

УДК: 541.182.644

ЯМР-ДИАГНОСТИКА НАНОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОГЕЛЕВЫХ МАТРИЦ, СОДЕРЖАЩИХ ИНКОРПОРИРОВАННЫЙ ГИДРОКСИЛАПАТИТ

И.Е.Болдескул¹, Ю.М.Самченко², С.Н.Данильченко¹,
В.В.Трачевский³, Л.Б.Суходуб⁴, А.Ю. Волянский⁴,
И.Ю.Кучма, З.Р.Ульберг², Л.Ф.Суходуб¹

¹Институт прикладной физики НАН Украины, Су-
мы, Украина

²Институт биокolloидной химии им.

Ф.Д.Овчаренко НАН Украины, Киев, Украина

³Институт металлофизики НАН Украины, Киев,
Украина

⁴ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им.
И.Мечникова», АМН Украины, Харьков, Украина

Ранее показано [1], что пористые полимерные матрицы, полученные методом радикальной полимеризации акриловых мономеров, широко применяются в качестве биоматериалов медицинского назначения благодаря таким присущим им свойствам, как высокое водосодержание, биосовместимость, близость по консистенции к тканям живого организма, высокая газо- и ионопроницаемость, эластичность, способность к пролонгированному высвобождению лекарственных препаратов и к культивированию различных бактерий и клеток. Гидрогели положительно зарекомендовали себя и в пластической хирургии, однако, преимущественно при протезировании мягких тканей, что обусловлено их низкой механической прочностью [2].

На протяжении ряда лет предпринимаются попытки использовать в качестве искусственного материала для замены костной ткани гидроксилапатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, представляющий собой основной неорганический компонент человеческих костей и обладающий биосовместимостью, биоактивностью, нетоксичностью и остеокондуктивностью. Однако механические характеристики гидроксилапатита, прежде всего хрупкость, не позволяют использовать его для изготовления несущих нагрузку имплантантов [3,4].

Перспективной с точки зрения протезирования костной ткани представляется изготовление композитных материалов на основе гидрогелей и гидроксилапатита, позволяющих сочетать и усиливать полезные характеристики исходных компонентов.

Были исследованы различные гидрогелевые системы, отличающиеся такими параметрами, как мономерный состав, частота сшивки, содержание сшитого полимера в гидрогеле и т.п. Исследованию подвергались гидрогели в различных консистентных состояниях – в виде монолитных пластин самой разнообразной геометрии, в виде высокодисперсных микрогранул со средним диаметром частиц около 0,1 мм, а также в виде пластичной мазеобразной массы, пригодной для безболезненного инъекционного введения в организм пациента [1].

Синтез гидрогелей в виде монолитных пластин и блоков осуществлялся посредством смешивания в водной среде мономеров (акриламида, акрилонитрила, акриловой кислоты), сшивающего агента - N,N'-метилен-бис-акриламида, компонентов окислительно-восстановительной иницирующей смеси – персульфата калия и метабисульфата натрия с последующей стадией гелеобразования в пресс-формах с заданной геометрией. Через 30 минут гидрогелевые изделия подвергали отмывке от остаточных количеств непрореагировавших компонентов, как это детально описано в [5].

Для синтеза микрогранул сополимерных гидрогелей водные растворы соответствующих компонентов диспергировали в среде несмешивающегося органического растворителя (например, толуола) при постоянном перемешивании. Продолжительность гелеобразования составляла около 30 мин, после чего гранулы гидрогеля, близкие к сферической форме, отделяли, промывали и высушивали. Синтез гидрогелей в виде пластичной мазеобразной массы детально описывался ранее [1,4,5]. Были также разработаны и проанализированы различные методы введения ГАП в нанопоры сополимерных гидрогелей. В частности, были разработаны методы, основанные на встречной диффузии кальций фосфатных прекурсоров при последовательном насыщении гидрогелевой матрицы солями кальция и фосфора, на введении предварительно синтезированного ГАП (в виде высушенного высокодисперсного порошка или суспензии) в поровое пространство гидрогелей в момент их синтеза, а также на синхронном процессе образования гидрогелевой матрицы и ее минерализации образующимися кальций фосфатными соединениями [6].

