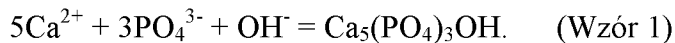


Sposób otrzymywania nanocząstek hydroksyapatytowych

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nanocząstek hydroksyapatytu, w postaci nanopłytek, nanopręcików, nanosfer, w procesie precypitacji chemicznej na mokro, z użyciem środka dyspergującego.

Kość ludzka może być uważana za przykład kompozytu nieorganiczno-organicznego, zawierającego około 70% wagowych nieorganicznych kryształów, głównie hydroksyapatytu o wzorze chemicznym $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, oraz 30% wagowych macierzy organicznej, głównie kolagenu typu I [Osteoblast mineralization with composite nanofibrous substrate for bone tissue regeneration, Venugopal JR, Giri Dev VR, Senthilram T, Sathiskumar D, Gupta D, Ramakrishna S., Cell Biology International, 35, 2011]. Obecnie hydroksyapatyt do zastosowań biomedycznych, takich jak nośniki leków, wypełnianie ubytków kostnych, przygotowanie implantów, wytwarzany jest najczęściej z wykorzystaniem następującej reakcji chemicznej:



Jako źródło jonów wapnia stosuje się najczęściej sole wapnia rozpuszczalne w wodzie, takie jak azotan lub chlorek, a jako źródło jonów fosforanowych stosuje się rozpuszczalne w wodzie fosforany amonu, sodu lub wapnia. Reakcję prowadzi się zwykle w środowisku zbliżonym do obojętnego, w temperaturze pokojowej lub podwyższonej.

W reakcji według powyższego równania uzyskiwany jest hydroksyapatyt charakteryzujący się właściwym stosunkiem molowym atomów Ca/P równym 1,67, co jest wartością charakteryzującą hydroksyapatyt pochodzenia naturalnego [Calcium phosphates as substitution of bone tissues, Vellet-Regi M, Gonzalez-Calbet JM, Progress in Solid State Chemistry, 32, 2004]. Gęsty hydroksyapatyt znajduje szereg zastosowań w zastępowaniu kości i jest wykorzystywany do naprawy uszkodzeń kostnych w ubytkach dentystycznych i ortopedycznych, natychmiastowego zastąpienia zębów, powiększania krawędzi pęcherzykowych, jako materiał do pokrycia miazgi oraz w rekonstrukcji szczękowo-twarzowej [Synthesis of stoichiometric nano crystalline hydroxyapatite by ethanol-based sol-gel technique at low temperature, Kuriakose TA, Kalkura SN, Palanichamy M, Arviuoli D, Dierks K, Bocelli G et al., Journal of Crystal Growth, 263, 2004].

Niestety, kryształy strącanego w czysto wodnych roztworach soli hydroksyapatytu są stosunkowo duże, o rozmiarach rzędu kilkudziesięciu, a nawet do kilkuset mikrometrów. Tak otrzymywane kryształy są ponadto całkowicie nierozpuszczalne i nie ulegają przebudowie w organizmie ludzkim. Naturalna kość jest natomiast strukturą dynamiczną; jest ciągle rozpuszczana i budowana przez komórki kostne, zatem zastosowanie hydroksyapatytu nieulegającego rozpuszczaniu przez komórki kostne zaburza ten proces. W celu rozwiązania tego problemu opracowano szereg technik otrzymywania hydroksyapatytu w formie nanokryształów lub stosowano hydroksyapatyt zawierający różne dodatki, tak by stał się podatny na przebudowę komórkową. Opisywano techniki wytwarzania nanocząstek hydroksyapatytu poprzez modyfikację przebiegu reakcji przedstawionej wzorem 1, z wykorzystaniem promieniowania UV, mikrofal, często w połączeniu z wysoką temperaturą i znacznym ciśnieniem (proces hydrotermalny) lub stosując na gotowych kryształach ablację laserową. Klasycznie stosowane techniki wytwarzania nanohydroksyapatytu bazują na procesach takich jak: synteza zol-żel, reakcje w stanie stałym, koprecypitacja, reakcje hydrotermalne, synteza w mikroemulsjach, synteza mechanochemiczna oraz różne techniki mokrej chemii, wśród nich – chemiczna precypitacja na mokro. Wszystkie przedstawione wcześniej sposoby wytwarzania nanohydroksyapatytu wymagają odpowiednich nastaw temperatury przebiegu procesu, w zakresie od 25°C do nawet 500°C, odpowiednich nastaw pH mieszaniny reakcyjnej, w zakresie od 4,5 do 11. W niektórych przypadkach wymagane jest podwyższone ciśnienie procesu, nawet do 40 atmosfer, lub stosowane są toksyczne środki powierzchniowoczywne.

