

**Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra anorganické technologie**

**Charakterizace a termochemická studie biologických  
fosforečnanů vápenatých**

**Ing. Anna Kohutová**

**Disertační práce**

**2012**

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci použila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č.121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle zákona § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 19. 11. 2012

Ing. Anna Kohutová

*Na tomto místě bych ráda poděkovala za odborné vedení a poskytnutí cenných rad při řešení doktorské práce doc. Ing. Ladislavu Svobodovi, CSc. a celé Katedře anorganické technologie za příjemné kolektivní zázemí. Mé srdečné díky dále patří MuDr. Miroslavu Loudovi, PhD., Dr. RNDr. Petru Bezdičkovi, doc. Ing. Ludvíku Benešovi, prof. Ing. Miroslavu Vlčkovi CSc., Ing. Evě Večerníkové a Ing. Milanu Vlčkovi, CSc.*

*Dále věnuji mimořádné poděkování své rodině, která mi umožnila realizovat má studia a prožít přínosná léta na akademické půdě.*

## **ABSTRAKT**

Disertační práce se zabývá metodami přípravy, charakterizací a termochemickou studií hydroxyapatitu,  $\beta$ -fosforečnanu vápenatého a amorfního fosforečnanu vápenatého, které představují důležité sloučeniny vyskytující se v živých organismech, v nichž sehrávají významnou roli. Rovněž byly porovnány vlastnosti synteticky připravených sloučenin a preparátů biologického původu. Vzorke studovaných materiálů byly zkoumány pomocí elektronové mikroskopie s energiově disperzním analyzátozem, rentgenovou difrakční analýzou, rentgenovou mikrodifrakcí, Ramanovou spektroskopií a optickou emisní spektroskopií s indukčně vázaným plazmatem. Termodynamická studie zahrnuje určení teplotní závislosti krystalizačních entalpií fosforečnanů vápenatých, hydroxyapatitu a biologických hydroxyapatitů pomocí zdvojeného izoperibolického reakčního kalorimetru, stanovení rozpustnosti těchto sloučenin při 25 °C v destilované vodě a při 25, 37 a 45 °C v simulovaném fyziologickém prostředí o iontové síle 0,3 mol.dm<sup>-3</sup>. V práci byly také pomocí diferenční termické analýzy a termogravimetrie studovány transformační procesy probíhající ve studovaných materiálech.

### **KLÍČOVÁ SLOVA:**

fosforečnany vápenaté, hydroxyapatit, tvrdé tkáně, ledvinové kameny, krystalizační entalpie, zdvojený izoperibolický reakční kalorimetr

---

**ABSTRACT**

The dissertation thesis focuses on methods of preparation, characterization and a thermodynamic study of hydroxyapatite,  $\beta$ -tricalcium phosphate and amorphous calcium phosphate in relation to their biological occurrence in living organisms. Biological specimens – samples of hard tissues and kidney stones – have been obtained for this thesis and compared with synthetically prepared samples. Analytical methods such as Scanning Electron Microscopy with Energy-dispersive X-ray Spectrometer, X-ray Diffraction Techniques, Raman Spectroscopy and Inductively Coupled Plasma Atomic Emission spectroscopy have been used to examine the biological samples qualitatively and quantitatively. The thermodynamic study includes determination of crystallization enthalpies of tricalcium phosphates, hydroxyapatites and biological hydroxyapatites using an isoperibolic twin reaction calorimeter at 25, 37 and 45°C and at the physiological ionic strength of 0.3 mol.dm<sup>-3</sup>. The dissertation further includes determination of the solubility of calcium phosphates at 25 °C in distilled water, and 25, 37 and 45°C with reference to the previous calorimeter measurement in physiological conditions. The thesis has been extended to include an examination of transformation process using a differential thermal analysis and thermogravimetry.

**KEY WORDS:**

calcium phosphates, hydroxyapatite, hard tissues, kidney stones, enthalpy of crystallization, twin isoperibolic reactive calorimeter

---

**Obsah**

<b>1. Úvod</b>	<b>9</b>
<b>2. Teoretická a literární část</b>	<b>11</b>
2.1 Reakční teplo a příbuzné termodynamické veličiny	11
2.1.1 Lineární kombinace chemických reakcí	11
2.1.2 Hessův zákon	12
2.1.3 Rozpouštěcí a zřed'ovací tepla	12
2.2 Experimentální termochemie	13
2.2.1 Princip kalorimetrie	14
2.2.2 Rozdělení kalorimetrů	14
2.2.3 Aplikační možnosti kalorimetrie	16
2.3 Krystalizace	17
2.3.1 Nukleace	17
2.3.2 Růst krystalů	19
2.3.3 Termodynamika krystalizace	19
2.4 Stanovení krystalizačních tepel	20
2.4.1 Určení $\Delta_c H$ z teplotní závislosti rozpustnosti	20
2.4.2 Určení $\Delta_c H$ z integrálních rozpouštěcích či zřed'ovacích tepel	20
2.4.3 Určení $\Delta_c H$ z diferenciálních rozpouštěcích tepel	20
2.4.4 Přímé měření $\Delta_c H$	21
2.5 Metody strukturní a prvkové analýzy	21
2.5.1 Elektronová mikroskopie s EDX mikroanalyzátozem	21
2.5.2 Rentgenová difrakční analýza a mikrodifrakce	21
2.5.3 Ramanova spektroskopie	22
2.5.4 Optická emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem	23
2.5.5 Termická analýza	23
2.6 Biologický výskyt fosforečnanů vápenatých	24
2.6.1 Kostní tkáň	24
2.6.2 Zubní tkáň	26
2.6.3 Patologická biomineralizace	27
2.7 Uplatnění a vývoj aplikací fosforečnanů vápenatých	30
2.7.1 Bioaplikace	30
2.7.2 Průmyslové použití	32

---

2.8	<i>Charakterizace fosforečnanů vápenatých</i>	33
2.8.1	<i>Amorfní fosforečnan vápenatý</i>	35
2.8.2	<i>Fosforečnan vápenatý</i>	37
2.8.3	<i>Hydroxyapatit</i>	38
2.8.4	<i>Charakterizace biologických CaP sloučenin</i>	39
2.9	<i>Termodynamické vlastnosti fosforečnanů vápenatých</i>	41
2.9.1	<i>Rozpustnost</i>	41
2.9.2	<i>Stabilita ve vodných roztocích</i>	43
2.9.3	<i>Termické změny fosforečnanů vápenatých</i>	45
2.9.4	<i>Termické změny biologických fosforečnanů vápenatých</i>	48
2.9.5	<i>Termochemické studie CaP</i>	53
<b>3.</b>	<b><i>Experimentální část</i></b>	<b>60</b>
3.1	<i>Přístroje a zařízení</i>	60
3.2	<i>Použité chemikálie</i>	61
3.3	<i>Pracovní postupy</i>	62
3.3.1	<i>Syntéza amorfního fosforečnanu vápenatého</i>	62
3.3.2	<i>Syntéza krystalického fosforečnanu vápenatého</i>	62
3.3.3	<i>Syntéza hydroxyapatitu</i>	62
3.3.4	<i>Preparace biologických vzorků</i>	63
3.3.4.1	<i>Biologický hydroxyapatit</i>	63
3.3.4.2	<i>Zubní tkáň</i>	63
3.3.4.3	<i>Ledvinové kameny</i>	64
3.4	<i>Strukturní a prvková analýza fosforečnanů vápenatých</i>	65
3.5	<i>Stanovení rozpustnosti fosforečnanů vápenatých</i>	66
3.6	<i>Charakterizace studovaných fosforečnanů termochemickými metodami</i>	66
3.6.1	<i>Termická analýza</i>	66
3.6.2	<i>Kalorimetrická studie</i>	67
3.6.2.1	<i>Izoperibolický reakční kalorimetr</i>	67
3.6.2.2	<i>Vyhodnocení dat</i>	68
3.6.2.3	<i>Kalibrace izoperibolického kalorimetru</i>	69
3.6.2.4	<i>Vlastní měření a experimentální podmínky stanovení <math>\Delta_c H</math></i>	70

---

<b>4. Výsledky a diskuze</b>	<b>71</b>
4.1 <i>Strukturní a mikrostrukturní charakterizace zkoumaných vzorků</i>	71
4.1.1 <i>Syntetizované a komerční vzorky fosforečnanů vápenatých</i>	71
4.1.2 <i>Biologické vzorky</i>	75
4.1.2.1 <i>Vzorky tvrdých tkání</i>	75
4.1.2.2 <i>Vzorky ledvinových kamenů</i>	80
4.1.3 <i>Shrnutí strukturní a prvkové analýzy zkoumaných vzorků</i>	89
4.2 <i>Strukturní charakterizace kalcinovaných vzorků</i>	93
4.2.1 <i>Syntetizované a komerční vzorky fosforečnanů vápenatých</i>	93
4.2.2 <i>Biologické vzorky</i>	94
4.2.2.1 <i>Vzorky tvrdých tkání</i>	94
4.2.2.2 <i>Vzorky ledvinových kamenů</i>	95
4.2.3 <i>Shrnutí strukturní charakterizace kalcinovaných vzorků</i>	96
4.3 <i>Studium rozpustnosti zkoumaných fosforečnanů vápenatých</i>	98
4.4 <i>Charakterizace studovaných vzorků CaP pomocí termoanalytických metod</i>	100
4.4.1 <i>Diferenční termická analýza a termogravimetrie</i>	100
4.4.1.1 <i>Termická analýza syntetických vzorků</i>	100
4.4.1.2 <i>Termická analýza vzorků tvrdých tkání</i>	103
4.4.1.3 <i>Termická analýza vzorků ledvinových kamenů</i>	106
4.4.1.4 <i>Shrnutí výsledků termické analýzy zkoumaných vzorků CaP</i>	109
4.4.2 <i>Reakční kalorimetrie</i>	110
4.4.2.1 <i>Kalibrace izoperibolického reakčního kalorimetru a postup měření</i>	110
4.4.2.2 <i>Stanovení krystalizačních entalpií zkoumaných vzorků CaP</i>	111
4.4.2.3 <i>Shrnutí výsledků kalorimetrických měření</i>	117
<b>5. Závěr</b>	<b>120</b>
<b>6. Literatura</b>	<b>124</b>
<i>Seznam symbolů a zkratk</i>	<b>132</b>
<i>Publikační činnost autora</i>	<b>137</b>
<i>Sebevzdělávací aktivity</i>	<b>142</b>
<b>Příloha</b>	<b>143</b>



## 1. Úvod

Fosforečnany vápenaté jsou vzhledem ke svému výskytu v živých organismech již řadu let předmětem intenzivního výzkumu. Velmi zkoumanou oblastí je příprava a vývoj různých kompozitních materiálů, ve kterých jsou tyto sloučeniny přítomny společně s titanem, keramikou nebo sklem, a které by našly uplatnění ve stomatologii, neurochirurgii či ortopedii. Zuby a kosti jsou z velkého podílu tvořeny hydroxyapatitem ve formě krystalů různého stupně zralosti a dalšími prekurzorickými fosforečnany, jako jsou amorfní fosforečnan vápenatý,  $\beta$ -fosforečnan vápenatý, fosforečnan oktavápenatý nebo dihydrát hydrogenfosforečnanu vápenatého. Pro uchování dobré funkce kostí a zubů je důležitá kontinuální remodelace minerální hmoty. Návrhy těchto bioaktivních materiálů vycházejí z faktu, že kostní tkáň se během celého života průběžně resorbuje a opět nově vytváří. Bioaktivní vrstva kompozitu tak reaguje s tělní tekutinou a na povrchu implantátu dochází k vysrážení termodynamicky stabilnějšího fosforečnanu vápenatého, díky němuž dochází k přizpůsobení cizího implantátu okolnímu prostředí a vzniku pevných chemických vazeb s živou kostní tkání. V posledních letech je výzkum v této oblasti více a více urychlován pro velký zájem o využití těchto kompozitů pro biomedicínské aplikace, jakými jsou např. kostní náhrady, implantáty, protetika, kostní cementy, pasty či koloidní suspenze.

Současný materiálový výzkum je možné podle používaných metod přípravy rozdělit na plazmové naprašování, impulzové laserové techniky, elektrostatické depozice, hydrotermální syntézy, kalcinace, metody sol-gel, srážení z vodných roztoků, metody mechano-chemické a na mikrovlnné přípravy. Volba způsobu syntézy souvisí s fyzikálně-chemickými vlastnostmi výsledného fosforečnanu vápenatého vyplývajících z požadavků aplikace materiálu.

Vedle přirozeného výskytu fosforečnanů vápenatých v tvrdých tkáních existují i případy biomineralizace, kdy dochází k nadměrnému ukládání těchto solí do měkkých tkání nebo vnitřních orgánů. Touto patologickou kalcifikací dochází k tvorbě ledvinových, močových nebo žlučnickových kamenů, vzniku zubního kamene, vápenatění srdečních chlopní, cév a svalů. Vedle nadměrné produkce fosforečnanů vápenatých však může docházet také k opačnému případu, tedy k patologické demineralizaci, která je způsobena metabolickými a genetickými vadami. Příčinná léčba těchto onemocnění je dosud omezená a léčebnými zásahy se napravují a zmenšují jejich následky, nebo se potlačují příčiny jejich vzniku. Tyto aspekty

přispívají ke snaze o dokonalejší popis a charakterizaci biologicky významných fosforečnanů vápenatých, aby bylo možné lépe pochopit procesy jejich vzniku a transformační děje odehrávající se v živých organismech.

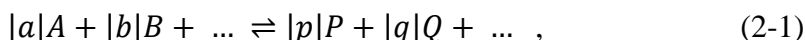
Tato práce si klade za cíl nalézt optimální reakční podmínky přípravy fosforečnanů vápenatých o vlastnostech blízkých biologickým analogům a provést strukturní a chemickou analýzu obou typů těchto materiálů pomocí metod elektronové mikroskopie s energiově disperzním analyzátozem, rentgenovou difrakční analýzou, rentgenovou mikrodifrakcí, Ramanovou spektroskopií, optickou emisní spektroskopií s indukčně vázaným plazmatem a termickou analýzou. Záměrem termochemické studie pak bylo navrhnout metodiku stanovení krystalizační entalpie studovaných látek, experimentálně ji ověřit v podmínkách simulovaného fyziologického prostředí a porovnat získaná data s publikovanými údaji. Výsledkem práce by tak měla být komplexní studie biologicky významných fosforečnanů vápenatých po stránce jejich strukturních a termochemických vlastností, jejichž popis je v literatuře zatím neúplný.

## 2. Teoretická a literární část

Termodynamika pojednává o přeměnách jednoho druhu energie v druhý, o směru průběhu fyzikálních a chemických procesů a o rovnováhách, ke kterým při nich dochází. Je založena na 6-ti postulátech, které vznikly zobecněním pozorovaných a experimentálních faktů. První postulat je o přechodu systému do rovnovážného stavu, druhý je tvrzení, že vnitřní energie je extenzivní veličinou a další čtyři se nazývají větami termodynamickými [1].

### 2.1 Reakční teplo a příbuzné termodynamické veličiny

Pro většinu dějů se spotřebovává nebo uvolňuje část energie ve formě tepla. Studium těchto tepelných změn se zabývá termochemie. Veličinu, která charakterizuje tepelný efekt chemické reakce, nazýváme reakční teplo  $Q_r$ , a to je dáno množstvím tepla, které systém při reakci vyměňuje s okolím. Uvažujme obecnou rovnici



kterou lze zapsat v celistvém tvaru

$$0 = \sum_{i=1}^n \nu_{R,i} R_i \quad (2-2)$$

kde  $\nu_{R,i}$  jsou stechiometrické koeficienty látky  $R_i$  a  $n$  je počet látek účastnících se reakce. Reakční teplo za stálého objemu udává změnu vnitřní energie reagující soustavy  $\Delta_r U$ , tj. rozdíl vnitřních energií konečných a výchozích látek

$$Q_r = \Delta_r U = |p|U_{m,p} + |q|U_{m,q} + \dots - |a|U_{m,a} - |b|U_{m,b} - \dots \quad (2-3)$$

$$Q_r = \Delta_r U = \sum_{i=P,Q,\dots} U_i - \sum_{i=A,B,\dots} U_i = \sum_{i=1}^n \nu_{R,i} U_{m,i} [T, V] \quad (2-4)$$

a reakční teplo za stálého tlaku je pak dáno změnou entalpie  $Q_r = \Delta_r H$ , tj. rozdílem entalpií konečných a výchozích látek

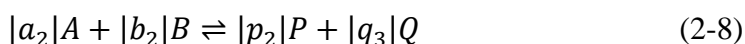
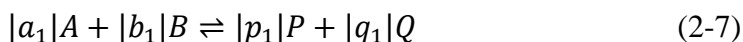
$$Q_r = \Delta_r H = |p|H_{m,p} + |q|H_{m,q} + \dots - |a|H_{m,a} - |b|H_{m,b} - \dots \quad (2-5)$$

$$Q_r = \Delta_r H = \sum_{i=P,Q,\dots} H_i - \sum_{i=A,B,\dots} H_i = \sum_{i=1}^n \nu_{R,i} H_{m,i} [T, p], \quad (2-6)$$

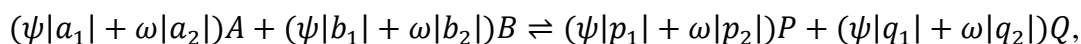
kde  $H_{m,i}$  je molární entalpie čisté látky  $i$ . Přičemž platí, že reakce, při nichž se teplo do okolí odevzdává je reakce exotermní ( $\Delta_r U, \Delta_r H < 0$ ) a reakce probíhající za konzumpce tepla z okolí je reakce endotermní ( $\Delta_r U, \Delta_r H > 0$ ).

#### 2.1.1 Lineární kombinace chemických reakcí

Máme-li reakce



a u reakce (2-7) vynásobíme všechny stechiometrické koeficienty obecné reakce libovolným číslem  $\psi$  a číslem  $\omega$  pak stechiometrické koeficienty reakce (2-8) a tyto dvě reakce sečteme, dostaneme následující reakci (2-9)



kteřou nazýváme lineární kombinací reakcí (2-7) a (2-8). Obdobně lze definovat lineární kombinaci více chemických reakcí.

### 2.1.2 Hessův zákon

Měření reakčního tepla lze nejjednodušeji provést realizací příslušné reakce v kalorimetru a pak ze znalosti změny teploty  $\Delta T$  a kalibrační konstanty vypočítat reakční teplo  $Q_r$ . Některé reakce však nelze v kalorimetru uspořádat podle žádaných podmínek, případně probíhají příliš pomalu. Zákon aditivity reakčních tepel – Hessův zákon – umožňuje vypočítat reakční teplo dané reakce prostřednictvím jí odpovídající kombinace reakcí, jelikož platí, že reakční teplo závisí jedině na výchozích látkách a reakčních produktech a je nezávislé na způsobu, kterým reakce probíhá. Tedy jestliže máme chemickou reakci  $X$ , která je lineární kombinací reakcí  $X_1, X_2, \dots$  je její reakční entalpie stejnou lineární kombinací příslušných reakčních entalpií reakcí  $X_1, X_2, \dots$

### 2.1.3 Rozpouštěcí a zředňovací tepla

Rozpouštěcí teplo  $\Delta_{diss,i}H$  je vyjádřeno vztahem

$$\Delta_{diss,i}H = Q/n_i [T, p], \quad (2-10)$$

kde  $Q$  je teplo vyměněné s okolím, které doprovází rozpouštění  $n_i$  molů látky  $i$  v  $n_r$  molech rozpouštědla za specifikované teploty  $T$  a tlaku  $p$ . Takto definované teplo se někdy nazývá integrální rozpouštěcí teplo a závisí na  $T$ ,  $p$  a složení vzniklé směsi. Závislost  $\Delta_{diss,i}H$  na složení se vyjadřuje pomocí relativního množství rozpouštědla  $n_{rel}$

$$n_{rel} = n_r/n_i \quad (2-11)$$

a rozpouštěcí teplo je pak definováno jako množství tepla, které doprovází rozpouštění 1 molu látky v  $n_{rel}$  molech rozpouštědla. Pro výpočet entalpie binární směsi z rozpouštěcího tepla, označíme-li indexem 1 rozpouštědlo a indexem 2 rozpouštěnou látku, platí

$$H_{mix} = n_{rel}H_{m,1}^* + H_{m,2}^{\times} + \Delta_{diss,2}H, \quad (2-12)$$

kde  $H_{mix}$  je entalpie směsi,  $H_{m,1}^*$  molární entalpie čistého rozpouštědla,  $H_{m,2}^{\times}$  molární entalpie čisté látky, která může být před rozpouštěním za dané teploty a tlaku v jiné fázi než směs, a  $\Delta_{diss,2}H$  je rozpouštěcí entalpie látky.

Pro vztahy mezi rozpouštěcím teplem a směšovací entalpií pro binární směs, kdy čistá látka 2 je ve stejné fázi jako směs, platí, že  $H_{m,2}^{\times} = H_{m,2}^*$  a pak lze vztahy upravit na tvary

$$\Delta H^M = \Delta H^E = \frac{\Delta_{diss,2}H}{n_{rel}+1} \quad \text{a} \quad (2-13)$$

$$\Delta_{diss,2}H = \frac{\Delta H^M}{x_2}, \quad (2-14)$$

kde  $\Delta H^M$  je směšovací entalpie, která je vztažena na 1 mol směsi, zatímco rozpouštěcí teplo je vztaženo na 1 mol rozpuštěné látky a  $\Delta H^E$  je molární dodatková entalpie.

Mimo integrálních veličin, popisujících směs jako celek, se používají diferenciální veličiny popisující jednotlivé složky směsi. Označíme-li v  $k$ -složkové směsi rozpouštědlo jako 1, definujeme diferenciální rozpouštěcí teplo látky  $i$  ( $i > 1$ ) vztahem

$$\bar{H}_i^{\times} = \bar{H}_i - H_{m,i}^{\times}, \quad (2-15)$$

kde  $\bar{H}_i^{\times}$  je diferenciální rozpouštěcí teplo látky  $i$ ,  $\bar{H}_i$  partiální molární entalpie látky  $i$  a  $H_{m,i}^{\times}$  je molární entalpie směsi. Je-li čistá rozpuštěná látka ve stejné fázi jako směs, tj.  $H_{m,i}^{\times} = H_{m,i}^*$ , pak diferenciální rozpouštěcí teplo látky je rovno její dodatkové partiální molární entalpii  $\bar{H}_i^{\times} = \bar{H}_i^E$ . Diferenciální zředovací teplo, což je název pro dodatkovou partiální molární entalpii rozpouštědla  $\Delta\bar{H}_1^E$ , lze vyjádřit vztahem

$$\Delta\bar{H}_1^E = \bar{H}_1 - H_{m,1}^*. \quad (2-16)$$

Diferenciální rozpouštěcí tepla závisí na koncentraci roztoku směsi. Na počátku rozpouštění, tedy při rozpouštění látky v čistém rozpouštědle, bývá toto teplo označováno jako první diferenciální rozpouštěcí teplo. Při rozpouštění v téměř nasyceném roztoku je odpovídající teplo označováno jako poslední diferenciální rozpouštěcí teplo. K výše uvedeným teplům se řadí ještě molární integrální zředovací teplo  $\Delta_{dil}H^i$ , které je definované jako změna entalpie roztoku vztažená na 1 mol rozpuštěné látky při zředění z jedné koncentrace na jinou. Toto teplo se rovná rozdílu integrálních rozpouštěcích tepel dané směsi pro uvažované koncentrace.

## 2.2 Experimentální termochemie

Experimentální termochemie představuje metodiku stanovení reakčních tepel chemických, biochemických, fyzikálních a fyzikálně chemických procesů a té se říká kalorimetrie. Do oblasti chemické a biochemické kalorimetrie patří především měření spalného tepla organických sloučenin a měření reakčních tepel reakcí. Fyzikální a fyzikálně chemická kalorimetrie zahrnuje stanovení tepelných kapacit, tepel adsorpčních, rozpouštěcích, krystalizačních a stanovení tepelných efektů doprovázejících fázové přechody I. a II. řádu. První užití kalorimetrie

bylo publikováno v monografii autorů Lavoisier a Laplace „*Sur la chaleur*“ v roce 1780 [2]. Autoři v této práci popsali použití ledového kalorimetru, kde se uvolněné teplo určovalo měřením hmotnosti roztátého ledu. Měřili tak spalné teplo uhlíku a výsledkem bylo, že „spálení jedné unce uhlíku způsobí roztání šesti liber a dvou uncí ledu“. Tento výsledek odpovídá spalnému teplu  $-413,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  a dobře koreluje s dnešní hodnotou  $-393,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### 2.2.1 Princip kalorimetrie

Energie, která má být měřena, se převede na teplo  $Q$  a to se měří na základě změny teploty  $\Delta T$  podle vztahu

$$Q = C \cdot \Delta T, \quad (2-17)$$

kde  $C$  je tepelná kapacita kalorimetru daná uspořádáním pokusu. Ke stanovení  $C$  je třeba kalorimetr kalibrovat, tj. dodat mu známé množství tepla a určit změnu teploty  $\Delta T$ . Množství tepla  $Q$  je pak dáno rovnicí

$$Q = U \cdot I \cdot t = R \cdot I^2 \cdot t, \quad (2-18)$$

kde  $U$  je elektrické napětí,  $t$  je čas ohřevu,  $R$  elektrický odpor a  $I$  je elektrický proud. Bohužel není možné teplo  $Q$  uchovat v kalorimetru beze ztrát. Jakmile se totiž mezi kalorimetrem a jeho okolím vytvoří teplotní rozdíl  $\Delta T = T_k - T_p$  dochází k tepelnému toku  $\lambda$ , který nakonec vede k vyrovnání obou teplot. Když kalorimetr umístíme do termostatu, pak teplota  $T_p$  je konstantní. Teplotní tok je popsán Newtonovým ochlazovacím zákonem

$$dQ/dt = -\lambda \cdot \Delta T = -\varepsilon \cdot C \cdot \Delta T, \quad (2-19)$$

kde  $\lambda$  je tepelný tok,  $\varepsilon$  je ochlazovací konstanta a  $C$  je tepelná kapacita kalorimetru.

### 2.2.2 Rozdělení kalorimetrů

Rozmanitost studovaných dějů si vynutila sestavení různých typů kalorimetrů. Nejzákladnější dělení je založeno na velikosti měřeného množství tepla (makro-, mikro-), rychlosti děje (studie dějů trvajících desítky sekund až několik měsíců), měřené teplotě (nízkoteplotní v intervalu  $-250$  do  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ , středněteplotní:  $0 - 100 \text{ }^\circ\text{C}$  a vysokoteplotní nad  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ) a podle uspořádání (jednoduché, diferenční). Nejčastější dělení kalorimetrů je pak založeno na způsobu provedení kalorimetrického experimentu, který je závislý na konstrukci přístroje a veličinách, kterými je charakterizován, a to obecná měřená veličina  $A$ , teplota kalorimetru  $T_k$ , teplota pláště  $T_p$ , tepelná kapacita kalorimetru  $C$  a konstanta přestupu tepla  $k$ .

***Izotermická kalorimetrie ( $T_k = T_p = konst.; A \neq T_k$ )***

Při tomto uspořádání jsou plášť i vlastní kalorimetrická cela udržovány na shodné, konstantní teplotě, což umožňuje izotermické sledování dějů jako vypařování nebo směšování. Z důvodů konstantně udržované teploty je měřenou veličinou např. změna objemu doprovázející skupenskou přeměnu vhodně zvolené látky nebo elektrický příkon, který je potřeba k udržení konstantní teploty cely. U těchto přístrojů lze dosáhnout velké přesnosti měření, jelikož měření není zatíženo chybou plynoucí z obvykle nedostatečné přesné hodnoty koeficientu přestupu tepla.

***Adiabatická kalorimetrie ( $T_k = T_p = f(dQ/dt)$ )***

Adiabatické kalorimetry se nejčastěji používají pro studium pomalejších exotermních procesů. Plášť kalorimetru je dotemperován na teplotu sledující průběh teploty cely. Při přesné shodě obou průběhů je přestup tepla mezi kalorimetrickou celou a pláštěm nulový a veškeré teplo, uvolněné v kalorimetru, se spotřebuje na ohřívání cely. Měřenou veličinou je teplota cely, která je snímána čidlem, nejčastěji platinovým teploměrem nebo termistorem. Přesnost měření se zhoršuje komplikovaností dosažení adiabatičnosti, které je dosahováno díky nákladnému elektronickému zařízení.

***Adiatermická kalorimetrie ( $T_k = f(dQ/dt) = T_p; k = Q$ )***

Metoda, u které se dosahuje adiabatičnosti díky tepelné izolaci cely od okolí a měření se nejčastěji provádí pomocí Dewarových nádob. I když je to jen přibližná podmínka realizace adiabatického uspořádání, lze poměrně přesně určit tepelné efekty rychlých dějů.

***Diatermická kalorimetrie ( $T_k = f(dQ/dt) \neq T_p = konst$ )***

V tomto případě je opět měřenou veličinou teplota cely. Teplo uvolněné nebo spotřebované při studovaném ději však nezpůsobuje změnu teploty cely, ale je částečně vyměňováno s okolím a při výpočtu musí být použita korekce na tyto tepelné ztráty.

***Izodiatermická kalorimetrie ( $T_k = konst. > T_p = konst., A \neq T_k$ )***

Cela kalorimetru je opatřena přídavným elektrickým topením, které udržuje celu na vyšší konstantní teplotě, než jakou má plášť. Z rozdílu mezi příkonem při vlastním měření a příkonem při slepém pokusu lze určit velikost tepelného efektu uvnitř kalorimetru. V praxi se izodiatermickému kalorimetru říká kalorimetr s tepelným tokem. Výhodou je, že není nutná

korelace na tepelné ztráty. Tento způsob se používá při měření především exotermních tepelných efektů.

### ***Izoperibolická kalorimetrie ( $T_k \neq konst.$ , $T_p = konst.$ )***

Pro tento typ je charakteristické udržování teploty obalu kalorimetru na konstantní hodnotě. Tepelný efekt probíhající v kalorimetru určíme z časového průběhu teplotní křivky. Ideální průběh závislosti teplota-čas je za předpokladu minimální výměny tepla mezi reakční nádobou a okolím. Použití metody izoperibolické reakční kalorimetrie je vhodné pro sledování dějů, které jsou ukončeny do 15 až 20 minut. Důvodem je výměna tepla mezi reakční nádobkou a pláštěm kalorimetru, která se po této době uplatňuje.

### **2.2.3 Aplikační možnosti kalorimetrie**

Kalorimetrie je pokládána za univerzální metodu vzhledem k její použitelnosti v různých vědeckých oblastech. Tato metoda nám poskytuje důležité informace o reakcích, včetně reakční kinetiky, změnách tepelných kapacit, změnách entalpií, změnách entropií, o rovnovážných konstantách a reakčních mechanismech. Dále pak je využitelná při charakterizaci materiálů (rozklady, oxidace, koroze, spékání) a určování fyzikálních dějů (adsorpce, desorpce, morfologické změny, hydroscopicita). Možné jsou také studie biologických jevů – fotosyntézy, enzymatické katalýzy, ale i studie založené na změně optických a elektrických vlastností. Kalorimetrie nachází různorodé uplatnění od metalurgie, materiálového inženýrství, chemického průmyslu, agronomie, gastronomie, energetických materiálů, biologických systémů, medicíny až k jadernému průmyslu. Předmětem studií např. v metalurgii je sestavení fázových diagramů různých slitin [3], určení tepelných kapacit [4] a mechanismů tuhnutí [5]. V gastronomii je naproti tomu kalorimetrie používána pro určení oxidace potravinářských olejů [6], pro studium rostlin z hlediska fotofyziky [7] a určování metabolismu pupenů ovocných stromů [8]. Studium minerálních systémů a keramik poskytuje zase cenné informace pro stavební průmysl, materiálové inženýrství [9] a chemický průmysl. Z hlediska medicíny je to pak např. studie postupného uvolňování lékových forem [10], jejich polymorfismu [11] a rozkladu [12]. V posledních letech se tato metoda využívá ve výzkumech zabývajících se způsoby uchovávání energie, v oblastech farmaceutiky a medicíny.



## 2.3 Krystalizace

Při krystalizaci dochází k samovolnému uspořádání molekul do vnitřně organizovaných krystalů, kde kvalita výsledného krystalického produktu je dána především čistotou krystalů, rozměrovou stejnorodostí vzniklých krystalinitů a krystalovým tvarem. Proces krystalizace je zpravidla provázen exotermním efektem, neboť samotné rozpouštění většiny látek ve vodě se vzrůstem teploty převážně stoupá. Molární krystalizační tepla  $\Delta_{cr}H$  lze vypočítat z různých experimentálních dat a možnosti stanovení je popsána v kapitole 2.4. Obecně platí, že krystalizační teplo se až na znaménko rovná poslednímu rozpouštěcímu teplu, tedy diferenciálnímu rozpouštěcímu teplu látky v oblasti nasycení. Informace o termodynamických vlastnostech koncentrovaných roztoků, zvláště pro oblasti blízké nasycení, jsou však vzácné a nesrovnatelně méně publikované než pro oblasti zředěných roztoků [13]. V rámci kinetiky krystalizace lze krystalizaci popsat v několika krocích, a to nukleaci, růst a tvorba krystalů, případně ještě tvorba agregátů. Jednotlivé procesy neprobíhají obvykle jednotlivě, ale rozvíjí se současně, což velice stěžuje studium kinetiky krystalizace.

### 2.3.1 Nukleace

První etapou krystalizace je nukleace, kdy dochází k vytváření krystalizačních zárodků v přesyceném roztoku. Druhá etapa je pak růst vzniklých nukleí. Zárodky mezi sebou interagují, může docházet jak k agregaci, asociaci, tak k rozpadu či růstu. Díky tomu roztok obsahuje klastry různých velikostí. Klastry, které překročí kritickou mez, se již samovolně nerozpadají a jsou schopné dalšího růstu. Nukleace může být primární a sekundární, kde primární se dále dělí na homogenní a heterogenní. Při homogenní nukleaci se nuklea tvoří náhodnými srážkami kdekoli v celém objemu krystalujícího roztoku bez interakce s heterogenními nečistotami či prostředím, ve kterém se nukleace odehrává. Při heterogenní nukleaci vznikají zárodky na cizích površích, ať už na stěnách krystalizátoru, míchadle nebo částicích cizích tuhých fází. V praxi je reálnější samozřejmě nukleace heterogenní. Sekundární nukleace slouží k vývinu přesně definovaných krystalů pomocí metody očkování, kdy jsou do směsi přidávány krystalizační zárodky.

V teorii **homogenní nukleace** uvažujeme kulovitý zárodek. Vytvoření fázového rozhraní mezi kapalnou a pevnou fází je spojeno se změnou Gibbsovy energie  $\Delta G$ , která je popsána vztahem

$$\Delta G = -\frac{4}{3}\pi r^3 \cdot |\Delta G_V| + 4\pi r^2 \sigma, \quad (2-20)$$

kde  $\Delta G_V$  je hnací síla nukleace (nabývá záporných hodnot) a značí rozdíl mezi Gibbsovými energiemi jednotkových objemů pevné a kapalně fáze při teplotě menší než je teplota tuhnutí. Veličina  $\sigma$  je mezifázové napětí mezi kapalnou a krystalickou fází. První člen ve vztahu způsobuje pokles a druhý člen růst  $\Delta G$ . Nukleace je samovolný děj a proto při ní musí  $\Delta G$  klesat. Po překonání hranice kritického poloměru  $r^*$  a nukleační bariéry  $\Delta G^*$ , nuklea dále rostou spontánně. Toto chování je založené na jednoduchém faktu, že povrch kulovité částice se zvětšuje s  $r^2$ , zatímco objem částice s  $r^3$ , a to způsobí, že vnitřní přitažlivé síly v agregátu převáží nad mezifázovým napětím  $\sigma$ . Při vzniku nuklea dochází k extrému, kdy platí následující vztah:

$$(d\Delta G/dr)_{r=r^*} = 0 \quad (2-21)$$

a z něj pak dostáváme konečné výrazy pro kritickou velikost nuklea

$$r^* = 2\sigma/|\Delta G_V| \quad (2-22)$$

a bariéru homogenní nukleace

$$\Delta G_{hom} = 16\pi\sigma^3/3|\Delta G_V|^2. \quad (2-23)$$

Proces probíhající v praxi lépe popisuje mechanismus **heterogenní nukleace**. Stěny krystalizátoru, míchadlo nebo krystalizační přísady představují aktivní povrch, kde se zachytí molekulární klastry. Aby tento klastr dorostl do nuklea, stačí mu vytvořit pouze jeho vrchlík. Heterogenní nukleace je energeticky výhodnější, protože k vytvoření nuklea na pevném nosiči vyžaduje mnohem menší počet částic, než by vyžadoval nukleus o stejné kritické velikosti  $r^*$  při homogenní nukleaci. Podmínkou heterogenní nukleace je smáčení pevného substrátu krystalickou fází. Smáčecí úhel  $\varphi$  se uplatňuje v rovnovážné rovnici mezifázových napětí  $\sigma$

$$\sigma^{l-s} = \sigma^{nu-s} + \sigma^{l-n} \cdot \cos \varphi, \quad (2-24)$$

kde  $l$  je kapalina,  $s$  pevný povrch a  $nu$  je nukleus. Nukleační bariéra heterogenní nukleace je nižší než u homogenní nukleace a je definována následujícím vztahem (2-25):

$$\Delta G_{het} = \Delta G_{hom} \cdot f(\varphi) = \frac{16\pi\sigma^3}{3|\Delta G_V|^2} \cdot \frac{(2 + \cos \varphi) \cdot (1 - \cos \varphi)^2}{4}$$

Pro  $\varphi = 180^\circ$  odpovídá funkce  $f(\varphi) = 1$  a nukleace se uskuteční pouze homogenním mechanismem, při  $\varphi = 0^\circ$  by  $\Delta G_{het}$  měla hodnotu 0, tedy nukleační bariéra by zmizela, což je v praxi nemožné.

### 2.3.2 Růst krystalů

Krystaly mohou nukleovat a růst pouze tehdy, je-li roztok přesycený. Proces růstu je komplikovaný a jeho detaily nejsou dosud zcela objasněny. Přesycený roztok obsahuje celou škálu složek – atomy, ionty, molekuly, klastry, společně s jejich hydratovanými formami, kde jejich struktura je mnohdy nejasná. Při růstu krystalů převažuje tok stavebních jednotek směrem na povrch krystalu nad jeho odtokem z povrchu. Řídicím procesem je většinou difúze. Výsledkem růstu krystalu je krystalová plocha a soubor všech těchto ploch se označuje jako krystalový tvar. Tyto krystalové plochy nemusí podléhat stejnoměrnému růstu, avšak úhly mezi plochami nejsou na rozdílu růstu závislé a jsou vždy konstantní. Krystalová plocha narůstá růstovými mechanismy. Z energetického hlediska se stavební jednotky nejlépe připojují ke zlomům krystalové plochy, méně ochotně k hranám a nejhůře k hladké ploše. Při růstu je využito i přítomných defektů na povrchu, jako je tomu např. u šroubové dislokace, kde na čárovém defektu dojde k nárůstu hmoty šroubového tvaru.

### 2.3.3 Termodynamika krystalizace

Z termodynamického hlediska dochází ke krystalizaci tehdy, když je chemický potenciál krystalizované složky v rovnovážném stavu  $\mu_r$  nižší, než chemický potenciál této složky v přesyceném stavu  $\mu_p$ . Hnací silou krystalizace je pak rozdíl těchto potenciálů

$$\Delta\mu = \mu_p - \mu_r . \quad (2-26)$$

Vzhledem k obecnému vztahu

$$\mu = \mu_o + R_g T \ln a , \quad (2-27)$$

kde  $\mu_o$  je standardní chemický potenciál,  $R_g$  plynová konstanta a  $a$  je aktivita. Z předešlých rovnic vyplývá vztah

$$\Delta\mu/R_g T = \ln a_p/a_r = \Phi , \quad (2-28)$$

kde  $\Phi$  je přesycení, reprezentující hnací sílu krystalizace. Aktivita  $i$ -té složky v roztoku odpovídá:

$$a_i = \gamma_i \cdot x_i , \quad (2-29)$$

kde  $x_i$  je molární zlomek a  $\gamma_i$  aktivitní koeficient.

Vyčíslení či odhad aktivitních koeficientů a z toho vyplývající výpočet přesycení bývá často komplikovaný. Pro ideální roztok nebo v případě koncentrační nezávislosti aktivitního koeficientu lze vztah (2-28) vyjádřit následovně

$$\Delta\mu/R_g T = \ln x_p/x_r \sim (x_p - x_r)/x_r . \quad (2-30)$$

Často však nezbyvá než oblast přesycení, v závislosti na teplotě a vlastnostech matečního roztoku, určit experimentálně.

## 2.4 Stanovení krystalizačních tepel

### 2.4.1 Určení $\Delta_{cr}H$ z teplotní závislosti rozpustnosti

K výpočtu krystalizačního tepla z teplotní závislosti rozpustnosti lze použít následující vztahy:

$$\Delta_{cr}H = \nu_R R_g T^2 (dm_{st}/dT)_{sat} \cdot [(\partial \ln \gamma_{\pm} / \partial m_{st})_T + (1/m_{st})_{sat}], \quad (2-31)$$

$$d \ln K / dT = \Delta_{cr}H / R_g T^2, \quad (2-32)$$

kde  $\nu_R$  je stechiometrický počet iontů,  $\gamma_{\pm}$  střední aktivitní koeficient,  $m_{st}$  molalita,  $R_g$  plynová konstanta a  $K$  termodynamická rovnovážná konstanta. Úskalím této metody výpočtu je, že vlastní data závislosti rozpustnosti na teplotě se výrazně liší, zvláště u systémů, které snadno tvoří přesycené roztoky. Další omezení představuje nedostatek spolehlivých dat aktivitních a osmotických koeficientů v oblastech blížících se nasycení.

### 2.4.2 Určení $\Delta_{cr}H$ z integrálních rozpouštěcích či zřed'ovacích tepel

Druhá, často používaná metoda určení krystalizační entalpie vychází z koncentrační závislosti integrálních rozpouštěcích či zřed'ovacích tepel. Experimentální stanovení těchto tepel je z hlediska kalorimetrické experimentální techniky relativně snadné. Množství rozpouštěné látky může být voleno tak, aby výsledný tepelný efekt byl zatížen co nejmenší experimentální chybou. Nevýhodou naopak je, že v oblastech koncentrovanějších roztoků může děj probíhat natolik pomalu, že přesahuje časovou stabilitu experimentálního zařízení. V těchto případech se využívá hodnot integrálních zřed'ovacích tepel, kde je třeba znát hodnotu prvního rozpouštěcího tepla. Při extrapolaci hodnot rozpouštěcího tepla na nekonečné zředění pro látky podléhající hydrolyze nejistého rozsahu může však docházet k značnému zatížení chybou. Výpočet krystalizačního tepla z integrálních rozpouštěcích tepel je založen na převodu těchto tepel na diferenciální hodnoty a v jejich extrapolaci do oblasti nasycení.

### 2.4.3 Určení $\Delta_{cr}H$ z diferenciálních rozpouštěcích tepel

Podle definice je diferenciální rozpouštěcí teplo spojeno s rozpouštěním látky do nekonečného množství rozpouštědla, tedy takového množství roztoku, kdy koncentrační změna je zanedbatelná. Experimentálně se určují pouze tzv. pseudodiferenciální tepla, kdy jsou koncentrační změny v roztoku co nejmenší. Měření těchto tepel je však náročné na expe-

rimentální provedení, především na citlivost měření výstupního signálu, vzhledem k malým tepelným efektům. Čím méně látky je rozpuštěno, tím více se získané teplo blíží diferenciálnímu rozpouštěcímu teplu.

#### 2.4.4 Přímé měření $\Delta_{cr}H$

K výpočtu krystalizačního tepla z měřených tepelných efektů v průběhu krystalizace z přesycených roztoků je třeba znát hodnoty zředovacích tepel v oblasti přesycení. Hodnoty zředovacích tepel látek v oblasti přesycení v porovnání s vlastními krystalizačními tepley jsou relativně malé a byly stanoveny jen pro málo systémů. Dalším důležitým požadavkem pro stanovení  $\Delta_{cr}H$  je přesné určení množství vykrystalizovaného podílu v průběhu krystalizace.

### 2.5 Metody strukturní a prvkové analýzy

V následujících podkapitolách budou krátce shrnuty principy metod používaných pro strukturní, mikrostrukturní a prvkovou charakterizaci materiálů studovaných v této disertační práci.

#### 2.5.1 Elektronová mikroskopie s EDX mikroanalyzátozem

K vytváření obrazu povrchu vzorku pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (*SEM*) je využíváno zpětně odražených primárních elektronů společně se sekundárními elektrony, které vznikají interakcí atomů vzorku s elektrony elektronového paprsku. Zpětně odražené elektrony jsou primární elektrony, které vnikají do vzorku a odrážejí se, přičemž se jejich energie příliš nesníží – mají stále stejnou rychlost, ale dojde ke změně směru. Jelikož odražené elektrony unikají i z hlubších vrtev, jsou získány společně s obrazem povrchu i podoby hlouběji položených vrstev. Pomocí sekundárních elektronů se dosáhne vyššího rozlišení, protože k detektoru dorazí pouze sekundární elektrony, které jsou z povrchových vrstev vzorku. Při ozáření materiálu elektronovým paprskem vzniká také rentgenové záření, které je vyvoláno vzájemným působením elektronů s materiálem. Toto záření dosahuje pro každý prvek specifické energie a slouží k identifikaci prvků obsažených ve vzorku pomocí energiově disperzního mikroanalyzátozem (*EDX*).

#### 2.5.2 Rentgenová difrakční analýza a mikrodifrakce

Rentgenová prášková difrakce (*XRD*) využívá krátkovlnné elektromagnetické spektrum z oblasti 0,01 až 10 nm ke studiu uspořádání stavebních částic v pevných látkách. Vlnová délka tohoto ionizujícího záření odpovídá meziatomovým vzdálenostem ve většině struktur pevných látek, a tak může při jeho dopadu docházet k difrakci (ohybu) na elektronech

jednotlivých atomů. Analýzou difraktovaného záření lze následně stanovit některé strukturní parametry a případně určit rozmístění stavebních částic v krystalové mřížce studované pevné fáze. Všechny difraktometry jsou postaveny na principu Braggova zákona popsaného vztahem

$$n_{hkl} \cdot \lambda = 2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin \theta, \quad (2-33)$$

kde  $n_{hkl}$  je řád difrakce,  $\lambda$  vlnová délka,  $d_{hkl}$  mezivzrostlá vzdálenost a  $\theta$  Braggův úhel, jehož dvojnásobek odpovídá difrakčnímu úhlu. Poziční úhel detektoru ( $2\theta$ ) je po dobu měření stále zaznamenáván, takže pokud dojde na libovolné strukturní rovině ve vzorku ke splnění Braggovy rovnice, zaznamená detektor zvýšení intenzity difraktovaného svazku. Prášková rentgenová mikrodifrakce ( $\mu$ -XRD) představuje progresivní nedestruktivní metodu, která umožňuje provedení komplexní fázové analýzy z ploch fragmentů o velikosti pár stovek mikrometrů čtverečních během několika hodin. Je využíváno mikrosvazku synchrotronového záření nebo záření fokusovaného polykapilární primární optikou, což dává intenzitu dostatečnou ke sběru difrakčních dat z malých ploch vzorků.

### 2.5.3 Ramanova spektroskopie

Podstatou Ramanovy spektroskopie (RS) je měření rozptylu záření, které vzniká interakcí monochromatického záření s molekulami měřené látky. Při dopadu fotonu na molekulu může dojít ke dvěma druhům srážky – pružné a nepružné. Je-li tato srážka dokonale pružná (elastický rozptyl), tak se energie kvanta nezmění, rozptýlené světlo má stejnou frekvenci jako světlo dopadající a dochází k tzv. Rayleighovu rozptylu. V případě nepružné srážky fotonu s molekulou (rozptyl neelastický), mohou nastat dvě situace, kdy první je, že foton excitačního monochromatického záření předá část své energie dané molekule a dojde ke zvýšení její rotačně-vibrační energie. Energie fotonu se tak sníží a vznikne Ramanovo záření o vyšší vlnové délce. V druhém případě foton naopak převezme část rotačně-vibrační energie od molekuly a vznikne záření o nižší vlnové délce. Ramanův rozptyl je důsledkem toho, že dopadající světlo indukuje v molekule dipólový moment a ve směru dipólmomentu může být vyvolána i změna polarizovatelnosti molekuly. Indukovaný dipól není konstantní veličinou, ale závisí na vzájemné pozici obou atomů v molekule. Získaná Ramanova spektra jsou mnohdy komplikovaná, protože jednotlivé absorpční pásy se mohou překrývat, v mezním případě i koincidovat. Pomocí různých programů (*Opus*, *Omnis*) se provádějí rozklady pásů Ramanových spekter, která vedou ke zvýraznění detailů průběhů až k oddělení překrývajících se pásů a přesnějšímu odečtu vlnočtu maxim pík [14].

### 2.5.4 Optická emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem

Optická emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (*ICP-OES*) je založena na registrování fotonů emitovaných atomy či ionty v excitovaném stavu při přechodu valenčních elektronů z vyšší energetické hladiny na nižší, tedy jejich deexcitaci. Emisní spektrum má čárový charakter, to znamená, že jednotlivé přechody náleží velmi úzkému rozmezí vlnových délek, které ve spektru jeví jako čáry přiřazené jedné vlnové délce. Analyticky využitelná oblast vlnových délek, ve které se projeví čáry odpovídající přechodům valenčních elektronů, je 110 – 900 nm. Počet čar roste s počtem valenčních elektronů a může se pohybovat od jednotek (alkalické kovy) až po několik tisíc čar (Fe, W aj.). Vlnová délka čar ve spektru charakterizuje prvky přítomné ve vzorku (kvalitativní složení) a intenzita jednotlivých čar určuje pak jejich koncentraci (kvantitativní složení). Aby bylo možné zaznamenat atomové čárové spektrum, musí být prvky ve vzorku v atomární formě a excitovány. Toho se nejčastěji dosahuje termickým buzením, kdy dochází nejprve k atomizaci a následně k excitaci prvků. U *ICP-OES* se k buzení prvků používá indukčně vázaného plazmatu.

### 2.5.5 Termická analýza

Metodami termické analýzy se sledují pochody probíhající při zahřívání nebo ochlazování vzorků. Sledované pochody zahrnují dehydrataci, oxidaci, tepelný rozklad, krystalizaci, tání, sublimaci, polymeraci, fázové přeměny a další. Dílčí metody termické analýzy registrují změny hmotnosti vzorku, uvolňování nebo pohlcování tepla, změny rozměru, vodivosti apod. Mezi nejzákladnější metody termické analýzy patří termogravimetrie (*TG*) která zaznamenává změny hmotnosti analyzovaného vzorku při jeho plynulém zahřívání nebo ochlazování. Změny hmotnosti se vyjadřují v závislosti na teplotě ( $m = f(T)$ ), resp. čase ( $m = f(t)$ ). Z *TG* záznamu se odvozuje křivka *DTG* jeho derivací podle času. Záznam ve formě *DTG* je vhodnější nežli klasická *TG* v případech, kdy je třeba zjistit změny hmotnosti, které v průběhu děje proběhly těsně za sebou. Křivka *DTG* neobsahuje prodlevy a zlomy, ale píky, jejichž vrcholy odpovídají inflexním bodům zlomů na křivce *TG*. Další často užívanou metodou je diferenční termická analýza (*DTA*), která sleduje změny projevující se uvolňováním nebo spotřebováváním tepelné energie (tj. exotermické či endotermické pochody). Tato metoda je schopná určovat děje spojené se změnou entalpie  $\Delta H$ , jako jsou například tání, vypařování, sublimace, změny modifikací, dehydratace aj. Při *DTA* se porovnávají změny teplot zkoumaného vzorku ( $T_S$ ) s referentním vzorkem ( $T_R$ ), který těmto změnám nepodléhá. Teplotní rozdíl  $\Delta T$  se zaznamenává graficky v podobě teplotní nebo časové závislosti. Když je  $\Delta T < 0$  ( $T_S < T_R$ )

jedná se o endotermní efekt, v případě  $\Delta T > 0$  ( $T_S > T_R$ ) o exotermní. Endotermní děj ve vzorku tedy vede ke zpoždění teploty vzorku za teplotou referenčního materiálu a ke vzniku endotermního píku na *DTA* křivce. Naopak, když teplota vzorku převyšuje teplotu referenční látky, na *DTA* křivce se objeví exotermní pík. Podle množství pohlcené nebo uvolněné energie, které je úměrné ploše píku na křivce  $\Delta T = f(T)$ , lze usuzovat na množství složky vzorku, která tento efekt způsobila.

## 2.6 Biologický výskyt fosforečnanů vápenatých

Fosforečnany vápenaté (CaP) tvoří nedílnou součást tvrdých tkání všech obratlovců, včetně člověka. Zuby a kosti jsou z velkého podílu tvořeny apatitem (AP,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})_2$ ), konkrétněji hlavně hydroxyapatitem (HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) v krystalech různého stupně zralosti, společně s dalšími fosforečnany vápníku, které se aktivně podílejí na kalcifikaci a vývoji kostní hmoty. CaP sloučeniny, u kterých je předpokládána prekurzorická funkce před samotnou tvorbou HA, jsou amorfní fosforečnan vápenatý (ACP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (*am*)),  $\beta$ -forma fosforečnanu vápenatého ( $\beta$ -TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), whitlockit (WHI,  $(\text{Ca}, \text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2$ ), brushit (DCPD,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a fosforečnan oktavápenatý (OCP,  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) [14–17]. K dalšímu výskytu vápenatých fosforečnanů v těle dochází při nadměrné biomineralizaci, kdy jsou ukládány CaP sole do tkání, kde se normálně nevyskytují. Objevují se ve stěnách tkání, srdečních chlopních, dochází k tvorbě kamenů v dutinách orgánů či k onemocnění kostí [18]. Výskyt CaP sloučenin je shrnut v následující tabulce (*Tab. 1*).

*Tab. 1: Výskyt vybraných biologických fosforečnanů vápenatých v lidských tkáních*

	CaP	Výskyt
AP/ HA	Apatit/ Hydroxyapatit	kostní tkáň, MT <sup>a</sup> , ZK <sup>a</sup> , MK <sup>a</sup> , LK <sup>a</sup>
OCP	Fosforečnan oktavápenatý	ZK <sup>a</sup> , MK <sup>a</sup>
DCPD	Brushit	ZK <sup>a</sup> , KRY <sup>b</sup> , CHK <sup>c</sup>
WHI/ $\beta$ -TCP	Whitlockit/ $\beta$ -fosforečnan vápenatý	artróza, MT <sup>a</sup> , ZK <sup>a</sup>
ACP	Amorfní fosforečnan vápenatý	srdeční kalcifikace, LK <sup>a</sup> , KRY <sup>b</sup>

<sup>a</sup> MT - měkké tkáň, ZK - zubní kámen, MK - močové kameny, LK - ledvinové kameny

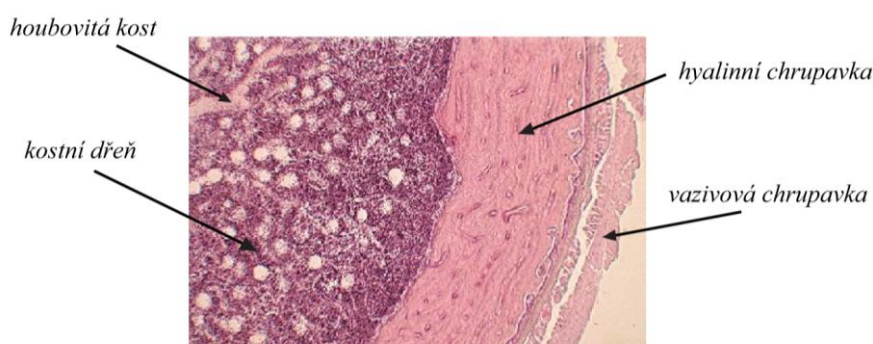
<sup>b</sup> KRY/ krystalurie – přítomnost sedimentu v moči, <sup>c</sup> CHK/ chronokalcidonóza – porucha chrupavek

### 2.6.1 Kostní tkáň

Fyziologicky je kostní tkáň tvořena z 25 až 75 hm% kostním minerálem a do zbytku je tvořena z kolagenu, vody a nekolagenních, organických složek (proteoglykany, lipidy aj). Široký rozptyl obsahu sušiny anorganického podílu v organické matici je způsoben nejen druhem



kosti, místem uložení, ale i stářím a metabolickou rovnováhou v organismu [14,19–21]. Minerál je v kosti přítomen hlavně ve dvou formách, jako HA a amorfni složka. Mladé kosti navíc obsahují DCPD a OCP společně s amorfni fází fosforečnanu. Vlastnosti kosti závisí na struktuře, jako je kortikální tloušťka, kostní průměr, dále pak na mezerovitosti, stupni mineralizace, velikosti krystalů, vlastnostech organického podílu aj. [22]. Při zahájení vývoje kostí se začíná tvořit houbovitá kost (trámčina). Na její tvorbě se uplatňují především bílkoviny za podpory růstových látek, zejména vitaminu A a Zn. K tvorbě trámčiny je důležitá bílkovinná složka, v níž má nezastupitelnou roli kolagen. Na *Obr. 1* je znázorněn mikroskopický snímek průřezu holenní kosti.



*Obr. 1: Mikroskopický snímek průřezu holenní kosti*

Vyšší podíl anorganické složky způsobuje silnější, ale zároveň křehčí kosti. Např. stehenní hovězí kost obsahuje vysokou koncentraci apatitické složky na rozdíl od jeleního parohu, který má vyšší podíl kolagenu [23,24]. Hodnoty složení kostního materiálu byly publikovány ve studiích [25,26] a jsou znázorněny v *Tab. 2* společně se složením syntetického HA.

*Tab. 2: Chemické složení kostní hmoty a syntetického HA*

Složka	w / hm%							
	Ca <sup>2+</sup>	P <sup>5+</sup>	Ca:P	Cl <sup>-</sup>	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Anorg <sup>a</sup>	Org <sup>b</sup>	H <sub>2</sub> O
Kost*	34,8	15,2	1,71	0,13	7,4	65	25	10
HA	39,6	18,5	1,67	–	–	100	–	–

\*kost dále obsahuje stopová množství Na<sup>+</sup> (0,90), Mg<sup>2+</sup> (0,72), K<sup>+</sup> (0,03), F<sup>-</sup> (0,03) P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup> (0,07)

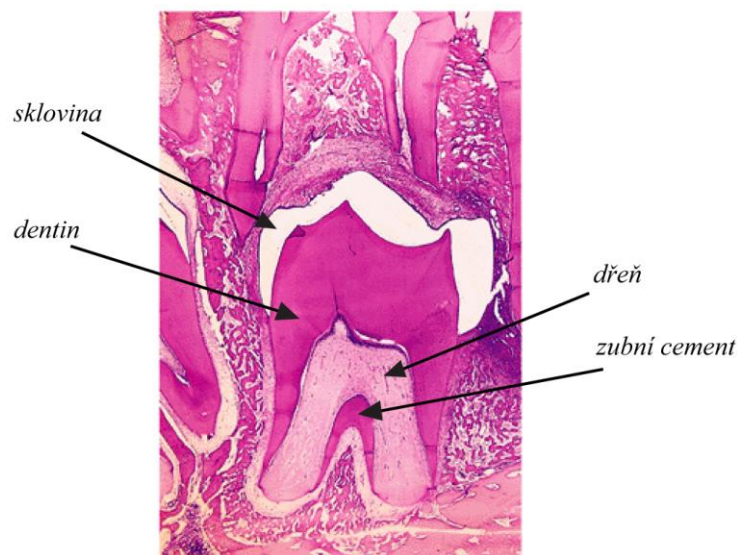
<sup>a</sup> anorganický podíl, <sup>b</sup> organický podíl

Kosti jsou v průběhu života kontinuálně remodelovány a dochází k recyklaci až 5 hm% kostní hmoty během týdne. Tyto pochody se odehrávají v trámčině, kde se HA společně se svými

prekurzorickými CaP usazuje a kde dochází k tzv. „kostnímu zrání“. Remodelační procesy jsou specifické pro daná věková období a jsou ovlivněna genetickými dispozicemi [27–29].