Поскольку характерной особенностью синтетического ГАП является структурный полиморфизм и нестехиометричность состава [7], то одна из важных задач заключается в диагностике продуктов синтеза с целью установления закономерностей, позволяющих целенаправленно регулировать процесс образования ГАП или других фосфатов кальция.

Одним из эффективных методов экспресс-диагностики ГАП и сопутствующих ортофосфатов кальция, образующихся в матрицах различной консистенции, является метод ядерного магнитного резонанса высокого разрешения на ядрах атома фосфора (ЯМР ^{31}P) с вращением образца под магическим углом (MAS) [8,9]. Ширина линии ЯМР MAS твердых образцов отражает степень кристалличности, а время накопления сигнала - сравнительную кинетику процесса синтеза, который зависит от особенностей сшивки гидрогелей, т.е. соотношения дисперсионной среды и дисперсной фазы. Параметры спектров ЯМР-MAS отражают особенности структуры твердых образцов, в частности величина химического сдвига (χ) $\delta^{31}\text{P}$ позволяет охарактеризовать локальное атомное окружение фосфат-аниона как в кристаллической, так и в аморфной фазе, а ширина линии сигнала $\nu_{1/2}$ является функцией порядка, четко фиксируя переход от нанокристаллической структуры к макрокристаллической.

Целью настоящей работы было получение и исследование ЯМР ^{31}P MAS спектров гидрогелевых кальций

фосфатных композитов для идентификации соответствующих структур. Отдельно привлекались данные рентгенофазового анализа (РФА), позволяющие однозначно установить присутствие ГА и других фосфатов кальция и охарактеризовать их нанокристаллическую фазу. ЯМР исследования были осуществлены в Центре коллективного пользования Института металлофизики им. Г.В.Курдюмова НАН Украины с помощью ЯМР-спектрометра AVANCE 400 фирмы Bruker (Германия). Исследование рентгеновской дифракции выполнено на дифрактометре ДРОН-4 (предприятие «Буревестник», Россия) с гониометром ГУР-9, работающим в автоматическом режиме. Дифрактограммы получали в интервале значений угла дифракции 2θ от 5 до 90° с размером шага $0,02^\circ$ и временем измерения 1 с/шаг. Рентгеновское излучение обеспечивалось медной трубкой (Cu- K_α излучение) при токе 30 мА и напряжении 40 кВ с по-

лощением Cu- K_β радиации фильтром из металлического никеля. Идентификация кристаллических фаз проводилась путем сравнения полученных дифрактограмм со справочной базой данных JCPDS с использованием пакета программ DIFWIN 1. Оценка размеров кристаллитов проводилась по формуле Селякова-Шерера.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Спектры ЯМР ^{31}P MAS регистрировались на частоте 161,98 МГц при скорости вращения образца 6,0 Кгц с использованием одноимпульсной последовательности (длительность импульса 4,0 мсек.) в режиме накопления и задержкой между импульсами 25 сек.

Химические сдвиги $\delta^{31}\text{P}$, приведенные в таблице 1, измерены в отношении внешнего эталона – 85% раствора фосфорной кислоты.

Таблица 1.- Величины химических сдвигов $\delta^{31}\text{P}$ (м.д.) образцов гидрогелевых кальций-фосфатных композитов.

№образца	Тип образца	$\delta^{31}\text{P}$ (м.д.)	Ширина $\nu_{1/2}$ Гц	Примечание	№поз. (рис.2)
1	ГАП	2,34	191	РФА-нано ГА высокодисперсн	1
2	72 А ГА	2,4	185	РФА-нано ГА пластина, гидратир	
3	XVII ТП1 А4,5,6	2,34	295	высокодисперсн гидратирован	2
4	XVII ТП1 А1,2,3	2,3	580	дегидратиров. плечо 1,5; ТКФ	
5	Д1 ГА 7	2,34	190	мазеобразный гидратирован	
6	90	2,28	705	пластина дегидратирован	3
7	X Л2 ГА	2,34	290	пластина гидратирован	
8	63.6	2,18	462	пластина дегидратирован	4
9	12.1 Д1. ГА	1,51(ТКФ)	1044	мазеобр. дегидрати плечо (-0,5)	5
10	X111Л2 ГА 1-5	2,66	355	пластина дегидрат плечо 0,8 (ТКФ)	
11	X111Л2 ГА 8-10	2,55	413	пластина дегидрат плечо 0,6 (ТКФ)	
12	56	2,26	620	пластина дегидрат	
13	76	2,21	320	высокодисперсный гидратир	
14	54.2	2,5	722	пластина дегидрат	

