



(54) **Sposób wytwarzania i kontroli wielkości nanoobjektów krzemionkowych zawierających barwnik fluorescencyjny w swojej strukturze**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
27.07.2020 BUP 16/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
22.08.2022 WUP 34/22

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT CHEMII FIZYCZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**TOMASZ ANDRYSZEWSKI, Ciechocinek, PL
MICHALINA IWAN, Konstancin-Jeziorna, PL
KARINA KWAPISZEWSKA, Warszawa, PL
GRZEGORZ BUBAK, Katowice, PL
ROBERT HOŁYST, Warszawa, PL
MARCIN FIJAŁKOWSKI, Warszawa, PL
MONIKA KSIĘŻOPOLSKA-GOCALSKA,
Warszawa, PL**

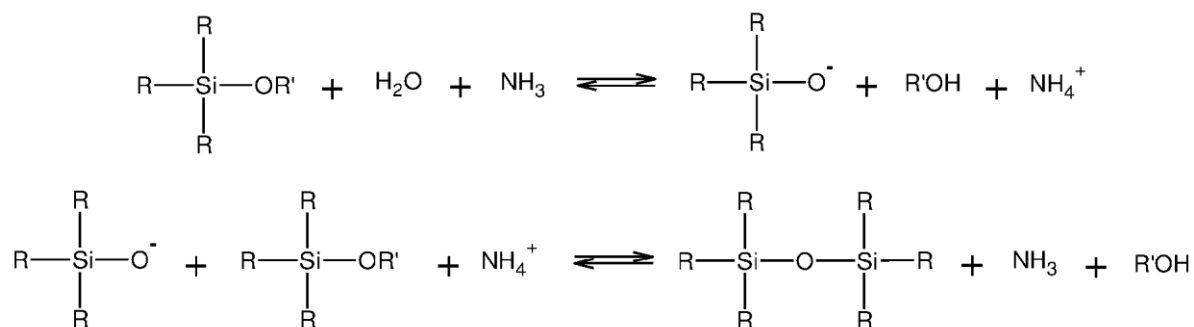
(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Krystian Żygadło

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób syntezy stabilnych, inertnych chemicznie i nietoksycznych nanoobjektów krzemionkowych zawierających w swojej strukturze barwnik fluorescencyjny, posiadający grupę izotiocyjanianową, taki jak fluoresceina i rodamina B, których rozmiar (średnicę) można kontrolować w szerokim zakresie (20–100 nm) poprzez zmianę ilości barwnika stosowanego w procesie syntezy. W proponowanej metodzie przy zachowaniu jednakowego składu roztworu oraz temperatury prowadzenia procesu powstają nanoobjekty krzemionkowe o różnej średnicy oraz różnej zawartości barwnika fluorescencyjnego.

W literaturze znane są publikacje, w których z tetraalkoksylanów w obecności wody, amoniaku i etanolu tworzone są nanoobjekty krzemionkowe. Proces ten nosi nazwę metody Stober'a i jest obecnie najczęściej stosowany w syntezie nanocząstek krzemionkowych /*Journal of American Science*, 2010;6(11), 985–989/. W procesie tym jako mieszaninę reakcyjną stosuje się układ składający się z wody, etanolu oraz amoniaku. Dodatkowo do tak przygotowanej mieszaniny wprowadza się tetraalkoksylany będące prekursorami krzemionki, które w procesie hydrolizy generują w pierwszym etapie tetrahydroksykrzem, który następnie w procesie kondensacji tworzy nanoobjekty krzemionkowe. Mechanizm całego procesu opisać można następującymi równaniami reakcji: /Z Lu et al./*Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 317 (2018) 450–456/



Jak czytamy w przytoczonej publikacji sam mechanizm tworzenia nanoobjektów krzemionkowych polega na wytworzeniu w pierwszym etapie niewielkich, niestabilnych nanoobjektów, które w czasie trwania procesu ulegają aglomeracji tworząc większe stabilne nanoobjekty. Niestabilność powstałych nanoobjektów wynika z ich niewielkiego rozmiaru. Mechanizm procesu przedstawiono na Fig. 1.

Ze względu na unikatowe właściwości krzemionki, takie jak transparentność czy nietoksyczność, a także w oparciu o mechanizm tworzenia nanoobjektów krzemionkowych naukowcy postanowili wykorzystać proces Stober'a do „zamykania” różnego rodzaju materiałów w otoczkę zbudowanej z czystej krzemionki. Jednymi z takich przykładów są reakcje zamykania fluorescencyjnych barwników. W reakcjach tych dokonuje się modyfikacji struktury barwników poprzez wprowadzenie grup trialkoksylanowych. Ugrupowania te ze względu na wysokie podobieństwo do prekursorów krzemionki ulegają procesowi współkondensacji z tetraalkoksylanami. Dzięki temu dochodzi do chemicznego związania barwnika w strukturze tworzonego nanoobjektu. /G. Chen et al. / *Dyes and Pigments* 93 (2012) 1532–1537/ W takich procesach powstają nanoobjekty, które z jednej strony wykazują np. fluorescencję charakterystyczną dla wykorzystanego barwnika, a z drugiej posiadają właściwości fizykochemiczne całkowicie odmienne niż barwnik. W sytuacji, gdy po wprowadzeniu barwnika fluorescencyjnego do komórki żywej mogłaby nastąpić jego sorpcja do elementów komórkowych, zamknięcie barwnika w inertnej, transparentnej oraz nietoksycznej otoczkę krzemionkowej celem śledzenia jego swobodnej dyfuzji jest dobrym pomysłem.

