

В. В. Туров, А. В. Головань, П. П. Горбик, В. М. Мищенко,
Ю. Б. Шевченко, академик НАН Украины В. Ф. Чехун

Гидратационные свойства композитных материалов на основе наноразмерного гидроксиапатита и белковых молекул

The state of water in nanocomposites modeling the bone tissue and created on the basis of nanodimensional hydroxyapatite and polypeptides (gelatin, albumin) by the method of ^1H NMR spectroscopy is studied. The state and thermodynamic parameters of bound water was determined. It is shown that water in composites can exist in strongly and weakly associated states. The maximal amount of weakly associated water is registered for composites containing albumin. It is shown that the weakly polar environment, such as chloroform, diminishes the value of bound water in nanocomposites due of the cluster state formation.

Создание искусственных костных тканей и имплантов является одной из приоритетных задач современной трансплантологии, поскольку в результате разного рода травм возникает необходимость замены как целых костей, так и их фрагментов. Большой прогресс в этом направлении достигнут при формировании костных протезов из искусственного гидроксиапатита [1]. Однако функция костной ткани не сводится только к обеспечению жесткости и двигательной активности организма. Внутри костной ткани организмом осуществляется синтез многих типов клеток, таких как красные кровяные тельца, лейкоциты, тромбоциты и др. [2]. Следовательно, костная ткань служит биоактивной матрицей, внутри которой происходят сложные биохимические превращения. Вероятно, строение самой костной ткани, как и внутренней среды, способствует процессу созревания и трансформации клеток.

Выполненные ранее исследования с использованием низкотемпературной ЯМР спектроскопии показали, что пористая составляющая костной ткани содержит более 30% по массе связанной воды. Эта вода наблюдается в ^1H ЯМР спектрах в виде двух сигналов, отвечающих сильноассоциированной и слабоассоциированной воде [3, 4]. Измерение среднего координационного числа воды может быть проведено на основе измерения величины химического сдвига протонов. При этом принимается, что для неассоциированной воды величина химического сдвига протонов воды близка к 1 м. д., а для тетракоординированной воды — к 7 м. д. [5–7]. Целью настоящей работы было исследование структуры и термодинамических характеристик воды в нанокompозитах гидроксиапатит-желатин (ГАП-Gel) и гидроксиапатит-альбумин (ГАП-Alb).

Экспериментальная часть. *Материалы.* Нанодисперсный гидроксиапатит (химическая формула кристаллов $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot \text{OH}_2$) с удельной поверхностью $120 \text{ м}^2/\text{г}$ синтезирован путем осаждения из смеси водных растворов солей $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ при высоких значениях pH [8, 9].

Для приготовления нанокompозитов использовался пищевой желатин и сывороточный альбумин человека. Суспензию тщательно перемешивали при 40°C до полного растворения Gel, после чего образец подвергали ультразвуковой обработке в течение 15 мин. Полученный композитный материал высушивали в сушильном шкафу при 60°C в течение нескольких

часов. Такие образцы содержали не более 5% связанной воды. Гидрофобная среда моделировалась путем добавления к гидратированным порошкам или суспензиям нанокompозитов некоторого количества хлороформа или дейтерированного хлороформа.

