

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **240969**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **419752**

(22) Data zgłoszenia: **09.12.2016**

(51) Int.Cl.

C03C 3/097 (2006.01)

C03C 4/00 (2006.01)

A61L 27/10 (2006.01)

(54) **Sposób otrzymywania mikro lub nanocząstkowego szkła bioaktywnego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

18.06.2018 BUP 13/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

04.07.2022 WUP 27/22

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA KRAKOWSKA
IM. TADEUSZA KOŚCIUSZKI, Kraków, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MARCIN BANACH, Górka Stogniowska, PL
JOLANTA PULIT-PROCIAK, Kraków, PL
PAWEŁ STAROŃ, Kraków, PL
ANITA STAROŃ, Kraków, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Magdalena Krekora

PL 240969 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania mikro lub nanocząstkowego szkła bioaktywnego, zawierającego tlenek krzemu (IV) (SiO_2), tlenek fosforu (V) (P_2O_5), tlenek wapnia (CaO) oraz tlenek sodu (Na_2O), wzbogaconego jonami metali albo jonami fluorkowymi albo nanocząstkami metali albo nanocząstkami tlenków metali.

Bioaktywne szkła krzemianowo-fosforanowe znalazły zastosowanie w inżynierii tkankowej jako implanty ceramiczne. Dzięki znacznej porowatości ich struktury powierzchniowej, możliwe jest ich trwałe połączenie z przylegającą tkanką. Bioaktywne szkła krzemianowo-fosforanowe wykazują wysoką odporność na korozję i charakteryzują się korzystnymi parametrami wytrzymałościowymi. Ich użyteczność warunkowana jest szeregiem innych właściwości zapewniających ich wysoką biogodność. W wyniku kontaktu bioszklą z płynami ustrojowymi, na jego powierzchni tworzy się hydroksyapatyt węglowy, którego struktura jest zbliżona do fazy mineralnej kości. Jest to spowodowane dyfuzją jonów i utworzeniem warstwy powierzchniowej bogatej w krzem, która następnie jest aktywowana poprzez wbudowanie się jonów wapniowych i fosforanowych. W toku dalszych procesów, w środowisku lekko zasadowym, warstwa ta ulega krystalizacji z utworzeniem apatytu. Dodatkowo bioszklą ceramiczne wpływają korzystnie na rewaskularyzację, czyli poszerzenie i udrażnianie zwężonych naczyń krwionośnych. Mają również zdolność do zwiększania przyczepności osteoblastów oraz aktywności enzymów. Szczególnie korzystną właściwością szkieł jest możliwość tworzenia połączeń z różnymi tkankami szkieletowymi (chrząstka, kości, tłuszcz).

Znany jest z opisu patentowego US7192602B2 sposób otrzymywania szkła krzemianowego o właściwościach antybakteryjnych, które zawiera: 20–70% mas. SiO_2 , 5–30% mas. Na_2O , 0–5% mas. K_2O , 1–15% mas. P_2O_5 , 0–10% mas. B_2O_3 , 4–30% mas. CaO , 0–2% mas. Ag_2O , 0–8% mas. ZnO , 0–5% mas. CuO , 0–8% mas. MgO , 0–7% mas. Al_2O_3 , 0–5% mas. CeO_2 i 0–2% mas. Fe_2O_3 . Rolę czynników antymikrobiologicznych pełnią tlenki srebra, miedzi i ceru, których łączna zawartość w produkcji nie przekracza 100 ppm.

Autorzy opisu patentowego US7141520B2 podają skład szklistego materiału ceramicznego zawierającego 30–65% mas. SiO_2 , 5–30% mas. Na_2O , 5–30% mas. CaO i 0–15% mas. P_2O_5 . Dzięki dodatkowi jonów srebra, złota, cynku, miedzi lub ceru, w ilości nie przekraczającej 2% mas., kompozycja zyskuje właściwości biobójcze.

W opisie patentowym US7223414B1 podano sposób wytwarzania resorbowalnego krzemianowo-fosforanowo-wapniowego kompozytu bioaktywnego, mogącego znaleźć zastosowanie w transporcie leków. Autor podaje, iż produkt dodaje się do kompozycji farmaceutycznej, co skutkuje kontrolowanym uwalnianiem substancji czynnych zachodzącym nawet przez 28 dni. Według wynalazku, szkło bioaktywne otrzymuje się w wyniku temperaturowej obróbki jego komponentów, zachodzącej w temperaturze od 355 do 800°C.

Znany jest z opisu patentowego US8093166B2 sposób wytwarzania bioaktywnego szkła ceramicznego, które może znaleźć zastosowanie w inżynierii tkankowej. Podstawowy skład kompozycji zawiera SiO_2 , Na_2O , K_2O , CaO i P_2O_5 . Dodatkowo, materiał może być wzbogacony o inne tlenki, m. in. tytanu lub magnezu. Proces polega na dokładnym wymieszaniu prekursorów tlenków i następnym ich stapianiu w temperaturze 1360°C przez 3 godziny w celu otrzymania homogenicznego szkła bioaktywnego.

