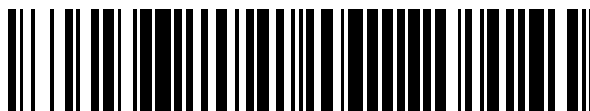


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 127**

51 Int. Cl.:

B01J 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2008 PCT/GB2008/004225**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.0009 WO09081138**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2008 E 08863725 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2237873**

54 Título: **Preparación de coloides metálicos**

30 Prioridad:

21.12.2007 GB 0724870

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.08.2017

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF LINCOLN (100.0%)
FACULTY OF HEALTH, LIFE & SOCIAL SCIENCE
BRAYFORD POOL
LINCOLN, LINCOLNSHIRE LN6 7TS, GB**

72 Inventor/es:

**WHITE, PETER CYRIL y
HJORTKJAER, JAKOB HOWIE**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 629 127 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Preparación de coloides metálicos

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a un método para preparar coloides metálicos estables.

Antecedente de la invención

10

Por muchos años los analistas químicos no utilizaron la espectroscopia Raman porque fallaba en proporcionar el grado de sensibilidad requerido para la detección de cantidades de trazas de analitos. La razón principal de esto son los altos niveles de fondo de fluorescencia que surgen de muestra o sustrato.

15 En 1974, Fleischman descubrió, mientras utilizaba espectroscopia de Raman para estudiar reacciones electroquímicas de piridina sobre un electrodo de plata, que hubo una destacada mejora de las señales Raman en piridina, con plata que apaga una gran cantidad de fluorescencia de fondo. Se sabe que la mejora de la superficie sólo se puede alcanzar si la superficie de plata es rugosa y no lisa.

20 La posibilidad de utilizar dispersiones coloidales de plata (Ag) u oro (Au) en soluciones acuosas se demostró primero por Creighton y colaboradores en 1979 (Creighton, J.A.; Blatchford, C.G.; Albrecht, M.G. J Chem. Soc., Faraday Trans. 2 1979, 75, 790). Se ha encontrado que se pueden alcanzar efectos mejorados de superficie iguales o incluso mayores con coloides de plata. Un coloide es una suspensión de partículas metálicas en solución. Con el fin de lograr el alcance óptimo, se requiere agregación controlada de partículas de coloides de plata, normalmente
25 utilizando compuestos orgánicos o inorgánicos como reactivos de agregación.

Con el tremendo aumento en la sensibilidad que se puede alcanzar utilizando este efecto de mejora de superficie, se han desarrollado técnicas analíticas de Espectroscopia de Dispersión Raman Mejorada de Superficie (SERS) y espectroscopia de Dispersión Raman de Resonancia Mejorada de Superficie (SERRS).

30

El crecimiento en el uso de estas técnicas ha sido exponencial, pero el problema principal es producir coloides estables con buenas propiedades de dispersión de luz y capaces de apagar la fluorescencia de fondo. Con el fin de que un coloide permanezca estable las partículas de plata deben permanecer suspendidas indefinidamente, pero se sabe que en muchas ocasiones ocurre agregación y la plata cae fuera de la solución.

35

Los coloides de plata se pueden preparar mediante reducción química ya sea con borohidruro de sodio o citrato de sodio. Es bien sabido que el citrato reduce coloides que son más estables y muchos analistas han preparado éstos utilizando un método publicado por P.C. Lee and O. Meisel (J.Phys.Chem., 1982, 86, 3391-3395). Sin embargo, es bien sabido que es difícil la reproducibilidad tanda a tanda para lograr este método y la estabilidad, es decir la vida útil es variable. De dichos coloides de plata que utilizan este método requiere el uso de cristalería ultra limpia y temperaturas con exactitud, velocidad de agitación, etc.

40

En razón a que este método publicado original ha sido modificación publicada de este método original (C.H. Munro, W.E. Smith and P.C. White, Analyst 1993, Vol. 118. 733-735). Esta modificación publicada del método conocido original conduce a algunas mejoras en las propiedades del coloide de plata, pero la estabilidad a largo plazo de los coloides sigue siendo un problema.

45

Intentos anteriores en producir coloides de plata con propiedades de dispersión de luz deseable han sido pobres y debido a estos resultados decepcionantes ha habido poco entusiasmo para ir en contra de la sabiduría percibida de que la naturaleza iónica de sodio en el nitrato de plata era de hecho responsable de los intentos fallidos por obtener coloides de plata con vida útil y estabilidad adecuada. En WO2007/107792 divulgamos y reivindicamos un método para producir coloides de plata muy estables con buenas propiedades SERRS que utilizan citrato de litio en lugar de citrato de sodio para reducir el nitrato de plata.

50

El uso de clorhidrato de hidroxilamina para reducir el nitrato de plata a un pH alcalino y a una temperatura ambiente fue publicado en Leopold, N.; Lendi B.; J.Phys.Chem.B 2003, 107, 5723-5727. Los resultados publicados en este documento muestran que los coloides tienen un ancho de banda alto y valores λ_{max} con una distribución grande de tamaño de partícula. Estas propiedades son típicas de coloides pobres y no se esperaría que proporcionen buen espectro SERRS. El espectro presentado muestra altos niveles de fondo de fluorescencia, que es típico de pobre adsorción del tinte sobre las partículas de plata. No hay mención en el documento de la estabilidad o reproducibilidad del espectro SERRS de diferentes tandas de coloides, y esto ha sido el mayor problema en la espectroscopia de SERRS.

60

Se pueden utilizar coloides de oro en diversas aplicaciones de nanotecnología, por ejemplo, en biosensores, así como en espectroscopia Raman. Otros metales en forma de coloidales se pueden aplicar a aplicaciones similares, o pueden encontrar nuevas aplicaciones.

65

Resumen de la invención

De acuerdo con la presente invención, un método para producir soluciones de coloides metálicas, que comprenden agregar una solución acuosa de sal de hidroxilamina a una solución acuosa de un álcali y luego agregar una solución acuosa de iones metálicos, se caracteriza al seleccionar fosfato de hidroxilamina como la sal de hidroxilamina e introducir la solución de iones metálicos mediante inyección rápida a través de un chorro de alta velocidad de tal manera que los iones metálicos estén sustancialmente dispersos a través de la mezcla dentro de un segundo.

Actualmente, el método se puede alcanzar mejor al utilizar volúmenes muy pequeños de soluciones, por ejemplo, inyectar un volumen pequeño de solución de iones metálicos en la solución de hidroxilamina utilizando una pipeta de émbolo. El método de la invención puede emplear ventajosamente alta velocidad, técnicas de inyección de bajo volumen tal como aquellas utilizadas en impresoras de chorro de tinta, en donde gotas pequeñas se expulsan rápidamente y a alta velocidad.

Los iones metálicos son de plata u oro, aunque otros iones, tal como cobre, también se pueden utilizar para producir coloides. La plata puede estar en la forma de solución de nitrato de plata.

El álcali es preferiblemente una base fuerte tal como hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, se prefiere hidróxido de sodio. La solución álcali es preferiblemente preparada frescamente, ya que se considera que la absorción de dióxido de carbono de la atmósfera afecta el resultado, se ha encontrado que el uso de hidróxido de sodio que ha estado en reposo algún tiempo, incluso durante un período de dos horas, resulta en un coloide más oscuro con mayor una λ_{\max} mayor, reducción de absorbancia y mayores valores de ancho de banda.

