



SKORUPY JAJ KURZYCH JAKO SUROWIEC DO PRODUKCJI FOSFORANÓW WAPNIA

Klaudia Pluta, Dagmara Malina, Agnieszka Sobczak-Kupiec
Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki

CHICKEN EGGSHELLS AS A RAW MATERIALS FOR CALCIUM PHOSPHATES SYNTHESIS

Streszczenie

Wykorzystanie produktów ubocznych pochodzących z produkcji wyrobów spożywczych i ferm wylęgowych, jakimi są skorupki jaj kurzych, stanowi interesującą alternatywę dla klasycznych metod otrzymywania potencjalnego materiału implantacyjnego – fosforanów wapnia. Popularność ceramiki hydroksyapatytowej w środowisku medycznym spowodowana jest właściwościami jakimi obdarzone są te materiały tj. bioaktywność, biogodność oraz osteokonduktywność. Celem badań było wykorzystanie skorupki jaj kurzych jako surowca do produkcji fosforanów wapnia. Wstępnie oczyszczone skorupki zostały poddane jednostopniowej kalcynacji w piecu komorowych w zmiennych warunkach temperaturowych, które miały na celu zbadanie wpływu temperatury na właściwości finalnego produktu. Skorupki jaj kurzych zawierają w swym składzie ok. 94% (m/m) węglanu wapnia, który w procesie termicznym ulega rozkładowi do tlenku wapnia. Syntezę hydroksyapatytu przeprowadzono metodą mokrą, stosując jako substraty zawieszoną wodorotlenku wapnia pozyskanego z produktu kalcynacji skorupki

oraz roztwór kwasu fosforowego(V). Otrzymane proszki poddano analizie fizykochemicznej potwierdzającej występowanie hydroksyapatytu.

Słowa kluczowe: hydroksyapatyt, fosforany wapnia, skorupki jaj, kalcynacja.

Abstract

The use of by-products from the production of food industry and farms hatching such as shell chicken eggs is an interesting alternative to conventional methods for the preparation of the potential implant material – calcium phosphates. Because of unique properties of hydroxyapatite such as bioactivity, biocompatibility and osteoconductive, this material is commonly use in the medical community. The main goal of this research is development of calcium phosphate synthesis method from waste material such as eggshells. Pre-cleaned eggshells were subjected to a single-stage calcination in furnace chamber in varying temperature condition, which were intended to examine the effect of temperature on the properties of the final product. Chicken eggshells contain approx. 94% (m/m) calcium carbonate, which in the thermal process decomposed to calcium oxide. HAp synthesis was carried out by wet methods, using as a starting materials calcium hydroxide suspension obtained from calcined eggshells and solution of phosphoric acid. The obtained powders were characterized using physicochemical method to confirm the presence of hydroxyapatite.

Keywords: hydroxyapatite, calcium phosphates, eggshells, calcination.

WPROWADZENIE

Materiały implantacyjne wykonane na bazie fosforanów wapnia, które są związkami wchodzącymi w skład naturalnej kości od wielu lat ciekawi wiele środowisk naukowych. Fosforany wapnia, do których zalicza się hydroksyapatyt, należą do materiałów wykazujących bioaktywność, czyli zdolność do wytworzenia wiązań chemicznych bezpośrednio pomiędzy powierzchnią materiału, a otaczającą tkanką kostną (Ślósarczyk 1997, Świeczko Żurek 2009). Przyczyną bardzo dobrej adaptacji hydroksyapatytu w środowisku żywego organizmu jest jego chemiczne i mineralogiczne podobieństwo do nieorganicznego składnika kości jak i zębów (Szymański i in. 1991, Ślósarczyk i in. 1994). Hydroksyapatyt wykazuje również działanie osteokonduktywne polegające na wspomaganiu procesów regeneracji uszkodzonej kości. Dzięki porowatości wykorzystanego materiału możliwe jest narastanie nowej tkanki kostnej na jego powierzchni oraz

