

УДК 544.77.023.5

СИНТЕЗ МОНОДИСПЕРСНЫХ СИЛИКАТНЫХ ЧАСТИЦ МЕТОДОМ КОНТРОЛИРУЕМОГО ДОРАЩИВАНИЯ

© 2023 г. Б. Н. Хлебцов¹, *, А. М. Буров¹¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ “Саратовский научный центр РАН” (ИБФРМ РАН), пр. Энтузиастов, д. 13, Саратов, 410049 Россия

*e-mail: khlebtsov_b@ibppm.ru

Поступила в редакцию 17.03.2023 г.

После доработки 05.05.2023 г.

Принята к публикации 05.05.2023 г.

Разработка простого и воспроизводимого протокола синтеза изодисперсных коллоидов кремнезема в широком диапазоне размеров от десятков нанометров до нескольких микрометров представляет значительный интерес с точки зрения их многочисленных приложений в фотонике, биосенсинге и биомедицине. При использовании широко известного метода Штобера происходит непрерывное образование и рост зародышевых частиц, что приводит к получению полидисперсных коллоидов. В работе использован метод последовательного доращивания силикатных частиц, получаемых гидролитической конденсацией тетраэтилортосиликата в спирто-водной среде с использованием щелочного катализатора. Показано, что данная методика позволяет получать коллоиды с размером частиц от 50 нм до 3 мкм и стандартным отклонением менее 5%. Дополнительным преимуществом методики постадийного доращивания является возможность включать в состав силикатной матрицы функциональные молекулы и наночастицы, например, флуорофоры или репортеры гигантского комбинационного рассеяния.

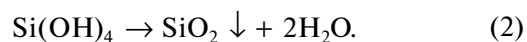
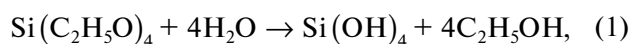
DOI: 10.31857/S0023291223600293, EDN: ZQMCQA

ВВЕДЕНИЕ

Силикатные (кремнеземные, SiO₂) наночастицы представляют значительный интерес для множества приложений, включая фотонику [1], биомедицину [2], биосенсинг [3], катализ [4] и многие другие [5, 6], благодаря простоте синтеза, возможности получать частицы в широком диапазоне размеров, биоинертности и высокой химической стабильности. Следует отметить, что для ряда перспективных приложений требуется строгий контроль размеров и полидисперсности образцов. Например, для получения плотноупакованных двумерных коллоидных кристаллов, которые используются в качестве компонентов детекторов газа [7] или фотонных устройств [8], подходят только коллоиды с полидисперсностью менее 5%, а положения максимума отражения света в таком кристалле определяется размером частиц согласно закону Брэгга [9]. Отмечалось также, что полидисперсность частиц является существенным препятствием для получения высококачественных синтетических опалов [10] и золотых наноболочек на кремнеземных ядрах [11].

В 1968 г. Штобер и соавторы опубликовали метод получения силикатных наночастиц путем гидролитической конденсации силикатных прекур-

соров в среде одноатомного спирта с использованием аммиака в качестве катализатора [12]. Метод заключался в простом смешивании реагентов при комнатной температуре и реакции в течение 2–3 ч при постоянном перемешивании. Размер частиц в оригинальной работе составлял от десятков до сотен нанометров и контролировался путем изменения концентрации аммиака, вида спирта (метанол, этанол, изопропанол), а также вида силанового прекурсора. Метод Штобера оказался настолько прост, что за последующие пятьдесят лет тысячи научных коллективов успешно применили его модификации для синтеза SiO₂ наночастиц в своих лабораториях, а оригинальная статья имеет более двенадцати тысяч цитирований. На сегодняшний день есть консенсус, что наиболее простой и воспроизводимой является модификация метода с использованием этанола в качестве растворителя и тетраэтилортосиликата в качестве прекурсора [13]. Контроль размера здесь осуществляется путем варьирования концентрации тетраэтилортосиликата, аммиака и воды. Двухстадийная реакция гидролитической конденсации имеет вид:



Несмотря на простоту и воспроизводимость реакции, метод Штобера имеет ряд ограничений. Во-первых, с помощью него невозможно получить коллоиды с диаметром частиц менее 50 нм (некоторые авторы указывают нижний порог 70 нм [14]). Следует отметить, что для синтеза таких малых частиц чаще используют другие методики, такие как синтез в мицеллах и микроэмульсиях [15, 16] или гидролиз в присутствии аминокислот в водной среде [17, 18], распространен также синтез пористых силикатных наночастиц с добавлением ПАВ [19]. Однако эти подходы уступают в простоте и воспроизводимости методу Штобера. Во-вторых, сравнительно монодисперсные коллоиды (<5%) получаются только для размеров частиц 120–500 нм [20, 21], в то время как для меньших и больших частиц полидисперсность достигает 20% [20]. Это обусловлено тем, что при синтезе происходит непрерывное образование и рост зародышевых частиц, а добавление в реакционную смесь слишком малого или слишком большого количества тетраэтилортосиликата нарушает баланс между скоростью гидролиза и конденсации. За последние 50 лет было предпринято множество попыток построить кинетические кривые реакции и получить оптимальные соотношения компонентов для получения монодисперсных коллоидов. Были исследованы множество различных параметров, включая концентрации реагентов, скорость и порядок их добавления, температуру реакции, скорость перемешивания и многие другие [5]. Особенно следует отметить работу Богуша и Жуковски [22], в которой предлагался процесс многоступенчатого дорастивания частиц, состоящий в разделении общего требуемого количества ТЭОС на порции и постадийного их добавления в реакционную среду после завершения предыдущей стадии роста. В дальнейшем метод многостадийного дорастивания частиц для получения частиц заданного размера широко использовался многими исследователями [20, 23]. Несмотря на это, до настоящего времени нет единого универсального подхода, позволяющего получать монодисперсные коллоиды в широком диапазоне размеров.

Одним из возможных решений проблемы полидисперсности может стать использование многостадийного протокола, при котором частицы, полученные на определенной стадии, используются как центры конденсации (“зародыши”) для роста более крупных частиц. Основными задачами на пути реализации этого подхода являются получение малых (менее 50 нм) монодисперсных зародышевых частиц для первой стадии дорастивания и дальнейший контроль отсутствия образования вторичных зародышей. Данная идеология применялась ранее для получения силикатных наночастиц с диаметрами от 20 до 200 нм путем гидролиза тетраэтилортосиликата в водной среде в присутствии L-аргинина [21]. Ранее авторы работы

[21] и мы в работе [24] показали, что эти частицы могут использоваться в качестве зародышей для дорастивания в более крупные частицы модифицированным методом Штобера. В настоящей работе мы демонстрируем, что методика многостадийного дорастивания может быть использована для получения силикатных наночастиц с контролируемым размером в диапазоне 50–3000 нм и полидисперсностью менее 5%. Дополнительными преимуществами разработанной методики постадийного дорастивания являются отсутствие необходимости использовать абсолютизированный этанол и возможность включать в состав силикатной матрицы функциональные молекулы и наночастицы, например, флуорофоры или репортеры гигантского комбинационного рассеяния (ГКР).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В работе использовались следующие реагенты. Аммиак (30% водный раствор, CAS-номер: 1336-21-6), флуоресцин изотиоцианат (ФИТЦ, >97%), 4-нитротиофенол (97%), цитрат натрия (>99%), золотохлористоводородная кислота (99.99%), полиакриловая кислота (мол. масса 1800, CAS-номер: 9003-01-4), поливинилпирролидон (мол. масса 10000, CAS-номер: 9003-39-8) были получены из Sigma-Aldrich. Тетраэтилортосиликат (ТЭОС, 98%) был получен из Maclin. В работе использовали 96% этиловый спирт (Кировский БиоХим завод) и деионизированную воду, очищенную с помощью установки УВОИ-МФ (Медиана-фильтр), удельное сопротивление 18.2 МОм/см.

