

Способ определения концентрации и локализации мажорных примесей (Mg, Na, K) биологического апатита минерализованных тканей

С.Н. Данильченко^{1,2,*}

¹ Сумский государственный университет, ул. Римского-Корсакова, 2, 40007 Сумы, Украина

² Институт прикладной физики НАН Украины, ул. Петропавловская, 58, 40000 Сумы, Украина

(Получено 26.02.2013; опубликовано online 17.10.2013)

Биологический апатит является основной минеральной фазой костной ткани и многих кальцинированных патологических отложений. В составе таких биоминералов в значительных концентрациях присутствуют Mg, Na и K, не содержащиеся обычно в чистом апатите. В данной работе апробирован метод определения преобладающей локализации этих элементов путем разделения апатитной и неапатитной составляющей минерала костной ткани. Процедура препарирования включала термическую обработку с последующим ультразвуковым диспергированием порошкообразно материала в водной среде; концентрации элементов определялись методами атомной спектроскопии. Из полученных результатов следует, что Mg и Na в биоапатите кости могут находиться как в структурно-связанном состоянии, замещая кальций в катионной подрешетке апатита, так и в лабильном состоянии, локализуясь на поверхности кристаллов, в то время как K не может в заметных количествах входить в структуру апатита или быть с ним химически связанным.

Ключевые слова: Биоапатит, Mg, Na, K, Концентрация, Локализация, Катионная подрешетка, Растворимость, Отжиг, Ультразвук, Поверхность кристаллов.

PACS numbers: 61.72.Ss, 61.30.Hn

1. ВВЕДЕНИЕ

Гидроксиапатит кальция (идеализированная формула $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), присутствует в биологических системах, как в составе нормально минерализованных тканей (кости, зубы, хрящи), так и в составе патологических минеральных отложений (сердечно-сосудистые кальцификаты, камни почек, щитовидной железы и др.) [1-4]. И в том и в другом случае в минеральной компоненте биологической ткани находятся примесные ионы, которые могут, как входить в кристаллическую структуру апатита, замещая в ней основные ионы, так и локализоваться на поверхности нанокристаллов или в следовой кристаллоаморфной фазе. Особое место среди элементов-металлов, оказывающих большое влияние на кристаллохимические характеристики биогенного апатита, занимают такие щелочные и щелочноземельные металлы как магний, натрий и калий. Например, в минерале кости эти элементы обнаруживаются в сравнительно больших количествах (Na ~ 1,0 мас. %, Mg ~ 0,2-0,6 мас. %, K ~ 0,07 мас. %) [1]. Поэтому в литературе их часто определяют как «мажорные» примеси или макроэлементы в отличие от «минорных» или микроэлементов, содержание которых в биоапатите нормальной костной ткани не превышает нескольких сотых или тысячных долей процента [1, 2]. Детальному изучению структурного и функционального назначения натрия, магния и калия в биоапатите посвящено большое количество работ (например, [5-10]). Весьма актуальными остаются вопросы локализации и концентрации примесных элементов биоапатита тканей скелета и патологических минеральных отложений. До последнего времени не вполне выяснено, какая часть (доля) примесных Mg, Na, K, входит в кристаллическую

структуру биоапатита, какая локализуется в, так называемом, «неапатитном окружении» биокристаллов, или находится в составе следовых аморфных фаз. Наноразмерная природа кристаллов биоапатита не позволяет выяснить это существующими методами локального микроанализа. Однако, при условии разделения апатитной и неапатитной компонент биоминерала, полезная полуквантитативная информация может быть получена и с применением традиционных твердотельных методов исследования.

В данной работе предложен способ определения преимущественной локализации таких элементов как Mg, Na и K в минерализованных биологических тканях, основу которых составляет биоапатит, а также метод оценки соотношения концентраций этих элементов в апатитной и неапатитной компоненте биоминерала.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Фосфаты кальция биологических тканей и их растворимость

Апатиты кальция как биологического, так и синтетического происхождения практически не растворимы в воде и слабых щелочных растворах, хотя растворимы в кислотах. В дистиллированной воде (pH ≈ 6,5) гидроксиапатит растворяется во много раз слабее, чем другие ортофосфаты кальция (рис. 1), предположительно присутствующие в некоторых биологических минералах в малых количествах [11].