Opis patentowy CN1361076 ujawnia bioaktywne szkło nanocząsteczkowe, którego rozmiar wynosi 20–500 nm oraz sposób jego wytwarzania. Szkło nanocząsteczkowe składa się z SiO_2 w ilości 42–90% wagowych, CaO w ilości 5–30% wagowych, P_2O_5 1–15% wagowych i Na_2O w ilości 0–25% wagowych. Sposób otrzymywania tego szkła polega na tym, że jony Ca albo Ca i Na w roztworze albo w postaci soli nieorganicznej wprowadza się do wody dejonizowanej, regulując wartość pH roztworu poprzez dodanie NH_4H albo NaOH . Następnie do roztworu dodaje się mieszaninę TEOS i TEP i całość się miesza, a w skutek hydrolizy i polimeryzacji jony wapnia, fosforu i sodu wnikają w sieć tworzoną przez dwutlenek krzemu i formują cząstki koloidalne biologicznego szkła, które tworzą osad w roztworze alkalicznym. Osad ten jest filtrowany i suszony.

Z publikacji Sibó Shen et al. „Microwave aqueous synthesis of hydroxyapatite bilayer coating on magnesium alloy for orthopedic application”, Chemical Engineering Journal 309 (2017) 278–287 znana jest metoda otrzymywania warstwy hydroksyapatytowej na stopach magnezu. Zgodnie z tą metodą otrzymuje się materiał krystaliczny o litej strukturze.

Z publikacji Enobong R. Essien et al. „Economic route to sodiumcontaining silicate bioactive glass scaffold”, Open Journal of Regenerative Medicine Vol. 1, No. 3, 33–40 (2012) znane jest szkło wytworzone metodą zol–żel o składzie 30,55% SiO₂ – 28,57% Na₂O – 33,21% CaO – 7,67% P₂O₅, a więc o znacznie obniżonej zawartości krzemu. Otrzymany materiał szklany w kontakcie z płynami ustrojowymi (SBF) spowodował powstanie hydroksyapatytu węglowego (HCA).

Z publikacji Nicola Gargiulo et al. „Silver-containing mesoporous bioactive Glass with improved antibacterial properties”, J Mater Sci: Mater Med (2013) 24:2129–2135 zaprezentowano metodę opartą na wykorzystaniu układu etanolowego, otrzymaniu zolu i poddaniu go samoorganizacji indukowanej (EISA), a następnie kalcynacji żelu w 500°C. Takie warunki procesu doprowadziły do otrzymania materiału częściowo skrytalizowanego zawierającego wyłącznie fazę metaliczną srebra.

Nieoczekiwanie okazało się, iż możliwe jest opracowanie bardzo prostej i energooszczędnej metody otrzymywania bioaktywnego szkła mikro i nanocząstkowego wzbogaconego jonami metali albo jonami fluorkowymi albo nanocząstkami metali albo nanocząstkami tlenków metali nadającego się do wytwarzania implantów biomedycznych.

Sposób otrzymywania mikro lub nanocząstkowego szkła bioaktywnego, zawierającego tlenek krzemu (IV) (SiO₂), tlenek fosforu (V) (P₂O₅), tlenek wapnia (CaO) oraz tlenek sodu (Na₂O), wzbogaconego jonami metali albo jonami fluorkowymi albo nanocząstkami metali albo nanocząstkami tlenków metali według wynalazku charakteryzuje się tym, że wodny roztwór prekursora tlenku krzemu miesza się z kwasem azotowym (V) albo kwasem chlorowodorowym, stosunek molowy kwasu azotowego (V) albo chlorowodorowego do metakrzemianu sodu wynosi od 2 do 4, z otrzymanej zawiesiny wymywa się azotan (V) sodu albo chlorek sodu, następnie do zawiesiny w warunkach ciągłego mieszania dodaje się wodny roztwór prekursora tlenku fosforu albo prekursor tlenku fosforu w postaci stałej, po czym do powstałej mieszaniny wprowadza się w warunkach ciągłego mieszania, wodorotlenek wapnia, a następnie wprowadza się do niej:

- 1) wodny roztwór zawierający jony srebra, miedzi lub złota; albo
- 2) wodny roztwór zawierający jony srebra, miedzi lub złota i roztwór wodny substancji o właściwościach redukujących jony metali i stabilizujących rozmiar nanometryczny; albo
- 3) wodny roztwór soli fluoru; albo
- 4) zawiesinę sporządzoną przez zmieszanie roztworu wodnego prekursora cynku, żelaza, miedzi lub cyrkonu i roztworu wodorotlenku sodu,

po czym mieszaninę poddaje się procesowi hydrotermalnemu w polu promieniowania mikrofalowego, w temperaturze od 200 do 250°C przez 10 do 20 min i przy ciśnieniu od 20 do 40 bar, a w ostatnim etapie otrzymaną mieszaninę suszy się. Wodorotlenek wapnia otrzymuje się poprzez dodanie wodnego roztworu wodorotlenku sodu do wodnego roztworu prekursora tlenku wapnia.

Jako źródło krzemu stosuje się metakrzemian sodu pięciowodny (Na₂SiO₃·H₂O), jako źródło wapnia stosuje się azotan (V) wapnia czterowodny (Ca(NO₃)₂·4H₂O), jako źródło atomów sodu stosuje się wodorotlenek sodu (NaOH) albo wodorotlenek sodu (NaOH) i fosforan monosodowy (NaH₂PO₄), a prekursorem tlenku fosforu (V) jest fosforan monosodowy (NaH₂PO₄) albo wodorofosforan diamonu ((NH₄)₂HPO₄).

W sposobie stosuje się od 4,20 do 5,50 jednostek masowych Na₂SiO₃·5H₂O, od 0,25 do 1,35 (NH₄)₂HPO₄ albo od 0,20 do 1,25 NaH₂PO₄, od 2,30 do 3,60 Ca(NO₃)₂·4H₂O, od 0,08 do 1,20 NaOH.