penetracja wnętrza materiału, co stanowi rusztowanie dla odbudowującej się kości (Pamuła 2008, Sachlos i in. 2003, Ślósarczyk 2003). Chemiczne i strukturalne właściwości proszków hydroksyapatytowych mogą być modyfikowane poprzez dobór odpowiedniej metody i warunków syntezy. Cechy te decydują ostatecznie o medycznym zastosowaniu materiału, dlatego też należy stosować metodę, która pozwala na sterowanie morfologią, składem chemicznym i krystalicznością tworzyw hydroksyapatytowych. Klasyczne metody otrzymywania syntetycznego HAp obejmują bezpośrednie strącanie z roztworów, techniki hydrotermalne, hydrolizę fosforanów wapnia, metody suche czy żół – żel (Marciniak 2002, Łaskawiec i in. 2008). Alternatywną metodą pozyskiwania hydroksyapatytu jest jego odzysk ze źródeł naturalnych bądź bioodpadów. Ekstrakcja HAp ze szkieletów koralowców, kości zwierzęcych, muszli ostryg czy skorupki jaj ma swoje uwarunkowanie ekonomiczne i jest korzystne dla środowiska (Kusurini i in. 2012, Balazsi i in. 2007). Do otrzymywania HAp z kości bydłych, zbudowanych w 65-75% z hydroksyapatytu, wykorzystuje się wodę w stanie podkrytycznym, procesy hydrotermalne lub rozkład termiczny. Procesy te mają spowodować rozpuszczenie, hydrolizę bądź rozkład fazy organicznej obecnej w tkankach kostnych. Reakcje hydrolizy mogą przebiegać w środowisku kwasowym – z wykorzystaniem kwasu mlekowego oraz zasadowym – używając roztworu NaOH. Wykorzystanie pierwszego czynnika gwarantuje łagodny przebieg reakcji, a ponadto eliminuje problemy związane z niebezpiecznymi odpadami (Ooi i in. 2007, Barakat i in. 2009). Równie atrakcyjnym sposobem pozyskiwania hydroksyapatytu jest konwersja węglanu wapnia, z którego zbudowane są szkielety koralowców. Organizmy te posiadają porowatą strukturę przypominającą budowę kości gąbczastej, dlatego też procesowi poddaje się nieprzetworzone struktury. Szkielety koralowców w 99% zbudowane są z aragonitu będącego izomorficzną odmianą CaCO_3 (Ben-Nissan i in. 2003, Pekka i in. 2006). W celu otrzymania HAp wykorzystuje się metodę hydrotermalną opracowaną w 1974 r. Polega ona na oddziaływaniu wysokiej temperatury i ciśnienia na masę koralowców w obecności wodnego roztworu fosforanu(V) amonu. W tych warunkach dochodzi do wymiany jonowej, przez co w strukturze szkieletu koralowca powstaje hydroksyapatyt zgodnie z równaniem (Sivakumar i in. 1996).

Celem badań było wykorzystanie skorupki jaj kurzych jako surowca do produkcji fosforanów wapnia poprzez proces jednostopniowej kalcynacji w piecu komorowych. Syntezę hydroksyapatytu przeprowadzono metodą moką, stosując jako substraty zawiesinę wodorotlenku wapnia pozyskanego z produktu kalcynacji skorupki oraz roztwór kwasu fosforowego(V). Otrzymane proszki poddano analizie XRD, FT-IR, SEM oraz obliczono stosunek molowy Ca/P.