W metodzie precypitacji chemicznej na mokro konieczne jest zastosowanie środka dyspergującego reagenty w środowisku reakcji, zapobiegającego tworzeniu się dużych kryształów. W znanych w sztuce protokołach wytwarzania nanohydroksyapatytu sposobem precypitacji chemicznej na mokro stosowane są środki dyspergujące obejmujące: surfaktanty, takie jak bromek cetylotrimetyloamoniowy (CTAB) [Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template, Wang Y, Zhang S, Wei K, Zhao N, Chen J, Wang X. *Materials Letters* 60, 2006], emulgatory, takie jak etanoloamina [Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process, Wang P, Li C, Gong H, Jiang X, Wang H, Li K. *Powder Technology* 203, 2010], macierze polimerowe z polimerów, takich jak alkohol poliwinylowy (PVA), glikol polietylenowy (PEG) [In situ synthesis and characterization of nano-size hydroxyapatite in poly(vinyl alcohol) matrix, Mollazadeh S, Javadpour J, Khavandi A. *Ceramics International* 33, 2007] oraz inne substancje chemiczne, takie jak np. kwas

cytrynowy, aminokwasy, kwas (etylenodinitrylo)tetraoctowy (EDTA), i podobne [Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering, Zhou H, Lee J. Acta Biomaterialia 7, 2011].

Dotychczas znane techniki otrzymywania nanohydroksyapatytu wymagają stosowania wysokich temperatur w połączeniu z wysokim ciśnieniem, toksycznych emulgatorów czy dyspergatorów, niebiodegradowalnych polimerów. Pociąga to potrzebę długotrwałego oczyszczania produktu i sporej ilości odpadów, przy czym zawsze pozostaje ryzyko wywołania efektu toksycznego przez pozostałość dodatków chemicznych.

Celem wynalazku było opracowanie nowego sposobu otrzymywania nanocząstek hydroksyapatytu, metodą precypitacji chemicznej na mokro, w łagodnych warunkach, przy zastosowaniu w pełni biozgodnego emulgatora. Celem wynalazku było także uzyskanie możliwości sterowania morfologią wytwarzanego hydroksyapatytu. Cel ten został zrealizowany dzięki przeprowadzeniu reakcji przedstawionej wzorem I w układzie reakcyjnym, w którym jako środek dyspergujący jest zastosowana lecytyna.

Sposób otrzymywania nanocząstek hydroksyapatytu metodą precypitacji chemicznej na mokro, polega na tym, że rozpuszczalną w wodzie sól wapnia i rozpuszczalny w wodzie fosforan poddaje się reakcji w roztworze wodnym, przy stosunku molowym atomów wapnia do atomów fosforu wynoszącym około Ca/P 1,67 i w obecności środka dyspergującego, i według wynalazku charakteryzuje się tym, że jako środek dyspergujący stosuje się lecytynę w ilości od 0,05% wag. do 20,00% wag., reakcję prowadzi się w temperaturze w zakresie od 20°C do 95°C, korzystnie 60°C, przy pH od 7 do 14, korzystnie 10.

