



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128852** (13) **C2**
(51) МПК (2024.01)

G01N 21/00
B01J 13/00
B82Y 10/00
B82Y 20/00
B82Y 40/00
G01N 21/65 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: a 2022 00602	(72) Винахідник(и): Піотті Марсело Едуардо (US), Шеффлер Раймонд Г. (US), Ковальські Марк (US)
(22) Дата подання заявки: 13.07.2020	(73) Володілець (володільці): СІКПА ХОЛДІНГ СА, Avenue de Florissant 41, 1008 Prilly, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 07.11.2024	(74) Представник: Соклаков Антон Олександрович, реєстр. №506
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/874,158, 19192040.4, 20163879.8	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2008118986 A1, 22.05.2008 US 2008081340 A1, 03.04.2008 US 2008003576 A1, 03.01.2008 US 2005142567 A1, 30.06.2005 US 2012156491 A1, 21.06.2012 WO 2011/119589 A1, 29.09.2011 WO 2016/059429 A1, 21.04.2016 US 2006038979 A1, 23.02.2006 WO 2016/086999 A1, 09.06.2016
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 15.07.2019, 16.08.2019, 18.03.2020	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US, EP, EP	
(41) Публікація відомостей про заявку: 23.03.2022, Бюл.№ 12	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 06.11.2024, Бюл.№ 45	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/EP2020/069684, 13.07.2020	

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ МІТОК ДЛЯ ПОВЕРХНЕВО-ПІДСИЛЕНОЇ РАМАНІВСЬКОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ

(57) Реферат:

Даний винахід належить до галузі способів виготовлення міток поверхнево-підсиленої раманівської спектроскопії (SERS). Спосіб виготовлення згідно із даним винаходом є відтворюваним і універсальним і дозволяє доцільним чином утворювати великі кількості SERS-міток, що характеризуються вузьким розподілом за розмірами і високою часткою агрегатів з малим числом. SERS-мітки, виготовлені заявленим способом виготовлення, описаним у даному документі, забезпечують підвищені відповіді SERS групи.

UA 128852 C2

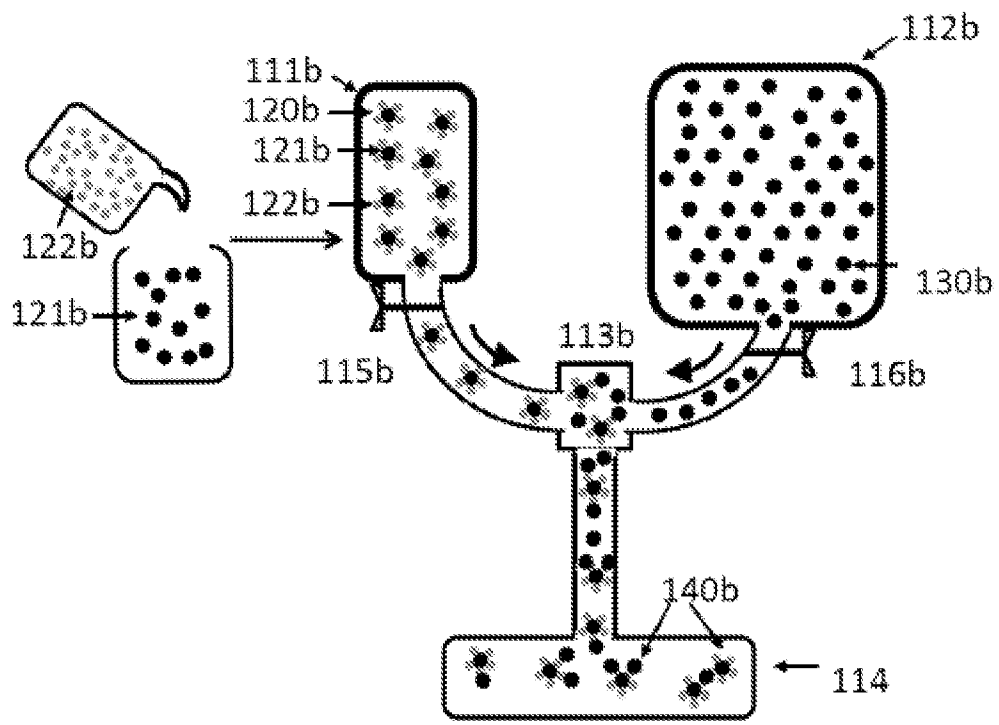


Fig. 1b

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід відноситься до галузі способів виготовлення міток поверхнево-підсиленої раманівської спектроскопії (SERS). Спосіб виготовлення згідно із даним винаходом є відтворюваним і універсальним і дозволяє доцільним чином утворювати великі кількості SERS-міток, що характеризуються вузьким розподілом за розмірами і високою часткою агрегатів з малим числом. SERS-мітки, виготовлені заявленим способом виготовлення, описаним у даному документі, забезпечують підвищені відповіді SERS групи.

Передумови створення винаходу

Мітки поверхнево-підсиленої раманівської спектроскопії (SERS) виявилися корисними для безлічі застосувань, включаючи нанесення етикеток на продукти для цілей ідентифікації й автентифікації, а також високопродуктивний мультиплексний скринінг у технології мікрочіпів, діагностики та біоіміджингу. SERS-мітки являють собою агрегати наночастинок з плазмонною поверхнею та адсорбованими на їхній поверхні активними репортерними молекулами раманівського розсіювання. Наночастинки з плазмонною поверхнею відповідають за генерування електричного поля, необхідного для раманівського розсіювання, у той час як активна репортерна молекула раманівського розсіювання забезпечує унікальний вібраційний відбиток SERS-мітки. Зазвичай агрегати є зовнішнім шаром покриття, який а) ізолює SERS-мітку від зовнішнього середовища, тим самим запобігаючи вимиванню активних репортерних молекул раманівського розсіювання з SERS-мітки та захищаючи SERS-мітку від забруднення зовнішнього середовища, яке може призвести до вібраційного шуму, б) збільшує колоїдну стабільність SERS-мітки та с) забезпечує зручну поверхню для подальшої хімічної функціоналізації. На сьогоднішній день як зовнішні шари покриття використовуються полімери та діоксид кремнію.

Через сильну залежність плазмонних властивостей від агрегованих станів наночастинок виробництво SERS-міток з великою кількістю агрегатів з малим числом є дуже бажаним для одержання збільшених SERS-відповідей у групі. SERS-мітки з великою кількістю агрегатів з малим числом одержували або за допомогою методів постсинтетичного сортування, або за допомогою процесів синтезу з контрольованою агрегацією.

Наприклад, фракціонування у потоці за наявності поля, застосовуване до суміші, що містить окремі наночастинки й агрегати наночастинок розміром від димерів до октамерів, привело до одержання фракції, збагаченої димерними (10 %), тримерними (21 %) і тетрамерними (13 %) SERS-мітками, але яка, проте, містила високу відсоткову частку одиночних наночастинок (52 %) (J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 10903-10910). Суміш, що містить окремі наночастинки й агрегати розміром від димерів до додекамерів, була збагачена димерними (52 %) і тримерними (32 %) SERS-мітками за допомогою центрифужного способу постсинтетичного сортування у високов'язкому середовищі із градієнтом щільності, такому як водне середовище із градієнтом щільності йодиксанолу (US9802818B2). Крім того, що методи постсинтетичного сортування є трудомісткими та дорогими, для них необхідним є застосування жорстких умов (у випадку, наприклад, високов'язких реагентів), які приводять до дестабілізації SERS-міток без покриття. Таким чином, методи постсинтетичного сортування є сумісними лише з SERS-мітками, що мають покриття з діоксиду кремнію або полімеру. Отже, процеси синтезу з контрольованою агрегацією мають значну перевагу для виробництва SERS-міток з вузьким розподілом за розмірами і високим співвідношенням агрегатів з малим числом.

Агрегація з використанням твердої підкладки дозволила одержати SERS-мітки з вузьким розподілом за розміром. У публікації Ruan і співавт. (Adv. Optical Mater. 2014, 2, 65-73) описано синтез SERS-міток з асиметричними центральною та периферичною структурами, що мають деяку кількість, тобто 18 ± 2 , периферичних структур у вигляді наносфер Au із середнім діаметром 24 нм на центральну структуру у вигляді наносфери Au із середнім діаметром 180 нм. Синтез передбачає адсорбцію стабілізованих цетилтриметиламонію бромідом центральних структур наночастинок Au на покритому оксидом індію й олова предметному склі або кремнієвій пластинці з наступним зануренням функціоналізованої твердої підкладки у розчин 4-амінотіофенолу у воді/ацетонітрилі для адсорбції активної репортерної молекули раманівського розсіювання на поверхні наночастинок Au і наступним зануренням на 1 годину у суспензію наночастинок Au із середнім діаметром 24 нм. Агрегатний стан SERS-міток можна відслідковувати шляхом контролю часу занурення функціоналізованої твердої підкладки у суспензію периферичних наночастинок Au та/або зменшення концентрації периферичних наночастинок Au у вказаній суспензії. В основі способу, описаного Ruan і співавт., лежить застосування такої поверхнево-активної речовини як цетилтриметиламонію бромід, для стабілізації колоїду Au, що значно зменшує поверхню, доступну для адсорбції активної репортерної молекули раманівського розсіювання, на центральній структурі наночастинок Au і

тим самим інтенсивність SERS-сигналу, подаваного SERS-мітками. Для зв'язування периферичних наночастинок Au із центральною структурою наночастинок Au у способі агрегації застосовують активні репортерні молекули раманівського розсіювання, що володіють двома функціональними групами зі спорідненістю до поверхні з Au. Таким чином, даний спосіб є застосовним лише для одержання SERS-міток, що містять активні репортерні молекули раманівського розсіювання, у яких є дві функціональні групи зі спорідненістю до поверхні з Au, що являє собою серйозне обмеження з погляду застосування активних репортерних молекул раманівського розсіювання як "відбитка" SERS-мітки. Більше того, при вказаному способі необхідним є тривалий час реакції, і він не є придатним для рентабельного одержання великих кількостей SERS-міток.

Ще один спосіб складання SERS-міток з вузьким розподілом за розмірами з використанням твердої підкладки був описаний Yoop і співавт. (ACS Nano 2012, 8, 7199-7208). В основі способу лежать залежні від розміру схильності наночастинок Au, адсорбованих на предметних стеклах з функціональними аміногрупами, і застосування алкандитолів для зв'язування периферичних наночастинок Au із центральною структурою наночастинок Au. Були одержані SERS-мітки з 13 ± 3 периферичними наночастинками Au із середнім діаметром 13 нм на центральну структуру наночастинок Au із середнім діаметром 51 нм. Спосіб, розроблений Yoop і співавт., зважаючи на все, дозволяє включати будь-яку активну репортерну молекулу раманівського розсіювання у SERS-мітку. Однак вказаний спосіб має обмеження з погляду розмірів наночастинок Au, які можна використовувати, і поверхні центральної структури наночастинок Au, доступної для активних репортерних молекул раманівського розсіювання. Більше того, при даному способі необхідним є тривалий час реакції, і він не є придатним для рентабельного одержання великих кількостей SERS-міток.

Таким чином, залишається потреба у відтворюваних, рентабельних і універсальних способах виготовлення SERS-міток, які дозволяють доцільним чином утворювати великі кількості SERS-міток, що характеризуються вузьким розподілом за розмірами і високою часткою агрегатів з малим числом. Для одержання збільшених погоджених SERS-відповідей дуже необхідними є SERS-мітки з великою кількістю агрегатів з малим числом.

Короткий опис винаходу

Відповідно, метою даного винаходу є створення універсального, рентабельного та відтворюваного способу виготовлення SERS-міток, який дозволяє доцільним чином утворювати великі кількості SERS-міток, що характеризуються вузьким розподілом за розмірами і високою часткою агрегатів з малим числом. Це досягається за допомогою реалізації способу виготовлення міток для поверхнево-підсиленої раманівської спектроскопії (SERS), переважно SERS-міток для застосування як захисного елемента, що передбачає наступні стадії:

а) одержання першого колоїду, що фактично складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром, диспергованих у водному розчиннику, та стабілізуючого засобу, адсорбованого на поверхні вказаних наночастинок, та характеризується значенням ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ;

б) одержання другого колоїду, що фактично складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром, диспергованих у водному розчиннику, активних репортерних молекул раманівського розсіювання, адсорбованих на поверхні вказаних наночастинок, та стабілізуючого засобу, адсорбованого на поверхні вказаних наночастинок, та характеризується значенням ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ;

в) об'єднання першого колоїду із другим колоїдом таким чином, щоб співвідношення кількості наночастинок першого колоїду та кількості наночастинок другого колоїду становило від приблизно 25:1 до приблизно 1:1, переважно від приблизно 5:1 до приблизно 1:1, більш переважно від 4:1 до приблизно 3:1 з одержанням третього колоїду;

г) індукцію агрегації наночастинок за допомогою будь-якої зі стадій d1)-d3) або їхньої комбінації:

d1) змішування третього колоїду, одержаного на стадії в), при рН у діапазоні від приблизно 2,2 до найнижчого значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання мають сумарний електричний заряд від 0 до 0,3;

d2) додавання розчину солі, переважно розчину неорганічної солі, до третього колоїду, одержаного на стадії в);

d3) додавання водорозчинного розчинника до третього колоїду, одержаного на стадії в); та е) зупинку агрегації.

Переважно, стадія б) у заявленому та описаному у даному документі способі передбачає наступні стадії, здійснювані у порядку b1)-b3):

b1) одержання колоїду, що фактично складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром, диспергованих у водному розчиннику, та стабілізуючого засобу, адсорбованого на поверхні вказаних наночастинок, та характеризується значенням ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ;

5 b2) доведення рН колоїду до найнижчого значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання, які повинні адсорбуватися на поверхні наночастинок, не несуть сумарний електричний заряд, при цьому підтримуючи значення ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ, переважно є нижчим -40 мВ; та

10 b3) додавання розчину активних репортерних молекул раманівського розсіювання у розчиннику до колоїду, одержаного на стадії b2), при цьому підтримуючи значення ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ.

У додатковому переважному варіанті здійснення стадії c) та d) здійснюють одночасно у проточній системі безперервної дії. У додатковому переважному варіанті здійснення розмір наночастинок у першому колоїді відрізняється від розміру наночастинок у другому колоїді.

15 Як проілюстровано за допомогою прикладів E1–E14, заявлений у даному документі спосіб дозволяє інтегрувати ряд активних репортерних молекул раманівського розсіювання у SERS-мітку та не обмежений комбінацією конкретних розмірів наночастинок, що дозволяє також синтезувати SERS-мітки, що містять наночастинок з однаковим розміром, що підтверджується, наприклад, прикладами E1-E8 та E12-E14. Додатково, заявлений та описаний у даному

20 документі спосіб виготовлення дозволяє одержати SERS-мітки з вузьким розподілом за розмірами, як проілюстровано, наприклад, на фіг. 3a та фіг. 3b, і високим співвідношення агрегатів з малим числом, як проілюстровано, наприклад, на фіг. 3a та фіг. 3b, і характеризується значно більш коротким часом реакції у порівнянні зі способами, відомими з літератури.

25 Короткий опис креслень

На фіг. 1a схематично зображено спосіб виготовлення SERS-міток згідно із даним винаходом. Спосіб виготовлення передбачає об'єднання другого колоїду (120a), що фактично складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром (121a), диспергованих у водному розчиннику (не показаний), при цьому наночастинок мають

30 адсорбовані на їхній поверхні активні репортерні молекули раманівського розсіювання (122a) і стабілізуючий засіб (не показаний), з першим колоїдом, що фактично складається із наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром (130a), диспергованих у водному розчиннику (не показаний), при цьому наночастинок мають адсорбований на їхній поверхні стабілізуючий засіб (не показаний), й індукцію агрегації наночастинок із одержанням SERS-міток (140a).

На фіг. 1b схематично представлено варіант здійснення способу виготовлення SERS-міток згідно із даним винаходом. У даному конкретному способі виготовлення проточний реактор безперервної дії містить два резервуари (111b, 112b) під тиском, трійник (113b) і резервуар (114b) для збору, при цьому кожен із двох резервуарів (111b, 112b) під тиском з'єднаний за

40 допомогою трубки із трійником (113b), який сам з'єднаний за допомогою трубки з резервуаром (114b) для збору. Спосіб виготовлення передбачає об'єднання й одночасне змішування при рН у діапазоні від приблизно 2,2 до найнижчого значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання мають сумарний електричний заряд від 0 до 0,3, у трубці, що з'єднує трійник (113b) з резервуаром (114b) для збору проточного реактора безперервної дії, першого колоїду, що подається з резервуара (112b) під тиском та фактично складається з

45 наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром (130b), диспергованих у водному розчиннику (не показаний), при цьому вказані наночастинок мають адсорбований на їхній поверхні стабілізуючий засіб (не показаний), із другим колоїдом (120b), що подається з резервуара (111b) під тиском та фактично складається із наночастинок з плазмонною

50 поверхнею та по суті однаковим розміром (121b), диспергованих у водному розчиннику (не показаний), при цьому вказані наночастинок мають адсорбовані на їхній поверхні активні репортерні молекули (122b) раманівського розсіювання та стабілізуючий засіб (не показаний). Змішування при рН у діапазоні від приблизно 2,2 до найнижчого значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання мають сумарний електричний заряд від 0 до

55 0,3, індукуює агрегацію наночастинок. Стадію агрегації зупиняють у резервуарі (114b) для збору, тим самим одержуючи цільові SERS-мітки (140b).