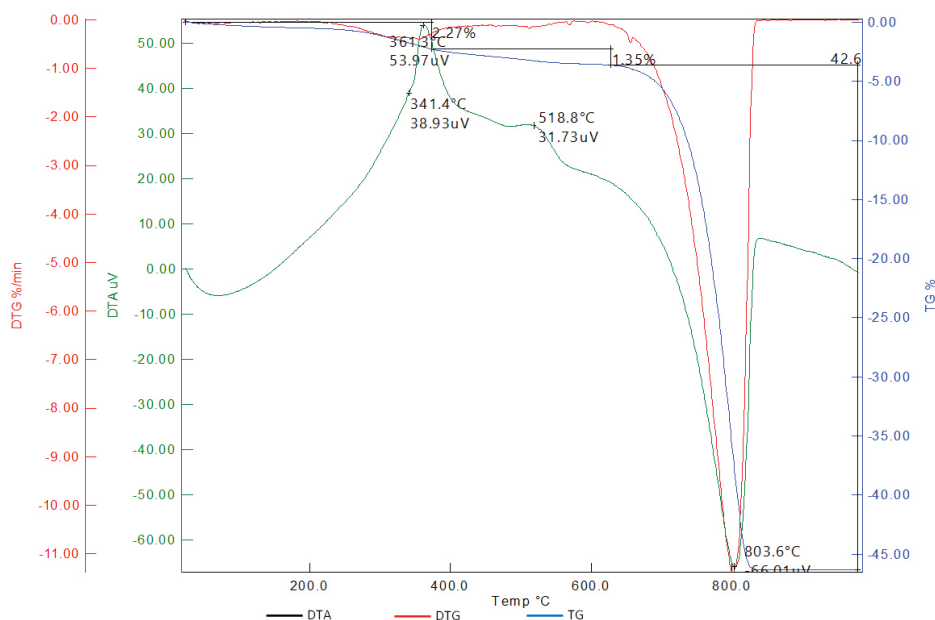
MATERIAŁ I METODY

Wyjściowym materiałem wykorzystanym do syntezy hydroksyapatytu były skorupki jaj kurzych. Pod względem chemicznym zawierają one bowiem ok. 94% (m/m) węglanu wapnia, który w procesie termicznym ulega rozkładowi do tlenku wapnia. Związek ten z kolei może być bezpośrednio wykorzystany do syntezy fosforanów wapnia. Prezentowane badania zakładały przygotowanie surowców, syntezę fosforanów wapnia oraz ich analizę fizykochemiczną. Analizę termiczną rozdrobnionego materiału przeprowadzono za pomocą aparatu EXTAR Series Termogravimetry/Differential Thermal Analyzer TG/DTA7300 SII. Analizę składu fazowego wszystkich próbek dokonano metodą rentgenograficzną z użyciem dyfraktometru Philips X'Pert zaopatrzonego w monochromator grafitowy PW 1752/00. Analizę w podczerwieni FT-IR dokonano w zakresie podczerwieni podstawowej tj. 400 – 4000 cm^{-1} za pomocą spektrometru Scimitar Series FTS 2000 firmy Digilab. Przeprowadzenie analizy FT-IR wymagało przygotowania półprzeźroczystych pastylek zawierających 0,2000±00011 g wysuszonego KBr oraz 0,0007 g analizowanego materiału. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) umożliwiła obserwację mikrostruktury analizowanych proszków. Morfologię próbek zbadano wykorzystując skaningowy mikroskop elektronowy Jeol JSM-5510LV. Zawartość wapnia w syntezowanych proszkach hydroksyapatytu oznaczono metodą kompleksometryczną z wykorzystaniem wersenianu disodowego (EDTA) wg normy PN-R-64803. Metoda ta polega na rozpuszczeniu analizowanej próbki w kwasie azotowym, wytrąceniu zawartych w niej fosforanów za pomocą azotanu bizmutu(III), a następnie oznaczenie wapnia przez miareczkowanie roztworem EDTA. Za wynik końcowy oznaczenia przyjęto średnią arytmetyczną wyników co najmniej dwóch równoległych oznaczeń, między którymi różnica nie przekracza 0,4%. Zawartość fosforu w analizowanym materiale oznaczono metodą dyferencyjno-fotometryczną wg normy PN-80, C-87015. Metoda ta polega na utworzeniu barwnego kompleksu fosforo–wanado–molibdenowego i pomiarze fotometrycznym gęstości optycznej przy długości fali 430 nm. Do analizy wykorzystano spektrofotometr Evolution 201 firmy ThermoScientific.

WYNIKI I DYSKUSJA

Skorupki jaj kurzych po wstępnym procesie oczyszczania zostały rozdrobnione w młynie nożowym. Materiał poddano analizie termicznej (rysunek 1.), która pozwala wnioskować, że rozkład termiczny zachodzi w trzech etapach. W pierwszym etapie w temperaturze ok. 340°C następuje 2,27% ubytek masy analizowanej próbki związany z rozkładem związków organicznych pozostałych w próbce, czego dowodzi analiza DTA przedstawiająca efekt egzotermiczny tego

procesu. Efekt związany z 1,35% ubytkiem masy przypisuje się częściowemu rozkładowi węglanu wapnia, który zapoczątkowany został w temperaturze ok. 650°C i jest reakcją endotermiczną. Największy ubytek masy (42,6%) następuje w temperaturze 800°C również odpowiada za rozkład węglanu wapnia obecnego w materiale do postaci tlenku wapnia zgodnie z równaniem:



