

Конкурсна робота

на тему:

**«Синтез та фізико-хімічні властивості гранульованих матеріалів
біомедичного призначення»**

АНОТАЦІЯ

під шифром «БІОМАТЕРІАЛИ»

Конкурсна робота: 29 с., 15 рис., 5 табл., 30 джерел.

Об'єктом вивчення є фізико-хімічні особливості формування гранульованих матеріалів на основі полімеру природного походження – натрій альгінату та неорганічної складової - гідроксиапатиту.

Метою даної роботи є встановлення закономірностей формування гранул гідроксиапатит - альгінат натрію та дослідження поверхневої активності та фізико-хімічних властивостей одержаних біоматеріалів для подальшого використання в ортопедії.

В роботі проведено дослідження морфології, фазового складу та адсорбційних характеристик отриманих гранульованих матеріалів по відношенню до йонів Zn^{2+} та Cu^{2+} .

Отримано гранульовані матеріали на основі гідроксиапатиту та альгінату натрію заданої морфології та фазового складу. Досліджено їх адсорбцію по відношенню до йонів Zn^{2+} та Cu^{2+} та десорбцію сорбованих йонів у водних розчинах.

Результати роботи можуть бути використані в медичній практиці, зокрема в ортопедії, оскільки отримані матеріали є біосумісними та біоактивними та здатні до біорезорбції в умовах організму. Їх можна застосовувати в матеріалознавстві для отримання матеріалів біомедичного призначення, з заданими властивостями, що мають антибактеріальну дію, або як наповнювачі для фільтрів питної води. Одержані закономірності процесу адсорбції отриманими гранулами щодо йонів Zn^{2+} та Cu^{2+} дозволяють прогнозувати сорбційну ємність отриманих матеріалів, та швидкість досягнення рівноваги в системі. Дослідження десорбції йонів можна використовувати для прогнозування виходу йонів металів *in vivo*.

Ключові слова: адсорбція, десорбція, біоматеріали, гідроксиапатит, альгінат натрію.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНИЙ СТАН ПРОБЛЕМИ СТВОРЕННЯ БІОМАТЕРІАЛІВ.	5
РОЗДІЛ 2. ФОРМУВАННЯ МАТЕРІАЛІВ НА ОСНОВІ ГІДРОКСИАПАТИТУ ТА АЛЬГІНАТУ НАТРІЮ	8
2.1. Матеріали	8
2.2. Приготування розчинів вихідних речовин	8
2.3. Проведення експерименту по отриманню матеріалів	9
2.4. Основні методи дослідження	10
РОЗДІЛ 3. ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	14
3.1 Дослідження морфології та елементного складу мікрогранул після сорбції йонів Zn^{2+} та Cu^{2+} з водних розчинів.....	15
3. 2. Дослідження фазового складу мікрогранул	17
3. 3. Дослідження поверхневої активності мікрогранул.....	18
3.4. Дослідження біосумісності та антибактеріальних властивостей отриманих матеріалів	29
ЛІТЕРАТУРА	32

ВСТУП

Актуальність дослідження. Питання розробки та створення нових матеріалів медичного призначення на основі мінеральної складової кісткової тканини та біополімерів продовжує бути актуальним, оскільки не дивлячись на численні спроби ідеального матеріалу для заміни кістки досі не створено. Введення йонів металів при синтезі дозволяє отримати біоматеріали з антибактеріальними властивостями та пролонгованим і контрольованим виходом йонів при формуванні кісткової тканини. Саме утворенню таких матеріалів і присвячена дана робота, оскільки їх складові – гідроксиапатит (ГА) і альгінат натрію (Альг) мають природне походження, а їх поєднання дозволяє варіювати основні властивості та характеристики отриманих композитів. В роботі були отримані гранульовані матеріали ГА-Альг з різним співвідношенням компонентів та досліджені їх адсорбційні характеристики по відношенню до йонів Zn^{2+} та Cu^{2+} , а також можливості вивільнення йонів *in vitro*.

Методи дослідження. Робота проведена із застосуванням сучасних методів дослідження. Дослідження морфології та елементного складу здійснювали методом растрової електронної мікроскопії з рентгенівським мікроаналізатором. Фазовий склад одержаних гранул визначали методом рентгенівської дифрактометрії. Методами атомно-абсорбційної спектрометрії та титриметричного аналізу оцінювали вміст цинку та міді в отриманих гранульованих матеріалах.

Мета дослідження. Метою даної роботи є встановлення закономірностей формування гранульованих матеріалів на основі гідроксиапатиту та альгінату натрію та отримання інформації про поверхневу активність одержаних матеріалів для подальшого їх використання в якості біоматеріалів.

РОЗДІЛ 1. СУЧАСНИЙ СТАН ПРОБЛЕМИ СТВОРЕННЯ БІОМАТЕРІАЛІВ

Понад 40 білліонів євро щорічно витрачається на лікування захворювань і травм кісткової тканини [1] і понад 50% цих витрат використовуються на остеопластичні матеріали, імплантати та протези. Такі матеріали повинні мати біосумісність та остеокондуктивні властивості. Форми біоматеріалів можуть бути найрізноманітніші в залежності від їх призначення: покриття імплантатів, губки, скафолди, порошок, гелі та гранульовані матеріали. Найбільша біосумісність та остеокондуктивність проявляються у матеріалах, що поєднують органічну та неорганічну складові [2]. Оскільки кістка є матеріалом, в якому фібрили колагену поєднуються з кристалами гідроксиапатиту ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), композитні матеріали ГА/колаген найбільш актуальні для заміщення кісткової тканини [3]. Досить перспективними є гранульовані матеріали для контрольованого вивільнення лікарських засобів [4] на основі ГА завдяки його здатності адсорбувати різноманітні речовини та біосумісності.

При синтезі таких матеріалів важливо знайти оптимальне поєднання органічної та неорганічної складових, а також забезпечити поступове вивільнення активного компоненту. Крім того, бажаним є антибактеріальний ефект композитних матеріалів, оскільки під час імплантації їх в організм це дозволяє зменшити запалення в місці імплантації, а отже пришвидшує його приживлення.

В роботі [4] гранульовані матеріали ГА/Альг були використані для контрольованого вивільнення натрію диклофенаку як модельного лікарського засобу. Мікро-частинки ГА діють як неорганічні зв'язуючі компоненти в нанокompозитах, які зменшують рухливість полімерних ланцюгів натрію альгінату, змінюючи морфологію поверхні та зменшуючи їх набухання. Перевагами біополімерів є відсутність токсичності, біосумісність, здатність до біодеградації [5]. Вихід лікарських засобів безпосередньо з ГА є досить швидким, а полімерна оболонка сповільнює вихід лікарських засобів [6,7].

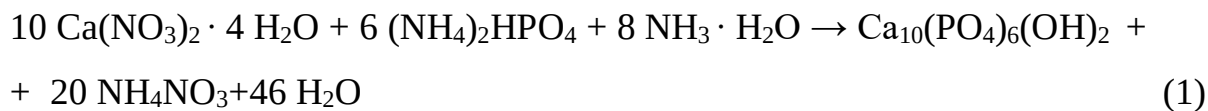
В роботі [8] ГА показує високу іонообмінну здатність по відношенню до йонів важких металів завдяки його складу та унікальній кристалічній структурі [9]. Як відомо, кристалічна структура ГА показує високу ступінь структурної невпорядкованості, завдяки численним хімічним заміщенням. Внутрішні дефекти структури сприяють зростанню адсорбційної ємності.

Порошок ГА може бути синтезований з використанням різних методів: гідротермальний синтез, твердофазний синтез, осадження, золь-гель метод, механохімічний метод, мікроемульгування, тощо. Різноманітність методів підготовки призводить до отримання матеріалів різної кристалічності, морфології, стехіометрії з суттєвими відмінностями в фізико-хімічних характеристиках (фазовій стабільності та розчинності). Нанорозмірні матеріали ілюструють високу реакційну здатність у порівнянні з такими ж матеріалами мікронного та субмікронного рівня [10].

Альгінат натрію - лінійний, аніонний полісахарид, який складається з глікозидних залишків β -D-мануронової і α -L-гулууронової кислот і утворює оболонку мікрогранул завдяки взаємодії з двовалентними катіонами металів (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} та ін.) [11]. Існує синергетичний ефект між полімером та неорганічним матеріалом за рахунок електростатичної взаємодії, та водневих зв'язків між складовими, внаслідок чого можуть покращуватись механічні властивості, здатність до набухання, ефективність вивільнення сорбованих йонів металів.

Існує багато методів формування мікрогранул на основі альгінату, одностадійні [12, 13], коли альгінат натрію змішують з гідрофосфатом амонію $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, а потім по краплям додають в розчин $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ [12]. Недоліком таких методів є можливість формування кальцій-дефіцитного апатиту. Інша група вчених дотримується методу двостадійного синтезу, коли готовий ГА додають до альгінату, а потім в результаті гелеутворення отримують гранули ГА-Альг [14].

З метою утворення стехіометричного апатиту ми пропонуємо спочатку синтезувати ГА за наступним рівнянням реакції:



Потім відмиваємо його і в сирому стані додаємо до альгінату натрію різних концентрацій для отримання розчинів із заданою концентрацією альгінату та ГА. Гранули утворюються при додаванні отриманої суспензії ГА в альгінаті до розчинів, що містять катіони відповідних металів. Отримані гранули мають задану сферичну форму і діаметр, обумовлений діаметром вихідного отвору піпетки.

Після відпалювання при 900°C гранул отриманих способом гелеутворення в розчині, що містить йони Ca^{2+} можна отримати сферичні гранули ГА [15, 16].

Особливої актуальності набуває визначення сорбційної активності отриманих гранул ГА-Альг та їх здатності адсорбувати йони Zn^{2+} та Cu^{2+} з водних розчинів. Визначення адсорбційних властивостей отриманих гранул має суттєве значення не тільки для одержання біоматеріалів, але і при використанні таких сорбентів для очищення розчинів від металів у відносно низьких концентраціях. В даному дослідженні проведено оцінку адсорбції йонів Zn^{2+} та Cu^{2+} з водних розчинів мікрогранулами ГА-Альг, які були синтезовані при додаванні суміші альгінату з ГА в 0,2н розчин CaCl_2 (зразки 1а та 2 а). Неорганічна фаза (ГА) формується всередині органічної матриці - альгінату, що дозволяє отримати матеріали близькі природним наноккомпозитам.

