

DOI: <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2023-89-5-14-18>

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ, ФОСФОРА И ЦЕРИЯ В НОВЫХ БИОСОВМЕСТИМЫХ МАТЕРИАЛАХ МЕТОДОМ РЕНТГЕНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА С ПОЛНЫМ ВНЕШНИМ ОТРАЖЕНИЕМ

© Алина Александровна Самойлова¹, Наталия Валерьевна Петракова²,
Надежда Александровна Андреева², Татьяна Николаевна Пенкина²,
Сергей Геннадьевич Дорофеев¹, Дарья Геннадьевна Филатова^{1,2*}

¹ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, химический факультет, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3; *e-mail: gak1.analyt@gmail.com

² Институт металлургии и материаловедения им. А. А. Байкова Российской академии наук, Россия, 119334, Москва, Ленинский пр-т, д. 49.

*Статья поступила 1 марта 2023 г. Поступила после доработки 1 марта 2023 г.
Принята к публикации 23 марта 2023 г.*

Предложен подход к определению состава новых биосовместимых материалов на основе церийсодержащих фосфатов кальция методом РФА ПВО. Определены диапазоны содержаний аналитов в растворах для правильного определения Са, Р, Се методом внешнего стандарта. Отмечено систематическое занижение сигнала кальция при его содержании в анализируемой пробе композита выше 30 мг/л. Для оценки соответствия пробы критерию тонкого слоя проведен анализ спектров комптоновского рассеяния для раствора образца керамики, значение максимума составило 16,8 кэВ (96°). Согласно графику массового коэффициента ослабления для пленки заданного состава ослабление интенсивности линии кальция перпендикулярно подложке не связано с поглощением образца. Выбраны внутренние стандарты (Gd и Cu) и найдены условия для определения микро- и макрокомпонентов в растворах и суспензиях образцов. Показано, что при содержании кальция в пробе до 50 мг/л возможно правильное определение Са, Р и Се методом РФА ПВО в растворах и суспензиях с S_p 0,05 и 0,09 соответственно. Отмечена сходимость результатов, полученных методами внешнего и внутреннего стандарта при соответствующих разбавлениях растворов и суспензий.

Ключевые слова: рентгенофлуоресцентный анализ с полным внешним отражением; РФА ПВО; биосовместимая керамика; кальций; фосфор; церий; анализ суспензий.

QUANTIFICATION OF CALCIUM, PHOSPHORUS, AND CERIUM IN NOVEL BIOCOMPATIBLE MATERIALS BY TOTAL REFLECTION X-RAY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

© Alina A. Samoilova¹, Nataliya V. Petrakova², Nadezhda A. Andreeva²,
Tatiana N. Penkina², Sergey G. Dorofeev¹, Dariya G. Filatova^{1,2*}

¹ Lomonosov Moscow State University, 1-3, Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia; *e-mail: gak1.analyt@gmail.com

² Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science of the Russian Academy of Sciences, 49, Leninsky prosp., Moscow, 119334, Russia.

Received March 1, 2023. Revised March 1, 2023. Accepted March 23, 2023.

An approach to the determination of the composition of novel biocompatible materials based on cerium-containing calcium phosphates by TXRF is proposed. The ranges of analyte contents in solutions for the correct determination of Ca, P, Ce by the external standard method were determined. A systematic underestimation of the calcium signal at a Ca content in the analyzed composite sample above 30 mg/liter is noted. The Compton scattering spectra for the ceramic sample solution were analyzed to assess the compliance of the sample with the thin layer criterion, the maximum value was 16.8 keV (96°). According to the graph of the mass attenuation coefficient for a film of a given composition, the attenuation of the calcium line is not related with the absorption effect of the sample. The internal standards (Gd and Cu) were selected and conditions for the determination of micro- and macro-components in solutions and suspensions of samples were determined. It is shown that with a calcium content up to 50 mg/liter in the sample, it is possible to determine correctly Ca, P, and Ce by TXRF method in solutions and suspensions with S_p

0.05 and 0.09, respectively. The convergence of the results obtained is noted by the methods of external and internal standards with appropriate dilutions of solutions and suspensions.