W oparciu o mechanizm tworzenia stabilnych nanoobjektów krzemionkowych przedstawiony na Fig. 1, czyli proces aglomeracji małych, niestabilnych nanoobjektów krzemionkowych celem wytworzenia większych, stabilnych, zauważono, iż po wprowadzeniu do takiego niestabilizowanego układu innych nanoobjektów np. Fe₃O₄ dochodzi do procesu pokrywania ich powierzchni poprzez ochronną warstwę krzemionki (Fig. 2).

Rozmiar, jaki osiągną stabilne nanoobjekty krzemionkowe syntetyzowane w mieszaninie reakcyjnej zależy od kilku czynników. Jednym z podstawowych szeroko opisywanym i przeanalizowanym w literaturze jest sam skład mieszaniny reakcyjnej, głównie wzajemny stosunek etanolu oraz wody w tej

mieszaniu. /*Journal of Materials Science and Engineering A 3 (4) (2013) 237–242*/. Zmiana tego stosunku pozwala na generowanie nanoobjektów krzemionkowych o średnicy w przedziale od kilku (roztwór, w którym dominuje woda lub roztwór, w którym dominuje etanol) do nawet 650 nm, przy czym maksimum osiągane jest dla układu zawierającego około 15% wody).

Kolejnym czynnikiem decydującym o rozmiarze nanoobjektów krzemionkowych, który można znaleźć w literaturze jest temperatura prowadzenia procesu. /*Eugene Mahon, Delyan R. Hristov, Kenneth A. Dawson, Chem. Commun., 2012, 48, 7970–7972*/. Przy zachowaniu jednakowego składu roztworu ogólnym wnioskiem jaki można wyciągnąć, analizując wpływ temperatury na wielkość tworzonych nanoobjektów krzemionkowych jest to, że wzrost temperatury prowadzenia procesu powoduje powstawanie mniejszych nanoobjektów.

Analizując czynniki wpływające na wielkość syntetyzowanych nanoobjektów krzemionkowych należy także wskazać na czas prowadzenia reakcji. W tym przypadku wydłużenie czasu prowadzenia procesu powoduje wzrost średnicy powstałych nanoobjektów. /*Z. Lu et al./Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 317 (2018) 45–456*/. Z tego też powodu w niektórych publikacjach znaleźć można informacje, iż reakcję należy przerwać na przykład po 60 minutach prowadzenia procesu w celu uzyskania jego powtarzalności. /*Journal of Materials Science and Engineering A 3 (4) (2013) 237–242* /.

A zatem, w dziedzinie wciąż istnieje zapotrzebowanie na opracowanie takiego sposobu otrzymywania nanoobjektów krzemionkowych zawierających w swojej strukturze barwnik fluorescencyjny, który łatwo pozwoli na kontrolowanie ich wielkości, zwłaszcza przy zachowaniu stałego stosunku etanolu, wody i amoniaku oraz stałej temperatury prowadzenia procesu.

Twórcy niniejszego wynalazku przeprowadzili obszernie badania mające na celu rozwiązanie powyższego problemu technicznego i opracowali sposób syntezy stabilnych nanoobjektów krzemionkowych zawierających w swojej strukturze barwnik fluorescencyjny, których średnicę można kontrolować poprzez zmianę ilości prekursora barwnika stosowanego do syntezy nanoobjektów, przy zachowaniu stałego stosunku etanolu, wody i amoniaku oraz stałej temperatury prowadzenia procesu.

Tak więc, przedmiotem niniejszego wynalazku jest sposób wytwarzania nanoobjektów krzemionkowych o wielkości od 20 do 100 nm zawierających w swojej strukturze barwnik fluorescencyjny obejmujący etapy, w których:

- a) przygotowuje się roztwór prekursora barwnika poprzez zmieszanie fluorescencyjnego barwnika zawierającego grupę izotiocyjanianową, aminopropylotrietoksylanu oraz etanolu w temperaturze 25–28°C,
- b) miesza się etanol z roztworem amoniaku, po czym dodaje się roztwór prekursora barwnika oraz tetraetoksylan,

charakteryzujący się tym, że do mieszaniny etanolu, z wodą i amoniakiem w naczyniu reakcyjnym dodaje się roztwór prekursora barwnika, korzystnie dodaje się roztwór prekursora barwnika w ilości od 55 mg do 334 mg, i dodaje się tetraetoksylan, przy czym stosunek wagowy tetraetoksylanu do roztworu prekursora barwnika wynosi 115,6:55,3 do 122:333,5 wagowo, przy czym zmiana stosunku ilości roztworu prekursora barwnika do ilości tetraetoksylanu powala na otrzymanie nanoobjektów o średnicach od 20 do 100 nm, i otrzymywanie nanoobjektów prowadzi się w temperaturze od 55°C do 60°C, przy stosunku wagowym $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{etanol}$ wynoszącym odpowiednio od 1/3,29/115 do 1/3,26/113, przy czym proces wytwarzania nanoobjektów prowadzi się w czasie sześciu dni, przy czym stosunek wagowy mieszaniny etanolu, wody i amoniaku do ilości roztworu prekursora barwnika wynosi od 2615,1 : 55,3 do 2569 : 333,5.,

przy czym stosunek wagowy mieszaniny etanolu, wody i amoniaku do ilości tetraetoksylanu wynosi od 2814,9:123,3 do 2897,6:122 uwzględniając etanol z prekursora,

przy czym wraz ze wzrostem stosunku wagowego tetraetoksylanu do roztworu prekursora barwnika maleje średnica otrzymanych nanoobjektów krzemionkowych.

