

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **235292**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **396906**

(22) Data zgłoszenia: **07.11.2011**

(51) Int.Cl.

C01B 25/32 (2006.01)

A61L 27/12 (2006.01)

(54)

Sposób otrzymywania nanopłytek z syntetycznego hydroksyapatytu

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

13.05.2013 BUP 10/13

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

15.06.2020 WUP 07/20

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT WYSOKICH CIŚNIEŃ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

DARIUSZ SMOLEŃ, Warzyce, PL

**ALEKSANDRA KĘDZIERSKA,
Kolonja Zawada, PL**

ELŻBIETA PIETRZYKOWSKA, Łochów, PL

TADEUSZ CHUDOBA, Warszawa, PL

WITOLD ŁOJKOWSKI, Warszawa, PL

WOJCIECH ŚWIĘSZKOWSKI, Warszawa, PL

**KRZYSZTOF JAN KURZYDŁOWSKI,
Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Piotr Adamczyk

PL 235292 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nanopłytek z syntetycznego hydroksyapatytu o strukturze heksagonalnej.

Na świecie istnieje bardzo duże zapotrzebowanie na materiały umożliwiające regenerację ubytków kostnych, powstałych w wyniku wypadków, chorób nowotworowych, zabiegów dentystycznych albo operacji chirurgicznych, a niemożliwych do samodzielnej regeneracji przez organizm człowieka. Prowadzonych jest wiele badań mających na celu opracowanie technologii pozwalających na uzupełnienie i regenerację ubytków kostnych. Kość człowieka w 75% swojej masy składa się z nieorganicznego związku zwanego bioapatytem, który nadaje kości sztywność i wytrzymałość mechaniczną. Stosowanie na większą skalę apatyty pochodzącego z kości ludzkich napotyka na barierę psychologiczną oraz rodzi ryzyko przeniesienia na biorcę czynników chorobotwórczych obecnych w kościach dawcy. Dlatego od wielu lat trwają próby uzyskania syntetycznego hydroksyapatytu, o składzie chemicznym wyrażanym wzorem $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, będącego odpowiednikiem wspomnianego bioapatytu. O przydatności sproszkowanego syntetycznego hydroksyapatytu do celów medycznych decyduje stosunek ilości wapnia do fosforu oraz wielkość ziaren takiego proszku. Bioapatyt tworzy płaskie podłużne ziarna o strukturze heksagonalnej, których długość przekątnej nie przekracza wartości 50 nm. Większość syntetycznie uzyskiwanych hydroksyapatytów krystalizuje w układzie jednoskośnym, choć znane są także syntetyczne krystality o strukturze heksagonalnej. Wyniki badań dowodzą, że rozmiar ziaren hydroksyapatytu ma decydujący wpływ na stopień rozwoju komórek kościotwórczych i wielkości apoptozy, przy czym im mniejszy jest rozmiar ziarna hydroksyapatytu, tym rozwój osteblastów jest intensywniejszy i szybszy, a apoptoza mniejsza. Jednym ze znanych sposobów otrzymywania syntetycznego hydroksyapatytu jest formowanie jego struktur krystalicznych z mieszaniny zawiesiny wodorotlenku wapnia w wodzie i kwasu fosforowego. Najbliższe przedmiotowi wynalazku jest rozwiązanie ujawnione w publikacji Y.Z. Wang, Y. Fu „Microwave-hydrothermal synthesis and characterization of hydroxyapatite nanocrystalites” (Materials Letters, Vol. 65/2011, str. 3388–3390). Publikacja ta opisuje sposób otrzymywania hydroksyapatytowych nanopreciżków o długości większej niż 30 nm. Synteza nanopreciżków następuje pod wpływem oddziaływania promieniowaniem mikrofalowym o częstotliwości ok. 2,45 GHz na ciekły prekursor, w skład którego wchodzi kwas fosforowy, uwodniony azotan wapnia oraz etylenodiamina. Autorzy publikacji nie ujawnili użytej w eksperymencie tzw. gęstości promieniowania, czyli ilości dostarczonej energii mikrofalowej odniesionej do jednostki objętości prekursora.

Celem wynalazku było uzyskanie sproszkowanego syntetycznego hydroksyapatytu o strukturze heksagonalnej, możliwie najbardziej naśladującego bioapatyt występujący w ludzkich kościach.

