Površinski pojačano Ramanovo raspršenje na nanočesticama srebra u koloidnoj suspenziji i na čvrstoj podlozi

Banović, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:496169

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-27**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Helena Banović

POVRŠINSKI POJAČANO RAMANOVO RASPRŠENJE NA NANOČESTICAMA SREBRA U KOLOIDNOJ SUSPENZIJI I NA ČVRSTOJ PODLOZI

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Snežane Miljanić i neposrednim voditeljstvom doc. dr. sc. Adriane Kenđel.

Zahvale

Najveću zahvalu dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Snežani Miljanić koja je svojim znanjem upotpunila moje cjelokupno akademsko iskustvo. Zahvaljujem joj se na izboru teme, strpljenju i razumijevanju tijekom izrade diplomskog rada te na svim konstruktivnim savjetima i uloženom trudu.

Isto tako, veliko hvala neposrednoj voditeljici doc. dr. sc. Adriani Kenđel na stručnosti, susretljivosti i nesebičnoj pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Zahvaljujem se i svim mojim dragim prijateljima i kolegama na podršci i na svim lijepim zajedničkim trenutcima koji će zauvijek ostati dio mene.

Posebno hvala mojim roditeljima na neizmjernoj ljubavi i podršci tijekom studiranja. Bez njihove potpore ne bih bila tu gdje jesam.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **X**
ABSTRACT ..... **XII**
§ 1. UVOD **1**
§ 2. LITERATURNI PREGLED **2**
2.1. Ramanova spektroskopija **2**
2.2. Površinski pojačana Ramanova spektroskopija **5**
2.2.1. Mehanizmi pojačanja raspršenja *6*
2.2.1.1. Elektromagnetski mehanizam *6*
2.2.1.2. Kemijski mehanizam *7*
2.2.2. Metalni supstrati *8*
2.2.3. Modelne molekule *12*
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **15**
3.1. Kemikalije **15**
3.2. Mjerni uređaji **16**
3.3. Priprava supstrata srebra **17**
3.3.1. Priprava koloida srebra *17*
3.3.2. Priprava otopina *18*
3.3.3. Priprava mjernih uzoraka u koloidnim suspenzijama *18*
3.3.3.1. Svježe pripravljena koloidna suspenzija *18*
3.3.3.2. Koncentrirana koloidna suspenzija *19*
3.3.3.3. Agregirana koloidna suspenzija *19*
3.3.4.1. Stakleni filter-papir *19*
3.3.4.2. Tretirano staklo *20*
3.3.4.3. Silanizirano staklo *20*
3.4. SERS učinkovitost supstrata srebra **21**
3.4.1. Koncentracijski ovisni SERS spektri *21*
3.4.2. Reproducibilnost *21*
3.4.3. Faktor pojačanja *22*
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA **24**
4.1. Ramanovi spektri **24**
4.2. Koncentracijski ovisni SERS spektri **29**
4.2.1. Svježe pripravljena koloidna suspenzija *29*

4.2.2. Koncentrirana koloidna suspenzija *32*
4.2.3. Agregirana koloidna suspenzija *34*
4.2.4. Stakleni filter-papir *39*
4.2.5. Tretirano staklo *42*
4.2.6. Silanizirano staklo *45*
4.3. Reproducibilnost **48**
4.4. Faktor pojačanja **61**
§ 5. ZAKLJUČAK **63**
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI) **65**
§ 7. LITERATURNI IZVORI **66**
§ 8. DODATAK ..... **XV**
§ 9. ŽIVOTOPIS ..... **XVII**

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

POVRŠINSKI POJAČANO RAMANOVO RASPRŠENJE NA NANOČESTICAMA SREBRA U KOLOIDNOJ SUSPENZIJI I NA ČVRSTOJ PODLOZI

Helena Banović

Istražena je SERS učinkovitost nanočestica srebra dispergiranih u koloidnim suspenzijama: svježe pripravljenoj, koncentriranoj i agregiranoj, te imobiliziranih na čvrstim podlogama: staklenom filter-papiru, staklu tretiranom s fluorovodičnom kiselinom i staklu silaniziranom s (3-aminopropil)trimetoskisilanom. Nanočestice srebra pripravljene su redukcijom srebrova(I) nitrata s trinatrijevim citratom te su nosile negativan naboj citratnih iona na površini. Rodamin 6G i fluorescein korišteni su kao modelne molekule pozitivnog i negativnog naboja. Zahvaljujući elektrostatskim privlačnim interakcijama pojačano Ramanovo raspršenje opaženo je za rodamin 6G sa svim istraživanim SERS supstratima, posebice u agregiranoj suspenziji srebra (EF = $5{,}68\times10^6$). Ramanovo raspršenje fluoresceina pojačano je samo na nanočesticama srebra imobiliziranim na staklu, i to najviše na nakupinama nanočestica u obliku prstena kave (EF = $8{,}23\times10^3$). Koloidne suspenzije srebra reproducibilniji su SERS supstrati od čvrstih SERS supstrata, što je posljedica nejednolike raspodjele nanočestica na čvrstim podlogama i otežanog fokusiranja zrake na uzorak prilikom snimanja spektra.

(xii + 67 stranica, 39 slika, 3 tablica, 23 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: fluorescein, koloid, Ramanovo raspršenje, rodamin 6G, SERS, srebro, staklo

Mentor: prof. dr. sc. Snežana Miljanić
Neposredni voditelj: doc. dr. sc. Adriana Kenđel

Ocjenitelji:
1. prof. dr. sc. Snežana Miljanić
2. prof. dr. sc. Željka Soldin
3. prof. dr. sc. Ines Primožič
Zamjena: doc. dr. sc. Adriana Kenđel

Datum diplomskog ispita: 16. prosinca 2020.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING ON SILVER NANOPARTICLES IN COLLOIDAL SUSPENSION AND ON A SOLID SUPPORT

Helena Banović

The SERS efficiency of silver nanoparticles dispersed in colloidal suspensions: freshly prepared, concentrated and aggregated, and immobilized on solid substrates: glass filter paper, hydrofluoric acid-treated glass and glass silanized with (3-aminopropyl)trimethoxysilane was investigated. Silver nanoparticles were prepared by reduction of silver(I) nitrate with trisodium citrate and carried a negative charge of citrate ions on the surface. Rhodamine 6G and fluorescein were used as model molecules of positive and negative charge. Owing to electrostatic attractive interactions, the enhanced Raman scattering was observed for rhodamine 6G with all investigated SERS substrates, especially in the aggregated silver suspension (EF = 5.68×10^6). The Raman scattering of fluorescein was enhanced only onsilver nanoparticles immobilized on glass, at most on the coffee ring-shaped aggregates (EF = 8.23×10^3). The silver colloidal suspensions were more reproducible SERS substrates than the solid SERS substrates, due to the uneven distribution of nanoparticles on the solid substrates and the difficulty of focusing the laser beam on the sample when recording the spectrum.

(xii + 67 pages, 39 figures, 3 tables, 23 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: colloid, fluorescein, glass, Raman scattering, rhodamine 6G, SERS, silver

Mentor: Dr. Snežana Miljanić, Professor
Assistant mentor: Dr. Adriana Kenđel, Assistant Professor

Reviewers:
1. Dr. Snežana Miljanić, Professor
2. Dr. Željka Soldin, Professor
3. Dr. Ines Primožič, Professor
Substitute: Dr. Adriana Kenđel, Assistant Professor

Date of exam: 16 December 2020

§ 1. UVOD

Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (engl. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS) je metoda vibracijske spektroskopije koja se koristi za detekciju i strukturnu analizu molekule analita smještene na ili u neposrednoj blizini SERS supstrata, nanostrukturirane površine metala. Adsorpcijom molekule na površinu metala, najčešće srebra ili zlata, intenzitet raspršenog zračenja se može povećati i do 10^6 puta. Takvo pojačanje raspršenja se objašnjava pomoću dvije jednako valjane teorije, a to su elektromagnetski mehanizam te kemijski mehanizam ili mehanizam pojačanja raspršenja uslijed prijenosa naboja. SERS spektroskopija se široko primjenjuje budući da se radi o nedestruktivnoj metodi visoke osjetljivosti koja omogućava detekciju analita pri vrlo niskim koncentracijama.[1]

Cilj ovog diplomskog rada je bio ispitati SERS učinkovitost supstrata srebra u obliku nanočestica srebra dispergiranih u koloidnim suspenzijama i imobiliziranih na čvrstim podlogama, pomoću modelne molekule pozitivnog naboja, rodamina 6G, i molekule negativnog naboja, fluoresceina. Rodamin 6G i fluorescein su organske molekule koje pripadaju skupini fluorescentnih ksantenskih bojila, a zbog svojih strukturnih karakteristika dobro raspršuju zračenje.[2] Adsorpcijom na nanostrukturiranu površinu metala pojačava se raspršeno zračenje i gasi fluorescencija što omogućava njihovu strukturnu analizu.

Nanočestice srebra su pripravljene redukcijom srebrova(I) nitrata s trinatrijevim citratom. Uz svježe pripravljenu koloidnu suspenziju nanočestica srebra, kao supstrati su korištene i koncentrirana i agregirana koloidna suspenzija. Kao čvrste podloge za imobilizaciju nanočestica srebra korišteni su stakleni-filter papir, staklo tretirano s fluorovodičnom kiselinom te staklo silanizirano s (3-aminopropil)trimetoksisilanom. U svrhu ispitivanja učinkovitosti supstrata srebra snimljeni su koncentracijski ovisni SERS spektri otopina modelnih molekula na svakom pojedinom supstratu te je određena reproducibilnost i izračunat faktor pojačanja za svaki supstrat. Opaženi SERS spektri rodamina 6G i fluoresceina su interpretirani s obzirom na strukturne karakteristike modelnih molekula i karakteristike korištenih SERS supstrata.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Ramanova spektroskopija

Ramanova spektroskopija je metoda vibracijske spektroskopije komplementarna IR spektroskopiji. Metoda se temelji na neelastičnom, Ramanovom raspršenju elektromagnetskog zračenja do kojega dolazi uslijed interakcije primarnog kvanta svjetlosti s ciljnom molekulom.

Ramanova spektroskopija koristi monokromatsko upadno zračenje koherentnog snopa izvor kojega je laser. Za tu vrstu spektroskopije je važno da je molekula čija se struktura proučava polarizabilna,[3] odnosno da se prilikom interakcije s upadnim zračenjem lako deformira elektronski oblak oko jezgre. Prilikom distorzije elektronskog oblaka elektroni prelaze u takozvano virtualno stanje, stanje više energije koje ne odgovara niti jednom pravom energijskom stanju molekule. Energija virtualnog stanja je određena frekvencijom lasera. Takvo stanje karakterizira izrazita nestabilnost te se elektroni koji se nađu u tom stanju vrlo brzo otpuštaju u obliku raspršenog zračenja. Za raspršenje nije nužno da upadni fotoni imaju energiju koja odgovara razlici između dva energijska stanja molekule stoga se mogu koristiti laseri u različitom području elektromagnetskog spektra (ultraljubičastom, vidljivom ili bliskom infracrvenom području).

Prilikom interakcije upadnog zračenja s elektronskim oblakom molekule ista se može nalaziti u osnovnom ili pobuđenom vibracijskom stanju osnovnog elektronskog stanja i ovisno o tome razlikuju se dvije vrste Ramanovog raspršenja, Stokesovo i anti-Stokesovo. Ukoliko molekula uslijed pobude prelazi iz osnovnog vibracijskog stanja osnovnog elektronskog stanja u virtualno stanje i potom se vraća u više vibracijsko stanje osnovnog elektronskog stanja govori se o Stokesovom povratnom raspršenju, raspršenju manje frekvencije i veće valne duljine od upadnog zračenja. Ako se prijelaz u virtualno stanje događa iz višeg vibracijskog stanja osnovnog elektronskog stanja, te se iz virtualnog stanja molekula vraća u osnovno vibracijsko stanje osnovnog elektronskog stanja riječ je o anti-Stokesovom povratnom raspršenju, raspršenju veće frekvencije, a manje valne duljine od zračenja lasera.[3]

Raspršeno zračenje se detektira pod određenim kutom obzirom na smjer upadnog zračenja, a intenzitet ovisi o polarizabilnosti molekule i energiji laserskog snopa. Stokesovo raspršenje je vjerojatnije od anti-Stokesovog te je ujedno i jačeg intenziteta budući da se prema

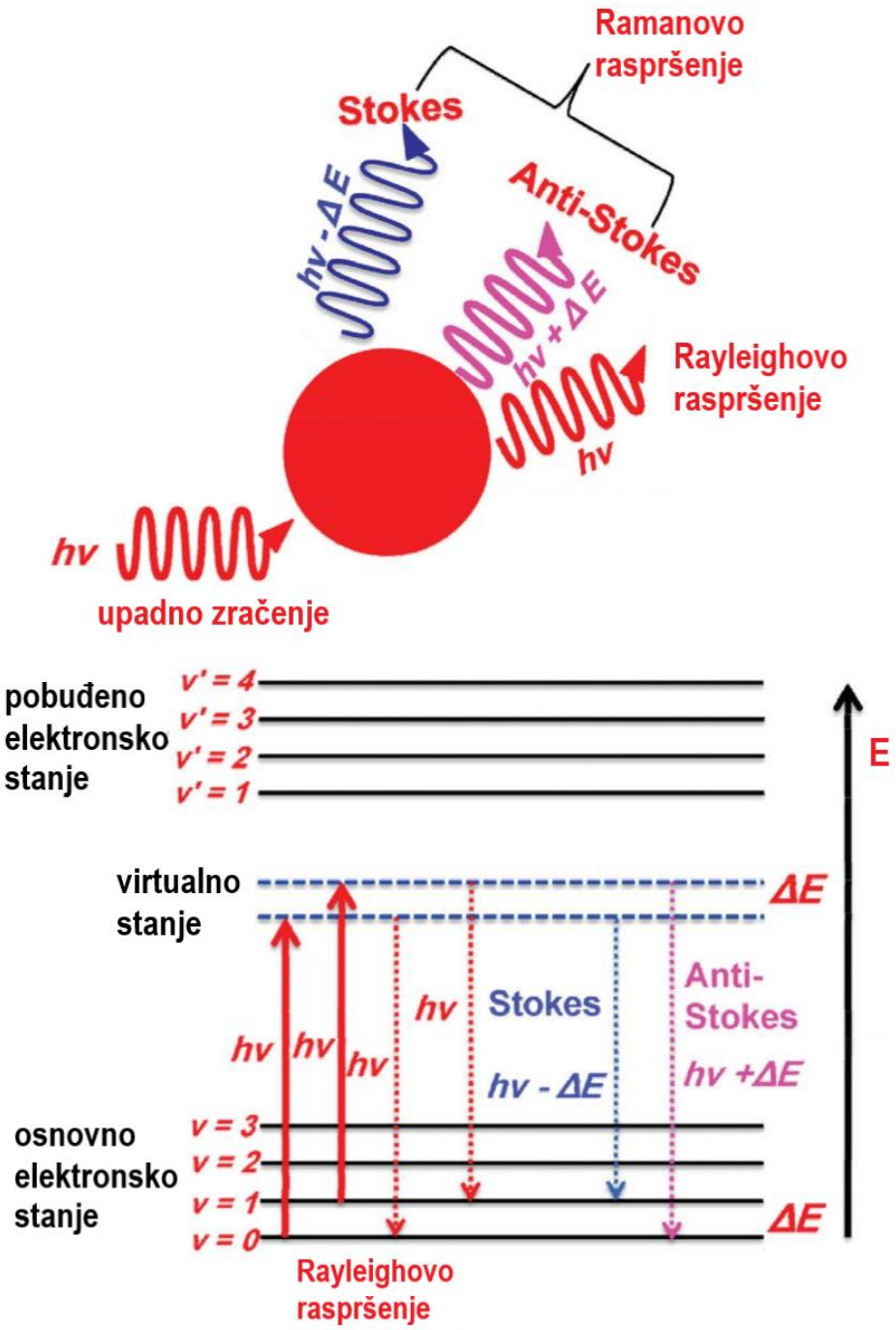
Boltzmannovoj raspodjeli većina molekula pri sobnoj temperaturi nalazi u osnovnom vibracijskom stanju osnovnog elektronskog stanja dok samo nekolicina njih zauzima pobuđena vibracijska stanja. Iz tog razloga se najčešće analizira samo Stokesov spektar. Ramanov (Stokesov) spektar prikazuje ovisnost Ramanovog intenziteta o valnom broju, odnosno razlici valnih brojeva upadnog zračenja lasera i raspršenog zračenja.[3]

Fluorescencija, kao način radijativnog prijelaza iz pobuđenog stanja, može zasjeniti proces Stokesovog raspršenja. U svrhu izbjegavanja tog neželjenog procesa koriste se laseri manje energije, odnosno veće valne duljine koja nije dovoljna za prijelaz u pobuđeno elektronsko stanje.[4] Često je korišten diodni laser zračenje kojega je na granici između vidljivog i bliskog infracrvenog područja.

Uz neelastično raspršenje zračenja postoji i ono elastično, poznato pod nazivom Rayleighovo raspršenje. Kod Rayleighovog raspršenja ne dolazi do značajnog prijenosa energije, odnosno energija raspršenog zračenja je jednaka energiji primarnog, upadnog zračenja lasera. Shematski prikaz Rayleighovog i Ramanovog, Stokesovog i anti-Stokesovog raspršenja dan je na slici 1.

Općenito gledano, Ramanovo, neelastično raspršenje je puno slabijeg intenziteta u odnosu na Rayleighovo raspršenje što je povezano sa činjenicom da se samo jedan od ukupno 10^6–10^8 fotona neelastično rasprši.[4] Također, u procesu Ramanova raspršenja, interakcija upadnog zračenja s elektronskim oblakom, uzrokuje pomak jezgri atoma što utječe na sami intenzitet raspršenog zračenja budući da jezgre imaju znatno veću masu od elektrona.

Ramanova spektroskopija primarno se primjenjuje pri istraživanju molekulskih struktura. Pogodna je za analizu vodenih otopina budući da voda slabo raspršuje zračenje. Jednostavnost metode i mala količina uzorka potrebna za analizu dodatna je prednost Ramanove spektoskopije. Uz prednosti, postoje i nedostatci metode, a kao glavni nedostatak se ističe slaba osjetljivost iste. Upravo u svrhu povećanja osjetljivosti metode razvijena je spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja.[4]



Slika 1. Shematski prikaz Rayleighovog i Ramanovog raspršenja.[4]

2.2. Površinski pojačana Ramanova spektroskopija

U odnosu na klasičnu Ramanovu spektroskopiju primjenom površinski pojačane Ramanove spektroskopije intenzitet raspršenog zračenja se može povećati za 10^6 puta, što tu metodu čini visoko osjetljivom za pročuvanje molekulske strukture analita prisutnog u niskim koncentracijama.

Površinski pojačano Ramanovo raspršenje je po prvi puta otkriveno 1974. godine od strane britanskog znanstvenika M. Fleischmana i njegovih suradnika. Naime, oni su opazili pojačanje Ramanovog raspršenja piridina, heterocikličkog spoja, adsorbiranog iz vodene otopine na srebrovu elektrodu hrapave površine, no taj efekt pojačanja su pripisali isključivo povećanju površine elektrode uslijed hrapavosti čime je bila omogućena adsorpcija većeg broja molekula piridina. Tri godine kasnije druga skupina znanstvenika, Jeanmarie i Van Duyne te Albreicht i Creighton, je usporedbom faktora pojačanja raspršenja piridina došla do činjenice da razlog pojačanja intenziteta Ramanovog raspršenja nije samo povećanje površine, nego da on leži i u efektu površinskog pojačanja raspršenja, takozvanom SERS efektu.[5]

Osim metalnih elektroda hrapavih površina kao SERS aktivne površine danas se koriste i nanočestice metala u koloidnim suspenzijama ili na čvrstoj podlozi, te metalni filmovi. Uvjet da bi neka metalna površina bila aktivna, odnosno da bi pojačala intenzitet raspršenog zračenja, je taj da je na nju adsorbiran analit bilo fizikalnim bilo kemijskim putem.

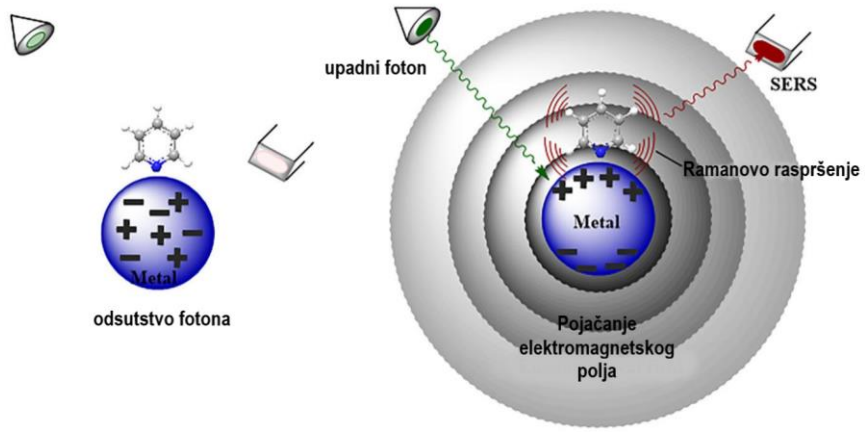
Površinski pojačana Ramanova spektroskopija je visoko osjetljiva i selektivna metoda s kojom se mogu detektirati isključivo molekule koje se nalaze blizu površine metala.[6] SERS spektar molekule od interesa se u većini slučajeva razlikuje od klasičnog Ramanovog spektra i njegova interpretacija nije u potpunosti jednostavna. Vezanjem molekule s centrom simetrije na metalnu površinu, ista gubi to svojstvo te u tome slučaju prestaje vrijediti pravilo međusobnog isključenja. Iz tog razloga se u SERS spektru mogu pojaviti nove vrpce koje odgovaraju IR aktivnim vibracijama molekule što dodatno otežava analizu. Također, neke vrpce mogu biti znatno jačeg intenziteta nego u klasičnom Ramanovom spektru, a neke mogu i u potpunosti izostati što je pak povezano s orijentacijom molekula na površini metala. Iako interpretacija SERS spektra zna biti otežana, metoda površinski pojačanog Ramanovog raspršenja je široko primjenjivana budući da je nedestruktivna i omogućuje detekciju molekula in situ i u vodenim otopinama.[4]

2.2.1. Mehanizmi pojačanja raspršenja

S obzirom na vrstu adsorpcije ili vezanja analita na hrapavu metalnu površinu postoje dvije jednako valjane teorije kojima se nastoji pobliže objasniti i opisati efekt površinskog pojačanja intenziteta raspršenog zračenja. To su elektromagnetski mehanizam te kemijski mehanizam ili mehanizam pojačanja uslijed prijenosa naboja.