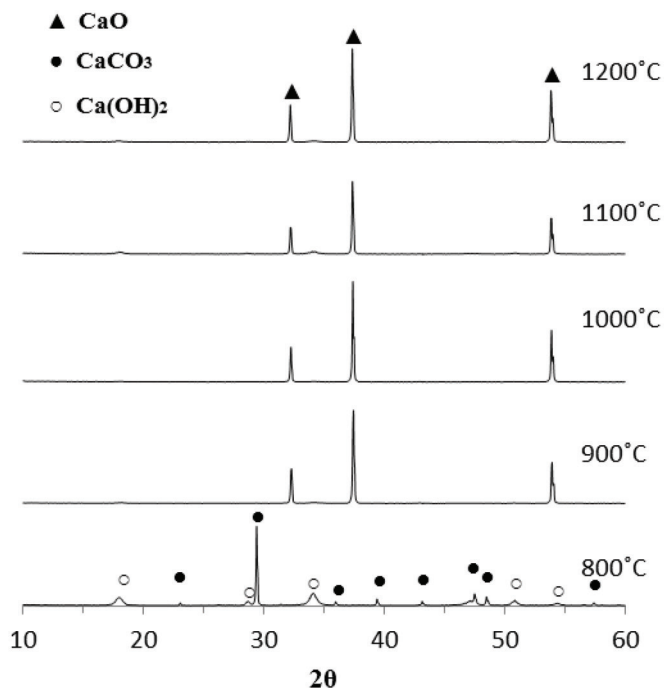
Rysunek 1. Analiza termiczna skorupki jaj kurzych.

Figure 1. Thermal analysis of chicken eggshells.

Na podstawie powyższej analizy dobrano odpowiedni zakres temperatur procesu. Kalcynację zmielonego materiału prowadzono w piecu komorowym w atmosferze powietrza w zakresie temperatur 800-1200°C przez 3 godziny. Prowadzenie procesu w danym zakresie temperaturowym miało na celu zbadanie wpływu temperatury kalcynacji skorupki jaj kurzych na właściwości fizykochemiczne otrzymanych w dalszych etapach fosforanów wapnia.

Na podstawie analizy XRD (rys. 2) wykazano, iż materiał kalcynowany w temperaturze 800°C zawiera w swym składzie aż 78,9% CaCO_3 (29,4°, 35,5°, 39,4°, 43,2°, 47,5° oraz 21,1% Ca(OH)_2 (18°, 34,4° oraz 50,9°), co świadczy o nieskuteczności procesu. Zastosowanie wyższych temperatur w zakresie od 900°C do 1200°C pozwoliło na otrzymanie pożądanego produktu w postaci tlen-

ku wapnia, dla którego maksima dyfrakcyjne występują przy wartościach kąta 2θ : $32,2^\circ$, $37,3^\circ$ oraz $53,9^\circ$. Na podstawie otrzymanych wyników próbkę prażoną w najniższej temperaturze wykluczono z dalszych etapów zadania badawczego.



Rysunek 2. Dyfraktogramy produktów kalcynacji skorupki jaj kurzych.

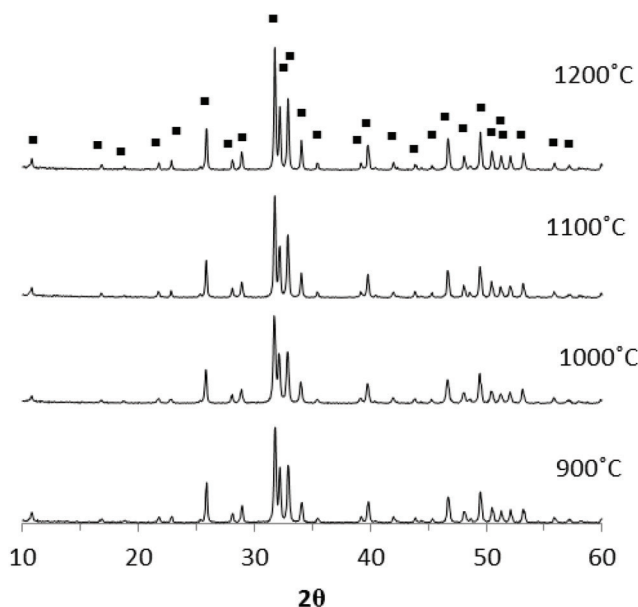
Figure 2. XRD patterns of calcined chicken eggshells.

Syntezę hydroksyapatytu przeprowadzono metodą moką, stosując jako substraty zawiesinę wodorotlenku wapnia pozyskanego z produktu kalcynacji skorupki jaj oraz roztwór kwasu fosforowego(V) o stężeniach odpowiednio 0,5 M oraz 0,3 M. W przygotowanych roztworach oznaczono stężenie poszczególnych substancji zgodnie z normami: PN-88C-87015 oraz PN-R-64803.

