-</sup> joniem, kas līdz šim ir augstākā HPerAp aizvietošanas pakāpe, izmantojot karsēšanas metodi augstā temperatūrā. Nedaudz zemākus rezultātus ieguvis H. Zhao ar kolēģiem, CaHAp aizvietojot 59% OH<sup>-</sup> ar O<sub>2</sub><sup>-</sup> joniem [5, 43].

Apstrādi ar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> var sadalīt vēl divās apakšgrupās: β-trikalcijs fosfāta hidrolīzes reakcija un HAp hidrotermiskā apstrāde. β-trikalcijs fosfātu diennakti izkarsē 900 °C – 1000 °C temperatūrā, pēc tam atdzesē, pievieno ūdeņraža peroksīda šķīdumu un atstāj uz 15 līdz 24 stundām noslēgtā traukā 80 °C – 100 °C temperatūrā. Pēc tam iegūto maisījumu filtrē, nogulsnes mazgā un žāvē 80 °C vai liofilizē. Šajā metodē neliela OH<sup>-</sup> jonu daļa tiek aizvietota ar superoksīdjonu, iegūtajam produktam raksturīga augsta kristāliskuma pakāpe [35, 44].

Izmantojot hidrotermisko apstrādes metodi ar koncentrētu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> šķīdumu, SrCaHAp struktūrā līdz pat 80% OH<sup>-</sup> jonu kolonnas var aizvietot ar O<sub>2</sub><sup>-</sup> joniem. Optimālā apstrādes temperatūra ir 90 °C – 150 °C. Iepriekš pētīti arī citi skābekļa ģenerējošie reaģenti ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOOH), taču tie neuzrādīja tik augstus rezultātus kā H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [23, 33, 45]. Salīdzinot iepriekš apskatītās metodes, redzams, ka HPerAp paraugi ar augstāko peroksīdjonu saturu iegūti izmantojot hidrotermisko apstrādes metodi ar 50% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> šķīdumu.

#### 1.4. Kalcija fosfātu biomateriālu mikrobioloģiskās īpašības

Visbiežāk izraisītās komplikācijas pēc biomateriālu implantēšanas ir infekcijas, kuru pamatā ir baktēriju adhēzija un biofilmas veidošana uz implanta virsmas. Infekcijas veidošanos var iedalīt vairākos posmos: mikroorganismu migrācija un piestiprināšanās uz implanta virsmas, mikroorganismu dalīšanās un koloniju veidošana, kas producē ekstracelulārus polisaharīdus. Biofilma jeb bioplēve samazina antibakteriālo līdzekļu iedarbību un pasargā mikroorganismus no saimniekorganisma imūnsistēmas – fagocītiem un antivielām [46, 47].

Starptautiskās Standartizācijas organizācijas (ISO) standarti nosaka biomateriāliem nepieciešamās pārbaudes, bet tajos nav izvērstas mikrobioloģiskās testēšanas metodes un virzieni. Vairākiem mikroorganismiem, kas ir mikrofloras pārstāvji, piemīt afinitāte pret organismā ievietotiem mākslīgiem implantiem. Ādas mikrofloras pārstāvji: stafilokoki (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), *Pseudomonas aeruginosa* un citas baktērijas [48]. Baktērijas ir viens no biežākajiem cēloņiem, kas izraisa ar implantiem saistītas infekcijas.

Pēc implantu ievietošanas 90% infekciju izraisa patogēnās baktērijas, visbiežāk gram-pozitīvās – *S. aureus* un *S. epidermidis*, kā arī gram-negatīvās – *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* un *Proteus vulgaris* [46, 49]. Pētījumos apkopots, ka visbiežāk infekcijas tiek izraisītas baktērijām nokļūstot organismā no operāciju bloka vides, personāla apģērba,

ķirurģijas instrumentiem un iekārtām. Biofilmu veidojošajām baktērijām ir zema metaboliskā aktivitāte un piemīt specifiska aizsardzība, tādēļ tās ārstēšanai – sistemātiskai antibiotiku lietošanai, pakļaujas ar zemu efektivitāti. Pēdējo desmitu gadu laikā ir izstrādātas vairākas tehnoloģijas kā samazināt vai novērst implantu piesārņošanu ar mikroorganismiem. Viena no izmantotākajām metodēm ir implanta virsmas modificēšana, apstrādājot to ar antibiotikām, antimikrobiāliem līdzekļiem, metālu, kalcija fosfātu pārklājumiem [46, 50]. HAp raksturīga antibakteriāla aktivitāte pret gram-pozitīvām un gram-negatīvām baktērijām, tā strukturā aizvietojo Ca<sup>2+</sup> jonus ar Ag<sup>+</sup>, Ce<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> vai Sr<sup>2+</sup> joniem, iespējams uzlabot antibakteriālās īpašības [51, 52, 53]. SrHAp piemīt antibakteriālās īpašības pret *E. coli*, *Lactobacillus* un *S. aureus* [6].

Daudzi biomateriāli, kurus izmanto biomedicīnisko palīgierīču ražošanai, sekmē baktēriju adhēziju, kolonizāciju un biofilmu veidošanos ar dažādiem patogēniem mikroorganismiem. Zinātnieku uzdevums ir uzlabot jau esošos materiālus, mainot to virsmu fizikālās un bioloģiskās īpašības, un izveidot jaunus, kuri samazina mikroorganismu piesaistīšanos [54]. Modificējot polikarbonāta, polistirola, polivinilhlorīda, HAp un teflona biomateriālu virsmu ar serumu, to hidrofobās īpašības samazina *C. albicans* biofilmas veidošanos [55]. Pētījumā ar stikla keramikas biomateriāliem un *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* baktērijām iegūtie rezultāti liecina, ka *P. aeruginosa* ir izteiktāka tendence piesaistīties un veidot baktēriju kolonijas uz biomateriālu virsmas, salīdzinot ar *S. epidermidis* [56, 57].

***Staphylococcus aureus*.** *S. aureus* ir sfēriska, gram-pozitīva, nekustīga baktērija, kas neveido sporas un aug anaerobos apstākļos, bet nav jutīga pret skābekli. *S. aureus* augšanai labvēlīga temperatūra ir robežās no 6,7 °C līdz 45 °C, optimālā temperatūra baktērijas augšanai ir 37 °C un optimāls vides pH ir 7,4 – 7,6. *Staphylococcus* ģints baktērijām piemīt spēja augt augstās NaCl koncentrācijās (6 – 10%). *S. aureus* visbiežāk kultivē uz asins agara, barojošā agara vai buljona barotnēs [58].

*S. aureus* piemīt nekontrolējama tieksme attīstīt rezistenci pret antibiotikām. Meticilīnrezistentais *S. aureus* (MRSA) celms ir viena no bīstamākajām baktērijām, kas ir rezistenta pret β-laktāmu grupas antibiotikām. MRSA iedala divās grupās pēc tā inficēšanās veidiem: veselības aprūpes iestādēs un sabiedrībā iegūtu [58, 59]. Biofilma, kas izveidojusies ap implantu, nodrošina MRSA izdzīvošanu un ilgāku uzturēšanos organismā, tādējādi pagarinot antibiotiku lietošanu, kas tālāk veicina antimikrobo rezistenci [60]. Glikopeptīdu grupas antibiotikas, visbiežāk vankomicīnu, izmanto MRSA ierosināto infekciju ārstēšanā. Vankomicīnu ārstēšanā izmanto jau 50 gadus, bet arvien biežāk parādās zinātniski raksti par tā efektivitātes nepilnīgumu [61].

*S. aureus* ir sastopama cilvēku un dzīvnieku mikroflorā, ja saimniekorganisma imunitāte nav pazemināta un ādas integritāte nav bojāta, tad infekcijas iespējamības risks ir zems [62]. *S. aureus* izraisa dažādas slimības: ādas un zemādas audu infekcijas, bakterēmiju, pneimoniju, ķirurģisko brūču infekcijas. Tā ir rezistenta pret hloramfenikolu, ciprofloksacīnu, klindamicīnu, eritromicīnu, rifampīnu, tetraciklīnu, trimetoprīmu un β-laktāma antibiotikām [63].

Apstrādājot amorfo kalcija fosfātu (ACP) ar sudraba halogenīdu koloīdiem, iespējams uzlabot materiāla antibakteriālo aktivitāti. Halogenīdu koloīdi ar negatīvu lādiņu nodrošina stiprākas antibakteriālās īpašības, visaugstākā aktivitāte piemīt ACP, kas apstrādāts ar 10% AgI<sup>-</sup>. Pētījumu rezultāti apkopoti 1.4. tabulā [64, 65].

1.4. tabula

**Minimālā inhibējošā koncentrācija (MIC) un minimālā baktericīdā koncentrācija (MBC) amorfam kalcija fosfātam un apstrādātam ar sudraba halogenīdu koloīdiem [65]**

Paraugi	<i>S. aureus</i> (MSCL 334)		<i>P. aeruginosa</i> (MSCL 331)	
	MIC, mg/mL	MBC, mg/mL	MIC, mg/mL	MBC, mg/mL
ACP	>10	>10	>10	>10
ACP – 10% AgI <sup>-</sup>	1,3	>10	0,6	>10
ACP – 10% AgBr <sup>-</sup>	>5	>5	2,5	2,5
ACP – 10% AgCl <sup>-</sup>	>5	>5	>5	>5

*Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas* ģints – nūjiņveida, gram-negatīvas, aerobas un kustīgas baktērijas ar polārām viciņām. Optimālā temperatūra baktēriju attīstībai ir 20 °C un skābe vide (pH<5,5). Salīdzinot ar *Staphylococcus* ģints baktērijām, *Pseudomonas* nav tik izturīgas NaCl šķīdumā – to attīstība NaCl šķīdumā tiek ierobežota [59].

Veselības aprūpes iestādēs *P. aeruginosa* ir viena no izplatītākajām baktērijām, kas spēj ierosināt infekcijas. Baktērijai piemīt rezistence pret dažādiem dezinfekcijas šķīdumiem, tādēļ tā atrodama sanitārajos mezglos, uz medicīniskām ierīcēm un aparatūras [66].

*P. aeruginosa* izraisītās slimības: bakterēmija, pneimonija, urīnceļu infekcijas. Baktērijas ierosinātās slimības ir grūti ārstējamas, jo tai piemīt augsta rezistence pret antibiotiskajām vielām: aminoglikozīdiem, β-laktāmu, hloramfenikolu, ciprofloksacīnu, tetraciklīnu un sulfonamīdiem [58, 66].

Zinātniskajos rakstos norādīts, ka SrCaHAp un SrHAp piemīt antimikrobiālas īpašības pret *S. aureus*. un *P. aeruginosa*. Apatītu antibakteriālās īpašības var uzlabot, apstrādājot tos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> šķīduma klātbūtnē, ar Sr aizvietotu apatītu pētījuma rezultāti apkopoti 1.5. tabulā. Ar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apstrādātiem paraugiem (25%-CaSrHPerAp un 75%-SrCaHPerAp) raksturīgas zemākas MIC un MBC pret *P. aeruginosa* [45, 51, 57].

Ar Sr aizvietotu apatītu MIC un MBC

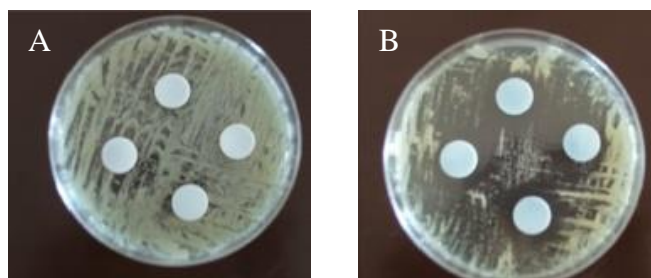
Paraugi	<i>P. aeruginosa</i> (MSCL 331)	
	MIC, mg/mL	MBC, mg/mL
25%-CaSrHAp	>136	>136
25%-CaSrHPerAp	>132	>132
75%-SrCaHAp	>220	>220
75%-SrCaHPerAp	>128	>128
100%-SrHClAp	147	147
100%-SrPerClAp	140	140

### 1.5. Antibakteriālās aktivitātes noteikšana

Antibakteriālos līdzekļus var klasificēt pēc to iedarbības veidiem – tie var traucēt šūnu sienīņu, proteīnu un nukleīnskābju sintēzi, kā arī inhibēt metabolismu. Gram-pozitīvām un gram-negatīvām baktērijām to iedarbības mehānismi ir līdzīgi [67]. Kā galvenais udeņraža peroksīda antibakteriālās aktivitātes mehānisms tiek uzskatīts – makromolekulu (proteīnu, lipīdu, ogļhidrātu un nukleīnskābju) oksidēšana, kurā piedalās brīvie radikāļi ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{O}$ ,  $\cdot\text{OOH}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Sākumā šūnās rodas oksidatīvais stress, tā rezultātā šūnas organoīdos pastiprināti veidojas brīvie radikāļi. Enzīmi spēj noārdīt tikai daļu no tiem, līdz ar to mikroorganismiem tiek radīti funkciju traucējumi un izmaiņas šūnu uzbūvē [36, 37]. Gan  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gan metālu joni rada bojājumus DNS struktūrā un ietekmē DNS replikācijas procesu. Par dominējošo antibakteriālās aktivitātes mehānismu metāla joniem uzskata to uzkrāšanās šūnu membrānās, tādējādi izmainot šūnu caurlaidību [6, 45, 68].

Pamatmetodes antibakteriālās aktivitātes raksturošanai un noteikšanai ir disku difūzijas, agara vai buljona (mikro vai makro) atšķaidījuma metodes. Atšķaidījuma metodes ir piemērotas antibakteriālās (gan pret gram-pozitīvām, gan gram-negatīvām baktērijām) un antifungālās aktivitātes noteikšanai. Agarā vai buljonā iespējams noteikt antimikrobiālā reaģenta koncentrāciju, tādējādi var iegūt MIC vērtības [69, 70]. Biomateriālu analizēšanai visbiežāk izmanto disku difūzijas un mikroatšķaidījuma metodes.

**Disku difūzijas metode.** Metodes pamatā ir antimikrobiālu vielu difūzija agara gēlā, kas kavē mikroorganismu augšanu. Uz plates ar agara barotni inokulē mikroorganismus un novieto papīra vai analizējamā materiāla diskus, kas piesūcināti vai piesātināti ar noteiktas koncentrācijas antimikrobiālu reaģentu [69]. 1.2. attēlā izmantoti HAp (A) un CuHAp (B) diski (apatītu pulveri sapresēti tabletēs), lai pārbaudītu *E. coli* reakciju uz biomateriāliem [71]. Plates inkubē mikroorganismu augšanai piemērotos apstākļos. Pēc tam uz barotnes mēra inhibīcijas zonas diametrus, kurās ir inhibēta mikroorganismu augšana [69].



1.2. att. HAp (A) un CuHAp (B) antibakteriālo īpašību raksturošana pret *E. coli*, izmantojot disku difūzijas metodi [71]

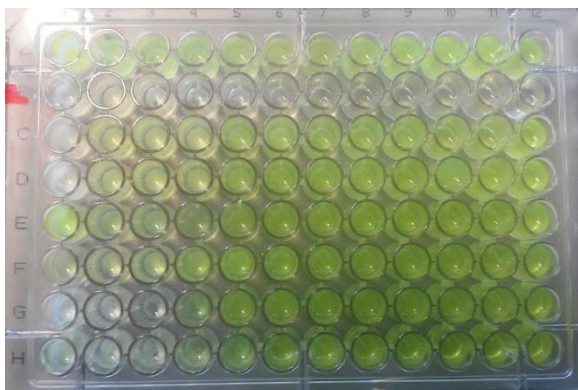
Metodes priekšrocības ir vienkāršība un zemās izmaksas, to plaši izmanto augu ekstraktu, ēterisko eļļu un medikamentu antibakteriālo īpašību pārbaudīšanai. Kā metodes trūkumu var minēt to, ka nav iespējams noteikt precīzu minimālo inhibējošo koncentrāciju (*MIC*) – zemāko antibakteriālās vielas koncentrāciju, kas inhibē baktēriju augšanu. *MIC* noteikšanai var izmantot empīriskus aprēķinus [69, 70].

**Atšķaidījuma metodes.** Makroatšķaidījuma metode – references metode un viena no pirmajām metodēm, ko izmantoja un vēl joprojām izmanto antibakteriālās aktivitātes noteikšanai. Analīzi parasti veic stikla mēģenēs, kurās barotnes tilpums ir lielāks nekā 1 mL. Katrā analīzes sērijā iekļauj divas mēģenes, kas satur buljona barotni, bet tajās nav pievienots antibakteriāls reaģents. No tām vienu izmanto sterilitātes pārbaudei, bet otrā mēģenē pievieno attiecīgo mikroorganismu. Mēģenes inkubē, pēc tam vizuāli salīdzina, nosakot *MIC* vērtības [70, 71].

Mikroatšķaidījuma metodē parasti izmanto 6 – 8 atšķaidījumus (piemēram, 1, 2, 4, 8, 16, 32 g/mL) un 12 dažādus antibakteriālus analītus. Mikrobioloģisko testēšanu veic 96-lauciņu mikroplatēs, kurās 2 lauciņus jeb iedobes sagatavo citādāk: vienā lauciņā iepilda tikai barotni un baktēriju suspensiju (baktēriju augšanas kontrole), otrā – tikai barotni (mikroplates sterilitātes kontrole). Ievērojot, ka katru nākamo lauciņu sērijā atšķaida 2 reizes, pārējos lauciņos iepilda barotni, antibakteriālo reaģentu un beigās pievieno baktēriju suspensiju. Mikroplates inkubē, pēc tam vizuāli novērtē, kuros lauciņos ir inhibēts baktēriju augšanas process. No lauciņiem, kuros nav novērota baktēriju augšana, paņem 50 µL un uzsēj tos uz plates, kas satur asins agaru vai citas piemērotas barotnes. Pēc plašu inkubācijas skaita koloniju veidojošās vienības (kvv), iegūto skaitli izdalot ar tūkstoti, iegūst *MBC* – antibakteriālās vielas koncentrāciju, kas vismaz par 99,9% samazina baktēriju koncentrāciju [69, 70, 71]. Metodes priekšrocības: mazi reaģentu daudzumi, salīdzinoši ātri iespējams pārbaudīt vairākus paraugus vai izmantot vairākas baktērijas [70].

1.3. attēlā redzama 96-lauciņu mikroplate, kurā analizēti 7 antibakteriālie materiāli un veikti 12 atšķaidījumi. *P. aeruginosa* raksturīgs zaļš, fluorescējošs krāsojums, šajā gadījumā apskatot mikroplati pēc krāsojuma un tā intensitātes viegli var noteikt, vai analizējamais paraugs inhibē

baktēriju augšanu un tam piemīt antibakteriālas īpašības. 1.3. attēlā augstākā antibakteriālā iedarbība novērojama pirmajā un otrajā atšķaidījumā, trešajā un ceturtajā – ļoti zema aktivitāte. Pārējos atšķaidījumos izteikta antibakteriālā aktivitāte nav novērojama [45, 57].

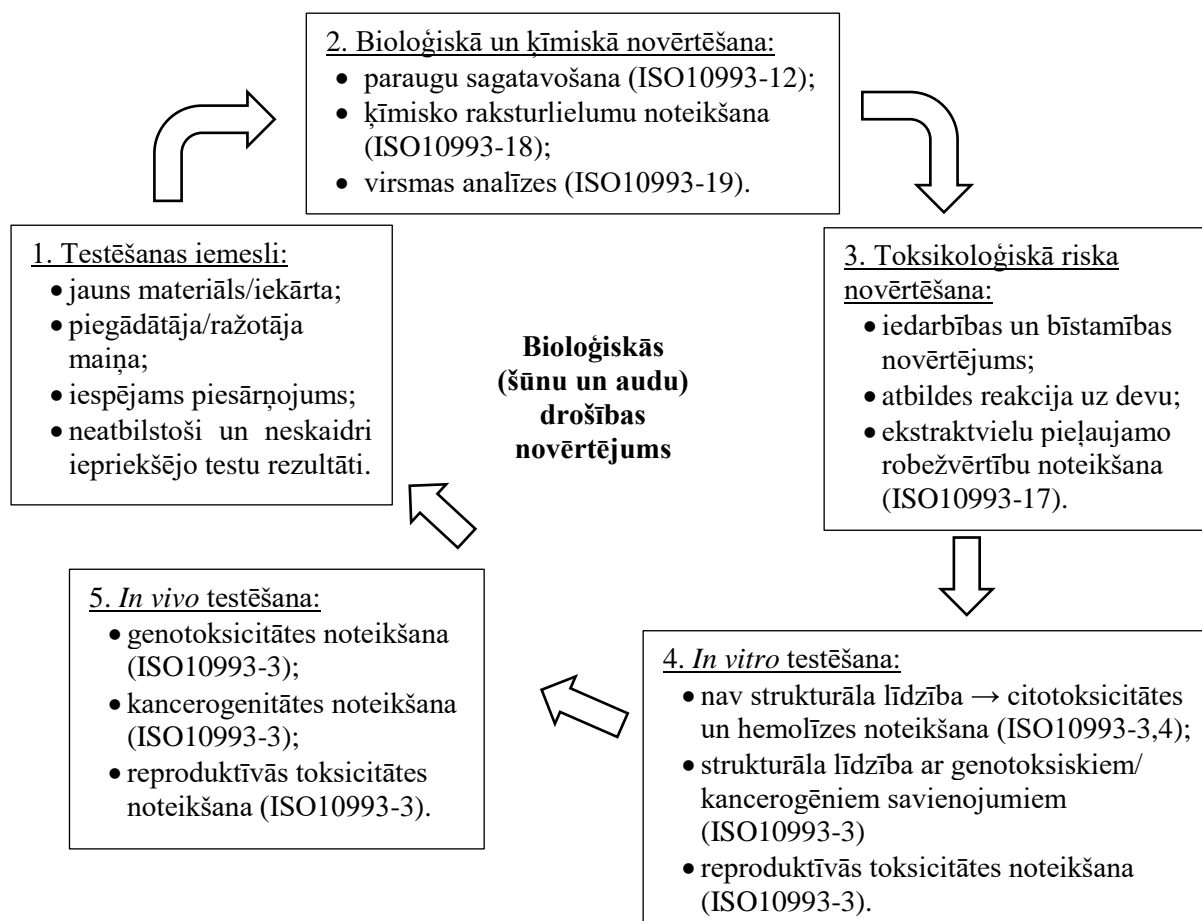


**1.3. att. 25%-CaSrHAp (A1), 25%-CaSrHPerAp (B1), 100%-SrHClAp (C1), 100%-SrPerClAp (D1, E1) un TCP (F1, G1) mikrotestu plate. H1 – barotne; H2, H3 – barotne un *S. aureus*; H4-H12 – barotne un *P. aeruginosa* [45]**

## 1.6. Toksicitātes novērtēšana

Biomateriālu iedalījums pēc bioloģiskā uzdevuma: toksiskie – nelabvēlīgi iedarbojas uz apkārtējiem audiem, bioinertie – nereaģē ar organisma audiem un šūnām, bioaktīvie – uz tiem notiek reakcijas un audu reģenerācija [73]. Metālu un keramikas saturoši biomateriāli organismā var izdalīt jonus un citas vielas, kas izmantotas to apstrādei, un nelabvēlīgi ietekmēt šūnas vai audus.

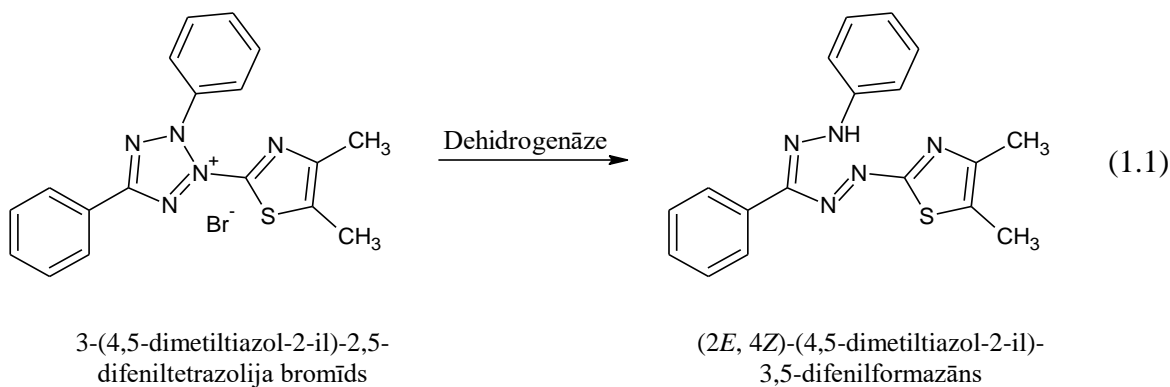
Lai biomateriālus varētu izmantot medicīniskiem nolūkiem, tos nepieciešams pārbaudīt un pēc tam sertificēt, pārliecinoties par to drošību, nekaitīgumu un atbilstību paredzētajam mērķim. Materiālu testēšanas process sastāv no *in vitro* pētījumiem ar šūnu kultūrām, *in vivo* – ar dzīvniekiem un klīniskiem *in vivo* pētījumiem. Bioloģiskās drošības novērtējums ietver: ķīmiskās analīzes, toksikoloģisko izvērtējumu, *in vitro* un *in vivo* testēšanu. Biomateriāliem un medicīnas piederumiem bioloģiskās novērtēšanas vadlīnijas nosaka ISO10993 kopas standarti. 1.4. attēlā izveidota shēma, kurā apkopoti galvenie biomateriālu bioloģiskās drošības testēšanas iemesli, virzieni un biežāk izmantotās metodes [74, 75].



#### 1.4. att. Medicīnisko ierīču un materiālu bioloģiskās drošības novērtēšana [74]

Risku izvērtēšana ir viens no pamatprocesiem, lai noteiktu materiāla toksicitāti. Iespējamo materiāla toksicitāti nosaka, izvērtējot toksikoloģiskos riskus – identificējot bīstamo vielu klātbūtni, novērtējot to iespējamo iedarbību, nosakot organisma atbildes reakcijas atkarību no bīstamā savienojuma devas. Risku izvērtēšana nav tik laikietilpīga un dārga kā *in vitro* un *in vivo* metodes, bet tā sniedz teorētiskus rezultātus [74, 76].

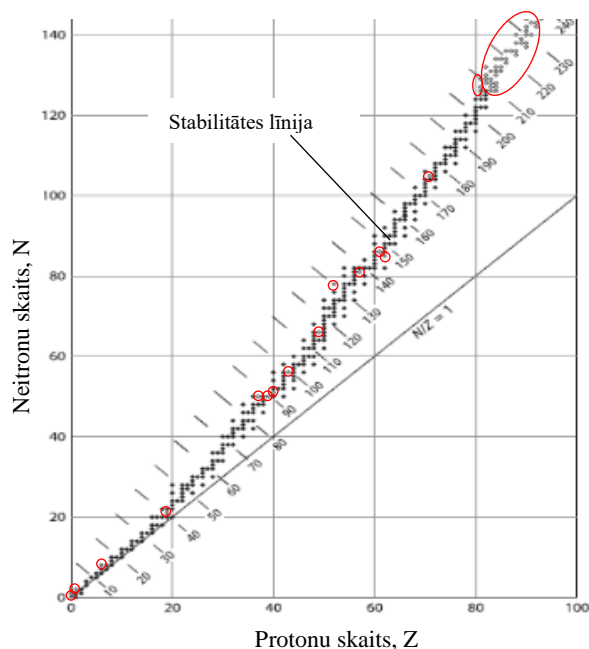
*In vitro* testēšanu veic ārpus dzīvā organisma, izmantojot enzīmus, DNS struktūras, izolētas organisma šūnas vai tās elementus. Izmantojot šūnu kultūru testus, var novērtēt materiāla vai ekstrakta bioloģisko saderību un potenciālo toksicitāti vai kairināmību [74, 77]. Citotoksicitātes, šūnu dzīvotspējas un proliferācijas noteikšanai izmanto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīda (MTT) testu. Tā pamatā ir tetrazolija sāļu reducēšana ar mitohondriju enzīmiem – dehidrogenāzēm, kur metaboliski aktīvās šūnas pārvēršas krāsainā reakcijas produktā, kura absorbciju mēra 400 – 600 nm robežās. Dzeltēnā krāsā esošais MTT tiek reducēts uz formazānu – violetā krāsā (1.1. reakcijas vienādojums) [78].



*In vivo* metodes pēta vielu iedarbību uz veseliem, dzīviem organismiem vai šūnām. Šīs metodes izmanto sistemātiskās toksicitātes (akūtās, subakūtās un subhroniskās) noteikšanai. Biomateriālu *in vivo* testos visbiežāk izmanto peles, žurkas un trušus [57, 76].

### 1.7. Stabīlie izotopi

Izotopi jeb nuklīdi ir viena elementa atomi, kuru kodolos ir vienāds protonu skaits, bet atšķirīgs neitronu skaits. Izotopu stabilitāti nosaka  $\frac{\text{neitronu (N)}}{\text{protonu (Z)}}$  skaita attiecība kodolā. Pieaugot elementu atommasai, palielinās  $\frac{N}{Z}$  skaita attiecība.  $\frac{N}{Z}$  attiecības maksimālā vērtība ir  $\sim 1,5$ , pie kuras izotopi ir stabili. 1.5. attēlā redzams, ka pie maza protonu skaita stabilitātes līnija sakrīt ar taisni, kas raksturo N un Z skaita attiecību kodolā [79, 80].



1.5.att. Stabīlo (aizpildīti melni riņķi) un nestabīlo (tukši riņķi, kas apvilkti ar sarkanu apli) izotopu protonu un neitronu skaits [79]

Vieglie izotopi ir stabili, ja  $\frac{N}{Z}$  skaita attiecība ir 1. Izotopi, kuros protonu skaits ir virs 20, šī attiecība ir lielāka par 1. Kodoli, kuros protonu skaits ir virs 83, neatkarīgi no neitrona skaita ir nestabili. Stabīlie izotopi nesabrūk vai arī to pussabrukšanas periods ir pārāk ilgs, lai to fiksētu. Izotopu attiecības izveidojušās Zemes rašanās laikā un līdz šim laikam tikpat kā nav mainījušās, nelielas izmaiņas veicinājuši bioloģiski, ķīmiski un fizikāli procesi. Skābekļa izotopu sastopamība dabā:  $^{16}\text{O}$  – 99,763%,  $^{17}\text{O}$  – 0,0375%,  $^{18}\text{O}$  – 0,1995% [80, 81].