Синтез силикатных “зародышей” диаметром 30–50 нм

Для получения силикатных частиц диаметром 50 нм 2.5 мг полиакриловой кислоты растворяли в 30 мл этанола. Затем к этому раствору добавляли 1.5 мл раствора аммиака (здесь и далее использовался 30% раствор без разбавления). Далее с помощью шприцевого насоса добавляли 0.75 мл тетраэтилортосиликата по каплям в течение 4 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании (700 об./мин). После завершения добавления ТЭОС, реакцию продолжали при перемешивании еще 2 ч. Полученные частицы использовали в дальнейшем без дополнительной очистки. Для получения силикатных частиц среднего размера 30 нм протокол был абсолютно таким же, за исключением того, что количество добавляемой полиакриловой кислоты было 5 мг.

*Метод последовательного доращивания
для синтеза силикатных частиц
с диаметром от 80 до 3000 нм*

Разработанная методика синтеза силикатных наночастиц схематически показана на рис. 1. Каждый шаг синтеза заключался в следующем. В колбу объемом 50 мл наливали 24 (или 18 для доращивания частиц размером более 1 мкм) мл этанола, 2 мл воды, 1.5 мл раствора аммиака, 6 (или 12 для доращивания частиц размером более 1 мкм) мл коллоида “зародышевых” частиц. Помещали коллоид на магнитную мешалку при 700 об./мин. Далее с использованием шприцевого насоса добавляли 0.75 мл тетраэтилортосиликата по каплям в течение 4 ч. После завершения добавления ТЭОС реакцию продолжали при перемешивании еще 2 ч до полной конденсации прекурсора. Этот процесс можно наблюдать визуально по остановке помутнения коллоида. Полученные частицы центрифугировали при 10000–200 g в зависимости от размера частиц и ресуспендировали в 30 мл этанола с помощью ультразвука. Процедуру центрифугирования/ресуспендирования осадка повторяли 6 раз для полной отмытки от продуктов реакции и вторичных частиц малых размеров. В завершении полученный на каждом этапе коллоид использовался в качестве “зародышей” на следующем этапе доращивания. Синтез считался законченным при достижении размера частиц требуемого значения.

*Получение силикатных наночастиц
со встроенными флуоресцентными молекулами*

В качестве модельного флуорофора использовался флуоресцин изотиоцианат. На первом этапе получали силанизированный прекурсор красителя путем смешивания 1 мг ФИТЦ с 5 мг 3-аминопропилтриметоксисилана в 2 мл этанола. Инкубировали раствор в течение 24 ч. На втором этапе в колбу объемом 50 мл наливали 24 мл этанола, 2 мл воды, 1.5 мл раствора аммиака, 6 мл коллоида “зародышевых” частиц с диаметрами 302 ± 12 нм и концентрацией кремнезема 8 мг/мл. Помещали коллоид на магнитную мешалку при 700 об./мин. Далее каждые 12 мин добавляли 30 мкл ТЭОС и 5 мкл раствора силинизированного флуорофора. Проводили 10 добавлений. Полученные частицы центрифугировали при 5000 g и ресуспендировали в 30 мл воды с помощью ультразвука.

*Получение наночастиц
со встроенными ГКР-метками*

На первом этапе получали 13 нм золотые наночастицы методом Френса [25]. Для этого 100 мл 0.01% водного раствора золотохлористоводородной кислоты нагревали в колбе с обратным водным холодильником до 100°C при постоянном перемешивании на магнитной мешалке (700 об./мин). Да-

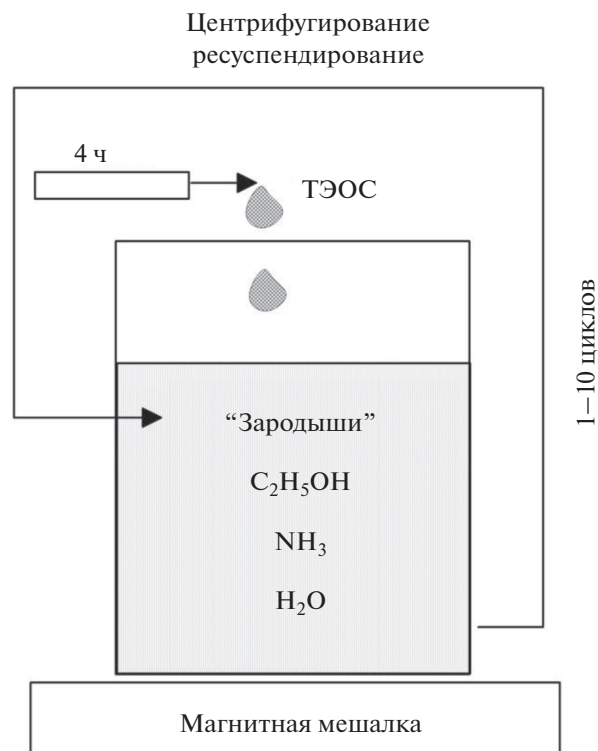


Рис. 1. Схематическое изображение процесса синтеза кремнеземных наночастиц методом многостадийного доращивания.

лее к полученному кипящему раствору добавляли 3 мл 1% раствора цитрата натрия. Реакцию восстановления золота можно визуально наблюдать по изменению цвета коллоида с бледно-желтого до ярко-красного. На втором этапе к коллоиду силикатных частиц добавляли 3-аминопропилтриметоксисилан (финальная концентрация 1%). Инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Полученные аминированные частицы центрифугировали при 5000 g 10 мин и ресуспендировали в 30 мл воды с помощью ультразвука. На третьем этапе 6 мл коллоида силикатных частиц добавляли к 100 мл коллоида 13 нм золотых наночастиц. За счет электростатического взаимодействия отрицательно заряженные золотые частицы сорбировались на поверхность положительно заряженных аминированных силикатных частиц. Важно использовать как минимум 10-кратный избыток золотых наночастиц для предотвращения агрегации коллоидов. Инкубировали смесь 1 ч при перемешивании 700 об./мин. Для дополнительной стабилизации добавляли поливинилпирролидон до финальной концентрации 1 мг/мл. Инкубировали дополнительно 1 ч при перемешивании 700 об./мин. Далее частицы центрифугировали 4000 g 10 мин и ресуспендировали в 6 мл этанола. Добавляли 20 мкл 2 мМ спиртового раствора 4-нитротиофенола и инкубировали 1 ч. За счет образования Au–S ре-

портерные молекулы связываются с поверхностью золотой наночастицы. Полученный коллоид, состоящий из силикатных ядер с золотыми наночастицами и молекулами 4-тионитрофенола на поверхности, использовали в качестве “зародышей” для дальнейших циклов доращивания, как было описано ранее.

Характеризация образцов

В качестве основного метода для определения размеров и полидисперсности наночастиц использовалась просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Среди преимуществ данной методики следует отметить возможность одновременного определения размера, степени полидисперсности частиц, а также, во многих случаях, визуализацию структуры частиц (например, для объектов вида ядро/оболочка). Хорошо известные недостатки ПЭМ, связанные с трудоемкостью, ограниченной выборкой анализируемых частиц и агрегацией при сушке, не столь актуальны для нашего вида образцов.

Силикатные наночастицы исследовали с помощью электронного микроскопа “Libra 120” (Карл Цейсс, Германия) с ускоряющим напряжением 120 кВ в центре коллективного пользования “Симбиоз” при ИБФРМ РАН. Медные сетки, покрытые формваровой пленкой, использовали в качестве подложек. На подложку наносили 3 мкл этаноловой дисперсии наночастиц и выдерживали в течение 30 мин.

Концентрация наночастиц определялась гравиметрически, путем взвешивания на аналитических весах сухого остатка после лиофилизации коллоида. Общий вес частиц в 1 мл коллоида вместе с данными ПЭМ позволяют однозначно определять числовую концентрацию частиц по формуле:

$$N = \frac{3m}{4\pi\rho R^3}, \quad (3)$$

где m – масса кремнезема, выраженная в мг, ρ – плотность кремнезема, выраженная в мг/см³, R – радиус частиц, выраженный в сантиметрах.

Спектры оптической плотности образцов измеряли с помощью спектрофотометра Specord S300 (Analytik Jena, Германия) в диапазоне длин волн 350–800 нм с использованием кювет с длиной оптического пути 1 см. Для измерения исходные коллоиды ресуспендировались в десятикратном объеме этанола.

Измерение гидродинамического размера наночастиц проводили с использованием установки Zetasizer ZS (Malvern). Измерения проводили в четырехсторонних пластиковых кюветах, частицы диспергировали в этаноле, оптическая плотность коллоида на длине волны 633 нм составляла

около 0.1. Использовали стандартную процедуру накопления и обработки корреляционной функции, предложенную производителем установки.

