

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЕКТИНА НА ХАРАКТЕР КРИСТАЛЛИЗАЦИИ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ ИЗ МОДЕЛЬНОГО РАСТВОРА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ЖИДКОСТИ

О.А. Голованова, д-р геол.-минерал. наук, профессор

П.А. Пятанова, канд. хим. наук, доцент

Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского

(Россия, г. Омск)

Аннотация. В работе представлены результаты исследований кристаллизации фосфатов кальция в присутствии пектина. Изучены условия образования органо-минерального композита гидроксилapatит-пектин. При увеличении времени выдерживания осадка в маточном растворе и уменьшении содержания пектина в исходном модельном золе, увеличивается содержание окристаллизованного гидроксилapatита в органо-минеральном композите и снижается содержание фосфатов кальция, в том числе аморфного фосфата кальция. Увеличение содержания пектина в исходном модельном золе от 0,01 до 0,1 масс.% приводит к росту резорбируемости ОМК в 0,9 масс.% растворе хлорида натрия.

Исследованы температурные превращения и установлено, что в процессе термообработки синтезированных образцов в интервале температур 200-600 °С потеря массы образцов происходит за счет дегидратации гидроксилapatита, фосфатов кальция и деструкции пектина.

Ключевые слова: гидроксилapatит, пектин, кристаллизация, температурные превращения, биорезорбируемость.

Введение

Гидроксилapatит кальция (ГА) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, является основной неорганической составляющей костной и зубной тканей, широко используется в медицине в качестве материала для производства имплантатов [1-6]. Применение чистого ГА в имплантологии сильно ограничено из-за таких важных характеристик как низкая биорезорбируемость и невысокие прочностные характеристики. Включение полисахаридов в состав материалов на основе гидроксилapatита улучшают их прочностные характеристики и в значительной степени повышают растворимость ГА, увеличивают эффективность действия имплантата [7-11]. В данном исследовании в качестве полисахарида был выбран пектин. Применение пектина в качестве компонента материалов для имплантатов практически не исследовано. Пектин – полисахарид, образованный из остатков D-галактуроновой кислоты и присутствующий в большинстве высших растений – фруктах, овощах, корнеплодах. В медицине пектин используется для изготовления физиологически активных веществ, обладающих полезными для человеческого здоровья свойствами [12].

Мы предполагаем, что введение пектина в состав органо-минерального композита на основе гидроксилapatита позволит улучшить прочностные характеристики и повысить биорезорбируемость синтезированного материала.

Целью данной работы являлся синтез органо-минерального композита гидроксилapatит-пектин и изучение влияния органического полимера пектина на характер кристаллизации гидроксилapatита в ходе его осаждения из водных растворов, содержащих пектин, а также исследование температурных превращений и биорезорбируемости полученного биокомпозита.

Экспериментальная часть

Синтез органо-минерального композита (ОМК) на основе ГА и пектина проводили осаждением из водного раствора, моделирующего по качественному составу внеклеточную жидкость в присутствии пектина с различной концентрацией (0,01 до 0,1 масс. %) и золь-гель методом с концентрацией пектина (0,1 до 0,2 масс. %). В качестве прототипа внеклеточной жидкости был использован модельный раствор, состав которого приведен в табл. 1.

Таблица 1. Ионный состав раствора, используемый для синтеза ОМА

Компонент-ион	Концентрация, ммоль/л
Ca ²⁺	24,6
Na ⁺	284
K ⁺	20
Mg ²⁺	3
Cl ⁻	210
PO ₄ ³⁻	10
CO ₃ ²⁻	54
SO ₄ ²⁻	1

По первому методу осаждение фосфатов кальция проводится путем смешивания водных растворов хлорида кальция, хлорида магния, гидрофосфата калия, гидрокарбоната натрия, сульфата натрия, хлорида натрия и водного раствора пектина при температуре 25°C. При смешивании данных компонентов образовывался пектиновый золь, в котором происходило осаждение твердой фазы фосфата кальция.

В качестве второго метода получения композита был выбран золь-гель метод, включающий получение золя пектина, с последующим переводом его в гель. На первой стадии золь-гель процесса реакции гидролиза и поликонденсации приводят к образованию коллоидного раствора - золя, размер которых не превышает несколько десятков нм. Добавление ионов металлов кальция и магния (присутствующих в модельном растворе, табл. 1) приводят к интенсивному образованию контактов между частицами и образованию монолитного геля. Для ускорения гелеобразования в системе использовалось упаривание при температуре 70 °С.