W sposobie stosuje się roztwory wodne o stężeniu od 15 do 40% Na₂SiO₃·5H₂O, od 5 do 40% (NH₄)₂HPO₄, od 2 do 40% NaH₂PO₄, od 20 do 70% Ca(NO₃)₂·4H₂O, od 2 do 40% NaOH.

Do mieszaniny wprowadza się (NH₄)₂HPO₄ albo NaH₂PO₄ w postaci stałej.

W sposobie stosuje się kwas azotowy (V) o stężeniu od 20 do 50% albo kwas chlorowodorowy o stężeniu od 20 do 36%.

Mieszaninę poddaje się działaniu mikrofal w naczyniu teflonowym reaktora mikrofalowego.

Źródłem jonów srebra jest roztwór azotanu (V) srebra, jonów miedzi roztwór siarczanu miedzi albo chlorku miedzi, jonów złota roztwór kwasu tetrachlorozłotowego.

Stężenie roztworów wodnych zawierających jony metali wynosi od 0,001 mol/dm³ do 1 mol/dm³, korzystnie 0,1 mol/dm³.

Roztwory zawierające jony metali wprowadzane są w ilości zapewniającej zawartość jonów metali w szkłe bioaktywnym od 0,5 do 2,0%.

Roztwory zawierające jony metali wprowadzane są w ilości zapewniającej zawartość nanocząstek metali w szkłe bioaktywnym od 50 do 100 mg/kg.

Jako reduktor i stabilizator stosuje się kwas szikimowy, kwas taninowy, kwas galusowy, kwas elagowy, salicylan sodu albo winian sodowo-potasowy w ilości stanowiącej stosunek molowy tego związku do jonów metalu od 0,1 : 1 do 1 : 1.

Stosuje się roztwory wodne reduktora i stabilizatora o stężeniu od 0,001 mol/dm³ do 1 mol/dm³, korzystnie od 0,001 mol/dm³ do 0,01 mol/dm³.

Źródłem jonów fluoru jest roztwór wodny fluorku sodu.

Stężenie roztworu fluorku sodu wynosi od 0,1 do 1 mol/dm³.

Roztwór fluorku sodu dodawany jest w ilości zapewniającej zawartość jonów fluorkowych w produkcji finalnym od 0,5% do 2,0%.

Jako źródło jonów cynku (II), żelaza (III), cyrkonu (IV) lub miedzi (II) stosuje się odpowiednio azotan (V) cynku, azotan (V) żelaza (III), chlorek cyrkonu, siarczan (VI) miedzi (II) albo chlorek miedzi (II).

W sposobie stosuje się wodny roztwór soli zawierający jony metalu w stężeniu od 0,01 do 0,5 mol/dm³.

W sposobie stosuje się wodorotlenek sodu o stężeniu od 0,2 do 2 mol/dm³ w ilości stanowiącej stosunek molowy tego związku do jonów metalu od 1 : 1 do 2 : 1.

Zawartość tlenku cynku, żelaza, cyrkonu albo miedzi w produkcie wynosi od 2 do 5%.

Proces suszenia prowadzi się w temperaturze od 50°C do 110 przez 2 do 24 h.

Dodatek jonów lub nanocząstek srebra, miedzi albo złota zapewnia właściwości antymikrobiologiczne kompozycji, a jony fluorkowe warunkują jej właściwości remineralizujące. Zgodnie z wynalazkiem, wytworzone szkła bioaktywne różnią się zawartością poszczególnych tlenków, która może się zmieniać: SiO₂ 40–50%, Na₂O 20–30%, CaO 20–30%, P₂O₅ 2–10%. Zawartość jonów srebra oraz jonów fluorkowych waha się od 0,5 do 2,0% mas. Zawartość nanocząstek metali wynosi od 50 do 100 mg/kg. Materiał może być wzbogacony również w nanocząstki tlenku cynku, żelaza, cyrkonu albo miedzi występujące w ilości od 2 do 5% mas. Szkła wytwarzane są w procesie hydrotermalnym, w polu promieniowania mikrofalowego.

Średni rozmiar cząstek nanokrystalicznego szkła bioaktywnego mieści się w zakresie nano- i mikrometrycznym. Dzięki zmniejszeniu cząstek do skali nano i mikrometrycznej, możliwe jest osiągnięcie wyższej aktywności produktu. Jest to spowodowane zwiększonym stosunkiem powierzchni do objętości cząstek oraz zwiększonej objętości porów. Rozwinięcie powierzchni umożliwi szybszą dyfuzję jonów oraz intensyfikuje adsorpcję białek na powierzchni szkła, dzięki czemu produkt wykazuje wyższą aktywność biologiczną.

Podstawą efektywności nanokrystalicznych szkielek krzemianowo-fosforanowych jest ich oddziaływanie z tkankami. W wyniku kontaktu szkielek z płynami ustrojowymi zawierającymi jony wodorowe i hydroniowe, na ich powierzchni zachodzą reakcje nieorganiczne oraz komórkowe, które prowadzą do proliferacji oraz zwapnienia i regeneracji kości. Procesy rozpoczyna wymiana jonów Na⁺ i Ca²⁺ dyfundujących z powierzchni bioszklek z jonami H⁺ oraz H₃O⁺. Dalsze procesy biochemiczne prowadzą do aktywacji genu odpowiedzialnego za wywołanie osteostymulacji. Jest to uzależnione od rozpuszczalności jonów krzemu i wapnia. Procesy adsorpcyjne mają charakter dynamiczny i regulowane są różnymi czynnikami, m. in. pH, morfologią szkła, rozmiarem i porowatością cząstek, stężeniem białek.