Спектры флуоресценции образцов наночастиц с инкорпорированными флуорофорами измеряли с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (США) в 1 см четырехсторонних кварцевых кюветах при возбуждении длиной волны 488 нм. Для уменьшения эффекта внутреннего фильтра [26] исходные коллоиды разводились в 40 раз.

Спектры гигантского комбинационного рассеяния образцов наночастиц с инкорпорированными ГКР-репортерами измеряли с использованием установки PeakSeeker Pro (Ocean optics, США) в 1 см четырехсторонних кварцевых кюветах при возбуждении длиной волны 785 нм. Мощность лазерного излучения равнялась 30 мВт, время накопления сигнала 10 с. Для уменьшения эффекта внутреннего фильтра лазерный луч был сфокусирован вблизи стенки кюветы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для синтеза силикатных “зародышевых” частиц с размерами в диапазоне 30–50 нм мы использовали модифицированный метод Штобера с добавлением в реакционную смесь полиакриловой кислоты (ПАК). В присутствии аммиака происходит агрегация молекул ПАК с образованием нерастворимого в этаноле комплекса ПАК-NH₃ [27]. Данный комплекс служит затравкой для дальнейшего синтеза кремнезема. Это, совместно с постепенным добавлением тетраэтилортосиликата в течение 4 ч, приводит к отсутствию вторичного “зародышеобразования” и синтезу монодисперсного коллоида. Следует отметить, что важность постепенного добавления ТЭОС для получения монодисперсных коллоидов отмечалась в работе Богуша и Жуковски [22]. Детальное исследование влияния скорости добавления прекурсоров было позже проведено также в работе [23]. Одновременное введение большого количества ТЭОС приводит к значительному превышению критической концентрации по продуктам гидролиза и, как следствие, к мультимодальности распределения частиц по размерам и их коагуляции.

На рис. 2а показано электронно-микроскопическое изображение силикатных наночастиц, полученных при добавлении 2.5 мг ПАК в реакционную смесь. Видно, что частицы имеют квазисферическую форму. Гистограмма распределения по диаметрам представлена на вставке рис. 2а. Средний размер частиц составляет 48 нм, а среднеквадратичное отклонение диаметров 2 нм. Здесь и далее в статье электронно-микроскопическое определение среднего размера и стандартного отклонения выполнялось при обсчете 200 наночастиц на изображениях. Следует отметить принци-

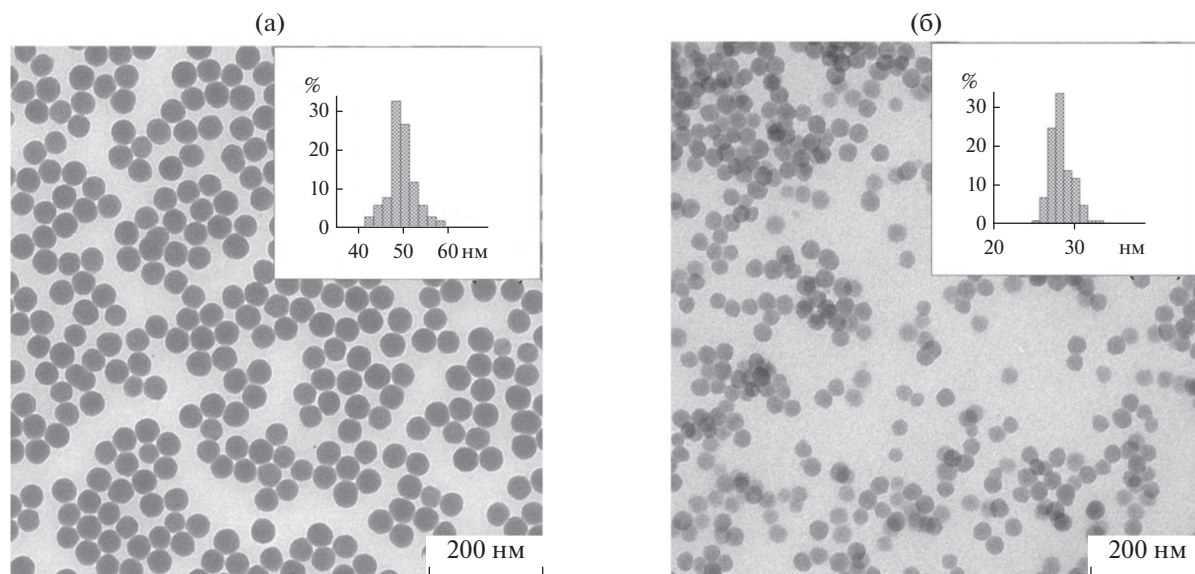


Рис. 2. Электронно-микроскопические изображения силикатных наночастиц, получаемых гидролитической конденсацией тетраэтилортосиликата при добавлении 2.5 (а) и 5 (б) мг полиакриловой кислоты в реакционную смесь. На вставках показаны гистограммы распределения частиц по размерам. Масштабный отрезок на ПЭМ изображениях равен 200 нм.

пиально важную роль ПАК в формировании относительно монодисперсного коллоида с диаметром частиц менее 70 нм. Например, при соблюдении всех условий синтеза за исключением добавления ПАК, происходит формирование полидисперсного коллоида со средним диаметром частиц 170 нм (см. Приложение рис. 7). Увеличение концентрации ПАК приводит к увеличению центров конденсации и, следовательно, к уменьшению среднего размера силикатных частиц. Например, на рис. 2б показано электронно-микроскопическое изображение частиц, полученных при добавлении 5 мг ПАК в реакционную смесь. Видно сохранение квазисферической формы кремнезема, уменьшение среднего диаметра до 29 нм. Дальнейшее увеличение количества добавляемой ПАК до 10 мг приводит к формированию малых частиц различных форм со средним размером менее 20 нм. Предположительно эти структуры можно охарактеризовать как комплекс из конденсированного силиката и полиакриловой кислоты. Еще одним важным моментом на пути к получению монодисперсных частиц с диаметром менее 70 нм является низкая скорость поступления ТЭОС в реакционную смесь. Мы заметили, что изменение протокола реакции с четырехчасового введения на одномоментное добавление всего прекурсора приводит к формированию агрегированного коллоида (см. Приложение рис. 8). Наконец, мы обнаружили важность использования ПАК с низким молекулярным весом (1.8 кДа). При использовании ПАК с молекулярными весами 35 и 100 кДа наблюдается помутнение ростового раствора и выпадение осадка еще

до начала добавления тетраэтилортосиликата. Очевидно, что при взаимодействии аммиака с полиакриловой кислотой с высокой молекулярной массой образуются полидисперсные микро и наночастицы, которые не могут служить “зародышами” для дальнейшего синтеза монодисперсных силикатных частиц.

Следующим этапом в работе была реализация методики доращивания “зародышевых” частиц до требуемого размера. В качестве первичных “зародышей” мы использовали частицы, показанные на рис. 2а. На рис. 3 показаны типичные электронно-микроскопические изображения силикатных частиц, полученных на 1–9 шагах доращивания. Видно, что все частицы имеют сферическую форму, относительно изодисперсны и не агрегированы. Размер получаемых частиц последовательно растет с каждой стадией доращивания от 50 нм для изначальных частиц до 3 мкм на последнем шаге. Измеренные по данным электронной микроскопии средние диаметры частиц совместно с их стандартными отклонениями (по результатам обсчета не менее 200 частиц) показаны в табл. 1.