В качестве эталонного образца был использован высококристаллический синтетический ГАП (образец 67), о чем свидетельствует рентгеновская дифрактограмма (рис.1), для которого величина химического сдвига

(х.с.), измеренного с помощью ЯМР-спектрометра в миллионных долях(м.д.), составляет $\delta^{31}\text{P}=2,34$ (позиция 1 на рис.2)

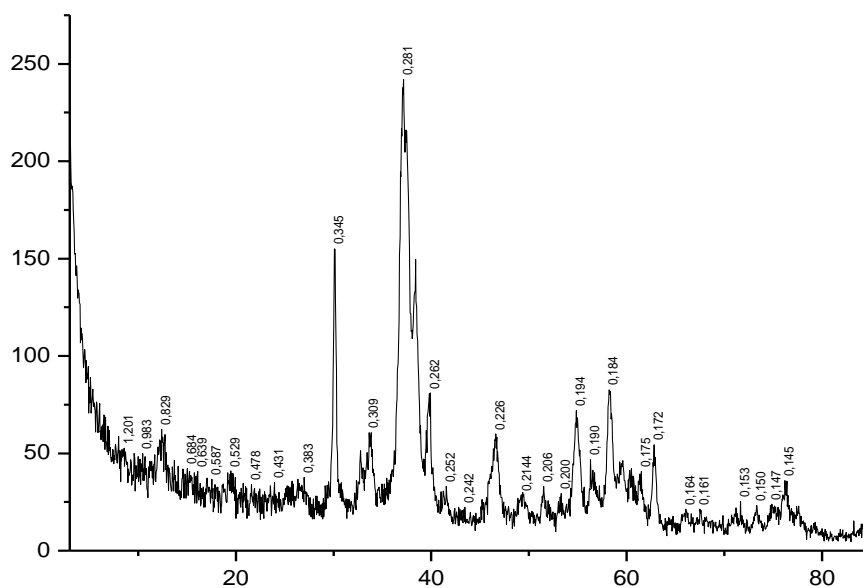


Рис.1. Дифрактограмма синтетического высококристаллического ГА (эталонный образец 67).

На рисунке 2 показаны ЯМР ^{31}P MAS спектры ряда композитов, состоящих из полиакриламидных гидрогелевых матриц с инкорпорированными в их поровое пространство частичками гидроксилпатита

