

УДК 535.343.2, 611.018.4

PACS 82.80.Ch + 83.80.Lz + 83.80.Pc

Оптимизация свойств композита на основе гидроксиапатита и хитозана путем вариации его состава и режимов термообработки

В.В. Стариков, С.О. Рудченко

*Национальный технический университет
«Харьковский политехнический институт»
61002, Харьков, ул. Фрунзе, 21*

Рассматривается возможность синтеза препарата на основе композитной смеси гидроксиапатита и хитозана различного биологического происхождения. Установлено оптимальное соотношение входящих в состав композита составляющих для получения нанокристаллической структуры апатита, близкой по размеру кристаллов к кристаллам гидроксиапатита костной ткани. Определены источники появления в композите карбонатапатитов разных типов и трансформация его химического состава при термообработке.

Ключевые слова: гидроксиапатит, хитозан, ИК-спектроскопия, карбонатапатит, термообработка.

Розглядається можливість синтезу препарату на основі композитної суміші гідроксиапатиту та хітозану різного біологічного походження. Встановлено оптимальне співвідношення складових, що входять до складу композиту для отримання нанокристалічної структури апатиту, близької за розміром кристалів до кристалів гідроксиапатита кісткової тканини. Визначені джерела появи в композиті карбонатапатитов різних типів і трансформація його хімічного складу при термообробці.

Ключові слова: гідроксиапатит, хітозан, ІК-спектроскопія, карбонатапатит, термообробка.

Possibility of synthesis of composite on the base of mixture of hydroxyapatite and chitosan of different biological origin was considered. Optimum correlation of composite components for the reception of nanocrystalline apatite structure, near to bone tissue hydroxyapatite crystals was estimated. The sources of appearance of carbonateapatites of different types in the composite and transformation of composite chemical composition at heat treatment were determined.

Keywords: hydroxyapatite, chitosan, IR- spectroscopy, carbonateapatite, heat treatment

Введение

Композиты на основе фосфатов кальция и естественных биополимеров все более широко используются при изготовлении биоматериалов различного целевого назначения. Большой спектр таких материалов может быть создан на основе нанокристаллического апатита и хитозана [1].

Гидроксиапатит (ГА) является кристаллохимическим аналогом минеральной составляющей тканей скелета животных и людей. Его физико-химические свойства, размеры кристаллов и морфология поверхности чрезвычайно чувствительны к условиям приготовления. Контроль вводимых или случайных примесей важен для получения стехиометрического ГА. Гидроксиапатит имеет две структурные формы: гексагональную и моноклинную [3]. Гексагональный ГА обычно формируется осаждением в пересыщенных растворах

при температурах от 25 °С до 100 °С, а моноклинный ГА формируется при нагреве гексагональной формы до 850 °С и последующем охлаждении до комнатной температуры [2].

Неорганическая часть костной ткани человека содержит: 75 % гидроксиапатита, 19 % карбонатапатита, 4,4 % хлорапатита и 0,66 % фторапатита. Поэтому при синтезе искусственного гидроксиапатита для лучшей имитации костной ткани человека добавляют карбонатапатит либо в виде отдельного компонента, либо путем контролируемой замены OH^- и PO_4^{3-} групп карбонатными группами. В зависимости от типа замещенной группы (гидроксильной или фосфатной) формируются структуры карбонатапатита А- или В-типа соответственно.

Содержание карбонатапатитов в минерале костной ткани в течение жизни изменяется, в частности, происходит увеличение содержания карбонатапатита А-типа с возрастом. Следовательно, при производстве

заменителей стремятся получить главным образом продукт с преимущественным содержанием карбонатапатита В-типа, что соответствует молодой костной ткани [3].

Хитозан (Х) представляет собой аморфно-кристаллический биополимер, для которого характерно явление полиморфизма. Хитозан получают из хитина при его деацетилировании. Хитин – распространенный в природе полисахарид, являющийся основой скелетной системы в панцирях ракообразных, клеточной стенке грибов и бактерий и т.п. Благодаря биосовместимости с тканями человека, способности усиливать регенеративные процессы при заживлении ран и бактерицидным свойствам, хитозан представляет большой интерес для медицины.

В процессе синтеза композиционных материалов ГА/Х попадание примесей, источниками которых могут служить реагенты, используемые как для синтеза ГА, так и хитозана, неизбежно. Эти примеси нарушают стехиометрию ГА и приводят к снижению степени кристалличности апатитной фазы. Для повышения степени кристалличности апатитной фазы, удаления органической фазы из материалов биологического происхождения и снижения концентрации примесей проводится термическая обработка композитов. Структурные и функциональные свойства композиционных материалов ГА/Х также определяются количественным соотношением входящих компонентов ГА и Х. Поэтому оптимизация состава композита ГА/Х и выбор режима его термообработки для реализации необходимой структуры и химического состава определяют актуальность данной работы.

