

В. К. Цубер<sup>1</sup>, Л. А. Лесникович<sup>1</sup>, А. И. Кулак<sup>1</sup>, И. В. Трофимова<sup>1</sup>,  
П. Т. Петров<sup>2</sup>, Т. В. Трухачева<sup>2</sup>, Ю. Д. Коваленко<sup>3</sup>, В. Л. Красильникова<sup>3</sup>

## СИНТЕЗ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ В БИОАКТИВНОМ ГИДРОКСИАПАТИТЕ

<sup>1</sup> Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси, Минск;

<sup>2</sup> Республиканское унитарное предприятие “Белмедпрепараты”, Минск;

<sup>3</sup> Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск

Разработан метод синтеза биоактивного гидроксиапатита (ГА), адаптированный к условиям промышленного производства. Установлено, что нанокристаллический ГА в форме геля более эффективно стимулирует процессы остеогенеза по сравнению с порошком. Кроме того, гелевая форма ГА является удобной для ее применения в качестве инъекционной лекарственной формы, вводимой непосредственно в костную рану. Гель ГА также может использоваться для пропитки пористых керамических имплантатов для придания им биоактивных свойств. Установлено, что термическая и лучевая стерилизация лекарственных форм на основе ГА не оказывает заметного влияния на их свойства и на стабильность этих препаратов в течение 3 лет в условиях естественного хранения.

Гидроксиапатит (ГА) — основной фосфат кальция  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  — синтетический аналог неорганической составляющей костной и зубной ткани. Гидроксиапатит обладает уникальной способностью активно связываться с костной тканью, стимулируя процессы репаративной остеорегенерации при непосредственном введении в костную рану, не вызывая воспалительных процессов и реакции иммунного отторжения [1–4].

В последнее десятилетие наблюдается резкий рост интереса к разработке новых методов синтеза ГА [3–6] и созданию на его основе различного рода биоматериалов [7–9] и лекарственных препаратов [10–13]. С этой целью ГА был получен как в аморфном, так и в поликристаллическом состоянии, в виде керамических покрытий, порошков и гелей, различных композиций с инертными и биоактивными полимерами [5–9, 14–18], адаптированных для практического использования в стоматологии, ортопедии, челюстно-лицевой хирургии и офтальмологии.

Несмотря на большое количество научных публикаций и патентной литературы по методам синтеза различных форм ГА, на стадии реального внедрения этих методов в производственную практику остро встает задача выбора метода идентификации биоактивных форм ГА, необходимость обоснования оптимальных режимов синтеза и выделения ГА, приемлемых не только для лабораторной, но и для заводской практики.

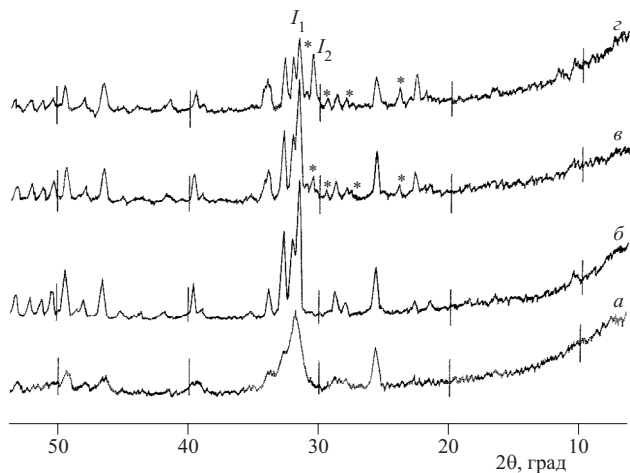
С учетом указанных обстоятельств, связанных с внедрением методов получения ГА и препаратов на его основе в условиях производства Республиканского унитарного предприятия “Белмедпрепараты” (Минск, Беларусь), в рамках данной работы нами рассматриваются ключевые методические аспекты синтеза биоактивной формы ГА, его выделения и идентификации, оптимизированные по надежности и воспроизводимости.