Los resultados han demostrado que el período óptimo para producir coloides con las propiedades UV y SERRS más deseables es cuando la etapa posterior de mezcla se realiza con el fin de alcanzar dispersión completa dentro de 10 segundos. Cuando la etapa de mezcla se realiza en un período más corto (2 segundos) o un período mayor (30 segundos), esto produce resultados significativamente más pobres en la forma de coloides inestables.

Los coloides producidos por el método del solicitante muestran que exhiben propiedades UV destacadas. Para una preparación coloidal diluida (60 μ l de coloide en 3 ml de agua) en una cubeta de 1 cm de longitud de trayecto, esto produce un espectro UV que presenta un valor λ_{\max} de normalmente 389 ± 1 nm, un ancho de banda 28 ± 2 nm y una absorbancia de 0.475 ± 25 . Los coloides resultantes también dan un espectro SERRS muy intenso y un menor fondo de fluorescencia que los resultados previos del solicitante obtenidos cuando se utiliza citrato de litio como el agente de reducción.

La reducción de las sales metálicas produce partículas metálicas y aniones presentes en la solución se atraen hacia la superficie de la partícula. Siempre que la carga permanezca en las partículas se repelerán entre sí y permanecerán en la solución. Idealmente, las partículas metálicas en una solución coloidal deben permanecer en la solución indefinidamente, pero en la producción de muchos coloides esta estabilidad no se alcanza y ocurre agregación de partículas con el tiempo, resultando en colapso del coloide. Prueba de esta ocurrencia se puede monitorear mediante UV, en donde un aumento en λ_{\max} , y ancho de banda, y reducción de absorbancia, se observan durante un período de tiempo.

En el método propuesto del solicitante para la producción de coloides, la elección de la sal de hidroxilamina, es decir, el anión, se encuentra que influencia la estabilidad del coloide. En la preparación de coloides de plata con diferentes sales de hidroxilamina, no se puede obtener coloides estables con las sales ácidas de sulfato, nitrato u O-sulfónico. Con las sales de clorhidrato, se pueden obtener coloides con estabilidad limitada, pero con las sales de fosfato se puede producir un coloide muy estable. La inestabilidad creciente observada se puede relacionar con la insolubilidad, es decir, el producto de solubilidad (K_{sp}) de la sal de plata – $K_{sp} \text{ Ag}_2\text{SO}_4 = 1.2 \times 10^{-5}$, $\text{AgCl} = 1.8 \times 10^{-10}$ y $\text{Ag}_3\text{PO}_4 = 1.2 \times 10^{-16}$.

También se considera que la valencia del anión afecta la estabilidad del coloide. Con los coloides de reducción de citrato de Lee y Meisel, el citrato de plata tiene una K_{sp} muy similar del sulfato de plata y por lo tanto no se esperaría que fuera muy estable. Sin embargo, el citrato es un anión trivalente y esto posiblemente explica el grado más alto de estabilidad de lo esperado. Por lo tanto, con el fosfato también es un anión trivalente y esto también puede explicar la mejora de estabilidad alcanzada con el fosfato de hidroxilamina. Utilizando el método propuesto del solicitante para la preparación de coloide de oro que se ha producido, pero una forma estable sólo se puede alcanzar con el fosfato y no la sal de clorhidrato de hidroxilamina. Por lo tanto, el método utiliza una sal de hidroxilamina seleccionada de tal manera que el anión es de alta valencia, y cuando se combina con dicho ion metálico formaría una sal de metal que tiene una baja solubilidad en agua. El nitrato de plata, cloruro de oro o nitrato de cobre pueden, por ejemplo, se utilizado como la solución de ion metálico.

Los coloides de plata producidos utilizando clorhidrato de hidroxilamina (coloides HHAg) mostraron, dentro de 48 horas de producción, una reducción de ancho de banda y de λ_{\max} dentro de aumento de absorbancia en sus

propiedades UV. Después de este período de tiempo λ_{\max} y el ancho de banda se redujeron en un índice mucho más lento, sin cambios principales en la absorbancia durante 30 días, pero más allá de este período se observó absorbancia que cayó bastante rápido. Lo coloides producidos al utilizar fosfato de hidroxilamina (coloides HPAg) mostraron mucha mayor estabilidad. Durante un período de 30 días, estos no mostraron cambios principales iniciales en sus propiedades UV y durante largos periodos de tiempo mostraron solo muy poca reducción en su ancho de banda y valores λ_{\max} y retienen el nivel de absorbancia.

Se ha encontrado adicionalmente que madurar el coloide durante un periodo predeterminado producirá un coloide estable cuyas propiedades no experimentan cambios adicionales. El período de maduración se ve influenciado por la temperatura. A temperatura ambiente, el periodo de maduración se puede extender hasta aproximadamente 8 semanas, pero a mayores temperaturas el tiempo tomado para alcanzar estabilidad se reduce sustancialmente, tomando, por ejemplo, sólo aproximadamente 24 horas a 40-50°C. El proceso de maduración también facilita el tamaño del contenedor, y se prefiere utilizar un contenedor que tiene un área de superficie grande para un volumen dado. El uso de otros contenedores plásticos, tal como aquellos hechos de policarbonato, polipropileno y tereftalato de polietileno (PET), resultan en un colapso anticipado del coloide, como lo hacen los contenedores de vidrio. La estabilidad también se ve influenciada por el material del contenedor en el que se almacena el coloide, y se ha encontrado que los contenedores de poliestireno dan la mayor estabilidad.

El coloide de plata producido por el método de la invención contiene una concentración de plata de 0.114 mg ml⁻¹, que es muy similar a la concentración de plata en un coloide de Lee y Meisel de reducción de citrato. Sin embargo, a diferencia del último, los coloides HHAg y HPAg producen aumento considerable en la sensibilidad de las señales SERRS cuando se utiliza una solución diluida del coloide. La dilución esta preferiblemente dentro del rango de 25 a 70%, y esto se puede alcanzar al utilizar, por ejemplo, agua o solución acuosa de agentes de agregación inorgánicos tal como cloruro de sodio, ácido nítrico, o agentes de agregación orgánica tal como la poli-L-lisina.

Para los SERRS, la agregación de partículas de plata es esencial para alcanzar el efecto de mejora de superficie. Normalmente, con coloides de reducción de citrato de Lee y Meisel, si las concentraciones de analitos son mayores de 10⁻⁵ M se analizan, entonces ocurre el fenómeno de auto agregación. Con el fin de detectar analitos en menores concentraciones, se tiene que utilizar agentes de agregación orgánicos o inorgánicos. Estudios realizados con coloides HHAg muestran que durante las primeras 48 horas de vida del coloide es posible alcanzar auto agregación a menores concentraciones (aproximadamente 10⁻⁸ M) y obtener señales SERRS fuertes, superando de esta manera cualquier necesidad de un agente de agregación y cualquier dilución adicional de la muestra. Estudios de auto agregación con proteínas unidas a hierro, es decir, citocromo C (Cyt C), hemoglobina (Hb) y mioglobina (Mb) se han alcanzado en una concentración de 10⁻⁷ M.

Con coloides HHAg mayores de 48 horas solo se puede alcanzar el espectro SERRS intenso mediante la agregación de un agente de agregación. Las propiedades únicas de este coloide se atribuyen a la presencia de iones de cloruro (de clorhidrato de hidroxilamina) que están presentes. Iones de cloruro se han utilizado tradicionalmente como un reactivo de agregación y esto explicaría por qué se puede alcanzar auto agregación del uno mismo. La necesidad de agregar un agente de agregación después de aproximadamente 48 horas indica un crecimiento de los agregados a un tamaño en donde se precipitan de la solución y reducen la concentración de cloruro por debajo del nivel requerido para auto agregación. La pérdida en absorbancia UV y algún oscurecimiento visible de la solución coloidal después de dejarlos reposar indicaría que esta última ocurre.

