

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243214 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **433973**

(22) Data zgłoszenia: **2020.05.14**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.11.15 BUP 33/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.07.17 WUP 29/2023**

(51) MKP:

C01B 32/15 (2017.01)

C09K 11/06 (2006.01)

C09K 11/65 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA KRAKOWSKA IM. TADEUSZA
KOŚCIUSZKI, Kraków, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

MAREK PIĄTKOWSKI, Kraków, PL

ŁUKASZ JANUS, Wieliczka, PL

JULIA RADWAN-PRAGŁOWSKA, Kraków, PL

DARIUSZ BOGDAŁ, Kraków, PL

(74) Pełnomocnik:

Andrzej Stachowski, Kraków, PL

(54) Tytuł:

Sposób otrzymywania węglowych kropek kwantowych modyfikowanych powierzchniowo

PL 243214 B1

Opis wynalazku

DZIEDZINA TECHNIKI

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania węglowych kropek kwantowych (CQDs) modyfikowanych powierzchniowo związkami organicznymi, nadających się do zastosowania jako środki do biodetekcji komórek nowotworowych, jonów metali oraz związków nisko- i wysokocząsteczkowych istotnych biologicznie, bioobrazowania komórek i organelli komórkowych, elementów sensorów i biosensorów, systemów kontrolowanego dostarczania i uwalniania leków, biotuszy, a także do śledzenia procesów biochemicznych.

STAN TECHNIKI

Węglowe kropki kwantowe (CQDs) to kuliste materiały o wielkości od 1 do 10 nm, cechujące się właściwościami luminescencyjnymi, dobrą rozpuszczalnością w roztworach wodnych, zdolnością do przenikania błon komórkowych, a także niską cytotoksycznością. Należą one do nanomateriałów zero-wymiarowych, przez co rozumie się w nanotechnologii takie, które mają rozmiar poniżej 100 nm we wszystkich trzech wymiarach geometrycznych. Ich unikalną cechą jest zdolność do fluorescencji o zmiennej charakterystyce.

Węglowe kropki kwantowe mają rdzeń węglowy, który może posiadać liczne grupy funkcyjne na swojej powierzchni, takie jak karboksylowe, aminowe i hydroksylowe. Węglowe kropki kwantowe mogą być otrzymywane metodami dwu- lub jednoetapowymi.

Do dwuetapowych metod można zaliczyć ablację laserową, metody elektrochemiczne oraz utlenianie sadzy kwasem mineralnym.

Wśród metod jednoetapowych można wymienić syntezę hydrotermalną, syntezę w warunkach promieniowania mikrofalowego oraz pirolizę.

Jednym z najważniejszych parametrów węglowych kropek kwantowych jest wydajność kwantowa fluorescencji, która determinuje ich aplikacyjność. Można na nią wpłynąć poprzez takie metody jak pasywacja lub modyfikacja powierzchni.

Do najbardziej znanych metod modyfikacji powierzchni węglowych kropek kwantowych w procesach dwuetapowych zalicza się:

1. Autopasywacja powierzchni na drodze utleniania nanokropek węglowych otrzymanych w procesie elektrolizy elektrody grafitowej;
2. Pasywacja powierzchni za pomocą poli(glikolu etylowego) nanokropek kwantowych otrzymanych w wyniku ablacji laserowej prekursora węglowego (grafitu);
3. Funkcjonalizacja powierzchni nanokropek węglowych otrzymanych w wyniku utleniania sadzy kwasem azotowym, za pomocą pochodnych amin.

Natomiast do najbardziej znanych metod modyfikacji powierzchni węglowych kropek kwantowych w procesach jednoetapowych zalicza się:

1. Autopasywacja powierzchni powstających nanokropek węglowych nieprzereagowanymi lub nie-degradowanymi prekursorami bogatymi w heteroatomy takie jak S, N, O;
2. Funkcjonalizacja powierzchni powstających nanokropek węglowych na drodze tworzenia wiązań kowalencyjnych pomiędzy grupami funkcyjnymi obecnymi na rdzeniu węglowym a grupami funkcyjnymi pochodzącymi od związków modyfikujących bogatych w heteroatomy takie jak S, N, O.

Wymienione wyżej metody modyfikacji powierzchni nanokropek węglowych cechują się niską powtarzalnością, a w przypadku metody hydrotermalnej także czasochłonnością oraz trudnością w kontrolowaniu zachodzenia procesu. Dodatkowo, stosowanie związków modyfikujących, takich jak pirydyna czy trietyloamina oraz ich pochodne, zwiększa cytotoksyczność modyfikowanych nanokropek.

Ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie, biokompatybilność oraz zdolność do fluorescencji o różnej charakterystyce, węglowe kropki kwantowe znajdują zastosowanie w medycynie i farmacji do wizualizacji komórek i ich organelli, badania procesów biochemicznych, czy detekcji różnych związków istotnych biologicznie. Z tego względu, kluczowym jest, aby nanokropki węglowe cechowały się brakiem cytotoksyczności i wysoką czystością.

Obecnie znane i stosowane metody zwiększania kwantowej wydajności fluorescencji są albo niewystarczające, albo wymagają stosowania toksycznych substancji modyfikujących. To powoduje, że poszukiwane są nowe metody modyfikacji powierzchniowej węglowych kropek kwantowych, których efektem będzie znaczące polepszenie właściwości nanokropek bez efektu cytotoksyczności.

Spośród znanych sposobów otrzymywania węglowych kropek kwantowych najbardziej do rozwiązania według niniejszego wynalazku zbliżony jest sposób przedstawiony w opisie patentowym

CN 102583307 B, który ujawnia metodę syntezy nanokropek węglowych w polu promieniowania mikrofalowego. Według tego opisu, w pierwszej kolejności przygotowuje się roztwór źródła węgla organicznego: mleka, miodu, jaj, soku z cytryny, magnolii, itp. w ultraczystej wodzie w stosunku od 1 : 10 do 1 : 50. Następnie mieszaninę umieszcza się w reaktorze mikrofalowym i poddaje promieniowaniu o mocy od 15 W do 1000 W, w temperaturze 150°C–180°C przez okres od 15 do 300 minut.

W artykule pt. „Organic amine-grafted carbon quantum dots with tailored surface and enhanced photoluminescence properties”, Carbon, 2015, vol. 91, strony 291–297, opisano metodę modyfikacji powierzchni węglowych kropek kwantowych otrzymanych na drodze chemicznego utleniania i wytrawiania antracytu kwasem azotowym. Według rozwiązania węglowe kropki kwantowe mieszano z chlorkiem tionylu, a następnie dodawano odpowiednich amin, takich jak etylenodiamina (EDA), butanodiamina (BDA), heksanodiamina (HMDA), dodecyloamina (DDA) i oktadecyloamina (ODA). Modyfikację prowadzono w atmosferze azotu w temperaturze 110°C.

W artykule pt. „Nitrogen Doped Carbon Quantum Dots Modified by Lens culinaris β -Galactosidase as a Fluorescent Probe for Detection of Lactose”, Journal of Fluorescence, 2019, vol. 29, strony 1213–1219, przedstawiona jest metoda modyfikacji węglowych kropek kwantowych otrzymanych metodą hydrotermalną z mocznika i kwasu cytrynowego przez 12 godzin w temperaturze 200°C. Artykuł ujawnia sposób modyfikacji nanokropek węglowych dotowanych azotem na drodze immobilizacji β -galaktozydazy, enzymu pochodzącego z soczewicy jadalnej. W pierwszym etapie szczepienia (modyfikacji) powierzchni przeprowadza się reakcję węglowych kropek kwantowych z mieszaniną dwóch związków: *N*-hydroksysukcynimidu i *N*-etylo-*N*-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu, co prowadzi do utworzenia wiązań kowalencyjnych pomiędzy pierwszorzędowymi grupami aminowymi oraz grupami karboksylowymi obecnymi na powierzchni kropek kwantowych. Następnie, według metody przedstawionej w publikacji, dodaje się roztworu bydlęcej surowicy płodowej, aby zablokować niespecyficzne miejsca wiązań na powierzchni nanokropek węglowych. W ostatnim etapie do częściowo zmodyfikowanych nanokropek węglowych dodaje się roztwór enzymu w buforze fosforanowym i mieszaninę inkubuje się w temperaturze pokojowej przez 12 godzin.

Jak wskazują doniesienia z literatury fachowej i patentowej, obecnie nie jest znana metoda otrzymywania węglowych kropek modyfikowanych powierzchniowo związkami z grupy kumaryn.

