



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11)**2 835 237** (13) **C1**

(51) МПК
C01F 11/00 (2006.01)
C01B 25/32 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)
B82Y 30/00 (2011.01)
A61L 27/12 (2006.01)
A61K 6/75 (2020.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C01F 11/00 (2025.01); C01B 25/32 (2025.01); B82B 3/00 (2025.01); B82Y 30/00 (2025.01); A61L 27/12 (2025.01); A61K 6/75 (2025.01)

(21)(22) Заявка: 2024123062, 12.08.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.08.2024

Дата регистрации:
24.02.2025

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 12.08.2024

(45) Опубликовано: 24.02.2025 Бюл. № 6

Адрес для переписки:

308015, г.Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Токтарева Татьяна Михайловна

(72) Автор(ы):

Тарасов Игорь Александрович (RU),
Трубицын Михаил Александрович (RU),
Фурда Любовь Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет"(НИУ "БелГУ") (RU)

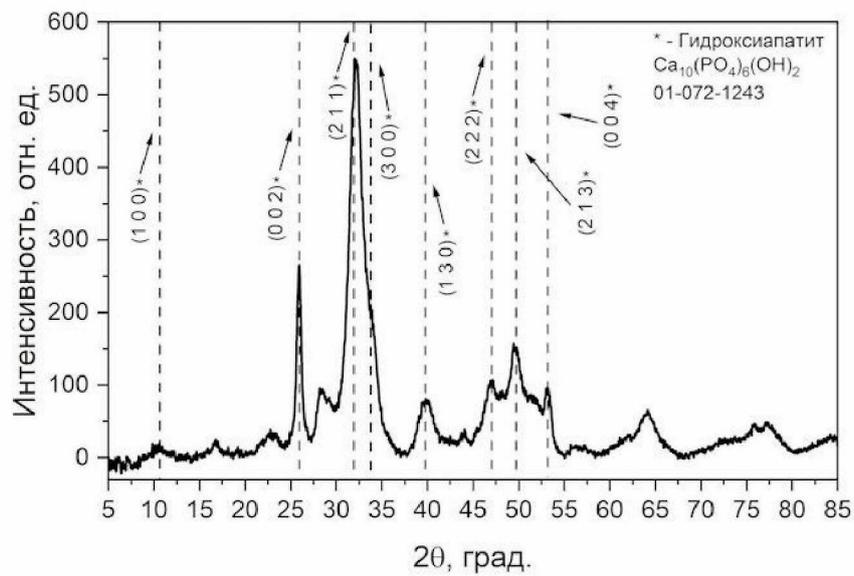
(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2736048 C1, 11.11.2020. PALARD
M. et al. Synthesis of silicate hydroxyapatite
Ca₁₀(PO₄)_{6-x}(SiO₄)_x(OH)_{2-x}, Journal of Solid
State Chemistry, v.181, Issue 8, August 2008,
p.1950-1960. BOGDANOVA E.A. et al. Synthesis
and study of nanosized biomaterials based on
hydroxyapatite., Nanosystems: Physics, Chemistry,
Mathematics, 2014, 5(4), p.590-596. (см. прод.)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНОГО КАЛЬЦИЙДЕФИЦИТНОГО СИЛИКАТ- И ФТОРЗАМЕЩЕННОГО ГИДРОКСИАПАТИТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к созданию новых биоматериалов медицинского назначения, а именно к получению однофазного наноразмерного биомиметического гидроксиапатита, допированного силикат- и фторид-анионами формулы Ca_{10-d}(PO₄)_{6-y}(SiO₄)_y(OH)_{2-y-z-2d}F_z·nH₂O, где d – степень дефицитности ионов кальция Ca²⁺, y - коэффициент или степень замещения фосфат-анионов силикат-анионами, z - коэффициент или степень замещения гидроксид-анионов фторид-анионами, с

молярным соотношением Ca²⁺/PO₄³⁻+SiO₄⁴⁻<1,67 и молярным отношением фторид-анионов к силикат-анионам, равным от 0 до 2. Биоматериал может быть использован для производства биоактивных стоматологических пломбирочных материалов, а также других стоматологических и хирургических применений. Способ обеспечивает получение упомянутого гидроксиапатита с регулируемой биорезорбируемостью и остеоиндуктивностью. 5 ил., 2 табл., 3 пр.



Фиг. 1

(56) (продолжение):

СОИН А.В. и др. Синтез и исследование анионмодифицированных апатитов., Альтернативная энергетика и экология, 2007, N1(45), p.130-132. US 2014348943 A1, 27.11.2014.

RU 2 8 3 5 2 3 7 C 1

RU 2 8 3 5 2 3 7 C 1



(51) Int. Cl.
C01F 11/00 (2006.01)
C01B 25/32 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)
B82Y 30/00 (2011.01)
A61L 27/12 (2006.01)
A61K 6/75 (2020.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C01F 11/00 (2025.01); C01B 25/32 (2025.01); B82B 3/00 (2025.01); B82Y 30/00 (2025.01); A61L 27/12 (2025.01); A61K 6/75 (2025.01)

(21)(22) Application: **2024123062, 12.08.2024**(24) Effective date for property rights:
12.08.2024Registration date:
24.02.2025

Priority:

(22) Date of filing: **12.08.2024**(45) Date of publication: **24.02.2025** Bull. № 6

Mail address:

**308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Toktareva Tatyana Mikhajlovna**

(72) Inventor(s):

**Tarasov Igor Aleksandrovich (RU),
Trubitsyn Mikhail Aleksandrovich (RU),
Furda Liubov Vladimirovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi
natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) METHOD OF PRODUCING NANOSIZED CALCIUM-DEFICIENT SILICATE- AND FLUORINE-SUBSTITUTED HYDROXYAPATITE

(57) Abstract:

