



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0025536
(43) 공개일자 2018년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C01B 21/064 (2006.01) B82Y 15/00 (2017.01)
B82Y 20/00 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C01B 21/0648 (2013.01)
B82Y 15/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0112312
(22) 출원일자 2016년09월01일
심사청구일자 2016년09월01일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
한국교통대학교산학협력단
충청북도 충주시 대소원면 대학로 50
(72) 발명자
이용규
충청북도 충주시 연수동산로 12, 107동 603호 (연수동, 연수리슈빌아파트)
허강무
대전광역시 유성구 어은로 57, 131동 1503호 (어은동, 한빛아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김성호, 박형달

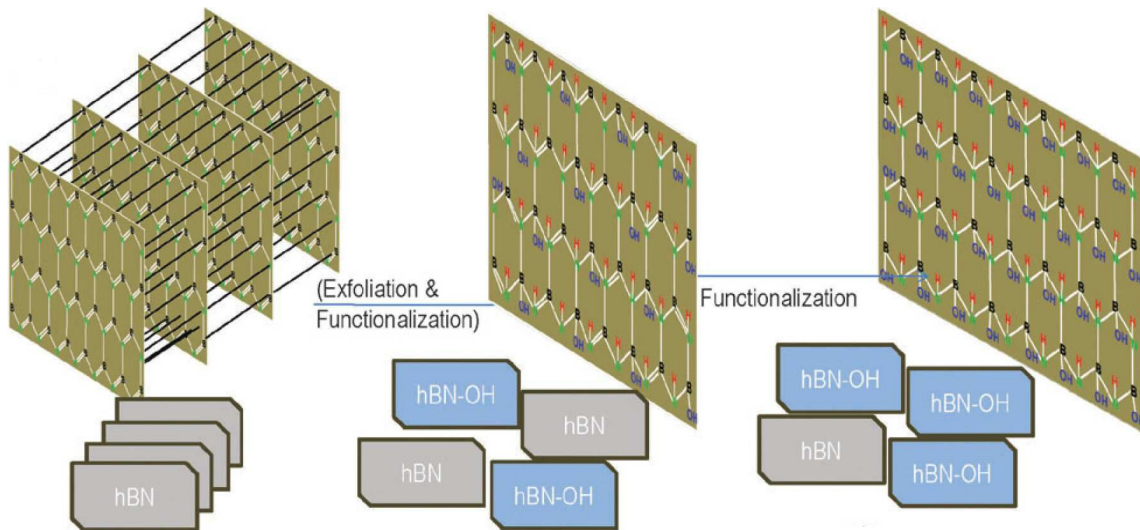
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 하이드록시기가 도입된 육방정 질화 붕소 나노 시트 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 육방정 질화 붕소 나노 시트 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 형광성을 이용하여 생체 분자 탐지하기 위한 육방정 질화 붕소 나노 시트의 대규모의 박리화 및 기능화를 최적화한 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, hBN으로부터 hBN-OH 나노 시트를 만들기 위한 편리한 공정을 최적화하였으며, 대량 생산에도 유리한 효과가 있다. 또한 hBN-OH 나노 시트는 푸른 형광 방출(blue emission)을 보이기 때문에 세포를 이미징할 수 있고 전기화학 분석을 통해 생체분자를 탐지하는데 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

B82Y 20/00 (2013.01)

C01P 2004/20 (2013.01)

(72) 발명자

엄디 누루나비

대전광역시 유성구 궁동 농대로 7-1, 201호

엄디 나피자만

충청북도 충주시 대소원면 대학로 50, 화학생명관
242호

김유경

대전광역시 유성구 온천로 45, 알파동 1426호 (봉
명동, 유성 푸르지오 시티)

이지영

경기도 안성시 고수2로 20, 210동 1401호 (당왕동,
대우경남아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345241249

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인기초연구지원

연구과제명 나노하이브리드 고분자 전달체를 이용한 광역학 암치료제 개발

기 여 율 1/3

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415143256

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 로봇산업융합핵심기술개발(R&D)

연구과제명 정밀 약물표적 및 방출기능을 갖는 외부 구동형 나노로봇 시스템 개발

기 여 율 1/3

주관기관 전남대학교산학협력단

연구기간 2015.12.01 ~ 2016.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415141989

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 산업현장핵심기술수시개발(R&D)

연구과제명 중금속을 함유하지 않는 양자점 기반 암세포 표지 기술 개발

기 여 율 1/3

주관기관 경희대학교산학협력단

연구기간 2015.09.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

- i) hBN(Hexagonal boron nitride) 분말을 물에 분산시켜 수분산액을 제조하는 단계;
 - ii) 상기 수분산액에 초음파를 인가하여 hBN을 가수분해시켜 hBN-OH 시트를 제조하는 단계;
 - iii) 상기 수분산액에 유기 용매를 첨가하여 용매 추출을 통해 hBN-OH 시트가 분산된 수상부를 회수하는 단계;
및
 - iv) 상기 hBN-OH 시트를 건조하는 단계;
- 를 포함하여 제조하는 것을 특징으로 하는 hBN-OH(Hexagonal boron nitride-OH) 나노 시트의 제조방법.

청구항 2

- 제1항에 있어서,
상기 i) 단계 이후, ii) 단계 이전에 추가로,
상기 수분산액에 과산화수소수(H_2O_2)를 첨가하는 것을 특징으로 하는 hBN-OH 나노 시트의 제조방법.

청구항 3

- 제2항에 있어서,
상기 과산화수소수는 20 내지 50 중량% 첨가하는 것을 특징으로 하는 hBN-OH 나노 시트의 제조방법.

청구항 4

- 제1항에 있어서,
상기 i) 단계 이후, ii) 단계 이전에 추가로,
상기 수분산액에 황산(H_2SO_4)을 첨가하는 것을 특징으로 하는 hBN-OH 나노 시트의 제조방법.

청구항 5

- 제4항에 있어서,
상기 황산은 수분산액의 pH가 2.5 내지 3.5가 되도록 첨가하는 것을 특징으로 하는 hBN-OH 나노 시트의 제조방법.

청구항 6

- 제1항에 있어서,
상기 i) 단계 이후, ii) 단계 이전에 추가로 상기 수분산액에 황산(H_2SO_4)을 첨가하는 경우, iii) 단계 이후,
iv) 단계 이전에 추가로,

상기 회수된 수상부를 투석하는 것을 특징으로 하는 hBN-OH 나노 시트의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 ii) 단계의 초음파는 20 내지 30 kHz의 초음파를 10 내지 30시간 동안 인가하는 것을 특징으로 하는 hBN-OH 나노 시트의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 ii) 단계의 hBN의 가수분해는 수분산액에 초음파를 인가한 후, 환류시키는 것을 특징으로 하는 육방정 질화 붕소 나노 시트 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 iii) 단계의 유기 용매는 n-부탄올, tert-부탄올, 톨루엔, 테트라하이드로퓨란 및 디메틸아세트아마이드 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 hBN-OH 나노 시트의 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 iv) 단계의 건조는 동결 건조인 것을 특징으로 하는 hBN-OH 나노 시트의 제조방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 방법으로 제조되며, 두께가 2 ~ 4nm인 것을 특징으로 하는 hBN-OH 나노 시트.

청구항 12

제11항의 hBN-OH 나노 시트를 포함하는 생체 분자 탐지체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 육방정 질화 붕소 나노 시트 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 형광성을 이용하여 생체 분자를 탐지하기 위한 육방정 질화 붕소 나노 시트의 대규모의 박리화 및 기능화를 최적화한 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 육방정 질화 붕소(Hexagonal boron nitride: 이하 hBN)는 새로운 3D 물질로 광열 효과(Photothermal effect)가

뛰어나고 높은 양성자 이동률과 화학적 안정성을 가지고 있어 촉망받는 재료이다. 특히 hBN은 이온성 B-N 결합에 의해 육방정 격자구조(Hexagonal honeycomb layer structure)를 가지는데 이는 그래핀(Graphene)과 황화몰리브덴(Molybdenum sulfide)과 같은 다른 2D 재료의 결합과 유사하다. 또한 그래핀은 전기화학 분야에서 응용하기 위해 질소 도핑을 필요로 하지만, hBN은 약 50%의 질소 원자를 포함하기 때문에 전기/분석 화학 분야에서의 응용될 수 있는 잠재력과 이점을 가지며, 약물과 유전자 전달 재료로도 유망한 후보이다.

[0005] 그러나 천연자원의 부족; 대량 생산의 비교적 복잡한 과정; 박리, 기능화, 수정 방법이 복잡하고 큰 스케일에서의 재현성이 떨어져 hBN의 응용에 어려움이 있다. 다양한 분야에서 hBN의 응용을 위해서는 이러한 문제점들을 극복해야 한다. hBN은 친수성기가 부족하기 때문에 수용액에서 용해되지 않아, 박리 방법을 통해 용해도 및 분산성을 향상시키기 위한 연구가 진행되고 있다.