2.2.1.1. Elektromagnetski mehanizam

Radi lakšeg shvaćanja istog, elektromagnetski mehanizam pojačanja raspršenja se aproksimira modelom metalne sfere, pri čemu sfera predstavlja nanočesticu metala čija je površina prekrivena vodljivim elektronima koji se mogu slobodno kretati po hrapavoj površini. Ukoliko se takva nanostrukturirana hrapava površina ozrači laserom određene valne duljine vodljivi elektroni počinju koherentno oscilirati te se inducira dipol nanočestice metala i nanočestica se polarizira. Takve oscilacije vodljivih elektrona nazivaju se površinskim plazmonima. Kada frekvencija oscilacija vodljivih elektrona nanočestica metala rezonira s frekvencijom lasera stvara se jako električno polje oko molekule adsorbirane na površinu metala koje uzrokuje njenu jaču polarizaciju čime se povećava intenzitet Ramanovog raspršenja adsorbirane molekule.[7] Elektromagnetski mehanizam pretpostavlja da je molekula analita adsorbirana ili se nalazi vrlo blizu površini metala te je shematski prikazan na slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz elektromagnetskog mehanizma pojačanja raspršenja molekule analita.[7]

Veličina pojačanja električnog polja osim o frekvenciji ovisi i o veličini i obliku nanostruktura metala te načinu na koji se organiziraju u nakupine. Naime, najveće pojačanje intenziteta raspršenog zračenja adsorbirane molekule se opaža na takozvanim vrućim točkama („hot spots“), mjestima gdje dvije nanočestice metala agregiraju i na kojima su električna polja vrlo jaka.

Električno polje na površini metalne sfere inducirano laserskim upadnim zračenjem može se opisati izrazom:

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

pri čemu E_r označava ukupno električno polje metala na udaljenosti r od površine sfere dok je slovom a označen promjer sfere koji je znatno manji od valne duljine upadnog zračenja. Simbolom E_0 je označeno električno polje lasera, a θ predstavlja kut u odnosu na smjer električnog polja. Simbolom g je označena konstanta ovisna o dielektričnoj konstanti metalne sfere i okolnog medija. Vrijednost dielektrične konstante metalne sfere ovisi o frekvenciji upadnog zračenja lasera.

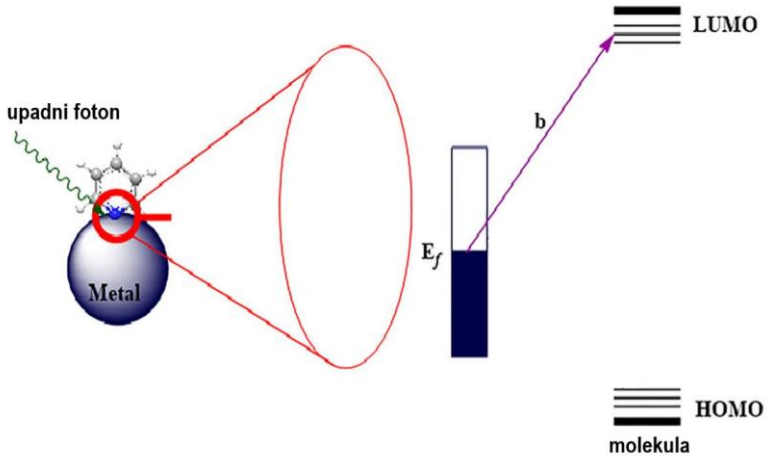
Električnom polju na nanostrukturiranoj površini metala najviše doprinose dvije komponente: električno polje okomito na površinu i polje paralelno s njome. Električno polje okomito na površinu veće je jakosti od polja paralelnog s površinom, te će najveće pojačanje intenziteta raspršenog zračenja biti opaženo za molekulu adsorbiranu i polariziranu okomito na površinu metala. Također jakost električnog polja opada s r^3 odnosno s udaljenošću molekule analita od površine nanočestice metala što se odražava na intenzitet raspršenog zračenja molekule.

2.2.1.2. Kemijski mehanizam

Kemijski mehanizam ili mehanizam pojačanja uslijed prijenosa naboja pretpostavlja da je analit kemijski vezan na hrapavu, nanostrukturiranu površinu metala. Kemijska veza se najčešće

ostvaruje preko atoma dušika, sumpora ili kisika i omogućava prijenos naboja s metala na molekulu analita i obrnuto.

Uslijed djelovanja upadnog zračenja na površinu metala s kemiapsorbiranom molekulom analita dolazi do prijenosa naboja. Pod prijenosom naboja se podrazumijeva prijelaz elektrona iz Fermijevog nivoa metala u energijski najnižu elektronima nepopunjenu molekulsku orbitalu (LUMO orbitala) pri čemu se povećava polarizabilnost molekule (slika 3). Nakon kratkotrajne pobude molekule u virtualno stanje, slijedi povratak elektrona u metal pri čemu se zračenje raspršuje.[7]



Slika 3. Shematski prikaz procesa prijenosa naboja s metala na molekulu uslijed djelovanja upadnog zračenja.[7]

Kemijsko pojačanje intenziteta raspršenog zračenja kratkog je dosega u usporedbi s elektromagnetskim pojačanjem i ovisno je o strukturnim i elektronskim značajkama molekule analita. Također, rezultantno pojačanje zračenja uslijed prijenosa naboja je za $10–10^3$ iz čega proizlazi da ukupnom pojačanju intenziteta raspršenog zračenja više doprinosi elektromagnetski mehanizam budući da nije ograničen na prvi sloj molekula analita, već se opaža i iz udaljenijih slojeva.[7]

2.2.2. Metalni supstrati

Za uspješnost metode površinski pojačanog Ramanovog raspršenja važno je pomno odabrati i pripraviti metalni supstrat na koji će se adsorbirati molekula analita. Osobito je važno da

tijekom priprave ne zaostanu nečistoće jer one mogu rezultirati novim vrpcama u spektru što dodatno otežava interpretaciju istog.[5] S obzirom na učinkovitost najčešće korišteni metali u pripravi supstrata su srebro i zlato. Površine drugih metala, poput bakra i željeza, također pojačavaju intenzitet raspršenog zračenja, no u znatno manjoj mjeri razlog čemu leži u njihovoj visokoj kemijskoj reaktivnosti koja dovodi do promjene prirode površine i gubitka hrapavosti koja je ključna za opažanje SERS efekta.

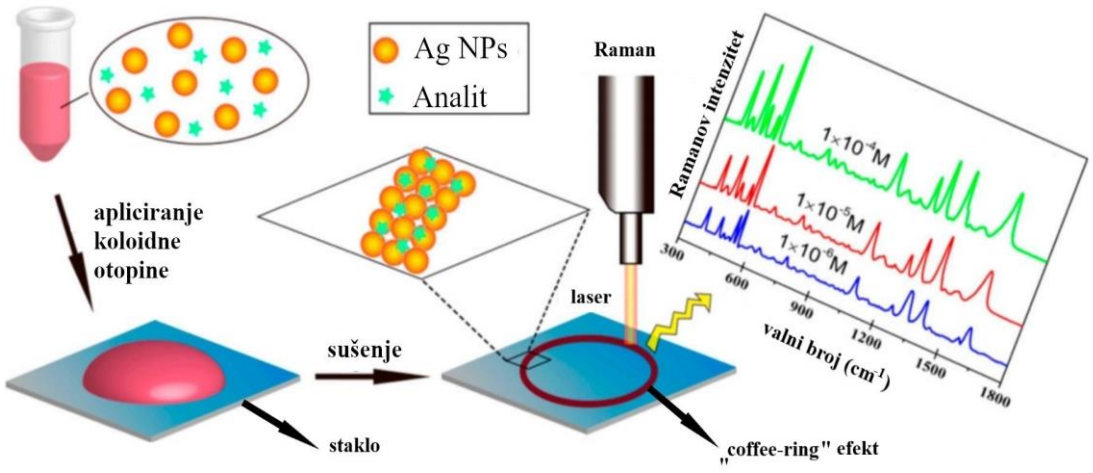
Idealni supstrati za površinski pojačanu Ramanovu spektroskopiju su oni visoke čistoće i učinkovitosti, dobre stabilnosti i reproducibilnosti, te visoke osjetljivosti. Homogenost u veličini i obliku nanočestica metala, te kontroliranje njihove agregacije povećava reproducibilnost supstrata. Metalni supstrat svih navedenih karakteristika ne postoji, već se ovisno o vrsti analize primjenjuje supstrat s odgovarajućim svojstvom. Primjerice za kvantitativnu analizu je bitna dobra reproducibilnost supstrata, dok je za kvalitativnu analizu najbitnija visoka učinkovitost, odnosno maksimalno pojačanje raspršenja kako bi se mogle detektirati molekule prisutne u vrlo niskim koncentracijama.[5]

Kao SERS supstrati danas se aktivno koriste koloidne suspenzije nanočestica metala, nanočestice metala na čvrstoj podlozi te nanostrukture sintetizirane izravno na čvrstim podlogama.[8] U rjeđe korištene supstrate za opaženje SERS efekta ubrajaju se metalne elektrode hrapave površine i metalni filmovi.

Zbog svoje jednostavne i jeftine priprave najčešće su u upotrebi koloidne suspenzije nanočestica metala. Takve suspenzije se pripravljaju redukcijom soli metala s odgovarajućim reducirajućim agensom. Kao reducirajući agensi najčešće se upotrebljavaju trinatrijev citrat, natrijev borhidrid, hidrazin te hidroksilamin hidroklorid.[9] Promjer nanočestica metala se kreće između 10 i 100 nm.[4] Tijekom priprave važno je kontrolirati njihovu veličinu i geometriju mijenjanjem eksperimentalnih uvjeta poput temperature i koncentracije reducirajućeg agensa, s time da je kontroliranje geometrije složenije od kontrole veličine. Ta dva parametra, veličina i geometrija nanočestice metala, uvelike utječu na rezonatnu frekvenciju površinskih plazmona, a samim time i na pojačanje intenziteta raspršenja. U svrhu pojačanja raspršenja koloidne suspenzije nanočestica metala se mogu dodatno agregirati dodatkom agensa anorganske ili organske prirode. Agregacijom nanočestica mijenja se naboj što smanjuje elektrostatsku barijeru prilikom adsorpcije analita i povećava broj vrućih točaka u kojima se opaža najveće pojačanje raspršenja adsobirane molekule analita. Stupanj agregacije je teško kontrolirati, pa prekomjerna agregacija može dovesti do nastanka velikih klastera koji ne pokazuju plazmonsku

aktivnost ili je ona u velikoj mjeri smanjena što za posljedicu ima izostanak signala u spektru molekule analita.[10]

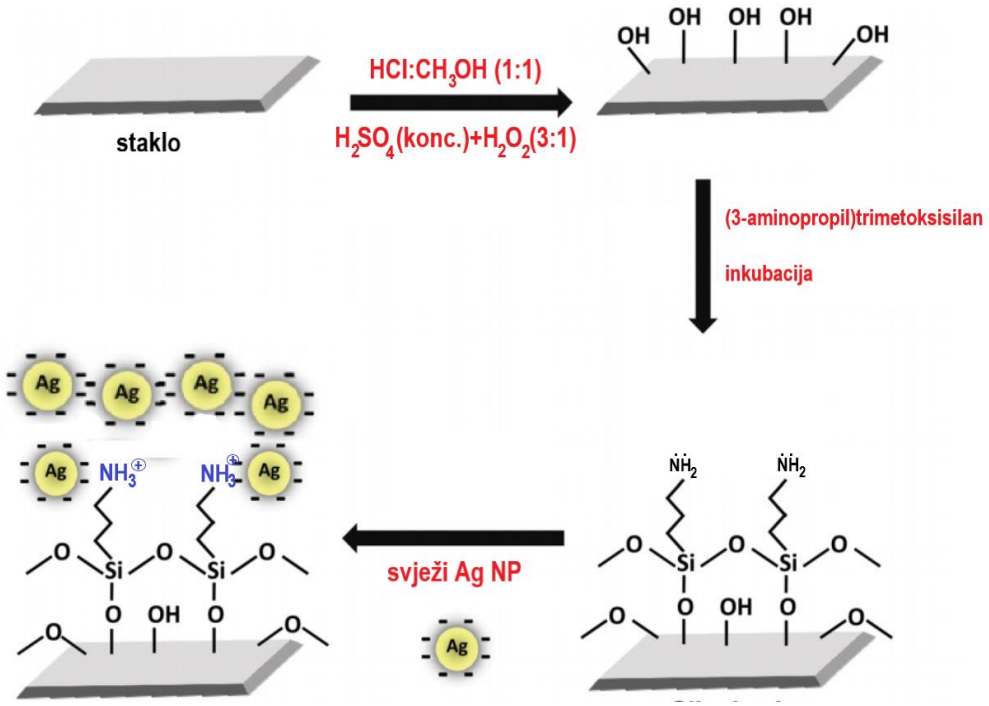
Nanočestice metala imobilizirane na čvrstim podlogama su često korišteni supstrati za molekule koje nisu Raman aktivne ili slabo raspršuju zračenje. Kao čvrste podloge uglavnom se koriste stakleni filter-papiri te mikroskopska stakalca površina kojih se silanizira ili tretira fluorovodičnom kiselinom u svrhu postizanja efekta „prstena kave“ (engl. *coffee ring*). Efekt „prstena kave“ podrazumijeva nakupljanje nanočestica metala na rubu kapljice i njihovu agregaciju čime nastaje veliki broj SERS aktivnih mjesta, tzv. vrućih točaka što povećava osjetljivost same metode zbog veće efikasnosti raspršenja molekula analita adsorbiranih na takva aktivna mjesta (slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz efekta “prstena kave” (engl. *coffee ring*) na stakalcu tretiranom s HF.[11]

Postupak silanizacije staklenih površina se provodi pomoću spojeva organosilana, (3-merkaptopropil)trimetoksisilana (MPTMS) ili (3-aminopropil)trimetoksisilana (APTMS) u svrhu uvođenja amino ili tiolnih skupina na koje će se vezati nanočestice metala. Organosilani su bifunkcionalne molekule te se preko metoksi skupine vežu na površinu stakla koja je prekrivena silanolnim skupinama dok preko druge funkcionalne skupine, tiolne ili amino, ostvaruju jaku interakciju s nanočesticama metala koja može biti kemijske (npr. Au–S, Ag–N) ili elektrostatske prirode.[9] Silani s amino funkcionalnom skupinom pokazuju velik afinitet za nanočestice srebra, no da bi se ostvarila privlačna elektrostatska interakcija nužno je protonirati

amino skupine budući da površinu nanočestica srebra većinom stabiliziraju negativni ioni (slika 5).[12]



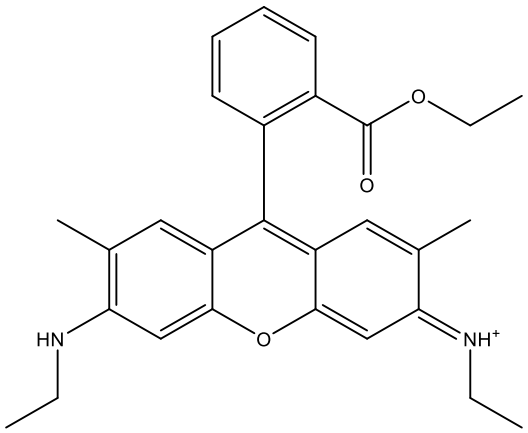
Slika 5. Shematski prikaz postupka imobilizacije nanočestica srebra na silaniziranu površinu stakla.[12]

Manje efikasni čvrsti supstrati za opažanje efekta površinskog pojačanja raspršenja adsorbirane molekule analita su stakleni filter-papiri. Naime, površina tih supstrata je hidrofilna te brza apsorpcija suspenzije koloidnih nanočestica i analita za posljedicu ima slabi SERS signal. Iako im je SERS učinkovitost niska, stakleni filter-papiri su jeftini supstrati za imobilizaciju nanočestica srebra koji ne zahtjevaju čišćenje prije tretiranja koloidom. Uz nisku cijenu i jednostavnost upotrebe tu vrstu supstrata karakterizira i biorazgradivost.[13]

Osim vrste metalnog supstrata, na površinsko pojačanje Ramanovog raspršenja utjecaj imaju struktura molekule analita, način adsorpcije iste, te frekvencija i snaga primjenjenog upadnog zračenja lasera.

2.2.3. Modelne molekule

Rodamin 6G je heterociklički spoj molekulske formule $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$ čija je molekulska struktura prikazana na slici 6. Pripada skupini ksantenskih bojila i zbog svojih svojstava je često korišten kao fluorescentna proba i kao modelna molekula u spektroskopiji površinski pojačanog Ramanovog raspršenja. Naime, rodamin 6G ima visoki molarni apsorpcijski koeficijent, ε u vidljivom području elektromagnetskog spektra te visoko kvantno iskorištenje.[2]

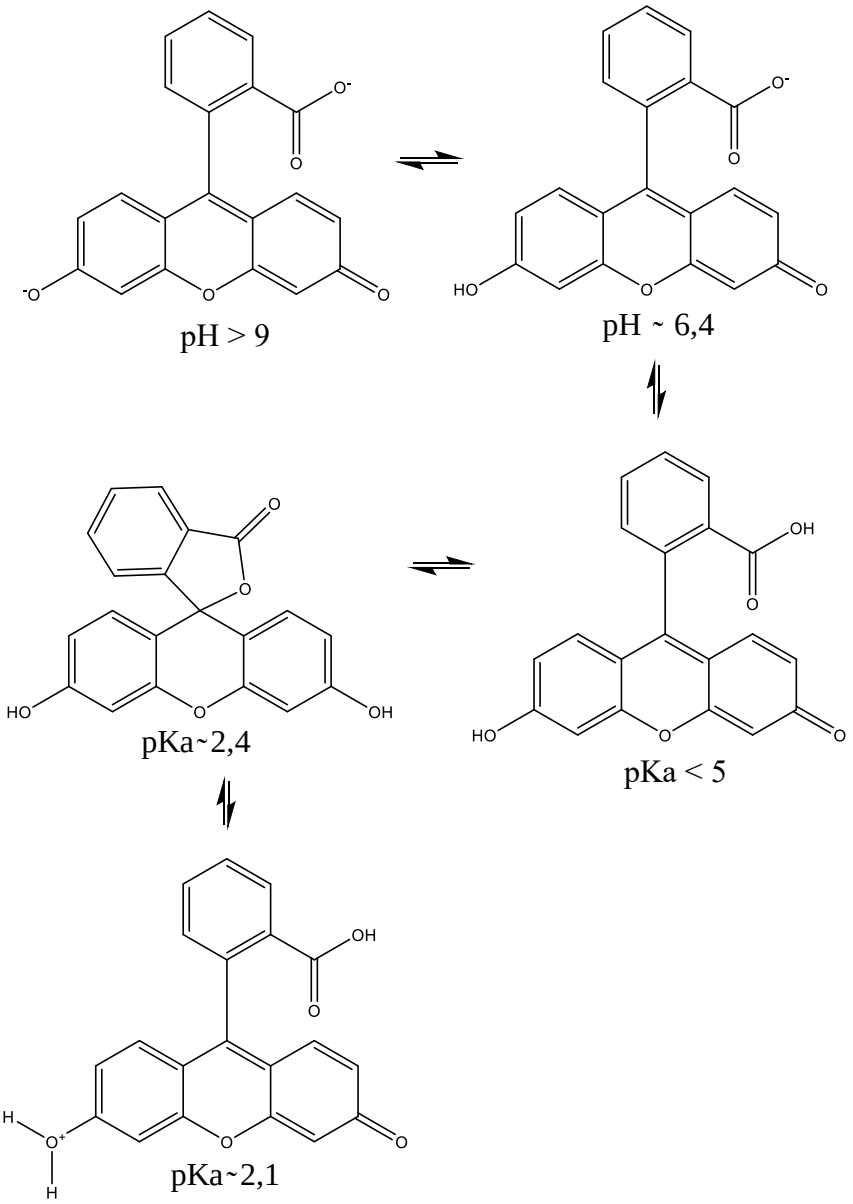


Slika 6. Strukturna formula molekule rodamina 6G.

Molekula rodamina 6G sadrži pozitivno nabijeni ksantenski sustav aromatskog karaktera kao osnovni dio svoje strukture. Upravo taj pozitivan naboj u strukturi je ključan za adsorpciju molekule na površinu koloida metala, ukoliko je ona negativno nabijena, i opažanje efekta površinski pojačanog Ramanovog raspršenja. Ksantenski dio rodamina 6G kao supstituente sadrži dvije metilne skupine, dvije etilamino skupine, te orto supstituirani fenilni prsten. Preko dušikovih atoma etilamino skupina moguće je i kemijsko vezanje na hrapavu nanostrukturiranu površinu metala, te stoga uz elektromagnetski mehanizam pojačanju intenziteta raspršenog zračenja doprinosi i kemijski mehanizam što molekulu rodamina 6G čini vrlo pogodnom modelnom molekulom za SERS mjerenja.

Fluorescein je heterociklički spoj molekulske formule $C_{20}H_{12}O_5$. Također pripada skupini fluorescentnih ksantenskih bojila budući da osnovu strukture spoja čini ksantenski prsten.[2] Strukturno je sličan molekuli rodamina 6G, no za razliku od rodamina 6G koji je isključivo

pozitivno nabijen, fluorescein u vodenim otopinama može postojati u različitim oblicima što je posljedica pH ovisne ravnoteže između neutralnog i anionskih oblika floresceina, te kationskog oblika fluoesceina (slika 7).[14] Ovisno o naboju fluoresceina razlikovat će se i priroda interakcije s površinom metalnog supstrata. Ukoliko je fluorescein prisutan u svom anionskom obliku može doći do odbojnih elektrostatskih interakcija ako je nanostrukturirana površina metala negativno nabijena. U tom slučaju ne dolazi do adsorpcije fluoresceina na nanočestice metala te pojačanje Ramanovog raspršenja izostaje.



Slika 7. Strukturni oblici fluoresceina.[14]

Heterociklički spojevi rodamin 6G i fluorescein zbog svojih strukturnih karakteristika dobro raspršuju zračenje i stoga su često korišteni u istraživanju prikladnosti pripravljenih metalnih suptrata za SERS mjerenja.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Srebrov nitrat, p.a., Kemika

Trinatrijev citrat dihidrat, p.a., Kemika

Kalcijev nitrat tetrahidrat, p.a., Kemika

Natrijev klorid, p.a., Kemika

Rodamin 6G, p.a., Fluka

Dinatrijev fluoresceinat, p.a., Fluka

Fluorovodična kiselina (φ = 1 %), p.a., Riedel–de Haën

Klorovodična kiselina (w = 36,5%), p.a., Fluka

Metanol, p.a., Fluka

Sumporna kiselina (konc.), p.a., Fluka

Vodikov peroksid (w = 30%), p.a., T.T.T. doo

(3-Aminopropil)trimetoksisilan, p.a., Sigma-Aldrich

Laboratorijsko posuđe za pripravu koloida i otopina modelnih molekula oprano je otopinom deterdženta (Kemex), isprano 5% dušičnom kiselinom te deioniziranom Milli-Q vodom. Kvarcne kivete, korištene za pripravu i snimanje mjernih uzoraka, prane su 5% dušičnom kiselinom te temeljito ispirane deioniziranom Milli-Q vodom.

