

УДК 542.65

## Исследование свойств гидроксиапатита, выделенного из костной ткани сельскохозяйственных животных

Е. А. ЗЕЛИЧЕНКО, В. В. ГУЗЕЕВ, А. С. РОГУЛИНА, О. А. ГУРОВА, Я. Б. КОВАЛЬСКАЯ

*Северский технологический институт НИЯУ МИФИ,  
проспект Коммунистический, 65, Северск 636036 (Россия)**E-mail: zelichenko65@mail.ru*

(Поступила 10.02.12; после доработки 09.07.12)

### Аннотация

Исследована зависимость свойств кальцийфосфатных соединений от способа их выделения из биологического сырья. Проведены физико-химические исследования свойств полученных материалов. Предложенная методика позволяет получать ультрадисперсные порошки биологического гидроксиапатита с регулируемой дисперсностью и составом, максимально приближенным к составу костной ткани. Установлено, что наиболее близко к минеральному матриксу костной ткани кальцийфосфатное соединение, осажденное из раствора, который получен деминерализацией раствором с содержанием хлороводорода 1 моль/л.

**Ключевые слова:** кальцийфосфатные соединения, осаждение, дисперсность, фазовый состав, стехиометрия

### ВВЕДЕНИЕ

Заместительное восстановление органо-тканевых участков в пораженной области организма – одна из важных проблем современной медицины. Это относится практически ко всем областям хирургии, где необходимо восстановить утраченную структуру органа или ткани и их функциональные характеристики. При этом восстановление должно происходить как за счет специфической структуры и свойств имплантата, так и за счет активации собственных клеточных элементов и усиления регенерации ткани в целом [1]. При создании биосовместимых материалов используют порошки фосфатов кальция, в частности гидроксиапатита (ГА) различного стехиометрического и гранулометрического состава, с различной морфологией. В настоящее время используют гидроксиапатит биологического и искусственного происхождения. Биологический гидроксиапатит преимущественно получают путем обжига костей крупного рогатого скота (КРС) с после-

дующим измельчением. Порошки ГА характеризуются широким спектром дисперсности, включают частицы размером 50–100 мкм. Синтетически ГА в основном получают с использованием растворных и твердофазных методов. Растворные методы включают осаждение, гидротермальный синтез и гидролиз фосфатов кальция. В зависимости от метода синтеза порошки ГА могут различаться по морфологии, удельной поверхности, стехиометрии и степени кристалличности [2].

Для ГА, полученного из биологического сырья, характерен стабильный химический состав и наличие микроэлементов, присущих костному минералу.

В работе [3] описано выделение кальцийфосфатных соединений (КФС) из костной ткани сельскохозяйственных животных с использованием растворов хлороводородной кислоты. Проведенные исследования показали, что применение концентрированных растворов хлороводородной кислоты сопровождается потерей таких остеотропных элементов, как фосфор, магний и сера, а это может негативно

сказаться на биосовместимости имплантационных кальцийфосфатных материалов. По соотношению кальция и фосфора наиболее близки к основной минеральной составляющей костной ткани (ГА) кальцийфосфатные соединения, выделенные из костной ткани КРС с использованием слабых растворов хлороводородной кислоты (для ее деминерализации) и насыщенного раствора гидроксида аммония (для осаждения фосфатов кальция).

Получение ГА из костной ткани животных [4] имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами:

- сохраняется ценный микроэлементный состав, максимально приближенный к составу кости человека;
- можно регулировать размер частиц гидроксиапатита;
- отходы производственного процесса не содержат химически активных и летучих соединений (экологичность процесса);
- простота метода в аппаратном оформлении.

Цель данной работы – получение ультрадисперсного порошка ГА с микроэлементным и фазовым составом, идентичным природной кости.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводились с помощью растрового электронного микроскопа Philips SEM 515 и просвечивающего микроскопа CM 30/STEM с разрешающей способностью до 0.24 нм. Фазовый состав определялся с использованием рентгеновского дифрактометра Shimadzu XRD 6000. Элементный состав определялся с помощью рентгенофлуоресцентного анализа (РФА) на спектрометре VRA-30 и на ИК-спектрофотометре SPECORD M 80. Удельная поверхность частиц ГА определялась с по-

мощью прибора Sorbtometer M ver 1.0.0.0 многоточечным методом БЭТ.

В лабораторных условиях получены кальцийфосфатные соединения из костной ткани КРС.