[0007] 한편, 최근 이러한 hBN에 다양한 기능기를 도입하는 비공유성 기능화(Non-covalent functionalization) 방법이 보고되었다. 습식(Wet chemistry) 방법, 화학 기상 증착법(Chemical vapor deposition: CVD), 도파민 전자빔(Electron beam of dopamine) 방법과 같은 여러 방법들은 카테콜(Catechol)과 hBN 기질 사이의 물리적 화학적 상호작용을 통해 아민 그룹을 도입하기 위해 사용되었다. 많은 연구에서 복합재료와 전자기술에 응용하기 위해 넓은 표면적을 가지는 다층의 두꺼운 hBN의 기능화에 대한 연구가 진행되어 왔다. 3차원 재료를 박리(Exfoliation) 및 기능화(Functionalization)하기 위한 가장 널리 쓰이는 방법은 Hammer's method이기는 하지만, 이 공정은 과량의 산을 필요로 하여 환경과 안전문제가 지적되고 있다. 한편, 친수성인 하이드록시기(Hydroxyl group)를 도입하거나 유기 용매에서의 가수 분해 등 몇몇 방법들이 보고되었지만, 재생산성이 좋고 대량 생산이 가능한 손쉬운 방법들은 아직 보고되지 않았다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제2015-0028745호 "육방정 질화붕소 나노시트/세라믹 나노 복합 분말 및 그의 제조 방법, 및 육방정 질화붕소/세라믹 나노 복합 소재 및 그의 제조 방법"

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 상기한 바와 같이, hBN의 대규모 박리화와 기능화, 수용액에서의 용해도 문제를 해결하기 위한 최적화된 공정을 위하여 본 발명자들은 다각적으로 연구를 수행한 결과 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 원 포트 반응(One-pot reaction)을 통해 hBN-OH 나노 시트를 얻기 위한 친환경적, 재현성, 생체 안정성, 규모를 키울 수 있는 손쉬운 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 i) hBN(Hexagonal boron nitride) 분말을 물에 분산시켜 수분산액을 제조하는 단계; ii) 상기 수분산액에 초음파를 인가하여 hBN을 가수분해시켜 hBN-OH 시트를 제조하는 단계; iii) 상기 수분산액에 유기 용매를 첨가하여 용매 추출을 통해 hBN-OH 시트가 분산된 수상부를 회수하는 단계; 및 iv) 상기 hBN-OH 시트를 건조하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 hBN-OH 나노 시트 제조방법을 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 상기 제조방법으로 제조되며, 두께가 2 ~ 4 nm인 hBN-OH 나노 시트를 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 상기 hBN-OH 나노 시트를 포함하는 생체 분자 탐지체를 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따르면, hBN으로부터 hBN-OH 나노 시트를 만들기 위한 편리한 공정을 최적화하였으며, 대량 생산에도 유리한 효과가 있다. 또한 hBN-OH 나노 시트는 푸른 형광 방출(Blue emission)을 보이기 때문에 세포를 이미징 할 수 있고 전기화학 분석을 통해 생체분자를 탐지하는데 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명에 따른 hBN의 시트화 및 기능화 방법의 모식도이다.
 도 2는 본 발명에 따른 hBN-OH를 추출하는 방법의 모식도이다.
 도 3은 본 발명에 따른 실시예 1 내지 3의 흐름도이다.
 도 4는 본 발명에 따른 hBN-OH의 푸른 형광 방출 이미지이다.
 도 5는 본 발명에 따른 hBN-OH의 H-NMR 분석 데이터이다.
 도 6은 본 발명에 따른 (a)hBN과 (b)hBN-OH의 TEM-EDS 성분분석 이미지이다.
 도 7은 본 발명에 따른 (a)hBN과 (b)hBN-OH의 AFM 이미지이다.
 도 8은 본 발명에 따른 (a)hBN과 (b)hBN-OH의 TEM 이미지이다.
 도 9는 본 발명에 따른 hBN-OH의 HR-TEM 이미지이다.
 도 10은 본 발명에 따른 hBN과 hBN-OH의 TGA 곡선이다.
 도 11은 본 발명에 따른 hBN과 hBN-OH의 시간에 따른 질량 변화의 일차 도함수(DTG)이다.
 도 12는 본 발명에 따른 hBN과 hBN-OH의 라만 스펙트럼 데이터이다.
 도 13은 본 발명에 따른 hBN-OH의 UV-vis 흡광도 데이터이다.
 도 14는 본 발명에 따른 hBN과 hBN-OH의 XPS 스펙트럼 데이터이다.
 도 15는 본 발명에 따른 hBN과 hBN-OH의 각 구성원소별 XPS 스펙트럼 데이터이다.
 도 16은 본 발명에 따른 hBN과 hBN-OH의 제타포텐셜 데이터이다.
 도 17은 본 발명에 따른 hBN과 hBN-OH의 FL 데이터이다.
 도 18은 본 발명에 따른 hBN-OH로 개질화된 유리탄소 전극의 사이클릭 볼타모그램이다.
 도 19는 본 발명에 따른 hBN-OH로 개질되지 않은 유리탄소 전극의 사이클릭 볼타모그램이다.
 도 20은 본 발명에 따른 hBN-OH의 콜로이드 안정성 테스트 결과이다.
 도 21은 본 발명에 따른 (a)KB 세포와 (b)hBN-OH를 흡수한 KB 세포의 이미지이다.
 도 22는 본 발명에 따른 (a)KB 세포와 (b)hBN-OH를 흡수한 KB 세포의 bio SEM 이미지이다.
 도 23은 본 발명에 따른 hBN과 hBN-OH의 세포 생존률 데이터이다.
 도 24는 본 발명에 따른 hBN-OH의 용혈 분석 데이터이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 육방정 질화 붕소 나노 시트의 제조방법을 제공한다.

[0021] 본 명세서에서 사용되는 "hBN"는 육방정 질화 붕소(Hexagonal boron nitride)를 의미하며, 또한 "hBN-OH"는 하이드록시기가 도입된 수용성 육방정 질화 붕소를 의미한다. 이는 2차원 평면 구조체로서 B-N 간의 결합이 sp^2 공유결합이고, 층간 결합은 반 데르발스 결합(van der Waals bond)을 포함한다.

- [0023] 본 발명은 i) hBN(Hexagonal boron nitride) 분말을 물에 분산시켜 수분산액을 제조하는 단계; ii) 상기 수분산액에 초음파를 인가하여 hBN을 가수분해시켜 hBN-OH 시트를 제조하는 단계; iii) 상기 수분산액에 유기 용매를 첨가하여 용매 추출을 통해 hBN-OH 시트가 분산된 수상부를 회수하는 단계; 및 iv) 상기 hBN-OH 시트를 건조하는 단계;를 포함하여 제조하는 것을 특징으로 하는 hBN-OH(Hexagonal boron nitride-OH) 나노 시트의 제조방법을 제공한다.
- [0025] 이하 단계별로 상세히 설명한다.
- [0026] 먼저 hBN 분말을 준비하여 hBN 수분산액을 제조하기 전에, hBN 분말을 마이크로웨이브파와 같은 고주파를 인가하는 전처리 공정을 통하여 이후 단계인 초음파 분해를 용이하게 할 수 있다.
- [0028] 이후, hBN 분말을 물에 분산시켜 수분산액을 제조한다. 이때 증류수에 소정량의 과산화수소(H_2O_2), 황산(H_2SO_4) 또는 이들의 조합을 더욱 첨가할 수 있다. 이러한 과산화수소(H_2O_2) 또는 황산(H_2SO_4)과 같은 산성 용매는 높은 극성으로 인하여 hBN 분자 내 배위결합을 분해하고 이온화하여 박리를 가속화하는 역할을 한다.
- [0030] 이때 과산화수소수는 20 내지 50 중량%, 구체적으로 25 내지 35 중량%가 되도록 첨가하는 것 바람직하며, 또한 황산을 첨가한 수분산액의 pH는 2.5 내지 3.5가 되도록 조절하는 것 바람직하다. 상기 과산화수소수의 첨가량과 수분산액의 pH 범위는 배위결합을 이온화하고 박리를 가속화하는데 적절하다.
- [0032] 다음으로 상기 수분산액에 초음파를 인가하여 hBN을 가수분해시켜 hBN-OH 시트를 제조한다. 초음파는 hBN의 배위결합을 분리하여 가수 분해시키는 것으로 초음파는 20 내지 30 kHz, 바람직하게는 20 내지 25 kHz 범위를 적용한다. 초음파를 인가하는 방법은 초음파조(Bath sonicator) 또는 초음파 분쇄기(Ultrasonicator)를 사용하여 약 10 내지 30 시간 동안 인가될 수 있다. 일례로, 초음파 분쇄기를 사용하여 초음파 분해시킨 후, hBN 수분산액을 다시 초음파조로 이동시켜 추가적으로 분해시켜 배위결합을 분리한다.
- [0034] 보다 구체적으로 배위결합을 분리하면 다층의 hBN 시트가 박리되는데, 구체적으로 hBN 시트는 상기 초음파(Sonication) 처리와 용매의 극성에 의해 가수분해가 되어 박리되고 쪼개진다. 박리된 hBN은 쪼개지는 동안 모서리들이 부분적으로 -OH 그룹으로 기능화될 수 있으며, hBN-OH의 두께가 다양하게 생성된다. 부분적으로 과산화수소(H_2O_2), 황산(H_2SO_4)과 같은 산성 용매는 배위결합을 이온화하고 박리를 가속화하는 필수적인 역할을 동시에 할 수 있다.
- [0036] hBN 수분산액에 상기 과산화수소(H_2O_2), 황산(H_2SO_4)을 동시에 처리하는 과정이 용매의 높은 극성으로 인해 박리와 가수분해 하기에 가장 효과적이며 높은 용해성을 관찰할 수 있다. 물과 초음파조(Bath sonication)를 이용하는 것이 hBN을 박리하고 가수분해 하는데 효과적이고 가장 쉬운 과정이나, 과량 적용하게 되면 산화와 용해도 정도가 매우 낮아지고, 또한 정량적으로 분석이 어려운 점이 있다.
- [0038] 이때 상기 분해된 hBN을 환류시켜 가수분해가 더욱 일어나도록 하면 높은 수율의 hBN-OH를 얻을 수 있다. 환류 방법은 통상적인 방법에 따라 90 내지 100℃에서 6 내지 24시간 동안 수행될 수 있다. 또한 빛이 차단된 어두운 환경에서 진행하는 것이 바람직한데 보론나이트라이드는 외부 빛에 의해 형광이 발생하며, 발생한 형광은 분석 시 피크(Peak)에 영향을 주기 때문이다.
- [0040] 상기 초음파 인가를 수행하면, hBN이 hBN-OH로 전환되면서 분산성이 증가하는 것을 관찰할 수 있는데, 이것은 친수성 기능기(-OH)를 가지는 작은 분자들로 변환한다는 증거이다.