3.2. Mjerni uređaji

Apsorpcijski spektar koloida srebra snimljen je UV/VIS/NIR spektrofotometrom SPECORD 200 tvrtke Analytik Jena pri čemu su korištene kvarcne kivete duljine puta zračenja od 1,00 cm. Mjerno područje snimanja bilo je između 200 i 1100 nm uz razlučivanje od 1 nm.

Za mjerenje pH vrijednosti pripravljenog koloida srebra korišten je pH metar tvrtke Mettler Toledo (model MP 220) s kombiniranom staklenom-kalomel elektrodom InLab® 413. pH metar je baždaren otopinama pufera pH vrijednosti 7,00 i 4,01.

Ramanovi i SERS spektri snimljeni su pomoću interferometra EQUINOX 55 tvrtke BRUKER koji je opremljen s Ramanovim modulom FRA 106/S. Kao izvor pobudnog zračenja korišten je Nd:YAG laser valne duljine 1064 nm. Snaga laserskog snopa ovisila je o agregatnom stanju mjernih uzoraka, tako su tekući uzorci snimani pri snazi lasera od 500 mW, dok su kruti uzorci snimani uz snagu lasera od 100 mW. Za snimanje krutih uzoraka korišten je aluminijski nosač, dok su otopine i koloidne suspenzije snimane u kvarcnim kivetama. Spektri su snimani u području 3500–100 cm^{-1} uz razlučivanje od 4 cm^{-1}, a konačni spektri bili su rezultat uprosječivanja 128 snimaka. Snimljeni spektri su obrađeni u programu ORIGIN® 8.5.

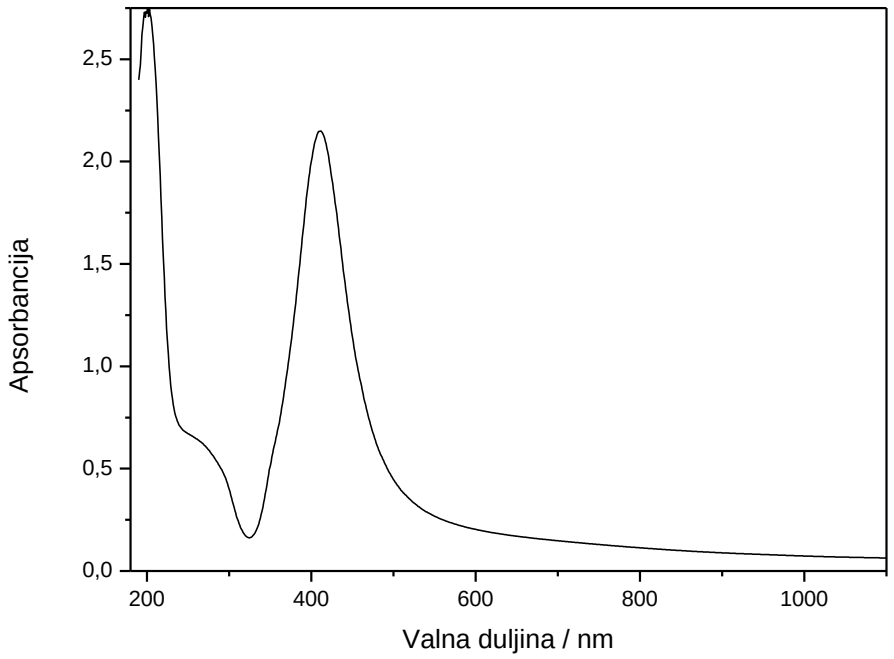
3.3. Priprava supstrata srebra

3.3.1. Priprava koloida srebra

Koloid srebra pripravljen je redukcijom srebrova(I) nitrata s trinatrijevim citratom prema izmijenjenom Lee-Meiselovom postupku.[15]

Srebrov nitrat (0,03607 g) je otopljen u deioniziranoj vodi (200 cm^3) te je otopina zagrijana do vrenja na uljnoj kupelji uz miješanje i refluks otapala. U otopinu je potom dodana 1%-tna otopina trinatrijevog citrata (4 cm^3) te je reakcijska smjesa dalje zagrijavana (refluks otapala) 90 minuta na uljnoj kupelji uz neprestano miješanje, pri čemu se bezbojna reakcijska smjesa obojila u sivo zelenu.

Pripravljenoj koloidnoj suspenziji nanočestica srebra (AgNP) izmjerena je pH-vrijednost 7,25 te joj je snimljen UV/Vis spektar. Valna duljina apsorpcijskog maksimuma sintetiziranog koloida zabilježena je pri 411 nm (slika 8).



Slika 8. UV/Vis apsorpcijski spektar koloida srebra.

3.3.2. Priprava otopina

Ishodne otopine rodamina 6G (R6G) i fluoresceina (FL) koncentracije 1×10^{-3} mol dm^{-3} pripravljene su otapanjem odgovarajuće mase krute tvari u deioniziranoj vodi. Za pripravu ishodne otopine rodamina 6G koncentracije 1×10^{-3} mol dm^{-3} otopljeno je 0,0048 g rodamina 6G u deioniziranoj vodi (10,00 cm^3), dok je ishodna otopina fluoresceina iste koncentracije pripravljena otapanjem 0,0037 g dinatrijevog fluoresceinata također u deioniziranoj vodi (10,00 cm^3). Za pripravu mjernih uzoraka dodatno su pripravljene otopine nižih koncentracija (1×10^{-4} mol dm^{-3}, 1×10^{-5} mol dm^{-3}, 1×10^{-6} mol dm^{-3}) razrjeđivanjem ishodnih otopina rodamina 6G i fluoresceina deioniziranom vodom.

3.3.3. Priprava mjernih uzoraka u koloidnim suspenzijama

Mjerni uzorci modelnih molekula, rodamina 6G i fluoresceina, u koloidnim suspenzijama pripravljeni su neposredno prije mjerenja korištenjem svježe pripravljenog, koncentriranog i agregiranog koloida. Koloid srebra je tijekom priprave mjernih uzoraka miješan pomoću magnetske miješalice kako bi se izbjeglo taloženje nanočestica koje može utjecati na SERS signal. Po završetku priprave kiveta s mjernim uzorkom je pažljivo stavljena u komoru Ramanovog spektrometra prilagođenu za snimanje tekućih uzoraka.

3.3.3.1. Svježe pripravljena koloidna suspenzija

Mjerni uzorci rodamina 6G i fluoresceina u svježe pripravljenoj koloidnoj suspenziji pripravljeni su na način da je u kvarcnu kivetu mikropipetom prvo dodan ranije izračunati volumen odgovarajuće koncentracije otopine spoja, rodamina 6G ili fluoresceina, zatim deionizirana voda, te 400 μdm^3 svježe pripravljenog koloida srebra. Nakon dodatka svake komponente sustav analit-koloid je promiješan, a ukupni volumen koloidne suspenzije iznosio je 500 μdm^3. Ukupno je bilo pripravljeno osam mjernih uzoraka, a koncentracije rodamina 6G i fluoresceina u svježe pripravljenom koloidu su redom iznosile 1×10^{-4}, 5×10^{-5}, $2{,}5\times10^{-5}$, 1×10^{-5}, 5×10^{-6}, 1×10^{-6}, 5×10^{-7} i 1×10^{-7} mol dm^{-3}.

3.3.3.2. Koncentrirana koloidna suspenzija

Ukupni volumen od 70 cm^3 svježe pripravljenog koloida srebra koncentriran je centrifugiranjem pri 5000 obrtaja u minuti tijekom 15 minuta pri sobnoj temperaturi. Tako pripravljen, koncentrirani koloid korišten je za pripravu mjernih uzoraka različitih koncentracija rodamina 6G i fluoresceina. Uzorci za SERS mjerenje, ukupnog volumena 500 μdm^3, pripravljeni su na isti način i u istom koncentracijskom području (1×10^{-4}–1×10^{-7} mol dm^{-3}) kao u slučaju kada je za pripravu mjernih uzoraka korišten svježe pripravljeni koloid.

3.3.3.3. Agregirana koloidna suspenzija

Mjerni uzorci ispitivanih spojeva koncentracija 1×10^{-4}, 5×10^{-5}, $2{,}5\times10^{-5}$, 1×10^{-5}, 5×10^{-6}, 1×10^{-6}, 5×10^{-7} i 1×10^{-7} mol dm^{-3} u agregiranoj koloidnoj suspenziji pripravljeni su u kvarcnim kivetama na način da su mikropipetom redom dodani i promiješani određeni volumen odgovarujuće otopine spoja rodamina 6G ili fluoresceina, zatim deionizirana voda, 400 μdm^3 svježe pripravljenog koloida srebra, te ukupno 50 μdm^3 agregirajućeg sredstva. Za agregaciju koloida srebra korištene su vodene otopine kalcijevog nitrata (1×10^{-3} mol dm^{-3}) i natrijevog klorida (1×10^{-2} mol dm^{-3}). Soli za agregaciju dodavane su prema redoslijedu prema kojem je prvo dodan kalcijev nitrat, a zatim natrijev klorid u jednakom volumenu. Ukupni volumen svakog mjernog uzorka iznosio je 500 μdm^3.

3.3.4. Priprava mjernih uzoraka na čvrstim podlogama

Mjerni uzorci su pripravljeni nanošenjem otopine spoja, rodamina 6G i fluoresceina, na nanočestice srebra imobilizirane na različitim čvrstim podlogama. Kao čvrste podloge korišteni su: stakleni-filter papir, staklo tretirano fluorovodičnom kiselinom i silanizirano staklo. Spektri mjernih uzoraka na čvrstim podlogama su snimljeni njihovim unošenjem u komoru Ramanovog spektrometra prilagođenu snimanju čvrstih uzoraka.

3.3.4.1. Stakleni filter-papir

Filter papir s borosilikatnim staklenim nitima koji je korišten kao čvrsti supstrat tretiran je prije nanošenja otopine spoja s koloidom srebra na način da je na četvrtinu staklenog filter-papira

postupno, mikropipipetom, aplicirano 100 μdm^3 (30 + 30 + 40 μdm^3) koloidne suspenzije. Tretirani stakleni filter-papir je ostavljen preko noći da se suši na sobnoj temperaturi te je potom korišten kao SERS supstrat. Na osušeni stakleni filter-papir je pažljivo, po sredini, aplicirano 100 μdm^3 otopine ispitivanog spoja određene koncetracije. Koncentracije otopina rodamina 6G i fluoresceina, aplicirane na tretirane staklene filter-papire su bile u rasponu od 1×10^{-4} do 1×10^{-7} mol dm^{-3}. Tretirani stakleni filter-papiri s analitom su sušeni na sobnoj temperaturi 1 h, te su potom podvrgnuti snimanju. Spektri su snimani na različitim mjestima čvrstog supstrata u svrhu opažanja što boljeg signala.

3.3.4.2. Tretirano staklo

Druga čvrsta podloga na kojoj je testirano pojačanje Ramanovog signala modelnih molekula, rodamina 6G i fluoresceina, bilo je predmetno stakalce za mikroskopiju. Stakalca su očišćena uranjanjem 20 minuta u vodenu otopinu fluorovodične kiseline (φ = 1 %)[16] te ispiranjem deioniziranom vodom. Nakon toga stakalca su sušena na sobnoj temperaturi 48 h. Na osušena stakalca je pomoću mikropipete aplicirano po 100 μdm^3 mjernog uzorka modelnog spoja koncentracija 1×10^{-4}, 5×10^{-5}, $2{,}5\times10^{-5}$, 1×10^{-5}, 5×10^{-6}, 1×10^{-6}, 5×10^{-7} i 1×10^{-7} mol dm^{-3} u svježe pripravljenoj koloidnoj suspenziji srebra. Mjerni uzorci rodamina 6G i fluoresceina u svježe pripravljenoj koloidnoj suspenziji srebra pripravljeni su na način opisan u poglavlju 3.3.3.1. Nakon apliciranja mjernih uzoraka na tretirana stakalca ista su sušena 2 sata na sobnoj temperaturi. Na osušenim stakalcima bila je vidljiva pojava tzv. „prstena kave“ (engl. *coffee ring*). SERS spektri su snimani na rubovima nastalog prstena pomicanjem nosača s uzorkom u fokus laserskog snopa.

3.3.4.3. Silanizirano staklo

Pojačanje Ramanovog raspršenja modelnih molekula je testirano i na silaniziranim kvarcnim stakalcima koja su korištena kao čvrsti SERS supstrati. Prije postupka silanizacije kvarcna stakalca su temeljito očišćena na način da su prvo uronjena 30 minuta u otopinu koja je sadržavala 30 cm^3 klorovodične kiseline i 30 cm^3 metanola, te potom kratko u otopinu 45 cm^3 sumporne kiseline i 15 cm^3 vodikovog peroksida (tzv. piranha otopina) čime je pospješena i hidroksilacija površine stakla.[12] Nakon tog tretmana stakalca su dobro isprana deioniziranom vodom i osušena na zraku pri sobnoj temperaturi. Osušena stakalca su silanizirana na način da

su bila uronjena 4 sata u 60 cm^3 otopine (3-aminopropil)trimetoksisilana u metanolu (φ = 5 %).[17] Nakon toga su isprana metanolom te sušena u sušioniku 1 sat na temperaturi od 100 °C. Nakon sušenja stakalca su uronjena u koloidnu suspenziju nanočestica srebra 24 sata. Na tretirana silanizirana stakalca, osušena na sobnoj temperaturi, aplicirane su otopine rodamina 6G i fluoresceina u rasponu koncentracija od 1×10^{-4} do 1×10^{-7} mol dm^{-3}. Nakon nanošenja otopine spoja stakalca su sušena 2 sata na sobnoj temperaturi. Spektri su snimani na različitim mjestima čvrstog supstrata pomicanjem nosača s uzorkom u fokus laserskog snopa.

3.4. SERS učinkovitost supstrata srebra

Učinkovitost pripravljenih supstrata srebra, nanočestica srebra dispergiranih u koloidnim suspenzijama i imobiliziranih na čvrstim podlogama, ispitana je snimanjem koncentracijski ovisnih SERS spektara modelnih spojeva, rodamina 6G i fluoresceina, na temelju kojih je određena reproducibilnost i faktor pojačanja SERS supstrata.

3.4.1. Koncentracijski ovisni SERS spektri

U svrhu mjerenja koncentracijski ovisnih SERS spektara pripravljeni su mjerni uzorci koji su sadržavali modelne molekule sljedećih koncentracija: 1×10^{-4}, 5×10^{-5}, $2{,}5\times10^{-5}$, 1×10^{-5}, 5×10^{-6}, 1×10^{-6}, 5×10^{-7} i 1×10^{-7} mol dm^{-3}. Mjerni uzorci u koloidnim suspenzijama i na čvrstim podlogama su pripravljeni na ranije opisani način.

3.4.2. Reproducibilnost

Otopine rodamina 6G i fluoresceina koncentracije pri kojoj je opažen najintenzivniji SERS spektar sa svakim od pripravljenih supstrata srebra, korištena je za određivanje njegove reproducibilnosti. Tri mjerna uzorka odgovarajuće koncentracije pripravljena su na isti način sa svakim od SERS supstrata. Potom je provedeno snimanje jednog mjernog uzorka tri puta. U slučaju koloidnih suspenzija sadržaj u kiveti promiješan je između svakog snimanja, dok su u slučaju supstrata na čvrstim podlogama spektri snimljeni na tri različita mjesta na susptratu. Za preostala dva mjerna uzorka provedeno je samo po jedno snimanje. Reproducibilnost mjerenja s nanočesticama srebra u koloidnim suspenzijama i na čvrstim podlogama za rodamin 6G i

fluorescein izražena je kao standardno odstupanje intenziteta vrpce pri pri 1509 cm^{-1} za R6G, odnosno vrpce pri 1314 cm^{-1} za FL.

3.4.3. Faktor pojačanja

Faktor pojačanja (engl. *enhancement factor*, EF) za svaki SERS supstrat izračunat je na temelju intenziteta najjače vrpce modelne molekule u Ramanovom spektru otopine (1×10^{-2} mol dm^{-3}) i intenziteta odgovarajuće vrpce u SERS spektru modelne molekule one koncentracije za koju je opaženo najveće površinsko pojačanje Ramanovog raspršenja.

Za molekulu rodamina 6G je odabrana vrpca pri 1509 cm^{-1}, dok je za molekulu fluoresceina analizirana vrpca pri 1314 cm^{-1}. Intenziteti vrpci pri tim valnim brojevima određeni su u programu OPUS 6.0. U Ramanovim spektrima otopina intenziteti su iznosili 0,00036 za R6G i 0,00031 za FL, dok su vrijednosti u SERS spektrima, ovisne o SERS supstratu, navedene u tablici 1.

Tablica 1. Intenziteti vrpci R6G i FL u SERS spektrima najvećeg intenziteta.

SERS supstrat	**R6G**		**FL**	
	I_{1509}	c / mol dm^{-3}	I_{1314}	c / mol dm^{-3}
svježi koloid AgNP	0,014591	5×10^{-5}	-	-
koncentrirani koloid AgNP	0,062568	5×10^{-5}	-	-
agregirani koloid AgNP	0,204488	1×10^{-6}	-	-
AgNP na staklenom filter-papiru	0,012170	1×10^{-4}	-	-
AgNP na tretiranom staklu	0,194780	1×10^{-4}	0,025503	1×10^{-4}
AgNP na silaniziranom staklu	0,001010	1×10^{-4}	0,0028594	1×10^{-4}

Za izračun vrijednosti faktora pojačanja SERS supstrata korišten je sljedeći izraz[18]:

$$EF = \frac{I_{\mathrm{SERS}}\, c_{\mathrm{RS}}}{I_{\mathrm{RS}}\, c_{\mathrm{SERS}}} \qquad (2)$$

u kojem c označava koncentraciju modelne molekule u vodenoj otopini (c_{RS}) ili na SERS supstratu za koju je opažen najjintenzivniji SERS spektar (c_{SERS}), dok su simbolima I_{SERS} i I_{RS}

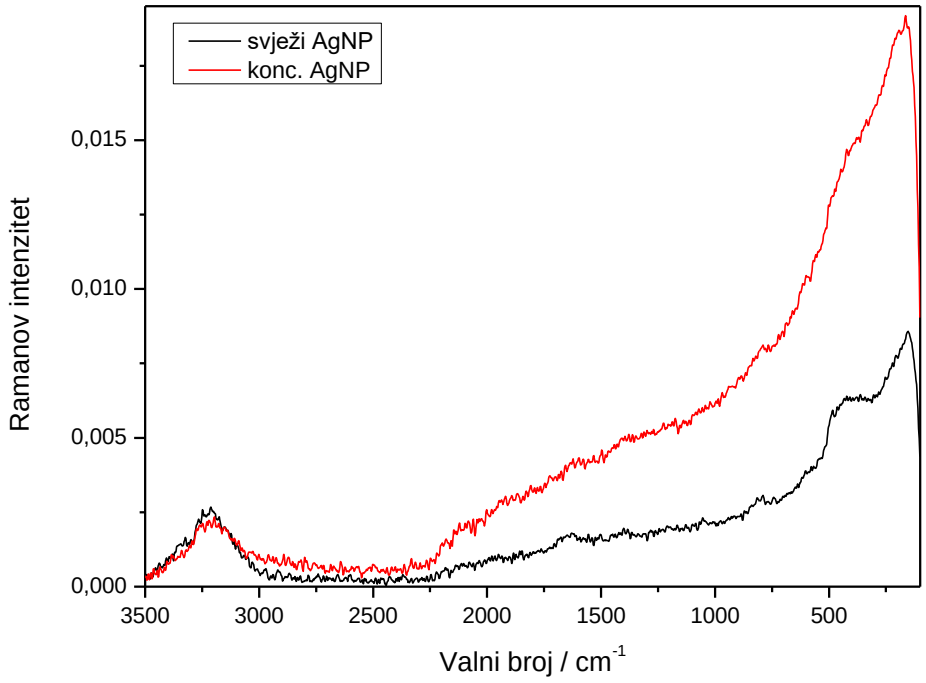
redom označeni intenziteti odgovarajuće vrpce modelne molekule u SERS spektru i u Ramanovom spektru otopine. Izračunate vrijednosti faktora pojačanja korištene su za usporedbu učinkovitosti različitih SERS supstrata, odnosno sposobnosti pojačanja raspršenog zračenja molekula rodamina 6G i fluoresceina.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ramanovi spektri

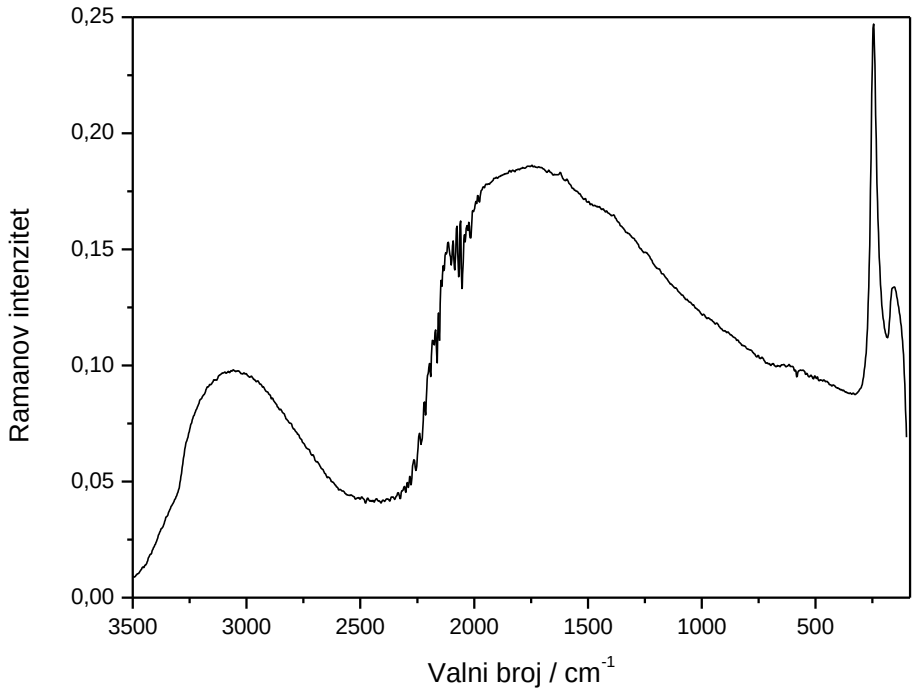
Ramanovi spektri pripravljenih koloidnih suspenzija srebra snimljeni su radi njihove dodatne karakterizacije te lakšeg tumačenja SERS spektara modelnih molekula rodamina 6G i fluoresceina snimljenih s različitim supstratima.