Srebro w postaci jonowej lub nanocząstkowej charakteryzuje się wysoką aktywnością biobójczą, dzięki czemu znalazło ono zastosowanie w walce z patogennym działaniem drobnoustrojów. Srebro spowalnia funkcjonowanie mikroorganizmów poprzez ich dezaktywację lub destrukcję. Jest ono czynnikiem niszczącym szerokie spektrum bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. Działa bakteriobójczo również wobec szczepów opornych na antybiotyki. Dowiedziono, iż srebro może być również skuteczną bronią w walce z wirusami, gdyż hamuje ich replikację. Hamuje także działanie grzybów, m.in. *Aspergillus*, *Candida* i *Saccharomyces*.

Działanie jonów fluorkowych można określić jako wielokierunkowe. Preparaty zawierające fluor sprzyjają wzmocnieniu zębiny. Jest to spowodowane obecnością fluoroapatytu powstałego poprzez zastąpienie jonów hydroksylowych jonami fluorkowymi. Dodatek jonów fluoru do kompozycji szklanej może również spowodować wzmocnienie i zwiększenie wytrzymałości np. struktury zęba. Jony fluoru charakteryzują się również wysoką skutecznością przeciwpróchniczą. Dzięki pokryciu powierzchni zęba cienkim filmem zawierającym związki fluoru, możliwa jest remineralizacja szkliska zachodząca wskutek powolnego, ale ciągłego uwalniania się fluoru i jego wbudowania się w strukturę zęba.

Wynalazek ilustrują poniższe przykłady:

Przykład 1

Do 20 j.m. H₂O wprowadzono 5 j.m. Na₂SiO₃·5H₂O i mieszało. Do otrzymanego roztworu przy ciągłym mieszaniu wkroplono 9,9 j.m. 30% roztworu HNO₃. Następnie powstałą zawiesinę przesączono, a osad przemyto wodą dejonizowaną. Do odsączonego osadu dodano 30 j.m. wody dejonizowanej. Do otrzymanej zawiesiny dodano wodny roztwór NaH₂PO₄ otrzymany przez zmieszanie 0,32 j.m. soli z 5 j.m. H₂O, a następnie zawiesinę Ca(OH)₂. W celu strącenia wodorotlenku wapnia przy ciągłym mieszaniu do roztworu azotanu(V) wapnia dodano wodorotlenek sodu. Roztwór azotanu(V) wapnia otrzymano z 2,8 j.m. Ca(NO₃)₂·4H₂O i 5 j.m. H₂O, a wodorotlenek sodu z 0,95 j.m. NaOH i 4,75 j.m. H₂O. Do utworzonej mieszaniny wprowadzono 15 j.m. roztworu wodnego AgNO₃ o stężeniu 0,1 mol/dm³. Powstałą mieszaninę, w celu przeprowadzenia procesu hydrotermalnego, przeniesiono do zamkniętego naczynia teflonowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym. Proces prowadzono przy mocy mikrofal 650 W przez 10 minut. Temperatura procesu osiągnęła 210°C, natomiast ciśnienie 40 barów. Po procesie hydrotermalnym osad odsączono i suszono w temperaturze 70°C przez 12 h. Otrzymano szkło o składzie (% molowy) 47,2 SiO₂ – 23,8 CaO – 26,4 Na₂O – 2,7 P₂O₅ i 0,5% zawartości Ag⁺. Otrzymany materiał ma postać igieł o nanometrycznym rozmiarze (przekrój poprzeczny ok. 80 nm) oraz mikrometrycznych aglomeratów nanometrycznych cząstek kulistych (40–100 nm).

Przykład 2

Z 1,194 j.m. Na₂SiO₃·5H₂O oraz 1,5 j.m. H₂O przygotowano wodny roztwór metakrzemianu sodu, do którego w warunkach ciągłego mieszania, w temperaturze pokojowej wkroplono 1,141 j.m. roztworu kwasu chlorowodorowego o stężeniu 36%. Do powstałej zawiesiny tlenku krzemu (IV) dodano roztwór sporządzony z 0,198 j.m. (NH₄)₂HPO₄ i 1,0 j.m. H₂O. Do powstałej mieszaniny, w warunkach ciągłego mieszania, w temperaturze pokojowej dodano zawiesinę wodorotlenku wapnia, którą strącono wcześniej w warunkach ciągłego mieszania i w temperaturze pokojowej poprzez dodanie 0,245 j.m. NaOH w 6,0 j.m. H₂O do wodnego roztworu azotanu (V) wapnia otrzymanego z 0,724 j.m. Ca(NO₃)₂·4H₂O i 6,0 j.m. H₂O. Do mieszaniny wprowadzono następnie zawiesinę wodorotlenku cynku, którą strącono wcześniej w warunkach ciągłego mieszania i w temperaturze pokojowej poprzez dodanie 0,053 j.m. NaOH rozpuszczonego w 2,0 j.m. H₂O do roztworu otrzymanego przez rozpuszczenie 0,196 j.m. Zn(NO₃)₂·6H₂O w 4,0 j.m. H₂O.