### Методика эксперимента

Синтез ГА в лабораторных условиях производился из водных растворов хлорида кальция  $\text{CaCl}_2$  (квалификации ос.ч.) концентрацией 0,08–0,63 моль/л и двузамещенного фосфата аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (ч.д.а.) концентрацией 0,06–0,23 моль/л в щелочной среде, созданной добавлением раствора аммиака (ос.ч.) в соответствии с разработанной нами методикой [5, 6]. Для получения 3,5 г конечного продукта реакционный объем составляет 800 мл. В данном процессе на начальной стадии синтеза образуется аморфная фаза, включающая наряду с ГА значительное количество трикальцийфосфата (ТКФ), возможно в форме ионных ассоциатов типа  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$  [9].

Рентгенофазовый анализ проводили с использованием дифрактометра ДРОН-3 с излучением  $\text{CuK}\alpha = 1,5405 \text{ \AA}$ . ИК-спектроскопический анализ ГА и смеси ГА с различным содержанием ТКФ проводили на Фурье ИК спектрометре MIDAC 2000 (США) с использованием таблеток бромида калия.

Для изучения специфической активности синтезированного ГА в Белорусской медицинской академии последипломного образования проводился медико-биологический эксперимент на беспородных половозрелых белых крысах стадной разведения. На большеберцовой кости был сформирован дефект размером 2 мм в глубину и 5–6 мм в длину, который заполняли порошком либо гелем ГА, подвергнутым тепловой (автоклавированием при 120 °С; 1,1 атм; 45 мин) или лучевой ( $\gamma$ -излучением 2,5 Мрад) стерилизации. С учетом объема полости и влажности геля ГА его количество, введенное в место дефекта, составляло 2–3 мг в случае порошка ГА либо 20–25 мкл при использовании геля ГА. Исследование распределения препарата в скелете крыс (*in vivo*) проводилось методом остеосцинтиграфии с помощью компьютеризированной  $\gamma$ -камеры LEM “Siemens”. Метод основан на использовании остеотропного радиофармацевтического препарата (РФП) Медронат (“Amersham”), меченого изотопом



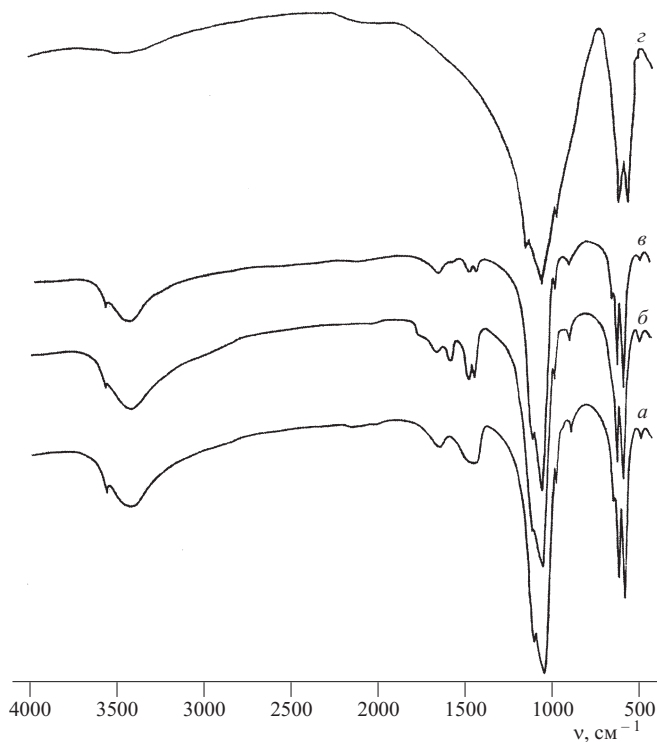
**Рис. 1.** Рентгенограммы образцов ГА нанокристаллического (а), закристаллизованного термообработкой при 800 °С — чистого (б) и смеси с ТКФ 18 % (в), 50 % (г); дифракционные линии ТКФ обозначены звездочкой “\*”

технеция ( $^{99m}\text{Tc}$ ), который избирательно накапливается в быстрообменной части органического матрикса скелета. Препарат вводился в хвостовую вену крысы в дозе 20 – 40 МБк/100 г массы тела животного. Выбор именно препарата Медронат в качестве носителя радиоизотопной метки был обусловлен его высокой тропностью по отношению к ГА. Запись остеосцинтиграммы проводилась через 120 – 150 мин после введения РФП в организм крысы. Выделялись зоны интереса на скнтиграмме скелета и рассчитывалось нормированное по площади процентное отношение в заданных участках скелета. При этом показания сравнивались по степени накопления препарата в исследуемом участке и в аналогичном участке, где оперативное вмешательство не производилось.

