

# Pojačanje Ramanova raspršenja na nanočesticama zlata pripremljenim u puferu HEPES

---

Radoslavić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:606055>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



# Pojačanje Ramanova raspršenja na nanočesticama zlata pripremljenim u puferu HEPES

---

Radoslavić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:606055>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2023-01-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO–MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Ivana Radoslavić

**POJAČANJE RAMANOVA RASPRŠENJA  
NA NANOČESTICAMA ZLATA  
PRIPREMLJENIM U PUFERU HEPES**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2022.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka  
Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc.  
Adriane Kendel.



## Zahvale

Veliko hvala mojoj mentorici **doc. dr. sc. Adriani Kendel** na uloženom trudu i vremenu, te savjetima, motivaciji, pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala mojoj **veseloj trojci; Matei, Nikoli i Petri** s kojima je zajedničko spremanje za ispit kod Bere bilo najbolje i najproduktivnije.

Hvala i najvažnijim i najmilijim mojima, **obitelji** na svakoj riječi podrške, bezgraničnoj vjeri i ljubavi tijekom studiranja, a posebno mojoj blizanki **Jopi** koja je prošla svaki moj pad i pobjedu na PMF-u i sve to istrpjela uz puno razumijevanja i podrške.





# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Ramanova spektroskopija .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja .....</b>	<b>4</b>
2.2.1. Elektromagnetski mehanizam.....	6
2.2.2. Kemijski mehanizam ili mehanizam prijenosa naboja.....	7
2.2.3. Metalni supstrati .....	8
<b>2.3. Modelne molekule za SERS mjerenja .....</b>	<b>10</b>
2.3.1. Rodamin 6G ( <b>R6G</b> ) .....	10
2.3.2. (E)-1,2-di(piridin-4-il)eten ( <b>BPE</b> ) .....	11
2.3.3. Dinatrijev fluoresceinat ( <b>Na<sub>2</sub>FI</b> ).....	12
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Kemikalije.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Mjerni uređaji .....</b>	<b>14</b>
<b>3.3. Priprava koloidnih suspenzija zlata .....</b>	<b>15</b>
3.3.1. Sinteza „bez sjemena“ .....	15
3.3.2. Sinteza „sa sjemenom“ .....	15
<b>3.4. Priprava otopina i mjernih uzoraka.....</b>	<b>15</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>17</b>
<b>4.1. Ramanovi spektri modelnih molekula .....</b>	<b>17</b>
4.1.1. Rodamin 6G .....	17
4.1.3. Dinatrijev fluoresceinat .....	22
<b>4.2. Karakterizacija pripremljenih koloidnih suspenzija zlata.....</b>	<b>24</b>
<b>4.3. Nemodificirane koloidne suspenzije zlata kao SERS supstrati.....</b>	<b>26</b>
4.3.1. Koncentracijski ovisni SERS spektri u nemodificiranom koloidu zlata <b>AuNP</b> .....	26
4.3.2. Koncentracijski ovisni SERS spektri u nemodificiranom koloidu zlata <b>AuNP_Ag</b> .....	31
<b>4.4. Vremenski ovisni SERS spektri nemodificiranih koloida zlata AuNP i AuNP_Ag .....</b>	<b>36</b>
4.4.1. Koloid <b>AuNP</b> .....	36
4.4.2. Koloid <b>AuNP_Ag</b> .....	37
<b>4.5. Modificirane koloidne suspenzije zlata kao SERS supstrati.....</b>	<b>38</b>

---

4.5.1. Koncentracijski ovisni SERS spektri u modificiranom koloidu zlata <i>AuNP(+PVP)</i> .....	38
4.5.2. Koncentracijski ovisni SERS spektri u modificiranom koloidu zlata <i>AuNP_Ag(+PVP)</i> .....	42
<b>4.6. Vremenski ovisni SERS spektri modificiranih koloida zlata <i>AuNP(+PVP)</i> i <i>AuNP_Ag(+PVP)</i>.....</b>	<b>46</b>
4.6.1. Koloid <i>AuNP(+PVP)</i> .....	46
4.6.2. Koloid <i>AuNP_Ag(+PVP)</i> .....	46
<b>4.7. Vremenski ovisni UV/Vis/NIR i Raman spektri koloidnih suspenzija zlata.....</b>	<b>47</b>
4.7.2. Vremenski ovisni Ramanovi spektri koloidnih suspenzija zlata.....	50
<b>4.8. Faktor pojačanja.....</b>	<b>53</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>55</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI) .....</b>	<b>57</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>58</b>
<b>§ 8. DODATAK.....</b>	<b>XV</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XXV</b>





Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno–matematički fakultet

**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### POJAČANJE RAMANOVA RASPRŠENJA NA NANOČESTICAMA ZLATA PRIPREMLJENIM U PUFERU HEPES

Ivana Radoslavić

Istražena je SERS (spektroskopija površinski pojačanog Ramanova raspršenja) učinkovitost i stabilnost koloida zlata pripremljenih redukcijom tetraklorozlatne(III) kiseline 4–(2–hidroksietil)–1–piperazinetilensulfonskom kiselinom (pufer HEPES) pomoću modelnih molekula rodamina 6G (**R6G**), (E)-1,2-di(piridin-4-il)etena (**BPE**) i dinatrijeva fluoresceinata (**Na<sub>2</sub>FI**). Koloidi su sintetizirani na dva načina: sinteza „bez sjemena“ u kojoj su samo pomiješani metalna sol i pufer, te sinteza „sa sjemenom“ u koju se dodaje, osim metalne soli i pufera, i srebrov nitrat. Istražen je i utjecaj dodatka polimera poli(vinil-pirolidona) (PVP) na stabilnost pripremljenih koloida i pojačanje raspršenja zračenja. U svim koloidima zlata najjače pojačanje raspršenja nađeno je za molekulu **BPE**, vrlo vjerojatno zbog njezine neutralnosti i strukturnih značajki. Modelne molekule s nabojem elektrostatski odbija HEPES koji stabilizira nanočestice i nalazi se na površini zlata u obliku zwitter iona. Uvođenje stabilizirajućeg polimera PVP u sustav stvara steričku barijeru i dobiveni spektri modelnih molekula pokazuju vrlo slabe vrpce. No, takvi modificirani koloidi su najstabilniji kroz vrijeme.

(xxv + 60 stranica, 43 slika, 10 tablica, 31 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: površinski pojačano Ramanovo raspršenje, koloid zlata, HEPES, PVP

Mentor: doc. dr. sc. Adriana Kenđel

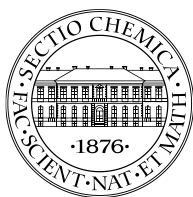
Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Adriana Kenđel
2. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
3. doc. dr. sc. Đani Škalamera

Zamjena: prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Datum diplomskog ispita: 30. rujna 2022.





University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Chemistry

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### ENHANCEMENT OF RAMAN SCATTERING ON GOLD NANOPARTICLES PREPARED IN HEPES BUFFER

Ivana Radoslavić

The SERS (surface-enhanced Raman scattering) efficiency and stability of gold colloids prepared by reduction of tetrachloroauric(III) acid with 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES buffer) were investigated using rhodamine 6G (**R6G**), (E)-1,2-di(pyridin-4-yl)ethene (**BPE**) and disodium fluoresceinate (**Na<sub>2</sub>FI**). Colloids were synthesized in two ways: the "seedless" synthesis, in which the metal salt and buffer are mixed, and the "seeded" synthesis, in which, in addition to the metal salt and buffer, silver nitrate was added. The influence of the poly(vinylpyrrolidone) - PVP addition on the stability of the prepared colloids and the scattering enhancement were investigated. In all gold colloids, the strongest SERS effect was found for the **BPE** molecules, most likely due to its neutrality and structural features. The charged model molecules are electrostatically repelled by HEPES, which stabilizes the nanoparticles and was located on the gold surface as zwitter ion. Introduction of the polymer PVP into the system resulted with a steric barrier and the obtained spectra of the model molecules show very weak bands. However, such modified colloids are the most stable over time.

(xxv +60 pages, 43 figures, 10 tables, 31 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: surface-enhanced Raman scattering, gold colloid, HEPES, PVP

Mentor: Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor
  2. Dr. Biserka Prugovečki, Professor
  3. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Snežana Miljanić, Professor  
Date of exam: September 30, 2022



## § 1. UVOD

Ramanova spektroskopija je vibracijska metoda koja se temelji na detekciji neelastičnog raspršenja nakon interakcije zračenja i molekule. Prednosti metode su nedestruktivnost, mogućnost snimanja u vodenim otopinama te jednostavna priprava uzorka za mjerenje, najveći nedostaci su slaba osjetljivost metode, degradacija uzorka te fluorescencija, stoga se razvijaju tehnike koje će ublažiti ili zaobići navedene nedostatke. Jedna od takvih tehnika je i površinski pojačano Ramanovo raspršenje (engl. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS). SERS tehnikom se dobiva intenzivnije pojačanje raspršenja ( $10^5$ – $10^6$  puta veće od normalna Ramanova raspršenja) uslijed adsorpcije molekule analita na hrapavu metalnu površinu. Kao metalni supstrati za adsorpciju i/ili kemijsko vezanje analita najčešće se koriste nanočestice srebra i zlata u obliku koloidnih suspenzija ili imobilizirane nanočestice na čvrstoj podlozi. Koloidne suspenzije pripremaju se redukcijom metalnih soli, pri čemu reducens vrlo često ima i ulogu stabilizatora koji sprječava agregiranje i oksidaciju nastalih nanočestica. Osim iona zaostalih ili nastalih tijekom pripreme koloida, kao stabilizirajući agensi vrlo često se koriste i molekule polimera.<sup>1,2,3</sup>

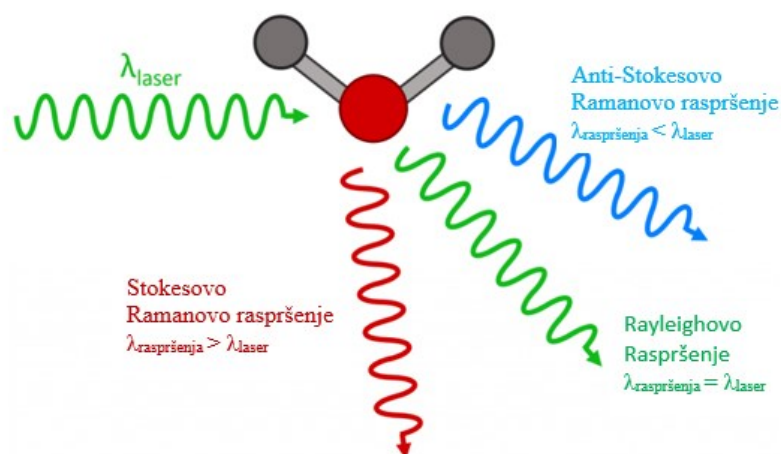
Svrha ovog diplomskog rada je ispitati SERS učinkovitosti pripremljenih supstrata pri čemu su korištene modelne molekule rodamin 6G, (E)-1,2-di(piridin-4-il)eten i dinatrijev fluoresceinat. Sintetizirana je koloidna suspenzija zlata u 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetilensulfonskoj kiselini (pufer HEPES) koji ima ulogu reducensa i stabilizatora zlatnih nanočestica. Sinteza je provedena na dva načina; u sintezi „bez sjemena“ reakcijska smjesa uključuje samo metalnu sol i reducens, dok se u sintezi „sa sjemenom“ dodaje srebrov nitrat. Promatrana je SERS učinkovitost koloidnih suspenzija zlata sa i bez dodatka polimera poli(vinil-pirolidona) koji služi kao stabilizator, dok je UV/Vis spektroskopijom analizirana stabilnost pripremljenih koloida. Snimljeni su koncentracijski i vremenski ovisni SERS spektri u svrhu određivanja granice detekcije i izračuna faktora pojačanja za pojedine supstrate te kako bi se odredilo ponašanje analita u koloidnoj suspenziji tijekom vremena. Svi SERS spektri snimljeni su korištenjem pobudnog zračenja pri 532 i 785 nm.



## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Ramanova spektroskopija

Fenomen neelastičnog raspršenja svjetlosti prvi je postulirao Smekal 1923. godine, dok su ga eksperimentalno analizirali 1928. godine Raman i Krishnan. U izvornom eksperimentu sunčeva svjetlost je bila fokusirana teleskopom na uzorak (tekućina ili para bez prašine). Uz uzorak je bila postavljena druga leća za prikupljanje raspršenog zračenja. Sustav optičkih filtara korišten je kako bi se dokazalo postojanje raspršenog zračenja čija se frekvencija razlikuje od frekvencije upadne svjetlosti.<sup>4</sup>



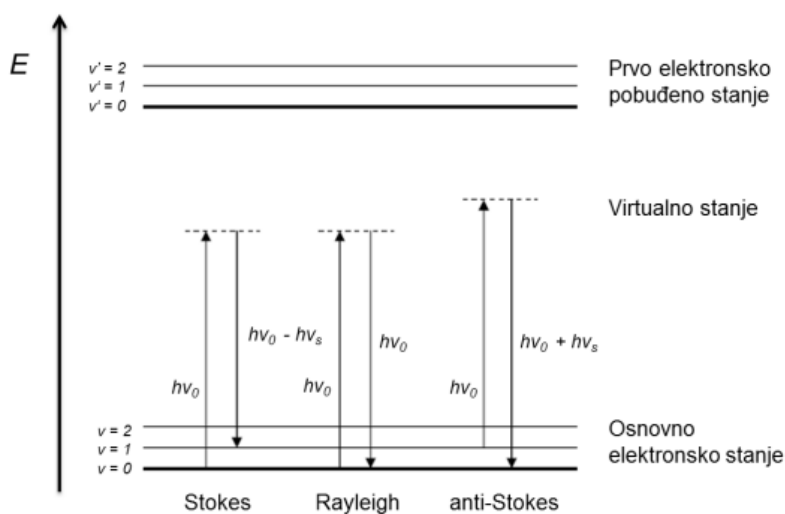
Slika 1. Shematski prikaz Stokesova, Rayleigheva i anti-Stokesova raspršenja.

Ilustracija je preuzeta s internetske stranice [www.edinst.com](http://www.edinst.com) i prilagođena literaturnom izvoru.<sup>5</sup>

Uslijed interakcije svjetlosti s tvari, foton svjetlosti može se apsorbirati, raspršiti ili može proći kroz tvar bez interakcije. Ukoliko energijska razlika između osnovnog i pobuđenog stanja odgovara energiji upadnog fotona, dolazi do apsorpcije fotona i prelaska molekule u više energijsko stanje. Kada interakcija fotona s molekulom rezultira raspršenjem zračenja, energija upadnog fotona ne treba odgovarati razlici energija između dvaju stanja. Raspršenje se najčešće primjenjuje za određivanje veličine čestica i raspodjele čestica manjih od 1  $\mu\text{m}$ , no glavna tehnika raspršenja koja se koristi za određivanje strukture je Ramanova spektroskopija.

U Ramanovoj spektroskopiji interakcijom zračenja i molekule dolazi do polarizacije elektronskog oblaka oko jezgara. Pri tome nastaje kratkoživuće, nestabilno stanje molekule koje se naziva virtualno stanje. Virtualno stanje nije stvarno energijsko stanje molekule i njegova energija ovisi o energiji pobude. Iz virtualnog stanja se fotoni otpuštaju u obliku raspršenog zračenja. Raspršeno zračenje dijeli se na dominantno Rayleighovo raspršenje i slabo Ramanovo raspršenje. Na slici 2 prikazan je energijski dijagram Rayleighova i Ramanova raspršenja. Intenzivno Rayleighovo raspršenje se zbiva prilikom interakcije upadnog zračenja i elektronskog oblaka pri kojoj ne dolazi do pomicanja jezgara. To je elastičan proces u kojem nema prijenosa energije s fotona na molekulu ili obrnuto i molekula se nakon pobude u virtualno stanje vraća u početno energijsko stanje. Ramanovo raspršenje je puno manje vjerojatno s obzirom na to da se tek  $10^6$ – $10^8$  fotona Raman raspršuje. Kod Ramanovog raspršenja upadno zračenje, osim polarizacije elektronskog oblaka, potiče i gibanje jezgara pa dolazi do prijenosa energije s fotona na molekulu ili obrnuto. Takvo neelastično raspršenje naziva se Ramanovo raspršenje. Ramanovo raspršenje dijeli se na Stokesovo i anti-Stokesovo raspršenje. Prilikom Stokesovog načina raspršenja molekula iz osnovnog vibracijskog stanja prelazi u virtualno i vraća se u više vibracijsko stanje. Raspršeno zračenje je manje energije od pobudnog zračenja. Proces u kojem molekula iz višeg vibracijskog stanja prelazi u virtualno i vraća se u osnovno vibracijsko stanje odgovara anti-Stokesovom raspršenju pri čemu je energija raspršenog zračenja veća od energije pobudnog zračenja. Stokesove i anti-Stokesove vrpce daju istu informaciju o strukturi molekula, samo je razlika u njihovim intenzitetima u Ramanovim spektrima.

Infracrvena (engl. *infraed*, IR) i Ramanova spektroskopija su komplementarne metode, ali imaju različita izborna pravila. Molekula će apsorbirati infracrveno zračenje ako tijekom vibracije dolazi do promjene električnog dipolnog momenta i zato su intenzivne vrpce u IR spektrima posljedica apsorpcije zračenja polarnih skupina. Neka vibracija će biti aktivna u Ramanovom spektru ako pod utjecajem laserskog zračenja dolazi do promjene polarizabilnosti. Najintenzivnije raspršuju zračenje funkcijske skupine bogate elektronima, kao što su nezasićene veze ili aromatski strukturni motivi. Upravo zbog ove razlike u izbornim pravilima, intenzivne vrpce vibracija u Ramanovom spektru mogu biti puno slabijeg intenziteta u IR spektru i obrnuto. Također, za molekule koje posjeduju centar simetrije vrijedi dodatno pravilo međusobnog isključenja, prema kojem niti jedna vibracija ne može biti i IR i Raman aktivna.<sup>1,8</sup>



Slika 2. Energijski dijagrami Stokesova, Rayleighova te anti-Stokesova raspršenja.<sup>10</sup>

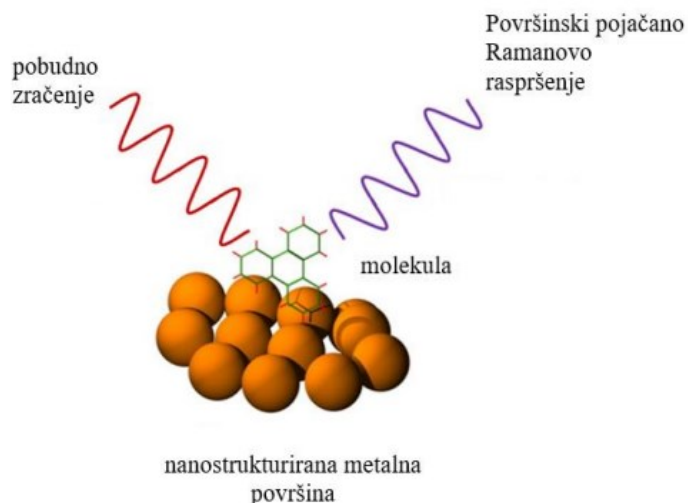
Ramanovom spektroskopijom mogu se dobiti informacije o kemijskoj strukturi i fizičkim oblicima molekula. Također se koristi i za semikvantitativnu analizu tvari u uzorku. Prednosti Ramanove spektroskopije su minimalne pripreme uzoraka, visoke specifičnosti, *in vivo* aplikacije optičkih vlakana te kompatibilnosti s fiziološkim mjerenjima jer voda ne smeta pri mjerenjima.<sup>4</sup> Osnovni nedostaci su slaba osjetljivost te pojava fluorescencije koja može prekriti vrpce analiziranog spoja. Kako bi se umanjili navedeni nedostaci, razvijaju se različite tehnike Ramanove spektroskopije, a jedna od njih je i spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS).

## 2.2. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja

SERS spektroskopijom opaža se raspršenje molekula adsorbiranih na hrapavu površinu metala. U odnosu na klasičnu Ramanovu spektroskopiju, intenzitet raspršenog zračenja pojačava se i do  $10^6$  puta.

Površinsko pojačanje Ramanova raspršenja otkrio je Fleischman 1974. godine. Opazio je intenzivno Ramanovo raspršenje piridina adsorbiranog na hrapavu srebrovu elektrodu i pretpostavio da je povećanje površine uslijed hrapavosti dovelo do pojačanja raspršenja. No, 1977. godine Jeanmaire i Van Duyne te Albrecht i Creighton su dokazali kako je pojačanje raspršenja molekula koje su bile adsorbirane na površinu  $10^5$ – $10^6$  puta veće u odnosu na klasično Ramanovo raspršenje vrsta u otopini, dok bi samo povećanje površine srebra

rezultiralo pojačanjem raspršenja za 10 puta. Shematski prikaz SERS eksperimenta dan je na slici 3.



Slika 3. Shematski prikaz SERS eksperimenta.<sup>11</sup>

S obzirom da je adsorpcija analita na površini glavni uvjet za aktivni supstrat u SERS spektroskopiji, vrsta metala i hrapave površine izuzetno je važna. Osim toga, na pojačanje raspršenja utječu i karakteristike pobudnog zračenja, struktura i svojstva molekula koje se istražuju i način adsorpcije ili vezanja molekula na površinu metala.

SERS spektar se vrlo često razlikuje od Ramanovog spektra, jer može doći do pomaka ili smanjenja intenziteta postojećih vrpci, ili do pojave novih vrpci. Navedeno je rezultat izbornih pravila za SERS prema kojim se tijekom adsorpcije molekule na metalnu površinu narušava simetrija molekule što dovodi do promjene u normalnim vibracijama. Osim toga, vibracije koje su polarizirane okomito na metalnu površinu najintenzivnije raspršuju zračenje. Pravilo međusobnog isključenja ne vrijedi u SERS spektrima ako se radi o molekulama koje imaju centar simetrije jer se adsorpcijom na metalnu površinu centar simetrije gubi.<sup>1,2</sup>

Prihvaćena su dva mehanizma kojima se objašnjava pojačanje raspršenja s površine metala. U prvom mehanizmu analit se adsorbira ili se nalazi vrlo blizu metalne površine (elektromagnetsko pojačanje), dok se u drugom slučaju analit nalazi kemijski vezan na površinu metala, najčešće putem atoma dušika, kisika ili sumpora (kemijsko pojačanje). Kemijsko pojačanje može se dogoditi isključivo iz prvog sloja analita vezanog na površinu dok se

elektromagnetsko pojačanje događa iz prvog, drugog i svakog sljedećeg sloja analita uz površinu.<sup>2</sup>

### 2.2.1. Elektromagnetski mehanizam

Elektromagnetski mehanizam pretpostavlja interakciju molekula analita i površinskih plazmona, pri čemu su molekule analita smještene vrlo blizu metalne površine.