- [0042] 이후, 상기 수분산액에 유기 용매를 첨가하여 용매 추출을 통해 hBN-OH 시트가 분산된 수상부를 회수한다. 이러한 과정을 통해 상기 하이드록시기로 기능화되지 않은 hBN은 유기/수용성 용매를 추출하는 과정에서 분리되어 제거된다. 이때 사용 가능한 유기 용매로는 n-부탄올(n-Butanol), tert-부탄올(tert-Butanol), 톨루엔(Toluene), 테트라하이드로퓨란(Tetrahydrofuran) 및 디메틸아세트아마이드(Dimethylacetamide) 중에서 선택된 1종 이상을 선택할 수 있으며, 바람직하게는 n-부탄올을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 상기 수분산액에 황산이 포함된 경우, 회수된 수상부의 물을 교체하여 투석함으로써 황산의 부산물을 제거할 수 있다. 투석 시간에는 제한은 없으나, 1 내지 12시간 동안 1 내지 3시간 간격으로 물을 교체할 수 있다. 이때 투석의 전 과정은 상술한 환류 과정과 같은 이유로 빛이 차단된 어두운 환경에서 진행하는 것이 바람직하다.
- [0046] 마지막으로 상기 hBN-OH 나노 시트를 건조한다. 건조하는 방법에는 제한이 없으나, hBN-OH가 고온에서 분해되는 특성으로 인하여 바람직하게는 동결 건조한다. 건조 과정 또한 상술한 환류 과정과 같은 이유로 빛이 차단된 어두운 환경에서 진행하는 것이 바람직하다.
- [0048] 본 발명에 따른 hBN-OH 나노 시트는 형광 방출 특성을 보이므로, 피부 종양을 이미징하고, 질병을 진단하기 위한 생체 분자 탐지체로 적용 가능하다. 뿐만 아니라, 생체 의학과 공학 외의 다른 연구에서도 응용될 수 있다.
- [0050] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예를 첨부된 예시도면에 의거하여 상세히 설명한다. 이러한 도면은 본 발명을 설명하기 위한 일 구현예로서 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 본 명세서에 한정되지 않는다.
- [0052] 도 1은 본 발명에 따른 hBN-OH의 박리화 및 기능화 방법을 보여주는 모식도이고, 도 2는 본 발명에 따른 hBN-OH를 추출하는 방법을 보여주는 모식도이다. 도 2를 참고하면, 수상은 hBN-OH를 유기 용매(예컨대, tert-부탄올) 상은 hBN을 포함하므로, 추출 과정을 통해서 수상부에 존재하는 hBN-OH 나노 시트를 선택적으로 수득할 수 있다.
- [0054] 도 3은 후술하는 실시예 1 내지 3의 과정을 흐름도로 보여주며, 이를 수행하기에 앞서, 다음의 물질들을 준비하였다.
- [0055] 육방정 보론 나이트라이드(Pristine boron nitride, hBN, 98%), 황산(99.99%) 그리고 과산화수소수(30 wt%)를 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입했다. N-부탄올을 Samchun pure chemicals co. ltd(Gyeonggi-do, Korea)에서 구입했다. 우태아혈청(FBS)을 포함하는 세포 배양 시약(Cell culture reagent), 페니실린, 스트렙토마이신, 트립신/EDTA, 그리고 둘베코(Dulbecco)의 인산완충식염수(Phosphate buffer saline: PBS)를 Gibco BRL(Carlsbad, CA, USA)에서 구입했다. 또한 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2 와 5-Diphenyl tetrazolium bromide(MTT)를 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입했다.
- [0057] <실시예 1>
- [0058] step 1) 육방정 보론 나이트라이드(98%, hBN) 분말 일정량을 전자레인지로 통해 마이크로웨이브파(Microwave)를 2분 동안 조사하였다.
- [0059] step 2) 상기 hBN 분말을 증류수(DW)에 분산시킨 후, 초음파조(Bath sonication)에서 12시간 동안 용해시켜 hBN 분산액을 제조하였다.
- [0060] step 3) 상기 hBN 분산액을 10분 동안 초음파 분쇄시켰다.
- [0061] step 4) 이 hBN의 혼합물을 빛을 차단한 환경에서 환류 냉각기를 연결하고 95 ~ 100 °C에서 환류시켰다.

[0062] step 5) 수용성 hBN-OH(Hydroxyl-functionalized hexagonal boron nitride)를 추출하기 위해 충분한 양의 3차 부탄올(n-Butanol)을 용액에 추가하고 수분산액에 용해되는 질화 붕소를 회수한 후 동결건조기로 건조하였다.

[0064] <실시예 2>

[0065] 상기 실시예 1의 step 2) 수행 후, hBN 분산액에 34.6% 농도의 과산화수소(H_2O_2)를 30 중량%로 첨가하였으며, step 2) 이후의 과정을 실시예 1과 동일하게 수행하였다.

[0067] <실시예 3>

[0068] 상기 실시예 1의 step 2)에서 hBN에 증류수(DW)와 과산화수소(H_2O_2)를 7 : 3의 부피비로 혼합한 분산매를 이용하여 분산시킨 후, 초음파조(Bath sonication)에서 12시간 동안 용해시켰으며, hBN 분산액에 1%의 황산(H_2SO_4)을 2mL 만큼 추가하여 pH를 3으로 조절한 후, step 2) 이후의 과정을 실시예 1과 동일하게 수행하되, step 5)에서 동결건조를 수행하기 전, 황산의 부산물을 제거하기 위해 6시간 동안 2시간 간격으로 물을 교체해주며 투석하였다. 이러한 투석과 건조 과정은 은박지로 빛을 차단한 어두운 환경에서 진행하였다.

[0070] 이하 실험예는 상기 실시예 3의 제조방법에 따라 제조된 hBN-OH 나노 시트와, 상기 박리화 및 기능화 되기 전의 육방정 보론 나이트라이드(98%, hBN)를 대상으로 실시하였다.

[0072] <실험예 1> 특성 분석

[0073] 도 4는 hBN-OH가 블루(Blue) 형광을 나타내는 것을 보여주는 이미지이다. 이러한 형광 특성으로 인하여, hBN-OH는 생체 외 단일 세포 영상, 바이오센싱(Biosensing), 말초 조직 영상과 같은 생체 의학과 생체 공학 연구 분야에 유용하게 응용될 수 있음을 알 수 있다. 이러한 hBN-OH는 밴드갭과 전도성을 갖도록 하는 수많은 하이드록시(-OH) 그룹과 케토($C=O$) 그룹을 포함한다.

[0075] 도 5은 hBN-OH의 H-NMR 분석을 나타낸 것으로, 대략 3.6 ppm에서 피크가 나타남으로써 -OH 그룹의 존재를 확인할 수 있다.

[0077] 도 6은 TEM-EDS를 이용하여 hBN과 hBN-OH에 포함된 각각의 성분들을 정량, 정성분석한 이미지로서, 황산과 과산화수소가 존재하는 수분산액에서 상당한 가수분해와 산화가 일어난 것을 확인할 수 있다. hBN에서 전환된 hBN-OH는 대략 40%의 산소를 포함한다. 무시할만한 양의 염소(Cl)와 칼륨(K)이 불순물로서 나타났다. EDS에 의한 기본요소의 분석은 hBN에서 hBN-OH로의 전환을 정량적, 정성적으로 관찰하고 측정하였다. hBN과 hBN-OH의 이미지는 붕소(B), 질소(N), 산소(O)와 같은 각각의 요소들의 출현을 시각적으로 확인할 수 있다.

