

5

Sposób wytwarzania pustych w środku nanocząstek srebra pokrytych nanometryczną warstwą krzemionki, puste w środku nanocząstki srebra pokryte nanometryczną warstwą krzemionki oraz ich zastosowanie jako nanorezonatorów

10

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania pustych w środku nanocząstek srebra pokrytych nanometryczną warstwą krzemionki, puste w środku nanocząstki srebra pokryte nanometryczną warstwą krzemionki oraz ich zastosowanie jako nanorezonatorów.

15

W praktyce często określa się skład chemiczny warstwy powierzchniowej różnych materiałów. Analizę taką można prowadzić wieloma zróżnicowanymi względem siebie metodami, przy czym znaczna część dostępnych technik badawczych pozwala jedynie na

określanie składu powierzchni próbki, która to próbka znajduje się w wysokiej próżni. W wielu przypadkach interesuje nas jednak wyznaczenie składu powierzchni badanego obiektu znajdującego się w warunkach *in situ*, czyli, na przykład, w płynach, takich jak na

przykład gaz o „normalnym” lub podwyższonym ciśnieniu lub też ciecz. Przeprowadzenie

analizy powierzchniowej próbki znajdującej się w cieczy lub powietrzu jest szczególnie

istotne w przypadku obiektów biologicznych, dla których umieszczenie próbki w próżni powoduje zazwyczaj nieodwracalną zmianę jej struktury, a nawet jej zniszczenie.

20

W roku 2010 Tian i wsp. [*Nature* 464 (2010), 392-395] zaproponowali nową technikę analityczną o nazwie *SHINERS* (od ang. *SHELL-Isolated Nanoparticle-Enhanced Raman Spectroscopy*), która pozwala na zarejestrowanie widma oscylacyjnego molekuł tworzących fazę powierzchniową (w tym próbek biologicznych) w warunkach *in situ*. Metoda ta polega na rejestracji widma Ramana z analizowanej powierzchni, która przed

przeprowadzeniem pomiaru pokrywana jest nanocząstkami metalu efektywnie podtrzymującego rezonans plazmonów powierzchniowych (określanymi również jako

nanorezonatory). Używane nanocząstki są otoczone bardzo cienką (rzędu kilku

30

nanometrów) przezroczystą warstwą ochronną (na przykład z SiO_2 , Al_2O_3), która chroni przed bezpośrednim kontaktem metalu z badaną próbką oraz pozwala na dopasowanie nanocząstek do różnych kształtów powierzchni próbki. Otrzymane w ten sposób nanorezonatory elektromagnetyczne, po ich osadzeniu na próbce, powodują lokalnie
5 znaczne zwiększenie natężenie pola elektrycznego promieniowania elektromagnetycznego padającego na próbkę. W przypadku rejestracji widma Ramana powierzchni pokrytej nanorezonatorami obserwuje się więc ogromny wzrost intensywności sygnału od molekuł znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie rezonatora. Stosując tę technikę badawczą można określać w warunkach *in situ* skład chemiczny powierzchni różnych układów, w
10 tym układów biologicznych (na przykład ścian komórkowych). Ideę pomiarów *SHINERS* ilustruje Figura 1.

Opracowując nowe materiały do pomiarów *SHINERS* testowano w stanie techniki różne materiały, z których otrzymywano nanorezonator (na przykład Au lub Ag), różny materiał warstwy ochronnej (na przykład SiO_2 , Al_2O_3 , MnO_2), różny kształt
15 nanorezonatora (nanorezonator kulisty, nanorezonator w postaci pręta) czy też różne rozmiary poszczególnych elementów nanoukładu [Lin i wsp., *J. Electroanal. Chem.* 688 (2013) 5-11]. Dodatkowo, dla zwiększenia wysokiej czułości, dobrej powtarzalności uzyskiwanych wyników oraz skuteczności utrzymywania natywnej konformacji biocząsteczek zaproponowano modyfikację powierzchni nanocząstek grupami anionowymi
20 (publikacja zgłoszeniowa CN103604798).