**Izotopi bioloģiskajā apatītā.** Bioloģiskiem un dabas objektiem izotopu sastāvu veido vides parametri un bioloģiskie procesi. Galvenokārt stabilo izotopu pētījumos izmanto bioloģiskā apatīta materiālus (kaulus, dentīnu un zobu emalju), jo tie ir izturīgākie audi [82]. Kaulus izmanto oglekļa un skābekļa izotopu attiecību ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ) mērījumos, lai pētītu iepriekšējo gadsimtu klimata, uztura, fizioloģijas un migrācijas īpatnības [83]. Kauliem un zobiem raksturīgas noteiktas karbonātu un fosfātu  $\delta^{18}\text{O}$  vērtības, kuru lielumu galvenokārt ietekmē ūdens, mitrums un uzturs. Skābekļa izotopu attiecības vērtības ir saistītas ar vietējo ūdens sastāvu, tā izotopisko profilu. Fosfātiem un karbonātiem piemīt zināma rezistence pret noārdīšanos, tādēļ, lai raksturotu paleoekoloģiju un paleoklimatu, izmanto dzīvnieku fosilās atliekas [84]. Fosilijās, kas saglabājušās vairāk nekā miljons gadu, dominē oglekļa un skābekļa izotopi. Apatītu materiālos analizē arī stroncija izotopu attiecību, jo tas ir viens no pamatelementiem vai aizvietotājiem apatītā.

Līdz šim bioloģisko apatītu materiāli izmantoti dažādos stabilo izotopu pētījumos: dinozauru termoregulācijas,  $\text{C}_4$  tipa augu globālās attīstības, airkāju migrācijas, vaļveidīgo kārtas pārstāvju osmoregulācijas, mastodonu migrācijas un daudzos citos [23, 82].

### 1.8. Vieglo stabilo izotopu attiecību masspektrometrija (IRMS)

Vieglo stabilo izotopu attiecību masspektrometrija (IRMS) ir analīzes metode, ko izmanto, lai noteiktu izotopu relatīvo attiecību, galvenokārt  $^2\text{H}/^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  vai  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ , dažādos cietos un šķīdros paraugos. Skābekļa stabilo izotopu attiecību novirzi aprēķina, izmantojot 1.2. vienādojumu, rezultātu izsaka ‰ vai ppm. Vienādojumā ar R apzīmēta smagā ( $^{18}\text{O}$ ) un vieglā ( $^{16}\text{O}$ ) izotopa attiecība. Starptautiskā Atomenerģijas Aģentūra (IAEA) nosaka stabilo izotopu standartus [81, 85].

$$\delta = \left( \frac{R_{\text{paraugs}}}{R_{\text{standarts}}} - 1 \right) \quad (1.2)$$

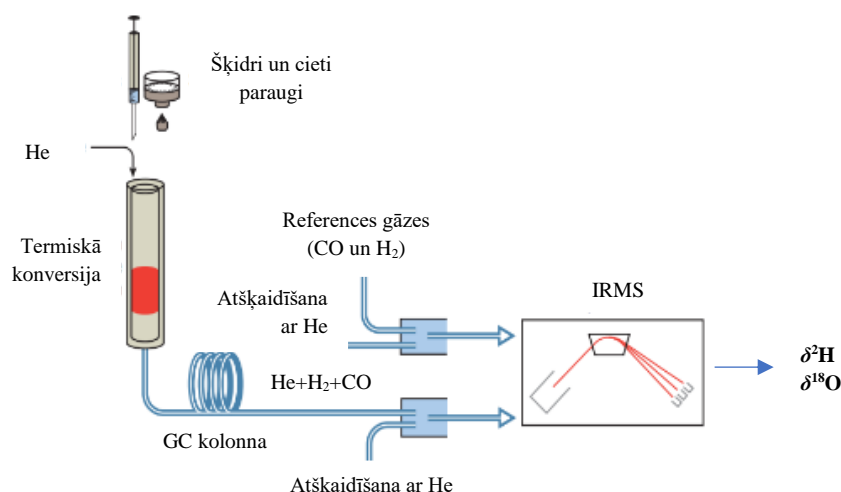
Biežāk izmantotās IRMS iekārtas konfigurācijas gāzu analizēšanai ir nepārtrauktas plūsmas izotopu attiecību masspektrometrija (CF-IRMS) un divkārtas ieplūdes izotopu attiecību masspektrometrija (DI-IRMS) [81, 86, 87].

Analīzēs izmanto divu veidu elementu analizatorus:

- Elementu analīzes izotopu attiecību masspektrometrija (EA-IRMS) – nosaka oglekli un slāpekli. Cietus un negaistošus paraugus sagatavo alvas kapsulās. Paraugus sadedzina O<sub>2</sub> atmosfērā 900 °C – 1050 °C temperatūrā. Kā references gāzes izmanto CO<sub>2</sub> un N<sub>2</sub>.

- Termiskās konversijas elementu analīzes izotopu attiecību masspektrometrija (TC/EA-IRMS) – nosaka ūdeņradi un skābekli, metodē izmanto augsttemperatūras konversijas analizatoru. Cietus un negaistošus paraugus sagatavo sudraba kapsulās. CO un H<sub>2</sub> ir references gāzes [81].

**Termiskās konversijas elementu analīzes izotopu attiecību masspektrometrija.** Augsttemperatūras konversijas metodi izmanto ūdeņraža un skābekļa analīzei, tās darbības princips redzams 1.6. attēlā. Konversijas process notiek 1350 °C – 1450 °C temperatūrā, kurā gan organiskie, gan neorganiskie savienojumi tiek pārvērsti H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> un CO gāzēs. TC/EA-IRMS sistēmas ārpusē ir alumīnija caurule, bet iekšpusē stiklveida oglekļa caurule, kas ir pildīta ar oglekļa daļiņām un sudraba šķiedrām. Iekšējās caurules funkcija ir halogēnu atomu saistīšana. Svarīgi ir atdalīt sistēmā izdalītās gāzes, izmantojot gāzu hromatogrāfijas kolonnu, jo N<sub>2</sub> ir izobārisks ar CO (abiem m/z ir 28) un tas ietekmē H<sub>2</sub> jonizāciju [81, 88].



1.6.att. TC/EA-IRMS principiālā shēma [88]

Interfeiss savieno elementu analizatoru ar masspektrometru, kontrolē jonu avotā ieplūstošo gāzu tilpumu un nepieciešamības gadījumā atšķaida analizējamā parauga gāzi ar nesējgāzi, šajā sistēmā tas ir He. TC/EA-IRMS sistēmā iespējama vienlaicīga δ<sup>2</sup>H un δ<sup>18</sup>O noteikšana, ja paraugā ir pārāk liela O/H attiecība, nepieciešams ar He atšķaidīt radušos CO vai atšķaidīt H<sub>2</sub>, ja O/H attiecība ir maza [81].

Masspektrometrā izmanto elektronu kūli (elektronu jonizāciju), lai jonizētu gāzes molekulas. Iegūtie joni tiek fokusēti un paātrināti, izmantojot augstspriegumu. Pirms detektoru–Faradeja kausu sasniegšanas joni iziet caur magnētisko lauku, to plūsmas trajektoriju nosaka izmantotais spriegums un magnētiskā lauka intensitāte. Izmantojot vairākus Faradeja kausus,

vienlaicīgi iespējams noteikt vairākus elementus. Lai iegūtu savstarpēji salīdzināmus signālus, katrs detektors ir savienots ar signāla pastiprinātāju, kas pastiprina signālu, balstoties uz aptuvenām dabā esošo izotopu attiecību vērtībām [79, 81, 85].

**Kalibrēšana.** IRMS references materiālus var iedalīt 3 grupās:

1. Primārie jeb kalibrēšanas materiāli – no tiem izveidotas  $\delta$  vērtību skalas katram nosakāmajam elementam. VSMOW (*Vienna Standard Mean Ocean Water*) ir starptautiski pieņemts, kā ūdeņraža un skābekļa izotopu attiecību nulles punkti. VSMOW pagatavots, sajaucot destilētu okeāna ūdeni ar citiem ūdens paraugiem, lai iegūtu izotopu attiecību, kas ir tuva vēsturiskajam SMOW standartam.

2. Sekundārie jeb references materiāli – kalibrēti pret primārajiem materiāliem. Biežāk izmantotie references materiāli  $\delta^{18}\text{O}$  mērījumiem apkopoti 1.6. tabulā;

3. Starplaboratoriju un laboratorijas iekšējie salīdzināšanas materiāli – ikdienā izmanto kalibrēšanai un kvalitātes kontrolei. Tos kalibrē pret sekundārajiem materiāliem [79, 81, 87].

1.6. tabula

**Sekundārie references materiāli  $\delta^{18}\text{O}$  mērījumiem**

Apzīmējums	Izcelsmē	$\delta^{18}\text{O}$ , ‰	Standartnovirze, ‰
IAEA-602	benzoscābe	+71,4	0,5
IAEA-601	benzoscābe	+23,3	0,3
USGS-43	indiešu mati	+14,11	0,10*
USGS-42	tibetiešu mati	+8,56	0,10*
GISP	ūdens	-24,76	0,09
LSVEC	litija karbonāts	-26,7**	0,2

\* – apmaiņai nepakļauto daļu sākotnējais izotopu sastāvs;

\*\* – vērtības noteiktas pēc VPDB (*Vienna Peedee Belemnite*) skalas.

**Izmantošana.** IRMS metodei ir plašas izmantošanas iespējas, tādēļ aizvien biežāk tā tiek izmantota dažādās nozarēs:

- arheoloģijā – pētot kaulu atšķirīgo augšanas ātrumu iespējams iegūt informāciju par cilvēces migrāciju, uzturu, sociālajām atšķirībām (turības līmeni, dzimumu, vecumu, veselību);
- ekoloģijā – barības vielu aprites pētījumiem un barības tīklu izveidē izmanto slāpekļa un oglekļa izotopu attiecības, hidroekoloģijā – skābekļa un ūdeņraža izotopu attiecības;
- kriminālistikā – pārbauda vielu un produktu autentiskumu (gleznas, dokumentus, pārtikas produktus, medikamentus, sprāgstvielas), salīdzinot ar produktu oriģināliem, un nosaka to patieso izcelsmi;

- bioloģijā un medicīnā – augu un cilvēku fizioloģijā, vielmaiņas pētījumos, toksikoloģijā;
- vides zinātnē – identificē antropogēnā piesārņojuma avotus (degvielas un naftas produktu noplūdes) [81].

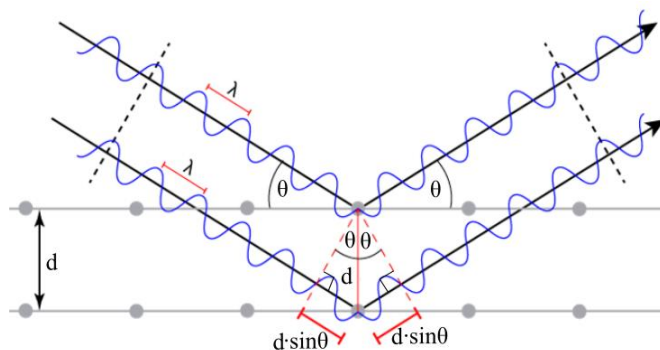
### 1.9. Pulvera rentgendifraktometrija (PXRD)

Rentgenstarojums ir elektromagnētiskais starojums ar viļņu garumu 0,01 – 10 nm, tipiskais viļņu garums, kuru izmanto pulvera rentgendifraktometrijā (PXRD) ir 0,01 – 0,5 nm diapazonā. Rentgendifraktometrijas metode balstās uz analizējamā parauga izkliedētā rentgenstarojuma intensitātes mērījumiem atkarībā no parauga apstarošanas leņķa. PXRD ir precīza, ātra un paraugu nesagraujoša analīzes metode, kuru izmanto kristālisko vielu kvalitatīvā un kvantitatīvā sastāva iegūšanai, identificējot fāžu sastāvu un nosakot kristālu struktūru, kristālrežģa parametrus un ķīmisko sastāvu [89, 90].

PXRD metodes pamatā ir Brega-Vulfa vienādojums (1.3. vienādojums), tas shematiski ilustrēts 1.7. attēlā. Rentgenstarojuma difrakciju novēro, ja izpildās 1.3. vienādojums [91].

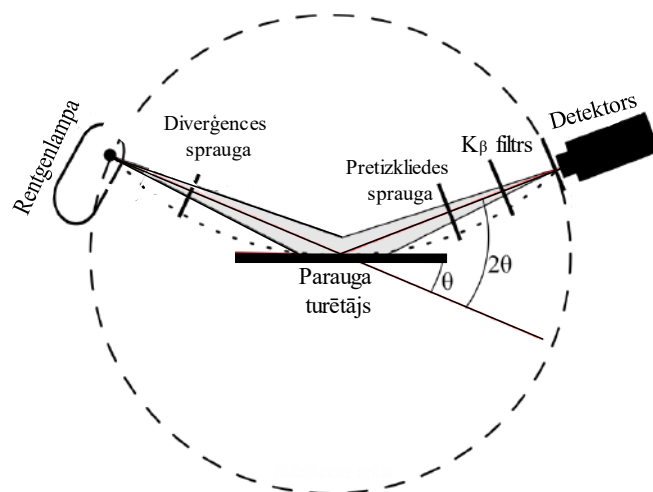
$$n\lambda = 2d \cdot \sin\theta, \quad (1.3)$$

- kur  $n$  – atstarošanas kārtā (parasti  $n=1$ );  
 $\lambda$  – rentgenstarojuma viļņa garums, nm;  
 $d$  – atomu starpplakņu attālums, nm;  
 $\theta$  – puse no difrakcijas leņķa.



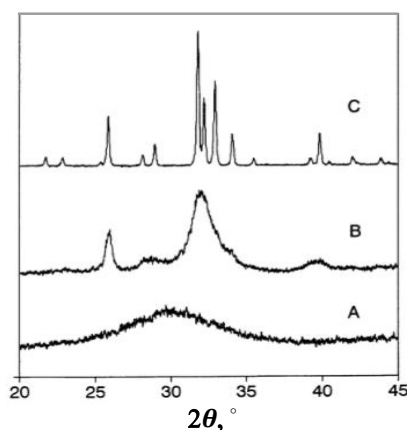
1.7.att. Brega-Vulfa vienādojuma ģeometriskā ilustrācija [89]

1.8. attēlā redzamas rentgendifraktometra galvenās sastāvdaļas: rentgenlampa, diverģences sprauga, parauga turētājs, pretizkliedes sprauga un detektors. Rentgenstarojums veidojas rentgenlampā, tas krīt uz pētāmo paraugu, kas novietots goniometra paraugu turētājā. Rentgenlampa griežas ap horizontālu asi, uz kuras novietots analizējamais paraugs, un pagriežiena leņķis tiek precīzi izmērīts. Ap goniometra asi griežas detektors, no kura impulsi nonāk impulsu pārveidotājā, kas tālāk tiek pārveidoti uz datu apstrādes programmu [90, 91].



1.8.att. Rentgenifraktometra optiskā shēma [92]

**Apatītu raksturošana.** PXRД galvenokārt izmanto, lai analizētu fāžu sastāvu, kristāliskuma pakāpi un noteiktu kristālrežģa parametrus. Apatītiem difrakcijas ainā raksturīgs reflekss ir pie  $2\theta=31,8^\circ$  leņķa. 1.9. attēlā redzamas atšķirīga kristāliskuma CaP difrakcijas ainas. Amorfaī fāzei raksturīgās pazīmes ir fona pacelšanās un refleksu paplašināšanās [2, 93].



1.9.att. Amorfaī kalcija fosfāta (A), vāji kristāliska jeb sīkkristāliska apatīta (B), kristāliska hidroksilapatīta (C) difrakcijas ainas (Cu  $K_{\alpha}$ ,  $\lambda = 0,154$  nm) [93]

Vāji kristāliskiem paraugiem paplašinās difrakcijas refleksi, tas apgrūtina precīzu apatītu fāžu identificēšanu. Sarežģījums rada līdzīgu struktūru atšķiršana, piemēram, oktakalcija fosfāts un oksihidroksilapatīts. 5 – 10 % amorfās fāzes vāji kristāliskos paraugos ar PXRД nav nosakāmas. Iegūto informāciju nepieciešams papildināt ar citām analīzes metodēm, kas ir piemērotākas amorfu savienojumu analīzei, tās ir, infrasarkanā starojuma un Ramana spektroskopija [93].

Apatītu kvantitatīvā un kvalitatīvā sastāva noteikšanai izmanto viļņu disperso rentgenfluorescences spektrometriju (WD-XRF). Metode ir salīdzinoši ātra, precīza un nesagrauj analizējamo paraugu, būtiskākā priekšrocība – multielementu analīzes metode. Tās

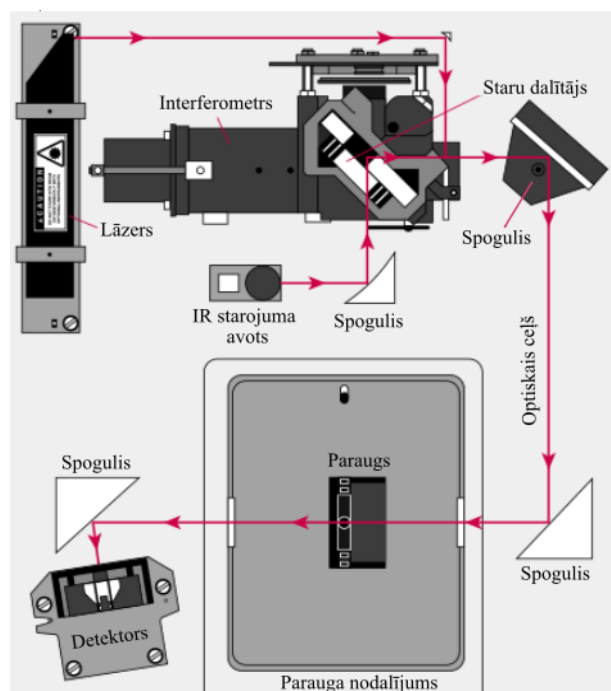
pamatā ir sekundārā rentgenstarojuma veidošanās, kas ir atšķirīgs katram ķīmiskajam elementam – atšķirīgo elektronu pāreju dēļ. Izmantojot primāro rentgenstarojumu, elektronus izsit no atomu iekšējiem enerģijas līmeņiem, radušos tukšumus aizpilda elektroni no augstākiem enerģijas līmeņiem, kuru pāreju rezultātā tiek izstarots sekundārais rentgenstarojums [7, 89].

### 1.10. Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija (FTIR)

Infrasarkanais starojums (IR) ir daļa no elektromagnētiskā starojuma spektra, to iedala trīs apgabalos: tālajā ( $10 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ), vidējā ( $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ) un tuvajā IR apgabalā ( $4000 - 12800 \text{ cm}^{-1}$ ). Molekula var absorbēt tikai tādu IR starojumu, kura ierosinātās svārstības izraisa molekulas dipolmomenta izmaiņas. Ķīmiskajām saitēm absorbējot IR kvantus pie attiecīgajiem viļņa garumiem, IR spektrā novērojamas absorbcijas joslas. Izplatītākās saišu svārstības molekulās ir stiepes (simetriskas un asimetriskas valences svārstības) – rezultātā molekulā mainās saišu garumi starp atomiem, un lieces (vienā plaknē ( $\delta$ ) – šķērveida un šūpuļveida (*scissoring, rocking*), vairākās plaknēs ( $\gamma$ ) – vērpes un vēdekļveida (*twisting, wagging*) deformācijas svārstības) – molekulā mainās saišu leņķi [94].

IR spektroskopiju galvenokārt izmanto ķīmisko savienojumu un funkcionālo grupu identifikācijai. Parasti IR gaismas avota intensitāte ir zema, salīdzinot ar Furjē transformācijas infrasarkanajiem spektrometriem, kuriem interferogramma no gaismas avota tiek uzņemta pilnā spektrā [95]. Biežāk izmanto caurstarošanas (*transmittance*) un kopējās iekšējās atstarošanas (*attenuated total reflectance*) Furjē transformācijas infrasarkanos spektrometrus. Caurstarošanas spektrometra optiskā shēma attēlota 1.10. attēlā. Izmantojot šī veida spektrometrus, paraugu sagatavošana ir nepieciešama – analizējamo paraugu iepresē sārnu metālu halogenīdu tabletē vai suspendē nujolā. Izmantojot otra veida spektrometru – paraugu sagatavošana nav nepieciešama, jo to novieto uz iekšējās atstarošanās prizmas, parasti uz dimanta, retāk – izmanto silīciju vai cinka selenīdu [96].

FTIR spektrometrā (1.10. attēlā) ir iebūvēts He-Ne lāzers, lai varētu kontrolēt attālumus starp spoguļiem interferometrā. Interferometrs sastāv no staru dalītāja un diviem spoguļiem (kustīgā un nekustīgā). Staru dalītājs ienākošo IR starojumu sadala starp abiem spoguļiem. Ar kustīgā spoguļa palīdzību var mainīt starojuma ceļu interferometrā. Pēc atstarošanās no abiem spoguļiem staru dalītājā veidojas interferences aina. Tad pa optisko ceļu IR starojums nonāk parauga nodalījumā un noslēgumā – detektorā, kas reģistrē IR starojuma intensitātes atkarību no laika (interferogrammu raksturojošie parametri) jeb no kustīgā spoguļa pozīcijas, kas ir atkarīga no spoguļa pārvietošanās ātruma [96, 98].



1.10.att. FTIR spektrometra optiskā shēma [97]

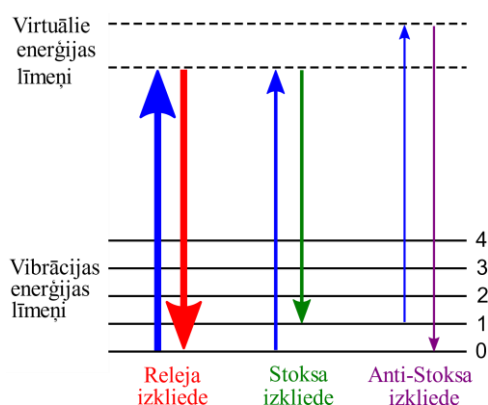
Vidējā IR apgabala starojuma avoti ir silīcija karbīda (*Globar*) vai Nernsta stieņi, tālā IR apgabalā – augstspiediena dzīvsudraba lampas, tuvā IR apgabalā – volframa lampas. Šajā IR apgabalā izmanto divu veidu detektorus: deiterēta triglicīna sulfāta (DTGS) un dzīvsudraba kadmija telurīda (MCT) detektorus. MCT detektoriem ir augstāka jutība, taču tiem nepieciešama dzesēšana ar šķidro slāpekli, salīdzinot ar DTGS detektoriem, kuriem raksturīgas zemākas iegādes un ekspluatācijas izmaksas [99, 100].

**Apatītu raksturošana.** Parasti CaP raksturošanai izmanto caurstarošanas FTIR spektrometru, paraugu iepresē KBr tabletēs (uzņemot spektru IR reģionā, kas ir virs  $360\text{ cm}^{-1}$ ), retāk citu sārmu metālu halogenīdu (NaCl, CsI u.c.) tabletēs. Sārmu metālu halogenīdi ir higroskopiski, tie labi absorbē mitrumu, tādēļ IR spektros vērojams paaugstināts fons  $1600 - 1700\text{ cm}^{-1}$  un  $3000 - 3900\text{ cm}^{-1}$ . Ūdeni, kas adsorbējies parauga sagatavošanas laikā, kā arī fonu IR spektrā var samazināt, parauga sagatavošanu ar KBr veicot slāpekļa vai argona atmosfērā. Ierobežojumi KBr izmantošanai: tā tīrība ( $\text{NO}_3^-$  piemaisījums spektrā parādās kā šaura josla  $1383 - 1384\text{ cm}^{-1}$ ) un cietvielu reakcijas (apmaiņas reakcijas starp KBr un  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , ūdenī šķīstošiem hlorīdiem un nitrātiem) [101].

FTIR spektros raksturīgākās HAp grupas ir  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , kā arī  $\text{HPO}_4^{2-}$ , kas raksturo nestehiometrisku HAp [102]. Metodi izmanto, lai noteiktu hidroksiljonu daudzumu apatītos, izsakot attiecību:  $\text{OH}^-$  ( $632\text{ cm}^{-1}$ ) absorbcijas joslas laukums pret  $\nu_4\text{ PO}_4^{3-}$  ( $565 - 600\text{ cm}^{-1}$ ) laukumu, pēc tam šo attiecību pielīdzina kalibrēšanas grafikam un iegūst hidroksiljonu daudzumu [103]. Metodes priekšrocības: salīdzinoši vienkārša, ātra un nepieciešams mazs parauga daudzums.

## 1.11. Ramana spektroskopija

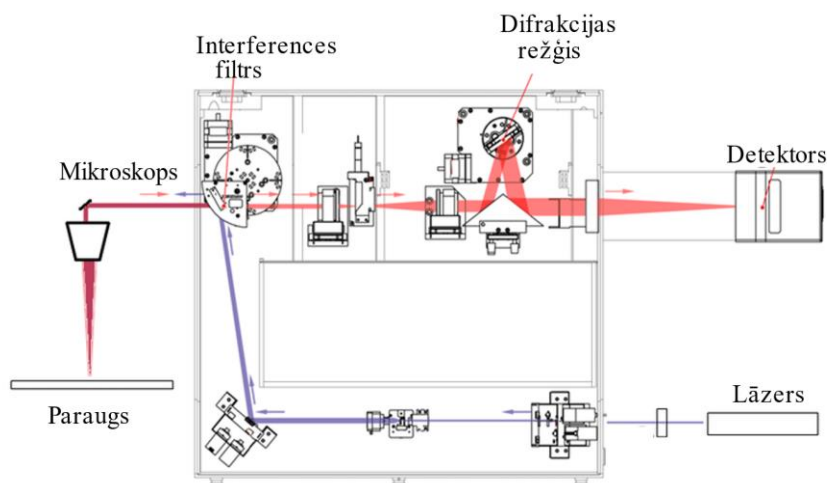
Ramana spektroskopijas metode balstās uz monohromatiskas gaismas neelastīgu izkliedi, tas ir, mijiedarbojoties ar paraugu, mainās fotonu frekvence. Paraugs absorbē fotonus, ko izstaro lāzers, un pēc tam tos izkļiedē. Salīdzinot ar sākotnējo monohromatisko fotonu frekvenci, izkļiedētajiem fotoniem frekvence nobīdās uz leju (Stoksa nobīde) vai uz augšu (anti-Stoksa nobīde), tā rezultātā, veidojas Ramana efekts. Parasti Stoksa izkļiede ir intensīvāka nekā anti-Stoksa (1.11. att.), jo lielāka varbūtība, ka fotons enerģiju atdod nekā saņem no analizējamā parauga. Paaugstinot temperatūru, palielinās anti-Stoksa izkļiedes intensitāte. Ramana efekts ir salīdzinoši vājš, to veido tikai 1 no katriem  $10^6 - 10^8$  fotonu, kas izkļiedējas. Tā nobīdes izmanto, lai raksturotu vibrācijas, rotācijas un citas zemfrekvenču pārejas molekulās, analizējot cietus, šķidrus vai gāzveida paraugus. Ramana efekts balstās uz molekulārām vibrācijām, kas izraisa molekulas polarizējamības maiņu [104, 105].



1.11.att. Releja, Stoksa un anti-Stoksa izkļiežu enerģijas līmeņu diagramma [106]

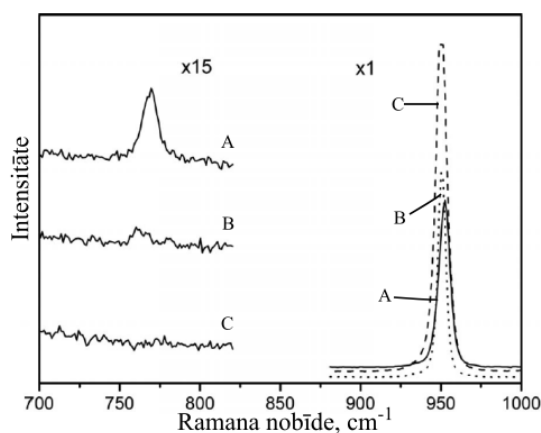
Releja izkļiede – dominējošais gaismas izkļiedes process (>99,9%). Tā ir elastīga izkļiede, kurā ierosināta molekula atgriežas sākotnējā vibrācijas enerģijas līmenī (1.11. att.) un izstaro gaismu ar tādu pašu frekvenci kā svārstību ierosinātājam [105].

Parasti monohromatiskas gaismas avots ir lāzers ar noteiktu viļņa garumu ultravioletajā, redzamajā vai tuvā infrasarkanajā diapazonā. Visbiežāk izmantotie viļņu garumi lāzeros: 532 nm, 638 nm, 785 nm un 1064 nm. No parauga izkļiedētos fotonus savāc izmantojot lēcu sistēmu, un tad staru kūli laiž caur filtru vai spektrometru, lai nofiltrētu lāzera viļņa garumu. Tālāk caur difrakcijas režģi – līdz tas sasniedz detektoru [104, 107, 108].



1.12.att. Renishaw inVia Ramana spektrometra optiskā shēma ar konfokālo mikroskopu [107]

**Apatītu raksturošana.** Ramana spektrā joslas pie  $750 - 850 \text{ cm}^{-1}$  atbilst peroksīdjonu simetriskām vibrācijām [5, 17, 43]. Tām ir vairākas reizes mazāka intensitāte nekā  $\text{PO}_4^{3-}$  joniem. SrHAp paraugiem spektrā pie  $950 \text{ cm}^{-1}$  raksturīgas simetriskas stiepes vibrācijas  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\nu_1$ ), SrHPerAp paraugiem – pie  $952 \text{ cm}^{-1}$ , CaHAp – pie  $961 \text{ cm}^{-1}$ , CaHPerAp – pie  $964 \text{ cm}^{-1}$  (1.13. att.) [5]. Iekļaujot HAp struktūrā  $\text{O}_2^{2-}$  jonus,  $\text{OH}^-$  joslas ( $3570 \text{ cm}^{-1}$ ) intensitāte samazinās [43].