### Результаты и их обсуждение

Выполненное исследование показало, что для образования ГА с минимальным содержанием ТКФ требуется не только соблюдение ряда условий — порядка сливания исходных растворов, поддержания стехиометрического соотношения ионов кальция и фосфора ( $\text{Ca/P} = 1,67$ ), но и обязательное наличие стадии созревания — выдерживания осадка под маточным раствором в течение 7 – 14 сут при pH 10 – 11 [5, 6]. В результате становится возможным синтезировать ГА достаточно высокой степени чистоты с содержанием ТКФ не выше 5 % (в пределах чувствительности рентгенофазового анализа).

Использование данной методики в опытно-промышленных условиях позволяет из 25 л реакционного объема получить около 100 г порошка ГА. Семикратное воспроизведение данного метода в условиях Научно-фармацевтического центра РУП “Белмедпрепараты” показало, что при соблюдении всех заданных условий синтеза получается высокочистый ГА, пригодный для всех основных видов использования, и, в частности, для применения его в качестве перораль-



**Рис. 2.** ИК-спектры нанокристаллических образцов ГА — чистого (а), смеси ГА с ТКФ 18 % (б), 50 % (в) и индивидуального ТКФ (г)

ной формы (гель, порошок), непосредственного введения в костную рану (гель, порошок) и имплантатов (плотная и пористая керамики, покрытия на эндопротезах).

Одним из важных элементов создания оптимальной технологии синтеза ГА является разработка методов объективного контроля его химического состава, и, в первую очередь, определения наличия примеси ТКФ. Определение количества примеси ТКФ в синтезированных образцах ГА осуществлялось методом химического анализа на ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{PO}_4^{3-}$  и расчетом мольного соотношения  $\text{Ca/P}$  в форме  $V$ -индекса:

$$V = F \cdot X_1/X_2, \quad (1)$$

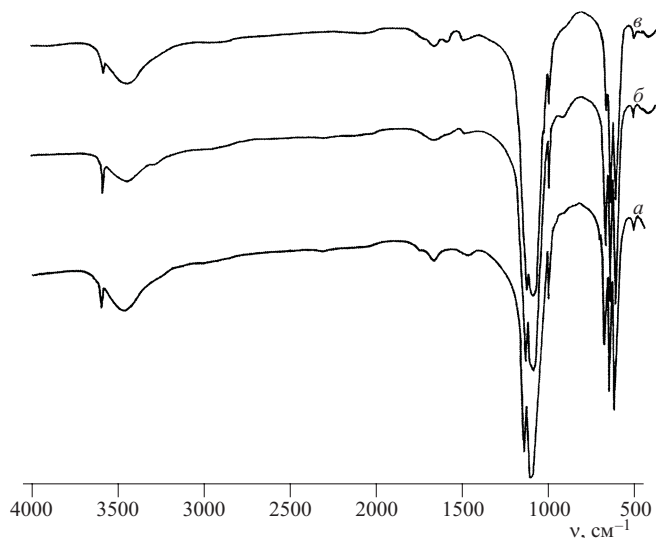
где  $F = 2,3695$  — коэффициент пересчета  $\text{Ca/P}$  соотношения от % к молярности,  $X_1$  — концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (%), а  $X_2$  — концентрация  $\text{PO}_4^{3-}$  ионов (%), определенные с помощью химического анализа.

