Московский Государственный Университет

им. М.В. Ломоносова.

Курсовая Работа

Синтез нестехиометрического гидроксиапатита для получения бифазной биосовместимой керамики

Молчанова Мария 10Н

СУНЦ МГУ

Руководитель

Ларионов Дмитрий Сергеевич

ФНМ МГУ

Содержание

Приложение 1

Список использованных в работе сокращений:

ПФК – пирофосфат кальция

ГАп – гидроксиапатит;

РФА – рентгенофазовый анализ;

I. Введение

Одним из важных направлений современного неорганического материаловедения является разработка биоматериалов на основе фосфатов кальция.

В настоящее время на первый план вышел так называемый регенерационный подход лечения костных тканей, в рамках которого акцент делается на замещение биоматериала растущей костной тканью, а материалу отводят роль активного источника необходимых для построения костной ткани элементов, лишь первоначально осуществляющего опорную функцию. Материалы, применяемые для регенерации костной ткани, должны, прежде всего, ускорять процесс срастания, резорбировать и обеспечивать замену имплантата новой костной тканью. В рамках регенерационного подхода в последнее время широкое применение находят конструкции тканевой инженерии (КТИ), позволяющие снизить сроки лечения в 3-4 раза по сравнению традиционными имплантатами. КТИ представляют собой неорганическую биосовместимую пористую матрицу, в которой созданы условия для культивирования в ней клеточного материала.

Использование материалов на основе фосфатов кальция, характеризующиеся биологической совместимостью с тканями организма и активностью по отношению к соединению с костной тканью и формированию новой костной ткани, предоставляет уникальные возможности в этом направлении. Разработано и изучено много вариантов использования керамических материалов в организме: от спеченных имплантатов, несущих физиологические нагрузки, до цементов, применяемых для пластики костных дефектов, керамических средств локализованной и пролонгированной доставки лекарственных препаратов в организм, биоактивных покрытий, обеспечивающих интеграцию имплантата с костной тканью, и пористых матриксов для клеточных технологий реконструкции костных тканей.

Цель работы: синтезировать нестехиометрический гидроксиапатит для получения бифазной биосовместимой керамики.

II. Литературный обзор

2.1 Строение и свойства костной ткани

Кость - сложный материал с многоуровневой организацией, содержащий костный мозг, нервы, кровеносные и лимфатические сосуды. Кость выполняет множество функций, в том числе опорную, запасающую и т.д.

Остеоны, являющиеся основной «строительной» единицей кости, имеют вид цилиндров диаметром 100-500 мкм и длиной до нескольких сантиметров. Каждый остеон состоит из 3-25 костных пластинок, расположенных концентрически вокруг общей сердцевины - гаверсова канала (рис. 1.1) [3].

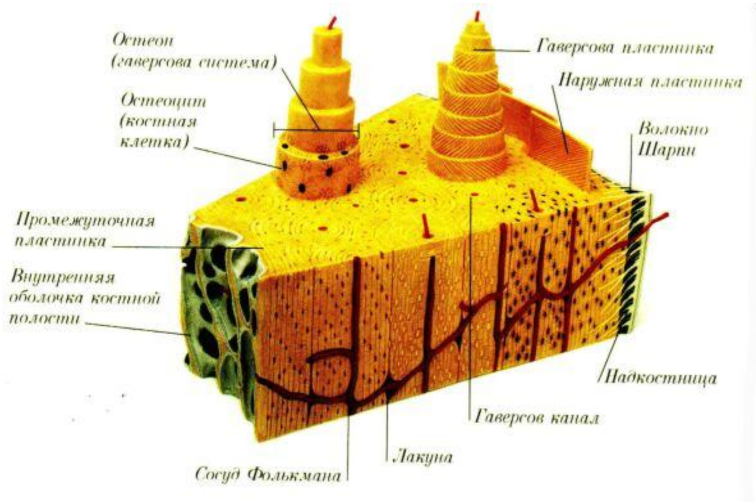


Рис. 1. Уровни организации костной ткани.