Do naczynia reakcyjnego odmierzone 500 ml przygotowanej z przekalcynowanych skorupki, zawiesiny Ca(OH)_2 , a następnie dodano 25 ml wody amoniakalnej w celu utrzymania zasadowego pH reakcji. Następnie do mieszaniny reakcyjnej wkraplało przygotowany roztwór kwasu fosforowego(V). Otrzymaną suspensję mieszano przez 1h i pozostawiono na 24h celem dojrzewania osadu, po czym przesączono, przemyto i wysuszono w 105°C .



Badania rentgenograficzne pozwoliły na analizę składu fazowego przygotowanych próbek. Na ich podstawie wykazano, iż jedyną obecną fazą krystaliczną we wszystkich proszkach jest hydroksyapatyt. Każdy z dyfraktogramów próbek otrzymanych z tlenku wapnia po kalcynacji skorupki jaj kurzych charakteryzuje się porównywalną intensywnością, co przekłada się na równoważny stopień krystaliczności hydroksyapatytu w poszczególnych próbkach. Maksima dyfrakcyjne dla badanych próbek występują w tych samych położeniach kątowych ($25,9^\circ$, $31,8^\circ$, $32,2^\circ$, $32,9^\circ$, $39,8^\circ$, $46,7^\circ$, $49,5^\circ$).



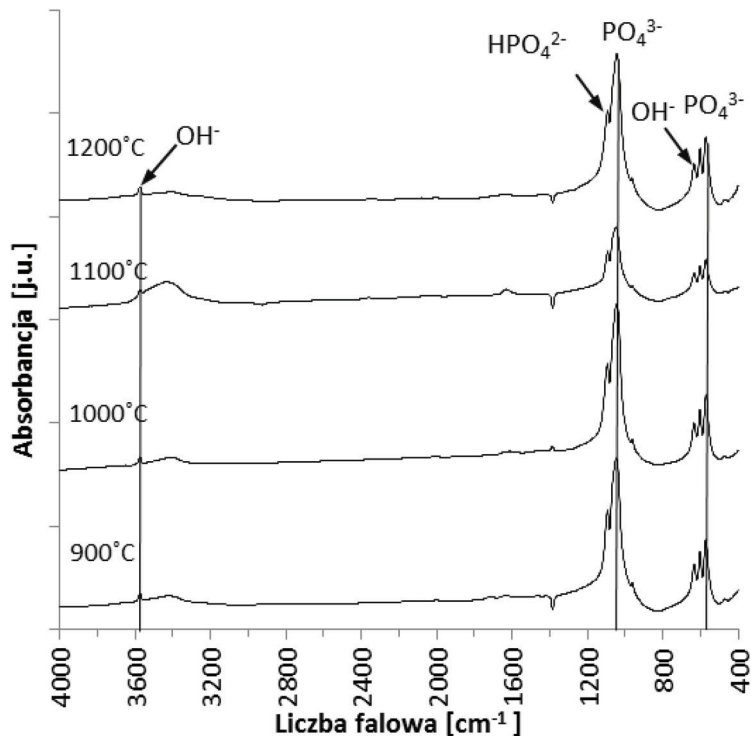
Rysunek 3. Dyfraktogramy proszków HAp.

Figure 3. XRD patterns of HAp powders.

Analiza absorpcyjnych widm w podczerwieni wszystkich proszków hydroksyapatytowych potwierdza występowanie charakterystycznych grup obecnych w HAp. Piki w zakresie liczby falowej $600\text{--}580\text{ cm}^{-1}$ przypisywane są występowaniem potrójnie zdegenerowanych drgań zginających O-P-O, pochodzących od grup PO_4^{3-} . Piki o największej intensywności występujące w granicach $1150\text{--}970\text{ cm}^{-1}$ związane są z potrójnie zdegenerowanymi, asymetrycznymi drganiami rozciągającymi P-O.

Maksima absorpcyjne występujące przy 640 cm^{-1} odpowiadają drganiom O-H pochodzących od grup hydroksylowych. Szeroki pik o bardzo małej intensywności w zakresie $1600\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$ prawdopodobnie pochodzi od drgań rozciągających H-O-H związanych z obecnością w materiale śladowych ilości

wody. Podobny pik o maksimum przy 2350 cm^{-1} wskazuje na obecność CO_2 w atmosferze prowadzenia analizy. Charakterystycznym dla struktury HAp są pasma występujące przy liczbie falowej ok. 3500 cm^{-1} , które spowodowane są drganiem rozciągającymi grup OH^- .



