

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ**

КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

Направление: 03.04.02– «Физика»

«Медицинская физика»

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

(магистерская диссертация)

**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ЗАМЕНЫ
КОСТНОЙ ТКАНИ НА ОСНОВЕ ЗАМЕЩЕННЫХ
ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ МЕТОДАМИ СПЕКТРОСКОПИИ
ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА**

Работа завершена:

« ___ » _____ 2018 г. _____

(А.С. Старшова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.ф.-м.н., вед.науч. сотр.

« ___ » _____ 2018 г. _____

(М.Р. Гафуров)

Заведующий кафедрой медицинской физики:

д.х.н., профессор

« ___ » _____ 2018 г. _____

(А.В. Аганов)

Казань - 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
1. Фосфаты кальция – синтез, структура и свойства	
1.1.Биокерамика на основе фосфатов кальция	6
1.2.Гидроксиапатит – структура и основные свойства.....	9
1.3.Трикальцийфосфат – синтез, структура и основные свойства.....	16
1.4.Октакальций фосфат – синтез, структура и основные свойства.....	22
2. Основы электронного парамагнитного резонанса.....	31
3. Экспериментальная часть.....	39
Заключение.....	52
Список литературы	54

Введение

На данный момент актуальным является поиск биоматериалов для замены костной ткани или, другими словами, искусственных имплантатов. Из множества вариантов перспективным признано создание генактивированных персонализированных имплантатов, представляющих особый класс медицинских изделий для костной пластики. Генная конструкция состоит из матрикса-носителя, который объединяют с биологически активными нуклеиновыми кислотами. Для изготовления матрикса-носителя можно использовать различные материалы, одним из них являются керамики на основе фосфатов кальция (ФК) - синтетического аналога костной ткани. Дополнительный интерес вызывает возможность использования керамических материалов для изготовления имплантатов в качестве протеза кости, причем пористые керамические материалы обладают определенными преимуществами перед другими материалами.

Синтетические материалы на основе ФК очень перспективны для клинического и экспериментального применения, так как при их использовании в качестве несущей матрицы для клеток и лекарственных препаратов, они могут вести себя как остеокондукторы (остеопластические материалы, которые способны инициировать митогенез стволовых клеток костного мозга, хемотаксис клеток-предшественников и их дифференцировку в остеобластном направлении, так как содержат в составе материалов факторов роста), так и проявлять остеоиндуктивные свойства (способность материалов выполнять роль матрицы, вдоль которой происходит новообразование костных структур) [1-2].

Большинство аллопластических материалов на основе гидроксиапатита (ГА) обладают удовлетворительной биосовместимостью и совершенно не токсичны, но при этом имеют низкую кинетику резорбции. По своим свойствам практически все остеопластические материалы на

основе ГА являются остеокондукторами. Гидроксильные и ортофосфатные группы в составе ГА замещают на карбонат-ион, кальций на цинк и магний для того, чтобы ускорить резорбцию ГА и приблизить его по минеральному составу к нативной костной ткани [3].

Для улучшения остеоиндуктивных свойств ГА-керамики сейчас создаются различные специальные композитные материалы, которые можно представить в виде комбинации остеокондуктивного матрикса и биоактивных агентов. Дексаметазон, стволовые клетки и факторы роста могут выступать в качестве активаторов остеогенеза.

Помимо ГА, на сегодняшний день для практического хирурга наибольший интерес представляют следующие биорезорбируемые ФК материалы – трикальцийфосфат (ТКФ) в β -модификации (β -ТКФ) и октакальцийфосфат (ОКФ), которые в основном производят в виде порошков и цемента.

Как уже упоминалось выше, для контролируемого изменения резорбции, остеокондуктивности, улучшения механических свойств и т.п., применения ФК как носителей лекарственных средств, а также в целях дальнейшей персонализации имплантатов, ФК керамики и цементы изготавливают замещенными различными анионами и катионами. Поэтому необходимо развивать различные аналитические методы детектирования и количественного анализа контроля вхождения или высвобождения интересующих ионов, способов синтеза ФК, степени их очистки, резорбции, взаимного фазового перехода и т.д. Одним из эффективных способов исследования ФК является метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Однако не все его современные возможности используются в полной мере для характеристики ФК материалов. Достаточно хорошо исследованы методом ЭПР керамики на основе гидроксиапатита. Для ТКФ подобных работ крайне мало, а для ОКФ исследования методами ЭПР практически отсутствуют.

Цель данной работы – исследование возможностей методов ЭПР для изучения замещенных фосфатных керамик(ФК), определения их состава и концентрации примесных центров. Достижение этой цели требовало решения ряда задач, таких как:

- Освоение методик проведения ЭПР измерений в стационарном и импульсном режимах;
- Регистрация и расшифровка спектров ЭПР номинально «чистых» и допированных ионами металлов (железо, марганец, медь, барий, стронций, магний) порошков ФК (гидроксиапатит, трикальцийфосфат, октакальций фосфат)
- Сравнение результатов с данными, полученными другими аналитическими методами (РФА, порошковая дифрактометрия, ИК-спектроскопия, электронная микроскопия)

Основные измерения выполнялись на кафедрах квантовой электроники и радиоспектроскопии, медицинской физики. Использовалось оборудование центра коллективного пользования физико-химических исследований КФУ и сторонних организаций. Синтез изученных соединений проводился в Институте металлургии и материаловедения имени А.А. Байкова Российской академии наук, г. Москва (ИМЕТ РАН). Часть работы финансировалась проектом Российского фонда фундаментальных исследований РФФИ № 18-32-00337 («мой первый грант», основной исполнитель).

1. Фосфаты кальция – синтез, структура и свойства

1.1. Биокерамика на основе фосфатов кальция

Биокерамика – это биоматериалы, которые имеют керамическую природу и отвечают всем требованиям, предъявляемым к современным имплантатам. Современная биокерамика включает в себя вещества естественного происхождения, которые входят в ее композитный состав. Они могут использоваться как наполнители, как дополнения к костным трансплантатам, остеозамещающие материалы, обеспечивающие управляемое воздействие на репаративный остеогенез, средства депонирования лекарственных препаратов.

Все биокерамические материалы по типу биохимического взаимодействия с организмом можно разделить на

1) биорезорбируемые материалы (трикальцийфосфат или сульфат кальция), которые полностью могут замениться биологическими структурами.

2) Биоинертные, к которым можно отнести оксид алюминия, циркония, сохраняющие форму имплантата и поверхностную структуру без врастания тканей и, при этом они не изменяются под действием окружающей среды.

3) биологически активные материалы (типа гидроксиапатита), которые могут изменяться на границе с живыми тканями [4-6].

Некоторые формы биокерамики, например, костные цементы, обладают опорной функцией, но их показатели прочности не позволяют использовать данную форму в качестве фиксации компонентов эндопротезов.

На данный момент во всем мире проводится множество исследований, которые направлены на изучение возможности придания остеоиндуктивных свойств биокерамическим материалам. Большие надежды подают материалы на основе сульфата кальция, трикальцийфосфата кальция, октокальцийфосфата и гидроксиапатита. Их можно использовать для составления композитных материалов с добавлением коллагена, аутокости или костного морфологического белка (ВМР).

Аналогами минерального компонента костного вещества являются биологически активные кальцийфосфатные материалы на основе ГА и ТКФ, имеющими структурные сходства в химическом составе с костной тканью. Эти материалы разрабатывали для того, чтобы уменьшить потребность в аутотрансплантатах, а в дальнейшем даже заменить их [7]. Основные виды ФК приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Основные виды фосфатов кальция [7]

Химическая формула	Название	Отношение Ca/P	Интервал pH	Произведение растворимости
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	Монокальциевый фосфат	0,5	<1	Раств.
$\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Дикальциевый фосфат дигидрат	1	<1	$10^{-6,63}$
CaHPO_4	Дикальциевый фосфат (гидрофосфат кальция)	1	2-4	$10^{-7,02}$
$\text{Ca}_8(\text{H}_2\text{PO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Октакальциевый фосфат	1,33	6-7	$10^{-95,9}$
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Гидроксиапатит	1,5-1,67	>5	$10^{-117,2}$
Аморфный	Аморфный фосфат кальция	1,33-1,67	>5	?
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Трикальциевый фосфат (ортофосфат кальция)	1,5	-	-
$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$	Тетракальциевый фосфат	1,2	-	-

В нижней части таблицы находятся фосфаты кальция, которые не существуют в водных растворах. Чистые ГА и ТКФ не имеют выраженных остеоиндуктивных свойств, поэтому невозможно проследить процесс их перестройки, так как эти материалы обладают низкой рентгеноконтрастностью [8].

Установлено, что кристаллы синтетического ГА и ТКФ в биологической системе поддаются влиянию метаболизма клеток организма и распадаются на ионы кальция и фосфора, которые в дальнейшем входят в структуру регенерирующей костной ткани.

1.2 Гидроксиапатит – структура и свойства

Основной неорганической составляющей костной ткани, а также зубной эмали является ГА, который хорошо усваивается человеческим организмом и широко применяется в ортопедии, травматологии и стоматологии для замещения костных дефектов и покрытия различных имплантатов. Данный ортофосфат кальция можно получить путем гидролиза гидроортофосфата кальция или соединением оксида кальция и ортофосфорной кислоты. ГА представляет из себя аморфный белый порошок, растворимость в воде которого будет зависеть от температуры и будет обратно пропорциональна температуре [3-4].

Ортофосфаты кальция могут классифицироваться в соответствии с тремя структурными типами: структура типа апатита, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$, с общей формулой $\text{A}_{10}\text{X}_6\text{Y}_2$ (гидроксиапатит, тетракальцийфосфат); структура типа глазерита, в которой кристаллизуются полиморфные модификации трикальцийфосфата; слоистая структура (дикальцийфосфат, монокальцийфосфат), где $\text{A} = \text{Ca}^{2+}, \text{Sr}^{2+}, \text{Ba}^{2+}, \text{Mg}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{Fe}^{2+}$ и др., $\text{X} = \text{PO}_4^{3-}, \text{CO}_3^{2-}$ и др., $\text{Y} = \text{OH}^-, \text{F}^-, \text{Cl}^-$ и др. Параметры элементарной ячейки ГА: $a = b = 9,43 \text{ \AA}, c = 6,88 \text{ \AA}$ [9].

Кристалл гидроксиапатита имеет две структурных подсистемы. Одной из них являются Са-каналы с группами OH^- внутри них, а другая представлена остовым каркасом, в который могут внедряться ионы $\text{X} - \text{F}, \text{Cl}, \text{OH}, \text{CO}_3^{2-}$, которые способны изоморфно замещать PO_4 -группы. Химическая формула гидроксиапатита - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (рисунок 1).

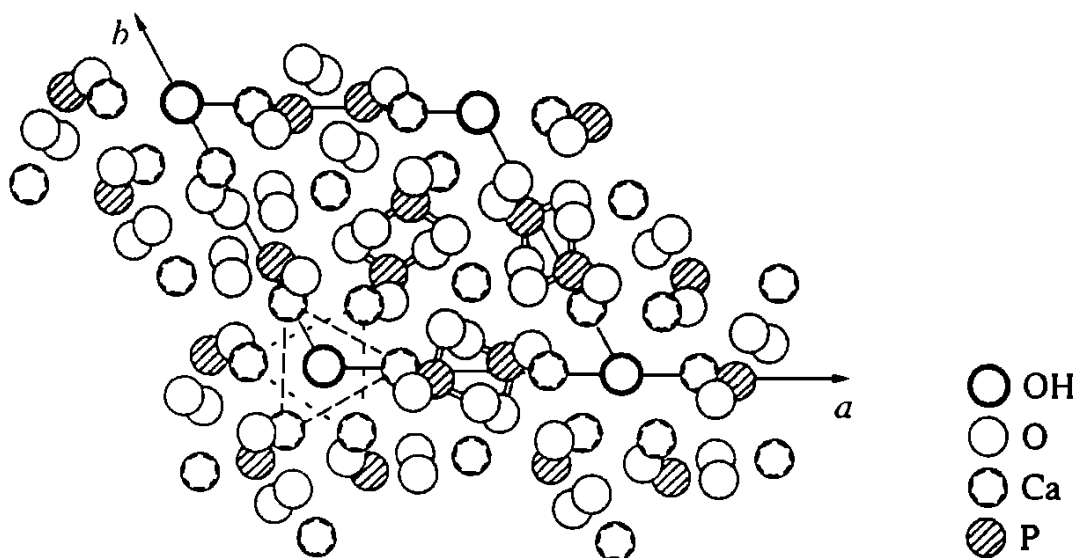


Рисунок 1 – Структура ГА [9]

В этом случае молярное соотношение Ca/P (кальциевофосфатный коэффициент) равно 1,67, а решётка имеет гексагональную структуру (рисунок 2А). Фосфатные группы расположены в виде равнобедренных треугольников вокруг гексагональной оси, вдоль которой распределены гидроксильные группы. Вода может заполнять микропространство между кристаллами (рисунок 2 Б).

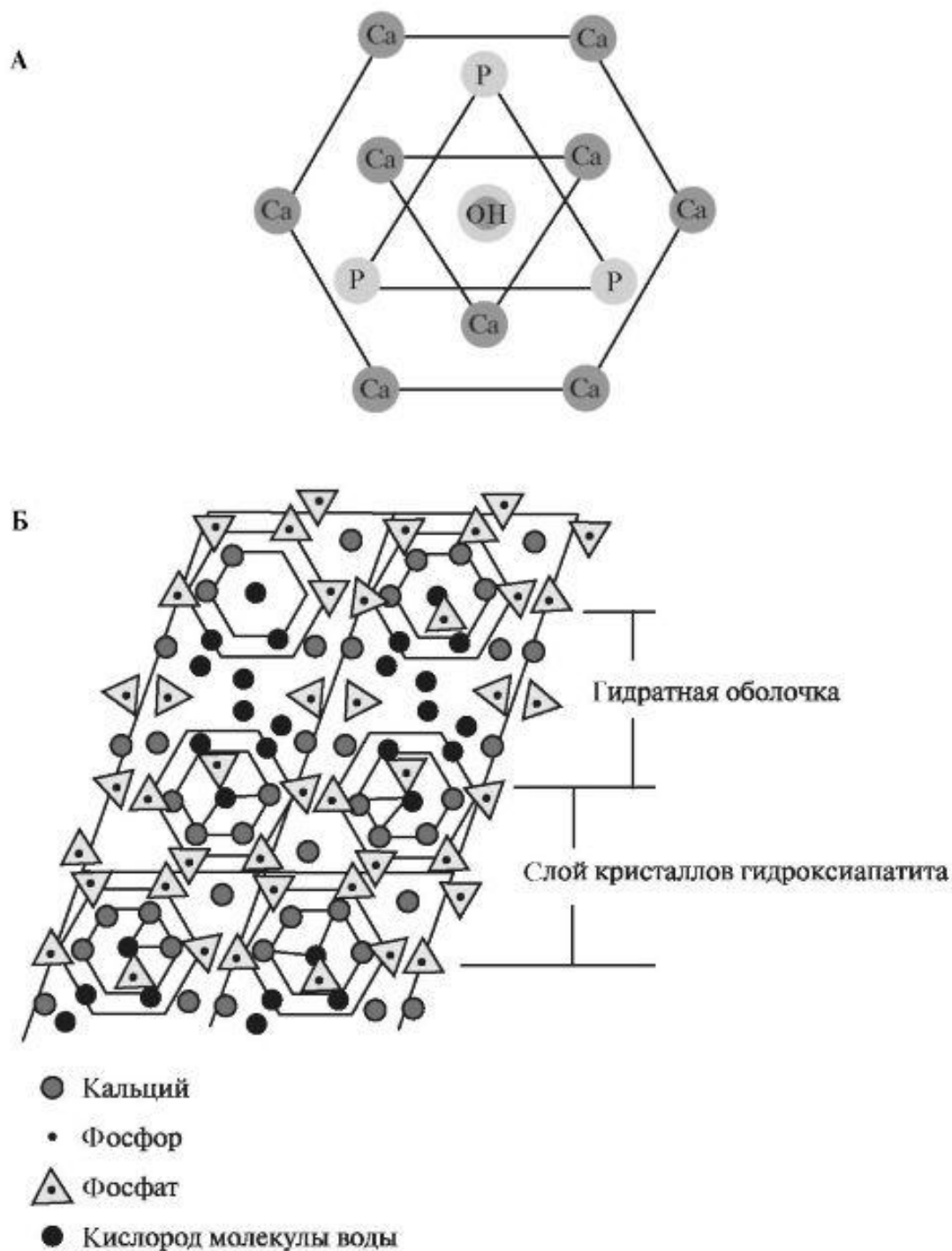


Рисунок 2 – Гидроксиапатит:
 А – гексагональная форма молекулы гидроксиапатита; Б – расположение кристаллов гидроксиапатита в эмали зуба [10]

Гидроксиапатит электронейтрален, он обладает стабильной ионной решёткой и является устойчивым соединением, при этом кристаллы ГА могут встречаться как с положительным, так и с отрицательным зарядом. В

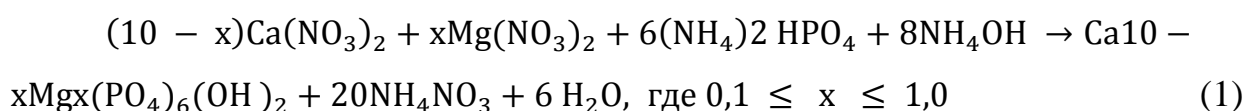
случае, когда в структуре гидроксиапатита содержится 8 ионов кальция, то он заряжен отрицательно, если же количество ионов кальция составляет 12, ГА можно считать заряженным положительно. Неустойчивые кристаллы обладают реакционной способностью, так как возникает поверхностная электрохимическая неуравновешенность.

