

Структурні властивості апатит-біополімерних нанокіпозитів, легованих ZnO

О.О. Мартинюк^{1,*}, Л.Ф. Суходуб¹, Л.Б. Суходуб², А.М. Мешков¹

¹ Сумський державний університет МОН України, вул. Римського-Корсакова, 2, 40007 Суми, Україна

² ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечнікова АМН України», вул. Пушкінська, 14/16, 61057 Харків, Україна

(Отримано 10.10.2016; опубліковано online 23.12.2016)

Стаття присвячена дослідженню структури, морфології, механічних характеристик, фазового та елементного складу синтезованих апатит-біополімерних наноструктурованих зразків легованих ZnO для потреб ортопедії та стоматології. Знайдено, що модифікований гідроксиапатит (ГА) (Са/P ~ 1,62-1,63) має збільшені розміри кристалітів у порівнянні з стехіометричним ГА (Са/P = 1,67). В результаті відпалу (900 °С) зафіксована присутність фаз три кальцій фосфату і кальцій цинк фосфату, а також зменшення параметрів елементарної комірки ГА (*a* та *c*), що є результатом часткового заміщення Са²⁺ іонами Zn²⁺, які мають різні іонні радіуси (0,104 нм проти 0,074 нм).

Ключові слова: Гідроксиапатит, Оксид цинку, Трикальцій фосфат, Композит, Полімер.

DOI: 10.21272/jnep.8(4(2)).04090

PACS numbers: 87.85.J-,
87.64.Bx, 87.64.Ee

1. ВСТУП

Для хірургії відновлення пошкодженої кісткової тканини золотим стандартом є ауто кістка-матеріал отриманий від самого пацієнта. Але недостатня кількість подібного матеріалу, отримання якого супроводжується створенням додаткових втручань в організм пацієнта стимулює пошук нових ефективних графтів. Останнім часом дослідження композитних матеріалів на основі гідроксиапатиту [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, ГА] з різними добавками на основі полімерних матриць природного та штучного походження є одним з головних напрямків в області створення біоматеріалів [1-3], в основному, щоб отримати якісні матеріали, придатні для використання в заміщенні кісткової тканини. Добре відомо, що гідроксиапатит має хімічну схожість з неорганічною частиною кісткової тканини людини [4], володіє біологічною активністю та біосумісністю [5, 6]. Властивості ГА, такі як морфологія, стехіометрія, кристалічність і розмірів кристалітів мають великий вплив у виробництві матеріалів для біомедичних застосувань. Тому вкрай важливо знати, як різноманітні добавки впливають на ці властивості ГА. Відомо, що включення в структуру ГА інших елементів може різко змінити його властивості [7].

Для дослідників завжди було проблемою синтез нанобіоматеріалів з певним діапазоном розмірів частинок, морфологією і хімічним складом. В останні роки інтерес до наночастинок оксиду цинку (ZnO) значно збільшився, головним чином, через їх фізичні, хімічні і біологічні властивості. *In vitro* дослідження показали, що Zn²⁺ має прямий специфічний проліферативний ефект на клітини остеобластів [8], володіє потужною і селективною інгібуючою дією на резорбції кісткової тканини остеокластами [9, 10]. Крім того, завдяки своїй гігроскопічності інгібує життєдіяльність і ріст мікроорганізмів, бере участь у багатьох метаболічних клітинних процесах (репарація

і регенерація), у синтезі колагену, життєво важливого елемента для загоєння і відновлення клітинних тканин [11]. Серед іонів металів цинк присутній в якості мікроелемента в кісткових мінералах [12], крім того, цинк сприяє щільності кісткової тканини і запобігає втраті кісткової маси [13].

