

PACS numbers: 68.37.Ps, 78.30.Jw, 79.60.Jv, 87.64.Dz, 87.64.K-, 87.80.Lg, 87.85.jf

Морфологические особенности, пространственно-структурная организация и свойства кальцинированных образований биогенного происхождения

В. Л. Карбовский, Н. А. Курган, В. Х. Касияненко

*Институт металлофизики им. Г. В. Курдюмова НАН Украины,
бульв. Акад. Вернадского, 36,
03680, ГСП, Киев-142, Украина*

Методами атомно-силовой микроскопии, рентгеновской эмиссионной, фотоэлектронной и ИК-спектроскопии, а также ЯМР исследованы морфологические особенности, пространственно-структурная организация и свойства кальцинированных образований биогенного происхождения. Установлено, что механизм образования кальцинированных частиц состоит из одновременного формирования наночастиц и нанокристаллов CaCO_3 . Формирование наночастиц кальцита размером в 7–10 нм происходит на волокнах органического матрикса. Центры роста кристаллов на органических ядрах представляют собой наложение монолитных кристаллических образований размером в 240–300 нм и состоят из нанокристаллов кальцита. Свойства биогенного CaCO_3 отличаются от свойств кальцита, полученного промышленным способом.

Методами атомно-силової мікроскопії, Рентгенової емісійної, фотоелектронної та ІЧ-спектроскопії, а також ЯМР досліджено морфологічні особливості, просторово-структурну організацію та властивості кальцинованих утворень біогенного походження. Встановлено, що механізм утворення кальцинованих частинок складається з одночасного формування наночастинок та нанокристалів CaCO_3 . Формування наночастинок кальциту розмірами у 7–10 нм відбувається на волокнах органічного матриксу. Центри росту кристалів на органічних ядрах представляють собою нашарування монолітних кристалічних утворень розміром у 240–300 нм і складаються із нанокристалів кальциту. Властивості біогенного CaCO_3 відрізняються від властивостей кальциту, одержаного промисловим шляхом.

Morphological features, spatial-structure organization, and properties of limed formations of biogenic origin are studied using atomic force microscopy, NMR, x-ray emission, photoelectron, and IR-spectroscopy. As revealed, the mechanism of limed-particles formation consists of the simultaneous formation of CaCO_3 nanoparticles and nanocrystals. The formation of calcite na-

nanoparticles with size of 7–10 nm occurs in fibres of organic matrix. Crystal-growth centres on the organic nuclei are monolithic crystal structures of 240×300 nm and consist of calcite nanocrystals. Biogenic CaCO₃ has properties different from those of CaCO₃ fabricated by an industrial method.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия, наночастицы, биогенные нанокристаллы, морфология.

(Получено 19 октября 2010 г.)

1. ВВЕДЕНИЕ

Ввиду важности установления особенностей функционирования минерализованных биологических тканей длительное время проводится всестороннее изучение кристаллов биогенного происхождения [1–5]. В целом, минерализованные биологические ткани рассматриваются как биогенные композиционные материалы, состоящие из наноразмерных минеральных частиц, связанных с органической матрицей. Одним из интересных объектов этого ряда является скорлупа яиц — биокристалл, растущий в органических тканях животных так же, как минералы, из которых состоят зубы и кости человека и животных. Интерес к данному объекту обусловлен не только научно-исследовательским подходом, но и практическим ракурсом применения продуктов из скорлупы в качестве сорбента токсических веществ, а также получения биосовместимых материалов [6–12]. Так как понимание процессов синтеза кальцинированных образований в живом организме способствует установлению принципов получения биосовместимых материалов нового поколения, изучение особенностей функционирования минерализованных биологических тканей скорлупы яйца открывает новые перспективы управляемого получения синтетических аналогов биокристаллов. Целью данной работы было установление морфологических особенностей и пространственно-структурной организации скорлупы куриного яйца.

2. МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследование нанорельефа поверхности образцов выполнялось методом сканирующей атомно-силовой микроскопии (АСМ) на высоковакуумном сканирующем зондовом микроскопе JSPM 4610 (JEOL, Япония). В качестве сканирующего зонда использовался кантилевер с алмазным острием NSG-10-DLC. Рабочий вакуум был не хуже 10⁻⁷ Па.

