

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
Кафедра наноелектроніки

**МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА**

зі спеціальності 163 – «Біомедична інженерія»

на тему:

**«Застосування інструментальних методів для дослідження властивостей біоматеріалів на основі ортофосфатів кальцію»**

**Гапона Владислава Івановича**

**Завідувач кафедру**

\_\_\_\_\_ проф. О.Д.Погребняк

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 р.

**Науковий керівник**

\_\_\_\_\_ Л. Б. Суходуб

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 р.

Суми – 2018

## РЕФЕРАТ

Магістерська містить: 79 сторінок, 32 рисунки, 18 таблиць 8 формул та 57 джерел літератури.

Об'єктом даного дослідження є альгінат- та хітозан- апатитні матеріали з включенням йонів металів.

Метою роботи є вивчення структури кісткової тканини, зокрема її мінеральної складової та йонних включень, дослідження композитів на основі полімерів і гідроксиапатиту та можливість їх застосування в медичних цілях.

В роботі описана структура кістки, зокрема її мінеральна складова, властивості біополімерів, методи отримання гідроксиапатиту з включенням йонів металів.

Досліджено вплив біополімерів та йонів металів на формування кристалічної ґратки гідроксиапатиту, її структурну характеристику та елементарний склад. Структурні характеристики матеріалів досліджувалась за допомогою рентгенівського дифрактометра ДРОН-3, а можливість розгляду елементарного складу надавав рентгено-флуоресцентний спектрометр ElvaX.

ХІТОЗАН, АЛЬГІНАТ, ГІДРОКСИАПАТИТ, ЙОННЕ ЗАМІЩЕННЯ, XRD, RFA.

## ЗМІСТ

<u>СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ</u>	3
<u>ВСТУП</u>	4
<u>РОЗДІЛ 1. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА</u>	5
<u>1.1.Будова та властивості кісткової тканини</u>	5
<u>1.1.1.Структура кістки</u>	6
<u>1.1.2.Мінеральна фаза кістки</u>	7
<u>1.2.Загальні властивості гідроксиапатиту</u>	9
<u>1.2.1.Методи синтезу гідроксиапатиту</u>	13
<u>1.3.Апатит-полімерні композитні матеріали</u>	15
<u>1.4.Йони металів в структурі кісткової тканини</u>	18
<u>РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА</u>	20
<u>2.1.Інструментальні методи дослідження кальцій-фосфатних сколук</u>	20
<u>2.1.1.Рентгено-флуоресцентний аналіз (РФА)</u>	20
<u>2.1.2.Програмно – методична база аналізу спектрометра ElvaX</u>	23
<u>2.1.3.Метод фундаментальних параметрів</u>	23
<u>2.1.4. Регресійний метод</u>	24
<u>2.1.5.Метод рентгенівської дифракції</u>	24
<u>2.2.Матеріали та методики</u>	29
<u>2.2.1.Матеріали</u>	30
<u>2.2.2.Методики синтезу</u>	30
<u>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ</u>	34
<u>3.1. Дослідження зразків ГА з вмістом цинку та полімерів</u>	37
<u>3.2. Дослідження зразків ГА з вмістом алюмінію та полімерів</u>	49
<u>РОЗДІЛ 4. РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЦИНКУ ТА АЛЮМІНІЮ В СКЛАДІ ЗРАЗКІВ ГІДРОКСИАПАТИТУ МЕТОДОМ РФА</u>	61
<u>РОЗДІЛ 5. БЕЗПЕКА ЖИТТЄДІЯЛЬНОСТІ</u>	68
<u>ВИСНОВКИ</u>	72
<u>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ</u>	73

## СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ГА (НА) – гідроксиапатит

СГА – свіжоосаджений гідрокиапатит

ОФК – ортофосфати кальцію

XRD – рентгенівська дифракція

РФА – рентгено-флуоресцентний аналіз

SEM – скануючи електронна мікроскопія

mW – мікрохвильове випромінювання

Alg – Альгінат

CS – Хітозан

Me – йони металів

## ВСТУП

Композитні матеріали на основі ГА та полімерів природного й синтетичного походження, наприклад альгінат чи хітозан, широко застосовуються в медицині, оскільки жива кісткова тканина відрізняється від них тільки тим, що вона насичена біологічними тканинами й рідинами, які об'єднані в систему. Для покращення фізико-хімічних та механічних властивостей матеріалів, створених для заміщення кісткової тканини, можливе додавання йонів перехідних металів, присутніх у біологічному апатиті.

Дослідження впливу зміни концентрації йонів металів на початкових етапах синтезу ГА дозволить вибрати оптимальні співвідношення компонентів для отримання матеріалу, що максимально наближений до кісткової тканини в контексті іонного та біологічного заміщення.

Дана робота є частиною систематичного дослідження біоматеріалів, які проводяться в ННЦ «Нано- і біоматеріали» Сум ДУ в рамках держбюджетної наукової теми № 62.15.00-01.18/203П «Фізичні основи формування складу апатит-біополімерних пористих матриць для контрольованої доставки лікарських засобів в зону імплантації».

## РОЗДІЛ 1. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

### 1.1. Будова та властивості кісткової тканини

Кістка – біокерамічний композит, що на протязі довгого часу привертав увагу інженерів та матеріалознавців, які прагнули дублювати її особливі механічні властивості, наприклад високу міцність та в'язкість руйнування (опір матеріалу до розповсюдження тріщин) характерні для архітектури цього не органічно-неорганічного комплексу композиту.

Кісткова тканина належить до широкої групі сполучних тканин, в яких головну роль грає позаклітинний матрикс. Матрикс насичений неорганічними мінеральними речовинами, що надає кістці міцності та твердості. Саме з цих причин кісткова тканина становить великий інтерес для біомеханіки. Серйозною проблемою є виявлення взаємозв'язку між функцією кістки та її структурою. Незважаючи на те, що кісткова тканина вивчена досить добре, залишаються багато проблем, що досі не вирішені.

#### 1.1.1. Структура кістки

Зазвичай виділяють два види кісткової тканини: компактну і трабекулярну. Тканини відрізняються одна від одної за мікроструктурою та пористістю. Кістка складається з органічних (40%) і неорганічних (60%) компонентів. Органічні компоненти кісткової тканини переважно складаються з колагену (90 - 95%), який, будучи структуроутворюючим протеїновим елементом кісткової тканини, бере участь в утворенні форми кістки і забезпечує її міцність при

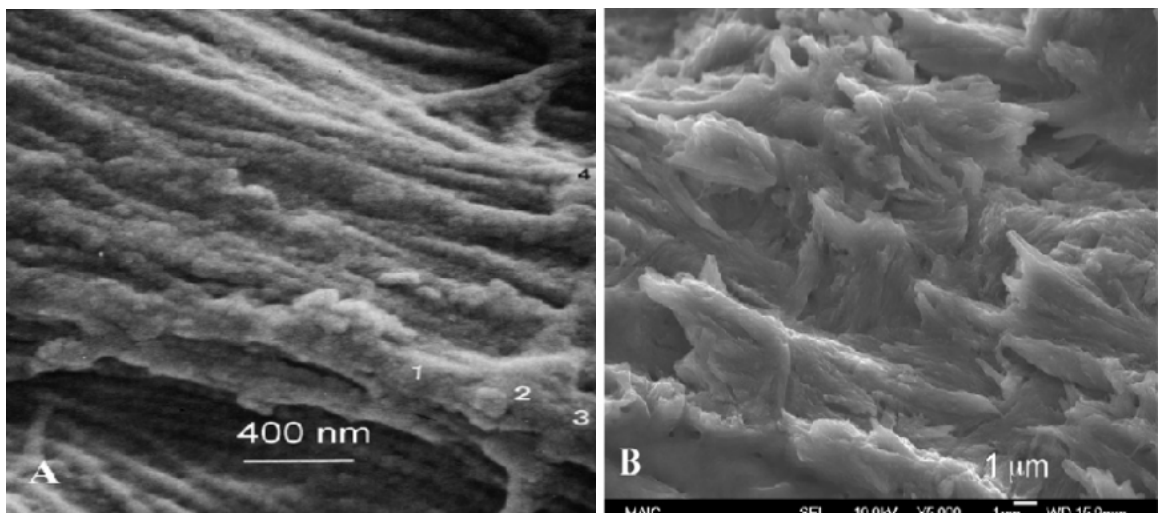
розтягуванні [1, 2]. Колаген - це волокнистий протеїн, утворений агрегацією тропоколагенових молекул. Колаген, зазвичай, розташовується в паралельних або концентричних шарах, формуючи кістку. Колаген перешкоджає розвитку крихкості кісткової речовини. Також у позаклітинному матриксі містяться неколагенові протеїни (остеонектін, остеопонтін, остеокальцин), які пов'язані з колагеновими волокнами.

Фракція органічних речовин синтезується остеобластами і мінералізується незабаром після їх відкладення [3]. Позаклітинний матрикс кісткової тканини мінералізований приблизно на 60%. Кістковий мінерал - це хімічна речовина, що складається з кальцію, фосфату і гідроокисів з невеликим вмістом магнію [4-6]. Основна хімічна формула кристала гідроксиапатиту кальцію має наступний вигляд:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Мінерали надходять в кістку з плазми крові і з поживних речовин. Розмір мінеральних кристалів невеликий: 50x25x3 нм. Кристали щільно оточені колагеновими волокнами. Мінеральні кристали також виникають в незаповнених просторах між колагеновими волокнами. Кальцинований матрикс надає кістці міцності.

### 1.1.2. Мінеральна фаза кістки

Розміри кристалів ГА, про які повідомляється в літературі, варіюються величинами довжини 30-50 нм; ширини 15-30 нм; товщини 2-10 нм. Останні дослідження AFM показують, що кісткові кристали довші, з шириною та довжиною від 30 до 200 нм [6, 7]. Хоча ця мінливість частково обумовлена підготовкою зразка, вона, ймовірно, також є функцією типу мінералізованої тканини (наприклад, видів тварин, дозрівання та розташування досліджуваної тканини).

Досліджувані методом рентгенівської дифракції біоматеріали часто описують як "низько кристалічні", із-за надзвичайно малих розмірів кристалітів. Зменшення кристалічності, як вважається, відбувається внаслідок включення домішок, таких як карбонат, йони натрію та магнію (4-6% карбонат, 0,9% Na, 0,5% Mg) [3,6]. Такі апатити, як біогенний мінерал, є нестехіометричними. Наприклад, на рис. 1.1 представлені SEM зображення морфологічної текстури кісток собаки (рис.1.1. А), індички (рис. 1.1. В), коня (рис. 1.1. С), а також кістка людини (рис. 1.1. D).





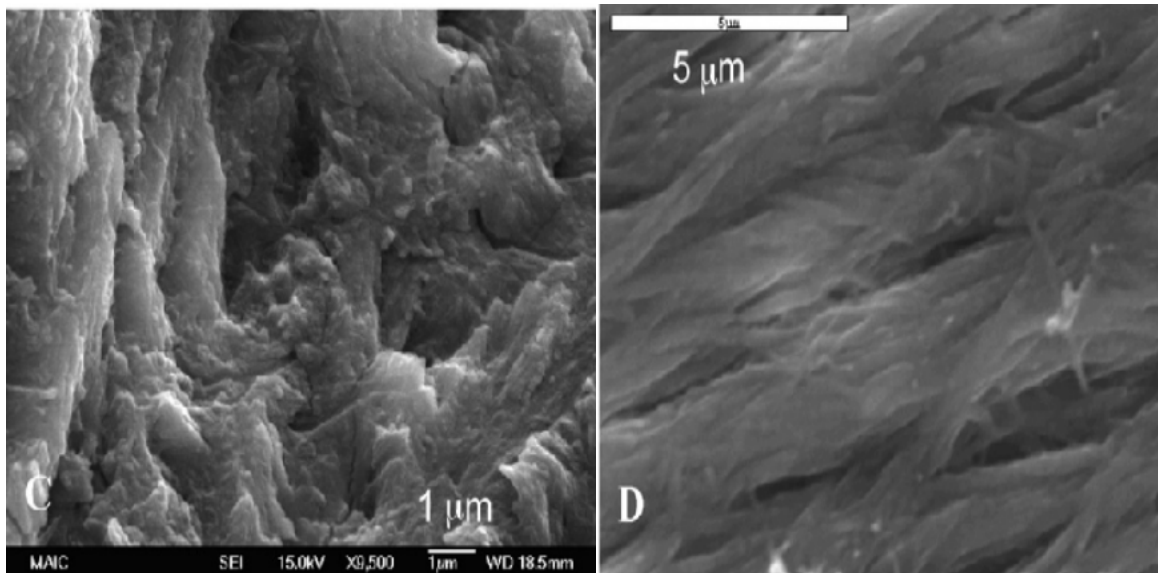


Рисунок 1.1 – Порівняння текстур кісток за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEM). Кістка собаки(A), індички (B), коня (C), а також кістка людини (D). [2].

Серед різних форм апатитів (фтор-, хлор- апатити) зустрічається форма апатиту, яка має мінеральне найменування Дахліт, яке іноді використовується в літературі [5, 6], але біологічний апатит частіше відповідає гідроксиapatиту. Мінеральний кістковий матеріал - апатит, дефіцитний кальцієм, при співвідношенні Ca: P менше 1,67, що є теоретичним значенням для стехіометричного гідроксиapatиту  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  [7]. Оскільки кістка - це жива тканина, яка постійно перебудовується та відновлюється, малий розмір або нестехіометрія кристалітів, імовірно, надає мінеральній фазі розчинність, необхідну для резорбції кристалів остеокластами (резорбуючі клітини кісток). Кісткові замітники, виготовлені з синтетичного ГА, хоча біологічно й активні (стимулюють формування кістки), проте досить повільно розсмоктуються через низьку розчинність ГА в фізіологічних умовах [8, 9]. Тому часто в лабораторних умовах синтезують нестехіометричний гідроксиapatит, наприклад, карбонат вмісний.

## 1.2. Загальні властивості гідроксиапатиту

Останнім часом зріс інтерес до вивчення гідроксиапатиту (ГА) як до біосумісного та біорезорбційного матеріалу, аналогу мінеральної складової кісткової тканини. У літературі зустрічаються латинські (HA, HAP) і українські (ГА) скорочення. Вивченням цієї речовини та матеріалів на її основі зайняті фахівці біомедичного та біотехнічного напрямку, науково-дослідні інститути і науково-дослідні центри різних напрямків (медицина, фізика, хімія, біофізика і т.д.). [10-13]. На рис. 1.2. показана структурна формула гідроксиапатиту кальцію.

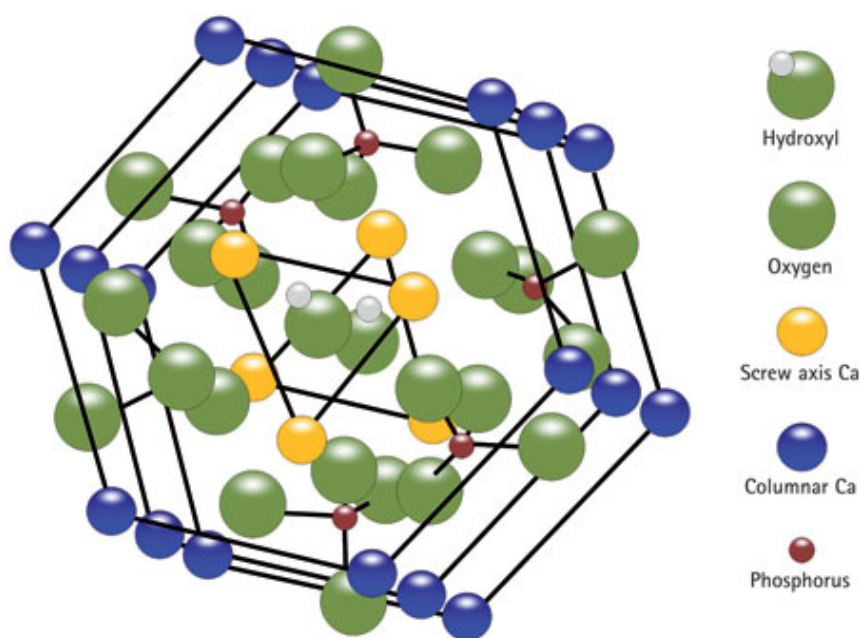


Рисунок 1.2 – Структурна формула гідроксиапатиту кальцію

Гідроксиапатит кальцію, як і ортофосфати кальцію (ОФК) використовують в якості компонентів для отримання біоматеріалів. Одною з найважливіших якостей цих сполук є співвідношення кальцію до фосфору, від якого залежать кислотність та розчинність. В таблиці 1.1 приведені дані за величиною співвідношення Ca/P в

різних ОФК після проведення синтезу за близьких до фізіологічних температур, та після високотемпературної термічної обробки. [13, 14].

Таблиця 1.1 – Відношення Ca/P в різних ОФК

Температурні умови	Назва	Формула	Ca/P	Мінерал
Безпосередньо після синтезу	Монокальційфосфат гідрат (МКФГ)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,50	–
	Дикальційфосфат (ДКФ)	$\text{CaHPO}_4$	1,00	Монетит
	Дикальційфосфат дигідрат (ДКФД)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00	Брушит
	Октокальційфосфат (ОКФ)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	–
	«Свіжоосаджений» гідроксиапатит (СГА)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,50- 1,67	–
	Аморфний фосфаткальцію (АФК)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,50	–
Після високотемпературної обробки	Монокальційфосфат (МКФ)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,50	–
	β-трикальційфосфат (β -ТКФ)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50	–
	Гідроксиапатит (ГА)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,50- 1,67	–
	Оксиапатит (ОАП)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$	1,67	–
	Тетракальційфосфат (ТетраКФ)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,00	–

Класифікація фосфатів кальцію приводиться у відповідності до трьох структурних типів: структури, що схожі на апатит, до яких відноситься ГА, галоген-заміщені ГА, ОКФ та ТетраКФ; структури типу глазериту, до яких належать модифікації ТКФ; структури з

розшаруванням – ДКФД, ДКФ, МКФГ. Із всіх ортофосфатів кальцію найбільш термодинамічно стійкими є структури типу апатиту, тому вони найчастіше є кінцевими продуктами реакції в системах з йонами  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{PO}_4^{3-}$  [14].

Поведінка ОФК залежить від їх розчинності. Якщо розчинність ОФК перевищує розчинність мінеральної складової тканини, то такий ОФК є біодеградуєчим в середовищі даного рН. При рН, рівному приблизно 7 швидкість деградації змінюється в наступній послідовності: МКФГ > ТетраКФ =  $\alpha$ -ТКФ > ДКФД > ДКФ > ОКФ >  $\beta$ -ТКФ > СГА > ГА.

Матеріали на основі свіжоосажденного ГА (СГА) і ГА володіють більшою стійкістю до резорбції рідинами організму, ніж інші ортофосфати. СГА отримують шляхом осадження з водного розчину або золь-гель методом. Він являє собою рентгеноаморфний порошок, в якому співвідношення  $\text{Ca/P}$  близько до 1,67. При термічній обробці СГА понад 800 °С в результаті кристалізації утворюється ГА, співвідношення  $\text{Ca/P}$  в ньому становить 1,67. Кінетика резорбції в значній мірі залежить від наявності домішок, дисперсності продукту, ступеню кристалічності і розвиненості поверхні. Тільки добре викристалізований ГА може мати швидкість біодеградації нижчу, ніж у мінеральної складової кісткової тканини [15].

Літературні джерела свідчать, що решітка гідроксиapatиту має гексагональну структуру. ГА є стійкими сполуками, вони мають дуже стабільну йонну ґратку, йони в якій упаковані щільно і утримуються за рахунок електростатичних сил. Сила зв'язку прямо пропорційна величині заряду йонів і обернено пропорційна квадрату відстані між ними. ГА електронейтральний, якщо в його структурі міститься 8 йонів кальцію, то він набуває негативного заряду. ГА може мати позитивний заряд, якщо кількість йонів кальцію досягає 12. Такі

кристали мають реакційною здатністю, виникає поверхнева електрохімічна невривноваженість, і вони стають нестійкими [12].

Елементи кристалічної решітки ГА можуть обмінюватися з йонами розчину, що оточує кристал, і змінюватися за рахунок йонів, що знаходяться в цьому розчині. Це властивість апатитів робить їх високочутливими до йонного складу крові та міжклітинної рідини. Найчастіше зустрічаються такі варіанти обміну йонів:  $\text{Ca}^{2+}$  заміщається катіонами  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{2+}$ , рідше  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ . При цьому відбувається зміна властивостей ГА, змінюються міцність і розміри кристалів [9,16].

ГА - тверда неорганічна речовина. У природі ця речовина входить до складу гірських порід (разом з хлор - і фторапатитами), та становить основну масу кісток тварин і людини. Розрізняють стехіометричний ГА  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  і нестехіометричний.

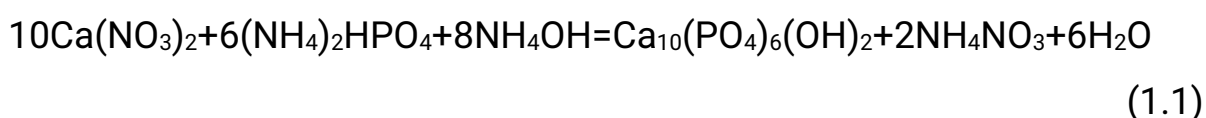
Біомінерал кістки є нестехіометричним [9]. Синтезовані ГА можуть мати як стехіометричну, так і нестехіометричну форму. Номенклатурна назва стехіометричного ГА - дигідроксид - гексаортофосфат три-кальцію. За хімічним складом це поліортофосфатна сполука, що дозволяє припустити наявність властивостей, близьких властивостям інших поліортофосфатів кальцію (низька розчинність, порівняно висока температура розкладання) [11, 12, 17].

Синтезовані ГА - порошки білого кольору різної дисперсності. Для створення медичних матеріалів і препаратів найбільш значущими є біосумісність, біорезобція, розчинність, термостійкість цієї речовини, а так само дисперсність порошоків на його основі. Наявність двох перших із зазначених властивостей, представляється очевидним і загальноприйнятим фактом [15]. Розчинність ГА у водних середовищах, особливо в фізіологічних рідинах *in vitro* і *in vivo*,

безпосередньо впливає на швидкість резорбції, враховується в відповідних дослідженнях. Відзначається найбільш низьке значення даного параметра для ГА серед тих, що використовуються в медицині ортофосфатів кальцію [18]. Швидкість розчинення і резорбції в свою чергу в значній мірі залежать від дисперсності.