### 2.6.2 Zubní tkáň

Struktura zubní tkáně je daleko komplikovanější než struktura kosti. Zuby jsou tvořeny sklovinou (email), zubovinou (dentinem), zubním cementem a zubní dření (Obr. 2). Sklovina je nejtvrďší tkáň lidského těla a ve zralém stavu obsahuje až 98 hm% anorganické fáze, převážně v podobě HA [30]. Její tloušťka se v jednotlivých částech zubu liší. Email je obecně nejsilnější na řezacích hranách a hrbolcích, kde dosahuje tloušťky až 2,5 mm a na okrajích se ztenčuje [31]. Dentin tvoří hlavní součást zubu. Je to pojivová tkáň tvrdší než kost, obsahuje 70 hm% anorganických látek, opět převážně HA a 20 hm% organických látek [32].



Obr. 2: Mikroskopický snímek příčného řezu zubu

Tvorba skloviny zaniká při prořezání zubu a později již není schopna samovolné regenerace [20]. Krystaly HA ve sklovině jsou o dost větší než krystaly obsažené v dentinu a kosti. Přítomnost  $F^-$  vykazuje vyšší krystalinitu a pravidelnější šestiúhelníkovou souměrnost AP, která byla pozorována u vzorků žraločích zubů [25]. Obdobná spojitost mezi obsahem  $F^-$  a krystalickými parametry apatitu byly nalezeny i pro sklovinu v lidských vzorcích [34]. V následující Tab. 3 jsou shrnuty hodnoty chemického složení obsaženého v jednotlivých částech zubu [25–28,35].

Tab. 3: Chemické složení zubů – zastoupení anorganických složek

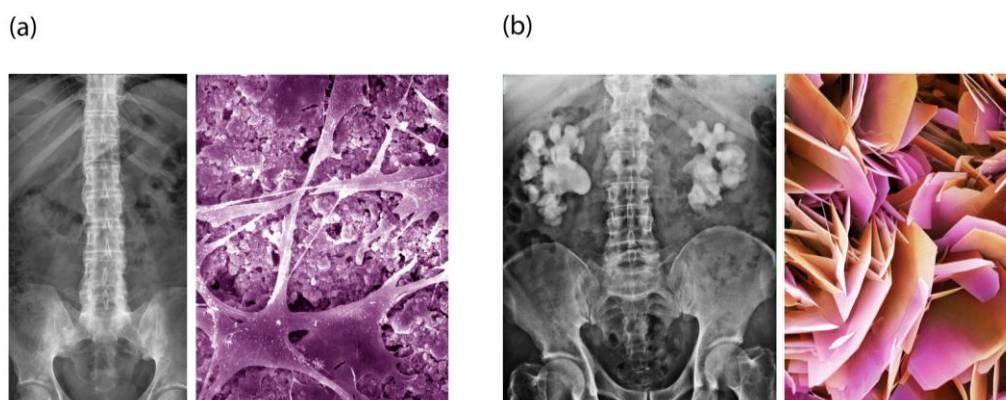
Složka	w / hm %			
	Celý zub [35]	Sklovina [25,26]	Dentin [25,26]	Cement [35]
Ca <sup>2+</sup>	35,2	36,5	35,1	26,2
P <sup>5+</sup>	16,8	17,7	16,9	12,2
Mg <sup>2+</sup>	0,3	0,44	1,23	*
Na <sup>+</sup>	–	0,5	0,6	*
K <sup>+</sup>	–	0,08	0,05	*
Ca:P	2,1	1,63	1,61	2,08
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	3,45	3,5	5,6	*
F <sup>-</sup>	–	0,01	0,06	*
Cl <sup>-</sup>	–	0,3	0,01	*
Anorg <sup>a</sup>	–	97	70	60
Org <sup>b</sup>	–	1,5	20	25
H <sub>2</sub> O	–	1,5	10	15

\* hodnota srovnatelná s hodnotou dentinu, <sup>a</sup> anorganický podíl, <sup>b</sup> organický podíl

### 2.6.3 Patologická biomineralizace

#### a) Poruchy kalcifikace

Nadměrné ukládání vápenatých solí do organické matrice, v níž se normálně nevyskytují, je označováno jako extrémní biomineralizace, patologická kalcifikace nebo jednoduše zvápenatění (Obr. 3). Existují dva druhy krajní biomineralizace: dystrofická a metastatická [16,25,36–39]. První se objevuje v poškozených tkáních, zejména napadá tkáň tepen nebo vazivo uzlovité strupy [40,41]. Výrazná bývá i kalcifikace srdečních chlopní u starších lidí [42]. Metastatická kalcifikace je způsobena hyperkalcemií (zvýšená hladina Ca<sup>2+</sup> v krvi) a dochází u ní k ukládání vápenatých solí do zdravých tkání [43].

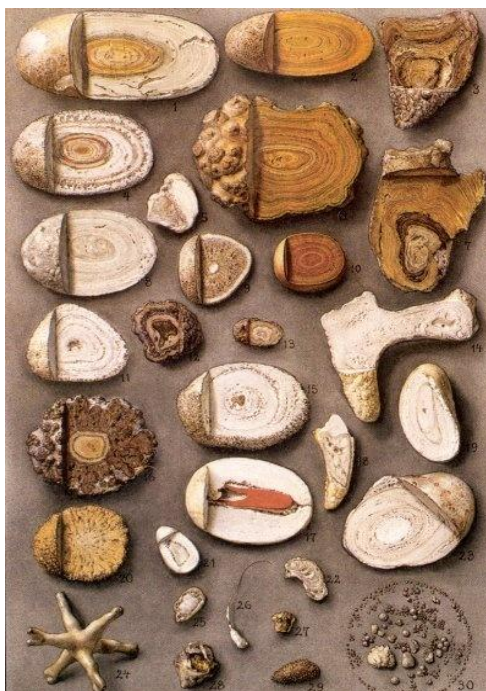


Obr. 3: Příklady kalcifikace: kostnatění páteře (a) a ledvinový kámen (b)

K zvápenatění může dojít vlivem zvýšené hladiny hormonů, v souvislostech s destruktivními procesy kostí, při špatném metabolismu vitamínu D nebo v důsledku selhání ledvin. Ukládání vápenatých solí probíhá i v jiných orgánech, např. v plicích, žaludeční sliznici či ve svalech [44]. Na rozdíl od minerální fáze obsažené v přirozeně kalcifikovaných částech, minerální fáze patologické kalcifikace se obvykle vyskytují ve formě směsí fosforečných a nefosforečných složek ( $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{P}_2\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , šťavelany, aj.) [18,25,26,45,46]. Vedle těchto kalcifikačních poruch se vyskytuje také opačný případ, kdy dochází k nedostatečnému vývinu, úbytku nebo ztrátě pevnosti a hutnosti kostní hmoty, jako je např. „nemoc křehkých kostí“, tedy „*osteogenesis imperfecta*“, či porucha tvorby dentinu – „*dentinogenesis imperfecta*“. Příčinná léčba v dnešní době zatím neexistuje a spočívá v nápravě a zmírňování následků tohoto onemocnění [47].

### b) Litiáza

V různých orgánech se poměrně často tvoří kameny, jejichž tvorba se obecně označuje jako litiáza. Doplnění tohoto pojmu o název příslušného orgánu pak označuje bližší původ kamene, jako např. kamenný konkrement v ledvinách či močových cestách označován jako urolitiáza. Ledvinové a močové kameny (Obr. 4) jsou složité, heterogenní systémy doprovázené organickou maticí, která vytváří pojivo mezi krystalickými a amorfními agregáty těchto složek.



Obr. 4: Různorodost ledvinových kamenů

Názory na vznik urolitiáz se velmi různí. Jsou známy dvě hlavní teorie, které se navzájem liší. První je tzv. koloidová, kdy je jako základ tvorby konkrementu brána základní matrice. Druhá teorie vidí základ konkrementu v jeho „jádre“, tvořeném obvykle anorganickými látkami, nejčastěji CaP krystality. Toto jádro je tvořeno jednou látkou, na kterou se centricky „nabalují“ další vrstvy [49,50]. Z hlediska chemismu je možné konkrementy považovat za směsi látek, tvořené obvykle 2 až 4 hlavními komponentami, spolu s dalšími minoritními látkami. Jen v malé míře se vyskytují monominerální litiázy. Mezi nejčastější CaP složky vyskytující se v ledvinových kamenech patří HA, AP, WHI, BRU ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), dahllit (DAL,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$ ) a monetit (MON,  $\text{CaHPO}_4$ ) [51–54]. Procentuální zastoupení jednotlivých konkrementů není v literatuře jednotné a je spojováno jak s kontinentálními, národnostními, tak dokonce i s populačními faktory. V Tab. 4 je uveden přehled výskytu urolitiázy ve střední Evropě [55].

Tab. 4: Výskyt urolitiázy ve střední Evropě vzhledem k jejímu chemickému složení

Název	Výskyt / %
Monohydrát šťavelanu vápenatého (WHE, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	40 – 60
Dihydrát šťavelanu vápenatého (WED, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	40 – 60
Smíšené kameny na bázi CaP	20 – 60
Smíšené kameny (šťavelany vápenaté + CaP)	35 – 40
Struvit (STR, $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	5 – 15
Kyselina močová	5 – 10
Brushit	2 – 4
Cystin ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ )	1 – 3

Ledvinové kameny se kromě chemické struktury liší i příčinami svého vzniku. Jedním z hlavních důvodů vzniku močových kamenů je nedostatečný příjem tekutin, dále infekce močových cest, nadměrný příjem potravy bohaté na kamenotvorné látky nebo vrozené poruchy metabolismu. Krystaly vznikají při precipitaci solí různého chemického složení za vhodných podmínek (iontová síla,  $pH$ ). Např. v kyselém moči se zpravidla vyskytují uráty, v alkalické pak fosforečnany. Většina krystalů je snadno identifikovatelná morfologicky, problémy mohou však činit amorfní formy v podobě ACP, u kterého bylo prokázáno, že podporuje vznik fosforečnanových urolitiáz tvořících 20 % močových kamenů [53,55,56].

## **2.7 Uplatnění a vývoj aplikací fosforečnanů vápenatých**

Fosforečnany vápenatými se zabývalo již v minulém století několik vědeckých týmů [57–60] a v dnešní době se ve výzkumech nadále intenzivně pokračuje. Představují bohatou skupinu chemických sloučenin obecně charakterizovaných velkou termodynamickou stabilitou. Apatity mají obecně tři neobvyklé a chemicky důležité vlastnosti: vysoký stupeň nestechiometrie, vysokou specifickou plochu a sklon k vytváření rozptýlených, krystalických či krypto-krystalických forem. Jejich struktura poskytuje ve své krystalické mříži vysoký počet vakancí a dovolují tak mnohonásobnou iontovou substituci, která následně ovlivňuje jejich reaktivitu a dává tak příležitost vzniku novým materiálům důležitým v chemických a přírodních vědách. Jejich výjimečných vlastností je plně využíváno v oblasti medicíny [61–65], katalýzy [66,67] a ekologie [68,69].

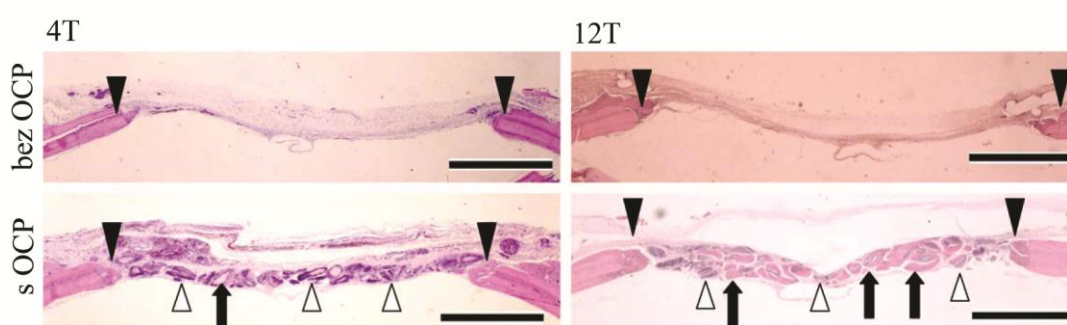
### **2.7.1 Bioaplikace**

CaP jsou v největší míře používány pro povrchové úpravy kostních náhrad, protetik a implantátů. Kovy jsou stále, a pravděpodobně ještě nějakou dobu zůstanou, jako hlavní komponenta kostních náhrad. Pro zlepšení bioaktivních vlastností se povrch kovů upravuje vrstvičkou CaP s cílem stabilizovat rozhraní kost – protetikum a zajistit tak rychlou rekonvalescenci a dlouhodobou životnost v těle pacienta. Existují dvě hlavní možnosti přípravy bioaktivní vrstvy na substrátu, a to vysokoenergetický a nízkoenergetický způsob. Vedle protetik a chirurgických implantátů se tyto látky zkoumají ve vývoji kostních cementů, keramik a koloidních suspenzí.

Průmyslově nejvíce vyvinuté jsou plazmové nástřiky [71–74]. Hlavní složkou nánosu je HA vedle dalších CaP komponent jako jsou  $\alpha$ -TCP,  $\beta$ -TCP či amorfnní fáze. Teplotní gradient způsobuje různorodost v distribuci a krystalinitě obsažených složek [75–79]. ACP je klíčovou složkou, jelikož díky své rychlé rozpustnosti podporuje rychlejší ustálení kostní tkáně [80–82]. Pro zvětšení konverze mezi ACP a HA byla vyvinuta metoda plazmového spreje s vodní parou [83]. Další možnou metodou je použití laseru či vloženého napětí [84,85].

Pro negativní stránky vysokoenergetického způsobu naprašování, jako je nekontrolovatelná homogenita vrstev, nízká resorpce, rozvrstvení, nemožnost uložení tepelně nestabilní fáze (např. ACP a OCP) a nemožnost zakomponování léčebných molekul do vrstvičky CaP, byla v Holandsku skupinou prof. Groota vyvinuta nízkoenergetická technika tvorby CaP vrstvy z roztoku. Kovový substrát se ponoří do přesyceného roztoku CaP, což vede ke srážení apatitů

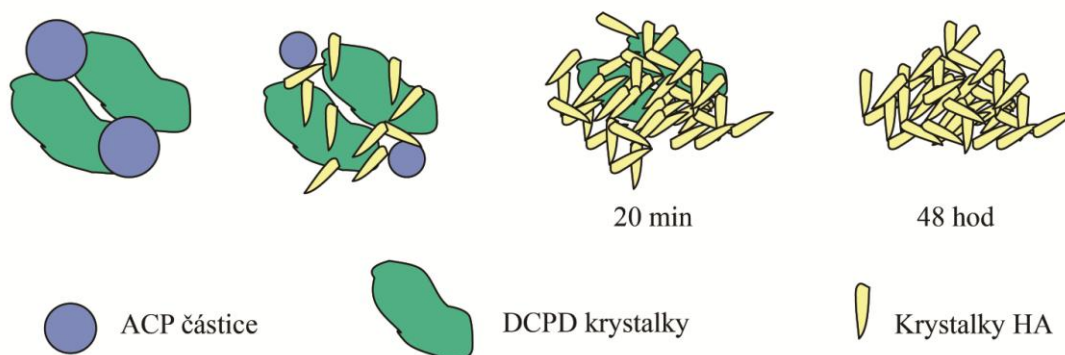
na jeho povrchu [86,87]. Těto techniky je využíváno především pro dentální a ortodontické aplikace umožňující vytvoření tenkého filmu CaP. Tuto vrstvu na rozdíl od vrstvy připravené vysokoenergetickými metodami lze dopovat, např. molekulami antibiotik (tobramycinem) pro lokální redukci infekce při akceptaci implantátu a zlepšení adaptibilních podmínek v těle hostitele [88]. Tato technika však zatím není upravená pro komerční využití. Na *Obr. 5* je uvedena ukázka nízkoteplotně upraveného povrchu obsahujícího OCP při studii „*in vivo*“. Studie srovnává regeneraci kosti bez a s OCP implantátem po 4 týdnech (4T) a 12 týdnech (12T). V případě skupiny bez OCP implantátu byla regenerace kosti omezena, zatímco implantát s OCP podpořil regeneraci kosti [89].



*Obr. 5: Regenerace kosti „s“ a „bez“ OCP v implantátu*  
*Plné trojúhelníčky naznačují rozmezí poškození, bílé trojúhelníčky ukazují umístění implantátu a černé šipky pak nově vytvořenou kost*

Další významnou oblastí zájmu o CaP jsou kostní cementy, které se využívají v podobě past či hmot pro reparaci kostních defektů. Přítomnost kostního cementu na bázi CaP umožňuje rychlejší hojení kostního poranění. Na trhu je dostupný cement Biopon ( $\alpha$ -BSM<sup>®</sup>, Etex Corp.), směs tvořená APC a DCPD v poměru 1:1. Jeho postupná konverze je zobrazena na *Obr. 6*. Vzniklé nanokrystalické částice apatitu mají krystalinitu podobnou jako apatit obsažený v lidské kosti [90].

Pro zlepšení mechanických vlastností se do CaP cementů přidávají polymerní látky [91], případně např. cyklodextrin, který zlepšuje mezimolekulové interakce ve vodném prostředí [92,93]. Cementy se dopují také lékovými agenty – antibiotiky či růstovými hormony pro zvýšení osteokonduktivity a osteoinduktivity [94–97].



Obr. 6: Schéma konverze komerčního produktu  $\alpha$ -BSM<sup>®</sup>

### 2.7.2 Průmyslové použití

Fosforečnany vápenaté se vyskytují nejen v kosterním skeletu živých organismů, ale také se hojně objevují v zemské kůře v podobě apatitů a fosforitů. Vznikají v širokém spektru podmínek a v přírodě jsou běžné především jako podružné směsi v magmatických horninách, zároveň jsou obsaženy i v horninách vyvřelých, usazených či přeměněných. Minerální apatity jsou standardně používány pro výrobu kyseliny fosforečné a následně pro výrobu čistících prostředků a hnojiv. Mimo to bylo dosaženo úspěchů ve vývoji a výzkumu CaP komponent při fotokatalytickém čištění vod a vzduchu [98–100], jako prostředek při sanaci půd [101,102], čištění průmyslových a jaderně zamořených vod [103–106]. Sorpčních vlastností apatitu je využíváno k frakcionaci biochemických substancí, tj. bílkovin, enzymů, nukleových kyselin, hormonů a virů [107–109]. Dále je využíván jako složka katalyzátorů k dehydrataci a dehydrogenaci alkoholů [110] a oxidaci alkanů [111,112]. V těchto aplikacích je využíváno povrchově funkčních skupin, povrchového náboje, hydrofilicity, pórovitosti, sorpčních vlastností, nízké rozpustnosti ve vodě, vysoké stability za redukčních a oxidačních podmínek, dostupnosti a nízké ceny.



## 2.8 Charakterizace fosforečnanů vápenatých

Fosforečnany vápenaté představují bohatou skupinu sloučenin. V terciálním systému  $\text{Ca}(\text{OH})_2 \times \text{H}_3\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (případně  $\text{CaO} \times \text{P}_2\text{O}_5 \times \text{H}_2\text{O}$ ) je známo 11 nesubstituovaných fosforečnanů vápenatých s molárním poměrem  $\text{Ca}:P$  v rozsahu 0,5 – 2,0 (Tab. 5) [113,114]. ACP není do tohoto systému zařazován, jelikož není považován za samostatnou fázi, ale jako mikrostrukturální alternativa CaP [115].

Tab. 5: Přehled CaP sloučenin podle klesajícího poměru  $\text{Ca}:P$

Zkratka	Název	Chemický vzorec	$\text{Ca}:P$
TTCP	Fosforečnan tetravápenatý	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
HA	Hydroxyapatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,7
TCP	Fosforečnan vápenatý ( $\alpha$ , $\beta$ , $\chi$ )	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
OCP	Fosforečnan oktavápenatý	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,3
DCPD	Dihydrát hydrogenfosforečnanu vápenatého	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
DCP	Hydrogenfosforečnan vápenatý	$\text{CaHPO}_4$	1,0
CPP	Pyrofosfát vápenatý	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
CPPD	Dihydrát pyrofosforečnanu vápenatého	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
HCP	Fosforečnan heptavápenatý	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
TDHP	Dihydrogenfosforečnan tetravápenatý	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,7
CMP	Metafosfát vápníku ( $\alpha$ , $\beta$ , $\chi$ )	$\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$	0,5

Základní strukturu fosforečnanů tvoří izolované tetraedry  $\text{PO}_4^{3-}$ , které jsou vzájemně vázány prostřednictvím kationtu. Uvnitř tetraedrů se uplatňují hlavně kovalentní vazby, mezi tetraedry a kationy pak především iontové vazby. Tab. 6 znázorňuje krystalografické parametry vybraných CaP sloučenin [25,26]. Pro srovnání jsou v Tab. 7 uvedeny strukturální parametry biologických vzorků obsahujících významný podíl CaP v podobě HA [70].

Tab. 6: Strukturální parametry CaP

Mřížka		Mřížkové parametry					
		$a_p / \text{Å}$	$b_p / \text{Å}$	$c_p / \text{Å}$	$\alpha / ^\circ$	$\beta / ^\circ$	$\chi / ^\circ$
DCPD	Monoklinická Ia	5,8122	15,1803	6,2392	–	116	–
$\alpha$ -TCP	Monoklinická P2 <sub>1</sub> /a	12,8872	27,2804	15,2192	–	126	–
$\beta$ -TCP	Romboedrická R3cH	10,4184	10,4184	37,3464	–	–	120
OCP	Triklinická	19,6924	9,5232	6,8352	90	93	109
HA	Monoklinická P2 <sub>1</sub> /b	9,8421	19,6843	6,8815	–	–	120
	Hexagonální P6 <sub>3</sub> /m	9,4303	9,4303	6,8911	–	–	120

Tab. 7: Strukturální parametry biologických vzorků tvrdých tkání

	Mřížkové parametry		Krystalinita nm	$MP^A$ GPa	$PT^B$ MPa	Kalcinace 800 °C
	$a_p / \text{Å}$	$c_p / \text{Å}$				
Sklovina	9,441	6,880	100 $\mu\text{m} \times 50 \times 50$	80	10	$\beta$ -TCP+HA
Dentin	9,421	6,887	35 $\times$ 25 $\times$ 4	15	100	$\beta$ -TCP+HA
Cement	*	*	*	15	100	$\beta$ -TCP+HA
Kost	9,410	6,890	50 $\times$ 25 $\times$ 4	0,34 – 13,8	150	HA+CaO
HA	9,430	6,891	200 – 600	10	100	HA

<sup>A</sup> MD – modul pružnosti, <sup>B</sup> PT – pevnost v tahu, \* hodnota srovnatelná s hodnotou dentinu

CaP sloučeniny charakterizuje především molární poměr  $Ca:P$ , acidita/bazicitu, rozpustnost, způsob nukleace, růstu krystalů a fázová stabilita. Tyto parametry silně korelují s  $pH$  roztoku. Čím je nižší hodnota molárního poměru  $Ca:P$ , tím je CaP sloučenina kyselější a tím je více vodorozpustná [26,109,116]. HA se přednostně tvoří v neutrálních a zásaditých podmínkách, ve více kyselých pak spíše OCP a DCPD, kde se předpokládá jejich prekurzorická funkce při celkové konečné přeměně na apatickou fázi. Tento fakt potvrdily „*in vitro*“ studie, v „*in vivo*“ studiích se však tato hypotéza nepotvrdila a spíše se předpokládá přechod na stabilnější fázi přes ACP či  $\beta$ -TCP [117]. Celá situace je v reálných podmínkách daleko složitější. Přítomnost velkého počtu iontů a molekul v biologických podmínkách způsobuje substituci těchto iontů do krystalické struktury apatitu, případně jsou adsorbovány na povrch krystalů. OCP a DCPD se vedle biologického HA vyskytují především při patologické kalcifikaci, kdy je  $pH$  prostředí nižší než za normálních podmínek. Přítomnost peptidů, proteinů a různých anorganických přísad má značný vliv na krystalizaci a je velmi nesnadné předpokládat charakter vznikající CaP fáze [18,118,119].

Pro charakterizaci CaP fáze se používají různé metody, např. chemická analýza, optická a elektronová mikroskopie, infračervená spektroskopie (*FTIR*), Ramanova spektroskopie (*RS*), rentgenová difrakční analýza (*XRD*), nukleární magnetická rezonance (*NMR*), termická analýza. V *Tab. 8* jsou uvedeny charakteristické pásy *RS* pro HA, TCP, ACP, doplněné pro srovnání i daty OCP a DCPD [115,120]. Významné difraktogramy jsou uvedeny v podkapitolech 2.8.1 až 2.8.3 věnovaných ACP, TCP, HA a lze je nalézt i v databázi *JCPDS* [121]. Vzhledem k obtížné rozlišitelnosti některých vibračních domén ať už ve *FTIR* či *RS* způsobené superpozicí a výskytem širokého pásu málo krystalické nebo amorfní substance ve vzorku, je vhodné metody kombinovat. Biologické CaP se často vyskytují v částečně krystalické podobě, jejich kvalitativní a kvantitativní analýza založená pouze na jediné charakterizační metodě se považuje za nedostatečnou, neboť nevyklučuje přítomnost další příbuzné CaP fáze.

Tab. 8: Charakteristické pásy CaP sloučenin v Ramanově spektru

Specifikace	HA	TCP
	$\nu_i / \text{cm}^{-1}$	$\nu_i / \text{cm}^{-1}$
$\nu_{as}$ P-O v $\text{PO}_4^{3-}$	1076 (w), 1054 (w), 1046 (md), 1030 (w)	1074 (w), 1046 (md),
$\nu_s$ P-O v $\text{PO}_4^{3-}$	961 (vs)	970 (vs), 961 (sh)
$\nu_d$ O-P-O v $\text{PO}_4^{3-}$	620 (vw), 610 (w), 594 (md), 582 (w)	624 (w), 612 (md), 578 (w), 599 (w)
$\nu_d$ O-P-O v $\text{PO}_4^{3-}$	447 (md), 433 (w)	480 (w), 460 (w), 439 (md)
$\nu_{as}$ P-O v $\text{HPO}_4^{2-}$	–	1090 (md)
$\nu_s$ P-O v $\text{HPO}_4^{2-}$	–	1039 (w), 1015 (md)
$\nu_s$ P-OH v $\text{HPO}_4^{2-}$	–	948 (vs)
$\nu_d$ $\text{HPO}_4^{2-}$	–	555 (w), 549 (w)
$\nu_d$ O-P-O v $\text{HPO}_4^{2-}$	–	408 (md-b)

Specifikace	DCPD	OCP
	$\nu_i / \text{cm}^{-1}$	$\nu_i / \text{cm}^{-1}$
$\nu_{as}$ P-O v $\text{HPO}_4^{2-}$	1121(vw)	1110 (vw)
$\nu_{as}$ P-O v $\text{PO}_4^{3-}$	1081 (w), 1059 (vw)	1080 (w), 1049 (vw)
$\nu_s$ P-O v $\text{HPO}_4^{2-}$	–	1010 (md)
$\nu_s$ P-O v $\text{PO}_4^{3-}$	985 (vs), 878 (md)	965 (sh), 958 (vs)
$\nu_s$ P-OH v $\text{HPO}_4^{2-}$	–	917 (w), 883 (w)
$\nu_s, \nu_{as}, \nu_d$ v $\text{PO}_4^{3-}$	593 (md)	610 (md-w), 593 (md), 582 (md)
$\nu_d$ $\text{HPO}_4^{2-}$	530 (md)	528 (w), 556 (vw)
$\nu_d$ O-P-O v $\text{PO}_4^{3-}$	–	449 (m), 429 (m)
$\nu_d$ O-P-O v $\text{HPO}_4^{2-}$	415 (md), 379 (w)	413 (m), 354 (w)

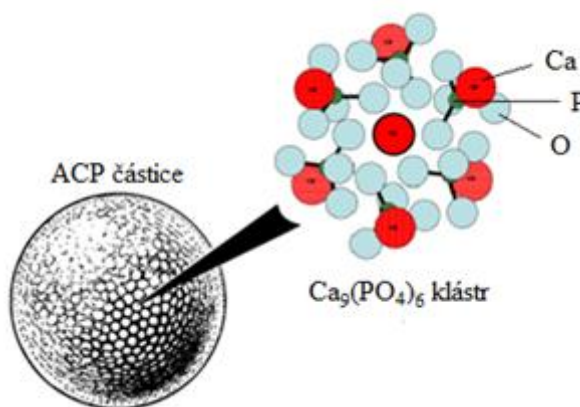
$\nu_s$  - symetrická vibrace,  $\nu_{as}$  - asymetrická vibrace,  $\nu_d$  - deformační vibrace

vs – velmi intenzivní, w - slabý, md - střední, b – široký, sh - rameno

### 2.8.1 Amorfni fosforečnan vápenatý

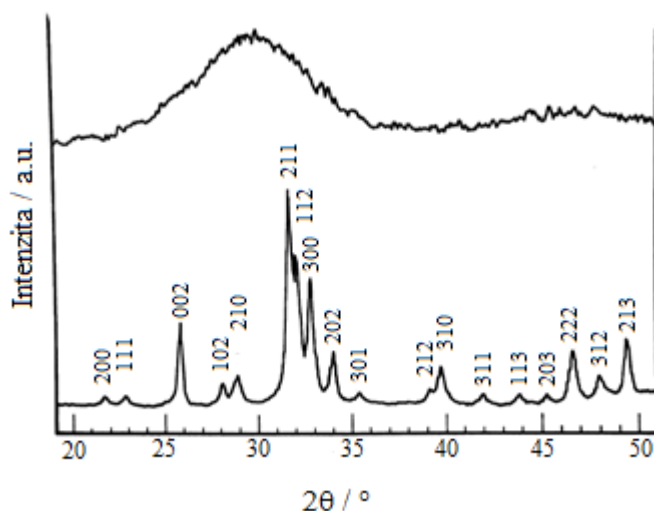
Chemické vzorce ACP nejsou v literatuře uváděny jednotně. Nejčastěji je ACP popsán v podobě  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$  (am) [122,123], dále jako  $\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y$  [18] či  $\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ , kde  $n$  odpovídá rozmezí 3 – 4,5 [70]. Vznik ACP je považován za tranzitní stav během srážení CaP sloučenin z vodných roztoků. Jeho prvotní tvorba souvisí s povrchovou energií, která je nižší než povrchová energie termodynamicky stabilnějších CaP fází, tedy především TCP, OCP či HA [124]. Amorfizace ACP roste s rostoucí koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{PO}_4^{3-}$ , právě tak jako s rostoucím  $pH$  a klesající reakční teplotou. Nepřetržitý pohyb a aglomerace ACP částic přispívají k pozvolné přeměně na krystalicky stabilnější složky – tedy nejprve na nestechiometrickou podobu HA (CDHA,  $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x((\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x})$ ,  $0 < x < 1$ ), který se pak pozvolně přeměňuje na HA [26,109]. Chemické složení ACP v roztoku závisí především na poměru  $\text{Ca}:P$  a  $pH$ . Např. ACP s  $\text{Ca}:P$  poměrem kolem 1,18 ( $pH$  6,6), nebo  $\text{Ca}:P \sim 1,53$  ( $pH$  11,7) [109] či  $\text{Ca}:P \sim 2,5$  pro  $pH > 11,7$  [26,125].

První strukturální hypotézy popsali Betts a Posner [126,127]. Uvedli, že částice ACP je tvořena molekulami  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$  a byla označena jako tzv. „Posnerův klastr“ (Obr. 7) [128]. Vedle Posnerova modelu se objevovaly i další alternativní návrhy v podobě klasického  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  či  $\text{Ca}_6(\text{PO}_4)_4$  [129]. Při lyofilizaci dochází ke shlukování těchto jednotek a částice ACP může mít velikost 20 – 220 nm. Struktura ACP je trigonální s centrálním iontem  $\text{Ca}^{2+}$ . Fosforečnany mají trigonální symetrii s inverzním centrem, kde každá jednotka je bez symetrie [130,131].



Obr. 7: Struktura ACP – „Posnerův klastr“

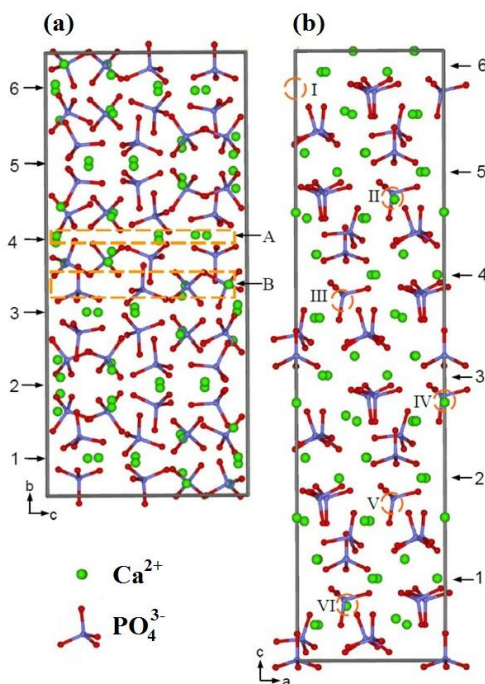
XRD záznam ACP je znázorněn na Obr. 8 (horní křivka), spodní křivka patří dobře krystalickému HA [59]. XRD záznam ACP je bez jakýchkoli difrakčních linií s mírným konkávním průběhem kolem difrakčního úhlu  $2\theta \sim 30^\circ$ . FTIR záznam ACP vykazuje pásovou superpozici a široký pás v oblasti  $\nu_i \sim 3800 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ . Za charakteristickou doménu ACP je ve vibrační spektroskopii považován pás při  $950 \text{ cm}^{-1}$  [131].



Obr. 8: XRD záznam ACP (horní křivka) a dobře krystalického HA (dolní křivka)

### 2.8.2 Fosforečnan vápenatý

Existují dvě hlavní modifikace krystalického fosforečnanu vápenatého, nízkoteplotní  $\beta$  forma TCP ( $\beta$ - $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$ ) a vysokoteplotní  $\alpha$  modifikace TCP ( $\alpha$ - $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$ ) lišící se mřížkovou strukturou (Obr. 9), chemickou a termodynamickou stabilitou [134].



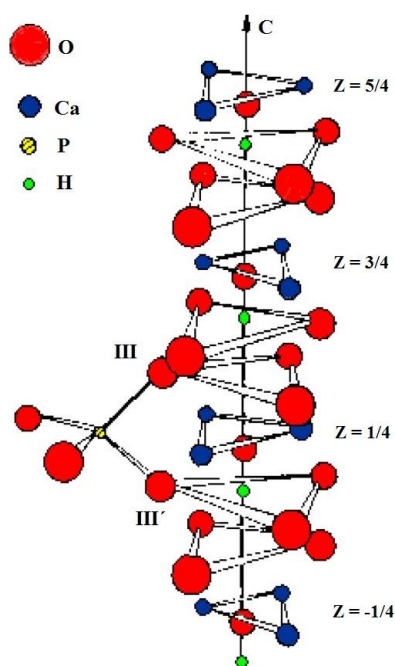
Obr. 9: Struktura  $\alpha$ -TCP (a) a  $\beta$ -TCP (b)

Kalcinací  $\beta$ -TCP při teplotě 1125 °C dochází k transformaci na  $\alpha$ -TCP [70]. Strukturální parametry obou TCP byly uvedeny v Tab. 6 v kap. 2.8.  $\beta$ -TCP je stabilnější než  $\alpha$ -TCP [135], z čehož plyne větší reaktivita  $\alpha$ -TCP ve vodných roztocích, kde dochází k hydrolyzám na směs příbuzných CaP. V biologickém systému se čistý  $\alpha$ -TCP nevyskytuje [136,137]. Taktéž čistý  $\beta$ -TCP není obsažen v tvrdých tkáních, vyskytuje se v živých organismech pouze v podobě Mg-substrátu, nazývaném jako whitlokit (WHI,  $\beta$ - $(\text{Ca,Mg})_3(\text{PO}_4)_2$ ). Struktura  $\beta$ -TCP obsahuje vakance, které jsou příliš malé pro vlastní iont  $\text{Ca}^{2+}$ , ale dovolují zakomponování  $\text{Mg}^{2+}$  do struktury  $\beta$ -TCP. Tento biologický CaP se vyskytuje v měkkých tkáních, chrupavkách kloubních spojů a dále při patologické kalcifikaci, jako jsou tvorby zubního kamene, močových a ledvinových kamenů či při artritidě [13,125,138].  $\beta$ -TCP vykazuje menší strukturální uspořádanost než  $\alpha$ -TCP. Jeho Ramanovo spektrum souvisí s neúplným osídlením kladných iontových míst v krystalické struktuře. S HA mají relativně podobné RS záznamy (viz Tab. 8) [115].  $\beta$ -TCP nemůže být srážen z vodných roztoků, ale je připravován výhradně kalcinací nad 800 °C tepelným rozkladem nestechiometrického HA či z

ACP. Další možností je reakce v pevné fázi mezi  $\text{CaHPO}_4$  a  $\text{CaO}$ . Kromě toho jej lze připravit kalcinací kosti, kde je ale pravděpodobnější vznik iontově substituovaného  $\beta$ -TCP, v podobě WHI. Synteticky připravený  $\beta$ -TCP je používán společně s HA v bioaplikacích, jako kostní cement a v biokeramice (viz kap. 2.7.1) [70].

### 2.8.3 Hydroxyapatit

První popis HA byl publikován společně s popisem existence ACP fáze v roce 1964 [139]. HA je druhá nejstabilnější CaP sloučenina po fluorapatitu (FA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ). Elementární buňka HA obsahuje dvě molekuly  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  a krystalizuje v monoklinické struktuře  $\text{P}2_1/\text{b}$  [140]. Při teplotě nad  $250\text{ }^\circ\text{C}$  dochází k přechodu z monoklinické na hexagonální uspořádání  $\text{P}6_3/\text{m}$  [141,142]. Hexagonální HA (Obr. 10) [143] je méně vnitřně uspořádaný než monoklinická modifikace, což vede k vytváření míst pro iontovou vakanci a substituci. Substituce ionty  $\text{OH}^-$ ,  $\text{F}^-$  či  $\text{Cl}^-$  významně stabilizuje hexagonální struktury HA. Díky tomu je hexagonální HA zřídka stechiometrický a v přírodě se téměř jako monokrystal s hexagonální grupou nevyskytuje. Pro přípravu HA může být použito několik technik, jako reakce z pevné fáze, metody mechano-chemické, metody sol-gel a reakce z vodných roztoků, které zahrnují srážecí reakce, hydrotermální metody a hydrolyzy z jiných méně stabilních CaP sloučenin [144–147]. I když jsou realizovány ideální podmínky pro vysrážení stechiometrického HA, produkt syntézy bývá většinou nestechiometrický s předtvorbou prekurzorické fáze [70].



Obr. 10: Struktura HA

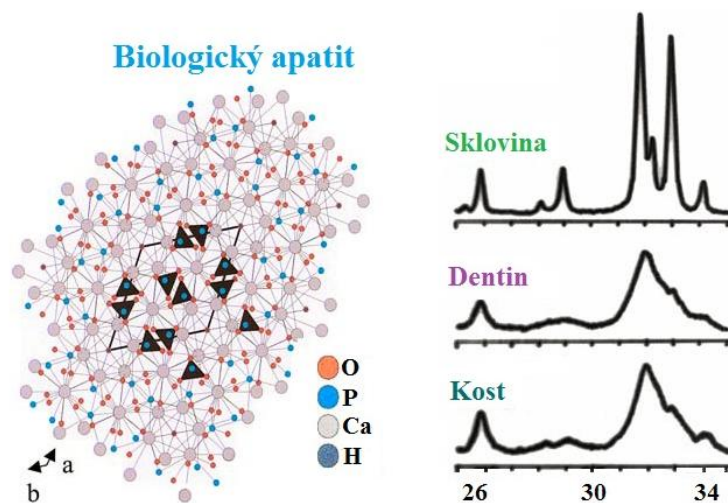
Nejčastěji je HA syntetizován z vodných roztoků obsahujících  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{PO}_4^{3-}$  ve stechiometrickém poměru 1,67 při  $\text{pH} > 9$  a zahříván po několik hodin až dní. Výsledný produkt je filtrován, sušen a obvykle kalcinován při 1000 °C [148]. Nekalcinovaný HA má většinou menší krystalinitu a nestechiometrický charakter, stejně jako HA vyskytující se v biologických systémech, z čehož vyplývá jeho široké uplatnění v biomimetických oblastech medicíny. V první fázi srážení z vodných roztoků vznikají neapatitické sloučeniny, tj. prekurzorické stupně jako ACP a CDHA, které s postupem času podléhají zrání a aglomeraci, kdy molární poměr  $\text{Ca}:P = 1,67$  je dosažen přibližně po 5 hodinách při 90 °C [149]. Povrch čerstvě vysráženého HA je složen ze strukturně hydratovaných vrstev obsahujících snadno substituovatelné ionty [150]. Mikrokrystalický HA může být připraven reakcí z pevné fáze, např. z DCP, DCPD, OCP a CaO,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  nebo  $\text{CaCO}_3$  při teplotě nad 1200 °C v atmosféře  $\text{H}_2\text{O}$  (g) a  $\text{N}_2$  (g). Hydrotermální metody jsou obsáhle popsány v literatuře [109,151]. Metody sol-gel jsou prováděny nejčastěji v etanolu za použití ethanolátu vápenatého a kyseliny fosforečné [152,153]. Mechano-chemická syntéza je realizována ze suché směsi  $\text{CaHPO}_4$  a CaO, případně lze použít prášek přírodního korálu [154–156]. Velké krystaly HA mohou být syntetizovány z chlorapatitu [157] nebo homogenní syntézou [158]. Menší částice HA lze připravit pyrolýzou aerosolu, který obsahuje klíčové  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{PO}_4^{3-}$  komponenty v přiměřeném poměru [159]. V dnešní době jsou studie zaměřovány na vývoj a výzkum nanočástic HA [160].

#### 2.8.4 Charakterizace biologických CaP sloučenin

Biomineralizace je proces „*in vivo*“ spojený s tvorbou anorganických minerálů v živém organismu (viz *Tab. 1*). CaP sloučeniny se přirozeně vyskytují v tělech savců a taktéž se vyskytují v krajních případech biomineralizace při patologické kalcifikaci [15]. Pro biologický apatit je charakteristická přítomnost různých substituentů a vakancí, které způsobují rozdílnosti v molárním poměru  $\text{Ca}:P$  a odchyľují jej tak od poměru stechiometrického HA. To má vliv na krystalickou strukturu, díky čemuž dochází ke snížení stability a zvýšení reaktivity. Mezi hlavní substituenty patří  $\text{CO}_3^{2-}$ , který je v anorganické matici zastoupen ze 4 – 8 % jako náhrada  $\text{PO}_4^{3-}$  a dále bývá velmi často zastoupen  $\text{Mg}^{2+}$  (0,5 – 1,5 %). Přítomnost těchto iontů vede k rozpínání krystalické mříže a významně zvyšuje rozpustnost [161]. Vedle těchto iontů byly studovány i další možnosti substituce, jako např.  $\text{Na}^+$  ionty, které zvyšují mechanické vlastnosti minerální hmoty, ionty  $\text{HPO}_4^-$ , které zvyšují resorbovatelnost a  $\text{F}^-$  ionty, které zlepšují pevnost a termickou stabilitu [18,26,109].

Na *Obr. 11* je uvedena struktura biologického HA, společně s charakteristickými XRD záznamy HA obsaženého v kosti, zubním dentinu a sklovině. Obecný vzorec biologického

apatitu je zde deklarován v podobě  $\text{Ca}_{8,3}\text{V}_{0,7}(\text{PO}_4)_{8,3}(\text{HPO}_4, \text{CO}_3)_{1,7}(\text{2OH}, \text{CO}_3)_{0,15}$ , kde V představuje vakance [70].



Obr. 11: Charakterizace tvrdých tkání: struktura (vlevo), XRD (vpravo)

Sklovina vykazuje viditelně více krystalickou strukturu než HA obsažený v dentinu a kosti. To může souviset s vyšší koncentrací  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{CO}_3^{2-}$  iontů v kostech a dentinu na rozdíl od jejich obsahu ve sklovině. Jejich vyšší koncentrace vysvětluje vyšší rozpustnost a menší krystalickou velikost, která přímo souvisí se snazší resorbovatelností pevné tkáně. Mladé kosti mají rychlejší schopnost rekonstrukce a revitalizace. Navíc, krystaly biologického apatitu jsou daleko menších rozměrů než krystaly chemicky čistého HA či CDHA [18,162].

Biologický se od syntetického HA odlišuje především malými rozměry krystalických zrn a nízkým stupněm krystalické jasnosti. Tyto rysy společně s kombinací nestechiometricity, krystalickou neuspořádaností a přítomností dalších iontů v krystalické mřížce vysvětluje specifické chování biologické matrice. Malá krystalická velikost způsobuje velký specifický povrch částic, který je využíván např. pro sorpci proteinů a léčiv [162,163].

Kalcifikační procesy společně se studiem rozpustnosti a rovnovážných procesů CaP sloučenin jsou zkoumány od roku 1925 [164,165]. CaP povaha kosti byla poprvé určena v roce 1913 [166] a o několik let později bylo ohlášeno, že je vysoká pravděpodobnost přítomnosti  $\text{CO}_3^{2-}$  v apatitické struktuře [167]. Výsledky rentgenové analýzy kostí a mineralizovaných tkání pak vedly k návrhu složení blížícímu se FA a dahllitu (DAH,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$ ) [168]. V současnosti se uvádí, že jsou kosti vystavěny ze zmineralizovaných kolagenních vláken. Do skupiny tkání obsahujících CaP patří vedle kostí především sklovina, dentin, zubní cement a

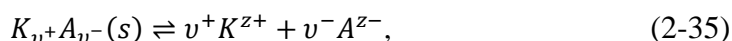


dále specifické alternativy, jako např. jelení parohy či skořápky vajec [169]. Kostí a zuby obsahují téměř 99 % celkového množství tělesného vápníku a asi 85 % celkového množství fosforu, což odpovídá téměř 2 kg z hmotnosti průměrného člověka (~ 60 kg) [170]. Navíc, CaP materiály nejsou vůči tělesným podmínkám nikterak inertní a hrají důležitou roli v metabolických funkcích, jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách.

## 2.9 Termodynamické vlastnosti fosforečnanů vápenatých

### 2.9.1 Rozpustnost

Při disociační rovnováze heterogenního systému, tj. nasyceného roztoku málo rozpustné soli  $K_v+A_v-$  s její tuhou fází, aktivitu  $a_{K_v+A_v-}$  lze považovat za konstantní. Tuto rovnováhu popisuje následující rovnice a charakterizuje ji součin rozpustnosti  $K_s$



$$K_s = a_{K_v}^{v^+} \cdot a_{A_v}^{v^-} = c_{K_v}^{v^+} \cdot c_{A_v}^{v^-} \cdot \gamma_{K_v} \cdot \gamma_{A_v}, \quad (2.36)$$

kde  $a$  je aktivita,  $c$  je molární koncentrace a  $\gamma_i$  je aktivní koeficient. Pro definované rozpouštědlo a teplotu má součin rozpustnosti stálou hodnotu. Přidá-li se do roztoku málo rozpustné soli elektrolyt, který má se solí společný iont, rozpustnost soli klesne, přidá-li se sůl, která nemá s danou solí žádný společný iont, rozpustnost naopak vzroste. Koncentrace komponent lze stanovit z rovnovážných údajů soli za použití látkové bilance, podmínky neutrality a rovnovážných dat disociačních a asociačních iontových párů (Tab. 9).

Tab. 9: Rovnovážná data pro vodné roztoky CaP

	Disociační a asociační konstanty			Ref.
	25 °C	37 °C	45 °C	
$H_3PO_4 \leftrightarrow H^+ + H_2PO_4^-$	$7,11 \cdot 10^{-3}$	$6,22 \cdot 10^{-3}$	$5,63 \cdot 10^{-3}$	[171]
$H_2PO_4^- \leftrightarrow H^+ + HPO_4^{2-}$	$6,30 \cdot 10^{-8}$	$6,58 \cdot 10^{-8}$	$6,61 \cdot 10^{-8}$	[172]
$HPO_4^{2-} \leftrightarrow H^+ + PO_4^{3-}$	$4,73 \cdot 10^{-13}$	$6,61 \cdot 10^{-13}$	$6,61 \cdot 10^{-13}^a$	[173]
$Ca^{2+} + H_2PO_4^- \leftrightarrow CaH_2PO_4^+$	25,6	31,9	$36,5^b$	[174]
$Ca^{2+} + HPO_4^{2-} \leftrightarrow CaHPO_4$	548	681	$787^b$	[174]
$Ca^{2+} + PO_4^{3-} \leftrightarrow CaPO_4^-$	$2,9 \cdot 10^6$	$3,46 \cdot 10^6$	$3,86 \cdot 10^{6b}$	[174]
$Ca^{2+} + OH^- \leftrightarrow CaOH^+$	13,8	$21,3^c$	$28,4^b$	[175]
$H^+ + OH^- \leftrightarrow H_2O$	$1,004 \cdot 10^{-14}$	$2,42 \cdot 10^{-14}$	$4,09 \cdot 10^{-14}$	[176]

<sup>a</sup> předpokládá se stejná hodnota jako při 37 °C, <sup>b</sup> extrapolovaná hodnota, <sup>c</sup> interpolace z dat při 25 a 40 °C

Výsledky jsou následně aproximovány pro danou iontovou sílu  $I$ . Střední aktivní koeficient  $\gamma_{\pm}$  lze vypočítat pomocí rozšířeného vztahu Debye-Hückelova

$$\log \gamma_{\pm} = -\tilde{A}|z_+z_-| \left( \frac{\sqrt{I}}{1+\tilde{a}\tilde{B}\sqrt{I}} \right), \quad (2-37)$$

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2, \quad (2-38)$$

kde  $z_+$  a  $z_-$  jsou iontové náboje, parametry  $\check{A}$  a  $\check{B}$  charakterizují rozpouštědlo a  $\check{a}$  je efektivní průměr iontu v Å (1 Å = 0,1 nm). Tento vztah platí pro elektrolyty s iontovou silou  $I \leq 0,01$  mol.dm<sup>-3</sup>. Další alternativou výpočtu  $\gamma_{\pm}$  je Jonesův vztah pro roztoky o  $I \leq 1$  mol.dm<sup>-3</sup>

$$\log \gamma_{\pm} = -\check{A}|z_+z_-| \left( \frac{\sqrt{I}}{1+e\sqrt{I}} \right) + fI, \quad (2-39)$$

kde konstanty  $e$  (dm<sup>3/2</sup>.mol<sup>-1/2</sup>) a  $f$  (dm<sup>3/2</sup>.mol<sup>-1/2</sup>) mají podle Daviese hodnoty 1,0 a -0,3 a vztah podle Jonese dostává pak následující podobu

$$\log \gamma_{\pm} = -\check{A}|z_+z_-| \left( \frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} \right) - 0,3I, \quad (2-40)$$

Hodnoty parametrů  $\check{A}$  a  $\check{B}$  pro vodné roztoky v intervalu 20 – 45 °C jsou uvedeny v Tab. 10.

Tab. 10: Teplotní závislost parametrů  $A$ ,  $B$

$T / ^\circ\text{C}$	20	25	30	37	40	45
$\check{A} / \text{dm}^{2/3} \text{mol}^{-1/2}$	0,5047	0,5092	0,5141	0,5212	0,5242	0,5299
$\check{B} / \text{dm}^{3/2} \text{mol}^{-1/2} \text{Å}^{-1}$	0,3277	0,3287	0,3297	0,3312	0,3318	0,3326

Studiem rozpustností CaP v různých prostředích a za různých teplot  $T$  se zabývalo několik vědeckých studií [177–182]. Souhrn zjištěných hodnot je uveden v Tab. 11.

Tab. 11: Součiny rozpustností vybraných fosforečnanů vápenatých

$T / ^\circ\text{C}$	$pK_s$			
	HA [178]	DCPD [179]	OCP [180]	$\beta$ -TCP [181]
5	58,53 ± 0,04	6,63 ± 0,01	48,2 <sup>(6°C)</sup>	29,01 ± 0,03
15	58,49 ± 0,03	6,60 ± 0,01	–	28,77 ± 0,02
25	58,52 ± 0,04	6,59 ± 0,01	48,4 ± 0,1 <sup>(23,5°C)</sup>	28,92 ± 0,02
37	58,63 ± 0,05	6,65 ± 0,01	48,7 ± 0,2	39,55 ± 0,02

Součiny rozpustností CaP uvedených v Tab. 11 byly definovány jako

$$pK_s^{HA} = -\log([Ca^{2+}]^5[OH^-][PO_4^{3-}]^3) \quad (2-41)$$

$$pK_s^{DCPD} = -\log([Ca^{2+}][HPO_4^{2-}]) \quad (2-42)$$

$$pK_s^{OCP} = -\log([Ca^{2+}]^4[H^+][PO_4^{3-}]^3) \quad (2-43)$$

$$pK_s^{TCP} = -\log([Ca^{2+}]^3[PO_4^{3-}]^2) \quad (2-44)$$

Teplotní závislost rozpustnosti HA, OCP a DCPD není tolik výrazná jako u  $\beta$ -TCP, u něhož mezi teplotami 5, 15, 25 °C a teplotou 37 °C je rozdíl v hodnotě  $pK_s$  o více než 10. To může být spojeno s pozvolným přechodem k nižší rozpustnosti vlivem částečné transformace na termodynamicky stabilnější fázi, jako je např. OCP či HA.

Bylo vypracováno mnoho studií rozpustnosti ACP, výsledky některých z nich se výrazně liší a jsou uvedeny v *Tab. 12*. Hodnota u  $\alpha$ -TCP se zdá být dokonce chybná, neboť se předpokládá, že rozpustnost  $\alpha$ -TCP je nižší než ACP. Nestabilita ACP (sklon ke konverzi na apatity) znesnadňuje přesné určení jeho rozpustnosti, i když studie autorů Meyer a Eanes ukázala, že iontová aktivita ACP ve vodném prostředí zůstává relativně stabilní [118,183]. Další nesnáze souvisejí s počátečním složením reakční směsi a jsou spojené s přítomností nečistot v podobě  $\text{HPO}_4^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  či  $\text{CO}_3^{2-}$ . Změna ve složení během zrání ACP a v průběhu vnitřní hydrolyzy bez jakékoli změny struktury může mít vliv na data rozpustnosti. Pokud se použije vysoký poměr pevné látky vůči roztoku, docílí se rychlejšího ustanovení rozpouštěcí rovnováhy v roztoku a předejde se nechtěné hydrolyze.

*Tab. 12: Rozpustnost různých ACP a TCP produktů při 25 °C*

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$pK_s$	Ref.
ACP (20 °C)	25,2	[183]
ACP 1 <sup>a</sup> (Ca:P = 1,35)	25,5	[184] *
ACP 2 <sup>a</sup> (Ca:P = 1,35)	28,3	[184] *
ACP (25 °C, pH 7-9)	25,5	[185] **
ACP (18 ± 3 °C)	26,3	[186]
ACP	24,8	[187]
ACP (25 °C)	25,7	[188]
ACP (25 °C, pH 6)	29,9	[189]
$\beta$ -TCP	28,9	[190]
$\alpha$ -TCP	25,5	[191]

<sup>a</sup> ACP se liší časem zrání, \* ~32 % celkového P jako  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,

\*\* ~ 4 % celkového P jako  $\text{HPO}_4^{2-}$

### 2.9.2 Stabilita ve vodných roztocích

Transformační pochody ve vodných roztocích byly sledovány v závislosti na teplotě, pH a přítomnosti cizích iontů [118,191–193]. ACP se ve styku s matečným roztokem transformuje na HA, což ukázalo několik studií [191,194,195], případně přechází na OCP [196]. Rychlost transformace je značně pomalejší v alkalické oblasti, kdy při pH 9 probíhala necelých 5 h [191], kdežto při neutrálním pH a 25 °C trvala do 20 min [194,195]. V prostředí pH 3 – 4 existuje ACP jen pár minut a okamžitě přechází na DCPD místo HA. Bylo však také zjištěno, že ve velmi alkalické oblasti (pH 12,8) se konverzní čas opět zkrátí a trvá méně než 1 h [192]. Hydrolyza ACP je teplotně závislá [191], při 10 °C trvá tři dny, při 26 °C pak 2 h a do 30 min se ACP přetransformuje na apatickou formu při 37 °C (pro pH 8) [191]. Byly pozorovány i autokatalytické transformace v gelovitém ACP. Při neutrálním pH kompletně zhydrolyzuje ACP při 20 °C během 15 h, při 25 °C za 7 h [197] a do 20 min při teplotě 37 °C [198].

Na transformaci v mediích mají vliv některé organické molekuly a dále ionty jako např.  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $CO_3^{2-}$  či  $P_2O_5^{2-}$ , které jsou charakteristické pro tělní tekutiny a jsou přítomné při biochemických procesech „*in vivo*“. Některé látky proces konverze inhibují (–), jiné zase naopak tuto konverzi podporují (+, ++ [26,199–201]. V *Tab. 13* jsou přehledně shrnuty účinky vybraných látek na konverzi zvolených CaP sloučenin. Často dochází k tomu, že během působení iontů na CaP dojde k jejich zabudování do struktury fosforečnanu, jako je tomu v případě  $\beta$ -TCP a iontů  $Mg^{2+}$  a  $Zn^{2+}$ , či v případně působení  $CO_3^{2-}$  na AP strukturu [18]. ACP fázi lze stabilizovat ve vodném roztoku pomocí cyklodextrinů (CD), kde se např. molekuly  $\beta$ -CD adsorbují na povrch amorfních částic, sníží tak jejich rozpustnost a jsou schopny takto stabilizovat ACP až na 24 h [202].

*Tab. 13: Vliv vybraných iontů a sloučenin na složení CaP sloučenin*

	DCPD	OCP	$\beta$ -TCP <sup>A</sup>	AP <sup>B</sup>	ACP
~ ~ ~ Anorganické látky ~ ~ ~					
F <sup>-</sup>	–	–	–	++	–
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	–	–	–	++ <sup>C</sup>	+ <sup>D</sup>
P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup>	–	–	–	–	++
Mg <sup>2+</sup>	+	+	+	–	+ <sup>D</sup>
Al <sup>3+</sup>		–		–	+
Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>		–		–	+
Zn <sup>2+</sup>	+	–	+	–	+
~ ~ ~ Organické látky ~ ~ ~					
Citrát		–		–	
Proteoglykan				–	
Fosfátové proteiny				+	
Proteolipidy				+	

<sup>A</sup> čistý  $\beta$ -TCP, <sup>B</sup> apatit se sklonem k deficitům, <sup>C</sup> vznik dahllitu ( $Ca_{10}(PO_4CO_3)_6(OH)_2$ ),

<sup>D</sup> nutný krajní molární poměr iontu k obsahu  $Ca^{2+}$  ve struktuře ACP

V *Tab. 14* jsou uvedeny *pH* intervaly stabilit vybraných CaP sloučenin ve vodném prostředí při 25 °C [178,203]. U ACP je pokládán za metastabilní oblast *pH* interval 5 – 12. Jeho rozpustnost značně klesá s rostoucím *pH*. ACP se v rozmezí *pH* 7 – 9 postupně transformuje přes OCP na HA. Největší stabilitu v daném intervalu ACP vykazuje při *pH* = 10,3 [192].

