

УДК 542.06+542.85

БИОРЕЗОРБИРУЕМЫЕ ПОРОШКОВЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$

*Е.С. Ковалева, Я.Ю. Филиппов, В.И. Путляев, Ю.Д. Третьяков,
В.К. Иванов, Н.И. Силкин, Л.Ф. Галиуллина, А.А. Родионов,
Г.В. Мамин, С.Б. Орлинский, М.Х. Салахов*

Аннотация

Использование материала на основе карбонатсодержащего гидроксиапатита $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$ (КГАП) для создания биорезорбируемых имплантатов, применяемых в качестве заменителей костной ткани, считается перспективным. Он более точно воспроизводит состав кости по сравнению с немодифицированным гидроксиапатитом (ГАП) и обладает повышенной биорезорбцией вследствие микроискажений, возникающих при вхождении карбонат-иона в структуру апатита. Использование приема частичного замещения фосфатных групп в структуре гидроксиапатита позволяет увеличить растворимость биоматериала. Основной задачей данной работы являлось получение нанокристаллического Ca–Na-карбонатапатита заданного состава, исследование взаимосвязи между содержанием карбонатных групп CO_3^{2-} , микроструктурой (кристаллической структурой) и растворимостью полученного материала, подготовка образцов для экспериментов *in vitro*. В работе были использованы следующие методы исследования: РФА, ИК-спектроскопия, ПЭМ, РЭМ, РСМА, ЯМР с ВМУ, стационарный и импульсный ЭПР/ДЭЯР в X- и W-диапазоне, низкотемпературная адсорбция азота (БЭТ), ТГА/ДТА, ионометрия растворов (рН, рСа), АЭС с индуктивно-связанной плазмой (ИСП), волюмометрия. Показано, что в результате синтеза образуется КГАП смешанного А–В типа (замещение на карбонатные группы происходит как в позиции ОН-групп – А-тип, так и в позиции PO_4^{3-} – В-тип). Исследована термическая стабильность полученных порошков. Представлены результаты, которые позволяют выдвинуть гипотезу о конкуренции ионов NO_3^- и CO_3^{2-} при замещении А-позиции в структуре апатита. Исследование биоактивности полученных материалов в модельных растворах показало большую биоактивность и резорбируемость модифицированных образцов по сравнению с немодифицированным гидроксиапатитом.

Ключевые слова: имплантат, гидроксиапатит, биорезорбция, ИК-спектроскопия, ПЭМ, РЭМ, РСМА, ЯМР, ЭПР, ДТА.

Введение

Синтетический гидроксиапатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ГАП) – широко распространенный материал, применяемый в медицине для лечения поврежденных костных тканей вследствие химического и фазового подобия неорганической составляющей костной ткани [1, 2].

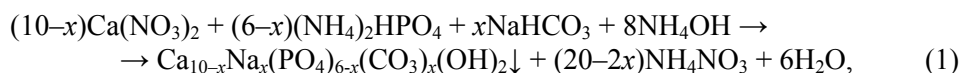
Со времени первых попыток использования фосфатов кальция в медицине концепция применения биоматериалов претерпела серьезные изменения. На первый план вышел так называемый регенерационный подход, в рамках которого

акцент делается на замещении биоматериала нативной растущей костью, а материалу отводят роль (активного) источника необходимых для построения костной ткани элементов, лишь первоначально осуществляющего опорную функцию. Регенерационный подход требует от современных биоматериалов прежде всего ускорения процесса срастания и замены имплантата новой костной тканью. Материал имплантата должен также оказывать остеостимулирующее действие, в то время как механические нагрузки во время лечения можно исключить [3].

Одним из известных способов повышения резорбируемости керамики на основе ГАП является переход к химическому модифицированию гидроксиапатита. С кристаллохимической точки зрения замена катиона или аниона эффективна для изменения энергии решетки кристалла (и, следовательно, изменения произведения растворимости) и кислотно-основных свойств поверхности (то есть кинетики процесса растворения) [4, 5]. В настоящей работе подход к контролю скорости резорбции базируется на идее использования анионного и катионного замещения ГАП. В качестве основного объекта исследования был выбран гидроксипатит, модифицированный карбонат-ионом и ионом натрия, с различными степенями замещения [6, 7].

1. Экспериментальная часть

Для синтеза немодифицированного и модифицированного ионами Na^+ и CO_3^{2-} гидроксиапатита кальция методом осаждения из водного раствора согласно уравнению реакции (1) использовали следующие реактивы: гидрофосфат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (марки «хч»), нитрат кальция $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (марки «хч»), гидрокарбонат натрия NaHCO_3 (марки «хч»), 30%-ный водный раствор NH_3 (марки «хч»), карбонат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (марки «хч»):



где $x = 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2$. Стехиометрическое количество NaHCO_3 добавляли к раствору, содержащему 0.5 М $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Затем доводили pH раствора прикапыванием концентрированного раствора аммиака до значений $\text{pH} \sim 11.5 \pm 1$, после чего к смеси при $t = 55 \pm 1$ °С покапельно добавляли 0.3 М раствора $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ при интенсивном перемешивании. Осадок оstarивали при температуре 80 ± 1 °С в течение 24 ч. Полученные осадки отделяли от маточного раствора фильтрованием на воронке Бюхнера, затем промывали слабым раствором аммиака и дистиллированной водой для более полного удаления побочных продуктов реакции и далее сушили при комнатной температуре на воздухе до полного высыхания.

Для достижения наибольшей степени кристалличности и дополнительного удаления побочных продуктов реакции порошки подвергались нагреву при температуре 260 °С в течение 1 ч в сушильном шкафу. Порошки ГАП и Na-КГАП были охарактеризованы различными методами исследования и использованы для дальнейших экспериментов *in vitro*.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Кристаллическая структура и состав карбонатгидроксиапатитов.

Рентгенофазовый анализ полученных порошков Na-КГАП¹ с различными степенями замещения по уравнению реакции (1) показал, что все образцы являются однофазными и плохо закристаллизованными. Из рис. 1 видно, что замещенные апатиты принадлежат к той же пространственной группе, что и гидроксиапатит – $R\bar{6}_3/m$, однако по характерному смещению пиков в сторону, соответствующую меньшим межплоскостным расстояниям (бóльшим углам), можно заключить, что параметры элементарной ячейки изменяются (уменьшаются) за счет встраивания в решетку карбонат-ионов и, возможно, ионов натрия.

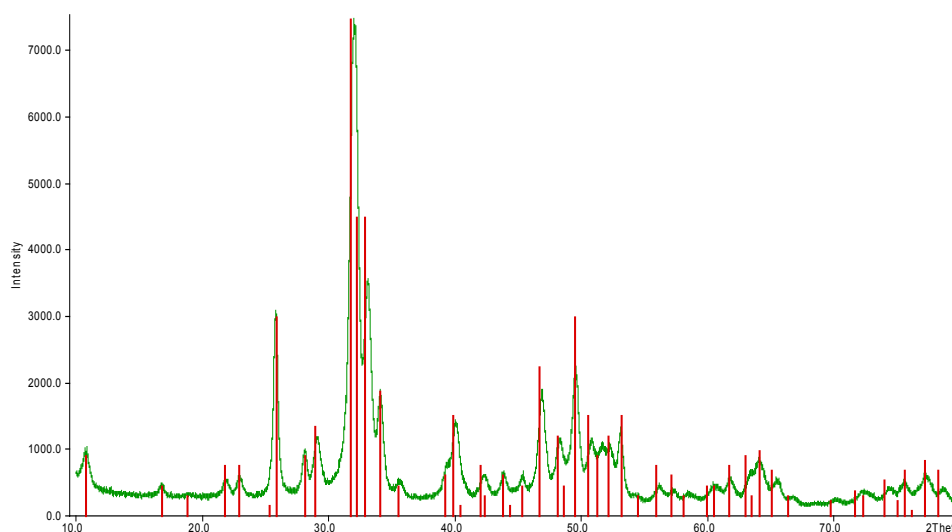


Рис. 1. Характерная рентгенограмма порошков, полученных по реакции (1). Штрих-диаграмма соответствует карточке 9-432 базы ICDD PDF-2

Для серии порошковых образцов Na-КГАП с использованием данных рентгеновского анализа и программы WinXPow (МНК без внутреннего стандарта, с подгонкой систематической ошибки сдвига нулевого положения гониометра) были рассчитаны параметры элементарных решеток порошков, подвергнутых термической обработке при $t = 260$ °С в течение 1 ч (табл. 1).