1.13.att. Ramana spektrs  $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{O}_2)_x(\text{OH})_{2-2x}$ , (A)  $x=0,68$ , (B)  $x=0,14$ , (C)  $x=0$  [5]

## 2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

### 2.1. Izmantotie reaģenti, aparatūra un trauki

#### Reaģenti:

- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (CAS: 13477-34-4), tīrs, ražotājs *Chempur*. GHS05, GHS07;
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (CAS: 7783-28-0), ķīmiski tīrs, ražotājs *Ing. Petr Svec – PENTA*. GHS07;
- 25%  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (CAS: 1336-21-6), tīrs, ražotājs *Chempur*. GHS05, GHS07, GHS09;
- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (CAS: 506-87-6), analītiski tīrs, ražotājs *Ing. Petr Svec – PENTA*. GHS07;
- $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  (CAS: 10042-76-9), ķīmiski tīrs, ražotājs *Sigma-Aldrich*. GHS03, GHS05, GHS07;
- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  (CAS: 64-17-5), pārfašēts. GHS02, GHS07;
- 50%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (CAS: 7722-84-1), analītiski tīrs, izplatītājs *Honeywell Fluka*. GHS03, GHS05, GHS07;
- $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (CAS: 6153-56-6), analītiski tīrs, izplatītājs *STANLAB*. GHS05, GHS07;
- 98%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , (CAS: 7664-93-9), analītiski tīrs, ražotājs *Sigma-Aldrich*. GHS05;
- $\text{KMnO}_4$  (CAS: 7722-64-7), ķīmiski tīrs, ražotājs *Peaxum*. GHS03, GHS05, GHS07, GHS09;
- 70%  $\text{HClO}_4$  (CAS: 7601-90-3), analītiski tīrs, ražotājs *Sigma-Aldrich*. GHS03, GHS05, GHS07, GHS08;
- dejonizēts  $\text{H}_2\text{O}$ , īpatnējā elektrovadītspēja  $0,055 \frac{\mu\text{S}}{\text{cm}}$ , B30 (*Adrona Crystal*, sērijas nr. 4610);
- IAEA-601 (benzoscābe),  $\delta^{18}\text{O} +23,3 \text{ ‰}$ ,  $S_n = 0,3 \text{ ‰}$ ;
- IAEA-602 (benzoscābe),  $\delta^{18}\text{O} +71,4 \text{ ‰}$ ,  $S_n = 0,5 \text{ ‰}$ ;
- Saharoze (CAS: 57-50-1),  $\geq 99,0 \text{ ‰}$ , ražotājs *Sigma-Aldrich*;
- $\text{KBr}$  (CAS: 7758-02-3),  $\geq 99 \text{ ‰}$ , ražotājs *EMD Millipore*, GHS07.

\*1. pielikumā atšifrētas GHS piktogrammas izmantotajiem reaģentiem

#### Aparatūra:

- laboratorijas svāri *KERN 440 – 33*, sērijas nr. WC0285080. Specifikācija: maksimālā masa 200 g, precizitāte  $\pm 0,01 \text{ g}$ ;
- analītiskie svāri *KERN ABS*, sērijas nr. WB0810231. Specifikācija: maksimālā masa 220 g, precizitāte  $\pm 0,0001 \text{ g}$ ;
- analītiskie svāri *BOECO BC 100*, sērijas nr. D95-09-011. Specifikācija: maksimālā masa 60/210 g, precizitāte  $\pm 0,01/0,1 \text{ mg}$ ;
- žāvēšanas skapis *SNOL 24/200*. Specifikācija: maksimālā temperatūra  $220 \text{ °C}$ ;

- elektriskās plītiņas ar magnētisko maisītāju *Thermo SCIENTIFIC SP131010-33*. Specifikācija: maksimālā temperatūra 540 °C, maksimālais maisīšanas ātrums 1200  $\frac{\text{apgr.}}{\text{min}}$ ;
- infrasarkanais termometrs *Voltcraft IR-1001A*, inv. nr. 05101178. Specifikācija: temperatūras diapazons no -50,0 °C līdz 1000 °C, precizitāte  $\pm 2$  °C izmantotajā temperatūras diapazonā (no -20,0 °C līdz 200 °C);
- nepārtrauktas plūsmas izotopu attiecību masspektrometrs *nuHorizon (Nu Instruments)*. Specifikācija: augsttemperatūras konversijas elementu analizators *HT-PyrOH Unit (EuroVector)*;
- viļņu dispersijas rentgenfluorescences spektrometrs *S8 TIGER (Bruker)*. Datu apstrādes programma Eval 2. Specifikācija: maksimālā jauda 4kW, rentgenlampas anoda materiāls – rodijs, 0,2  $\mu\text{m}$  biezs Cu filtrs primārā rentgenstarojuma atdalīšanai;
- rentgendifraktometrs *D8 ADVANCE (Bruker)*. Vadības programma DIFFRAC Plus XRD Commander, datu apstrādes programma Diffrac.EVA 4.1.1, datubāze PDF-2/Release 2013 RDB;
- Furjē transformācijas infrasarkanais spektrometrs *ALPHA (Bruker)*;
- Ramana spektrometrs *inVia Raman (Renishaw)* aprīkots ar mikroskopu. Datu apstrādes programma GRAMS/A1 8.0.

*Trauki un citi piederumi:*

- hidrotermiskie spiediena trauki. Specifikācija: nerūsējošā tērauda korpuss, 170 °C maksimālā karsēšanas temperatūra, 4,4 cm diametrs;
- mikropipete *Finnpipette*. Specifikācija: 100 – 1000  $\mu\text{L}$ , precizitāte  $\pm (1,0 - 0,6) \%$ ;
- mikropipete *Finnpipette*. Specifikācija: 500 – 5000  $\mu\text{L}$ , precizitāte  $\pm (2 - 0,5) \%$ ;
- 10 mL A klases birete,  $\pm 0,03$  mL;
- 100 mL A klases mērkolbas,  $\pm 0,10$  mL;
- 25 mL A klases mērpipete,  $\pm 0,10$  mL;
- 100 mL A klases mērcilindrs,  $\pm 0,5$  mL;
- 1 L Bunzena kolbas un porcelāna Bihnera piltuves (10,0 cm diametrs);
- sterilas 96-lauciņu mikroplates, *Sarstedt*;
- sudraba kapsulas (3,5 mm · 5 mm), *EuroVector*;
- 5  $\mu\text{m}$  polipropilēna plēve.

## 2.2. Šķīdumu pagatavošana

- 0,7 M amonjaka šķīdums: 1 L vārglāzē ielēja 900 mL dejonizēta ūdens, pievienoja 52 mL konc. amonjaka ūdens šķīduma un uzpildīja vārglāzi līdz 1 L atzīmei ar dejonizētu ūdeni;
- 0,01 M  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  šķīdums: 100,00 mL mērkolbā ielēja  $\frac{2}{3}$  dejonizēta ūdens, pievienoja 0,1261 g skābeņskābes dihidrāta, izšķīdināja to un uzpildīja kolbu līdz atzīmei ar dejonizētu ūdeni;
- 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  šķīdums: 250 mL vārglāzē ielēja 150 mL dejonizēta ūdens, pievienoja 21,5 mL konc. sērskābes, kad šķīdums atdzisa, uzpildīja vārglāzi līdz 200 mL atzīmei ar dejonizētu ūdeni;
- 0,001 M  $\text{KMnO}_4$  šķīdums: 1 L vārglāzē pārnesa 0,11 g kristāliska kālija permanganāta, izšķīdināja to 700 mL dejonizēta ūdens;
- 8,3 M  $\text{HClO}_4$  šķīdums: 150 mL vārglāzē ielēja 25 mL dejonizēta ūdens, pievienoja 71,5 mL konc.  $\text{HClO}_4$  un uzpildīja vārglāzi līdz 100 mL atzīmei ar dejonizētu ūdeni.

## 2.3. Hidroksilapatītu (HAp) sintēzes

Izmantojot nogulsnešanas metodi, sintezēja kalcija hidroksilapatītu (CaHAp), ar 25% stronciju aizvietotu hidroksilapatītu (25%-CaSrHAp) un ar 75% stronciju aizvietotu hidroksilapatītu (75%-SrCaHAp).

Atsevišķi pagatavoja divus šķīdumus (Nr.1 un Nr.2). Lai pagatavotu šķīdumu Nr.1, izšķīdināja  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  un  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  500 mL dejonizēta ūdens un pievienoja 25% amonjaka ūdens šķīdumu. Lai pagatavotu šķīdumu Nr.2, izšķīdināja  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  un  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  250 mL dejonizēta ūdens. Reaģentu daudzumi apkopoti 2.1. tabulā [109].

2.1. tabula

Reaģentu daudzumi CaHAp, 25%-CaSrHAp un 75%-SrCaHAp sintēzēm

Šķīdums	Reaģenti	CaHAp	25%-CaSrHAp	75%-SrCaHAp
Nr.1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,150 mol	0,112 mol	0,038 mol
	$\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$	–	0,038 mol	0,112 mol
	25% $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,405 mol	0,405 mol	0,405 mol
Nr.2	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,055 mol	0,055 mol	0,055 mol
	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	0,010 mol	0,010 mol	0,010 mol

Pie šķīduma Nr.1 pievienoja šķīdumu Nr.2. un maisīja 10 minūtes. Filtrēja, iegūtās nogulsnes mazgāja ar 0,7 M amonjaka šķīdumu, skaloja ar 500 mL etanola un žāvēja 2 stundas 120 °C (CaHAp) un 40 minūtes 100 °C temperatūrā (25%-CaSrHAp, 75%-SrCaHAp). Izzāvētos HAp sasmalcināja piestā un tālāk izmantoja hidroksil-peroksiapatītu iegūšanai.

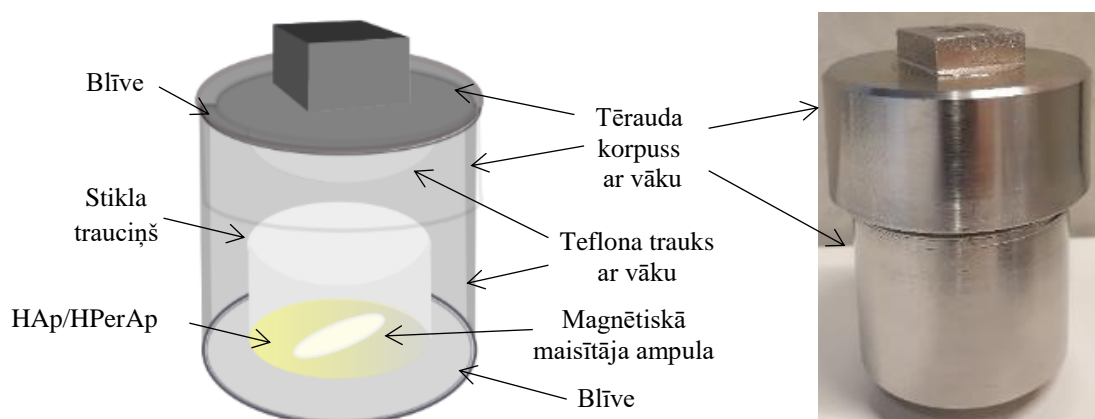
## 2.4. Paraugu analīze ar WD-XRF metodi

CaHAp, 25%-CaSrHAp un 75%-SrCaHAp noteica kvantitatīvo elementu sastāvu, izmantojot WD-XRF. Parauga turētājā ( $\varnothing = 32$  mm) iestiprināja polipropilēna plēvi, to vienmērīgā slānī pārklāja ar analizējamo paraugu. Parauga turētāju ievietoja spektrometrā.

Rentgenfluorescences spektrometra darbības režīms: atmosfēras spiediens, He atmosfēra, noteikšanas režīms – *Full scan*.

## 2.5. Hidroksil-peroksiapatītu (HPerAp) hidrotermiskā apstrāde

Hidrotermiskā spiediena trauka sistēmas stikla trauciņā ar precizitāti  $\pm 0,0001$  g iesvēra  $\sim 0,065$  g CaHAp un ielika magnētiskā maisītāja ampulu. Stikla trauciņu ievietoja teflona traukā, kurā uzmanīgi ielēja 4 mL 50%  $H_2O_2$  šķīduma, un uzlika vāku. Teflona trauku ievietoja nerūsējošā tērauda korpusā un to aizvēra, uzlietot blīvi un uzskrūvējot vāku (2.1.att.).



### 2.1. att. Hidrotermiskā spiediena trauka uzbūve

Paralēli sagatavoja četrus hidrotermiskos traukus ar CaHAp paraugiem, tos karsēja 6 stundas  $100$  °C temperatūrā, nodrošinot vienmērīgu maisīšanu. Lai uzturētu nemainīgu hidrotermiskās apstrādes temperatūru, nerūsējošā tērauda korpusus pārklāja ar foliju un, ievērojot darba drošības noteikumus, tos pārsedza ar stikla šķiedras audumiem. Hidrotermiskās apstrādes temperatūru pārbaudīja ar infrasarkano termometru, mērot sildvirsmu un hidrotermisko spiediena trauku temperatūras. Pēc apstrādes traukus atdzesēja līdz telpas temperatūrai un tad atvēra [45, 109]. Procesu atkārtoja vairākkārt, mainot apstrādes temperatūru un izejvielas. 2.2. tabulā apkopots iegūto paraugu daudzums hidrotermiskās apstrādes procesā.

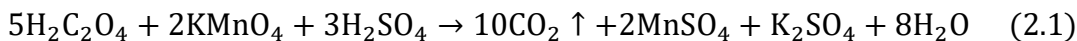
Ar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> šķīdumu hidrotermiski apstrādātie HPerAp paraugi

Hidrotermiskās apstrādes temperatūra, °C	Apstrādāto paraugu skaits		
	CaHPerAp	25%-CaSrHPerAp	75%-SrCaHPerAp
100	8	12	8
110	4	4	4
120	4	4	4
130	4	4	4
140	4	4	4
150	8	8	8

## 2.6. Permanganometriskā H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> noteikšana HPerAp paraugos

Kvantitatīvi noteica ūdeņraža peroksīda saturu hidrotermiski apstrādātajos paraugos, izmantojot permanganometrisko titrēšanu. Veica pārrēķinu no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uz O<sub>2</sub><sup>2-</sup> jonu saturu apstrādātajos paraugos, jo hidrotermiskās apstrādes procesa rezultātā apatītu struktūrā OH<sup>-</sup> joni daļēji tiek aizvietoti ar O<sub>2</sub><sup>2-</sup> nevis H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekulām.

Skābeņskābes šķīdumu izmantoja titranta standartizēšanai (2.1. reakcijas vienādojums). Izmantojot 2.2. vienādojumu, aprēķināja KMnO<sub>4</sub> šķīduma koncentrāciju.



$$c_{\text{KMnO}_4} = \frac{2}{5} \cdot \frac{c_{\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4} \cdot V_{\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4}}{V_{\text{KMnO}_4}} = \frac{2}{5} \cdot \frac{\left( \frac{m_{\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}}{M_{\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} \cdot V_{\text{kolba}} \right) \cdot V_{\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4}}{V_{\text{KMnO}_4}} \quad (2.2)$$

kur  $c_{\text{KMnO}_4}$  – titranta molārā koncentrācija,  $\frac{\text{mol}}{\text{L}}$ ;

$c_{\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4}$  – skābeņskābes standartšķīduma koncentrācija,  $\frac{\text{mol}}{\text{L}}$ ;

$V_{\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4}$  – skābeņskābes standartšķīduma alikvotās daļas tilpums, L;

$V_{\text{KMnO}_4}$  – titrēšanai izlietotais titranta tilpums, L;

$m_{\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}$  – skābeņskābes dihidrāta iesvara masa, g;

$M_{\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}$  – skābeņskābes dihidrāta molmasa,  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ;

$V_{\text{kolba}}$  – skābeņskābes standartšķīduma tilpums, L;

Pēc hidrotermiskās apstrādes analizēja HPerAp paraugus. Nosvēra ~0,01 g HPerAp ar precizitāti ± 0,0001 g, iesvaru izšķīdināja nelielā tilpumā 8,3M HClO<sub>4</sub> (CaHPerAp izšķīdināja 600 μL, 25%-CaSrHPerAp – 800 μL, 75%-SrCaHPerAp – 1600 μL) un pievienoja 30 mL

dejonizēta ūdens. Titrēja ar nostandartizēto  $\text{KMnO}_4$  šķīdumu līdz viegli sārtai krāsai, kas neatkrāsojās [35, 45, 109]. Izmantojot 2.3. vienādojumu, aprēķināja  $\text{O}_2^{2-}$  jonu masas daļu HPerAp paraugos.

$$\omega_{\text{O}_2^{2-}} = \frac{5}{2} \cdot \frac{c_{\text{KMnO}_4} \cdot V_{\text{KMnO}_4} \cdot M_{\text{O}_2^{2-}}}{m_{\text{paraugam}}} \cdot 100\% \quad (2.3)$$

kur  $\omega_{\text{O}_2^{2-}}$  – peroksīdjonu masas daļa, %;

$M_{\text{O}_2^{2-}}$  – peroksīdjonu molmasa,  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ;

$m_{\text{paraugam}}$  – parauga iesvara masa, g.

## 2.7. Antibakteriālo īpašību noteikšana

Mikrobioloģisko testēšanu veica CaHAp, CaHPerAp (100°C un 150 °C), 25%-CaSrHAp, 25%-CaSrHPerAp (100°C un 150 °C), 75%-SrCaHAp un 75%-SrCaHPerAp (100°C un 150 °C) paraugiem. Lai noteiktu apatītu antibakteriālās īpašības, izmantoja *Pseudomonas aeruginosa* MSCL 331 un *Staphylococcus aureus* MSCL 334 baktērijas. MIC un MBC kvantitatīvai noteikšanai izmantoja sērijveida divkārsa atšķaidījuma metodi. Baktērijas audzēja uz agara platēm (*Sanofi Diagnostics Pasteur, France*) 37 °C temperatūrā. Tās suspendēja sterilā ūdenī, lai iegūtu  $10^6$  kvv. Sintezētos paraugus iesvēra mikroplašu pirmajā kolonnā (A1 – G1) ar precizitāti  $\pm 0,0001$  g, to iesvaru masa bija 0,04 g – 0,07 g intervālā.

96-lauciņu mikroplates pirmajā kolonnā (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1) iemērīja 200  $\mu\text{L}$  barotnes (*Müller-Hinton BD*), bet atlikušajos lauciņos – 100  $\mu\text{L}$  barotnes. Pēc tam katrā sērijā jeb mikroplates rindā (A – G) veica atšķaidīšanu, katrā nākamajā lauciņā samazinot koncentrāciju divas reizes. Visās iedobēs pievienoja baktēriju suspensiju (*P. aeruginosa* vai *S. aureus*), izņemot H1 iedobi – to izmantoja kā mikroplates sterilitātes kontroles lauciņu. H sērijas iedobes (H2 – H12) izmantoja kā baktēriju augšanas kontroles lauciņus.

Mikroplates ar *P. aeruginosa* inkubēja termostatā 24 stundas 37 °C temperatūrā, mikroplates ar *S. aureus* – 48 stundas 37 °C. 50  $\mu\text{L}$  suspensijas no visiem mikroplašu trauciņiem izsēja Petri platēs uz agara un tās inkubēja termostatā 24 – 48 stundas 37 °C temperatūrā. Skaitot koloniju veidojošās vienības, novērtēja rezultātus. Kvv skaits, kas ir tūkstoš reižu mazāks nekā sākumā (suspendējot baktērijas sterilā ūdenī), definēja kā MBC. MIC definēja kā zemāko vielas koncentrāciju, kas inhibēja baktēriju augšanu par 80% [45, 109].

## 2.8. Paraugu analīze ar TC/EA-IRMS metodi

Pirms analīžu veikšanas uz analītiskajiem svāriem (ar precizitāti  $\pm 0,01$  mg) atsevišķās sudraba kapsulās iesvēra  $\sim 0,5$  mg IAEA-601 un IAEA-602 standartvielas. Kapsulas aizlocīja un izveidoja lodīti, vairākkārt to salocot. Katrai standartvielai iesvēra 5 paralēlos paraugus. Tāpat sagatavoja 4 kapsulas ar laboratorijas standartvielu – saharozi. Kapsulās iesvēra 0,8 mg – 1,0 mg CaHAp, 25%-CaSrHAp, 75%-SrCaHAp, CaHPerAp (100 °C, 150 °C), 25%-CaSrHPerAp (100 °C, 150 °C) un 75%-SrCaHPerAp (100 °C, 150 °C) paraugus, kā arī sintēzes izejvielas –  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  un  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ . Katram analizējamam paraugam sagatavoja 2 paralēlos paraugus, tos visus ievietoja autosamplerā.

TC/EA-IRMS iekārtas darbības režīms, nosakot  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  izotopu attiecību: 1450 °C kolonnas temperatūra,  $105 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$  nesējgāzes plūsmas ātrums, nesējgāze – He (tīrība 99,996%, izplatītājs AGA), references gāze – CO (tīrība 99,997%, izplatītājs AGA).

Pirms instrumentālās analīzes noteica masspektrometra iekšējo stabilitāti un linearitāti. References gāzi kalibrēja ar IAEA-601 un IAEA-602 standartvielām. Pēc katriem 10 paraugiem izanalizēja laboratorijas standartu, lai novērtētu iekārtas linearitāti un stabilitāti [109].

Izmantojot 2.4. vienādojumu, izmērītajām  $\delta^{18}\text{O}$  vērtībām aprēķināja standartnovirzes.

$$S_n = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad (2.4)$$

## 2.9. Paraugu analīze ar PXRD metodi

Analizējamos paraugus saberza pietā un iepresēja stikla kivetēs, izmantojot Petri trauciņu. Atsevišķi katru kivetu ievietoja rentgendifraktometra parauga turētājā, iestatīja analīzes parametrus un uzņēma rentgendifraktogrammas.

Rentgendifraktometra darbības režīms: starojuma avots – Cu  $K_\alpha$ ,  $\lambda = 1,54180$  Å, pozīcijas jutīgais detektors *LynxEye*,  $K_\beta$  filtrs – 0,020 mm bieza niķeļa folija, 0,6 mm diverģences sprauga, 8,0 mm pretizkliedes sprauga, 40 kV anodspriegums, 40 mA anodstrāva,  $5^\circ - 60^\circ$  uzņemšanas diapazons,  $0,02^\circ$  mērījuma solis, 0,2 s soļa ilgums.

## 2.10. Paraugu analīze ar FTIR metodi

Uz analītiskajiem svāriem (ar precizitāti  $\pm 0,0001$  g) atsevišķi iesvēra  $\sim 0,003$  g analizējamās vielas (25%-CaSrHAp, 25%-CaSrHPerAp (100°C un 150 °C) , 75%-SrCaHAp, 75%-SrCaHPerAp(100°C un 150 °C)) un saberza pietā ar  $\sim 0,300$  g KBr, kuras pirms analīzes izžāvēja 120 °C temperatūrā un atdzesēja eksikatorā. Izmantojot tablešu spiedi, saberzto pulveri sapresēja tabletēs, kuras izmantoja FTIR spektru uzņemšanai.

FTIR spektrometra specifikācija un darbības režīms: DLaTGS (*deuterated L-alanine doped triglycine sulphate*) detektors ar KBr logu, caurstarošanas režīms,  $400\text{ cm}^{-1}$  –  $1800\text{ cm}^{-1}$  uzņemšanas diapazons, katram spektram uzņemtas 100 interferogrammas,  $2\text{ cm}^{-1}$  spektrālā izšķiršana.

### **2.11. Paraugu analīze ar Ramana spektroskopijas metodi**

Ramana joslu pozīcijas uz abscisas ass (viļņa skaitli) kalibrēja ar polistirola standarta spektru. Analizējamiem paraugiem (25%-CaSrHAp, 25%-CaSrHPerAp ( $100^{\circ}\text{C}$  un  $150^{\circ}\text{C}$ ), 75%-SrCaHAp, 75%-SrCaHPerAp ( $100^{\circ}\text{C}$  un  $150^{\circ}\text{C}$ )) nebija nepieciešama atsevišķa to sagatavošana. Ramana spektrometra specifikācija un darbības režīms: lādiņsaites matricas (*CCD – charge coupled device*) detektors, cietvielu (*DPSS – Diode-Pumped Solide-State*) lāzers, 532 nm viļņa garums, 3 mW jauda,  $400\text{ cm}^{-1}$  –  $3600\text{ cm}^{-1}$  uzņemšanas diapazons, 400 s spektra uzņemšanas ilgums, 20x objektīva palielinājums, 0,40 skaitliskā apertūra (*NA – Numerical Aperture*). Programmā *GRAMS/AI* noteica joslu parametrus, izmantojot Gausa – Lorenca sadalījuma funkciju.

Iepriekš iegūtie Ramana spektri Rīgas Tehniskajā universitātē un Latvijas Universitātes Cietvielu fizikas institūtā nesniedza gaidīto informāciju, tādēļ maģistra darba ietvaros paraugu analīzi veica sadarbojoties ar Viļņas Universitāti.

### 3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

#### 3.1. Sintezēto apatītu raksturojums

Izmantojot nogulsnešanas metodi, sintezēja hidroksilapatītus: CaHAp, 25%-CaSrHAp un 75%-SrCaHAp. Visiem iegūtajiem HAp raksturīga balta krāsa, tos izmantoja kā izejvielas hidroksil-peroksiapatītu iegūšanai. Iegūtajiem CaHPerAp raksturīgais krāsojums ir no baltas līdz gaiši pelēkai krāsai, 25%-CaSrHPerAp – gaiši dzeltena krāsa, 75%-SrCaHPerAp – no gaiši pelēkas līdz iedzeltenai krāsai. Salīdzinot viena apatīta materiāla krāsu intensitātes starp paraugiem, kuri apstrādāti dažādās temperatūrās, redzamas nelielas atšķirības. Piemēram, 25%-CaSrHPerAp paraugi, kas apstrādāti 110 °C un 120 °C temperatūrā, ir spilgtāk dzelteni nekā pārējie apstrādātie paraugi. CaHPerAp un 75%-SrCaHPerAp paraugiem šī krāsu robeža nav tik izteikta, līdz ar to vizuāli nevar novērtēt pie kādas apstrādes temperatūras ir intensīvāks kristālu krāsojums. Krāsu maiņa liecina par peroksīdjonu iekļaušanu HAp struktūrā.

Lai raksturotu katjonu aizvietošanu SrCaHAp paraugos, noteica elementu oksīdu masas daļas, izmantojot WD-XRF pamatmetodi (bez standartiem). 3.1. tabulā apkopoti eksperimentāli iegūtās un teorētiski aprēķinātās masas daļas (3.1. vienādojums). Katram eksperimentālajam rezultātam norādīta statistiskā kļūda, kuru aprēķināja datu apstrādes programma, izmantojot analīzes fundamentālos jeb pamatmetodes parametrus.

$$\omega_{teor.} = \frac{z \cdot M_{oksīda}}{M_{HAp}} \cdot 100\% \quad (3.1)$$

kur  $\omega_{teor.}$  – teorētiski aprēķinātā elementa oksīda masas daļa HAp, %;

$z$  – elementa oksīdu skaits vienā HAp molekulā;

$M_{oksīda}$  – elementa oksīda molmasa,  $\frac{g}{mol}$ ;

$M_{HAp}$  – hidroksilapatīta molmasa,  $\frac{g}{mol}$ .

3.1. tabula

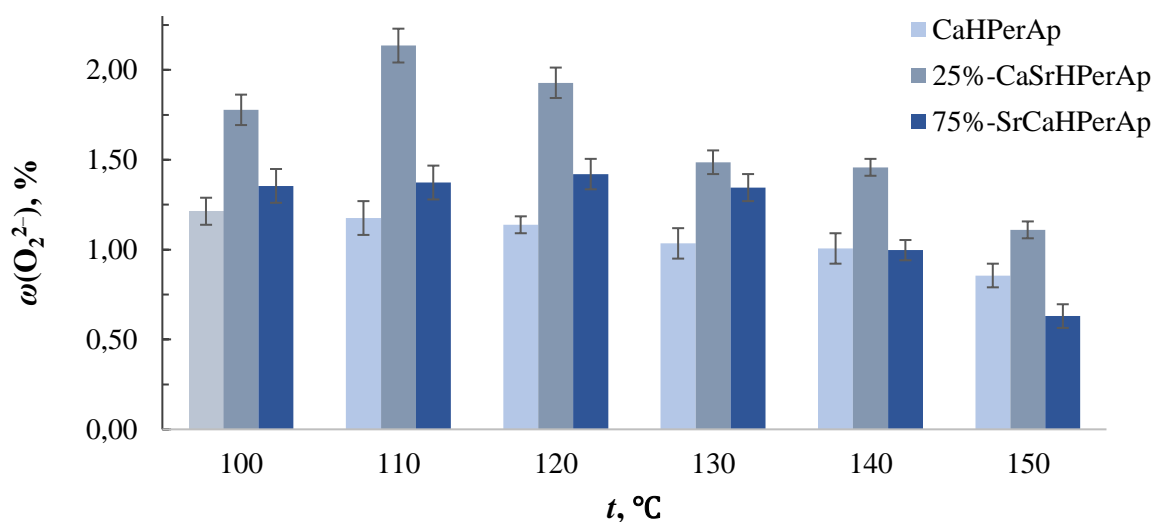
**Eksperimentāli un teorētiski noteiktās elementu oksīdu masas daļas (%) HAp paraugos**

Paraugi Oksīdi	CaHAp	25%-CaSrHAp	75%-SrCaHAp
CaO <sub>eksp.</sub>	61,7 ± 0,2	42,4 ± 0,2	14,2 ± 1,8
CaO <sub>teor.</sub>	55,8	37,4	10,3
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> <sub>eksp.</sub>	37,7 ± 0,4	36,1 ± 0,5	30 ± 3
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> <sub>teor.</sub>	42,4	37,9	31,3
SrO <sub>eksp.</sub>	0,2 ± 1,0	21,54 ± 0,06	55,91 ± 0,18
SrO <sub>teor.</sub>	0,0	23,06	57,09

Iegūtos rezultātus izmantoja, lai noteiktu  $\frac{\text{Sr}}{(\text{Sr}+\text{Ca})}$  molāro attiecību. 25%-CaSrHAp paraugam eksperimentāli iegūtā  $\frac{\text{Sr}}{(\text{Sr}+\text{Ca})}$  molārā attiecība ir ~22% (Sr saturs ~18%), bet 75%-SrCaHAp molārā attiecība ir ~75% (Sr saturs ~47%). Kursa darbā „Dažādu apatītu materiālu sintēze  $\delta^{18}\text{O}$  pētījumiem” SrCaHAp paraugos noteica Sr saturu, 25%-CaSrHAp –  $(19,1 \pm 1,1)\%$ , 75%-SrCaHAp –  $(47,8 \pm 1,8)\%$ , izmantojot induktīvi saistītas plazmas masspektrometrijas (ICP-MS) metodi. Ar WD-XRF (2. pielikumā apskatāmi spektri) un ICP-MS metodēm iegūtie rezultāti, norādīja uz to, ka paraugi satur nelielus Sr (CaHAp), Ba, Mg un Cr piemaisījumus, tos var attiecināt uz sintēžu izejvielu tīrību. Vairākiem izmantotajiem reaģentiem norādītā tīrība: tīrs vai ķīmiski tīrs. Sintezētie SrCaHAp paraugi iegūti ar teorētiski prognozēto  $\frac{\text{Sr}}{(\text{Sr}+\text{Ca})}$  molāro attiecību.