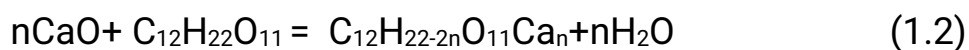
### 1.2.1. Методи синтезу гідроксиапатиту

Серед методів отримання ГА відомі методи «мокрої хімії», в яких в якості вихідних сполук використовують фосфат амонію і нітрат кальцію або фосфат амонію і хлорид кальцію [12]. У цих способах неможливо повністю видалити супутній продукт, що є суттєвим недоліком, так як порошок агресивний до тканин організму. Відомий спосіб отримання ГА, в якому в якості вихідних компонентів використовують хлорид кальцію і гідрофосфат натрію [19]. Недоліком цього способу є застосування кип'ятіння в лузі, яке призводить до отримання крупнокристалічного порошку. Також реагентами для отримання порошку ГА є оксид кальцію і гідрофосфат амонію, які не містять агресивного супутнього продукту [17]. В роботі [20] автор розглядає синтез дрібнокристалічних порошоків ГА методом осадження з водних розчинів, в яких в якості вихідних реагентів використовували розчини нітрату кальцію і гідроортофосфат амонію. Взаємодія між реагентами відбувається за реакцією :



Прикладом синтезу ГА є наступний: розчин  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (концентрацією 1.3, 1, 0.5, 0.25 моль / л) додавали по краплях до розчину  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (концентрацією 1, 0.6, 0.3, 0.15 моль / л) зі швидкістю 3,5 мл / хв. Реакцію проводили при  $t = 60^\circ \text{C}$  при інтенсивному перемішуванні; рН підтримували на рівні 9, використовуючи 25% розчин аміаку. Отриманий осад після старіння протягом 30 хвилин фільтрували за допомогою паперового фільтра. Потім порошок сушили при кімнатній температурі протягом 2 год і просівали через сито з розміром осередків 200 мкм. Для отримання кераміки пресовані зразки обпалювали при  $900^\circ \text{C}$  протягом 6 год (швидкість нагрівання  $5^\circ \text{C}/\text{хв}$ ). Для подолання можливих негативних наслідків енергійного розкладання нітрату амонію на першому етапі випалу вибирали умови, що забезпечують повільне розкладання супутнього продукту. У зв'язку з цим спресовані зразки С нагрівали до температури  $400^\circ$  зі швидкістю  $1^\circ \text{C}/\text{хв}$  ».

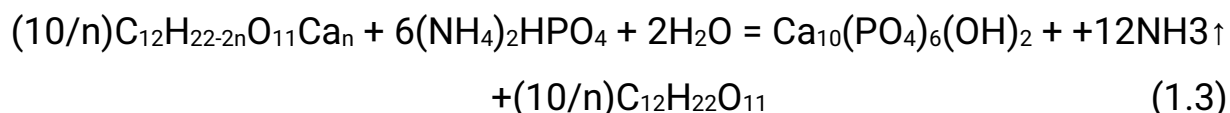
Прикладом іншого методу [13] було отримання нанокристалічного порошку ГА, що містить неагресивний біосумісний супутній продукт реакції. У способі отримання нанокристалічного порошку ГА, в якості вихідних сполук використовують сахарат кальцію  $\text{C}_{12}\text{H}_{22-n}\text{O}_{11}\text{Ca}_n$  і гідрофосфат амонію. Розчин сахарату кальцію готують взаємодією відпаленого при  $1000^\circ \text{C}$  оксиду кальцію і розчину сахарози по реакції (1.2).



Значення  $n$  для даної реакції варіюють від 0,5 до 2. Більш низькі значення  $n$  призводять до значного збільшення кількості сахарози для проведення синтезу без істотного впливу на розмір часток продукту. При  $n$ , що перевищує 2, в розчині утворюються

нерозчинні сахарати кальцію, що, при проведенні синтезу ГА призводить до утворення багатофазного продукту, що містить поряд з ГА не реагуючий вихідний компонент - сахарат кальцію.

До отриманого сахарат кальцію по краплях додають розчин гідро фосфату амонію при постійному перемішуванні при кімнатній температурі відповідно до реакції (1.3):



Для перетворення отриманого гелю аморфного фосфату кальцію в суспензію нанокристалічного ГА реакційну суміш нагрівають до  $T = 60 \text{ }^\circ \text{C}$ . Отриману суспензію фільтрують, відфільтрований осад висушують в тонкому шарі [13].

### 1.3. Апатит-полімерні композитні матеріали

Композитні матеріали, в основі яких ГА та полімери природнього та синтетичного походжень знайшли свою нішу в якості медичних матеріалів, оскільки кісткова тканини має лише одну відмінну від них рису – вона насичена тканинами й рідинами, утворюючи біологічну систему. Матеріал на основі ГА володіє остеоіндуктивними властивостями, які ще не достатньо вивчені, проте деякі можна пояснити наступним чином:

1) поверхнева структура імплантованого матеріалу визначає селективну абсорбцію на його поверхні неколагенових білків позаклітинного матриксу - фібронектину, вітронектину, остеокальцину, кісткових сіалопропротеїнів та ін., які через клітинно-субстратні адгезивні рецептори (інтегрини) сприяють подальшій адгезії клітин-попередників - остеобластів, їх проліферації й диференціюванню при



одночасному гальмуванню адгезії і зростання клітин фібробластичної лінії;

2) наноструктурований гідроксиапатит, маючи виокорозвинену площу поверхні, абсорбує численні ендogenous кісткові морфогенетичні й остеогенні білки, які є остеоіндуктивними факторами в процесі прикріплення до імплантату й диференціювання малодиференційованих клітин реципієнта в остеобласти.

Композитні матеріали на основі нанокристалічного (розмір кристалітів до 100 нм), нестехіометричного кальційдефіцитного ГА відзначаються підвищеною хімічною та біологічною активністю в процесах відновлення враженої кісткової тканини. Однак, тверді форми ГА, отримані при високотемпературній обробці, не мають достатньої біологічної активності.

Тільки за умов низькотемпературного синтезу гелю та порошоків ГА вдається отримати матеріали, близькі за структурою до природного біоапатиту. Такий матеріал, створений на основі гідрогелю ГА та альгінату в лабораторії «Біо-нанокомпозит» СумДУ у формі гранул, уже пройшов *in vivo* дослідження та дістав високу оцінку спеціалістів [21].

Встановлено, що біокомпозитні матеріали на основі альгінату володіють високою біосумісністю, гарною гідрофільністю, не мають імуногенних властивостей та здатні стимулювати остеопластичні процеси [22].

Альгінат представляє собою ланцюг безазотистих полісахаридів, що складається із блоків залишків  $\beta$ -D-маннуринової кислоти або її C-5-епімеру (M) та  $\alpha$ -L-гулуринової кислоти (G), які з'єднані між собою 1-4- глікозидними зв'язками.

Альгінати, як правило, використовують у вигляді гідрогелів у біомедицині, у тому числі для загоєння ран, доставки ліків і тканинної

інженерії. Гідрогелі представляють собою «зшити» тривимірну сітку, утворену гідрофільними полімерами з високим вмістом води. Їхні фізико-хімічні властивості критично залежать як від типу та щільності «зшивки», так і від молекулярної ваги та хімічного складу полімерів. Збільшення молекулярної маси альгінату може поліпшити фізичні властивості отриманих гелів [21].

З іншого боку серед біополімерів велику наукову привабливість в області медицини, біотехнологій, фармації, косметики має хітозан. Хітозан є полісахаридом, одним з небагатьох природних катіонітів. В своїй структурі він має три типи реактивних функціональних груп, які забезпечують його хімічні взаємодії. Це надає хітозану таких властивостей, як біосумісність з нативними тканинами макроорганізму, біодеградація, протимікробна активність [23, 24].

Глюкозамінні ланки в структурі хітозану є місцями приєднання до його молекулярного ланцюга.

Так, в протонованій формі аміногрупи дозволяють приєднання через електростатичну взаємодію, нуклеофільні властивості амінів дозволяють приєднання шляхом ковалентних зв'язків, оскільки аміни мають активну йонну пару електронів на електронегативному атомі азоту. Саме ці електрони приєднуються до позитивно зарядженої частини іншої молекули. З йонами металів хітозан зв'язується через механізми комплексоутворення [25]. На рис. 4.1. подана структурна хімічна формула двох ланцюгів хітозану (1) та механізм їх «зшивання» двовалентним йоном металу (2).

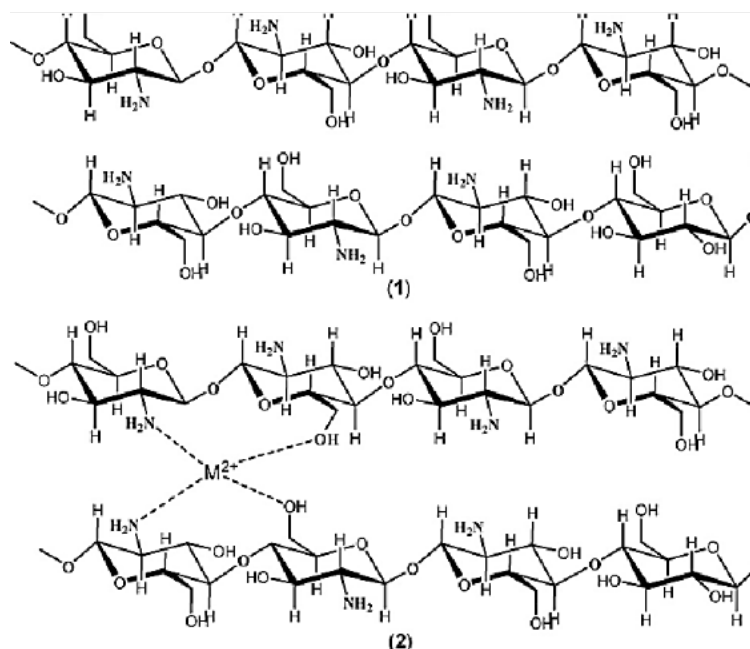


Рисунок 1.3 – Схема утворення комплексу метал-хітозан [25]

Вище наведені властивості хітозану широко використовують на практиці комплексно з факторами росту, антибактеріальними агентами, у складі матеріалів на основі гідроксиапатиту для лікування кісткової тканини . З літературних джерел відомо, що хітозан проявляє протимікробну та фунгіцидну дію щодо широкого спектру мікроорганізмів [26-28].

#### 1.4. Йони металів в структурі кісткової тканини

Як відомо, багато металів присутні в тканинах в дуже малих

концентраціях, але саме вони відіграють суттєву роль в регуляції клітинних функцій, активують або інгібують ферментативні процеси [29,30].

Металоорганічні сполуки, до складу яких входять перехідні елементи (Ag, Zn, Cu, Ti, Co, V, Cr,) відіграють важливу роль в синтезі матеріалів, створенні лікарських препаратів, каталізі, фотохімії, біологічних системах, проявляють протимікробні властивості в складі терапевтичних засобів [31].

Літературні дані свідчать, що такі елементи в результаті особливостей будови їх внутрішніх електронних оболонок (так звані  $d^{10}$  йони), мають ряд загальних специфічних властивостей, а саме: здатність до комплексоутворення, можливість набувати різних ступенів окислення, взаємодіяти з рядом негативно заряджених молекул [32].

Для покращення фізико-хімічних та механічних властивостей матеріалів для заміщення кісткової тканини при синтезі можливе додавання йонів перехідних металів, присутніх у біологічному апатиті. В останні роки інтерес до наночастинок оксиду цинку (ZnO) значно збільшився, головним чином, через їхні фізичні, хімічні й біологічні властивості. *In vitro* дослідження підтвердили, що іони цинку мають прямий специфічний проліферативний ефект на остеобласти [33], виконують селективну інгібуючу дію при резорбції кісткової тканини остеокластами, що пов'язаний з пригніченням сигнального шляху  $Ca^{2+}$  Calcineurin-NFATc1. Таким чином, на думку дослідників, цинк може бути корисним терапевтичним кандидатом для запобігання втрати кісткової тканини, викликаній активацією NFATc1 в остеокластах. Крім того, цинк інгібує життєдіяльність і ріст мікроорганізмів, бере участь у багатьох метаболічних клітинних процесах (репарація й регенерація), у синтезі колагену – важливого

елементу для загоєння і відновлення клітинних тканин [24]. Серед іонів металів, цинк присутній в якості мікроелемента в кісткових мінералах, сприяє щільності кісткової тканини й запобігає втраті кісткової маси [34]. Так, був синтезований гідроксиапатит в присутності іонів  $Zn^{2+}$  та альгінату натрію [35]. Результати цього дослідження показали, що в ході синтезу відбулося утворення нестехіометричного кальцій дефіцитного гідроксиапатиту з додатковою фазою  $ZnO$ . Після прогрівання зразків до  $900\text{ }^{\circ}\text{C}$  методом рентгенівської дифракції було показано появу двох додаткових фаз – трикальцій фосфату та кальцій цинк фосфату, що є наслідком часткового заміщення в кристалічній структурі гідроксиапатиту іонів  $Ca^{2+}$  на іони  $Zn^{2+}$  під час проходження температурної обробки. При цьому відбулося зменшення основних параметрів кристалічної ґратки гідроксиапатиту, що є доказом іонного включення іонів  $Zn^{2+}$ , які мають менший іонний радіус ( $0,074\text{ нм}$ ) у порівнянні із  $Ca^{2+}$  ( $0,104\text{ нм}$ ).

В ході виконання даної роботи був розглянутий вплив іонів алюмінію на формування ГА. Алюміній (Al), який широко зустрічається в кістках та зубах, є мікроелементом твердих тканин людини. Однак біологічний ефект Al залишається спірним: повідомлялися як позитивні, так і негативні функції елемента в метаболізмі кісткової тканини людини [36-38]. Кілька досліджень на тваринах показали, що низькі дози Al можуть індукувати остеогенез [39-41]. І навпаки, Al відзначено зниження утворення і зростання кісток *in vitro* [42] Al вважався потенційно токсичним і викликав аберантний метаболізм кісток, такий як остеомаліяція і остеопороз [43-46]. Розуміння факторів і механізмів, які впливають на процес метаболізму кістки, має першорядне значення для розвитку профілактичних методів та лікування цих захворювань. У попередніх дослідженнях в основному представлені експериментальні і клінічні

ефекти Al на біологічні характеристики. У твердих тканинах людини гідроксиапатит  $[HA; Ca_{10} (PO_4)_6 (OH)_2]$  є основною неорганічною складовою, і, таким чином, на біологічні ефекти Al в тверди тканинах впливає зміна фізичних і хімічних характеристик HA, легуваних Al [47, 48].

## РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 2.1. Інструментальні методи дослідження кальцій-фосфатних сколук

#### 2.1.1. Рентгено-флуоресцентний аналіз (РФА)

Метод рентгено-флуоресцентного аналізу базується на залежності інтенсивності рентгенівської флуоресценції від концентрації елемента в зразку. При опроміненні зразка потужним потоком випромінювання рентгенівської трубки виникає характеристичне флуоресцентне випромінювання атомів пропорційне їх концентрації в зразку. Опромінення атомів зразка фотонами з високою енергією - збудливим первинним випромінюванням рентгенівської трубки викликає випускання електронів. Електрони залишають атом [49]. Як наслідок, в одній або більше електронних орбіталах утворюються "дірки" - вакансії, завдяки чому атоми переходять в збуджений стан, тобто стають нестабільні. Через мільйонні частки секунди атоми повертаються до стабільного стану коли вакансії у внутрішніх орбіталах заповнюються електронами із зовнішніх орбіталей. Такий перехід супроводжується випусканням енергії у вигляді вторинного фотона - це явище і називається "флуоресценція". Енергія вторинного фотона

знаходиться в діапазоні енергій рентгенівського випромінювання, яке розташовується в спектрі електромагнітних коливань між ультрафіолетом і гамма-випромінюванням (рис. 2.1) [50].

Метод рентгенофлуоресцентного аналізу (РФА) заснований на вимірюванні енергій (довжин хвиль в спектрометрах з хвильової дисперсією) і інтенсивностей спектральних ліній, емітованих в результаті вторинної рентгенівської емісії. Первинний потік квантів від рентгенівської трубки опромінює зразок, змушуючи кожен елемент цього зразка випускати вторинні рентгенівські кванти, які мають властивий тільки цьому елементу набір енергій (основа для якісного визначення складу). Інтенсивність потоку вторинного виходу, залежить від вмісту цього елемента в пробі (основа для кількісного аналізу). Спектри рентгенівської флуоресценції пов'язані з електронними переходами в внутрішніх рівнях атома. Головним завданням кількісного РФА є обчислення вмісту вимірюваного елемента з інтенсивностей спектральних ліній всіх елементів зразка. Ця аналітична залежність ускладнена впливом матричних ефектів, тобто поглинанням, або, навпаки, посиленням характеристичної вторинної емісії вимірюваного елемента іншими елементами матриці за рахунок вторинної флюоресценції.

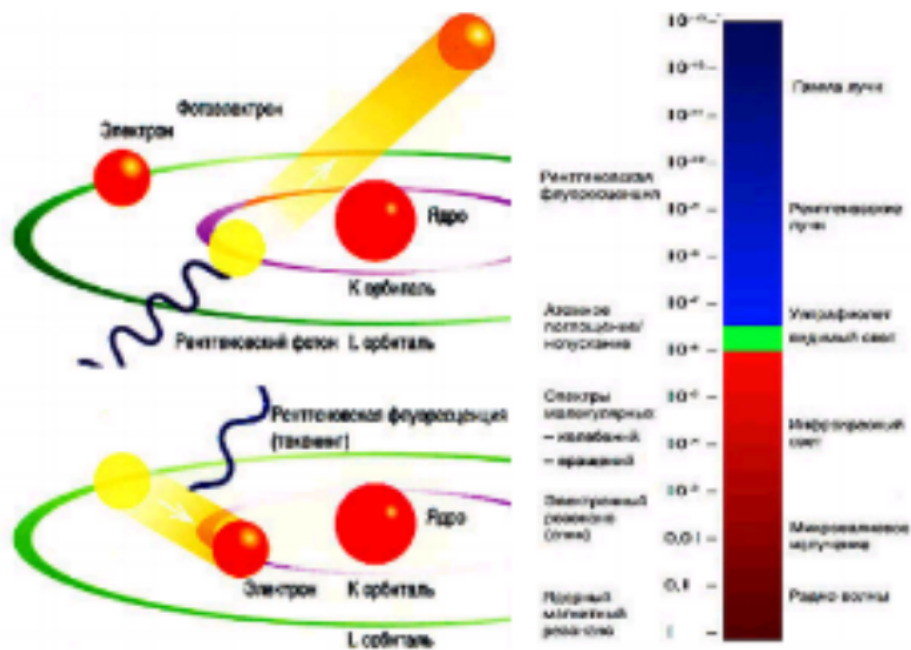


Рисунок 2.1 – Механізм виникнення атомної флуоресценції [50]

Різні електронні орбіталі позначаються K, L, M, де K - орбіталь, найближча до ядра. Кожній орбіталі електрона в атомі кожного елемента відповідає власний енергетичний рівень. Енергія вторинного фотона визначається різницею між енергією початковою і кінцевою орбіталей, між якими відбувся перехід електрона. Основні електронні переходи наведені на рис. 2.2. [50].

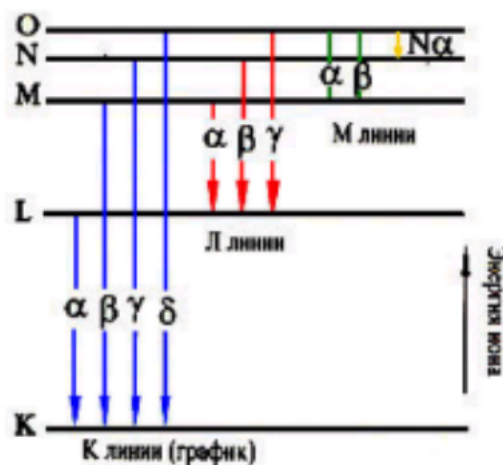


Рисунок 2.2 – Основні електронні переходи рентгенівської флуоресценції



Довжина хвилі випускається фотона пов'язана з енергією формулою

$$E = E_1 - E_2 = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.1),$$

де  $E_1$  і  $E_2$  - енергії орбіталей, між якими відбувся перехід електрона,  $h$  - постійна Планка,  $c$  - швидкість світла,  $\lambda$  - довжина хвилі (вторинного) фотона. Таким чином, довжина хвилі флуоресценції є індивідуальною характеристикою кожного елемента і називається характеристичною флуоресценцією. Інтенсивність (число фотонів, що надходять за одиницю часу) пропорційна концентрації (кількості атомів) відповідного елемента. Це дає можливість елементного аналізу речовини: визначення кількості атомів кожного елемента, що входить до складу зразка [51].

Енергія ліній характеристичного випромінювання для деяких елементів дана на рис. 2.3., де наведені типові спектри K та L- серій рентгенівського випромінювання, що отримані за допомогою енергетичних спектрометрів з високою роздільною здатністю. Загальна схожість з еталонною формою енергетичного спектру рентгенівського випромінювання перевіряють на першому етапі виявлення та ідентифікації зразку.

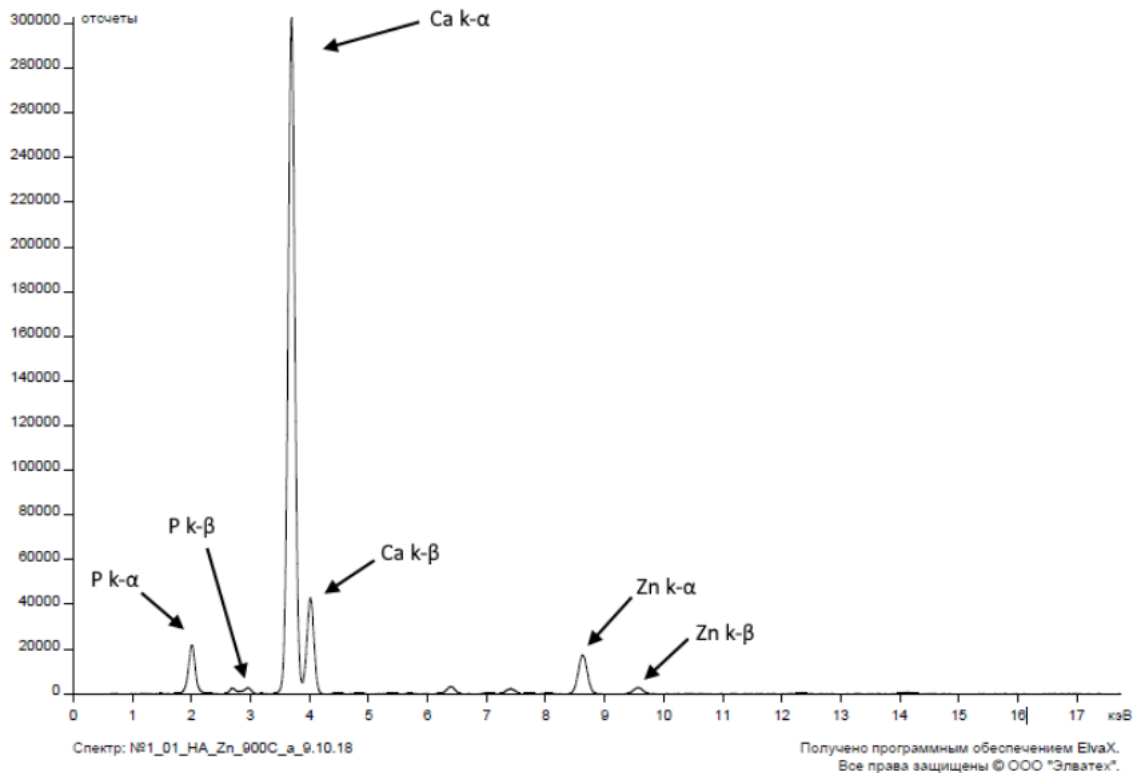


Рисунок 2.3 - «К-серія» характеристичного рентгенівського випромінювання. Тут можна побачити типові спектри К та L- серій рентгенівського випромінювання, що відповідають цинку, фосфору та кальцію.