W wyniku tego otrzymano końcową mieszaninę reakcyjną, którą przeniesiono do zamkniętego naczynia teflonowego, które umieszczono w reaktorze mikrofalowym w celu przeprowadzenia procesu hydrotermalnego. Proces prowadzono przy mocy mikrofal 600 W przez 15 minut. Temperatura procesu osiągnęła 200°C, natomiast ciśnienie 40 barów. Po procesie hydrotermalnym osad odsączono, przemyto wodą dejonizowaną i suszono w temperaturze 110°C przez 2 h. Otrzymano szkło o składzie (% molowy) 42,75 SiO₂ – 23,28 CaO – 23,28 Na₂O – 5,70 P₂O₅ – 5,00 ZnO. Otrzymany materiał charakteryzuje się ok. 45 nm rozmiarem cząstek kulistych.

Przykład 3

Z 1,194 j.m. Na₂SiO₃·5H₂O oraz 1,5 j.m. H₂O przygotowano wodny roztwór metakrzemianu sodu, do którego w warunkach ciągłego mieszania, w temperaturze pokojowej wkroplono 1,141 j.m. roztworu kwasu chlorowodorowego o stężeniu 36%. Do powstałej zawiesiny tlenku krzemu (IV) dodano roztwór sporządzony z 0,198 j.m. (NH₄)₂HPO₄ i 1,0 j.m. H₂O. Do powstałej mieszaniny, w warunkach ciągłego mieszania, w temperaturze pokojowej dodano zawiesinę wodorotlenku wapnia, którą strącono wcześniej w warunkach ciągłego mieszania i w temperaturze pokojowej poprzez dodanie 0,245 j.m. NaOH w 6,0 j.m. H₂O do wodnego roztworu azotanu (V) wapnia otrzymanego z 0,724 j.m. Ca(NO₃)₂·4H₂O i 6,0 j.m. H₂O. Następnie do mieszaniny wprowadzono 0,726 j.m. roztworu chlorku miedzi (II) o stężeniu 0,00174 mol/dm³, a następnie 0,080 j.m. roztworu kwasu taninowego o stężeniu 0,00787 mol/dm³.

W wyniku tego otrzymano końcową mieszaninę reakcyjną, którą przeniesiono do zamkniętego naczynia teflonowego, które umieszczono w reaktorze mikrofalowym w celu przeprowadzenia procesu hydrotermalnego. Proces prowadzono przy mocy mikrofal 600 W przez 10 minut. Temperatura procesu osiągnęła 200°C, natomiast ciśnienie 40 barów. Po procesie hydrotermalnym osad odsączono, przemyto wodą dejonizowaną i suszono w temperaturze 110°C przez 2 h. Otrzymano szkło o składzie (% molowy) 44,00 SiO₂ – 25,13 CaO – 25,13 Na₂O – 6,95 P₂O₅ oraz zawartości nanocząstek miedzi równej 100 mg/kg. Otrzymany materiał charakteryzuje się ok. 200 nm rozmiarem cząstek kulistych szkieł z wbudowanymi nanocząstkami miedzi.

Przykład 4

Do 20,0 j.m. H₂O wprowadzono 5,0 j.m. Na₂SiO₃·5H₂O i mieszano. Do otrzymanego roztworu przy ciągłym mieszaniu wkroplono 9,9 j.m. 30% roztworu HNO₃. Następnie powstałą zawiesinę przesączono, a osad przemyto wodą dejonizowaną. Do odsączonego osadu dodano 30 j.m. wody dejonizowanej. Do otrzymanej zawiesiny dodano wodny roztwór NH₂HPO₄ otrzymany przez zmieszanie 0,32 j.m. soli z 5,0 j.m. H₂O, a następnie zawiesinę Ca(OH)₂. W celu strącenia wodorotlenku wapnia przy ciągłym mieszaniu do roztworu azotan(V) wapnia dodano wodorotlenek sodu. Roztwór azotan(V) wapnia otrzymano z 2,8 j.m. Ca(NO₃)₂·4H₂O i 5,0 j.m. H₂O, a wodorotlenek sodu z 0,95 j.m. NaOH i 4,75 j.m. H₂O. Do utworzonej mieszaniny wprowadzono 5,0 j.m. roztworu NaF o stężeniu 0,328 mol/dm³. Powstałą mieszaninę, w celu przeprowadzenia procesu hydrotermalnego, przeniesiono do zamkniętego naczynia teflonowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym. Proces prowadzono przy mocy mikrofal 650 W przez 10 minut. Temperatura procesu osiągnęła 220°C, natomiast ciśnienie 40 barów. Po procesie hydrotermalnym osad odsączono i suszono w temperaturze 70°C przez 12 h. Otrzymano szkło o składzie (% molowy) 47,2 SiO₂ – 23,8 CaO – 26,4 Na₂O – 2,7 P₂O₅ i 1,0% zawartości F⁻. Otrzymany materiał ma postać igieł i płatków o nanometrycznym rozmiarze cząstek.

Przykład 5

Szkło o składzie (% molowy) 47,2 SiO₂ – 23,8 CaO – 26,4 Na₂O – 2,7 P₂O₅ i 1,0% zawartości F⁻ ustabilizowano termicznie przez 3 h w 700°C, a następnie przy użyciu prasy hydraulicznej typu PLH-25T o nacisku 70 bar uformowano z niego pastylki o wymiarach 10 x 2 mm. Następnie pastylki o masie ok. 0,25 g umieszczono w pojemnikach polietylenowych i dodano do nich 25 cm³ płynu SBF, sztucznej śliny albo wody dejonizowanej. Pojemniki szczelnie zamknięto i inkubowano w temperaturze 37°C. Próbkę usuwano z inkubatora w okresach 6 h, 24 h, 48 h, 72 h oraz 240 h. Wszystkie roztwory przesączono i poddano analizom.