표 1

[0079]

Element	Absorption correction	hBN		hBN-OH	
		wt%	wt%	wt%	wt%
B	1.00	40.75	0.53	37.35	0.33
N	1.00	53.03	0.49	21.03	0.29
Cl	1.00	1.22	0.03	1.02	0.13
Si	1.00	0.48	0.02	-	-
O	1.00	-	-	40.1	0.32
K	1.00	1.11	0.03	0.11	0.03
total		~100.00		~100.00	

- [0081] 상기 표 1을 보면 hBN은 ~ 40% B, 53% N와 적은 양의 Cl, Si, K를 포함하는 반면에 hBN-OH는 대략 37% B, 21% N, 40% O와 적은 양의 Cl을 포함한다. 이러한 결과는 hBN-OH가 hBN으로부터 전환된 것임을 알 수 있는 증거와 충분한 양의 O가 존재함을 보여준다. B의 양은 hBN과 hBN-OH에서 거의 일치하지만 N은 hBN보다 hBN-OH에서 매우 적다. 이러한 결과는 산화/가수분해는 hBN에서 N이 마침내 NH₃로 방출되면서 일어났다는 것을 확인하였다.
- [0083] 도 7 내지 도 9는 hBN과 hBN-OH의 산화(Oxidation)와 하이드록시화(Hydroxylation)된 정도를 정성적, 정량적으로 확인하기 위해 원자간력현미경(Atomic force microscope: AFM) 분석과 투과전자현미경(Transmission electron microscope: TEM) 분석을 실시한 결과이다. AFM은 Nanoscope III Controller와 Veeco Digital Instrument Multimode Scanning Probe Microscope에서 Tapping mode로 측정했으며, TEM 분석을 JEOL 2100 field emission TEM system로 측정했다.
- [0085] 도 7의 AFM에서 hBN은 지름이 0.5 ~ 1 μm 이고 두께가 70 nm인 마이크로 입자(microparticle)로 관찰되었으며, hBN-OH는 지름이 ~ 100 nm이며 두께가 2 ~ 4 nm인 나노 시트(nanosheet)로 관찰되었다. 이것은 hBN을 더 작은 hBN-OH로 박리하고 자르는데 효과적임을 보여주는 결과이다. 도 8의 TEM 이미지에 의하면 결정 상태에서 hBN은 지름이 1 μm 이상이며, hBN-OH는 지름이 70 ~ 100 nm이고 지그재그 모양을 보여준다. 도 9의 HR-TEM에 의해 포착된 이미지로 모서리를 보이며 분명하게 접힌 hBN-OH를 보여준다. hBN-OH의 HR-TEM 분석으로부터, 층의 수가 10층 이하이고(층 간의 거리는 ~ 0.33 nm), 두께는 2 ~ 4 nm인 것을 발견하였다. HR-TEM 결과는 AFM 분석으로부터 얻은 결과와 매우 일치한다. 이러한 관찰은 또한 다층의 hBN 구조를 얇은 층의 hBN-OH로 박리할 수 있다는 증거를 제공한다.
- [0087] 도 10은 열적 안정성을 평가하기 위해 열 중량 분석 방법을 이용해 hBN과 hBN-OH가 온도의 변화에 따라 중량이 얼마나 변화하는지 TA-Q50 열중량 분석기(Thermogravimetric analyzer)를 통해 측정한 TGA 곡선이다. 600℃까지 가열하며 관찰하였을 때 hBN의 경우 높은 온도에서 중량 변화가 없는 것으로 보아 안정한 것을 알 수 있다. 그러나 hBN-OH는 -OH기의 분해로 인해 약 40%의 무게 손실을 보였다. 초기(25 ~ 150 ℃) 2% 정도의 무게 손실은 물의 증발로 인한 결과이며, 150 ~ 240 ℃ 사이에서 약 35%의 무게 손실은 기능기의 분해로 인한 결과이다. 최종적으로, TGA 곡선에서 240 ~ 600 ℃사이에서 3% 무게 손실을 보였다. 도 11은 시간에 따른 질량 변화의 일차 도함수(DTG)로서, hBN-OH는 빠른 열분해의 단일 피크를 가지고 있으며, 230℃에서 최대 분해율을 나타낸다.
- [0089] 도 12는 hBN에서 hBN-OH의 변환율을 알아보기 위하여, 라만 분광광도계(Thermo-Nicolet-Almega dispersive Raman spectrometer)를 이용하여 532 방출 파장으로 측정하고 분석한 결과이다. hBN의 라만 스펙트럼은 보통 1350 ~ 1400 cm^{-1} 범위의 피크를 보인다. 그러나 1000 cm^{-1} 주위에서 입방정 질화붕소(cBN: Cubic boron nitride) 피크가 나타난다. 이 결과로 보아 BN은 hBN과 cBN이 혼합된 것이라는 걸 알 수 있다. 700 cm^{-1} 에 나오는 피크로 hBN-OH에 O 원자가 존재함을 확인하였다. 우선, hBN-OH의 라만 스펙트럼은 낮은 강도의 고주파 진동 E2g의 포논 분산을 나타낸다. 박리된 hBN-OH는 hBN과 다르게 B-N 결합의 진동과 층의 두께(~4-5)로 인해 1356 cm^{-1} 에서 높은 강도를 나타낸다. 결과적으로 라만 스펙트럼을 이용하여 hBN-OH 스펙트럼에서 cBN의 피크가 작아진 것을 관찰함으로써 박리와 반응 후 cBN이 hBN-OH으로 대부분 변환된 것을 확인하였다.
- [0091] 도 13은 hBN-OH의 UV-vis 흡광도를 분석한 것으로, UV-vis spectra는 20℃에서 10 mm의 석영셀(길이 1 cm)을 이용해 자외-가시광 분광법(UV-VIS spectroscopy, Mecasys Co.Ltd., Korea)로 측정하였다. 각 물질의 흡광도 그래프는 그들 각각의 에너지 밴드 갭을 보여준다. hBN-OH의 UV-vis 흡광도는 청색 발광 흡수 피크의 대표적인 378 nm에서 넓게 나타났다. N의 결손, O의 농축 때문에 이러한 결과가 나타난다. N의 결손은 아마도 초음파 분쇄기와 전자레이저의 마이크로파의 조사로 B-N 결합이 부분적으로 깨져 발생한다. hBN-OH에 의해 광자가 흡수되

자마자, 전자는 들뜨기 시작하고, 그 결과 가전자대(Valence band)에서 전도대(Conduction band)로 전자가 이동한다. hBN은 Zero-band gap 3D 물질로 전자 및 광전자 공학에서 응용이 제한된다. 이는 에너지 밴드갭을 가지지 않기 때문에 hBN에서 optical FL을 일반적으로 관찰할 수 없기 때문이다. 그러나 hBN-OH의 밴드갭은 직접 크기, 모양, sp^2 도메인 부분과 관련된 이전에 보고된 방법에 따르면 3.25 eV로 계산된다. hBN-OH의 밴드갭 값은 hBN-OH의 반사율과 흡광도를 기반으로 계산하였고, quantum yield도 UV를 통해 흡광도를 측정하여 $QY_X = QY_S * [A_X/A_Y] * [F_S/F_X] * [n_X/n_S]^2$ 공식에 의해 적분값을 계산하여 값을 얻었다.

[0093] 도 14는 본 발명에 따른 hBN과 hBN-OH의 XPS 스펙트럼 데이터로, hBN-OH에서 O 원자 존재를 확인하고 그 양을 계산하면 약 40%가 나온다. 또한 도 15는 본 발명에 따른 hBN과 hBN-OH의 각 구성원소별 XPS 스펙트럼 데이터로 각각의 정량적인 원자의 함량은 표 2에서 보여주고 있다. B/N ratio는 hBN과 hBN-OH에서 각각 0.66, 0.88이다.

표 2

Content	hBN	hBN-OH
B	38.21	27.72
N	57.89	31.48
O	0	38.73
C	1.92	0
S	0	0.3

[0097] 도 16은 시료 표면의 전하를 알아보기 위해 제타포텐셜(Zeta Electronics, South Korea)을 측정한 결과이며, 박리된 hBN-OH는 제타포텐셜의 음전하(Negative charge)를 통해 상당한 양의 -OH 그룹을 포함하고 있는 것을 알 수 있다. 자연 상태의 hBN은 -2.6 mV의 제타포텐셜 값을 가지나, hBN-OH의 계산된 제타포텐셜은 -17 mV로 측정되었다. 이러한 음의 값의 제타포텐셜은 hBN-OH의 과량의 산소에 의해 발생하는 것이다.

[0099] 도 17은 UV-vis 분석으로부터 얻은 흡광도 프로파일을 기반으로 Microplate FL analyzer를 사용해 hBN-OH의 FL 성질을 측정한 결과이다. hBN-OH는 청색을 방출하는 370nm의 필터에 의해 여기하면서 390nm에서 발광 피크를 나타낸다. hBN이 -OH 기능기로 기능화되면 가시광선을 흡수하기 시작하고 청색 발광을 관찰할 수 있어 분석화학 및 in vitro 이미징에 광범위하게 응용될 수 있다. hBN-OH의 계산된 양자 효율은 약 36%이다.

[0101] <실험예 2> 도파민 센싱

[0102] 순환전압전류법(Cyclic voltammetry assay)는 CHI 7031D electrochemical workstation(CHI, USA)로 실시하였다. 유리상 탄소(Classy carbon), Ag/AgCl 그리고 Pt wire를 작업 전극, 기준전극과 상대전극으로 각각 사용하였다. 1 mg/mL의 농도로 hBN-OH를 물에 용해시키고 균일하게 분산시키기 위해 볼텍싱(Vortexing) 하였다. 유리상 탄소 전극(GC)은 드랍 캐스트(Drop cast) 공정을 통해 hBN-OH 용액으로 코팅하고, 공기 중에서 건조시켰다. 전극은 도파민을 1.5 μ M의 농도로 PBS(pH 7.4)에 용해시켜 제조하였다. 사이클릭볼타미터(Cyclic voltammeter)의 파라미터: -0.1 ~ +0.5 V 사이의 전위차. 검정의 경우, 그 유리 전극은 아무것도 코팅하지 않았고(bare electrode) 마지막에 그 전해질(도파민)을 hBN-OH와 섞고 개질화되지 않은 유리상 탄소 전극(GC)에 의해 분석되기 전에 10분 동안 배양시켰다. 도 18은 hBN-OH로 개질화된 유리탄소 전극(GC)의 사이클릭볼타모그램(Cyclic voltammogram)으로 PBS에 용해된 매우 낮은 농도의 DOPA를 감지할 수 있음을 보여준다. hBN-OH로 개질화된 GC는 약 185 μ A, 개질화되지 않은 GC는 오직 8 μ A의 전류가 측정되었다. 도 19는 개질화되지 않은 유리탄소 전극(GC)의 사이클릭볼타모그램(Cyclic voltammogram)이며, 이 DOPA의 농도는 이전의 보고된 높은 농도(1mM)를 사용하여 조사한 것보다 더 낮고, 이전에 보고된 높은 농도의 도파민은 혈관 또는 뇌에서의 DOPA 농도와 일치하지 않은 농도로 현실적이지 않다. 즉, hBN-OH로 개질화된 GC가 이전의 다른 시스템들에 비해 더 낮은

농도의 DOPA을 잘 감지하는 것을 알 수 있다.

