

ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-АБСОРБЦИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ СВОБОДНЫХ И СТРУКТУРНО-СВЯЗАННЫХ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ

С. Н. Данильченко*, Ю. В. Рогульский, А. Н. Кулик, А. Н. Калинкевич

УДК 548.73:549.753.1

Институт прикладной физики НАН Украины,
40030, Сумы, ул. Петропавловская, 58, Украина; e-mail: danilserg50@gmail.com

(Поступила 12 ноября 2018)

Предложен метод химического разделения компонентов костной ткани, основанный на их избирательной растворимости, с последующим определением микроэлементов методом атомно-абсорбционной спектрометрии. Определены общие (суммарные) концентрации Mg, Zn, Fe, Sr, Cu, Mn, Pb и концентрации этих элементов в растворах с pH 6.5, 10 и 12 после их взаимодействия с препаратом кости. Полученные концентрации “растворимых” фракций микроэлементов критически проанализированы с учетом возможных реакций образования и осаждения в щелочных растворах новых нерастворимых фаз. На основании полученных данных способность элементов иметь подвижные фракции в составе костной ткани можно представить рядом $Mg > Zn \geq Fe > Sr > Cu$. При этом некристаллический Mg преимущественно локализован в воде или биожидкостях кости, а некристаллический Zn — в растворимой щелочами органической компоненте кости, Pb и Mn в растворах практически не обнаруживаются, т. е. локализуются в кристаллической фазе.

Ключевые слова: костная ткань, микроэлементы, концентрация, локализация, избирательная растворимость, апатит, атомно-абсорбционная спектрометрия.

A method of chemical separation of the components of bone tissue, based on their selective solubility, with the subsequent determination of microelements by atomic absorption spectrometry, is proposed. The total concentrations of Mg, Zn, Fe, Sr, Cu, Mn, and Pb, and the concentrations of these elements in solutions with pH 6.5, 10, and 12 after their interaction with the bone preparation were determined. The obtained concentrations of the “soluble” fractions of trace elements are critically analyzed taking into account the possible reactions of formation and precipitation new insoluble phases in alkaline solutions. Based on the data obtained, the ability of elements to form mobile fractions in the composition of bone tissue can be represented as follows: $Mg > Zn \geq Fe > Sr > Cu$; at the same time, noncrystalline Mg is predominantly localized in water or biological liquids of the bone, and noncrystalline Zn — in the alkali-soluble organic component of the bone, Pb and Mn are practically not detected in solutions, i.e., localized in the crystalline phase.

Keywords: bone tissue, microelements, concentration, localization, selective solubility, apatite, atomic absorption spectrometry.

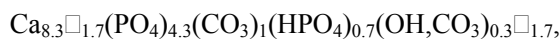
Введение. При определении микроэлементного состава биологических минерализованных тканей важно знать не только абсолютные концентрации, но и долевое распределение элементов между разными компонентами ткани. В костной ткани микроэлементы могут локализоваться в нанокристаллах биологического апатита, замещая основные ионы; в гидратной оболочке на поверхности кристаллов; в органических составляющих ткани; в биологических жидкостях и клеточных элементах. В последнее время предпринимаются попытки определения преимущественной локализации микроэлементов минерализованных тканей методами рентгеновской абсорбционной спектрометрии, хотя

DETERMINATION OF LABILE AND STRUCTURALLY BOUND MICROELEMENTS OF BONE TISSUE BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

S. N. Danilchenko*, Yu. V. Rogulsky, A. N. Kulik, A. N. Kalinkevich (Institute of Applied Physics, National Academic of Sciences of Ukraine, 58 Petropavlovskaya Str., Sumy, 40030, Ukraine; e-mail: danilserg50@gmail.com)

их применение существенно лимитируется ограниченной доступностью высокоярких (синхротронных) источников излучения.

