

УДК 546.41:54.05

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КАЛЬЦИЙ-ДЕФИЦИТНОГО КАРБОНАТСОДЕРЖАЩЕГО ГИДРОКСИАПАТИТА В ПРИСУТСТВИИ ЦИТРАТ-ИОНОВ

Трубицын М. А., Хоанг Вьет Хунг, Фурда Л. В.

*Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия
E-mail: hung.hoangviet191290@gmail.com*

В настоящей работе методом осаждения из водных растворов были получены образцы кальций-дефицитного карбонатсодержащего гидроксиапатита (Ca_d -КГАП) с различными мольными соотношениями $\text{Ca}/(\text{PO}_4^{3-} + \text{CO}_3^{2-})$. Синтез осуществляли в присутствии цитрат-ионов с целью ингибирования роста и предотвращения агрегации кристаллов. Полученные образцы были исследованы различными физико-химическими методами анализа. Результаты рентгенофазового анализа (РФА) показали, что все синтезированные материалы являются однофазными и могут быть идентифицированы как модификация ГАП. Средний размер кристаллитов Ca_d -КГАП и КГАП составляет 17,21 – 23,4 нм. Методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) установлено, что для всех исследуемых материалов частицы имеют игольчатую форму. Длина и ширина кристаллов составляет 40 – 65 нм и 3,0 – 6,5 нм соответственно. После высушивания синтезированных гидрогелей, образцы Ca_d -КГАП и КГАП представляют собой порошки белого цвета. Результаты анализа методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) показали, что полученные нанокристаллы агрегируют в более крупные частицы размером 1–5 мкм. Методом низкотемпературной адсорбции-десорбции азота (БЭТ) выявлено, что исследуемые материалы обладают развитой удельной поверхностью.

Ключевые слова: гидроксиапатит, кальций-дефицитный, карбонатсодержащий, биоматериал, цитрат-ионы, фазовый состав, размер частиц.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время биоматериалы на основе синтетического гидроксиапатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, ГАП) в силу химического сходства с костной тканью находят широкое применение в медицинской практике (стоматологии, ортопедии, хирургии) в виде керамики, цементов, композитов, покрытий и т.д. [1–3].

Известно, что минеральный состав костей человека и животных не отвечает стехиометрическому ГАП и может рассматриваться как кальций-дефицитный карбонатсодержащий гидроксиапатит с молярным соотношением $\text{Ca}/(\text{PO}_4^{3-} + \text{CO}_3^{2-}) < 1,67$ [$\text{Ca}_{10-d}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x-y}(\text{CO}_3)_y(\text{OH})_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, Ca_d -КГАП], который, как показано во многих работах [4–6], обладает лучшей биоактивностью и биорезорбируемостью по сравнению с немодифицированным гидроксиапатитом. Как следствие, в последние годы Ca_d -КГАП весьма эффективно используется в качестве биосовместимых имплантатов.

На данный момент известны различные методы синтеза нанокристаллического Ca_d -КГАП из которых выделяют: мокрый (осаждение из растворов) [7], сухой

(твердофазный синтез) [8], гидротермальный [9] и золь-гель [10]. Методика и параметры синтеза в значительной степени оказывают влияние не только на фазовый состав, термическую стабильность, но и на морфологию и размер частиц синтезируемых материалов. Известно, что цитрат-ионы являются модификаторами кристаллических структур и способны ингибировать рост и агрегацию кристаллов [11]. Поэтому разработка способа получения стабильного монофазного нанокристаллического Са_д-КГАП является актуальным направлением исследования.

