

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202300073** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.08.30

(51) Int. Cl. **C01B 32/17 (2017.01)**

(22) Дата подачи заявки
2023.12.22

(54) **СПОСОБ ОЧИСТКИ ОДНОСЛОЙНЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК**

(31) **2023103987**

(32) **2023.02.21**

(33) **RU**

(71) Заявитель:

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ
МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА
МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)
(ФГАОУ ВО ПЕРВЫЙ МГМУ ИМ.
И.М. СЕЧЕНОВА МИНЗДРАВА
РОССИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ)) (RU)**

(72) Изобретатель:

**Власова Ирина Ивановна,
Сулейманов Шакир Камилович,
Ключев Тимомфей Олегович,
Кошелева Настасья Владимировна,
Тимашев Петр Сергеевич (RU)**

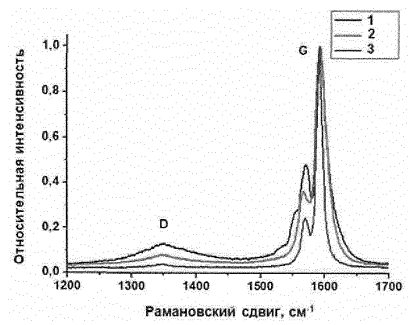
(57) Изобретение относится к области нанотехнологий, а именно к способу очистки и "мягкого" окисления поверхности однослойных углеродных нанотрубок (ОУНТ). Изобретение может быть использовано для очистки поверхности нанотрубок для последующей их функционализации различными биологически активными молекулами с целью биомедицинских применений для терапии ряда патологий, а также для использования ОУНТ в изготовлении точных диагностических приборов и зондов. Способ очистки однослойных углеродных нанотрубок (ОУНТ) заключается в том, что проводят диспергирование ОУНТ в воде, затем их разводят в буфере при нейтральном рН до концентрации 100 мкг/мл, после чего начинают обработку ОУНТ гипохлоритом, добавляя его до концентрации 50-250 мкМ, при этом отслеживают окисление путем приборного измерения оптических спектров поглощения не ранее чем через 7-8 ч после каждой добавки гипохлорита, которые проводят до уменьшения амплитуды спектра суспензии в ближней инфракрасной области на 12-20% относительно контрольной пробы, к которой вместо гипохлорита добавляют эквивалентный объем воды. Техническим результатом изобретения является повышение эффективности очистки ОУНТ.

A1

202300073

202300073

A1



202300073 A1

202300073 A1

СПОСОБ ОЧИСТКИ ОДНОСЛОЙНЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области нанотехнологий, а именно к способу очистки и «мягкого» окисления поверхности однослойных углеродных нанотрубок (ОУНТ). Изобретение может быть использовано для очистки поверхности нанотрубок для последующей их функционализации различными биологически активными молекулами с целью биомедицинских применений для терапии ряда патологий, а также для использования ОУНТ в изготовлении точных диагностических приборов и зондов.

Уровень техники

В последнее десятилетие произошел существенный прогресс в области использования наноматериалов для биомедицины, особенно быстро развивается сфера применения углеродных нанотрубок (УНТ). Углеродная нанотрубка – это цилиндр из одного слоя графена (однослойные нанотрубки, ОУНТ), или нескольких соосных цилиндров (многослойные). Благодаря своему строению и размерам, углеродные нанотрубки обладают уникальными физико-химическими свойствами. Они в 20 раз прочнее стали, химически инертны, электропроводность в 1000 раз выше, чем у меди, имеют особые свойства проводимости и т.д. Это делает их перспективными для применения в различных областях наукоемких технологий. Кроме того, высокое соотношение площади поверхности по сравнению с длиной, высокая теплопроводность и хорошая способность проникать внутрь клетки делают УНТ перспективными наночастицами для применения в медицине для адресной доставки лекарств, тканевой инженерии, биоимиджинга, биосенсоров и терапии опухолей (Thakur A., et al. Carbon nanotubes: Types, synthesis, cytotoxicity and applications in biomedical. *Materials Today: Proceedings*, 2022;50(5): 2256-2268. doi:10.1016/j.matpr.2021.10.002). С целью улучшения биосовместимости ОУНТ их функционализируют, то есть химически модифицируют поверхность нанотрубок для улучшения их растворимости, снижения токсичности и придания специальных свойств для использования в таргетной терапии. УНТ окисляют сильными кислотами, модифицируют полигликолями и др., присоединение к поверхности наночастиц таргетных молекул и лекарственных препаратов позволяет обеспечить направленную терапию различных локальных патологий. Функционализация нанотрубок может быть ковалентной, тогда к ним химически присоединяют различные молекулы, улучшающие их биосовместимость (PEG, PEI), а также лекарственные препараты или