Površina metala prekrivena je vodljivim elektronima koji se slobodno gibaju uzduž površine stvarajući elektronski oblak na određenoj udaljenosti od površine. Kada se zračenje usmjeri na površinu metala, dolazi do interakcije električnog polja upadnog elektromagnetskog zračenja i elektronskog oblaka, te elektroni počinju koherentno oscilirati i takve oscilacije nazivamo površinski plazmoni (slika 4). Površinski plazmoni posjeduju tzv. rezonancijsku frekvenciju pri kojoj najučinkovitije adsorbiraju i raspršuju svjetlost, a spomenuta frekvencija ovisi o metalu i prirodi površine. S obzirom na prirodu površine, koja može biti hrapava ili glatka, ovisi hoće li doći do oscilacija u ravnini ili okomito na metalnu površine. Ako su oscilacije elektrona u ravnini površine, što je karakteristika glatkih površina, dolazi do apsorpcije, ali ne i raspršenja zračenja. Međutim, na hrapavim površinama prisutne su oscilacije okomito i u ravnini na metalnu površinu, što rezultira apsorpcijom, ali u većoj mjeri raspršenjem zračenja.<sup>1,2</sup>

Model metalne sfere koristi se pri opisu elektromagnetskog pojačanja raspršenog zračenja. Kada se mala metalna kugla izloži primijenjenom električnom polju iz lasera, električno polje na površini je prikazano relacijom,

$$E_r = E_0 \cos \theta + g \left( \frac{a^3}{r^3} \right) E_0 \cos \theta \quad (1)$$

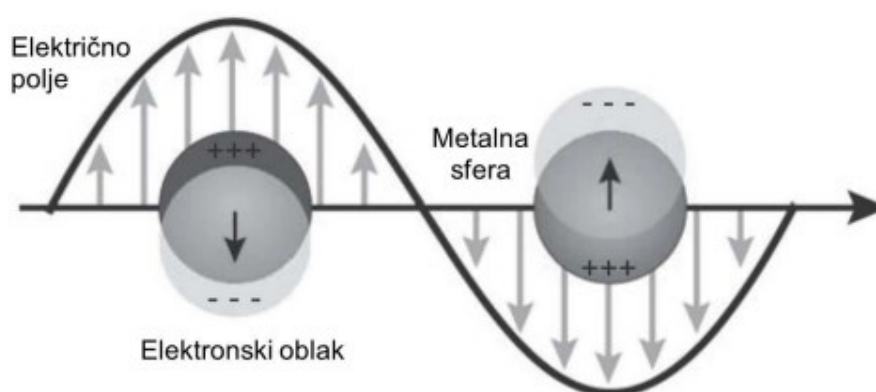
gdje je  $E_r$  je ukupno električno polje na udaljenosti  $r$  od površine kugle,  $a$  je polumjer kugle,  $\theta$  je kut u odnosu na smjer električnog polja, a  $g$  je konstanta povezana s dielektričnim konstantama tako da vrijedi,

$$g = \left( \frac{\varepsilon_1(\nu_L) - \varepsilon_0}{\varepsilon_1(\nu_L) + 2\varepsilon_0} \right) \quad (2)$$

$\varepsilon_0$  i  $\varepsilon_1$  su dielektrične konstante medija koji okružuje kuglu i metalne kugle, a  $\nu_L$  je frekvencija upadnog zračenja  $\varepsilon_0$  i  $\varepsilon_1$  su dielektrične konstante medija koji okružuje kuglu i metalne kugle, a  $\nu_L$  je frekvencija upadnog zračenja. Pri vrijednosti frekvencije (plazmonska rezonancijska frekvencija) kad je vrijednost  $g$  maksimalna, ekscitacija površinskog plazmona izrazito

pojačava lokalno električno polje molekule koja je adsorbirana na površini. Elektroni u analitu molekula koja je adsorbirana na površinu uzrokuje povećanje polarizacije oko molekule uslijed interakcije s oblakom elektrona. Električno polje može se opisati s dvije komponente, a to je polje okomito na površinu i polje paralelno s površinom. Iz jednadžbi 1. i 2. vidi se kako je električno polje koje je okomito na površinu veće od onog paralelno s površinom. Shodno navedenom, najveće pojačanje je zapaženo za molekulu koja je adsorbirana i polarizirana okomito na površinu.<sup>1</sup>

Dokazano je kako se najveće pojačanje ne događa ravnomjerno oko svake izolirane čestice, već u točkama nekih dodirnih čestica ili nakupinama čestica. Prilikom adsorpcije nanočestica srebra na površinu, moguće je proučavati kakva je raspodjela poboljšanja po površini, iz čega se zaključuje kako su neki dijelovi površine iznimno aktivni, dok drugi ostaju neaktivni. Aktivne dijelove zovemo „*hot spots*” te ovise o frekvenciji korištene pobude. Mjesta između čestica su područja iznimne SERS aktivnosti, a točka na kojoj se dvije čestice dodiruju posjeduje vrlo jako električno polje. Valja istaknuti kako, veličina i oblik čestice, način organiziranja čestica u klustere te niska odabrana frekvencija doprinose poboljšanju SERS-a.<sup>1</sup>



Slika 4. Shematski prikaz lokaliziranih površinskih plazmona.<sup>9</sup>

### 2.2.2. Kemijski mehanizam ili mehanizam prijenosa naboja

Kemijsko pojačanje ili pojačanje uslijed prijenosa naboja, podrazumijeva stvaranje veze između analita i metalne površine. Nastalom vezom nastaju površinske vrste koje uključuju površinske atome metala i analit, čime dolazi do prijenosa naboja s metalne površine na analit. Nastanak površinske vrste (novo elektronsko stanje) za posljedicu ima povećanje polarizabilnosti molekule. Pretpostavlja se kako su ta nova stanja rezonantni međuprodukti

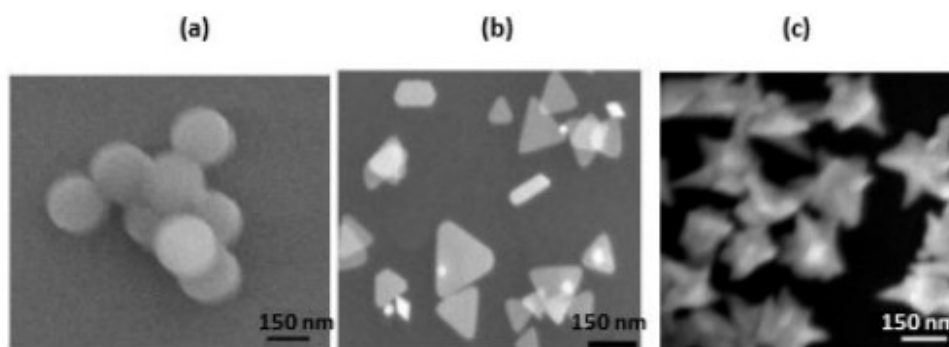
Ramanovog raspršenja. Kemijsko poboljšanje ima mnogo manji učinak na klasično Ramanovo poboljšanje, obično  $10^2$ – $10^4$  puta.<sup>1</sup>

### 2.2.3. Metalni supstrati

Zahtjevi koje metalni supstrati moraju ispuniti kako bi što efikasnije pojačali raspršenje zračenja su: hrapavost površine koja omogućuje pojačanje Ramanova raspršenja, uspješna adsorpcija analita, dobra stabilnost, reproducibilnost i čistoća. Prvi supstrati korišteni za SERS istraživanja bili su koloidi srebra, zlata ili bakra te folije/žice izrađene od zlata, srebra ili bakra koje su hrapavu površinu tvorile na kemijski/elektrokemijski način. SERS aktivne površine mogu se dobiti na tri općenita načina pa razlikujemo: 1. metalne nanočestice u suspenziji 2. metalne nanočestice imobilizirane na čvrstim podlogama i 3. nanostrukture proizvedene izravno na krutoj tvari nanolitografijom ili sintezom temeljenoj na šabloni.<sup>10</sup>

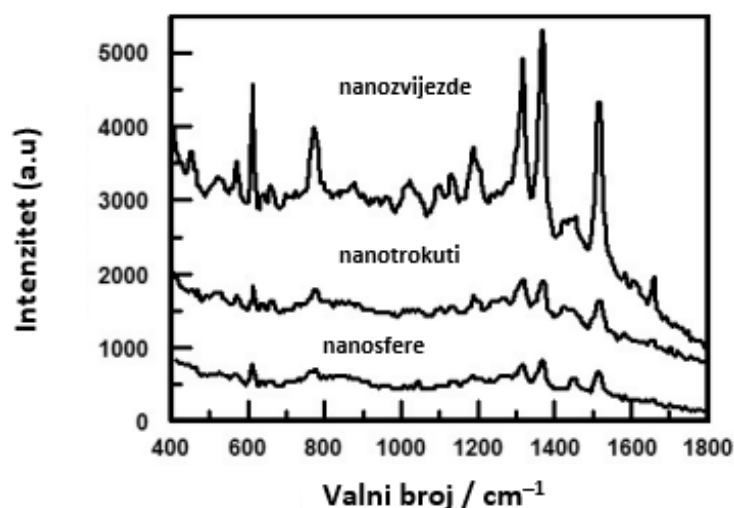
Metalne nanočestice u suspenziji mogu se pripremiti kemijskim ili fizikalnim metodama. Primjer fizikalne metode njihove pripreme je pulsna laserska ablacija plemenitih metala u tekućem mediju. Način priprave spomenutom metodom sastoji se od usmjeravanje izvora zračenja na metu, uslijed čega dolazi do apsorpcije impulsa lasera te nastanka plazma oblaka koji se brzo širi u tekućini i emitira udarne valove, hladi se i razgrađuje. Atomizirani materijal se zatim ukloni s mete te stupa u interakciju s vrstama prisutnim u tekućini i dolazi do nukleacije, rasta i formiranja nanočestica. Povećanje veličine čestica vodi i do povećanja SERS učinka jer ono ovisi o broju dostupnih elektrona. SERS aktivne nanočestice mogu se prirediti i „mokrom“ kemijskom sintezom uz dodatak sredstva za redukciju srebra ili zlata, a to su najčešće trinatrijev citrat, natrijev borhidrid, hidrazin ili 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetilensulfonska kiselina (HEPES). Uz reducens, često se koriste i stabilizirajući reagensi koji sprečavaju agregaciju nanočestica na način da se vežu na površinu nanočestica, a najviše korišteni su poli(etilen-glikol) (PEG), cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB), taninska kiselina i poli(vinil-pirolidon) (PVP). Jačina i koncentracija redukcijskog agensa određuje veličinu nanočestica. Tako jači redukcijski agens poput natrijeva borhidrida tvori manje nanočestice, a slabija redukcijska vrsta stvara veće čestice. Nukleacijom se atomi metala spajaju te dolazi do tvorbe klastera i na kraju do nastanka kristalne jezgre. Dodatkom sufraktanta može se kontrolirati oblik čestica, jer uslijed takvog dodatka dolazi do promjene površinske energije i kontrole agregacije čestica. Sintezom je moguće dobiti razne oblike nanočestica od nanosfera,

nanotrokuta i nanokocki do nanožica i nanozvijezda. Slika 5 prikazuje strukture nanosfera, nanotrokuta i nanozvijezda dobivene skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM).



Slika 5. Prikaz oblika nanosfera (a), nanotrokuta (b) i nanozvijezda (c) snimljeni skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM).<sup>10</sup>

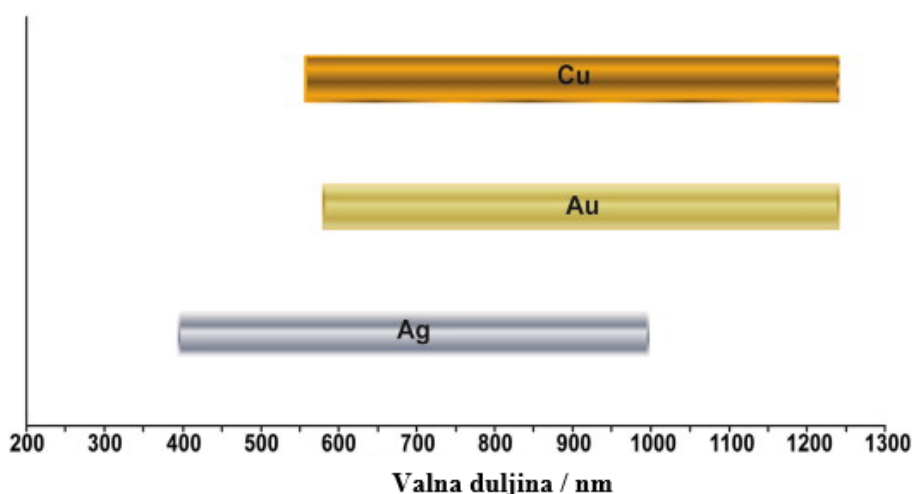
Nadalje, SERS pojačanje ovisi o obliku nanočestica koloida. Na slici 6 prikazan je SERS spektar rodamina 6G dobiven na tri različita oblika nanočestica zlata: nanozvijezde, nanotrokuti i nanosfere. Iz priloženog je zaključeno kako SERS poboljšanje raste za navedeni niz nanosfere < agregirane nanosfere < nanotrokuti << nanozvijezde. Razlog opisanog je različit broj „vrućih točaka“ po čestici, a taj je broj najveći za nanozvijezde. „Vruće točke“ su mjesta gdje je izrazito pojačano lokalno električno polje u usporedbi s okolinom.<sup>11</sup>



Slika 6. Usporedba 5  $\mu$ M rodamin 6G SERS spektra u suspenzijama zlatnih nanozvijezda, nanotrokuta i agregiranih nanosfera. Spektri su dobiveni pomoću laserske pobude od 785 nm. Preuzeto iz reference 10 i prilagođeno prema literaturnom izvoru.



Prethodno je navedeno da elektromagnetski mehanizam najviše doprinosi pojačanju Ramanova raspršenja na hrapavoj metalnoj površini i najintenzivniji SERS efekt dobiva se kada valna duljina lasera odgovara vrijednosti plazmonske rezonancije. Kao metali se najčešće koriste srebro i zlato zbog njihove stabilnosti, no vrlo često i bakar. Lokalizirana površinska plazmonska rezonancija za najčešće korištene metale u SERS analizama pokriva većinu vidljivog i bliskog infracrvenog dijela spektra, što je optimalno područje za većinu SERS mjerenja (slika 7).<sup>11</sup>



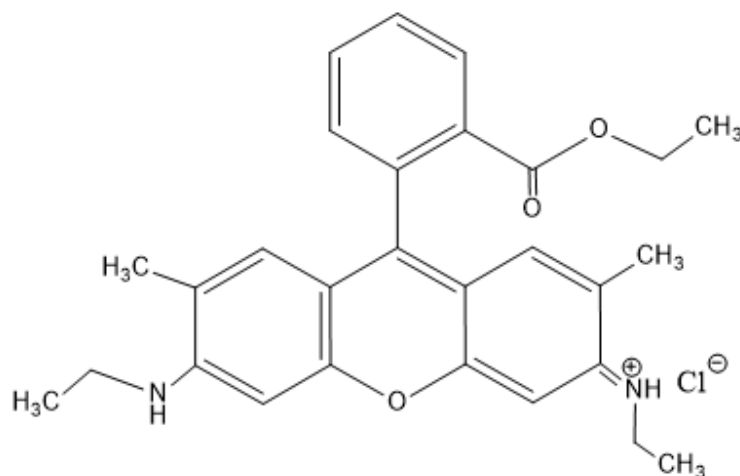
Slika 7. Približni rasponi valnih duljina gdje su Ag, Au i Cu dobro okarakterizirani i utvrđeni su da podržavaju SERS.<sup>11</sup>

## 2.3. Modelne molekule za SERS mjerenja

### 2.3.1. Rodamin 6G (R6G)

Za analizu SERS efekta često se koristi boja rodamin 6G koja je vrlo jak fluorofor pod djelovanjem vidljivog zračenja. Upotrebljava se kao nelinearni optički materijal, kao senzor te kao fotosenzibilizator. Do gašenja fluorescencije u molekuli **R6G** dolazi ukoliko je molekula prisutna u obliku dimera ili viših struktura. Spomenuti se proces događa zbog prijenosa pobudne energije između monomera i agregata koji se zatim raspadaju bez emisije zračenja. Dimeri imaju niski kvantni prinos te zahvaljujući tome efikasno gase emisiju. Također, do gašenja

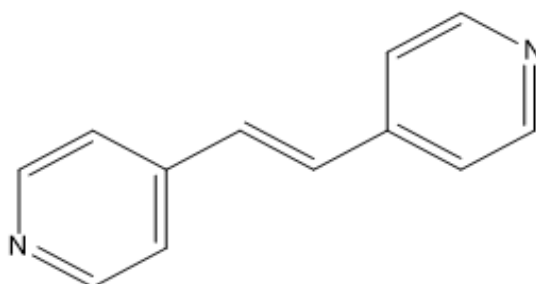
fluorescencije može doći uslijed snažne adsorpcije na hrapavu metalnu površinu, čime je omogućeno promatranje Ramanovih signala bez smetnji fluorescencije. U vrlo kiselim uvjetima ( $\text{pH} < 2$ ) **R6G** gubi svoju etoksi skupinu te nastaje lakton, i shodno tome dolazi do smanjenja fluorescencije.<sup>11</sup> Struktura rodamina 6G prikazana je na slici 8.



Slika 8. Struktura rodamina 6G.

### 2.3.2. (E)-1,2-di(piridin-4-il)eten (**BPE**)

(E)-1,2-di(piridin-4-il)eten ili **BPE** je molekula koja nema širu primjenu u kemiji kao primjerice druge modelne molekule korištene u ovom radu, već se koristi kao ligand ili takozvani „linker“ u metalo–organskoj kemiji ili kod koordinacijskih polimera. Nadalje, svoju upotrebu nalazi i kod dinuklearnih kompleksa cinka koje pokazuju fotokontroliranu fluorescenciju. Razmatrani spoj sastoji se od dva piridinska prstena povezana dvostrukom vezom, a struktura molekule prikazana je na slici 9.<sup>13</sup>

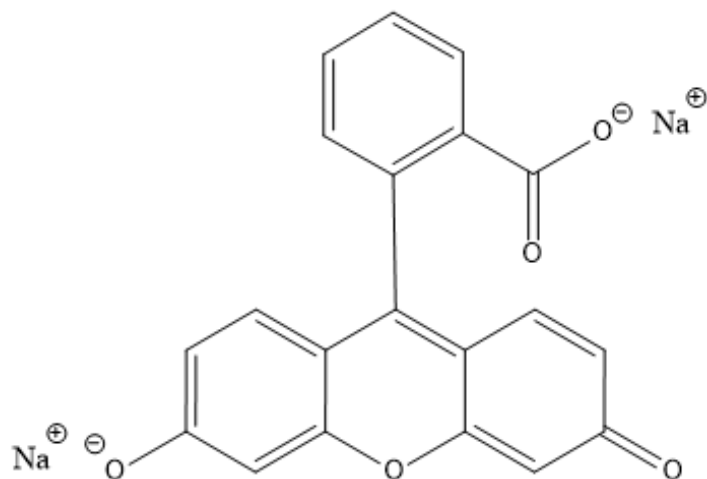


Slika 9. Struktura (E)-1,2-di(piridin-4-il)etena (BPE).

**BPE** može postojati u *trans* i *cis* obliku, no s obzirom na veću stabilnost *trans* oblika, *trans*-**BPE** se najčešće koristi u SERS analizama kao modelna molekula za karakterizaciju supstrata. Uočeno je kako pri pobudi od 532 nm elektroni iz zlatnih nanočestica odlaze s površine i difundiraju dalje te konvertiraju molekulu u anionski oblik, a kao posljedicu imaju promjenu konformacije molekule (izomerizacija).<sup>10</sup> **BPE** koji je adsorbiran na površini nanočestica zlata daje SERS spektar s dvije intenzivne vrpce pri 1581 i 1638  $\text{cm}^{-1}$  koje se značajno razlikuju od onih u spektru snimljenom u otopini ili plinovitoj fazi čiste modelne molekule. Navedene su razlike pripisane adsorpciji molekule na površini zlatnih nanočestica i to na način da se **BPE** veže na površinu metala preko atoma dušika iz piridinskog prstena.<sup>17</sup>

### 2.3.3. Dinatrijev fluoresceinat ( $\text{Na}_2\text{Fl}$ )

Dinatrijev fluoresceinat ( $\text{Na}_2\text{Fl}$ ) organski je fluorofor s ksantenskom jezgrom. Vodena otopina  $\text{Na}_2\text{Fl}$  apsorbira plavo svjetlo, dok emitira žutozeleno svjetlo. Intenzitet emisije svjetlosti ovisi o debljini uzorka, koncentraciji i pH otopine. Otopina dinatrijevog fluoresceinata koristi se u oftalmologiji za otkrivanje bolesti rožnice i kao mimetički lijek, s obzirom na sličnu molekulsku masu i strukturu s mnogim lijekovima. Fluoresceinatni ion pokazuje sklonost stvaranja dimera u vodenoj otopini kod većih koncentracija. Složena kiselobazna ravnoteža odgovorna je za četiri različita oblika kojima se  $\text{Na}_2\text{Fl}$  može naći, a to su: kationski, neutralni, anionski i dianionski oblik. Spektroskopskim metodama je određeno kako je pri neutralnim i bazičnim pH uvjetima najviše prisutan anionski i dianionski oblik, dok je s druge strane neutralna i kationska vrsta karakteristična za kiseli medij. Kemijska struktura spoja prikazana je na slici 10.<sup>14,15</sup>



Slika 10. Kemijska struktura dinatrijeva fluoresceinata.

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Kemikalije

4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetilensulfonska kiselina, p. a., Fluka

Rodamin 6G, p. a., Fluka

(E)-1,2-di(piridin-4-il)eten, p. a., BLDpharm

Dinatrijev fluoresceinat, p. a., Fluka

Poli(vinil-pirolidon), p. a. Acros Organics

Tetraklorozlatna(III) kiselina, p.a. Sigma Aldrich

Srebrov nitrat, p. a., Gram-Mol

Natrijev hidroksid, p. a., T.T.T.

Koncentrirana klorovodična kiselina, p. a., Fluka

### 3.2. Mjerni uređaji

Ramanovi i SERS spektri snimljeni su konfokalnim Ramanovim mikroskopom/spektrometrom InVia tvrtke Renishaw opremljenim laserima koji emitiraju zračenje pri 532 i 785 nm. Maksimalna snaga lasera koji emitira zračenje na 532 nm je 100 mW, a lasera koji emitira zračenje na 785 nm 300 mW. Vrijeme ekspozicije je 10 s, a broj akumulacija 1. Tijekom snimanja povećanje objektiva bilo je  $\times 5$ , a snaga lasera podešena ovisno o uzorku. Spektri su snimani u području  $100\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ , a za njihovu obradu korišten je program Wire 5.3. Čvrsti uzorci snimani su na aluminijskom nosaču, dok su uzorci u koloidnim suspenzijama te tekući uzorci snimani u aluminijskim posudama volumena  $40\text{ }\mu\text{L}$ .

Apsorpcijski spektri koloidnih suspenzija nanočestica snimljeni su na UV/Vis spektrofotometru SPECORD 200 tvrtke Analytik Jena. Uzorci su snimani u kvarčnoj kivetu duljine puta zračenja 2 mm, u rasponu valnih duljina od 190–1100 nm.

pH vrijednost koloidnih suspenzija određena je pH metrom tvrtke Mettler Toledo (model MP 220) s kombiniranom staklenom–kalomel elektrodom InLab®413. Uređaj je baždaren otopinama pufera, čije su pH vrijednosti bile 7,00 i 4,00.

### 3.3. Priprava koloidnih suspenzija zlata

Za pripravu koloidnih suspenzija korišten je pufer HEPES određene koncentracije i pH vrijednosti. Pufer HEPES koncentracije  $c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pripremljen je na sljedeći način: 2,3804 g čvrstog uzorka se otopilo u 80,00 mL deionizirane vode, i otopina s tikvicom je smještena na magnetsku miješalicu te je određena pH vrijednost dobivene otopine. Željena pH vrijednost od 7,40 dobivena je otapanjem krutog NaOH u otopini. Nakon što je postignut pH od 7,40, tikvica je nadopunjena deioniziranom vodom do 100 mL.

#### 3.3.1. Sinteza „bez sjemena“

Koloidna suspenzija zlatnih nanočestica bez sjemena i polimera (**AuNP**) pripravljena je miješanjem 4 mL HEPES pufera ( $c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) i 6 mL Milli-Q deionizirane vode, a zatim je u otopinu dodano 20  $\mu\text{L}$  tetraklorozlatne(III) kiseline ( $c = 5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ). Nakon nježnog miješanja, otopina je ostavljena na sobnoj temperaturi oko 30 min pri čemu je došlo do promjene boje iz bezbojne u tamno-ljubičastu.

Koloidne nanočestice zlata stabilizirane polimerom PVP (**AuNP(+PVP)**) pripravljene su na gore opisan način, samo je u dobivenu suspenziju, nakon stajanja od 30 minuta, dodano 1200  $\mu\text{L}$  PVP 10 000 ( $c = 2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) te je koloidna suspenzija ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi.

#### 3.3.2. Sinteza „sa sjemenom“

Srebrom potpomognuta sinteza nanočestica zlata, pripravljena je kao i prethodno opisana sinteza „bez sjemena“, ali uz dodatak 4  $\mu\text{L}$  otopine srebrovog nitrata ( $c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka tetraklorozlatne(III) kiseline u otopinu (**AuNP\_Ag**).

Stabilizator PVP 10 000 ( $c = 2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) dodan je u količini od 1200  $\mu\text{L}$  te je koloid ostavljen preko noći na sobnoj temperaturi (**AuNP\_Ag(+PVP)**).

### 3.4. Priprava otopina i mjernih uzoraka

Početne otopine rodamina 6G (**R6G**), (E)-1,2-di(piridin-4-il)etena (**BPE**) i dinatrijeva fluoresceinata (**Na<sub>2</sub>FI**) koncentracije  $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  pripravljene su otapanjem odgovarajuće mase krutog uzorka u Milli-Q deioniziranoj vodi. Za pripremu otopine **R6G** otopljeno je 9,823 mg čvrste tvari u 10,229 mL deionizirane vode, dok je za pripremu otopina **BPE** otopljeno je

---

3,721 mg čvrste tvari u 10,207 mL deionizirane vode. Otopina dinatrijeva fluoresceinata priređena je otapanjem 10,810 mg praškaste krutine u 14,300 mL deionizirane vode.