Надкостница покрывает кость снаружи и прочно прикреплена к ней толстыми пучками коллагеновых волокон, которые проникают и вплетаются в слой наружных общих пластинок кости. Эти волокна придают тканям механическую прочность на растяжение. Молекулы коллагенов состоят из трех скрученных спирально полипептидных нитей. Молекулы коллагена способны собираться в фибриллы, диаметром 100-2000 нм.

Благодаря своему строению, кость является сложноорганизованным композиционным материалом минерал-биополимер. Несмотря на низкую плотность (~ 2 г/см^3), кость обладает высокой прочностью и большой устойчивостью к образованию трещин. Характеристики костной ткани меняются в зависимости от типа кости, характера нагрузок, возраста человека [4].

В общем виде минеральный состав кости (табл. 1) приближенно можно выразить формулой $(Ca,Na)_{10-x-y}(HPO_4)_x(CO_3)_y(PO_4)_{6-x-y}(OH)_{2-x-y-z}(Cl,F)_z$,где в молодом организме x+y ~1.7, с возрастом x уменьшается,а y увеличивается [5].

Таблица 1. Химический состав костной ткани [3,6].

Состав костной ткани	*Вес, %*
Ca^{2+}	24.5
P (в форме фосфатов)	11.5
Ca/P	1.65
Na^{+}	0.7
Mg^{2+}	0.55
K^{+}	0.03
CO_3^{2-}	5.8
F^{-}	0.02
Cl^{-}	0.10
$P_2O_7^{4-}$	0.07
Всего неорг.	65.0
Всего органич.	25.0
Вода	10.0
Размер кристаллов, нм	**50 × 20 × 5**

Механическую прочность костной ткани придают коллагены – наиболее распространенные белки в организме человека (30 % от общего количества). Их молекулы состоят из трех скрученных спирально полипептидных нитей и способны собираться в фибриллы, диаметром 100 -2000 нм. Кальцификация костного матрикса протекает в межфибриллярном пространстве [6].

Кость является сложноорганизованным композиционным материалом «минерал-биополимер». На механические характеристики костной ткани влияет тип рассматриваемой кости, характер нагрузок, возраст человека. Необходимо отметить анизотропию механических свойств кости (наиболее сильное различие для свойств, измеренных вдоль и перпендикулярно оси трубчатой кости) (табл. 2) [6, 7].

Таблица 2. Механические свойства компактной кости и дентина зубов [6].

Характеристики	***Направление испытаний по отношению к оси кости***	***Дентин зубов***

	" ‖ "	" ⊥ "	
Прочность на растяжение, МПа	124 - 174	49	250 - 350
Прочность на сжатие, МПа	170 -193	133	11 - 17
Прочность на изгиб, МПа	160[a]	-	21 - 53
Модуль Юнга, ГПа	17 - 27	11.5	11 - 19
Трещиностойкость, K_{1C}, МПа*м$^{1/2}$	2 - 12[a]	-	12

2.2 Требования к материалам – заменителям костной ткани

Биоматериалы, претендующие на роль имплантатов, должны обладать следующими свойствами и характеристиками:

1) химические свойства – отсутствие нежелательных химических реакций с тканями и межтканевыми жидкостями, отсутствие коррозии;

2) механические характеристики биокерамики должны быть близкими к таковым для кости(например, различие в упругости может привести к утрате имплантата вследствие резорбции находящегося с ним в контакте костного вещества;

3) биологические свойства – отсутствие реакций со стороны иммунной системы организма, срастание с костной тканью, стимулирование процесса образования костной ткани(остеосинтеза);

4) для быстрого прорастания костной ткани в имплантат необходимо наличие в последнем сквозных пор размером не менее 100-150 мкм.