таргетные молекулы. В случае нековалентной функционализации биомолекулы, поверхностно-активные вещества, полимеры и другие химические вещества сорбируются на поверхности УНТ. Образование нековалентной связи происходит за счет сил, обеспечивающих адсорбцию, таких как электростатическая сила, водородные связи, силы Ван-дер-Ваальса и взаимодействия π -стэкинга (Murjani, BO, et al. Carbon nanotubes in biomedical applications: current status, promises, and challenges. Carbon Lett. 2022; 32:1207-1226. doi:10.1007/s42823-022-00364-4). С другой стороны, эти же силы обеспечивают сорбцию различных посторонних веществ на поверхности нанотрубок, таких как белки, липиды, бактериальные липополисахариды и др. Например, связывание белков с УНТ очень сильное – константы диссоциации комплексов белков с нанотрубками лежат в диапазоне 1-0.1 мкМ. Поскольку в производстве нанотрубок и в дальнейшей лабораторной работе с ними стерильность не соблюдается, на поверхности наночастиц могут сорбироваться различные активные вещества, которые изменяют свойства наночастиц. Удаление органики, а также примесных остатков аморфного углерода, оставшихся после каталитических процессов синтеза УНТ, возможно с помощью ряда физических методов, а также с использованием растворителей, таких как спирт и H_2O_2 (Алексашина ЕВ и др. Кислотная активация углеродных нанотрубок. Конденс. среды и межфазные границы 2009; 11(2):101-105; Жерлицин АГ и др. Получение углеродных нанотрубок из природного газа. Вестник науки Сибири 2012;3(4):30-36). Однако, эти вещества сложно удалить из нанотрубок, они могут оставаться во внутренней полости наночастиц и влиять на их свойства.

Химикам также известен стандартный методический подход для очистки, модификации и укорочения нанотрубок – это их окисление в результате озвучивания или кипячения в смеси пероксида водорода и сильной кислоты (HNO_3 , HCl) (Strong, KL, et al. Purification process for single-wall carbon nanotubes. Carbon. 2003;41(8):1477-1488. DOI: 0.1016 / S0008-6223(03)00014-9). Окисление нанотрубок позволяет избавиться от примесей металлов и аморфного углерода, а также приводит к появлению на их поверхности заряженных карбонильных и гидроксильных групп, что улучшает растворимость и биосовместимость наночастиц. Такая процедура очистки проводится для большинства нанотрубок при их коммерческом производстве.

Авторами изобретения также проводились исследования, в которых изучали окисление поверхности УНТ активными формами кислорода и гипохлоритными кислотами. Было показано, что наиболее эффективным окислителем, способным окислять и деградировать (разрушать) нанотрубки является хлорноватистая кислота ($HOCl$) – основной продукт миелопероксидазы нейтрофилов. Для доказательства возможность

биодеградация УНТ *in vivo* в очаге воспаления мы проводили длительную обработку УНТ, как однослойных (5-7 дней) так и многослойных (10-15 дней), высокими концентрациями гипохлорита NaOCl (1-10 mM) – натриевой соли HOCl, которая при нейтральных pH существует в растворе в равновесии с HOCl (Vlasova I.I. et al. PEGylated single-walled carbon nanotubes activate neutrophils to increase production of hypochlorous acid, the oxidant capable of degrading nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012; 264(1):131-142. doi: 10.1016/j.taap.2012.07.027; Masyutin AG, Bagrov D.V., Vlasova I.I., et al. Wall Thickness of Industrial Multi-Walled Carbon Nanotubes Is Not a Crucial Factor for Their Degradation by Sodium Hypochlorite. *Nanomaterials.* 2018;8(9):715. doi: 10.3390/nano8090715).