Rysunek 4. Widma FT-IR proszków HAp.

Figure 4. FT-IR spectra of HAp powders.

Zawartość fosforu w analizowanych próbkach waha się w granicach 17,24-18,09%, natomiast wapnia 36,55-40,66%. Stosunek molowy wapnia do fosforu zawiera się w granicach 1,64-1,72, co wskazuje na występowanie nieznacznych odstępstw od stechiometrii (1,67).

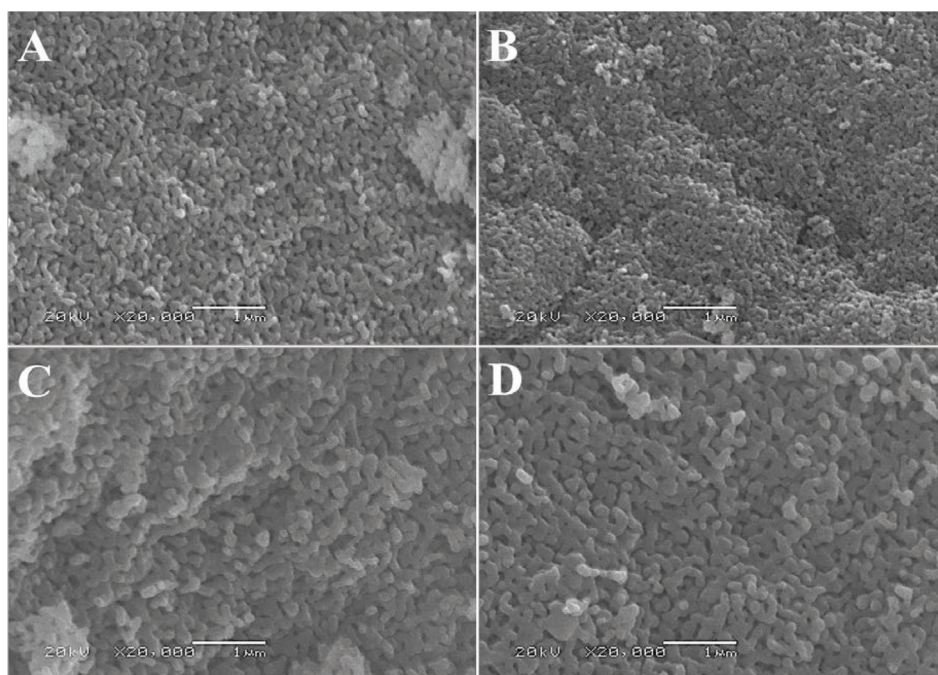
Analiza morfologii powierzchni otrzymanych proszków hydroksyapatytu (rys.5) wskazuje na występowanie aglomeratów ziaren hydroksyapatytu o nieregularnym kształcie i rozmiarze. Ponadto obserwuje się kryształity o kształcie zbliżonym do eliptycznego, a ich rozmiar mieści się w zakresie od 100 do 300 nm. Powierzchnia próbki, do której syntezy wykorzystało materiał kalcynowany w 1000°C wykazała, iż proszek charakteryzuje się mniejszym rozmiarem kryształitów, niż w przypadku pozostałych próbek od 50 do 100 nm. Poza

tym w przygotowanej serii badawczej nie są dostrzegalne wyraźne różnice w rozmiarach, kształcie czy zdolności do aglomeracji ziaren hydroksyapatytowych.

Tabela 1. Wyniki oznaczenia wapnia, fosforu i stosunku molowego Ca/P w syntezowanych materiałach.

Table 1. Results of calcium and phosphorus content determination and Ca/P molar ratio in synthesized materials.

Oznaczenie	Temperatura kalcynacji [°C]			
	900	1000	1100	1200
Wapń [%]	36,55±0,01	40,66±0,02	40,10±0,01	40,33±0,03
Fosfor [%]	17,24±0,01	18,00±0,01	18,09±0,05	17,99±0,03
Ca/P	1,65	1,75	1,72	1,72



Rysunek 5. Mikrofotografie SEM otrzymanych proszków HAp, A) 900°C, B) 1000°C, C) 1100°C, D) 1200°C.