Тому синтез апатит-біокіпозитних матеріалів з додаванням наночастинок ZnO може забезпечити покращання фізико-хімічних та механічних властивостей матеріалів для використання в заміщенні кісткової тканини. Завдяки присутності монодисперсного нанорозмірного кальцій дефіцитного ГА ефективність остеогенезу та інших регенеративних процесів значно зростатиме, а наявність гідрогелевої матриці забезпечить високу біосумісність композиту. Саме ці фактори і обумовили мету нашого дослідження.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Матеріали

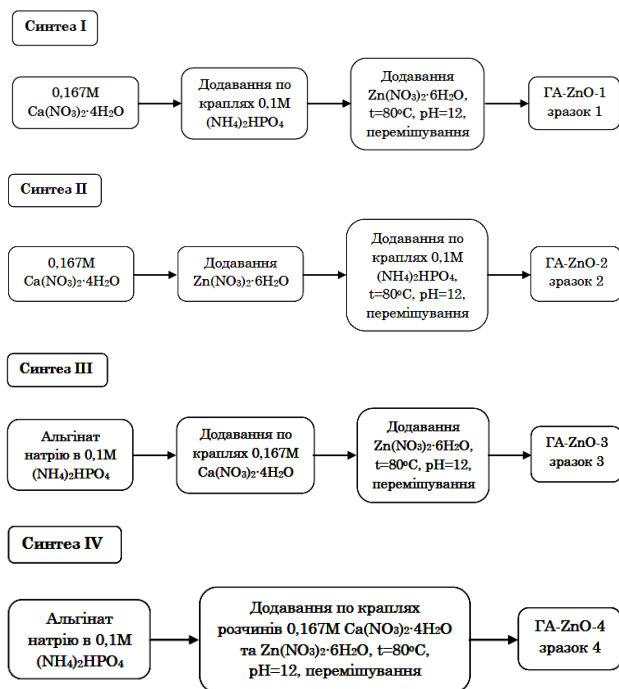
Використовувалися наступні хімічні речовини: кальцій нітрат тетрагідрат (Ca(NO₃)₂·4H₂O), гідрофосфат амонію ((NH₄)₂HPO₄), гідроксид амонію (NH₄OH), цинк нітрат гексагідрат Zn(NO₃)₂·6H₂O класифікації «ХЧ», «Merck»; натрію альгінат (АН) (E401) молекулярною масою 15 кДа, Китай.

2.2 Синтез композитних матеріалів

Синтез продуктів проводили методом «мокрої хімії» з водних розчинів 0,167 М кальцій нітрату тетрагідрату, 0,1 М гідрофосфату амонію та 0,045 М цинк нітрат гексагідрату. За результатами розрахунків кінцеве співвідношення утворених ГА та ZnO внаслідок реакції синтезу складало 3:1 відповідно. Альгінат натрію розчиняли в (NH₄)₂HPO₄ в сушильній шафі при температурі 37 °С протягом 1 доби в кількості, яка забезпечує вміст 5 мас. % дано-

* martinyuk2010@yandex.ua

го полімеру щодо вмісту ГА в кінцевому продукті. Реакцію синтезу проводили при температурі 80 °С, значення рН = 12 реакційної суміші досягали за допомогою 25 % водного розчину NH₄OH, що є необхідною умовою для синтезу як ГА, так і ZnO. Суміш зберігали при температурі навколишнього середовища (25 °С) протягом 1 доби, після чого утворений осад багаторазово промивали дистильованою водою до рН ~ 7,4 та відділяли за допомогою центрифуги. Для подальших досліджень продукт висушували при 37 °С та прожарювали при 900 °С протягом 1 години. Було підготовлено 4 типи зразків:



2.3 Структурні дослідження

Структура отриманих зразків була визначена методом рентгенівської дифракції на автоматизованому дифрактометрі ДРОН-3 (НПП «Буревестник», Росія). При дослідженні використовувалось випромінювання CuKα (довжина хвилі 0,154 нм), фокус по Брегу-Брентано θ - 2θ (2θ – брегівський кут). Величини струму та напруги складали 20 мА та 40 кВ відповідно. Дослідження зразків проводилося в режимі безперервної реєстрації (швидкість 4°/хв.), діапазон кутів 2θ від 10° до 60°. Результати експерименту передаються безпосередньо в програмний пакет підтримки експерименту DifWin-1 (ТОО «Эталон ПТЦ») для попередньої обробки. Ідентифікація кристалічних фаз проводилась за допомогою картотеки JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards).