Главная минеральная составляющая костной ткани млекопитающих — нанокристаллический дефектный апатит, который с учетом основных элементов и частичных замещений карбонат-ионом (CO_3^{2-}) фосфатных групп (PO_4^{3-}) и ионов гидроксила (OH^-) может быть представлен следующим образом [1, 2]:



где \square — вакансии. Кроме указанных элементов в минерале костной ткани находятся другие ионы, которые могут входить в кристаллическую структуру апатита, замещая в ней базовые ионы. Особое место среди элементов-металлов, оказывающих большое влияние на кристаллохимические характеристики биогенного апатита, занимают щелочные и щелочноземельные металлы, такие как магний, натрий и калий. В минерале кости эти элементы обнаруживаются в сравнительно больших концентрациях ($\text{Na} \sim 1.0$ мас.%, $\text{Mg} \sim 0.2\text{—}0.6$ мас.%, $\text{K} \sim 0.07$ мас.% [3]), поэтому в литературе их часто определяют как “мажорные” примеси или макроэлементы в отличие от “минорных” или микроэлементов, содержание которых в биоапатите нормальной костной ткани не превышает нескольких сотых или тысячных долей процента [3—6]. К микроэлементам кости относятся прежде всего железо, цинк, стронций, свинец и некоторые другие [6, 7].

Аккумуляция биологически значимых ионов в минерале костной ткани функционально обусловлена, так как помимо опорной функции кости выполняют роль “депо” микроэлементов, которые могут быть мобилизованы для поддержания необходимого концентрационного уровня в биологических жидкостях организма. Также в костях “депонируются” (при этом частично инактивируются) и нежелательные или даже токсичные элементы, попадающие в организм при неблагоприятных экологических условиях. Этому способствует толерантность структуры апатита к изоморфным замещениям, что в конечном итоге дает возможность отложения в тканях скелета вполне удовлетворительного, функционально полноценного минерального вещества в условиях резких колебаний экологических факторов и диеты.

Существенным является то, что как основные ионы, так и “мажорные” и “минорные” элементы костной ткани, локализующиеся преимущественно в кристаллической решетке биологического апатита, могут находиться и на поверхности нанокристаллов биоминерала, в мягких тканях и биологических жидкостях кости. В работах [6, 8] предложена модель ультраструктурной организации минерала костной ткани, согласно которой нанокристаллы апатита окружены относительно лабильной, но структурированной, гидратной оболочкой, содержащей различные катионы и анионы. Очевидно, что неапатитная локализация металлических ионов обеспечивает им большую подвижность и более активное участие в обменных биохимических процессах. Для некоторых элементов экспериментально определены или гипотетически предложены примерные концентрационные соотношения фракций разной локализации [9]. Предполагается, что разные ионы обладают неодинаковой способностью к переходам из структурно-связанного состояния в свободное [3, 10].

Наиболее часто элементный состав минерализованных тканей исследуется методами электронно-зондового (EDX (WDX)) и протонно-зондового рентгеноспектрального анализа (PIXE). Эти методы позволяют оценить содержание основных элементов и “мажорных” примесей с уровнем концентрации ≥ 0.01 мас.%. Основные их недостатки — невысокий порог обнаружения и невозможность отдельного определения фракций одного и того же элемента в разных химических состояниях или разной локализации. Методы атомно-абсорбционной спектрометрии (FAAS, GFAAS) и масс-спектрометрии элементного анализа, в том числе с индуктивно-связанной плазмой, обладая высокими аналитическими характеристиками, в особенности низким порогом обнаружения, также не способны предоставить информацию о преимущественной локализации определяемого микроэлемента.

В последние годы получил развитие новый эффективный подход, дающий информацию о локальной координации или химическом статусе ионов, основанный на рентгеновской абсорбционной спектроскопии (XAS), а именно на анализе околопороговой структуры спектров поглощения (XANES) и протяженной тонкой структуры спектров поглощения (EXAFS) [9, 11, 12]. Однако широкое применение этих методов существенно лимитируется ограниченной доступностью источников сверхяркого (синхротронного) рентгеновского излучения. Тем не менее уже имеются данные XAS о процентном распределении Sr^{2+} между решеткой апатита (35—45 %), гидратным окружением (~ 30 %) и коллагеном [9]. С помощью метода μ -XANES получены доказательства преимущественной локализации Pb в позициях Ca^{2+} решетки апатита [12]. Накапливается информация о химическом статусе Zn^{2+} в кос-

тях, хрящах и патологических кальцификатах [13, 14]. При исследованиях биологических минерализованных тканей методы XAS применяются в комбинации с рентгеновским флуоресцентным микроанализом (μ XRF) и рентгеновской микродифракцией (μ XRD) [13]. На основе накапливаемого опыта открываются перспективы изучения зависимости преимущественной локализации микроэлементов от возраста, происхождения и условий образования биоминералов.