Следует отметить, что во всех случаях стандартное отклонение не превышало 5%. На каждом шаге доращивания с первого по шестой размер частиц увеличивается в среднем на 70%, что хорошо согласуется с данными массового баланса. Действительно, отношение добавляемого ТЭОС к гидролизованному при получении зародышей равно 5 к 1. Следовательно, размер частиц должен увеличиваться в корень кубический из 5 раз, то есть около 1.7 раз. Массовый баланс косвенно свиде-

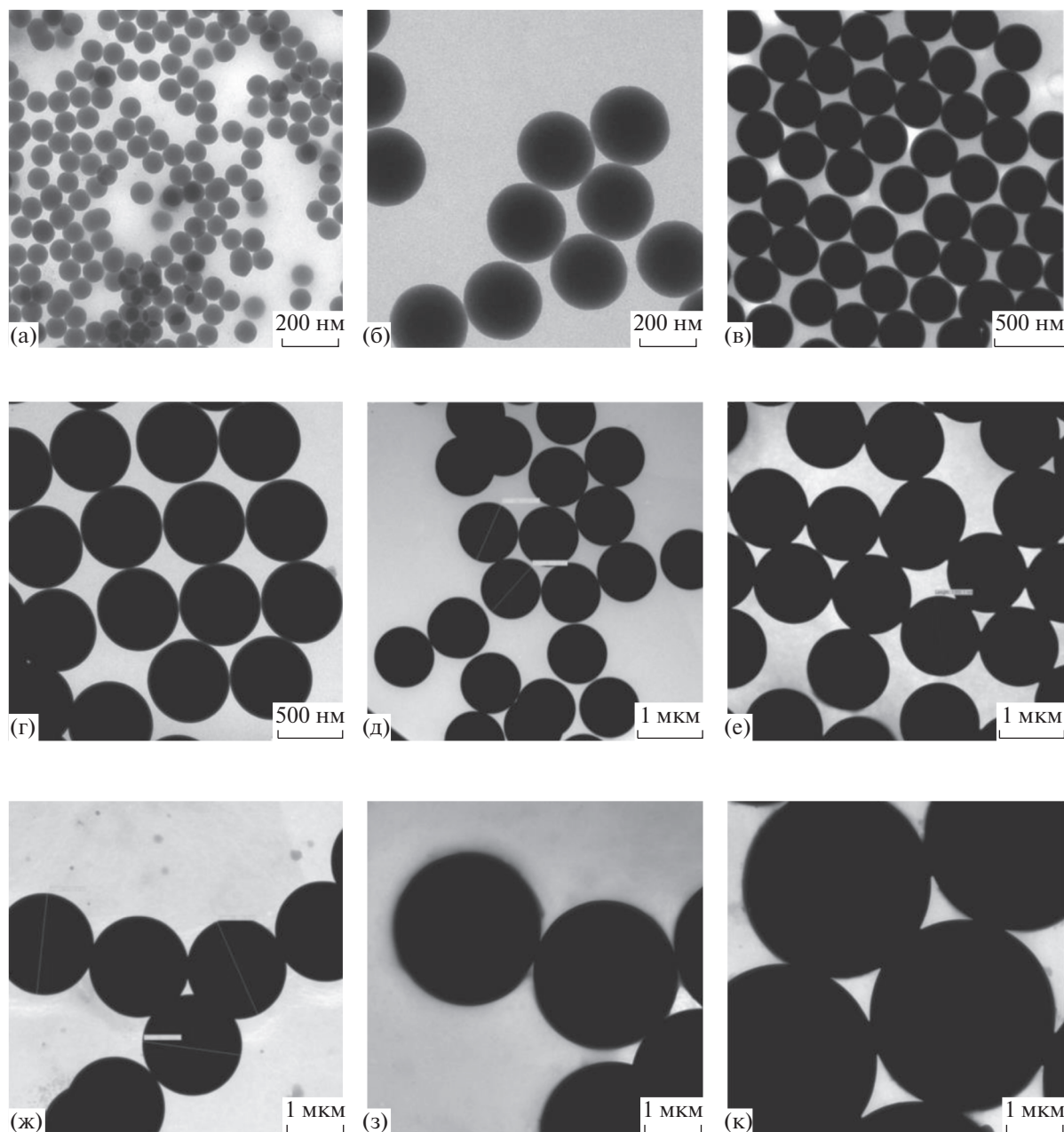


Рис. 3. Типичные электронно-микроскопические изображения силикатных частиц, полученных на 1(а)–9(к) шагах доращивания “зародышевых” частиц. Масштабный отрезок на ПЭМ изображениях равен: 200 нм (а, б), 500 нм (в, г) и 1 мкм (д–к).

тельствует о том, что не образуется новых зародышей, т.е. площади поверхности затравок достаточно, чтобы в данных конкретных условиях проведения процесса “утилизировать” все формы образующегося кремнезема. Обратная ситуация наблюдается для более поздних шагов доращивания. Мы заметили, что при использовании 6 мл “зародышевых” частиц в реакции наблюдается лишь небольшое увеличение их размеров, а коллоид содержит огромное количество дополни-

тельных силикатных частиц малого размера (см. Приложение рис. 9). Мы предполагаем, что это связано с существенным уменьшением суммарной площади поверхности “зародышевых” частиц на поздних шагах доращивания. Действительно, если измеренная массовая концентрация диоксида кремния во всех коллоидах отличалась не сильно (варьировалась от 8 до 11 мг/мл), то число частиц отличается в 10^4 раз для первого и шестого шага доращивания согласно формуле (3).

Таблица 1. Размеры частиц, полученных на различных шагах многостадийной реакции гидролитической конденсации, а также параметры реакции.

Этап	Начальный размер, нм	Конечный размер, нм	Стандартное отклонение, нм	Количество ТЭОС, мл	Объем дисперсии “зародышей”, мл*
Шаг 1	48	80	3	0.75	6
Шаг 2	80	176	7	0.75	6
Вариант 1	80	128	4	0.3	6
Шаг 2	80	128	4	0.3	6
Вариант 2	80	128	4	0.3	6
Шаг 3	176	302	12	0.75	6
Шаг 4	302	595	20	0.75	6
Шаг 5	595	1010	30	0.75	6
Вариант 1	595	700	25	0.25	6
Шаг 5	595	700	25	0.25	6
Вариант 2	595	700	25	0.25	6
Шаг 5	595	860	27	0.5	6
Вариант 3	595	860	27	0.5	6
Шаг 6	1010	1330	40	0.75	12
Шаг 7	1330	1690	51	0.75	12
Шаг 8	1690	2200	43	0.75	12
Шаг 9	2200	2500	56	0.75	12
Шаг 10	2500	3000	65	0.75	12

* Концентрация кремнезема 8 мг/мл.

Таким образом, даже несмотря на увеличение размера, суммарная площадь поверхности падает в 20 раз. В случае получения целевых силикатных частиц диаметром 1 мкм и более, отмывка от вторичных частиц (размеры которых согласно ПЭМ менее 200 нм) не составляет труда. В нашей работе мы использовали шестикратное осаждение/ресуспендирование, причем ускорение при центрифугировании подбиралось таким образом, чтобы минимизировать осаждение вторичных наночастиц. Дополнительно мы увеличили количество добавляемых на шагах 6–10 доразрастания “зародышей” в два раза – с шести до двенадцати миллилитров. Это позволило уменьшить потери ТЭОС на образование побочных частиц, однако уменьшило максимально возможный шаг увеличения размера при каждом этапе доразрастания с 70 до 30%. Следует также отметить, что контроль размеров частиц может осуществляться не только числом шагов доразрастания, но и количеством добавляемого ТЭОС на каждом этапе. Например, уменьшение количества ТЭОС с 0.75 до 0.3 мл на втором шаге позволяет уменьшить размер получаемых частиц со 176 до 128 нм (см. табл. 1). Аналогично уменьшение количества ТЭОС на пятом шаге до 0.25 и 0.5 мл позволяет получать частицы с размерами 700 и 860 нм.