### 2.1.2. Програмно – методична база аналізу спектрометра ElvaX

Програмне забезпечення кількісного аналізу спектрометра ElvaX включає безеталонний метод фундаментальних параметрів і регресійний алгоритм.

### 2.1.3. Метод фундаментальних параметрів

При використанні методу фундаментальних параметрів в процесі виконання кількісного аналізу результат автоматично нормується на 100%. Якщо в зразку присутні елементи легші за Na, то їхні масові частки потрібно задати як не вимірювальні елементи.

Тому метод фундаментальних параметрів в даному випадку не прийнятний і потрібно застосовувати для кількісного аналізу регресійну модель.

#### 2.1.4. Регресійний метод

Регресійний метод аналізу спектрів використовує емпіричний математичний опис реальних фізичних залежностей між інтенсивністю спектральних ліній і концентрацією елементів. Для побудови розрахункової моделі використовується масив стандартних зразків, подібних за складом з аналізованими пробами. При переході вимірювань до зразків з іншим складом елементів необхідне переналаштування калібрувальних залежностей по іншому набору стандартів.

#### 2.1.5. Метод рентгенівської дифракції

Рентгенівський структурний аналіз – метод дослідження атомної структури речовини з використанням явища дифракції рентгенівських променів. Дифракція рентгенівських променів відбувається при їх взаємодії з електронними оболонками атомів досліджуваної речовини. Дифракційна картина залежить від довжини хвилі випромінювання, яке використовується та атомної структури досліджуваного об'єкту.

Кристалічні речовини мають чітку періодичність будови, та являють собою створену самою природою дифракційну решітку для рентгенівського випромінювання.

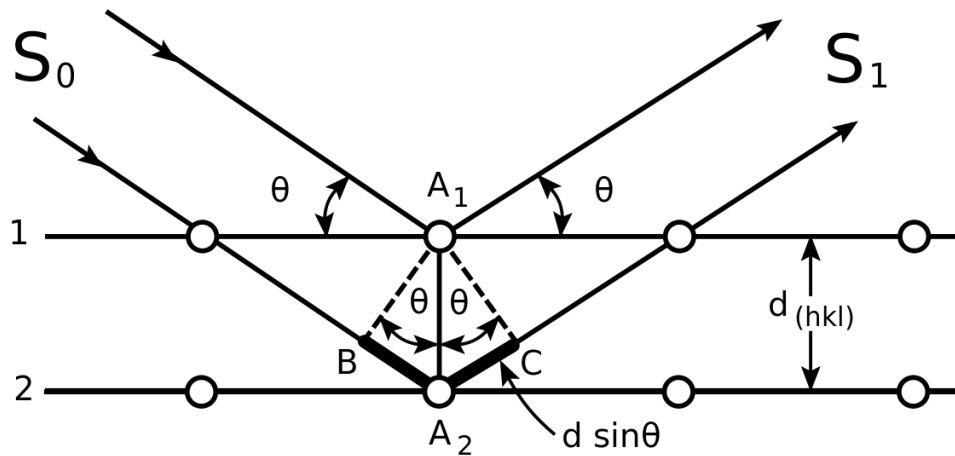


Рисунок 2.4 – Схематичне зображення кутів рентгенівської дифракції (до рівняння Вульфа-Брегга)

Дія двох пучків рентгенівських променів через систему двох атомних площин у кристалі схематично показана на рис. 2.4. різниця ходу двох пучків становить  $2\Delta$ . Оскільки  $2\Delta = d \cdot \sin \theta$ , де  $d$  – відстань між двома сусідніми атомними площинами (*міжплощинна відстань*), то різниця ходу дорівнює  $2d \cdot \sin \theta$ . Для зразків конструкційної інтерференції різниця ходу повинна дорівнювати  $n \cdot \lambda$ :

$$2d \cdot \sin \theta = n \cdot \lambda \quad (2.2),$$

де  $d$  – міжплощинна відстань, Å;  $\lambda$  – довжина хвилі рентгенівського випромінювання, Å;  $\theta$  – кут падіння (відбиття) рентгенівських променів, град.;  $n$  – порядок відбиття (1,2,3, .....).

Співвідношення (2.2) називається умовою *Вульфа-Брегга*.

Умова Вульфа-Брегга дозволяє, знаючи величину  $\lambda$  та експериментально виміряні кути  $\theta$ , визначити значення міжплощинних відстаней досліджуваної кристалічної структури речовини у вузлах конструкційної інтерференції. Інтенсивність цієї інтерференції пов'язана із симетрією кристалічної ґратки.

Для визначення параметрів елементарної комірки кристалічних

матеріалів необхідно виконати ідентифікацію атомних площин, тобто позначити їх індексами, які відповідають їх просторовому положенню в елементарній комірці, відносно вибраних у ній координатних вісей ( $h, k, l$  – індекси Міллера).

Для роботи на дифрактометрі використовується плоский зразок. Щоб збільшити кількість кристалів, які беруть участь у формуванні дифракційної картини, матеріал перед проведенням аналізу ретельно подрібнюють, розтирають із спиртом в агатовій ступці, дають висохнути, а потім наносять на плоску поверхню підкладки, або виготовляють пресовану таблетку. Зразок розташовуються у стандартну форму (кювету гоніометра) таким чином, щоб його поверхня була рівною і співпадала із верхнім краєм кювети.

Даний тип досліджень був проведений за допомогою рентгенівського дифрактометра ДРОН-3 (рис. 2.5.), який є універсальним дифрактометром і може бути використаний для дослідження як монокристалів, так і полікристалічних речовин.



Рисунок 2.5 – Загальний вигляд дифрактометра ДРОН-3.

Дифрактометр складається з наступних основних частин:

гоніометра (рис. 2.6.), джерела рентгенівського випромінювання (рис. 2.7.), блока вимірювально-реєструючої і керуючої апаратури в комплексі з персональним комп'ютером.

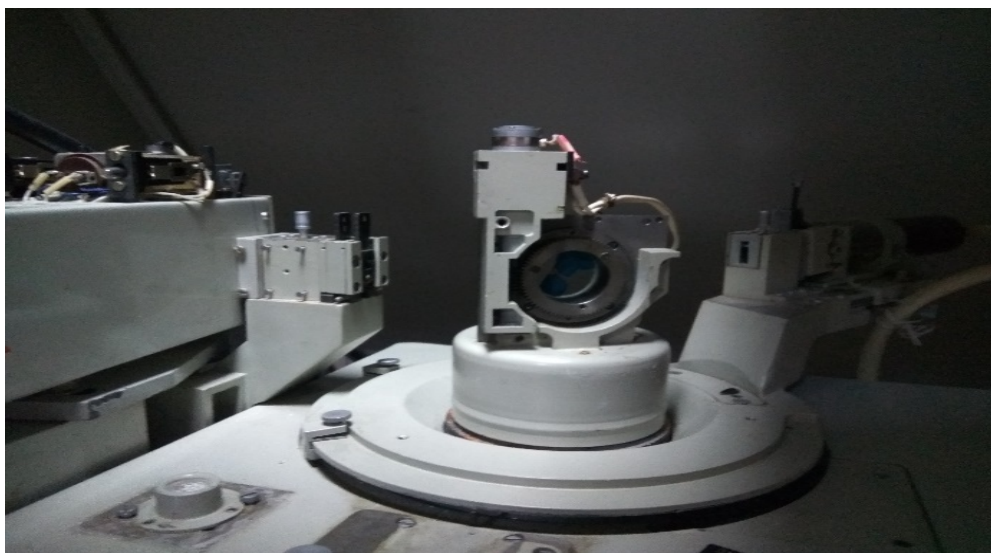


Рисунок 2.6 – Загальний вигляд гоніометра ГУР-9

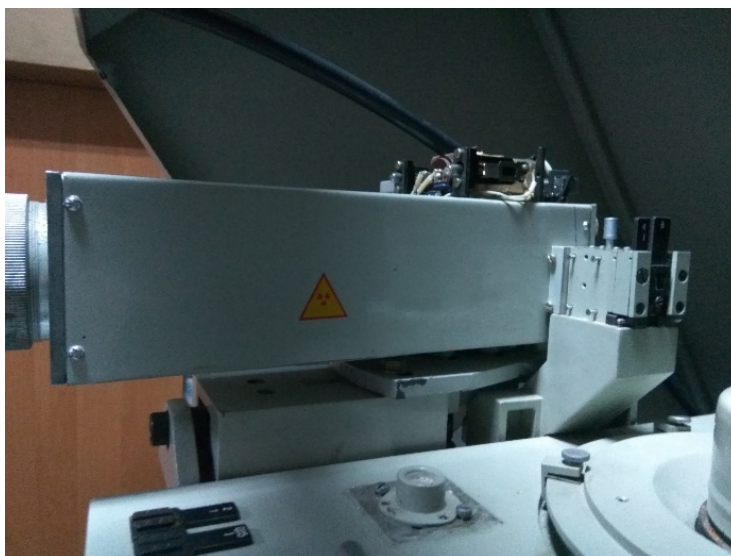


Рисунок 2.7 – Джерело рентгенівського випромінювання ІРИС-7.

Принцип роботи гоніометра заснований на явищі дифракції рентгенівських променів від атомних площин кристалічної ґратки досліджуваної речовини. В приладі використовується

монохроматичне рентгенівське випромінювання, джерелом якого є рентгенівська трубка ВБС-27 з мідним анодом ( $\lambda = 1,54018 \text{ \AA}$ ). У гоніометрі ГУР-9 реалізований метод фокусування рентгенівського випромінювання по Брегу–Брентано (рис. 2.8.).

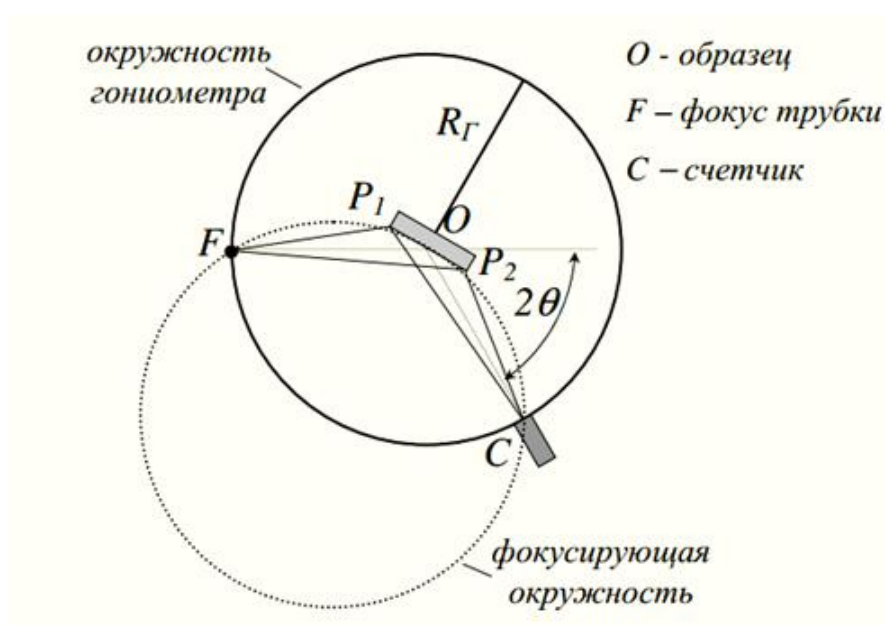


Рисунок 2.8 – Схема фокусування по Брегу–Брентано

У гоніометрі щілину S1 джерела випромінювання F і щілину S2 лічильника розташовуються на колі радіуса R, в центрі якого знаходиться плоский зразок. Радіус фокусу кола  $r = R/2\sin\theta$  міняється при зміні кута відбиття  $\theta$ . Щоб виконувалася умова фокусування, використовують метод  $\theta / 2\theta$ -сканування. В цьому випадку встановлюють площину зразка при  $\theta = 0$  уздовж первинного пучка, а при зміні положення лічильника на кут  $2\theta$  повертають зразок на кут  $\theta$ .

Відбите випромінювання потрапляє на детектор, який перетворює рентгенівські кванти в електричні сигнали, кількість яких пропорційна інтенсивності випромінювання. Електричні імпульси виходу з блоку детектора надходять в керуючий блок, де посилюються і використовуються в якості інформаційного сигналу

для вимірювання і реєстрації швидкостей імпульсів рентгенівського випромінювання.

Початковий кут сканування  $\theta$ , визначений за оптичною шкалою гоніометра, вводиться в керуючий блок з клавіатури комп'ютера у відповідне поле комп'ютерного меню приладу. Подальший від-рахунок кутів проводиться блоком автоматики і видається на екрані комп'ютера у вигляді відміток на дифрактограмі в режимі реального часу і в цифровому вигляді у відповідному полі меню. Крок кутового відліку може вибиратися в межах від 0,01 до 5 градусів.

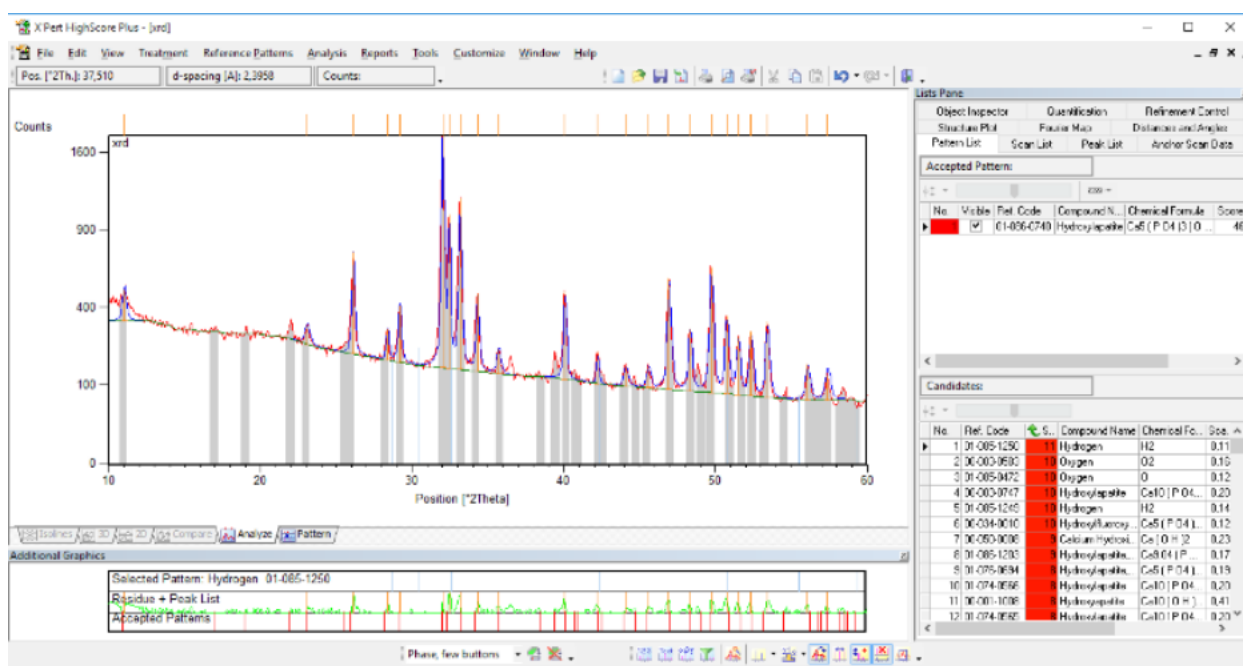


Рисунок 2.9 – Рентгенограма отримана за допомогою ДРОН-3

На рис. 2.9. показана рентгенограма, горизонтальна вісь якої відповідає за кут відбиття  $2\theta$ , а вертикальна вісь відповідає кількості рентгенівських квантів, що перетворюються в електричні сигнали, кількість яких пропорційна інтенсивності випромінювання.

## 2.2. Матеріали та методики



Нижче наведені характеристики матеріалів, що використовувалися в експериментах, технологічна схема отримання порошків ГА, описані етапи отримання зразків та методи дослідження їх структури та основних властивостей.

Під час виконання дипломної роботи були синтезовані композитні матеріали на основі ГА з включенням біополімерів – Хітозану та Альгінату. Ключовим етапом синтезу було додавання іонів Zn та Al в різних концентраціях, для перевірки здатності ГА заміщати йони Ca на вищезгадані.

Вплив мікрохвильової енергії, під час створення композитів, дозволив значно скоротити час дозрівання матеріалу. Поглинання мікрохвильових випромінювань матеріалами, з подальшим вивільненням тепла, проходить за допомогою двох специфічних механізмів - дипольних взаємодій та йонної провідності. Мікрохвилі не здатні змінювати молекулярну структуру, оскільки вони не мають достатньої енергії, щоб зламати ковалентні хімічні зв'язки [56]. Тому, щоб оптимізувати умови синтезу використовують мікрохвильову техніку [57].

### 2.2.1. Матеріали

Кальцій нітрат  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  тетрагідрат ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), Гідрофосфат амонію  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , Гідроксид амонію  $(\text{NH}_4\text{OH})$  класифікації «ХЧ» (виробництво «Merck»); натрію альгінат молекулярною масою 150 кДа, (E401), Китай), хітозан молекулярною масою 150-300 кДа, Альгінат натрію  $(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6\text{Na})_n$ .

### 2.2.2. Методики синтезу

*Методика синтезу зразків  $\text{HA}_{\text{Zn}}$  та  $\text{HA}_{\text{Al}^{3+}}$*

Утворення продукту відбувалось методом «мокрої хімії»

наступним чином:

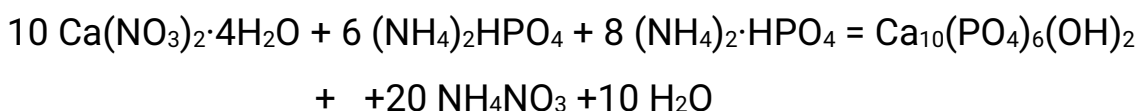
1. До 300 мл водного розчину 0,167 М кальцій нітрату тетрагідрату  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  додавали водний розчин Нітрат цинку  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  або нітрату алюмінію  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  в концентраціях, які становили 25% та 2,5% від концентрації нітрату кальцію, тобто 0,045М та 0,0045М. В подальшому вміст цинку та алюмінію у зразках буде позначений як  $k=1$  та  $k=0,1$  відповідно.

2. 300 мл 0,1 М розчин гідрофосфату амонію  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  додавали по краплях до суміші розчинів сполук кальцію та цинку або кальцію та алюмінію (п.1).

3. Значення  $\text{pH}=10,5$  реакційної суміші досягали додаванням 25% водного розчину  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Реакцію синтезу проводили під дією мікрохвильового випромінювання при потужності 450 Вт в мікрохвильовій печі M1712NR протягом 3 хвилин.

4. Після охолодження утворений осад багаторазово промивали дистильованою водою до  $\text{pH} \sim 7,4$  та відділяли за допомогою центрифуги. Після цього отриманий продукт висушували при  $37^\circ\text{C}$  або відпалювали при  $900^\circ\text{C}$  протягом 1 години.

Утворення ГА за відсутності сполук металів відбувається за наступною реакцією:



Додавання  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  або  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  в ході синтезу під дією мікрохвильового випромінювання  $mW$  вносить певні корективи в ході реакції, які можуть привести до часткового заміщення йонів кальцію в ГА йонами цинку або алюмінію що, можливо, і призводить до утворення інших кальцій фосфатних сполук.

*Методика синтезу зразків  $\text{HA}_{\text{Zn}}\text{Alg}$  та  $\text{HA}_{\text{Al}^{3+}}\text{Alg}$*

1. До 300 мл водного розчину 0,167 М кальцій нітрату тетрагідрату  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  додавали водний розчин нітрату цинку  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  або нітрату алюмінію  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  в концентраціях, які становили 25% та 2,5% від концентрації нітрату кальцію, тобто 0,045М та 0,0045М. В подальшому вміст цинку та алюмінію у зразках буде позначений як  $K=1$  та  $K=0,1$  відповідно (P1).

2. До 300 мл 0,1 М розчину гідрофосфату амонію  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  додавали 1,2 г порошку альгінату натрію для утворення 0,4% розчину та залишали в сушильній шафі при температурі 37 С протягом 1 доби, після чого обробляли ультразвуком протягом 2 хвилин до утворення гомогенної субстанції(P2).

3. Додавали суспензію P2 до суміші P1 крапельним методом при постійному перемішуванні на магнітному змішувачі ( $\text{rpm}=1200$ ) для утворення однорідної суспензії (P3).

4. До P3 додавали близько 50 мл 25% мас.водного розчину аміаку до досягнення значення  $\text{pH}=10,5$  реакційної суміші (P4).

5. Реакцію синтезу проводили під дією мікрохвильового випромінювання при потужності 450 Вт в мікрохвильовій печі M1712NR протягом 3 хвилин (10 разів по 30 секунд). Кінцева температура суміші складала близько 50°C.

6. Після охолодження утворений осад багаторазово промивали дистильованою водою до  $\text{pH}\sim 7,4$  та відділяли за допомогою центрифуги. Після цього отриманий продукт висушували при 37°C або відпалювали при 900 °C протягом 1 години.

#### *Методика синтезу зразків $\text{HA}_{\text{Zn}}\text{CS}$ та $\text{HA}_{\text{Al}^{3+}}\text{CS}$*

1. До 300 мл водного розчину 0,167 М кальцій нітрату тетрагідрату  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  додавали водний розчин нітрату цинку  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  або нітрату алюмінію  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  в концентраціях, які

становили 25% та 2,5% від концентрації нітрату кальцію, тобто 0,045M та 0,0045M. В подальшому вміст цинку та алюмінію у зразках буде позначений як  $k=1$  та  $k=0,1$  відповідно (P1).

2. Хітозан в кількості 1,2 г розчиняли в 300 мл 1% оцтової кислоти в сушильній шафі при температурі 37°C протягом 1 доби, після чого обробляли ультразвуком протягом 2 хвилин до утворення гомогенної субстанції. До утвореної суспензії додавали 300 мл 0,1 M розчину гідрофосфату амонію  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . (P2).

3. Суспензію P2 додавали до суміші P1 крапельним методом при постійному перемішуванні на магнітному змішувачі ( $\text{rpm}=1200$ ) для утворення однорідної суспензії (P3).

4. До P3 додавали близько 50 мл 25% мас.водного розчину аміаку до досягнення значення  $\text{pH}=10,5$  реакційної суміші (P4)

5. Реакцію синтезу проводили під дією мікрохвильового випромінювання при потужності 450 Вт в мікрохвильовій печі M1712NR протягом 3 хвилин (10 разів по 30 секунд). Кінцева температура суміші складала близько 50 °C.

6. Після охолодження утворений осад багаторазово промивали дистильованою водою до  $\text{pH}\sim 7,4$  та відділяли за допомогою центрифуги. Після цього отриманий продукт висушували при 37°C або відпалювали при 900 °C протягом 1 години.

### РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

**МЕТА** Біоapatити характеризуються присутністю домішкових йонів, більшість з яких беруть важливу участь в метаболізмі. З цієї причини ГА з йонним заміщенням біологічно значимі та привабливі для тканинної інженерії.

Багато досліджень, які присвячені йонному заміщенню не мають достатніх експериментальних зразків регулярної інкорпорації домішкових йонів в структуру ГА. Безумовно, це пов'язано з певними експериментальними труднощами виявлення подібної інкорпорації, а саме низького ступеня кристалічності неорганічного середовища і дуже малою кількістю домішкових йонів (ДІ).