Jednakże, znane ze stanu techniki nanorezonatory wykazują pewne niedogodności, takie jak ograniczone zastosowanie w przypadku analizy z wykorzystaniem promieniowania laserowego o większej długości fali. W szczególności, w warunkach
25 takich istotnemu obniżeniu może ulec czułość pomiaru. Dlatego też wciąż istnieje zapotrzebowania na opracowanie nowych materiałów, które mogłyby być wykorzystywane w metodzie *SHINERS* bez wskazanych powyżej ograniczeń. Twórcy niniejszego wynalazku opracowali więc nowy rodzaj nanorezonatorów nadających się do tego celu.

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest sposób wytwarzania pustych w środku nanocząstek srebra pokrytych nanometryczną warstwą krzemionki obejmujący etapy:

a) wytwarzania pustych w środku nanocząstek srebra

b) pokrywania pustych w środku nanocząstek srebra nanometryczną warstwą krzemionki.

Korzystnie, puste w środku nanocząstki srebra otrzymuje się w etapie (a) przez wytwarzanie nanocząstek srebra, które następnie są kolejno utleniane do nanocząstek z
5 odpowiednich tlenków i zredukowane w obecności środków powierzchniowo czynnych.

Korzystniej, etap (a) sposobu według wynalazku prowadzi się przez

(i) wytwarzanie "pierwotnych" nanocząstek Ag,

(ii) utlenienie "pierwotnych" nanocząstek Ag do nanocząstek Ag₂O,

(iii) redukcję nanocząstek Ag₂O prowadzącą w pierwszej kolejności do pokrycia
10 nanocząstek Ag₂O warstwą srebra, której grubość stopniowo rośnie.

Najkorzystniej etap (a) sposobu według wynalazku prowadzi się jak opisano przez Moshe i Markovich [*Chem. Mater.* 23 (2011) 1239-1245].

W korzystnej postaci wykonania etap (b) sposobu według wynalazku prowadzi się przez zanurzenie pustych w środku metalicznych nanocząstek otrzymanych w etapie (a) w
15 roztworze alkoksylsilanu, a następnie przez dodanie roztworu zawierającego jony krzemianowe. Szczególnie korzystnie roztworem alkoksylsilanu jest 3-aminopropylotrimetoksylsilan. Równie korzystnie pokrywanie pustych w środku nanocząstek srebra warstwą krzemionki prowadzi się przez 3-5 dni z roztworu krzemianów (na przykład Na₂SO₄) o stężeniu 0,1-100 mM (najkorzystniej 9 mM) i o wartości pH w zakresie 7-13
20 (najkorzystniej 10-11). W tych warunkach uzyskuje się warstwę o odpowiedniej grubości.

Dużą zaletą opracowanego przez Twórców niniejszego wynalazku sposobu wytwarzania nanocząstek jest to, że w procesie szklenia (tj. w procesie pokrywania nanometryczną warstwą krzemionki), nanocząstki srebra pozostają stabilne. Na Figurze 1 przedstawiono zdjęcie TEM nanocząstek Ag pustych w środku i pokrytych krzemionką,
25 otrzymanych sposobem według wynalazku. Zgodnie z uzyskanym obrazem nanocząstki nie ulegają zniszczeniu w procesie szklenia.

Przedmiotem niniejszego wynalazku są także puste w środku nanocząstki srebra pokryte nanometryczną warstwą krzemionki.

W szczególności wynalazek dotyczy nanocząstek otrzymanych sposobem według wynalazku.

Puste w środku, pokryte nanometryczną warstwą krzemionki nanocząstki srebra według wynalazku znajdują zastosowanie jako nanorezonatory w metodzie *SHINERS*.
5 Dlatego też kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie nanocząstek według wynalazku jako nanorezonatorów w metodzie *SHINERS*. Zaletą stosowania opracowanego przez Twórców materiału do pomiarów *SHINERS* jest to, że w wielu przypadkach można uzyskać znacznie większą czułość analizy składu powierzchni. W porównaniu do zabezpieczonych SiO₂ nanorezonatorów znanych ze stanu techniki, stosowanie
10 nanocząstek według wynalazku jako nanorezonatorów w metodzie *SHINERS* umożliwia przesunięcie maksimum absorpcji promieniowania elektromagnetycznego w stronę dłuższych fal (patrz Figury 3 i 4). Dzięki przesunięciu pasma absorpcyjnego w stronę dłuższych fal w przypadku stosowania promieniowania laserowego o większej długości fali uzyskuje się lepsze parametry pracy nanorezonatora (przykłady zastosowań
15 przedstawiono w Przykładach 3 i 4 oraz na Figurach 5 i 6). Z zamieszczonych poniżej przykładów jednoznacznie wynika, że metoda *SHINERS* wykorzystująca nanocząstki według wynalazku jako nanorezonatory charakteryzuje się wyższą czułością.