На фіг. 1c схематично представлено варіант здійснення способу виготовлення SERS-міток згідно із даним винаходом. У даному конкретному способі виготовлення проточний реактор безперервної дії містить три резервуари (111c, 112c, 150c) під тиском, трійник (113c) і резервуар (114c) для збору. Кожен із двох резервуарів (111c, 112c) під тиском з'єднаний за допомогою

60

трубки із трійником (113с), який сам з'єднаний за допомогою трубки з резервуаром (114с) для збору. Спосіб виготовлення передбачає об'єднання й одночасне змішування при рН у діапазоні від приблизно 2,2 до найнижчого значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання мають сумарний електричний заряд від 0 до 0,3, у трубці, що з'єднує

5 трійник (113с) з резервуаром (114с) для збору проточного реактора безперервної дії, першого колоїду, що подається з резервуара (112с) під тиском та фактично складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром (130с), диспергованих у водному розчиннику (не показаний), при цьому наночастинки мають адсорбований на їхній поверхні стабілізуючий засіб (не показаний), із другим колоїдом (120с), що подається з резервуара (111с)

10 під тиском та фактично складається із наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром (121с), диспергованих у водному розчиннику (не показаний), при цьому вказані наночастинки мають адсорбовані на їхній поверхні активні репортерні молекули (122с) раманівського розсіювання та стабілізуючий засіб (не показаний). Змішування при рН у діапазоні від приблизно 2,2 до найнижчого значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання мають сумарний електричний заряд від 0 до 0,3, індукує агрегацію наночастинок. Стадію агрегації зупиняють шляхом введення води, що зберігається у резервуарі (150с) під тиском, у трубку, що веде у резервуар (114с) для збору, для того, щоб розвести колоїд, шляхом введення основного розчину, що зберігається у резервуарі (150с) під тиском, у трубку, що веде у резервуар (114с) для збору, шляхом введення полімеру, що зберігається у резервуарі (150с) під тиском, у трубку, що веде у резервуар (114с) для збору, або шляхом введення попередника діелектричного матеріалу, що зберігається у резервуарі (150с) під тиском, у трубку, що веде у резервуар (114с) для збору, тим самим одержуючи цільові SERS-мітки (140с).

На фіг. 2а-с проілюстровано зміну інтенсивності SERS-сигналу з часом реакції агрегації: на

25 фіг. 2а показано зміну інтенсивності SERS з часом реакції агрегації у SERS-міток, виготовлених так, як описано у прикладі E1; на фіг. 2b показано зміну інтенсивності SERS з часом реакції агрегації у SERS-міток, виготовлених так, як описано у прикладі E14; на фіг. 2с показано зміну інтенсивності SERS з часом реакції агрегації у SERS-міток, виготовлених так, як описано у прикладі E13. Горизонтальна вісь відповідає часу реакції агрегації у секундах, а вертикальна вісь відповідає SERS-відповіді при збудженні на 785 нм. Реєстровану інтенсивність SERS вимірювали із часом для акумулювання заряду світлодіодом 100 мс кожену 1 секунду при заданій концентрації золота, і для даної інтенсивності сигналу встановлювали кореляцію зі зразками, розведеними до 12,5 мкг Au/мл та піддаваними скануванню з 1-секундним часом для акумулювання заряду світлодіодом.

35 На фіг. 3а-б представлено SEM-зображення, одержані від SERS-міток, що містять наночастинки різних розмірів і виготовлених згідно з прикладом E9 (фіг. 3а) та 10 (фіг. 3б). Як підтверджується SEM-зображеннями, SERS-мітки, виготовлені згідно із даним винаходом, є збагаченими агрегатами з малим числом, такими як димери, тримери та тетрамери, і мають вузький розподіл за розмірами.

40 Фіг. 4 являє собою графік, що ілюструє значення ζ -потенціалу першого колоїду A2 (на графіку зображений зафарбованими колами) і других колоїдів D2 (на графіку зображений зафарбованими трикутниками), D5 (на графіку зображений зафарбованими ромбами) та D6 (на графіку зображений зафарбованими квадратами), при титруванні вказаних колоїдів водним розчином 1 н. HCl або водним розчином 1 н. NaOH. Горизонтальна вісь відповідає значенню рН, а вертикальна вісь відповідає значенню ζ -потенціалу (мВ). Умови, при яких була видна агрегація (тобто колоїди були нестабільними), обведені колом. Як підтверджується фіг. 4, ряд колоїдів, що характеризуються значенням ζ -потенціалу нижче -25 мВ, були стабільними. Такі колоїди можна застосовувати як перший і другий колоїди, відповідно, у способі виготовлення згідно із даним винаходом.

50 На фіг. 5 проілюстровано розвиток значень інтенсивності SERS-сигналу у колоїдів, що агрегують у проточній системі. Кожне вимірювання проводили на 1-метрових мітках уздовж 7-м прозорої трубки з FEP. Дані, представлені ромбами, з'єднаними суцільний лінією, були одержані на SERS-мітках, одержаних так, як описано у прикладі E8. Дані, представлені колами, з'єднаними пунктирною лінією, були одержані на SERS-мітках, одержаних так, як описано у

55 прикладі E11.

Докладний опис
Визначення

Для трактування значення термінів, розглянутих в описі та викладених у формулі винаходу, повинні використовуватися наступні визначення.

У контексті даного документа форма однини об'єкта вказує на один об'єкт або більше і необов'язково обмежує об'єкт одністю.

У контексті даного документа мається на увазі, що термін "щонайменше" означає один або декілька, наприклад, один, або два, або три.

5 Термін "який/що містить" у контексті даного документа є невинятковим та таким, що допускає внесення змін. Таким чином, наприклад, розчин, який містить сполуку А, може окрім А містити й інші сполуки. Разом з тим термін "який/що містить" охоплює, як і його конкретний варіант здійснення, також більш виняткові значення "який/що складається по суті з" та "який/що складається з", так що, наприклад, "розчин, який містить А, В та необов'язково С" також може (в основному) складатися з А та В або (в основному) складатися з А, В та С.

10 Коли даний опис стосується "переважних" варіантів здійснення/ознак, комбінації цих "переважних" варіантів здійснення/ознак також слід розглядати як розкриті до тих пір, поки дана комбінація "переважних" варіантів здійснення/ознак має значення з технічної точки зору.

15 У контексті даного документа термін "приблизно" означає, що зазначена кількість або величина може мати конкретне визначене значення або деяке інше значення, сусіднє з ним. Загалом, термін "приблизно", який означає певне значення, призначений для зазначення діапазону у межах $\pm 5\%$ значення. Як один приклад, фраза "приблизно 100" означає діапазон 100 ± 5 , тобто діапазон від 95 до 105. Переважно, діапазон, позначений терміном "приблизно", означає діапазон у межах $\pm 3\%$ значення, більш переважно - $\pm 1\%$. Загалом, при використанні терміну "приблизно" можна очікувати, що подібні результати або ефекти згідно із даним винаходом можуть бути одержані у діапазоні $\pm 5\%$ зазначеного значення.

20 Зненацька було виявлено, що спосіб виготовлення міток для поверхнево-підсиленої раманівської спектроскопії (SERS), переважно SERS-міток для застосування як захисного елемента, що передбачає наступні стадії:

25 а) одержання першого колоїду, що фактично складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром, диспергованих у водному розчиннику, та стабілізуючого засобу, адсорбованого на поверхні вказаних наночастинок, та характеризується значенням ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ;

30 б) одержання другого колоїду, що фактично складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром, диспергованих у водному розчиннику, активних репортерних молекул раманівського розсіювання, адсорбованих на поверхні вказаних наночастинок, та стабілізуючого засобу, адсорбованого на поверхні вказаних наночастинок, та характеризується значенням ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ;

35 в) об'єднання першого колоїду із другим колоїдом таким чином, щоб співвідношення кількості наночастинок першого колоїду та кількості наночастинок другого колоїду становило від приблизно 25:1 до приблизно 1:1, переважно від приблизно 5:1 до приблизно 1:1, більш переважно від приблизно 4:1 до приблизно 3:1 з одержанням третього колоїду;

40 д) індукцію агрегації наночастинок за допомогою будь-якої зі стадій d1)-d3) або їхньої комбінації:

d1) змішування третього колоїду, одержаного на стадії в), при рН у діапазоні від приблизно 2,2 до найнижчого значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання мають сумарний електричний заряд від 0 до 0,3;

d2) додавання розчину солі, переважно розчину неорганічної солі, до третього колоїду, одержаного на стадії в);

45 d3) додавання водорозчинного розчинника до третього колоїду, одержаного на стадії в); та е) зупинку агрегації;

забезпечує рентабельним і доцільним чином велику кількість SERS-міток з вузьким розподілом за розмірами і високим співвідношенням агрегатів з малим числом. Спосіб не має ніяких обмежень з погляду активної репортерної молекули раманівського розсіювання, що підлягає застосуванню як "відбитка" SERS-мітки, або розміру наночастинок з плазмонною поверхнею, що містяться у першому та другому колоїді, що дозволяє виготовляти різні SERS-мітки.

50 Як добре відомо фахівцеві у даній галузі техніки та використовується у даному документі, SERS-мітка містить один агрегат наночастинок з плазмонною поверхнею і активними репортерними молекулами раманівського розсіювання, адсорбованими на поверхні наночастинок. Наночастинки з плазмонною поверхнею відповідають за генерування електричного поля, необхідного для раманівського підсилення, у той час як активні репортерні молекули раманівського розсіювання забезпечують унікальний вібраційний відбиток SERS-мітки. SERS-мітка може додатково містити зовнішній шар покриття, що ізолює агрегат наночастинок із адсорбованими на поверхні активними молекулами раманівського розсіювання

від зовнішнього середовища. Таким чином, зовнішній шар покриття а) ізолює SERS-мітку від зовнішнього середовища, тим самим запобігаючи вимиванню активних репортерних молекул раманівського розсіювання з SERS-мітки та захищаючи SERS-мітку від забруднення зовнішнього середовища, яке може призвести до появи неправильних піків, б) збільшує колоїдну стабільність SERS-мітки та с) забезпечує зручну поверхню для подальшої хімічної функціоналізації. Шари зовнішнього покриття включають діоксид кремнію та полімери, такі як поліетиленімін (PEI), натрієва сіль співполімеру стиролу та малеїнової кислоти (PSMA), полідіалілдиметиламонію хлорид (PDADMAC).

Завдяки продемонстрованому SERS-сигналу SERS-мітки, одержані за допомогою заявленого й описаного у даному документі способу виготовлення, є особливо придатними як захисний елемент для захисту документів і виробів від підробки та незаконного відтворення. У контексті даного документа термін "захисний елемент" позначає елемент, який може бути включений в або нанесений на захищений документ або виріб з метою визначення його автентичності та його захисту від підробок і незаконного відтворення. Захисний елемент може являти собою знак, зображення, малюнок або графічний елемент, надруковані, нанесені у вигляді покриття або напилені на захисний елемент або виріб із фарбою, лаком або композицією для нанесення покриття, які містять SERS-мітки, одержані за допомогою способу виготовлення згідно із даним винаходом. Альтернативно, SERS-мітки можуть функціонувати як захисний елемент, якщо вони вбудовані у підкладку захищеного документа. Терміни "захисний документ" та "захисний виріб" відносяться до документа або виробу, що має цінність, що робить його потенційно підданим спробам підробки або незаконного відтворення, і який зазвичай захищений від підробки або фальсифікації щонайменше однією захисною ознакою. Термін "захисний виріб" у контексті даного документа охоплює всі вироби, які повинні бути захищені від підробки та/або незаконного відтворення, щоб гарантувати їхній вміст. Приклади захищених документів включають без обмеження цінні документи та цінні комерційні товари. Типові приклади цінних документів включають без обмеження банкноти, юридичні документи, квитки, чеки, ваучери, гербові марки, акцизні марки, угоди й таке інше, документи, що засвідчують особу, такі як паспорти, посвідчення особи, візи, банківські карти, кредитні карти, транзакційні карти, документи для одержання доступу, вхідні квитки і таке інше. Цінні комерційні товари охоплюють пакувальний матеріал, зокрема для косметичних виробів, нутрицевтичних виробів, фармацевтичних виробів, спиртних напоїв, тютюнових виробів, напоїв або харчових продуктів, електротехнічних/електронних виробів, тканин або ювелірних виробів, тобто виробів, які повинні бути захищені від підробки та/або незаконного відтворення для гарантування дійсності вмісту впакування, подібного, наприклад, до справжніх лікарських засобів. Приклади пакувальних матеріалів включають без обмеження етикетки, такі як товарні етикетки для автентифікації, етикетки та печатки із захистом від розкриття.

У контексті даного винаходу по визначенню термін "наночастинка" означає окрему частинку, що має розмір, що відповідає максимальному фізичному розміру (наприклад, довжині, діаметру тощо) у діапазоні від 20 ± 5 нм до 160 ± 5 нм, переважно від 40 ± 5 нм до 140 ± 5 нм. Наночастинка у контексті даного винаходу має плазмонну поверхню, тобто наночастинка має зовнішню поверхню, здатну підсилювати раманівське розсіювання активної молекули раманівського розсіювання. Зовнішня поверхня наночастинок виконана з будь-якого відомого SERS-підсилювального матеріалу. Переважно, SERS-підсилювальний матеріал вибраний із золота (Au), срібла (Ag), міді (Cu), алюмінію (Al), паладію (Pd), платини (Pt) або їхньої суміші або сплаву, і більш переважно із золота (Au). Наночастинка у контексті даного винаходу може бути твердою або порожньою та переважно є твердою. Тверда наночастинка може бути виконана з одного матеріалу, тобто з SERS-підсилювального матеріалу зовнішньої поверхні наночастинок, або з декількох матеріалів, тобто матеріал(-и) центральної структури наночастинок може(можуть) відрізнитися від SERS-підсилювального матеріалу зовнішньої поверхні наночастинок. Порожня наночастинка являє собою наночастинку, центральна структура якої являє собою порожній простір. Наночастинка може мати будь-яку форму, яку можна одержати. Переважно, наночастинка являє собою тверду наночастинку з Au. Переважно, наночастинка має форму, вибрану із групи, що складається зі сфери, сфероїда, стрижня, диска, призми та куба, більш переважно вибрану зі сфери та сфероїда, і ще більш переважно наночастинка має форму сфероїда.

У контексті даного документа формулювання "наночастинки з по суті однаковим розміром" означає, що вказані наночастинки мають розмір, що відповідає максимальному фізичному розміру (наприклад, довжині, діаметру тощо) у межах ± 20 нм, переважно у межах ± 10 нм від середнього розміру, визначеного для вказаних наночастинок за допомогою способів електронної мікроскопії, таких як трансмісійна електронна мікроскопія (ТЕМ) або сканувальна

електронна мікроскопія (SEM), або, якщо застосовано, за допомогою способу з публікації Haiss і співавт. (Anal. Chem. 2007, 79, 4215-4221).

Наночастинки першого колоїду, другого колоїду та колоїду, одержаного на стадії b1), диспергують у водному розчиннику. У контексті даного документа термін "водний розчинник" відноситься до води та суміші води з одним або декількома водорозчинними розчинниками, причому водорозчинний розчинник переважно вибраний з переліку, що включає метанол, етанол, пропанол, ізопропанол, тетрагідрофуран, N-метил-2-піролідон (NMP), диметилсульфоксид (DMSO), N,N-диметилформамід (DMF), ацетон і ацетонітрил.

Перший колоїд, одержаний на стадії a) способу виготовлення, другий колоїд, одержаний на стадії b) способу виготовлення, а також колоїд, одержаний на стадії b1) способу виготовлення, не містять полімерів або поверхнево-активних речовин для стабілізації. Стабілізація колоїдів полімерами (наприклад, полівінілпіролідом) або поверхнево-активними речовинами (наприклад, бромідом цетилтриметиламонію) є добре відомою з рівня техніки. Проте, оскільки полімери та поверхнево-активні речовини додають до колоїдів до додавання активних репортерних молекул раманівського розсіювання, вони значно зменшують поверхню, доступну на наночастинках для адсорбції активних репортерних молекул раманівського розсіювання, і збільшують відстань між колоїдними частинками в агрегаті, що, як наслідок, приводить до того, що в SERS-міток спостерігається більш низька інтенсивність SERS-сигналу. Для подолання даного недоліку перший колоїд, другий колоїд, а також колоїд, одержаний на стадії b1), не містять поверхнево-активних речовин і полімерів.

Стабілізуючий засіб, адсорбований на поверхні наночастинок першого колоїду, другого колоїду та колоїду, одержаного на стадії b1), переважно вибраний з карбонових кислот, солей карбонових кислот, фосфорних кислот, солей фосфорних кислот, аскорбінової кислоти, солей аскорбінової кислоти і їхніх сумішей. Щоб уникнути конкуренції між активними репортерними молекулами раманівського розсіювання та стабілізуючим засобом під час адсорбції активних репортерних молекул раманівського розсіювання на поверхні наночастинок переважно, щоб стабілізуючий засіб не містив груп, що володіють спорідненістю до SERS-підсилювальних матеріалів, зокрема до золота. Прикладами таких груп є азотвмісні групи, сірковмісні групи, етинільні групи, ціаногрупи та ізоціанідні групи.

У контексті даного документа термін "карбонова кислота" відноситься до органічної сполуки, що містить карбоксильну групу (C(=O)OH), і охоплює монокарбонові кислоти (тобто органічні сполуки, що містять одну карбоксильну групу), такі як молочна кислота, і полікарбонові кислоти (тобто органічні сполуки, що містять дві або більше карбоксильних груп), такі як лимонна кислота.