Sposób według wynalazku zawiera etap przygotowania prekursora, polegający na sporządzeniu jednorodnej mieszaniny zawiesiny wodorotlenku wapnia w wodzie i kwasu fosforowego, oraz etap formowania z tego prekursora nanostruktur krystalicznych poprzez oddziaływanie na przygotowany prekursor promieniowaniem mikrofalowym, o częstotliwości korzystnie z zakresu od 2,4 do 2,5 GHz. Wynalazek polega na tym, że w etapie formowania nanostruktur krystalicznych stosuje się promieniowanie mikrofalowe o gęstości mocy zawierającej się w przedziale od 1 do 10 watów na każdy 1 cm³ prekursora, trwające od 10 do 900 sekund.

W jednym z wariantów wynalazku etap formowania nanostruktur krystalicznych prowadzi się w naczyniu reakcyjnym z materiału dielektrycznego, korzystnie w naczyniu teflonowym.

W kolejnych wariantach wynalazku etap formowania nanostruktur krystalicznych prowadzi się w naczyniu reakcyjnym szczelnie zamkniętym i kończy się ten etap po wytworzeniu się w naczyniu określonego ciśnienia, nie większego niż 2 atm. Etap formowania nanostruktur krystalicznych można zakończyć także po uzyskaniu w naczyniu określonej temperatury, nie wyższej niż 150°C.

W jeszcze innym wariantcie wynalazku, w etapie przygotowania prekursora do mieszanej zawiesiny wodorotlenku wapnia w wodzie dozjuje się kwas fosforowy, przy czym pojedyncza dawka kwasu nie przekracza 0,5 mililitra, a odstęp czasowy pomiędzy kolejnymi dawkami jest nie krótszy niż 0,1 sekundy.

W wyniku realizacji wynalazku uzyskano hydroksyapatytowy nanoproszek o właściwościach znacznie bliższych bioapatytowi niż preparaty tego typu znane dotychczas.

Wynalazek został przedstawiony w przykładach realizacji na załączonym rysunku, na którym fig. 1 przedstawia obraz TEM grupy nanopłytek według wynalazku, a fig. 2 przedstawia w powiększeniu taki obraz jednej nanopłytki. Fig. 3 przedstawia przykładowy dyfraktogram XRD nanoproszku według wynalazku, a fig. 4 przedstawia przykładowy rozkład rozmiarów nanopłytek w takim nanoproszku.

Nanopłytki według wynalazku wytwarza się w dwóch etapach. Najpierw sporządza się prekursor w postaci jednorodnej mieszaniny zawiesiny wodorotlenku wapnia w wodzie i kwasu fosforowego, po czym taki prekursor poddaje się działaniu promieniowania mikrofalowego, w wyniku czego następuje proces formowania się nanostruktur krystalicznych w formie płytek.