Рентгеновские эмиссионные спектры были получены на модернизированном флуоресцентном спектрографе ДРС-2М с трубкой

5BXV7-Cr. Время экспозиции *K*-спектров кальция в исследуемых соединениях составило ~ 90 ч. Для получения ИК-спектров образцы готовились в виде таблеток. Спектры пропускания регистрировались в области от 4000 см^{-1} до 400 см^{-1} на двухлучевом спектрофотометре 'Specord M80' (область регистрации $4000\text{--}250\text{ см}^{-1}$).

Рентгеновские фотоэлектронные спектры получены на фотоэлектронном спектрометре JSPM 4610 фирмы 'JEOL' с использованием монохроматического MgK_α ($1253,6\text{ эВ}$) рентгеновского источника. Во время выполнения эксперимента вакуум в аналитической камере составлял 10^{-7} Па, точность определения энергии связи электронов $0,1\text{ эВ}$. Для калибровки рентгеновских фотоэлектронных спектров с учётом заряда, скапливающегося на непроводящем образце во время эксперимента, на его поверхность был нанесён тонкий слой золота. Калибровка рентгеновских фотоэлектронных спектров выполнялась по энергии связи $\text{Au}4f$ -линии золота, что позволило получить достаточно высокую точность определения энергий связи электронов для элементов исследуемых образцов.

Спектры ЯМР регистрировались на спектрометре фирмы 'Bruker' серии Avance 400, при комнатной температуре. ЯМР спектры были получены вращением образца под магическим углом (MAS ЯМР) на частотах 10 кГц и 15 кГц , что позволяет исключить эффекты, связанные с анизотропией и диполь-дипольным взаимодействием, но не исключает квадрупольные взаимодействия второго порядка. Магнитное поле было выставлено по ^{13}C ЯМР-спектру адамантана, который использовался в качестве внешнего стандарта для калибровки магнитного поля.

Исследуемые образцы представляли собой скорлупу куриного яйца (СКЯ), очищенную от подскорлупной плёнки, и промышленный CaCO_3 в виде порошка. Для удаления подскорлупной плёнки, СКЯ дополнительно проваривали при 100°C в течение 7 мин.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первый этап исследований морфологии поверхности скорлупы куриного яйца состоял в изучении подскорлупной мембраны. Как известно, скорлупа состоит, главным образом, из кальцита — кристаллов карбоната кальция (CaCO_3). Она трёхслойная: внутренний слой, составляющий треть толщины скорлупы, состоит из конических кристаллов, скреплённых белковыми мостиками из кератина и коллагена (подскорлупная мембрана), следующий слой состоит из тесно прижатых друг к другу столбчатых кристаллов карбоната кальция. Все это покрыто тонкой кожицей (кутикулой). Кристаллы кальцита, образующие скорлупу, не соединены между собой идеально плотно. За счёт этого скорлупа имеет микроскопические поры, через которые происходит газообмен развивающегося эмбриона (рис. 1, а).

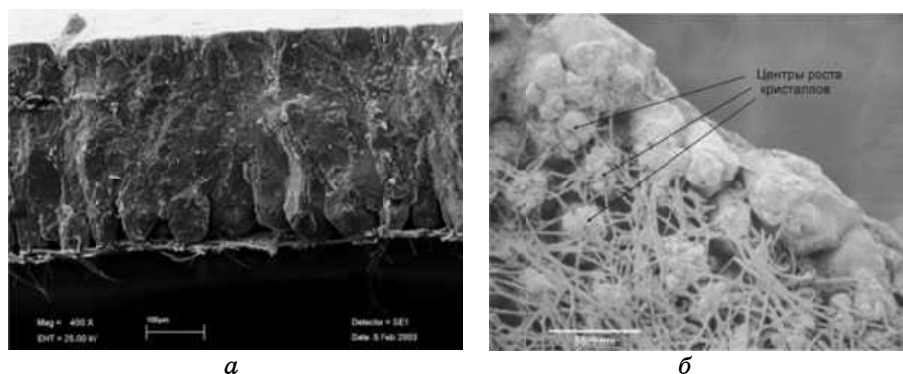


Рис. 1. SEM-изображения скорлупы куриного яйца: *а*) боковое сечение [1]; *б*) волокна кератина и коллагена из внешней подскорлупной мембраны, на которых формируются кристаллы карбоната кальция [13].