В целом по сравнению с незамещенным ГАП, имеющим параметры $a = b = 9.432(2)$ Å и $c = 6.890(1)$ Å, видно, что у всех составов замещенных Na-КГАП параметр a меньше, а параметр c больше. В ряду различных составов Na-КГАП с увеличением содержания карбонат-ионов происходит неравномерное уменьшение параметра a , в то время как изменение параметра c связано с прохождением через локальный минимум (для $x = 1$ при расчетном содержании CO_3^{2-} 6.3–7.1 вес. % в зависимости от механизма гетеровалентного замещения). Объем элементарной кристаллической решетки меняется аналогично изменению

¹ Ниже будет показано, что замещение Са на Na пренебрежимо мало в условиях синтеза, принятых в настоящей работе. Тем не менее образцы, полученные по реакции (1), будут обозначаться и как Na-КГАП, и как КГАП.

Табл. 1

Расчитанные объемы и параметры элементарных решеток образцов Na-КГАП ($P6_3/m$), полученных по реакции (1), после термической обработки 260 °С/1 ч

Значение x в формуле $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$	a , Å	c , Å	V , Å ³
0	9.402(2)	6.890(1)	527.5(2)
0.25	9.408(2)	6.898(3)	528.7(3)
0.5	9.376(2)	6.893(2)	524.8(2)
0.75	9.355(3)	6.890(2)	522.2(3)
1	9.356(3)	6.889(2)	522.3(3)
1.5	9.335(4)	6.894(3)	520.3(5)
2	9.337(3)	6.904(2)	521.3(2)

Табл. 2

Содержание (в вес. %) CO_3^{2-} по данным микроволнометрии и суммарного количества ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) по данным ТГ в образцах КГАП по сравнению с теоретическими значениями, рассчитанными исходя из следующих моделей гетеровалентного замещения: модель А – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}(\text{CO}_3)_x$, модель В – $\text{Ca}_{(10-x/2)}(\text{PO}_4)_{(6-x)}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$, модель В1 – $\text{Ca}_{(10-x)}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{(6-x)}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$, модель АВ – $\text{Ca}_{(10-x)}(\text{PO}_4)_{(6-x)}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$

x	% CO_3^{2-} волнометрия	% ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) по ТГ (± 0.5)	Модель А		Модель В		Модель В1		Модель АВ	
			CO_3^{2-} , %	($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$), %	CO_3^{2-} , %	($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$), %	CO_3^{2-} , %	($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$), %	CO_3^{2-} , %	($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$), %
0	1.5 ± 0.05	3.4	0	1.79	0	1.79	0	1.79	0	1.79
0.25	3.8 ± 0.15	3.2	1.48	2.42	1.51	2.93	1.51	2.92	1.53	2.73
0.5	3.86 ± 0.24	не измер.	2.95	3.05	3.07	4.09	3.07	4.09	3.13	3.70
0.75	6.09 ± 0.40	6.3	4.39	3.66	4.67	5.29	4.66	5.28	4.81	4.73
1	7.1 ± 0.33	6.5	5.82	4.27	6.32	6.53	6.30	6.51	6.58	5.81
1.5	9.67 ± 0.61	8.9	8.63	5.46	9.76	9.11	9.72	9.07	10.39	8.14
2	13.36 ± 0.02	10.9	11.36	6.63	13.42	11.85	13.33	11.77	14.63	10.73

параметра a . Подобное изменение размеров элементарной ячейки свидетельствует о двух фактах: а) карбонат-ион внедряется в решетку апатита (поскольку размеры карбонатного аниона меньше размеров фосфат-иона), б) тенденция к уменьшению параметра a и увеличению c отвечает образованию КГАП В-типа (CO_3^{2-} замещает PO_4^{3-}).

Реальное содержание карбонатных групп (см. табл. 2) рассчитывалось по результатам микроволнометрического анализа; кроме того, по данным ТГ-анализа рассчитан вес. % ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$).

Экспериментальные данные сравнены с 4-мя моделями гетеровалентного замещения:

- моделью А – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}(\text{CO}_3)_x$,
- моделью В1 – $\text{Ca}_{(10-x)}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{(6-x)}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$,
- моделью В – $\text{Ca}_{(10-x/2)}(\text{PO}_4)_{(6-x)}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$,
- моделью АВ – $\text{Ca}_{(10-x)}(\text{PO}_4)_{(6-x)}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$.

Видно, что содержание карбонат-ионов в структуре гидроксиапатита по данным волнометрического анализа практически соответствует теоретическому

содержанию (вычисленному исходя из предположения о вхождении в состав твердой фазы всех карбонат-ионов, содержащихся в растворе) для составов с высокой степенью замещения ($x = 1 \dots 2$). Следует отметить, что не удастся точно установить модель замещения на основании только приведенных в табл. 2 данных, однако модели строения В-типа или смешанного АВ-типа лучше всего объясняют экспериментальные результаты. В области малых степеней замещения ($x = 0 \dots 1$) содержание карбонат-ионов и воды в апатитах значимо превосходит теоретические значения, полученные исходя из любой из 4-х анализируемых моделей замещения. Подобное расхождение затруднительно объяснить лишь адсорбцией CO_2 и воды, поскольку: 1) слабосвязанная вода в значительной мере «отсечена» термообработкой порошков при 260°C , 2) адсорбция должна лишь возрастать при увеличении x (при этом заметно уменьшается размер кристаллов апатита и увеличивается поверхность, доступная для адсорбции, см. далее обсуждение ПЭМ-данных). Мы полагаем, что разумное объяснение может быть дано исходя из следующих соображений: (1) реальные кристаллы апатита представляют собой мезопористые тела, содержащие, возможно, маточный раствор; (2) помимо карбонат-иона и воды исследуемые апатиты могут содержать и нитрат-ионы, причем как в окклюдированном маточном растворе, так и встроенные в решетку.

Повышенное содержание свободной или слабосвязанной воды в КГАП, термообработанных при 260°C , подтверждают ИК-спектры порошков (рис. 2), на которых широкую размытую полосу в области $2700\text{--}3700\text{ см}^{-1}$ обоснованно связывают со слабосвязанной/свободной водой. Нам представляется, что в качестве резервуара для подобной воды (а точнее раствора) могут выступать мезопоры в кристаллах КГАП.

Суждение о механизме замещения можно вынести также на основании характера изменения параметров и объема ячейки КГАП в зависимости от величины x (табл. 1) и содержания CO_3^{2-} (табл. 2), а также от ИК-спектров (рис. 2).

Наиболее информативна зависимость объема ячейки от состава, в которой можно выделить три области:

1) $x = 0 \dots 0.25$ – объем ячейки практически не меняется, хотя по данным химического анализа и ИК-спектроскопии происходит внедрение карбонат-ионов в решетку апатита (нарастание интенсивности колебаний $\nu_2(\text{CO}_3)^{2-}$ при 870 см^{-1} и $\nu_3(\text{CO}_3)^{2-}$ при 1460 см^{-1} и 1417 см^{-1} ; ослабление интенсивности валентных колебаний $(\text{OH})^-$ -групп на 3437 см^{-1} и 636 см^{-1}); это может свидетельствовать о преимущественном замещении гидроксид-ионов карбонат-ионами в гексагональных каналах структуры апатита, то есть о формировании КГАП А-типа;

2) заметное сжатие решетки в интервале $x = 0.25 \dots 0.75$; относительное изменение объема при этом составляет примерно 1.2%;

3) незначительное уменьшение объема решетки в интервале $x = 0.75 \dots 2$; при этом на участках 2 и 3 по данным ИК-спектроскопии нарастают колебания карбонатных групп и падает интенсивность колебаний ионов гидроксила (в образце с $x = 2$ колебания гидроксидных групп отсутствуют); в области $\nu_2(\text{CO}_3)^{2-}$ при $860\text{--}890\text{ см}^{-1}$ (см. врезку на рис. 2) наблюдается сдвиг максимума поглощения в сторону более низких значений волновых чисел, что соответствует ослаблению связи карбонат-иона с окружающими ионами Са, то есть нарастанию содержания карбонатных групп в В-позициях.