В работах других авторов также применялся гипохлорит для окисления и деградации нанотрубок. Обработка нативных (as produced) УНТ гипохлоритом для улучшения их растворимости была предложена ранее (заявка US 2009/0048386 A1, публ. 19.02.2009. METHOD FOR TREATMENT OF CARBON NANOTUBES). Авторы использовали экстремально высокие концентрации гипохлорита (0.1-10% или до 1.2 M), а следовательно, щелочные pH раствора и малые времена инкубации (от минут до 24 часов). При таких высоких концентрациях NaOCl модификация УНТ происходит неконтролируемо. Авторы заявки измеряли образование заряженных групп на поверхности УНТ, однако только этот параметр не является характеристикой модификации нанотрубок – в результате окисления на их поверхности могут образовываться дефекты (дырки), и в местах этих дефектов УНТ становятся ломкими и теряют свои уникальные свойства.

В заявке US 2010/0190239 A1, публ. 29.07.2010г., предложена обработка нанотрубок пероксидазами – пероксидазой хрена или миелопероксидазой - в присутствии пероксида водорода (Star A., Kagan V.E., Allen B.L. DEGRADATION OF NANOMATERIALS, 2010, Pub. No.: US 2010/0190239 A1). Продуцируемые ферментами оксиданты реагируют с нанотрубками (Публикация авторов: Kagan VE, Konduru N.V., Feng W., Allen B.L., Conroy J., Volkov Y., Vlasova I.I. et al. Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. *Nat Nanotechnol.* 2010;5(5):354-359. doi:10.1038/nnano.2010.44), модифицируют их поверхность, что облегчает деградацию УНТ в организме, а также может быть использовано для удаления УНТ, накопившихся в окружающей среде в месте их производства. Однако добавляемые пероксидазы сами являются биологически активным материалом, могут оставаться на поверхности НТ и реагировать с другими молекулами.

Другие физико-химические подходы также использовались для очистки и модификации свойств УНТ. Комбинированное использование микроволнового излучения и Cl₂ газа позволяет эффективно удалять примеси катализаторов – переходных металлов, используемых при синтезе УНТ (Gomez V, et al. Enhanced purification of carbon nanotubes by

microwave and chlorine cleaning procedures. RSC advances. 2016;6(14):11895-11902. doi:10.1039/C5RA24854J). В патенте RU 2296046 С1 предложен нагрев нанотрубок до температуры 1500-1600°C в парах сульфида цинка для увеличения сорбционной емкости наночастиц.

Известно, что хлорноватистая кислота взаимодействует с аморфным углеродом. Активированный уголь используется для дехлорирования воды ($C^* + HOCl = C^*O + Cl^- + H^+$) (<https://aquaboss.ru/poleznye-stati/udalenie-hlora-i-hloramina-na-aktivirovannom-ugle.html>), поэтому можно ожидать, что аморфный углерод, сорбированный на углеродных нанотрубках, будет окисляться в присутствии гипохлорита.

Следует отметить, что все известные методы обработки нанотрубок не позволяют решить проблему увеличения их биосовместимости, поскольку в них не учитывается необходимость поверхностной очистки и отсутствует постоянный контроль за процессом окислительной модификации НТ, что имеет важное значение для сохранения баланса между свойствами НТ и их растворимостью/биосовместимостью. Сорбированные на поверхности УНТ органические молекулы, не прошедшие очистку, могут оказывать неблагоприятное воздействие на клетки и ткани, и особенно на клетки иммунной системы.

Раскрытие сущности изобретения

Техническим результатом изобретения является повышение эффективности очистки ОУНТ. В результате осуществления способа получают нанотрубки, не содержащие органических примесей на поверхности и сопутствующего аморфного углерода, при непрерывном контроле за процессом окислительной модификации ОУНТ.

Технический результат достигается за счет того, что проводят диспергирование ОУНТ в воде, затем их разводят в буфере при нейтральном рН до концентрации 100 мкг/мл, после чего начинают обработку ОУНТ гипохлоритом, добавляя его до концентрации 50-250 мкМ, при этом отслеживают окисление путем приборного измерения оптических спектров поглощения не ранее, чем через 7- 8 часов после каждой добавки гипохлорита, которые проводят до уменьшения амплитуды спектра суспензии в ближней инфракрасной области на 12-20% относительно контрольной пробы, к которой вместо гипохлорита добавляют эквивалентный объем воды.