У контексті даного документа термін "сіль карбонової кислоти" відноситься до натрієвої або калієвої солі карбонової кислоти.

Переважно стабілізуючий засіб вибраний з карбонових кислот, солей карбонових кислот, аскорбінової кислоти, солей аскорбінової кислоти та їхніх сумішей. Ще більш переважно, стабілізуючий засіб вибраний з лимонної кислоти, солей лимонної кислоти, молочної кислоти, солей молочної кислоти, аскорбінової кислоти, солей аскорбінової кислоти та їхніх сумішей. До солей лимонної кислоти відносяться дигідроцитрат мононатрію, гідроцитрат динатрію, цитрат тринатрію, дигідроцитрат монокалію, гідроцитрат дикалію та цитрат трикалію. До солей молочної кислоти відносяться лактат натрію та лактат калію. До солей аскорбінової кислоти відносяться аскорбат натрію й аскорбат калію. У найбільш переважному варіанті здійснення стабілізуючий засіб вибраний з лимонної кислоти, дигідроцитрату мононатрію, гідроцитрату динатрію, цитрату тринатрію, дигідроцитрату монокалію, гідроцитрату дикалію та цитрату трикалію, а також їхніх сумішей.

Переважно, заявлений та описаний у даному документі спосіб виготовлення дозволяє інтегрувати будь-яку активну репортерну молекулу раманівського розсіювання у SERS-мітку. До переважних активних репортерних молекул раманівського розсіювання відносяться повністю сполучені молекули, що містять арильну групу, заміщену одним або декількома замісниками, вибраними з NR^1R^2 , $-\text{SH}$, $-\equiv$, $-\equiv\text{N}$ та $-\text{N}=\equiv$, переважно з $-\text{NR}^1\text{R}^2$ та $-\text{SH}$, та/або N-вмісну гетероарильну групу, та/або S-вмісну гетероарильну групу, при цьому залишки R^1 та R^2 незалежно один від одного вибрані з -H та алкілу, переважно з -H та C_1 - C_4 -алкілу.

Як відомо фахівцям у галузі органічної хімії, повністю сполучена молекула являє собою молекулу, що має систему сполучених електронів, що охоплює всю молекулу. Система сполучених електронів являє собою систему з'єднаних p-орбіталей з делокалізованими електронами.

Як добре відомо фахівцям у даній галузі техніки, "арильна група" являє собою групу, одержану з моноциклічної або поліциклічної ароматичної вуглеводневої сполуки шляхом

видалення одного атома водню з кільцевого атома вуглецю. Приклади арильних груп включають без обмеження фенільну, нафтильну, антраценільну, фенантрильну та піренільну.

5 S-вмісна гетероароматична сполука являє собою ароматичну сполуку, що містить гетероатом сірки як частину циклічної сполученої π-системи. Як частина циклічної сполученої π-системи, S-вмісна гетероароматична сполука може додатково містити один або декілька атомів азоту. Приклади S-вмісних гетероарильних груп включають без обмеження тіофенільну, тіазолільну, ізотіазолільну, тіадіазолільну, бензотіофенільну, бензотіазолільну, бензоізотіазолільну, бензотіадіазолільну, імідазотіазолільну й імідазотіадіазолільну.

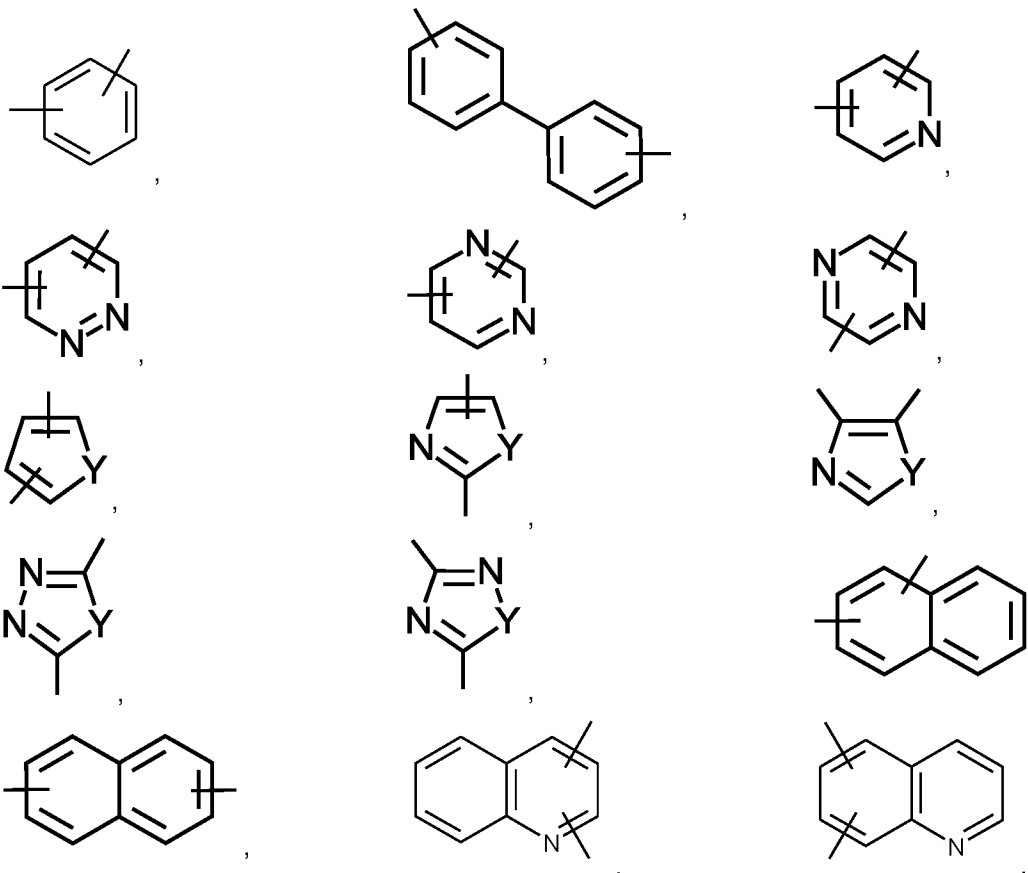
10 N-вмісна гетероароматична сполука являє собою ароматичну сполуку, що містить щонайменше один гетероатом азоту як частину циклічної сполученої π-системи. Як частина циклічної сполученої π-системи, N-вмісна гетероароматична сполука може додатково містити один або декілька атомів кисню. Приклади N-вмісних гетероарильних груп включають без обмеження імідазолільну, піразолільну, триазолільну, тетразолільну, бензоімідазолільну, індазолільну, бензотриазолільну, піридинільну, піримідинільну, піридазинільну, триазинільну, хінолінільну, ізохінолінільну, діазанфатильну, хіналозинільну, цінолінільну, фталазинільну, хіноксалінільну, пурінільну, азафенантрильну, діазафенантрильну, азаантраценільну, діазаантраценільну, азапіренільну, діазапіренільну, оксазолільну, ізоксазолільну, оксадіазолільну, бензоксазолільну, бензізоксазолільну та бензоксадіазолільну.

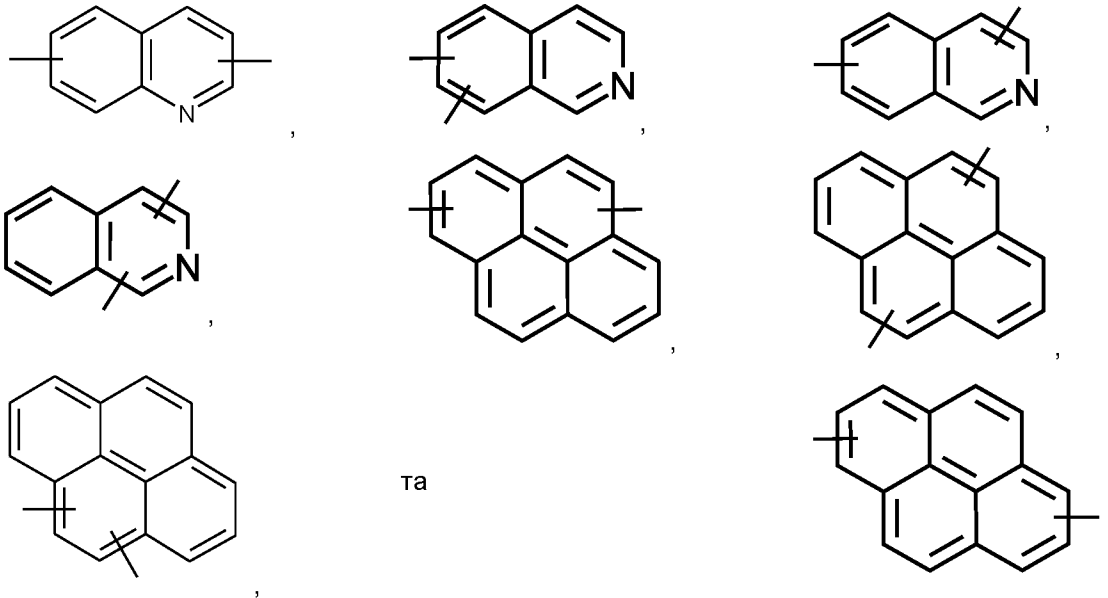
20 До переважних активних репортерних молекул раманівського розсіювання відносяться без обмеження наступні:

- повністю сполучена сполука, що складається з арильної групи, заміщеної одним або декількома замісниками, вибраними з $-NR^1R^2$, $-SH$, $-E$, $-N$ та $-N=$, переважно з $-NR^1R^2$ та $-SH$, яка з'єднана прямо або за допомогою лінкера $-L^1$ -з арильною групою, заміщеною одним або декількома замісниками, вибраними з переліку, що включає аміногрупу ($-NH_2$), N-алкіламіногрупу, N,N-діалкіламіногрупу, тіолову групу, етинільну групу, ціаногрупу й ізоціанідну групу, N-вмісну гетероарильну групу або S-вмісну гетероарильну групу, при цьому

замісники R^1 та R^2 мають значення, які визначені у даному документі;

30 лінкер $-L^1$ -вибраний з $-CR^8=CR^9-$, $-N=N-$, $-E-$, $-CR^{10}=CR^{11}-o-C_6H_4-$, $-CR^{10}=CR^{11}-m-C_6H_4-$, $-CR^{10}=CR^{11}-p-C_6H_4-$, $-CR^{10}=CR^{11}-o-C_6H_4-CR^{12}=CR^{13}-$, $-CR^{10}=CR^{11}-m-C_6H_4-CR^{12}=CR^{13}-$, $-CR^{10}=CR^{11}-p-C_6H_4-CR^{12}=CR^{13}-$, $-CR^{14}=N-N=CR^{15}-$,





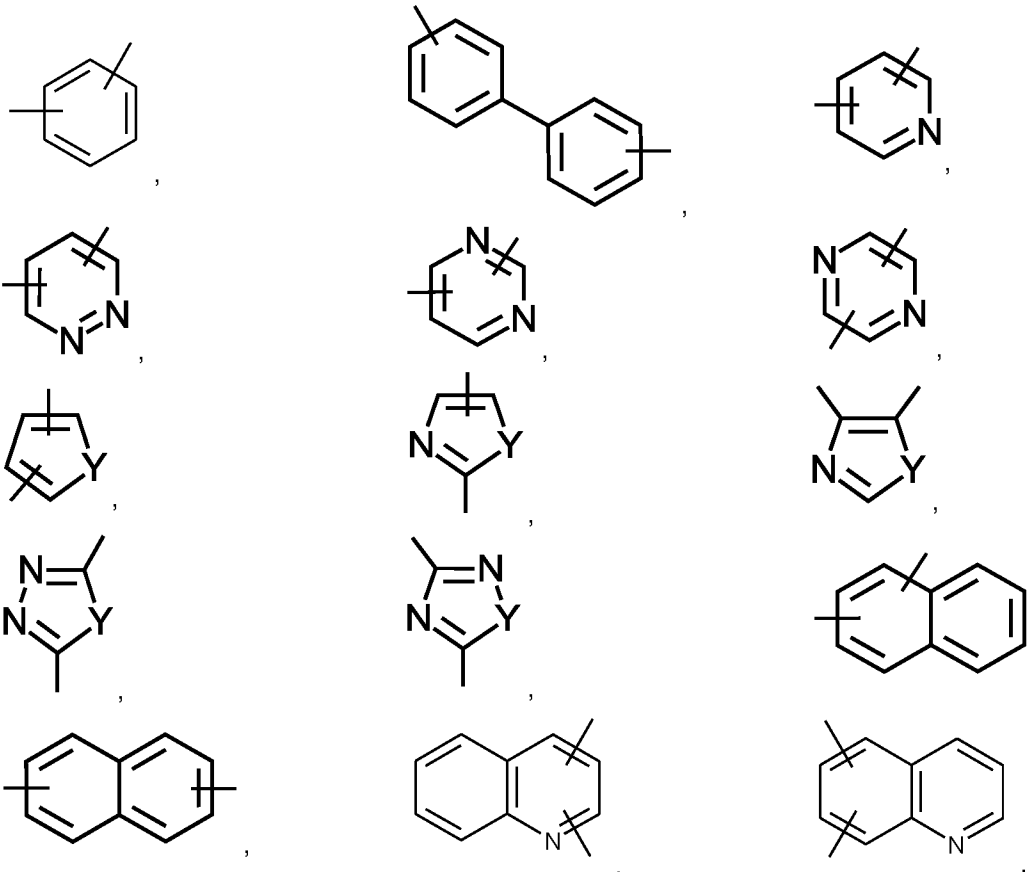
та

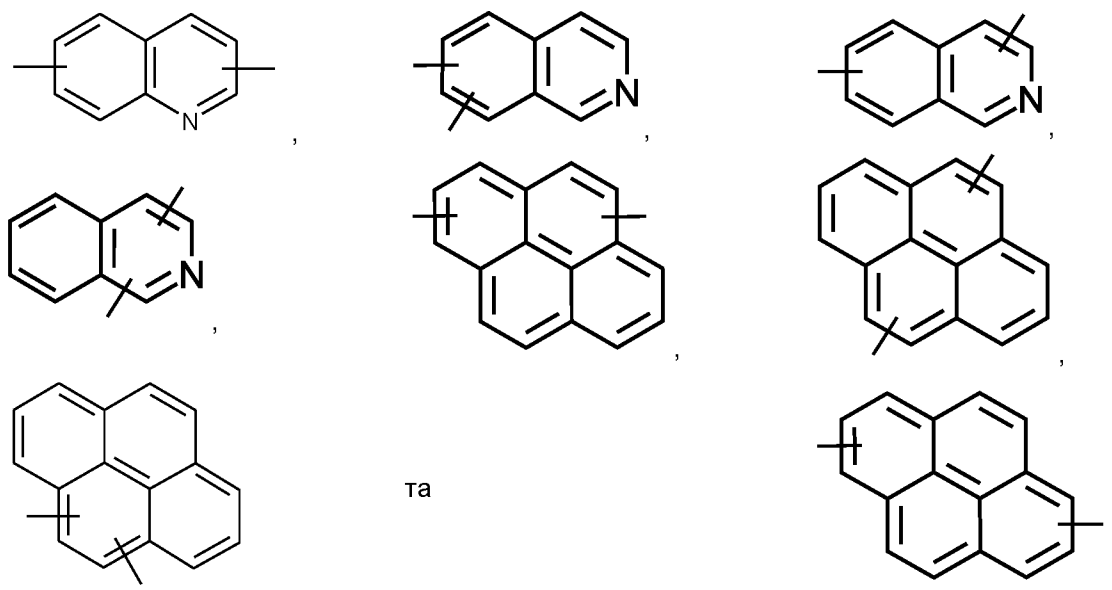
та
замісники R⁸-R¹⁵ вибрані з водню, алкілу, алкокси, алкілтію, формілу, ціано, нітро, галогеніду, гідроксикарбонілу та алкоксикарбонілу;

5 - повністю сполучена сполука, що складається з N-вмісної гетероарильної групи, яка з'єднана прямо або за допомогою лінкера -L¹-з N-вмісною гетероарильною групою або S-вмісною гетероарильною групою,

при цьому

10 лінкер -L¹-вибраний з -CR⁸=CR⁹-, -N=N-, -≡-, -CR¹⁰=CR¹¹-o-C₆H₄-, -CR¹⁰=CR¹¹-m-C₆H₄-, -CR¹⁰=CR¹¹-p-C₆H₄-, -CR¹⁰=CR¹¹-o-C₆H₄-CR¹²=CR¹³-, -CR¹⁰=CR¹¹-m-C₆H₄-CR¹²=CR¹³-, -CR¹⁰=CR¹¹-p-C₆H₄-CR¹²=CR¹³-, -CR¹⁴=N-N=CR¹⁵-,





та замісники R^8 - R^{15} вибрані з водню, алкілу, алкокси, алкілтію, формілу, ціано, нітро, галогеніду, гідроксикарбонілу та алкоксикарбонілу;

та

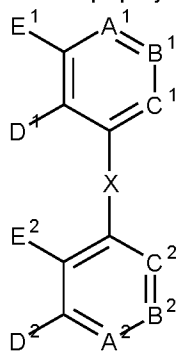
- 5 - повністю сполучена сполука, що складається з арильної групи, заміщеної одним або декількома, переважно щонайменше двома, замісниками, вибраними з $-NR^1R^2$, $-SH$, $-\equiv$, $-\equiv n$ та $-N\equiv$, переважно з $-NR^1R^2$ та $-SH$, N-вмісної гетероарильної групи, необов'язково заміщеної одним або декількома замісниками, вибраними з $-NR^3R^4$, $-SH$, $-\equiv$, $-\equiv N$ і $-N\equiv$, або S-вмісної гетероарильної групи, необов'язково заміщеної одним або декількома замісниками, вибраними з $-NR^5R^6$, $-SH$, $-\equiv$, $-\equiv N$ та $-N\equiv$, з'єднаної прямо з атомом водню, при цьому замісники R^1 та R^2 мають значення, визначені у даному документі, та замісники R^3 - R^6 незалежно один від одного вибрані з $-H$ та алкілу, переважно з $-H$ та C_1 - C_4 -алкілу.