[0104] **<실험예 3> 콜로이드 안정성 테스트**

[0105] hBN-OH는 자연 상태에서 높은 음이온의 표면을 가지기 때문에 물이나 PBS에 용해되었을 때 안정하지 않다. 따라서 폴리에틸렌이민(Poly (ethylene imine): PEI)와 가지형 폴리에틸렌이민(Branched-poly(ethylene imine): bPEI) 용액과 같은 양이온성 고분자 용액에서 안정성과 분산성을 관찰하기 위하여 콜로이드 안정성 테스트를 실시하였다. 먼저, hBN-OH를 PBS(10mg/mL)에 용해시키고 세 그룹으로 나누었다. PEI(1 kDa)과 bPEI(25 kDa)에 각각 hBN-OH를 포함하는 PBS(1%) 용액을 추가하고 나머지 하나는 아무것도 추가하지 않았다. 분산 후 0, 6, 12, 24 시간에 이미지를 확인하고 분산성을 관찰하였다.

[0107] 도 20은 hBN-OH의 콜로이드 안정성 테스트 결과 hBN-OH는 PBS와 bPEI(25 kDa, 1%)보다 PEI(1 kDa, 1%)에 용해시키는 것이 안정하다는 것을 보여준다. 음이온성 hBN-OH는 양이온성인 PEI, bPEI와 정전기 상호작용을 통해 복합체를 형성함을 알 수 있다.

[0109] **<실험예 4> 세포 내 흡수**

[0110] hBN-OH의 세포 내 흡수를 확인하기 위해 Epithelial carcinoma(KB) 세포에 배양했다. 세포의 기본 배지는 10%의 우태아혈청(FBS)이 첨가된 RPMI-1640이며, 5% 이산화탄소가 공급되고 적당한 습도와 37°C가 유지되는 환경에서 배양한다. 약 5×10^4 cells/mL인 세포의 단일층을 0.25% trypsin-0.03% EDTA 용액으로 얻었다. 8-well plate에 RPMI-1640 배양액의 세포(20 μ L)를 seeding하고 시료 투여 전 24시간 동안 배양한다. 그 후에 50 μ g/mL의 hBN-OH를 추가하고 2시간 동안 배양한다. 흡수되지 않은 입자들을 제거하기 위해 세포를 PBS로 세척한다. 분명한 세포 형태를 얻기 위해 파라포름알데이드(Paraformaldehyde)로 세포를 고정한 후 CLSM으로 측정한다.

[0112] hBN-OH의 세포 흡수 능력과 in vitro 이미징에 대해 조사하기 위해, KB 세포와 공배양시키고, 세포 내에 hBN-OH를 축적하기 위해 4시간 동안 배양시켰다. 축적되지 않은 hBN-OH를 제거하기 위해 부드럽게 석션을 하면서 세포 배양 접시(Cell culture plate)를 여러 차례 세척한다.

[0114] 도 21은 공초점 레이저 현미경을 사용하여 얻은 KB 세포의 이미지이다. 결과 hBN-OH의 세포 내 흡수를 확인할 수 있다. 비록 hBN-OH는 개질화된 고분자도 아니고 세포 표적화 부분에 결합되지도 않았지만 상당한 양의 hBN-OH가 세포 내부에 위치한 것 같은 모양이 관찰되었다. EPR/RES system을 통해 비특이적 hBN-OH는 암세포가 있는 곳에 자리를 잡을 것이라고 추정된다.

[0116] **<실험예 5> 세포 모폴로지**

[0117] Epithelial carcinoma(KB) 세포를 상기 실험예 4와 동일한 방법으로 배양하였다. 세포를 1% 글루타르알데히드(Glutaraldehyde)와 0.1 M 카코딜산나트륨(Sodium cacodylate)의 고정액에 분산시켰다. 1%의 탄닌산(Tannic acid)에 고정시키고 알코올을 통해 탈수시키는 것과 같은 다양한 단계에 따라 세포를 고정시키고 탈수시켰다. 그 후 탈수된 세포를 골드로 스퍼터 코팅하고 SEM을 통해 관찰하였다.

[0119] 도 22는 hBN-OH 존재 여부에 따른 KB 세포의 bio SEM 이미지이다. 살린(Saline)에 처리된 세포와 비교하여 hBN-OH와 함께 공생 배양된 세포의 세포막 내에서 변화를 분명하게 관찰하였다.

[0121] **<실험예 6> 세포 독성**

[0122] Epithelial carcinoma(KB) cells은 Korea Cell Bank(Seoul, Korea)로부터 얻었고 75 mm³ T flask에 배양했다. 그 세포는 1×10^5 cells/well의 농도로 8-well plate로 옮겼다. 그 세포들을 바닥 표면 위에 부착시키기 위해 하루 동안 배양시켰다. hBN-OH는 0.1 mg/mL의 농도로 PBS에 분산시켜 10 μ L를 well에 추가하였다. hBN-OH과 KB cell은 PBS로 세척하면서 4시간 동안 배양시켰다. 그 후 공초점 현미경을 통해 세포에 축적된 hBN-OH의 형광을 측정하였다. 세포 독성을 평가하기 위해 KB 세포를 96-well plate에 Seeding하고 24시간 동안 인큐베이션 하고, hBN과 hBN-OH을 다양한 농도(1, 10, 25, 50 and 100 μ g/mL)로 만들고 이를 96-well plate에 추가했다. RPMI-1649 배지를 대조군(Control)으로 사용하고 24시간 동안 37℃에서 어두운 조건에서 배양하고, MTT 수용액 50 μ L을 24시간 배양 과정이 끝나기 전에 4시간 동안 각 셀에 추가했다. 시간이 다 되면 상층액은 제거한다. 포르마잔 크리스탈(Formazan crystal)의 용해를 위해 150 μ L의 MTT 가용화 용액(MTT solubilisation solution)을 각 셀에 추가하고 varioskans flash(Thermo Scientific, USA)을 이용하여 570nm³ 파장에서 흡광도를 찍었다. 아래의 식을 통해 세포 생존율을 계산하였다.

[0123]
$$\text{Cell viability(\%)} = (\text{absorbance of sample cells} / \text{absorbance of control cells}) \times 100$$

[0125] 도 23은 상기 계산된 세포 생존율 데이터이다. 매우 높은 농도(500 μ g mL⁻¹)에서도 90% 이상의 세포들이 생존한 것으로 보아 hBN과 hBN-OH에서 독성은 가지지 않는 것을 알 수 있다.

[0127] <실험예 7> 용혈 분석

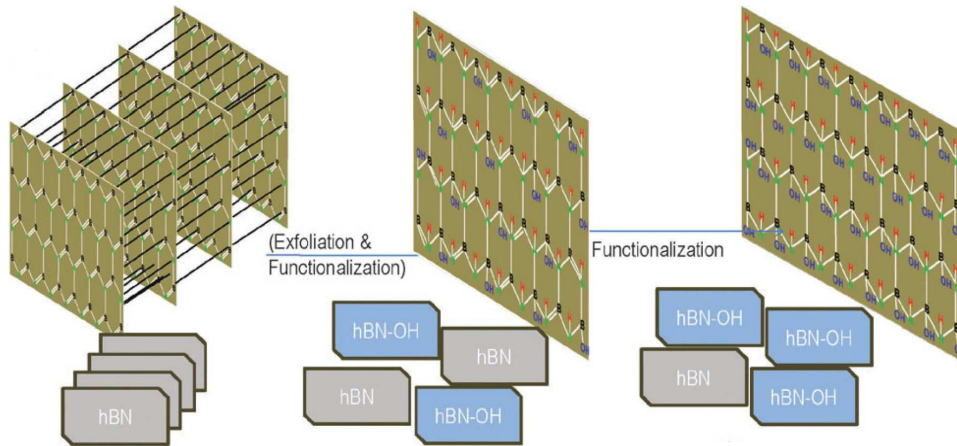
[0128] hBN-OH의 용혈 분석(Hemolysis assay)을 위해 SD쥐(Sprague rat)로부터 신선한 피를 얻었다. 원심분리를 하고 PBS로 세 번 세척을 하여 적혈구를 얻었다. 얻어진 적혈구에 PBS를 첨가하여 섞고 다시 원심분리했다. 다양한 농도(10, 20, 50, 100 μ g mL⁻¹)의 hBN-OH (200 μ g/mL)을 적혈구 용액 1 mL 첨가하고 37℃에서 4시간 동안 배양했다.

[0130] 도 24는 용혈된 비율을 측정하기 위해 394 nm에서 상층액의 흡광도를 측정한 데이터이다. 그 결과 매우 높은 농도(100 μ g mL⁻¹)에서도 약 4%의 용혈만이 측정된 것을 보아 hBN-OH가 혈액과 섞일 수 있는 재료임을 알 수 있다.