Ramanovi spektri svježe pripravljenog i koncentriranog koloida srebra prikazani na slici 9 pokazuju međusobnu sličnost. U oba spektra može se uočiti široka vibracijska vrpca srednjeg intenziteta u području između 3500 i 3000 cm^{-1} koja odgovara istezanju veza O–H vodenog medija. U spektrima nisu uočene vrpce koje bi se mogle pripisati karakterističnim vibracijama citratnih iona koji se nalaze na površini nanočestica srebra, a uslijed kojih nanočestice nose negativan naboj. Naime, trinatrijev citrat je korišten kao reducirajući agens u pripravi koloida, u kojem se nakon redukcije zaostali citratni ioni smještaju na formirane nanostrukture srebra i imaju stabilizirajući učinak, sprječavajući agregaciju nanočestica srebra. Ramanov spektar trinatrijeva citrata prikazan je na slici D1 u Dodatku. U spektru koncentrirane suspenzije srebra, pripravljene centrifugiranjem svježeg koloida, uočava se podignuta bazna linija, koja se pripisuje raspršenju zračenja na većem broju nanočestica metala u jednakom volumenu suspenzije.



Slika 9. Ramanov spektar svježe pripravljenog i koncentriranog koloida srebra.

Na slici 10 prikazan je spektar koloida srebra agregiranog s kalcijevim nitratom (1×10^{-3} mol dm^{-3}) i natrijevim kloridom (1×10^{-2} mol dm^{-3}). Ioni kalcija neutraliziraju negativan naboj citratnih iona na površini nanočestica srebra, što uzrokuje agregaciju nanočestica, dok kloridni ioni, zahvaljujući visokom afinitetu prema srebru, istiskuju s površine slabo vezane citratne ione, stvarajući manju steričku barijeru molekulama analita prilikom vezanja na površinu srebra. U spektru se opaža oštra intenzivna vrpca pri približno 240 cm^{-1} koja odgovara istezanju veze Ag–Cl, a rezultat je kemisorpcije kloridnih iona na površinu srebra. U spektru izostaje karakteristična vrpca nitratnih iona u području između 1400 i 1300 cm^{-1}, jer se zbog slabog afiniteta prema srebru nitratni ioni ne vežu na nanostrukturianu površinu.



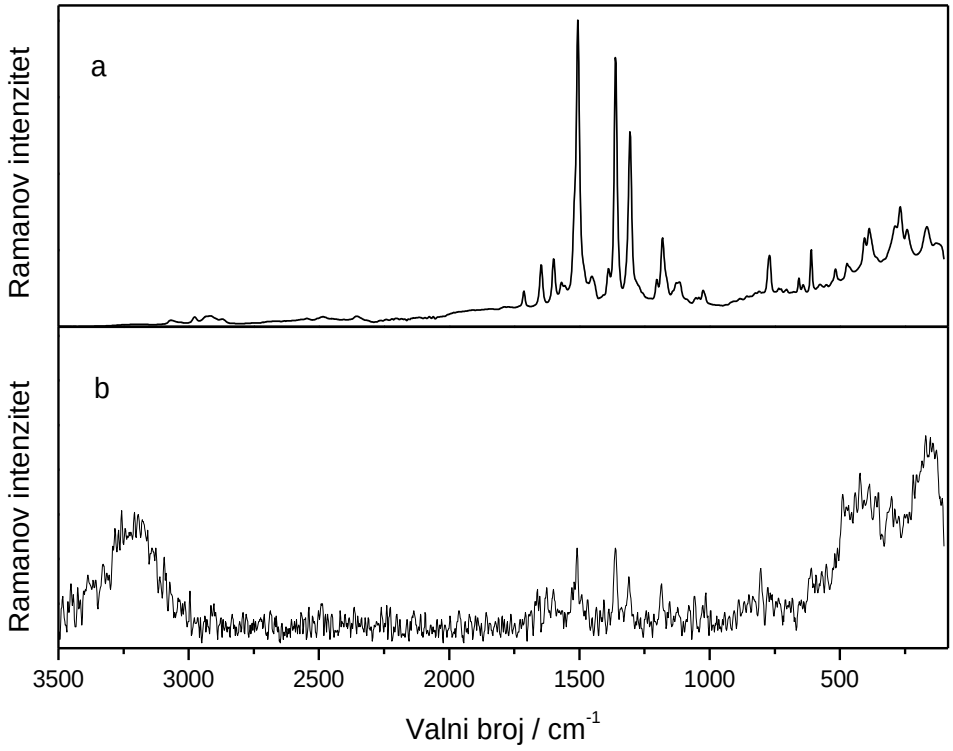
Slika 10. Ramanov spektar koloida srebra agregiranog s $Ca(NO_3)_2$ ($c = 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}) i NaCl ($c = 1\times10^{-2}$ mol dm^{-3}).

Prije snimanja koncentracijski ovisnih SERS spektara modelnih molekula na različitim supstratima srebra, za svaku modelnu molekulu je snimljen Ramanov spektar čvrste tvari i otopine koncentracije 1×10^{-2} mol dm^{-3}. Asignacija karakterističnih vrpci u Ramanovim spektrima rodamina 6G i fluoresceina dana je u tablici 2.

Najintenzivnije vrpce u Ramanovom spektru čvrstog uzorka rodamina 6G opažaju se pri 1506, 1361 i 1305 cm^{-1} (slika 11.a). Vrpce pri 1506 i 1361 cm^{-1} pripisuju se istezanju CC veza u aromatskom ksantenskom sustavu, dok intenzitetu vibracijske vrpce pri 1305 cm^{-1} uz aromatsko CC istezanje doprinosi i istezanje C−N veze između atoma ugljika ksantenskog prstena i atoma dušika iz etilamino skupine. Vrpca slabijeg intenziteta pri 1181 cm^{-1} rezultat je vibracija istezanja C−O−C veza u ksantenu. Jasno razlučene vrpce pri 770 i 610 cm^{-1} pripisuju se redom deformacijskim vibracijama CH skupina ksantenskog i fenilnog prstena te svijanju aromatskih sustava.

U Ramanovom spektru otopine rodamina 6G ($c = 1\times10^{-2}$ mol dm^{-3}) uočavaju se vrpce pri pri 1509, 1362 i 1310 cm^{-1}, no bitno slabijeg intenziteta od odgovarajućih vrpci u spektru

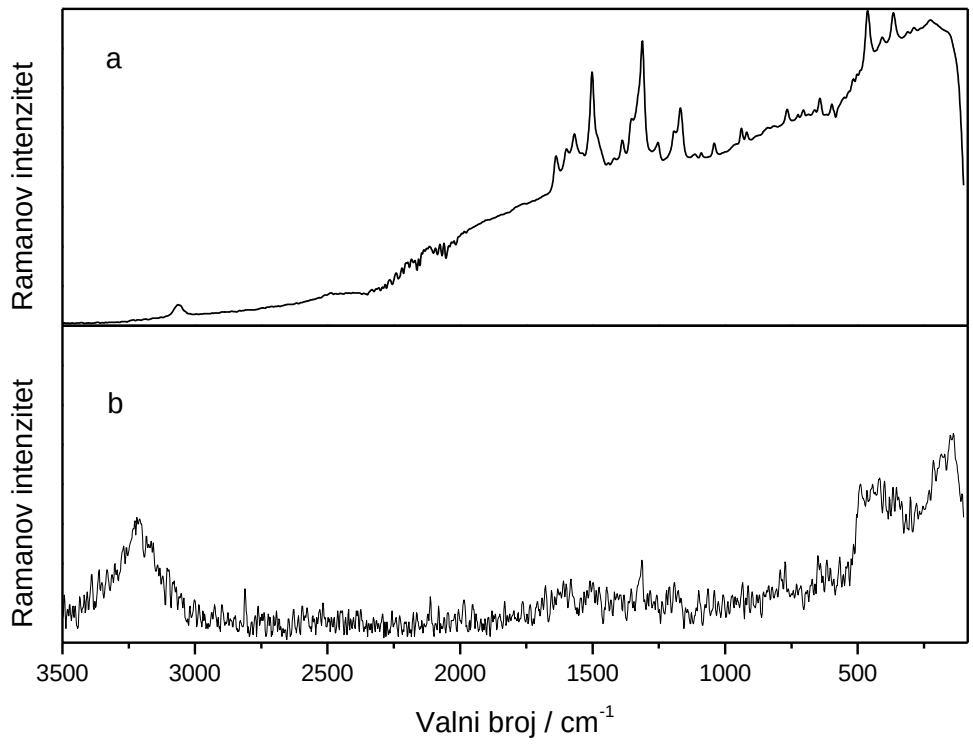
čvrstog uzorka (slika 11.b), razlog čemu leži u slaboj osjetljivosti Ramanove spektroskopije. Ostale vrpce rodamina 6G vrlo su slabog intenziteta, a osim značajnog šuma, spektru otopine doprinose i vrpce isteznih (~3500 cm^{-1}) i deformacijskih (~1600 cm^{-1}) vibracija molekula vode.



Slika 11. Ramanovi spektri R6G: a) čvrsti uzorak i b) otopina, $c = 1\times10^{-2}$ mol dm^{-3}.

Najintenzivnije vrpce u Ramanovom spektru čvrstog uzorka fluoresceina, pri 1502 i 1312 cm^{-1}, potječu od isteznih vibracija CC veza aromatskog ksantenskog sustava, dok se vrpca pri 1168 cm^{-1} pripisuje istezanju C–O veze (slika 12.a). Vrpce slabijeg intenziteta pri 1598 i 1387 cm^{-1} odgovaraju redom antisimetričnom te simetričnom istezanju COO^- skupine. Slabe vrpce u području 950–600 cm^{-1} potječu od deformacijskih vibracija CH skupina aromatskih sustava. U spektru se uočavaju i dvije oštre vibracijske vrpce srednjeg intenziteta pri 463 i 365 cm^{-1} koje se pripisuju deformaciji prstena.

U Ramanovom spektru vodene otopine fluoresceina ($c = 1\times10^{-2}$ mol dm^{-3}) opažena je tek vrlo slaba vrpca vibracije ksantena pri 1314 cm^{-1} (slika 12.b).



Slika 12. Ramanovi spektri FL: a) čvrsti uzorak i b) otopina, $c = 1\times10^{-2}$ mol dm^{-3}.

Tablica 2. Asignacija osnovnih vibracijskih vrpci u Ramanovim spektrima R6G i FL.

Valni broj / cm^{-1}				**Vibracija**[19, 20]
R6G		**FL**		
Čvrsti uzorak	**Otopina** 1×10^{-2} mol dm^{-3}	**Čvrsti uzorak**	**Otopina** 1×10^{-2} mol dm^{-3}	
		3063		ν C–H (ar)
2976				ν_{as} C–H (CH_3)
2916				ν_s C–H (CH_3)
1712				ν C=O
1646				δ N–H
1598		1638		ν CC (ar)
		1598		ν_{as} COO^-
1506	1509	1502		ν CC (xr)
		1387		ν_s COO^-
1361	1362	1312	1314	ν CC (xr)
1305	1310			ν C–N
1181		1253		ν_{as} C–O–C
		1168		ν C–O
1025		1040		δ_{ip} CH (ar)
		939		δ COO^-
770		765		δ_{oop} CH (ar)
610		643		δ_{oop} CH (ar)
472		463		δ CCC
		365		δ CCC

Kratice: ν_{as}, antisimetrično istezanje; ν_s, simetrično istezanje; δ, deformacija; ip, u ravnini; oop, izvan ravnine; ar, aromatski sustav; xr, ksantenski sustav.

4.2. Koncentracijski ovisni SERS spektri

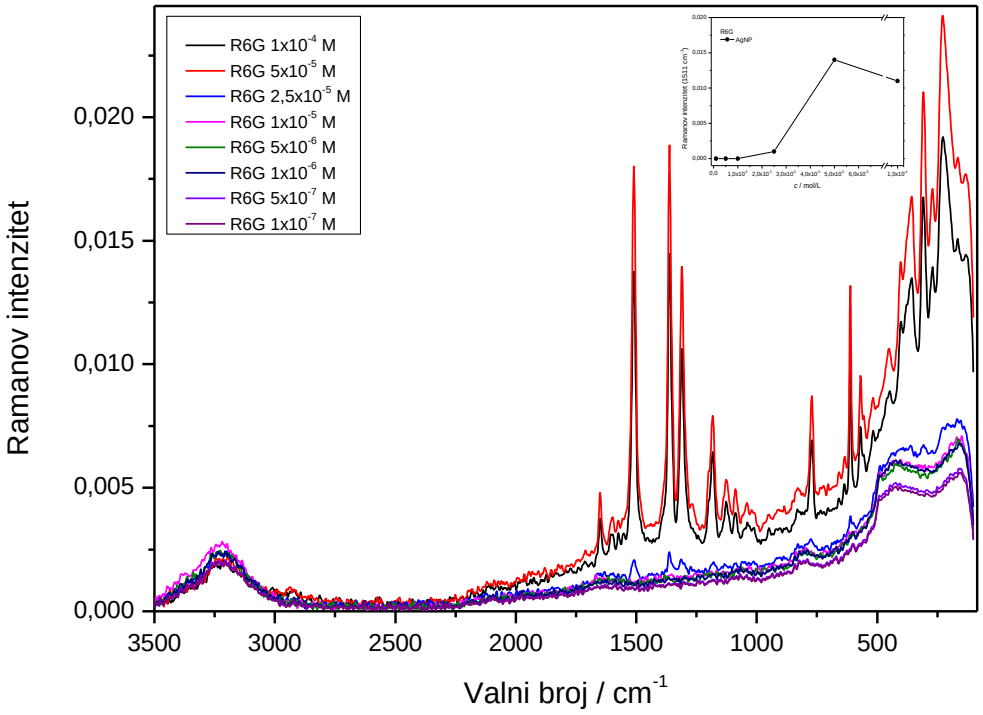
4.2.1. Svježe pripravljena koloidna suspenzija

U svrhu ispitivanja SERS učinkovitosti svježe pripravljene koloidne suspenzije srebra snimljeni su SERS spektri ksantenskih boja, rodamina 6G i fluoresceina, različitih koncentracija u pripravljenom supstratu srebra.

Za mjerne uzorke koji su sadržavali rodamin 6G opaženo je pojačanje Ramanovog raspršenja, dok je to pojačanje za drugu ksantensku boju izostalo (slike 13 i 14). Molekule rodamina 6G nose pozitivan naboj u strukturi te se uslijed elektrostatskih privlačnih sila s

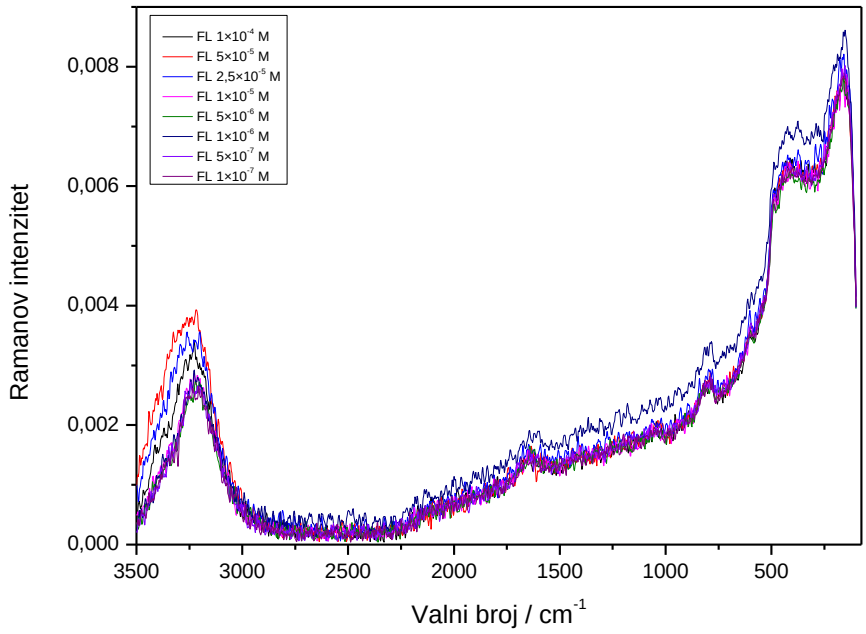
negativno nabijenim citratnim ionima na nanočesticama srebra u koloidnoj suspenziji adsorbiraju na površinu nanočestica. Za razliku od rodamina 6G, molekule fluoresceina su pri pH vrijednosti koloidne suspenzije (pH = 7,25) negativno nabijene te se zbog elektrostatskih odbojnih sila s negativno nabijenim površinskim slojem citratnih iona ne adsorbiraju na površinu nanočestica srebra.

U svježe pripravljenom koloidu srebra snimljeni su koncentracijski ovisni SERS spektri rodamina 6G u području koncentracija 1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3} (slika 13). U spektrima rodamina 6G koncentracija $2{,}5\times10^{-5}$, 5×10^{-5} i 1×10^{-4} mol dm^{-3} opažaju se karakteristične vrpce vibracija molekule, međutim, njihov intenzitet ne mijenja se linearno s povećanjem koncentracije. Na to ukazuje prikaz ovisnosti intenziteta vrpce pri 1511 cm^{-1}, koja odgovara isteznoj vibraciji ksantenskog sustava molekule, o koncentraciji rodamina 6G (umetak na slici 13). Koncentracija rodamina 6G pri kojoj se opaža najintenzivniji SERS spektar iznosi 5×10^{-5} mol dm^{-3}. Može se pretpostaviti da je pri toj koncentraciji postignuta optimalna pokrivenost površine nanočestica srebra, pri čemu intenzivne vrpce istezanja ksantenskog sustava (1509 i 1362 cm^{-1}) ukazuju na adsorpciju molekula rodamina 6G na površinu srebra s okomito položenim ksantenskim prstenom. Također, u SERS spektru rodamina 6G prisutna je i vrpca srednjeg intenziteta pri približno 240 cm^{-1}, koja se može pripisati istezanju veze Ag–N, nastale između dušika iz etilamino skupine rodamina 6G i metalnog supstrata. SERS spektar rodamina 6G koncentracije $2{,}5\times10^{-5}$ mol dm^{-3} je značajno slabijeg intenziteta u usporedbi sa SERS spektrima rodamina 6G većih koncentracija, razlog čemu je drugačija orijentacija molekula na površini srebra. Pri nižoj koncentraciji molekule na površini nanočestica imaju više prostora na raspolaganju te se smještaju pod kutem, pri čemu slabije raspršuju zračenje. Također, u istom SERS spektru nedostaje vrpca koja bi ukazivala na kemisorpciju molekula na površinu srebra. Pojačanje Ramanovog raspršenja u potpunosti izostaje za koncentracije rodamina 6G niže od $2{,}5\times10^{-5}$ mol dm^{-3}, što se pripisuje malom broju molekula rodamina 6G na nanočesticama srebra te smještanju molekula paralelno površini srebra, koje ne doprinose pojačanju raspršenog zračenja.



Slika 13. Koncentracijski ovisni SERS spektri R6G (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) u svježem koloidu AgNP. Umetak: ovisnost intenziteta vrpce istezanja ksantenskog sustava pri 1511 cm^{-1} o koncentraciji rodamina 6G.

Na slici 14 prikazani su SERS spektri fluoresceina u području koncentracija 1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3} u svježe pripravljenom koloidu srebra. U snimljenim spektrima nisu uočene karakteristične vrpce fluoresceina neovisno o koncentraciji ksantenske boje te snimljeni spektri odgovaraju spektru koloidne suspenzije srebra.



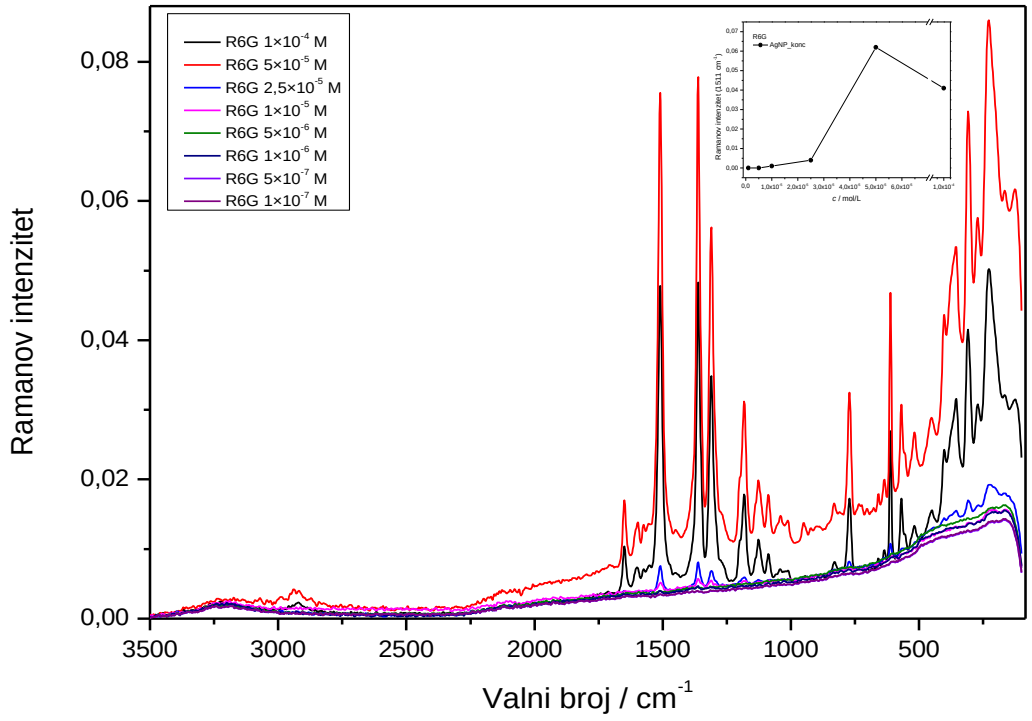
Slika 14. Koncentracijski ovisni SERS spektri FL (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) u svježem koloidu AgNP.

U snimljenim koncentracijski ovisnim SERS spektrima rodamina 6G i fluoresceina uočava se podignuta bazna linija, što je posljedica raspršenja zračenja na nanočesticama srebra i fluorescencije molekula.