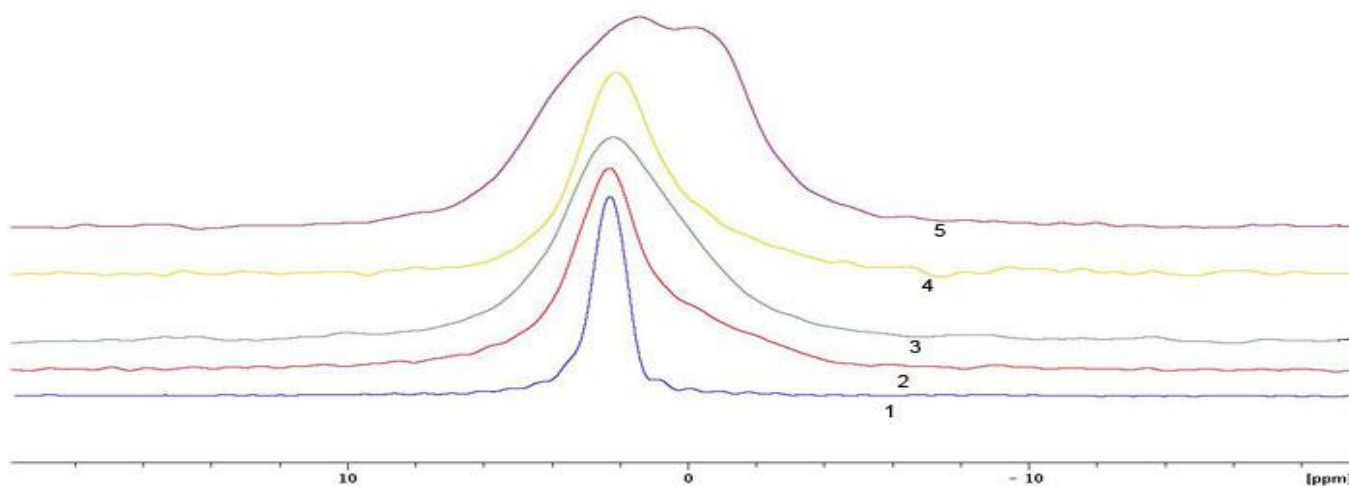


Рисунок 2. ЯМР-спектры кальций фосфатных гидрогелевых нанокомпозитов:

- 1- синтетический высококристаллический ГА (образец 67);
- 2- высокодисперсный композит, обработанный в течение 1 часа раствором аммиака в максимально гидратированном состоянии (образцы 17ТП 1А 4,5,6);
- 3- в виде монолитной пластины, обработанный в течение 7,5 часов раствором аммиака в дегидратированном состоянии (образец 90);
- 4- в виде монолитной пластины, обработанный в течение 4 часов раствором аммиака в дегидратированном состоянии (образец 63.6);

5- мазеобразный, обработанный в течение 24 часов раствором аммиака в дегидратированном состоянии (образец 12.1 Д1.ГА).

Результаты и их обсуждение

Как видно из Таблицы 1, положение резонансных сигналов ЯМР ^{31}P MAS спектров нанокompозита 72А ГА (образец 2) и эталонного образца (1) совпадают. Ширина линий этих сигналов также близка и составляет $\nu_{1/2} = 185 \div 190$ Гц. Аналогичные спектроскопические харак-

теристики обнаружены для мелкодисперсных (с микрогранулами до 10 мкм) образцов (3)- ТП 1А ГА 4,5,6, синтезированного в виде пластины и измельченного образца (7) – Х Л2 ГА и мазеобразного гидратированного (5) – Д1 ГА 7, соответствующие параметры которых $\delta^{31}\text{P} = 2,2 \div 2,5$ м.д. близки. Дифрактограммы этих образцов в РФА отвечают нанокристаллическому ГАП. Одна из дифрактограмм приведена на рисунке 3.