В сложившейся ситуации представляется целесообразным дополнить перечисленные выше подходы более традиционными и доступными методами количественного определения микроэлементов с привлечением простых способов фракционирования пробы биологической минерализованной ткани. Ключевым этапом исследований при этом становятся процедуры препарирования материала.

В работах [15—17] предложена методика выделения из костной ткани неизмененных кристаллов биоапатита путем комбинированной химической и ультразвуковой обработки. Благодаря такой подготовке исследованы морфологические характеристики нанокристаллов биоапатита методами просвечивающей электронной микроскопии [15, 16] и микроскопии атомных сил [17].

В работах [10, 18] изучена возможность определения преимущественной локализации Mg, Na и K в образцах костного апатита с использованием атомно-абсорбционной и атомно-эмиссионной спектроскопии. Процедура препарирования включала в себя пошаговую термическую обработку (в интервале 560—720 °C) с последующим ультразвуковым диспергированием порошкообразных материалов в воде. Лабильные (растворимые) фракции элементов определялись в водной среде после ультразвуковой обработки. Из полученных данных следует, что Mg и Na в биоапатите кости находятся как в структурно-связанном состоянии, замещая кальций в решетке апатита, так и в лабильном состоянии, локализуясь вне кристаллов, в то время как калий не может в заметных количествах входить в структуру апатита или быть с ним химически связанным. Также установлено, что концентрация лабильного магния костных образцов ≈ 30 —40 % его общего содержания.

Известна работа [19], в которой для выяснения преимущественной локализации Na и K в костях применено химическое удаление органического материала с использованием гидразина. Определение ионного состава препарированных таким образом образцов проведено методом масс-спектрометрии вторичных ионов (SIMS). Установлено, что большую часть натрия и калия содержит именно удаленный органический материал кости.

В настоящей работе опробован способ химического разделения апатитной и неапатитной составляющих костной ткани с исключением процедур ступенчатого отжига и ультразвукового диспергирования. Этот подход основан на том, что апатиты кальция как биологического, так и синтетического происхождения практически не растворимы в воде и щелочных средах, хотя растворимы в кислотах. Другие фосфаты кальция, предположительно присутствующие в некоторых биологических минералах, растворяются в дистиллированной воде ($\text{pH} \approx 7$) заметно лучше, чем гидроксиапатит [3, 20]. Кроме того, развитая удельная поверхность кристаллической фазы кости может аккумулировать большое количество жизненно важных микроэлементов организма без связывания их в структуре апатита. Такие подвижные “лабильные” формы депонирования обосновываются необходимостью быстрого переноса этих элементов к местам их назначения или дефицита.

Как видно, в водных средах с $\text{pH} 7$ —8 могут быть получены растворы слабосвязанных лабильных элементов, присутствующих в биологических минерализованных тканях. Повышение pH до 10—12 приводит к полному растворению органических составляющих костной ткани (преимущественно коллагена). Вместе с тем при $\text{pH} 10$ —12 может быть инициировано осаждение вторичных фаз из растворенных ионов, что нежелательно при решении аналитических задач разделения микропримесей разной локализации. Поэтому в настоящей работе использованы растворы с $\text{pH} 6.5$, 10 и 12, а полученные концентрации “лабильных” фракций определяемых микроэлементов критически проанализированы с учетом возможных реакций образования и осаждения новых нерастворимых фаз. Полученные значения ни в коей мере не отображают полную картину локализации микроэлементов кости, тем не менее предоставляя информацию об их относительной способности к миграциям в биологической ткани.

