

EDN: VYTUKT

УДК 546.05:548.5

## Physico-Chemical Properties of a Composite Material Based on a Mixture of Calcium Phosphates and Hyaluronic Acid

**Anna A. Tsyganova\*** and **Olga A. Golovanova**  
*Dostoevsky Omsk State University*  
*Omsk, Russian Federation*

Received 03.08.2023, received in revised form 27.10.2023, accepted 30.10.2023

**Abstract.** Composites based on a mixture of calcium phosphates and hyaluronic acid (HA) have been synthesized, the properties of which can be adjusted by varying the filler/matrix ratio and the drying temperature, which makes it possible to consider the obtained materials promising for use in medicine. We investigated their composition, morphology, and dynamic dissolution behavior. The addition of a powder material to the matrix hyaluronic acid causes no changes in its composition, but increases resorption rate of the sample. We have optimized the synthesis conditions of the composite: the filler/matrix ratio and the drying temperature and time.

**Keywords:** composite material, a mixture of calcium phosphates, hyaluronic acid, dynamic dissolution.

**Acknowledgements.** The research was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation («Conducting fundamental scientific research and exploratory scientific research by small individual scientific groups», № 23–23–00668).

Citation: Tsyganova A. A., Golovanova O. A. Physico-chemical properties of a composite material based on a mixture of calcium phosphates and hyaluronic acid. J. Sib. Fed. Univ. Chem., 2023, 16(4), 608–617. EDN: VYTUKT



## **Физико-химические свойства композиционного материала на основе смеси фосфатов кальция и гиалуроновой кислоты**

**А. А. Цыганова, О. А. Голованова**  
*ФГАОУ ВО «ОмГУ им. Ф. М. Достоевского»  
Российская Федерация, Омск*

**Аннотация.** Синтезированы композиты на основе смеси фосфатов кальция и гиалуроновой кислоты (ГК), свойства которых возможно корректировать при помощи варьирования соотношения наполнитель/матрица и температуры сушки, что позволяет считать полученные материалы перспективными для применения в медицине. Изучен состав, морфология образцов и их динамическое растворение. Установлено, что внедрение смеси фосфатов кальция в матрицу ГК не изменяет его состав, однако увеличивает скорость его резорбции. Подобраны оптимальные условия синтеза композиционного материала: соотношение наполнитель/матрица, температура и продолжительность сушки.

**Ключевые слова:** композиционный материал, смесь фосфатов кальция, гиалуроновая кислота, динамическое растворение.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда («Проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований малыми отдельными научными группами», № 23–23–00668).

Цитирование: Цыганова А. А., Голованова О. А. Физико-химические свойства композиционного материала на основе смеси фосфатов кальция и гиалуроновой кислоты. Журн. Сиб. федер. ун-та. Химия, 2023, 16(4). С. 608–617. EDN: VYТУКТ

### **Введение**

Поиск оптимальных материалов для имплантатов, разработка новых медицинских биоком-  
позитов на основе фосфатов кальция и биополимеров являются перспективными направлениями  
научных исследований [1, 2]. Обязательными требованиями, которые предъявляются к подобным  
материалам, являются относительно высокая скорость растворения (сопоставимая со скоростью  
образования новой ткани), активное участие поверхности биоматериала в биохимических реак-  
циях, протекающих на границе имплантат/кость и возможность стерилизации без изменения  
физико-химических свойств [3]. При этом важным принципом при создании биоматериалов, для  
последующего применения в качестве имплантатов для замещения костных дефектов, является  
приближение свойств материалов к характеристикам натуральной кости (состав, морфология,  
структура) [4].

