

## ФОРМИРОВАНИЕ АНИЗОМЕТРИЧНЫХ ЧАСТИЦ ГИДРОКСИАПАТИТА В ГИДРОТЕРМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

© Т. П. Масленникова<sup>1\*</sup>, И. П. Добровольская<sup>2,3\*\*</sup>, Э. Н. Гатина<sup>1</sup>,  
Д. А. Кириленко<sup>4</sup>, В. Л. Уголков<sup>1</sup>, В. Е. Юдин<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Институт химии силикатов им. И. В. Гребенщикова РАН,  
199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 2

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
195251, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 29

<sup>3</sup> Институт высокомолекулярных соединений РАН,  
199004, г. Санкт-Петербург, Большой пр. В.О., д. 31

<sup>4</sup> Физико-технический институт им А. Ф. Иоффе,  
194021, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., д. 26

E-mail: \*maslennikova.tp@iscras.ru; \*\*zair2@mail.ru

Поступила в Редакцию 12 сентября 2019 г.

После доработки 23 сентября 2019 г.

Принята к публикации 14 декабря 2019 г.

*Методами рентгенофазового анализа, просвечивающей электронной микроскопии, а также комплексного термического анализа показано, что в результате синтеза из водных растворов гидрофосфата аммония и нитрата кальция образуются кристаллы брушита. Гидротермальная обработка брушита приводит к формированию квазиодномерных наночастиц гидроксиапатита, продольный размер которых составляет около 400 нм, а поперечный — 40 нм. Показано, что наночастицы гидроксиапатита могут быть использованы в качестве наполнителей композиционных матриц для тканевой инженерии, в частности, в трансплантологии костной ткани.*

Ключевые слова: гидроксиапатит; брушит; гидротермальная обработка; наночастицы; кристаллическая структура

DOI: 10.31857/S0044461820050023

Гидроксиапатит является одним из основных компонентов костной ткани животных и человека, его содержание составляет 50–70%. Костная ткань состоит из клеток (остеобластов, остеоцитов, остеокластов), коллагена и нерастворимых фосфатов кальция в виде гидроксиапатита  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  и карбонатапатита  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$ . Гидроксиапатит в тканях представляет собой наноразмерные частицы различной формы,

связанные с клетками и фибриллярным коллагеном. Целью тканевой инженерии является разработка материалов, которые после имплантирования их в живой организм под воздействием биологической активной среды инициируют процесс образования новой ткани, идентичной ткани реципиента [1], поэтому в последние годы резко возрос интерес к разработке способа получения наночастиц гидроксиапатита.

Наночастицы синтетического гидроксиапатита различной морфологии получают с помощью твердофазных реакций, эмульсионных и золь-гель технологий, а также гидротермального метода [2–5]. Наиболее полно способы получения и свойства наночастиц синтетического гидроксиапатита для использования их в биологии и медицине описаны в работах [6–8]. Особое внимание уделено изучению формы одно-, двух- и трехмерных частиц. Результаты исследования влияния термической обработки на структуру и свойства наночастиц синтетического и биологического гидроксиапатита приведены в статье [9]. Методами рентгеновской дифракции, электронной просвечивающей микроскопии показано, что гидроксиапатит, полученный методом осаждения, представляет собой порошок, состоящий из анизотричных частиц, продольный размер которых составляет 70–100 нм, а поперечный — 7–9 нм. Синтетический гидроксиапатит характеризуется меньшей термической устойчивостью по сравнению с гидроксиапатитом биологического происхождения.

Основным требованием к материалам для клеточных технологий является их биосовместимость, отсутствие негативного влияния на клетки как самих материалов, так и продуктов их биорезорбции, поэтому наиболее перспективным представляется метод синтеза кристаллов гидроксиапатита из водных растворов солей кальция. Такой метод не предполагает использования каких-либо реагентов, способных повлиять на пролиферативную активность клеток. Несмотря на большое число работ, посвященных синтезу гидроксиапатита, крайне мало исследований по изучению влияния условий формирования на морфологию наночастиц гидроксиапатита. Вместе с тем известно, что такие параметры структуры твердых тел, как пористость, величина удельной поверхности, размеры и дефектность кристаллитов, существенно влияют на реакционную способность материала, его поведение в жидких активных средах [10].