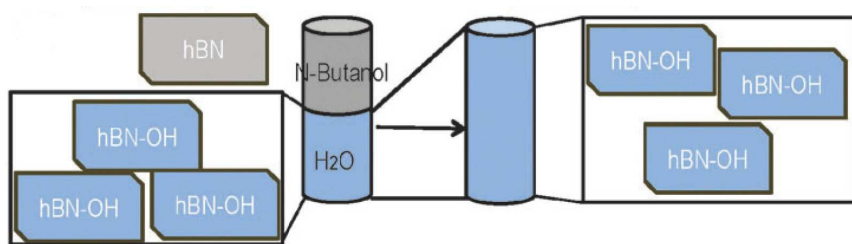
[0132] 본 발명자들은 박리되고 기능화된 hBN-OH 나노 시트를 얻기 위한 방법의 재현 가능성을 평가했으며, 이에 hBN-OH 나노 시트는 광 방출을 보여 생체 의학과 공학 외의 다른 연구에서도 응용될 수 있음을 확인하였다. 예를 들어, hBN-OH 나노 시트의 형광은 피부 종양을 이미징하고, 질병을 진단하기 위한 전기/분석 화학과 이미징을 이용해서 약물/유전자 전달과 같은 다양한 응용에 사용될 수 있다. 또한 몇 가지 실험예를 통하여 본 발명에 따른 hBN-OH 나노 시트는 생체 외에서 생체, 혈액 적합성을 보이는 것을 확인하였다.

도면

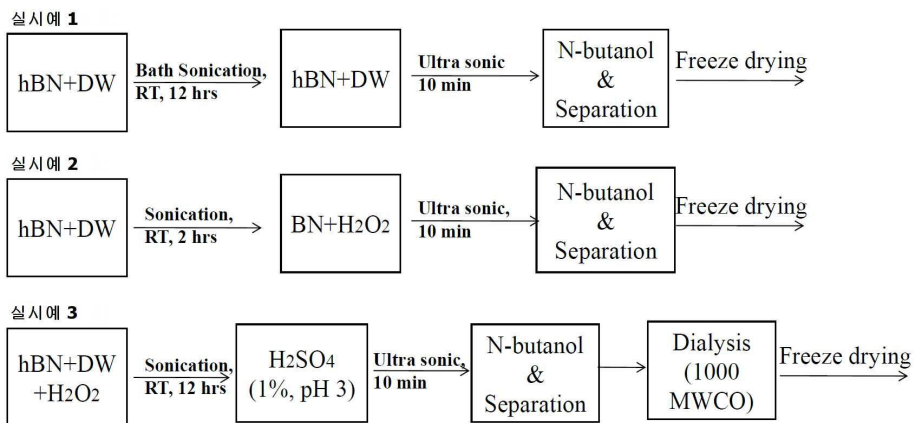
도면1



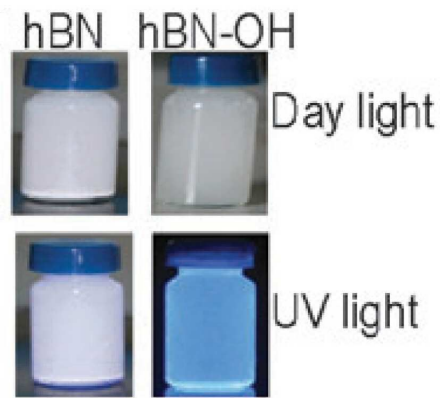
도면2



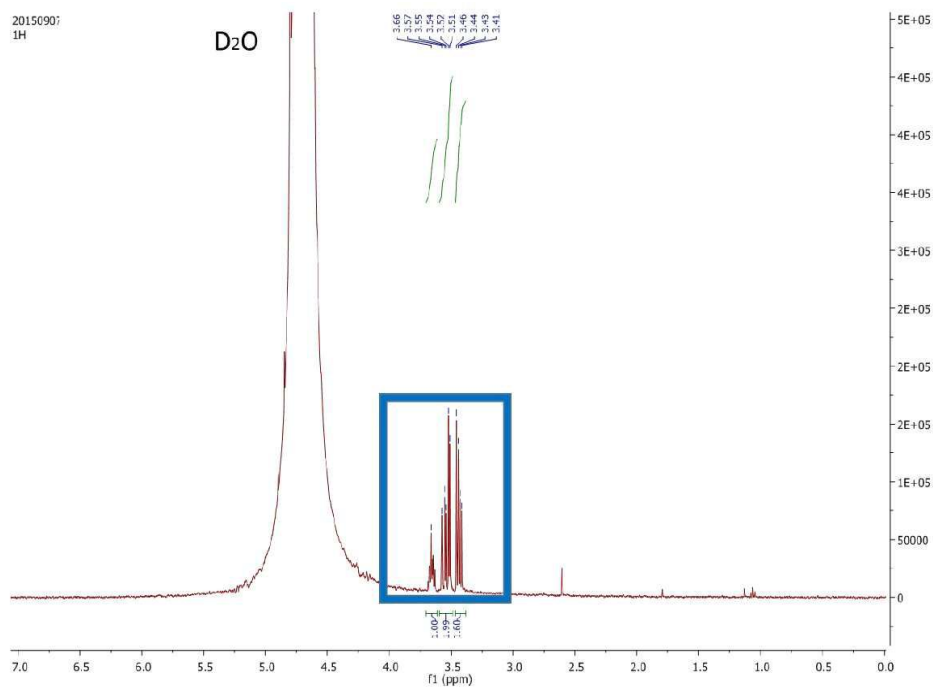
도면3



도면4

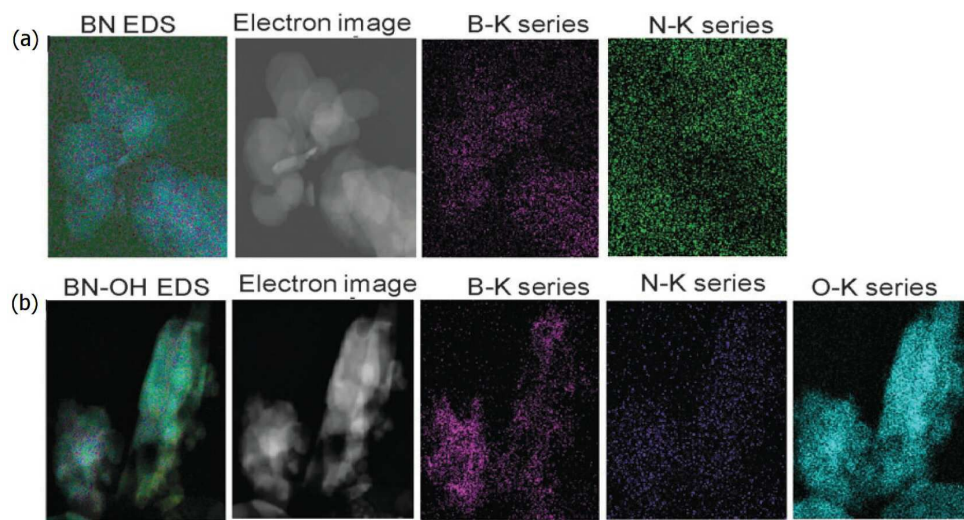


도면5

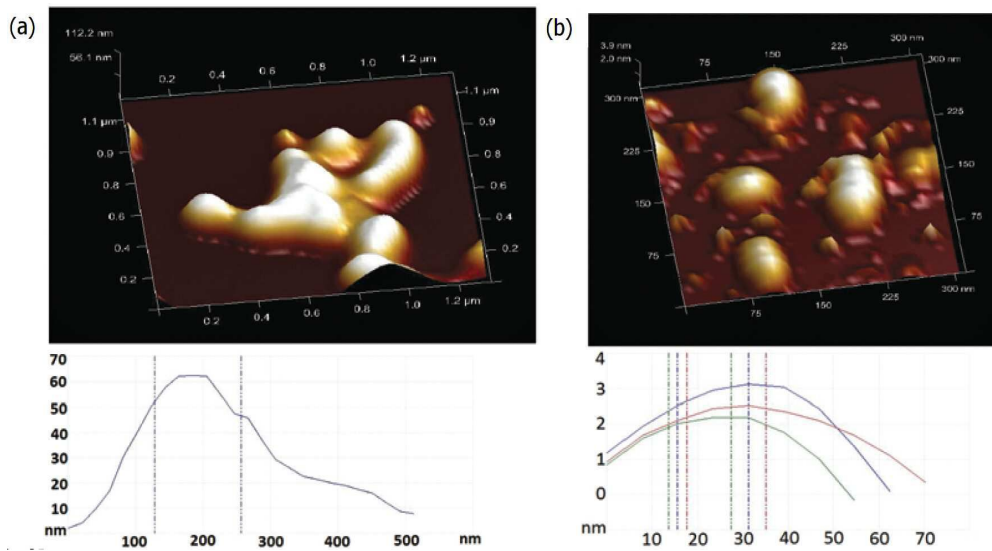


¹H-NMR spectrum of hBN-OH show appearance of proton peaks.