Обсудим теперь оптические свойства получаемых частиц. На рис. 4 показаны спектры оптиче-

ской плотности силикатных наночастиц, получаемых на 1–10 шаге доразрастания, а также спектр исходных 50 нм “зародышей”. Все кривые на графиках нормированы к концентрации кремнезема 4 мг/мл. Полученные спектры типичны для непоглощающих сферических частиц. В частности, для частиц с размерами менее 2 мкм наблюдаются спадающие кривые без экстремумов, что объясняется более эффективным рассеянием света в коротковолновом спектральном диапазоне. Для более крупных частиц существует максимум рассеяния в видимой области за счет интерференционных эффектов. При выполнении условий однократности рассеяния [28], оптическая плотность коллоида является суммой потери энергии светового пучка на отдельных частицах и может быть представлена в виде:

$$\tau = N\pi R^2 Q(R, n), \quad (4)$$

где N – число рассеивающих частиц в единице объема, R – их радиус, n – относительный показатель преломления частиц, $Q(R, n)$ – коэффициент рассеяния. Плавный характер зависимости мутности или оптической плотности на небольшом интервале длин волн позволяет аппроксимировать спектр мутности соотношением Ангстрема [29]:

$$\tau \sim \lambda^{-w}. \quad (5)$$

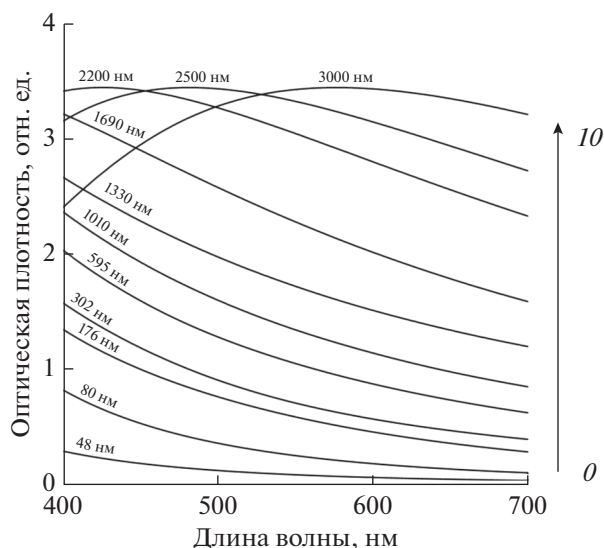


Рис. 4. Нормированные спектры оптической плотности “зародышевых” силикатных частиц (кривая 0) и силикатных частиц, полученных на 1–10 шагах доращивания. Спектры нормированы к длине оптического пути 1 см и концентрации кремнезема 4 мг/мл.

Показатель степени или волновой экспонент w численно равен тангенсу угла наклона спектра мутности в двойных логарифмических координатах, взятому со знаком минус.

Подстановкой (4) в (5) можно получить зависимость волнового экспонента от радиуса частиц и их показателя преломления. Ранее нами были получены калибровочные зависимости для определения среднего размера монодисперсных силикатных частиц по волновому экспоненту [30].

Другим распространенным методом определения размеров частиц является динамическое рассеяние света [31]. Мы решили сравнить результаты определения размеров частиц тремя методами:

ПЭМ, спектротурбидиметрия (СТТ) и динамическое светорассеяние (ДРС). Результаты сравнительных измерений показаны в табл. 2. Видно хорошее согласие данных для методов электронной микроскопии и спектротурбидиметрии, что ожидаемо, учитывая монодисперсность и сферичность коллоидов. Следует также отметить завышение результатов метода ДРС по сравнению с другими методиками, которое часто объясняется наличием приповерхностного слоя, влияющего на гидродинамические свойства частиц.

В последние годы большое внимание уделяется получению и использованию функциональных наночастиц и наноматериалов [32]. С этой точки зрения разработанная многостадийная методика доращивания представляется перспективной в связи с возможностью включать послойно в объем или на поверхность частиц функциональные молекулы и/или наночастицы. Для демонстрации этой возможности мы синтезировали наночастицы с включенными флуоресцентными молекулами. Методика синтеза соответствовала этапу 4 доращивания силикатных частиц, однако в момент доращивания в реакционную смесь добавлялся конъюгированный с аminosиланом краситель (флуоресцин изотиоцианат, ФИТЦ). Следует отметить, что методика позволяет получать частицы с любым красителем, способным реагировать с аминогруппой. Например, аналогичные результаты мы получали с активированными эфирами бордипиррометена.

На рис. 5а показаны электронно-микроскопические изображения синтезированных силикатных частиц с инкорпорированными в поверхностный слой молекулами ФИТЦ. Средний размер полученных частиц равнялся 388 нм. На увеличенном изображении частицы на вставке рис. 5а можно различить поверхностный флуоресцентный слой толщиной около 40 нм. Отметим, что инкорпора-

Таблица 2. Средние диаметры частиц, полученных на различных шагах многостадийной реакции гидролитической конденсации, определенные с помощью методов ПЭМ, СТТ и ДРС

Диаметр ПЭМ, нм	Волновой экспонент	Диаметр СТТ, нм	Диаметр ДРС, нм
48	3.98	56	72
80	3.79	83	112
176	2.76	180	225
302	2.52	286	340
595	2.12	592	670
1010	1.83	930	1090
1330	1.59	1310	1450
1690	—	—	1805
2200	—	—	2500
2500	—	—	2670
3000	—	—	3300

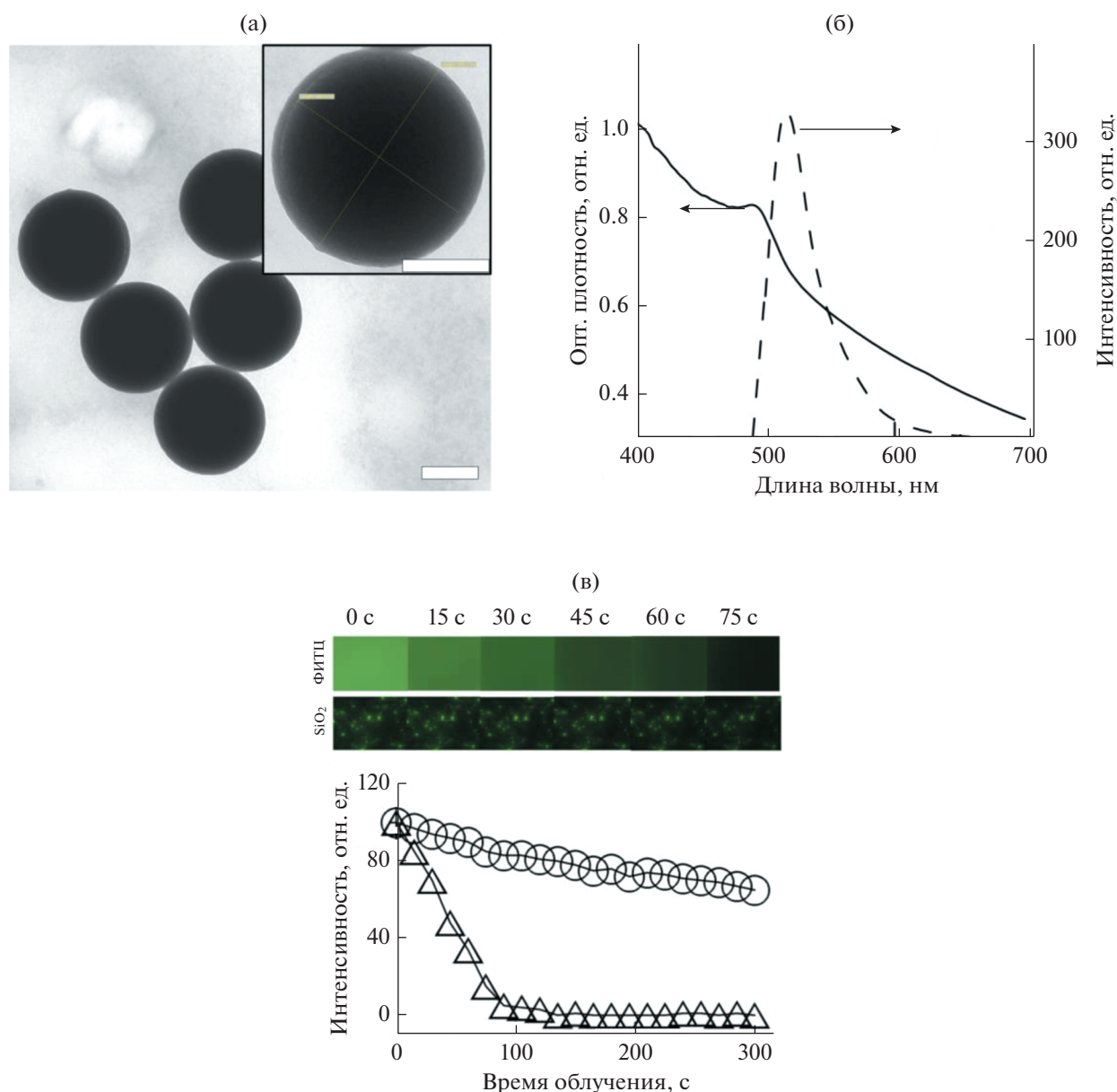


Рис. 5. (а) Типичные электронно-микроскопические изображения силикатных частиц с инкорпорированными молекулами ФИТЦ. На вставке показано увеличенное изображение единичной частицы. Масштабные отрезки равны 200 нм. (б) Нормированные спектры оптической плотности и флуоресценции указанных частиц. Измерение спектра флуоресценции проводили при возбуждении светом длиной волны 488 нм. (в) Серии изображений флуоресценции ФИТЦ и кремнеземных наночастиц, полученные в течение 75 с облучения. Кинетика фотообесцвечивания ФИТЦ (треугольники) и кремнеземных наночастиц (круги) в течение 300 с облучения.