¹H ЯМР спектроскопия. Спектры ЯМР снимали на ЯМР спектрометре высокого разрешения Varian Mercury 400 с рабочей частотой 400 МГц. Температуру регулировали с точностью ± 1 К. Интенсивности сигналов определяли с точностью $\pm 10\%$. Для предотвращения переохлаждения суспензий спектры ¹H ЯМР незамерзающей воды записывали при нагревании суспензий, предварительно охлажденных до температуры 210 К. Условием замерзания воды на межфазной границе адсорбент (биополимер)/вода является равенство свободных энергий молекул адсорбированной воды и льда. При этом понижение температуры замерзания адсорбированной воды (273 К) определяется уменьшением свободной энергии воды, вызванным адсорбционными взаимодействиями ($\Delta G = G_0 - G$, где G_0 — свободная энергия льда при $T = 273$ К) [6, 7]. Поскольку свободная энергия льда с понижением температуры изменяется по линейному закону [10], $\Delta G = -0,036$ (273 К). Площадь под кривой $\Delta G(C_{uw})$ определяет величину межфазной энергии (γ_s), которая равна суммарному понижению свободной энергии воды, обусловленному присутствием границы раздела фаз. По зависимостям $\Delta G(C_{uw})$ рассчитывались также параметры слоев сильно- и слабосвязанной воды [6, 7]. При этом под слабосвязанной водой понимают ту часть незамерзающей воды, для которой $\Delta G < 0,5$ кДж/моль [7]. Количественные значения толщины слоев каждого типа воды (C_{uw}^s и C_{uw}^w для сильно- и слабосвязанной воды соответственно) и максимальные величины понижения свободной энергии воды, вызванное адсорбцией (ΔG^s и ΔG^w), могут быть получены экстраполяцией соответствующих участков зависимостей к осям абсцисс и ординат.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1, 2 приведены температурные зависимости спектров ¹H ЯМР воды в нанокompозитах, приготовленных на основе Gel и Alb соответственно. Соотношение концентраций минеральной и белковой составляющих для каждого образца, а также содержание в них воды приведено в табл. 1. Номера образцов на рис. 1 и 2 отвечают номерам образцов в табл. 1.

При высокой гидратированности нанокompозитов ГАП-Gel (см. рис. 1, а, б) в спектрах регистрируются сигналы сильно- и слабоассоциированной воды (сигналы 1 и 2, химические сдвиги $\delta = 5$ и $\delta = 1$ м. д. соответственно). Добавление к нанокompозиту дейтерохлороформа (см. рис. 1, б) слабо влияет на вид спектров и соотношение интенсивностей сигналов 1 и 2 (при $T = 278$ К это соотношение близко к 15). С понижением температуры интенсив-

Таблица 1. Характеристики слоев связанной воды в нанокompозитах, содержащих гидроксипатит и белковые молекулы

Номер образца	ГАП-белок	Тип белка	C_{H_2O} , мг/г	C_{uw}^s , мг/г	C_{uw}^w , мг/г	ΔG^s , кДж/моль	ΔG^w , кДж/моль	γ_s , Дж/г
1	8	Gel	595	300	295	-2,7	-1,5	27,2
2*	8	Gel	500	150	350	-2,7	-1,7	18,6
3	8	Gel	45	45	—	-2,7	—	3,8
4*	8	Gel	45	45	—	-2,7	—	1,9
5	0,92	Alb	2470	270	280	-2,7	-0,7	26,4
6*	0,47	Alb	454	280	174	-2,7	-1	24,6
7*	1,31	Alb	1960	120	380	-2,7	-0,5	15,1
8	∞	—	Избыток	200	550	-2,4	-0,6	19,7
9	0	Alb	3590	1800	1790	-2,5	-0,8	183

* В присутствии хлороформа.