Исходное сырье готовилось следующим образом [5]: кости сельскохозяйственных животных очищали от параоссальных тканей механическим путем, промывали теплой водой, ополаскивали дистиллированной водой. Далее выполняли деминерализацию костей раствором соляной кислоты с концентрацией 0.5–4.5 моль/л. По завершении деминерализации жидкую часть взвеси отделяли фильтрацией. Гидроксиапатит осаждали из декальцированных растворов добавлением (при активном перемешивании) 20–25 % раствора гидроксида аммония, до достижения реакции среды pH 7.3–7.5. При этом отмечалось обильное выпадение осадка. Взвесь подвергали фильтрации. Полученное пастообразное вещество промывали дистиллированной водой до получения реакции промывных вод pH 6.0–6.5. Для очистки от костных белков, соосадившихся при выделении неорганического матрикса, полученный материал обрабатывали раствором карбамида. Далее осадок высушивали при температуре 100 °С и измельчали. Исследованы образцы ГА, осажденного из раствора, который был получен деминерализацией костной ткани раствором HCl с концентрацией 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 3.5, 4.5 моль/л (образцы № 1–6 соответственно), а также образец ГА, полученный обжигом костей КРС при 1200 °С (образец № 7).

Осаждение КФС проводили после 2, 5, 9 и 13 сут деминерализации костей. Серию опытов с концентрацией HCl 7 моль/л не прово-

ТАБЛИЦА 1

Результаты элементного анализа порошков гидроксиапатита

Номер образца	Концентрация HCl, моль/л	Атомная доля элементов, %			Ca/P
		О	Р	Са	
1	0.5	67.05	14.26	18.69	1.31
2	2	65.08	13.22	21.70	1.64
5	3.5	61.71	10.78	20.28	1.88
7	0	64.27	13.96	21.77	1.56

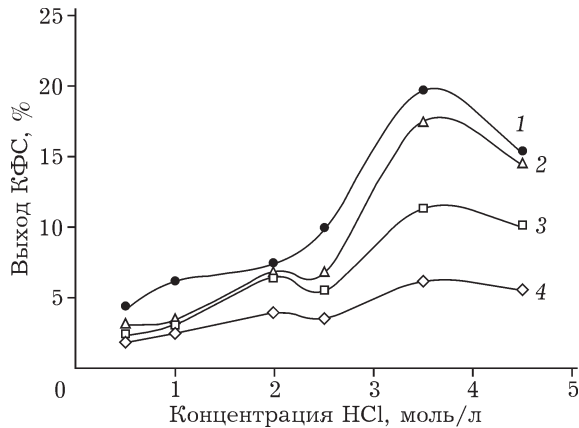


Рис. 1. Зависимость массы полученных кальцийфосфатных соединений (КФС) от концентрации раствора хлороводорода. Время декальцинации, сут: 2 (1), 9 (2), 5 (3), 13 (4).

дили, так как в этом случае происходило обугливание и полное растворение костной ткани. Полученная смесь приобретала студнеобразную консистенцию, и ее было невозможно отделить от жидкой фракции.

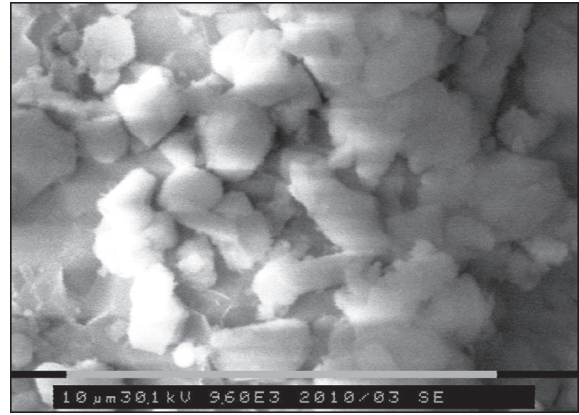


Рис. 3. Микрофотография частиц гидроксиапатита, полученного обжигом костей КРС. Ув. 9600.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты элементного анализа [6] (табл. 1) позволяют судить о степени стехиометричности полученных порошков. Очевид-