Гидроксиапатит (ГА) – наиболее распространенное соединение для замещения костных  
дефектов, обладает низкой растворимостью, что зачастую приводит к необходимости повторных  
операций из-за нарастания новой кости на поверхности имплантата, в то время как его материал

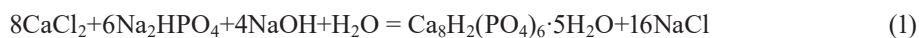
еще не растворился [5, 6]. Это обуславливает необходимость создания материала с оптимальным временем растворения в организме, в частности, применение смесевых вариантов и прекурсоров биологических фосфатов кальция [7]. Помимо этого в последние годы наблюдается повышенный интерес исследователей к такой группе материалов, как биополимеры, которые обладают высокой совместимостью с живыми тканями [8–10]. Многие из них способны образовывать водорастворимые гели, которые возможно отверждать с помощью нагревания, изменения pH, ультрафиолетового излучения или различных добавок [11, 12, 13]. Подобная особенность позволяет изменять физико-химические свойства получаемых биоактивных материалов, включать в их состав клетки, остеоиндукторы и вирусы, что открывает новые возможности для использования на практике. Примером такого соединения является гиалуроновая кислота (ГК). ГК является природным полисахаридом и представляет собой гликозаминогликан, обладающий высокими гигроскопическими свойствами, хорошей биосовместимостью, биологической активностью и другими полезными свойствами [14, 15].

В данной работе внимание уделено композитам в качестве наполнителя, в которых выступает смесь фосфатов кальция (ФК) – гидроксиапатита, являющегося основным компонентом кости, октакальция фосфата и брушита, повышающих резорбируемость фосфатного материала, а матрицей – гиалуроновая кислота.

Целью работы является синтез и изучение физико-химических свойств композиционных материалов на основе смеси фосфатов кальция и гиалуроновой кислоты.

### Экспериментальная часть

На основе литературных данных [16, 17] был выбран способ синтеза смеси фосфатов кальция [18] путем осаждения из водного раствора. Осаждение проводили при температуре 40 °С, pH 6.5 с введением добавки ионов магния в концентрации 12.5 ммоль/л. Добавка Mg<sup>2+</sup> способна ингибировать процесс формирования ФК, что позволяет получать многофазные порошки фосфатов кальция, которые в перспективе могут оказаться более биоактивными и обладать ярко выраженными остеоиндуктивными свойствами [19]. В основе данного способа лежит следующая химическая реакция (1):



Смешивание растворов проводили при температуре 0–5 °С. После вызревания осадка под маточным раствором в течение 48 ч твердую фазу отделяли от раствора фильтрованием, высушивали при температуре ~80 °С до полного удаления химически несвязанной воды.

Для получения композиционного материала в качестве биополимера использовали ГК. Для получения геля ГК использовали высокомолекулярный гиалуронат натрия. Готовили 2 % водный раствор ГК. В полученный гель вводили порошок (смесь фосфатов кальция) в количестве 10, 30, 50 мас.% и интенсивно перемешивали. Вспенивание осуществляли с помощью магнитной мешалки. Пену помещали в тигель и высушивали при температуре 25 или 200 °С.

Фазовый состав полученных образцов исследовали с помощью РФА (дифрактометр D 8 Advance, фирмы Bruker). Съемку рентгеновской дифрактограммы выполняли на порошковом рентгеновском дифрактометре D 8 Advance, фирмы Bruker в CuK<sub>α</sub>-излучении (длина волны

0.15406 нм) с использованием позиционно-чувствительного детектора Lynxeye. Область сканирования  $5^{\circ}$ – $80^{\circ}$ . Идентификация пиков на дифрактограммах проводилась с помощью картотеки JCPDS (гидроксилапатит (ГА) – JCPDS 09–0432, брушит – JCPDS 72–0713, октакальций фосфата (ОКФ) – JCPDS 26–1056) и программных пакетов DifWin 4.0 и Crystallographica Search-Match. Содержание присутствующих фаз в образцах определяли по методу корундовых чисел (метод Чанга, программа Crystallographica Search-Match).

ИК-спектры получали на спектрофотометре «ФСМ 2202», Инфраспек, Россия. В ходе исследования образец в виде порошка смешивали с KBr, насыпали в германиевую кювету и прессовали. Регистрацию спектров проводили с разрешением  $4\text{ см}^{-1}$ , общее число сканирований – 50. Запись спектра исследуемых образцов проводили в области от 400 до  $4000\text{ см}^{-1}$ . Обработку данных осуществляли с использованием программы Origin Pro 8.0. Предел обнаружения составлял 5 %.