4.2.2. Koncentrirana koloidna suspenzija

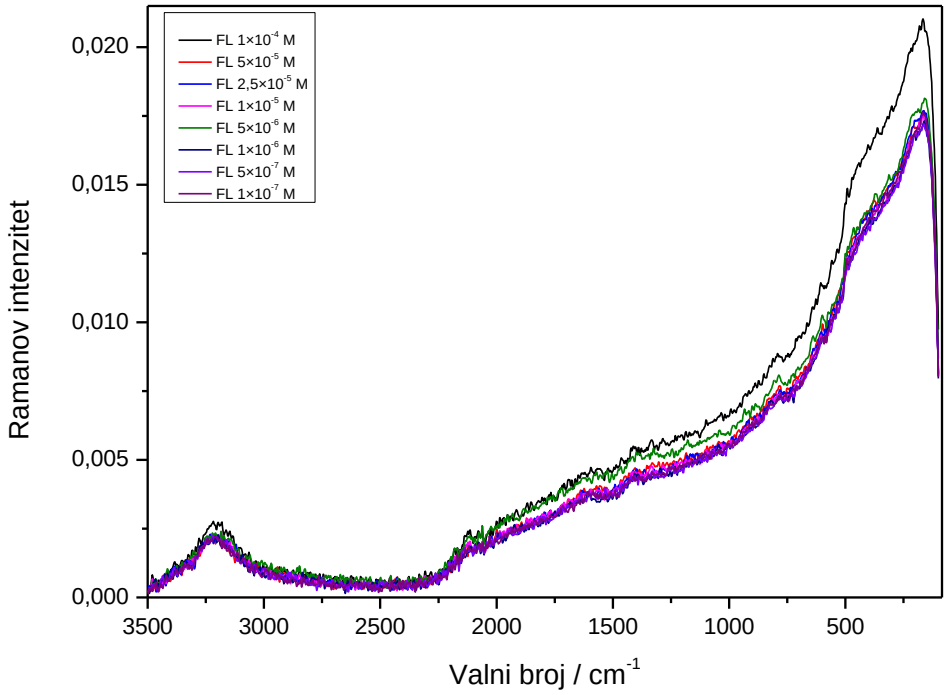
Koncentracijski ovisni SERS spektri rodamina 6G (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) u koncentriranoj koloidnoj suspenziji srebra očekivano su jačeg intenziteta od spektara snimljenih sa svježim koloidom srebra (slika 15). Centrifugiranjem koloida uklonjen je suvišak citratnih iona iz suspenzije, čime je omogućena spontana agregacija većeg broja nanočestica srebra u odnosu na jednaki volumen svježeg koloida. Agregiranjem nanočestica nastaju mjesta vrlo jakih električnih polja, tzv. vruće točke, na kojima adsorbirane molekule rodamina 6G intenzivno raspršuju zračenje. Slično SERS spektrima rodamina 6G u svježem koloidu, nije uočena linearna promjena intenziteta raspršenog zračenja s povećanjem koncentracije, što je vidljivo iz prikaza ovisnosti intenziteta karakteristične vibracije rodamina 6G pri 1511 cm^{-1} o

koncentraciji (umetak na slici 15). Nelinearnost promjene intenziteta raspršenja s koncentracijom molekule pripisana je koncentracijski ovisnom položaju i orijentaciji molekula na površini nanočestica srebra. U koncentriranoj koloidnoj suspenziji srebra najintenzivniji SERS spektar opažen je pri koncentraciji 5×10^{-5} mol dm^{-3}, jednako kao i u svježem koloidu srebra, no jačeg intenziteta. Međutim, iako slabog intenziteta uočen je spektar rodamina 6G u koncentriranoj suspenziji pri nižoj koncentraciji, $c = 1\times10^{-5}$ mol dm^{-3}, nego u svježem koloidu.



Slika 13. Koncentracijski ovisni SERS spektri R6G (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) u koncentriranom koloidu AgNP. Umetak: ovisnost intenziteta vrpce istezanja ksantenskog sustava pri 1511 cm^{-1} o koncentraciji rodamina 6G.

U koncentracijski ovisnim SERS spektrima fluoresceina (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) ne uočavaju se karakteristične vrpce fluoresceina koje bi ukazivale na adsorpciju molekula na nanočestice metala (slika 16). I u ovom slučaju najvjerojatniji uzrok izostanku pojačanja Ramanovog raspršenja su odbojne elektrostatske interakcije između negativno nabijenih molekula fluoresceina i površinskog sloja citratnih aniona na nanočesticama srebra.



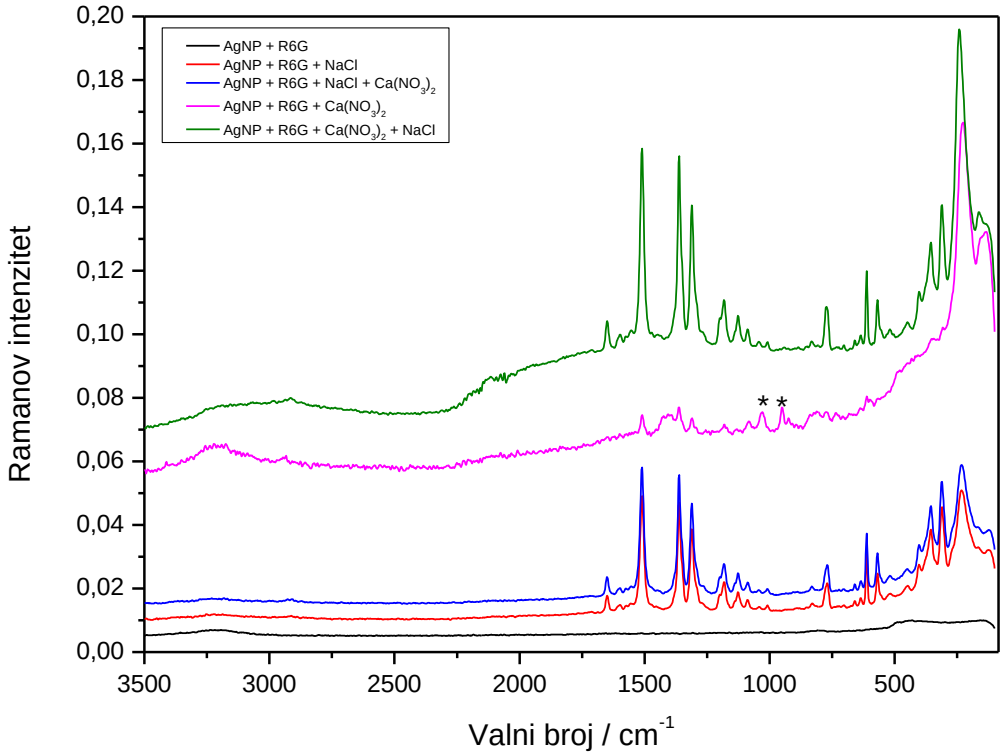
Slika 14. Koncentracijski ovisni SERS spektri FL (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) u koncentriranom koloidu AgNP.

4.2.3. Agregirana koloidna suspenzija

Prije snimanja koncentracijski ovisnih SERS spektara u agregiranoj koloidnoj suspenziji srebra, ispitan je utjecaj agregirajućih agensa na pojačanje Ramanovog raspršenja rodamina 6G koncentracije 5×10^{-6} mol dm^{-3}, pri kojoj nije opažen SERS spektar u svježem koloidu srebra. Kao agregirajući agensi korišteni su kalcijev nitrat (c = 1×10^{-3} mol dm^{-3}) i natrijev klorid (c = 1×10^{-2} mol dm^{-3}) različitog redoslijeda dodavanja u mjerni uzorak.

SERS spektar otopine rodamina 6G, c = 5×10^{-6} mol dm^{-3}, nije opažen u koloidu srebra bez agregirajućeg agensa. Dodatkom NaCl u koloidnu suspenziju srebra koja sadrži rodamin 6G opaža se pojačanje Ramanovog raspršenja, koje se nakon dodatka $Ca(NO_3)_2$ u isti uzorak ne mijenja. Međutim, ako se u mjerni uzorak najprije doda $Ca(NO_3)_2$, pojačanje Ramanovog raspršenja rodamina 6G vrlo je slabo, a vrpcama vibracija rodamina 6G interferiraju vrpce vibracija citratnih iona (1420, 1030, 950 cm^{-1}). Daljnjim dodatkom NaCl u isti mjerni uzorak,

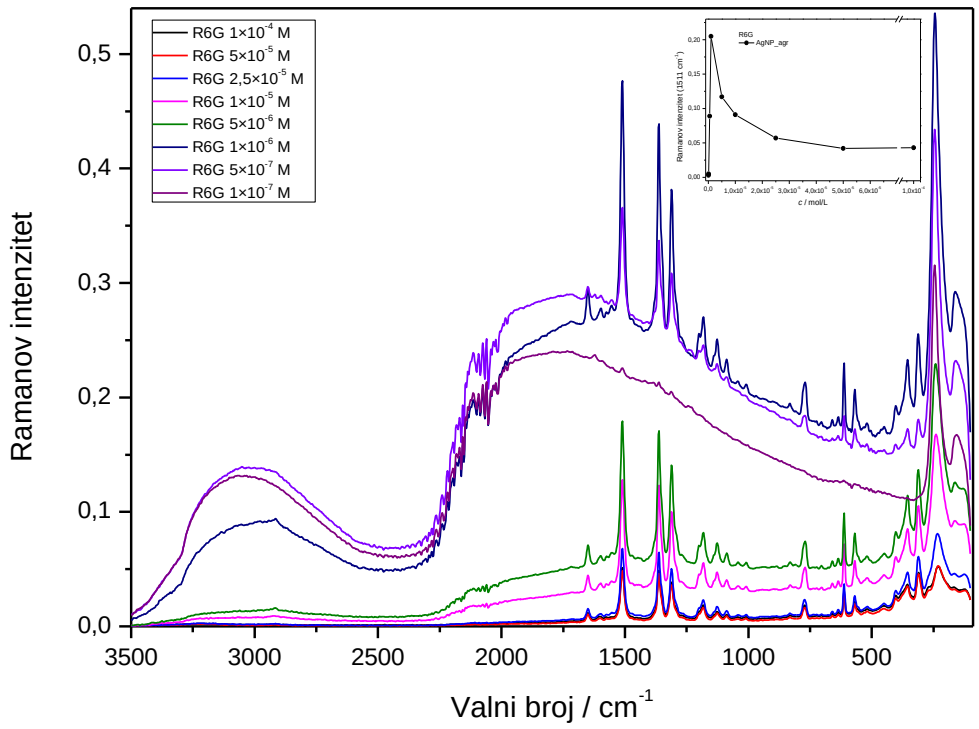
Ramanovo raspršenje rodamina 6G značajno se pojačava. To se može objasniti činjenicom da kalcijevi ioni neutraliziraju negativan naboj na površini koloida srebra koji potječe od citratnih iona te na taj način potiču agregaciju nanočestica i stvaranje vrućih točaka. Nakon dodatka natrijeva klorida u mjerni uzorak kloridni ioni zamjenjuju citratne ione na površini nanočestica srebra te zahvaljujući svojoj veličini stvaraju manju steričku barijeru molekulama rodamina 6G za vezanje s nanočesticama srebra.[21] Vrlo intenzivna vrpca pri 240 cm^{-1} potvrđuje kemisorpciju kloridnih iona na površini srebra i nastanak velikog broja SERS aktivnih mjesta.



Slika 15. SERS spektri R6G (5×10^{-6} mol dm^{-3}) u svježe pripravljenom koloidu srebra: bez agregirajućeg sredstava (crno), s NaCl ($c = 1\times10^{-2}$ mol dm^{-3}) (crveno), s NaCl ($c = 1\times10^{-2}$ mol dm^{-3}) i $Ca(NO_3)_2$ ($c = 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}) (plavo), s $Ca(NO_3)_2$ ($c = 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}) (ružičasto), s $Ca(NO_3)_2$ ($c = 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}) i NaCl ($c = 1\times10^{-2}$ mol dm^{-3}) (zeleno).

S obzirom na najintenzivniji SERS spektar rodamina 6G opažen kombinacijom agregirajućih agensa koja je uključivala dodavanje najprije kalcijeva nitrata, a zatim natrijeva klorida u mjerni uzorak, uzorci rodamina 6G različitih koncentracija u koloidnoj suspenziji srebra agregirani su dodatkom anorganskih soli tim redoslijedom.

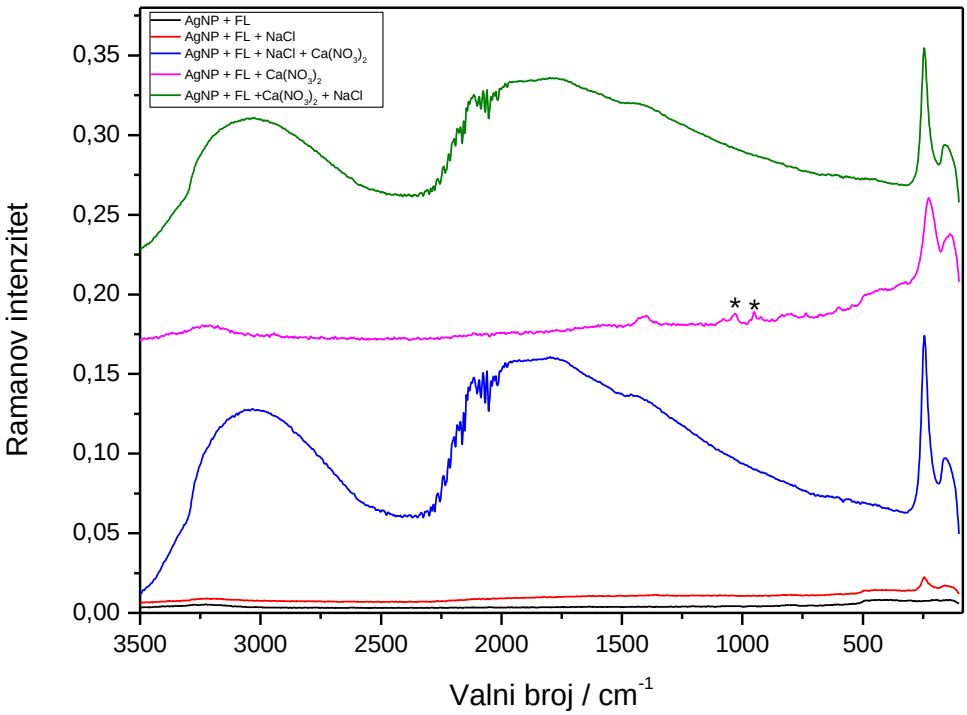
Pojačanje intenziteta Ramanovog raspršenja rodamina 6G u agregiranom koloidu srebra opaženo je u čitavom mjerenom koncentracijskom području (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) (slika 18). Međutim, niti u ovom slučaju promjena intenziteta raspršenog zračenja linearno ne prati povećanje koncentracije, na što ukazuje prikaz ovisnosti intenziteta vrpce istezanja ksantenskog sustava molekule pri 1511 cm^{-1} o koncentraciji rodamina 6G (umetak na slici 18). Najveće pojačanje raspršenog zračenja rodamina 6G opaženo je pri koncentraciji 1×10^{-6} mol dm^{-3}. Intenzivne vrpce u području između 1550 i 1100 cm^{-1}, koje odgovaraju isteznim vibracijama ksantenskog sustava, ukazuju na adsorpciju molekule s optimalno okomito položenim ksantenom prema površini srebra. Pri većim i manjim koncentracijama od 1×10^{-6} mol dm^{-3} molekule se smještaju pod kutem u odnosu na površinu srebra te je intenzitet raspršenog zračenja manji. Pri najmanjoj mjerenoj koncentraciji rodamina 6G, $c = 1\times10^{-7}$ mol dm^{-3}, još uvijek se naziru vrlo slabe vrpce u spektru, koje upućuju na prisutnost rodamina 6G u suspenziji. Porast bazne linije sa smanjenjem koncentracije pripisan je većem doprinosu raspršenja zračenja na agregiranim nanočesticama srebra. Vrlo jaka vrpca pri približno 240 cm^{-1}, uočena u svim SERS spektrima rodamina 6G, odgovara istezanju veze Ag–Cl, nastale između metala i kloridnih iona iz agregacijskog agensa, NaCl.



Slika 16. Koncentracijski ovisni SERS spektri R6G (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) u koloidu AgNP agregiranom s $Ca(NO_3)_2$ ($c = 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}) i NaCl ($c = 1\times10^{-2}$ mol dm^{-3}). Umetak: ovisnost intenziteta vrpce istezanja ksantenskog sustava pri 1511 cm^{-1} o koncentraciji rodamina 6G.

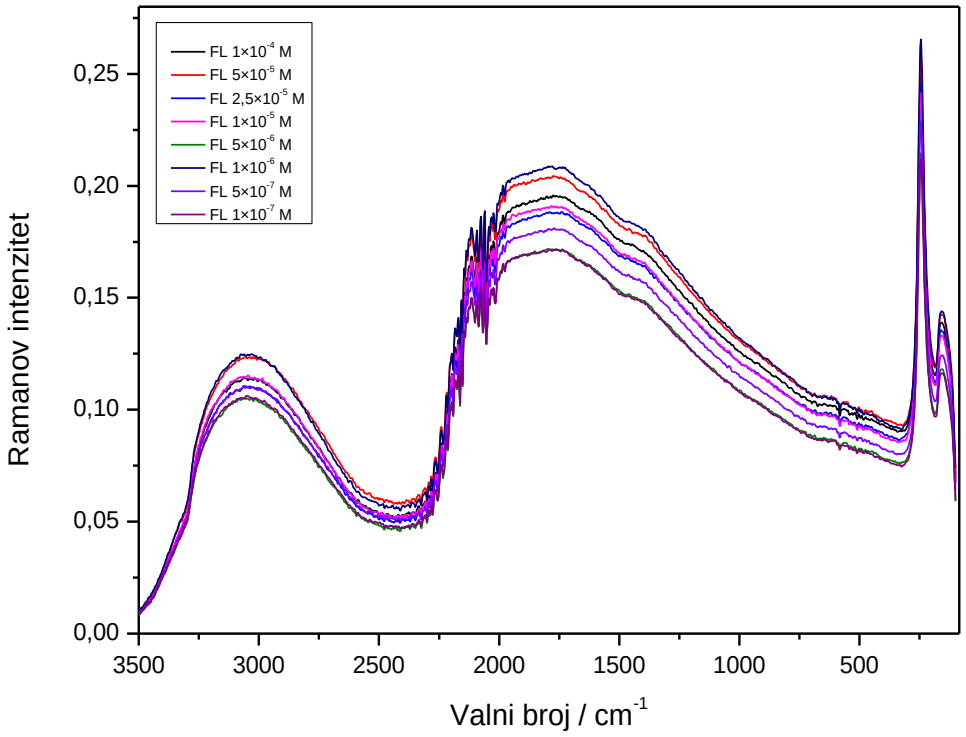
Prije snimanja koncentracijskih ovisnih SERS spektara fluoresceina ispitan je utjecaj agregirajućih agensa i redoslijeda njihova dodavanja u mjerni uzorak fluoresceina koncentracije 5×10^{-6} mol dm^{-3}, pri kojoj nije opažen SERS spektar u svježem koloidu. Dodatkom niti jednog od agregirajućih agensa u mjerni uzorak, neovisno o redoslijedu, nije opaženo pojačano Ramanovo raspršenje fluoresceina (slika 19), odnosno nije pospješena adsorpcija molekula s negativnim nabojem u strukturi na nanočestice srebra. U spektru uzorka koji sadrži samo $Ca(NO_3)_2$ kao agregirajući agens uočene su slabe vrpce citratnih iona (1030, 950 cm^{-1}), što upućuje na agregaciju nanočestica i nastajanje vrućih točaka, dok vrpca pri 245 cm^{-1} u spektru uzorka koji sadrži samo NaCl ukazuje na zamjenu citratnih iona na površini kloridnim ionima. U prisutnosti oba agregirajuća agensa u mjernom uzorku bazna linija u spektru je podignuta,

bez obzira na redoslijed dodavanja soli, uslijed raspršenja zračenja na agregiranim nanočesticama, te se uočava vrpca istezanja veze Ag–Cl (245 cm^{-1}).



Slika 17. SERS spektri FL (5×10^{-6} mol dm^{-3}) u svježe pripravljenom koloidu srebra: bez agregirajućeg sredstava (crno), s NaCl ($c = 1\times10^{-2}$ mol dm^{-3}) (crveno), s NaCl ($c = 1\times10^{-2}$ mol dm^{-3}) i $Ca(NO_3)_2$ ($c = 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}) (plavo), s $Ca(NO_3)_2$ ($c = 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}) (ružičasto), s $Ca(NO_3)_2$ ($c = 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}) i NaCl ($c = 1\times10^{-2}$ mol dm^{-3}) (zeleno).

Koncentracijski ovisni SERS spektri fluoresceina (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) snimljeni u suspenziji srebra agregiranoj na isti način kao u slučaju rodamina 6G (dodatak $Ca(NO_3)_2$ pa NaCl), u potpunosti su odgovarali Ramanovom spektru agregiranog koloida srebra (slika 20). Niti djelomična neutralizacija negativnog naboja na nanočesticama srebra niti veći broj SERS aktivnih mjesta nastalih kontroliranim agregiranjem nanočestica, nisu doprinijeli uspješnoj adsorpciji molekula fluoresceina i opažanju Ramanovog raspršenja fluoresceina u koloidnoj suspenziji srebra.



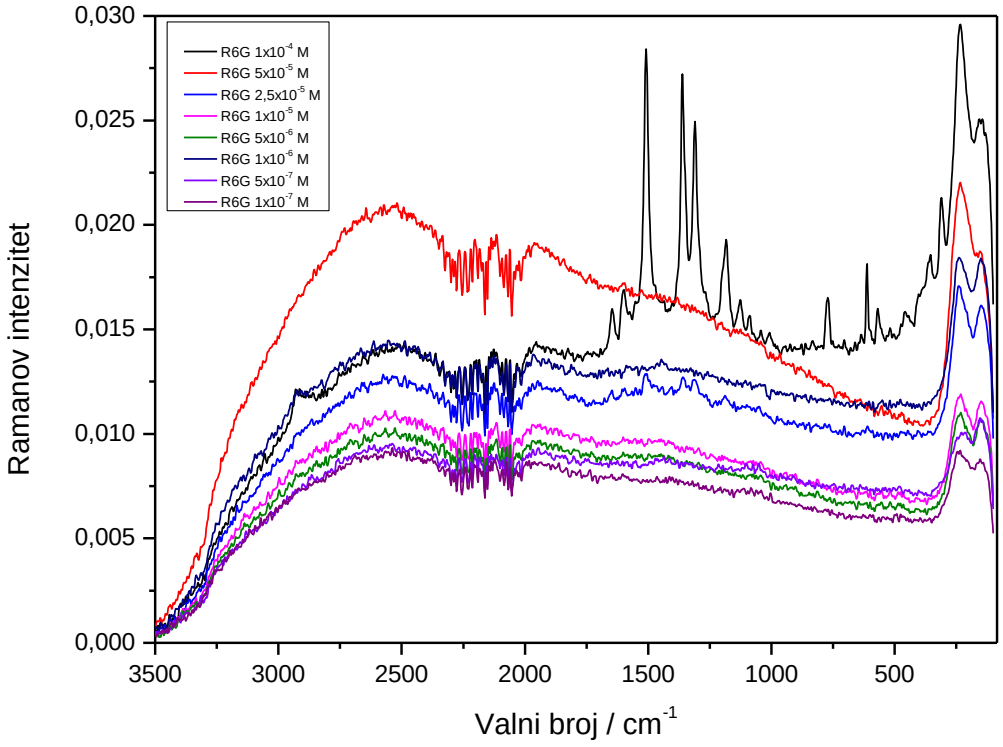
Slika 18. Koncentracijski ovisni SERS spektri FL (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) u koloidu AgNP agregiranom s $Ca(NO_3)_2$ ($c = 1\times10^{-3}$ mol dm^{-3}) i NaCl ($c = 1\times10^{-2}$ mol dm^{-3}).