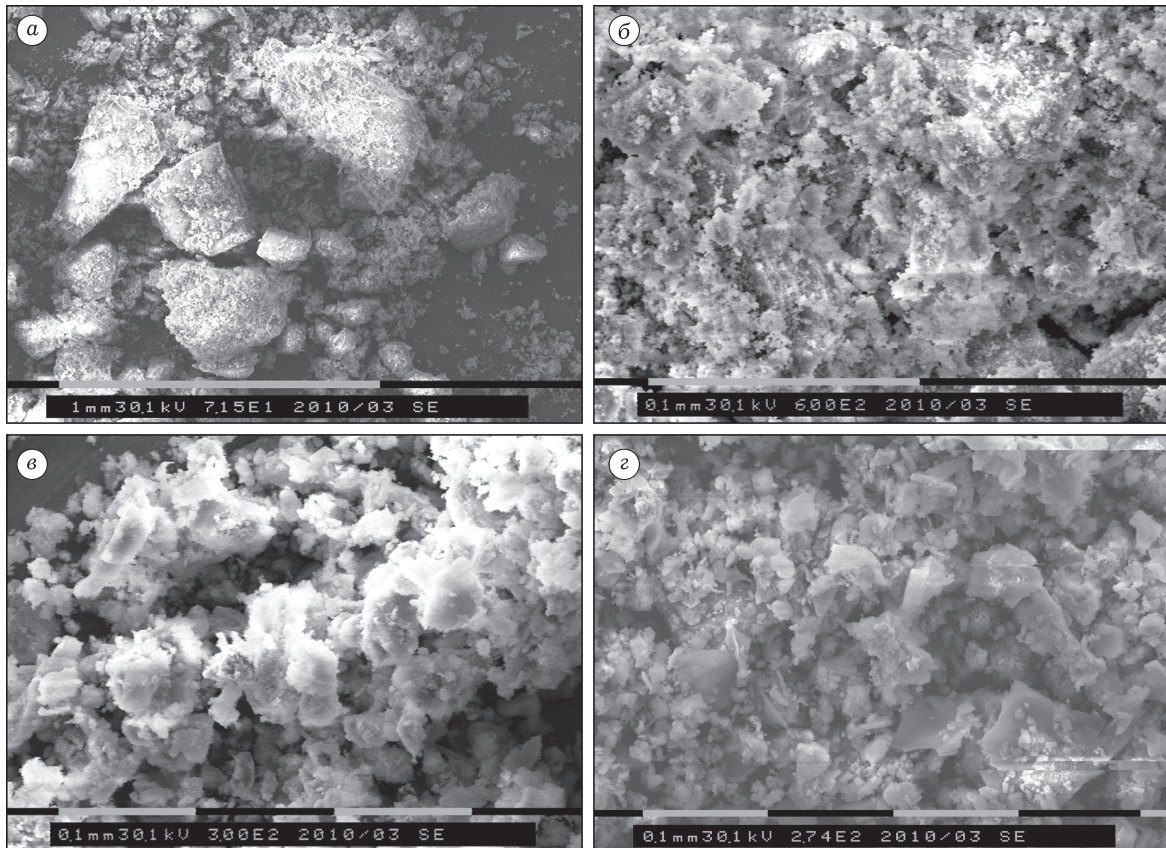


Рис. 2. Микрофотографии частиц фосфатного соединения, полученного с использованием раствора HCl с различной концентрацией, моль/л: 1 (а), 2,5 (б), 3,5 (в), 4,5 (г); ув.  $\times 715$  (а),  $\times 274$  (б),  $\times 300$  (в),  $\times 600$  (г).

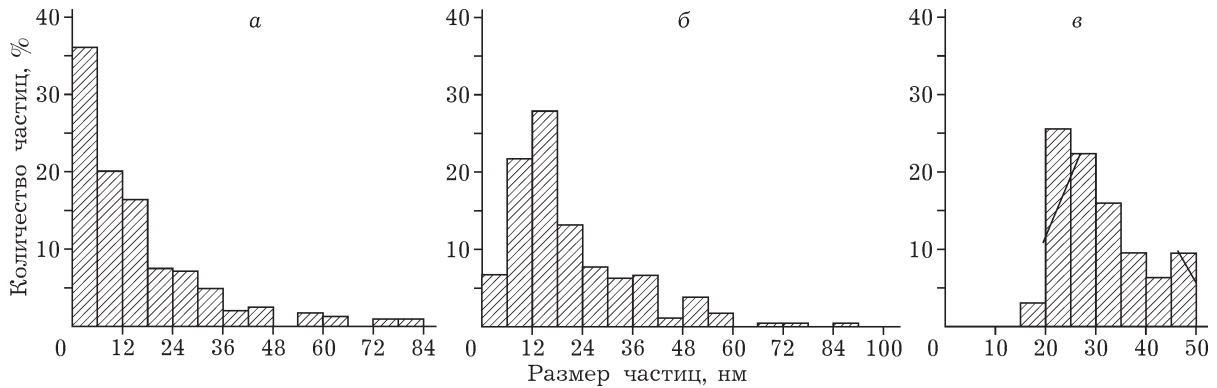


Рис. 4. Гистограммы распределения частиц гидроксиапатита по размерам: а-в – образцы № 1, 2, 7 соответственно (см. табл. 1).