Все многообразие биоматериалов классифицируют по нескольким признакам. С точки зрения действия биоматериалов на ткани организма, биосовместимые материалы разделяют на биотолерантные, биоинертные и биоактивные :

- *Биотолерантные материалы* в имплантированном состоянии из-за малого сродства с костной тканью отделены от нее сравнительно толстыми промежуточными слоями (металлические сплавы, полимеры).
- *Биоинертные материалы* характеризуются слабым взаимодействием с костной тканью, после пересадки и вживления отделены от последней тонкими промежуточными слоями и слабо фиксированы в тканях организма (материалы на основе оксида алюминия и циркония).

- *Биоактивными материалами* являются материалы на основе фосфатов кальция, например ГАП, ТКФ и др.

С точки зрения действия тканей организма на имплантат можно выделить материалы *биорезистивные* (ГАП) *и биорезорбируемые* (ТКФ, фосфатные биостекла). Биорезистивность – свойство материала, характеризующее его химическую и структурную устойчивость к воздействию тканей и среды организма. Биорезорбируемость характерна для некоторых кальцийфосфатных материалов, которые, деградируя, являются источником компонентов для формирования фосфатов кальция в организме.

2.3 Конструкции тканевой инженерии для биомедицинского применения

Тканевая инженерия направлена на создание искусственных тканей и органов для терапевтической реконструкции поврежденных органов посредством доставки опорных структур, клеток, молекулярных и механических сигналов для регенерации в область дефекта. Регенеративные методы лечения используют конструкции тканевой инженерии (КТИ) для восстановления биологических функций, т.е. регенерации ткани, а не синтетический материал для его простого замещения.

КТИ предназначены для создания условий регенерации тканей. КТИ состоят из жесткой опорной структуры (матрицы) и содержат клетки, молекулярные и механические сигналы, способные локально инициировать регенеративные процессы в области дефекта [8]. КТИ способствуют восстановлению биологической целостности поврежденного органа и его функциональной активности в 3-4 раза быстрее в сравнении с традиционно применяемыми алло-транспарантами или синтетическими материалами.

2.4 методы получения гидроксиапатита

ГАп можно получать либо растворными методами, либо в ходе твердофазного синтеза.

$$10Ca(NO_3)_2 + 6(NH_4)_2HPO_4 + 8H_2O = Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2\downarrow + 20NH_4NO_3 \quad (1)$$

$$10Ca(OH)_2 + 6H_3PO_4 = Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2\downarrow + 18H_2O \quad (2)$$

Если осаждать ГАп из раствора с начальным отношением Ca/P=1,667, при pH = 7, то получается ГАП с отношением близком к 1.50, причём отношение Ca/P возрастает с увеличением pH. Используя этот метод, можно получать соединения, имеющие отношение Ca/P от 1,511 до 1,663.

Если порошок с отношением Ca/P = 1,511 осаждать при 30 °C, pH = 7, то получается отношение реагентов Ca/P = 1,50 с точностью до 1%. Уменьшение значения pH от 7 до 6,5 приводит к падению отношения Ca/P от 1,511 до 1,50.

При pH > 8 и температуре выше 90 °C с высокой точностью(+/- 0,001) получается ГАп с отношением Ca/P=1,667 $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$.

Твердофазный синтез позволяет получать крупнокристаллический материал с заданным отношением Ca/P, но требует продолжительного нагревания при температуре 1000–1300°C. Отжиги при высокой температуре применяются и для спекания предварительно полученных (например, растворными методами) порошков при создании фосфатных керамики:

$$6CaHPO_4 \bullet 2H_2O + 4CaO = Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 4H_2O\uparrow, \qquad (3)$$

$$10CaCO_3 + 6(NH_4)_2HPO_4 = Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 10CO_2\uparrow + 12NH_3\uparrow + 8H_2O\uparrow. \qquad (4)$$

2.5 Спекание (понятие, механизмы), реакционное спекание

Спекание представляет собой процесс уплотнения и консолидации частиц порошковой массы под действием высоких температур. Следствием спекания является упрочнение материала. Керамический материал медицинского назначения должен обладать достаточной прочностью, близкой к прочности костной ткани; высоким сопротивлением усталости при воздействии статических и динамических нагрузок, особенно в коррозионно-активной среде организма, а также удовлетворительной вязкостью разрушения.