CEL WYNAŁAZKU

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu otrzymywania węglowych kropek kwantowych modyfikowanych powierzchniowo związkami z grupy kumaryn bez stosowania toksycznych związków, tak aby poprawić ich właściwości luminescencyjne, i by mogły posłużyć do biodetekcji komórek nieprawidłowych, jonów metali i związków istotnych biologicznie, bioobrazowania komórek i struktur komórkowych, jako element systemów kontrolowanego dostarczania i uwalniania leków, element biotuszy, sensorów i biosensorów oraz do śledzenia procesów biochemicznych.

ISTOTA WYNAŁAZKU

Istota wynalazku polega na tym, że w pierwszym etapie procesu surowiec organiczny poddaje się reakcji karbonizacji w środowisku wodnym, w obecności czynnika zwęglającego, a następnie produkt reakcji karbonizacji oddziela się od mieszaniny poreakcyjnej i oczyszcza otrzymując kropki węglowe o niemodyfikowanej powierzchni, a następnie w drugim etapie oczyszczone węglowe kropki kwantowe poddaje reakcji modyfikacji powierzchni na drodze szczepienia związkiem organicznym, po czym produkt reakcji modyfikacji powierzchni oddziela się od mieszaniny poreakcyjnej i oczyszcza, dla otrzymania finalnego roztworu, zawierającego węglowe kropki kwantowe o zmodyfikowanej powierzchni.

Zgodnie z wynalazkiem, sposób charakteryzuje się tym, że w pierwszym etapie surowiec organiczny zawierający heteroatomy tlenu i/lub azotu umieszcza się w środowisku wodnym, w naczyniu reakcyjnym transparentnym dla promieniowania mikrofalowego, dodaje się środek zwęglający w postaci wodnego roztworu kwasu, w ilości 10–50% mas. w stosunku do surowca organicznego i prowadzi się proces karbonizacji surowca w tym roztworze, przy mieszaniu substratów z zastosowaniem promieniowania mikrofalowego o mocy 300–500 W oraz w temperaturze 210–250°C, przez czas 1–3 godz., a otrzymaną mieszaninę poreakcyjną zobojętnia się wodnym roztworem wodorotlenku sodu do pH w zakresie 6–7, następnie produkt karbonizacji oddziela się od zawartych w środowisku poreakcyjnym związków niskocząsteczkowych oraz nieprzereagowanych substratów i makrocząstek węgla poprzez filtrację przez filtry membranowe o średnicy porów 0,2–0,45 μm lub poprzez wirowanie mieszaniny poreakcyjnej z prędkością 2000–4500 obr./min, po czym otrzymamy roztwór, zawierający nanocząstki węglowe, oczyszcza się z niskocząsteczkowych produktów ubocznych organicznych i nieorganicznych

oraz nano- i mikrocząstek za pomocą dializy, stosując wodę destylowaną jako czynnik oczyszczający i membranę o MWCO z zakresu 500–1000 Da.

Oczyszczony produkt reakcji karbonizacji, w postaci wodnego roztworu nanokropek węglowych o niemodyfikowanej powierzchni (będących semiprekursorem, na bazie którego otrzymuje się produkt finalny) kieruje się następnie do drugiego etapu procesu. Roztwór ten może być ewentualnie wysuszony lub zamrożony i poddany procesowi liofilizacji celem usunięcia rozpuszczalnika, przed skierowaniem go do drugiego etapu procesu.

W drugim etapie procesu powierzchnię nanomateriałów węglowych otrzymanych w reakcji karbonizacji modyfikuje się, sporządzając roztwór nanokropek węglowych o niemodyfikowanej powierzchni, zawierający nie mniej niż 0,2 mg nanokropek na 1 ml rozpuszczalnika organicznego lub wody, a następnie dodając do tego roztworu pochodną kumaryny, która w swojej strukturze zawiera przynajmniej jedną reaktywną grupę funkcyjną aldehydową i/lub karboksylową, zachowując stosunek masowy nanomateriał węglowy : pochodna kumaryny wynoszący 1 : 1–10, przy czym reakcję modyfikacji powierzchni prowadzi się w naczyniu reakcyjnym transparentnym dla mikrofal przy mieszaniu substratów, poddając mieszaninę działaniu pola promieniowania mikrofalowego o mocy 150–500 W, przy ciśnieniu 1–20 atm., przez 30–120 min. Następnie tak zmodyfikowane nanomateriały węglowe oczyszcza się od nieprzereagowanych substratów oraz produktów ubocznych, stosując proces dializy z zastosowaniem membran o MWCO 500–1000 Da, i z użyciem wody jako czynnika oczyszczającego, otrzymując produkt finalny w postaci roztworu nanokropek węglowych o powierzchni zmodyfikowanej związkami z grupy kumaryn.