Эксперимент. Объект исследования — образец кортикальной (плотной) кости из бедра взрослой коровы, полученный от поставщика мясных продуктов сразу после убоя скота. Предварительная подготовка образцов включала в себя механическую очистку и сушку на воздухе при 100 °C. Все процедуры выполнялись с минимальным использованием реактивов и химических агентов для предотвращения попадания в пробы посторонних элементов. Высушенные образцы кости тщательно растирали в фарфоровой ступке до мелкодисперсного порошка.

При подготовке к определению суммарных концентраций элементов методом атомно-абсорбционной спектроскопии навеску образца (~0.015 г) переносили в полипропиленовую пробирку, добавляли 0.5 мл концентрированной (56 %) азотной кислоты и после полного растворения образца доводили объем пробы до 10 мл. Полнота растворения пробы подтверждалась отсутствием эффекта Тиндалля (Tyndall) в полученном растворе.

Приготовление проб для измерения концентраций элементов в растворах с pH 6.5, 10 и 12: 1) приготовление растворов с pH 12: КОН (100 мл, 0.56 г/л), NaOH (100 мл, 0.4 г/л), NH₄OH; 2) разбавление приготовленных растворов до pH 10 в отдельных полипропиленовых пробирках (10 мл); 3) взвешивание и размещение в пробирках (7 шт.) по 0.1 г порошка кости; 4) заполнение пробирок 5 мл различных растворов; 5) взбалтывание содержимого пробирок в течение 10—15 мин после добавления раствора с повторным взбалтыванием (5 мин) после осаждения нерастворенной фракции; 6) отстаивание содержимого пробирок в штативе в течение 15—16 ч перед непосредственным измерением концентраций.

Для приготовления проб использованы реактивы (азотная кислота, растворы щелочей и аммиака) квалификации Х.Ч. Все растворы приготовлены с использованием бидистиллированной воды с электрической проводимостью ≤1 мкСм. Для предотвращения взаимодействия реактивов со стеклом использована полипропиленовая химическая посуда.

Калибровочные растворы для определения содержания Zn, Cu, Fe, Mn, Pb, Mg, Sr готовились из государственных стандартных образцов (ГСО).

Концентрации определены на атомно-абсорбционном комплексе КАС 120.1 (SELMi, Украина) с дейтериевым корректором фона. Источником излучения служили спектральные лампы ЛТ-6 с полым катодом. Использован электротермический атомизатор А-5 со стандартной графитовой печью с пирографитовым покрытием длиной 28 мм и внутренним диаметром 6 мм.

Проба дозировалась в печь посредством дозатора МД-20 объемом 20 ± 0.4 мкл. Спектральные режимы измерения (длина волны, ширина спектральной щели, ток лампы) для Zn, Cu, Fe, Mn, Pb, Mg, Sr общепринятые [21]. Атомно-абсорбционный сигнал сканировался с шагом 0.016 с и обрабатывался компьютером. Температурная программа печи подбиралась для каждого элемента отдельно для достижения наиболее оптимальных условий анализа. Для чистоты эксперимента и предотвращения возможных химических загрязнений никакие дополнительные спектральные буферы и модификаторы не применялись.

Предварительная полуколичественная оценка элементного состава представленного образца кости в исходном состоянии выполнена с использованием сканирующего электронного микроскопа Nova NanoSEM 450 (FEI, США), оснащенного энергодисперсионным рентгеновским (EDX) кремниевым (SDD) детектором X-MaxN (Oxfords Instruments, Великобритания) и ультратонким окном, активная площадь SDD 20 мм². Ускоряющее напряжение электронного пучка 15 кВ. Спектры получены при интегрировании сигнала от произвольной сканируемой области гладкого среза кости. Токопроводящие покрытия для материалов перед анализом не применялись.

Апатитная природа биоминерала анализируемого образца и ее неизменность после обработки в щелочных растворах с разными pH подтверждена методами рентгеновской дифракции в параллельных структурных исследованиях.

