

(19)



(10) **LT 6147 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **6147**

(51) Int. Cl. (2015.01): **C01B 25/00**
A61L 27/00

(21) Paraiškos numeris: **2013 060**

(22) Paraiškos padavimo data: **2013 06 04**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2014 12 29**

(45) Patento paskelbimo data: **2015 04 27**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

Aivaras KAREIVA, LT

(73) Patento savininkas:

UAB MOKSLINIŲ TYRIMŲ PLĖTROS LABORATORIJA, Didžioji g. 20, LT-01128 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Milda TUMKEVIČIENĖ, Patentinių paslaugų centras, UAB, J. Basanavičiaus g. 11/1, LT-03108 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Norimos morfologijos kalcio hidroksiapatito nanokristalų gavimo būdas

(57) Referatas:

Išradimas priskiriamas prie cheminių junginių, pasižyminčių akyta struktūra, konkrečiai prie norimos morfologijos kalcio hidroksiapatito nanokristalų, skirtų skeleto sutrikimams gydyti, gavimo. Siūlomo išradimo tikslas – gauti norimos morfologijos ir dydžio kalcio hidroksiapatitų nanokristalus. Tikslas pasiekiamas tuo, kad siūlomame būde ruošia du tirpalus: a) 2,5-5,0 masės % kalcio acetato bei 1,2-2,4 masės % diamonio vandenilio tetroksofosfato atskirai ištirpina 80-120 ml distiliuoto vandens, juos maišo prie 25-65 °C; b) 1,15-2,25 masės % vyno rūgšties (TA) tirpina 90-100 ml distiliuoto vandens, o 4,4-8,8 masės % etilendiamintetraacto rūgšties (EDTA), 5,85-11,7 masės % 1,2-diamincikloheksantetraacto (DCTA) ištirpina 100 ml vandens ir 22 ml 10 % amoniakinio vandens tirpale, maišo, tirpalą b) pila į tirpalą a), maišo 15-20 val. 65-75 °C, gautą gelį džiovina 20-24 h 100 °C, o sumaltą dar iškaitina 5 h 900-1200 °C. Keičiant kompleksą sudarančių reagentų (DCTA, EDTA ir TA) molinį santykį galima keisti kalcio hidroksiapatito paviršiaus morfologiją.

LT 6147 B

Išradimas priskiriamas prie cheminių junginių, pasižyminčių akyta struktūra, konkrečiai prie norimos morfologijos kalcio hidroksiapatito nanokristalų, skirtų skeleto sutrikimams gydyti, gavimo.

Kalcio turintys apatitai pagal cheminę sudėtį yra artimi kaulinio audinio neorganinės dalies sudėčiai ir pasižymi panašiomis cheminėmis ir fizikinėmis savybėmis, todėl labai perspektyvus jų panaudojimas yra skeleto implantų gamyboje bei odontologijoje.

Pats populiariausias kalcio hidroksiapatitų kristalų sintezės būdas yra kalcio hidroksiapatito zolių-gelių sintezė nevandenėje terpėje, fosforo pradinėmis medžiagomis naudojant įvairius dialkilfosfitus. Ca-P-O geliai hidroksiapatitui sintetinti buvo gauti lėtai hidrolizuojant kalcio butanoato arba kalcio acetilacetono ir dialkilfosfito mišinius. Vienfaziai $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ pavyzdžiai gauti kaitinant pradinius Ca-P-O gelius 15 valandų 1000 °C temperatūroje, kuri yra pakankamai žema temperatūra šio tipo junginiams gauti (A. Beganskienė, I. Bogdanovičienė, S. Mathur, H. Shen, A. Kareiva. Dialkilfosfatai, kaip fosforo pirmtakai kalcio hidroksiapatito zolių-gelių sintezei (Dialkyl phosphates as phosphorus precursors for the sol-gel synthesis of calcium hydroxyapatite). *Environmental Chemistry and Physics*. 26 (2004) 164; A. Beganskienė, I. Bogdanovičienė, A. Kareiva. Kalcio acetilacetono – naujas kalcio pirmtakas, skirtas $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ gavimui zolių-gelių būdu (Calcium acetylacetonate – a novel calcium precursor for sol-gel preparation of $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). *Chemija*. 2-3 (2006) 16.). Tačiau šiais būdais nebuvo gauti norimos morfologijos kalcio hidroksiapatito kristalai.

