

## 02 Фотолюминесцентные свойства нанопористого нанокристаллического карбонат-замещенного гидроксиапатита

© Д.Л. Голощапов, П.В. Середин, Д.А. Минаков, Э.П. Домашевская

Воронежский государственный университет,  
394018 Воронеж, Россия

e-mail: goloshchapov@phys.vsu.ru

Поступила в редакцию 22.08.2017 г.

Изучены люминесцентные характеристики аналога минеральной составляющей эмали зубов — нанокристаллического карбонат-замещенного гидроксиапатита кальция В-типа (КГАП) с дефектами на поверхности нанокристаллов в виде нанопор  $\sim 2\text{--}5\text{ nm}$ . Показано, что лазерно-индуцированная люминесценция синтезированных нами образцов КГАП расположена в области  $\sim 515\text{ nm}$  ( $\sim 2.4\text{ eV}$ ) и связана с наличием в кристаллической решетке КГАП групп  $\text{CO}_3$ , замещающих группы  $\text{PO}_4$ . Установлено, что интенсивность полосы люминесценции образцов КГАП связана с содержанием в них структурно связанных групп  $\text{CO}_3$  и снижается при уменьшении концентрации внутрицентровых дефектов этого типа в структуре апатита. Полученные в работе результаты потенциально значимы для разработки основ методики прецизионной и ранней диагностики кариеса твердой ткани зуба человека.