Результаты и их обсуждение. Как подтверждается EDX-спектрами (рис. 1), элементный анализ плотной кости методом электронно-зондового рентгеноспектрального анализа возможен только на уровне основных элементов и “мажорных” примесей и даже полуколичественное определение калия в большинстве случаев вызывает серьезные затруднения. Оцененные из EDX-спектров концентрации Na (≈1.16 мас.%) и Mg (≈0.45 мас.%) хорошо согласуются с литературными данными [3, 6]. В то же время, как видно из рис. 2, метод атомно-абсорбционной спектроскопии позволяет надежно измерять концентрации как макроэлементов (Mg), так и микроэлементов вплоть до Cu и Mn, содержащихся в костной ткани на уровне нескольких ppm. Измеренные концентрации микроэлементов кости соответствуют литературным данным [3, 6]. Некоторое превышение концентрации Sr и особенно Pb над значениями, приведенными в [6], можно объяснить очень высокой восприимчивостью костной ткани к неблагоприятным экологическим факторам. Следует отметить хорошее соответствие концентраций Mg, определенных методом атомно-абсорбционной спектроскопии и EDX.

Измерение содержания выбранных элементов в растворах с разными значениями pH показывает, что Pb и Mn практически не обнаруживаются в растворенном состоянии. Из этого можно сделать вывод о преимущественной локализации этих элементов в апатите костной ткани. Содержание Zn

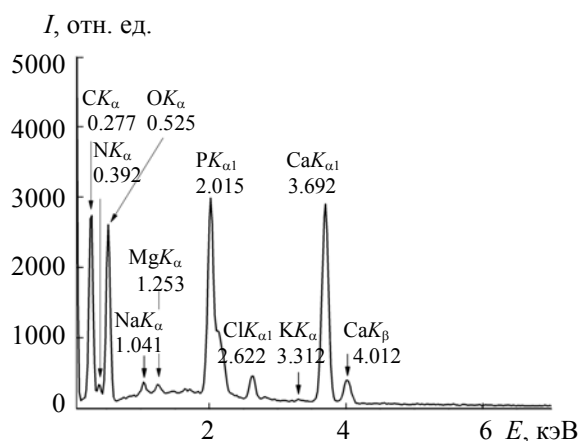


Рис. 1. EDX-спектр исследуемого образца кортикальной кости

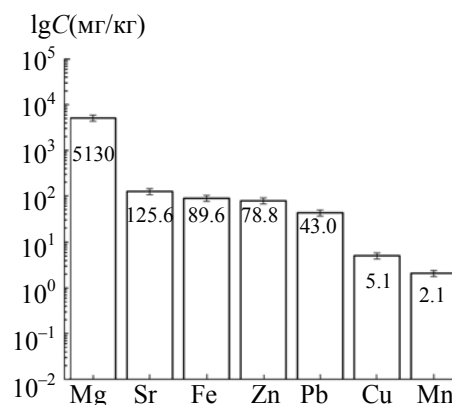


Рис. 2. Суммарные (абсолютные) концентрации элементов в образце кортикальной кости, определенные методом атомно-абсорбционной спектроскопии

в растворах разных электролитов наиболее нетипично и описано ниже. Для остальных элементов (Mg, Sr, Fe и Cu), концентрации которых в декантированных растворах могут быть измерены методом атомно-абсорбционной спектроскопии, т. е. превышают порог надежного обнаружения, построены диаграммы (рис. 3). Анализ этих диаграмм позволяет сделать некоторые заключения о соотношениях стабильных (структурно-связанных) и лабильных фракций элементов.

Согласно рис. 3, а, в связанном состоянии (т. е. не растворяется водой) находится ~80—85 % общего магния. Из данных [18] (отжиг+ультразвук+атомная абсорбция) следует, что ~60—70 % магния, присутствующего в кости, внедряется в структуру биоапатита, замещая в ней кальций, а остальной магний предположительно локализуется вне кристаллов костного минерала и легко может быть удален при ультразвуковой обработке. Это различие в процентном содержании связанного Mg можно объяснить прежде всего тем, что исключение ультразвуковой обработки снижает эффективность выхода в раствор ионов Mg, локализуемых на поверхности кристаллов. Кроме того, могут иметь место специфические особенности данного образца костной ткани. В целом же данные настоящего исследования и более ранних работ удовлетворительно согласуются и свидетельствуют о наличии в костной ткани значительной фракции ($\geq 15\%$ общего содержания) водорастворимого магния. Количество растворимого магния значительно уменьшается в растворе аммиака и в щелочной среде (при pH 10 и еще больше при pH 12). Это уменьшение растворимости магния обусловлено повышением концентрации гидроксил-ионов с повышением pH.