Розміри кристалітів розраховували за формулою Шеррера:

$$L = \frac{K\lambda}{\beta_m \cos \theta},$$

де L – розмір кристаліту, K – коефіцієнт форми (приймаємо $K = 1$), β_m – інтегральна ширина профілю

дифракційної лінії.

Розрахунок сталих a і c гексагональної фази матеріалів проводився за формулами (для JCPDS 09-432 $a = 0,942$ нм, $c = 0,688$ нм; для JCPDS 79-205 $a = 0,324$ нм, $c = 0,518$ нм):

$$a = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} \sqrt{\frac{4}{3}(h^2 + hk + k^2) + \left(\frac{a}{c}\right)^2 l^2}$$

$$c = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} \sqrt{\frac{4}{3}\left(\frac{c}{a}\right)^2 (h^2 + hk + k^2) + l^2},$$

де λ – довжина хвилі рентгенівського випромінювання; (hkl) – індекси Мілера.

Кількісний фазовий аналіз проводили за допомогою методу Чанга [14].

Співвідношення Ca/P розраховувалось за наступною формулою:

$$\frac{Ca}{P} = \frac{10 \cdot (100 - \%TCP) / M_{HAP} + 3 \cdot \%TCP / M_{HAP}}{6 \cdot (100 - \%TCP) / M_{HAP} + 2 \cdot \%TCP / M_{HAP}},$$

де M_{HAP} – молярна маса ГА; %TCP – концентрація фази ТКФ в %.

2.4 Просвічуюча електронна мікроскопія

Електронно-мікроскопічні дослідження проводилися після ультразвукового диспергування зразків на просвічуючий електронний мікроскоп ПЕМ-125К (ВАТ «Selmi», м.Суми) при прискорюючій напрузі 90 кВ і струму пучка 100 мкА. Зразки у вигляді порошку поміщали в дистильовану воду і обробляли ультразвуком на установці УЗДН-А (ВАТ «Selmi», м.Суми). Ультразвуковий випромінювач знаходився в посудині з дистильованою водою і порошкоподібними зразками протягом 10 хвилин. Питома потужність становила близько 15-20 Вт/см² при робочій частоті випромінювача 22 кГц. Потім кілька крапель отриманої суспензії наносили на спрямований вертикально вгору ультразвуковий випромінювач УЗДН-А і розпилювали 2-3 секунди, варіюючи потужність установки. Розпилений аерозоль вловлювали на тонку вуглецеву плівку (10-20 нм), розміщену на мідній сітці.

2.5 Рентгено-флуоресцентна спектроскопія

Мікроелементний склад зразків визначався з використанням рентгено-флуоресцентного спектрометра «ElvaX Light SDD» (Україна, Київ). Спектрометр дозволяє визначати вміст елементів в інтервалі від Na ($Z = 11$) до U ($Z = 92$). Джерелом первинного випромінювання у приладі є рентгенівська трубка з родієвим анодом, термоелектричне охолодження детектора здійснюється з використанням елементів Пельтьє, спектрометр має берилієве вікно товщиною 140 мкм. Роздільна здатність рентгенівського детектора складає 165 еВ при 5,9 кеВ (лінія Mn K_α). Обробка отриманих енергетичних спектрів проводилася в програмному комплексі підтримки експерименту ElvaX.

2.6 Механічні вимірювання

Дослідження механічних властивостей отриманих зразків проводились на деформаційній машині МРК-1 гвинтового типу шляхом їх квазістатичного навантаження з постійною швидкістю з автоматичним записом діаграм.

За діаграмою деформації визначають значення максимального навантаження зразків (P). Потім знаходять механічну напругу в МПа (межу міцності) за формулою

$$\sigma = \frac{F_{np}}{S}$$

де F_{np} – сила пружності при максимальному навантаженні P , Н;

S – площа поперечного перерізу зразка, мм².