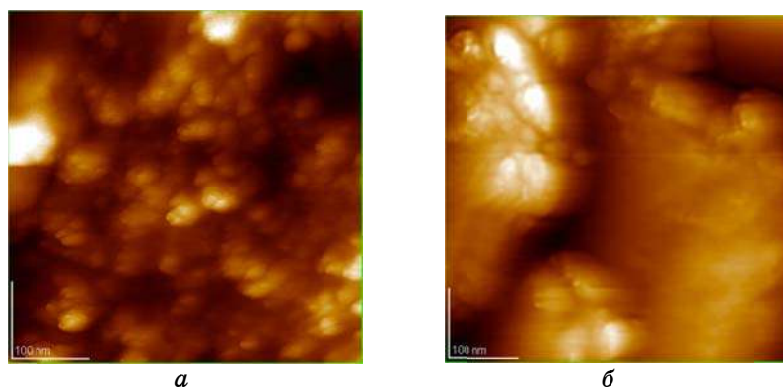


Рис. 2. АСМ-изображение подскорлупной мембраны: *а*) наночастицы карбоната кальция, формирующиеся на волокнах кератина и коллагена в органической матрице; *б*) центр роста кристаллов кальцита.

Внутри сети органического матрикса находятся органические ядра — центры роста монокристаллов кальцита (рис. 1, *б*, 2).

АСМ-исследования подскорлупной мембраны представлены на рис. 2. Видно, что формирование наночастиц кальцита происходит на волокнах органического матрикса (рис. 2, *а*), причём, волокна полностью покрыты наночастицами. Размер частиц варьируется в пределах 7–10 нм (рис. 2, *а*). В свою очередь центры роста кристаллов представляют собой наслоение монокристаллических образований размером 240–300 нм (рис. 2, *б*). Скорее всего, эти образования состоят не из отдельных наночастиц, а представляют собой нанокристаллы кальцита.

На следующем этапе исследований были получены АСМ-изобра-

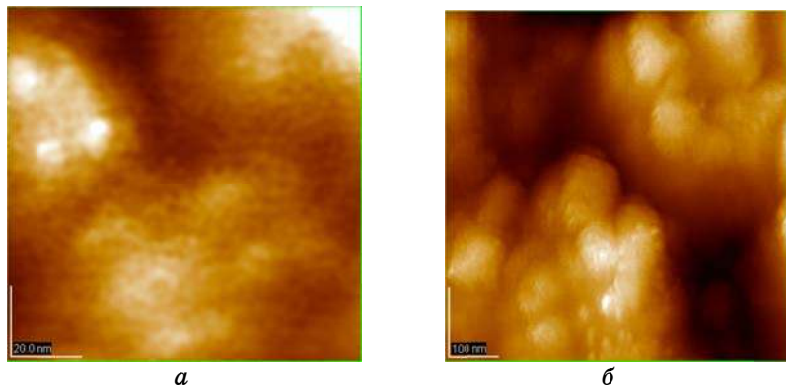


Рис. 3. АСМ-изображение органической кутикулы: *а*) кристаллы кальцита, покрытые кутикулой (размер снимка 100×100 нм); *б*) поровые каналы на поверхности скорлупы между кристаллами (размер снимка 709–502 нм).