Целью работы являлось изучение процесса формирования структуры наночастиц синтетического гидроксиапатита, полученных из водных растворов гидрофосфата аммония и нитрата кальция.

### Экспериментальная часть

Синтез гидроксиапатита проводили из водных растворов  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  х.ч. и  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  «чистый» в дистиллированной воде, растворы солей были взяты в молярном отношении  $\text{Ca}/\text{P} = 1.67$ . Раствор гидрофосфата аммония медленно добавляли к раствору нитрата кальция при постоянном перемешивании с помо-

щью магнитной мешалки, рН суспензии составлял 5.0–5.1. Суспензию переносили в тефлоновый тигель объемом 100 мл и проводили гидротермальную обработку при  $T = 200^\circ\text{C}$ , давлении 10 МПа в течение 20 ч. Полученный порошок промывали дистиллированной водой до достижения нейтральной реакции и сушили при  $T = 50^\circ\text{C}$  в атмосфере воздуха. Для исследования состава и структуры частиц, полученных в результате синтеза и не подвергнутых гидротермальной обработке, суспензию выдерживали до формирования осадка, который отделяли и промывали дистиллированной водой.

Кристаллическую структуру порошков исследовали с помощью метода рентгенофазового анализа (РФА) на дифрактометре ДРОН-3М (НПО «Буревестник»). Измерения проводили в режиме на отражение (геометрия Брэгга–Брентано) с использованием  $\text{CuK}_\alpha$ -излучения ( $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ , никелевый  $\beta$ -фильтр). Регистрацию вели в пошаговом режиме в интервале углов  $2\theta = 10\text{--}70^\circ$  с шагом  $0.02^\circ$  при экспозиции в точке 1 с. Обработку полученных данных и идентификацию пиков проводили с использованием пакета программы DFWin и базы данных ICDD PDF-2.

Размеры кристаллитов определяли методом Шеррера, использовали рефлексы гидроксиапатита (100),  $2\theta = 10.80^\circ$  и (002),  $2\theta = 26.12^\circ$ .

Форму и размеры наночастиц определяли с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на электронном микроскопе высокого разрешения JEM 2100-F с  $U_{\text{уск}}$  до 200 кВ с приставкой Oxford Instruments INCA для энергодисперсионного микрорентгеноспектрального анализа.

Комплексный термический анализ проводили на анализаторе STA 429 CD Netzsch с использованием платинородиевого держателя образцов типа TG + DSC в интервале температур 50–1000°C при нагревании со скоростью  $20 \text{ град}\cdot\text{мин}^{-1}$ , в потоке воздуха  $10 + 40 \text{ см}^3\cdot\text{мин}^{-1}$ . При анализе регистрировали изменения массы образца с точностью  $\pm 0.005 \text{ мг}$  [кривые термогравиметрии (ТГ), % от исходной массы] и изменения энтальпии материала [кривые дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК),  $\text{мВт}\cdot\text{мг}^{-1}$ ], направления экзотермических эффектов вниз, так как для исследуемой системы (таблетки материала) выделение тепла (экзотермия) имеет отрицательное значение.

Исследование структуры полученных порошков проводили методом ИК-спектроскопии при использовании Фурье-спектрометра ФСМ-1201. Диапазон волновых чисел составлял  $450\text{--}4000 \text{ см}^{-1}$ , измерения проводили на воздухе в режиме пропускания, разре-

шение составляло  $4 \text{ см}^{-1}$ . Обработку спектров осуществляли с использованием базового программного обеспечения Fspes, реализующего автоматическое измерение спектров, имеющего средства графического отображения спектров и их фрагментов. Полученные с помощью программы Excel цифровые данные использовали для построения спектра пропускания.

Для определения удельной поверхности образцов использовался метод низкотемпературной адсорбции азота (метод Брунауэра–Эммета–Теллера, газовый анализатор Quantochrome, Nova-1200e).