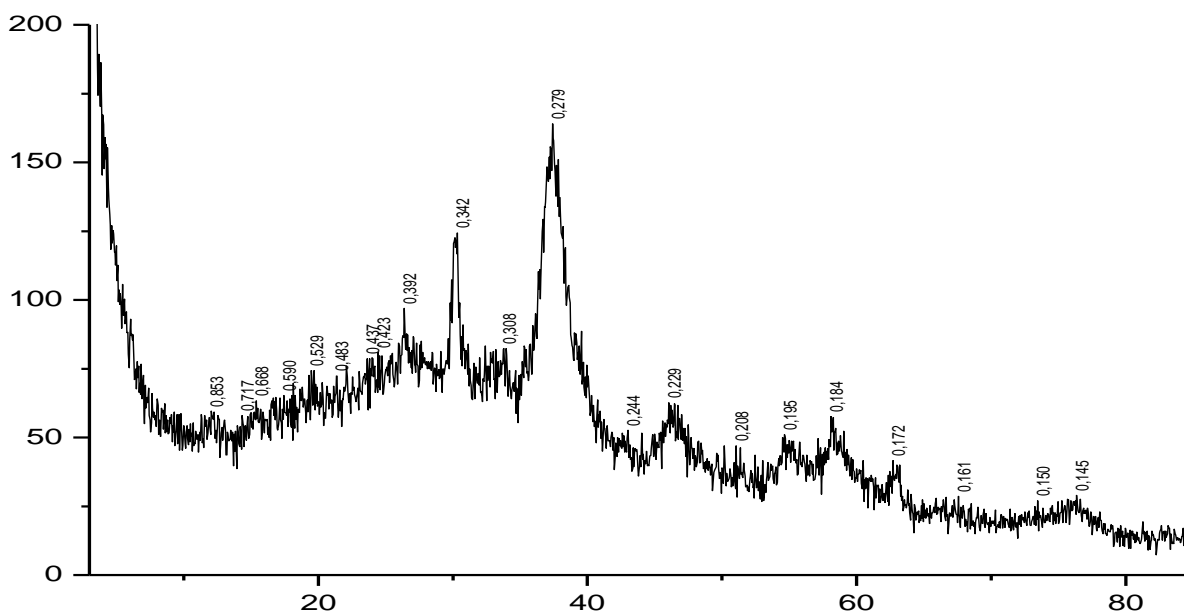


Рис.3. Рентгеновская дифрактограмма образца наполненной кальций фосфатами полиакриламидной гидрогелевой матрицы типа Х Л2-ГА, синтезированной в виде пластины и обработанной раствором аммиака в гидратированном состоянии.

Для образцов (10,11) Х111 Л2 ГА – пластинчатых композитов с различной продолжительностью насыщения кальций фосфатами, наблюдаются сигналы с $\delta^{31}\text{P} = 2,55 \div 2,66$ м.д., ассиметрично уширенные за счет компонент слабого поля ($\nu_{1/2} = 400 \div 550$ Гц), или в виде плато в интервале $\delta^{31}\text{P} = 0,8 \div -0,8$ м.д., обусловленного присутствием ортофосфатов Са, содержание которых в пробах уменьшается во времени, т.е. в процессе их трансформации в ГАП. Оценка интегральной интенсивности сигналов образцов (10,11) (время экспозиции кальций фосфатов 335 и 135 часов, соответственно) указала на содержание в них большего количества ГАП по сравнению с образцом (2) (время экспозиции 1 час).

Обращает внимание ширина линий, наблюдаемых в ЯМР ^{31}P спектрах сигналов, которая для образцов (4) (ХV11 ТП НА 1,2,3) в два раза превышает соответствующие значения для образцов (3) (ХV11 ТП НА 4,5,6), причем проявляется особенность в виде плеча со значением $\delta = 1,8$ м.д. и $\delta = 0,8$ м.д.), что может быть связано с присутствием β -трикальций фосфата (ТКФ), для которого $\delta^{31}\text{P} = 1,0$ м.д. Несмотря на то, что при переходе к образцу (3) (ХV11 ТП НА 4,5,6) линия в спектре заметно сужается, как отмечено выше, ассиметрия сигнала вследствие суперпозиции остается. Аналогичная картина наблюдается для образцов (10) и (11).

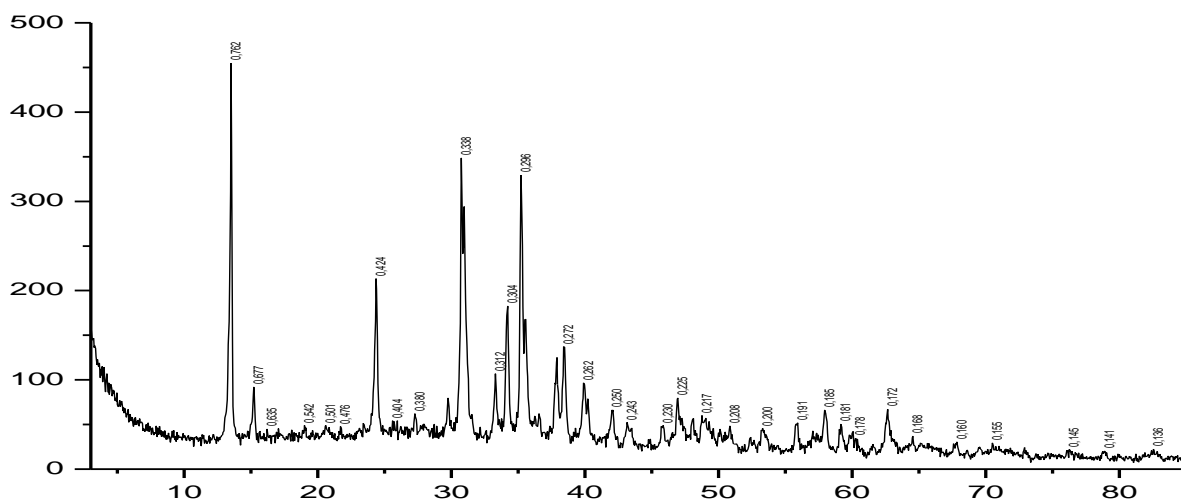


Рис.4. Рентгеновская дифрактограмма образца (9) наполненной кальций фосфатами мазеобразной полиакриламидной гидрогелевой матрицы типа 12.1.Д1 ГА, обработанной раствором аммиака в дегидратированном состоянии.