Нестехиометричность состава - одно из уникальных свойств ГА. Она выражается в отношении Ca/P, ($1,5 < \text{Ca/P} < 1,67$) и дает возможность проводить ряд анионных и катионных замещений в решетке ГА. Могут происходить различные замещения кальция, например, ионы натрия, могут занять его позиции в семивершинниках, а ионы магния могут войти в состав девятивершинников. Одним из определяющих факторов при заполнении катионных позиций является характер химической связи, которая образуется замещающим ионом в определенном положении кристаллической решетки [11].

Чаще всего для замещения используют катионы натрия и магния и различные анионы, на основе карбоната, силиката, фторида и хлорида. Введение в структуру апатита ионов-заместителей приводит к искажению и деформации кристаллической решётки, что в дальнейшем приводит к увеличению растворимости и биорезорбируемости замещенного ГА по сравнению с чистым ГА. При замещении фтором апатит становится более термодинамически устойчивым соединением, а следовательно резорбируемость апатита в жидкостях организма ниже по сравнению с чистым ГА. Или, например, введение ионов магния в структуру ГА влияет на устойчивость апатитоподобной структуры, что приводит к изменению скорости биорезорбции материалов в живом организме. Фосфат магния универсален в качестве ингибитора превращения фосфатов кальция в гидроксиапатит. В результате замещения ионов кальция ионами магния и ионов гидроксила ионами фтора (концентрация ионов магния составляла от 1 до 10% ат. от общего содержания катионов) образуются новые магний- и

фторсодержащие соединения со структурой ГА. При этом размер кристаллов магнийсодержащих ГА уменьшается с ростом количества вводимого иона магния. Также уменьшается параметр a кристаллической решетки ГА. С.М. Бариновым с сотрудниками были проведены исследования влияния количества магния на состав и структуру образующихся фосфатов [12].

Синтез магнийсодержащих фосфатов проводили по реакции:



Выявлено, что решающим фактором, определяющим структуру фосфата, является концентрация ионов магния, вводимого в процессе синтеза. Так, введение 1% ат. ионов магния от общего содержания катионов стабилизирует структуру ГА. Увеличение содержания ионов магния более 2,5% ат. приводит к дестабилизации структуры апатита и переходу в витлокит. Температура термической обработки также вносит существенный вклад в структуру образующегося соединения: увеличение температуры термообработки выше 800°C приводит к образованию фосфата со структурой витлокита. Магний оказывает дестабилизирующее действие на структуру ГА, что можно объяснить различием ионных радиусов кальция и магния.

В одном из экспериментов магний вводили в количестве от 1 до 6 ат. % от отношения $\text{Mg}/(\text{Ca}+\text{Mg})$, далее прокаливали образующиеся осадки при температурах 900 и 1100 °C. Синтез вели аналогично вышеописанному, термообработку проводили при 900° и 1100°C. Методом РФА было установлено, что увеличение количества ионов магния свыше 6% приводит к образованию однофазного продукта со структурой витлокита. Полученные магнийсодержащие фосфаты кальция имели размер частиц 300-500нм. Фазовый состав получаемых порошков практически не изменяется при

увеличении температуры до 1100°C, в отличие от бифазных фосфатов кальция (БФК), не содержащих ионы магния. Более высокая термическая стабильность Mg-БФК позволяет получать плотно спеченную керамику без изменения фазового состава образцов [13].

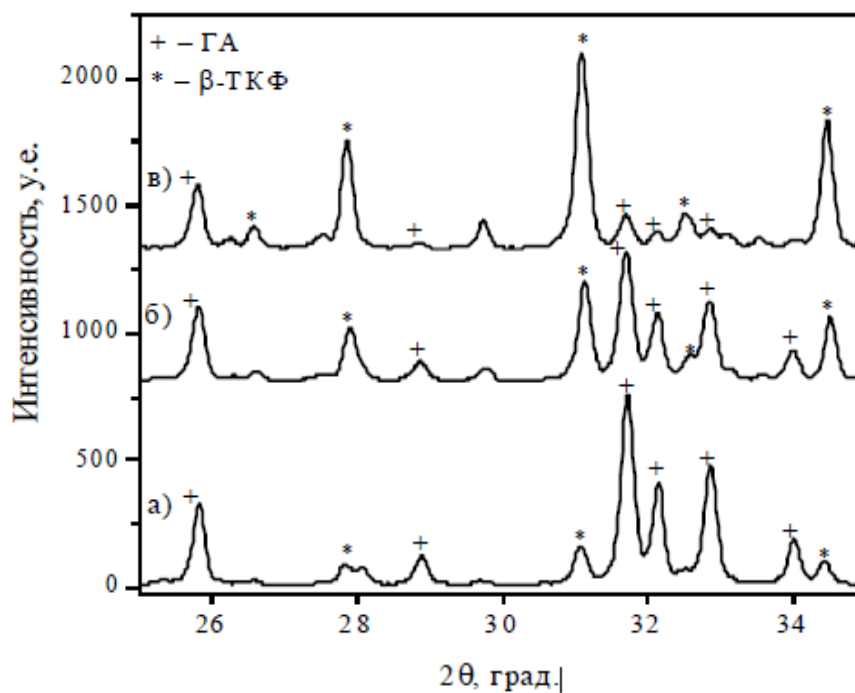


Рисунок 3 – Дифрактограммы порошков магнийсодержащих БФК при температуре 900 °С: а) №1 – 1 % Mg, б) №3 – 3 % Mg, в) №5 – 6 % Mg [13]

1.2 Трикальцийфосфат – синтез, структура и свойства

Можно разделить все ортофосфаты кальция на два условных класса, к первому можно отнести соединения, которые при физиологических условиях можно получить синтезом, а ко второму классу – высокотемпературные соединения, для получения которых необходимо произвести термическую обработку промежуточных продуктов синтеза (трикальцийфосфат, тетракальцийфосфат и их α - модификации).

Материалы на основе ТКФ обладает большей скоростью резорбции по сравнению с материалами на основе ГА. ТКФ также используют в двухфазных материалах на основе ГА/ТКФ, что позволяет контролировать скорость резорбции материала.

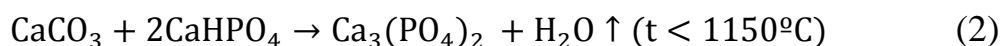
Известны четыре полиморфные модификации ТКФ: α -ТКФ, который является устойчивым при температурах от 1120 до 1470°C и метастабильным при температуре менее 1120°C; α' -ТКФ, стабильный при температурах выше 1470°C; β -ТКФ, стабильный при температурах ниже 1120°C, и β' -ТКФ - фаза, которая существует при высоких давлениях [14].

β -ТКФ имеет структуру, сходную с такой для витлокита $\text{Ca}_{18}(\text{Mg, Fe})_2\text{H}_2(\text{PO}_4)_{14}$, который обнаружен во многих продуктах биологической минерализации. Структура всех ТКФ относится к структурному типу глазерита. α -ТКФ кристаллизуется в моноклинной сингонии, с параметрами решетки $a = 12,887 \text{ \AA}$, $b = 27,280 \text{ \AA}$, $c = 15,219 \text{ \AA}$, $\beta = 126,200$ и $Z = 24$. β -ТКФ кристаллизуется в ромбоэдрической сингонии, с параметрами элементарной ячейки $a = 10,439 \text{ \AA}$, $c = 37,375 \text{ \AA}$, $Z = 21$. Изоморфное замещение ионов кальция на ионы магния происходит со следующими особенностями: магний в небольшом количестве стабилизирует структуру β -ТКФ, а замещение происходит по позициям,

смежным катионными вакансиями в ромбоэдрической структуре, при высоком содержании магния происходит стабилизация структуры α -ТКФ, при этом замещение кальция происходит в катион-анионных колоннах элементарной ячейки [15].

Так называемый аморфный кальцийфосфат, АФК, в общем случае описываемый формулой $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, может также рассматриваться как ТКФ [16].

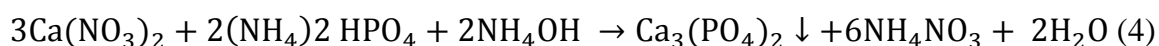
Это соединение играет важную роль в процессах минерализации костных тканей и является переходной фазой ГА. ТКФ является высокотемпературной фазой и может быть получен в ходе твердофазного синтеза между карбонатом кальция и монетитом по реакции



β -ТКФ может быть получен разложением кальций-дефицитного ГА. При температурах 700-800 °С он теряет воду и переходит в полиморфную фазу β -ТКФ [17].



Кальций-дефицитный апатит можно получить путем смешивания суспензии $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и раствора ортофосфорной кислоты [18].



Стехиометрические количества раствора гидрофосфата аммония медленно добавляют к раствору нитрата кальция при температуре 60 °С. Далее добавляют раствор NH_4OH или HNO_3 . После 2 часов старения, раствор

охлаждают до комнатной температуры, порошок осаждают и отжигают при температуре 900 °С.

При температуре выше 1150 °С β -ТКФ переходит в высокотемпературную α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ модификацию, растворимость которой в воде существенно выше.

Структура ТКФ, представлена на рисунках 4 и 5, она позволяет проводить изоморфные замещения ионов кальция на ионы магния, цинка, меди, стронция, марганца, силикат-ионы [19].

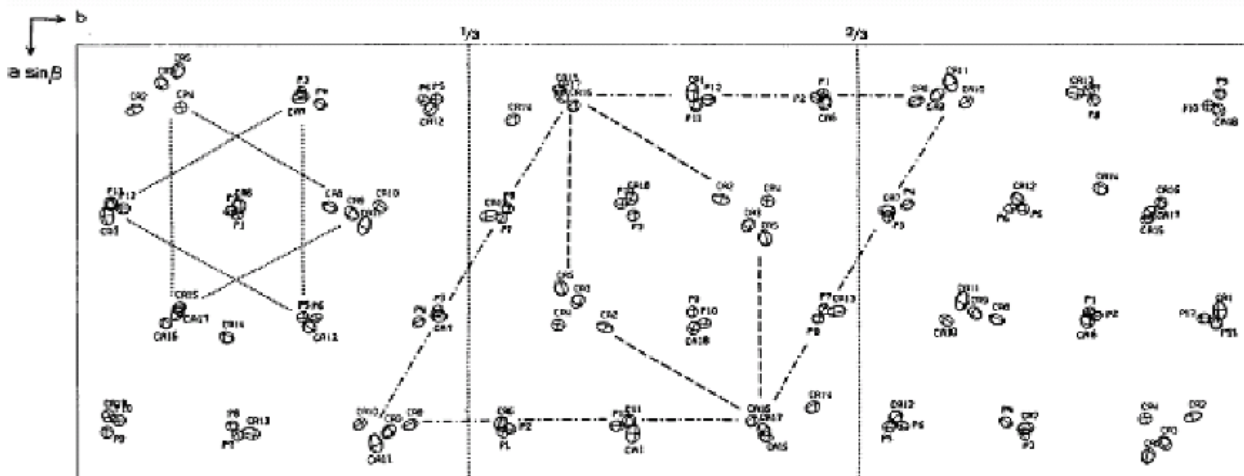


Рисунок 4 – Проекция структуры α -ТКФ вдоль оси с. Тире выделяют область ячейки, относящуюся к глазериту, а точки-тире – ГА [19]

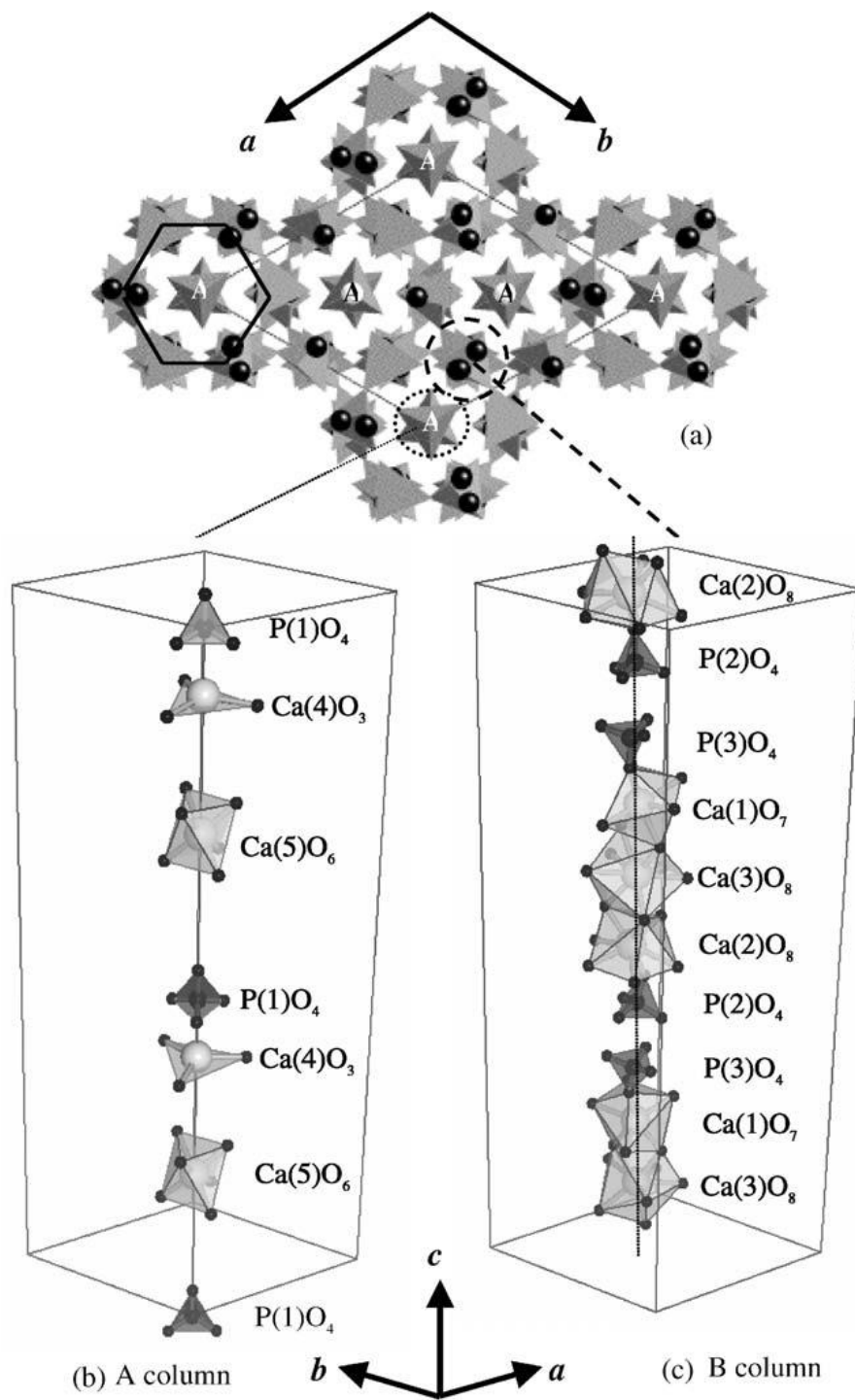
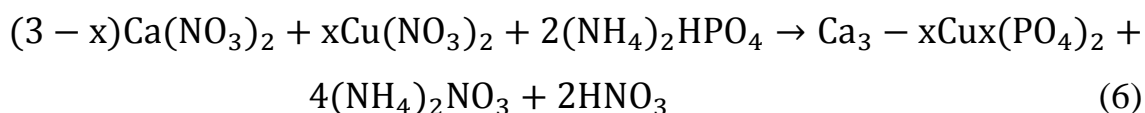


Рисунок 5 – Проекция кристаллической структуры $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ на плоскости [20]

В природе это вещество широко распространено, его можно встретить в составе различных минералов, таких как апатит, фосфорит, гидроксиапатит [20].