*Tab. 14: Oblasti pH pro dosažení nejvyšší stability CaP ve vodných roztocích při 25 °C*

	<i>pH</i> rozsah		<i>pH</i> rozsah
DCPD	2,0 – 6,0	OCP	5,5 – 7,0
$\alpha$ -TCP	*	ACP <sup>#</sup>	5,0 – 12,0
$\beta$ -TCP	*	HA	9,5 – 12,0

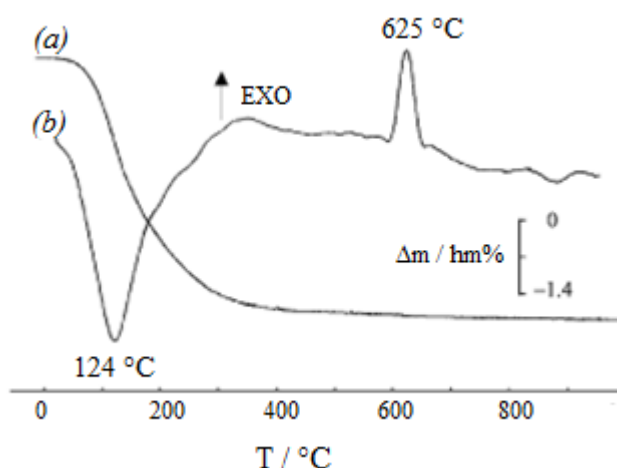
\* nejsou sráženy z vodných roztoků, <sup>#</sup> metastabilní ve vodném roztoku

Existují celkem tři obecné teorie mechanismu konverze ACP. První z nich hovoří o změně poměru  $Ca:P$  ve struktuře, která je spojená se změnou poměru  $Ca:P$  v roztoku. Ta je způsobena tvorbou další pevné fáze s jiným poměrem  $Ca:P$ , kterou může být TCP nebo HA; každopádně směřuje k termodynamicky stabilnější fázi než je samotný ACP. Jako druhý mechanismus je uvažována reorganizace Posnerových klastrů, které budují apatitické krystalky. Poslední teorií je povrchová transformace [197], kdy dochází ke shlukování ACP částic a k následné tvorbě zárodků TCP či HA a růst zrn je podporován migrací částic [204]. Mechanismus konverze není ještě plně objasněn a názory se v literatuře liší. Je vysoce pravděpodobné, že se uplatňuje několik mechanismů najednou, případně lze hledat vysvětlení v odlišných rozpouštěcích vlastnostech různých vrstev či částí vzniklých CaP krystalků.

### 2.9.3 Termické změny fosforečnanů vápenatých

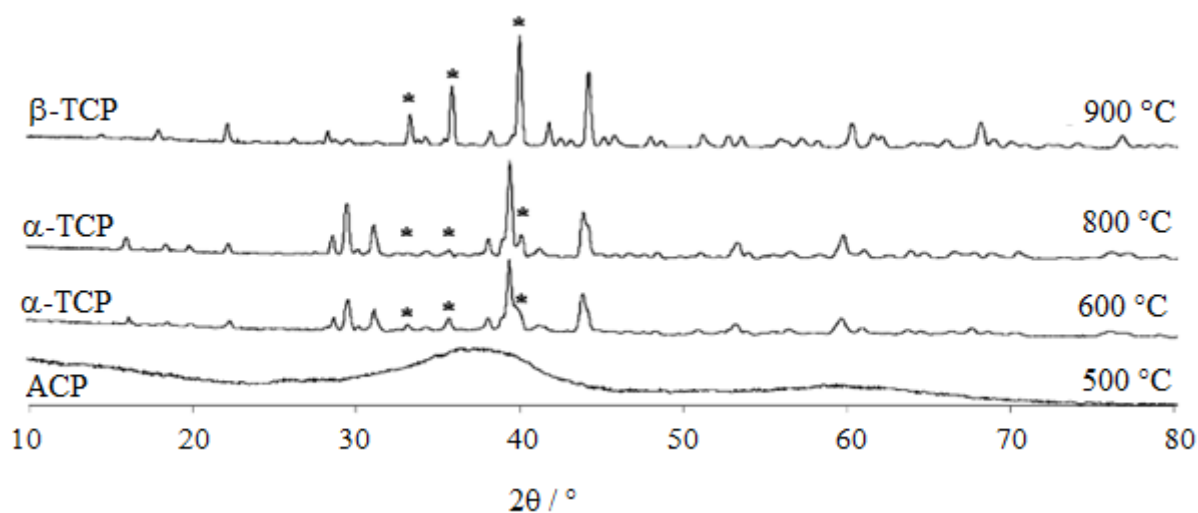
#### a) Amorfní a krystalické modifikace $Ca_3(PO_4)_2$

Dehydrataci a změny ACP během zahřívání zkoumali např. Somrani [205], Eanes [206], Feng [207] a další [191,204,208]. Somrani a kol. zahříváním vzorku zjistili, že nejprve dochází k dehydrataci v oblasti 25 – 327 °C s maximem DTA křivky okolo 124 °C, se zdánlivou aktivační energií dehydratace 68,2 kJ.mol<sup>-1</sup> [209], viz Obr. 12. Intenzivní exotermní pík s maximem při 625 °C je přiřazen krystalizaci ACP na termodynamicky stabilnější formy TCP. Transformační procesy při plazmovém naprašování ACP v teplotním rozsahu od pokojové teploty do 1000 °C ukázaly, že docházelo k tvorbě polykrystalické směsi  $Ca_2P_2O_7$  (CCP), HA a CaO [207]. Podobných výsledků dosáhli i v jiných studiích, kde výsledná kalcinační směs ale neobsahovala CaO [182,208].



Obr. 12: TG (a) a DTA (b) křivky ACP

ACP si ponechává svou amorfní podobu až do teploty 500 °C, kdy nebyla pozorována přítomnost žádné krystalické fáze (Obr. 13). Po zahřátí na teplotu 600 °C dochází především ke krystalizaci na  $\alpha$ -TCP s malým množstvím nízkoteplotní modifikace  $\beta$ -TCP. Tato metastabilní fáze byla zaznamenána až do teplot 800 °C. Čistá forma nízkoteplotního  $\beta$ -TCP byla obdržena po kalcinaci nad 900 °C [202,206]. Samotné nukleaci TCP fáze předchází iontová reorganizace a „upevňování“ vnitřní struktury ACP. Tento fakt vysvětluje další možnosti rozdílností v termochemických údajích, jako je rozpustnost či reakční entalpie, v závislosti na přípravě a vnitřním uspořádání samotné amorfní fáze [205].



Obr. 13: XRD záznamy termické transformace ACP

Souhrn výsledků studia přeměny ACP na TCP, resp. CCP, je uveden v následující Tab. 15.

Tab. 15: Termická transformace ACP

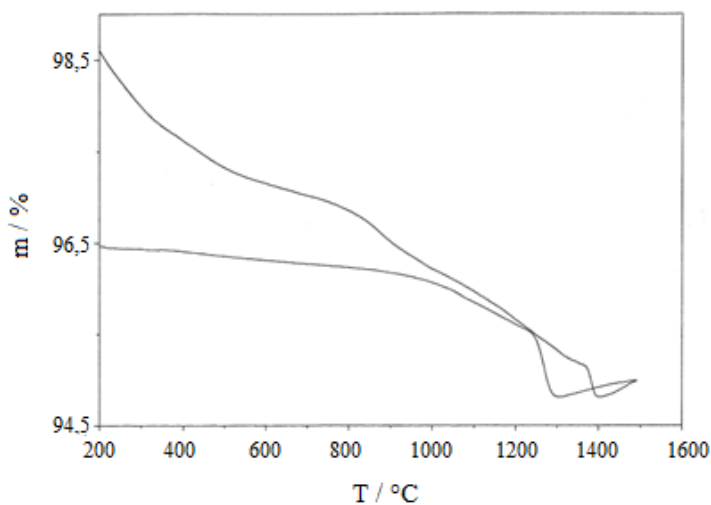
$T / ^\circ\text{C}$	ACP $\rightarrow$ TCP			
	[205]	[32]	[191]	[182]*
500	ACP	ACP (1 h)	$\alpha$ -TCP (>0,5 h)	ACP <sup>400°C</sup>
600	$\alpha$ -TCP + 6% $\beta$ -TCP	$\beta$ -TCP (4 h)	–	$\alpha$ -TCP + $\alpha$ -CCP <sup>730°C</sup>
700	$\alpha$ -TCP + 7% $\beta$ -TCP	$\alpha$ -TCP + $\beta$ -TCP	$\alpha$ -TCP (>0,5 h)	$\beta$ -TCP + $\beta$ -CCP <sup>1000°C</sup>
800	$\alpha$ -TCP + 4% $\beta$ -TCP	$\alpha$ -TCP (1 h)	$\alpha$ -TCP (>0,5 h)	$\alpha$ -TCP + $\alpha$ -CCP <sup>1230°C</sup>
900	$\beta$ -TCP	–	–	$\alpha$ -TCP + $\alpha$ -CCP <sup>1320°C</sup>

\*ACP připraven naprašovací metodou při jiných  $T / ^\circ\text{C}$

Z termických analýz vyplývá, že ACP je nejméně stabilní CaP fází ve srovnání s krystalickými modifikacemi TCP či apatitickými strukturami. Nestabilita ACP, společně s vysokým specifickým povrchem, vysvětluje jeho tendenci k rychlé transformaci ve vodném prostředí na termodynamicky stabilnější CaP struktury, případně až na apatity. Toho je využíváno v praxi, kde je ACP dávána přednost před  $\alpha$ -TCP v biomimetických cementech.

### b) Hydroxyapatit

Struktura HA je v oboru vysokých teplot ovlivněna mnoha faktory, jako metodou přípravy, přítomností substitujících iontů ve struktuře, velikostí částic, strukturovaností vzorku, stechiometricitou, čistotou a samozřejmě také podmínkami termické analýzy (množstvím vzorku, atmosférou, rychlostí ohřevu apod.). Obecně je známo, že HA obsahuje dva typy vázané vody, tj. adsorbovanou a vodu vmezeřenou do krystalické struktury [210]. Adsorbovaná voda je charakteristická svou reverzibilitou a termickou nestabilitou v oboru teplot 25 – 200 °C, při svém odchodu ze vzorku nemá vliv na mřížkové parametry HA. Na rozdíl od toho, strukturní voda je nevratně odstraněna až za vyšších teplot, kdy její ztráta povolna začíná od 200 °C a způsobuje během dalšího zahřívání kontrakci mřížkových parametrů. HA postupně dehydratuje, dochází k uvolňování OH<sup>-</sup> iontů z matrixu vzorku a kalcinace spěje až ke vzniku oxyhydroxyapatitu (OHA), který je prezentován vzorcem  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{O}_x\text{V}_x$ , kde  $x < 1$  a V představuje vakance. V případě, že  $x$  je rovno 1, jedná se o oxoapatit (OA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$ ) [211,212]. Dehydratace HA se neodehrává skokově, ale v širším intervalu teplot. Pokud je zahřívání prováděno za vakua, HA ztrácí OH<sup>-</sup> ionty okolo 850 °C. V případě kalcinace na vzduchu pak v oblasti okolo teploty 1100 °C [213]. Kompletní dehydratace nevede k tvorbě OA, ale degradaci apatitické struktury na směs CaP (nad 1360 °C). Samotný OA vzniká za přísně regulovaných podmínek mezi 800 – 1050 °C a není zcela běžný [212]. Byly zkoumány také transformační procesy při řízeném ochlazení z 1500 °C na 200 °C. Průběh termické analýzy je uveden na Obr. 14. V oblasti 1350 – 1300 °C byla zaznamenána existence malého množství OA ve směsi TTCP a  $\alpha$ -TCP. Tato směs pod teplotou 1290 °C rehydratovala na OHA a dalším ochlazením pod 1100 °C se směs zcela reorganizovala na původní HA [214].



Obr. 14: TG křivka zahřívání a chlazení HA v rozsahu 200 – 1500 °C

Byl taktéž studován vliv atmosféry během termické analýzy. Zvýšení tlaku nasycených par způsobilo zpomalení dehydroxylačních procesů, což způsobilo zvýšení teploty rozkladu HA [215]. Termický rozklad HA obecně probíhá minimálně ve 4 stupních odpovídajících různým mechanismům [216]. V *Tab. 16* jsou znázorněny kinetické mechanismy, společně s hodnotami aktivační energie  $E_A$  a stupni konverze  $\kappa$ . Údaje jsou navíc doplněny o  $E_A$  difuze  $\text{OH}^-$  iontů do struktury HA, interakce  $\text{OH}^-$  iontů a o strukturní uspořádání OA [215,217].

*Tab. 16: Mechanismy termické transformace HA*

Kinetická proces	$E_A / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\kappa$ *
Uvolnění $\text{OH}^-$ z HA struktury	530 *	$0,02 \leq \kappa \leq 0,70$
Difuze $\text{OH}^-$ do HA struktury	190 *, 230 #	$0,02 \leq \kappa \leq 0,13$
Interakce $2\text{OH}^-$ za vzniku $\text{H}_2\text{O}$ (g) a $\text{O}^{2-}$	235 *, 251 $\Delta$	$0,80 \leq \kappa \leq 0,98$
Vytěsnění $\text{H}_2\text{O}$ z vrstvy OHA nebo OA	$x$	$x$
Strukturní uspořádání OA	410 *, 440 #	$0,13 \leq \kappa \leq 0,98$

\* Wang a kol. [216], # Gross a kol. [217],  $\Delta$  Gross a kol. [215],  $x$  hodnota neurčena

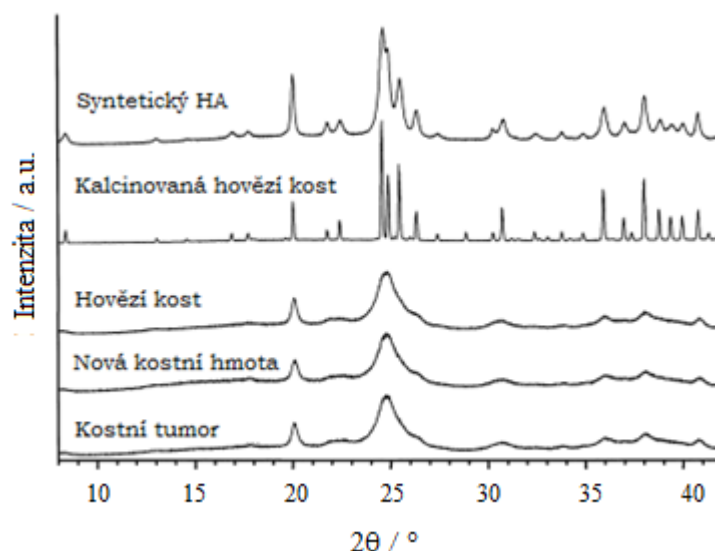
#### 2.9.4 Termické změny biologických fosforečnanů vápenatých

Termickou analýzou, stabilitou a strukturními parametry kostních materiálů, které obsahují CaP, se zabývaly např. studie autorů Jankovic [218], Toque [219], Peters [133], Mezahi [220], Votyakov [221], Kesmez [222], Ying [223] a Holager [224]. Naproti tomu ledvinové kameny, jejich mikrostruktura, transformační procesy a fázová zastoupení jsou popsány ve studiích autorů Ghosh [225], Berenyi [226], Afzal [227] či Kaloustian [228].

##### a) kostní materiály

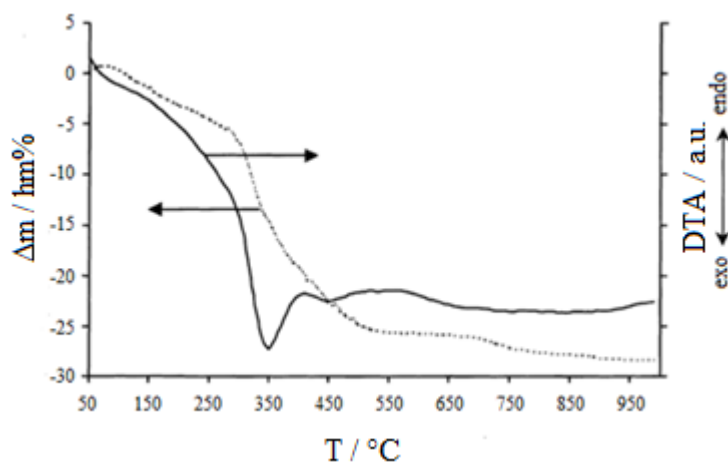
Biologické CaP v kostech tvoří společně s organickou maticí vysoce hierarchickou strukturu [169,229]. Hlavní základna je tvořena z dlouhých kolagenních vláken o průměru asi 100 nm, které obsahují krystalky HA. Složení tvrdých tkání – jak kostí, tak zubů – je specifická záležitost, jejich složení není definitivní a pohybuje se v širším intervalu proměnlivosti poměru  $\text{Ca:P}$ , který způsobuje rozdílnost mechanických vlastností materiálu. Vedle tohoto je proměnlivý i obsah organické hmoty. U zubů se pohybuje v intervalu od 20 do 70 hm%, plně vyvinutá, zdravá kost obsahuje ~ 25 hm% organické hmoty, kostní trámčina 70 hm% a kost postižená tumorem 21 hm% [230]. U hovězí kosti je uváděno 10 hm%  $\text{H}_2\text{O}$ , 30 hm% organické hmoty a 60 hm% HA [218]. Z *Obr. 15* je patrný rozdíl pološířek píku difraktogramů studovaných vzorků kostí. Lze si povšimnout, že není viditelná žádná výrazná změna mezi záznamem nekalcinované hovězí kosti a níže zaznamenanými vzorky lidských kostí.





Obr. 15: XRD záznamy kostních vzorků a syntetického HA

Termický rozklad kostního substrátu probíhá nejméně ve 3 krocích, jak je vidět na Obr. 16. Nejprve v oblasti 50 – 260 °C dochází k dehydrataci, za níž následuje degradace struktury a pak prudší pokles hmotnosti způsobený pyrolýzou organické hmoty, kdy dochází k rozkladu kostní dřeně, tuku a kolagenu na plynné fragmenty CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O a CH<sub>4</sub>. Poslední stupeň je doprovázen mírným poklesem TG křivky mezi 650 – 850 °C, kdy dochází k dekarboxylaci kostní matrice [218,230].



Obr. 16: TG-DTA analýza kosti postižené tumorem

V Tab. 17 jsou pak uvedeny transformační kroky kalcinace kostního materiálu (vzorky stehenní hovězí kosti B-HA1, B-HA2 a B-HA3), doplněné o údaje z transformace synteticky připraveného HA (S-HA).

Tab. 17: Fázové změny při kalcinaci kostního materiálu

$T / ^\circ\text{C}$	S-HA* [220]	B-HA1* [220]	B-HA2* [219]	B-HA3# [219]
700	–	–	HA, $\beta$ -TCP, $\alpha$ -TCP	HA
800	HA, $\beta$ -TCP	HA	HA, $\beta$ -TCP, $\alpha$ -TCP	HA
900	–	–	HA, $\beta$ -TCP, $\alpha$ -TCP	HA
1000	–	–	HA, $\beta$ -TCP, $\alpha$ -TCP	HA
1100	$\beta$ -TCP, $\alpha$ -TCP, HA	HA	HA, $\beta$ -TCP, $\alpha$ -TCP	HA, $\alpha$ -TCP
1200	TTCP, HA	HA	–	–

\* prášek, # tableta

Termogram skloviny a dentinu ve vzdušné atmosféře (rychlost ohřevu  $2,5 \text{ } ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) proměřil mezi prvními Holager [224,231]. Obdobně jako u termické analýzy kostí, i zub má v rozsahu teplot  $20 - 1050 \text{ } ^\circ\text{C}$  tři výrazné oblasti poklesu hmotnosti, a to při  $100$ ,  $300$  a  $700 \text{ } ^\circ\text{C}$ . První pokles je spojen s dehydratací vzorku, která vede v případě skloviny ke ztrátě  $1,7 \text{ hm}\%$  a v případě dentinu  $9,7 \text{ hm}\%$ . V okolí teploty  $300 \text{ } ^\circ\text{C}$ , kdy dochází k rozkladu proteinu, společně s dehydratací krystalicky vázané vody poklesla hmotnost skloviny o  $3,9 \text{ hm}\%$  a v dentinu o  $21,3 \text{ hm}\%$ . V poslední oblasti změny hmotnosti docházelo k uvolnění plynného  $\text{CO}_2$  z biologické matrice zubu. Rozdílnost v hmotnostních úbytcích skloviny a dentinu je zapříčiněna jednak jejich rozdílnou strukturou (viz Obr. 11, kap. 2.8.4), jednak odlišným složením minerálních složek, jak je uvedeno v Tab. 3, kapitoly 2.6.2.

V Tab. 18 jsou shrnuty výsledky *TG-DTA* analýzy zubních materiálů – skloviny a dentinu, které byly od sebe odseparovány za použití chirurgického kladívka (**A**), případně řezného kotouče (**B**) [232]. Dále jsou uvedeny výsledky *DTG* analýzy zubního materiálu studovaného pod vzdušnou atmosférou (**C**) [224] a pod atmosférou  $\text{CO}_2$  (**D**) [231]. Po kalcinaci skloviny, dentinu a cementu na  $800 \text{ } ^\circ\text{C}$  obsahují všechny tři složky zubu převážně HA s  $\beta$ -TCP a v případě kalcinace kostní tkáně pak HA společně s CaO (viz Tab. 7, kap. 2.8) [25].

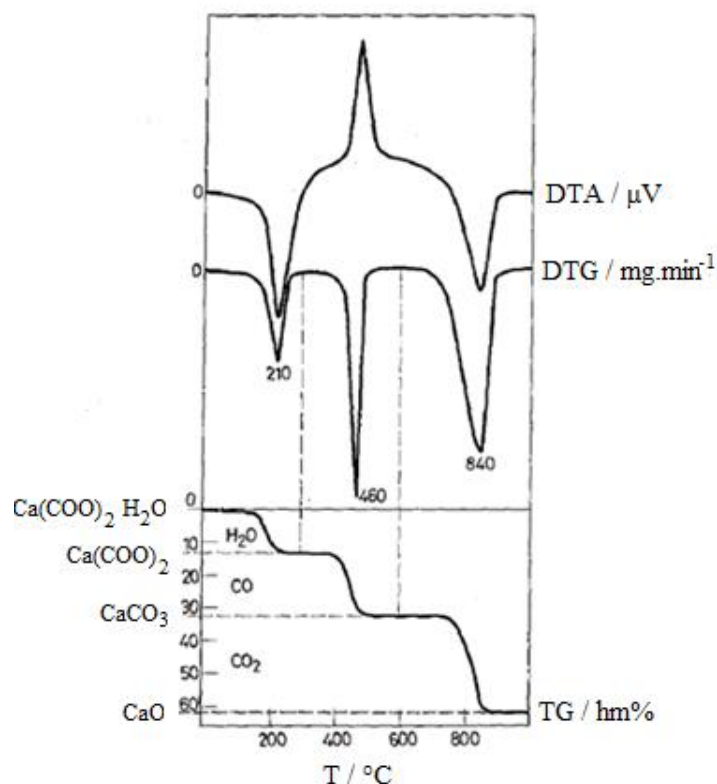
Tab. 18: Hmotnostní ztráty zubních materiálů získané pomocí termické analýzy

$w / \text{hm}\%$	Sklovina				Dentin			
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
Ca:P	2,0	2,0	–	–	2,0	2,2	–	–
H <sub>2</sub> O	0,2	0,8	1,7	1,4	4,2	4,1	9,7	8,3
CO <sub>2</sub>	1,4	1,5	2,6	1,6	5,7	4,2	3,4	5,1
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	58,3	58,1	–	–	47,4	53,8	–	–
OrgM	4,1	4,0	3,5	2,5	18,0	14,0	21,3	16,1

A - chirurgické kladívko, B - řezný kotouč, C - DTA v atmosféře vzduchu, D - DTA v atmosféře CO<sub>2</sub>

**b) ledvinové kameny**

Tvorba ledvinových kamenů je jednou z nejstarších nemocí, kterou se lidstvo zabývá. Kameny mají různorodou povahu, jak ve složení, tvarech či struktuře, tak v příčinách vzniku. Znalost jejich složení je základem pro porozumění jejich etiologii a prevenci vzniku. Samotná kvalitativní analýza je v případech analýzy komplexních vzorků neprůkazná. Taktéž spektrální analýzy nejsou dostačující pro identifikaci složek vzorků. Pro porozumění chování různých složek přítomných ve smíšených kamenech, k rozlišení bezvodých a hydratovaných komponent v pevné fázi a ke zkoumání termické stability a kvalitativního složení anorganických a organických podílů mohou být získány důležité informace pomocí termické analýzy, která je tak ve výzkumu biologických vzorků nepostradatelná. První termoanalytická studie KS byla provedena vědeckým týmem Berenyi a kol. [226]. Termogramy KS na bázi whewellitů (WHE,  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) jsou uvedeny na *Obr. 17*.



*Obr. 17: Záznamy TG, DTG a DTA analýzy WHE*

TG křivka má tři charakteristické hmotnostní úbytky. V prvním stupni dochází k dehydrataci krystalicky vázané vody ze šřavelanu, kde hmotnostní pokles odpovídá ztrátě jedné molekuly vody. Po dehydrataci následuje rozklad organické hmoty na anorganický podíl  $\text{CaCO}_3$  s minimem na DTG křivce při 460  $^\circ\text{C}$ . Poslední endotermní efekt je způsoben odchodem  $\text{CO}_2$  ze vzorku při rozkladu  $\text{CaCO}_3$  na  $\text{CaO}$  [226]. Následující *Tab. 19* shrnuje výsledky termické

analýzy KS [227]. Autoři studie potvrdili třístupňový odchod vody z konkrementu na bázi šřavelanů vápenatých, tj. weddellitu (WED,  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a whewellitu (WHE,  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Nejprve odchází fyzikálně vázaná voda (do 80 °C), pak krystalicky vázaná voda v teplotním rozsahu 90 – 170 °C za vzniku monohydrátu a nakonec poslední molekula strukturní vody, která odchází mezi 170 – 300 °C [227]. Odchod vody může tvořit superpozici několika píků s širokým endotermním efektem v oblasti teplot 50 – 300 °C (viz Tab 19). Ve většině případů zkoumaných vzorků byly identifikovány endotermní a exotermní procesy, které jsou spojovány s dehydratací, rozkladem a úplnou pyrolýzou vzorku. Kameny vždy obsahují nekystalický, organický podíl, který s anorganickými látkami tvoří základ kamene a vytváří tak celkovou matici konkrementu. Rozklad organického podílu je charakterizován exotermním píkem kolem teploty 390 °C. KS tvořené pouze CaP se vyskytují ojediněle, obvykle jsou minoritní příměsí kamenů na bázi  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  [51,56].

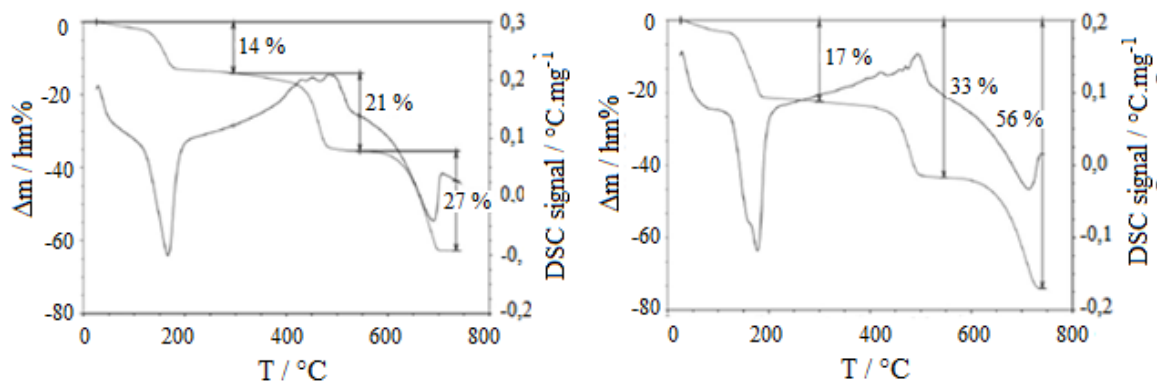
Tab. 19: Publikované termoanalytické parametry ledvinových kamenů

Chemické složení	Efekt, $T / ^\circ\text{C}$			
	Endotermní		Exotermní	
	interval	pík	interval	pík
WHE*	180 – 290	245	360 – 405	380
	670 – 830	790	420 – 470	450
WHE, WED <sup>#</sup>	50 – 270	230	450 – 490	470
	680 – 800	765	–	–
WHE, WED, AP <sup>&amp;</sup>	150 – 220	200	310 – 370	345
	375 – 420	405	430 – 480	455
	600 – 750	710	–	–
WHE, TCP	180 – 290	250	60 – 155	115
	–	380	440 – 490	475
	–	420	–	–
	670 – 815	790	–	–

\* WHE - whewellit:  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , <sup>#</sup>WED - weddellit:  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

<sup>&</sup>AP – hydroxyapatit a dahllit  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$

Mezi novější práce patří termická studie KS týmu Ghosh a kol. [225]. Záznam termických křivek DSC-TG je uveden na Obr. 18 a umožňuje porovnat rozdíly v chování konkrementu na bázi WHE vůči směsnému konkrementu WHE/WED (6:4) [225].



Obr. 18: Záznamy DSC-TG ledvinových kamenů na bázi WHE (vlevo) a WHE/WDE (vpravo)

WHE kámen byl stabilní do teploty 166 °C, kde došlo k dehydrataci na bezvodý šřavelan vápenatý. Konverze bezvodého šřavelanu na  $\text{CaCO}_3$  byla doprovázena hmotnostním úbytkem 21,4 hm% s maximem DSC signálu při 478 °C a při 696 °C došlo k úplné dekarboxylaci na CaO. WHE patří mezi nejčastěji se vyskytující kameny a společně s WED a fází CaP zabírají první tři místa v žebříčku četnosti výskytu, jak již bylo zmíněno v kap. 2.6.3. Pozorovaná třístupňová hmotnostní ztráta WHE (12,7 – 18,8 – 28,7) hm% přibližně odpovídá teoretickým váhovým úbytkům  $\text{CaC}_2\text{O}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  [227]. Ledvinový kámen na bázi směsi WHE/WED v poměru 6:4 podléhala taktéž třístupňové ztrátě (15,9 – 18,8 – 24,5) hm%, a to v teplotních intervalech 150 – 180 °C, 420 – 488 °C a 625 – 715 °C. Tyto údaje se významně liší od výsledků termické analýzy čistého monohydrátu a dihydrátu šřavelanu vápenatého. Rozdílnost mezi těmito dvěma vzorky je odrazem různých pevností vazeb molekul vody ve struktuře WHE a WED a taktéž úzkou specifičností matrice v každém jednotlivém vzorku ledvinového kamene.

### 2.9.5 Termochemické studie CaP

Termochemií CaP se začali vědci zabývat již v 60 letech minulého století [233]. Během následujících 25 let bylo ale provedeno jen málo studií zabývajících se entalpickými charakteristikami a výzkumy byly zaměřeny především na syntézy a charakterizace struktur CaP. Až později, ve studii Kibalczyk a kol. [234] byla sledována entalpická odezva spontánního srážení CaP z roztoků pro různé molární poměry  $\text{Ca:P}$  od 0,17 po 3,33 a o různých počátečních  $\text{pH}$  při teplotách 30, 37 a 42 °C [234]. V Tab. 20 jsou uvedeny hodnoty zjištěných molárních standardních reakčních entalpií  $\Delta_r H^\circ$ . Ve studii však chybí charakteristiky vzniklých fází a entalpické údaje tedy nelze jednoznačně přisoudit konkrétnímu CaP jen na základě poměru  $\text{Ca:P}$ .

Tab. 20: Reakční entalpie ACP pro různé poměry Ca:P

Ca:P	pH	T / °C	$\Delta_r H^0 / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ca:P	pH	T / °C	$\Delta_r H^0 / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
1,67	5,8	30	10,1	1,67	10,7	30	19,1
	7,4	30	13,6		10,7	37	21,2
	7,4	37	16,2		10,7	30	18,6
	8,6	30	18,2		11,0	30	12,8
	9,5	30	18,7	1,33	7,4	30	14,9
	9,5	37	20,8		7,4	37	15,9
	9,5	42	22,2		7,4	42	17,1

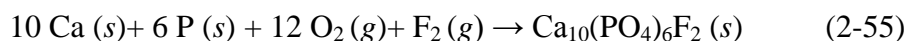
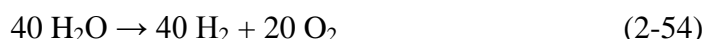
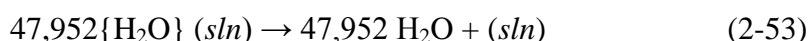
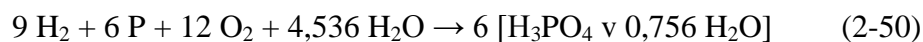
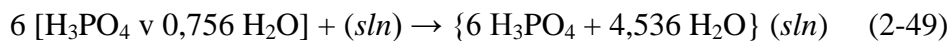
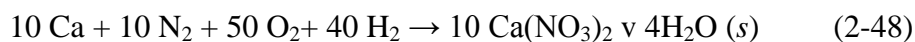
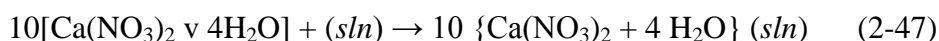
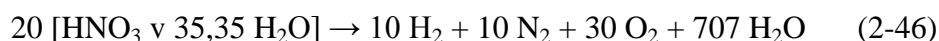
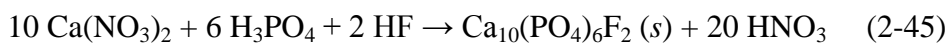
Další entalpická studie zkoumala vliv  $\text{Mg}^{2+}$  iontu na srážení ACP při teplotě 30 °C a pH 7,4. Entalpie srážení ACP jsou uvedeny v Tab. 21 [235]. Jak je patrné,  $\text{Mg}^{2+}$  iont snižuje reakční entalpii a dochází k postupnému včleňování  $\text{Mg}^{2+}$  do CaP struktury zkoumaného ACP za vzniku WHI, který je stabilnější nežli samotný ACP. Tato práce nastínila možnost existence dvou modifikací ACP, tj. ACP1 a ACP2, jejichž existence byla zmíněna v kap. 2.9.1.

Tab. 21: Vliv  $\text{Mg}^{2+}$  na entalpii srážení ACP

Poměr Mg:Ca	$\Delta_r H^0 / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	Pozn.
0,0	27,07	ACP1
0,2	25,46	ACP1
0,0	27,60	ACP2
0,2	23,32	ACP2

Z novějších prací je třeba uvést entalpickou studii apatitů na bázi  $M_{10}(\text{PO}_4)_6Y_2$ , kde  $M$  představuje  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , případně kombinaci  $\text{Ca}^{2+}$  s jiným z uvedených kovů. Za  $Y$  byly voleny ionty  $\text{F}^-$ ,  $\text{OH}^-$  a  $\text{Cl}^-$ . Tyto sloučeniny byly syntetizovány a posléze rozpuštěny v roztoku kyseliny za použití izoperibolického kalorimetru s cílem určit rozpouštěcí entalpii  $\Delta_{\text{diss}}H$  dané látky [236].

Kombinací rozpouštěcích entalpií s dalšími vhodně zvolenými údaji byly určeny standardní molární slučovací entalpie  $\Delta_f H^0$ . Níže uvedené rovnice (2-45) až (2-54) posléze vedou ke stanovení  $\Delta_f H^0$  fluorapatitu definované reakcí (2-55). Tyto reakce mohou být obecně uskutečnitelné, neuskutečnitelné nebo pouze hypotetické. Měření tepla při rozpouštění komponent ve stejném rozpouštědle umožňuje zjistit entalpii reakce a tak odvodit entalpii tvorby produktu. Tento způsob je užitečný, zvláště když hodnota rozpouštěcí entalpie závisí na koncentraci výsledného roztoku, kdy dochází ke vzájemnému ovlivňování iontů v konečné směsi.



Reakce (2-45) znázorňuje proces opačný k rozpouštění apatitu v 46 hm% kyselině dusičné. Reakce (2-46), (2-48), (2-50), (2-52), (2-54) jsou dílčí reakce jednotlivých produktů, případně meziproduktů v reakčním schématu obdržných z „*Handbook of Chemistry and Physics 2006/2007*“ [237]. Reakce (2-47), (2-49), (2-51) a (2-53) jsou doplňující reakce potřebné k uzavření stechiometrie celého reakčního schématu. Jedná se o tepelné odezvy spojené s rozpouštěním, případně ředěním ve zvoleném rozpouštědle (značeno „*sln*“). Konečná reakce (2-55) pak znázorňuje reakci vzniku FA z elementárních prvků. Výsledné  $\Delta_f H^0$  pro studované AP jsou shrnuty v *Tab. 22*.

*Tab. 22: Standardní slučovací entalpie vybraných AP při 25 °C*

$M_{10}(\text{PO}_4)_6Y_2$	$\Delta_f H^0 / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$		
	$Y = \text{F}$	$Y = \text{OH}$	$Y = \text{Cl}$
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6Y_2$	-13 548	-13 305	-13 179
$\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6Y_2$	-13 604	-13 373	-13 233
$\text{Ba}_{10}(\text{PO}_4)_6Y_2$	-13 564	-13 309	-13 246
$\text{Cd}_{10}(\text{PO}_4)_6Y_2$	-8 795	-8 648	-8 463
$\text{Pb}_{10}(\text{PO}_4)_6Y_2$	-8 261	-8 261	-8 204

Ze studií vyplývá, že FA je stabilnější než AP obsahující OH, který je stabilnější než chlorapatit (CIA). To vysvětluje experimentální zkušenost, že pokud je v reakční směsi přítomný fluorit, je srážení FA upřednostňováno. CIA lze (s výjimkou olovnatého apatitu) připravit pouze reakcí z pevné fáze, protože mokrou cestou se přednostně sráží HA. Pro řadu vzorků na bázi  $M_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (viz *Tab. 22*) jsou více stabilní apatity s kovem alkalických zemin, než v případě  $\text{Cd}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  či  $\text{Pb}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Další kalorimetrická studie [63] určila

$\Delta_f H^\circ$  (HA) na hodnotu  $-13\,399 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  a  $\Delta_f H^\circ$  (CIA) =  $-13\,231 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  prostřednictvím rozpouštěcích reakcí dané apatitické komponenty v roztoku HCl nebo HNO<sub>3</sub>. Tyto hodnoty se od údajů v Tab. 22 liší o cca 0,7 % u HA, případně o 0,3 % u CIA [236].

Kalorimetrickými studiemi CaP se dále zabývali autoři Jacques [238], Craig [239] a další [240–242]. Ze studie [239] vyplývá, že na hodnotu  $\Delta_f H^\circ$  má vliv stechiometrický poměr Ca:P, kvalita použitých komponent a stupeň krystalinity. Vyšší stupeň krystalinity vede k růstu hodnoty rozpouštěcí entalpie  $\Delta_{diss} H^\circ$  v důsledku zápornějších hodnot  $\Delta_f H^\circ$ . Kalorimetricky byly studovány i biologické zdroje HA [238]. Vzorky byly získány z kořenů lidských zubů, které byly žihány pro odstranění organického podílu při  $T \sim 1200 \text{ }^\circ\text{C}$ . Kalcinace biologických vzorků ale často vedou na směsi HA,  $\beta$ -TCP, CaO a bývají přítomny i nečistoty, jako např. sloučeniny  $\text{Mg}^{2+}$  či  $\text{Na}^+$ . Autoři se v této studii nepokusili nečistoty odstranit a určené hodnoty entalpií jsou zatíženy jistou nepřesností. Byla pozorována rozdílnost mezi stechiometrickým a nestechiometrickým HA, kde deficitní HA měl hodnotu  $\Delta_f H^\circ$  o  $770 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  nižší nežli stechiometrický [242]. Tento fakt je v souladu s nižší stabilitou deficitního HA. V následující Tab. 23 jsou uvedeny standardní molární slučovací tepla HA publikovaná různými autory.

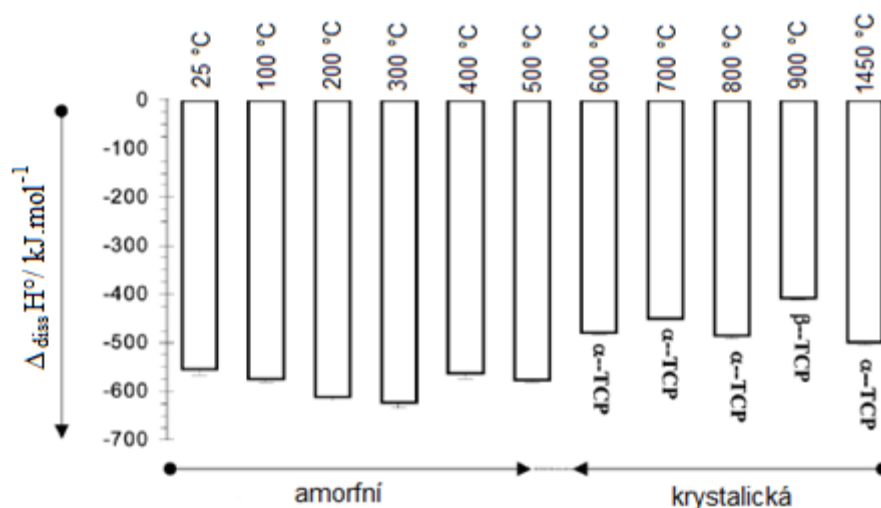
Tab. 23: Publikované hodnoty standardní slučovací entalpie HA

<i>Sln*</i>	$\Delta_f H^\circ / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	Ref.
HCl:18,90H <sub>2</sub> O	$-13\,557 \pm 71$	[243]
HNO <sub>3</sub> :13,99H <sub>2</sub> O	$-13\,509 \pm 9$	[233]
HNO <sub>3</sub> :7,79H <sub>2</sub> O	$-13\,484 \pm 13$	[238]
HCl:19,29H <sub>2</sub> O	$-13\,453 \pm 27$	[243]
HCl:553,41H <sub>2</sub> O	$-13\,430 \pm 81$	[63]
HCl:553,41H <sub>2</sub> O	$-13\,415 \pm 80$	[239]
HNO <sub>3</sub> :35,35H <sub>2</sub> O	$-13\,398 \pm 11$	[63]
HNO <sub>3</sub> :35,35H <sub>2</sub> O	$-13\,360 \pm 10$	[244]
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> :nH <sub>2</sub> O	$-13\,351 \pm 5$	[245]

\* rozpouštědlo použité v reakčním schématu

Standardními molárními rozpouštěcími entalpiemi  $\Delta_{diss} H^\circ$  při různých teplotách předúpravy ACP se zabývala studie [205]. Hodnoty rozpouštěcí entalpie byly značně proměnlivé v závislosti na charakteru a obsahu vody v ACP. Získané výsledky pro vzorky ACP předúpravené v teplotním intervalu 100 – 1450 °C jsou graficky zpracovány na Obr. 19.



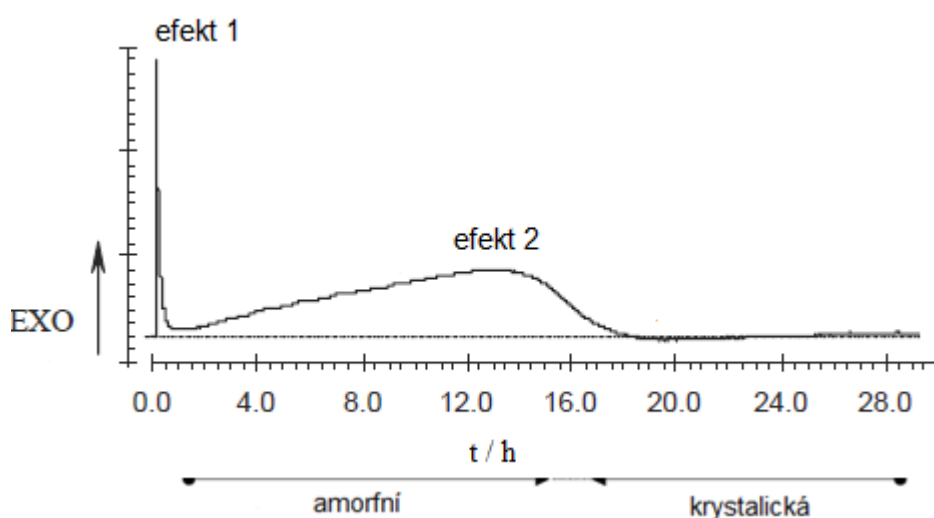


Obr. 19 : Entalpie rozpouštění tepelně předupraveného ACP při 25 °C v 9 % HNO<sub>3</sub>

Hodnota  $\Delta_{diss}H^{\circ}$  se značně snižuje se zvyšující se teplotou předehřátí v oblasti 25 – 300 °C. Pro vzorky zahříváné od 300 do 700 °C se rozpouštěcí entalpie znovu zvyšuje. Při 500 °C, kde je vzorek stále ještě v amorfni podobě, dochází k opětovnému poklesu způsobenému pravděpodobně snížením jeho specifického povrchu. Nad 500 °C se vzorek transformuje na TCP. ACP tranzitně přechází na  $\beta$ -TCP při 900 °C a při rozpouštění vykazuje nejmenší exotermní efekt charakterizovaný  $\Delta_{diss}H^{\circ} = -408,1 \pm 2,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$ . Tato hodnota se liší od dřívější studie o 4,4 %, kde byla pro  $\beta$ -TCP stanovena  $\Delta_{diss}H^{\circ} = -390,1 \pm 1,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$  [246]. Rozpouštěcí entalpie amorfni fáze zahřáté na teplotu 300 °C dává naopak nejvyšší exotermní odezvu a tento ACP tak může být považován za nejméně stabilní fázi.  $\beta$ -TCP má vyšší rozpouštěcí entalpii než  $\alpha$ -TCP, ačkoli  $\Delta_{diss}H^{\circ}$  závisí na podmínkách tvorby. Standardní rozpouštěcí entalpie  $\Delta_{diss}H^{\circ}$  čistého  $\alpha$ -TCP (vzorek ACP zahřátý na 1450 °C) má hodnotu  $-536,3 \pm 1,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$  a je nižší než u vzorku ACP po kalcinaci při 800 °C, kdy rovněž vznikl  $\alpha$ -TCP a rozpouštěcí entalpie měla hodnotu  $-512,0 \pm 1,8 \text{ kJ.mol}^{-1}$ . Tento rozdíl je větší než experimentální chyba a nemůže tak být přisuzován přítomností malého množství  $\beta$ -TCP ve vzniklém produktu.  $\alpha$ -TCP vznikající při nižší teplotě je stabilnější než fáze tvořená za vyšších teplot. Tento fakt je přisuzován skutečnosti, že vysokoteplotní fáze obsahuje více vakancí než fáze vzniklá při nižších teplotách [247]. Vysoká teplota měla také za následek změnu specifického povrchu vzorku ACP, který zůstal konstantní do 400 °C a pak se ostře snížil pro vzorky zahříváné nad 500 °C. Specifický povrch nakonec dosáhl velmi malých hodnot – řádově se jedná o pokles ze 70 na jednotky  $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$  [248]. Rozpouštěcí entalpie ACP je mnohem nižší než entalpie jeho krystalických modifikací a než HA, jehož  $\Delta_{diss}H^{\circ}$  má

hodnotu  $-362,7 \pm 1,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  [249]. Nízká  $\Delta_{diss}H^{\circ}$  a vysoká specifický povrch amorfni fáze vysvětlují její snadný přechod na apatit ve vodném prostředí.

Pomocí mikrokolorimetru byl studován vliv míry hydratace ACP na jeho transformaci na krystalickou formu TCP [64]. Analýza odhalila dva zřetelné exotermní efekty, viz *Obr. 20*. Nejdříve došlo k velmi rychlému, relativně slabému efektu náležejícímu smáčecímu procesu (efekt 1). Druhá tepelná odezva byla naproti tomu pozvolná, se silným tepelným efektem a je přiřazena vnitřní rehydrataci a krystalizaci ACP fáze (efekt 2). K rehydrataci dochází před samotnou konverzí na apatit. Ve vodném prostředí probíhají různé hydrolytické procesy v závislosti na přípravě vzorku.



*Obr. 20: Mikrokolorimetrický záznam hydrolyzy  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 1,2 \text{ H}_2\text{O}$  při  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$   
efekt 1 – smáčení, efekt 2 – rehydratace, krystalizace*

V *Tab. 24* jsou uvedeny výsledky mikrokolorimetrických měření standardních smáčecích entalpií  $\Delta_w H^{\circ}$  (efekt 1) a standardních transformačních entalpií  $\Delta_{tr} H^{\circ}$  (efekt 2) tří rozdílně připravených vzorků ACP, které obsahovaly proměnlivé množství vody. V prvním případě  $3,5 \text{ H}_2\text{O}$  (16,5 hm%  $\text{H}_2\text{O}$ ) – vzorek **A**, dále  $1,2 \text{ H}_2\text{O}$  (6,3 hm%  $\text{H}_2\text{O}$ ) – vzorek **B** a nakonec vzorek **C** s 3,7 hm%  $\text{H}_2\text{O}$  (0,6  $\text{H}_2\text{O}$ ).

*Tab. 24: Standardní entalpie hydrolytických procesů CaP při  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  [64]*

ACP	Tepelná úprava ACP	Efekt 1		Efekt 2		Celkový efekt	
		$\Delta_w H^{\circ} / \text{J}\cdot\text{g}^{-1}$	t / min	$\Delta_{tr} H^{\circ} / \text{J}\cdot\text{g}^{-1}$	t / h	$\Sigma \Delta H / \text{J}\cdot\text{g}^{-1}$	t / h
<b>A</b>	72 h při $-18^{\circ}\text{C}$	-11,3	39	-74,0	6,5	-85,3	12,5
<b>B</b>	2 h při $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$	-11,6	54	-181,4	17,5	-193,0	22
<b>C</b>	2 h při $400 \text{ }^{\circ}\text{C}$	-11,6	56	-193,6	30	-205,2	32

Rychlost konverze amorfni fáze na apatit je značně závislá na míře hydratace a zvyšuje se s nárůstem teploty předúpravy. Snížení obsahu vody ve struktuře ACP tedy zrychluje transformační proces konverze na částečně krystalickou, nestechiometrickou apatitickou fází, která je prekurzorem HA. Směs neobsahovala žádné stopy přítomnosti TCP či OCP, jejichž přítomnost při transformaci ACP ve vodných prostředích bylo možné očekávat.

Entalpie transformace ACP byla studována rovněž pomocí *DSC* techniky [207]. Během ohřevu docházelo k exotermnímu efektu s počáteční teplotou cca 680 °C, maxima na *DSC* křivce bylo dosaženo kolem 710 °C. Termická krystalizace poskytuje nezbytnou energii pro růst krystalů na úkor tvorby metastabilních fází. Z výsledků *DSC* byla určena entalpie transformace ACP  $\Delta_{tr}H$  na směs HA, CCP a CaO o hodnotě  $-20,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Ve studii [250] dosahovala  $\Delta_{tr}H$  výsledné hodnoty  $-43,0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Transformační entalpie ACP byly určeny i pomocí metody *DTA* [205]. Vzorky ACP zde byly před analýzou vystaveny různým teplotám, stanovené hodnoty  $\Delta_{tr}H$  jsou uvedeny v *Tab. 25*. Výrazné rozdíly mezi hodnotami  $\Delta_{tr}H$  v literatuře [205,207,205] lze přičíst odlišným metodám a podmínkám přípravy ACP. Ve studiích [207,250] byl výzkum zaměřen na studii amorfni fáze používané pro plazmové naprašování a vzorek ACP obsahoval jistá množství HA (7, resp. 14 hm% HA). Po *DSC* analýze obsahovala výsledná směs TTCP, HA a CaO.

*Tab. 25: Entalpie transformace ACP na krystalickou fází*

Tepelná úprava ACP	$\Delta_{tr}H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ *
72 h při $-18 \text{ }^\circ\text{C}$	$-76,3$
2 h při $200 \text{ }^\circ\text{C}$	$-75,7$
2 h při $400 \text{ }^\circ\text{C}$	$-71,9$
2 h při $500 \text{ }^\circ\text{C}$	$-91,4$

\* hodnoty vztaženy na  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$

Ve vzorku ACP po termické analýze byla metodou *XRD* zaznamenána přítomnost jediné fáze, a to HA ve všech případech jejich tepelné předúpravy [205]. Hodnoty  $\Delta_{tr}H$  uvedené v *Tab. 25* jsou podobné pro lyofilizované ACP a vzorky ACP, které byly temperovány při 200 a 400 °C, na rozdíl od vzorku zahřívávaného při 500 °C, kdy se hodnota  $\Delta_{tr}H$  od předcházejících údajů výrazně liší. Tento fakt může potvrzovat teorii o dvou modifikacích ACP, které se odlišují různým atomárním uspořádáním a specifickým povrchem [205], navíc s rostoucí teplotou předúpravy vzorku ACP klesal obsah vody ve vzorcích, jak uvedla studie [64].

### 3. Experimentální část

#### 3.1 Přístroje a zařízení

Atomový absorpční spektrometr GBC 906 AA (GBC, Austrálie)

Mikrovlnná pec ETHOS 900 (Milestone)

Reakční izoperibolický kalorimetr (Univerzita Pardubice, ČR)

Ramanův spektrometr BRUKER IFS 55 IR spektrofotometr s FRA 106 (Bruker AXE, USA)

Rentgenový difraktometr D8 Advance (Bruker AXE, USA)

Rentgenový difraktometr X'PertPRO MPD (PANalytical, Nizozemí)

Řezačka „Buehler Low Speed Saw“ (Buehler LTD, USA)

Skenovací elektronový mikroskop JEOL JSM-5500LV s EDX (IXRF Systems, JAP/USA)

Spektrometr SPECTROCIROS<sup>CCD</sup> (Analytical Instruments GmbH, Německo)

Termická analýza SETSYS EVOLUTION s QMS 403-4 (Setaram/Balzars, Francie)

#### *Skenovací elektronový mikroskop s EDX*

Měření provedl Ing. Milan Vlček, CSc. – Společná laboratoř chemie pevných látek Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v.v.i. a Univerzity Pardubice (UPa)

#### *Ramanův spektrometr*

Měření provedl prof. Ing. Miroslav Vlček, CSc. – Katedra obecné a anorganické chemie, UPa.

#### *Difraktometr X'PertPRO MPD*

Měření provedl Dr. RNDr. Petr Bezdička – Ústav anorganické chemie AV ČR v.v.i.

#### *Difraktometr D8 Advance*

Měření provedl doc. Ing. Ludvík Beneš, CSc. – Společná laboratoř chemie pevných látek Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v.v.i. a UPa.

#### *Termická analýza TG-DTA/QMS*

Měření provedly Ing. Eva Večerníková a Mgr. Monika Maříková – Ústav anorganické chemie AV ČR v.v.i.

### 3.2 Použité chemikálie

Amoniak (*aq*) –  $\text{NH}_3$ , 25%, p.a., Lach-ner Neratovice  
 Citronan sodný (*s*) –  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , p.a., Lachema Brno  
 Dihydrogenfosforečnan amonný (*s*) –  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ , 99,9%, Sigma Aldrich Steinheim  
 Dihydrogenfosforečnan draselný (*s*) –  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , p.a., Penta Chrudim  
 Dihydrogenfosforečnan sodný (*s*) –  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , p.a., Lachema Brno  
 Dusičnan vápenatý (*s*) –  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , p.a., Penta Chrudim  
 Fosforečnan sodný (*s*) –  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 98,5%, Lachema Brno  
 Hydrogenfosforečnan amonný (*s*) –  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 98%, Fluka Analytical  
 Hydrogenfosforečnan sodný (*s*) –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 99%, Penta Chrudim  
 Hydroxid draselný (*s*) –  $\text{KOH}$ , p.a., Lach-ner Neratovice  
 Hydroxid sodný (*s*) –  $\text{NaOH}$ , 98%, Lach-ner Neratovice  
 Hydroxid vápenatý (*s*) –  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , 96%, Sigma Aldrich Steinheim  
 Hydroxyapatit (*s*) –  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , 99,999%, Sigma Aldrich Steinheim  
 Chlorid amonný (*s*) –  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , p.a., Lachema Brno  
 Chlorid draselný (*s*) –  $\text{KCl}$ , 99,999%, Sigma Aldrich Steinheim  
 Chlorid sodný (*s*) –  $\text{NaCl}$ , p.a., Penta Chrudim  
 Chlorid vápenatý (*s*) –  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , čistý, Lach-ner Neratovice  
 Kyselina dusičná (*aq*) –  $\text{HNO}_3$ , 65%, HPLC čistota, Merck  
 Kyselina fosforečná (*aq*) –  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 85%, p.a., Lachema Brno  
 Kyselina chlorovodíková (*aq*) –  $\text{HCl}$ , 35%, Lach-ner Neratovice  
 Peroxid vodíku (*aq*) –  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30%, Penta Chrudim  
 Síran hořečnatý (*s*) –  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , p.a., Lachema Brno  
 Síran sodný (*s*) –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , p.a., Lachema Brno  
 Standardní roztoky  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  (*aq*) – 1000 ppm v 0,5 M  $\text{HNO}_3$ , Merck  
 Tetramethylammonium chlorid (*s*) –  $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$ , 98%, Fluka Analytical

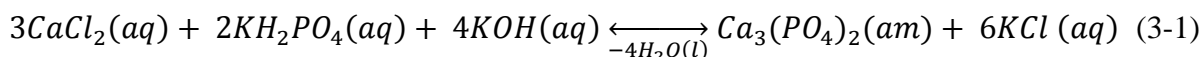
### **Biologické vzorky**

Vzorky lidských ledvinových kamenů (KS1 – KS6) – Fakultní nemocnice Hradec Králové  
 Vzorky lidských zubů (HT1 – HT3) – Soukromá stomatologická ordinace, Česká Lípa  
 Vzorek hovězí stehenní kosti (BTB)

### 3.3 Pracovní postupy

#### 3.3.1 Syntéza amorfního fosforečnanu vápenatého

Amorfní fosforečnan vápenatý (ACP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (*am*)) byl připraven následující reakcí [251]:



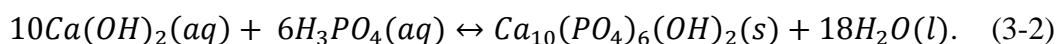
Roztok chloridu vápenatého (44,11 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  v  $300 \text{ cm}^3$  destilované vody) byl smíchán s roztokem dihydrogenfosforečnanu draselného (27,22 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  v  $200 \text{ cm}^3$  destilované vody), který obsahoval 22,44 g KOH. Směs byla 2 min míchána a poté zfiltrována na Büchnerově nálevce, promyta destilovanou vodou a etanolem. Gelovitý produkt byl vždy připravován těsně před experimentem a sušen při  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 3.3.2 Syntéza krystalického fosforečnanu vápenatého

Krystalický fosforečnan vápenatý ( $\beta$ -TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) byl syntetizován z roztoku dusičnanu vápenatého (46,3 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  v  $550 \text{ cm}^3$  destilované  $\text{H}_2\text{O}$ ) a hydrogenfosforečnanu amonného (27,2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  v  $1300 \text{ cm}^3$   $\text{H}_2\text{O}$ ). Druhý roztok byl upraven roztokem  $\text{NH}_3$  na *pH* 10. Reakční směs byla promíchávána po dobu 2 min ( $400 \text{ ot. min}^{-1}$ ). Vzniklá sraženina byla filtrována, promyta roztokem  $\text{NH}_3$  ( $5 \text{ cm}^3$  koncentrovaného roztoku  $\text{NH}_3$  na  $1 \text{ dm}^3$  destilované  $\text{H}_2\text{O}$ ), destilovanou vodou a sušena při  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Výsledný produkt byl 24 h kalcinován při teplotě  $900 \text{ }^\circ\text{C}$  [252].

#### 3.3.3 Syntéza hydroxyapatitu

Syntetický hydroxyapatit (sHA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) byl připraven pomalým přikapáváním ( $3,5 \text{ ml. min}^{-1}$ ) roztoku hydroxidu vápenatého (1,85 g  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ve  $250 \text{ cm}^3$  destilované vody) k roztoku kyseliny fosforečné (1 ml 85%-ní  $\text{H}_3\text{PO}_4$  v  $250 \text{ cm}^3$  destilované vody) podle následující reakce [144]



Směs byla udržována po dobu 1 h na reakční teplotě  $80^\circ\text{C}$  a míchána rychlostí  $400 \text{ ot. min}^{-1}$ . Vzniklý produkt byl ponechán po dobu 24 hodin v matečném roztoku, pak zfiltrován a třikrát promyt destilovanou vodou na Büchnerově nálevce. Následovalo sušení připraveného produktu při  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.3.4 Preparace biologických vzorků

Pro porovnání vlastností syntetických a biologických vzorků fosforečnanů vápenatých byly analyzovány tkáně obsahující významný podíl HA v podobě ledvinových kamenů (vzorky označeny KS1 – KS6), zubů (HT1 – HT3) a kosti (BTB).