Следует отметить, что октакальций фосфат (OCP) и дикальций фосфат дигидрат (DCPD) часто обнаруживаются в патологически кальцинируемых тканях и рассматриваются как фазы предшествующие образованию апатита. Трикальций фосфат

* danil50@hotmail.com

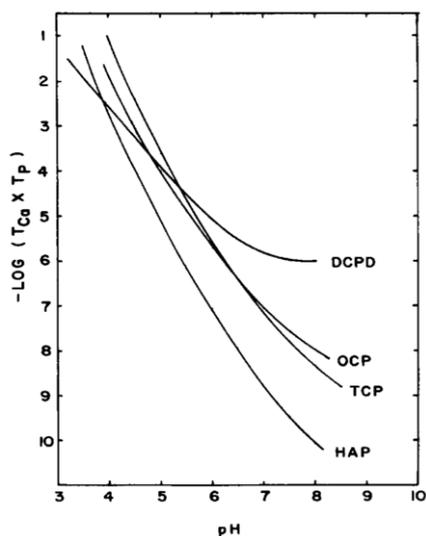


Рис. 1 – Изотермы растворимости различных фосфатов кальция при 37 °С (HAP – гидроксиапатит, TSP – трикальций фосфат, OCP – октакальций фосфат, DCPD – дикальций фосфат дигидрат) [11]

(TSP) является высокотемпературной фазой и в биологических тканях присутствует только в Mg-замещенной форме (часть кальция замещена магнием), входя в состав различных патологически кальцинируемых биологических тканей (зубной камень, камни почек, сердечнососудистые депозиты и др.). Mg-замещенный трикальций фосфат обладает более высокой растворимостью, чем обычный TSP. Все перечисленные фосфаты кальция могут присутствовать в патологических кальцификатах как фазы сопутствующие апатиту, который является конечным продуктом процесса биоминерализации.

Минерал костной ткани кроме апатита не содержит других ортофосфатов кальция в виде выраженных кристаллических фаз, однако, присутствие их следовых количеств дискутируется в соответствующей литературе [1-3]. Кроме того, поверхность нанокристаллов костного минерала может содержать значительное количество сторонних для «чистого» апатита элементов в слабосвязанном состоянии. Учитывая высокое отношение «поверхность / объем», кристаллическая фаза кости может аккумулировать большие количества жизненно важных микроэлементов организма даже без связывания их в структуре биоапатита. Такие подвижные «лабильные» формы депонирования обусловлены необходимостью быстрого транспорта этих элементов к местам их назначения или дефицита.

Таким образом, химические элементы биологических минералов (тканей скелета и патологических отложений), не входящие в кристаллическую структуру биоапатита, обладают достаточной подвижностью, чтобы быть переведенными в водорастворимое состояние при сохранении нерастворенными нанокристаллов биоапатита. Из этого следует, что в водных средах с pH = 6-8 могут быть получены водные растворы всех возможных солей кальция, присутствующих в составе минералов биологических тканей, кроме апатита. Дальнейшее повышение pH до значений 9-10 и выше может привести к инициированию осаждения вторич-

ного апатита из ионов растворенных фаз, что не желательно при решении аналитических задач разделения микропримесей разной локализации.