Введение ионов одновалентных и двухвалентных металлов или силикат-ионов в структуру β -ТКФ позволяет увеличить скорость резорбции материалов по сравнению с ТКФ, так как возникает напряжение в решётке. При введении ионов цинка, меди, серебра ТКФ приобретает антибактериальные свойства. Силикат-ионы в структуре ТКФ улучшают пролиферацию клеток на материалах из кремнийзамещённых ТКФ. Цинк является ингибитором по отношению к процессу образования остеокластов и одновременно активизирует работу остеобластов [21,22].

Замещённый ТКФ можно получить осаждением солей из водного раствора, но также можно использовать и гетерофазные взаимодействия между исходными реагентами. Процесс синтез описан в реакциях (6,7):



Для данной работы пористые керамические гранулы из замещенных ТКФ были получены методом пропитки ячеистого полимерного матрикса суспензией из керамического материала, далее следовала сушка и термообработка для того, чтобы выжечь органическую составляющую и соединить керамическим части.

Методом рентгенофазового анализа установлено, что все соединения, которые были синтезированы различными методами, имеют структуру, которую можно сравнить со структурой β -ТКФ. Полученные данные ИК-спектроскопии, позволяют нам сделать вывод, что эти образованные соединения имеют структуру витлокита [23].

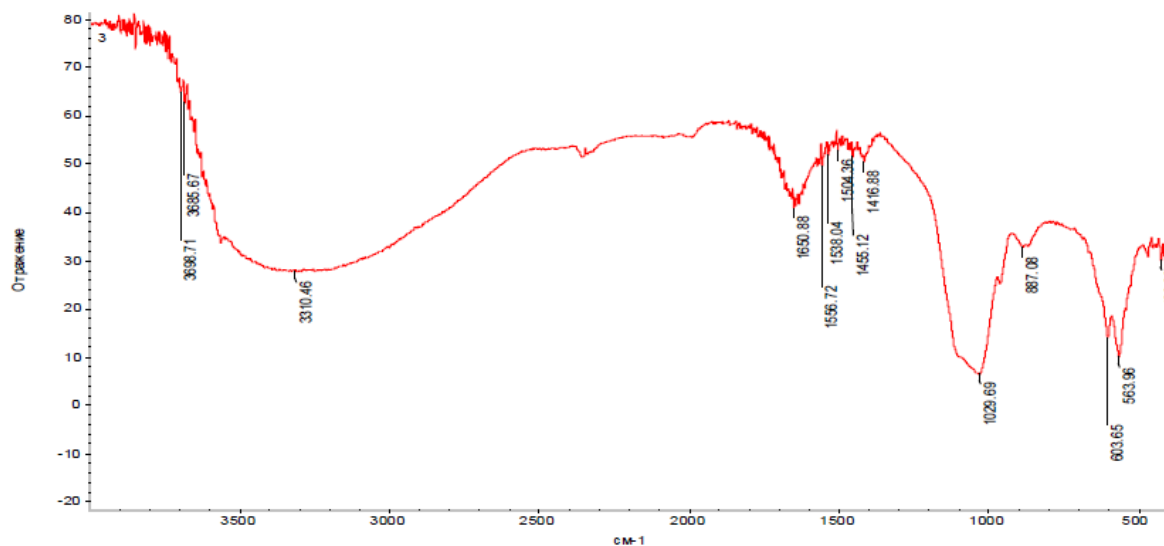


Рисунок 6 – ИК спектр ТКФ, замещенного серебром [23]

В области $560-610\text{ см}^{-1}$ располагается дублет, что говорит о колебании фосфатных групп, что является характерным для соединений со структурой β -ТКФ. К колебаниям фосфатных групп были также отнесены полосы при 1030, 970, 602, 564 см^{-1} , о наличие несвязных молекул воды говорит широкая полоса в области $3000-3500\text{ см}^{-1}$ и полоса при 1400 см^{-1} .

1.3. Октакальций фосфат - синтез, структура и свойства.

На данный момент большие перспективы и повышенный интерес ученых во всем мире вызывают предшественники или прекурсоры биологических ФК. Это соединения фосфатов кальция, участвующие в ранней стадии минерализации. Они являются центрами кристаллизации в кости и зубной эмали с последующим формированием осажденного ГА и далее в ГА с высокой степенью кристалличности. Одним из наиболее перспективных прекурсоров, остеопластических материалов для заполнения костных дефектов является октакальций фосфат.

Кристаллическая структура ОКФ представлена на рисунке 7 с химической формулой $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ с атомарным соотношением $\text{Ca}/\text{P}=1,33$. Она представляет собой триклинную сингонию с параметрами ячейки: $a=90,1^\circ$; $b=9,523^\circ$; $c=6,835^\circ$; $\alpha=90,1^\circ$; $\beta=92,54^\circ$; $\gamma=108,05^\circ$. Схематически структура ОКФ представлена на рисунке 8. Область с заштрихованными атомами представляет собой «апатитовый» слой. Атомы водорода опущены для ясности [24].

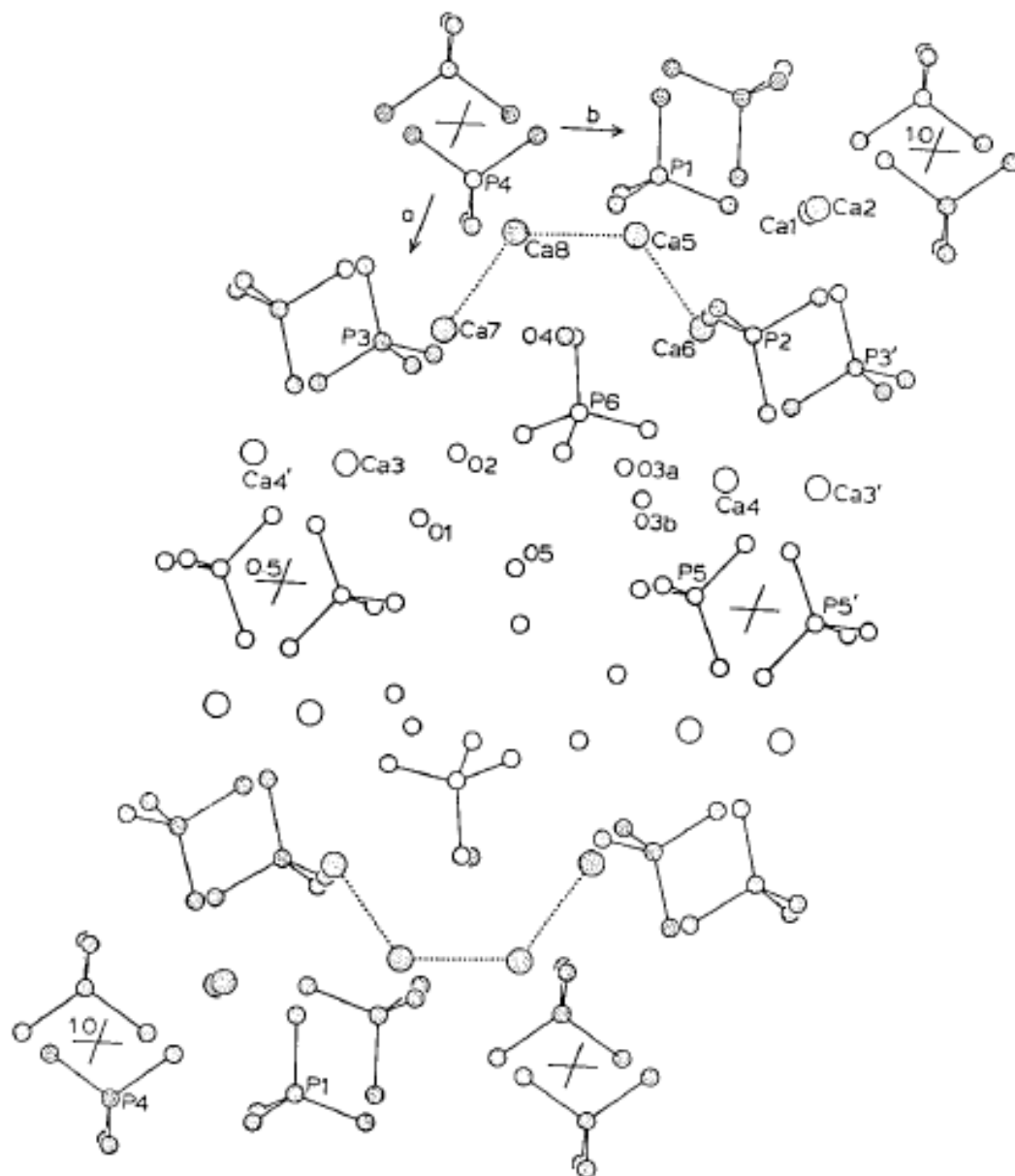


Рисунок 7 – Кристаллическая структура октакальция фосфата, проецируемого вниз по оси Z [24]

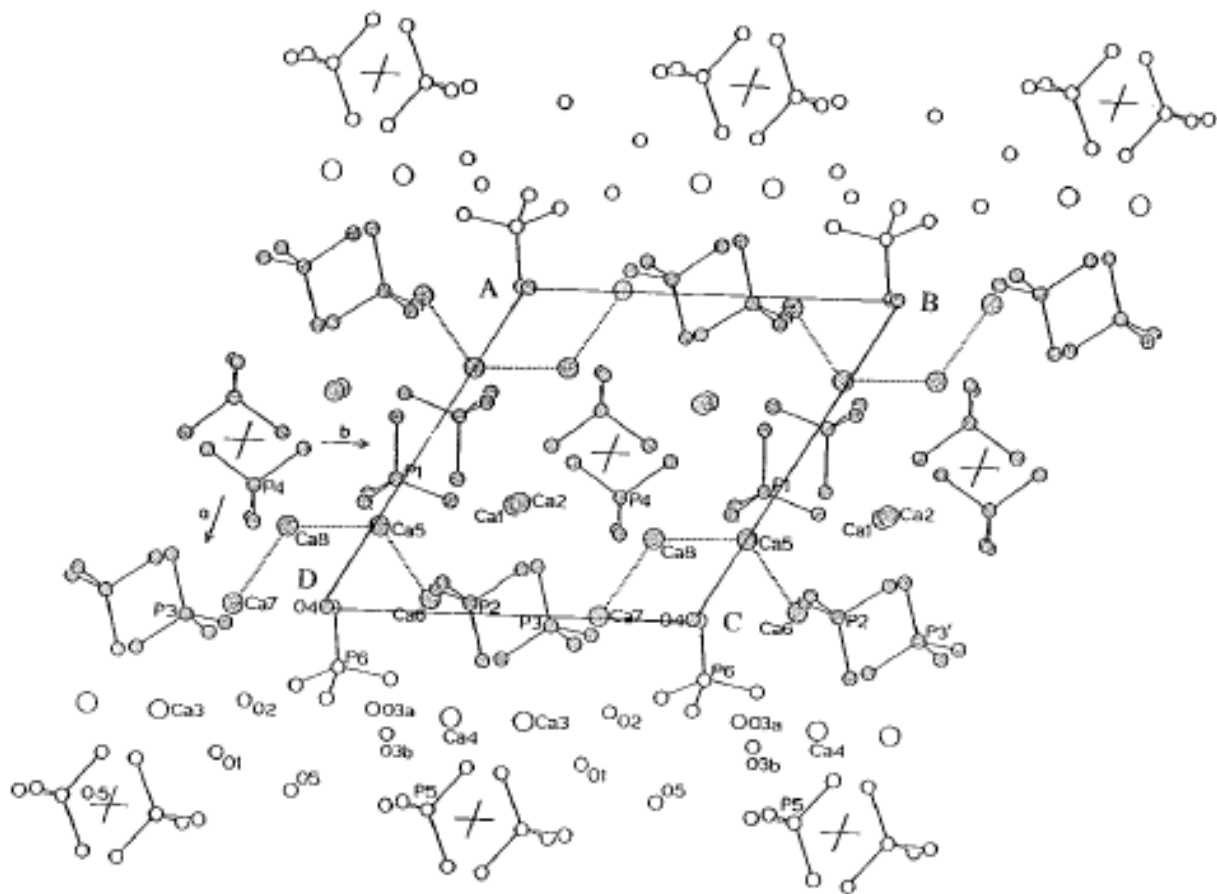


Рисунок 8 – Другой вид элементарной ячейки, показывающий апатичный слой, располагающийся в центре. Гидратированные слои сверху и снизу представляют собой переходное состояние [24]

Расположение атомов в области от 0 до 1/4 в ОКФ почти такое же, как в ГА. Эта часть состоит из двух Ca^{2+} катионов и двух PO_4^{3-} групп. ГА и ОКФ имеют в своей структуре схожие слои (слой А), которые разделены гидратированными слоями (слой В), которые содержат молекулы воды, то есть ОКФ представляет собой термодинамически метастабильную полиморфную модификацию гидроксиапатита. В слое В содержится 2 типа групп $(\text{HPO})_4^{2-}$, одна из которых соединена со слоем А, а другая расположена между слоями А в конфигурации $(\text{CaHPO}_4)\text{Ca}$. Это позволяет предположить вхождение в ОКФ других ионов путем ионного обмена с группами $(\text{HPO})_4^{2-}$. Одной из особенностей ОКФ является его способность обратимо менять содержание

ионов $(\text{HPO})_4^{2-}$ в гидратированных слоях В. На это может влиять изменение рН среды от щелочной до нейтральной. Слоистая структура ОКФ схематически представлена на рисунке 9.