### 3.2. Peroksīdjonu saturs hidrotermiski apstrādātajos apatītu paraugos

Maģistra darba ietvaros hidrotermiski  $\text{H}_2\text{O}_2$  šķīduma klātbūtnē apstrādāja 25 paraugu sērijas, kopā iegūstot 100 HPerAp paraugus. Kvantitatīvi novērtēja peroksīdjonu saturu, permanganatometriski nosakot ūdeņraža peroksīda masas daļu hidrotermiski apstrādātajos paraugos: CaHPerAp, 25%-CaSrHPerAp un 75%-SrCaHPerAp. Pamatojoties uz zinātniskajos rakstos publicēto informāciju, ka apatītu struktūrā  $\text{OH}^-$  jonus daļēji var aizvietot ar  $\text{O}_2^{2-}$  nevis  $\text{H}_2\text{O}_2$  molekulām, tika veikts pārrēķins uz  $\text{O}_2^{2-}$  jonu saturu hidrotermiski apstrādātajos paraugos (skatīt. 2.6. apakšnodaļu). 3.1. attēlā apkopoti HPerAp paraugu titrēšanu rezultāti, kas hidrotermiski  $\text{H}_2\text{O}_2$  klātbūtnē apstrādāti 100 °C, 110 °C, 120 °C, 130 °C, 140 °C un 150 °C temperatūrā.



3.1. att. Vidējā  $\text{O}_2^{2-}$  jonu masas daļa HPerAp paraugos, kuri hidrotermiski apstrādāti 6 stundas temperatūras intervālā no 100 °C līdz 150 °C

Augstākajā hidrotermiskās apstrādes temperatūrā, kas ir 150 °C, visiem HPerAp paraugiem raksturīga zemākā  $O_2^{2-}$  masas daļa. Samazinot apstrādes temperatūru, palielinājās peroksīdjonu saturs apatītos. Sr iekļaušana CaHAp modificē tā kristālisko režģi, tas ietekmē anjonu aizvietošanu. Palielinot Sr saturu HPerAp, palielinājās hidrotermiskās apstrādes temperatūra, pie kuras HPerAp sasniedza  $O_2^{2-}$  jonu koncentrācijas maksimumu. Augstākā temperatūrā SrCaHAp kristāliskais režģis ir stabilāks un anjonu aizvietošana notika komplicētāk nekā zemākā temperatūrā. Zinātniskajā literatūrā, kurā publicēts pētījums par SrCaHAp hidrotermisku apstrādi  $H_2O_2$  šķīduma klātbūtnē, lielāks peroksīda saturs iegūts zemākajā temperatūrā (130 °C, 140 °C, 150 °C, 170 °C) [43].

50%  $H_2O_2$  šķīduma viršanas temperatūra ir 114 °C, tā stabilitāti un sadalīšanos ietekmē šķīdumam pievienotie stabilizatori. Izmantotā reaģenta ražotājs neatklāj, kādi stabilizatori tam pievienoti. Visbiežāk pievieno alvas un fosfātu saturošus stabilizatorus, lai saglabātu reaģentam raksturīgās fizikālās īpašības. Iegūtie eksperimentālie rezultāti liecina, ka izmantotais  $H_2O_2$  šķīdums sācis sadalīties zem viršanas temperatūras (<110 °C).

Izvēlētajā hidrotermiskās apstrādes temperatūras intervālā (100 °C – 150 °C) daļēji ar stronciju aizvietotiem hidroksil-peroksiapatītiem (SrCaHPerAp) raksturīgi  $O_2^{2-}$  masas daļas maksimumi. 25%-CaSrHPerAp augstāko  $O_2^{2-}$  saturu (2,27% ± 0,08%) novēroja 110 °C, 75%-SrCaHPerAp – (1,51% ± 0,08%) 120 °C temperatūrā. CaHPerAp funkcijas ( $\omega_{H_2O_2}=f(T)$ ) maksimums ir zemākā temperatūrā ( $\leq 100$  °C), jo izvēlētajā intervālā, palielinot apstrādes temperatūru, peroksīdjonu saturs pakāpeniski samazinājās un nenovēroja ne funkcijas maksimumu, ne minimumu.

Lai novērtētu hidroksiljonu aizvietošanas pakāpi un hidrotermiskās apstrādes procesa efektivitāti, nepieciešams aprēķināt teorētisko  $O_2^{2-}$  jonu saturu peroksiapatītā, kurā 100%  $OH^-$  joni ir aizvietoti ar peroksīdjoniem, un salīdzināt to ar eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem. Šādi iespējams noteikt procentuālo  $O_2^{2-}$  jonu daudzumu, kas aizvietojis  $OH^-$  jonus (3.2. vienādojums).

$$x(OH^- \rightarrow O_2^{2-}) = \frac{\omega_{O_2^{2-}} \text{ eksp.}}{\omega_{O_2^{2-}} \text{ teor.}} \cdot 100\% = \frac{\left( \frac{5}{2} \cdot \frac{c_{KMnO_4} \cdot V_{KMnO_4} \cdot M_{O_2^{2-}}}{m_{\text{paraugam}}} \right)}{\left( \frac{M_{O_2^{2-}}}{M_{HAp}} \right)} \cdot 100\% \quad (3.2)$$

3.2. tabulā salīdzinātas teorētiskās un eksperimentālās vērtības un aprēķināta hidroksiljonu aizvietošanas pakāpe, daļēji aizvietojojot tos ar  $O_2^{2-}$  joniem.

Eksperimentālais un teorētiskais  $O_2^{2-}$  jonu saturs HPerAp

Paraugi	Apstrādes temperatūra, °C	Eksperimentālā $\omega_{O_2^{2-}}$ vid., %	Teorētiskā $\omega_{O_2^{2-}}$ , %	$x(OH^- \rightarrow O_2^{2-})$ , %
CaHPerAp	100	$1,21 \pm 0,08$	3,19	$38 \pm 3$
	110	$1,18 \pm 0,09$		$37 \pm 3$
	120	$1,14 \pm 0,05$		$35,7 \pm 1,6$
	130	$1,03 \pm 0,08$		$32 \pm 3$
	140	$1,01 \pm 0,08$		$32 \pm 3$
	150	$0,86 \pm 0,07$		$27 \pm 2$
25%-CaSrHPerAp	100	$1,78 \pm 0,08$	2,85	$62 \pm 3$
	110	$2,14 \pm 0,09$		$75 \pm 3$
	120	$1,93 \pm 0,08$		$68 \pm 3$
	130	$1,49 \pm 0,07$		$52 \pm 2$
	140	$1,46 \pm 0,05$		$51,2 \pm 1,8$
	150	$1,11 \pm 0,05$		$38,9 \pm 1,8$
75%-SrCaHPerAp	100	$1,35 \pm 0,09$	2,35	$57 \pm 4$
	110	$1,37 \pm 0,09$		$58 \pm 4$
	120	$1,42 \pm 0,08$		$60 \pm 3$
	130	$1,35 \pm 0,08$		$57 \pm 3$
	140	$1,00 \pm 0,06$		$43 \pm 3$
	150	$0,63 \pm 0,07$		$27 \pm 3$

Kvantitatīvās analīzes rezultāti liecina, ka apatītu struktūrā  $OH^-$  jonu kolonnas daļēji ir aizvietotas ar  $O_2^{2-}$  joniem. Tas norāda, ka izvēlētajos apstrādes apstākļos (6 stundas, temperatūras intervālā no 100 °C līdz 150 °C) nenotiek pilnīga ūdeņraža peroksīda sadalīšanās un iekļaušanās SrCaHAp vai CaHAp struktūrā – netiek pilnīgi aizvietotas  $OH^-$  kolonnas ar peroksīdjoniem. CaHAp, kas apstrādāti ar 50%  $H_2O_2$  šķīdumu, iespējams aizvietot vismaz 38%  $OH^-$  kolonnas ar  $O_2^{2-}$  joniem, 25%-CaSrHAp var aizvietot 75%  $OH^-$  jonu, bet 75%-SrCaHAp – vismaz 60%  $OH^-$  jonu.

Salīdzinot ar citos pētījumos iegūtajiem rezultātiem, kuros izmantotas augsttemperatūras metodes, izdevies iegūt līdzvērtīgus produktus ar augstu peroksīdjonu saturu. Zinātniskajā literatūrā pieejamā informācija norāda, ka līdz šim SrHAp izdevies aizvietot 68%  $OH^-$  ar  $O_2^{2-}$  joniem un tas ir augstākais procentuālais peroksīdjonu daudzums [5,43]. 25%-CaSrHPerAp paraugi uzrādīja augstākus rezultātus, bet kā iepriekš tika norādīts, pie augstāka Sr satura peroksīdjonu iekļaušana apatītu struktūrā noris sarežģītāk.

### 3.3. Antibakteriālo īpašību izvērtējums

Izmantojot mikroatšķaidījuma metodi sintezētajiem apatītiem noteica minimālo inhibējošo un baktericīdo koncentrāciju pret patogēnām baktērijām – *Staphylococcus aureus* (gram-pozitīva) un *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negatīva). Sintezētajiem paraugiem, izņemot neapstrādātu CaHAp, piemīt antibakteriālas īpašības pret abām patogēnām baktērijām. Nedaudz augstāku antibakteriālo aktivitāti novēroja pret *P. aeruginosa* baktēriju.

Parasti gram-negatīvās baktērijas ir izturīgākas pret antibakteriāliem līdzekļiem, pateicoties to uzbūvei – šūnapvalku veido peptidoglikāna slānis, kas no ārpuses ir pārklāts ar vēl vienu membrānu. Gram-pozitīvām baktērijām šūnapvalku veido tikai peptidoglikāna slānis, taču tas ir līdz pat 5 reizēm biežāks nekā gram-negatīvām baktērijām. Pētījumā par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izmantošanu dezinfekcijai un sterilizācijai, norādīts, ka gram-negatīvās baktērijas (*P. aeruginosa* un *E. coli*) ir jutīgākas pret 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> šķīdumu nekā *S. aureus* (gram-pozitīva) baktērija [36]. Maģistra darbā iegūtie eksperimentālie rezultāti korelē ar literatūrā aprakstītajām tendencēm. 3.3. tabulā redzams, ka H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> klātbūtnē hidrotermiski apstrādātiem paraugiem antibakteriālās īpašības ir izteiktākas, jo MIC un MBC vērtības ir mazākas nekā neapstrādātiem paraugiem.

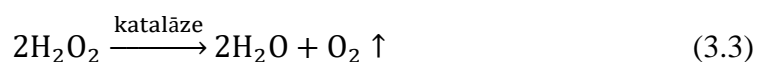
3.3. tabula

**Sintezēto apatītu minimālā inhibējošā un baktericīdā koncentrācija**

Paraugi	<i>S. aureus</i> MIC, MBC, mg/mL	<i>P. aeruginosa</i> MIC, MBC, mg/mL	$\omega_{O_2^-}$ , %
CaHAp	–	>107	–
CaHPerAp (100 °C)	54	54	1,24 ± 0,08
CaHPerAp (150 °C)	54	54	0,92 ± 0,07
25%-CaSrHAp	121	120	–
25%-CaSrHPerAp (100 °C)	40	26	1,69 ± 0,10
25%-CaSrHPerAp (150 °C)	54	26	1,11 ± 0,05
75%-SrCaHAp	193	>220	–
75%-SrCaHPerAp (100 °C)	63	33	1,35 ± 0,08
75%-SrCaHPerAp (150 °C)	52	52	0,63 ± 0,07

Palielinot peroksīdjonu saturu apatītos, samazinās minimālā inhibējošā un baktericīdā koncentrācija. Izņēmums ir 75%-SrCaHPerAp paraugi, kuriem pie zemākas peroksīdjonu masas daļas ir nedaudz izteiktākas antibakteriālās īpašības pret *S. aureus*. No 75%-SrCaHPerAp paraugu iegūtajiem rezultātiem redzams, ka *P. aeruginosa* ir jutīgāka uz O<sub>2</sub><sup>2-</sup> satura izmaiņu. CaHPerAp un 25%-CaSrHPerAp paraugiem ir sasniegta maksimālā antibakteriālā aktivitāte

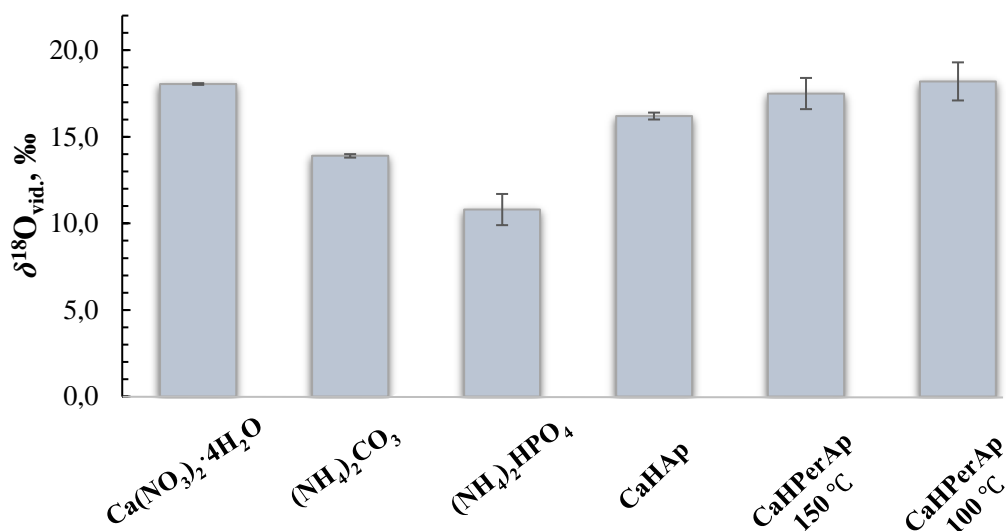
pret *P. aeruginosa*, pie nosacījuma, ka baktērijas jutība nemainās, palielinot antibakteriālā reaģenta daudzumu ~1,5 reizes. Līdzīgi arī CaHPerAp gadījumā, iekļaujot apatīta struktūrā vairāk  $O_2^-$ , baktēriju jutību tas neietekmē. Apstiprinās izvirzītā hipotēze, ka biomateriālu antibakteriālās īpašības var uzlabot, apstrādājot tos  $H_2O_2$  šķīduma klātbūtnē. CaHPerAp (100 °C un 150 °C) un 75%-SrCaHPerAp (150 °C) materiāliem *MIC* un *MBC* vērtības pret abām baktērijām ir vienādas. *Staphylococcus* un *Pseudomonas* ģints baktērijas ir katalāzes pozitīvi mikroorganismi, tie producē katalāzi – enzīmu, kas sadala ūdeņraža peroksīdu (3.3. reakcijas vienādojums). Tas var ietekmēt antibakteriālo aktivitāti, palielinot *MIC* un *MBC* vērtības hidrotermiski apstrādātiem paraugiem.



Baktēriju augšanu ievērojami samazina hidrotermiski apstrādātie apatīti. Visefektīvāk *P. aeruginosa* un *S. aureus* inhibē 25%-CaSrHPerAp paraugi. Salīdzinot neapstrādātu apatītu paraugu *MIC* un *MBC*, 3.3. tabulā vērojams, ka, aizvietojojot  $Ca^{2+}$  ar 75%  $Sr^{2+}$  joniem, antibakteriālā aktivitāte ir līdzvērtīga vai uzlabojas, tāpat to var attiecināt uz hidrotermiski apstrādātiem paraugiem – vairumā gadījumu ir augstāka antibakteriālā aktivitāte.

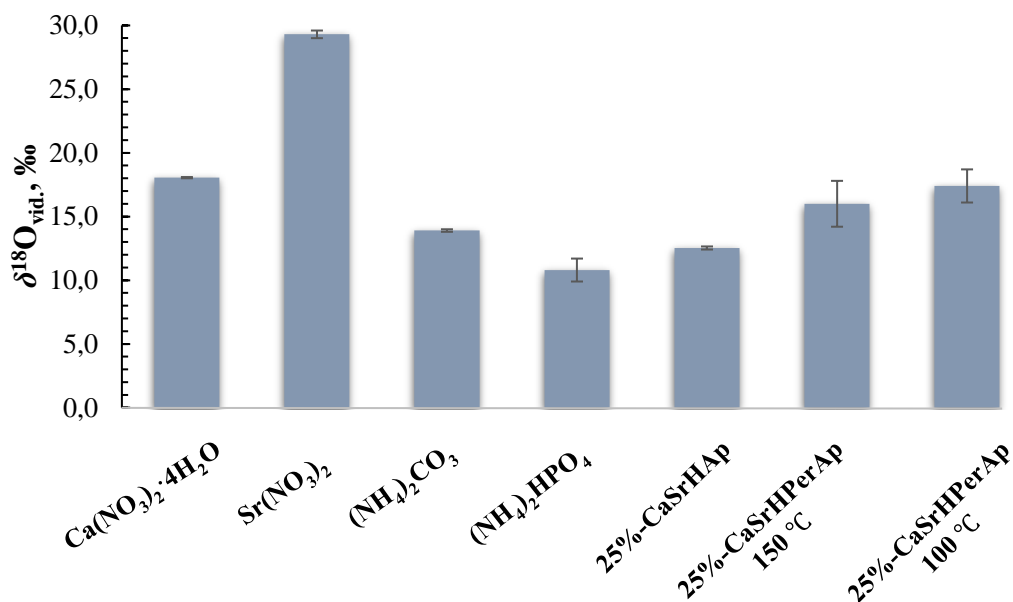
### 3.4. $\delta^{18}O$ vērtību izvērtējums hidroksil-peroksiapatītos un to sintēžu izejvielās

Ar TC/EA-IRMS metodi analizēja CaHAp, CaHPerAp, SrCaHAp, SrCaHPerAp un to sintēžu izejvielas, kuras standartapstākļos ir cietā agregātstāvoklī. 3.2. attēlā apkopotas  $\delta^{18}O$  vērtības CaHAp un tā sintēzē izmantotajiem reaģentiem, kā arī hidrotermiskās apstrādes procesos iegūtajiem CaHPerAp. Redzams, ka visām izejvielām un sintēžu produktiem ir atšķirīgas  $^{18}O/^{16}O$  izotopu attiecības. Neliela atšķirība vērojama starp neapstrādātiem un ar  $H_2O_2$  šķīdumu apstrādātiem paraugiem. Hidrotermiskās apstrādes procesa apstākļi bija nemainīgi, izņemot temperatūru, kas ir ietekmējusi  $\delta^{18}O$  vērtības izmaiņas starp apstrādātiem paraugiem. Temperatūras maiņa ietekmē peroksīdjonu saturu HPerAp struktūrā, rezultātā mainās arī  $^{18}O/^{16}O$  izotopu attiecības. Neapstrādātiem hidroksilapatītu paraugiem kopējo skābekļa izotopu attiecību veido  $(PO_4)^{3-}$  un  $OH^-$ , bet apstrādātiem –  $(PO_4)^{3-}$ ,  $OH^-$  un  $O_2^-$ . 3.2. attēlā redzams, ka apatītu  $\delta^{18}O$  vērtības veidošanā ieguldījumu sniedz  $(NH_4)_2HPO_4$ ,  $(NH_4)_2CO_3$  un  $H_2O_2$ . Salīdzinot CaHPerAp un CaHAp  $\delta^{18}O$  variācijas, apstrādātiem paraugiem raksturīgas augstākas  $^{18}O/^{16}O$  izotopu attiecību vērtības.



3.2.att.  $\delta^{18}\text{O}$  vērtības CaHPerAp un to sintēzes izejvielām

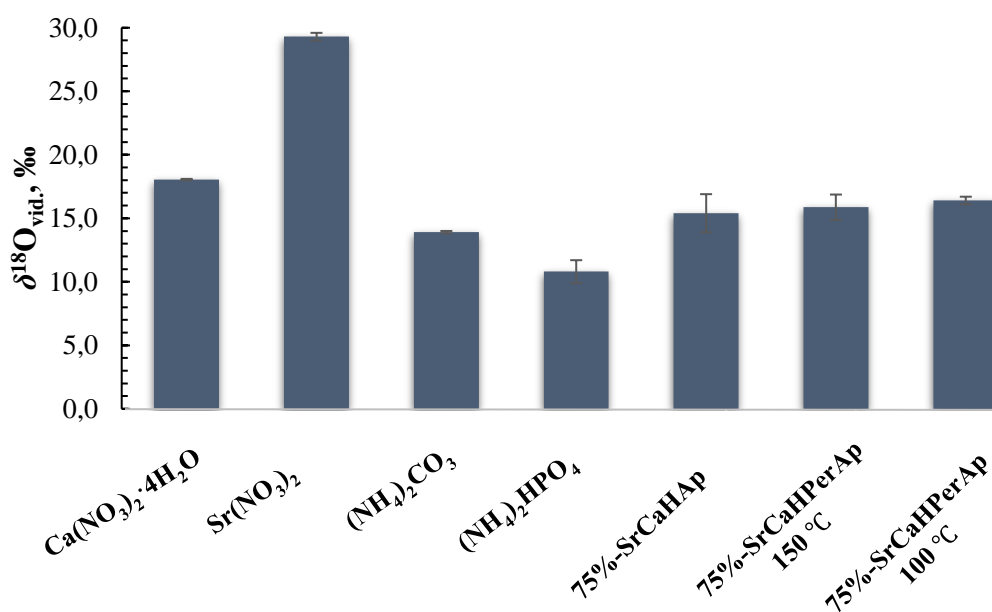
3.3. attēlā apkopotas 25%-CaSrHPerAp, 25%-CaSrHAp un tā sintēzē izmantoto reaģentu  $\delta^{18}\text{O}$  vērtības. Vērojams, ka būtiski atšķirīga un augstāka skābekļa stabilo izotopu attiecība ir sintēzes izejvielai –  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ , taču tā sniedz ieguldījumu  $\text{Ca}^{2+}$  jonu aizvietošanā, bet neietekmē apatītu  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  izotopu attiecības. Tāpat kā 3.2. attēlā, apstrādātiem paraugiem ir lielākas  $\delta^{18}\text{O}$  vērtības, salīdzinot ar neapstrādātiem paraugiem.



3.3.att.  $\delta^{18}\text{O}$  vērtības 25%-CaSrHPerAp un to sintēzes izejvielām

3.4. attēlā apkopotas 75%-SrCaHPerAp, 75%-SrCaHAp un tā sintēzē izmantoto reaģentu  $\delta^{18}\text{O}$  vērtības. Salīdzinot ar iepriekšējiem attēliem (3.2. un 3.3.), vērojama kopīga tendence, tas ir, 100 °C apstrādes temperatūrā  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  izotopu attiecību vērtība ir lielāka nekā 150 °C. Tāpat

arī 100 °C temperatūrā apstrādātajiem HPerAp paraugiem raksturīgs augstāks peroksīdjonu saturs. Tas norāda, ka  $\delta^{18}\text{O}$  starpību starp apstrādātiem paraugiem (100 °C un 150 °C temperatūrā) nodrošina  $\text{O}_2^{2-}$  jonu masas daļas izmaiņas.



3.4.att.  $\delta^{18}\text{O}$  vērtības 75%-SrCaHPerAp un to sintēzes izejvielām

Balstoties uz iepriekš novērotajām sakarībām, izmantojot permanganometriskās noteikšanas rezultātus un  $\delta^{18}\text{O}$  vērtības, iespējams aprēķināt  $\text{O}_2^{2-}$  jonu saturu HPerAp no TC/EA-IRMS mērījumu rezultātiem. Nepieciešams noteikt  $\delta^{18}\text{O}$  variācijas neapstrādātam (HAp) un visiem hidrotermiski apstrādātiem paraugiem (HPerAp), lai varētu aprēķināt starpības  $\delta^{18}\text{O}$  vērtībām starp neapstrādāto un apstrādātiem paraugiem (3.4. un 3.5. vienādojumi). Aprēķinu piemēros izmantoti CaHAp un CaHPerAp eksperimentālie rezultāti, aprēķiniem nepieciešamie lielumi apkopoti 3.4. tabulā.

$$\begin{aligned} \Delta\delta^{18}\text{O}_{\text{CaHPerAp } 150\text{ °C}} &= \delta^{18}\text{O}_{\text{CaHPerAp } 150\text{ °C}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{CaHAp}} = \\ &= 17,5\text{ ‰} - 16,2\text{ ‰} = 1,3\text{ ‰} \end{aligned} \quad (3.4)$$

$$\begin{aligned} \Delta\delta^{18}\text{O}_{\text{CaHPerAp } 100\text{ °C}} &= \delta^{18}\text{O}_{\text{CaHPerAp } 100\text{ °C}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{CaHAp}} = \\ &= 18,2\text{ ‰} - 16,2\text{ ‰} = 2,0\text{ ‰} \end{aligned} \quad (3.5)$$

Vienam no apstrādātajiem paraugiem titrimetriski jānosaka peroksīdjonu saturs, lai, izmantojot aprēķinātās  $\delta^{18}\text{O}$  starpības, varētu izveidot proporciju un aprēķināt cita parauga  $\text{O}_2^{2-}$  masas daļu, šajā gadījumā  $\omega_{\text{O}_2^{2-}\text{-CaHPerAp } 100\text{ °C}}$  (3.6. un 3.7. vienādojumi).

$$\frac{\Delta\delta^{18}\text{O}_{\text{CaHPerAp } 150\text{ °C}}}{\omega_{\text{O}_2^{2-}\text{-CaHPerAp } 150\text{ °C}}} = \frac{\Delta\delta^{18}\text{O}_{\text{CaHPerAp } 100\text{ °C}}}{\omega_{\text{O}_2^{2-}\text{-CaHPerAp } 100\text{ °C}}} \quad (3.6)$$

$$\omega_{\text{O}_2^{2-}\text{-CaHPerAp } 100\text{ °C}} = \frac{\omega_{\text{O}_2^{2-}\text{-CaHPerAp } 150\text{ °C}} \cdot \Delta\delta^{18}\text{O}_{\text{CaHPerAp } 100\text{ °C}}}{\Delta\delta^{18}\text{O}_{\text{CaHPerAp } 150\text{ °C}}} =$$

$$= \frac{0,81 \% \cdot 2,0 \text{ ‰}}{1,3 \text{ ‰}} = 1,25 \% \quad (3.7)$$

3.4. tabula

**$O_2^{2-}$  jonu saturs noteikšana, izmantojot permanganometriju un IRMS**

Paraugi (apstrādes temperatūra)	Titrimetriski $\omega_{O_2^{2-}}$ , %	$\delta^{18}O$ , ‰	Izmantojot IRMS $\omega_{O_2^{2-}}$ , %
CaHAp	–	$16,2 \pm 0,2$	–
CaHPerAp (100 °C)	$1,19 \pm 0,05$	$18,2 \pm 0,9$	$1,25 \pm 0,11$
CaHPerAp (150 °C)	$0,81 \pm 0,05$	$17,5 \pm 1,1$	$0,77 \pm 0,06$
25%-CaSrHAp	–	$12,53 \pm 0,12$	–
25%-CaSrHPerAp (100 °C)	$1,72 \pm 0,08$	$17,4 \pm 1,3$	$1,6 \pm 0,2$
25%-CaSrHPerAp (150 °C)	$1,15 \pm 0,07$	$16,0 \pm 1,8$	$1,23 \pm 0,18$
75%-SrCaHAp	–	$15,4 \pm 1,5$	–
75%-SrCaHPerAp (100 °C)	$1,31 \pm 0,07$	$16,4 \pm 0,3$	$1,28 \pm 0,12$
75%-SrCaHPerAp (150 °C)	$0,64 \pm 0,06$	$15,9 \pm 1,0$	$0,66 \pm 0,13$

Izmantojot netiešo mērīšanu (matemātiskas sakarības), analizējamajos paraugos aprēķināja  $O_2^{2-}$  masas daļas no IRMS rezultātiem, rezultāti apkopoti 3.4. tabulas ceturtajā kolonnā. Katram rezultātam, ko ieguva netiešajā mērīšanā, aprēķināja pilno kļūdu. No tās aprēķina var izvērtēt kurš mērījums vairāk ietekmēja rezultātu ( $\omega_{O_2^{2-}}$  izmantojot IRMS) un nākotnē uzlabot tā precizitāti. Kļūdas aprēķinu piemēros izmantoja CaHAp un CaHPerAp eksperimentālos rezultātus, lai izteiksmes būtu uzskatāmas, izveidoja apzīmējumus:  $A = \omega_{O_2^{2-}CaHPerAp\ 100\ ^\circ C}$ ;  $B = \omega_{O_2^{2-}CaHPerAp\ 150\ ^\circ C}$ ;  $C = \Delta\delta^{18}O_{CaHPerAp\ 100\ ^\circ C}$ ;  $D = \Delta\delta^{18}O_{CaHPerAp\ 150\ ^\circ C}$ ;  $E = \delta^{18}O_{CaHAp}$ ;  $F = \delta^{18}O_{CaHPerAp\ 100\ ^\circ C}$ ;  $G = \delta^{18}O_{CaHPerAp\ 150\ ^\circ C}$ . 3.8. izteiksme raksturo titrēšanas radīto parciālkļūdu.

$$\Delta A_B = \frac{\partial A}{\partial B} \cdot \Delta B = \frac{C}{D} \cdot \frac{\partial B}{\partial B} \cdot \Delta B = \frac{C}{D} \cdot \Delta B \quad (3.8)$$

Rezultāta precizitātes raksturošanai aprēķināja titrēšanas relatīvo kļūdu (3.9. vienādojums).

$$r_B = \frac{\Delta B}{B} = \frac{0,05}{0,81} = 0,062 \quad (3.9)$$

Pareizinot un izdalot 3.8. izteiksmi ar  $B$ , iegūst 3.10. vienādojumu.

$$\Delta A_B = A \cdot r_B = 1,25 \% \cdot 0,062 = 0,078 \% \quad (3.10)$$

3.11. izteiksme raksturo  $\Delta\delta^{18}O_{CaHPerAp\ 100\ ^\circ C}$  radīto parciālkļūdu.

$$\Delta A_C = \frac{\partial A}{\partial C} \cdot \Delta C = \frac{B}{D} \cdot \frac{\partial C}{\partial C} \cdot \Delta C = \frac{B}{D} \cdot \Delta C \quad (3.11)$$

$\Delta\delta^{18}\text{O}_{\text{CaHPerAp } 100\text{ }^\circ\text{C}}$  iegūtā rezultāta precizitātes raksturošanai aprēķināja relatīvo kļūdu (3.12. vienādojums).

$$r_C = \left| \frac{\Delta F}{F} - \frac{\Delta E}{E} \right| = \left| \frac{0,9}{18,2} - \frac{0,2}{16,2} \right| = 0,037 \quad (3.12)$$

Pareizinot un izdalot 3.11. izteiksmi ar  $C$ , iegūst 3.13. vienādojumu.

$$\Delta A_C = A \cdot r_C = 1,25\% \cdot 0,037 = 0,046\% \quad (3.13)$$

3.14. izteiksme raksturo  $\Delta\delta^{18}\text{O}_{\text{CaHPerAp } 150\text{ }^\circ\text{C}}$  radīto parciālkļūdu.

$$\Delta A_D = \frac{\partial A}{\partial D} \cdot \Delta D = B \cdot C \cdot \frac{\partial \left(\frac{1}{D}\right)}{\partial D} \cdot \Delta D = (-1) \cdot \frac{B \cdot C}{D^2} \cdot \Delta D \quad (3.14)$$

$\Delta\delta^{18}\text{O}_{\text{CaHPerAp } 150\text{ }^\circ\text{C}}$  iegūtā rezultāta precizitātes raksturošanai aprēķināja relatīvo kļūdu (3.15. vienādojums).

$$r_D = \left| \frac{\Delta G}{G} - \frac{\Delta E}{E} \right| = \left| \frac{1,1}{17,5} - \frac{0,2}{16,2} \right| = 0,051 \quad (3.15)$$

No 3.14. izteiksmes iegūst 3.16. vienādojumu.

