

Pojačanje Ramanovog raspršenja na nanočesticama srebra i zlata veličine 20 nm

Kapusta, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:793168>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-21**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Antonija Kapusta

**POJAČANJE RAMANOVOG RASPRŠENJA
NA NANOČESTICAMA SREBRA I ZLATA
VELIČINE 20 nm**

Diplomski rad

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

Zagreb, 2022.

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

Zahvale

Veliko hvala mentorici prof. dr. sc. Snežani Miljanić što je svakom pitanju i problemu pristupila s puno razumijevanja i stručnosti te je tijekom mog cijelog akademskog puta pokazivala veliku želju prenijeti dio svog znanja i strasti prema znanosti. Veliko hvala i neposrednoj voditeljici doc. dr. sc. Adriani Kenđel što je uvijek bila nasmijana i spremna pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Hvala mami jer nikad nije sumnjala u moje odluke i što je imala bezgranično strpljenja sa mnom.

Suzani i Vanji što su imali razumijevanje i podršku.

Hvala Miljenku i Ivani na cimerstvu, smijehu i brizi.

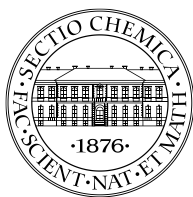
Hvala Sari čije ime piše u rječniku pod definicijom prijatelja.

Najveće hvala mom Marku, čiji je smijeh najljepši zvuk na svijetu, što je došao i ostao kad je najviše trebalo.

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Ramanova spektroskopija	3
2.2. Površinski pojačana Ramanova spektroskopija.....	5
2.2.1. <i>Mehanizmi pojačanja Ramanovog raspršenja.....</i>	<i>7</i>
2.2.2. <i>SERS supstrati.....</i>	<i>9</i>
2.3. Istraživane molekule	12
2.3.1. <i>Rodamin 6G</i>	<i>12</i>
2.3.2. <i>Etidijev bromid.....</i>	<i>13</i>
2.3.3. <i>5,5'-Bis[4-(bis(4-(N,N,N-trimetilamonij)-2,6-dimetilfenil)boril)-3,5-dimetilfeniletinil]-2,2'-ditiofen tetratriflat.....</i>	<i>15</i>
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Kemikalije.....	16
3.2. Mjerni uređaji	16
3.3. Nanočestice metala.....	17
3.3.1. <i>Nanočestice srebra.....</i>	<i>17</i>
3.3.2. <i>Nanočestice zlata.....</i>	<i>18</i>
3.4. Priprava otopina i mjernih uzoraka.....	19
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. UV/Vis apsorpcijski spektri	20
4.1.1. <i>Koloidne suspenzije.....</i>	<i>20</i>
4.1.2. <i>Istraživane molekule</i>	<i>21</i>
4.2. Ramanovi spektri	22
4.2.1. <i>Koloidne suspenzije.....</i>	<i>22</i>
4.2.2. <i>Istraživane molekule</i>	<i>26</i>
4.2. SERS spektri.....	34
4.2.1. <i>Rodamin 6G.....</i>	<i>34</i>
4.2.2. <i>Etidijev bromid.....</i>	<i>39</i>
4.2.3. <i>5,5'-Bis[4-(bis(4-(N,N,N-trimetilamonij)-2,6-dimetilfenil)boril)-3,5-dimetilfeniletinil]-2,2'-ditiofen tetratriflat.....</i>	<i>44</i>

§ 5. ZAKLJUČAK	49
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI)	51
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	52
§ 8. DODATAK.....	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXIV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

POJAČANJE RAMANOVOG RASPRŠENJA NA NANOČESTICAMA SREBRA I ZLATA VELIČINE 20 nm

Antonija Kapusta

Istražena je SERS učinkovitost koloidnih suspenzija nanočestica srebra i zlata dimenzija 20 nm, stabiliziranih slojem citratnih iona (NP_cit) i poli(vinilpirolidona) (NP_PVP) na površini. Snimljeni su SERS spektri rodamina 6G, etidijeva bromida i tiofenskog derivata bis-triarilborana pri tri valne duljine pobudnog zračenja 532, 785 i 1064 nm. Sve su molekule pozitivno nabijene te se adsorbiraju na nanočestice metala uslijed elektrostatskih privlačnih interakcija s negativno nabijenim citratnim ionima na površini metala. Primijećeno je, međutim, da pristup površini metala sterički ometaju taninska kiselina (AgNP_cit i AuNP_cit) i poli(vinil pirolidon) (AgNP_PVP i AuNP_PVP), sastojci dodani tijekom ili nakon pripreve nanočestica. SERS spektri najčešće su opaženi nakon pobude Vis zračenjem (532 nm), koje je najbliže plazmonske frekvencije nanočestica metala ($\lambda(\text{AgNP}) = 427 \text{ nm}$, $\lambda(\text{AuNP}) = 525 \text{ nm}$) i omogućava pre-rezonantne uvjete mjerenja nužne za pojačanje raspršenog zračenja.

(xii + 52 stranica, 27 slika, 5 tablica, 26 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: etidijev bromid, nanočestice srebra, nanočestice zlata, rodamin 6G, SERS

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. doc. dr. ss. Đani Škalamera
- Zamjena: doc. dr. sc. Adriana Kenđel

Datum diplomskog ispita: 25. veljače 2022.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

ENHANCEMENT OF RAMAN SCATTERING ON 20 nm SILVER AND GOLD NANOPARTICLES

Antonija Kapusta

SERS efficiency of colloidal suspensions of 20 nm silver and gold nanoparticles, stabilized by a surface layer of citrate ions (NP_cit) and poly (vinyl pyrrolidone) (NP_PVP) was investigated. SERS spectra of rhodamine 6G, ethidium bromide and thiophene derivative of bis-triarylborane were acquired at three excitation wavelengths 532, 785 and 1064 nm. All molecules are positively charged and adsorb on metal nanoparticles due to electrostatic attractive interactions with negatively charged citrate ions on the metal surface. It has been observed, however, that access to the metal surface was sterically hindered by tannic acid (AgNP_cit and AuNP_cit) and poly (vinyl pyrrolidone) (AgNP_PVP and AuNP_PVP), compounds added during or after nanoparticles preparation. The SERS spectra were mostly observed after excitation by Vis radiation (532 nm), which was closest to the plasmon frequency of metal nanoparticles ($\lambda(\text{AgNP}) = 427 \text{ nm}$, $\lambda(\text{AuNP}) = 525 \text{ nm}$) allowing pre-resonant measurement conditions necessary for the scattering enhancement.

(xii + 52 pages, 27 figures, 5 tables, 26 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: ethidium bromide, gold nanoparticles, silver nanoparticles, rhodamine 6G, SERS

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. Đani Škalamera, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Adriana Kenđel, Assistant Professor

Date of exam: 25 February 2022

§ 1. UVOD

Spektroskopija je znanost koja proučava interakciju elektromagnetskog zračenja i tvari.¹ Spektroskopska metoda koja se temelji na raspršenju zračenja nazvana je Ramanova spektroskopija, prema C. V. Ramanu koji je prvi eksperimentalno opazio fenomen neelastičnog raspršenja.² S obzirom da se samo mali dio fotona raspršuje neelastično (jedan od 10^6 – 10^8 fotona),³ pri čemu je značajno intenzivniji proces elastično, Rayleighovo raspršenje, metodu karakterizira slaba osjetljivost. Slaba osjetljivost metode prevladana je razvojem površinski pojačane Ramanove spektroskopije (engl. *surface-enhanced Raman spectroscopy*, SERS). SERS je tehnika vibracijske spektroskopije koja se temelji na pojačanju Ramanovog raspršenja molekula adsorbiranih na nanostrukturiranu površinu metala.⁴ Još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno na koji način se zračenje molekula na površini metala pojačava, ali se smatra kako je ono posljedica dva različita mehanizma, elektrokemijskog i magnetskog. Elektrokemijsko pojačanje najviše doprinosi ukupnom pojačanju raspršenog zračenja (čak do 10^{10}) te nije nužno da je molekula u kontaktu s metalnim supstratom, već da se nalazi u njegovoj blizini. Kemijsko pojačanje daleko slabije doprinosi ukupnom pojačanju od elektrokemijskog pojačanja (10^2 – 10^4) te zahtijeva nastajanje veze između molekule i supstrata.⁵ Kao metalni supstrati u SERS spektroskopiji najčešće se koriste nanočestice zlata i srebra zbog kemijske inertnosti i plazmonske rezonancije u vidljivom dijelu zračenja, a fizikalnim i kemijskim postupcima uspješno se pripremaju nanočestice različitih dimenzija i oblika. Upravo ta dva svojstva utječu na plazmonske rezonancije nanočestica o kojoj, uz frekvenciju pobudnog zračenja i svojstva istraživanih molekula, ovisi pojačanje Ramanovog raspršenja. Opažena optimalna veličina sferičnih nanočestica srebra i zlata iznosi oko 50 nm.^{6,7} Kako bi se ispitala učinkovitost metalnih supstrata za primjenu u SERS spektroskopiji, koriste se različite modelne molekule. Jedna od najčešćih modelnih molekula je rodamin 6G (R6G), fluorescentna boja vrlo intenzivnog SERS signala.

Svrha ovog diplomskog rada bila je istražiti površinski pojačano Ramanovo raspršenje odabranih molekula na nanočesticama zlata i srebra veličine 20 nm. Ispitivane nanočestice zlata i srebra, stabilizirane slojem citratnih iona ili poli(vinilpirolidona) na površini, pripravljene su u Laboratoriju za optiku i optički tanke slojeve Instituta Ruđer Bošković.

Preliminarna mjerenja na Institutu Ruđer Bošković ukazala su na primjenjivost pripremljenih nanočestica za UV/Vis apsorpcijska mjerenja, s obzirom da manje raspršuju zračenje od nanočestica većih dimenzija. Učinkovitost sintetiziranih nanočestica za SERS mjerenja testirana je pomoću rodamina 6G, etidijeva bromida i tiofenskog derivata bis-triarilborana. Za razliku od R6G koji je modelna molekula za SERS, etidijev bromid i novosintetizirani 5,5'-bis[4-(bis(4-(*N,N,N*-trimetilamonij)-2,6-dimetilfenil)boril)-3,5-dimetilfeniletinil]-2,2'-ditiofen tetratriflat odabrani su za istraživanje jer tvore komplekse s DNA i RNA čiju je strukturu moguće istraživati SERS spektroskopijom.

SERS spektri snimljeni su nakon pobude zračenjem valnih duljina 532, 785 i 1064 nm. Opaženi spektri interpretirani su s obzirom na valnu duljinu pobudnog zračenja, plazmonske rezonancije nanočestica, naboj kemijskih vrsta na površini nanočestica te optička svojstva i strukturu molekula.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

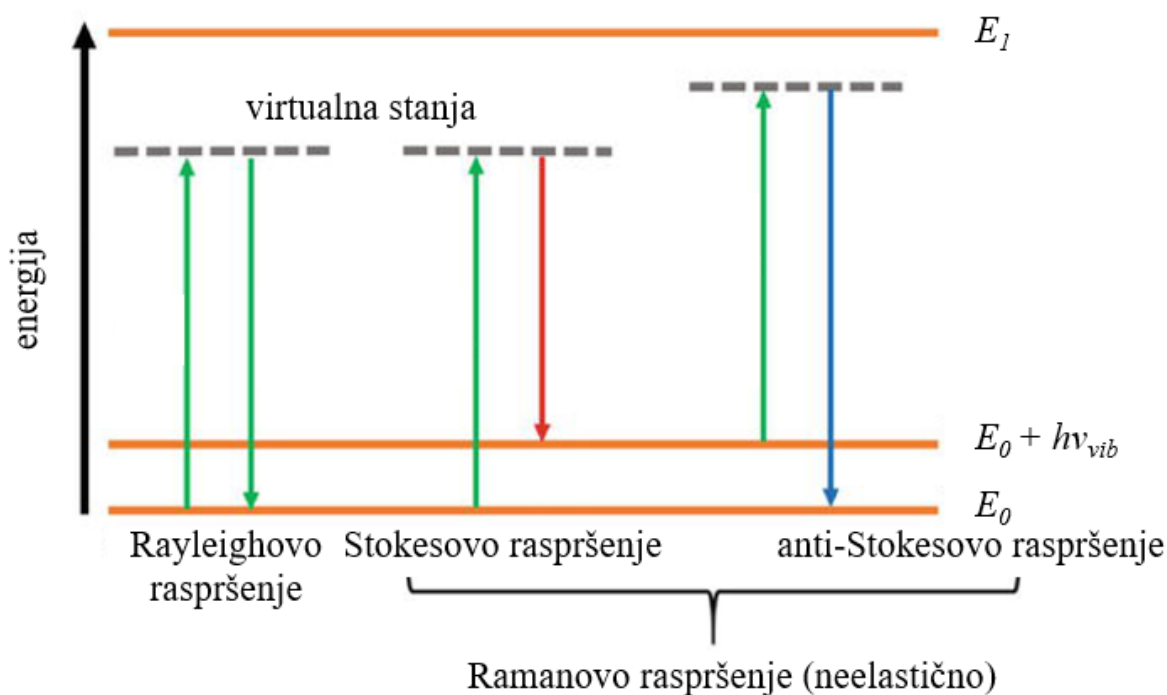
2.1. Ramanova spektroskopija

Spektroskopske metode temelje se na apsorpciji, emisiji ili raspršenju zračenja. Ramanova spektroskopija, koja se temelji na raspršenju, nazvana je prema C. V. Ramanu, koji je zajedno s K. S. Krishnanom publicirao prvi rad u kojem je opisana ova tehnika.² U svom pokusu koristili su teleskop kojim je Sunčeva svjetlost fokusirana na tekući uzorak, dok je drugom lećom sakupljano raspršeno zračenje. Sustavom optičkih filtera dokazano je da se frekvencija raspršenog zračenja razlikuje od frekvencije upadnog zračenja. Tako je eksperimentalno opažen fenomen neelastičnog, Ramanovog raspršenja.

Ramanova spektroskopija se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzoraka. Kvalitativna analiza služi za određivanje identiteta uzorka, na temelju frekvencije raspršenog zračenja. Kvantitativna pak služi za određivanje koncentracije analita u uzorku, mjerenjem intenziteta raspršenog zračenja. Ramanova spektroskopija je, dakle, nerazorna tehnika kemijske analize koja koristi neelastično raspršeno zračenje za identifikaciju molekule na temelju karakterističnog spektra koji predstavlja molekulski otisak prsta (engl. *fingerprint*). U Ramanovoj spektroskopiji uzorak se osvjetljava zračenjem jedne frekvencije (monokromatskog lasera), koje nakon interakcije s molekulama uzrokuje raspršenje zračenja. Ramanovo raspršenje ne zahtjeva podudaranje energije upadnog zračenja s razlikom energije između osnovnog i pobuđenog stanja.