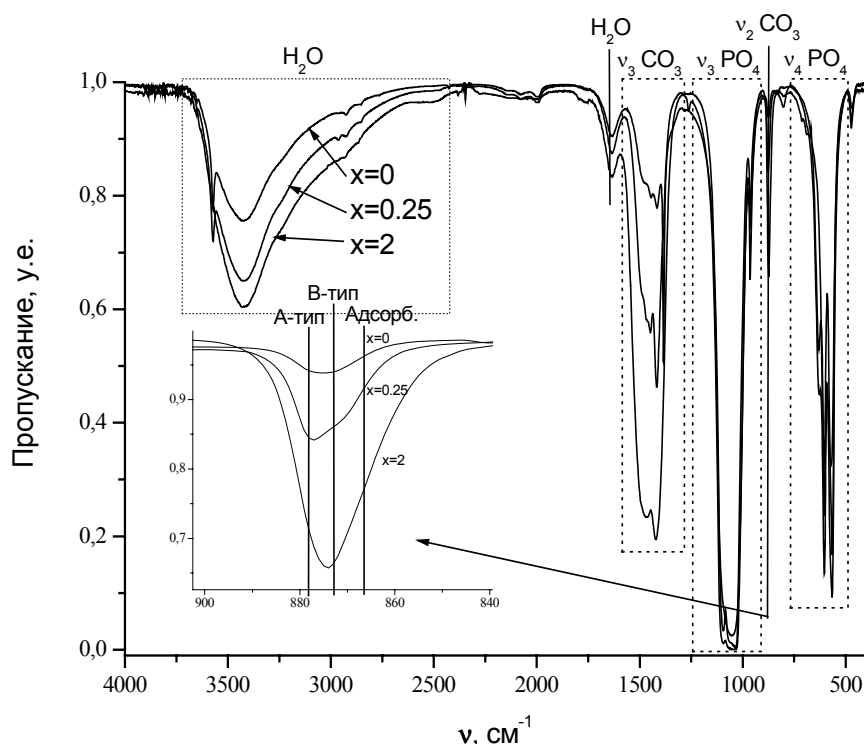


Рис. 2. ИК-спектры образцов КГАП, отожженных при 260 °С

На основании изложенных фактов мы предполагаем, что в интервале $x = 0.25 \dots 0.75$ начинается заполнение В-позиций с сохранением (и, возможно, некоторым возрастанием) содержания карбонатных групп в А-позициях, то есть формирование смешанного КГАП АВ-типа. Первоначальное уменьшение объема решетки, которое всегда сопровождается замещением карбонатными ионами в В-позициях (PO_4^{3-} -групп), в дальнейшем компенсируется увеличением числа карбонат-ионов в канальных А-позициях (поскольку замещения А- и В-типа вызывают разнонаправленные изменения параметров решетки, то они могут компенсировать друг друга). Кроме того, модель замещения АВ-типа предполагает образование двух вакансий на каждый встроенный карбонат-ион, одной в позициях Са и одной в позициях гидроксид-иона в каналах: $\text{Ca}^{2+} + \text{PO}_4^{3-} + \text{OH}^- = \text{V}_{\text{Ca}} + \text{CO}_3^{2-} + \text{V}_{\text{OH}}$. Это позволяет решетке эффективно релаксировать структурные напряжения, связанные с изоморфным замещением. Однако на этапе 2 (начало заполнения В-позиций) можно ожидать значительных локальных деформаций решетки, скомпенсированных в объеме кристалла (так называемых микронапряжений второго рода, диагностируемых по уширению линий на рентгенограммах).

Мы предприняли также попытку уточнить механизм замещения на основании данных химического анализа порошков КГАП на Са, Р, CO_3^{2-} , Na.

Рис. 3 свидетельствует о том, что до $x = 1.5$ содержание натрия в КГАП пренебрежимо мало (в пределах ошибки метода), и лишь при высоких степенях замещения карбонат-ионов можно заметить вклад механизма В1.

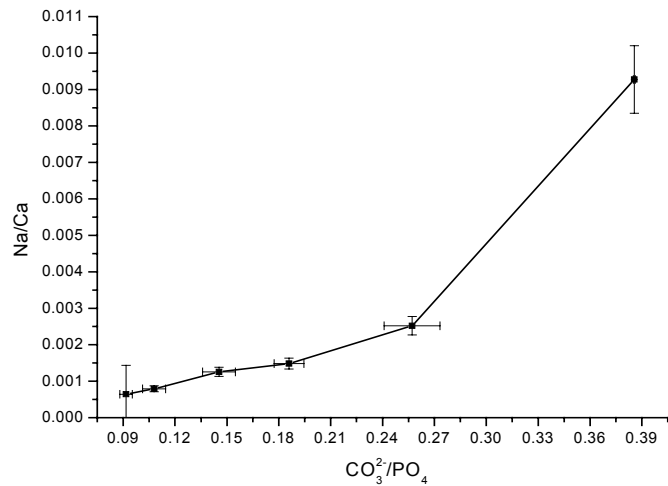
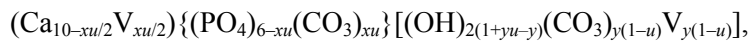


Рис. 3. Степень замещения кальция натрием по результатам химического анализа

Таким образом, строение смешанного КГАП АВ-типа (без заметного замещения натрием) можно описать следующим образом:



где (·) – позиции Ca, {·} – позиции В-типа, [·] – позиции А-типа, параметр $0 < x < 6$ описывает замещение В-типа, параметр $0 < y < 1$ описывает замещение А-типа, параметр $0 < u < 1$ описывает переход между В- и А-позициями (аналог степени обращенности в шпинелях);

$$\text{Ca/P} = \frac{10 - xy/2}{6 - xu}, \quad \text{CO}_3/\text{P} = \frac{xu + y(1-u)}{6 - xu}.$$

Можно показать, что рассматриваемая в статье двухфазная 6-компонентная система при фиксации таких интенсивных параметров, как температура, давление, активность ионов водорода, будет иметь не менее трех внутренних степеней свободы (например, введенных выше параметров x, y, u). При фиксированных параметрах синтеза (p, T, pH , состав раствора) состав (то есть соотношения Ca/P и CO₃/P) и структура осадка (вклады А- и В-типов замещения) однозначно не определены. Следовательно, небольшие локальные вариации состава раствора и pH способны изменить состав осадка КГАП. Это может быть причиной того, что однородность состава и морфология кристаллов КГАП не будет воспроизводиться при повторении синтеза. Это объясняет значительный разброс литературных данных относительно концентрационных зависимостей параметров решетки.

2.2. Микроструктура карбонатгидроксиапатитов. По данным просвечивающей электронной микроскопии (рис. 4) наблюдается закономерное уменьшение размера частиц с увеличением значения x .

Помимо этого можно заметить изменение габитуса кристаллов КГАП с игольчатой формы (характерной как для чистого ГАП, так и для КГАП А-типа) на равноосную (подобное превращение иглы в сферы характерно для замещения В-типа). Нами обнаружены, однако, два явления, которым не уделялось до настоящего времени внимания в литературе, посвященной КГАП.

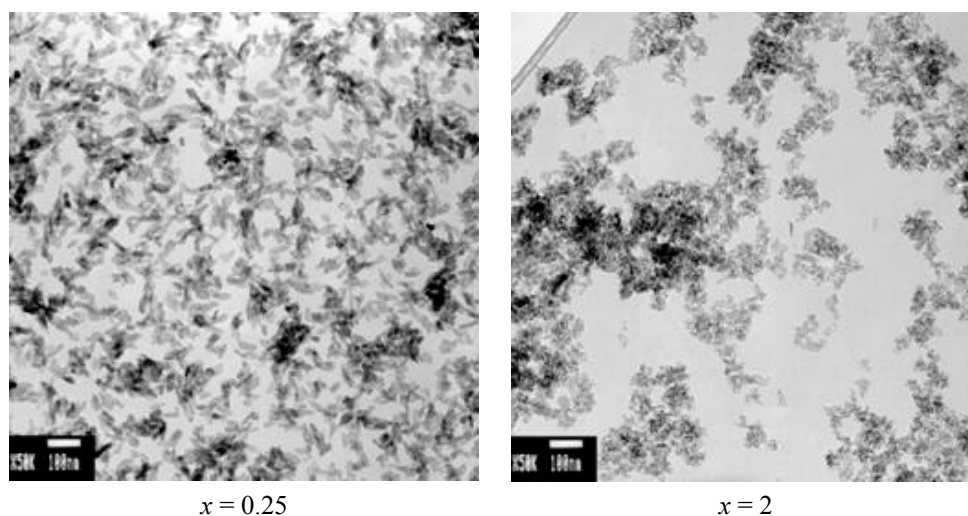


Рис. 4. Микрофотографии образцов Na-KГАП, отожженных при 260 °С ($\times 50000$)

1. Сосуществование двух различных морфологических типов кристаллов в пределах одного образца. Это хорошо различимо на образцах с $x = 0, 0.25$ и отчасти с $x = 1$. Мы полагаем, что это может быть связано с обсуждавшейся выше разной степенью заполнения А- и В-позиций в различных кристаллах при одном и том же брутто-составе. Интересно, что образец с $x = 2$ морфологически однороден.