Korzystnie jako surowiec organiczny do karbonizacji stosuje się glukozę, sacharozę lub chitosan.

Korzystnie w reakcji karbonizacji stosuje się kwas solny lub siarkowy(VI) jako czynnik zwęglający.

Korzystnie w reakcji karbonizacji stosuje się wodę destylowaną w ilości 100 g na 0,5 do 33 g surowca, a najkorzystniej 100 g na 20 g surowca organicznego.

Korzystnie karbonizację surowca organicznego prowadzi się w polu promieniowania mikrofalowego, stosując ciśnienie 1 do 20 atm.

Korzystnie przed procesem oczyszczania na membranach dializacyjnych, mieszaninę poreakcyjną z reakcji karbonizacji zobojętnia się wodnym roztworem wodorotlenku sodu o stężeniu 2–5% mas. do wartości pH z zakresu 6–7.

Korzystnie oczyszczanie nanomateriałów węglowych, przed procesem modyfikacji ich powierzchni, prowadzi się stosując wodę destylowaną o przewodnictwie właściwym z zakresu 1,7–2,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ i membrany dializacyjne o MWCO z zakresu 500–1000 Da.

Korzystnie w reakcji modyfikacji powierzchni wykorzystuje się wodny roztwór niemodyfikowanych węglowych kropek kwantowych o stężeniu 5 mg/ml.

Korzystnie reakcję modyfikacji powierzchni nanokropek węglowych za pomocą kumaryn przeprowadza się stosując temperaturę w zakresie 140–200°C, przy stosunku masowym nanomateriał węglowy : pochodna kumaryny w zakresie 1: 5–7.

Korzystnie w reakcji modyfikacji powierzchni nanokropek węglowych używa się pochodnych kumaryny wykazujących fluorescencję w zakresie promieniowania ultrafioletowego w zakresie 250–380 nm.

Korzystnie w reakcji modyfikacji powierzchni nanokropek węglowych używa się pochodnych kumaryny wykazujących fluorescencję w zakresie promieniowania widzialnego 380–800 nm.

Korzystnie w reakcji modyfikacji powierzchni nanokropek węglowych używa się pochodnych kumaryny wykazujących fluorescencję w zakresie bliskiej podczerwieni 800–1200 nm.

Korzystnie proces oczyszczania zmodyfikowanych powierzchniowo nanomateriałów węglowych przeprowadza się stosując wodę destylowaną o przewodnictwie właściwym z zakresu 1,7–2,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ i membrany dializacyjne o MWCO z zakresu 500–1000 Da.

Węglowe kropki kwantowe stanowiące produkt opisanego wyżej sposobu, modyfikowane związkami z grupy kumaryn, cechują się zwiększoną wydajnością kwantową fluorescencji w porównaniu do nanomateriałów niepoddawanych funkcjonalizacji oraz brakiem cytotoksyczności.

Sposób według wynalazku eliminuje konieczność stosowania toksycznych związków organicznych z grupy amin (dietyloamina, trietyloamina, hydroksyloamina, pirydyna itp.), a przy tym jest szybki i relatywnie tani.

Rozwiązanie według wynalazku zobrazowano w poniższych przykładach, nieograniczających zakresu jego ochrony.

Ponadto na załączonym rysunku pokazano schematy otrzymywania węglowych kropek kwantowych modyfikowanych powierzchniowo związkami z grupy kumaryny, przy czym fig. 1 przedstawia schemat procesu według przykładu 1, fig. 2 przedstawia schemat procesu według przykładu 2, a fig. 3 przedstawia schemat procesu według przykładu 3.