#### 3.3.4.1 Biologický hydroxyapatit

Jako zdroj přírodního HA byla zvolena střední část hovězí stehenní kosti, zn. BTB (*Obr. 21*). Kost byla důkladně očištěna od živočišných tkání, vyvařena ve vodě a dočištěna v ultrazvukové lázni. Příčný řez vzorku byl zhotoven pomocí řezačky opatřené diamantovým kotoučem s možností nastavení otáček v rozsahu 1 – 300 ot.min<sup>-1</sup>. Vzorek byl poté broušen směsí korund – etanol. Po analýze povrchu příčného řezu pomocí *SEM-EDX* byl vzorek homogenizován ve vibračním mlýně (2 min) a prášek analyzován *XRD*, *RS* a *TG-DTA/MS*. Vzorek BTB pro prvkovou analýzu pomocí *ICP-OES*, studii rozpustnosti a kalorimetrická měření byl upraven kalcinováním po dobu 1 h při 800 °C pro odstranění přítomné organické matrice. Po ochlazení vzorku v exsikátoru byl vzorek promyt na Büchnerově nálevce zředěnou HCl a několikrát destilovanou vodou pro odstranění podílu CaO, případně Ca(OH)<sub>2</sub>. Takto získaný biologický hydroxyapatit (bHA) byl 3 krát promyt etanolem a sušen při 100 °C.



*Obr. 21: Vzorek kosti*

#### 3.3.4.2 Zubní tkáň

Vzorky lidských zubů byly získány od dobrovolných dárců z Libereckého kraje. Po extrakci byly vzorky omyty lékařským lihem a uchovány ve formaldehydu. Pro charakterizaci byly vybrány tři vzorky zubů: HT1 – řezák, HT2 – třenový zub a HT3 – stolička (viz *Obr. 22*). Po zhotovení příčných řezů byly vzorky broušeny směsí korund – etanol, omyty destilovanou vodou a po osušení uchovány v mikrozkuhavce. Po analýze *SEM-EDX* byly zuby rozemlety ve vibračním mlýnu a prášek byl charakterizován *XRD*, *RS* a termickou analýzou. Stejně jako vzorek biologického HA (bHA) byl připraven i vzorek zubního HA (tHA).



Obr. 22: Vzorčky zubní tkáně

### 3.3.4.3 Ledvinové kameny

6 vzorků lidských ledvinových kamenů (KS1 – KS6) bylo získáno od Fakultní nemocnice Hradec Králové (popis vzhledu a hmotnosti viz Tab. 26). Vzorčky KS byly očištěny etanolem od nečistot, omyty destilovanou vodou, sušeny při laboratorní teplotě a uchovány v mrazicím boxu pro zabránění případné bakteriální kultivaci.

Tab. 26: Studované vzorky ledvinových kamenů

Vzorek	m/mg	Vzhled
KS1	12,3	Hnědý s čirými krystalky, nerovnoměrný povrch
KS2	21,0	Běžový, nerovnoměrný povrch
KS3	13,6	Červenohnědý, nerovnoměrný povrch
KS4	157,6	Šedý s bílými kolečky, hladký povrch
KS5	231,5	Hnědý s čirými krystalky, rovnoměrný povrch
KS6	407,0	Hnědočervený, nerovnoměrný povrch

Vzorčky KS byly rozříznuty, omyty destilovanou vodou a osušeny teplým vzduchem. Vzhledem ke křehkosti vzorků nebyly jejich příčné řezy broušeny a byly podrobeny prvkové analýze na přístroji *SEM-EDX*. Zbývající část vzorku byla rozemleta v achátové misce na jemný prášek a analyzována pomocí *XRD*, *RS* a termické analýzy.



### 3.4 Strukturní a prvková analýza fosforečnanů vápenatých

Biologické vzorky získané pro tuto studii byly nejprve podrobeny prvkové analýze příčného řezu na skenovacím elektronovém mikroskopu s energiově disperzním mikroanalyzátozem (*SEM-EDX*). Povrchová charakterizace *SEM-EDX* byla prováděna ve vysokém vakuu bez nutnosti pokovení. Poté byly příčné řezy vzorků rozemlety na jemný prášek a podrobeny kvalitativní analýze pomocí *RS*. Spektrofotometr umožňoval měřit Ramanova spektra v oblasti  $50 - 3500 \text{ cm}^{-1}$  pro Stokesovy linie a  $110 - 2000 \text{ cm}^{-1}$  pro Anti-Stokesovy linie. Analyzátozem využíval laser *Nd:YAG* s vlnovou délkou 1,06 mm s nastaveným výkonem 300 mW. Pro každý vzorek bylo použito 200 skenů spektra. K vyhodnocení Ramanova spektra byl použit program *OMNIC 7.3* (Netzsch, Německo). Krystalinita a fázové složení práškových vzorků byly zkoumány pomocí rentgenového difraktometru (*XRD*) na přístroji *X'PertPRO MPD*. Pomocí rentgenové mikrodifrakce ( $\mu$ -*XRD*) byly zkoumány tři pevné vzorky ledvinových kamenů (KS4 – KS6) a vzorek příčného řezu zubu (HT1).

Termická a mikrogravimetrická studie biologických vzorků byla uskutečněna na přístroji pro simultánní analýzu *TG-DTA*, který byl připojen k hmotnostnímu spektrometru pro analýzu uvolněných plynů. Biologické vzorky po termické analýze byly opět analyzovány pomocí *XRD* techniky pro stanovení přítomných fází v kalcinovaných vzorcích pro bližší pochopení transformačních procesů. Syntetické vzorky (ACP, TCP a sHA) byly analyzovány pomocí *XRD* (*D8 Advance*), *RS* a *TG-DTA*. Pro srovnání a úplnost údajů byl analyzován také komerční HA (cHA, 99,999% HA) od firmy Sigma Aldrich Steinheim.

Metodou *ICP-OES* byly stanoveny obsahy prvků  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{P}^{5+}$  v synteticky připravených vzorcích ACP, TCP, cHA a sHA. Prvková analýza byla provedena i u biologického hydroxyapatitu bHA, tHA v podobě kalcinovaných vzorků BTB a HT. Analyzované vzorky byly k *ICP* analýze připraveny následujícím způsobem: do teflonových kelímků bylo naváženo asi 0,5 g vzorku s přesností 0,001 g a přidala se rozkladná směs ( $6 \text{ cm}^3$  konc.  $\text{HNO}_3$  s  $1 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}_2$ ). Vzorky byly dále vhodně naředěny za přídavku 0,5 M kyseliny  $\text{HNO}_3$  a cesiového pufru. Pro každou sérii měření byl paralelně proveden slepý pokus. Ke kalibraci byly použity standardy o koncentraci 1000 ppm v 0,5 M  $\text{HNO}_3$ , v případě fosforu byl standardní roztok připraven z  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  rozpuštěním v 0,5 M  $\text{HNO}_3$ . Kalibrační roztoky byly připraveny vhodným ředěním základních standardních roztoků, za přídavku 0,5 M  $\text{HNO}_3$  a cesiového pufru, obdobně jako byly upraveny samotné vzorky. Interval kalibračních řad a příslušné vlnové délky pro stanovení jednotlivých prvků jsou uvedeny v *Tab. 27*. Dále byly

provedeny odhady obsahů H<sub>2</sub>O ve vzorcích ACP, β-TCP, cHA, sHA a ve vzorcích BTB a HT prostřednictvím TG analýzy v teplotním intervalu 30 – 200 °C.

Tab. 27: Vlnové délky a kalibrační standardy pro měření na přístroji ICP-OES

Prvek	Standard	Interval kalibrační řady/ppm	λ /nm
Ca	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> v 0,5 M HNO <sub>3</sub>	0 – 10	393,37
Na	NaNO <sub>3</sub> v 0,5 M HNO <sub>3</sub>	0 – 8,5	589,59
K	KNO <sub>3</sub> v 0,5 M HNO <sub>3</sub>	0 – 7,5	766,49
Mg	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> v 0,5 M HNO <sub>3</sub>	0 – 2,5	279,55
P	(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> v 0,5 M HNO <sub>3</sub>	0 – 10	177,49

### 3.5 Stanovení rozpustnosti fosforečnanů vápenatých

Rozpouštěcí experimenty byly prováděny v dvoustěnné nádobě, která byla temperována pomocí kryostatu (s přesností ± 0,5 °C) a opatřena magnetickým míchadlem s možností nastavení otáček v rozsahu 100 – 1200 ot.min<sup>-1</sup>. Změna koncentrace Ca<sup>2+</sup> iontů v roztoku byla sledována potenciometricky pomocí vápníkové iontově selektivní elektrody (ISE). Po ustálení rovnováhy byl injekční stříkačkou s filtrem Millipore (velikost pórů 0,22 μm) odebrán vzorek roztoku pro AAS analýzu. Pro každou teplotu bylo realizováno 5 rozpouštěcích experimentů s ACP, β-TCP, cHA, sHA a u biologických vzorků bHA a tHA. Rozpustnost CaP vzorků byla sledována při teplotách 25 °C v demineralizované vodě a při 25, 37 a 45 v roztoku NaCl o iontové síle 0,3 mol.dm<sup>-3</sup>. ISE elektroda byla navíc opatřena sítíčkou, která zabraňovala vniknutí tuhých částic do vnitřních prostor elektrody.

Pro kalibraci AAS a ISE elektrody byla použita kalibrační řada roztoků připravených ze zásobního roztoku Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O zředěním příslušným objemem demineralizované vody. V případě stanovení rozpustnosti v roztoku NaCl byla kalibrační řada upravena přidávkem zásobního roztoku NaCl na hodnotu  $I = 0,3 \text{ mol.dm}^{-3}$  pro minimalizaci matričního efektu. Během AAS měření vzorků byla použita atomizace plamenem vzduch – acetylen, průtok oxidantu 10 dm<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup>, průtok paliva 2 dm<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup> a vlnová délka 422,7 nm.

### 3.6 Charakterizace studovaných fosforečnanů termochemickými metodami

#### 3.6.1 Termická analýza

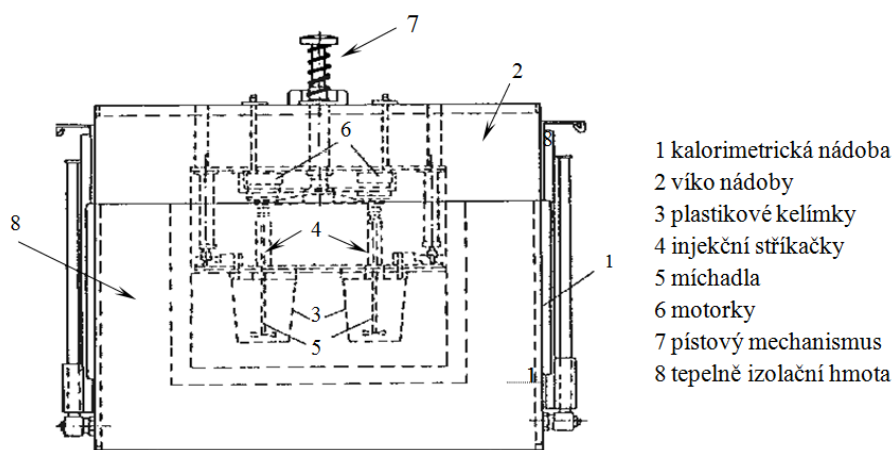
Syntetické a biologické vzorky byly analyzovány na zařízení *Setsys Evolution 1750* v oblasti 30 – 1280 °C s rychlostí ohřevu 5 °C.min<sup>-1</sup>. Termická analýza (TG-DTA) studovaných vzorků byla doplněna kvadrupólovým spektrometrem pro analýzu plynných produktů uvolněných během ohřevu vzorku (MS). Měření probíhalo v dynamické atmosféře argonu (99,995 %)

o průtoku  $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Tato přístrojová technika dovoluje charakterizovat látky s velmi malou hmotností v rozmezí od jednotek mg až po 35 g s citlivostí  $0,03 \mu\text{g}$ . Vzorky o hmotnosti cca 10 mg byly naváženy do korundového kelímku o objemu  $100 \mu\text{m}^3$ . Jako referenční vzorek byl použit  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  (Merck) o stejné hmotnosti jako měl vzorek. Hmotnostní spektrometr pracoval v režimu *MID* (*multiplan ion detection*) pro zvolené hmotnosti. Volba plynných fragmentů souvisela se složením zkoumaného vzorku, které bylo stanovené metodou *XRD*.

### 3.6.2 Kalorimetrická studie

#### 3.6.2.1 Izoperibolický reakční kalorimetr

Ke stanovení reakčních tepel byl použit zdvojený izoperibolický reakční kalorimetr vyvinutý na Katedře anorganické technologie Univerzity Pardubice [254, 255]. Kalorimetr se skládá z části reakční (termostatovaná nádoba, reakční a srovnávací cela s příslušenstvím) a z části měřicí, obsahující Wheatstoneův můstek, zapisovač a počítač s digitální voltmetrovou kartou *PCL-860* (*Advantech Co., USA*). Kalorimetr byl umístěn v temperované skříni, kde byla teplota udržována s přesností  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vnitřek byl vybaven výplní s dvěma dutinami pro zasunutí dvou plastových nádobek o objemu  $200 \text{ cm}^3$  a hmotnosti 7,5 g. Kelímky sloužily jako reakční a srovnávací nádobka. Víko bylo vyrobeno z teflonu s vertikálně posuvným úchytem a opatřeno párem injekčních stříkaček, párem míchadel a termistorů (viz *Obr. 23*).



Obr. 23: Čelní pohled na izoperibolický kalorimetr

Roztok činidla a referenční látky se vstříkoval plastovými injekčními stříkačkami o objemu max.  $10 \text{ cm}^3$ . Stříkačky se společně vyprazdňovaly pomocí pístového mechanismu. Míchání bylo zajištěno dvěma míchadly, jejichž otáčky šlo regulovat ( $300$  až  $1500 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Motorčky poháněly míchadla odděleně, což mělo výhodu v tom, že obsah obou nádobek bylo možné

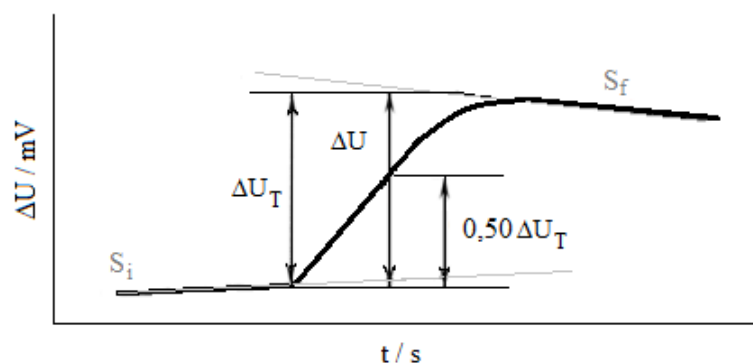
míchat různou rychlostí a šlo tak ovlivňovat závislost *napětí-čas* ( $\Delta U-t$ ) předreakčního děje při různém přestupu tepla z obou nádobek. Jako teplotní čidla byly použity termistory *NR 506* s odporem 90 k $\Omega$  při 25 °C. Termistory v reakční a srovnávací nádobce byly připojeny k diferenčnímu můstku typu *31.00* firmy *Knauer, SRN*. Napěťový výstup můstku byl načítán a zapisován do paměti počítače pomocí voltmetrové karty s použitím programu *Karata* (Univerzita Pardubice, ČR). K odporovému můstku byl paralelně připojen zapisovač pro kontrolní zápis teplotních křivek.

### 3.6.2.2 Vyhodnocení dat

Základním předpokladem správného a reprodukovatelného měření je řádné vyhodnocení výšky tepelného pulsu. Pro zpracování naměřených dat byl pro tuto disertační práci navržen vyhodnocovací modul *ISY* programu *OriTas 2011 RC*.

#### *Teorie vyhodnocení kalibračních dat*

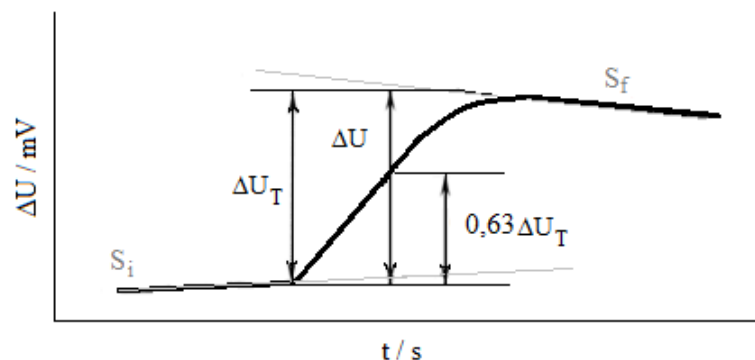
Při elektrické kalibraci je vznikající teplo přímo úměrné době průchodu proudu odporovým tělískem a výsledný napěťový rozdíl  $\Delta U$  mezi počátečním a konečným stavem je určen extrapolací směrnic počáteční linie  $S_i$  a konečné linie  $S_f$  do času  $t$ , ve kterém teplotní změna odpovídá  $0,5\Delta U_T$ . Vyhodnocení je znázorněno na *Obr. 24* [256].



*Obr. 24: Vyhodnocení elektrické kalibrace*

#### *Teorie vyhodnocení dat chemické reakce*

Při chemické reakci vznikající teplo není lineární funkcí času a změna teploty, resp. napětí  $\Delta U$ , která doprovází chemickou reakci je určena extrapolací směrnic počáteční linie  $S_i$  a směrnic konečné linie  $S_f$  do času  $t$ , ve kterém napěťová změna odpovídá  $0,63\Delta U_T$ , jak je znázorněno na *Obr. 25* [256].



Obr. 25: Vyhodnocení typické reakční křivky

### Program OriTas 2011 RC

Pro účely této práce byl navržen modul vyhodnocení reálných naměřených dat v nadstavbovém modulu *ISY* programu *OriTas 2011 RC*. Samotný program *OriTas*, jako hlavní součást instalačního balíčku *Project OriTas*, je určen především pro zpracování a analýzu dat ze záznamu izoperibolického kalorimetru. Byl vytvořen pro numerické vyhodnocení napěťových křivek, tj. pro extrapolaci směrnic základních linií  $S_i$  a  $S_f$ , odhad  $\Delta U_T$  a výpočet výsledného korekčního napětí  $\Delta U$ , které bylo dále přepočítáváno na reakční entalpii podle vztahů uvedených níže.

#### 3.6.2.3 Kalibrace izoperibolického kalorimetru

Jelikož výstupním záznamem izoperibolického kalorimetru je závislost  $\Delta U-t$ , bylo nutné přístroj před měřením kalibrovat a stanovit hodnotu přepočítávacího koeficientu  $\mathcal{G}$  mezi teplem a napětím. Díky tomu lze závislost  $U = f(t)$  převést na závislost  $Q = f(t)$ . Pro zjištění koeficientu  $\mathcal{G}$  byla použita kalibrace odporovým tělískem. Do reakční a srovnávací nádoby bylo napipetováno 100 cm<sup>3</sup> destilované vody, nádoby byly vytemperovány v termostatu na požadovanou teplotu (25, 37 či 45 °C) a poté byly umístěny do kalorimetru. Po zapnutí míchadel a ustavení rovnovážných podmínek bylo pomocí kalibračního tělíska dodáno určité množství tepla, které se vypočítalo ze vztahu

$$Q = U \cdot I \cdot t = R \cdot I^2 \cdot t, \quad (3-3)$$

kde  $Q$  je teplo dodané kalibračním tělískem,  $I$  elektrický proud procházející tělískem,  $R$  odpor tělíska a  $t$  je doba trvání tepelného efektu během kalibrace. Pro každou teplotu bylo provedeno 5 měření. Kalibrační konstanta  $\mathcal{G}$  se pak určí ze vztahu

$$\mathcal{G} = Q / \Delta U, \quad (3-4)$$

kde  $\Delta U$  představuje změnu výstupního napětí odporového můstku určené ze záznamu křivky (viz kap. 3.6.2.2). Vzhledem k reakčním podmínkám používaným při stanovení molární roz-

pouštěcí entalpie  $\Delta_{diss}H^{TCP}$  a  $\Delta_{diss}H^{HA}$  byly termistory opatřeny ochranným obalem proti agresivnímu působení HCl a pro zajištění stejných podmínek tak bylo učiněno i při kalibraci. U izoperibolického kalorimetru byla ověřena správnost měření pomocí standardní endotermní reakce rozpouštění pevného KCl (99,999 %) v destilované vodě [257].

#### 3.6.2.4 Vlastní měření a experimentální podmínky stanovení $\Delta_{cr}H$

Entalpie rozpouštěcích reakcí, ze kterých byly dle navrženého schématu (kap. 4.4.2.2) vypočítány hledané hodnoty krystalizačních entalpií  $\Delta_{cr}H$  studovaných CaP, byly stanoveny pomocí zkalibrovaného reakčního izoperibolického kalorimetru. Vzorčky  $\beta$ -TCP, ACP,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a jednotlivých HA byly rozpouštěny v 0,1 M HCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  navíc v 0,1 M roztoku tetramethylamonium chloridu, který plnil funkci disociačního činidla. Do reakční a srovnávací nádoby kalorimetru bylo napipetováno  $100 \text{ cm}^3$  příslušného rozpouštědla, přičemž jeho iontová síla byla nastavena 3M roztokem NaCl tak, aby při zohlednění obsahu zkoumaného podílu CaP měla celkovou hodnotu  $0,3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Do reakční patrony (upravené plastové injekční stříkačky) byla umístěna odpovídající pevná fáze v takovém množství, aby byla splněna konstantní látková množství v celém schématu. Jako referenční systém byla použita prázdná patrona a obě byly zataveny parafínem, aby byl zamezen kontakt s prostředím před vlastním experimentem. Nádoby s rozpouštědlem byly temperovány v termostatu na potřebnou teplotu a potom společně s patronami vloženy do kalorimetru. Termistory byly opatřeny ochranným obalem proti agresivnímu působení HCl. Každá rozpouštěcí reakce byla proměřena 5krát. Při rozpouštění se pracovalo v přebytku rozpouštědla, aby bylo zaručeno zreagování veškeré pevné fáze. Po zapnutí míchadel byl kalorimetr uzavřen, po ustálení napěťového signálu byl spuštěn načítací program, který zaznamenal předreakční linie (60 s) a poté byla do reakčního roztoku vpravena tuhá fáze. Konec reakce se projevil ustálením konstantní hodnoty  $\Delta U$  na čase. Tepelné efekty dějů byly určeny z časových průběhů napěťových křivek  $\Delta U-t$ , uvolněné teplo dané reakce bylo přímo úměrné rozpouštěnému množství zvolené komponenty. Data byla vyhodnocena pomocí nadstavbového modulu ISY programu *OriTas 2011 RC*.

## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1 Strukturní a mikrostrukturní charakterizace zkoumaných vzorků

Při volbě chemických a fyzikálních metod, které byly pro tuto práci vybrány k analýze a charakterizaci zkoumaných vzorků, se vycházelo ze současných možností a dostupnosti přístrojové techniky. Pro strukturní posouzení vybraných biologických vzorků byly použity skenovací elektronový mikroskop s rentgenovým energiově disperzním mikroanalyzátozem (*SEM-EDX*) a rentgenová mikrodifrakce ( $\mu$ -*XRD*). Syntetické a biologické práškové vzorky byly zkoumány za použití rentgendifrakční analýzy (*XRD*), Ramanovy spektroskopie (*RS*) a optické emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (*ICP-OES*).

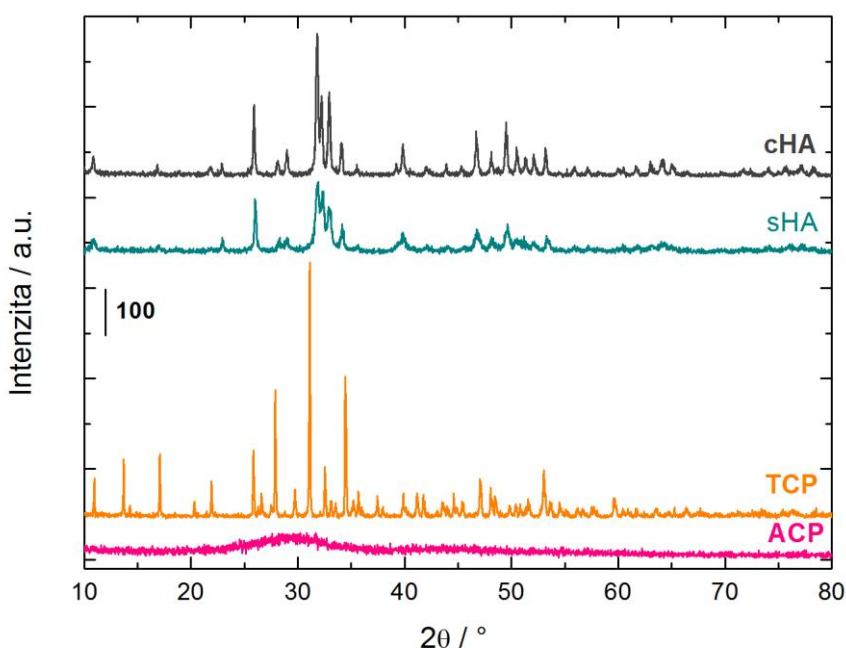
Ve všech případech syntézně připravených CaP se jednalo o požadovaný homogenní, jedno-složkový systém CaP, tj. amorfni fosforečnan vápenatý (ACP),  $\beta$ -formu fosforečnanu vápenatého ( $\beta$ -TCP) a hydroxyapatit (HA). Byly stanoveny molární poměry *Ca:P* a zastoupení  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Mg}^{2+}$  iontů metodou *ICP-OES*. Molární poměry *Ca:P* ve vzorcích ACP a  $\beta$ -TCP odpovídaly hodnotám 1,45 a 1,47. Krystalinity  $\beta$ -TCP měly průměrnou hodnotu  $\bar{d} = 217$  nm. Komerční vzorek hydroxyapatitu (cHA) o molárním poměru *Ca:P* = 1,65 obsahoval hexagonální krystalinity o velikosti 71 nm. Připravený sHA s molárním poměrem *Ca:P* = 1,61 se odlišoval od cHA menšími rozměry krystalitů ( $\bar{d}_{\text{sHA}} = 29$  nm).

*XRD* analýza potvrdila přítomnost HA ve studovaných lidských ledvinových kamenech (KS), a to ve vzorcích KS3 a KS6. Po termické analýze vedené do teploty 1280 °C byla tato složka navíc objevena i v KS4 a KS5. *EDX* analýza tento fakt v případě KS3, KS4 a KS6 potvrdila. Všechny KS obsahovaly štavelan vápenatý, ať už v podobě whewellitu (WHE,  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) či směsi WHE s wedellitem (WED,  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). U vzorku stehenní hovězí kosti (BTB) byl detekován homogenní systém HA ( $\bar{d}_{\text{BTB}} = 13$  nm), který byl zabudován v pórovité matrici kosti. Obdržené vzorky lidských zubů (HT) obsahovaly jedinou krystalickou složku se dvěma velikostně odlišnými fázemi HA1 a HA2 o  $\bar{d}_{\text{HA1}}$  cca 36 nm a  $\bar{d}_{\text{HA2}} = 6$  nm.

#### 4.1.1 Syntetizované a komerční vzorky fosforečnanů vápenatých

Pro účely této práce byly syntetizovány vzorky sHA,  $\beta$ -TCP a ACP, které jsou významné pro svůj výskyt v živých organismech. Způsoby syntézy byly voleny s ohledem na charakter těchto minerálních složek organismu. Jejich vlastnosti byly shrnuty v Teoretické a literární části a jsou obsáhle popsány v mnoha literárních zdrojích [70,120,131]. U syntéz zkoumaných fosforečnanů se ve všech třech případech vycházelo z vodných roztoků, v případě  $\beta$ -TCP byl

produkt následně po několik hodin kalcinován při 800 °C. Vzorek ACP byl připraven rychlou srážecí reakcí z roztoků chloridu vápenatého, dihydrogenfosforečnanu draselného a hydroxidu draselného [251], syntéza  $\beta$ -TCP byla realizována kombinací srážecí reakce a kalcinace [252], HA byl syntetizován z vodných roztoků kyseliny fosforečné a hydroxidu vápenatého [144]. Pro srovnání vlastností biologického a synteticky připraveného HA byl zakoupen komerční HA (zn. cHA). Kvalita syntézně připravených CaP byla potvrzena XRD a RS analýzou. Záznamy XRD spekter studovaných CaP jsou vyobrazeny na následujícím Obr. 26.



Obr. 26: XRD záznamy syntetizovaných vzorků CaP

U připravených vzorků byly metodou XRD určeny mřížkové parametry a průměrné velikosti krystalitů  $\bar{d}$ , získané hodnoty jsou uvedeny v Tab. 28.

Tab. 28: Strukturální parametry syntetizovaných vzorků CaP

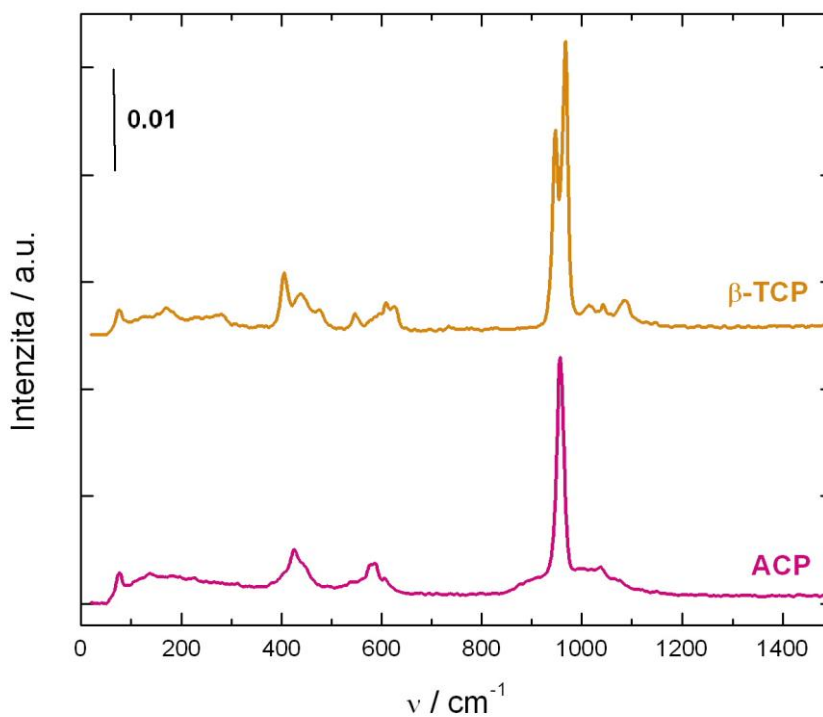
Vzorek	Fáze	Grupa	w / hm%	Mřížkové parametry		$\bar{d}$ / nm
				a / Å	c / Å	
ACP	ACP	–	100	~ ~ ~ amorfni fáze ~ ~ ~		
TCP	$\beta$ -TCP	R3cH	100	10,4180	37,3720	217
cHA	HA	P6 <sub>3</sub> /m	100	9,4154	6,8809	71
sHA	HA	P6 <sub>3</sub> /m	100	9,4327	6,8703	29

Mřížkové parametry analyzovaných CaP odpovídají krystalickým modifikacím, jejichž hodnoty byly publikovány v práci [25] a jsou taktéž uvedeny v databázi JCPDS [121].

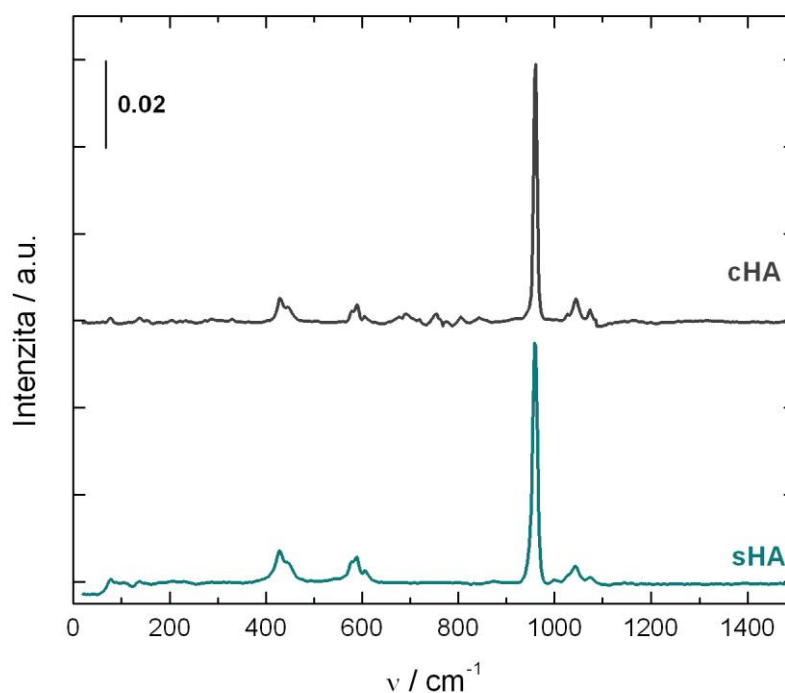


Difraktogram ACP odpovídá amorfnímu charakteru vzorku, záznam neobsahuje žádné difrakční linie a širší pás s maximem  $2\theta \sim 30^\circ$  se shoduje se záznamem ACP uváděným v publikaci [59].

Ramanova spektra připravených CaP jsou uvedena na *Obr. 27 a 28*. Ze záznamů jsou patrné intenzivní linie symetrické vibrace P-O v  $\text{PO}_4^{3-}$  v oblasti  $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$  typické pro vzorky ACP, sHA a cHA. V případě  $\beta$ -TCP se v oblasti kolem  $970 \text{ cm}^{-1}$  nacházela superpozice dvou píků. RS analýza dále vyloučila přítomnost jakýchkoli dalších CaP fází a potvrdila homogenní charakter zkoumaných látek ve shodě s výsledky XRD.



*Obr. 27: Záznam Ramanova spektra vzorků ACP a  $\beta$ -TCP*



Obr. 28: Záznam Ramanova spektra vzorků sHA a cHA

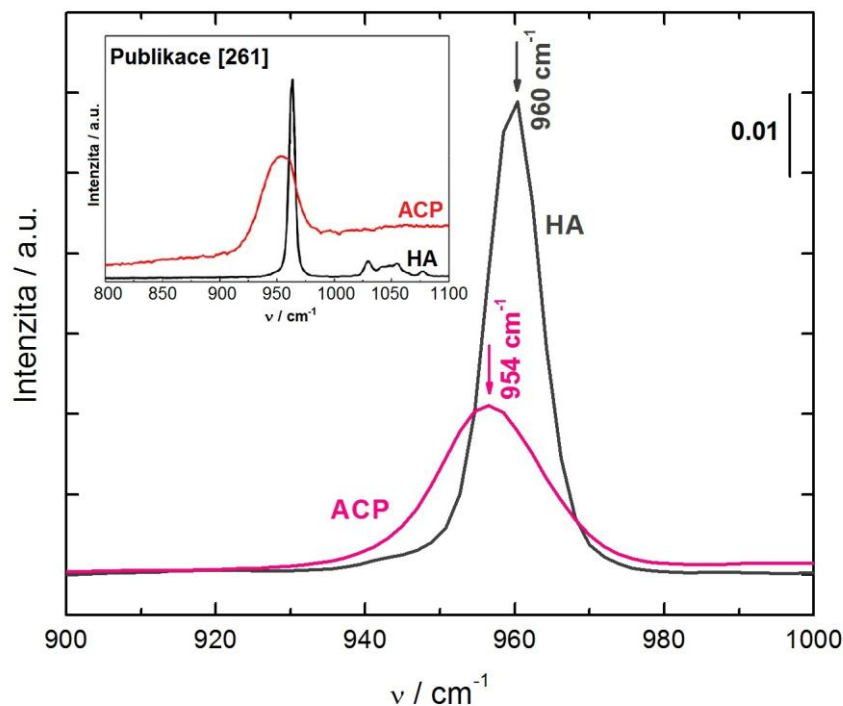
Hodnoty symetrických ( $\nu_s$ ), asymetrických ( $\nu_{as}$ ) a deformačních pásů ( $\nu_d$ ) CaP sloučenin jsou uvedeny v Tab. 29, stanovené hodnoty odpovídají údajům uvedeným v kap. 2.8.

Tab. 29: Charakteristické Ramanovy linie syntetizovaných fosforečnanů

Charakteristická linie	cHA	sHA
$\nu_{as}$ P-O v $\text{PO}_4^{3-} / \text{cm}^{-1}$	1074 (w), 1045 (w)	1074 (w), 1043 (w)
$\nu_s$ P-O v $\text{PO}_4^{3-} / \text{cm}^{-1}$	960 ( $\nu_s$ )	959 ( $\nu_s$ )
$\nu_d$ O-P-O v $\text{PO}_4^{3-} / \text{cm}^{-1}$	605 (w), 589 (w)	606 (w), 588 (w)
$\nu_d$ O-P-O v $\text{PO}_4^{3-} / \text{cm}^{-1}$	429 (w)	428 (w)
Charakteristická linie	TCP	ACP
$\nu_{as}$ P-O v $\text{HPO}_4^{2-} / \text{cm}^{-1}$	1085 (w), 1043 (w)	1037 (w)
$\nu_{as}$ P-O v $\text{PO}_4^{3-} / \text{cm}^{-1}$	967 ( $\nu_s$ )	954 ( $\nu_s$ )
$\nu_s$ P-O v $\text{HPO}_4^{2-} / \text{cm}^{-1}$	625 (w), 609 (w), 596 (w)	586 (w)
$\nu_s$ P-O v $\text{PO}_4^{3-} / \text{cm}^{-1}$	438 (md)	425 (w)
$\nu_s, \nu_{as}, \nu_d$ v $\text{PO}_4^{3-} / \text{cm}^{-1}$	1014 (md)	–
$\nu_d$ $\text{HPO}_4^{2-} / \text{cm}^{-1}$	947 ( $\nu_s$ )	–
$\nu_d$ O-P-O v $\text{HPO}_4^{2-} / \text{cm}^{-1}$	405 (md-b)	–

$\nu_s$  - velmi intenzivní, w - slabý, md - střední, b – široký, sh - rameno

Na *Obr. 29* je uveden detail  $\nu_s$  P-O v  $\text{PO}_4^{3-}$  vzorku ACP ve srovnání s  $\nu_s$  linií P-O skupiny  $\text{PO}_4^{3-}$  ve vzorku cHA. Pás ACP je charakteristicky posunut k nižším hodnotám vlnočtu  $\nu$  než je hodnota této linie pro dobře krystalický HA. Tato skutečnost je v dobré shodě s publikovanými údaji, viz *Obr. 29* [261].

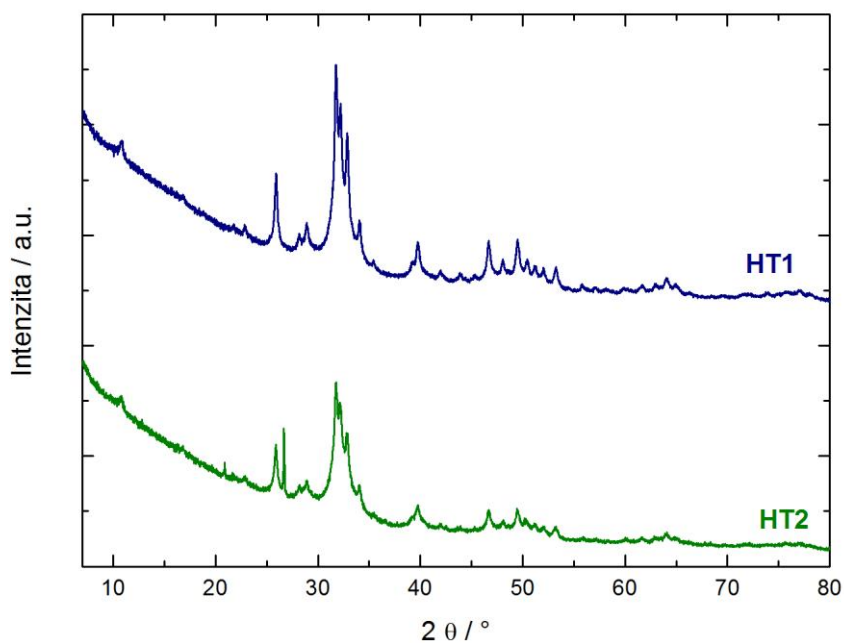


*Obr. 29: Detail charakteristické  $\nu_s$  P-O v  $\text{PO}_4^{3-}$  ve vzorcích ACP a cHA*

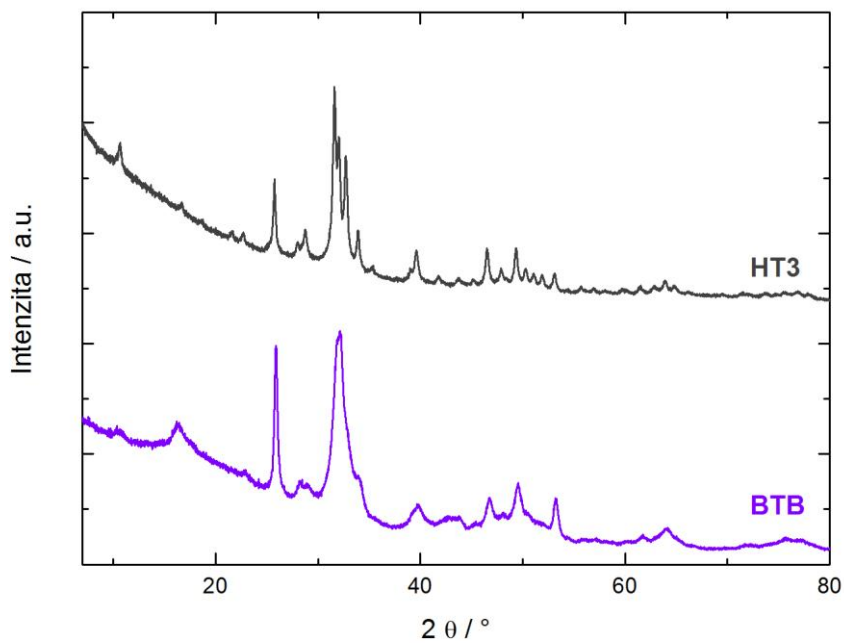
#### 4.1.2 Biologické vzorky

##### 4.1.2.1 Vzorky tvrdých tkání

Jako zdroj biologického HA byla zvolena stehenní hovězí kost (BTB). Navíc byly obdrženy vzorky lidských zubů (HT), které darovali pacienti soukromé stomatologické ordinace z České Lípy. Z výčtu zubů byly vybrány tři exempláře, HT1 – řezák, HT2 – třenový zub a HT3 – stolička. Tyto tři vzorky nepocházely od jediného pacienta a byly tedy u nich předpokládány rozdílnosti ve složení a termickém chování. Aspekty jako věk pacientů, stravovací a hygienické návyky či nemoci nebyly v této disertační práci blíže zkoumány. Strukturní analýza práškového materiálu tvrdých tkání byla provedena metodou *XRD*, viz *Obr. 30* a *31*. Všechny zvolené vzorky obsahovaly v organické matici jedinou minerální složku prokazatelnou *XRD* technikou, a to HA s prostorovou grupou  $\text{P6}_3/\text{m}$ . Jiné CaP fáze nebyly diagnostikovány.



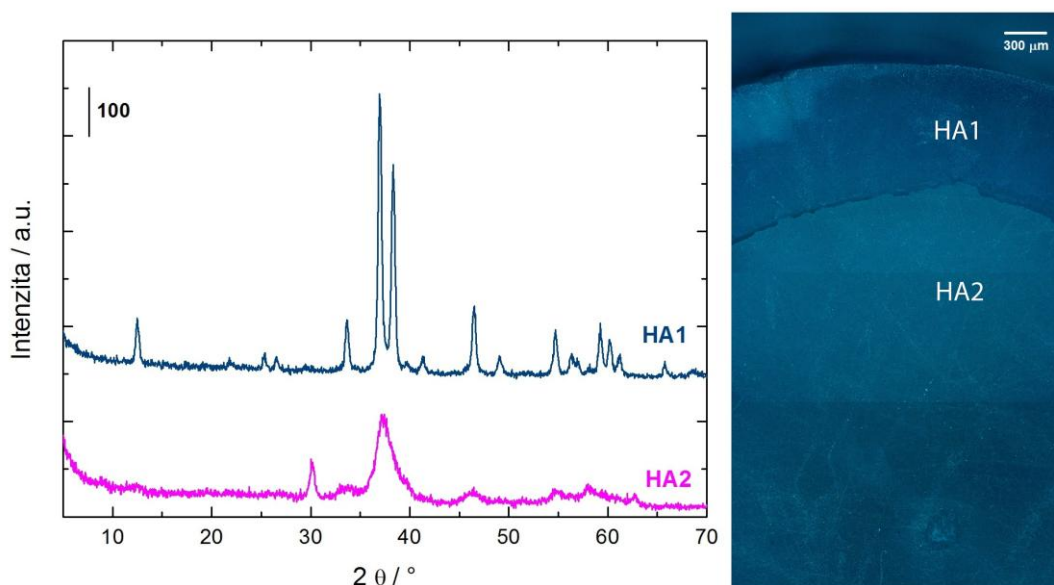
Obr. 30: Difraktogramy práškových vzorků HT1 a HT2



Obr. 31: Difraktogramy práškových vzorků HT3 a BTB

Příčný řez vzorku HT1 byl podroben  $\mu$ -XRD analýze. Tato metoda odhalila dva typy struktury HA o různé krystalinitě přítomné HA fáze (Obr. 32). Okrajová část průřezu zubu obsahovala

lépe vyvinuté krystality HA (HA1,  $\bar{d} = 34$  nm) než HA obsažený ve vnitřní části zubu, kde se průměrná velikost zrn  $\bar{d}$  pohybovala okolo 6 nm (HA2), viz *Tab. 30*.



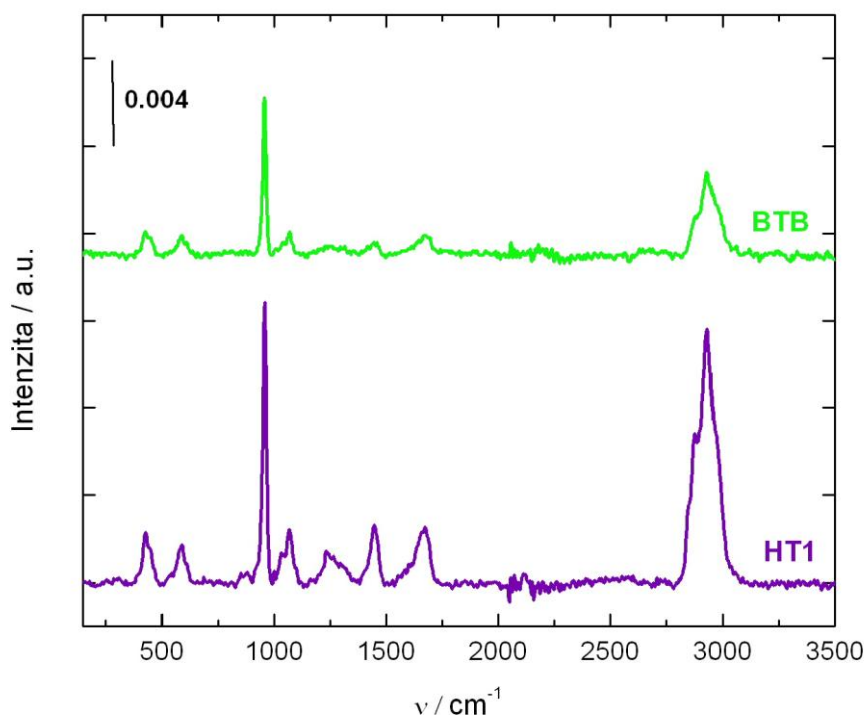
Obr. 32:  $\mu$ -XRD záznam příčného řezu HT1 společně se zákresem analyzovaných oblastí

Výsledná data XRD práškových vzorků HT1 – HT3 byla vzhledem k tomuto faktu korelována na dvě přítomné fáze HA v poměru 1:1, výsledky jsou uvedeny v *Tab. 30*.

Tab. 30: Strukturální parametry krystalických fází CaP přítomných v tvrdých tkáních

Vzorek	Fáze	Prostorová grupa	w / hm%	Mřížkové parametry		$\bar{d}$ / nm
				a / Å	c / Å	
BTB	HA	P6 <sub>3</sub> /m	100	9,4339	6,8854	13
HT1	HA1	P6 <sub>3</sub> /m	50	9,4448	6,885	34
	HA2	P6 <sub>3</sub> /m	50	9,3976	6,8812	6
HT2	HA1	P6 <sub>3</sub> /m	50	9,4426	6,8851	33
	HA2	P6 <sub>3</sub> /m	50	9,4339	6,869	6
HT3	HA1	P6 <sub>3</sub> /m	50	9,4448	6,8838	36
	HA2	P6 <sub>3</sub> /m	50	9,4042	6,8894	6

Vzorek BTB obsahoval jedinou fázi HA zabudovanou v organické matrici a velikost jejich krystalitů  $\bar{d}$  se pohybovala kolem 13 nm. Mřížkové parametry odpovídaly parametrům typickým pro kostní materiály, které byly uvedeny v kapitole 2.8, *Tab. 7*. Práškové vzorky BTB a HT1 byly analyzovány RS a jejich spektra jsou uvedena na *Obr. 33*.



Obr. 33: Ramanova spektra vzorků BTB a HT1

Ze spekter jsou patrné úzké ostré píky asymetrické vibrace P-O v  $\text{PO}_4^{3-}$  společně s dalšími typickými doménami specifickými pro HA (viz Tab. 31).

Tab. 31: Charakteristické Ramanovy linie zkoumaných kostních vzorků

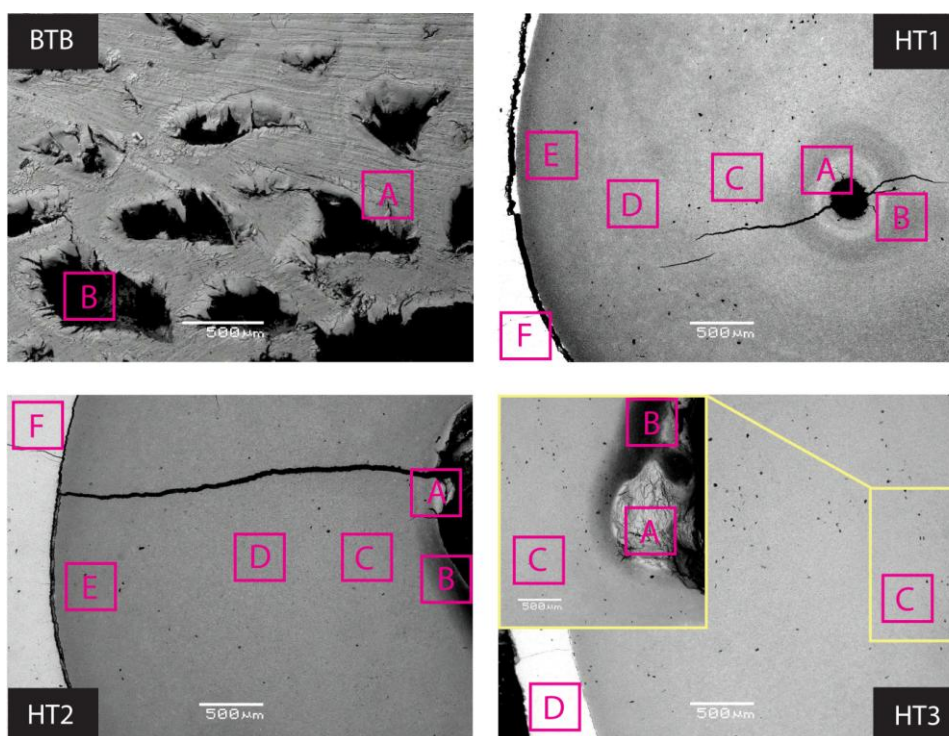
Charakteristická linie	BTB	HT1
$\nu_{as}$ P-O v $\text{PO}_4^{3-} / \text{cm}^{-1}$	1069 ( <i>w</i> )	1068 ( <i>w</i> )
$\nu_s$ P-O v $\text{PO}_4^{3-} / \text{cm}^{-1}$	957 ( <i>vs</i> )	958 ( <i>vs</i> )
$\nu_d$ O-P-O v $\text{PO}_4^{3-} / \text{cm}^{-1}$	587 ( <i>w</i> )	588 ( <i>w</i> )
$\nu_d$ O-P-O v $\text{PO}_4^{3-} / \text{cm}^{-1}$	429 ( <i>w</i> )	429 ( <i>w</i> )
~ ~ ~ Organická matrice ~ ~ ~		
$\nu_s$ C-H v $\text{CH}_2$ a $\text{CH}_3 / \text{cm}^{-1}$	2850 ( <i>sh</i> ), 2880 ( <i>sh</i> )	2853 ( <i>sh</i> ), 2879 ( <i>sh</i> )
$\nu_{as}$ C-H v $\text{CH}_2$ a $\text{CH}_3 / \text{cm}^{-1}$	2932 ( <i>vs</i> ), 2973 ( <i>sh</i> )	2933 ( <i>vs</i> ), 2973 ( <i>sh</i> )
$\nu_d$ C-H v $\text{CH}_2$ a $\text{CH}_3 / \text{cm}^{-1}$	1446 ( <i>md</i> )	1447 ( <i>md</i> )
$\nu$ primární $\text{NH}_2 / \text{cm}^{-1}$	1249 ( <i>md</i> ), 1667 ( <i>md</i> ),	1253 ( <i>md</i> ), 1675 ( <i>md</i> ),

*vs* - velmi intenzivní, *w* - slabý, *md* - střední, *b* – široký, *sh* - rameno

Přítomnost jiných CaP fází byly vyloučeny, nicméně v oblasti  $3000 - 2780 \text{ cm}^{-1}$  se objevila široká superpozice několika píků společně s liniemi v oblasti kolem  $1250$  a  $1670 \text{ cm}^{-1}$ . Z výsledků vyplývá, že se jedná o linie typické pro kolagenní vlákna. Kolagen má pět

charakteristických vibračních domén: vibrace amidické skupiny při cca 1268 a 1655  $\text{cm}^{-1}$ , dále deformační vibrace  $\text{CH}_2$  a  $\text{CH}_3$  skupiny při 1447  $\text{cm}^{-1}$ , asymetrické a symetrické vibrace  $\text{CH}_2$  a  $\text{CH}_3$  v oblasti 2800 – 3000  $\text{cm}^{-1}$  a nakonec vibrace NH skupiny při 3320  $\text{cm}^{-1}$  [262]. Nalezené linie jsou ve shodě s údaji v publikaci [262], přičemž poslední linie NH skupiny zanikla v šumu ramanova spektra.

Příčné řezy vzorků tvrdých tkání byly zkoumány metodou *SEM-EDX*, jejich mikroskopické snímky jsou zobrazeny na *Obr. 34*. Vzorek kosti měl porézní strukturu se stopovým obsahem Zn, který se přirozeně vyskytuje v kostech, převážně v okostici a hutné kostní tkáni (*Tab. 32*). V celé studované ploše nebyly nalezeny výrazné změny prvkového zastoupení a vzorek je tedy pokládán za homogenní, tvořený jedinou minerální fází HA (o molárních poměrech  $\text{Ca:P} \sim 1,56$  a  $\text{Ca:O} \sim 0,23$ ) uloženou v organické matici kosti, viz *Tab. 32*.



*Obr. 34: Mikroskopické snímky příčných řezu vzorků tvrdých tkání*

U vzorků zubní tkáně byly *EDX* analýzou nalezeny výrazné rozdíly mezi zónou **F** u vzorků HT1 a HT2 a zbývajícími vnitřními pásmy **A – E** a ve vzorku HT3 mezi zónou **D** a vnitřními zónami **A – C**. U vzorků HT2 a HT3, které obsahovaly významné množství hliníku a stopové množství mědi, výrazně klesl poměr  $\text{Ca:P}$  pod hodnoty 1,35 na úkor nárůstu obsahu Na nad

1,5 at% (Tab. 32). Příčina souvisí s kontaminací vnitřní části vzorků amalgamovým materiálem. Oba tyto vzorky totiž obsahovaly drobnou plombu, která byla sice mechanicky odstraněna, ale došlo k difuzi Al a Cu do hlubších vrstev vzorků. Ve vzorcích nebyla zaznamenaná přítomnost fluoridových iontů, jež byly očekávány v zónách **F** u vzorků HT1, HT2 a v zóně **D** vzorku HT3. Přítomnost jakékoli formy FA nebyla potvrzena ani *XRD* technikou.

Tab. 32: Prvkové složení tvrdých tkání v místě řezu stanovené metodou EDX

Vzorek	Zóna	Složení / at%							Ca:P	Ca:O
		O	P	Ca	Na	Mg	Al	#		
BTB	A	72,01	10,59	16,61	–	–	–	Zn	1,57	0,23
	B	71,92	11,28	16,8	–	–	–	Zn	1,55	0,23
HT1	A	67,00	12,24	18,38	0,61	0,81	0,97	–	1,50	0,27
	B	67,40	12,14	18,12	0,69	0,91	0,75	–	1,49	0,27
	C	66,60	12,34	18,94	0,73	0,83	0,56	–	1,53	0,28
	D	66,75	12,32	18,86	0,77	0,75	0,55	–	1,53	0,28
	E	66,66	12,42	18,95	0,85	0,66	0,47	–	1,53	0,28
	F	62,21	13,99	22,35	0,73	0,21	0,51	–	1,60	0,36
HT2	A	62,60	14,47	19,29	1,67	0,8	1,42	Cu	1,33	0,31
	B	69,88	10,68	13,16	2,41	0,40	3,36	Cu	1,23	0,19
	C	66,54	12,90	17,93	1,11	0,69	1,65	–	1,48	0,27
	D	67,17	11,98	17,93	0,87	0,73	1,32	–	1,50	0,27
	E	68,26	11,74	17,53	0,79	0,57	1,11	–	1,49	0,26
	F	62,93	14,70	21,27	0,96	0,22	0,56	–	1,51	0,34
HT3	A	66,46	12,19	16,37	2,26	0,33	2,25	Cu	1,34	0,25
	B	67,07	10,39	11,94	2,76	0,35	7,39	Cu	1,15	0,18
	C	64,19	12,96	17,53	2,32	0,60	2,41	–	1,35	0,27
	D	62,57	14,80	22,34	0,86	0,24	0,54	–	1,59	0,36

# – stopová množství prvků

#### 4.1.2.2 Vzorky ledvinových kamenů

Pro tuto studii bylo získáno 6 lidských ledvinových kamenů (KS1 – KS6), které věnovali pacienti Urologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové pro výzkumné záměry této disertační práce. Fázové složení a strukturní parametry byly zjištěny analýzou práškových vzorků KS1 – KS6 za použití *XRD* techniky. Výsledky jsou přehledně zpracovány v Tab. 33 a příslušné difraktogramy jsou uvedeny v příloze na Obr. P1 – P6. Z uvedených 6 vzorků

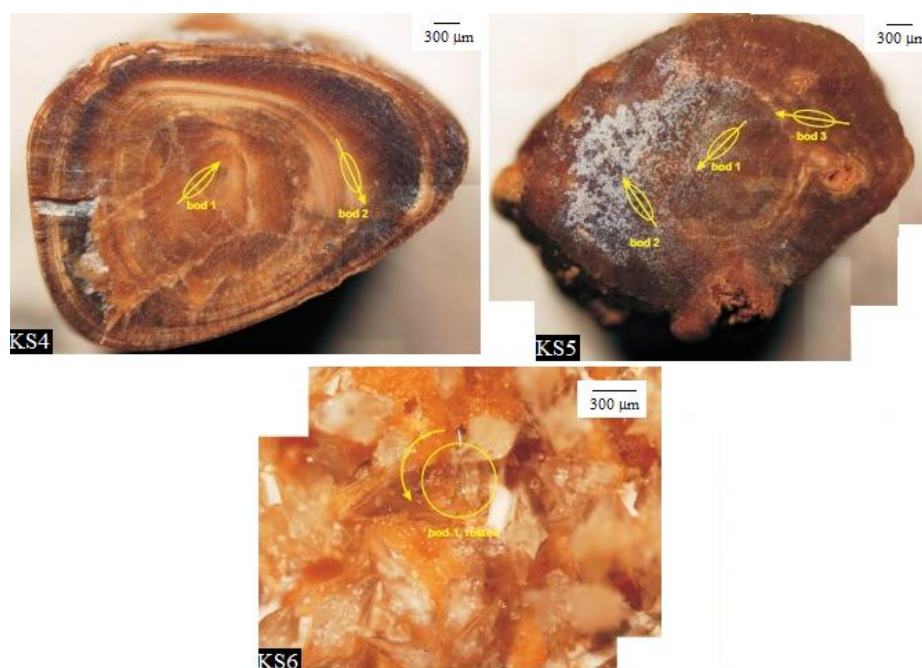


ledvinových kamenů obsahovaly významné množství HA fáze vzorky KS3 a KS6 s obsahem 31 hm%, resp. 11 hm% HA. Všechny vzorky obsahovaly v organické matici WHE. Vzorky KS1, KS4, KS5 byly minerálně monofázové, obsahovaly pouze WHE. Vzorek KS2 obsahoval vedle WHE navíc ještě WED v poměru WED:WHE ~ 6:4. Strukturální parametry přítomné HA fáze odpovídají údajům biologického HA s prostorovou grupou P6<sub>3</sub>/m.