Korzystnie, jako barwnik fluorescencyjny zawierający grupę izotiocyjanianową stosuje się izotiocyjanian rodaminę B albo izotiocyjanian fluoresceiny.

Korzystnie, w kolejnym etapie pokrywa się powierzchnię nanoobjektów krzemionkowych warstwą ligandu HS-R albo $(\text{EtO})_3\text{-Si-R}$, w których R oznacza łańcuch alifatyczny, takiego jak – $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$, z uzyskaniem funkcjonalizacji powierzchni nanoobjektów krzemionkowych.

Korzystnie, proces funkcjonalizacji powierzchni nanoobjektów krzemionkowych z wykorzystaniem ligandów tiolowych prowadzi się w temperaturze od 55 do 60°C przez kilka dni.

Opis figur rysunku:

- Fig. 1 przedstawia mechanizm tworzenia stabilnych nanoobjektów krzemionkowych;
Fig. 2 przedstawia mechanizm pokrywania nanoobjektów ochronną warstwą krzemionki;
Fig. 3 przedstawia wykresy DLS po objętości dla nanoobjektów krzemionkowych zawierających rdzeń fluorescencyjny uzyskanych po Etapie 2;
Fig. 4 przedstawia wykresy DLS po objętości dla nanoobjektów krzemionkowych zawierających rdzeń fluorescencyjny, funkcjonalizowanych ligandem HS-C₁₂H₂₅ uzyskanych po Etapie 3;
Fig. 5 przedstawia wykresy DLS po objętości dla nanoobjektów krzemionkowych zawierających rdzeń fluorescencyjny, funkcjonalizowanych ligandem HS-C₁₂H₂₅ po procesie oczyszczania uzyskanych po Etapie 4;
Fig. 6 przedstawia zmianę średnicy nanoobjektów krzemionkowych w zależności od stężenia barwnika w mieszaninie reakcyjnej dla obiektów pokrytych ligandem HS-C₁₂H₂₅.

Definicje

Aminopropylotrietoksylan (APTES) – związek o strukturze (C₂H₅O)₃Si-C₃H₇-NH₂

Tetraetoksylan (TEOS) – związek o wzorze (C₂H₅O)₄Si

Tetraalkoksylany – wzór ogólny (R-O)₄Si, rodzina związków organicznych będących pochodnymi alkoholi (alkoholany) powstałe w wyniku reakcji alkoholi z czterochlorkiem krzemu (SiCl₄)

Istotną zaletą sposobu według wynalazku jest łatwa dostępność surowców, a także niewielki koszt syntezy nanoobjektów krzemionkowych. Dodatkowo w oparciu o proponowaną metodę uzyskać można serię nanoobjektów krzemionkowych zawierających w swojej strukturze barwnik fluorescencyjny, różniących się zarówno rozmiarem (średnicą), jak i ilością chemicznie związanego barwnika.

Sposób wytwarzania nanoobjektów krzemionkowych z barwnikiem fluorescencyjnym w strukturze obejmuje następujące etapy:

1. Przygotowanie prekursora barwnika fluorescencyjnego na drodze reakcji wytwarzania wiązania pomiędzy grupą izotiocyanianową barwnika fluorescencyjnego np. rodaminu B lub fluoresceiny a grupą aminową aminopropylotrietoksylanu. Powstały prekursor z uwagi na fakt, iż posiada reaktywną grupę trietoksylanową (C₂H₅O)₃Si- może ulegać reakcji współkondensacji z tetraetoksylanem, dzięki czemu barwnik jest chemicznie wiązany w strukturze nanoobjektu.
2. Proces tworzenia nanoobjektów – w mieszaninie wody, etanolu i amoniaku tetraetoksylan oraz grupa trietoksylanowa prekursora barwnika ulegają hydrolizie, dzięki czemu stają się zdolne do kondensacji. Każdy z parametrów tego procesu może być dowolnie zmieniany, niemniej skład mieszaniny reakcyjnej oraz temperatura wpływają na wielkość powstałych nanoobjektów.
3. Pokrywanie powierzchni powstałych nanoobjektów poprzez ligandy – w mieszaninie reakcyjnej powierzchnia nanoobjektów krzemionkowych pokryta jest przez grupy -OH. Grupy takie nie są jednak przyłączone w sposób trwały. W związku z powyższym do mieszaniny reakcyjnej po procesie wzrostu nanoobjektów wprowadzane są ligandy zawierające grupy, które mogą tworzyć trwałe wiązania z atomami krzemu. Dodatkowo ligandy powierzchniowe determinują właściwości fizykochemiczne powstałych nanoobjektów. Poprzez odpowiedni dobór ligandów można wytworzyć nanocząstki rozpuszczalne w wodzie lub rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych. Do procesu funkcjonalizacji powierzchni krzemionki można stosować ligandy HS-R albo (EtO)₃Si-R, w których R oznacza łańcuch alifatyczny, takie jak HS-C₁₂H₂₅.
4. Proces oczyszczania – wirowanie powstałych nanoobjektów ma za zadanie oddzielenie ich od zanieczyszczeń, takich jak np. resztki niezwiązanego barwnika czy też nadmiar ligandów. Wykorzystywany jest także do tego, aby przeprowadzić nanocząstki do innego rozpuszczalnika.