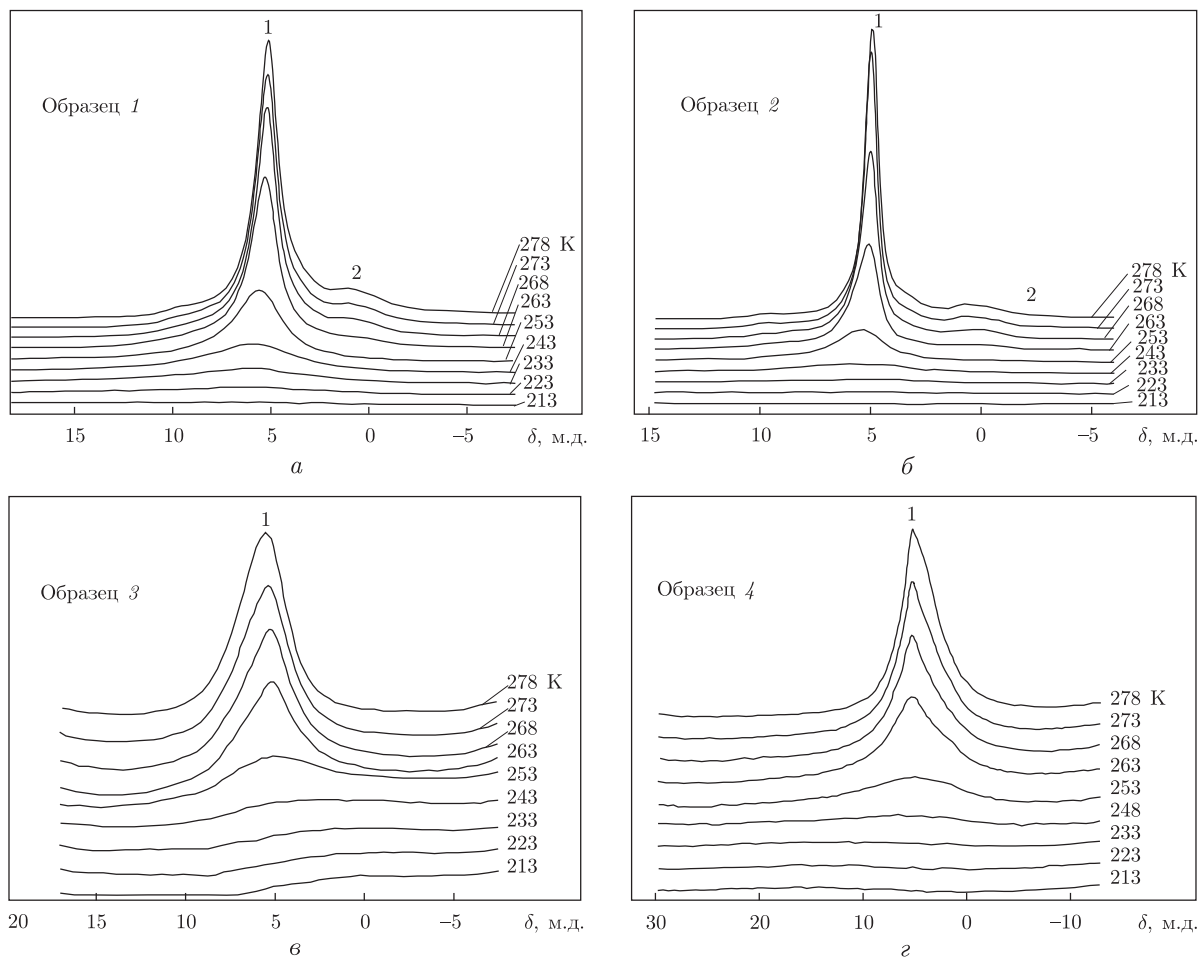


Рис. 1

ность обоих сигналов уменьшается ввиду замерзания части межфазной воды, а ширина сигналов растет из-за уменьшения молекулярной подвижности воды при низких температурах [11]. Уменьшение гидратированности образцов приводит к полному исчезновению сигнала слабоассоциированной воды (см. рис. 1, в, з).

Для нанокмозитов ГАП-Alb в присутствии хлороформа вид спектров усложняется. Для образца б (см. рис. 2), в котором соотношение концентраций ГАП : Alb : H₂O равно 2 : 4,5 : 3, в спектрах одновременно наблюдаются три сигнала связанной воды. Это сигналы 1 и 2 сильно- и слабоассоциированной воды, а также сигналы 3 с промежуточным значением химического сдвига. Кроме того, в спектрах регистрируются сигналы СН₃ и СН₂ групп этанола, присутствующего в хлороформе в качестве стабилизирующего агента. Соотношение интенсивностей сигналов 1 и 2 составляет 10 : 1 при $T > 260$ К. С понижением температуры интенсивность сигнала 1 и 3 снижается, следовательно, ответственная за эти сигналы вода является слабосвязанной.