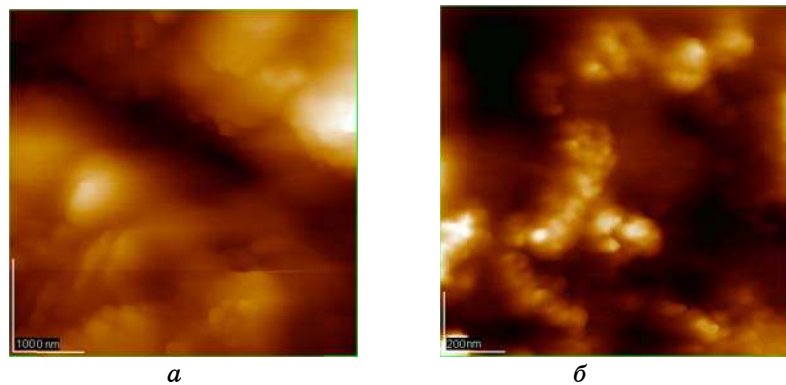


Рис. 4. АСМ-изображение поверхности скорлупы без кутикулы: *а*) порового канала между кристаллами кальцита на поверхности скорлупы (размер снимка 496–374 нм); *б*) снимок поверхности в увеличенном масштабе 1,15×1,17 мкм.

жения поверхности скорлупы с органической кутикулой (рис. 3).

Видно, что кутикула полностью покрывает кристаллы кальцита на поверхности скорлупы и имеет сетчатый характер (рис. 3, *а*). При большем масштабе (рис. 3, *б*) видны поровые каналы на поверхности скорлупы между кристаллами. Кристаллы имеют одинаковую высоту, размеры и форму, что свидетельствует о высокой степени организации биогенных минералов. Биокристалл растёт из бесчисленных центров, но стыковка всех его фрагментов в единой мозаике роста оказывается идеальной. По-видимому, существуют особые, строгие законы биологической минерализации. Вероятно, они определяются

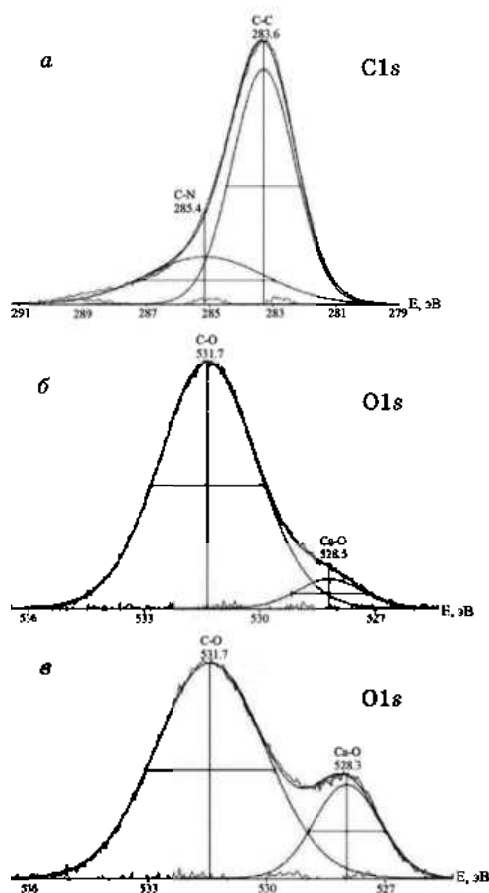


Рис. 5. РФС-спектры: а) 1s-линии углерода СКЯ; б) 1s-линии кислорода СКЯ, полученные под углом 0° ; в) 1s-линии кислорода СКЯ, полученные под углом $+30^\circ$.

очень высоким (на молекулярном уровне) соответствием в трёхмерной организации биогенных минералов и органических матриц — основы роста биогенных кристаллов.

Для более подробного изучения поровых каналов были выполнены АСМ-исследования поверхности скорлупы с удалённой кутикулой (рис. 4).

В верхней части снимка (рис. 4, а) виден поровой канал между кристаллами кальцита, который имеет продолговатую форму и приблизительные размеры 160–70 нм. Кроме того, на поверхности видны образования (рис. 4, б), напоминающие образование нанокристаллов кальцита на волокнах органического матрикса и, скорее всего, свидетельствующие, о наличии органического матрикса

ТАБЛИЦА 1. Энергии связи электронов (эВ) и ширина линии (эВ) (измеренная на половине высоты) остовных уровней атомов исследуемых соединений.