DOI: 10.21883/OS.2018.02.45522.188-17

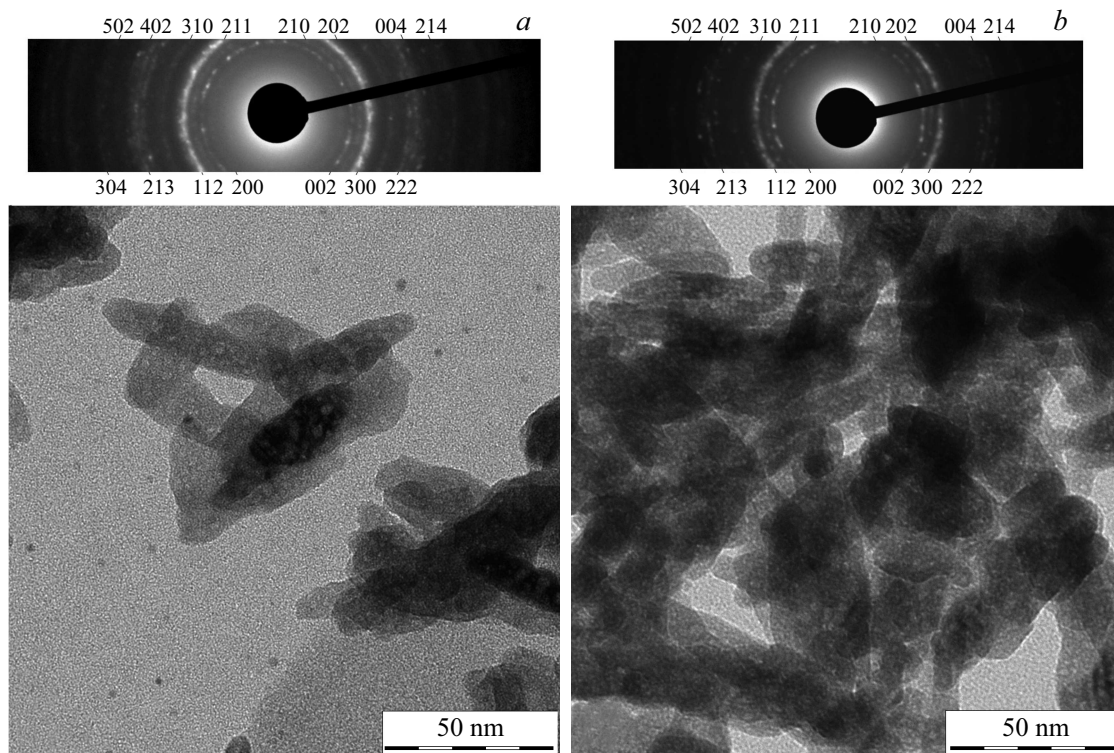
### Введение

Гидроксиапатит кальция  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (ГАП) и его замещенные формы являются основой минеральной составляющей костной ткани, эмали и дентина зубов человека, а также материалов для их протезирования [1,2]. На сегодняшний день весьма актуальной задачей является разработка методик диагностики патологий зубной ткани на самой ранней стадии образования [3–5], а, следовательно, и анализа состояния биоапатита эмали зуба в целом. Хорошо известно, что с возрастом ГАП эмали зубов деградирует с образованием карбонат-замещенного гидроксиапатита (КГАП) с множеством примесей [6,7]. Это приводит к дополнительным рискам возникновения кариеса, так как, например, КГАП является более растворимым по сравнению с беспримесным гидроксиапатитом [8]. Образование примесного карбонат-замещенного гидроксиапатита, а также иных фосфатов кальция может быть зарегистрировано на ранних стадиях их формирования благодаря неинвазивным методам анализа, таким как инфракрасная Фурье-спектроскопия (ИК), спектроскопия комбинационного рассеяния и лазерно-индуцированная фотолюминесценция (ФЛ) [7,9].

Что касается люминесценции твердых тканей зуба, то необходимо отметить, что вклад в спектр ФЛ твердых тканей зуба вносит как органическая, так и минеральная составляющая [10]. Основой неорганической составляющей эмали и дентина зубов является нестехиометрический гидроксиапатит кальция (ГАП) с большим числом изоморфных замещений в структуре [11,12], который имеет собственный спектр ФЛ. При этом необходимо отметить, что тип дефекта в структуре гидроксиапатита кальция может определять положение максимума люминесценции [13]. Кроме внутрицентровых дефектов, изменения в спектр ФЛ могут вносить различные фазовые

превращения, происходящие при кариозных процессах в эмали и дентине зуба человека [14]. Очевидно, что в случае регистрации ФЛ от нативных тканей, которые уже были подвергнуты обработке или препарированию, необходимо наличие базы спектров ФЛ эталонов, которые позволят выделить сигнал от возможных патогенных образований в зубной ткани, материала пломбы и здоровых участков интактной зубной ткани.

Неоднократно показано [15,16], что спектры ФЛ от здоровой, пораженной и области с развитым кариесом имеют смещение, а также дополнительные полосы в спектрах ФЛ. Однако при этом области твердой ткани зуба с патологией могут быть выявлены лишь на стадии „белого пятна“ и позднее, что оставляет открытыми вопросы об интерпретации полезного сигнала, а также своевременной диагностике природы заболевания. Поэтому в последнее время активно разрабатываются и находят клиническое применение различные диагностические устройства, принцип действия которых основан на оценке сигнала ФЛ от твердых тканей зуба [14,17–21]. Обработанный программным комплексом ФЛ сигнал позволяет визуализировать картину пораженной области. Быстрота и наглядность обнаружения патологий являются преимуществом данного типа приборов. К сожалению, к их общим недостаткам следует отнести невозможность на современном этапе провести диагностику патологии твердой ткани зуба (кариеса) на наиболее ранней стадии образования. В том числе существует проблема регистрации и интерпретации ФЛ сигнала по глубине кариозного поражения. Трудности в решении данных задач связаны с дефектной структурой биоапатита, наличия внутрирешеточных замещений в кристаллической решетке и молекулярном окружении (появление различных примесей в составе), что влияет на форму и положение полосы ФЛ. Описанные проблемы можно решить при изучении люминесцентных



**Рис. 1.** ПЭМ микрофотографии и микродифракция образцов, полученных из растворов с pH = 9 (a), 8.5 (b).

характеристик синтетических биокомпозитов — аналогов нативных тканей зубов. Создание композиционных биомиметических материалов с составом, аналогичным тканям зуба (интактным и пораженным кариесом различной степени формирования), а также последующий системный анализ ФЛ этих образцов, на наш взгляд, позволит найти более эффективные методы ранней диагностики локальных участков интактной эмали [3,15]. Для кариозных областей данный подход позволит увеличить избирательность приборов по отношению к полученной информации и повысить точность диагностирования [9,19].