Za snimanje koncentracijski ovisnih SERS spektara pripravljene su ishodne vodene otopine modelnih molekula u rasponu koncentracija od  $8 \times 10^{-4}$ ,  $8 \times 10^{-5}$ ,  $8 \times 10^{-6}$  i  $8 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> dok je još dodatno za **BPE** priređena otopina koncentracije  $8 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. Navedene su otopine pripravljene razrjeđivanjem ishodne otopine analita u adekvatnom volumenu deionizirane vode. U svrhu snimanja SERS spektara modelnih molekula u koloidnim suspenzijama, u aluminijsku posudicu dodano je 5 µL otopine modelne molekule te 35 µL koloidne suspenzije zlata (ukupan volumen iznosio je 40 µL). Koncentracije otopina modelnih molekula u mjerenim uzorcima iznosile su redom  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  i  $1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> te dodatna  $1 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> za **BPE**.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Ramanovi spektri modelnih molekula

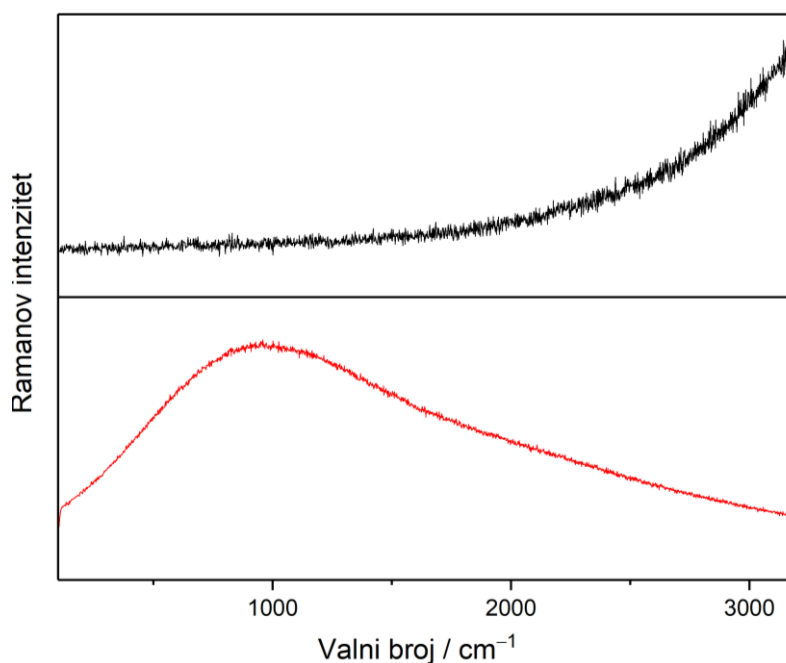
#### 4.1.1. Rodamin 6G

Snimljeni su Ramanovi spektri modelne molekule **R6G** u čvrstom stanju i vodenoj otopini koncentracije,  $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , pri valnim duljinama pobude 532 i 785 nm.

U spektru krutine **R6G** dobivenog pobudom pri 532 nm nisu dobivene vrpce koje bi odgovarale karakterističnim vibracijama molekule. Korištenjem veće snage lasera rezultiralo je zasićenjem detektora, dok mala snaga lasera ne rezultira vrpčama u spektru.

Ramanov spektar vodene otopine rodamina 6G ( $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) dobiven pobudom iste valne duljine pokazuje samo porast bazne linije kao posljedicu fluorescencije rodaminske boje. R6G apsorbira zračenje pri 526 nm, nakon čega intenzivno fluorescira.<sup>18</sup> Budući da je valna duljina pobude 532 nm vrlo blizu valne duljine apsorpcije **R6G**, vrlo vjerojatno dolazi do pobuđivanja elektronskih prijelaza što rezultira emisijom zračenja, a ne raspršenjem.

Ramanovi spektri čvrstog uzorka i otopine **R6G** ( $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) snimljeni pri pobudi od 532 nm prikazani su na slici 11.

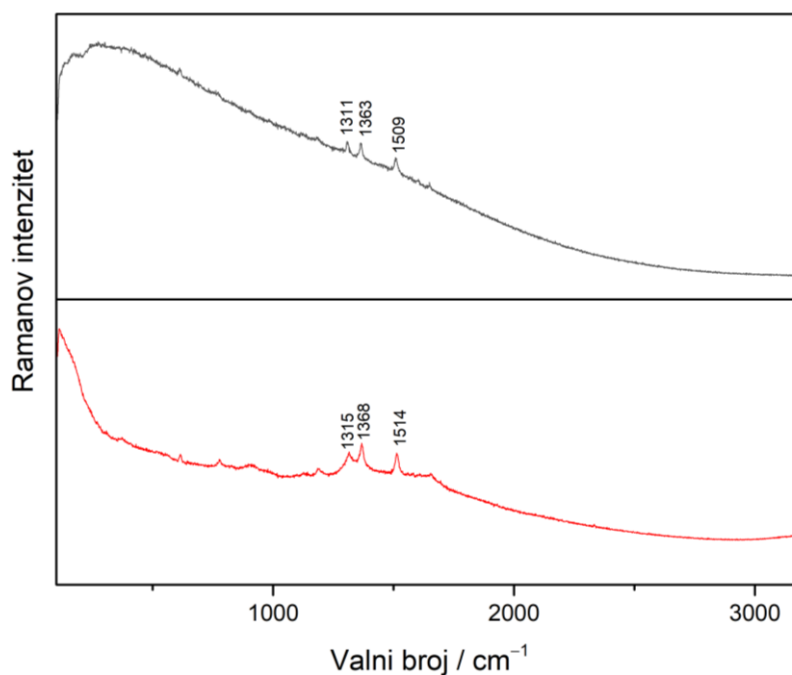


Slika 11. Ramanovi spektri krutine **R6G** (crno) i vodene otopine **R6G** koncentracije  $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (crveno) pri pobudi lasera od 532 nm i snazi lasera  $1,2 \times 10^{-4} \text{ mW}$ .



Ramanov spektar krutine **R6G** dobiven pobudom 785 nm sadrži nekoliko karakterističnih vrpca spoja, uz podignutu baznu liniju zbog već spomenute fluorescencije molekula analita. Vrpce pri 1509 i 1363  $\text{cm}^{-1}$  odgovaraju vibracijama istežanja C–C veze, dok vrpca pri 1311  $\text{cm}^{-1}$  odgovara istežanju C–N veze ksantenskog prstena. Slaba vrpca na 613  $\text{cm}^{-1}$  potječe od deformacija C–H veze u aromatu (tablica 1).

U Ramanovom spektru vodene otopine **R6G** ( $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) snimljenom pri pobudi 785 nm uočene su vrpce koje odgovaraju vibraciji ksantenskog prstena pri valnim brojevima 1514, 1368 i 1315  $\text{cm}^{-1}$ . U spektru vodene otopine **R6G** uočena je dodatna vrpca pri 780  $\text{cm}^{-1}$  koja odgovara deformaciji C–H veze u aromatu.<sup>23</sup> Asignacija najintenzivnijih vrpca iz uzoraka snimljenih pri pobudi 785 nm prikazana je u tablici 1, dok su Ramanovi spektri čvrstog uzorka i vodene otopine rodamina 6G ( $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) prikazani su na slici 12.



Slika 12. Ramanovi spektri krutine **R6G** (crno) i vodene otopine **R6G** koncentracije  $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (crveno) pri pobudi lasera od 785 nm i snazi lasera  $3,2 \times 10^{-4} \text{ mW}$  za krutinu te 319 mW za otopinu.

Tablica 1. Asignacija osnovnih vibracijskih vrpca u Ramanovim spektrima čvrstog uzorka i vodene otopine **R6G** ( $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) pri valnoj duljini pobude 785 nm.

Valni broj / $\text{cm}^{-1}$		Vibracija
krutina	otopina	
1509	1514	$\nu$ CC (ks)
1363	1368	$\nu$ CC (ks)
1311	1315	$\nu$ C–N
	780	$\delta_{\text{oop}}$ CH (ar)
613	612	$\delta_{\text{oop}}$ CH (ar)

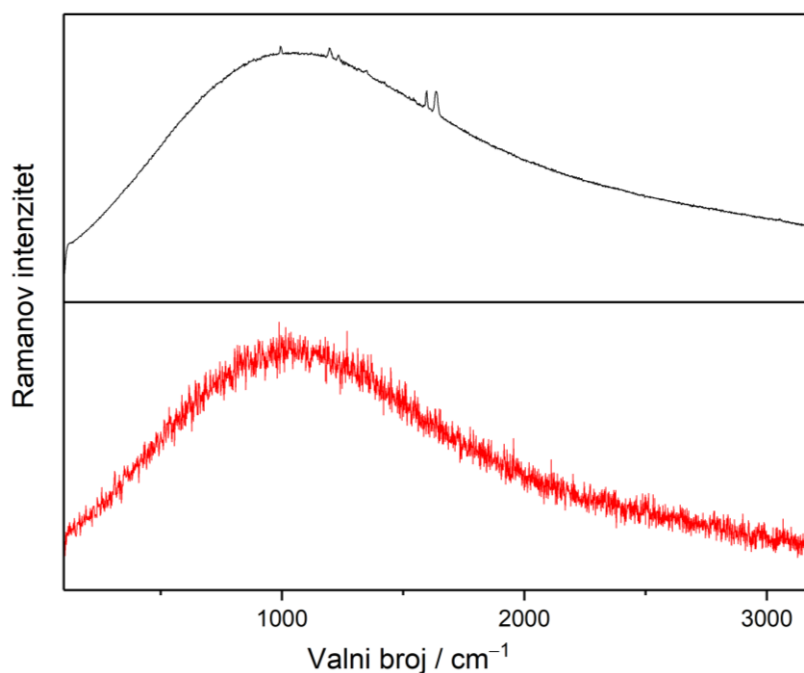
Kratice:  $\nu$  – istezanje;  $\delta$  – deformacija; oop – izvan ravnine; ks – ksanten; ar – aromatsko.

#### 4.1.2. (E)-1,2-di(piridin-4-il)eten

Ramanovi spektri modelnog spoja **BPE** u čvrstom stanju i otopini koncentracije,  $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , snimljeni pri pobudama 532 i 785 nm, prikazani su na slikama 13 i 14. Asignacija opaženih vrpca dana je u tablici 2.

U spektru krutine **BPE** dobivenog pobudom pri 532 nm uočeno je povećanje bazne linije i nekoliko intenzivnijih vrpca koje potječu od vibracija promatrane molekule. Vrpce koje odgovaraju istezanju CC veze ( $1638 \text{ cm}^{-1}$ ) te vrpca istezanja C–C veze i deformacije C–H ( $1598 \text{ cm}^{-1}$ ) uočene su kao dvije najintenzivnije vrpce u Ramanovom spektru. Intenzitetu vrpca kod valnog broja  $1234 \text{ cm}^{-1}$  doprinose deformacije C–H veze i istezanja C–C veze piridinskog prstena. Istezanje veze između C atoma prstena i C atoma etilena rezultiraju vrpcom pri  $1197 \text{ cm}^{-1}$ , zajedno sa svijanjem C–H veze piridina.

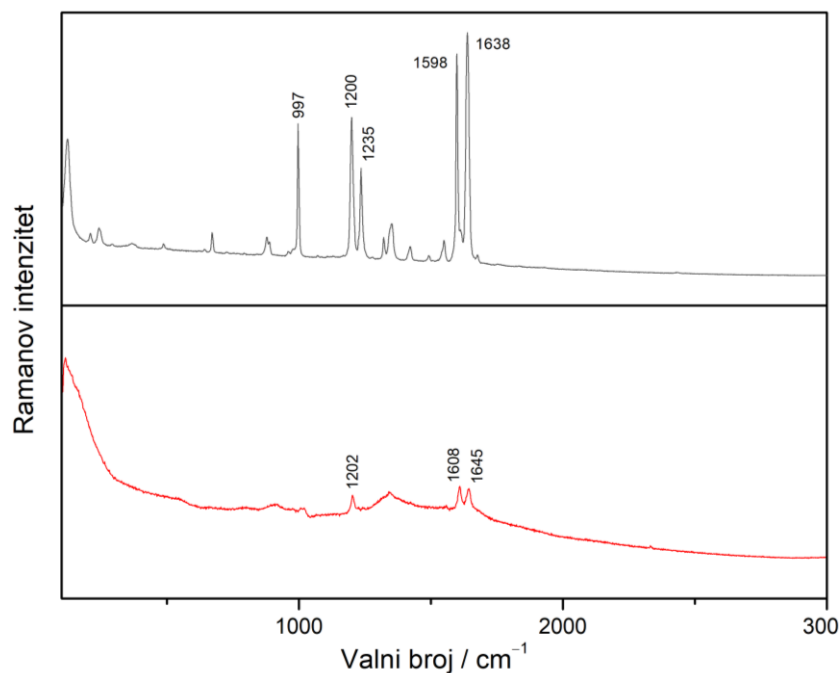
Ramanov spektar vodene otopine **BPE** ( $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) dobiven pobudom pri 532 nm nije pokazao karakteristične vrpce modelne molekule već izraženu baznu liniju kao posljedicu emisije zračenja.



Slika 13. Ramanovi spektri krutine **BPE** (crno) i vodene otopine **BPE** koncentracije  $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (crveno) pri pobudi lasera od 532 nm i snazi lasera 0,06 mW za krutinu te  $1,2 \times 10^{-3} \text{ mW}$  za otopinu.

Ramanov spektar krutine **BPE** dobiven pobudom lasera pri 785 nm (slika 14) sadrži više vrpce značajnijih intenziteta, u odnosu na spektar dobiven pobudom pri 532 nm. Najintenzivnija vrpca u spektru odgovorna je za istežanje C=C veze u lancu koji povezuje dva piridinska prstena. Također su uočene vrpce vibracija aromata na 1598, 1550, 1235 i 1200 cm<sup>-1</sup> (tablica 2). Deformacije prstena piridina u ravnini rezultiraju vrpcom u spektru pri 997 cm<sup>-1</sup>, dok vrpca slabog intenziteta pri 671 cm<sup>-1</sup> odgovora deformaciji unutar prstena.<sup>3,21</sup>

U Ramanovom spektru otopine **BPE** dobivenog pobudom pri 785 nm (slika 14) javljaju se samo tri intenzivne vrpce koje potječu od vibracijskih modova modelne molekule. Tako najintenzivnija vrpca na 1638 cm<sup>-1</sup> odgovara istežanju C=C etilena, dok su druge dvije vrpce kod 1608 i 1202 cm<sup>-1</sup> posljedice istežanja i deformacija piridinskog prstena (tablica 2).



Slika 14. Ramanovi spektri krutine **BPE** (crno) i vodene otopine **BPE** koncentracije  $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (crveno) pri pobudi lasera od 785 nm i snazi lasera 3,2 mW za krutinu te 319 mW za otopinu.

Tablica 2. Asignacija najintenzivnijih vrpci u Ramanovim spektrima krutina i otopine **BPE** dobivenih pobudnim zračenjem pri 532 i 785 nm.

Valni broj / $\text{cm}^{-1}$			Vibracija
532 nm	785 nm		
krutina	krutina	otopina	
1636	1638	1645	$\nu \text{ C=C}$ (etilen)
1596	1598	1608	$\nu \text{ CC}$ (piridin)
	1550		$\nu \text{ C-N}$ (piridin)
1349	1349		$\delta \text{ CH}$ , $\nu \text{ CC}$ (etilen)
1234	1235		$\delta \text{ CH}$ , $\nu \text{ CC}$ (piridin)
1197	1200	1202	$\nu \text{ C}_{\text{prsten}} - \text{C}_{\text{etilen}}$
995	997		$\delta$ prsten
	671		$\delta$ prsten

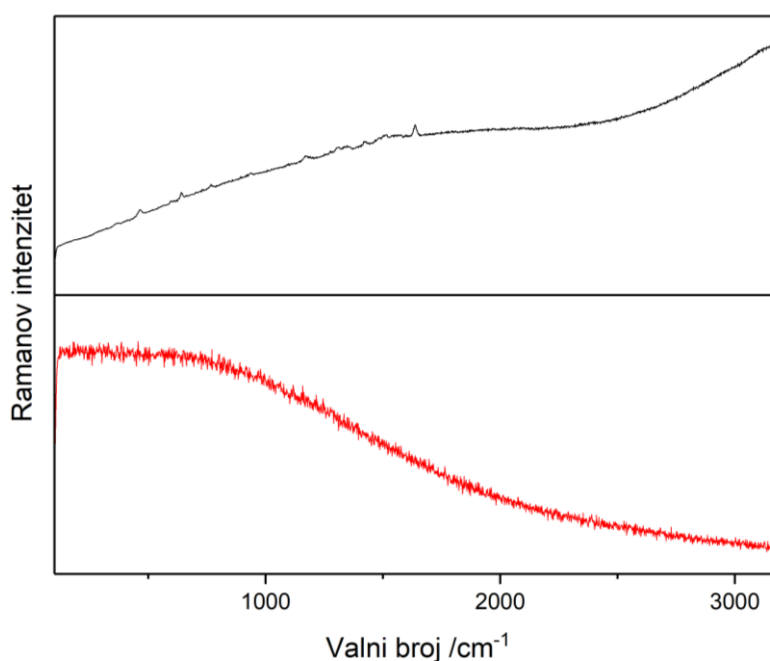
Kratice:  $\nu$  – istezanje;  $\delta$  – deformacija

#### 4.1.3. Dinatrijev fluoresceinat

Snimljeni su Ramanovi spektri modelne molekule dinatrijeva fluoresceinata u čvrstom stanju i otopini koncentracije,  $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Spektri su snimani pri valnim duljinama pobude od 532 (slika 15) i 785 nm (slika 16).

Ramanov spektar krutine **Na<sub>2</sub>FI** dobiven pri pobudi od 532 nm pokazuje vrpce spoja slabih intenziteta. Vrpca pri  $1637 \text{ cm}^{-1}$  potječe od istežanja CC veze u ksantenskom prstenu, dok je vrpca pri  $1176 \text{ cm}^{-1}$  rezultat istežanja C–O veze. Vrpce pri niskim valnim brojevima kod  $642$  i  $464 \text{ cm}^{-1}$  posljedica su deformacije C–H aromata, odnosno torzija ksantenskog prstena (tablica 3).

Spektar vodene otopine dinatrijeva fluoresceinata ( $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) snimljen pri pobudi od 532 nm pokazuje intenzivnu baznu liniju kao posljedicu fluorescencije ispitivanog spoja.

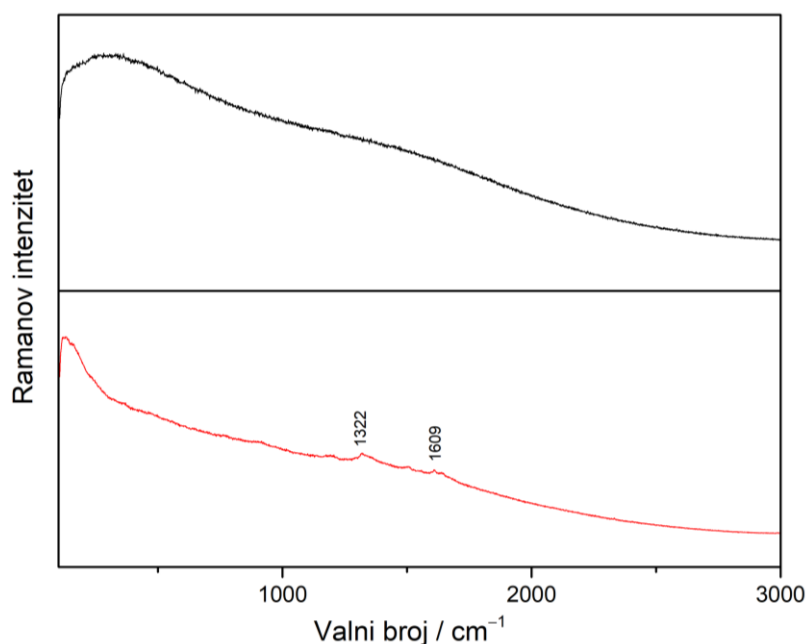


Slika 15. Ramanovi spektri krutine **Na<sub>2</sub>FI** (crno) i vodene otopine **Na<sub>2</sub>FI** koncentracije  $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (crveno) pri pobudi lasera od 532 nm i snazi lasera  $1,2 \text{ mW}$  za krutinu te  $1,2 \times 10^{-4} \text{ mW}$  za otopinu.

Prilikom pobude uzorka **Na<sub>2</sub>FI** pobudnim zračenjem pri 785 nm nisu uočene vrpce analita zbog korištene male snage pobude. Veća snaga lasera rezultirala je zasićenjem detektora.

Spektar otopine dinatrijeva fluoresceinata dobiven korištenjem pobude pri 785 nm rezultira slabim širokim vrpčama (slika 17).<sup>15</sup> Najintenzivnije vrpce se javljaju na  $1609 \text{ cm}^{-1}$ , koja

potječe od antisimetričnog istežanja  $\text{COO}^-$  skupine, te vrpca na  $1322\text{ cm}^{-1}$  i potječe od istežanja CC veza ksantenskog prstena.



Slika 16. Ramanovi spektri krutine **Na<sub>2</sub>FI** (crno) i vodene otopine **Na<sub>2</sub>FI** koncentracije  $c = 2 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$  (crveno) pri pobudi lasera od 785 nm i snazi lasera  $3,2 \times 10^{-4}\text{ mW}$  za krutinu te 319 mW za otopinu.

Tablica 3. Asignacija najintenzivnijih vrpca u Ramanovim spektrima krutina i otopine **Na<sub>2</sub>FI** dobivenih pobudnim zračenjem pri 532 i 785 nm.

Valni broj / $\text{cm}^{-1}$		Vibracija
532 nm	785 nm	
krutina	otopina	
1637		$\nu$ CC (ar)
	1609	$\nu_{\text{as}}$ $\text{COO}^-$
	1508	$\nu$ CC (ks)
	1322	$\nu$ CC (ks)
1172		$\nu$ C–O
642		$\delta_{\text{oop}}$ CH (ar)
465		$\delta$ CCC

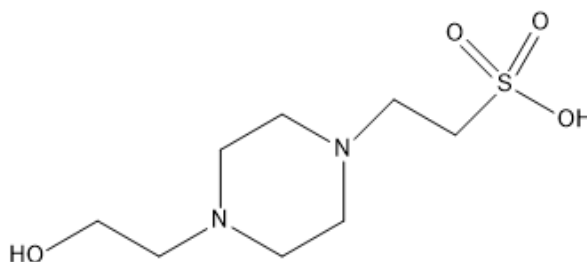
Kratice:  $\nu$  – istežanje;  $\delta$  – deformacija; oop – izvan ravnine; ks – ksanten; ar – aromatsko, as – antisimetrično.

## 4.2. Karakterizacija pripremljenih koloidnih suspenzija zlata

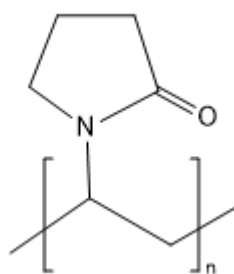
U radu su sintetizirane i karakterizirane četiri koloidne suspenzije zlata. Prvi koloid dobiven je reakcijom tetraklorozlatne(III) kiseline i pufera HEPES (**AuNP**). Prema literaturi, kada se tijekom reakcije sinteze doda srebrov nitrat koji služi kao „sjeme“ oko kojeg se formiraju nanočestice zlata, kao rezultat nastaju monodispergirane nanočestice zlata određene, kontrolirane veličine. Tako pripremljenom koloidu (**AuNP\_Ag**) odredila se stabilnost i SERS efekt je uspoređen s koloidom zlata **AuNP** pripremljenom sintezom bez „sjemena“. Koloidi pripremljeni na opisana dva načina, stabilizirani samo s molekulama pufera HEPES (slika 17) koje okružuju nanočestice, ne pokazuju stabilnost, pa je u koloide uveden poli(vinil-pirolidon) (slika 18) kao stabilizirajući agens nanočestica zlata.<sup>23</sup>

U svrhu karakterizacije koloida određen je pH svake koloidne suspenzije, valna duljina maksimalne apsorpcije zračenja i snimljeni su Ramanovi spektri. U tablici 4 prikazane su izmjerene vrijednosti pH te određeni apsorpcijski maksimumi za istražene koloide.

Svim pripremljenim koloidnim suspenzijama zlata snimljeni su Ramanovi spektri koristeći pobudno zračenje pri 532 i 785 nm. U spektrima snimljenim pri pobudi 532 nm uočena je samo bazna linija bez dodatnih vrpca i slike spektara nalaze se u Dodatku (slika D7). Spektri dobiveni pobudom pri 785 nm prikazani su na slici 19. Vrpce koje se javljaju u spektrima oko 1350 i 1050  $\text{cm}^{-1}$  potječu od vibracijskih modova sulfonata iz molekula HEPES-a koje okružuje i stabiliziraju nanočestice zlata.<sup>27</sup> U Ramanovom spektru koloida **AuNP\_Ag(+PVP)** uočene su dodatne vrpce pri 900 i 1380  $\text{cm}^{-1}$  koje potječu od svijanja CH veza dodanog polimera.<sup>28</sup>



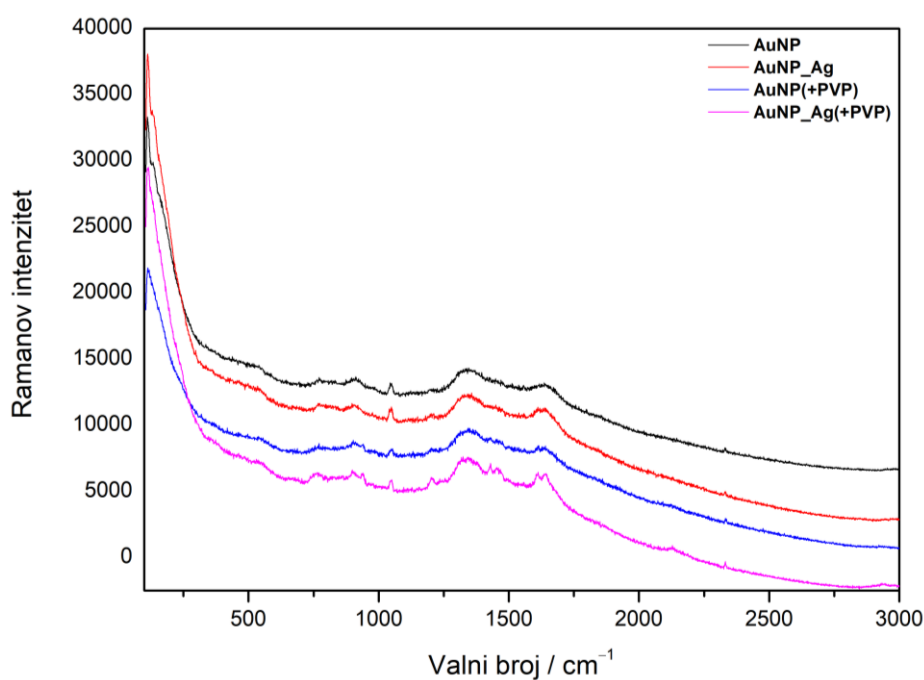
Slika 17. Struktura molekule HEPES.