Dodatkową zaletą rozwiązań według wynalazku jest to, że podczas wytwarzania nanocząstek według wynalazku na otrzymanie pustej w środku struktury zużywa się mniej
20 metalu szlachetnego niż jest to konieczne w przypadku wytwarzania analogicznej „pełnej w środku” struktury znanej ze stanu techniki.

Przedmiot niniejszego wynalazku uwidoczniono na rysunku, na którym:
Figura 1 przedstawia zasady znanych ze stanu techniki pomiarów *SHINERS*;
Figura 2 przedstawia obraz TEM nanocząstek według wynalazku;
25 Figura 3 przedstawia widma UV-vis: (a) dotychczas wytwarzanych („pełnych”) nanorezonatorów srebrnych zabezpieczonych warstwą SiO₂ oraz (b) otrzymanego przez Twórców niniejszego wynalazku produktu zawierającego zabezpieczone warstwą SiO₂ nanocząstki Ag puste w środku.

Figura 4 przedstawia widma Ramana: (a) płytki Au, na powierzchni której osadzono chemicznie monowarstwę kwasu p-merkaptobenzoesowego, (b) płytki Au, na powierzchni której osadzono chemicznie monowarstwę kwasu p-merkaptobenzoesowego, a następnie osadzono warstwę pustych w środku nanocząstek Ag zabezpieczonych warstwą nanometrycznej krzemionki. Długość linii wzbudzającej 532 nm.

Figura 5 przedstawia widma Ramana: (a) proszku parationu metylowego, (b) powierzchni czystej pomarańczy, (c) powierzchni pomarańczy skażonej parationem metylowym, (d) powierzchni pomarańczy skażonej parationem metylowym i pokrytej klasycznymi (pełnymi w środku) nanorezonatorami, (e) powierzchni pomarańczy skażonej parationem metylowym i pokrytej pustymi nanorezonatorami.

PRZYKŁADY

Przykład 1. Sposób wytwarzania pustych w środku nanocząstek Ag pokrytych nanometryczną warstwą krzemionki

Dla wytworzenia nanocząstek srebra pustych w środku do szklanego naczynka o pojemności 9 ml, umieszczonego na mieszadle magnetycznym, wprowadzono pipetą 2,6 ml zimnej wody destylowanej (z lodówki), a następnie dodano 150 μ l 10 mM roztworu azotanu srebra (AgNO_3) oraz 18 μ l 10 mM roztworu 1-glutationu. Kolejno dodano 0,5 ml 0,1 M roztworu NaOH i pH roztworu doprowadzono do wartości około 12, a roztwór zabarwił się na lekko żółty kolor. Następnie do roztworu dodano 180 μ l świeżo przygotowanego roztworu borowodorku sodu (NaBH_4) o stężeniu 10 mM, przy czym roztwór natychmiast zmienił barwę na czerwonawą.

W celu pokrycia nanocząstek srebra pustych w środku nanometryczną warstwą krzemionki do 3 ml zawiesiny nanocząstek dodano 0,04 ml 1 mM 3-aminopropylotrimetoksyilanu (APTMS) i mieszano przez 15 minut. Następnie dodano 0,32 ml świeżo przygotowanego roztworu krzemianu sodu o stężeniu 0,54%, przygotowanego przez zmieszanie 2,5 ml 1 M HCl i 1 ml 26,5% Na_2SiO_3 o stężeniu 26,5%. Roztwór mieszano przez 3 do 5 dni w temperaturze pokojowej, w zaciemnionym miejscu (pod przykryciem z folii aluminiowej). Tak przygotowane próbki dwukrotnie odwirowano przez 15 minut z szybkością 5000 obrotów/minutę (rpm) i przepłukano wodą

destylowaną, zebrano i usunięto supernatant (roztwór), zaś do osadu dodano 3 ml wody destylowanej.