Модуль пружності при стисненні (E) в МПа розраховували за формулою

$$E = \frac{(F_1 - F_2) \cdot h_0}{S \cdot (h_2 - h_1) \cdot \frac{v_{\text{гв.}}}{v_{\text{стр.}}}}$$

де F_1 – сила пружності, що відповідає навантаженню P_1 на діаграмі деформації, Н; F_2 – сила пружності, що відповідає навантаженню P_2 на діаграмі деформації, Н; h_0 – початкова висота зразка, мм; S – площа поперечного перерізу зразка, мм²; h_1 – зміна висоти зразка, що відповідає навантаженню P_1 , мм; h_2 – зміна висоти зразка, що відповідає навантаженню P_2 , мм; $v_{\text{гв.}}$ – швидкість гвинта деформаційної машини, 0,25 мм/хв; $v_{\text{стр.}}$ – швидкість стрічки самописця, 12 мм/хв.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 представлені зображення синтезованих зразків, отриманих за допомогою просвічуючої електронної мікроскопії.

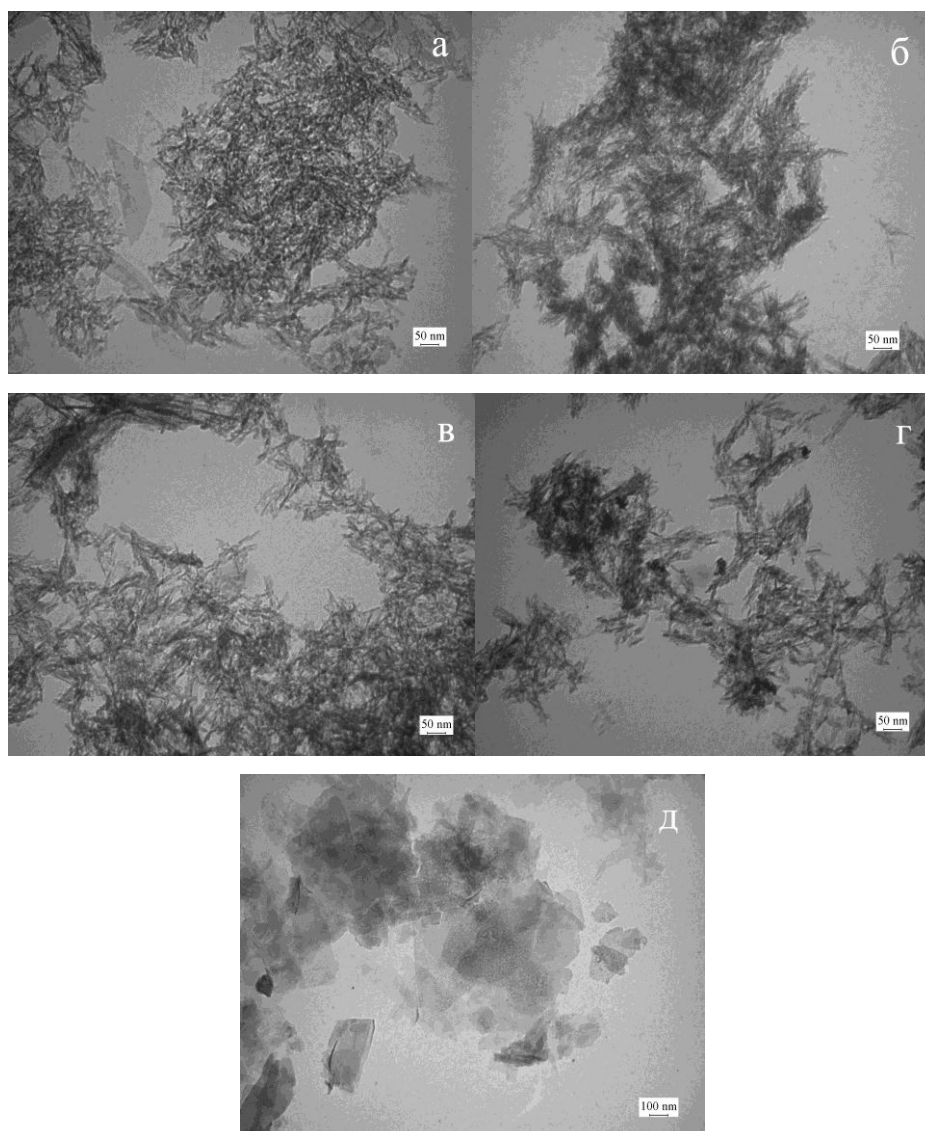


Рис. 1 – ПЕМ зображення синтезованих композитних матеріалів: а) – зразок №1; б) – зразок №2; в) – зразок №3; г) – зразок №4; д) – ZnO

Знімки ПЕМ демонструють продовговату, голчату структуру частинок гідроксиапатиту у складі композитного матеріалу розміром до 50 нм, хоча їх форма дещо відрізняється від форми кристалів чистого ГА. Тобто включення в композитний матеріал ZnO та альгінату призводить до зміни форми кристалітів утворених наночастинок ГА та їх розмірів, що було підтверджено рентгеноструктурним аналізом.

За допомогою методу рентгенівської дифракції був визначений фазовий склад отриманих композитів (рис. 2). Результати рентгеноструктурного аналізу висушених при 37 °С отриманих порошків показали, що основною фазою отриманого продукту є аморфний дрібнокристалічний ГА (JCPDS № 09-432). Подальше прогрівання