2.2 Препарирование образцов и методика определения концентраций

Объектом исследования в данной работе служили образцы биоапатита кортикальной (плотной) кости различных животных. Предварительная подготовка образцов, включающая механическую очистку, сушку и получение температурных рядов в интервале 560-720 °С с шагом 40 градусов. При каждой фиксированной температуре образцы выдерживали один час, а затем медленно охлаждали до комнатной температуры. Все процедуры пробоподготовки преднамеренно выполнялись с минимальным использованием реактивов и химических агентов для предотвращения попадания в пробы натрия, калия и магния. Отожженные образцы растирали в ступке до мелкодисперсного порошка и подвергали обработке ультразвуком в установке УЗДН-А (SELMI, Украина). Ультразвуковой излучатель находился в сосуде с дистиллированной водой и материалом образца в течение десяти минут. Удельная мощность составляла приблизительно 15-20 Вт/см² при рабочей частоте излучателя 22 кГц. Полученную суспензию фильтровали. Концентрации Mg, Na и K определяли методами атомной спектроскопии (прибор КАС 120.1, SELMI, Украина) как в воде после ультразвуковой обработки и фильтрации, так и в исходных порошках отожженного биоапатита (до обработки ультразвуком). В последнем случае образцы растворяли в концентрированной соляной кислоте (х.ч.). Концентрации элементов, определенные в воде после ультразвуковой обработки и фильтрации относили к подвижной («лабильной») фракции, т.е., как не связанные структурно в кристаллической решетке биоапатита.

Для определения содержания Mg была применена атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС) с электротермической атомизацией (атомизатор А-5 с трубчатой графитовой печью в составе КАС 120.1). Температура печи задавалась программатором и контролировалась W-Re термодарой. Погрешность измерения температуры поверхности печи на стадии атомизации не превышала 5 %. Проба дозировалась самплером МД-10. Измерения атомно-абсорбционного сигнала Mg проводились на резонансной длине волны 202,6 нм, при ширине щели 1 нм. Температурный режим печи был следующим: сушка при 100 °С продолжительностью 30 с; пиролиз при 1000 °С в течение 15 с; атомизация при 2000 °С в течение 5 с, при максимальном обдуве аргоном. Содержание Na и K определяли в режиме атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС) с пламенной атомизацией пробы. Измерения атомно-эмиссионного сигнала проводили на резонансной длине волны 589,0 нм и 769,9 нм для Na и K, соответственно, при ширине щели 0,1 нм. Во всех случаях аналитический сигнал сканировался и обрабатывался персональным компьютером с шагом 0,016 с.

Электронно-микроскопические изображения кристаллов биоапатита были получены с использованием просвечивающего электронного микроскопа ПЭМ-125К (SELMI, Украина).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из данных рентгеновской дифракции и просвечивающей электронной микроскопии [12-15] известно, что наиболее быстрый рост кристаллов биоапатита кости происходит в интервале температур 600-700 °С, после чего костный минерал представляется состоящим из приблизительно равноразмерных блоков порядка 200 нм. На рис. 2 представлены типичные электронно-микроскопические изображения препаратов биоапатита, подвергнувшегося отжигу при температурах 500 °С (а) и 800 °С (б). В ходе рекристаллизационных процессов размеры кристаллов апатита увеличиваются в несколько раз.

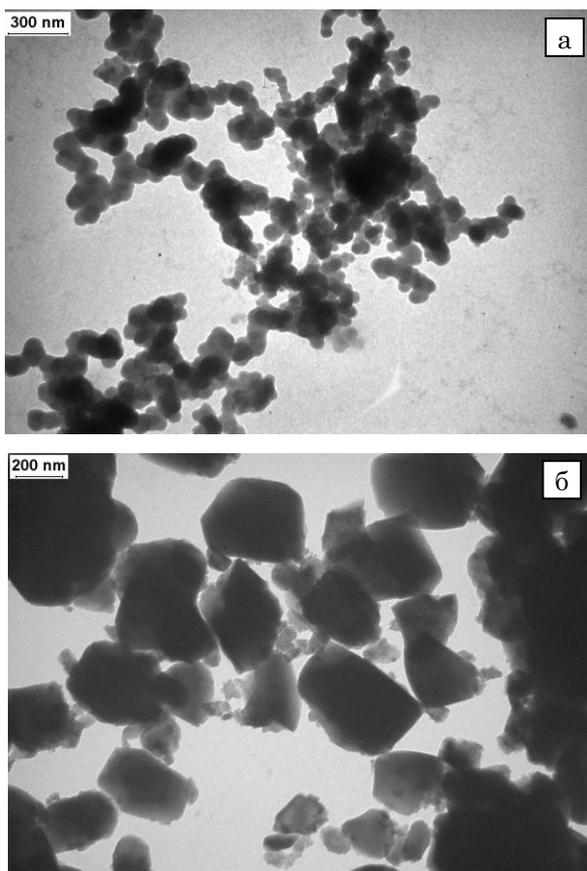


Рис. 2 – Электронно-микроскопическое изображение кристаллов биоапатита после термической и ультразвуковой обработки: (а) – 500 °С, увеличение – 13500; (б) – 800 °С, увеличение – 20250