### Обсуждение результатов

Кристаллическую структуру образцов исследовали методом рентгенофазового анализа. По данным РФА установлено, что в результате осаждения из водных растворов  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  и  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  начинает формироваться кристаллогидрат гидрофосфата кальция ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) — аналога минерала брушита (рис. 1, кривая 1). После гидротермальной обработки суспензии в течение 20 ч в водной среде происходит перекристаллизация брушита в гидроксиапатит. На рентгеновских дифрактограммах (рис. 1, кривая 2) были зафиксированы пики, относящиеся только к фазе гидроксиапатита.

Рассчитанный методом Шеррера поперечный размер кристаллита гидроксиапатита составляет  $29 \pm 1 \text{ нм}$ , продольный —  $40 \pm 1 \text{ нм}$ . Корректно определить размеры кристаллитов брушита не представляется возможным ввиду малых значений полуширины рефлексов, менее  $0.01^\circ$ , что сопоставимо с погреш-

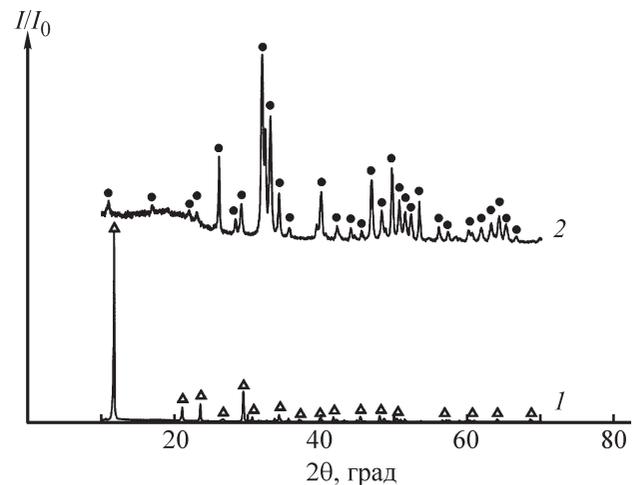


Рис. 1. Рентгеновские дифрактограммы образцов, полученных в результате осаждения (1) и после гидротермальной обработки осажденного порошка (2).

1 —  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  — брушит (JCPDC 11-293), 2 —  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  — гидроксиапатит (JCPDC 9-432).

ностью измерения. Это позволяет предположить, что размеры кристаллитов брушита больше 100 нм.

Данные ИК-спектроскопии образцов достаточно хорошо согласуются с данными рентгенофазового анализа (рис. 2). В ИК-спектре осажденного образца присутствуют все полосы, характерные для брушита. Группы полос поглощения можно отнести к деформационным  $\delta(\text{PO}_4^{3-})$  —  $525, 576, 662 \text{ см}^{-1}$  и валентным  $\nu(\text{PO}_4^{3-})$  —  $987, 1057, 1135 \text{ см}^{-1}$  колебаниям связей O–P–O в группах  $\text{HPO}_4^{2-}$  [11]. Наличие в структуре брушита кристаллизационной воды подтверждается

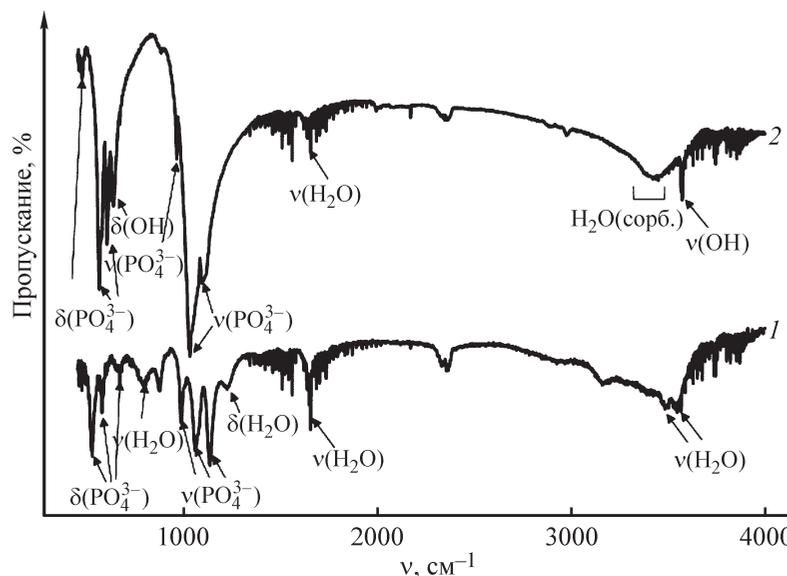


Рис. 2. ИК-спектры синтезированных образцов до (1) и после (2) гидротермальной обработки.