Taip pat žinomas kalcio hidroksiapatito gavimo būdas, kai pradinėmis medžiagomis buvo naudojamos $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 0,4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4OH ir metilceliuliozė. Sintezės eigoje 3 ml 0,1 g/l metilceliuliozės tirpalo ištirpina 1440 ml dejonizuoto vandens. Šiame tirpale ištirpina 0,152 mol $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 0,4\text{H}_2\text{O}$, ir prideda 0,090 mol $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Į gautą mišinį įmaišo 115 ml 24% NH_4OH tirpalo. Tirpalas visą laiką buvo maišomas ant karštos kaitinimo plytelės. Gautas mišinys dar buvo maišomas 3 val. 60-70 °C temperatūroje. Susidariusias nuosėdas nufiltruoja ir dekantuoja 5 kartus dejonizuotu vandeniu. Filtratas džiovinamas 24 h 100 °C temperatūroje. Gauti milteliai kaitinami 6 val. 1000 °C temperatūroje su tarpiniais maišymais. (C. C. Silva, A. S. B. Sombra. Hidroksiapatitų, gautų mechaninio legiravimo būdu, Ramano spektroskopijos matavimai (Raman spectroscopy measurements of

hydroxyapatite obtained by mechanical alloying). *J. Phys. Chem. Solids.* **65** (2004) 1031.)

Artimiausias siūlomam išradimui yra kalcio hidroksiapatito gavimas zolių-gelių būdu. Ca-P-O geliams sintetinti vandeniniu zolių-gelių būdu, Ca ir P šaltiniais pasirinkta kalcio acetato monohidratas ir diamonio vandenilio tetroksofosfatas. Stechiometrinius pradinių medžiagų kiekius $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,03 mol) ir $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,018 mol) atskirai ištirpina 100 ml distiliuoto vandens. Gautus skaidrius bespalvius tirpalus kambario temperatūroje, arba sušildytus iki 65 °C sumaišo. Tada 0,015 mol vyno rūgšties ištirpina 100 ml distiliuoto vandens ir po vienos valandos intensyvaus maišymo toje pačioje temperatūroje, uždengtose stiklinėse, į pradinių medžiagų tirpalą supila vyno rūgšties tirpalą. Po to, tirpalas buvo koncentruojamas atviroje stiklinėje, esant 65 °C temperatūrai. Gautus Ca-P-O gelius džiovina 24 h krosnyje (100 °C). Kserogelius sumala agato grūstuvėje ir kaitina 5 h 1000 °C temperatūroje (temperatūros kėlimo greitis 10 °C/min). (I. Bogdanovičiene, A. Beganskiene, K. Tõnsuaadu, J. Glaser, H.-J. Meyer, A. Kareiva. Kalcio hidroksiapatito, $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA) keramikos gaminiai, gauti zolių-gelių vandeninėje terpėje būdu (Calcium hydroxyapatite, $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA) ceramics prepared by aqueous sol-gel processing). *Mater. Res. Bull.* **41** (2006) 1754.)

Tačiau šiuo būdu taip pat nebuvo gauti norimos morfologijos kalcio hidroksiapatito kristalai.

Siūlomo išradimo tikslas – gauti norimos morfologijos ir dydžio kalcio hidroksiapatitų nanokristalus.

Tikslas pasiekiamas tuo, kad siūlomame būde ruošia du tirpalus:

a) 2,5-5,0 masės % kalcio acetato bei 1,2-2,4 masės % diamonio vandenilio tetroksofosfato atskirai ištirpina 80-120 ml distiliuoto vandens, juos maišo prie 25-65 °C; b) 1,15-2,25 masės % vyno rūgšties (TA) tirpina 90-100 ml distiliuoto vandens, o 4,4-8,8 masės % etilendiamintetraacto rūgšties (EDTA), 5,85-11,7 masės % 1,2-diamincikloheksantetraacto (DCTA) ištirpina 100ml vandens ir 22 ml 10 % amoniakinio vandens tirpale, maišo, tirpalą b) pila į tirpalą a), maišo 15-20 val. 65-75 °C, gautą gelį džiovina 20-24 h 100 °C, o sumaltą dar iškaitina 5 h 900-1200 °C; kai DCTA, EDTA ir TA molinis santykis yra 1:1:1, gaunamų kristalitų dydis yra 200-300 nm, kristalitų forma- suaugusios sferos, kai DCTA, EDTA ir TA molinis santykis yra 1:0,5:0,5,