Два головних чинника, а саме розмір ДІ і здатність структури переносити деформації, тобто зміну решітки, визначають ступінь акомодатії структури ГА при йонному заміщенні. У відповідності до правила Гольдшміта (Goldschmit), йони одного елементу можуть заміщувати йони іншого в йонних кристалах, якщо різниця між йонними радіусами не більше 15 %, а їх заряди відрізняються не більше як на  $\pm 1$ , при умові збереження електронейтральності. Якщо заміщення включає гетеровалентні йони, зарядовий баланс має зберегтися завдяки спареному паралельному заміщенню ( $\text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$  спарено з  $\text{Na}^+ \rightarrow \text{Ca}^{2+}$ ).

Наявність йонного заміщення може бути встановлена завдяки XRD-аналізу (метод рентгенівської дифракції). Порошковий XRD-спектр твердого розчину включає тільки одну кристалічну фазу і акуратне визначення параметрів решітки елементарної комірки (ЕК) дозволяє перевірити зміни відносного складу.

Розміри ЕК, як правило, зростають при заміщенні меншого

йона на більший, але зміна їх орієнтації також залежить від фактора заміщення. Зсув піка на дифрактограмі в сторону менших кутів відповідає збільшенню міжплощинних відстаней.

Йонне заміщення також викликає абсорбційного ІЧ-спектру (розщеплення смуг та зсуви).

Як було вище сказано, ГА широко використовується в якості біологічно активної речовини при відновленні та заміні твердих кісткових тканин. НА, легований різними сторонніми йонами, такими як  $F$ ,  $CO_2^{3-}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$  і  $SiO_4$  довів свою ефективність в зміні фізико-хімічних властивостей і стимулюванні активності кісткових клітин, значно поліпшивши біологічну працездатність імплантатів НА [52]. Також повідомляється, що наночастинки ГА з вмістом алюмінію є біосумісними і придатними для біомедичного використання [53]. Основна увага дослідників приділена механізму, який лежить в основі заміщення та розташування у кристалічній ґратці ГА таких йонів, як  $Sr$ ,  $Si$ ,  $F$  і  $Cd$ , проте кристалографічні стани  $Al^{3+}$  в кристалічній структурі ГА залишаються невідомими.

В ході даної роботи були синтезовані та досліджені зразки ГА з вмістом йонів  $Zn^{2+}$  та  $Al^{3+}$ , визначені їх структурні параметри методом рентгенівської дифракції, а також досліджений елементний склад за допомогою рентгено-флуоресцентного аналізу. В ході експерименту також було досліджено вплив полімерів - альгінату натрію (Alg) та хітозану (CS) на формування кристалітів ГА.

Для дослідження було підготовано декілька груп зразків, а саме: НА\_01Zn, НА\_01Zn\_Alg, НА\_01Zn\_CS, НА\_1Zn, НА\_1Zn\_Alg, НА\_1Zn\_CS, НА\_01Al, НА\_01Al\_Alg, НА\_01Al\_CS, НА\_1Al, НА\_1Al\_Alg, НА\_1Al\_CS.

В ході синтезу ГА водний розчин нітрату цинку  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  або нітрату алюмінію  $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  додавали до суміші сполук

фосфору та кальцію в концентраціях, які становили 25% та 2,5% від концентрації нітрату кальцію, тобто 0,045M та 0,0045M. В подальшому вміст цинку та алюмінію у зразках буде позначений як K=1 та K=0,1 відповідно. Концентрація CS та Alg становила 0,4% по відношенню до об'єму суміші реагентів.

Методом рентгенівської дифракції досліджували зразки, як висушені при 37°C, так і відпалені за температури 900°C.

Щоб визначити параметри елементарної комірки, такі як середній розмір, ширина та висота, виконали ідентифікацію індексів Міллера для атомних площин, відносно координатних вісей. (h, k, l – індекси Міллера).

$$a_{hko} = 2d_{hko} \frac{\sqrt{3}}{3} \sqrt{h^2 + hk + k^2} \quad \text{і} \quad c_{00l} = l \cdot d_{00l}, \quad (3.1)$$

де  $a_{hko}$  – параметр елементарної комірки для площини з індексами hko;

$d_{hko}$  – міжплощинна відстань площини hko;

$h, k, l$  – індекси Міллера;

$c_{00l}$  – параметр елементарної комірки для площини з індексами 00l;

$d_{00l}$  – міжплощинна відстань площини 00l.

Для розрахунку були обрані найбільш чіткі та інтенсивні піки з індексами (002), (130), (004) та (222). Пік з індексом (002) найчастіше застосовується для розрахунку параметру  $c$ .

Середній розмір кристалітів розрахований за формулою Селякова-Шеррера [54]:

$$L = \frac{K \lambda}{\beta_m \cos \theta}, \quad (3.2)$$

де  $K$  – безрозмірна константа, яка залежить від форми кристалітів ( $K = 1$ );

$\beta_m$  – інтегральна ширина дифракційного профілю;

$\lambda$  – довжина хвилі рентгенівського випромінювання;

$\theta$  – кут дифракції.

Рівень мікродеформацій вимірювався як відношення зміни міжплощинної відстані отриманого зразка відносно еталону, у якої деформації відсутні. У випадку, коли деформація у зразку відбувається лише через деформації кристалічної решітки, то величина мікродеформацій розраховується за формулою:

$$\varepsilon = \frac{\beta_n}{4 \operatorname{tg} \theta}, \quad (3.3)$$

де  $\beta_n$  – інтегральна ширина дифракційного профілю.

### 3.1. Дослідження зразків ГА з вмістом цинку та полімерів

Рисунок 3.1. демонструє рентгенівські спектри від зразків ГА з вмістом йонів цинку, а в таблиці 3.1. приведені розраховані на основі XRD аналізу структурні параметри кристалітів.



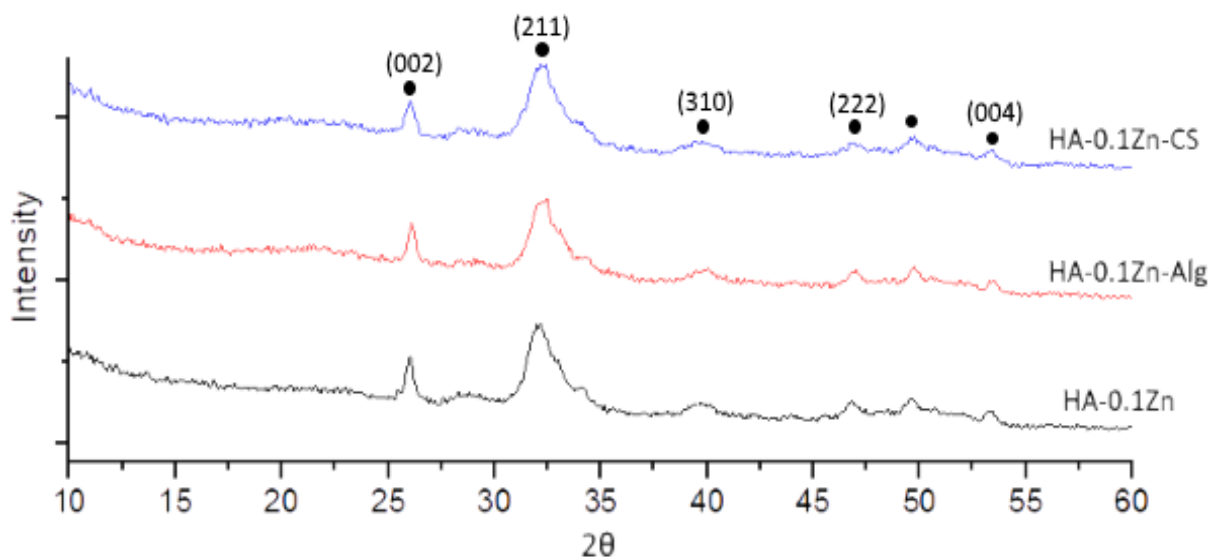


Рисунок 3.1 – Дифрактограми зразків з вмістом йонів цинку у композитному матеріалі, висушеному при 37°C, за умови, що вихідна концентрація  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  становила 0,0045 М (K=0.1). ● – ГА (JCPDS 1-1008).

Дифрактограми демонструють низьку кристалічність зразків, висушених при 37 °C , що підтверджується розширеними піками та малими розмірами кристалітів 25-28 нм (таб 3.1.). Індексом Міллера на дифрактограмах позначені основні піки, які відповідають ГА.

Таблиця 3.1 – Структурні параметри ГА у композитному матеріалі з вмістом йонів цинку та полімерів, висушеному при 37°C, за умови, що вихідна концентрація  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  становила 0,0045 М (K=0.1).

Зразок	Індекс Міллера	Параметри решітки, А		Середній розмір кристаліті в, нм	Рівень мікродеформації
	hkl	<i>a</i>	<i>c</i>	L	$e \cdot 10^3$
№1 HA-0,1Zn	310	9,42	6,83 7	28,84	0,328
	002				

№3 HA-0,1Zn-Alg	310	9,40	6,81	28,84	0,327
	002	1	8		
№6 HA-0,1Zn-CS	310	9,39	6,81	25,04	0,376
	002	6	8		

За даними рентгенівської дифракції синтезований матеріал відповідає гідроксиапатиту (JCPDS 1-1008), який відрізняється від стандартного стехіометричного ГА (JCPDS 9-432), для якого параметри кристалічної решітки складають :  $a=9,418$  А,  $c=6,884$  А . Такі зміни, очевидно, відбулися за рахунок впливу як йонів цинку, так і полімерів. При цьому (таблиця 3.1.), в зразках з вмістом Alg та CS (№6, №3) відбувається зменшення параметрів  $a$  та  $c$  в порівнянні зі зразком синтезованим без полімерів (№1). При цьому рівень мікродеформацій у зразку з вмістом CS є найвищим.

Для збільшення роздільної здатності піків та виявлення дефектів кристалічної решітки, які сформувалися під впливом додаткових йонів та молекул, зразки були відпалені при 900°C протягом 1 години.

Рентгенівські спектри від зразків ГА з вмістом йонів цинку та полімерів, відпалених при 900°C протягом 1 години, приведені на рисунку 3.2., а в таблиці 3.2. надані структурні параметри кристалітів цих зразків, що розраховані на основі XRD аналізу.

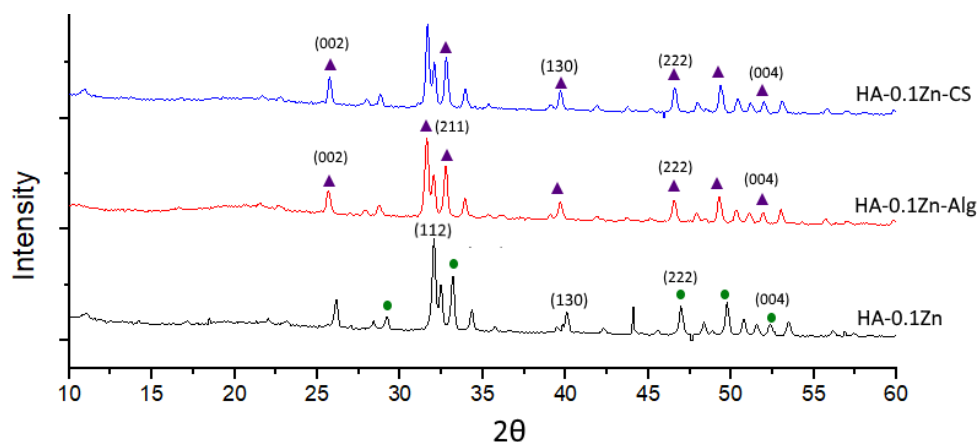


Рисунок 3.2 – Дифрактограми зразків з вмістом йонів цинку та молекул полімерів у композитному матеріалі, відпаленому при 900°C. Вихідна концентрація  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  становила 0,0045 М (K=0.1). ▲ - ГА (JCPDS 01-082-1943); ● - ГА (JCPDS 01-086-0740);

Після відпалу зразків при 900 °C протягом 1 години різко зростає кристалічність ГА, що підтверджується чітко вираженими піками. Розмір кристалітів збільшується до 34-43 нм для різних зразків (таб 3.2.).

Таблиця 3.2 – Структурні параметри зразків з вмістом йонів цинку у композитному матеріалі, висушеному при 900°C, за умови, що вихідна концентрація  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  становила 0,0045 М (K=0.1).

Зразок	Індекс Міллер а	Параметри решітки, А		Середній розмір кристаліті в, нм	Рівень мікродформа ції
	hkl	<i>a</i>	<i>c</i>	L	E*10 <sup>3</sup>
№1 HA-0,1Zn	210	9,329	6,84	37,75	0,1
	004	1	5		
№3 HA-0,1Zn-Alg	310	9,448	6,93	34,58	0,3
	002	8	5		
№6 HA-0,1Zn-CS	310	9,443	6,91	43,23	0,2

	002	8	2		
--	-----	---	---	--	--

За даними рентгенівської дифракції ГА у відпаленому зразку №1, синтезованому без впливу полімерів, відповідає картці (JCPDS 01-082-1943) в той час, як під впливом полімерної компоненти (№3 та №6), формується ГА (JCPDS 01-086-0740) (рис 3.2.). При цьому, як показано в таблиці 3.2., в зразках з вмістом Alg та CS (№6, №3) відбувається збільшення параметрів  $a$  та  $c$ , тоді як в зразку №1 спостерігається суттєве зменшення параметру  $a$ .

Значення рівнів мікродеформації для аналізу цих зразків не мають критичного впливу, оскільки цей розрахунок прив'язаний до параметрів кристалічної решітки певного обраного компоненту матеріалу. Якщо ж цей матеріал має в своєму складі декілька структур, то загальний аналіз мікродеформації втрачає сенс.

Дані факти, а також подальші RFA дослідження підтверджують входження йонів цинку в структуру матеріалів.

Кількісний та елементний склад експериментальних зразків був визначений з використанням малогабаритного рентгенофлуоресцентного аналізатору ElvaX, який приєднаний до комп'ютера та забезпечений програмними методами аналізу. В таблиці 3.3. приведені результати дослідження для зразків з вмістом цинку та полімерів, висушених та відпалених при 900 С. Також приведені розрахунки співвідношень Ca/P та Zn/Ca у композитах. По кожному із зразків вимірювання проводилось тричі, а в таблицях приводилося середні арифметичні значення вимірів.

Таблиця № 3.3 – Співвідношення Ca/P та Zn/Ca у композитних матеріалах за умови, що вихідна концентрація  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  становила 0,0045 М (K=0.1).

Зразок	Атомне співвідношення			Концентрація, %		
	Ca/P	(Ca+Zn)/P	Zn/Ca	Ca	P	Zn
№1_HA-Zn-37C	1,547	1,5660117 7	0,012	35,78	17,869	0,703
№3_HA-Zn-Alg-37C	1,567	1,5952123 7	0,018	34,48 5	17,004	1
№6_HA-Zn-Cs-37C	1,539	1,5652197 2	0,017	34,39 2	17,266	0,941
№1_HA-Zn-900C	1,498	1,515607	0,017	35,03 7	18,071	0,665
№3_HA-Zn-Alg-900C	1,457	1,478312	0,014	33,39 1	17,713	0,781
№6_HA-Zn-Cs-900C	1,491	1,528977	0,016	34,35 6	17,649	0,905

Вищеописана таблиця дає чітке уявлення, про те, що йони Zn, в отриманому матеріалі, наявні. Найбільші концентрації Zn присутні в зразках №3 та №6 як до відпалу при 900 °C, так і після. На основі отриманих результатів можна сказати, що біополімери, за малих концентрацій йонів цинку, сприяють їх заміщенню в композитах на основі ГА.

Для визначення процесів, які відбуваються в кристалічній решітці ГА під дією додаткових йонів цинку, вміст цих йонів був збільшений в 10 разів і становив 25% від концентрації нітрату кальцію в материнському розчині або 0,045М (K=1). Зразки даної серії в подальшому позначені: HA-1Zn, HA-1Zn-Alg, HA-1Zn-CS. На рисунку

3.3. приведені XRD результати зразків, висушених при 37°C, а в таблиці 3.4.

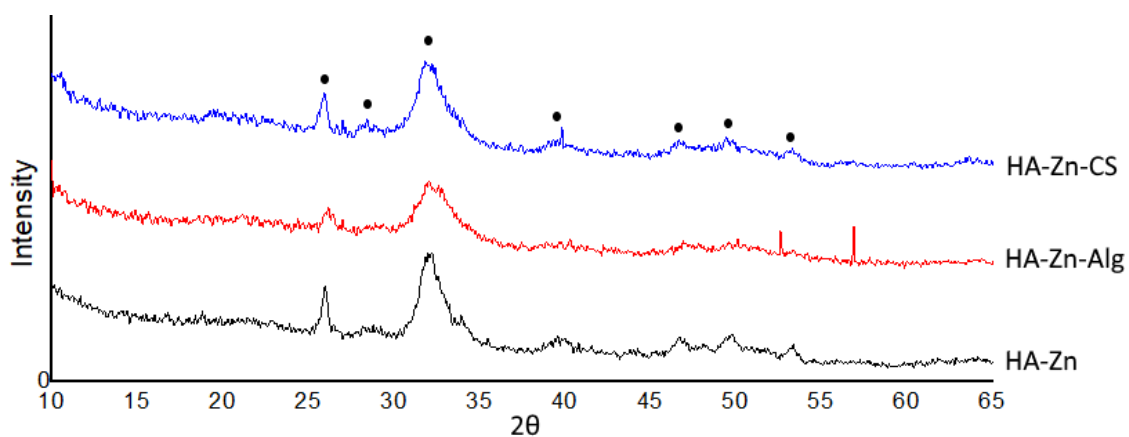


Рисунок 3.3 – Дифрактограми зразків з вмістом йонів металів у композитному матеріалі, висушеному при 37°C, за умови, що вихідна концентрація  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  становила 0,045M (K=1). Основні піки HA позначені • та відповідають (JCPDS 1-1008).

Індексомі Міллера на дифрактограмах позначені основні піки, які відповідають ГА. Дифрактограми демонструють більш розширені піки ГА, що свідчить про низьку кристалічність зразків та малі розміри кристалітів 18-24 нм (таблиця 3.4.). Розміри даних кристалітів зменшуються, а рівень мікрODEформацій збільшується в порівнянні зі зразками серії K=0.1, отриманими за такого ж температурного режиму .

Таблиця 3.4 – Структурні параметри зразків з вмістом йонів металів та полімерів у композитному матеріалі, висушеному при 37°C, за умови, що вихідна концентрація  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  становить 0,045 M (K=1).

Зразок	Індекс и Міллер	Параметри решітки, А	Середній розмір кристаліті	Рівень мікрODEформації
--------	-----------------	----------------------	----------------------------	------------------------

	a		B, нм		E*10 <sup>3</sup>
	hkl	a	c	L	
№1 HA-Zn	310	9,47	6,85	18,831	0,503
	002	6	3		
№3 HA-Zn-Alg	310	9,47	6,81	24,637	0,382
	002		1		
№6 HA-Zn-CS	310	9,43	6,87	21,171	0,448
	002	2	0		

В усіх зразках даної серії збільшується параметр *a* та зменшується параметр *c* в порівнянні до ГА (JCPDS 9-432 *a*=9,418 Å , *c*=6,884 Å ).

Рівень мікрODEформацій, при однаковій фазі ГА отриманих зразків, найбільше значення має в зразку №1 та №6. Найменше значення збереглося за зразком з Alg, що може говорити про подібність явищ йонного заміщення між серіями K=1 та K=0.1.

Відпалені при 900°C протягом 1 години зразки даної серії приведені на рисунку на рисунку 3.4. В таблиці 3.5. надані структурні параметри кристалітів, розраховані на основі XRD аналізу.

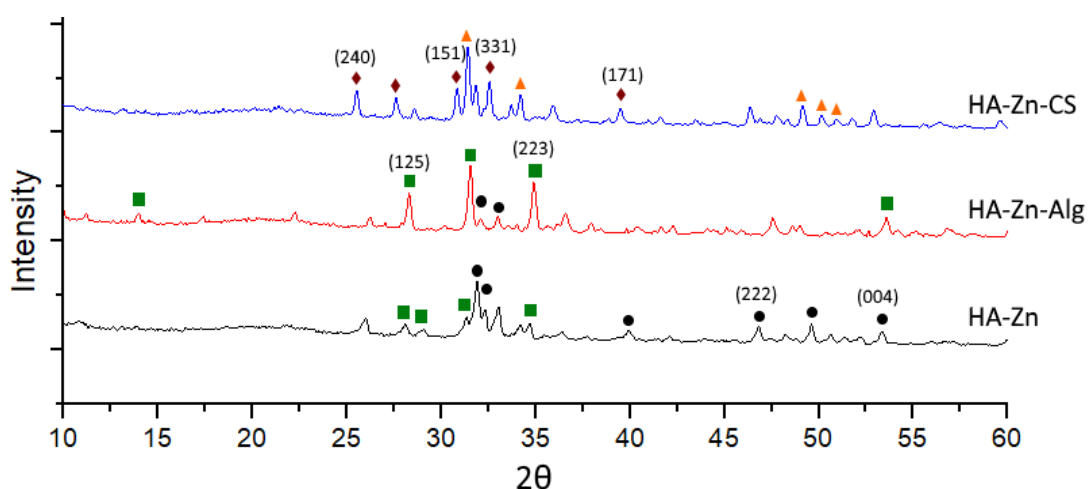


Рисунок 3.4 – Дифрактограми зразків з вмістом йонів металів

та полімерів у композитному матеріалі, відпаленому при 900°C, за умови, що вихідна концентрація  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  становила 0,045 М (K=1).

● - 01-086-0740 Hydroxylapatite ;  
 ▲ - 00-006-0426 Whitlockite  $Ca_9Zn(HPO)_4(PO_4)_6$ ; ♦ - 00-001-0941 Calcium Phosphate Oxide;  
 ■ - 00-003-0713 Whitlockite  $Ca_3O_8P_2$ ;

Результати показали, що тільки в двох зразках №1(НА-1Zn) та №3(НА-1Zn-Alg) присутня доля гідроксиапатиту (JCPDS 01-086-0740). Крім цього в обох зразках присутня фаза Вітлокіту (JCPDS 00-003-0713  $Ca_3O_8P_2$ ). В зразку №6(НА-1Zn-CS) присутні Кальцій-фосфат-оксид (JCPDS 00-001-0941) та Вітлокіт (JCPDS 00-006-0426  $Ca_9Zn(HPO)_4(PO_4)_6$ ).

Таблиця 3.5 – Структурні параметри зразків з вмістом іонів металів у композитному матеріалі, висушеному при 900°C, за умови, що вихідна концентрація  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  становила 0,045 М (K=1).

Зразок	Індекс и Міллер а	Параметри решітки, А		Середній розмір кристаліті в, нм	Рівень мікродеформа ції
	hkl	<i>a</i>	<i>c</i>	<i>e</i>	
№1 НА-Zn	310	9,38 6	6,84	28,837	0,328
	002				
№3 НА-Zn-Alg	310	9,40 2	6,83 1	62,956	0,082
	004				
№6 НА-Zn-CS	310	9,49 1	6,97 1	40,965	0,235
	002				

Аналіз структурних параметрів довів, що середній розмір кристалітів в зразку №1 складає 28.8 нм. Це значення є



співрозмірним до кристалітів в зразку серії K=0.1. У двох інших зразках після відпалу різко зростає розмір кристалітів після відпалу та становить 63 та 41 нм для зразків №3 та №6, відповідно. Розміри кристалічних комірок отриманих фаз Вітлокіту та Кальцій фосфат оксиду знайти не вдалося, тому, висновки стосовно появи нових компонентів в отриманих зразках, базуються лише на результаті XRD-аналізу.