При этом для каждого типа нанотрубок необходимо подбирать свое время обработки (количество добавок NaOCl к ОУНТ), так чтобы уменьшение амплитуды спектров поглощения суспензии ОУНТ составило 12-20%.

Предложенный способ очистки поверхности ОУНТ основан на разнице в несколько порядков величин скорости реакции HOCl с аморфным углеродом или органическими

веществами и с прочными ОУНТ. Константа скорости реакции NaOCl с большинством химических соединений, в том числе с белками и липидами составляет $\sim 1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) (PattisonDI, et al. Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases. *Curr Med Chem.*, 2006;13(27):3271-3290. doi:10.2174/092986706778773095), что позволит очистить поверхность УНТ от возможных примесей. Ранее в работе авторов изобретения было показано, что скорость реакции окислителя с ОУНТ очень медленная, например, для карбоксилированных ОУНТ (к-ОУНТ) она составляет (450 ± 50) нмоль HOCl в час на 1 мг к-ОУНТ (Власова И.И. и др. Индуцированная миелопероксидазой деградация однослойных углеродных нанотрубок определяется синтезом гипохлорита. *Биоорг. химия* 2011;37(4):510-521).

Краткое описание чертежей

Изобретение поясняется чертежами, где на фиг.1 представлена фотография суспензий к-ОУНТ (100 мкг/мл) после обработки гипохлоритом в суммарной концентрации: 1 – 0 мкМ, 2 – 100 мкМ, 3 – 1.5 мМ, На фиг. 2 представлены соответствующие спектры поглощения образцов. Образец 3 иллюстрирует, что к-ОУНТ можно полностью разрушить, добавляя высокие концентрации гипохлорита. На фиг.3 представлены Рамановские спектры к-ОУНТ после обработки гипохлоритом в суммарной концентрации: 1 – 0 мкМ, 2 – 250 мкМ, 3 – 1.5 мМ G-band 1597 cm^{-1} , D-band 1350 cm^{-1} . Спектры нормализованы по амплитуде G-полосы.

Осуществление изобретения

Предлагаемый способ очистки однослойных углеродных нанотрубок осуществляется следующим образом.

Авторами экспериментально были установлены основные режимные характеристики способа.

Нанотрубки диспергируют в деионизированной воде с помощью ультразвукового соникатора (Sonicator Q55, Qsonica, США) при мощности 10 Вт в течение 30 с несколько раз с перерывами 15 с (пробирка помещается на лед) или в ультразвуковой ванне (Elma Ultrasonic, Германия) при 4–10 °С по несколько часов, так что суммарное время составляет не менее 10 часов. Использование ультразвуковой соникации позволяет получить суспензию одиночных или собранных в пучки по несколько штук агрегатов ОУНТ. Вариант использования ультразвуковой ванны предпочтительнее, так как лучше сохраняется нативная структура наночастиц. Затем суспензию ОУНТ центрифугируют при 5000 г в течение 30 мин для осаждения крупных агрегатов наночастиц, супернатант используют для

дальнейшей обработки. Стоковые суспензии УНТ в воде (0.8–1.5 мг/мл) хранятся в темноте при 4 °С. При длительном хранении (более 1 месяца) необходимо проводить повторное центрифугирование.

При этом концентрацию нанотрубок определяют, используя коэффициент экстинкции в ближней инфракрасной области (1050-1080 нм), известный от производителя или измеренный по стандартной методике (Liu Z, et al. *Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery*. ACS Nano 2007; 1(1):50-56. doi: 10.1021/nm700040t.).

Затем ОУНТ растворяют в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.2 до концентрации 100 мкг/мл для дальнейшей обработки гипохлоритом.

NaOCl стабилен в виде раствора 10–15% хлора в воде, содержащей NaOH. Концентрацию NaOCl в исходном растворе определяют путем измерения оптической плотности при 290 нм ($\epsilon = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) после последовательных разведений реагента в 5 мМ NaOH.-Концентрация коммерческих растворов NaOCl составляет от 1 до 2 М.

Аликвоты NaOCl добавляют к ОУНТ, ресуспендированным в буфере, до концентрации реагента 50-250 мкМ. В случае, если для достижения заданной концентрации NaOCl к суспензии ОУНТ надо добавлять менее 5 мкл исходного раствора гипохлорита, непосредственно перед добавкой необходимо приготовить промежуточный раствор NaOCl в буфере с мМ концентрацией. К контрольным не модифицированным образцам ОУНТ добавляют эквивалентное количество воды.