Характерной особенностью пектинового золя, как лиофильного коллоида, является непропорционально высокое возрастание вязкости при увеличении его концентрации. Поэтому концентрации пектина в первом методе варьировались в интервале от 0,01 до 0,1 масс.%, так как при дальнейшем повышении концентрации золь переходил в гель. Во втором золь-гель методе концентрация пектина варьировалась в интервале от 0,1 до 0,2 масс.%, так как необходимо было добиться образования геля.

Время выдерживания осадков в маточном растворе составляло 5,7,10 дней. Полученные по первому методу осадки состава гидроксилпатит-пектин являлись трудно фильтруемыми, в виде студенистых органо-минеральных масс. В дальнейшем осадки отмывали дистиллированной водой и сушили на воздухе при температуре 90°C в течение 3 часов. Осадки, полученные в результате упаривания по золь-гель методу промывались водой и сушили на воздухе при температуре 90°C в течение 3 часов.

С целью изучения температурных превращений, протекающих в композите гидроксилпатит-пектин, образцы последовательно прокаливали при температурах 200, 400, 600°C. Изучение резорбируемости (растворимости) полученных образцов проводилось путем их динамического растворения при постоянном перемешивании в 0,9% растворе NaCl, имитация пассивной резорбции. Через определенные промежутки времени ($\tau=0-60$ мин с интервалом 1 мин) с использованием прямой потенциометрии фиксировали значение показателя концентрации ионов кальция в растворе.

Физико-химическую идентификацию синтезированных композитов гидроксилпатит-пектин осуществляли с помощью рентгенофазового анализа (рентгеновский дифрактометр D8 Advance) и ИК-спектроскопии (инфракрасный Фурье-спектрометр ФСМ 2202). Для определения соотношения Ca/P в синтезированном ОМК проводили анализ надосадочной жидкости с применением трилометрического (РД 52.24.403-2007) и спектрофотометрического (ГОСТ 18309-72) методов анализа.

Результаты и их обсуждение

В ходе проведения исследования была выявлена зависимость массы осадка от времени выдерживания осадка в маточном растворе и от концентрации пектина. При

увеличении концентрации пектинового золя и времени выдерживания осадка массы, синтезированных осадков композита увеличиваются (табл. 2).

Таблица 2. Зависимость массы осадка от концентрации пектина и времени выдерживания осадков в маточном растворе

Время выдерживания осадка в маточном растворе	Концентрация пектинового золя, %	Масса осадка, г
5 дней	0,01	0,7888 ±0,0002
	0,05	0,9719 ±0,0003
	0,075	1,0103 ±0,0003
	0,1	1,0283 ±0,0002
	0,15	2,0417±0,0004
7 дней	0,01	0,8659 ±0,0002
	0,05	1,0685 ±0,0003
	0,075	1,2100 ±0,0002
	0,1	1,2957 ±0,0003
	0,15	2,2025±0,0005
10 дней	0,01	0,9460 ±0,0002
	0,05	1,2600 ±0,0002
	0,075	1,6003 ±0,0002
	0,1	1,8127 ±0,0003
	0,15	2,2035±0,0004

Методом РФА было установлено, что в полученных осадках присутствует одна кристаллическая фаза - гидроксилпатит. Основным интенсивным линиям ГА соответствуют углы 2Θ : 31,7; 24,9; 38,1 (рис. 1). На дифрактограммах воспроизводятся линии спектра индивидуального ГА, что свидетельствует о протекании реакции в растворе при выбранных условиях и образовании в ходе синтеза гидроксилпатита.

Однако, гидроксилпатит, полученный в присутствии пектина, является плохо окристаллизованным. Слабое разрешение и уширение рефлексов дифрактограмм синтезированного ОМК гидроксилпатит-пектин свидетельствует о низкой степени кристалличности образующихся продуктов. Исследовано влияние времени выдерживания осадка под маточным раствором на фазовый состав и стехиометрию соединений. При выдерживании осадка под раствором в течение 5 дней, полученный осадок, согласно данным РФА, со-

держал гидроксилпатит, однако слабые плохо разрешенные пики на дифрактограммах и низкая интенсивность полос свидетельствовали о плохой окристаллизованности полученного гидроксилпатита, значительного содержания в составе ОМК фосфатов кальция, в том числе аморфного фосфата кальция. При увеличении времени выдерживания до 7-10 дней окристаллизованность гидроксилпатита в составе ОМК увеличивалась, улучшалась разрешенность пиков на дифрактограммах и увеличивалась их интенсивность.