Slika 18. Struktura molekule PVP.

Tablica 4. Izmjerene vrijednosti pH i apsorpcijskih maksimuma za istražene koloide.

Vrsta koloida	pH	Apsorpcijski maksimum
AuNP	7,18	552
AuNP_Ag	7,33	523
AuNP (+PVP)	7,18	541
AuNP_Ag(+PVP)	7,23	531



Slika 19. Ramanovi spektri četiri različite vrste sintetiziranih zlatnih nanočestica snimljeni pri pobudi lasera od 785 nm i snazi lasera 319 mW.



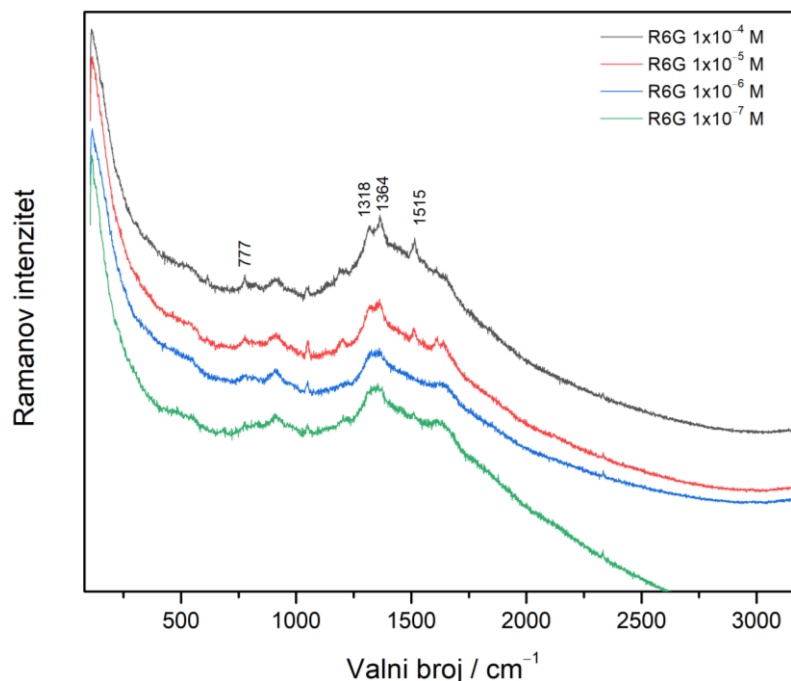
### 4.3. Nemodificirane koloidne suspenzije zlata kao SERS supstrati

#### 4.3.1. Koncentracijski ovisni SERS spektri u nemodificiranom koloidu zlata **AuNP**

Snimljeni su SERS spektri modelnih molekula **R6G**, **BPE** i **Na<sub>2</sub>FI** u koloidnoj suspenziji zlata bez dodatka polimera, **AuNP**, sintetiziranoj metodom bez „sjemena“, u rasponu koncentracija  $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , odnosno  $1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  za **BPE**. Navedeni uzorci snimani su pri dvije pobude laserskog zračenje, 532 i 785 nm kako bi se odredila učinkovitost koloida kao SERS supstrata, granica detekcije te faktor pojačanja Ramanova raspršenja za korištene supstrate.

U koncentracijski ovisnim SERS spektrima rodamina 6G snimljenima pri pobudi 532 nm u koloidu **AuNP** nisu uočene vrpce vibracija molekule **R6G**, vjerojatno zbog prekrivanja vrpca molekula analita širokom vrpcom koja nastaje kao rezultat fluorescencije modelne molekule (slika D8). U SERS spektrima modelne molekule rodamina 6G u koloidnoj suspenziji zlata **AuNP** dobivenima pobudom pri 785 nm uočene su karakteristične vrpce vibracija rodaminske boje (slika 20). Tako vrpca na  $1638 \text{ cm}^{-1}$  odgovara istezanju veza CC u aromatskom prstenu, dok vrpce na  $1515$  i  $1364 \text{ cm}^{-1}$  potječu od istezanja veza CC u ksantenskom prstenu. Pri  $1318 \text{ cm}^{-1}$  javlja se vrpca istezanja C–N veze, dok vrpce pri nižim valnim brojevima odgovaraju vibracijama svijanja CH aromatskog prstena. SERS spektri **R6G** najnižih koncentracija poklapaju se s Ramanovim spektrom koloidne suspenzije **AuNP** gdje je samo prisutna vrpca pri  $1050 \text{ cm}^{-1}$  koja potječe od vibracija sulfonatnih skupina HEPES-a. Promjena koncentracije modelnih molekula u sustavu nije rezultirala pomakom postojećih niti pojavom novih vrpca što upućuje na zaključak da ne dolazi do promjene orijentacije molekula **R6G** na površini nanočestica. Prilično slab intenzitet vrpca rodamina 6G u SERS spektrima dobivenim u **AuNP** koloidu objašnjava se steričkim smetnjama molekula HEPES-a na površini metala koje sprječavaju da se molekule **R6G**, iako elektrostatski privučene negativno nabijenom sulfonskom skupinom, dovoljno približe nanočestici zlata kako bi došlo do većeg pojačanja raspršenja zračenja. Najniža koncentracija u čijem spektru su još vidljive vrpce spoja R6G, odnosno granica detekcije, je  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

Asignacija svih dobivenih vrpca u SERS spektrima R6G različitih koncentracija, dobivenih pobudom pri 785 nm prikazana je u tablici 5.



Slika 20. SERS spektri rodamina 6G različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP** pobudom pri 785 nm i snage lasera od 319 mW.

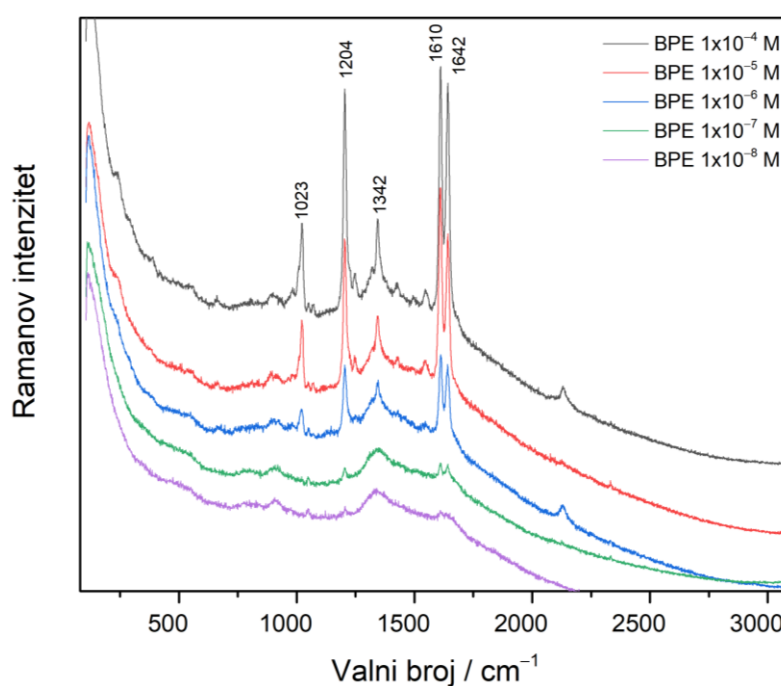
Tablica 5. Asignacija opaženih vrpca u SERS spektrima različitih koncentracija **R6G** u **AuNP** koloidu dobivenih pobudom pri 785 nm.

Valni broj /cm <sup>-1</sup>			Vibracija
1×10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup>	1×10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup>	1×10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup>	
1636	1638		v CC (ar)
1515	1512		v CC (ks)
1364	1355	1353	v CC (ks)
1318	1318		v C–N
1053	1053	1051	v <sub>s</sub> (SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )*
777			δ <sub>oop</sub> CH (ar)
612			δ <sub>oop</sub> CH (ar)

Kratice: v – istežanje; δ – deformacija; oop – izvan ravnine; s – simetrično; ks – ksanteni; ar – aromatsko.

SERS spektri modalne molekule (E)-1,2-di(piridin-4-il)etena (**BPE**) u koloidu zlata **AuNP** dobiveni pobudom pri 532 nm (slika D9) nisu pokazali karakteristične vrpce vibracije spoja

zbog široke vrpce fluorescencije koje prekriva spektre. No, korištenjem pobude pri 785 nm dobiveni su SERS spektri s jasni vidljivim vrpčama, karakterističnim za vibracije modelne molekule **BPE**. Vrpca vibracije pri  $1642\text{ cm}^{-1}$  rezultat je istezanja veze C=C u etilenu, dok je vrpca pri  $1610\text{ cm}^{-1}$  posljedica istezanja veze CC u piridinskom prstenu. Smanjenjem koncentracije spoja **BPE** uočeno je smanjenje intenziteta vrpce u SERS spektra čiji profili odgovaraju Ramanovim spektrima koloidne suspenzije zlata **AuNP**. Granica detekcije za promatrani sustav je  $1 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ . SERS koncentracijski spektri BPE prikazani su na slici 21 snimljeni pobudom lasera pri 785 nm, a asignacija najintenzivnijih vrpce dana je u tablici 6.

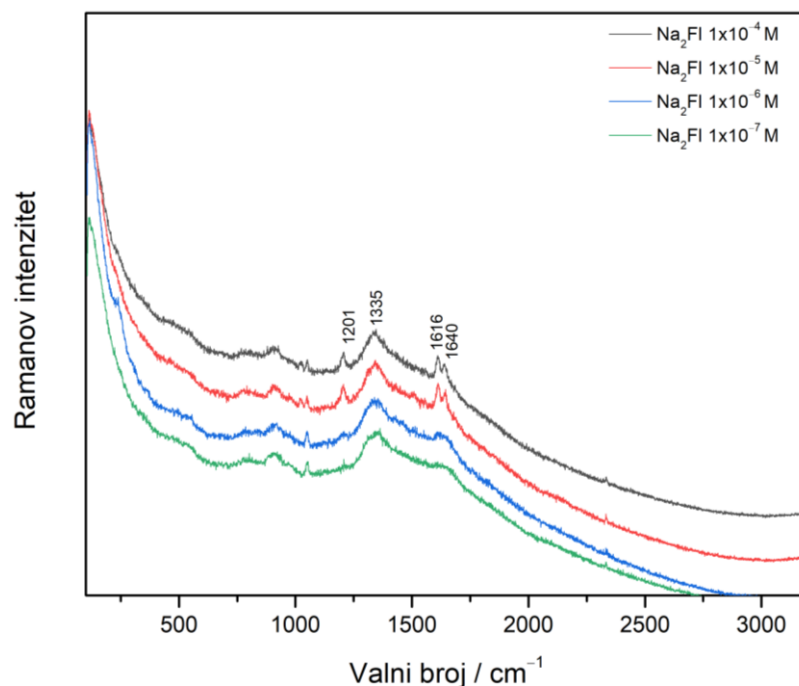


Slika 21. SERS spektri **BPE** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP** pobudom pri 785 nm i snage lasera od 319 mW.

Tablica 6. Asignacija opaženih vrpca u SERS spektrima različitih koncentracija **BPE** u **AuNP** koloidu dobivenih pobudom pri 785 nm.

Valni broj /cm <sup>-1</sup>				Vibracija
1×10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup>	1×10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup>	1×10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup>	1×10 <sup>-7</sup> mol L <sup>-1</sup>	
1642	1642	1642	1641	v C=C (etilen)
1610	1610	1611	1610	v CC (piridin)
1543				v C–N (piridin)
1204	1204	1204	1203	v C <sub>prsten</sub> – C <sub>etilen</sub>

SERS spektar dinatrijeva fluoresceinata u koloidnoj suspenziji zlata **AuNP** sniman pri pobudi lasera od 532 nm (slika D10), zbog prekrivanja spektra vrpcom nastalog uslijed fluorescencije nije pokazao vrpce tipične za vibracije modalne molekule **Na<sub>2</sub>FI**. Korištenje pobude pri 785 nm rezultira spektrima dinatrijevog fluoresceinata koji sadrže nekoliko karakterističnih vrpca analita. Vrpca pri 1640 cm<sup>-1</sup> potječe od istežanja CC veza u ksantenskom prstenu, dok vrpca kod 1616 cm<sup>-1</sup> odgovara antisimetričnom istežanju karboksilne skupine. Vrpca uočena pri 1201 cm<sup>-1</sup> rezultat je istežanja C–O karboksilne skupine. Smanjenjem koncentracije analita u koloidu rezultira smanjenjem intenziteta vrpca, te pri najnižoj koncentraciji ( $c = 1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) SERS spektar odgovara spektru čiste koloidne suspenzije zlata. Dakle, granica detekcije je 1×10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>. Koncentracijski ovisni SERS spektri dinatrijeva fluoresceinata dobiveni pobudom 785 nm prikazani su na slici 22, a asignacija najintenzivnijih vrpca u spektrima različitih koncentracija nalazi se u tablici 7.



Slika 22. SERS spektri  $\text{Na}_2\text{FI}$  različitih koncentracija snimljeni u koloidu  $\text{AuNP}$  pobudom pri 785 nm i snazi lasera 319 mW.

Tablica 7. Asignacija opaženih vrpca u SERS spektrima različitih koncentracija  $\text{Na}_2\text{FI}$  u  $\text{AuNP}$  koloidu dobivenih pobudom pri 785 nm.

Valni broj / $\text{cm}^{-1}$			Vibracija
$1 \times 10^{-4}$ $\text{mol L}^{-1}$	$1 \times 10^{-5}$ $\text{mol L}^{-1}$	$1 \times 10^{-6}$ $\text{mol L}^{-1}$	
1640	1645	1625	$\nu(\text{CC})_{\text{ksan}}$
1616	1609		$\nu_{\text{as}} \text{COO}^-$
1335	1344	1338	$\nu(\text{CC})_{\text{ksan}}$
1201	1206		$\nu \text{C-O}(\text{COOH})$

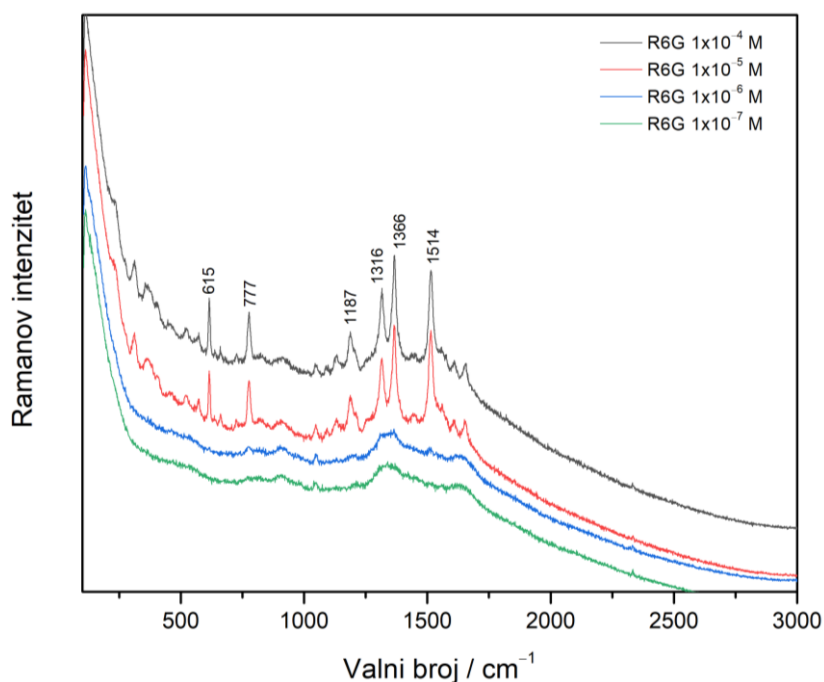
Usporedbom spektara molekula rodamina 6G, (E)-1,2-di(piridin-4-il)etena te dinatrijeva fluoresceinata u koloidnoj suspenziji zlata  $\text{AuNP}$ , uočeno je da pri najvećoj koncentraciji otopina svih modelnih molekula nanočestice zlata najjače pojačavaju Ramanovo raspršenje, što rezultira najintenzivnijim vrpca u spektrima. Nadalje, smanjenjem koncentracije analita pojačanje Ramanovog raspršenja slabi ili u slučaju najniže koncentracije u potpunosti izostaje

kada SERS spektar odgovara Ramanovom spektru koloidne suspenzije zlata. Granice detekcije svih modelnih molekula u AuNP koloidu bile su u mikromolarnom koncentracijskom području.

Od svih promatranih modelnih molekula, molekule **BPE** pokazuju najintenzivnije vrpce u SERS spektrima. Pri uvjetima snimanja, kod pH vrijednosti koloida 7,18 HEPES je zwitter ion pa istovremeno odbija i privlači nabijene molekule što sprječava njihovu optimalnu orijentaciju na površinu nanočestica. Molekula bez naboja može se približiti površini zlata i postići optimalan položaj za najintenzivnije pojačanje raspršenja.<sup>30</sup>

*4.3.2. Koncentracijski ovisni SERS spektri u nemodificiranom koloidu zlata AuNP\_Ag*  
Snimljeni su SERS spektri modelnih molekula u koloidnoj suspenziji zlata (**AuNP\_Ag**), pripravljenoj metodom uz dodatak „sjemena“, odnosno srebrova nitrata. Koncentracija modelnih molekula bila je u rasponu  $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  –  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , odnosno  $1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  –  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  u slučaju **BPE**. Spektri su snimljeni pri dvije valne duljine pobude kod 532 i 785 nm kako bi se utvrdila učinkovitost SERS supstrata, granica detekcije te faktor pojačanja za korištene supstrate.

Koncentracijski ovisni SERS spektri molekula **R6G** u koloidnoj suspenziji zlata **AuNP\_Ag** snimljeni pobudom lasera od 532 nm (slika D11) nisu pokazali vrpce vibracija molekule **R6G** s obzirom na fluorescenciju spoja pri toj pobudnoj valnoj duljini. SERS spektri rodamin 6G u **AuNP\_Ag** koloidu snimljeni pobudom pri 785 nm, prikazani su na slici 23. Intenzivne vrpce modelne molekule jasno su vidljive u spektrima najveće koncentracije. U spektrima vrpce najvećih intenziteta potječu od aromatskog središnjeg sustava pa vrpce kod  $1514$  i  $1366 \text{ cm}^{-1}$  odgovaraju istežnim CC vibracijama ksantenskog sustava, dok se vrpca pri  $1315 \text{ cm}^{-1}$  pripisuje istežanju C–N veze u ksantenskoj strukturi. CH deformacije van ravnine doprinose intenzitetu vrpca pri  $777$  i  $615 \text{ cm}^{-1}$ . U spektrima koncentracija niže od  $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  javljaju se samo vrpce supstrata pa se navedena koncentracija smatra granicom detekcije. U tablici 8 dana je asignacija intenzivnih vrpca iz SERS spektara R6G dobivenih pobudom pri 785 nm u koloidu **AuNP\_Ag**.

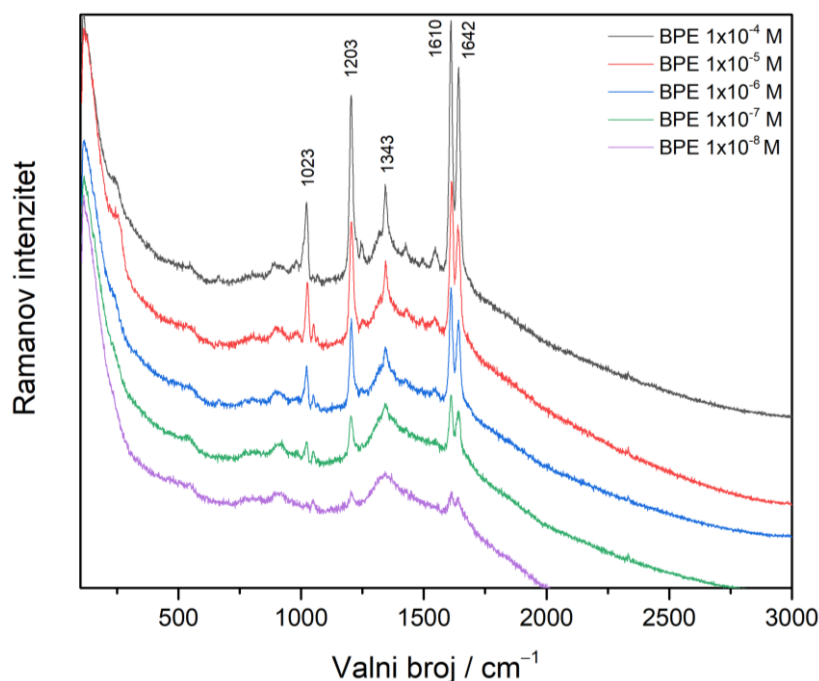


Slika 23. SERS spektri **R6G** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag** pobudom pri 785 nm i snazi lasera od 319 mW.

Tablica 8. Assignacija opaženih vrpca u SERS spektrima različitih koncentracija **R6G** u **AuNP\_Ag** koloidu dobivenih pobudom pri 785 nm.

Valni broj /cm <sup>-1</sup>				Vibracija
1×10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup>	1×10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup>	1×10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup>	1×10 <sup>-7</sup> mol L <sup>-1</sup>	
1654	1650			v CC (ar)
1514	1514	1514		v CC (ks)
1366	1368	1352		v CC (ks)
1316	1317			v C–N
1187	1188			v C–O–C
1044	1048	1045	1050	v <sub>s</sub> (SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )*
777	776			δ <sub>oop</sub> CH (ar)
615	615			δ <sub>oop</sub> CH (ar)

Koncentracijski ovisni SERS spektri molekula **BPE** snimljeni u **AuNP\_Ag** koloidu pri pobudi lasera od 532 nm (slika D12), nisu pokazali karakteristične vrpce modelne molekule. SERS spektri spomenutog spoja dobiveni pobudom pri 785 nm (slika 24) rezultiraju vrpčama karakterističnim za modelnu molekulu **BPE** uz značajno povećanje Ramanovog raspršenja u odnosu na Ramanov spektar čiste vodene otopine **BPE**. Najintenzivnije vrpce u spektru potječu od vibracija etilena (1642 i 1343  $\text{cm}^{-1}$ ) i istezanja CC veza prstena piridina (1610 i 1203  $\text{cm}^{-1}$ ), a detaljnije su asignirane u tablici 9. Smanjenje broja molekula **BPE** u koloidu dovodi do slabijeg pojačanja raspršenja i posljedično vrpčama manjeg intenziteta u SERS spektrima. Kao granica detekcije određena je koncentracija  $1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ .



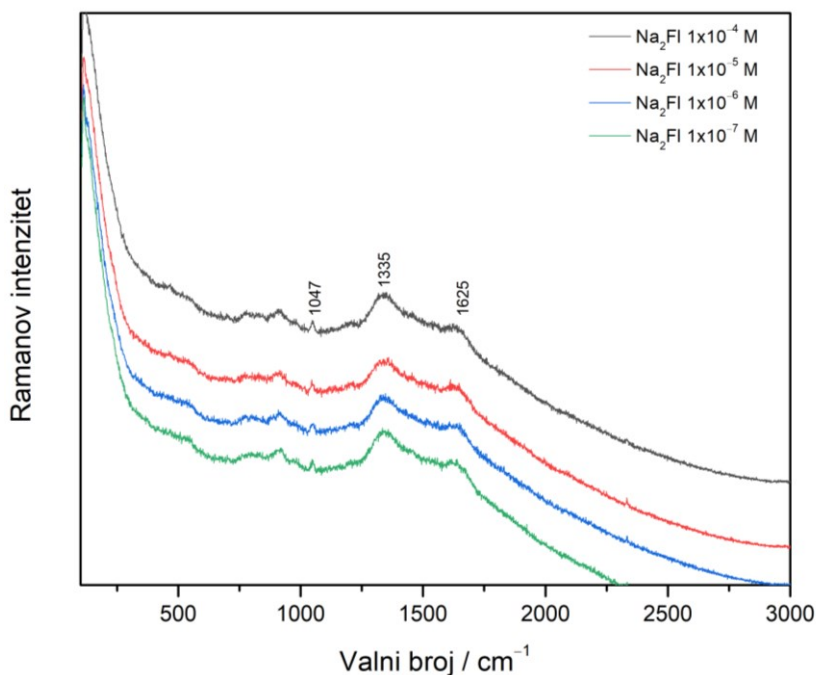
Slika 24. SERS spektri **BPE** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag** pobudom pri 785 nm i snazi lasera 319 mW.



Tablica 9. Assignacija opaženih vrpce u SERS spektrima različitih koncentracija **BPE** u **AuNP\_Ag** koloidu dobivenih pobudom pri 785 nm.