При спекании выделяют следующие основные процессы:

- уплотнение материала, связанное с изменением количества, размеров и формы пор;
- рекристаллизация;
- возврат, или снижение и выравнивание остаточных напряжений;
- превращения, химические реакции.

III. Экспериментальная часть

3.1 Физико-химическая характеристика материалов, использованных в работе

Дигидрофосфат аммония, $NH_4H_2PO_4$ – бесцветные кристаллы, разлагается с выделением NH_3, $t_{пл}$ = 192 °C, практически нерастворим в ацетоне, плохо растворим в спирте.

Нитрат кальция, $Ca(NO_3)_2$•$4H_2O$ – бесцветные кристаллы, плавящиеся в кристаллизационной воде при 42,7 °C. Выше 51,1 °C кристаллизуется безводная соль, плотность 2,36 г/см^3. При плавлении разлагается. Нитрат кальция сильно гигроскопичен. Растворимость: 127 г безводно нитрата кальция в 100 г H_2O (при 20 °C).

Аммиак водный, NH_3 – водный раствор аммиака, бесцветная прозрачная жидкость с характерным острым запахом, обладает слабощелочной реакцией из-за протекания реакции гидролиза.

3.2 Подготовка образцов

3.2.1 Получение нестехиометрического апатита методом осаждения из водных растворов

Синтез апатита проводили методом осаждения из водных растворов солей. Для этого к 50 мл 0,3 М раствора $NH_4H_2PO_4$ при непрерывном перемешивании прикапывали раствор 0,5 М $Ca(NO_3)_2$ общим объёмом 45 мл (раствор готовили из $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (хч., Лабтех)). Прикапывание осуществляли на приборе Mettler Toledo T50 в режиме pH-статирования. Для проведения эксперимента была задана программа с циклом, включающий в себя попеременное добавление раствора (0,5 мл за цикл) и доведение кислотности среды до заданной путём добавления раствора аммиака. После конца протекания реакции проводилось перемешивание в течение 30 минут. Общее время синтеза составляло около двух часов.

Полученный осадок фильтровали на воронке Бюхнера. Снятый с фильтра осадок сушили на воздухе в течение 12 часов, а затем дезагрегировали в ступке. Образцы полученных веществ были отданы на рентгенофазовый анализ.

3.2.2 Формование образцов

Одноосное одностороннее прессование таблеток из порошков массой 0.2 г проводили на ручном прессе Carver C (США), при давлении ~ 5 МПа.

3.2.3 Обжиг образцов

Прессовки отжигали при температурах 900 и 1100°С в течение 2 и 6 часов. Скорость нагрева была 5 °С/мин, образцы охлаждали с печью.

3.3 Методы исследования образцов и обработка экспериментальных данных

В данном разделе рассмотрены методы исследования, применявшиеся в данной работе, а также методики, используемые для обработки экспериментальных данных.

3.3.1 Рентгенографические исследования. Качественный рентгенофазовый анализ

Качественный рентгенофазовый анализ проводили на дифрактометре Rigaku D/Max-2500 с вращающимся анодом (Япония). Съёмку проводили в режиме на отражение (геометрия Брегга-Брентано) с использованием Cu Kср. излучения (длина волны λ = 1.54183 Å). Параметры работы генератора: ускоряющее напряжение 40 кВ, ток трубки 200 мА. Съёмку проводили в кварцевых кюветах без усредняющего вращения. Для закрепления порошковых образцов не использовали растворители. Параметры съёмки: интервал углов 2θ = 3-70 °, шаг по 2θ 0.02 °, скорость регистрации спектров 5 °/мин. Для коррекции спектра в качестве внутреннего стандарта использовали порошок кремния (ASTM). Качественный анализ полученных рентгенограмм проводили с помощью программы WinXPOW при использовании базы данных ICDD PDF-2. Профильный анализ спектров и определение значений параметров решётки осуществляли в программе WinXPOW.