Korzystnie jako źródło jonów wapnia Ca^{2+} w układzie reakcyjnym stosuje się sole wapnia łatwo rozpuszczalne w wodzie, takie jak azotan, octan, chlorek, mleczan (np. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

Korzystnie jako źródło jonów fosforanowych PO_4^{3-} w układzie reakcyjnym stosuje się łatwo rozpuszczalne w wodzie fosforany amonu, sodu, potasu (np. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$).

Korzystnie stosuje się lecytynę pochodzenia naturalnego, jak lecytynę sojową lub z jaj kurzych.

Korzystnie lecytynę dodaje się w stężeniu od 0,05% do około 1,5% celem uzyskania nanopłytek; w stężeniu od 1,5% do około 3% celem uzyskania nanopręcików; w stężeniu od 3% do 20% celem uzyskania nanosfer.

Szczegółowo sposób według wynalazku realizuje się tak, że do wodnego roztworu związku będącego źródłem jonów wapnia w wodzie demineralizowanej dodaje się roztwór wodny lecytyny w wodzie demineralizowanej. Mieszaninę reakcyjną podgrzewa się do

temperatury w zakresie od 20°C do 95°C, korzystnie 60°C, oraz dostosowuje się wartość pH w zakresie od 6 do 14, korzystnie około 10. Po uzyskaniu stabilnych warunków, do mieszaniny reakcyjnej dodaje się roztwór wodny fosforanu, tak by stechiometryczną ilość dodać w czasie do 24 godzin, korzystnie 1 - 2 godziny. Następnie roztwór chłodzi się do temperatury otoczenia i wiruje w celu wydzielenia produktu. Po dekantacji, otrzymany produkt przemywa się rozpuszczalnikiem organicznym (heksan, benzyna, etanol, aceton, izopropanol) lub wodą w celu usunięcia pozostałości lecytyny z produktu. Niewielka pozostałość lecytyny (0.01% – 2%) nie wpływa negatywnie na właściwości produktu, a nawet je poprawia. Otrzymany produkt suszy się w temperaturze otoczenia lub podwyższonej.

Uzyskany produkt reakcji syntezy charakteryzowano za pomocą dyfrakcji promieni Roentgena (XRD) oraz stosując spektrofotometrię w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR). Na rysunku przedstawiono:

Fig. 1 - widmo FTIR uzyskanego produktu w odniesieniu do lecytyny i komercyjnie dostępnego hydroksyapatytu. Pierwsze widmo dotyczy lecytyny, drugie komercyjnego krystalicznego hydroksyapatytu, trzecie nano-hydroksyapatytu otrzymanego zgodnie z wynalazkiem.

Fig. 2 - charakterystyka krystalograficzna otrzymanego produktu, zgodna z danymi w pliku JCPDF nr 09-0432, w postaci dyfraktogramu XRD

Fig. 3 - zdjęcie SEM produktu o morfologii nanopłytek, uzyskanego zgodnie z przykładem 1.

Fig. 4 – zdjęcie SEM produktu o morfologii nanopręcików oraz nanosfer, uzyskanego zgodnie z przykładem 2.

Fig. 5 – zdjęcie SEM produktu o morfologii nanosfer o średnicach od około 30 nm do około 70 nm, uzyskanego zgodnie z przykładem 3.

Fig. 6 – zdjęcie SEM produktu o morfologii nanosfer o średnicy od około 30 nm do 100 nm, uzyskanego zgodnie z przykładem 4.

W sposobie według wynalazku naturalny surfaktant – lecytyna, składająca się głównie z fosfatydylocholin, związków fosfolipidowych posiadających cholinę związaną z grupą fosforanową, będący składnikiem błony komórkowej, mitochondriów, reticulum endoplazmatycznego oraz ściany jądra komórkowego – otacza powstające zarodki kryształów hydroksyapatytu i blokuje możliwość dalszego wzrostu kryształów. Taki układ reakcyjny pozwala prowadzić krystalizację hydroksyapatytu do formy nanocząstek o morfologii zależnej od stężenia środka dyspergującego – lecytyny – w układzie reakcyjnym. W procesie powstawania nanocząstek hydroksyapatytu dochodzi do częściowego związania lecytyny z produktem lub jej fizycznego związania w porach powstających cząstek. W obecnym

wynalazku, taka sytuacja traktowana jest jako korzystna, zwiększająca biokompatybilność i bioaktywność materiału.