PRZYKŁADY

Przykład 1

Do 3 g glukozy dodano 20 ml wody oraz 0,5 ml 35% mas. roztworu kwasu solnego. Roztwór umieszczono w reaktorze mikrofalowym ciśnieniowym stosując moc promieniowania 300 W w czasie 3 godzin i prowadząc reakcję w temperaturze 250°C. Produkt reakcji karbonizacji glukozy przeniesiono do zlewki i umieszczono w łaźni ultradźwiękowej w temperaturze 40°C, ekstrahując CQDs przez 20 minut z zwęglonej masy poreakcyjnej. Roztwór zobojętniono wodnym roztworem NaOH do pH = 7, a następnie przesączono przez filtr membranowy o średnicy porów wynoszącej 200 nm. Przesącz umieszczono w rurze dializacyjnej o MWCO (Molecular Weight Cut-Off) – 500–1000 Da i prowadzono proces dalszego oczyszczania przez 4 doby, stosując wodę destylowaną jako rozpuszczalnik. Otrzymane oczyszczone nanomateriały węglowe z karbonizacji glukozy, w postaci wodnego roztworu posłużyły jako semiprekursory do otrzymywania CQDs szczepionych (modyfikowanych) powierzchniowo pochodnymi kumaryny. CQDs otrzymane z glukozy zawierają na swojej powierzchni grupy hydroksylowe (-OH), które mogą tworzyć wiązania kowalencyjne z karboksylowymi pochodnymi kumaryny. W celu zmodyfikowania powierzchni CQDs otrzymanych z karbonizacji glukozy, do roztworu wodnego zawierającego 5 mg/ml CQDs dodano 20 mg kwasu 7-(N,N-dietyl)kumaryno-3-karboksylowego. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w ciśnieniowym reaktorze mikrofalowym i prowadzono reakcję modyfikacji stosując moc promieniowania 300 W, czas 120 minut i temperaturę 200°C. Produkt reakcji oczyszczono, stosując membrany dializacyjne MWCO = 500–1000 Da oraz wodę destylowaną jako rozpuszczalnik, oddzielając do fazy wodnej nieprzereagowaną pochodną kumaryny. Otrzymano zmodyfikowane powierzchniowo CQDs o właściwościach hydrofilowych, dobrze rozpuszczalne w wodzie, które wykazywały fluorescencję w zakresie 400–650 nm przy wzbudzeniu 365 nm, posiadające wydajność kwantową fluorescencji wynoszącą 16%. Otrzymany nanomateriał zbadano pod kątem cytotoksyczności wykorzystując linię komórkową L929 metodą testu XTT opisanego w protokole dostępnym na stronie: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11465015001?lang=pl®ion=PL>. Żywotność komórek wynosiła powyżej 90%, przy stężeniu zmodyfikowanych CQDs wynoszącym 0,03 mg/ml. Schemat procesu przedstawiono na załączonym rysunku na fig. 1.

Przykład 2

Do reaktora mikrofalowego ciśnieniowego dodano 2 g sacharozy, 0,2 g kwasu siarkowego(VI) o stężeniu 96% mas. oraz 20 ml wody destylowanej. Reakcję karbonizacji sacharozy prowadzono przez 60 minut, stosując moc promieniowania mikrofalowego wynoszącą 500 W, temperatura mieszaniny reakcyjnej wynosiła 210°C. Otrzymany produkt reakcji zobojętniono stosując 5% mas. roztwór NaOH i wirowano przy 4500 rpm w celu oddzielenia zawiesiny węgla, oraz prowadzono dalszy proces oczyszczania na membranach dializacyjnych MWCO 500–1000 Da, stosując jako rozpuszczalnik wodę destylowaną, przez 3 doby. Oczyszczone CQDs otrzymane z karbonizacji sacharozy poddano reakcji modyfikacji powierzchni kwasem kumaryno-3-karboksylowym. Do reaktora mikrofalowego ciśnieniowego dodano 10 ml roztworu CQDs o stężeniu wynoszącym 5 mg/ml oraz 20 mg kwasu kumaryno-3-karboksylowego. Reakcję prowadzono stosując moc promieniowania mikrofalowego wynoszącą 500 W przez 30 minut i temperaturę 190°C. W wyniku reakcji pochodnej kumaryny z CQDs powstały wiązania chemiczne pomiędzy grupami karboksylowymi kumaryny a hydroksylowymi CQDs. Otrzymane zmodyfikowane CQDs poddano oczyszczaniu, stosując proces membranowy oraz wodę destylowaną jako rozpuszczalnik, używając membrany dializacyjne MWCO 500–1000 Da. Otrzymano CQDs zmodyfikowane powierzchniowo o właściwościach hydrofilowych, dobrze rozpuszczalne w wodzie. Otrzymany nanomateriał zbadano pod kątem cytotoksyczności wykorzystując linię komórkową L929 metodą testu XTT. Żywotność komórek wynosiła ponad 90% przy stężeniu zmodyfikowanych CQDs wynoszącym 0,035 mg/ml. Schemat procesu przedstawiono na załączonym rysunku na fig. 2.