Аналіз елементного складу висушених при 37 С та відпалених при 900 С зразків приведені в таблиці 3.6.

Таблиця 3.6 – Співвідношення Ca/P та Zn/Ca у композитних матеріалах за умови, що вихідна концентрація  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  становила 0,045 М (K=1).

Зразок	Атомне співвідношення			Концентрація, %		
	Ca/P	(Ca+Zn)/P	Zn/Ca	Ca	P	Zn
№1_HA_Zn_37C	1,691	1,80923 3	0,07	33,37	15,25	3,803
№3_HA_Zn_Alg_37Cb	1,72	1,96956 4	0,113	30,747	13,818	5,646
№6_HA_Zn-Cs_37C	1,616	1,91309 5	0,219	24,807	11,865	8,859
№1_HA_Zn_900C	1,646	1,76148 6	0,071	32,936	15,467	3,786

№3_HA_Zn_Alg_900C	1,577	1,93854 6	0,112	28,752	14,088	5,27
№6_HA_Zn-Cs_900C	1,672	1,75439 4	0,212	25,552	11,812	8,834

Результати RFA-аналізу показують, що в порівнянні до серії  $K=0.1$ , вміст цинку в структурі композитних матеріалів очікувано збільшується. Однак, при збільшенні концентрації нітрату цинку в вихідному розчині в 10 разів вміст йонів цинку в готовому продукті збільшується приблизно в 5 разів для HA-1Zn, в 8 разів для HA-1Zn-Alg та в 6 разів для HA-1Zn-CS. Очевидно, що такий результат пов'язаний з різною енергетичною здатністю Альгінату та Хітозану зв'язувати йони металу. Також на концентрацію йонів Zn, згідно XRD-аналізу вплинули появи нових фаз в кожному зі зразків.

Рисунки 3.5-3.7 графічно демонструють співвідношення параметрів кристалітів  $a$ ,  $c$  та їх середній розмір  $L$  у всіх зразках з вмістом цинку та полімерів.

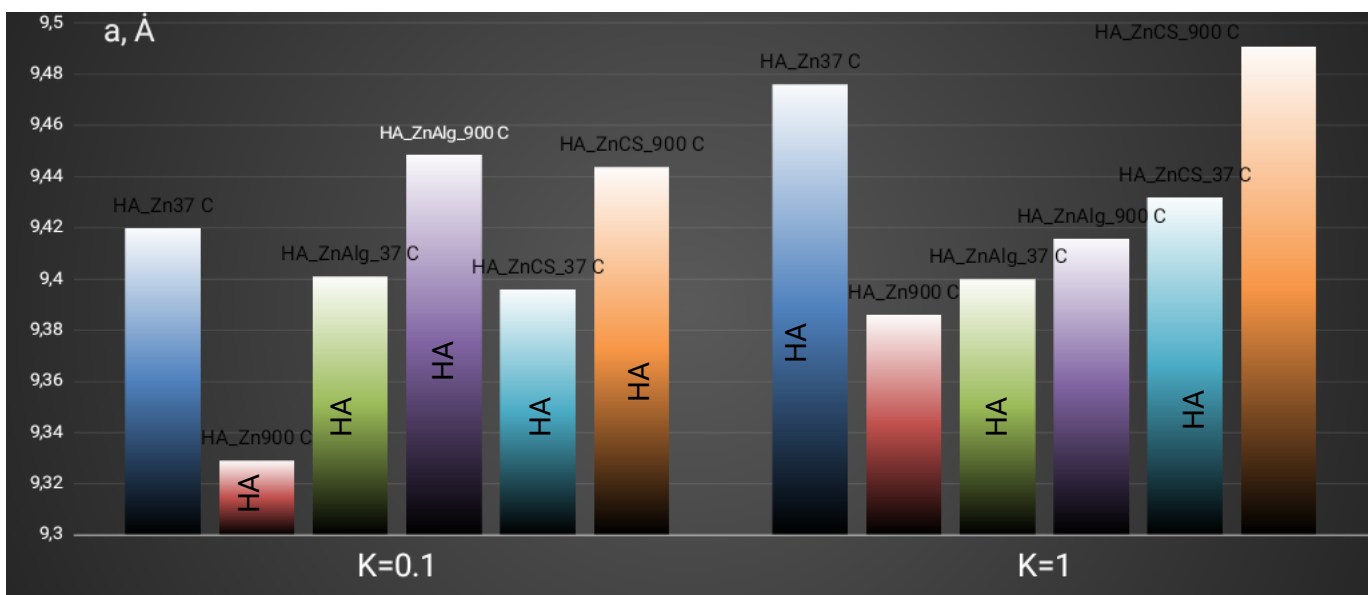


Рисунок 3.5 – Порівняльна характеристика параметру  $a$  ГА в складі композитів.

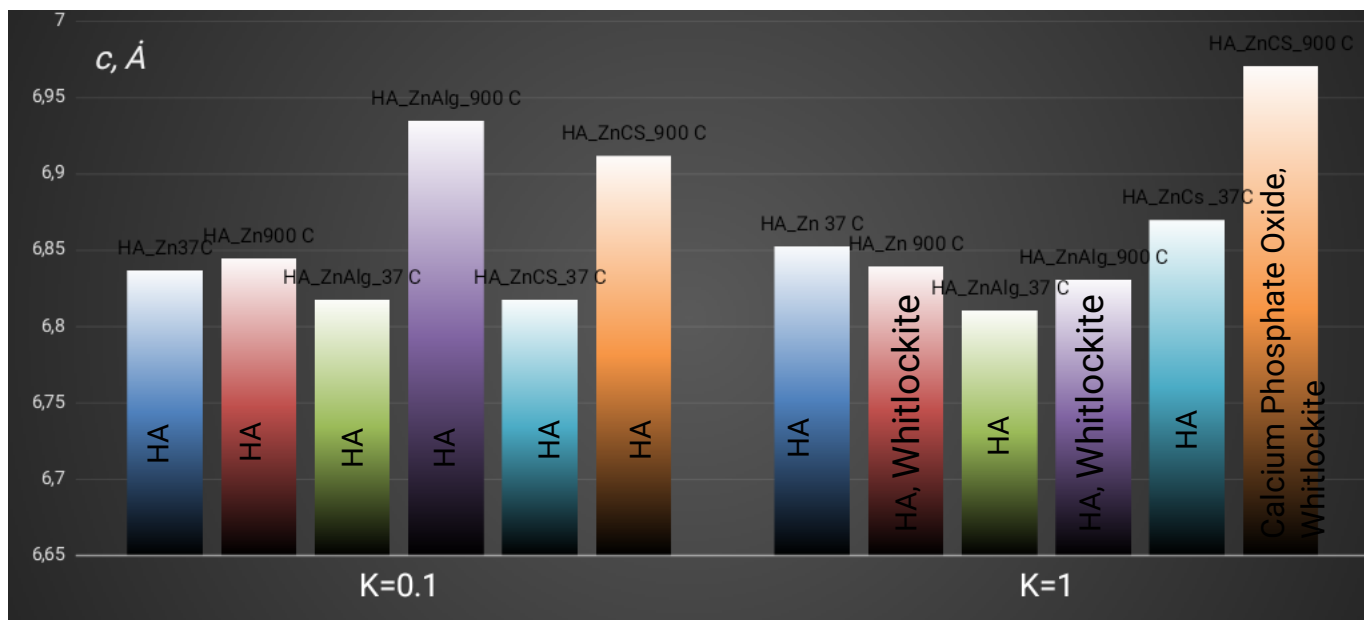


Рисунок 3.6 – Порівняльна характеристика параметру  $c$  ГА в складі композитів та фазовий склад зразків.

Вище приведені узагальнюючі гістограми, що порівнюють характеристики параметрів  $a$  та  $c$  в усіх зразках, до яких додавалися йони Zn.

Зразки серії  $K=0.1$  до відпалу своїми параметрами наближаються до стандартного стехіометричного ГА (JCPDS 9-432  $a=9,418$  Å ,  $c=6,884$  Å ). Після відпалу проявляються додаткові фази ГА, що відображається на зростанні параметрів  $a$  та  $c$  для зразків №3 і №6.

Після підвищення концентрації йонів Zn в 10 разів кристалічність до відпалу значно впала, що викликало деякі труднощі при розрахунку параметрів кристалічної решітки. У всіх зразках серії  $K=1$  постерігається ріст параметрів  $a$  та  $c$  в порівнянні до серії  $K=0,1$  при однакових температурних умовах.

За відпалу при 900 °C зразків серії  $K=1$  відбулася поява додаткових фаз Вітлокіту та Кальцій оксид фосфату, що, в

подальшому відбилися на отриманих значення  $a$  та  $c$ . Зокрема в зразку №6 HA\_Zn\_CS значно зріс параметр  $c$ , оскільки отриманий продукт відповідає Calcium Phosphate Oxide та Whitlockite.

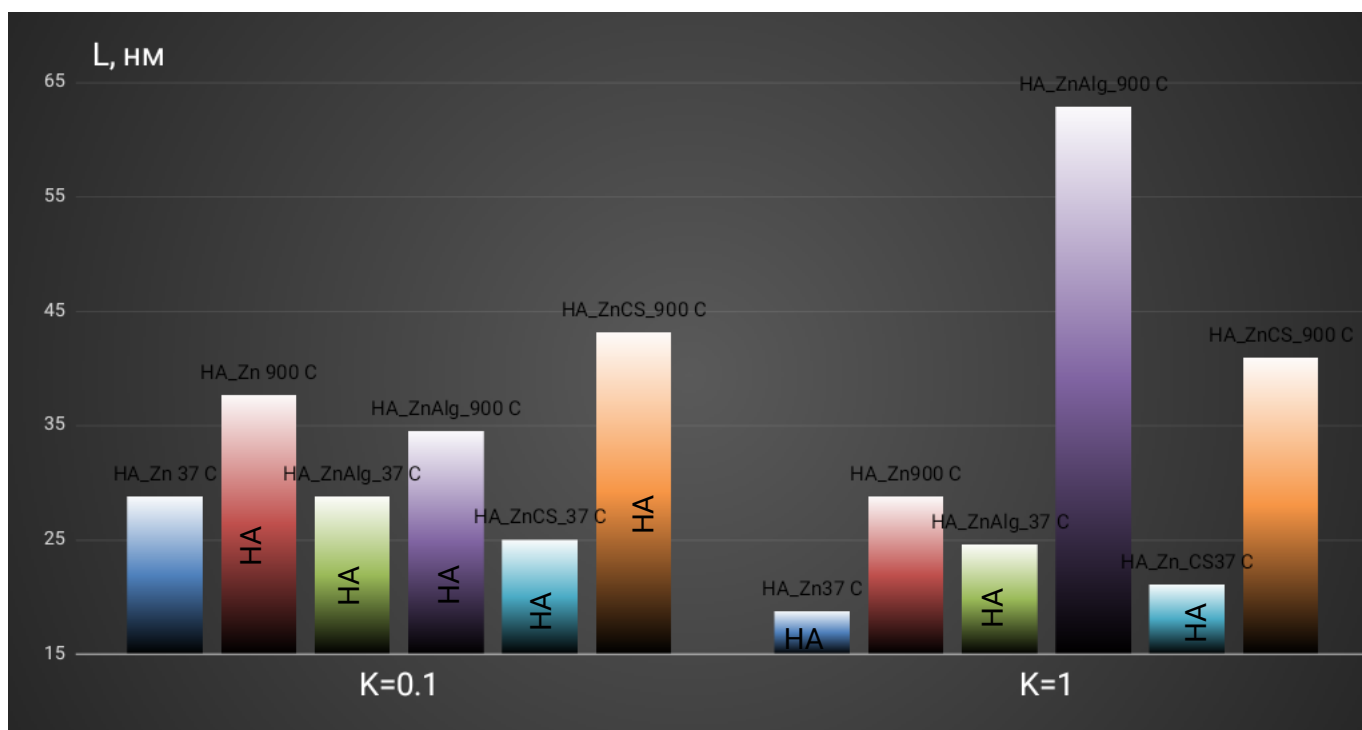


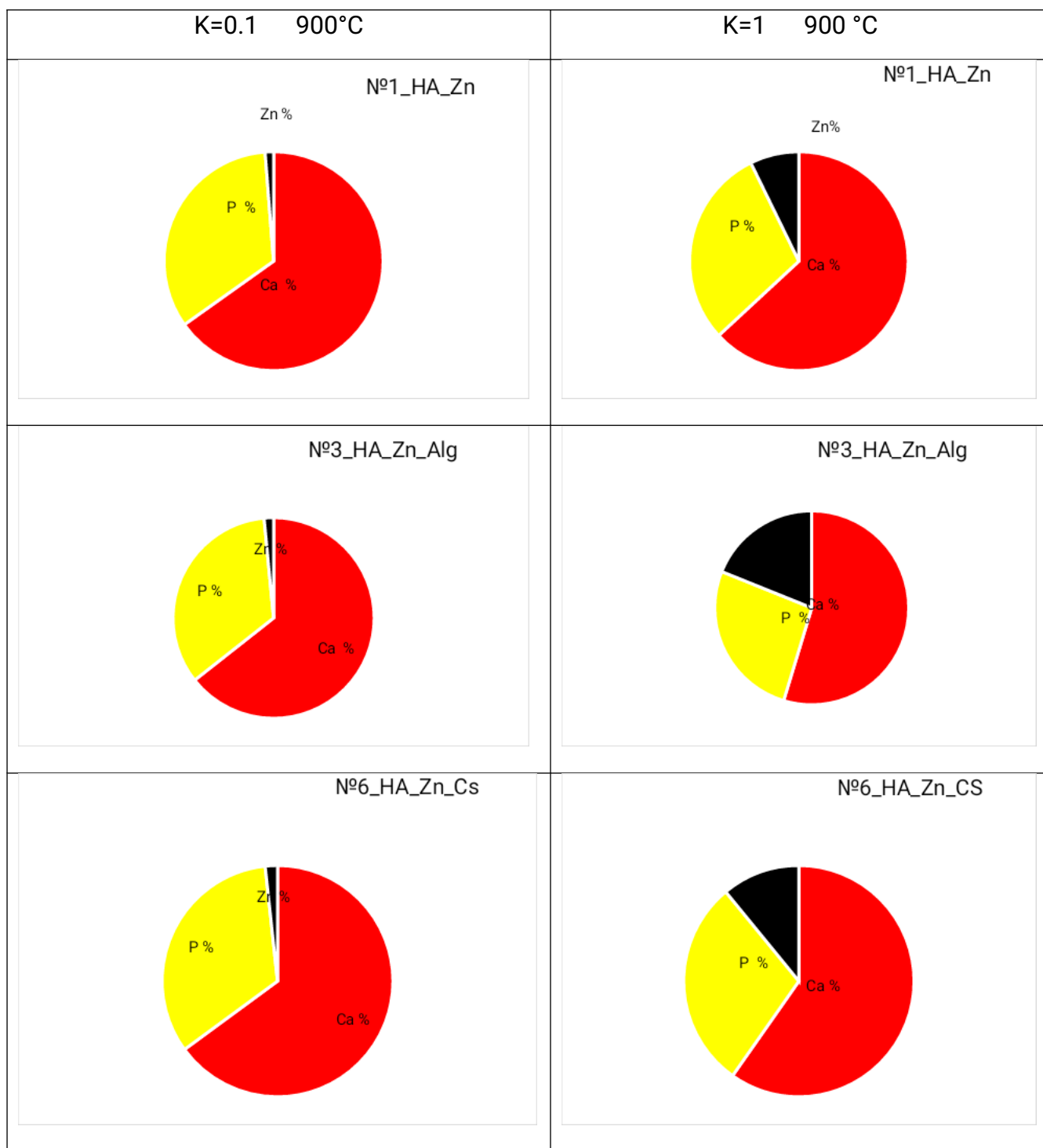
Рисунок 3.7 – Порівняльна характеристика середнього розміру кристалітів ГА L.

Для обох серій зразків ( $K=1$ ,  $K=0.1$ ) помітна тенденція росту розміру кристалів після відпалу, що демонструє гістограма на рисунку 3.7.

Найбільша різниця в значеннях параметру  $L$  помітна між відпаленими та висушеними зразками серії  $K=1$ . Це пояснюється збільшеною концентрацією йонів Zn та появою нових фаз.

В таблиці 3.7. представлена порівняльна характеристика елементного складу відпалених при  $900\text{ }^{\circ}\text{C}$  експериментальних зразків (серій  $K=0.1$  та  $K=1$ ).

Таблиця 3.7 – Порівняльна характеристика елементного складу відпалених при  $900\text{ }^{\circ}\text{C}$  серій  $K=0.1$  та  $K=1$ .



Завдяки РФА-аналізу можна оцінити елементарний склад зразків у відсоткових співвідношеннях.

Згідно проведеним дослідженням між серіями K=0.1 та K=1 відбувається очікуване збільшення концентрації Zn.

За концентрації Zn  $M=0,0045$  після високотемпературної обробки спостерігаємо практично однаковий вміст цинку у всіх зразках даної серії.

Проте, при збільшенні кількості йонів цинку при синтезі в 10 разів, спостерігається зміна його відсоткового вмісту в досліджуваних зразках. Якщо брати зразок №1 HA\_Zn серії K=1 в якості еталону та знехтувати можливі помилки в приготуванні і дослідженні композитів, можна зробити наступні висновки:

- Найбільший вміст адсорбованих йонів цинку демонструють зразки синтезовані в присутності Альгінату. Даний факт не суперечить літературним даним про здатність йонів металів зв'язувати макромолекули даного полімеру. Надмірний вміст Zn в умовах даного експерименту сприяє деформаціям кристалічної ґратки ГА та призводить до утворення фази Вітлокіту після відпалу.

- Синтез в присутності біополімеру Хітозану також сприяє збільшенню вмісту йонів Zn в композиті, порівняно зі зразком синтезованим без полімерів. При відпалі зразків серії K=1 зникає фаза гідроксиапатиту, натомість з'являються фази Вітлокіту та Кальцій фосфат оксиду.

### 3.2. Дослідження зразків ГА з вмістом алюмінію та полімерів

Рисунок 3.8. демонструє рентгенівські спектри від зразків ГА з вмістом йонів алюмінію, а в таблиці 3.8. приведені розраховані на

основі XRD аналізу.

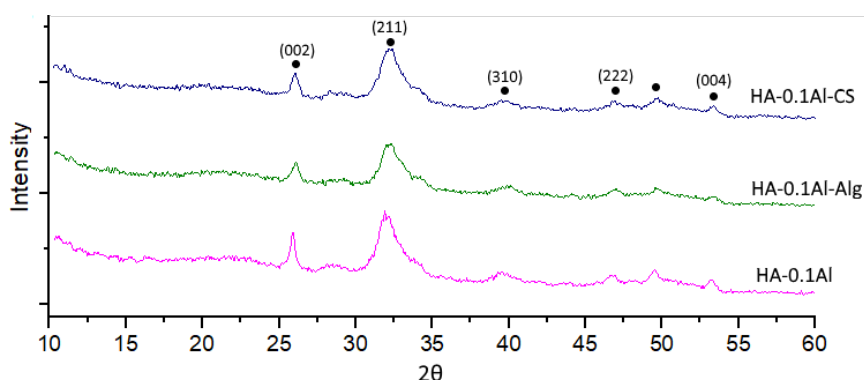


Рисунок 3.8 – Дифрактограми зразків з вмістом йонів алюмінію у композитному матеріалі, висушеному при 37°C, за умови, що вихідна концентрація  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  становила 0,0045 М (K=0.1). ● - JCPDS 1-1008.

За даними рентгенівської дифракції в синтезованому матеріалі з'являється фаза гідроксиapatиту (JCPDS 1-1008). Аналогічний результат отриманий і для Zn. Дифрактограми демонструють низьку кристалічність зразків, отриманих з додаванням алюмінію та висушених при 37 °C, що підтверджується розширеними піками та малими розмірами кристалітів 21-35 нм (таблиця 3.8.). Індексомі Міллера на дифрактограмах позначені основні піки, які відповідають ГА.

Таблиця 3.8 – Структурні параметри зразків з вмістом йонів

алюмінію та полімерів у композитному матеріалі, висушеному при 37°C, за умови, що вихідна концентрація  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  становила 0,0045 М (K=0.1).

Зразок	Індекси Міллера	Параметри решітки, А		Середній розмір кристаліти в, нм	Рівень мікродеформації
	hkl	<i>a</i>	<i>c</i>	L	e
№2 HA-0,1Al <sup>3+</sup>	310	9,441	6,871	35,46	0,268
	002				
№4 HA-0,1Al <sup>3+</sup> -Alg	310	9,411	6,818	25,04	0,376
	002				
№7 HA-0,1Al <sup>3+</sup> -CS	310	9,441	6,842	21,63	0,437
	002				

Структурні параметри ГА в отриманих зразках відрізняються від стандартного стехіометричного ГА (JCPDS 9-432), для якого параметри кристалічної решітки складають :  $a=9,418$  А ,  $c=6,884$  А . Такі зміни, очевидно, відбулися за рахунок впливу як йонів алюмінію, так і полімерів. При цьому (таблиця 3.8.), в зразках з вмістом Alg та CS (№6, №3) відбувається зменшення параметру *c* в порівнянні зі зразком синтезованим без полімерів (№1). При цьому рівень мікродеформацій у зразку з вмістом CS є найвищим.

Для збільшення роздільної здатності піків та виявлення дефектів кристалічної решітки, які сформувалися під впливом додаткових йонів та молекул, зразки були відпалені при 900°C протягом 1 години.

Рентгенівські спектри від зразків ГА, відпалених при 900°C протягом 1 години, приведені на рисунку 3.9., а в таблиці 3.9. надані структурні параметри кристалітів цих зразків, що розраховані на



основі XRD аналізу.

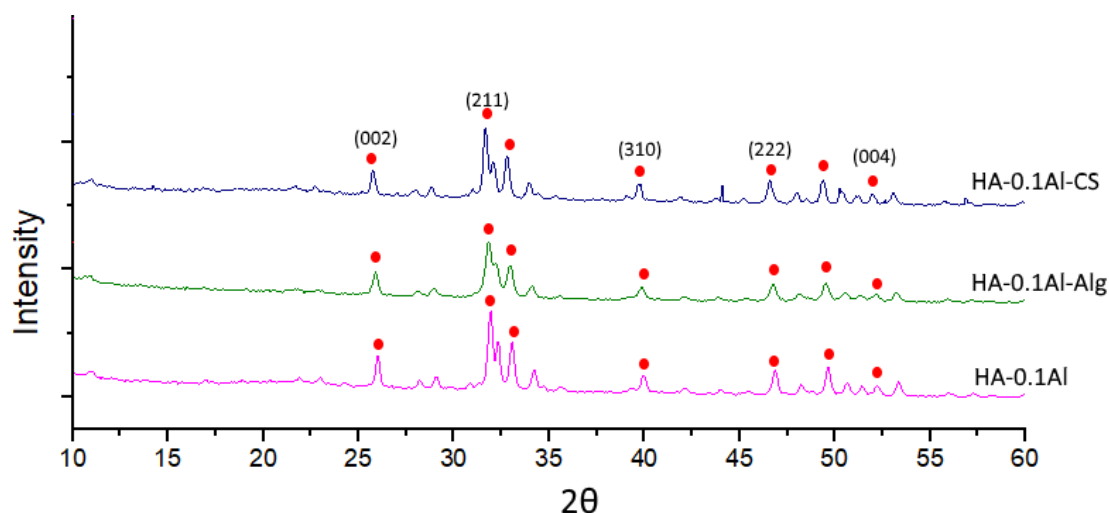


Рисунок 3.9 – Дифрактограми зразків з вмістом йонів алюмінію у композитному матеріалі, відпаленому при 900°C, за умови, що вихідна концентрація  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  становила 0,0045 М (K=0.1). ● – ГА (JCPDS 01-084-1998).