На адсорбцію йонів Zn^{2+} та Cu^{2+} впливає концентрація альгінату та метод їх виготовлення. Але всі ці адсорбенти діють при невисоких концентраціях йонів металів, що обумовлено адсорбційною ємністю даних матеріалів. При виготовленні біоматеріалів також важливо визначити здатність отриманих гранул до десорбції, що і було здійснено в даній роботі.

Істотні відмінності отриманих матеріалів - простота відтворення, можливість утворення нитчастої чи гранульованої форм, можливість створення багат шарових оболонок, взаємодія між органічною та неорганічною складовими дозволяють з успіхом використовувати дані матеріали у якості біоматеріалів медичного призначення.

РОЗДІЛ 2. ФОРМУВАННЯ МАТЕРІАЛІВ НА ОСНОВІ ГІДРОКСИПАТИТУ ТА АЛЬГІНАТУ НАТРІЮ

2.1. Матеріали

В роботі використовували альгінат натрію, кваліфікації «фарм.» виробництва Sanpu Chemical Co., Ltd. (Shanghai, China).

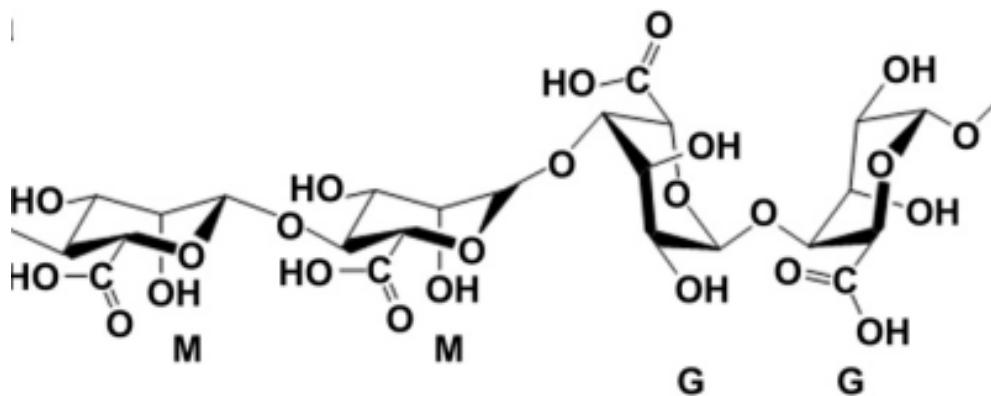


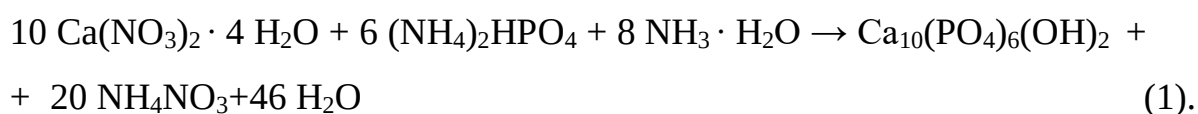
Рис.1. Структурна формула альгінату натрію [17]

Реактиви для синтезу гідроксиapatиту $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ та $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ кваліфікації «ч.д.а.» вітчизняного виробництва, розчиняли у воді для отримання вихідних розчинів із співвідношенням $\text{Ca/P}=1,67$ з концентраціями 0,1 моль/л ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) та 0,06 моль/л ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$). Регулювання рН здійснювали додаванням по краплям 5% розчину аміаку у воді.

2.2. Приготування розчинів вихідних речовин

В роботі використовували розчини альгінату натрію двох концентрацій (1% та 1,5 %). Для їх приготування кристалічний альгінат натрію кваліфікації фарм. масою 1 г (1,5 г) розчиняли в розрахованому об'ємі дистильованої води (100 мл). Масу реактивів визначали за допомогою аналітичних терезів, точність вимірювання маси складала 0,005 мг.

Синтез ГА здійснювали відповідно наступному рівнянню реакції:



Свіжоприготований ГА змішували з 1% (зразок 1) та 1,5% (зразок 2), водними розчинами альгінату у співвідношенні 1:1 для отримання композитних мікрогранул із вмістом альгінату 0,5 % та 0,75% відповідно.

2.3. Проведення експерименту по отриманню матеріалів

2.3.1 Отримання гранульованих матеріалів

Отриману суміш по краплях додавали в 0.2н розчин CaCl_2 для утворення мікрогранул (1 а, 2 а) в оболонці альгінату Са, отримані матеріали залишали в 0.2н розчині CaCl_2 на 24 години. Експериментальна установка для формування мікрогранул показана на рис.1.

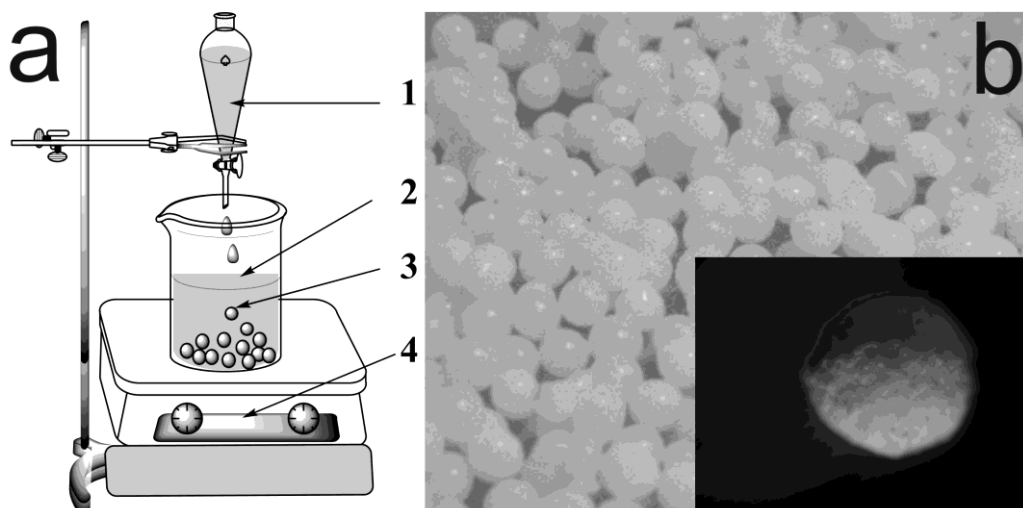


Рис.2. а) Установка для отримання ГА-Alg мікрогранул [18]: 1) розчин альгінату змішаний з свіжоприготованим ГА, 2) 0.2 Н розчин CaCl_2 , 3) утворення мікрогранул ГА-Alg, 4) магнітна мішалка; б) Загальний вигляд мікрогранул ГА-Alg отриманих в 0.2 Н розчині CaCl_2 (1 а) і оптична морфологія отриманої гранули.

Частина отриманих мікрогранул була тричі промита дистильованою водою з наступним зануренням у 0.2н ZnSO_4 на 24 години (1 б, 2 б) для дослідження їх сорбційних властивостей по відношенню до йонів Zn^{2+} .

2.3.2. Отримання нитчастих матеріалів

Використовуючи тип синтезу описаний в даній роботі, можуть бути отримані не лише гранульовані матеріали, а й нитчасті [19,20], для цього отриману суспензію ГА з 0,1 % альгінатом натрію диспергують ультразвуком для гомогенного перемішування та подрібнення, набирають у шприц і видавлюють крізь голку. В такому випадку біоматеріал має форму ниток (Рис. 3).



Рис. 3. Нитчаста морфологія матеріалу ГА-альгінат 0,1 %.

Нитчаста форма отриманих матеріалів також може бути успішно застосована для створення матеріалів медичного призначення [19,20].

2.4. Основні методи дослідження

Визначення кислотності розчину проводили за допомогою рН-метру (МА-150) виробництва ООО Антех (Республіка Білорусь). Даний прилад сертифікований і внесений в Державний реєстр засобів вимірювання № UA-MI/Зр-523-2003 від 25 червня 2003 р. Діапазон вимірювань приладу рН від -1.00 до 14.00, температури від -10 до 100°C, дискретність рН=0,01, температура 1°C, основна похибка вимірювань рН $\pm 0,05$, а температури ± 2 °C.

Дослідження морфології були проведені з використанням оптичної мікроскопії (Karl Zeiss Primo Star, Germany) та скануючої електронної мікроскопії (PEMMA-102, “SELMi”, Україна). Елементний склад було визначено на базі растрового електронного мікроскопа з рентгенівським мікроаналізатором.

Рентгенодифракційні дослідження проводились на автоматизованому дифрактометрі «ДРОН 4-07» (НВП «Буревестник», Російська Федерація) в режимі на віддзеркалення (геометрія Бреґґа-Брентано) з використанням Cu K α -випромінювання (довжина хвилі $\lambda=1,5418$ Å, нікелевий β -фільтр). Параметри роботи генератора: прискорювальна напруга 40 кВ, струм трубки – 20 мА. Реєстрація відбувалася в безперервному режимі зі швидкістю 1°/хв в діапазоні кутів 2θ від 10° до 60°. Всі процедури обробки експериментальних даних були виконані за допомогою програмного пакету підтримки експерименту і обробки результатів DIFWIN-1 (ТОВ «Еталон-ТЦ»). Ідентифікацію кристалічних фаз проводили за допомогою картотеки JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards).

Визначення концентрації йонів Zn^{2+} і Cu^{2+} методом атомно-адсорбційної спектрометрії (ААС)

Для визначення концентрацій йонів Zn^{2+} і Cu^{2+} у досліджуваних зразках використовували серійний комплекс атомної абсорбції КАС-120.1 (ВАТ “Selmi”, м. Суми, Україна) призначений для визначення концентрації хімічних елементів у рідких пробах різного походження і складу з двопробеним спектрофотометром С-115-М1, з наступними технічними характеристиками: спектральний діапазон вимірювань - 190-900 нм, спектральний дозвіл не більш 0,1 нм, діапазон вимірювання оптичної густини 0-2000 мВ, діапазон вимірювання масової концентрації 10-100 $C_{\text{характ.}}$, межа виявлення 0.005-0.15 мг/л, абсолютна похибка вимірювання поглинання не більш ніж 0.01 [21].