Соединение	C1s	O1s	Ca2p _{1/2}	Ca2p _{3/2}	N1s
CaO	—	528,8 [14]	350,0 [14]	346,5 [15]	—
СКЯ	283,6 (2,33)	530,66 (2,86)	350,14 (2,46)	346,64 (2,19)	398,12 (2,88)
CaCO ₃	290,03 (1,97)	531,93 (2,24)	350,79 (2,3)	347,22 (2,45)	—

Примечание: Значения энергии связи электронов даны относительно энергии связи электронов Au4f (т.е. 87,5 эВ). Погрешность измерений — 0,1 эВ.

не только в подскорлупной мембране, но и на поверхности скорлупы, хотя и в значительно меньшей степени.

Для более детального исследования физико-химического состава скорлупы, были выполнены спектральные исследования. С целью установления особенностей влияния органического матрикса на процессы минерализации, полученные данные сравнивались с данными по чистому CaCO₃ и кристаллам нативной кости человека.

В таблице 1 приведены энергии связи электронов и ширины линий остовных уровней атомов исследуемых соединений и CaO. Значения CaO приведены для удобства интерпретации результатов. Из таблицы 1 следует, что энергии связей электронов всех остовных уровней у СКЯ меньше, чем у CaCO₃, а линии шире. Также у СКЯ обнаружено наличие азота, скорее всего, из органического матрикса. Так как в органическом матриксе, кроме азота, присутствуют углерод, кислород и сера это приводит к уширению всех линий, их смещению в сторону меньших энергий связи и появлению дополнительных пиков в спектрах C1s и O1s остовных уровней атомов СКЯ. Метод РФС с угловым разрешением позволяет выполнять разделение этих пиков (рис. 5). Пик на 283,6 эВ соответствует связи C–C, а на 285,4 отражает взаимодействие углерода с азотом C–N. Для CaCO₃ характерно наличие только одного пика на 290 эВ, который отражает связь C–O (табл. 1). Пики в области 528 эВ на РФС-спектрах кислорода отражают взаимодействие кальция с кислородом в образце, а около 531 эВ кислорода с углеродом. Наличие серы при диагностике методом РФС не выявлено, ввиду его малого содержания на поверхности скорлупы ~ 0,03 вес.% [16].

Энергия связи остовных электронов атомов кальция и кислорода в СКЯ (~ 528 эВ) совпадает с энергией связи тех же электронов в CaO (табл. 1), что, по-видимому, связано с близкой степенью ионности кальция и кислорода в этих соединениях и свидетельствует о наличии большей электронной плотности на атомах кальция и кислорода. Скорее всего, это объясняется тем, что при взаимодействии с органическим матриксом, углерод из карбоната образует связь с азо-

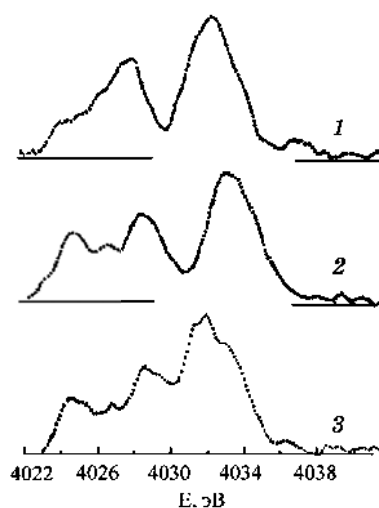


Рис. 6. Совмещённые в единой шкале CaK_β -полосы в кристаллах CaCO_3 (1), скорлупы куриного яйца (СКЯ) (2) и кристалле нативной кости человека (3).