- 15 Арильна група, заміщена одним або декількома замісниками, вибраними з $-NR^1R^2$, $-SH$, $-\equiv$, $-\equiv N$ і $-N\equiv$, переважно з $-NR^1R^2$ та $-SH$, може містити один або декілька додаткових замісників, переважно вибраних з гідрокси, алкілу, алкокси, алкілтію, формілу, нітро, галогеніду, гідроксикарбонілу, алкоксикарбонілу та O-вмісної гетероарильної групи та більш переважно вибраних з алкілу, алкокси, алкілтію, галогенідів та O-вмісної гетероарильної групи.

- 20 N-вмісна гетероарильна група та S-вмісна гетероарильна група можуть містити один або декілька додаткових замісників, переважно вибраних з аміно, N-алкіламіно, N,N-діалкіламіно, тіолу, гідрокси, алкілу, алкокси, алкілтію, формілу, ціано, ізоціаніду, етинілу, нітро, галогеніду, гідроксикарбонілу, алкоксикарбонілу та O-вмісної гетероарильної групи, переважно з алкільної, алкокси, алкілтію, галогенідів і O-вмісної гетероарильної групи.

- 25 Приклади O-вмісних гетероарильних груп включають без обмеження фуранільну, бензофуранільну, ізобензофуранільну, оксазолільну, ізоксазолільну, бензоксазолільну й оксадіазолільну.

Переважною активною репортерною сполукою раманівського розсіювання є сполука загальної формули (I),



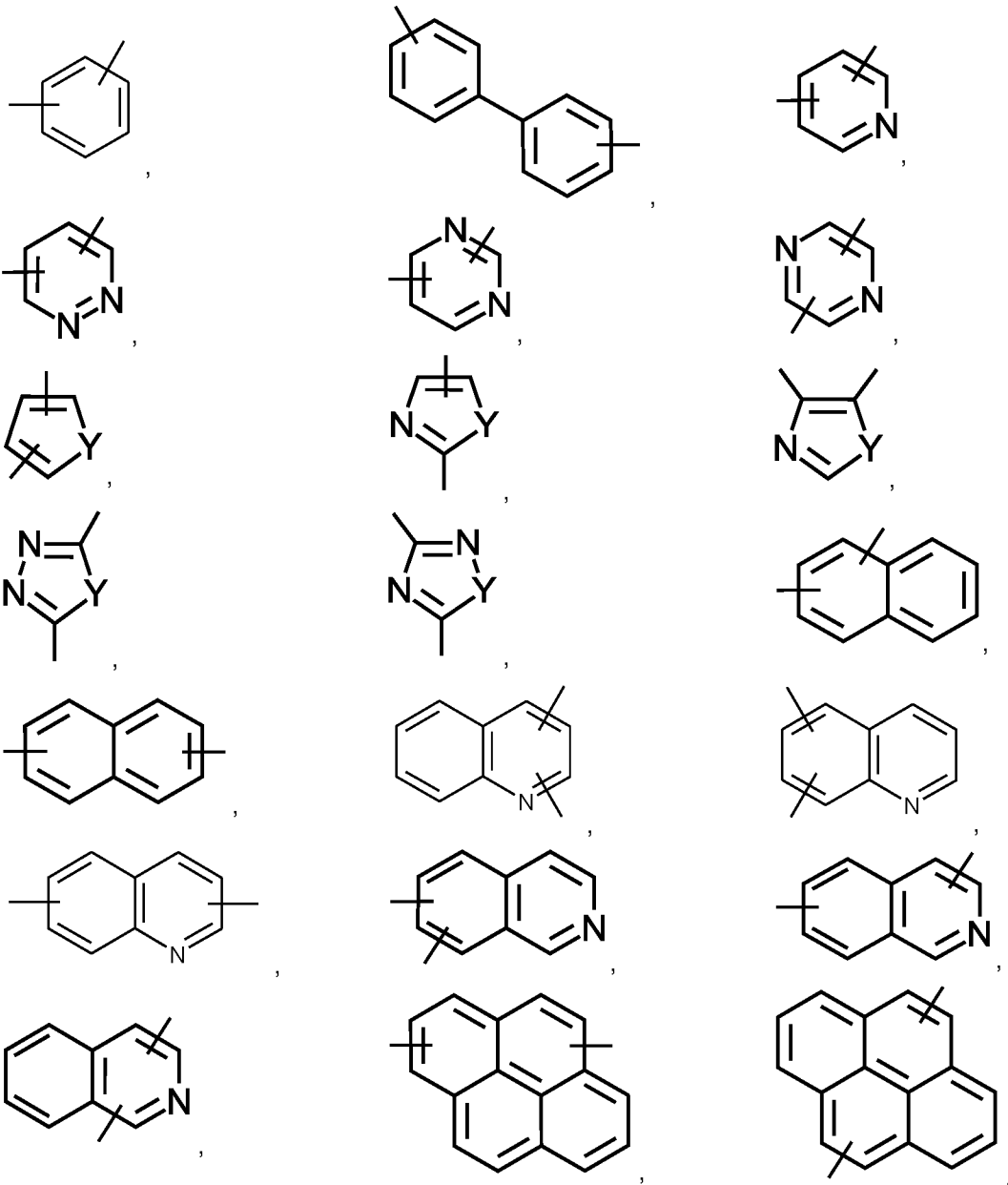
при цьому

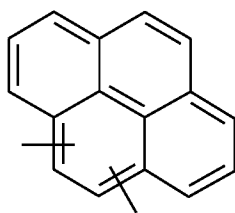
A¹, B¹ та C¹ незалежно один від одного вибрані з N, CR¹⁶ та CR¹⁷, за умови, що тільки один з A¹, B¹ та C¹ являє собою N;

A², B² та C² незалежно один від одного вибрані з N, CR¹⁸ та CR¹⁹, за умови, що тільки один з A², B² та C² являє собою N;

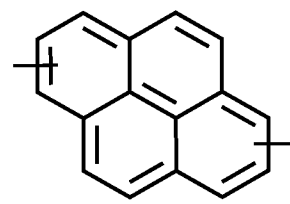
5 E¹, D¹, E², D², R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸ та R¹⁹ незалежно один від одного вибрані з водню, аміно, N-алкіламіно, N,N-діалкіламіно, тіолу, гідрокси, алкілу, алкокси, алкілтіо, формілу, ціано, ізоціаніду, алкінілу, нітро, галогеніду, гідроксикарбонілу, алкоксикарбонілу та O-вмісної гетероарильної групи, переважно з водню, алкілу, алкокси, алкілтіо, галогенідів і O-вмісної гетероарильної групи; та

10 X являє собою одинарний зв'язок або лінкер -L²-, вибраний з -CR⁸=CR⁹-, -N=N-, -≡-, -CR¹⁰=CR¹¹-o-C₆H₄-, -CR¹⁰=CR¹¹-m-C₆H₄-, -CR¹⁰=CR¹¹-p-C₆H₄-, -CR¹⁰=CR¹¹-o-C₆H₄-CR¹²=CR¹³-, -CR¹⁰=CR¹¹-m-C₆H₄-CR¹²=CR¹³-, -CR¹⁰=CR¹¹-p-C₆H₄-CR¹²=CR¹³-, -CR¹⁴=N-N=CR¹⁵-,





та



при цьому R⁸-R¹⁵ вибрані з водню, алкілу, алкокси, алкілтію, формілу, ціано, нітро, галогеніду, гідроксикарбонілу, та алкоксикарбонілу.

5 Переважно, залишки A¹ та A² являють собою N у загальній формулі (I). Більш переважно, залишки A¹ та A² являють собою N, а замісники E¹, D¹, E², D², R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸ та R¹⁹ являють собою водень у загальній формулі (I).

До активних репортерних молекул раманівського розсіювання відносяться без обмеження наступні: 2-меркаптопіридин; бензолтіол; меркаптобензойна кислота; 4-нітробензолтіол; 3,4-дихлорбензолтіол; 3-фтортіофенол; 4-фтортіофенол; 3-5-біс(трифторметил)бензолтіол; 4-меркаптофенол; біфеніл-4-тіол, 7-меркапто-4-метилкумарин, 1-(4-гідроксифеніл)-1H-тетразол-5-тіол, 2-фтортіофенол, 2-нафталінтіол, 4-(((3-меркапто-5-(2-метоксифеніл)-4H-1,2,4-триазол-4-іл)іміно)метил)фенол, (2-трифторметил)бензолтіол, 4-амінотіофенол, 1-нафталінтіол, 1,1',4,1''-терфеніл-4-тіол, біфеніл-4,4'-дитіол, тіосаліцилова кислота, 4-(((3-меркапто-5-(2-піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-4-іл)іміно)метил)-1,2-бензолдіол, 4-(((3-меркапто-5-(2-піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-4-іл)іміно)метил)бензойна кислота, 2,3,4,6-тетрафторбензолтіол, (5-(4-метоксифеніл)-1,3,4-оксадазол-2-тіол), (E)-1,2-ди(піридин-4-іл)етен, 5-(піридин-4-іл)-1,3,4-оксадазол-2-тіол та 1,4-біс((E)-2-(піридин-4-іл)вініл)бензол.

Перший колоїд, одержаний на стадії а), характеризується значенням ζ-потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ. Другий колоїд, одержаний на стадії б), характеризується значенням ζ-потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ.

У контексті даного документа значення ζ-потенціалу колоїду відноситься до значення ζ-потенціалу, вимірюваного для вказаного колоїду при концентрації 0,05 мг матеріалу наночастинок/мл за допомогою Malvern Zetasizer Nano-ZS з 1-мл вигнутими капілярними кюветами. Якщо необхідно, а саме у випадку колоїдів з концентрацією вище 0,05 мг матеріалу наночастинок/мл, перед вимірюванням ζ-потенціалу колоїд розводять деіонізованою водою до досягнення концентрації матеріалу наночастинок 0,05 мг/мл.

Переважно, концентрація матеріалу наночастинок (мг/мл) у першому колоїді й у другому колоїді нижче 0,66 мг/мл і більш переважно становить від приблизно 0,05 мг/мл до приблизно 0,30 мг/мл, для прикладу, 0,05 мг/мл, 0,10 мг/мл, 0,15 мг/мл, 0,20 мг/мл, 0,25 мг/мл і 0,30 мг/мл.

Після об'єднання першого колоїду із другим колоїдом, наприклад шляхом простого додавання другого колоїду до першого колоїду таким чином, щоб співвідношення кількості наночастинок першого колоїду та кількості наночастинок другого колоїду становило від приблизно 25:1 до приблизно 1:1, переважно від приблизно 5:1 до приблизно 1:1, більш переважно від приблизно 4:1 до приблизно 3:1, індукується агрегація наночастинок. Описана у даному документі агрегація полягає у виборчій агрегації наночастинок другого колоїду з наночастинками першого колоїду, тобто відсутня агрегація наночастинок першого колоїду з наночастинками першого колоїду, а також відсутня або має місце незначна агрегація наночастинок другого колоїду з наночастинками другого колоїду.

Агрегацію наночастинок індуюють за допомогою будь-якої зі стадій d1)-d3) або їхньої комбінації:

d1) змішування третього колоїду, одержаного на стадії с), при рН у діапазоні від приблизно 2,2 до найнижчого значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання мають сумарний електричний заряд від 0 до 0,3;

d2) додавання розчину солі, переважно розчину неорганічної солі, до третього колоїду, одержаного на стадії с);

d3) додавання водорозчинного розчинника до третього колоїду, одержаного на стадії с).

У переважному варіанті здійснення індукція агрегації наночастинок передбачає стадію d1), а саме змішування третього колоїду, одержаного на стадії с), при рН у діапазоні від приблизно 2,2 до найнижчого значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання мають сумарний електричний заряд від 0 до 0,3. Сумарний електричний заряд активної репортерної молекули раманівського розсіювання та значення рН, що відповідає вказаному сумарному електричному заряду, можна спрогнозувати за допомогою таких онлайн-інструментів, як Chemicalize.com (Chemicalize. Chemaxon. <http://chemicalize.com/#/calculation>).

При рН у діапазоні від приблизно 2,2 до найнижчого значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання мають сумарний електричний заряд від 0 до 0,3, відбувається виборча агрегація наночастинок першого колоїду з наночастинками другого колоїду.

5 Альтернативно, індукція агрегації наночастинок передбачає стадію d2) додавання розчину солі, переважно розчину неорганічної солі, до третього колоїду, одержаного на стадії с). Індукована солями агрегація наночастинок є добре відомим для фахівця у галузі колоїдної хімії способом індукції агрегації наночастинок (Chemphyschem 2018, 19, 24-28). Приклади неорганічних солей, які необхідно застосовувати на стадії d2) способу виготовлення, у формі розчину, такого як водний розчин, включають без обмеження фторид натрію, хлорид натрію, бромід натрію, йодид натрію, хлорид магнію, хлорид калію і їхні суміші.

10 У додатковому альтернативному варіанті здійснення індукція агрегації наночастинок передбачає стадію d3), а саме додавання водорозчинного розчинника до третього колоїду, одержаного на стадії с). Водорозчинний розчинник переважно вибраний з переліку, що включає метанол, етанол, пропанол, ізопропанол, тетрагідрофуран, N-метил-2-піролідон (NMP), диметилсульфоксид (DMSO), N,N-диметилформамід (DMF), ацетон і ацетонітрил.

15 Переважний спосіб виготовлення згідно із даним винаходом передбачає наступні стадії:

а) одержання першого колоїду, що фактично складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром, диспергованих у водному розчиннику, та стабілізуючого засобу, адсорбованого на поверхні вказаних наночастинок, та характеризується значенням ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ;

20 б) одержання другого колоїду, що фактично складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром, диспергованих у водному розчиннику, активної репортерної молекули раманівського розсіювання загальної формули (I), адсорбованої на поверхні вказаних наночастинок, та стабілізуючого засобу, адсорбованого на поверхні вказаних наночастинок, та характеризується значенням ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ;

25 с) об'єднання першого колоїду із другим колоїдом таким чином, щоб співвідношення кількості наночастинок першого колоїду та кількості наночастинок другого колоїду становило від приблизно 25:1 до приблизно 1:1, переважно від приблизно 5:1 до приблизно 1:1, більш переважно від приблизно 4:1 до приблизно 3:1 з одержанням третього колоїду;

30 д) індукцію агрегації наночастинок за допомогою будь-якої зі стадій d1)-d3) або їхньої комбінації:

d1) змішування третього колоїду, одержаного на стадії с), при рН у діапазоні від приблизно 2,2 до приблизно 6,1, переважно від приблизно 2,6 до приблизно 5,7;

35 d2) додавання розчину солі, переважно розчину неорганічної солі, до третього колоїду, одержаного на стадії с);

d3) додавання водорозчинного розчинника до третього колоїду, одержаного на стадії с); та

е) зупинку агрегації.

40 Переважно, в описаних у даному документі способах виготовлення стадія b) передбачає наступні стадії, здійснювані у порядку b1)-b3):

b1) одержання колоїду, що містить наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром, диспергованих у водному розчиннику, та стабілізуючий засіб, адсорбований на поверхні вказаних наночастинок, та характеризується значенням ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ;

45 b2) доведення рН колоїду до значення, що перевищує найнижче значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання, які повинні адсорбуватися на поверхні наночастинок, не несуть сумарний електричний заряд, при цьому підтримуючи значення ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ, переважно є нижчим -40 мВ; та

50 b3) додавання розчину активних молекул раманівського розсіювання у розчиннику до колоїду, одержаного на стадії b2), при цьому підтримуючи значення ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ.

Колоїд, одержаний на стадії b1) заявленого у даному документі способу виготовлення, фактично складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром, диспергованих у водному розчиннику, та стабілізуючого засобу, адсорбованого на поверхні вказаних наночастинок. Перший колоїд, одержаний на стадії а) заявленого у даному документі способу виготовлення, фактично складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром, диспергованих у водному розчиннику, та стабілізуючого засобу, адсорбованого на поверхні вказаних наночастинок. Другий колоїд, одержаний на стадії б) заявленого у даному документі способу виготовлення, фактично складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром, диспергованих у водному розчиннику,

активних репортерних молекул раманівського розсіювання, адсорбованих на поверхні вказаних наночастинок, та стабілізуючого засобу, адсорбованого на поверхні вказаних наночастинок. Таким чином, наночастинок першого колоїду та наночастинок другого колоїду не несуть на своїй поверхні молекули або організми, що забезпечують специфічну взаємодію за допомогою механізму відповідності "ключ до замка" між наночастинками першого колоїду та наночастинками другого колоїду. Приклади таких молекул включають антитіла, білки, антигени, комплементарні ланцюги ДНК і комплементарні ланцюги РНК. Приклади таких організмів включають бактерії, віруси та спори. Таким чином, перший колоїд, другий колоїд, а також колоїд, одержаний на стадії b1), крім того, що вони не містять поверхнево-активних речовин і полімерів, вони також не містять таких молекул, як антитіла, білки, антигени, комплементарні ланцюги ДНК і комплементарні ланцюги РНК, а також таких організмів, як бактерії, віруси та спори.