Valni broj /cm <sup>-1</sup>					Vibracija
1×10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup>	1×10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup>	1×10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup>	1×10 <sup>-7</sup> mol L <sup>-1</sup>	1×10 <sup>-8</sup> mol L <sup>-1</sup>	
1642	1639	1642	1640	1641	v C=C (etilen)
1610	1613	1611	1610	1609	v CC (piridin)
1546					v C–C (piridin)
1343	1344	1343	1341		δ <sub>oop</sub> CH / v CC (etilen)
1203	1204	1204	1202	1202	v C–O–C
1023	1023	1023	1025		v C <sub>prsten</sub> – C <sub>etilen</sub>

Mjernim uzorcima u koloidnoj suspenziji zlata **AuNP\_Ag**, koji su sadržavali otopine dinatrijevog fluoresceinata različitih koncentracija, snimljeni su SERS spektar kod obje valne duljine pobude. Pobuda pri 532 nm nije rezultirala upotrebljivim spektrom, s obzirom na malu snagu lasera koja je korištena, a koja nije dovela do zasićenja detektora (slika D13). SERS spektri **Na<sub>2</sub>FI** dobiveni pobudom pri 785 nm prikazani su na slici 25. Slabe vrpce koje se javljaju potječu od vibracija molekula HEPES-a koje stabiliziraju nanočestice. Nisu uočene vrpce karakteristične za istraživanu modelnu molekulu. Smanjenjem koncentracije spoja intenzitet vrpce gotovo se ne mijenja, što je dodatan dokaz da vrpce ne potječu od vibracija natrijevog fluoresceinata.



Slika 25. SERS spektri **Na<sub>2</sub>FI** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag** pobudom pri 785 nm i je snage lasera 319 mW.

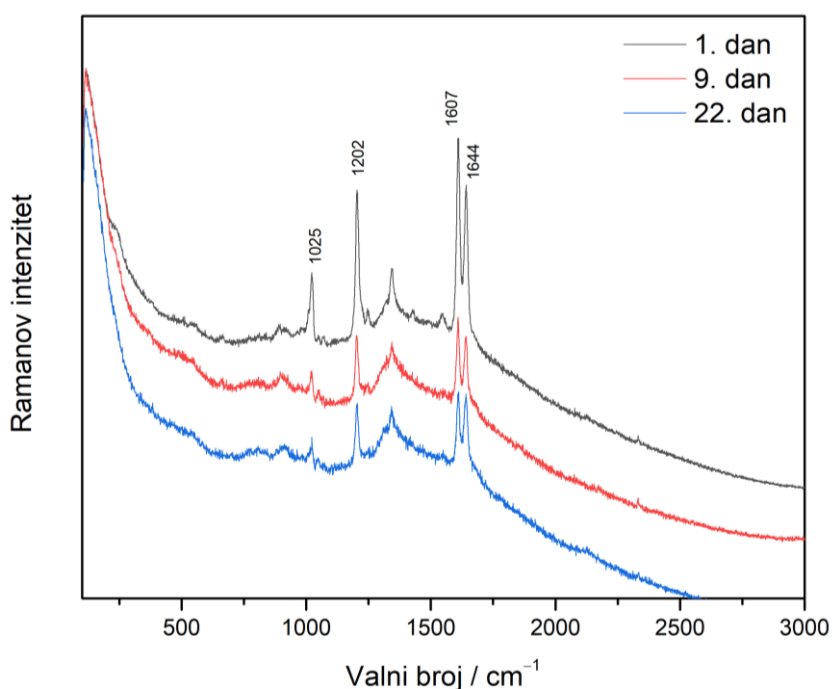
Dodatak „sjemena“, u ovom slučaju srebrovog nitrata, tijekom pripreve koloidne suspenzije zlata rezultira većim brojem monodispergiranih i razgranatih zlatnih nanočestica, dakle spomenuta sol srebra služi za usmjeravanje oblika nanočestica.<sup>26</sup> Usporedbom SERS spektara dobivenih u koloidu **AuNP**, koji je sintetiziran metodom bez „sjemena“, i spektara uzoraka u koloidu **AuNP\_Ag**, koji je pripremljen metodom „sa sjemenom“, vidljivo je da ciljano poboljšavanje morfologije kod drugog koloida pogoduje molekulama rodamina 6G i **BPE**, s obzirom da vrpce u njihovim spektrima postaju intenzivnije, a u slučaju analize **BPE** smanjuje se i detekcijska granica. Promjena morfologije i povećanje razgranatosti vrlo vjerojatno dovodi do drugačije orijentacije molekula HEPES-a na površini nanočestica, pri čemu je negativno nabijena sulfonatna skupina usmjerena prema suspenziji i elektrostatski privlači pozitivno nabijene molekule rodamina 6G koji se na taj način približava nanočesticama zlata, i dobiveni SERS spektar **R6G** je bogat vrpčama. Opisano potvrđuje i nedostatak vrpca u spektru **Na<sub>2</sub>FI** dobivenih u koloidu **AuNP\_Ag**, što se može objasniti elektrostatskim odbijanjem izložene sulfonatne skupine i fluoresceinatnog aniona.

#### 4.4. Vremenski ovisni SERS spektri nemodificiranih koloida zlata AuNP i AuNP\_Ag

Kako bi se odredila vremenska stabilnost pripremljenih koloidnih suspenzija, snimani su SERS spektri nakon 9. i 22. dana od priprave koloida i uspoređeni su sa spektrima dobivenim u svježe pripremljenom koloidu. Kao modelna molekula odabrana je otopina (E)-1,2-di(piridin-4-il)etena koncentracije  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, s obzirom da je pokazivala intenzivne vrpce u oba koloida, a kao pobudno zračenje odabran je laser pri 785 nm.

##### 4.4.1. Koloid AuNP

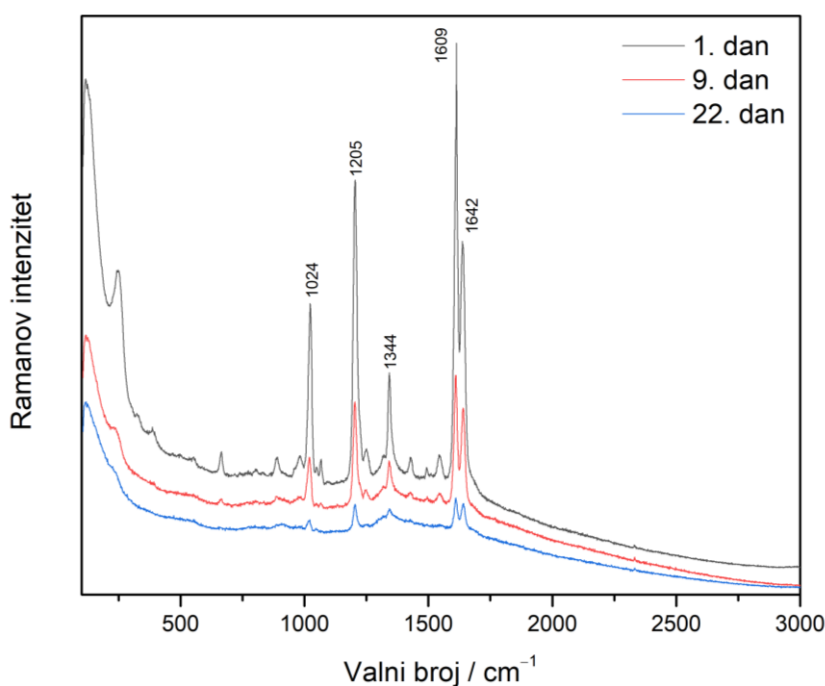
Usporedbom SERS spektara molekula **BPE** snimljenim u koloidnim suspenzijama **AuNP** različite starosti uočeno je da stajanjem koloid gubi na svojoj SERS učinkovitosti i intenziteti vrpca znatno slabe (slika 26). U spektrima nisu uočene nove vrpce ili pomaci postojećih vrpca, što upućuje na zaključak da nije došlo do raspada kemijskih vrsta u koloidu.



Slika 26. Vremenski ovisni SERS spektri **BPE**,  $c = 1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, snimljeni u koloidu **AuNP** pobudom pri 785 nm i snazi lasera 319 mW.

#### 4.4.2. Koloid AuNP\_Ag

Koloid sintetiziran metodom „sa sjemenom“ **AuNP\_Ag**, prema vremenski ovisnim SERS spektrima (slika 27), pokazuje lošiju stabilnost u odnosu na koloid dobiven sintezom "bez sjemena“. Stajanje koloida rezultira slabijim SERS efektom na modelnim molekulama te su dobivene vrpce **BPE** u spektru snimanom u koloidu starom 22 dana izrazito oslabljene, u odnosu na vrpce u spektru svježe pripremljenog koloida. Također je zapaženo da dolazi do promjene omjera intenziteta vrpce u spektru, što upućuje na drugačiju orijentaciju modelne molekule prema površini zlata, vrlo vjerojatno zbog promjena na površini uzrokovanih starenjem.



Slika 27. Vremenski ovisni SERS spektri **BPE**,  $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag** pobudom pri 785 nm i snazi lasera 319 mW.

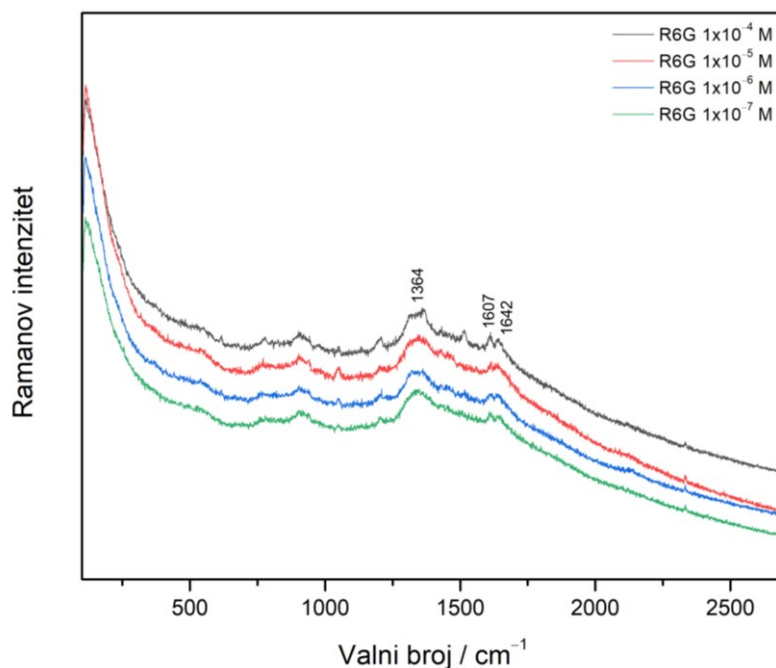
## 4.5. Modificirane koloidne suspenzije zlata kao SERS supstrati

Koloidi zlata, **AuNP** i **AuNP\_Ag**, u kojima su nanočestice stabilizirane molekulama HEPES-a, nisu se pokazale kao stabilne koloidne suspenzije, jer već nakon par dana stajanja pokazuju bitno slabiju SERS učinkovitost. Kako bi se povećala stabilnost, često se u koloidnu suspenziju dodaju različiti reagensi koji sprječavaju agregaciju i/ili nagomilavanje nanočestica. U ovom radu kao stabilizirajući polimer korišten je poli(vinil-pirolidon).

### 4.5.1. Koncentracijski ovisni SERS spektri u modificiranom koloidu zlata **AuNP(+PVP)**

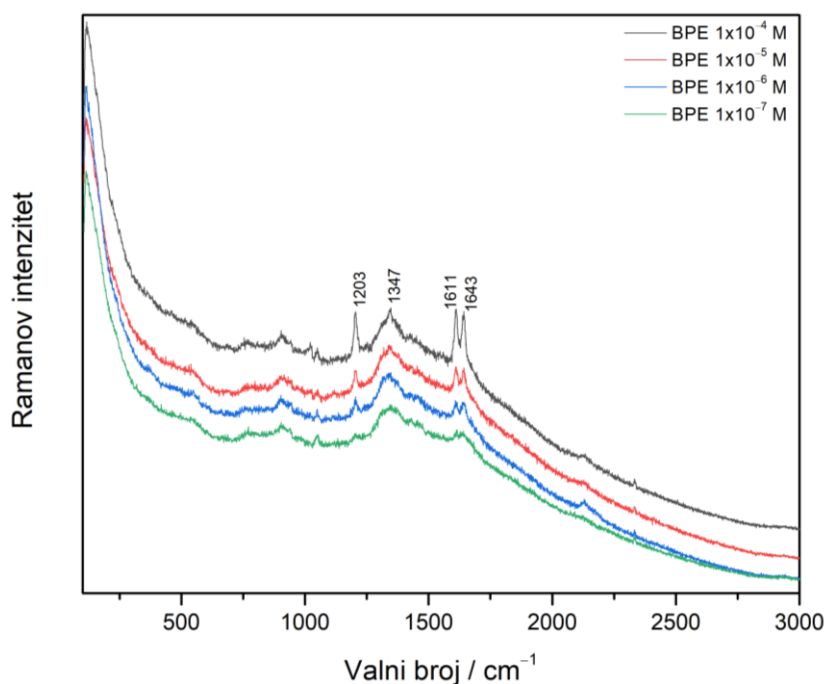
Snimljeni su SERS spektri modelnih molekula **R6G**, **BPE** i **Na2FI** u koloidnoj suspenziji zlata uz dodatak poli(vinil-pirolidona), **AuNP(+PVP)**, u rasponu koncentracija  $1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> –  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Svi mjerni uzorci snimljeni su korištenjem pobuda pri 532 nm i 785 nm, dok je snaga lasera prilagođena svakoj koncentraciji posebno ovisno o uzorku kako bi dobili vrpce u spektru najvećeg mogućeg intenziteta.

U koncentracijski ovisnim SERS spektrima molekule rodamina 6G u koloidu **AuNP(+PVP)** snimljenih pri pobudi zračenja od 532 nm, nisu uočene vrpce vibracija modelne molekule zbog već prethodno spomenute fluorescencije spoja čija široka vrpca prekriva cijeli spektar (slika D14). SERS spektri **R6G** u koloidu **AuNP(+PVP)** snimljeni pobudom pri 785 nm u rasponu koncentracija  $1 \times 10^{-7}$  –  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> sadrže vrlo slabe vrpce koje potječu od vibracija modelne molekule i vidljive su samo u spektru najveće koncentracije **R6G** (slika 28). Tako vrpca pri 1642 cm<sup>-1</sup> potječe od aromatskog CC istezanja, a karakteristične vrpce CC istezanja ksantenskog sustava javljaju se pri 1515 i 1364 cm<sup>-1</sup>. SERS spektri nižih koncentracija **R6G** odgovaraju Ramanovom spektru čistog koloida **AuNP(+PVP)**.



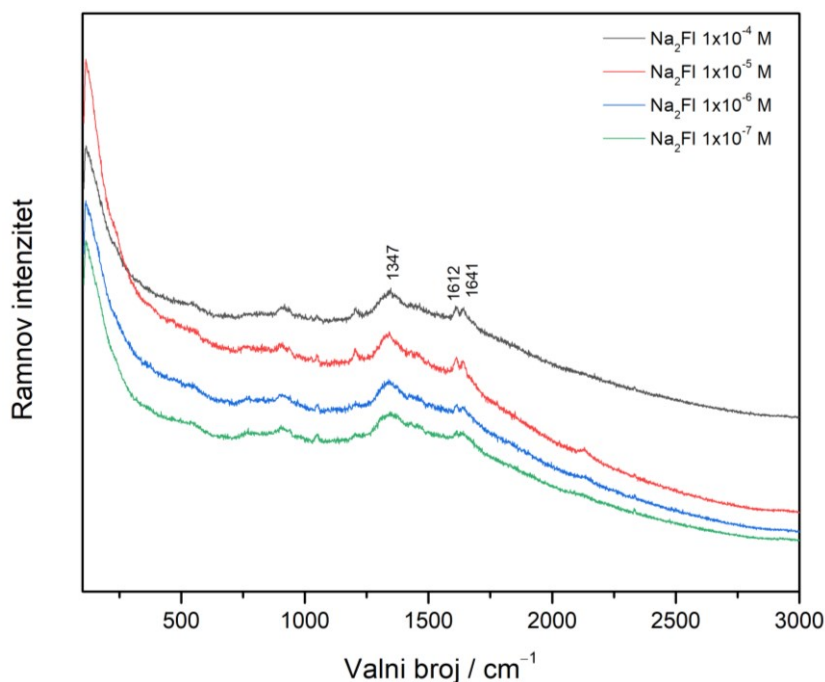
Slika 28. SERS spektri **R6G** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP(+PVP)** pobudom pri 785 nm i snage lasera od 319 mW.

Snimljeni su SERS spektri otopina spoja **BPE** u rasponu koncentracija  $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  u **AuNP(+PVP)** koloidu pri pobudi od 532 nm, ali u spektru nisu opažene vrpce istraživane molekule (slika D15). SERS spektri **BPE** u istom koncentracijskom rasponu snimljeni su pobudom pri 785 nm i prikazani na slici 29. U spektrima su prisutne vrpce koje potječu od vibracijskih modova istraživane molekule pa tako vrpca kod  $1643 \text{ cm}^{-1}$  potječe od istežanja C=C veze etilena, dok vrpce na  $1611 \text{ cm}^{-1}$  odgovara istežanju CC veze u piridinskom prstenu. Širokoj vrpci na  $1347 \text{ cm}^{-1}$  doprinose deformacija CH veze i istežanje CC veze etilenske skupine. Kao granica detekcije uzeta je koncentracija,  $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , jer SERS spektar niže koncentracije odgovara Ramanovom spektru čistog koloida **AuNP(+PVP)**.



Slika 29. SERS spektri **BPE** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP(+PVP)** pobudom pri 785 nm i snazi lasera 319 mW.

U SERS spektrima dinatrijeva fluoresceinata u koloidu **AuNP(+PVP)**, snimljenima pri pobudi 532 nm, nisu vidljive vrpce spoja zbog fluorescencije. Nekoliko vrpca karakterističnih za analizirani spoj **Na<sub>2</sub>FI** vidljivo je u SERS spektrima snimljenim pobudom pri 785 nm pa tako vrpca kod  $1641 \text{ cm}^{-1}$  potječe od istezanja CC veza u ksantenskom prstenu, dok je vrpca na  $1612 \text{ cm}^{-1}$  rezultat antisimetričnog istezanja karboksilne skupine. Slaba vrpca istezanja C–O veze javlja se kod  $1201 \text{ cm}^{-1}$ . Smanjenje koncentracije **Na<sub>2</sub>FI** u koloidu **AuNP(+PVP)** uočava se slabljenjem intenziteta i nestankom vrpca molekula analita. Koncentracijski ovisni SERS spektri spoja **Na<sub>2</sub>FI** u koloidu **AuNP(+PVP)** snimljeni pobudom pri 532 nm prikazani su na slici D16, dok se SERS spektri snimljeni pobudom pri 785 nm nalaze na slici 30.



Slika 30. SERS spektri **Na<sub>2</sub>FI** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP(+PVP)** pobudom pri 785 nm i snazi lasera 319 mW.

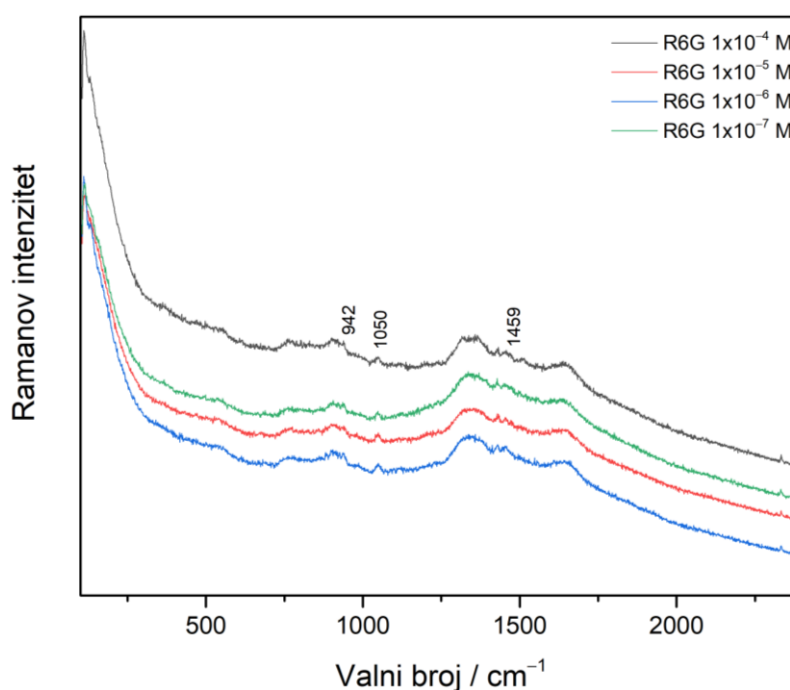
Poli(vinil–pirolidon) (PVP) je polimer bez naboja koji služi kao stabilizator površine nanočestica te regulira rast nanočestica. Zbog svoje strukture sprječava agregaciju zlatnih nanočestica putem odbojnih sila prisutnih zbog hidrofobnog lanca ugljika (učinak steričkih smetnji). Interakcija između molekula PVP i metala odvija se putem karbonilne skupine i dušikovog atoma iz piridinskog prstena, i ta je interakciji drugačija za različite oblike AuNP. SERS spektri dobiveni uvođenjem PVP u sustav puno su slabijeg intenziteta u odnosu na spektre modelnih molekula dobivene u čistom koloidu AuNP. Vrlo vjerojatno dodatak polimera u koloidnu suspenziju, čiji je cilj stabilizacija nastalih nanočestica, povećava steričku barijeru kod adsorpcije molekula na nanočestice zlata i zato je pojačanje Ramanovog raspršenja bitno slabije u odnosu na sustav bez PVP.<sup>22</sup>



#### 4.5.2. Koncentracijski ovisni SERS spektri u modificiranom koloidu zlata *AuNP\_Ag(+PVP)*

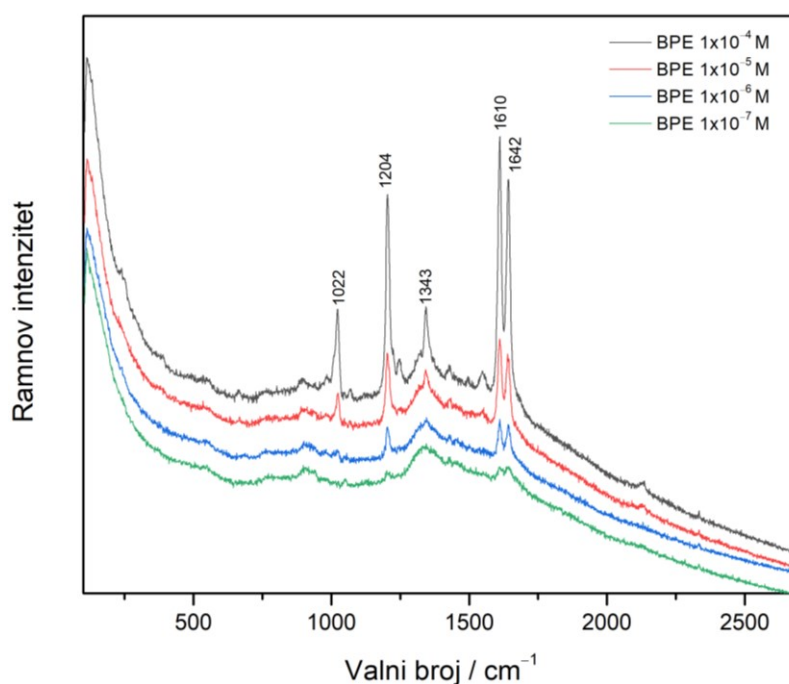
Snimljeni su SERS spektri modelnih molekula u koloidnoj suspenziji zlata dobivenoj metodom sinteze „uz sjeme“, uz dodatak otopine poli(vinil-pirolidona), **AuNP\_Ag(+PVP)**. Raspon koncentracija promatranih otopina **R6G**, **BPE** i **Na<sub>2</sub>FI** bio je  $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ – $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  te su svi mjerni uzorci snimani pri dvije valne duljine pobude, 532 nm i 785 nm, kako bi se utvrdila učinkovitost SERS supstrata, granica detekcije te faktor pojačanja za pripremljeni supstrat.

U SERS spektrima rodamina 6G u koloidu **AuNP\_Ag(+PVP)**, snimljenima pobudom pri 532 nm (slika D17), nisu uočene vrpce vibracija molekula analita jer je spektar prekriven širokom vrpcom fluorescencije. SERS spektri **R6G** snimljeni pobudom pri 785 nm (slika 31) nisu pokazali karakteristične vrpce koje bi odgovarale modelnoj molekuli, već su sve vrpce prisutne u spektru rezultat vibracija molekula HEPES-a koje okružuju nanočestice zlata. Tako vrpca pri  $1050 \text{ cm}^{-1}$  odgovara istežanju veze sulfonatne skupine u molekuli HEPES-a, dok slabe široke vrpce pri  $942$  i  $1459 \text{ cm}^{-1}$  odgovaraju posljedica deformacijskih vibracija metilenske skupine u molekuli poli(vinil-pirolidona).<sup>30</sup>



Slika 31. SERS spektri **R6G** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag(+PVP)** pobudom pri 785 nm i snazi lasera 319 mW.