Posljedica interakcije zračenja i molekule je narušavanje oblaka elektrona oko jezgre (polarizacija) i nastajanje kratkoživućeg nestabilnog stanja, tzv. "virtualnog stanja", nakon čega dolazi do brzog otpuštanja fotona. Energija virtualnih stanja određena je frekvencijom zračenja izvora. Nakon interakcije monokromatskog zračenja s molekulama uzorka, ono se raspršuje u svim smjerovima. Veći dio raspršenog zračenja ima frekvenciju jednaku frekvenciji upadnog zračenja te se naziva Rayleighovo raspršenje. Manji dio zračenja ima frekvenciju različitu od frekvencije upadnog zračenja i čini Ramanovo raspršenje. Tijekom raspršenja potaknuto je kretanje jezgara pa se energija prenosi bilo s upadnog fotona na molekulu bilo s molekule na raspršeni foton. Ukoliko tijekom raspršenja nema promjene

energije, a molekula se iz virtualnog stanja vraća u isto energijsko stanje, radi se o Rayleighovom raspršenju. Ukoliko tijekom raspršenja molekula apsorbira zračenje, odnosno iz osnovnog vibracijskog stanja prelazi u virtualno i vraća se u više vibracijsko stanje, radi se o Stokesovom raspršenju. Ako se tijekom raspršenja energija prenosi na raspršeni foton, odnosno molekula iz višeg vibracijskog stanja prelazi u virtualno stanje da bi se potom vratila u osnovno vibracijsko stanje, radi se o anti-Stokesovom raspršenju. Kada je frekvencija upadnog zračenja veća od frekvencije raspršenog zračenja, u Ramanovom spektru uočavaju se Stokesove vrpce. Kada je frekvencija upadnog zračenja manja od frekvencije raspršenog zračenja, u spektru se opažaju anti-Stokesove vrpce. Stokesove vrpce uključuju prijelaze iz nižih u više energijske razine, stoga su one intenzivnije od anti-Stokesovih. Dijagram Rayleighovog i Ramanovog raspršenja prikazan je na Slici 1.



Slika 1. Energijski dijagram Ramanovog i Rayleighovog raspršenja.⁸

Ramanovi spektri sastoje se od brojnih vrpce različitog intenziteta i frekvencije koji odgovaraju različitim vibracijama molekule. Vibracijske vrpce pružaju informacije o funkcijskim skupinama i strukturi molekule.

Promjena polarizabilnosti elektronskog oblaka oko molekule tijekom vibracije važna je za opažanje Ramanovog spektra uzorka. U Ramanovoj spektroskopiji, veće promjene polarizabilnosti i veće raspršenje uzrokuju simetrične vibracije, zbog čega je ta metoda komplementarna infracrvenoj spektroskopiji, u kojoj je veća promjena dipolnog momenta karakteristična za antisimetrične vibracije. Za molekule koje imaju centar simetrije vrijedi pravilo međusobnog isključenja, prema kojem niti jedna vibracija ne može biti i IR i Raman aktivna.

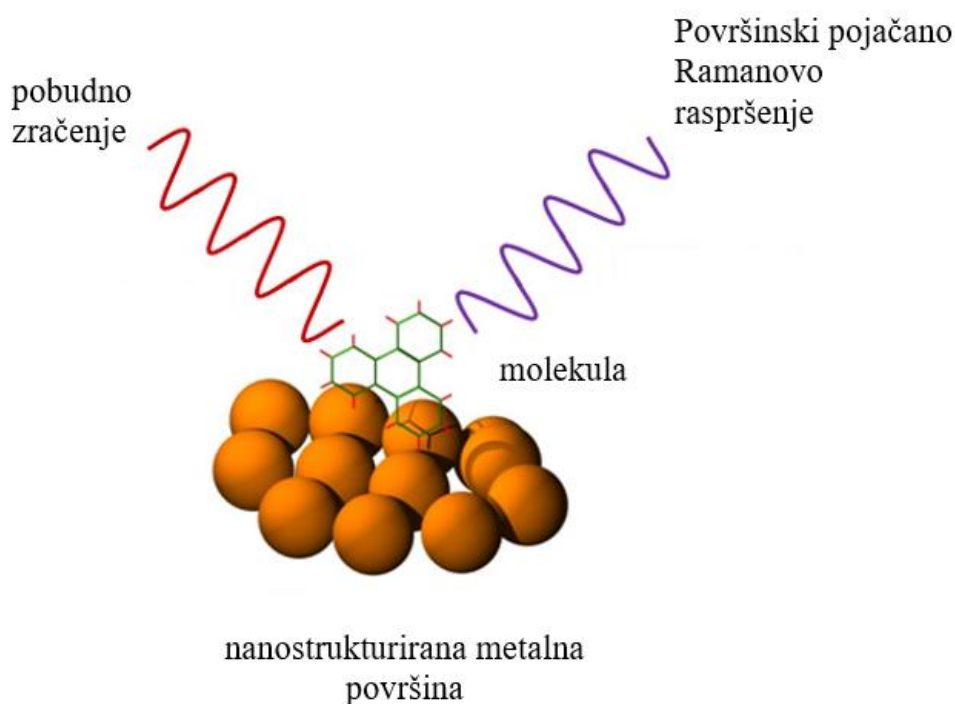
Ramanov spektar prikazuje ovisnost intenziteta Ramanovog raspršenja o valnom broju, a najčešće se snima u rasponu $4000\text{--}10\text{ cm}^{-1}$. Intenzitet raspršenog zračenja ovisi o molekuli i uvjetima snimanja spektra, odnosno polarizabilnosti molekule koja se analizira te snazi i frekvenciji lasera. Ramanovi spektrofotometri mogu biti disperzivni i nedisperzivni. Disperzivni koriste prizmu ili rešetku, dok nedisperzivni koriste interferometar, primjerice Michelsonov. Disperzivni Ramanovi spektrometri kao izvor zračenja koriste argon ionski laser (488 i 514,5 nm), plinski He-Ne laser (632,8 nm) ili diodni laser (785 i 830 nm).⁹ Za detekciju se koriste fotomultiplikatori ili višekanalni detektori, tzv. CCD (engl. *charge-coupled device*) uređaji. Komercijalni FT-Ramanovi spektrofotometri počeli su se koristiti kasnih 1980-ih kako bi se premostili nedostaci CCD i drugih detektora zračenja u bliskom infracrvenom području. Kao izvor zračenja koristi se Nd³⁺:YAG laser (engl. *neodymium-doped yttrium aluminium garnet*) koji emitira zračenje pri 1064 nm,⁹ a kao detektori indij galij arsenid (InGaAs) ili germanijev detektor, ohlađeni na kriogene temperature kako bi se smanjio šum u spektru te poboljšao odnos signala prema šumu. U svrhu povećanja osjetljivosti Ramanove spektroskopije razvijene su tehnike koje se temelje na rezonantnom Ramanovom raspršenju (RRS) i površinski pojačanom Ramanovom raspršenju (SERS).

2.2. Površinski pojačana Ramanova spektroskopija

SERS prvi puta spominju 1974. godine Fleishman i suradnici. Njihov eksperiment sastojao se od srebrove elektrode hrapave površine na koju se adsorbirao piridin iz vodene otopine. Pritom su uočili pojačanje Ramanovog raspršenja, koje su pripisali povećanju površine elektrode uslijed hrapavosti, što je omogućilo adsorpciju većeg broja molekula. Njihovo objašnjenje demantiraju nekoliko godina poslije Jeanmaire i Van Duyne te Albrecht i

Creighton, koji su ustvrdili kako razlog pojačanja Ramanovog raspršenja za 10^6 puta nije samo povećanje površine uslijed kojeg se intenzitet pojačava za faktor manji od 10, već opaženo pojačanje Jeanmaire pripisuje jakim električnim poljima na površini metala, a Albrecht formiranju kompleksa molekula-metal.⁵

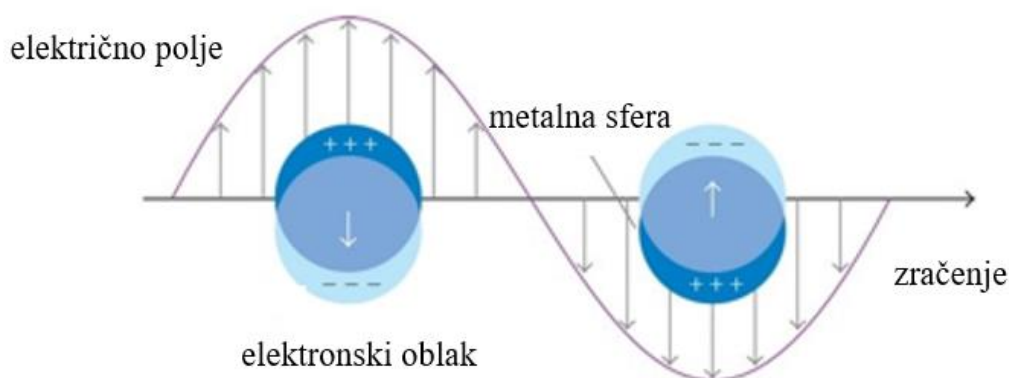
SERS spektroskopija je modificirana tehnika normalne Ramanove spektroskopije u kojoj se nakon adsorpcije molekule na površinu metala pojačava intenzitet Ramanovih signala. Slikovito je SERS prikazan na Slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz površinski pojačanog Ramanovog raspršenja.¹⁰

Od metala se za pripremu SERS supstrata najčešće koriste srebro, zlato i bakar, a hrapave površine pripravljuju se u obliku metalnih filmova, elektroda hrapavih površina ili agregiranih koloidnih suspenzija. Da bi metalni supstrat bio SERS aktivna površina, nužno je da se analit adsorbira na površinu. Površina metala prekrivena je vodljivim elektronima koji se slobodno kreću po površini. Prilikom interakcije sa zračenjem elektroni na hrapavoj metalnoj površini počinju oscilirati pri čemu nastali lokalizirani površinski plazmoni pojačavaju elektromagnetsko polje. Površinski plazmoni imaju rezonantnu frekvenciju koja ovisi o

metalnu i prirodnu površinu. Ilustracija lokaliziranog površinskog plazmona prikazana je na Slici 3.



Slika 3. Ilustracija rezonancije površinskih plazmona koje su rezultat oscilacija elektrona na površini metala kao odgovora na vanjsko električno polje.¹¹

Prednosti SERS spektroskopije su mnogobrojne, primjerice: minimalna priprema uzoraka, nedestruktivnost metode, mogućnost istraživanja bioloških sustava (voda slabo raspršuje zračenje), identifikacija molekula na temelju karakterističnog SERS spektra kao jedinstvenog vibracijskog „otiska prstiju“, istovremena detekcija različitih analita te visoka osjetljivost koja omogućava kvantitativna istraživanja u niskom koncentracijskom području te detekciju jedne molekule u otopini. Ipak, metoda posjeduje i određena ograničenja, primjerice: opažanje SERS spektra zahtijeva bliski kontakt između metalne površine i analita, supstrati mijenjaju svoja svojstva s vremenom što uzrokuje slabljenje signala te ih se najčešće ne može ponovno koristiti, relativno su slabo selektivni za dani analit i teško ih je reproducibilno pripremiti. Iako je provedeno mnogo istraživanja o fenomenu površinskog pojačanja, SERS mehanizmi i dalje nisu u potpunosti objašnjeni. Vjeruje se kako je pojačanje posljedica dva različita mehanizma, elektromagnetskog i kemijskog.¹²

2.2.1. Mehanizmi pojačanja Ramanovog raspršenja

Elektromagnetsko pojačanje ne zahtijeva kemijsku vezu između analita i metalne površine, već je analit adsorbiran ili se nalazi vrlo blizu metalne površine pri čemu se ostvaruju interakcije između analita i plazmona. Na glatkim površinama, oscilacije elektrona

(površinski plazmoni) odvijaju se paralelno površini metala. Međutim, na hrapavoj metalnoj površini, plazmoni su lokalizirani te elektroni mogu oscilirati paralelno i okomito na površinu metala.

Upadno zračenje na hrapavoj površini uzrokuje pobudu plazmona uslijed čega se električno polje na površini metala pojačava. Jaka električna polja uzrokuju pojačanje intenziteta raspršenog zračenja, pri čemu se pojačanje signala smanjuje s udaljavanjem analita od površine. Pojačanje električnog polja na površini plazmonskog supstrata vrlo je nehomogeno i uglavnom je lokalizirano na malim prostornim područjima, nazvanim „vruće točke“ (engl. *hot spots*). Strukturno, to su oštri vrhovi nanostrukturiranih supstrata ili mjesta između nanočestica koje se dodiruju. Dodirna mjesta nanočestica su značajno učinkovitija u pojačanju optičkih signala od oštih vrhova.⁵

Kemijsko pojačanje uključuje direktnu interakciju analita s metalnom površinom, odnosno, nastajanje kemijske veze između analita i metalne površine (analit se najčešće veže s metalom preko atoma dušika, sumpora, kisika). Kemijski mehanizam nužno podrazumijeva prijenos naboja između metalne površine i analita, zbog čega se u SERS spektrima može uočiti pomak vibracijskih vrpca u odnosu na normalan Ramanov spektar. Također, zbog interakcije molekule s elektronima metala polarizabilnost se povećava.

Neovisno o vrsti mehanizma pojačanja, intenzitet vrpca ovisi o orijentaciji molekule na površini metala jer je električno polje okomito na površinu metala veće od polja paralelnog s površinom. Dakle, najveće pojačanje opaziti će se za molekulu adsorbiranu i polariziranu okomito na metalnu površinu. U Tablici 1 nalazi se pregled osnovnih svojstava elektromagnetskog i kemijskog pojačanja.⁵

Tablica 1. Svojstva elektromagnetskog i kemijskog mehanizma pojačanja Ramanovog raspršenja.

Elektromagnetsko pojačanje	Kemijsko pojačanje
Posljedica interakcije plazmona i molekule na površini metalnog supstrata	Posljedica promjene polarizabilnosti molekule uslijed nastanka kemijske veze sa supstratom
Karakteristično za supstrat i neovisno o vrsti molekule	Ovisno o vrsti molekule
Veći doprinos ukupnom pojačanju raspršenog zračenja, do 10^{10} puta	Manji doprinos ukupnom pojačanju raspršenog zračenja, 10^2 – 10^4 puta
Mala udaljenost molekule od supstrata (oko 1–10 nm od površine)	Kontakt molekule i supstrata (kemijska veza)
Efekt dugog dometa u odnosu na duljinu kemijske veze	Efekt kratkog dometa

2.2.2. SERS supstrati

Najčešće korišteni SERS aktivni supstrati mogu se razvrstati u tri kategorije: metalne nanočestice u suspenziji, metalne nanočestice imobilizirane na čvrstim podlogama i nanostrukture proizvedene izravno na krutim supstratima nanolitografijom i templatnom sintezom.¹² SERS supstrati tradicionalno se izrađuju od limitiranog broja metala. Od metala se najčešće koriste zlato i srebro jer oni ne reagiraju sa zrakom, iako se sve češće koristi i litij. Bakar i željezo u kontaktu s kisikom stvaraju slojeve oksida čime se potencijalno gubi hrapavost površine i nastaje prostorna barijera između analita i površine metala što utječe na uspješnost SERS analize.