Cuando se comprará con un estudio SERRS anterior de Mb, en el que se utiliza un coloide con reducción de citrato de sodio con agente de agregación (Abdali, S., Johannessen, C., Nygaard, J. and Norbygaard, T., J. Phys. Condens. Matter, 2007, 19, 285205-285212), el coloide HHAg, preparado de acuerdo con el método Lendl original, produce substancialmente menor fondo de fluorescencia. Adicionalmente, las variaciones observadas entre el espectro indican diferencias en las químicas de superficie de los coloides con reducción de citrato de sodio e hidroxilamina.

Estudios con coloides HPAg muestran que son más similares a las sales con reducción de citrato de Lee y Meisel ya que no muestran ningún nivel de auto agregación para concentraciones de analito por encima de 10⁻⁷ M. Sin embargo, sobre la adición de un agente de agregación se puede obtener un espectro SERRS muy fuerte con muy bajos niveles de fluorescencia de fondo.

Se ha observado que los coloides HPAg tienen una única propiedad. Se han utilizado tintes benzotriazol anteriormente como analitos para determinar de estudios UV las propiedades de auto agregación de los coloides y estimar la concentración de tintes en la que ocurre el cubrimiento de partículas coloidales (Faulds, K., Littleford, R.E., Graham, D., Dent, G. and Smith, W.E., Anal. Chem., 2004, 76, 592-598). Un estudio similar con coloides HPAg también han mostrado que ocurre auto agregación en el rango de 1 x 10⁻⁶ a 1 x 10⁻⁷ M, pero en comparación con un coloide de reducción de citrato de Lee y Meisel, los UV muestran una absorbancia en ancho de banda fuerte más angosta estrecho en longitudes de onda más cortas, por ejemplo, aproximadamente 650 nm, comparado con aproximadamente 720 nm. Estos resultados indican que debido al tamaño de partícula más pequeño de los coloides HPAg, se producen grupos agregados más pequeños y por lo tanto tienen una longitud de onda de plasmon menor que el coloide de plata con reducción de citrato de Lee y Meisel. El efecto observado también es dependiente de la concentración y ocurre el efecto máximo dentro del rango de concentración de 5 x 10⁻⁷ a 7.5x10⁻⁷ M. TEM de estas

- soluciones muestra grumos discretos ($70 \times 115 \mu\text{m}$) de partículas agregadas y cuando se utiliza un láser 633nm, se maximiza el espectro Raman en el rango de concentración 5×10^{-7} a 7.5×10^{-7} M. Por lo tanto es posible obtener una estimación más precisa de la concentración del tinte en el que ocurre el cubrimiento monocapa de las partículas coloidales. Adicionalmente, aunque solamente sobre una concentración limitada el coloide HPAG proporciona un método mejorado de superficie única para análisis de un tinte amarillo con una longitud de onda laser (633 nm).
- Estos resultados indican que con este método de preparación es posible alcanzar niveles mucho más bajos de detección de lo que se habría obtenido previamente por otros expertos en la técnica espectroscopia SERRS.
- 5 Breve descripción de los dibujos
- En los dibujos, que ilustran gráficamente los resultados de estudios en coloides producidos mediante métodos de acuerdo con la invención:
- 15 La figura 1 es una gráfica de intensidad Raman contra el número de ondas comparando los resultados obtenidos del coloide de clorhidrato de hidroxilamina con los resultados obtenidos en los estudios anteriores del solicitante utilizando citrato de litio;
- 20 La figura 2a es un espectro UV/Visible de un coloide de plata obtenido utilizando clorhidrato de hidroxilamina como el agente de reducción y siguiendo el método publicado en Leopold, N.; Lendi B, V, Chem B 2003, 107, 5723-5727);
- 25 La figura 2b muestra espectro UV/Visible de un coloide de plata obtenido de acuerdo con el método de la invención utilizando clorhidrato de hidroxilamina como el agente de reducción, que muestra la estabilidad del coloide durante 30 días;
- La figura 2c muestra espectro UV de un coloide de plata obtenido de acuerdo con el método de la invención utilizando fosfato de hidroxilamina como el agente de reducción, que muestra la estabilidad del coloide durante 7 meses;
- 30 La figura 3a es una gráfica de intensidades SERRS (señales 1649, 1363 y 612 cm^{-1} para rodamina 6G) contra el tiempo, que ilustra los resultados obtenidos en el que se realiza la introducción de las etapas de mezcla de tal manera que alcanza la dispersión completa de coloides HHAg dentro de 10 segundos;
- 35 La figura 3b es una gráfica similar que ilustra los resultados obtenidos en el que la etapa de introducción y mezcla para producir coloides HHAg se realiza dentro de un corto período de 2 segundos;
- La figura 3c es una gráfica similar adicional que ilustran los resultados que muestran la desestabilización de los coloides en el que la etapa de introducción y mezcla para producir coloides HHAg se realiza dentro de un período mayor de 30 segundos;
- 40 La figura 4a es una gráfica de intensidad Raman contra el número de ondas (cm^{-1}) que ilustra el aumento en la sensibilidad SERRS de rodamina 6G (10^{-8} M) cuando se utiliza 50% de dilución del coloide de reducción de clorhidrato de hidroxilamina con cloruro de sodio como agente de agregación (514 nm);
- 45 La figura 4b es una gráfica similar que ilustra el aumento en la sensibilidad SERRS de rodamina 6G (10^{-8} M) cuando se utiliza una dilución al 50% de coloide de reducción de clorhidrato de hidroxilamina con poli-L-lisina como el agente de agregación (514 nm);
- 50 La figura 4c es una gráfica que ilustra la sensibilidad SERRS de rodamina 6G (10^{-8} M) cuando se utiliza una dilución al 50% de coloide de reducción de clorhidrato de hidroxilamina sin agente de agregación (514 nm);
- La figura 5 es una gráfica de intensidad de SERRS (a.u. = unidades arbitrarias) contra porcentaje de volumen de 10^{-7} M de proteína en la muestra, que ilustra la auto agregación y las intensidades de SERRS alcanzadas para bandas de 1375 y 1169 cm^{-1} de proteínas unidas a hierro, CytC Mb y Hb; las gráficas muestran condiciones SERRS optimizadas (relación de coloide HHAg: volumen de analito) para cada proteína a una concentración de 10^{-7} M.
- 55 La figura 6 es una gráfica de intensidad SERRS contra el número de ondas que ilustra el espectro SERRS de auto agregación de las proteínas unidas a hierro CytC, Mb y Hb (cada proteína en una concentración de 10^{-7} M) bajo condiciones SERRS optimizadas;
- 60 La figura 7 es un espectro UV/Visible de un coloide de oro producido de acuerdo con el método de la invención utilizando fosfato de hidroxilamina como el agente de reducción;
- 65 La figura 8 es una imagen TEM (microscopio electrónico de transmisión) de un coloide HPAG agregado con una solución de 7.5×10^{-7} M de un tinte de benzotriazol;

La figura 9 es una gráfica de concentración versus intensidad Raman de la señal de 1368 cm^{-1} para un tinte benzotriazol utilizando una longitud de onda láser de 633 nm ;

5 La figura 10 muestra el efecto de maduración a temperatura ambiente de propiedades espectrales UV de un coloide de plata obtenido de acuerdo con el método de la invención, utilizando fosfato de hidroxilamina como el agente de reducción, con la figura 10a de grafica λ_{max} contra tiempo (semanas), figura 10b grafico de ancho de banda contra tiempo y figura 10c grafico de absorbancia contra tiempo;

10 La figura 11 muestra el espectro SERS de riboflavina obtenida de cuatro tandas maduradas diferentes de coloide obtenida de plata al madurar a temperatura ambiente y de acuerdo con el método de la invención utilizando fosfato de hidroxilamina como el agente de reducción; y

15 La figura 12 muestra graficas de ancho de banda UV contra tiempo en diferentes temperaturas de maduración en una tanda de coloide producida de acuerdo con el método de la invención para reducir nitrato de plata con fosfato de hidroxilamina.

