Методы и объекты химического анализа, 2009, т. 4, № 1, С. 92–96.

Применение колебательной спектроскопии для экспресс-анализа композитных материалов на основе акриловых гидрогелей и гидроксиапатита

И. Е. Болдескул[1], Ю. М. Самченко[2], Л. Б. Суходуб[3],
З. Р. Ульберг[2], Л. Ф. Суходуб[1], Л. И. Береза[2]

[1]Институт прикладной физики Национальной академии наук Украины, ул.Петропавловская, 58, 40030 Сумы, Украина; e-mail: boldeskul@voliacable.com
[2]Институт биоколлоидной химии им. Ф.Д.Овчаренко Национальной академии наук Украины, бульв.Академика Вернадского 42, 03142 Киев, Украина
[3]Институт микробиологии и иммунологии им. И.И.Мечникова Академии медицинских наук Украины, ул.Пушкинская 14, 61057 Харьков, Украина

Поступила: 29 августа 2008 / Принята к опубликованию: 23 февраля 2009

Рассмотрены изменения в колебательных спектрах полиакриламидных гидрогелей в процессе получения композитных матералов на их основе в различных консистентных состояниях. Показана эффективность используемых методик для диагностики ортофосфатов кальция, инкорпорированных в гидрогелевую матрицу.

***Boldeskul I.E., Samchenko Yu.M., Sukhodub L.B., Ulberg Z.R., Sukhodub L.F., Bereza L.I. Application of vibrational spectroscopy in express analysis of acrylic hydrogel and hydroxyapatite based composite materials** – Infrared spectra absorption and ATR of acrylamide-, acrylonitril-, acrylic acid-based homo- and co-polymers hydrogel matrices differing in the monomer ratio, as well as in the consistency state. The above-mentioned is also valid for similar matrices, that comprise various calcium phosphates (HaP including) synthesized during their preparation. Efficiency of vibrational spectroscopy in qualitative express analysis of substances that form at different stages of synthesis.*

Ключевые слова: *колебательные спектры, гидрогелевые матрицы, гидроксиапатит*
Keywords: *IR-spectroscopy, hydrogel, hydroxyapatite*

Одним из направлений развития медико-биологического материаловедения является разработка методов синтеза и получения биосовместимых композитных материалов на основе гидроксиапатитной (ГА) керамики, характеризующейся образованием нанокристаллических структур с управляемыми свойствами для использования при изготовлении остеоимплантов [1, 2].

Сохранение нанокристаллической структуры является одним из условий синтеза ГА в плане дальнейшего взаимодействия с биомолекулами [3, 4]. Потребность в таких материалах далеко не исчерпывается керамикой и в последнее время интенсивно развиваются методы получения полимерных нанокомпозитов, содержащих ГА и другие ортофосфаты кальция (ОФК), в том числе с использованием золь-гель технологий [5, 6]. К ним относятся сополимерные пространственно-сшитые гидрогелевые матрицы с пористой гетерогенной структурой, синтезированные трехмерной сополимеризацией гидрофильных, гидрофобных и ионогенных акриловых мономеров. Образующиеся наноразмерные ячейки (поры) могут играть роль депо биологически активных веществ и выполнять функции своеобразных молекулярных реакторов, в частности, для формирования и стабилизации наночастиц композитов, включающих ГА [7]

Используемые при этом методы золь-гель синтеза позволяют подбирать комбинации кальций- и фосфорсодержащих прекурсоров на молекулярном уровне, что способствует получению продуктов гомогенного состава [6, 8]. Учитывая структурный полиморфизм и нестехиометричность ОФК, остается актуальным экспресс-анализ образующихся веществ (композитов), требующий накопления и идентификации физико-химических данных и, прежде всего, рентгеноструктурных и спектральных исследований.

Как было показано ранее [4, 5], колебательная спектроскопия достаточно эффективна для диагностики кристалличности (аморфизации) ОФК, в т.ч. ГА в различных структурных модификациях.