Температурные зависимости спектров ¹H ЯМР воды в гидратированных порошках ГАП (см. рис. 2, а) и Alb (см. рис. 2, б) в присутствии CDCl₃ представлены на рис. 2. Как видно из этих рисунков, сигнал слабоассоциированной воды наблюдается только для воды, адсорбированной внутри белковых глобул альбумина. Структурная дифференциация

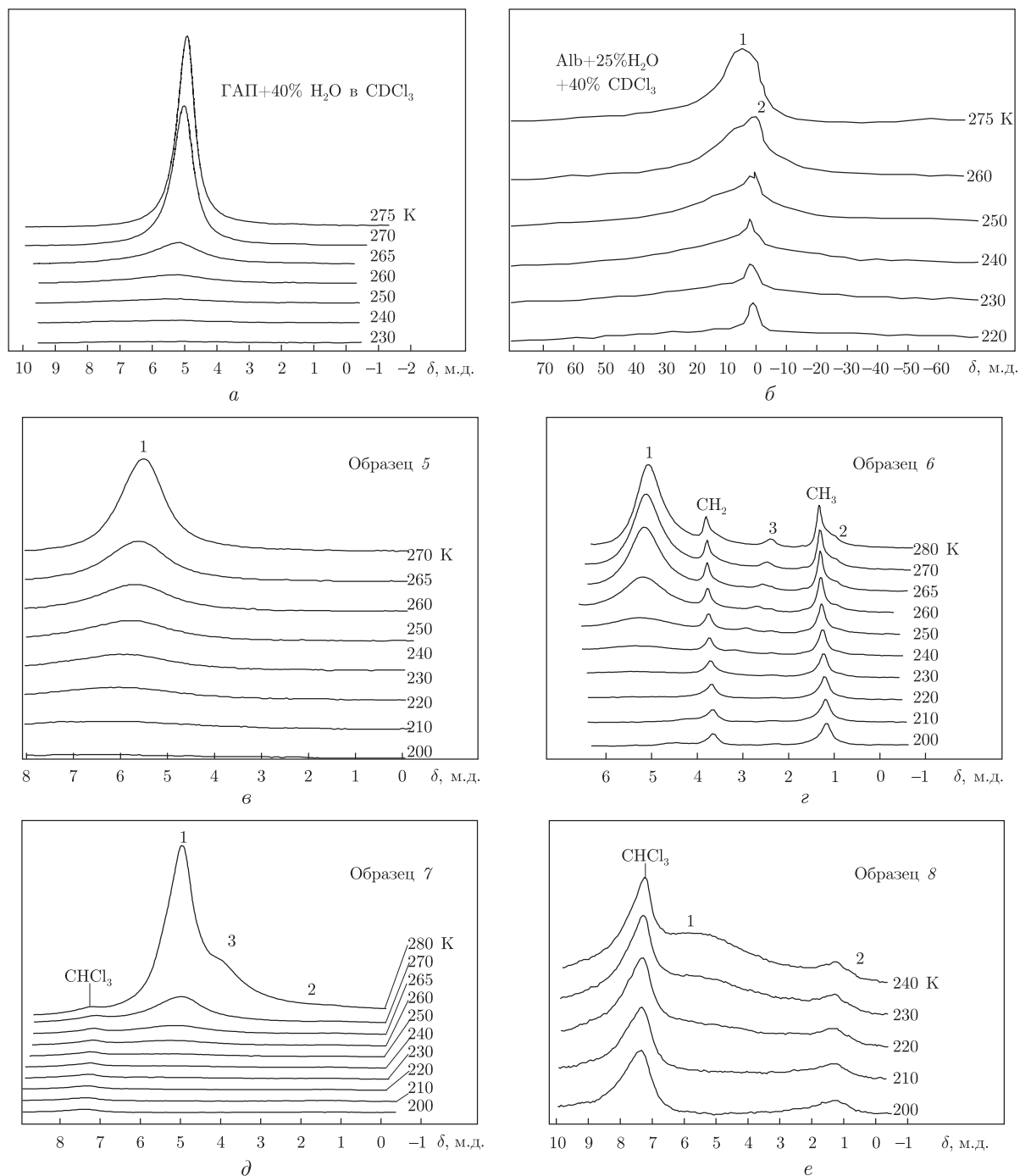


Рис. 2

внутриглобулярной воды в Alb описана в статье [12], где высказано предположение, что под влиянием слабополярной органической среды, глобула альбумина претерпевает конформационные изменения, в результате которых сетка водородных связей внутриглобулярной воды частично разрушается и значительная часть связанной воды взаимодействует с границей раздела фаз по механизму гидрофобной гидратации [13].