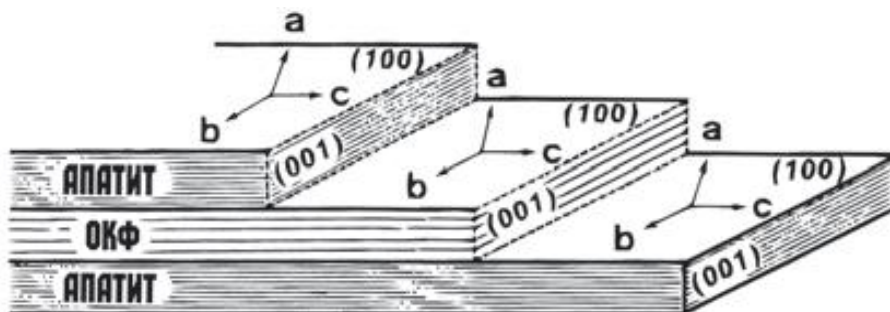
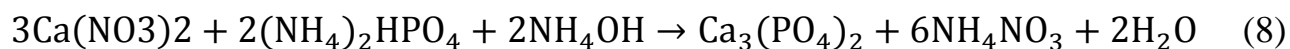


Рисунок 9 – Схематическая связь между кристаллами ОКФ и апатитом в структуре ОКФ/апатит[25]

Переход ОКФ в ГА в организме может происходить в результате непрерывного гидролиза *in situ*, либо по механизму растворения ОКФ и осаждения ГА из перенасыщенного раствора, это превращение необратимое. Гидролиз сопровождается присоединением к молекуле ОКФ ионов кальция из раствора и переходом части фосфат-ионов в раствор.

Морфологически ОКФ кристаллизуется в виде плоских кристаллов расположенных на плоскостях и центрированных на оси триклинной кристаллической системы. ГА - наименее растворимая часть при значениях рН около 7, эти значение соответствует рН плазме крови человека [26].

Существуют различные способы синтеза метастабильного ОКФ. Наиболее распространёно осаждение из водного раствора. Для наших исследований ОКФ были синтезированы в группе В.С. Комлева (ИМЕТ РАН) путем осаждения из водного раствора. Сначала проводился синтез α -ТСП путем осаждения из растворов нитрата кальция и гидрофосфата аммония.



Раствор гидрофосфата аммония (0,5 моль / л) постепенно добавляли к раствору нитрата кальция (0,5 моль / л) при постоянном перемешивании. Полученную суспензию выдерживали на воздухе в течение 24 часов. Затем осадок отфильтровывали и сушили при 120 °С.

Для получения керамических гранул α -ТКФ использовалась технология пропитки клеточного полимерного шаблона керамическим скольжением с последующим спеканием при 1300 °С. Закалку осуществляли путем охлаждения керамики при комнатной температуре. После этого керамику измельчали. Далее α -ТКФ керамические гранулы были преобразованы в ОКФ путем погружения в 1000 мл 1,5 М водного раствора ацетата натрия и 0,15 М глутаминовой аминокислоты. Гранулы выдерживали в течение 168 ч при встряхивании при 35° С, далее тщательно промывали в дистиллированной воде по меньшей мере пять раз и сушили в течение ночи при 37 ° С. Затем гранулы погружали в водный 1,5 М раствор ацетата натрия с величиной рН $8,7 \pm 0,1$ в течение 168 ч при встряхивании при 35 ° С. Были получены следующие образцы (Таблица 2).

Таблица 2 – Образцы ОКФ

№ по порядку	№ образца в данной работе	Описание
1	0	Октакальциевый фосфат (ОКФ) чистый
2	3	ОКФ с замещением ионами Si^{2+} 10% масс
3	4	ОКФ с замещением ионами Fe^{2+} 1% масс
4	5	ОКФ с замещением ионами Fe^{2+} 5% масс
5	6	ОКФ с замещением ионами Fe^{2+} 10% масс
6	9	ОКФ с замещением ионами Mg^{2+} 10% масс
7	12	ОКФ с замещением ионами Ba^{2+} 10% масс

Фазовый состав анализировали с помощью обычной рентгеноструктурной (XRD) методики исследования порошкообразных материалов (Shimadzu XRD-6000 (Япония), медный катод, $\lambda = 1,54183 \text{ \AA}$). Образцы сканировали от $2\Theta = 3^\circ - 40^\circ$ с шагом шаг $0,02^\circ$ (рисунок 10)

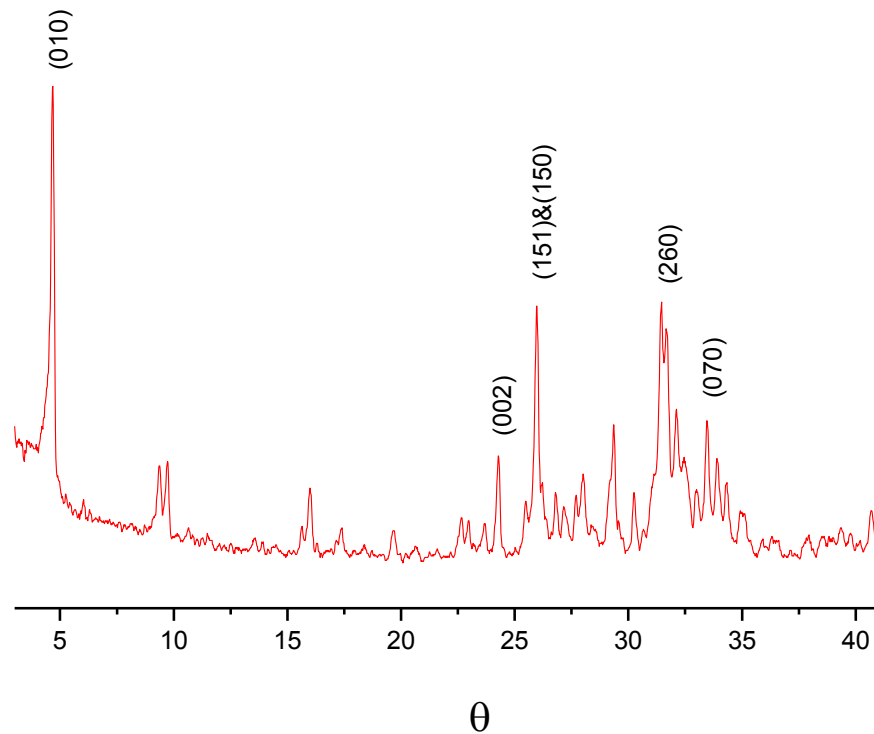


Рисунок 10 – Рентгеновская дифрактограмма ОКФ, подтверждающая фазу с характеристиками: (010) основное отражение при $2\theta = 4.9^\circ$ и пики (2 6 0), (151) и (150), (0 7 0), (0 0 2)

Из исследований методами электронной микроскопии (СЭМ) установлено, что образцы ОКФ имеют структуру схожую с типичной морфологией розеток, которая состоит из пластинчатых кристаллов и представлена на рисунке 11.

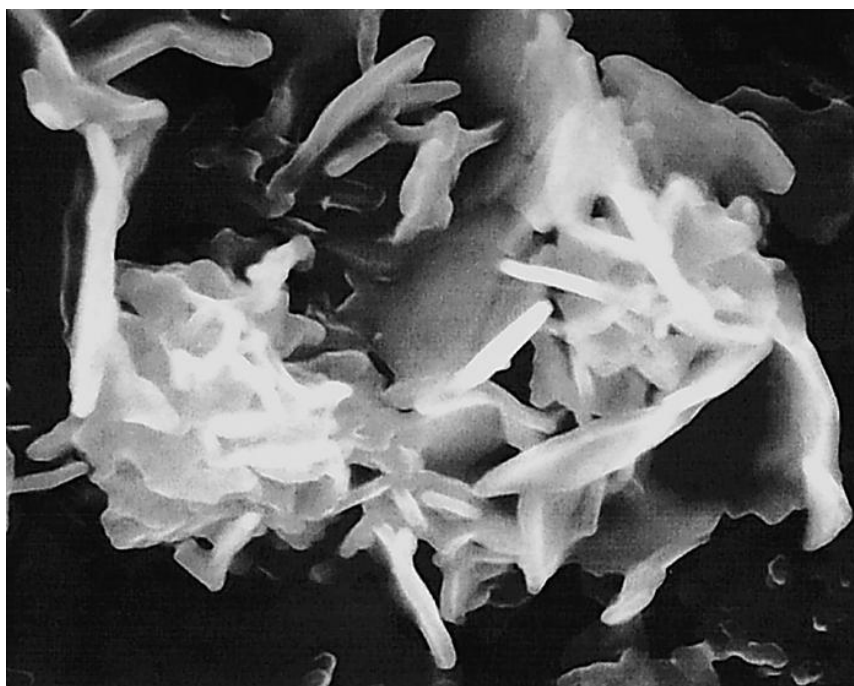
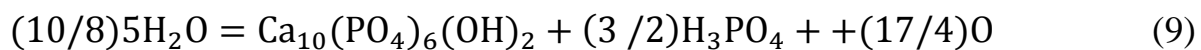


Рисунок 11 – Морфология частиц ОКФ

Проблема гидролиза ОКФ важна в связи с гипотезой биоминерализации, так как формирование в организме стабильной фазы проходит через метастабильную фазу, то есть через формирование ОКФ[27]. Преобразование ОКФ в ГА *in vivo* – это результатом стойкого гидролиза или это может происходить через механизм растворения ОКФ или, напротив, методом осаждение насыщенного раствора. Кристаллографические фазы ОКФ и ГА сохраняются во время гидролиза. Превращение ОКФ в ГА – это необратимый процесс.



Эксперимент показал, что ГА (Ca / P = 1,49) образуется во время гидролиза ОКФ (Ca / P = 1,26) [28]. Костная ткань живых организмов содержит примесные ионы, которые могут повлиять на процесс гидролиза. Было

выявлено значительное ингибирующее действие ионов магния в процессе гидролиза.

При высоком содержании магния ($> 10^{-4}$ М), продуктом гидролиза может быть ОКФ или ГА, а также β -ТКФ [29]. Ионы Zn^{2+} и Cu^{2+} являются самыми сильными ингибиторами конверсии. Процесс гидролиза в их присутствии включает период индукции, который составляет относительно длительный период уменьшения рН и короткий период, когда значение рН возвращается на конечный уровень. Ионы Pb^{2+} являются сильным ингибитором, а ионы Mg^{2+} , напротив, являются слабым. Двухвалентные ионы железа и цинка полностью ингибирует превращение ОКФ в ГА. Механизм тормозного действия связан с адсорбцией ионов, что препятствует росту ядер новых фаз. В организме человека инородные ионы существенно влияют на ремоделирование костной ткани.

Так было показано, что в эксперименте *in vitro* при высоких концентрациях марганца (> 100 мкМ) продуктом гидролиза брушита может быть не ОКФ и ГА, а β -ТКФ. Было изучено влияние 5 и 10 мкМ ионов различных металлов на гидролиз брушита до ОКФ и ГА в растворе ортофосфорной кислоты с добавлением нитрата металла. Наиболее сильное ингибирующее действие ОКФ и переход ОКФ в апатит наблюдался на модельной мембранной системе факторов роста кристаллов зубной эмали. Установлено, что без фтора образуются широкие ленточные кристаллы размером около 100 мкм. При добавлении 0,1 мг/л анионов фтора характер кристаллов меняется и начинает проявляться структура апатита, преимущественно ОКФ. При концентрации 1 мг/л, по данным фазового анализа, преобладающей фазой являлся апатит с небольшим количеством ОКФ. При концентрации фторид-ионов 2 мг/л формируются апатитовые структуры, преобладают кристаллы игольчатой формы размером около 1 мкм, то есть фтор стимулирует переход ОКФ в ГА..

Предполагаемое биологическое поведение данного материала можно представить следующей схемой: на 1-м этапе происходят активация остеогенеза через ОКФ и растворение аморфной фазы, приводящее к увеличению пористости для инфильтрации тканевой жидкости и клеточных элементов; далее происходит постепенное растворение кристаллической фазы α -ТКФ, согласующееся с процессами остеогенеза. Анализ данных литературы показал, что материалы на основе ОКФ обладают скорее остеоиндуктивными свойствами, что дает возможность создавать новые перспективные остеопластические материалы с уникальными характеристиками [30].

Был проведен ряд различных исследований, направленных на изучение материала на основе ОКФ, в роли имплантата для замещения костной ткани. По данным микролучевой рентгеновской дифракции было установлено, что ОКФ, который поместили в место дефекта со временем преобразуется в апатит. Например, у крыс в крупных дефектах костной ткани регенерация начиналась не только у краевой зоны дефекта, но и на части имплантата, который был достаточно удален от краевой зоны. На основе этих результатов можно говорить о том, что ОКФ является универсальным материалом, который может выступать как центр, где возникают репаративные процессы. В костном матриксе, который был образован на основе ОКФ, вокруг имплантата был обнаружен специфический белок костной ткани, который представлен в виде остеокальцина и коллагена первого типа [31-33].

2. Основы электронного парамагнитного резонанса

Явление электронного парамагнитного резонанса было открыто в 1944 году Евгением Константиновичем Завойским, который обнаружил, что парамагнитный образец, помещенный в постоянное магнитное поле, может поглощать энергию подаваемого на него электромагнитного поля. Поглощение электромагнитного излучения парамагнитными образцами имело избирательный (резонансный) характер, поскольку оно наблюдалось лишь при определенном соотношении между напряженностью постоянного магнитного поля и частотой переменного электромагнитного поля [34-35]. В стационарном методе ЭПР (CW режим) измеряется поглощение микроволновой сверхвысокочастотной (СВЧ) мощности образцом при его непрерывном облучении и медленном сканировании постоянного магнитного поля. Большинство коммерческих спектрометров ЭПР позволяют регистрировать спектры только в этом режиме.

Для получения дополнительной информации о парамагнитных центрах в данной работе использовались также импульсные методы, которые позволяют измерять сигнал микроволнового излучения спиновой системы после того, как ее возбудили одним или несколькими микроволновыми импульсами. Этот сигнал несет не только спектральную информацию, но и информацию о динамике спиновой системы. В таких экспериментах образец в определенном энергетическом состоянии подвергается сильному импульсному воздействию электромагнитного излучения. Спиновая система выходит из состояния равновесия, которое можно зафиксировать.

С появлением импульсных методов стало возможным точно измерить времена спин-спиновой и спин-решеточной релаксации, оценить расстояния

между парамагнитными центрами, расшифровывать сложные спектры ЭПР гетерогенных систем, используя различие их динамических характеристик и т.д. Варьируя различные последовательности импульсов и их параметры (длительность импульса, амплитуда, время задержки между импульсами), можно получить дополнительные сведения о динамических характеристиках парамагнитных центров.

На рисунке 12 изображен когерентный импульсный спектрометр ЭПР и его основные блоки [36].