Tab. 33: Strukturální parametry krystalických fází přítomných v ledvinových kamenech

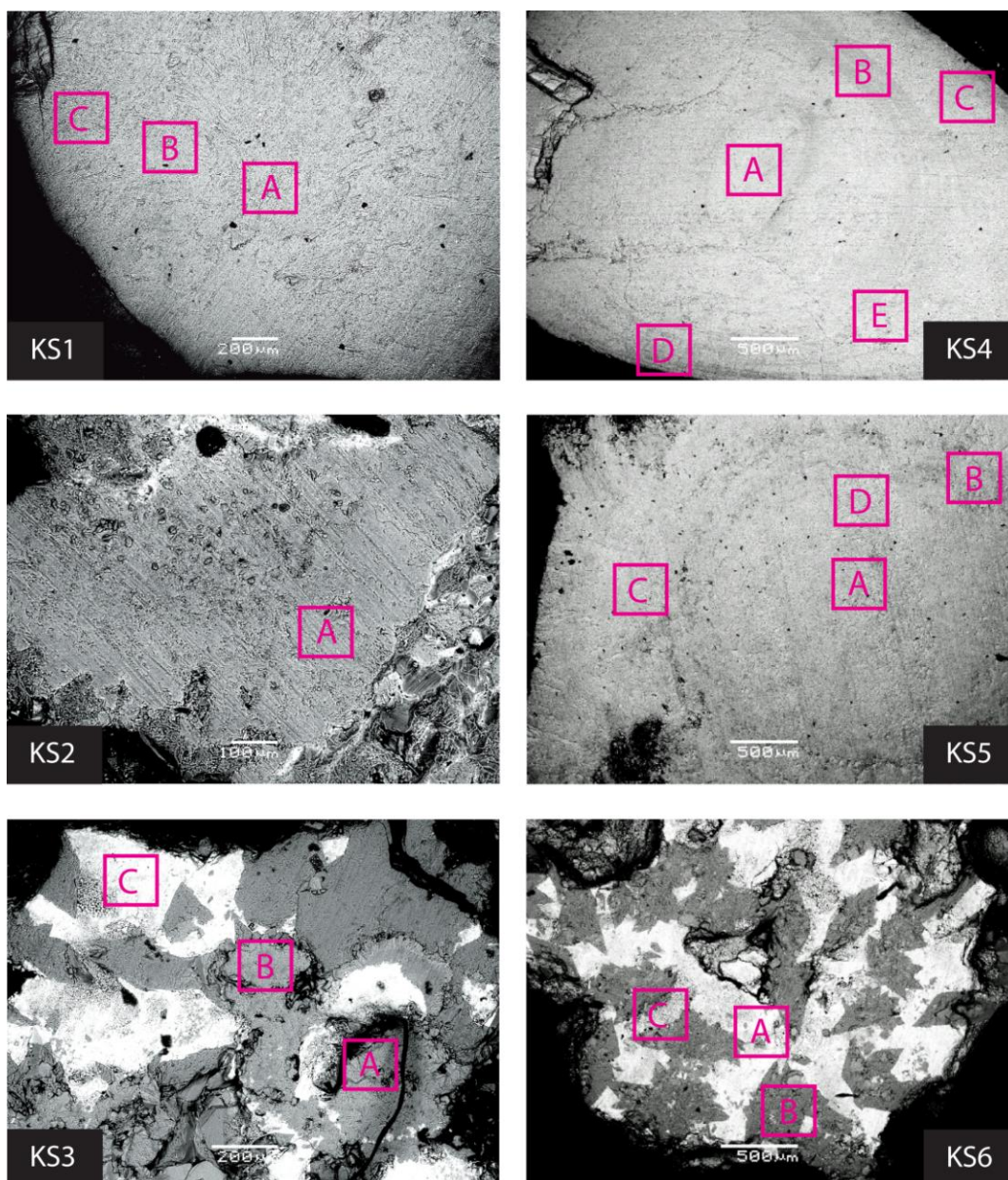
Vzorek	Fáze	Prostorová grupa	w / hm%	Mřížkové parametry				d / nm
				a / Å	b / Å	c / Å	β / °	
KS1	WHE	P12 <sub>1</sub> /c	100	6,2948	14,5958	10,1217	109,3	212
KS2	WED	I4/m	61	12,3567	–	7,3558	–	217
	WHE	P12 <sub>1</sub> /c	39	6,1800	14,5916	9,8817	106,2	191
KS3	WED	I4/m	47	12,3547	–	7,3567	–	201
	HA	P6 <sub>3</sub> /m	31	9,4836	–	6,8798	–	24
	WHE	P12 <sub>1</sub> /c	22	6,1764	14,5878	9,9109	106,1	182
KS4	WHE	P12 <sub>1</sub> /c	100	6,2952	14,5967	10,1210	109,4	170
KS5	WHE	P12 <sub>1</sub> /c	100	6,2944	14,5933	10,1203	109,1	253
KS6	WED	I4/m	56	12,3539	–	7,3604	–	531
	WHE	P12 <sub>1</sub> /c	33	6,2955	14,5965	10,1231	109,5	377
	HA	P6 <sub>3</sub> /m	11	9,4490	–	6,8917	–	15

Na Obr. 35 jsou zobrazeny mikroskopické snímky vzorků KS4, KS5, KS6 se zákresem míst, která byla podrobněji zkoumána metodou  $\mu$ -XRD pro získání dalších informací o přítomných krystalických fázích.  $\mu$ -XRD analýza vzorků KS4 – KS6 však nenalezla žádné nové informace, nedetekovala přítomnost odlišných mikrostruktur CaP ani rozdílné mikrofáze HA očekávané v případě vzorku KS6 a její výsledky tak byly srovnatelné s výsledky XRD analýzy práškových forem těchto zkoumaných vzorků (Tab. 33).



Obr. 35: Mikroskopické snímky vzorků KS4 – KS6 s označením oblastí  $\mu$ -XRD analýzy

Příčné řezy všech vzorků ledvinových kamenů (KS) byly zkoumány pomocí *SEM-EDX*. *EDX* mikroanalýza určila prvkové složení zón vyznačených na Obr. 36, její výsledky jsou pak následně uvedeny v Tab. 34. Na Obr. 36 jsou viditelné dvě odlišné skupiny vzorků, které se liší mechanismem vzniku konkrementu, jak bylo popsáno v kapitole 2.6.3. Vzorky KS1, KS4 a KS5 mají podobnou strukturu a *XRD* technika potvrdila ve všech třech případech jejich monofázový charakter představovaný výhradně WHE v organické matici vzorku. Tyto ledvinové kameny mají zřetelný střed, od kterého dochází k postupnému vrstvení materiálu směrem k okraji vzorku, které není způsobeno změnou složení (Tab. 34), ale rozdílnou rychlostí nabalování materiálu na jádro konkrementu, což se projevuje i barevnou diferencí vrstev. Druhou skupinou (KS2, KS3, KS6) jsou konglomeráty bez patrného středu vzorku. Vzorky KS3 a KS6 obsahují významný podíl HA a na snímcích *SEM* jsou zřejmé dvě výrazně odlišné oblasti. Bílé zóny jsou anorganického charakteru, což je dáno přítomností CaP, tmavě šedé oblasti jsou pak tvořeny převážně WHE, případně WED. Vzorek KS2 nemá taktéž viditelný nukleus, je však možné, že střed konkrementu byl při průřezu vzorku minul vzhledem k nepravidelnému tvaru kamene. Jeho struktura vypadá velmi kompaktní, bez viditelných zón rozdílného složení WED a WHE a nelze s jistotou říct, jestli se jedná o konglomerát či nikoli.



Obr. 36: Mikroskopické snímky příčných řezů vzorků KS1 – KS6

O přítomnosti apatitových struktur ve vzorcích KS3 – zóna C a KS6 – zóna A a B svědčí stanovené poměry  $Ca:P \sim 1,51$ , resp. 1,37 a 1,50, což potvrzují výsledky získané metodou *XRD*. Navíc byl poměr  $Ca:P \sim 1,53$  charakteristický pro CaP také zjištěn ve vzorku KS4 v zóně E, u něhož *XRD* analýza přítomnost těchto sloučenin neprokázala. Nicméně u tohoto vzorku bylo zastoupení CaP složky potvrzeno po termické analýze v podobě přítomnosti HA, viz kap. 4.2.2.2. Spolu s CaP fází se v dané oblasti vyskytovala i stopová množství prvků Mg, Na, Si a Cl iontů, které byly patrně součástí apatitové struktury v daném segmentu vzorku.

Tab. 34: Výsledky EDX analýzy ledvinových kamenů

Vzorek	Zóna	Složení / at%				Ca:P	Ca:O
		O	P	Ca	#		
KS1	A	82,12	0,39	17,26	Si	–	0,21
	B	84,07	0,13	15,62	Si	–	0,19
	C	83,55	0,19	16,04	Si	–	0,19
KS2	A	86,17	0,63	13,20	–	–	0,15
	B	81,47	3,05	15,48	–	–	0,19
KS3	A	83,15	0,29	16,57	–	–	0,20
	B	83,81	0,86	15,34	–	–	0,18
	C	<b>69,57</b>	<b>12,06</b>	<b>18,26</b>	Mg	<b>1,51</b>	<b>0,26</b>
KS4	A	83,15	0,25	16,6	–	–	0,20
	B	82,92	0,23	16,44	Si	–	0,20
	C	83,01	0,25	16,59	Si	–	0,20
	D	86,46	0,47	12,89	Si	–	0,15
	E	<b>69,93</b>	<b>11,23</b>	<b>17,19</b>	Na, Mg, Cl	<b>1,53</b>	<b>0,25</b>
KS5	A	83,41	0,26	15,96	Si	–	0,19
	B	83,23	0,20	15,78	Si	–	0,19
	C	85,46	0,24	13,83	Si	–	0,16
	D	85,9	–	13,31	Si	–	0,15
KS6	A	<b>70,27</b>	<b>11,92</b>	<b>16,29</b>	Si, Na, Mg, Cl	<b>1,37</b>	<b>0,23</b>
	B	<b>73,70</b>	<b>10,11</b>	<b>15,13</b>	Na, Mg, Cl	<b>1,50</b>	<b>0,21</b>
	C	83,75	1,03	15,22	–	–	0,18

tučně - Ca:P a Ca:O odpovídající poměrům v CaP, # stopová množství prvků

Oblasti bez významného množství fosforu poukazují na přítomnost WED a WHE fáze. Těmto dvěma komponentám odpovídají molární poměry  $Ca:O = 0,20$  (WHE) a  $0,17$  (WED) a jsou v dobré shodě s údaji uvedenými v Tab. 34, tj. WHE fáze byla detekována metodou EDX ve všech zkoumaných vzorcích ledvinových kamenů, naproti tomu WED fáze byla s jistotou nalezena ve vzorku KS2 zóna A a dále pak navíc ve vzorku KS4 (zóna D) a KS5 (zóna C, D), kde nebyla XRD technikou ani RS záznamy přítomnost WED fáze dříve prokázána a jedná se pravděpodobně pouze o lokální výskyt. Ve vzorcích KS3 a KS6 hodnota  $Ca:O = 0,18$  pravděpodobně odpovídá koexistenci WHE a WED fází.

Práškové vzorky ledvinových kamenů byly analyzovány RS. Jejich výsledná spektra společně s vyznačenými charakteristickými liniemi jsou uvedena na Obr. 37 – 42 a následně pak zpracovány v Tab. 35. U vzorků KS3 a KS6 byla potvrzena přítomnost HA výskytem domény v oblasti  $961\text{ cm}^{-1}$  s malým, nepatrným posunem k vyšším vlnočtům způsobeným pravděpodobně organickou maticí vzorku. Ramanova spektra u ostatních vzorků nepotvrdila přítomnost jakékoli další krystalické ani amorfní CaP fáze, ani v případě vzorku KS4, kde SEM-EDX objevila nepatrnou zónu tohoto typu. V záznamech nebyl potvrzen Ramanův posun k nižším vlnočtům typický pro ACP fázi ( $\nu_i \sim 950\text{ cm}^{-1}$ ), ani superpozice dvou píků v oblasti  $\nu_i \sim 970\text{ cm}^{-1}$ , která by potvrdila přítomnost výskytu TCP fáze.

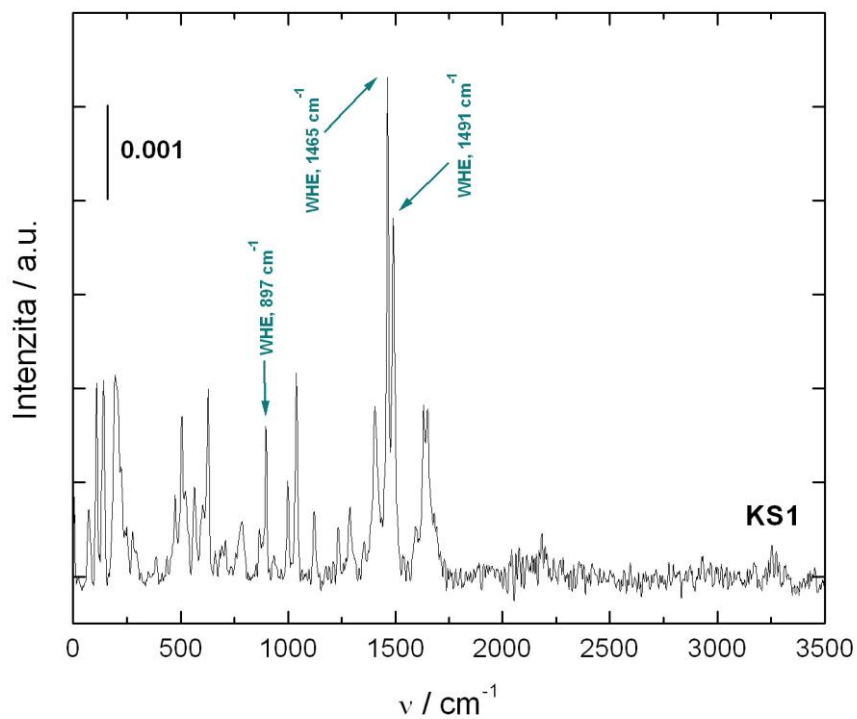
Tab. 35: Charakteristické Ramanovy linie zkoumaných ledvinových kamenů

Identifikovaná složka	KS1	KS2
WHE, $\nu_i / \text{cm}^{-1}$	1491 ( <i>vs</i> ), 1465 ( <i>vs</i> ), 897 ( <i>md</i> )	1491 ( <i>sh</i> ), 1465 ( <i>vs</i> ), 898 ( <i>md</i> )
WED, $\nu_i / \text{cm}^{-1}$	–	1478 ( <i>vs</i> ), 912 ( <i>md</i> )
HA, $\nu_i / \text{cm}^{-1}$	–	–
Identifikovaná složka	KS3	KS4
WHE, $\nu_i / \text{cm}^{-1}$	1495 ( <i>sh</i> ), 1466 ( <i>sh</i> ), 897 ( <i>sh</i> )	1491 ( <i>vs</i> ), 1465 ( <i>vs</i> ), 898 ( <i>vs</i> )
WED, $\nu_i / \text{cm}^{-1}$	1477 ( <i>vs-b</i> ), 912 ( <i>md</i> )	1478 ( <i>vs</i> ), 912 ( <i>md</i> )
HA, $\nu_i / \text{cm}^{-1}$	2935* ( <i>md-b</i> ), 964 ( <i>md</i> )	–
Identifikovaná složka	KS5	KS6
WHE, $\nu_i / \text{cm}^{-1}$	1491 ( <i>vs</i> ), 1465 ( <i>vs</i> ), 897 ( <i>md</i> )	1491 ( <i>vs</i> ), 1465 ( <i>vs</i> ), 897 ( <i>md</i> )
WED, $\nu_i / \text{cm}^{-1}$	–	1476 ( <i>sh</i> ), 916 ( <i>w</i> )
HA, $\nu_i / \text{cm}^{-1}$	–	964 ( <i>md</i> ), 2935* ( <i>md-b</i> )

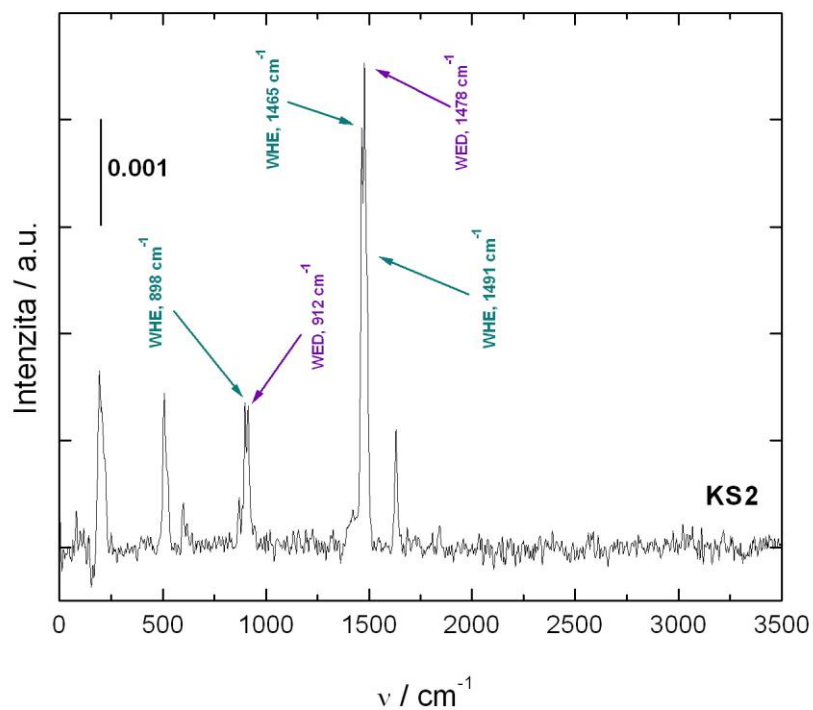
*vs* - intenzivní, *w* - slabý, *md* - střední, *b* – široký, *sh* - rameno, \*  $\text{CH}_2$  a  $\text{CH}_3$  vibrace typické pro kolagen

Výrazné linie v oblasti  $1491 - 1464\text{ cm}^{-1}$  potvrzují přítomnost WED a WHE fáze. V případě WHE Ramanovo spektrum obsahuje výrazný dublet symetrické vibrace  $\text{COO}^-$  skupiny při  $1493$  a  $1468\text{ cm}^{-1}$ , zatímco WED je charakterizován ostrým singletem při  $1477\text{ cm}^{-1}$ , jak je uvedeno v literaturách [263–265]. V případě směsi WED a WHE, jako tomu bylo u vzorků KS2, KS3 a KS6, obsahovalo spektrum superpozici těchto tří linií. U všech vzorků KS byla potvrzena přítomnost WHE fáze píkem v oblasti  $\sim 898\text{ cm}^{-1}$  odpovídající C–C vibraci ve WHE. Díky přítomnosti WED se u vzorků KS2, KS3 a KS6 objevila navíc C–C linie WED složky v oblasti  $912\text{ cm}^{-1}$  (KS2, KS3), resp.  $916\text{ cm}^{-1}$  (KS6). Vzorky KS3 a KS6 obsahovaly HA s jeho charakteristickou linií při  $964\text{ cm}^{-1}$ . Mimoto se objevil u vzorků KS3 a KS6 široký pík v oblasti  $3050 - 2770\text{ cm}^{-1}$ , který byl nalezen i ve vzorcích HT1 a BTB, a jehož původ je přikládán symetrickým, asymetrickým a deformačním vibracím  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  a  $\text{NH}_2$  typickým

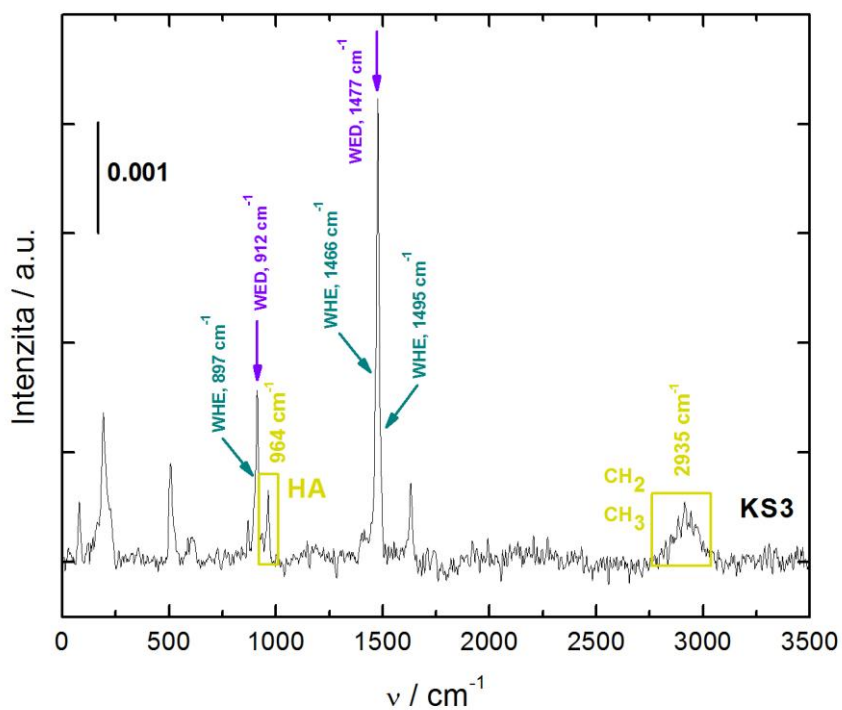
pro kolagen [262]. Vzorky KS1, KS2, KS4 a KS5 superpozici píků v oblasti kolem  $2934\text{ cm}^{-1}$  neobsahují. U zbývajících neidentifikovaných linií byly vyloučeny jiné možnosti původu typické pro ledvinové kameny, jako je BRU, WHI, STR, cystine, kyselina močová atd. a jejich původ lze předpokládat v organické matici či zbytkových metabolitech.



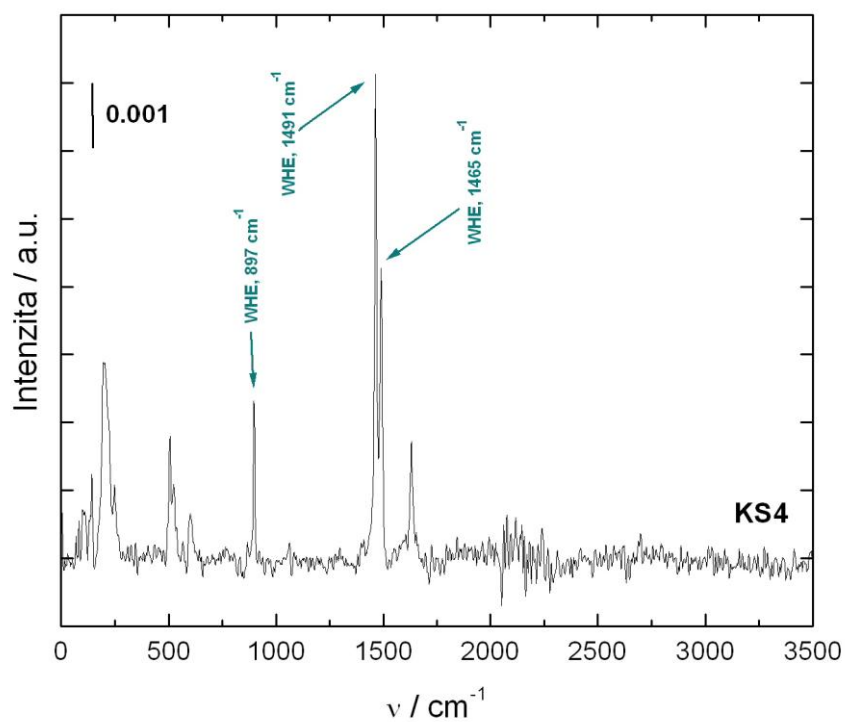
Obr. 37: Záznam Ramanova spektra vzorku KS1



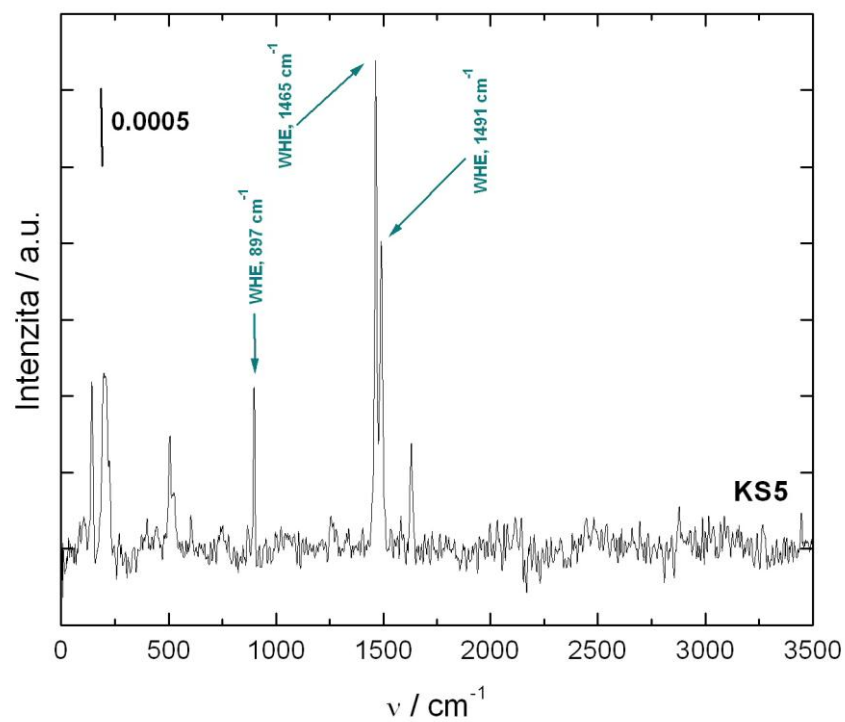
Obr. 38: Záznam Ramanova spektra vzorku KS2



Obr. 39: Záznam Ramanova spektra vzorku KS3

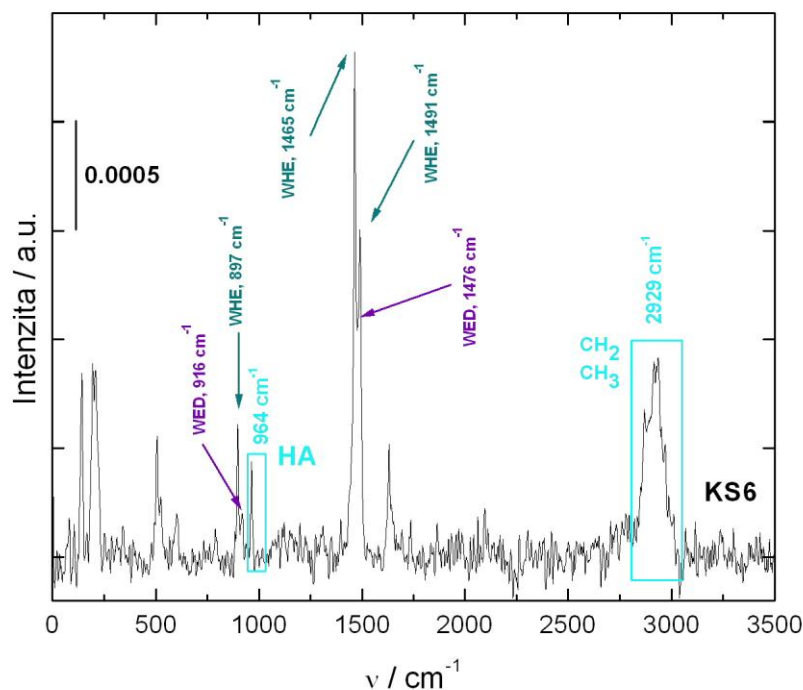


Obr. 40: Záznam Ramanova spektra vzorku KS4



Obr. 41: Záznam Ramanova spektra vzorku KS5





Obr. 42: Záznam Ramanova spektra vzorku KS6

#### 4.1.3 Shrnutí výsledků strukturní a prvkové analýzy zkoumaných vzorků

V Tab. 36 jsou uvedeny teoretické molární poměry  $Ca:P$  a  $Ca:O$  vypočítané z chemických vzorců studovaných látek, společně s teoretickým množstvím  $H_2O$  v nich obsažené. Tyto údaje byly porovnány s hodnotami experimentálně získanými z EDX analýzy příčných řezů biologických vzorků (Tab. 32 a Tab. 34).

Tab. 36: Teoretické poměry  $Ca:P$  a  $Ca:O$  ve vybraných sloučeninách

Sloučenina	w $H_2O$ / hm%	$Ca:P$	$Ca:O$	Sloučenina	$Ca:P$	$Ca:O$
<i>Šťavelany vápenaté</i>				<i>Stechiometrický CaP</i>		
WHE	12,3	–	0,20	DCPD*	1,00	0,17
WED	22,0	–	0,17	OCP	1,30	0,28
<i>ACP: <math>Ca_3(PO_4)_2 \cdot nH_2O</math></i>				$\beta$ -TCP	1,50	0,38
ACP, $n = 3,5$	16,9	1,50	0,26	HA	1,67	0,38
ACP, $n = 4$	18,9	1,50	0,25	<sup>#</sup> CDHA: $Ca_{10-x}(HPO_4)_x((PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x})$		
ACP, $n = 4,5$	20,7	1,50	0,24	CDHA, $x = 0,25$	1,63	0,38
ACP, $n = 5$	22,5	1,50	0,23	CDHA, $x = 0,50$	1,58	0,37
ACP, $n = 5,5$	24,2	1,50	0,22	CDHA, $x = 0,75$	1,54	0,37
ACP, $n = 6$	25,8	1,50	0,21	CDHA, $x = 1,00$	1,50	0,36

\* 20,9 hm%  $H_2O$ , <sup>#</sup> částečně krystalický, nestechiometrický HA:  $0 < x < 1$

Poměry  $Ca:P$  a  $Ca:O$  ve vzorcích KS3 (zóna **C**), KS4 (zóna **E**) a KS6 (zóna **B**) nejvíce odpovídají teoretickým poměrům ACP, případně částečně krystalickému HA (CDHA,  $x = 1$ ), viz *Tab. 36*. Metodou *XRD* byly určeny velikosti HA krystalitů o rozměrech 24 nm pro KS3 a 15 nm pro KS6. Molární poměry stechiometrického i nestechiometrického HA [70,120] odpovídají vyšším hodnotám, než bylo metodou *EDX* prokázáno, především v hodnotách poměru  $Ca:O$ , kde se tento poměr pohyboval kolem hodnoty 0,37. Vzorek KS6 v zóně **A** obsahoval CaP frakci s nižšími hodnotami molárních poměrů  $Ca:P \sim 1,37$  a  $Ca:O \sim 0,23$  způsobenými výraznější iontovou substitucí než bylo v ostatních zkoumaných oblastech KS. V zónách bez výskytu CaP fáze odpovídá molární poměr  $Ca:O$  přítomnosti WED a WHE fáze, kde poměr  $Ca:O$  ve WHE fázi se pohybuje okolo 0,20 a ve WED fázi  $\sim 0,17$ .

Na okrajích příčných řezů vzorků zubů HT1, HT2 byly detekovány vyšší hodnoty molárních poměrů  $Ca:P$  a  $Ca:O$  (1,60 a 0,36) než ve středu vzorku, kde molární poměry  $Ca:P$  a  $Ca:O$  odpovídaly hodnotám cca 1,51 a 0,27. Ve vzorku HT3 se pohybovaly tyto hodnoty kolem 0,51 ( $Ca:P$ ) a 0,34 ( $Ca:O$ ). Výjimku tvořily oblasti v HT2 a HT3, kde bylo nalezeno stopové množství Cu a zvýšený obsah Al. Jejich přítomnost způsobila pokles obsahu vápníku v dané zóně zubu, a tedy i snížení molárního poměru  $Ca:P$  a  $Ca:O$ . Velikost krystalitů ve sklovině byla určena metodou *XRD* na cca 34 nm, na rozdíl od vnitřní části zubu, kde  $\bar{d} = 6$  nm. Stanovené molární poměry ve sklovině odpovídají výskytu CDHA, který je v publikacích uváděn v podobě  $Ca_{10-x}(HPO_4)_x((PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x})$ , kde  $x$  se pohybuje v rozmezí 0,5 – 1,0. Vnitřní část zubní tkáně se blíží, stejně jako u ledvinových kamenů, spíše charakteru málo krystalicky vyvinuté složky CaP na bázi nestechiometrického HA. V případě vzorku BTB molární poměr  $Ca:P$  odpovídá taktéž molárnímu poměru CDHA. *XRD* analýza ve vzorku BTB určila přítomnost jediné CaP složky, a to HA o velikosti krystalických zrn  $\bar{d} = 13$  nm.

V následující *Tab. 37* je uvedeno prvkové složení syntetizovaných CaP a biologických vzorků tvrdých tkání HT1 – HT3 a BTB, které bylo stanoveno pomocí metody *ICP-OES*. Měly tak být ověřeny a doplněny informace získané technikou *EDX*. V tabulce jsou uvedeny přibližné odhady obsahu vody v podobě dat získaných během *DTA-TG* analýzy v teplotním intervalu 30 – 200 °C. Tyto úbytky z podstatné části odpovídají dehydrataci vzorku, i když hmotnostní spektroskopie plynů odcházejících během *DTA-TG* odhalila i nepatrné dekarboxylační procesy. Tento fakt je blíže diskutován v kapitolách 4.4.1.1. a 4.4.1.2.

Tab. 37: Výsledky analýz syntetických vzorků CaP a vzorků tvrdých tkání získané metodami ICP-OES a DTA-TG

Vzorek	Obsah prvků / hm%					Ca:P	$\Delta m^*$ hm%
	Ca	P	Na	K	Mg		
ACP	32,8	17,4	–	0,07	–	1,45	19,6
$\beta$ -TCP	34,6	18,2	0,06	–	–	1,47	0,2
sHA	35,2	16,9	0,02	0,01	0,19	1,61	0,8
cHA	34,8	16,3	0,09	–	–	1,65	0,2
BTB	22,6	10,7	0,54	0,03	0,43	1,64	5,8
HT1	27,8	13,2	0,63	0,02	0,59	1,63	4,5
HT2	29,1	13,6	0,47	0,01	0,33	1,66	5,6
HT3	30,2	14,1	0,51	0,03	0,48	1,65	3,6

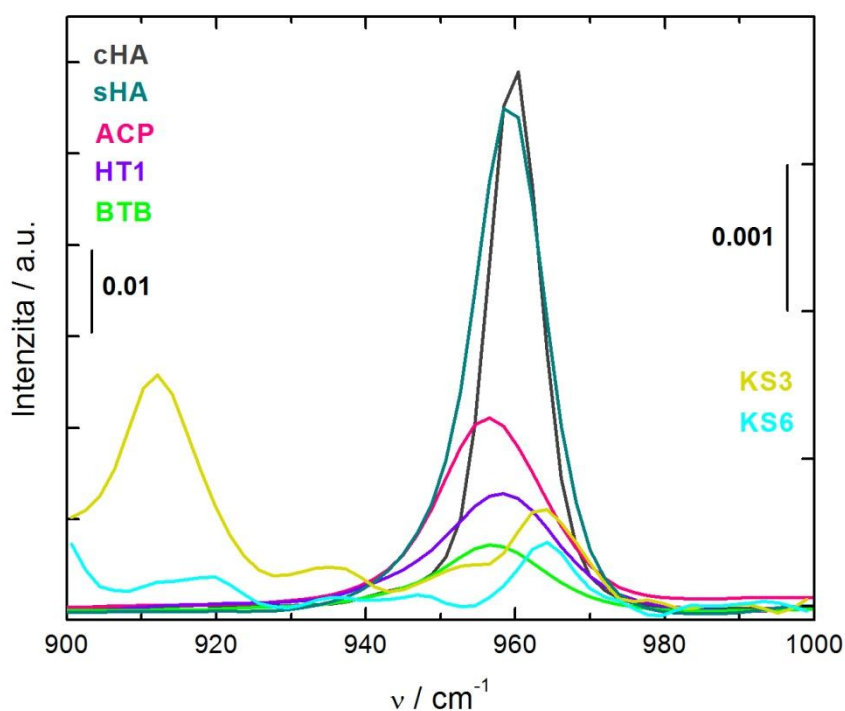
\* úbytek hmotnosti stanoven metodou TG v intervalu 30 – 200 °C

ACP obsahoval 19,6 hm% H<sub>2</sub>O, což odpovídá cca 4 molekulám vody (viz Tab. 36). Během termické analýzy byly ve vzorcích tvrdých tkání – BTB, HT1, HT2 a HT3 – zaznamenány úbytky H<sub>2</sub>O ve dvou stupních: první hmotnostní pokles je uveden v Tab. 37, v případě druhého stupně (> 200 °C) se jednalo o odchod strukturně vázané vody, kde navíc docházelo také k rozkladu organické matrice za vývinu NO<sub>x</sub>, CO<sub>x</sub> a SO<sub>2</sub>.

Molární poměry Ca:P kostních materiálů stanovené ICP-OES byly získány kvartací rozemletých tkání (HT1 – HT3 a BTB) po EDX analýze. Porovnání EDX a ICP-OES výsledků je tedy v tomto případě zatížené jistou nepřesností. Metoda EDX měla za cíl především detekci proměnlivého poměru Ca:P a Ca:O a odhalení případné přítomnosti mikrostrukturního zastoupení jednotlivých CaP fází, jako tomu bylo např. u vzorků HT, kde byly nalezeny mikrofáze HA1 a HA2. Molární poměry stanovené metodou ICP-OES jsou pro většinu vzorků nižší, než teoretické hodnoty zaznamenané v Tab. 36 a než bylo uvedeno v kap. 2.6.1 a 2.6.2. (publikované molární poměry Ca:P se nacházely v rozmezí 1,61 – 1,63 pro zubní tkáň a pro kosti měly hodnotu kolem 1,71, případně 1.67 [220]).

Následující Obr. 43 srovnává charakteristické linie symetrické vibrace PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> v HA struktuře, která byla detekována ve zkoumaných vzorcích RS technikou, tj. ve vzorcích synteticky připravených sHA, cHA a následně pak v biologických vzorcích HT1, BTB, KS3 a KS6. Dále je pro srovnání uveden i záznam Ramanova spektra vzorku ACP. Jak je z daných linií pozorovatelné, komerční vzorek cHA relativně odpovídá intenzitě linie připraveného sHA, nicméně vzorek cHA má ostřejší pík, kterému odpovídá nižší hodnota jeho pološířky

(značeno jako *FWHH*), než bylo zaznamenáno u vzorku sHA. Nižší hodnota *FWHH* může vypovídat o větší krystalitě či o větším procentuálním zastoupení HA složky v heterogenním systému biologického vzorku KS. U vzorků cHA a sHA hodnota *FWHH* koreluje s výsledky *XRD* analýzy, kde u vzorku cHA byla nalezena větší průměrná velikost zrn než ve vzorku sHA (Tab. 28). Hodnota parametru *FWHH* dalších vzorků obsahujících významné množství HA klesá v následující posloupnosti: HT1 > BTB >> HA (KS6) > HA (KS3). Posuny maxima absorpčních píků k vyšším vlnočtům u vzorků KS3 a KS6 jsou způsobeny přítomností WHE a WED uložených v biologické matici vzorku, navíc intenzita symetrické vibrace P-O linie v těchto KS je 10 krát menší než u ostatních zkoumaných vzorků.



Obr. 43: Charakteristické linie  $\nu_s$  P-O v  $PO_4^{3-}$  ve vzorcích obsahujících významné množství HA

## 4.2 Strukturní charakterizace kalcinovaných vzorků

Studované vzorky byly podrobeny termické analýze v oboru teplot 30 – 1280 °C, její výsledky jsou komentovány v kapitole 4.4.1. Následující kapitoly 4.2.1 a 4.2.2 se věnují strukturní charakterizaci a fázovému složení vzorků po termické analýze, během níž došlo k jejich kalcinaci. Hlavním záměrem bylo pozorovat transformační procesy CaP v daném teplotním intervalu. Pozornost byla také zaměřena na termickou stabilitu biologických HA, především BTB a HT, které byly dále použity v kalcinované podobě i v termochemické studii (viz kap. 4.2.2).

### 4.2.1 Syntetizované a komerční vzorky fosforečnanů vápenatých

Metodou XRD bylo zjištěno, že během termické analýzy z 30 °C na 1280 °C se vzorek ACP z 63 hm% transformoval na HA s hexagonální prostorovou grupou P6<sub>3</sub>/m. Kalcinovaný ACP dále obsahoval 24 hm% WHI a 12 hm% β-TCP, jak je uvedeno v Tab. 38. V případě analyzovaného WHI se nejednalo o iontově substituovaný TCP, ale o TCP s hexagonální prostorovou grupou P6<sub>3</sub>/mmc, jenž je v databázi JCPDS označován jako WHI [121]. Dalším zkoumaným vzorkem byl β-TCP, který zůstal po kalcinaci zcela nezměněn. Nebyl zaznamenán jakýkoli podíl vysokoteplotní formy α-TCP, která vzniká při teplotě 1125 °C. Komerční vzorek cHA a syntézně připravený sHA si po kalcinaci ponechaly část původního obsahu HA, v případě cHA to bylo 91 hm%, u sHA pak 26 hm% (Tab. 38).

Tab. 38: Strukturní parametry syntetických vzorků CaP po jejich kalcinaci

Vzorek	Fáze	Grupa	w / hm%	Mřížkové parametry				$\bar{d}$ / nm
				a / Å	b / Å	c / Å	$\beta$ / °	
ACP	HA	P6 <sub>3</sub> /m	64	9,4214	–	6,8814	–	129
	WHI	P6 <sub>3</sub> /mmc	24	10,4290	–	37,3800	–	153
	β-TCP	R3c	12	6,9280	–	–	45,0	212
β-TCP	β-TCP	R3cH	100	10,4191	–	37,3653	–	214
cHA	HA	P6 <sub>3</sub> /m	91	9,4020	–	6,8869	–	151
	TTCP	P12 <sub>1</sub> 1	9	7,0172	11,9797	9,4570	91,0	162
sHA	α-TCP	P12 <sub>1</sub> /a1	74	12,8870	27,2800	15,2190	126,2	186
	HA	P6 <sub>3</sub> /m	26	9,4148	–	6,8892	–	138

V kapitole 2.8.3 bylo zmíněno, že hexagonální modifikace HA je méně strukturně uspořádaná než modifikace monoklinická, která je termicky stabilní do teplot cca 250 °C [134,135]. Monoklinická modifikace HA nebyla syntetizována a veškeré způsoby přípravy HA vedly ke vzniku hexagonální modifikace. Vedle stabilních podílů HA se ve vzorku cHA vyskytovalo 9 hm% TTCP ( $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ , fosforečnan tetraápenatý) a ve vzorku sHA bylo po kalcinaci detekováno 74 hm% TCP. Ten však neměl romboedrické uspořádání, jak bylo očekáváno, ale parametry odpovídaly vysokoteplotní modifikaci  $\alpha$ -TCP.

## 4.2.2 Biologické vzorky

### 4.2.2.1 Vzorky tvrdých tkání

Vzorek kalcinované kosti obsahoval 80 hm% HA, 14 hm% CaO (LI) a 6 hm% TTCP (viz Tab. 39), kde frakce LI představuje pozůstatek rozkladu organické matrice kosti. Na rozdíl od vzorku BTB, vzorky zubních tkání obsahovaly po kalcinaci HA pouze v minoritním zastoupení (okolo 2 hm%). Hlavní podíl byl tvořen WHI s romboedrickou prostorovou grupou R3cH o stechiometrickém vzorci  $\text{Ca}_{2,86}\text{Mg}_{0,14}(\text{PO}_4)_2$ . V případě HT3 navíc kalcinovaný vzorek obsahoval stopové množství TTCP, který částečně transformoval z HA fáze, obdobně jako tomu bylo u vzorku BTB a komerčního vzorku cHA.

Tab. 39: Strukturní parametry krystalických fází přítomných v kalcinovaných vzorcích tvrdých tkání

Vzorek	Fáze	Grupa	w / hm%	Mřížkové parametry				d / nm
				a / Å	b / Å	c / Å	$\beta / ^\circ$	
BTB	HA	P6 <sub>3</sub> /m	80	9,4510	–	6,8802	–	133
	LI	225	14	4,8044	–	–	–	188
	TTCP	P12 <sub>1</sub> 1	6	7,0107	11,9949	9,4656	90,8	118
HT1	WHI	R3cH	98	10,3565	–	6,885	–	90
	HA	P6 <sub>3</sub> /m	2	9,4142	–	6,8812	–	150
HT2	WHI	R3cH	98	10,4109	–	37,4265	–	115
	HA	P6 <sub>3</sub> /m	2	9,4036	–	6,9181	–	183
HT3	WHI	R3cH	98	10,3876	–	37,4018	–	83
	HA	P6 <sub>3</sub> /m	2	9,4268	–	6,8961	–	104
	TTCP	P2 <sub>1</sub>	t.a.	7,0139	11,9853	9,4636	90,8	133

t.a. – stopové množství

#### 4.2.2.2 Vzorky ledvinových kamenů

Složení kalcinovaných vzorků KS bylo zkoumáno u všech studovaných materiálů s výjimkou KS1, jehož hmotnost byla pro termickou analýzu příliš malá. V případě vzorků KS2 a KS3 byla po termické analýze provedena pouze identifikace přítomných složek bez určení procentuálního zastoupení z důvodu malé hmotnosti vzorku a nesplnění podmínek nutných pro kvantifikaci přítomných fází metodou *XRD*. HA se objevil ve vzorcích KS3, KS4, KS5 a KS6. Ve vzorku KS6 byl HA majoritní složkou s procentuálním obsahem 65 hm%, na rozdíl od vzorků KS4 a KS5, kde byl HA přítomen pouze v množství do 4 hm% (*Tab. 40*). Ve vzorku KS3 nebyl HA stanoven. Ve všech případech výskytu byla HA přiřazena hexagonální modifikace  $P6_3/m$ . V původních, nekalcinovaných vzorcích byl HA identifikován metodami *XRD* a *RS* v KS3 a KS6, metoda *EDX* navíc detekovala nepatrnou zónu HA i ve vzorku KS4.

*Tab. 40: Strukturální parametry krystalických fází přítomných ve vzorcích KS po jejich kalcinaci*

Vzorek	Fáze	Grupa	w / hm%	Mřížkové parametry		$\bar{d}$ / nm
				a / Å	c / Å	
KS2	LI	Fm3m	–	4,8081	–	96
	PO	P3m1	–	3,589	4,9226	14
KS3	HA	$P6_3/m$	–	9,4025	6,8903	135
	LI	Fm3m	–	4,8069	–	94
	PO	P3m1	–	3,5887	4,9216	14
KS4	PO	P3m1	97	3,5883	4,9149	15
	HA	$P6_3/m$	3	9,3757	6,9007	80
KS5	LI	Fm3m	78	4,8110	–	428
	PO	P3m1	18	3,5867	4,9324	13
	HA	$P6_3/m$	4	9,3797	6,9515	80
KS6	HA	$P6_3/m$	65	9,3939	6,8935	217
	LI	Fm3m	30	4,8113	–	307
	WHI	R3cH	5	10,4337	37,2856	80

Přítomnost HA v kalcinovaných vzorcích KS4 a KS5 byla pravděpodobně způsobena zvýšením koncentrace přítomných CaP následkem dehydratace a rozkladu původního materiálu během termické analýzy nad detekční mez *XRD*. Další možností by mohla být přítomnost amorfni složky ACP v KS a její transformace na termodynamicky stabilnější

formu v podobě HA. Ve vzorku KS6 se po kalcinaci vedle HA a LI navíc objevilo 5 hm% WHI s romboedrickou grupou R3cH o vzorci  $\text{Ca}_{2,86}\text{Mg}_{0,14}(\text{PO}_4)_2$ .

Existence fází LI a PO je důsledkem dekarboxylace šťavelanů, jak je tomu ve vzorku KS2, který původně obsahoval WED a WHE v poměru  $\sim 6:4$ , a u vzorků KS4 a KS5, které v nekalcinované podobě obsahovaly pouze fázi WHE. Kalcinace způsobila růst krystalitů HA nad 80 nm, u KS6 až na 217 nm, u HA v nekalcinovaných vzorcích ledvinových kamenů dosahovaly hodnoty  $\bar{d}$  cca 20 nm.

#### 4.2.3 Shrnutí strukturní charakterizace kalcinovaných vzorků

V teplotním intervalu 30 – 1280 °C byl termicky stabilní jediný vzorek, a to synteticky připravený  $\beta$ -TCP. Po jeho kalcinaci na 1280 °C se jeho fázové složení a mřížkové parametry krystalitů prakticky nezměnily. Vzorek ACP se kalcinací transformoval na směs HA a v minoritním zastoupení přítomných  $\beta$ -TCP a WHI. Transformační procesy ACP jsou obecně ovlivněny metodami přípravy, které mají vliv na vnitřní uspořádání amorfni fáze a stechiometrický poměr CaP [202,205]. V literatuře jsou pro teplotní interval 600 – 900 °C uváděna rozdílná zastoupení produktů kalcinace, nejčastěji se jedná o směsi CaP v podobě  $\alpha$ ,  $\beta$ -TCP, případně společně s CCP (viz kap. 2.9.3.). Komerční vzorek cHA degradoval z 9 hm% na TTCP, narozdíl od vzorku sHA, který si svou původní strukturu zachoval z 26 hm% a zbývající část se transformovala na vysokoteplotní modifikaci  $\alpha$ -TCP (74 hm%). To vypovídá o daleko větší termické stabilitě vzorku cHA, který před termickou analýzou vykazoval také větší krystalickou jasnost než vzorek sHA. Kalcinačním procesem došlo v cHA a sHA ke kontrakci mřížkových parametrů struktury HA (viz Tab. 28 a Tab. 38), která byla důsledkem větších rozměrů krystalických zrn HA fáze po termické analýze ( $\bar{d}_{sHA} = 186$  nm,  $\bar{d}_{cHA} = 151$  nm). HA frakce obsažená v kalcinovaném vzorku ACP měla oproti tomu krystalickou mřížku rozšířenější, s menší velikostí krystalizačních zrn HA ( $\bar{d} = 129$  nm) než v kalcinovaných vzorcích sHA a cHA.

Vzorky HT1 – HT3 se kalcinací z 98 % transformovaly na WHI, narozdíl od vzorku BTB, kde po kalcinaci jako majoritní složka vystupoval HA (80 hm%) ve směsi s 6 hm% TTCP a 14 hm% CaO. TTCP byl detekován ve stopovém množství i ve vzorku HT3. Vzhledem k výsledkům  $\mu$ -XRD analýzy plochy vzorku HT1 (viz Obr. 32) byly mřížkové parametry HT1 až HT3 korelovány na dvě HA formy, a to HA1 a HA2 o různých velikostech krystalitů a byly u nich určeny rozdílné mřížkové parametry, viz Tab. 30, kap. 4.1.2.1. Jednotlivé vzorky



---

HT byly pro termickou analýzu rozemlety bez separace HA1 a HA2 frakce, čímž zanikly původní rysy těchto dvou odlišných fází. Z těchto důvodů nelze s jistotou posoudit změny v parametrech strukturní mřížky HA ve vzorcích HT. Obecně došlo k nárůstu krystalinity HA fáze, jak ve vzorcích HT, tak ve vzorku BTB, viz *Tab. 39*.

V kalcinovaných vzorcích KS byla potvrzena přítomnost HA, a to ve vzorcích KS3, KS4, KS5 a KS6, společně ve směsi s CaO, případně Ca(OH)<sub>2</sub>. V KS6 se navíc nacházelo i 5 hm% WHI. Ve vzorku KS2 a KS4 byla po termické analýze metodou *XRD* nalezena směs CaO a Ca(OH)<sub>2</sub> jako pozůstatek dekarboxylace WHE (KS4) a směsi WHE/WED (KS2). Vzorek KS5 před kalcinací neobsahoval žádné zastoupení CaP viditelné *XRD* technikou a mohlo tak dojít buď transformací amorfního, nebo málo krystalicky vyvinutému CaP podílu, který byl součástí biologické matrice, a který nebylo možné detekovat *XRD* nebo *RS* technikou. Příčinou mohlo být taktéž zvýšení koncentrace přítomné CaP složky nad detekční limit *XRD* techniky vzhledem k hmotnostnímu úbytku vzorku během termické analýzy. Pro přítomnost WHI fáze ve vzorku KS6 je obdobné vysvětlení jako v případě nalezení HA fáze ve vzorku KS5. U podílů HA přítomných v kalcinovaných vzorcích KS došlo k významným kontrakcím mřížkových parametrů HA a taktéž k nárůstu krystalinity HA částic v kalcinovaných KS.

### 4.3 Studium rozpustnosti studovaných fosforečnanů vápenatých

Byla zjišťována koncentrace vápenatých iontů  $c_{Ca}$  v roztocích studovaných CaP v demineralizované vodě při 25 °C a ve vodném roztoku NaCl o iontové síle 0,3 mol.dm<sup>-3</sup> při teplotě 25, 37 a 45 °C. Koncentrace iontů  $Ca^{2+}$  v roztocích byla stanovena metodou AAS. Zkoumanými vzorky byly syntetizované fosforečnany ACP,  $\beta$ -TCP, cHA, sHA a kalcinované biologické materiály BTB (bHA) a kvartací získaný vzorek směsi HT1 – HT3 (tHA). Fázová složení vzorků bHA a tHA byla ověřena metodou XRD, příslušné difraktogramy jsou uvedeny v příloze (Obr. P7). Upravené vzorky bHA a tHA obsahovaly jedinou složku v podobě hexagonálního HA (P6<sub>3</sub>/m) s dobře vyvinutými krystalitami, tj. krystality bHA měly velikost 107 nm a tHA 178 nm. Pro každý zkoumaný vzorek CaP bylo provedeno pro danou teplotu 5 nezávislých rozpouštěcích experimentů. Ustavování rovnovážného stavu (*l*) – (*s*) během rozpouštěcího procesu bylo sledováno prostřednictvím vápnikové iontově selektivní elektrody. Doba rozpouštění ACP činila cca 20 min, u vzorku  $\beta$ -TCP ~ 40 min a v případě vzorků HA max. 1 hodinu. Nerozpouštěný podíl zkoumaného vzorku v matečném roztoku byl odfiltrován a analyzován metodou XRD, která potvrdila, že v daných časových intervalech nedocházelo k transformacím na jiné CaP fáze. Ze získaných hodnot  $c_{Ca}$  byly vypočítány součiny rozpustnosti  $K_s$  za použití vztahů uvedených v kapitole 2.9.1. V Tab. 41 jsou shrnuty hodnoty  $pK_s$  stanovené v demineralizované H<sub>2</sub>O při 25 °C, kde vliv středního aktivitního koeficientu  $\gamma_{\pm}$  byl zanedbán.

Tab. 41: Rozpustnost studovaných CaP v demineralizované vodě při 25 °C

CaP	$pK_s$ 25°C
ACP	19,41 ± 0,36
$\beta$ -TCP	26,65 ± 0,52
cHA	59,73 ± 0,28
sHA	58,29 ± 0,84
bHA	60,97 ± 0,53
tHA	63,26 ± 0,69

V případě rozpouštění studovaných vzorků v roztoku NaCl o iontové síle 0,3 mol.dm<sup>-3</sup> simulujícím fyziologické podmínky byla pro výpočet  $\gamma_{\pm}$  vzorků ACP,  $\beta$ -TCP a všech HA použita Daviesova korekce Jonesova vztahu (pro roztoky o  $I \leq 1$  mol.dm<sup>-3</sup>) podle vztahu uvedeného v kapitole 2.9.1.  $pK_s$  studovaných vzorků CaP pro teploty 25, 37 a 45 °C jsou uvedeny v Tab. 42. Zvýšení iontové síly způsobilo nárůst rozpustnosti při 25 °C u všech CaP o cca 4 % oproti experimentům prováděným za stejných podmínek v H<sub>2</sub>O.

Tab. 42: Rozpustnost studovaných CaP v roztoku NaCl o  $I=0,3 \text{ mol.dm}^{-3}$ 

CaP	$pK_s$		
	25 °C	37 °C	45 °C
ACP	18,69 ± 0,21	18,88 ± 0,17	20,15 ± 0,28
β-TCP	25,72 ± 0,15	25,68 ± 0,23	26,04 ± 0,31
cHA	57,98 ± 0,41	57,42 ± 0,23	57,65 ± 0,53
sHA	55,65 ± 0,73	55,54 ± 0,60	55,71 ± 0,36
bHA	58,13 ± 0,65	57,97 ± 0,48	58,32 ± 0,39
tHA	60,16 ± 0,77	60,53 ± 0,59	60,60 ± 0,64

Teplotní závislosti rozpustnostních dat jednotlivých CaP sloučenin byly statisticky vyhodnoceny pomocí F-testu o shodnosti rozptylů a rozdíly středních hodnot  $pK_s$  mezi teplotami 25, 37 a 45 °C daného studovaného vzorku byly posouzeny dvouvýběrovým studentským t-testem. Z výsledků vyplynulo, že hodnoty  $pK_s$  pro ACP jsou teplotně závislé, na rozdíl od rozpustnostních dat studovaných vzorků β-TCP a HA, kde se tato hypotéza nepotvrdila a experimentálně určené  $pK_s$  nebyly v daném teplotním intervalu teplotně závislé. To je ve shodě s publikovanými údaji [178], ze kterých vyplývá jejich vysoká termodynamická a chemická stabilita.