© И.Е. Болдескул, Ю.М. Самченко, Л.Б. Суходуб, З.Р. Ульберг, Л.Ф. Суходуб, Л.И. Береза

Материалы и методики исследования

В настоящей работе нами проведено спектроскопическое исследование полимерных гидрогелевых матриц на основе мономеров акриламида (АА) и сшивающего реагента (N,N'-метиленбисакриламид), в том числе включающих сформированные в их поровом пространстве частицы ГА, с целью диагностики промежуточных состояний в процессе синтеза, а также выявления неоднородности состава и контроля содержания сопутствующих ОФК в конечном продукте.

Гелеобразование проводилось в водной среде при комнатной температуре. Инициирование осуществлялось с использованием окислительно-восстановительной системы. Суммарное содержание сшитого полимера в гидрогелях варьировалось в диапазоне от 5 до 50%, а концетрация сшивающего реагента – в пределах от 0,01 до 1%. Подробно методика синтеза гидрогелей описана нами ранее [9].

Гидрогелевые матрицы в зависимости от условий и времени обработки получены нами в различных консистентных состояниях: в виде пластин или пленок, порошка либо мазеобразном, соответственно, образцы Л-2, ТП-1 и Д1 (таблица). Синтезированные гидрогелевые матрицы обладают высокой биосовместимостью, а их базовые физико-химические параметры (набухаемость, прочность, эластичность, прозрачность, ионо- и паропроницаемость, сорбционная и пролонгирующая способность по отношению к различным лекарственным препаратам) могут целенаправленно изменяться в широких пределах [10].

Формирование наночастиц ГА в поровом пространстве гидрогелевой матрицы с превалирующим размером пор 20–40 нм осуществляли путем последовательной ее обработки растворами $(NH_4)_2HPO_4$, $Ca(NO_3)_2$ и NH_4OH. Были установлены оптимальные соотношения реагентов, температурные и временные режимы обработки, позволяющие достичь наибольшей эффективности процесса формирования частиц ГА в нанопорах гидрогеля.

Инфракрасные (ИК) спектры поглощения и многократного нарушенного полного внутреннего отражения (МНПВО) в диапазоне 4000-400 $см^{-1}$, а в ряде случаев комбинационного рассеяния света (КРС) были получены с помощью ИК-Фурье спектрометра VERTEX 70 и FT-Raman –приставки RAM II производства фирмы BRUKER (Германия). При измерении спектров КРС использован Nd:YAG лазер с длиной волны 1064 нм.

Табл. Колебательные частоты ($см^{-1}$) образцов гидрогелей (Л-2, ТП-1, Д-1) и гидрогелей, содержащих гидроксиапатит (Л-2 ГА, ТП-1 ГА, Д-1 ГА), а также их отнесение

АА	Л-2	ТП-1	Д1	Л-2ГА	ТП-ГА	Д-1 ГА	отнесение
3340	3400	3400	3600		3355	3349	ν (OH)
3290							
3160	3189	3200	3200	3175	3180	3190	ν (OH,NH)
3000	2960						
	2925	2930	2950				ν (NH)
2820		2880	2800				ν (CH)
		2780					
				2365			
	2200		2200				
1670	1660	1680	1670	1660	1660	1660	ν (C=O)
1600	1600	1600	1600	1600	1615	1610	δ (NH)
1430	1455	1455	1460	1450	1445	1445	δ (OH)
	1415	1415	1410	1410	1405	1405	δ (CH)
1350	1350	1350			1360	1360	ν (C-C)
	1315	1320	1340			1316	ν (C-N)
	1180	1180	1200				
1140	1120	1120	1130	1120	1120	1130	
1050				1060	1050	1055	ν^{as} (PO)
984				995	995	990	ν^{s} (PO)
959							
842–815				870	870	870	
	710	790–738					
640–610	663–624	603		542	540		δ (O-P-O)
578	510			515		520	

Исследуемые пробы высушенных гидрогелей получали в виде порошков растиранием в агатовой ступке с добавлением жидкого азота для уменьшения вязкости (комкования) и последующим прессованием в таблетки KBr для регистрации ИК-спектров поглощения, либо в естественной консистенции для спектров МНПВО и КРС. Следует отметить хорошее соответствие ИК-спектров поглощения и МНПВО по расположению максимумов и их относительной интенсивности для референтных образцов кристаллического мономерного АА за исключением широкой структурированной полосы в области 600–700 $см^{-1}$, где в первом случае преобладает по интенсивности пик 613 $см^{-1}$, а во втором – 710 $см^{-1}$.