3.3.2 Растровая электронная микроскопия

Исследование микроструктуры образцов проводили на растровом электронном микроскопе с автоэмиссионным источником LEO SUPRA 50VP (Carl Zeiss, Германия). Для исследования образцы наклеивали на медную подложку при помощи проводящего углеродного клея и напыляли на них слой углерода или золота (напылительные установки Univex300 - Leybold, Германия; Fine Coat - JEOL, Япония). Ускоряющее напряжение электронной пушки составляло 5-20 кВ. Изображения получали во вторичных электронах при увеличениях до 100000× и регистрировали в оцифрованном виде на ЭВМ.

3.3.3 Измерение геометрической плотности

Геометрические параметры образцов до и после обжига измерялась с помощью микрометра Digital Calliper.

IV. Результаты. Обсуждение результатов

Для всех серий полученных обжигом образцов были проведены рентгеновские исследования, результаты которых приведены на рис. 4-6.

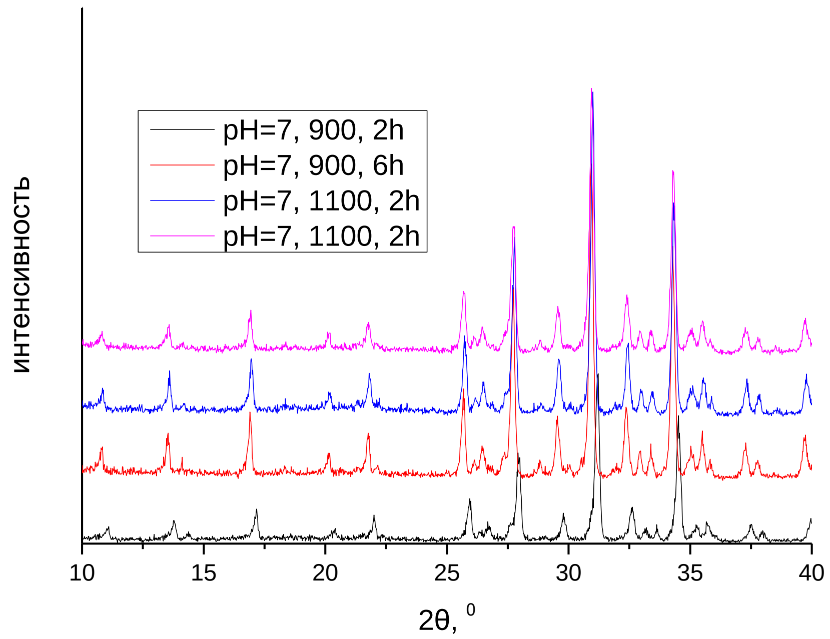


Рис. 3. Рентгенофазовый анализ образцов, полученных обжигом при pH = 7.

Данные РФА показали формирование чистого ортофосфата кальция в β-модификации (см. рис. 3) для всех образцов с незначительной примесью непроидентифицированных соединений. Это противоречит данным, согласно которым основным фактором, определяющим состав осадка, а значит и отношение Ca к P, является кислотность среды. По-видимому, относительно низкая температура получения приводит к формированию аморфного фосфата кальция с отношением Ca/P, находящимся в строгом соответствии с отношением Ca/P в растворе. Ввиду относительно небольшого времени синтеза (2 часа) старение осадка не происходит, в противном случае наблюдалось бы постепенный выход в раствор ортофосфат-ионов (в протонированных формах) и постепенное смещение отношения Ca/P в осадке в сторону 1,67. Результатом обжига тогда стала бы двухфазная смесь ТКФ/ГАп.