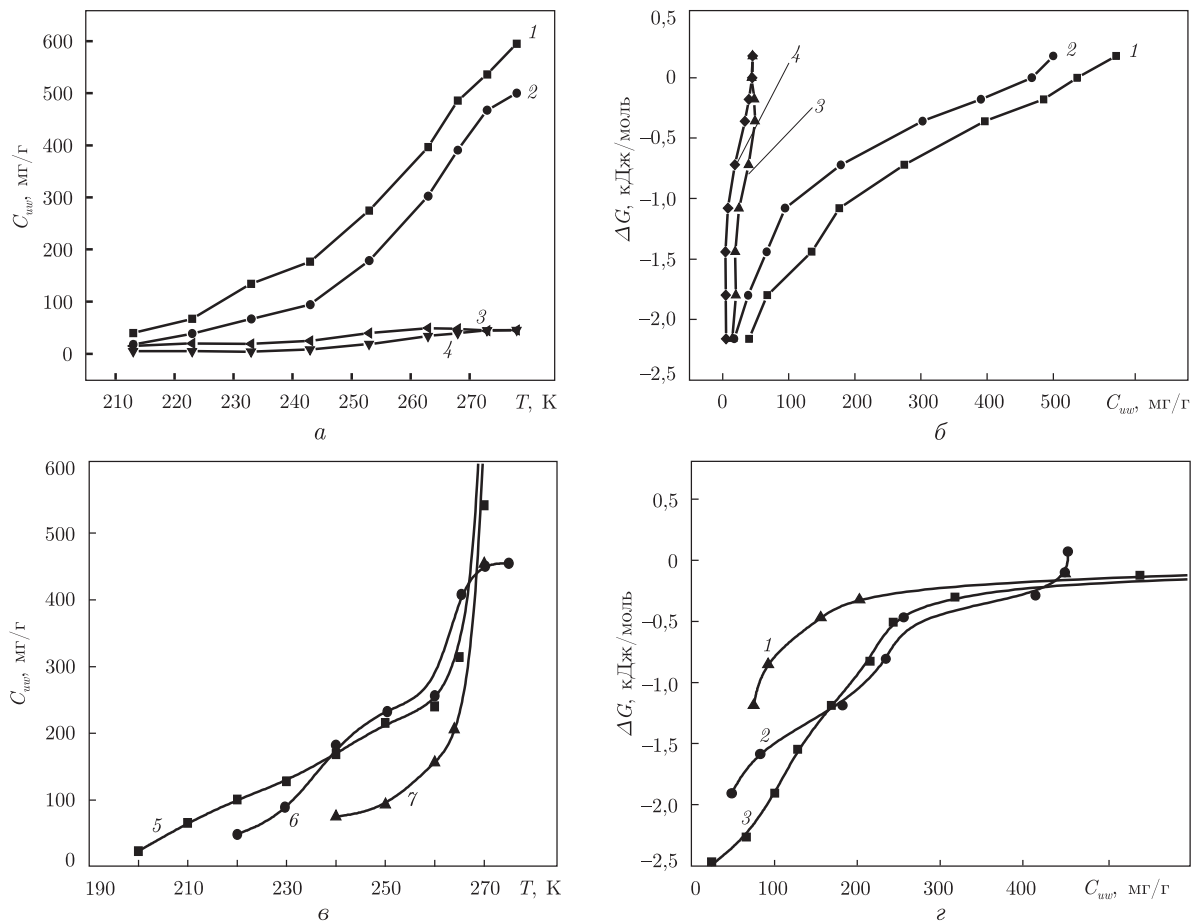


Рис. 3

С ростом гидратированности композита (ГАП : Alb : H₂O равно 3 : 2,4 : 10) (см. рис. 2, *d*, *e*) форма спектров и распределение интенсивностей сигналов меняется. При 280 К в спектрах регистрируются сигналы 1, 2 и 3. Сигнал 4 исчезает, а интенсивность сигнала 2 уменьшается в несколько раз и он регистрируется в спектрах только при большом усилении (см. рис. 2, *e*). Сигнал 3 наблюдается лишь при относительно высокой температуре, следовательно, он отвечает уже не сильно-, а слабосвязанной воде.

Температурные зависимости концентрации незамерзающей воды в нанокompозитах 1–7 иллюстрирует рис. 3, *a*, *в* и построенные на их основе зависимости изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды — рис. 3, *б*, *г*. Характеристики слоев связанной воды суммированы в табл. 1.

Для образцов 3 и 4 с малым содержанием воды всю межфазную воду можно квалифицировать как сильносвязанную, поскольку она замерзает при температуре < 250 К [6, 7]. Сильносвязанной остается также значительная часть воды в нанокompозитах ГАП-Gel с высокой гидратированностью. На зависимостях $\Delta G(C_{uw})$ можно выделить два участка, которые характеризуются разным наклоном к оси абсцисс и отвечают двум типам сильносвязанной воды [6].

В среде хлороформа (см. рис. 3, *б*, образец 2) зависимость $\Delta G(C_{uw})$ расположена выше, чем в воздушной среде (образец 1), т. е. слабополярные вещества уменьшают энергию взаи-