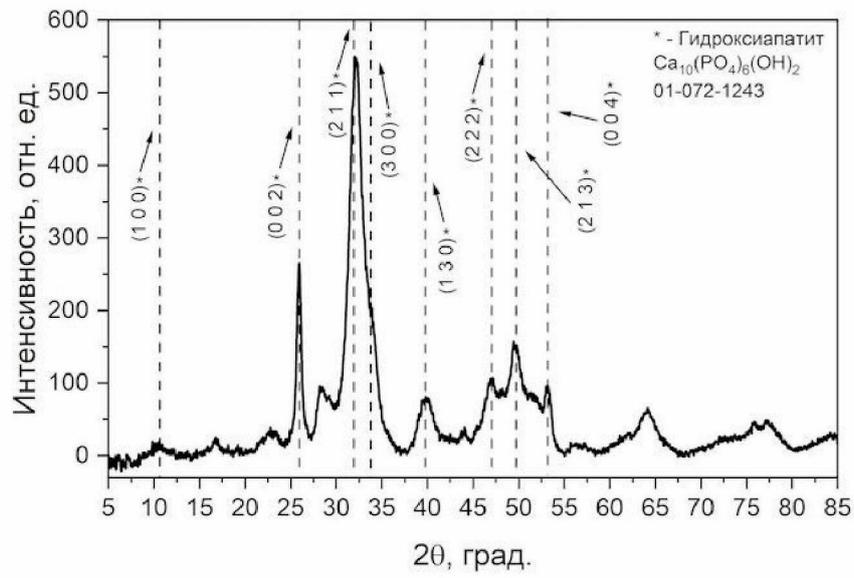
FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to creation of new biomaterials for medical purposes, namely to production of single-phase nanosized biomimetic hydroxyapatite, doped with silicate- and fluoride-anions of formula $\text{Ca}_{10-d}(\text{PO}_4)_{6-y}(\text{SiO}_4)_y(\text{OH})_{2-y-z-2d}\text{F}_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, where d is the degree of deficiency of calcium ions Ca^{2+} , y is coefficient or degree of substitution of phosphate anions with silicate anions, z is the coefficient or degree of substitution of hydroxide anions with fluoride anions,

with molar ratio $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-} + \text{SiO}_4^{4-} < 1.67$ and molar ratio of fluoride anions to silicate anions of 0 to 2. Biomaterial can be used for production of bioactive dental filling materials, as well as for other dental and surgical applications.

EFFECT: method enables to obtain said hydroxyapatite with controlled bioresorbability and osteoinductance.

1 cl, 5 dwg, 2 tbl, 3 ex



Фиг. 1

Заявляемое техническое решение относится к области медицины и созданию новых биоматериалов медицинского назначения, конкретно к способу получения наноразмерного биомиметического гидроксиапатита, модифицированного силикат- и фторид-анионами, который может быть использован для производства биоактивных стоматологических пломбировочных материалов, а также для других стоматологических и хирургических применений.

Терминология, используемая в рамках данной заявки.

Биомиметические материалы или биомиметики (англ. biomimetic materials, biomimetics, bioinspired materials) - материалы, создаваемые на основе принципов, существующих в живой природе. Это макро-, микро- и наноразмерные синтетические структуры, которые представляют собой аналоги фрагментов тканей, органов или биологически активных продуктов метаболизма, повторяющих свойства живых систем;

ГАП - гидроксиапатит;

Допирование (англ. doping) - внедрение небольших количеств модифицирующих веществ в структуру гидроксиапатита;

Биорезорбируемость - способность материала растворяться при контакте с межклеточными жидкостями и поглощаться организмом;

Остеоиндуктивность - способность материала стимулировать образование новой зубной и костной ткани;

Остеокондуктивность - способность материала выполнять роль «каркаса» (скаффолда, с англ. «scaffold») для дальнейшего формирования биогенной костной и зубной ткани;

Биосовместимость - свойство материала не вызывать негативную реакцию организма;

Биоактивность - способность материала стимулировать протекание биологических процессов;

Остеобласты - клетки костной и зубной ткани, напрямую обеспечивающие процесс её формирования;

БГАП - биомиметический гидроксиапатит;

ТЭОС - тетраэтоксисилан;

SBF-раствор (англ. Simulated Body Fluid) - раствор, аналогичный по химическому составу межклеточной жидкости человека;

РФА - рентгенофазовый анализ;

ПЭМ - просвечивающая электронная микроскопия;

СЭМ - сканирующая электронная микроскопия.

В настоящее время, гидроксиапатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (далее - ГАП) и материалы на его основе широко используются в медицинских целях: главным образом, в хирургии и стоматологии, так как данный материал является главной минеральной составляющей костной и зубной ткани человека и животных [Dorozhkin S. V. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine // Materials. 2009. № 2 (2). С. 399-498.]. Отличительной особенностью материалов на основе гидроксиапатита является их хорошая биосовместимость, а также способность к стимулированию биологических процессов организма, в том числе процессов образования костной и зубной ткани, а также свойство выполнять роль «каркаса» (скаффолда - с англ. «scaffold») для дальнейшего образования новой зубной и костной ткани [Eliaz N., Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications // Materials (Basel, Switzerland). 2017. № 4 (10). С. 334.]. Однако, существенными недостатками материалов на основе ГАП, применяющихся в настоящее время в медицинской практике, являются низкая биорезорбируемость и остеоиндуктивность.

Известно, что биорезорбируемость главным образом может регулироваться величиной удельной поверхности ГАП за счёт уменьшения размера частиц, также, на все вышеперечисленные свойства напрямую влияет химическое модифицирование гидроксиапатита различными ионами. Известно, что биогенный апатит, входящий в минеральный состав кости, зубной эмали и дентина человека, содержит помимо ионов кальция, фосфат- и гидроксид-анионов, кремний и фтор в виде силикат- и фторид-анионов соответственно. Помимо этого, биогенный апатит является кальцийдефицитным, то есть его молярное соотношение атомов кальция к суммарному содержанию фосфора, кремния и углерода, представляется меньше 1,67. Также, частицы, составляющие биогенный ГАП, по своей морфологии являются наноразмерными с преимущественно сферической формой. Благодаря вышеперечисленным свойствам, биогенный ГАП обладает оптимальными биорезорбируемостью и остеоиндуктивностью [Cacciotti I. Cationic and Anionic Substitutions in Hydroxyapatite. 2016. С. 145-211.].

Количество научно-исследовательских работ, направленных на получение биомиметического гидроксиапатита, в последние годы существенно возросло.

Известно, что использование пломбирочных материалов, содержащих наночастицы гидроксиапатита, уменьшает зубную гиперчувствительность, ингибирует деминерализацию, приводящую к разрушению зубной ткани, а также способствует восстановлению зубной эмали. Немаловажно, наночастицы ГАП в наибольшей степени биосовместимы, обладают наибольшей адгезией к зубной ткани, и способны защищать биогенную эмаль путём формирования слоя на её поверхности [Umaphy V. R. и др. Current trends and future perspectives on dental nanomaterials - An overview of nanotechnology strategies in dentistry // Journal of King Saud University - Science. 2022. № 7 (34). №. 102231.]. Регулирование размеров частиц и степени кристалличности синтетического гидроксиапатита может осуществляться варьированием теххимических параметров синтеза и введением низкомолекулярных органических ди- и трикарбоновых гидроксикислот. Наиболее часто используется лимонная кислота [Neupane M. и др. Influence of the number of carboxyl groups on the nucleation of hydroxyapatite // Metals and Materials International. 2010. (16). С. 333-338.].