Учитывая, что спектры ИК-поглощения твердых веществ, обладающих полиморфизмом, могут иметь различия в зависимости от пробоподготовки [11] при прессовании таблеток KBr выдерживались одинаковые условия их приготовления: навески образца, просеивание пробы (0,008 мм) и величина давления. В свою очередь спектры МНПВО характеризуют состояние поверхности цельных пластинчатых образцов или линз не подвергшихся разрушению и, как будет показано ниже, содержат дополнительную информацию. При этом принималось во внимание, что в некоторых случаях с помощью одной лишь ИК-сектроскопии бывает затруднительно обнаружить разницу между сополимерами и смесью гомополимеров [11, 12].

Результаты исследований и их обсуждение

ИК-спектры собственно гидрогелевых матриц, измеренные обоими методами обнаруживают характерную картину вцелом, позволяющую их легко распознавать и идентифицировать с колебаниями функциональных группировок и отличаются незначительно расположением максимумов и в большей степени перераспределением относительной интенсивности последних. Так, сравнительный анализ спектров гомополиакриламидных гидрогелей и кристаллического АА показывает, что наиболее интенсивные и широкие перекрывающиеся полосы в диапазоне волновых чисел 4000–1500$см^{-1}$ соответствуют частотам валентных колебаний ν (XH), где (X=O, N, C).

В спектрах акриламида (рис. 1) максимумы ν (NH)=3407 и 3189 $см^{-1}$ отнесены, к антисимметричным валентным колебаниям свободной и связанной амидной группы, проявление которых иногда обнаруживает особенности (слабовыраженную структуру), повидимому вследствие перекрывания с близлежащими малоинтенсивными полосами поглощения, о чем будет сказано ниже. Амидному фрагменту

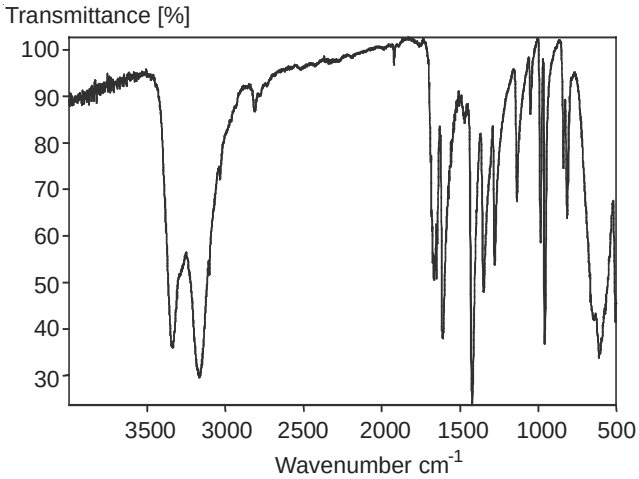

Рис. 1. ИК-спектр мономерного акриламида

принадлежит интенсивный максимум ν(C=O)=1673 $см^{-1}$ (Амид I), перекрывающийся с максимумом деформационного колебания δ (NH) =1620 $см^{-1}$ (Амид II), образуя уширенный дублет, компоненты которого могут несколько отличаться в спектрах образцов гидрогелей в зависимости от соотношения исходных веществ вследствие структурных вариаций или наложения колебаний C=C связей и сопряжения с ними [12, 13], а также внутри- и межмолекулярных взаимодействий. В частности, наличие терминальных протонодонорных и акцепторных группировок на поверхности или в порах матрицы приводит к образованию водородных связей (H-связи) с соответствующими им спектральными проявлениями. Анализируя этот участок в спектрах гидрогелей (рис. 2) следует принимать во внимание прежде всего возможность наложения полос поглощения для свободных и ассоциированных форм Амид I и Амид II, поскольку для первых при образовании H-связей частота понижается, а для вторых наоборот – повышается [14,15].