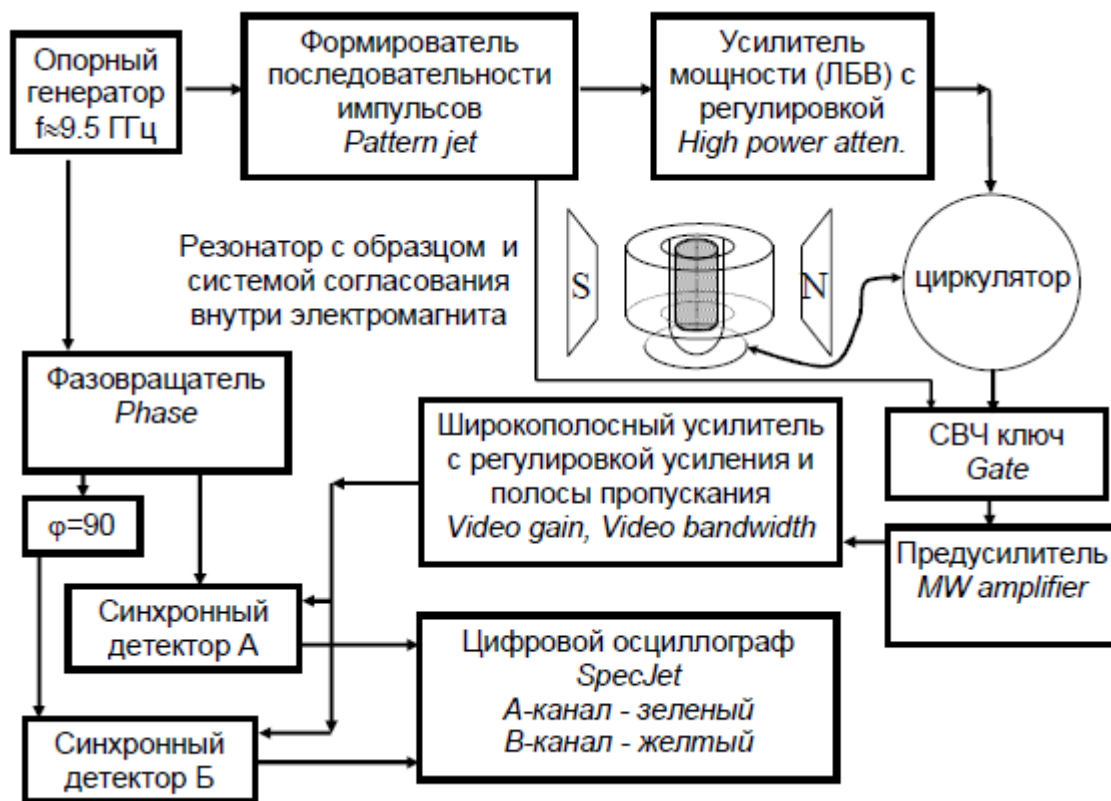


Рисунок 12 – Блок схема импульсного когерентного спектрометра ЭПР [36]

Кратко рассмотрим схему работы когерентного спектрометра ЭПР. Помещаем в резонатор, который помещен в электромагнит, исследуемый образец. Импульсы создает формирователь импульсных последовательностей,

они отражаются в виде изменения ТТЛ уровня сигнала, а затем модулируется сигнал опорного генератора с помощью СВЧ ключей, далее мы получаем импульсную последовательность из СВЧ импульсов. Для того, чтобы усилить импульсы используются лампы бегущей волны, они проходят через циркулятор и подаются на резонатор спектрометра [36].

После импульсов возникает сигнал спиновой индукции, который идет на предусилитель, защищенный специальным СВЧ ключом, там сигнал дополнительно усиливается с помощью широкополосного усилителя с регулируемой полосой пропускания и коэффициентом усиления, затем подается на два синхронных детектора. Сигналы, которые подаются с опорного генератора на вторые входы синхронных детекторов, являются сдвинутыми по фазе на 90 градусов. Так появляется возможность измерить комплексный сигнал вида « $A+jB$ », где реальная компонента « A » сигнала снимается с первого синхронного детектора, а мнимая « B » – со второго детектора. Затем эти сигналы подаются на цифровой осциллограф, после чего происходит дальнейшая обработка. Дополнительную информацию о спектральных и временных характеристиках парамагнитных центров можно получить, изменяя параметры магнитного поля и импульсной последовательности.

При отсутствии СВЧ импульсов вектор равновесной намагниченности образца, который помещен в резонатор, направлен вдоль направления постоянного магнитного поля H_0 . После включения генератора СВЧ вектор намагниченности поворачивается вокруг магнитной компоненты H_1 электромагнитной волны в резонаторе с частотой

$$\omega_1 = \frac{g\mu_B}{h}H_1 \quad (10)$$

Если прекратить воздействие генератора СВЧ после поворота вектора намагниченности, то этот вектор снова начнет прецессировать, но уже вокруг направления постоянного магнитного поля H_0 . Так можно поворачивать вектор

намагниченности и изменять угол при варьировании длительности воздействия СВЧ поля или длительности импульса. После поворота можно разложить вектор намагниченности на продольную компоненту (вдоль оси z) и поперечную компоненту (в плоскости $x-y$). Когда система находится в равновесии вектор намагниченности, направлен вдоль оси z , поперечная компонента равна 0 и существует только продольная. Чтобы получить максимальную поперечную намагниченность, вектор намагниченности необходимо повернуть на $\pi/2$. Длительность этого импульса обратно пропорциональна значению H_1 , а магнитная компонента зависит от СВЧ мощности, которую подают на образец, и от добротности нагруженного резонатора. Из этого следует, что увеличение СВЧ мощности укорачивает необходимый импульс. Для современных спектрометров длительность $\pi/2$ импульса находится в пределах от 10 до 100 нс. Вектор намагниченности прецессирует после воздействия импульса $\pi/2$, а в СВЧ резонаторе возникают колебания, имеющие такую же частоту. С помощью квадратурного детектирования на частоте опорного генератора СВЧ получают фазу и амплитуду колебания. Этот сигнал называется сигналом свободной индукции (ССИ). Если частота опорного генератора совпадает с частотой прецессии Лармора, наблюдается резонанс и сигнал постоянного уровня. Если частоты не совпадают, то видна модуляция на разностной частоте, что позволяет точно настроиться на резонанс. После возбуждения системы импульсом $\pi/2$ возникают процессы релаксации, стремящиеся вернуть систему в состояние равновесия. Выделяют два основных процесса релаксации: спин-спиновая (релаксация поперечной намагниченности) и спин-решеточная релаксация (релаксация продольной намагниченности).

При релаксации поперечной намагниченности энергия магнитной подсистемы не изменяется, происходит распад прецессирующего вектора намагниченности в плоскости $x-y$. Эту релаксацию можно разделить на два типа, зависящих от разброса частот ларморовской прецессии, которая может

быть вызвана неоднородностью магнитного поля или неоднородностью параметров образца, либо взаимодействием магнитных моментов между собой.

Первый тип воздействия не зависит от времени, то есть не изменяется от воздействия импульсной последовательности, из этого следует, что его можно обратить во времени, за счет чего можно наблюдать электронное спиновое эхо.

Второй тип отражает случайную природу и не может быть обращен во времени. Для него введено обозначение характеристического времени процесса как T_2 .

При релаксации продольной намагниченности, вектор намагниченности возвращается в равновесное состояние, при этом вся избыточная энергия магнитной подсистемы передается в тепловую энергию, характеристическое время такого процесса обозначается как T_1 .

Релаксационные процессы приводят к быстрому уменьшению сигнала свободной индукции после импульса $\pi/2$, поэтому этот сигнал называют спадом свободной индукции.

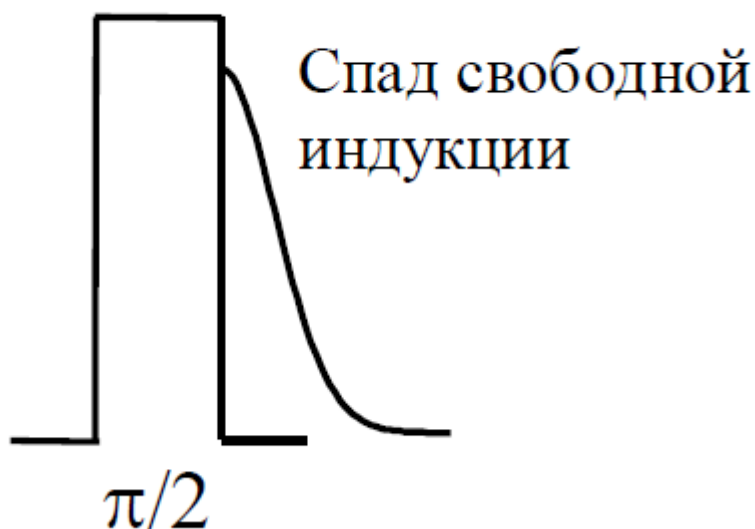


Рисунок 13 – Схема формирования сигнала свободной индукции при соблюдении условий резонанса [36]

Для наблюдения сигнала электронного спинового эха необходимы импульсные последовательности, состоящие минимум из двух импульсов. Последовательность из импульсов $\pi/2$ и π называется последовательностью Хана. После первого импульса можно зарегистрировать сигнал свободной индукции, далее поперечная намагниченность спиновой пакет начинает распадаться в плоскости x - y , затем сигнал свободной индукции исчезает, так как намагниченность равномерно распределяется в плоскости x - y . Можно изменить знак угловой скорости компонент магнитного момента спиновой пакета, если после первого импульса через время τ приложить π - импульс. Этот процесс очень похож со случаем распада ССИ, но обращен во времени. После начала второго импульса компоненты намагниченности спиновой пакета вновь соберутся, образуя макроскопическую намагниченность. Так можно зарегистрировать комбинацию из двух ССИ, которые зеркально отражены во времени относительно точки 2τ после первого импульса. Этот сигнал называется первичным электронным спиновым эхо (ЭСЭ) и изображен на рисунке 14.

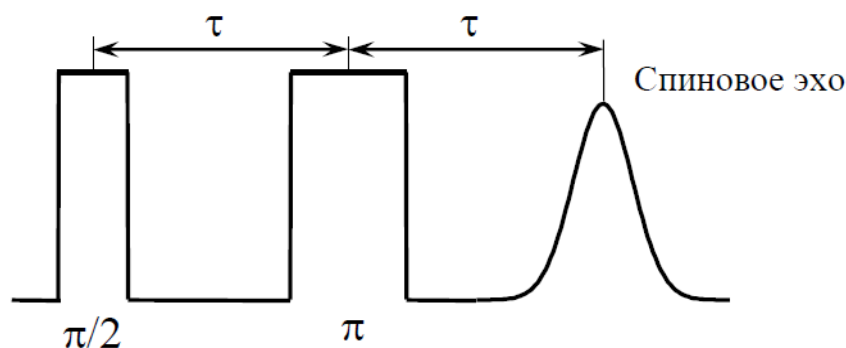


Рисунок 14 – Схема формирования сигнала первичного эха [36]

Для измерения времени спин-спиновой релаксации используют двух импульсную последовательность Хана. Распад поперечной намагниченности обуславливается двумя типами процессов: разбросом частот ларморовской прецессии, который может быть вызван неоднородностью магнитного поля или неоднородностью параметров образца, либо вызван взаимодействием магнитных моментов между собой. Первый тип является причиной возникновения ЭСЭ, а второй определяется взаимодействием между спинами и относится к истинной спин-спиновой релаксации. Он возникает после действия импульса $\pi/2$ и носит случайную природу и, следовательно, не может быть инвертирован во времени вторым импульсом. Так амплитуда ЭСЭ будет уменьшаться в зависимости от τ . Можно измерить амплитуду ЭСЭ для ряда последовательностей Хана с разным временем τ , а затем построить график зависимости амплитуды ЭСЭ от времени 2τ . Аппроксимация этой зависимости функцией типа позволит определить время спин-спиновой релаксации T_2 .

$$A = A_0 \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2}\right) \quad (11)$$

Спин-решеточная релаксация связана с передачей энергии от магнитной подсистемы в тепловую, т.е. с возвращением продольной намагниченности к своему равновесному значению. Для того, чтобы измерить процессы спин-решеточной релаксации, поворачивают вектор намагниченности на определенный угол и следят за его восстановлением. Простейшая последовательность для измерения времени спин-решеточной релаксации состоит из трех импульсов. Первый π импульс поворачивает вектор намагниченности на 180 градусов, при этом он задает максимальную дополнительную энергию, далее выделяют время T для процессов релаксации

продольной намагниченности, после этого времени запускают зондирующую последовательность Хана, которая имеет наименьшее возможное время τ .

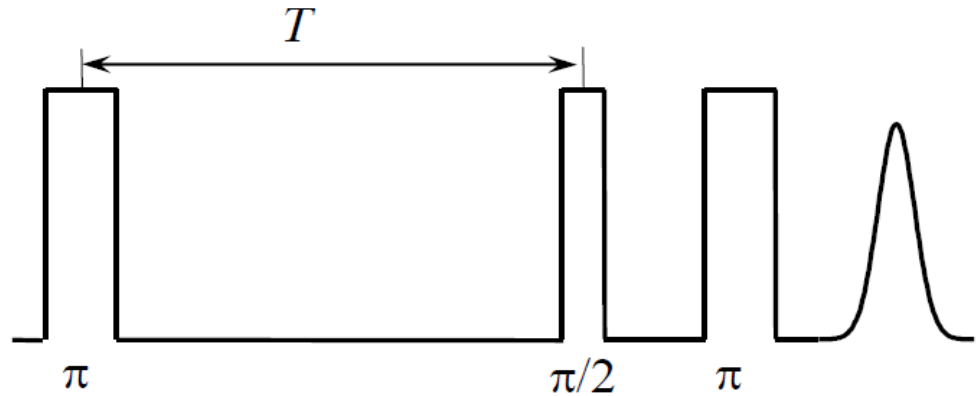


Рисунок 15 – Схема формирования сигнала первичного эха [36]

Можно определить время спин-решеточной релаксации, построив зависимость амплитуды спинового эха от времени T и аппроксимировав эту зависимость функцией типа

$$A = A_1 - A_0 \exp\left(-\frac{T}{T_2}\right) \quad (12)$$

Через время $3T_2$ перпендикулярная составляющая намагниченности, практически исчезает. Иногда требуется наблюдать спиновое эхо спустя время значительно большего чем $3T_2$, но меньше чем T_1 , так как различие во временах T_2 и T_1 , может достигать нескольких тысяч раз.

3. Экспериментальная часть

Синтез образцов ГА, ТКФ, ОКФ и их характеристика методами XRD, РФА, ИК спектроскопии. Мы дополнительно провели эксперименты по XRD на дифрактометре D2 Phaser (ИГи НгТ КФУ, группа проф. В.П. Морозова и инж. Г.М. Ескиной), РФА на спектрометре S2 Picofox (КНИТУ-КХТИ, группа проф. Р.А. Юсупова и доц. С.А. Бахтеева) через год после хранения и исследования образцов, чтобы убедиться в отсутствии существенных изменений в их составе. Ниже приведены данные по образцам замещенных ОКФ и Cu-ТКФ (Рисунок 16, Таблица 3).

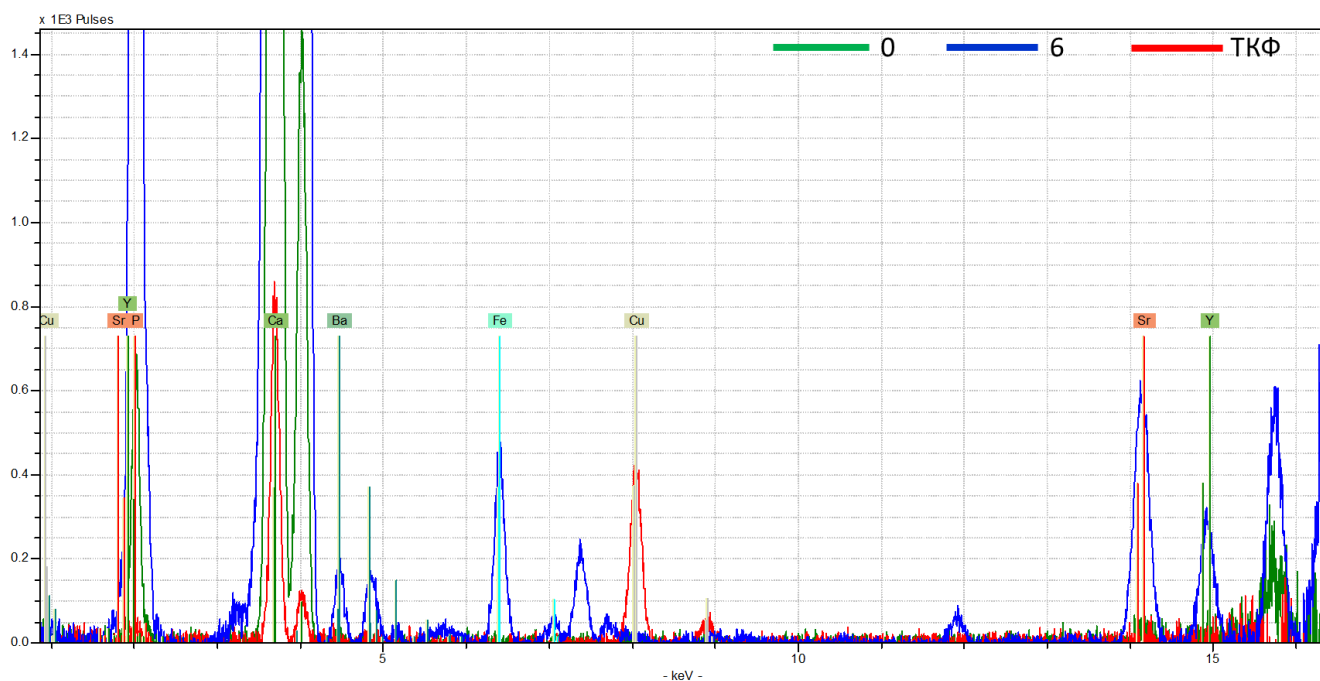


Рисунок 16 – Данные рентгенофлуоресцентного анализа на приборе: S2 PICOFOX, где зеленая линия 0 - чистый ОКФ, синяя 6 – примесный с 10 % железа, красная линия - Cu-ТКФ

Таблица 3 – Данные рентгенофлуоресцентного анализа, представленного на рисунке 16 в табличном виде

Образец	ОКФ-0	ОКФ-6	ТКФ
P	38.5	37.7	15.8
Ca	61.5	61.9	77.0
Fe		0.06	
Cu			7.2
Br		0.003	
Sr		0.03	
Y		0.01	
Ba		0.2	

Спектры ЭПР в непрерывном режиме (CW) были получены с использованием настольных спектрометров Labrador (Екатеринбург, Россия) и ESP-300 (Bruker), работающих на частоте СВЧ 9,4-9,9 ГГц. Первые ЭПР измерения, произведенные на настольном спектрометре ЭПР LABRADOR при комнатной температуре с пределом чувствительности порядка 10^{13} спинов/Гаусс $\sqrt{\text{Гц}}$ и разверткой ± 300 Гс в области $g \approx 2$, не выявили следов парамагнитных примесей ни в одном из исследованных образцов ГА, ТКФ, ОКФ (исходных, с примесями Cu, Sr, Mg, Ba, Fe, 1-10 %). Пример спектра дан на рисунке 17.