Процес адсорбції проводили при постійній температурі та перемішуванні. Гранули адсорбенту були змішані з вихідним розчином $CuSO_4$ з концентрацією

100 ммоль/л (при відношенні твердої до рідкої фаз 1:10) при температурах 22 та 50°C. Час контакту сорбенту з розчином змінювали з 5 хвилин до 24 годин.

Для приготування серії калібрувальних розчинів використовували вихідний розчин з відомою концентрацією Cu^{2+} 100 мМ. Дозатором відбирали по 10 мкл вихідних розчинів вносили в мірні пробірки і доводили бідистиллятом до 10мл, таким чином розводили в 1000 разів. Всі проби аналогічно розводили бідистиллятом в 1000 разів. Осад не відбирався, пробірки зі зразками не струшували. Таким чином, вплив осаду на визначення міді був мінімізований. Всі розчини готувались на бідистильованій воді з електричною провідністю не більше 1мкСм.

Для приготування серії калібрувальних розчинів використовували вихідний розчин з відомою концентрацією 0,2н ZnSO_4 . Дозатором відбирали по 10 мкл вихідного розчину вносили в мірну пробірку і доводили бідистиллятом до 10мл, таким чином розводили в 1000 разів. Всі проби аналогічно розводили бідистиллятом в 1000 разів. Розчини готувались на дистильованій воді з електричною провідністю не більше 1мкСм. Комплекс атомно-абсорбційний спектрофотометричний КАС-120.1 призначений для визначення концентрації хімічних елементів у рідких пробах, тому пробопідготовка зводилась до розведення зразків в 1000 разів.

Титриметричний метод визначення концентрації йонів Zn^{2+} та Cu^{2+}

По закінченню процесів сорбції - десорбції розчин відокремлювали від твердої фази фільтруванням через паперовий фільтр.

У фільтраті концентрацію Zn^{2+} визначали, використовуючи його комплексоутворення з ЕДТА (етилендіамінтетраацетат). ЕДТА - полідентантій ліганд, який утворює з іонами Zn^{2+} комплексну сполуку складу 1:1. Індикатором слугував еріохром чорний, який також утворює комплекс з іоном Zn^{2+} , але цей комплекс менш стійкий, ніж $\text{Zn} - (\text{ЕДТА})$. Титрування проводять у лужному середовищі з використанням аміачного буфера ($\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$) при $\text{pH} = 10$. Додають трохи індикатора і чекають повного розчинення. Далі проводять

титрування розчином ЕДТА до зміни кольору досліджуваного розчину від винно-червоного до блакитного. Концентрацію йонів Cu^{2+} знаходили методом комплексометричного титрування ЕДТА у відповідності до стандартної методики в присутності мурексиду у лужному середовищі (зразки 1,6,7,12).

Показник адсорбції розраховували за формулою [22]:

$$A = \frac{(C_0 - C) \cdot V \cdot m_{\text{еквMe}^{2+}} \cdot 1000}{m_{\text{гранул}}}, \quad (2).$$

де C_0 - вихідна концентрація адсорбата в моль-екв/л, C - рівноважна концентрація адсорбата в моль-екв / л, V - об'єм розчину адсорбата в л; $m_{\text{еквMe}^{2+}}$ - маса еквівалента Me; m - маса гранул в г, A - показник адсорбції, мг / г.

Мікрогранули були витягнуті після 24 годин перебування в розчинах з концентрацією ZnSO_4 0.2н та CuSO_4 0.2н, висушені до постійної маси і зважені для розрахунку показника адсорбції іонів Zn^{2+} та Cu^{2+} та на суху речовину. Надалі насичені цинком гранули, занурювали в фізрозчин (0,9 % NaCl) і досліджували їх здатність їх до десорбції іонів цинку. Досліди проводили без перемішування при температурі (20°C) при співвідношенні рідкої і твердої фази (10:1). Проби фільтрату для аналізу відбирали через кожну годину протягом 6 годин.

Для характеристики швидкості адсорбції досліджували графічну залежність показника адсорбції (маса (мг) адсорбованих іонів Zn^{2+} на 1 г капсул адсорбенту при певній температурі) і тривалості контакту. Процес адсорбції досліджували в ізотермічних умовах і струшуванні суміші. Наважки адсорбентів змішували з маточним розчином цинк сульфату (при співвідношенні твердої і рідкої фази Т:Р = 1:10) з концентраціями іонів Zn^{2+} 0,2 і 0,5 моль-екв/л і термостатували при температурах 289 К і 309 К. Тривалість контакту змінювали від 1 до 24 годин. Суспензію фільтрували і визначали вміст іонів цинку в фільтраті методом комплексометричного титрування відповідно до стандартної методики.

РОЗДІЛ 3. ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Морфологія отриманих гранул досліджена методами оптичної та растрової електронної мікроскопії. Загальний вигляд мікрогранул зразку 2 а в розчині (Рис. 4 а) та після фільтрування (Рис. 4 б) представлені нижче.

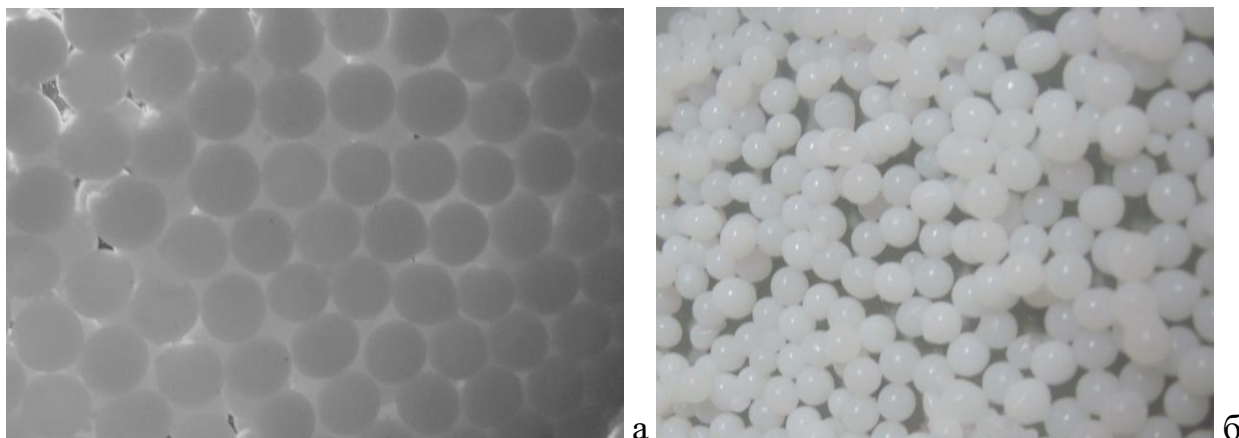


Рис. 4. Сформовані в 0,2 Н розчині CaCl_2 мікрогранули ГА-Альг: а) загальний вигляд в процесі осадження; б) після фільтрування [23].

Після висихання на повітрі розмір отриманих мікрогранул зменшується до 10 разів у залежності від концентрації в них ГА.

На рис. 5. зображено зовнішній вигляд гранул ГА-Альг 1 а та 2 а отриманих у 0,2 н розчині CaCl_2 , досліджений методом оптичної мікроскопії. У випадку 1 а концентрація альгінату менша, гранули мають більший розмір у порівнянні зі зразком 2а. Кожна гранула була розрізана навпіл та методом растрової електронної мікроскопії досліджена поверхня гранул та їх поперечний переріз. Встановлено, що поверхня для обох зразків 1а та 2а отриманих цим методом має звивисту морфологію, завдяки чому збільшується площа поверхні.

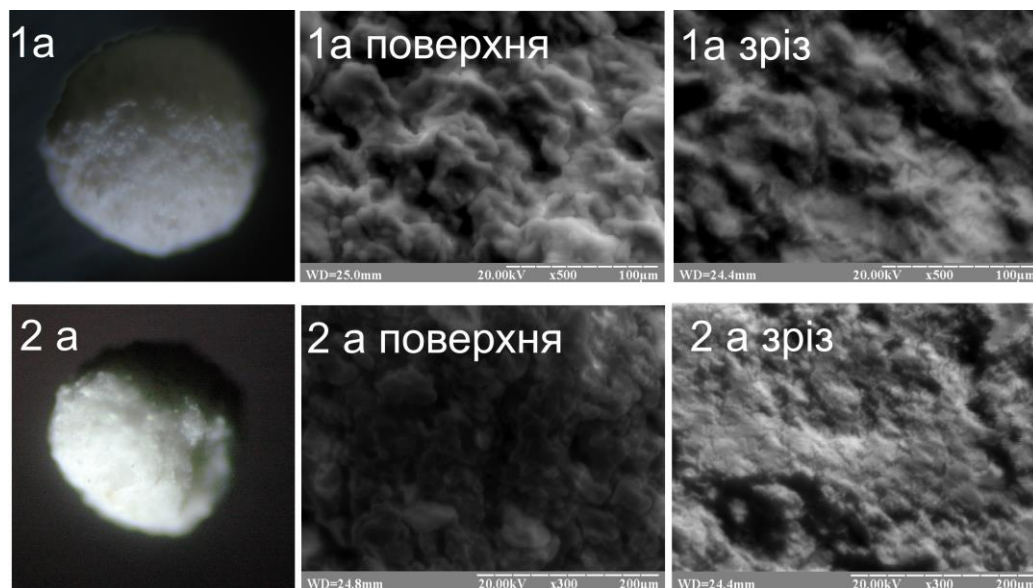


Рис. 5. Зовнішній вигляд гранул 1а та 2а отриманих у 0,2 н розчині CaCl_2 , після старіння в цьому розчині протягом 24 годин, морфологія поверхні та перерізу гранули.

3.1 Дослідження морфології та елементного складу мікрогранул після сорбції йонів Zn^{2+} та Cu^{2+} з водних розчинів

На рис. 6 зображено зовнішній вигляд гранул 1b та 2b отриманих у 0,2 н розчині CaCl_2 , після старіння в 0,2н розчині ZnSO_4 протягом 24 годин. Отримані таким способом гранули також мають звивисту морфологію [18, 23], що сприяє подальшій адсорбції.