Эффекты гидратации, т.е. проявление водородных связей с участием адсорбированных молекул воды, также отчетливо наблюдаются в колебательных спектрах и соответствующее отнесение максимумов приведено в таблице, обсуждение поведения которых выходит за рамки настоящего сообщения. Заметим лишь, что существует корреляция с полученными ранее данными дифференциальной сканирующей калориметрии о распределнии содержания связанной воды с измененными физическими свойствами в сополимерных гидрогелях акрилового ряда [16, 17].

В области валентных колебаний метиленовой группы можно выделить три максимума: наиболее интенсивный ν_{as}(CH)=2930 $см^{-1}$ и малой интенсивности в виде плеча 2850 $см^{-1}$, а также 2770 $см^{-1}$.

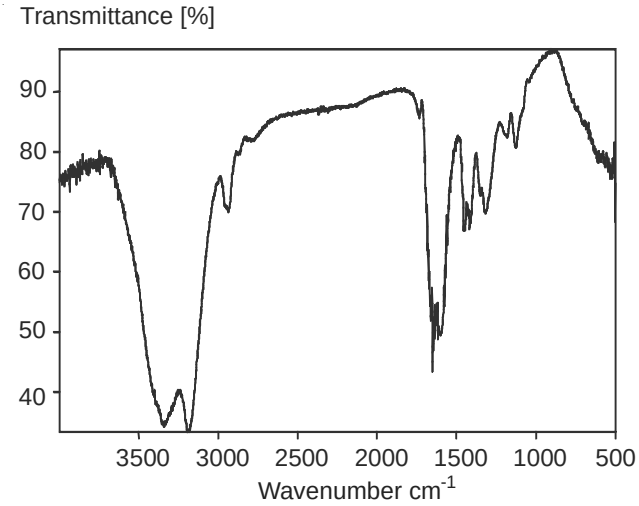

Рис. 2. ИК-спектр гидрогелевой полиакриамидной матрицы.

Последний из них, по-видимому, соответствует симметричному колебанию $\nu_s(CH_2)$, в то время как колебание с частотой ν=2850 см$^{-1}$ может быть идентифицировано с непрореагировавшим акриламидом, в спектре которого аналогичный максимум преобладает в указанном спектральном участке (таблица).

Наибольшие различия в спектрах акриламидных гидрогелей в сравнении с исходными мономерами наблюдаются в области “отпечатков пальцев” 1500–700 см$^{-1}$, где спектры заметно упрощаются в сравнении с акриламидом (рис. 2) В частности, наиболее интенсивные максимумы последнего 1430 и 1360 см$^{-1}$, обусловленные колебаниями δ(CH) и ν (CN) (Амид III) [15] расщепляется в дублеты с меньшей интенсивностью 1450–1410 см$^{-1}$ и 1340–1320 см$^{-1}$, перекрываясь со скелетными колебаниями в т.ч. 1120 см$^{-1}$, ослабевают и уширяются,образуя плато. Исчезают интенсивные дублеты около 1000 и 800 см$^{-1}$, а также широкая структурированная полоса 600 см$^{-1}$ и появляется новый максимум 1185 см$^{-1}$.

Таким образом, рассмотренные особенности в области ”отпечатков пальцев” в достаточной мере типичны для исследованных гидрогелей и могут быть использованы для целей их идентификации, а также контроля степени отмывки гидрогелевых матриц от довольно токсичных исходных мономеров, что является весьма актуальным применительно к гидрогелям медицинского назначения [18].