Измерение удельной поверхности образцов по методу БЭТ ( $S_{\text{БЭТ-N}_2}$ ) проводили на адсорбционном приборе «Gemini 2380» по адсорбции стандартного газа азота при 77.4 К по одной точке изотермы адсорбции азота в токе гелия (относительное давление паров азота  $p/p_0 = 0.075$ ) в течение 3 ч. Диапазон измерения удельной поверхности от 0.5 до  $999\text{ м}^2/\text{г}$ . Предел допускаемой относительной погрешности измерений удельной поверхности в режиме многократного измерения  $<5\%$ .

Изучение морфологии, определение формы частиц твердых фаз проводили методом оптической микроскопии с помощью микроскопа серии «XSP-140». Пробы тонким слоем наносили на часовое стекло и изучали материал под микроскопом. Расчет размеров кристаллов проводили с помощью программы «Top View».

Исследование резорбции полученных образцов проводили путем их динамического растворения при постоянном перемешивании в растворе 0.9%-ного хлорида натрия (рН 7.0), ацетатном буфере (рН 4.75) и растворе соляной кислоты (рН 1.0) при температуре  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Через определенные промежутки времени (0–90 мин) с помощью прямой потенциометрии фиксировали значение кислотности среды и показателя концентрации ионов кальция в растворе. Кинетические кривые были обработаны в соответствии с предложенными алгоритмами в работах [20, 21]. Математическую обработку всех данных осуществляли с использованием статистических программ Statistica.10 из статистического пакета StatSoft и Static2.

### Результаты и обсуждение

В результате синтеза смеси фосфатов кальция методом РФА установлено, что полученный осадок представлен фазами октакальций фосфата, брушита и гидроксилапатита (рис. 1), основным интенсивным линиям которых соответствуют углы  $2\theta$ : ОКФ – 11.4, 22.8; ГА – 25.9, 29.6, 31.8; брушита – 20.4, 47.3, 35.2.

В ИК-спектрах полученного образца присутствуют полосы, характерные для фосфатных групп (рис. 2): валентные асимметричные колебания  $1024$  и  $1154\text{ см}^{-1}$ , характерные для связей O–P–O, а также пики  $530$ ,  $574\text{ см}^{-1}$ , соответствующие колебаниям в  $\text{PO}_4^{3-}$ .

При детальном изучении морфологии осадка (рис. 3) установлено, что образующиеся кристаллы имеют форму «розеток», состоящих из пластинчатых кристаллов, характерных для ОКФ, кристаллов моноклинной структуры, характерной для брушита и кристаллов гексаго-

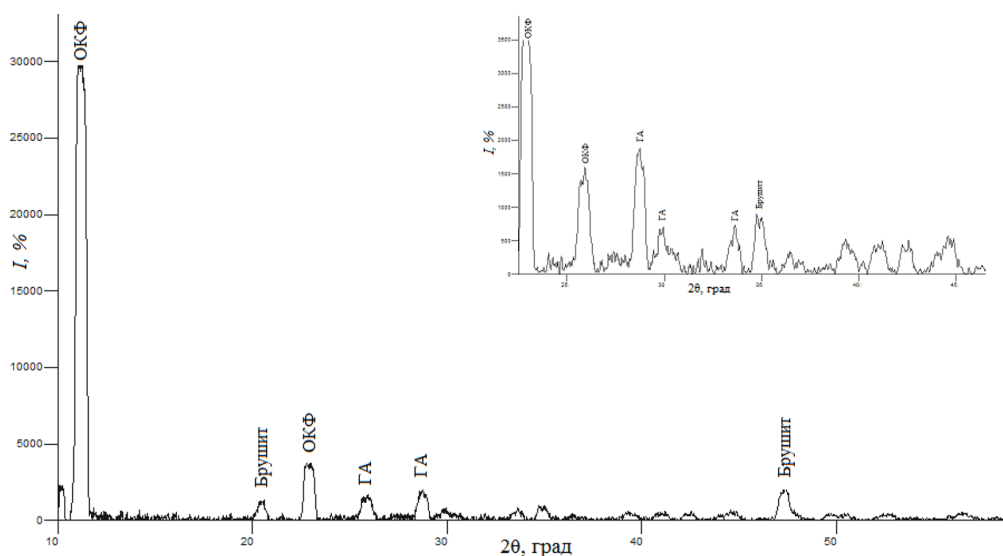


Рис. 1. Дифрактограмма смеси фосфатов кальция

Fig. 1. Diffractogram of a mixture of calcium phosphates

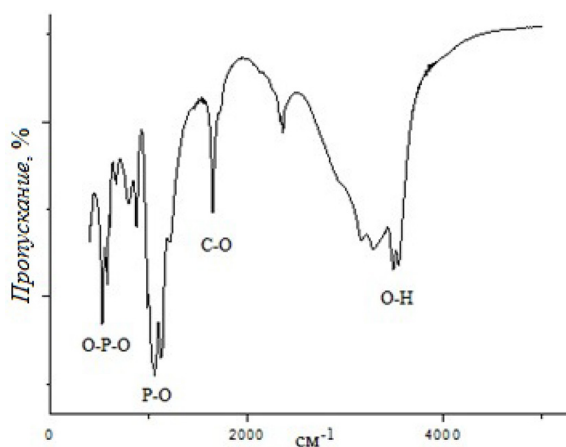


Рис. 2. ИК-спектр смеси фосфатов кальция

Fig. 2. IR-spectrum of a mixture of calcium phosphates

нальной сингонии, характерной для ГА, с размерами кристаллитов ОКФ – 2.96, брушита – 2.45, ГА – 2.15 нм.

На следующем этапе работы был синтезирован композит на основе смеси ФК и гиалуроновой кислоты. Методом РФА установлено, что наполнитель, используемый в данном композите не изменяет своего фазового состава и представлен фазами ГА, ОКФ и брушита (рис. 4). Основным интенсивным линиям, которых соответствуют углы по шкале  $2\theta$ : ГА – 29,4; 31,2; 33,6; 40,1; ОКФ – 11,4; 24,6; брушит – 20,4; 47,3.

В ИК-спектрах полученных образцов присутствуют полосы, характерные как для фосфатов кальция, так и для гиалуроновой кислоты (рис. 5).

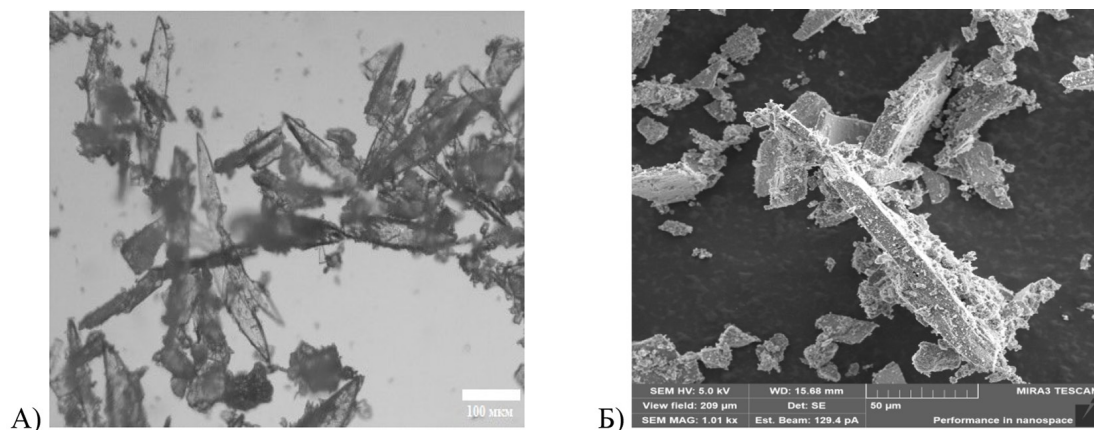


Рис. 3. Вид частиц смеси фосфатов кальция

Fig. 3. Morphology of particles of a mixture of calcium phosphates

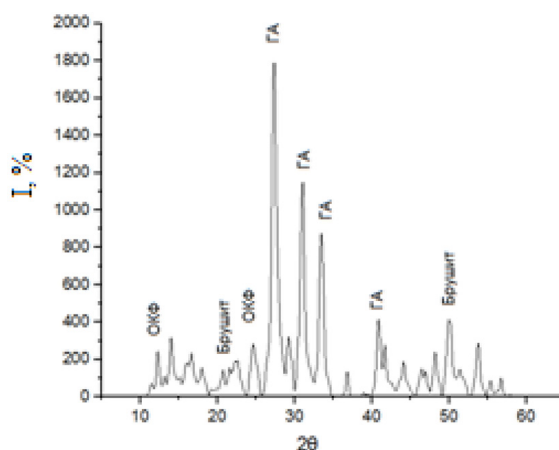


Рис. 4. Дифрактограмма композиционных материалов на основе смеси фосфатов кальция и ГК (10/90, 25 °C)

Fig. 4. Diffractogram of composite materials based on a mixture of calcium phosphates and HA (10/90, 25 °C)

Наличие пика в области  $560\text{--}590\text{ см}^{-1}$  говорит о деформационных колебаниях  $\text{P}=\text{O}$  в тетраэдре  $\text{PO}_4^{3-}$ . К колебаниям фосфатных групп также отнесены полосы в области  $1060\text{--}1140\text{ см}^{-1}$ , соответствующие валентным колебаниям  $\text{O}-\text{P}-\text{O}$ . Также обнаружены валентные колебания, характерные для карбоксилат ионов при  $1437$  и  $1668\text{ см}^{-1}$ , колебания  $\text{C}-\text{H}$  группы при  $2380\text{ см}^{-1}$ . Наблюдаются деформационные колебания  $\text{H}-\text{O}-\text{H}$  при  $1642\text{ см}^{-1}$  и валентные колебания  $\text{O}-\text{H}$  в области  $3100\text{--}3600\text{ см}^{-1}$  в  $\text{H}_2\text{O}$ . Особенностью данных спектров являются сдвиги максимумов поглощения  $\text{COO}^-$  в коротковолновую область по сравнению с пиками ГК ( $1408$  и  $1630\text{ см}^{-1}$ ), что предположительно связано с образованием комплекса ГК с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 6).

Удельная поверхность композиционного материала, содержащего 10 % наполнителя и высушенного при комнатной температуре, определенная методом БЭТ, увеличивается по срав-

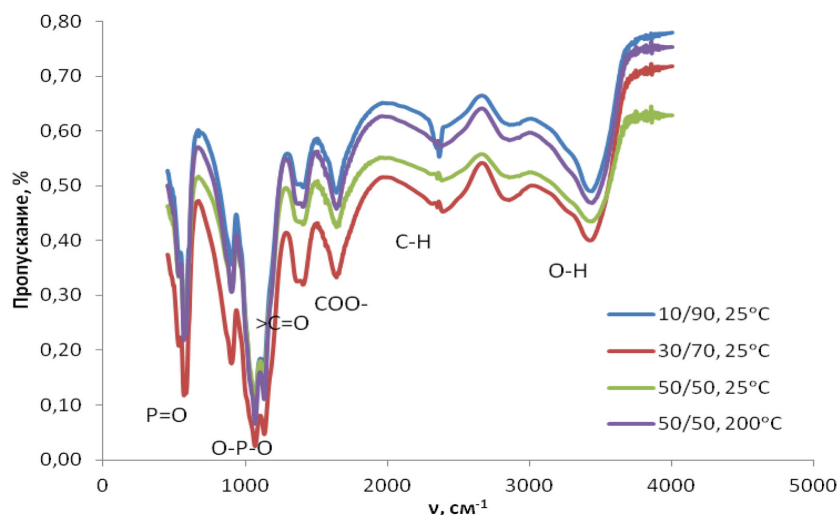


Рис. 5. ИК-спектры композиционных материалов на основе смеси фосфатов кальция и гиалуроновой кислоты

Fig. 5. IR-spectrum of composite materials based on a mixture of calcium phosphates and hyaluronic acid

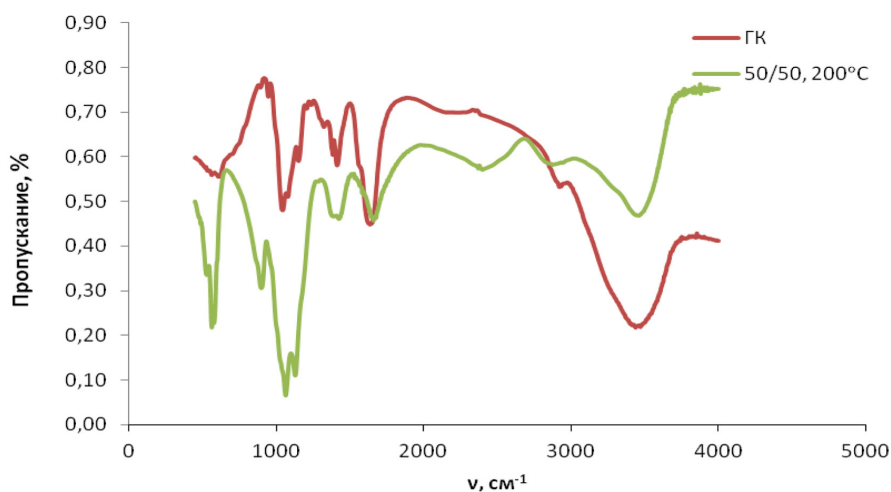


Рис. 6. ИК-спектры композиционных материалов на основе смеси фосфатов кальция и гиалуроновой кислоты и ИК-спектр гиалуроновой кислоты

Fig. 6. IR-spectra of composite materials based on a mixture of calcium phosphates and hyaluronic acid and the IR-spectrum of hyaluronic acid

нению с порошковым материалом от 23 м<sup>2</sup>/г до 26 м<sup>2</sup>/г, при этом увеличение содержания наполнителя в композите до 50 % уменьшает удельную поверхность до 16 м<sup>2</sup>/г, а увеличение температуры сушки до 200 °С до 15 м<sup>2</sup>/г, что связано с уплотнением композиционного материала в процессе термообработки.

Для изучения биорезорбируемости образцов было проведено их растворение в 0.1 М растворе HCl, ацетатном буферном растворе и 0.9 % растворе NaCl. Из полученных данных (табл. 1, рис. 7) следует, что резорбируемость полученных композитов снижается при увеличении температуры сушки композита и увеличении соотношения наполнитель/матрица, при

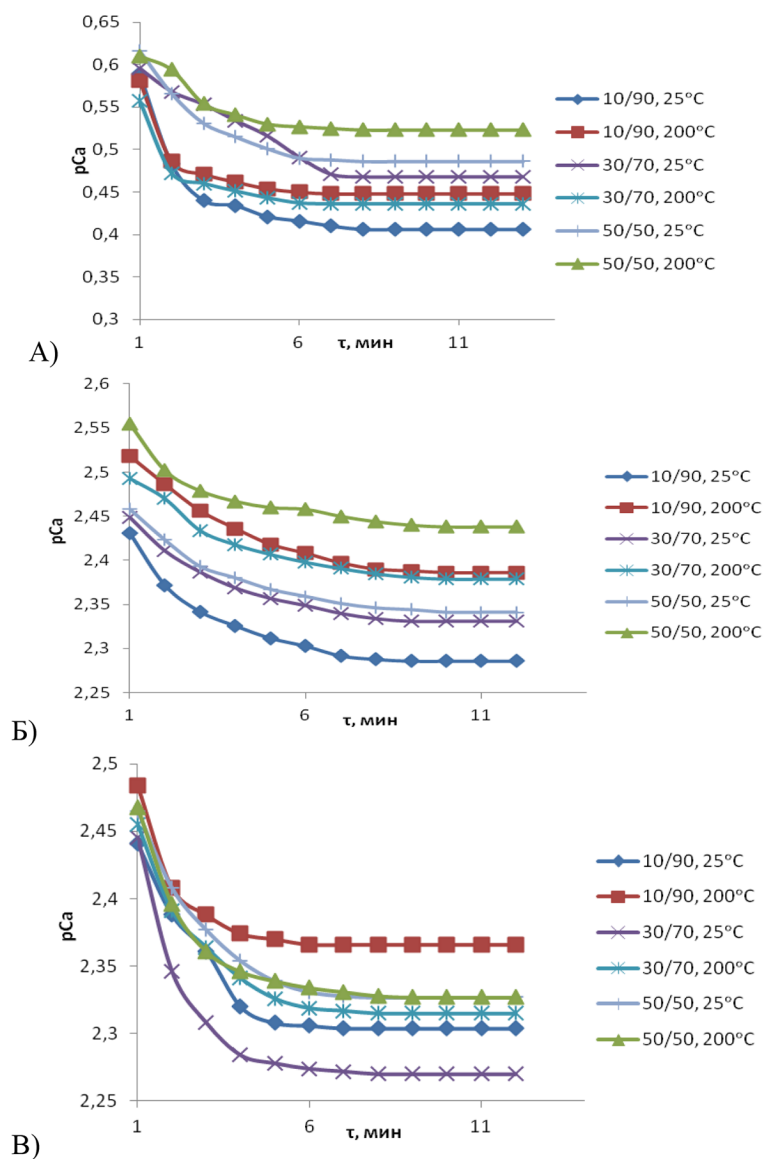


Рис. 7. Кинетические кривые растворения композиционных материалов на основе ГК с различным соотношением наполнитель/матрица: А – в 0,1n растворе соляной кислоты; Б – в ацетатном буферном растворе; В – в растворе хлорида натрия

Fig. 7. Kinetic curves of dissolution of composite materials based on HA with different filler/matrix ratio: A – in 0.1 n hydrochloric acid solution; B – in acetate buffer solution; C – in sodium chloride solution

этом максимальную начальную скорость растворения образцы имеют в изотоническом растворе при значениях pH, близких к физиологическим.



Таблица 1. Значения начальных скоростей растворения

Table 1. Values of initial dissolution rates

Среда	Соотношение наполнитель/ матрица в композите	Начальная скорость, ммоль/л*мин	
		$T_{\text{сушки}}=25\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_{\text{сушки}}=200\text{ }^{\circ}\text{C}$
0,1 М раствор HCl	100/0	4,9	
	10/90	20,6	17,4
	30/70	18,8	16,1
	50/50	17,1	12,5
Ацетатный буферный раствор	100/0	12,1	
	10/90	15,9	14,1
	30/70	13,6	12,0
	50/50	11,7	10,4
0,9 % раствор NaCl	100/0	9,0	
	10/90	22,4	20,5
	30/70	20,3	17,9
	50/50	18,1	14,0

### Заключение

Предложен способ получения композиционных материалов на основе смеси ФК и ГК, свойства которых возможно корректировать за счет варьирования соотношения наполнитель/матрица и температуры сушки. Выяснено, что оптимальной температурой сушки образцов является  $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , так как они при данной температуре характеризуются максимальным значением удельной поверхности и начальной скорости растворения. Установлено, что скорость резорбции синтезированных образцов снижается при увеличении температуры сушки композита и увеличении соотношения наполнитель/матрица.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### Список литературы / References

- [1] Solonenko A.P., Golovanova O.A. Synthesis, Composition, and Properties of Calcium Phosphate–Gelatin Composites. *Russ. J. Inorg. Chem* 2015. 60(9). 1034.
- [2] Combes C., Cazalbou S., Rey C. Apatite biomaterials. *Minerals* 2016. 6. 1–25.
- [3] Wise D.L., Trantolo D.J., Lewandrowski K.-U., Gresser J.D., Cattaneo M.V. *Biomaterials Engineering and Devices: Human Applications*. NY.: 2000.
- [4] Предеин Ю.А., Рерих В.В. Костные и клеточные имплантаты для замещения дефектов кости. *Современные проблемы науки и образования* 2016. 6. 132. [Predein Yu.A., Rerich V.V. Bone and cellular implants for the replacement of bone defects. *Modern Problems of Science and Education*. 2016. 6. 132.]
- [5] Barinov S.M., Komlev V.S. Calcium phosphate based bioceramics. Moscow. Science, 2005.
- [6] Tadic D., Epple M. A Thorough Physicochemical Characterisation of 14 Calcium Phosphate-Based Bone Substitution Materials in Comparison to Natural Bone. *Biomaterials*. 2004. 25. 987–994.

[7] Gurin A.N., Komlev V.S., Fadeeva I.V., Barinov S.M. Octacalcium phosphate – precursor of biomineralization, novel bone scaffold. *Stomatologiia*. 2010. 89(4). 65–72.

[8] Dutta P.K. Chitin and chitosan for regenerative medicine. Berlin: Springer, 2016. 389.

[9] Andersen Th. Alginates as biomaterials in tissue engineering. *Carbohydr. Chem.* 2012. 37. 227–258.

[10] Vunain E., Mishra A.K., Mamba B.B. 1 – Fundamentals of chitosan for biomedical applications, Editor(s): J. Amber Jennings, Joel D. Bumgardner, Chitosan Based Biomaterials. Woodhead Publishing, 2017, 1. 3–30.

[11] Бикбов М.М., Хуснитдинов И.И., Сигаева Н.Н., Вильданова Р.Р. Полимерные гели и их применение в офтальмологии. *ПМ* 2017. 9. 39–42. [Bikbov M.M., Khusnitdinov I.I., Sigaeva N.N., Vildanova R.R. Polymer gels and their application in ophthalmology. *PM* 2017. 9. 39–42. (in Rus.)]

[12] Кузнецова В.С., Васильев А.В., Григорьев Т.Е., Загоскин Ю.Д., Чвалун С.Н., Бухарова Т.Б., Гольдштейн Д.В., Кулаков А.А. Перспективы использования гидрогелей в качестве основы для отверждаемых костно-пластических материалов. *Стоматология* 2017. 96(6). 68–74. [Kuznetsova V.S., Vasilyev A.V., Grigoriev T.E., Zagoskin Yu.D., Chvalun S.N., Buharova T.B., Goldshtein D.V., Kulakov A.A. The prospects of hydrogels usage as a basis for curable osteoplastic materials. *Dentistry* 2017. 96(6). 68–74 (in Rus.)]

[13] Федотов А.Ю., Комлев В.С., Смирнов В.В., Фадеева И.В., Баринов С.М., Иевлев В.М., Солдатенков С.А., Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А. Гибридные композиционные материалы на основе хитозана и желатины, армированные гидроксиапатитом, для тканевой инженерии. *Материаловедение*. 2010. 7. 41–46. [Fedotov A. Yu., Komlev V.S., Smirnov V.V., Fadeeva I.V., Barinov S.M., Ievlev V.M., Soldatenkov S.A., Sergeeva N.S., Sviridova I.K., Kirsanova V.A., Akhmedova S.A. Hybrid composite materials based on chitosan and gelatin reinforced with hydroxyapatite for tissue engineering. *Materials science*. 2010. 7. 41–46 (in Rus.)]

[14] Dovedytis Matthew, Liu, Zhuo, Bartlett Samuel. Hyaluronic acid and its biomedical applications: *Engineered Regeneration* 2020. 1. 102–113.

[15] Huang G., Huang H. Application of hyaluronic acid as carriers in drug deliver. *Drug Deliv* 2018. 25(1). 766–772.

[16] Tung M.S., Tomazic B., Brown W.E. The effects of magnesium and fluoride on the hydrolysis of octacalcium phosphate. *Arch. OralBiol* 1992. 3. 585–591.

[17] Dorozhkin S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials* 2010. 31. 1465–1485.

[18] Golovanova O.A., Tsyganova A.A., Chikanova E.S. Targeted synthesis of octacalcium phosphate and a study of its properties. *Glass Physics and Chemistry* 2016. 42(6). 615–620.

[19] Tsyganova A.A., Golovanova O.A. Role of Mg<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> and F<sup>-</sup> ions in octacalcium phosphate crystallization. *Inorganic Materials* 2017. 53(12). 1261–1269.