Byly však zjištěny významné rozdíly v rozpustnosti jednotlivých vzorků HA pro danou teplotu, kde rozdílnost hodnot  $pK_s$  je přisuzována rozdílné krystalinitě, rozdílnému molárnímu poměru  $Ca:P$  a je možné i ovlivnění způsobené přítomností různých příměsí zabudovaných ve struktuře HA (např.  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $CO_3^{2-}$  či  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ ), které odhalila EDX analýza, MS detekce odcházejících plynů během termické analýzy či ICP-OES. Za hlavní faktor snížení rozpustnosti je pokládána především větší krystalinita vzorku. Přidružené ionty, jako  $F^-$  a  $Cl^-$ , které se často vyskytují v biologických vzorcích HA, nebyly XRD ani EDX technikou ve zkoumaných vzorcích použitých v rozpouštěcích experimentech detekovány. Hodnoty  $pK_s$  pro ACP se v rozmezí teplot 25 – 45 °C zvýšily z 18,69 na 20,15, což odpovídá změně  $K_s$  o cca dva řády. XRD záznamy pevné amorfní fáze po rozpouštěcích experimentech při teplotách 25 a 45 °C jsou uvedeny v příloze na Obr. P21. Oba obdržené difraktogramy neobsahovaly žádné difrakční linie a ACP po rozpouštěcích experimentech při 45 °C mělo výrazně nižší pološířku píku než v případě ACP po experimentech při 25 °C. Tento parametr může poukazovat na případnou restrukturalizaci ACP, jak bylo uvedeno v literatuře [189,235]. V daném časovém intervalu nedocházelo ke konverzi na termodynamicky stabilnější alternativu CaP a byly splněny podmínky pro určení rozpustnosti ACP.

## 4.4 Charakterizace studovaných vzorků CaP pomocí termoanalytických metod

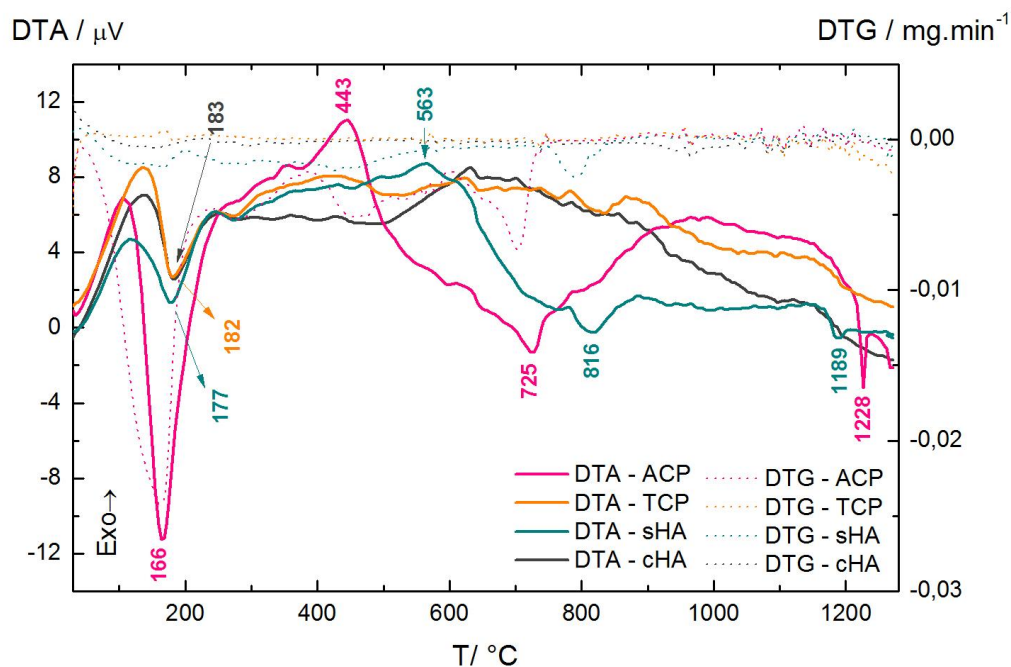
### 4.4.1 Diferenční termická analýza a termogravimetrie

Tepelné efekty ve zkoumaných vzorcích byly studovány v teplotním intervalu 30 – 1280 °C pomocí metody *DTA-TG*, která byla kombinovaná s *MS* zařízením pro analýzu uvolňovaných plynů. Jednalo se zejména o ztrátu adsorbované vody (cca do 200 °C), u biologických vzorků za vyšších teplot docházelo navíc k uvolňování strukturně vázané vody. Dekarboxylace studovaných vzorků se v malé míře odehrávala v širším rozpětí teplot, u biologických vzorků dokonce v celém teplotním intervalu termické analýzy. U některých vzorků byly zaznamenány dehydroxylační procesy přítomné HA složky s nepatrným záznamem fragmentu 18 v teplotním intervalu 650 – 1100 °C. U biologických vzorků docházelo vedle dehydratace navíc k pyrolýze organické matrice. Rozklad proběhl ve dvou stupních, nejprve mezi teplotami 250 – 600 °C, kdy docházelo k tvorbě fragmentů  $\text{CO}_x$ ,  $\text{NO}_x$  a k uvolnění strukturně vázané  $\text{H}_2\text{O}$ , v teplotním intervalu 600 – 1000°C probíhal další rozklad spojený s odchodem  $\text{CO}_x$ ,  $\text{NO}_x$  a  $\text{SO}_2$ . Po termické analýze byly kalcinované vzorky strukturně analyzovány *XRD* technikou, výsledky byly komentovány v kap. 4.2.

#### 4.4.1.1 Termická analýza syntetických vzorků

Vzorek ACP vykazoval na *TG* křivce tři hmotností úbytky. První, poměrně značný úbytek hmotnosti okolo 19,6 hm% nastal v teplotním rozpětí 30 až 215 °C (*Tab. 43*), kdy docházelo především k dehydrataci vzorku spojené s endotermním píkem při 166 °C (*Obr. 44*). *MS* analýza zaznamenala uvolnění vody v podobě fragmentu 18, společně s nepatrným množstvím  $\text{CO}_2^+$  (*44*), viz *Obr. 45* a *Obr. 46*. Druhý hmotností úbytek 0,6 hm% v oblasti 215 – 596 °C byl spojen s uvolněním  $\text{CO}_2^+$  z kalcinovaného vzorku ACP, které bylo doprovázeno částečnou transformací na termodynamicky stabilnější formu CaP s exotermním píkem na *DTA* křivce při 443 °C. Transformace ACP na CaP proběhla za nižší teploty, nežli bylo dosud publikováno [202,206,209]. Za tímto exotermním efektem následoval třetí stupeň změny hmotnosti v podobě ztráty 1,6 hm%, kde byl *MS* zaznamenán odchod nepatrného množství  $\text{H}_2\text{O}$ , doprovázený širokým endotermním efektem na *DTA* křivce s maximem při 725 °C. Tento efekt souvisí pravděpodobně s dehydroxylačními procesy přítomné HA struktury. Dehydroxylace HA obecně probíhá ve 4 až 5 krocích a je doprovázena širokým endotermním píkem mezi teplotami 600 až 1000 °C, viz [213–217]. Podrobně je mechanismus tohoto procesu vedoucího k tvorbě OHA či OA popsán v literatuře [216]. *DTA-TG* analýza vzorku ACP zaznamenala při teplotě 1228 °C endotermní efekt, který je přisuzován transformaci, případně restrukturalizaci vzorku za vzniku konečného fázového zastoupení

v podobě 64 hm% HA, 26 hm% WHI a 12 hm% TCP. XRD technika po kalcinaci ACP neodhalila přítomnost OA ani OHA, i když byl zaznamenán dehydroxylační efekt. Jak však uvádí publikace [212,214], OA a OHA během ochlazování vzorku snadno zanikají.



Obr. 44: DTA-DTG křivky syntetických CaP

Na rozdíl od ACP, syntetizovaný vzorek  $\beta$ -TCP nevykazoval v teplotním oboru 30 – 1280 °C žádné významné změny hmotnosti. MS analýza zaznamenala během kalcinace minimální ztrátu vody a povrchově vázaných fragmentů CO<sub>2</sub>, viz Obr. 45 a 46. Během termické analýzy nedošlo k žádným transformačním procesům ani výrazným změnám mřížkových parametrů krystalitů  $\beta$ -TCP (viz Tab. 38, kap 4.2.1.).

Syntetizovaný vzorek sHA ztratil přibližně 4 hm% v teplotním intervalu 30 – 636 °C, tento úbytek byl spojen s dehydratací a nepatrnou dekarboxylací vzorku. V oblasti vyšších teplot docházelo k dehydroxylačním procesům s maximem endotermního píku při 816 °C za vývoje nepatrného množství H<sub>2</sub>O (viz Obr. 45). Za tímto širokým píkem následoval endotermní efekt s maximem při teplotě 1189 °C, který byl taktéž pravděpodobně spojen s restrukturalizací složek v kalcinovaném vzorku, stejně jako tomu bylo u vzorku ACP. Výsledná kalcinační směs sHA neobsahovala OHA ani OA. Vzorek sHA transformoval ze 74 hm% na  $\alpha$ -TCP. Naproti tomu vzorek cHA vykazoval ve srovnání se vzorkem sHA daleko menší hmotnostní úbytky a při ohřevu do 1280 °C navíc nedocházelo k dehydroxylačním ani reorganizačním

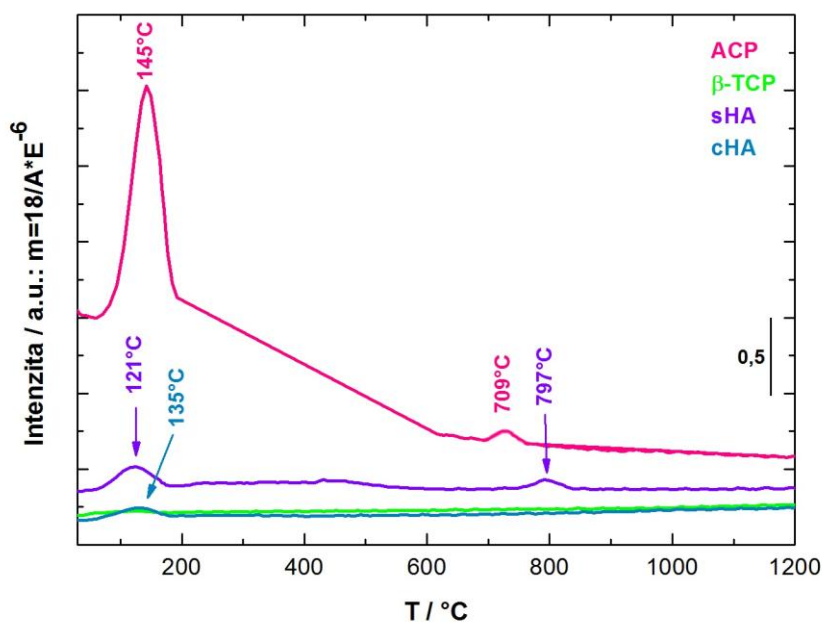
procesům. Vzorek cHA transformoval z 9 hm% na TTCP (Tab. 38) a MS analýza zaznamenala uvolnění jen nepatrného množství povrchově vázaného  $\text{CO}_2^+$  a  $\text{H}_2\text{O}^+$ .

Tab. 43: Termoanalytické údaje syntetických CaP a MS data uvolněných plynů během DTA-TG

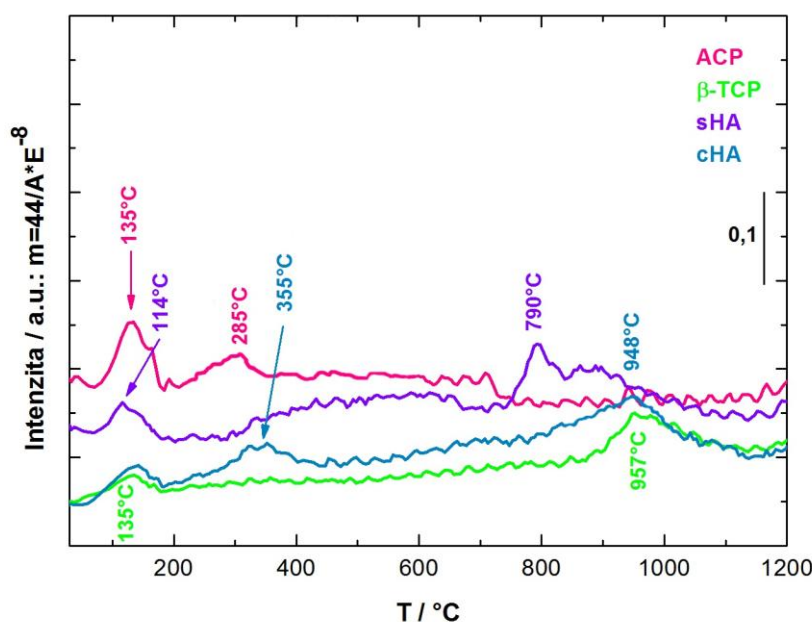
Vzorek	$\Delta w / \text{hm}\%$	Rozsah $T / ^\circ\text{C}$	Plynné fragmenty*
ACP	19,6	30 – 215	18, 44
	0,6	215 – 596	44
	1,6	596 – 1280	18, 44
$\beta$ -TCP	0,2	30 – 150	18, 28, 44
	-	150 – 1280	44
cHA	0,2	30 – 354	18, 44
	1,0	354 – 1280	44
sHA	0,8	30 – 197	18, 44
	2,9	197 – 636	44
	0,7	636 – 1280	18, 44

\* 18 –  $\text{H}_2\text{O}^+$ , 28 –  $\text{CO}^+$ , 44 –  $\text{CO}_2^+$

Na Obr. 45 a 46 jsou uvedeny MS záznamy studovaných vzorků CaP během DTA-TG.



Obr. 45: MS záznam fragmentu 18 odcházejícího ze vzorků CaP během termické analýzy

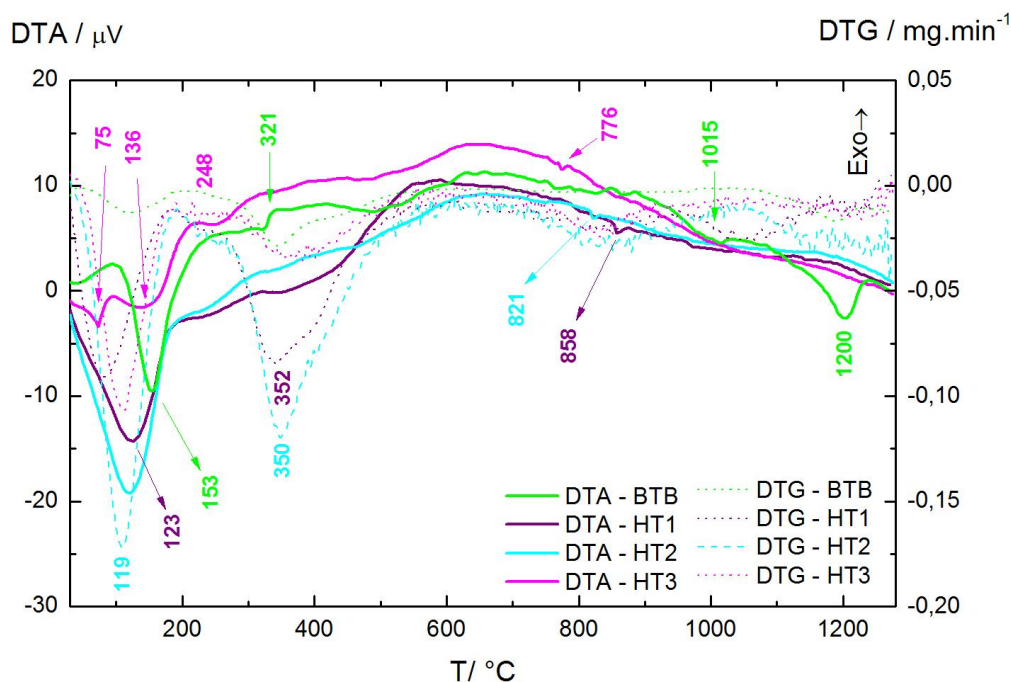


Obr. 46: MS záznam odcházejícího fragmentu 44 ze vzorků CaP během termické analýzy

#### 4.4.1.2 Termická analýza vzorků tvrdých tkání

Termická analýza vzorku BTB odhalila 3 výrazné hmotnostní úbytky spojené s uvolněním plynných fragmentů, jak je uvedeno v *Tab. 44*. V oblasti do 200 °C došlo ke ztrátě 5 hm% povrchově vázané H<sub>2</sub>O, což odpovídá endotermnímu efektu při 153 °C, viz *Obr. 47*. V celém studovaném teplotním intervalu docházelo k uvolňování CO<sub>2</sub>, který byl zřejmě vázán v porézní struktuře kosti. V oblasti do 550 °C ztratil vzorek BTB cca 21 % své hmotnosti a v následujícím kroku do 1280 °C pak dalších 15 hm% (*Tab. 44*). MS detekovala nízké koncentrace organických fragmentů CH<sub>3</sub> (15) a oxidů dusíku (30, 46) v oblasti 200 – 559 °C. Podobně jako u vzorků cHA i zde docházelo při 1200 °C k přechodu bHA na TTCP. Dva následné endotermní píky s maximy 1015 °C a 1200 °C na *DTA* křivce pravděpodobně souvisí s dehydroxylačními procesy, které byly identifikovány i při kalcinaci ACP a sHA.

Vzorky dentinů HT1 – HT3 vykazovaly do 200 °C především ztrátu vody, která byla pozorována na *DTA* záznamu u vzorků HT1 a HT2 s maximy při 119 °C a 123 °C, jak je vidět na *Obr. 47*. Vzorek HT3 v této oblasti obsahoval dva výrazné endotermie při 75 a 136 °C, spojené s celkovým poklesem hmotnosti 3,6 hm%. Tento efekt mohl být způsoben uvolněním dvou různě vázaných typů molekul H<sub>2</sub>O [210].



Obr. 47: Souhrn DTA-DTG křivek vzorků tvrdých tkání

Tab. 44: Termoanalytické údaje vzorků tvrdých tkání a MS data plynů uvolněných během DTA-TG

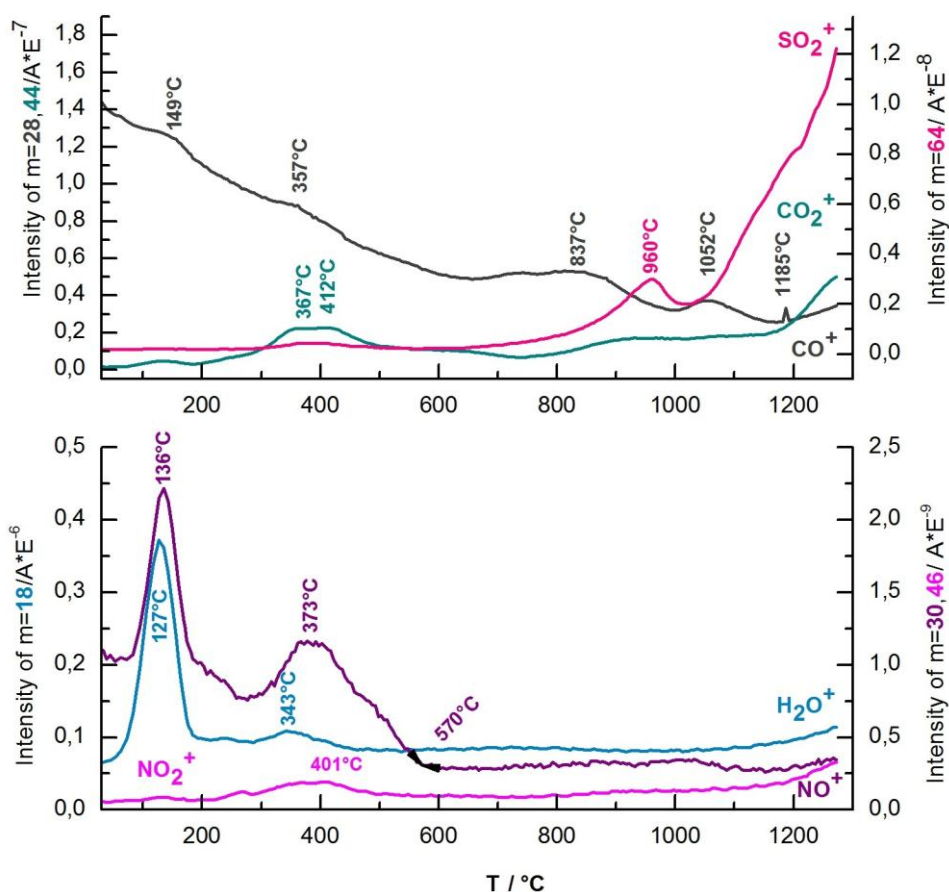
Vzorek	$\Delta w / \text{hm}\%$	Rozsah $T / ^\circ\text{C}$	Plynné fragmenty*
BTB	5,8	30 – 200	18, 28
	20,6	200 – 559	15, 18, 28, 30, 44, 46, 64
	15,9	559 – 1280	28, 44
HT1	4,5	30 – 200	18, 28, 30
	14,4	200 – 570	18, 28, 30, 44, 46
	5,9	570 – 990	28, 30, 64
	4,3	990 – 1280	28
HT2	5,6	30 – 190	17, 18, 19, 28, 30, 31, 38, 44, 46
	14,7	275 – 620	17, 18, 30, 31, 38, 44, 64
	6,0	620 – 1030	28, 44
	4,3	1030 – 1280	28, 44
HT3	3,6	30 – 196	17, 18, 19, 30, 31, 38, 44
	6,0	196 – 571	17, 18, 28, 30, 31, 44, 46, 64, 142
	4,5	571 – 1072	28, 44
	1,4	1072 – 1280	–

\* 15 -  $\text{CH}_3^+$ , 17 -  $\text{OH}^+$ , 18 -  $\text{H}_2\text{O}^+$ , 19 -  $\text{F}^+$ , 28 -  $\text{CO}^+$ , 30 -  $\text{NO}^+$ , 31 -  $\text{P}^+$ , 38 -  $\text{F}_2^+$ , 44 -  $\text{CO}_2^+$ ,  
46 -  $\text{NO}_2^+$ , 64 -  $\text{SO}_2^+$ , 142 -  $\text{P}_2\text{O}_5^+$



Vzorek HT3 se z 98 hm% transformoval na WHI se stopovým množstvím TTCP, v případě vzorku BTB se objevilo 6 hm% TTCP vedle 80 hm% stabilního podílu HA a 14 hm% pozůstatku organické matrice v podobě CaO (LI). Vzorky HT1 a HT2 po kalcinaci obsahovaly z 98 % přetransformovaný podíl HA na WHI.

MS záznamy plynů odcházejících ze vzorků HT1 – HT3 při teplotách nad 300 °C zachytily produkty pyrolýzy: fragmenty 28 ( $\text{CO}^+$ ), 30 ( $\text{NO}^+$ ), 31 ( $\text{P}^+$ ), 44 ( $\text{CO}_2^+$ ), 46 ( $\text{NO}_2^+$ ) a 64 ( $\text{SO}_2^+$ ), jejichž přítomnost souvisela s rozkladem biologické matrice, jak je uvedeno na příkladu MS záznamu vzorku HT1 na Obr 48. Navíc u vzorků HT2 a HT3 byla detekována nepatrná množství fragmentů  $\text{F}^+$ ,  $\text{F}_2^+$  a fragmenty obsahující fosfor (31, 142), viz Tab. 44.



Obr. 48: MS záznamy plynů odcházejících ze vzorku HT1 během termické analýzy

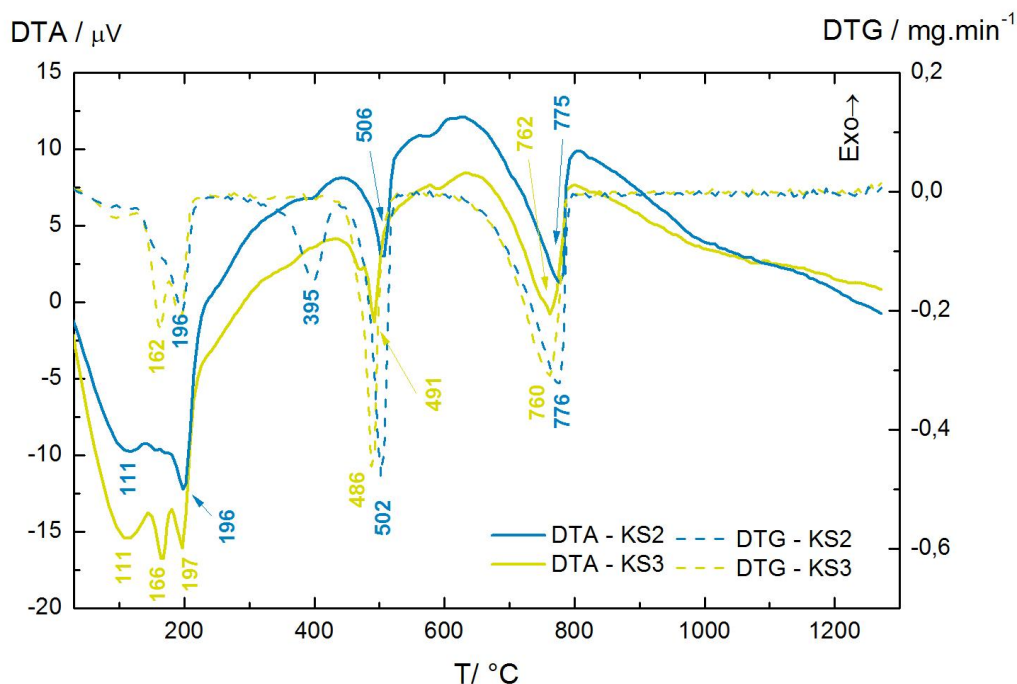
Na DTA křivkách studovaných HT se objevily endotermní píky kolem 350 °C, které odpovídaly hmotnostní ztrátě 14,5 hm% u vzorků HT1 a HT2 a 6,0 hm% u HT3. Rozklady organické matrice HT probíhaly ve dvou stupních, nejprve mezi teplotami 250 až 600 °C, což bylo spojené s vývojem fragmentů  $\text{NO}_x$ ,  $\text{CO}_x$  a strukturálně vázané  $\text{H}_2\text{O}$  a pak v oblasti kolem

1000 °C, kde došlo k odchodu NO<sub>x</sub>, CO<sub>x</sub> a SO<sub>2</sub>. Hmotnostní úbytky nad cca 600 °C u vzorků HT1 a HT2 jsou téměř totožné (~ 10 hm%), u vzorku HT3 činí okolo 6 hm%. Z průběhů *DTA* křivek v oblasti nad 600 °C lze usuzovat, že navíc dochází ke krystalizaci, či reorganizaci přítomné HA složky v BTB na termodynamicky stabilnější podobu CaP či k dočasnému vzniku OHA nebo OA, jak bylo uvedeno výše [216]. Ve výsledném kalcinovaném vzorku BTB byly *XRD* analýzou potvrzeny CaP frakce v podobě HA a TTCP. Nad 700 °C byly průběhy křivek *DTA* u všech dentinových vzorků prakticky shodné a endotermní píky s maximy při teplotách 776 °C (HT3), 821 °C (HT2) a 858 °C (HT1) souvisí pravděpodobně s dehydroxylací přítomné HA struktury [211–214].

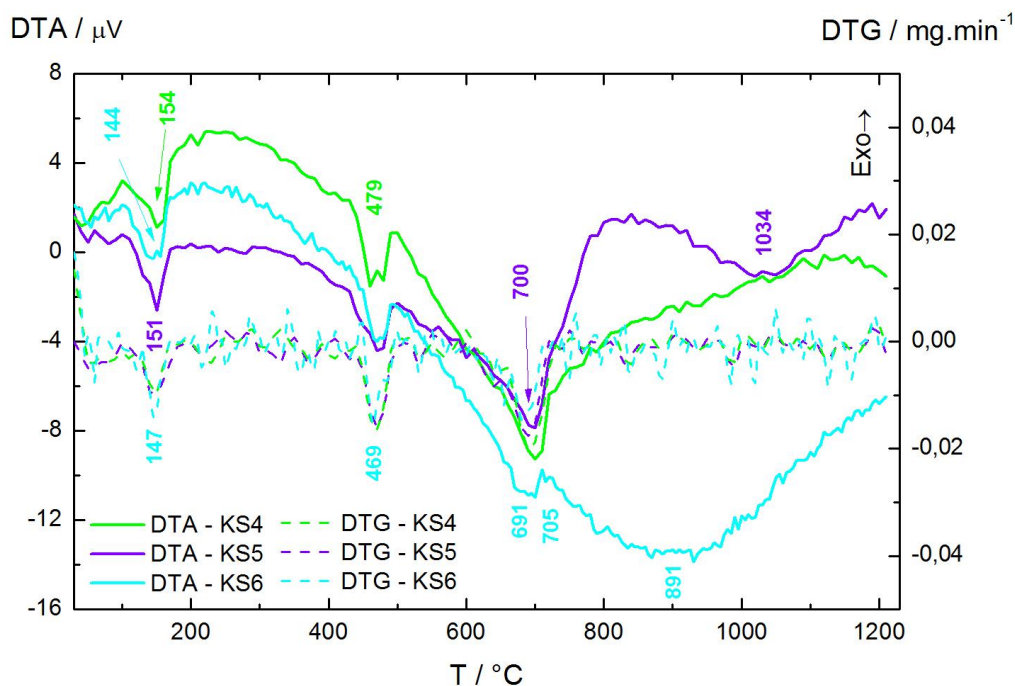
#### 4.4.1.3 Termická analýza vzorků ledvinových kamenů

Termickou analýzou byly zkoumány všechny vzorky ledvinových kamenů s výjimkou vzorku KS1, kterého nebylo dostatečné množství pro termickou analýzu. Studované vzorky KS v původním stavu obsahovaly významný podíl šřavelanů vápenatých v podobě WHE, či jeho směsi s WED. Vzorky KS3 a KS6 před termickou analýzou navíc obsahovaly HA, v případě vzorku KS3 to bylo 31 hm% a u vzorku KS6 pak 11 hm%. Po termické analýze nebylo možné ve vzorcích KS2 a KS3 stanovit obsahy přítomných složek z důvodu malého množství vzorku. Vzorek KS6 po kalcinaci na 1280 °C obsahoval 65 hm% HA. HA fázi obsahovaly rovněž kalcinované vzorky KS4 (3 hm%) a KS5 (4 hm%), u kterých HA nebyl před kalcinací metodami *XRD* a *RS* zjištěn. Po kalcinaci byla v kameni KS6 jako v jediném vzorku nalezena WHI fáze (5 hm%), která mohla vzniknout z ACP, jehož přítomnost v původním vzorku nebyla vzhledem ke složitosti *XRD* a *RS* záznamů jednoznačně prokázána. Jako další možná alternativa může být uvažována transformace přítomného HA na WHI, třetí možností je stanovení WHI díky překročení meze stanovitelnosti této sloučeniny metodou *XRD* vlivem zakoncentrování vzorku kalcinačními procesy, jak bylo zmíněno v kap. 4.2.2.2.

*DTA-DTG* křivky vzorků ledvinových kamenů signalizují tři až čtyři charakteristické hmotnostní úbytky spojené s termickým rozkladem především WHE (KS4, KS5), případně směsi WHE a WED (KS2, KS3 a KS6), viz *Obr. 49* a *50*. Nejdříve docházelo ke ztrátě adsorbované a krystalicky vázané vody v oboru teplot přibližně 30 – 320 °C a za ní následovaly dva stupně rozkladu biologické matrice vzorku. Dvoustupňový rozklad organické hmoty probíhal v rozmezí teplot 400 – 600 °C a dále pak mezi 600 °C až 800 °C za vývoje plynných fragmentů NO<sub>x</sub> (30,46), CO<sub>x</sub> (28,44) a SO<sub>2</sub> (64).



Obr. 49: DTA-DTG křivky vzorků KS2 a KS3



Obr. 50: DTA-DTG křivky vzorků KS4, KS5 a KS6

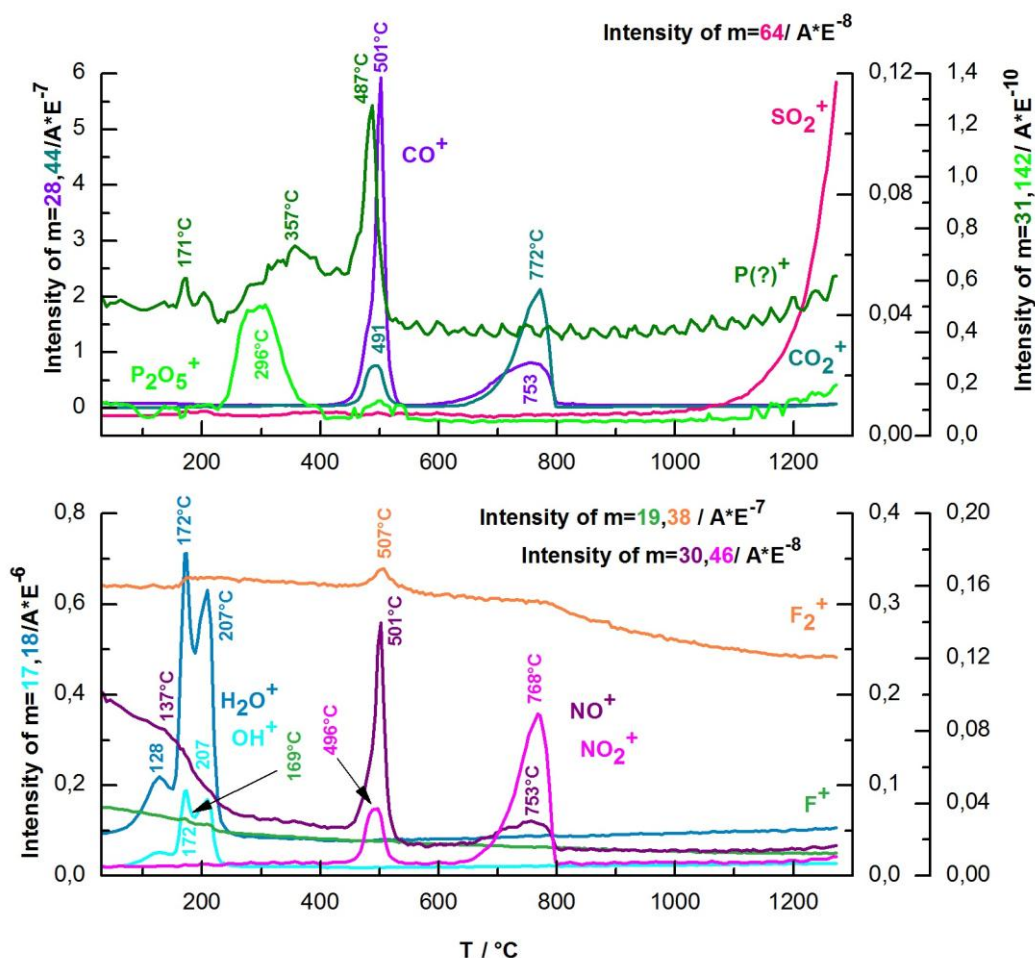
V Tab. 45 jsou přehledně shrnuty DTA-TG a MS údaje všech zkoumaných KS. U termické analýzy vzorků KS4 – KS6 byly bohužel navoleny pouze detekce fragmentů 18, 28, 44 a výsledky MS nejsou tedy úplné. Nicméně MS záznamy KS2 a KS3 vykazují plnohodnotné údaje. Příklad záznamu MS kalcinovaného vzorku KS3 je následně uveden na Obr. 51.

Tab. 45: Termoanalytické údaje vzorků KS a MS údaje plynů uvolněných během DTA-TG

Vzorek	$\Delta w / \text{hm}\%$	Rozsah $T / ^\circ\text{C}$	Plynné fragmenty*
KS2	17,9	30 – 278	17, 18, 19
	17,7	278 – 556	28, 30, 31, 38, 44, 46, 142
	28,0	556 – 1280	28, 30, 44, 46
KS3	11,5	30 – 270	17, 18, 19
	8,1	270 – 442	18, 28, 30, 31, 38, 46, 64, 142
	13,9	442 – 626	28, 30, 38, 44, 46
	23,9	626 – 1280	28, 30, 44, 46
KS4	12,7	30 – 315	18
	19,6	315 – 584	28, 44
	28,5	584 – 779	44
	6,7	779 – 1220	–
KS5	17,7	30 – 323	18
	11,1	323 – 549	28, 44
	36,1	549 – 884	44
	6,0	884 – 1220	–
KS6	8,2	30 – 313	18
	13,6	313 – 852	28, 44
	21,9	582 – 793	44
	11,2	793 – 1220	–

\* 17 -  $\text{OH}^+$ , 18 -  $\text{H}_2\text{O}^+$ , 19 -  $\text{F}^+$ , 28 -  $\text{CO}^+$ , 30 -  $\text{NO}^+$ , 31 -  $\text{P}^+$ , 38 -  $\text{F}_2^+$ , 44 -  $\text{CO}_2^+$ ,  
46 -  $\text{NO}_2^+$ , 64 -  $\text{SO}_2^+$ , 142 -  $\text{P}_2\text{O}_5^+$

Na záznamu MS vzorků KS2 a KS3 jsou patrné i fragmenty  $\text{F}^+$ ,  $\text{F}_2^+$ ,  $\text{P}^+$  a  $\text{P}_2\text{O}_5^+$ , které byly zaznamenány taktéž v MS zubních vzorků HT2 a HT3. XRD analýza práškových vzorků ani detekce plošných zón příčných řezů vzorků KS prostřednictvím  $\mu\text{-XRD}$  a EDX analýz, nezaznamenaly přítomnost  $\text{F}^-$  iontu ve zkoumaných vzorcích. V oblasti 500 – 800 °C dochází k rozkladu  $\text{CaCO}_3$  na  $\text{CaO}$  (KS6), který u vzorků KS2 – KS6 částečně či úplně hydratoval na  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  během ochlazujícího procesu po skončení kalcinace. V oblasti nad 800 °C je patrné odlišné chování vzorků KS5 a KS6 od ostatních zkoumaných vzorků (Obr. 49 a 50). U těchto dvou kamenů se objevuje široký endotermní pík s maximem 1034 °C (KS5), resp. 891 °C (KS6), který pravděpodobně souvisí z již dříve zmíněnou dehydroxylací HA struktury [211,212]. U vzorku KS3 však tento široký endotermní pík není detekován, pravděpodobně z důvodů zreagování  $\text{OH}^-$  iontů s přítomnými složkami nebo nemožnosti difuze v matici KS.



Obr. 51: MS záznam odcházejících plynů ze vzorku KS3 během termické analýzy

#### 4.4.1.4 Shrnutí výsledků termické analýzy zkoumaných vzorků CaP

Během *DTA-TG* studovaných vzorků docházelo k četným transformačním procesům doprovázeným vývojem plynných fragmentů, které byly detekovány a identifikovány *MS* analýzou. Předmětem zájmu byl především HA a jeho přítomnost v biologických vzorcích, tj. ve vzorcích BTB, HT, dále v KS3, KS6 a také jeho výskyt ve vzorcích, v nichž se původně nevyskytoval, po termické analýze, tj. po kalcinaci (vzorky ACP, KS4 a KS5). Kalcinací vzorků na 1280 °C došlo ke kontrakcím mřížkových parametrů HA, k významnému růstu HA krystalitů a na *DTA* křivkách byly u vzorků ACP, sHA, BTB, HT, KS5 a KS6 zaznamenány charakteristické endotermní procesy spojené s dehydroxylací a restrukturalizací HA struktury. Ve vzorcích podrobených kalcinaci nebyly metodou *XRD* zaznamenány dehydroxylační produkty v podobě OA ani OHA, které, pokud se během kalcinačního procesu vytvořily, pravděpodobně zanikly v průběhu chlazení vzorku po termické analýze.

#### 4.4.2 Reakční kalorimetrie

Přímé stanovení krystalizačních molárních entalpií hydroxyapatitu ( $\Delta_{cr}H^{HA}$ ) a fosforečnanu vápenatého ( $\Delta_{cr}H^{TCP}$ ) v izoperibolickém reakčním kalorimetru nebylo možné, a proto bylo navrženo schéma aditivních rovnic rozpouštěcích reakcí ve shodě s lineární kombinací reakcí a Hessova zákona (viz kap. 2.1.1 a 2.1.2). Hodnoty  $\Delta_{cr}H^{HA}$  a  $\Delta_{cr}H^{TCP}$  byly odvozeny z experimentálně stanovených hodnot rozpouštěcích entalpií, tedy z  $\Delta_{diss}H^{HA}$  a  $\Delta_{diss}H^{TCP}$ . Kalorimetrická měření byla provedena při teplotách 25, 37 a 45 °C, u všech zvolených reakcí byla upravena iontová síla prostředí pomocí NaCl na hodnotu 0,3 mol.dm<sup>-3</sup> pro simulaci fyziologických podmínek.

##### 4.4.2.1 Kalibrace izoperibolického reakčního kalorimetru a postup měření

Kalibrační konstanty  $\mathcal{G}$  izoperibolického kalorimetru pro teploty 25, 37 a 45 °C byly určeny elektrickou kalibrací (viz kap. 3.6.2.3) s využitím programu *OriTas 2011 RC*. Pro každou teplotu bylo uskutečněno 5 nezávislých měření, výsledné hodnoty  $\mathcal{G}$  jsou uvedeny v *Tab. 46*. Citlivost odporového můstku byla nastavena na hodnotu 8, odpor elektrického tělíska s příslušenstvím odpovídal 35,5  $\Omega$  a proud procházející kalibračním tělískem měl hodnotu 97,3 mA. Experimentálně byla určena rozpouštěcí entalpie vysoce čistého KCl (99,999 %) v demineralizované vodě  $\Delta_{diss}H$  (KCl, 500 H<sub>2</sub>O) a stanovená hodnota 17,06 kJ.mol<sup>-1</sup> byla porovnána s publikovaným údajem 17,58 kJ.mol<sup>-1</sup> [257]. Z porovnání vyplývá, že stanovené hodnoty entalpií lze považovat za správné, chyba měření, resp. odchylka stanovené hodnoty od publikované byla menší než 3 %.

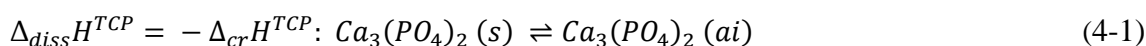
*Tab. 46: Kalibrační konstanty izoperibolického reakčního kalorimetru při různých teplotách*

$T / ^\circ\text{C}$	25	37	45
$\mathcal{G} / \text{J.V}^{-1}$	$278,5 \pm 8,9$	$292,7 \pm 11,1$	$301,4 \pm 14,7$

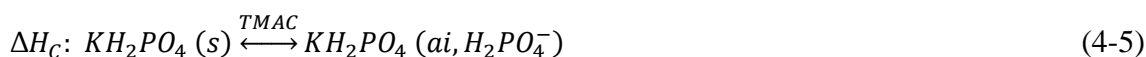
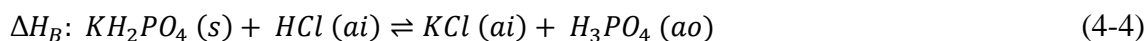
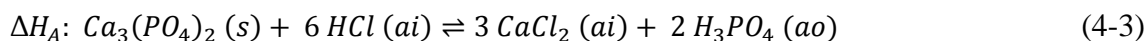
Experimentální postupy kalorimetrických měření jsou popsány v kap. 3.6.2.4. Záznamy závislosti  $\Delta U - t$  byly vyhodnoceny programem *OriTas 2011 RC* pro získání výsledného napětí  $\Delta U$  odpovídajícího dané chemické reakci, jak bylo uvedeno v kapitole 3.6.2.2. Získané hodnoty  $\Delta U$  byly přepočítány pomocí kalibrační konstanty  $\mathcal{G}$  na reakční entalpie  $\Delta_r H$  a jejich hodnoty byly vztaženy na jednotková molární množství zkoumaných látek. Hodnoty molárních reakčních entalpií studovaných rozpouštěcích reakcí byly určeny při teplotách 25, 37 a 45 °C při  $I = 0,3 \text{ mol.dm}^{-3}$ .

#### 4.4.2.2 Stanovení krystalizačních entalpií zkoumaných vzorků CaP

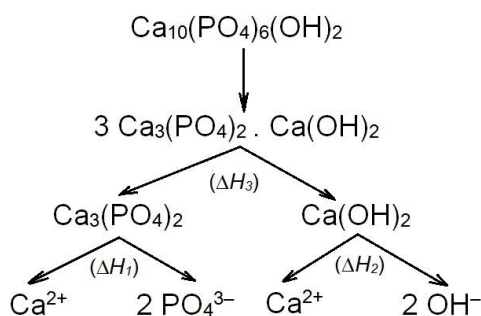
Pro stanovení  $\Delta_{cr}H^{TCP}$  byla použita rozpouštěcí reakce (4-3)  $\beta$ -TCP v 0,1 M HCl ( $\Delta H_A$ ) a rozpouštěcí reakce (4-4) a (4-5)  $KH_2PO_4$  v téže kyselině ( $\Delta H_B$ ) a v 0,1 M roztoku TMAC (tetramethylamonium chlorid), který plnil funkci disociačního činidla ( $\Delta H_C$ ). Výsledná hodnota  $\Delta_{cr}H^{TCP}$  byla vypočtena ze znalosti  $\Delta H_A$ ,  $\Delta H_B$  a  $\Delta H_C$  podle výsledné rovnice (4-2). Podle metodiky stanovení  $\Delta_{cr}H^{TCP}$  byla určena i krystalizační molární entalpie ACP ( $\Delta_{cr}H^{ACP}$ ), kde byl místo TCP použit čerstvě připravený vzorek ACP.



$$\Delta_{diss}H^{TCP} = \Delta H_A - 6 \Delta H_B + 6 \Delta H_C \quad (4-2)$$

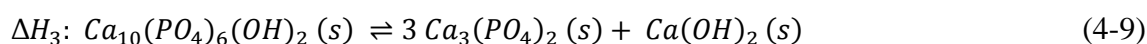
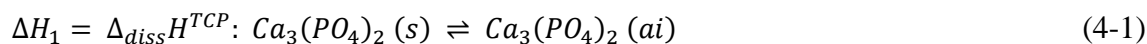
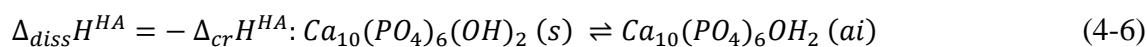


Hodnota  $\Delta_{cr}H^{HA}$  byla určena obdobným způsobem, a to z entalpie  $\Delta_{diss}H^{TCP}$  (v tomto případě dále značena jako  $\Delta H_1$ ), dále z rozpouštěcí reakce (4-8)  $Ca(OH)_2$  v kyselině chlorovodíkové ( $\Delta H_2$ ) a z entalpie disociace HA ( $\Delta H_3$ ) na  $Ca_3(PO_4)_2$  a  $Ca(OH)_2$  v poměru 3:1 (viz Obr. 52).

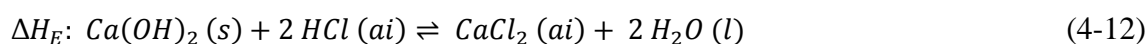
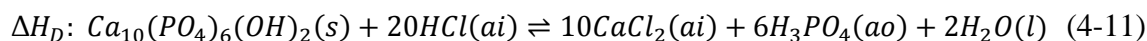
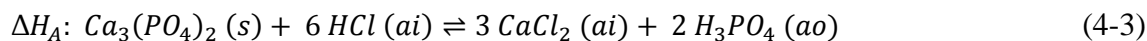


Obr. 52: Schematické znázornění dílčích kroků pro určení  $\Delta_{cr}H^{HA}$

Výsledná hodnota  $\Delta_{cr}H^{HA}$  byla vypočítána podle aditivní rovnice (4-7) pro vzorky sHA, cHA, bHA a tHA z  $\Delta H_1$  (4-1),  $\Delta H_2$  (4-8) a  $\Delta H_3$  (4-9), kde  $\Delta H_1$  představuje již získanou  $\Delta_{diss}H^{TCP}$ .



$\Delta H_3$  zohledňuje vazbu  $Ca_3(PO_4)_2$  a  $Ca(OH)_2$  v poměru 3:1 a byla vypočtena z aditivní rovnice (4-10) reakcí (4-3), (4-11) a (4-12):



V následující *Tab. 47* jsou uvedeny slučovací entalpie  $\Delta_f H^\circ$  vybraných sloučenin, které byly převzaty z databáze *NIST* [258], a které posloužily k výpočtu teoretických hodnot rozpouštěcích entalpií studovaných látek  $\Delta_{diss}H^*$  při 25°C.



Tab. 47: Standardní slučovací entalpie a teoretické hodnoty molárních rozpouštěcích entalpií CaP a složek reakcí navrženého schématu

Databáze NIST		$\Delta_f H^\circ / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta_{\text{diss}} H^* / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
$\Delta H_A (4-3)$	CaCl <sub>2</sub> (ai)	-877,13	-84,3
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (ao)	-1 288,34	
	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (s)	-4 120,80	
	HCl (ai)	-167,16	
$\Delta H_B (4-4)$	KCl (ai)	-419,53	27,6
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (ao)	-1 288,34	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (s)	-1 568,33	
	HCl (ai)	-167,16	
$\Delta H_C (4-5)$	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (ai, H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )	-1 548,67	19,7
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (s)	-1 568,33	
$\Delta H_1 = \Delta_{\text{diss}} H^{\text{TCP}} (4-1)$			<b>-131,7</b>
$\Delta H_2 (4-8)$	Ca(OH) <sub>2</sub> (ai)	1 002,82	<b>-16,7</b>
	Ca(OH) <sub>2</sub> (s)	-986,09	
$\Delta H_D (4-11)$	CaCl <sub>2</sub> (ai)	-877,13	-252,7
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (ao)	-1 288,34	
	H <sub>2</sub> O (l)	-285,83	
	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub> (s)	-13 477,00	
	HCl (ai)	-167,16	
$\Delta H_E (4-12)$	CaCl <sub>2</sub> (ai)	-877,13	-128,4
	H <sub>2</sub> O (l)	-285,83	
	Ca(OH) <sub>2</sub> (s)	-986,09	
	HCl (ai)	-167,16	
$\Delta H_3 (4-9)$			<b>128,6</b>
$\Delta_{\text{diss}} H^{\text{HA}} (4-6)$			<b>-283,2</b>

Tab. 48 až Tab. 54 shrnují experimentálně určené reakční entalpie studovaných reakcí v simulovaném fyziologickém prostředí pro teploty 25, 37 a 45 °C. Uváděné hodnoty představují průměr z 5 nezávislých měření. Hodnoty  $\Delta_{\text{diss}} H$  pro ACP a  $\beta$ -TCP byly vypočítány pomocí  $\Delta H_A$ ,  $\Delta H_B$  a  $\Delta H_C$  a pro určení výsledných hodnot  $\Delta_{\text{diss}} H^{\text{HA}}$  vzorků sHA, cHA, bHA a tHA se vycházelo ze znalosti  $\Delta H_1$ ,  $\Delta H_2$  a  $\Delta H_3$ .

Tab. 48: Teplotní závislost rozpouštěcích entalpií ACP a  $\beta$ -TCP v 0,1 M HCl

$T / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_A / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	
	$\beta$ -TCP	ACP <sup>A</sup>
25	$-111,6 \pm 4,2$	$-92,3 \pm 2,0$
37	$-124,1 \pm 5,9$	$-116,9 \pm 4,4$
45	$-134,2 \pm 5,7$	$-125,6 \pm 4,8$

<sup>A</sup>ACP jako  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ Tab. 49: Teplotní závislost rozpouštěcích entalpií  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  v 0,1 M HCl a TMAC

$T / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_B / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta H_C / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
25	$21,3 \pm 0,7$	$19,3 \pm 0,5$
37	$24,4 \pm 0,6$	$21,9 \pm 0,4$
45	$27,1 \pm 1,2$	$24,3 \pm 0,9$

Z entalpií  $\Delta H_A$ ,  $\Delta H_B$  a  $\Delta H_C$  chemických reakcí (4-3) až (4-5), které byly realizovány v simulovaných fyziologických podmínkách, byly vypočteny hodnoty rozpouštěcích entalpií ACP a  $\beta$ -TCP, jež jsou uvedeny v Tab. 50. V případě ACP se jedná o hodnoty náležející formě  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , kterou prokázaly výsledky ICP-OES a TG (viz kap. 4.1.3).

Tab. 50: Teplotní závislost rozpouštěcích entalpií  $\beta$ -TCP a ACP v simulovaných fyziologických podmínkách

$T / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_I = \Delta_{\text{diss}}H^{\text{TCP}} / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	
	$\beta$ -TCP	ACP
25	$-123,6 \pm 6,7$	$-104,3 \pm 5,5$
37	$-139,1 \pm 7,3$	$-131,9 \pm 6,2$
45	$-151,0 \pm 10,6$	$-142,4 \pm 10,2$

V Tab. 51 až Tab. 53 jsou uvedeny hodnoty entalpií  $\Delta H_D$ ,  $\Delta H_E$ ,  $\Delta H_2$  a  $\Delta H_3$  pro 25, 37 a 45  $^\circ\text{C}$ , ze kterých se vycházelo při výpočtu  $\Delta_{\text{diss}}H$  zkoumaných HA.

Tab. 51: Teplotní závislost rozpouštěcích entalpií zkoumaných HA v 0,1 M HCl

$T / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_D / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$			
	cHA	sHA	bHA	tHA
25	$-303,5 \pm 9,4$	$-300,7 \pm 10,7$	$-324,2 \pm 11,2$	$-335,7 \pm 13,0$
37	$-324,3 \pm 10,7$	$-318,4 \pm 11,2$	$-344,0 \pm 14,4$	$-353,6 \pm 12,5$
45	$-338,9 \pm 12,9$	$-325,7 \pm 12,1$	$-352,8 \pm 11,0$	$-356,3 \pm 14,3$

Tab. 52: Teplotní závislost rozpouštěcí entalpie  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  v  $\text{H}_2\text{O}$  a 0,1 M HCl

$T / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_2 / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta H_E / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
25	$-15,0 \pm 0,6$	$-122,0 \pm 3,9$
37	$-13,9 \pm 0,7$	$-136,3 \pm 4,8$
45	$-12,8 \pm 0,6$	$-140,7 \pm 4,4$

Tab. 53: Teplotní závislost entalpie reakce (4-9)

$T / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_3 / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$			
	cHA	sHA	bHA	tHA
25	$153,3 \pm 16,2$	$156,1 \pm 16,9$	$132,6 \pm 17,3$	$121,1 \pm 18,5$
37	$184,3 \pm 21,2$	$190,2 \pm 21,5$	$164,6 \pm 23,3$	$155,0 \pm 22,2$
45	$204,4 \pm 21,9$	$217,6 \pm 21,4$	$190,5 \pm 20,8$	$187,0 \pm 22,7$

Tab. 54: Teplotní závislost rozpouštěcích entalpií vzorků HA v simulovaných fyziologických podmínkách

$T / ^\circ\text{C}$	$\Delta_{diss}H^{HA} / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$			
	cHA	sHA	bHA	tHA
25	$-232,5 \pm 17,5$	$-229,7 \pm 18,2$	$-253,2 \pm 18,6$	$-264,7 \pm 19,7$
37	$-246,9 \pm 22,0$	$-241,0 \pm 22,3$	$-266,6 \pm 24,0$	$-276,2 \pm 22,9$
45	$-261,4 \pm 24,3$	$-248,2 \pm 23,9$	$-275,3 \pm 23,4$	$-278,8 \pm 25,0$

Teplotní závislost rozpouštěcích entalpií studovaných vzorků CaP byla ověřena statisticky pomocí dvouvýběrového studentova t-testu se zvolenou hladinou významnosti  $\alpha = 0,05$ . Bylo zjištěno, že hodnoty  $\Delta_{diss}H$  vzorků ACP a  $\beta$ -TCP jsou teplotně závislé (Tab. 50), na rozdíl od hodnot  $\Delta_{diss}H$  vzorků sHA, tHA, bHA a tHA (Tab. 54), u nichž nebyly na zvolené hladině významnosti prokázány statisticky významné rozdíly v hodnotách rozpouštěcích entalpií stanovených při teplotách 25, 37 a 45  $^\circ\text{C}$ , což je v souladu se závěry uvedenými v kap. 4.3 o teplotní nezávislosti rozpustnosti CaP na bázi HA. Chyby stanovení (směrodatné odchytky) aditivních hodnot entalpií (tj.  $\Delta H_1$ , resp.  $\Delta_{diss}H^{TCP}$ ,  $\Delta H_3$  a  $\Delta_{diss}H^{HA}$ ) byly určeny pomocí zákona o šíření chyb (viz Příloha). Rozdíly mezi teoretickými hodnotami  $\Delta_{diss}H^*$  a hodnotami experimentálně určenými  $\Delta_{diss}H$  (viz Tab. 47 a Tab. 54) jsou důsledkem rozdílných reakčních podmínek, neboť hodnoty z databáze NIST platí pro rozpouštění v čisté vodě, na rozdíl od hodnot stanovených v této disertační práci, kde byla iontová síla roztoku, v němž rozpouštění probíhalo, nastavena přidávkem NaCl na hodnotu 0,3 mol.dm<sup>-3</sup>, aby se tak alespoň částečně simulovaly fyziologické podmínky.

V literatuře [259] její autoři stanovili rozpouštěcí entalpie  $\beta$ -TCP a HA při 25 °C prostřednictvím systému chemických reakcí za proměnlivého  $pH$  pomocí izoperibolického kalorimetru a mikrokolorimetru. Extrapolace na  $pH$  7 vedla k určení  $\Delta_{diss}H$  daných CaP v čisté vodě. Byly získány hodnoty  $\Delta_{diss}H = -138,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  pro  $\beta$ -TCP a  $\Delta_{diss}H = -393,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  pro HA. Rozpouštěcí entalpie HA je v tomto případě, podobně jak je tomu i u našich hodnot, velmi vzdálená teoreticky vypočítané ( $\Delta_{diss}H^{HA} = -283,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Jinou možností porovnání publikovaných údajů  $\Delta_{diss}H$  s hodnotami experimentálně určenými v této práci může být kombinace hodnot z databáze *NIST* s hodnotami standardních slučovacích entalpií  $_{f}H^{\circ}(\text{HA},cr) = -13305 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  [236] a  $_{f}H^{\circ}(\beta\text{-TCP},cr) = -4056 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  [260]. Tento přístup vede k hodnotám  $\Delta_{diss}H^{\beta\text{-TCP}} = -127,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  a  $\Delta_{diss}H^{HA} = -247,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  [236,258,260], což jsou hodnoty relativně blízké těm, které byly stanoveny v této práci. Rozpouštění těchto málo rozpustných fosforečnanů v  $\text{H}_3\text{PO}_4$  bylo studováno také ve studiích [249,260], kde hodnoty vykazují opět vyšší rozpouštěcí entalpií HA, než udává teoretický výpočet. Podobně je tomu i u prací [244,259,266]. V těchto případech byla pro rozpouštění CaP využita zředěná 10 %-ní kyselina dusičná. Srovnání námi stanovených hodnot  $\Delta_{diss}H$  studovaných CaP s dříve publikovanými daty je z důvodu různých iontových sil a  $pH$  roztoků těžko proveditelné. Veškeré dostupné údaje jsou shrnuty v následujících *Tab. 55* a *Tab. 56*.

*Tab. 55: Porovnání stanovené rozpouštěcí entalpie  $\beta$ -TCP s publikovanými daty*

$T / ^{\circ}\text{C}$	$\Delta_{diss}H^{\beta\text{-TCP}} / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
25	$-123,6 \pm 6,7$
	-125,5 [249]
	-127,2 [SEP]
	-130,3 [260]
	-138,3 [259]
<i>SEP: semiempirický přístup zhodnocení <math>\Delta_{diss}H^{\beta\text{-TCP}}</math> [258,260]</i>	

*Tab. 56: Porovnání rozpouštěcí entalpie HA s publikovanými daty*

$T / ^{\circ}\text{C}$	$\Delta_{diss}H^{HA} / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$				
	cHA	sHA	bHA	tHA	HA
25	$-232,5 \pm 17,5$	$-229,7 \pm 18,2$	$-253,2 \pm 18,6$	$-264,7 \pm 19,7$	-247,4 [SEP]
					-354,6 [249]
					-364,3 [244]
					-364,8 [266]
					-393,6 [259]

*SEP: semiempirický přístup zhodnocení  $\Delta_{diss}H^{HA}$  [236,258]*

Z experimentálně získaných hodnot  $\Delta_{diss}H$  studovaných vzorků CaP (ACP,  $\beta$ -TCP, sHA, cHA, bHA a tHA) byly odvozeny krystalizační entalpie  $\Delta_{cr}H$  podle vztahů (4-1) a (4-6) a jejich hodnoty jsou shrnuty v *Tab. 57*.