Спектры ЭПР в непрерывном режиме (CW) были получены с использованием настольных спектрометров Labrador (Екатеринбург, Россия) и ESP-300 (Bruker), работающих в СВЧ X-диапазоне (частота 9,4-9,9 ГГц). Концентрацию ПК оценивали при комнатной температуре в резонаторе с двойной полостью ER4105DR спектрометра ESP-300 путем сравнения интегральных интенсивностей спектров исследуемого образца и контрольных образцов (раствор Cu-DETC и Mn^{2+} в порошке MgO). Импульсные измерения ЭПР проводились с использованием возможностей X-диапазона спектрометра

BrukerElexsys 580/680. Облучение рентгеновским излучением синтезированных порошков было обеспечено с использованием трубки URS-55 ($U = 55$ кВ, $I = 16$ мА, W-анткатода) при комнатной температуре с расчетной дозой 5 кГр для создания стабильных парамагнитных центров в номинальном чистом материале.

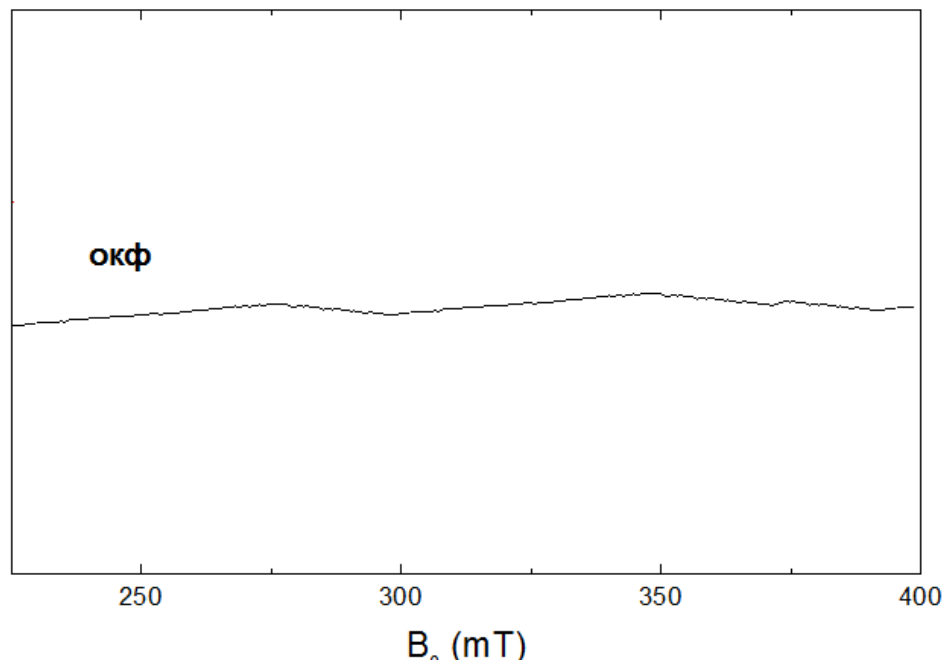


Рисунок 17 – Спектр ОКФ зарегистрированный на спектрометре Labrador

Для сравнения, можно рассмотреть спектры, которые мы получили ранее, исследуя чистый ТКФ и с замещениями ионами меди (рисунок 18).

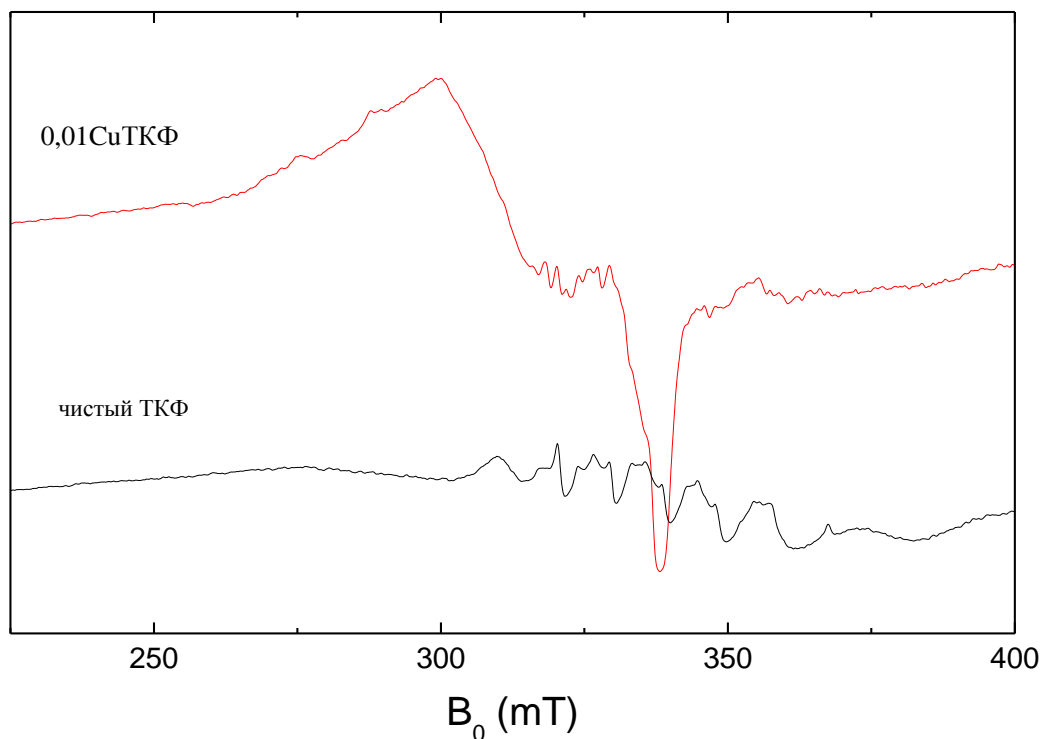


Рисунок 18 – ЭПР спектры 0,01CuTKФ (верхняя, красная линия) и ТКФ (нижняя, черная линия) при комнатной температуре

Таким образом, даже в исходном образце ТКФ детектируется сигнал ЭПР, который свидетельствует о наличии ионов Mn^{2+} . Для дальнейшего изучения номинально чистого ОКФ был использован более мощный спектрометр. Были проведены измерения на спектрометре BrukerElexSys 580/680 (чувствительность порядка 10^{10} спинов/Гаусс $\sqrt{Гц}$). Сравнение сигналов в номинально недопированном образце ОКФ до рентгеновского облучения и после облучения.

На обзорном спектре видно, что существенные сигналы ЭПР появляются только после облучения образца рентгеном в течение 15-30 минут (рисунок 19).

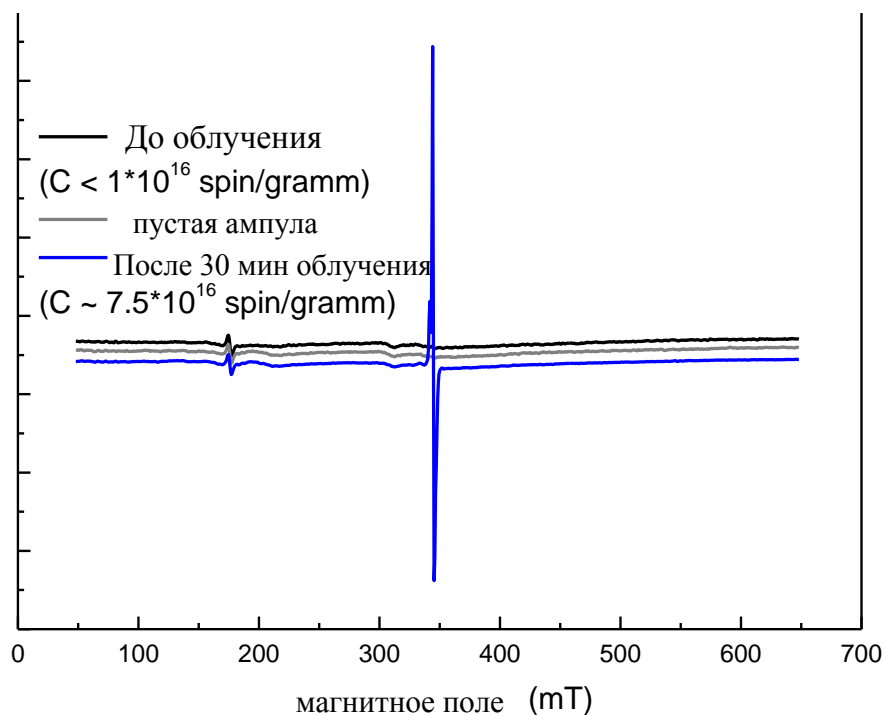


Рисунок 19 — ЭПР спектр чистого ОКФ до и после облучения. Также приведен спектр пустого резонатора с ампулой

Из сравнения с образцами с известными концентрациями, можно дать верхнюю границу концентрации радиационно-наведенных парамагнитных центров в номинально чистом ОКФ, что составит не более $1 \cdot 10^{16}$ спин/грамм. Таким образом использование комбинированного подхода исследования исходных и радиационно-облученных образцов позволяет количественно и качественно оценить наличие дополнительных примесей не только в ГА и ТКФ, но и в ОКФ.

Для выяснения природы радиационных центров в облученных образцах были подробно записаны сигналы ЭПР в центральной области спектра (диапазон поля ~ 300 - 400 мТл, рисунок 20).

Из сравнения с образцами с известными концентрациями, можно дать верхнюю границу концентрации парамагнитных центров в номинально чистом ОКФ, что составит не более $1 \cdot 10^{16}$ спин/грамм.

В облученном образце были подробно записаны сигналы ЭПР в центральной области спектра (диапазон поля ~ 300 - 400 мТл).

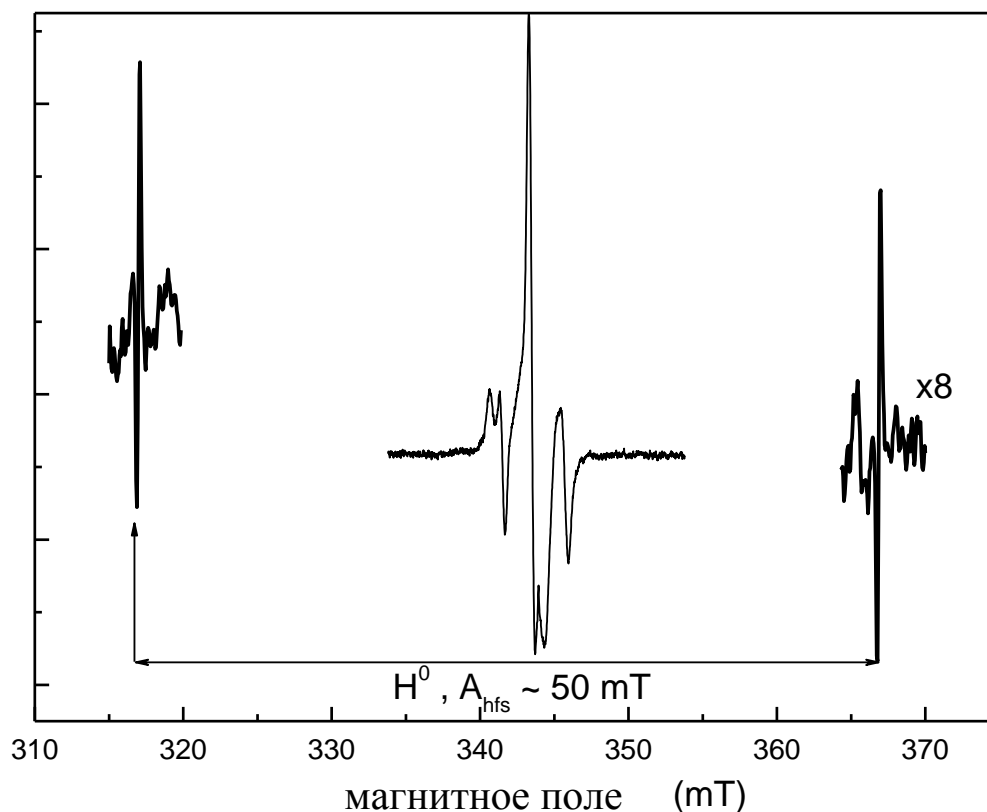


Рисунок 20 – ЭПР спектр ОКФ в центральной области и сигналов от H_0

По характерному расщеплению порядка 50 мТл между парой слабоинтенсивных линий, и группу сигналов в центре спектра на $g=2$, можно судить о наличии парамагнитного центра H^0 , который обычно всегда возникает в образцах, синтезированных методом твердофазного синтеза. Если рассмотреть группу сигналов в центре детальнее, то можно сравнить сигналы, записанные в стационарном и импульсном режимах. Для этого проведем либо интегрирование спектра стационарного режима (CW, левая панель рисунка 21), либо продифференцируем спектр импульсного ЭПР (ESE правая панель рисунка 21).