Материалы и методы

В работе исследовали композитные образцы со следующими соотношениями гидроксиапатита и хитозана: 85/15, 70/30, 50/50 и 20/80.

Исходные образцы отжигали в электрической печи на воздухе при температурах 400 °С, 700 °С, 900 °С и 1100 °С в течение 45 минут. Количество воды и соотношение апатит/хитозан в композитах оценивали путем взвешивания образцов до и после отжига.

Рентгенографические исследования проводили на автоматизированном дифрактометре ДРОН-4-07 в режиме на отражение (геометрия Брегга-Брентано) с использованием Cu K_α излучения (длина волны $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, никелевый β -фильтр). Все процедуры обработки экспериментальных данных были выполнены с помощью лицензионного программного пакета поддержки эксперимента и обработки результатов (DIFWIN-1, ТОО «Эталон ПТЦ»).

Инфракрасные спектры были получены на приборе Spectrum One (Perkin Elmer). Перед исследованиями образцы в виде порошка смешивались с порошком KBr (2,5 ÷ 3,0 мг апатита/хитозан на 300 мг KBr) и

спрессовывались в таблетки.

Испытания на микротвердость проводились на приборе ПМТ-3 по Викерсу с нагрузкой 20 г.

Результаты и их обсуждения

При анализе экспериментально полученных спектров были использованы полученные ранее спектры костной ткани человека [4] и смеси ГА и Х [5]. Согласно [4], ИК-спектр костной ткани имеет характеристические полосы поглощения кристаллического ГА в областях $1100 \div 1000 \text{ см}^{-1}$ и $600 \div 570 \text{ см}^{-1}$ с характерными для минеральной составляющей колебаниями карбонатных ионов в областях $1455 \div 1430 \text{ см}^{-1}$ и 870 см^{-1} .

После термической обработки при 1000 °С органическая составляющая удаляется, при этом происходит увеличение остроты полос поглощения. Более резко проявляются полосы 3572 см^{-1} и 630 см^{-1} , соответствующие гидроксильной группе OH^- , в то время как характеристические полосы поглощения карбоната больше не обнаруживаются.

Согласно данным рентгеноструктурного анализа нестехиометрические апатиты при термической обработке претерпевают превращение в β -трикальцийфосфат (β -ТКФ), в то время как стехиометрические апатиты не преобразовываются ни в какую другую фазу. Присутствие β -ТКФ определяют полосы $1120, 970$ и 940 см^{-1} . Относительное количество β -ТКФ для трабекулярной кости составляет 15 %, а корковой – 10 % [4].

В работе исследовались концентрационные ряды нанокompозитных материалов на основе апатита кальция и хитозана (ГА/Х), предназначенные для заполнения дефектов кости, с целью установления оптимального варианта сочетания ГА и Х по концентрации. Материалы получали путем добавления водных растворов CaCl_2 и NaH_2PO_4 (при соотношении $\text{Ca/P} = 1,67$) в 0,2 % раствор хитозана в 1 %-уксусной кислоте. Продукты синтеза подвергались старению, интенсивной промывке и сушке. Различное соотношение минерального и органического компонента регулировалось объемом вносимых в раствор хитозана растворов солей [1].

Исследование образцов осуществлялось посредством рентгеноструктурного анализа, анализа ИК-спектров и измерения микротвердости.

Рентгеноструктурный анализ композита ГА/Х показал присутствие нанокристаллического апатита (рис. 1). При увеличении концентрации хитозана в композите уменьшается средний размер кристаллитов апатита, что проявляется в уширении линий рентгеновской дифракции, обратно пропорциональном размерам кристаллитов. Оценка ширины профиля основных дифракционных линий показала, что при соотношении ГА и Х равном 50/50, размеры кристаллитов в композите сравнимы с размерами

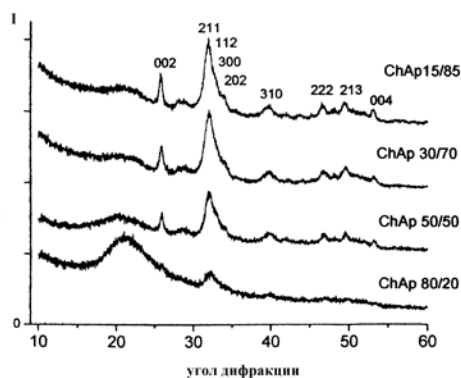


Рис. 1. Рентгеновские дифрактограммы образцов ГА/Х с различным исходным соотношением компонентов.