gaunamų kristalitų dydis yra 200-400 nm, kristalitų forma- plokštuminiai, kai DCTA, EDTA ir TA molinis santykis yra 1:0,25:0,005, gaunamų kristalitų dydis yra 20-80 nm, kristalitų forma- sferos, kai DCTA, EDTA ir TA molinis santykis yra 0,5:0,25:1, gaunamų kristalitų dydis yra 800-1000 nm, kristalitų forma- strypai, kai DCTA, EDTA ir TA molinis santykis yra 0,005:0,005:1, gaunamų kristalitų dydis yra 1-3µm, kristalitų forma- strypai, kai DCTA, EDTA ir TA molinis santykis yra 0,25:1:0,5, gaunamų kristalitų dydis yra 600-700 nm, kristalitų forma- adatos.

Sintetinant kalcio hidroksiapatitą siūlomu zolių-gelių būdu galima kontroliuoti kristalitų dydį nuo 20 nm iki 3 µm; taip pat galima kontroliuoti dalelių morfologiją ir dalelių formą (plokštuminiai, adatėlių pavidalo, sferiniai ir kt. kristalitai). Tai pasiekama efektyviai kontroliuojant kompleksus sudarančių reagentų prigimtį, koncentracijas bei jų santykį.

Kalcio hidroksiapatitas gaunamas vandeniniu zolių-gelių būdu, Ca ir P šaltiniais pasirenkant kalcio acetato monohidratą ir diamonio vandenilio tetroksofosfatą. Zolių-gelių sintezės procesuose naudoja skirtingus kompleksuojančius reagentus: TA (vyno rūgštis), EDTA (etilendiamintetraacto rūgštis) ir DCTA (1,2-diamincikloheksantetraacto rūgštis).

PAVYZDYS: Kalcio hidroksiapatitui gauti ruošia du tirpalus: a) 0,03 mol $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ir 0,018 mol $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ atskirai ištirpina 100 ml distiliuoto vandens; b) 0,015 mol TA ištirpina 100 ml distiliuoto vandens, o 0,03 mol EDTA ir 0,03 mol DCTA ištirpina 100 ml vandens ir 22 ml 10 % amoniakinio vandens tirpale. Gauna skaidrius bespalvius tirpalus, kuriuos kambario temperatūroje, o vėliau sušildytus iki 65 °C, sumaišo. Mišinys įgauna balkšvą spalvą. Taip paruošia du pradinių medžiagų tirpalus. Po vienos valandos intensyvaus maišymo toje pačioje temperatūroje, uždengtose stiklinėse, į pradinių medžiagų tirpalus supila TA, arba EDTA, arba DCTA tirpalus. Abu mišiniai tapo skaidresni. Gautą tirpalą toliau maišo magnetine maišykle uždengtose laboratorinėse stiklinėse 15 val. 65 °C temperatūroje. Po to, tirpalus koncentruoja atvirose stiklinėse, esant tai pačiai 65 °C temperatūrai. Maišymą pabaigia tuomet, kai tirpalai virto baltu, klampiu geliu. Gautus gelius džiovina 24 h krosnyje (100 °C). Gautus kserogelius sumala agato grūstuvėje ir dar iškaitina 5 h 1000 °C temperatūroje (temperatūros kėlimo greitis 10 °C/min).

Keičiant kompleksus sudarančių reagentų (DCTA, EDTA ir TA) molinius

santykius, galima keisti kalcio hidroksiapatito paviršiaus morfologiją (1 lentelė).

1 lentelė.