Przykład 3

W naczyniu reaktora mikrofalowego ciśnieniowego umieszczono 1 g chitozanu o stopniu deacetylacji wynoszącym 90%, dodano 20 ml wody oraz 0,5 g 35% mas. roztworu kwasu solnego. Zastosowano do reakcji karbonizacji moc promieniowania mikrofalowego wynoszącą 300 W, w czasie 2 godzin

i temperaturze 250°C. Produkt reakcji karbonizacji chitozanu zobojętniono, przesączono przez filtr membranowy o średnicy porów 200 nm. Proces dalszego oczyszczania prowadzono z zastosowaniem rur dializacyjnych z regenerowanej celulozy MWCO 500–1000 Da, stosując wodę destylowaną jako rozpuszczalnik, przez okres 5 dni. Otrzymany oczyszczony produkt reakcji karbonizacji zatężono, tak aby otrzymać stężenie CQDs na poziomie 3 mg/ml. Do 20 ml tak uzyskanego roztworu zawierającego produkt reakcji karbonizacji chitozanu dodano 10 mg 2-(7-N,N-dietylo)-2-okso-2H-chromen-3-yl acetaldehydu i wstawiono do reaktora mikrofalowego ciśnieniowego na czas 100 minut, temperatura procesu wynosiła 140°C, a moc promieniowania mikrofalowego 150 W. Produkt reakcji oczyszczano metodą dializacyjną jak w przykładzie 2, otrzymując CQDs zmodyfikowane powierzchniowo aldehydową pochodną kumaryny. Otrzymano zmodyfikowane powierzchniowo CQDs, które miały właściwości hydrofilowe, były dobrze rozpuszczalne w wodzie i wykazywały fluorescencję w zakresie 400–650 nm przy wzbudzeniu 365 nm, posiadając wydajność kwantową fluorescencji wynoszącą 14%. Otrzymany nanomateriał zbadano pod kątem cytotoksyczności wykorzystując linię komórkową L929 metodą testu XTT. Żywotność komórek wynosiła ponad 90% przy stężeniu zmodyfikowanych CQDs wynoszącym 0,02 mg/ml. Schemat procesu przedstawiono na załączonym rysunku na fig. 3.

KORZYSTNE SKUTKI WYNAŁAZKU

Sposób według wynalazku umożliwia wytworzenie nanokropek węglowych modyfikowanych powierzchniowo związkami z grupy kumaryn, charakteryzujących się korzystniejszymi właściwościami, zwiększoną wydajnością kwantową fluorescencji oraz czystością w porównaniu do węglowych kropek kwantowych otrzymywanych znanymi metodami, a także zwiększoną rozpuszczalnością w roztworach wodnych i niższą lub brakiem cytotoksyczności w stosunku do kropek kwantowych o rdzeniu niewęglowym.

W procesie prowadzonym sposobem według wynalazku modyfikacja powierzchniowa kropek kwantowych o rdzeniu węglowym przeprowadzana jest z zastosowaniem związków organicznych o właściwościach luminescencyjnych o niskiej cytotoksyczności w porównaniu do innych barwników fluorescencyjnych. Dzięki temu jest możliwe otrzymanie węglowych kropek kwantowych o polepszonej charakterystyce spektroskopowej bez zwiększania ich cytotoksyczności.

Węglowe kropki kwantowe (CQDs) modyfikowane powierzchniowo według wynalazku posiadają dodatkowe układy chromoforowe, co polepsza ich zdolność do emisji energii w zakresie UV-Vis, a także zwiększa ich fotostabilność i odporność na fotobielenie.

Modyfikacja powierzchni nanokropek węglowych związkami z grupy kumaryn pozwala na zastosowanie ich w detekcji biomolekuł, śledzeniu procesów biochemicznych, czy wizualizacji struktur komórkowych, co w przypadku niemodyfikowanych kumaryn jest niemożliwe lub ograniczone ze względu na niską lub brak rozpuszczalności w roztworach wodnych tej grupy związków.

Sposób modyfikacji pozwala na kontrolę stopnia modyfikacji powierzchni nanomateriałów poprzez dopasowanie warunków reakcji takich jak zmiana ciśnienia, zmiana mocy promieniowania mikrofalowego, temperatury prowadzenia procesu i czasu jego trwania.