Биогенный апатит включает в свой состав силикат-анионы. Их влияние на свойства ГАП характеризуется увеличением биоактивности вследствие стимулирования активности остеобластов, приводящего к ускорению биореминерализации, также наблюдается увеличение остеокондуктивности и остеоиндуктивности, характеризующееся наибольшей интеграцией силикат-замещённого ГАП в биогенный гидроксиапатит [Cacciotti I. Cationic and Anionic Substitutions in Hydroxyapatite. 2016. С. 145-211.].

Наряду с силикат-анионами, важную роль играет замещение на фторид-анионы. Их влияние на свойства ГАП выражается в виде увеличения кристалличности материала и снижению его биорезорбируемости, а также повышению химической и термической стабильности. Биоактивность фторид-замещённого гидроксиапатита не снижается в значительной мере по сравнению с незамещённым гидроксиапатитом [Cacciotti I. Cationic and Anionic Substitutions in Hydroxyapatite. 2016. С. 145-211.]. Введение фторид-анионов обеспечивает повышенную стойкости ГАП в кислых средах, в том числе в биологических. [Seyedmajidi S., Rajabnia R., Seyedmajidi M. Evaluation of antibacterial properties of hydroxyapatite/bioactive glass and fluorapatite/bioactive glass nanocomposite foams as a cellular scaffold of bone tissue // Journal of Laboratory Physicians. 2018. № 3 (10). С. 265-270.].

В связи с вышеизложенным, синтез наноразмерного кальцийдефицитного силикат- и фторзамещённого гидроксиапатита стоматологического назначения является весьма

актуальным.

Макарова С.В. и др. предложили способ получения фторзамещённого гидроксиапатита твердофазным методом при взаимодействии безводного гидроортофосфата кальция CaHPO_4 , отожжённого оксида кальция CaO и безводного фторида кальция CaF_2 [Макарова С.В. и др. Механохимический синтез карбонат- и фторзамещённого гидроксиапатитов // Химия в интересах устойчивого развития. 2020. № 1. С. 51-56.].

Способ включает механохимический синтез в планетарной мельнице с использованием стального барабана и стальных мелющих тел. Навески реагентов переносят в планетарную мельницу и осуществляют измельчение в течение 30 минут, затем, для повышения степени кристалличности, синтезированные образцы отжигают при температуре 1100°C в течение 2ч в электрической печи со скоростью подъёма температуры $10^\circ\text{C}/\text{мин}$. Полученный материал представляет собой частицы ГАП с размером первичных кристаллитов 20-32 нм. Для исключения образования натира железа в продуктах перед проведением синтеза осуществляют футеровку барабанов смесью исходных реагентов. Возможно наличие примеси оксида кальция в синтезированном ГАП. Полученный продукт представляет собой белый порошок.

Недостатками известного способа являются:

-высокий размер первичных кристаллитов гидроксиапатита, из-за которого ГАП не обладает оптимальной биорезорбируемостью;

-высокая температура и продолжительность термообработки, в процессе которой биоактивность ГАП снижается вследствие агломерации и роста частиц;

-присутствие примеси оксида кальция, которая может вызывать локальный переизбыток ионов кальция, быстрая резорбция примеси по отношению к ГАП также может влиять на образование микротрещин при стоматологическом применении.

Известен гидротермальный способ получения гидроксиапатита при взаимодействии в автоклаве 0,06М и 0,1М растворов гидроортофосфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и нитрата кальция $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ соответственно [Prihanto A. и др. Batch hydrothermal synthesis of nanocrystalline, thermostable hydroxyapatite at various pH and temperature levels // Inorganic Chemistry Communications. 2023. (157). №. 111301.].

В раствор гидроортофосфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ с pH 5,0 при помощи бюретки вводят раствор $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ с pH 7,5 со скоростью 150 мл/час. Далее раствору дают отстояться в течение 20 минут, поддерживая pH введением раствора аммиака. После отстаивания суспензию переносят в автоклав, который затем нагревают до необходимой температуры и выдерживают в течение 24 часов. После осуществления синтеза осадок отфильтровывают и промывают, затем полученную пасту высушивают при 105°C в течение 2 часов и измельчают. Полученный продукт представляет собой белый порошок.

Недостатками известного способа являются:

- полученный гидроксиапатит обладает неоднородной формой кристаллов;

- крупный размер первичных кристаллитов гидроксиапатита, из-за которого ГАП не обладает оптимальной биорезорбируемостью;

- сложность процесса синтеза, связанная с необходимостью поддерживать повышенную температуру в течение длительного времени.

Наиболее близким к заявленному способу, выбранным за прототип, является способ, описанный в патенте РФ №2736048 опубл. 11.11.2020. Указанный способ получения биомиметического гидроксиапатита (далее - БМГАП) включающий реакцию между растворами, содержащими ионы кальция, фосфат-анионы, карбонат-анионы и силикат-

анионы в присутствии лимонной кислоты, отстаивание, отделение осадка, промывку, сушку и измельчение, где для синтеза БМГАП смешивают водные растворы, содержащие тетрагидрат нитрата кальция $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, безводный гидроортофосфат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, моногидрат лимонной кислоты $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, тетраэтоксисилан $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_4\text{Si}$, безводный карбонат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Процесс синтеза БМГАП формулы $\text{Ca}_{10-d}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x-y-z}(\text{CO}_3)_y(\text{SiO}_4)_z(\text{OH})_{2+x+y-z-2d} \cdot n\text{H}_2\text{O}$, где d - степень дефицитности Ca^{2+} ; y - коэффициент или степень замещения фосфат ионов карбонат-анионами, z - коэффициент или степень замещения фосфат ионов силикат-анионами, осуществляют методом осаждения: в реакционный сосуд, содержащий раствор нитрата кальция, при перемешивании добавляют раствор лимонной кислоты по молярному соотношению 10:1 и с помощью раствора гидроксида аммония рН данной системы доводят до 10-11, продолжая перемешивание, осуществляют допирование силикат- и карбонат-анионами для получения готового продукта со степенью замещения карбоната и кремния $y=z=1$, для чего последовательно добавляют расчетные количества сначала тетраэтоксисилана, затем карбоната аммония $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ и интенсивно перемешивают в течение 5-10 минут, затем в композицию из нитрата кальция/лимонной кислоты/ТЭОС/карбоната аммония добавляют по каплям со скоростью 4-5 мл/мин раствор гидроортофосфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ для получения готового продукта с молярным соотношением в диапазоне от 1,50 до 1,60, поддерживая рН реакционной смеси равным 10-11 с помощью гидроксида аммония, и перемешивают в течение 30 минут, отстаивают в течение 24 часов при комнатной температуре, после чего осадок отделяют, промывают и сушат при 100-120°C до постоянной массы с последующим измельчением. Весь процесс производят при комнатной температуре. Данный способ позволяет получить порошок БМГАП, который может быть использован для производства медицинских материалов, стимулирующих восстановление дефектов костной ткани, в том числе в ортопедии и стоматологии.