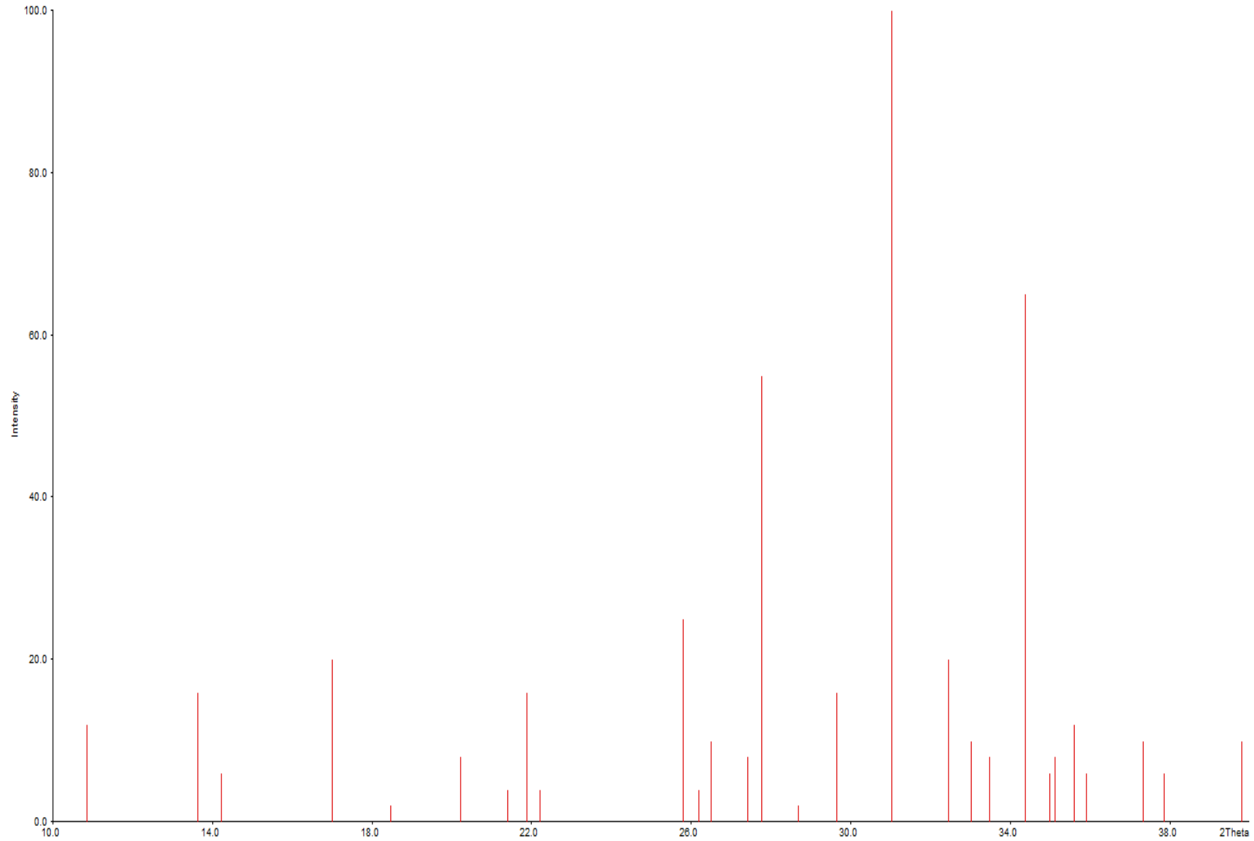


Рис. 4. Рентгенограмма $Ca_3(PO_4)_2$ базы PDF-2 ICDD

До и после обжига были измерены масса и геометрические параметры образцов. Полученные данные приведены в таблицах 3-5.