Приведенная на рис.4 рентгеновская дифрактограмма подтверждает наличие в образце (9) примесей кальций фосфатов не апатитного происхождения.

В ИК-спектрах поглощения исследованных образцов наблюдаются характеристичные для ГАП максимумы, среди которых наиболее интенсивный дублет, обусловленный трижды вырожденными асимметричными колебаниями фосфат аниона в интервале $\nu_3^{as}(P-O)=1050-1070 \text{ см}^{-1}$ [10]. Судя по спектральным проявлениям, в рассмотренных образцах отсутствуют ионы HPO_4^{2-} , сигналы которых отличаются наличием спутников, обусловленных спин-спиновым взаимодействием с протонами.

Таким образом, увеличение ширины спектральных линий для ряда образцов свидетельствует о большей разупорядоченности фосфатной подсистемы в аморфной фазе ГАП, т.е. о присутствии структурно неэквивалентных фосфатных групп и наличии примесных фаз ортофосфатов кальция.

Выводы

Таким образом, анализ спектров ЯМР ^{31}P MAS показал, что степень гидратации гидрогелевой матрицы перед обработкой ее раствором аммиака (на завершающей стадии) кардинальным образом влияет на структуру формирующихся фосфатов кальция, причем преимущественное образование гидроксиапатита наблюдается при обработке максимально гидратированной структуры, тогда как в случае предварительной дегидратации матрицы равновесие процесса сдвигается в сторону протекания конкурирующих реакций, приводящих, например, к образованию трикальций фосфата (рис.2: поз.2-гидратированная структура, поз.3,4,5-дегидратированная).

Список литературы

1. Самченко Ю.М. Гидрогелеві носії лікарських препаратів з керованими колоїдно-хімічними властивостями [Текст]: дис. на здобуття наукового ступеня доктора хімічних наук: 02.00.11 / Самченко Юрій Маркович – Київ, 2006.-307 с.
2. Gertsyuk M. Separation of Nonreacted Acrylamide from Polyacrylamide Gel for Endoprothesing / Gertsyuk M., Samchenko Y. // *Ars Separatoria Acta* -2007.-№5.-P.99-102.
3. Биокерамика на основе фосфатов кальция [Текст] / [Баринов С.М., Комлев В.С.]. - М.: Наука, 2005. – 202с.
4. Самченко Ю.М. Гидрогелевые нанореакторы для формирования гидроксиапатита / Самченко Ю.М., Суходуб Л.Ф., Данильченко С.Н., Береза Л.И., Ульберг З.Р., Суходуб Л.Б., Шостенко А.Г. // *Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии.* – 2005. – Т.6, № 2. – С. 479-485.
5. Samchenko Y. Synthetic hydrogels based on acrylic comonomers / Samchenko Y., Ulberg Z., Sokolyuk A. // *Journal de Chimie Physique.* – 1996. - № 93. – P.920-931.
6. Суходуб Л.Б. Гидрогелеві кальцій-фосфатні наноконпозиції [Текст]: дис. на здобуття наукового ступеню кандидата хімічних наук: 02.00.11/ Суходуб Людмила Борисівна – Київ, 2009. – 132с.
7. Шпак П.П. Апатиты [Текст] / Шпак П.П., Карбовский В.Л., Трачевский В.В. – К.: Академперіодика, 2002. – 414с.
8. Hartman P. X-Ray diffraction and Infrared characterization of local structure in heat-treated oxyhydroxyapatite microcrystals: An analog of the thermal decomposition of hydroxyapatite during Plasma-Spray procedure / Hartman P., Jager C., Barth St., Vogel J., Meyer K. // *Journal of Solid State Chemistry* -2001. – vol.160. – P. 460-468.
9. Загородний Ю.А. Структурные и фазовые соотношения в апатитах кальция по данным ЯМР MAS ^{31}H , ^{13}F , 1H / Загородний Ю.А., Карбовский В.Л., Калиниченко Е.А., Калиниченко А.М. // *Металлофизика: новейшие технологии*- 2006. – Т.28, № С. 1331-1350.

