

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL

KEEMIASTEHNIKA INSTITUUT

KESKKONNAKAITSE JA KEEMIASTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

**L-seriini ja fosfo-L-seriini sidumine vesilahustes Cu ja Zn asendatud
Ca-hüdroksüülapatiitidega**

Magistritöö

Frieda Kriisa

Juhendaja: Kaia Tõnsuaadu,

Anorgaaniliste materjalide teaduslaboratoorium,

vanemteadur

Keemia- ja keskkonnakaitse tehnoloogia õppekava KAKM02

2016

Autorideklaratsiooni vorm

Deklareerin, et käesolev magistritöö, mis on minu iseseisva töö tulemus, on esitatud Tallinna Tehnikaülikooli magistrikraadi taotlemiseks ja et selle alusel ei ole varem taotletud akadeemilist kraadi.

Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on viidatud või (avaldamata tööde korral) toodud autorlus välja põhitekstis.

.....

Frieda Kriisa

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1.1. Apatiitide keemiline koostis, struktuur ja omadused	6
1.1.2. Apatiitide leidumine looduses	9
1.1.3. Apatiitide süntees	9
1.1.4. Kasutusala	10
1.2.1. Aminohapped	11
1.2.2. Aminohapete omadused	12
1.2.3. Kompleksühendid.....	14
1.2.4. Aminohapete adsorptsioon apatiidi pinnal	16
1.2.5. Kokkuvõtte ja töö eesmärk	18
2. TÖÖ EKPERIMENTAALNE OSA	20
2.1. Kasutatud kemikaalid	20
2.2. Kasutatud analüüsimeetodid ning katseseadmed	21
2.3. Katse käik	21
3. TULEMUSED JA ARUTELU	22
3.1. Aminohapete tiitrimiskõverad	22
3.2. Lahuste pH muutus	24
3.3. Katioonide sisaldus OPL-Ser ja L-Ser lahustes	26
3.3. Lahuste UV spektroskoopiline analüüs	30
3.4. Termiline analüüs	36
3.5. Tahke faasi IP spektroskoopiline analüüs	39
KOKKUVÕTE	44
SUMMARY	46
KASUTATUD KIRJANDUS	48
LISAD	51

KASUTATUD LÜHENDID

AAS – Aatomabsorptsioon-spektromeetria (ingl *Atomic Absorption Spectroscopy*)

ATR – Nõrgendatud täielik sisepeegeldus (ingl *Attenuated Total Reflectance*)

CaAp – Kaltsiumapatiit (ingl *Calcium Apatite*)

ClAp – Kloorapatiit (ingl *Chlorapatite*)

CuAp – Vaskapatiit (ingl *Copper Apatite*)

FAP – Fluorapatiit (ingl *Fluorapatite*)

FT-IR – Fourier' teisendusega infrapunaspektroskoopia (ingl *Fourier transform infrared spectroscopy*)

Glu – Glutamiinhape (ingl *Glutamic acid*)

Gly – Glütsiin (ingl *Glycine*)

HAp – Hüdroksüapatiit (ingl *Hydroxyapatite*)

His – Histidiin (ingl *Histidine*)

L-Ser – L-Seriin (ingl *L-Serine*)

L-Pro – L-Proliin (ingl *L-Proline*)

OPL-Ser – Fosfoseriin (ingl *Ortho-Phospho-L-Serine*)

PZC – null-laengu punkt (ingl *Point of Zero Charge*)

ZnAp – Tsinkapatiit (ingl *Zinc Apatite*)

SISSEJUHATUS

Kasvav nõudlus ja hind maailmaturul on loonud ajendi Eesti rahvusliku rikkuse ehk fosforiidiks ladestunud fluorkarbonaatapatiidist koosnevate lingulaatide kojapoolmete rikka liivakivi uurimise Põhja-Eesti kivimites. Lisaks fosforhappe, väetiste ning pesuaine komponentide tootmisele looduslikest apatiitidest, on üha enam pakkunud huvi sünteetiliste apatiitide keemiline olemus ja uute kasutusvalade leidmine.

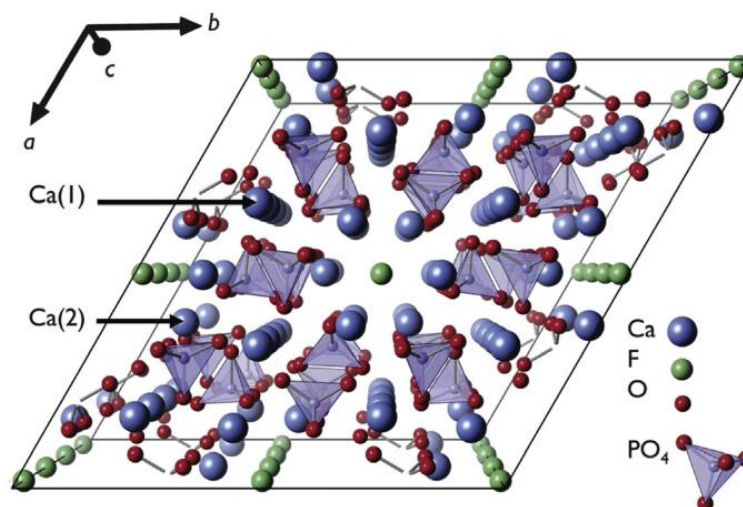
Võime siduda oma struktuuri katalüütiliselt aktiivseid katioone, adsorbeerida ning moodustada kompleksühendeid orgaaniliste ja metallorgaaniliste ühenditega võimaldavad apatiite kasutada madala keskkonnamõju ning kõrge efektiivsusega heterogeensete katalüsaatorite sünteesimiseks. [1] Lisaks on võimalik bioühilduvate omadustega apatiite kasutada meditsiinis luude asendusmaterjalidena või ravimikandjatena. Bioapatiitides (luud ja hambad) on aminohapetel katalüütiline roll orgaanilises sünteesis (nt hammaste mineraliseerumine). Seetõttu on biomolekulaarsetes süsteemides huviorbiidis aminohapete ja apatiitide metalli-ioonidest moodustunud kompleksühendid, mis sarnanevad bioaktiivsetele tsentritele ning on seotud bioloogilistes funktsioonides metallide toksikoloogia ning toiteainete ringlusega. [2,3]

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida aminohapete seostumist apatiitidega, hinnates lahuse omaduste (pH, kontsentratsioon) ning apatiidi koostise mõju sidumisprotsessile. Töös uuriti seriini (L-Ser) ning fosfaatrühma sisaldava fosfoseriini (OPL-Ser) seostumist sünteetiliste Ca- ning osalise Cu ja Zn asendustega hüdroksüülapatiitidega vesilahustes.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1.1. Apatiitide keemiline koostis, struktuur ja omadused

Apatiit on fosforit ja kaltsiumit sisaldav mineraal, mille keemiline üldvalem on $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$, kus X on tavaliselt hüdroksiid-, fluoriid- või kloriidioon. Vastavad nimetused on hüdroksiapatiit (HAp), fluorapatiit (FAp) ning kloorapatiit (ClAp). Apatiidi kristallid on heksagonaalse struktuuriga ja kuuluvad ruumigruppi $p6_3/m$. Joonisel 1.1 on esitatud Ca, F, O ning PO_4 paikemine FAp kristallivõres. Heksagonaalsel teljel paiknevaid ühevalentseid anioone (X) ümbritsevad 6 Ca(2) aatomit, mis moodustavad telje ümber kanali. Tetraeedriline PO_4 seob kolme hapniku aatomiga Ca(1) ning neljanda hapniku aatomiga Ca(2). F^- ioonid asetsevad Ca aatomiga samal tasapinnal. OH^- ning Cl^- ioonid on mõõtmetelt suured ning asetsevad üleval või allpool tasapinda, põhjustades kõrvalekaldeid kristalli sümmeetrias. [1,4,5,6]



Joonis 1.1. FAp-i heksagonaalne struktuur, milles Ca^{2+} ning F^- on seotud tetraeedrilise PO_4^{3-} iooniga. [4]

Selline struktuur võimaldab mitmesuguseid asendusi nii katioonide kui ka anioonide positsioonides [5]. Nii looduslike kui ka sünteetiliste apatiitide enamlevinud asendused on esitatud tabelis 1.1. Apatiitide erinevad asendused võivad toimuda samal ajal ning sõltuvalt keemilisest koostisest, on võimalik saada uute omaduste ja kasutusomadega apatiite. Struktuursed asendused mõjutavad oluliselt apatiidi keemilisi ja füüsikalisi omadusi. [1,4]

Tabel 1.1. Enamlevinumad ühe-, kahe- ja kolmevalentsete ioonide asendused apatiidis. [1,4,7]

$Me_{10}(XO_4)_6Y_2$	
Me	$Ca^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, Pb^{2+}, Cd^{2+}, Mn^{2+},$ $Mg^{2+}, Sr^{2+}, Fe^{2+}, Ni^{2+}, Na^+, K^+, \dots$
XO ₄	$PO_4^{3-}, AsO_4^{3-}, VO_4^{3-}, CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, SiO_4^{4-}, \dots$
Y	$F^-, Cl^-, I^-, Br^-, OH^-, O^{2-}, S^{2-}, CO_3^{2-}, \dots$

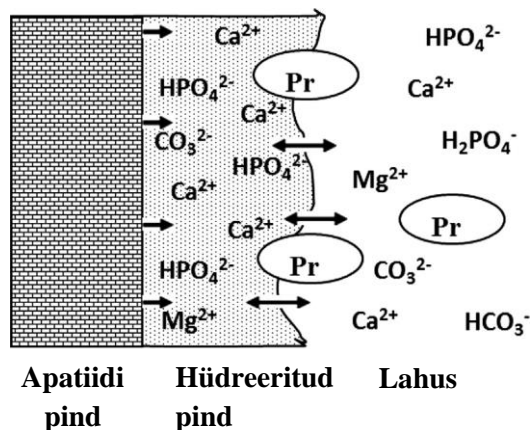
Apatiidi kristallid on nõeljad heksagonaalsed prismad. Nende värvus sõltub lisanditest, kuid enamasti on apatiidid värvuselt valged, hallikad, rohelised, kollakad, lillakad või sinised. Apatiitide suhteline kõvadus Mohsi skaala alusel on 5 ning tihedus jääb vahemikku 3,1 - 3,2 g/cm³. Apatiitide null-laengu punkt (pzc) jääb pH vahemikku 6,5 - 8,5. [5,6,8]

Apatiitide omadused sõltuvad nii Ca/P molaarsuhtest kui ka apatiidi eripinnast. Stõhhiomeetrilise kaltsiumapatiidi Ca/P molaarsuhe on 1,67. Eripind sõltub sünteesi tingimustest ning võib ulatuda 150 - 200 cm²/g-ni. See on väiksem kui teistel katalüütilistel materjalidel (nt tseoliidid). [1,5]

Apatiit on vähelahustuv tahke mineraal ning selle lahustuvus sõltub oluliselt pH-st. Apatiitide lahustuvus vees suureneb pH vähenemisel. Sealjuures väga madalatel pH väärtustel on märgatav järsk lahustuvuse tõus. Kui lahuse pH on 7 on FAp-i lahustuvus 3 ppm ning kui lahuse pH on 4, suureneb lahustuvus 253 ppm-ni [9]. Lahuse kontsentratsiooni suurenemisel suureneb Ca lahustuvus apatiidist. Rõhu suurenemisel apatiidi lahustuvus vees väheneb [9,10]. Mineraalide lahustuvus sõltub kristallvõre energiast. Näiteks lahustub HAp (34092 kJ/mol) kergemini kui FAp (34118 kJ/mol). Vastavad lahustuvuskonstandid on FAp-l $K_s = 3,19 \cdot 10^{-61}$ ning HAp-l $K_s = 7,36 \cdot 10^{-60}$. Mida suurem on apatiidi pinna funktsionaalsete rühmade reaktiivsus, seda suurem on mineraali lahustuvus. Lahustuvust mõjutavad ka struktuursed asendused. Enamtuntud on lahustuvuse suurenemine karbonaatasenduse korral. [5,6]

Fourier' teisendusega infrapunaspektroskoopia (FT-IR) ning tuumamagnetresonantsi spetkroskoopia (SS-NMR) meetoditel põhinevad uuringud on näidanud, et apatiidi kristallid on lahuses kaetud hüdreeritud pinnaga (joonis 1.2). See pind erineb tahke apatiidi pinnast, on väga õrn ega säili kuivades. Mittestõhhiomeetrilise pinnakihi teke tuleneb Ca ja OH rühmade

vakantside tekkimisest ning fosfaatrühma protoneerumisest. Hüdreeritud pind koosneb nõrgalt seotud ioonidest, mida on võimalik liita kasvava apatiidi struktuuri, asendada ioonidega lahusest ning valkudes esinevate laetud rühmadega (Pr). [6,7]



Joonis 1.2. Hüdreeritud pinnal toimub ionivahetus apatiidi ja lahuse vahel. [7]

Apatiidile iseloomulik hüdreeritud pind ja kristalliline struktuur võimaldavad adsorptsiooni ning kompleksi moodustumist ehk ioonide või molekulide sidumist pinna funktsionaalsete rühmadega [10]. Adsorptsioon toimub adsorbendi pinna aktiivsetel tsentritel, on vaadeldav keemilise reaktsioonina ning see lõpeb monomolekulaarse kihi moodustumisega [11].

Adsorptsioon apatiidis on seotud elektrostaatiliste jõududega ning pinna ioonide vahetusprotsessiga. Apatiidi pinnal toimub ionivahetus lahuse ioonidega, milles hüdreeritud pinnal on oluline osa. Lihtsusatud mudeli alusel võib apatiidi pinda kirjeldada kahe funktsionaalse rühmaga, $\equiv\text{CaOH}$ ning $\equiv\text{OPO}_3\text{H}_2$, kus „ \equiv “ tähistab tahket pinda. Lahuses toimub nende rühmade protoneerumine, deprotoneerumine ning lisaks kompleksühendite moodustumine erinevate ioonidega (fosfaat-, kaltsium-, fluoriidioon jt) apatiidi pinnal. Apatiitide pinnal võib toimuda ionivahetusprotsess ning selliselt on võimalik apatiitide koostist modifitseerida. Erinevates uurimistöodes on kirjeldatud mitmed ionivahetusprotsesse nagu karbonaat/vesinikfosfaat, magneesium/kaltsium või strontsium/kaltsium. Ionivahetus sõltub protsessis osalevatest ioonidest ning seda kirjeldatakse Langmuir- tüüpi isotermiga. [6,7,12]

Sarnaselt metallioonide sidumisele võib ka anioonsete molekulide sidumine toimuda nii ionivahetuse kui ka lahustumis – sadenemis protsessi tulemusel. Adsorptsiooni mõjutavad apatiidi pinna laeng, mis sõltub tema koostisest, keskkonna pH-st ja seotava molekuli

funktsionaalsete rühmade konfiguratsioonist. Sõltuvus pinnalaengust ei ole lineaarne, sest katioonide ja anioonide jaotus pinnal ei ole ühtlane. [7]

1.1.2. Apatiitide leidumine looduses

Ideaalse struktuuri ja koostisega apatiite looduses ei leidu - need esinevad keeruliste kompleksühenditena. Apatiite leidub nii meteoriitides kui ka tard-, moonde- ja settekivimites. Vulkaanilise päritoluga FAp ja ClAp leidub näiteks Koola poolsaarel Venemaal ning Nelsoni maakonnas Virginias. Moondekivimitest pärinevad apatiitide suurimad leiukohad asuvad Durango osariigis Mehhikos ning Cape provintsis Lõuna-Aafrikas. Merelise päritoluga settekivimid (fosforiidid) sisaldavad fluorkarbonaatapatiiti ning seda leidub Marokos. Eestis leiduv fosforiit on biogeense tekkega. Imetajate kõvakudedes (luudes ja hammastes) moodustavad apatiidid põhilise anorgaanilise osa. [5,8,13]

1.1.3. Apatiitide süntees

Apatiitide sünteesimiseks on erinevaid meetodeid – märjad sadestamismeetodid, kuivad tahkefaasilised ning sool-geel meetodid. Temperatuuri alusel eristatakse madala ja kõrge temperatuuriga sünteesimeetodeid. Sõltuvalt sünteesi tingimustest erinevad saadud apatiidid nii omadustelt, struktuurilt kui ka morfoloogialt. [1,13,14]

Kuivadest tahkefaasilistest meetoditest tuntakse mehhanokeemilist ning kõrgtemperatuurilist meetodit. Kuivad meetodid sobivad suuremahuliseks tootmiseks, kuid sünteesitud apatiidid on ebakorrapärase kujuga kristallid. [14]

1. Kõrgtemperatuurilise tahke faasi sünteesil Ca- ja P-sisaldavad soolad jahvatatakse ning kaltsineeritakse kõrgel temperatuuril (1000 °C). Kõrge temperatuuri kasutamise tõttu on meetod energiakulukas, lisaks saadakse ebakorrapärase kujuga heterogeensed apatiidi kristallid.
2. Mehhanokeemilisel meetodil saadakse korrapärase struktuuriga apatiidid. Lähteaineid jahvatatakse ja segatakse kuulveskis stöhhiomeetrilises vahekorras. Produktide omadused sõltuvad reagentide tüübist, kuulveskist, kuulide diameetrist ja kuulveski pöörlemiskiirusest.

Märjad meetodid võimaldavad sünteesida korrapärase kujuga apatiite. Apatiitide omadusi on võimalik reguleerida protsessi parameetritega.

1. Keemiline sadestamine on lihtsaim meetod HAp sünteesimiseks, sest HAp on toatemperatuuril vähelahustuv ja stabiilne, kui lahuse pH on suurem kui 4,2. HAp sünteesimiseks võib kasutada kaltsiumi ning fosfaati sisaldavaid reagente (kaltsiumhüdroksiid või kaltsiumnitraat Ca^{2+} allikana ning fosforhape või diammoniumfosfaat PO_4^{3-} allikana). Sünteesi meetodi käigus lisatakse reagente tilkhaaval pidevalt segades kontrollitud pH-ga lahusesse. Saadud suspensiooni hoitakse atmosfäärirõhul, filtreeritakse, seejärel sade pestakse, kuivatatakse ning purustatakse pulbriks.
2. Süntees hüdrotermilisel meetodil viiakse läbi sarnaselt sadestamisega lahuses, kuid küpsemise protsess toimub kõrgendatud temperatuuril (vee keemistemperatuurist kõrgemal) ning rõhu all. Protsessi käigus saadakse stöhhiomeetiline ning kristalliline HAp. Hüdrotermilise meetodi töövahendid on kõrgendatud temperatuuri ja rõhu tõttu kallimad.
3. Sool-geel meetodi rakendamisel segatakse omavahel Ca- ja P- sisaldavad reagentid (alkoksiidid) vees või orgaanilises lahustis. Selle käigus tekivad kompleksühendid, mis moodustavad geeli. Apatiidi saamiseks geel kuivatatakse ja põletatakse. Meetodi puuduseks on toormaterjalide kõrge hind ning sekundaarsete faaside (CaO , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) teke.

