

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **237111**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **420764**

(22) Data zgłoszenia: **08.03.2017**

(51) Int. Cl.

**C01B 21/064 (2006.01)**

**C01B 35/00 (2006.01)**

**B32B 5/18 (2006.01)**

**B32B 5/16 (2006.01)**

(54)

**Sposób funkcjonalizacji eksfoliowanego heksagonalnego azotku boru**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**10.09.2018 BUP 19/18**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**22.03.2021 WUP 06/21**

(73) Uprawniony z patentu:

**ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET  
TECHNOLOGICZNY W SZCZECINIE,  
Szczecin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**EWA MIJOWSKA, Szczecin, PL  
MATEUSZ DUDZIAK, Szczecin, PL  
MAGDALENA JĘDRZEJCZAK-SILICKA,  
Szczecin, PL**

**PL 237111 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób funkcjonalizacji eksfoliowanego heksagonalnego azotku boru.

Nie są znane sposoby funkcjonalizacji eksfoliowanego heksagonalnego azotku boru.

Z *Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions* nature physical science 241, 20–22 (01 January 1973) znana jest metoda wytworzenia nanocząstek złota o kontrolowanej wielkości, funkcjonalizacji grafenu (*Decorating Graphene Sheets with Gold Nanoparticles*, Ryan Muszynski, Brian Seger, and Prashant V. Kamat, J. Phys. Chem. C, 2008, 112 (14), pp 5263–5266) polegająca na wymieszaniu grafenu z kwasem chlorozłotowym, podgrzaniu go do wrzenia, a następnie dodaniu cytrynianu sodu w celu redukcji złota i naniesieniu go na powierzchnię grafenu.

Sposób funkcjonalizacji eksfoliowanego heksagonalnego azotku boru, według wynalazku, charakteryzuje się tym, że eksfoliowany heksagonalny azotek boru zanurza się w nadtlenku wodoru w stosunku 1:2, gotuje się pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 110°C przez 48 godzin, suszy się i miesza z wodą w stosunku 2:50 w stosunku do wody. Następnie pod chłodnicą zwrotną doprowadza się do wrzenia i dodaje kwas chlorozłotowy w stosunku 4:3 w odniesieniu do heksagonalnego azotku boru i podgrzewa przez 5 minut w temperaturze 100°C. Dodaje się kroplami cytrynian sodu w stosunku 5:1 do ilości kwasu chlorozłotowego i prowadzi się reakcję przez 1 godzinę w stanie wrzenia, po czym otrzymany roztwór studzi się, odwirowuje się otrzymany związek i przemywa wodą w celu wyrównania pH do 7.

Korzystnie eksfoliowany heksagonalny azotek boru uzyskuje się w taki sposób, że sproszkowany heksagonalny azotek boru miesza się z manganianem (VII) potasu w stosunku 1:4, miesza się mieszałem magnetycznym pod chłodnicą zwrotną, następnie stopniowo dolewa się kwas siarkowy (VI) o stężeniu 96% w ilości w ilości 20:1 w stosunku do manganianu, podgrzewa się to temperatury 40°C przez 6 godzin i studzi. Następnie dodaje się nadtlenek wodoru w ilości stosunku 10:3 w odniesieniu nadtlenku do kwasu i całość utrzymuje się w niskich temperaturach z wykorzystaniem łaźni wodnej z lodem. Tak otrzymany eksfoliowany chemicznie heksagonalny azotek boru poddaje się oczyszczaniu w wirówce, wyrównując pH do 7 i przemywa wodą, a następnie w ilości 0,5% objętościowych miesza się z N-metylopirolidonem, poddaje sonikacji tipem przez 30 minut i odparowuje rozpuszczalnik.

Korzystnie stosuje się sonikator o mocy 600 W, w którym moduł pulsowania ustawia się na 5 sekund, 5 sekund włączony, 5 sekund wyłączony.