ция флуоресцентных молекул не влияла на коллоидные свойства, то есть не приводила к повышению степени полидисперсности, агрегации частиц или их способности выступать в качестве зародышей для дальнейшего доразвивания. На рис. 5б показаны спектры оптической плотности и флуоресценции полученных композитных частиц. Спектр флуоресценции измерен при возбуждении светом с длиной волны 488 нм. Экстинкция композитных частиц представляет собой суперпо-

зицию спектра экстинкции силикатного коллоида и молекулярного красителя. Это позволяет провести оценку количества молекул красителя в одной частице. Определенная по взвешиванию сухого остатка массовая концентрация кремнезема в коллоиде составляет 4 мг/мл. Учитывая плотность кремнезема 1.7 г/см^3 и диаметр частиц 400 нм, числовая концентрация частиц равна 7.4×10^{10} шт/мл. Определенная по спектрофотометрической калибровке [33] концентрация

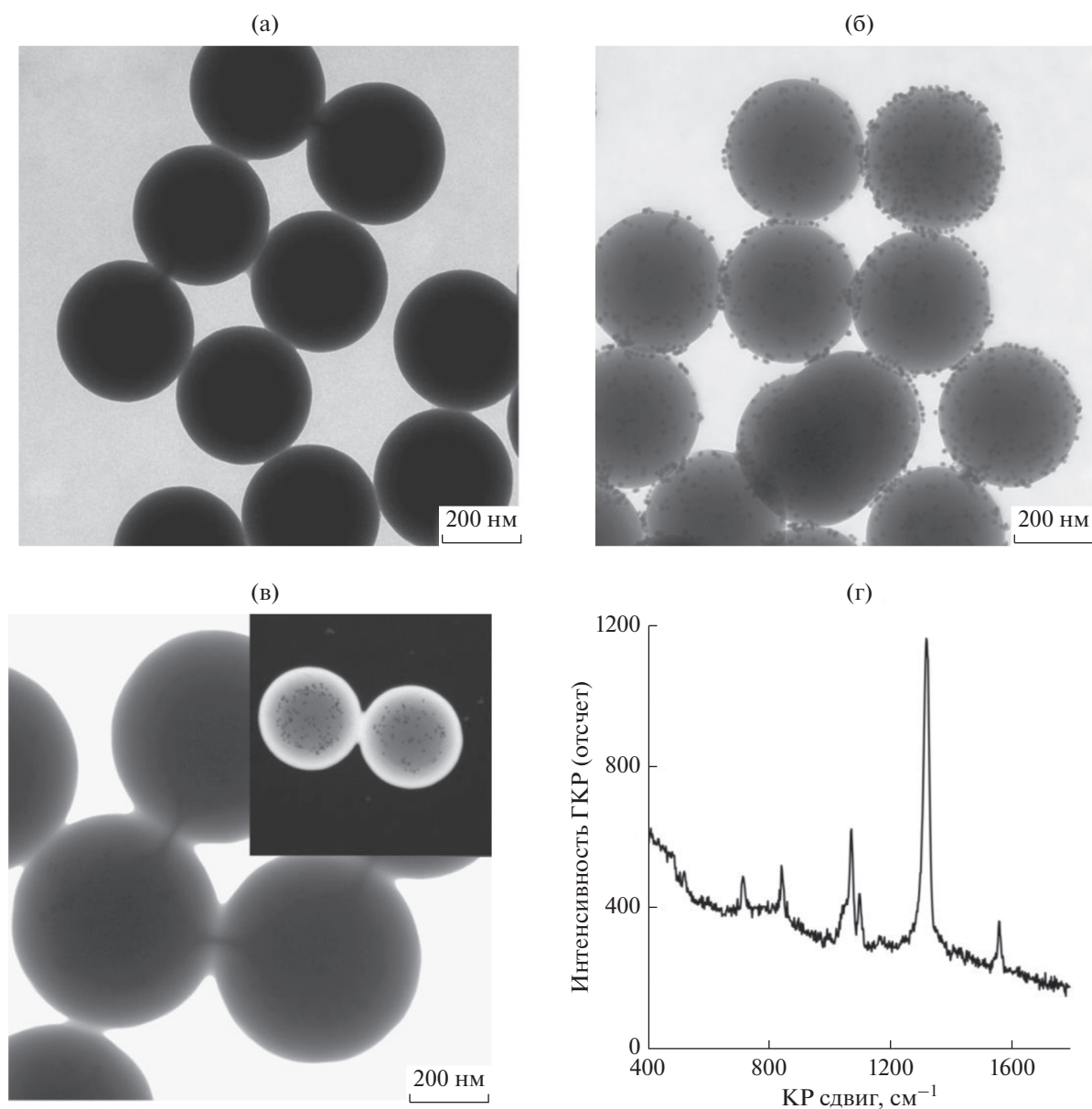


Рис. 6. Типичные электронно-микроскопические изображения 300 нм силикатных частиц, используемых в качестве ядер для синтеза композитных частиц (а), силикатных наночастиц с адсорбированными ГКР метками (б), и покрытых дополнительным слоем кремнезема композитных частиц (в). На вставке показано изображение в режиме рассеяния электронов, которое позволяет визуализировать ГКР метки внутри кремнеземной матрицы. Масштабный отрезок на всех ПЭМ изображениях равен 200 нм. (г) Спектр гигантского комбинационного рассеяния от коллоида композитных наночастиц.

ФИТЦ равна 0.27 мкг/мл. Учитывая молярную массу ФИТЦ, равную 389 г/моль, числовая концентрация молекул красителя равна 4.16×10^{14} шт./мл. Таким образом, на одну частицу приходится около 5600 молекул красителя. Если предположить равномерное распределение молекул красителя в 40-нанометровой оболочке, то среднее межмолекулярное расстояние будет равно около 14 нм. При таких расстояниях эффект концентрацион-

ного тушения флуоресценции маловероятен. Это подтверждается наблюдаемым спектром флуоресценции наночастиц (рис. 5б), который точно соответствует спектру молекулярного красителя, как по положению, так и по интенсивности. Следует также отметить, что яркость единичной метки (частицы с инкорпорированными молекулами красителя) достаточна для визуализации единичных частиц. В качестве примера на рис. 10 в При-

ложении показано конфокальное флуоресцентное микроскопическое изображение клетки HeLa, инкубированной с флуоресцентными наночастицами. Существенным препятствием на пути использования органических красителей в методике флуоресцентной микроскопии является фотообесцвечивание. В настоящее время считается, что основной механизм фотообесцвечивания заключается в фотохимической реакции с синглетным кислородом [34]. С этой точки зрения включение флуоресцентных красителей в кремнеземную матрицу должно повышать их фотостабильность. Для проверки этого предположения мы провели измерение интенсивности флуоресценции от 1 мМ раствора ФИТЦ и кремнеземных частиц с инкорпорированным красителем при постоянном облучении в течение 300 с. Облучение проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DMI 3000-B с использованием 40× объектива и синего светофильтра (средняя длина волны 480 нм). Через каждые 15 с проводилось фотографирование флуоресценции с постоянной экспозицией и диафрагмой. Далее средняя интенсивность пикселей на изображении оцифровывалась с помощью программы ImageJ и нормировалась на максимальную интенсивность в начальный момент времени. На рис. 5в в верхнем ряду показаны серии изображений флуоресценции ФИТЦ и кремнеземных наночастиц (и их агрегатов), полученные в течение 75 с облучения. Очевидно практически полное фотообесцвечивание красителя в растворенном состоянии, в то время как при включении ФИТЦ в кремнеземную матрицу интенсивность флуоресценции сокращается не более чем на 15% за 75 с облучения. На рис. 5в также представлена динамика фотообесцвечивания при облучении в течение 300 с. Треугольниками показаны данные для раствора ФИТЦ, кружками для наночастиц и их агрегатов. Определенная как тангенс угла наклона кривой в нулевой точке, скорость фотообесцвечивания сокращалась в пять раз при включении красителя в кремнеземную матрицу.