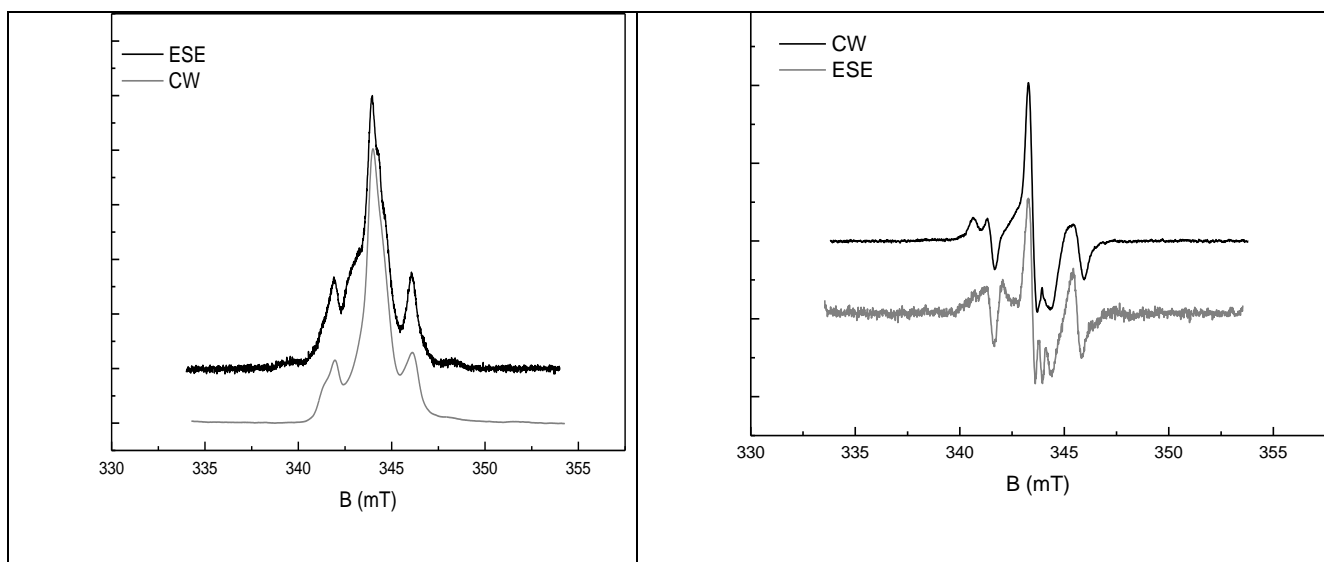


Рисунок 21 – Сравнение спектров CW и ESE .Слева- спектр ESE и проинтегрированный спектр CW, справа- спектр CW и продифференцированный спектр ESE

Видно, что присутствует несколько типов парамагнитных центров, возникающих в номинально чистом образце под воздействием рентгеновского облучения, относящихся, предположительно, к азотным (NO_3^{2-}) и карбонатным (CO_2^- , CO_3^{3-}) центрам.

Одна из возможностей разделения разных центров – изменение падающей СВЧ мощности. Пример для образца ОКФ, замещённого барием с 10% концентрацией приведен на рисунке 22.

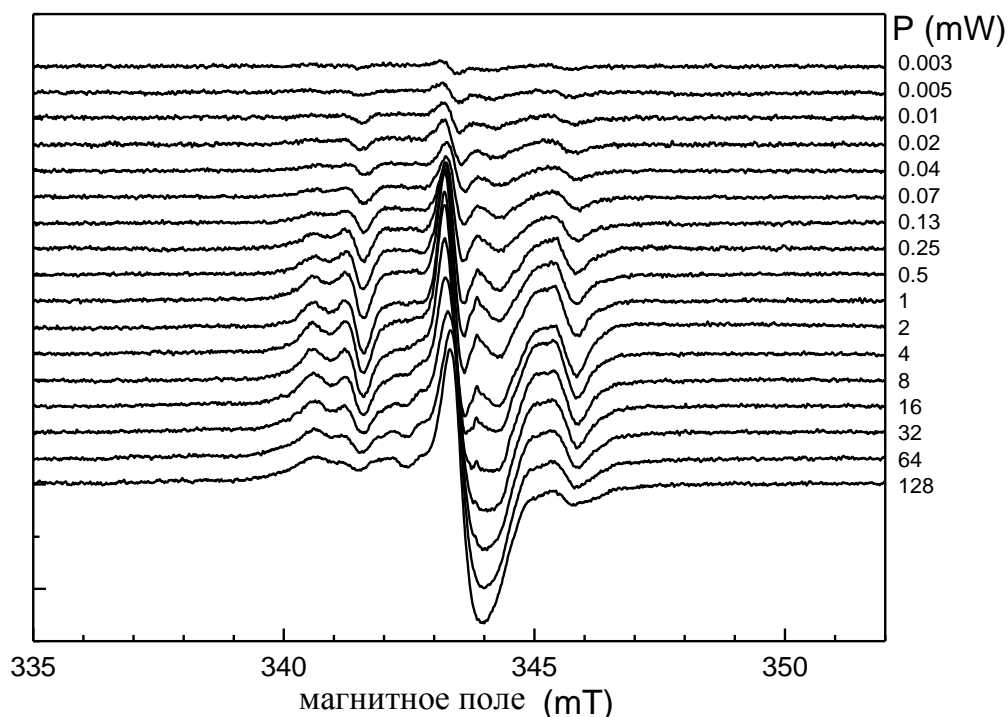


Рисунок 22 – Спектр ЭПР ОКФ с 10% Ва в зависимости от падающей СВЧ мощности

Структурный сигнал насыщается при мощности ~ 10 мВт, бесструктурная линия в центре (centralpeak) продолжает увеличиваться при увеличении мощности, что говорит о том, что природа центрального пика отличается от других «боковых» пиков (иными словами времена электронной релаксации, по крайней мере одного из парамагнитных центров, дающих вклад в сигнал этого пика, короче, чем для парамагнитных центров, дающих вклады в «боковые» сигналы). Анализ литературы показывает, что не существует данных по параметрам радиационно-наведенных центров в ОКФ. Хорошо изучены природные и синтетические кристаллы и порошки ГА, но даже для них природа многих радиационно-наведенных сигналов ЭПР остается непонятной [37]. В таблицах 4-7 приведены данные для некоторых известных из литературы азотных, фосфорных, кислородных и углерод центрированных радикалов [38-40].

Используя литературные данные мы симулировали спектры ЭПР наиболее часто встречающихся радиационных парамагнитных центров, используя программу EasySpin [41] в импульсном и непрерывном режимах. Результаты для ряда симуляций приведены на рисунках 23-25.

Таблица 4 – Параметры карбонатных-производных радикалов в ряде материалов (параметры СТС от изотопа ^{13}C , в МГц). НAp= гидроксиапатит; sc= кристалл; po=порошок

Радикал		g_x	g_y	g_z	g_{izo}	Ax	Ay	Az	Aiso
CO_2^-	CaCO ₃	2.0032	1.9972	2.0016	2.0006	379	369	496	415
	НAp, sc	2.0027	1.9974	2.0027	2.0009				
	MgO	2.0030	1.9970	2.0015	2.0005	513	506	630	550
	HaA, po				2.0006				410
	НAp, po	2.0030	1.9970	2.0015	2.0005	460	556	445	487
O-CO ⁻	MgO	2.0035	1.9970	2.0028	2.0011	485	478	600	521
CO_3^{3-}	CaCO ₃	2.0031	2.0031	2.0013	2.0025	312	312	480	368
CO_3^{3-}	CaCO ₃	2.0162	2.0162	2.0051	2.0125	26.5	26.5	36.8	29.9
	CaCO ₃	2.0132	2.0194	2.0055	2.0127				
CO ⁻	MgO	2.0055	2.0055	2.0021	2.0044	75.8	30.9	0	35.8
	НAp, po	2.0061	2.0061	2.0019	2.0047				
	НAp, po	2.0058	2.0041	2.0023	2.0041				

Таблица 5 – Параметры азот-центрированных радикалов в гидроксиапатитах (НАр) и других матрицах (переделать под свои обозначения)

Радикал	Матрица/условия	g_x	g_y	g_z	A_x	A_y	A_z
NO_2^{2-}	Апатит, 77 К	2.0014	2.0067	2.0051	0.4	0.5	3.88
NO_3	KNO_3 кристалл-irr EPR/77	2.0075	2.0075	2.0018	0.06	0.12	0.22
NO_3^{2-}	ГА, X-irr, RT	2.006	2.006	2.0019	3.4	3.4	6.8
	ГА, X-irr, RT	2.0061	2.0061	2.0028	3.18	3.18	6.83
	ГА, X-irr, RT	2.0057	2.0052	2.0017	3.27	3.27	6.70
	Нано-ГА, X-irr., 50–300 К	2.0052	2.0052	2.0011	3.35(35)	3.35(35)	6.65(40)

Таблица 6 – Параметры кислородных радикалов в апатитах

Радикал	Матрица	g_x	g_y	g_z
O_2^-	Апатит	1.9512	1.9551	2.4360
O_3^-	Зубная эмаль	2.0032	2.0182	2.0118
O^-	ГА	2.041	2.039	2.0010

Таблица 7 – Параметры фосфатных радикалов в апатитах

Радикал	Матрица	g_x	g_y	g_z	A_x	A_y	A_z
PO_4^{2-}	Апатит	2.0062	2.0062	2.030	3.08	3.08	2.20

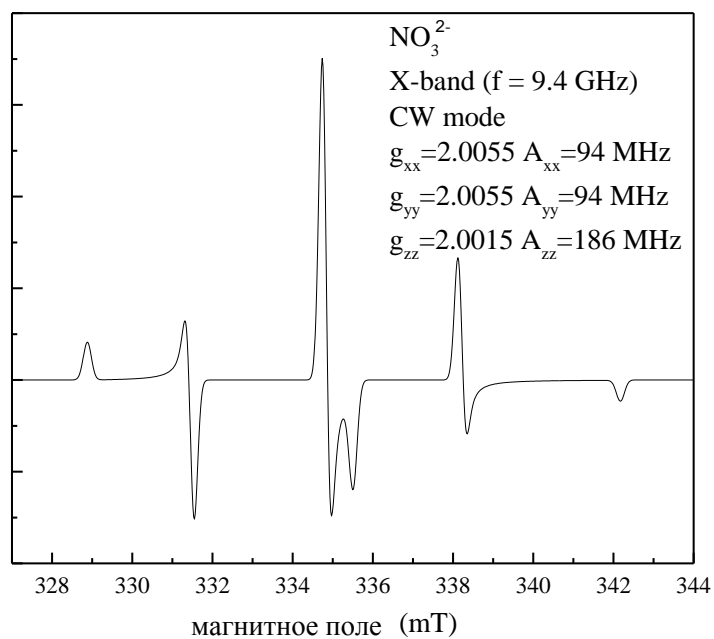


Рисунок 23 – Симулированный спектр ЭПР азотного радикала NO_3^{2-} в непрерывном режиме. Параметры симуляции указанные на рисунке

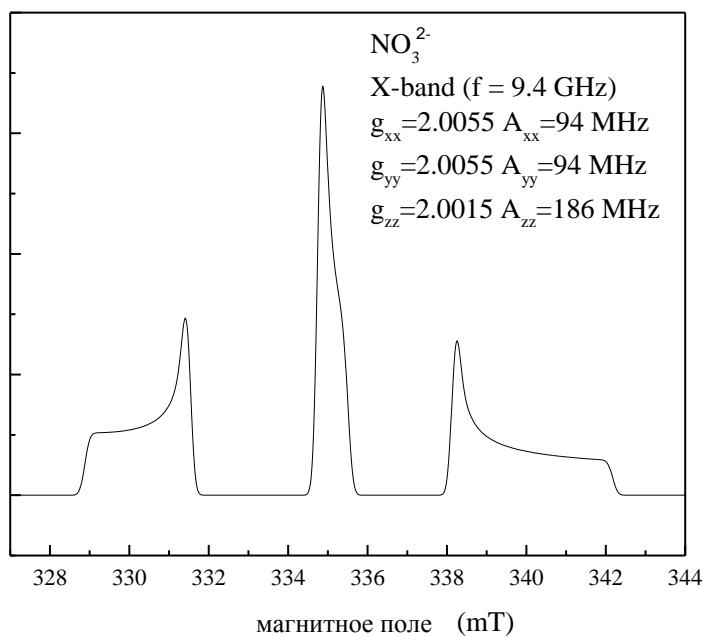


Рисунок 24 – Симулированный спектр ЭПР азотного радикала NO_3^{2-} в импульсном режиме. Параметры симуляции указанные на рисунке

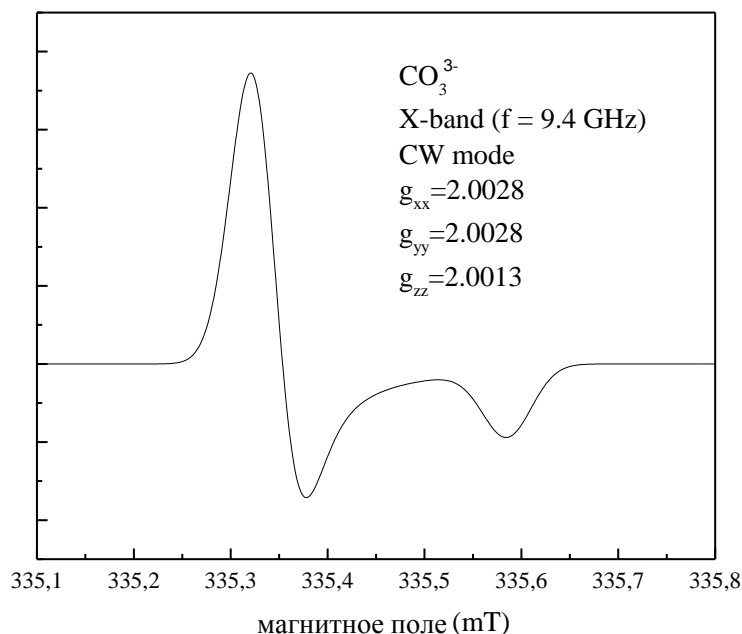


Рисунок 25 – Симулированный спектр ЭПР углерод центрированного радикала в непрерывном режиме. Параметры симуляции указанные на рисунке

Мы подробно изучили поведение сигнала в диапазоне магнитных полей 340-350 мТ. На рисунке 22 представлена зависимость спектра от мощности СВЧ. Можно выделить по крайней мере два разных типа парамагнитных центров: в то время как интенсивность и амплитуда широкой линии в середине спектра с шириной линии 1 мТл растет с мощностью (обозначается как парамагнитный центр 1, ПЦ1), тогда как второй «структурный» парамагнитный центр (ПЦ2) с максимальным расщеплением 55 мТ начинает насыщаться уже при $PMW = 10$ мВт.

Линейная форма парамагнитного центра 1 напоминает те, что относятся к стабильным карбонатным радикалам в ГА. Для детального изучения природы ПЦ1 мы измерили поперечные (T_2) и продольные (T_1) времена релаксации при $T = 100$ К импульсными методами ($\pi/2$ - τ - π и π - T - $\pi/2$ - τ - π импульсные последовательности, соответственно) в магнитном поле, соответствующем

максимуму сигнала ЭСЭ на рисунке 21. Кривая T_2 может быть описана только одним экспоненциальным распадом с $T_2 = 1.8 \mu\text{s}$. Кривая T_1 представлена на рисунке 26.