На стадії b2) способу виготовлення згідно із даним винаходом рН колоїду доводять до значення, що перевищує найнижче значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання, які повинні адсорбуватися на поверхні наночастинок, не несуть сумарний електричний заряд, при цьому підтримуючи значення ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ, переважно є нижчим -40 мВ. Сумарний електричний заряд активної репортерної молекули раманівського розсіювання та значення рН, що відповідає вказаному сумарному електричному заряду, можна спрогнозувати за допомогою таких онлайн-інструментів, як Chemicalize.com (Chemicalize. Chemaxon. <http://chemicalize.com/#/calculation>).

Переважно, на стадії b2) рН колоїду доводять до діапазону від приблизно 8,2 до приблизно 12,1, при цьому підтримуючи значення ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ, переважно є нижчим -40 мВ. У більш переважному варіанті здійснення рН колоїду доводять на стадії b2) до значення приблизно 11,0.

На стадії b3) згідно із даним винаходом розчин активної репортерної молекули раманівського розсіювання у розчиннику додають у колоїд, одержаний на стадії b2), при цьому підтримуючи значення потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ. Розчинник, застосовуваний для одержання розчину активної репортерної молекули раманівського розсіювання, охоплює будь-який водний розчинник і будь-який органічний розчинник, що є придатним для розчинення активної репортерної молекули раманівського розсіювання. Приклади органічних розчинників включають без обмеження спирти, переважно вибрані з метанолу, етанолу, пропанолу та ізопропанолу, тетрагідрофурану, N-метил-2-піролідону (NMP), диметилсульфоксиду (DMSO), N,N-диметилформаміду (DMF), ацетону й ацетонітрилу. До водних розчинників відносяться без обмеження вода та суміші води та водорозчинних розчинників, таких як метанол, етанол, пропанол, ізопропанол, тетрагідрофуран, N-метил-2-піролідон (NMP), диметилсульфоксид (DMSO), N,N-диметилформамід (DMF), ацетон і ацетонітрил.

Переважний спосіб виготовлення згідно із даним винаходом передбачає наступні стадії:

a) одержання першого колоїду, що фактично складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром, диспергованих у водному розчиннику, та стабілізуючого засобу, адсорбованого на поверхні вказаних наночастинок, та характеризується значенням ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ;

b) одержання другого колоїду, що фактично складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром, диспергованих у водному розчиннику, активної репортерної молекули раманівського розсіювання загальної формули (I), адсорбованої на поверхні вказаних наночастинок, та стабілізуючого засобу, адсорбованого на поверхні вказаних наночастинок, та характеризується значенням ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ;

c) об'єднання першого колоїду із другим колоїдом таким чином, щоб співвідношення кількості наночастинок першого колоїду та кількості наночастинок другого колоїду становило від приблизно 25: 1 до приблизно 1:1, переважно від приблизно 5:1 до приблизно 1:1, більш переважно від 4:1 до приблизно 3:1 з одержанням третього колоїду;

d) індукцію агрегації наночастинок за допомогою будь-якої зі стадій d1)-d3) або їхньої комбінації:

d1) змішування третього колоїду, одержаного на стадії c), при рН у діапазоні від приблизно 2,2 до приблизно 6,1, переважно від приблизно 2,6 до приблизно 5,7;

d2) додавання розчину солі, переважно розчину неорганічної солі, до третього колоїду, одержаного на стадії c);

d3) додавання водорозчинного розчинника до третього колоїду, одержаного на стадії c); та е) зупинку агрегації,

при цьому стадія b) передбачає наступні стадії, здійснювані у порядку b1)-b3):

b1) одержання колоїду, що фактично складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та по суті однаковим розміром, диспергованих у водному розчиннику, та стабілізуючого засобу, адсорбованого на поверхні вказаних наночастинок, та характеризується значенням ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ;

5 b2) доведення рН колоїду до значення у діапазоні від приблизно 8,0 до приблизно 12,1, переважно від приблизно 8,2 до 12,1, при цьому підтримуючи значення ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ, переважно є нижчим -40 мВ; та

10 b3) додавання розчину активної репортерної молекули раманівського розсіювання загальної формули (I) у розчиннику до колоїду, одержаного на стадії b2), при цьому підтримуючи значення ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ.

Авторами даного винаходу було виявлено, що інтенсивність сигналу SERS-міток, виготовлених згідно із даним винаходом, можна додатково збільшити шляхом забезпечення адсорбції субмоношару або моношару активних репортерних молекул раманівського розсіювання на поверхні наночастинок, що містяться у другому колоїді. Таким чином, додатковий переважний варіант здійснення згідно із даним винаходом відноситься до способу виготовлення SERS-міток, як заявлено у даному документі, при цьому наночастинок другого колоїду мають абсорбований на їхній поверхні субмоношар або моношар активних репортерних молекул раманівського розсіювання. У контексті даного документа моношар активних репортерних молекул раманівського розсіювання, адсорбованих на поверхні наночастинок другого колоїду, відносяться до шару товщиною в одну активну репортерну молекулу раманівського розсіювання, адсорбованого на поверхні вказаних наночастинок. У контексті даного документа субмоношар активних репортерних молекул раманівського розсіювання відноситься до неповного моношару активних репортерних молекул раманівського розсіювання. Для забезпечення того, що субмоношар або моношар активних репортерних молекул раманівського розсіювання адсорбується на поверхні наночастинок другого колоїду, кількість активних репортерних молекул раманівського розсіювання, додаваних на стадії b3) до колоїду, одержаного на стадії b2), необхідно розраховувати за допомогою добре відомих фахівцеві у даній галузі техніки способів, враховуючи залежність від форми та розміру наночастинок другого колоїду.

30 Заявлений у даному документі спосіб виготовлення дозволяє також одержувати SERS-мітки, що містять суміш різних активних репортерних молекул раманівського розсіювання, тобто суміш двох або більше різних активних репортерних молекул раманівського розсіювання. Це дає особливу перевагу, оскільки забезпечується доступ до ряду SERS-міток, при цьому кожна із вказаних SERS-міток характеризується унікальним SERS-сигналом шляхом комбінування у різних співвідношеннях обмеженої кількості різних активних репортерних молекул раманівського розсіювання. Для одержання таких SERS-міток наночастинок другого колоїду, одержані на стадії b), підготовляють таким чином, щоб на їхній поверхні була абсорбована суміш різних активних репортерних молекул раманівського розсіювання (тобто суміш із двох або більше різних активних репортерних молекул раманівського розсіювання). Такий другий колоїд можна одержати за допомогою стадії b3) способу виготовлення розчину активних молекул раманівського розсіювання у розчиннику, що містить дві або більше різних активних репортерних молекул раманівського розсіювання, або шляхом послідовного здійснення стадії b3) способу виготовлення й із застосуванням щораз іншого розчину, що містить іншу активну репортерну молекулу раманівського розсіювання. Таким чином, додатковий варіант здійснення згідно із даним винаходом відноситься до способу виготовлення, при якому на стадії b3) розчин активних репортерних молекул раманівського розсіювання у розчиннику містить суміш із двох або більше різних активних репортерних молекул раманівського розсіювання. Інший додатковий варіант здійснення згідно із даним винаходом відноситься до способу виготовлення, при якому стадію b3) послідовно здійснюють n разів, при цьому $n \geq 2$, із застосуванням щораз розчину, що містить активну репортерну молекулу раманівського розсіювання, яка структурно відрізняється від активних репортерних молекул раманівського розсіювання, застосовуваних в інших $n-1$ розчинах, застосовуваних на інших $n-1$ стадіях. У контексті даного документа різні активні репортерні молекули раманівського розсіювання відносяться до активних репортерних молекул раманівського розсіювання, що мають різну хімічну структуру та забезпечують інший спектр SERS.

55 Для додаткового збільшення кількості агрегатів з малим числом i , як наслідок, інтенсивності SERS-сигналу, подаваного SERS-мітками, виготовленими за допомогою заявленого у даному документі способу виготовлення, переважно, щоб на стадії c) співвідношення кількості наночастинок першого колоїду та кількості наночастинок другого колоїду становило від 60 приблизно 5:1 до приблизно 1:1, переважно від приблизно 4:1 до приблизно 3:1. Як

продемонстровано, наприклад, за допомогою прикладу 10 та фіг. 3b, співвідношення кількості наночастинок першого колоїду та кількості наночастинок другого колоїду, що становить від приблизно 5:1 до приблизно 1:1, забезпечує доступ до SERS-міток з великою кількістю агрегатів з малим числом, таких як димери, тримери та тетрамери.

5 Для індукції агрегації за допомогою способу, описаного для стадії d1), необхідно домісити третій колоїд, одержаний на стадії c), при рН у діапазоні від приблизно 2,2 до найнижчого значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання мають сумарний електричний заряд від 0 до 0,3, що у випадку активної репортерної молекули раманівського розсіювання загальної формули (I) являє собою рН у діапазоні від приблизно 2,2 до приблизно 6,1, переважно від приблизно 2,6 до приблизно 5,7. Цього можна досягти або шляхом додавання кислого розчину до третього колоїду, одержаного на стадії c), або шляхом доведення рН першого колоїду до такого значення, щоб колоїд, одержаний на стадії d1), мав необхідне значення рН.

15 Таким чином, один варіант здійснення згідно із даним винаходом відноситься до способу виготовлення, при якому стадія d1) додатково передбачає додавання кислого розчину до третього колоїду, одержаного на стадії c), при перемішуванні, так щоб рН одержаного колоїду становив у діапазоні від приблизно 2,2 до найнижчого значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання мають сумарний електричний заряд від 0 до 0,3, що у випадку активної репортерної молекули раманівського розсіювання загальної формули (I) являє собою рН у діапазоні від приблизно 2,2 до приблизно 6,1, переважно від приблизно 2,6 до приблизно 5,7. Придатні кислоти розчини включають без обмеження оцтову кислоту, соляну кислоту й азотну кислоту.

20 Щоб уникнути додаткової стадії виготовлення, зручно довести значення рН першого колоїду до такої величини, щоб колоїд, одержаний на стадії d1), мав рН у діапазоні від приблизно 2,2 до найнижчого значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання мають сумарний електричний заряд від 0 до 0,3, що у випадку активної репортерної молекули раманівського розсіювання загальної формули (I) являє собою рН у діапазоні від приблизно 2,2 до приблизно 6,1, переважно від приблизно 2,6 до приблизно 5,7.

25 Заявлений у даному документі спосіб виготовлення також передбачає стадію e) зупинки агрегації. Переважно, стадія e) передбачає будь-яку з наступних стадій e1)-e4):

30 e1) доведення рН колоїду, одержаного на стадії d), до значення, що перевищує найнижче значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання, які повинні адсорбуватися на поверхні наночастинок, не несуть сумарний електричний заряд;

35 e2) розведення колоїду, одержаного на стадії d), водою, переважно так, щоб концентрація наночастинок у колоїді стала нижче $6 \cdot 10^9$ наночастинок/мл;

e3) додавання полімеру до колоїду, одержаного на стадії d);

e4) додавання попередника діелектричного матеріалу до колоїду, одержаного на стадії d).

40 У заявленому у даному документі способі виготовлення згідно із даним винаходом агрегацію можна зупинити кожним зі способів e1)-e4).

45 Доведення рН колоїду, одержаного на стадії d), до значення, що перевищує найнижче значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання, які повинні адсорбуватися на поверхні наночастинок, не несуть сумарний електричний заряд, як описано на стадії e1), що приводить до збільшення кількості електростатичних відштовхувань між агрегатами наночастинок, приводячи до зупинки процесу агрегації. Сумарний електричний заряд активної репортерної молекули раманівського розсіювання та значення рН, що відповідає вказаному сумарному електричному заряду, можна спрогнозувати за допомогою таких онлайн-інструментів, як Chemicalize.com (Chemicalize. Chemaxon. <http://chemicalize.com/#/calculation>).

50 Додавання полімеру до колоїду, одержаного на стадії d), як описано для стадії e3), приводить до збільшення кількості стеричних відштовхувань між агрегатами наночастинок і приводить до зупинки процесу агрегації. Переважно, щоб полімер, застосований на стадії e3), не виявляв впливу на SERS-сигнал від SERS-мітки. До придатних полімерів відносяться без обмеження полівінілпіролідон і поліетиленгліколь.

55 Додавання попередника діелектричного матеріалу до колоїду, одержаного на стадії d), як описано на стадії e4), приводить до інкапсуляції агрегатів наночастинок щонайменше з одним шаром діелектричного матеріалу, що стабілізує SERS-мітки та беззастережно приводить до зупинки процесу агрегації. Переважно, попередник діелектричного матеріалу являє собою попередник діоксиду кремнію. До попередників діоксиду кремнію відносяться без обмеження розчини тетраетилортосилікату та 3-амінопропілтриметоксисилану в етанолі, розчини тетраетилортосилікату та (3-меркаптопропіл)триметоксисилану в етанолі, розчини силікату натрію у воді та розчини (3-меркаптопропіл)триметоксисилану у воді.

Альтернативно, процес агрегації можна зупинити шляхом розведення колоїду, одержаного на стадії d), водою. Переважно, агрегацію зупиняють шляхом розведення колоїду, одержаного на стадії d), водою так, щоб досягалася концентрація матеріалу наночастинок [мкг/мл], яка є нижчою або дорівнює 12,5 мкг/мл (див., наприклад: E1-E8, E11-E14). Альтернативно, агрегацію зупиняють шляхом розведення колоїду, одержаного на стадії d), водою так, щоб концентрація наночастинок стала нижче $6 \cdot 10^9$ наночастинок/мл.

Додатковий переважний варіант здійснення даного винаходу відноситься до способу виготовлення SERS-міток, при якому стадія e) фактично складається зі стадії e3), та спосіб виготовлення додатково передбачає розведення колоїду, одержаного на стадії e3), водою та/або нанесення на SERS-мітки покриття діелектричного матеріалу.

У додатковому переважному варіанті здійснення стадії c) та d) заявленого у даному документі способу виготовлення здійснюють одночасно у проточній системі безперервної дії. У даному конкретному способі виготовлення застосовують проточний реактор безперервної дії. Такий проточний реактор безперервної дії схематично зображений на фіг. 1b та фіг. 1c і складається із двох резервуарів (111b, 112b, 111c, 112c) під тиском, з'єднаних за допомогою трубки із трійником (113b, 113c) і резервуаром (114b, 114c) для збору. У резервуарі (111b, 111c) під тиском зберігається другий колоїд, а в резервуарі (112b, 112c) під тиском зберігається перший колоїд. Для збору SERS-міток і, необов'язково, для зупинки агрегації (114c) застосовують поєднану з атмосферою посудину (114b, 114c). Трубку, що з'єднує кожен з резервуарів (111b, 112b, 111c, 112c) під тиском із трійником (113b, 113c), застосовують для транспортування колоїдів. Додаткову трубку, що з'єднує трійник (113b, 113c) з резервуаром (114b, 114c) для збору, застосовують для здійснення агрегації. Агрегати наночастинок, одержані у результаті агрегації, збирають у посудину (114b) для збору, де зупиняють агрегацію.

При одночасному здійсненні стадій c) та d) способу виготовлення у проточній системі безперервної дії додатково переважно, щоб стадію e) також здійснювали у проточній системі безперервної дії.

Як згадано вище, наночастинок, застосовуваних у способі виготовлення SERS-міток, можуть мати будь-яку форму, яку можна одержати, таку як сфера, сфероїд, стрижень, диск, призма та куб. Переважно, форма наночастинок з плазмонною поверхнею, застосовуваних у заявленому у даному документі способі виготовлення згідно із даним винаходом, вибрана зі сфери та сфероїда. Ще більш переважно, вказані наночастинок мають форму сфероїда.

У переважному варіанті здійснення наночастинок першого колоїду та наночастинок другого колоїду мають однаковий розмір. Зручно, щоб при такому способі виготовлення SERS-міток колоїдом, застосовуваним для одержання другого колоїду (тобто колоїду, одержуваного на стадії b1)), був перший колоїд.

В альтернативному варіанті здійснення розмір наночастинок першого колоїду відрізняється від розміру наночастинок другого колоїду. Наприклад, розмір наночастинок у першому колоїді може бути менше розміру наночастинок у другому колоїді, у результаті чого SERS-мітки мають структури, схожі з такою у SERS-міток, зображених на фіг. 3a, або розмір наночастинок у першому колоїді може перевищувати розмір наночастинок у другому колоїді, у результаті чого SERS-мітки мають структури, схожі з такою SERS-міток, зображених на фіг. 3b.

Заявлений у даному документі спосіб виготовлення переважно здійснюють з колоїдами, при цьому плазмонна поверхня наночастинок у першому колоїді та/або плазмонна поверхня наночастинок у другому колоїді виконана із золота, більш переважно з колоїдами, що містять тверді наночастинок золота та ще більш переважно з колоїдами золота, стабілізованими цитратом.

Приклади

Даний винахід далі буде описано більш докладно у відповідності з наступними необмежувальними прикладами.