Frekvencija površinskih plazmona većine SERS supstrata nalazi se u vidljivom području elektromagnetskog zračenja. U idealnom slučaju, a u svrhu maksimalnog pojačanja raspršenog zračenja, frekvencija pobudnog zračenja treba se podudarati s frekvencijom plazmonske rezonancije na površini metala. Između različitih oblika SERS supstrata koloidne suspenzije posebno su atraktivne jer se mogu pripremiti jednostavnim postupcima kemijske

sinteze. Potencijalni problem primjene takve vrste supstrata jest nemogućnost reproducibilne pripreme i posljedično analize, s obzirom na nestabilnost koloida uslijed koje se mijenja veličina čestica. Zbog toga je nužno koristiti novopripravljeni koloid za istraživanja. Razvija se stoga sinteza reproducibilnih, stabilnih koloida. Štoviše, koloid pripremljen redukcijom srebrnih iona s trinitrijevim citratom može se proizvesti gotovo monodisperzan s vijekom trajanja od godine dana.¹² Sažeto, SERS supstrati, prema Natanu te Linu i suradnicima, trebaju posjedovati sljedeće karakteristike, prikazane u Tablici 2.

Tablica 2. Karakteristike idealnih SERS supstrata.^{13,14}

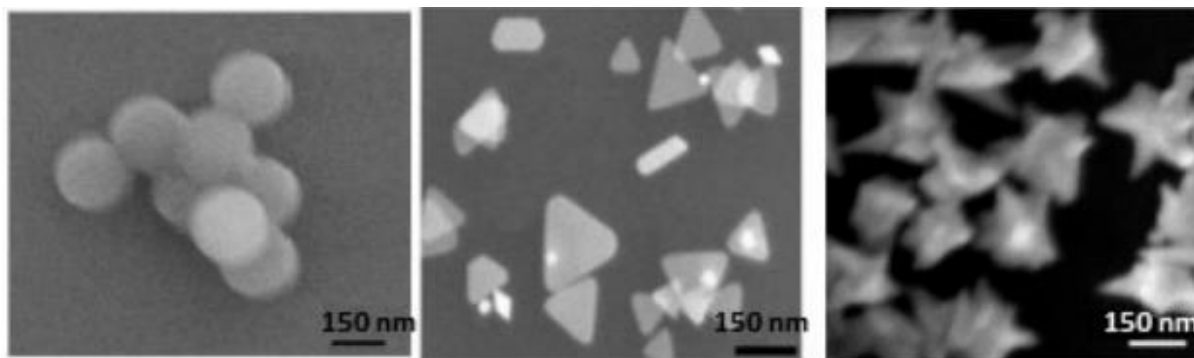
Karakteristika	Predložena referentna točka	Napomena
Veliko pojačanje	$> 10^5$	Veće pojačanje omogućuje osjetljiviju i/ili bržu analizu.
Jednolikost	Varijacije $< 20\%$	Jednoliki i reproducibilni supstrati olakšavaju i ubrzavaju analizu.
Reproducibilnost	Varijacije $< 20\%$	
Velika površina	U mm^2	
Stabilnost		Supstrati se trebaju koristiti za analizu izvjesno vrijeme nakon pripreme, ne smiju se razgraditi dodatkom otapala.
Jednostavnost pripreme / niski troškovi pripreme		Niski troškovi su važni za široku primjenu SERS tehnike.
Čistoća površine		Površina supstrata ne smije sadržavati zaostala onečišćenja iz postupka pripreme.

Jedna od fizikalnih metoda pripreme nanočestica u suspenziji jest pulsna laserska ablacija plemenitih metala u tekućem mediju. Primjenom te tehnike, veličina nanočestica u suspenziji ovisi o vremenu izlaganja laserskom zračenju i pH-vrijednosti vodenog medija. Optimalna

SERS aktivnost uočena je za nanočestice srebra i zlata sintetizirane u vodi pri pH = 10,3, pri čemu duže izlaganje zračenju rezultira nanočesticama manjih dimenzija.¹²

SERS učinak ovisi o veličini čestica i valnoj duljini pobude. Lokalizirani površinski plazmoni nastaju podudaranjem frekvencije oscilacija valentnih elektrona metala s frekvencijom pobudnog zračenja. Nastajanje lokaliziranih površinskih plazmona rezultira pojačanjem elektromagnetskog polja u blizini površine metala zbog čega se Ramanovo raspršenje molekula adsorbiranih na površinu metala povećava. Za učinkovitu optimizaciju faktora pojačanja nanočestica, treba uzeti u obzir maksimum rezonancije lokaliziranih površinskih plazmona (engl. *localized surface plasmon resonance*, LSPR). Smatra se da se Ramanovo raspršenje učinkovito pojačava kada se nanočestica pobuđuje zračenjem pri svom LSPR maksimumu. Pri tome čestice manjih dimenzija imaju manju valnu duljinu plazmonske rezonancije od nanočestica većih dimenzija. Također, monodispergirane nanočestice u suspenziji karakterizira manja valna duljina plazmonske rezonancije od plazmonske rezonancije agregata nanočestica u suspenziji ili na čvrstom nosaču, jer postojeći plazmoni nakupljanjem nanočestica postaju zajednički za dvije ili više nanočestica. Prema tome kontrolom dimenzije nanočestica ili kontroliranim agregiranjem nanočestica mogu se pripremiti supstrati odgovarajućih LSPR maksimuma.¹⁵

Kemijska sinteza SERS aktivnih nanočestica u otopini najčešće se provodi redukcijom iona srebra ili zlata u vodenom mediju s reducensima poput trinatrijeva citrata, natrijeva borhidrida ili hidrazina. Za sprečavanje agregacije nanočestica koriste se sredstva poput polietilenglikola (PEG), taninske kiseline ili poli(vinilpirolidona) (PVP). Veličina nanočestica u kemijskoj sintezi kontrolira se jačinom i koncentracijom reducirajućeg agensa, pri čemu s jačim redukcijskim sredstvima nastaju manje nanočestice, a sa slabijim redukcijskim sredstvima veće. Ukoliko se tijekom sinteze dodaju surfaktanti, može se kontrolirati oblik nanočestica. Površinski aktivne tvari stabiliziraju specifične kristalne ravnine u rastućoj nanostrukтури, čime je moguće kontrolirati rast na toj ravnini. Tako primjerice mogu nastati nanosfere, nanotrokuti, nanožice ili nanozvijezde (Slika 4).¹²



Slika 4. SEM slike nanostruktura zlata (s lijeva na desno): nanosfere, nanotrokuti, nanozvijezde.¹²

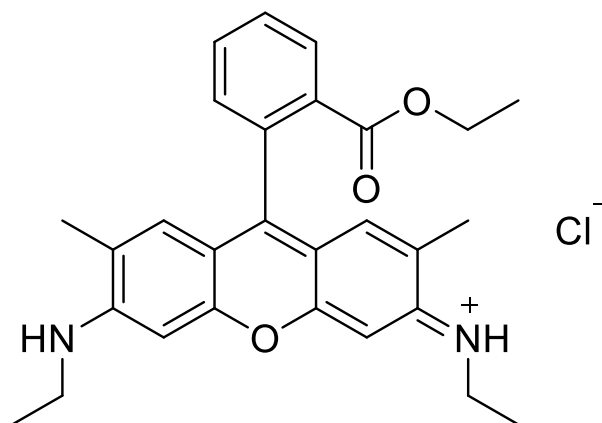
Na pojačanje Ramanovog raspršenja, osim veličine čestica, utječe i oblik nanočestica. Uočeno je kako SERS učinak raste u nizu: nanosfere < agregirane nanosfere < nanotrokuti << nanozvijezde. Opaženi trend je pripisan broju „vrućih mjesta“ na nanočesticama, kojih ima najviše na nanozvijezdama jer imaju oštre rubove i vrhove.¹²

2.3. Istraživane molekule

2.3.1. Rodamin 6G

Modelne molekule u SERS spektroskopiji su molekule aromatske strukture koje intenzivno raspršuju zračenje. Sadrže strukturne jedinice bogate elektronima te heteroatome kojima se vežu na metalne površine. Često su nabijene kako bi mogle ostvariti elektrostatske interakcije s ionima na površini nanočestica metala. Za ispitivanje SERS efekta na novim metalnim supstratima često se kao modelne boje koriste rodamini, posebice rodamin 6G (R6G). Izrazito je jak fluorofor kada ga se pobudi vidljivim zračenjem te emitira zračenje u crvenom području vidljivog spektra. Normalno Ramanovo raspršenje R6G opaža se tek nakon pobude zračenjem u NIR (bliskom infracrvenom) području. R6G se snažno adsorbira na hrapavu metalnu površinu, što posljedično gasi njegovu fluorescenciju. Rezultirajući SERS spektri su među najintenzivnijim uočenim pa je R6G odigrao ključnu ulogu u razvoju metoda detekcije jedne molekule (engl. *single molecule detection*) te u razvoju SERS supstrata.¹⁶ Istraživanjem kemijskog vezanja R6G na površinu nanočestica srebra, uočeno je da se molekula rodamina na metalnu površinu veže preko amino skupina ksantenskog sustava što uzrokuje zamjetne

spektralne promjene. Organske boje iz obitelji ksantena koriste se kao medij za lasere s podesivim rasponom valnih duljina. Rodamin 6G također se koristi kao senzor, nelinearni optički materijal, fotosenzibilizator i kao oznaka malarijske proteaze.¹⁷ Struktura rodamina 6G prikazana je na Slici 5.



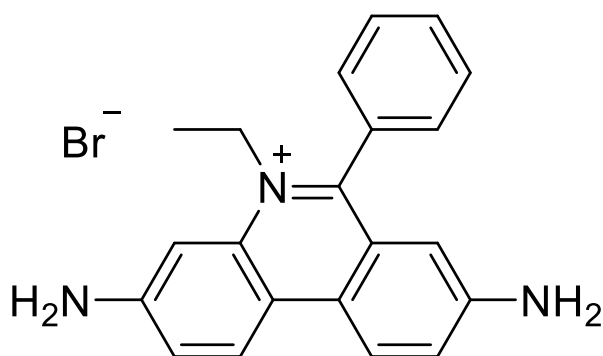
Slika 5. Molekulska struktura rodamina 6G.

2.3.2. Etidijev bromid

Svojstva nukleinskih kiselina te njihove interakcije s raznim kemijskim spojevima učestalo se istražuju. Provedena istraživanja su bitna jer objašnjavaju osnove djelovanja prirodnih i sintetskih lijekova koji se vežu na DNA, a dobivene informacije koriste se prilikom genske terapije i primjene u dijagnostici. Interakcije malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama općenito se dijele na: nepovratne, kada nastaju kovalentne veze male molekule s polinukleotidima ili se polinukleotidni lanac cijepa, te povratne/ravnotežne, kada nastaju nekovalentni kompleksi. Jedna od vrsta ravnotežnih interakcija je interkalacija. Dvolančani i neki jednolančani polinukleotidi tvore u vodenim otopinama organizirane strukture zavojnice, najvećim dijelom zbog aromatskih interakcija slaganja između baza. Unatoč velikoj stabilnosti takvih struktura, složene baze se povremeno razmiču. Ukoliko se u otopini nalaze planarne aromatske molekule, moguće je da se umetnu (interkaliraju) između parova baza. Takvi interkalativni kompleksi su stabilniji od samih polinukleotida. Postoji više teorija koje objašnjavaju interkalaciju, no najčešće se smatra kako je ona rezultat elektrostatskih i hidrofobnih interakcija. Također, uvjet za interkaliranje je i veličina molekule, koja mora dozvoliti smještanje između susjednih baza.¹⁸

Interkalirajući lijekovi su molekule koje se sastoje od policikličkog aromatskog prstena koji se može smjestiti između dva para baza dvostruke zavojnice DNA. Razlog takvog vezanja interkalator-DNA je aromatska interakcija između π -elektronskog sustava molekule i nukleinskih baza, iako i elektrostatske interakcije između pozitivno nabijenog dušika u molekularnoj strukturi lijeka i negativno nabijene fosfodieterske skupine DNA značajno doprinose vezanju. Geometrija vezanja molekula lijeka u odnosu na parove baza istražuje se najčešće rendgenskom kristalografijom ili NMR spektroskopijom. Zahvaljujući jednostavnosti i isplativosti sve se češće koristi Ramanova spektroskopija, koja pruža informacije o relativnoj orijentaciji dijelova interkalirane molekule unutar dvostruke zavojnice.¹⁸

Etidijev bromid (EB) je planarna kationska molekula s konjugiranim π -elektronskim sustavom te je intenzivno proučavan kao interkalator DNA. Rendgenske analize pokazale su kako interkalacija fenantridina rezultira produljenjem DNA zavojnice i odmotavanjem fosfodieterske okosnice. Potaknute konformacijske promjene uzrokuju funkcionalne promjene nukleinske kiseline što uzrokuje poremećaje staničnih procesa. Metodama Ramanove spektroskopije proučavane su strukturne promjene bilo molekule etidijevog bromida bilo nukleinske kiseline u kompleksu etidijev bromid-DNA. Uočeno je kako nakon interakcije s nukleinskom kiselinom, etidijev bromid biva duboko „zakopan“ u dvostrukoj zavojnici pri čemu ravnina fenantridina nije potpuno okomita na os DNA, što amino supstituente čini dostupnima za vezanje vodikovom vezom s nukleinskim bazama.¹⁹ Struktura etidijevog bromida prikazana je na Slici 6.

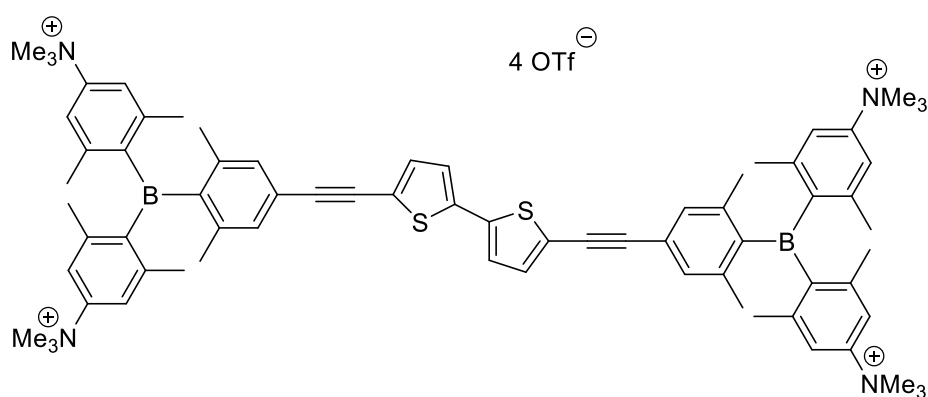


Slika 6. Molekulska struktura etidijevog bromida.

2.3.3. 5,5'-Bis[4-(bis(4-(*N,N,N*-trimetilamonij)-2,6-dimetilfenil)boril)-3,5-dimetilfeniletinil]-2,2'-ditiofen tetratriflat

Od kada su prije 135 godina prvi puta opisani u literaturi, triarilborani nalaze široku primjenu, npr. za pripravu metalo-organskih mreža (engl. *metal-organic framework*, MOF) ili u optoelektronici. Bor u triarilborilnoj skupini ima koordinaciju 3 te služi kao jak π -akceptor i jaka Lewisova kiselina. Nedavno je sintetiziran novi derivat triarilborana, 5,5'-bis[4-(bis(4-(*N,N,N*-trimetilamonij)-2,6-dimetilfenil)boril)-3,5-dimetilfeniletinil]-2,2'-ditiofen tetratriflat (DTB).²⁰ UV/Vis apsorpcijska i fluorescencijska mjerenja ukazala su na snažnu stabilizaciju dvolančanih DNA i RNA. U kompleksima s dvolančanim i jednolančanim nukleinskim kiselinama DTB se veže sa sličnim afinitetima, pri čemu se pretpostavlja da se oko jednolančane RNA omotava kao lanac oko tetrakationskog bis-triarilboranskog motiva, poput niti oko vretena, dok se manji utor predlaže kao dominantno vezno mjesto za dvolančanu DNA, a veliki utor za dvolančanu RNA.

Prilikom snimanja SERS spektara, uočeni su snažni signali čak i pri niskim koncentracijama. To potvrđuje kako su trostruke veze važne za snažno Ramanovo raspršenje i ukazuje da je umetanje aromatskih dijelova između dvije trostruke veze, pomoću kojih se podešavaju apsorpcijska i emisijska svojstva molekula, izvediva alternativa za dizajn dualnih Ramanovih i fluorescentnih kromofora.²⁰



Slika 7. Molekulska struktura 5,5'-bis[4-(bis(4-(*N,N,N*-trimetilamonij)-2,6-dimetilfenil)boril)-3,5-dimetilfeniletinil]-2,2'-ditiofen tetratriflata.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Rodamin 6G, p.a., Fluka

Etidij bromid, p.a., Fluka

5,5'-Bis[4-(bis(4-(*N,N,N*-trimetilamonij)-2,6-dimetilfenil)boril)-3,5-dimetilfeniletinil]-2,2'-ditiofen tetratriflat²⁰

Trinatrijev citrat dihidrat, p.a., Kemika

Srebrov(I) nitrat, p.a., GramMol

Poli(vinilpirolidon), p.a., Acros Organic

Taninska kiselina, p.a., Sigma

3.2. Mjerni uređaji

Za snimanje Ramanovih i SERS spektara korišten je interferometar EQUINOX 55 tvrtke BRUKER, opremljen s Ramanovim modulom FRA 106/S i Nd:YAG laserom koji emitira zračenje pri 1064 nm. Za snimanje čvrstih uzoraka korištena je snaga lasera od 100 mW, dok je za snimanje koloidnih uzoraka snaga lasera bila 500 mW. Čvrsti praškasti uzorci snimani su na odgovarajućem aluminijskom nosaču, a uzorci pripremljeni u koloidnim suspenzijama u kvarcnoj kivetu iza koje je postavljeno zrcalo kako bi se postigla što veća refleksija raspršenog zračenja prema detektoru. Spektri su snimani u području 3500–100 cm⁻¹ uz razlučivanje od 4 cm⁻¹, a rezultat su uprosječivanja 128 snimaka. Spektri su obrađeni u programu OPUS 5.0.

Osim interferometra EQUINOX 55, korišten je i *inVia* Ramanov spektrometar tvrtke *Renishaw* spregnut s konfokalnim optičkim mikroskopom *Leica* i opremljen laserima koji emitiraju zračenje pri 532 i 785 nm, maksimalne snage 100, odnosno 300 mW. Prilikom snimanja spektra korišten je objektiv povećanja 5×, dok je snaga lasera podešavana ovisno o uzorku. Čvrsti praškasti uzorci snimani su na aluminijskom nosaču, dok su tekući uzorci snimani u aluminijskim posudicama za termogravimetrijsku analizu volumena 40 μL. Spektri su snimani u području valnih brojeva 0–3200 cm⁻¹. Spektri su analizirani i obrađeni u programu Wire 5.3.

UV/Vis apsorpcijski spektri koloidnih suspenzija i istraživanih molekula snimljeni su pomoću UV/Vis/NIR spektrofotometra SPECORD 200 tvrtke Analytik Jena. Uzorci su snimani u kvarcnoj kiveti duljine puta zračenja 0,2 cm, u području između 190 i 1100 nm uz razlučivanje od 1 nm.

Za mjerenje pH vrijednosti koloida korišten je pH metar tvrtke Mettler Toledo MP 220 s InLab®413 kombiniranom staklenom-kalomel elektrodom, a uređaj je baždaren s otopinama pufera pH vrijednosti 7,00 i 4,00.

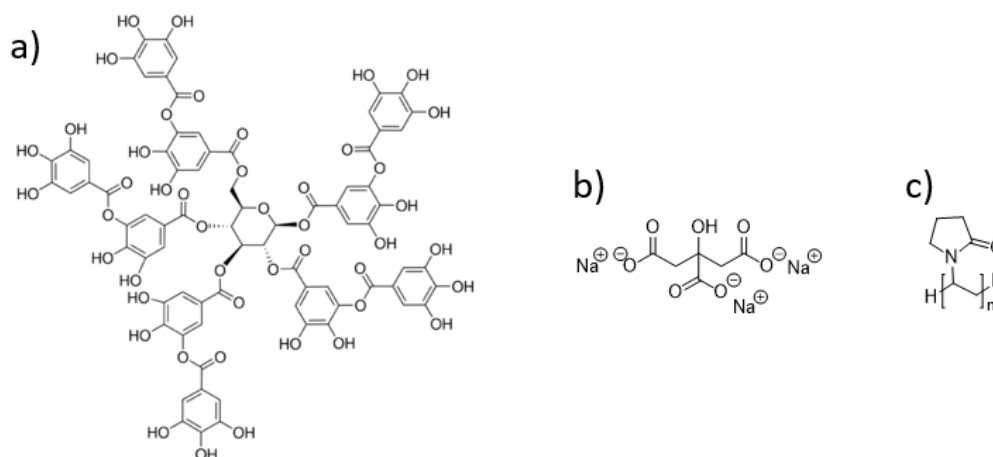
3.3. Nanočestice metala

Koloidne suspenzije nanočestica srebra i zlata s površinskim slojem citratnih iona ili poli(vinilpirolidona) (PVP) pripravljene su u Laboratoriju za optiku i optički tanke filmove Instituta Ruđer Bošković. Očekivana veličina nanočestica po generacijama sinteze i pripadajuće valne duljine plazmonske rezonancije navedeni su u Dodatku (Tablice 1 i 2).

3.3.1. Nanočestice srebra

Koloidne suspenzije nanočestica srebra pripravljene su sintezom iz sjemena nanočestica srebra. U tikvicu se doda 4 mL otopine taninske kiseline ($c = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), 20 mL otopine trinatrijeva citrata ($c = 2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) i 76 mL vode. Nakon što zavrije, reakcijska smjesa vrije 3 minute, nakon čega se u smjesu špricom injektira 1 mL otopine srebrova(I) nitrata ($c = 2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). Nakon 20 minuta temperatura reakcije snizi se na 83 °C i iz smjese uzme alikvot od 20 mL. Na taj način sintetizirano je sjeme srebra za sintezu nanočestica većih dimenzija. Potom se u reakcijsku smjesu doda 16,5 mL vode, nakon jedne minute 0,5 mL trinatrijeva citrata ($c = 2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), nakon isteka još jedne minute 1,5 mL taninske kiseline ($c = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) te 1 mL otopine srebrova(I) nitrata ($c = 2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) koji pokreće reakciju. Na taj način se sintetiziraju nanočestice veličine 15 nm. Prije dodavanja nove šarže reaktanata u tikvicu, uzima se 20 mL reakcijske smjese koja sadrži prvu generaciju nanočestica srebra. Postupak se ponavlja, a svakim novim stupnjem sinteze nastaju nanočestice većih dimenzija. Druga generacija sintetiziranih nanočestica ima dimenziju oko 20 nm.

Suspenzija nanočestica srebra stabiliziranih slojem citratnih iona na površini, AgNP_cit, pripravljena je u vodi, dok je dodatkom polimera, poli(vinilpirolidona), u kakodilatnom puferu pripravljena suspenzija nanočestica srebra stabiliziranih slojem PVP-a na površini, AgNP_PVP. Strukture spojeva korištenih za sintezu, taninske kiseline, trinatrijeva citrata i PVP-a, prikazane su na Slici 8.



Slika 8. Molekulske strukture: a) taninske kiseline, b) trinatrijeva citrata i c) poli(vinilpirolidona).

3.3.2. Nanočestice zlata

Koloidne suspenzije nanočestica zlata pripravljene su sintezom iz sjemena nanočestica zlata. Sinteza se temelji na redukciji tetraklorzlatne(III) kiseline s trinatrijevim citratom. Nakon što je 150 mL otopine trinatrijeva citrata ($c = 2,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) uzavrelo i ključalo 3 minute, dodan je 1 mL otopine $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ($c = 2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). U ovom koraku nastaje sjeme zlatnih čestica za sintezu nanočestica zlata većih dimenzija. U reakcijsku smjesu nakon 10 minuta doda se još 1 mL otopine zlatnog prekursora. Za rast nanočestica, temperaturu reakcijske smjese je potrebno spustiti na 83 °C. Nakon postizanja potrebne temperature doda se još 1 mL otopine $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ u reakcijsku smjesu. Potom je uzet alikvot od 55 mL reakcijske smjese, što je nadomješteno s 55 mL otopine trinatrijeva citrata ($c = 2,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Sinteza druge generacije nanočestica nastaju nanočestice dimenzija oko 20 nm.

U vodi je pripravljena suspenzija nanočestica zlata stabiliziranih slojem citratnih iona na površini, AuNP_cit, dok je u kakodilatnom puferu dodatkom polimera,

poli(vinilpirolidona), pripravljena suspenzija nanočestica zlata stabiliziranih slojem PVP-a na površini, AuNP_PVP.

3.4. Priprava otopina i mjernih uzoraka

Ishodne otopine rodamina 6G (R6G) i etidijeva bromida (EB) koncentracije 1×10^{-2} mol L⁻¹ pripravljene su otapanjem odgovarajuće mase praškastog uzorka u Milli-Q deioniziranoj vodi. Za pripremu otopine R6G otopljeno je 0,02450 g rodamina u 5115 µL deionizirane vode dok je za pripremu otopine EB otopljeno 0,01947 g čvrste tvari u 4938 µL deionizirane vode. Ishodna otopina DTB, koncentracije $7,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, pripravljena je na Institutu Ruđer Bošković. Za snimanje koncentracijski ovisnih SERS spektara, pripravljene su otopine koncentracija 1×10^{-5} , 1×10^{-6} i 1×10^{-7} mol L⁻¹ za sva tri spoja na način da se ishodna otopina spojeva razrijedila u odgovarajućem volumenu deionizirane vode. Te su otopine korištene za pripremu mjernih uzoraka u koloidnim suspenzijama.

Mjerni uzorci R6G, EB i DTB u koloidnim suspenzijama pripremljeni su na način da je u semimikro epruvetu dodano 4 µL analita (ishodne otopine odgovarajuće koncentracije), zatim 4 µL deionizirane vode te 32 µL koloidne suspenzije srebra ili zlata. Smjesa je promiješana pipetom nakon dodatka svih sastojaka. Ukupan volumen otopine koji je iznosio 40 µL premješten je u kvarcnu kivetu ili aluminijske posudice.

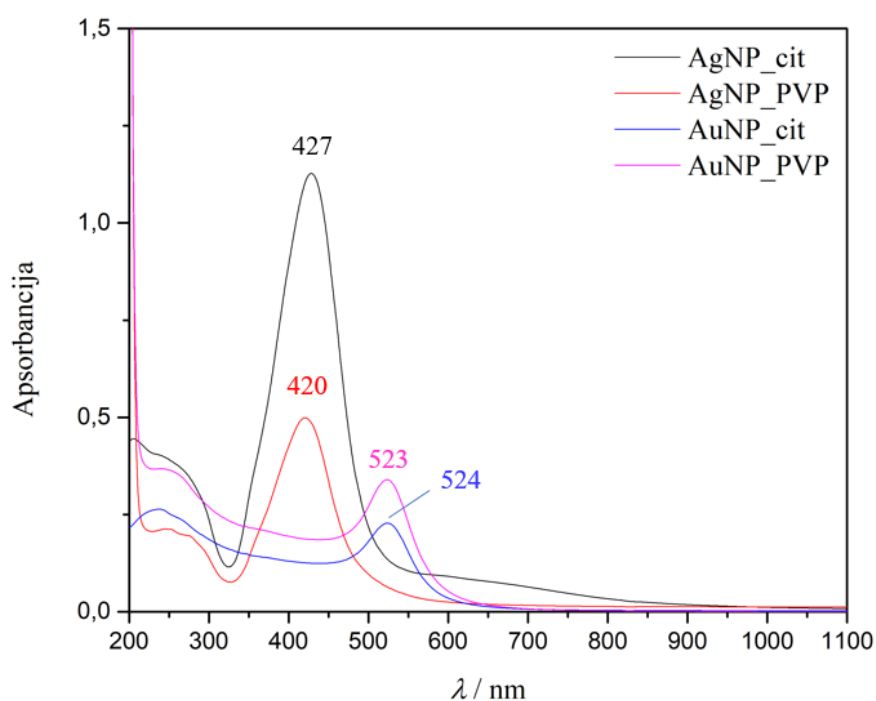
Za snimanje Ramanovih spektara spojeva koji su korišteni tijekom pripreme koloidnih suspenzija, pripravljene su otopine srebrova(I) nitrata ($c = 1 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹), trinatrijeva citrata ($c = 1 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹), poli(vinilpirolidona) ($c = 1 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) i taninske kiseline ($c = 1 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹). Otopina srebrova(I) nitrata priređena je otapanjem 0,00831 g čvrste tvari u 4892 µL deionizirane vode. Otopina trinatrijeva citrata priređena je otapanjem 0,01551 g čvrste tvari trinatrijeva citrata dihidrata u 5275 µL deionizirane vode. Otopina poli(vinilpirolidona) vrlo je viskozna, a pripremljena je otapanjem 0,97114 g čvrste tvari u 1942 µL deionizirane vode. Za pripremu otopine taninske kiseline, odvagano je 0,01681 g krutine te otopljeno u 988 µL deionizirane vode.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UV/Vis apsorpcijski spektri

4.1.1. Koloidne suspenzije

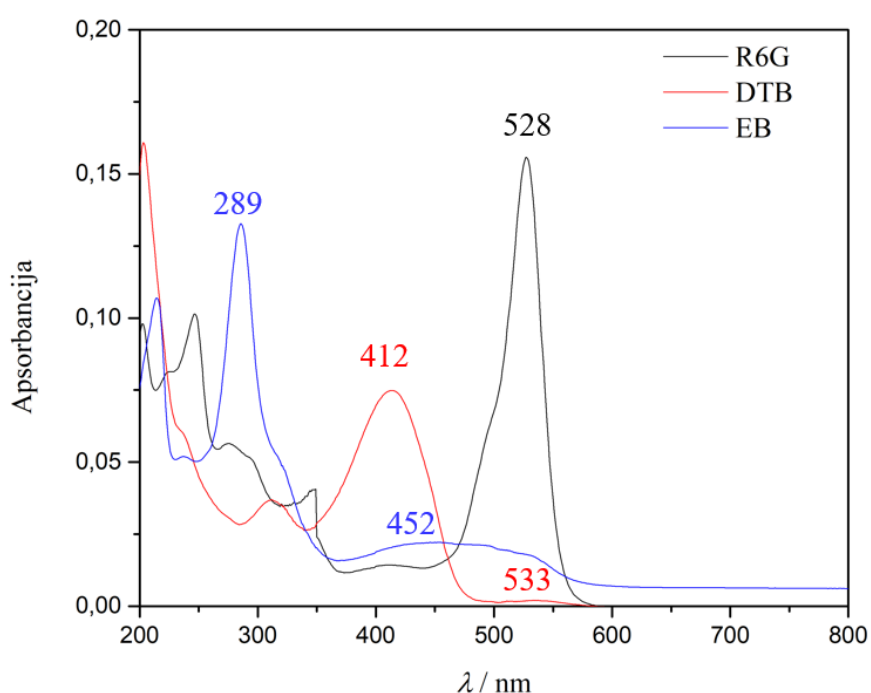
U svrhu karakterizacije koloida snimljeni su UV/Vis apsorpcijski spektri koloidnih suspenzija nanočestica metala i izmjerene pH-vrijednosti. Koloidnoj suspenziji nanočestica zlata s citratnim ionima na površini izmjeren je pH = 6,01, a suspenziji nanočestica zlata s PVP-om na površini pH = 6,87. Za koloidnu suspenziju nanočestica srebra s citratnim ionima na površini izmjerena pH-vrijednost bila je 8,47, dok je za suspenziju nanočestica srebra s PVP-om na površini pH-vrijednost iznosila 6,98. Valna duljina rezonancije plazmona nanočestica zlata iznosila je 523 nm (AuNP_cit) i 524 nm (AuNP_PVP), a nanočestica srebra 427 nm (AgNP_cit) i 420 nm (AgNP_PVP). UV/Vis/NIR apsorpcijski spektri koloidnih suspenzija nanočestica srebra i zlata prikazani su na Slici 9.



Slika 9. UV/Vis/NIR apsorpcijski spektri koloidnih suspenzija nanočestica srebra i zlata.

4.1.2. Istraživane molekule

U svrhu karakterizacije istraživanih molekula snimljeni su UV/Vis apsorpcijski spektri otopina rodamina 6G, etidijeva bromida te spoja DTB (Slika 10). Koncentracija svih otopina iznosila je 1×10^{-5} mol L⁻¹. Rodamin 6G je fluorescentni spoj s apsorpcijskim maksimumom pri 528 nm. Etidijev bromid je također fluorescentna molekula koja maksimalno apsorbira zračenje pri 289 nm. Derivat triarilborana DTB ima apsorpcijski maksimum pri 412 nm. Vrijednosti valnih duljina apsorpcijskih maksimuma odgovaraju onima u literaturi.²⁰⁻²²



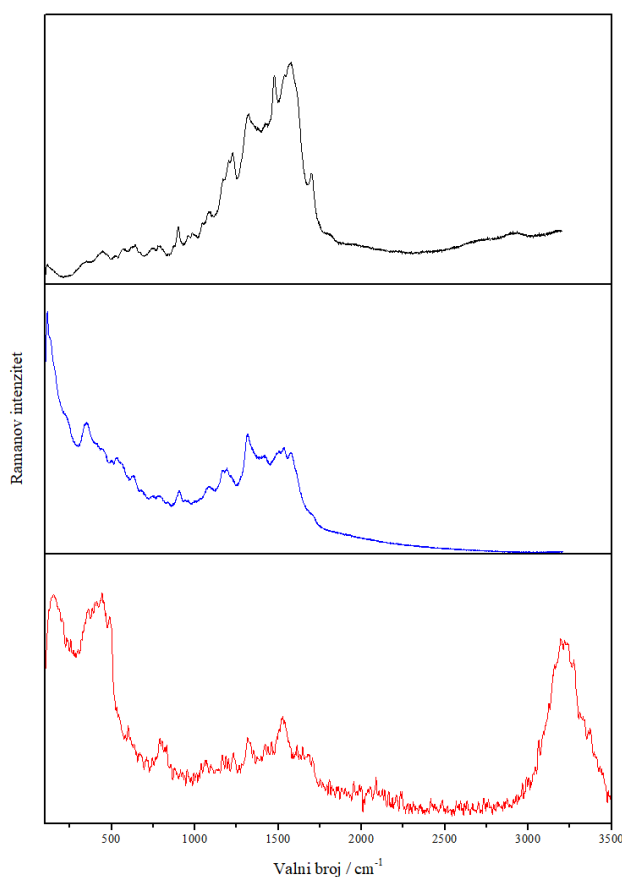
Slika 10. UV/Vis apsorpcijski spektri istraživanih molekula: rodamina 6G (crno), spoja DTB (crveno) i etidijeva bromida (plavo).

4.2. Ramanovi spektri

4.2.1. Koloidne suspenzije

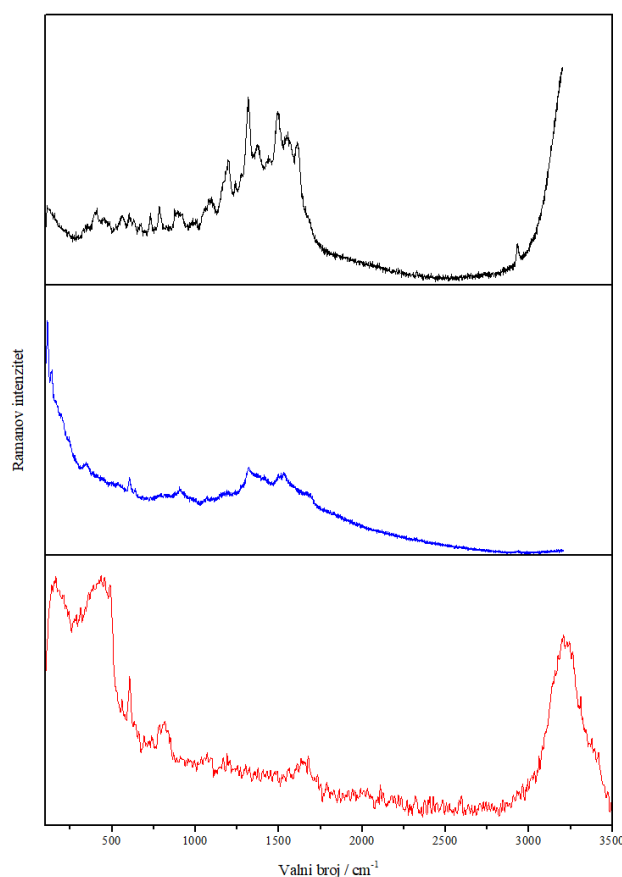
Snimljeni su Ramanovi spektri koloidnih suspenzija nanočestica srebra i zlata s citratnim ionima ili poli(vinilpirolidonom) na površini pri valnim duljinama pobude 532, 785 i 1064 nm.

Spektri koloidne suspenzije nanočestica srebra s citratnim ionima na površini, AgNP_cit, razlikuju se ovisno o valnoj duljini pobude, a intenzivne vrpce prisutne su nakon pobude zračenjem sve tri valne duljine (Slika 11.a). Opažene vrpce ne mogu se direktno pripisati sastojcima korištenim za pripremu koloida (trinatrijev citrat, taninska kiselina) i najvjerojatnije potječu od oksidacijskih produkata citratnih iona (acetondikarboksilna kiselina i acetocena kiselina) nastalih tijekom priprave koloida.^{4,23}



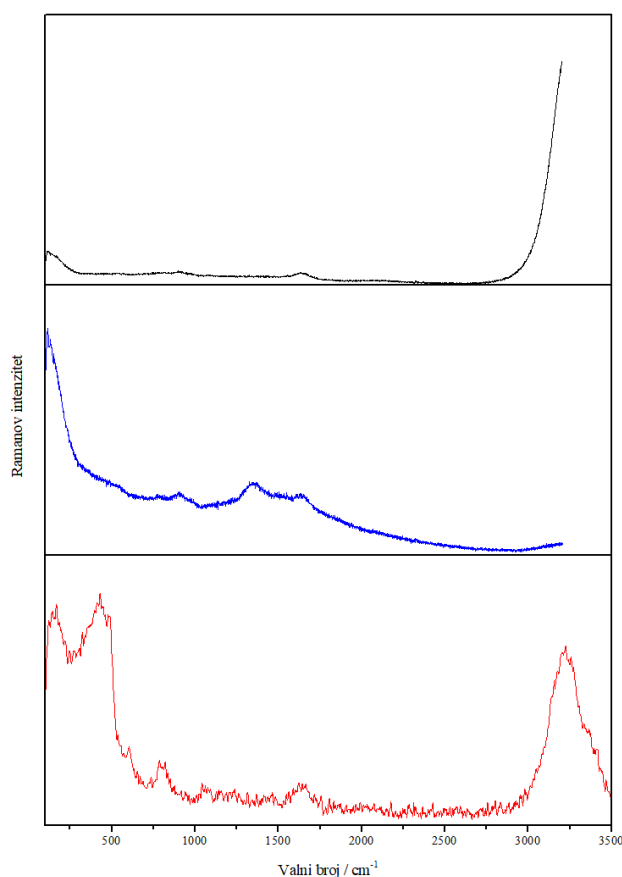
Slika 11. a) Ramanovi spektri AgNP_cit nakon pobude zračenjem pri 532 nm (crno), 785 nm (plavo) i 1064 nm (crveno).

Spektri koloidne suspenzije nanočestica srebra s PVP-om na površini, AgNP_PVP, razlikuju se ovisno o valnoj duljini pobude (Slika 11.b). Nakon pobude zračenjem valne duljine 532 nm, vidljive su intenzivne vrpce nalik vrpčama u spektru AgNP_cit pri istoj valnoj duljini pobude. Ne mogu se direktno pripisati niti jednom od sastojaka koloida te najvjerojatnije potječu od citratnih iona i/ili njihovih oksidacijskih produkata.²⁴ Spektri AgNP_PVP snimljeni nakon pobude NIR zračenjem valnih duljina 785 i 1064 nm odgovaraju spektru vode (vrpce deformacije molekule vode pri 1650 cm^{-1} i istežanja H–O–H veza vode pri 3235 cm^{-1}) s vrpcom srednjeg intenziteta pri 606 cm^{-1} koja potječe od kakodilatnog pufera, odnosno istežanja veze As=O.²⁰



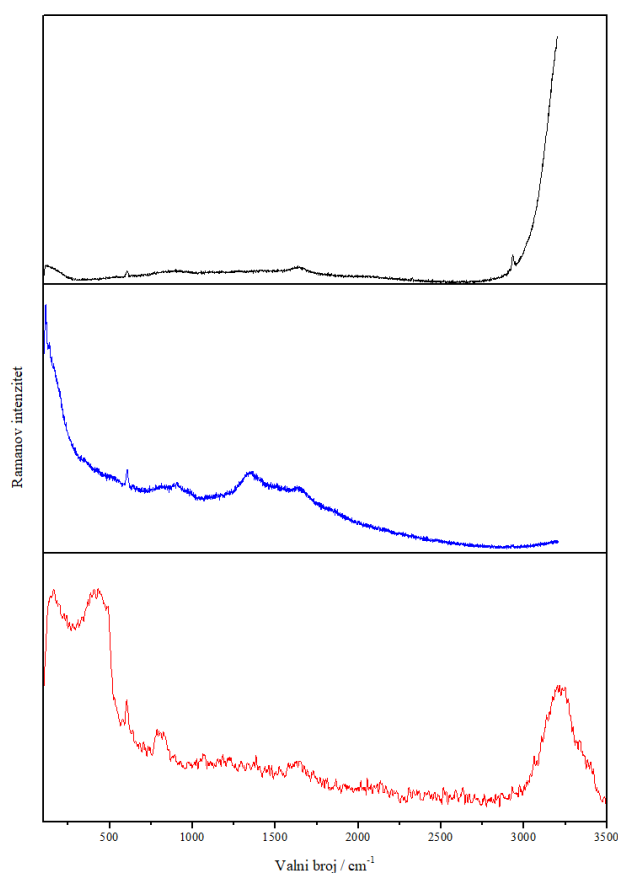
Slika 11. b) Ramanovi spektri AgNP_PVP nakon pobude zračenjem pri 532 nm (crno), 785 nm (plavo) i 1064 nm (crveno).

U spektrima koloidne suspenzije nanočestica zlata s citratnim ionima na površini, AuNP_cit, nakon pobude zračenjem valnih duljina 532 i 785 nm uočava se vrpca pri 1635 cm^{-1} koja se može pripisati strižnoj deformaciji molekule vode (Slika 12.a). U spektru pri 785 nm vidljive vrpce pri 910 i 1350 cm^{-1} potječu od aluminijske posudice za snimanje uzoraka. Nakon pobude pri 1064 nm opažen je spektar vode: široke vrpce deformacija molekule vode pri 795 i 1650 cm^{-1} te istezanja H–O–H veza pri 3235 cm^{-1} .



Slika 12. a) Ramanovi spektri AuNP_cit nakon pobude zračenjem pri 532 nm (crno), 785 nm (plavo) i 1064 nm (crveno).

Spektri koloidne suspenzije nanočestica zlata s poli(vinilpirolidonom) na površini, AgNP_PVP, nakon pobude zračenjem valnih duljina 532 i 785 nm nalikuju spektrima AuNP_cit (Slika 12.b). Međutim, uz vrpce vode i aluminijske posudice uočavaju se vrpce kakodilatnog pufera pri 606 i 2933 cm^{-1} pripisane istezanju veze $\text{As}=\text{O}$, odnosno antisimetričnom istezanju veza $\text{C}-\text{H}$ metilne skupine.²⁰ U spektru koloida nakon pobude pri 1064 nm uočavaju se vrpce vibracija vode (795 , 1650 , 3235 cm^{-1}) te vrpca vibracije kakodilatnog pufera (605 cm^{-1}).

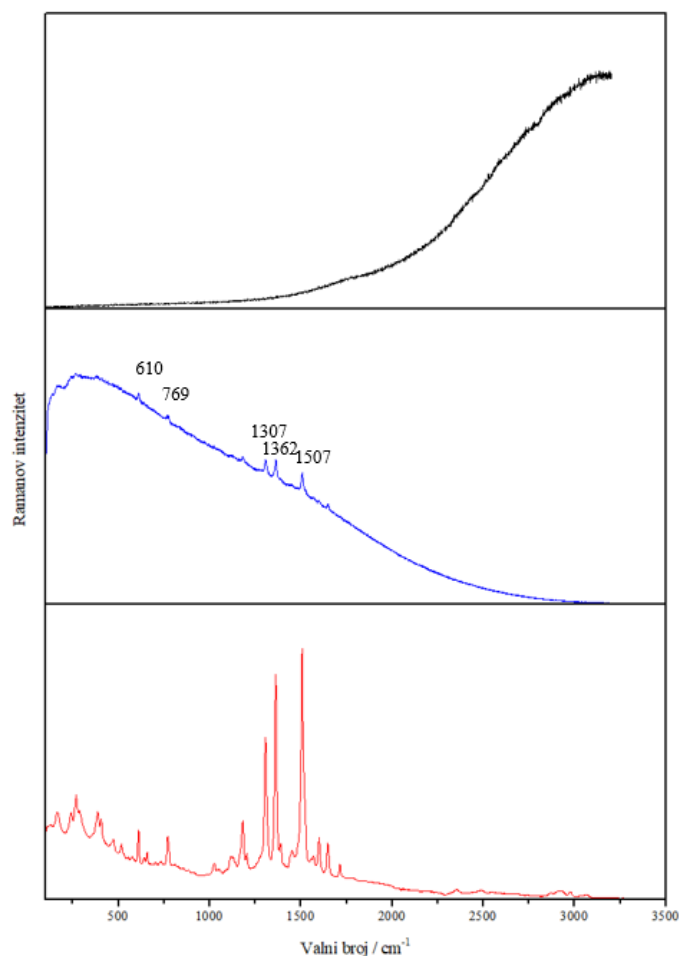


Slika 12. b) Ramanovi spektri AuNP_PVP nakon pobude zračenjem pri 532 nm (crno), 785 nm (plavo) i 1064 nm (crveno).

4.2.2. Istraživane molekule

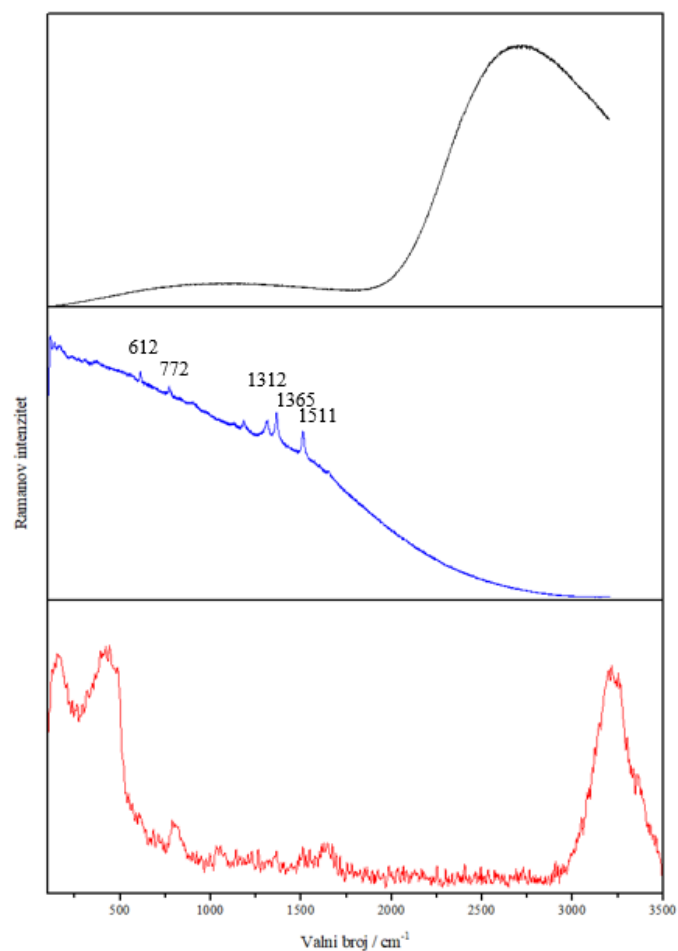
Snimljeni su Ramanovi spektri čvrstog uzorka i vodene otopine rodamina 6G, $c = 1 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} , pri valnim duljinama pobude 532, 785 i 1064 nm. Prilikom snimanja spektara snaga lasera podešavana je ovisno o uzorku, kako bi se izbjegao raspad ili gorenje uzorka s jedne strane, a postignuo maksimalni intenzitet, s druge strane. Opažene vibracijske vrpce asignirane su u Tablici 3.

U spektru čvrstog uzorka R6G nakon pobude zračenjem pri 532 nm, nisu uočene vrpce koje bi odgovarale vibracijama spoja, već porast bazne linije pri višim valnim brojevima koji ukazuje na emisiju zračenja R6G (Slika 13.a). Iz UV/Vis spektra vidljivo je da R6G apsorbira zračenje pri 528 nm (Slika 10), koje je blisko valnoj duljini pobudnog zračenja (532 nm), uslijed čega R6G fluorescira, a fluorescencija prekriva Ramanovo raspršenje. U spektru snimljenom pri valnoj duljini pobude 785 nm, povišena bazna linija još uvijek upućuje na fluorescenciju uzorka, no uočavaju se i vibracijske vrpce slabog intenziteta koje potječu od R6G. Vrlo slaba vrpca pri 1648 cm^{-1} pripisana je deformacijama NH skupine etilamino supstituenata. Vrpce pri 1507 , 1362 i 1307 cm^{-1} odgovaraju istežanjima CC veza ksantenskog sustava, od kojih vrpce pri 1307 cm^{-1} doprinosi istežanje C–N veze između atoma ugljika ksantena i atoma dušika etilamino skupine.²⁵ Vrpce vrlo slabog intenziteta pri 769 i 610 cm^{-1} pripisane su deformacijama izvan ravnine CH skupina ksantenskog sustava i fenilnog prstena te svijanju aromatskih jedinica.¹⁶ U spektru snimljen nakon pobude pri 1064 nm fluorescencija ne interferira raspršenom zračenju te je opažen intenzivan Ramanov spektar R6G, u kojem dominiraju vibracijske vrpce ksantenskog dijela molekule pri 1507 , 1362 i 1307 cm^{-1} .



Slika 13. a) Ramanovi spektri čvrstog uzorka R6G nakon pobude zračenjem pri 532 nm (crno), 785 nm (plavo) i 1064 nm (crveno).

U Ramanovom spektru vodene otopine R6G ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), snimljenom pri valnoj duljini pobude 532 nm, fluorescencija prekriva čitavo spektralno područje (Slika 13.b). U spektru snimljenom nakon pobude pri 785 nm, opažene su vibracijske vrpce slabog intenziteta, pripisane istezanjima ksantenskog sustava (1511 , 1365 i 1312 cm^{-1}) te deformacijama aromatskih CH skupina (772 i 612 cm^{-1}). Spektar otopine R6G snimljen nakon pobude zračenjem pri 1064 nm odgovara spektru vode, što je posljedica manje energije pobudnog zračenja u bliskom infracrvenom području, nedovoljne za detekciju molekula u otopini.



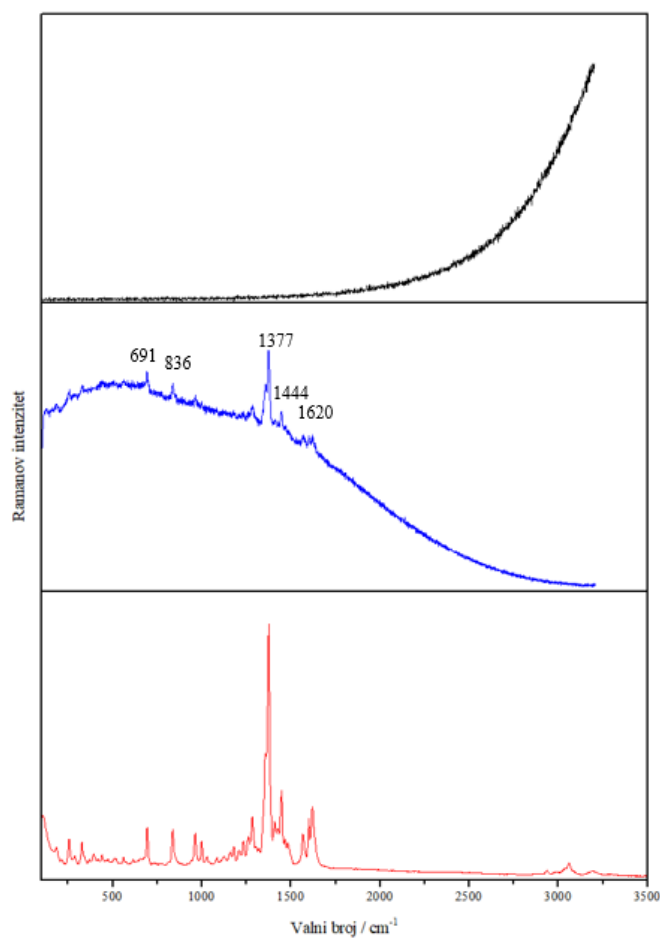
Slika 13. b) Ramanovi spektri otopine R6G, $c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, nakon pobude zračenjem pri 532 nm (crno), 785 nm (plavo) i 1064 nm (crveno).

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

Valni broj / cm^{-1}		Vibracija
Čvrsti uzorak	Vodena otopina	
1507	1511	$\nu \text{ CC}$
1362	1365	$\nu \text{ CC}$
1307	1312	$\nu \text{ C-N}$
769	772	$\delta_{\text{oop}} \text{ CH}$
610	612	$\delta_{\text{oop}} \text{ CH}$

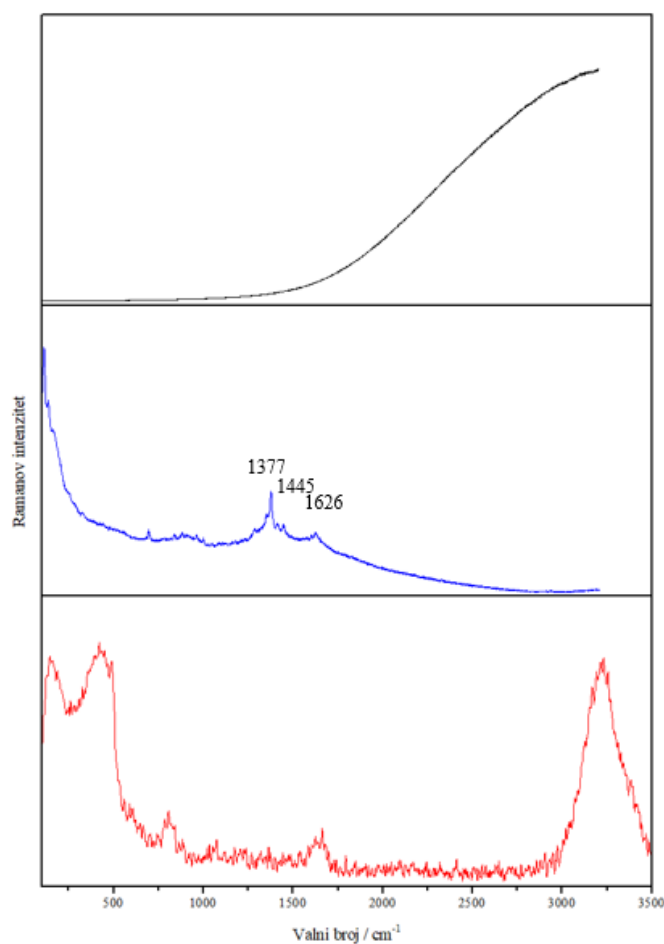
Snimljeni su Ramanovi spektri čvrstog uzorka i vodene otopine etidijeva bromida, $c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pri valnim duljinama pobude 532, 785 i 1064 nm. Prilikom snimanja spektara snaga lasera podešavana je ovisno o uzorku, kako bi se izbjegnulo raspad ili gorenje uzorka s jedne strane, a postignuo maksimalni intenzitet, s druge strane. Opažene vrpce asignirane su u Tablici 4.

U spektru čvrstog uzorka EB, snimljenom pri valnoj duljini pobude 532 nm, nisu uočene vrpce koje bi odgovarale vibracijama molekule, već porast bazne linije pri višim valnim brojevima, koji upućuje na fluorescenciju spoja (Slika 14.a). Povišena bazna linija u spektru nakon pobude pri 785 nm također ukazuje na fluorescencije EB, dok je doprinos emisije zračenja u potpunosti izbjegnuto snimanjem spektra pri 1064 nm. U oba spektra uočena je slaba vrpca pri 1620 cm^{-1} pripisana istezanju CC veza fenantridina te vrpca srednjeg intenziteta pri 1444 cm^{-1} pripisana simetričnim istezanjima konjugiranih CC i CN veza fenantridina te deformaciji CH_2 skupine. Vrlo intenzivna vrpca pri 1374 cm^{-1} posljedica je istezanja fenantridinskog sustava te simetrične deformacije CH_3 skupine. Deformacije fenantridina doprinose vrpcama pri 836 i 691 cm^{-1} .



Slika 14. a) Ramanovi spektri čvrstog uzorka EB nakon pobude zračenjem pri 532 nm (crno), 785 nm (plavo) i 1064 nm (crveno).

U Ramanovom spektru vodene otopine EB ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) snimljenom pri valnoj duljini pobude 532 nm, fluorescencija dominira u spektru (Slika 14.b). U spektru snimljenom pobudnim zračenjem pri 785 nm opažene su vrpce slabog intenziteta pri 1626 i 1445 cm^{-1} . Između vrpce pripisanih istezanju CC i CN veza fenantridina, najintenzivnija je vrpca pri 1377 cm^{-1} kojoj doprinosi deformacija metilne skupine. Kao i u slučaju otopine R6G, spektar otopine EB snimljen nakon pobude u NIR području odgovara spektru vode.¹⁹



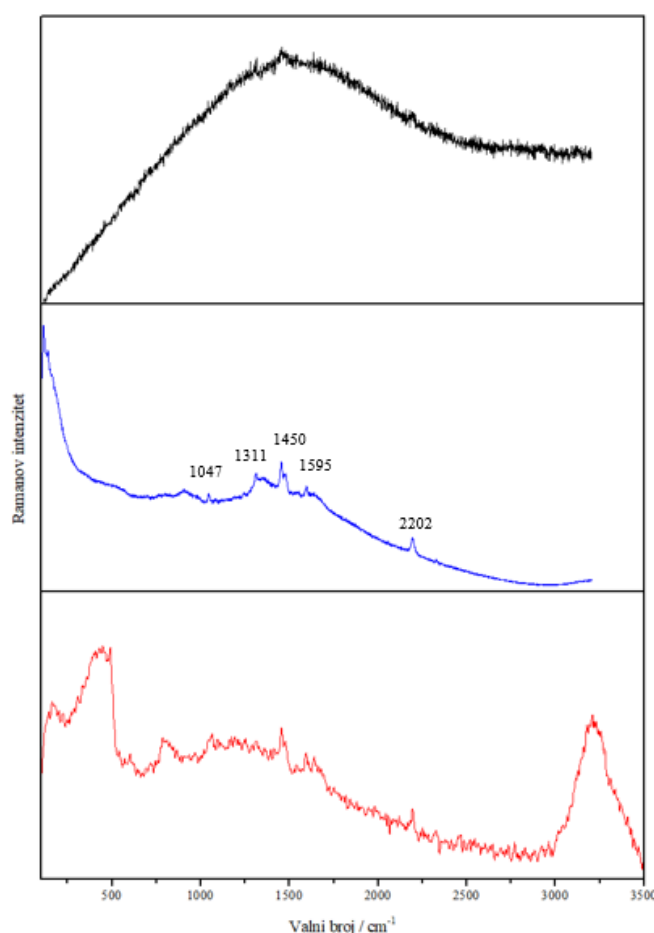
Slika 14. b) Ramanovi spektri otopine EB, $c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, nakon pobude zračenjem pri 532 nm (crno), 785 nm (plavo) i 1064 nm (crveno).

Tablica 4. Asignacija osnovnih vibracijskih vrpci u Ramanovim spektrima čvrstog uzorka i vodene otopine etidijevog bromida ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) pri valnoj duljini pobude 785 nm.

Valni broj / cm^{-1}		Vibracija
Čvrsti Uzorak	Vodena otopina	
1620	1626	$\nu \text{ CC}$
1444	1445	$\nu \text{ CC/CN}, \delta_{\text{sc}} \text{ CH}_2$
1374	1377	$\nu \text{ CC}, \delta_{\text{s}} \text{ CH}_3$
836	/	$\delta \text{ fenantridin}$
691	/	$\delta \text{ fenantridin}$

Snimljeni su Ramanovi spektri vodene otopine DTB, $c = 7,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, pri valnim duljinama pobude 532, 785 i 1064 nm (Slika 15). Prilikom snimanja spektara snaga lasera podešavana je ovisno o uzorku, kako bi se izbjegnulo raspad ili gorenje uzorka s jedne strane, a postignuo maksimalni intenzitet, s druge strane. Opažene vrpce asignirane su u Tablici 5.

U spektru snimljenom nakon pobude pri 532 nm nisu uočene vrpce koje bi odgovarale vibracijama spoja, već očekivana fluorescencija DTB s obzirom da spoj apsorbira zračenje u Vis dijelu spektra (412 nm).²⁰ U spektrima nakon pobude zračenjem u NIR području (785 i 1064 nm) fluorescencija je umanjena te su opažene karakteristične vibracijske vrpce spoja. Vrpca srednjeg intenziteta pri 2202 cm^{-1} pripisana je istežanju trostrukih $\text{C}\equiv\text{C}$ veza, a vrpca pri 1595 cm^{-1} aromatskim CC istežanjima. Najintenzivnija vrpca pri 1450 cm^{-1} odgovara istežanju CS veza tioletenskih sustava, dok vrpce pri 1311 i 1047 cm^{-1} potječu od istežanja tioletenskih prstenova, odnosno deformacije u ravnini CH skupina tioletena.²⁰



Slika 15. Ramanovi spektri otopine DTB, $c = 7,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, nakon pobude zračenjem pri 532 nm (crno), 785 nm (plavo) i 1064 nm (crveno).

Tablica 5. Asignacija osnovnih vibracijskih vrpci u Ramanovim spektrima vodene otopine DTB ($c = 7,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) pri valnoj duljini pobude 785 nm.

Valni broj / cm^{-1}	Vibracija
Vodena otopina	
2202	$\nu \text{ C}\equiv\text{C}$
1595	$\nu \text{ CC}$
1450	$\nu \text{ CS}$
1311	ν tiofen
1047	$\delta_{\text{ip}} \text{ CH (tiofen)}$

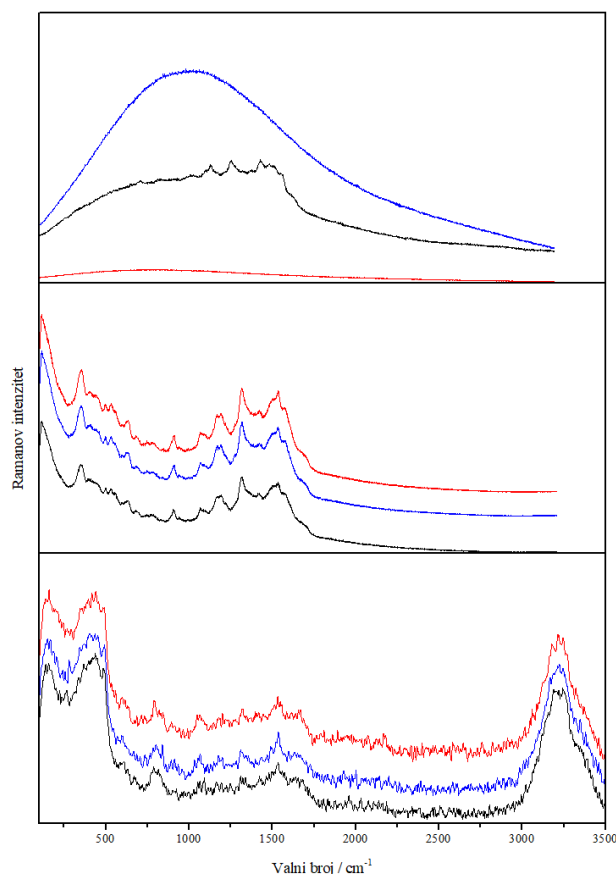
4.2. SERS spektri

4.2.1. Rodamin 6G

U svrhu testiranja učinkovitosti sintetiziranih koloida AgNP_cit, AgNP_PVP, AuNP_cit i AuNP_PVP kao SERS supstrata, snimljeni su SERS spektri rodamina 6G u rasponu koncentracija 1×10^{-7} – 1×10^{-5} mol L⁻¹ nakon pobude zračenjem 532, 785 i 1064 nm. Prilikom snimanja spektara snaga lasera podešavana je ovisno o uzorku.

U SERS spektrima uzoraka rodamina 6G u koloidu AgNP_cit nisu uočene karakteristične vibracijske vrpce molekule R6G nakon pobude niti Vis (532 nm) niti NIR (785 i 1064 nm) zračenjem u istraživanom koncentracijskom području (Slika 16). Spektre R6G koncentracija 1×10^{-6} i 1×10^{-5} mol L⁻¹, snimljenim pobudnim zračenjem pri 532 nm prekriva fluorescencija, dok su vrpce u spektru najniže koncentracije, 1×10^{-7} mol L⁻¹, pripisane citratnim ionima i njihovim oksidacijskim i razgradnim produktima. Spektri R6G snimljeni pobudnim zračenjem pri 785 i 1064 nm nalikuju jedan drugome neovisno o koncentraciji R6G, a odgovaraju spektru koloida AgNP_cit.

Iako su prema literaturi zabilježeni intenzivni SERS spektri R6G na nanočesticama srebra s citratnim ionima na površini,²⁶ na koje se molekule rodamina adsorbiraju uslijed elektrostatskog privlačenja između pozitivnog naboja molekula R6G i negativnog naboja citratnih iona na površini srebra, u ovom slučaju pojačanje Ramanovog raspršenja je izostalo. Za pretpostaviti je da prisutnost kemijskih vrsta na površini nanočestica, zaostalih nakon pripreme koloida (razgradni i oksidacijski produkti citratnih iona te taninska kiselina) ometa adsorpciju molekula na površinu nanočestica. Također, istraživane monodispergirane nanočestice dimenzije 20 nm, uslijed plazmonske frekvencije pri 427 nm teorijski najučinkovitije raspršuju zračenje nakon pobude u Vis dijelu spektru, koje je u ovo slučaju prekriveno fluorescencijom rodamina.

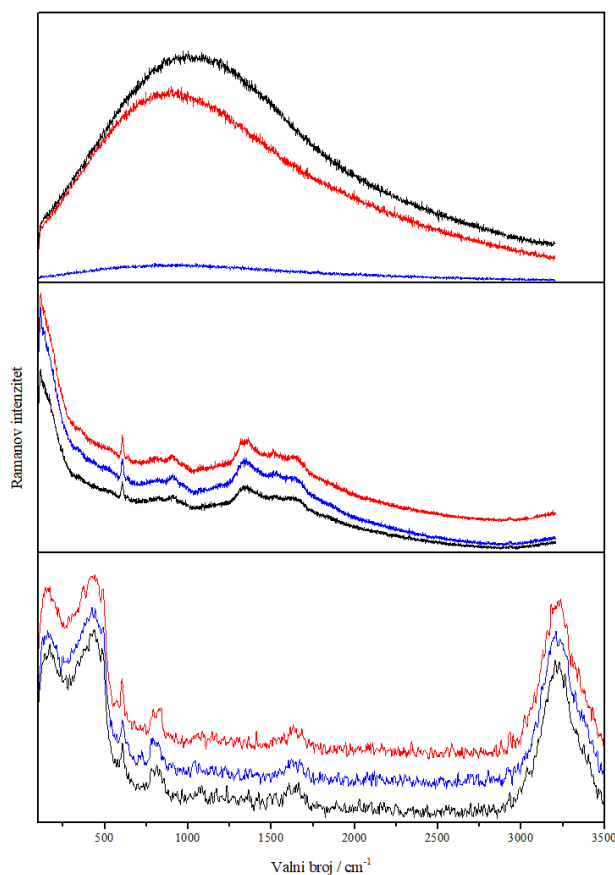


Slika 16. SERS spektri R6G koncentracije 1×10^{-7} mol L⁻¹ (crno), 1×10^{-6} mol L⁻¹ (plavo) i 1×10^{-5} mol L⁻¹ (crveno), u koloidnoj suspenziji AgNP_cit nakon pobude zračenjem pri 532, 785 i 1064 nm.

U SERS spektrima rodamina 6G u koloidu nanočestica srebra s polimerom na površini, AgNP_PVP, neovisno o pobudnom zračenju (532, 785 i 1064 nm) i koncentraciji R6G (1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol L⁻¹), nisu uočene karakteristične vibracijske vrpce spoja (Slika 17). Spektre snimljene pobudnim zračenjem u Vis području prekriva fluorescencija rodamina 6G, dok spektri snimljeni nakon pobude zračenjem u NIR području odgovaraju spektru koloida, odnosno vode, s vrpcom kakodilatnog pufera pri 606 cm^{-1} .

Poli(vinilpirolidon) je polimer koji oblaže nanočestice i na taj način ih stabilizira jer sprječava njihovu agregaciju. Međutim, s obzirom da je neutralna molekula ne može ostvariti privlačne elektrostatske interakcije s pozitivno nabijenim molekulama R6G, a tvoreći sloj na površini nanočestica predstavlja steričku barijeru koja priječi prilaz površini srebra, odnosno

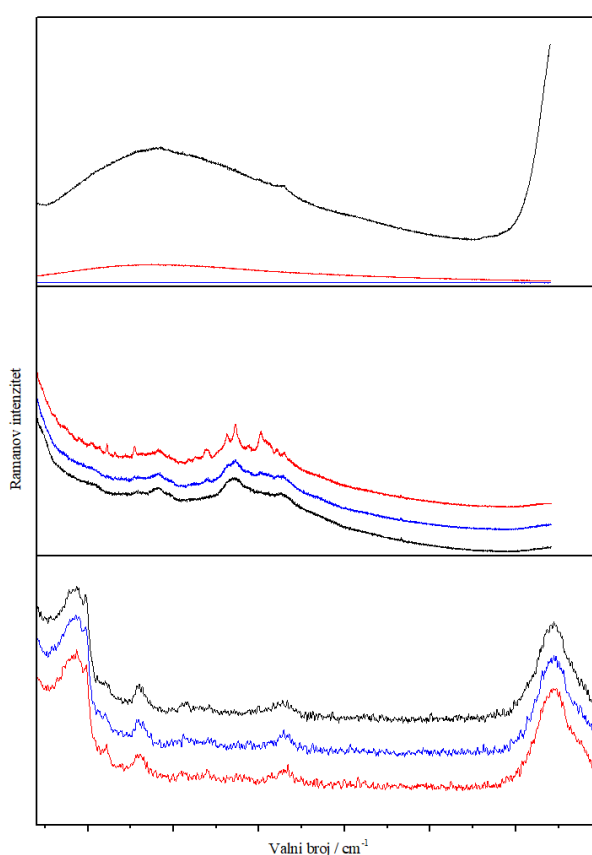
onemogućava smještanje molekula R6G blizu nanočesticama srebra nužno za pojačanje Ramanovog raspršenja.



Slika 17. SERS spektri R6G koncentracije 1×10^{-7} mol L⁻¹ (crno), 1×10^{-6} mol L⁻¹ (plavo) i 1×10^{-5} mol L⁻¹ (crveno), u koloidnoj suspenziji AgNP_PVP nakon pobude zračenjem pri 532, 785 i 1064 nm.

U SERS spektrima rodamina 6G u koloidu AuNP_cit, snimljenim pobudnim zračenjem pri 532 nm, nisu uočene vibracijske vrpce spoja, već spektre prekriva fluorescencija (Slika 18). Međutim, nakon pobude zračenjem pri 785 nm, u spektru uzorka koncentracije 1×10^{-5} mol L⁻¹ uočavaju se karakteristične vibracijske vrpce R6G pri 611, 771, 1316, 1363 i 1511 cm⁻¹, dok pri nižim koncentracijama, 1×10^{-7} i 1×10^{-6} mol L⁻¹, spektri nalikuju spektru koloida. Za pretpostaviti je da pri najvećoj mjerenoj koncentraciji molekule R6G zauzimaju optimalan položaj na površini nanočestica zlata i smještaju se okomito na površinu, dok smanjenjem koncentracije imaju više prostora na raspolaganju pa se nagnju ili smještaju paralelno s

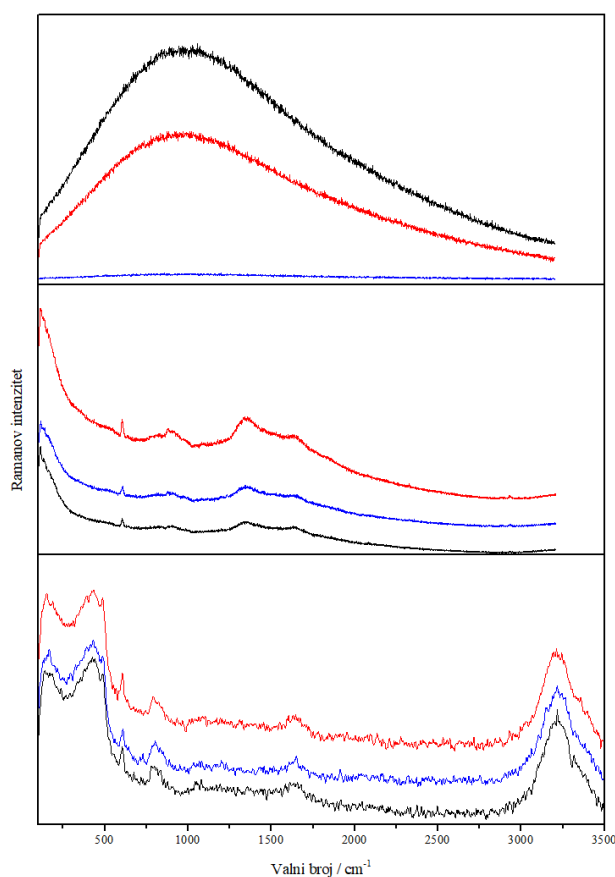
površinom nanočestica, pri čemu pojačanje raspršenja slabi ili u potpunosti izostaje. Pri tome se molekule R6G adsorbiraju na površinu nanočestica zlata privlačnim elektrostatskim interakcijama između pozitivno nabijenih molekula R6G i negativno nabijenog sloja citratnih iona na površini zlata. Za razliku od nanočestica srebra, pobudno zračenje pri 785 nm omogućava pre-rezonanciju s plazmonsom frekvencijom nanočestica zlata (525 nm) uslijed čega se raspršeno zračenje pojačava. U spektrima snimljenim nakon pobude NIR zračenjem (1064 nm) manje energije i veće razlike u odnosu na valnu duljinu plazmonske rezonancije, nisu uočene karakteristične vibracijske vrpce spoja, već spektri odgovaraju spektru koloida.