Отжиг сопровождается сложными процессами массопереноса и перераспределения вещества между кристаллами [10, 12-14]. Логично предположить, что при этом могут происходить изменения локализации Mg, Na и K, закономерности которых отражают структурную роль этих «мажорных» примесей биоапатита.

На рис. 3 приведены концентрации Mg, определенные в минерале костной ткани разных животных с применением описанной выше методики. Как видно, интегральное содержание магния (рис. 3а) находится в пределах известных из литературы значений 0,2-0,6 мас. %, и не обнаруживает заметных температурных вариаций. Небольшой рост концентрации Mg в интервале 200-560 °С можно объяснить некото-

рым «обогащением» пробы в результате пиролитического разложения и удаления органической компоненты кости. Концентрация лабильного Mg (рис. 3б) при температуре 200 °С составляет примерно от одной трети до половины общего Mg образцов. При температурах 680-720 °С происходит резкое увеличение концентрации лабильного Mg до значений соответствующих общей концентрации Mg при этих температурах. Полученные результаты свидетельствуют о переходе ионов Mg²⁺ из структурно устойчивого состояния в решетке апатита в лабильное состояние на поверхности нанокристаллов. Это термоактивируемый процесс происходит при температуре, соответствующей увеличению размеров кристаллитов, исчезновению микродеформаций решетки и разложению карбонатных комплексов биоминерала [10, 14]. Ионы магния, оказавшиеся на поверхность кристаллов апатита, легко растворяются в водной среде при ультразвуковой обработке.

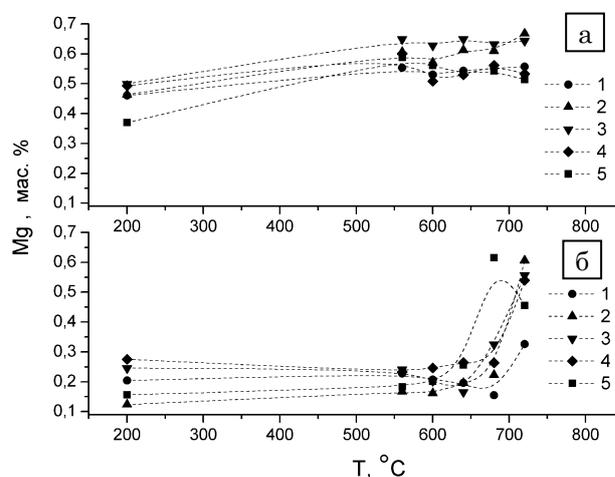


Рис. 3 – Результаты определения методом ААС (А) интегрального содержания магния в отожженных образцах костей разных животных (1 – кролик, 2 – бык, 3 – свинья, 4 – индюк, 5 – курица); и (Б) магния, перешедшего в водный раствор в результате ультразвуковой обработки («лабильный» Mg)

На рис. 4 приведена общая концентрация Na и K в образцах костей животных, отожженных при разных температурах (а) и концентрация лабильного Na и K тех же образцов (б) по данным атомно-эмиссионной спектрометрии. Как видно, общая концентрация Na в костных образцах при температуре отжига 200-720 °С лежит в пределах 0,5-0,8 мас. %, а K – 0,07-0,14 мас. %, что согласуется с литературными данными [4, 5]. Закономерности перехода Na и K при отжиге в лабильное состояние существенно различны. Если для калия характерно примерное равенство концентраций общей и лабильной составляющей во всем диапазоне температур, то для натрия наблюдаются выраженные максимумы и минимумы концентрации лабильной составляющей в зависимости от температуры отжига. Это означает, что практически весь калий костного минерала не связан структурно с кристаллами апатита и легко переходит в водную среду в ходе ультразвуковой обработки образцов, отожженных в интервале 200-720 °С. Для натрия, напротив, переход в среду ультразвуковой обработки