4.2.4. Stakleni filter-papir

Stakleni filter-papir, koji je korišten kao čvrsti nosač za imobilizaciju nanočestica srebra, sastoji se od isprepletenih borosilikatnih staklenih niti, koje daju vrlo slabo Ramanovo raspršenje, te čine neravnu površinu pogodnu za pojačanje raspršenog zračenja. Na površinu staklenog-filter papira kapanjem je nanesena koloidna suspenzija srebra, na koju je nakon sušenja nanesena kap otopine ksantenske boje. Spektri su snimljeni nakon potpunog sušenja uzorka.

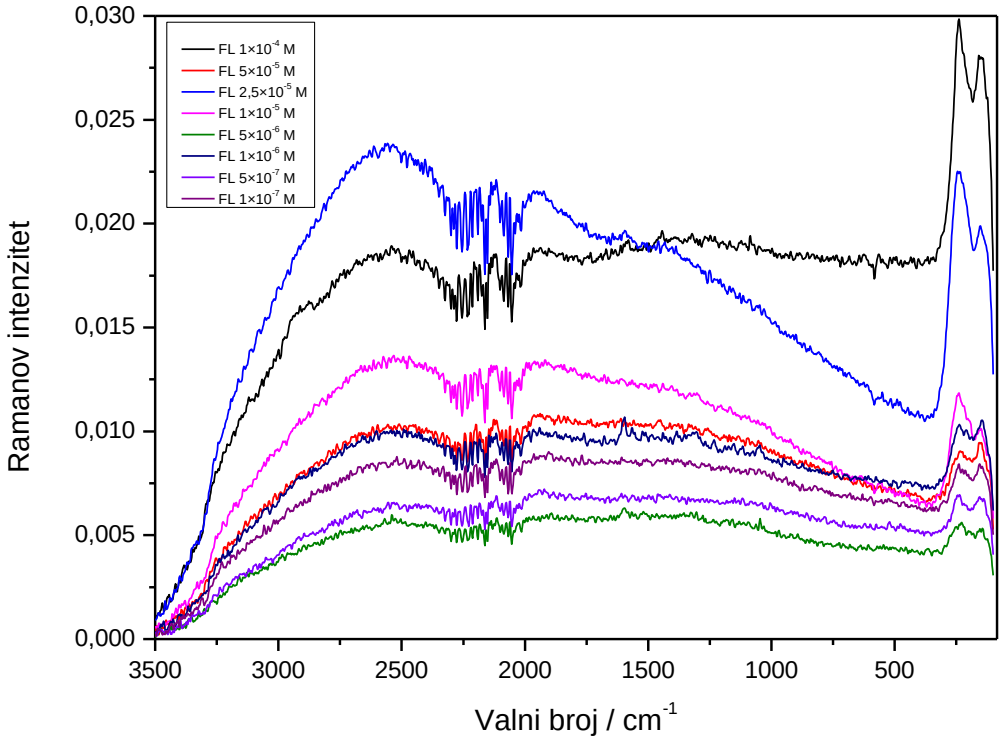
Snimljeni su koncentracijski ovisni spektri rodamina 6G (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) nakon nanošenja i sušenja kapi otopine na staklenom filter-papiru prethodno tretirano koloidom

srebra. Pojačanje raspršenja za molekulu rodamina 6G na staklenom filter-papiru opaženo je za uzorak najveće koncentracije, $c = 1\times10^{-4}$ mol dm^{-3} (slika 21). Intenzivne vrpce karakterističnih vibracija molekule ukazuju na adsorpciju molekula na tretirani stakleni filter-papir, dok vrlo jaka vrpca pri 240 cm^{-1} upućuje na kemisorpciju molekula na čvrsti supstrat. Vrlo slabi SERS spektar opažen je i za uzorak koncentracije $2{,}5\times10^{-5}$ mol dm^{-3}, dok je za uzorke nižih koncentracija, kao i za uzorak koncentracije 5×10^{-5} mol dm^{-3}, raspršenje potpuno izostalo. Izostanak slijeda opaženih SERS spektara pripisan je neravnomjernoj raspodjeli nanočestica srebra na površini filter-papira. Naime, nakon sušenja kapi koloidne suspenzije moglo se opaziti nakupljanje nanočestica srebra na rubu kapi. Iako se pomicanjem nosača uzorka podešavao položaj uzorka u fokus zrake, nije bilo moguće precizno fokusirati lasersku zraku na mjesta nakupina nanočestica na filter-papiru.



Slika 19. Koncentracijski ovisni SERS spektri R6G (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) na nanočesticama srebra imobiliziranim na staklenom filter-papiru.

Za sve otopine fluoresceina u mjerenom koncentracijskom području (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}), nanesene u obliku kapi na nanočestice srebra imobilizirane na staklenom filter-papiru, raspršenje je u potpunosti izostalo (slika 22). Uz neravnomjernu raspodjelu nanočestica srebra na staklenom filter-papiru, razlog izostanku raspršenog zračenja su i odbojne elektrostatske interakcije negativnih molekula s citratnim ionima koji okružuju nanočestice srebra, a koje sprječavaju adsorpciju molekula na površinu SERS supstrata.

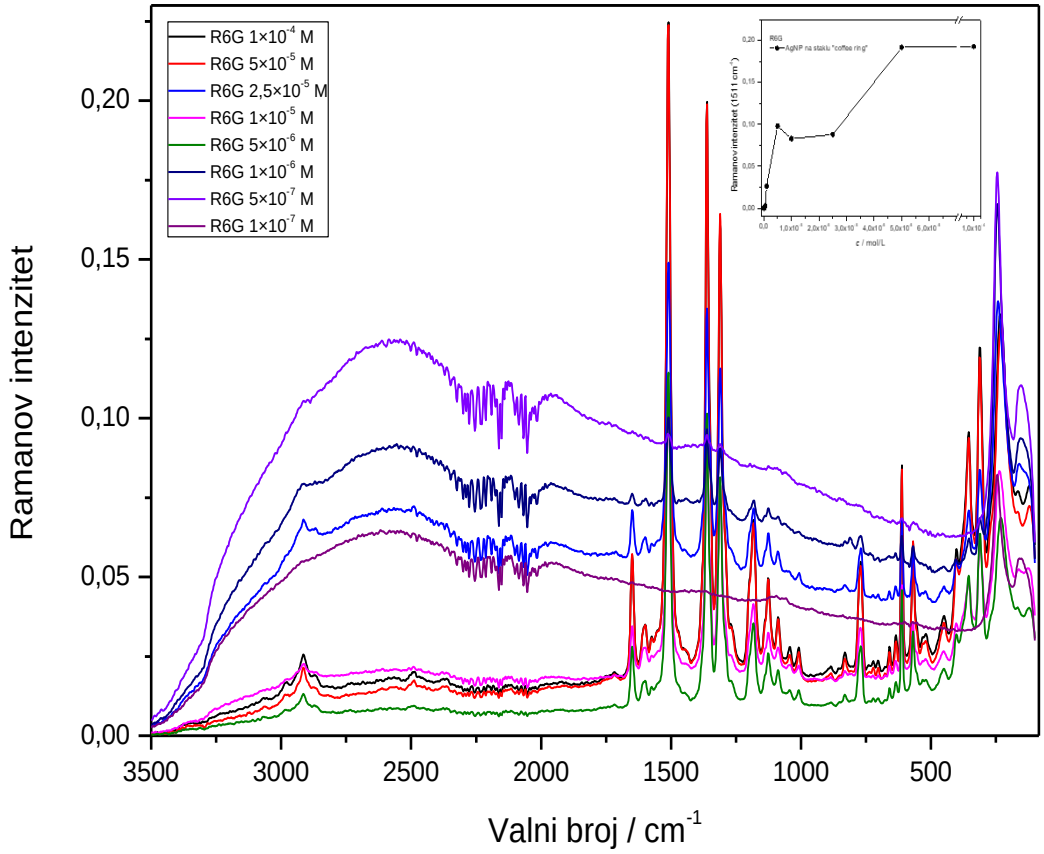


Slika 20. Koncentracijski ovisni SERS spektri FL 1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) na nanočesticama srebra imobiliziranim na staklenom filter-papiru.

4.2.5. Tretirano staklo

Prije imobilizacije nanočestica srebra na mikroskopsko staklo, stakalce za mikroskopiju nagrizano je fluorovodičnom kiselinom u svrhu formiranja neravne hidrofilne površine. Mjerni uzorak modelnih spojeva u svježe pripravljenoj koloidnoj suspenziji srebra nanesen je u obliku kapi na stakalce. Sušenjem kapi nanočestice srebra nakupljaju se na rubu kapi, pri čemu nastaje tzv. prsten kave.[22] Nakupljanjem nanočestica srebra na rubu kapi stvaraju se vruće točke, na kojima se pojačava intenzitet raspršenog zračenja adsorbiranih molekula.

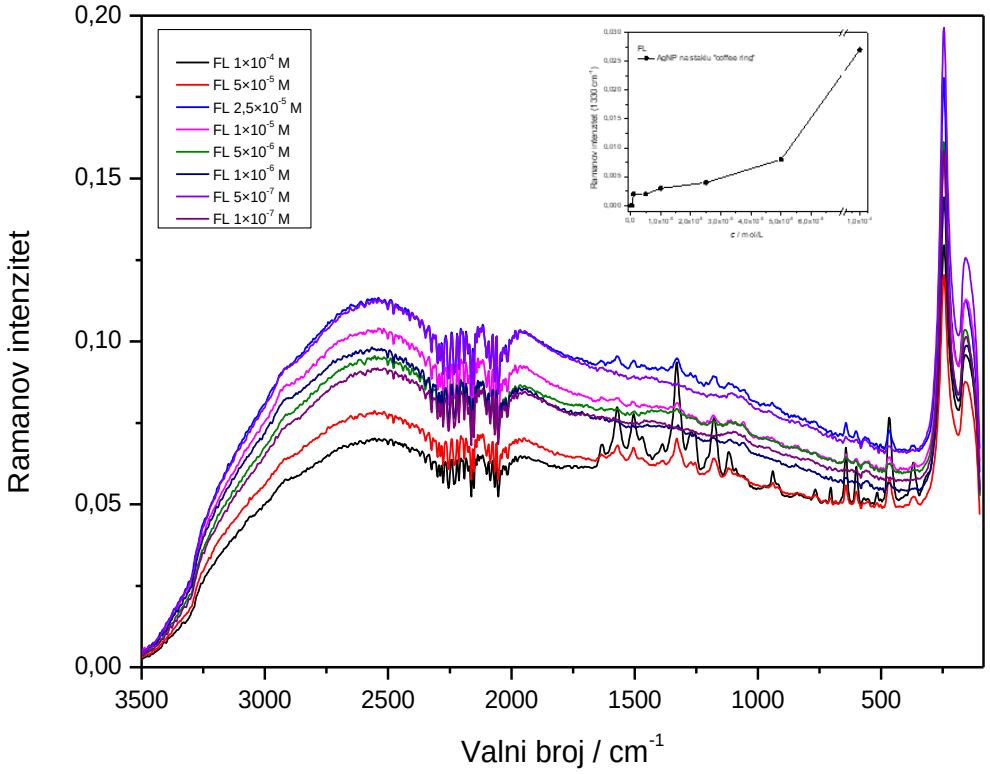
Koncentracijski ovisni SERS spektri rodamina 6G (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) na tretiranom staklu prikazani su na slici 23. Opaženi su SERS spektri rodamina 6G u gotovo čitavom mjerenom koncentracijskom području, 5×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}, pri čemu najintenzivniji spektar za uzorak najveće koncentracije, $c = 1\times10^{-4}$ mol dm^{-3}, a najslabiji spektar, s prepoznatljivim vrpcama rodamina 6G, za uzorak submikromolarne koncentracije, $c = 5\times10^{-7}$ mol dm^{-3}. Međutim, intenzitet vrpci u opaženim SERS spektrima ne prati linearno promjenu koncentracije rodamina 6G, što je već ranije pripisano koncentracijski ovisnoj orijentaciji molekula na površini nanočestica srebra. Na to ukazuje prikazana ovisnost intenziteta vrpce pri 1511 cm^{-1} o koncentraciji rodamina 6G (umetak na slici 23).



Slika 21. Koncentracijski ovisni SERS spektri R6G (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) na staklu tretiranom s HF i AgNP. Umetak: ovisnost intenziteta vrpce istezanja ksantenskog sustava pri 1511 cm^{-1} o koncentraciji rodamina 6G.

Pri snimanju koncentracijski ovisnih SERS spektara fluoresceina (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) najintenzivniji SERS spektar opažen je za uzorak najveće koncentracije, $c = 1\times10^{-4}$ mol dm^{-3}, dok su slabi spektri opaženi za uzorke nižih koncentracija, od 5×10^{-5} mol dm^{-3} do 1×10^{-6} mol dm^{-3} (Slika 24). Vrpce opažene u području 1500–1100 cm^{-1} većinom su pripisane istezanju C–O–C i CC veza aromatskog ksantenskog sustava molekule fluoresceina. Opažanju karakterističnih vrpci fluoresceina doprinijelo je spontano nastajanje agregata nanočestica srebra i SERS aktivnih mjesta tijekom sušenja uzorka na tretiranom staklu, na kojima su istovremeno između nanočestica srebra ostale „zarobljene“ molekule fluoresceina. Iako smanjenje koncentracije uzorka prati pad SERS intenziteta, ono

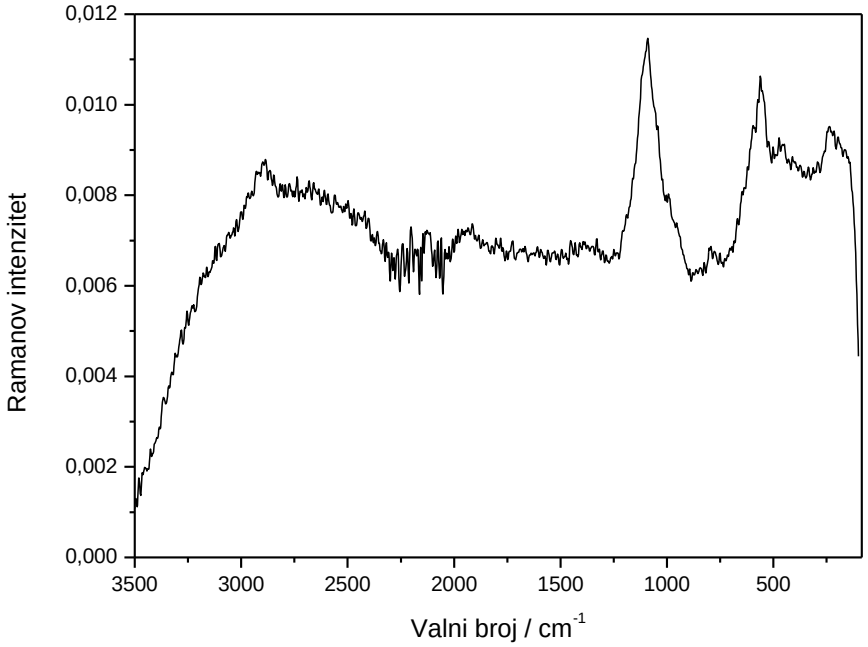
nije linearno, na što upućuje prikaz ovisnosti intenziteta vrpce pri 1330 cm^{-1} o koncentraciji fluoresceina (umetak na slici 24).



Slika 22. Koncentracijski ovisni SERS spektri FL (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) na staklu tretiranom s HF i AgNP. Umetak: ovisnost intenziteta vrpce istezanja ksantenskog sustava pri 1330 cm^{-1} o koncentraciji fluoresceina.

4.2.6. Silanizirano staklo

Postupak silaniziranja stakla s (3-aminopropil)trimetoksisilanom proveden je u svrhu uvođenja primarnih amino skupina na površinu borosilikatnog stakla i imobilizacije koloidnih nanočestica srebra. Naime, vezanje nanočestica srebra na silanizirano staklo posljedica je elektrostatskog privlačenja između pozitivno nabijenog dušika amino skupine na površini silaniziranog stakla i negativno nabijenih citratnih iona na nanočesticama srebra. Uz privlačne elektrostatske interakcije imobilizaciji nanočestica srebra doprinose i van der Waalsove sile te slabe kovalentne veze. Na postojanje kemijske veze Ag–N ukazuje vrpca slabog intenziteta pri približno 240 cm^{-1} u Ramanovom spektru čvrstog supstrata (slika 25).

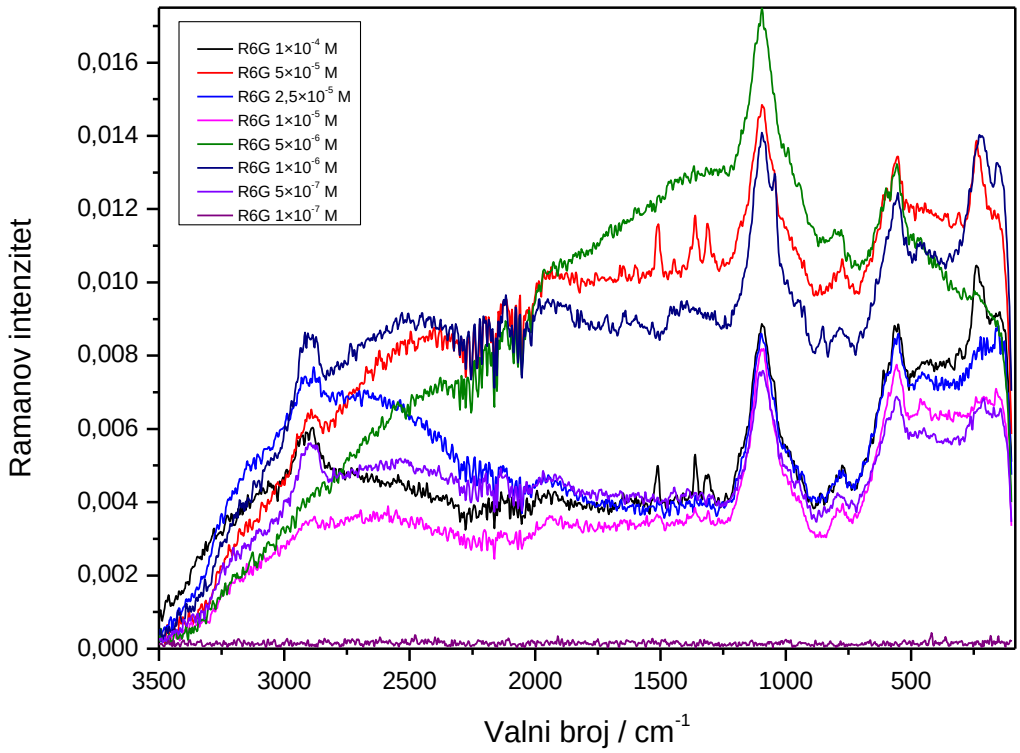


Slika 23. Ramanov spektar silaniziranog stakla tretiranog s AgNP.

U Ramanovom spektru silaniziranog stakla tretiranog s koloidom srebra opažaju se dvije vrpce jakog intenziteta pri približno 1100 i 520 cm^{-1}, koje redom odgovaraju antisimetričnom istezanju Si–O–Si veza te svijanju O–Si–O skupine u strukturi stakla.[23] Radi usporedbe snimljeni su Ramanovi spektri čistog stakla i silaniziranog stakla bez nanočestica srebra (slika D2 u Dodatku). Imobilizacijom nanočestica srebra na silanizirano staklo, one se nalaze blizu

jedna drugoj te tvore agregate na površini čvrstog supstrata, s kojih se raspršenje adsorbiranih molekula pojačava.

Otopine rodamina 6G u rasponu koncentracija 1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3} nanesene su na površinu silaniziranih stakalaca tretiranih koloidom srebra. SERS spektri su opaženi samo za uzorke najvećih koncentracija 1×10^{-4} i 5×10^{-5} mol dm^{-3} (slika 26).

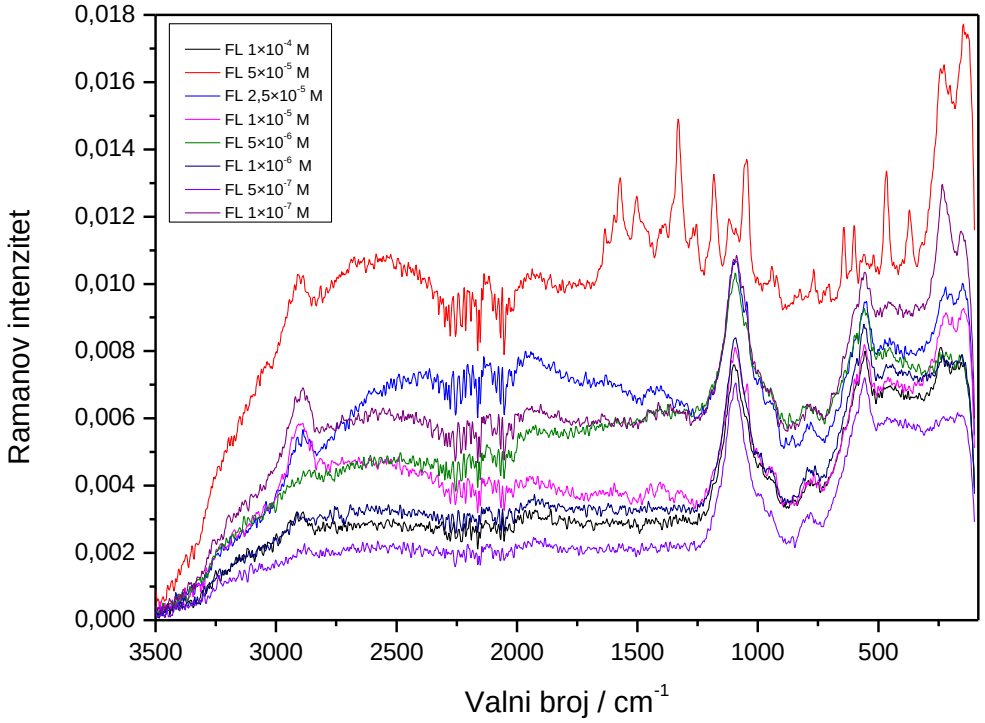


Slika 24. Koncentracijski ovisni SERS spektri R6G (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) na staklu silaniziranom s (3-aminopropil)trimetoksisilanom i tretiranom s AgNP.

Uz karakteristične vrpce vibracije rodamina 6G u području 1550–1250 cm^{-1}, u SERS spektru su prisutne vrpce silaniziranog stakla (1100, 520 cm^{-1}). Za uzorke koncentracija nižih od 5×10^{-5} mol dm^{-3} nije opažano pojačanje raspršenog zračenja rodamina 6G, te su razlike u spektrima tih uzoraka pripisane nejednolikoj raspodjeli nanočestica srebra, odnosno različitoj površini SERS supstrata.