Целью настоящей работы является разработка способа получения Са_д-КГАП в присутствии цитрат-ионов, а также изучение его морфологии и физико-химических характеристик.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе были получены образцы Са_д-КГАП с мольными соотношениями Са/(PO₄³⁻+CO₃²⁻) - 1,33; 1,50; 1,58; а также 1,67 в качестве сравнения (индексы образцов – Са_д-КГАП 1,33; Са_д-КГАП 1,50; Са_д-КГАП 1,58; КГАП 1,67 соответственно). Синтез образцов Са_д-КГАП и КГАП осуществляли по авторской методике осаждением из водного раствора следующих реагентов: хлорида кальция (CaCl₂), гидрокарбоната натрия (NaHCO₃) и дигидроортофосфата натрия (NaH₂PO₄). В качестве источника цитрат-ионов в данную систему вводили лимонную кислоту. Синтез проводили при интенсивном перемешивании с помощью верхнеприводной мешалки в течение 20 минут при комнатной температуре и pH на уровне 10,5. Затем реакционную смесь постепенно нагревали до 80 °С и выдерживали в температурном интервале 80 °С – 90 °С в течение 4 ч. Полученный осадок отфильтровывали, промывали дистиллированной водой и сушили при 110 °С до постоянной массы. Далее полученные образцы измельчали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния и просеивали через сито с отверстиями диаметром 0,25 мм.

Количественное определение кальция проводили комплексонометрическим титрованием. Содержание карбонатов в высушенных образцах Са_д-КГАП и КГАП определяли алкалометрическим методом [12]. Для количественного определения фосфора в полученных материалах использовали спектрофотометрический метод на приборе LEKI SS1104 при длине волны λ=420 [13]. Все синтезированные образцы имели фактическое мольное соотношение Са/(PO₄³⁻+CO₃²⁻) близкое к проектному.

Рентгенофазовый анализ полученных порошков Са_д-КГАП и КГАП проводили на дифрактометре Rigaku Ultima IV с излучением CuK_α при λ = 1.54178 Å в интервале 2θ=5-85 °. Результаты обрабатывали с использованием базы данных ICDD, PDF 2008 и программы PDXL Qualitative Analysis. Размер первичных кристаллитов рассчитывали по формуле Шеррера [14].

Морфологию поверхности полученных материалов исследовали при помощи просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 фирмы «JEOL», Япония. Ускоряющее напряжение электронной пушки составило 200 кВ, а материал катода - монокристалл LaB₆. Электронные фотографии в просвечивающем режиме получены при увеличении x200.000.

Особенности структуры порошков Са_д-КГАП и КГАП изучали с помощью растрового электронного микроскопа Quanta 200 3D. Ускоряющее напряжение

электронной пушки составило 5 кВ. Для регистрации изображения материалов использовали CCD камеру с применением преобразования Хуга (Hough). Увеличение изображения до $\times 20.000$.

Определение удельной поверхности ($S_{уд.}$), объема и среднего размера пор исследуемых материалов проводили методом Брюнера-Эммета-Теллера (БЭТ) при температуре 77К на автоматизированной сорбционной установке TriStar II 3020 (фирма «Micromeritics», США). Величина удельной поверхности рассчитывалась по изотерме низкотемпературной адсорбции паров азота по односточному методу БЭТ в точке $P/P_0 = 0,3189$, объем пор при $P/P_0 = 0,980666$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты РФА подтвердили, что синтезированные материалы являются однофазными (рис. 1) и могут быть идентифицированы как модификация ГАП, т.е. принадлежат к той же пространственной группе, что и гидроксипатит – гексагональная сингония $R\bar{3}m$. Характеристики образцов представлены в таблице 1.