В отличие от магния лишь небольшая часть стронция ($\approx 1\%$) обнаруживается в воде (рис. 3, б), т. е. не связана со структурой биологического апатита. Содержание стронция в дистиллированной воде (1.5 мг/кг) и растворах щелочей и аммиака (≤ 8.5 мг/кг) значительно ниже расчетных 1600 мг/кг для реакции $\text{Sr}(\text{OH})_2 \rightarrow \text{SrOH}^+ + \text{OH}^-$, произведение растворимости (Пр) = $3.2 \cdot 10^{-4}$ [22]. Это означает, что причиной выявленных низких концентрации стронция в растворах не могут быть образование и осаждение новых нерастворимых фаз. Некоторое увеличение концентрации растворимого стронция в щелочной среде (при pH 10 и 12) по сравнению с нейтральной можно объяснить присутствием небольшой доли стронция в органической составляющей кости, которая полностью растворяется в щелочах. Таким образом, полученные данные указывают на то, что основная часть стронция костной ткани находится в кристаллах апатита, замещая кальций, и только небольшая часть находится в химических состояниях, которые не связаны с минеральной структурой.

Железо костной ткани (рис. 3, в) в заметно большей степени, чем стронций (но меньше, чем магний), может находиться в подвижном (растворимом) состоянии ($\approx 2\%$ общего содержания). Содержание железа в растворах щелочей, аммиака и дистиллированной воде на порядок ниже расчетного (9.6 мг/кг), необходимого для реакции $\text{Fe}(\text{OH})_2 \rightarrow \text{FeOH}^+ + \text{OH}^-$, Пр = $3 \cdot 10^{-10}$ [22], что исключает возможность получения заниженных значений из-за образования и осаждения новых нерастворимых фаз. Некоторое увеличение концентрации подвижного железа в щелочной среде по сравнению с нейтральной можно объяснить присутствием небольшой его части в органических компонентах кости.

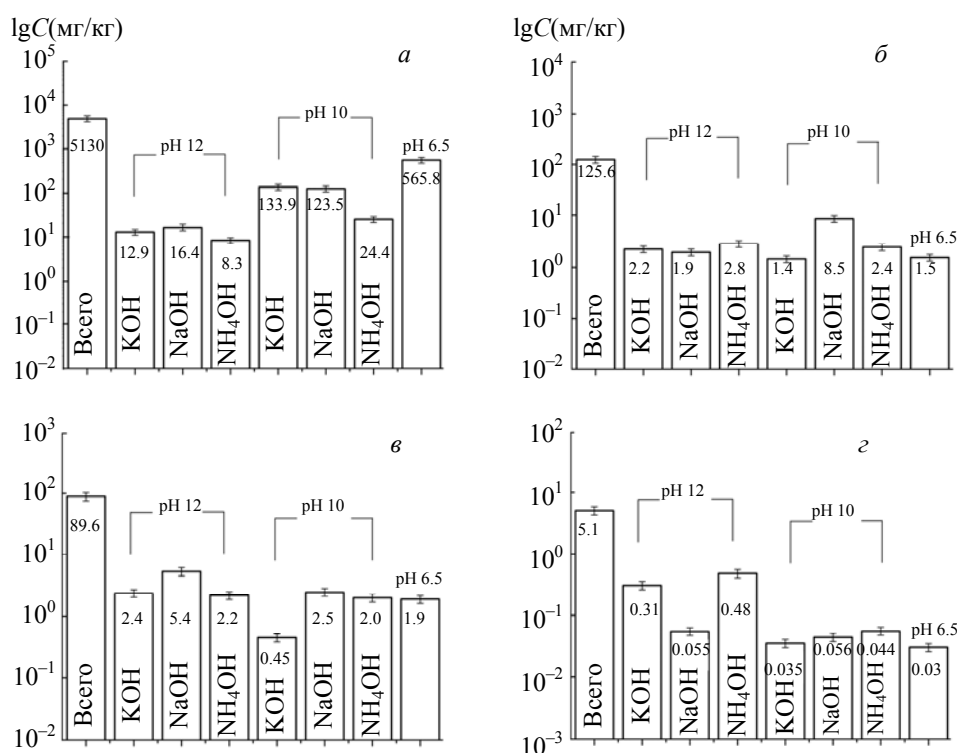


Рис. 3. Содержание магния (а), стронция (б), железа (в) и меди (г) в исследуемом образце кортикальной кости