Sposób według wynalazku, nie ograniczając zakresu jego ochrony został bliżej przedstawiony w niżej podanym przykładzie. Wykresy DLS rejestrowano na aparacie ZETASIZER Nano Series (Nano-ZS) firmy Malvern wykorzystując kuwety kwarcowe.

Przykład 1

Sposób wytwarzania i kontroli wielkości nanoobjektów krzemionkowych poprzez zmianę ilości barwnika fluorescencyjnego zawartego w ich strukturze

Etap 1 – Przygotowanie roztworu prekursora barwnika

Do naczynia szklanego odważono 4,06 mg ($7,5735 \cdot 10^{-6}$ mola) izotiocyanianu rodaminu B. W kolejnym kroku dodano 2 ml (1,56497 g) etanolu o czystości 99,8% oraz 20 μ l (19,36 mg) APTES-u (aminopropylotrietoksylanu). Przygotowaną mieszaninę szczelnie zamknięto, osłonięto od światła, wstawiono do łaźni ultradźwiękowej i poddano działaniu ultradźwięków przez 60 sekund. Następnie do roztworu wprowadzono mieszadło magnetyczne, umieszczono na stoliku mieszadła magnetycznego i pozostawiono w temperaturze 25–28°C na 4 godziny. Trwałość przygotowanego roztworu prekursora przechowywanego w temperaturze do 4°C wynosi 36 godzin. Ilości substratów wykorzystane przy tworzeniu prekursora przedstawia Tabela 1.

Izotiocyanian rodaminu B	4,06 mg ($7,5735 \cdot 10^{-6}$ mol)
Etanol (99,8%)	2 ml (1,56497 g)
APTES	20 μ l (19,36 mg)

T a b e l a 1 – Ilości substratów wykorzystywane przy tworzeniu prekursora barwnika

Etap 2 – Wytwarzanie nanoobjektów krzemionkowych zawierających w swojej strukturze fluorescencyjny barwnik

Do sześciu szklanych fiolek wprowadzono odpowiednio 2,5190 g, 2,3636 g, 2,4804 g, 2,5014 g, 2,4710 g oraz 2,4640 g etanolu, o czystości 99,8%. Następnie dodano kolejno 96,1 mg, 92,0 mg, 102,6 mg, 100,6 mg, 102,3 mg oraz 105,0 mg stężonego amoniaku, o stężeniu 23,4%. Do każdej z fiolek wprowadzono mieszadło magnetyczne, szczelnie zamknięto i umieszczono w łaźni olejowej na stoliku mieszadła magnetycznego o temperaturze 55–60°C na 30 minut. Skład przygotowanych roztworów przedstawia Tabela 2.

	Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6
Etanol 99,8%	2,5190 g	2,3636 g	2,4804 g	2,5014 g	2,4710 g	2,4640 g
amoniak	96,1 mg	92,0 mg	102,6 mg	100,6 mg	102,3 mg	105,0 mg

T a b e l a 2 – Skład roztworów wykorzystanych do procesu wzrostu nanoobjektów

W kolejnym kroku w sześciu strzykawkach 1 ml odważono odpowiednio 55,3 mg, 99,0 mg, 156,1 mg, 216,1 mg, 269 mg, 333,5 mg przygotowanego w etapie 1 roztworu prekursora barwnika. W kolejnych sześciu strzykawkach odważono odpowiednio 115,6 mg, 111,8 mg, 119,4 mg, 123,3 mg, 121,0 mg oraz 122,0 mg tetraetoksylanu (TEOS). Następnie do każdej z fiolek wprowadzono jako pierwszy odważoną ilość prekursora barwnika, a następnie po minucie odważoną ilość TEOS-u. Do próbki 1 wprowadzono odpowiednio 55,3 mg odważonego prekursora barwnika oraz 115,6 mg TEOS-u. Dla próbki 2 było to 99 mg prekursora barwnika oraz 111,8 mg TEOS-u. Ilości dla poszczególnych próbek przedstawia Tabela 3.

	Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6
Prekursor barwnika	55,3 mg	99 mg	156,1 mg	216,1 mg	269 mg	333,5 mg
TEOS	115,6 mg	111,8 mg	119,4 mg	123,3 mg	121 mg	122 mg

T a b e l a 3 – Ilości prekursora barwnika oraz TEOS-u użyte do wzrostu nanoobjektów

Zawartość fiolek szczelnie zamknięto i pozostawiono na stoliku mieszadła magnetycznego, w temperaturze 55– 60°C na 6 dni.

Po tym czasie dla każdej z uzyskanych próbek wykonano pomiar średnicy przy użyciu techniki DLS. Pomiar wykonywano w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 1 cm. Do kuwety wprowadzano 1,3 ml etanolu oraz dodawano 200 μ l próbki. Uzyskane wyniki zestawiono w Tabeli 5 oraz na Fig. 3. Zmianę średnicy nanoobjektów krzemionkowych bez powierzchniowego ligandu w zależności od stężenia prekursora barwnika w mieszaninie reakcyjnej przedstawiono na Fig. 6.

W Tabeli 4 umieszczono informacje na temat składu mieszanin reakcyjnych dla próbek 1–6.

	Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6
Etanol 99,8%	2,5190 g	2,3636 g	2,4804 g	2,5014 g	2,4710 g	2,4640 g
Etanol z prekursora	0,0545 g	0,0975 g	0,1538 g	0,2129 g	0,2650 g	0,3286 g
Woda	0,0736 g	0,0705 g	0,0786 g	0,0771 g	0,0784 g	0,0804 g
amoniak	0,0224 g	0,0215 g	0,0240 g	0,0235 g	0,0239 g	0,0246 g
TEOS	0,1156 g	0,1118 g	0,1194 g	0,1233 g	0,1210 g	0,1220 g
Stosunek wagowy (NH ₃ : H ₂ O : Etanol)	1 : 3,29 : 115	1 : 3,28 : 114	1 : 3,28 : 119	1 : 3,28 : 115	1 : 3,28 : 115	1 : 3,26 : 113

T a b e l a 4 – Skład mieszanin reakcyjnych dla syntezowanych próbek 1–6

	Nanoobiekty po procesie syntezy (Etap 2)			Nanoobiekty po procesie funkcjonalizacji (Etap 3)			Nanoobiekty po procesie oczyszczania (Etap 4)		
	Średnica nanoobektu [nm]	Odchylenie standardowe [nm]	Stopień polidispersji	Średnica nanoobektu [nm]	Odchylenie standardowe [nm]	Stopień polidispersji	Średnica nanoobektu [nm]	Odchylenie standardowe [nm]	Stopień polidispersji
Próbka 1	22,73	8,048	0,107	26,53	8,975	0,112	27,21	8,849	0,100
Próbka 2	28,46	10,03	0,108	30,70	10,43	0,098	30,63	10,68	0,117
Próbka 3	39,17	13,16	0,098	39,68	13,27	0,087	39,38	13,79	0,108
Próbka 4	49,33	18,47	0,115	51,34	18,93	0,102	50,49	20,52	0,124
Próbka 5	66,79	26,09	0,103	69,50	27,98	0,114	72,49	27,53	0,108
Próbka 6	95,84	42,13	0,113	101,9	40,72	0,095	105,2	42,57	0,096

T a b e l a 5 – Średnica nanoobjektów zawierających rodaminowy fluorescencyjny rdzeń zmierzona za pomocą techniki DLS

Etap 3 – Pokrywanie powierzchni nanoobjektów krzemionkowych przez warstwę ligandu HS-C₁₂H₂₅ (funkcjonalizacja powierzchni nanoobjektów krzemionkowych)

Do sześciu szklanych fiolek wprowadzono po 2 ml etanolu, o czystości 99,8% oraz 0,4 ml ligandu HS-C₁₂H₂₅. Do każdej z fiolek wprowadzono mieszadło magnetyczne, szczelnie zamknięto i umieszczono w łaźni olejowej na stoliku mieszadła magnetycznego o temperaturze 55–60°C celem ogrzania. Następnie do fiolek wprowadzono po 2 ml próbek od 1 do 6 uzyskanych w etapie 2. Fiolki szczelnie zamknięto i intensywnie mieszając pozostawiono w łaźni olejowej o temperaturze 55–60°C na 4 dni.

Dla każdej z uzyskanych próbek ponownie wykonano pomiar DLS w sposób analogiczny jak w etapie 2 (Tabela 5, Fig. 4).

Zmianę średnicy nanoobjektów krzemionkowych pokrytych ligandem HS-C₁₂H₂₅ w zależności od stężenia prekursora barwnika w mieszaninie reakcyjnej przedstawiono na Fig. 6.

Etap 4 – Wydzielanie oraz oczyszczanie uzyskanych nanoobjektów

Zawartość każdej z fiolek / próbek uzyskanych po etapie 3 przeniesiono do falkonu wirówkowego wykonanego korzystnie z polipropylenu o objętości 15 ml. Następnie do każdego falkonu dodano 11 ml n-heksanu. Całość zamieszano i poddano wirowaniu z szybkością 9000 rpm przez 45 minut celem zwirowania nanoobjektów krzemionkowych. W kolejnym kroku z falkonów usunięto supernatant, do każdego dodano po 3 ml etanolu, a następnie uzyskane osady rozproszone w łaźni ultradźwiękowej. Do każdego z falkonów ponownie dodano 11 ml n-heksanu, całość zamieszano i ponownie poddano wirowaniu z szybkością 9000 rpm przez 45 minut. Proces wirowania, dekantacji oraz rozpraszania osadu w czystym etanolu powtórzono pięciokrotnie. W ostatnim kroku po usunięciu supernatantów, każdy z uzyskanych osadów rozproszone z wykorzystaniem ultradźwięków w 3 ml etanolu.

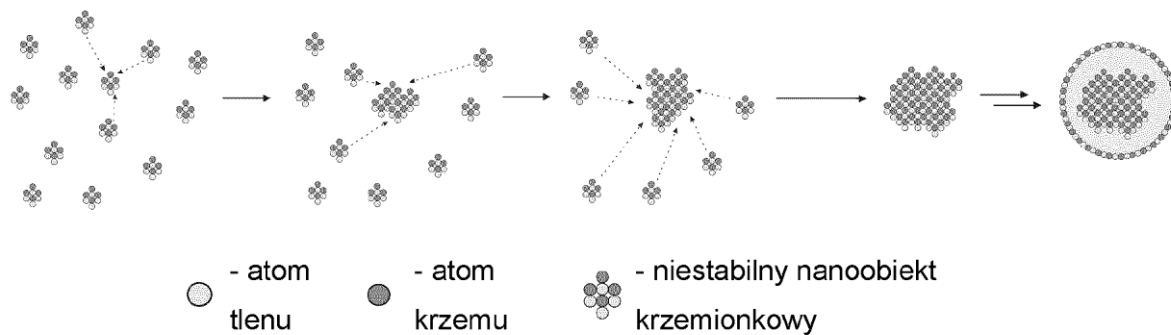
Dla każdej z uzyskanych próbek ponownie wykonano pomiar DLS w sposób analogiczny jak w etapie 2 (Tabela 5, Fig. 5).