2. Практически все образцы являются мезопористыми с размерами пор не более 10 нм. Наиболее отчетливо пористость наблюдается в игольчатых кристаллах (как при оптимальном дефокусе, так и при пере- и недофокусировке) при больших увеличениях. Нагрев образца электронным пучком приводит к коалесценции пор, по-видимому, к их вскрытию и потере образцом первоначального габитуса. Наименее устойчивы под электронным пучком именно игольчатые кристаллы. Известно, что пористость характерна для частиц аморфного фосфата кальция (АФК) вследствие специфики механизма его образования (аналог перехода золь-гель); при дальнейшем превращении АФК в наноапатит последний наследует пористость аморфного прекурсора. Поскольку карбонат-ион является известным ингибитором превращения АФК \rightarrow ГАП, неудивительно, что при синтезе КГАП образуются пористые частицы. Несмотря на несомненную важность этого феномена для понимания свойств порошков КГАП, в настоящей работе не ставилось задачи установления корреляции между объемом и размерами пор и степенью замещения в КГАП.

Микроструктура (реальная структура) образцов Na-KГАП была изучена в данной работе также рентгенографическим методом анализа ширины пиков на рентгенограмме. Обращает на себя внимание немонотонное изменение области когерентного рассеяния (ОКР) при тенденции к известному уменьшению значений размеров с ростом x . Следует отметить, что значения ОКР систематически меньше размеров кристаллов по данным ПЭМ, но близки к рассчитанным исходя из значений удельной поверхности материалов, определенных методом низкотемпературной адсорбции азота (БЭТ). Это подтверждает тезис о мезопористости материалов, но также свидетельствует и о доступности пор для ад-

сорбции азота (что, видимо, связано со вскрытием пор в процессе дегазации образцов при подготовке их к измерениям). Размер ОКР в этом случае отражает среднюю толщину стенок между соседними порами – величину, зависящую от размера и объема пор. Ее немонотонное изменение – результат действия нескольких факторов, таких, как состав, сложный характер распределения ионов по позициям кристаллической структуры, локальные изменения условий синтеза, различная устойчивость материала к термообработке.

Поры, заполненные побочным продуктом реакции – раствором NH_4NO_3 , представляют серьезную опасность для медико-биологических применений материала в силу высокой токсичности нитрат-ионов. В нашей работе этому вопросу уделено пристальное внимание. Осадок тщательно промывали, была проведена термообработка КГАП. Содержание азота контролировалось локально методом рентгеноспектрального микроанализа РСМА (при энергии пучка не более 10 кэВ). Примеси соединений азота не были обнаружены методом РСМА, однако в ИК-спектрах некоторых образцов заметна характерная полоса колебания нитратного иона в «карбонатной» области спектра ($\sim 1350 \text{ см}^{-1}$, образец с $x = 0$)¹.

2.3. ЭПР исследования карбонатгидроксиапатитов. Для изучения карбонизированных гидроксиапатитов в качестве парамагнитных зондов используются центры, возникающие при облучении кристаллов при 300 и 77 К рентгеновским или гамма-излучением. В облученных образцах методы ЭПР и ДЭЯР позволили идентифицировать значительное количество неорганических радикалов, таких, как O^- , O_3^- , CO_3^- , CO_3^{3-} , CO_2^- , CO , PO_4^- , H^0 [9–13]. Наибольший интерес с точки зрения практического применения представляют радикалы CO_2^- , которые обладают высокой стабильностью. Они образуются при облучении при комнатной температуре и в соответствии с механизмом замещения карбонатной группы могут быть локализованы либо в позиции ОН (А-тип) либо в позиции PO_4 (В-тип). Определение концентрации радикалов CO_2^- из анализа спектров ЭПР используется в целях дозиметрии при исследовании радиационных поражений [14], для оценки дозы облучения при радиационной обработке пищевых продуктов, содержащих костный материал [15], а также для характеристики степени кальцификации стенок сосуда при атеросклерозе [16].

Нами была использована аналогичная методика для изучения порошков нанокристаллов гидроксиапатита с различными степенями карбонизации.

Для создания парамагнитных комплексов исследуемые образцы облучались рентгеновскими лучами при комнатной температуре на установке УРС-55 ($U = 55 \text{ кВ}$, $I = 16 \text{ мА}$, W-антикатод), доза облучения для всех образцов составляла порядка 100 кГр.

Запись спектров ЭПР производилась в X и W-диапазонах (9.6, 94 ГГц) на спектрометре Elexsys 680 фирмы Bruker с применением стационарного и импульсного режимов. Использовались стандартные двух- и трехимпульсные последовательности при измерении времен релаксации и спектров ЭПР и ДЭЯР.

¹ Представленные данные ИК-спектроскопии не позволяют, однако, сделать однозначного заключения о локализации нитрат-иона: в мезопорах, заполненных маточным раствором, в (хемо)сорбированном состоянии или в позициях кристаллической решетки КГАП.

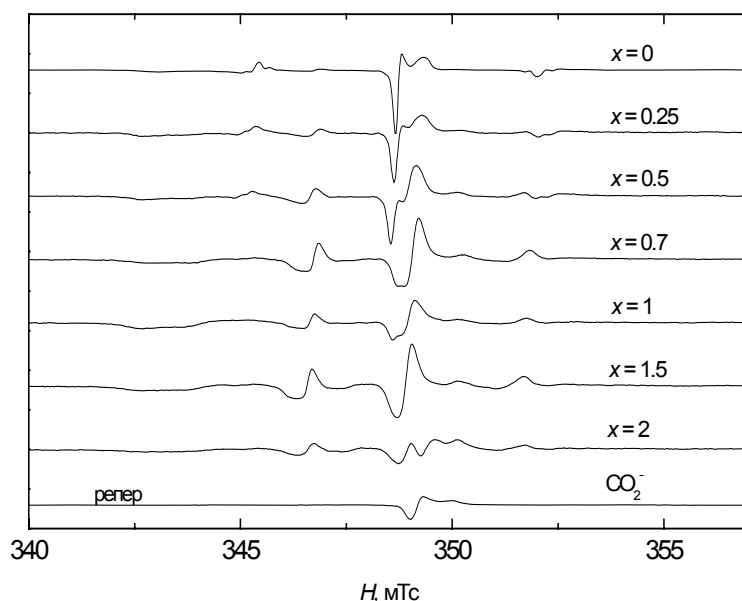


Рис. 5. Спектры ЭПР нанокристаллов гидроксиапатита $\text{Ca}_{10}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_x$ (30 нм) с различными степенями карбонизации $x = 0-2$ мол. %. Частота СВЧ 9.6 ГГц, $T = 300$ К

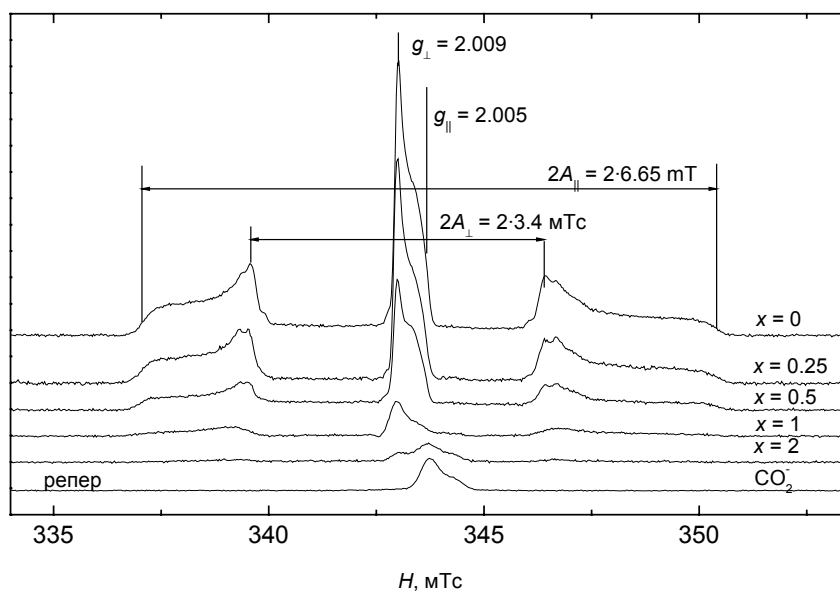


Рис. 6. Спектры ЭПР, полученные при детектировании амплитуды электронного спинового эха нанокристаллов гидроксиапатита $\text{Ca}_{10}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_x$ (30 нм) с различными степенями карбонизации $x = 0-2$ мол. %. Частота СВЧ 9.6 ГГц, $T = 300$ К

Исследования проводились при температурах 50 и 300 К. Образцы изучались до и после рентгеновского облучения.