существенно и закономерно зависит от температуры отжига. Так, при температурах отжига 200-560 °С около половины общего натрия оказывается лабильным, при 600-640 °С выход натрия в жидкую среду заметно уменьшается, а при 680 °С существенно возрастает и при 720 °С снова падает. Тот факт, что концентрация лабильной составляющей при 680 °С оказалась несколько выше, чем концентрация общего натрия в тех же образцах объясняется возможностью дополнительного выделения натрия из стекла химической посуды, в которой проводилась ультразвуковая обработка. Необходимо отметить, что для обнаруженных эффектов температурных изменений локализации натрия в биоминерале костной ткани существенным есть общий характер вариаций содержания лабильного натрия с температурой, а не абсолютные значения концентраций. Полученные результаты показывают, что натрий в биоapatите костной ткани, подобно магнию [9], может находиться как в структурно-связанном состоянии, замещая кальций в катионной подрешетке апатита, так и в лабильном состоянии, локализуясь на поверхности кристаллов, в то время как калий имеет на много меньшую способность входить в структуру апатита или быть с ним химически связанным. Очевидно, это обусловлено значениями ионных радиусов К, Mg, Na и Ca ($K^+ - 1,38 \text{ \AA}$, $Mg^{2+} - 0,72 \text{ \AA}$, $Na^+ - 1,02 \text{ \AA}$, $Ca^{2+} - 1,0 \text{ \AA}$) [1]. Близкие значения ионных радиусов Ca^{2+} , Na^+ и Mg^{2+} делают возможными взаимные замещения и изоморфные превращения в апатите.

Особого внимания заслуживает анализ сложной температурной зависимости лабильного натрия. Из полученных данных следует, что при отжиге 600-640 °С натрий захватывается и удерживается решеткой апатита, а при 680 °С выходит на поверхность кристаллов, теряет связь со структурой апатита и удаляется ультразвуковой обработкой. Известно, что однозарядные ионы Na^+ в биоapatите или синтетических карбонатсодержащих апатитах поддерживают электрический баланс кристаллов, частично замещая двухзарядные ионы Ca^{2+} в ответ на замещения фосфатного аниона PO_4^{3-} ионом карбоната CO_3^{2-} [1, 5, 7]. Поэтому термоактивируемые процессы миграции или изменения локализации CO_3^{2-} и Na^+ в биоapatите должны быть взаимосвязаны. Действительно, выявленный в настоящей работе, переход натрия в лабильное состояние при 680 °С согласуется с фактом частичной потери биоapatитом карбонатов при 700 °С, детально изученным другими методами [12-14]. Можно также предположить, что при 600-640 °С структурой апатита связывается натрий органической составляющей костной ткани в ответ на проникновение в решетку апатита ионов CO_3^{2-} из того же термически разрушенного органического матрикса.

В целом, учитывая высокие миграционные способности карбонатного иона CO_3^{2-} в апатите при температурах 600-900 °С [12], все обратимые переходы ионов Na^+ при отжиге можно объяснить необходимостью сохранения электрической нейтральности кристаллов.

В конечном итоге отжиг биоapatита при температурах 900 °С и выше приводит к образованию стехиометрического апатита с устранением всех замещений в анионной и катионной подрешетках [14].