модействия воды с поверхностью [14]. Данный эффект обусловлен формированием в наноразмерных пустотах кластеров воды и слабополярных молекул, в которых с твердой фазой преимущественно граничит органический компонент [15]. В нанокompозитах ГАП-Gel энергия кластерообразования определяется разницей в величине межфазной энергии, обусловленной присутствием хлороформа. В соответствии с данными табл. 1, эта разница равна 9 кДж/моль. Учитывая, что в гелях желатина, содержащих 74% белка, величина $\gamma_S = 30$ Дж/г можно заключить, что энергия взаимодействия ГАП-Gel невелика и составляет 3 Дж/г.

Для нанокompозитов на основе Alb, зависимости $\Delta G(C_{uw})$ содержат участки, обусловленные сильно- и слабосвязанной водой. Сравнение величин межфазной энергии для образцов 5 и 7 показывает, что в присутствии слабополярной среды величина γ_S уменьшается почти вдвое и становится даже меньше, чем для водной суспензии ГАП (образец 8). Ввиду того, что межфазная энергия воды в 22% растворе Alb достигает 183 Дж/г (образец 9), при формировании нанокompозита ГАП-Alb происходит коагуляция белковых молекул на наноразмерных частицах ГАП или внутри пустот в агрегатах, сформированных первичными частицами.

На основании проделанной нами работы можно утверждать, что в нанокompозитах, приготовленных на основе наноразмерного ГАП и белков (альбумина и желатина), связанная вода будет находиться в нескольких состояниях, между которыми молекулярный обмен происходит медленно в шкале времени ЯМР, что дает возможность отдельно наблюдать сигналы сильно- и слабоассоциированной воды. Появлению слабоассоциированной воды в композитах ГАП-Alb способствует присутствие слабополярной среды хлороформа. Для обоих типов нанокompозитов слабополярная среда уменьшает взаимодействие воды с границей раздела фаз, что, вероятно, обусловлено формированием в наноразмерных пустотах, содержащихся внутри композитов, кластерных структур, состоящих из молекул хлороформа и воды.