Stężenie lecytyny wpływa na morfologię uzyskanego produktu, co pozwala na kontrolowanie kształtu otrzymywanych nanocząstek.

Zastosowanie lecytyny jako emulgatora pozwala prowadzić proces w roztworze wodnym i w stosunkowo łagodnych warunkach. Lecytyna jest całkowicie nietoksyczna, a jej niewielka pozostałość w otrzymywanym produkcie nie wywołuje efektów negatywnych, lecz poprawia zwilżalność otrzymanego produktu, co podnosi jego walory użytkowe i ułatwia formowanie implantów kostnych z takiego proszku. Lecytyna jest składnikiem błony komórkowej, co podnosi biozgodność tak otrzymanego nanohydroksyapatytu.

Sposób według wynalazku został przedstawiony bliżej w przykładach stosowania.

Przykład 1.

Porcję 0,0075 moli (1,775g) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ rozpuszczono w 25ml wody demineralizowanej. Przygotowano 0,3% roztwór lecytyny w 37,5ml wody demineralizowanej. Roztwór lecytyny wkroplono do roztworu tetrahydratu azotanu wapnia. Wartość pH uzyskanej mieszaniny reakcyjnej ustalono na 10 oraz mieszaninę ustawiono w kąpeli wodnej na 60°C oraz mieszano. Do mieszaniny reakcyjnej wkroplono z szybkością 2ml/h 15ml roztwór 0,0046 moli (0,594g) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ w wodzie demineralizowanej o pH ustalonym na wartość 10. Po wkropleniu mieszaninę reakcyjną mieszano przez 1,5 godziny w temperaturze reakcji 60°C. Następnie mieszaninę naturalnie schłodzono do temperatury otoczenia, poddano wirowaniu, dekantacji. Uzyskany biały produkt przemyto pięciokrotnie heksanem w celu usunięcia pozostałości lecytyny. Morfologię uzyskanego produktu scharakteryzowano za pomocą elektronowej mikroskopii skaningowej (SEM) i przedstawiono na Fig. 3. Uzyskano produkt o morfologii nanopłytek o grubości kilku nanometrów oraz szerokości i długości rzędu kilku do kilkudziesięciu mikrometrów.

Przykład 2.

Porcję 0,0075 moli (1,775g) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ rozpuszczono w 25ml wody demineralizowanej. Przygotowano 1,5% roztwór lecytyny w 37,5ml wody demineralizowanej. Roztwór lecytyny wkroplono do roztworu tetrahydratu azotanu wapnia. Wartość pH uzyskanej mieszaniny reakcyjnej ustalono na 10 oraz mieszaninę ustawiono w kąpeli wodnej na 60°C oraz mieszano. Do mieszaniny reakcyjnej wkroplono 15ml roztwór 0,0046 moli (0,594g) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ w wodzie demineralizowanej o pH ustalonym na wartość 10 z szybkością 2ml/h. Po wkropleniu mieszaninę reakcyjną mieszano przez 1,5 godziny w temperaturze reakcji - 60°C. Następnie mieszaninę naturalnie schłodzono do temperatury otoczenia, poddano

wirowaniu, dekantacji. Uzyskany biały produkt przemyto pięciokrotnie heksanem w celu usunięcia pozostałości lecytyny. Morfologię uzyskanego produktu scharakteryzowano za pomocą elektronowej mikroskopii skaningowej (SEM) i przedstawiono na Fig. 4. Uzyskano produkt o morfologii nanoprecieków oraz nanosfer. Uzyskano nanopreciki o długości od około 30 nm do około 180 nm oraz nanosfery o średnicach od około 30 nm do 70 nm.