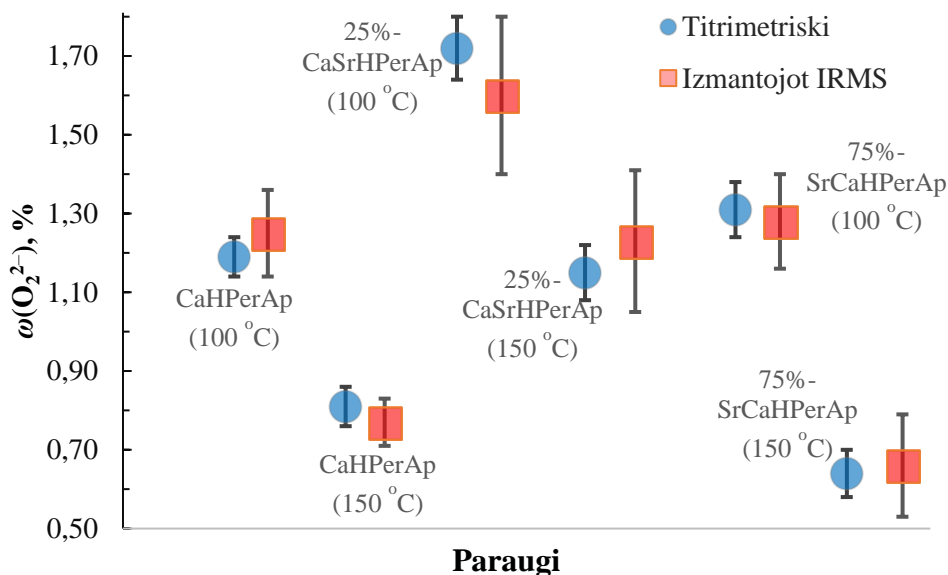
$$\Delta A_D = (-1) \cdot A \cdot r_D = (-1) \cdot 1,25\% \cdot 0,051 = -0,064\% \quad (3.16)$$

Saskaitot visas parciālkļūdas (3.10., 3.13. un 3.16. vienādojumi), aprēķināja pilno kļūdu (3.17. vienādojums). Aprēķinātās parciālkļūdas raksturo, kā iegūto  $\omega_{\text{O}_2^-}$  vērtību (izmantojot IRMS) ietekmē tiešajā mērīšanā noteikto lielumu pilnās kļūdas. Pārējiem netiešajā mērīšanā iegūtajiem rezultātiem analogiski aprēķināja pilno kļūdu.

$$\Delta A = \Delta\omega_{\text{O}_2^- \text{CaHPerAp } 100\text{ }^\circ\text{C}} = \sqrt{(\Delta A_B)^2 + (\Delta A_C)^2 + (\Delta A_D)^2} = 0,11\% \quad (3.17)$$

Lielākās parciālkļūdas raksturīgas paraugiem, kuros ir zems peroksīdjonu saturs un kuru  $\delta^{18}\text{O}$  mērījumiem nenoteiktība ir lielāka par 1 ‰. Uzlabojot paraugu homogenitāti, varētu samazināt pilnās kļūdas lielumu netiešajā mērīšanā.

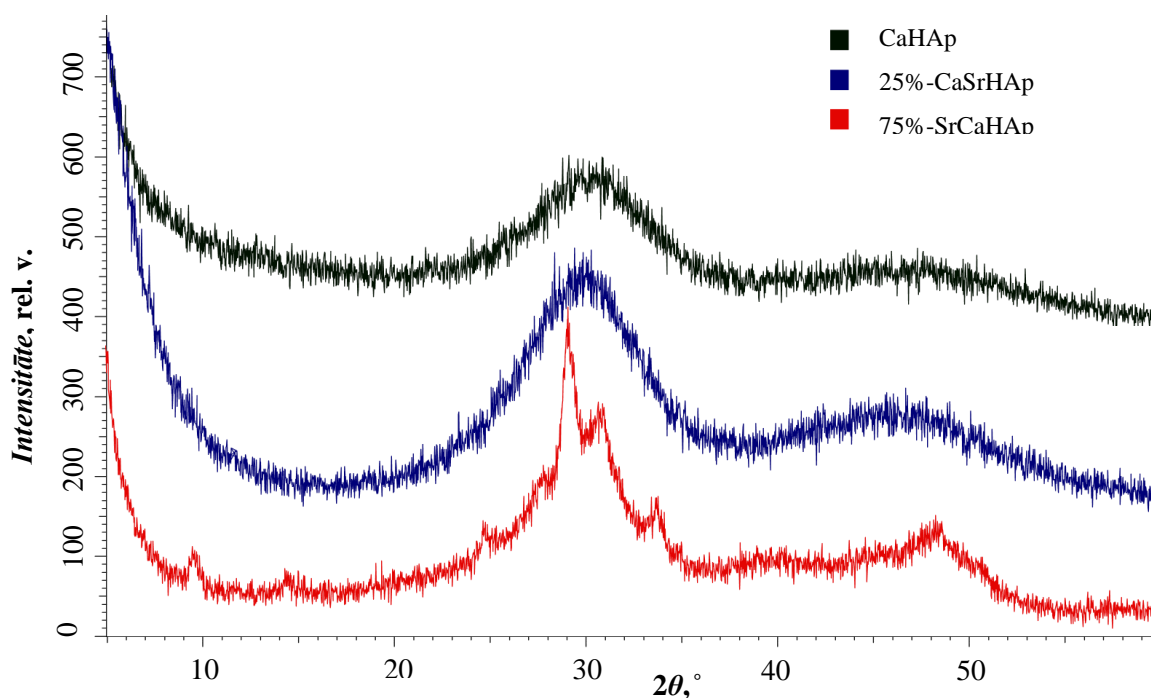
3.4. tabulā un 3.5. attēlā vērojams, ka no IRMS iegūtās peroksīdjonu masas daļas vērtības atrodas titrimetriskās noteikšanas drošības intervāla robežās. No iegūtajiem rezultātiem secināms, ka ar iepriekš aprakstītajām matemātiskām sakarībām ir iespējams noteikt peroksīdjonu saturu, katrā sērijā veicot tikai vienu titrēšanu. Ja analizējamie paraugi ir daudz un nepieciešams uzzināt  $\delta^{18}\text{O}$  un aptuvenās  $\text{O}_2^-$  masas daļas, tad šī metode ar aprēķiniem vienkāršo un paātrina rezultātu iegūšanu.



3.5.att. Eksperimentāli noteikto un aprēķināto peroksīdjonu satura salīdzinājums

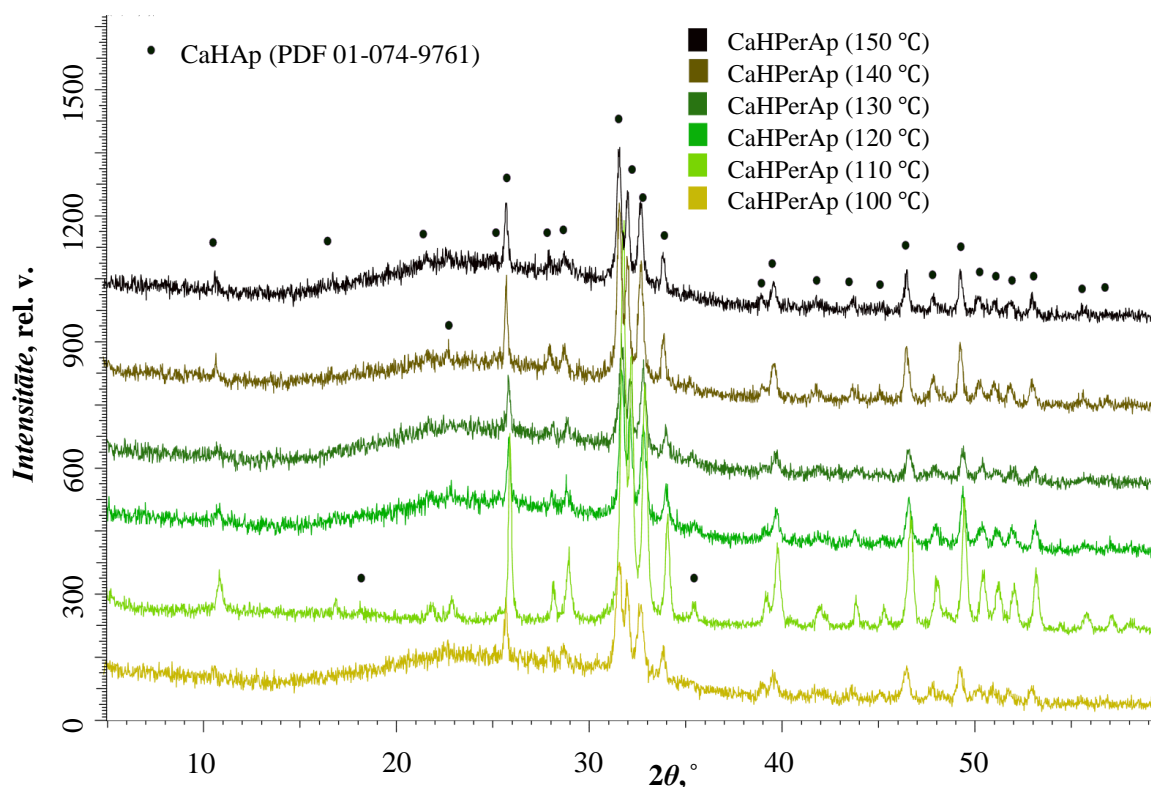
### 3.5. Sintezēto apatītu kvalitātes novērtējums, izmantojot PXRD

Pirms hidrotermiskās apstrādes analizēja CaHAp, 25%-CaSrHAp un 75%-SrCaHAp. Ar nogulsnešanas metodi ieguva amorfus CaHAp un 25%-CaSrHAp, skatīt 3.6. attēlu. Uz amorfās fāzes veidošanos norāda plati difrakcijas refleksi, fona pacelšanās un salīdzinoši augstā fona relatīvā intensitāte. Palielinoties Sr saturam paraugā, pieaug tā kristāliskuma pakāpe. 1.9. attēlā vienkopus apvienotas ACP difrakcijas ainās ar atšķirīgām kristāliskuma pakāpēm, salīdzinot ar 75%-SrCaHAp difrakcijas ainu, redzams, ka tās profils pielīdzināms vāji kristāliskai vai sīkkristāliskai vielai.



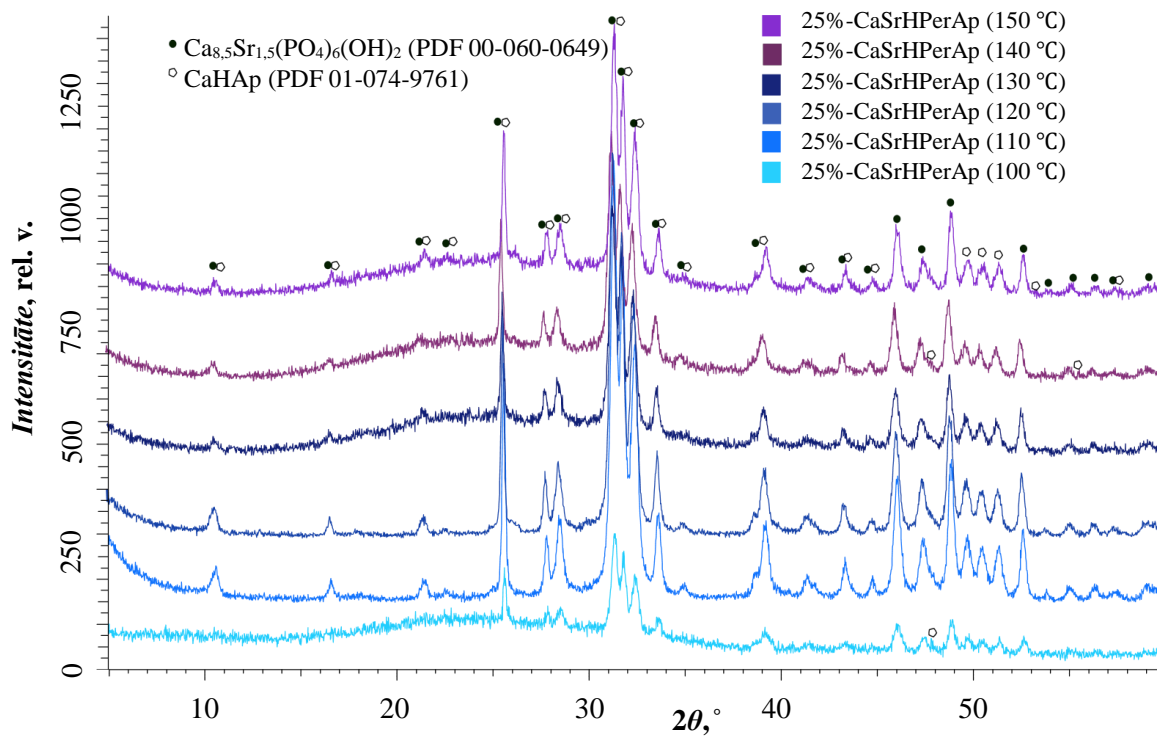
3.6.att. CaHAp, 25%-CaSrHAp un 75%-SrCaHAp rentgendifraktogrammas

Hidrotermiskās apstrādes laikā paraugiem palielinājās kristāliskuma pakāpe, tiem pārejot no amorfās uz kristālisko fāzi. 3.7. attēlā redzams, ka difrakcijas refleksi ir atdalīti, kļuvuši šaurāki un intensīvāki, kā arī fona līmenis ir samazinājies. CaHPerAp refleksu pozīcijas sakrīt ar datubāzē esošajiem CaHAp refleksiem. Vizuāli novērtējot CaHPerAp paraugu difrakcijas ainu, izteikti augstāka kristāliskuma pakāpe vērojama CaHPerAp, kas hidrotermiski H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> šķīduma klātbūtnē apstrādāti 6 stundas 110 °C temperatūrā, pārējiem paraugiem raksturīgs fona pacēlums no 22° līdz 30°, tāpat kā CaHAp. CaHPerAp (100 °C un 150 °C) paraugi ir vāji kristāliski.



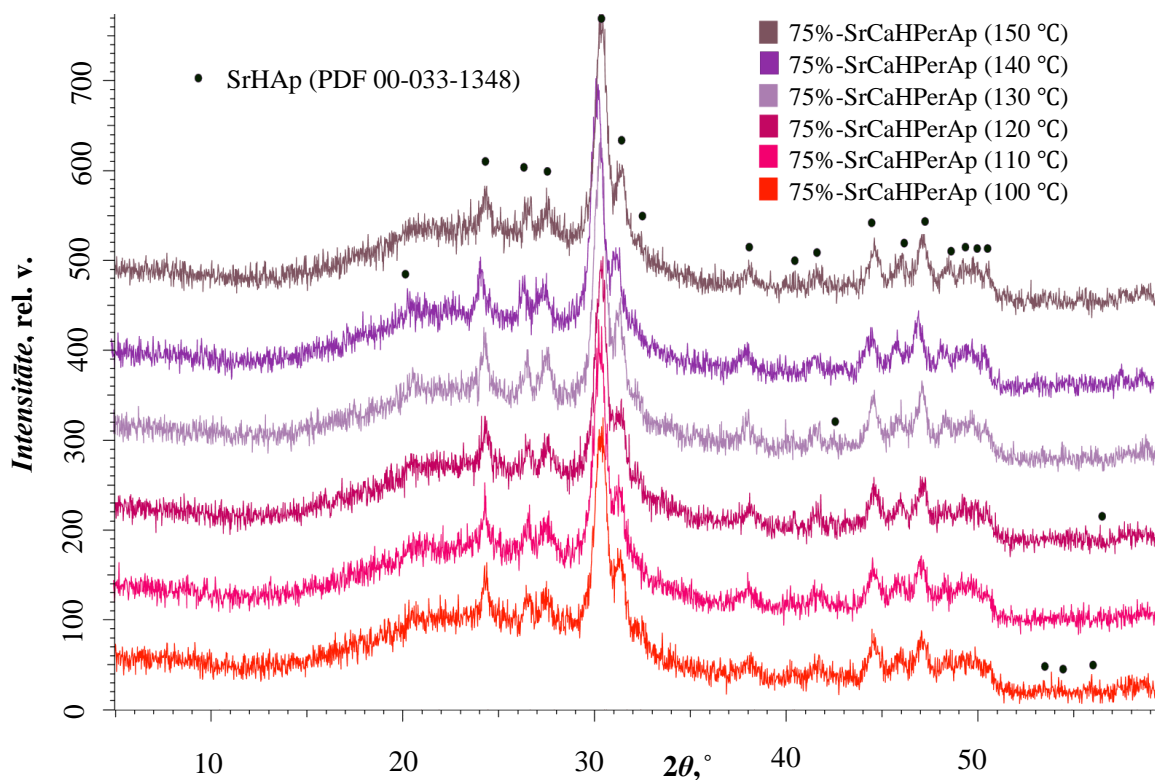
3.7.att. CaHPerAp rentgendifraktogrammu salīdzinājums atkarībā no hidrotermiskās apstrādes temperatūras

Augstāka kristāliskuma pakāpe novērojama 25%-CaSrHPerAp paraugiem, kas hidrotermiski apstrādāti 110 °C un 120 °C temperatūrā, difrakcijas ainas apskatāmas 3.8. attēlā. Salīdzinot ar visiem iegūtajiem HPerAp, šie paraugi uzrādīja arī augstāko peroksīdjonu saturu, tas ir, aizvietojojot OH<sup>-</sup> jonus ar 68% – 75% O<sub>2</sub><sup>2-</sup> jonu. 25%-CaSrHPerAp (110 °C un 120 °C) novēroja intensīvāko dzeltenu krāsojumu kristāliem, kas liecina par peroksīdjonu iekļaušanu apatītu struktūrā. 25%-CaSrHPerAp (100 °C) raksturīgs fona pacēlums intervālā no 20° līdz 25°, tas novērojams 25%-CaSrHAp amorfai fāzei, skatīt 3.6. attēlu. Difrakcijas refleksi un to relatīvās intensitātes sakrīt ar datubāzē esošajiem CaHAp un SrCaHAp refleksiem, abu savienojumu refleksu pozīcijas atrodas blakus vai dažās vietās pat pārklājas. Tas apliecina, ka iegūtie paraugi ir SrCaHAp, kuros kalcija procentuālais daudzums ir lielāks nekā stroncija.



3.8.att. 25%-CaSrHPerAp rentgendifraktogrammu salīdzinājums atkarībā no hidrotermiskās apstrādes temperatūras

Līdzīgi kā iepriekšējos attēlos (3.7. un 3.8.), 75%-SrCaHAp paraugi pēc apstrādes  $H_2O_2$  klātbūtnē kļuvi kristāliskāki, tie raksturojami kā vāji kristāliski, skatīt 3.9. attēlu.



3.9.att. 75%-SrCaHPerAp rentgendifraktogrammu salīdzinājums atkarībā no hidrotermiskās apstrādes temperatūras

Salīdzinot ar CaHPerAp un 25%-CaSrHPerAp difrakcijas ainām, redzams, ka 75%-SrCaHPerAp nav tik kristāliski, jo visiem paraugiem raksturīgs augsts fona līmenis, it īpaši intervālā no 17° līdz 34°. Mazāka fona ietekme un šaurāki refleksi novērojami 75%-SrCaHPerAp (130 °C un 140°C) paraugu rentgendifraktogrammās. SrHAp refleksu pozīcijas un to intensitātes, kas atrodas datubāzē, ir sakrītošas ar iegūto 75%-SrCaHPerAp refleksiem.

Visiem iegūtajiem HPerAp vērojama līdzīga tendence – difrakcijas ainas ar augstāko kristāliskuma pakāpi raksturīgas paraugiem ar augstāku peroksīdjonu saturu, bet mazāk kristāliski paraugi iegūti 100 °C temperatūrā. Tas norāda, ka hidrotermiskā apstrāde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> šķīduma klātbūtnē 6 stundas 100 °C temperatūrā nav pietiekama, lai iegūtu kristāliskus produktus.

### 3.6. Apatītu funkcionālo grupu raksturošana ar FTIR metodi

SrCaHAp un SrCaHPerAp struktūras un funkcionālo grupu raksturošanai izmantoja FTIR spektrometru. 3.5. tabulā salīdzināti funkcionālo grupu absorbcijas joslu maksimumi ar CaHAp, kas apkopoti no literatūras datiem. 3.10. attēlā apskatāmi FTIR spektri analizētajiem paraugiem.

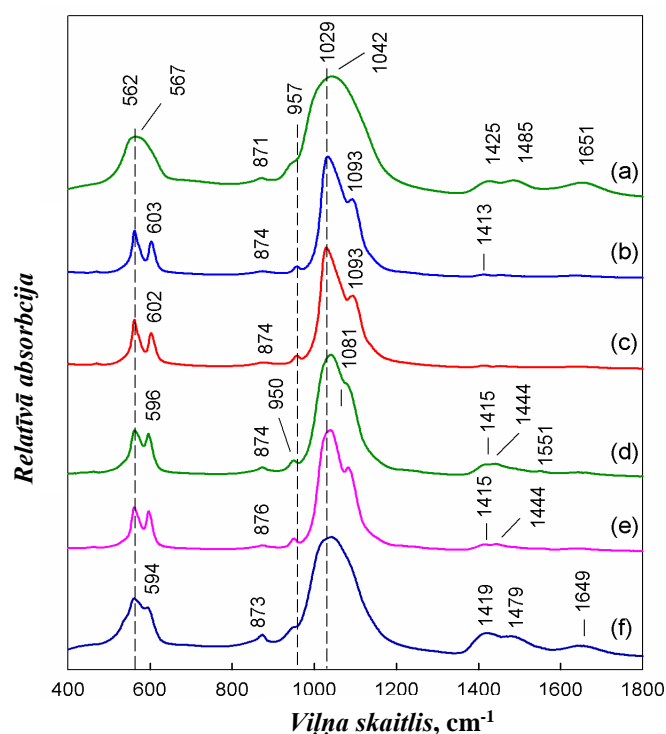
3.5. tabula

Apatītu funkcionālo grupu absorbcijas joslu maksimumi

Vibrācijas Paraugi	$\nu_1$ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , cm <sup>-1</sup>	$\nu_2$ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , cm <sup>-1</sup>	$\nu_3$ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , cm <sup>-1</sup>	$\nu_4$ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , cm <sup>-1</sup>	$\nu_{as}$ CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , cm <sup>-1</sup>	$\gamma$ CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , cm <sup>-1</sup>	$\nu$ OH <sup>-</sup> , cm <sup>-1</sup>
CaHAp [17, 113, 114, 115]	962 v	472 v	1031 – 1042 ļs 1091 – 1093 ļs	563 – 566 ļs 602 – 604 ļs	1417 vid	877 v	3569 – 3572 v
25%- CaSrHAp	957 plecs	nn	1042 pl	567 pl	1425 vid 1485 vid	871 v	nn
25%- CaSrHPerAp (100 °C)	957 v	469 ļv	1029 ļs 1093 ļs	562 s 603 s	1414 ļv 1456 ļv 1487 ļv	874 ļv	3566 ļv
25%- CaSrHPerAp (150 °C)	957 v	469 ļv	1029 ļs 1093 ļs	562 s 602 s	1414 ļv 1455 ļv 1484 ļv	874 ļv	3568 ļv
75%- SrCaHAp	951 plecs	nn	1040 pl	561 pl 594 pl	1419 vid 1479 vid	874 ļv	nn

Vibrācijas Paraugi	$\nu_1$ $\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{cm}^{-1}$	$\nu_2$ $\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{cm}^{-1}$	$\nu_3$ $\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{cm}^{-1}$	$\nu_4$ $\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{cm}^{-1}$	$\nu_{\text{as}}$ $\text{CO}_3^{2-}$ , $\text{cm}^{-1}$	$\gamma$ $\text{CO}_3^{2-}$ , $\text{cm}^{-1}$	$\nu$ $\text{OH}^-$ , $\text{cm}^{-1}$
75%- SrCaHPerAp (100 °C)	950 v	462 ļv	1038 ļs, pl 1081 plecs	562 s 596 s	1415 v 1444 v 1489 ļv	876 ļv	nn
75%- SrCaHPerAp (150 °C)	950 v	462 ļv	1036 ļs 1082 ļs	562 s 596s	1415 v 1444 v 1489 ļv	873 ļv	nn

Tabulā izmantotie apzīmējumi un saīsinājumi:  $\nu$  – svārstības;  $\nu_{\text{as}}$  – asimetriskas svārstības;  $\delta$  – deformācijas svārstības;  $\gamma$  – deformācijas svārstības vairākās plaknēs; ļs – ļoti stipras; s – stipras; vid – vidējas; v – vājas; ļv – ļoti vājas; nn – nav novērotas; pl – platas.



3.10.att. Hidrotermiski apstrādātu un neapstrādātu SrCaHAp FTIR spektri. Apzīmējumi: a – 25%-CaSrHAp; b – 25%-CaSrHPerAp (100 °C); c – 25%-CaSrHPerAp (150 °C); d – 75%-SrCaHPerAp (100 °C); e – 75%-SrCaHPerAp (150 °C); f – 75%-SrCaHAp

$\text{PO}_4^{3-}$  joniem raksturīga tetraedriska punktveida simetrijas grupa ( $T_d$ ) un četras vibrāciju modas:  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$ ,  $\nu_4$  [110, 111]. 25%-CaSrHAp uzrādīja divas intensīvas un platas absorbcijas joslas, kas atrodas pie viļņu skaitļiem  $567 \text{ cm}^{-1}$  un  $1042 \text{ cm}^{-1}$ , skatīt 3.10. attēlu (a). Šīs pazīmes attiecīgi pieder pie  $\text{PO}_4^{3-}$  grupas  $\nu_4$  un  $\nu_3$  vibrācijām. Platas, simetriskas absorbcijas joslas

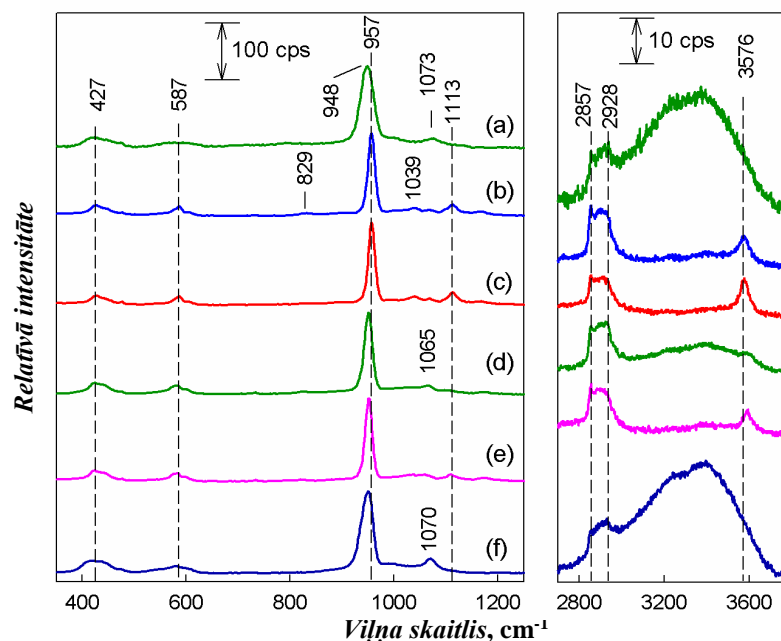
raksturīgas amorfiem paraugiem, tas ir, 25%-CaSrHAp ( $567\text{ cm}^{-1}$  un  $1042\text{ cm}^{-1}$ ) un 75%-SrCaHAp ( $1040\text{ cm}^{-1}$ ). To apstiprina arī difrakcijas ainas 3.6. attēlā. Plecs pie  $957\text{ cm}^{-1}$  ir saistīts ar  $\text{PO}_4^{3-}$  simetrisku stiepšanos ( $\nu_1$ ), kas aktivizējas infrasarkanajā spektrā. SrCaHAp paraugiem  $\nu_1\text{ PO}_4^{3-}$  josla atrodas pie mazāka viļņa skaitļa nekā CaHAp, to ietekmē molekulas masa. Arī palielinot Sr daudzumu HAp, samazinās viļņu skaitlis, pie kura novēro  $\nu_1\text{ PO}_4^{3-}$  absorbcijas maksimumu, skatīt 3.5. tabulu [14, 112, 113, 114]. Fosfātu joslas ir sadalītas divās daļās –  $562\text{ cm}^{-1}/603\text{ cm}^{-1}$  un  $1029\text{ cm}^{-1}/1093\text{ cm}^{-1}$  (3.10. attēla b piemērs), attiecīgi  $\nu_4$  un  $\nu_3$  modas. Šī pazīme ir raksturīga kristāliskiem paraugiem – hidrotermiski apstrādātiem HPerAp. Tas sakrīt ar iepriekš novēroto rentgendifraktogrammās.  $\text{PO}_4^{3-}$   $\nu_1$  mainās no  $947\text{ cm}^{-1}$  līdz  $957\text{ cm}^{-1}$ , literatūrā norādīts, ka CaHAp šo vibrāciju novēro pie  $962\text{ cm}^{-1}$  [113, 114, 115]. Palielinot Sr saturu apatītu paraugos, samazinājās viļņa skaitlis, pie kura novēroja  $\nu_4$  fosfātu vibrācijas, skatīt 3.5. tabulu.