валентными [ $791\text{ см}^{-1}$  —  $\nu(\text{H}_2\text{O})$ ] и деформационными [ $1219\text{ см}^{-1}$   $\delta(\text{H}_2\text{O})$ ] колебаниями O–H–O.

В ИК-спектре образца, полученного после гидротермальной обработки, присутствуют валентные ( $471, 575, 601\text{ см}^{-1}$ ) и деформационные ( $963, 1040, 1090\text{ см}^{-1}$ ) колебания связей O–P–O. Полоса поглощения при  $642\text{ см}^{-1}$  соответствует деформационным колебаниям OH-групп, валентные колебания сорбированной и кристаллизационной воды представлены в спектре фоном в области  $3350\text{--}3500\text{ см}^{-1}$ . На деформационные колебания H–O–H указывают полосы  $1670\text{--}1675\text{ см}^{-1}$ . Перечисленные спектральные особенности характерны для кристаллов гидроксиапатита.

После синтеза до гидротермальной обработки в суспензии формируются частицы различной морфологии, с большим разбросом значений по размерам, что следует из результатов исследования образцов

методом ПЭМ (рис. 3). Преимущественная морфология частиц — стержнеобразная. Размеры частиц: длина от  $300\text{ нм}$  до нескольких микрометров, ширина от  $90$  до  $300\text{ нм}$  (рис. 3, а, б). В образце присутствуют частицы микрометрового размера с морфологией, близкой к гексагональной и сферической. Размеры таких частиц составляют от  $500$  до  $900\text{ мкм}$ .

Анализ данных ПЭМ образца, полученного после гидротермальной обработки, показал, что частицы гидроксиапатита имеют четко выраженную анизотричную форму, продольные размеры частиц составляют  $200\text{--}400\text{ нм}$ , поперечные — около  $40\text{ нм}$  (рис. 3, в). На микрофотографии высокого разрешения (рис. 3, г) наблюдается практически идеальная гексагональная кристаллическая структура гидроксиапатита.

Методом низкотемпературной адсорбции азота были определены значения удельной поверхности