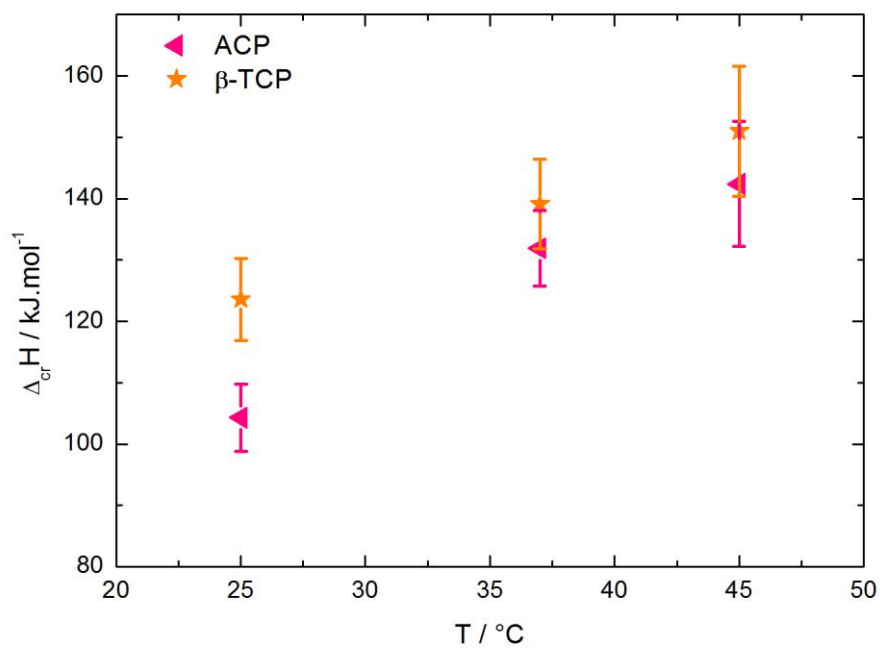
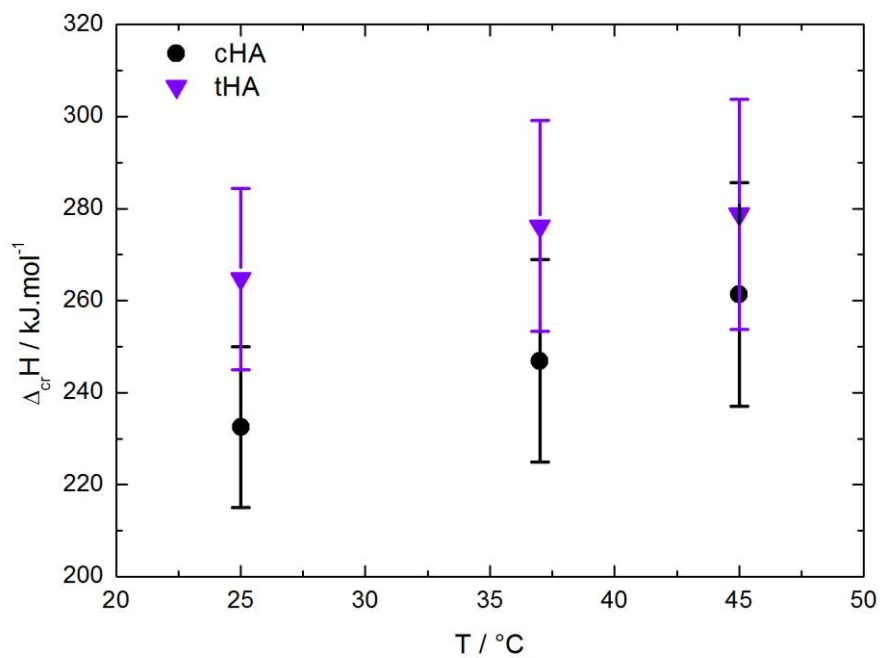
*Tab. 57: Teplotní závislosti krystalizačních entalpií  $\Delta_{cr}H$  zkoumaných vzorků CaP*

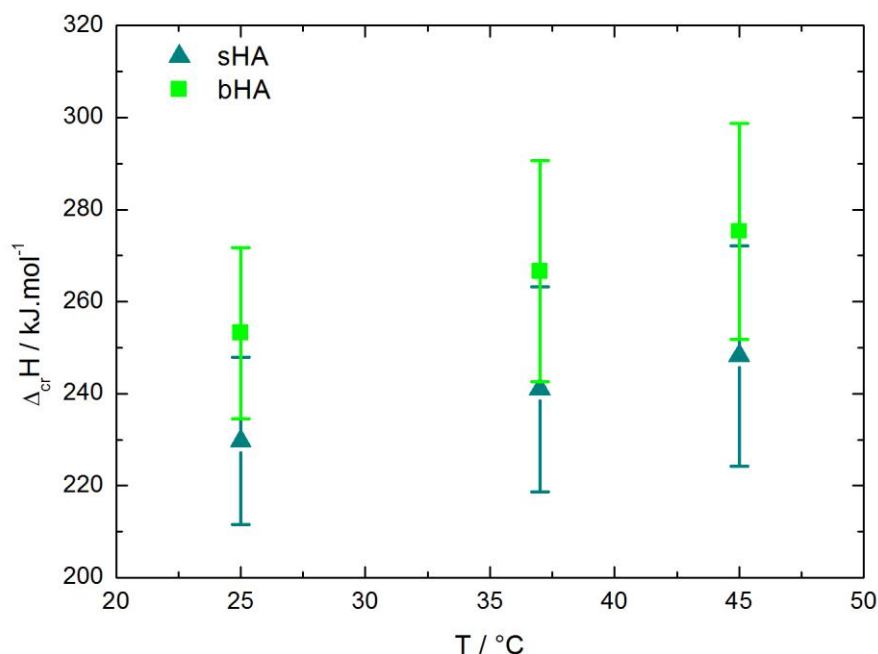
$T / ^\circ\text{C}$	$\Delta_{cr}H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$					
	cHA	sHA	bHA	tHA	$\beta$ -TCP	ACP
25	$232,5 \pm 17,5$	$229,7 \pm 18,2$	$253,2 \pm 18,6$	$264,7 \pm 19,7$	$123,6 \pm 6,7$	$104,3 \pm 5,5$
37	$246,9 \pm 22,0$	$241,0 \pm 22,3$	$266,6 \pm 24,0$	$276,2 \pm 22,9$	$139,1 \pm 7,3$	$131,9 \pm 6,2$
45	$261,4 \pm 24,3$	$248,2 \pm 23,9$	$275,3 \pm 23,4$	$278,8 \pm 25,0$	$151,0 \pm 10,6$	$142,4 \pm 10,2$

#### 4.4.2.3 Shrnutí výsledků kalorimetrických měření

Bylo zjištěno, že rozdílnost hodnot  $\Delta_{diss}H$  mezi  $\beta$ -TCP a ACP a mezi jednotlivými typy HA fází je způsobena několika faktory, a to především hodnotou stechiometrického poměru  $Ca:P$  (*Tab. 37*) a stupněm krystalinity. Tyto faktory byly zmíněny i v publikacích několika autorů [238–240]. Prokázaným faktem je skutečnost, že pokles  $\Delta_{diss}H$  ACP oproti  $\beta$ -TCP a mezi vzorky HA (sHA – cHA – bHA – tHA) koreluje se zvyšujícím se stupněm krystalinity. Metodou XRD bylo zjištěno, že vzorek  $\beta$ -TCP měl velikost krystalinitů 217 nm, u HA hodnota  $\bar{d}$  činila: sHA  $\sim$  29 nm, cHA  $\sim$  71 nm, vzorky biologických HA po kalcinaci na teplotu 800  $^\circ\text{C}$  měly hodnoty  $\bar{d} \sim$  107 nm (bHA), resp.  $\sim$  178 nm (tHA). Z údajů uvedených v *Tab. 50* a *Tab. 54* vyplývá, že absolutní hodnoty  $\Delta_{diss}H$  se zvyšují v pořadí ACP <  $\beta$ -TCP < sHA < cHA < bHA < tHA. S nárůstem teploty dochází u ACP a  $\beta$ -TCP k poklesu hodnot  $\Delta_{diss}H$ , u vzorků HA tento pokles není na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  statisticky významný.

Obdržené  $\Delta_{cr}H$  studovaných CaP představují energii potřebnou pro vyloučení jednoho molu krystalů zkoumaného CaP z nasyceného roztoku při dané teplotě a jejich hodnoty při různých teplotách jsou názorně graficky zpracovány na *Obr. 53*, *Obr. 54* a *Obr. 54*.

Obr. 53: Teplotní závislost  $\Delta_{cr}H$  vzorků ACP a  $\beta$ -TCPObr. 54: Teplotní závislost  $\Delta_{cr}H$  vzorků cHA a tHA



Obr. 55: Teplotní závislost  $\Delta_{cr}H$  vzorků sHA a bHA

S rostoucí teplotou, molárním poměrem  $Ca:P$  a zvyšováním krystalinity studovaných vzorků CaP tedy dochází k nárůstu energie potřebné pro tvorbu pevné fáze z matečního roztoku, a to v pořadí: ACP <  $\beta$ -TCP < sHA < cHA < bHA < tHA. ACP se tedy bude srážet ochotněji nežli  $\beta$ -TCP či HA a naopak. ACP a méně vyvinuté krystalinity CaP se budou také daleko lépe rozpouštět než příbuzné krystalické analogy. Tato fakta přímo souvisejí se snadnější resorbovatelností, restrukturalizací a biokompaktibilitou dané látky uvnitř živého organismu. Ve studiích zmíněných v kapitole 2.7.1 bylo potvrzeno, že amorfni a méně krystalicky vyvinuté fáze HA, případně CDHA, se mnohem rychleji transportují do biologické matrice, kde dochází ke snadnější konverzi a vzniku biologického substrátu s pojivovou tkání, nežli by tomu bylo u interakce vysoce krystalické HA substance s pojivovou tkání. Tento fakt úzce souvisí se samoobnovujícími cykly probíhajícími v živých tkáních, se zráním a remodelací kostní hmoty v tělních systémech. Tyto skutečnosti jsou sledovány v četných biomimetických studiích s cílem nalézt kompatibilní materiály mezi pojivovou tkání a např. implantátem a zvýšit tak schopnost její regenerace. Volbou fyziologických podmínek kalorimetrických experimentů a použitím hydroxyapatitu biologického původu se i tato práce pokusila přispět k dosažení tohoto cíle.

## 5. Závěr

Cílem předložené dizertační práce bylo prostudovat biologicky významné fosforečnany vápenaté po stránce podmínek jejich syntézy, strukturních, fyzikálně chemických a termochemických vlastností a zjistit, do jaké míry se liší vybrané charakteristiky syntetických a biologickou cestou vzniklých sloučenin.

V teoretické a literární části práce byly shrnuty dosavadní poznatky o vápenatých solích kyseliny fosforečné (CaP), které tvoří nepostradatelný anorganický podíl kostního skeletu mnoha živých organismů, v nichž se vyskytují především ve formě hydroxyapatitu (HA) různého stupně krystalické zralosti, společně s jeho prekurzorickými formami v podobě amorfního fosforečnanu vápenatého (ACP),  $\beta$ -formy fosforečnanu vápenatého ( $\beta$ -TCP), hydrogenfosforečnanu vápenatého nebo fosforečnanu oktavápenatého. Během života v těchto organismech probíhají četné biochemické procesy, které vedou k neustálé restrukturalizaci a obnově kostní hmoty, dochází k hormonálním změnám či projevům genetických dispozic, které mohou vést k poruchám kalcifikace spojeným s patologickým kostnatěním měkkých tkání, k ukládání CaP solí v dutinách vnitřních orgánů, či naopak k nedostatečnému vývinu, úbytku nebo ztrátě pevnosti a hutnosti kostní hmoty. Mnohé studie se zabývají výzkumem a vývojem nových biokompaktibilních, snadno resorbovatelných a biologicky aktivních kompozitů na bázi CaP, které nacházejí významné uplatnění ve farmakologických, medicínských a biomimetických oborech. V této části práce jsou také uvedeny možné způsoby syntézy, strukturní, fyzikálně chemické a termochemické vlastnosti CaP, které následně posloužily při řešení stanovených úkolů dizertace. Pro účely strukturní charakterizace a termochemické studie byly vybrány a syntetizovány hydroxyapatit,  $\beta$ -fosforečnan vápenatý a amorfní fosforečnan vápenatý jako hlavní představitelé obsáhle skupiny biologicky významných CaP. Studovány byly rovněž CaP v podobě biologického HA obsaženého ve vzorcích lidských zubů (HT) a stehenní hovězí kosti (BTB) a dále vzorky ledvinových kamenů (KS).

Kombinace chemických a fyzikálních metod, které byly pro tuto studii zvoleny (*XRD*, *SEM-EDX*, *RS*, *ICP-OES*, *DTA-TG*, reakční kalorimetrie), se jeví jako velmi vhodná pro charakterizaci laboratorně připravených a biologických vzorků CaP. Prostřednictvím těchto metod bylo možné ve zkoumaných vzorcích určit fázová zastoupení CaP, zjistit velikosti krystalitů, mřížkové parametry, stupeň krystalinity i obsahy prvků. Byl posouzen vliv kalcinace na mřížkové parametry a poměrové zastoupení krystalických fází kalcinovaných vzorků.



Prostřednictvím termické analýzy byly odhaleny transformační procesy, které ve studovaných materiálech během kalcinace probíhají, pomocí MS detekce byly současně získány údaje o složení uvolňovaných plynů, což vedlo k odhalení dehydroxylačních procesů, ke kterým ve struktuře HA během kalcinace dochází.

Studiem biologických vzorků bylo zjištěno, že zubní materiály obsahují dvě odlišné fáze HA s rozdílnými mřížkovými parametry a velikostmi částic. Ve vzorcích ledvinových kamenů bylo identifikováno minoritní zastoupení HA, v kalcinovaných vzorcích HT byl nalezen krystalický fosforečnan vápenatý ve formě whitlockitu (WHI), zřejmě v důsledku transformace částečně krystalické fáze HA. Nepatrný obsah WHI byl nalezen také v případě kalcinovaného ledvinového kamene KS6, buďto jako výsledek přeměny amorfní fáze CaP, nebo se kalcinací dosáhlo meze detekovatelnosti WHI ve vzorku metodou XRD. Kalcinací syntetického ACP na 1280 °C došlo k jeho transformaci na HA a dvě modifikace TCP s rozdílnou prostorovou grupou odpovídající  $\beta$ -TCP a WHI. Vzorek laboratorně připraveného  $\beta$ -TCP byl na rozdíl od ACP termicky zcela stabilní. Syntetizovaný vzorek HA (sHA) kalcinací transformoval ze 74 hm% na vysokoteplotní formu  $\alpha$ -TCP, na rozdíl od komerčního cHA, který z 9 hm% přešel na fosforečnan tetravápenatý. Rozdílnost kalcinačních produktů byla způsobena rozdílnou metodou přípravy obou syntetických vzorků HA, neboť sHA byl připravován z vodných roztoků, na rozdíl od komerčního cHA, který byl připraven hydrotermální metodou a poté sintrován. Určené mřížkové parametry zkoumaných CaP odpovídaly publikovaným údajům. Kalcinací docházelo ke kontrakcím strukturní mřížky HA, zvyšování stupně krystalinity a růstu krystalitů HA fází obsažených v kalcinovaných vzorcích. Během termické analýzy vzorků ACP, sHA, BTB, všech vzorků HT a některých vzorků KS obsahujících HA byly identifikovány dehydroxylační procesy probíhající ve struktuře HA. Rentgenová prášková difrakce vzorků po termické analýze nezaznamenala přítomnost produktů dehydroxylace HA v podobě oxoapatitu ani oxohydroxyapatitu. Pokud došlo k jejich vzniku, zanikly během ochlazovacího procesu vzorku po ukončení kalcinace.

Vedle strukturní a prvkové charakterizace studovaných materiálů bylo hlavním cílem práce stanovení jejich krystalizační entalpie jako významného termochemického parametru. Pro tyto experimenty byl zvolen izoperibolický reakční kalorimetr a modelové fyziologické prostředí spočívající v úpravě jeho iontové síly na hodnotu 0,3 mol.dm<sup>-3</sup> a měření při teplotách 25, 37 a 45 °C, což mělo přiblížit experimentální podmínky procesům probíhajícím v živých systémech. Bylo navrženo schéma aditivních rovnic, které umožnilo stanovení krystalizačních entalpií prostřednictvím vhodně zvolených rozpouštěcích reakcí.

Měření byla provedena jak se synteticky připravenými vzorky ACP,  $\beta$ -TCP, sHA, cHA, tak s biologickými materiály HT a BTB. Syntetizované HA (sHA, cHA) nebylo nutné pro entalpickou studii kalcinovat, na rozdíl od biologických předloh HA (HT, BTB), které bylo nutné kalcinací zbavit organického podílu pro získání čistých forem HA (bHA, tHA). Bylo zjištěno, že velikost krystalitů HA v biologických vzorcích podrobených kalcinaci, se kalcinací zvětšuje. Tento fakt se projevil v termochemické studii, kde krystalizační entalpie HA přítomného v kalcinovaných biologických vzorcích ve formě větších krystalitů vykazovaly vyšší hodnoty nežli u HA syntetizovaného o menší krystalinitě. Bohužel se nepodařilo získat biologický HA bez nutného kalcinačního procesu. Vedle HA byly stanoveny  $\Delta_{cr}H$  rovněž u vzorků ACP a  $\beta$ -TCP, u kterých vykazovaly nižší hodnoty než u HA. Vliv na hodnoty  $\Delta_{cr}H$  měla i stechiometrie zkoumaných vzorků, která byla v této práci charakterizována molárním poměrem  $Ca:P$ . S rostoucí hodnotou molárního poměru  $Ca:P$  docházelo k nárůstu krystalizační entalpie zkoumaných vzorků. Pro studovaný teplotní interval 25 – 45 °C klesají hodnoty krystalizační entalpie v pořadí tHA > bHA > cHA > sHA >>>  $\beta$ -TCP > ACP. Nižší hodnoty  $\Delta_{cr}H$  vzorku ACP vůči  $\beta$ -TCP a vzorku sHA proti tHA, bHA a cHA odpovídají nižšímu množství energie potřebné k vyloučení jednoho molu těchto sloučenin z nasyceného roztoku při dané teplotě než u výše zmíněných zkoumaných látek, což lze vysvětlit prvotní tvorbou málo krystalicky vyvinuté, nestechiometrické fáze, která postupně aglomeruje, restrukturalizuje a krystalicky „zraje“ za vzniku organizovaných seskupení HA krystalitů v biologickém matrixu tkání. ACP a  $\beta$ -TCP představují krystalicky nevyvinuté a termodynamicky méně stabilní formy CaP, na rozdíl od studovaných vzorků HA, které představují hierarchicky uspořádané, termodynamicky stabilní fáze s dobrým vývinem krystalitů. Na základě těchto výsledků lze také předpokládat průběh transformačních procesů ve vodných roztocích ACP, z nichž by se měly vylučovat termodynamicky stabilnější TCP a HA. Nezávislost krystalizační entalpie a rozpustnosti HA na teplotě lze přičíst vysoké chemické stabilitě této sloučeniny, obdobné závěry platí i pro  $\beta$ -TCP.

Vedle získání velkého množství experimentálních dat, kterými tato studie přispěla k rozšíření dosavadních poznatků o vlastnostech biologicky významných forem fosforečnanů vápenatých, se díky navrženému systému rozpouštěcích reakcí podařilo nalézt vhodný způsob stanovení krystalizačních entalpií  $\beta$ -formy fosforečnanu vápenatého a hydroxyapatitu s využitím dostupné kalorimetrické techniky – izoperibolického zdvojeného kalorimetru. Analogickým postupem lze tuto důležitou termochemickou veličinu stanovit i u jiných sloučenin, u nichž je její přímé měření nesnadné. Získaná entalpická a rozpustnostní data

prokazují genezi vzniku a transformací jednotlivých forem fosforečnanů vápenatých v živých organismech a potvrzují souvislosti mezi tvorbou, restrukturalizací a samoobnovujícími cykly probíhajícími v jejich tkáních. Navržené schéma lze taktéž využít při studiu vlivu organických a anorganických látek na tvorbu a vylučování CaP v biologických systémech, což by umožnilo odhalit a blíže pochopit biochemické procesy probíhající „*in vivo*“.

## 6. Literatura

1. A. Malijevský, J.P. Novák a kol., Breviář fyzikální chemie, VŠCHT Praha, Praha, 2001.
2. A.L. Lavoisier, P.S. Laplace, Sur la chaleur, Mémoires de l'Académie royale des sciences de Paris, Gallica, 1780.
3. P. Dantzer, P. Millet, *Thermochim. Acta* 370 (2001) 1.
4. D.V. Louzguine, A. Inoue, *Mater. Res. Bull.* 34 (1999) 1991.
5. G.W. Smith, *Thermochim. Acta* 323 (1998) 123.
6. B. Kowalski, K. Ratusz, A. Miciula, K. Krygier, *Thermochim. Acta* 307 (1997) 117.
7. P. Johansson, I. Wadso, J. *Biochem. Biophys. Method* 35 (1997) 103.
8. A.A. Gargea, E.C. Millan, J.A. Orozco a kol., *Thermochim. Acta* 349 (2000) 89.
9. J. Salonen, V.P. Lehto, E. Laine, J. *Porous Mater.* 7 (2000) 335.
10. L.D. Hanson, *Ind. Eng. Chem. Res.* 39 (2000) 3541.
11. H.E. Gallis, J.C. Miltenburg, H.A.H. Oonk, *Phys. Chem.Chem. Phys.* 2 (2000) 5619.
12. C. Durucan, P.W. Brown, *Mater. Res.* 5 (2000) 717.
13. S. Kolařík, V. Pekárek, V. Vacek, *Chemický průmysl* 32-57 (1982) 516.
14. L.C. Palmer, C.J. Newcomb, S.R. Kaltz a kol., *Chem. Rev.* 108 (2008) 4754.
15. J.D. Pasteris, B. Wopenka, E. Valsami-Jones, *Elements* 4 (2008) 97.
16. H.A. Lowenstam, S. Weiner, *On biomineralization*, Oxford University Press, UK, 1989.
17. P.M. Dove, J.J. de Yoreo, S. Weiner, *Biomineralization* 54 (2003) 1.
18. R.Z. LeGeros, *Z. Kardiol.* 90-3 (2001), 116.
19. J.D. Currey, *Bones: Structure and mechanics*, Princeton University Press, USA, 2002.
20. J.Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, P. Zioupos, *Med. Eng. Phys.* 20 (1998) 92.
21. M. Tzaphlidou, *J. Biol. Phys.* 34-1 (2008) 39.
22. K.S. Davison, K. Siminoski, J.D. Adachi a kol., *Semin. Arthritis Rheum.* 36 (2006) 22.
23. C.H. Turner, D.B. Burr, *Bone* 14 (1993) 595.
24. J.D. Currey, *J. Biomech.* 37 (2004) 549.
25. G. Daculsi, J.M. Bouler, R.Z. LeGeros, *Int. Rev. Cytology* 172 (1997) 129.
26. R.Z. LeGeros, *Calcium phosphates in oral biology and medicine*, Karger, Swiss, 1991.
27. A.L. Boskey, *Elements* 3 (2007) 385.
28. N. Sahai, M.A.A. Schoonen, *Mineral. Soc. Am.* 64 (2006) 223.
29. A.L. Boskey, R. Roy, *Chem. Rev.* 108 (2008) 4716.
30. J.D. Currey, K. Brear. *Hardness, J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1 (1990) 14.
31. C.M. Huang, Q. Zhang, S. Bai, C.S. Wang, *Spectrosc. Spect. Anal.* 27 (2007) 2448.
32. J. Xue, L. Zhang, L. Zou a kol., *J. Synchrotron Rad.* 15 (2008) 235.
33. S.P. Ho, B. Yu, W. Yun a kol., *Acta Biomater.* 5 (2009) 707.

34. A. Vieira, R. Hancock, H. Limeback a kol., *J. Dent. Res.* 82 (2003) 909.
35. E. Lazzari, *Dental Biochemistry*, Lea and Febiger Publ., Philadelphia, 1968.
36. G.A. Block, T.E. Hulbert-Shearon a kol., *Am. J. Kidney Dis.* 31 (1998) 607.
37. J.J. Kazama, N. Amizuka, M. Fukagawa, *Ther. Apher. Dial.* 10-1 (2006) 34.
38. C. Frondel, E.L. Prien, *Science* 95 (1942) 431.
39. C. Frondel, E.L. Prien, *Science* 103 (1946) 326.
40. A. Becker, M. Epple, K.M. Müller a kol., *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 2032.
41. L.A. Fitzpatrick, R.T. Turner, E.R. Ritman, *Endocrinology* 144 (2003) 2214.
42. E.I. Suvorova, P.A. Buffat, J. Long. *Term. Eff. Med. Implants* 15 (2005) 355.
43. P. Grech, *Diagnosis in metabolic bone disease*, Hodder Arnold H&S, USA, 1998.
44. E.K. Hale, *Dermatology Online J.* 9 (2003) 2.
45. R. Lagier, C.A. Baud, *Pathol. Res. Pract.* 199 (2003) 329.
46. J.A. Wesson, M.D. Ward, *Elements* 3 (2007) 415.
47. L.A. DiMeglio, M. Peacock, *J. Bone Miner. Res.* 21-1 (2006) 132.
48. J. Mačák, J. Mačáková, *Patologie*, GRADA Publishing, Praha, 2004.
49. C. Bick, G. Brien, *Z. Med. Labor Technik* 17 (1976) 341.
50. C. Bick, G. Schubert, G. Brien, *Die Kombination von Polarisationsmikroskopie und RTG in der Harnsteinanalyse*, Jena, 1980.
51. A. Dubanský, J. Němec, M. Zich, *Acta Montana* 80 (1989) 1.
52. Č. Michalec, *Močový sediment a močové konkrementy*, Avicenum, Praha 1988.
53. V. Tesař, *Klinická nefrologie*, GRADA Publishing, Praha, 2006.
54. [www.kidney.org](http://www.kidney.org) – National Kidney Foundation, New York, USA.
55. D. Stejskal, *Urolitiáza*, GRADA Publishing, Praha, 2007.
56. A. Dubanský a kol., *Rozbory močových konkrementů: Instrumentální analytické metody pro klinickou praxi a základní výzkum*, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno, 1994.
57. W. Kibalczyk, K. Bondarczuk, *J. Cryst. Growth* 71 (1985) 751.
58. J. Christoffersen, M.R. Christoffersen a kol., *J. Cryst. Growth* 94 (1989) 767.
59. A. Bienstock, A.S. Posner, *Arch. Biochem. Biophys.* 124 (1968) 604.
60. J.D. Termine, A.S. Posner, *Arch. Biochem. Biophys.* 140 (1970) 581.
61. J. Carlos, A.Ch. Martineli, M.S. Tung, *J. Braz. Dent.* 13 (2002) 75.
62. E. Eidelman, E.D. Eanes, *Monogr. Oral. Sci. Basel. Karger.* 18 (2001) 50.
63. F.J.A.L. Cruz, M.E.M. da Piedade a kol., *J. Chem. Thermodyn.* 37 (2005) 1061.
64. S. Somrani, M. Banu, M. Jemal a kol., *J. Solid State Chem.* 178 (2005) 1337.
65. Ch.W. Yih, L.M. Shen, L.P. Hsun a kol., *Colloid Surface A* 295 (2007) 274.
66. W. Yujiro, I. Toshiyuki, S. Yasushi a kol., *J. Eur. Ceram. Soc.* 26 (2006) 469.
67. M.P. Reddy, A. Venugopal, M. Subrahmanyam, *Appl. Catal. B-Environ.* 69 (2007) 164.

68. S. Baillez, A. Nzihou, D.B. Assolant a kol., *J. Hazard Mater.* 139 (2007) 443.
69. M.P. Reddy, A. Venugopal, M. Subrahmanyam, *Water Res.* 41 (2007) 379.
70. V.S. Dorozhkin, *Materials* 2 (2009) 399.
71. Y. Yang, K.H. Kim, J.L. Ong, *Biomaterials* 26 (2005) 327.
72. S.H. Maxian, J.P. Zawadsky, M.G. Dunn, *J. Biomed. Mater. Res.* 27 (1993) 717.
73. C.A. Blitterswijk, Y.P. Bovell, J.S. Flach a kol., *Variations in hydroxyapatite crystallinity: Effect on interface reactions*, Raven Press, New York, 1993.
74. K.A. Gross, C.C. Berndt a kol., *Int. J. Oral. Maxillof. Implants.* 12 (1997) 589.
75. J. Weng, X.D. Liu, X.D. Li a kol., *Biomaterials* 16 (1995) 39.
76. W. Tong, J. Chen, X. Li a kol., *Biomaterials* 17 (1996) 1507.
77. K.A. Gross, C.C. Berndt, H. Herman, *J. Biomed. Mater. Res.* 39 (1998) 407.
78. S.W.K. Kweh, K.A. Khor, P. Cheang, *Biomaterials* 23 (2002) 381.
79. M.T. Carayon, J.L.S. Lacout, *J. Solid State Chem.* 172 (2003) 339.
80. Y.C. Tsui, C. Doyle, T.W. Clyne, *Biomaterials* 19 (1998) 2031.
81. R.B. Heimann, R. Wirth, *Biomaterials* 27 (2006) 823.
82. C.F. Feng, E.J. Khor, E.J. Liu a kol., *Scr. Mater.* 42 (2000) 103.
83. Y. Cao, J. Weng, J. Chen a kol., *Biomaterials* 17 (1996) 419.
84. L. Clcries, J.M. Fernandez-Pradas, J.L. Morenza, *J. Biomed. Mater. Res.* 49 (2000) 43.
85. M.C. Siebers, X.F. Walboomers a kol., *J. Biomed. Mater. Res. A* 78 (2006) 258.
86. S.C.G. Leeuwenburgh, P. Layrolle a kol., *J. Biomed. Mater. Res.* 56 (2001) 208.
87. P. Habibovic, F. Barrcre a kol., *J. Am. Ceram. Soc.* 85 (2002) 517.
88. M. Stigter, K. Groot, P. Layrolle, *Biomaterials* 23 (2002) 4143.
89. O. Suzuki, S. Kamakura, T. Katagiri, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 77 (2006) 201.
90. M. Banu, *Mise en forme d'apatites nanocristallines: Céramiques et ciments*, Thesis, Institut National Polytechnique, Toulouse, France, 2005.
91. X. Wang, J. Ye, H. Xiang, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater* 78 (2006) 259.
92. S.P. Victor, C.P. Sharma, *Colloids Surf., B* 85-2 (2011) 221.
93. S. Leprêtre, F. Chai, J.C. Hornez a kol., *Biomaterials* 30 (2009) 6086.
94. D.D. Lee, A. Tofighi, M Aiolova a kol., *Clin. Orthop. Relat. Res.* 367 (1999) 396.
95. R.H. Li, M.L. Bouxsein, C.A. Blake a kol., *J. Orthop. Res.* 21 (2003) 997.
96. D.A. Miranda, N.M. Blumenthal, R.G. Sorensen a kol., *J. Periodontol.* 76 (2005) 210.
97. H.J. Seeherman, K. Azari, S. Bidic a kol., *J. Bone Joint. Surg.* 88 (2006) 1553.
98. M.P. Reddy, A. Venugopal, M. Subrahmanyam, *Water Res.* 41 (2007) 379.
99. T. Nonami, H. Hase, K. Funakoshi, *Catal. Today* 96 (2004) 113.
100. E.D. Berry, G.R. Siragusa, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 4069.
101. G.B. Wickramanayake, A.R. Gavaskar, J.T. Gibbs a kol., *Remediation of chlorinated and recalcitrant compounds*, Columbus, Ohio, 2000.

102. J-G. Rio, P. Morando, D. Cicerone, *J. Environ. Manage.* 71 (2004) 169.
103. I. Smiciklas, S. Dimovic, I. Plecas a kol., *Water Res.* 40 (2006) 2267.
104. J.G. Rio, P. Sanchez, P.J. Morando a kol., *Chemosphere* 64 (2006) 1015.
105. C. Fuller, J. Bargar, J. Davis a kol., *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 158.
106. Y.M. Wang, T.C. Chen, K.J. Yeh a kol., *J. Hazard. Mater. B* 88 (2000) 63.
107. T.L. Brooks, *Hydroxylapatite*, Calbiochem Brand Biochemicals, San Diego, 1981.
108. P.W. Brown, B. Constanz, *Hydroxyapatite and Related Materials*, CRS Press, UK, 1994.
109. J.C. Elliot, *Stud. Inorg. Chem.* 18 (1994) 389.
110. J.A.S. Bett, L.G. Christner, W.K. Hall, *J. Am. Chem. Soc.* 89 (1967) 5535.
111. S. Sugiyama, T. Minami a kol., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 92 (1996) 293.
112. K. Elkabouss, M. Kacimi a kol., *J. Phys. IV France* 123 (2005) 313.
113. J.C. Elliot, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Elsevier, Amsterdam, 1994.
114. A.H. Aparecida, M.V.L. Fook a kol., *Quim. Nova* 30 (2007) 892.
115. S. Koutsopoulos, *J. Biomed. Mat. Res.* 62 (2002) 600.
116. Z. Amjad, *Calcium phosphates in biological and industrial systems*, Kluwer Academic Publishers, Boston, 1997.
117. L. Wang, G.H. Nancollas, *Chem. Rev.* 108 (2008) 4628.
118. L.C. Chow, E.D. Eanes, *Octacalcium Phosphate Monographs*, Karger, Swiss, 2001.
119. A.M.V. Soares, V.E. Arana-Chavez a kol., *J. Anat.* 181 (1992) 345.
120. S.V. Dorozhkin, *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 4457.
121. JCPDS PDF-4 database: International Centre for Diffraction Data, 2010.
122. M.J. Larsen, S.I. Jensen, *Archs oral Biol.* 31 (1986) 565.
123. D. Rabadjieva, R. Gergulova a kol., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21 (2010) 2501.
124. E.D. Eanes, J.D. Termine, M.U. Nysten, *Calcif. Tissue Res.* 12 (1973) 143.
125. W.C. O'Neill, *Kidney Int.* 72 (2007) 792.
126. F. Betts, A.S. Posner, *Trans. Am. Crystallogr. Assoc.* 10 (1974) 73.
127. F. Betts, A.S. Posner, *Mater Res Bull* 9 (1974) 353.
128. F. Betts, N.C. Blumenthal a kol., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2088.
129. G. Treboux, P. Layrolle a kol., *J. Phys. Chem. A* 104 (2000) 5111.
130. J. Tropp, N.C. Blumenthal, J.S. Waugh, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 22.
131. C. Combes, C. Rey, *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 3362.
132. J.E. Harries, D.W.L. Hukins a kol., *J. Cryst. Growth* 84 (1987) 563.
133. F. Peters, K. Schwarz, M. Epple, *Thermochim. Acta* 361 (2000) 131.
134. L. Liang, P. Rulis, W.Y. Ching, *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 3763.
135. X. Yin, M.J. Stott, A. Rubio, *Phys.Rev. B* 68 (2003) 205205.
136. B.R. Constantz, I.C. Ison a kol., *Science* 267 (1995) 1796.

137. E. Fernández, M.P. Ginebra a kol., *J. Biomed. Mater. Res.* 32 (1996) 367.
138. T. Kodaka, K. Debari, S. Higashi, *J. Electron Microsc.* 37 (1988) 73.
139. M.I. Kay, R.A. Young, A.S. Posner, *Nature* 204 (1964) 1050.
140. J.C. Elliott, P.E. Mackie, R.A. Young, *Science* 180 (1973) 1055.
141. M. Mathew, S. Takagi, Structures of biological minerals in dental research. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* 106 (2001) 1035.
142. N. Rangavittal, A.R. Landa-Cánovas a kol., *J. Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) 660.
143. S.R. Neuman, N. Marcio, M.M. Vera, *Thermochimica Acta* 451 (2006) 16.
144. K.H. Prakash, R. Kumar a kol., *Langmuir* 22 (2006) 11002.
145. K.P. Sanosh, M.Ch. Chu a kol., *Bull. Mater. Sci.* 32 (2009) 465.
146. S.Y. Yoon, Y.M. Parka a kol., *Mater. Chem. Phys.* 91 (2005) 48.
147. J.S. Earl, D. J Wood, S J Milne, *J. Phys.Conf. Ser.* 26 (2006) 268.
148. O. Suzuki, S. Kamakura a kol., *Biomaterials* 27 (2006) 2671.
149. L.M. Rodriguez-Lorenzo, M. Vallet-Regi, *Chem. Mater.* 12 (2000) 2460.
150. S. Cazalbou, C. Combes a kol., *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 2148.
151. K. Ioku, G. Kawachi a kol., *J. Mater. Sci.* 41 (2006) 1341.
152. P. Layrolle, A. Lebugle, *Chem. Mater.* 6 (1994) 1996.
153. P. Layrolle, A. Lebugle, *Chem. Mater.* 8 (1996) 134.
154. B. Yeong, X. Junmin, J. Mang, *J. Am. Ceram. Soc.* 84 (2001) 465.
155. D.M. Roy, S.K. Linnehan, *Nature* 247 (1974) 220.
156. B. Ben-Nissan, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 7 (2003) 283.
157. J.C. Elliott, R.A. Young, *Nature* 214 (1967) 904.
158. J. Tao, W. Jiang, H. Pan a kol., *J. Cryst. Growth* 308 (2007) 151.
159. M. Vallet-Regi, M.T. Gutiérrez Rios a kol., *J. Solid State. Chem.* 112 (1994) 58.
160. A.R. Kumar, S. Kalainathan, *Crystal. Res. Technol.* 43 (2008) 640.
161. A.L. Boskey, *Curr. Osteoporos. Rep.* 4 (2006) 71.
162. C. Rey, C. Combes a kol., *Adv. Sci. Technol.* 49 (2006) 27.
163. M. Vallet-Regi, J.M. González-Calbet, *Progr. Solid State. Chem.* 32 (2004) 1.
164. L.E. Holt, V.K. La-Mer, H.B. Chown, *J. Biol. Chem.* 64 (1925) 509.
165. L.E. Holt, V.K. La-Mer, H.B. Chown, *J. Biol. Chem.* 64 (1925) 567.
166. T. Gassmann, *Z. Physiol. Chem.* 83 (1913) 403.
167. M.A. Bredig, *Z. Physiol Chem.* 216 (1933) 239.
168. N.W. Taylor, C. Sheard, *J. Biol. Chem.* 81 (1929) 479.
169. S. Weiner, HD. Wagner, *Ann. Rev. Mater. Sci.* 28 (1998) 271.
170. V. Matkovic, *Am. J. Clin. Nutr.* 54 (1991) 245.
171. R.G. Bates, *J. Res. Natl. Bur. Stand.* 47 (1951) 127.
172. R.G. Batles, S.F. Acres, *J. Res. Natl. Bur. Stand.*, 30 (1943) 129.



- 
173. N. Bjerrum, A.K. Unmack, *Den. Vidensk. Selsk. Mat. Fys. Medd.* 9 (1929) 98.
  174. A. Chughtal, R. Marshall, G.H. Nancollas, *J. Phys. Chem.* 72 (1988) 206.
  175. R.G. Bates, V.E. Bower, R.G. Canham, *Trans. Faraday. Soc.* 55 (1959) 2062.
  176. T. Ackermann, *Z. Elektrochem.* 82 (1958) 411.
  177. J.C. Heughebaert, *J. Cryst. Growth* 77 (1986) 192.
  178. H. McDowell, T.M. Gregory, W.E. Brown, *J. Res. Nat. Bur. Stand. (US)* 81A (1977) 273.
  179. T.M. Gregory, T.M. Moreno, W.E. Brown, *J. Res. Nat. Bur. Stand. (US)* 74A (1970) 461.
  180. M.S. Tung, N. Eidelman a kol., *J. Res. Nat. Bur. Stand. (US)* 93 (1988) 613.
  181. T.M. Gregory, E.C. Moreno a kol., *J. Res. Nat. Bur. Stand. (US)* 78A (1974) 667.
  182. J.R. Burns, B. Finlayson, *J. Urol.* 128 (1982) 426.
  183. J.L. Meyer, E.D. Eanes, *Calcif. Tissue Res.* 25 (1978) 59.
  184. J. a M.R. Christoffersen, W. Kibalczyk, F.A. Andersen, *J. Cryst Growth* 106 (1990) 349.
  185. A. Pamiatnikh, *Solubility of amorphous tricalcium phosphate: Godishnik na Sofiskiia Universitet Sv. Kliment Okhridski, Khimicheski Fakultet*, 1992.
  186. M.M. Seckler, O.S.L. Bruisma, G.M. Rosmalen, *Water Resour.* 30 (1996) 1677.
  187. B. Byrappa, T. Ohachi, *Crystal growth technology*, William Andrew Pub., USA, 2003.
  188. L. Montastruc, C. Azzaro-Pantel, B. Biscans a kol., *Chem. Eng. J.* 94 (2003) 41.
  189. S.V. Dorozhkin, *J Mater Sci* 42 (2007) 1061.
  190. B.O. Fowler, S. Kuroda, *Calcif. Tissue. Int.* 38 (1986) 197.
  191. A.L. Boskey, A.S. Posner, *J. Phys. Chem.* 77 (1973) 2313.
  192. J.L. Meyer, C.C. Weatherall, *J. Colloid Interface Sci.* 89 (1982) 257.
  193. N.C. Blumenthal, F. Betts, A.S. Posner, *Calcif. Tissue Res.* 23 (1977) 245.
  194. E.D. Eanes, A.S. Posner, *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 28 (1965) 233.
  195. E.D. Eanes, A.S. Posner, *Mat. Res. Bull.* 5 (1970) 377.
  196. J.C. Heughebaert, G.H. Nancollas, *J. Chem. Eng.* 30 (1985) 279.
  197. C. Guégan, *Contribution à l'étude cinétique de l'évolution de l'état amorphe à l'état apatitique des orthophosphates trimétalliques (Ca, Mg) précipités*, Thesis, Institut National Polytechnique, Toulouse, 1978.
  198. D. Knaack, M.E. Goad a kol., *J. Biomed. Mater. Res.* 43 (1998) 399.
  199. A. Gaffar, R.Z. LeGeros, R.J. Gambogi, *Adv. Dent. Res.* 9 (1995) 419.
  200. H. Fleisch, *J. Crystal Growth* 53 (1981) 120.
  201. R.Z. LeGeros, *Prog. Cryst. Growth Charact* 4 (1981) 1.
  202. Y. Li, T. Wiliana, K.C. Tam, *Mat. Res. Bull.* 42 (2007) 820.
  203. E. Fernández, F.J. Gil a kol., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 10 (1999) 169.
  204. J. Puech, J.C. Heughebaert, G. Montel, *J Cryst Growth* 56 (1982) 20.
  205. S. Somrani, C. Ray, M. Jemal, *J. Mater. Chem.* 13 (2003) 888.
  206. E.D. Eanes, *Calif. Tiss. Res.* 5 (1970) 133.

- 
207. C.F. Feng, K.A. Khor, S.W.K. Kweha kol., *Mat. Lett.* 46 (2000) 229.
  208. M. Maciejewski, T.J. Brunner a kol., *Thermochimica Acta* 468 (2008) 75.
  209. T. Kanazawa, T. Umetali, N. Uchiyama, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 32 (1982) 399.
  210. R.Z. LeGeros, G. Bonel, R. Legros, *Calcif. Tiss. Res.* 26 (1978) 111.
  211. P.E. Wang, T.K. Chaki, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 4 (1993) 150.
  212. J.C. Trombe, G. Montel, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 40 (1977) 15.
  213. B. Locardi, U.E. Pazzaglia a kol., *Biomaterials* 14 (1993) 437.
  214. C.J. Liao, F.H. Lin, K.S. Chen a kol., *Biomaterials* 20 (1999) 1807.
  215. K.A. Gross, C.C. Berndt, P. Stephens a kol., *J. Mater. Sci.* 33 (1998) 3985.
  216. T. Wang, A.D. Reisel, E. Muller, *J. Eur. Ceram. Soc.* 24 (2004) 693.
  217. K.A. Gross, V. Gross, C.C. Berndt, *J. Am. Ceram. Soc.*, 81 (1998) 106.
  218. B. Jankovic, L. Kolar-Anic a kol., *Thermochim. Acta* 495 (2009) 129.
  219. J.A. Toque1, M.K. Herliansyah a kol., *Biomed.* 15 (2007) 152.
  220. F.Z. Mezahi, H. Oudadesse a kol., *J. Therm. Anal. Calorim.* 95 (2009) 21.
  221. S. Votyakov, D. Kiseleva a kol., *J. Therm. Anal. Calorim.* 101 (2010) 63.
  222. M. Kesmez, J. Lyon, L.D. Cocke, Characterization of the evolutionary aspects of great white shark teeth by XRD methods and other supporting techniques, International Centre for Diffraction Data, 2004.
  223. D. Yinga, G.K. Chuahb, C.Y.S. Hsua, *Journal of Dentistry* 32 (2004) 41.
  224. J. Holager, *J. Dent. Res.* 49 (1970) 546.
  225. S. Ghosh, S. Basu a kol., *J. Appl. Cryst.* 42 (2009) 629.
  226. M. Berenyi, G. Liptay, *J. Therm. Anal.* 3 (1971) 437.
  227. M. Afzal, M. Iqbal, H. Ahmad, *J. Therm. Anal.* 38 (1992) 1671.
  228. J. Kaloustian, A.M. Pauli a kol., *J. Therm. Anal. Calorim.* 70 (2002) 959.
  229. R.A. Robinson, J. Hopkins, *Med. J.* 145 (1979) 10.
  230. R.L. Forst, M.L. Weier, *Thermochim. Acta* 409 (2004) 79.
  231. J. Holager, *J. Dent. Res.* 51(1972) 102.
  232. M.A.F. Zenóbio, M.S. Nogueira, E.G. Zenóbio, Chemical composition of human enamel and dentin. Preliminary results to determination of the effective atomic number, Thesis, Cidade Universitária - Pampulha, Brazil, 2008.
  233. A.J. Gottshall, *J. South Africa* 11 (1958) 45.
  234. W. Kialczyc, A. Zielenkiewicz, W. Zielenkiewicz, *Termochim. Acta* 131 (1988) 47.
  235. W. Kialczyc, J. Christoffersen a kol., *J. Crystal Growth* 106 (1990) 355.
  236. M. Jemal, Thermochemistry and kinetics of the reactions of apatite phosphates with acid solutions, Thesis, Tunis El Manar University, Tunis El Manar, 2011.
  237. D.R. Lide, *Handbook of Chemistry and Physics*, 87th Edition, CRC Press, 2006.
  238. J.K. Jacques, *J. Chem. Soc.* (1963) 3820.

239. R.G. Craig, H.M. Rootare, *Anal. Calorimetry* 3 (1974) 397.
240. S. Chabchoub, J. Rogez, H. Said, *Thermochim. Acta* 474 (2008) 8.
241. I. Khattech, M. Jemal, *Thermochim. Acta* 298 (1997) 23.
242. R.I. Martin, K.S. TenHuisen a kol., *J. Phys. Chem. B* 101 (1997) 9375.
243. Z.G. Smirnova, V.V. Illarionov, S.I. Volkovich, *Russ. J. Inorg. Chem.* 7 (1962) 920.
244. M. Jemal, A.B. Cherifa a kol., *Thermochim. Acta* 259 (1995) 13.
245. S. Elasri, A.B. Cherifa a kol., *Thermochim. Acta* 249 (1995) 126.
246. A.B. Cherifa, M. Jemal, *Ann. Chim.* 10 (1985) 542.
247. X. Marchandise, P. Belgrand a kol., *Technol. Biol. Med.* 16 (1995) 50.
248. B. Dickens, L.W. Schroeder, W.E. Brown, *J. Solid State Chem.* 10 (1974) 232.
249. A.B. Cherifa, S. Somrani, M. Jemal, *J. Chem. Phys.* 88 (1991) 1893.
250. R. Kumar, P. Cheang, K.A. Khor, *Acta Mater.* 52 (2004) 1171.
251. W. Kibalczyk, A. Zielenkiewicz, *J. Crystal Growth* 82 (1987) 733.
252. J.C. Heughebaert, G. Montel, *Bull. Soc. Chem.* 8–9 (1977) 2923.
253. G.H. Nancollas, M.S. Mohan, *Archs. Oral. Biol.* 15 (1970) 731.
254. V. Velich, V. Hrnčíř, AO 266759, 1989.
255. V. Velich, P. Petr, R. Severa, *Chem. Listy* 84 (1990) 202.
256. D.J. Eatought, J.J. Christensen, R.M. Izatt, *Experiments in thermometric titrimetry and titration calorimetry*, Brigham Young University Press, Provo Utah, 1974.
257. G.A. Uriano, Standard reference material 1655, potassium chloride KCl (cr) for solution calorimetry, National bureau of standards certificate, Washington, 1981.
258. NIST database: D.D. Wagman, W.H. Evans a kol., *The NBS tables of chemical thermodynamic properties*, National bureau of standards, Washington, 1982.
259. A.B. Cherifa, J. Rogez, M. Jemal, J.C.Mathieu, *J. Therm. Anal. Calorim.* 63 (2001) 689.
260. S.B. Abdelkader, A.B. Cherifa a kol., *Thermochim Acta* 334 (1999) 123.
261. S. Saber-Samandari, A. Gross, *Biomaterials* 31 (2010) 6386.
262. C. Gullekson, L. Lucas, K. Hewitt a kol., *Biophysical Journal* 100 (2011) 1837.
263. P. Carmona, J. Bellanato, E. Escolar, *Biospectroscopy* 3 (1997) 331.
264. A.T. Tu, *J. Chin. Chem. Soc-Taip.* 50 (2003) 1.
265. D. Pappas, B.W. Smith, J.D. Winefordner, *Talanta* 51 (2000) 131.
266. A.B. Cherifa, M. Jemal a kol., *Thermochim. Acta* 237 (1994) 285.

## Seznam použitých symbolů a zkratek

<i>Symbol</i>	<i>Význam</i>	<i>Jednotka</i>
$a$	Aktivita	–
$a_{lp}, b_{lp}, c_{lp}$	Mřížkové parametry: vektory základní buňky	[Å]
$\ddot{a}$	Efektivní průměr iontu	[Å]
$ai$	Vodný roztok, ionizovaná substance	
$am$	Amorfni stav	
$ao$	Vodný roztok, neionizovaná substance	
$aq$	Vodný roztok, koncentrace není specifikovaná	
$A$	Obecná měřená veličina	
$\ddot{A}$	Koeficient charakterizující rozpouštědlo	[dm <sup>2/3</sup> .mol <sup>-1/2</sup> ]
$\ddot{B}$	Koeficient charakterizující rozpouštědlo	[dm <sup>3/2</sup> .mol <sup>-1/2</sup> . Å <sup>-1</sup> ]
$c$	Molární koncentrace	[mol.dm <sup>-3</sup> ]
$C$	Tepelná kapacita kalorimetru	[J.K <sup>-1</sup> ]
$d_{hkl}$	Meziorovinná vzdálenost	[nm]
$\Delta G$	Změna Gibbsovy energie	[J]
$\Delta G^*$	Kritická hodnota změny Gibbsovy energie (nukleační bariera)	[J]
$\Delta G_{het}$	Kritická hodnota změny Gibbsovy energie při heterogenní nukleaci	[J]
$\Delta G_{hom}$	Kritická hodnota Gibbsovy energie při homogenní nukleaci	[J]
$\Delta G_v$	Změna Gibbsovy energie vztažená na jednotkový objem	[J.m <sup>-3</sup> ]
$\Delta H$	Změna entalpie	[J.mol <sup>-1</sup> ]
$\Delta_{cr}H$	Molární krystalizační entalpie	[J.mol <sup>-1</sup> ]
$\Delta_{diss}H$	Molární rozpouštěcí entalpie	[J.mol <sup>-1</sup> ]
$\Delta_f H^o$	Standardní molární slučovací entalpie	[J.mol <sup>-1</sup> ]
$\Delta_{diss,2}H$	Rozpouštěcí molární entalpie látky 2	[J.mol <sup>-1</sup> ]
$\Delta H_i^E$	Molární dodatková entalpie	[J.mol <sup>-1</sup> ]
$\Delta_{dill}H_i$	Molární integrální zředovací teplo	[J.mol <sup>-1</sup> ]
$\Delta H^M$	Směšovací molární entalpie	[J.mol <sup>-1</sup> ]
$\Delta_r H$	Reakční molární entalpie	[J.mol <sup>-1</sup> ]
$\Delta_r H^o$	Standardní molární reakční entalpie	[J.mol <sup>-1</sup> ]
$\Delta_{tr} H^o$	Standardní molární transformační entalpie	[J.mol <sup>-1</sup> ]
$\Delta_w H^o$	Standardní molární smáčecí entalpie	[J.mol <sup>-1</sup> ]

$\Delta S$	Změna entropie	[J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> ]
$\Delta_r U$	Změna vnitřní energie reagující soustavy	[J]
$E$	Energie	[J]
$E_A$	Aktivační energie	[J]
$e$	Konstanta pro výpočet aktivního koeficientu (2-39)	[dm <sup>3/2</sup> .mol <sup>-1/2</sup> ]
$f$	Konstanta pro výpočet aktivního koeficientu (2-39)	[dm <sup>3/2</sup> .mol <sup>-1/2</sup> ]
$h$	Planckova konstanta	[J.s]
$H_i^x$	Diferenční rozpouštěcí entalpie látky $i$	[J.mol <sup>-1</sup> ]
$H_{m,1}^*$	Molární entalpie čistého rozpouštědla	[J.mol <sup>-1</sup> ]
$H_{m,i}$	Molární entalpie čisté látky $i$	[J.mol <sup>-1</sup> ]
$H_{mix}$	Entalpie binární směsi	[J.mol <sup>-1</sup> ]
$H_{m,2}^x$	Molární entalpie čisté látky 2	[J.mol <sup>-1</sup> ]
$k$	Konstanta přestupu tepla	[W.m <sup>-2</sup> .K <sup>-1</sup> ]
$K$	Rovnovážná termodynamická konstanta	–
$K_s$	Součin rozpustnosti	–
$I$	Iontová síla	[mol.dm <sup>-3</sup> ]
$I$	Elektrický proud	[A]
$m_{st}$	Molalita	[mol.kg <sup>-1</sup> ]
$m$	Hmotnost	[kg]
$n_i$	Látkové množství látky $i$	[mol]
$n_{hkl}$	Řád difrakce	–
$n_u$	Nukleus	
$n_r$	Látkové množství rozpouštědla	[mol]
$n_{rel}$	Relativní množství rozpouštědla	–
$p$	Tlak	[Pa]
$Q_r$	Reakční teplo	[J]
$r$	Poloměr zárodku	[nm]
$r^*$	Kritický poloměr zárodku	[nm]
$R$	Elektrický odpor	[Ω]
$R_g$	Plynová konstanta	[J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> ]
$R_i$	Obecná reaktanta	
$sln$	Rozpouštědlo	
$S_i$	Směrnice počáteční linie	

$S_f$	Směrnice konečné linie	
$t$	Čas	[s]
$T$	Teplota	[°C]
$T_k$	Teplota kalorimetru	[°C]
$T_p$	Teplota okolí	[°C]
$U$	Vnitřní energie	[J]
$U$	Elektrické napětí	[V]
$U_C$	Korigované elektrické napětí	[V]
$U_T$	Úhrnné elektrické napětí	[V]
$V$	Vakance	
$w$	Hmotnostní zlomek	[hm %]
$\Delta w$	Hmotnostní úbytek	[hm %]
$x_i$	Molární zlomek	–
$x_p$	Molární zlomek v přesyceném stavu	–
$x_r$	Molární zlomek v rovnovážném stavu	–
$X_i$	Obecně reakce	
$z_i$	Iontový náboj ( $z_+$ – kationtu, $z_-$ – aniontu)	–

<b>Řecký symbol</b>	<b>Význam</b>	<b>Jednotka</b>
$\alpha, \beta, \gamma$	Mřížkové parametry: úhly svírající vektory $a_{lp}, b_{lp}, c_{lp}$	[°]
$\bar{d}$	Krystalinita	[Å]
$\varepsilon$	Ochlazovací konstanta	[s <sup>-1</sup> ]
$\phi$	Přesycení	–
$\gamma_i$	Aktivitní koeficient látky $i$	–
$\gamma_{\pm}$	Střední aktivitní koeficient	–
$\mathcal{G}$	Kalibrační konstanta izoperibolického kalorimetru	[J.V <sup>-1</sup> ]
$\varphi$	Kontaktní úhel	[°]
$\lambda$	Vlnová délka	[nm]
$\mu$	Chemický potenciál	–
$\mu_o$	Standardní chemický potenciál	–
$\mu_p$	Chemický potenciál v přesyceném stavu	–
$\mu_r$	Chemický potenciál v rovnovážném stavu	–
$\nu_{R,i}$	Stechiometrický koeficient	–

$\nu$	Vlnočet	$[\text{cm}^{-1}]$
$\nu_{as}$	Asymetrická vibrace	$[\text{cm}^{-1}]$
$\nu_d$	Deformační vibrace	$[\text{cm}^{-1}]$
$\nu_s$	Symetrická vibrace	$[\text{cm}^{-1}]$
$\theta$	Braggův úhel	$[\text{°}]$
$\sigma$	Mezifázové napětí	$[\text{N.m}^{-1}]$
$\kappa$	Stupeň přeměny	–
$\omega, \psi$	Korekční koeficienty $\nu_{R,i}$	–

<b>Zkratka</b>	<b>Název</b>	<b>Vzorec</b>
ACP	Amorfní fosforečnan vápenatý	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ( <i>am</i> )
AP	Obecně apatity	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})_2$
bHA	Kostní HA	
BTB	Stehenní hovězí kost	
CaP	Obecně fosforečnany vápenaté (ACP, TCP, HA)	
CD	Cyklodextrin	
CDHA	Nestechiometrický HA ( $1 < x < 0$ )	$\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$
cHA	Komerční HA	
ClA	Chlorapatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$
CMP	Metafosforečnan vápníku ( $\alpha, \beta, \gamma$ forma)	$\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$
CPP	Pyrofosfát vápenatý	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
CPPD	Dihydrát pyrofosfátu vápenatého	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
DAH	Dahllit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$
DCP	Hydrogenfosforečnan vápenatý (monetit)	$\text{CaHPO}_4$
DCPD	Dihydrát DCP, brushit	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
DSC	<i>Diferenční skenovací kalorimetrie</i>	
DTA	<i>Diferenční termická analýza</i>	
DTG	<i>Diferenční termogravimetrie</i>	
EDX	<i>Rentgenový mikroanalyzátor</i>	
ESD	<i>Vysokoenergetická úprava povrchů laserem</i>	
EXAFS	<i>Rentgenová adsorpční spektroskopie</i>	
FA	Fluorapatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$
FTIR	<i>Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací</i>	

HA	Hydroxyapatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
HCP	Fosforečnan heptavápenatý	$\text{Ca}_7(\text{P}_2\text{O}_7)_2$
HT	Lidský zub	
ICP-OES	<i>Optická emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem</i>	
JCPDS	Databáze difraktogramů	
KS	Lidský ledvinový kámen	
LI	Oxid vápenatý	CaO
MS	<i>Hmotnostní spektroskopie</i>	
$\mu$ -XRD	<i>Rentgenová prášková mikrodifrakce</i>	
NMR	<i>Nukleární magnetická rezonance</i>	
OA	Oxoapatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}_2$
OCP	Fosforečnan oktovápenatý	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
OHA	Oxyhydroxyapatit ( $x < 1$ , $V$ – vakance)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{O}_x\text{V}_x$
PLD	<i>Vysokoenergetická úprava povrchu napěťovým rázem</i>	
PO	Hydroxid vápenatý	$\text{Ca}(\text{OH})_2$
RS	<i>Ramanova spektroskopie</i>	
SEM	<i>Skenovací elektronový mikroskop</i>	
sHA	Synteticky připravený HA	
STR	Struvit	$\text{NH}_4\text{Mg}(\text{PO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
TA	<i>Křivka přímého ohřevu</i>	
TCP	Krystalický fosforečnan vápenatý ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ forma)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
TDHP	Dihydrogenfosforečnan tetravápenatý	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$
TG	<i>Termogravimetrie</i>	
TGA	<i>Termogravimetrická analýza</i>	
tHA	Zubní HA	
TMA	<i>Termomechanická analýza</i>	
TMAC	Tetramethylenamonium chlorid	$(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$
TTCP	Fosforečnan tetravápenatý (hilgenstockit)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$
WED	Dihydrát šťavelanu vápenatého (wedellit)	$\text{Ca}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
WHE	Monohydrát šťavelanu vápenatého (whewellit)	$\text{Ca}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
WHI	Whitlockit	$(\text{Ca},\text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2$
XRD	<i>Rentgenová prášková difrakce</i>	



## Publikační činnost autora

### Články v odborných časopisech

**Kohutová A.**, Honcová P., Svoboda L., Bezdička P., Maříková M.

*Structural characterization and thermal behaviour of biological hydroxyapatite,*

J. Therm. Anal. Calorim. 108 (2012) 163 – 170.

**Kohutová A.**, Pilný P., Honcová P., Svoboda L.

*Synthesis and thermodynamic properties of amorphous calcium phosphate*

Sci. Pap. Univ. Pardubice 17A (2011) 155 – 165.