Nanocząstki srebra puste w środku pokryte nanometryczną warstwą krzemionki wykazują silną absorpcję promieniowania w zakresie fal dłuższych niż obserwowane dla „pełnych” nanocząstek srebra. Znajduje to odzwierciedlenie w zabarwieniu roztworu koloidalnego tych nanocząstek.

Fig. 2 przedstawia zdjęcie TEM nanocząstek otrzymanych jak opisano w niniejszym przykładzie.

Przykład 2. (porównawczy) Sposób wytwarzania pełnych nanocząstek Ag pokrytych nanometryczną warstwą krzemionki

W celu wytworzenia pełnych nanocząstek srebra do okrągłodennej kolby o pojemności 250 ml wprowadzono 124,5ml wody destylowanej i dodano 0,5 ml roztworu AgNO_3 o stężeniu 45 ml/ml. Tak przygotowany roztwór doprowadzono, pod chłodnicą zwrotną, za pomocą czaszy grzejnej do wrzenia. Po zagotowaniu roztworu dodano 10 ml roztworu cytrynianu sodu przygotowanego poprzez zmieszanie 1,14 ml 5% roztworu cytrynianu sodu i 8,86 ml wody destylowanej. Roztwór wkrapłano powoli. Po wkropleniu roztwór utrzymywano w stanie wrzenia przez jedną godzinę. Po około 15 minutach pojawiło się charakterystyczne brązowe zabarwienie typowe dla pełnych nanocząstek srebra.

Przykład 3. Badanie właściwości pustych w środku nanocząstek Ag pokrytych nanometryczną warstwą krzemionki

Rejestracja widm UV-vis

Zarejestrowano widma UV-vis dla roztworów koloidalnych nanocząstek otrzymanych w Przykładzie 1 oraz w Przykładzie 2.

Na Fig. 3 przedstawiono zarejestrowane widma UV-vis. Jako (a) oznaczono widmo zarejestrowane dla nanocząstek znanych ze stanu techniki (otrzymanych w Przykładzie 2), a jako (b) widmo dla nanocząstek według wynalazku (otrzymanych w Przykładzie 1).

Z zarejestrowanych widm wynika, że maksimum absorpcji promieniowania elektromagnetycznego dla nanocząstek według wynalazku (otrzymanych w Przykładzie 1)

ulega przesunięciu w stronę dłuższych fal w porównaniu do nanocząstek znanych ze stanu techniki (otrzymanych w Przykładzie 2). Takie przesunięcie maksimum absorpcji w stronę dłuższych fal stanowi o istotnej zalecie nanocząstek według wynalazku, ponieważ umożliwia uzyskanie korzystniejszych parametrów pracy nanorezonatora w przypadku stosowania promieniowania laserowego o większej długości fali.

Rejestracja widm SERS dla kwasu para-merkaptobenzoesowego

Dla sprawdzenia właściwości nanocząstek według wynalazku (otrzymanych w Przykładzie 1) jako nanorezonatorów, zarejestrowano, z ich wykorzystaniem, widma SERS dla zaadsorbowanego na powierzchni złotej kwasu para-merkaptobenzoesowego i porównano z widmem zarejestrowanym dla tego samego układu (złoto – kwas para-merkaptobenzoesowego) zarejestrowanego pod nieobecność nanocząstek według wynalazku.

W celu przygotowania podłoży do pomiarów widm SERS cztery kawałki złotej blaszki, uprzednio oczyszczonej roztworem składającym się z 3 części objętościowych stężonego H_2SO_4 i 1 części objętościowej 30% H_2O_2 , wygrzano w piecu w temperaturze 975°C w celu kompletnego wygładzenia powierzchni. Następnie, blaszki te umieszczono na 24 godziny w nasyconym roztworze kwasu para-merkaptobenzoesowego (roztwór analitu). Kolejno blaszki wyciągnięto z roztworu i wodą destylowaną usunięto nadmiar analitu. Dla części tak uzyskanych próbek rejestrowano od razu widmo SERS. Na inne próbki przed zarejestrowaniem widma SERS naniesiono dodatkowo niewielką ilość nanocząstek według wynalazku otrzymanych w Przykładzie 1.