U nizu otopina fluoresceina koncentracija 1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3} na silaniziranom staklu tretiranom s koloidom srebra, opažen je SERS spektar samo za uzorak koncentracije 5×10^{-5} mol dm^{-3} (slika 26). Spektar otopine veće i nižih koncentracija od 5×10^{-5} mol dm^{-3} nisu opaženi

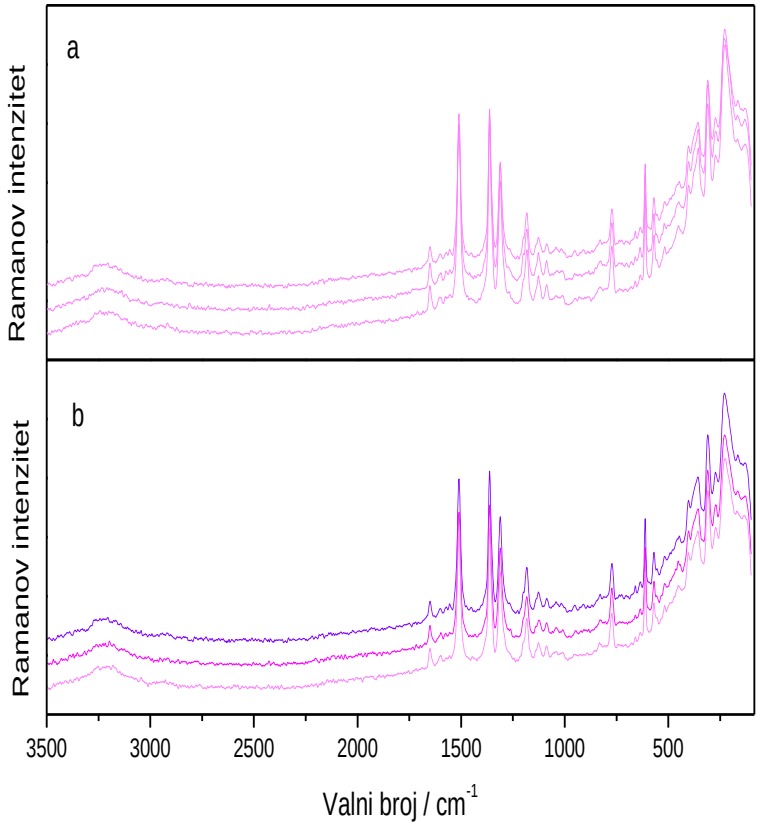
te snimljeni spektri odgovaraju spektru silaniziranog stakla različitog intenziteta raspršenja zračenja. Za pretpostaviti je da površina silaniziranog stakla nije jednoliko prekrivena nanočesticama srebra, pri čemu na mjesta imobiliziranih nanočestica nije bilo moguće precizno fokusirati lasersku zraku.



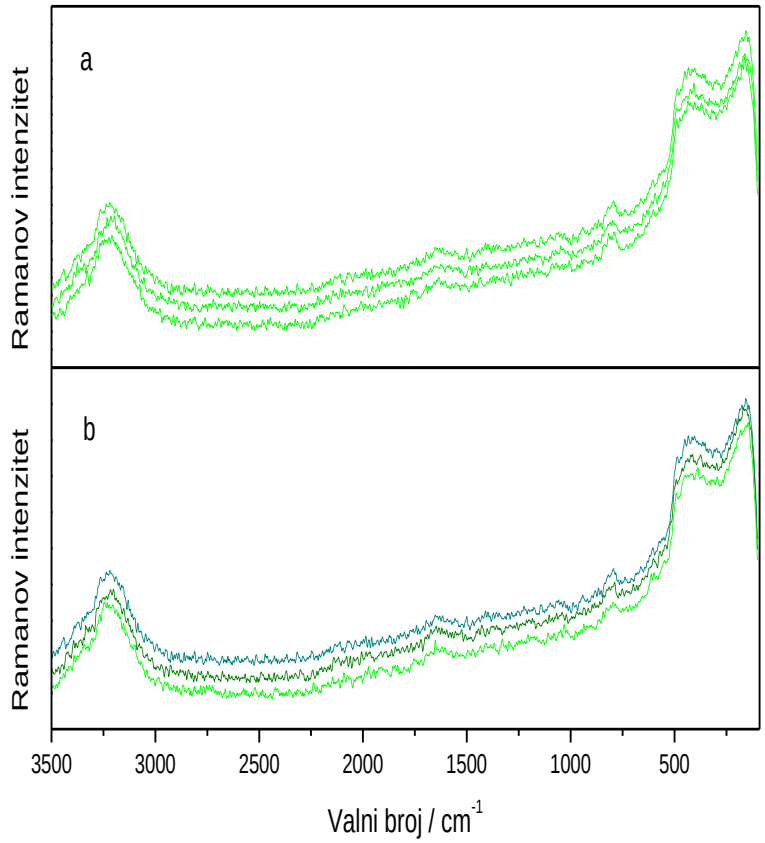
Slika 25. Koncentracijski ovisni SERS spektri FL (1×10^{-7}–1×10^{-4} mol dm^{-3}) na staklu silaniziranom s (3-aminopropil)trimetoksisilanom i tretiranom s AgNP.

4.3. Reproducibilnost

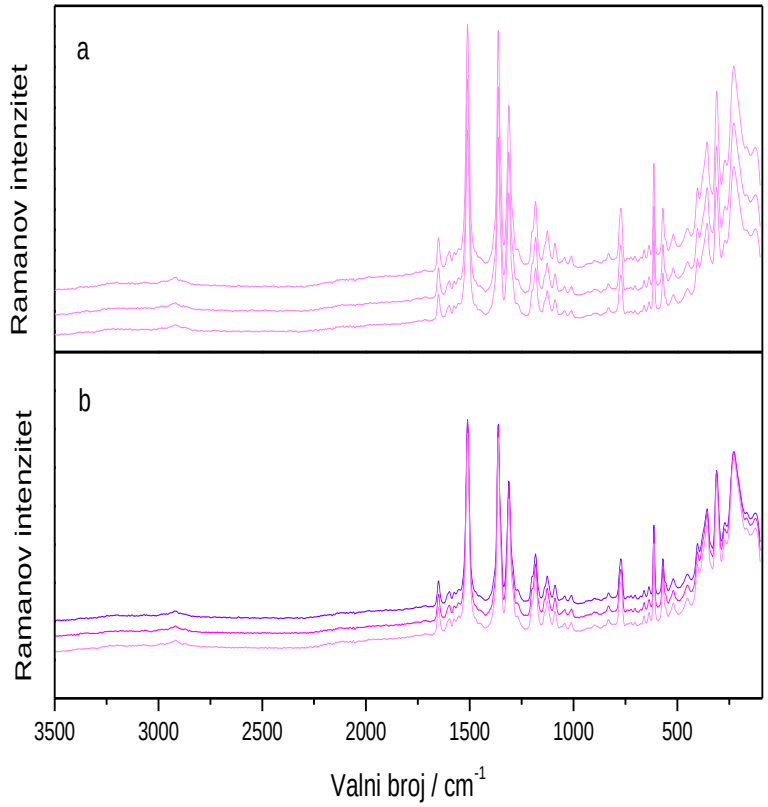
Ponovljivost mjerenja s odgovarajućim SERS supstratom određena je snimanjem tri spektra jednog uzorka, te snimanjem spektara tri uzorka pripravljena na isti način (slike 28–39). Spektri istog uzorka ukazivali su na reproducibilnost korištenog SERS susptrata (jednolikost nanostrukturirane površine s koje se opaža pojačanje), dok su spektri uzoraka pripravljenih na isti način, osim na svojstva supstrata, upućivali i na ponovljivost priprave uzorka. Pri određivanju reproducibilnosti mjerenja korištene su otopine rodamina 6G i fluoresceina onih koncentracija za koje je opaženo najveće pojačanja Ramanovog raspršenja. Reproducibilnost je izražena kao standardno odstupanje intenziteta vrpce pri 1509 cm^{-1} za rodamin 6G te vrpce pri 1314 cm^{-1} za fluorescein (tablica 3).



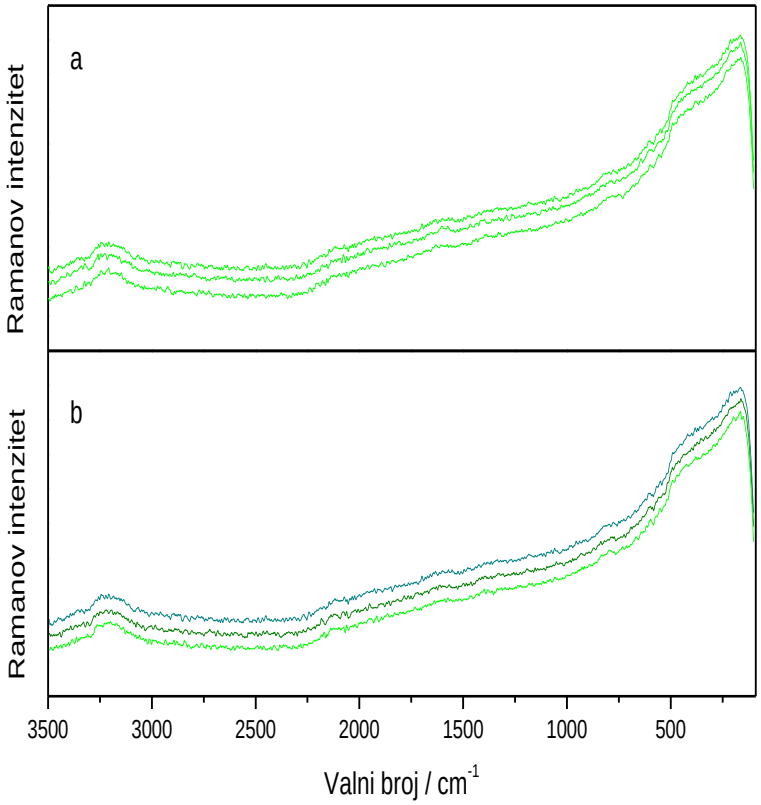
Slika 26. SERS spektri R6G (5×10^{-5} mol dm^{-3}) u svježem koloidu AgNP: a) jedan uzorak snimljen tri puta, b) tri uzorka. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.



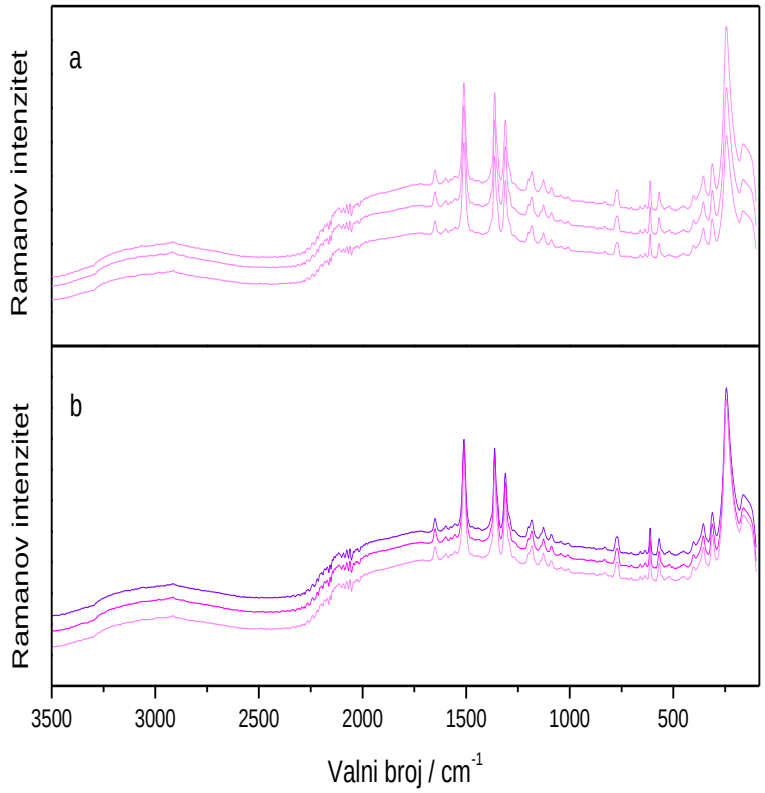
Slika 27. SERS spektri FL (5×10^{-5} mol dm^{-3}) u svježem koloidu AgNP: a) jedan uzorak snimljen tri puta, b) tri uzorka. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.



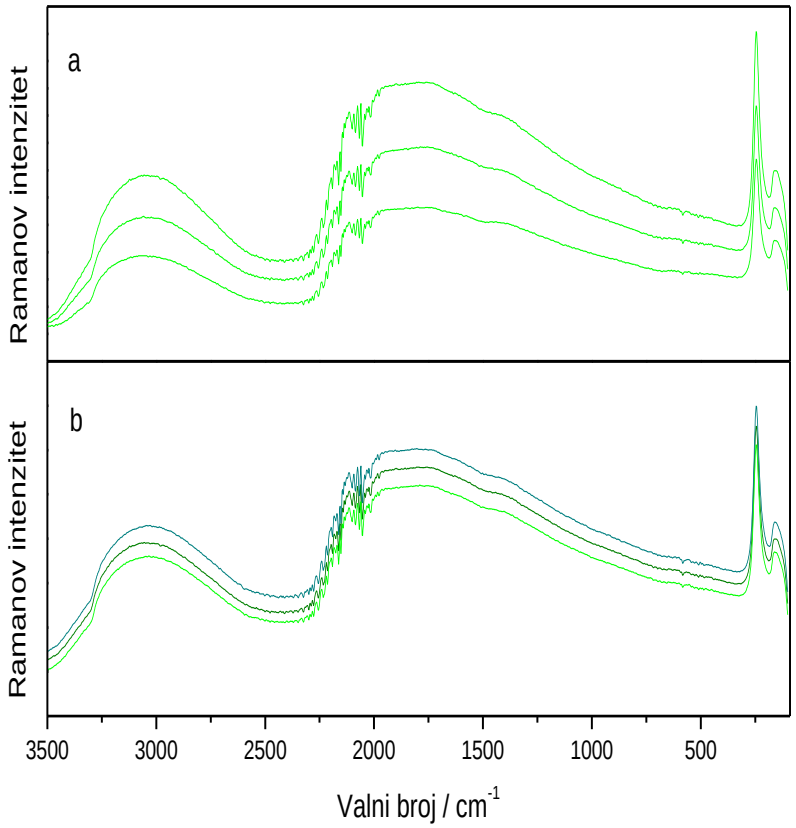
Slika 28. SERS spektri R6G (5×10^{-5} mol dm^{-3}) u koncentriranom koloidu AgNP: a) jedan uzorak snimljen tri puta, b) tri uzorka. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.



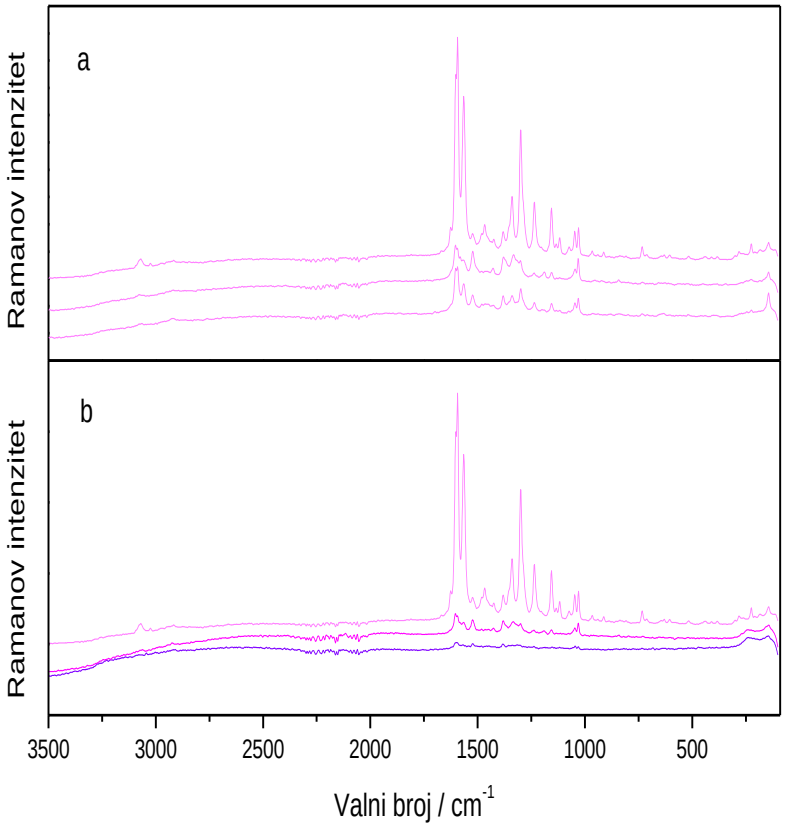
Slika 29. SERS spektri FL (5×10^{-5} mol dm^{-3}) u koncentriranom koloidu AgNP: a) jedan uzorak snimljen tri puta, b) tri uzorka. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.



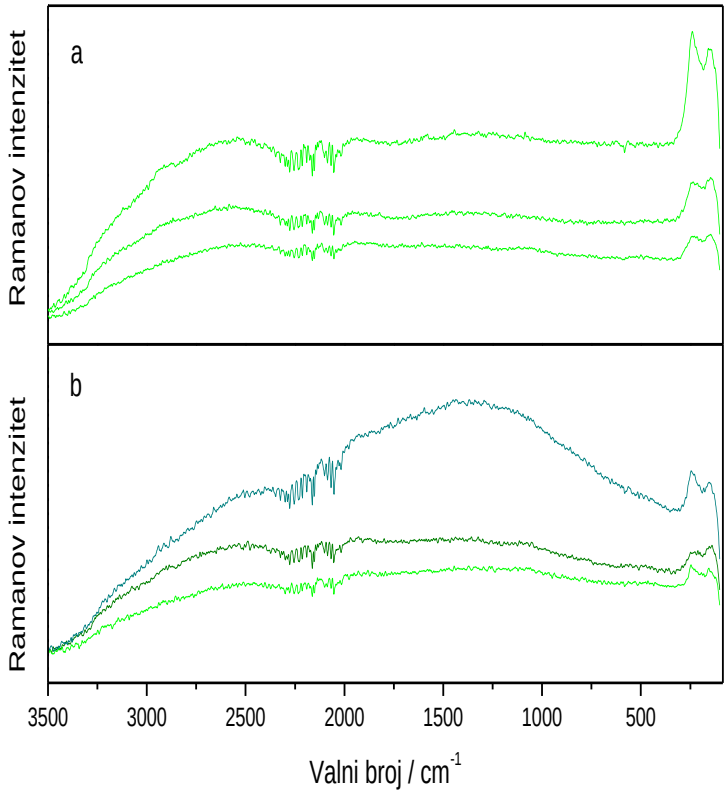
Slika 30. SERS spektri R6G (1×10^{-6} mol dm^{-3}) u agregiranom koloidu AgNP: a) jedan uzorak snimljen tri puta, b) tri uzorka. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.



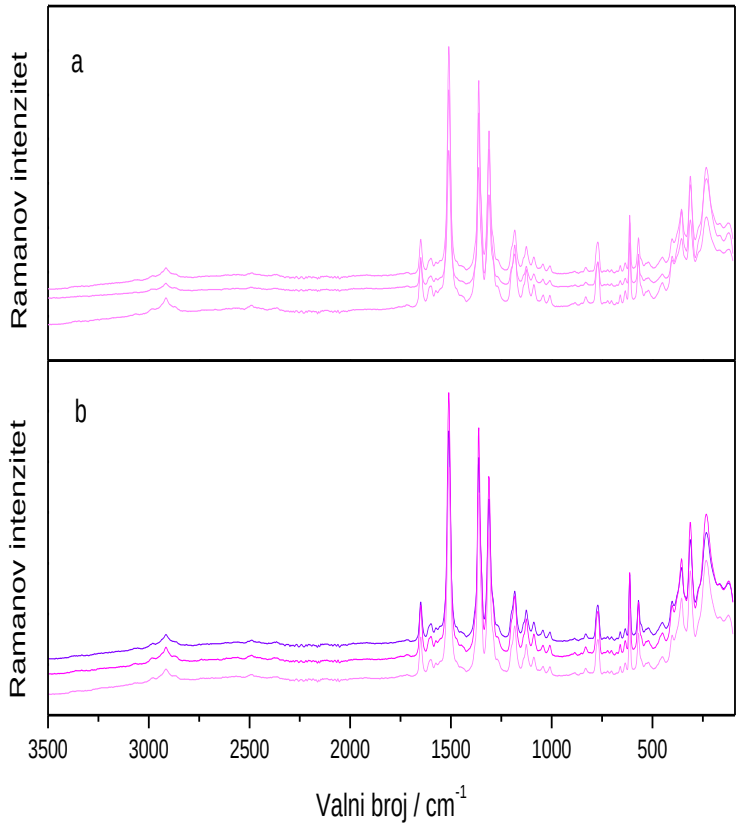
Slika 31. SERS spektri FL (5×10^{-5} mol dm^{-3}) u agregiranom koloidu AgNP: a) jedan uzorak snimljen tri puta, b) tri uzorka. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.



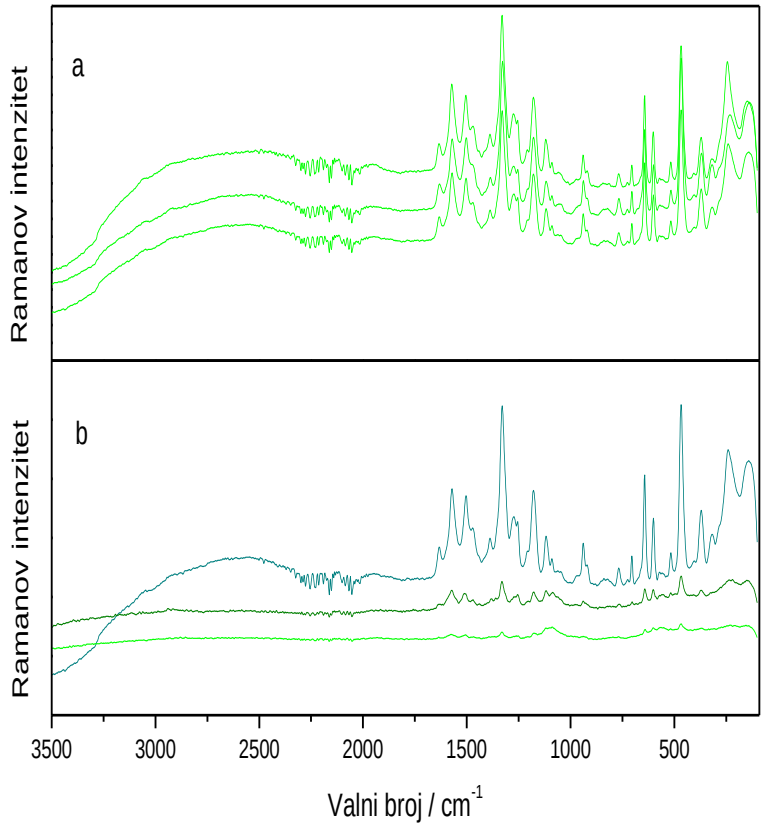
Slika 32. SERS spektri R6G (1×10^{-4} mol dm^{-3}) na staklenom filter-papiru tretiranom koloidom srebra: a) jedan uzorak snimljen tri puta, b) tri uzorka. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.