зразків до 900 °С призводило до появи двох додаткових фаз – трикальцій фосфату (ТКФ) JCPDS № 09-169 та кальцій цинк фосфату (КЦФ) JCPDS № 48-1196, інтенсивності піків яких перекриваються на дифрактограмі. Присутність останньої фази може бути наслідком вбудовування в кристалічну структуру композитного матеріалу іонів Zn²⁺ під час проходження температурної обробки [15]. Очевидно, що в результаті реакцій синтезу композитних матеріалів утворюється нестехіометричний кальцій дефіцитний гідроксиапатит, який при нагріванні до T = 900 °С трансформується в β-ТКФ [16]. Наявність частки ТКФ свідчить про присутність дефектів кристалічної решітки, спричинених частковим заміщенням іонів Ca²⁺ іонами Zn²⁺. Також на рентгенограмах були зареєстровані досить інтенсивні піки, які були ідентифіковані як відбивання від площин (002), (101), (110) фази оксиду цинку (JCPDS № 79-205). Таким чином, рентгенівські спектри підтверджують формування кристалітів гідроксиапатиту в присутності оксиду цинку та альгінату натрію. У таблиці 1 наведені результати розрахунку структурних характеристик синтезованих композитних матеріалів, відпалених при 900 °С в порівнянні з чистим ГА.

Таблиця 1 – Структурні параметри кристалітів ГА та ZnO за даними рентгеноструктурного аналізу

Зразок	Індекс Міллера	L, нм	a, нм	c, нм	C, %		
					ГА	ТКФ та КЦФ	
ГА-ZnO-1	ГА	(002)	66,8	0,936	0,688	47,4	52,6
		(211)	50,1				
		(004)	53,2				
ГА-ZnO-2	ГА	(002)	51,9	0,934	0,686	60	40
		(211)	44,4				
		(004)	45,7				
ГА-ZnO-3	ГА	(002)	58,2	0,935	0,686	69	31
		(211)	44,8				
		(004)	37,7				
ГА-ZnO-4	ГА	(002)	53,6	0,933	0,686	59	41
		(211)	42,8				
		(004)	31,9				
ГА-ZnO-4	ZnO	(101)	26,4	0,942	0,688	100	-
		(002)	49,8				