Figure 5. SEM microphotography of HAp powders A) 900°C, B) 1000°C, C) 1100°C, D) 1200°C.

WNIOSKI

Przeprowadzone badania potwierdzają, że wykorzystując jako źródło wapnia skorupki jaj kurzych uzyskuje się pożądaný produkt, jakim jest hydroksyapatyt. Wykazano, że minimalna temperatura pozwalająca na całkowitą kalcynację materiału to 900°C. Na podstawie analizy rentgenograficznej dowiedziono, iż jedyną fazą krystaliczną w przygotowanej serii badawczej jest HAp, a próbki charakteryzują się porównywalnym stopniem krystaliczności. Ponadto w zależności od założonych warunków procesu, otrzymany materiał wykazuje nieznaczne różnice we właściwościach tj. rozmiar krystalitów i ich kształt oraz procentowa zawartość wapnia i fosforu. Wykorzystanie skorupki jaj do syntezy hydroksyapatytu jest alternatywą dla klasycznych metod otrzymywania materiału implantacyjnego. Opracowanie metod otrzymywania bioaktywnych HAp może być ważnym krokiem w kierunku stworzenia nowej generacji biomateriałów.

LITERATURA

- Szymański A., (1991): *Biomineralizacja i biomateriały*, Warszawa: PWN.
- Ślósarczyk A., Sobierska E., Paszkiewicz Z. (1994): *Hydroksyapatyt jako materiał implantacyjny*, Ceramics, 46: 155–159.
- Ślósarczyk A., (1997): *Bioceramika hydroksyapatytowa*, Kraków: Polskie Towarzystwo Ceramiczne.
- Świeczko-Żurek B., (2009): *Biomateriały*, Gdańsk: Wyd. Politechniki Gdańskiej.
- Ślósarczyk A., (2003): *Biomateriały ceramiczne, Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000*, tom 4: *Biomateriały*, Warszawa, Polska Akademia Nauk: 99-156
- Pamuła E. (2008): *Biomateriały dla inżynierii tkankowej: badania nad kształtowaniem struktury i właściwości biologicznych poliestrów alifatycznych*, Kraków: Akapit.
- Sachlos E., Czernuszka J.T. (2003): *Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication. Technology to the production of tissue engineering scaffolds*, Europeans Cells and Materials, 5:29 – 40.
- Marciniak J. (2002): *Biomateriały*, Warszawa: Wyd. Politechniki Śląskiej.
- Łaskawiec J., Michalik R., (2008): *Zagadnienia teoretyczne i aplikacyjne w implantach*, Gliwice: Wyd. Politechniki Śląskiej.
- Kusrini E., Pudjiastuti A.R., Astutiningsih S., I in. (2012): *Preparation of Hydroxyapatite from Bovine Bone by Combination Methods of Ultrasonic and Spray Drying*, Bio-Chemical and Environmental Sciences (ICBEE'2012).

Balazsi C., Weber F., Kover Z. (2007): *Preparation of Calcium Phosphate Bioceramics from natural resources*, Journal of the European Ceramics Society, 27: 1601-1606.
Ooi C.Y., Hamdi M., Ramesh S. (2007): *Properties of hydroxyapatite produced by annealing of bovine bone*, Ceramics International, 33: 1171-1177.

Barakat N.A., Seob Khil M., Omran A.M i in. (2009): *Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods*, Journal of materials processing technology, 209: 3408-3415.

Ben-Nissan B. (2003): *Natural bioceramics: from coral to bone and beyond*, Current Opinion in Solid State and Materials Science, 7: 283-288.

Pekka Y. (2006): *Applications Of Coralline Hydroxyapatite With Bioabsorbable Containment And Reinforcement As Bone Graft Substitute*, Academic dissertation, Helsinki.

Sivakumar M., Sampath T.S., Kumart K.L. (1996): *Development of hydroxyapatite derived from Indian coral*, Biomaterials, 17: 1709-1714.

Podziękowania

*Badania realizowane w ramach projektu LIDER/037/481/L-5/13/NCBR/2014
finansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBR).*

Klaudia Pluta, Dagmara Malina, Agnieszka Sobczak-Kupiec
Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki
Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej
Instytut Chemii i Technologii Nieorganicznej
ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków
e-mail: plutaklaudia@chemia.pk.edu.pl

Wpłynęło: 19.09.2016

Akceptowano do druku: 19.10.2016