Таблица 3. Масса и геометрические параметры образцов, синтезированных при pH = 9 до и после обработки.

pH = 9	900				1100			
	2 ч	6 ч	***2 ч***	***6 ч***	2 ч	6 ч	***2 ч***	***6 ч***
масса, г	0,197	0,196	***0,202***	***0,196***	0,200	0,198	***0,199***	***0,197***
плотность, г/см3	1,70	1,82	***1,57***	***1,57***	1,99	1,74	***1,68***	***1,59***
высота, мм	2,30	2,14	***2,56***	***2,49***	2,00	2,27	***2,36***	***2,47***
масса, г	0,16	0,16	***0,16***	***0,19***	0,16	0,16	***0,18***	***0,18***
высота, мм	2,23	2,06	***2,46***	***2,31***	1,74	1,86	***2,02***	***2,01***
плотность, г/см3	1,51	1,73	***1,38***	***1,80***	2,64	2,63	***2,52***	***2,69***
диаметр, мм	7,77	7,65	***7,75***	***7,60***	6,74	6,51	***6,75***	***6,50***
потеря массы, %	18,78	16,33	***20,79***	***3,57***	18,00	17,68	***8,54***	***9,14***
изменение высоты, %	-3,04	-3,74	***-3,91***	***-7,23***	-13,00	-18,06	***-14,41***	***-18,62***
изменение диаметра, %	-2,88	-4,38	***-3,13***	***-5,00***	-15,75	-18,63	***-15,63***	***-18,75***
изменение плотности, %	-11,20	-4,94	***-12,17***	***15,17***	32,79	51,72	***50,09***	***69,14***
изменение объёма, %	-8,54	-11,98	***-9,82***	***-16,27***	-38,25	-45,74	***-39,06***	***-46,28***

Таблица 4. Масса и геометрические параметры образцов, синтезированных при pH = 8 до и после обработки.

pH = 8	900				1100			
	2 ч	6 ч	***2 ч***	***6 ч***	2 ч	6 ч	***2 ч***	***6 ч***
масса, г	0,202	0,207	***0,203***	***0,193***	0,204	0,197	***0,199***	***0,151***
плотность, г/см3	2,16	2,26	***1,64***	***1,60***	2,21	2,18	***1,65***	***1,69***
высота, мм	1,86	1,82	***2,47***	***2,40***	1,84	1,80	***2,40***	***1,78***
масса, г	0,15	0,15	***0,18***	***0,18***	0,15	0,15	***0,18***	***0,14***
высота, мм	1,85	1,78	***2,38***	***2,27***	1,68	1,60	***2,00***	***1,53***
плотность, г/см3	1,63	1,76	***1,65***	***1,74***	2,20	2,32	***2,69***	***2,57***
диаметр, мм	7,94	7,86	***7,71***	***7,64***	7,21	7,10	***6,55***	***6,71***
потеря массы, %	26,24	26,57	***9,85***	***6,22***	25,98	25,38	***9,05***	***7,95***
изменение высоты, %	-0,54	-2,20	***-3,64***	***-5,42***	-8,70	-11,11	***-16,67***	***-14,04***
изменение диаметра, %	-0,75	-1,75	***-3,63***	***-4,50***	-9,88	-11,25	***-18,13***	***-16,13***
изменение плотности, %	-24,71	-22,22	***0,73***	***8,72***	-0,19	6,58	***62,82***	***52,23***
изменение объёма, %	-2,02	-5,59	***-10,50***	***-13,74***	-25,84	-29,99	***-44,14***	***-39,53***