Содержание меди почти для всех вариантов растворов (рис. 3, г) лишь немного превышает порог обнаружения. Исключение составляют растворы KOH и NH₄OH при pH 12, в которых обнаружено заметное увеличение количества меди вследствие образования хорошо растворимых комплексных соединений меди [23]. Концентрация меди в воде равна расчетному значению 0.030 мг/кг для реакции $\text{Cu}(\text{OH})_2 \rightarrow \text{CuOH}^+ + \text{OH}^-$, $\text{Pr} = 2.2 \cdot 10^{-13}$ [22]. В целом полученные данные свидетельствуют о нахождении почти всей меди костной ткани в структуре биоапатита.

Данные о концентрациях Zn, определенных в растворах разных электролитов, отличаются тем, что цинк в дистиллированной воде и растворах щелочей NaOH и KOH не обнаружен; в растворах аммиака выявлено 0.93 и 10.0 мг/кг Zn при pH 12 и 10. На наш взгляд, это объясняется тем, что образующаяся в щелочной среде гидроксид цинка Zn(OH)₂ дает нерастворимый осадок при взаимодействии с NaOH и KOH и, напротив, в растворах аммиака вследствие реакции $\text{Zn}(\text{OH})_2 + 4\text{NH}_3 \rightarrow [\text{Zn}(\text{NH}_3)_4](\text{OH})_2$ образуется растворимый комплекс. Исходя из этого, цинк следует отнести к элементам, как способным быть связанными в кристаллической решетке биоапатита, так и входящим в состав органических составляющих костной ткани, причем неапатитная фракция цинка представляется довольно весомой.

Сравнивая полученные данные для цинка и магния, необходимо отметить приблизительно равное для них доленое распределение “нерастворимых” и “растворимых” фракций с той лишь разницей, что в случае цинка лучшим растворителем является аммиак, а в случае магния — вода. Это указывает на то, что некристаллический цинк преимущественно локализован в растворимой щелочами органике, а магний — в несвязанной воде или биожидкостях кости.

Заключение. Предложен метод определения соотношения свободных (растворимых) и структурно-связанных микроэлементов костной ткани путем химического разделения компонентов кости с последующим измерением концентраций методом атомно-абсорбционной спектрометрии. Определены общие (суммарные) концентрации Mg, Zn, Fe, Sr, Cu, Mn, Pb в образце кости и концентрации этих элементов в растворах различных электролитов с pH 6.5, 10 и 12 после их взаимодействия с измельченным препаратом кости. Способность элементов иметь подвижные (не апатитные) фракции в составе костной ткани представлена следующим рядом: $\text{Mg} > \text{Zn} \geq \text{Fe} > \text{Sr} > \text{Cu}$; при этом некристаллический Mg преимущественно локализован в воде или биожидкостях кости, а некристалличе-

ский Zn — в растворимой щелочами органической компоненте; Pb и Mn в использованных растворах не обнаружены, т. е. локализованы в кристаллической фазе.

Очевидно, что преимущественная локализация и относительная лабильность биологически значимых элементов определяются функциональным назначением костной ткани, а значит, любое отклонение от нормального соотношения “нерастворимых” и “растворимых” фракций может быть связано с той или иной патологией. Надеемся, что данная работа и последующие за ней исследования костной ткани разных видов (компактной и губчатой) в норме и при некоторых патологиях (например, остеопороз) позволят дополнить и уточнить существующую модель ультраструктурной организации минерала кости [6] и выявить корреляции между распределением микроэлементов и функциональными нарушениями. Это в свою очередь должно способствовать выбору правильной стратегии лечения и профилактики заболеваний и патологий скелета.