Другим примером эффективной встройки функциональных объектов внутрь силикатной матрицы служит получение наночастиц с инкорпорированными ГКР-метками. ГКР-метки состоят из металлических наночастиц с адсорбированными молекулами с высоким сечением комбинационного рассеяния. В нашей работе мы использовали 13 нм золотые наночастицы с адсорбированными молекулами нитробензентиола. Данные ГКР-метки были адсорбированы на силикатные частицы перед 4 шагом доращивания.

На рис. 6 представлены ПЭМ фотографии 300 нм силикатных сфер, используемых в качестве ядер (панель (а)), тех же сфер, после адсорбции ГКР-меток (панель (б)) и после доращивания дополнительной силикатной оболочки

(панель (в)). Частицы сохраняют монодисперсность и коллоидную стабильность на всех этапах получения композитного образца. В результате ГКР-метки инкорпорированы внутрь силикатной частицы, а толщина вторичной силикатной оболочки составляет около 100 нм. Следует отметить, что из-за большой толщины оболочки золотые частицы внутри кремнезема не видны на обычном ПЭМ изображении. Однако, при использовании режима рассеянных электронов и фильтра по энергии рассеяния, соответствующего кремнию, ГКР-метки могут быть легко визуализированы (см. вставку на панели (в)). На рис. 6г показаны спектры ГКР полученного коллоида композитных частиц. В соответствии с нашими предыдущими измерениями [35], в спектрах ГКР для всех образцов преобладают пики нитробензола: π (CC) при 723 см^{-1} , π (CH) при 854 см^{-1} , ν (CS) при 1081 см^{-1} , δ (CH) при 1110 см^{-1} , ν (NO₂) при 1343 см^{-1} и ν (CC) при 1569 см^{-1} с наиболее интенсивным пиком на 1343 см^{-1} , связанным с вибрацией нитрогруппы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе был использован метод последовательного доращивания силикатных частиц, получаемых гидролитической конденсацией тетраэтилортосиликата в спирто-водной среде с использованием щелочного катализатора, для получения частиц большого диаметра (до 3 мкм). Ключевым моментом является создание условий направленной гидролитической конденсации тетраэтилортосиликата на поверхности “зародышей” за счет варьирования концентрации частиц, уменьшения скорости добавления прекурсора и очистки от вторичных зародышей путем центрифугирования/ресуспендирования образца. Данная методика позволяет получать частицы с размером в диапазоне от 50 нм до 3 мкм. Размер получаемых частиц контролируется числом шагов доращивания и количеством добавляемого тетраэтилортосиликата. Полученные образцы были охарактеризованы методами просвечивающей электронной микроскопии, спектротурбидиметрии и динамического светорассеяния.

Синтез монодисперсных силикатных частиц в широком диапазоне размеров является не единственным преимуществом многостадийной методики доращивания. Показано, что разработанный подход позволяет получать функциональные наночастицы за счет включения в состав флуоресцентных молекул и ГКР-меток без изменения коллоидной стабильности и монодисперсности образца. Мы полагаем, что полученные наночастицы могут найти применения в различных областях, включая фотонику и биомедицину.

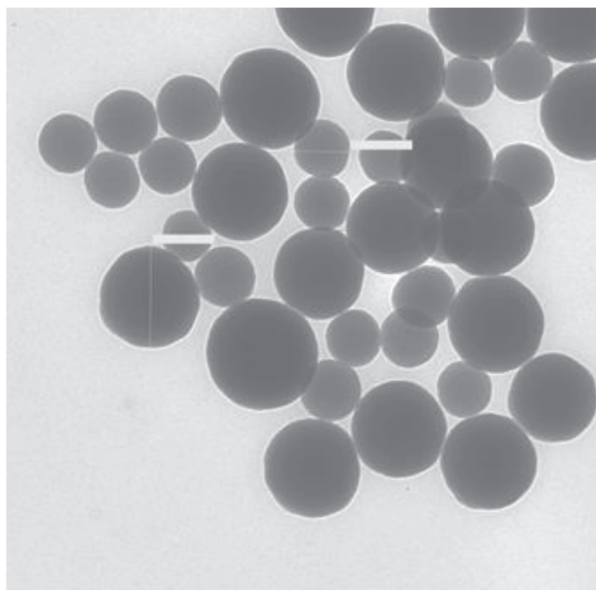


Рис. 7. Электронно-микроскопическое изображение кремнеземных наночастиц, полученных методом Штобера. Состав реакционной смеси 30 мл этанола, 1.5 мл аммиака, 0.75 мл ТЭОС.

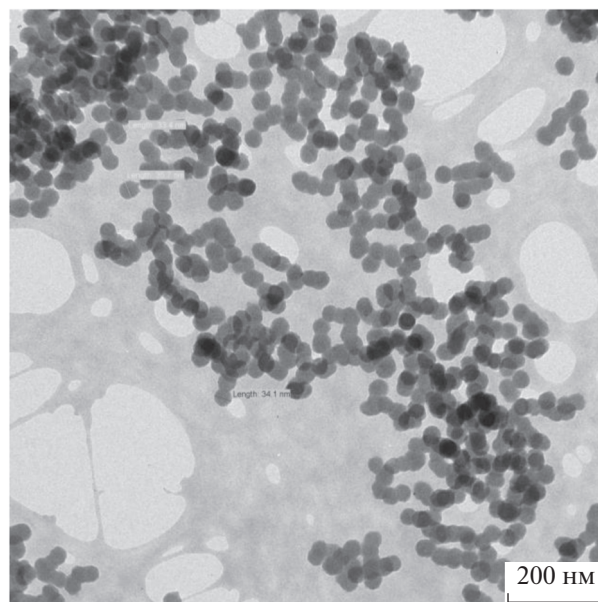


Рис. 8. Электронно-микроскопическое изображение агрегированных кремнеземных “зародышей”, получаемых при одномоментном добавлении ТЭОС в реакционный раствор.

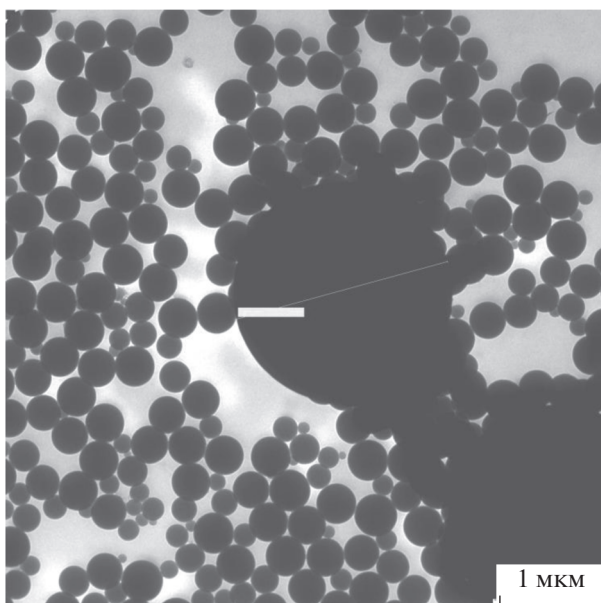


Рис. 9. Электронно-микроскопическое изображение кремнеземных частиц, полученных на 8 шаге перероста в неоптимальных условиях и без отмывки от вторичных частиц.

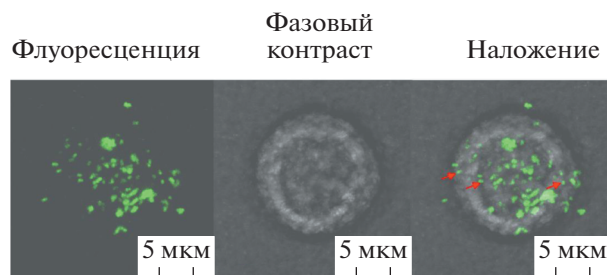


Рис. 10. Флуоресцентное и фазово-контрастное изображения и их наложение, полученные для клетки HeLa после инкубации с флуоресцирующими силикатными наночастицами. Стрелками показано изображение единичных частиц.