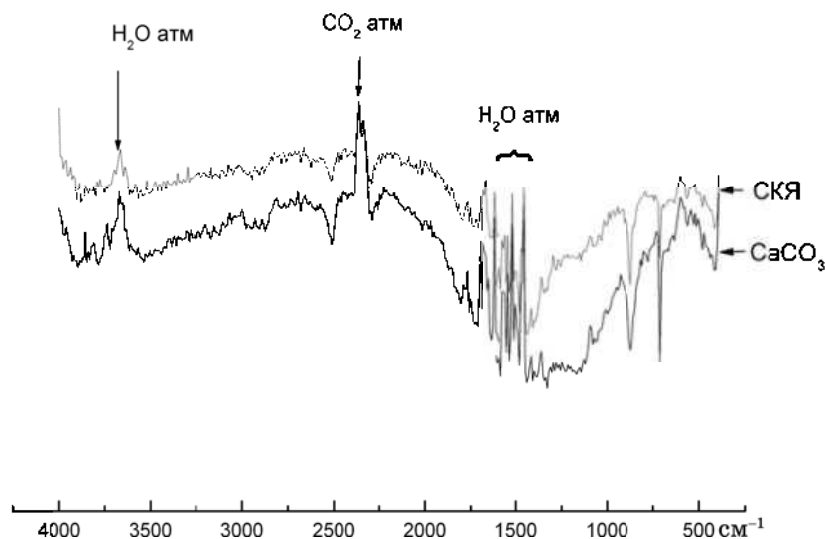


Рис. 7. Спектры ИК-поглощения исследуемых соединений.

том из органического матрикса ($-\text{C}=\text{N}-$, 398,0 эВ [15]) и при этом происходит перераспределение электронной плотности между CO_3 и кальцием.

Влияние органического матрикса подтверждается также рентгеновскими эмиссионными K_β -спектрами кальция (рис. 6). Форма кривой CaK_β -полосы в СКЯ подобна CaK_β -полосе в кристаллах

нативной кости человека, которая, как известно, тоже содержит органический матрикс из кератина и коллагена.

Форма и положение главного максимума CaK_β -полосы СКЯ совпадает с CaCO_3 , это объясняется тем, что минерал нативной кости представлен гидроксоапатитом кальция, а минерал СКЯ состоит из CaCO_3 .

Форму K -спектра кальция в основном определяют две особенности: главный максимум, формируемый p - и d -состояниями кальция и низкоэнергетический, связанный с проявлением p -состояний кислорода и углерода. Более расщепленная тонкая структура CaK_β -полос в СКЯ и нативной кости свидетельствует о том, что $4s$ -электроны кальция в конфигурации $3p^63d^14s^1$ в большей степени участвуют в экранировке поля ядра для $3d$ -электронов кальция.

Совместное рассмотрение ИК-спектров СКЯ и CaCO_3 (рис. 7) показывает совпадение всех интенсивных особенностей ИК-спектров, что свидетельствует об однотипности кристаллической структуры исследуемых соединений. Интенсивные особенности, наблюдаемые в области от 500 см^{-1} до 1500 см^{-1} , соответствуют колебаниям CO_3^{2-} ионов. Как известно [17], свободный CO_3^{2-} ион характеризуется четырьмя вибрационными модами: симметричное растяжение ν_1 1063 см^{-1} ; поперечный изгиб ν_2 879 см^{-1} ; ассиметричное растяжение ν_3 1415 см^{-1} и плоскостной изгиб ν_4 680 см^{-1} . ИК-полоса ν_1 неактивна в минералах. Фактически в CO_3^{2-} ионе существует шесть мод, но 2 моды вырождены в модах ν_3 и ν_4 . В карбонате полосы ν_3 и ν_4 проявляются дублетом. Это удвоение объясняется повышением степени вырождения, обусловленным структурой минерала и положением аниона в ней [17]. Таким образом, наблюдаемые (рис. 7) ИК-полосы 713 см^{-1} и 875 см^{-1} соответствуют колебаниям ν_4 и ν_2 CO_3^{2-} иона. Колебание ν_3 в области 1415 см^{-1} не наблюдается ввиду наложения колебаний ионов воды из атмосферы.

Смещение изотропного пика ^{13}C MAS ЯМР в сторону более высоких частот (табл. 2) при переходе от CaCO_3 до СКЯ, а также уменьшение энергии связи остоновых электронов, находящихся на $1s$ -орбитали углерода, говорит о перераспределении электронной плотности на углероде при наличии органического матрикса.

Такое отличие в электронном строении должно отражаться и на свойствах кальцита, что подтверждается, например, дифференциально-термическим анализом. Установлено [18], что разложение промышленного кальцита происходит при $749,9^\circ\text{C}$, тогда как CaCO_3 из СКЯ распадается при $771,5^\circ\text{C}$.