Zemas intensitātes joslas pie  $871\text{ cm}^{-1}$  (simetriska locīšanās),  $1425\text{ cm}^{-1}$  un  $1485\text{ cm}^{-1}$  (asimetriska C–O stiepšanās) saistītas ar  $\text{CO}_3^{2-}$  vibrācijām [116, 117]. Karbonātajoniem raksturīgās joslas izteiktākas ir neapstrādātiem paraugiem, skatīt 3.10. attēlu (a un f). Joslas veidošanā pie  $871\text{ cm}^{-1}$  piedalās  $\text{HPO}_4^{2-}$ , tas norāda, ka iespējams SrCaHAp ir piemaisījums no sintēzes izejvielas –  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  [118, 119, 120]. Josla pie  $1649\text{ cm}^{-1}$  un  $1651\text{ cm}^{-1}$  ir saistīta ar adsorbētā ūdens molekulu deformācijas vibrāciju. Apatītu hidrotermiska apstrāde  $\text{H}_2\text{O}_2$  šķīduma klātbūtnē ievērojami samazinājusi  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  un adsorbētā ūdens joslas.

Salīdzinot 75%-SrCaHPerAp ( $100\text{ }^\circ\text{C}$  un  $150\text{ }^\circ\text{C}$ ) absorbcijas joslas un to maksimums, redzams, ka tās sakrīt vai nobīde ir nenozīmīga – mazāka par spektrometra izšķiršanu ( $\leq 2\text{ cm}^{-1}$ ). To pašu var attiecināt uz 25%-CaSrHPerAp ( $100\text{ }^\circ\text{C}$  un  $150\text{ }^\circ\text{C}$ ) paraugiem.

### 3.7. Apatītu funkcionālo grupu raksturošana, izmantojot Ramana spektroskopiju

SrCaHAp un SrCaHPerAp struktūras un funkcionālo grupu raksturošanai izmantoja Ramana spektrus, kas uzņemti „pirkstu nospiedumu” (*fingerprint*) apgabālā ( $350\text{ cm}^{-1}$  –  $1250\text{ cm}^{-1}$ ) un  $\text{OH}^-$  funkcionālās grupas apgabālā ( $2750\text{ cm}^{-1}$  –  $3690\text{ cm}^{-1}$ ). Ramana spektru funkcionālās grupas un viļņu skaitļi atainoti 3.11. attēlā un salīdzināti ar literatūras datiem 3.6. tabulā [112, 113, 121, 122, 123].



3.11.att. Hidrotermiski apstrādātu un neapstrādātu SrCaHAp Ramana spektri. Apzīmējumi: a – 25%-CaSrHAp; b – 25%-CaSrHPerAp (100 °C); c – 25%-CaSrHPerAp (150 °C); d – 75%-SrCaHPerAp (100 °C); e – 75%-SrCaHPerAp (150 °C); f – 75%-SrCaHAp

3.6. tabula

Apatītu funkcionālo grupu Ramana joslu maksimumi

Vibrācijas Paraugi	$\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ , $\text{cm}^{-1}$	$\nu_2 \text{PO}_4^{3-}$ , $\text{cm}^{-1}$	$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ , $\text{cm}^{-1}$	$\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$ , $\text{cm}^{-1}$	$\nu \text{OH}^-$ $\text{cm}^{-1}$
CaHAp	962 – 963 ļs	428 – 430 vid 446 – 448 vid	1031 v 1044 – 1048 vid 1070 – 1075 vid	578 – 580 vid 589 – 592 vid 607 – 609 vid	3567 – 3575 vid
25%- CaSrHAp	948,0 ļs, pl	423 vid, pl	nn nn 1073 v	581 v, pl	nn
25%- CaSrHPerAp (100 °C)	956,4 ļs	426 vid 448 plecs	nn 1039 vid 1066 v	579 vid, plecs 587 vid 605 v	3574,1 vid
25%- CaSrHPerAp (150 °C)	956,7 ļs	427 vid 445 plecs	nn 1040 vid 1068 v	576 plecs 587 vid 605 v	3576,3 vid
75%- SrCaHAp	949,8 ļs, pl	420 vid, pl 436 plecs	nn nn 1072 s	549 plecs 579 vid 601 plecs	nn

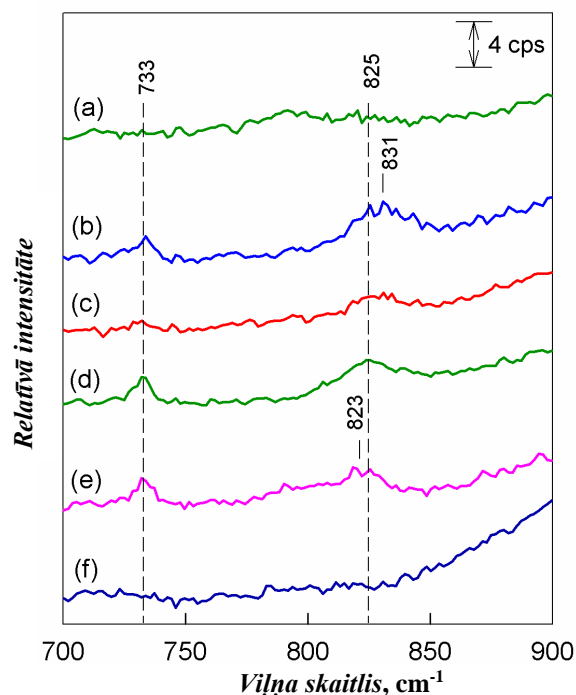
Vibrācijas Paraugi	$\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ , $\text{cm}^{-1}$	$\nu_2 \text{PO}_4^{3-}$ , $\text{cm}^{-1}$	$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ , $\text{cm}^{-1}$	$\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$ , $\text{cm}^{-1}$	$\nu \text{OH}^-$ $\text{cm}^{-1}$
75%- SrCaHPerAp (100 °C)	950,6 ļs	424 vid 439 plecs	nn 1032 plecs 1064 vid	556 plecs 580 vid 598 v	3592,6 v, pl
75%- SrCaHPerAp (150 °C)	951,1 ļs	423 vid 438 plecs	nn 1033 vid 1058 vid	nn 581 vid 598 v	3591,6 vid

Tabulā izmantotie apzīmējumi un saīsinājumi:  $\nu$  – svārstības; ļs – ļoti stipras; s – stipras; vid – vidējas; v – vājas; nn – nav novērotas; pl – platas.

Intensīvāko joslu „pirkstu nospiedumu” apgalbā veido fosfātu grupa ( $\nu_1$ ), platāku to uzrāda hidrotermiski neapstrādātie paraugi. 25%-CaSrHAp un 75%-SrCaHAp nenovēroja  $\nu \text{OH}^-$  joslu pie  $\sim 3576 \text{ cm}^{-1}$ , tās vietā redzama plata un intensīva josla, kas raksturo adsorbētā ūdens molekulas, skatīt 3.11 attēlu (a un f).

$\text{H}_2\text{O}_2$  šķīduma klātbūtnē apstrādātiem paraugiem novēroja šaurākas  $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$  un mazāk intensīvas adsorbētā ūdenim raksturīgās joslas. Ramana spektros redzams neliels organisko savienojumu piemaisījumu daudzums, C–H saites stiepšanās pie  $2857 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2$  un  $\text{CH}_3$  grupu vibrācijas pie  $2900 \text{ cm}^{-1}$ .

3.12. attēlā atainots  $700 \text{ cm}^{-1} - 900 \text{ cm}^{-1}$  apgabals, kurā SrCaHPerAp redzamas joslas pie  $823 \text{ cm}^{-1} - 831 \text{ cm}^{-1}$ , kas raksturīgas peroksīdjoniem. Literatūrā norādīts, ka O–O stiepes svārstības novērojamas  $750 \text{ cm}^{-1} - 850 \text{ cm}^{-1}$  intervālā [5, 17, 43, 124]. Šīs joslas nav redzamas 25%-CaSrHAp un 75%-SrCaHAp paraugiem (3.12. att. a un f), taču hidrotermiski apstrādātiem paraugiem novērojama sakarība – palielinoties hidrotermiskās apstrādes temperatūrai, samazinās peroksīdjoniem raksturīgās joslas intensitāte. Novērotā sakarība korelē ar peroksīdjonu saturu HPerAp paraugos.



3.12.att. Hidrotermiski apstrādātu un neapstrādātu SrCaHAp Ramana spektri, izgriezts un palielināts 700 cm<sup>-1</sup> – 900 cm<sup>-1</sup> apgabals. Apzīmējumi: a – 25%-CaSrHAp; b – 25%-CaSrHPerAp (100 °C); c – 25%-CaSrHPerAp (150 °C); d – 75%-SrCaHPerAp (100 °C); e – 75%-SrCaHPerAp (150 °C); f – 75%-SrCaHAp

3.7. tabulā kvantitatīvi raksturotas funkcionālās grupas, izmantojot Ramana spektros esošo joslu intensitātes un pilnos platumus pusaugstumā. Redzams, ka neapstrādātiem paraugiem daži lielumi netika novēroti vai to attiecība ir 0. FTIR un Ramana spektroskopijas mērījumus veica vienu reizi, tādēļ 3.7. tabulā norādītajiem datiem nav iespējams veikt datu statistisko apstrādi.

3.7. tabula

SrCaHAp un SrCaHPerAp relatīvi integrētās joslu intensitātes un pilnie platumi pusaugstumā no Ramana spektriem

Parametri, vibrācijas	$\frac{I_{O_2^{2-}}}{I_{PO_4^{3-}}} = \frac{\nu(O-O)}{\nu_1(PO_4^{3-})}$	<i>FWHM</i> ( $\nu_1, PO_4^{3-}$ ), cm <sup>-1</sup>	<i>FWHM</i> ( $\nu, OH^-$ ), cm <sup>-1</sup>
Paraugi			
25%-CaSrHAp	0	29,1	nn
25%-CaSrHPerAp (100 °C)	0,035	15,7	64,2
25%-CaSrHPerAp (150 °C)	0,015	14,8	51,9

Parametri, vibrācijas Paraugi	Ramana $\frac{I_{O_2^{2-}}}{I_{PO_4^{3-}}} = \frac{\nu(O-O)}{\nu_1(PO_4^{3-})}$	Ramana <i>FWHM</i> ( $\nu_1, PO_4^{3-}$ ), $cm^{-1}$	Ramana <i>FWHM</i> ( $\nu, OH^-$ ), $cm^{-1}$
75%-SrCaHAp	0	26,1	nn
75%-SrCaHPerAp (100 °C)	0,027	17,9	55,1
75%-SrCaHPerAp (150 °C)	0,019	15,6	45,9

Tabulā izmantotie apzīmējumi un saīsinājumi: *I* – relatīvi integrēta joslas intensitāte; *FWHM* – pilnais platumš pusaugstumā; nn – nav novērots.

Ramana spektru joslu analīze pie  $\sim 830\text{ cm}^{-1}$  apstiprināja, ka peroksīdjonu relatīvais daudzums samazinās, palielinot hidrotermiskās apstrādes temperatūru (no 100 °C uz 150 °C). Izmantojot Ramana joslu *FWHM* lielumu, var iegūt informāciju par HAp kristāliskumu [122]. Pēc paraugu hidrotermiskās apstrādes ievērojami samazinās *FWHM* ( $\nu_1 PO_4^{3-}$ ) vērtības. Arī apstrādes temperatūras paaugstināšana samazināja *FWHM* ( $\nu_1 PO_4^{3-}$ ) vērtības, tas norāda uz kristāliskuma pakāpes samazināšanos. Iegūtajiem rezultātiem ir sakrītoša tendence ar 1.13. attēlu, palielinot  $O_2^{2-}$  jonu saturu, samazinās  $\nu_1 PO_4^{3-}$  joslas intensitāte. Zinātniskajā literatūrā norādīts, ka zīdītāju kārtas pārstāvju kauliem un ACP *FWHM* ( $\nu_1 PO_4^{3-}$ ) vērtības attiecīgi ir  $\sim 19$  un  $\sim 34$  [125]. ACP un HAp fosfors ir vairāk nekā kaulos, tādēļ eksperimentāli iegūtās vērtības atrodas starp dabīgā kaula un ACP *FWHM* vērtībām.

Palielinot Sr saturu, samazinājās  $OH^-$  grupu relatīvais daudzums.  $OH^-$  joslu analīze parāda divas sakarības – palielinot Sr koncentrāciju, palielinājās viļņa skaitlis, pie kura novēro attiecīgās joslas maksimumu (skatīt 3.6. tabulu) un samazinājās *FWHM* vērtības.

## SECINĀJUMI

1. Izmantojot nogulsnešanas metodi ar  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  un  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  ūdens šķīdumiem, var iegūt hidroksilapatītus ar dažādu kristāliskuma pakāpi vēlamajās  $\frac{\text{Sr}}{(\text{Sr}+\text{Ca})}$  molārās attiecībās.
2. Hidrotermiski apstrādājot hidroksilapatītus  $\text{H}_2\text{O}_2$  šķīduma klātbūtnē 6 stundas 100 °C līdz 150 °C temperatūras intervālā,  $\text{OH}^-$  jonus ar  $\text{O}_2^{2-}$  var aizvietot daļēji: CaHAp 38%  $\text{OH}^-$  ar  $\text{O}_2^{2-}$  joniem, 25%-CaSrHAp – 75%  $\text{OH}^-$  jonu, 75%-SrCaHAp – vismaz 60%  $\text{OH}^-$  jonu.
3. Gram-negatīvā baktērija *Pseudomonas aeruginosa*, salīdzinot ar gram-pozitīvo – *Staphylococcus aureus*, ir jutīgāka pret hidrotermiski apstrādātiem paraugiem, īpaši pret tiem, kuriem raksturīgs augstāks peroksīdjonu saturs – 25%-CaSrHPerAp.
4. Hidrotermiski  $\text{H}_2\text{O}_2$  šķīduma klātbūtnē apstrādātiem paraugiem ir par 3% – 39% augstākas  $\delta^{18}\text{O}$  vērtības nekā neapstrādātiem paraugiem. Aprēķinātās un eksperimentāli iegūtās  $\text{O}_2^{2-}$  jonu masas daļas vērtības savstarpēji sakrīt kļūdu robežās.
5. Ar stronciju aizvietotu hidroksilapatītu FTIR spektros ir redzamas visas kalcija hidroksilapatīta raksturīgās absorbcijas joslas un stroncija ietekmes dēļ tās ir nobīdītas pie mazākiem viļņa skaitļiem.
6. Samazinot hidrotermiskās apstrādes temperatūru, Ramana spektros 25%-CaSrHPerAp un 75%-SrCaHPerAp palielinās peroksīdjonu raksturīgās joslas intensitāte, kas korelē ar peroksīdjonu saturu paraugos.

## IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Elliot, J. C.; Wilson, R. M.; Dowker, S. E. P. Apatite Structures. *Adv. X-Ray Anal.* **2002**, *45*, 172–181.
2. Dorozhkin, S. V. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials.* **2009**, *2*, 399–498.
3. Canillas, M.; Pena, P.; Aza, A. H.; Rodriguez, M. A. Calcium phosphate for biomedical applications. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio.* **2017**, *56*, 91–112.
4. Szczes, A.; Holysz, L.; Chibowski, E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *249*, 321–330.
5. Kazin, P.; Zysin, M.; Dinnebier, R.; Magdysyuk, O.; Tretyakov, Y.; Jansen, M. An unprecedented process of peroxide ion formation and its localization in the crystal structure of strontium peroxy-hydroxyapatite  $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{O}_2)_x(\text{OH})_{2-2x}$ . *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2012**, *638*, 909–919.
6. Kolmas, J.; Groszyk, E.; Kwiatkowska – Różycka, D. Substituted hydroxyapatites with antibacterial properties. *BioMed Research International.* **2014**, *2014*, 2–15.
7. Terra, J.; Dourado, E. R.; Eon, J.; Ellis, D. E.; Gonzalez, G.; Rossi, A. M. The structure of strontium-doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 568–577.
8. Apatite Mineral Data. <http://webmineral.com/data/Apatite.shtml#WrgCf4hubIV> (skatīts 05.01.2018.).
9. Yatonchai, C.; Wren, A. W.; Curran, D. J.; Hornez, J.; Towler, M. R. Comparison of the Weibull characteristics of hydroxyapatite and strontium doped hydroxyapatite. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials.* **2013**, *21*, 95–108.
10. Zhu, Y.; Zhang, X.; Chen, Y.; Xie, Q.; Lan, J.; Qian, M.; He, N. A comparative study on the dissolution and solubility of hydroxylapatite and fluorapatite at 25 °C and 45 °C. *Chem. Geol.* **2009**, *268*, 80-96.
11. Mucalo, M. *Hydroxyapatite (HAp) for biomedical applications*; Woodhead Publishing: Cambridge, 2015; pp 3–155.
12. Reyes-Gasga, J.; Martinez-Pineiro, E. L.; Bres, E. F. Crystallographic structure of human tooth enamel by electron microscopy and x-ray diffraction: hexagonal or monoclinical? *Journal of Microscopy.* **2012**, *248*, 102–109.
13. Chen, Z.; Liu, Y.; Mao, L.; Gong, L.; Sun, W.; Feng, L. Effect of cation doping on the structure of hydroxyapatite and the mechanism of defluoridation. *Ceram. Int.* **2018**, *44*, 6002–6009.

14. Bigi, A.; Boanini, E.; Capuccini, C.; Gazzano, M. Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals. *Inorganica Chimica Acta*. **2007**, *360*, 1009–1016.
15. Hydroxyapatite. <http://www.chemtube3d.com/solidstate/SShydroxyapatite.htm> (skatīts 03.03.2018.).
16. Landi, E.; Tampieri, A.; Celotti, G.; Sprio, S.; Sandri, M.; Logroscino, G. Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement. *Acta Biomaterialia*. **2007**, *3*, 961–969.
17. Huaguang, Y.; Zhanga, H.; Wangb, X.; Gub, Z.; Lib, X.; Denga, F. Local structure of hydroxy-peroxy apatite: A combined XRD, FT-IR, Raman, SEM, and solid-state NMR study. *J. Phys. Chem. Solids*. **2007**, *68*, 1863–1871.
18. Zhang, W.; Cao, N.; Chai, Y.; Xu, X.; Wang, Y. Synthesis of nanosize single-crystal strontium hydroxyapatite via a simple sol-gel method. *Ceram. Int.* **2014**, *40*, 16061–16064.
19. Kaygili, O.; Keser, S.; Kom, M.; Eroksuz, Y.; Dorozhkin, S. V.; Ates, T.; Ozercan, I. H.; Tatar, C.; Yakuphanoglu, F. Strontium substituted hydroxyapatites: Synthesis and determination of their structural properties, in vitro and in vivo performance. *Materials Science and Engineering C*. **2015**, *55*, 538–546.
20. Earl, J. S.; Wood, D. J.; Milne, S. J. Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite. *Journal of Physics*. **2006**, *26*, 268–271.
21. Synthesis method of hydroxyapatite. [https://www.researchgate.net/publication/281089917\\_Synthesis\\_methods\\_of\\_hydroxyapatite](https://www.researchgate.net/publication/281089917_Synthesis_methods_of_hydroxyapatite) (skatīts 03.03.2018.).
22. Orlovskii, V. P.; Komlev, V. S.; Barinov, S. M. Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics. *Inorg. Mater.* **2002**, *38*, 973–984.
23. Valkovska, V. Dažādu apatītu materiālu sintēze  $\delta^{18}\text{O}$  pētījumiem. Kursa darbs. LU Ķīmijas fakultāte, Rīga, 2017.
24. Šupová, M. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceram. Int.* **2015**, *41*, 9203–9231.
25. Pors-Nielsen, S. The biological role of strontium. *Bone*. **2004**, *35*, 583–588.
26. Kolmas, J.; Velard, F.; Jaguszewska, A.; Lemaire, F.; Kerdjoudj, H.; Ganfloff, S. C.; Kaflak, A. Substitution of strontium and boron into hydroxyapatite crystals: Effect on physicochemical properties and biocompatibility with human Wharton-Jelly stem cells. *Materials Science and Engineering C*. **2017**, *79*, 638–646.
27. Marques, C. F.; Olhero, S.; Abrantes, J. C. C.; Marote, A.; Ferreira, S.; Vieira, S. V.; Ferreira J. M. F. Biocompatibility and antimicrobial activity of biphasic calcium phosphate powders doped with metal ions for regenerative medicine. *Ceram. Int.* **2017**, *43*, 15719–15728.

28. Pilmane, M.; Salma-Ancane, K.; Loca, D.; Locs, J.; Berzina-Cimdina, L. Strontium and strontium ranelate: Historical review of some of their functions. *Mater. Sci. Eng., C*. **2017**, *78*, 1222–1230.
29. Wang, M.; Wang, Q.; Lu, X.; Wang, K.; Ren, F. Computer Simulation of Ions Doped Hydroxyapatite: A Brief Review. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* **2017**, *32*, 978–987.
30. Frangopol, P. T.; Mocanu, A.; Almasan, V.; Garbo, C.; Balint, R.; Borodi, G.; Bratu, I.; Horovitz, O.; Tomoaia-Cotisel, M. Synthesis and structural characterization of strontium substituted hydroxyapatites. *Revue Roumaine de Chimie*. **2016**, *61*, 337–344.
31. Querido, W.; Rossi, A. L.; Farina, M. The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches. *Micron*. **2016**, *80*, 122–134.
32. Pan, H. B.; Li, Z. Y.; Lam, W. M.; Wong, J. C.; Darvell, B. W.; Luk, K. D. K.; Lu, W. W. Solubility of strontium-substituted apatite by solid titration. *Acta Biomaterialia*, **2009**, *5*, 1678–1685.
33. Gross, K. A.; Jersova, A.; Viksna, A. Synthesis of peroxyapatite by hydrothermal processing. *Engineering Materials*. **2015**, *631*, 88–92.
34. Abert, J.; Bergmann, C.; Fischer, H. Wet chemical synthesis of strontium-substituted hydroxyapatite and its influence on the mechanical and biological properties. *Ceram. Int.* **2014**, *40*, 9195–9203.
35. Vandecandelaere, N.; Bosc, F.; Rey, C.; Drouet, C. Peroxide-doped apatites: Preparation and effect of synthesis parameters. *Powder Technol.* **2014**, *255*, 3–9.
36. McDonnell, G. The use of hydrogen peroxide for disinfection and sterilization applications, In: *PATAI's Chemistry of Functional Groups*; Marek, I., Ed.; John Wiley & Sons: Published Online, 2014; pp 1–34.
37. Linley, E.; Denyer, S. P.; McDonnell, G.; Simons, C.; Maillard, J. Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 1589–1596.
38. Trombe, J. C.; Montel, G. Some features of the incorporation of oxygen in different oxidation states in the apatitic lattice – I. *J. inorg. nucl. Chem.* **1978**, *40*, 15–21.
39. Trombe, J. C.; Montel, G. Some features of the incorporation of oxygen in different oxidation states in the apatitic lattice – II. *J. inorg. nucl. Chem.* **1978**, *40*, 23–26.
40. Skogareva, L.; Pilipenko, G.; Shabalova, I., Tripol'skaya, T. Peroxo derivatives of hydroxyapatite and calcium hydrophosphate. *Russ. J. Inorg. Chem.* **2011**, *56*, 673–679.

41. Osite, A.; Gross, K. A.; Viksna, A.; Prikulis, J.; Sainova, A. Investigation of hydrothermal processing of strontium peroxyapatite synthesis. *Recent Advances on Mechanics, Materials, Mechanical Engineering and Chemical Engineering*. **2015**, 75–79.
42. Simpson, R. D. Mineralogical notes: Oxygen-rich apatite. *Am. Mineral.* **1969**, *54*, 560–562.
43. Zhao, H.; Li, X.; Wang, J.; Qu, S.; Weng, J.; Zhang, X. Characterization of peroxide ions in hydroxyapatite lattice. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52*, 157–163.
44. Rey, C.; Trombe, J. C.; Montel, G. Some features of the incorporation of oxygen in different oxidation states in the apatitic lattice – III. *J. inorg. nucl. Chem.* **1978**, *40*, 27–30.
45. Valkovska, V. Pilnīgi un daļēji ar stronciju aizvietotu peroksiapatītu sintēze un to analīze. Bakalaura darbs. LU Ķīmijas fakultāte, Rīga, 2016.
46. Simchi, A.; Tamjid, E.; Pishbin, F.; Bocaccini, A. R. Recent progress in inorganic and composite coatings with bactericidal capability for orthopaedic applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. **2011**, *7*, 22–39.
47. Lushcak, V. I. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochemistry (Moscow)*. **2001**, *66*, 476–48.
48. Reinis, A. Staphylococcus epidermidis un Pseudomonas aeruginosa adhēzijas un kolonizācijas intensitātes noteikšana uz oriģināli sintezētu biomateriālu virsmas in vitro un in vivo pētījumos un to ietekme uz iekaisuma citokīnu ekspresiju audos. Promocijas darbs. RSU, Rīga, 2016.
49. Yoda, I.; Koseki, H.; Tomita, M.; Shida, T.; Horiuchi, H.; Sakoda, H.; Osaki, M. Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion. *BMC Microbiology*. **2014**, *14*, 1–7.
50. Breij, A.; Riool, M.; Kwakman, P. H. S.; Boer, L.; Cordfunke, R. A.; Drijfhout, J. W.; Cohen, O.; Emanuel, N.; Zaat, S. A. J.; Nibbering, P. H.; Moriarty, T. F. Prevention of *Staphylococcus aureus* biomaterial-associated infections using a polymer-lipid coating containing the antimicrobial peptide OP-145. *J. Controlled Release*. **2016**, *222*, 1–8.
51. Lin, Y.; Yang, Z.; Cheng, J.; Wang, L. Synthesis, Characterization and Antibacterial Property of Strontium Half and Totally Substituted Hydroxyapatite Nanoparticles. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* **2008**, *23*, 475–479.
52. Lin, Y.; Yang, Z.; Cheng, J. Preparation, Characterization and Antibacterial Property of Cerium Substituted Hydroxyapatite Nanoparticles. *Rare Earth*. **2007**, *25*, 452–456.
53. Noda, I.; Miyaji, F.; Ando, Y.; Miyamoto, H.; Shimazaki, T.; Yonekura, Y.; Miyazaki, M.; Mawatari, M.; Hotokebuchi, T. Next Generation Antibacterial Hydroxyapatite Coating:

- Antibacterial Activity of Ag Ions in Serum. *Journal of the International Society for Ceramics in Medicine*, **2011**, *1*, 1–3.
54. Pierce, C. G.; Srinivasan, A.; Ramasubramanian, A. K.; Lopez-Ribot, J. L. From Biology to Drug Development: New Approaches to Combat the Threat of Fungal Biofilms. In: *Microbial biofilms*; Ghannoum, M.; Parsek, M.; Whiteley, M.; Mukherjee, P. K., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2015; pp 376–377.
55. Chandra, J.; Patel, J. D.; Li, J.; Zhou, G.; Mukherjee, P. K.; McCormick, P. K.; Anderson, J. M.; Ghannoum, M. A. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 8795–8801.
56. Reinis, A.; Stunda, A.; Kroica, J.; Kuznecova, V.; Berzina-Cimdina, L.; Vetra, J.; Jakovlevs, D.; Rostoka, D. Staphylococcus epidermidis and Pseudomonas aeruginosa adhesion and colonisation intensity on a biomaterial with various crystallisation degrees and modified surfaces in an in vitro study. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2009**, *34*, 22.
57. Valkovska, V. Dažādu apatītu materiālu sintēze mikrobioloģisko īpašību izpētei. Kursa darbs. LU Ķīmijas fakultāte, Rīga, 2018.
58. Brooks, G. F.; Carroll, K. C.; Butel, J. S.; Morse, S. A.; Mietzner, T. A. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. The McGraw-Hill Companies, Inc. 2013; pp 199–206.
59. Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, A. M. *Medical microbiology*. Elsevier Science: Canada, 2016; pp 273–279.
60. Šturme, S. Staphylococcus aureus rezistence pret antimikrobajām vielām. Diplomdarbs. LU Medicīnas fakultāte, Rīga, 2017.
61. Balode, A. Meticilīnrezistentā Staphylococcus aureus molekulāri bioloģiskās īpatnības daudzprofilu stacionārā ārstētiem pacientiem Latvijā. Promocijas darbs. RSU klīniskā mikrobioloģija, Rīga, 2011.
62. Hamdan-Partida, A.; Sainz-Espuñes, T.; Bustos-Martínez, J. Characterization and persistence of Staphylococcus aureus strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community. *Journal of Clinical Microbiology.* **2010**, *48*, 1701–1705.
63. Vázquez-Sánchez, D.; Rodríguez-López, P. Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus*. In: *Staphylococcus aureus*; Fetsch, A., Ed.; Elsevier Science: London, 2017; pp 87–103.
64. Kalnina, D.; Gross, K. A.; Onufrijevs, P.; Dauksta, E.; Nikolajeva, V.; Stankeviciute, Z.; Kareiva, A. The Antimicrobial Action of Silver Halides in Calcium Phosphate. *Key Engineering Materials.* **2015**, *631*, 384–389.

65. Gross, K. A.; Kalnina, D.; Stankeviciute, Z.; Nikolajeva, V. Charge state of silver halide colloids determines the antibacterial activity in amorphous calcium phosphate. *Key Engineering Materials*. **2014**, 587, 74–79.
66. Pollack, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Principles and practices of infectious diseases*; Mandell, G. L.; Dolan, R.; Bennett, J. E., Eds.; Churchill Livingstone: New York, 1995; pp 1820–2003.
67. McCarter, Y. S. Antimicrobial Modes of Action. In: *Manual of antimicrobial susceptibility testing*; Coyle, M. B., Ed.; American Society for Microbiology: Washington, 2005; pp 25–63.
68. Diaz-Visurraga, J.; Gutiérrez, C.; Plessing, C.; Garcia, A. *Metal nanostructures as antibacterial agents*; Mendez-Vilas, A., Ed.; Formatex Research Center: Spain, 2011; Vol. 1, pp 210–218.
69. Bolouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. **2016**, 6, 71–79.
70. Qaiyumi, S. Macro- and microdilution methods of antimicrobial susceptibility testing, In: *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*; Schwalbe, R.; Steele-Moore, L.; Goodwin, A. C., Eds.; CRC Press: Boca Raton, London, New York, 2007, pp 75-79.
71. Stanic, V.; Dimitrijevic, S.; Antic-Stankovic, J.; Mitric, M.; Jokic, B.; Plecas, I. J.; Raicevic, S. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders. *Appl. Surf. Sci.* **2010**, 256, 6083–6089.
72. Ortez, J. H.; Rankin, I. D. Test methods. In: *Manual of antimicrobial susceptibility testing*; Coyle, M. B., Ed.; American Society for Microbiology: Washington, 2005; pp 25–63.
73. Chatzistavrou, X.; Velamakanni, S.; DiRenzo, K.; Lefkelidou, A.; Fenno, J. C.; Kasuga, T.; Boccaccini, A. R.; Papagerakis, P. Designing dental composites with bioactive and bactericidal properties. *Mater. Sci. Eng., C*. **2015**, 52, 267–272.
74. Wolf, M. F.; Coleman, K. P.; Lewerenz, G. M. In vitro assessment of cell and tissue compatibility. In: *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*; Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemonds, J. E., Eds.; Academic Press: Canada, 2013; pp 593–608.
75. Komisijas paziņojums saistībā ar Padomes Direktīvas 90/385/EEK īstenošanu par dalībvalstu tiesību aktu tuvināšanu attiecībā uz aktīvām implantējamām medicīnas ierīcēm. Paziņojums C 173/92, 13.05.2016., Eiropas Komisija. <http://eur-lex.europa.eu> [skatīts 31.12.2017.].