но, что наиболее близкое к стехиометрическому соотношению Са/Р (1.64) имеет порошок ГА, осажденного из раствора, который был получен деминерализацией раствором с концентрацией HCl 1 моль/л (образец № 2).

На рис. 1 приведена зависимость массы полученного осадка от концентрации соляной кислоты. Видно, что с увеличением времени декальцинации масса полученных осадков возрастает во всех случаях. Максимальный выход наблюдается при использовании раствора HCl с концентрацией 3.5 моль/л.

На рис. 2, 3 представлены микрофотографии порошков ГА. Согласно результатам растровой электронной микроскопии, синтезированные образцы ГА представляют собой порошкообразную смесь агломератов размером до 400 мкм.

На рис. 4 приведены гистограммы распределения частиц ГА по размерам, полученные методом секущей по STEM-изображениям. Для образца № 1 (0.5 моль/л HCl) пик локализован в диапазоне 0–6 нм. Для образца № 2 (1 моль/л HCl) пик локализован в диапазоне



Рис. 5. Площадь удельной поверхности частиц ГА всех представленных образцов.

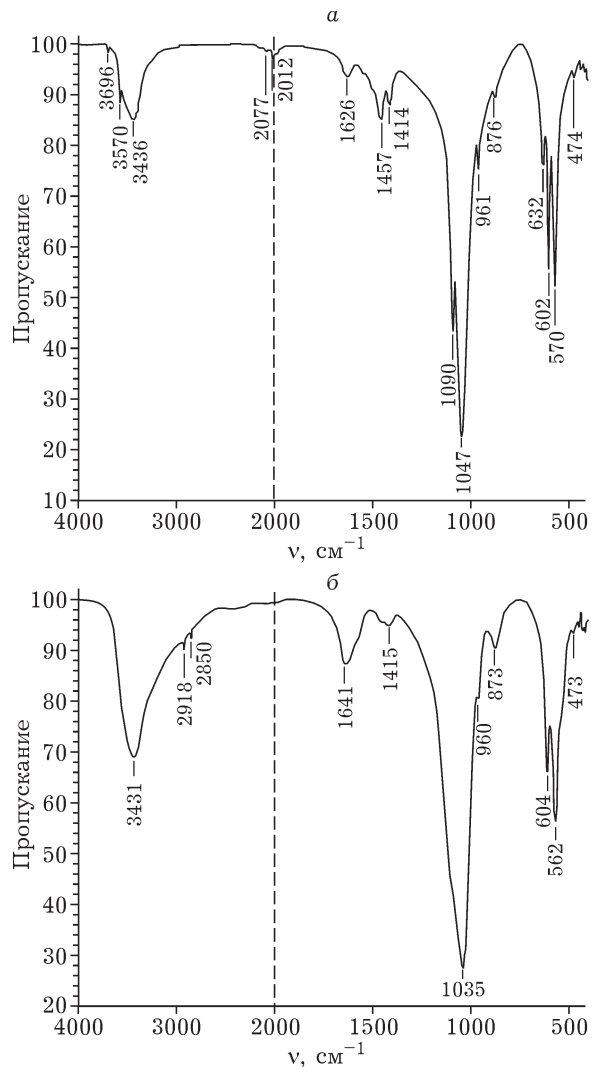


Рис. 6. ИК-спектры образцов ГА: а – осажденного из раствора, полученного деминерализацией костной ткани раствором хлороводорода; б – полученного обжигом костей КРС.

12–18 нм. В обоих случаях наблюдаются вытянутые “хвосты” в сторону больших значений. Для образца № 7 распределение локализовано в узком интервале (20–50 нм).

Согласно диаграмме, представленной на рис. 5, наименьшую площадь удельной поверхности имеет образец ГА, полученный обжигом костей КРС (образец № 7). Максимальной площадью удельной поверхности обладают порошки, осажденные из растворов, которые были получены деминерализацией растворов с концентрацией HCl 0.5 и 1 моль/л.

На рис. 6 представлены ИК-спектры образцов биологического ГА. В случае образца биологического ГА, полученного путем обжига КРС, наблюдается пик при 3436 см<sup>-1</sup>, что соответствует колебаниям OH-групп в адсорбированной воде. Полосы поглощения с волновыми числами 2012, 1047–1090, 961 см<sup>-1</sup> относятся к колебаниям связей P–O в ГА, а полоса при 632 см<sup>-1</sup> – деформационному колебанию группы OH в ГА. Полосы поглоще-

ния с волновыми числами 570 и 602 см<sup>-1</sup> соответствуют деформационным колебаниям фосфатной группы.