При изучении влияния концентрации пектинового золя в процессе образования твердой фазы установлено, что при концентрации пектина 0,15-0,2 масс.% резко увеличивалась вязкость раствора, образовывались, главным образом фосфаты кальция, в том числе аморфный фосфат кальция, содержание гидроксилпатита в составе ОМК невелико (низкая интенсивность пиков на дифрактограммах). При

концентрациях пектина 0,01; 0,05; 0,075, 0,1 масс.% основной кристаллической фазой являлся гидроксилпатит (**рис.1**).

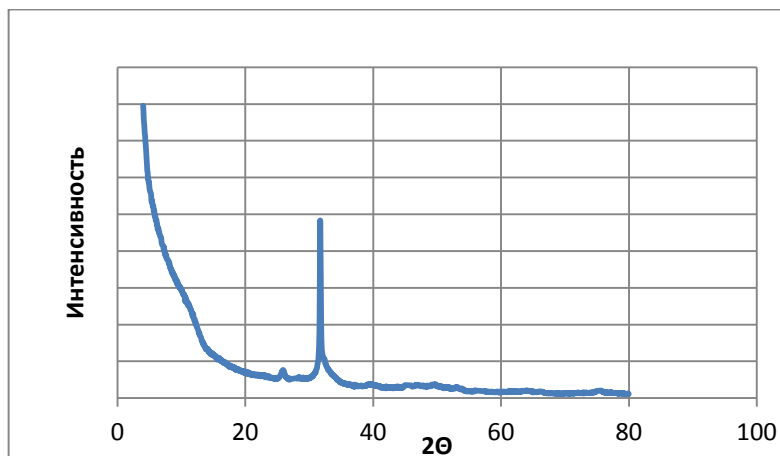


Рис. 1. Дифрактограмма ОМК (время выдерживания осадков в маточном растворе 7 дней, массовая концентрация пектинового золя, 0,01масс.%)

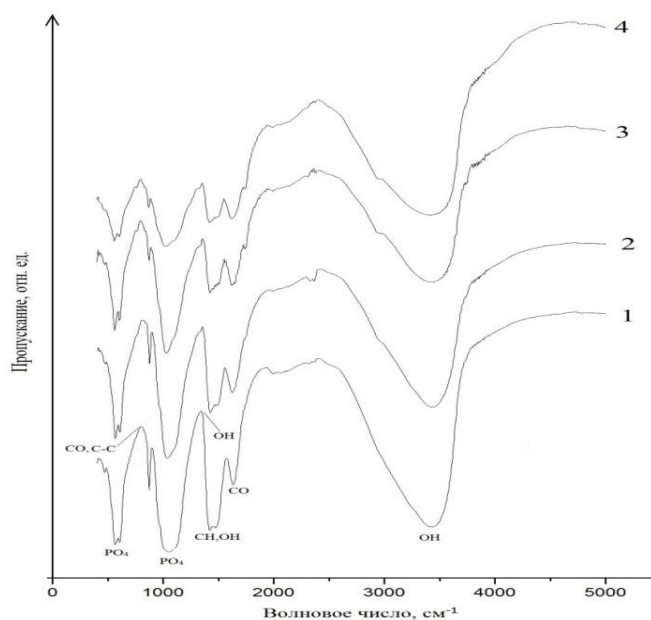


Рис. 2. ИК-спектры ОМК (время выдерживания осадков в маточном растворе 7 дней, массовая концентрация пектинового золя масс%: 1- 0.01, 2- 0,05, 3- 0,075, 4- 0,1).