Для определения вхождения карбонат иона в нанокристаллы гидроксиапатита $\text{Ca}_{10}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_x$ (30 нм) с различными степенями карбонизации

$x = 0-2$ мол. % были изучены спектры ЭПР в стационарном режиме спектрометра в X-диапазоне согласно рекомендациям стандарта [14]. Спектры ЭПР облученных нанокристаллов гидроксиапатита представлены на рис. 5. Спектры значительно отличались от спектров ЭПР, представленных в многочисленных работах, например [17], по исследованию карбонизированного гидроксиапатита. Для определения природы наблюдаемых новых парамагнитных центров в X-диапазоне была использована более информативная методика импульсного ЭПР с детектированием амплитуды первичного электронного спинового эха (рис. 6). Спектр ЭПР образцов с $x = 0$ описывается спиновым гамильтонианом аксиальной симметрии

$$H = g_{\parallel} \beta H_z S_z + g_{\perp} \beta (H_x S_x + H_y S_y) + A_{\parallel} S_z I_z + A_{\perp} (S_x I_x + S_y I_y),$$

где $S = 1/2$, $I = 1$; с параметрами гамильтониана $g_{\parallel} = 2.005$, $g_{\perp} = 2.009$, $A_{\parallel} = 6.65$ мТс, $A_{\perp} = 3.4$ мТс.

Параметры спинового гамильтониана были определены в предположении, что главные направления тензоров g и A совпадают. Формы линий спектра ЭПР характерны для спектров порошка и обусловлены усреднением по всем возможным ориентациям парамагнитного центра. Наличие трех линий в спектре объясняется сверхтонким взаимодействием магнитного момента неспаренного электрона парамагнитного центра с магнитным моментом ядра со спином $I = 1$.

Параметры наблюдаемого спектра ЭПР (g -тензор и тензор сверхтонкого взаимодействия A) близки к соответствующим характеристикам радикала NO_3^{2-} в облученном кристалле KNO_3 и других кристаллических матрицах [18, 19]. Характерной особенностью спектра радикала NO_3^{2-} является аксиальная симметрия. Такие радикалы впервые наблюдаются в образцах синтетического гидроксиапатита. Наличие NO_3 -групп в гидроксиапатите можно объяснить методикой синтеза исследуемых нанокристаллов, при которой раствор содержит нитрат-ион за счет как исходного реагента $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, так и продукта реакции $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$. Известно, что целый ряд анионов может изоморфно встраиваться из раствора в решетку гидроксиапатита в каналные позиции ОН или даже в позиции калийфосфатного каркаса (так происходит, например, с анализируемым в статье карбонат-ионом). При этом соответствующий ион оказывает сильное модифицирующее действие на габитус растущего апатитного кристалла; имеются сведения о влиянии на него CO_3^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- (например, [20]), однако в отношении NO_3^- определенного мнения до сих пор не выработано. Структурно нитрат-ион подобен карбонатному иону (плоский треугольник, термодинамические радиусы равны 1.89 и 1.85 Å соответственно [21]), тем не менее его меньшая основность (и, следовательно, сродство к катиону Ca^{2+}), на первый взгляд, свидетельствует о неблагоприятной энергетике (хемо)сорбции и изоморфного замещения. В то же время заряд нитрат-иона, равный по величине таковому для OH^- , позволяет теоретически заполнить каналы апатитной структуры (то есть А-позиции) полностью нитрат-ионами. В случае же карбонатапатита А-типа компенсация заряда при гетеровалентном замещении приводит к половинному заполнению каналов. Образующаяся структура с вакансиями может быть дополнительно стабилизирована за счет энтропийного фактора (то есть разупорядочения КГАП А-типа при повышенных температурах). В таком случае существуют такие условия

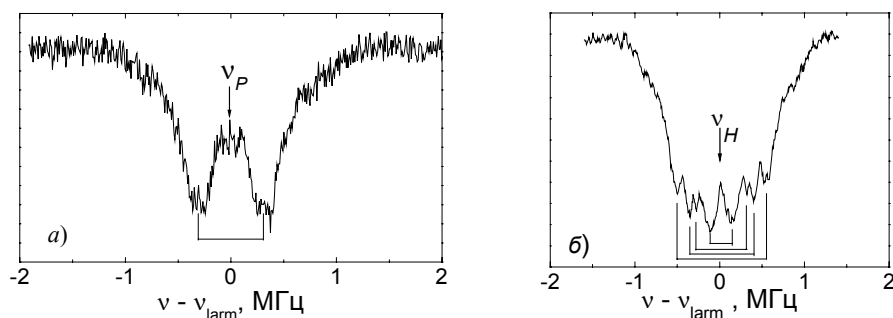


Рис. 7. Спектры ДЭЯР нанокристаллов гидроксиапатита $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (30 нм): а) область ларморовской частоты фосфора; б) область ларморовской частоты протонов. Частота СВЧ 93.8 ГГц, $T = 300$ К

Табл. 3

Параметры спектра ДЭЯР и рассчитанные расстояния до ближайших лигандов

Ядро	Частота, КГц	Рассчитанное расстояние, Å
H1	1058	4.2
H2	755	4.7
H3	595	5.1
H4	261	6.7
P	635	3.7

синтеза (небольшие концентрации карбонатного иона и невысокие температуры, способствующие замещению А-типа), при которых NO_3^- успешно конкурирует с CO_3^{2-} за позиции А-типа в каналах. Таким образом, происхождение парамагнитных центров NO_3^{2-} может быть двояким: (1) нитрат-ионы маточного раствора, инкапсулированного мезопорами; (2) изоморфизм в А-позициях.

Для удаления маточного раствора, находящегося в мезопорах синтезированного гидроксиапатита, исследуемые образцы помимо технологической сушки при 260°C были подвергнуты отжигу при 400°C в вакууме ($P < 10^{-4}$ мбар) с последующим облучением рентгеновскими лучами. Значительных изменений в спектре ЭПР NO_3^{2-} не произошло. Это указывает на то, что при синтезе нанокристаллы группы NO_3 не остаются в маточном растворе, а внедряются в кристаллическую решетку.

Дополнительным аргументом в пользу такого вывода является факт, что радикалы NO_3^{2-} образовывались при облучении образцов при комнатной температуре; образование стабильных радикалов NO_3^{2-} при облучении растворов при 300 К маловероятно.

Для уточнения локализации были исследованы спектры ДЭЯР (рис. 7). Спектр ядер азота по данным ЭПР должен занимать интервал частот 95–186 МГц, что приводит к крайне низкой интенсивности сигнала ДЭЯР, не позволяющей его детектировать. В спектре ДЭЯР наблюдались линии, соответствующие ларморовским частотам фосфора и водорода. Ближайшее окружение по данным ДЭЯР состоит из одного иона фосфора и четырех ионов водорода. Результаты измерений спектров ДЭЯР и оценка расстояний до ближайших лигандов при магнитном диполь-диполь взаимодействии представлены в табл. 3. Анализируя

данные о кристаллографической структуре гидроксиапатита и сравнивая меж-атомные расстояния до ближайших ядер фосфора и водорода для различных позиций, можно предположить, что парамагнитный комплекс NO_3^{2-} занимает позицию А-типа в ОН-каналах.

С увеличением степени карбонизации спектр ЭПР трансформировался и происходило значительное уменьшение интенсивности спектра NO_3^- . При значениях $x = 2$ в спектре ЭПР начинали преобладать линии, характерные для спектров радикала CO_2^- . Такую трансформацию спектра можно объяснить, во-первых, тем, что группа NO_3 является более эффективной электронной ловушкой, чем CO_2^- [17], во-вторых, тем, что с увеличением степени карбонизации происходит уменьшение концентрации группы NO_3 в гидроксиапатите, поскольку с увеличением x возрастает вклад замещения В-типа.