Недостатки известного способа заключаются в том, что:

-низкая продолжительность процесса гидролиза тетраэтоксисилана, в результате которого замещение на силикат-анионы может происходить в недостаточной степени;
 -значительное время между добавлением карбоната аммония и введением раствора гидроортофосфата аммония, в результате которого может образоваться инертная примесь карбоната кальция.

Задачей настоящего изобретения является разработка способа получения однофазного наноразмерного биомиметического гидроксиапатита с регулируемой биорезорбируемостью и остеоиндуктивностью.

Технический результат заключается в осуществлении поставленной задачи, а именно, реализация предполагаемого изобретения обеспечивает получение БГАП, модифицированного силикат- и фторид-анионами с регулируемой биорезорбируемостью и остеоиндуктивностью формулы $\text{Ca}_{10-d}(\text{PO}_4)_{6-y}(\text{SiO}_4)_y(\text{OH})_{2-y-z-2d}\text{F}_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, где d - степень дефицитности ионов кальция Ca^{2+} ; y - коэффициент или степень замещения фосфат-анионов силикат-анионами, z - коэффициент или степень замещения гидроксид-анионов фторид-анионами с молярным отношением фторид-анионов к силикат-анионам от 0 до 2.

Предложен способ получения однофазного наноразмерного биомиметического гидроксиапатита, допированного силикат- и фторид-анионами формулы $\text{Ca}_{10-d}(\text{PO}_4)_{6-y}$

$(\text{SiO}_4)_y(\text{OH})_{2-y-z-2d}\text{F}_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, где d - степень дефицитности ионов кальция Ca^{2+} ; y - коэффициент или степень замещения фосфат-анионов силикат-анионами, z - коэффициент или степень замещения гидроксид-анионов фторид-анионами, с молярным соотношением

 5 $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-} + \text{SiO}_4^{4-} < 1,67$ и молярным отношением фторид-анионов к силикат-анионам равным от 0 до 2, включающий приготовление композиции из нитрата кальция, лимонной кислоты, тетраэтоксисилана и фторида аммония. Композицию готовят в

 10 следующей последовательности: к раствору нитрата кальция при перемешивании добавляют раствор лимонной кислоты по молярному соотношению 9,3:1 и с помощью раствора гидроксида аммония доводят рН данной системы до 10-11. Продолжая

 перемешивание, доводят температуру реакционной среды до 40°C, вводят тетраэтоксисилан и затем интенсивно перемешивают композицию в течение 5-10 минут. Вводят навеску фторида аммония в количествах, необходимых для получения

 гидроксиапатита со степенями замещения y равным 1 и z равным от 0 до 2, и молярным

 15 отношением фторид-анионов к силикат-анионам равным от 0 до 2. Затем в полученную композицию вводят раствор гидроортофосфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ со скоростью 8-10 мл/мин, поддерживая рН реакционной смеси в диапазоне 10-11 с помощью раствора гидроксида аммония. Температура композиции в течение процесса введения раствора гидроортофосфата аммония составляет 40°C. По окончании процесса введения раствора

 20 гидроортофосфата аммония, реакционную смесь перемешивают в течение 20 минут, затем отстаивают в изотермических условиях в течение 12 часов, после чего отделяют образовавшийся осадок, который промывают и сушат при 100-120°C до постоянной массы с последующим измельчением.

25 Продукт, полученный предложенным способом, является однофазным и максимально близок по химическому составу и структуре костям человека и животных за счёт

 следующих параметров: молярное соотношение $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-} + \text{SiO}_4^{4-} < 1,67$, средний размер кристаллитов от 8,88 нм до 9,15 нм, сферическая форма частиц, степень кристалличности от 91,53% до 96,31%, максимальная концентрация ионов кальция в SBF-растворе от

 30 2,87 ммоль/л до 4,42 ммоль/л. Варьируемые путём изменения молярного отношения фторид-анионов к силикат-анионам от 0 до 2 размер кристаллов и степень кристалличности обеспечивают возможность регулирования биорезорбируемости и

 остеоиндуктивности готового продукта.

35 Поставленная задача достигается тем, что способ получения однофазного наноразмерного биомиметического гидроксиапатита с регулируемой биорезорбируемостью и остеоиндуктивностью формулы $\text{Ca}_{10-d}(\text{PO}_4)_{6-y}(\text{SiO}_4)_y(\text{OH})_{2-y-z-2d}\text{F}_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, где d - степень дефицитности ионов кальция Ca^{2+} ; y - коэффициент или

 степень замещения фосфат-анионов силикат-анионами, z - коэффициент или степень замещения гидроксид-анионов фторид-анионами, включающий смешение растворов,

 40 содержащих ионы кальция, фосфат-анионы, силикат-анионы, отстаивание, фильтрование, промывку от маточного раствора и сушку, включает следующие новые признаки:

 - к раствору нитрата кальция при перемешивании добавляют раствор лимонной кислоты по молярному соотношению 9,3:1 и с помощью раствора гидроксида аммония

 45 доводят рН данной системы до 10-11;

 - продолжая перемешивание, осуществляют допирование силикат- и фторид-анионами в количествах, необходимых для получения гидроксиапатита со степенями замещения y у равным 1 и z равным от 0 до 2, и молярным отношением фторид-анионов к кремний-анионам от 0 до 2, для чего последовательно добавляют расчётные количества ТЭОС

и перемешивают реакционную среду в течение 5-10 минут при температуре 40°C, после чего добавляют навеску фторида аммония NH_4F ;

- в полученную композицию нитрата кальция, лимонной кислоты, ТЭОС и фторида аммония вводят раствор гидроортофосфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ со скоростью 8-10 мл/мин для получения готового продукта с молярным соотношением $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-} + \text{SiO}_4^{4-} < 1,67$, поддерживая температуру реакционной среды 40°C и pH в диапазоне 10-11;

- реакционную смесь после добавления всего объёма гидроортофосфата аммония перемешивают в течение 10 минут;

- реакционную смесь после перемешивания отстаивают в изотермических условиях в течение 12 часов.