Поэтому целью нашей работы стало изучение эмиссионных свойств аналога минеральной составляющей нативной ткани зуба — карбонат-замещенного нанокристаллического гидроксиапатита и определение зависимостей спектральных характеристик синтезированных биоматериалов от содержания примесей в них.

## Материалы и методы исследования

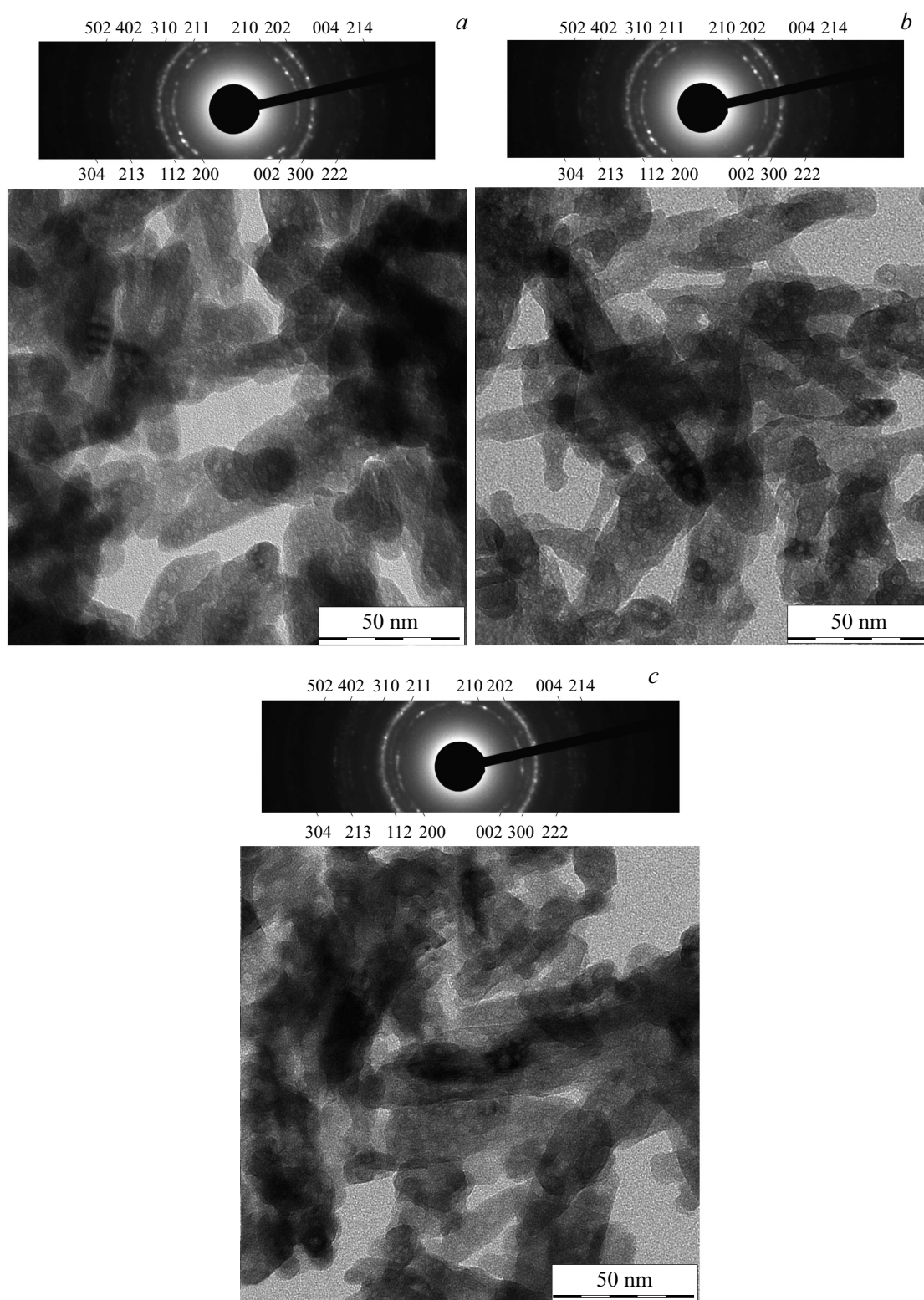
В данном исследовании нанокристаллический КГАП был получен с использованием яичной скорлупы птиц по методике, предложенной в работе [22]. Различное содержание карбонат-включенных групп в КГАП достигалось при титровании раствором  $\text{H}_3\text{PO}_4$  раствора  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  по изменению значения величины pH от 9 до 7 с шагом в 0.5 (pH-метр/иономер ИПЛ 111-1) с точностью 0.01 на атмосфере, содержащей  $\text{CO}_2$  [22].