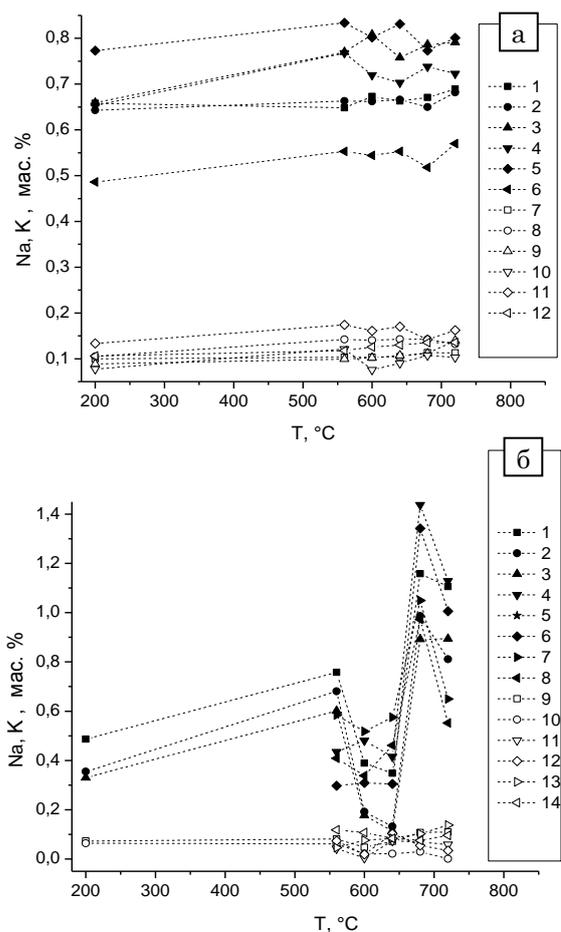


Рис. 4 – Результаты измерения методом атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС) общего (а) и лабильного (б) Na и K в отожженных образцах костей разных животных (а: 1 и 7 – корова, 2 и 8 – кролик, 3 и 9 – бык, 4 и 10 – свинья, 5 и 11 – индюк, 6 и 12 – курица; б: 1 и 9 – свинья А, 2 и 10 – свинья В, 3 и 11 – свинья С, 4 – курица, 5 – бык, 6 – корова, 7 и 13 – кролик А, 8 и 14 – кролик В)

Необходимый приток кальция в решетку обеспечивается его изначальным присутствием в неапатитных составляющих биоминералов, экспериментально подтвержденным многими работами [9, 11, 15]. Неясным на сегодня остается вопрос о том, в каких формах находятся в биоминералах кальций, магний, натрий и калий, не входящие в структуру апатита.

4. ВЫВОДЫ

В данной работе на примере костной ткани апробирована методика отделения кристаллического биоapatита от неапатитных составляющих биоминерала путем комбинированной термической и ультразвуковой обработки. Исследованный интервал температур отжига соответствует рекристаллизации апатита с устранением в конечном итоге всех катионных и анионных замещений в решетке. При этом ионы, удаленные из структуры апатита, оказываются в «лабильном» состоянии и могут быть переведены в водный раствор. Последующий элементный анализ (атомная спектроскопия) позволяет определять концентрацию примесных элементов. Оценка соотношения концентраций элементов в «лабильном» и струк-

турносвязанном состоянии способствует выявлению их функциональной роли, особенностей неапатитного окружения кристаллов и ультраструктурной организации биоминералов, что важно при поиске средств направленного влияния на процессы нормальной и патологической биоминерализации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность сотрудникам Института прикладной физики НАН Украины Кулику А.Н. и Бугаю А.Н. за помощь в выполнении исследований методами атомной спектроскопии.

Спосіб визначення концентрації та локалізації мажорних домішок (Mg, Na, K) біологічного апатиту мінералізованих тканин

С.М. Данильченко^{1,2}

¹ Сумський державний університет, вул. Римського-Корсакова, 2, 40007 Суми, Україна

² Інститут прикладної фізики НАН України, вул. Петропавлівська, 58, 40000 Суми, Україна

Біологічний апатит є основною мінеральною фазою кісткової тканини та багатьох кальцинованих патологічних відкладень. У складі таких біомінералів у значних концентраціях присутні Mg, Na і K, які зазвичай не містяться у чистому апатиті. У даній роботі апробовано метод визначення переважної локалізації цих елементів шляхом розділення апатитної і неапатитної складових мінералу кісткової тканини. Процедура препарування включала термічну обробку та подальше ультразвукове диспергування порошкоподібного матеріалу у водному середовищі; концентрації елементів визначалися методами атомної спектроскопії. З отриманих результатів витікає, що Mg і Na у біоapatиті кістки можуть знаходитись як у структурно зв'язаному стані, заміщуючи кальцій в катіонній підрешітці апатиту, так і у лабільному стані, локалізуючись на поверхні кристалів, в той час як K не може у істотних кількостях входити до структури апатиту чи бути з ним хімічно зв'язаним.