При осуществлении способа очистки однослойных углеродных нанотрубок авторы отслеживали окисление ОУНТ, измеряя их спектры поглощения, что возможно делать с помощью спектрофотометра, позволяющего проводить измерения в ближней инфракрасной области (например, спектрофотометр Cary-50, Varian, США). Измерение оптических спектров суспензии ОУНТ проводят не ранее, чем через 7-8 ч после каждой добавки NaOCl. Этого времени достаточно, чтобы гипохлорит прореагировал с ОУНТ, если в них нет примесей. Инкубацию можно проводить дольше (например, инкубация в ночь). Инкубацию проводят в темном месте при комнатной температуре. Если в суспензиях видны агрегаты нанотрубок или поглощение в контроле изменилось более чем на 10%, перед записью спектров суспензии ОУНТ подвергаются ультразвуковой обработке по 15 с два раза с интервалом 10 с с помощью ультразвукового гомогенизатора (Sonopuls HD 2070, Bandelin Electronic, Германия) при 10 Вт, 20 кГц. Для измерения оптических спектров ОУНТ разводят в воде, так чтобы проводить измерения в оптимальном диапазоне поглощения, которое рекомендовано для прибора. Для регистрации Рамановских спектров каплю раствора высушивают на стекле. Исследование образцов методом спектроскопии

комбинационного рассеяния проводят с использованием лазера 514нм (Ar, 20мВт) с помощью ND (neutral density) фильтров с варьируемой мощностью в интервале 0.1 - 1 мВт.

Общее количество добавленного гипохлорита, необходимого для удаления примесей и начала мягкого окисления поверхности УНТ, зависит от количества примесей, но обычно не превышает 1 мМ. Очистку нанотрубок от примесей и окисление их поверхности можно считать завершенными, когда поглощение суспензии на 1060 нм уменьшалось на 12-20%. Уменьшение оптического поглощения означает, что начинается модификация углеродной поверхности ОУНТ, дальнейшая обработка может привести к модификации структуры ОУНТ и их деградации.

Изобретение поясняется примерами.

Пример 1

Карбоксилированные однослойные УНТ (к-УНТ) покупали у фирмы Carbon Solutions Inc. (США). 5 мг к-ОУНТ помещали в пробирку типа эппендорф и добавляли 1 мл mQ воды. Соникацию нанотрубок проводили с помощью ультразвукового соникатора Sonicator Q55, Qsonica, США, помещая зонд прибора в пробирку, которая устанавливалась в стакан со льдом. Ультразвуковую обработку проводили по при мощности 10 Вт в течение 30 с 5 раз с 15 с перерывами. Полученную суспензию центрифугировали при 5000g 30 мин, отбирали супернатант, и его опять центрифугировали при тех же условиях. Для определения концентрации к-ОУНТ использовали коэффициент экстинкции 13.2 ml mg⁻¹cm⁻¹ (Vlasova I.I., et al. PEGylated single-walled carbon nanotubes activate neutrophils to increase production of hypochlorous acid, the oxidant capable of degrading nanotubes. Toxicol Appl Pharmacol. 2012; 264(1):131-142. doi: 10.1016/j.taap.2012.07.027). Концентрация составила (1.5±0.2) мг/мл. Суспензию нанотрубок добавляли к 2 мл 50 мМ Na-фосфатного буфера, рН 7.2 так, чтобы конечная концентрация к-ОУНТ была 100 мкг/мл. Суспензию распределяли по 1 мл в пробирки – контроль и проба для обработки NaOCl. Коммерческий раствор NaOCl имел концентрацию 1.5 М гипохлорита, его разбавляли в 150 раз для приготовления рабочего 10 мМ раствора NaOCl в буфере. К пробе добавляли 5 мкл этого раствора до конечной концентрации 50 мкМ. К контрольной пробе добавили 5 мкл воды. После первой добавки инкубировали суспензии в течение 8 ч при комнатной температуре в темном месте, после инкубации измеряли поглощение при 1060 нм. Для этого брали аликвоту суспензии к-ОУНТ и добавляли к ней дистиллированную воду в соотношении 1:2. Измерения повторяли 3 раза, для измерений использовали спектрофотометр Cary-50, Varian, США. Поглощение обработанной гипохлоритом пробы достоверно не изменилось (поглощения в пробе с гипохлоритом уменьшилось менее, чем на 10% относительно контроля). После чего к суспензии добавили еще 5 мкл 10 мМ NaOCl и инкубировали