Ponadto, korzystną cechą sposobu według wynalazku jest brak szkodliwych produktów ubocznych, a także niewykorzystywanie w procesie toksycznych rozpuszczalników, czy modyfikatorów.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania węglowych kropek kwantowych modyfikowanych powierzchniowo związkami organicznymi, polegający na tym, że w pierwszym etapie surowiec organiczny poddaje się reakcji karbonizacji w środowisku wodnym, w obecności czynnika zwęglającego, a następnie produkt reakcji karbonizacji oddziela się od mieszaniny poreakcyjnej, oczyszcza i w drugim etapie poddaje reakcji modyfikacji powierzchniowej związkiem organicznym, po czym produkt reakcji modyfikacji powierzchni oddziela się od mieszaniny poreakcyjnej i oczyszcza, **znamienny tym**, że w pierwszym etapie surowiec organiczny zawierający heteroatomy tlenu i/lub azotu umieszcza się w środowisku wodnym, w naczyniu reakcyjnym transparentnym dla promieniowania mikrofalowego, dodaje się środek zwęglający w postaci wodnego roztworu kwasu, w ilości 10–50% mas. w stosunku do surowca organicznego i prowadzi się proces karbonizacji surowca w tym roztworze, przy mieszaniu substratów z zastosowaniem promieniowania mikrofalowego o mocy 300–500 W oraz w temperaturze 210–250°C, przez czas 1–3 godz., a otrzymaną mieszaninę poreakcyjną zobojętnia się wodnym roztworem wodorotlenku sodu do

- pH w zakresie 6–7, następnie produkt karbonizacji oddziela się od zawartych w środowisku poreakcyjnym związków niskocząsteczkowych oraz nieprzereagowanych substratów i makrocząstek węgla poprzez filtrację przez filtry membranowe o średnicy porów 0,2–0,45 μm lub poprzez wirowanie mieszaniny poreakcyjnej z prędkością 2000–4500 obr./min, po czym otrzymamy roztwór, zawierający nanocząstki węglowe, oczyszcza się z niskocząsteczkowych produktów ubocznych organicznych i nieorganicznych oraz nano- i mikrocząstek za pomocą dializy, stosując wodę destylowaną jako czynnik oczyszczający i membranę o MWCO z zakresu 500–1000 Da, a następnie w drugim etapie powierzchnię nanomateriałów węglowych otrzymanych w reakcji karbonizacji modyfikuje się, sporządzając roztwór nanokropek węglowych o niemodyfikowanej powierzchni, zawierający nie mniej niż 0,2 mg nanokropek na 1 ml rozpuszczalnika organicznego lub wody, a następnie dodając do tego roztworu pochodną kumaryny, która w swojej strukturze zawiera przynajmniej jedną reaktywną grupę funkcyjną aldehydową i/lub karboksylową, zachowując stosunek masowy nanomateriał węglowy : pochodna kumaryny wynoszący 1 : 1–10, przy czym reakcję modyfikacji powierzchni prowadzi się w naczyniu reakcyjnym transparentnym dla mikrofal przy mieszaniu substratów, poddając mieszaninę działaniu pola promieniowania mikrofalowego o mocy 150–500 W, przy ciśnieniu 1–20 atm., przez 30–120 min, a następnie tak zmodyfikowane nanomateriały węglowe oczyszcza się od nieprzereagowanych substratów oraz produktów ubocznych, stosując proces dializy z zastosowaniem membran o MWCO 500–1000 Da, i z użyciem wody jako czynnika oczyszczającego, otrzymując produkt finalny w postaci roztworu nanokropek węglowych o powierzchni zmodyfikowanej związkami z grupy kumaryn.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako surowiec organiczny stosuje się glukozę, sacharozę lub chitozan.
 3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w reakcji karbonizacji stosuje się kwas solny lub kwas siarkowy(VI).
 4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w reakcji karbonizacji stosuje się wodę destylowaną w ilości 100 g na 0,5 do 33 g surowca, korzystnie 100 g na 20 g surowca organicznego.
 5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że karbonizację surowca organicznego prowadzi się w polu promieniowania mikrofalowego, stosując ciśnienie 1 do 20 atm.
 6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że przed procesem oczyszczania na membranach dializacyjnych, mieszaninę poreakcyjną z reakcji karbonizacji zobojętnia się wodnym roztworem wodorotlenku sodu o stężeniu 2–5% mas. do wartości pH z zakresu 6–7.
 7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że oczyszczanie nanomateriałów węglowych, przed procesem modyfikacji ich powierzchni, prowadzi się stosując wodę destylowaną o przewodnictwie właściwym z zakresu 1,7–2,5 $\mu\text{S/cm}$ i membrany dializacyjne o MWCO z zakresu 500–1000 Da.
 8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w reakcji modyfikacji powierzchni wykorzystuje się wodny roztwór niemodyfikowanych węglowych kropek kwantowych o stężeniu 5 mg/ml.
 9. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reakcję modyfikacji powierzchni nanokropek węglowych za pomocą kumaryn przeprowadza się stosując temperaturę w zakresie 140–200°C, przy stosunku masowym nanomateriał węglowy : pochodna kumaryny w zakresie 1 : 5–7.
 10. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w reakcji modyfikacji powierzchni nanokropek węglowych używa się pochodnych kumaryny wykazujących fluorescencję w zakresie promieniowania ultrafioletowego w zakresie 250–380 nm.
 11. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w reakcji modyfikacji powierzchni nanokropek węglowych używa się pochodnych kumaryny wykazujących fluorescencję w zakresie promieniowania widzialnego 380–800 nm.
 12. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w reakcji modyfikacji powierzchni nanokropek węglowych używa się pochodnych kumaryny wykazujących fluorescencję w zakresie bliskiej podczerwieni 800–1200 nm.
 13. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces oczyszczania zmodyfikowanych powierzchniowo nanomateriałów węglowych przeprowadza się stosując wodę destylowaną o przewodnictwie właściwym z zakresu 1,7–2,5 $\mu\text{S/cm}$ i membrany dializacyjne o MWCO z zakresu 500–1000 Da.