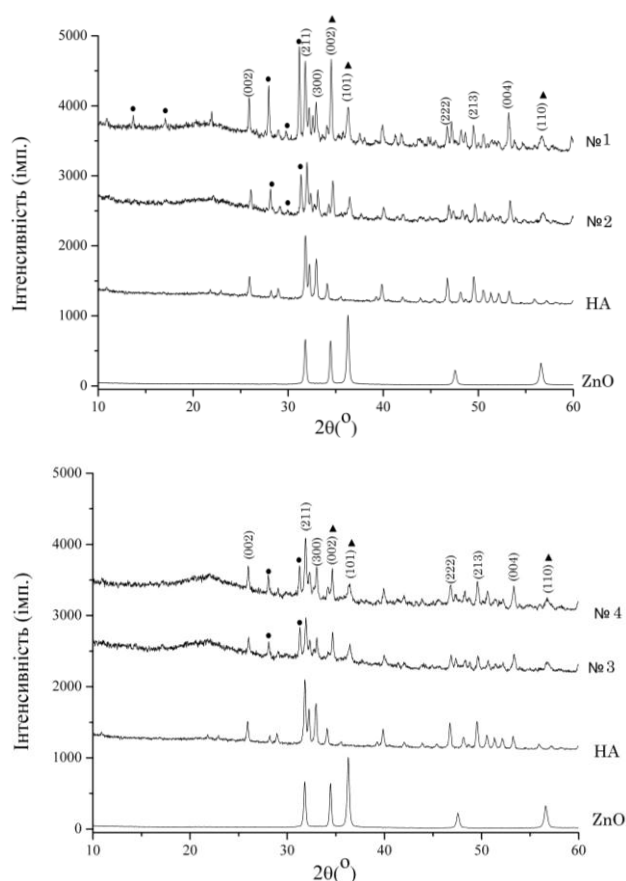


Рис. 2 – Рентгенівські дифрактограми синтезованих композитних матеріалів. Індексомі Міллера відмічені основні піки ГА (JCPDS № 09-432) та ZnO (JCPDS № 79-205). Символом ● позначені основні піки фази ТКФ та кальцій цинк фосфату, символом ▲ – ZnO

Результати свідчать, що параметри кристалічної решітки ГА (a та c) у складі синтезованих композитних матеріалів відрізняються від параметрів чистого ГА. Це є наслідком часткового заміщення іонів Ca^{2+} іонами Zn^{2+} . Так, параметри a і c зменшились у всіх дослідних зразках в результаті іонного включення Zn в елементарні комірки ГА, який має менший іонний радіус (0,074 нм) в порівнянні з кальцієм (0,104 нм).

Присутність іонів цинку та альгінату натрію під час синтезу впливає на розмір кристалітів ГА, а саме: середній розмір кристалітів у зразках ГА-ZnO-1, ГА-ZnO-2, ГА-ZnO-3 та ГА-ZnO-4 збільшився в порівнянні з чистим ГА з 49,8 до 66,8 нм, 51,9 нм, 58,2 нм та 53,6 нм відповідно. Спосіб отримання композиційного матеріалу впливає на фазовий склад кінцевого продукту: вміст ГА в зразку ГА-ZnO-2 на 12 мас.% більший в порівнянні з ГА-ZnO-1, а вміст ГА в зразку ГА-ZnO-3 більший на 10 мас.%, ніж в зразку ГА-ZnO-4.

Мікроелементний склад зразків був визначений за допомогою рентгено-флуоресцентного спектрометра «ElvaX Light SDD». Типовий для всіх досліджених зразків рентгено-флуоресцентний спектр наведений на рис. 3. Результатом аналізу підтверджено наявність іонів Ca, P і Zn у складі композитних матеріалів.

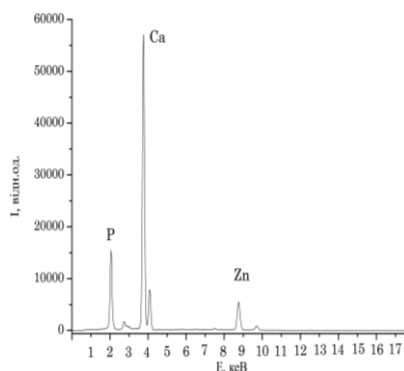


Рис. 3 – Характеристичний рентгенівський спектр синтезованих композитних матеріалів

Атомні співвідношення Ca/P в композитних матеріалах, відпалених при 900 °С, розраховані за результатами рентгено-флуоресцентного аналізу (РФА), рентгенівської дифракції (РД) та растрової електронної мікроскопії (РЕМ), представлені в таблиці 2.