Przykład 3.

Ilość 0,0075 moli (1,775g) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ rozpuszczono w 25ml wody demineralizowanej. Przygotowano 3% roztwór lecytyny w 37,5ml wody demineralizowanej. Roztwór lecytyny wkroplono do roztworu tetrahydratu azotanu wapnia. Wartość pH uzyskanej mieszaniny reakcyjnej ustalono na 10 oraz mieszaninę ustawiono w kąpeli wodnej na 60°C oraz mieszano. Do mieszaniny reakcyjnej wkroplono 15ml roztwór 0,0046 moli (0,594g) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ w wodzie demineralizowanej o pH ustalonym na wartość 10 z szybkością 2ml/h. Po wkropleniu mieszaninę reakcyjną mieszano przez 1,5 godziny w temperaturze reakcji - 60°C. Następnie mieszaninę naturalnie schłodzono do temperatury otoczenia, poddano wirowaniu, dekantacji. Uzyskany biały produkt przemyto pięciokrotnie heksanem w celu usunięcia pozostałości lecytyny. Morfologię uzyskanego produktu scharakteryzowano za pomocą elektronowej mikroskopii skaningowej (SEM) i przedstawiono na Fig. 5. Uzyskano produkt o morfologii nanosfer o średnicach od około 30 nm do około 70 nm.

Przykład 4.

Ilość 0,0075 moli (1,775g) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ rozpuszczono w 25ml wody demineralizowanej. Przygotowano 9% roztwór lecytyny w 37,5ml wody demineralizowanej. Roztwór lecytyny wkroplono do roztworu tetrahydratu azotanu wapnia. Wartość pH uzyskanej mieszaniny reakcyjnej ustalono na 10 oraz mieszaninę ustawiono w kąpeli wodnej na 60°C oraz mieszano. Do mieszaniny reakcyjnej wkroplono 15ml roztwór 0,0046 moli (0,594g) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ w wodzie demineralizowanej o pH ustalonym na wartość 10 z szybkością 2ml/h. Po wkropleniu mieszaninę reakcyjną mieszano przez 1,5 godziny w temperaturze reakcji - 60°C. Następnie mieszaninę naturalnie schłodzono do temperatury otoczenia, poddano wirowaniu, dekantacji. Uzyskany biały produkt przemyto pięciokrotnie heksanem w celu usunięcia pozostałości lecytyny. Morfologię uzyskanego produktu scharakteryzowano za pomocą elektronowej mikroskopii skaningowej (SEM) i przedstawiono na Fig. 6. Uzyskano produkt o morfologii nanosfer o średnicy od około 30 nm do 100 nm.

Przykład 5.

Porcję 0,0075 moli uwodnionego chlorku wapniowego rozpuszczono w 30ml wody demineralizowanej. Przygotowano 10% roztwór lecytyny w 40ml wody demineralizowanej.

Roztwór lecytyny wkroplono do roztworu chlorku wapnia. Wartość pH uzyskanej mieszaniny reakcyjnej ustalono na 9 oraz mieszaninę ustawiono w kąpeli wodnej na 50°C oraz mieszano. Do mieszaniny reakcyjnej wkroplono 15ml roztworu 0,0046 moli fosforanu sodu w wodzie demineralizowanej o pH ustalonym na wartość 9. Po wkropleniu mieszaninę reakcyjną mieszano przez godzinę w temperaturze reakcji 50°C. Następnie mieszaninę naturalnie schłodzono do temperatury otoczenia i poddano wirowaniu. Uzyskany biały proszek przemyto dwukrotnie etanolem 95% w celu usunięcia nadmiaru lecytyny. Uzyskano produkt o morfologii nanosfer o średnicach od około 30 nm do 110 nm.