Przykład 1

Do zlewki z 75 ml wody umieszczonej na mieszadło magnetycznym pracującym z prędkością 800 obr/min dodano 1,7243 g (0,0233 mola) wodorotlenku wapnia, po czym odczekano 15 minut do momentu ujednolicenia się powstałej zawiesiny. Następnie do zlewki z otrzymaną zawiesiną dozowano 0,95 cm³ 85% roztworu kwasu fosforowego dawkami po 0,01 ml co 3 sekundy każda. Ilość dodanego kwasu była ilością stechiometryczną. Po zakończeniu dozowania kwasu powstały prekursor pozostawiano na włączonym mieszadło przez 30 minut. Następnie przeniesiono prekursor do teflonowego naczynia reakcyjnego, które po szczelnym zamknięciu umieszczono w reaktorze mikrofalowym Magnum II firmy Ertec i rozpoczęto etap formowania nanostruktur krystalicznych. W etapie tym do prekursora dostarczano promieniowanie mikrofalowe o częstotliwości 2,45 GHz ($\pm$ 50 KHz) z gęstością mocy 8 W/1 cm³ prekursora. Równolegle mierzono ciśnienie w naczyniu reakcyjnym poprzez pomiar siły wywieranej od wewnątrz na pokrywę naczynia reakcyjnego i etap formowania nanostruktur krystalicznych zakończono po wytworzeniu się w naczyniu reakcyjnym ciśnienia 2 atm. Następnie reaktor z naczyniem reakcyjnym studzono przez 5 minut za pomocą zainstalowanej w reaktorze chłodnicy wodnej. Po otwarciu naczynia reakcyjnego zlano z nad otrzymanego osadu ciecz poreakcyjną. Sam osad przeniesiono na sączek i przemywano 150 ml bezwodnego etanolu, a następnie suszono w sterylizatorze powietrznym w przepływie powietrza o temperaturze 30°C przez ok. 16 godzin. W efekcie otrzymano suchy nanoproszek, który podany badaniu TEM (transmisyjnym mikroskopem elektronowym) okazał się być czystym fazowo hydroksyapatytem o strukturze heksagonalnej i parametrach sieci a: 9,424(4) Å oraz c: 6,879(4) Å oraz o stosunku molowym Ca/P równym 1,647. Średni rozmiar otrzymanych nanopłytek określono na podstawie obrazów TEM rejestrowanych przy pomocy techniki ciemnego pola i licząc średnią arytmetyczną najdłuższych cięciw obrysów co najmniej 200 nanopłytek. Tak określony średni rozmiar uzyskanych nanopłytek wynosił 5,8 nm, przy czym ich współczynnik kształtu zdefiniowany jako stosunek długości nanopłytki do jej szerokości wahał się w przedziale od 2 do 3. Powierzchnia właściwa otrzymanego nanoproszku wynosiła 188,6 m²/g.

Przykład 2

Przygotowanie prekursora było analogiczne jak w przykładzie 1, przy czym czas mieszania po zakończeniu dozowania kwasu fosforowego przedłużono do 35 minut. Następnie rozpoczęto analogiczny jak w pierwszym przykładzie etap formowania nanostruktur w tym samym reaktorze mikrofalowym, przy czym zamiast ciśnienia w naczyniu reakcyjnym mierzono temperaturę. Etap ten zakończono po osiągnięciu w naczyniu temperatury 112°C. Analogicznie jak poprzednio wyodrębniono suchy nanoproszek, który okazał się czystym fazowo hydroksyapatytem o strukturze heksagonalnej, przy czym jego stosunek molowy Ca/P wynosił 1,582. Średni rozmiar nanopłytek określony przy pomocy opisanej wyżej techniki ciemnego pola wynosił 5,6 nm. Na fig. 4 przedstawiono rozkład rozmiarów uzyskanych w tym przykładzie nanopłytek, których współczynnik kształtu wahał się w przedziale od 4 do 5. Powierzchnia właściwa uzyskanego nanoproszku wynosiła 223,5 m²/g.

Przykład 3

Prekursor przygotowano w sposób opisany w pierwszym przykładzie. Następnie zrealizowano analogicznie jak w pierwszym przykładzie etap formowania nanostruktur w reaktorze mikrofalowym, dostarczając do prekursora promieniowanie mikrofalowe przez 90 sekund i w taki sam sposób wyodrębniono suchy sproszkowany heksagonalny hydroksyapatyt, w którym stosunek molowy Ca/P wynosił 1,572. Średni rozmiar otrzymanych nanopłytek określony przy pomocy techniki ciemnego pola wynosił 5,4 nm, a ich współczynnik kształtu zawierał się w przedziale od 4 do 5. Powierzchnia właściwa otrzymanego nanoproszku wynosiła 226,8 m²/g. Fig. 1 przedstawia obraz TEM jednej z nanopłytek otrzymanych w tym przykładzie. Na obrazie tym zaznaczono białą linią zarys nanopłytki i odcinek o długości 5 nm.

Przykład 4

Analogicznie jak w pierwszym przykładzie do zawiesiny wodorotlenku wapnia dodano kwas fosforowy, a następnie intensywnie mieszano prekursor do momentu uzyskania przez niego stabilnego pH w zakresie od 9 do 10. Następnie prekursor umieszczono w szczelnie zamykanym naczyniu teflonowym i w tym samym co poprzednio reaktorze mikrofalowym przeprowadzono etap formowania nanostruktur krystalicznych, dostarczając do prekursora energię mikrofalową aż do momentu osiągnięcia w naczyniu

temperatury 100°C. Tak samo jak w poprzednich przykładach wyodrębniono suchy sproszkowany hydroksyapatyt, w którym stosunek molowy Ca/P miał wartość 1,596. Powierzchnia właściwa otrzymanego nanoproszku wynosiła 236,4 m²/g. Średni rozmiar otrzymanych nanopłytek określony przy pomocy opisanej wcześniej techniki ciemnego pola wynosił 5,4 nm, a ich współczynnik kształtu zawierał się w przedziale od 4 do 5.