Таблиця 2 – Атомні співвідношення Ca/P композитних матеріалів

Зразок	Ca/P 900 °С РФА	Ca/P 900 °С РЕМ	Ca/P 900 °С РД
ГА-ZnO-1	1,54	1,60	1,62
ГА-ZnO-2	1,57	1,61	1,63
ГА-ZnO-3	1,59	1,63	1,64
ГА-ZnO-4	1,57	1,62	1,63

Результати розрахунків співвідношення Ca/P за допомогою цих методів дещо відрізняються між собою, але всі чисельні дані відповідають утворенню саме нестехіометричного кальцій дефіцитного гідроксиапатиту.

Результати вимірювань та обчислень механічних властивостей отриманих зразків наведені в табл. 3.

Таблиця 3 – Механічні властивості синтезованих зразків

Зразок	Межа міцності σ , МПа	Модуль пружності E , МПа
ГА-ZnO-1	0,63	18,2
ГА-ZnO-2	0,78	17,5
ГА-ZnO-3	0,88	15,2
ГА-ZnO-4	0,91	14,3

Результати досліджень показали, що зі зменшенням розмірів кристалів від 50,1 нм до 44,4 нм в зразку без додавання полімеру (ГА-ZnO-1 та ГА-ZnO-2 відповідно), відбувається збільшення межі міцності даних матеріалів від 0,63 МПа до 0,78 МПа. Дана тенденція зберігається для зразків синтезованих у присутності полімерної складової. Отримані результати не суперечать літературним даним, які свідчать, що механічні характеристики погіршуються із збільшенням вмісту аморфної фази, мікропористості і розмірів кристалітів, в той час як висока ступінь кристалічності, низька пористість мають тенденцію давати вищу жорсткість, більш високі міцність на стиск, на розрив та руйнівну міцність [17]. В той же час модуль пружності зростає в зворотньому напрямку.

4. ВИСНОВКИ

Результати дослідження показали, що синтез ГА в присутності іонів Zn^{2+} суттєво не змінює основну фазу продукту. Молярне співвідношення Ca/P для експериментальних зразків доводить утворення нестехіометричного кальцій дефіцитного гідроксиапатиту з додатковою фазою ZnO. Прогрівання зразків до 900 °С призводило до появи двох додаткових фаз – трикальцій фосфату та кальцій цинк фосфату, що є наслідком часткового заміщення в кристалічній структурі ГА іонів Ca^{2+} на іони Zn^{2+} під час проходження температурної обробки. Параметри a і c зменшились у всіх дослідних зразках в результаті іонного включення в елементарні комірки ГА іонів Zn^{2+} , які мають менший іонний радіус (0,074 нм) в порівнянні з Ca^{2+} (0,104 нм). Присутність іонів цинку та альгінату натрію під час синтезу впливає на розмір кристалітів ГА. Середній розмір кристалітів ГА в композитах збільшився в порівнянні з чистим ГА. Спосіб отримання композиційного матеріалу впливає на фазовий склад кінцевого продукту. Результати досліджень механічних властивостей показали, що зі зменшенням розмірів кристалітів відбувається збільшення межі міцності даних матеріалів. В той же час модуль пружності зростає в зворотньому напрямку.

Structural Properties of Apatite-Biopolymer Nanocomposites, Doped ZnOO.O. Martynyuk¹, L.F. Sukhodub¹, L.B. Sukhodub², A.M. Meshkov¹¹ *Sumy State University, 2, Rymsky Korsakov St., 40007 Sumy, Ukraine*² *SI "Institute of Microbiology and Immunology, the Mechnikov I.I. AMS of Ukraine", 14/16, Pushkinska St., 61057 Kharkiv, Ukraine*

The article is devoted to study the structure, morphology, mechanical properties, phase and elemental composition of synthesized nanostructured biopolymer apatite samples doped ZnO for the needs of orthopedics and dentistry. It is found that modified hydroxyapatite (HA) (Ca/P ~ 1,62-1,63) has increased the crystallites size compared to stoichiometric HA (Ca/P = 1,67). As a result of annealing (900 °C) is fixed the presence of phases three calcium phosphate and calcium zinc phosphate and reducing of *a* and *c* parameters of the HA unit cell. This is the result of the partial substitution of Ca²⁺ for Zn²⁺ ions, which have different ionic radii (0,104 nm against 0,074 nm).