76. Anderson, J. M.; Schoen, F. J. In vivo assessment of tissue compatibility. In: *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*; Ratner, B. D.; Hoffman, A. S. Schoen, F. J.; Lemonds, J. E., Eds.; Academic Press: Canada, 2013; pp 609–616.
77. Inayat-Hussain, S.; Rajab, N. F; Siew, E. L. In vitro testing of biomaterials toxicity and biocompatibility. In: *Cellular response to biomaterials*; Silvio, E. D, Ed.; Woodhead Publishing: England, 2008; pp 508–537.
78. Basu, B. *Biomaterials science and tissue engineering: principles and methods*; Cambridge University Press: United Kingdom, 2017; pp 312–313.
79. Hoefs, J. *Stable isotope geochemistry*; Springer: Berlin, 2009; pp 4 – 206.
80. Clark, I., D.; Fritz, P. *Environmental isotopes in hydrogeology*; Lewis Publishers: New York, 1997; pp 1–15.
81. Carter, J. F.; Barwick, V. J. *Good practice guide for isotope ratio mass spectrometry*; FIRMS, 2011; pp 2–18.
82. Kohn, M. J.; Thure, E. C. Stable isotope compositions of biological apatite. In: *Phosphates: geochemical, geobiological, and materials importance*; Kohn, M. J.; Rakovan, J.; Hughes, J. M., Eds.; Mineralogical Society of America: Washington, 2002; Vol. 48, pp 455–488.
83. Metcalfe, J. Z.; Longstaffe, F. J.; White, C. D. Method-dependent variations in stable isotope results for structural carbonate in bone bioapatite. *Journal of Archaeological Science*. **2009**, *36*, 110–121.
84. Chesson, L. A. Tipple, B. J.; Howa, J. D.; Bowen, G. J.; Barnette, J. E.; Cerling, T. E.; Ehleringer, J. R. Human-related forensic applications of stable isotope analysis. In: *Treatise on Geochemistry*; Turekian, K. K.; Holland, H. D., Eds.; Elsevier: Oxford, 2014; Vol. 14, pp 302–303.
85. Krouse, H. R. Isotope Ratio Mass Spectrometry. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*; Meyers, R. A., Ed.; Wiley&Sons: New York, 2000; Vol. 13, pp 11774–11795.
86. Fry, B. *Stable isotope ecology*; Springer-Verlag: New York, 2006; 21–39.
87. Brenna, T. J.; Corso, N. T.; Tobias, H. J.; Caimi, J. R. High-precision continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*. **1997**, *16*, 227–258.
88. Thermo scientific TC/EA – high temperature conversion elemental analyzer. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IQLAAEGAATFAETMALU> (skatits 10.04.2017.).
89. Ermrich, M.; Opper, D. *XRD for the analyst. Getting acquainted with the principles*; PANalytical: Almelo, 2013; pp 7–72.

90. Jenkins, R.; Snyder, R. L. Instruments for the measurement of powder patterns. In: *Introduction to X-ray Powder Diffractometry*; Winefordner, J. D., Ed.; Wiley: New York, 1996, pp 178–187.
91. Cockcrfot, J. K.; Fitch, A. N. Experimental Setups. In: *Powder diffraction: Theory and Practice*; Dinnebier, R. E.; Billinge, S. J. L., Eds.; RSC Publishing: Cambridge, 2008, pp 20–57.
92. Introduction to X-ray Powder Diffraction. <http://epswww.unm.edu/media/pdf/01-XRD-Intro.pdf> (skatīts 28.03.2018.).
93. Rey, C. Characterization of Ca-P biomaterials. In: *Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems*; Amjad, Z., Ed.; Springer: New York, 1998; pp 232–236.
94. Stuart, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*; Wiley: New York, 2004; pp 1–70.
95. Brangule, A. Furjē transformācijas infrasarkanās spektroskopijas pielietojums sintezēto un dabisko kalcijs fosfātu analīzē. Promocijas darbs. RTU Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte, Rīga, 2017.
96. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*; Thomson Brooks Cole: Belmont, 2007; pp 430–495.
97. FTIR instruments. <https://www.chromacademy.com/lms/sco533/12-infrared-spectroscopy-FTIR-instruments.html?fChannel=14&fCourse=77&fSco=533&fPath=sco533/12-infrared-spectroscopy-FTIR-instruments.html> (skatīts 30.03.2018.).
98. Infrasarkanā Furje spektroskopija. [https://www.cfi.lu.lv/fileadmin/user\\_upload/lu\\_portal/projekti/cfi/Studentiem/laboratorijas\\_darbi/Infrasarkan%C3%A1\\_Furje\\_spektroskopija.pdf](https://www.cfi.lu.lv/fileadmin/user_upload/lu_portal/projekti/cfi/Studentiem/laboratorijas_darbi/Infrasarkan%C3%A1_Furje_spektroskopija.pdf) (skatīts 02.04.2018.).
99. Gremlich, H. U. Infrared and Raman Spectroscopy. In: *Handbook of Analytical Techniques*; Gunzler, H.; Williams, H., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, 2001; 465–503.
100. Subramanian, A.; Rodriguez-Saona, L. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. In: *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*; Sun, D., Ed.; Academic Press: New York, 2009, pp 145–178.
101. Chukanov, N. V.; Chervonnyi, A. D. *Infrared Spectroscopy of Minerals and Related Compounds*; Springer: Switzerland, 2016; pp 1–11.
102. Berzina-Cimdina, L.; Borodajenko, N. Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: *Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology*; Theophanides, T., Ed.; InTech: China, 2012, pp 123–148.

103. Gross, K.; Pluduma, L.; Demnati, I.; Grossin, D.; Berzina-Cimdina, L.; Rey, C. Thermal Analysis the Hydroxyl Concentration in Hydroxyapatite. 23rd European Conference on Biomaterials 2010 (ESB 2010), Tampere, Finland, September 11-15, 2010; pp 176.
104. Raman Spectroscopy Basics. [http://web.pdx.edu/~larosaa/Applied\\_Optics\\_464-564/Projects\\_Optics/Raman\\_Spectroscopy/Raman\\_Spectroscopy\\_Basics\\_PRINCETON-INSTRUMENTS.pdf](http://web.pdx.edu/~larosaa/Applied_Optics_464-564/Projects_Optics/Raman_Spectroscopy/Raman_Spectroscopy_Basics_PRINCETON-INSTRUMENTS.pdf) (skatīts 07.04.2018.).
105. Smith, E.; Dent, G. *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*; Wiley: Chichester, 2005; Vol. 1, pp 3–135.
106. Theory of Raman Scattering. <http://bwtek.com/raman-theory-of-raman-scattering/#> (skatīts 12.04.2018.).
107. Guillaume, F. N. New approaches to understand conductive and polar domain walls by Raman spectroscopy and low energy electron microscopy. Ph.D. Thesis, Luxembourg Institute of Science and Technology, Belvaux, 2016.
108. Larkin, P. J. Basic Principles. In: *Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation*; Morrissey, K., Ed.; Elsevier: Amsterdam, Oxford, Cambridge, 2018; pp 7–28.
109. Valkovska, V.; Osīte, A.; Buša, L.; Nikolajeva, V. Characterization of Hydrothermal Processing Influence on Strontium Substituted Apatite by Investigating Stable Oxygen Isotope Ratio and Antibacterial Activity of Obtained Peroxyapatite. *Key Engineering Materials*. **2018**, 762, 14–18.
110. Jastrzębski, W.; Sitarz, M.; Rokita, M.; Bułat, K. Infrared spectroscopy of different phosphates structures. *Spectrochim. Acta, Part A*. **2011**, 79, 722–727.
111. Posset, U.; Löcklin, E.; Thull, R.; Kiefer, W. Vibrational spectroscopic study of tetracalcium phosphate in pure polycrystalline form and as a constituent of a self-setting cement. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, 40, 640–645.
112. O'Donnell, M. D.; Fredholm, Y.; Rouffignac, A.; Hill, R. G. Structural analysis of a series of strontium-substituted apatites. *Acta Biomaterialia*. **2008**, 4, 1455–1464.
113. Karampas, I. A.; Kontoyannis, C. G. Characterization of calcium phosphates mixtures. *Vibr. Spectrosc.* **2013**, 64, 126–133.
114. Rehman, I.; Bonfield, W. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **1997**, 8, 1–4.
115. Frasnelli, M.; Cristofaro, F.; Sglavo, V. M.; Diré, S.; Callone, E.; Ceccato, R.; Bruni, G.; Cornaglia, A. I.; Visai, L. Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration. *Mater. Sci. Eng., C*. **2017**, 71, 653–662.

116. Pereiro, I.; Rodríguez-Valencia, C.; Serra, C.; Solla, E. L.; Serra, J.; González, P. Pulsed laser deposition of strontium-substituted hydroxyapatite coatings. *Appl. Surf. Sci.* **2012**, *258*, 9192–9197.
117. Shamim, M.; Dana, K. Dependence of bonding interactions in layered double hydroxides on metal cation chemistry. *J. Mol. Struct.* **2016**, *1125*, 27–35.
118. Ulian, G.; Valdrè, G.; Corno, M.; Ugliengo, P. The vibrational features of hydroxyapatite and type A carbonated apatite: A first principle contribution. *American Mineralogist.* **2013**, *98*, 752–759.
119. Li, Z. Y.; Lam, W. M.; Yang, C.; Xu, B.; Ni, G. X.; Abbah, S. A.; Cheung, K. M. C.; Luk, K. D. K.; Lu, W. W. Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. *Biomaterials.* **2007**, *28*, 1452–1460.
120. Shimamura, A.; Jones, M. I.; Kanezaki, E.; Metson, J. B. Complete desorption of interlayer hydrogen phosphate in Mg/Al-layered double hydroxides by means of anion exchange with 1-octanesulfonate. *J. Mater. Sci.* **2012**, *47*, 1142–1147.
121. Liao, J.; Li, Y.; Guan, X.; Liu, J.; Zhang, Y.; Xie, Y.; Yang, Z.; Duan, X.; Zhou, A.; Zhu, J. Structural characterization of microwave-assisted solution-synthesized strontium-substituted hydroxyapatite. *Nano.* **2016**, *11*, 1–9.
122. Sofronia, A. M.; Baies, R.; Anghel, E. M.; Marinescu, C. A.; Tanasescu, S. Thermal and structural characterization of synthetic and natural nanocrystalline hydroxyapatite. *Mater. Sci. Eng., C.* **2014**, *43*, 153–163.
123. Saber-Samandari, S.; Alamara, K.; Saber-Samandari, S.; Gross, K. A. Micro-Raman spectroscopy shows the coating process affects the characteristics of hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia.* **2013**, *9*, 9538–9546.
124. Vacque, V.; Sombret, B.; Huvenne, J. P.; Legrand, P.; Suc, S. Characterization of the O–O peroxide bond by vibrational spectroscopy. *Spectrochim. Acta, Part A.* **1997**, *53*, 55–66.
125. Grauw, C. J.; Brujin, J. D.; Otto, C.; Greve, J. Investigation of bone and calcium phosphate coatings and crystallinity determination using Raman microspectroscopy. *Cells and Materials.* **1996**, *6*, 57–62.
126. Hazard Communication Standard Pictogram. [https://www.osha.gov/Publications/HazComm\\_QuickCard\\_Pictogram.html](https://www.osha.gov/Publications/HazComm_QuickCard_Pictogram.html) (skatīts 19.04.2018.).

## PATEICĪBAS

Izsaku pateicību Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātes Analītiskās un Fizikālās ķīmijas katedru, Bioloģijas fakultātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedras un Viļņas Universitātes Ķīmijas fakultātes kolēģiem par sadarbību maģistra darba izstrādē, īpaši:

- Mag. chem., pētniecei Laumai Bušai par  $\delta^{18}\text{O}$  vērtību noteikšanu;
- Asoc. prof., Dr. biol. Vizmai Nikolajevai par antibakteriālo īpašību noteikšanu;
- Dr. habil. Gediminas Niaura un prof., Dr. habil. Aivaras Kareiva par FTIR un Ramana spektru uzņemšanu.

## **Pielikumi**

GHS piktogrammu atšifrējums



GHS02 – uzliesmojošs;



GHS03 – oksidētājs;



GHS05 – kodīgs;



GHS07 – kaitīgs, kairinošs;

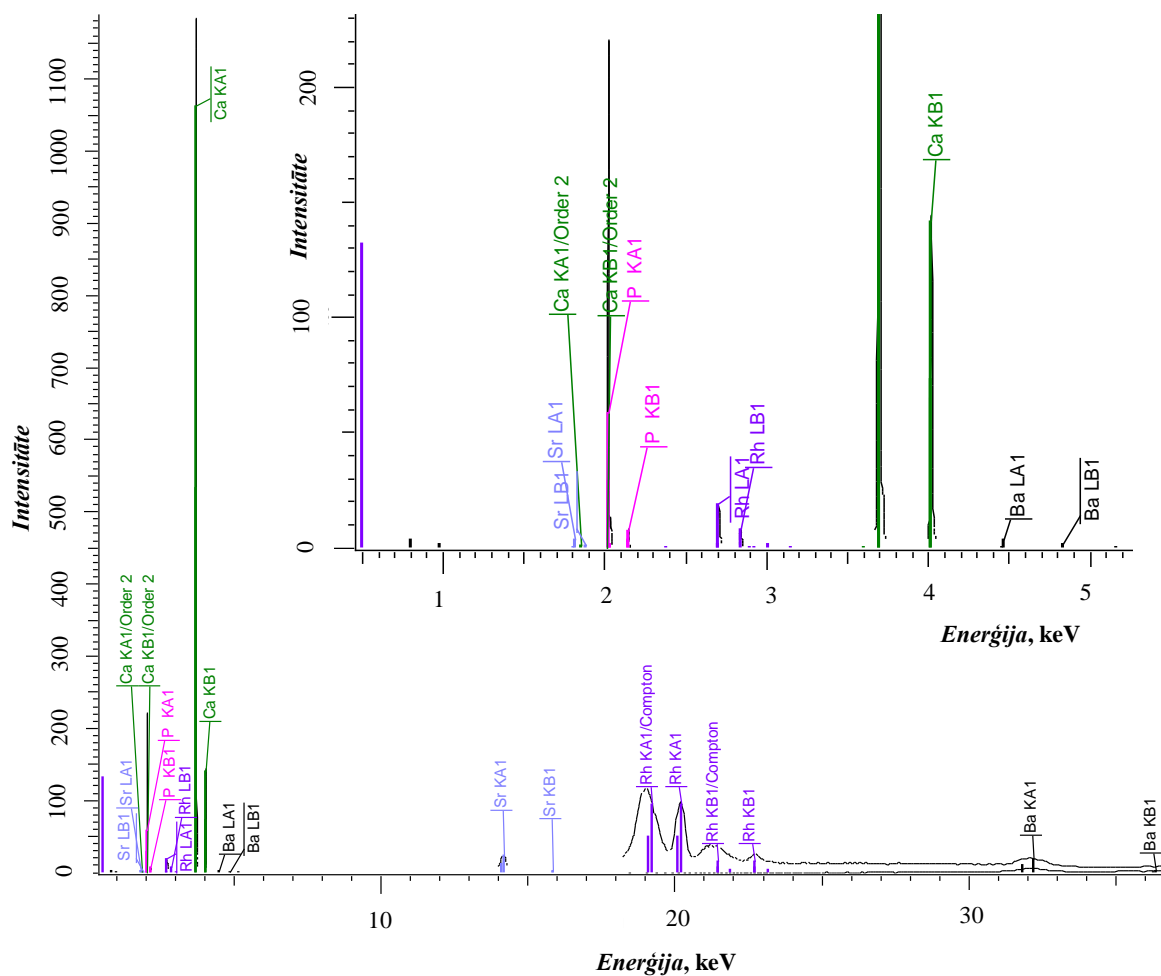


GHS08 – bīstams veselībai;

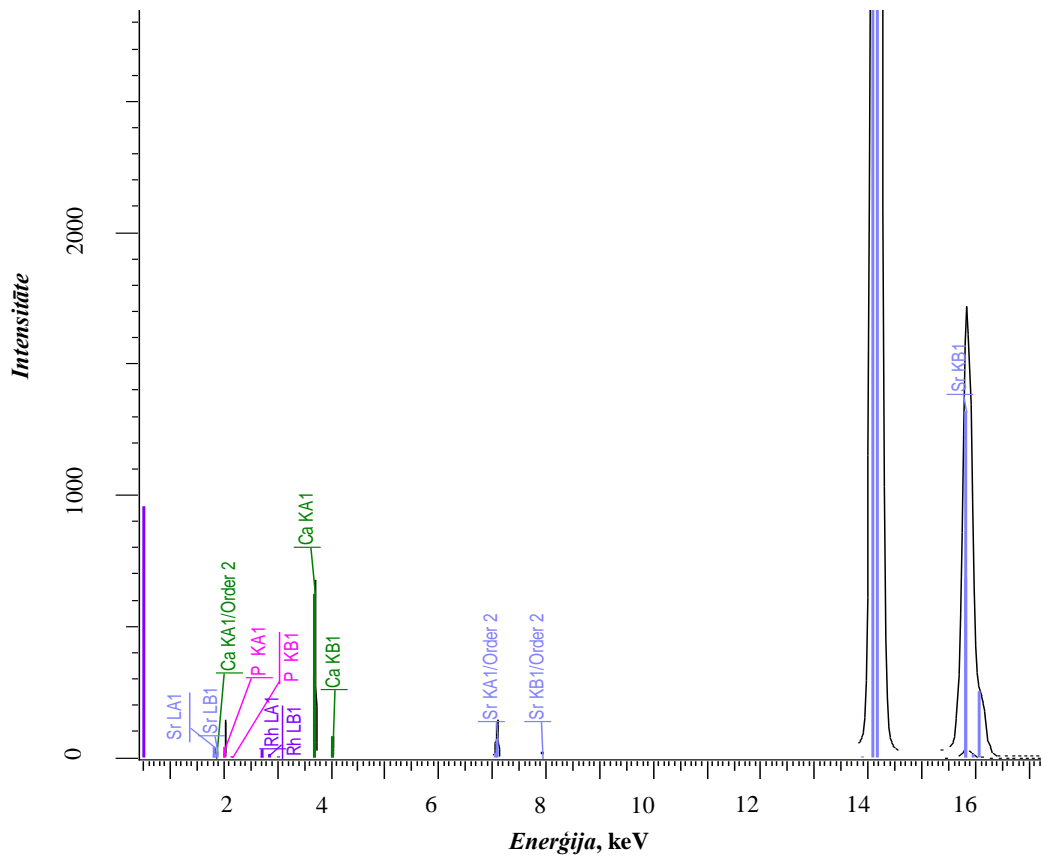


GHS09 – bīstams videi [126].

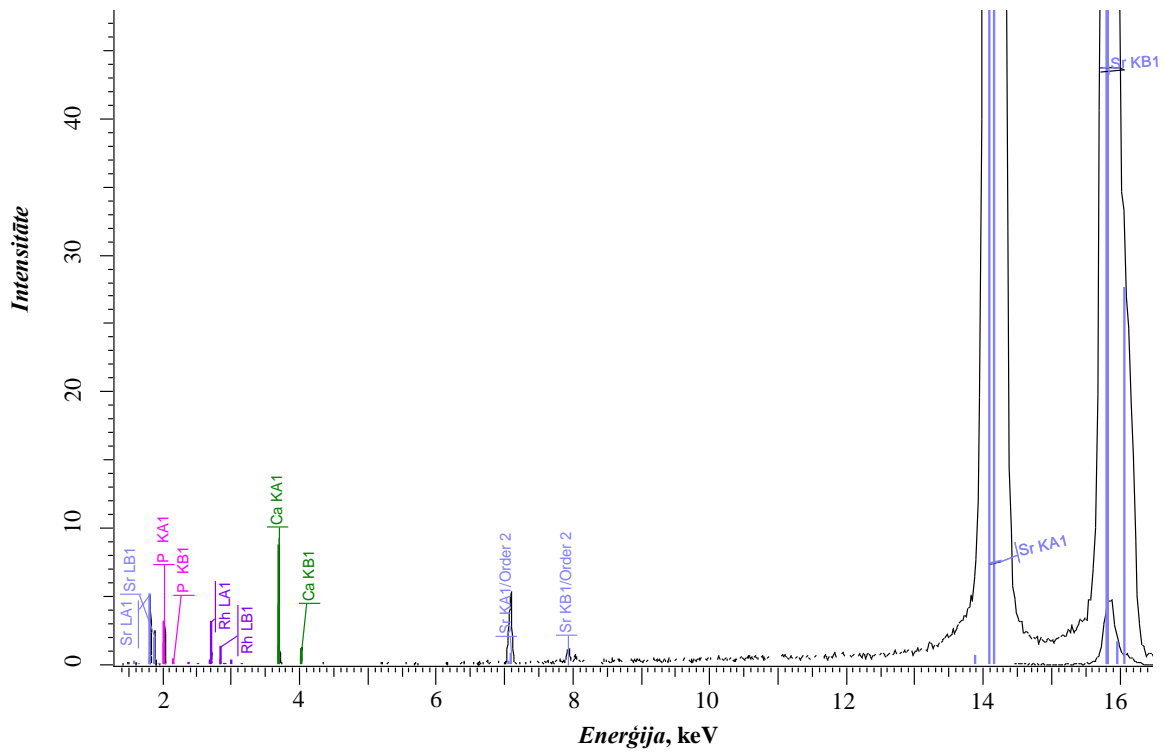
## WD-XRF spektri



1. att. CaHAp rentgenspektrs



2. att. 25%-CaSrHAp rentgenspektrs



3. att. 75%-SrCaHAp rentgenspektrs

## HYDROTHERMAL PROCESSING OF DIFFERENT CALCIUM PHOSPHATES BY H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> AND THEIR INVESTIGATION BY LIGHT STABLE ISOTOPE RATIO MASS SPECTROMETRY

**Agnese Osīte, Valda Valkovska, K. Treigūte, Lauma Buša**

*University of Latvia, Faculty of Chemistry, Jelgavas Str. 1, Riga, Latvia  
e-mail: agnese.osite@lu.lv*

Calcium phosphates as biomaterials are used already for several decades. Of particular importance and more essential is a wide range of clinical applications – both for coating of metallic implants and in bone grafts for bone regeneration. Among all the calcium orthophosphate representatives' hydroxyapatite (HAp) and tricalcium phosphates (TCP) are the most promising biomaterials. Nevertheless mammals bone is a very complicated hierarchical material, though chemically synthesized biomaterials represent almost excellent chemical similarity to inorganic phase of biological apatites [1]. Although synthetic HAp and TCP has some shortcomings as weak antibacterial property – the undesirable infection threats could be minimize by improving properties of the above mentioned biomaterials [2]. One of the widely used approaches for properties' improvement is incorporation of different ions, since the apatite lattice is very tolerant of substitutions. Hydrogen peroxide is commonly used as effective disinfectant and it is also found in the human body – it is generated by phagocytes to modulate the inflammatory processes, but high concentrations for internal use can damage cells which are involved in bone replacement. Low peroxy ion concentration and slow release could provide additional antibacterial activity of synthesized biomaterials.

The current research focused on the peroxide ion incorporation in calcium phosphates. Different materials – strontium hydroxyapatite (SrHAp), hydroxyapatite (HAp), tricalcium phosphate (TCP) and calcium phosphate were exposed 50% wt. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a closed hydrothermal steel vessel system under mild conditions at 150 °C. The content of hydrogen peroxide was determined by permanganometry and continuous flow isotope ratio mass spectrometry was used to determine δ<sup>18</sup>O values for treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and untreated calcium phosphates.

Sample	ω(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), %	δ <sup>18</sup> O, ‰	S <sub>n</sub> , ‰
75%-SrCaHAp	-	15.43	0.19
75%-SrCaPerAp	2.01	16.52	0.16
HAp	-	13.2	0.3
HPerAp	1.30	16.7	0.1
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> untreated	-	16.90	0.40
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> treated	0.92	19.86	0.02
TCP untreated	-	19.2	0.2
TCP treated	0.50	20.2	0.2

**Table** ωH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and δ<sup>18</sup>O values of treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and untreated apatite materials

### References

- [1] Mucalo, M. *Hydroxyapatite (HAp) for biomedical applications*. 2015, 3-155.  
[2] Kolmas, J.; Groszyk, E.; Kwiatkowska – Różycka, D. *BioMed Research International*. 2014, 2-15

## THE EFFECTS OF HYDROTHERMAL PROCESSING IN PRESENCE OF H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF STRONTIUM SUBSTITUTED APATITE

### HIDROTERMISKĀS APSTRĀDES H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> KLĀTBŪTNĒ IETEKME UZ STRONCIJU AIZVIETOTU APATĪTU ANTIBAKTERIĀLO AKTIVITĀTI

Valda Valkovska<sup>1</sup>, Agnese Osīte<sup>1</sup>, Vizma Nikolajeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Chemistry, University of Latvia, Jelgavas Street 1, Riga, LV-1004, Latvia

<sup>2</sup> Faculty of Biology, University of Latvia, Jelgavas Street 1, Riga, LV-1004, Latvia

E-mail: valkovska.valda@gmail.com

Hydroxyapatite (HAp) is a biocompatible material, which is widely used for biomedical applications – usually for coatings of metallic implants and bone substitute. Synthetic HAp is chemically similar to the inorganic phase of vertebrate bones. Still some disadvantages of biomaterial are highlighted – weak antibacterial and mechanical properties. Cationic and anionic substitutions of HAp are assumed as one of the most appropriate strategies to improve these properties [1, 2].

The aim of the current research is to improve antibacterial activity of HAp by the cationic substitution and the peroxide ion incorporation in CaHAp and partially substituted strontium hydroxyapatite (SrCaHAp). The synthesized samples displayed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. The hydrothermal processing of HAp and SrCaHAp increases the antibacterial activity against both types of bacteria. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of microbiology tests are shown in Table 1.

Table 1  
The MIC, MBC and values of the synthesized apatites

Sample	<i>S. aureus</i> MIC, MBC, [mg/mL]	<i>P. aeruginosa</i> MIC, MBC, [mg/mL]	$\omega_{\text{H}_2\text{O}_2}$ , [%]
CaHAp	–	>107	–
CaPerAp (100 °C)	54	54	1.32 ± 0.08
CaPerAp (150 °C)	54	54	0.98 ± 0.07
25%-SrCaHAp	121	120	–
25%-SrCaPerAp (100 °C)	40	26	1.80 ± 0.11
25%-SrCaPerAp (150 °C)	54		1.18 ± 0.05
75%-SrCaHAp	193	>220	–
75%-SrCaPerAp (100 °C)	63	33	1.44 ± 0.09
75%-SrCaPerAp (150 °C)	52	52	0.67 ± 0.07

#### References:

- [1] Mucalo, M. *Hydroxyapatite (HAp) for biomedical applications*. 2015, 3–155.
- [2] Šupová, M. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceram. Int.* 2015, 41, 9203–9231.

Tēzes Rīgas Tehniskās universitātes 58. Starptautiskajā zinātniskajā konferencē „*Materials science and applied chemistry, MSAC 2017*”

## **Characterization of hydrothermal processing influence on strontium substituted apatite by investigation stable oxygen isotope ratio and antibacterial activity of obtained peroxyapatite**

Valda Valkovska<sup>1,a \*</sup>, Agnese Osīte<sup>2,b</sup>, Lauma Buša<sup>3,c</sup> and Vizma Nikolajeva<sup>4,d</sup>

<sup>1,2,3</sup> Faculty of Chemistry, University of Latvia, Latvia, Jelgavas street 1, Riga, LV-1004

<sup>4</sup> Department of Microbiology and Biotechnology, University of Latvia, Jelgavas street 1, Riga, LV-1004, Latvia

<sup>a</sup>valkovska.valda@gmail.com, <sup>b</sup>agnese.osite@lu.lv, <sup>c</sup>lauma.busa@lu.lv, <sup>d</sup>vizma.nikolajeva@lu.lv

**Keywords:** Strontium substituted hydroxyapatite, peroxyapatite, hydrothermal processing, hydrogen peroxide, stable oxygen isotope, antibacterial activity.

### **Introduction**

Nowadays hydroxyapatite (HAp) is a bioactive, biocompatible material, which is still intensively investigated due to its key properties – fundamentally – chemical similarity to inorganic phase of vertebrate bones. Osteoconductive capabilities and biocompatibility are features, why it is extensively used in biomedicine as bone substitute and material of dental enamel remineralization, as well as it is being developed for use in tissue engineering [1].

Still some disadvantages of biomaterial are highlighted – weak mechanical and antibacterial properties [2]. One of the strategies to overcome weaknesses of HAp and improve its properties is cationic and anionic substitutions. Strontium (Sr) is an essential trace element, which improves the mechanical properties of the HAp, induces the formation and inhibits the resorption of bone tissue [2, 3]. Mainly solution of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is used as disinfectant because it has an antibacterial effect. In the human body H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is generated by phagocytes to modulate the inflammatory processes. Inclusion of low peroxide ion concentration in HAp structure could provide additional antibacterial activity [4].

Isotopic profile of substances is a representative and unique parameter to determine their history and origin. The stable oxygen and carbon isotope compositions ( $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ) of bioapatite in bones and teeth have been used to research physiology, diet, migration and ancient climate. Up to now  $\delta^{18}\text{O}$  compositions of synthetic HAp have been slightly investigated [5].

