

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **240988**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **419463**

(51) Int.Cl.
C03C 3/097 (2006.01)
C03C 4/00 (2006.01)
A61L 27/10 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **15.11.2016**

(54) **Sposób otrzymywania mikro lub nanocząstkowego szkła krzemianowo-fosforanowego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
21.05.2018 BUP 11/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
11.07.2022 WUP 28/22

(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 240988 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania mikro lub nanocząstkowego szkła krzemianowo-fosforanowego bioaktywnego, wykorzystywanego w szczególności do wytwarzania implantów medycznych.

Bioaktywne szkła krzemianowo-fosforanowe stosowane są jako implanty medyczne i należą do grupy biomateriałów ceramicznych. Charakteryzują się one znaczną porowatością umożliwiającą trwałe połączenie tkanki z implantem. Materiały bioceramiczne są również odporne na korozję oraz charakteryzują się korzystnymi parametrami wytrzymałościowymi. Szkła krzemianowo-fosforanowe znalazły zastosowanie w inżynierii tkankowej dzięki szeregowi innych cech warunkujących ich wysoką biogodność. Na powierzchni bioszklą pozostającego w kontakcie z płynami ustrojowymi tworzy się hydroksyapatyt węglowy, którego struktura jest zbliżona do fazy mineralnej kości. W wyniku kontaktu bioszklą z tkankami żywymi, następuje dyfuzja jonów oraz tworzy się powłoka powierzchniowa, bogata w krzem. Następnie, powłoka ta jest aktywowana poprzez wbudowanie jonów wapniowych i fosforanowych. Kolejne procesy prowadzą do krystalizacji powierzchni z utworzeniem w środowisku lekko zasadowym bioaktywnej warstwy apatytu. Ponadto, bioszklą ceramiczne wykazują zdolność do zwiększania rewasularyzacji, czyli poszerzania i udrażniania zwężonych naczyń krwionośnych. Zwiększają również przychepność osteoblastów oraz aktywność enzymów. Ważną cechą bioszkieł krzemianowo-fosforanowych jest ich zdolność do tworzenia kilku typów komórek różnych tkanek szkieletowych (chrząstka, kości, tłuszcz).

Znany jest z opisu patentowego US7214635B2 skład kompozycji bioaktywnego szkła ceramicznego, zawierającego 20–40% mol. CaO, 40–60% mol. SiO₂ oraz 10–20% mol. MgO. Produkt ten cechuje się wysoką aktywnością biologiczną i wytrzymałością mechaniczną. Sposób wytwarzania tego szkła ceramicznego polega na tym, że 34,1% mol. proszkowego tlenku wapnia, 50,0% mol. proszkowego tlenku krzemu i 15,9% mol. proszkowego tlenku magnezu miesza się dokładnie. Otrzymany materiał wytapia się stapia się w temperaturze 1560°C przez 1 godzinę. Po ochłodzeniu, uzyskuje się sztabki bioaktywnego szkła charakteryzującego się jednorodną strukturą.

W opisie patentowym WO1995013835A1 opisano sposób wytwarzania szkieł bioaktywnych, które mogą być stosowane w chirurgii ortopedycznej, szczękowej i dentystrycznej. Dzięki zróżnicowanemu składowi chemicznemu, możliwa jest kontrolowana szybkość biocementacji. Kompozycja, w składzie podstawowym, zawiera tlenek wapnia, tlenek sodu i tlenek fosforu (V) i może być wzbogacana o Na₂O, MgO, Al₂O₃, B₂O₃ i CaF₂. Sposób wytwarzania tych szkieł bioaktywnych polega na tym, że prekursorzy tlenków miesza się ze sobą dokładnie, po czym spieka się je w warunkach wysokotemperaturowych. Następnie, otrzymany materiał ceramiczny rozdrabnia się do otrzymania drobnoziarnistego proszku. Uzyskany produkt wykazuje wysoką odporność na czynniki o charakterze dezintegracyjnym, m.in. zmiana pH, starzenie.

Z opisu patentowego US20090325775A1 znany jest sposób wytwarzania szklistego bioaktywnego materiału ceramicznego charakteryzującego się strukturą wapniowo-fosforanową z dodatkiem dwutlenku tytanu. Mieszaninę prekursorów miesza się i stapia w temperaturze ok. 400°C przez 3 godziny. Po ochłodzeniu, materiał mieli się. Ponowna obróbka cieplna może być stosowana w celu rekrytalizacji koniecznej do uzyskania bioaktywnego materiału ceramicznego. Autor podaje, iż produkt może wspomagać zrost złamanych kości.