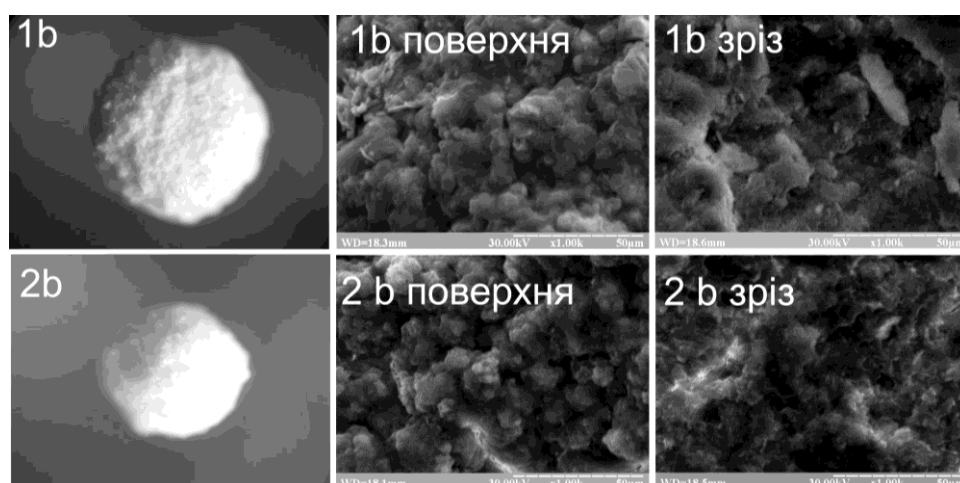


Рис. 6. Зовнішній вигляд гранул 1 b та 2 b отриманих у 0,2 н розчині CaCl_2 , після старіння в 0,2н розчині ZnSO_4 протягом 24 годин, морфологія поверхні та перерізу гранули.

На рис. 7. представлений рентгенівський мікроаналіз зразків 1 b та 2 b. Розраховане співвідношення Ca/P (ат.%)=1,67 і відповідає ГА. Крім того в обох зразках виявлено цинк, що свідчить про його наявність у складі капсул.

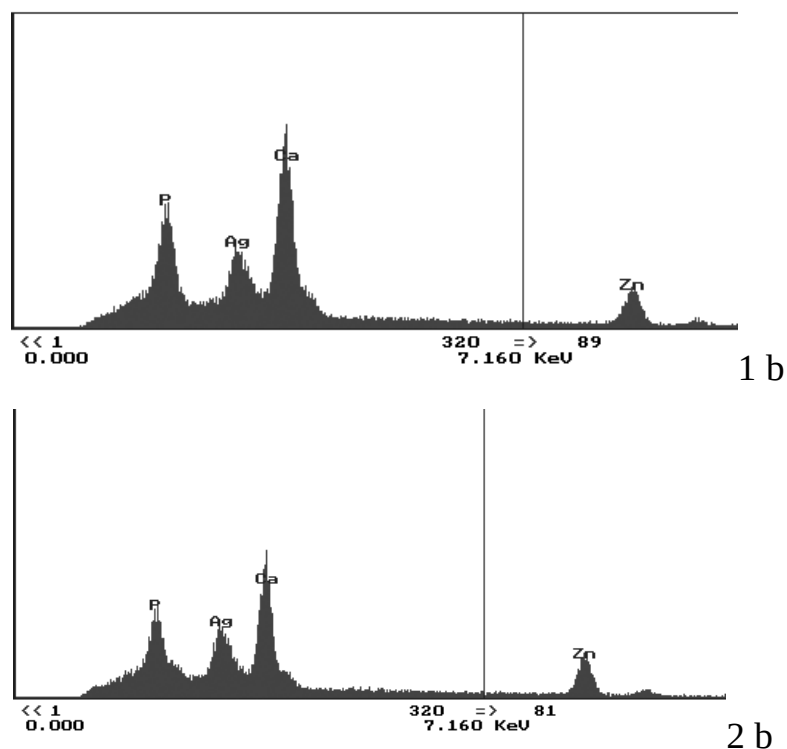


Рис. 7. Рентгенівський мікроаналіз зразків 1 b та 2 b отриманих у 0,2 н розчині CaCl_2 , після старіння в 0,2н розчині ZnSO_4 протягом 24 годин.

Зразки 1с і 2с отримані безпосередньо в 0,2н розчині ZnSO_4 мають схожу морфологію до тих, що представлені на рис. 6, тому не представлені в даній роботі.

На Рис. 8. представлена морфологія та мікроструктура поверхні гранул ГА/Альг отриманих в 0,2 н розчині CaCl_2 (2 а) та мікрогранул з йонами Cu^{2+} (зразки 1 d, 2 d, 1 е, 2 е). Після адсорбції йонів міді гранули ГА/Альг мають більш шорсткувату поверхню, ніж мікрогранули отримані в розчині CaCl_2 (1 а, 2 а). Розраховане на основі даних мікроаналізу співвідношення Ca/P (1,67 ат.%), відповідає ГА [24]. Наявність піку міді вказує на її присутність в одержаному матеріалі (Рис.8.)

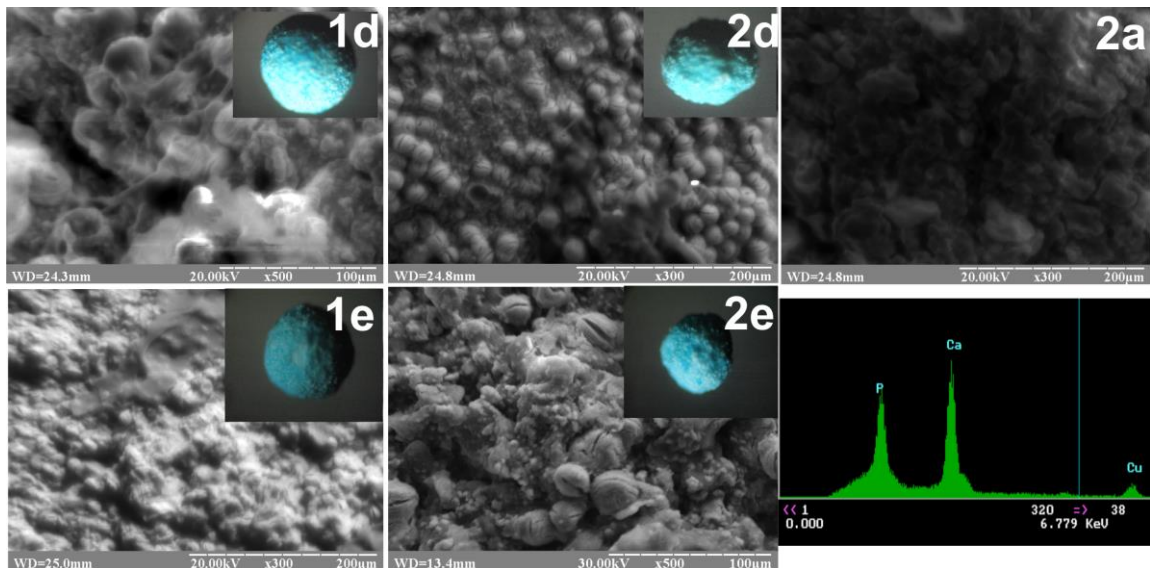


Рис. 8. Морфологія поверхні зразків ГА/Альг отриманих в 0,2 н розчині CaCl_2 (2 а); ГА/Альг отриманих в розчині CaCl_2 та занурених в 0,2 М розчин CuSO_4 (1 d, 2 d); ГА/Альг отриманих безпосередньо в 0,2 М розчині CuSO_4 (1 е, 2 е). Рентгенівський спектр зразку 2 е [24].

3. 2. Дослідження фазового складу мікрогранул

Методом рентгенівської дифрактометрії встановлено, що фазовий склад мікрогранул представлений гідроксиапатитом і аморфним альгінатом (Рис. 9).

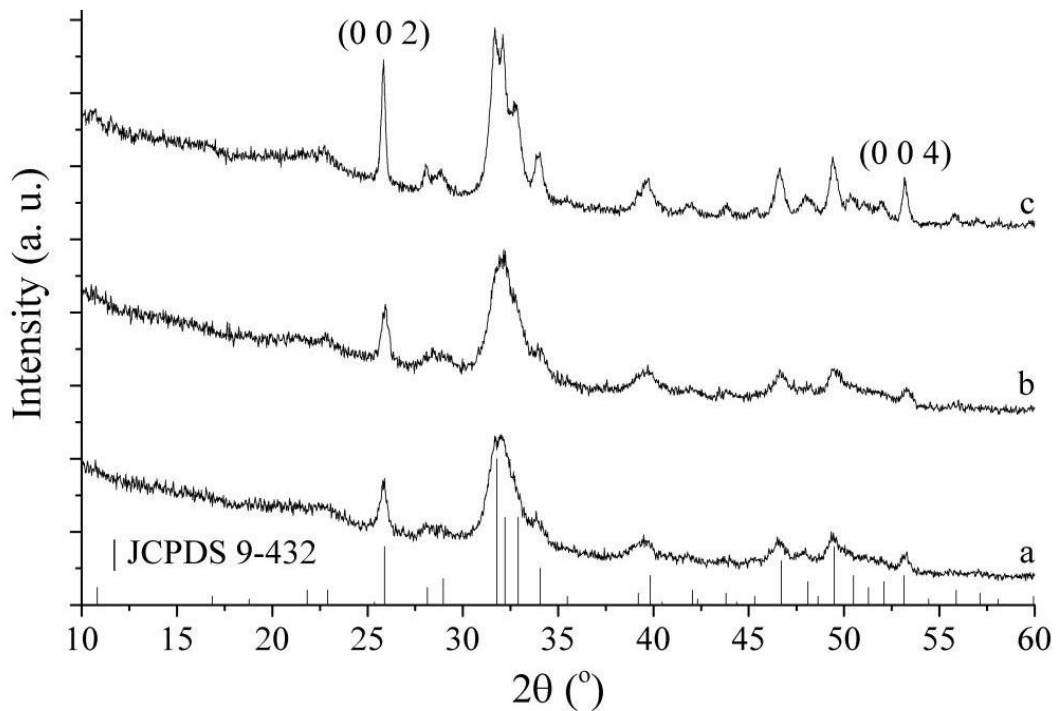


Рис. 9. Дифрактограми зразків отриманих в 0,2 н розчині CaCl_2 : а) зразок 1 а, б) зразок 2 а, с) ГА.