Після відпалу зразків при 900 °C протягом 1 години різко зростає кристалічність ГА, що підтверджується чітко вираженими піками. Розмір кристалітів збільшується до 43 нм для кожного зі зразків, що можна побачити в таблиці 3.9.

Таблиця 3.9 – Структурні параметри зразків з вмістом йонів алюмінію у композитному матеріалі, відпалених при 900°C, за умови, що вихідна концентрація  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  становила 0,0045 М (K=0.1).

Зразок	Індекси Міллера	Параметри решітки, А		Середній розмір кристаліти в, нм	Рівень мікродеформації
	hkl	a	c	L	E*10 <sup>3</sup>
№2 HA-0,1Al <sup>3+</sup>	310	9,381	6,840	43,26	0,2
	002				
№4 HA-0,1Al <sup>3+</sup> -Alg	310	9,402	6,87	43,25	0,2

	002	6	1		
№7 HA-0,1Al3+-CS	310	9,426	6,90	43,23	0,2
	002	3	9		

За даними рентгенівської дифракції після відпалу отриманий продукт відповідає ГА (JCPDS 01-084-1998) (рис 3.9.). При цьому, як показано в таблиці 3.9., в усіх трьох зразках відбувається зменшення параметру  $a$  в порівнянні з висушеними при 37°C зразками. За схожими середніми розмірами кристалів констатується факт про наявність однієї фази ГА в кожному зі зразків. Очевидно, що різниця в параметрах решітки  $a$  та  $c$  пояснюється впливом полімерів. Така ж залежність спостерігається і в зразках з вмістом йонів Zn.

Дані про кількісний та елементарний склад експериментальних зразків з вмістом алюмінію, визначені з використанням малогабаритного рентгено-флуоресцентного аналізатору ElvaX, приведені в таблиці 3.10.

Таблиця 3.10 – Співвідношення Ca/P та Zn/Ca у композитних матеріалах за умови, що вихідна концентрація  $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  становила 0,0045 М (K=0.1).

Зразок	Співвідношення		Концентрація, %		
	Ca/P	Zn/Ca	Ca	P	Zn
№2_HA_Al_37C	1,664	0,018	36,39	16,9	0,428
№4_HA_Al_Alg_37C	1,862	0,022	35,057	14,554	0,518
№7_HA_Al_Cs_37C	1,741	0,023	34,949	15,513	0,531
№2_HA_Al_900C	1,54	0,014	36,166	18,146	0,337
№4_01_HA_Al_Alg_900C	1,783	0,017	36,695	15,963	0,418
№7_01_HA_Al_CS_900C	1,606	0,013	37,326	17,966	0,329

Аналіз кількісного елементарного складу отриманого матеріалу, дозволяє сказати про включення Al до складу синтезованих зразків. Найбільші концентрації Al присутні в зразках №4 та №7, що висушені при температурі 37 °С. Після відпалу при температурі 900 °С концентрація Al значно зменшилась для всіх зразків. Загалом, при порівнянні зі зразками з Zn, що отримані за таких же температурних умов, відсоток алюмінію в композитах менший.

На основі отриманих результатів можна сказати, що біополімери, за малих концентрацій йонів алюмінію, сприяють їх заміщенню в композитах на основі ГА під час просушування. Проте, після відпалювання ситуація міняється. Можливо, це можна пояснити тим, що Al краще пов'язується з біополімерами і під час високотемпературної обробки вигорає разом з ними.

Для визначення процесів, які відбуваються в кристалічній решітці ГА під дією додаткових йонів алюмінію, їх вміст був збільшений в 10 разів і становив 25% від концентрації нітрату кальцію в материнському розчині або 0,045M (K=1). Зразки даної серії в подальшому позначені: HA-1Al, HA-1Al-Alg, HA-1Al-CS.

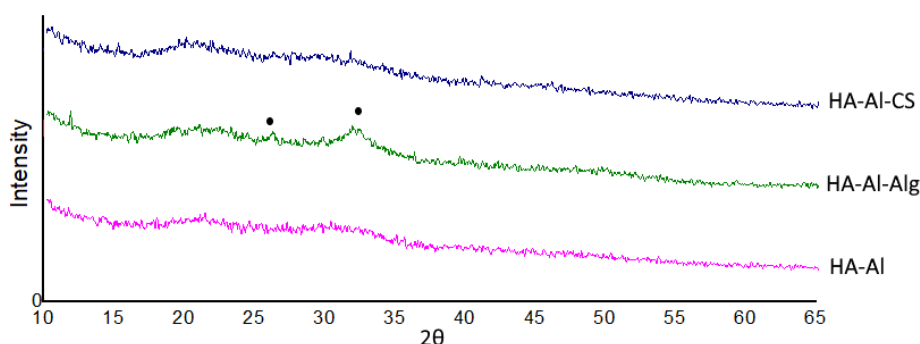


Рисунок 3.10 – Дифрактограми зразків з вмістом йонів алюмінію у композитному матеріалі, висушеному при 37°C, за умови, що вихідна концентрація  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  становила 0,045 M (K=1).

● - JCPDS 1-1008 (Hydroxyapatite) .

Дифрактограми демонструють розширені піки ГА, що свідчать про дуже низьку кристалічність зразків. Через це немає можливостей провести аналіз структурних параметрів цих зразків. Отриманий результат відповідає літературним джерелам, які свідчать, що кристалічність НА різко зменшується зі збільшенням вмісту Al. (55).

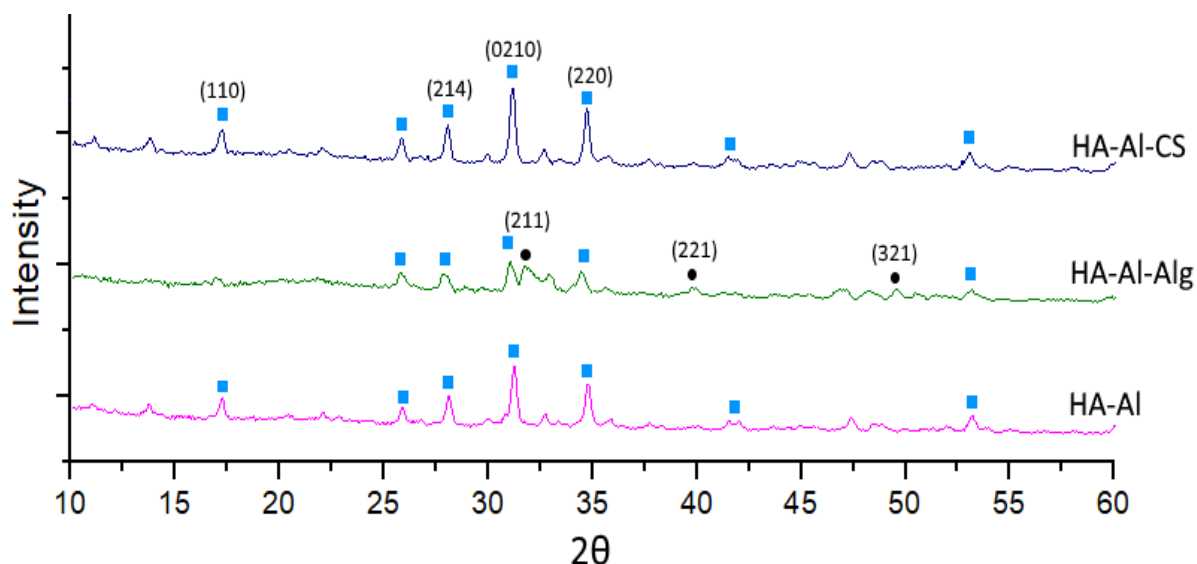


Рисунок 3.11 – Дифрактограми зразків з вмістом йонів металів у композитному матеріалі, відпаленому при 900°C, за умови, що вихідна концентрація  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  становила 0,045 М (К=1).

● - 01-086-0740 Hydroxylapatite; ■ - 00-048-1192 Calcium Aluminum Phosphate.

Результати показали, що в лише в одному зразку присутня доля гідроксиапатиту (JCPDS 01-086-0740). Крім цього в усіх зразках присутній Алюміній кальцій фосфат (JCPDS 00-048-1192  $\text{AlCa}_9\text{O}_{28}\text{P}_7$ ). Це підтверджується аналізом структурних параметрів (таблиця 3.11.)

з параметрами кристалічної решітки  $a=10,32 \text{ \AA}$ , та  $c=37 \text{ \AA}$ , з дуже низькими відхиленнями для окремих зразків. Також варто звернути увагу, що середній розмір кристалітів в зразку №4 (24,6 нм), де

присутня фаза гідроксиапатиту, відрізняється, в порівнянні до зразків №2 та №6, де ГА відсутній (28,3 нм).

Таблиця 3.11 – Структурні параметри зразків з вмістом йонів металів у композитному матеріалі, висушеному при 900°C, за умови, що вихідна концентрація  $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  становила 0,045 М (K=1).

Зразок	Індекс и Міллер а	Параметри решітки, А		Середній розмір кристалітів, нм
	hkl	<i>a</i>	<i>c</i>	L
№2 HA-Al <sup>3+</sup>	220	10,3	37,2	28,335
	006	2	3	
№4 HA-Al <sup>3+</sup> -Alg	220	10,3	37,2	24,584
	006	5	3	
№7 HA-Al <sup>3+</sup> -CS	220	10,3	37,1	28,335
	006	4	9	

Аналіз елементного складу висушених при 37 °С та відпалених при 900 °С зразків приведені в таблиці 3.12.

Таблиця 3.12 – Співвідношення Ca/P та Al/Ca у композитних матеріалах за умови, що вихідна концентрація  $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  становила 0,045 М (K=1).

Зразок	Співвідношення		Концентрація, %		
	Ca/P	Al/Ca	Ca	P	Al

№2_HA_AI_900C	1,114	0,264	23,435	16,255	4,16
№4_HA_AI_Alg_900C	1,345	0,131	26,172	15,036	2,299
№7_HA_AI_CS_900C	1,179	0,347	22,826	14,966	5,329

Результати RFA-аналізу показують, що в порівнянні до серії K=0.1, вміст алюмінію в структурі композитних матеріалів очікувано збільшується. Однак, при зростанні концентрації Al в вихідному розчині в 10 разів вміст йонів в готовому продукті збільшується приблизно в 4 рази для HA-1Al, в 2 рази для HA-1Al-Alg та в 5,5 разів для HA-1Al-CS. Очевидно, що такий результат пов'язаний з різною енергетичною здатністю Альгінату та Хітозану зв'язувати йони металу. Також на концентрацію йонів Al, згідно XRD-аналізу вплинули появи нових фаз в кожному зі зразків

На рис. 3.12-3.14. демонструється співвідношення параметрів кристалітів  $a$ ,  $c$  та їх середній розмір  $L$  у всіх зразках з вмістом алюмінію та полімерів.

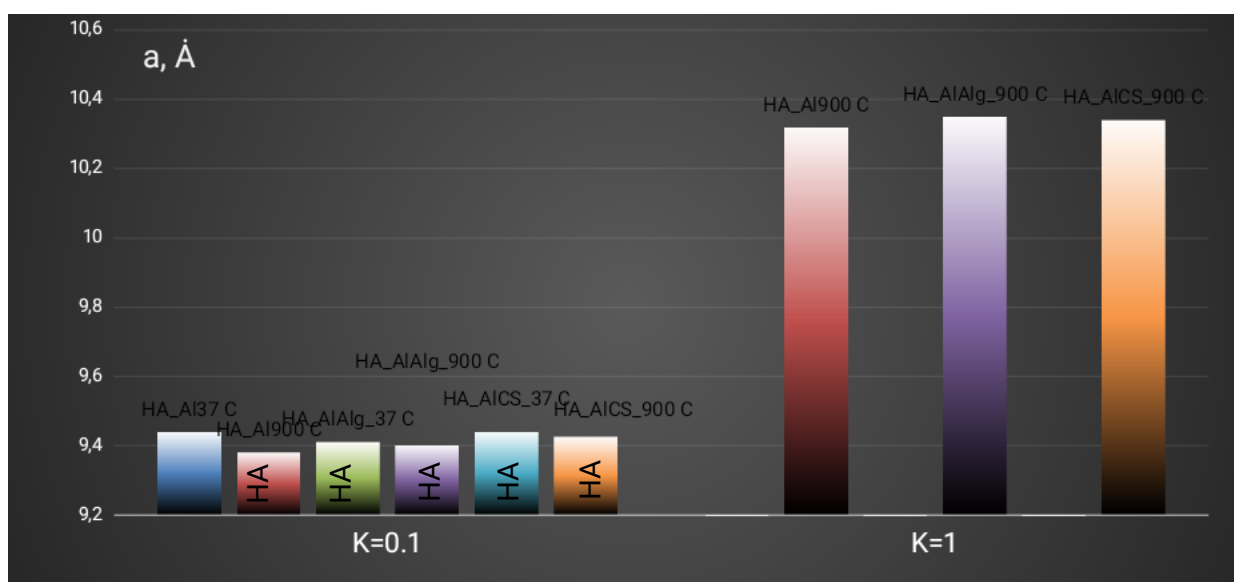


Рисунок 3.12 – Порівняльна характеристика параметру  $a$  ГА в складі композитів.

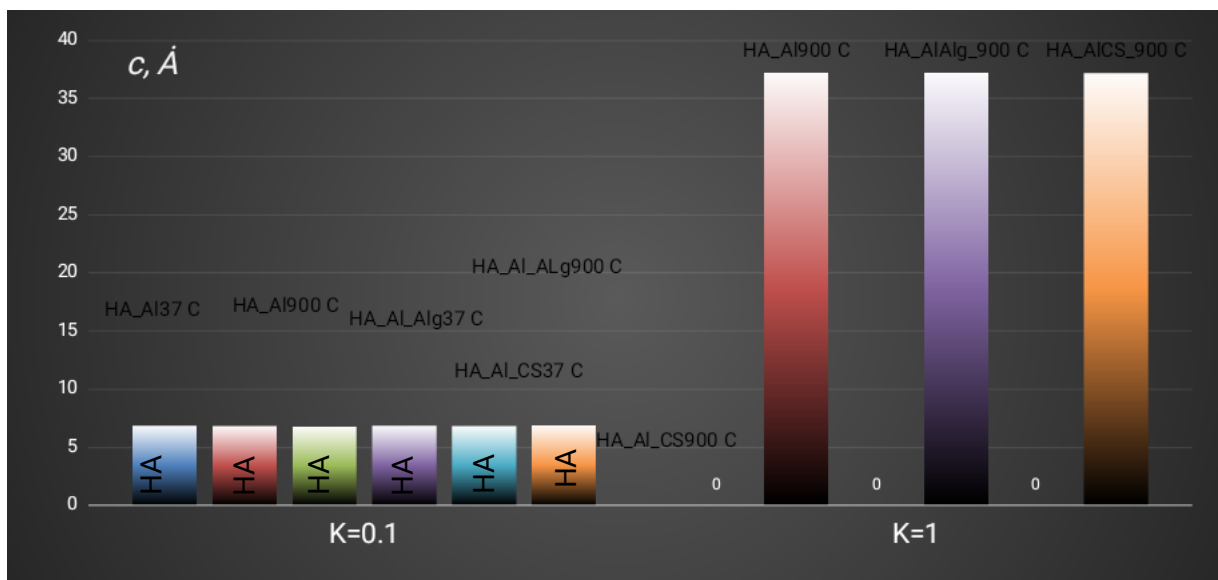


Рисунок 3.13 – Порівняльна характеристика параметру  $c$  кристалітів.

Вище приведені узагальнюючі гістограми, що порівнюють дані щодо параметрів  $a$  та  $c$  в усіх зразках, синтезованих в присутності йонів Al.

Зразки серії K=0.1, до відпалу своїми параметрами наближаються до стандартного стехіометричного ГА (JCPDS 9-432  $a=9,418$  Å ,  $c=6,884$  Å ). Після відпалу спостерігаються дві фази ГА (JCPDS 01-084-1998 та JCPDS 01-086-0740), що відображається на незначному зростанні параметру  $c$  для зразків №4 і №7.

Після підвищення концентрації йонів Al в 10 разів рівень кристалічності був настільки низьким, що взагалі не було можливості провести аналіз розмірів чи параметрів кристалічної решітки.

За відпалу при 900 °C зразків серії K=1 відбулася поява додаткової фази Кальцій алюміній фосфату в усіх трьох зразках, що додатково відображається на параметрах  $a$  та  $c$ . Ці параметри відповідають фазі (JCPDS 00-048-1192 Calcium Aluminum Phosphate  $AlCa_9O_{28}P_7$  )

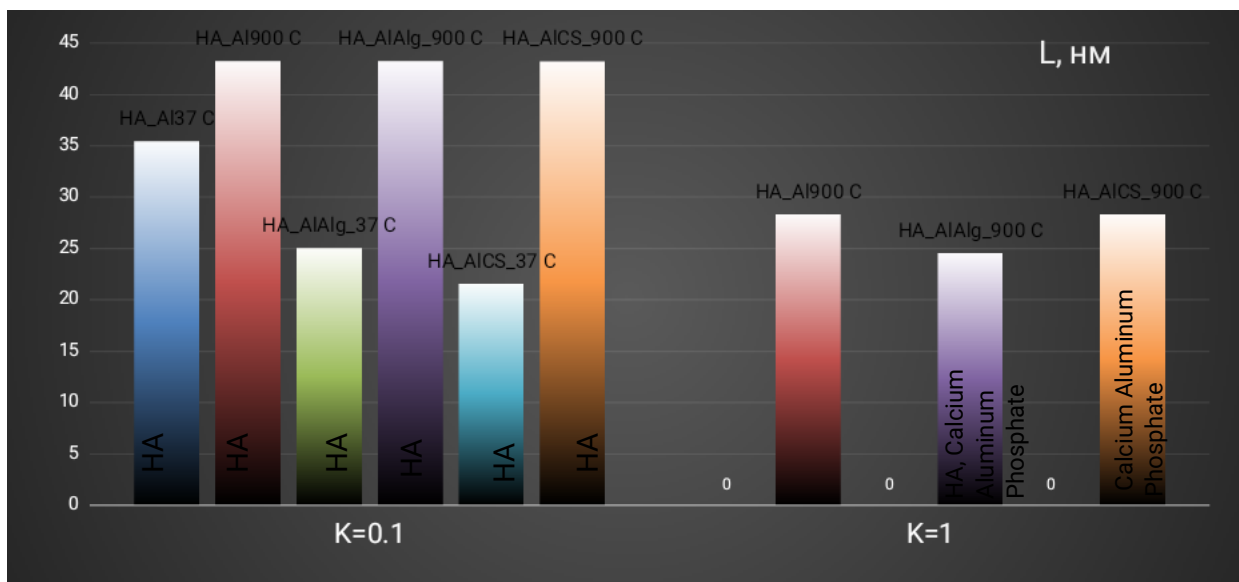


Рисунок 3.14 – Порівняльна характеристика середнього розміру кристалітів L та фазовий склад зразків.

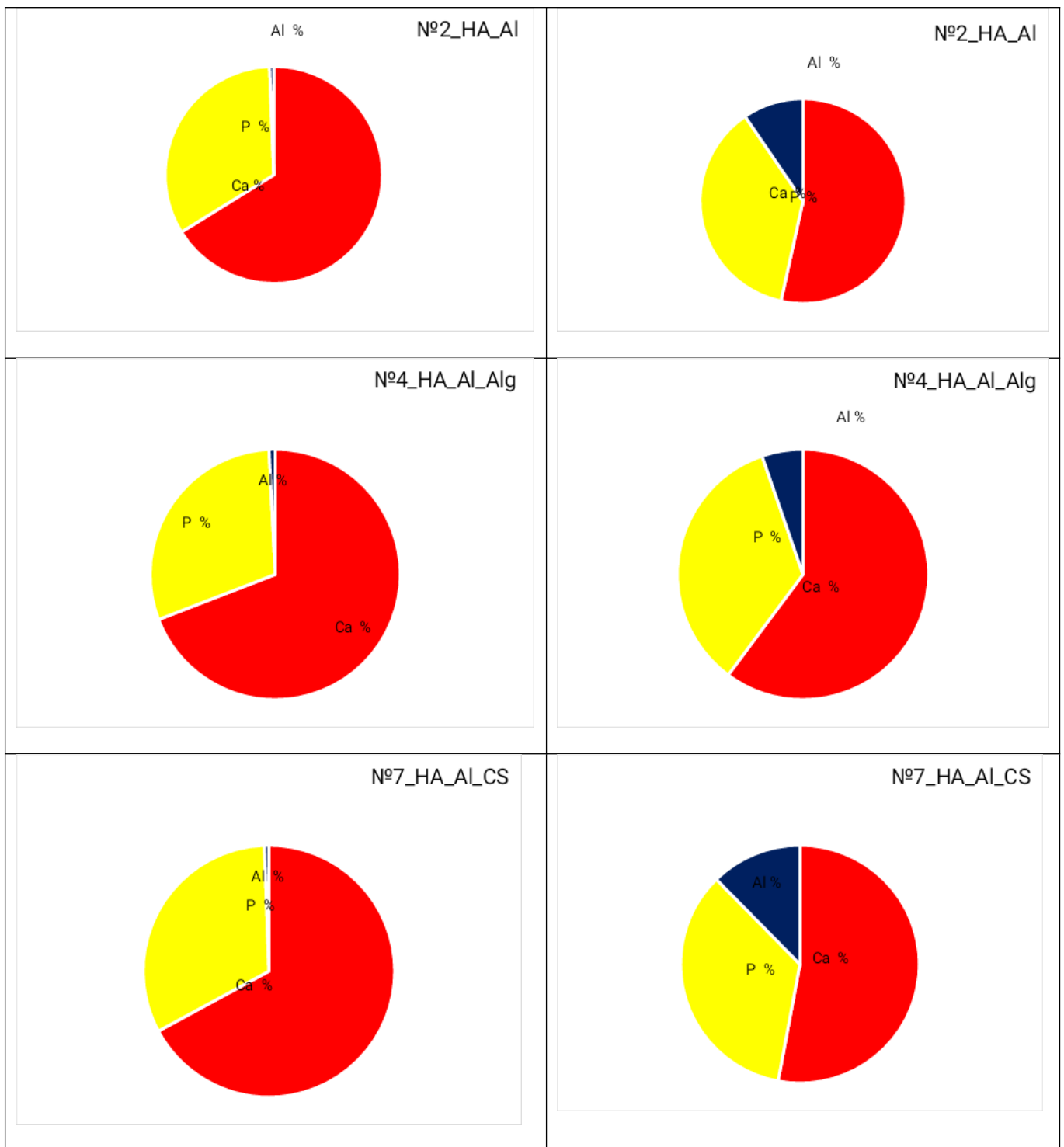
Для серії зразків K=0.1 помітна тенденція росту розміру кристалів після відпалу, що демонструє гістограма на рисунку 3.14. Для серії K=1, про таку залежність сказати неможливо, оскільки відсутні результати аналізу композитів після висушування.