Zmianę średnicy nanoobjektów krzemionkowych pokrytych ligandem HS-C₁₂H₂₅ uzyskanych po procesie oczyszczania w zależności od stężenia w mieszaninie reakcyjnej prekursora barwnika przedstawiono na Fig. 6.

Zastrzeżenia patentowe

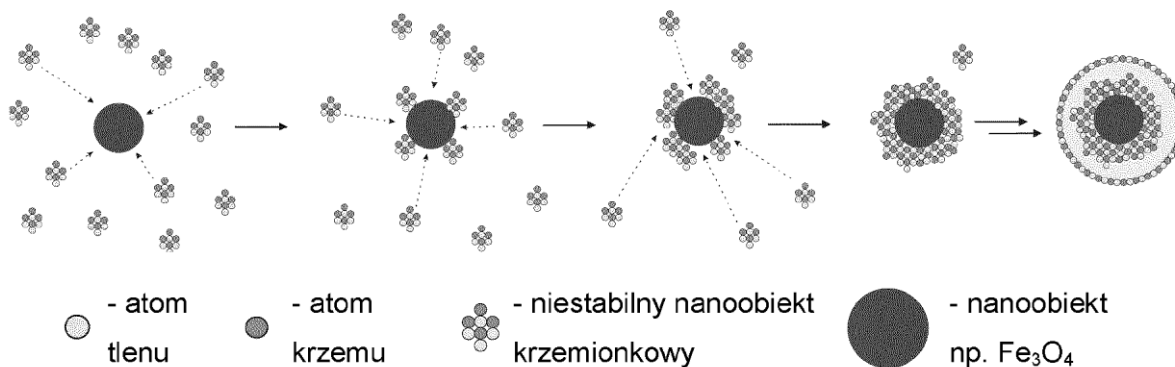
1. Sposób wytwarzania nanoobjektów krzemionkowych o wielkości od 20 do 100 nm zawierających w swojej strukturze barwnik fluorescencyjny obejmujący etapy, w których:
 - a) przygotowuje się roztwór prekursora barwnika poprzez zmieszanie fluorescencyjnego barwnika zawierającego grupę izotiocyjanianową, aminopropylotrietoksylanu oraz etanolu w temperaturze 25–28°C,
 - b) miesza się etanol z roztworem amoniaku, po czym dodaje się roztwór prekursora barwnika oraz tetraetoksylan,**znamienny tym**, że do mieszaniny etanolu, z wodą i amoniakiem w naczyniu reakcyjnym dodaje się roztwór prekursora barwnika, korzystnie dodaje się roztwór prekursora barwnika w ilości od 55 mg do 334 mg, i dodaje się tetraetoksylan, przy czym:
stosunek wagowy tetraetoksylanu do roztworu prekursora barwnika wynosi 115,6:55,3 do 122:333,5 wagowo,
zmiana stosunku ilości roztworu prekursora barwnika do ilości tetraetoksylanu pozwala na otrzymanie nanoobjektów o średnicach od 20 do 100 nm, i otrzymywanie nanoobjektów prowadzi się w temperaturze od 55°C do 60°C, przy stosunku wagowym NH₃/H₂O/etanol wynoszącym odpowiednio od 1/3,29/115 do 1/3,26/113,
proces wytwarzania nanoobjektów prowadzi się w czasie sześciu dni,
stosunek wagowy mieszaniny etanolu, wody i amoniaku do ilości roztworu prekursora barwnika wynosi od 2615,1 : 55,3 do 2569 : 333,5,
stosunek wagowy mieszaniny etanolu, wody i amoniaku do ilości tetraetoksylanu wynosi od 2814,9:123,3 do 2897,6:122 uwzględniając etanol z prekursora,
wraz ze wzrostem stosunku wagowego tetraetoksylanu do roztworu prekursora barwnika maleje średnica otrzymanych nanoobjektów krzemionkowych.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako barwnik fluorescencyjny zawierający grupę izotiocyjanianową stosuje się izotiocyjanian rodaminę B albo izotiocyjanian fluoresceiny.
3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że pokrywa się powierzchnię nanoobjektów krzemionkowych warstwą ligandu HS-R albo EtO₃-Si-R, w których R oznacza łańcuch alifatyczny -C₁₂H₂₅ w celu funkcjonalizacji powierzchni nanoobjektów krzemionkowych.
4. Sposób według zastrzeżenia 3, **znamienny tym**, że proces funkcjonalizacji powierzchni nanoobjektów krzemionkowych z wykorzystaniem ligandów tiolowych prowadzi się w temperaturze od 55 do 60°C w czasie czterech dni.