Keywords: total reflection X-ray fluorescence spectroscopy; TXRF; biocompatible ceramics; Ca; P; Ce; analysis of suspension.

Введение

В основе создания современных костнозамещающих имплантатов лежит биомиметический принцип, заключающийся в воспроизведении структуры и свойств костной ткани. Способы синтеза кальцийфосфатных материалов (КФ-материалов), их структура, физико-химические свойства и поведение в биологических системах активно изучаются и описаны в работе [1]. Фосфаты кальция имеют химический состав, сходный с неорганической составляющей костной ткани, однако имплантаты на основе фосфатов кальция не отвечают всем требованиям реконструктивной хирургии костной ткани. Одним из способов решения этой проблемы стало создание композитов с заданными свойствами [2 – 5]. Так, добавки ионов РЗЭ обеспечивают функциональное сходство в инженерии костной ткани [6], в частности, добавки церия обеспечивают повышенную проводимость и уменьшение сопротивления имплантата для лучшей регенерации костной ткани, а также антибактериальную активность [7 – 10]. Люминесцентные свойства для визуализации имплантата достигаются легированием эрбием [11]. При этом необходим контроль допирования материалов в условиях синтеза, поэтому поиск подходов к экспрессному и правильному определению состава полученных композитов является важным этапом исследований в данной области. Для определения состава композитов чаще применяют методы ИСП-МС и ИСП-АЭС в растворах после разложения образцов [12 – 15]. Для определения элементного состава твердых материалов описано применение метода энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDX) [8, 9]. При этом на результаты количественного анализа влияют состояние поверхности, микронеоднородность, состав матрицы и количество добавки, а достоверность расчета мольного соотношения компонентов анализируемого материала с точностью до десятых долей процента не обсуждается [16]. Применение метода рентгенофлуоресцентного анализа с полным внешним отражением (РФА ПВО) для биологических исследований обсуждалось в работе [17], однако для характеристики биосовместимой керамики практически не описано. Метод РФА ПВО сочетает преимущества многоэлементного анализа суспензий и растворов с низким уровнем матричных помех [18], поэтому этим методом определяют, например, растворимость малорастворимого КФ-композита в биологических жид-

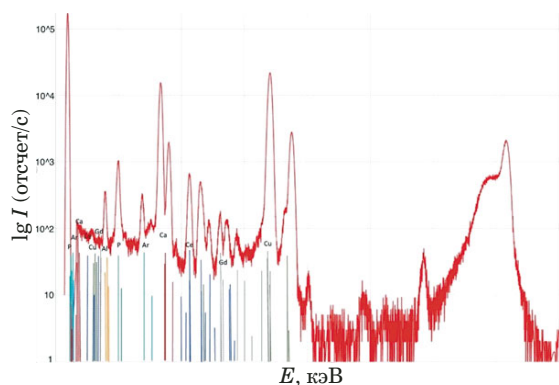
костях [19]. Ранее нами показано, что перспективным является применение метода РФА ПВО для анализа образцов новых материалов в растворах и суспензиях [20]. При этом необходим поиск подходов для получения правильных результатов одновременного определения макро- и микрокомпонентов композитов в условиях отсутствия стандартных образцов состава новых материалов. Цель настоящей работы — разработка подхода к определению Ca, P и добавок Ce в образцах биосовместимой керамики методом РФА ПВО.

Экспериментальная часть

Порошки церийсодержащих фосфатов кальция $\text{Ca}_{10-x}\text{Ce}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ были получены методом осаждения из нитратов кальция и церия и гидрофосфата аммония при поддержании уровня pH добавлением водного раствора аммиака [21]. Полученные осадки были высушены и просеяны через сито с размером ячейки 100 мкм.

Для построения градуировочных графиков готовили стандартные растворы с концентрацией фосфора 1 – 100 мг/л, кальция — 1 – 200 мг/л, церия — 0,1 – 5 мг/л. Для расчетов методом внутреннего стандарта использовали растворы Gd (0,5 мг/л) и Cu (20 и 40 мг/л).