суспензию 16 ч (в ночь), после чего измеряли поглощение: изменения поглощения составили (18 ± 4) % от значений в контрольной суспензии. Для контроля за модификацией НТ записывали спектры. Фото суспензий ОУНТ представлено на фиг. 1, соответствующие спектры поглощения приведены на фиг. 2. Дальнейшие добавки реагента приводят к деградации (разрушению) наноструктур (фиг. 1,2 образец 3). Деградация наночастиц сопровождается не только уменьшением оптического поглощения растворов, но и исчезновением характерных полос поглощения ОУНТ – металлической (M1) и полупроводниковой (S2). В случае очистки и слабого окисления поверхности ОУНТ добавки гипохлорита возможны только при полном сохранении полос M1 и S2 (фиг. 2, кривая 2).

Характеризовать деградацию УНТ можно с помощью других методов, например, динамическое рассеяние света и Рамановская спектроскопия. Однако, эти методы более трудоемки, чем измерение спектров поглощения, менее достоверны и требуют специального оборудования. На фиг.3 приведены Рамановские спектры нанотрубок с разной степенью деградации, полученные с помощью многофункциональной системы исследования методом спектроскопии рамановского рассеяния (Инсайт солюшнс, Россия). Основное отличие спектров – деградация нанотрубок сопровождается увеличением соотношения амплитуды пиков G и D, что служит стандартным маркером окисления ОУНТ (Russier J. et al. Oxidative biodegradation of single- and multi-walled carbon nanotubes. *Nanoscale*. 2011;3(3):893-896. doi: 10.1039/c0nr00779j)

Полученные ОУНТ не содержат органических примесей и аморфного углерода, они могут быть далее осаждены ультрацентрифугированием (не менее 200000 g) и высушены, в таком виде нанотрубки хранятся в холодильнике в течение нескольких лет, и в дальнейшем могут быть использованы для функционализации таргетными молекулами.

Пример 2

В качестве примера контаминации нанотрубок органическими соединениями мы использовали липополисахариды (ЛПС), которые добавляли к суспензии к-ОУНТ. к-ОУНТ были приготовлены, как описано в примере 1. Далее нанотрубки разводили в 1 мл 50 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7.2, содержащем 1 мг/мл ЛПС (около 200 мкМ). Раствор распределяли в пробирки по 0.5 мл – контроль и проба для обработки. Готовили рабочий раствор 10 мМ NaOCl в буфере. Гипохлорит быстро взаимодействует с ЛПС, как и с любой органической молекулой, можно ожидать, что часть добавленного гипохлорита уйдет на взаимодействие с ЛПС. Поэтому добавки концентрацию гипохлорита в пробах увеличили. Добавка 75 мкМ NaOCl с последующей инкубацией 7 часов не привела к изменению поглощения пробы относительно контроль (проба, к которой добавлена вода). После второй

добавки 75 мкМ и последующей инкубации 16 часов также не наблюдали достоверных (более 10%) отличий в поглощении пробы и контроля. После третьей добавки 75 мкМ поглощение суспензии уменьшилось на (15 ± 2) %. При этом форма спектров не изменилась, специфические полосы поглощения M1 и S2 имели такую же форму, как в контрольной пробе. Суммарная концентрация добавленного гипохлорита составила 225 мкМ, это выше, чем в примере 1, что говорит о взаимодействии NaOCl с добавленным ЛПС.