Присутствие в составе полученного ОМК ионов PO_4^{3-} из структур гидроксилпатита и фосфатов кальция, а также функциональных групп $-\text{OH}$, $-\text{C}=\text{O}$, пектина идентифицировали с помощью ИК-Фурье спектроскопии. В ИК-спектре органического минерального композита присутствуют полосы, характерные для гидроксилпатита и фосфатов кальция (**рис. 2**): полосы ассиметричных валентных колебаний связей $\text{P}-\text{O}$, PO_4^{3-} групп: 1092 (слабое плечо) и 1033 cm^{-1} ; рефлекс 963 cm^{-1} относится к симметричным валентным колебаниям $\text{P}-$

O , PO_4^{3-} групп; полосы с максимумом поглощения 603, 565 cm^{-1} соответствуют деформационным колебаниями PO_4^{3-} ; широкая полоса в области 2800-3700 cm^{-1} и пик при 3570 cm^{-1} соответствуют валентным колебаниям сорбированной и кристаллизационной воды. В спектрах (**рис. 2**) присутствуют также полосы колебаний характерные для пектина: рефлекс 3422 cm^{-1} соответствует валентным колебаниям группы OH , 1435 и 1747 cm^{-1} соответствует валентным колебаниям группы $\text{C}=\text{O}$.

В спектрах ГА полученного осаждением из водных растворов и золь-гель методом присутствуют полосы колебаний карбонатных групп (1419, 1435 и 875 см^{-1}), частично замещающих PO_4^{3-} и OH группы ГА (предположительно АБ замещение) при его синтезе из модельного раствора.

ИК спектры композитов, полученных при различной концентрации пектиновых зольей, имеют схожую структуру (рис. 2). Присутствуют все полосы характерные для гидроксилатапата и пектина. Достаточная интенсивность полос пектина в спектре ОМК позволяет предположить возможность адсорбции макромолекул пектина на поверхности гидроксилатапата и фосфатов кальция.

Поскольку, в образцах полученных золь-гель методом с концентрацией пектина 0,15 и 0,2 масс. %, установлено низкое содержание кристаллической фазы гидроксилатапата, для дальнейших определений кальций-фосфорного коэффициента и резорбируемости были взяты образцы, полученные методом осаждения из раствора, с концентрацией пектина 0,01; 0,05; 0,075, 0,1 масс. %.

Таблица 3. Значения кальций-фосфорного коэффициента композитов гидроксилатапата-пектин в зависимости от времени выдерживания осадков в маточном растворе и концентрации пектина в исходном золе.

Время выдерживания осадка в маточном растворе	Концентрация пектиновой золя, %	Са/Р в осадке
5 дней	0,01	1,73±0,01
	0,05	1,77±0,02
	0,075	1,84±0,03
	0,1	1,89±0,01
7 дней	0,01	1,66±0,02
	0,05	1,76±0,01
	0,075	1,70±0,01
	0,1	1,77±0,05
10 дней	0,01	1,67±0,04
	0,05	1,77±0,01
	0,075	1,79±0,01
	0,1	1,79±0,05

Анализ результатов определения Са/Р коэффициента в полученных композитах (табл.3) показывает, что для образцов с минимальной концентрацией пектиновой золя 0,01% и временем старения осадков 7 и 10 дней значение Са/Р коэффициента составляет 1,66 и 1,67, что соответствует стехиометрическому гидроксилатапату [11]. Для образцов с большей концентрацией пектиновой золя и временем выдерживания осадков под раствором менее 5 дней это соотношение составляло более 1,70. Эти результаты полностью согласуются с данными РФА и ИК-спектроскопии, согласно которым с ростом содержания пектина в исходных золях (ростом вязкости) и уменьшением времени синтеза кристалличность полученных ОМК становится меньше. Предположительно, с увеличением вязкости золя уменьшается скорость диффузии фосфат ионов, что приводит к отклонению от стехиометрического состава фосфатов кальция и увеличению величины Са/Р коэффициента.

При изучении термических превращений, в процессе термообработки ОМК, наблюдалась непрерывная убыль массы осадков. Изменения функционально-группового состава фиксировали методом ИК-спектроскопии. На **рис. 3** приведены ИК-спектры ОМА гидроксилапатит-пектин, прошедших термическую обработку. Согласно данным ИК-спектров (**рис. 3**) образцов после прокаливания в области 200-600 °С значительно снижается интенсивность, а затем исчезает полоса поглощения в области 2700-3700 см⁻¹, вызванной колебаниями связей Н-О-Н группы в молекулах адсорбированной и структурно связанной воды. Это указывает на дегидратацию порошков в интервале температур 200-600 °С. Происходит последовательное удаление химически несвязан-