Pomiar stężenia jonów wapnia i sodu dokonywano metodą AAS. Stężenie jonów fosforanowych badano metodą spektrofotometryczną, natomiast stężeniu jonów fluorkowych metodą potencjometryczną z zastosowaniem elektrody jonoselektywnej. Pomiar pH wykonano przy pomocy pH-metru wyposażonego w elektrodę zespoloną.

We wszystkich bioaktywnych szklach krzemianowo-fosforanowych z dodatkiem jonów fluorkowych zaobserwowano wzrost pH. Najbardziej jest to widoczne w pierwszych 40 godzinach inkubacji. Wzrost pH jest związany z wymianą jonów Ca²⁺, HPO₄²⁻, PO₄³⁻ oraz Na⁺ z jonami H⁺ lub H₃O⁺ między badanym materiałem a symulowanym płynem. Wzrost stężenia jonów fosforanowych oraz jonów wapniowych związany jest z ich wymianą między roztworem, a badanym materiałem. Końcowym efektem jest wytworzenie warstwy apatytu.

Dodatek jonów fluorkowych do bioaktywnego szkła krzemianowo-fosforanowego nie spowodował znaczących zmian w pH oraz stężeniach jonów. Można wnioskować, że dodatek jonów F⁻ nie wpływa na procesy wymiany jonów i krystalizację. Badano również ilość uwalnianych jonów fluorkowych. Uwalnianiu F⁻ z materiału inkubowanego w płynie imitującym środowisko jamy ustnej, pozwala wnioskować o przydatności materiału do zastosowania go w stomatologii, ponieważ jony fluoru działają przeciwróżniczo.

Badania składu fazowego XRD inkubowanych bioaktywnych szkieł krzemianowo-fosforanowych potwierdzają obecność hydroksyapatytu na powierzchni materiałów. Badania składu fazowego wykazały, że w bioaktywnym szkłe krzemianowo-fosforanowym z dodatkiem jonów fluorkowych po inkubacji, fazą dominującą jest krzemian sodowo-wapniowy Ca₅Na₂Si₃O₉. Fazy towarzyszące to: Ca₅(PO₄)₃(OH), Ca₂P₂O₇, CaSiO₃, Ca₅(PO₄)₃F, Na₅Ca₄(PO₄)₄F.

Obrazy SEM powierzchni badanego materiału po 10 dniach inkubacji w płynach symulujących wyraźnie wykazują zmiany zachodzące w morfologii badanego materiału. W próbkach bioaktywnego szkła po inkubacji w wodzie dejonizowanej, sztucznej ślinie oraz sztucznym osoczu krwi, zaobserwowano nową warstwę w porównaniu z próbkami przed inkubacją. Świadczy to o bioaktywności materiału. Badania XRD oraz FTIR potwierdziły obecność hydroksyapatytu. Bioaktywne szkła z dodatkiem jonów fluorkowych po inkubacji tworzą znacznie większą warstwę powstałych związków niż bioaktywne szkła bez dodatków. Obecność jonów fluorkowych wpływa więc na proces krystalizacji apatytu.

Przykład 6

Celem prowadzonych badań było sprawdzenie występowania właściwości bakteriostatycznych oraz bakteriobójczych próbek nanomateriałów z dodatkiem nanocząstek srebra określonej technologii wytwarzania poprzez wyznaczenie odpowiednich efektywnych stężeń. Zgodnie kryterium PN EN

1040:2006 badany preparat posiada właściwości bakteriobójcze w przypadku, gdy uzyskuje się wskaźnik redukcji ilości bakterii testowych o $5 \log_{10}$ w 1 z 3 sprawdzanych kolejnych stężeń. Zaobserwowanie spadku ilości bakterii testowych poniżej $5 \log_{10}$ w warunkach prowadzonych badań świadczy, iż badana substancja posiada właściwości bakteriostatyczne, czyli wpływa na hamowanie wzrostu i rozmnażania bakterii.

Przedmiotem badań były ustabilizowane termicznie przez 3 h w 700°C materiały szkliste: szkło bioaktywne o składzie $47,2 \text{ SiO}_2 - 23,8 \text{ CaO} - 26,4 \text{ Na}_2\text{O} - 2,7 \text{ P}_2\text{O}_5$, które stanowiło kontrolę oraz trzy szkła o identycznym składzie ale zawierające odpowiednio 0,5%, 1,0% i 2,0% srebra. Z próbek w postaci stałych, suchych proszków przygotowano naważki, które rozcieńczono z użyciem sterylnej wody, przeznaczonej do badań mikrobiologicznych uzyskując zawiesiny wodne. Badaniu poddano trzy różne stężenia produktu. Stężenia zmieniały się w postępie geometrycznym ze współczynnikiem 2, tzn. z dwukrotnym rozcieńczeniem.

W badaniu zastosowano zgodnie z metodą badawczą 2 szczepy wzorcowe będące przedstawicielami bakterii G (-): *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 oraz bakterii G (+): *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, wobec których sprawdzana była aktywność biostatyczna i biobójcza.

Testowe zawiesiny komórek bakterii zostały przygotowane z hodowli w fazie logarytmicznego wzrostu w formie roboczych roztworów w płynie Ringera o stężeniu na poziomie $1,0 \cdot 10^8$ do $5 \cdot 10^8$ jtk/ml.