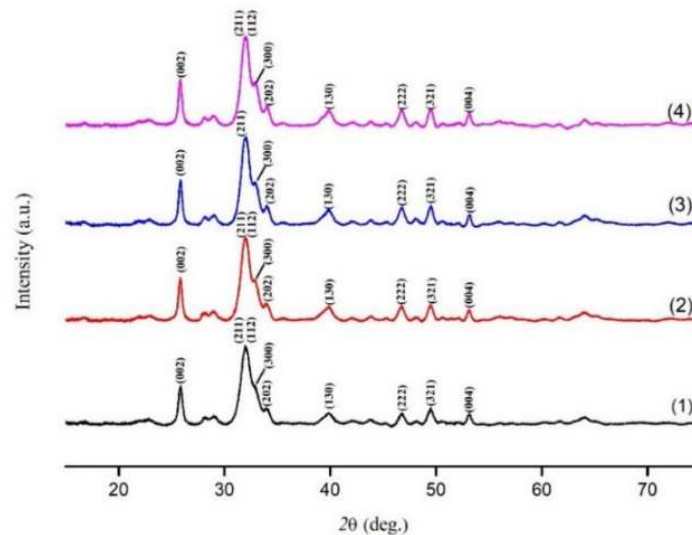


Рис. 1. Рентгеновские порошковые дифрактограммы полученных образцов: (1) – Ca_d -КГАП 1,33; (2) - Ca_d -КГАП 1,50; (3) - Ca_d -КГАП 1,58; (4) - КГАП 1,67.

Расчеты по формуле Шеррера показали, что средний размер кристаллитов для Ca_d -КГАП и КГАП составляет от 17,21 до 23,4 нм. Это согласуется с предположением, что цитрат-ионы в реакции могут ограничивать рост кристаллов ГАП в процессе их созревания. Для Ca_d -КГАП при увеличении мольного соотношения $Ca/(PO_4^{3-}+CO_3^{2-})$ наблюдается тенденция к росту размера кристаллитов. По мере приближения значения мольного отношения к

стехиометрическому отмечается уменьшение параметров элементарной ячейки a, b, c в частности, и объема элементарной ячейки веществ в целом.

Таблица 1
Характеристики образцов Са_д-КГАП и КГАП по данным РФА

Образец	Число фаз	Параметры элементарной ячейки, нм		Степень кристалличности, %	Средний размер кристаллитов, нм
		a = b	c		
Са _д -КГАП 1,33	1	0,9404	0,6897	73,69	17,21
Са _д -КГАП 1,50	1	0,9404	0,6889	91,16	19,92
Са _д -КГАП 1,58	1	0,9390	0,6880	82,39	23,40
КГАП 1,67	1	0,9380	0,6875	89,84	18,50

Метод просвечивающей электронной микроскопии был использован для изучения морфологии полученных материалов и оценки размеров частиц после синтеза. Установлено, что для всех исследуемых образцов частицы имеют игольчатую форму, длина и ширина кристаллов 40 – 65 нм и 3,0 – 6,5 нм соответственно. На рисунке 2 в качестве примера представлено ПЭМ-изображение синтезированного образца Са_д-КГАП 1,50.

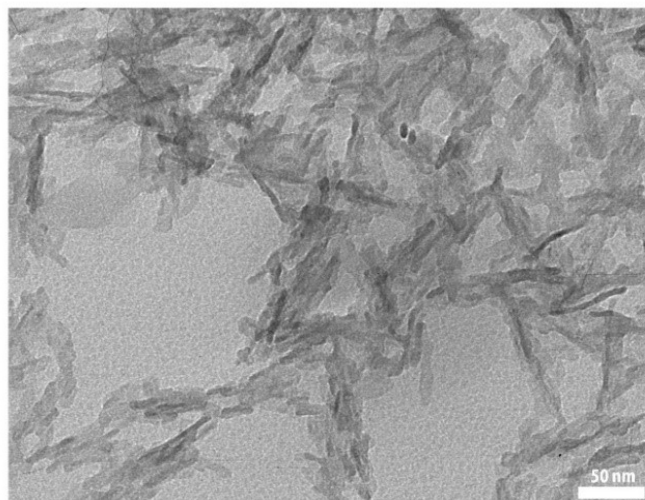


Рис. 2. ПЭМ-изображение образца Са_д-КГАП 1,50.