ной воды, затем слабосвязанной воды из осадка, одновременно происходит дегидратация пектина. При прокаливании композита при температуре 600 °С на ИК спектре образца (**рис.3**) уменьшается интенсивность рефлексов С=О группы пектина 1620 см⁻¹, а так же исчезают максимумы СН при 1423см⁻¹, которые отвечают связям метиленовых группировок пектина, это свидетельствует о деструктивных процессах в молекуле пектина. Согласно литературным данным при 295⁰ С происходит полное выгорание пектина с образованием угля [12]. Значительные изменения в ИК-спектрах видны при температуре прокаливания выше 400⁰С, для образцов отмечается улучшение разрешенности полос PO₄³⁻ групп (565,603 и 962 см⁻¹).

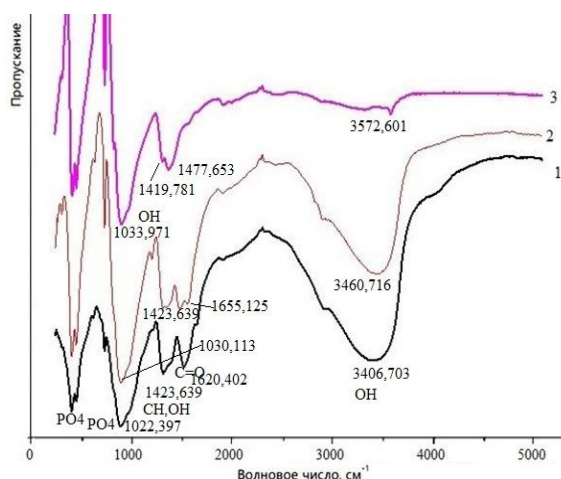


Рис. 3. ИК-спектры ОМК (время выдерживания осадков в маточном растворе 7 дней, массовая концентрация пектинового золя 0.01 %) Температура термообработки: 1 - 200⁰С, 2 - 400⁰С, 3 -600⁰С

При изучении биорезорбируемости проводилось растворение образцов в 0,9 масс.% растворе NaCl, имитация пассивной резорбции. В результате эксперимента была получена зависимость концентрации ионов кальция от времени растворения (**рис. 4**). По мере взаимодействия ионов среды с синтезированными образцами происходит переход ионов кальция в раствор, что отражается на ходе кинетических кривых. Наиболее быстро концентрация кальция нарастает на начальном этапе резорбции, при времени до 20 минут, затем

скорость резорбции уменьшается, кривые выходят на плато. При варьировании концентрации пектинового золя от 0,01 до 0,1масс. % наблюдается некоторое увеличение растворимости композита, что согласуется с литературными данными [7], согласно которым введение полисахаридов в состав фосфатных композитов увеличивает биорезорбируемость материалов, за счет увеличения при кристаллизации доли аморфной составляющей и уменьшения стехиометрии образующегося ГА.

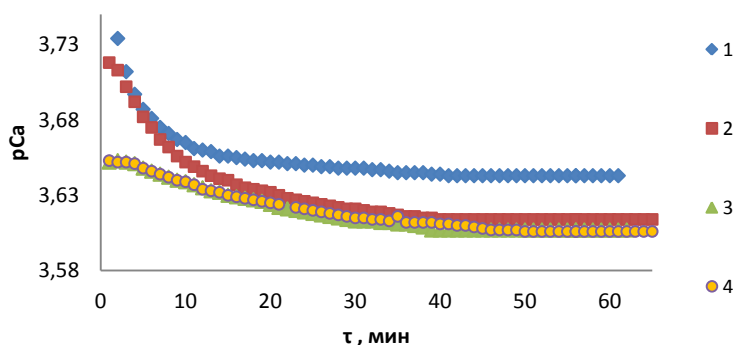


Рис. 4. Зависимость рСа от времени растворения ОМК в 0,9 масс.% растворе NaCl. Массовая концентрация пектинового золя: 1-0,01 %; 2-0,05%, 3- 0,075%, 4-0,1%

Таким образом, в результате проведенной работы синтезирован органоминеральный композит на основе гидроксилапатита и пектина из водного раствора, моделирующего по составу внеклеточную жидкость, в присутствии пектина. Минеральной составляющей полученного композита являются гидроксилапатит, фосфаты кальция (в том числе аморфный), а органической составляющей пектин. При увеличении времени синтеза ОМК и уменьшении содержания пектина в исходном золе, увеличивается содержание окри-