Поскольку расчетное соотношение  $\text{Ca/P}$  для ГА равно 1,67, а для ТКФ — 1,50, оценить количество примеси ТКФ (в вес. %) можно по отклонению соотношения  $\text{Ca/P}$  от его расчетного значения по формуле:

$$Y_2 = (A_x/A) \cdot 100 \%, \quad (2)$$

где  $Y_2$  — концентрация примеси ТКФ, %;  $A = 0,17$  — постоянная, вычисленная в соответствии со стехиометрическим содержанием кальция и фосфора в ГА и ТКФ;

$$A_x = 1,67 - V.$$



**Рис. 3.** ИК-спектры закристаллизованных образцов, прокаленных при 800 °С, — чистого ГА (*а*) и смеси ГА с ТКФ 18 % (*б*), 50 % (*в*)

Несмотря на высокую степень объективности химического метода анализа содержания ТКФ в образцах ГА, этот метод представляется достаточно трудоемким и длительным. В связи с этим нами были сопоставлены достоинства и недостатки в использовании рекомендуемых для данной цели методов рентгенографического анализа и ИК-спектроскопии.

Количественное определение содержания примеси ТКФ в образцах ГА методом рентгенографического экспресс-анализа проводилось с использованием синтезированных по приведенной выше методике образцов индивидуального ГА, а также, для сопоставления образцов на основе смеси ГА с 18 и 50 вес. % ТКФ.

Поскольку ГА, синтезированный из водных растворов, является нанокристаллическим [5, 6], рентгенограммы его в этом состоянии являются мало информативными (рис. 1, *а*) и идентификация примеси ТКФ по ним практически невозможна. С целью перевода ГА в состояние со степенью кристалличности, достаточной для рентгенофазового анализа, исследуемые образцы подвергали термообработке при температуре 800 °С в

течение 6 ч на воздухе, при этом изменения стехиометрического соотношения Са/Р в ГА, как и в ТКФ не происходит [19, 20]. В итоге, на дифракционной картине термообработанного ГА (рис. 1, *б*) видны характерные линии, с высокой интенсивностью позволяющие осуществлять количественный анализ.

Как видно из рис. 1, для образцов на основе смеси ГА с ТКФ, содержащей 18 % ТКФ (1, *в*) и 50 % ТКФ (1, *з*), наряду с дифракционными линиями ГА появляются характерные линии ТКФ. Соответственно, с увеличением концентрации ТКФ с 18 до 50 % интенсивность его наиболее характерной дифракционной линии ( $I_2$ ) увеличивается, а линии ГА — уменьшается.

Сопоставление данных количественного рентгенофазового анализа и результатов химического анализа показало, что для определения концентрации примеси ТКФ с приемлемой для практических целей точностью можно использовать значения интенсивностей наиболее характерных пиков [21] —  $I_1$  для ГА и  $I_2$  для ТКФ (рис. 2, *з*), считая их прямо пропорциональными количеству вещества [22, 23]. Количество примеси ТКФ  $Y_2$  (вес. %) можно рассчитывать по формуле:

$$Y_2 = (I_2/I_1 + I_2) \cdot 100 \%, \quad (3)$$

где  $Y_2$  — концентрация примеси ТКФ (вес. %);  $Y_1$  — концентрация ГА (вес. %).

Метод рентгенофазового анализа содержания ТКФ в образцах ГА был сопоставлен также и с методом ИК-спектроскопии, с использованием непрогретых (высушенных при 60 °С) (рис. 2) и термообработанных (рис. 3) образцов чистого ГА, ТКФ и смесей ГА с 18 и 50 % ТКФ (рис. 2). Как видно из рис. 2, 3 и из таблицы, спектральное положение полос поглощения в области фосфатных групп практически идентично как для исходных, так и термообработанных образцов.

Из сопоставления полученных ИК-спектров с данными литературы [19, 20, 22 – 24] следует, что в случае непрогретых (нанокристаллических) образцов (рис. 2), так же как и термообработанных (рис. 3), полосы в области 400 – 800  $\text{см}^{-1}$  обусловлены преимущественно деформационными колебаниями тетраэдров  $\text{PO}_4$ , а полосы в области 900 – 1200  $\text{см}^{-1}$  — валентными колебаниями связей Р-О. Деформационные колебания молекул гидратной воды представлены одиночной полосой 1621  $\text{см}^{-1}$ . Валентным колебаниям ОН-групп соответствует широкая полоса в области 2800 – 3700  $\text{см}^{-1}$ , свидетельствующая о наличии системы водородных связей. На фоне широкой полосы валентных колебаний ОН-групп проявляется узкая полоса при 3570  $\text{см}^{-1}$ , характерная для гидроксильных ОН-групп, координированных катионом. В результате термообработки при 800 °С происходит разрушение водородных связей и выделение гидратной воды, однако ввиду высокой термической устойчивости связи ОН-группы с катионом в ГА, интенсивность полосы колебаний, связанных с этой группой, не снижается, а даже несколько возрастает.