Таким образом впервые показано, что в процессе синтеза синтетического карбонатгидроксиапатита азотные соединения не остаются в маточном растворе, а внедряются в кристаллическую структуру ГАП, причем нитрат-ион (который присутствует в наиболее распространенном варианте растворного синтеза) имеет различное предпочтение к А- и В-позициям. Присутствие карбонат-иона, особенно в области замещения В-типа, существенно меняет ситуацию. В живых организмах, где минерализация матрикса приводит к образованию КГАП В-типа, это, по-видимому, является своеобразной «гарантией» от накопления окисленных форм азота в твердых тканях. Следует отметить, что в сравнении с ЭПР другие методы, использованные в работе, не дают возможности локализовать (а нередко даже обнаружить ввиду их меньшей чувствительности) азотсодержащие анионы в исследуемых образцах. Полученные результаты являются практически важными для оценки токсичности наногидроксиапатита, синтезируемого для целей биопротезирования, а также для разработки приемов очистки апатита от токсичных примесей (в частности, путем термообработки).

2.4. ЯМР исследования карбонатгидроксиапатитов. Были получены спектры карбонатгидроксиапатитов с $x = 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5$ и 2.0 .

^1H ЯМР с ВМУ спектры синтетического гидроксиапатита представлены на рис. 8.

Первоначально нами были получены спектры на спектрометре Bruker Avance 400 при частоте вращения образца 5555 Гц (рис. 8, слева), однако разрешение спектров оказалось недостаточным для их корректного анализа. Для улучшения качества и разрешения спектров нами были записаны спектры гидроксиапатита на спектрометре Bruker Avance 500 при частоте вращения образца 12000 Гц (рис. 8, справа).

^1H ЯМР спектры гидроксиапатита содержат две линии с химическими сдвигами $\delta = 4.31$ м.д. и $\delta = 1.39$ м.д. при $x = 0.5 \dots 1.75$, которые незначительно смещаются в сторону более слабых полей при $x = 2.0$.

Джагером и соавторами [8] было выдвинуто предположение, что линия, резонирующая в более слабых полях с химическим сдвигом, относится к молекулам воды, включенным в кристаллы гидроксиапатита. Ее интегральная интенсивность, как видно из спектра, практически не изменяется, что подтверждает

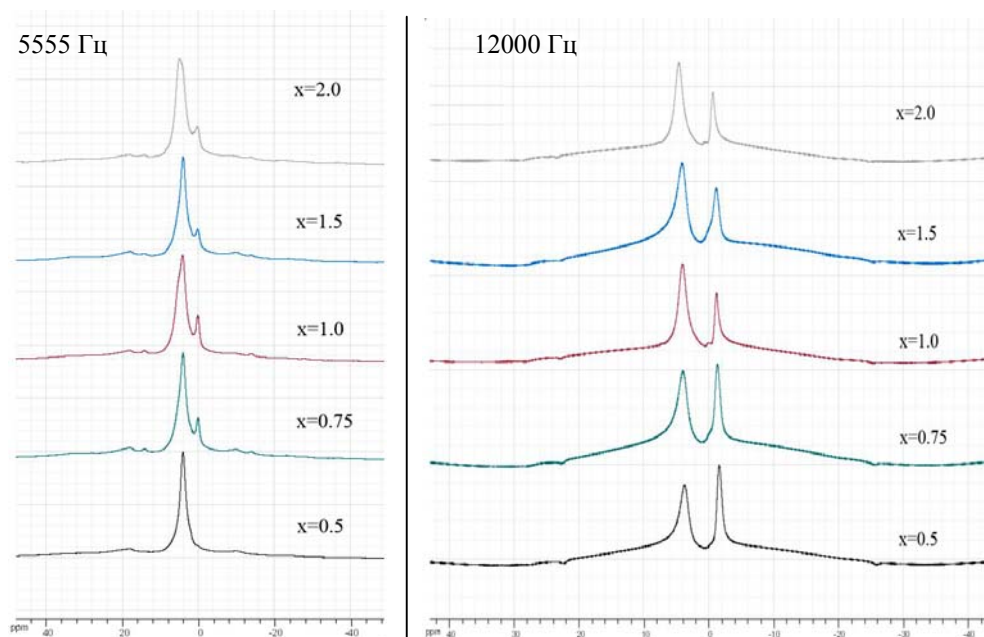


Рис. 8. ^1H ЯМР с ВМУ спектры гидроксиапатита: слева – спектры, полученные при частоте вращения образца 5555 Гц, справа – спектры, полученные при частоте вращения образца 12000 Гц

это предположение. Вторая же линия относится к ОН-группе самого гидроксиапатита. По спектрам видно, что с изменением параметра x меняется отношение интенсивностей этих линий, что связано с заменой части ОН групп карбонатными группами CO_3^{2-} . Видно, что с увеличением x уменьшается и интенсивность линии ОН гидроксиапатита по отношению к интегральной интенсивности линии воды, содержание которой в гидроксиапатите можно считать приблизительно постоянным, что свидетельствует об образовании гидроксиапатитов А-типа.

^{13}C ЯМР спектры гидроксиапатита с различными x представлены на рис. 9. Следует отметить, что ранее в литературе не были описаны случаи получения ^{13}C ЯМР спектров карбонатгидроксиапатитов.

Спектр ЯМР ^{13}C синтетического гидроксиапатита содержит одну уширенную линию в области $\delta \sim 168 \dots 173$ м.д., относящуюся к CO_3^{2-} -группе. В спектрах наблюдается систематическое смещение линии в сторону более сильных полей при увеличении степени замещения x . Как и следовало ожидать, с уменьшением x интегральная интенсивность CO_3^{2-} линий уменьшается.

^{31}P ЯМР с ВМУ спектры синтетического гидроксиапатита приведены на рис. 10. Спектр содержит единственную линию при $\delta = 1.08$ м.д., химический сдвиг которой практически не меняется при изменении степени карбонизации. Интенсивность линий ^{31}P заметно уменьшается с увеличением степени карбонизации, что говорит об образовании гидроксиапатитов В-типа.

Таким образом, показано, что при карбонизации гидроксиапатита образуются гидроксиапатиты А- и В-типа.

Известно, что в костных тканях различают аморфный и слабокристаллический (то есть в наноформе) гидроксиапатит, причем соотношение между двумя

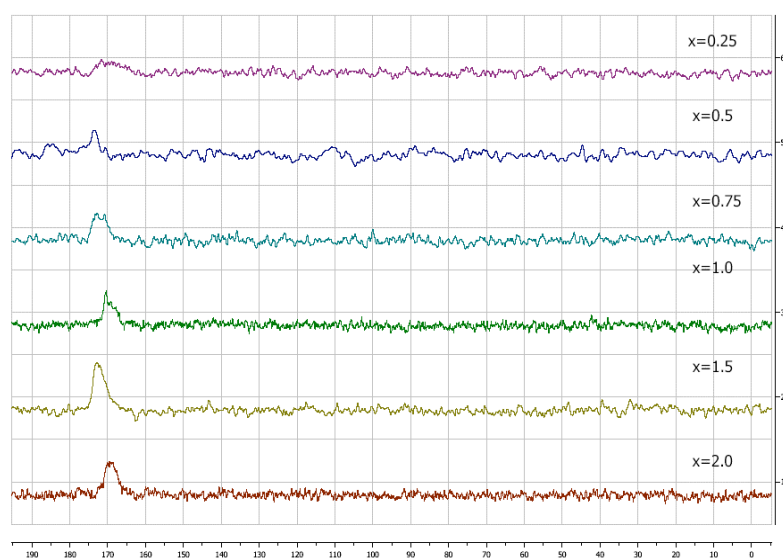


Рис. 9. ^{13}C ЯМР с ВМУ спектры гидроксиапатита (частота вращения образца 12000 Гц)

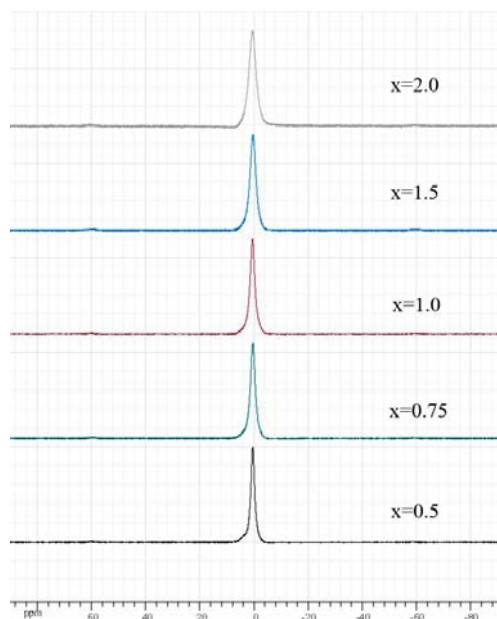


Рис. 10. ^{31}P ЯМР с ВМУ спектры гидроксиапатита (частота вращения образца 12000 Гц)

указанными типами ГАП меняется с возрастом кости. Кроме того, известно, что линии магнитного резонанса ядер со спином $\frac{1}{2}$ твердых тел, имеющие гауссову форму, характерны для кристаллических образцов с жесткой решеткой, а лоренцева форма линии наблюдается для образцов, в которых имеется движение ядерных спинов. Был проведен анализ формы линии ^{31}P ЯМР спектров синтетического ГАП с различными степенями карбонизации. Установлено, что резонансные линии ^{31}P обусловлены суперпозицией линий гауссовой и лоренцевой форм, причем отношение интегральных интенсивностей этих линий изменяется с уменьшением степени карбонизации, как показано в табл. 4.