Rysunki

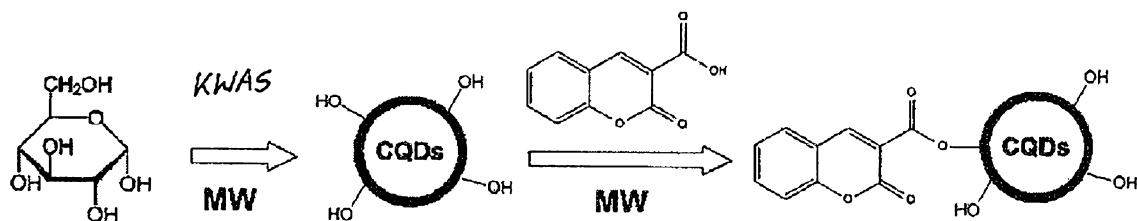


Fig. 1

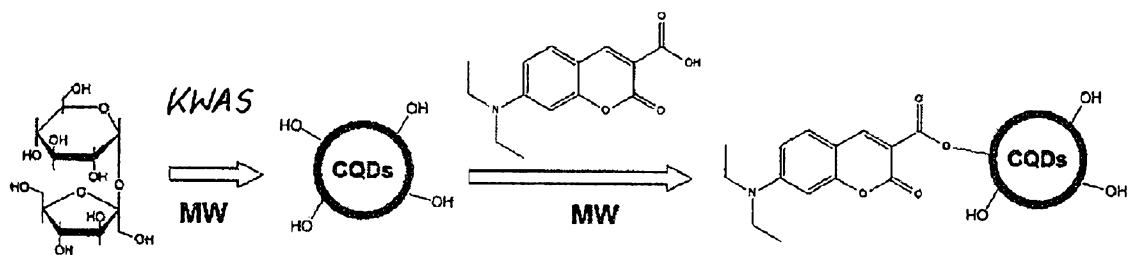


Fig. 2

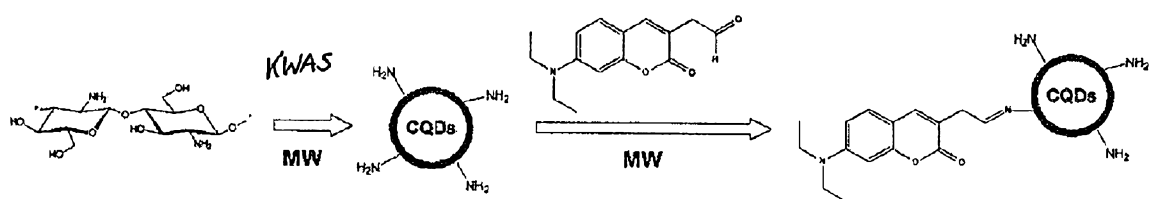


Fig. 3