Образцы гидроксиапатита были исследованы с использованием методов рентгеновской дифракции (ДРОН-4.07  $\text{Co } K\alpha = 1.790$ ), инфракрасной Фурье-спектроскопии (Vertex-70, Bruker), спектроскопии комбинационного рассеяния (LabRam HR800); просвечивающей электронной микроскопии (Libra-120 Carl Zeiss), фотолюминесцентной спектроскопии (установка на базе волоконно-оптического спектрометра USB4000-VIS-NIR фирмы OceanOptics и лазерного источника возбуждения с длиной волны 405 nm).

## Результаты и обсуждение

Результаты рентгеновской дифракции исследуемых образцов показали, что все материалы являются нанокристаллическими формами гидроксиапатита со средним размером кристаллитов 35 nm в соответствии с [22]. Для уточнения локальной микроструктуры и фазового постоянства образцов был использован метод просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с высоким разрешением. Образцы гидроксиапатита, полученные при различных значениях pH = 9, 8.5, 8, 7.5, 7 и отожженные при  $400^\circ\text{C}$ , для ПЭМ анализа подвергались ультразвуковому диспергированию в водной среде.

Для всех исследованных образцов эксперимент показал, что образовавшиеся нанокристаллы имеют стержневидную форму с диаметром  $\sim 20$  nm и длиной  $\sim 50$  nm, а результаты микродифракции подтверждают существование единственной фазы — гидроксиапатита кальция (рис. 1).



**Рис. 2.** ПЭМ микрофотографии и микродифракция образцов, полученных из растворов с pH = 8 (a), 7.5 (b), 7 (c).

Исследование морфологии нанокристаллов гидроксиапатита методом ПЭМ с нанометровым разрешением показало образование на поверхности нанокристаллов дефектной пористой структуры (рис. 1,2). Из представ-

ленных микрофотографий видно, что при уменьшении значения pH раствора размеры нанопор увеличиваются.

Изучение полученных в настоящей работе материалов методом ИК спектроскопии (Vertex-70 Bruker (ЦКП-

НО ФГБОУ ВО „ВГУ“) позволило установить, что все образцы являются карбонат-замещенными формами гидроксиапатита. Моды колебаний в ИК спектрах в области  $1415$ ,  $1425$  и  $1450\text{ cm}^{-1}$  указывают на образование КГАП В-типа: замещение группы  $\text{PO}_4$  группой  $\text{CO}_3$ , как показано в нашей предыдущей работе [22]. При этом следует отметить, что по соотношению интенсивностей колебательных мод  $\text{PO}_4$ , расположенных в области  $1090\text{ cm}^{-1}$ , и мод группы  $\text{CO}_3$  можно качественно определить степень замещения комплексом  $\text{CO}_3$  группы  $\text{PO}_4$  в структуре апатита [23,24]. Экспериментальные данные показали, что у изучаемых в настоящей работе образцов интенсивность моды колебаний группы  $\text{CO}_3$  в ИК спектрах от образца к образцу уменьшается, тогда как интенсивность основной моды группы  $\text{PO}_4$  остается неизменной. Таким образом, с уменьшением на этапе синтеза образцов величины pH раствора с 9 до 7 (введение большего числа групп  $\text{PO}_4$ ) уменьшается интенсивность мод колебаний от включенного в структуру ГАП карбонат-аниона.

В работах по исследованию КГАП было показано, что в случае наличия искажения в кристаллической решетке апатита и включения аниона  $\text{CO}_3$  в структуру ГАП в спектрах комбинационного рассеяния наблюдался сдвиг полос  $\text{PO}_4$ . Чтобы установить влияние дефекта в структуре синтезированных нами образцов КГАП на их оптические свойства, было проведено исследование с привлечением метода спектроскопии комбинационного рассеяния. Полученные результаты представлены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, в спектрах образцов с различными значениями pH раствора, кроме основных мод фосфорно-кислородной группы, локализованных около  $961$ ,  $587$  и  $431\text{ cm}^{-1}$ , наблюдается появление дополнительной моды в области  $\sim 1070\text{ cm}^{-1}$ . Ее появление можно соотнести с появлением в структуре КГАП группы  $\text{CO}_3$ , которая замещает в подрешетке ГАП группу  $\text{PO}_4$ . Однако следует отметить, что в данной области спектра  $1077$ ,  $1045$ ,  $1035\text{ cm}^{-1}$ , располагаются низкоинтенсивные моды группы  $\text{PO}_4$ . Отметим, что соотношение интенсивностей дополнительных мод и основной фосфатной моды, локализованной около  $961\text{ cm}^{-1}$ , во всех спектрах остается приблизительно одинаковым. Детальное рассмотрение формы колебания  $\text{PO}_4$  (рис. 3) показало, что в результате включения в структуру ГАП аниона  $\text{CO}_3$  появляются асимметрия и сдвиг данного максимума на  $5\text{ cm}^{-1}$  для образцов со значениями pH раствора 7 и 9. Этот факт хорошо коррелирует с данными ИК спектроскопии о природе карбонат-замещенных образцов КГАП В-типа.

Фотолюминесцентная спектроскопия полученных в настоящей работе образцов КГАП обнаружила сильную зависимость интенсивности главного максимума ФЛ от условий получения материалов по предложенной методике, а также от их последующей термической обработки. На рис. 4 приведены спектры люминесценции всех образцов КГАП, полученных в настоящей работе при различных (конечных) значениях pH раствора

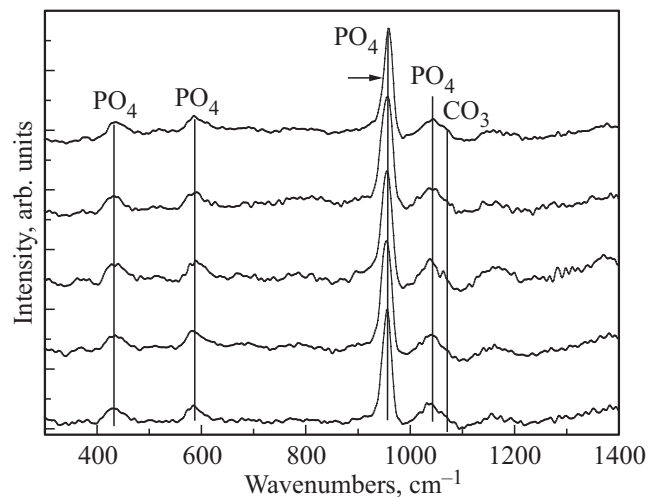


Рис. 3. Спектры комбинационного рассеяния образцов, полученных из растворов с pH 9 и 7 и отожженных при  $400^\circ\text{C}$ .

(9, 8.5, 8, 7.5, 7) и отожженных при  $400^\circ\text{C}$ . Максимум полосы ФЛ находится около  $\sim 515\text{ nm}$  и соответствует энергии перехода  $\sim 2.4\text{ eV}$ . Анализ спектров КГАП показал, что интенсивность ФЛ от образцов КГАП с pH, равным 7.5 и 7, меньше, чем у образцов с pH = 9–8. Это может быть связано с уменьшением концентрации примесных центров люминесценции  $\text{CO}_3^{2-}$  в образцах карбонат-замещенного гидроксиапатита, полученных при меньших значениях pH. Подобные соотношения интенсивностей в профиле полосы ФЛ, по-видимому, связаны с элементарным составом исходного материала (скорлупы птичьих яиц), который использовался нами при синтезе гидроксиапатита. В синтезированных материалах содержание карбонат-аниона в максимальной концентрации составляет  $\sim 5\%$ , что сопоставимо с их содержанием в биоапатите эмали зубов человека. Сопоставляя методику синтеза образцов, описанную в нашей предыдущей работе [22], и данные из аналогичных исследований, можно заметить, что получение гидроксиапатита жидкофазными методами в присутствии атмосферы приводит к включению атмосферного газа  $\text{CO}_2$  в состав получаемого материала. В результате флуктуации в содержании карбонат-аниона в составе образца оказываются существенными для наблюдения полосы ФЛ заданной интенсивности.

Анализ литературных источников показывает, что фотолюминесценция в беспримесном ГАП может быть вызвана собственными структурными дефектами, возникающими в процессе его получения с преднамеренным и непреднамеренным модифицированием состава [25,26]. В работе [27] приводятся результаты исследования собственной ФЛ ГАП, в соответствии с которыми его ширина запрещенной зоны составляет  $\sim 7.7\text{ eV}$ . С использованием этого значения и полученных нами спектров ФЛ с максимумом  $\sim 2.4\text{ eV}$  (рис. 4) мы рассматриваем возможный вариант модели ФЛ карбонат-замещенного гидроксиапатита, центром люминесценции

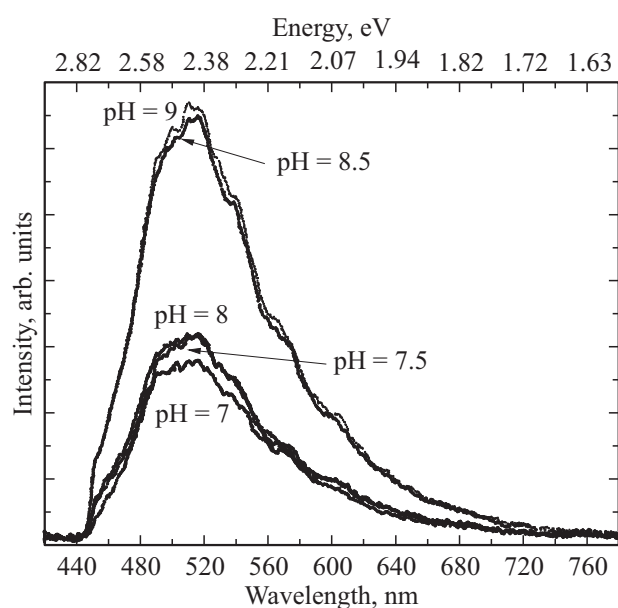


Рис. 4. ФЛ-спектры КГАП, полученных из растворов с pH = 9, 8.5, 8, 7.5, 7 и отожженных при 400°C.

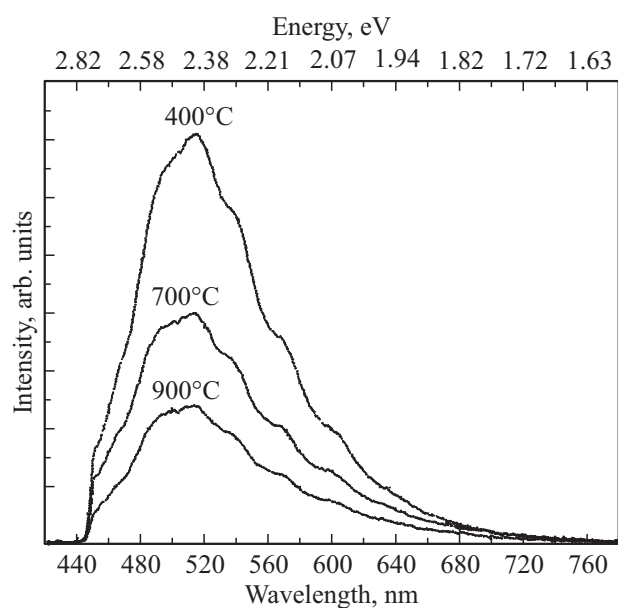


Рис. 5. ФЛ-спектры КГАП, полученных из растворов с pH=8.5 и отожженных при температурах 400, 700, 900°C.

которого является группа  $\text{CO}_3$ , замещающая группу  $\text{PO}_4$  в структуре КГАП. Следует отметить, что в работе [27] максимум ФЛ, обусловленный собственными дефектами беспримесного ГАП, зарегистрирован при  $\sim 3.8$  eV. Однако длина волны использованного нами источника возбуждения не позволяет регистрировать ФЛ при таких энергиях. Поэтому зарегистрированы закономерности для наблюдаемой нами внутрицентральной ФЛ с максимумом при  $\sim 2.4$  eV.

Исследование образцов КГАП, подвергнутых термическому отжигу в интервале температур 400–900°C,

подтвердили предположения относительно примесного механизма наблюдаемой ФЛ. При исследовании ФЛ образцов, полученных при одном значении величины pH (8.5) и отожженных при 400, 700, 900°C, было обнаружено, что интенсивность их фотолюминесценции снижается (рис. 5). Это связано с понижением содержания карбонат-ионов в структуре КГАП по мере увеличения температуры отжига образцов. Данный факт согласуется с результатами, полученными методами РСА и ИК спектроскопии, и не противоречит рассматриваемой модели ФЛ.

## Заключение

В настоящей работе изучены люминесцентные характеристики синтезированных образцов карбонат-замещенного гидроксиапатита кальция В-типа (КГАП) — аналога минеральной составляющей эмали зубов. Методами рентгеновской дифракции и просвечивающей микроскопии установлено, что все синтезируемые образцы являются нанокристаллическим гидроксиапатитом кальция с присутствием нанопор на поверхности нанокристаллов. С использованием ИК и рамановской спектроскопии подтверждено, что в полученных материалах группа  $\text{PO}_4$  замещается группой  $\text{CO}_3$  в процессе синтеза. Исследование люминесцентных свойств синтезированных образцов показало, что спектры образцов КГАП имеют максимум, расположенный в области  $\sim 515$  nm ( $\sim 2.4$  eV). Сопоставление спектров люминесценции позволило определить, что изменение величины pH раствора (введение большего числа групп  $\text{PO}_4$ ) на этапе синтеза КГАП влияет на интенсивность спектров ФЛ образцов. Этот факт может быть связан с наличием меньшего числа групп —  $\text{CO}_3$  в структуре КГАП, полученных с меньшим значением pH раствора (наличия большего числа групп  $\text{PO}_4$ ). Обнаруженные особенности спектров ФЛ могут быть использованы для разработки основ методики прецизионной и ранней диагностики кариеса твердой ткани зуба человека.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда проект № 17-75-10046.

## Список литературы

- [1] Fleet M.E. Carbonated Hydroxyapatite: Materials, Synthesis, and Applications. CRC Press, 2014. 272 p.
- [2] Jang S.J., Kim S.E., Han T.S., Son J.S., Kang S.S., Choi S.H. // In Vivo. 2017. V. 31. N 3. P. 335–341.
- [3] Seredin P., Goloshchapov D., Prutskij T., Ippolitov Y. // PLoS ONE. 2015. V. 10. N 4. P. 1–11. doi 10.1371/journal.pone.0124008
- [4] Pretty I.A., Ellwood R.P. // J. Dent. 2013. V. 41. Supplement 2. P. S12–S21. doi 10.1016/j.jdent.2010.04.003
- [5] Rocha-Cabral R.M., Mendes F.M., Maldonado E.P., Zezell D.M. A simple dental caries detection system using full spectrum of laser-induced fluorescence / Ed. Kurachi C., Svanberg K., Tromberg B.J., Bagnato V.S. 2015. P. 95311A–1–95311A–13. doi 10.1117/12.2180777