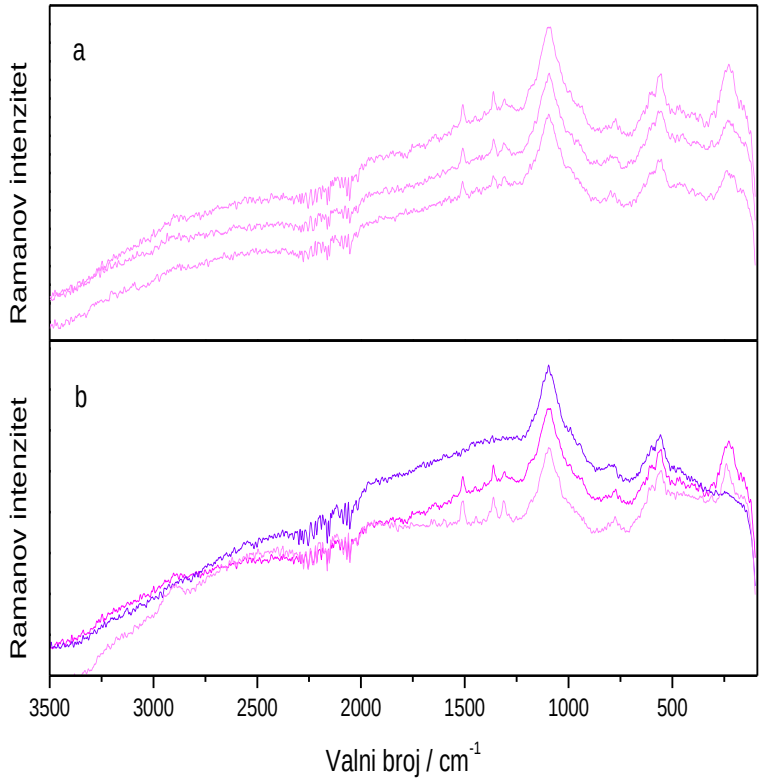
Slika 33. SERS spektri FL (1×10^{-4} mol dm^{-3}) na staklenom filter-papiru tretiranom koloidom srebra: a) jedan uzorak snimljen tri puta, b) tri uzorka. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.



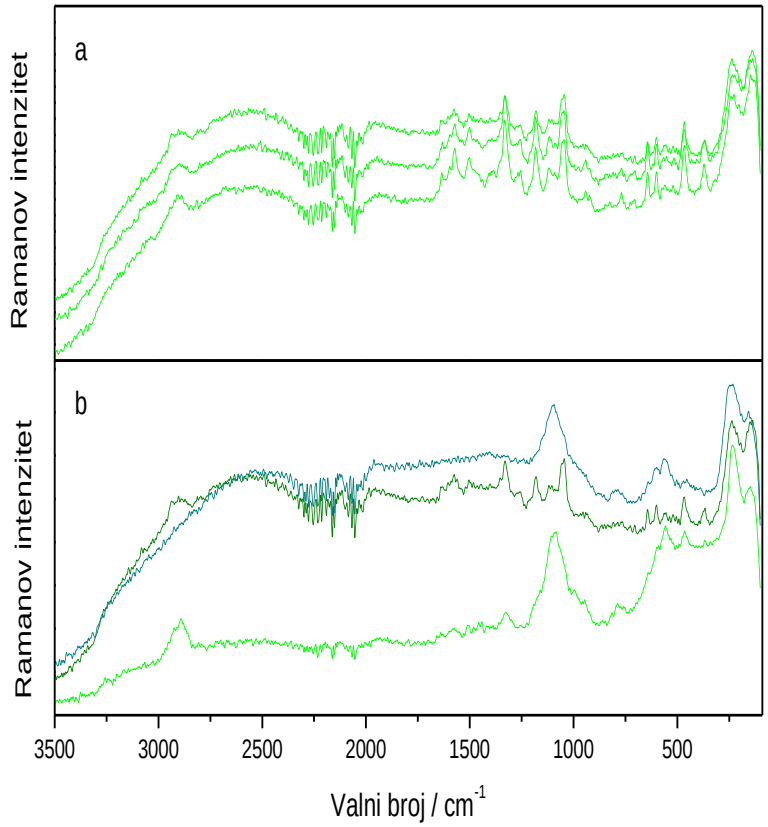
Slika 34. SERS spektri R6G (1×10^{-4} mol dm^{-3}) na staklu tretiranom s HF i AgNP: a) jedan uzorak snimljen tri puta, b) tri uzorka. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.



Slika 35. SERS spektri FL (1×10^{-4} mol dm^{-3}) na staklu tretiranom s HF i AgNP: a) jedan uzorak snimljen tri puta, b) tri uzorka. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.



Slika 36. SERS spektri R6G (5×10^{-5} mol dm^{-3}) na staklu silaniziranom s (3-aminopropil)trimetoksisilanom i tretiranom s AgNP: a) jedan uzorak snimljen tri puta, b) tri uzorka. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.



Slika 37. SERS spektri FL (5×10^{-5} mol dm^{-3}) na staklu silaniziranom s (3-aminopropil)trimetoksisilanom i tretiranom s AgNP: a) jedan uzorak snimljen tri puta, b) tri uzorka. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.

Tablica 2. Reproducibilnost supstrata izražena pomoću standardnog odstupanja intenziteta vrpce pri 1509 cm^{-1} za R6G te vrpce pri 1314 cm^{-1} za FL.

SERS supstrat	**R6G**		**FL**	
	I_{1509}		I_{1314}	
	Jedan uzorak	**Tri uzorka**	**Jedan uzorak**	**Tri uzorka**
svježi koloid AgNP	0,0107±0,0003	0,013±0,002	-	-
koncentrirani koloid AgNP	0,1205±0,005	0,102±0,013	-	-
agregirani koloid AgNP	0,148±0,004	0,140±0,008	-	-
AgNP na staklenom filter-papiru	0,01±0,02	0,01±0,02	-	-
AgNP na tretiranom staklu	0,22±0,03	0,21±0,07	0,056±0,006	0,02±0,03
AgNP na silaniziranom staklu	0,0009±0,0001	0,0008±0,0007	0,0022±0,0008	0,001±0,001

U nizu pripravljenih SERS supstrata srebra bolju reproducibilnost pokazuju nanočestice srebra dispegirane u koloidnim suspenzijama nego nanočestice srebra imobilizirane na čvrstim podlogama. Među koloidnim suspenzijama nanočestica srebra najbolja ponovljivost supstrata i priprave uzorka karakterizira svježi koloid srebra, dok se koncentriranjem i agregiranjem nanočestica srebra ponovljivost mjerenja smanjuje. Loša reproducibilnost i supstrata i priprave uzorka opažena je za nanočestice srebra na staklenom-filter papiru i silaniziranom staklu, koja se može pripisati neravnomjernoj imobilizaciji nanočestica na površini čvrstog nosača. Nešto bolja ponovljivost postignuta je nanošenjem mjernog uzorka (suspenzije nanočestica srebra s analitom) na tretirano staklo. Odstupanja među spektrima u tom slučaju posljedica su otežanog fokusiranja laserske zrake na nakupine nanočestica na rubu prstena formiranog sušenjem mjernog uzorka na staklu.

4.4. Faktor pojačanja

Učinkovitost pripravljenih supstrata srebra za površinsko pojačanje Ramanovog raspršenja modelnih molekula, rodamina 6G i fluoresceina, procijenjena je izračunom faktora pojačanja raspršenog zračenja za svaki pojedini supstrat. Izračunate vrijednosti faktora pojačanja raspršenog zračenja modelnih molekula na odgovarajućem SERS supstratu dane su u tablici 3.

Tablica 3. Faktori pojačanja raspršenog zračenja R6G i FL na različitim SERS supstratima srebra.

SERS Supstrat	**Faktor pojačanja (EF)**	
	R6G	**FL**
svježi koloid AgNP	$8{,}11\times10^{3}$	–
koncentrirani koloid AgNP	$3{,}48\times10^{4}$	–
agregirani koloid AgNP	$5{,}68\times10^{6}$	–
AgNP na staklenom filter-papiru	$3{,}38\times10^{3}$	–
AgNP na tretiranom staklu	$5{,}41\times10^{4}$	$8{,}23\times10^{3}$
AgNP na silaniziranom staklu	$5{,}61\times10^{2}$	$9{,}22\times10^{2}$

Izračunati faktori pojačanja ukazuju da isti supstrati različito pojačavaju raspršenje zračenja različitih modelnih molekula. Naime, za fluorescein je pojačanje Ramanovog raspršenja u koloidnim suspenzijama u potpunosti izostalo, dok se za rodamin 6G Ramanovo raspršenje pojačalo 10^{3}–10^{6} puta. Za razliku od negativno nabijene molekule fluoresceina, molekula rodamina 6G nosi pozitivan naboj u strukturi te se elektrostatski privlači sa slojem negativno nabijenih citratnih iona na nanočesticama srebra, što doprinosi adsorpciji molekula iz vodenog medija na površinu metala i opažanju SERS efekta. Najveći faktor pojačanja izračunat je za rodamin 6G u agregiranoj koloidnoj suspenziji (EF = $5{,}68\times10^{6}$), što je posljedica nastanka velikog broja SERS aktivnih mjesta s kojih se raspršeno zračenje adsorbiranih molekula intenzivno pojačava. Nadalje, kada se usporede vrijednosti faktora pojačanja, koloidne suspenzije nanočestica srebra bolje pojačavaju raspršeno zračenje rodamina 6G nego nanočestice srebra na čvrstim podlogama. Čvrste SERS supstrate karakterizira nejednolika raspodjela nanočestica srebra, što utječe na njihovu SERS aktivnost i umanjuje vrijednost faktora pojačanja.

Međutim, upravo je na čvrstim SERS supstratima opaženo pojačanje Ramanovog raspršenja fluorescеina. Pri tome je za nanočestice srebra na tretiranom staklu opažen faktor pojačanja (EF = $8{,}23\times10^3$) za red veličine veći od faktora pojačanja za nanočestice srebra na silaniziranom staklu (EF = $9{,}22\times10^2$). Općenito, najveći faktor pojačanja za nanočestice srebra na čvrstim podlogama izračunat je u slučaju kada se na podlogu nanosi suspenzija nanočestica koja već sadrži analit. Može se pretpostaviti da nakupljanjem nanočestica srebra u obliku prstena kave nastaju SERS aktivna mjesta na kojima zaostaju modelne molekule, neovisno o svom naboju, te se raspršeno zračenje površinski pojačava.

§ 5. ZAKLJUČAK

SERS učinkovitost nanočestica srebra dispergiranih u različitim koloidnim suspenzijama: svježe pripravljenoj, koncentriranoj i agregiranoj, te imobiliziranih na čvrstim podlogama: staklenom filter-papiru, staklu tretiranom s fluorovodičnom kiselinom i staklu silaniziranom s (3-aminopropil)trimetoskisilanom, istražena je pomoću rodamina 6G i fluoresceina. U tu svrhu su snimljeni koncentracijski ovisni SERS spektri modelnih molekula te su određeni reproducibilnost i faktor pojačanja pripravljenih SERS supstrata.

U snimljenim spektrima fluoresceina u koloidnim suspenzijama nisu uočene vrpce karakterističnih vibracija molekule, budući da su pri pH koloida srebra (pH = 7,25), pripravljenog redukcijom srebrova(I) nitrata s trinatrijevim citratom, molekule fluoresceina negativno nabijene te su odbojne elektrostatske sile spriječile njihovu adsorpciju na nanočestice srebra, koje su nosile negativan naboj zbog zaostalih citratnih aniona na površini. S druge strane, pojačanje Ramanovog raspršenja rodamina 6G opaženo je u svim koloidnim suspenzijama i posljedica je adsorpcije pozitivno nabijenih molekula na negativno nabijenu površinu nanočestica srebra. Koloidne suspenzije su se pokazale reproducibilnim supstratima za opažanje pojačanog raspršenja rodamina 6G, pri čemu je za koloidnu suspenziju srebra, agregiranu dodatkom kalcijeva nitrata i natrijeva klorida, postignut najveći faktor pojačanja raspršenog zračenja, reda veličine 10^6. U prilog učinkovitosti agregirane koloidne suspenzije srebra ide i činjenica da je s tim SERS supstratom detektirana najniža koncentracija rodamina 6G od 1×10^{-7} mol dm^{-3}.

U odnosu na koloidne suspenzije, nanočestice srebra imobilizirane na čvrstim podlogama nisu se pokazale reproducibilnim supstratima, što je posljedica neravnomjerne raspodjele nanočestica srebra na površini supstrata i otežanog fokusiranja laserske zrake pri snimanju SERS spektara. Također, faktori pojačanja raspršenog zračenja na nanočesticama srebra imobiliziranim na čvrstim podlogama bili su niži od faktora pojačanja za nanočestice srebra u suspenzijama. Usprkos tome, SERS spektri fluoresceina opaženi su upravo na nanočesticama srebra na tretiranom staklu i silaniziranom staklu, na temelju čega se može pretpostaviti da elektrostatske interakcije imaju manju ulogu pri adsorpciji molekula na čvrste SERS supstrate. Najveće pojačanje raspršenog zračenja fluoresceina, reda veličine 10^3, opaženo je za fluorescein adsorbiran na nanočestice srebra na staklu tretiranom s HF, koje stvaraju

prepoznatljiv oblik prstena kave i SERS aktivna mjesta s kojih se raspršeno zračenje intenzivno pojačava.

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

AgNP – nanočestice srebra

ar – aromatski

as – antisimetrična vibracija

δ – deformacijska vibracija

EF – faktor pojačanja

FL – fluorescein

ip – u ravnini, engl. *in plane*

IR – infracrveno zračenje

Nd:YAG – itrij-aluminij granat dopiran s neodimijem

NIR – blisko infracrveno zračenje

ν – istezna vibracija

oop – izvan ravnine, engl. *out of plane*

R6G – rodamin 6G

s – simetrična vibracija

s – standardno odstupanje

SERS – površinski pojačano Ramanovo raspršenje

UV – ultraljubičasto zračenje

VIS – vidljivo zračenje

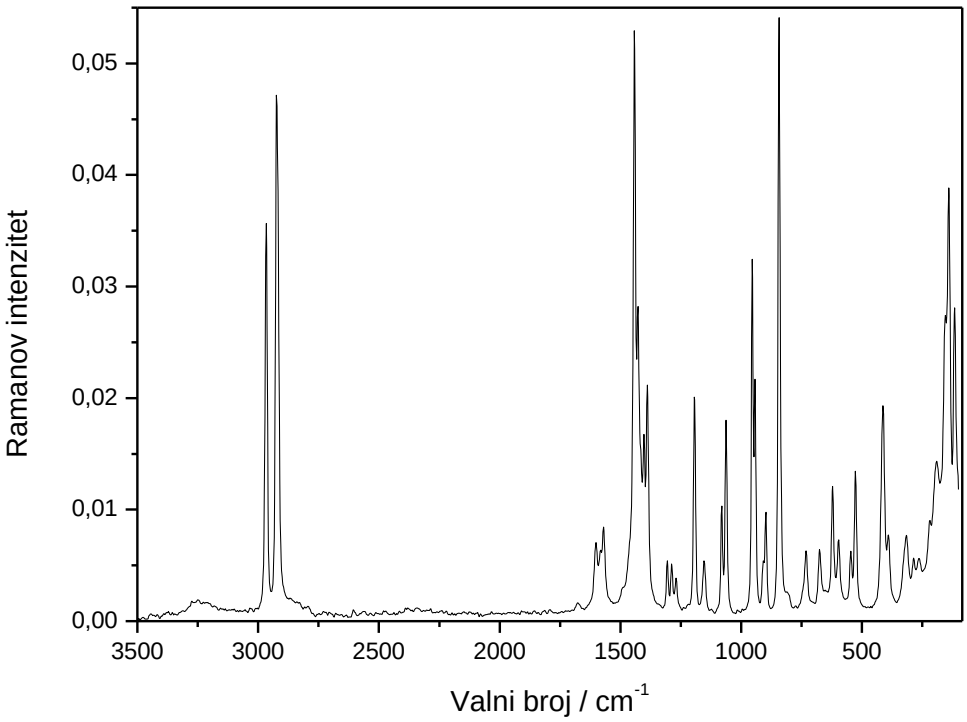
xr – ksantenski prsten, engl. *xanthene ring*

§ 7. LITERATURNI IZVORI

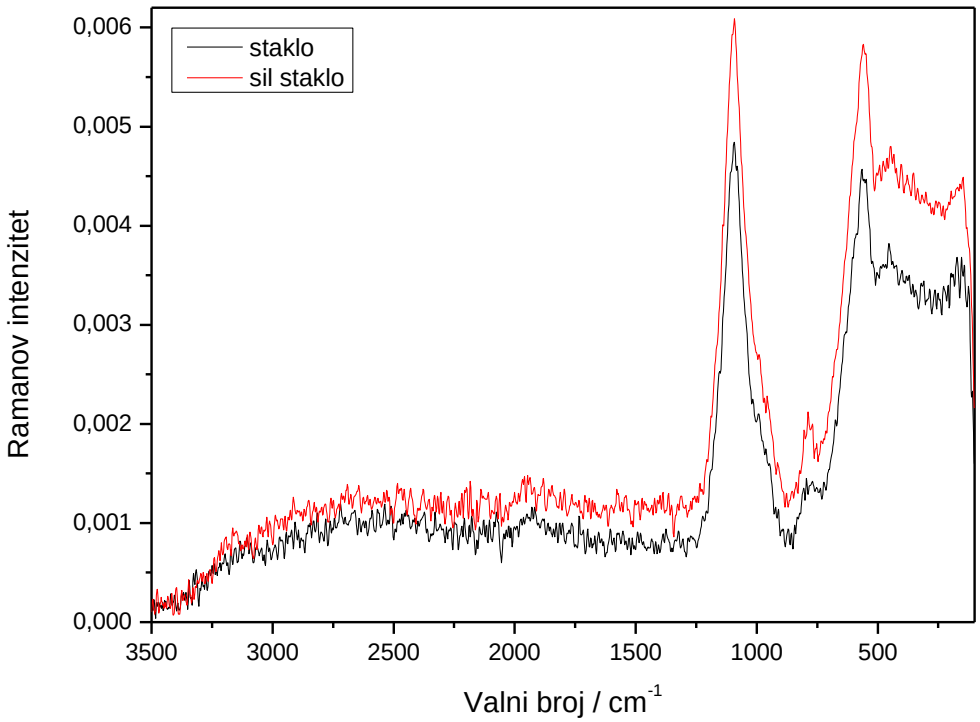
1. S. Schlücker, *Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2011.
2. H. Zheng, X. Q. Zhan, Q. N. Bian, X. J. Zhang, *Chem. Commun.* **49** (2013) 429–447.
3. Y. Leng, *Materials Characterization: Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods*, Second Edition, Wiley, 2008, str. 257–267.
4. G. Barbillon, *Nanoplasmonics – Fundamentals and Applications*, InTech, Rijeka, 2017., str. 361–370.
5. X. M. Lin, Y. Cui, Y. H. Xu, B. Ren, Z. Q. Tian, *Anal. Bioanal. Chem.* **394** (2009) 1729–1745.
6. X. Zhang, N. C. Shah, R. P. Van Duyne, *Vib. Spectrosc.* **42** (2006) 2–8.
7. S. A. Ogundare, W. E. van Zyl, *Cellulose* **26** (2019) 6489–6528.
8. M. Fan, G. F. S. Andrade, A. G. Brolo, *Anal. Chem. Acta.* **693** (2011) 7–25.
9. P. A. Mosier-Boss, *Nanomaterials* **7** (2017) 142–171.
10. J. F. Betz, W. W. Yu, Y. Cheng, I. M. White, G. W. Rubloff, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16** (2014) 2224–2239.
11. S. Du, C. Yu, L. Thang, L. Lu, *Nanomaterials* **8** (2018) 757.
12. S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji, *Nanoscale* **5** (2013) 7328–7340.
13. M. Lee, K. Oh, H. K. Choi, S. G. Lee, H. J. Youn, H. L. Lee, D. H. Jeong, *ACS Sens* **3** (2018) 151–159.
14. R. Rathod, S. Bera, M. Singh, D. Hondal, *RSC Adv.* **6** (2016) 34608–34615.
15. P. C. Lee, D. Meisel, *J. Phys. Chem.* **86** (1982) 3391–3395.
16. L. Zhang, P. Li, X. Bu, J. Wu, X. Zhang, B. Zhao, Y. Tian, *Anal. Bioanal. Chem.* **410** (2018) 7599–7609.
17. O. Peron, E. Rinnert, M. Lehaitre, P. Crassous, C. Compère, *Talanta* **79** (2009) 199–204.
18. E. C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer, P. G. Etchegoin, *J. Phys. Chem.* **111** (2007) 13794–13803.

19. K. Kneipp, Y. Ozaki, Z. Q. Tian, *Recent Developments in Plasmon-Supported Raman Spectroscopy: 45 Years of enhanced Raman signal*, World Scientific, London, 2017, str. 401–414.
20. L. Wang, A. Roitberg, C. Meuse, A. K. Gaigalas, *Spectrochim. Acta A* **57** (2001) 1781–1791.
21. N. Leopold, A. Stefancu, K. Herman, I. Sz. Todor, S. D. Lancu, V. Moisoiu, L. P. Leopold, *Beilstein J. Nanotechnol.* **9** (2018) 2236–2247.
22. B. Murugesan, Y. Yong, *ACS Omega* **4** (2019) 14928–14936.
23. A. K. Yadav, P. Singh, *RSC Adv.* **5** (2015) 67583–67609.

§ 8. DODATAK



Slika D1. Ramanov spektar trinatrijeva citrata.



Slika D2. Ramanov spektar stakla i silaniziranog stakla.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Helena Banović

Datum rođenja: 13. travnja 1995.

Mjesto rođenja: Zagreb, Hrvatska

Obrazovanje

2002.–2010.	Osnovna škola Zvonimira Franka, Kutina
2010.–2014.	Srednja škola Tina Ujevića, Opća gimnazija, Kutina
2014.–2018.	Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
2018.	Diplomski sveučilišni studij Kemija, smjer: istraživački, grane: analitička i organska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Akademsko zvanje

2018.	Sveučilišna prvostupnica kemije (univ. bacc. chem.)