Lisaks kasutatakse märja meetodi korral apatiitide sünteesimiseks emulsioon või sonokeemilist meetodit. Viimasel aastakümnel on tähelepanu pööratud apatiitide sünteesile biogeensetest materjalidest (luud, munakoored, veeloomade skelett) ning kombineeritud meetoditele (hüdrotermiline/mehhanokeemiline, hüdrotermiline/hüdrolüüs jt kombinatsioonid). [13,14]

1.1.4. Kasutusala

Apatiitidel on palju kasutusalasid nii keemias kui ka biokeemias. Sünteetilised apatiidid on bioühilduvad ning seega on võimalik kasutada neid meditsiinis luude asendus- ja parandusmaterjalidena, ravimikandjatena või kasutada modifitseeritud kujul valkude ja geenide transportimisel. [1,4,10,13]

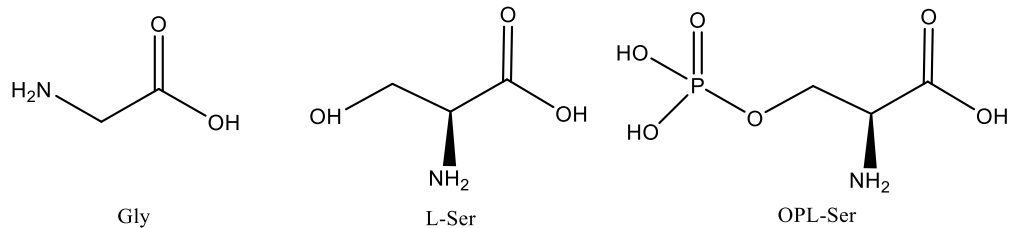
Sb või Mn asendustega FAp-te kasutatakse fluorestsents materjalina luminofoorlampides, Ho või Nd asendusega apatiite aga laserites [5]. Apatiitidel on omadus siduda oma struktuuri mikroelemente ning seetõttu on võimalik neid kasutada muldade ja vee puhastamiseks toksilistest metallioonidest. HAp-id on stabiilsed, vähe lahustuvad ning seega leiavad rakendust heterogeensete katalüsaatoritena orgaanilises sünteesis (Ru/HAp ja Au/HAp katalüsaatorid). [5,10,15]

Looduslik apatiit on oluline toormaterjal väetiste tootmiseks, loomasööda lisandiks ning pesuaine komponendiks (polüfosfaadid). Enamik väetiste tootmisetevõtteid kasutab maakide töötlemiseks lagundusprotsessi väävel- või lämmastikhappega, mille tulemusel saadakse puhastamata H_3PO_4 . Peaaegu kõik apatiitide maagid sisaldavad väikeses koguses (<1 massi%) haruldasi muldmetalle. Seetõttu annab suuremahuline apatiidi maakide töötlemine fosfaatväetiste tootmise kõrvalproduktina suure koguse haruldasi muldmetalle. [5,6,16]

1.2.1. Aminohapped

Aminohapped on olulised „ehituskivid“ elusorganismide valkudes ja ensüümides. Aminohapete keemilist koostist väljendatakse üldvalemiga $H_2N-CHR-COOH$. See molekul sisaldab funktsionaalset amino- ($-NH_2$) ja karboksüülrühma ($-COOH$) ning selle kõrval oleva süsiniku aatomi küljes olevat kõrvalahelat ($-R$). Lihtsaima aminohappe glütsiini (Gly) keemiline struktuur on kujutatud joonisel 1.3. Teistes aminohapetes on R alifaatne, aromaatne või heterotsükliilise jääkrühmaga. Lisaks on joonisel esitatud polaarse külghelaga seriini (L-Ser) ning fosfoseriini (OPL-Ser) struktuurid. Looduses esineb üle 700 aminohappe, millest peamised 20 moodustavad enamiku elusorganismide valgud. Standardaminohapetest eristatakse mittepolaarse, polaarse, happelise või aluselise kõrvalahelaga aminohappeid:

1. Mittepolaarsed külghelaga aminohapped on glütsiin,alaniin, valiin, leutsiin, isoleutsiin, metioniin, proliin, fenüülalaniin ja trüptofaan.
2. Polaarsed külghelaga aminohapped on asparagiin, glutamiin, seriin, treoniin, türosiin ning tsüsteiin.
3. Happelise ahelaga aminohapped on asparagiinhape ja glutamiinhape.
4. Aluselise külghelaga aminohapped on lüsiin, arginiin ning histidiin. [17,18]



Joonis 1.3. Aminohapete keemilised struktuurid - glütsiin (Gly), seriin (L-Ser) ning fosfoseriin (OPL-Ser).

Aminohapped on seotud valkudesse peptiidideme kaudu. Peptiidide moodustub ühe aminohappe karboksüülrühma ning teise aminohappe aminorühma vahel. Polüpeptiidid ning bioloogilise funktsiooniga valgud koosnevad 30-50 lineaarsest aminohappe jäägist. [17,18]

Seriin tuleneb siidi ladinakeelsest nimetusest *sericum*. L-Ser osaleb pea kõikide looduslike valkude koostises. See aminohape on oluline normaalse immuunsüsteemi talitluseks, samuti tagab paljude ensüümide (nt esteraas) funktsioneerimise. [19] L-Ser osaleb puriini- või pürimidiinaluste sünteesil, osaleb mitmete ensüümide aktiivsete tsentrite funktsioneerimisel ning on lähteaineks mitmetele aminohapetele (glütsiin, tsüsteiin, trüptofaan). [3] OPL-Ser on Ser-i ja fosforhappe ester ning moodustub organismis L-Ser-i biosünteesi vaheproduktina. OPL-Ser osaleb nt hammaste mineraliseerumise protsessis. [20,21]

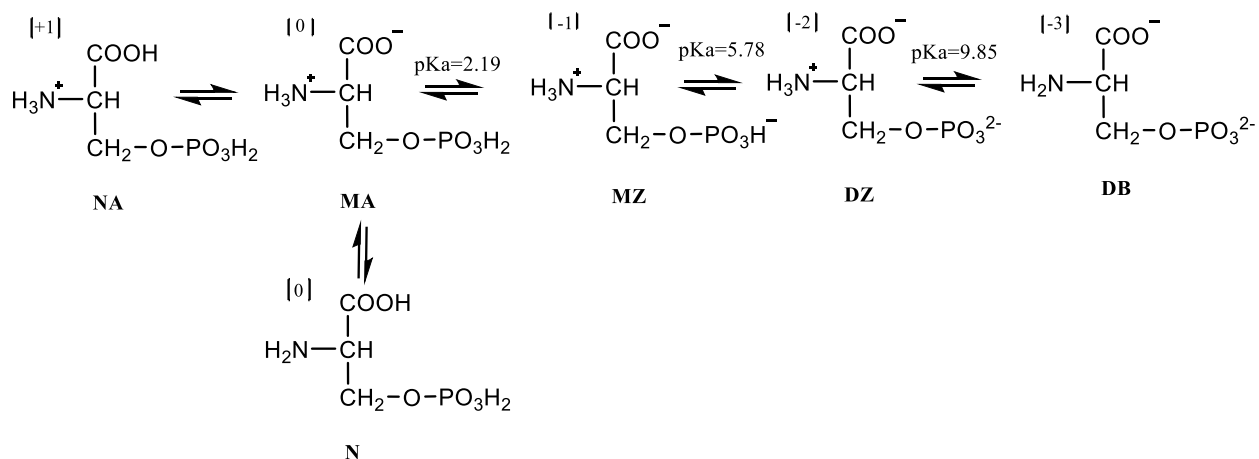
1.2.2. Aminohapete omadused

Aminohapped on värvuseta kristalsed ained, mis lahustuvad hästi vees, vähesel määral alkoholides ning ei lahustu mittepolaarsetes orgaanilistes lahustites. Proliin, hüdroksüproliin, glütsiin jaalaniin on vees väga hästi lahustuvad. Happe või aluse lisamine suurendab aminohapete lahustuvust soola moodustumisega. Teiste aminohapete juuresolek tõstab samuti lahustuvust. Aminohapped ei lahustu puhastes orgaanilistes lahustites (eetrid) polaarsuse tõttu. Süsteiin ja proliin lahustuvad võrdlemisi halvasti etanoolis. [17,18]

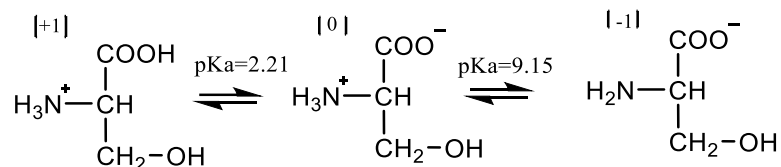
Aminohapped on kiraalsed ehk käelised molekulid. Looduses leidub eelkõige vasakukäelisi ehk L-konfiguratsiooniga aminohappeid. Paremakäelisi ehk D-konfiguratsiooniga aminohappeid esineb suhteliselt harva, näiteks mõningate antibiootikumide koostises. [18]

Aminohapete tugevust iseloomustav dissotsiatsioonikonstant K_a avaldub elektrolüüdi HA ning ionide H^+ ja A^- kaudu. Dissotsiatsioonikonstanti väljendatakse kontsentratsioonide (mol/l) või aktiivsuste kaudu: $K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = \frac{[a_H^+][a_A^-]}{[a_{HA}]}$. Mida väiksem on K_a , seda suurem on pK_a ning seda nõrgema happega on tegemist. Dissotsiatsioonikonstanti on võimalik määrata tiitrimiskõveralt, kui ekvivalentpunkti ümbruses tekib hüppeline pH muutus ning selle saavutamisel on kogu määratav aine titrandiga ära reageerinud. [22]

Aminohapped sisaldavad nii amino- kui ka karboksüülrühma, mille tõttu on võimalik nii positiivselt kui ka negatiivselt laetud iooni teke. Kui lahuse pH on madalam aminorühma dissotsiatsioonikonstandist (pK_a), siis toimub protoneerumine ehk H^+ liitumine lämmastikuga. Kui pH väärtus on suurem kui karboksüülrühma pK_a , toimub deprotoneerumine ning karboksüülrühm omandab negatiivse laengu. Seega sisaldavad aminohapped nende kahe pH väärtuse vahel nii positiivse kui ka negatiivse laenguga rühma ning esinevad vesilahuses tsvitter- ehk kaksikioonina. Skeemil 1 on esitatud OPL-Ser-i dissotsieerumine, vastavad pK_a väärtused ning protoneerumisastmed. Skeemil 2 on esitatud L-Ser dissotsieerumine, vastavad pK_a väärtused ja laengud. [17,18,20,22]



Skeem 1. Fosfoseriini dissotsiatsioon, kus kahetähelise sümboli esimene osa tähistab fosfaatrühma neutraalset, ühealuselist või kahealuselist protoneerumisastet (ingl. *Neutral, Monobasic, Dibasic*) ning teine osa tähistab seriini happelist, tsvitterioonilist või aluselist fragmenti (ingl *Acidic, Zwitterionic, Basic*). [20]



Skeem 2. Seriini dissotsiatsioon, vastavad pKa väärtused ja laengud. [18]

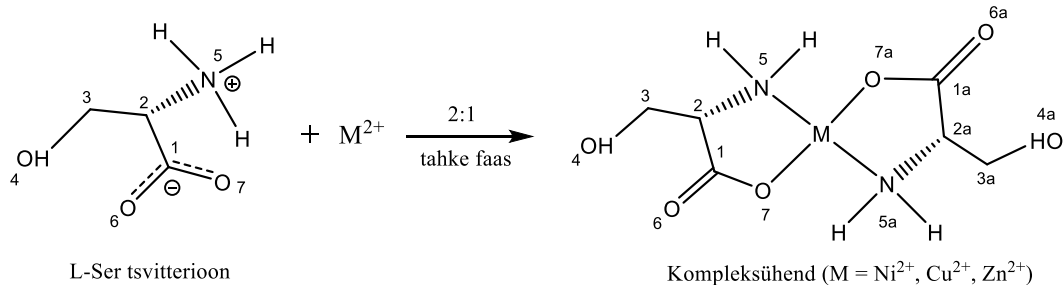
Aminohappeid iseloomustab isoelektriline punkt (pI), mille korral aminohappe elektrilaeng on summaarselt null ning elektrijuhtivus minimaalne. Kui pH on väiksem kui pI käitub aminohape kationina, vastasel juhul anioonina. pI väärtust leitakse amino- ja karboksüülrühma ning ioniseeruvate R- rühmade dissotsiatsioonikonstantide kaudu. [22]

Aminohapped on bidentaatsed ligandid mitmetele metalli-ioonidele. Cu^{2+} ioonidele on iseloomulik moodustada veres aminohapete, peptiidide või teiste biomolekulidega kompleksühendeid. [23] Mitmed ensüümid, nagu kollageenaas ja stromelüsiin sisaldavad Zn^{2+} ioone, mis moodustavad aminohapete (His ja Glu) kõrvalrühmade funktsionaalsete rühmadega kompleksühendeid. [17]

1.2.3. Kompleksühendid

Aminohapped moodustavad metalli-ioonidega mitmesuguseid kompleksühendeid, mis osalevad bioloogilistes protsessides. Metalliooni ja aminohapete kompleksühendeid on põhjalikult uuritud viimastel aastakümnetel, kuna nende omadused sarnanevad biomolekulaarsetes süsteemides osalevatele aktiivsetele tsentritele ning metalli-ioonid on seotud nukleiinhapete konformatsioonide stabiliseerimisega. Lisaks on aminohappe-metall kompleksühendid seotud metallide toksilisuse ning toiteainetega rakkudes. Aminohappe-metall kompleksühendid on potentsiaalsed ravimiasendajad karjakasvatusektoris ning inimeste toidulisandites. Seega on metalli-ioonide kompleksühendite moodustumise protsess oluline eelkõige biokeemia valdkonnas. [2,3]

Kompleksi moodustamine toimub Lewisi happe (metalli-ioon kui elektronipaari akseptor) ja aluse (ligand kui elektronipaari doonor) vahelise reaktsiooni käigus. Skeemil 3 on esitatud L-Ser-i tsvitterioon ning sellele vastava kompleksühendi skemaatiline struktuur tahkes faasis. Selle kompleksühendi moodustumisel seotakse metalli-ioon kahe L-Ser-i tsvitteriooniga. [3,22]



Skeem 3. Aminohappe tsvitteriooni ja metalli-iooni kompleksühendi skemaatiline struktuur, kus M tähistab metalli (Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) ioone. [3]

Kompleksühendite püsivust iseloomustatakse stabiilsuskonstantidega ($\log K_f$). Püsivuskonstandiks K_f nimetatakse kompleksühendi tekkereaktsiooni tasakaalukonstanti, mis avaldub kujul: $K_f = \frac{[ML]}{[M][L]}$. [22]

Kompleksi moodustumine vähendab lahuses olevate ionide kontsentratsiooni. Tabelis 1.2 on esitatud katselises töös uuritud aminohapete kompleksühenditele iseloomulikud $\log K_f$ väärtused [24]. Lähtudes tabeli andmetest, on Cu²⁺ metalliiooni kompleksühend kõige püsivam OPL-Ser-ga, vähem stabiilne kompleks moodustub L-Pro ning L-Ser-ga. Kõige ebapüsivamad kompleksühendid moodustuvad Ca²⁺ ionidega.

Tabel 1.2. Aminohapete kompleksühenditele iseloomulikud püsivuskonstantide väärtused. [24]

	L-Ser		OPL-Ser		L-Pro		
	$\log K_f (25^\circ\text{C})$	μ	$\log K_f (25^\circ\text{C})$	μ	$\log K_f (25^\circ\text{C})$	μ	
H ⁺	$\frac{[HL]}{[L][H]}$	9,05 (± 3)	0,1	9,88 (± 7)	0,1	10,46 (± 7)	0,1
Ca ²⁺	$\frac{[ML]}{[M][L]}$	1,43	0,1	1,9 (± 3)	0,1	-	-
Zn ²⁺	$\frac{[ML]}{[M][L]}$	4,60 (± 6)	0,1	5,84 (± 4)	0,1	5,27	0,1
Cu ²⁺	$\frac{[ML]}{[M][L]}$	7,90 (± 5)	0,1	9,5 (± 1)	0,1	8,83 (± 3)	0,1

*“-”, – andmed puuduvad

1.2.4. Aminohapete adsorptsioon apatiidi pinnal

Aminohapete adsorptsiooni apatiidil on uuritud peamiselt eesmärgiga selgitada elusorganismides toimuvaid protsesse, kus kõvakoed (luud, hambad) on kontaktis biovedelikega. OPL-Ser ning L-Ser adsorptsioon apatiidil on seotud hammaste moodustumise protsessiga. Mineraliseerumise käigus OPL-Ser adsorbeerub HAp pinnale ning blokeerib aktiivsete kristalli tsentrite kasvu. Bioloogiliste kõvakudede analoogina kasutatakse sünteetilist HAp-i. [25]

Erinevad uurimisgrupid on uurinud nii L-ser kui OPL-Ser käitumist apatiitide pinnal ning seoseid, mis seda mõjutavad. Uurimistöodes on näidatud nii kontsentratsiooni, pH kui ka aja mõju sidumiskatsetele. Uurimistöodes on vaadeldud ka OPL-Ser ning L-Ser lahuste adsorptsiooni võime erinevust. Lisaks on kirjeldatud HAp-i ja fosfoseriiniiooni eeldatava pinnakompleksi moodustumist.

Kõrge kontsentratsiooniga L-Ser lahuste adsorptsiooni käitumise olulisust on uuritud hammaste moodustumise seisukohast. Aminohappe adsorptsiooni uurimiseks segati 300 mg HAp (eripind = $52 \text{ m}^2/\text{g}$) ja 10 ml L-Ser lahust (kontsentratsioonide vahemik 0,02-0,1 M) temperatuuril $37,0 \text{ }^\circ\text{C}$ pH = 7,4 ning pH = 10,0 juures. Saadud suspensiooni loksutati 2 tundi ning filtreeriti. Eraldatud lahuses määrati L-Ser kontsentratsioon spektrofotomeetiliselt lainepikkusel 570 nm ning arvutati L-Ser hulk (Γ , $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) apatiidi pinnal. Lisaks määrati HAp ζ – potentsiaali muutus. [26]

Katsest selgus, et pH = 7,4 korral apatiidi pinnale adsoreerunud L-Ser hulk vastab Langmuiri isotermile ning adsorptsioon toimub kompleksi moodustumisega apatiidi pinnal, sealjuures adsorptsiooni pH 10,0 korral praktiliselt ei toimu. Saadud tulemust seletatakse elektrostaatilise interaktsiooniga positiivselt laetud L-Ser aminorühma ning negatiivselt laetud HAp pinna vahel. Lisaks toimub L-Ser pH = 7,4 lahuses märkimisväärne HAp osakeste ζ – potentsiaali muutus, mida L-Ser pH = 10,0 lahuse puhul ei toimu. [26]

Seoseid hammaste mineraliseerumisega on uuritud ka OPL-Ser-i ($\text{H}_2\Psi$, kus Ψ tähistab fosfoseriiniiooni) ning HAp-i puhul. Uurimistöö käigus vaadeldi OPL-Ser-i adsorptsiooni HAp-l erineva kontsentratsiooniga lahustes. Katses segati 1,0 g HAp-i (eripind = $41,0 \text{ m}^2/\text{g}$; Ca/P = 1,57) 10 ml OPL-Ser lahusega (kontsentratsioonide vahemik 2 - 100 mmol/L) ning loksutati 2 ja 24 tundi toatemperatuuril. OPL-Ser kontsentratsiooni muutuse hindamiseks kasutati spektrofotomeetriat küllastunud apatiidi vesilahuse suhtes lainepikkusel 210 või 228 nm. Seotud

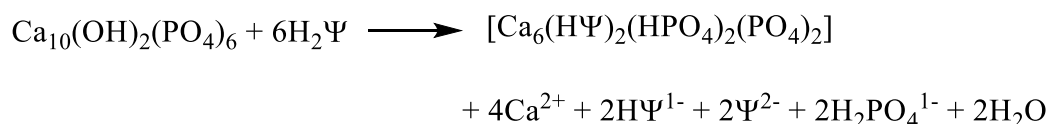
aminohappe hulk A (mol/g) määrati võrrandist $A = V\Delta C/W$, kus V (l) tähistab lahuse ruumala, mis on kontaktis apatiidiga W (g) ning ΔC (mol/l) tähistab alg ja lõpplahuse kontsentratsioonide erinevust. [21]

Kaks tundi loksutatud proovide (OPL-Ser kontsentratsioonid 2 - 12,5 mmol/l) adsorptsiooni isotermid kattuvad proovide isotermidega, mida loksutati 24 tundi. Sellest tulenevalt võib väita, et adsorptsioon või reaktsiooniprotsess muutub ajast sõltumatuks kahe tunniga ning tekib tasakaal. Kõrgematel kontsentratsioonidel (12.5 - 100 mmol/l) toimub järsk adsorptsiooni isotermi tõus, mis on tingitud Ca ning P ionide vabanemisest lahusesse kontsentratsiooni suurenemisel. Ionvahetusprotsessis on apatiidist vabanenud fosfaat- ja kaltsiumioonid lineaarses sõltuvuses fosfoseriini ionide sidumisega. Katsetingimustel 10 ml lahust ja 1 g apatiiti on ioonsuhted vastavalt $Ca/\Psi = 2,05$ ning $P/\Psi = 1,12$. [21]

6 päeva seisnud filtraatides tekib sade, kui OPL-Ser kontsentratsioon on kõrgem kui 80 mmol/L. Tekkinud sade oli sarnane sünteesitud $Ca\Psi\cdot H_2O$ soolale - valged ebakorrapärased kristallid lagunevad 190 °C juures ning omavad identseid funktsionaalsete rühmade neeldumispunkte IP spektrites. [21]

Aminohapetega töödeldud apatiidid pesti, kuivatati ning määrati orgaanika sisaldus põletusmeetodil. Lenduva CO_2 määramine kromatograafiliselt näitas, et katses kasutatud apatiitidel ei esinenud pinnaga seotud OPL-Ser. Apatiidi pinnal optilise ega skaneeriva elektronmikroskoobiga võõraid faase ei esinenud. Apatiitide eripinnaga olulisi muutusi peale adsorptsiooni ei toimunud, kuid kontsentratsiooni suurenemisel toimus eripinna vähenemine. [21]

Ca ja P vabanemine apatiidist lahusesse viitab sellele, et tegemist on ionvahetusprotsessiga ning kompleksi tekkimisega. Eeldatav pinnakompleksi moodustumine on võrrandina esitatud skeemil 4. Võrrandist avaldub, et iga HAp-i mooli kohta kulub 6 mooli OPL-Ser-i. Sellest 2 mooli kasutatakse kompleksühendi moodustamiseks, 4 mooli esinevad lahuses $H\Psi^{1-}$ ning Ψ^{2-} ionidena. [21]



Skeem 4. HAp-i ja fosfoseriiniiooni eeldatava pinnakompleksi moodustumine.

Lisaks eelnevale on hinnatud ka aja mõju adsorptsioonile. HAp-i (eripind = 23 m²/g; Ca/P = 1,71) sisaldavast tuubist juhiti läbi 0,5 - 8,0 mM OPL-Ser lahused (pH = 7) ning määrati adsorptsiooni sõltuvus ajast UV-Vis spektrofotomeetriaga lainepikkusel 540 nm. Samaaegselt määrati ζ – potentsiaali muutus. Selgus, et küllastuse tekkimisel adsorbeerus HAp-i pinnale maksimaalselt 3,5 μmol/m² (va 0,5 mM OPL-Ser lahuses, kui küllastuse piiriks oli 1,06 μmol/m²). Apatiidi pinnale on pH = 7 juures iseloomulikud ≡CaOH²⁺, ≡HPO₄²⁻ ja ≡OH₂^o rühmad, kus „≡“ tähistab tahket pinda. OPL-Ser adsorptsiooni pH = 7 juures seletatakse apatiidi monomolekulaarse kihi täitumisega ning OPL-Ser HL²⁻ rühma ja apatiidi pinna ≡CaOH²⁺ vahelise kompleksi tekkega. Mõõdetud ζ – potentsiaali väärtused saavutasid tasakaalu ja olid vastavuses HAp-i monomolekulaarse kihi täitumisega. [25]

Lisaks on kirjeldatud uurimistöodes OPL-Ser-i ning Ser-i 0.1 M lahuste (pH = 7) adsorptsiooni võime erinevust. On läbi viidud katseid, kus loksutati 100 mg apatiiti (eripind = 155 m²/g; Ca/P = 1,49) 5 ml aminohappe lahusega (kontsentratsioonide vahemik 0,1 - 10 mmol/L) 1 tund toatemperatuuril. Aminohappe kontsentratsiooni muutust määrati fluorestsents detektoriga täiustatud vedelkromatograafia lainepikkusel 340 nm. [27]

Aminohapete kontsentratsioonide vahemikus 0,18 - 10 mmol/l on OPL-Ser adsorptsiooni võime apatiidile 4 - 5 korda suurem kui L-Ser-l. Kui 0,183 mmol/l OPL-Ser-st adsorbeerub apatiidi pinnale 0,052 μmol/m², siis 0,200 mmol/l Ser-st adsorbeerub 0,012 μmol/m². OPL-Ser ja L-Ser adsorptsioon kasvab lahuse kontsentratsiooni suurenedes. Ser-ga töödeldud apatiitide IP spektrites esinesid COO⁻ ja NH₃⁺ rühmadele iseloomulikud sümmeetrilised võnkumised lainearvudel 1427 cm⁻¹ ja 1469 cm⁻¹. OPL-Ser töödeldud apatiitidel esinesid NH₃⁺ ja COO⁻ sümmeetriliste võnkumistega seotud neeldumispäiged lainearvul 1465 ja 1422 cm⁻¹. Uusimustöös leiti, et OPL-Ser sisaldav fosfaatrühm suurendab aminohappe adsorptsiooni apatiidile ning tekkiva kompleksühendi püsivust. [27]

1.2.5. Kokkuvõte ja töö eesmärk

Nii HAp kui ka aminohapetel on oluline osa elusorganismide biokeemilistes protsessides ja nende omadused on mõjutatud paljudest faktoritest. L-Ser ning OPL-Ser lahuste sidumisvõime uurimisel HAp-ga on leitud, et adsorptsioon või reaktsiooniprotsess saavutab tasakaalu 2 tunniga. Sidumine apatiidi pinnaga toimubioonvahetuse või elektrostaatilise vastasmõju tõttu positiivselt

laetud aminorühma ja negatiivselt laetud HAp pinna vahel ja kompleksühendite moodustumise tõttu HAp pinnal.

Katsetest on selgunud, et L-Ser (pH = 7) ja OPL-Ser adsorptsioon HAp pinnale madalatel kontsentratsioonidel vastab Langmuiri isotermile. pH = 10 korral on L-Ser adsorptsioon HAp-le peaaegu olematu. OPL-Ser-i ionvahetusprotsessis (pH = 2) on apatiidist vabanenud fosfaat- ja kalsiumioonid lineaarses sõltuvuses seriinfosfaadi ionide sidumisega. Küllastuse tekkimisel adsorbeerub HAp-i pinnale OPL-Ser lahustest (0,5 - 8,0 mM) maksimaalselt 3,5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. OPL-Ser adsorptsiooni pH = 7 juures seletatakse apatiidi monomolekulaarse kihi täitumisega ning OPL-Ser HL²⁻ rühma ja apatiidi pinna $\equiv\text{CaOH}^{2+}$ vahelise kompleksi tekkega. OPL-Ser-is sisalduv fosfaatrühm suurendab aminohappe adsorptsiooni apatiidile ja tekkiva kompleksühendi püsivust ning seega on adsorptsiooni võime 4 - 5 korda suurem kui L-Ser-l.

Apatiidi omadused sõltuvad asendustest struktuuris ja aminohapetega tekkivate komplekside tugevused sõltuvad seotavast kationist, seega on huvipakkuv kationsete asenduste mõju aminohapete sidumisele apatiidiga.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida aminohapete seostumist apatiitidega, hinnates lahuse omaduste (pH, kontsentratsioon, ionne koostis) mõju sidumisprotsessile. Töös uuriti seriini (L-Ser) ning fosfaatrühma sisaldava fosfoseriini (OPL-Ser) seostumist sünteetiliste Ca- ning osalise Cu ja Zn asendustega hüdroksüülapatiitidega vesilahustes.

Töös uuriti aminohappe lahuste pH muutuseid, määrati AAS-ga Ca²⁺, Zn²⁺ ja Cu²⁺ kationide sisaldus ning registreeriti UV-spektrid aminohappe kontsentratsiooni ning lahuses olevate kationide sisalduse hindamiseks. Aminohapetega loksutatud apatiitides toimuvate muutuste hindamiseks registreeriti FT-IR spektrid ning viidi läbi termoanalüüs koos eralduvate gaaside analüüsiga.

2. TÖÖ EKPERIMENTAALNE OSA

2.1. Kasutatud kemikaalid

Antud töö uurimisobjektideks olid sünteetilised apatiidid - kaltsiumapatiit (HAp), tsinkapatiit (ZnAp) ning vaskapatiit (CuAp). Tabelis 2.1 on esitatud töös kasutatud apatiitide omadused – eripinnad, Ca, P, Zn, Cu protsendilised sisaldused ning Ca/P moolsuhe. Eksperimentaalses töös kasutatud aminohapped, nende kaubanduslikud nimetused, vastavad lühendid, molekulivalemid ja -massid on esitatud tabelis 2.2.

Tabel 2.1. Töös kasutatud apatiitidele vastavad eripinnad ning Ca, P, Zn ja Cu sisaldused apatiidis.

Apatiit	Eripind, m ² /g	Ca, %	P, %	Zn, %	Cu, %	Ca/P moolsuhe
CaAp	126	38,25	18,28			1,62
ZnAp	137	37,32	18,08	0,57		1,60
CuAp	154	36,10	17,54		0,91	1,59

Tabel 2.2. Töös kasutatud aminohapped, nende vastavad lühendid, molekulivalemid ja – massid

Aminohape	Kaubanduslik nimetus	Tootja	Lühend	Molekuli- valem	M, g/mol
Seriin	L-Serine	Sigma- Aldrich	L-Ser	C ₃ H ₇ NO ₃	105,09
Fosfoseriin	O-Phospho-L- Serine	Sigma- Aldrich	OPL-Ser	C ₃ H ₈ NO ₆ P	185,07

2.2. Kasutatud analüüsimeetodid ning katseseadmed

Lahuste pH määramiseks kasutati Mettler Toledo elektroodi DG-112 Pro, mida kalibreeriti Mettler Toledo pH puhverlahustega (4,01; 7,00; 9,21). Aminohapete tiitrimine viidi läbi Mettler Toledo T90 titraatoriga (titrant KOH 0,1 M, doseerimiskiirus 0,5 ml/min, segamise kiirus 30 %, $\text{pH}_{\text{lõpp}} = 12$).

Katioonide Ca^{2+} , Zn^{2+} ja Cu^{2+} sisalduse määramiseks kasutati aatomabsorptsiooni AAS Spektra 220F atsetüleen-õhk gaasisegus. Ca sisalduse määramine lainepikkusel 422,7 nm ning 239,9 nm (optimaalsed tööpiirkonnad vastavalt 0,01 - 3 $\mu\text{g/mL}$ ja 2 - 800 $\mu\text{g/mL}$). Cu sisalduse määramine lainepikkusel 327,4 nm (optimaalne tööpiirkond 0,1 - 24 $\mu\text{g/mL}$) ning tsink sisalduse määramine lainepikkusel 213,9 nm (0,01 - 2 $\mu\text{g/mL}$).

UV-spektreid mõõdeti Biochrom Libra S70PC kahekiirelise UV/Vis spektrofotomeetriga. Mõõtmised viidi läbi ultravioletses spektrialas lainepikkuse vahemikus 190 - 390 nm 2 nm intervalliga 10 mm kvartsküvetis.

Termiliseks analüüsiks kasutati Setaram LabSys-Evo 1600 termoanalüsaatorit ning Pfeiffer Quadrupole massispektroskoopi (MS) eralduvate gaaside analüüsiks. Mõõtmised viidi läbi Pt tiiglis Ar ja 20 % O_2 segu voolus temperatuurivahemikus 30 - 1200 °C, gaasivoo kiirus 60 ml/min, temperatuuri tõusu kiirus 10 °C/min. Registreeriti osakeste eraldumine, mille massi ja laengu suhe (m/z , kus m on iooni mass, z on iooni laeng) on 15 (NH_3), 18 (H_2O), 30 [N_xO_y (NO , N_2O , NO_2)] ning 44 (CO_2).

Infrapunaspektrite registreerimiseks kasutati teemantkristalliga Bruker Alpha FT-IR nõrgendatud täieliku sisepeegeldusega (ATR) spektroskoopi. IR-spektrid registreeriti järgmiste parameetrite juures: lahutusvõime 4 cm^{-1} , mõõtepiirkond 400 - 4000 cm^{-1} ja keskmistatavate spektrite arv 24. Spektromeetrit kasutati OPUS programmiga ning spektreid töödeldi OMNIC programmiga.

2.3. Katse käik

Eksperimentaalses töös uuriti aminohapete OPL-Ser ja L-Ser sidumisvõimet sünteetiliste apatiitidega (CaAp, ZnAp ning CuAp) erinevatel aminohappe kontsentratsioonidel ning pH väärtustel. Aminohapete tiitrimiskõverate (Mettler Toledo T90) alusel valiti katseteks apatiitidega lahuste pH väärtused. OPL-Ser sidumiskatseteks valiti kolm pH algväärtust ($\text{pH} = 2$, $\text{pH} = 6$ ja $\text{pH} = 8$). L-Ser sidumiskatseteks valiti kaks pH algväärtust ($\text{pH} = 6$ ja $\text{pH} = 8$). Aminohappe

lahuste kontsentratsioonid jäid vahemikku 0,005 - 0,05 M. Kõik katsed viidi läbi kahe paralleelkatsena.

300 mg apatiiti lisati 50 ml aminohappe lahusele ning loksutati 100 min GFL 3025 rotaatoris. Loksutatud segu tsentrifugeeriti SIGMA 2-16PK-ga 20 min (9000 p/min) ning filtreeriti MUNKTELL 100 g/m² tiheduse filterpaberiga. Filtraadis määrati pH ning võrreldi selle muutust aminohappe algse pH suhtes. Kõikides apatiidiga loksutatud proovides määrati AAS-ga Ca²⁺ sisaldus. Zn või Cu asendusega HAp-ga töödeldud lahustes määrati lisaks Zn²⁺ ja Cu²⁺ katioonide sisaldus.

Aminohappe kontsentratsiooni ning lahuses olevate katioonide sisalduse muutmise hindamiseks valmistati vaskatsetaat ning kaltsiumvesinikfosfaat sooladest lahused, mis sisaldasid 0,005 mg/ml Ca, 0,004 mg/ml P ning 0,0075 - 0,0225 mg/ml Cu. Valmistatud lahustest registreeriti kvartsküvetites UV-spektrid. Lisaks registreeriti apatiitidega loksutatud proovidest UV-spektrid lainepikkuse vahemikus 190-390 nm.

Segu filtreerimisel saadud sade kuivatati EV018 vaakumahjus 60 °C juures ning paralleelkatsete tahked sademed homogeniseeriti uhmris. Tahkete proovide analüüsimiseks registreeriti FTIR-ATR spektrid ning viidi läbi termoanalüüs.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1. Aminohapete tiitrimiskõverad

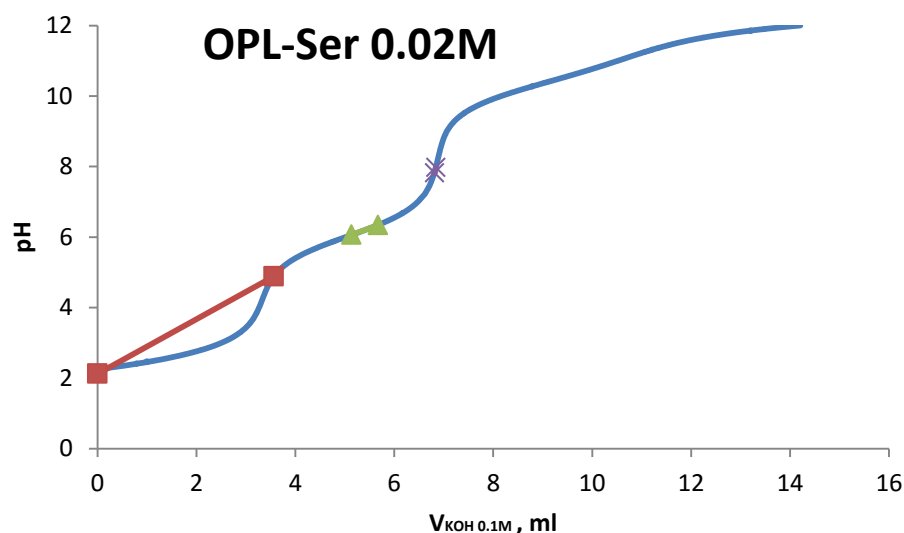
Selleks, et hinnata aminohapete happelisi ja aluselisi omadusi, võeti esmalt vaatluse alla OPL-Ser ja L-Ser tiitrimiskõverad. 0,02 M OPL-Ser lahusesse lisatud titrandi ja pH vaheline seos on esitatud tiitrimiskõvera joonisel 3.1 (titrant KOH 0,1 M, doseerimiskiirus 0,5 ml/min, segamise kiirus 30 %, pH_{I_{öpp}} = 12). 0,02 M L-Ser tiitrimiskõver on esitatud joonisel 3.2. Tiitrimiskõveratel muutub alguses lahuse pH aeglaselt, ekvivalentpunktide ümbruses muutub kiiresti ning sellele järgneb aeglane pH muutus.

Tiitrimiskõverate alusel valiti katseteks apatiitidega lahuste pH väärtused. Katsed OPL-Ser-ga viidi läbi kolme pH väärtuse juures. Fosfoseriini dissotsiatsioonist lähtuvalt (skeem 1) on aminohape pH vahemikul 2,19 - 9,85 tsvitterioon. Seega uuriti adsorptsiooni esmalt OPL-Ser

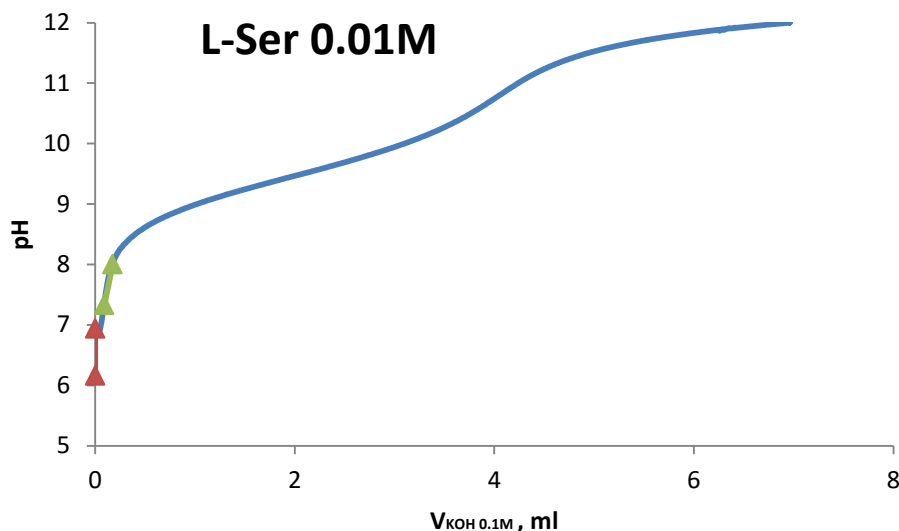
vesilahustes, mille pH ~ 2,2. Selle väärtuse korral on aminohape lähedane elektriliselt neutraalsele olekule (pI = 2,19) ning lahuses olevad katioonsed ja anioonsed laengud on sisuliselt võrdsed. Järgmisena võeti vaatluse alla osaliselt neutraliseeritud happe lahused, mille algne pH on 6 ning 8. OPL-Ser fosfaatrühma teise hüdroksüülrühma pKa = 5,78 ning seetõttu on aminohappe kogulaeng nende pH väärtuste korral -2 [20].

Katsed L-Ser-ga viidi läbi kahe pH väärtuse korral. Seriini dissotsiatsioonist lähtuvalt (skeem 2) käitub L-Ser pH vahemikul 2,21 - 9,15 kaksikioonina [18]. L-Ser adsorptsiooni uuriti tema vesilahuse pH ~ 6 korral, sest see on lähedane seriini isoelektrilisele punktile (pI = 5,68). Selleks, et võrrelda L-Ser sidumiskatsete tulemusi OPL-Ser-ga viidi läbi katsed ka pH = 8 lahustega.

Lisaks on tiitrimiskõveratele märgitud sidumiskatsete pH muutused, kus lahuseid on loksutatud CuAp-ga. OPL-Ser katsel pH = 2,12 juures on märgatav hüppeline pH tõus ($\Delta\text{pH} = 2,76$), pH 6,06 juures on pH tõus väiksem ($\Delta\text{pH} = 0,28$). Katsetel, mis viidi läbi pH 8 juures muutust peaaegu ei toimunud ($\Delta\text{pH} = -0,15$). L-Ser katsel, mille alg pH = 6,16 toimus pH tõus 0,78 ühiku võrra. L-Ser lahuse alg pH = 8,00 korral langes pH pärast CuAp-ga loksutamist 7,33-ni.



Joonis 3.1. Tiitrimiskõver, 0.02 M OPL-Ser tiitrimine 0.1 M KOH lahusega. Tiitrimiskõverale on märgitud 0.02 M OPL-Ser lahuse pH muutus CuAp-ga **1)** $\text{pH}_{\text{alg}}=2.12$ ja $\text{pH}_{\text{lõpp}}=4.88$; **2)** $\text{pH}_{\text{alg}}=6.06$ ja $\text{pH}_{\text{lõpp}}=6.34$; **3)** $\text{pH}_{\text{alg}}=7.97$ ja $\text{pH}_{\text{lõpp}}=7.82$.



Joonis 3.2. Tiitrimiskõver, 0.01 M L-Ser tiitrimine 0.1 M KOH lahusega. Tiitrimiskõverale on märgitud 0.01 M L-Ser lahuse pH muutus CuAp-ga **1)** $pH_{alg}=6,16$ ja $pH_{lõpp}=6,94$; **2)** $pH_{alg}=8,00$ ja $pH_{lõpp}=7,33$.

3.2. Lahuste pH muutus

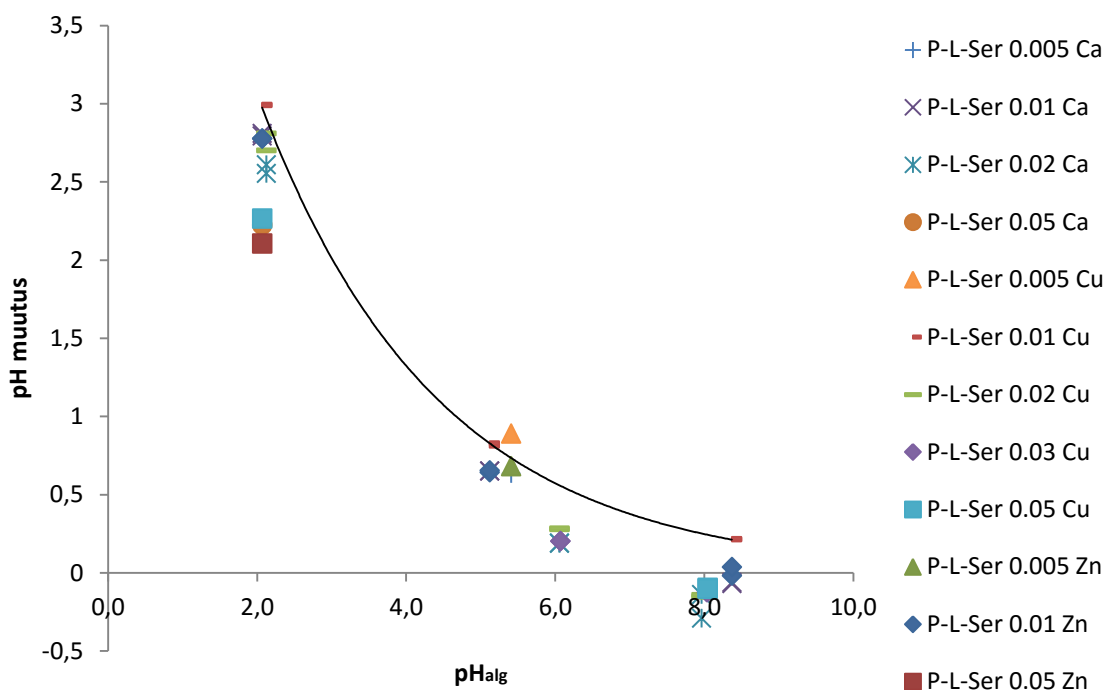
Apatiitidega loksutatud aminohappe lahuste pH muutuste hindamiseks määrati lahuste ning filtraatide pH väärtused. Katsetest selgus, et pH muutust mõjutab nii aminohappe kontsentratsioon kui ka lahuse algne pH. Lisaks mõjutavad ΔpH väärtust erineva koostisega apatiidid.

Joonisel 3.3 on esitatud Ca-, Cu- ning ZnAp-ga loksutatud OPL-Ser lahuste pH muutused alglahuse pH suhtes. Selgub, et suurim pH muutus toimub lahustes, mille algne pH = 2. Selle pH korral ΔpH väärtus väheneb OPL-Ser-i kontsentratsiooni suurenedes. Lisaks mõjutab pH muutust apatiidi koostis. 0,01 M lahuste korral on suurim ΔpH väärtus CuAp loksutistes (2,98), järgneb CaAp (2,81) ning väikseim pH muutus toimub ZnAp loksutistes (2,77). Sama seos kehtib 0,05 M OPL-Ser lahustes, kus Cu-, Ca- ja ZnAp loksutiste pH muutused on vastavalt 2,26, 2,22 ning 2,10. Katsed lahustega, mille pH väärtus on 5,4 või 6 annavad märkimisväärselt väiksema pH muutuse. Kõige vähem mõjutavad ΔpH muutust lahused, mille pH on 8. Selles piirkonnas 0,01 M CuAp loksutise korral pH tõuseb 0,21 ühiku võrra, ülejäänud pH muutused ei sõltu kontsentratsioonist ning annavad negatiivse pH muutuse -0,02 ning -0,14 väärtuste vahemikus.

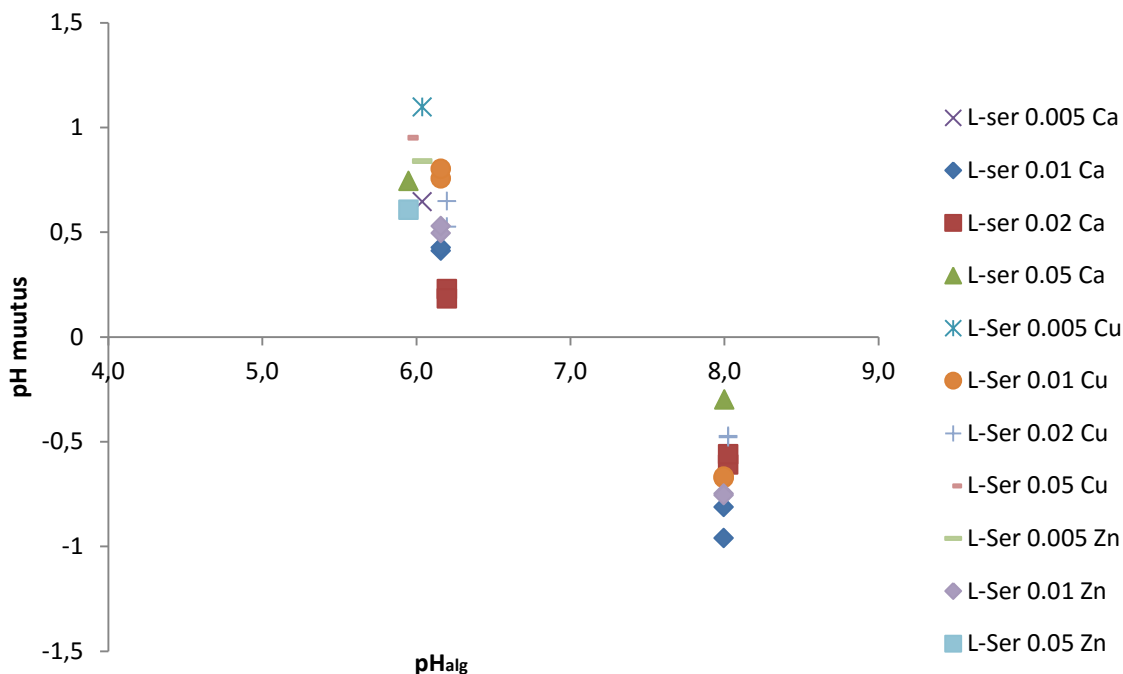
Sellest võib järeldada, et eelistatult toimub adsorptsioon OPL-Ser lahustes, mille pH on 2 ning adsorptsioon on minimaalne lahustes, mille pH on 8.

Joonisel 3.4 on esitatud Ca-, Cu- ning ZnAp-ga loksutatud L-Ser lahuste pH muutused alglahuse pH suhtes. Katsed L-Ser lahustega viidi läbi pH 6 ning 8 juures. Lahustes, mille algne pH oli 6 toimus katse käigus positiivse ΔpH muutus ning katsed lahustega, mille pH = 8 andsid negatiivse ΔpH muutuse. Lahustes, mille pH on 8, väheneb absoluutne ΔpH väärtus lahuse kontsentratsiooni suurenedes. Kui 0,01 M CaAp-ga loksutatud lahuse pH muutub -0,89 võrra ning 0,02 M lahuse korral -0,56, siis 0,05 M lahuse korral kõigest -0,30 võrra. Lahused, mille pH on 6 ei sõltu pH muutus kontsentratsioonist ega apatiidist ning jääb vahemikku 1,09 - 0,41.

Aminohappe lahuse pH muutus reaktsioonis apatiidiga sõltub enim lahuse alg pH-st, kontsentratsioonist ja mõningal määral ka apatiidi koostisest. Kõige suurem pH muutus toimub OPL-Ser lahustes, mille alg pH = 2. Sõltuvalt kontsentratsioonist ja apatiidi koostisest jääb ΔpH vahemikku 2,1 - 2,9. Aminohappe kontsentratsiooni suurenemisel pH muutus väheneb. Seda võib seletada apatiidi pinna passiveerimisega aminohappe adsorptsiooni tulemusel.



Joonis 3.3. Ca-, Cu- ning ZnAp-ga loksutatud OPL-Ser lahuste pH muutused alglahuse pH suhtes kontsentratsioonide vahemikus 0,005-0,05 M.



Joonis 3.4. Ca-, Cu- ning ZnAp-ga loksutatud L-Ser lahuste pH muutused alglahuse pH suhtes kontsentratsioonide vahemikus 0,005-0,05 M.

3.3. Katioonide sisaldus OPL-Ser ja L-Ser lahustes

Katioonide kvantitatiivse sisalduse määramiseks lahustes kasutati aatomabsorptsioonspektroskoopia (AAS) elementide määramise meetodit. Antud uurimistöös määrati apatiitidega loksutatud proovides Ca^{2+} , Zn^{2+} ja Cu^{2+} kontsentratsioon OPL-Ser ning L-Ser lahustes. Saadud tulemusi väljendati Ca, Zn ja Cu suhtelise sisaldusena protsentides. Nii nagu pH muutus, nii sõltub ka katioonide lahustuvus alglahuse kontsentratsioonist, pH-st ja apatiidi koostisest.

3.3.1. Fosfoseriin

Ca, Cu ja Zn suhteline lahustuvus OPL-Ser lahustes (0,005 M - 0,05 M) pH algväärtuste 2, 6 ja 8 korral on esitatud Tabelis 3.1. Katsetest CaAp-ga selgub, et pH 2 korral Ca lahustuvus apatiidist suureneb aminohappe kontsentratsiooni suurenedes 0,01 M lahuses 12,52 %-lt kuni 63,09 %-ni 0,05 M lahuses. Tabelist on näha, et Ca lahustuvus on 0,01 M lahustes pH = 6 korral 5 ja pH = 8 korral 4 korda väiksem võrreldes pH = 2 lahustega. 0,02 M OPL-Ser pH = 6 lahustes oli

suhteliselt 1,2 % Ca ning pH = 8 lahustes Ca ioone ei olnud. Seega võib järeldada, et lahustuvus selles piirkonnas ei sõltu OPL-Ser-i kontsentratsioonist.

Tabel 3.1. Ca, Cu ja Zn suhteline lahustuvus OPL-Ser lahustes (0,005 M - 0,05 M), kui lahuse algne pH on 2, 6 ja 8.

OPL-Ser						
pH _{alg}	Kontsentratsioon, M	CaAp	CuAp	ZnAp	CuAp	ZnAp
			Ca, suht %		Cu, suht %	Zn, suht %
2	0,01	12,52	12,77	12,35	3,82	0,51
	0,02	27,60	30,13	-	14,69	-
	0,05	63,09	66,52	63,61	-	26,46
6	0,005	1,32	1,55	1,27	-	-
	0,01	2,46	3,19	2,51	2,33	0,16
	0,02	1,20	1,74	-	6,91	-
	0,03	-	2,66	-	10,17	-
8	0,01	3,04	4,96	3,67	3,61	0,21
	0,02	0,00	0,00	-	11,62	-
	0,03	-	0,53	-	15,23	-
	0,05	-	0,50	-	20,34	-

Järgnevalt võeti vaatluse alla CuAp-ga loksutatud OPL-Ser lahused ning võrreldi Ca ja Cu suhtelist lahustuvust. Tabelist 3.1 on näha, et pH = 2 korral Ca suhteline lahustuvus CuAp-st kasvab analoogselt CaAp-ga kontsentratsiooni suurenemisel 0,01 M lahuses 12,77 %-lt kuni 66,52 %-ni 0,05 M lahuses. Kontsentratsioonidel 0,01 M ja 0,02 M toimub ka suhtelise Cu sisalduse suuremine 3,82-lt kuni 14,69 %-ni, kuid see on 2 - 3 korda väiksem Ca suhtelisest lahustuvusest. 0,05 M lahustes Cu ionide sisaldust ei määratud. Sellest tulenevalt võib järeldada, et nii CaAp-st kui CuAp-st lahustuvad OPL-Ser pH = 2 lahusesse eelistatult Ca katioonid.

OPL-Ser algväärtuse pH = 6 korral Cu lahustuvus suureneb kontsentratsiooni kasvades 0,01 M lahuses 2,33 %-lt kuni 10,17 %-ni 0,03 M lahuses. Sealjuures Ca suhteline lahustuvus on 0,01 M lahuses 1,4 korda suurem Cu lahustuvusest. Lahustest kontsentratsiooniga 0,02 ja 0,03 M toimub eelistatult Cu lahustumine apatiidist (vastavalt 6,91 % ja 10,17 %) ning see on 4 korda suurem Ca lahustuvusest. Võrreldes saadud tulemusi pH muutustega (joonis 3.3) on näha, et 0,01 M lahustes

toimub pH hüppeline tõus ($\Delta\text{pH} = 0,82$). 0,02 ja 0,03 M lahustes on ΔpH keskmiselt kõigest 0,24 ühikut.

OPL-Ser pH = 8 lahustes suureneb Cu sisaldus sõltuvalt kontsentratsioonist 0,01 M lahuses 3,61 %-lt kuni 20,34 %-ni 0,05 M lahuses. Suhteline Ca lahustuvus 0,01 M lahuses on 4,96 % ning taaskord on see 1,4 korda suurem Cu lahustuvusest. Suhteline Ca sisaldus 0,02 - 0,05 M lahustes on praktiliselt olematu. Samal ajal lahustes olulist pH muutust ei toimu (joonis 3.3).

Võrreldes erinevate pH-de mõju katioonide lahustuvusele CuAp-st on näha, et 0,02 M lahuses pH = 2 korral läheb lahusesse suhteliselt 30,13 % Ca, pH = 6 korral 1,74 % ning pH = 8 korral Ca lahusesse ei lähe. Seega võib väita, et pH suurenemisel Ca lahustuvus väheneb. Samal ajal Cu lahustuvus pH = 6 ja pH = 8 korral kasvab 6,91-lt kuni 11,62 %-ni ning pH = 2 korral on happelise lahuse tõttu 12,69 %.

ZnAp-ga loksutatud OPL-Ser lahuste katioonide suhtelised lahustuvused on samuti esitatud Tabelis 3.1 Selgub, et Ca ja Zn lahustuvus ei sõltu kontsentratsioonist. Eelistatult toimub Ca lahustumine, sest Zn suhteline lahustuvus pH 2, 6 ja 8 lahustes on vastavalt 24, 16 ja 17,5 korda väiksem Ca lahustuvusest. Lahuste pH muutustest on näha (joonis 3.3), et mida suurem on alglahuse pH, seda väiksem on lahuste ΔpH .

3.3.2. Seriin

Ca, Cu ja Zn suhteline lahustuvus L-Ser lahustes (0,005 M - 0,05 M) pH algväärtuste 6 ja 8 korral on esitatud Tabelis 3.2. Selgub, et CaAp-ga loksutatud L-Ser lahuste suhteline Ca sisaldus pH = 6 korral väheneb kontsentratsiooni suurenedes 0,005 M lahuses 0,33 %-lt kuni 0,30 %-ni 0,05 M lahustes. Tabelist on näha, et Ca lahustuvus pH = 8 korral on 0,01 M lahustes 5 ning 0,02 M lahustes 8 korda väiksem võrreldes pH = 6 lahustega. Sealjuures lahuste pH muutus (joonis 3.4) ei ole pH = 6 lahustes suurem kui 0,74 ühikut ning pH = 8 lahustes 0,89 ühikut.

CuAp-ga loksutatud L-Ser lahustes ei sõltu Ca suhteline lahustuvus pH = 6 lahustes kontsentratsioonist, jäädes vahemikku 0,42 - 0,44 %. Lahustes, mille pH = 8 on Ca lahustuvus CuAp-st oluliselt väiksem ning jääb vahemikku 0,08 - 0,15 %. Eelistatult toimub adsorptsioon ning kompleksi moodustumine Cu eraldumisega apatiidist, sest vaske eraldub 22,67 kuni 29,27 %. Samal ajal eraldub 0,01 M lahustesse Cu rohkem kui 0,02 M lahusesse nii pH 6 kui 8 korral. Lahuste ΔpH (joonis 3.4) ei ületa pH = 6 korral 1,1 ning pH = 8 korral 0,67 ühikut.

Tabel 3.2. Ca, Cu ja Zn suhteline lahustuvus L-Ser lahustes (0,005 M - 0,05 M), kui lahuse algne pH on 6 ja 8

L-Ser						
pH_{alg}	Kontsentratsioon, M	CaAp	CuAp Ca, suht %	ZnAp	Cu, suht %	Zn, suht %
6	0,005	0,33	0,44	0,34	-	-
	0,01	0,33	0,44	0,34	26,31	0,09
	0,02	0,32	0,42	-	23,12	
	0,05	0,30	0,43	0,31	-	0,11
8	0,005	-	-	-	-	-
	0,01	0,07	0,15	0,08	29,27	0,06
	0,02	0,04	0,08	-	22,67	-

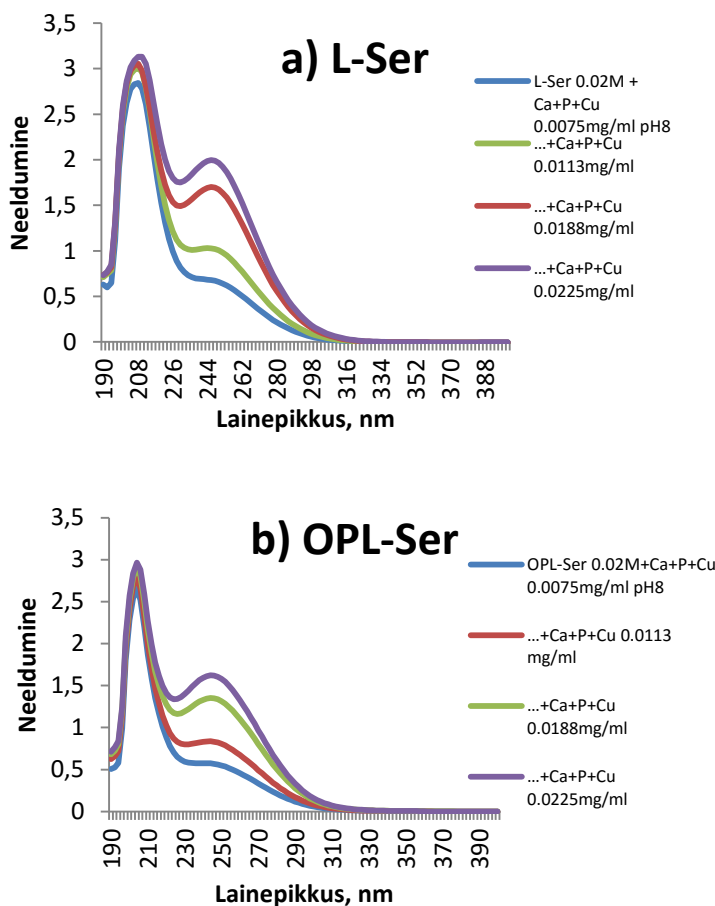
ZnAp-ga loksutatud L-Ser lahuste suhtelise Ca ja Zn sisalduse määramisest selgub, et eelistatult eraldub lahusesse apatiidist Ca katioonid. Adsorptsioon ZnAp-ga on kõige väiksem, sest suhteline Zn lahustuvus jääb vahemikku 0,06 - 0,11 % ning pH muutus (joonis 3.4) pH = 6 korral ei ole suurem kui 0,61 ning pH = 8 korral 0,75 ühikut.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et kationide suur sisaldus lahustes, mille pH oli 2 on tingitud peamiselt apatiidi lahustuvusest happelises lahuses, millega kaasneb lahuse happesuse vähenemine (pH tõus). Apatiit on stabiilne lahuses, mille pH > 7 ja vastavalt sellele väheneb kationide sisaldus uuritud lahustes. Cu suhteline lahustuvus on väiksem Ca lahustuvusest happelises lahuses, kuid kasvab pH tõustes.

Cu ionide sisalduse kasv lahustes, mille pH > 6 on ilmselt tingitud Cu ja aminohappe kompleksi tugevuse suurenemisest pH tõusuga. Aminohappe mõju Ca ja Zn lahustuvusele on väiksem, kuna kirjanduse andmetel nende komplekside püsivus on oluliselt väiksem (Tabel 1.2).

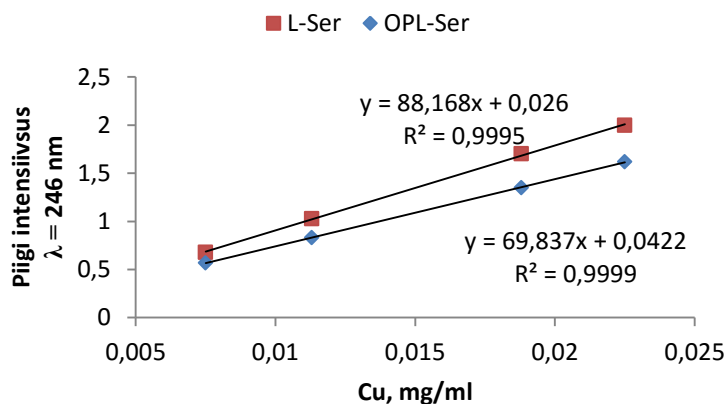
3.3. Lahuste UV spektroskoopiline analüüs

UV-spektrofotomeeter on sobilik meetod nii aminohapete kvantitatiivse kontsentratsiooni kui ka katioonide sisalduse määramiseks [17]. Katioonide mõju hindamiseks registreeriti UV- spektrid 0,02 M aminohappe lahustest, mille pH = 8 ning mis sisaldasid 0,005 mg/ml Ca, 0,004 mg/ml P ning 0,0075 - 0,0225 mg/ml Cu. Vastavad L-Ser ja OPL-Ser spektrid on esitatud joonisel 3.5.



Joonis 3.5. 0,02 M a) L-Ser; b) OPL-Ser pH = 8 lahuste UV- spektrid, mis sisaldasid 0,005 mg/ml Ca, 0,004 mg/ml P ning 0,0075 - 0,0225 mg/ml Cu.

UV- spektritel vaadeldi Cu ioonidele iseloomulikku neeldumise intensiivsust lainepikkusel 246 nm. Joonisele 3.6 lisatud seostest on näha, et nii OPL-Ser kui ka L-Ser Cu piikide intensiivsused on lineaarses sõltuvuses Cu kontsentratsiooniga lahuses. Sealjuures L-Ser piigid on intensiivsemad kui OPL-Ser vastavad Cu piigid. Ca ja Zn kompleksühendeid aminohapetega UV-spektroskoopia meetodil määrata ei saa [2].

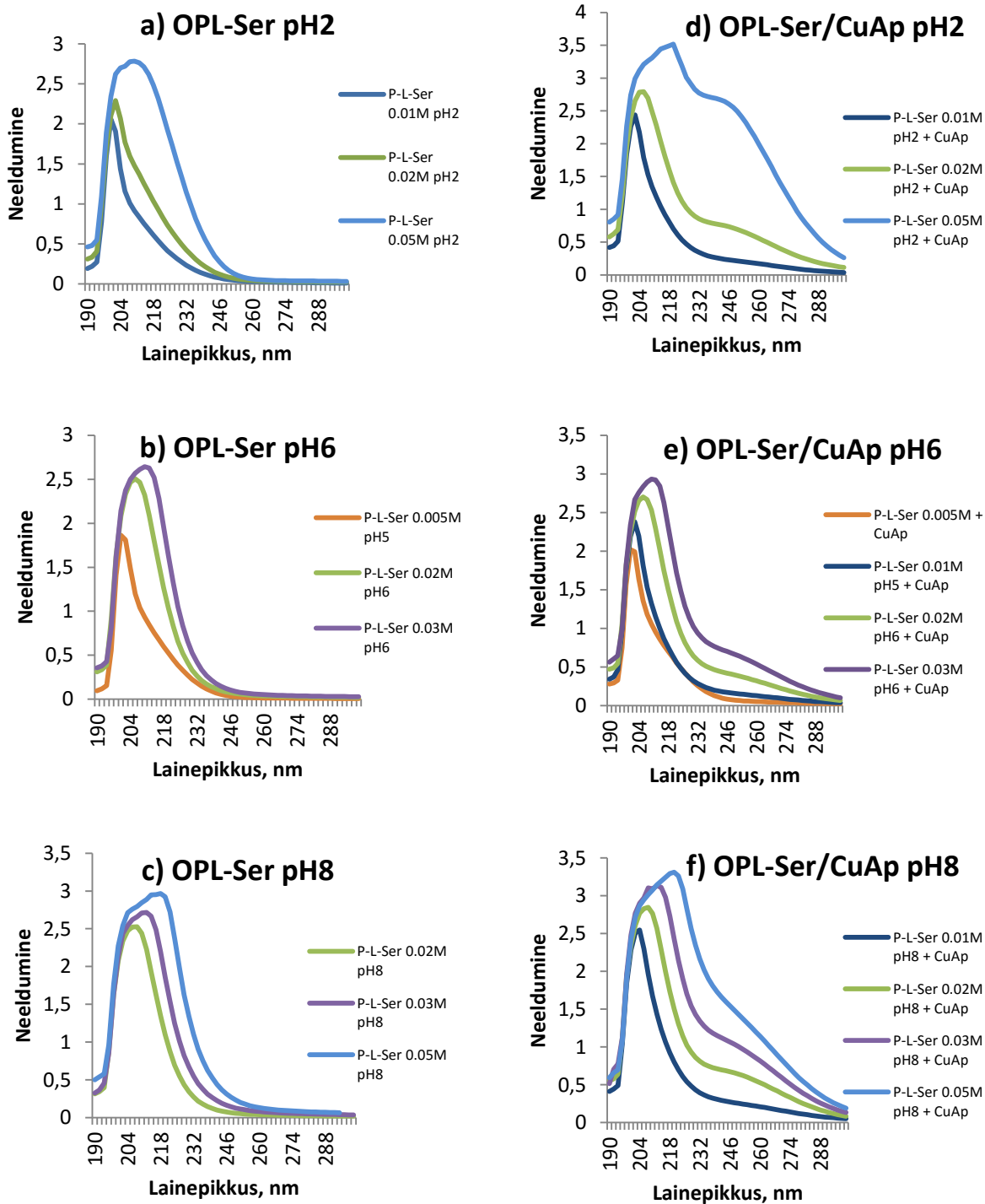


Joonis 3.6. 0,02 M L-Ser ja OPL-Ser pH = 8 lahuste UV- spektrite piikide ($\lambda = 246$ nm) intensiivsuste ja Cu sisalduse vaheline sõltuvus.

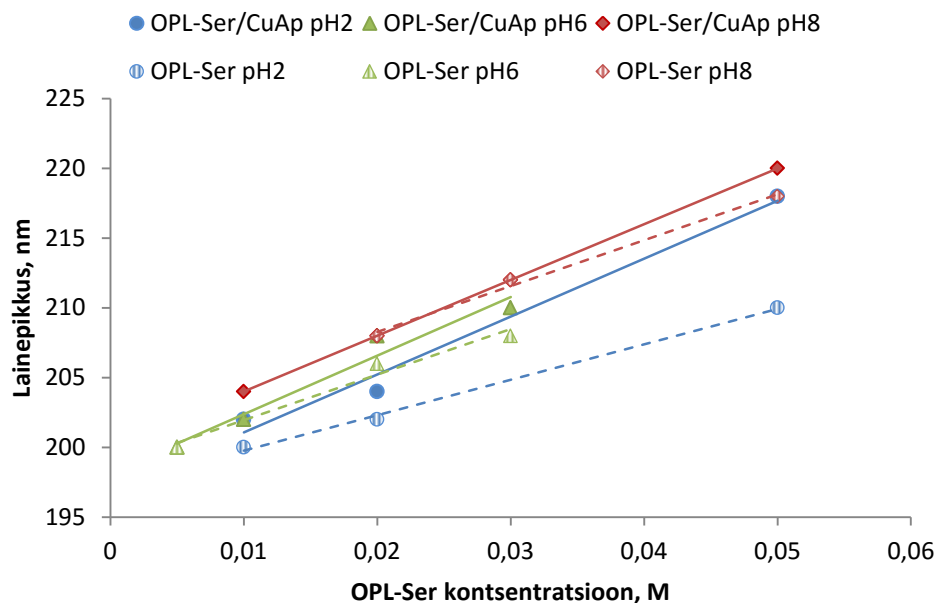
OPL-Ser (0,005 - 0,05 M) lahuste, kui a) pH = 2; b) pH = 6; c) pH = 8 ning OPL-Ser/CuAp sidumiskatsete lahuste, kui d) pH = 2; e) pH = 6; f) pH = 8 UV- spektrid on esitatud joonisel 3.7. OPL-Ser lahuste spektritelt on näha, et kontsentratsiooni kasvades muutuvad piigid intensiivsemaks ning laiemaks. Võrreldes neid spektreid CuAp-ga loksutatud lahuste UV-spektritega, muutuvad piigid pärast sidumiskatseid veelgi intensiivsemaks. Seega mõjutab aminohappe piike lisaks kontsentratsioonile ka kationide sisaldus lahuses. Cu ionidele iseloomulikust piigist ($\lambda = 246$ nm) on OPL-Ser/CuAp lahustes tekkinud UV-spektritel piigi õlad. Seda võib selgitada Cu ionide kompleksühendite tekkimisega. Lisaks selgub, et pH = 6 lahustes on UV-spektritel Cu piikide õlad väiksemad kui pH = 8 lahustes, mis on koosõlas Cu ionide sisaldusega lahuses.

OPL-Ser ja OPL-Ser/CuAp spektrite töötlemisel saadud maksimaalne piigi tippu nihkumine ($\lambda = 200-210$ nm) on lineaarses sõltuvuses kontsentratsiooniga (joonis 3.8.) Puhta aminohappe ja sidumiskatse lahuste võrdlemisel selgub, et kontsentratsiooni kasvades suureneb piigi tippu nihkumine. Lisaks on erinevus suurem pH = 2 korral ning kõige väiksem pH = 8 lahustes.

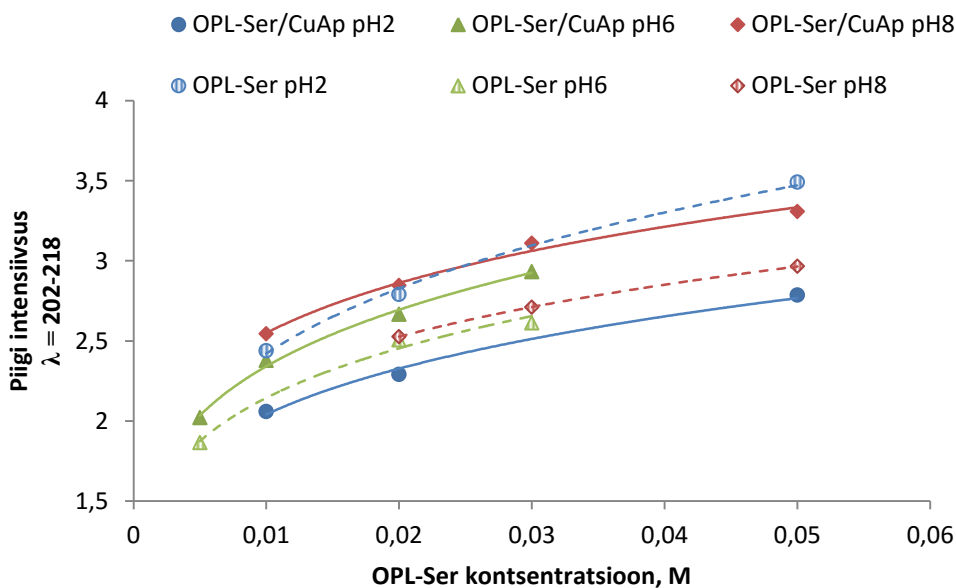
Analoogselt UV- spektrite piikide tippu nihkumisele on esitatud piigi intensiivsuste muutumise sõltuvus kontsentratsioonist astmefunktsioonina (joonisel 3.9). Alglahustes, mille pH = 2 toimub sidumiskatse tulemusena piikide intensiivsuste vähenemine. Seda võib selgitada lahuse hüppelise pH suurenemisega katse käigus, kus Δ pH tõuseb kuni kolme ühiku võrra. Lahustes, mille pH = 6 ja pH = 8 muutuvad sidumiskatse käigus spektri piigid intensiivsemaks.



Joonis 3.7. Vasakul on esitatud OPL-Ser lahuste UV- spektrid kontsentratsioonide vahemikus 0,01 – 0,05 M, kui a) pH = 2; b) pH = 6; c) pH = 8. Paremal on OPL-Ser lahuste UV- spektrid, mida on loksutatud CuAp-ga, kui alglahuse d) pH = 2; e) pH = 6; f) pH = 8.

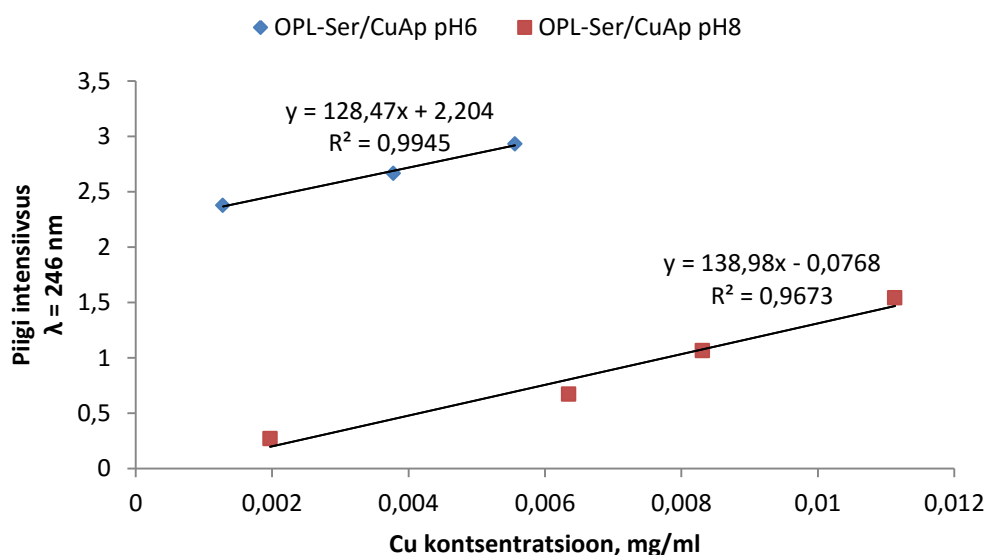


Joonis 3.8. Puhta OPL-Ser ja CuAp-ga loksutatud OPL-Ser lahuse kontsentratsiooni ning UV-spektri neeldumispigi ($\lambda = 200\text{-}210\text{ nm}$) tipu asukoha muutumise vaheline sõltuvus.



Joonis 3.9. Puhta OPL-Ser kui ka CuAp-ga loksutatud OPL-Ser lahuse kontsentratsiooni ning UV-spektri piigi ($\lambda = 200\text{-}210\text{ nm}$) neeldumise intensiivsuse vaheline seos.

Lisaks eelnevale võrreldi OPL-Ser/CuAp sidumiskatsete lahuste UV- spektrite piikide intensiivsuste ($\lambda = 246$ nm) ning AAS-ga määratud Cu kontsentratsioonide sõltuvust, kui pH = 6 ja pH = 8 (joonis 3.10). Selgus, et mõlema pH algväärtuse korral on Cu kontsentratsioon lahuses lineaarses sõltuvuses Cu ja aminohappe kompleksi piigi intensiivsusega, kuid pH = 6 lahuste piigid on intensiivsemad sellel lainepikkusel. UV- spektroskoopiline analüüs näitab seega aminohappe adsorptsiooni lineaarset sõltuvust kontsentratsioonist. Samas mõjutavad piigi intensiivsusi nii kationide sisaldus lahuses kui ka pH, mis segavad aminohappe kontsentratsiooni määramist.

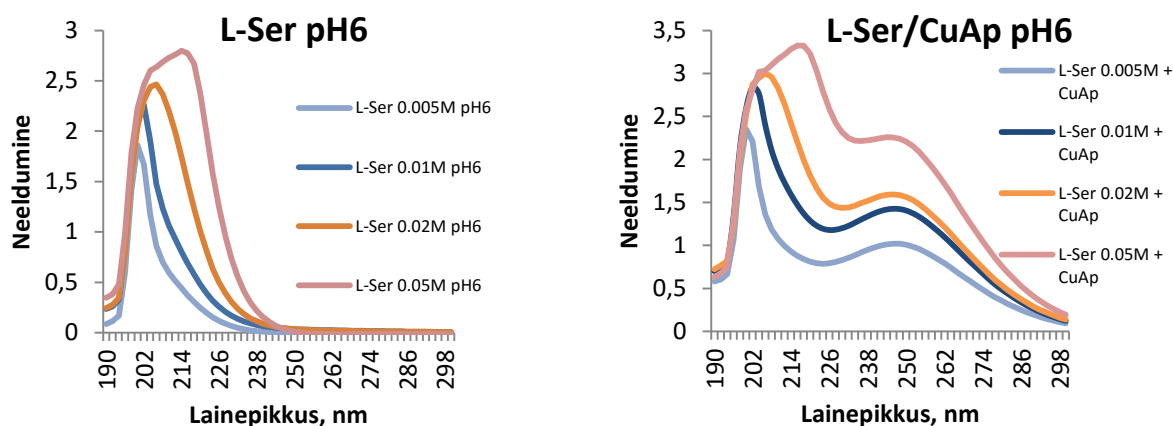


Joonis 3.10. OPL-Ser/CuAp lahuste UV-spektrite piikide intensiivsuste ($\lambda = 246$ nm) ja AAS meetodil määratud Cu kontsentratsiooni vaheline sõltuvus, kui lahuse pH = 6 ja pH = 8.

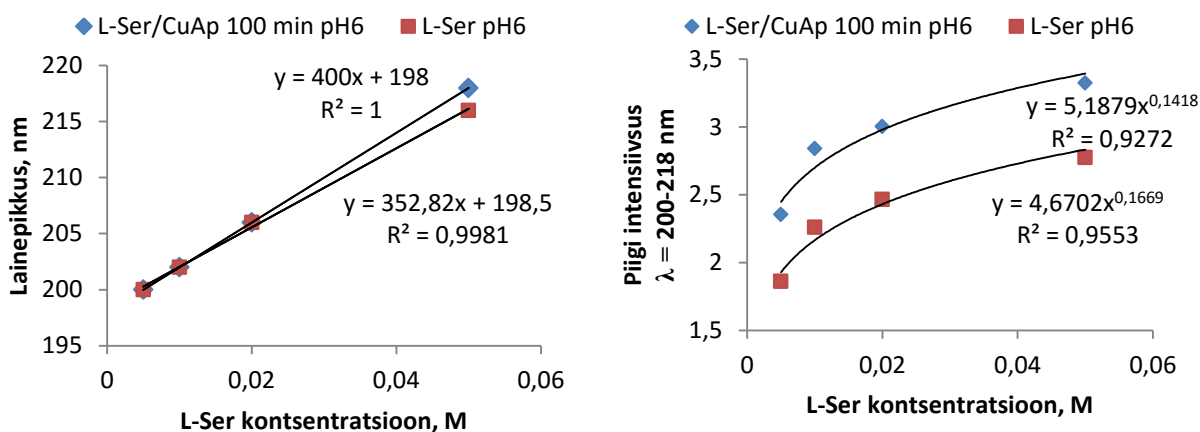
L-Ser (0,005 - 0,05 M; pH = 6) ning L-Ser/CuAp sidumiskatsete lahuste UV-spektritelt (joonis 3.11) on näha, et ka L-Ser kontsentratsiooni suurenedes muutuvad piigid intensiivsemaks ning toimub piikide nihkumine. Kui OPL-Ser/CuAp lahuste UV-spektritel oli iseloomulik piigi õlg lainepikkusel 246 nm, siis L-Ser sidumiskatsete lahuste spektritel esinevad sellel lainepikkusel Cu piigid.

Piikide nihkumise ja kontsentratsiooni vahelisest seosest (joonis 3.12 – vasakpoolne graafik) on näha, et piigi tipu asukoha muutus on lineaarses sõltuvuses aminohappe kontsentratsioonist nii puhta L-Ser kui ka CuAp-ga proovides. Piigi tipu asukoht muutub katse käigus vaid 0,05 M

lahuste korral. Seega ei avalda katioonid mõju aminohappe piigi tipu asukohale 0,005 – 0,02 M lahustes. Lisaks võrreldi L-Ser lahuse kontsentratsiooni ning piigi neeldumise intensiivsuse vahelist seost lainepikkusel 200 - 218 nm ning esitati see astmefunktsioonina (joonis 3.12 – parempoolne graafik). Saadud tulemustest selgub, et apatiidiga töödeldud lahuste piigid on intensiivsemad, kuid astmefunktsiooni kuju on väga sarnane puhta aminohappe lahusele.



Joonis 3.11. Vasakul on esitatud L-Ser pH = 6 lahuste UV- spektrid kontsentratsioonide vahemikus 0,005 – 0,05 M. Paremal on L-Ser pH = 6 lahuste UV- spektrid, mida on loksutatud CuAp-ga.



Joonis 3.12. Vasakul on esitatud puhta L-Ser ja CuAp-ga loksutatud L-Ser lahuse kontsentratsiooni ning UV-spektri neeldumispiki ($\lambda = 200-218$ nm) tipu asukoha muutumise vaheline sõltuvus. Parempoolsel joonisel on analoogselt esitatud L-Ser lahuse kontsentratsiooni ning piigi neeldumise intensiivsuse vaheline seos.

Kuigi UV absorptsioon lainepikkusel 200-218 nm on lineaarses sõltuvuses aminohappe sisaldusest lahuses segab selle seose kasutamist aminohappe sisalduse määramiseks kationide sisaldus lahuses, mis sõltub apatiidi lahustuvusest. Cu kompleksi UV absorptsioon lainepikkusel 246 nm sõltub nii Cu sisaldusest kui ka lahuse pH-st.

3.4 Termiline analüüs

Varasemates uurimustes on määratud apatiidiga seotud aminohappe hulk viimase kontsentratsiooni vähenemise järgi lahuses. Selleks on kasutatud erinevaid meetodeid nagu UV spektroskoopia või nihüdriini kompleksi spektrofotomeetria [2,30]. UV- spektroskoopia puudused on näidatud peatükis 3.3. Ka spektrofotomeetrilisel määramisel ei õnnestunud saada stabiilseid tulemusi. Seetõttu kasutati seotud aminohappe koguse määramiseks termilist analüüsi.

Kirjanduse andmetel adsorbeerub küllastuse tekkimisel HAp-i pinnale maksimaalselt 3,5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ OPL-Ser (0,008 M; pH = 7,0) lahusest [25]. Seega peaks olema võimalik siduda CaAp-ga (eripind 126 m^2/g) 132,3 μmol OPL-Ser, mis vastab maksimaalselt 8,2 % OPL-Ser apatiidis.

Apatiidiga seotud aminohapete koguse määramiseks kasutati termilist analüüsi koos eralduvate gaaside mass-spektromeetrilise analüüsiga. OPL-ser ($\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_6\text{P}$) ja L-ser ($\text{C}_3\text{NH}_7\text{O}_3$) termilisel lagunemisel hapniku juuresolekul tekivad H_2O , CO_2 ja NO_x . Kuna MS analüüs on väga tundlik, on võimalik eralduvate lämmastikgaaside hulga põhjal hinnata aminohappe sisaldust apatiidis.

Orgaanilise aine sisalduse hindamiseks aminohapetega loksutatud apatiitide proovides määrati termilise analüüsi käigus eraldunud gaasis lämmastikoksiidide (NO_x) hulk mass-spektroskoopiliselt. Selleks registreeriti $m/z = 30$ ioonvoolu muutus kuumutuse käigus ja arvutati temperatuurkõvera piigialune pindala. Esmalt valmistati mudelsegud apatiidist ja aminohappest sisaldusega 1 - 5% (Lisa 1 - CaAp ja 2,5 % OPL-Ser mudelsegu termogramm). Nendest segudest eraldunud NO_x temperatuurikõverate aluse piigi pindala võeti aluseks aminohappe sisalduse määramisel sidumiskatsetest saadud tahketes jääkides (Lisa 2).

Joonisel 3.13 on esitatud a) OPL-Ser ja b) L-Ser lahuste pH ning NO_x piikide pindalade vaheline sõltuvus. Lisaks on graafikutele märgitud töötlemata Ca-, Cu- ning ZnAp-i NO_x piikide pindalad.

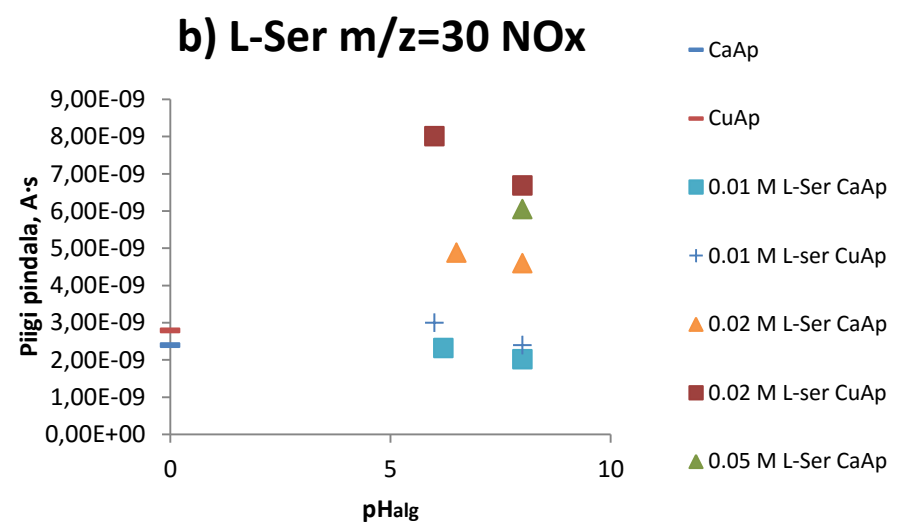
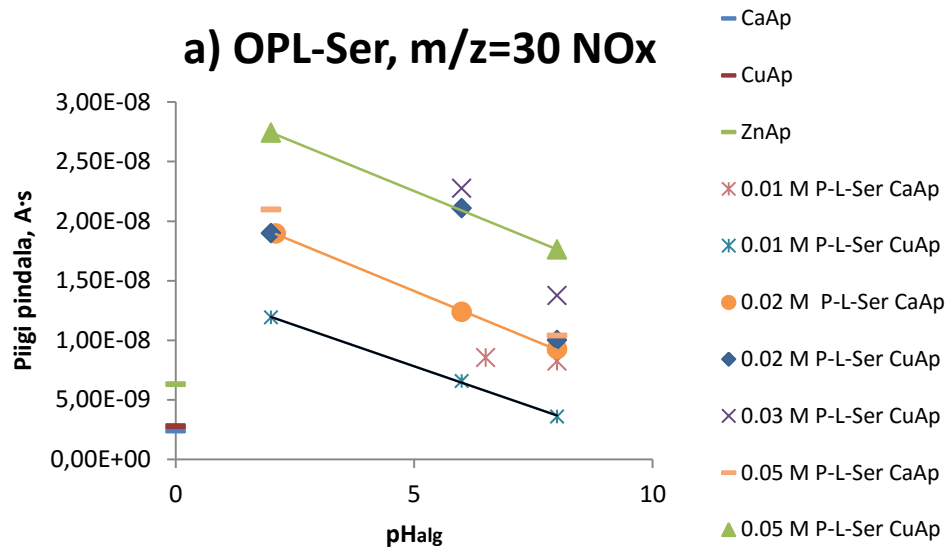
Eraldunud lämmastikoksiidide hulk sõltub katses kasutatud aminohappe lahuse kontsentratsioonist ja pH-st. Ca- ja CuAp-l 0,01 M L-Ser lahustes NO_x piikide pindalad ei ületa

algsete apatiitide pindalaid (Lisa 3 – CaAp termogramm; Lisa 4 – CuAp termogramm). Edasi kasvab orgaanilise aine sisaldus apatiitides lahuste kontsentratsiooni suurenemisel. Nii OPL-Ser kui ka L-Ser lahustega töödeldud apatiitides väheneb orgaanilise aine sisaldus lahuse pH suurenemisel sarnaselt katioonide lahustuvusega (Lisa 5 – OPL-Ser-ga loksutatud CuAp termogramm pH = 2; Lisa 6 – OPL-Ser-ga loksutatud CuAp termogramm pH = 8). CuAp-i võime siduda aminohapet on suurem CaAp-st nii L-Ser kui ka OPL-Ser lahustes.

Termilise analüüsi andmete alusel, võttes arvesse ka eripindade erinevusi, seotakse L-Ser (0,02 M, pH = 8) 1,3 korda rohkem ja OPL-Ser (0,05 M) alg pH 2 ja 8 korral vastavalt 1,1 ja 1,6 korda rohkem CuAp-ga kui CaAp-ga. Väiksemate aminohappe kontsentratsioonide korral ilmselt küllastuseni ei jõutud ja erinevused katioonsest asendusest apatiidis ei ilmnenu.

Termilise analüüsi andmetel on sidumiskatsetest saadud tahkes faasis 0,01 M OPL-Ser (pH = 6) lahuse sisaldus 3,9 %. Saadud tulemus on 2,1 korda väiksem kirjanduse andmetel saadud tulemustest. See näitab, et katsete käigus küllastust tahkel pinnal ei tekkinud. Sama kontsentratsiooniga L-Ser apatiidi pinnaga seotud ei ole.

Termoanalüüsi andmetel on sidumiskatsetest saadud apatiitides maksimaalselt 13,4 % OPL-Ser ning 0,7 % L-Ser. Apatiit seob seega oma pinnaga OPL-Ser rohkem kui L-Ser ning saadud katsetulemus on vastavuses nii pH muutuse kui katioonide lahustuvuse tulemustega. Katseviiga on ± 1 %, mis ei võimalda sügavamat analüüsi.



Joonis 3.13. a) OPL-Ser; b) L-Ser lahuste pH ning aminohapetega loksutatud apatiitide termilise analüüsi NO_x piikide pindalade vaheline sõltuvus.

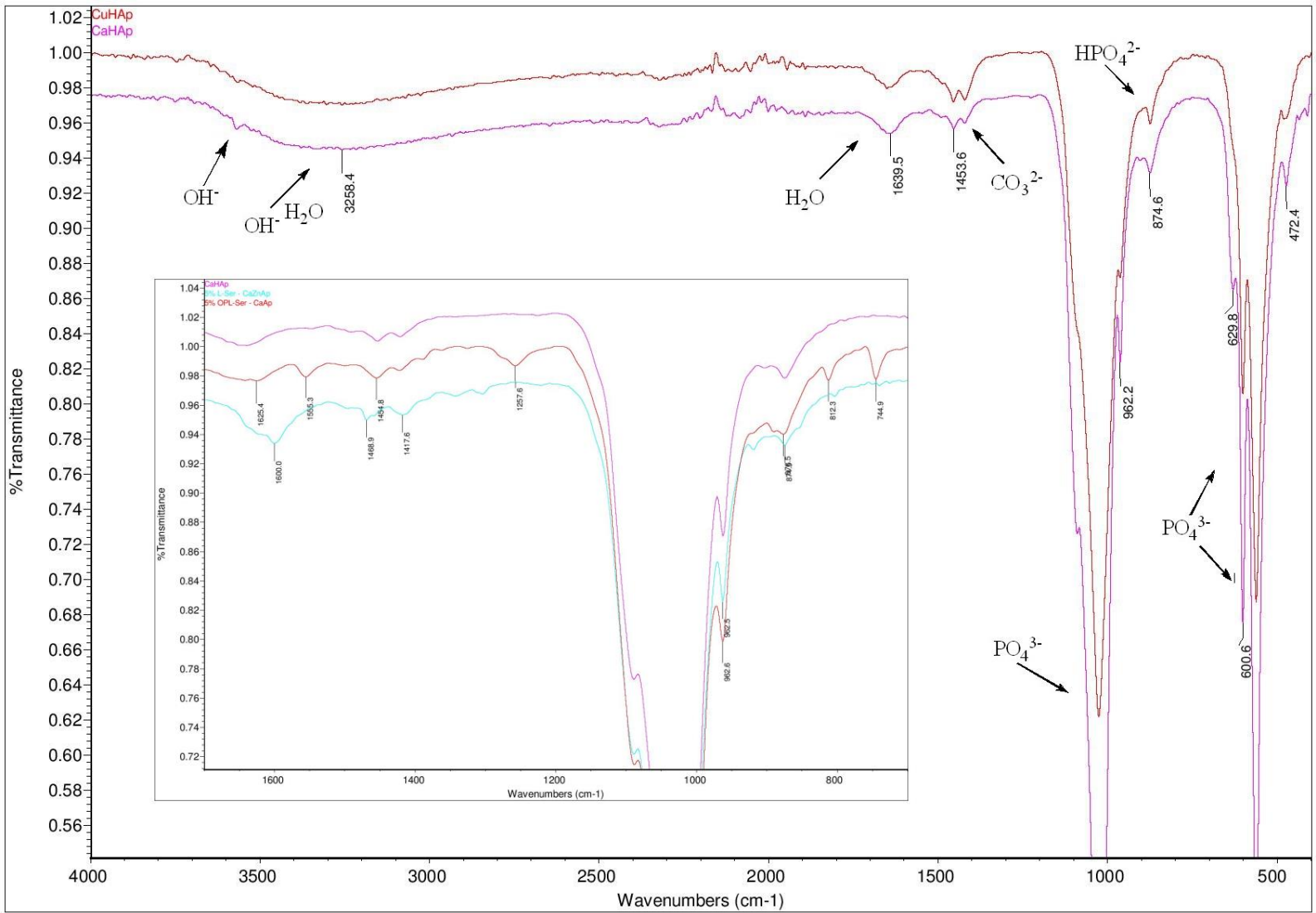
3.5. Tahke faasi IP spektrospektroskoopiline analüüs

Apatiitide struktuuride analüüsimiseks registreeriti IP- spektrid CaAp-st, CuAp-st, 5 % L-Ser/ZnAp ning 5 % OPL-Ser/CaAp mehaanilisest mudelsegust lainearvu vahemikus 4000- 400 cm^{-1} ning esitati need joonisel 3.14. CaAp-i spektrile on märgitud apatiidile iseloomulike rühmade võnkumistele vastavate piikide asukohad. Nõrga intensiivsusega piigid lainearvudel 3570 cm^{-1} ning 633 cm^{-1} on seotud apatiidi struktuuris esineva OH valentsvõnkumisega (ν). Fosfaatrühma valentsvõnkumistele on iseloomulikud intensiivsed piigid lainearvudel 1025 ja 962 cm^{-1} . Fosfaatrühma deformatsioonivõnkumistega (δ) avalduvad piigid lainearvudel 600, 561 cm^{-1} ning 474 cm^{-1} . Piigid lainearvul 1450 cm^{-1} ja 1420 cm^{-1} on seotud karbonaatiooni võnkumisega ning väike piik lainearvul 874 cm^{-1} vesinikfosfaadi või karbonaatiooniga. [27,28]

Joonisel 3.14 esitatud apatiidi ja 5 % L-Ser ning OPL-Ser mehaaniliste segude spektrilt on näha uute nõrkade piikide lisandumine apatiidi spektrile vahemikus 700-1700 cm^{-1} . L-Ser-le on iseloomulikud absorptsioonipiigid lainearvudel ~3400 cm^{-1} (O-H), 1601 cm^{-1} , 1434 cm^{-1} ja 1411 cm^{-1} (COO^-). Lisaks avalduvad IP spektris NH_3^+ iseloomulikud δ - võnkumised lainearvul 1621 cm^{-1} ja 1646 cm^{-1} ning CH sideme δ - võnkumised lainearvul 1305 cm^{-1} ja 1339 cm^{-1} [29]. NH_2 δ - võnkumine esineb lainepikkusel 1580-1650 cm^{-1} [3]. 5 % OPL-Ser ja CaAp-i mehaanilise mudelsegu spektril esinevad OPL-Ser-le iseloomulikud piigid lainearvudel 745, 812, 1257 ning 1555 cm^{-1} . Apatiidi ja aminohappe piikide osalise kattumise tõttu nende intensiivsused spektritel muutuvad.

OPL-Ser-ga (pH = 6) loksutatud Ca- ja CuAp-de IP spektrid on esitatud joonisel 3.15. IP spektrid on jaotatud kolme rühma: alumises rühmas puhta CaAp, CuAp ning 5%-ne OPL-Ser/CaAp mudelsegu spekter, keskmises reas aminohappega loksutatud CuAp-de spektrid ning ülemises reas CaAp-de spektrid. OPL-Ser-ga (pH = 8) loksutatud Ca- ja CuAp-de IP spektrites olulisi muutuseid võrreldes pH = 6 katsetega ei fikseeritud (Lisa 7).

Mehaanilise segu spektrist on näha, et OPL-Ser-le iseloomulikke intensiivseid piike lainearvul 1555, 1257, 812 ning 744 cm^{-1} Ca- ja CuAp-de spektritel ei esine. OPL-Ser-i COO^- (1422 cm^{-1}) ja NH_3^+ (1465 cm^{-1}) ν -võnkumiste piigid kattuvad osaliselt apatiitide karbonaatrühma võnkumispiikidega lainearvudel 1453 ja 1421 cm^{-1} .



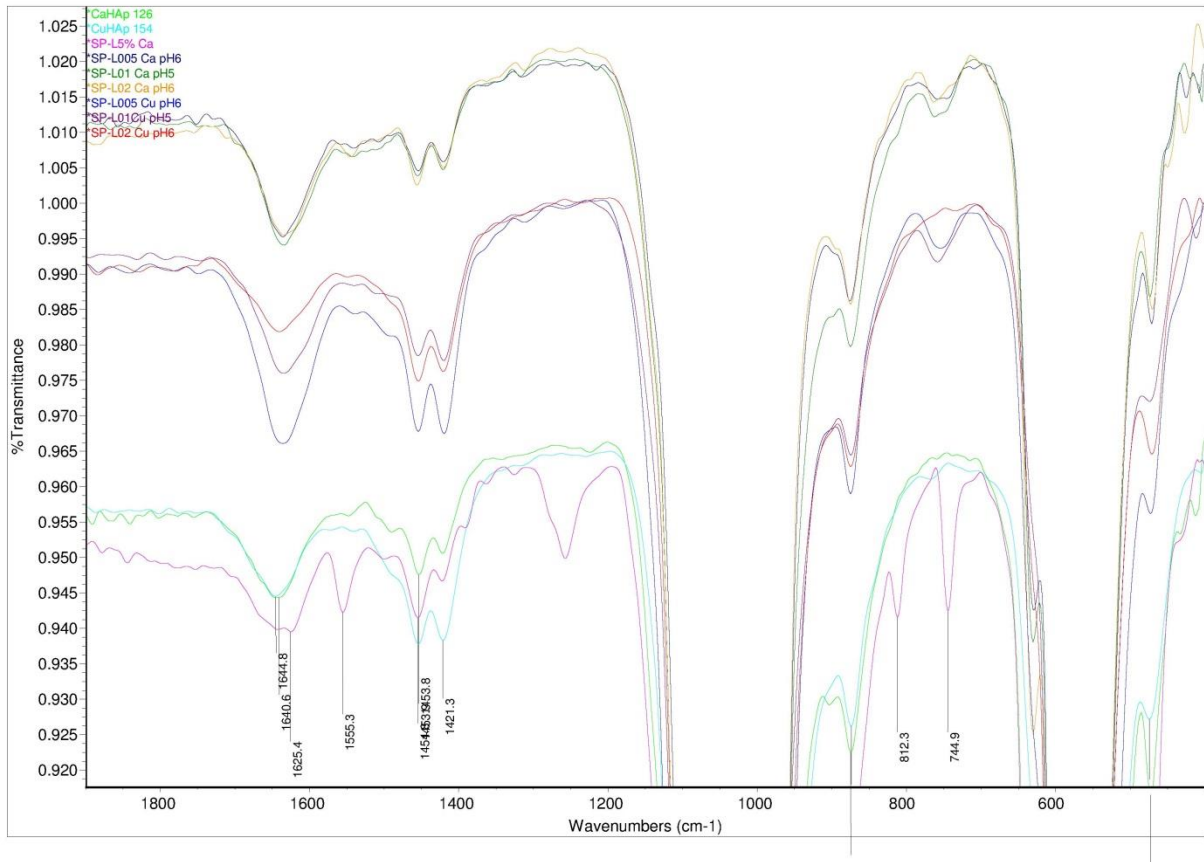
Joonis 3.14. CaAp ja CuAp IP- spektrid lainearvu vahemikus 4000- 400 cm⁻¹. Joonisele on lisatud 5 % L-Ser/ZnAp ning 5 % OPL-Ser/CaAp mehaanilise mudelsegu IP- spektrid lainearvu vahemikus 1700- 700 cm⁻¹.

Kuna apatiidi IP- spektril on karbonaatrühma piigid püsiva intensiivsusega, on võimalik piikide suhte määramisega hinnata aminohappe mõju sellel lainepikkusel. Apatiidi karbonaatrühma piikide (1453 ja 1421 cm^{-1}) suhted on CaAp-s 1,18 ning CuAp-s 0,95. Aminohappega loksutatud CaAp-des on piikide suhe 0,005 M lahuses 1,1 ning 0,01 M lahuses 1. Suurema aminohappe lahuse kontsentratsiooni korral piikide suhe uuesti suureneb (1,15). See muutus näitab, et apatiidi struktuuriga on seotud aminohappele iseloomulikud COO^- ning NH_3^+ rühmad. CuAp-des piikide suhted ei muutu.

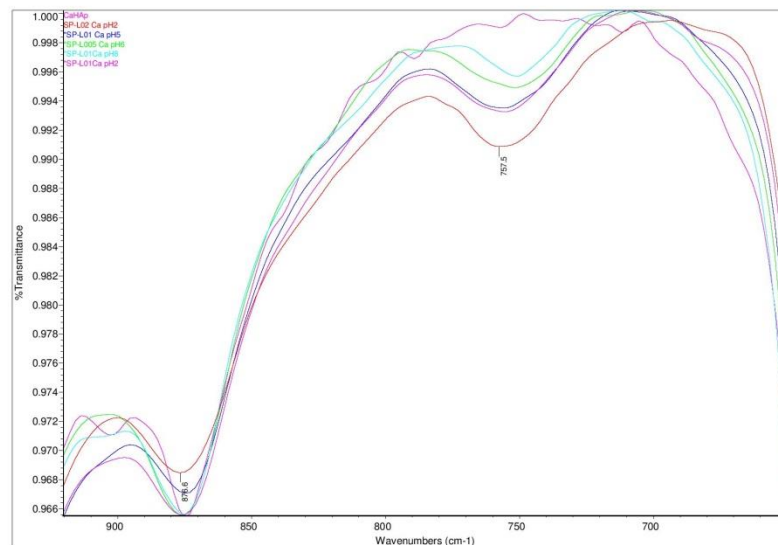
OPL-Ser-ga loksutatud apatiitide proovides (va SP-L02 Cu) esineb piik lainearvul 752 cm^{-1} , mida algses apatiidis ega mehaanilises segus ei esine. See viitab OPL-Ser ja apatiidi vahelisele reaktsioonile ning selle tulemusel uute keemiliste sidemete tekkimisele.

Selleks, et hinnata pH mõju OPL-Ser-ga loksutatud CaAp pinna muutustele, uuriti piigi intensiivsusi lainearvu vahemikus 920-650 cm^{-1} (joonis 3.16). Selgub, et lainearvul 752 cm^{-1} oleva piigi intensiivsus sõltub nii kontsentratsioonist kui ka pH-st. Orgaanilise aine sisaldus väheneb lahuse pH suurenemisel. Kõige intensiivsemad piigid esinevad 0,02 ja 0,01 M pH = 2 lahustega loksutatud CaAp-de spektritel. Apatiiti seotud aminohappe hulk on väiksem ning seega annavad nõrgema intensiivsusega piigi 0,01 ja 0,005 M pH = 6 lahused. Kõige nõrgema intensiivsusega piigi annab pH = 8 lahusega töödeldud apatiit. IP spektrite analüüsi tulemused on sarnased termilise analüüsi tulemustele ning adsorptsioon sõltub aminohappe lahuse pH-st, olles suurem happelisemas lahuses. Analoogselt Ca- ja CuAp sidumiskatsetega OPL-Ser-ga sõltuvad ZnAp-de sidumiskatsete tulemusel saadud IP- spektrite piigid lainearvul 752 cm^{-1} nii kontsentratsioonist kui ka pH-st (LISA 8).

L-Ser-ga (pH = 6) loksutatud Ca- ja CuAp-de IP spektrid on esitatud joonisel 3.17. Analoogselt OPL-Ser-ga on apatiitide IP spektrid jaotatud kolme rühma. L-Ser mehaanilises segus on näha, et aminohappele on iseloomulik intensiivne COO^- valentsvõnkumise (ν) piik lainearvul 1600 cm^{-1} , piigid lainearvul 1343 ning 1306 cm^{-1} , väike piik lainearvul 920, 435 ja 417 cm^{-1} . Karbonaatrühma piikide suhted lainearvudel 1453 ja 1421 cm^{-1} on CaAp-s 1,18 ning 0,02 M L-Ser-ga loksutatud apatiitides 1,42. Teistes CaAp sidumiskatsete proovides jääb see suhe võrreldes algse prooviga samaks. Sellest võib järeldada, et L-Ser avaldab apatiidile väiksemat mõju kui OPL-Ser.



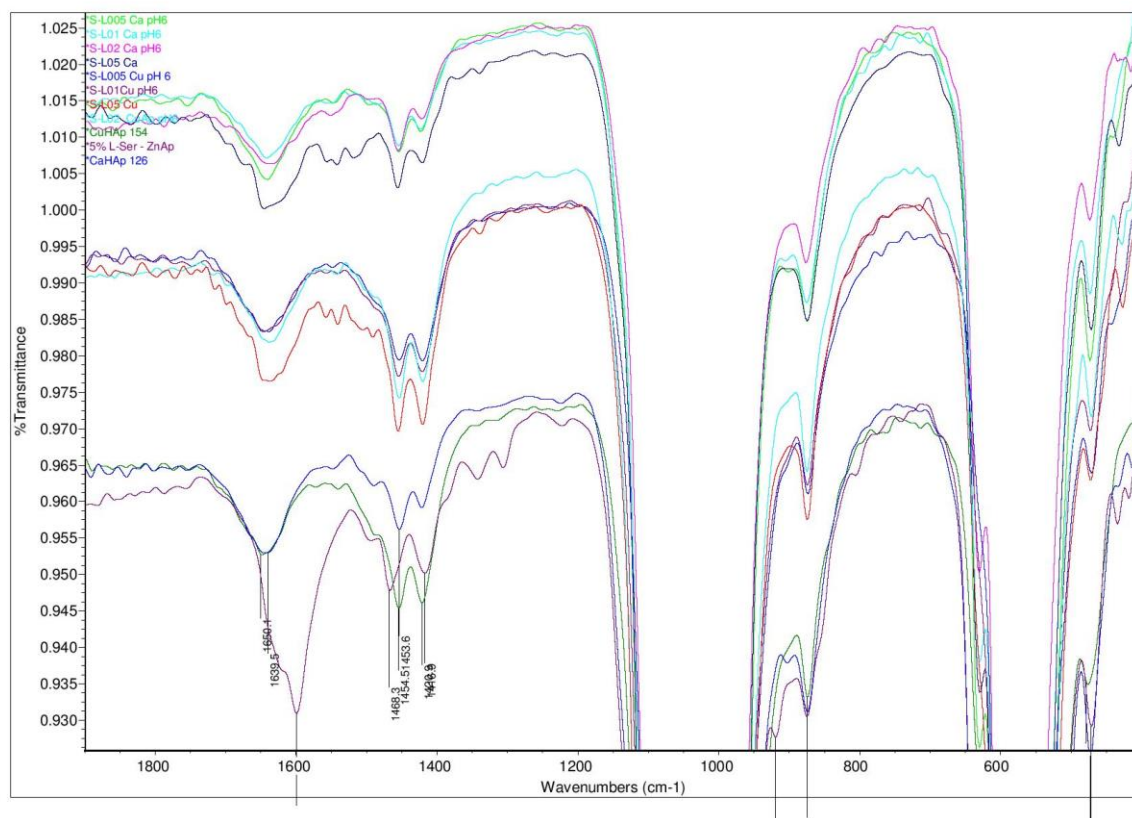
Joonis 3.15. IP spektrid: CaAp, CuAp, 5%-ne OPL-Ser/CaAp mehaaniline segu, OPL-Ser-ga (0,005-0,02 M; pH=6) loksutatud Cu- ja CaAp-d.



Joonis 3.16. OPL-Ser-ga loksutatud CaAp IP- spektrid lainearvu vahemikus 920-650 cm^{-1} .

Kompleksühendi Cu(L-Ser)_2 moodustumise korral tekivad nõrga intensiivsusega piigid lainearvudel 583 cm^{-1} ($\nu \text{ M-O}$) või 473 cm^{-1} ($\nu \text{ M-N}$) [3]. Antud töö spektritel esinevad nõrgad piigid lainearvul 473 cm^{-1} , kuid müra puhta apatiidi spektris ei võimalda selle piirkonna piike omavahel võrrelda. L-Ser pH = 8 lahustega töödeldud Ca- ja CuAp-de IP spektritel olulisi muutuseid ei fikseeritud (LISA 9).

Aminohapete karboksüülrühmale on iseloomulik asümmeetriline valentsvõnkumine lainepikkusel $1635\text{-}1618 \text{ cm}^{-1}$ ning aminorühmade võnkumised lainepikkusel 2600 cm^{-1} . Kompleksühendite moodustumisel need piigid nihkuvad $20\text{-}30 \text{ cm}^{-1}$, mis näitab karboksülaadi ja metalli-iooni kompleksi tekkimist. Protoneeritud aminorühma valentsvõnkumised (asümmeetriline $1560\text{-}1597 \text{ cm}^{-1}$ ning sümmeetriline $1502\text{-}1506 \text{ cm}^{-1}$) komplekside IP spektritel puuduvad, kuid NH_2 deformatsioonivõnkumine esineb 1627 cm^{-1} , mis viitab Cu(II)iooni koostoimele aminorühmaga. Lisaks esineb Cu-N võnkumise piik lainepikkusel $570\text{-}589 \text{ cm}^{-1}$. [23]



Joonis 3.17. IP spektrid: CaAp, CuAp, 5%-ne L-Ser/ZnAp mehaaniline segu, L-Ser-ga (0,005-0,05 M; pH=6) loksutatud Cu- ja CaAp-d.

KOKKUVÕTE

Käesolevas magistritöös uuriti L-Ser ja fosfaatrühma sisaldava OPL-Ser seostumist Ca- ning osalise Cu ja Zn asendustega hüdroksiüülapatiitidega vesilahustes. Töös hinnatakse nii lahuse pH, kontsentratsiooni kui apatiidi koostise mõju sidumisprotsessile.

Töö teoreetilises osas antakse ülevaade apatiitide keemilisest koostisest, omadustest, sünteesimeetoditest ning kasutusalaadest. Lisaks antakse ülevaade aminohapetest, nende adsorptsioonist apatiidi pinnal ning kompleksühendite moodustumisest.

Töö katselises osas valiti esmalt aminohapete tiitrimiskõverate alusel edasisteks katseteks apatiitidega sobivad lahuste pH väärtused. Sidumiskatseteks OPL-Ser-ga valiti kolm pH väärtust 2, 6 ja 8 ning L-Ser-ga kaks pH algväärtust 6 ja 8. Sidumiskatsetest selgus, et suurim pH muutus toimub OPL-Ser lahustes CuAp-ga, mille algne pH = 2. Aminohappe kontsentratsiooni suurenemisel sidumiskatse lahuse pH muutus väheneb, mida võib seletada apatiidi pinna passiiveerimisega aminohappe adsorptsiooni tulemusel. Lisaks väheneb muutus alglahuse pH suurenemisel.

Ca^{2+} , Zn^{2+} ja Cu^{2+} kationide sisaldus on suurim OPL-Ser pH = 2 lahustes ning kasvab kontsentratsiooni tõusuga, mis on tingitud apatiidi lahustuvusest. Happelises lahuses on Cu suhteline lahustuvus väiksem Ca lahustuvusest, kuid kasvab pH tõustes Cu ja aminohappe kompleksi tugevuse suurenemise tõttu. Aminohappe mõju Ca ja Zn lahustuvusele on väiksem, kuna kirjanduse andmetel nende komplekside püsivus on oluliselt väiksem.

UV- spektroskoopiline lähtelahuste, loksutiste ja mudellahuste analüüs näitas aminohappe absorptsiooni lineaarset sõltuvust kontsentratsioonist. Samas mõjutab piigi intensiivsust ja asukohta ka pH ja kationide sisaldus lahuses, mis segab aminohappe kontsentratsiooni määramist loksutistes. Cu - AH kompleksile iseloomuliku absorptsiooni suurus $\lambda = 246$ nm on lineaarses sõltuvuses Cu ionide kontsentratsiooniga lahuses, kuid ka seda mõjutab lahuse pH väärtus.

Adsorptsiooni tulemusel apatiidiga seotud orgaanilise aine sisalduse hindamiseks apatiitide proovides määrati termilise analüüsi käigus eraldunud gaasis lämmastikoksiidide (NO_x) hulk mass-spektroskoopiliselt. Eraldunud lämmastikoksiidide hulk suureneb aminohappe lahuse

konsentratsiooni tõusuga ja pH alanemisega. Termilise andmete alusel, võttes arvesse ka eripindade erinevuse, seotakse L-Ser (0,02 M, pH = 8) 1,3 korda rohkem ja OPL-Ser (0,05 M) alg pH 2 ja 8 korral vastavalt 1,1 ja 1,6 korda rohkem CuAp-ga kui CaAp-ga. Termilise analüüsi andmetel on sidumiskatsetest saadud tahkes faasis OPL-Ser maksimaalne sisaldus 3,9 % 0,01 M lahusest. See näitab, et katsete käigus küllastust ei saavutatud. L-Ser seotakse apatiitidega maksimaalselt 0,7 %.

Puhta apatiidi ja OPL-Ser sidumiskatse tahke jäägi IP spektrite võrdlus näitas uue piigi lisandumist lainepikkusel 752 cm^{-1} , mida algses apatiidis ega mehaanilises segus ei esine. See viitab uute keemiliste sidemete tekkimisele OPL-Ser ja apatiidi vahelisele reaktsiooni tulemusena. Selle piigi intensiivsus kasvab konsentratsiooni ja väheneb pH suurenemisel. Reaktsiooni tulemusel muutuvad ka karbonaatrühma piikide (1453 ja 1421 cm^{-1}) intensiivsuste suhted, mis samuti viitab OPL-Ser keemilisele seostumisele apatiidiga. L-Ser sidumiskatsetes piikide suhted ei muutu, kuid kompleksühendi Cu(L-Ser)_2 moodustumise tõttu esineb nõrk piik lainearvul 473 cm^{-1} (ν M-N).

Kokkuvõtvalt võib öelda, et OPL-Ser adsorptsioonivõime apatiidile ning tekkiva kompleksühendi püsivus on suurem L-Ser-st. Sidumise ulatus sõltub nii pH-st, konsentratsioonist kui ka apatiidi koostisest. Lisaks suurendab Cu asendus CaAp struktuuris aminohappe adsorptsiooni ning loovutab samaaegselt lahusesse kompleksühendite tekkimist soodustavaid Cu ioone.

SUMMARY

Adsorption of L-serine and phospho-L-serine onto Cu and Zn substituted Ca-hydroxyapatite

Frieda Kriisa

This Master's thesis investigates the adsorption effects of L-Serine and phospho-L-Serine onto Cu and Zn substituted Ca-hydroxyapatites. The study evaluates the impact of pH, concentration and ionic composition of the solution on adsorption process.

Introductory part describes apatites in general and provides detailed overview of apatite structure, chemical composition, properties, synthesis methods and utilisation. It also provides a brief overview of amino acids, their adsorption mechanism on apatite surface and formation of complexes.

In the experimental part, the titration curves of amino acids were used to determine the initial pH values for adsorption experiments. The pH values of the OPL-Ser solutions were adjusted at 2, 6 and 8, whereas L-Ser solutions were adjusted at 6 and 8. The results of the experiment show that higher amino acid concentration causes smaller change in pH. This suggests that the surface of apatite is passivated by the adsorbed amino acid. In addition, the change in pH decreases as the initial pH of the solution increases.

Ca^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} solubility is higher in OPL-Ser at pH = 2 and the solubility increases with the amino acid concentration. In acidic solutions Cu^{2+} relative solubility is smaller than Ca^{2+} solubility, but it increases with the rise of pH. This may be explained with the higher complex stability of Cu^{2+} ions at higher pH. Amino acids have smaller effect on Ca^{2+} and Zn^{2+} solubility due to their significantly less stable complexes with amino acids.

The UV absorption values have linear correlation of amino acids concentration but however, determination of their concentration in sorption solutions is impacted by dissolved cations and pH change.

Thermal analysis was used for determination of the content of amino acid adsorbed with apatite by the nitric oxides released during heating. The amount of nitric oxides evolved decreases with

decrease of the concentration of amino acid and increase of the pH of solution. According to the literature, apatite adsorbs 8,2 % OPL-Ser. Thermal analysis revealed that 0,01 M OPL-Ser solution had 3,9 % adsorption onto CaAp, which may refer to unsaturated apatite surface.

IR spectroscopy was used to evaluate changes in chemical structures of the apatites. Additional peak at 752 cm^{-1} suggests OPL-Ser chemisorption onto apatite surface. Intensity of that peak increases with the concentration of OPL-Ser and decreases with the pH rise. As a result of this reaction, the height ratios of the carbonate peaks at 1453 and 1421 cm^{-1} change. Due to the $\text{Cu}(\text{L-Ser})_2$ complex formation, there is a weak absorption peak at 473 cm^{-1} (ν M-N).

In conclusion, OPL-Ser adsorption and complex formation is more stable than that of L-Ser. Adsorption characteristics depend on solution pH and concentration as well as on the composition of apatite. Cu substitution in CaAp increases OPL-Ser adsorption despite the higher releases of Cu^{2+} cations due to the complex formation with amino acid in the aqueous solution.

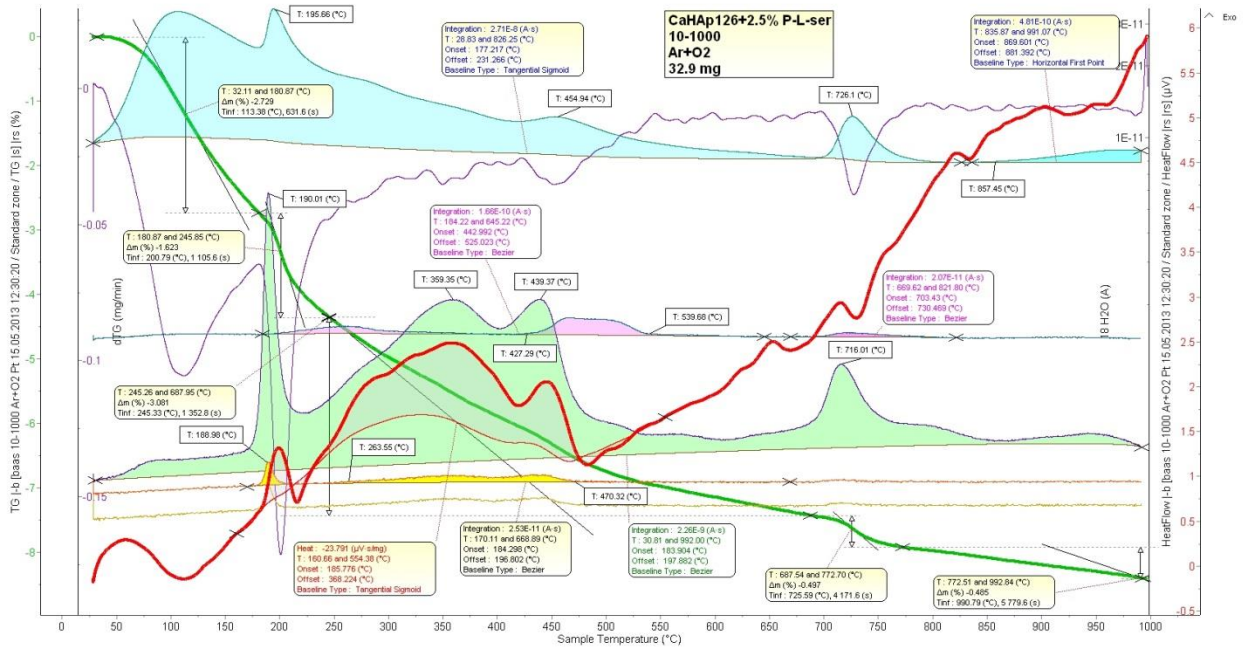
KASUTATUD KIRJANDUS

1. Gruselle, M. Apatites: A new family of catalysts in organic synthesis - Journal of Organometallic Chemistry, 2015, Vol. 793, p. 93-101.
2. Han, J.; Chi, Y. S. Vibrational and Electronic Spectroscopic Characterizations of Amino Acid-Metal Complexes – Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2010, Vol. 53, Issue 6, p. 821-825.
3. Mandal, S.; Das, G.; Askari, H. A Combined Experimental and Quantum Mechanical Investigation on Some Selected Metal Complexes of L-serine with Row Transition Metal Cations – Journal of Molecular Structure, 2015, Vol. 1081, p. 281–292.
4. Jay, E. E.; Rushton, M. J. D.; Grimes, R. W. Migration of fluorine in fluoroapatite – a concerted mechanism – Journal of Materials Chemistry, 2012, Vol. 22, p. 6097-6103.
5. Elliott, J.C. Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates. Elsevier, Amsterdam, 1994. 389.
6. Bengtsson, Å. Solubility and Surface Complexation Studies of Apatites. Doctoral Thesis, Umeå University, Sweden, 2007.
7. Rey, C.; Combes, C.; Drouet, C.; Cazalbou, S.; Grossin, D.; Brouillet, F.; Sarda, S. Surface properties of biomimetic nanocrystalline apatites; applications in biomaterials – Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials, 2014, Vol. 60, p. 63-73.
8. McConnell, D. Apatite Its Crystal Chemistry, Mineralogy, Utilization, and Geologic and Biologic Occurrences. Springer-Verlag, 1973. 111.
9. Ayers, J. C.; Watson, E. B. Solubility of Apatite, Monazite, Zircon, and Rutile in Supercritical Aqueous Fluids with Implications for Subduction Zone Geochemistry – Physical Sciences and Engineering, 1991, Vol. 335, p. 365–375.
10. Skartsila, K.; Spanos, N. Surface characterization of hydroxyapatite: Potentiometric titrations coupled with solubility measurements – Journal of Colloid and Interface Science, 2007, Vol. 308, p. 405-412.
11. Rouquerol, F.; Rouquerol, J.; Sing, K. Adsorption by Powders and Porous Solids. London, GB: Academic Press, 1998. 467.