- [6] *Leventouri T., Antonakos A., Kyriacou A., Venturelli R., Liarokapis E., Perdikatsis V.* // *Int. J. Biomater.* 2009. V. 2009. P. 1–6. doi 10.1155/2009/698547
- [7] *Piga G., Goncalves D., Thompson T.J.U., Brunetti A., Malgosa A., Enzo S.* // *Int. J. Spectrosc.* 2016. V. 2016. P. 1–9. doi 10.1155/2016/4810149
- [8] *Pan H., Darvell B.W.* // *Cryst. Growth Des.* 2010. V. 10. N 2. P. 845–850. doi 10.1021/cg901199h
- [9] *Seredin P.V., Goloshchapov D.L., Prutskij T., Ippolitov Y.A.* // *Results Phys.* 2017. V. 7. P. 1086–1094. doi 10.1016/j.rinp.2017.02.025
- [10] *Seredin P.V., Goloshchapov D.L., Kashkarov V.M., Ippolitov Y.A., Prutskij T.* // *Results Phys.* 2016. V. 6. P. 447–448. doi 10.1016/j.rinp.2016.08.003
- [11] *Combes C., Cazalbou S., Rey C.* // *Minerals.* 2016. V. 6. N 2. P. 34. doi 10.3390/min6020034
- [12] *Ghadimi E., Eimar H., Marelli B., Nazhat S.N., Asgharian M., Vali H., Tamimi F.* // *SpringerPlus.* 2013. V. 2. N 1. P. 499–512. doi 10.1186/2193-1801-2-499
- [13] *Waychunas G.A.* // *Rev. Mineral. Geochem.* 2002. V. 48. N 1. P. 701–742. doi 10.2138/rmg.2002.48.19
- [14] *Bachmann L., Zezell D.M., Ribeiro A. da C., Gomes L., Ito A.S.* // *Appl. Spectrosc. Rev.* 2006. V. 41. N 6. P. 575–590. doi 10.1080/05704920600929498
- [15] *Ionijā I.* // *J. Optoelectron. Adv. Mater. — Rapid Comm.* 2009. V. 3. N 10. P. 1122–1126.
- [16] *Chen Q.G., Zhu H.H., Xu Y., Lin B., Chen H.* // *Laser Phys.* 2015. V. 25. N 8. P. 085601. doi 10.1088/1054-660X/25/8/085601
- [17] *Karlsson L.* // *Int. J. Dent.* 2010. V. 2010. P. 1–9. doi 10.1155/2010/270729
- [18] *Salehi H., Terrer E., Panayotov I., Levallois B., Jacquot B., Tassery H., Cuisinier F.* // *J. Biophotonics.* 2012. P. 1–11. doi 10.1002/jbio.201200095
- [19] *Panayotov I., Terrer E., Salehi H., Tassery H., Yachouh J., Cuisinier F.J.G., Levallois B.* // *Clin. Oral Investig.* 2012. V. 17. N 3. P. 757–763. doi 10.1007/s00784-012-0770-9
- [20] *Subhash N., Thomas S.S., Mallia R.J., Jose M.* // *Lasers Surg. Med.* 2005. V. 37. N 4. P. 320–328. doi 10.1002/lsm.20229
- [21] *Sarycheva I., Yanushevich O., Minakov D., Shulgin V.* // *J. Stomatol.* 2015. V. 68. N 4. P. 424–429. doi 10.5604/00114553.1177528
- [22] *Goloshchapov D.L., Kashkarov V.M., Rumyantseva N.A., Seredin P.V., Lenshin A.S., Agapov B.L., Domashevskaya E.P.* // *Ceram. Int.* 2013. V. 39. N 4. P. 4539–4549. doi 10.1016/j.ceramint.2012.11.050
- [23] *Komlev V.S., Fadeeva I.V., Gurin A.N., Kovaleva E.S., Smirnov V.V., Gurin N.A., Barinov S.M.* // *Inorg. Mater.* 2009. V. 45. N 3. P. 329–334. doi 10.1134/S0020168509030194
- [24] *Yusufoglu Y., Akinc M.* // *J. Am. Ceram. Soc.* 2008. V. 91. N 1. P. 77–82. doi 10.1111/j.1551-2916.2007.02092.x
- [25] *Liu J., Wu Q., Ding Y.* // *Eur. J. Inorg. Chem.* 2005. V. 2005. N 20. P. 4145–4149. doi 10.1002/ejic.200500207
- [26] *Zhang C., Yang J., Quan Z., Yang P., Li C., Hou Z., Lin J.* // *Cryst. Growth Des.* 2009. V. 9. N 6. P. 2725–2733. doi 10.1021/cg801353n
- [27] *Feldbach E., Kirm M., Kotlov H., Mägi H.* *Luminescence Spectroscopy of Ca-apatites under VUV Excitation* // *DESY Photon Science Annual Report*. Available: [http://photon-science.desy.de/annual\\_report/files/2010/20101246.pdf](http://photon-science.desy.de/annual_report/files/2010/20101246.pdf). Accessed 28 Dec. 2016.