Рентгенофлуоресцентный анализ образцов проводили с использованием спектрометра S2 PICOFOX (Bruker Nano GmbH, Германия). Для возбуждения рентгеновской флуоресценции использовали излучение $\text{MoK}\alpha$. Время набора спектра (life time) составляло 250 с. Прибор укомплектован модулем высокой эффективности для увеличения чувствительности определения и кремниевым дрейфовым детектором XFlash® с термоэлектрическим охлаждением (энергетическое разрешение по линии $\text{MnK}\alpha$ — менее 150 эВ). Для отбора навесок массой 10 мг использовали весы Sartorius 1702MP8 (Германия) с точностью взвешивания $\pm 0,1$ мг. Образцы растворяли в 1 М азотной кислоте, анализировали разбавленные растворы. Для получения устойчивых суспензий образцы измельчали с помощью планетарной микромельницы Pulverisette 7 (Fritsch GmbH, Германия). Водные суспензии образцов перемешивали в деионированной воде с помощью Вортекс V-3 (Elmi) непосредственно перед измерением. Наносили 5 мкл суспензии или раствора образца дозатором на кремниевую подложку-отражатель и высушивали.



РФА ПВО спектр раствора образца $\text{Ca}_{10-x}\text{Ce}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
TXRF spectrum of $\text{Ca}_{10-x}\text{Ce}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

Обсуждение результатов

При анализе растворов модельных образцов с соотношениями концентраций элементов, отвечающими составу композитов $\text{Ca}_{10-x}\text{Ce}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, показано, что линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации сохраняется в диапазонах 1 – 40 мг/л для фосфора и 0,1 – 5 мг/л для церия. При этом для кальция наблюдается систематическое занижение сигнала при анализе модельной смеси, содержащей свыше 40 мг/л Са. Для оценки соответствия пробы критерию тонкого слоя проведен анализ спектров комптоновского рассеяния для раствора образца керамики с примерной концентрацией кальция 50 мг/л. Плечо комптоновского рассеяния в спектре имеет максимум 16,8 кэВ (96°), что близко к перпендикулярно к подложке. То же значение получено при расчете по уравнению Комптона

$$\cos \theta = 1 - \frac{m_e c^2}{E_\gamma} \left(\frac{E_\gamma}{E'_\gamma} - 1 \right),$$

где $E_\gamma = 17,44$ кэВ (МоК α средняя); $m_e c^2 = 511$ кэВ.

Для пробы массой 305,19 нг диаметром 3 мм поверхностная плотность составила 4,32 мкг/см². Согласно рассчитанному графику массового коэффициента ослабления для такого состава ослабление интенсивности линии Са перпендикулярно подложке составит $\exp(212 \cdot 4,32 \cdot 10^{-6}) = 1,0009$. Для фосфора ослабление больше: $\exp(852 \cdot 4,32 \cdot 10^{-6}) = 1,0037$, при этом оба значения меньше погрешности измерений. Таким образом, для всех исследуемых элементов образец является бесконечно тонким, т.е. занижение результатов определения кальция не связано с поглощением излучения в образце. Согласно исследованиям авторов [22, 23] занижение результатов определения кальция методом РФА ПВО при анализе природных апатитов обусловлено суммой факторов: различные формы кальция, получаемые при растворении пробы в HNO_3 , неоднородная толщина образца, образование нескольких фаз кальция. Очевидно, разбавление растворов исследуемых образцов керамики позволит снизить влияние различных факторов на результаты определения кальция методом внешнего стандарта. Как видно из данных табл. 1, при разбавлении растворов возможно одновременное определение Са, Р и добавки Се методом внешнего стандарта в исследуемых образцах после их разложения при содержании кальция не более 30 мг/л.