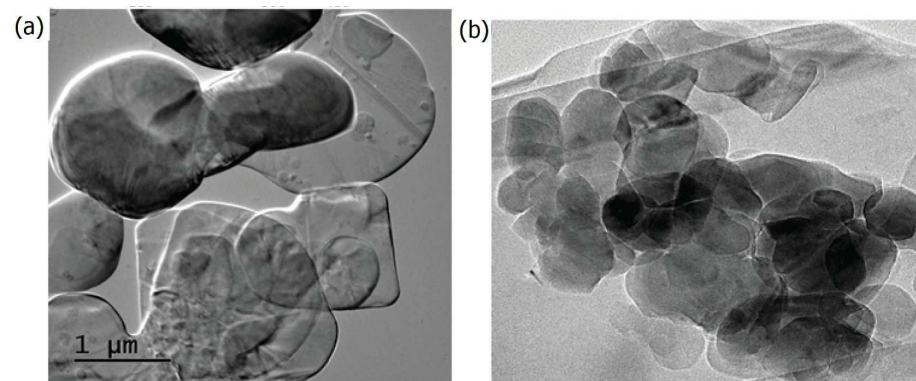
도면6



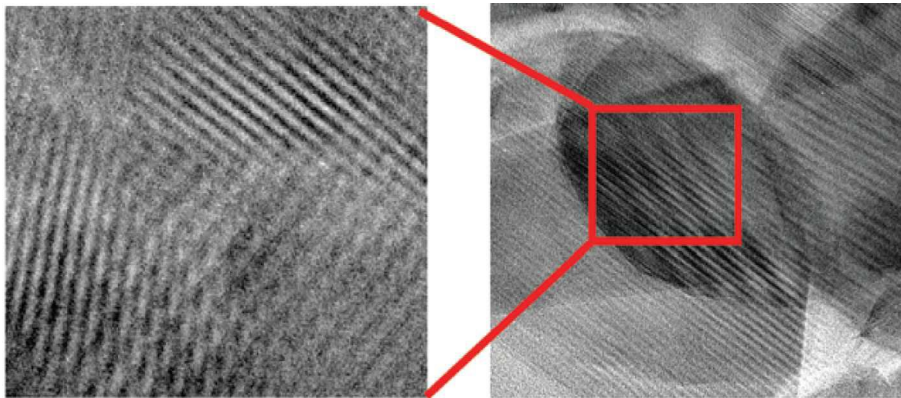
도면7



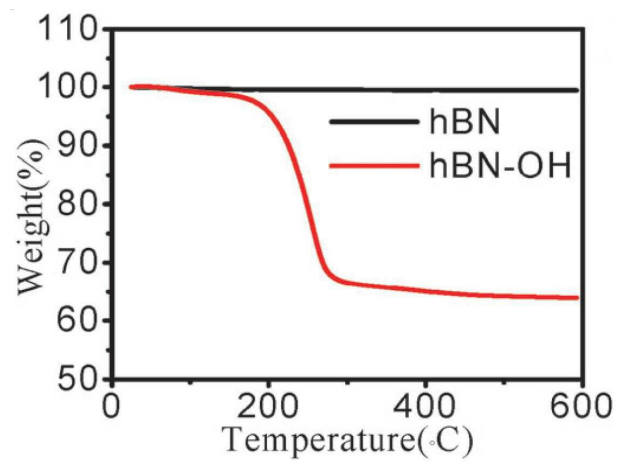
도면8



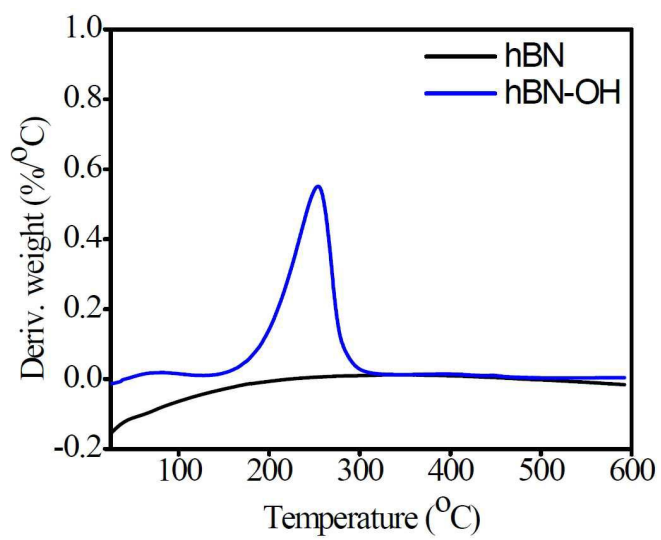
도면9



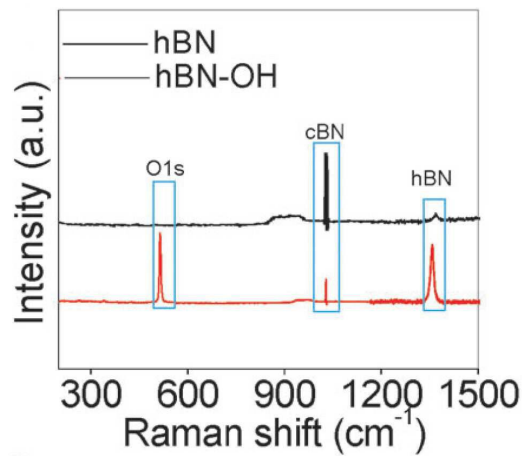
도면10



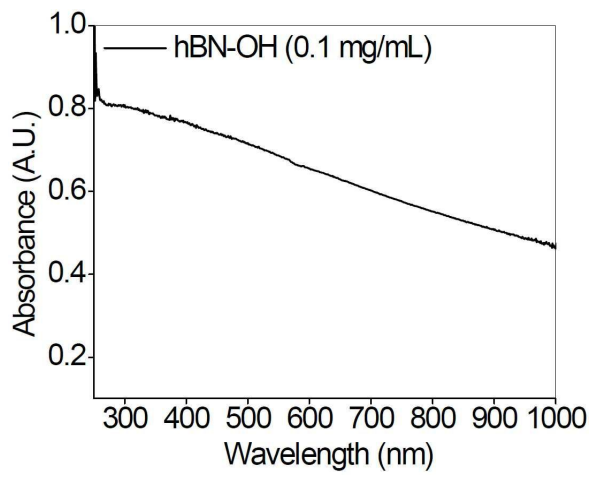
도면11



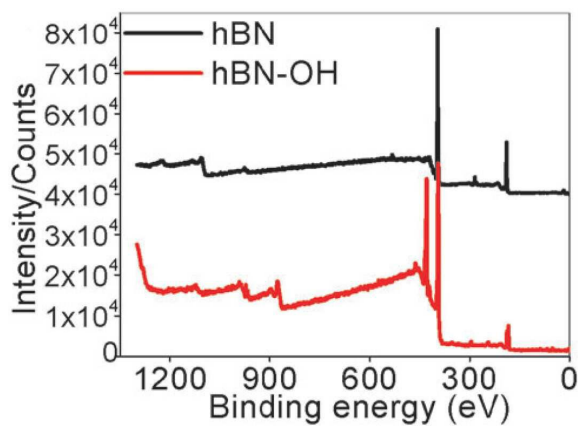
도면12



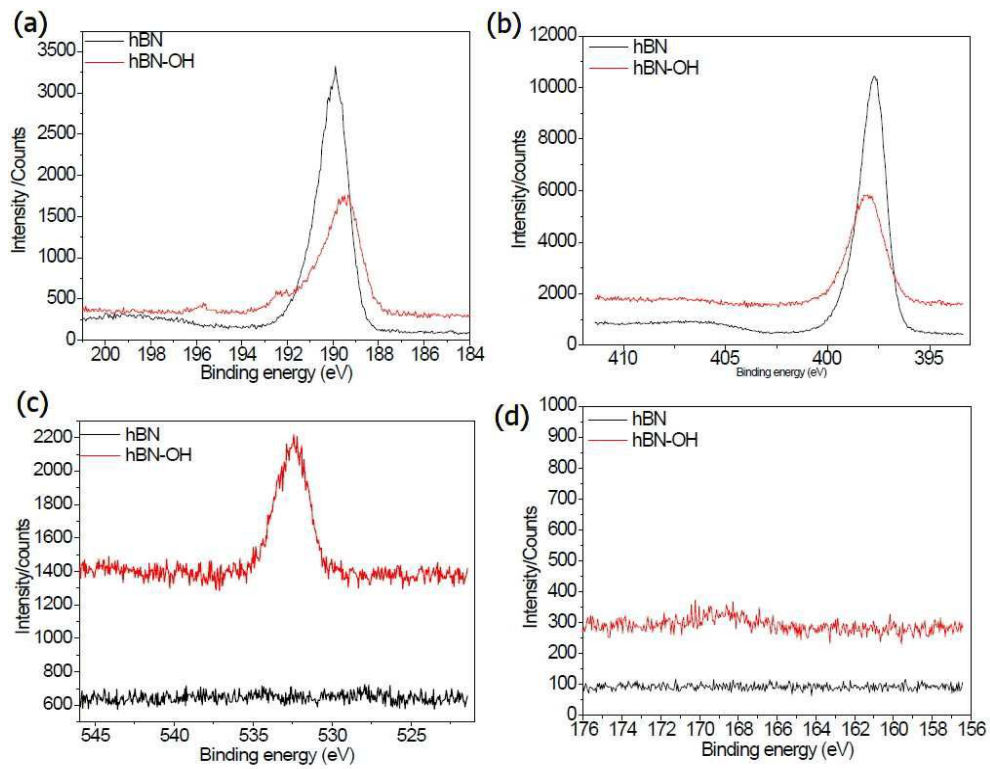
도면13



도면14

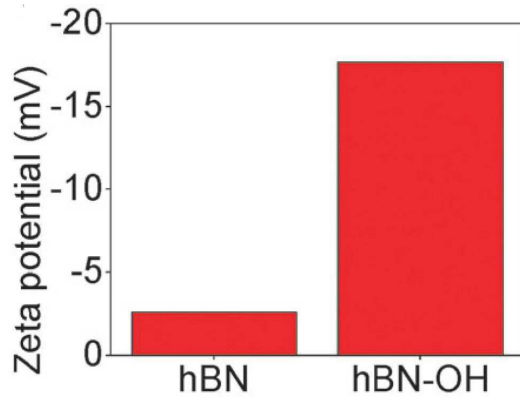


도면15

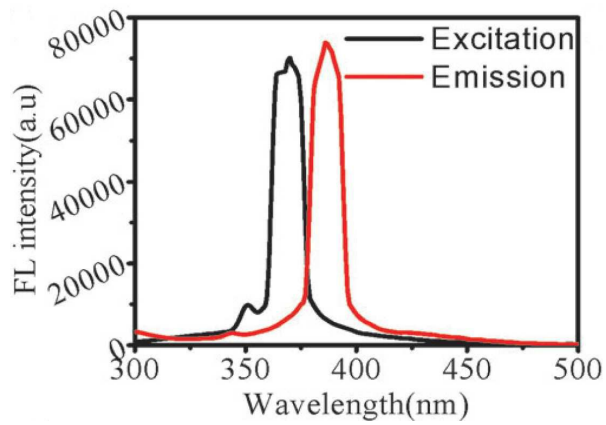


Individual peak survey of hBN and hBN-OH, (A) B1s, (B) N1s, (C) O1s, and (D) S1s.