3. 3. Дослідження поверхневої активності мікрогранул

3.3.1. Дослідження сорбційних властивостей отриманих мікрогранул щодо іонів Zn^{2+}

Вміст цинку визначено методом атомно адсорбційної спектроскопії і титриметричним аналізом з використанням ЕДТА [23].

Таблиця 1

Результати вимірювань вмісту Zn методом ААС

Концентрація		
Назва зразку	$C_n(\text{Zn}), \text{H}$	СКВ (%)
1 с	$0,038 \pm 0,002$	3
2 с	$0,034 \pm 0,002$	2
1 б	$0,018 \pm 0,003$	10
2 б	$0,010 \pm 0,001$	5

Вплив вмісту альгінату на адсорбційно-десорбційні показники гранул

Мікрогранули були витягнуті після 24 годин перебування в розчині з концентрацією ZnSO_4 0.2н, висушені до постійної маси і зважені для розрахунку показника адсорбції іонів Zn^{2+} на суху речовину [23]. Надалі ці насичені цинком гранули, поміщали в дистильовану воду і досліджували на здатність їх до десорбції іонів цинку. Досліди проводили без перемішування при температурі (20°C) при співвідношенні рідкої і твердої фази (10:1). Проби фільтрату для аналізу відбирали через кожну годину протягом 6 годин. Результати наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Сорбційні властивості отриманих мікрогранул

	1 б	2 б
Вміст Zn^{2+} у фільтраті по даним	$0,018 \pm 0,003$	$0,010 \pm 0,001$

ААС, Сн (Zn^{2+}), моль/л			
Показник адсорбції для сухих гранул через 24 години, мг/г		77,66	49,28
Показник десорбції, мг/г	Час десорбції	0,08	0,03
	2 години		
	4 години		
	6 годин		

Найбільший показник адсорбції характерний для зразка 1 б, це можна пояснити тим, що даний зразок має у своєму складі менший відсотковий вміст альгілату (0.5%) в порівнянні з зразком 2 б (0.75%), його оболонка істотно тонше і вільно пропускає іони Zn^{2+} , які адсорбуються гідроксиапатитом. Альгілат в цьому випадку зв'язується лише з певною кількістю іонів Zn^{2+} , що обумовлено обмеженою кількістю активних центрів ($-COO^-$ - груп) у його молекулах.

Крім того радіус іона Zn менше ніж Ca, внаслідок чого він ефективніше зв'язується з альгілатом.

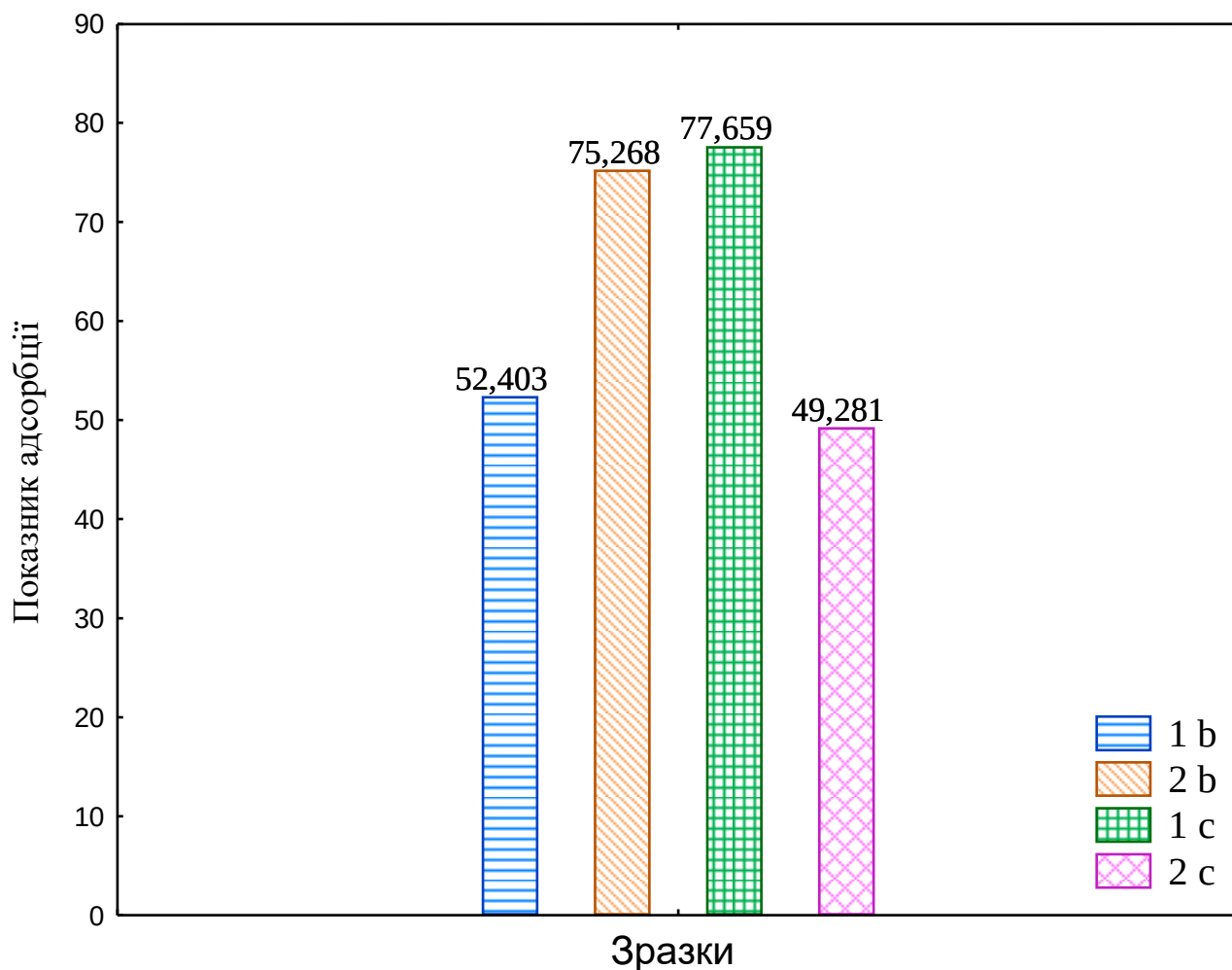


Рис.10. Поглинання іонів Zn^{2+} з водних розчинів мікрогранулами ГА-Альг отриманими різним шляхом синтезу (зразки 1 b, 2 b, 1 c, 2 c).

Результати дослідження десорбції іонів Zn^{2+} показали зворотну залежність. Зразки з найбільшим показником адсорбції 1 b мають найбільші показники десорбції, при цьому найбільша кількість іонів Zn^{2+} виходить за 2 години, через 4 години менше на 0.01.

Збільшення показника десорбції у випадку 1 b можна пояснити тим, що він адсорбував більше іонів Zn^{2+} , а значить і десорбує значно більшу кількість, оскільки концентрація цинку в ньому вища ніж у зразку 2 b.

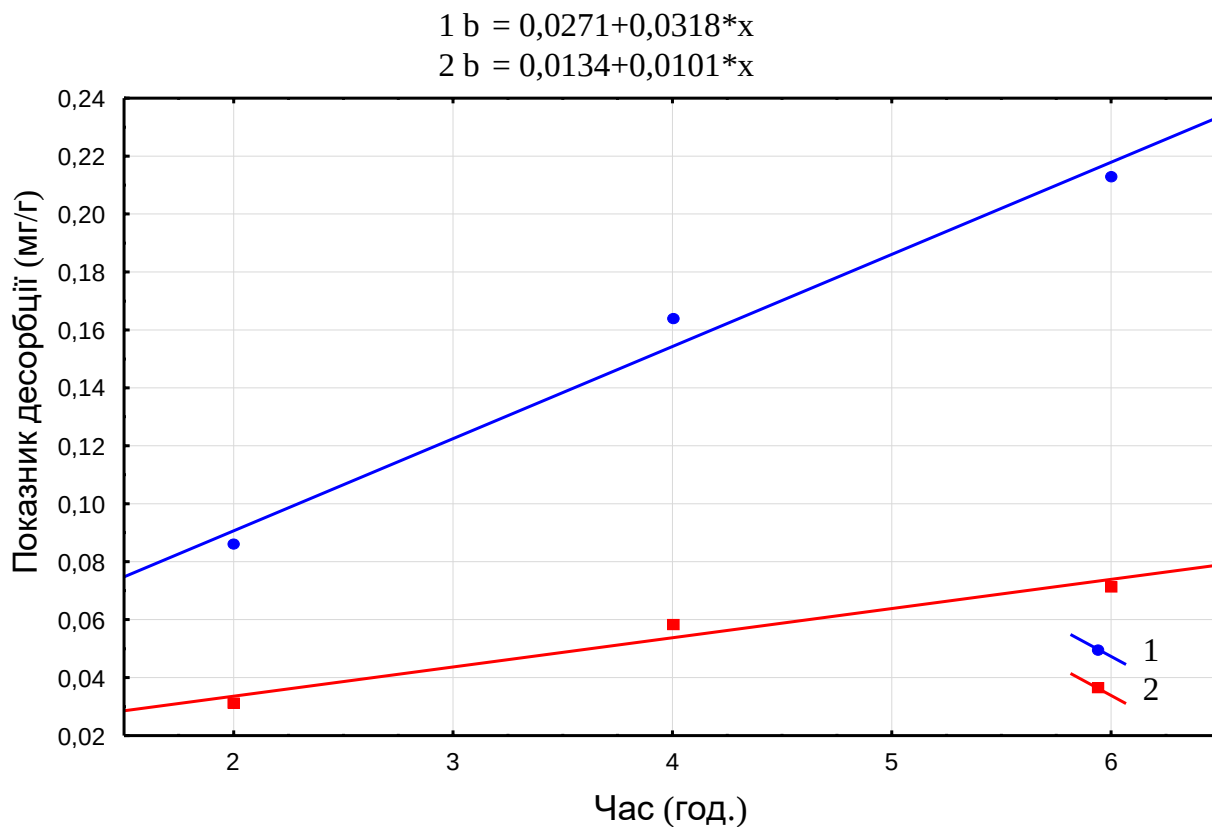


Рис. 10. Залежність показника десорбції йонів Zn^{2+} для мікрогранул, отриманих в розчині $CaCl_2$ після адсорбції йонів Zn^{2+} з 0.2 Н розчину $ZnSO_4$ протягом 24 годин (1 b, 2 b) [19].