Загальна частина

Описані далі реагенти одержували від наступних постачальників:

Тригідрат хлораурату золота (>99,9 %; CAS № 16961-25-4), боргідрид натрію (99,99 %; CAS № 16940-66-2), трьохосновний дигідрат цитрату натрію ($\geq 99,5$ %; CAS № 6132-04-3), (E)-1,2-ди(піридин-4-іл)етен (97 %; CAS № 13362-78-2), 5-(піридин-4-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-тіол (97 %; CAS № 15264-63-8), гідроксид натрію (реагент ACS, ≥ 97 %; CAS № 1310-73-2), гідрохлорид гідроксиламіну (99,999 %; CAS № 5470-11-1), терефталевий альдегід (ReagentPlus, 99 %, CAS № 623-27-8), 4-метилпіридин (99 %; CAS № 108-89-4), оцтовий ангідрид (ReagentPlus, ≥ 99 %; CAS № 108-24-7), дихлорметан (безводний, 99,8 %; CAS № 75-09-2) і метанол (HPLC, $\geq 99,9$ %; CAS № 67-56-1) були придбані у Sigma Aldrich. Соляна кислота (зі слідовим вмістом металів, 34-37 %; CAS № 7647-01-0) була придбана у Fisher Scientific.

Значення ζ -потенціалу вимірювали із застосуванням Malvern Zetasizer Nano-ZS з 1-мл вигнутими капілярними кюветами (DTS1060). Спектри оптичного поглинання реєстрували на спектрофотометрі Agilent 8453 і Perkin Elmer Lambda 650.

5 Зображення, одержані за допомогою сканувального електронного мікроскопа (SEM), фіксували на Hitachi S-4500.

785-нм раманівські спектри одержували на Ocean Optics QE 6500.

10 Розмір номінальних 140-нм золотих колоїдних частинок визначали шляхом відправлення зразка в EAG Laboratories для одержання зображень трансмісійної електронної мікроскопії (TEM). Зображення аналізували за допомогою програмного забезпечення ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Партія вважалася номінально відповідною 140 нм, якщо середньочисловий розмір частинок знаходився у межах ± 9 нм від номінального діаметра, при цьому середньочисловий розмір частинок визначали шляхом вимірювання 230 окремих частинок на мікрофотографіях TEM. Пов'язано з розміром характеристикою, вибраною для опису окремих частинок, був діаметр "еквівалентного кола" (CE), який відповідає діаметру кола, площа якого дорівнює площі ортогональної проекції частинки.

15 Діаметр наночастинок золота d (нм) для партій наночастинок розміром 40, 60, 90 нм розраховували способом, описаним в Haiss і співавт. (Anal. Chem. 2007, 79, 4215-4221), із застосуванням наступного рівняння:

$$d = \frac{\ln \frac{\lambda_{\text{spr}} - 512 \text{ нм}}{6,53}}{0,0216} \text{ нм}$$

20 де λ_{spr} позначає положення піка поверхневого плазмонного резонансу на графіку екстинкції, одержаному для зразка колоїду на Perkin Elmer Lambda 650, що працює в УФ/видимому спектрі. Партію вважали номінально відповідною 40 нм, 60 нм або 90 нм, якщо положення піка поверхневого плазмонного резонансу корелювало з діаметром у межах ± 9 нм від номінального діаметра.

25 I. Одержання вихідного розчину колоїдного Au (S1-S4)

Вихідні розчини колоїдного золота (S1-S4), що характеризуються розміром наночастинок Au (нм), концентраціями Au (мг/мл) і значеннями рН, зазначеними у таблиці 1, виготовляли так, як описано нижче.

I.1 Одержання вихідного розчину 40-нм колоїдного золота (S1)

30 В оснащеному сорочкою та ретельно очищеному 100-л скляному реакторі (ChemGlass) 79,5 л води з опором 17 МОм охолоджували до $3,5 \pm 0,5$ °С. Додавали тригідрат хлораурату золота (100 г) у вигляді 20 мас. % розчину у воді при перемішуванні лопатевою мішалкою на швидкості 400 об./хв. Поєднували трьохосновний дигідрат цитрату натрію (174,3 г) у вигляді 30 мас. % розчину у воді та гідрохлорид гідроксиламіну (155,6 г) у вигляді 23,5 мас. % розчину у воді та додавали у реактор. Через 10 с у реактор вносили 800 мкл боргідриду натрію у вигляді 0,063 мас. % розчину в 0,01 н. гідроксиду натрію. Реагентам давали прореагувати протягом 2 хвилин, а потім виливали у чистий барабан з одержанням вихідного розчину 40-нм колоїдного Au (S1) з концентрацією золота 0,25 мг Au/мл і значенням рН приблизно 2,4.

40 I.2 Одержання вихідного розчину 60-нм колоїдного золота (S2)

В оснащеному сорочкою та ретельно очищеному 100-л скляному реакторі (ChemGlass) 79,5 л води з опором 17 МОм охолоджували до $3,5 \pm 0,5$ °С. Додавали тригідрат хлораурату золота (200 г) у вигляді 20 мас. % розчину у воді при перемішуванні лопатевою мішалкою на швидкості 400 об./хв. Поєднували трьохосновний дигідрат цитрату натрію (173,3 г) у вигляді 30 мас. % розчину у воді та гідрохлорид гідроксиламіну (217,1 г) у вигляді 17,5 мас. % розчину у воді та додавали у реактор. Через 10 с у реактор вносили 800 мкл боргідриду натрію у вигляді 0,052 мас. % розчину в 0,01 н. гідроксиду натрію. Реагентам давали прореагувати протягом 2 хвилин, а потім виливали у чистий барабан. Партію розводили водою з опором 17 МОм до 160 л з одержанням вихідного розчину 60-нм колоїдного Au (S2) з концентрацією золота 0,25 мг Au/мл і рН приблизно 2,4.

50 I.3 Одержання вихідного розчину 90-нм колоїдного золота (S3)

В оснащеному сорочкою та ретельно очищеному 100-л скляному реакторі (ChemGlass) 79,5 л води з опором 17 МОм охолоджували до $3,5 \pm 0,5$ °С. Додавали тригідрат хлораурату золота (200 г) у вигляді 20 мас. % розчину у воді при перемішуванні лопатевою мішалкою на швидкості 400 об./хв. Поєднували трьохосновний дигідрат цитрату натрію (173,3 г) у вигляді 30 мас. % розчину у воді та гідрохлорид гідроксиламіну (217,1 г) у вигляді 17,5 мас. % розчину у воді та додавали у реактор. Через 10 с у реактор вносили 900 мкл боргідриду натрію у вигляді 0,01 мас. % розчину в 0,01 н. гідроксиду натрію. Реагентам давали прореагувати протягом 2 хвилин, а потім виливали у чистий барабан. Партію розводили водою з опором 17 МОм до 160 л з

одержанням вихідного розчину 90-нм колоїдного Au (S3) з концентрацією золота 0,25 мг Au/мл і рН приблизно 2,4.

1.4 Одержання вихідного розчину 140-нм колоїдного золота (S4)

У 2-л скляному бутелі перемішували 1,5 л води з опором 17 МОм при кімнатній температурі. Додавали тригідрат хлораурату золота (2,5 г) у вигляді 20 мас. % розчину у воді при перемішуванні. Поєднували трьохосновний дигідрат цитрату натрію (15,37 г) у вигляді 30,7 мас. % розчину у воді та гідрохлорид гідроксиламіну (8,37 г) у вигляді 16,7 мас. % розчину у воді та додавали у реактор. Через 5 с у реактор вносили 25 мкл боргідриду натрію у вигляді 0,01 мас. % розчину в 0,01 н. гідроксиду натрію. Додаткове перемішування протягом 15 хвилин давало вихідний розчин 140-нм колоїдного Au (S4) з концентрацією золота 0,25 мг Au/мл і рН приблизно 2,4.

Таблиця 1

Результати вивчення характеристик вихідних розчинів колоїдного Au (S1-S4)

Вихідний розчин колоїдного Au №	Розмір наночастинок Au (нм)	Концентрація Au (мг/мл)	рН
S1	40	0,25	≈2,4
S2	60	0,25	≈2,4
S3	90	0,25	≈2,4
S4	140	0,25	≈2,4

II. Одержання першого колоїду (A1-A9) (стадія а) способу виготовлення)

Перші колоїди (A1-A9) одержували з розчинів колоїдного Au S1, S2 та S4. За необхідності (у випадку, наприклад, колоїдів Au A1 та A7) вихідні розчини колоїдного Au розводили деіонізованою водою так, щоб виходила концентрація Au (мг/мл), зазначена у таблиці 2. Додатково, за необхідності (у випадку, наприклад, колоїдів Au A3, A4, A5, A6, A8, A9) вихідні розчини колоїдного Au самі по собі або після розведення обробляли водним 0,1 мМ розчином NaOH або водним 0,1 мМ розчином HCl для того, щоб довести значення рН перших колоїдів до значення рН, зазначеного у таблиці 2.

Таблиця 2

Результати вивчення характеристик перших колоїдів (A1-A9)

Вихідний розчин колоїдного Au №	Розмір наночастинок Au (нм)	Концентрація Au (мг/мл)	Значення рН
A1	60	0,10	≈2,5
A2	60	0,25	≈2,4
A3	60	0,25	≈3,0
A4	60	0,25	≈1,7
A5	60	0,25	≈8,8
A6	60	0,25	≈4,2
A7	140	0,10	≈2,4
A8	40	0,25	≈4,2
A9	60	0,25	≈6,0

Для застосування у способі виготовлення згідно із даним винаходом придатними були лише стабільні перші колоїди, тобто колоїди, у яких не була відсутня агрегація. Перші колоїди A1-A9 були стабільними, тобто у них не можна було виявити агрегацію наночастинок Au шляхом візуального виявлення зміни кольору з рожевого на пурпурний. Крім того, як видно на фіг. 4, стабільним був ряд колоїдів Au, що характеризувалися значенням дзета-потенціалу, який був нижче або дорівнював -25 мВ, за результатами вимірювання, описаного нижче у розділі IV. Отже, такі колоїди Au також були придатними до застосування як перших колоїдів у способі виготовлення згідно із даним винаходом.

III. Одержання другого колоїду, що містить наночастинок Au та активні репортерні молекули раманівського розсіювання, адсорбовані на поверхні наночастинок Au (D1-D11) (стадія б) способу виготовлення)

Колоїди Au (B1-B8), що характеризуються концентраціями Au (мг/мл) і значеннями рН, зазначеними у таблиці 3, одержували з вихідних розчинів колоїдного Au S1-S3. Одержання передбачало, за необхідності (у випадку, наприклад, колоїдів Au B1 та B5), розведення вихідних розчинів колоїдного Au деіонізованою водою так, щоб виходила зазначена концентрація Au (мг/мл), і доведення значення рН шляхом додавання водного 1 М розчину NaOH у вихідні розчини колоїдного Au як є або після розведення.

Таблиця 3

Результати вивчення характеристик колоїдів Au B1-B9

Колоїд Au №	Розмір наночастинок Au (нм)	Концентрація Au (мг/мл)	Значення рН
B1	60	0,10	≈11,2
B2	60	0,25	≈11,2
B3	60	0,25	≈9,8
B4	60	0,25	≈12,1
B5	90	0,10	≈11,0
B6	60	0,25	≈7,1
B7	60	0,25	≈5,1
B8	40	0,25	≈11,0
B9	60	0,25	≈8,2

Активну репортерну молекулу раманівського розсіювання 1,4-біс((E)-2-(піридин-4-іл)вініл)бензол синтезували так, як описано нижче.

У 50-мл круглодонну колбу з мішалкою завантажували терефталевий альдегід (3,44 г, 25,7 ммоль), 4-метилпіридин (9,57 г, 103 ммоль) і оцтовий ангідрид (25 мл). Суміш кип'ятили у колбі зі зворотним холодильником до повного видалення альдегіду (4 год., перевіряли за допомогою TLC). Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури та гасили шляхом виливання її у 100 мл крижаної води. Холодну суміш нейтралізували до рН 7 за допомогою водного 6 н. розчину NaOH, а бурий утворений осад фільтрували, промивали водою та сушили на повітрі. Екстракція дихлорметаном з наступним концентруванням розчинника досуха давала неочищений продукт, який очищали за допомогою колонкової флеш-хроматографії на силікагелі (метанол/дихлорметан: 5/95) з одержанням 0,875 г цільової активної репортерної молекули раманівського розсіювання у вигляді жовтої твердої речовини (12 %).

Другий колоїд (D1-D11), що містить наночастинки Au з адсорбованими на їхній поверхні активними репортерними молекулами раманівського розсіювання, одержували шляхом додавання деякого об'єму 0,1 мМ розчину активних репортерних молекул раманівського розсіювання в етанолі до 20 мл колоїду Au (B1-B5, B9) або 3 л колоїду Au (B8) з наступним перемішуванням одержаної суміші протягом 30 хв. (у випадку другого колоїду D1-D7, D9-D11)/1 год. (у випадку другого колоїду D8) при кімнатній температурі. У таблиці 4 наведено короткий опис активних репортерних молекул раманівського розсіювання й об'єми розчину активних репортерних молекул раманівського розсіювання в етанолі, які застосовували для одержання другого колоїду D1-D11.

30

Таблиця 4

Одержання других колоїдів D1-D11

Другий колоїд №	З колоїду Au	Активна репортерна молекула раманівського розсіювання	Об'єм 0,1 мМ розчину активних репортерних молекул раманівського розсіювання
D1	B1	(E)-1,2-ди(піридин-4-іл)етен	300 мкл
D2	B2	(E)-1,2-ди(піридин-4-іл)етен	750 мкл
D3	B3	(E)-1,2-ди(піридин-4-іл)етен	750 мкл
D4	B4	(E)-1,2-ди(піридин-4-іл)етен	750 мкл
D5	B2	5-(піридин-4-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-тіол	750 мкл

Одержання других колоїдів D1-D11

Другий колоїд №	З колоїду Au	Активна репортерна молекула раманівського розсіювання	Об'єм 0,1 мМ розчину активних репортерних молекул раманівського розсіювання
D6	B2	1,4-біс((Е)-2-(піридин-4-іл)вініл)бензол	750 мкл
D7	B5	(Е)-1,2-ди(піридин-4-іл)етен	240 мкл
D8	B8	(Е)-1,2-ди(піридин-4-іл)етен	127,5 мкл
D9	B9	(Е)-1,2-ди(піридин-4-іл)етен	750 мкл
D10	B1	1,4-біс((Е)-2-(піридин-4-іл)вініл)бензол	300 мкл
D11	B1	5-(піридин-4-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-тіол	300 мкл

Обробка 20 мл колоїдів Au B6 та B7 зі значенням рН нижче найнижчого значення рН, при якому (Е)-1,2-ди(піридин-4-іл)етен не несе сумарного електричного заряду, за результатами прогнозування Chemicalize.com, за допомогою 750 мкл 0,1 мМ розчину (Е)-1,2-ди(піридин-4-іл)етену в етанолі з наступним перемішуванням одержаної суміші протягом 30 хв. при кімнатній температурі приводила до одержання нестабільних колоїдів, про що свідчило візуальне виявлення зміни кольору суміші з рожевого на пурпурний при перемішуванні. Нестабільні колоїди не можна було застосовувати у способі виготовлення згідно із даним винаходом. Для забезпечення стабільності другого колоїду, тобто щоб уникнути агрегації наночастинок Au, що містяться у вказаному колоїді, було важливо, щоб у процесі одержання та зберігання вказаного колоїду значення ζ -потенціалу було нижче або дорівнювало -25 мВ, а значення рН було вище найнижчого значення рН, при якому активна репортерна молекула раманівського розсіювання, адсорбована на наночастинках Au, не несе сумарного електричного заряду, при цьому вказане значення можна було спрогнозувати, наприклад, за допомогою Chemicalize.com. У цьому змісті значення рН колоїду Au (B1-B5, B8, B9), застосовуваного для одержання другого колоїду, перед обробкою активною репортерною молекулою раманівського розсіювання доводили до значення, яке було вище найнижчого значення рН, при якому активна репортерна молекула раманівського розсіювання, адсорбована на наночастинках Au, що містяться у колоїді Au (B1-B5, B8, B9), не несе сумарний електричний заряд, при цьому вказане значення можна було спрогнозувати, наприклад, за допомогою Chemicalize.com.

IV. Стабільність першого та другого колоїдів. Для того, щоб їх можна було застосовувати у способі виготовлення згідно із даним винаходом, що дає SERS-мітки з великою кількістю агрегатів малого розміру, перший і другий колоїди повинні були бути стабільними, тобто під час одержання та зберігання вказаних колоїдів необхідно було уникнути агрегації наночастинок. Це можна було забезпечити підтримкою значення ζ -потенціалу вказаних колоїдів на рівні, що є нижчим або дорівнює -25 мВ. Як видно на фіг. 4 і у таблиці 5, як перший і другий колоїди у способі виготовлення SERS-міток згідно із даним винаходом можна було застосовувати ряд колоїдів Au.

ζ -потенціал першого колоїду A2 та другого колоїдів D2, D5 та D6 вимірювали залежно від рН при концентрації 0,05 мг Au/мл при кімнатній температурі. Результати представлено у таблиці 5 і графічно зображено на фіг. 4.

Вимірювання ζ -потенціалу здійснювали на Malvern Zetasizer Nano-ZS з 1-мл вигнутими капілярними кюветами. Фізичні властивості води при 25 °C та золота були попередньо завантаженими в обладнання. Кожен з першого колоїду A2 і других колоїдів D2, D5 та D6 розводили деіонізованою водою до концентрації 0,05 мг Au/мл.

Значення ζ -потенціалу першого колоїду A2 і другого колоїду D2, D5 та D6 при приблизно рН, застосовуваному для синтезу SERS-міток згідно із даним винаходом, представлено у 2-му стовпці таблиці 5. Значення ζ -потенціалу першого колоїду A2 і другого колоїду D2, D5 та D6 при рН, при якому колоїди стають нестабільними, представлено у 3-му стовпці таблиці 5. Нестабільність колоїду визначали шляхом візуального виявлення зміни кольору колоїду з рожевого на пурпурний.