Инкорпорирование в гидрогелевую матрицу предварительно синтезированного стехиометрического ГА отчетливо проявляется хорошо известными характеристическими частотами фосфат-аниона, прежде всего наиболее интенсивным дублетом трижды вырожденных антисимметричных валентных колебаний ν_3(P=O)=1089$_{пл}$-1051$_{макс}$см$^{-1}$, а также структурированной полосой деформационных колебаний δ(O-P-O) с максимумами 630, 604 и 570 см$^{-1}$ на фоне широкой куполообразной полосы 576 см$^{-1}$ [4–6].

В итоге общая картина представляет собой суммарный спектр ГАП и соответствующего гидрогелевого сополимера, и не обнаруживает специфических взаимодействий с последним. Симметричное колебание ν_1(P=O) =962 см$^{-1}$ проявляется слабым пиком на сколоне основного максимума. В спектре КРС ему соответствует самый интенсивный максимум и наиболее чувствительный для диагностики фазы [19], в данном случае более всего отвечающей нанокристаллической структуре. Остальные вышеприведенные максимумы проявляются в спектрах КРС в виде слабых дублетов 1070–1050, 600–590 и 450–430 см$^{-1}$, что характерно для фосфат-аниона T_d симметрии. Использование лазера 1064 нм для возбуждения спектров КРС сопровождается флуоресценцией, часто наблюдаемой для апатитных образцов [19].

В ИК-спектрах образцов, содержащих ГА (Л2-ГА, ТП-ГА, Д-1ГА) синтезированный в гидрогелях [8] наличие фосфатных анионов подтверждается появлением новой широкой интенсивной полосы поглощения с максимумами в интервале 1060 и 990 см$^{-1}$ (рис. 3). Наблюдающаяся разница в положении максимумов с сравнении с кристаллическим ГА объясняется скорее присутствием нестехиометрической аморфной фазы. На это указывает и отсутствие максимумов 3570 и 630 см$^{-1}$ отвечающих гидроксил-аниону в микрокристаллической структуре. Также отсутствуют в явном виде характерные четкие для ГА пики в участке 600–500 см$^{-1}$, а наблюдается ши-

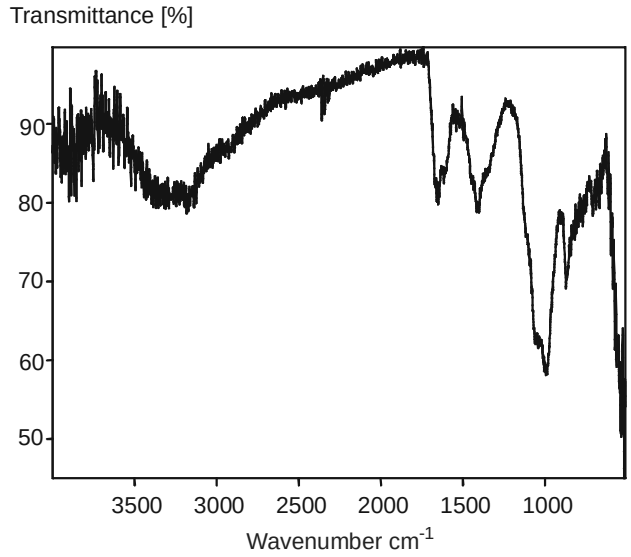

Рис. 3. ИК-спектр гидроксиапатита, синтезированного в гидрогелевой матрице

рокий максимум, что может также свидетельствовать о наличии наряду с ГА других Са-фосфатных фаз. В частности максимум 880 $см^{-1}$ скорее следует отнести к присутствию иона HPO_4^{2-} [6]. Широкая полоса малой интенсивности с максимумам 3400–3200 $см^{-1}$ обусловлена адсорбированными молекулами воды. Присутствие наноаморфного ГА подтверждается интенсивным пиком ν(P-O) = 960 $см^{-1}$ в спектре КРС.

Заключение

Колебательные спектры исследованных гидрогелевых матриц достаточно показательны для использования в целях их идентификации, либо контроля степени отмывки от токсичных исходных мономеров, а также подтверждают возможность синтеза ГА (ОКФ) в нанореакторе.