Ключові слова: Біоapatит, Mg, Na, K, Концентрація, Локалізація, Катіонна підрешітка, Розчинність, Відпал, Ультразвук, Поверхня кристалів.

The Approach for Determination of Concentration and Location of Major Impurities (Mg, Na, K) in Biological Apatite of Mineralized Tissues

S.N. Danilchenko^{1,2}

¹ Sumy State University, 2, Rimsky Korsakov Str., 40007 Sumy, Ukraine

² Institute of Applied Physics, NAS Ukraine, 58, Petropavlovskaya Str., 40030 Sumy, Ukraine

Biological apatite is the main mineral phase of bone tissue and of numerous calcified pathological deposits. Mg, Na, and K are usually absent in the structure of pure apatite and are present in such biominerals in significant concentrations. In present work the approach was tested for the determination of predominant location of these elements through separation of apatite and non-apatitic components of bone tissue mineral. The preparation procedures include the annealing and subsequent ultrasonication of powdered material in aqueous medium; concentrations of elements were determined by atomic spectrum analysis. The results suggest that Mg and Na in bone apatite can be both in the structurally bounded (substituting calcium in lattice) and in the labile state (being localized on the crystal surface), while K is not able to join the apatite structure in significant amount or be chemically bounded to it.

Keywords: Bioapatite, Mg, Na, K, Concentration, Location, Cation sublattice, Solubility, Annealing, Ultrasound, Crystal surface.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. J.C. Elliot, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates. Studies in Inorganic Chemistry* (Amsterdam: Elsevier: 1994).
2. G. Montel, G. Bonel, J.C. Heughebaert, J.C. Trombe, C. Rey, *J. Cryst. Growth* **53**, 74 (1981).
3. C. Rey, *Biomaterials* **11**, 13 (1990).
4. L. Stork, P. Müller, R. Dronskowski, J.R. Ortlepp, *Zeitschrift für Kristallographie* **220**, 201 (2005).
5. H.E. Feki, J.M. Savariault, A.B. Salah, M. Jemal, *Solid State Sci.* **2**, 577 (2000).
6. T.I. Ivanova, O.V. Frank-Kamenetskaya, A.B. Kol'tsov, *Zeitschrift für Kristallographie* **219**, 479 (2004).
7. J.D. Featherstone, I. Mayer, F.C. Driessens, R.M. Verbeeck, H.J. Heijligers, *Calcif Tissue Int.* **35**, 169 (1983).
8. J. Mayer, R. Schlam, J.D.B. Featherstone, *J. Inorg. Biochem.* **66**, 1 (1997).
9. S.N. Danilchenko, A.N. Kulik, P.A. Pavlenko, T.G. Kalinichenko, O.M. Buhay, I.I. Chemeris, L.F. Sukhodub, *J. Appl. Spect.* **73**, 437 (2006).
10. S.N. Danilchenko, I.Yu. Protsenko, L.F. Sukhodub, *Cryst. Res. Technol.* **44**, 553 (2009).
11. L. Wang, G.H. Nancollas, *Chem. Rev.* **108**, 4628 (2008).
12. A.B. Brik, S.N. Danilchenko, V.V. Radchuk, V.L. Karbovsky, A.M. Kalinichenko, N.N. Bagmut, *Mineralogical Journal* (Ukraine) **29** No 2, 32 (2007).
13. S.N. Danilchenko, V.A. Pokrovskiy, V.M. Bogatyrov, L.F. Sukhodub, B. Sulkio-Cleff, *Cryst. Res. Technol.* **40**, 692 (2005).
14. S.N. Danilchenko, A.V. Koropov, I.Yu. Protsenko, B. Sulkio-Cleff, L.F. Sukhodub, *Cryst. Res. Technol.* **41**, 268 (2006).
15. C. Lange, C. Li, I. Manjubala, W. Wagermaier, et al., *J. Struct. Biol.* **176**, 159 (2011).