После высушивания синтезированных гидрогелей, образцы Са_д-КГАП и КГАП представляют собой порошки белого цвета. В ходе проведенного анализа РЭМ-изображений установлено, что во всех синтезированных образцах нанокристаллы агломерируют в более крупные частицы размером 1-5 мкм. На рисунке 3 приведены РЭМ-изображения для порошков Са_д-КГАП 1,50 и КГАП 1,67 в качестве примера.

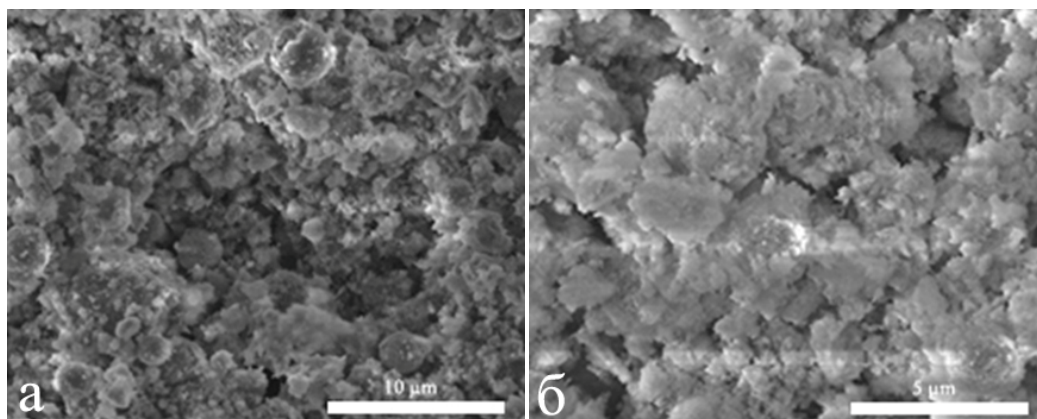


Рис. 3. РЭМ-изображения порошков: а) Са_д-КГАП 1,50 и б) КГАП 1,67.

Методом БЭТ установлено, что все исследуемые материалы обладают достаточно развитой удельной поверхностью (табл. 2), что может положительно отразиться на сорбционных свойствах данных образцов. Следует отметить, что для Са_д-КГАП наблюдается тенденция к увеличению удельной поверхности, в то время как объем пор и размер пор уменьшаются по мере того, как уменьшается отношение Са/(РО₄³⁻+СО₃²⁻).

Таблица 2

Текстурные характеристики образцов Са_д-КГАП и КГАП

Образец	Удельная поверхность, м ² /г	Объем пор, см ³ /г	Средний диаметр пор, Å
Са _д -КГАП 1,33	133,4	0,42	124,4
Са _д -КГАП 1,50	131,5	0,44	132,0
Са _д -КГАП 1,58	128,9	0,43	134,0
КГАП 1,67	142,5	0,39	109,1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Методом осаждения из водных растворов синтезированы наноразмерные образцы Са_д-КГАП с мольными соотношениями Са/(РО₄³⁻+СО₃²⁻) – 1,33; 1,50; 1,58 в присутствии цитрат-ионов.
2. Установлено, что исследуемые материалы являются однофазными и могут быть идентифицированы как модификация ГАП. Средний размер кристаллитов составляет от 17,21 до 23,4 нм.
3. Все синтезированные образцы в виде гидрогелей имеют игольчатую форму кристаллов длиной 40-65 нм и шириной 3,0–6,5 нм.
4. Порошки Са_д-КГАП и КГАП обладают достаточно развитой удельной поверхностью (128,9–142,5 м²/г).

Работа выполнена с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования "Технологии и Материалы НИУ "БелГУ".

Список литературы

1. Haider A. Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review / A. Haider, S. Haider, S. S. Han, I-K Kang // RSC Advances. – 2017. – Vol. 7. – P. 7442–7458.
2. Mucalo M., editor. Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications. 1st Edition / Mucalo M. // Elsevier. – 2015. – 404 p.
3. Kasir R. Inductive biomaterials for bone regeneration / R. Kasir, V. N. Vernekar, C. T. Laurencin // Materials Research. – 2017. – Vol. 32. – P. 1047–1060.
4. Pietak A. M. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics / Pietak A. M., Reid J. W., Stott M. J., Sayer M. // J. Biomater. – 2007. – Vol. 28. – P. 4023–4032.
5. Best S. M. The osteogenic behaviour of silicon substituted hydroxyapatite / S. M. Best, S. Zou, R. Brooks, J. Huang, N. Rushton, W. Bonfield // J. Key Eng. Mater. – 2008. – Vol. 361. – P. 985–998.
6. Трубицын М. А. Исследование резорбируемости и биосовместимости модифицированных наногидроксиапатитов / М. А. Трубицын, Н. Г. Габрук, С. В. Надеждин, В. Т. Ле, В. Д. Доан // Журнал Нанотехнологии и Охрана Здоровья. – М: Изд-во «ВЕЛТ». – 2013. – Вып. 3 (16). – С. 44–48.
7. Abidi S. A. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction / S. A. Abidi, Q. Murtaza // J. Mater. Sci. Technol. – 2013. – Vol. 30. – P. 307–310.
8. Youness R. A. Molecular modeling, FTIR spectral characterization and mechanical properties of carbonated-hydroxyapatite prepared by mechanochemical synthesis / R. A. Youness, M. A. Taha, H. Elhaes, M. Ibrahim // Mater Chem Phys. – 2017. – Vol. 190. – P. 209–218.
9. Qi Y. The morphology control of hydroxyapatite microsphere at high pH values by hydrothermal method / Y. Qi, J. Shen, Q. Jiang, B. Jin, J. Chen, X. Zhang // Adv Powder Technol. – 2015. – Vol. 26. – P. 1041–1046.
10. AlHammad M. S. Nanostructure hydroxyapatite-based ceramics by sol–gel method / M. S. AlHammad // J Alloys Compd. – 2016. – Vol. 661. – P. 251–256.
11. Skwarek E. Adsorption of citrate ions on hydroxyapatite synthesized by various methods / E. Skwarek, W. Janusz, D. Sternik // J Radioanal Nucl Chem. – 2014. – Vol. 299. – P. 2027–2036.
12. Воробьева Л. А. Химический анализ почв. / Воробьева Л. А. – М.: Изд-во МГУ, 1998. – 272 с.
13. ГОСТ 24024.9-81. Фосфор и неорганические соединения фосфора. Метод определения монофосфатов. М.: Изд-во стандартов, 1997. – 3 с.
14. Гинье А. Рентгенография кристаллов. Теория и практика. / Гинье А. – М.: ГИФМЛ, 1961. – 604 с.

SYNTHESIS AND INVESTIGATION STRUCTURAL-MORPHOLOGICAL OF
THE PROPERTIES OF CALCIUM-DEFICIENT CARBONATED
HYDROXYAPATITE IN THE PRESENCE OF CITRATE-IONS

Trubitsyn M. A., Hoang Viet Hung, Furda L. V.

*Belgorod National Research University, Belgorod, Russia
E-mail: hung.hoangviet191290@gmail.com*

It is known that the chemical composition of human and animal bones does not correspond to stoichiometric hydroxyapatite and can be considered as calcium-deficient carbonate-containing hydroxyapatite with a molar ratio $\text{Ca}/(\text{PO}_4^{3-} + \text{CO}_3^{2-}) < 1,67$ [$\text{Ca}_{10-d}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x-y}(\text{CO}_3)_y(\text{OH})_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, CadHCAp], which has better bioactivity and bioresorbability compared to unmodified hydroxyapatite. As a result, in recent years, CadHCAp has been very effectively used as biocompatible implants.

In the present work, samples CadHCAp were obtained at different $\text{Ca}/(\text{PO}_4^{3-} + \text{CO}_3^{2-})$ molar ratios by precipitation from aqueous solutions. The synthesis was carried out in the presence of citrate ions in order to inhibit growth and prevent crystal aggregation. The obtained samples were investigated using various physical-chemical methods of analysis. The results of x-ray phase analysis (XRD) showed that all synthesized materials are single-phase and can be identified as a modification of HAp. The average crystallite size of CadHCAp and CHA ranges from 17.21 to 23.4 nm. Transmission electron microscopy (TEM) analysis reveals that the nanoparticles of all studied samples were found in the form of needle-shaped. The length and width of the crystals is 40 – 65 nm and 3.0 – 6.5 nm, respectively. After drying the synthesized hydrogels, white powders of CadHCAp and CHA were received. The results of analysis by scanning electron microscopy (SEM) showed that, the obtained nanocrystals agglomerate into larger particles (1–5 μm). By the method of low-temperature adsorption-desorption of nitrogen (BET), it was found that the studied materials have a developed specific surface. The obtained results allow concluding that samples of CadHCAp are promising biomaterials for medical applications.

Keywords: hydroxyapatite, calcium-deficient, carbonate-containing, biomaterial, citrate ions, phase composition, particle size.

References

1. Haider A., Haider S., Han S. S., Kang I-K., Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review, *RSC Advances*, **7**, 7442 (2017).
2. Mucalo M., editor., Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications. 1st Edition, *Elsevier*, 404p (2015).
3. Kasir R., Vernekar V. N., Laurencin C. T., Inductive biomaterials for bone regeneration, *Materials Research*, **32**, 1047 (2017).
4. Pietak A. M., Reid J. W., Stott M. J., Sayer M., Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics, *J. Biomater*, **28**, 4023 (2007).
5. Best S. M., Zou S., Brooks R., Huang J., Rushton N., Bonfield W., The osteogenic behaviour of silicon substituted hydroxyapatite, *J. Key Eng. Mater*, **361**, 985 (2008).

6. Trubitsyn M. A., Gabruk N. G., Nadezhdin S. V., Le Van Thuan, Doan Van Dat., Investigation of resorbability and biocompatibility of modified nanohydroxyapatites, *Nanotechnology Journal and Health Protection*, **3** (16), 44 (Publishing House "WELT", Moscow, 2013). (*in Russ.*)
7. Abidi S. A., Murtaza Q., Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction, *J. Mater. Sci. Technol*, **30**, 307 (2013).
8. Youness R. A., Taha M. A., Elhaes H., Ibrahim M., Molecular modeling, FTIR spectral characterization and mechanical properties of carbonated-hydroxyapatite prepared by mechanochemical synthesis, *Mater Chem Phys*, **190**, 209 (2017).
9. Qi Y., Shen J., Jiang Q., Jin B., Chen J., Zhang X., The morphology control of hydroxyapatite microsphere at high pH values by hydrothermal method, *Adv Powder Technol*, **26**, 1041 (2015).
10. AlHammad M. S. Nanostructure hydroxyapatite-based ceramics by sol-gel method, *J Alloys Compd*, **661**, 251 (2016).
11. Skwarek E., Janusz W., Sternik D., Adsorption of citrate ions on hydroxyapatite synthesized by various methods, *J Radioanal Nucl Chem*, **299**, 2027 (2014).
12. Vorobieva L. A., Soil chemical analysis, 272 p. ("MGU Publishing House", Moscow, 1998). (*in Russ.*)
13. GOST 24024.9-81., Phosphorus and inorganic phosphorus compounds. Method for the determination of monophosphates, 3 p. ("Publishing house of standards", Moscow, 1997). (*in Russ.*)
14. Guinier A., Crystal X-ray. Theory and practice, 604 p. ("GIFFL", Moscow, 1961). (*in Russ.*)