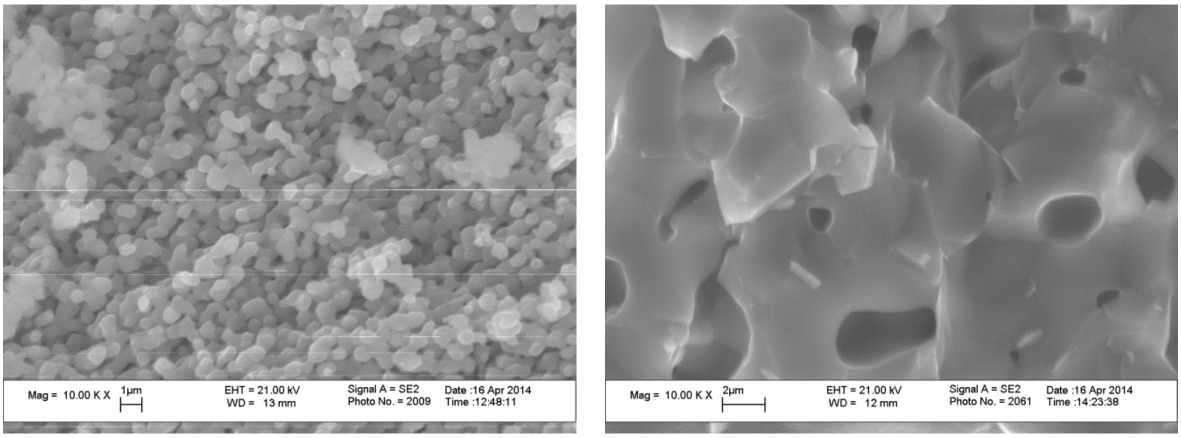
Таблица 5. Масса и геометрические параметры образцов, синтезированных при pH = 7 до и после обработки.

pH=7	900				1100			
	2 ч	6 ч	***2 ч***	***6 ч***	2 ч	6 ч	***2 ч***	***6 ч***
масса, г	0,203	0,197	***0,170***	***0,211***	0,203	0,203	***0,200***	***0,192***
плотность, г/см3	1,73	2,00	***1,50***	***1,65***	1,90	1,79	***1,64***	***1,63***
высота, мм	2,33	1,96	***2,25***	***2,55***	2,13	2,26	***2,43***	***2,34***
масса, г	0,17	0,17	***0,15***	***0,19***	0,17	0,17	***0,18***	***0,18***
высота, мм	2,27	1,89	***2,08***	***2,42***	1,84	1,98	***2,09***	***2,08***
плотность, г/см3	1,57	1,85	***1,56***	***1,70***	2,52	2,52	***2,56***	***2,44***
диаметр, мм	7,79	7,79	***7,75***	***7,65***	6,85	6,61	***6,56***	***6,63***
потеря массы, %	16,26	15,23	***10,00***	***10,43***	15,76	15,76	***9,50***	***8,85***
изменение высоты, %	-2,58	-3,57	***-7,56***	***-5,10***	-13,62	-12,39	***-13,99***	***-11,11***
изменение диаметра, %	-2,63	-2,63	***-3,13***	***-4,38***	-14,38	-17,38	***-18,00***	***-17,13***
изменение плотности, %	-9,35	-7,29	***3,74***	***3,22***	33,00	40,84	***56,49***	***49,29***
изменение объёма, %	-7,62	-8,57	***-13,24***	***-13,22***	-36,67	-40,19	***-42,17***	***-38,95***

На основании полученных данных можно сделать несколько выводов. Прежде всего, видно несколько тенденций. Удаление воды, входящей в состав осадка приводит к увеличению пористости материала, а вместе с тем, и с уменьшением плотности. Наличие сопутствующего продукта реакции приводит к дополнительному вкладу в порообразование. При больших температурах проявляется значительное увеличение плотности материала, что связано с процессами роста зёрен, и постепенному исчезновению пор. Время выдержки оказывает значительное, но не решающее значение на параметры материала.

Важно отметить, что параметры полученных серий довольно близки и не имеют ожидаемых изначально отличий.

При повышении температуры размер частиц увеличивается, т.к. частицы стремятся уменьшить общую площадь поверхности, в процессе спекания (рис. 5).



— увеличение температуры →

Рис. 5. Зависимость микроструктуры образцов от температуры