ТАБЛИЦА 2. ^{13}C ЯМР-данные спектров исследуемых соединений.

Образец	Положение пика, м. д.
CaCO_3	168,02
СКЯ	167,84

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые методами атомно-силовой микроскопии исследованы морфологические особенности кальцинированных образований скорлупы куриного яйца.

Установлено, что кальцит из СКЯ состоит из наночастиц и нанокристаллов CaCO_3 . Формирование наночастиц кальцита размером 7–10 нм происходит на волокнах органического матрикса. Центры роста кристаллов представляют собой наслаивание монокристаллических образований размером 240–300 нм. Скорее всего, эти образования состоят не из отдельных наночастиц, а представляют собой нанокристаллы кальцита.

Органический матрикс СКЯ присутствует не только в подскорлупной мембране, но и на поверхности скорлупы, хотя и в значительно меньшей степени. При взаимодействии с органическим матриксом, углерод из карбоната образует связь с азотом из органического матрикса и при этом происходит перераспределение электронной плотности между CO_3 и кальцием.

Форму K_β -спектра кальция в основном определяют две особенности: главный максимум, формируемый p - и d -состояниями кальция, и низкоэнергетический, связанный с проявлением p -состояний кислорода и углерода. Более расщепленная тонкая структура CaK_β -полос в СКЯ и нативной кости свидетельствует о том, что $4s$ -электроны кальция в конфигурации $3p^6 3d^1 4s^1$ в большей степени участвуют в экранировке поля ядра для $3d$ -электронов кальция.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. L. Dobiášová, R. Kužel, H. Šichová, and J. Kopeček, *J. Mat. Struc.*, **11**, No. 1a: 77 (2004).
2. C. Gröger, K. Lutz, and E. Brunner, *J. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **54**: 54 (2009).
3. F. H. Jones, *J. Surf. Sci. Rep.*, **42**: 75 (2001).
4. S. N. Danilchenko et al., *J. Cryst. Res. Technol.*, **41**, No.3: 268 (2006).
5. S. V. Dorozhkin, *J. Acta Biomaterialia*, **6**, No. 3: 715 (2010).
6. C. Balazsi, F. Weber, Z. Kover et al., *J. Eur. Ceram. Soc.*, **27**: 1601 (2007).
7. S.-J. Lee, Y.-S. Yoon, M.-H. Lee, and N.-S. Oh, *J. Mat. Lett.*, **61**: 1279 (2007).
8. S. Yoo, J. S. Hsieh, P. Zou, and J. Kokoszka, *J. Bioresource Tech.*, **100**: 6416 (2009).
9. В. Ф. Урьяш, А. Е. Груздева, Н. В. Гришатова и др., *Поволжский экологический журнал*, № 2: 167 (2005).
10. G. Gergely, F. Wéber, I. Lukács, A. L. Tyth et al., *J. Cer. Inter.*, **36**: 803 (2010).
11. W. Zheng, X. Li, Q. Yang, G. Zeng et al., *J. Haz. Mat.*, **147**: 534 (2007).
12. P. H. Jai, J. S. Wook, Y. J. Kyu et al., *J. Envir. Sci.*, **19**: 1436 (2007).
13. <http://people.eku.edu/ritchisong/avianreproduction.html>

14. J.-C. Dupin, D. Gonbeau, Ph. Vinatier, and A. Levasseur, *J. Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2**: 1319 (2000).
15. B. V. Crist, *Handbook of Monochromatic XPS Spectra—Vol. 1. The Elements and Native Oxides* (Mountain View, CA, USA: XPS International Inc.: 1999).
16. W. T. Tsai, J. M. Yang, C. W. Lai et al., *J. Bioresource Tech.*, **97**: 488 (2006).
17. K. Baltakys and R. Jauberthie, *J. Mat. Sci. Poland*, **27**, No. 4/1: 1077 (2009).
18. F. S. Murakami, P. O. Rodrigues, C. M. de Campos, and M. A. Segatto-Silva, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **27**, No. 3: 658 (2007).