Таблиця 5

Результати вимірювання ζ-потенціалу першого та другого колоїдів

№ колоїду Au, розведеного до 0,05 мг Au /мл [Концентрація Au]	ζ-потенціал після розведення (рН після розведення)	ζ -потенціал. при якому колоїд Au стає нестабільним (рН при якому колоїд Au стає нестабільним)
A2	-43 мВ (при рН ≈2,5)	-17 мВ (при рН ≈1,6)
D2	-44 мВ (при рН ≈10)	-22 мВ (при рН ≈6)
D5	-38 мВ (при рН ≈10)	-16 мВ (при рН ≈3,4)
D6	-36 мВ (при рН ≈10)	-23 мВ (при рН ≈7)

Об'єднання першого колоїду та других колоїдів, індукція агрегації та зупинка агрегації (стадія с), d) та е) способу виготовлення)

- 5 V.1SERS-мітки, що містять наночастинки Au однакового розміру (приклади E1-E8, E12-E14)
V.1.a Порціонна агрегація (приклади E1-E7, E12-E14)

10 Другий колоїд (D1-D6, D9-D11, 20 мл) швидко виливали у 80 мл першого колоїду (A1-A5, A9) і суміш перемішували у резервуарі для змішування за допомогою магнітної мішалки. Через 30 секунд після об'єднання колоїдів відбирали аліквоту об'ємом 125 мкл і розводили її водою до 1 мл, тим самим зупиняючи агрегацію. При такому розведенні (12,5 мкг Au/мл, що відповідало приблизно $5,72 \cdot 10^9$ наночастинок Au/мл) агрегація припинялася, і за допомогою лазерного збудження на рівні 785 нм і спектрометра QE65000, придбаного в Ocean Optics Inc., встановленого на час для акумулювання заряду світлодіодом в одну секунду, вимірювали SERS-сигнал. Результати вимірювань SERS-сигналу, здійснюваних на SERS-мітках, виготовлених так, як описано вище, показано у таблиці 6.

15 Як презентовано у прикладах E1-E7 та E12-E14 згідно із заявленим у даному документі способом згідно із даним винаходом та у порівняльних прикладах C1-C3, виборча агрегація частинок першого колоїду та частинок другого колоїду не відбувалася при низьких значеннях рН, таких як 1,8, і при значеннях рН, які були вище найнижчого значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання мали сумарний електричний заряд від 0 до 0,3, за результатами прогнозування Chemicalize.com.

Таблиця 6

Інтенсивність SERS-сигналу від SERS-міток згідно із прикладами E1-E7, E12 та порівняльними прикладами C1-C3

Приклад №	Перший колоїд №	Другий колоїд №	Співвідношення кількості наночастинок першого колоїду та кількості наночастинок другого колоїду	рН колоїду, одержаного при змішуванні першого та другого колоїду	Інтенсивність SERS-сигналу при концентрації 12,5 мкг Au/мл [сигналів у секунду ±500]
E1	A1	D1	≈4:1	≈2,9	9385
E2	A2	D2	≈4:1	≈2,6	14321
E3	A3	D2	≈4:1	≈3,2	17091
E4	A2	D3	≈4:1	≈3,3	7248
E5	A3	D4	≈4:1	≈5,7	14598
E12	A2	D9	≈4:1	≈2,6	11109
C1	A4	D2	≈4:1	≈1,8	3270 (агрегація була відсутня)
C2	A9	D2	≈4:1	≈6,5	512 (агрегація була відсутня)
C3	A5	D2	≈4:1	≈9,9	373 (агрегація була відсутня)

Інтенсивність SERS-сигналу від SERS-міток згідно із прикладами E1-E7, E12 та порівняльними прикладами C1-C3

Приклад №	Перший колоїд №	Другий колоїд №	Співвідношення кількості наночастинок першого колоїду та кількості наночастинок другого колоїду	pH колоїду, одержаного при змішуванні першого та другого колоїду	Інтенсивність SERS-сигналу при концентрації 12,5 мкг Au/мл [сигналів у секунду ± 500]
E6	A2	D5	$\approx 4:1$	$\approx 2,6$	15617
E13	A1	D11	$\approx 4:1$	$\approx 2,9$	13654
E7	A2	D6	$\approx 4:1$	$\approx 2,6$	28993
E14	A1	D10	$\approx 4:1$	$\approx 2,9$	24196

V.1.b Агрегація у проточній системі безперервної дії (приклад E8)

5 Схема проточного реактора безперервної дії, застосовуваного у способі виготовлення згідно із даним винаходом, представлена на фіг. 1b. Резервуар (111b) під тиском містив другий колоїд, а другий резервуар (112b) під тиском містив перший колоїд. Для збору SERS-міток використовували поєднану з атмосферою посудину (114b), яка містила концентрований розчин полімеру для зупинки реакції агрегації. Для транспорту колоїду застосовували трубки із прозорого фторованого етиленпропілену (FEP) від Cole Parmer® Scientific Experts з номінальним внутрішнім діаметром 8 мм. Для поєднання резервуара (111b) під тиском з T-подібним конектором (113b) використовували 30 см трубки з FEP. Для поєднання резервуара (112b) під тиском з T-подібним конектором (113b) використовували 30 см трубки з FEP. Для поєднання T-подібного конектора (113b) з посудиною (114b) для збору використовували 7 м трубки з FEP. Дана секція трубки між T-подібним конектором (113b) і посудиною (114b) для збору була секцією, у якій відбувалася агрегація.

15 Описані вище колоїди A8 (12 л) та D8 (3 л) розміщали у резервуарах 112b та 111b, відповідно. У резервуар (111b), що містив другий колоїд (D8), подавали тиск так, щоб швидкість потоку колоїду становила 0,66 л/хв. У резервуар (112b), що містив перший колоїд (A8), подавали тиск так, щоб швидкість потоку колоїду становила 2,65 л/хв. Після об'єднання в T-подібному конекторі об'єднаний колоїд, що характеризується співвідношенням кількості наночастинок першого колоїду A8 і кількості наночастинок другого колоїду D8, що становило $\approx 4:1$, мав значення pH приблизно 4,8 і швидкість потоку у трубці для агрегації, що становила 3,31 л/хв., що давало лінійну швидкість 1,1 м/с. Вимірювання SERS проводили через прозору трубку з FEP на мітці 1 м по довжині трубки для агрегації за допомогою зонда, з'єданого оптоволоконним кабелем зі спектрометром Ocean Optics QE65000 зі збудженням на рівні 785 нм. Час для акумулювання заряду світлодіодом скорочували так, щоб результат вимірювання на мітці на кінці трубки дорівнював значенню, одержаному в аліквоті об'ємом 50 мкл, відібраній з отвору трубки та розведеної до 1 мл водою (12,5 мкг Au/мл), тобто значення у зразка, у якому агрегація була зупинена розведенням водою, і вимірювали за допомогою лазерного збудження на рівні 785 нм і спектрометра Ocean Optics QE65000 з установленим часом для акумулювання заряду світлодіодом в одну секунду. Результати вимірювань SERS представлено графічно на фіг. 5 у вигляді ромбів, з'єднаних суцільною лінією. Інтенсивність сигналу SERS від зразка, що брали на кінці трубки та мав результат вимірювань 12,5 мкг Au/мл, становила 11044 імпульсів у секунду [± 500].

35 V.2 Перший колоїд і другий колоїд містили наночастинок Au різного розміру (приклади E9-E11)

V.2.a Порціонна агрегація (приклади E9 та E10)

Приклад E9

40 Другий колоїд (D7, 30 мл) швидко виливали у перший колоїд (A1, 55 мл) і суміш перемішували у резервуарі для змішування за допомогою магнітної мішалки. Співвідношення кількості наночастинок першого колоїду та кількості наночастинок другого колоїду становило $\approx 6,3:1$. Після 30 секунд перемішування при pH, що дорівнює приблизно 2,9, агрегацію зупиняли додаванням розчину полімеру, й одержані агрегати додатково покривали діоксидом кремнію згідно зі способом, описаним у US8497131B2, з одержанням цільових SERS-міток. На пластинки діоксиду кремнію краплями наносили ~ 2 -мкл аліквоти SERS-міток і висушували їх. Зразок

візуалізували на автоемісійному сканувальному електронному мікроскопі Hitachi S-4500, одержане зображення представлено на фіг. 3а. SERS-сигнал вимірювали з використанням лазерного збудження на рівні 785 нм і спектрометра QE65000, придбаного в Ocean Optics Inc., із установленим часом для акумулювання заряду світлодіодом в одну секунду. Інтенсивність SERS-сигналу, вимірювана для 12,5 мкг Au/мл, становила 18377 імпульсів у секунду [± 500].

Приклад Е10

Другий колоїд (D7, 20 мл) швидко виливали у перший колоїд (A7, 200 мл) і суміш перемішували у резервуарі для змішування за допомогою магнітної мішалки. Співвідношення кількості наночастинок першого колоїду та кількості наночастинок другого колоїду становило $\approx 2,65:1$.

Після 30 с перемішування при рН, що дорівнює приблизно 2,9, агрегацію зупиняли додаванням розчину полімеру, й одержані агрегати покривали діоксидом кремнію згідно зі способом, описаним у US8497131B2, з одержанням цільових SERS-міток. На пластинки діоксиду кремнію краплями наносили ~ 2 -мкл аліквоти SERS-міток і висушували їх. Зразок візуалізували на автоемісійному сканувальному електронному мікроскопі Hitachi S-4500, одержане зображення представлено на фіг. 3б.

V.2.b Агрегація у проточній системі (приклад Е11)

Схема проточного реактора безперервної дії, застосовуваного у способі виготовлення згідно із даним винаходом, представлена на фіг. 1b. Резервуар (111b) під тиском містив другий колоїд, а другий резервуар (112b) під тиском містив перший колоїд. Для збору SERS-міток і для зупинки агрегації застосовували поєднану з атмосферою посудину (резервуар для збору, 114b). Для транспорту колоїду застосовували трубки із фторованого етиленпропілену (FEP) від Cole Parmer® Scientific Experts з номінальним внутрішнім діаметром 8 мм. Для поєднання резервуара (111b) під тиском з Т-подібним конектором (113b) використовували 30 см трубки з прозорого FEP. Для поєднання резервуара (112b) під тиском з Т-подібним конектором (113b) використовували 30 см трубки з FEP. Для поєднання Т-подібного конектора (113b) з посудиною (114b) для збору використовували 7 м трубки з FEP. Дана секція трубки між Т-подібним конектором (113b) і посудиною (114b) для збору була секцією, у якій відбувалася агрегація.

Описані вище колоїди А6 (12 л) та D8 (3 л) розміщали у резервуарах 112b та 111b, відповідно. У резервуар (111b), що містив другий колоїд (D8), подавали тиск так, щоб швидкість потоку колоїду становила 0,66 л/хв. У резервуар (112b), що містив перший колоїд (А6), подавали тиск так, щоб швидкість потоку активованого колоїду становила 2,65 л/хв. Після об'єднання в Т-подібному конекторі об'єднаний колоїд, що характеризується співвідношенням кількості наночастинок першого колоїду А6 і кількості наночастинок другого колоїду D8, що становило $\approx 1,2:1$, мав рН приблизно 4,8 і швидкість потоку у трубці для агрегації, що становила 3,31 л/хв., що давало лінійну швидкість 1,1 м/с. Вимірювання SERS проводили через прозору трубку з FEP на мітці 1 м по довжині трубки для агрегації за допомогою зонда, з'єднаного оптоволоконним кабелем зі спектрометром Ocean Optics QE65000 зі збудженням на рівні 785 нм. Час для акумулювання заряду світлодіодом скорочували так, щоб результат вимірювання на мітці на кінці трубки дорівнював значенню, одержаному в аліквоті об'ємом 50 мкл, відібраній з отвору трубки та розведений до 1 мл водою (12,5 мкг Au/мл), (стадія e2), і вимірювали за допомогою лазерного збудження на рівні 785 нм і спектрометра Ocean Optics QE65000 із установленим часом для акумулювання заряду світлодіодом в одну секунду. Результати даних вимірювань графічно представлено на фіг. 5 у вигляді кіл, з'єднаних пунктирною лінією. Інтенсивність сигналу SERS від зразка, що брали на кінці трубки та мав результат вимірювань 12,5 мкг Au/мл, становила 28303 імпульсів у секунду [± 500].

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

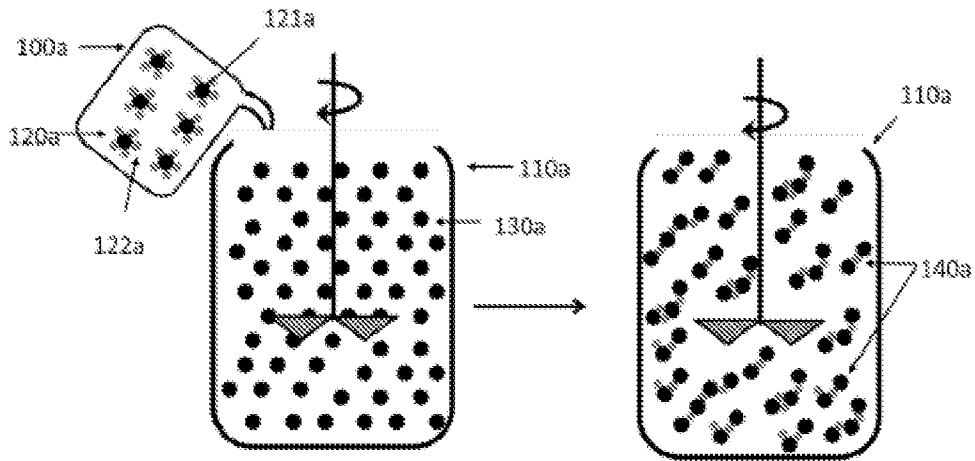
1. Спосіб виготовлення міток для поверхнево-підсиленої раманівської спектроскопії (SERS), що передбачає наступні стадії:

а) одержання першого колоїду, що складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та, по суті, однаковим розміром, диспергованих у водному розчиннику, та стабілізуючого засобу, адсорбованого на поверхні вказаних наночастинок, та характеризується значенням ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ, причому, по суті, однаковий розмір наночастинок являє собою розмір, що відповідає максимальному фізичному розміру у межах ± 20 нм від середнього розміру, визначеного для вказаних наночастинок за допомогою способів електронної мікроскопії;

б) одержання другого колоїду, що складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та, по суті, однаковим розміром, диспергованих у водному розчиннику, активних репортерних молекул

- раманівського розсіювання, адсорбованих на поверхні вказаних наночастинок, та стабілізуючого засобу, адсорбованого на поверхні вказаних наночастинок, та характеризується значенням ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ, причому, по суті, однаковий розмір наночастинок являє собою розмір, що відповідає максимальному фізичному розміру у межах ± 20 нм від середнього розміру, визначеного для вказаних наночастинок за допомогою способів електронної мікроскопії;
- 5 с) об'єднання першого колоїду із другим колоїдом таким чином, щоб співвідношення кількості наночастинок першого колоїду та кількості наночастинок другого колоїду становило від 25:1 до 1:1;
- 10 d) індукцію агрегації наночастинок за допомогою будь-якої зі стадій d1)-d2) або їхньої комбінації: d1) змішування третього колоїду, одержаного на стадії с), при рН у діапазоні від 2,2 до найнижчого значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання мають сумарний електричний заряд, який не перевищує 0,3; d2) додавання розчину солі до третього колоїду, одержаного на стадії с); та
- 15 e) зупинку агрегації.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що на стадії с) співвідношення кількості наночастинок першого колоїду та кількості наночастинок другого колоїду становить від 5:1 до 1:1.
3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що на стадії d2) розчин солі, який додають до третього колоїду, одержаного на стадії с), являє собою розчин неорганічної солі.
- 20 4. Спосіб за будь-яким із пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що стадія b) передбачає наступні стадії, здійснювані у порядку b1)-b3):
- b1) одержання колоїду, що складається з наночастинок з плазмонною поверхнею та, по суті, однаковим розміром, диспергованих у водному розчиннику, та стабілізуючого засобу, адсорбованого на поверхні вказаних наночастинок, та характеризується значенням ζ -
- 25 потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ, причому, по суті, однаковий розмір наночастинок являє собою розмір, що відповідає максимальному фізичному розміру у межах ± 20 нм від середнього розміру, визначеного для вказаних наночастинок за допомогою способів електронної мікроскопії;
- b2) доведення рН колоїду до значення, що перевищує найнижче значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання, які повинні адсорбуватися на поверхні наночастинок, не несуть сумарного електричного заряду, при цьому підтримуючи значення ζ -
- 30 потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ, переважно є нижчим -40 мВ; та
- b3) додавання розчину активних репортерних молекул раманівського розсіювання у розчиннику до колоїду, одержаного на стадії b2), при цьому підтримуючи значення ζ -потенціалу, що є нижчим або дорівнює -25 мВ.
- 35 5. Спосіб за будь-яким із пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що стабілізуючий засіб вибраний з карбонових кислот, солей карбонових кислот, фосфорних кислот, солей фосфорних кислот, аскорбінової кислоти, солей аскорбінової кислоти та їхніх сумішей.
6. Спосіб за будь-яким із пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що наночастинок другого колоїду мають абсорбований на їхній поверхні субмоношар або моношар активних репортерних молекул раманівського розсіювання.
- 40 7. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що на стадії b3) розчин активних репортерних молекул раманівського розсіювання у розчиннику містить суміш із двох або більше різних активних репортерних молекул раманівського розсіювання.
- 45 8. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що на стадії с) співвідношення кількості наночастинок першого колоїду та кількості наночастинок другого колоїду становить від 4:1 до 3:1.
9. Спосіб за будь-яким із пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що стадія d1) додатково передбачає додавання кислого розчину до третього колоїду, одержаного на стадії с), при перемішуванні, так щоб значення рН в одержаного колоїду становило у діапазоні від 2,2 до найнижчого значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання мають сумарний електричний заряд, який не перевищує 0,3.
- 50 10. Спосіб за будь-яким із пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що рН першого колоїду доводять так, щоб рН третього колоїду, одержаного на стадії d1), становив від 2,2 до найнижчого значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання мають сумарний електричний заряд, який не перевищує 0,3.
- 55 11. Спосіб за будь-яким із пп. 1-10, який **відрізняється** тим, що стадія e) передбачає будь-яку з наступних стадій e1)-e4):
- e1) доведення рН колоїду, одержаного на стадії d), до значення, що перевищує найнижче значення рН, при якому активні репортерні молекули раманівського розсіювання, які повинні
- 60

- адсорбуватися на поверхні наночастинок, не несуть сумарного електричного заряду;
 е2) розведення колоїду, одержаного на стадії d), водою;
 е3) додавання полімеру до колоїду, одержаного на стадії d);
 е4) додавання попередника діелектричного матеріалу до колоїду, одержаного на стадії d).
- 5 12. Спосіб за будь-яким із пп. 1-11, який **відрізняється** тим, що стадія е) складається зі стадії е3), та спосіб виготовлення додатково передбачає розведення колоїду, одержаного на стадії е3), водою та/або нанесення на SERS-мітки покриття діелектричного матеріалу.
13. Спосіб за будь-яким із пп. 1-12, який **відрізняється** тим, що стадії с) та d) здійснюють одночасно у проточній системі безперервної дії.
- 10 14. Спосіб за п. 13, який **відрізняється** тим, що стадію е) здійснюють у проточній системі безперервної дії.
15. Спосіб за будь-яким із пп. 1-14, який **відрізняється** тим, що наночастинок першого колоїду та наночастинок другого колоїду мають однаковий розмір.
16. Спосіб за будь-яким із пп. 1-14, який **відрізняється** тим, що розмір наночастинок першого колоїду відрізняється від розміру наночастинок другого колоїду.
- 15 17. Спосіб за будь-яким із пп. 1-16, який **відрізняється** тим, що плазмонна поверхня наночастинок у першому колоїді та/або плазмонна поверхня наночастинок у другому колоїді виконана із золота.