На ИК-спектре образцов биологического ГА, полученных деминерализацией костной ткани растворами с различной концентрацией хлороводорода (0.5–4.5 моль/л), присутствует широкая полоса поглощения при 3431 см<sup>-1</sup>, которая соответствует валентным колебаниям OH-группы в адсорбированной воде. Пики при 1035, 960 см<sup>-1</sup> относятся к колебаниям связей P–O в ГА, при 562–604 см<sup>-1</sup> – к деформационным колебаниям фосфатной группы. Полосы в областях 1515, 852, 880 см<sup>-1</sup> соответствуют модам колебаний карбонатных групп  $\nu_3$ ,  $\nu_2$  и  $\nu_4$  соответственно. Присутствие карбонат-иона в структуре ГА – характерная особенность биологического ГА, составляющего костные ткани организма. Спектры поглощения образцов № 1–6 идентичны.

Согласно результатам рентгенофазового анализа (табл. 2), синтезированные порошки

ТАБЛИЦА 2  
Результаты рентгенофазового анализа порошков гидроксиапатита

Номер образца (содержание HCl)	Обнаруженные фазы	Объемная доля фаз, %	Параметры решетки, Å
1 (0.5 моль/л)	Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (OH)	76	a = 9.522 c = 6.875
	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	17	a = 9.519 b = 18.748 c = 6.850 β = 120.66
	Ca(HPO <sub>4</sub> )(H <sub>2</sub> O) – брушит	6	a = 6.389 b = 15.227 β = 118.95
	Аморфная	1	–
2 (1 моль/л)	Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (OH)	89.4	a = 9.522 c = 6.875
	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	10.5	a = 9.519 b = 18.748 c = 6.850 β = 120.66
	Ca(HPO <sub>4</sub> )(H <sub>2</sub> O) – брушит	0.1	a = 6.389 b = 15.227 β = 118.95
	Аморфная	1	–
7 (0)	Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (OH)	99.7	a = 9.4016 c = 6.8797
	Ca <sub>0.5</sub> (Ti <sub>2</sub> P <sub>3</sub> O <sub>12</sub> )	0.3	a = 8.375 c = 22.01

ГА представляют собой гетерофазную смесь ГА гексагональной и моноклинной модификаций и на 99 % представлены кристаллической фазой; порошок ГА, полученный обжигом костей КРС, на 100 % представлен кристаллической фазой. Более того, очевидно, что фазовый состав ГА можно варьировать.

#### **ВЫВОДЫ**

1. Предложенный метод получения биологических фосфатов кальция из костной ткани позвоночных с использованием раствора соляной кислоты позволяет получить биоматериал, близкий по фазовому составу к гидроксиапатиту, образующемуся при обжиге костей КРС.

2. Установлено, что наиболее близок к стехиометрическому ГА ( $Ca/P = 1.64$ ) порошок, осажденный из раствора, который получен деминерализацией костной ткани раствором с содержанием хлороводорода 1 моль/л.

3. Предложенный способ синтеза гидроксиапатита позволяет получать ультрадисперсные порошки с регулируемой дисперсностью (в диапазоне от 10 до 500 нм).

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- 1 Леонтьев В. К. // *Стоматология*. 1996. № 5. С. 4–6.
- 2 Касавина Б. С. *Жизнь костной ткани*. 2-е изд. М.: Наука, 1979. С. 176.
- 3 Талашова И. А. Силантьева Т. А. // *Гений ортопедии*. 2007. № 4. С. 71–75.
- 4 Баринов С. М., Комлев В. С. *Биокерамика на основе фосфатов кальция*. М.: Наука, 2005. 204 с.
- 5 Зеличенко Е. А., Гузеев В. В., Каменчук Я. А., Карлов А. В., Процай Ю. А., Шашкин А. Б. // V Ставеровские чтения: Тр. Всерос. науч.-техн. конф. с междунар. участием “Ультрадисперсные порошки, наноструктуры, материалы: получение, свойства, применение” / Под ред. В. Е. Редькина. Красноярск: изд. ИПК СФУ, 2009. С. 426–428.
- 6 Зеличенко Е. А. *Разработка защитных биосовместимых керамических и полимерных покрытий на поверхности титана*: Дис. ... канд. техн. наук. Северск, 2011.