Присутствие лимонной кислоты в качестве модифицирующего агента в ходе синтеза БГАП способствует ингибированию роста и агрегации кристаллов ГАП.

Поддержание температуры реакционной среды на уровне 40°C обеспечивает наиболее полный гидролиз тетраэтоксисилана, благодаря чему замещение на силикат-анионы происходит в наибольшей степени.

Допирование гидроксипатита силикат- и фторид-анионами с варьируемым молярным соотношением фторид-анионов к силикат-анионам позволяет получить биомиметический материал, максимально приближённый по химическому составу и структуре природному биогенному апатиту костной ткани, при этом обеспечивая возможность регулировать биорезорбируемость и остеоиндуктивность продукта. В качестве источника фторид-анионов используется фторид аммония NH_4F , что позволяет более точно контролировать содержание фторид-анионов в полученном продукте. Допирование силикат-анионами обеспечивает улучшенную биоактивность ГАП благодаря интенсификации активности остеобластов и повышению биорезорбируемости, остеоиндуктивности, а допирование фторид-анионами позволяет регулировать степень кристалличности и химическую стабильность ГАП.

Предложенный способ характеризуют следующие фигуры.

Фиг. 1. Порошковая дифрактограмма РФА образца БГАП с молярным соотношением $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-} + \text{SiO}_4^{4-}$ равным 1,55, полученного при дефицитности ионов Ca^{2+} $d=0,7$, коэффициентами замещения фосфат-анионов силикат-ионами, гидроксид-анионов фторид-анионами $y=z=1$ или 2,88% и 1,95% масс. Si и F соответственно, и молярным соотношением фторид-анионов к силикат-анионам равным 1 в случае, когда соотношение компонента лимонной кислоты составляет 9,3:1 или 0,48% масс. Рентгенофазовый анализ проводили на дифрактометре Rigaku Ultima IV («RIGAKU») с детектором D/teX Ultra порошковым методом с использованием $\text{CuK}\alpha$ -излучения (длина волны $\lambda=1.54178$ Å). Параметры работы генератора: ускоряющее напряжение 40 кВ, ток трубки 250 мА. Съёмку проводили в кварцевых кюветах. Параметры съёмки: интервал двойных углов $2\theta = 5-85^\circ$, шаг по $2\theta = 0.02^\circ$, скорость регистрации спектров $5^\circ/\text{мин}$. Качественный анализ полученных порошковых дифрактограмм, профильный анализ спектров и определение значений параметров решетки проводили с помощью программы PDXL Qualitative Analysis при использовании баз данных ICDD (PDF-2 2008).

Фиг. 2. ИК-спектр образца БГАП с молярным соотношением $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-} + \text{SiO}_4^{4-}$ равным 1,55, полученного при дефицитности ионов Ca^{2+} $d=0,7$ и коэффициентами замещения фосфат-анионов силикат-ионами, гидроксид-анионов фторид-анионами $y=z=1$ или 2,88% и 1,95% масс. Si и F соответственно, и молярным соотношением фторид-анионов к силикат-анионам равным 1 в случае, когда соотношение компонента

лимонной кислоты составляет 9,3:1 или 0,48% масс. ИК-спектры пропускания полученных порошков регистрировали на инфракрасном Фурье-спектрометре ФСМ-2201 («Инфраспек») в интервале волновых чисел от 400 до 5500 см⁻¹. Образцы готовили методом таблетирования с КВг.

5 Фиг. 3. ПЭМ-микротография разбавленной в соотношении 100:1 водной гидродисперсии образца БГАП с молярным соотношением Ca²⁺/PO₄³⁻+SiO₄⁴⁻ равным 1,55, полученного при дефицитности ионов Ca²⁺ d=0,7 и коэффициентами замещения фосфат-анионов силикат-ионами, гидроксид-анионов фторид-анионами y=z=1 или 10 2,88% и 1,95% масс. Si и F соответственно, и молярным отношением фторид-анионов к силикат-анионам равным 1 в случае, когда соотношение компонента лимонной кислоты составляет 9,3:1 или 0,48% масс. Съёмку ПЭМ-микротографий осуществляли на электронном микроскопе JEM-2100 («JEOL»). Ускоряющее напряжение электронной пушки составляло 200 кВ, материал катода - LaB6 (гексаборид лантана), напряжение 15 - 200 кВ, разрешение - 0,19 нм, увеличение до 200000х. В качестве подложки применяли дырчатую углеродную плёнку с отверстиями диаметром 0,1 мм.

Фиг. 4. СЭМ-микротография разбавленной в соотношении 100:1 высушенной спиртовой гидродисперсии образца БГАП с молярным соотношением Ca²⁺/PO₄³⁻+SiO₄⁴⁻ 20 равным 1,55, полученного при дефицитности ионов Ca²⁺ d=0,7 и коэффициентами замещения фосфат-анионов силикат-ионами, гидроксид-анионов фторид-анионами y= z=1 или 2,88% и 1,95% масс. Si и F соответственно, и молярным отношением фторид-анионов к силикат-анионам равным 1 в случае, когда соотношение компонента лимонной кислоты составляет 9,3:1 или 0,48% масс. Съёмку СЭМ-микротографий 25 осуществляли на электронном микроскопе SU1510 («Hitachi») с увеличением до 50000х. В качестве подложки применяли углеродную электропроводящую ленту.

Фиг. 5. Выход ионов кальция в раствор образцов БГАП по примерам 1-3 в SBF-раствор в зависимости от времени экспозиции, где «Пр. 1», «Пр. 2» и «Пр. 3» - кривые растворимости образцов, полученных по примерам 1, 2 и 3 соответственно.

30 Заявляемый способ подтверждается следующими примерами.

Пример 1.

Синтез наноразмерного биомиметического гидроксиапатита с молярным соотношением Ca²⁺/PO₄³⁻+SiO₄⁴⁻ равным 1,55, полученного при дефицитности ионов 35 Ca²⁺ d=0,7 и коэффициентами замещения фосфат-анионов силикат-ионами, гидроксид-анионов фторид-анионами y=z=1, что соответствует содержанию Si и F 2,88% и 1,95% масс. соответственно, и молярным отношением фторид-анионов к силикат-анионам равным 1 в случае, когда соотношение компонента лимонной кислоты составляет 9,3:1 или 0,48% масс.