Rysunki



Mechanizm tworzenia stabilnych nanoobjektów krzemionkowych

Fig. 1



Mechanizm pokrywania nanoobjektów ochronną warstwą krzemionki

Fig. 2

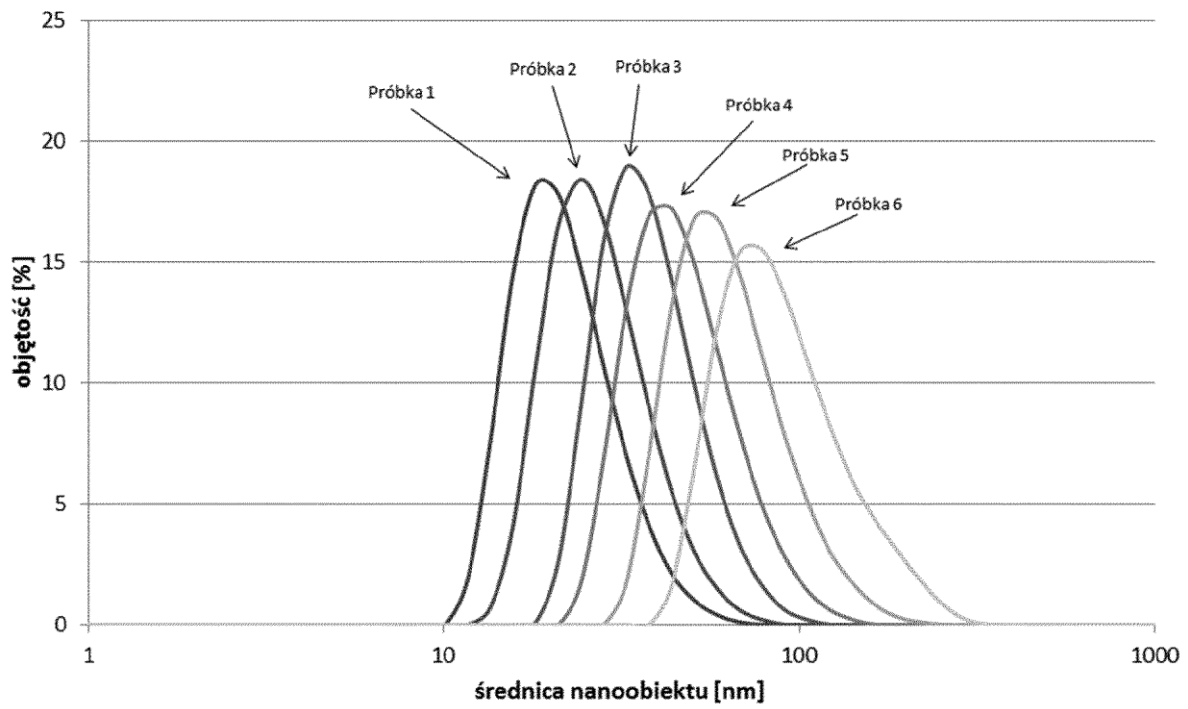


Fig. 3

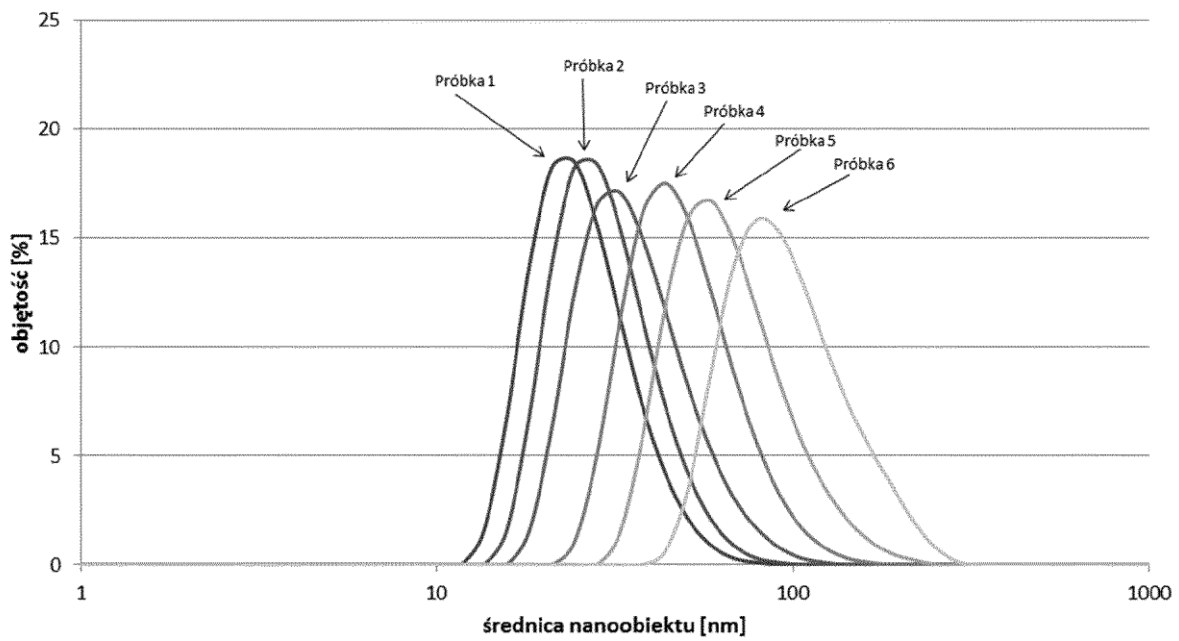


Fig. 4

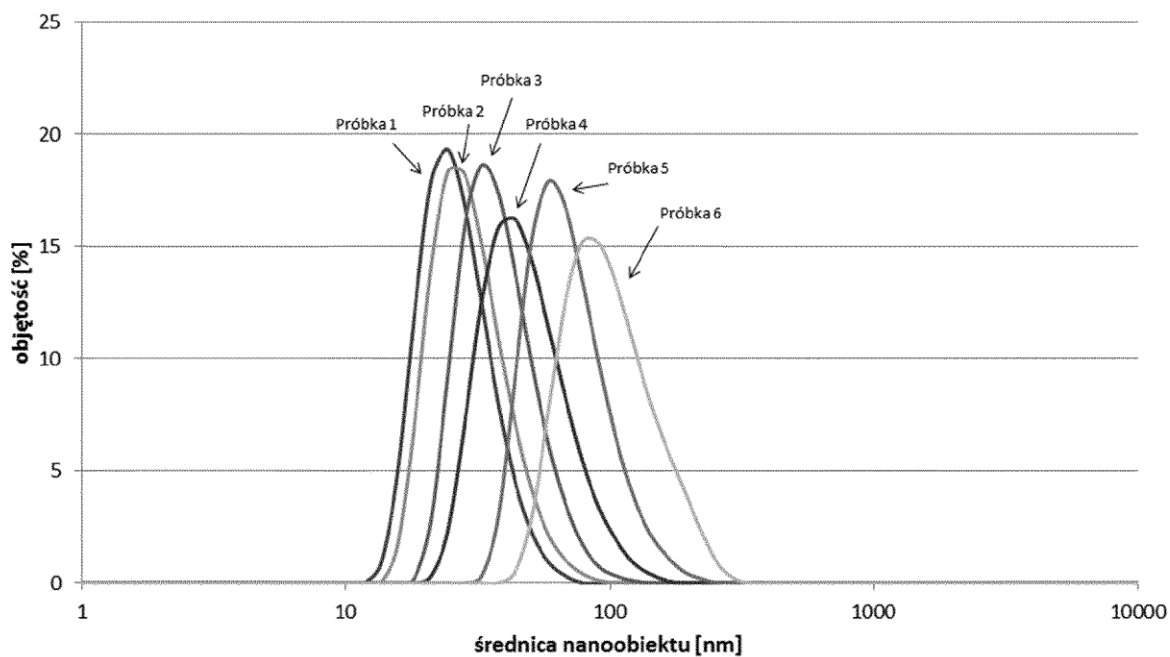