Табл. 4

Степень карбонизации x	Лоренцева линия	Гауссова линия
$x = 2.0$	59%	41%
$x = 1.5$	63%	37%
$x = 1.0$	67%	33%
$x = 0.75$	70%	30%
$x = 0.5$	75%	25%
$x = 0.25$	81%	19%

Как видно из анализа данных табл. 4, с уменьшением степени карбонизации уменьшается и вклад гауссовой линии в полученный резонансный сигнал, и можно предположить, что уменьшается и доля кристаллического гидроксиапатита в образце, количество же аморфного гидроксиапатита увеличивается. Тем не менее данный вывод не поддерживается приведенными ранее данными РФА и ПЭМ, а также описанной в литературе практикой получения КГАП. Напротив, известно, что увеличение содержания карбонат-иона (рост x) приводит как к ингибированию кристаллизации АФК, так и к замедлению роста кристаллов ГАП. Можно предположить, что рост вклада лоренцевой составляющей в форму линии ^{31}P ЯМР спектров с уменьшением x связан с доминированием в структуре замещений А-типа, приводящего к более разупорядоченной структуре с вакансиями, допускающей трансляционные и вращательные движения CO_3^{2-} в каналах, которые, вероятно, могут усиливать либрацию PO_4 -тетраэдров. Следует, однако, отметить, что данный вопрос, насколько нам известно, не обсуждался до сих пор в литературе.

2.5. Исследование растворимости карбонатгидроксиапатитов в слабокислой среде *in vitro*. Исследование растворимости проведено в слабокислой среде (рН 5.5, ацетатный буфер) для моделирования активной фазы резорбции материала остеокластами. Необходимо отметить, что получаемый при растворении КГАП раствор является метастабильным, поскольку содержание кальция в нем превышает содержание, определенное исходя из ПР ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (фазы стабильной в данном интервале рН) – $\text{pCa} = 3.3$. Визуально раствор остается опалесцирующим, а по истечении длительного времени значение pCa падает до величины порядка 3.5, то есть происходит кристаллизация брусита $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

На основании этих данных были определены начальные приведенные скорости растворения $w = \frac{d(\text{pCa})/dt|_{t=0}}{(\text{pCa}_0 - \text{pCa}_\infty)}$ (в с^{-1}), а также получена информация об

удельной поверхности образцов и получена зависимость размеров ОКР. Значения скоростей имеют тенденцию к росту с увеличением x , однако немонокотонно и практически симбатно с изменениями размеров ОКР и удельной поверхности. Наибольший интерес, по-видимому, представляет зависимость удельной скорости растворения $w_{\text{уд}} = w/s_{\text{уд}}$ (в $\text{г} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), представленная на рис. 11.

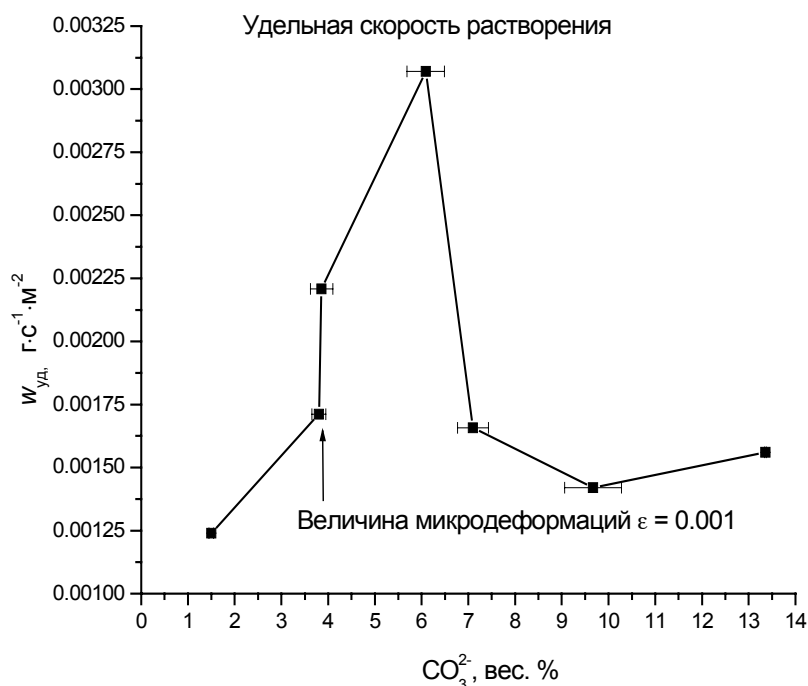


Рис. 11. Зависимость удельной начальной скорости растворения КГАП от содержания CO_3^{2-}

Данная кривая характеризует состояние поверхности и отражает «химический» вклад замещения в процесс резорбции (растворения). Отчетливо заметен максимум в области смены механизма замещения и появления микродеформаций в решетке КГАП. Не вполне ясно, насколько данный эффект связан именно с искажением решетки, а не с влиянием, например, мезопористости. Однако то, что данные особенности зарегистрированы нами комплексом различных методов, позволяет относиться с доверием к полученным данным. Абсолютное же значение скорости растворения растет с увеличением степени замещения, что отражает совокупность факторов роста поверхности частиц и изменения структуры при замещении.

3. Выводы

В работе получены КГАП с замещением CO_3^{2-} до 13.6 вес. % (замещение Na пренебрежимо мало). Совокупность данных позволяет утверждать, что в диапазоне 0–4 вес. % происходит замещение OH^- на CO_3^{2-} (образование КГАП А-типа), при дальнейшем увеличении содержания CO_3^{2-} происходит замещение PO_4^{3-} (формирование апатита В-типа), сопровождаемое заметным сжатием кристаллической решетки КГАП. Предложена трехпараметрическая модель строения смешанного КГАП АВ-типа, которая при синтезе допускает неоднородность состава кристаллов КГАП при заданном брутто-составе раствора. Это соображение положено в основу трактовки морфологического разнообразия кристаллов КГАП в пределах образца одного брутто-состава. Показано, что исследованные в работе апатиты являются мезопористыми телами с размерами

пор не более 10 нм, в которые может быть инкапсулирован содержащий токсичные NO_3^- -ионы маточный раствор.

Исследования КГАП методами радиоспектроскопии указывают на возможность изоморфного замещения NO_3^- -ионами позиций в каналах апатитной структуры, а также на конкуренцию между NO_3^- и CO_3^{2-} в замещении А-позиции. При высоких содержаниях карбонат-иона внедрение нитратного иона в решетку КГАП пренебрежимо мало. В живых организмах минерализация матрикса приводит к образованию КГАП В-типа, что является своеобразной «гарантией» от накопления окисленных форм азота в твердых тканях. В связи с этим использование ЭПР представляется практически важным для оценки токсичности наногидроксиапатита, синтезируемого для целей биопротезирования, а также для разработки приемов очистки апатита от токсичных примесей.

С увеличением содержания CO_3^{2-} наблюдается немонокотное увеличение скорости растворения КГАП в кислой среде ($\text{pH} \sim 5$). Максимальное значение удельной скорости растворения вследствие накопления деформаций решетки отвечает смене механизма замещения. В то же время растворимость в нейтральной среде монотонно возрастает с ростом содержания карбонат-иона.

Работа была выполнена при частичной поддержке РФФИ (проект № 09-02-97017-р_поволжье_a, 09-03-01078-а, заявка 10-03-90421-Укр_a), а также госконтракта №-П403 (НК-46П/35) от 30.07.2009 в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы».