Вплив температури та концентрації розчину адсорбату ($ZnSO_4$) на адсорбційну здатність гранул

Дані, наведені в таблиці 3 показують, що на швидкість адсорбції впливає температура та концентрація іонів цинку в розчині.

Таблиця 3.

Показники адсорбції іонів Zn^{2+} з розчину на капсулах ГА

Т, К	Час, год.	Концентрація йонів Zn^{2+} $C_{Zn^{2+}}^0$ у вихідному розчині, моль-екв/л	Концентрація Zn^{2+} $C_{Zn^{2+}}$ у фільтраті після адсорбції, моль-екв/л		Показник адсорбції йонів цинку капсулами ГА, мг/г	
			Зразки капсул		Зразки капсул	
			№1	№2	№1	№2

289	1	0,20	0,123	0,123	5,04	5,04
	2	0,20	0,116	0,116	10,08	10,08
	3	0,20	0,103	0,113	20,16	12,60
	12	0,20	0,053	0,052	59,46	59,96
	24	0,20	0,052	0,052	60,47	60,47
309	1	0,20	0,101	0,102	22,17	21,16
	2	0,20	0,076	0,081	41,32	37,79
	3	0,20	0,071	0,078	45,35	39,81
	12	0,20	0,042	0,046	68,02	65,00
	24	0,20	0,039	0,042	70,54	68,02
309	1	0,50	0,268	0,271	42,83	40,31
	2	0,50	0,232	0,239	70,54	65,50
	3	0,50	0,206	0,219	90,70	80,62
	12	0,50	0,158	0,161	128,49	125,97
	24	0,50	0,158	0,158	128,49	128,49

Після завершення процесу і настання рівноваги в системі через 24 години розбіжності практично відсутні. Даний факт свідчить про домінування гідроксиапатиту як адсорбенту в складі капсул і про його першорядну роль в даному процесі. У адсорбенті №1 - міститься 0,44% альгілату, в адсорбенті №2, міститься 1,124% альгілату.

З представлених в таблиці даних випливає, що на швидкість адсорбції істотно впливає температура [18]. На одному і тому ж адсорбенті при постійній концентрації іонів цинку в розчині показник адсорбції зростає в 3-4 рази при збільшенні температури на 20°C.

На графіку (Рис. 11) представлена залежність усереднених значень показника адсорбції іонів Zn^{2+} капсулами при різному часі контакту.

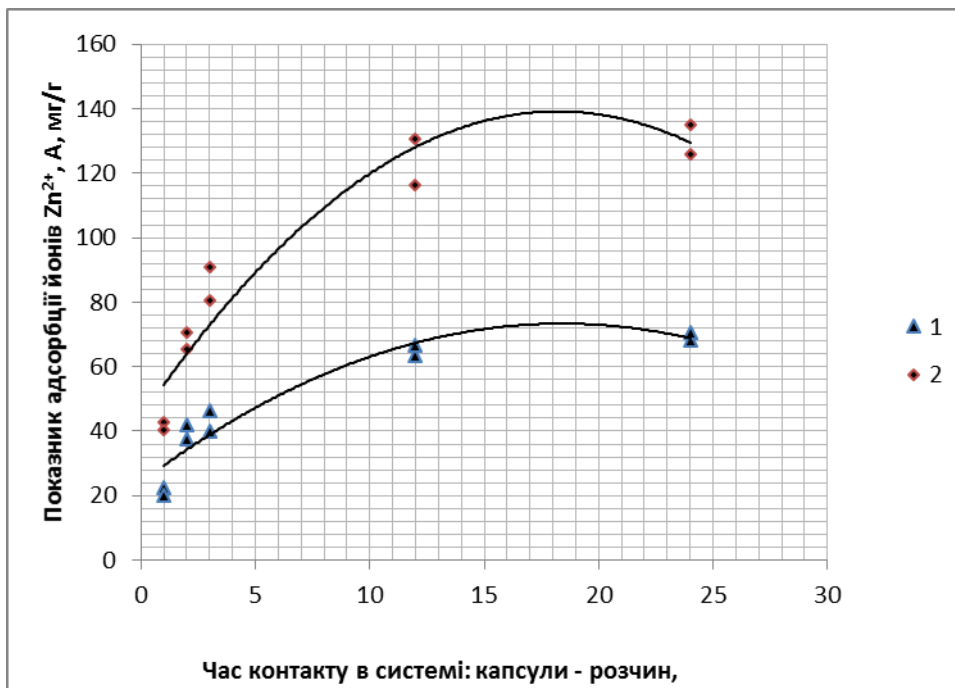


Рис 11. Залежність показника адсорбції йонів Zn^{2+} капсулами ГА при температурі 309 К з розчинів з різними вихідними концентраціями Zn^{2+} :
(крива 1- 0,2 моль-екв/л; крива 2 - 0,5 моль-екв/л).

Як видно з представлених залежностей до 12 години настає практично повне насичення гранул йонами Zn^{2+} . При цьому максимальне значення показника адсорбції перевищує 120 мг іонів цинку на 1 г капсул гідроксиapatиту, що свідчить про досить високу адсорбційну ємність гідроксиapatиту в гранульованій формі адсорбенту [18].

Деякі дослідження, присвячені механізму взаємодії йонів Zn^{2+} з ГА, вказують на можливий іонообмінний характер [25]. Гідроксиapatит відомий своєю здатністю іммобілізувати величезну кількість іонів металів як завдяки реакціям іонного обміну на поверхні, так і співосадження малорозчинних фаз фосфатів металів. На думку авторів [26, 27] адсорбція іонів цинку пов'язана зі взаємодією з поверхневими Р-ОН групами гідроксиapatиту, що супроводжується витісненням протонів H^+ . Для підтвердження даного процесу на капсулах ГА був проведений контроль рН розчинів, до і після адсорбції [18]. Зауважимо, що спочатку гідроксиapatит був промитий до нейтрального середовища, а вихідний розчин $ZnSO_4$ з концентрацією 0,2 моль-екв./л мав рН =

5,69. Приготована суспензія з розчину ZnSO_4 і ГА вже через 10 хв після інтенсивного перемішування мала $\text{pH} = 5,13$. Через годину контакту pH суспензії змінився незначно і відповідав $\text{pH} = 5,07$. Тенденції в зміні pH представлені на Рис.12.

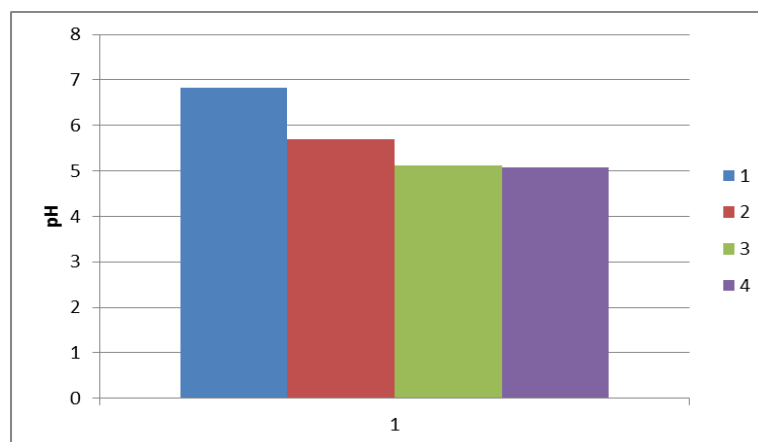


Рис 12. Показники кислотності середовища вихідного розчину солі, водної суспензії ГА і фільтратів після закінчення адсорбції (1 - pH водної суспензії ГА; 2 - pH розчину ZnSO_4 ($C_N = 0,2$ моль-екв / л); 3 - pH фільтрату через 10 хв адсорбції; 4 - pH фільтрату через 60 хв адсорбції.

Таким чином, як впливає з даних pH на Рис.12, при адсорбції іонів цинку капсулами ГА дійсно спостерігається деяке підкислення розчинів. Концентрація H^+ збільшується з $2,04 \cdot 10^{-6}$ в вихідному розчині сульфату цинку ($\text{pH} = 5,69$) до $8,51 \cdot 10^{-6}$ в фільтраті після адсорбції ($\text{pH} = 5,07$), що відповідає збільшенню іонів водню в 4 рази. Ці дослідження свідчать, що сорбція йонів Zn^{2+} призводить до вивільнення протона з поверхні $\equiv\text{POH}$ вузлів ГА в водний розчин. Це дає підставу говорити про поверхневий іонообмінний процес за участю іонів водню.

У процесі вивчення механізму процесу поглинання іонів Zn^{2+} капсулами на основі ГА в оболонці альгінату, встановлено, що вміст альгінату не впливає суттєво на адсорбційну ємність капсул. Отже, майже весь процес відбувається на поверхні гідроксиapatиту і пов'язаний з можливим проникненням даних іонів в його структуру.

Значний вплив на швидкість адсорбції іонів цинку капсулами гідроксиapatиту має температура [18]. При збільшенні температури на 20°C

швидкість процесу зростає в 3-4 рази. Це підтверджує хімічний характер досліджуваних процесів. Однак температура не збільшує адсорбційну ємність капсул і при однакових вихідних концентраціях показники адсорбції іонів цинку мають близькі значення. Максимальна адсорбційна ємність капсул по відношенню до іонів цинку більше 120 мг/г [18].

3.3.2. Дослідження сорбційних властивостей отриманих мікрогранул щодо йонів Cu^{2+}

Після 24 годинного занурення мікрогранул, розчин був профільтований і визначена концентрація йонів Cu^{2+} методом ААС. Для зразків 1 d і 2 d концентрація фільтрату була однаковою 24 ммоль/л. У випадку зразків 1 e і 2 e вона склала 19 і 21 ммоль/л відповідно. Отже, оболонка альгінату не має достатнього внеску в адсорбційну ємність отриманих мікросфер [24].

Експериментальні результати швидкості адсорбції при постійній концентрації іонів Cu^{2+} у розчині представлені в табл. 4 і рис. 13.