Анализ полученных ИК-спектроскопических данных позволяет сделать вывод, что этот метод наиболее

#### Волновые числа и отнесения полос поглощения ( $\text{см}^{-1}$ ) в ИК-спектрах ГА и ТКФ

Термообработанный при 800 °С ГА	Нанокристаллический ГА	ТКФ [24]	Отнесение полос [24]
573	566	549	$\delta\text{PO}_4^{3-}$
602	604	600	
632	632	—	
—	875	—	$\nu\text{CO}_3^{2-}$
963	962	969	$\nu\text{P-O}$
1038	1033	1038	
1090	1090	1118	
—	1422	—	$\nu\text{CO}_3^{2-}$
1618	1621	—	$\delta\text{OH}$
3434	3428	—	$\nu\text{OH}$
3572	3570	—	$\nu\text{OH}$

приемлем для установления состояния гидратной воды в образцах и динамики ее удаления в процессе термообработки и кристаллизации образцов. В то же время определение содержания примеси ТКФ в образцах ГА этим методом оказывается затруднительным. Как видно из рис. 2 и 3, при повышении содержания ТКФ от 18 до 50 % изменения в спектре недостаточны для надежной идентификации состава смеси. Для этой цели, таким образом, более надежным оказывается метод рентгенофазового анализа.

По данным остеосцинтиграфии установлено, что доля накопления РФП в проекции костного дефекта у крыс опытных групп с подсаженным ГА по сравнению с контрольным дефектом без ГА, обусловленная реакцией комплексообразования медронат-ГА в полости дефекта, не превышает 5–6 %. Характерно, что на 7 сут после введения геля и порошка ГА, подвергнутого термической стерилизации, отмечался большой уровень включения РФП в области дефекта по сравнению с животными контрольной группы. Такая же тенденция сохранилась на 14 сут, а на 21 сут среднее значение накопления РФП в области дефекта снизилось. На 28, 42 и 56 сут процесса заживления костной раны средние значения относительного уровня накопления РФП в зоне костного дефекта у животных всех наблюдаемых групп постепенно уменьшались.

У животных, в полость дефекта которых вводили гель ГА независимо от способа стерилизации (тепловая либо  $\gamma$ -лучевая), наибольший уровень включения РФП в зону костной раны относился к 14 сут наблюдения и был существенно большим, чем у животных, которым вводили порошок ГА.

Независимо от способа стерилизации ГА, заживление костной раны на 28 сут после операции было практически таким же, как у крыс контрольной группы без ГА на 56 сут. Следовательно, при использовании геля ГА для восстановления костной раны заживление происходит в 2 раза быстрее, чем в контрольной группе без него.

Таким образом, установлена специфическая активность и безвредность по отношению к костной ткани лекарственных препаратов на основе нанокристаллического ГА, которые оказывают стимулирующее действие на процессы репаративной остеорегенерации при введении их непосредственно в костную рану и ускоряют процессы заживления.

## SYNTHESIS, IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF IMPURITIES IN BIOACTIVE HYDROXYAPATITE

V. K. Tsuber<sup>1</sup>, L. A. Lesnikovich<sup>1</sup>, A. I. Kulak<sup>1</sup>, I. V. Trofimova<sup>1</sup>, P. T. Petrov<sup>2</sup>, T. V. Trukhacheva<sup>2</sup>, Yu. D. Kovalenko<sup>3</sup>, and V. L. Krasil'nikova<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of General and Inorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

<sup>2</sup> Pharmaceutical Research Center, "Belmedpreparaty" Company, Minsk, Belarus