Badania wykorzystujące XRD (dyfraktometrię rentgenowską) potwierdzają obecność tylko jednej fazy hydroksyapatytowej, która kształtem i położeniem pików dyfraktogramu jest najbardziej zbliżona do charakterystyki naturalnego składnika mineralnego kości. Przykładowy dyfraktogram XRD nanoproszku według wynalazku przedstawiono na fig. 3. Charakterystyczną cechą takiego nanoproszku jest także wysoce rozwinięta powierzchnia właściwa mierzona za pomocą metody BET (metodą izotermy Brunauera, Emmetta, Tellera) znacznie przekraczająca wartość 180 m²/g. Potwierdzony metodą ICP (detekcja pierwiastków za pomocą plazmy wzbudzonej indukcyjnie) stosunek zawartości wapnia do fosforu mieści się w granicach od 1,55 do 1,65.

Cechy nanoproszku według wynalazku predestynują go do wykorzystania na materiał biogodnych, resorbowalnych implantów kostnych ze względu na wysoki stopień rozwinięcia powierzchni właściwej (powyżej 180 m²/g), wysoką jednorodność materiału, strukturę krystaliczną, morfologię i proporcję wapnia do fosforu odpowiadającą naturalnemu bioapatytowi, co jest gwarantem podobieństwa oddziaływań biologicznych do naturalnego składnika kości materiału. Szybka i kontrolowana krystalizacja przy użyciu techniki mikrofalowej gwarantuje dostatecznie szybkie i równomierne przyswajanie materiału przez organizm, co nie jest możliwe w przypadku produktów hydroksyapatytowych będących mieszaniną kilku faz lub morfologii o różnym kształcie i dużym rozrzucie rozmiaru ziaren.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania nanopłytek z syntetycznego hydroksyapatytu o strukturze heksagonalnej, zawierający etap przygotowania prekursora, polegający na sporządzeniu jednorodnej mieszaniny zawiesiny wodorotlenku wapnia w wodzie i kwasu fosforowego, oraz etap formowania z tego prekursora nanostruktur krystalicznych poprzez oddziaływanie na przygotowany prekursor promieniowaniem mikrofalowym, o częstotliwości korzystnie z zakresu od 2,4 do 2,5 GHz, **znamienny tym**, że w etapie formowania nanostruktur krystalicznych stosuje się promieniowanie mikrofalowe o gęstości mocy zawierającej się w przedziale od 1 do 10 watów na każdy 1 cm³ prekursora trwające od 10 do 900 sekund.
2. Sposób otrzymywania nanopłytek według zastrz. 1, **znamienny tym**, że etap formowania nanostruktur krystalicznych prowadzi się w naczyniu reakcyjnym z materiału dielektrycznego, korzystnie w naczyniu teflonowym.
3. Sposób otrzymywania nanopłytek według zastrz. 2, **znamienny tym**, że etap formowania nanostruktur krystalicznych prowadzi się w szczelnie zamkniętym naczyniu reakcyjnym i kończy się go po wytworzeniu się w tym naczyniu określonego ciśnienia, nie większego niż 2 atm.
4. Sposób otrzymywania nanopłytek według zastrz. 3, **znamienny tym**, że etap formowania struktur nanokrystalicznych kończy się po wytworzeniu się w naczyniu reakcyjnym określonej temperatury, nie wyższej niż 150°C.
5. Sposób według dowolnego z zastrz. od 1 do 4, **znamienny tym**, że w etapie przygotowania prekursora do mieszanej zawiesiny wodorotlenku wapnia w wodzie dozuje się kwas fosforowy, przy czym pojedyncza dawka kwasu nie przekracza 0,5 mililitra, a odstęp czasowy pomiędzy kolejnymi dawkami jest nie krótszy niż 0,1 sekundy.