Descripción detallada de las realizaciones ilustradas

20 Un método de ejemplo de acuerdo con la invención comprende agregar una solución acuosa de fosfato de hidroxilamina (volumen $100\ \mu\text{l}$; concentración $0.075 \times 10^{-3}\text{ M}$ con respecto a hidroxilamina) a una solución acuosa de hidróxido de sodio (volumen de $4,5\text{ ml}$, concentración de $1.33 \times 10^{-3}\text{ M}$) en un frasco de poliestireno y dejar que la mezcla resultante repose durante un periodo predeterminado, (idealmente durante un periodo de 30 segundos), introducir una mezcla una solución acuosa 10^{-2} M de nitrato de plata (volumen $500\ \mu\text{l}$) y mezclar las soluciones
25 juntas, la solución de nitrato de plata se introduce en la mezcla rápidamente (menos de $0,5\text{ segundos}$) y la mezcla se realiza con el fin de dispersar el nitrato de plata completamente en la mezcla dentro de un periodo entre 2 segundos y 30 segundos . El contenedor tapado y sellado se calienta luego de $40\text{-}50^\circ\text{ C}$ durante 24 horas , con lo cual se produce un coloide estable.

30 Para la preparación de cloruro de oro se utiliza el mismo método excepto que se utiliza tetracloruro de hidrogeno en lugar de nitrato de plata.

La figura 1 compara los resultados anteriores obtenidos utilizando citrato de litio para reducir el nitrato de plata, con resultados más recientes utilizando clorhidrato de hidroxilamina para reducir el nitrato de plata. La muestra es una solución de 10^{-7} M de rodamina 6G agregado con solución de 0.175 NaCl que da una concentración final de 10^{-8} M del tinte. Se utiliza longitud de onda láser de 514 nm .

40 La figura 2 compara los resultados UV de mezcla $60\ \mu\text{l}$ de coloide con 3 ml de agua y el análisis posterior en una cubeta de longitud de trayectoria de 1 cm . La figura 2a muestra la producción de coloide utilizando clorhidrato de hidroxilamina como el agente de reducción de acuerdo con el método de Leopold, N.; Lendl, B.; V, Chem B 2003, 107, 5723-5727. La figura 2b muestra el método de acuerdo con la invención para reducir nitrato de plata con clorhidrato de hidroxilamina y la estabilidad del coloide durante un periodo de un mes. La figura 2c muestra el método de acuerdo con la invención para reducir nitrato de plata con fosfato de hidroxilamina y la estabilidad del coloide durante un periodo de siete meses.

45 Estos resultados demuestran, por lo tanto, que los resultados sobresalientes alcanzador por el solicitante se relacionan con la elección de la sal de hidroxilamina, la relación específica de los volúmenes utilizada, la velocidad y la duración de la mezcla, y el tamaño de partícula pequeño de los coloides que resultan les dan aumento de estabilidad y propiedades de dispersión de luz.

50 La figura 3a ilustra que cuando la etapa de mezcla entre el clorhidrato de hidroxilamina acuoso y el hidróxido de sodio acuoso con la solución acuosa de nitrato de plata se realiza con el fin de alcanzar la dispersión completa dentro de 10 segundos , los coloides resultantes son estables y poseen propiedades de SERR y UV deseables.

55 La figura 3b muestra los resultados de estudios replicados, en donde la etapa de mezcla se realiza dentro de un corto periodo de tiempo de 2 segundos . Es evidente de los resultados que los coloides resultantes son inestables. Esto se demuestra por el hecho de que con el tiempo los coloides muestran signos de desestabilización, indicados por la reducción de la intensidad Raman rápidamente durante un corto periodo de tiempo.

60 La figura 3 c muestra los resultados obtenidos en donde se realiza la etapa de mezcla sobre un periodo mayor de 30 segundos , esta figura indica la inestabilidad de los coloides resultantes y demuestra la agregación y desestabilización de los coloides.

65 La figura 3b y c demuestran resultados significativamente más pobres y coloides inestables que se obtienen cuando el periodo de mezcla se altera por encima y por debajo del periodo óptimo en el que se alcanza la dispersión completa de 10 segundos .

La figura 4a ilustra los resultados que muestran el aumento en sensibilidad SERRS de rodamina 6G (10^{-8} M) cuando se utiliza una dilución al 50% del coloide con reducción de HHAg con cloruro de sodio como el agente de agregación. (514 nm).

5 La figura 4b ilustra los resultados que muestran el aumento en sensibilidad SERRS de rodamina 6G (10^{-8} M) cuando utiliza una dilución al 50% del coloide con reducción de HHAg con poli-L-lisina como el agente de agregación (514 nm).

10 La figura 4C ilustra la sensibilidad SERRS de rodamina 6G (10^{-8} M) cuando se utiliza una dilución al 50% del coloide HHAg sin agente de agregación (autoagregación) (514 nm).

15 La figura 5 ilustra la autoagregación y las intensidades SERR alcanzadas para las bandas de 1375 y 1169^{-1} cm de las proteínas unidas a hierro, CytC, Mb y Hg. Las gráficas muestran condiciones SERR optimizadas (relación de coloide: HHAg volumen de analito) para cada proteína a una concentración de 10^{-7} M.

La figura 6 ilustra el espectro SERR de autoagregación de las proteínas unidas a hierro, CytC, Mb y Hg (cada proteína en una concentración de 10^{-7} M) bajo condiciones SERR optimizadas con un coloide con reducción de HHAg.

20 La figura 7 ilustra un espectro UV de un coloide de oro producido por el método del solicitante para reducir tetracloroaurato del hidrógeno con fosfato de hidroxilamina. El coloide se diluye mediante un factor de cinco con agua y se analiza en una cubeta de longitud de trayectoria de 1 cm.

25 La figura 8 ilustra una imagen TEM que muestra la agregación de un coloide HPAg con una solución de 7.5×10^{-6} M de 3,5-dimetoxi 4-(5'axobenzotriaxoil) fenilamina. Magnificación = $\times 220,000$.

30 La figura 9 ilustra el efecto de concentración de 3,5-dimetoxi 4-(5'axobenzotriaxoil) fenilamina en agregación de un coloide HPAg (un décimo de dilución) al monitorizar la intensidad Raman de la señal de 1370 cm^{-1} . Longitud de onda láser= 633 nm con una acumulación 1×10 sec y 10% de filtro.

La figura 10 muestra el cambio en las propiedades espectrales UV durante el periodo de maduración de temperatura ambiente de un coloide producido de acuerdo con el método de la invención para reducir nitrato de plata con fosfato de hidroxilamina.

35 La figura 11 ilustra el espectro SERS obtenido con riboflavina en concentración de 10^{-6} M utilizando tandas de coloides que fueron de 6, 9, 16 y 24 semanas de edad producidas de acuerdo con el método de invención para reducir nitrato de plata con fosfato de hidroxilamina y maduradas a temperatura ambiente. Estos resultados muestran que, aunque el coloide aún está madurando hasta aproximadamente ocho semanas la intensidad SERS de riboflavina sólo aumenta en menos del 5% sin aumento adicional con las tandas más viejas. Estos resultados confirman la larga vida útil, excelente reproducibilidad SERS y de tanda a tanda del coloide. La riboflavina también es un compuesto altamente fluorescente y el bajo nivel de fluorescencia observado se puede atribuir a las altas propiedades de apagado de fluorescencia del coloide HPAg. La Poli (L-lisina) en una concentración de (0.01% p/v) se utiliza como el agente de agregación. La longitud de onda láser fue de 514 nm.

45 Con referencia a la figura 12, las gráficas ilustran el efecto de temperatura sobre el tiempo de maduración de un coloide producido de acuerdo con método de la invención para reducir nitrato de plata con fosfato de hidroxilamina. Los resultados en este ejemplo son de monitorizar los cambios en el ancho de banda UV de la solución de coloide (60 μ l diluido en 3 ml de agua) en una cubeta de longitud de trayectoria 1 cm y muestra cómo el periodo de maduración reduce cuando aumenta la temperatura.

50 Los datos presentados aquí son los resultados de llevar a cabo un rango extendido de estudios de estabilidad en recipientes de poliestireno y vidrio y en un rango de temperaturas.

55 Los coloides de fosfato de hidroxilamina (coloides HPAg), cuando se producen en contenedores de poliestireno inicialmente, exhiben un espectro UV con un valor λ_{max} de normalmente 395 nm, un ancho de banda de 57 nm y una absorbancia de 0.280. Cualquier tanda de coloide producida sobre un período de normalmente 8 semanas (período de maduración) mostrará una reducción en λ_{max} hasta 389 ± 1 nm, con una reducción correspondiente en el ancho de banda hasta 28 ± 2 nm y aumento en la absorbancia hasta 0.475 ± 25 . Después que se han encontrado que estos valores permanecen constantes durante 20 semanas, como se puede observar en la figura 10. Tandas de coloides preparados en contenedores de vidrio muestran las mismas características UV iniciales pero dentro de 4 semanas pierden estabilidad y los agregados de plata cae fuera de la solución. Por lo tanto, se prefiere material de poliestireno para la preparación y almacenamiento del coloide.

65 La espectroscopia Raman de muestras de maduración muestra el aumento gradual de la intensidad SER(R)S y luego después de un período de maduración de 8 semanas permanece constante (Figura 11). Estudios TEM no indican cambio en el tamaño o distribución de partículas de las partículas coloidales de plata. A partir de esto, estos

resultados UV, Raman y TEM postulan que cuando se prepara primero el coloide, las partículas de plata del mismo tamaño se forman pero se mantienen juntas en grumos muy pequeños, posiblemente mediante fuerzas de enlace de hidrógeno débil. Posiblemente en la maduración por interacción con una superficie del recipiente, grumos pequeños se disocian en partículas de plata coloidales individuales.

5 Los cambios observados en las propiedades UV del coloide soportan fuertemente la postulación y si sólo hay una fuerza de unión débil entre las partículas entonces se concluyó que calentar la solución coloide ayudaría a la disociación de los grumos de partículas. Esto se confirmó al monitorizar las propiedades UV de muestras de coloides almacenadas en contenedores de poliestireno sobre un rango de temperaturas entre 4 y 55°C. Los períodos de maduros de las soluciones coloidales se reducen dramáticamente cuando las muestras se mantuvieron a 10 temperaturas por encima de temperatura ambiente con la reducción del periodo de maduración cuando aumenta la temperatura como se puede observar de la figura 12.

15 Las propiedades UV de estos coloides madurados coincide que aquellos obtenidos para coloides madurados a temperatura ambiente. De manera similar, la supervisión Raman de coloides durante estos períodos de maduración muestra un aumento en la intensidad SER(R)S, pero una vez maduros la intensidad permanece constante y coincide con aquella de un coloide madurado a temperatura ambiente. No se detectaron cambios en las propiedades UV para las muestras almacenadas a 4°C.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de producir una solución de coloide metálico, que comprende agregar una solución acuosa de una sal de hidroxilamina a una solución acuosa de un álcali y luego agregar una solución acuosa de los iones metálicos, caracterizado por seleccionar fosfato de hidroxilamina como la sal de hidroxilamina e introducir la solución de iones metálicos mediante inyección rápida a través de un chorro de alta velocidad de tal manera que los iones metálicos se dispersan a través de la mezcla dentro de un segundo.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el metal es plata.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la solución acuosa de iones metálicos es una solución de nitrato de plata.
- 15 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el metal es oro.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la solución acuosa de iones metálicos es una solución de tetracloroaurato de hidrógeno.
- 20 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el volumen de la mezcla en la que la solución de ion metálico se introduce es menor de 5 cm³.
7. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que después de introducción de la solución de ion metálico la mezcla se somete a mezcla adicional durante un periodo de entre 2 segundos y 30 segundos.
- 25 8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el álcali es hidróxido de sodio.
9. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la concentración de la sal hidroxilamina es 0.075 x 10⁻³ M.
- 30 10. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la concentración de álcali es 1.33 x 10⁻³ M.
- 35 11. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el tamaño de partícula resultante en el coloide es 19±9nm.
12. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende llevar a cabo la introducción y dispersión en un contenedor hecho de poliestireno.
- 40 13. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende madurar la solución de coloide a una temperatura por encima de la temperatura ambiente durante un periodo predeterminado con lo cual mejora la estabilidad.
- 45 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende madurar la solución de coloide a una temperatura en el rango de 40° a 50°C.

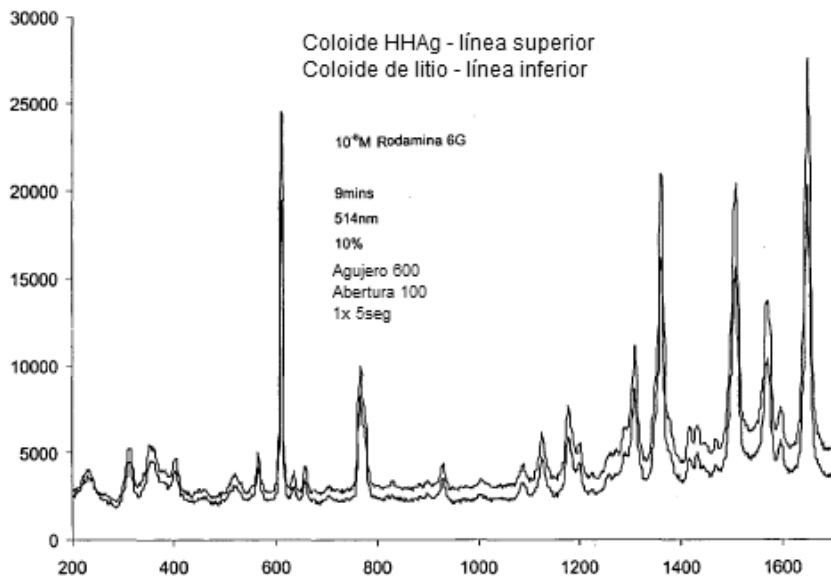


Fig 1

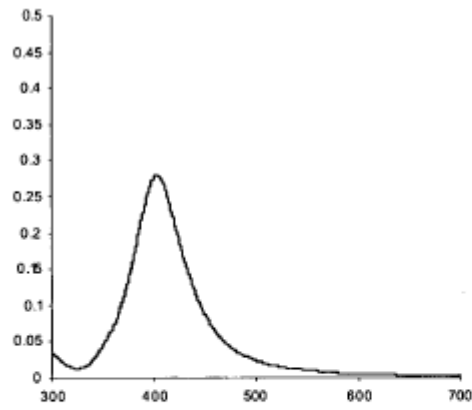


Fig 2a

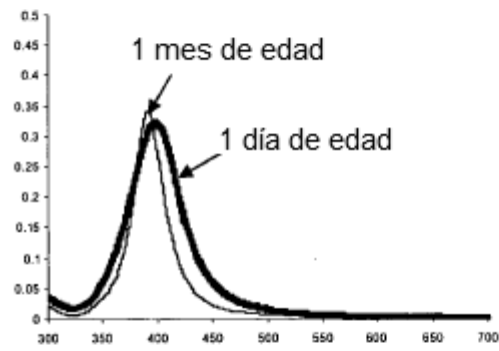


Fig 2b

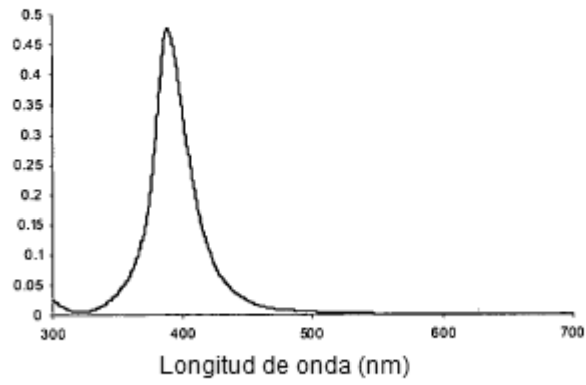


Fig 2c

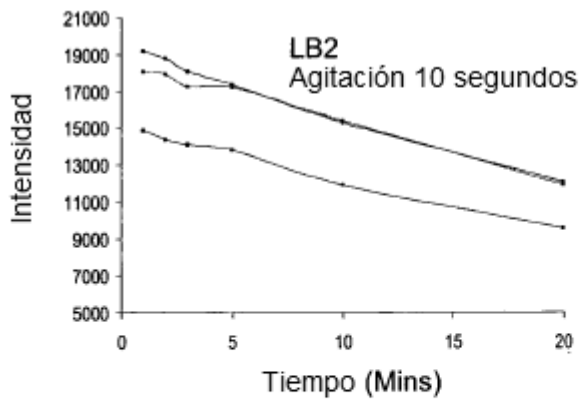


Fig 3a

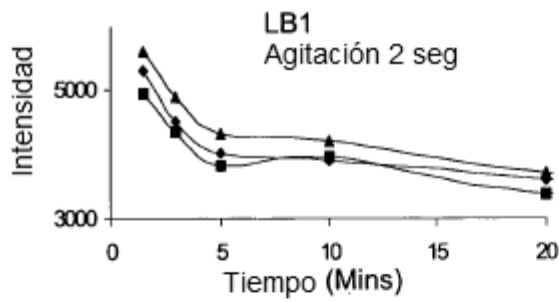


Fig 3b

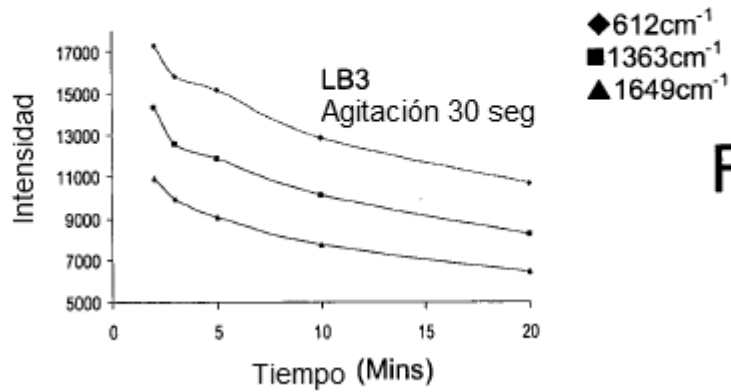
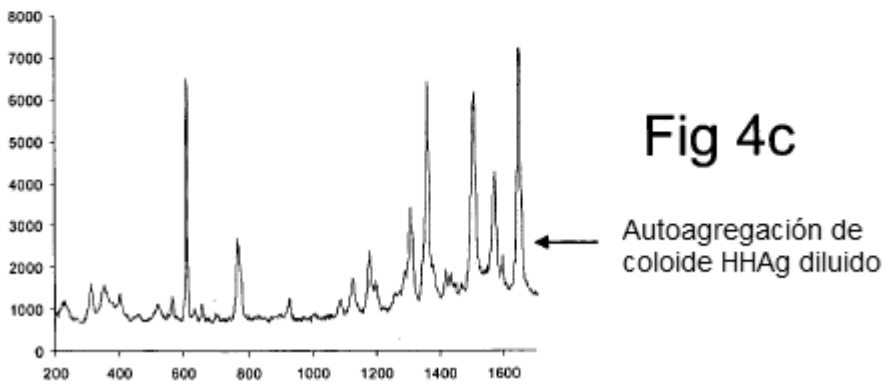
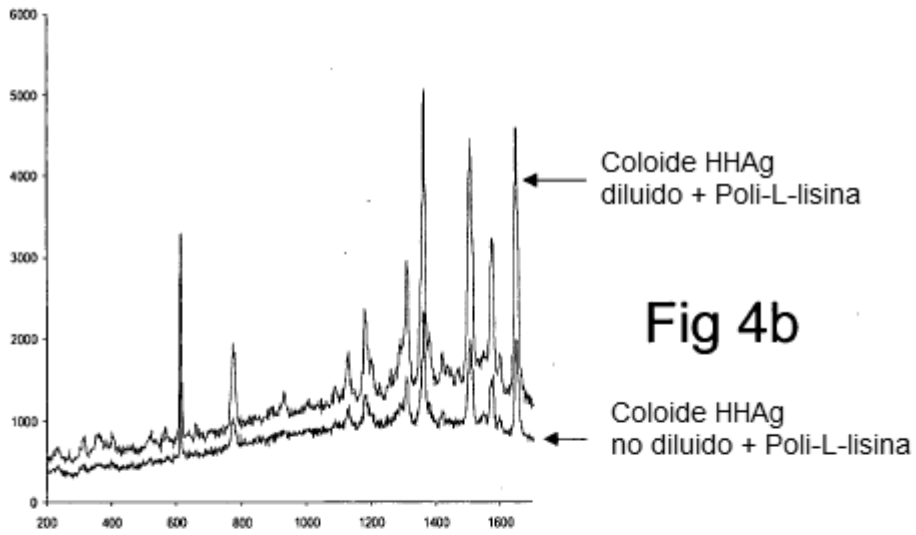
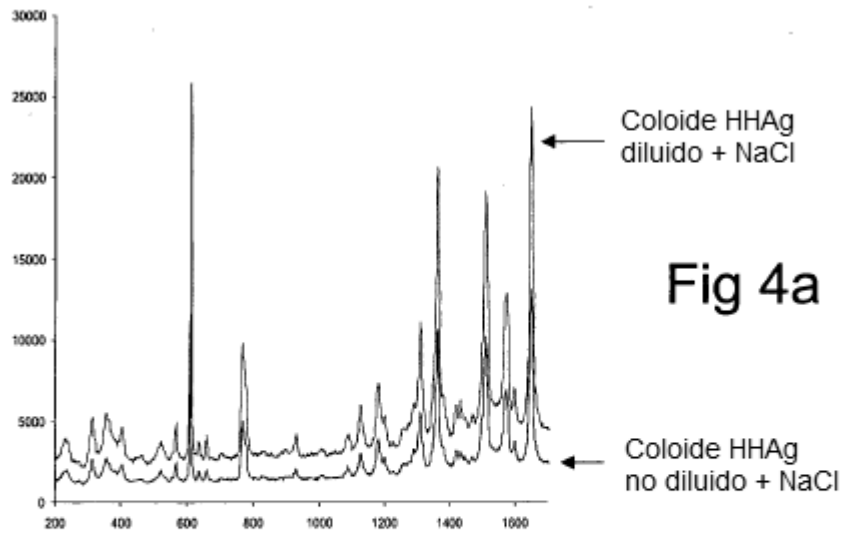


Fig 3c



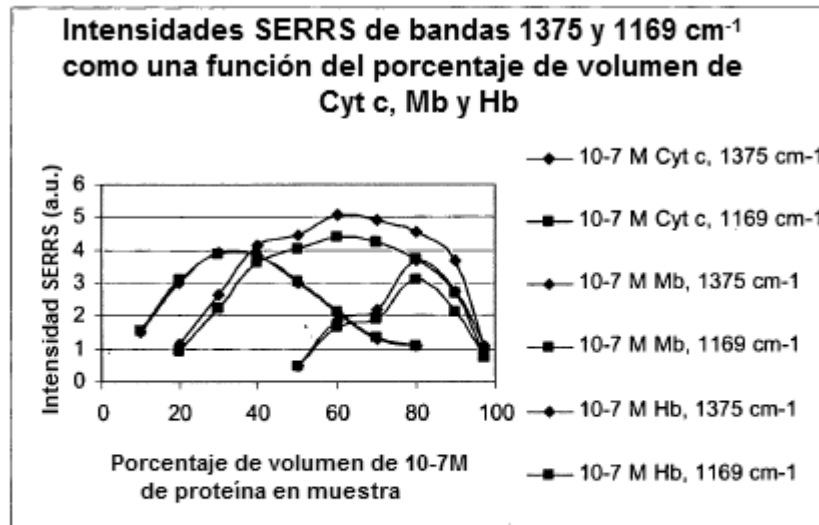


Fig 5

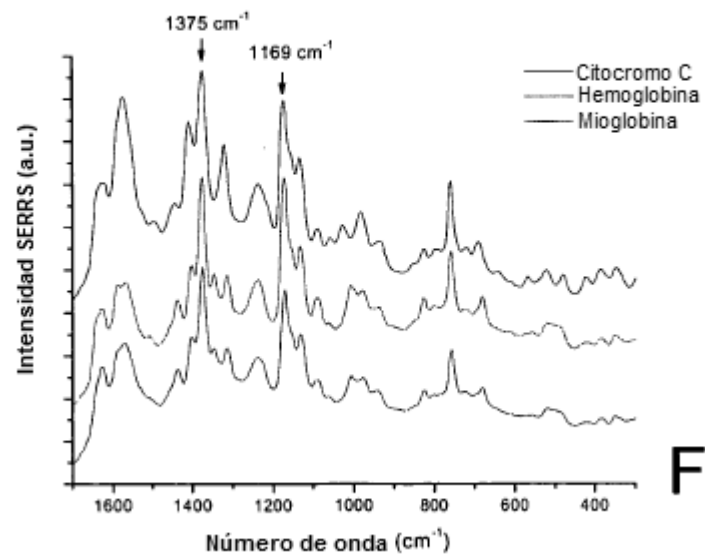


Fig 6

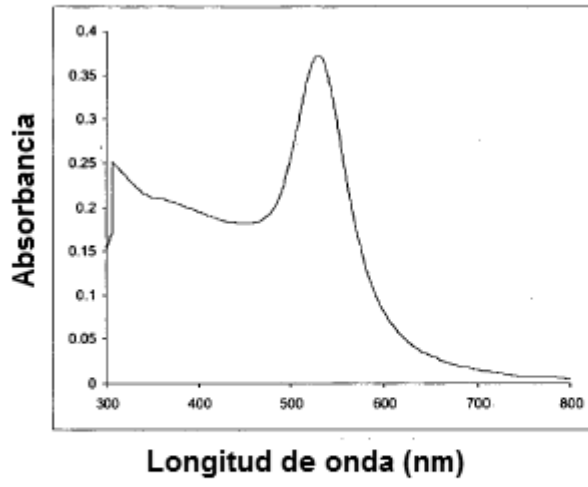


Fig 7

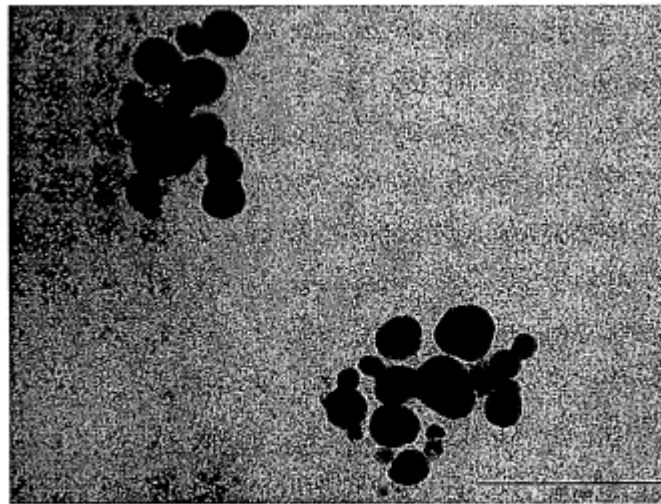


Fig 8

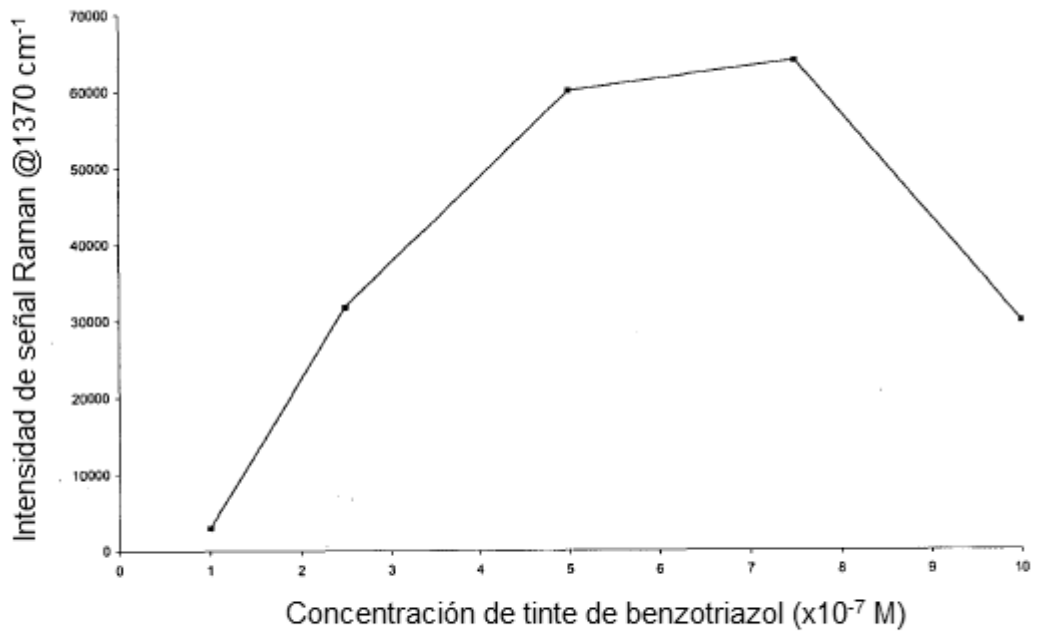


Fig 9

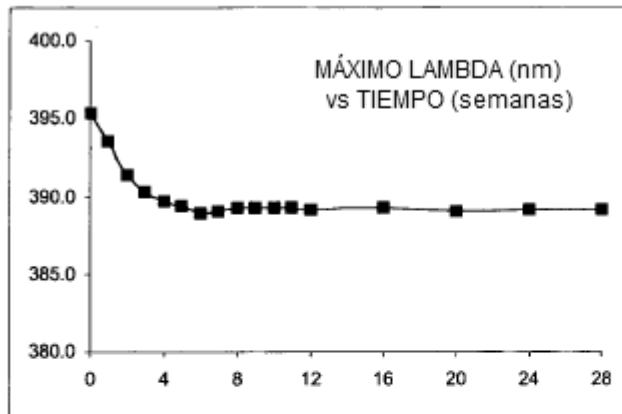


Fig 10a

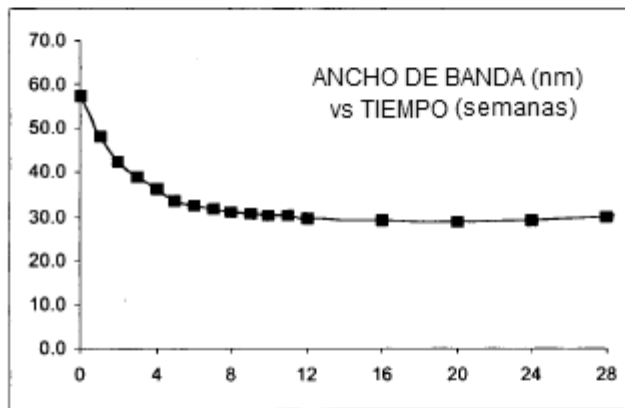


Fig 10b

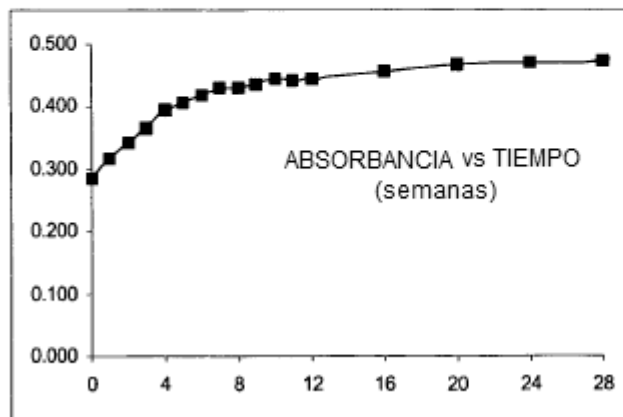


Fig 10c

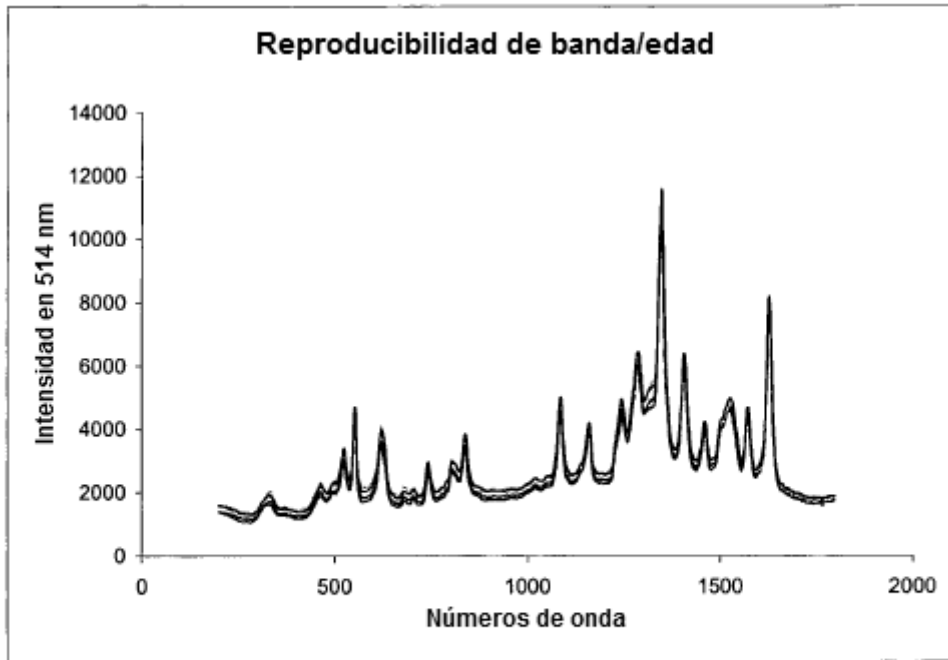


Fig 11

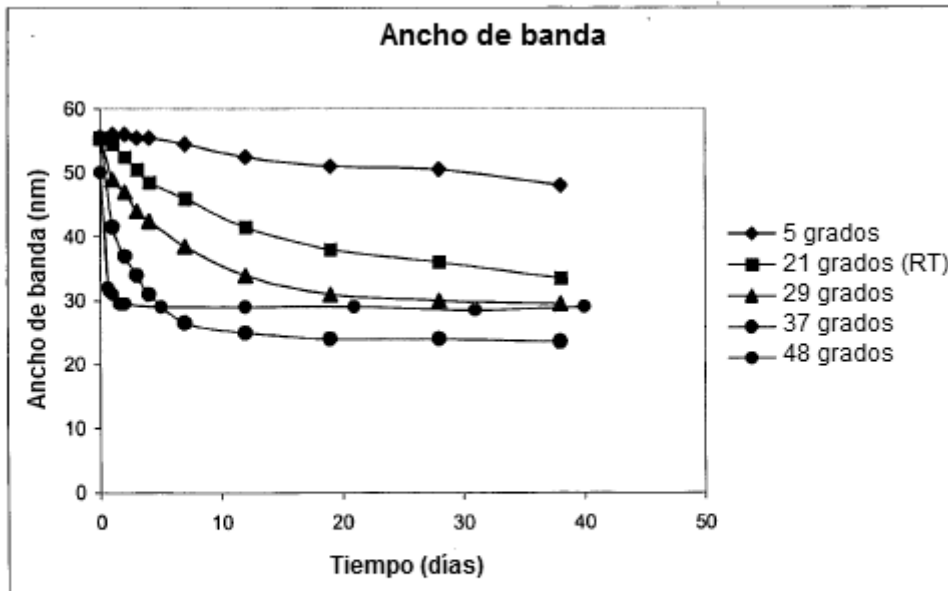


Fig 12