<sup>3</sup> Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk, Belarus

A method for the synthesis of bioactive hydroxyapatite (HA) adapted for industrial production is described. It is established that nanocrystalline HA gel more effectively stimulates osteogenic activity than does HA powder. In addition, HA gel is suitable as injection for direct introduction into bone wound. HA gel can be used for the impregnation of porous ceramic implants in order to improve their bioactivity and biocompatibility. It is shown that thermal and gamma-ray sterilization of HA-based drug preparations does not influence their properties as well as their stability during 3-years storage.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. П. Орловский, С. Г. Курдюмов, О. И. Сливка, *Стоматология*, № 5, 68 – 73 (1996).
2. А. И. Кулак, Л. А. Лесникович, И. В. Трофимова, *Изв. Белор. инженер. акад.*, 1(3), 31 – 34 (1997).
3. W. Suchanek and M. Yoshimura, *Mater. Res.*, 13(1), 94 – 117 (1998).
4. В. П. Орловский, В. С. Комлев, С. М. Баринев, *Неорг. матер.*, 38(10), 1159 – 1172 (2002).
5. Патент Республики Беларусь 2302; *Афіцыйны бюлетэнь*, 3(18), 157 (1998).
6. Л. А. Лесникович, И. В. Трофимова, А. Ф. Ильющенко и др., *Весті НАН Беларусі. Сер. хім. навук*, № 1, 15 – 19 (1999).
7. А. Ю. Малышева, Б. И. Белецкий, Е. Б. Власова, *Стекло и керамика*, № 2, 28 – 31 (2001).
8. В. А. Дубок, Н. В. Ульянин, *Ортопедия, травматология и протезирование*, 6(3), 26 – 30 (1998).
9. Ю. Д. Третьяков, *Успехи химии*, 73(9), 899 – 916 (2004).
10. Л. А. Лесникович, В. К. Цубер, И. В. Трофимова и др., *Наука и инновации, НАН Беларусі*, № 5 – 6, 75 – 82 (2003).
11. М. М. Соловьев, Т. М. Алехова, Л. Г. Владимировича и др., *Стоматология*, № 2, 48 – 53 (1994).
12. Р. К. Абоянц, Л. П. Истранов, А. Б. Шехтер и др., *Стоматология*, № 5, 23 – 26 (1996).
13. Н. А. Захаров, И. А. Полунина, К. Е. Полунин и др., *Неорг. материалы*, 40(6), 735 – 743 (2004).
14. M. T. Manley, in: *Hydroxyapatite coatings in orthopaedic surgery*, R. G. T. Geesink and M. T. Manley (eds.), Raven Press Ltd., New York (1993), pp. 1 – 23.
15. E. Milella, F. Cosentino, A. Licciulli, et. al., *Biomaterials*, 22(11), 1425 – 1431 (2001).
16. C. Wang, J. Ma, W. Cheng, and R. Xhang, *Mater. Lett.*, 57(1), 99 – 105 (2002).
17. R. L. Reis, A. M. Cunda, et. al., *Mat. Res. Innovat.*, 4, 263 – 272 (2001).
18. M. F. Asmus Sven, N. Arsush, and P. Guiseppe, *Adv. Compos. Mater.*, 11(3), 255 – 264 (2003).
19. В. П. Орловский, Ж. А. Ежова, Г. В. Родичива и др., *Ж. неорг. химии*, 35(5), 1337 – 1339 (1990).
20. Н. А. Чумаевский, В. П. Орловский, Ж. А. Ежова и др., *Ж. неорг. химии*, 37(12), 1455 – 1457 (1992).
21. Л. М. Ковба, В. К. Трунов, *Рентгенофазовый анализ*, Изд-во Московского ун-та, Москва (1976), сс. 132 – 135.
22. П. А. Арсеньев, А. А. Евдокимов, С. А. Смирнов и др., *Ж. неорг. химии*, 37(12), 2649 – 2652 (1992).
23. J. Pena, M. Vallet-Regi, *J. Eur. Ceram. Soc.*, 23(10), 1687 – 1696 (2003).
24. М. М. Жарский, Н. И. Воробьев, Т. И. Мельникова и др., *Свойства и методы идентификации веществ в неорганической технологии*, ФФИ РБ, Минск (1996), сс. 57, 227, 292.

Поступила 27.01.05