Для снижения влияния основы пробы на результаты определения состава композита и упрощения многоэлементного анализа предложено анализировать растворы образцов с применением внутренних стандартов. На основании полученного РФА ПВО спектра раствора композита (рисунок) обоснован выбор меди для определения фосфора и кальция, а гадолиния — для определения церия. Необходимость использования двух стандартов в данном случае вызвана различием в содержаниях основы — Са, Р и добавки Се, а также различием свойств этих элементов.

Таблица 1. Результаты определения Са, Р и Се (мг/л) методом РФА ПВО ($n = 3$; $P = 0,95$)

Table 1. Results of Ca, P, and Ce determination (mg/liter) by TXRF ($n = 3$; $P = 0.95$)

Номер образца	Заложено		Определяемый элемент	Найдено в растворе, мг/л	Рассчитано в образце	
	$n(\text{Ca})/n(\text{P})$	Добавка Се, % ат.			$n(\text{Ca})/n(\text{P})$	Добавка Се, % ат.
1	1,50	0,5	Са	20 ± 1	1,48	0,45
			Р	$10,5 \pm 0,8$		
			Се	$0,32 \pm 0,03$		
2	1,67	2,5	Са	30 ± 2	1,67	2,4
			Р	14 ± 1		
			Се	$2,5 \pm 0,2$		
3	1,67	0,5	Са	40 ± 2	1,30	0,5
			Р	24 ± 2		
			Се	$0,70 \pm 0,08$		

При анализе растворов образца с использованием меди в качестве внутреннего стандарта (40 мг/л) занижение результатов определения кальция отмечено при его концентрации более 50 мг/л. Вероятно, гомогенное распределение внутреннего стандарта позволяет расширить диапазон содержаний для правильного определения кальция по сравнению с методом внешнего стандарта за счет учета влияния различных факторов. Для снижения влияния пробоподготовки на результаты определения состава композита предложено анализировать суспензии образцов с применением внутренних стандартов. Результаты определения аналитов в растворах и суспензиях методом РФА ПВО, а также методом ИСП-АЭС в том же растворе для подтверждения правильности представлены в табл. 2.

Как видно из полученных данных, при содержании кальция до 50 мг/л в суспензии образцов возможно правильное определение Са, Р и Се методом РФА ПВО. При этом относительное стандартное отклонение результатов определения выше, чем в растворах — 0,09 и 0,05 соответственно. Это мы связываем со снижением воспроизводимости отбора аликвоты суспензии по сравнению с раствором. Отмечена сходимость результатов, полученных методами внешнего и внутреннего стандарта при соответствующих разбавлениях растворов и суспензий.

Заключение

При определении основных компонентов керамики Са и Р, а также добавки Се, перспективным является метод РФА ПВО для анализа растворов и суспензий образцов. При определении концентрации кальция выше 30 мг/л методом внешнего стандарта отмечено нарушение линей-

ной зависимости сигнала от концентрации. Согласно приведенным расчетам занижение результатов определения кальция не связано с поглощением образца, и проба соответствует критерию тонкого слоя. Показано, что применение Си и Gd в качестве внутренних стандартов в растворах и суспензиях образцов позволяет упростить анализ, увеличить верхнюю границу диапазона правильного определения кальция до 50 мг/л и улучшить воспроизводимость определения Са, Р и Се методом РФА ПВО.

Финансирование

Использование РФА ПВО спектрометра S2 PICOFOX поддержано программой развития Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова.

Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды».

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-23-00640, <https://rscf.ru/project/23-23-00640>.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Zhou H., Yang L., Gbureck U., et al. Monetite, an important calcium phosphate compound — Its synthesis, properties and applications in orthopedics / Acta Biomater. 2021. Vol. 127. P. 41 – 55. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.03.050
2. Ressler A., Ivanišević I., žuzić A., Somers N. The ionic substituted octacalcium phosphate for biomedical applications: A new pathway to follow? / Ceram. Int. 2022. Vol. 48. N 7. P. 8838 – 8851. DOI: 10.1016/j.ceramint.2021.12.126
3. Yilmaz B., Alshemary A. Z., Evis Z. Co-doped hydroxyapatites as potential materials for biomedical applications / Microchem. J. 2019. Vol. 144. P. 443 – 453. DOI: 10.1016/j.microc.2018.10.007