- [1] **R. Legros, N. Balmain, G. Bonel.** *J. Chem. Res.*, **77** (1986) 2313—2317
- [2] **C. Ray.** *Biomaterials*, **15** (1990) 433—437
- [3] **J. C. Elliott.** *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates/Studies in Inorganic Chemistry 18*, Amsterdam, Elsevier (1994)
- [4] **B. Wopenka, J. D. Pasteris.** *Mater. Sci. Eng. C*, **25** (2005) 131—143
- [5] **J. M. Hughes, J. Rakovan.** *Rev. Mineral. Geochem.*, **48** (2002) 1—12
- [6] **C. Combes, S. Cazalbou, C. Ray.** *Minerals*, **6** (2016) 34
- [7] **J. D. Pasteris.** *Am. Mineralogist*, **101** (2016) 2594—2610
- [8] **S. Cazalbou, C. Combes, D. Eichert et al.** *J. Mater. Chem.*, **14** (2004) 2148—2153
- [9] **C. G. Frankær, A. C. Raffalt, K. Stahl.** *Calcif Tissue Int.*, **94** (2014) 248—257
- [10] **С. Н. Данильченко.** *Журн. нано- та електрон. фіз.*, **3** (2013) 03043-1—03043-5
- [11] **D. Bazin, A. Dessombz, C. Nguyen, H. K. Ea, F. Lioté, J. Rehr, C. Chappard, S. Rouzière, D. Thiaudière, S. Reguer, M. Daudon.** *J. Synchrotron Radiat.*, **21** (2014) 136—142
- [12] **F. Meirer, B. Pemmer, G. Pepponi, N. Zoeger, P. Wobrauschek, S. Sprio, A. Tampieri, J. Goettlicher, R. Steininger, S. Mangold, P. Roschger, A. Berzlanovich, J. G. Hofstaetter, C. Strellet.** *J. Synchrotron Radiat.*, **18** (2011) 238—244
- [13] **A. Dessombz, C. Nguyen, H. K. Ea, S. Rouzière, E. Foy, D. Hannouche, S. Réguer, F.-E. Picca, D. Thiaudière, F. Lioté, M. Daudon, D. Bazin.** *J. Trace Element. Med. Biol.*, **27** (2013) 326—333
- [14] **D. Bazin, X. Carpentier, I. Brocheriou, P. Dorfmuller, S. Aubert, C. Chappard, D. Thiaudière, S. Reguer, G. Waychunas, P. Jungers, M. Daudon.** *Biochimie*, **91** (2009) 1294—1300
- [15] **H. M. Kim, C. Rey, M. J. Glimcher.** *J. Bone Miner Res.*, **10** (1995) 1589—1601
- [16] **H. M. Kim, C. Rey, M. J. Glimcher.** *Calcif Tissue Int.*, **59** (1996) 58—63
- [17] **S. J. Eppell, W. Tong, J. L. Katz, L. Kuhn, M. J. Glimcher.** *J. Orthop. Res.*, **19** (2001) 1027—1034
- [18] **С. Н. Данильченко, А. Н. Кулик, П. А. Павленко, Т. Г. Калиниченко, А. Н. Бугай, И. И. Чермерис, Л. Ф. Суходуб.** *Журн. прикл. спектр.*, **73**, № 3 (2006) 385—391 [**S. N. Danilchenko, A. N. Kulik, P. A. Pavlenko, T. G. Kalinichenko, O. M. Buhay, I. I. Chemeris, L. F. Sukhodub.** *J. Appl. Spectr.*, **73** (2006) 437—443]
- [19] **D. A. Bushinsky, K. L. Gavrillov, J. M. Chabala, R. Levi-Setti.** *J. Bone Miner. Res.*, **15** (2000) 2026—2032
- [20] **L. Wang, G. H. Nancollas.** *Chem. Rev.*, **108** (2008) 4628—4669
- [21] **И. Хавезов, Д. Цалев.** *Атомно-абсорбционный анализ*, Ленинград, Химия (1983)
- [22] **Ю. Ю. Лурье.** *Справочник по аналитической химии*, Москва, Мир (1979)
- [23] **У. Гофман.** *Руководство по неорганическому синтезу*, **6**, Москва, Мир (1986)