линией HeLa и Широкова Александра Александровича за проведение эксперимента по конфокальной лазерной микроскопии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nayl A.A., Abd-Elhamid A.I., Bräsede S. Recent progress in the applications of silica-based nanoparticles // RSC Adv. 2022. V. 12. P. 13706–13726.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 23-24-00062).

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов благодарит Пылаева Тимофея Евгеньевича за помощь в эксперименте с клеточной

2. Yang Y., Zhang M., Song H., Yu Ch. Silica-based nanoparticles for biomedical applications: From nano-carriers to biomodulators // *Acc. Chem. Res.* 2020. V. 53. P. 1545–1556.
3. Ji X., Wang H., Song B., Chu B., He Y. Silicon nanomaterials for biosensing and bioimaging analysis // *Front. Chem.* 2018. V. 6. № 38.
4. da Cunha T., Maulu A., Guillot J., Fleming Y., Duez B., Lenoble D., Arl D. Design of silica nanoparticles-supported metal catalyst by wet impregnation with catalytic performance for tuning carbon nanotubes growth // *Catalysts.* 2021. V. 11. № 8. P. 986.
5. Akhter F., Rao A.A., Abbasi M.N. et al. A comprehensive review of synthesis, applications and future prospects for silica nanoparticles (SNPs) // *Silicon.* 2022. V. 14. P. 8295–8310.
6. Hao T., Wang Y., Liu Zh. et al. Emerging applications of silica nanoparticles as multifunctional modifiers for high performance polyester composites // *Nanomaterials.* 2021. V. 11. № 11. P. 2810.
7. Zaytsev V., Ermatov, Fedorov F.S. et al. Design of an artificial opal/photonic crystal interface for alcohol intoxication assessment: Capillary condensation in pores and photonic materials work together // *Anal. Chem.* 2022. V. 94. № 36. P. 12305–12313.
8. Wei M.-X., Liu Ch.-H., Lee H. et al. Synthesis of high-performance photonic crystal film for SERS applications via drop-coating method // *Coatings.* 2020. V. 10. № 7. P. 679.
9. Furumi S. Self-assembled organic and polymer photonic crystals for laser applications // *Polymer Journal.* 2013. V. 45. № 6. P. 579–593.
10. García-Santamaría F., Salgueiriño-Maceira V., López C., Liz-Marzán L.M. Synthetic opals based on silica-coated gold nanoparticles // *Langmuir.* 2002. V. 18. № 11. P. 4519–4522.
11. Khanadeev V.A., Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G. Optical properties of gold nanoshells on monodisperse silica cores: Experiment and simulations // *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer.* 2017. V. 187. P. 1–9.
12. Stober W., Fink A., Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range // *Journal of Colloid and Interface Science.* 1986. V. 26. № 1. P. 62–69.
13. Ren G., Su H., Wang Sh. The combined method to synthesis silica nanoparticle by Stöber process // *Journal of Sol-Gel Science and Technology.* 2020. V. 96. P. 108–120.
14. F. Hu, K.D. Rasamani S.C. Abeyweera D. Zhang, Sun Y. Poly(acrylic acid) enabling the synthesis of highly uniform silica nanoparticles of sub-100 nm // *ChemNanoMat.* 2022. V. 8. Art № e202200006.
15. Pileni M.-P. The role of soft colloidal templates in controlling the size and shape of inorganic nanocrystals // *Nature Materials.* 2003. V. 2. P. 145–150.
16. Arriagada F.J., Osseo-Asare K. Synthesis of nanosize silica in a nonionic water-in-oil microemulsion: Effects of the water/surfactant molar ratio and ammonia concentration // *J. Colloid Interface Sci.* 1999. V. 211. № 2. P. 210–220.
17. Yokoi T., Sakamoto Y., Terasaki O., Kubota Y., Okubo T., Tatsumi T. Periodic arrangement of silica nanospheres assisted by amino acids // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. № 42. P. 13664–13665.
18. Wang J., Sugawara-Narutaki A., Fukao M., Yokoi T., Shimojima A., Okubo T. Two-phase synthesis of monodisperse silica nanospheres with amines or ammonia catalyst and their controlled self-assembly // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2011. V. 3. № 5. P. 1538–1544.
19. Ahmadi F., Sodagar-Taleghani A., Ebrahimnejad P. et al. A review on the latest developments of mesoporous silica nanoparticles as a promising platform for diagnosis and treatment of cancer // *International Journal of Pharmaceutics.* 2022. V. 625. P. 122099.
20. Giesche H. Synthesis of monodispersed silica powders II. Controlled growth reaction and continuous production process // *Journal of the European Ceramic Society.* 1994. V. 14. № 3. P. 205–214.
21. Hartlen D., Athanasopoulos A.P.T., Kitaev V. Facile preparation of highly monodisperse small silica spheres (15 to >200 nm) suitable for colloidal templating and formation of ordered arrays // *Langmuir.* 2008. V. 24. № 5. P. 1714–1720.
22. Bogush G.H., Tracy M.A., Zukoski C.F. Preparation of monodisperse silica particles: Control of size and mass fraction // *J. Non-Cryst. Solids.* 1988. V. 104. № 1. P. 95–106.
23. Chang S.M., Lee M., Kim W.S. Preparation of large monodispersed spherical silica particles using seed particle growth // *Journal of Colloid and Interface Science.* 2005. V. 286. № 2. P. 536–542.
24. Khanadeev V.A., Khlebtsov B.N., Klimova S.A., Tsvetkov M.Yu., Bagratashvili V.N., Sukhorukov G.B., Khlebtsov N.G. Large-scale high quality 2D silica crystals: a dip-drawing formation and decoration by gold nanorods for SERS analysis // *Nanotechnology.* 2014. V. 25. № 40. P. 405602.
25. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nature Physical Science.* 1973. V. 241. № 105. P. 20–22.
26. Weitner T., Friganović T., Šakić D. Inner filter effect correction for fluorescence measurements in microplates using variable vertical axis focus // *Anal. Chem.* 2022. V. 94. № 19. P. 7107–7114.
27. Wan Y., Yu S.H. Polyelectrolyte controlled large-scale synthesis of hollow silica spheres with tunable sizes and wall thicknesses // *J. Phys. Chem. C.* 2008. V. 112. № 10. P. 3641–3647.
28. Ван де Хюлст Г. Рассеяние света малыми частицами. М.: ИЛ, 1961.
29. Кленин В.И., Щеголев С.Ю., Лаврушин В.И. Характеристические функции светорассеяния дисперсных систем. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1977.
30. Khlebtsov B.N., Khanadeev V.A., Khlebtsov N.G. Determination of the size, concentration, and refractive index of silica nanoparticles from turbidity spectra // *Langmuir.* 2008. V. 24. № 16. P. 8964–8970.

31. *Berne B.J., Pecora R.* Dynamic Light Scattering with Application to Chemistry, Biology, and Physics. Mineola NY: Dover Publ., 2002.
32. *Chen L., Liang J.* An overview of functional nanoparticles as novel emerging antiviral therapeutic agents // Materials Science and Engineering C. 2020. V. 112. P. 110924.
33. *Khlebtsov B., Panfilova E., Khanadeev V., Bibikova O., Terentyuk G., Ivanov A., Rumyantseva V., Shilov I., Ryabova A., Loshchenov V., Khlebtsov N.G.* Nanocomposites containing silica-coated gold–silver nanocages and YB–2,4-dimethoxyhematoporphyrin: Multifunctional capability of IR-luminescence detection, photosensitization, and photothermolysis // ACS Nano. 2011. V. 5. № 9. P. 7077–7089.
34. *Demchenko A.P.* Photobleaching of organic fluorophores: Quantitative characterization, mechanisms, protection // Methods and Applications in Fluorescence 2020. V. 8. № 2. P. 022001.
35. *Khlebtsov B.N., Bratashov D.N., Khlebtsov N.G.* Tip-functionalized Au@Ag nanorods as ultrabright surface-enhanced Raman scattering probes for bioimaging in off-resonance mode // J. Phys. Chem. C. 2018. V. 122. № 31. P. 117983–17993.