кристаллитов биоапатита костной ткани (~ 20 нм) [1]. Близость размеров кристаллов апатита в композите и биоапатита кости позволяет при применении такого композита оптимизировать процессы остеогенеза. Поэтому, несмотря на изменение кристаллографических а, следовательно, и некоторых механических свойств ГА, а также увеличение содержания примесей, такое соотношение ГА и Х является наиболее оптимальным.

ИК-спектры образцов с разным соотношением ГА/Х представлены на рисунке 2. Гидроксиапатиту соответствуют полосы поглощения 1100, 1032, 602 и 563 см^{-1} , а хитозану – 2924, 1318 и 1153 см^{-1} . По мере увеличения концентрации Х наблюдается уменьшение интенсивности и увеличение ширины линий ГА. Это является дополнительным подтверждением того, что Х, взаимодействуя с ГА, снижает степень его кристалличности.

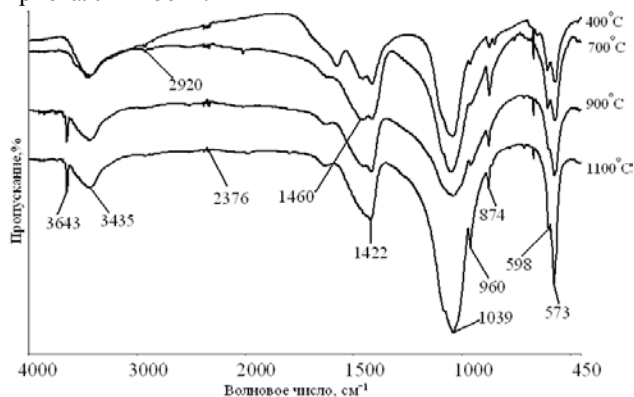


Рис. 2. ИК-спектры концентрационных рядов нанокompозитных материалов на основе апатита кальция и хитозана.

Также для всех спектров характерно наличие примесных ионов CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , а также воды. Судя по спектрам, основным источником примесей является хитозан, поскольку с увеличением его концентрации растет сигнал от примесных ионов.

Для синтезированных композитов характерно наличие примесей в виде карбонатов, насыщение

которыми происходит в процессе их приготовления. Источниками карбонатов могут служить как реагенты, используемые для синтеза ГА, так и хитозан.

Ранее [3,6] было установлено, что существует два типа замещения карбонатами и, следовательно, два типа карбонатапатита: карбонатапатит А-типа, когда карбонатная группа замещает гидроксильную группу, и карбонатапатит В-типа, когда карбонатная группа замещает фосфатную группу. Биологический апатит является смешанным АВ-типом карбонатапатита [3,6].

Каждый тип карбонатапатита имеет характеристические полосы частоты, обнаруживаемые в области $4000 \div 400$ см^{-1} . Карбонатапатит А-типа имеет полосы поглощения с частотами 1550 $\div$ 1545, 1450 и 880 $\div$ 878 см^{-1} , а карбонатапатит В-типа – полосы поглощения с частотами 1455 $\div$ 1450, 1430, 1410 и 872 $\div$ 870 см^{-1} [3,6,7].

Синтезированные и исследованные в работе апатиты являются карбонатапатитами АВ-типа. На спектрах поглощения (рис. 2) им соответствуют следующие полосы: 1540 и 1450 см^{-1} соответствуют карбонату А-типа, а 1455 и 871 см^{-1} соответствуют карбонату В-типа.

При соотношении компонентов ГА/Х 85/15 наблюдается присутствие преимущественно карбоната В-типа с полосами поглощения 1455 и 871 см^{-1} , и некоторого количества карбоната А-типа с полосой поглощения лежащей в области 1455 $\div$ 1450 см^{-1} . По мере увеличения концентрации Х наблюдается уменьшение содержания карбоната В-типа и увеличение содержания карбоната А-типа, о чем свидетельствует разделение широкой полосы 1560 $\div$ 1400 см^{-1} на два пика при достижении концентрации компонентов 50/50 и появление четкого и интенсивного пика 1540 см^{-1} при концентрации 20/80, который соответствует карбонату А-типа.

Следовательно, для исследуемых композитов основным источником карбоната В-типа является ГА, а источником карбоната А-типа в основном служит хитозан.