В таблиці 3.13. представлена порівняльна характеристика елементного складу відпалених при 900 °C експериментальних зразків (серій K=0.1 та K=1).

Таблиця 3.13 – Порівняльна характеристика елементного складу відпалених при 900 C серій K=0.1 та K=1.

K=0.1 900°C	K=1 900 °C





Згідно проведеним дослідженням між серіями  $K=0.1$  та  $K=1$  відбувається очікуване збільшення концентрації Al.

За концентрації Al  $M=0,0045$  в зразках не помітно значного впливу біополімерів після відпалу при  $900^{\circ}\text{C}$ .

При збільшенні початкової концентрації алюмінію в 10 разів

спостерігається зміна відсоткового елементарного складу в залежності від біополімеру. Якщо брати зразок №1 HA\_AI серії K=1 в якості еталону та знехтувати можливі помилки в приготуванні і дослідженні композитів, можна зробити наступні висновки:

- Найбільший вміст адсорбованих йонів цинку демонструють зразки синтезовані в присутності Хітозану. Даний факт не суперечить літературним даним про здатність йонів металів зв'язувати макромолекули даного полімеру. Надмірний вміст Zn в умовах даного експерименту сприяє деформаціям кристалічної ґратки ГА та призводить до утворення фази Calcium Aluminum Phosphate після відпалу.

- Синтез в присутності біополімеру Альгінату також сприяє збільшенню вмісту йонів Zn в композиті, порівняно зі зразком синтезованим без полімерів. При відпалі зразків серії K=1 зникає фаза гідроксиапатиту, натомість з'являється фаза Calcium Aluminum Phosphate.

## РОЗДІЛ 4. РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЦИНКУ ТА АЛЮМІНІЮ В СКЛАДІ ЗРАЗКІВ ГІДРОКСИАПАТИТУ МЕТОДОМ RFA

Для визначення вмісту цинку та алмінію в складі композитного матеріалу на основі ГА застосовуємо регресійний метод аналізу, який потребує набору калібрувальних зразків.

### *Підготовка калібрувальних зразків.*

До порошку синтезованого ГА додали водні розчини сполук  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  та  $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ , ретельно їх змішували з наступним висушуванням та подрібненням.

Кількісні характеристики калібрувальних зразків для визначення цинку та алюмінію приведені в таблицях 4.1. та 4.2.

Таблиця 4.1 – Кількісні характеристики калібрувальних зразків для визначення цинку.

Номер зразку		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Масовий вміст калібрувальних зразків													
Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> .(OH) <sub>2</sub>	г	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
									0,036	0,045			
Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O		0,004	0,006	0,008	0,01	0,02	0,027	3	3	0,07	0,1	0,15	0,2
	Σ							0,536	0,545				
Загальна вага	г	0,504	0,506	0,508	0,51	0,52	0,527	3	3	0,57	0,6	0,65	0,7
Масовий вміст елементів в Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O													
H	г	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,002	0,004	0,006	0,008
		2	2	3	4	8	1	5	8	8	1	1	1
N	г	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,002	0,003	0,004	0,006	0,009	0,014	0,018
		4	6	8	9	9	5	4	3	6	4	1	8
O	г	0,002	0,003	0,005	0,006	0,012	0,017	0,023	0,029	0,045	0,064	0,096	0,129
		6	9	2	5	9	4	4	2	2	5	8	1
Zn	г	0,000	0,001	0,001	0,002	0,004	0,005	0,008	0,010	0,015	0,022	0,033	0,044
		9	3	8	2	4	9	0	0	4	0	0	0
Масовий вміст елементів в Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> .(OH) <sub>2</sub>													
H O P Ca	г	0,001005											
		0,20703											
		0,092495											
		0,19947											
Загальний масовий вміст елементів в Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> .(OH) <sub>2</sub> та Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O													
H O N	Σ г	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	0,002	0,003	0,004	0,005	0,007	0,009
		0,210	0,211	0,212	0,213	0,220	0,224	0,230	0,236	0,252	0,272	0,304	0,336
		0,000	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003	0,003	0,004	0,007	0,009	0,014	0,019

P		0,092	0,092	0,092	0,092	0,092	0,092	0,092	0,092	0,092	0,092	0,092	0,092
Ca		0,199	0,199	0,199	0,199	0,199	0,199	0,199	0,199	0,199	0,199	0,199	0,199
Zn		0,001	0,001	0,002	0,002	0,004	0,006	0,008	0,010	0,015	0,022	0,033	0,044
Загальний відсотковий вміст елементів в $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ та $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$													
H	% Σ г	0,232	0,247	0,262	0,277	0,350	0,399	0,463	0,522	0,676	0,845	1,093	1,305
		41,59	41,68	41,77	41,86	42,29	42,59	42,97	43,32	44,24	45,26	46,74	48,01
O		0	0	0	0	6	1	2	7	7	1	4	5
N		0,075	0,112	0,148	0,185	0,362	0,482	0,637	0,782	1,156	1,570	2,173	2,691
		18,35	18,28	18,20	18,13	17,78	17,55	17,24	16,96	16,22	15,41	14,23	13,21
P		2	0	8	6	8	1	7	2	7	6	0	4
		39,57	39,42	39,26	39,11	38,36	37,85	37,19	36,58	34,99	33,24	30,68	28,49
Ca	7	1	6	2	0	0	4	0	5	5	8	6	
Zn		0,174	0,261	0,346	0,431	0,845	1,126	1,488	1,826	2,699	3,664	5,073	6,280

Таблиця 4.2 – Кількісні характеристики калібрувальних зразків для визначення алюмінію.

Номер зразку		1	2	3	4	5	6	7
Масовий вміст калібрувальних зразків								
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	г	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$		0,0040	0,0080	0,0200	0,0363	0,0700	0,1500	0,2000
Загальна вага	Σ г	0,504	0,508	0,52	0,5363	0,57	0,65	0,7
Масовий вміст елементів в $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$								
H	г	0,0002	0,0004	0,0010	0,0018	0,0034	0,0073	0,0097
N		0,0004	0,0009	0,0022	0,0041	0,0078	0,0168	0,0224
O		0,0031	0,0061	0,0154	0,0279	0,0537	0,1152	0,1535
Al		0,0003	0,0006	0,0014	0,0026	0,0050	0,0108	0,0144
Масовий вміст елементів в $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$								
H	г	0,001005						
O		0,20703						
P		0,092495						
Ca		0,19947						
Загальний масовий вміст елементів в $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ та $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$								
H	Σ г	0,0012	0,0014	0,0020	0,0028	0,0044	0,0083	0,0107
O		0,2101	0,2132	0,2224	0,2349	0,2608	0,3222	0,3606
N		0,0004	0,0009	0,0022	0,0041	0,0078	0,0168	0,0224
P		0,0925	0,0925	0,0925	0,0925	0,0925	0,0925	0,0925
Ca		0,1995	0,1995	0,1995	0,1995	0,1995	0,1995	0,1995
Al		0,0003	0,0006	0,0014	0,0026	0,0050	0,0108	0,0144
Загальний відсотковий вміст елементів в $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ та $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$								
H	% Σ г	0,238	0,274	0,379	0,515	0,770	1,271	1,526
O		41,687	41,963	42,766	43,800	45,749	49,567	51,510
N		0,089	0,176	0,431	0,758	1,376	2,585	3,201
P		18,352	18,208	17,787	17,247	16,227	14,230	13,214
Ca		39,577	39,266	38,360	37,194	34,995	30,688	28,496
Zn		0,057	0,113	0,277	0,487	0,883	1,660	2,055

#### 4.1. Розробка методики визначення вмісту цинку

Для отримання задовільних статистичних даних інтенсивності лінії Zn k- $\alpha$  та k- $\beta$  при малому вмісту Zn вибираємо режим роботи рентгенівської трубки: напруга анода 40kV ; струм трубки 5mA. Час експозиції -100s. Кількість вимірів кожного зразка – 3.

Для створення нового «Продукту» для вимірювання Zn в складі гідроксиапатиту виконується наступна послідовність дій (рис 4.1. – 4.4.).

1. Відкрити менеджер продуктів за допомогою кнопки 

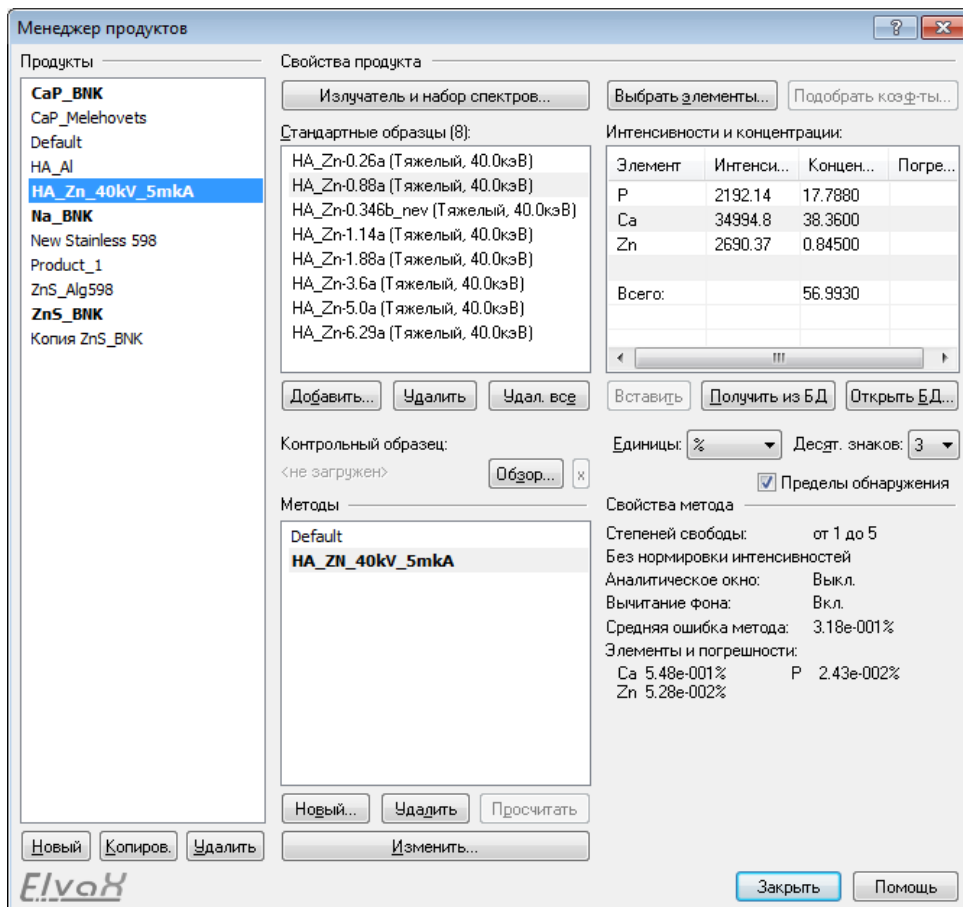


Рисунок 4.1 – Вікно «Менеджер продуктів»

2. Натиснути кнопку «*Новий*».
3. Зробити подвійний клік на назві нового продукту в списку та надати йому необхідне ім'я (НА\_40kV\_5mkA).
4. Натиснути кнопку «*Випромінювач і набір спектрів*» і в діалозі «*Налаштування продукту*» на сторінці «*Управління випромінювачем*». Встановити необхідні налаштування рентгенівського випромінювача (перш за все, за допомогою перемикача «*Завдання*»). Вказати вид спектрів, що набираються.

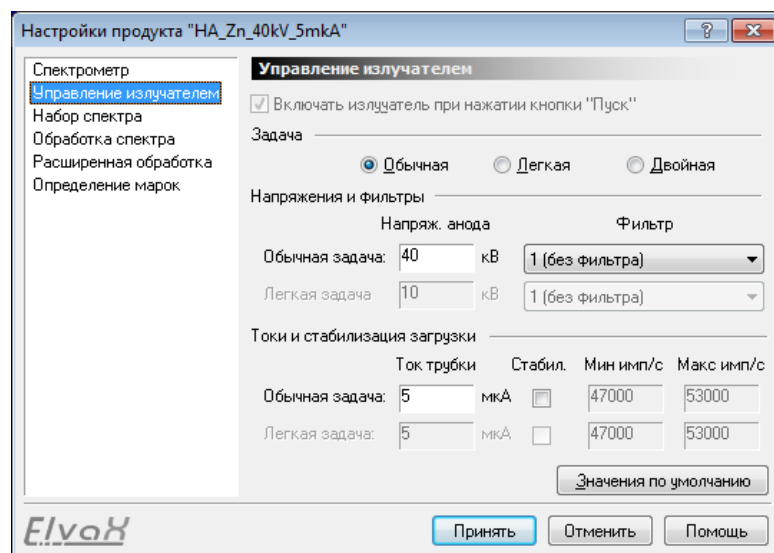


Рисунок 4.2 – Вікно «Керування випромінювачем»

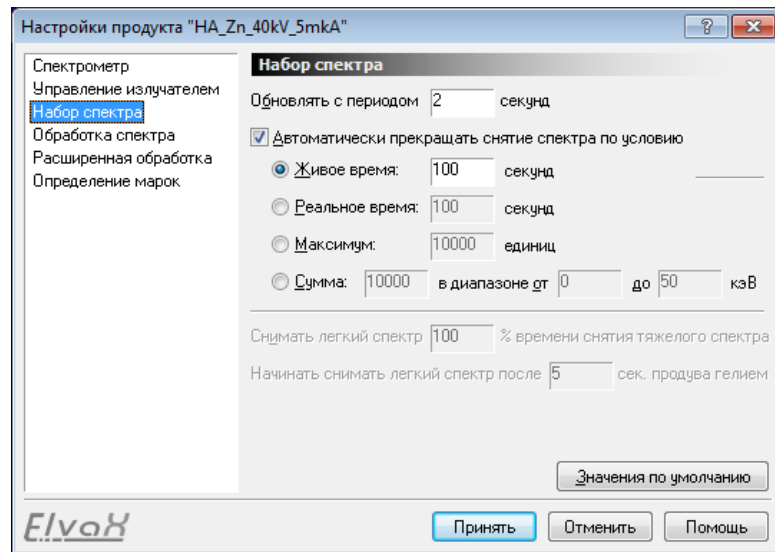


Рисунок 4.3 – Вікно «Набір спектру»

5. Натиснути кнопку «Вибрати елементи» і в періодичній таблиці вибрати всі присутні в калібрувальних зразках елементи - Zn, Ca, P.

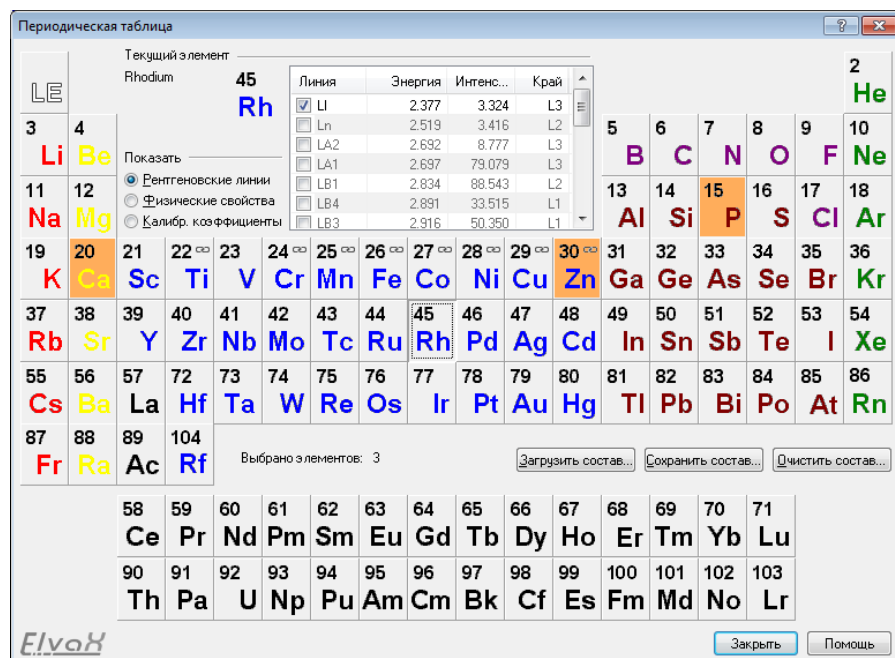


Рисунок 4.4 – Вікно «Періодична таблиця»

6. Закрити менеджер продуктів, і переконатися, що новий

продукт зроблений активним, тобто він вибраний у випадуючому списку продуктів на панелі *«Аналіз спектру»*.

7. Не змінюючи активного продукту, зробити набір спектрів стандартних зразків і зберегти їх у файли.

8. Відкрити менеджер продуктів і імпортувати збережені спектри стандартних зразків за допомогою кнопки *«Додати»*. Імпортовані спектри розкладаються на аналітичні серії вибраних елементів і інтенсивності останніх з'являються в таблиці *«Інтенсивності і концентрації»*.

9. Заповнити колонки *«Концентрація»* таблиці *«Інтенсивності і концентрації»* значеннями концентрацій, зазначеними в таблиці на калібрувальні зразки (таблиця 4.1.).

10. Натиснути кнопку *«Новий»* під списком методів для створення вимірювального методу. З'явиться діалог *«Редактор методу»*.

11. Натиснути кнопку *«Прорахувати»* для отримання коефіцієнтів регресійної моделі.

Продукт завершений і готовий до застосування для аналізу визначення вмісту цинку в складі зразків гідроксиапатиту.

Аналогічні дії були виконані при отримання калібрувальної залежності для визначення вмісту алюмінію.

Для аналізу якості приготування калібрувальних зразків і стабільності реєстрації рентгенівських спектрів побудований графік функції інтенсивності лінії Zn k- $\alpha$  (вісь Y) в залежності від його теоретичного вмісту - вісь X (таблиця 4.1.).



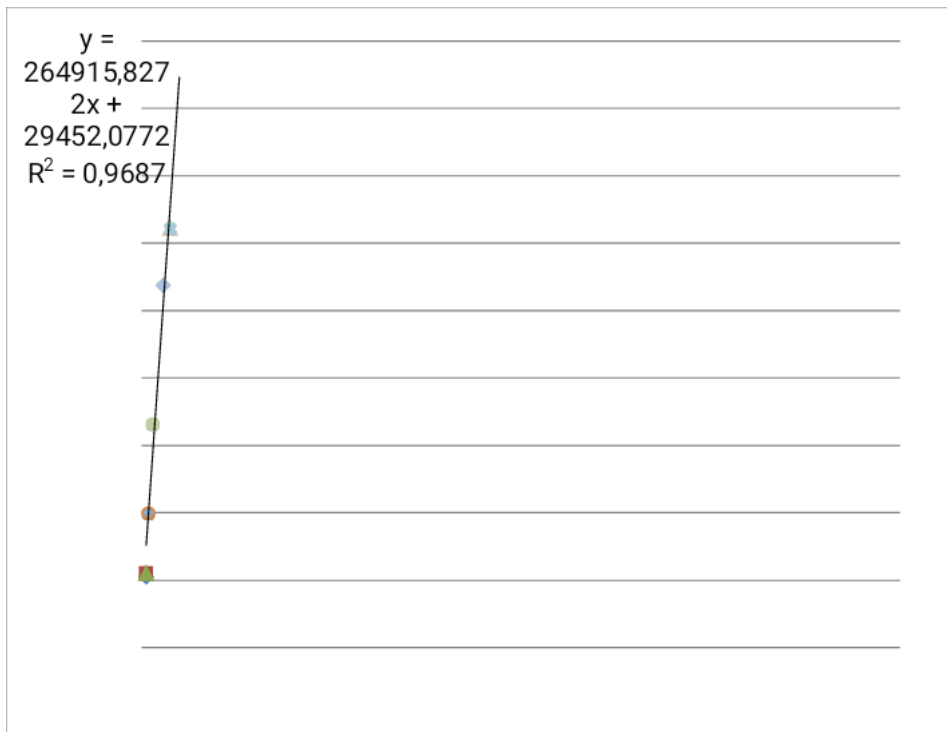


Рисунок 4.5 – Графік залежності теориточної масової частки цинку до фактичних значень інтенсивностей в експериментальних зразках

Також побудований графік функції теоретичної масової частки Zn в калібрувальних зразках (вісь Y) в залежності від теоретичного вмісту (вісь X) (таблиця 4.1.).

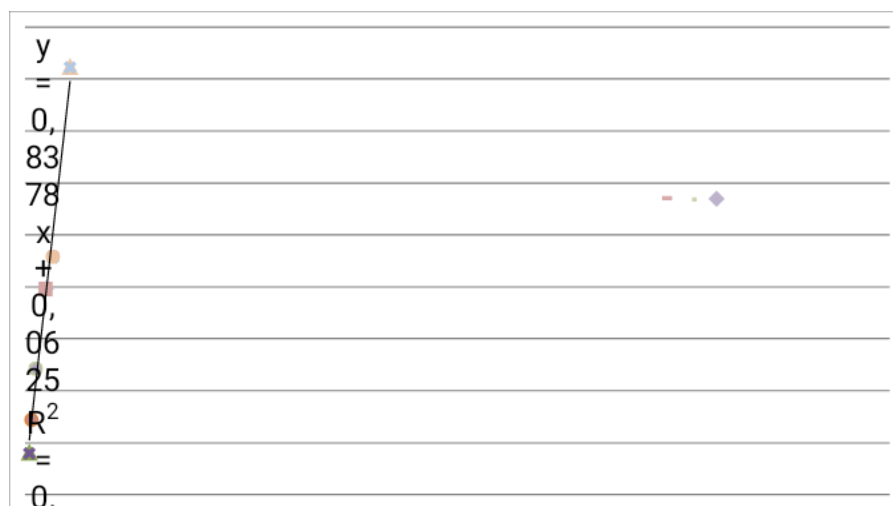


Рисунок 4.6 – Графік залежності теоретичної масової частки

цинку до фактичних значень масової частки в експериментальних зразках

Відпрацьовані параметри визначення вмісту цинку в зразках гідроксиapatиту.

Отримані функції підтверджують необхідну якість калібрування зразків та стабільність роботи приладу.

Рентгенофлуоресцентний спектрометр ElvaX №545 придатний для вимірювання вмісту цинку та алюмінію в складі зразків гідроксиapatиту методом РФА.

## РОЗДІЛ 5. БЕЗПЕКА ЖИТТЄДІЯЛЬНОСТІ

У дипломній роботі проводився синтез порошків ГАП, досліджувалися параметри його структури. Актуальним завданням в цьому розділі є виявлення в ході отримання та дослідження порошків негативних факторів впливу на організм людини. Робота виконувалася з хімічними речовинами, електроустаткуванням в лабораторному приміщенні, тому розділ буде присвячений розгляду хімічної та електробезпеки.

Визначення класу небезпеки хімічних речовин

У дипломній роботі використовуються наступні хімічні

речовини: нітрат кальцію -  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , гідроортофосфат амонію -  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , розчин аміаку -  $\text{NH}_3\text{OH}$ . Небезпечними і шкідливими виробничими факторами при виконанні даної роботи у відповідність з ГОСТ 12.0.003-2015 - є хімічні.