10. Самченко Ю.М. Синтез и спектральная идентификация гидроксилapatит содержащих гидрогелевых нанокomпозитов для протезирования костной ткани / Самченко Ю.М., Болдескул И.Е., Суходуб Л.Б., Данильченко С.Н., Береза Л.И., Ульберг З.Р., Суходуб Л.Ф. // Дoпoвiдi НАН Укpaїни – 2009.- № 8.- С.140-145.

УДК: 541.182.644

ЯМР-ДИАГНОСТИКА НАНОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОГЕЛЕВЫХ МАТРИЦ, СОДЕРЖАЩИХ ИНКОРПОРИРОВАННЫЙ ГИДРОКСИЛАПАТИТ

И.Е.Болдескул, Ю.М.Самченко, С.Н.Данильченко, В.В.Трачевский, Л.Б.Суходуб, А.Ю. Волянский, И.Ю. Кучма, З.Р.Ульберг, Л.Ф.Суходуб

Анализ спектры ЯМР ^{31}P MAS показал, что степень гидратации гидрогелевой матрицы перед обработкой ее раствором аммиака (на завершающей стадии) кардинальным образом влияет на структуру формирующихся фосфатов кальция, причем преимущественное образование гидроксиapatита наблюдается при обработке максимально гидратированной структуры, тогда как в случае предварительной дегидратации матрицы равновесие процесса сдвигается в сторону протекания конкурирующих реакций, приводящих, например, к образованию трикальций фосфата.

Ключевые слова: ^{31}P MAS ЯМР, гидрогелевые нанокomпозиты медицинского назначения, гидроксилapatит, трикальций фосфат

УДК: 541.182.644

ЯМР-ДІАГНОСТИКА НАНОКОМПОЗИТІВ НА ОСНОВІ ГІДРОГЕЛЕВИХ МАТРИЦЬ, ЩО МІСТЯТЬ ІНКОРПОРОВАНИЙ ГІДРОКСИЛАПАТИТ

И.Е.Болдескул, Ю.М.Самченко, С.Н.Данильченко, В.В.Трачевський Л.Б.Суходуб, А.Ю. Волянський, І.Ю.Кучма, З.Р.Ульберг, Л.Ф.Суходуб

Аналіз спектрів ЯМР ^{31}P MAS показав, що ступінь гідратації гідрогелевої матриці перед обробкою її розчином аміаку (на завершальній стадії) кардинально впливає на структуру фосфатів кальцію, що формуються. При цьому переважне утворення гідроксилapatиту спостерігається при обробці максимально гідратованої структури, в той час, як у випадку попередньої дегідратації матриці рівновага процесу здвигается в бік конкуруючих реакцій, що приводять, наприклад, до утворення трикальційфосфату.

Ключові слова: ^{31}P MAS ЯМР, гідрогеліві нанокomпозити медичного призначення, гідроксил апатит, три кальцій фосфат.

UDC: 541.182.644

^{31}P MAS MRS DIAGNOSTIC OF THE HYDROGEL-BASED NANOCOMPOSITES WITH INCORPORATED HYDROXYAPATITE

I.E.Boldeskul, Y.M.Samchenko, S.N.Danilchenko, V.V.Trachevsky, L.B. Sukhodub, A.Y.Voljansky, I.Y.Kuchma, Z.R.Ulberg, L.F.Sukhodub

^{31}P MAS Magnetic resonance spectra have demonstrated that the hydration level of the hydrogel matrix before treatment by ammonia solution (at the end stage) crucially in-

fluence of the structure of calcium phosphates. The predominant formation of the hydroxyapatite takes place when the structure has a maximum hydration level. In the dehydration case of the same structure a TCP phase is formed.

Key words: ^{31}P MAS, magnetic resonance spectra, hydrogel-based nanocomposites for medicine, hydroxyapatite, calcium phosphates.