сталлизованного гидроксилапатита в органо-минеральном композите и уменьшается содержание фосфатов кальция, в том числе аморфного фосфата кальция. В процессе термообработки образцов ОМК в интервале температур 200-600 °С потеря массы образцов происходит за счет дегидратации гидроксилапатита, фосфатов кальция и деструкции пектина. Увеличение содержания пектина в исходном модельном золе от 0,01 до 0,1 масс.% приводит к увеличению резорбируемости ОМК в 0,9 масс.% растворе хлорида натрия.

Библиографический список

1. Третьяков Ю.Д. Развитие неорганической химии как фундаментальной основы создания новых поколений функциональных материалов // Успехи химии, 2004. № 73, С. 899-916.
2. Dorozhkin Sergey V. Biocomposites and hybrid biomaterials based on calcium orthophosphates// Landes Bioscience, 2011.P.3
3. Voccaccini A.R, Blaker J.J. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds // Expert Rev Med Devices, 2005. Vol. 2. P. 303-17.
4. Kim H.W, Knowles J.C, Kim H.E. Hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery // Biomaterials, 2004. Vol. 25. P. 1279-87.
5. Svensson A, Nicklasson E, Harrah T et al. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage // Biomaterials, 2005. Vol. 26. P. 419-31.
6. Di Martino A, Sitterling M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering // Biomaterials, 2005. Vol. 26. P. 5983-90.
7. Захаров Н.А., Сенцов М.Ю. Взаимодействие гидроксиапатита кальция и метилцеллюлозы при их совместном осаждении // Краткие сообщения. Сорбционные и хроматографические процессы, 2011. Том 11. №. 2. С 178-183.
8. Хрипунов А.К., Баклагина Ю.Г, Синяев В.А., Шустикова Е.С., Парамонов Б.А., Романов Д.П.,Смыслов Р.Ю., Ткаченко А.А. Исследование нанокompозитов на основе гидратированных фосфатов кальция и целлюлозы *Acetobacter xylinum*. // Физика и химия стекла, 2008. т. 34, N 2. С. 192-200.
9. Sumathra M., Govindaraja D., Jeyarajb M. Sustainable pectin fascinating hydroxyapatite nanocomposite scaffolds to enhance tissue regeneration // Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2017. Vol. P. 46–53.

10. Munarin F., Petrini P., Barcellona G. Reactive hydroxyapatite fillers for pectin biocomposites // *Materials Science and Engineering*, 2014. Vol. 45 P. 154–161.

11. Куляшова К.С., Шаркеев Ю.П. Получение синтетического гидроксиапатита для формирования биопокровов на имплантатах медицинского назначения // *Химия в интересах устойчивого развития*. 19 2011. С. 447-453.

12. Аверьянова Е.В., Школьникова М.Н. Пектин: методы выделения и свойства. Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2015. 42 с.

**TO STUDY THE EFFECT OF PECTIN ON THE NATURE OF THE
CRYSTALLIZATION OF CALCIUM PHOSPHATES FROM A MODEL
SOLUTION OF EXTRACELLULAR FLUID**

O.A. Golovanova, *doctor of geological and mineralogical sciences, professor*

P.A. Pyatanova, *candidate of chemistry sciences, associate professor*

Dostoevsky Omsk state university

(Russia, Omsk)

Abstract. *The paper presents the results of studies of crystallization of calcium phosphates in the presence of pectin. The conditions of formation of the organo-mineral composite hydroxylapatite-pectin are established. By increasing the time the precipitate is kept in solution and reducing the pectin content in the initial model ash, the content of crystallized hydroxylapatite in the organo-mineral composite increases and the content of calcium phosphates, including amorphous calcium phosphate decreases. Increasing the content of pectin in the original model ash from 0.01 to 0.1 mass.% leads to an increase in the resorption of OMK in 0.9 mass.% sodium chloride solution. Temperature transformations are investigated and it is established that in the process of heat treatment of synthesized samples in the temperature range of 200-600 ° C, the mass loss of samples occurs due to dehydration of hydroxylapatite, calcium phosphates and destruction of pectin.*

Keywords: *hydroxylapatite, pectin, crystallization, temperature transformations, resorption.*