Z kolei z opisu patentowego US 8168208 B1 znany jest sposób otrzymywania krzemianowo-fosforanowo-wapniowego szkła bioaktywnego stymulującego wzrost tkanki kostnej. Kompozyt wytwarza się z mieszaniny soli krzemianowych i fosforanu wapnia. Mieszaninę komponentów poddaje się obróbce cieplnej w temperaturze od 130 do 1200°C. Produkt ten może być stosowany bezpośrednio w miejscu ubytku kości lub może tworzyć powłokę bioaktywną na powierzchni implantów ułatwiających wzrost kości.

Opis patentowy CN1361076 ujawnia bioaktywne szkło nanocząsteczkowe, którego rozmiar wynosi 20–500 nm oraz sposób jego wytwarzania. Szkło nanocząsteczkowe składa się z SiO₂ w ilości 42–90% wagowych, CaO w ilości 5–30% wagowych, P₂O₅ 1–15% wagowych i Na₂O 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 NH₃OH 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 Sibo Shen et al. "Microwave aqueous synthesis of hydroxyapatite bilayer coating on magnesium alloy for orthopedic application", Chemical Engineering Journal 309 (2017) 278–287 znany jest sposób otrzymywania warstwy hydroksyapatytowej na stopach magnezu. Nie jest to produkt w postaci szkła bioaktywnego, a materiał krystaliczny o litej strukturze.

Z publikacji W. Enobong R. Essien et al. "Economic route to sodium-containing silicate bioactive glass scaffold", Open Journal of Regenerative Medicine Vol.1, No.3, 33–40 (2012) znane jest szkło bioaktywne o składzie 30,55% SiO₂ – 28,57% Na₂O – 33,21% CaO – 7,67% P₂O₅, a więc o znacznie obniżonej zawartości krzemu.

Nieoczekiwanie okazało się, iż możliwe jest opracowanie bardzo prostej i energooszczędnej metody otrzymywania bioaktywnego szkła mikro i nanocząstkowego nadającego się do wytwarzania implantów biomedycznych.

Sposób otrzymywania mikro lub nanocząstkowego szkła krzemianowo-fosforanowego według wynalazku charakteryzuje się tym, że wodny roztwór prekursora tlenku krzemu miesza się z kwasem azotowym (V) albo kwasem chlorowodorowym, przy czym 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 i poddaje się całość 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 otrzymując produkt proszkowy. Azotan (V) sodu albo chlorek sodu wymywa się poprzez sączenie i przemywanie wodą otrzymanej zawiesiny.

Wodorotlenek wapnia otrzymuje się poprzez dodanie wodnego roztworu wodorotlenku sodu do wodnego roztworu prekursora tlenku wapnia.

Prekursorem tlenku wapnia jest azotan (V) wapnia czterowodny (Ca(NO₃)₂ · 4H₂O).

Azotan (V) wapnia czterowodny stosuje się w ilości od 2,30 do 3,60, a wodorotlenek sodu w ilości od 0,08 do 1,20 jednostek masowych.

W sposobie stosuje się roztwór azotanu (V) wapnia czterowodnego o stężeniu od 20 do 70% i roztwór wodorotlenku sodu o stężeniu od 2 do 40%.

Mieszaninę poddaje się działaniu mikrofal w naczyniu teflonowym reaktora mikrofalowego.

Prekursorem tlenku krzemu jest metakrzemian sodu pięciowodny (Na₂SiO₃ · 5H₂O), a prekursorem tlenku fosforu jest fosforan monosodowy (NaH₂PO₄) albo wodorofosforan diamonu ((NH₄)₂HPO₄).

Metakrzemian sodu pięciowodny stosuje się w ilości od 4,20 do 5,50 jednostek masowych.

Fosforan monosodowy stosuje się w ilości od 0,2 do 1,25 jednostek masowych albo wodorofosforan diamonu stosuje się w ilości od 0,25 do 1,35 jednostek masowych.

Używa się roztworu wodnego metakrzemianu sodu pięciowodnego o stężeniu od 15 do 40%.

Stosuje się roztwór fosforanu monosodowego o stężeniu od 2 do 40% albo roztwór wodorofosforanu diamonu o stężeniu od 5 do 40%.

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

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

Mikro lub nanocząstkowe szkło krzemianowo-fosforanowe według wynalazku składa się z 40–50% mol SiO₂, 20–30% mol Na₂O, 20–30% mol CaO i 2–10% mol P₂O₅. Szkło to jest otrzymywane sposobem według wynalazku.