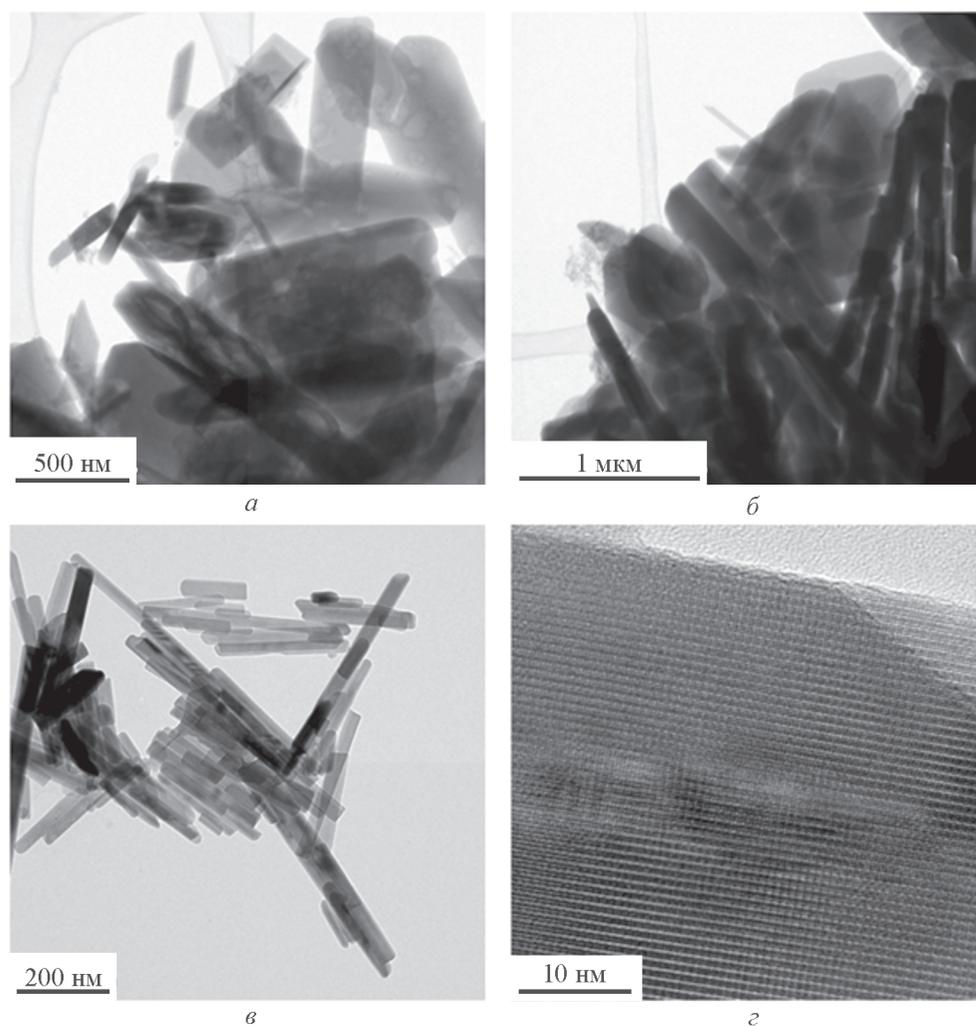


Рис. 3. Просвечивающая электронная микроскопия синтезированных образцов до (а, б) и после (в, г) гидротермальной обработки.

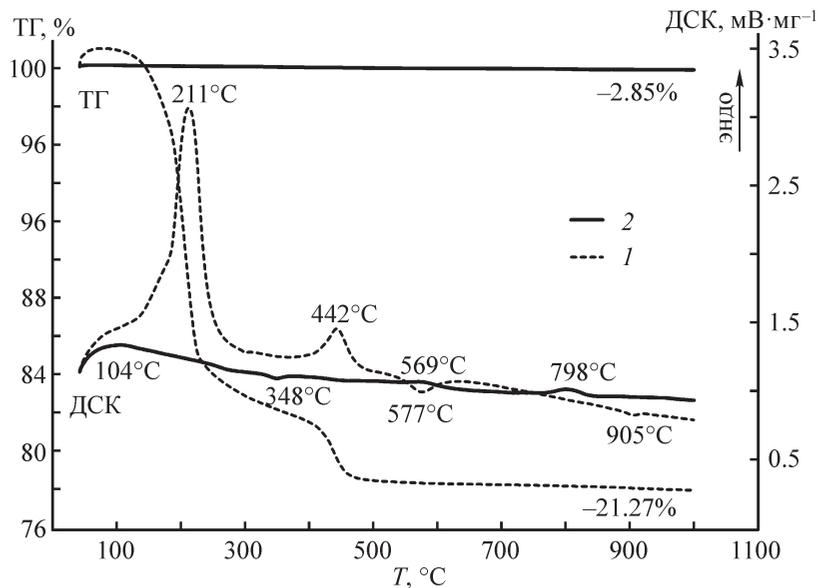


Рис. 4. Кривые дифференциально-сканирующей калориметрии и термогравиметрии образцов до (1) и после (2) гидротермальной обработки.

образцов синтетического брушита и гидроксиапатита. Для брушита эта величина составила  $34 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$ , для наночастиц гидроксиапатита —  $40 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$ .

Результаты исследования термических свойств кристаллов брушита и гидроксиапатита приведены на рис. 4. Для кривой ДСК образца брушита (кривая 1) характерно наличие двух эндотермических максимумов  $T_1 = 211^\circ\text{C}$  и  $T_2 = 442^\circ\text{C}$ . Первый эндотермический эффект связан с удалением сорбированной (несвязанной воды) из брушита, второй — с удалением кристаллизационной воды и образованием гидрофосфата кальция —  $\text{CaHPO}_4$ , аналога минерала монетита. По данным термогравиметрического анализа в интервале температур  $200\text{--}450^\circ\text{C}$  наблюдается интенсивная потеря массы образца, не подвергнутого гидротермальной обработке. По данным исследований, проведенных методом ДСК, при  $T = 569^\circ\text{C}$  был зафиксирован экзоэффект, который связан с переходом монетита в пирофосфат кальция ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ). Этот эффект также связан с удалением остатков оксидов азота. Последний небольшой экзоэффект при  $T = 905^\circ\text{C}$ , по всей вероятности, связан с совершенствованием и ростом кристаллов пирофосфата кальция. Данный экзотермический эффект сопровождается потерей массы образца менее 1%. На протяжении всего температурного интервала исследования  $T = 50\text{--}1000^\circ\text{C}$ , как следует из результатов термогравиметрического анализа, потеря массы образца составила 21.27%.