Работа выполнена при поддержке фонда CRDF (NUK2-2854-KV-07).

1. Saito T., Kin Y., Koshino T. Osteogenic response of hydroxyapatite cement implanted into the femur of rats with experimentally induced osteoporosis // *Biomaterials*. – 2002. – **23**. – P. 2711–2716.
2. *Гистология*. Учебник. 2-е изд., перераб. и доп. / Под ред. Э.Г. Улумбекова, Ю.А. Чельшева. – Москва: ГЕОТАР-МЕД, 2002. – 672 с.
3. Turov V. V., Gun'ko V. M., Zarko V. I. et al. Weakly and strongly associated nonfreezable water bound in bones // *Colloids and Surfaces*. – 2006. – **48**. – P. 167–175.
4. Gun'ko V. M., Turov V. V., Shpilko A. P. et al. Relationships between characteristics of interfacial water and human bone tissues // *Ibid.* – 2006. – **53**. – P. 29–36.
5. Gun'ko V. M., Turov V. V. Structure of hydrogen bonds and ^1H NMR spectra of water at the interface of oxides // *Langmuir*. – 1999. – **15**. – P. 6405–6415.
6. Туров В.В. Слои связанной воды и поверхностные силы в водных суспензиях высокодисперсных оксидов // *Химия поверхности кремнезема* / Под ред. А.А. Чуйко. – Киев: Наук. думка, 2001. – Т. 1. – С. 510–607.
7. Gun'ko V. M., Turov V. V., Bogatyrev V. M. et al. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces // *Adv. Coll. Interface Sci.* – 2005. – **118**. – P. 125–172.
8. Petroff A., Posner A. S. Crystalline basic calcium orthophosphate (Hydroxyapatite) // *Inorgan. Synth.* – 1960. – **66**. – P. 16–18.
9. Hayek E. H. Newly pentacalcium monohydroxyorthophosphate (Hydroxyapatite) // *Ibid.* – 1963. – **7**. – P. 63–65.
10. *Термодинамические свойства индивидуальных веществ* / Под ред. В.П. Глушкова. – Москва: Наука, 1978. – 495 с.

11. Манк В. В., Лебовка Н. И. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса в гетерогенных системах. – Киев: Наук. думка, 1988. – 202 с.
12. Гунько В. М., Туранская С. П., Нечипор О. В., Юхименко Е. В., Туров В. В., Чуйко А. А. Слабоассоциированная вода в биологических объектах и на межфазной границе кремнезёмов // Химия, физика и технология поверхности. – Киев: Наук. думка, 2006. – Вып. 11./12. – С. 397–430.
13. Schrade P., Klein H., Egru I. et al. Hydrophobic volume effect in albumin solutions // J. Colloid Interface Sci. – 2001. – **234**. – Р. 445–4447.
14. Туров В. В., Гунько В. М., Горбик П. П., Цапко М. Д., Головань А. П. Процессы самоорганизации водно-органических систем в наноразмерном пространстве твердых тел и биологических объектов // Физикохимия наноматериалов и супрамолекулярных структур / Ред. А. П. Шпак, П. П. Горбик. – Киев: Наук. думка, 2007. – С. 91–157.
15. Gun'ko V. M., Turon V. V., Turon A. V. et al. Behaviour of pure water and water mixture with benzene or chloroform adsorbed onto ordered mesoporous silicas // Central Europ. J. Chem. (CEJC). – 2007. – **5**, No 2. – Р. 420–454.

*Институт химии поверхности
им. А. А. Чуйко НАН Украины, Киев
Институт ядерной физики НАН Украины, Киев
Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого
НАН Украины, Киев*

Поступило в редакцию 07.04.2008