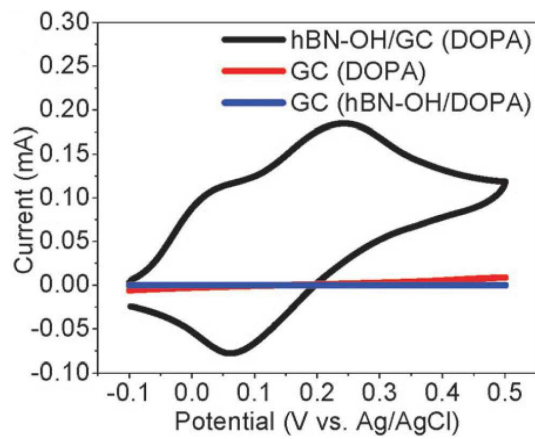
도면16



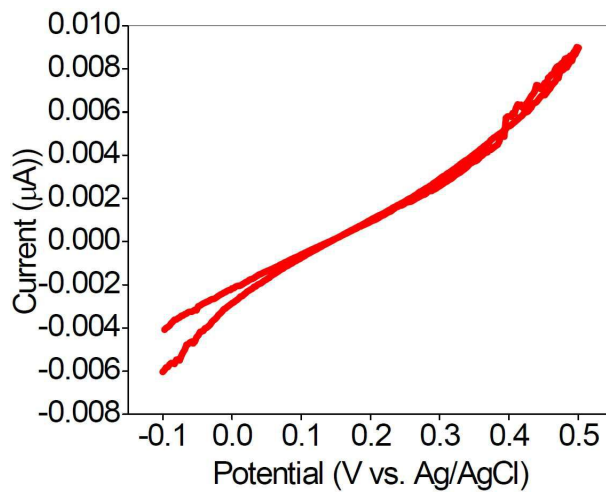
도면17



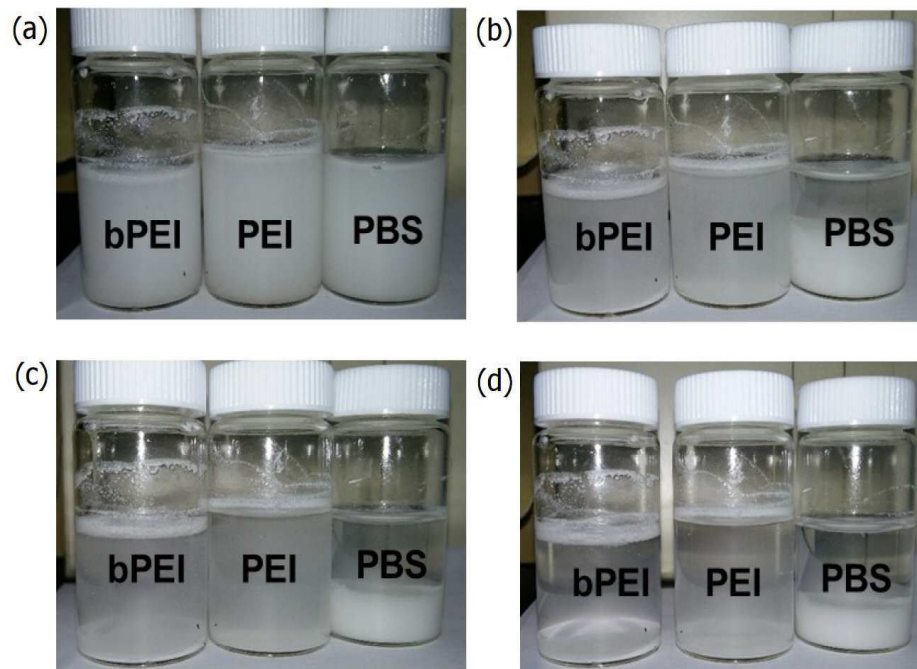
도면18



도면19

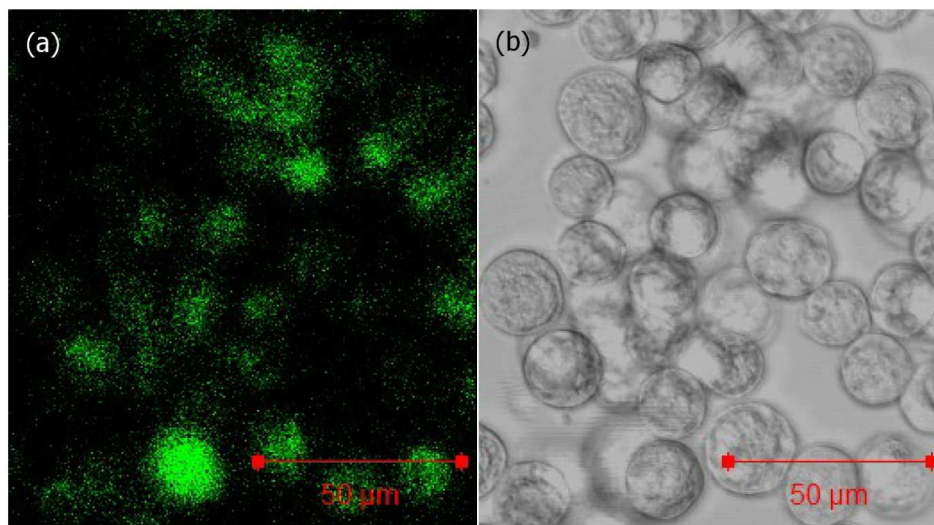


도면20

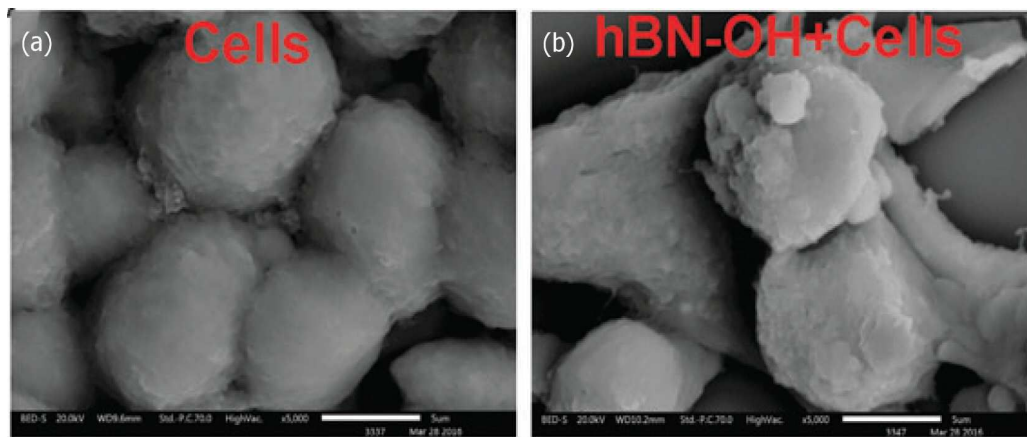


hBN-OH was dissolved in 1 M PBS (10 mg/mL), PEI (1% in PBS), bPEI (1% in PBS).

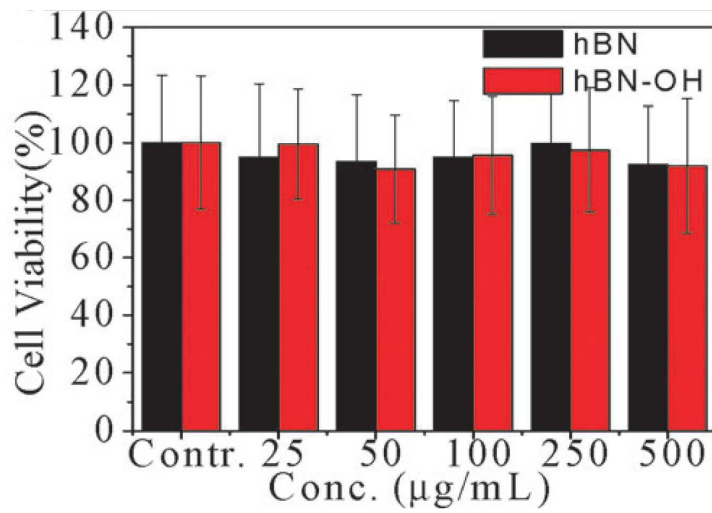
도면21



도면22



도면23



도면24