Spektri modelne molekule **BPE** u koloidnoj suspenziji zlata **AuNP\_Ag(+PVP)** snimljeni su pri valnim duljinama pobude 532 i 785 nm. Pobuda pri 532 nm nije rezultirala vrpca modelne molekule (slika D18). Snimanjem SERS spektara **BPE** pri pobudi od 785 nm (slika 32) uočene su intenzivne vrpce koje odgovaraju vibracijama modelne molekule **BPE**. Vrpca pri  $1022\text{ cm}^{-1}$  rezultat je istezanja C–C veze iz piridinskog prstena molekula **BPE**, dok intenzitetu vrpca pri  $1642$  i  $1343\text{ cm}^{-1}$  pridonose vibracije etilenske skupine. Intenzivna vrpca pri  $1610\text{ cm}^{-1}$  potječe od istezanja CC veza piridinskog prstena. Smanjenjem koncentracije modelne molekule u koloidu uočeno je smanjenje intenziteta karakterističnih vrpca promatranog spoja. Kao granica detekcije određena je koncentracija,  $c = 1 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$ . Asignacija najintenzivnijih vrpca iz koncentracijski ovisnih SERS spektara spoja **BPE** snimljenih u koloidu **AuNP\_Ag(+PVP)** pobudom od 785 nm prikazani su u tablici 9.

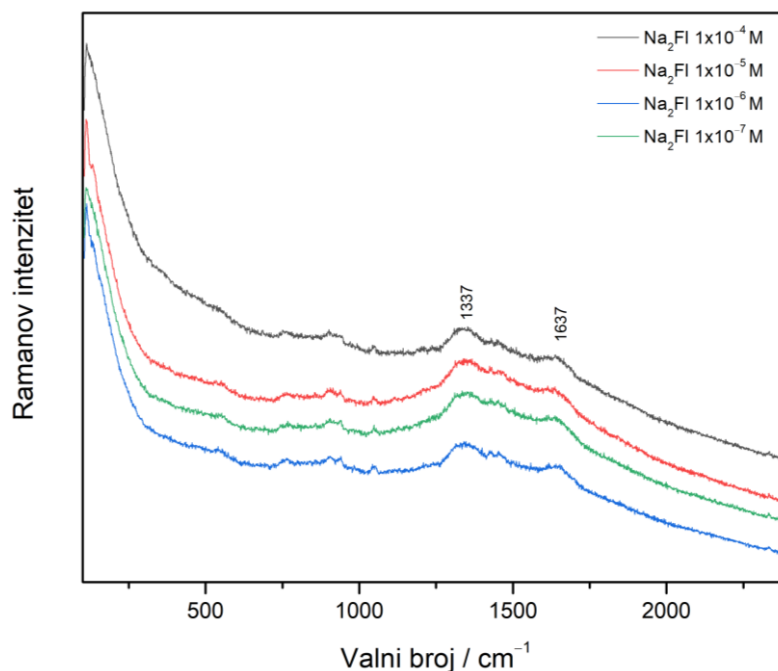


Slika 32. SERS spektri **BPE** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag(+PVP)** pobudom pri 785 nm i snazi lasera 319 mW.

Tablica 9. Assignacija opaženih vrpce u SERS spektrima različitih koncentracija **BPE** u **AuNP\_Ag(+PVP)** koloidu dobivenih pobudom pri 785 nm.

Valni broj /cm <sup>-1</sup>				Vibracija
1×10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup>	1×10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup>	1×10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup>	1×10 <sup>-7</sup> mol L <sup>-1</sup>	
1642	1640	1641	1640	v C=C (etilen)
1610	1610	1610	1610	v CC (piridin)
1343	1342	1346	1344	δ <sub>oop</sub> CH / v CC (etilen)
1204	1203	1202		v C–O–C
1022	1024			v C <sub>prsten</sub> – C <sub>etilen</sub>

SERS spektri dinatrijeva fluoresceinata u koloidnoj suspenziji zlata, **AuNP\_Ag(+PVP)**, prekriveni su intenzivnom vrpcom fluorescencije, kada se snime pobudnim zračenjem pri 532 nm (slika D19). Kada se kao pobuda koristi lasersko zračenje pri 785 nm (slika 33), dobiveni SERS spektri **Na<sub>2</sub>FI** ne pokazuju vrpce modelne molekule, nego anomalne vrpce supstrata koje potječu od vibracija molekula HEPES i PVP i profili SERS spektara odgovaraju profilu Ramanovog spektra koloidne suspenzije **AuNP\_Ag(+PVP)**.



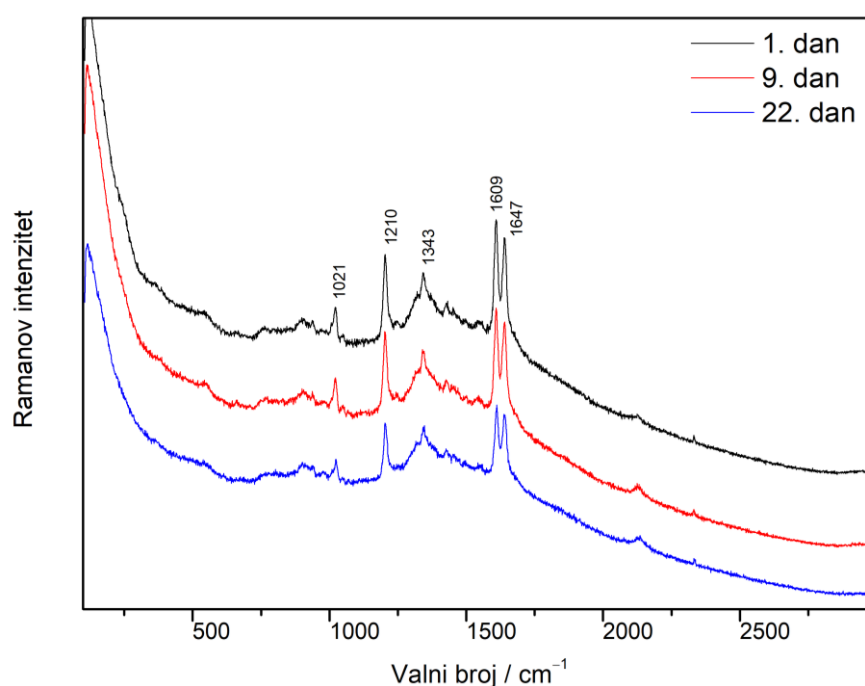
Slika 33. SERS spektri **Na<sub>2</sub>FI** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag(+PVP)** pobudom pri 785 nm i snazi lasera od 319 mW.

Usporedbom SERS spektara modelnih molekula dobivenih u koloidu pripremljenom metodom „sa sjemenom“ nakon čega je dodan polimer, **AuNP\_Ag(+PVP)**, jasno je vidljivo da dodatak polimera ne rezultira vrpčama u spektrima nabijenih modelnih molekula, vrlo vjerojatno zbog steričkih smetnji molekula polimera i prethodno opisanog elektrostatskog odbijanja između HEPES-a i **R6G** te **Na<sub>2</sub>FI**. Za razliku od spomenutih spojeva, **BPE** daje spektre koji sadrže intenzivne vrpce te se pretpostavlja kako je uslijed dodataka AgNO<sub>3</sub> došlo do poboljšanja morfologije AuNP, koja pogoduje adsorpciji navedene modelne molekule na površini zlata.<sup>26</sup>

## 4.6. Vremenski ovisni SERS spektri modificiranih koloida zlata AuNP(+PVP) i AuNP\_Ag(+PVP)

### 4.6.1. Koloid AuNP(+PVP)

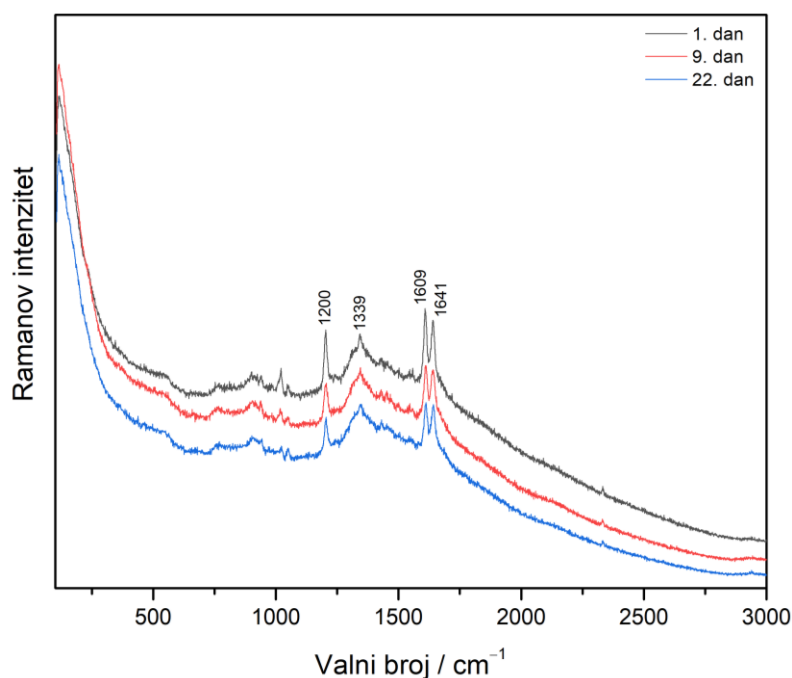
Vremenski ovisni SERS spektri modelne molekule **BPE** u koloidu **AuNP(+PVP)**, snimljeni pobudom pri 785 nm u određenim vremenskim intervalima prikazani su na slici 34. Vidljivo je da stajanjem koloid ne gubi na SERS učinkovitosti jer su promjene u intenzitetima vrpce spoja **BPE** zaista malene. Može se pretpostaviti da dodatak polimera PVP stabilizira pripravljene koloidne nanočestice zlata.



Slika 34. Vremenski ovisni SERS spektri **BPE**,  $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , snimljeni u koloidu **AuNP(+PVP)** pobudom pri 785 nm i snazi lasera 319 mW.

### 4.6.2. Koloid AuNP\_Ag(+PVP)

SERS spektri modelne molekule **BPE** snimani u koloidu **AuNP\_Ag(+PVP)** snimani tijekom vremena ne pokazuju značajne promjene u omjeru intenziteta vrpce, nema pojave novih vrpce ili bilo kakvi dokaz o promjeni vrsta na površini metala (slika 35). I u ovom slučaju pretpostavlja se da je za stabilnost odgovoran dodani polimer.



Slika 35. Vremenski ovisni SERS spektri **BPE**,  $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag(+PVP)** pobudom pri 785 nm i snazi lasera 319 mW.

#### 4.7. Vremenski ovisni UV/Vis/NIR i Raman spektri koloidnih suspenzija zlata

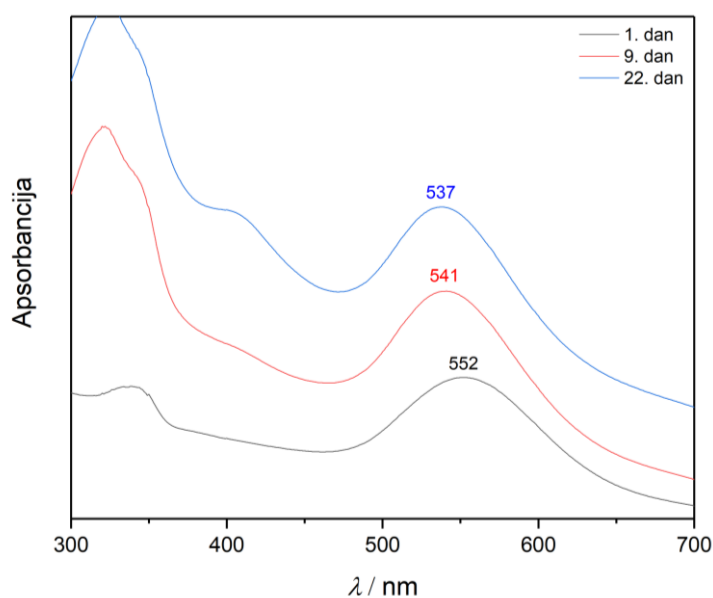
Opaženo je da tijekom vremena određene koloidne suspenzije zlata vrlo vjerojatno podliježu promjenama što rezultira slabljenjem intenziteta vrpca u SERS spektrima. Da bi se odredilo kako starenje utječe na položaj maksimuma apsorpcije, odnosno kakve promjene se zbivaju s metalnim nanočesticama tijekom vremena, snimani su vremenski ovisni UV/Vis/NIR i Ramanovi spektri pripremljenih koloida prvi dan, deveti dan te dvadeset i drugi dan nakon priprave.

##### 4.7.1. Vremenski ovisni UV/Vis/NIR spektri koloidnih suspenzija zlata

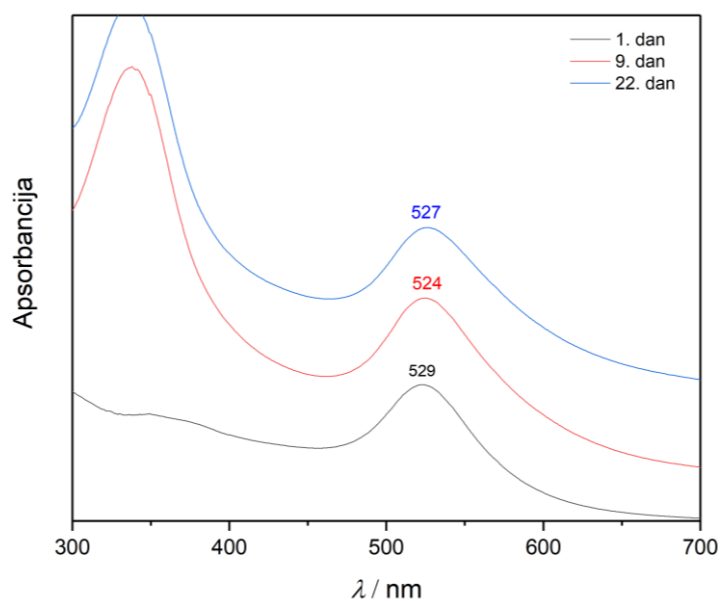
U svrhu ispitivanja stabilnosti koloida snimljeni su UV/Vis/NIR spektri za sve četiri pripravljena koloida, **AuNP**, **AuNP\_Ag**, **AuNP(+PVP)** i **AuNP\_Ag(+PVP)**, kako bi se odredila valna duljina rezonancije plazmona (slike 36–39).

U slučaju „čiste“ koloidne suspenzije zlata (**AuNP**) kroz sva tri mjerenja (1., 9. i 22. dan) uočen je plavi pomak u kojem je razlika valne duljine rezonancije plazmona nanočestice zlata

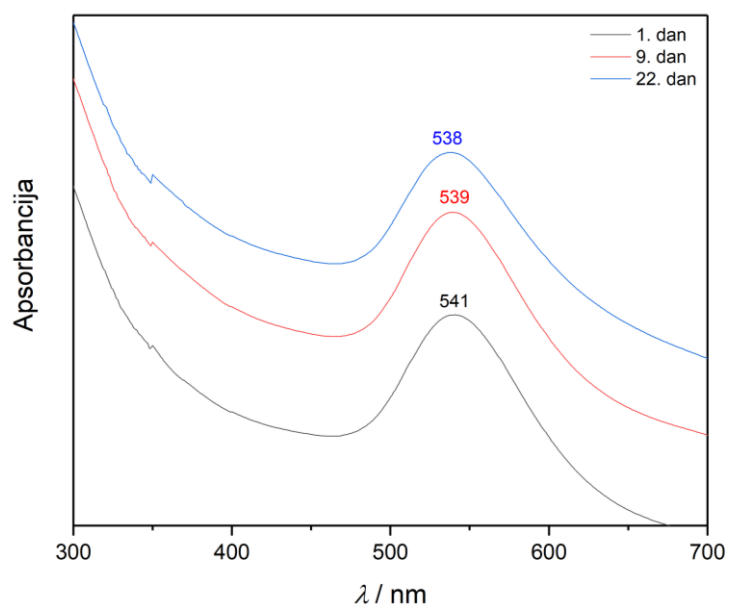
između prvog (552 nm) i dvadeset drugog (537 nm) dana iznosila 15 nm. Nadalje, kada je koloid zlata pripreman sintezom „sa sjemenom“ (**AuNP\_Ag**), promjene u valnoj duljini apsorpcijskog maksimuma između prvog i devetog dana su bile neznatne, dok je dvadeset drugog dana došlo do crvenog pomaka, s početnih 523 nm do konačnih 527 nm. Dodatkom stabilizatora poli(vinil–pirolidona) u koloidne suspenzije tijekom vremena nisu uočene bitne promjene u valnoj duljini rezonancije plazmona kod svih promatranih supstrata.



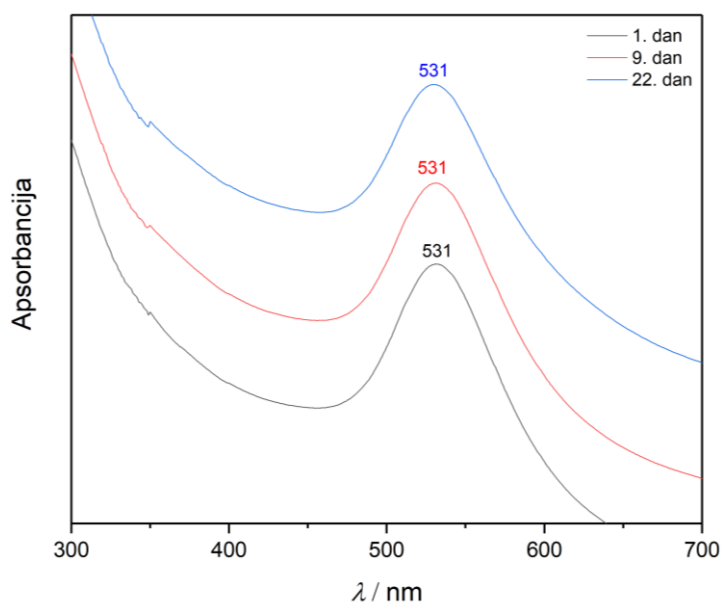
Slika 36. Vremenski ovisni UV/Vis/NIR spektri koloida zlata **AuNP**.



Slika 37. Vremenski ovisni UV/Vis/NIR spektri koloida zlata **AuNP\_Ag**.



Slika 38. Vremenski ovisni UV/Vis/NIR spektri koloida zlata **AuNP(+PVP)**.



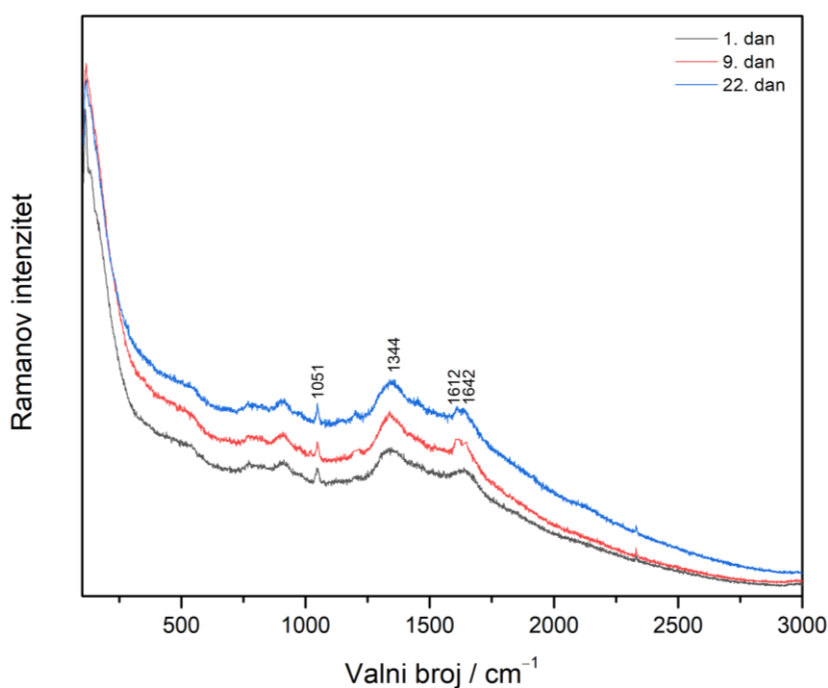
Slika 39. Vremenski ovisni UV/Vis/NIR spektri koloida zlata **AuNP\_Ag(+PVP)**.



#### 4.7.2. Vremenski ovisni Ramanovi spektri koloidnih suspenzija zlata

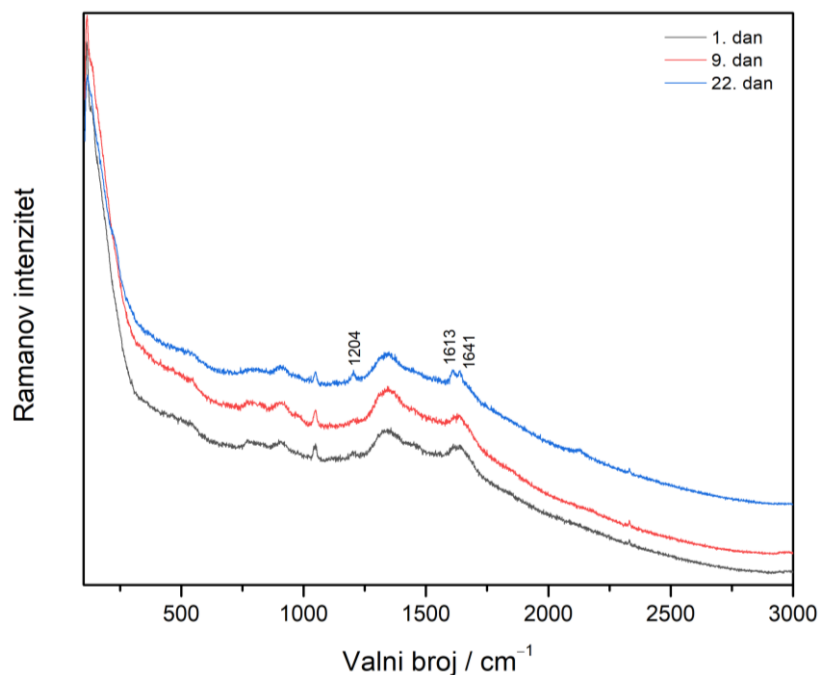
S obzirom da su UV/Vis/NIR spektri pojedinih koloidnih suspenzija ukazivali na pomake u valnoj duljini plazmona nastale tijekom vremena, što se može objasniti promjenama u načinu slaganja nanočestica u agregate ili obrnuto, snimljeni su Ramanovi spektri koloida zlata u istim vremenskim periodima, kako bi se istražilo jesu li navedene promjene vidljive i u Ramanovim spektrima.

Vremenski ovisni Ramanovi spektri koloidne suspenzije zlata **AuNP** (slika 40) ne pokazuju značajnije promjene tijekom vremena starenja, osim što su anomalne vrpce molekula HEPES izraženije kod koloida starog 22 dana, u odnosu na svježije pripravljeni.



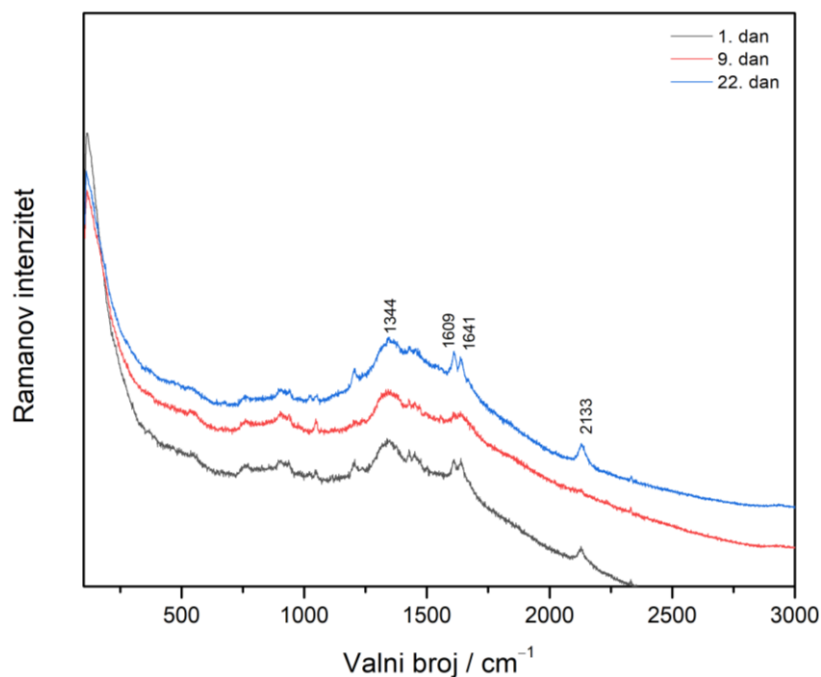
Slika 40. Vremenski ovisni Ramanovi spektri koloida zlata **AuNP** snimljeni pobudom pri 785 nm i snazi lasera 319 mW.

Ramanovi spektri koloida **AuNP\_Ag** (slika 41) prikazuju trend sličan gore opisanom koloidu, gdje starenje koloida rezultira vrpčama većeg intenziteta u spektru. U spektru koloida starog 22 dana vidljive su nove vrpce pri 1613 i 1204 cm<sup>-1</sup> koje nisu uočene u Ramanovim spektrima prethodno snimanih koloida, što upućuje na možebitnu promjenu orijentacije molekula HEPES-a na površini zlata.