Wszystkie widma zebrano za pomocą obiektywu dalekosiężnego x50 firmy Olympus, przy użyciu lasera zielonego 532 nm. Przeciętny czas zbierania widma wynosił 2 x 30sekund (2 akwizycje po 30 sekund).

Zarejestrowane w ten sposób widma Ramana przedstawiono na Fig. 4, na której widmo oznaczane jako (a) jest widmem zarejestrowanym dla płytek Au, na powierzchni których osadzono chemicznie monowarstwę kwasu p-merkaptobenzoesowego, a widmo oznaczone jako (b) jest widmem zarejestrowanym dla płytek Au, na powierzchni których osadzono chemicznie monowarstwę kwasu p-merkaptobenzoesowego, po czym naniesiono

warstwę pustych w środku nanocząstek Ag zabezpieczonych warstwą krzemionki otrzymanych w Przykładzie 1.

Wzmocnienie pasm charakterystycznych dla analitu potwierdza, że nanocząstki według wynalazku doskonale nadają się do przeprowadzania analiz ramanowskich różnego
5 rodzaju materiałów, w tym w szczególności materiałów biologicznych.

Przykład 4. Wykorzystanie pustych w środku nanocząstek Ag pokrytych nanometryczną warstwą krzemionki do badania metodą SHINERS skażenia powierzchni pomarańczy parationem metylovym

Dla potwierdzenia większej czułości analizy SHINERS z zastosowaniem
10 nanocząstek według wynalazku zarejestrowano widma Ramana dla (a) proszku parationu metylovego (związek z grupy związków fosforoorganicznych wchodzący w skład owadobójczych środków ochrony roślin), (b) powierzchni czystej pomarańczy, (c) powierzchni pomarańczy skażonej parationem metylovym, (d) powierzchni pomarańczy skażonej parationem metylovym i pokrytej nanorezonatorami ze stanu techniki
15 (nanocząstki otrzymane w Przykładzie 2), oraz (e) powierzchni pomarańczy skażonej parationem metylovym i pokrytej nanocząstkami według wynalazku (nanocząstki otrzymane w Przykładzie 1).

Do rejestracji wyżej wskazanych widm stosowano laser zielony 532 nm i obiektyw dalekosiężny 50x firmy Olympus, w czasie pomiaru nie używano żadnego filtra.

Najpierw zarejestrowano widma samej skórki pomarańczy. Otrzymane widmo
20 pochodzi od barwników karotenowych zawartych w skórce pomarańczy (widmo (b) na Fig. 5). Następnie przygotowano roztwór parationu metylovego, po czym jego niewielką ilość nakroplono na ściereczkę i przetarto nią powierzchnię skórki pomarańczy, którą pozostawiono do wyschnięcia. Kolejno zbierano widma ramanowskie (widmo (c) na Fig.
25 5). Następnie na skórkę pokrytą parationem metylovym наносono odpowiednio nanorezonatory ze stanu techniki (nanocząstki z Przykładu 2) albo nanocząstki według wynalazku (nanocząstki z Przykładu 1). Zarejestrowane widma dla tych układów przedstawiono na Fig. 5 jako widmo (d) i (e), odpowiednio.

W przypadku widm rejestrowanych na nanocząstkach srebra pustych w środku pokrytych nanometrycznej grubości warstwą krzemionki (tj. nanocząstek według wynalazku), widoczny jest dodatkowy pik, który pochodzi od drgań rozciągających grupy nitrowej ($-\text{NO}_2$).

- 5 Fakt, że pik ten nie jest widoczny na innych widmach rejestrowanych na skórcie pomarańczy, wskazuje, że metoda *SHINERS* wykorzystująca nanocząstki według wynalazku charakteryzuje się dużo wyższą czułością.

Dla porównania, na Fig. 5 dodatkowo przedstawiono widmo Ramana zarejestrowane dla proszku parationu metylowego.