40 Навеску 11,9810 г сухого кристаллогидрата Ca(NO₃)₂*4H₂O растворяют в реакторе, оборудованном верхнеприводной мешалкой в 100 мл дистиллированной воды. К этому раствору добавляют 10 мл 0,5М раствора лимонной кислоты, рН смеси доводят до 10 за счёт добавления 25 масс. % NH₄OH. Температуру реакционной среды доводят до 40°С. Далее к этой композиции при постоянном перемешивании добавляют 1,11 мл 45 ТЭОС (ρ = 0,94 г/см³), интенсивно перемешивают реакционную смесь в течение 5 минут и затем добавляют навеску 0,185 г NH₄F.

Навеску 3,302 г сухого (NH₄)₂HPO₄ растворяют в 100 мл дистиллированной воды,

затем полученный раствор помещают в делительную воронку и добавляют по каплям со скоростью 8 мл/мин в водный раствор, содержащий композицию из нитрата кальция, лимонной кислоты, ТЭОС и фторида аммония. При этом pH реакционной среды поддерживается постоянным на уровне 10 за счёт добавления 25 масс. % NH_4OH .

5 Температура реакционной среды поддерживается на уровне 40°C. После добавления всего объёма раствора $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ реакционную смесь перемешивают в течение 20 минут, а затем отстаивают в течение 12 часов в изотермических условиях для завершения процесса фазообразования.

10 Полученный осадок отделяют с помощью воронки Бюхнера, с использованием фильтровальной бумаги и вакуумного насоса. Затем осадок тщательно промывают от маточного раствора дистиллированной водой и сушат при 100°C в сушильном шкафу до постоянной массы. После этого образцы БГАП измельчают в мелкий порошок с использованием ступки и пестика.

Пример 2.

15 Синтез наноразмерного биомиметического гидроксиапатита с молярным соотношением $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-} + \text{SiO}_4^{4-}$ равным 1,55, полученного при дефицитности ионов Ca^{2+} $d=0,7$ и коэффициентами замещения фосфат-анионов силикат-ионами, гидроксид-анионов фторид-анионами $y=1$ и $z=0$ соответственно, что соответствует содержанию Si и F 2,89% и 0,00% масс. соответственно, и молярным отношением фторид-анионов к силикат-анионам равным 0 в случае, когда соотношение компонента лимонной кислоты составляет 9,3:1 или 0,48% масс.

25 Навеску 11,9810 г сухого кристаллогидрата $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяют в реакторе, оборудованном верхнеприводной мешалкой в 100 мл дистиллированной воды. К этому раствору добавляют 10 мл 0,5М раствора лимонной кислоты, pH смеси доводят до 10,5 за счёт добавления 25 масс. % NH_4OH . Температуру реакционной среды доводят до 40°C. Далее к этой композиции при постоянном перемешивании добавляют 1,11 мл ТЭОС ($\rho = 0,94 \text{ г/см}^3$) и интенсивно перемешивают реакционную смесь в течение 7 минут.

30 Навеску 3,302 г сухого $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды, затем полученный раствор помещают в делительную воронку и добавляют по каплям со скоростью 9 мл/мин в водный раствор, содержащий композицию из нитрата кальция, лимонной кислоты и ТЭОС. При этом pH реакционной среды поддерживается постоянным на уровне 10,5 за счёт добавления 25 масс. % NH_4OH . Температура реакционной среды поддерживается на уровне 40°C. После добавления всего объёма раствора $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ реакционную смесь перемешивают в течение 20 минут, а затем отстаивают в течение 12 часов в изотермических условиях для завершения процесса фазообразования.

40 Полученный осадок отделяют с помощью воронки Бюхнера, с использованием фильтровальной бумаги и вакуумного насоса. Затем осадок тщательно промывают от маточного раствора дистиллированной водой и сушат при 110°C в сушильном шкафу до постоянной массы. После этого образцы БГАП измельчают в мелкий порошок с использованием ступки и пестика.

Пример 3.

45 Синтез наноразмерного биомиметического гидроксиапатита с молярным соотношением $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-} + \text{SiO}_4^{4-}$ равным 1,55, полученного при дефицитности ионов

Ca^{2+} $d=0,7$ и коэффициентами замещения фосфат-анионов силикат-ионами, гидроксид-анионов фторид-анионами $y=1$ и $z=2$ соответственно, что соответствует содержанию Si и F 2,87% и 3,89% масс. соответственно, и молярным отношением фторид-анионов к силикат-анионам равным 2 в случае, когда соотношение компонента лимонной кислоты составляет 9,3:1 или 0,48% масс.

Навеску 11,9810 г сухого кристаллогидрата $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяют в реакторе, оборудованном верхнеприводной мешалкой в 100 мл дистиллированной воды. К этому раствору добавляют 10 мл 0,5М раствора лимонной кислоты, рН смеси доводят до 11 за счёт добавления 25 масс. % NH_4OH . Температуру реакционной среды доводят до 40°C. Далее к этой композиции при постоянном перемешивании добавляют 1,11 мл ТЭОС ($\rho = 0,94 \text{ г/см}^3$), интенсивно перемешивают реакционную смесь в течение 10 минут и затем добавляют навеску 0,370 г NH_4F .

Навеску 3,302 г сухого $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды, затем полученный раствор помещают в делительную воронку и добавляют по каплям со скоростью 10 мл/мин в водный раствор, содержащий композицию из нитрата кальция, лимонной кислоты, ТЭОС и фторида аммония. При этом рН реакционной среды поддерживается постоянным на уровне 11 за счёт добавления 25 масс. % NH_4OH .

Температура реакционной среды поддерживается на уровне 40°C. После добавления всего объёма раствора $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ реакционную смесь перемешивают в течение 20 минут, а затем отстаивают в течение 12 часов в изотермических условиях для завершения процесса фазообразования.

Полученный осадок отделяют с помощью воронки Бюхнера, с использованием фильтровальной бумаги и вакуумного насоса. Затем осадок тщательно промывают от маточного раствора дистиллированной водой и сушат при 120°C в сушильном шкафу до постоянной массы. После этого образцы БГАП измельчают в мелкий порошок с использованием ступки и пестика.

Физико-химические характеристики образцов, полученных по примерам 1-3 представлены в табл. 1, 2.

Таблица 1

Фазовый состав образцов, полученных по примерам 1-3.

Образец	Молярное отношение фторид-анионов к силикат-анионам	Количество фаз	Параметры элементарной ячейки, Å	
			a=b	c
Пример 1 (содержание Si и F 2,88% и 1,95% масс. соответственно)	1	1	9,5777	6,8426
Пример 2 (содержание Si и F 2,89% и 0,00% масс. соответственно)	0	1	9,4403	6,8580
Пример 3 (содержание Si и F 2,87% и 3,89% масс. соответственно)	2	1	9,4943	6,8731

Таблица 2

Средний размер кристаллитов, кристалличность и растворимость образцов, полученных по примерам 1-3.

Образец	Средний размер кристаллитов, нм	Максимальная концентрация ионов кальция в SBF-растворе, ммоль/л	Кристалличность, %
Пример 1	8,88	3,96	91,53
Пример 2	8,46	4,40	94,85
Пример 3	9,15	2,87	96,31

Средний размер кристаллитов D определяли по уравнению Селякова-Шеррера:

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta},$$

где D - размер кристаллита; K - коэффициент, зависящий от формы частиц и близкий к 1; λ - длина волны излучения; β - ширина дифракционного пика на полувысоте; θ - угол дифракции [Cullity B. D., Weymouth J. W. Elements of X-Ray Diffraction // Am. J. Phys. 1957. Vol. 25. P. 394-395].

Степень кристалличности K синтезированных образцов рассчитывали по данным рентгеновской дифрактограммы с использованием формулы:

$$K = \frac{S_{кр}}{S_{общ}} * 100\%,$$

где $S_{кр}$ - интегрированная площадь под всеми кристаллическими пиками; $S_{общ}$ - общая интегрированная площадь под всеми пиками дифракции рентгеновских лучей

при $2\theta = 5-80^\circ$ [Singh G., Singh S., Prakash S. Surface characterization of plasma sprayed pure and reinforced hydroxyapatite coating on Ti6Al4V alloy // Surf. Coat. Technol. 2011. Vol. 205. P.4814-4820].

Известно, что форма микроразмерных частиц ГАП также является важной для инициации провоспалительной реакции, и игольчатая форма кристаллов ГАП является наименее биосовместимой [Laquerriere P., Grandjean-Laquerriere A., Addadi-Rebbah S. et al. MMP-2, MMP-9 and their inhibitors TIMP-2 and TIMP-1 production by human monocytes in vitro in the presence of different forms of hydroxyapatite particles // Biomaterials. 2004. Vol. 25, № 13. P. 2515-24]. Также известно, что игольчатая форма кристаллов ГАП (размер 0,1-20 мкм) инициирует активацию NLRP3 инфламасомы и выраженную секрецию IL1 β макрофагами и дендритными клетками костного мозга мышей in vitro. При внутрибрюшинной инъекции микроразмерного и субмикронного ГАП воспалительный ответ не развивается при введении частиц ГАП сравнимого размера, но гладкой сферической формы [Lebre F., Sridharan R., Sawkins M.J. et al. The shape and size of hydroxyapatite particles dictate inflammatory responses following implantation. Sci. Rep. 2017; 7(1): 2922].

Предложенный способ позволяет получать наноразмерные частицы сферической формы размером от 5 до 60 нм (фиг. 3), которые согласно [Lebre F., Sridharan R., Sawkins M.J. et al. The shape and size of hydroxyapatite particles dictate inflammatory responses following implantation // Sci. Rep. 2017. Vol. 7, № 1: P. 2922] являются наиболее биосовместимыми для внутрибрюшинной инъекции.

Модифицирование получаемого гидроксиапатита силикат- и фторид-анионами происходит успешно, что подтверждается дифракционными пиками и валентными колебаниями, соответствующими силикат- и фторид-анионам, на дифрактограмме и ИК-спектре образцов гидроксиапатита соответственно (фиг. 1, 2). Согласно СЭМ-микрофотографии (фиг. 4), в процессе высушивания суспензии гидроксиапатита образуются структуры агломерированных частиц с морфологией, близкой к сферической, что хорошо согласуется с данными ПЭМ (фиг. 3).

По примерам 1-3, представленным в таблице 2, видно, что увеличение содержания фторид-анионов, вводимых в ходе синтеза БГАП, приводит к увеличению степени кристалличности БГАП и параметра элементарной ячейки «с», также, во фторсодержащих образцах средний размер кристаллитов незначительно увеличивается по мере увеличения содержания фтора в образцах, что позволяет успешно регулировать биорезорбируемость и остеоиндуктивность БГАП.

Биорезорбируемость исследуемых материалов изучали по международной стандартной методике в модельном SBF растворе. Образцы БГАП помещали и выдерживали в SBF-растворе при 37°C в изотермических условиях в течение 14 суток. Через заданные промежутки времени определяли концентрацию ионов кальция, переходящих в раствор, методом комплексонометрического титрования. Биорезорбируемость, согласно методике, оценивали по количественному выходу ионов Ca²⁺ (Фиг.5).

Таким образом, поставленная задача по разработке способа получения однофазного наноразмерного биомиметического гидроксиапатита с регулируемой биорезорбируемостью и остеоиндуктивностью решена, и при реализации предложенного способа достигнут заявленный технический результат, заключающийся в том, что получен БГАП формулы Ca_{10-d}(PO₄)_{6-y}(SiO₄)_y(OH)_{2-y-z-2d}F_z*nH₂O, где d - степень дефицитности ионов кальция Ca²⁺; y - коэффициент или степень замещения фосфат-

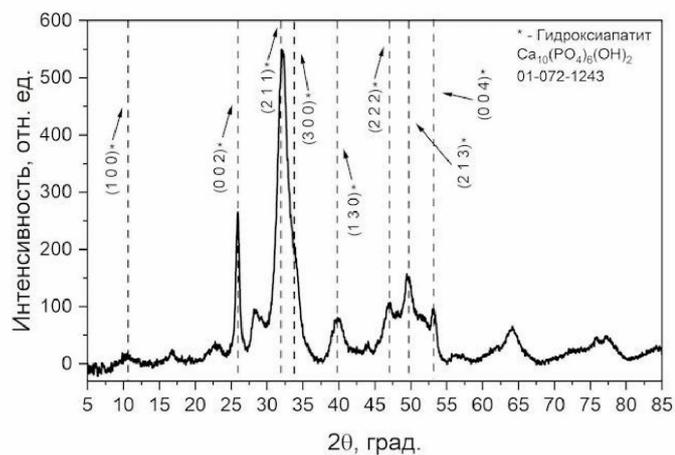
анионов силикат-анионами, z - коэффициент или степень замещения гидроксид-анионов фторид-анионами, молярном соотношении $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-} + \text{SiO}_4^{4-} < 1,67$ и молярным отношением фторид-анионов к силикат-анионам от 0 до 2 со средним размером кристаллитов от 8,88 до 9,15 нм, степенью кристалличности от 91,53 до 96,31%, максимальной концентрацией ионов кальция в SBF-растворе от 2,87 ммоль/л до 4,42 ммоль/л, и обладающий хорошей биосовместимостью за счёт того, что частицы БГАП обладают сферической формой, регулируемой биорезорбируемостью и остеиндуктивностью за счет варьирования молярного отношения фторид-анионов к силикат-анионам.

(57) Формула изобретения

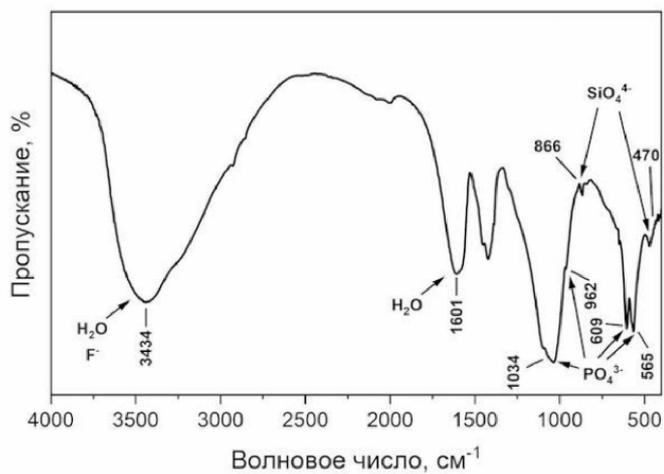
Способ получения однофазного наноразмерного биомиметического гидроксиапатита, допированного силикат- и фторид-анионами формулы $\text{Ca}_{10-d}(\text{PO}_4)_{6-y}(\text{SiO}_4)_y(\text{OH})_{2-y-z}$

$2d\text{F}_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, где d – степень дефицитности ионов кальция Ca^{2+} , y – коэффициент или степень замещения фосфат-анионов силикат-анионами, z – коэффициент или степень замещения гидроксид-анионов фторид-анионами, с молярным соотношением $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-} + \text{SiO}_4^{4-} < 1,67$ и молярным отношением фторид-анионов к силикат-анионам, равным от 0 до 2, включающий приготовление композиции из нитрата кальция, лимонной кислоты, тетраэтоксисилана и фторида аммония, для чего к раствору нитрата кальция при перемешивании добавляют раствор лимонной кислоты по молярному соотношению 9,3:1 и с помощью раствора гидроксида аммония доводят pH данной системы до 10-11, продолжая перемешивание, доводят температуру реакционной среды до 40°C, вводят тетраэтоксисилан и затем интенсивно перемешивают композицию в течение 5-10 мин, вводят навеску фторида аммония в количестве, необходимом для получения гидроксиапатита со степенью замещения y , равной 1, и z , равной от 0 до 2, и молярным отношением фторид-анионов к силикат-анионам, равным от 0 до 2, после чего в полученную композицию вводят раствор гидроортофосфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ со скоростью 8-10 мл/мин, поддерживая pH реакционной смеси в диапазоне 10-11 с помощью раствора гидроксида аммония и температуру в течение процесса введения раствора гидроортофосфата аммония на уровне 40°C, по окончании процесса введения раствора гидроортофосфата аммония перемешивают реакционную смесь в течение 20 мин, затем отстаивают в изотермических условиях в течение 12 ч, после чего осадок отделяют, промывают и сушат при 100-120°C до постоянной массы с последующим измельчением.

1

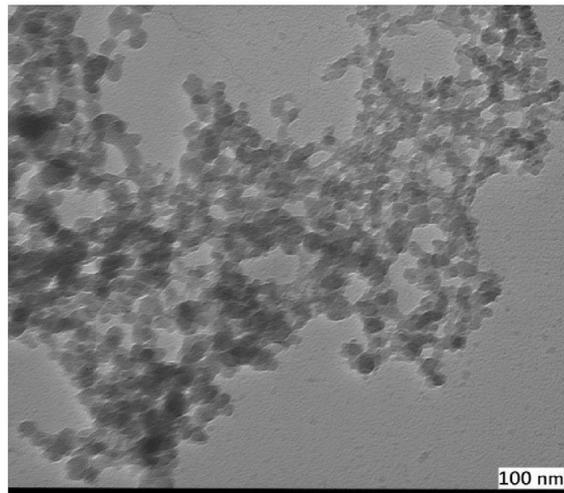


Фиг.1

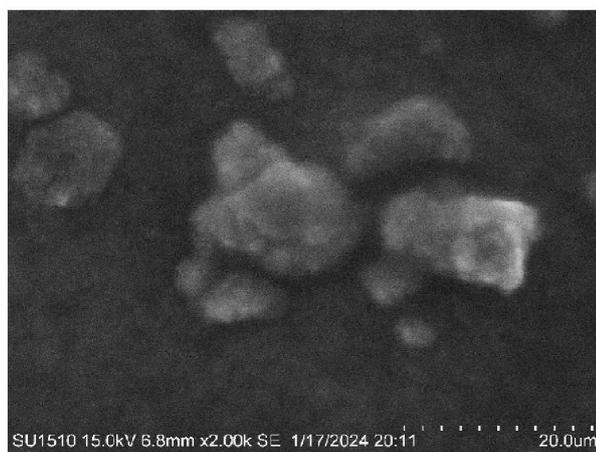


Фиг.2

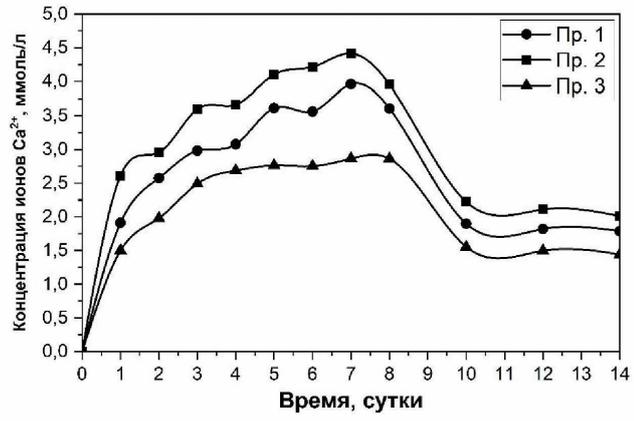
2



Фиг.3



Фиг.4



Фиг.5