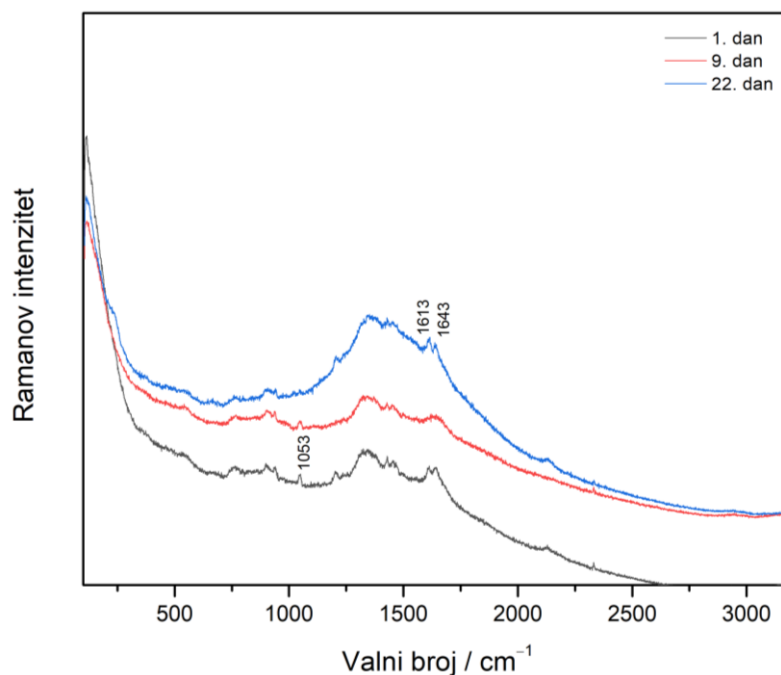
Slika 41. Vremenski ovisni Ramanovi spektri koloida zlata **AuNP\_Ag** snimljeni pobudom pri 785 nm i snazi lasera 319 mW.

Ramanovi spektri koloidne suspenzije zlata, **AuNP(+PVP)**, snimljeni pobudom pri 785 nm tijekom vremena prikazani su na slici 42. Dobiveni spektri su vrlo slični, ali stajanje pogoduje vibracijskim modovima HEPES-a čije vrpce postaju intenzivnije u spektru snimanom 22. dan od dana priprave. Pri 1047 cm<sup>-1</sup> u koloidu starom 22 dana izlazi vrpca, koja je bila samo rame u spektrima dobivenim u mjerenjima prvi i deveti dan.



Slika 42. Vremenski ovisni Ramanovi spektri koloida zlata **AuNP(+PVP)** snimljeni pobudom pri 785 nm i snage lasera od 319 mW.

Vremenski ovisni Ramanovi spektri koloidne suspenzije zlata **AuNP\_Ag(+PVP)** prikazani su na slici 43. U spektru snimljenom prvi dan jasno su vidljive vrpce koje potječu od vibracija molekula **PVP** i **HEPES**. Stajanjem se mijenja način orijentacije stabilizirajućih tvari oko nanočestica što je vidljivo u spektru kao pad intenziteta vrpce.



Slika 43. Vremenski ovisni Ramanovi spektri koloida zlata **AuNP\_Ag(+PVP)** snimljeni pobudom pri 785 nm i snage lasera od 319 mW.

#### 4.8. Faktor pojačanja

Faktor pojačanja (engl. *enhancement factor*, EF) je ključan parametar za procjenu učinkovitosti SERS supstrata, te postoje različite empirijske formule kojima se može procijeniti vrijednost EF.

U ovom radu faktor pojačanja za sve pripravljene koloidne suspenzije zlata izračunat je prema izrazu (3) pri čemu je korištena modelna molekula **BPE**.  $I_{sol}$  predstavlja intenzitet vrpce u Ramanovom spektru otopine **BPE**, dok je  $C_{sol}$  koncentracija molekula u otopini,  $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .  $C_{SERS}$  je koncentracija molekule **BPE** u dobivenom SERS spektru, a  $I_{SERS}$  intenzitet odabrane vrpce.

$$EF = \frac{I_{SERS} C_{sol}}{I_{sol} C_{SERS}} \quad (3)$$

Iz tablice 10 je jasno vidljivo kako najbolje pojačava raspršenje koloid dobiven metodom bez sjemena **AuNP** i modificirani koloid pripremljen sintezom „sa sjemenom“, **AuNP\_Ag(+PVP)**. Razlog većeg pojačanja raspršenja u koloidu **AuNP** je optimalnija orijentacija molekule **BPE** na površini zlatnih nanočestica pri čemu nema drugih molekula koje bi sterički ometale takvu interakciju. S druge strane, prisustvo reagensa za dobivanje više monodispergiranih i razgranatih nanočestica ( $\text{AgNO}_3$ ) uz prisustvo PVP-a koji je pridonio stabilizaciji površine ipak je došlo do pojačanja Ramanova raspršenja. Pri čemu isključivo njihovo međusobno prisustvo dovodi do učinkovita poboljšanja u SERS spektru.

Izračunati faktori pojačanja su prilično mali što, uz činjenicu da su svi SERS spektri snimljeni pri najvećoj snazi lasera, upućuje na zaključak da opisani načini pripreme koloida ne rezultiraju supstratima izvrsne SERS učinkovitosti.

Tablica 10. Prikaz faktora pojačanja raspršenja izračunatog za svaki pojedini supstrat modelne molekule **BPE** pri koncentraciji od  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , za vrpce pri  $1610 \text{ cm}^{-1}$ .

Vrsta supstrata	Faktor pojačanja (EF)
<b>AuNP</b>	41,1
<b>AuNP_Ag</b>	33,5
<b>AuNP(+PVP)</b>	20,1
<b>AuNP_Ag(+PVP)</b>	41,0

## § 5. ZAKLJUČAK

Istražena je SERS učinkovitost koloidnih suspenzija nanočestica zlata pripremljenih sintezom u 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetilensulfonskoj kiselini (pufer HEPES) „bez sjemena“ (**AuNP**), zatim sintezom „sa sjemenom“ (**AuNP\_Ag**), te nastalih suspenzija s dodatkom polimera poli(vinil-pirolidona), **AuNP(+PVP)** i **AuNP\_Ag(+PVP)**, pomoću modelnih molekula rodamina 6G (**R6G**), (E)-1,2-di(piridin-4-il)etena (**BPE**) i dinatrijeva fluorsceinta (**Na2FI**). U tu svrhu snimljeni su koncentracijski ovisni SERS spektri modelnih molekula. Kako bi se odredila stabilnost promatranih koloida zlata, snimljeni su UV/Vis/NIR spektri koloidnih suspenzija te vremenski ovisni SERS spektri modelnih molekula u koloidnih suspenzija, kao i samih koloidnih suspenzija.

U koncentracijski ovisnim SERS spektrima modelnih molekula u koloidnoj suspenziji **AuNP**, najbolje pojačanje raspršenja nađeno je za molekulu **BPE**, što je vjerojatno posljedica njezine strukture bez naboja koja joj omogućava približavanje površini zlata, dok ostale modelne molekule elektrostatski odbijaju molekule HEPES-a smještene na površini nanočestica kao njihovi stabilizatori. Dodatak  $\text{AgNO}_3$  kao reagensa koji potiče nastanak monodispergiranih i razgranatih zlatnih nanočestica omogućio je bolje pojačanje u koloidnoj suspenziji **AuNP\_Ag** za spojeve **R6G** i **BPE**, dok je za dinatrijev fluoresceinat izostalo. Negativan naboj **Na2FI** onemogućio je adsorpciju molekula na površini zlata zbog odbojnih elektrostatskih interakcija sa sulfonatnom skupinom pufera HEPES. Koloidna suspenzija zlata dobivena sintezom „sa sjemenom“, u koju je dodan polimer PVP, **AuNP\_Ag(+PVP)**, pokazala je zadovoljavajuće pojačanje u SERS spektru za (E)-1,2-di(piridin-4-il)eten, ali ne i za ostale dvije modelne molekule, što se objašnjava kombinacijom naboja modelnih molekula te steričkih smetnji koje izazivaju molekule polimera na površini. Koloidna suspenzija u kojoj je dodan samo stabilizator PVP, **AuNP(+PVP)**, pokazala je zadovoljavajuće pojačanje u spektrima za sve tri modelne molekule. S druge pak strane, modelna molekula (E)-1,2-di(piridin-4-il)etena u sve četiri vrste koloidnih suspenzija pokazala intenzivne vrpce u SERS spektrima, a razlog tome je struktura koja ne dovodi do steričkih smetnji i omogućava blisku interakciju s nanočesticama zlata. Pozitivan naboj rodamina 6G omogućio je povoljne elektrostatske interakcije s puferom HEPES korištenom u sintezi koloida, dok je rigidna

struktura molekule ipak otežala povoljnu adsorpciju na površini AuNP, za razliku od **Na<sub>2</sub>FI** koja se zbog negativnog naboja i steričkih smetnji ne približava nanočesticama zlata.

Iz vremenski ovisnih SERS spektara modelnih molekula u koloidnim suspenzijama opaženo je kako su najstabilnije koloidne suspenzije s dodanim poli(vinil-pirolidonom), **AuNP(+PVP)** i **AuNP\_Ag(+PVP)** pri čemu tijekom dvadeset dva dana nije došlo do značajne promjene u intenzitetu vrpce od interesa ili njihova nestanka u spektru. Proučavajući valnu duljinu rezonancije plazmona iz snimljenih UV/Vis/NIR spektara zaključeno je kako su se također koloidi s polimerom pokazali najstabilnijim, s obzirom da je promjena u valnoj duljini bila neznatna, odnosno u slučaju **AuNP\_Ag(+PVP)** nije bilo promjene valne duljine rezonancije plazmona u vremenskom periodu od 22 dana.

Najniža granica detekcije određena je u koloidu **AuNP\_Ag** za **BPE** ( $1 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>). Druge dvije modelne molekule imale su niže granice detekcije ( $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> /  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) što je očekivano zbog njihove slabe adsorpcije na nanočestice zlata.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

AuNP – zlatne nanočestice

AuNP\_Ag – zlatne nanočestice s srebrovim nitratom

AuNP(+PVP) – zlatne nanočestice s molekulama poli(vinilpirolidona) na površini

AuNP\_Ag(+PVP) – zlatne nanočestice s srebrovim nitratom i molekulama poli(vinilpirolidona) na površini

BPE –(E)-1,2-di(piridin-4-il)eten

$\delta$  – vibracija deformacija

$\delta_{wagg}$  – klaćenje

$\delta_{sci}$  – striženje

ip – u ravnini

IR – infracrveno zračenje

ksan – ksantenski prsten

LSPR – lokalizirana površinska plazmonska rezonancija

v – vibracija istezanja

$v_{as}$  – antisimetrična istežna vibracija

Na<sub>2</sub>Fl – dinatrijev fluoresceinat

NIR – blisko infracrveno zračenje

oop-izvan ravnine

p – piridin

PVP – poli(vinilpirolidon)

R6G – rodamin 6G

SERS – Površinski pojačano Ramanovo raspršenje

UV – ultraljubičasto zračenje

v – vinil

Vis – vidljivo zračenje



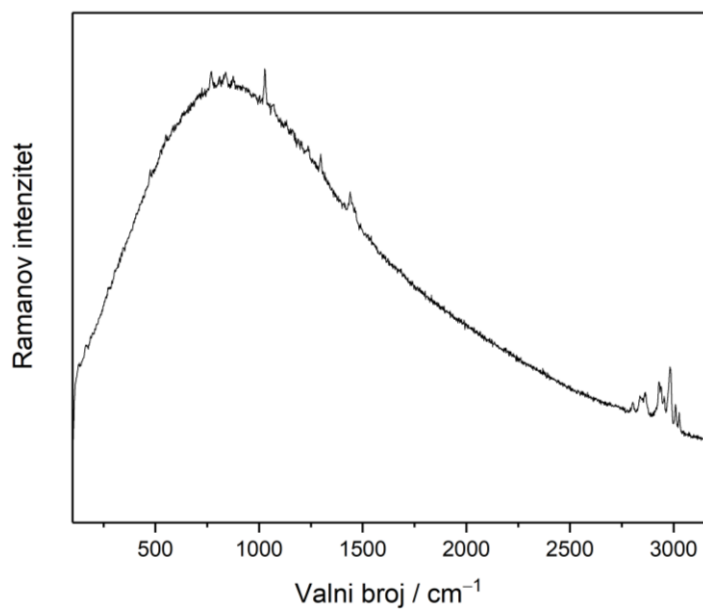
## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. E. Smith, G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, John Wiley & Sons Ltd, New Jersey, 2005, str. 2–5, 113–121.
2. J. R. Ferraro, K. Nakamoto, C. W. Brown, *Introductory Raman Spectroscopy*, Elsevier, Amsterdam, 2003., str. 161–164.
3. Kruszewski, M. Cyrankiewicz, *Acta Phys. Pol.* **123** (2013) 965–969.
4. K. Eberhardt, C. Stiebing, C. Matthaus, M. Schmitt, J. Popp, *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **15** (2015) 773–787.
5. <https://www.edinst.com/blog/what-is-raman-spectroscopy/> (datum pristupa 30. lipnja 2022.)
6. F. M. Zehentbauer, C. Moretto, R. Stephen, T. Thevar, J. R. Gilchrist, D. Pokrajac, K. L. Richard, J. Kiefer, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Vol. 12, Elsevier, Amsterdam, 2014, str. 147–151.
7. C. Van Dyck, B. Fu, R. P. Van Duyne, G. C. Schatz, M. A. Ratner, *J. Phys. Chem.* **122** (2018) 465–473.
8. P. J. Larkin, *IR and Raman Spectroscopy Principles and Spectral Interpretation*, Elsevier, Amsterdam, 2011, str. 15–19.
9. M. Ratkaj, *Primjena spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja u istraživanju farmaceutskih aktivnih tvari*, Doktorski rad, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2013, str. 4, 6.
10. P. A. Mosier–Boss, *Nanomaterials* **7,142** (2017) 1–30.
11. J. Langer, D. Jimenez de Aberasturi, J. Aizpurua, R. A. Alvarez–Puebla, B. Auguie, J. J. Baumberg, G. C. Bazan, S. E. J. Bell, A. Boisen, A. G. Brolo, J. Choo, D. Cialla-May, V. Deckert, L. Fabris, K. Faulds, F. J. García de Abajo, Royston Goodacre, D. Graham, A. J. Haes, C. L. Haynes, C. Huck, T. Itoh, M. Kall, J. Kneipp, N. A. Kotov, H. Kuang, E. C. Le Ru, H. Kwee Lee, J.-F. Li, X. Yi Ling, S. A. Maier, T. Mayerhöfer, M. Moskovits, K. Murakoshi, J.-M. Nam, S. Nie, Y. Ozaki, I. Pastoriza-Santos, J. Perez-Juste, J. Popp, A. Pucci, S. Reich, B. Ren, G. C. Schatz, T. Shegai, S. Schlücker, L.-L. Tay, K. G. Thomas,

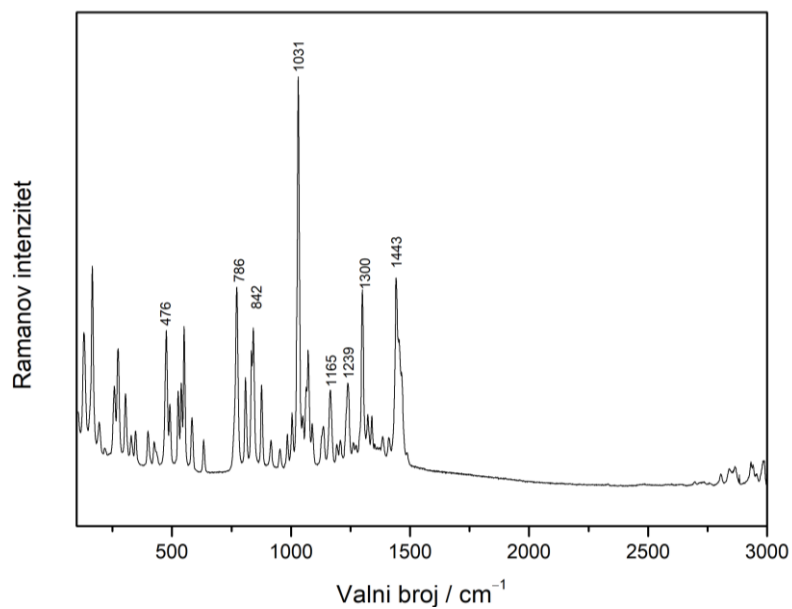
- Z.-Q. Tian, R. P. Van Duyne, T. Vo-Dinh, Y. Wang, K. A. Willets, C. Xu, H. Xu, Y. Xu, Y. S. Yamamoto, B. Zhao, L. M. Liz-Marzan, *ASC Nano* **14** (2020) 28–117.
12. <http://www-personal.umich.edu/~maungk/SERS.html> (datum pristupa 30. lipnja 2022.)
  13. <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/b52808> (datum pristupa 1. srpnja 2022.)
  14. H. Pataveepaisit, F. Srisuriyachai, *Earth Environ. Sci.* **609** (2020) 012102.
  15. T. Casalini, M. Salvalaglio, G. Perale, M. Masi, C. Cavallotti, *J. Phys. Chem. A* **115** (2011) 12896–12904.
  16. L. Wang, A. Roitberg, C. Meuse, A. K. Gaigalas, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **57** (2001) 1781–1791.
  17. W. Hu, G. Tian, S. Duan, L.-L. Lin, Y. Ma, Y. Luo, *Chem. Phys.* **453** (2015) 20–25.
  18. P. G. Seybold, D. P. Borris, *Spectrochimica Acta* **42A** (1986) 747–754.
  19. <https://www.edinst.com/blog/what-is-raman-spectroscopy/> (datum pristupa 30. lipnja 2022.)
  20. <http://protocol-place.com/basic-lab-techniques/stock-solutions/hepes-stock-solution-0-1-m-ph-7-4/> (datum pristupa 1. srpnja 2022.)
  21. <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/252433> (datum pristupa 1. srpnja 2022.)
  22. K. M. Koczur, S. Mourdikoudis, L. Polavarapu, S. E. Skrabalak, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **44** (2015) 17883–17905.
  23. P. Hildebrandt, M. Stockburger, *J. Phys. Chem.* **88** (1984) 5935–5944.
  24. B. Sharma, R. R. Frontiera, A. I. Henry, E. Ringe, R. P. Van Duyne, *Mater. Today* **15** (2012) 16–25.
  25. Z. Zhuanga, X. Shi, Y. Chena, M. Zuoa, *Spectrochimica Acta Part A* **79** (2011) 1593–1599. W. Hu, G. Tian, S. Duan, L.-L. Lin, Y. Ma, Y. Luo, *Chem. Phys.* **453** (2015) str. 20–25.
  26. D. W. Mulder, M. M. Phiri, A. Jordaan, B. C. Vorster, *R. Soc. Open. Sci.* **6** (2019) 190160.
  27. W. Xi., A. J. Haes, *J. Am. Chem. Soc.* **141** (2019) 4034–4042.
  28. C.H. Moran, M. Rycenga, Q.Zhang, Y. Xia, *J. Phys. Chem. C* **115** (2011) 21852–21857.
  29. M. Häring, M. M. Pérez-Madrugal, D. Kühbeck, A. Pettignano, F. Quignard, D. Díaz Díaz, *Molecules* **40** (2015) 4136–4147.
  30. P. B. Hammannavar, B. Lobo, *Mat. Sci. Res. India* **15** (2018) 55–67.

31. J. Sharmi Kumar, T.S. Renuga Devi, G.R. Ramkumaar, A. Bright, *Spectrochim. Acta A* **15** (2015) 1386–1425.

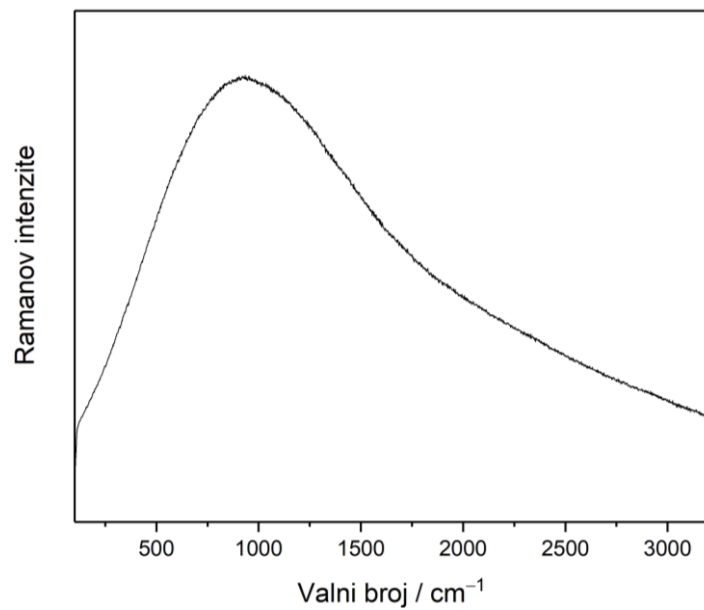
## § 8. DODATAK



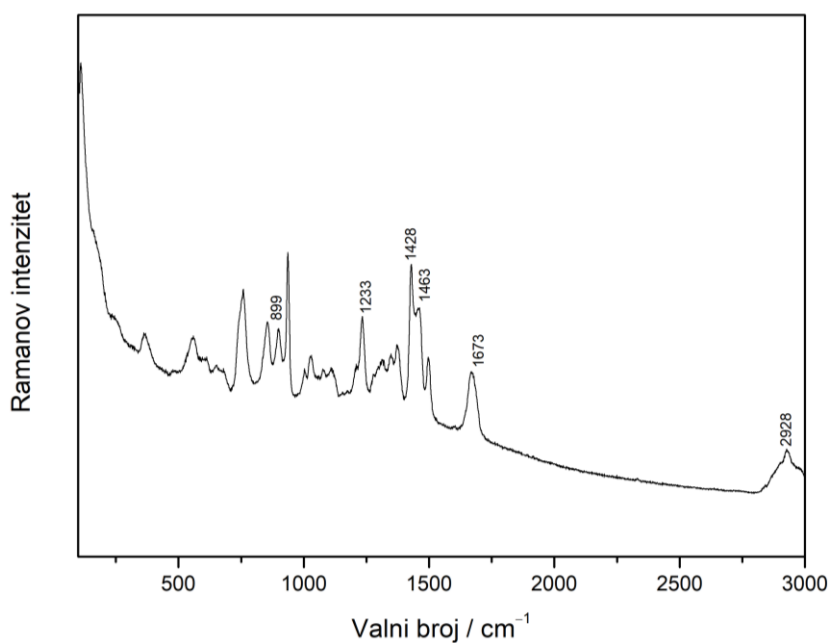
Slika D1. Ramanov spektar krutine HEPES snimljen pri pobudi lasera od 532 nm i snazi lasera 1,2 mW.



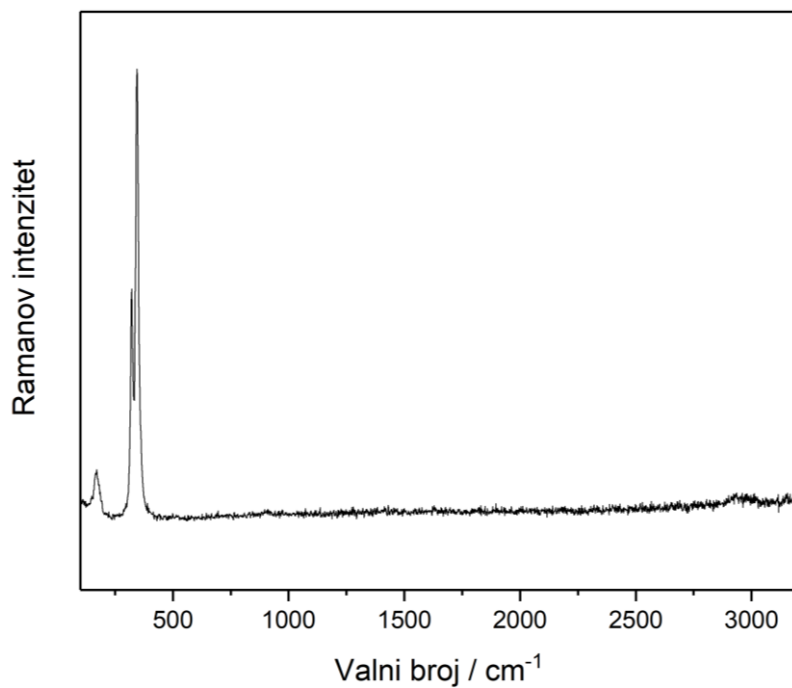
Slika D2. Raman spektar krutine HEPES snimljen pri pobudi lasera od 785 nm i snazi lasera 159,5 mW.



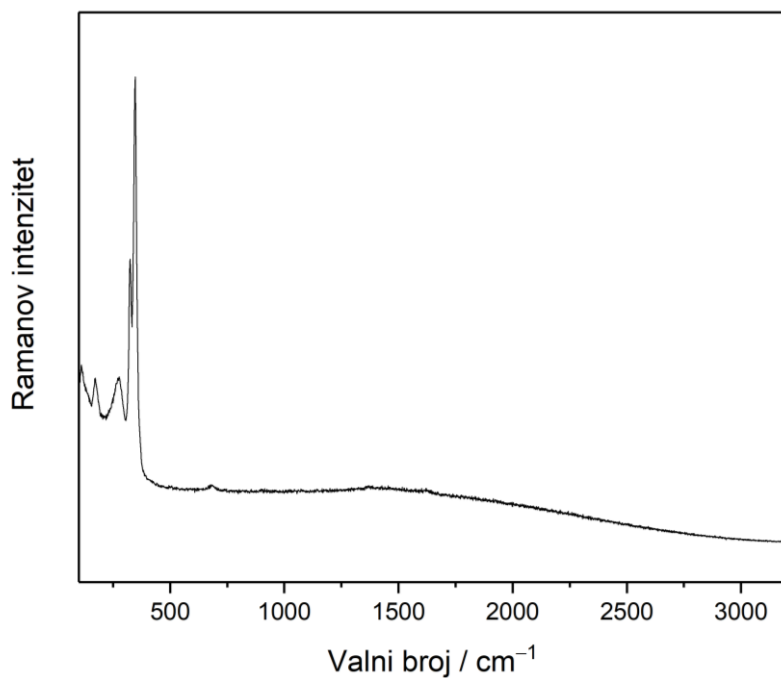
Slika D3. Raman spektar krutine PVP snimljen pri pobudi lasera od 532 nm i snazi lasera 1,2 mW.