Для препаратов с различным содержанием ГА и Х проводились измерения микротвердости. Полученные значения сравнивались с микротвердостью костной ткани человека, которая составляет 40 кг/мм^2 . Такое сравнение представляет интерес, поскольку исследуемые композиты в будущем предполагается использовать либо в качестве имплантатов, являющихся искусственными заменителями кости, либо как препараты, активирующие остеосинтез в зонах дефицита костной ткани.

Результаты замеров микротвердости композитов ГА/Х приведены на рисунке 3. Из рисунка видно, что уменьшение содержания ГА в композите сопровождается понижением твердости композита при одинаковой пористости препаратов.

Как обсуждалось ранее, наиболее оптимальным

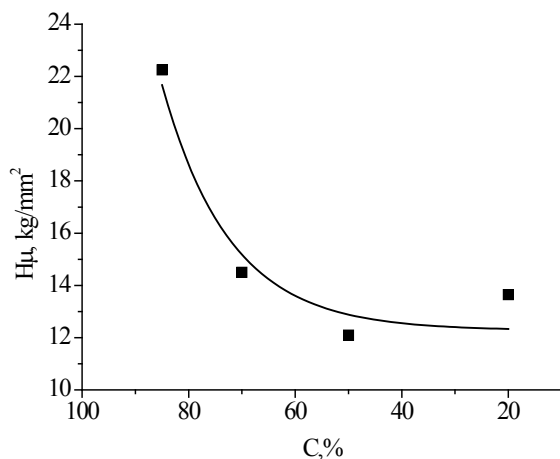


Рис. 3. Зависимость микротвердости (Hц) композита Х/ГА от содержания ГА.

вариантом сочетания ГА и Х является соотношение 50/50. Для данного композита среднее значение микротвердости составляло 12,1 кг/мм², что существенно отличается от микротвердости кости человека. Но данный факт не следует рассматривать как ограничитель в применении такого композита для замещения костной ткани, поскольку в большинстве случаев ГА/Х, являясь биodeградируемым материалом, со временем замещается костной тканью, а эффективность такого замещения в первую очередь определяется не прочностью, а морфологией и химическим составом композита.

Остеообразующий биоматериал биологического происхождения должен иметь неповрежденную микроструктуру и архитектуру новой кости, и не содержать органических фаз, чтобы избежать антигенного и иммунологического загрязнения при имплантации. Поэтому для улучшения степени кристалличности апатитной фазы, удаления органической фазы и других примесей проводилась термическая обработка образцов. При этом происходило частичное преобразование ГА в β -ТКФ и отжиг примесных ионов. Это подтверждалось как рентгеновским, так и спектральным анализом.

Отжиг проводился в электропечи на воздухе при температурах 400 °С, 700 °С, 900 °С и 1100 °С. Скорость нагревания поддерживалась 0,05 °С/с, время выдержки при заданной температуре составляло 45 мин.

Рентгеноструктурный анализ позволил установить, что микроструктура композита 50/50 не менялась в случае термической обработки при 400 °С. Если нагрев проводился до более высоких температур, то происходила полная деструкция и удаление органических фаз. При нагревании до 700 °С наблюдалась рекристаллизация минерала кости и сопровождалась быстрым ростом биоминеральных кристаллитов из-за исчезновения мозаичности, поскольку дефекты кристаллической решетки отжигались, а микродеформации решетчатой

структуры релаксировали. Таким образом, происходило исчезновение структурных нарушений и существенное приближение исследуемой структуры к бездефектному кристаллическому гидроксиапатиту [8].

При нагреве до температур в диапазоне 700 ÷ 900 °С композит был составлен из равноразмерных кристаллов ≥ 20 нм. При увеличении температуры до 900 ÷ 1100 °С происходил дальнейший рост кристаллов [8].

ИК-спектры образцов, представляющих собой композиты ГА/Х при концентрации составляющих 50/50, после термической обработки при различных температурах представлены на рисунке 4.

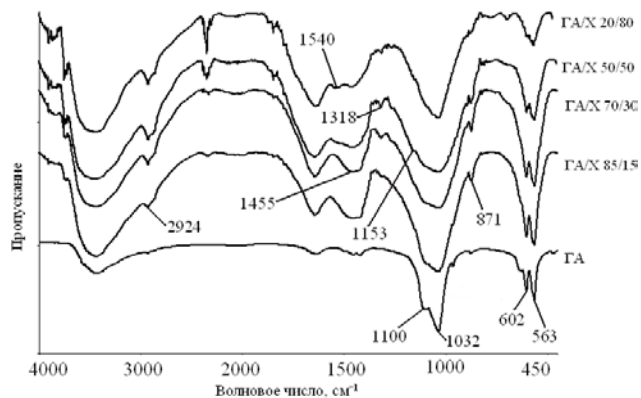


Рис. 4. ИК-спектры композита ГА/Х, обработанного при различных температурах.