Таблица 2. Результаты определения Са, Р и Се в растворах и суспензиях образцов $n = 10$, $P = 0,95$. Внутренние стандарты Cu (20 мг/л) и Gd (0,5 мг/л)

Table 2. Results of Ca, P, and Ce determination in solutions and suspensions of samples $n = 10$, $P = 0.95$. Internal standards Cu (20 mg/liter) and Gd (0.5 mg/liter)

Номер образца	Заложено		Определяемый элемент	Найдено в растворе, мг/л	Рассчитано в образце		Найдено в суспензии, мг/л	Рассчитано в образце		Найдено в растворе методом ИСП-АЭС, мг/л
	$n(\text{Ca})/n(\text{P})$	Добавка Се, % ат.			$n(\text{Ca})/n(\text{P})$	Добавка Се, % ат.		$n(\text{Ca})/n(\text{P})$	Добавка Се, % ат.	
1	1,50	0,5	Са	40 ± 2	1,50	0,5	43 ± 4	1,51	0,5	40 ± 4
			Р	21 ± 1			22 ± 2			22 ± 3
			Се	$0,70 \pm 0,04$			$0,75 \pm 0,07$			$0,73 \pm 0,08$
2	1,67	2,5	Са	36 ± 2	1,64	2,4	42 ± 4	1,64	2,4	37 ± 3
			Р	$17,0 \pm 0,8$			20 ± 2			17 ± 2
			Се	$3,0 \pm 0,1$			$3,5 \pm 0,4$			$3,3 \pm 0,2$
3	1,67	0,5	Са	50 ± 2	1,64	0,46	52 ± 5	1,62	0,44	52 ± 4
			Р	24 ± 1			25 ± 3			25 ± 3
			Се	$0,80 \pm 0,04$			$0,80 \pm 0,09$			$0,90 \pm 0,08$