**Kohutová A.**, Honcová P., Podzemná V., Bezdička P., Večerníková V., Louda M., Seidel J.

*Thermal analysis of kidney stones and their characterization,*

J. Therm. Anal. Calorim. 101 (2010) 695 – 699.

Kourková L., Svoboda R., Sádovská G., Podzemná V., **Kohutová A.**

*Heat capacity of NaNO<sub>2</sub>*

Thermochim. Acta 491 (2009) 80 – 83.

Podzemná V., Kourková L., Svoboda L., Honcová P., **Kohutová A.**

*Microcalorimeter – essential aspects of measurement*

Sci Pap Univ Pardubice 15A (2009) 137 – 149.

### Účast na zahraničních konferencích

**Kohutová A.**, Svoboda L., Podzemná V.

*Structural characterization and thermal behaviour of calcium phosphates*

10<sup>th</sup> European Symposium on Thermal Analysis and Calorimetry

Rotterdam, The Netherlands, 20. – 27.8. 2010, poster, str. 149.

Podzemná V., Svoboda L., **Kohutová A.**

*Utilization of the IC-calorimeter for study of enzyme-catalyzed reaction*

10<sup>th</sup> European Symposium on Thermal Analysis and Calorimetry

Rotterdam, The Netherlands, 20. – 27.8. 2010, poster, str. 196.

**Kohutová A.**, Podzemná V., Kourková L., Seidel J.

*Thermal analysis of kidney stones and their characterization*

10<sup>th</sup> Conference on Calorimetry and Thermal Analysis

Zakopane, Poland, 30.8. – 4.9. 2009, přednáška, str. 140; ISBN 978-83-751818-3-8.

Podzemná V., Sádovská G., Kourková L., **Kohutová A.**

*Utilization of the chip microcalorimeter for study of enzymatic reaction*

10<sup>th</sup> Conference on Calorimetry and Thermal Analysis

Zakopane, Poland, 30.8. – 4.9. 2009, poster, str. 145; ISBN 978-83-751818-3-8.

Kourková L., Sádovská G., Podzemná V., **Kohutová A.**

*Utilization of nucleation agent to prevent supercooling in  $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$*

18. Ulm-Freiburger Kalorimetrietage

Freiberg, Germane, 18. – 20. 3. 2009, přednáška, str. 3.

**Kohutová A.**, Sádovská G., Kourková L.

*The enthalpy of precipitation of amorphous calcium phosphate as an urinary stone*

17. Ulm-Freiburger Kalorimetrietage

Freiberg, Germane, 28. – 30.3 2007, poster, str. 86.

Kourková L, Sádovská G., **Kohutová A.**

*Heat capacity, enthalpy and entropy of  $NaNO_2$ ,  $NaBrO_3$  and  $NaHSO_4 \cdot H_2O$*

17. Ulm-Freiburger Kalorimetrietage

Freiberg, Germane, 28. – 30.3. 2007, poster, str. 76.

### **Účast na domácích konferencích**

**Kohutová A.**, Svoboda L., Podzemná V.

*Termochemická studie hydroxyapatitu*

62. sjezd asociací českých a slovenských chemických společností

Pardubice, Česká republika, 28. – 30.6.2010, poster, str. 613; ISSN 0009-2770.

**Kohutová A.**, Podzemná V., Kourková L.

*Stanovení rozpouštěcí entalpie hydroxyapatitu*

31. Mezinárodní slovenský a český kalorimetrický seminář

Terchová, Slovensko, 25. – 29.5. 2009, přednáška, str. 121-122; ISBN 978-80-7395-178-8.

Podzemná V., Honcová P., **Kohutová A.**, Kourková L.

*Možnosti aplikace čipového mikrokolorimetru*

31. Mezinárodní slovenský a český kalorimetrický seminář

Terchová, Slovensko, 25. – 29.5. 2009, přednáška, str. 127-130; ISBN 978-80-7395-178-8.

Kourková L., Sádovská G., Podzemná V., **Kohutová A.**

*Využití hydrátů anorganických solí pro akumulaci tepelné energie*

APROCHEM 2009

Milovy – Sněžné n. M., 20. – 22.4. 2009, poster, str. 2237 – 2240; ISBN 978-80-02-02106-3.

**Kohutová A.**, Sádovská G., Kourková L., Podzemná V.

*Biologické fosforečnany a možnosti získávání jejich krystalizačních tepel*

APROCHEM 2009

Milovy – Sněžné n. M., 20. – 22.4. 2009, poster, str. 2233 – 2234; ISBN 978-80-02-02106-3.

Podzemná V., Kourková L., **Kohutová A.**

*Využití čipového mikrokolorimetru při studiu entalpie reakcí*

APROCHEM 2009

Milovy – Sněžné n. M., 20. – 22.4. 2009, poster, str. 2235 – 2236; ISBN 978-80-02-02106-3.

**Kohutová A.**, Sádovská G., Kourková L., Podzemná V.

*Rozpustnost a entalpie srážení amorfního fosforečnanu vápenatého*

30. Mezinárodní český a slovenský kalorimetrický seminář

Rožnov pod Radh., 26. – 30.5. 2008, přednáška, str. 119 – 122; ISBN 978-80-7395-079-8.

Kourková L., Sádovská G., **Kohutová A.**, Podzemná V.

*Využití  $\text{NaNO}_2$  pro akumulaci energie*

30. Mezinárodní český a slovenský kalorimetrický seminář

Rožnov pod Radh., 26. – 30.5. 2008, přednáška, str. 123 – 126; ISBN 978-80-7395-079-8.

Pustková P., Sádovská G., Kourková L., **Kohutová A.**, Podzemná V.

*Uplatnění kalorimetrických metod při studiu anorganických materiálů*

Pokroky v anorganické technologii

Gabčíkovo, Slovensko, 20. – 22.5. 2008, přednáška, str. 27 – 28; ISBN 978-80-227-2866-9.

Kourková L., Sádovská G., Pilař R., **Kohutová A.**, Podzemná V.

*Využití anorganických solí pro akumulaci tepelné energie*

Pokroky v anorganické technologii

Gabčíkovo, Slovensko, 20. – 22.5. 2008, poster, str. 17 – 18; ISBN 978-80-227-2866-9.

**Kohutová A.**, Kourková L., Podzemná V., Sádovská G.

*Stanovení rozpustnosti amorfního fosforečnanu vápenatého*

Pokroky v anorganické technologii

Gabčíkovo, Slovensko, 20. – 22.5. 2008, poster, str. 19 – 20; ISBN 978-80-227-2866-9.

Podzemná V., Sádovská G., Kourková L., **Kohutová A.**

*Využití mikrokalorimetrie při studiu chemických reakcí*

Pokroky v anorganické technologii

Gabčíkovo, Slovensko, 20. – 22.5. 2008, poster, str. 21 – 22; ISBN 978-80-227-2866-9.

Kourková L., Sádovská G., **Kohutová A.**

*Stanovení tepelných kapacit roztoku síranu draselného z rozpouštěcích dat*

29. Mezinárodní slovenský a český kalorimetrický seminář

Medlov, 28.5. – 1.6. 2007, přednáška, str. 31 – 34; ISBN 978-80-7194-957-2.

**Kohutová A.**, Sádovská G., Kourková L.

*Srážení amorfního fosforečnanu vápenatého ve vztahu k tvorbě močových kamenů*

29. Mezinárodní slovenský a český kalorimetrický seminář

Medlov, 28.5. – 1.6. 2007, přednáška, str. 75 – 78; ISBN 978-80-7194-957-2.

Kourková L., Sádovská G., **Kohutová A.**

*Využití kalorimetru s tepelným tokem pro získání hodnot důležitých pro technologickou praxi*

APROCHEM 2007,

Milovy – Sněžné n. M., 16. – 18.4. 2007, poster, str. 2288 – 2292; ISBN 978-80-02-01893-3.

**Kohutová A.**, Sádovská G., Kourková L.

*Aplikace reakční kalorimetrie při sledování systémů (l) – (l) & (s) – (l)*

APROCHEM 2007

Milovy – Sněžné n. M., 16. – 18.4. 2007, poster, str. 2285 – 2287; ISBN 978-80-02-01893-3.

## **Sebevzdělávací aktivity**

Seminář *Měření a interpretace vibračních spekter*, 16. – 27. 1. 2012, VŠCHT, Praha.

Seminář *Základy FTIR spektroskopie a práce s programem Omnic*, březen 2011, VŠCHT, Praha.

*Calorimetry Summer School*, 20. – 25.6. 2010, CNRS, Institut de Recherches sur la Catalyse et l'Environnement de Lyon, France.

Stay on TU Bergakademie Freiberg, 2. – 8. 11. 2008, Freiberg, Germany.

*1<sup>st</sup> NanoSchool on Nanoscience and Nanotechnology in Molecular Scale: Theory and Experiment*, 24. – 29.8. 2008, J. Heyrovsky Institute of Physical Chemistry Academy of Science, Prague.

*Seminar on Material Analysis with the Aid of Thermal Analysis and Calorimetry*, April 2008, Prague.

# PŘÍLOHA

**Obsah přílohy**

*Obr. P1: XRD záznam ledvinového kamene KS1*

*Obr. P2: XRD záznam ledvinového kamene KS2*

*Obr. P3: XRD záznam ledvinového kamene KS3*

*Obr. P4: XRD záznam ledvinového kamene KS4*

*Obr. P5: XRD záznam ledvinového kamene KS5*

*Obr. P6: XRD záznam ledvinového kamene KS6*

*Obr. P7: XRD záznam kalcinovaného vzorku ACP*

*Obr. P8: XRD záznam kalcinovaného vzorku TCP*

*Obr. P9: XRD záznam kalcinovaného vzorku sHA*

*Obr. P10: XRD záznam kalcinovaného vzorku cHA*

*Obr. P11: XRD záznam kalcinovaného vzorku BTB*

*Obr. P12: XRD záznam kalcinovaného vzorku HT1*

*Obr. P13: XRD záznam kalcinovaného vzorku HT2*

*Obr. P14: XRD záznam kalcinovaného vzorku HT3*

*Obr. P15: XRD záznam kalcinovaného ledvinového kamene KS2*

*Obr. P16: XRD záznam kalcinovaného ledvinového kamene KS3*

*Obr. P17: XRD záznam kalcinovaného ledvinového kamene KS4*

*Obr. P18: XRD záznam kalcinovaného ledvinového kamene KS5*

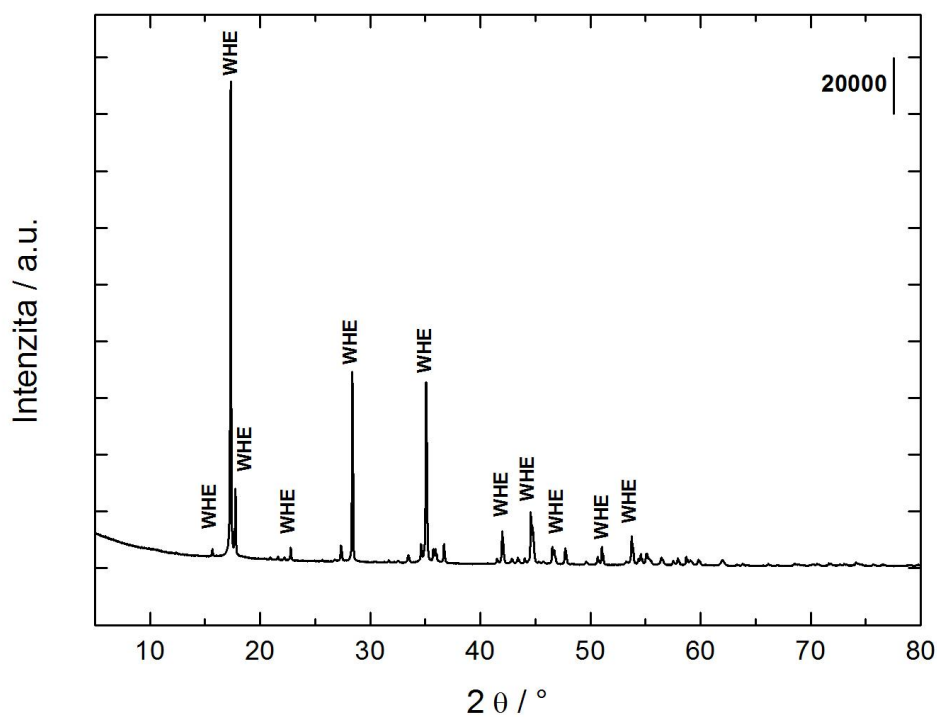
*Obr. P19: XRD záznam kalcinovaného ledvinového kamene KS6*

*Obr. P20: XRD záznam vzorků bHA a tHA*

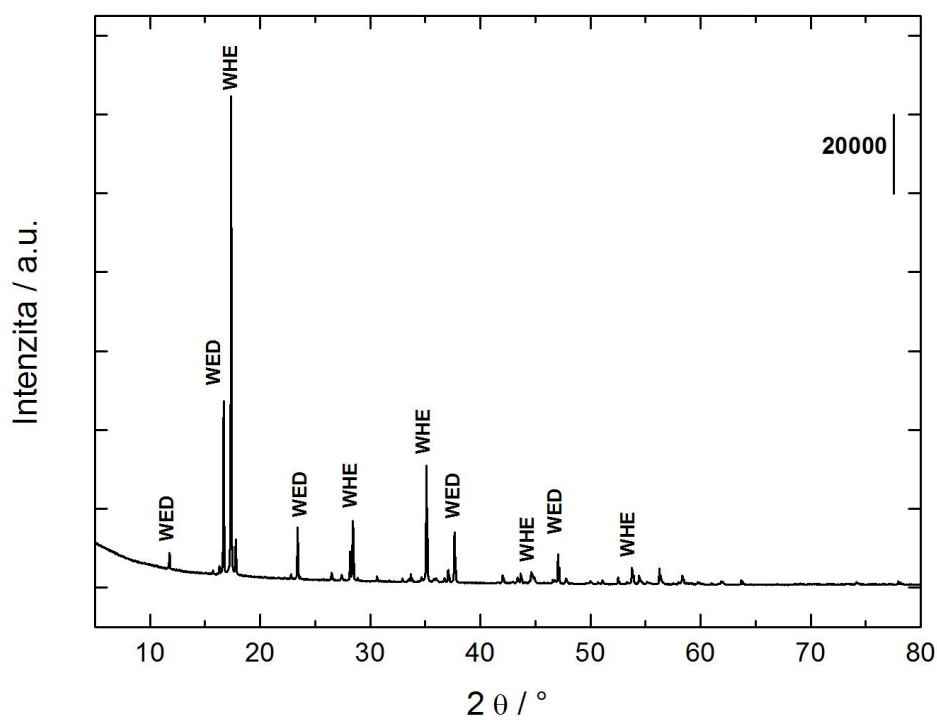
*Obr. P21: XRD záznam ACP po rozpouštěcích experimentech při 25 a 45 °C*

*Zákon o šíření chyb*

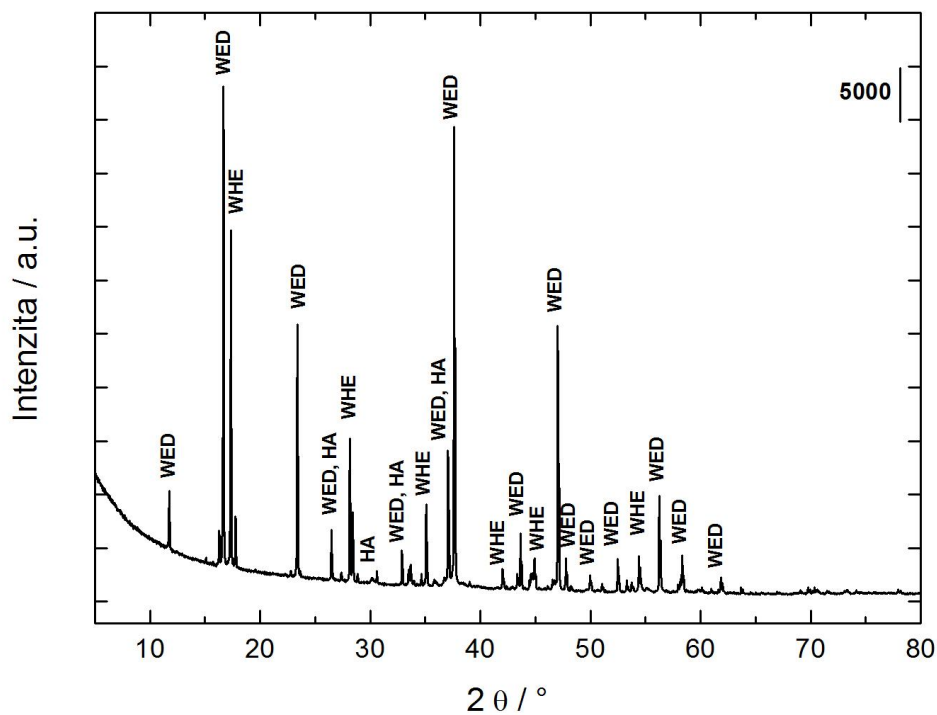




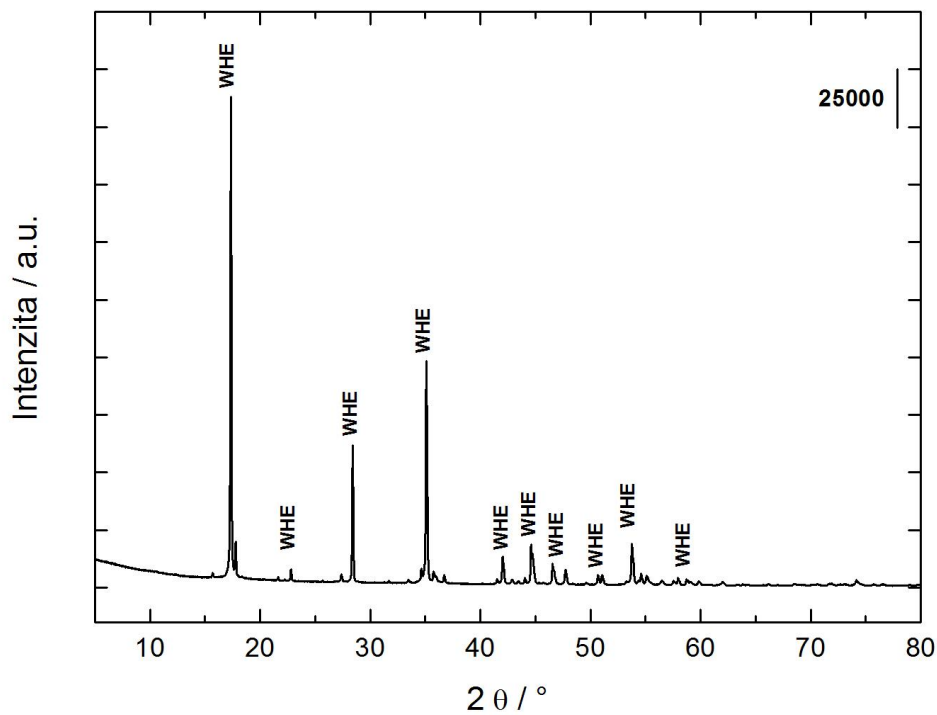
Obr. P1: XRD záznam ledvinového kamene KS1



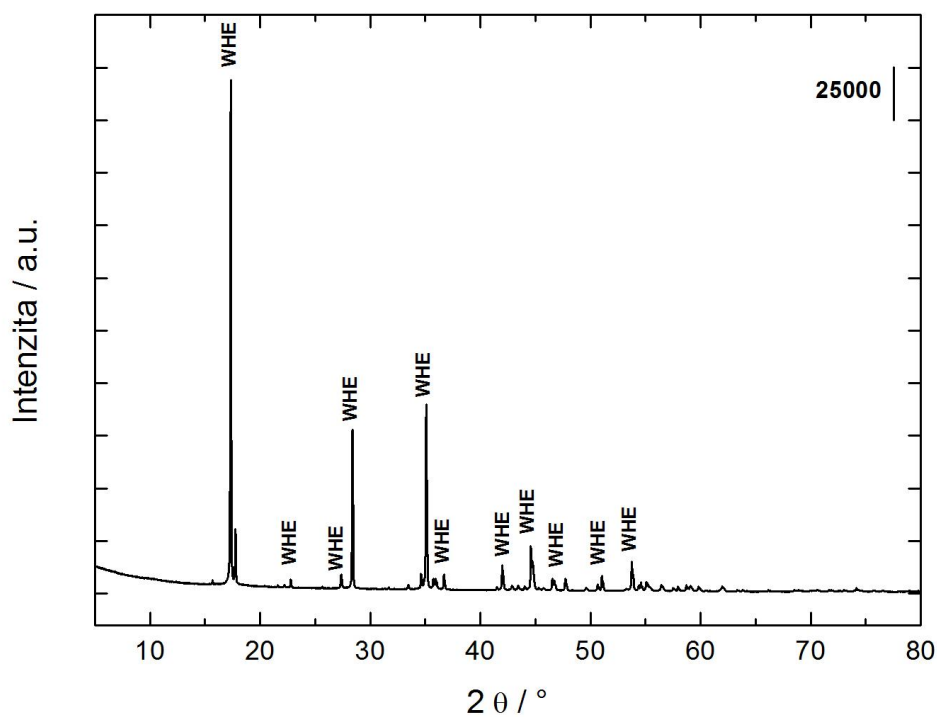
Obr. P2: XRD záznam ledvinového kamene KS2



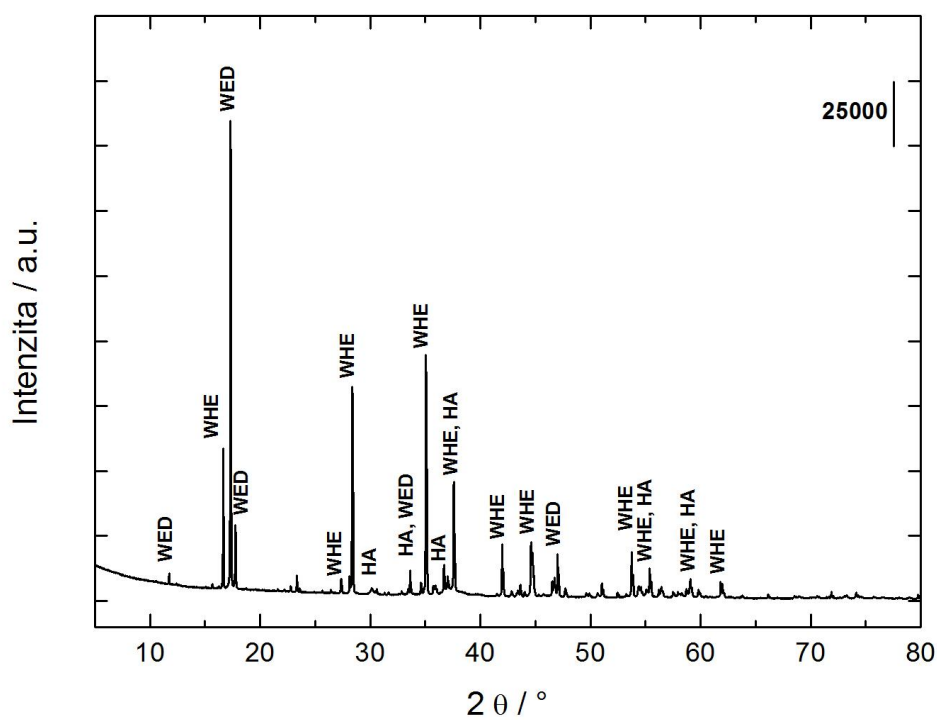
Obr. P3: XRD záznam ledvinového kamene KS3



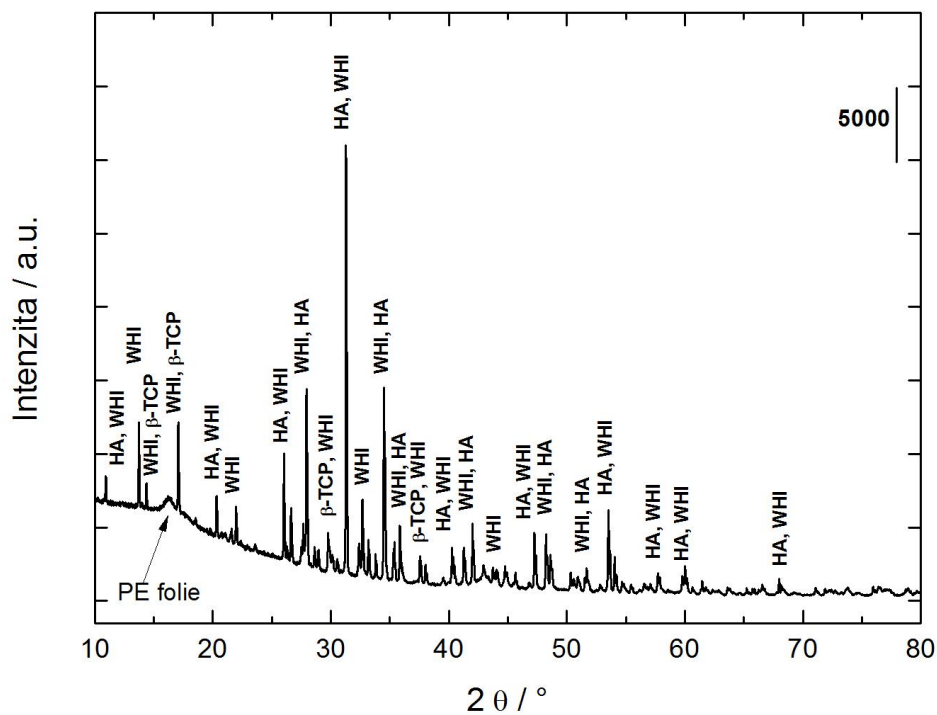
Obr. P4: XRD záznam ledvinového kamene KS4



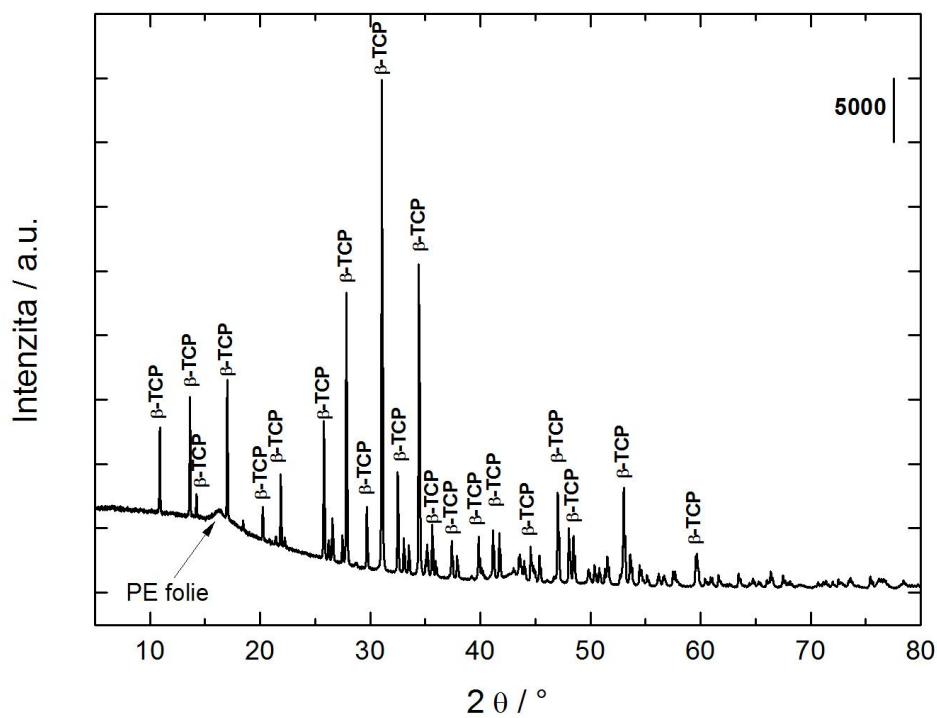
Obr. P5: XRD záznam ledvinového kamene KS5



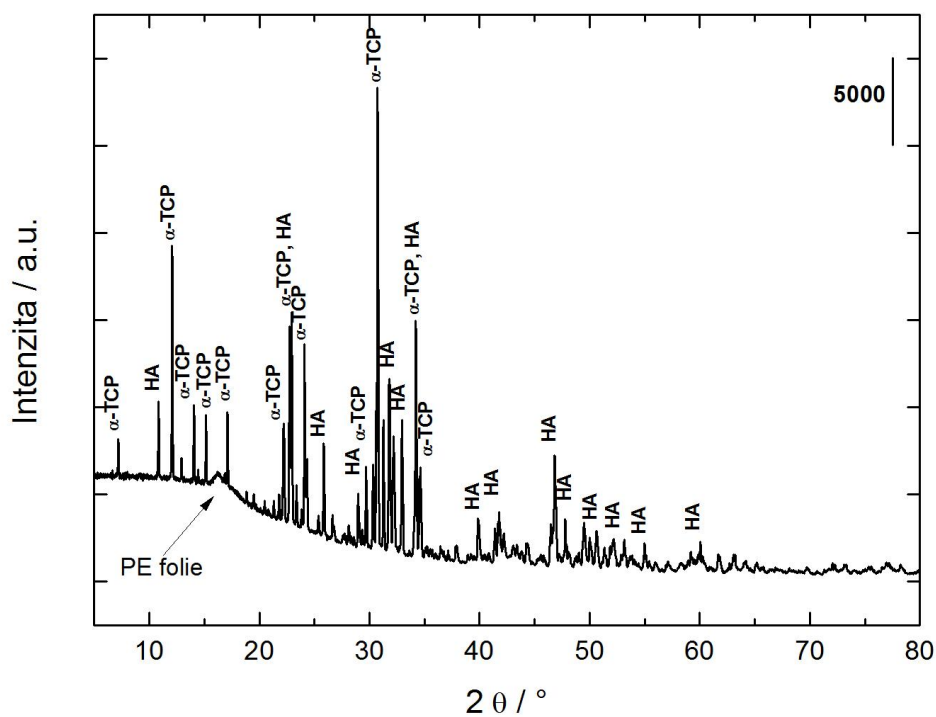
Obr. P6: XRD záznam ledvinového kamene KS6



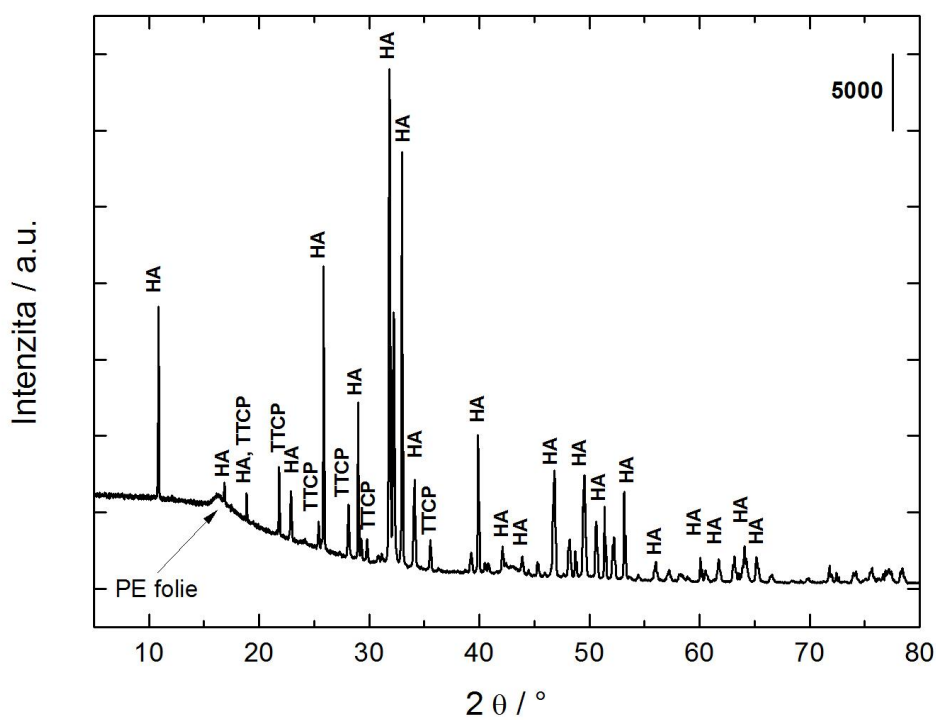
Obr. P7: XRD záznam kalcinovaného vzorku ACP



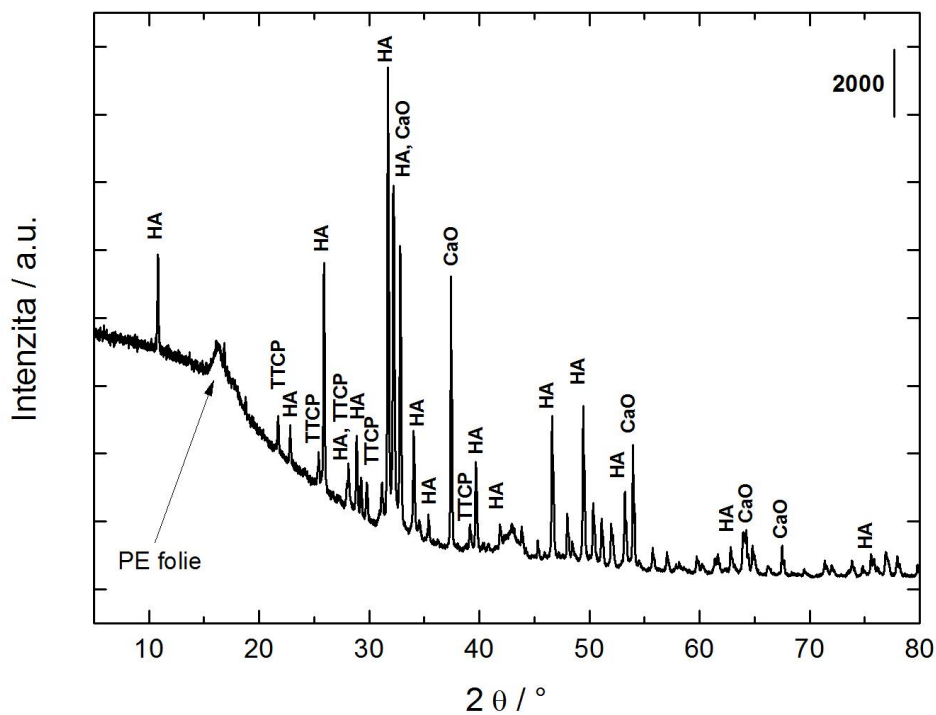
Obr. P8: XRD záznam kalcinovaného vzorku TCP



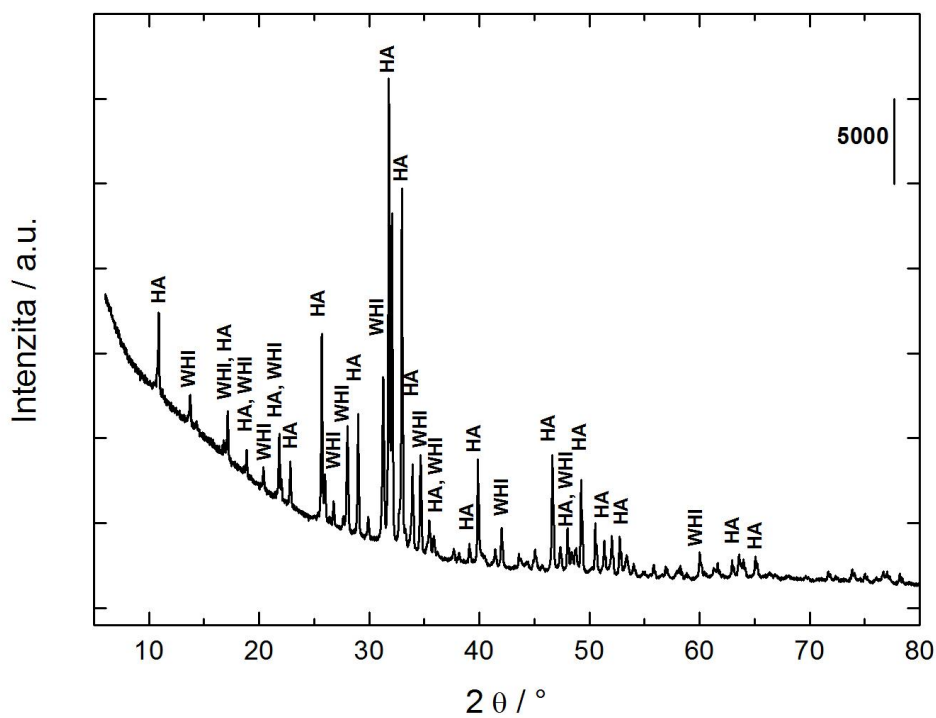
Obr. P9: XRD záznam kalcinovaného vzorku sHA



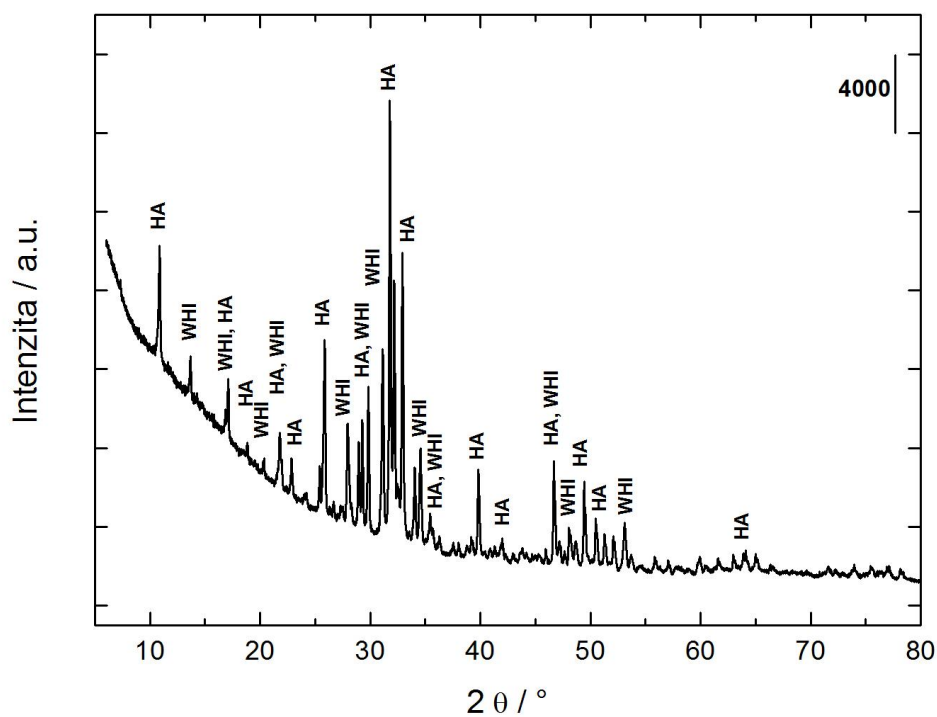
Obr. P10: XRD záznam kalcinovaného vzorku cHA



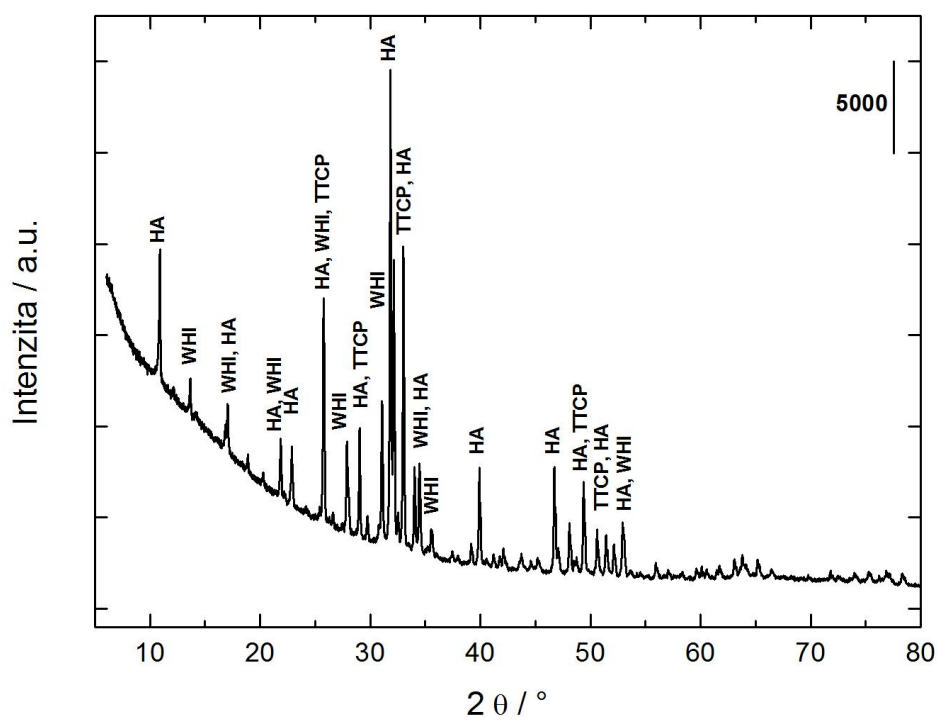
Obr. P11: XRD záznam kalcinovaného vzorku BTB



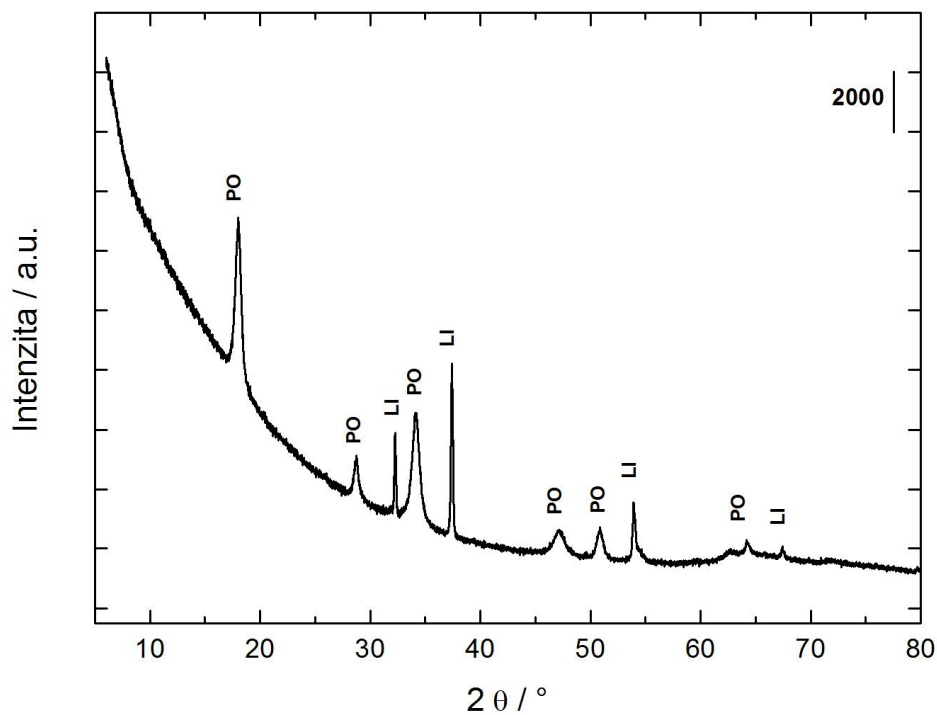
Obr. P12: XRD záznam kalcinovaného vzorku HTI



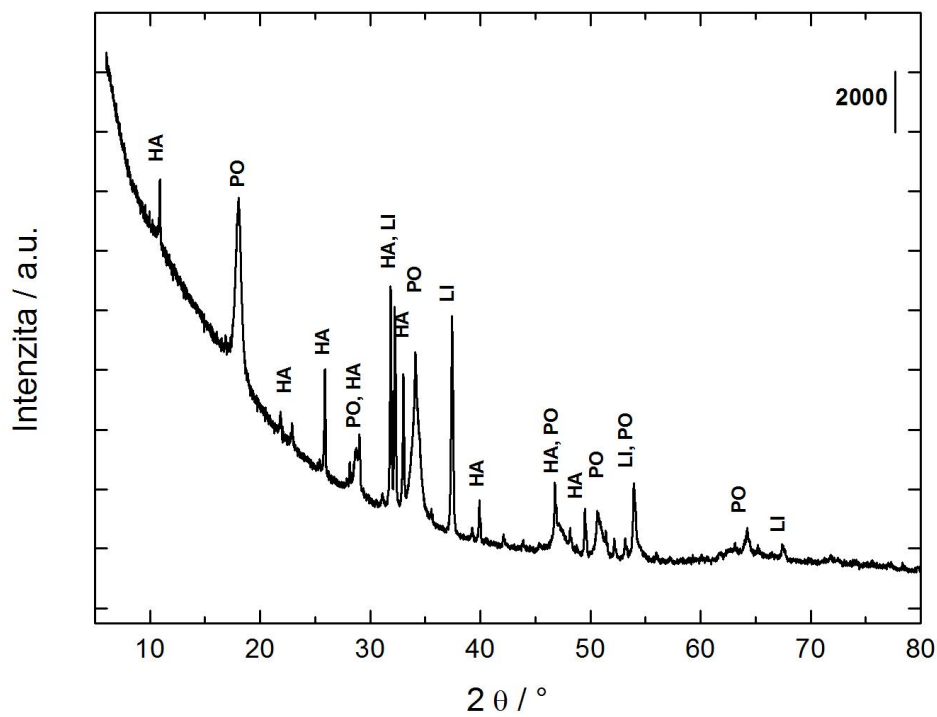
Obr. P13: XRD záznam kalcinovaného vzorku HT2



Obr. P14: XRD záznam kalcinovaného vzorku HT3

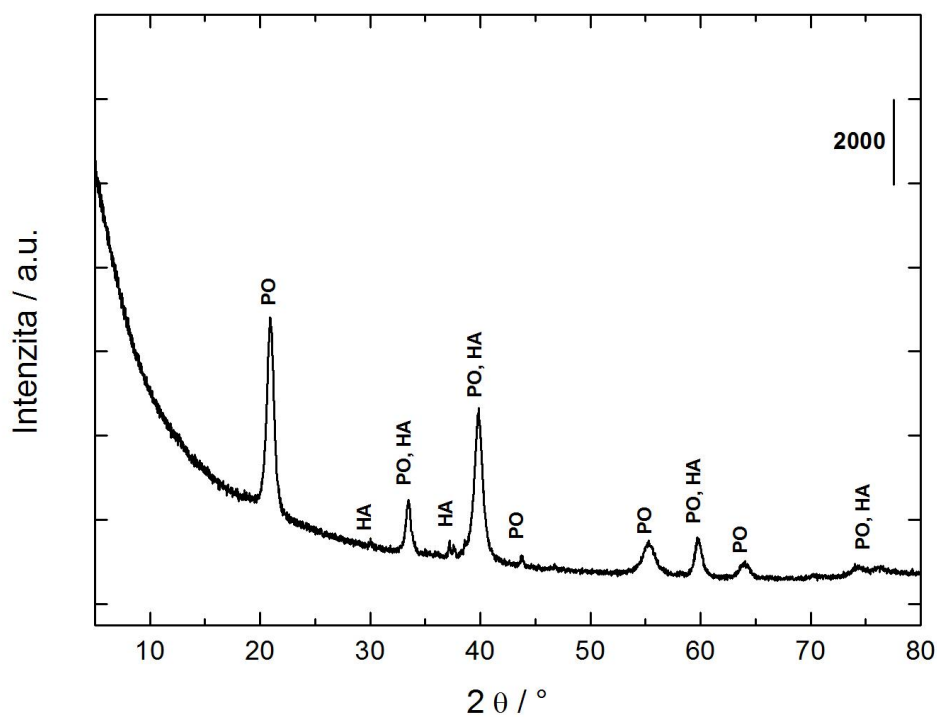


Obr. P15: XRD záznam kalcinovaného ledvinového kamene KS2

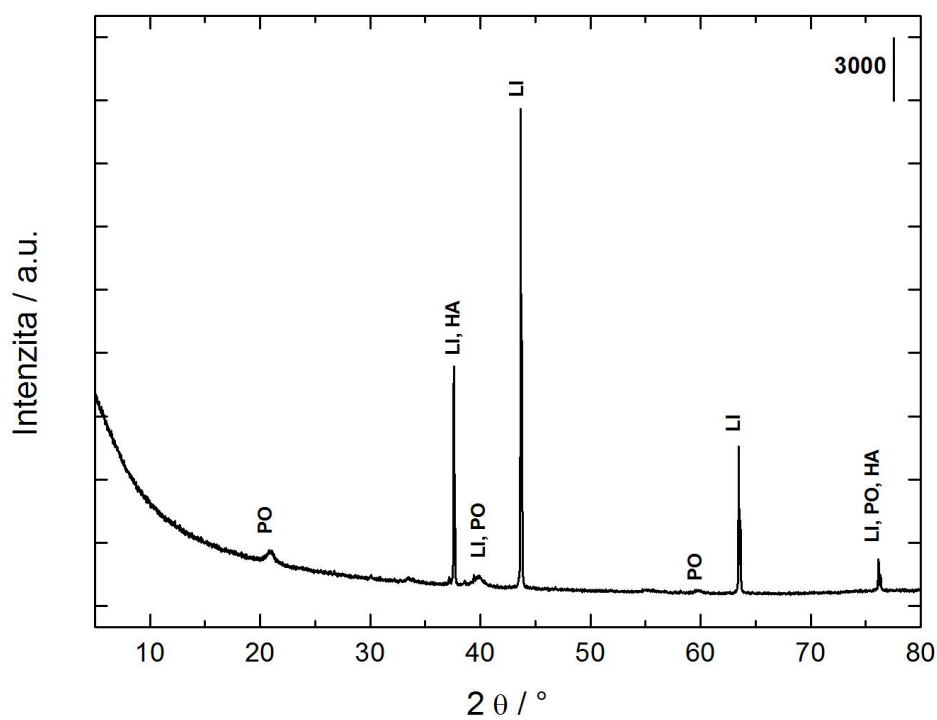


Obr. P16: XRD záznam kalcinovaného ledvinového kamene KS3

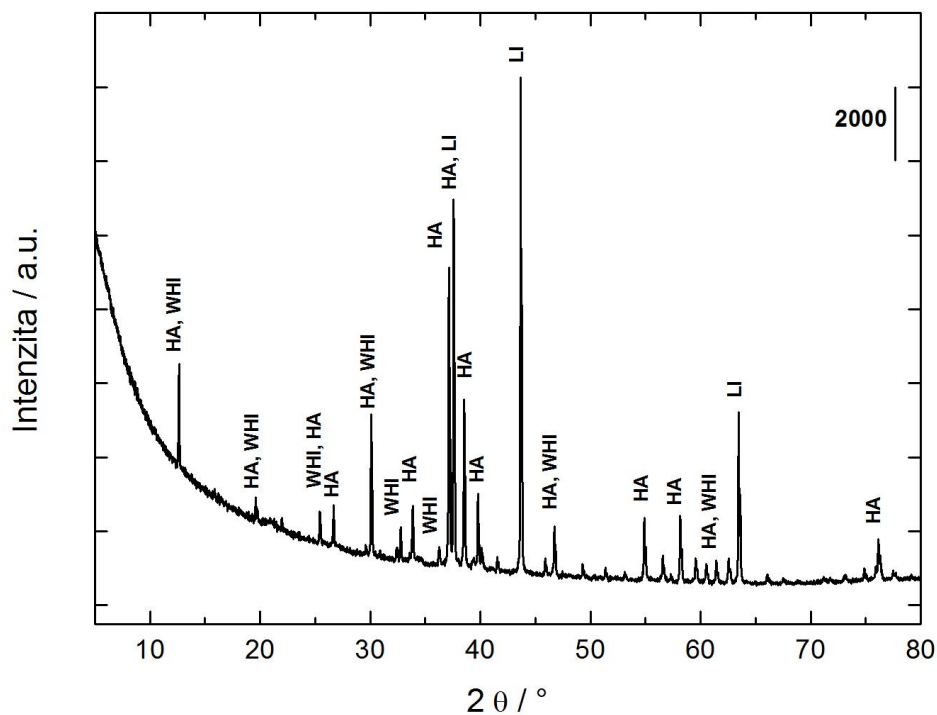




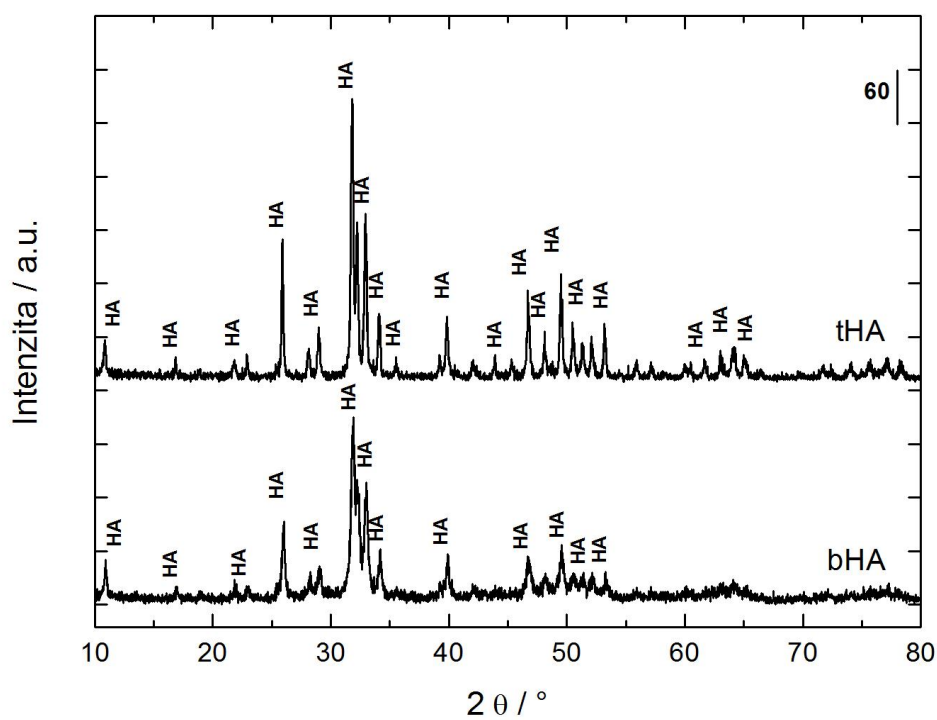
Obr. P17: XRD záznam kalcinovaného ledvinového kamene KS4



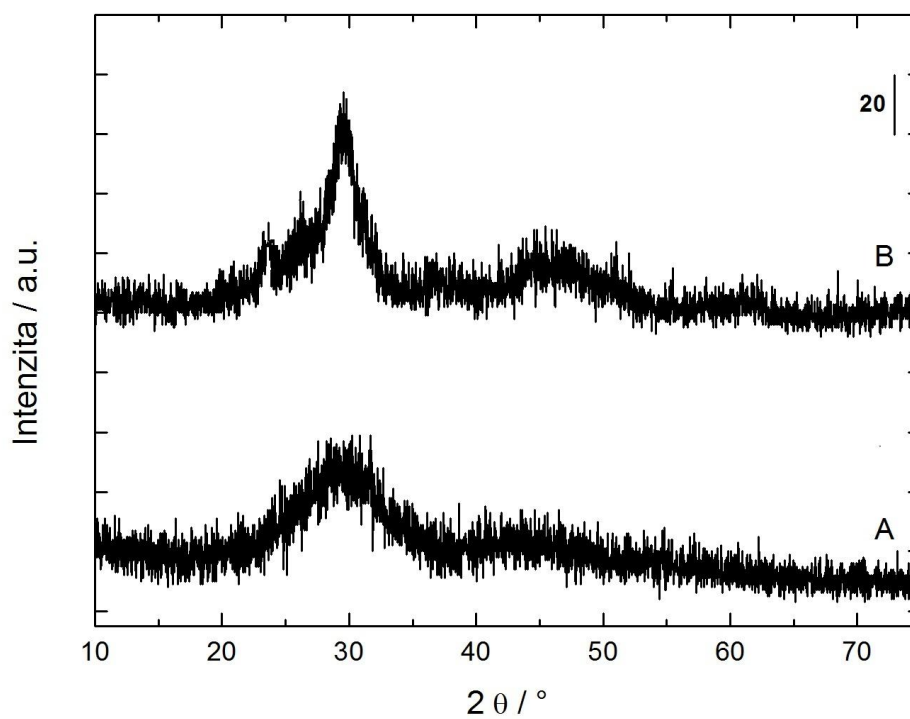
Obr. P18: XRD záznam kalcinovaného ledvinového kamene KS5



Obr. P19: XRD záznam kalcinovaného ledvinového kamene KS6



Obr. P20: XRD záznam vzorků bHA a tHA



Obr. P21: XRD záznam ACP po rozpouštěcích experimentech při 25 °C (A) a 45 °C (B)

## Zákon o šíření chyb

Jsou-li  $\hat{x}_1, \hat{x}_2, \hat{x}_3, \dots, \hat{x}_m$  aritmetické průměry přímo měřených veličin  $x_1, x_2, \dots, x_m$ , odhad střední hodnoty hledané veličiny  $\hat{y}$  se vypočítá ze vztahu:

$$\hat{y} = f(\hat{x}_1, \hat{x}_2, \hat{x}_3, \dots, \hat{x}_m)$$

Vyjádří-li se změna  $y$  diferenciálem

$$dy = \left( \frac{\partial f}{\partial x_1} \right)_{x_2, \dots, x_m} dx_1 + \dots + \left( \frac{\partial f}{\partial x_m} \right)_{x_1, \dots, x_{m-1}} dx_m$$

má konečná odchylka proměnné  $y_i$  následující podobu:

$$\hat{y} - y_i = \left( \frac{\partial f}{\partial x_1} \right) (\hat{x}_1 - x_{1i}) + \dots + \left( \frac{\partial f}{\partial x_m} \right) (\hat{x}_m - x_{mi}).$$

Pokud byla každá veličina  $x_1, x_2, \dots, x_m$  změřena  $n$ -krát, umocněním a sečtením přes všechna  $i$  se získá následující vztah:

$$\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y} - y_i)^2}{n-1} = \left( \frac{\partial f}{\partial x_1} \right)^2 \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{x}_1 - x_{1i})^2}{n-1} + \dots + \left( \frac{\partial f}{\partial x_m} \right)^2 \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{x}_m - x_{mi})^2}{n-1}$$

Jeho odmocněním se dospěje k výslednému vztahu pro výpočet šíření chyb:

$$\hat{s}_y = \sqrt{\left( \frac{\partial f}{\partial x_1} \right)^2 \hat{s}_{x_1}^2 + \dots + \left( \frac{\partial f}{\partial x_m} \right)^2 \hat{s}_{x_m}^2}$$

kde  $\hat{s}_y$  představuje souhrnnou chybu nepřímě měřené veličiny.