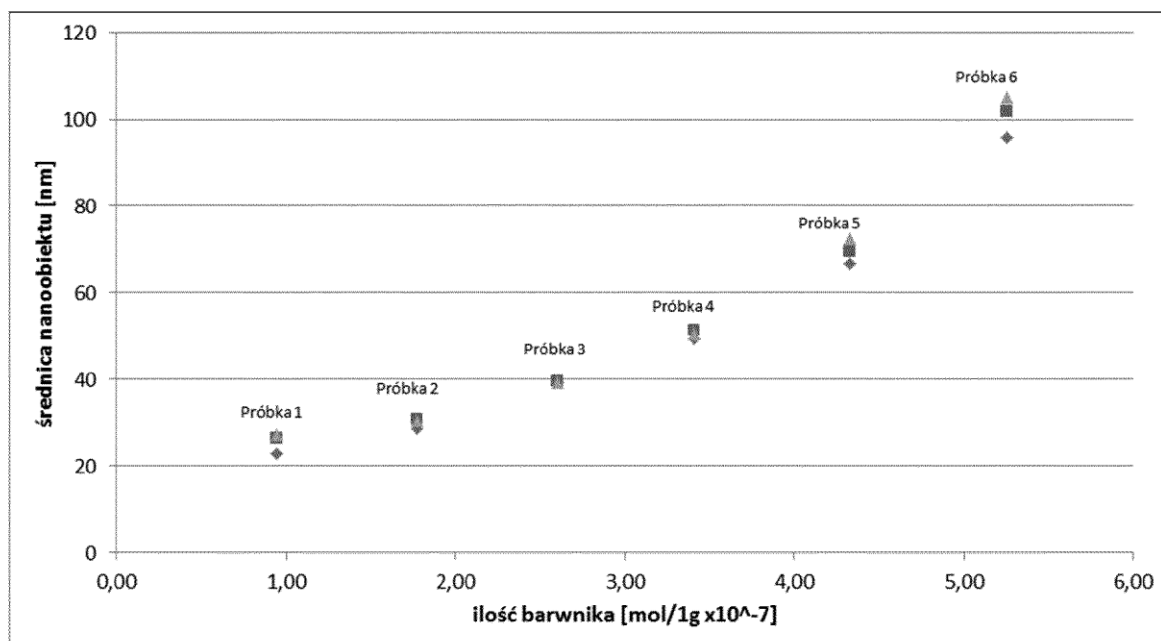


Fig. 5



- ◆ nanoobjekty krzemionkowe bez powierzchniowego ligandu (Etap 2)
- nanoobjekty krzemionkowe pokryte ligandem HS-C₁₂H₂₅ (Etap 3)
- ▲ nanoobjekty krzemionkowe pokryte ligandem HS-C₁₂H₂₅ po procesie oczyszczania (Etap 4)

Fig. 6