Eil.Nr.	DCTA, EDTA ir TA molinis santykis	Kristalitų forma	Kristalitų dydis
1.	DCTA:EDTA:TA=1:1:1	Suaugusios sferos	200-300 nm
2.	DCTA:EDTA:TA=1:0,5:0,5	Plokštuminiai	200-400 nm
3.	DCTA:EDTA:TA=1:0,25:0,005	Sferos	20-80 nm
4.	DCTA:EDTA:TA=0,5:0,25:1	Strypai	800-1000 nm
5.	DCTA:EDTA:TA=0,005:0,005:1	Strypai	1-3 μm
6.	DCTA:EDTA:TA=0,25:1:0,5	Adatų pavidalo	600-700 nm

Siūlomas būdas leidžia sukurti nanostruktūrintą kalcio hidroksiapatitą ir efektyviai jį panaudoti medicinoje. Iš nano-CAHA buvo gaminami 3D (tridimensiniai) audinio ląstelėms atviri keraminiai laikikliai. Suformuotas 3D sintetinis kaulo blokelis pasižymi porėta mikrostruktūra. Bendrasis porėtumas buvo apytiksliai lygus $92,4 \pm 2,2$ %, o vidutinis akučių dydis - 384 ± 74 μm . Skirtingos morfologijos CAHA pavyzdžiai gali būti panaudoti skirtingai pažeistam kauliniam audiniui, kurio struktūra priklauso nuo amžiaus, lyties ir kitų faktorių, atstatyti. Tokie blokeliai gali būti naudojami ortopedijoje kaulų implantais. Susintetintas zolių-gelių metodu nano-CAHA gali būti panaudotas dantų emalės remineralizacijai. Nustatyta, kad siūlomu būdu pagaminto CAHA remineralizacija yra lygi $31,3 \% \pm 13,9 \%$. Zolių-gelių metodu susintetinti bei kitų metalų jonais pakeisti CAHA pavyzdžiai $(\text{Ca}_{10-x}\text{M}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ turėtų būti tinkami vaistams bei baltymams transportuoti gyvame organizme.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Norimos morfologijos kalcio hidroksiapatito nanokristalų gavimo būdas, apimantis kalcio acetato monohidrato bei diamonio vandenilio tetrafosfato tirpinimą distiliuotame vandenyje, gauto tirpalo maišymą 25-65 °C, pridedant vyno rūgšties tirpalo, tirpalo koncentravimą, gauto gelio džiovinimą bei malimą aukštoje temperatūroje, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ruošia du tirpalus:

a) 2,5-5,0 masės % kalcio acetato bei 1,2-2,4 masės % diamonio vandenilio tetroksofosfato atskirai ištirpina 80-120 ml distiliuoto vandens, juos maišo prie 25-65 °C,

b) 1,15-2,25 masės% vyno rūgšties (TA) tirpina 90-100 ml distiliuoto vandens, o 4,4-8,8 masės % etilendiamintetraacto rūgšties (EDTA), 5,85-11,7 masės% 1,2-diamincikloheksantetraacto (DCTA) ištirpina 100 ml vandens ir 22 ml 10 % amoniakinio vandens tirpale, maišo, tirpalą b) pila į tirpalą a), maišo 15-20 val. 65-75 °C, gautą gelį džiovina 20-24 h 100 °C, o sumaltą dar iškaitina 5 h 900-1200 °C.

2. Būdas pagal apibrėžties 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jeigu DCTA, EDTA ir TA molinis santykis yra 1:1:1, gaunamų kristalitų dydis yra 200-300 nm, kristalitų forma - suaugusios sferos.

3. Būdas pagal apibrėžties 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jeigu DCTA, EDTA ir TA molinis santykis yra 1:0,5:0,5, gaunamų kristalitų dydis yra 200-400 nm, kristalitų forma - plokštuminiai.

4. Būdas pagal apibrėžties 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jeigu DCTA, EDTA ir TA molinis santykis yra 1:0,25:0,005, gaunamų kristalitų dydis yra 20-80nm, kristalitų forma - sferos.

5. Būdas pagal apibrėžties 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jeigu DCTA, EDTA ir TA molinis santykis yra 0,5:0,25:1, gaunamų kristalitų dydis yra 800-

1000 nm, kristalitų forma - strypai.

6. Būdas pagal apibrėžties 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jeigu DCTA, EDTA ir TA molinis santykis yra 0,005:0,005:1, gaunamų kristalitų dydis yra 1-3 μm , kristalitų forma- strypai.

7. Būdas pagal apibrėžties 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jeigu DCTA, EDTA ir TA molinis santykis yra 0,25:1:0,5, gaunamų kristalitų dydis yra 600-700nm, kristalitų forma - adatos.