Литература

1. *Webster T.J., Smith T.A.* Improved osteoblast functions on polymer: nanophase ceramic composites // J. Biomed. Mater. Res. – 2005. – 74. – P. 677–686.
2. *Баринов С.М., Комлев В.С.* Биокерамика на основе фосфатов кальция. – М.: Наука, 2005. – 202 с.
3. *Фомин А.С., Баринов С.М., Иевлев В.М., Смирнов В.В., Михайлов Б.И., Белоногов Е.К., Дроздова Н.А.* Нанокристаллическая гидроксиапатитная керамика, полученная спеканием, при пониженной температуре после воздействия высоких давлений // Доклады Академии наук. – 2008. – 418, № 3. – С. 352–355.
4. *Kumta P.N., Sfeir C., Dong-Hyun Lee, Olton D., Choi D.* Nanostructural Calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization // Acta Biomaterialia. – 2005. – 1. – P. 65–83.
5. *Brian J. Melde, Andreas Stein*. Periodic Macroporous Hydroxyapatite-Containing Calcium Phosphates // Chem. Mater. – 2002. – 14. – P. 3321–3326.
6. *Koutsopolus S.* Syntsesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods // J. Biomed. Mater. Res. – 2002. – 62. – P. 600–612.
7. *Самченко Ю.М., Пасмурцева Н.А., Ульберг З.Р.* Гидрогелевые нанореакторы медицинского назначения // Доповіді НАН України. – 2007. – № 2. – С. 146–150.
8. *Самченко Ю.М., Суходуб Л.Ф., Данильченко С.Н., Береза Л.И., Ульберг З.Р., Суходуб Л.Б., Шостенко А.Г.* Гидрогелевые нанореакторы для формирования гидроксиапатита // Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології (в печати)
9. *Samchenko Yu., Ulberg Z., Pertsov N.* Hydrogel medicinal systems of prolonged action // Progress in Colloid and Polymer Science. – 1996. – 102. – P. 118–122.
10. *Самченко Ю.М., Ульберг З.Р., Комарський С.А.* Кополімерні гідрогелі медичного призначення – Наукові основи розробки лікарських препаратів. – Харків "Основа", 1998. – С. 159–177.
11. *Смит А.* Прикладная ИК-спектроскопия. – М.: Мир, 1982. – 327 с.
12. *Белами Л.* Инфракрасные спектры сложных молекул. – М.: Изд-во иностранной л-ры, 1963. – 500 с.
13. *Казицина Л.А., Куплетская Н.Б.* Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. – М.: "Высшая школа", 1973. – 263 с.
14. *Наканиси К.* Инфракрасные спектры и строение органических соединений. – М.: Мир, 1965. – 210 с.
15. *Гордон А., Форд Р.* Спутник химика. – М.: Мир, 1976. – 541 с.
16. *Самченко Ю.М., Атаманенко И.Д., Полторацкая Т.П., Ульберг З.Р.* Состояние воды в мелкодисперсных гидрогелях на основе акриламида и акриловой кислоты // Коллоид. журн. – 2006. – 68, № 5. – С. 670–673.
17. *Суходуб Л.Б., Самченко Ю.М., Суходуб Л.Ф.* Ізотерми гідратації чистих та мінералізованих колагенових фібрил: дослідження з використанням п'єзогравіметрії та інфрачервоної спектроскопії // Доповіді НАН України. – 2008. – № 5. – С. 155–160.
18. *Gertsyuk M., Samchenko Y.* Separation of Nonreacted Acrylamide from Polyacrylamide Gel for Endoprothesing // Ars Separatoria Acta. – 2007. – № 5. – P. 99–102.
19. *Weinlaender M., Beumer J. 111, Kenney E.B., Moy K.P.* Raman microprobe investigation of the calcium phosphate phases of three commercially available plasma-flame-sprayed hydroxyapatite-coated implants // J. Mater. Sci.: Materials in Medicine. – 1992. – 3. – P. 397–401.