Таблиця 4.

Результати експериментальних досліджень адсорбції іонів міді капсулами ГА.

№ зразка	m капсул, г	Температура, °C	Час, хв.	C Cu^{2+} ммоль/л	A мг/г
1	0,5015	50	5	95	3,2
2	0,502	50	15	73	17,2
3	0,5	50	40	67	21,1
4	0,5005	50	60	58	26,9
5	0,5015	50	720	23	49,1
6	0,5025	50	1440	16	53,5
7	0,5015	22	5	98	1,3
8	0,502	22	15	86	8,9
9	0,5	22	40	77	14,7
10	0,5005	22	60	78	14,1
11	0,5015	22	720	28	45,9
12	0,5025	22	1440	23	49,0

Наведені дані (табл. 4) довели той факт, що температура впливає на швидкість адсорбції [24].

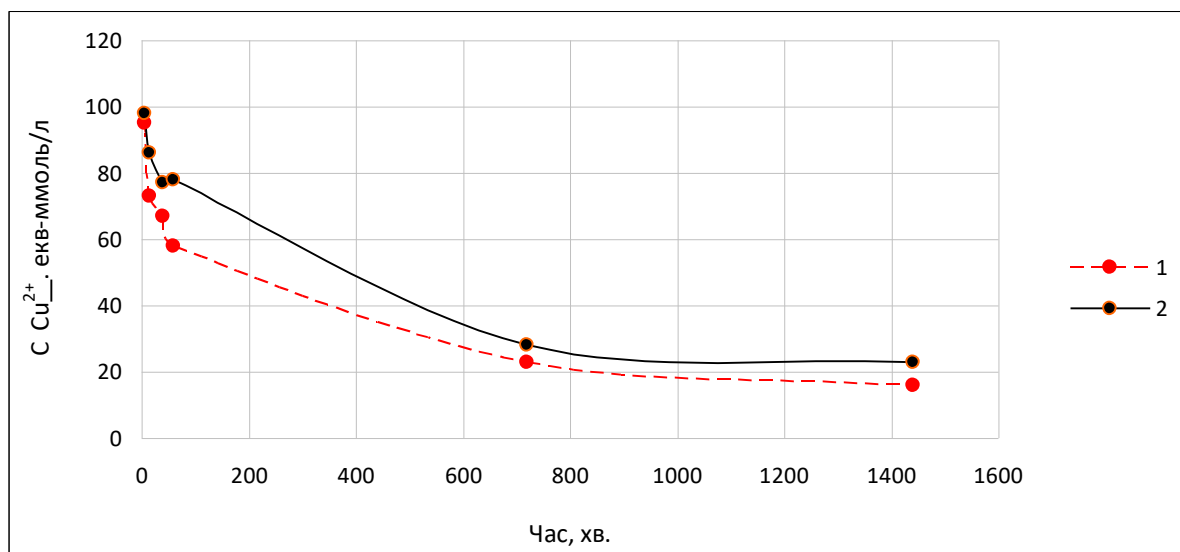


Рис 13. Вплив температури на зменшення вмісту іонів міді в маточному розчині за рахунок адсорбції їх мікрогранулами ГА/Альг з C^0 - вихідною концентрацією Cu^{2+} 100 ммоль/л: 1 - швидкість адсорбції іонів Cu^{2+} при 50 °C; 2 - швидкість адсорбції іонів Cu^{2+} при 22°C.

Показник адсорбції одного й того самого адсорбенту збільшується з підвищенням температури при однаковій початковій концентрації йонів Cu^{2+} у розчині [24]. Це можна було помітити переважно на перших етапах адсорбції (рис.13).

Як впливає з даних, наведених у таблиці 4, зменшення вмісту іонів Cu^{2+} у фільтраті за рахунок процесів адсорбції є більш інтенсивним при більш високій температурі (рис. 13 крива 1)

Як показано на Рис. 14 при тривалому контакті розчину з адсорбентами підвищення температури незначно збільшує показник адсорбції йонів Cu^{2+} капсулами ГА (А, мг/г). Це свідчить про настання насичення поверхні адсорбенту, і в цьому випадку температура, збільшуючи швидкість цього процесу, мало впливає на адсорбційну ємність ГА і є наслідком насичення енергетично неоднорідних, активних ділянок на поверхні капсул іонами міді.

Показник адсорбції йонів Cu^{2+} капсулами ГА не перевищує 60 мг/г (Рис 14). Невисокі значення показника адсорбції пов'язані з деякими особливостями процесу інкорпорації даного йона поверхнею адсорбенту [24].

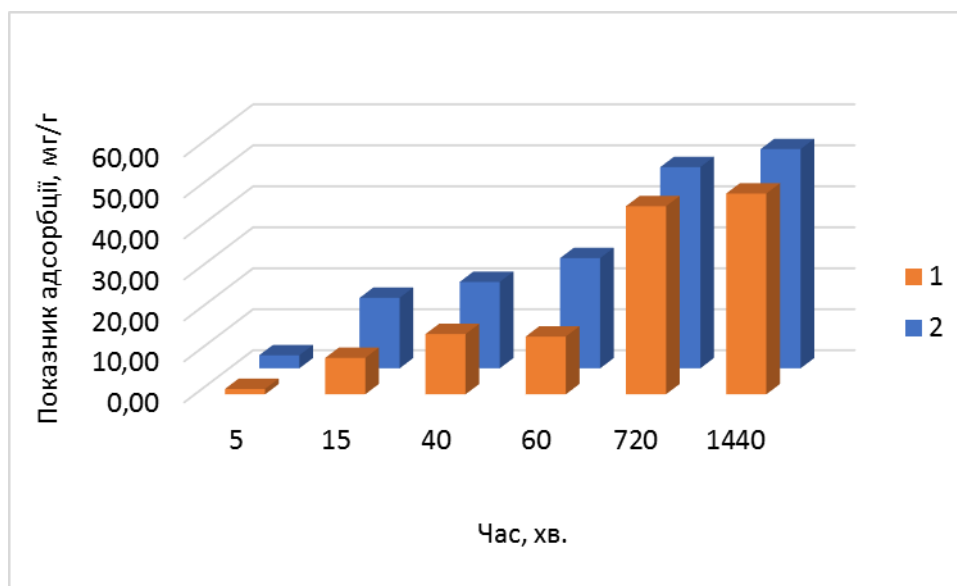


Рис. 14. Залежність показника адсорбції йонів Cu^{2+} капсулами ГА при температурах 22°C (ряд 1) і 50°C (ряд 2).

Гідроксиапатит є основною фазою отриманих композитних матеріалів, і робить основний внесок у процес сорбції йонів Cu^{2+} у порівнянні з альгінатом натрію. Температура, що збільшує швидкість процесу адсорбції, має незначний вплив на адсорбційну ємність гідроксиапатиту через насичення енергетично гетерогенних активних ділянок на поверхні мікрогранул йонами Cu^{2+} . Показник адсорбції мікрогранул ГА/Альг йонів Cu^{2+} не перевищує 60 мг/г.

В якості полімерної складової можна використовувати альгінат натрію в поєднанні з желатином, використовуючи різні співвідношення таких компонентів [28]. Вищевказані компоненти зберігають свої властивості при поєднанні їх з гідроксиапатитом. Перспективним є збагачення гранульованих матеріалів ГА/Альг йонами Mg^{2+} , які можуть вивільнятися у міжклітинну рідину, сприяючи тим самим формуванню кісткової тканини [29]. Крім того можна робити біоматеріали збагачені наночастинками срібла, що також є надзвичайно перспективним [30].

Отримані результати при вивченні сорбційної активності можуть бути використані при синтезі гранульованих матеріалів біомедичного призначення.

3.4. Дослідження біосумісності та антибактеріальних властивостей отриманих матеріалів

3.4.1. Дослідження антибактеріальних властивостей

Антибактеріальна активність отриманих гранул досліджена відносно різних груп мікроорганізмів за стандартною методикою [24]. Зразки 1b, 2b, 1c, 2c, 1d і 2d, викликали пригнічення життєдіяльності *S. aureus* та *E. coli* (мінімальна інгібуюча концентрація МІК). Зразки 1a, 2a, що мають у своєму складі лише альгінат та гідроксиапатит і зразки 1e, 2e не проявляють антибактеріальних властивостей відносно зазначених мікроорганізмів. Ні один з зразків не показав інгібуючої дії відносно *P. Aeruginosae*, що можливо пов'язано з недостатньою концентрацією йонів металів для дії на дані колонії.

Таблиця 5. Антибактеріальна активність мікрогранул ГА/Альг проти різних видів бактерій

	<i>E. Coli</i> (г)	<i>P. Aeruginosae</i> (г)	<i>S.Aureus</i> (г)
1a	0.0069	0.0064	0.0066
2a	0.0072	0.0066	0.0061
1b	0.0064	0.0067	0.0064
2b	0.0065	0.0070	0.0067
1c	0.0076	0.0064	0.0071
2c	0.0066	0.0072	0.0070
1d	0.0066	0.0067	0.0060
2d	0.0065	0.0072	0.0074
1e	0.0069	0.0064	0.0067
2e	0.0073	0.0066	0.0061

3.4.2. Дослідження антибактеріальних властивостей

Гістологічне дослідження кісткової тканини щурів на 24 добу після імплантації зразку 1 с представлено на рис. 15.

На 24 добу після імплантації дефект був представлений на периферії новоутвореною кістковою тканиною та в центральному відділі дефект був заповнений кістковим мозком і кістковою тканиною різного ступеня зрілості.

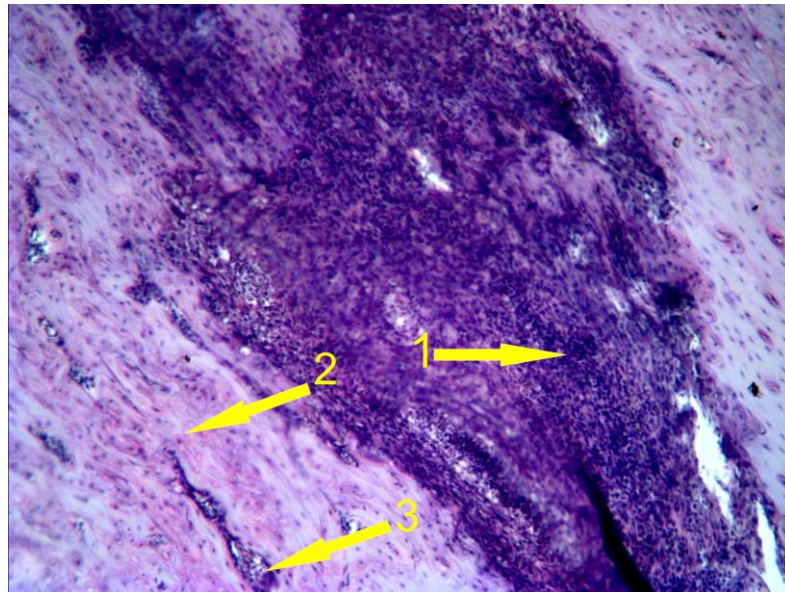


Рис.15. Морфологія місця імплантації матеріалу зразку 1с на 24 добу: 1 – кістковий мозок, 2 – новоутворена кісткова тканина, 3 – конус ремоделювання

Імплантат на 24 добу був повністю резорбований, що характеризує його біосумісність та здатність до біорезорбції.

ВИСНОВКИ

Головні досягнення даної роботи наступні:

1. Отримано гранульовані матеріали на основі гідроксиапатиту та біополімеру – альгінату натрію, запропоновано оптимальні концентрації реагентів та підібрані умови їх одержання.
2. Досліджено основні характеристики отриманих мікрогранул: морфологія, фазовий склад, елементний склад, поверхнева активність за допомогою сучасних методів аналізу.
3. Знайдені показники адсорбції та десорбції отриманих гранул по відношенню до іонів Zn^{2+} та Cu^{2+} , що може бути використано при синтезі гранул із заданими параметрами для використання в якості біоматеріалів.
4. Встановлено, що процес прискорюється при підвищенні температури, що пов'язано із хімічним характером взаємодії між капсулами ГА і іонами металів в розчині. Інкорпорація іонів цинку призводить до вивільнення протона з поверхні $\equiv ROH$ вузлів ГА в водний розчин. Це дає підставу говорити про поверхневий іонообмінний процес за участю іонів водню. Про це свідчить зміна рН фільтрату після адсорбції.
5. Проведено дослідження антибактеріальних властивостей та біосумісності отриманих матеріалів. Практично всі зразки проявили антибактеріальну активність. Показано, що на 24 добу імплантований матеріал резорбується і на його місці формується нова тканина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zethraeus N., Borgstorm F., Strom O., KAnis J., Jonsson B., Cost-effectiveness of the treatment and prevention of osteoporosis – a review of the literature and a references model, *Osteoporosis International*. 18 (2007) 9–23.
2. C. Rey, C. Combes, C. Drouet, M.J. Glimcher, Bone mineral: update on chemical composition and structure, *Osteoporosis International*. 20 (6) (2009) 1013–1021.
3. Kikuchi M., Ikoma T., Itoh S., Matsumoto H.N., Koyata Y. et al., Biomimetic synthesis of bone like nanocomposites using the self organization mechanism of hydroxyapatite and collagen, *Composite Science and Technology*. 64 (2004) 819–825.].
4. Zhang J., Wang Q., Wang A. In situ generation of sodium alginate/hydroxyapatite nanocomposite beads as drug-controlled release matrices. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 445–454.
5. Kaplan D.L., Wiley B.J., Mayer J.M., Arcidiacono S., Keith J., Lombardi S.J., et al. Biosynthetic polysaccharides. In: Shalaby S.W., editor. *Biomedical polymers*. New York: Hanser; 1994. p. 189–212.
6. Babaei Z., Jahanshahi M., Rabiee S.M., The fabrication of nanocomposites via calcium phosphate formation on gelatin–chitosan network and the gelatin influence on the properties of biphasic composites, *Materials Science and Engineering C*. 33 (2013) 370–375.
7. Pek Y.S., Gao S., Arshad M.S.M., Leck K.J., Ying J.Y. Porous collagen–apatite nanocomposite foams as bone regeneration scaffolds, *Biomaterials*. 29 (2008) 4300–4305.
8. Gotoh T., Matsushima K., Kikuchi K.I. Preparation of alginate–chitosan hybrid gel beads and adsorption of divalent metal ions, *Chemosphere* 55 (2004) 135.
9. Giannoudis P.V., Dinopoulos H., Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 36 (2005) 20–37.
10. Tardei Christu & Simonescu, Claudia Maria & Onose, Cristian & Sava et al. Evaluation of lab scale nano-hydroxyapatites for removal of lead ions from

- aqueous solutions. *Revista Romana de materiale (Romanian journal of materials)* 46 (2016) 289 – 295.
11. Venkatesan J., Bhatnagar I., Manivasagan P., Kang K.-H., Kim S.-K. Alginate composites for bone tissue engineering: A review, *International Journal of Biological Macromolecules* 72 (2015) 269-281.
 12. Zhang J., Wang Q., Wang A., In situ generation of sodium alginate/hydroxyapatite nanocomposite beads as drug-controlled release matrices. / *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 445-454.
 13. Xie M., Olderøy M. Ø., Andreassen J.-P., Selbach S. M., Strand B. L., Sikorski P. Alginate-controlled formation of nanoscale calcium carbonate and hydroxyapatite mineral phase within hydrogel networks / *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 3665-3675.
 14. Bernhardt A., Dittrich R., Lode A., Despang F., Gelinsky M. Nanocrystalline spherical hydroxyapatite granules for bone repair: in vitro evaluation with osteoblast-like cells and osteoclasts. / *J Mater Sci: Mater Med* 24 (2013) 1755-1766.
 15. Ribeiro C.C., Barrias C.C., Barbosa M.A. Preparation and characterisation of calcium-phosphate porous microspheres with a uniform size for biomedical applications. / *J. Mater Sci Mater Med*. 17 (2006) 455-63.
 16. Mateus A.Y., Barrias C.C., Ribeiro C., Ferraz M.P., Monteiro F.J. Comparative study of nanohydroxyapatite microspheres for medical applications. / *J. Biomed Mater Res A*. 86 (2008) 483-93.
 17. Siddhesh N. Pawar, Kevin J. Edgar Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. Review / *Biomaterials* 33 (2012) 3279-3305.
 18. Большанина С.Б., Яновская А.А., Кузнецов В.Н., Рогульский Ю.В., Станиславов А.С., Ильяшенко В.Ю., Сони А.К. Адсорбция ионов цинка капсулами гидроксипатита в альгинатной оболочке. Изучение кинетики *Науково-виробничий журнал "Хімічна промисловість України" № 2 (133), 2016, с. 3-11.*

19. Яновська Г.О., Большаніна С.Б., Моспан А.Б. Нитчасті та гранульовані форми біоматеріалів збагачених Zn^{2+} / Системи розроблення та поставлення продукції на виробництво. Матеріали I Міжнародної науково-практичної конференції (м. Суми, 17-20 травня 2016 р.) – Суми : Сумський державний університет, 2016. – С. 260-261
20. Моспан А.Б., Семененко Р.В., Яновська Г.О. Синтез нитчастих біоматеріалів на основі альгінату та гідроксиапатиту з додаванням іонів цинку / Сучасні технології у промисловому виробництві. Матеріали та програма IV Всеукраїнської міжвузівської науково-технічної конференції (м. Суми, 19-22 квітня 2016 р.) – Суми : Сумський Державний Університет, 2016. – Ч. 2. – С. 124
21. Спектрофотометр атомно-абсорбційний С-115-М1. Техническое описание и инструкция по эксплуатации: 2.851.034-04 ТО СССР М.: Внешторгиздат, 1989. – 47с.
22. Основы аналитической химии. Практическое руководство. Под ред. акад. Ю.А. Золотова. М.: Высшая школа, 2003. – 463с.
23. Моспан А.Б., Яновська Г. О. Синтез сучасних матеріалів на основі біополімерів і гідроксиапатиту / Перший крок у науку. Матеріали VII студентської конференції (Суми, 20 грудня 2015 р.) – Суми : Сумський Державний Університет, 2015. – С. 113-114.
24. A.A. Yanovska, S.B. Bolshanina, A.S. Stanislavov, V.N. Kuznetsov, A.B. Mospan, V.Yu. Illiashenko, Yu.V. Rogulsky, Ya.V. Trofimenko, S.N. Danilchenko Synthesis and characterization of Copper-loaded hydroxyapatite-alginate microspheres / Chemistry, Physics and Technology of Surface. 2017. V. 8. N 4. P. 400-409.
25. Matsunaga, H. Murata, T. Mizoguchi, A. Nakahira Mechanism of incorporation of zinc into hydroxyapatite. Acta Biomaterialia 6 (2010) 2289-2293.
26. B. Sandrine, N. Angea, B. Didier, C. Eric, S. Patrick, Removal of aqueous lead ions by hydroxyapatite: equilibria and kinetic process. J. Hazard. Mater. 139 (2007) 443-446.

- 27.Y. Xu, F.W. Schwartz, S.J. Traina, Sorption of Zn^{2+} and Cd^{2+} on hydroxyapatite surfaces, Environ. Sci. Technol. 28 (1994) 1472-1480.
- 28.Мосьпан А.Б., Яновська Г. О. Синтез, структура та властивості композитних матеріалів на основі карбонат апатиту та желатину / Наукова Україна. Збірник матеріалів Всеукраїнської студентської наукової конференції з міжнародною участю 25 травня 2015 р. – Дніпропетровськ: «SeKum Software», 2015. – С. 715-716.
- 29.Мосьпан А.Б., Яновська Г.О. Синтез гранульованих біоматеріалів на основі альгінату та гідроксиapatиту з додаванням іонів магнію / Сучасні технології у промисловому виробництві. Матеріали науково-технічної конференції викладачів, співробітників, аспірантів і студентів факультету технічних систем і енергоефективних технологій (м. Суми, 18-21 квітня 2017 р.) – Суми : Сумський Державний Університет, 2017. – Ч. 1. – С. 130-131
- 30.Kolmas J., Groszyk E., Kwiatkowska-Róhyska D., Substituted Hydroxyapatites with Antibacterial Properties. Review Article. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2014, Article ID 178123, 15 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/178123>.