Keywords: Hydroxyapatite, Zinc oxide, Tricalcium phosphate, Composite, Polymer.

Структурные свойства апатит-биополимерных наноконкомпозитов, легированных ZnOА.А. Мартынюк¹, Л.Ф. Суходуб¹, Л.Б. Суходуб², А.М. Мешков¹¹ *Сумский государственный университет МОН Украины, ул. Римского-Корсакова, 2, 40007 Сумы, Украина*² *ГУ «Институт микробиологии и иммунологии имени И.И. Мечникова АМН Украины», ул. Пушкинская, 14/16, 61057, Харьков, Украина*

Статья посвящена исследованию структуры, морфологии, механических характеристик, фазового и элементного состава синтезированных апатит-биополимерных наноструктурированных образцов легированных ZnO для нужд ортопедии и стоматологии. Найдено, что модифицированный гидроксиапатит (ГА) (Ca/P ~ 1,62-1,63) имеет увеличенные размеры кристаллитов по сравнению из стехиометрическим ГА (Ca/P = 1,67). В результате отжига (900 °C) зафиксировано присутствие фаз три кальций фосфат и кальций цинк фосфата, а также уменьшение параметров элементарной ячейки ГА (*a*, *c*), что является результатом частичного замещения Ca²⁺ ионами Zn²⁺, которые имеют различные ионные радиусы (0,104 нм против 0,074 нм).

Ключевые слова: Гидроксиапатит, Оксид цинка, Трикальций фосфат, Композит, Полимер.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. S. Nayar, A.K. Pramanick, B.K. Sharma, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 301 (2008).
2. F.L. De Paula, I.C. Barreto, M.H. Rocha-Leao, *Front. Mater. Sci. China* **3**, 145 (2009).
3. S.M. Zhang, F.Z. Cui, S.S. Liao, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **14**, 641 (2003).
4. G.A. Silva, O.P. Coutinho, P. Ducheyene, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **1**, 97 (2007).
5. J. Currey, *Biomaterials* **414**, 699 (2001)
6. M. Ogiso, *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater.* **43**, 318 (1998).
7. D.G. Guo, Y. Wang, K. Han, *Acta Biomaterialia* **5**, 3512 (2009).
8. M. Hashizume, M. Yamaguchi, *Mol. Cell. Biochem.* **122**, 59 (1993).
9. S. Kishi, M. Yamaguchi, *Biochem. Pharmacol.* **48**, 1225 (1994).
10. B.S. Moonga, D.W. Dempster, *J. Bone Mineral Res.* **10**, 453 (1995).
11. J.F. Hernandez-Sierra, F. Ruiz, D.C. Pena, *Nanomed-Nanotechnol.* **10**, 237 (2008).
12. A. Ito, M. Otsuka, *Curr. Appl. Phys.* **5**, 4026 (2005).
13. R.Z. Legeros. U.S. Patent 7, 419,680, publ. 02.09.2008.
14. F.H. Chung, *J. Appl. Crystallogr.* **8** No 1, 17 (1975).
15. K.A. Gross, L. Komarovska, A. Viksna, *J. Aust. Ceram. Soc.* **49**, 129 (2013).
16. V.M. Kuznetsov, L.B. Sukhodub, L.F. Sukhodub, *J. Nano-Electron. Phys.* **6** No 4, 04039 (2014).
17. C. Benaqqa, J. Chevalier, M. Saâdaoui, G. Fantozzi, *Biomaterials* **26**, 6106 (2005).