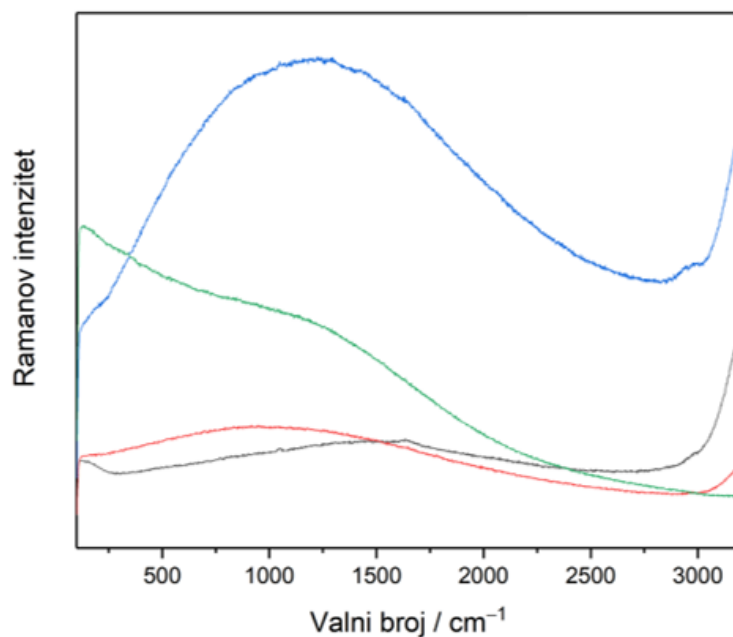
Slika D4. Raman spektar krutine PVP snimljen pri pobudi lasera od 785 nm i snazi lasera 159,5 mW.



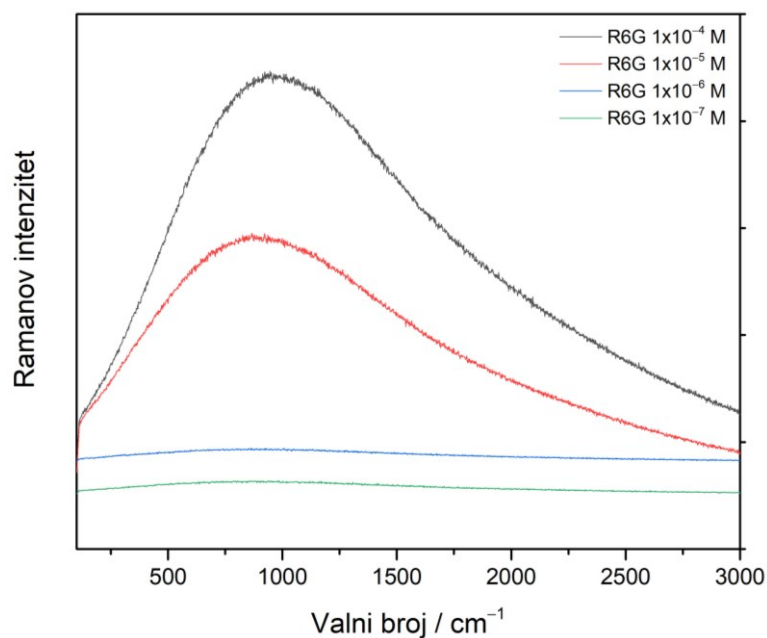
Slika D5. Raman spektar krutine tetraklorozlatne (III) kiseline snimljen pri pobudi lasera od 532 nm i snazi lasera 1,2 mW.



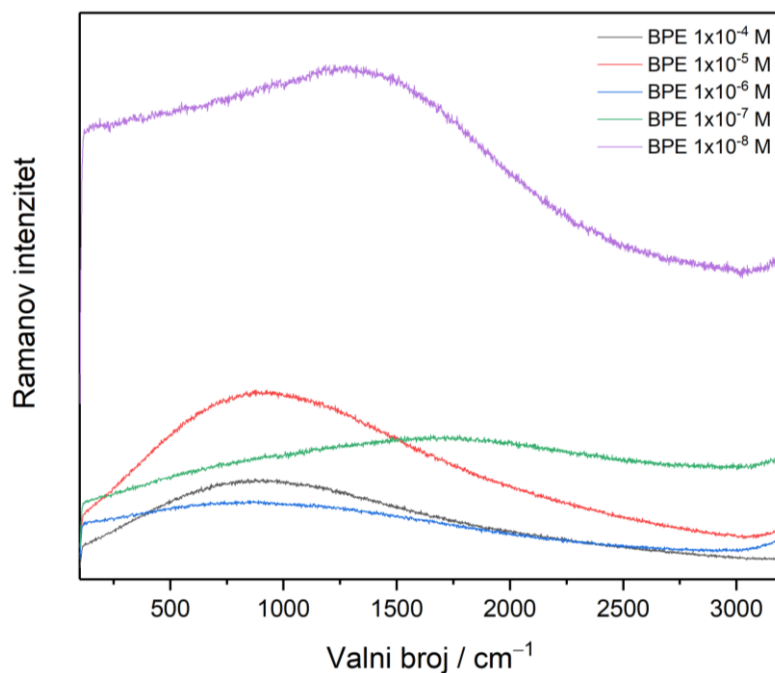
Slika D6. Raman spektar krutine tetraklorozlatne (III) kiseline snimljen pri pobudi lasera od 785 nm i snazi lasera 3,2 mW.



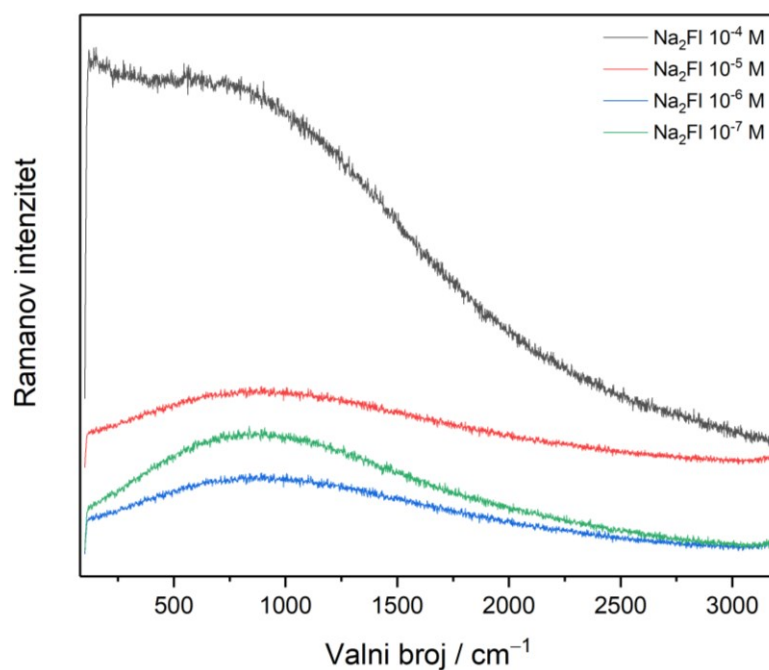
Slika D7. Raman spektri četiri različite vrste sintetiziranih zlatnih nanočestica crno (**AuNP**), crveno (**AuNP\_Ag**), plavo (**AuNP(+PVP)**) i zeleno (**AuNP\_Ag(+PVP)**) snimljenih pri pobudi lasera od 532 nm i snazi lasera od 12,1 mW (**AuNP**) 6,1 mW(**AuNP\_Ag**), 12,1 mW(**AuNP(+PVP)**), te 6,1 mW (**AuNP\_Ag(+PVP)**).



Slika D8. SERS spektri **R6G** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP** pobudom pri 532 nm i snazi lasera  $1,2 \times 10^{-4}$  mW.

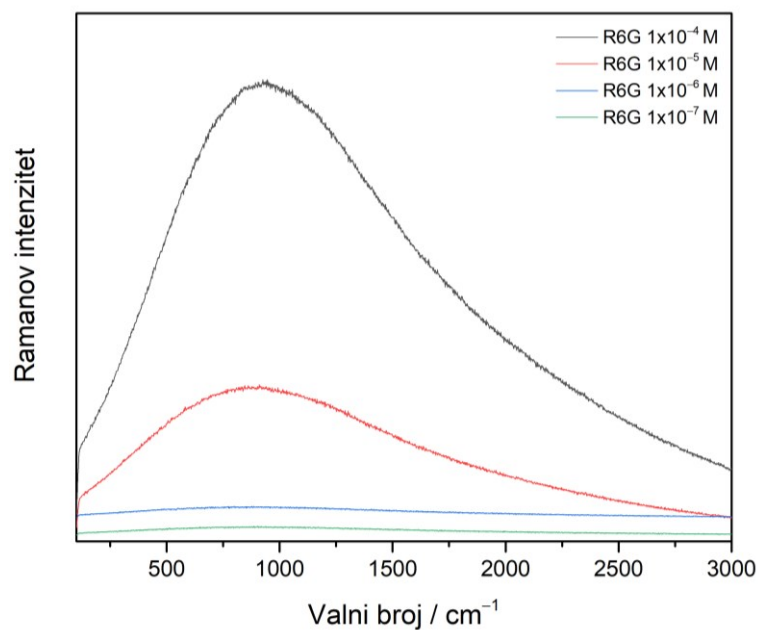


Slika D9. SERS spektri **BPE** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP** pobudom pri 532 nm i snazi lasera 0,61 mW za sve koncentracije osim  $1 \times 10^{-8}$  mol  $\text{L}^{-1}$  gdje snaga lasera iznosi 1,2 mW.

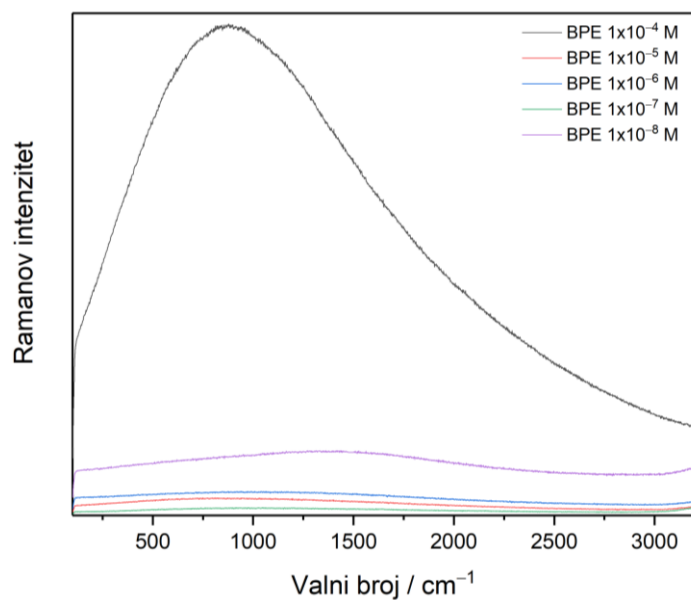


Slika D10. SERS spektri  **$\text{Na}_2\text{FI}$**  različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP** pobudom pri 532 nm i snazi lasera 0,06 mW.

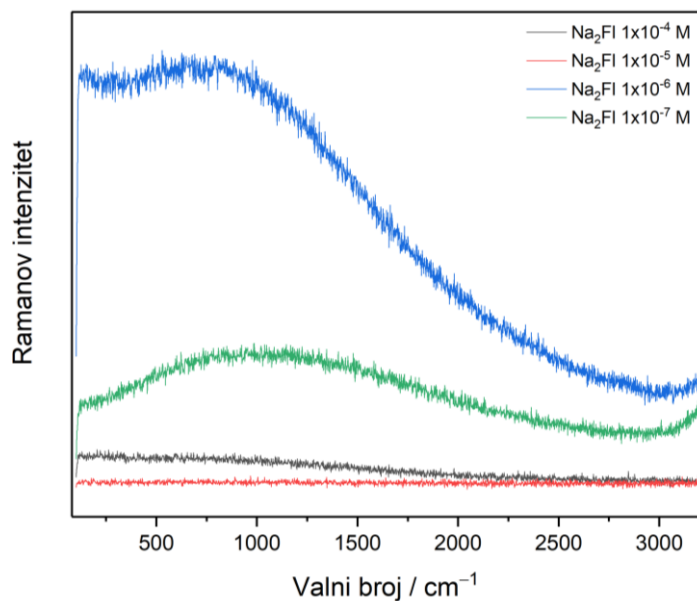




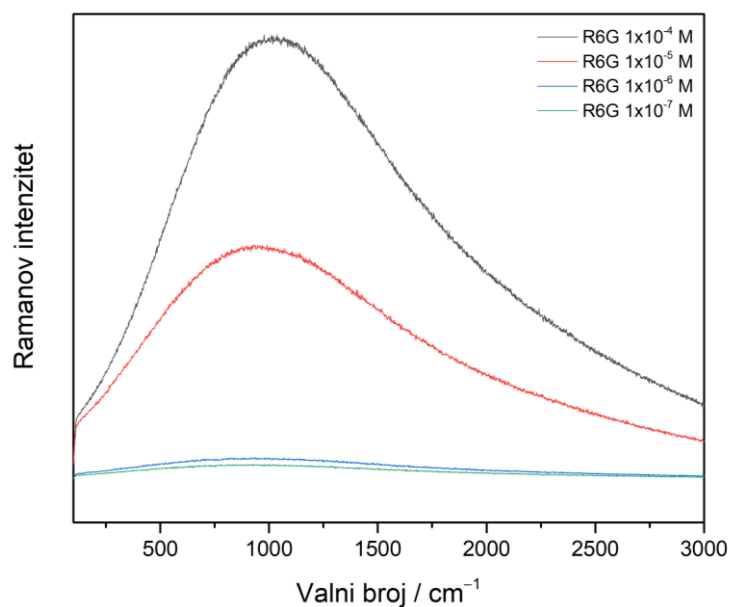
Slika D11. SERS spektri **R6G** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag** pobudom pri 532 nm i snazi lasera  $1,2 \times 10^{-7}$  mW.



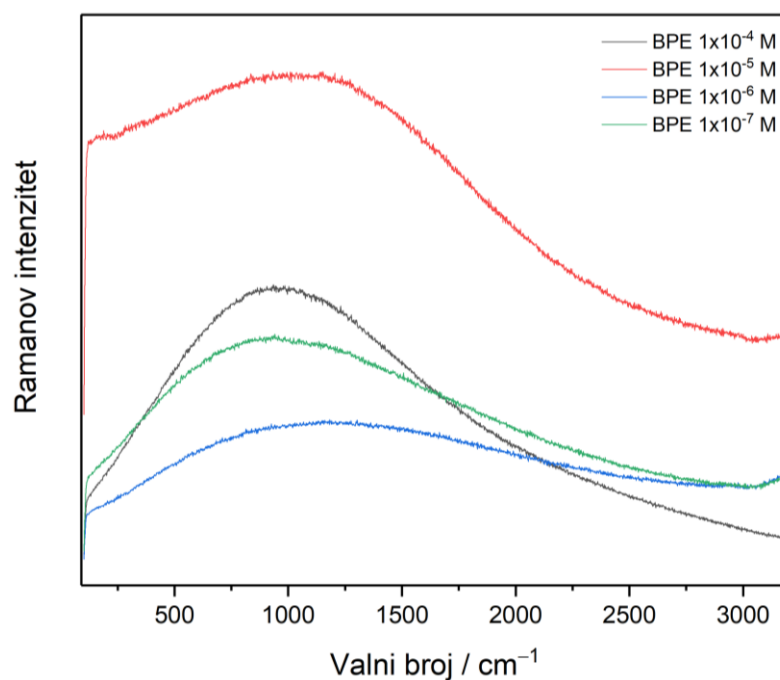
Slika D12. SERS spektri **BPE** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag** pobudom pri 532 nm i snazi lasera 0,61 mW za sve koncentracije osim  $1 \times 10^{-8}$  mol  $\text{L}^{-1}$  gdje snaga lasera iznosi 1,2 mW.



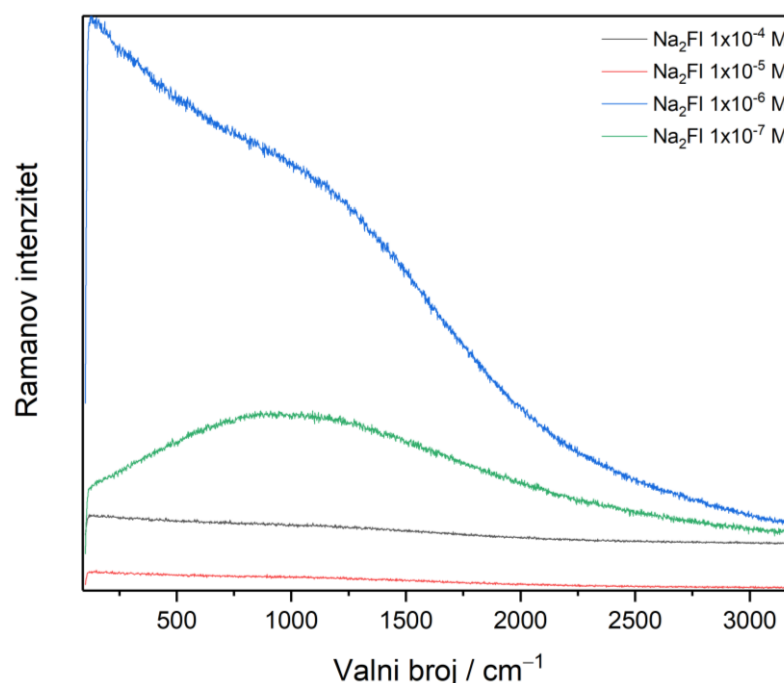
Slika D13. SERS spektri **Na<sub>2</sub>FI** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag** pobudom pri 532 nm i snazi lasera od  $1,2 \times 10^{-4}$  mW za koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  /  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> te 0,06 mW za koncentracije  $1 \times 10^{-6}$  /  $1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>.



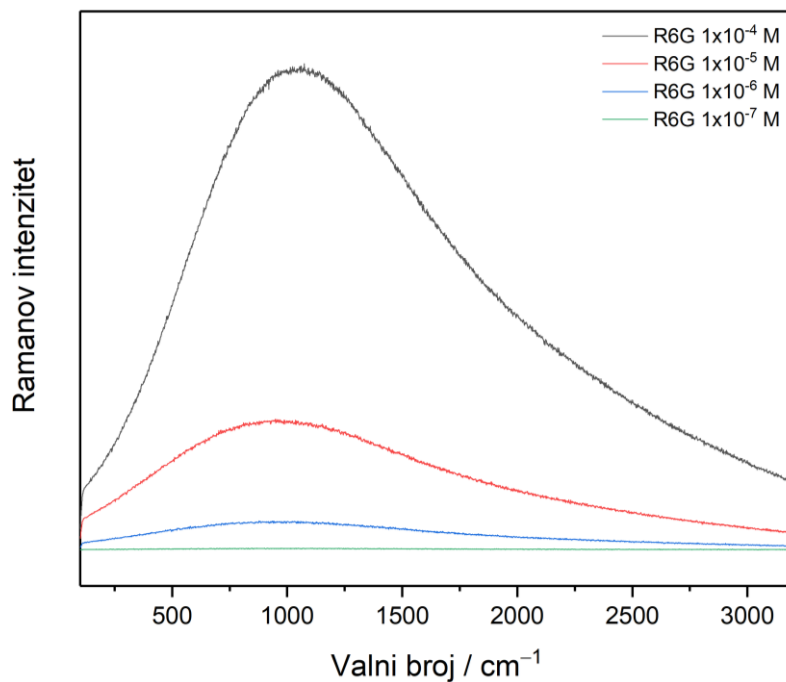
Slika D14. SERS spektri **R6G** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP(+PVP)** pobudom pri 532 nm i snazi lasera  $1,2 \times 10^{-4}$  mW.



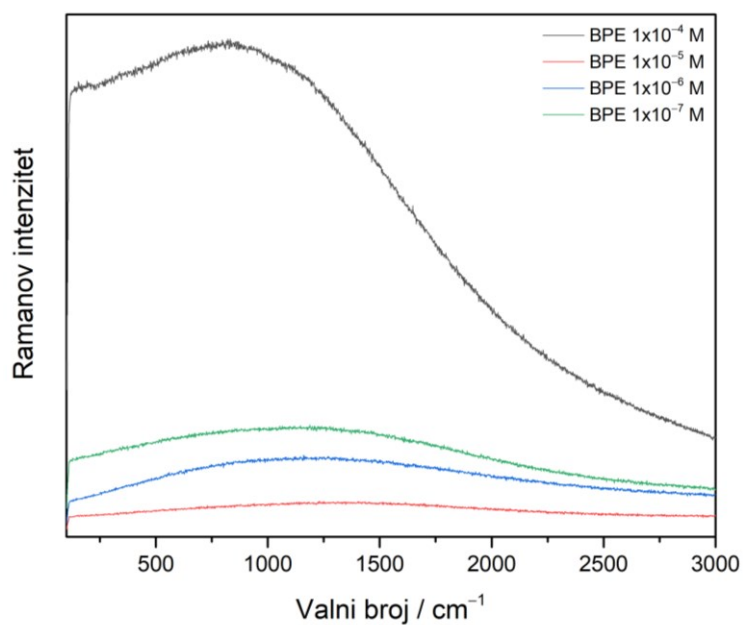
Slika D15. SERS spektri **BPE** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP(+PVP)** pobudom pri 532 nm i snazi lasera 0,06 mW za koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  mol  $\text{L}^{-1}$  te 0,06 mW za koncentracije  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  i  $1 \times 10^{-7}$  mol  $\text{L}^{-1}$ .



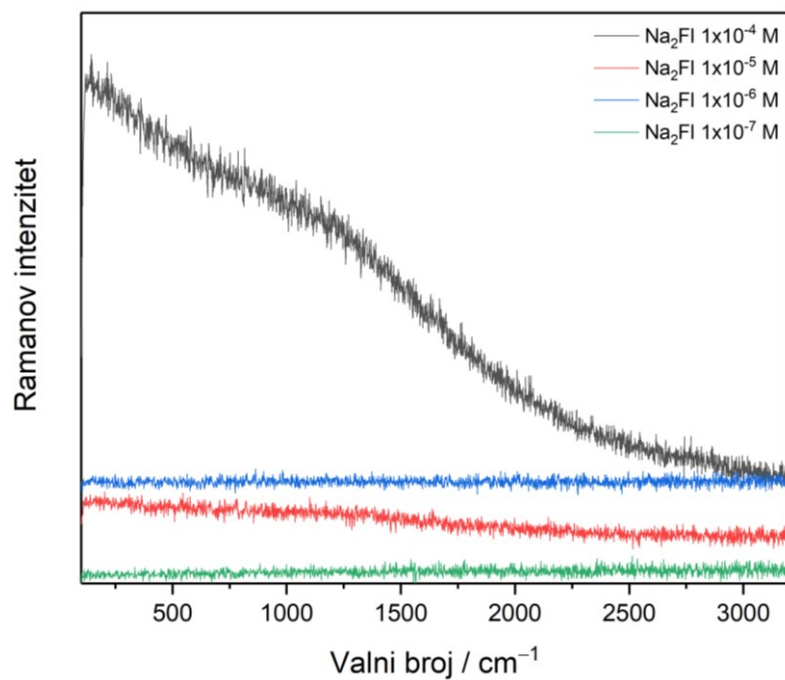
Slika D16. SERS spektri  **$\text{Na}_2\text{FI}$**  različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP(+PVP)** pobudom pri 532 nm i snazi lasera  $1,2 \times 10^{-4}$  mW za koncentracije  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  mol  $\text{L}^{-1}$  te 0,06 mW za koncentraciju  $1 \times 10^{-7}$  mol  $\text{L}^{-1}$ .



Slika D17. SERS spektri **R6G** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag(+PVP)** pobudom pri 532 nm i snazi lasera  $1,2 \times 10^{-4}$  mW.



Slika D18. SERS spektri **BPE** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag(+PVP)** pobudom pri 532 nm i snage lasera od 0,12 mW.



Slika D19. SERS spektri **Na<sub>2</sub>FI** različitih koncentracija snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag(+PVP)** pobudom pri 532 nm i snazi lasera  $1,2 \times 10^{-4}$  mW.

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Ivana Radoslavić

Datum rođenja: 23. svibnja 1997.

Mjesto rođenja: Split

### Obrazovanje

2004.–2012. Osnovna škola Petra Hektorovića Stari Grad

2012.–2016. Srednja škola Hvar – podružnica Jelsa – Opća gimnazija Jelsa

2016.–2020. Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2020.– Diplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2017., 2018., 2019. Dan i noć na PMF–u