Rozmiar cząstek bioaktywnego szkła krzemianowo-fosforanowego mieści się w zakresie nano- i mikrometrycznym. Zmniejszenie wielkości cząstek do skali nanometrycznej wpływa na ich wyższą wydajność. Wynika to z ich zwiększonej powierzchni właściwej oraz zwiększonej objętości porów. Prowadzi to do szybszego uwalniania jonów i zintensyfikowanej adsorpcji białek, co stanowi o ich wyższej aktywności biologicznej.

Istotą efektywności bioaktywnego szkła jest jego oddziaływanie z tkankami. Na powierzchni międzyfazowej, w wyniku kontaktu szkła z płynami ustrojowymi, które zawierają jony H⁺ i H₃O⁺ zachodzą reakcje nieorganiczne, a następnie reakcje komórkowe prowadzące do proliferacji oraz zwapnienia i regeneracji kości. Jednym z ważniejszych etapów jest wymiana jonów K⁺, Na⁺ i Ca²⁺ dyfundujących

z bioszklą z jonami wodorowymi i hydroniowymi. Regeneracja tkanki obejmuje kilka reakcji komórkowych zachodzących na granicy szkła i tkanki. Kluczowym procesem w regeneracji tkanki jest aktywacja genu odpowiedzialnego za wywołanie osteostymulacji, co jest uzależnione od rozpuszczalności jonów krzemu (Si^{4+}) oraz jonów wapnia (Ca^{2+}). Zachodzące procesy adsorpcyjne mają charakter dynamiczny i regulowane są różnymi czynnikami, m.in. pH, morfologią szkła, rozmiarem i porowatością cząstek, stężeniem białek.

Wynalazek ilustrują poniższe przykłady:

Przykład 1

Do 20 j.m. H_2O wprowadzono 5 j.m. Na_2SiO_3 i mieszano. Do otrzymanego roztworu przy ciągłym mieszaniu wkroplono 9,9 j.m. 30% roztworu HNO_3 . Następnie powstałą zawiesinę przesączono, a osad przemyto wodą dejonizowaną. Do odsączonego osadu dodano 30 j.m. wody dejonizowanej. Do otrzymanej zawiesiny dodano wodny roztwór NaH_2PO_4 otrzymany przez zmieszanie 0,32 j.m. soli z 5 j.m. H_2O , a następnie zawiesinę $\text{Ca}(\text{OH})_2$. 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. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ i 5 j.m. H_2O , a wodorotlenek sodu z 0,95 j.m. NaOH i 4,75 j.m. H_2O .

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 200°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 SiO_2 , 23,8 CaO , 26,4 Na_2O , 2,7 P_2O_5 . Otrzymany materiał charakteryzuje się ok. 200 nm rozmiarem cząstek.

Przykład 2

Z 4,77 j.m. $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ oraz 12 j.m. H_2O przygotowano wodny roztwór metakrzemianu sodu, do którego w warunkach ciągłego mieszania, w temperaturze pokojowej wkroplono 4,56 j.m. roztworu kwasu chlorowodorowego o stężeniu 36%. Do powstałej zawiesiny tlenku krzemu (IV) dodano 0,792 j.m. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. 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 4,98 j.m. wodnego roztworu wodorotlenku sodu o stężeniu 19,68% do wodnego roztworu azotan(V) wapnia otrzymanego z 2,89 j.m. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ i 2 j.m. H_2O . 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 240°C , natomiast ciśnienie 37 barów. Po procesie hydrotermalnym osad odsączono, przemyto wodą dejonizowaną w celu usunięcia NaCl i suszono w temperaturze 110°C przez 2 h. Otrzymano szkło o składzie (% molowy) 45,0 SiO_2 , 24,5 CaO , 24,5 Na_2O , 6,0 P_2O_5 . Otrzymany materiał charakteryzuje się ok. 30 nm rozmiarem cząstek.

Przykład 3

Szkło o składzie (% molowy) 47,2 SiO_2 , 23,8 CaO , 26,4 Na_2O , 2,7 P_2O_5 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 10x2 mm. Następnie pastylki o masie ok. 0,25 g umieszczono w pojemnikach polietylenowych i dodano do nich 25 cm^3 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. Pomiar pH wykonano przy pomocy pH-metru wyposażonego w elektrodę zespoloną.