Sposób według wynalazku jest łatwy w wykonaniu, nie wymaga wielu szkodliwych odczynników oraz skomplikowanej aparatury. Otrzymany sposobem według wynalazku heksagonalny azotek boru zawierający złoto może być wykorzystany w medycynie. Złoto znane jest ze swoich właściwości terapeutycznych. Ma ono właściwości antybakteryjne, wykorzystywane jest w terapii reumatoidalnego zapalenia stawów (w postaci aurotiojabłczanu sodu), znane jest także wykorzystywane promieniotwórczych izotopów złota w walce przeciw nowotworom. Właściwości złota różnią się jednak nieco w zależności od wielkości jego cząstek, np. nanozłota czy makrocząstek złota. Materiał otrzymany sposobem według wynalazku może być wykorzystany do zmiany morfologii oraz aktywności metabolicznej komórek. Może być wykorzystany w terapii antyrakowej, gdyż wpływa na potencjał proliferacyjny komórek rakowych, to znaczy obniża ich zdolność do podziału, co sprawia, że komórki rakowe nie dzielą się, natomiast dla zdrowych komórek jest nietoksyczny.

Rozwiązanie według wynalazku przedstawione jest w przykładzie wykonania i na rysunku, na którym fig. 1 i fig. 2 przedstawia zdjęcia heksagonalnego azotku bom ze złotem z transmisyjnego mikroskopu elektronowego, fig. 3 przedstawia zdjęcia heksagonalnego azotku boru ze złotem z mikroskopu sił atomowych, fig. 4 przedstawia analizę UV-Vis dla heksagonalnego azotku boru po eksfoliacjach oraz kompozytu heksagonalnego azotku boru ze złotem, fig. 5 przedstawia analizę morfologiczną linii komórek zdrowych L929, przy czym „a” – to hodowla kontrolna, a „b” – po 24 godzinach inkubacji z heksagonalnym azotkiem boru ze złotem, fig. 6 przedstawia analizę morfologiczną linii komórek raka piersi MCF-7, przy czym „a” – to hodowla kontrolna, a „b” – po 24 godzinach inkubacji z heksagonalnym azotkiem bom ze złotem, fig. 7 przedstawia analizę holograficzną linii komórek zdrowych L929 po dodaniu heksagonalnego azotku boru ze złotem, przy czym „a” – przedstawia moment rozpoczęcia inkubacji, „b” – przedstawia obraz po 1 godzinie inkubacji, C – obraz po 4 godzinach inkubacji, D – po 24 godzinach inkubacji, fig. 8 przedstawia analizę holograficzną linii komórek raka piersi MCF-7 po dodaniu heksagonalnego azotku boru ze złotem, przy czym „a” przedstawia moment rozpoczęcia inkubacji, „b” – przedstawia obraz po 1 godzinie inkubacji, „c” – obraz po 4 godzinach inkubacji, D – po 12 godzinach inkubacji, fig. 9 przedstawia wpływ stężeń heksagonalnego azotku bom ze złotem na komórki zdrowe

L929 i rakowe MCF-7, przy czym „a” przedstawia wpływ na aktywność mitochondrialną komórek, „b” – na uwolnienie wewnątrzkomórkowej dehydrogenazy LDH, „c” – na względną żywotność komórek.

Otrzymano eksfoliowany heksagonalny azotek boru w następujący sposób. Sproszkowany heksagonalny azotek boru w ilości 0,75 g mieszało z manganianem (VII) potasu w stosunku 1:4 i mieszało mieszałem magnetycznym pod chłodnicą zwrotną. Stopniowo dolewano kwas siarkowy (VI) o stężeniu 96% w ilości 60 ml, podgrzewano do temperatury 40°C przez 6 godzin i studzono. Następnie dodano nadtlenuk wodoru w ilości 200 ml i całość utrzymywano w niskich temperaturach z wykorzystaniem łaźni wodnej z lodem. Otrzymano eksfoliowany chemicznie heksagonalny azotek boru poddano oczyszczaniu w wirówce, wyrównując pH do 7 i przemyto wodą. Następnie poddano go eksfoliacji mechanicznej. Eksfoliacja mechaniczna polegała na tym, że heksagonalny azotek boru w ilości 0,3 g mieszało z N-metylopirolidonem w ilości 15 ml a następnie poddano sonikacji tipem przez 30 minut. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano heksagonalny azotek boru cienkich warstwach. Stosowano sonikator o mocy 600 W (25%), w którym moduł pulsowania ustawia się na 5 sekund, (5 sekund włączony, 5 sekund wyłączony).

Otrzymano w ten sposób eksfoliowany heksagonalny azotek boru poddaje się funkcjonalizacji złotem w następujący sposób. Eksfoliowany heksagonalny azotek boru zanurza się w nadtlenuku wodoru w stosunku 1:2, gotuje się pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 110°C przez 48 godzin, suszy się i miesza z wodą w stosunku 2:50 w stosunku do wody. Następnie pod chłodnicą zwrotną doprowadza się do wrzenia dodaje kwas chlorozłotowy w stosunku 4:3 w odniesieniu do heksagonalnego azotku boru i podgrzewa przez 5 minut w temperaturze 100°C. Dodaje się kroplami reduktor w postaci cytrynianu sodu w stosunku 5:1 do ilości kwasu chlorozłotowego i prowadzi się reakcję przez 1 godzinę w stanie wrzenia, po czym otrzymano roztwór studzi się, odwirowuje się otrzymano związek i przemywa wodą w celu wyrównania pH do 7. Badania potwierdzające osadzenie się złota na powierzchni heksagonalnego azotku boru zostały przeprowadzone za pomocą spektrofotometru UV-Vis, transmisyjnego mikroskopu elektronowego oraz skaningowego mikroskopu elektronowego. Wszystkie trzy metody potwierdziły obecność złota na powierzchni, a także możliwe było zbadanie dystrybucji oraz wielkości metalu na nośniku.

Przeprowadzono badanie mające na celu określenie wpływu otrzymanego nanokompozytu heksagonalnego azotku boru ze złotem (h-BN\_AuNP) na komórki ssące.

Określenie biokompatybilności zsyntetyzowanego nanozwiązku stanowiło istotny etap charakterystyki kompozytu h-BN\_AuNP i obejmowało – określenie potencjalnej zmiany morfologii komórek oraz aktywności metabolicznej.

W analizie biologicznej wykorzystano komórki dwóch adherentnych linii komórkowych – L929 (linia komórkowa mysich fibroblastów, ATCC® CCL-1™) oraz MCF-7 (linia komórkowa raka piersi, adenocarcinoma, ATCC® HTB-22™). Każda z linii została poddana działaniu kompozytu zawieszonego w pełnym medium hodowlanym DMEM uzupełnionym o bydlęcą surowicę płodową – FBS (10%), r-r antybiotyków (penicylinę-streptomycynę 50 IUml<sup>-1</sup>), r-r L- glutaminy (2 mM) oraz r-r amfoterycyny B (2.5 µgml<sup>-1</sup>). Komórki oby linii inkubowano z nanomateriałem w następujących stężeniach – 0,0, 3,125, 6,25, 10,0, 12,5, 25,0, 50,0, 100,0, 200,0 µgml<sup>-1</sup> przez okres 24 godzin (w standardowych warunkach dla hodowli komórkowych – 37°C, 95% wilgotności, 5% CO<sub>2</sub>).

Analizę morfologiczną komórek prawidłowych i nowotworowych oparto o obserwację mikroskopową (kontrast fazowy, mikroskop odwrócony, Nikon Eclipse TS-100) oraz holograficzną (HoloMonitor™ M4, Phase Holographic).

W przypadku obu obserwacji mikroskopowych komórki hodowano w butelkach typu T-flask 25 (o powierzchni wzrostu 25 cm<sup>2</sup>), po uprzednim ich wysianiu w ilości 7,5x10<sup>5</sup>/naczynie hodowlane. Mikrografię z użyciem mikroskopu odwróconego wykonano pod koniec 12-godzinnej inkubacji z testowanym czynnikiem. Natomiast analiza holograficzna polegała na pokłatkowej dokumentacji holograficznej obu linii komórkowych w czasie rzeczywistym, podczas 12-godzinnej inkubacji w odstępie 1 min. Zebrane w ten sposób dane po obróbce zostały przedstawione w postaci obrazów 2 i 3D na fig. 7 i 8.

Określenie wpływu kompozytu h-BN\_AuNP na aktywność metaboliczną komórek wymagała przeprowadzenia testów – CCK-8, LDH oraz NRU. W celu oszacowania wpływu kompozytu na metabolizm komórkowy komórki wsiano na płytki 96-dołkowe w ilości 5x10<sup>3</sup> komórek/dołek i hodowano w standardowych warunkach (jak wyżej) przez czas 24 godzin. Następnie komórki poddano działaniu kompozytu (w stężeniach jak wyżej) przez czas 24 godzin. Każdy test wykonano trzykrotnie w niezależnych doświadczeniach, a każde ze stężeń testowanych na płytkach powtórzono trzy razy. Uwzględniono także wpływ rozpuszczalnika (Pluronic) użytego do przygotowania wstępnego roztworu nanokompozytu

(o początkowym stężeniu  $1 \mu\text{g m}^{-1}$ ) na metabolizm komórkowy, a całość wyników odnoszono do hodowli kontrolnej (komórki inkubowane tylko z medium hodowlanym niezawierającym czynnika testowego).

Analiza metabolizmu komórkowego polegała na ocenie poziomu aktywności mitochondrialnej komórek obu linii przy pomocy testu CCK-8. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) pozwala na pomiar ilości rozpuszczalnego w wodzie pomarańczowego formazanu powstającego w wyniku redukcji WST-8 [2-(2-metoksy-4-nitrofenylo)-3-(4-nitrofenylo)-5-(2,4-disulfofenylo)-2H-tetrazolu, soli monosodowej] w obecności nośnika elektronów (1-metoksy PMS) w wyniku aktywności metabolicznej (mitochondrialnej w kompleksie I łańcucha oddechowego) komórek. Wyniki dla testu CCK-8 przedstawia wykres – fig. 9 A.

Test LDH (dehydrogenazy mleczanowej) wskazuje na poziom uszkodzenia błony plazmatycznej oraz śmierci komórkowej. Poziom LDH uwolnionego do medium komórkowego jest miarą ilości uszkodzonych komórek i cytotoksyczności badanego związku. Ilość uwolnienia LDH z komórek w obecności h-BN\_AuNP przedstawia wykres – fig. 9 B.

Test NRU określa poziom transportu aktywnego barwnika – czerwieni obojętnej (NR) przez żywe komórki, które magazynują go w organellach o kwaśnym pH (np. w lizosomach). Stopień ilości barwnika w teście wprost proporcjonalny do ilości żywych komórek określony w obecności różnych stężeń h-BN\_AuNP przedstawia wykres – fig. 9 C.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób funkcjonalizacji eksfoliowanego heksagonalnego azotku boru, **znamienny tym**, że eksfoliowany heksagonalny azotek boru zanurza się w nadtlenku wodoru w stosunku 1:2, gotuje się pod chłodnicą zwrotną w temperaturze  $110^{\circ}\text{C}$  przez 48 godzin, suszy się i miesza z wodą w stosunku 2:50 w stosunku do wody, następnie pod chłodnicą zwrotną doprowadza się do wrzenia i dodaje kwas chlorozłotowy w stosunku 4:3 do heksagonalnego azotku boru i podgrzewa przez 5 minut w temperaturze  $100^{\circ}\text{C}$ , po czym dodaje się kroplami cytrynian sodu w stosunku 5:1 do ilości kwasu chlorozłotowego i prowadzi się reakcję przez 1 godzinę w stanie wrzenia, następnie otrzymany roztwór studzi się, odwirowuje się otrzymany związek i przemywa wodą w celu wyrównania pH do 7.
2. Sposób funkcjonalizacji według zastrzeżenia 1, **znamienny tym**, że eksfoliowany heksagonalny azotek boru uzyskuje się w taki sposób, że sproszkowany heksagonalny azotek boru miesza się z manganianem (VII) potasu w stosunku 1:4, miesza się mieszałem magnetycznym pod chłodnicą zwrotną, następnie stopniowo dolewa się kwas siarkowy (VI) o stężeniu 96% w ilości w ilości 20:1 w stosunku do manganianu, podgrzewa się to temperatury  $40^{\circ}\text{C}$  przez 6 godzin i studzi, po czym dodaje się nadtlenek wodoru w ilości stosunku 10:3 w odniesieniu nadtlenku do kwasu i całość utrzymuje się w niskich temperaturach z wykorzystaniem łaźni wodnej z lodem, tak otrzymany eksfoliowany chemicznie heksagonalny azotek boru poddaje się oczyszczaniu w wirówce, wyrównując pH do 7 i przemywa wodą, a następnie w ilości 0,5% objętościowych miesza się z N-metylopirolidonem, poddaje sonikacji tipem przez 30 minut i odparowuje rozpuszczalnik.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosuje się sonikator o mocy 600 W, w którym moduł pulsowania ustawia się na 5 sekund, 5 sekund włączony, 5 sekund wyłączony.

## Rysunki



Fig.1

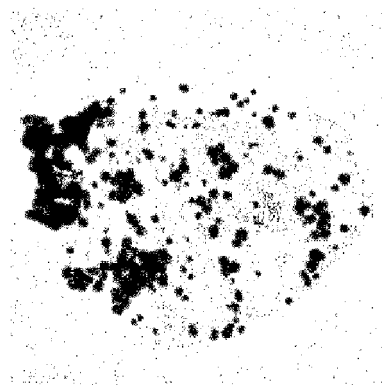


Fig.2

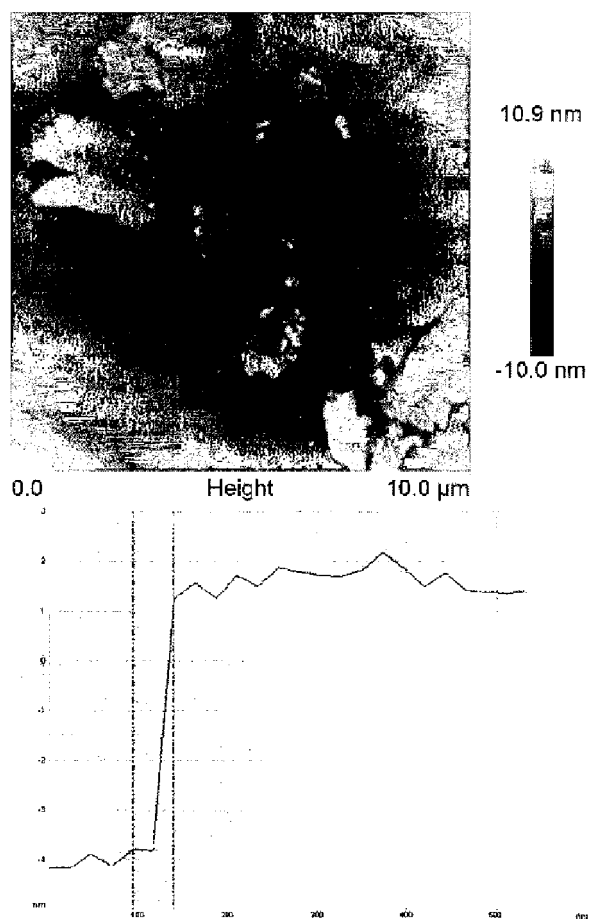


Fig.3

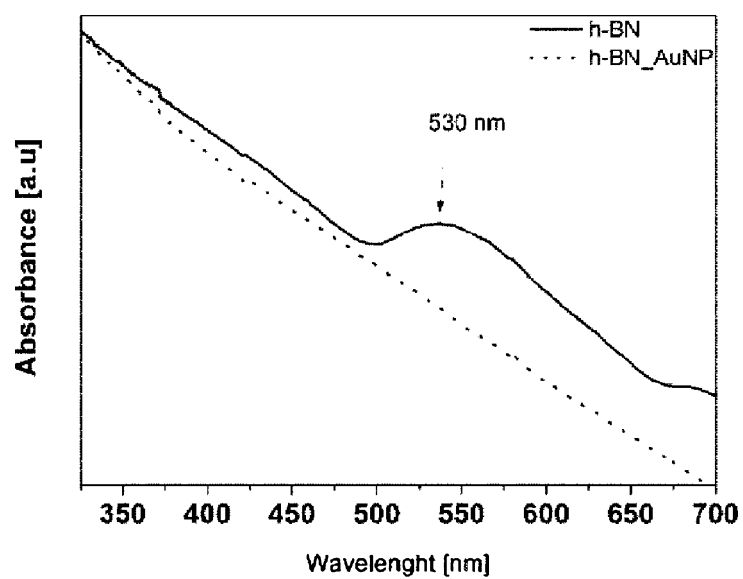


Fig. 4

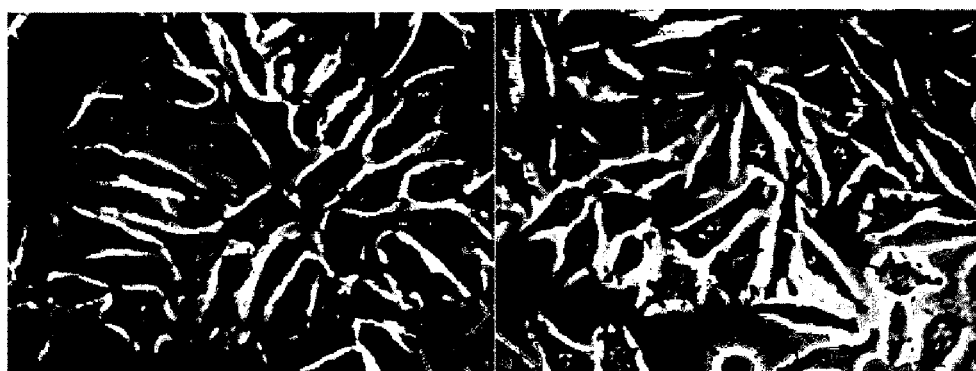


Fig. 5

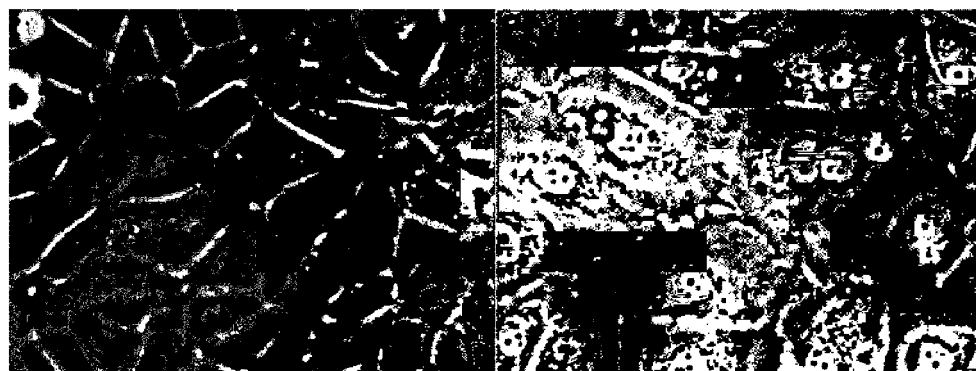


Fig. 6

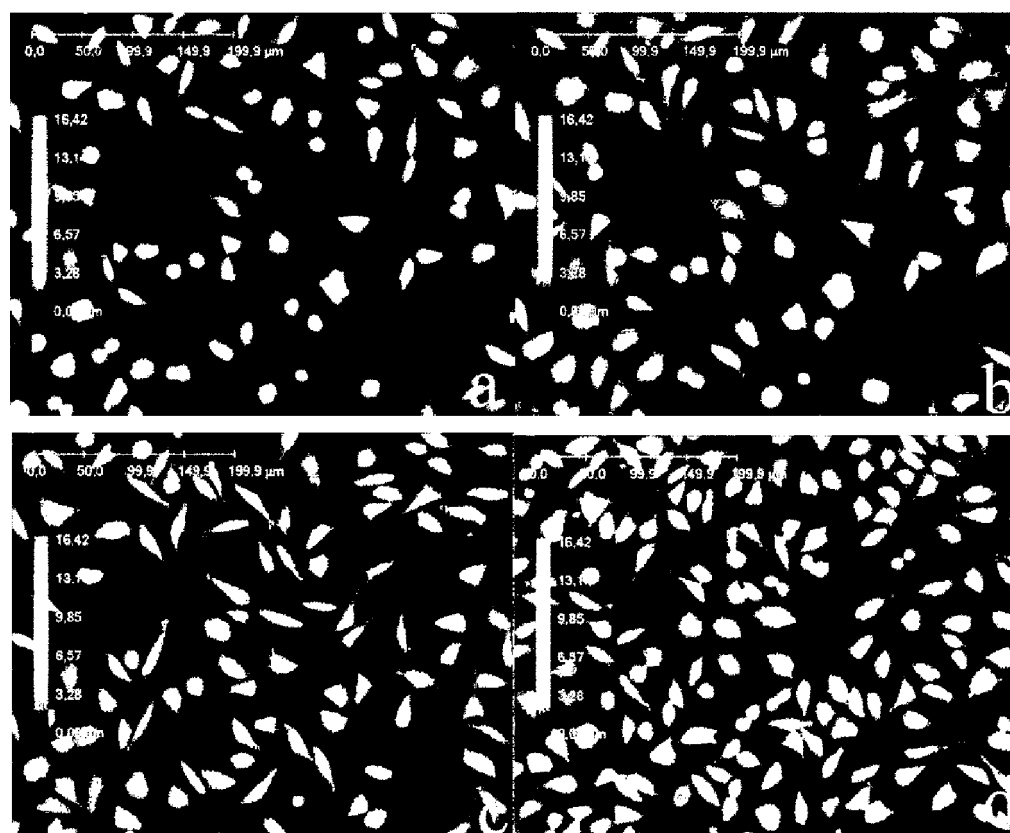


Fig. 7

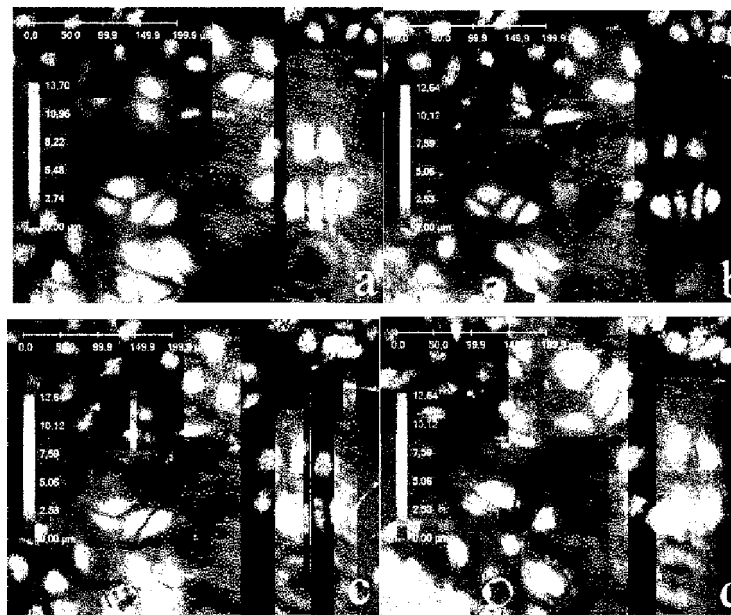
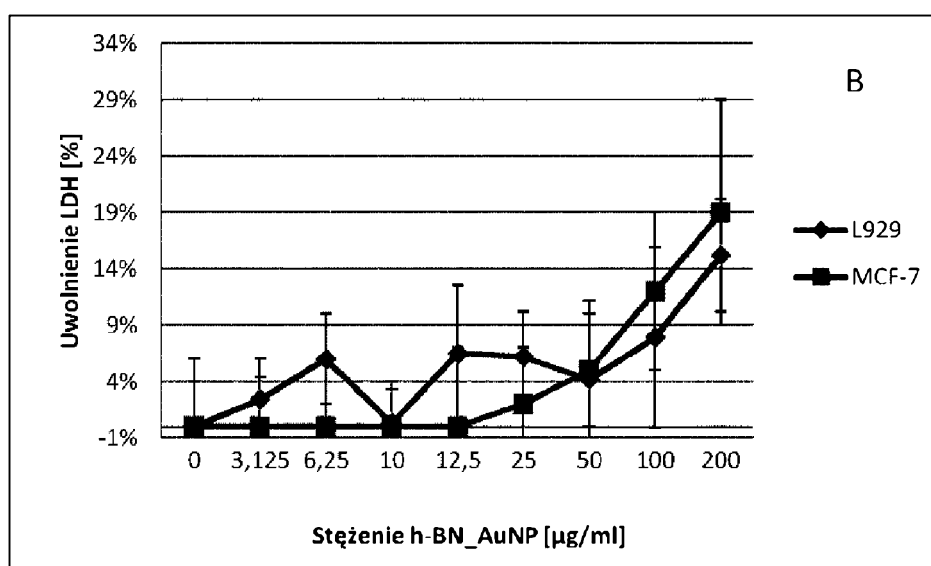
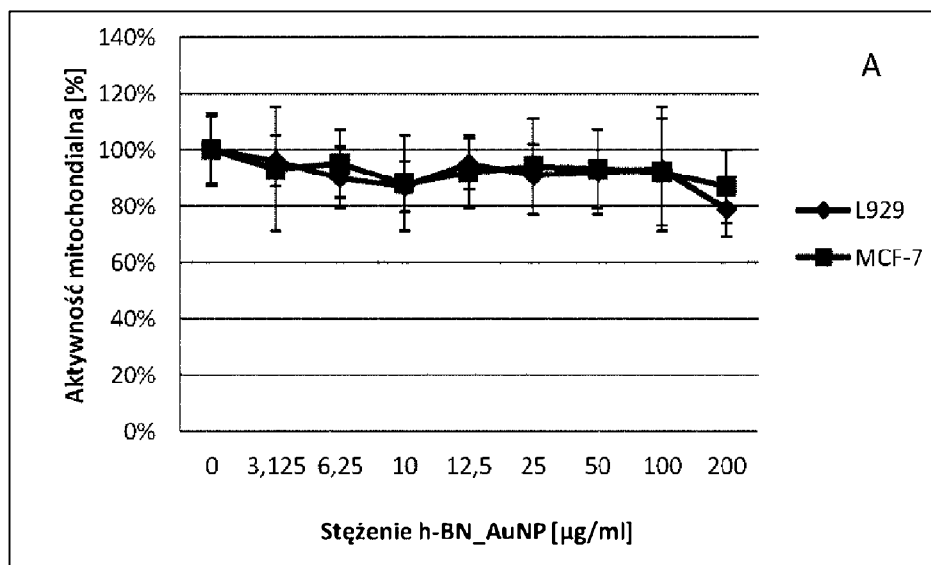


Fig. 8





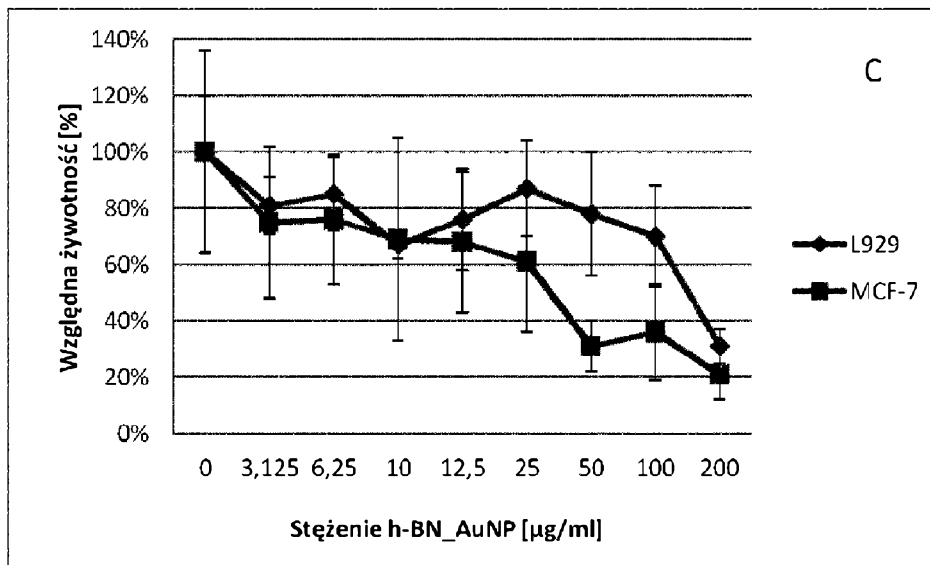


Fig.9