Rysunki

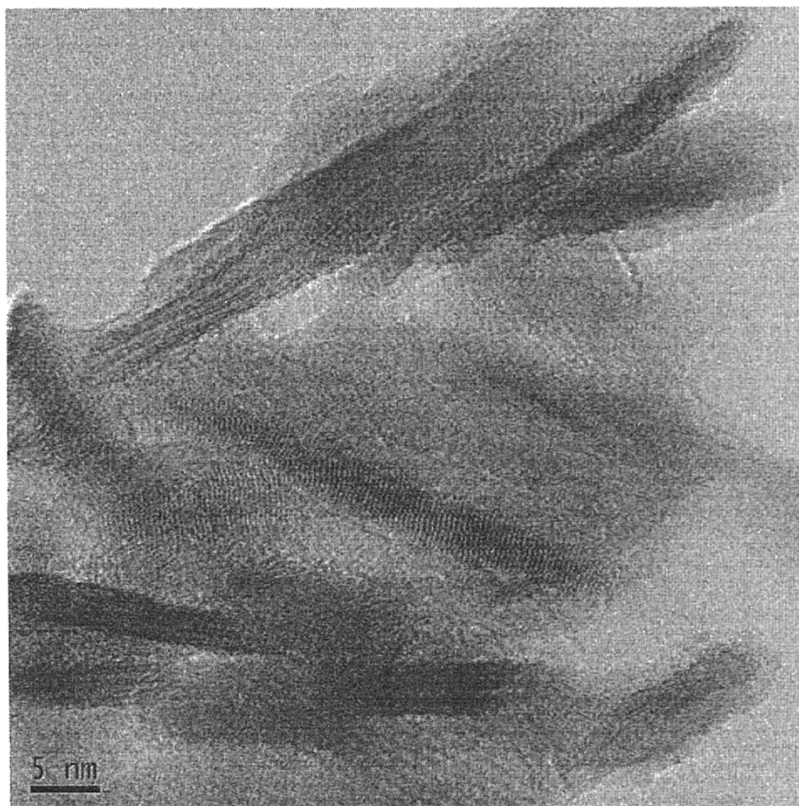


Fig.1

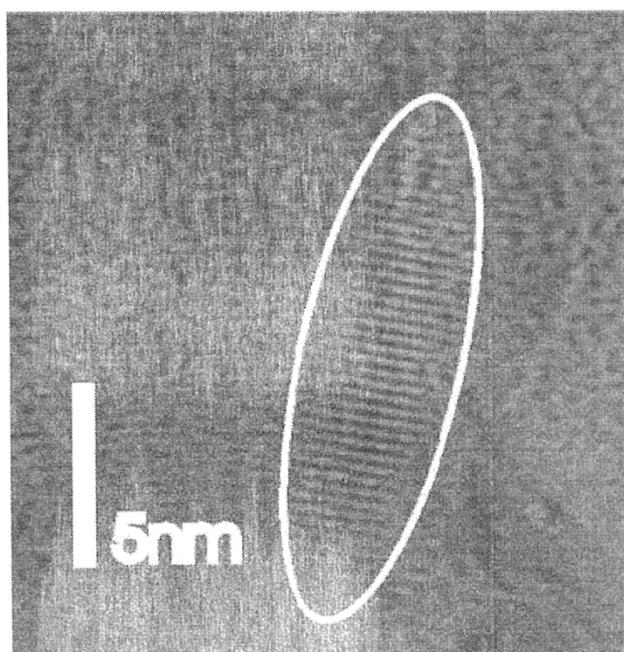