W badanych próbkach zaobserwowano wzrost pH. Wzrost pH jest związany z wymianą jonów Ca^{2+} , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} oraz Na^+ pochodzącego z bioaktywnego szkła z jonami H^+ lub H_3O^+ pochodzącymi z symulowanych roztworów. Wzrost stężenia jonów fosforanowych oraz jonów wapniowych po ok. 40 godzinie inkubacji jest związany z wymianą jonów między roztworem a badanym materiałem. W tym etapie następuje hydroliza wiązań niemoistkowych Si-O-Na/Ca z wytworzeniem wiązania Si-OH. Dalsza wymiana jonów powoduje tworzenie się grup hydroksylowych w wyniku zerwania wiązań siloksanowych. W badanych materiałach zauważalne jest również migracja jonów Ca^{2+} i PO_4^{3-} do powierzchni szkła i tworzeniem się na powierzchni materiału na warstwie SiO_2 warstwy bogatej w CaO - P_2O_5 . Końcowym efektem jest wytworzenie warstwy apatytu.

Badania składu fazowego XRD inkubowanych bioaktywnych szkieł krzemianowo-fosforanowych potwierdzają obecność hydroksyapatytu na powierzchni materiałów. Badania składu fazowego wykazały, że we wszystkich badanych próbkach po inkubacji fazą dominującą jest krzemian sodowo-wapniowy $\text{Ca}_2\text{Na}_2\text{Si}_3\text{O}_9$. Fazami towarzyszącymi w szkiełach inkubowanych sztucznej ślinie są: $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Badany materiał inkubowany w wodzie dejonizowanej oraz sztucznym osoczu krwi posiada dodatkowo fazę CaSiO_3 .

Obrazy powierzchni badanego materiału po 10 dniach inkubacji w płynach symulujących otrzymane techniką SEM wskazują na zmiany zachodzące w morfologii badanego materiału. W próbkach bioaktywnego szkła po inkubacji w wodzie dejonizowanej, sztucznej ślinie oraz sztucznym osoczu krwi zaobserwowano nową warstwę krystalitów, co dowodzi bioaktywności szkieł. Zgodnie z badaniami XRD można stwierdzić, że na powierzchni szkła narosły warstwy hydroksyapatytu o drobnych aglomeratach lub w postaci cienkiej warstwy pokrywającej badany materiał.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania mikro lub nanocząstkowego szkła krzemianowo-fosforanowego, **znamienny tym**, że wodny roztwór prekursora tlenku krzemu miesza się z kwasem azotowym (V) albo kwasem chlorowodorowym, przy czym 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 i poddaje się całość 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 wodorotlenek wapnia otrzymuje się poprzez dodanie wodnego roztworu wodorotlenku sodu do wodnego roztworu prekursora tlenku wapnia.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że prekursorem tlenku wapnia jest azotan (V) wapnia czterowodny ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).
4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że azotan (V) wapnia czterowodny stosuje się w ilości od 2,30 do 3,60, a wodorotlenek sodu w ilości od 0,08 do 1,20 jednostek masowych.
5. Sposób według zastrz. 3 albo 4, **znamienny tym**, że stosuje się roztwór azotanu (V) wapnia czterowodnego o stężeniu od 20 do 70% i roztwór wodorotlenku sodu o stężeniu od 2 do 40%.
6. Sposób według dowolnego z poprzedzających zastrz., **znamienny tym**, że mieszaninę poddaje się działaniu mikrofal w naczyniu teflonowym reaktora mikrofalowego.
7. Sposób według dowolnego z poprzedzających zastrz., **znamienny tym**, że prekursorem tlenku krzemu jest metakrzemian sodu pięciowodny ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), a prekursorem tlenku fosforu jest fosforan monosodowy (NaH_2PO_4) albo wodorofosforan diamonu ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$).
8. Sposób według zastrz. 7, **znamienny tym**, że metakrzemian sodu pięciowodny stosuje się w ilości od 4,20 do 5,50 jednostek masowych.
9. Sposób według zastrz. 7 albo 8, **znamienny tym**, że fosforan monosodowy stosuje się w ilości od 0,2 do 1,25 jednostek masowych albo wodorofosforan diamonu stosuje się w ilości od 0,25 do 1,35 jednostek masowych.
10. Sposób według zastrz. 7 albo 8 albo 9, **znamienny tym**, że używa się roztworu wodnego metakrzemianu sodu pięciowodnego o stężeniu od 15 do 40%.
11. Sposób według dowolnego z poprzedzających zastrz., **znamienny tym**, że stosuje się roztwór fosforanu monosodowego o stężeniu od 2 do 40% albo roztwór wodorofosforanu diamonu o stężeniu od 5 do 40%.
12. 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%.
13. 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.