Пример 3

Амидированные ОУНТ (ам-ОУНТ) имеют в своем составе ковалентно связанные с поверхностью нанотрубок амидные группы. Не более 1% атомов углерода УНТ связаны с амидными группами. 3 мг к-ОУНТ помещали в пробирку типа эппендорф и добавляли 500 мкл mQ воды. Чтобы не нарушить функционализацию ОУНТ, в этом случае использовали более мягкую ультразвуковую обработку. Соникацию нанотрубок проводили в ультразвуковой ванне (Elma Ultrasonic, Германия) при $4-10^{\circ}\text{C}$ в течение 2 часов 8 раз с перерывами в течение нескольких часов. Полученную суспензию центрифугировали при 5000g 30 мин, отбирали супернатант и опять центрифугировали при тех же условиях. Для определения концентрации ПЭГ-ОУНТ использовали коэффициент экстинкции $15 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Спектры поглощения этих УНТ выглядят также как спектры к-ОУНТ (фиг. 2). Гипохлорит реагирует с амидными (пептидными) группами с образованием хлорамидов (Hawkins C.L. et al. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino acids* 2003; 25:259-274. DOI 10.1007/s00726-003-0016-x), поэтому концентрацию гипохлорита в суспензии после каждой добавки увеличили до 100 мкМ. После первой и второй добавок 100 мкМ NaOCl и инкубации проб 8 и 16 часов, соответственно, не наблюдали различий в поглощении при 1060 нм между контрольным образцом и пробой, обработанной гипохлоритом. Третья добавка 100 мкМ NaOCl привела к уменьшению поглощения пробы на (10 ± 2) % относительно контроля. После четвертой добавки поглощения контроля и пробы отличались на (19 ± 2) %. Спектры контрольной и обработанной гипохлоритом проб не отличались по форме. Таким образом, обработку ам-ОУНТ завершили после добавления 400 мкМ NaOCl.

Пример 4

Пегелированные ОУНТ (ПЭГ с молекулярной массой 600 Да) получали из Carbon Solutions Inc. (США). Используемый тип ПЭГ-УНТ представляет собой кополимер, в котором не более 1% атомов углерода УНТ связаны с молекулами ПЭГ, и содержание ПЭГ составляет 10–25 мас.%. Аналогично примеру 3, для диспергирования ОУНТ использовали ультразвуковую баню. Для определения концентрации ПЭГ-ОУНТ использовали коэффициент экстинкции $20.2 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Спектры поглощения этих УНТ выглядят

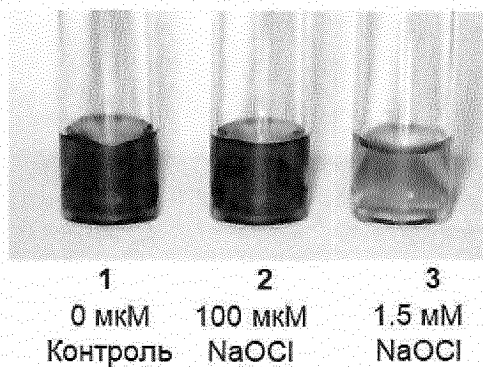
также как спектры к-ОУНТ (фиг. 2). Для очистки ПЭГ-ОУНТ к ним добавляли NaOCl так, что концентрация реагента после каждой добавки составляла 250 мкМ. Гипохлорит не реагирует с ПЭГ. Для уменьшения амплитуды спектра суспензии ПЭГ-ОУНТ в фосфатном буфере pH 7.2 в области 1060 нм на (20 ± 2) % понадобилось сделать 2 добавки гипохлорита, в суммарная концентрация составила 500 мкМ NaOCl.

Таким образом, предложенным способом достигается полное удаление из суспензии ОУНТ возможных примесей, таких как органические молекулы и аморфный углерод, с последующим частичным окислением поверхности ОУНТ (уменьшение поглощения на 12-20%), что способствует улучшению биосовместимости и биodeградируемости наночастиц.