W przypadku badania wobec szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 w I etapie badań 0,2 g naważki każdej z badanych próbek o stężeniach wyjściowych 0,5%, 1% oraz 2% rozcieńczono do 2 ml wodą i pobrano 0,8 ml przygotowanej próbki, do której dodano 0,1 ml wody + 0,1 ml testowej zawiesiny bakterii uzyskując odpowiednio 0,04%, 0,08% oraz 0,16% stężenie badanej próbki w trakcie badania. W przypadku badania wobec szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 w I etapie badań 0,2 g naważki badanych próbek o stężeniach wyjściowych 0,5%, 1% oraz 2% rozcieńczono do 2 ml wodą i pobrano 0,2 ml każdej z przygotowanych próbek, do których dodano 0,7 ml wody + 0,1 ml testowej zawiesiny bakterii uzyskując odpowiednio 0,01%, 0,02% oraz 0,04% stężenie badanej próbki w warunkach badania.

W II etapie badań po określonym czasie kontaktu wynoszącym 1, 5, 15, 30, 60, 120 min w temperaturze $20 \pm 10^{\circ}\text{C}$ pobierano jednakową objętość badanej mieszaniny (0,1 ml), którą dodawano do odpowiedniego dobranego neutralizatora (0,9 ml) o składzie: Tween 80 (30 g/L), saponina (30 g/L), lecytyna (3 g/L). W badaniu zastosowano metodę rozcieńczania – neutralizowania, służącą znoszeniu działania badanej substancji czynnej po określonym czasie działania. Po czasie neutralizacji wynoszącym 5 min 1 ml badanej zawiesiny z neutralizatorem przeniesiono systemem dwupłytkowym po 0,5 ml na podłoże odżywcze TSA (Tryptic Soy Agar) i poddano inkubacji w temp. 370°C w ciągu 24 h. Stężenia testowej zawiesiny bakterii przygotowanej do badania (N) znajdowały się na poziomie $1,0 - 5,0 \cdot 10^8$ jtk/ml, natomiast wartość początkowa w badanych próbkach (NO) wynosiła $1,0 - 5,0 \cdot 10^6$ jtk/ml. W przypadku uzyskania odpowiedniego spadku ilości bakterii badanego szczepu została ustalona liczba bakterii, które przeżyły po określonym czasie działania badanych próbek. Równocześnie przygotowano serię próbek kontrolnych, niezawierających srebra, które znalazły się w takim samym czasie kontaktu z badanym szczepem co próbka ze srebrem. Po 24 h inkubacji w temp. 370°C dokonano odczytu jakościowego oraz ilościowego szczepów i obliczono wskaźnik redukcji w warunkach prowadzonego badania.

W trakcie prowadzonych badań zaobserwowano właściwości bakteriostatyczne i bakteriobójcze badanych próbek, które wykazują efektywne działanie bakteriobójcze wobec *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 przy 4-krotnie niższym stężeniu i krótszym czasie działania preparatu w porównaniu do działania wobec *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Próbki uzyskały wysoki wskaźnik redukcji o 5–6 log w ciągu 60 min wobec 2 szczepów testowych uwzględnionych w metodzie badawczej i tym samym spełniły kryteria normy PN EN 1040:2006.

Podczas prowadzonych badań zaobserwowano efekt zwiększającej się odpowiednio efektywności działania biobójczego próbek wraz ze zwiększającym się stężeniem srebra oraz równoczesnego skracania się efektywnego działania biobójczego, które dla próbek o stężeniu 0,01%, 0,02%, 0,04% wynosi odpowiednio 15 min, 5 min i 1 min wobec bakterii *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. W odniesieniu do bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 zaobserwowano tą samą prawidłowość oddziaływania biobójczego, która dla próbek o stężeniu 0,04%, 0,08%, 0,16% wynosi odpowiednio 120 min, 60 min i 30 min. Próbki o stężeniu 0,04%, 0,08%, 0,16% badane wobec bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 wykazały wysokie działanie bakteriostatyczne, sięgające w zaokrągleniu wskaźnika redukcji 5 log odpowiednio dla czasu działania 60 min, 30 min i 15 min. Na podstawie uzyskanych

wyników badań należy przyjąć, że ustalone stężenie aktywne próbki ze srebrem działające efektywnie wobec obu badanych szczepów wynosi 0,04% przy czasie działania 120 min.

Na podstawie uzyskanych wyników badań badane próbki w odpowiednich stężeniach pretendują do zakwalifikowania do grupy środków o właściwościach antymikrobiologicznych.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania mikro lub nanocząstkowego szkła bioaktywnego, zawierającego tlenek krzemu (IV) (SiO_2), tlenek fosforu (V) (P_2O_5), tlenek wapnia (CaO) oraz tlenek sodu (Na_2O), wzbogaconego jonami metali albo jonami fluorkowymi albo nanocząstkami metali albo nanocząstkami tlenków metali, **znamienny tym**, że wodny roztwór prekursora tlenku krzemu miesza się z kwasem azotowym (V) albo kwasem chlorowodorowym, stosunek molowy kwasu azotowego (V) albo chlorowodorowego do metakrzemianu sodu wynosi od 2 do 4, z otrzymanej zawiesiny wymywa się azotan (V) sodu albo chlorek sodu, następnie do zawiesiny w warunkach ciągłego mieszania dodaje się wodny roztwór prekursora tlenku fosforu albo prekursor tlenku fosforu w postaci stałej, po czym do powstałej mieszaniny wprowadza się w warunkach ciągłego mieszania, wodorotlenek wapnia, a następnie wprowadza się do niej:
 - 1) wodny roztwór zawierający jony srebra, miedzi lub złota; albo
 - 2) wodny roztwór zawierający jony srebra, miedzi lub złota i roztwór wodny substancji o właściwościach redukujących jony metali i stabilizujących rozmiar nanometryczny; albo
 - 3) wodny roztwór soli fluoru; albo
 - 4) zawiesinę sporządzoną przez zmieszanie roztworu wodnego prekursora cynku, żelaza, miedzi lub cyrkonu i roztworu wodorotlenku sodu,po czym mieszaninę poddaje się procesowi hydrotermalnemu w polu promieniowania mikrofalowego, w temperaturze od 200 do 250°C przez 10 do 20 min i przy ciśnieniu od 20 do 40 bar, a w ostatnim etapie otrzymaną mieszaninę suszy się.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako źródło krzemu stosuje się metakrzemian sodu pięciowodny ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), jako źródło wapnia stosuje się azotan (V) wapnia czterowodny ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), jako źródło atomów sodu stosuje się wodorotlenek sodu (NaOH) albo wodorotlenek sodu (NaOH) i fosforan monosodowy (NaH_2PO_4), a prekursorem tlenku fosforu (V) jest fosforan monosodowy (NaH_2PO_4) albo wodorofosforan diamonu ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$).
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosuje się od 4,20 do 5,50 jednostek masowych $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, od 0,25 do 1,35 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ albo od 0,20 do 1,25 NaH_2PO_4 , od 2,30 do 3,60 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, od 0,08 do 1,20 NaOH .
4. Sposób według zastrz. 2 albo 3, **znamienny tym**, że stosuje się roztwory wodne o stężeniu od 15 do 40% $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, od 5 do 40% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, od 2 do 40% NaH_2PO_4 , od 20 do 70% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, od 2 do 40% NaOH .
5. Sposób według zastrz. 2 albo 3, **znamienny tym**, że do mieszaniny wprowadza się $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ albo NaH_2PO_4 w postaci stałej.
6. Sposób według dowolnego z poprzedzających zastrz., **znamienny tym**, że stosuje się kwas azotowy (V) o stężeniu od 20 do 50% albo kwas chlorowodorowy o stężeniu od 20 do 36%.
7. Sposób według dowolnego z poprzedzających zastrz., **znamienny tym**, że mieszaninę poddaje się działaniu mikrofal w naczyniu teflonowym reaktora mikrofalowego.
8. Sposób według dowolnego z poprzedzających zastrz., **znamienny tym**, że źródłem jonów srebra jest roztwór azotanu (V) srebra, jonów miedzi roztwór siarczanu miedzi albo chlorku miedzi, jonów złota roztwór kwasu tetrachlorozłotowego.
9. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że stężenie roztworów wodnych zawierających jony metali wynosi od 0,001 mol/dm³ do 1 mol/dm³, korzystnie 0,1 mol/dm³.
10. Sposób według zastrz. 8 albo 9, **znamienny tym**, że roztwory zawierające jony metali wprowadzane są w ilości zapewniającej zawartość jonów metali w szkłe bioaktywnym od 0,5 do 2,0%.
11. Sposób według zastrz. 8 albo 9, **znamienny tym**, że roztwory zawierające jony metali wprowadzane są w ilości zapewniającej zawartość nanocząstek metali w szkłe bioaktywnym od 50 do 100 mg/kg.

12. Sposób według dowolnego z zastrz. od 8 do 11, **znamienny tym**, że jako reduktor i stabilizator stosuje się kwas szikimowy, kwas taninowy, kwas galusowy, kwas elagowy, salicylan sodu albo winian sodowo-potasowy w ilości stanowiącej stosunek molowy tego związku do jonów metalu od 0,1 : 1 do 1 : 1.
13. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że stosuje się roztwory wodne reduktora i stabilizatora o stężeniu od 0,001 mol/dm³ do 1 mol/dm³, korzystnie od 0,001 mol/dm³ do 0,01 mol/dm³.
14. Sposób według dowolnego z zastrz. od 1 do 13, **znamienny tym**, że źródłem jonów fluoru jest roztwór wodny fluorku sodu.
15. Sposób według zastrz. 14, **znamienny tym**, że stężenie roztworu fluorku sodu wynosi od 0,1 do 1 mol/dm³.
16. Sposób według zastrz. 15, **znamienny tym**, że roztwór fluorku sodu dodawany jest w ilości zapewniającej zawartość jonów fluorkowych w produkcie finalnym od 0,5% do 2,0%.
17. Sposób według dowolnego z zastrz. od 1 do 7, **znamienny tym**, że jako źródło jonów cynku (II), żelaza (III), cyrkonu (IV) lub miedzi (II) stosuje się odpowiednio azotan (V) cynku, azotan (V) żelaza (III), chlorek cyrkonylu, siarczan (VI) miedzi (II) albo chlorek miedzi (II).
18. Sposób według zastrz. 17, **znamienny tym**, że stosuje się wodny roztwór soli zawierający jony metalu w stężeniu od 0,01 do 0,5 mol/dm³.
19. Sposób według zastrz. 17 albo 18, **znamienny tym**, że stosuje się wodorotlenek sodu o stężeniu od 0,2 do 2 mol/dm³ w ilości stanowiącej stosunek molowy tego związku do jonów metalu od 1 : 1 do 2 : 1.
20. Sposób według zastrz. 17 albo 18 albo 19, **znamienny tym**, że zawartość tlenku cynku, żelaza, cyrkonu albo miedzi w produkcie wynosi od 2 do 5%.
21. Sposób według dowolnego z poprzedzających zastrz., **znamienny tym**, że proces suszenia prowadzi się w temperaturze od 50°C do 110 przez 2 do 24 h.