Фиг. 1а

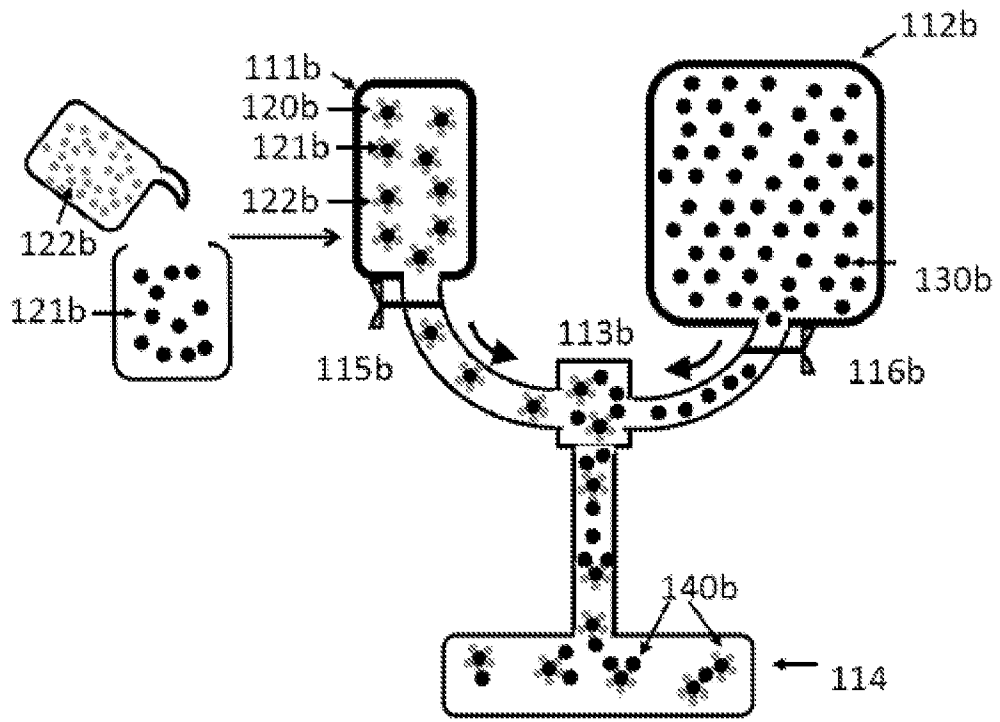


Fig. 1b

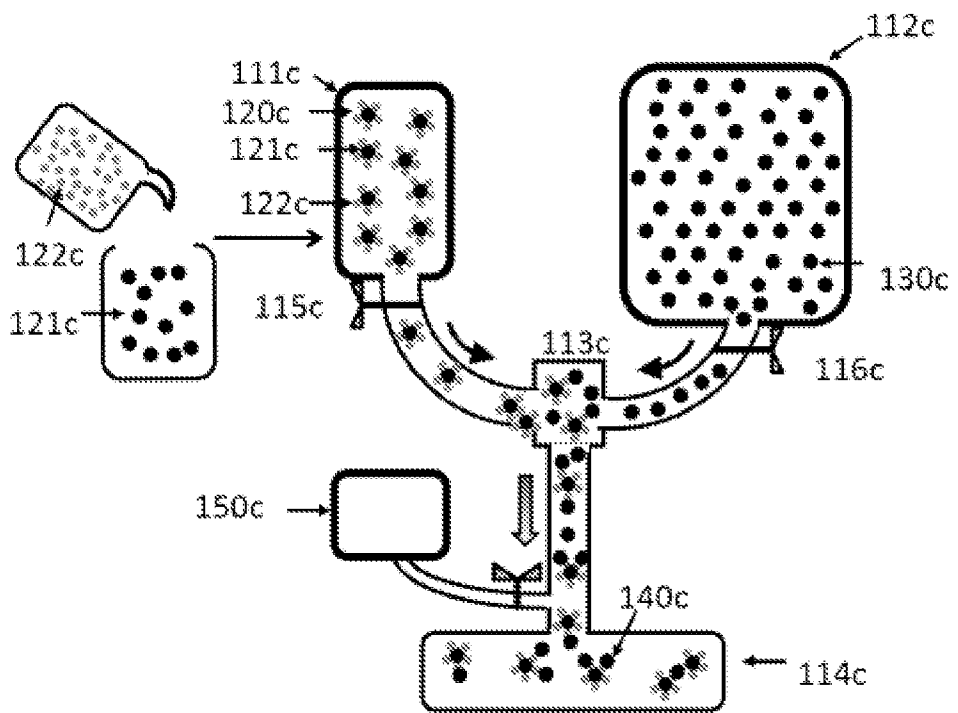
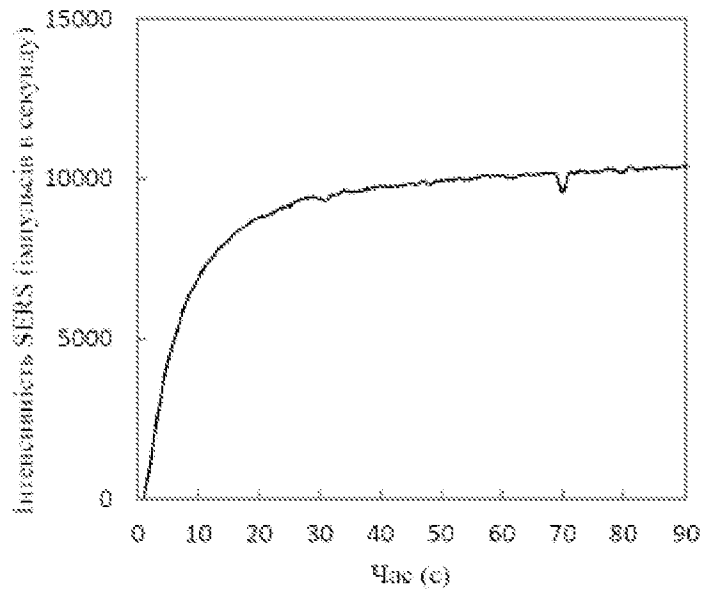
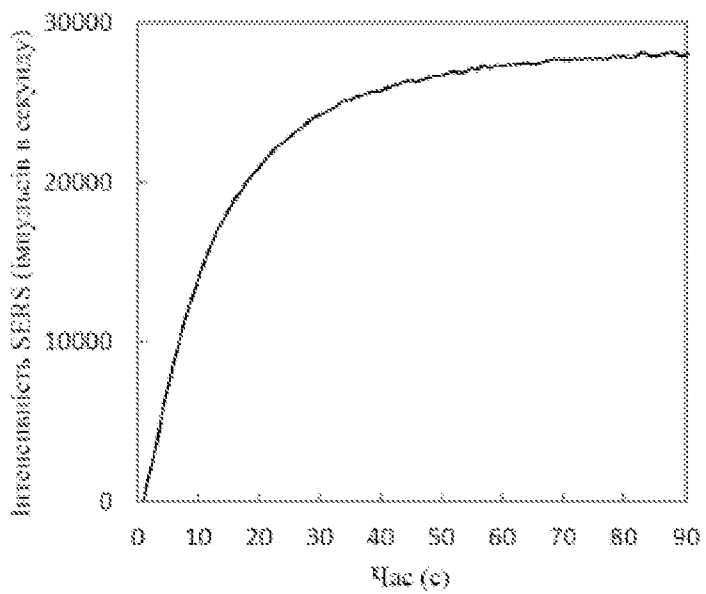


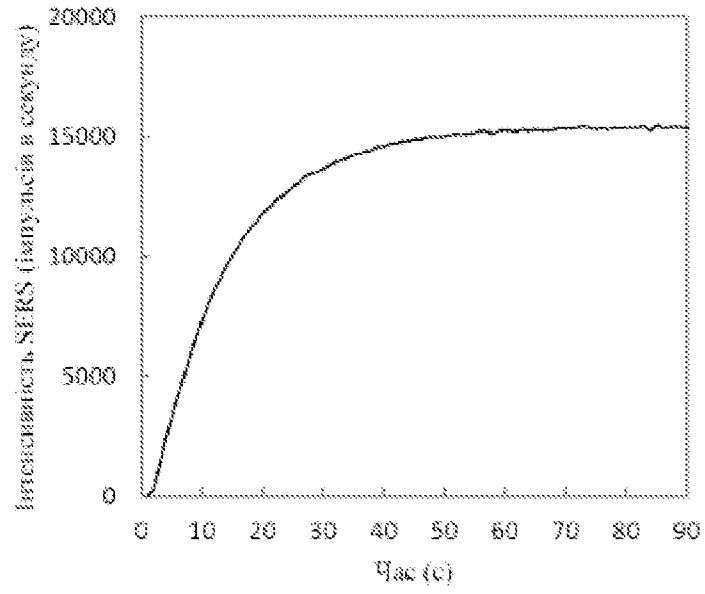
Fig. 1c



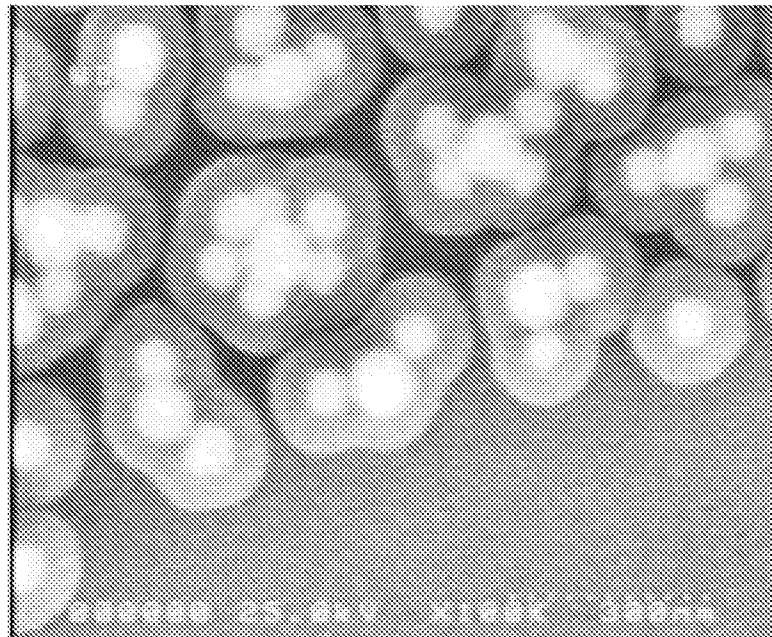
Фиг. 2а



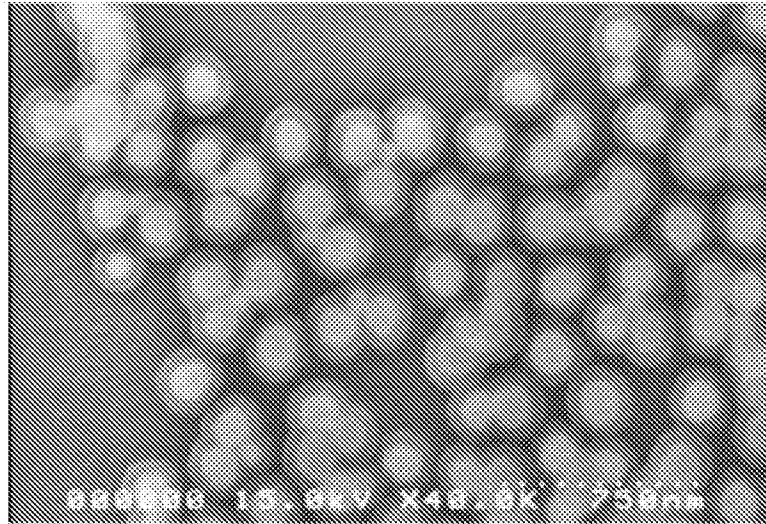
Фиг. 2б



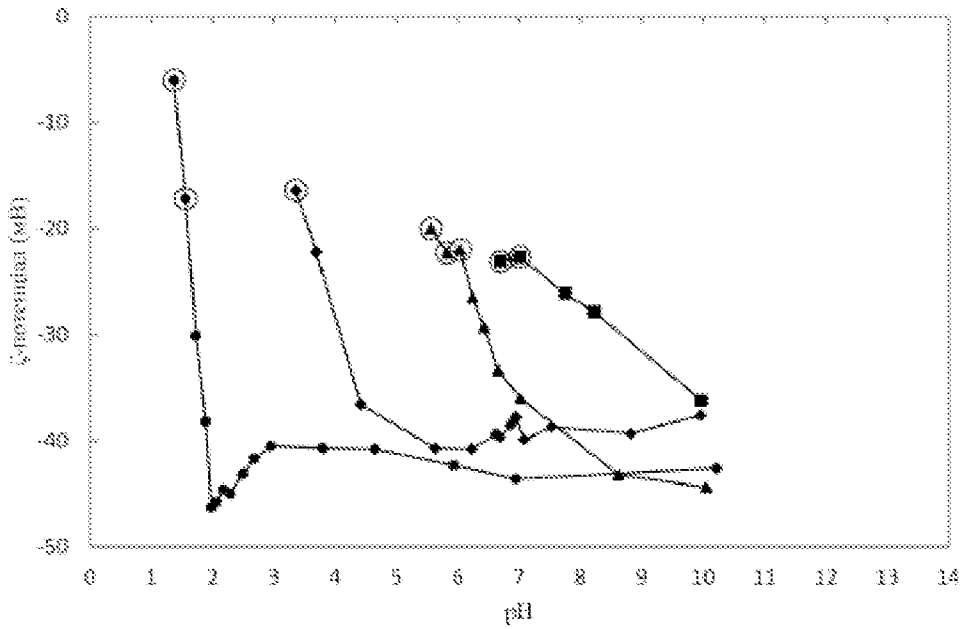
Фіг. 2с



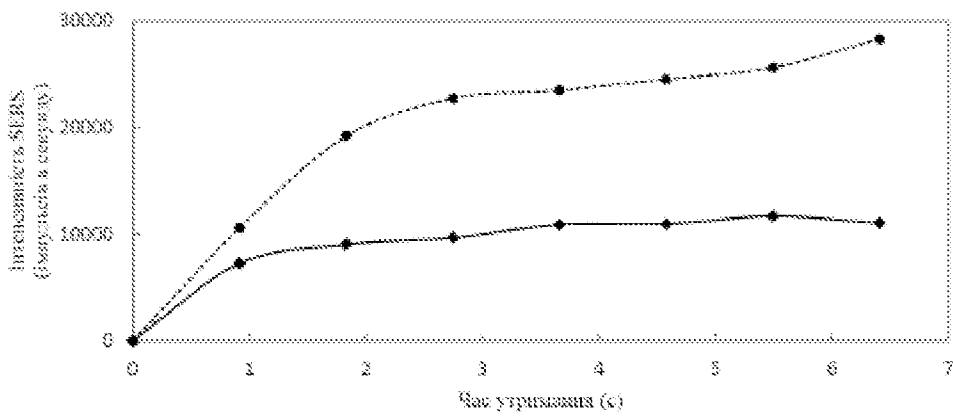
Фіг. 3а



Фиг. 3b



Фиг. 4



Фиг. 5