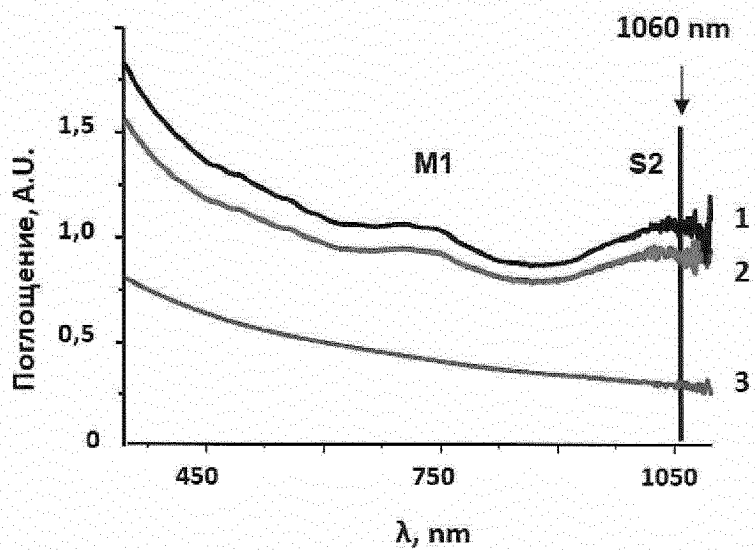
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ очистки однослойных углеродных нанотрубок (ОУНТ), заключающийся в том, что проводят диспергирование ОУНТ в воде, затем их разводят в буфере при нейтральном рН до концентрации 100 мкг/мл, после чего начинают обработку ОУНТ гипохлоритом, добавляя его до концентрации 50-250 мкМ, при этом отслеживают окисление путем приборного измерения оптических спектров поглощения не ранее, чем через 7- 8 часов после каждой добавки гипохлорита, которые проводят до уменьшения амплитуды спектра суспензии в ближней инфракрасной области на 12-20% относительно контрольной пробы, к которой вместо гипохлорита добавляют эквивалентный объем воды.

СПОСОБ ОЧИСТКИ ОДНОСЛОЙНЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

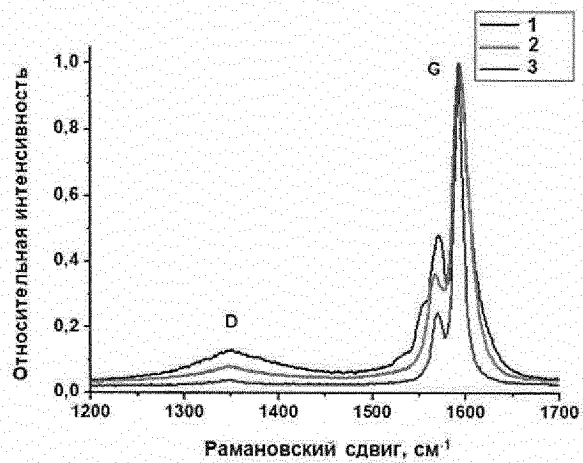


Фиг.1



Фиг.2

СПОСОБ ОЧИСТКИ ОДНОСЛОЙНЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК



Фиг.3

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202300073**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

МПК:

C01B 32/17 (2017.01)

СПК:

C01B 32/17**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

B82B 3/00, B82Y 40/00, C01B 32/159, 32/168, 32/17, 32/172, 32/174

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, EAPATIS, Google Patents, «Поисковая платформа» Роспатент, Google, Яндекс**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A, D	US 2009048386 A1 (ARKEMA FRANCE) 2009-02-19 весь документ	1
A	RU 2528985 C2 (ООО "НАНОТЕХЦЕНТР") 2014-09-20 весь документ	1
&	RU 2802348 C1 (ФГАОУ ВО ПЕРВЫЙ МГМУ ИМ. И.М. СЕЧЕНОВА МИНЗДРАВА РОССИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)) 2023-08-25 весь документ	1
A	CN 109867274 A (BEIJING HUATAN YUANXIN ELECTRONIC TECHNOLOGY CO., LTD.) 2019-06-11 весь документ	1
A	CN 110104631 A (SHENZHEN DYNANONIC CO., LTD.) 2019-08-09 весь документ	1
A, D	MASYUTIN A. G. et al. Wall Thickness of Industrial Multi-Walled Carbon Nanotubes Is Not a Crucial Factor for Their Degradation by Sodium Hypochlorite. NANOMATERIALS, 2018, 8(9): 715 doi:10.3390/nano8090715 весь документ	1

 последующие документы указаны в продолжении графы

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

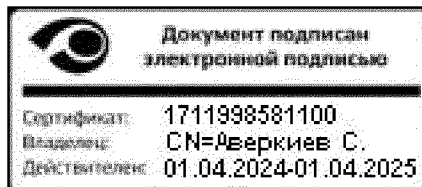
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи
евразийской заявки или после нее«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию
и т.д."P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки,
но после даты испрашиваемого приоритета"«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и при-
веденный для понимания изобретения«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска,
порочающий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска,
порочающий изобретательский уровень в сочетании с другими документами
той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 20 июня 2024 (20.06.2024)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев