

СИНТЕЗ КОМПОЗИТОВ ГИДРОКСИАПАТИТА С БИОПОЛИМЕРАМИ С ПОВЫШЕННОЙ МИКРОТВЕРДОСТЬЮ

Н. И. Пономарева¹, Т. Д. Попрыгина¹, С. И. Карпов², Ю. В. Соколов²

¹ Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко

² Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 20.06.11

Аннотация. Методами рентгенофазового анализа, инфракрасной спектроскопии, локального рентгеноспектрального микроанализа, сканирующей электронной микроскопии, просвечивающей электронной микроскопии исследовано образование композитов гидроксиапатита с хондроитинсульфатом и/или желатином, определена микротвердость материалов и найдены условия получения композитов с повышенной твердостью.

Ключевые слова: гидроксиапатит, хондроитинсульфат, желатин, композит, биополимер, микротвердость, рентгенофазовый анализ, инфракрасная спектроскопия, локальный рентгеноспектральный микроанализ, сканирующая электронная микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия.

Abstract. Composites of hydroxyapatite with chondroitin sulfate and/or gelatine has been studied using X-ray diffraction analysis, infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy method, and the conditions for the formation of materials with high microhardness were found.

Keywords: hydroxyapatite, chondroitin sulfate, gelatine, composite, biopolymer, microhardness, X-ray diffraction analysis, infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy.

ВВЕДЕНИЕ

Постоянно возрастающий интерес к гидроксиапатиту $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ГА), основному неорганическому компоненту костной ткани, обусловлен возможностями его применения в репаративной медицине: существуют керамические материалы, цементы, пасты, суспензии, покрытия на основе этого гидроксифосфата кальция, а также многочисленные обзоры [1—4], подробно рассматривающие как недостатки, так и преимущества этих форм. В настоящее время основные усилия исследователей направлены на достижение необходимых механических характеристик новых материалов [3—5], большей биосовместимости с тканями организма [6, 7], легкости практического применения [8]. Для получения биоактивных материалов синтез ГА проводят в средах, содержащих органические вещества, в результате чего образуются композиционные материалы, не обладающие, к сожалению, необходимой прочностью. Целью данной работы является синтез и исследование биокомпозитов ГА, обладающих повышенной микротвердостью. В качестве полимеров были выбраны хондроитинсульфат и желатин (продукт

гидролиза коллагена), имеющие отношение к формированию нативной костной ткани.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

При синтезе композитов «ГА/биополимеры» с соблюдением стехиометрического соотношения $\text{Ca:P} = 1.67$ исходными растворами служили 0.1M нитрат кальция (Schering-Kahbaum, Германия) и 0.06M гидрофосфат аммония (Merck, Германия). Добавление фосфатного раствора к кальциевому производили по каплям с помощью делительной воронки в течение 9 часов, для достижения и поддержания постоянного значения $\text{pH} = 10$ в систему добавляли раствор аммиака. Желатин добавляли в конце синтеза (количество изменяли от 0.1 % до 1.0 % в конечном растворе), хондроитинсульфат натрия вводили в начале (от 0.1 % до 1.0 %). Перемешивание раствора осуществляли с помощью магнитной мешалки. Температуру в системе увеличивали с 15 до 55 °C в течение первого часа синтеза, затем 8 ч поддерживали постоянную температуру 55 °C. Осадки фильтровали с помощью вакуумного насоса и фильтра Шотта Ø40, Ø16, промывали кипяченой дистиллированной водой, сушили на воздухе.

При синтезе композитов «ГА/биополимеры» с мольным соотношением $\text{Ca:P} > 1.67$ использовали следующие методики.

© Пономарева Н. И., Попрыгина Т. Д., Карпов С. И., Соколов Ю. В., 2012

Синтез композитов «ГА/хондроитинсульфат»

К 0.1М раствору нитрата кальция добавляли хондроитинсульфат (0.25 % в исходном растворе), перемешивали, затем из делительной воронки по каплям добавляли 0.06М гидрофосфат аммония в течение 9 ч при $t = 55\text{ }^\circ\text{C}$, осадок оставляли без перемешивания и нагревания на 10 ч, добавляли нитрат кальция (от 1 до 10 ммоль избытка Ca^{2+} по отношению к стехиометрическому количеству, присутствующему в растворе изначально) и осуществляли дополнительное перемешивание с нагреванием ($55\text{ }^\circ\text{C}$) в течение 5 ч.

Синтез композитов «ГА/желатин»

Осуществляли синтез ГА добавлением фосфатного раствора к кальциевому (см. предыдущую методику), поддерживая $\text{pH} = 10$ с помощью раствора аммиака, через 9 часов добавляли от 1 до 10 ммоль избытка Ca^{2+} по отношению к стехиометрическому количеству, присутствующему в растворе изначально, через 10 часов созревания осадка добавляли желатин (0.5 % в конечном растворе), осуществляли дополнительное перемешивание с нагреванием ($55\text{ }^\circ\text{C}$) в течение 5 ч.

Синтез композитов

«ГА/хондроитинсульфат/желатин»

К 0.1М раствору нитрата кальция добавляли хондроитинсульфат (0.25 %), перемешивали, из делительной воронки по каплям добавляли 0.06 М гидрофосфат аммония в течение 9 ч при $t = 55\text{ }^\circ\text{C}$, затем добавляли нитрат кальция (от 1 до 10 ммоль избытка Ca^{2+} по отношению к стехиометрическому количеству, присутствующему в растворе изначально), осадок оставляли без перемешивания и нагревания на 10 ч, добавляли желатин (0.5 %) и осуществляли дополнительное перемешивание с нагреванием ($55\text{ }^\circ\text{C}$) в течение 5 ч.

Электронная микроскопия (SEM) проводилась на приборе JSM-6380 LV (Япония), элементный анализ (ЛРСМА) выполняли с помощью приставки INCA Energy-250. ИК-спектры в интервале $4000\text{—}400\text{ см}^{-1}$ снимали на ИК-спектрометрах Инфралюм ФТ-02, Specord IR-75, образцы прессовали в таблетки с КВг. Дифрактограммы получены на приборах ДРОН-3М, ДРОН-7, излучение CuK_α , скорость сканирования $2\text{ }^\circ/\text{мин}$. Микротвердость по Виккерсу определяли на микротвердомере ПМТ-3 (увеличение 130 и $487\times$, алмазная пирамида с углом между гранями 136° , острием при вершине 1 мкм , пределы нагрузки $2\text{—}200\text{ Гс}$), а также твердомере FISCHER-SCOPE H100C (Германия). При подготовке к измерениям образцы высушивали при комнатной температуре в формах с плоскопараллельными гранями.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Композиты, полученные при идеальном мольном соотношении $\text{Ca:P} = 1,67$

Обнаружено, что с увеличением концентрации полимеров микротвердость изменяется незначительно, достигая максимального значения 5.03 кгс/мм^2 (49.3 Мн/м^2) для композитов «ГА/хондроитинсульфат» и 3.36 кгс/мм^2 (32.9 Мн/м^2) для композитов «ГА/желатин». Соответствующие оптимальные концентрации (0.25 % хондроитинсульфата и 0.5 % желатина) в растворе, приводящие к 7.2 вес. % хондроитинсульфата и 4.3 вес. % желатина в композите, а также другие условия синтеза (температура, порядок добавления реагентов) использовались для получения тройных композитов «ГА/хондроитинсульфат/желатин», максимальное значение твердости которых составило 4.60 кгс/мм^2 (45.1 Мн/м^2). Увеличение содержания серы в композитах (до 0.26 ат. %) коррелирует с увеличением суммарного содержания полимеров (8.35 ± 0.53 вес. %, гравиметрически), что может косвенно свидетельствовать о преимущественном связывании кристаллов ГА молекулами хондроитинсульфата, а не желатина. Данные РФА и ИКС подтверждают, что между молекулами биополимеров и кристаллами ГА существуют только слабые адсорбционные взаимодействия.

Композиты,

полученные при мольном соотношении $\text{Ca:P} > 1,67$

Уменьшение агломерации частиц ГА и увеличение степени связывания полимеров гидроксиапатитом приводит к изменению свойств материалов, в том числе их твердости. С этой целью синтез композитов проводился в присутствии избытка солей кальция. Введение избыточного количества ионов Ca^{2+} придает положительный заряд грануле коллоидного ГА, усиливая взаимодействие частиц с отрицательно заряженными в щелочной среде желатином и хондроитинсульфатом, находящимся в ионизированном состоянии.

Композиты «гидроксиапатит/хондроитинсульфат», полученные при избытке ионов кальция в растворе

При введении избыточного количества растворимой соли кальция в соответствующие системы наблюдается резкое увеличение твердости полученных образцов (рис. 1). На микрофотографиях SEM видна кластерно-агрегатная структура, границы частиц достаточно четкие, средний размер агрегата 0.2 мкм . ИК-спектры соответствующих соединений подтверждают образование композита гидроксиапатита с хондроитинсульфатом. Образуется множество внутримолекулярных и межмолеку-

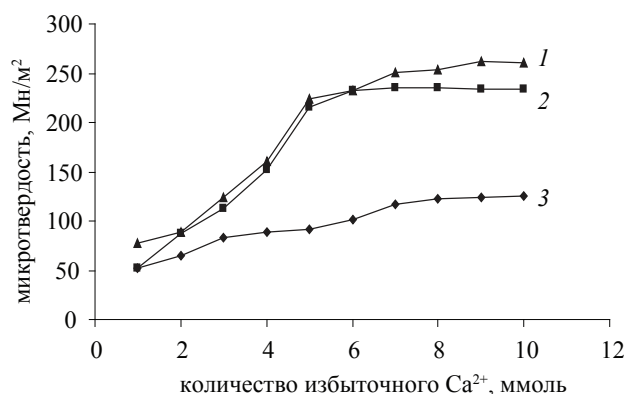


Рис. 1. Зависимость твердости композитов ГА с биополимерами от количества добавленного в раствор избытка Ca²⁺: 1 — «ГА/хондроитинсульфат/желатин»; 2 — «ГА/хондроитинсульфат»; 3 — «ГА/желатин»

кулярных водородных связей, новых ковалентных связей не обнаружено. Наличие интенсивных характерных полос поглощения хондроитинсульфата при волновых числах $\nu = 717, 1222, 1250 \text{ см}^{-1}$, и т.д. говорит о большей степени связывания хондроитинсульфата гидроксиапатитом в данной системе, что подтверждают также данные элементного анализа: количество органического полимера в составе композита увеличилось (до 11,58 вес. % хондроитинсульфата, 0,35—0,4 ат % S, и т.д.), однако и соотношение Са:Р изменялось в пределах 1,67—1,79, т.е. всегда превышало стехиометрическое, характерное для ГА (см. табл. 1). На дифрактограммах отдельных образцов наряду с пиками

ГА обнаруживаются рефлексы, соответствующие следам других фаз, например Ca₄P₂O₉, с соотношением Са:Р = 2.

Композиты «гидроксиапатит/желатин», полученные при избытке ионов кальция в растворе

Эффект увеличения твердости композитов «ГА/желатин», полученных при добавлении избыточного количества солей кальция в соответствующие системы, менее выражен по сравнению с композитами «ГА/хондроитинсульфат» (рис. 1). На изображениях SEM различимы округлые частицы размером менее 50 нм. Типичные дифрактограммы показывают отдельные пики гидроксиапатита ($d = 3,42, 2,81, 2,79, 2,72, 2,60, 2,25, 1,95, 1,84 \text{ \AA}$) на фоне галодиффузионного рассеяния. На ИК-спектрах полученных композитов обнаруживаются полосы колебаний соответствующих функциональных групп. В табл. 2 представлены результаты испытаний образцов.

Композиты «гидроксиапатит/хондроитинсульфат/желатин», полученные при избытке ионов кальция в растворе

В тройной системе «ГА — хондроитинсульфат — желатин» изменение твердости полученных образцов в зависимости от количества добавленного иона кальция более плавное по сравнению с композитами «ГА/хондроитинсульфат» (рис. 1). Максимальное значение твердости составило 262,15 Мн/м², что соответствует введению избыточного количества соли кальция, практически равного первоначальному количеству при синтезе

Таблица 1

Состав и характеристики композитов «ГА/хондроитинсульфат», полученных при избытке иона кальция в растворе

Избыток Ca ²⁺ в растворе, ммоль	Мольное соотношение Са/Р в композите	Содержание хондроитинсульфата в композите, вес. %	Микротверд. Hd, кгс/мм ²	Микротверд. Hd, Мн/м ²
1,0	1,68	7,42	5,33	52,23
2,0	1,67	7,91	8,96	87,84
3,0	1,68	8,54	11,48	112,55
4,0	1,72	9,67	15,56	152,45
5,0	1,75	11,20	23,90	234,22
6,0	1,74	10,83	23,72	232,45
7,0	1,75	11,58	23,99	235,15
8,0	1,79	11,32	23,97	234,87
9,0	1,74	10,95	23,84	233,65
10,0	1,79	11,21	23,89	234,12

Синтез композитов гидроксиапатита с биополимерами с повышенной микротвердостью

композита. Как и во всех остальных образцах, содержащих желатин, в композитах обнаруживается большое количество аморфной фазы. ИК-спектры (рис. 2) обнаруживают наличие характерных мод колебаний функциональных групп хондроитинсульфата и желатина, средний размер частиц составляет 100 нм. В табл. 3 представлены характеристики соответствующих композитов.

Таким образом, при избытке Ca^{2+} гидроксиапатит связывает большее количество биополимера, поэтому соответствующее изменение твердости объясняется изменением не только соотношения Са:Р, но и ГА: полимер. По количеству атомов серы и азота, вошедших в состав композита, можно сделать заключение, что связывание хондроитинсульфата кристаллами ГА увеличилось в большей сте-

Таблица 2

Состав и характеристики композитов «ГА/желатин», полученных при избытке иона кальция в растворе

Избыток Ca^{2+} в растворе, ммоль	Мольное соотношение Са/Р в композите	Содержание желатина в композите, вес. %	Микротверд. Hd, кгс/мм ²	Микротверд. Hd, Мн/м ²
1,0	1,66	4,42	5,32	52,136
2,0	1,67	4,58	6,54	64,092
3,0	1,66	4,64	8,42	82,516
4,0	1,65	4,82	9,09	89,082
5,0	1,66	4,85	9,32	91,336
6,0	1,67	4,83	10,36	101,528
7,0	1,67	5,58	12,00	117,600
8,0	1,66	5,72	12,44	121,912
9,0	1,67	5,91	12,62	123,676
10,0	1,66	6,37	12,72	124,656

Таблица 3

Состав и характеристики композитов «ГА/хондроитинсульфат/желатин», полученных при избытке иона кальция в растворе

Избыток Ca^{2+} в растворе, ммоль	Соотн. Са/Р в композ.	S, ат. %	N, ат. %	Σ содерж. полимеров в композ., вес. %	Микротверд. Hd, кгс/мм ²	Микротверд. Hd, Мн/м ²
1,0	1,67	0,18	0,41	8,12	7,96	78,01
2,0	1,67	0,22	0,43	8,30	9,12	89,38
3,0	1,68	0,21	0,43	8,54	12,62	123,68
4,0	1,71	0,25	0,41	9,72	16,37	160,43
5,0	1,77	0,28	0,44	11,27	22,92	224,62
6,0	1,79	0,27	0,47	13,83	23,72	232,46
7,0	1,80	0,31	0,45	12,58	25,57	250,59
8,0	1,86	0,28	0,48	12,32	25,83	253,13
9,0	1,84	0,30	0,52	13,95	26,75	262,15
10,0	1,88	0,30	0,48	15,21	26,53	259,99

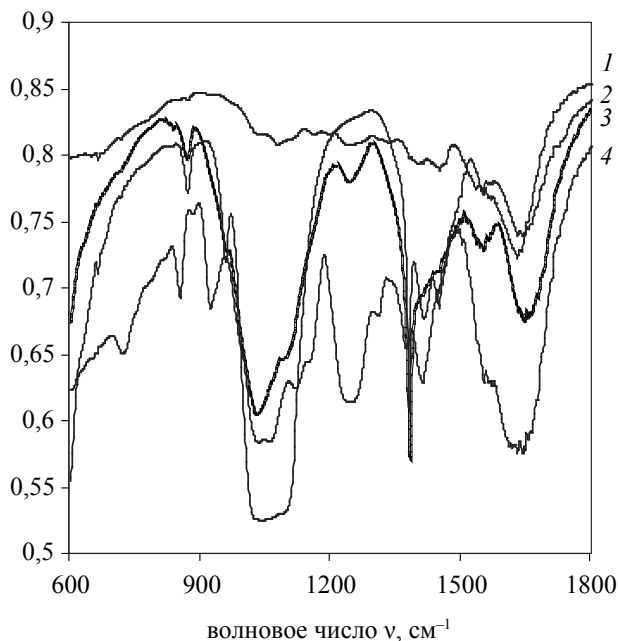


Рис. 2. ИК-спектры (область 600—1800 см⁻¹): 1 — ГА; 2 — желатин; 3 — композит «ГА/хондроитинсульфат/желатин»; 4 — хондроитинсульфат

пени, чем связывание желатина. Согласно экспериментальным данным, изменение твердости происходит в основном за счет присутствия хондроитинсульфата в системе. Твердость материалов, полученных в присутствии избытка растворимых солей кальция, превышает твердость эпоксидных смол с отвердителями и приближается к твердости денток-

сида, норакрила и других стоматологических материалов [9].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Баринов С. М.* Биокерамика на основе фосфатов кальция / С. М. Баринов, В. С. Комлев; под ред. К. А. Солнцева. — М.: Наука, 2005. — 204 с.
2. *Шпак А. П.* Апатиты / А. П. Шпак, В. Л. Карбовский, В. В. Трачевский. — К.: Академперіодика, 2002. — 414 с.
3. *Путляев В. И.* Современные биокерамические материалы / В. И. Путляев // Соровский образовательный журнал. — 2004. — Т.8, №1. — С.44—50.
4. *Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine* / edited by B. D. Ratner [et al]. — San Diego, CA: Academic Press, 1996. — 484 p.
5. *Polymer-polymer complex at the interface of polymethylmetacrylate with hydroxyapatite* / A. P. Krasnov [et al] // Intern.Journ.of Polymeric Mater. — 2004. — Vol. 53. — P. 1—10.
6. *Rusu V. M.* Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic-inorganic composite materials / V. M. Rusu, C. H. Ng, M. Wilke // *Biomaterials*.-2005.-N26. — P. 5414—5426.
7. *Hench L.* Bioceramics / L.Hench // *J.Am.Ceram. Soc.* — 1998. — Vol. 81, N 7. — P. 1705—1728.
8. *Hench L.* Bioceramics: from concept to clinic / L. Hench // *J. Am. Ceram. Soc.* — 1991. — Vol. 74, N 7. — P. 1487—1510.
9. *Кортуков Е.В.* Основы материаловедения: Учеб. пособие для стоматол. фак. мед. вузов / Е. В. Кортуков, В. С. Воеводский, Ю. К. Павлов. — М.: Высш.шк., 1988. — 215с.

Пономарева Наталья Ивановна — профессор, зав. каф. неорганической и физической химии, Воронежской государственной медицинской академии им. Н. Н. Бурденко; тел.: (473) 269-77-28, e-mail: kafneorgvma@yandex.ru

Попрыгина Татьяна Дмитриевна — ассистент кафедры неорганической и физической химии Воронежской государственной медицинской академии им. Н. Н. Бурденко; тел.: (473) 269-77-49, e-mail: tanechka-vma@yandex.ru

Карпов Сергей Иванович — доцент кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета; тел.: (473) 220-88-28, e-mail: sergk@chem.vsu.ru

Соколов Юрий Витальевич — доцент кафедры физики Воронежского государственного университета; тел.: (473) 220-82-44, e-mail: falcon@mail.ru

Ponomareva Natalia I. — professor, head of chair of inorganic and physical chemistry, Voronezh N. N. Burdenko State Medical Academy; tel.: (473) 269-77-28, e-mail: kafneorgvma@yandex.ru

Poprygina Tatiana D. — assistant of chair of inorganic and physical chemistry, Voronezh N. N. Burdenko State Medical Academy; tel.: (473) 269-77-49, e-mail: tanechka-vma@yandex.ru

Karpov Sergey I. — assistant professor of chair of analytical chemistry, Voronezh State University; tel.: (473) 220-88-28, e-mail: sergk@chem.vsu.ru

Sokolov Yuriy V. — assistant professor of chair of physics, Voronezh State University; tel.: (473) 220-82-44, e-mail: falcon@mail.ru