За характером результуючого хімічного впливу на організм людини хімічні речовини поділяють:

- на токсичні (отруйні);
- дратівливі;
- сенсibiliзуючі;
- канцерогенні;
- мутагенні;
- впливають на репродуктивну функцію.

Ступінь небезпеки хімічних речовин зв'язана зі шляхами їх потрапляння в організм людини, які поділяють на такі групи проникнення:

- через органи дихання (інгаляційний шлях);
- через шлунково-кишковий тракт (пероральний шлях);
- через шкірні покриви і слизові оболонки (шкірний шлях);
- через відкриті рани;
- при проникаючих пораненнях;
- при внутрішньом'язових, підшкірних, внутрішньовенних ін'єкціях.

Шкідливі речовини, що потрапили в організм людини, призводять до порушення здоров'я лише в тому випадку, коли їх кількість в повітрі перевищує граничну для кожної речовини величину.

Під гранично допустимою концентрацією (ГДК) шкідливих речовин в повітрі робочої зони розуміють таку максимальну концентрацію, яка при щоденній (крім вихідних днів) роботі протягом

8 годин або іншої тривалості (але не більше 40 годин на тиждень) протягом усього трудового стажу не викликає професійних захворювань або відхилень у стані здоров'я, які виявляються сучасними методами досліджень в процесі роботи або у віддалені строки життя теперішнього і наступних поколінь.

За ступенем впливу на організм шкідливі речовини поділяють на чотири класи небезпеки:

1-й - речовини надзвичайно небезпечні;

2-й - речовини високонебезпечні;

3-й - речовини помірно небезпечні;

4-й - речовини малонебезпечні.

Клас небезпеки шкідливих речовин встановлюють залежно від норм і показників, зазначених у таблиці 5.1.

Таблиця 5.1 – Клас небезпеки шкідливих речовин в залежності від норм і показників.

Найменування показника	Норми для класів небезпеки			
	1-й	2-й	3-й	4-й
Гранично допустима концентрація (ГДК) шкідливих речовин в повітрі робочої зони, мг / м <sup>3</sup>	0,1 >	0,1-1,0	1,0-10,0	> 10,0
Середня смертельна доза при введенні в шлунок, мг / кг	15 >	15-150	150-5000	>5000
Середня смертельна доза при нанесенні на шкіру, мг / кг	100>	100-500	500-2500	>2500
Середня смертельна концентрація в повітрі, мг / м <sup>3</sup>	500>	500-5000	5000-50000	>50000
Коефіцієнт можливості інгаляційного отруєння (PIA)	>300	300-30	29-3,0	3,0>
Зона гострої дії	<6,0	6,0-18	18,1-54	>54
Зона хронічної дії	10	10-5	4,9-2,5	2,5>

У таблиці 5.2 представлені токсичні речовини, що використовуються в роботі, їх властивості та особливості.

Таблиця 5.2 – ГДК токсичних речовин, що використовуються в роботі.

Речовина	ПДК, мг/м <sup>3</sup>	Клас небезпеки	Дія на організм
Нітрат кальцію - $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10	3-й	Надходження великої кількості нітратів в організм людини призводить до утворення різних сполук, які надають токсичну дію. Встановлено, що нітрати пригнічують дихання клітин, пов'язуючи гемоглобін і викликаючи кисневе голодування клітин - метгемоглобінемію.
Гідроортофосфат амонію - $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	6	4-й	Гідроортофосфат амонію є алергеном, який здатний викликати стійкі алергічні реакції у вигляді нападів ядухи і астми.
Розчина аміаку - $\text{NH}_3\text{OH}$	20	4-й	У малій концентрації викликає печіння в очах і сльозоточивість, при збільшенні дози - хімічний опік рогівки і навіть сліпоту. Вдихання аміачних випарів може згубно позначитися на дихальних шляхах організму: першіння в горлі, утруднення дихання, кашель.

З перерахованих вище речовин найнебезпечнішим є нітрат кальцію -  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Гранично допустима концентрація (ГДК) 10 мг / м<sup>3</sup>. Аскорбінова кислота, вітаміни А, Е, С допоможуть зменшити шкідливий вплив на організм людини, так як вони є речовинами, які запобігають і гальмують перетворення нітратів в організмі.

#### *Загальні вимоги при роботі в лабораторії*

При роботі в лабораторії завжди існує ризик контакту з приладами і небезпечними речовинами. Працювати одному в

лабораторії суворо заборонено, так як потрібна людина, яка зможе надати першу допомогу і вжити заходів по ліквідації аварії.

1. Потрібно знати, де знаходяться засоби першої допомоги;
2. Не можна перебувати в лабораторії у верхньому одязі;
3. В лабораторії заборонено приймати їжу, воду і палити;
4. Не можна пробувати на смак хімічні речовини;
5. Досліди проводяться тільки з використання чистого посуду. Після проведення експериментів брудний посуд необхідно відразу ж помити;
6. При роботі необхідно дотримуватися чистоти і стежити, щоб речовини не потрапили на шкіру і одяг;
7. При роботі з хімічними речовинами необхідно надіти спеціальні захисні засоби: халат, бахіли, рукавички;
8. На будь-якому посуді з реактивами обов'язково повинні бути етикетки, де вказується назва речовини, а іноді і дата проведення експерименту;
9. Заборонено плутати пробки (кришки) від банок з реактивами;
10. Заборонено залишати без нагляду ввімкнені електроприлади (піч, УЗВ, центрифуга і т.д.);
11. Заборонено виливати в раковину концентрати лугів і кислот, а також органічні розчинники, вогнебезпечні та сильно пахучі речовини. Для зливу таких речовин потрібно використовувати тільки спеціальні ємності з відповідними етикетками (наприклад, «Злив органічних речовин»);
12. Всі експерименти з небезпечними і пахучими речовинами потрібно виконувати строго під витяжною шафою;
13. Нагрівати рідину в пробірці слід поступово, направляючи отвір пробірки в сторону від себе і від людей поруч;

14. Після завершення роботи необхідно прибрати за собою приміщення, де проводилася робота і привести робоче місце в порядок;

15. Все електрообладнання після роботи має бути вимкнене;

16. Покидаючи лабораторію, слід перевірити, чи вимкнені всі електроприлади, чи перекрито водопостачання, чи вимкнені рубильники електроживлення.

## ВИСНОВКИ

У процесі виконання дипломної роботи були представлені результати аналізу композитних матеріалів на основі ГА з включенням іонів Al та Zn за присутності таких біополімерів, як Хітозан та Альгінат.

Також, під час проходження переддипломної практики та початкового періоду дипломного проектування, було виконане налаштування рентгено-флуоресцентного спектрометра ElvaX №545 шляхом розробки методик для визначення вмісту цинку та алюмінію в складі зразків гідроксиапатиту.

Відштовхуючись від результатів рентгено-флуоресцентного аналізу та методу рентгенівської дифракції можна сформулювати такі висновки:

1. Зв'язування макромолекул біополімерів йонами металів та входження останніх в структуру композитів відбулося у всіх зразках з вмістом Al та Zn, як за кількості 25% , так і 2,5% від концентрації нітрату кальцію, тобто 0,045M та 0,0045M.

2. Хітозан показав гарні результати зв'язування металів при наявності іонів Zn та Al. В порівнянні до контрольних зразків вміст відсотковий вміст розглянутих вище металів був більший. Оскільки молекула хітозану містить в собі велику кількість вільних аміногруп це дозволяє йому зв'язувати іони водню і набувати надлишковий позитивний заряд. Звідси і йде властивість хітозану, як хорошого аніоніту. Це також пояснює здатність хітозана пов'язувати і міцно утримувати іони різних металів (в тому числі і радіоактивних ізотопів, а також токсичних елементів).

3. Композити на основ ГА з вмістом біополімеру Альгінату найкраще зв'язують йони Zn при його високій концентрації в зразку.



Дещо гірші результати були Альгінат показав при зв'язуванні йонів Al, що можна пояснити меншою спорідненістю цього біополімеру до Алюмінію. У морських водоростях альгінова кислота виконує очисну функцію. Нормальному протіканню біохімічних реакцій заважають іони різних металів, що потрапляють через оболонку всередину клітини водорості. Альгінова кислота зв'язує проникли іони, і водорослева клітина виділяє утворилися альгінати на поверхню. Таким чином, клітини морських водоростей постійно виробляють альгінову кислоту і тим самим очищаються від токсичних для них іонів металів. Альгінова кислота і її солі мають іонообмінні властивості. Встановлено ряди катіонів в порядку зростання їх спорідненості до альгінової кислоти. Так, катіони свинцю, міді, барію, стронцію, цезію мають більшу спорідненість до альгінової кислоти, ніж катіони кальцію. Тому катіони важких металів і радіонуклідів витісняють з альгінату кальцію катіони кальцію, самі міцно зв'язуються альгіновою кислотою і виводяться з організму.

4. Оскільки біоапатити характеризуються присутністю домішкових йонів металів, більшість з яких беруть важливу участь метаболізмі, то виконана робота є актуальною. Було продемонстровано можливість входження йонів металів в структуру ГА та дослідження впливу концентрації останніх на елементний склад отриманого продукту.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- [1] E. Bonucci (Ed.), *Calcification in Biological Systems*, CRC Press, Boca Raton, 1992, p. 406.
- [2] Wouter Habraken, Pamela Habibovic, Matthias Epple, Marc Bohner, *Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future?*, *Materialstoday*, Volume 19, Issue 2, March 2016, Pages 69-87.
- [3] Liu, Y., Luo, D., & Wang, T. (2016). Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering. *Small*, 12(34), 4611–4632. doi:10.1002/sml.201600626
- [4] P. M. Visakh, Aji P. Mathew, Sabu Thomas (auth.), Sabu Thomas, P. M. Visakh, Aji P. Mathew (eds.), *Advances in Natural Polymers: Composites and Nanocomposites*, *Advanced Structured Materials*, 2015 - Volume 18, p 55-122.
- [5] Abdelwahed Barkaoui & Ridha Hambli, *Nanomechanical properties of mineralised collagen microfibrils based on finite elements method: biomechanical role of cross-links*, *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, Volume 17, 2014 - Issue 14.
- [6] Yao, Z. T., Chen, T., Li, H. Y., Xia, M. S., Ye, Y., & Zheng, H. (2013). Mechanical and thermal properties of polypropylene (PP) composites filled with modified shell waste. *Journal of Hazardous Materials*, 262, 212–217.
- [7] Smeets, P. J. M., Cho, K. R., Kempen, R. G. E., Sommerdijk, N. A. J. M., & De Yoreo, J. J. (2015). Calcium carbonate nucleation driven by ion binding in a biomimetic matrix revealed by in situ electron microscopy. *Nature Materials*, 14(4), 394–399. doi:10.1038/nmat4193
- [8] Sakae, T., Nakada, H., & John P. LeGeros. (2015). Historical Review of Biological Apatite Crystallography. *Journal of Hard Tissue Biology*, 24(2), 111–122. doi:10.2485/jhtb.24.11
- [9] Zhang, C., Cheng, D., Tang, T., Jia, X., Cai, Q., & Yang, X. (2015).

Nanoporous structured carbon nanofiber–bioactive glass composites for skeletal tissue regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(26), 5300–5309. doi:10.1039/c5tb00921a.

[10] Получение гидроксиапатита гидролизом  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  [Текст] / О. В. Сеницына [и др.] // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2005. – №1. – С. 78-85.

[11] Иванов, С. Ю. Новое поколение биоконпозиционных материалов для замещения костной ткани [Текст] / С. Ю. Иванов, Л. И. Риллер, А. Ф. Бизяев // Новое в стоматологии. – 1999. – №5. – С. 47.

[12] Структура и физико-химические свойства гибридного композита по-лигидроксипутират/гидроксиапатит [Текст] / Е. И. Шишацкая [и др.] // Перспективные материалы. – 2005. – №1. – С. 47-51.

[13] Эппле, М. Биоматериалы и биоминерализация [Текст] / Матиас Эппле; пер. с нем. под ред. В. Ф. Пичугина, Ю. П. Шаркеева, И. А. Хлусова. – Томск: Ветер, 2007. – 137 с.

[14] Модификация акриловой пластмассы введением в нее гидроксиапатита с последующей очисткой сверхкритической двуокисью углерода [Текст] / А. И. Воложин [и др.] // Новое в стоматологии. – 1999. – № 3. – С. 32-40.

[15] Получение гидроксиапатита гидролизом  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  [Текст] / О. В. Сеницына [и др.] // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2005. – №1. – С. 78-85.

[16] Li, M., Wang, L., Zhang, W., Putnis, C. V., & Putnis, A. (2016). Direct Observation of Spiral Growth, Particle Attachment, and Morphology Evolution of Hydroxyapatite. *Crystal Growth & Design*, 16(8), 4509–4518. doi:10.1021/acs.cgd.6b00637.

[17] Cacciotti, I. (2015). Cationic and Anionic Substitutions in Hydroxyapatite. *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*, 1–68.

doi:10.1007/978-3-319-09230-0\_7-1

[18] Ki-Taek Lim, Jin-Woo Kim, Jangho Kim, Jong Hoon Chun, Development and Evaluation of Natural Hydroxyapatite Ceramics Produced by the Heat Treatment of Pig Bones, *Journal of Biosystems Engineering* 2014; 39(3): 227-234.

[19] Синтез нанопорошков гидроксипатита для медицинских применений [Текст] / А. С. Фомин [и др.] // Перспективные материалы. – 2006. – №2. – С. 51-55.

[20] Martins, M., Barros, A. A., Quraishi, S., Gurikov, P., Raman, S. P., Smirnova, I., ... Reis, R. L. (2015). Preparation of macroporous alginate-based aerogels for biomedical applications. *The Journal of Supercritical Fluids*, 106, 152–159. doi:10.1016/j.supflu.2015.05.010.

[21] Л.Ф. Суходуб, А.О. Роцупкін, Л.Б. Суходуб, Н.В. Глущенко, Наноструктуровані матеріали на основі гідроксипатиту та альгінату для медицини. *JOURNAL OF NANO- AND ELECTRONIC PHYSICS* Vol. 9 No 4, 04017(12 pp) (2017).

[22] А. Н. Гурин, В. С. Комлев, А. Ю. Федотов, А. Л. Берковский, В. Е. Мамонов, А. С. Григорьян, А. С. Григорьян, Сравнительная характеристика материалов на основе хитозана, альгината и фибрина в комплексе с -трикальцийфосфатом для остеопластики (экспериментально-морфологическое исследование), *Стоматология*. 2014;93(1): 4-10.

[23] SUZUKI, T., KAJITA, Y., KATSUMATA, S., MATSUZAKI, H., & SUZUKI, K. (2015). Zinc Deficiency Increases Serum Concentrations of Parathyroid Hormone through a Decrease in Serum Calcium and Induces Bone Fragility in Rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 61(5), 382–390. doi:10.3177/jnsv.61.382

[24] А.М. Жибарев, Э.А. Ахметшин, Е.В. Жариков, *Журнал неорганической химии* 58, 1573 (2013).

[25] Drevet, R., Ben Jaber, N., Fauré, J., Tara, A., Ben Cheikh Larbi, A., & Benhayoune, H. (2016). Electrophoretic deposition (EPD) of nano-hydroxyapatite coatings with improved mechanical properties on prosthetic Ti6Al4V substrates. *Surface and Coatings Technology*, 301, 94–99. doi:10.1016/j.surfcoat.2015.12.058

[26] Sukhodub, L F; Roshchupkin, A A; Sukhodub, L B; Gluschenko, N V., Alternate title: Application Biocomposite Materials Based on Hydroxyapatite and Alginate in Medicine, *Journal of Nano- and Electronic Physics*; Sumy Ukraine Том 9, Изд. 4, (2017): 4017-1.

[27] Nazeer, M. A., Yilgör, E., & Yilgör, I. (2017). Intercalated chitosan/hydroxyapatite nanocomposites: Promising materials for bone tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 175, 38–46. doi:10.1016/j.carbpol.2017.07.054

[28] Ye.B. Vlasova, A.A. Nikitin, V.A. Stuchilov, N.V. Malychenko, L.A. Topilina, N.A. Kalabukhova, *Voprosy oboronnoy tekhniki* 17 (2013).

[29] Türk, S., Altınsoy, I., Çelebi Efe, G., Ipek, M., Özacar, M., & Bindal, C. (2018). 3D porous collagen/functionalized multiwalled carbon nanotube/chitosan/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 92, 757–768. doi:10.1016/j.msec.2018.07.020.

[30] Xiong, G., Luo, H., Zuo, G., Ren, K., & Wan, Y. (2015). Novel porous graphene oxide and hydroxyapatite nanosheets-reinforced sodium alginate hybrid nanocomposites for medical applications. *Materials Characterization*, 107, 419–425. doi:10.1016/j.matchar.2015.07.016.

[31] Е.И. Марченко, И.Г. Чухрай, Н.А. Байтус, *Вестник ВГМУ* 11 No 1, 22 (2012).

[32] Seo, H.-J., Cho, Y.-E., Kim, T., Shin, H.-I., & Kwun, I.-S. (2010). Zinc may increase bone formation through stimulating cell proliferation, alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblastic

MC3T3-E1 cells. *Nutrition Research and Practice*, 4(5), 356. doi:10.4162/nrp.2010.4.5.356.

[33] Ito, A., Otsuka, M., Kawamura, H., Ikeuchi, M., Ohgushi, H., Sogo, Y., & Ichinose, N. (2005). Zinc-containing tricalcium phosphate and related materials for promoting bone formation. *Current Applied Physics*, 5(5), 402–406. doi:10.1016/j.cap.2004.10.006

[34] O.O. Martynyuk, L.F. Sukhodub, L.B. Sukhodub, A.M. Meshkov, J. *Nano- Electron. Phys.* 8 No 4(2), 04090 (2016).

[35] Hans-Olov Hellström, Bengt Mjöberg, Hans Mallmin, Karl Michaëlsson, The aluminum content of bone increases with age, but is not higher in hip fracture cases with and without dementia compared to controls, *Osteoporosis International* December 2005, Volume 16, Issue 12, pp 1982–1988.

[36] Kraft, M. D. (2014). Phosphorus and Calcium. *Nutrition in Clinical Practice*, 30(1), 21–33. doi:10.1177/0884533614565251.

[37] C. Gomez-Alonso, P. Menendez-Rodriguez, M. J. Virgos-Soriano, J. L. Fernandez-Martin, M. T. Fernandez-Coto and J. B. Cannata-Andia, *Calcif. Tissue Int.*, 1999, 64, 534–541.

[38] L. D. Quarles, H. J. Gitelman and M. K. Drezner, *J. Clin Invest.*, 1989, 83, 1644–1650.

[39] D. Boyd, H. Li, D. A. Tanner, M. R. Towler, J. G. Wall, The antibacterial effects of zinc ion migration from zinc-based glass polyalkenoate cements, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* June 2006, Volume 17, Issue 6, pp 489–494

[40] Bojórquez-Quintal, E., Escalante-Magaña, C., Echevarría-Machado, I., & Martínez-Estévez, M. (2017). Aluminum, a Friend or Foe of Higher Plants in Acid Soils. *Frontiers in Plant Science*, 8. doi:10.3389/fpls.2017.01767

[41] Wang, M., Wang, L., Shi, C., Sun, T., Zeng, Y., & Zhu, Y. (2016).

The crystal structure and chemical state of aluminum-doped hydroxyapatite by experimental and first principles calculation studies. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(31), 21789–21796. doi:10.1039/c6cp03230c.

[42] Kruger, P. C., Parsons, P. J., Galusha, A. L., Morrissette, M., Recker, R. R., & Howard, L. J. (2013). Excessive Aluminum Accumulation in the Bones of Patients on Long-Term Parenteral Nutrition. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 38(6), 728–735. doi:10.1177/0148607113491981.

[43] Luo, X., Jia, S., Ma, Q., Zhong, M., Gao, P., Yu, Z., & Zhang, Y. (2014). Suppressive Effects of Subchronic Aluminum Overload on the Splenic Immune Function May Be Related to Oxidative Stress in Mice. *Biological Trace Element Research*, 157(3), 249–255. doi:10.1007/s12011-014-9888-8

[44] Chappard, D., Mabilieu, G., Moukoko, D., Henric, N., Steiger, V., Le Nay, P., ... De Bodman, C. (2015). Aluminum and iron can be deposited in the calcified matrix of bone exostoses. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 152, 174–179. doi:10.1016/j.jinorgbio.2015.09.008

[45] A. Lubkowska and D. Chlubek, *Trace Elem. Electrolytes*, 2015, 32, 52–59.

[46] Kaygili, O., Keser, S., Kom, M., Eroksuz, Y., Dorozhkin, S. V., Ates, T., ... Yakuphanoglu, F. (2015). Strontium substituted hydroxyapatites: Synthesis and determination of their structural properties, in vitro and in vivo performance. *Materials Science and Engineering: C*, 55, 538–546. doi:10.1016/j.msec.2015.05.081

[47] Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа. – М.: Мир, 1989. – 608 с.

[48] Бёккер Ю. Спектроскопия. – М.: Техносфера, 2009. – 528 с. 116-137.

[49] Jose A. C. Broekaert. Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas. – Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002. – 375 c.

[50] Z. Shokri Aghbolagh, A.R. Mahjoub, Sh. Ghammamy, Synthesis, characterization, of Fluorohydroxyapatite nanopowders by sol-gel processing, IJND, Article 13, Volume 5, Issue 3, Summer 2014, Page 291-29

[51] Kim, B., Oh, S., Shin, S., Yim, S.-G., Yang, S. Y., Hahn, Y. K., & Choi, S. (2018). Pumpless Microflow Cytometry Enabled by Viscosity Modulation and Immunobead Labeling. *Analytical Chemistry*, 90(13), 8254–8260. doi:10.1021/acs.analchem.8b01804.

[52] Yu, J., Zhang, X., Lu, Q., Sun, D., Wang, X., Zhu, S., ... Yang, W. (2018). Evaluation of analytical performance for the simultaneous detection of trace Cu, Co and Ni by using liquid cathode glow discharge-atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 145, 64–70. doi:10.1016/j.sab.2018.04.011.

[53] Danilchenko SN, Kukharenko OG, Moseke C [et al.] Determination of the bone mineral crystallite size and lattice strain from diffraction line broadening // *Cryst. Res. Technol.* 2002. Vol. 37. № 11. P. 1234–1240.

[54] Kaygili, O., Dorozhkin, S. V., & Keser, S. (2014). Synthesis and characterization of Ce-substituted hydroxyapatite by sol-gel method. *Materials Science and Engineering: C*, 42, 78–82. doi:10.1016/j.msec.2014.05.024.

[55] Kaynak Bayrak, G., Demirtaş, T. T., & Gümüşderelioğlu, M. (2017). Microwave-induced biomimetic approach for hydroxyapatite coatings of chitosan scaffolds. *Carbohydrate Polymers*, 157, 803–813. doi:10.1016/j.carbpol.2016.10.016.

[56] Loupy, A., Bram, G., & Sansoulet, J. (1992). Anion activation in solvent-free heterogeneous solution - use of microwave-ovens. *New*



Journal of Chemistry, 16, 233-242.

[57] Sinnwell, S., Ritter, H. (2007). Recent advances in microwave-assisted polymer synthesis. Australian Journal of Chemistry, 60, 729-743.