4. **Ghosh R., Das S., Mallick S. P., Beyene Z.** A review on the antimicrobial and antibiofilm activity of doped hydroxyapatite and its composites for biomedical applications / *Mater. Today Commun.* 2022. Vol. 3. P. 2352 – 4928. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2022.103311
5. **Wang C., Liu Y., Zhang Y., et al.** Synthesis, photothermal effects, and antibacterial properties of lanthanum-doped hydroxyapatite / *Ceram. Int.* 2023. Vol. 49. N 7. P. 11378 – 11392. DOI: 10.1016/j.ceramint.2022.11.337
6. **Zhang Y., Hu M., Zhang W., Zhang X.** Research on rare earth doped mesoporous bioactive glass nanospheres. I. Similarity of in vitro biological effects / *J. Non-Cryst. Solids.* 2022. Vol. 587. 121586. DOI: 10.1016/j.jnoncrysol.2022.121586
7. **Nisar A., Iqbal S., Rehman M., et al.** Study of physico-mechanical and electrical properties of cerium doped hydroxyapatite for biomedical applications / *Mater. Chem. Phys.* 2023. Vol. 299. 127511. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2023.127511
8. **Liu J., Zhou X., Zhang Y., et al.** Rapid hemostasis and excellent antibacterial cerium-containing mesoporous bioactive glass/chitosan composite sponge for hemostatic material / *Mater. Today Chem.* 2022. Vol. 23. 100735. DOI: 10.1016/j.mtchem.2021.100735
9. **Padmanabhan V. P., Kulandaivelu R., Nellaiappan S. N. T. S., et al.** Facile fabrication of phase transformed cerium (IV) doped hydroxyapatite for biomedical applications — A health care approach / *Ceram. Int.* 2020. Vol. 46. N 2. P. 2510 – 2522. DOI: 10.1016/j.ceramint.2019.09.245
10. **Ciobanu G., Harja M.** Cerium-doped hydroxyapatite/collagen coatings on titanium for bone implants / *Ceram. Int.* 2019. Vol. 45. N 2. Part B. P. 2852 – 2857. DOI: 10.1016/j.ceramint.2018.07.290
11. **Banerjee S., Bagchi B., Pal K., et al.** Essential oil impregnated luminescent hydroxyapatite: Antibacterial and cytotoxicity studies. / *Mater. Sci. Eng.: C.* 2020. Vol. 116. 111190. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111190
12. **Yuan Sh., Qi X., Zhang He., et al.** Doping gadolinium versus lanthanum into hydroxyapatite particles for better biocompatibility in bone marrow stem cells / *Chem.-Biol. Interact.* 2021. Vol. 346. 109579. DOI: 10.1016/j.cbi.2021. 109579
13. **Brahimi S., Ressler A., Boumchedda K., et al.** Preparation and characterization of biocomposites based on chitosan and biomimetic hydroxyapatite derived from natural phosphate rocks. / *Mater. Chem. Phys.* 2022. Vol. 276. 125421. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2021.125421
14. **Bazin T., Magnaudeix A., Mayet R., et al.** Sintering and biocompatibility of copper-doped hydroxyapatite bioceramics. / *Ceram. Int.* 2021. Vol. 47. N 10. Part A. P. 13644 – 13654. DOI: 10.1016/j.ceramint.2021.01.225
15. **Ullah Ih., Siddiqui M. A., Kolawole Sh. K., et al.** Synthesis, characterization and in vitro evaluation of zinc and strontium binary doped hydroxyapatite for biomedical application / *Ceram. Int.* 2020. Vol. 46. N 10. Part A. P. 14448 – 14459. DOI: 10.1016/j.ceramint.2020.02.242
16. **Priyadarshini B., Vijayalakshmi U.** Development of cerium and silicon co-doped hydroxyapatite nanopowder and its in vitro biological studies for bone regeneration applications / *Adv. Powder Technol.* 2018. Vol. 29. N 11. P. 2792 – 2803. DOI: 10.1016/j.appt.2018.07.028
17. **Szoboszlai N., Polgári Z., Mihucz V. G., Zárar G.** Recent trends in total reflection X-ray fluorescence spectrometry for biological applications / *Anal. Chim. Acta.* 2009. Vol. 633. N 1. P. 1 – 18. DOI: 10.1016/j.aca.2008.11.009
18. **von Bohlen A., Fernández-Ruiz R.** Experimental evidence of matrix effects in total-reflection X-ray fluorescence analysis: Coke case / *Talanta.* 2020. Vol. 209. 120562. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120562
19. **Meiszerics A., Havancsák K., Sinkó K.** Catalysis, nanostructure and macroscopic property triangle in bioactive calcium-containing ceramic systems / *Mater. Sci. Eng. C.* 2013. Vol. 33. N 3. P. 1371 – 1379. DOI: 10.1016/j.msec.2012.12.038
20. **Filatova D. G., Alov N. V., Vorobyeva N. A., et al.** Quantification of modifiers in advanced materials based on zinc oxide by total reflection X-ray fluorescence and inductively coupled plasma mass spectrometry / *Spectrochim. Acta. Part B.* 2016. Vol. 118. P. 62 – 65. DOI: 10.1016/j.sab.2016.02.008
21. **Nikitina Yu. O., Petrakova N. V., Demina A. Yu., et al.** Cerium-containing hydroxyapatites with luminescent properties / *Russ. J. Inorg. Chem.* 2021. Vol. 66. N 8. P. 1067 – 1072. DOI: 10.1134/S0036022621080179
22. **Maltsev A. S., Ivanov A. V., Chubarov V. M., et al.** Development and validation of a method for multielement analysis of apatite by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry / *Talanta.* 2020. Vol. 214. 120870. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.120870
23. **Maltsev A. S., Ivanov A. V., Pashkova G. V., et al.** New prospects to the multi-elemental analysis of single microcrystal of apatite by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry / *Spectrochim. Acta. Part B.* 2021. Vol. 184. 106281. DOI: 10.1016/j.sab.2021.106281