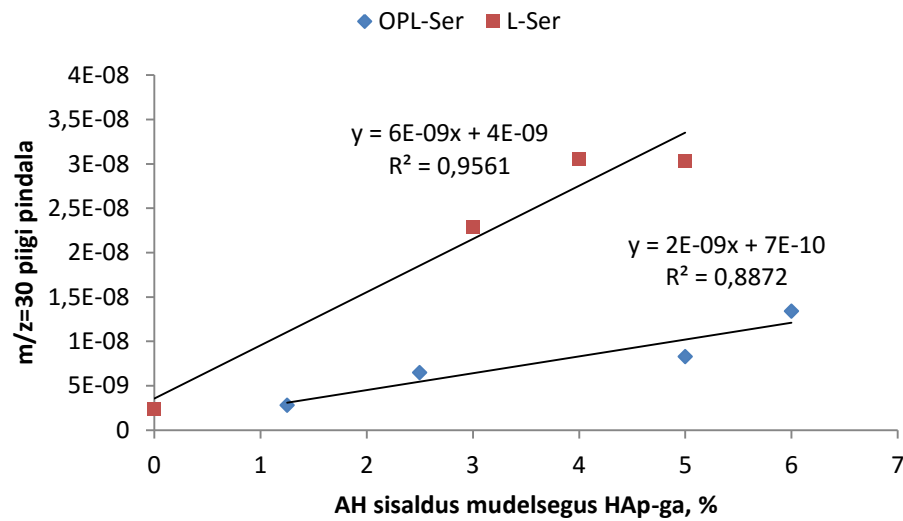
12. Cazalbou, S.; Eichert, D.; Ranz, X. Drouet, C.; Combes, C.; Harmand, M. F.; Rey, C. Ion exchanges in apatites for biomedical applications – *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2005, Vol. 16, Issue 5, p. 405-409.
13. Gomez-Morales, J.; Iafisco, M.; Delgado-Lopez, J.M.; Sarda S.; Drouet, C. Progress on the preparation of nanocrystalline apatites and surface characterization: Overview of fundamental and applied aspects – *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 2013, Vol. 59, p. 1–46.
14. Sadat-Shojai, M.; Khorasani M-T.; Dinpanah-Khoshdargi, E.; Jamshidi, A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures – *Acta Biomaterialia*, 2013, Vol. 9, p. 7591-7621.
15. Mondelli, C.; Ferri, D.; Baiker, A. Ruthenium at work in Ru-hydroxyapatite during the aerobic oxidation of benzyl alcohol: An *in situ* ATR-IR spectroscopy study – *Journal of Catalysis*, 2008, Vol. 258, p. 170-176.
16. Lucas, J.; Lucas, P.; Mercier, T.; Rollat, A.; Davenport, W. Rare Earths - Science, Technology, Production and Use. 1st ed. Elsevier, 2014. 406.
17. Barrett, G. C.; Elmore, D. T. Amino Acids and Peptides. Cambridge University Press, 1998. 224.
18. Fleck, M.; Petrosyan, A. M. Salts of Amino Acids - Crystallization, Structure and Properties. Springer, 2014. 574.
19. Kochergina, L. A.; Drobilova, O. M. The Thermochemical Characteristics of Complex Formation Reactions between 3d Transition Metal Ions and L-Serine in Aqueous Solution – *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2009, Vol. 83, No. 11, p. 1842–1849.
20. Śmiechowski, M. Theoretical pK_a prediction of O-phosphoserine in aqueous solution – *Chemical Physics Letters*, 2010, Vol. 501, p. 123–129.
21. Misra, D. N. Interaction of ortho-Phospho-L-serine with Hydroxyapatite: Formation of a Surface Complex – *Journal of Colloid and Interface Science*, 1997, Vol. 194, p. 249-255.
22. Sandhya, P.; Rashmi, J.; Usha, S. Inorganic Chemistry, Part I. Meerut, IND: Pragati Prakashan, 2010. 164.
23. Kryukova, N. P.; Frolov, V. Yu.; Kolokolov, F. A.; Bolotin, S. N.; Panyushkin, V. T. Synthesis and Study of Copper(II) Complexes with Aspartic Acid, Serine and Valine – *Russian Journal of General Chemistry*, 2005, Vol. 75, No. 4, p. 503-506.

24. Standard Reference Database 46, NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database Version 8.0.
25. Skartsila, K.; Spanos, N. Adsorption monitoring of phospho-L-serine on hydroxyapatite. *Colloid and Polymer Science*, 2012, Vol. 290, Issue 8, p. 731-739.
26. Spanos, N.; Klepetsanis, P. G.; Koutsoukos P. G. Model Studies on the Interaction of Amino Acids with Biominerals: The Effect of L-Serine at the Hydroxyapatite-Water Interface – *Journal of Colloid and Interface Science*, 2001, Vol. 236, p. 260-265.
27. Benaziz, L.; Barroug, A.; Legrouri, A.; Rey, C.; Lebugle, A. Adsorption of o-Phospho-L-Serine and L-Serine onto Poorly Crystalline Apatite – *Journal of Colloid and Interface Science*, 2001, Vol. 238, p. 48-53.
28. El Rhilassi, A.; Mourabet, M.; Bennani-Ziatni, M.; El Hamri, R.; Taitai, A. Interaction of some essential amino acids with synthesized poorly crystalline hydroxyapatite – *Journal of Saudi Chemical Society*, 2013
29. Jarmelo, S.; Reva, I.; Carey, P. R.; Fausto, R. Infrared and Raman spectroscopic characterization of the hydrogen-bonding network in L-serine crystal – *Vibrational Spectroscopy*, 2007, Vol. 43, p. 395-404.
30. Lee, Y. P.; Takahashi, T. An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin – *Analytical Biochemistry*, 1966, Vol. 14., Issue 1, p. 71-77

CaHAp ja 2,5 % OPL-Ser mudelsegu termogramm.

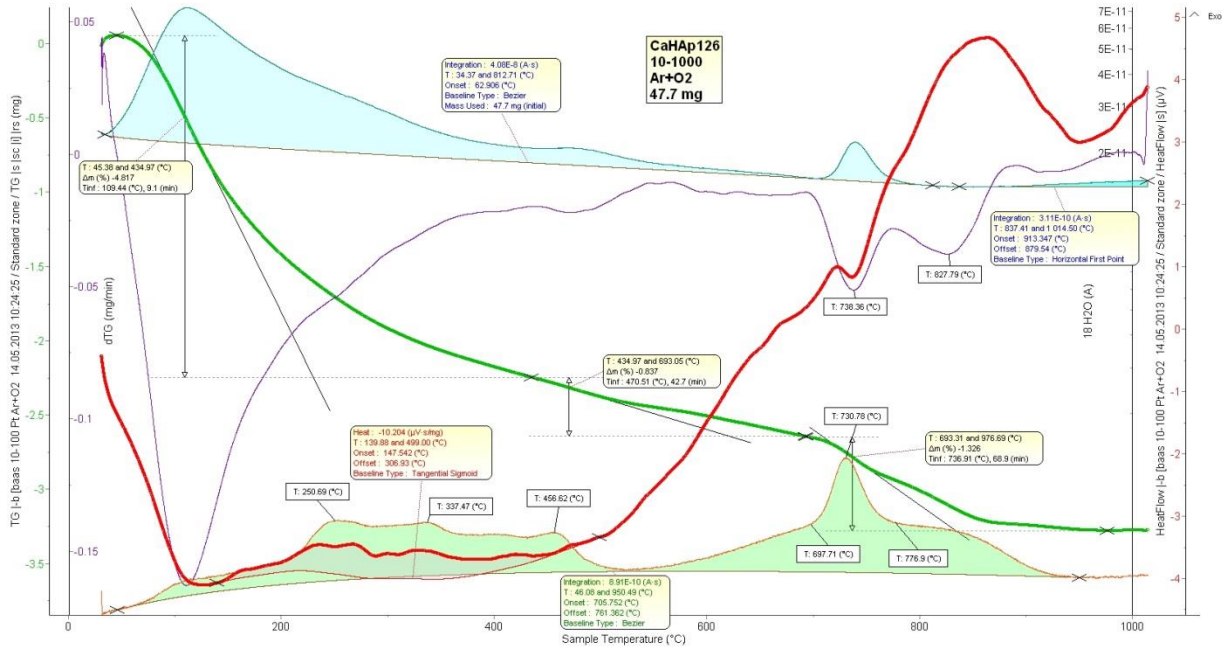


Termoanalüüsi käigus eraldunud gaasis lämmastikoksiidide (NO_x) temperatuurikõvera piigialuse pindala ning mudelsegude AH sisalduse vaheline sõltuvus.



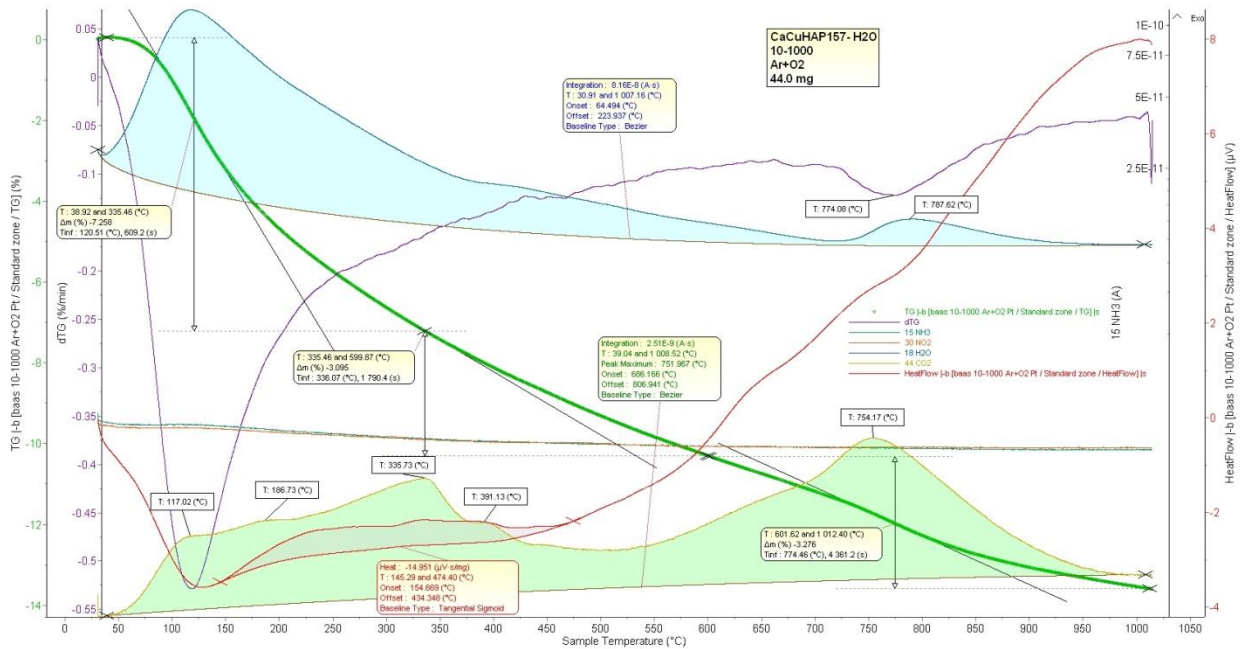
LISA 3

CaAp termogramm

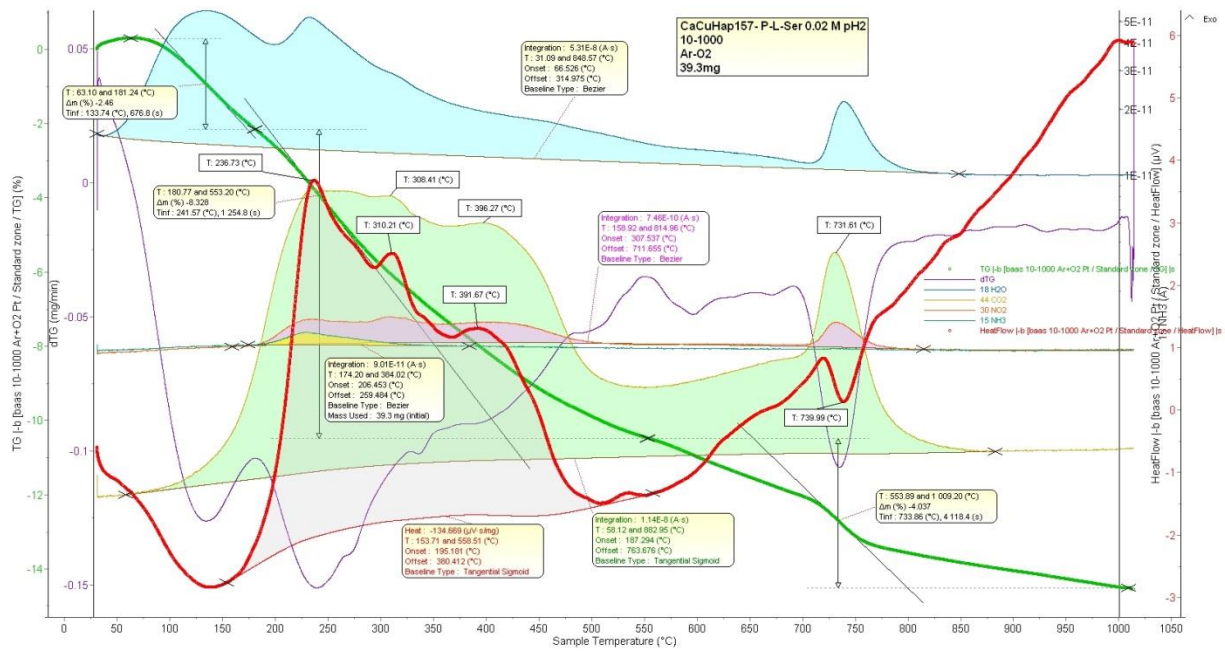


LISA 4

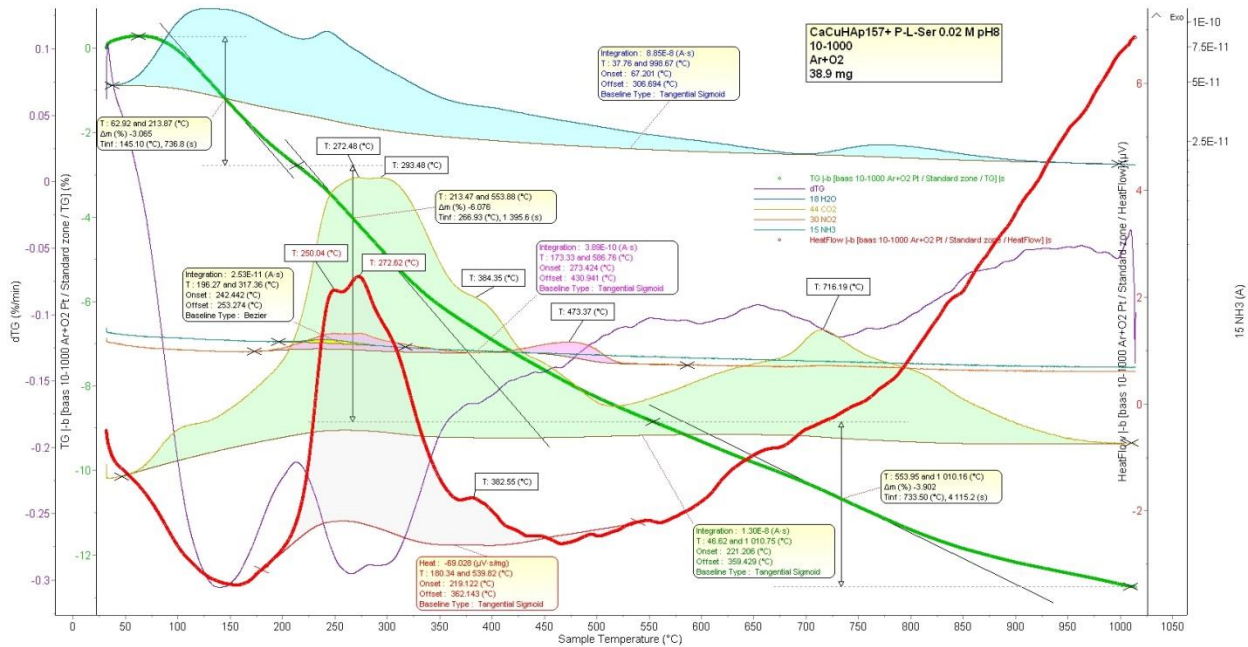
CuAp termogramm



0,02 M pH = 2 OPL-Ser-ga loksutatud CuAp-i termogramm

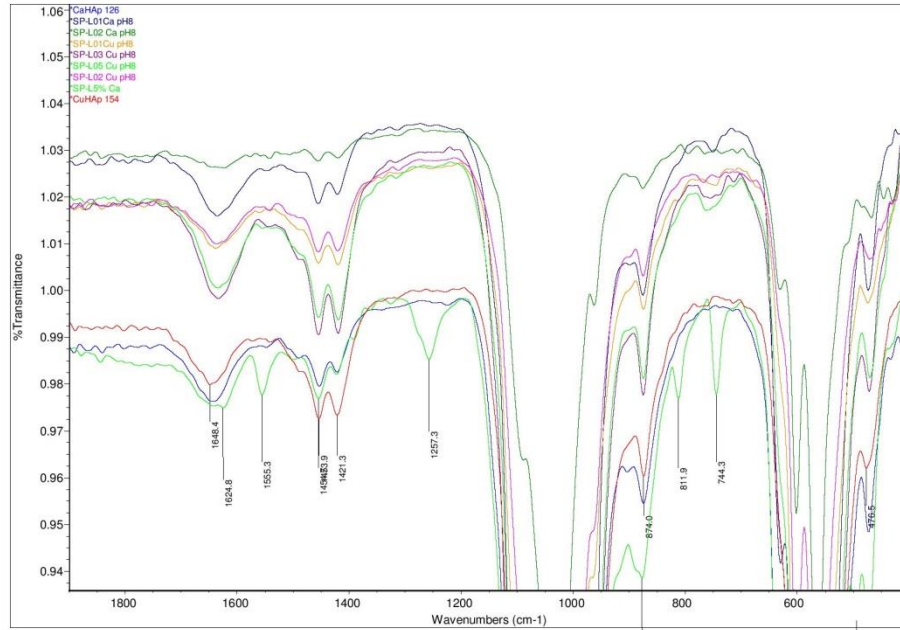


0,02 M pH = 8 OPL-Ser-ga loksutatud CuAp-i termogramm.



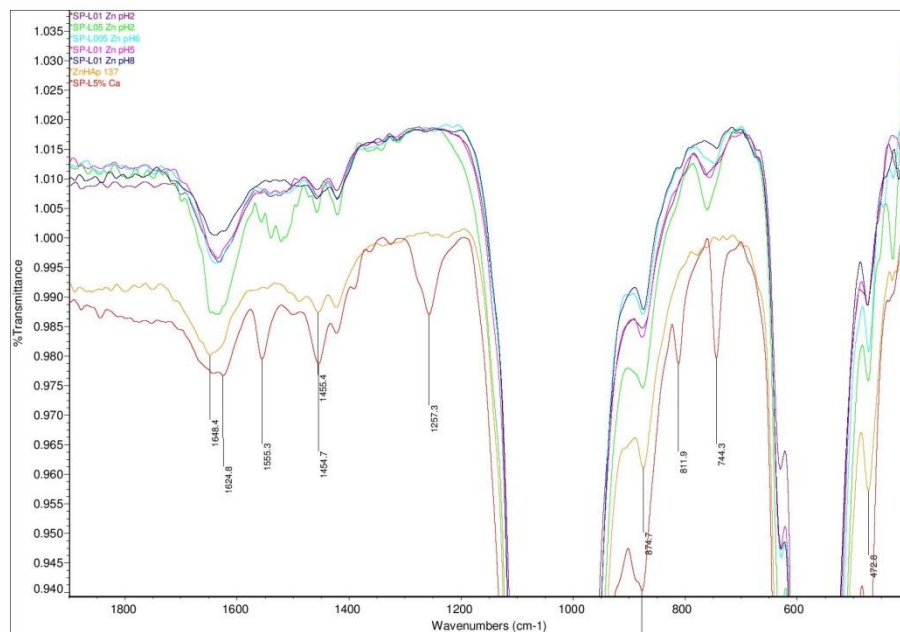
LISA 7

IP-spektrid CaAp, CuAp, 5%-ne OPL-Ser/CaAp mehaaniline segu, OPL-Ser-ga (0,01-0,05 M; pH=8) loksutatud Ca- ja CuAp.



LISA 8

IP-spektrid ZnAp, 5%-ne OPL-Ser/CaAp mehaaniline segu, OPL-Ser-ga (0,005-0,05 M; pH=2;6;8) loksutatud ZnAp.



LISA 9

IP-spektrid CaAp, 5%-ne L-Ser/ZnAp mehaaniline segu, L-Ser-ga (0,01-0,02 M; pH=8)
loksutatud Ca- ja CuAp.