Анализ показывает, что термическая обработка при 700 °С и выше приводила к распаду органических веществ и отжигу дефектов кристаллической решетки ГА. С увеличением температуры отжига до $T = 1100$ °С наблюдалось уменьшение ширины полос поглощения 1039 и 598 и 573 см⁻¹, соответствующих фосфатной группе PO_4^{3-} в ГА. Одновременно с этим происходило уменьшение интенсивности полос поглощения, соответствующих гидроксильной группе (3643 см⁻¹) и воде (3435 см⁻¹), а также ослабление 1422 см⁻¹ и полное исчезновение полос 2376 и 1460 см⁻¹, соответствующих углекислым ионам CO_3^{2-} . Кроме того, наблюдается частичное превращение ГА в β -ТКФ. Присутствие β -ТКФ определяется полосой поглощения 960 см⁻¹.

Таким образом следует отметить, что термическая обработка до 1100 °С позволяет существенно снизить содержание кристаллизованной воды в композите и удалить углекислые ионы из апатитной фазы.

В экспериментах по термообработке аналогичных препаратов была установлена закономерность изменения содержания карбонатов А- и В-типа в зависимости от температуры. Это представляется важным, поскольку при производстве заменителей стремятся получить главным образом продукт с карбонатом В-типа, что соответствует молодой костной ткани.

В работе установлено, что небольшое уменьшение общего количества карбоната в образцах при температуре до 500 °С происходит из-за потери

карбоната А-типа. При температуре 700 °С содержание карбоната А-и В-типа уменьшается в равной пропорции. Дальнейшее уменьшение общего количества карбоната при температурах до 900 °С происходит в большей степени из-за потери карбоната А-типа, а при температуре 1100 °С наблюдалось присутствие пиков соответствующих карбонату В-типа.

Выводы

На основании данных рентгеноструктурного и спектрального анализа установлено, что наиболее оптимальным вариантом сочетания ГА и Х является соотношение 50/50. Данный композит обладает наилучшими структурными характеристиками и удовлетворительным химическим составом.

В композитах ГА/Х источником карбонатных примесей В-типа является ГА, а источником примесей карбоната А-типа в основном служит хитозан.

Установлено, что приготовленный препарат является хорошим химическим аналогом и заменителем костной ткани человека. Термическая обработка при 700 °С и выше приводит к распаду органических веществ и отжигу дефектов кристаллической решетки ГА, относительному увеличению концентрации кристаллических включений ГА и удалению углекислых ионов. Наилучшие показатели по чистоте и кристалличности имеет образец ГА/Х, обработанный при температуре 1100 °С. Показано, что с помощью термообработки при 1100 °С можно получить препарат свободный от карбоната А-типа и тем самым приблизить его по химическому составу к молодой костной ткани.

1. Данильченко С.Н., Калинкевич О.В., Скляр А.М. и др. Наноструктурные биоматериалы на основе хитозан-апатитных композитов: получение, физико-химические характеристики, тесты in-vivo // Институт прикладной физики НАН Украины, г. Сумы, Украина. - 2008.
2. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite // *Biomaterials*. -2005. -№.24 -P. 5414-5426.
3. Landi E., Tampieri A. et al. Influence of synthesis and sintering parameters on the characteristics of carbonate apatite // *Biomaterials*. -2004. -№.25 -P. 1763-1770.
4. Bigi A., Cojazzi G., Panzavolta S.. Chemical and Structural Characterization of the Mineral Phase from Cortical and Trabecular Bone // *Journal of Inorganic Biochemistry*. -1997. -№.68 -P. 45-51.
5. Yamaguchi I., Tokuchi K., Fukuzaki H. et al. Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites // *J. Biomed. Mater. Res.* - 2001. -№. 55. -P. 20-27.
6. Rau J.V., Barinov S.M. et al. FTIR study of carbonate loss from carbonated apatites in the wide temperature range // *Institute for physical chemistry of ceramics, Ozernaya str., 48, Moscow, Russia*. -2004/

7. Fleet M.E. Infrared spectra of carbonate apatites: ν_2 -Region bands // *Biomaterials*. -2009. (Article in press).
8. Danilchenko S.N., Koropov A.V. et al. Thermal behavior of biogenic apatite crystals in bone: an X-ray diffraction study // *Institute of Applied Physics, National Academy of the Ukraine, Petropavlovskaya str., 58, Sumy, Ukraine*. - 2006.