Потеря массы образца гидроксиапатита, подвергнутого высокотемпературной обработке до

$T = 1000^\circ\text{C}$ , составила менее 3% (рис. 4, кривая 2), что, вероятно, свидетельствует о высокой степени его кристалличности. В интервале температур  $50\text{--}200^\circ\text{C}$  происходит удаление несвязанной и сорбированной воды, при  $T = 348^\circ\text{C}$  зафиксирован экзоэффект, который может быть отнесен к разложению нитрата аммония, входящего в состав гидроксиапатита. При температурах  $T = 569$  и  $798^\circ\text{C}$  наблюдаются еще два эндотермических эффекта, которые могут быть отнесены к удалению углекислого газа и остатков воды одновременно с частичным переходом гидроксиапатита в  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

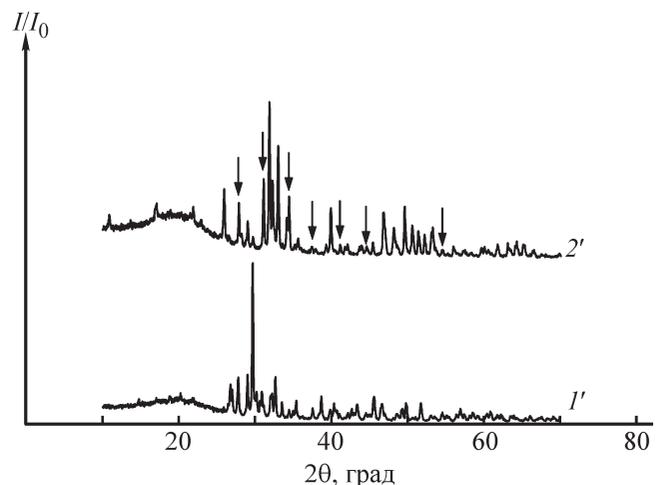


Рис. 5. Дифрактограммы образцов брушита (1') и гидроксиапатита (2') после обработки при  $T = 1000^\circ\text{C}$ .

Данные термического анализа хорошо согласуются с данными РФА образцов, полученных после термообработки до  $T = 1000^\circ\text{C}$ . Из анализа представленных на рис. 5 (кривые 1' и 2') дифрактограмм образцов синтетического брусита и гидроксиапатита, термообработанных в динамическом режиме нагрева со скоростью  $20 \text{ град}\cdot\text{мин}^{-1}$  до  $1000^\circ\text{C}$ , следует, что в образцах присутствуют фазы, относящиеся к продуктам разложения и термических преобразований брусита и гидроксиапатита.

На кривой 1' зафиксированы только пики, принадлежащие фазе пирофосфата кальция ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) (JCPDC 9-346). На кривой 2' наблюдаются пики ортофосфата кальция  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (JCPDC 9-169). Данная фаза отмечена стрелками. Все остальные неотмеченные пики на кривой 2' относятся к фазе гидроксиапатита  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (JCPDC 9-432).

### Выводы

В результате взаимодействия водных растворов гидрофосфата аммония и нитрата кальция формируются кристаллы брусита. Установлено, что в результате гидротермальной обработки осажденной суспензии формируются монофазные анизотричные наночастицы гидроксиапатита с продольными размерами 200–400 нм и поперечными около 40 нм.

Анализ свойств и структуры синтезированных наночастиц гидроксиапатита позволяет рекомендовать их в качестве наполнителя композиционных матриц для тканевой инженерии, а также для применения в клеточных технологиях.

### Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 19-73-30003.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

### Информация об авторах

Масленникова Татьяна Петровна, к.х.н.,  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0872-7592>

Добровольская Ирина Петровна, д.ф.-м.н.,  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2743-1532>

Гатина Эльмира Надыревна,  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9294-4428>

Кириленко Демид Александрович, к.ф.-м.н.,  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1571-209X>

Уголков Валерий Леонидович, к.т.н.,  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2895-0625>

Юдин Владимир Евгеньевич, д.ф.-м.н.,  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5517-4767>

### Список литературы

- [1] Добровольская И. П., Юдин В. Е., Попрядухин П. В., Иванькова Е. М. Полимерные матрицы для тканевой инженерии. СПб: Изд.-полиграф. ассоциация ун-тов России, 2016. С. 41–55 [Dobrovolskaya I. P., Yudin V. E., Popryadukhin P. V., Ivan'kova E. M. Polymer scaffolds for tissue engineering. St. Petersburg: Mediapapir, 2018. P. 37–49].
- [2] Paz A., Guadarrama D., López M., González J. E., Brizuela N., Aragón J. A comparative study of hydroxyapatite nanoparticles synthesized by different routes // Quimica Nova. 2012. V. 35. N 9. P. 1724–1727. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000900004>
- [3] de Caprariis B., Di Rita M., Stoller M., Verdone N., Chianese A. Reaction-precipitation by a spinning disc reactor: Influence of hydrodynamics on nanoparticles production // Chem. Eng. Sci. 2012. V. 76. P. 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2012.03.043>
- [4] Landi E., Logroscino G., Proietti L., Tampieri A., Sandri M., Sipro S. Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: From synthesis to in vivo behavior // J. Mater. Sci. Mater. Medicine. 2008. V. 19. N 1. P. 239–247. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0032-y>
- [5] Liu C., Huang Y., Shen W., Cui J. Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11 // Biomaterials. 2001. V. 22. N 4. P. 301–306. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00166-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00166-6)
- [6] Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphate deposits: Preparation, properties and biomedical applications // Mater. Sci. Eng. C. 2015. V. 55. P. 272–326. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.033>
- [7] Karpikhin A. E., Fedotov A. Yu., Komlev V. S., Barinov S. M., Sirotinkin V. P., Gordeev A. S., Shamrai V. F. Structure of hydroxyapatite powders prepared through dicalcium phosphate dihydrate hydrolysis // Inorg. Mater. 2016. V. 52. N 2. P. 170–175. <https://doi.org/10.1134/S0020168516020060>
- [8] Šupová M. Isolation and preparation of nanoscale bioapatites from natural sources: A review // J. Nanosci. Nanotechnol. 2014. V. 14. N 1. P. 546–563. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8895>
- [9] Добровольская И. П., Царев Н. С., Осмоловская О. М., Касаткин И. А., Иванькова Е. М., Попова Е. Н., Панкова Г. А., Юдин В. Е. Влияние термической обработки на структуру и свойства гидроксиапатита // ЖПХ. 2018. Т. 91. № 3. С. 328–334 [Dobrovolskaya I. P., Tsarev N. S.,

- Osmolovskaya O. M., Kasatkin I. A., Ivan'kova E. M., Popova E. N., Pankova G. A., Yudin V. E.* Effect of thermal treatment on the structure and properties of hydroxyapatite // *Russ. J. Appl. Chem.* 2018. V. 91. N 3. P. 368–374.  
<https://doi.org/10.1134/S1070427218030035>].
- [10] *Регель В. Р., Слуцкер А. И., Томашевский Э. Е.* Кинетическая природа прочности твердых тел // *Успехи физ. наук.* 1972. Т. 106. № 2. С. 193–228
- [*Regel' V. R., Slutsker A. I., Tomashevskii E. E.* The kinetic nature of the strength of solids // *Soviet Physics Uspekhi.* 1972 V. 15. N 1. P. 45–65. <http://dx.doi.org/10.1070/PU1972v015n01ABEH004945>].
- [11] *Mandel S., Tas A. C.* Brushite ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) to octacalcium phosphate ( $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) transformation in DMEM solutions at 36.5°C // *Mater. Sci. Eng. C.* 2010. V. 30. N 2. P. 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.10.009>
-