Fig.2

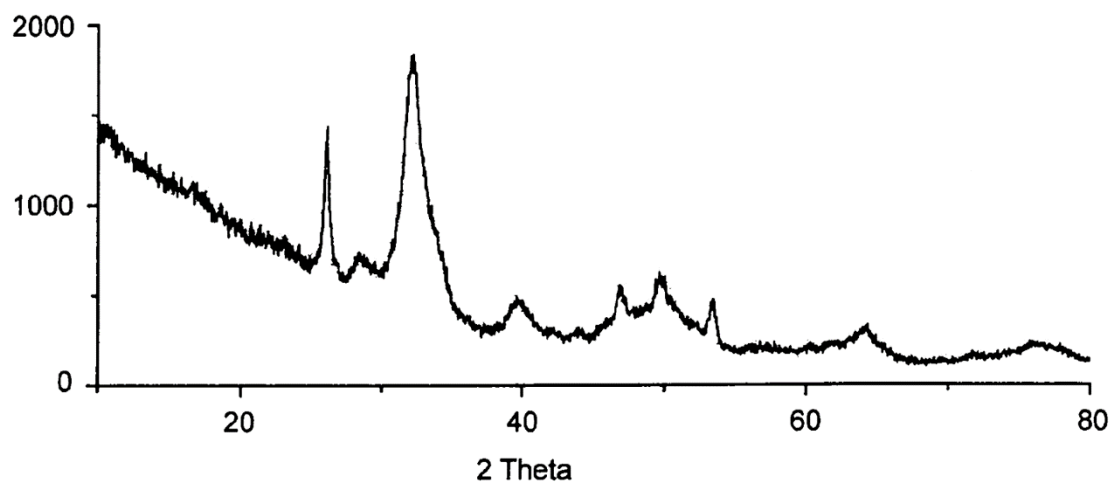


Fig.3

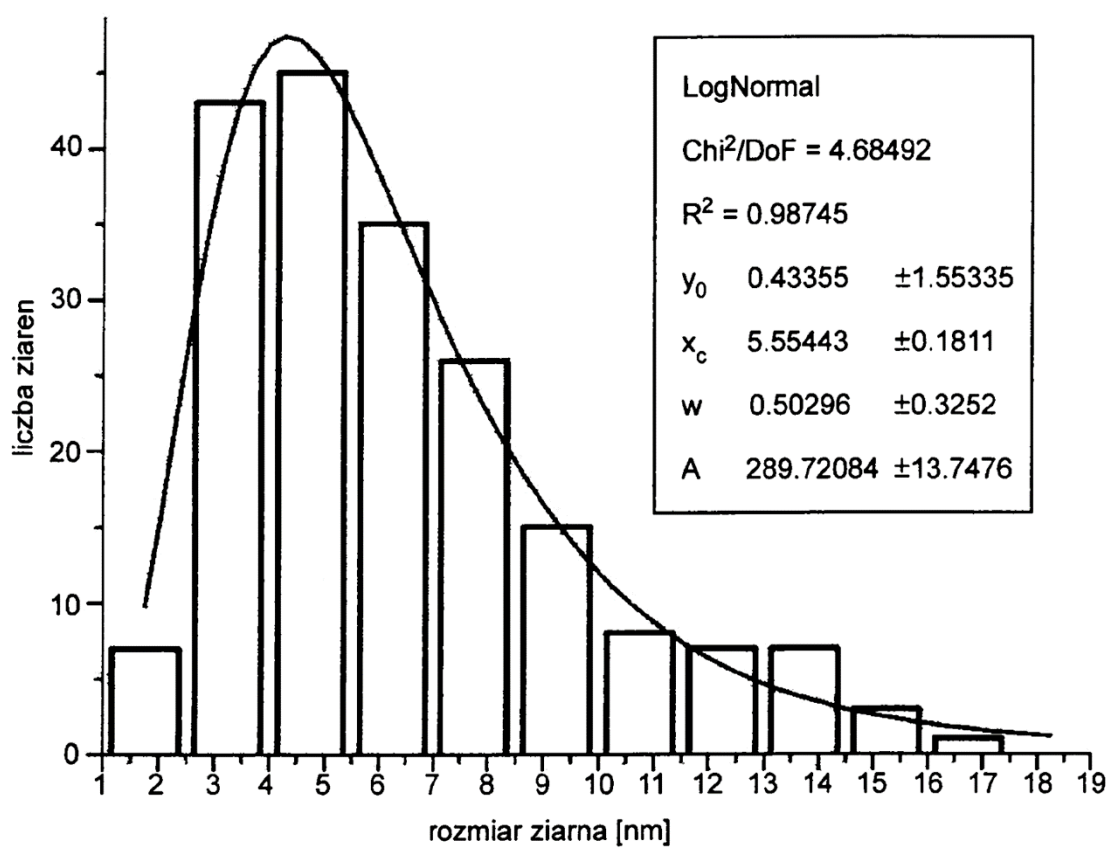


Fig.4