Summary

E.S. Kovaleva, Ya.Yu. Philippov, V.I. Putlyaev, Yu.D. Tretyakov, V.K. Ivanov, N.I. Silkin, L.F. Galiullina, A.A. Rodionov, G.V. Mamin, S.B. Orlynskiy, M.Kh. Salakhov. Bioresorbable powdered materials based on $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$.

The usage of carbonated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$ (Ca-HAp) is regarded to be perspective for creating the bioresorbable implants used for bone tissue substitution. It reproduces more exactly the bone composition in comparison with unmodified hydroxyapatite (HAp) and possesses higher bioresorption because of micro distortions appearing at inclusion of carbonate ions into apatite structure. Partial substitution of phosphate groups in hydroxyapatite structure increases biomaterial solubility. The main purpose of this study is to obtain the nanocrystalline Ca–Na-carbonated apatite of the given composition, to investigate the correlations between carbonate groups CO_3^{2-} content, microstructure (crystal structure), and solubility of obtained material, and to prepare the samples for the experiments in vitro. Methods of investigation used in this work are: RSA, IR spectroscopy, TEM, REM, RSMA, MAS NMR, CW and pulsed EPR/ENDOR in X- and W-band, low temperature nitrogen absorption, TGA/DTA, ionometry of the solutions (pH, pCa), AES with inductively bounded plasma, volumetric analysis. It is shown that Ca-HAp of mixed A-B-type is generated during the synthesis (carbonate groups are substituted in OH-position (A-type) as well as in PO_4^{3-} position (B-type)). Thermal stability of obtained powders is also investigated. Presented results allow proposing a hypothesis of NO_3^- and CO_3^{2-} ions concurrence in A-position in apatite structure. The study of obtained materials' bioactivity in model solutions has showed higher bioactivity and resorption for modified samples in comparison with unmodified hydroxyapatite.

Key words: implant, hydroxyapatite, bioresorption, IR spectroscopy, TEM, REM, RSMA, NMR, EPR, DTA.

Литература

1. Lafon J.P., Champion E., Bernache-Assollant D. Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x-2y}(\text{CO}_3)_y$ ceramics with controlled composition // J. Eur. Cer. Soc. – 2008. – V. 28. – P. 139–147.
2. LeGeros R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates // Clin. Orthoped. Rel. Res. – 2002. – V. 395. – P. 81–98.
3. Ito A., Maekawa K., Tsutsumi S., Ikazaki F., Tateishi T. Solubility product of OH-carbonated hydroxyapatite // J. Biomed. Mater. Res. – 1997. – V. 36. – P. 522–528.
4. Ellies L.G., Nelson D.G.A., Featherstone J.D.B. Quantitative analysis of early in vivo tissue response to synthetic apatite implants // J. Biomed. Mater. Res. – 1988. – V. 22, No 2. – P. 137–148.
5. Gibson I.R., Bonfield W. Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite // J. Biomed. Mater. Res. – 2002. – V. 59. – P. 697–708.
6. Vignoles M., Bonel G., Holcomb D.W., Young R.A. Influence of Preparation Conditions on the Composition of Type B Carbonated Hydroxyapatite and on the Localization of the Carbonate Ions // Calcif. Tissue Int. – 1988. – V. 43. – P. 33–40.
7. Driessens F.C.M., Verbeeck M.H., Kiekens P. Mechanism of Substitution in Carbonated Apatites // Z. Anorg. Allg. Chemie. – 1983. – V. 504. – P. 195–200.
8. Jager C. A solid-state NMR investigation of the structure of nanocrystalline hydroxyapatite // Magn. Reson. Chem. – 2006. – V. 44. – P. 573–580.
9. Mengeot M., Bartram R.H., Gilliam O.R. Paramagnetic holelike defect in irradiated calcium hydroxyapatite single crystals // Phys. Rev. B. – 1975. – V. 11. – P. 4110–4124.
10. Callens F., Vanhaelewyn G., Matthys P., Boesman E. EPR of carbonate derived radicals: Applications in dosimetry, dating and detection of irradiated food // Appl. Magn. Reson. – 1998. – V. 14. – P. 235–254.
11. Maes P., Callens F., Doorslaer S.V., Matthys P. Electron-nuclear double-resonance analysis of diatomic sulfur and selenium defects in NaBr and NaI // Phys. Rev. B. – 1996. – V. 54. – P. 1145–1147.
12. Schramm D.U., Terra J., Rossi A.M., Ellis D.E. Configuration of CO_2^- radicals in γ -irradiated A-type carbonated apatites: Theory and experimental EPR and ENDOR studies // Phys. Rev. B. – 2000. – V. 63. – P. 024107–024133.
13. Schramm D.U., Rossi A.M. Electron spin resonance (ESR) studies of CO_2^- radicals in irradiated A and B-type carbonate-containing apatites // Appl. Radiat. Isot. – 2000. – V. 52. – P. 1085–1091.
14. ГОСТ Р 22.3.04-95. Безопасность в чрезвычайных ситуациях. Контроль населения. Дозиметрический метод определения поглощенных доз внешнего гамма-излучения по спектрам электронного парамагнитного резонанса зубной эмали. – М.: Изд-во стандартов, 1995. – 27 с.
15. Food analysis – Horizontal Methods. Detection of irradiated food containing bone. Method by ESR spectroscopy. European standard EN 1786. – Published by CEN/TC 275, 1996. – 2 p.
16. Абдульянов В.А., Галиуллина Л.Ф., Галявич А.С., Изотов В.Г., Мамин Г.В., Орлинский С.Б., Родионов А.А., Салахов М.Х., Силкин Н.И., Ситдикова Л.М., Хайруллин Р.Н., Чельшев Ю.А. Стационарный и импульсный высокочастотный ЭПР кальцифицированной атеросклеротической бляшки // Письма в ЖЭТФ. – 2008. – Т. 88, Вып. 1. – С. 75–79.
17. Ikeya M. New application of electron spin resonance: dating, dosimetry, microscopy. – Singapore: World Scientific, 1993. – 520 p.

18. *Aktins P.W., Symons M.C.R.* The structure of inorganic radicals. An application of electron spin resonance to the study of molecular structure. – Amsterdam: Elsevier Publ. Co., 1967. – 310 p.
19. *Weil J.A., Bolton J.R.* Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications. – N. Y.: J. Wiley, 2007. – 664 p.
20. *Стенук А.А., Вересов А.Г., Путляев В.И., Третьяков Ю.Д.* Влияние анионов NO_3^- , CH_3COO^- и Cl^- на морфологию кристаллов гидроксилпатита кальция // Докл. РАН. – 2007. – Т. 412, № 1. – С. 11–14.
21. *Крестов Г.А.* Термодинамика ионных процессов в растворах. – Л.: Химия, 1984. – 272 с.

Поступила в редакцию
18.01.10

Ковалёва Елена Сергеевна – аспирант кафедры неорганической химии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

E-mail: kovaleva@inorg.chem.msu.ru, alenakovaleva84@mail.ru

Филиппов Ярослав Юрьевич – магистрант кафедры неорганической химии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

E-mail: filippovya@gmail.com

Путляев Валерий Иванович – кандидат химических наук, доцент кафедры неорганической химии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

E-mail: putl@inorg.chem.msu.ru

Третьяков Юрий Дмитриевич – доктор химических наук, профессор, академик РАН, декан факультета наук о материалах Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

E-mail: tret@inorg.chem.msu.ru

Иванов Владимир Константинович – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химической синергетики Института общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, г. Москва.

E-mail: van@igic.ras.ru

Силкин Николай Иванович – доктор физико-математических наук, профессор кафедры квантовой электроники и радиоспектроскопии Казанского государственного университета.

E-mail: Nikolai.Silkin@ksu.ru

Галиуллина Лейсан Фаритовна – аспирант кафедры квантовой электроники и радиоспектроскопии Казанского государственного университета.

E-mail: gleysf@mail.ru

Родионов Александр Александрович – аспирант кафедры квантовой электроники и радиоспектроскопии Казанского государственного университета.

Мамин Георгий Владимирович – кандидат физико-математических наук, доцент кафедры квантовой электроники и радиоспектроскопии Казанского государственного университета.

E-mail: George@Mamin@ksu.ru

Орлинский Сергей Борисович – кандидат физико-математических наук, доцент кафедры квантовой электроники и радиоспектроскопии Казанского государственного университета.

E-mail: sergei.orlinskii@ksu.ru

Салахов Мязюм Халимуллович – доктор физико-математических наук, ректор, заведующий кафедрой оптики и нанофотоники Казанского государственного университета.

E-mail: Myakzyum.Salakhov@ksu.ru