The aim of the current research is to improve antibacterial activity of HAp by the cationic substitution and the peroxide ion incorporation in host materials – HAp and partially substituted strontium HAp, which were obtained by wet chemical synthesis method. These host materials were subjected the hydrothermal processing at 100 °C and 150 °C temperature by 50% wt. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions. The content of hydrogen peroxide in PerAp was determined by permanganometry.

Reagents used in HAp synthesis and synthesized compounds were analyzed by thermal conversion elemental analyser – isotope ratio mass spectrometer. Antibacterial properties of apatites were investigated using *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* bacteria.

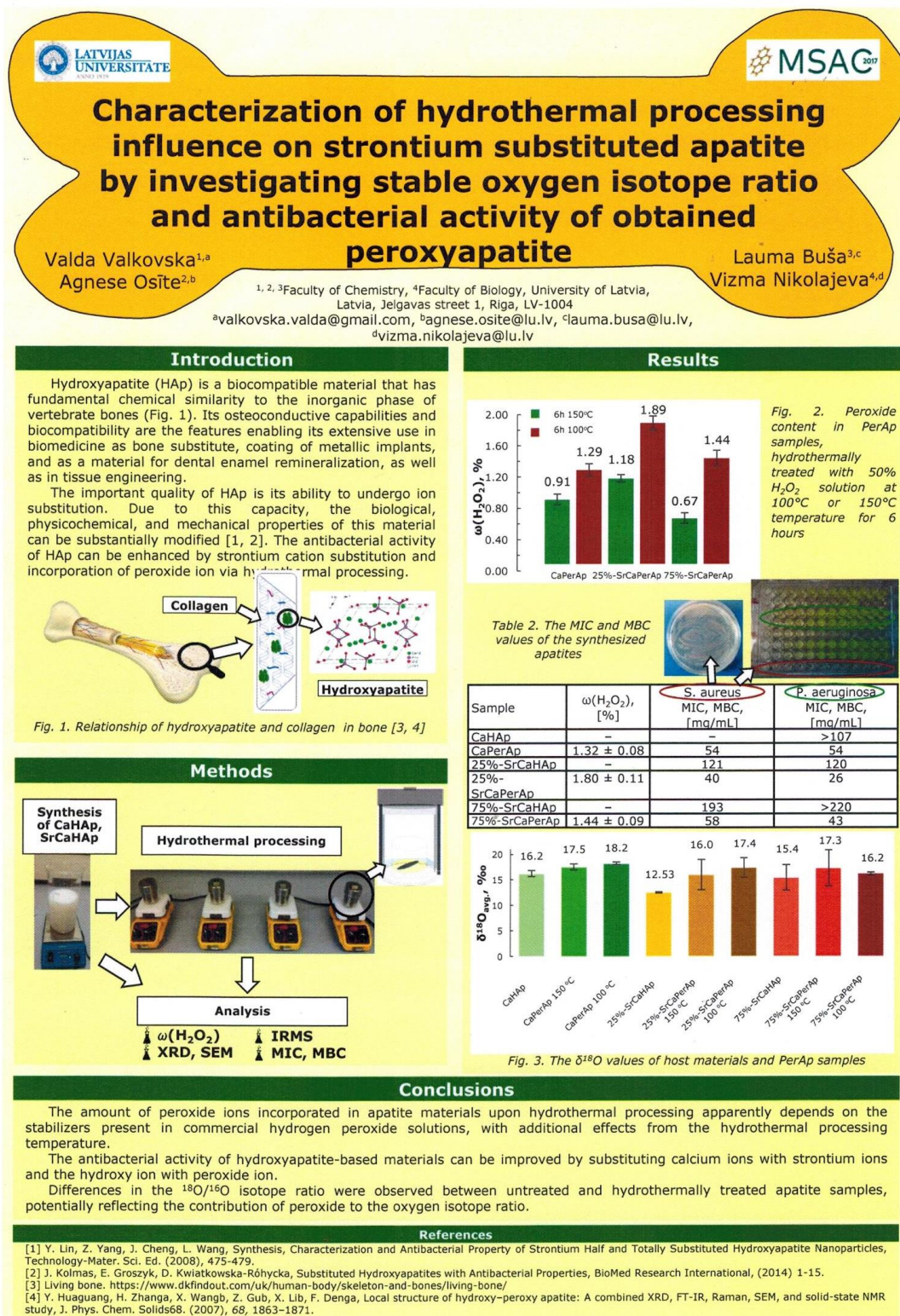
Table 1. Minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration of synthesized apatites

Sample	$\omega_{\text{H}_2\text{O}_2}$ , %	<i>P. aeruginosa</i> MIC, MBC, mg/mL	<i>S. aureus</i> MIC, MBC, mg/mL
HAp	–	>107	–
HPerAp	1.32 ± 0.08	54	54
25%-SrCaHAp	–	120	121
25%-SrCaPerAp	1.80 ± 0.11	26	40
75%-SrCaHAp	–	>220	193
75%-SrCaPerAp	1.44 ± 0.09	43	58

## References

- [1] Y. Lin, Z. Yang, J. Cheng, L. Wang, Synthesis, Characterization and Antibacterial Property of Strontium Half and Totally Substituted Hydroxyapatite Nanoparticles, *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* (2008) 475-479.
- [2] J. Kolmas, E. Groszyk, D. Kwiatkowska-Róhycka, Substituted Hydroxyapatites with Antibacterial Properties, *BioMed Research International*, (2014) 1-15.
- [3] A. Bigi, E. Boanini, C. Capuccini, M. Gazzano, Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals, *Inorg. Chim. Acta.* 360 (2007) 1009-1016.
- [4]. A. Osite, K.A. Gross, A. Viksna, J. Prikulis, A. Sainova, Investigation of Hydrothermal Processing of Strontium Peroxyapatite Synthesis, *Recent Advances on Mechanics, Materials, Mechanical Engineering and Chemical Engineering* (2015) 75-79.
- [5] J.Z. Metcalfe, F.J. Longstaffe, C.D. White, Method-dependent variations in stable isotope results for structural carbonate in bone bioapatite, *Journal of Archaeological Science* 36 (2009) 110-121.

Stenda referāts „Characterization of hydrothermal processing influence on strontium substituted apatite by investigating stable oxygen isotope ratio and antibacterial activity of obtained peroxyapatite”



Publikācija „Characterization of Hydrothermal Processing Influence on Strontium Substituted Apatite by Investigating Stable Oxygen Isotope Ratio and Antibacterial Activity of Obtained Peroxyapatite”

Key Engineering Materials  
ISSN: 1662-9795, Vol. 762, pp 14-18  
doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.762.14  
© 2018 Trans Tech Publications, Switzerland

Submitted: 2017-08-10  
Revised: 2017-09-25  
Accepted: 2017-10-14  
Online: 2018-02-05

**Characterization of Hydrothermal Processing Influence on Strontium Substituted Apatite by Investigating Stable Oxygen Isotope Ratio and Antibacterial Activity of Obtained Peroxyapatite**

Valda Valkovska<sup>1,a\*</sup>, Agnese Osīte<sup>1,b</sup>, Lauma Buša<sup>1,c</sup>, Vizma Nikolajeva<sup>2,d</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Chemistry, University of Latvia, Jelgavas 1, Riga, LV-1004, Latvia

<sup>2</sup>Faculty of Biology, University of Latvia, Jelgavas 1, Riga, LV-1004, Latvia

<sup>a</sup>valkovska.valda@gmail.com, <sup>b</sup>agnese.osite@lu.lv, <sup>c</sup>lauma.busa@lu.lv, <sup>d</sup>vizma.nikolajeva@lu.lv

**Keywords:** strontium-substituted hydroxyapatite, peroxyapatite, hydrothermal processing, hydrogen peroxide, stable oxygen isotopes, antibacterial activity

**Abstract.** Synthetic hydroxyapatite (HAp) has weak antibacterial and mechanical properties. The antibacterial activity of HAp can be enhanced by strontium cation substitution and incorporation of peroxide ion *via* hydrothermal processing at 100 °C and 150 °C temperature using 50% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution. The starting reagents and products of HAp processing were analyzed by thermal conversion elemental analyser – isotopic ratio mass spectrometer in order to determine the  $\delta^{18}\text{O}$  values. Using different host materials it could be possible to determine differences of  $\delta^{18}\text{O}$  values between untreated and hydrothermally treated HAp samples. The enhanced antibacterial properties of processed HAp samples were investigated using *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Hydrothermal processing by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions provides additional antibacterial activity and peroxide content of hydrothermally treated samples affect  $\delta^{18}\text{O}$  values.

### Introduction

Hydroxyapatite (HAp), Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> is a biocompatible material that has fundamental chemical similarity to the inorganic phase of vertebrate bones. Its osteoconductive capabilities and biocompatibility are the features enabling its extensive use in biomedicine as bone substitute, coating of metallic implants, and as a material for dental enamel remineralization, as well as in tissue engineering [1, 2]. The important quality of HAp is its ability to undergo ion substitution. Due to this capacity, the biological, physicochemical, and mechanical properties of this material can be substantially modified [2].

Strontium (Sr) has been used in the treatment of osteoporosis. Since Sr and calcium (Ca) have similar chemical properties, Ca<sup>2+</sup> ions in many types of crystals can be completely substituted with Sr<sup>2+</sup> ions. The incorporation of Sr<sup>2+</sup> ions in the HAp crystal lattice improves its biocompatibility, bioactivity, mechanical properties, and promotes the process of osteointegration. Some reports describe the antibacterial properties of Sr<sup>2+</sup> ions [2, 3]. Sr-substituted HAp has a higher antibacterial activity than HAp against *S. aureus*, *E. coli*, and *Lactobacillus* [1].

Solution of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is mainly used as a biocide for medical and veterinary disinfection and sterilization, as well as for other antimicrobial applications. Overall, gram-negative bacteria are more resistant to disinfectants than gram-positive bacteria, but two gram-negative bacteria (*P. aeruginosa* and *E. coli*) are known to be exceptions [4]. In the human body, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is generated by phagocytes to modulate the inflammatory processes. High concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can damage cells, but the inclusion of low peroxide ion concentration in HAp structure could provide significant antibacterial activity [5].

The isotopic profile of substances can be employed as a representative and unique parameter to determine their history and origin. The stable oxygen and carbon isotope compositions ( $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ) of biogenic apatite in bones and teeth have been used to research physiology, diet, migration, ancient climate, and to reconstruct the terrestrial and marine environments because phosphate and carbonate are generally resistant to degradation and the relationships between the measured  $\delta^{18}\text{O}$  value of both these components is well established. The  $\delta^{18}\text{O}$  composition of synthetic HAp has

been investigated in the context of oxygen isotope fractionation between synthetic apatite-bound carbonate and water [6, 7, 8].

In this study we performed characterization of peroxyapatites (PerAp) by antibacterial activity and stable oxygen isotope ratio.

### Materials and Methods

**Synthesis of HAp Materials.** The host materials (Calcium hydroxyapatite – CaHAp, partially Sr - substituted HAp – 25%-SrCaHAp and 75%-SrCaHAp) were synthesized using aqueous precipitation method by mixing two solutions (A and B). Analytical grade chemicals were used for the synthesis of HAp materials. The solution A was prepared by dissolving  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  in deionized water and adding 26% aqueous  $\text{NH}_3$  solution. Solution B was prepared by dissolving  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  and  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  in deionized water. The quantities of reagents are listed in Table 1. Solution B was combined with solution A and the obtained suspension was stirred for 10 min, filtered, and the solids were washed with 1.5% aqueous  $\text{NH}_3$  solution. The obtained CaHAp precipitate was dried at 120 °C for 2 ho. The SrCaHAp precipitates were additionally washed with 96.4% ethanol and dried at 100 °C for 40 min.

Table 1. Reagents for the synthesis of host materials

Solution	Reagents	CaHAp	25%-SrCaHAp	75%-SrCaHAp
A	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ( <i>Firma Chempur</i> )	0.075 mol	0.056 mol	0.019 mol
	$\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	-	0.019 mol	0.056 mol
	26% aqueous $\text{NH}_3$ ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	0.203 mol	0.203 mol	0.203 mol
B	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ( <i>AnalaR NORMAPUR</i> )	0.028 mol	0.028 mol	0.028 mol
	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ( <i>Ing. Petr Svec - Penta</i> )	0.005 mol	0.005 mol	0.005 mol

**Hydrothermal Processing.** PerAp were prepared by hydrothermal treatment of the host materials at two temperatures: 100 °C and 150 °C, in both cases for 6 h. A steel vessel was loaded with 0.06 g of each host material in powder form and 0.0703 mol of 50%  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution followed by heating for 6 h at appropriate temperature, and then cooled to room temperature. The 75%-SrCaPerAp material was obtained by hydrothermal processing at 150 °C using 50%  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution purchased from three different sources to investigate how stabilizers added by manufacturers to peroxide solutions affect the peroxide ion incorporation in apatite lattice.

**Analysis and Characterization.** The content of peroxide ions in PerAp was determined by permanganometry according to the following procedure: ~ 0.01 g of PerAp was accurately weighed on analytical balance, dissolved in 8.35 mol/L  $\text{HClO}_4$  (600  $\mu\text{L}$  – 1600  $\mu\text{L}$ ), then diluted with 25 mL deionized water and titrated with 0.001 M  $\text{KMnO}_4$  solution until the stoichiometric point was reached and the solution became purple.

X-ray diffraction (XRD) was used to study the crystalline phases of the synthesized and processed materials. The analysis was carried out on *Bruker D8 ADVANCE* diffractometer and ICDD PDF-2 database was used for XRD data analysis. The diffraction patterns were recorded from 5° to 60° 2 $\theta$  angles using  $\text{Cu K}\alpha$  radiation ( $\lambda=1.54180\text{\AA}$  generated at 40 kV and 40 mA).

*Hitachi S-4800* scanning electron microscope operated at 5 kV was used for obtaining images of the synthesized apatites.

The reagents used for HAp synthesis and the synthesized compounds were analyzed by thermal conversion elemental analyser (*EuroVector, HT-PyrOH Unit*) coupled with continuous flow isotopic ratio mass spectrometer (*Nu Instruments, nuHorizon*). Samples of 0.9 mg to 1.5 mg were weighed into silver foil cups, and the loaded cups were closed and inserted into the autosampler of the isotopic ratio mass spectrometer. All samples were measured in duplicate. The column temperature was 1450 °C and the He flow rate was 105 mL/min. The stable oxygen isotope ratios are reported in ‰ relative to *Vienna Standard Mean Ocean Water* (VSMOW). All sample measurements were adjusted to the international reference materials *IAEA-601* and *IAEA-602*.

The antibacterial properties of apatites were determined using *Pseudomonas aeruginosa* MSCL 331 and *Staphylococcus aureus* MSCL 334 bacterial strains. The bacteria were cultivated on Plate count agar (*Sanofi Diagnostics Pasteur*, France) at 37 °C. The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) against bacteria were determined by broth dilution method. In order to obtain a final density of  $10^6$  colony-forming units (CFU) per mL, bacteria were suspended in sterile water. Samples of the synthesized apatites were weighed into the first column of sterile *Sarstedt* 96-well TC plates. Series of two-fold dilutions of sample suspensions in *Müller-Hinton* broth (*BD*, UK) were prepared and equal amounts of bacterial suspension were added to each well, and the plates were incubated at 37 °C. After 24 h in case of *P. aeruginosa* and after 48 h in case of *S. aureus*, 50  $\mu$ L of suspension was removed from each well, spread onto Plate count agar (PCA) plate and incubated at 37 °C for 24–48 h. The number of colonies corresponding to a thousand-fold reduction as compared to the colony count of the starting inoculum was recorded as MBC. The MIC values were defined as the lowest concentration of the sample that inhibited the growth of bacteria by 80% [9].

### Results and Discussion

**XRD Analysis.** The XRD patterns showed that hydrothermal processing of the amorphous phase (host material) produced crystallization (Fig. 1). The crystallinity of the processed materials increased by rising Sr content in HAp.

**SEM Analysis.** SEM micrographs revealed a difference between the untreated and hydrothermally treated samples as shown in Fig. 2. The hydrothermally treated samples formed agglomerates. The 75%-SrCaPerAp samples obtained during the hydrothermal treatment at 150 °C contained spherical particles. The SEM micrographs of untreated HAp particles contained finer, randomly shaped particles.

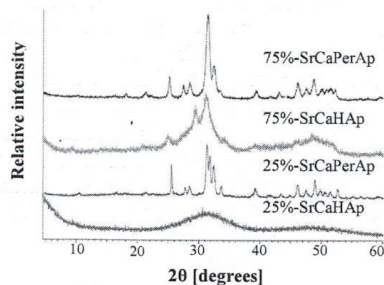


Fig.1. The XRD patterns of hydrothermally treated (150°C for 6 hours) and untreated samples

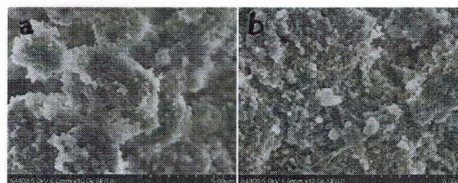


Fig.2. SEM micrographs of hydrothermally treated (a – 75%-SrCaPerAp) and untreated (b – 75%-SrCaHAp) samples

**Quantification of Hydrogen Peroxide Content.** The hydrogen peroxide content of obtained PerAp samples ranges from 0.66 to 1.98%. Higher values of peroxide content in PerAp were obtained at 100 °C (Fig. 3). The highest peroxide ion content was incorporated in 25%-SrCaHAp lattice. The amount of peroxide in the processed samples was affected by the selection of host materials and the synthesis conditions (temperature, time). Lowering the temperature (from 150 °C to 100 °C) was beneficial for the inclusion of additional peroxide amount in PerAp. Hydrothermal processing of 75%-SrCaHAp under the same conditions with 50%  $H_2O_2$  from three different sources allowed us to obtain PerAp with different content of peroxide (Fig. 4). It indicates that different added stabilizers (*Fluka* – proprietary knowledge of the manufacturer *Honeywell*; *Panreac* – from 190 to 220 mg/L of phosphates; *Sigma-Aldrich* – tin compounds and chelating agents) influence the stability of  $H_2O_2$  solution during heating. The most stable  $H_2O_2$  solution was supplied

by *Fluka* as a decomposition of the peroxide was to a lesser extent, which resulted in lower content of peroxide ion incorporated in the apatite lattice in these conditions of hydrothermal treatment.

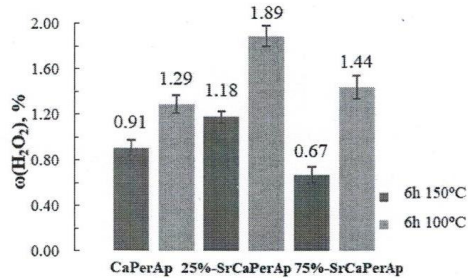


Fig.3. Peroxide content in PerAp samples, hydrothermally treated with 50% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution at 100 °C or 150 °C for 6 h

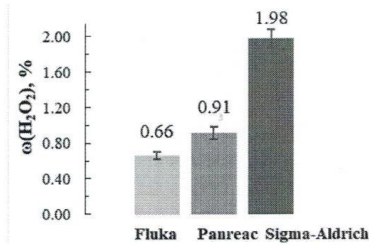


Fig.4. Peroxide content in 75%-SrCaPerAp, hydrothermally treated with 50% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution from three sources at 150 °C for 6 h

**Antibacterial Activity.** Synthesized HAp samples showed antibacterial activity against *P. aeruginosa* and *S. aureus* strains. The hydrothermally treated samples displayed enhanced antibacterial activity in comparison to untreated samples. The highest antibacterial activity was observed for the 25%-SrCaPerAp samples. The results of antibacterial activity tests are summarized in Table 2. The incorporation of peroxide in HAp increases the antibacterial activity against both types of bacteria used in this study. It was also observed that 25% substitution with Sr provided additional antibacterial activity.

Table 2. The MIC and MBC values of the synthesized apatites

Sample	ω(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), [%]	<i>P. aeruginosa</i> MIC, MBC, [mg/mL]	<i>S. aureus</i> MIC, MBC, [mg/mL]
CaHAp	–	>107	–
CaPerAp	1.32 ± 0.08	54	54
25%-SrCaHAp	–	120	121
25%-SrCaPerAp	1.80 ± 0.11	26	40
75%-SrCaHAp	–	>220	193
75%-SrCaPerAp	1.44 ± 0.09	43	58

**Determination of δ<sup>18</sup>O Values.** The peroxide content of PerAp samples and the origin of reagents affected the δ<sup>18</sup>O values. The oxygen isotope composition of the HAp synthesis reagents is different (Fig. 5). The major contribution to the δ<sup>18</sup>O value of the synthesized products was due to the isotopic composition of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. The <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O isotope ratio of HAp is affected by the contribution of oxygen contained in hydroxyl groups and phosphate ions, while the <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O isotope ratio of PerAp is additionally influenced by the isotopic composition of peroxide ions.

The hydrothermally treated apatites had higher δ<sup>18</sup>O values compared to untreated apatites. A similar trend was also observed with CaHAp, CaPerAp, 25%-SrCaHAp, and 25%-SrCaPerAp samples, where the δ<sup>18</sup>O values increased with increasing content of peroxide, but in case of 75%-SrCaPerAp the δ<sup>18</sup>O values decreased with increasing content of peroxide. The oxygen isotope measurements are summarized in Table 3.

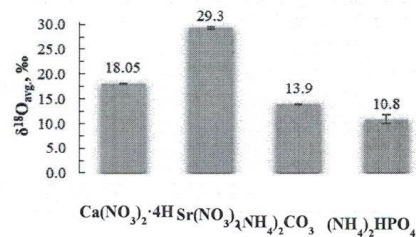


Fig.5. The δ<sup>18</sup>O values of HAp synthesis reagents

Table 3. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and δ<sup>18</sup>O values of host materials and PerAp samples

Sample	ω(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), [%] by titrimetry	δ <sup>18</sup> O, [‰]	S <sub>m</sub> , [%]
CaHAp	-	16.2	0.6
CaPerAp (150 °C 6h, <i>Fluka</i> )	0.86 ± 0.05	17.5	0.6
CaPerAp (100 °C 6h, <i>Fluka</i> )	1.26 ± 0.05	18.2	0.3
25%-SrCaHAp	-	12.53	0.12
25%-SrCaPerAp (150 °C 6h, <i>Fluka</i> )	1.22 ± 0.08	15.6	0.9
25%-SrCaPerAp (100 °C 6h, <i>Fluka</i> )	1.83 ± 0.07	17.4	1.9
75%-SrCaHAp	-	15.43	0.19
75%-SrCaPerAp (150 °C 6h, <i>Fluka</i> )	0.68 ± 0.06	17.3	1.5
75%-SrCaPerAp (100 °C 6h, <i>Fluka</i> )	1.11 ± 0.09	16.2	0.3
75%-SrCaPerAp (150 °C 6h, <i>Sigma-Aldrich</i> )	2.01 ± 0.08	16.52	0.16
75%-SrCaPerAp (150 °C 6h, <i>Panreac</i> )	0.89 ± 0.07	17.17	0.06

### Conclusions

The amount of peroxide ions incorporated in apatite materials upon hydrothermal processing depends on the stabilizers present in commercial hydrogen peroxide solutions, with additional effects from the hydrothermal processing temperature – materials richer in peroxide ions were obtained at lower temperature (100 °C). The antibacterial activity of hydroxyapatite-based materials can be improved by substituting calcium ions with strontium ions and the hydroxy ion with peroxide ion. Differences in the <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O isotope ratio were observed between untreated and hydrothermally treated apatite samples, potentially reflecting the contribution of peroxide to the oxygen isotope ratio.

### References

- [1] Y. Lin, Z. Yang, J. Cheng, L. Wang, Synthesis, Characterization and Antibacterial Property of Strontium Half and Totally Substituted Hydroxyapatite Nanoparticles, *Technology-Mater. Sci. Ed.* (2008), 475-479.
- [2] J. Kolmas, E. Groszyk, D. Kwiatkowska-Róhycza, Substituted Hydroxyapatites with Antibacterial Properties, *BioMed Research International*, (2014) 1-15.
- [3] A. Bigi, E. Boanini, C. Capuccini, M. Gazzano, Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals, *Inorg. Chim. Acta.* 360 (2007) 1009-1016.
- [4] G. McDonnell, The use of hydrogen peroxide for disinfection and sterilization applications, in: *PATAI's Chemistry of Functional Groups*, John Wiley & Sons, 2014, pp. 1-34.
- [5] A. Osite, K.A. Gross, A. Viksna, J. Prikulis, A. Sainova, Investigation of Hydrothermal Processing of Strontium Peroxyapatite Synthesis, *Recent Advances on Mechanics, Materials, Mechanical Engineering and Chemical Engineering* (2015) 75-79.
- [6] J.Z. Metcalfe, F.J. Longstaffe, C.D. White, Method-dependent variations in stable isotope results for structural carbonate in bone bioapatite, *Journal of Archaeological Science* 36 (2009) 110-121.
- [7] C. Le'cuyer, V. Balter, F. Martineau, F. Fourel, A. Bernard, R. Amiot, V. Gardien, O. Otero, S. Legendre, G. Panczer, L. Simon, R. Martini, Oxygen isotope fractionation between apatite-bound carbonate and water determined from controlled experiments with synthetic apatites precipitated at 10–37°C, *Geochim. Cosmochim. Acta* 74 (2010) 2072-2081.
- [8] L.A. Chesson, B.J. Tipple, J.D. Bowen, J.E. Barnette, T.E. Cerling, J.R. Ehleringer, Carbonates and phosphates in teeth and bones, in: H.D. Holland, K.K. Turekian (Eds.), *Treatise on Geochemistry*, second ed., Elsevier, Oxford, 2014, pp. 302-303.
- [9] S. Qaiyumi, Macro- and microdilution methods of antimicrobial susceptibility testing, in: R. Schwalbe, L. Steele-Moore, A.C. Goodwin (Eds.), *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, CRC Press, Boca Raton, London, New York, 2007, pp. 75-79.

Tēzes *EcoBalt2018*

## TEMPERATURE INFLUENCE OF HYDROTHERMAL PROCESSING ON PEROXIDE CONTENT AND CRYSTALLINITY OF CALCIUM AND PARTIALLY SUBSTITUTED STRONTIUM HYDROXY-PEROXYAPATITES

V. Valkovska<sup>1\*</sup>, A. Osīte<sup>1</sup>, G. Niaura<sup>2</sup>, A. Kareiva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Analytical Chemistry, University of Latvia, Jelgavas Str. 1, LV-1004, Riga, Latvia

<sup>2</sup>Department of Organic Chemistry, Center for Physical Sciences and Technology, Sauletekio Ave. 3, LT-10257, Vilnius, Lithuania

<sup>3</sup>Department of Inorganic Chemistry, Vilnius University, Naugarduko Str. 24, LT-03225, Vilnius, Lithuania

\*Corresponding author, e-mail: valkovska.valda@gmail.com

Hydroxyapatite is one of the main biomaterials used for clinical applications. The lack of these materials is antibacterial properties that can be improved by substituting calcium with strontium and hydroxyl group with peroxide ion in the HAp structure [1, 2]. Solution of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is suitable for the inclusion of peroxide ions in structure of apatite. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is mainly used as a biocide for medical and veterinary disinfection and sterilization, as well as for other antimicrobial applications [2, 3]. In the human body phagocytes are generating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to ensure function of the immune system [4].

In this study we performed investigation of partially strontium substituted hydroxy-peroxyapatites (SrHPerAp) by permanganatometry, X-ray powder diffraction (PXRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and Raman spectroscopy. Results of permanganatometry are shown in Figure 1. There were observed changes in parameters of infrared and Raman bands due to the composition of the samples or treatment procedure with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution. In a previous study [2] it was observed that the incorporation of peroxide in HAp increases the antibacterial activity against of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* bacterial strains.

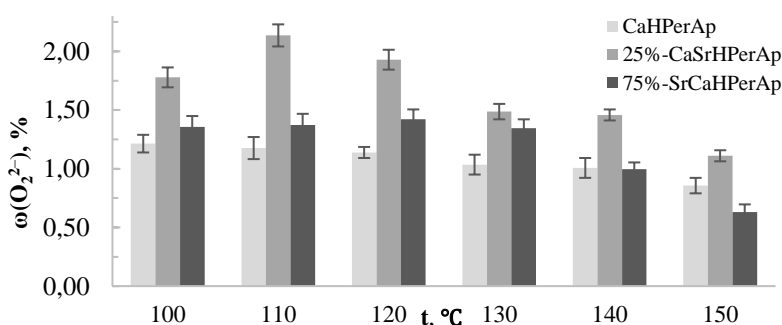


Figure 1. Peroxide content in HPerAp samples, hydrothermally treated with 50% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution at different temperatures (100 °C–150 °C) for 6 hours

### References

1. J. Kolmas, E. Groszyk, D. Kwiatkowska-Róhycka, *BioMed Research International*, **2014** (2014) 1-15.
2. V. Valkovska, A. Osīte, L. Buša, V. Nikolajeva, *Key Engineering Materials*, **762** (2018) 14–18.
3. G. McDonell, In: *PATAI's Chemistry of Functional Groups*, John Wiley & Sons, 2014, pp. 1-34.
4. A. Osite, K.A. Gross, A. Viksna, J. Prikulis, A. Sainova, *Recent Advances on Mechanics, Materials, Mechanical Engineering and Chemical Engineering*, (2015) 75-79.

Maģistra darbā iegūtie rezultāti tiks apkopoti zinātniskā rakstā un iesniegti žurnālā „*Chemija*”.

Maģistra darbs „**Daļēji ar stronciju aizvietotu hidroksil-peroksiapatītu analītiska raksturošana un antibakteriālo īpašību izpēte**” izstrādāts LU Ķīmijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autore: \_\_\_\_\_ V. Valkovska  
(*personiskais paraksts*) (*paraksta atšifrējums*)

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja docente, Dr. chem. Agnese Osīte: \_\_\_\_\_  
(*personiskais paraksts*) (*datums*)

Recenzents Dr. chem. Uģis Cābulis: \_\_\_\_\_  
(*personiskais paraksts*) (*datums*)

Darbs iesniegts Ķīmijas fakultātē: \_\_\_\_\_ (*datums*)

Dekāna pilnvarotā persona, metodiķe: \_\_\_\_\_ Vija Gutāne  
(*personiskais paraksts*)

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē:

\_\_\_\_\_ protokols Nr. \_\_\_\_\_ (*ieraksta sekretārs*)  
(*datums*) (*protokola Nr.*)

Komisijas sekretāre: \_\_\_\_\_  
(*personiskais paraksts*) (*paraksta atšifrējums*)