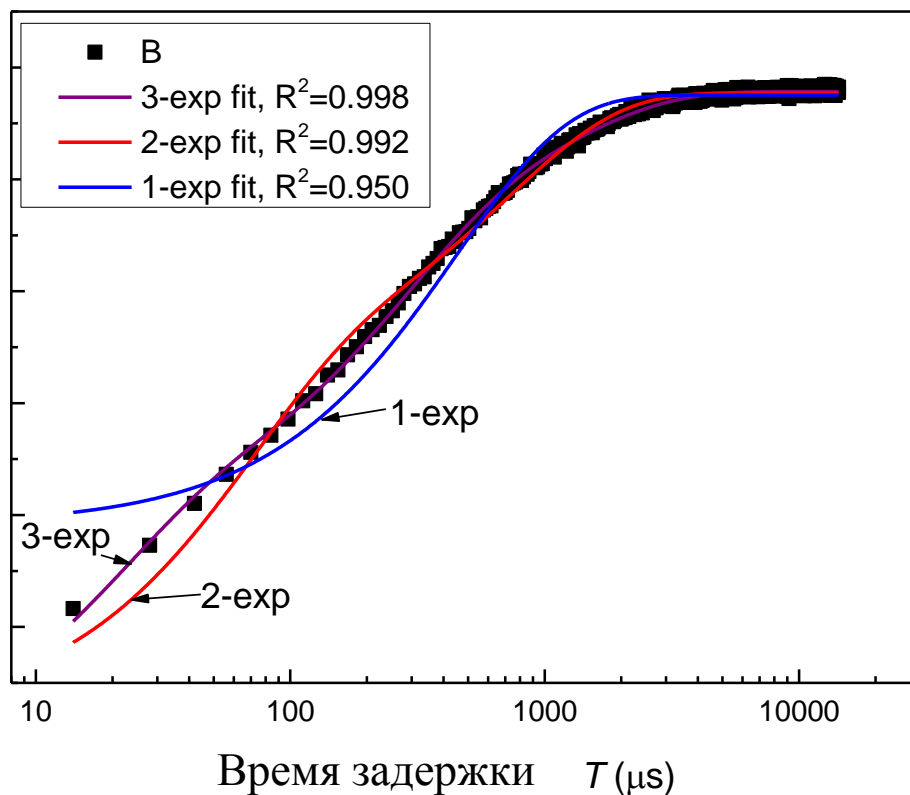


Рисунок 26– Кривая T_1 (заполненные квадраты) с аппроксимацией на несколько экспонент

Экспериментальные точки на кривой T_1 были аппроксимированы одним, двумя и тремя показателями:

$$y = y_0 + a * \exp\left(-\frac{T}{T_1}\right) \quad (13)$$

$$y = y_0 + a_1 * \exp\left(-\frac{T}{T_1^{(1)}}\right) + a_2 * \exp\left(-\frac{T}{T_1^{(2)}}\right) \quad (14)$$

$$y = y_0 + a_1 * \exp\left(-\frac{T}{T_1^{(1)}}\right) + a_2 * \exp\left(-\frac{T}{T_1^{(2)}}\right) + a_3 * \exp\left(-\frac{T}{T_1^{(3)}}\right) \quad (15)$$

Соответствующие времена $T_1 = 0.5$ мс; (2) $T_1^{(1)} = 0.06$ мс, (3) $T_1^{(2)} = 0.7$ мс; $T_1^{(1)} = 0.02$ мс, $T_1^{(2)} = 0.2$ мс, $T_1^{(3)} = 1.2$ мс. Как следует из рисунка 23 трехэкспоненциальное описание является лучшим. Мы предположили, что центр с самым длинным T_1 соответствует ПЦ1, а ПЦ2 по аналогии с ГА, в облученных образцах обусловлены устойчивыми NO_3^{2-} -ионами, которые заместили положение PO_4^{3-} в структуре ГА. Их порошковые спектры ЭПР могут описываться спин-гамильтонианом осевой симметрии

$$H = g_{\parallel}\beta B_z S_z + g_{\perp}\beta(B_x S_x + B_y S_y) + A_{\parallel} S_z I_z + A_{\perp}(S_x I_x + S_y I_y), \quad (16)$$

где g_{\parallel} и g_{\perp} - основные компоненты g-тензора, A_{\parallel} и A_{\perp} - основные компоненты сверхтонкого тензора, B_i , S_i и I_i - проекции напряженности внешнего магнитного поля, $S = 1/2$ и $I = 1$ - соответственно электронный и ядерный спины на $i = \{x, y, z\}$ координатную ось, β - магнетон Бора. Спектры ГА могут быть правильно смоделированы, если мы предполагаем гауссовское (непрерывное) распределение A_{\parallel} с отклонением 0,40 мТл от среднего значения 6,65 (40) мТл и дискретным распределением A_{\perp} вокруг 3,37 (5) мТл, а компоненты g-факторов для всех модификаций полученного радикала одинаковы ($g_{\parallel} = 2.0011(1)$, $g_{\perp} = 2.0052(1)$)

Заключение

В данной работе мы исследовали ряд номинально чистых и допированных различными катионами порошков фосфатов кальция, таких как гидроксиапатит, трикальцийфосфат и октакальций фосфат, широко применяемых для замещения костной ткани. Впервые были исследованы поликристаллы ОКФ методами стационарного и импульсного электронного парамагнитного резонанса. Были зарегистрированы спектры ЭПР радиационных наведенных парамагнитных центровв ОКФ. Удалось идентифицировать ряд из них, обусловленных наличием стабильных водородных, углерод центрированных и азотных радикалов. Впервые получены спектры ЭСЭ в образцах ОКФ при комнатной температуре, что открывает возможность изучения ФК при комнатной температуре импульсными методами ЭПР. Полученные данные могут использоваться в целях оптимизации процессов синтеза образцов.

Благодарности

Выражаю благодарность Б.В.Явкину, А.А. Родионову, Ф.Ф. Мурзаханову, Г.В. Мамину за помощь в проведении экспериментов и обсуждении результатов и фонду РФФИ за частичную финансовую поддержку (№ 18-32-00337).

Публикации по теме работы

- 1) Гафуров М.Р. Исследования номинально чистых и замещенных гидроксиапатитов и трикальцийфосфатов техниками электронного парамагнитного резонанса [Текст] / М.Р. Гафуров, Б.Ф. Габбасов, А.С. Старшова, С.Б. Орлинский, Г.В. Мамин// Всероссийское совещание Биоматериалы в медицине: программа и сборник тезисов докладов - Москва: ИМЕТ РАН, 2017. - С. 12-13.
- 2) Gabbasov B, Conventional, pulsed and high-field electron paramagnetic resonance for studying metal impurities in calcium phosphates of biogenic and synthetic origins [Text] / B. Gabbasov, M. Gafurov M, A.Starshova //Journal of Magnetism and Magnetic Materials. DOI: /10.1016/j.jmmm.2018.02.039.

Список литературы

1. Григорьян, А.С. Проблемы интеграции имплантатов в костную ткань (теоретические аспекты) [Текст] / А.С. Григорьян, А.К. Топоркова. – М.: Техносфера, 2007. – 128с.
2. Гурин, А.Н. Керамика из цинк- и железосодержащих гидроксоапатитов для остеопластики [Текст] / А.Н. Гурин, В.С. Комлев, И.В. Фадеева, С.М. Баринов // М.: Материаловедение. – 2012. – С.45-56.
3. Гурин, А.Н. Октакальций фосфат – прекурсор биологической минерализации, перспективный остеопластический материал [Текст] / А.Н. Гурин, В.С. Комлев, И.В. Фадеева, С.М. Баринов // М.: Стоматология. – 2010. – С.65-72.
4. Ginebra, M.P. Calcium phosphate cement as bone drug delivery systems [Text] / M.P. Ginebra, T. Traykova, J. Planell // J. Control Rel. – 2006. – Vol.113. – P.102-110.
5. Ambard, A. Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties [Text] / A. Ambard, J. Mueninghoff // J. Proshodont. – 2006. – №15. – P.321-328.
6. Hench, L. Ceramics, glasses and glass-ceramics [Text] / L. Hench, S. Best // Biomaterials Science. – New York : Elsevier. – 2004. – P.123-150.
7. Путляев, В.И. Современные биокерамические материалы [Текст] / В. И. Путляев // Соросовский образовательный журнал. – 2004. – № 1. – С. 44–50.
8. Подрушняк, Е.П. Перспективы использования стеклокерамики, содержащей биологический гидроксипатит для восстановления костной

- ткани [Текст] / Е.П. Подрушняк, Л.А. Иванченко, А.Т. Брусско // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2000. – № 2. – С. 129–130.
9. Муравьев, Э.Н. Квантово-химическое исследование электронной структуры и изоморфного замещения в гидроксиапатите кальция [Текст] / Э.Н. Муравьев, П.Н. Дьячков, О.М. Кепп // Ж. неорганическая химии. – 1996.– №.9.– С.1416–1419.
- 10.Вавилова, Т.П. Биохимия тканей и жидкостей рта: учебное пособие [Текст] / Т.П.Вавилова .:М, 2008. – 208с.
- 11.Pan, Y. Composition of the apatite group minerals: substitution mechanism and controlling factors [Text] / Y.Pan, M.Fleet // Phosphates: geochemical, geobiological and materials importance. Reviews in mineralogy and geochemistry. – 2002. – Vol.48.– P.13–49.
- 12.Фадеева, И.В. Синтез и структура магнийсодержащих гидроксиапатитов [Текст] / И.В. Фадеева, Л.И. Шворнева, С.М. Баринов, В.П. Орловский // Неорганические материалы. – 2003.– Т. 39. № 9. – С. 1102–1105.
- 13.Кубарев, О.Л. Биоактивная композиционная керамика в системе гидроксиапатит – трикальцийфосфат [Текст] / О.Л. Кубарев, В.С. Комлев, М. Маитц, С.М. Баринов // ДАН.– 2007.– Т.413, №3.– С.1-3.
- 14.Roux, P. Chimie minerale—sur une nouvelle forme cristalline de phosphate tricalcique [Text] / P. Roux , D. Louer , G. Bonel // Compt. Rend. Acad. Sc. Paris. – 1978. – V. 286.– P. 549-551.
- 15.Mathew M. Structures of biological minerals in dental research [Text] / M. Mathew, S. Takagi // J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol. – 2001.– V.106. – P.1035-1044.
- 16.Terminе, J.D. Comparative chemistry of amorphous and apatitic calcium phosphate preparations [Text] / J.D. Terminе., E.D. Eanes // J. Calcif. Tiss. Res. – 1972. – V. 10. – P. 171-197

17. Gibson, I. R. Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to β -tricalcium phosphate [Text] / I. R. Gibson, I. Rehman, S. Best, W. Bonfield // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2000. – V.11. – P.533-539.
18. Kwon, S-H. Synthesis and dissolution of β -TCP and HA/ β -TCP composite powders [Text] / S-H. Kwon, Y-K. Jun, S-H. Hong, H-E. Kim // *J. Eur. Ceramic Society.* – 2003. – V.23. – P.1039–1045.
19. Mathew, M. Crystal-Structure of Alpha- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [Text] / M. Mathew, L.W. Schroeder, B. Dickens, W.E. Brown // *Acta Crystallographica Section B-Structura Science.* – 1977. – T. 33. – № 13. – C. 1325-1333.
20. Yashima, M. Crystal structure analysis of β -tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ by neutron powder diffraction [Text] / A. Sakai, T. Kamiyama, A. Hoshikawa // *Journal of Solid State Chemistry* – 2003. – V 175. – P. 272-277.
21. Matsumoto, N. Thermal stability of β -tricalcium phosphate doped with monovalent metal ions [Text] / N. Matsumoto, K. Yoshida, K. Hashimoto, Y. Toda // *Materials Research Bulletin*– 2009. – №44 – P.1889–1894.
22. Araujo, J.C. Maximum substitution of magnesium for calcium sites in Mg-TCP structure determined by X-ray powder diffraction with the Rietveld refinement [Text] / J.C. Araujo, M.S. Sader, E.L. Moreira, V.C.A. Moraes, R.Z. LeGeros // *Materials Chemistry and Physics*– 2009.–№118 –P.337–340.
23. Bjerre, L. Flow perfusion culture of human mesenchymal stem cells on silicate-substituted tricalcium phosphate scaffolds [Text] / L. Bjerre, C.E. Bunger, M. Kassem, T. Mygind // *Biomaterials*– 2008.– №29–P.2616–2627.
24. Brown W.E. Octacalcium phosphate and hydroxyapatite [Text] / W.E. Brown., J.P. Smith, J.R. Lehr et al. // *Nature* –1962.–Vol.19–P.1048—1055.
25. Ijima, M. Effects of F— on apatite-octacalcium phosphate intergrowth and crystal morphology in a model system of tooth enamel formation [Text] / M. Ijima, H. Tohda, H. Suzuki et al. // *Calcif Tissue Int* –1992.– Vol.50–P.357—361.

26. Coombes, A.G. Resorbable synthetic polymers as replacements for bone graft [Text] / A.G. Coombes, M.C. Meikle // Clin Mater –1994.–Vol.17 – P.35—67.
27. Rau, J.V. FTIR study of carbonate loss from carbonated apatite in the wide temperature range [Text] / J.V. Rau, S. Nunziante Cesaro, D. Ferro, S.M. Barinov, I.V. Fadeeva // J. Biomed. Mater. Res. –2004. –V.71B.– P.441-447.
28. Köhl, G. Hydrogenphosphat- und carbonat apatit [Text] / G. Köhl, W.H. Nebergal // Z. Anorg. Allgem. Chem.– 1963.– V.324. –P.313-320.
29. Бузник, В.М. Структурные изменения в карбонатзамещенном гидроксиапатите при высоких температурах: исследования методами ЯМР ¹H- и КР-спектроскопии [Текст] / В.М. Бузник, С.Г. Козлова, С.П. Габуда, С.М. Баринов, В.Ю. Бибииков, И.В. Фадеева, В.С. Комлев // ДАН. – 2007. –Т. 413.– № 2. – С. 198-201.
30. Bigi, A. Synthesis and characterization of magnesium substituted hydroxyapatite [Text] / A. Bigi, L. Compostella, A.M. Fishera et al. // J. Inorg. Biochem. –1988.– V.34. –P. 35-37.
31. Фадеева, И.В. Цинк- и серебросодержащие гидроксиапатиты: синтез и свойства [Текст] / И.В. Фадеева, Н.В. Бакунова, В.С. Комлев, Л.И. Медвецкий и др // Доклады Академии наук. – 2012. –Т. 442. –№ 6. –С. 780.
32. Bakunova, N.V. A method of fabrication of porous carbonated hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering [Text] / N. V. Bakunova, V. S. Komlev, A. Y. Fedotov, I. V. Fadeeva et al // Powder Metallurgy Progress.–2008.– V.8.– №4.– P.336-342.
33. Эмануэль, Н.М. Электронный парамагнитный резонанс [Текст] / Н.М. Эмануэль, М.Г. Кузьмина // М.: Мир, 1985. – 54с.
34. Блюмельфельд, Л.А. Электронный парамагнитный резонанс [Текст] / Л.А. Блюмельфельд, А.Н. Тихонов // Соросовский образовательный журнал. 1997.– №9. – С.91–99.

- 35.Блюменфельд Л.А. Применение электронного парамагнитного резонанса в химии [Текст] / Л.А. Блюменфельд , В.В. Воеводский , А.Г.Семенов А.Г // Изд-во Сиб. отд-ния АН СССР, 1962. – 240 с.
- 36.Мамин, Г.В. Импульсный режим спектрометра ЭПР Настройка спектрометра и измерение спектров ЭПР и релаксационных зависимостей на примере спектрометра X- диапазона фирмы Брукер серии Elexsys Методическое пособие для подготовки специалистов в области ЭПР [Текст] / Ю.С. Кутьин, Г.В. Мамин, С.Б. Орлинский, М.Р. Гафуров, Н.И. Силкин // Казань.: КФУ – 2017.– 65с.
- 37.Moens P ^1H and ^{31}P ENDOR of the isotropic CO_2^- signal at $g=2.0007$ in the EPR spectra of precipitated carbonated apatites [Text] / P. D. W. Moens, F. J. Callens, E. R. Voesman, R. M. H. Verbeeck // J. Magnetic Resonance– April 1995. – Vol. 9.– P.103–113.
- 38.Fattibene, P. EPR dosimetry with tooth enamel: A review[Text]/ P. Fattibene, F. Callens // J. Elsevier – 2010 – V.68. – P.2033–2116.
- 39.Matkovic´a, I. Characterisation of b-tricalcium phosphate-based bone substitute materials by electron paramagnetic resonance spectroscopy[Text]/ I. Matkovic´a, N. Maltar-Strmecˇki.// J. Elsevier – 2012. – V.81. – P.1621–1628.
- 40.Gafurov. M. A DFT, X- and W-band EPR and ENDOR Study of Nitrogen-Centered Species in (Nano) Hydroxyapatite [Text] / M. Gafurov, T. Biktagirov, G. Mamin, S. Orlinskii //J. Physical Chemistry Chemical Physic – 2014 – V.45 – P.1189-1203.
- 41.Stoll,S. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR [Text] / S. Stoll,A. Schweiger. –J. Magn. Reson.– 2006.– V.178(1), P.42-55.