Slika 18. SERS spektri R6G koncentracije 1×10^{-7} mol L⁻¹ (crno), 1×10^{-6} mol L⁻¹ (plavo) i 1×10^{-5} mol L⁻¹ (crveno), u koloidnoj suspenziji AuNP_cit nakon pobude zračenjem pri 532, 785 i 1064 nm.

Jednako kao u spektrima R6G u koloidnoj suspenziji nanočestica srebra AgNP_PVP, nisu opaženi SERS spektri rodamina 6G u koloidu nanočestica zlata s polimerom na površini,

AuNP_PVP, bez obzira na valnu duljinu pobudnog zračenja (Slika 19). Spektre snimljene nakon pobude pri 532 nm prekriva fluorescencija rodamina 6G, dok spektri snimljeni nakon pobude pri 785 i 1064 nm odgovaraju spektrima koloida s kakodilatnim puferom. Za pretpostaviti je da neutralni polimer na površini onemogućava privlačne elektrostatske interakcije citratnih iona s molekulama R6G, a ujedno sterički priječi molekulama približavanje površini nanočesticama zlata, uslijed čega pojačanje Ramanovog raspršenja izostaje.



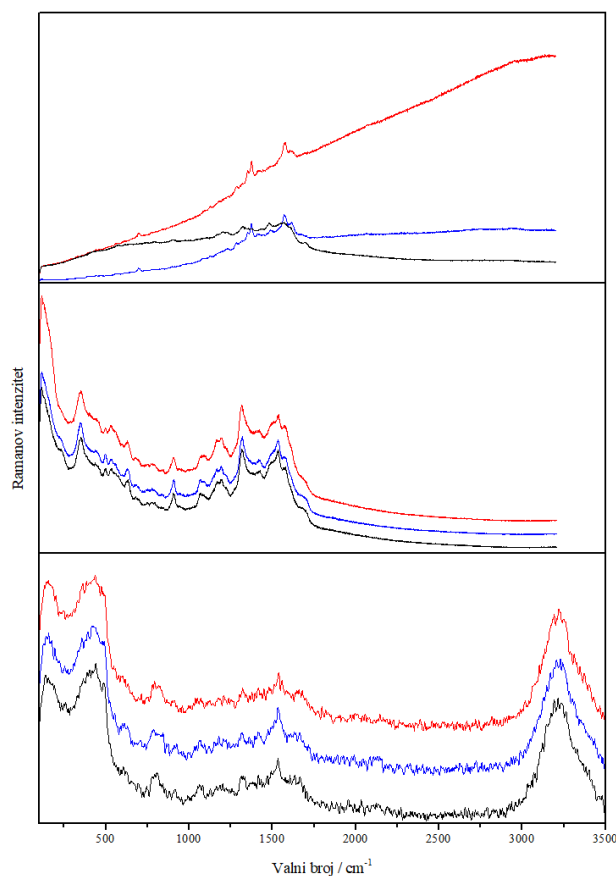
Slika 19. SERS spektri R6G koncentracije 1×10^{-7} mol L⁻¹ (crno), 1×10^{-6} mol L⁻¹ (plavo) i 1×10^{-5} mol L⁻¹ (crveno), u koloidnoj suspenziji AuNP_PVP nakon pobude zračenjem pri 532, 785 i 1064 nm.

4.2.2. Etidijev bromid

U svrhu testiranja učinkovitosti sintetiziranih koloida AgNP_cit, AgNP_PVP, AuNP_cit i AuNP_PVP kao SERS supstrata, snimljeni su SERS spektri etidijeva bromida u rasponu koncentracija 1×10^{-7} – 1×10^{-5} mol L⁻¹ nakon pobude zračenjem 532, 785 i 1064 nm. Prilikom snimanja spektara snaga lasera podešavana je ovisno o uzorku.

U SERS spektrima etidijeva bromida u koloidu AgNP_cit, snimljenim nakon pobude zračenjem 532 nm, uočava se povišena bazna linija koja ukazuje na fluorescenciju spoja, ali i superponirane vibracijske vrpce (Slika 20). U spektrima uzoraka EB koncentracija 1×10^{-6} i 1×10^{-5} mol L⁻¹, uz interferirajuće vrpce koloida, slabe vrpce pri 1575, 1374 i 699 cm⁻¹ pripisane su molekulama EB. Spektar najniže mjerene koncentracije EB, 1×10^{-7} mol L⁻¹, odgovara spektru koloida u kojem su opažene samo vrpce sastojaka i/ili njihovih oksidacijskih produkata zaostalih nakon pripreme koloida. Nakon pobude zračenjem 785 i 1064 nm snimljeni spektri odgovaraju spektru koloida u kojem dominiraju vrpce citratnih iona i/ili njihovih oksidacijskih i razgradnih produkata.

Za pretpostaviti je da se molekule EB adsorbiraju na površinu nanočestica srebra uslijed elektrostatskih privlačnih sila između pozitivno nabijenih molekula EB i negativno nabijenog sloja citratnih iona na površini nanočestica srebra. Za razliku od R6G koji apsorbira zračenje u Vis djelu spektra i intenzivno fluorescira nakon pobude zračenjem pri 532 nm, EB maksimalno apsorbira zračenje pri 289 nm pa fluorescencija EB interferira u manjoj mjeri raspršenom zračenju nakon pobude Vis zračenjem. Izostanak pojačanja raspršenog zračenja nakon pobude zračenjem većih valnih duljina (785 i 1064 nm), može se dijelom pripisati sastojcima koloida (razgradni produkti citrata i taninska kiselina) na površini nanočestica koji onemogućavaju prilazak molekulama EB površini metala, a dijelom manjoj energiji zračenja u NIR području i nemogućnosti postizanja rezonantnih uvjeta mjerenja.

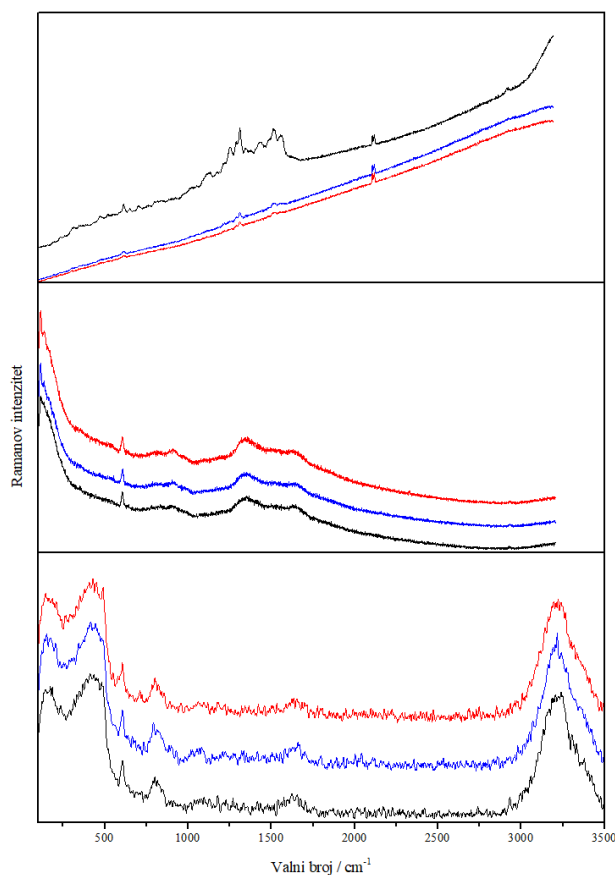


Slika 20. SERS spektri EB koncentracije 1×10^{-7} mol L⁻¹ (crno), 1×10^{-6} mol L⁻¹ (plavo) i 1×10^{-5} mol L⁻¹ (crveno), u koloidnoj suspenziji AgNP_cit nakon pobude zračenjem pri 532, 785 i 1064 nm.

U SERS spektrima etidijevog bromida u koloidu AgNP_PVP, snimljenim nakon pobude zračenjem 532 nm, osim vrpce koloida opažene su i vrlo slabe karakteristične vrpce spoja (Slika 21). U spektrima EB svih mjerenih koncentracija (1×10^{-7} , 1×10^{-6} i 1×10^{-5} mol L⁻¹) slabe vrpce pri 1572, 1376 i 699 cm⁻¹ pripisane su molekulama EB. Nakon pobude NIR zračenjem (785 i 1064 nm), snimljeni spektri odgovaraju spektru koloida s kakodilatnim puferom.

Iako je PVP neutralni polimer koji ne sudjeluje u elektrostatskom privlačenju pozitivno nabijenih molekula EB te sterički priječi smještanje molekula blizu površini srebra, za pretpostaviti je da se molekule EB ipak nalaze dovoljno blizu nanočesticama srebra da na

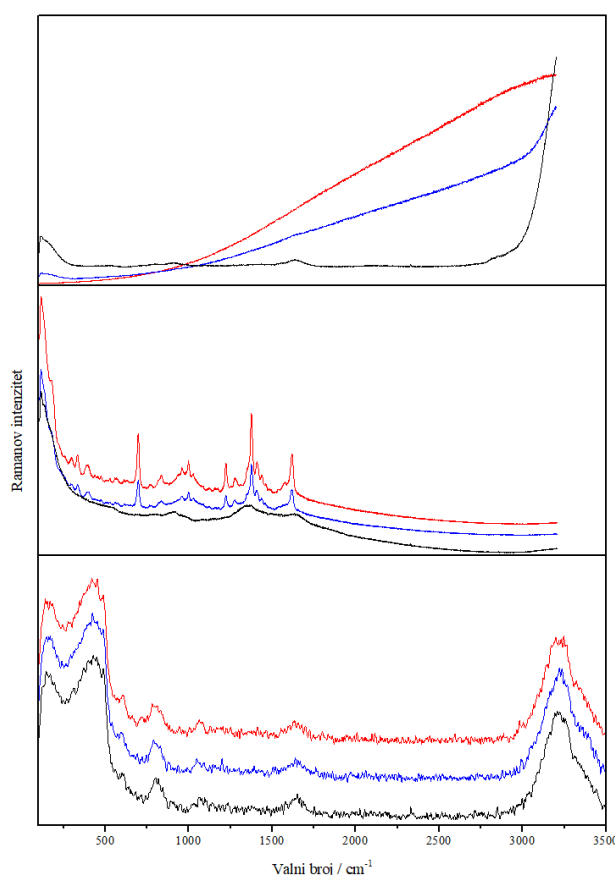
njih djeluju električna polja nastala nakon pobude plazmona vidljivim zračenjem (532 nm) što rezultira pojačanjem raspršenog zračenja.



Slika 21. SERS spektri EB koncentracije 1×10^{-7} mol L⁻¹ (crno), 1×10^{-6} mol L⁻¹ (plavo) i 1×10^{-5} mol L⁻¹ (crveno), u koloidnoj suspenziji AgNP_PVP nakon pobude zračenjem pri 532, 785 i 1064 nm.

U SERS spektrima etidijeva bromida u koloidu AuNP_cit, snimljenim nakon pobude zračenjem 532 nm, uočava se podignuta bazna linija koja ukazuje na fluorescenciju spoja, pri čemu spektar uzorka najmanje koncentracije odgovara spektru koloida (Slika 22). U spektrima EB koncentracija 1×10^{-5} i 1×10^{-6} mol L⁻¹, snimljenim nakon pobude zračenjem pri 785 nm, uočavaju se karakteristične vibracijske vrpce spoja pri 1618, 1377, 1222, 998 i 694 cm⁻¹, dok spektar uzorka najmanje koncentracije nalikuje spektru koloida. Spektri snimljeni nakon pobude zračenjem pri 1064 nm odgovaraju spektru koloida.

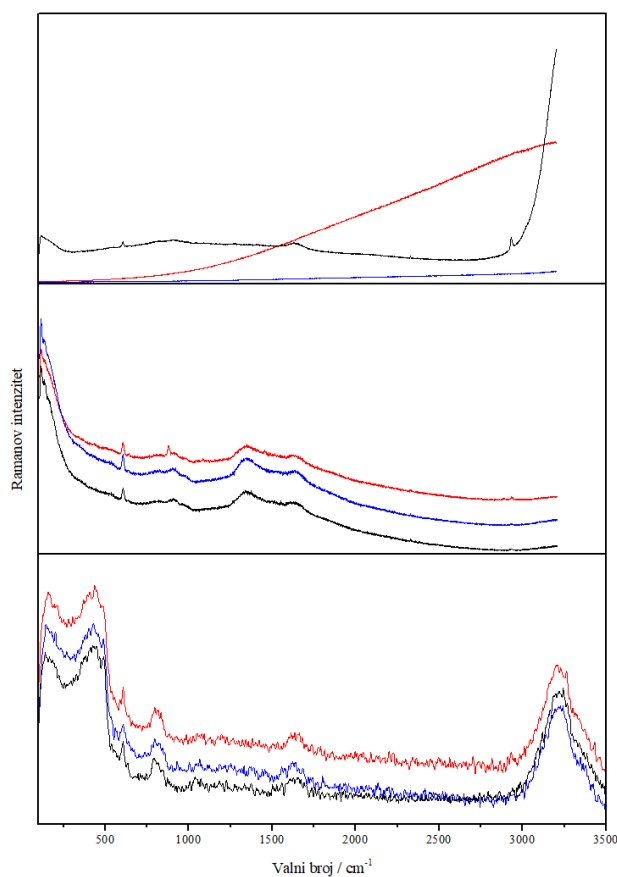
Nanočestice zlata na svojoj površini imaju sloj negativno nabijenih citratnih iona koji ih stabilizira i ujedno omogućava elektrostatsko privlačenje pozitivno nabijenih molekula EB. Adsorpcijom molekula EB na površinu zlata Ramanovo raspršenje se pojačava nakon pobude pri 785 nm. Pobudno zračenje manje valne duljine u Vis području (532 nm) uzrokuje fluorescenciju molekula EB koja prekriva Ramanov spektar, dok je pobudno zračenje veće valne duljine u NIR području (1064 nm) nedovoljne energije za opažanje Ramanovog raspršenja.



Slika 22. SERS spektri EB koncentracije 1×10^{-7} mol L⁻¹ (crno), 1×10^{-6} mol L⁻¹ (plavo) i 1×10^{-5} mol L⁻¹ (crveno) u koloidnoj suspenziji AuNP_cit nakon pobude zračenjem pri 532, 785 i 1064 nm.

U SERS spektrima uzoraka etidijeva bromida u koloidu nanočestica zlata s polimerom na površini, AuNP_PVP, nisu uočene karakteristične vibracijske vrpce spoja neovisno o koncentraciji (1×10^{-7} , 1×10^{-6} i 1×10^{-5} mol L⁻¹) i valnoj duljini pobudnog zračenja (532, 785 i

1064 nm) (Slika 23). Snimljeni spektri odgovaraju spektru koloidne suspenzije s kakodilatnim puferom, pri čemu se izostanak pojačanja raspršenog zračenja pripisuje ranije navedenim svojstvima polimera na površini nanočestica zlata.



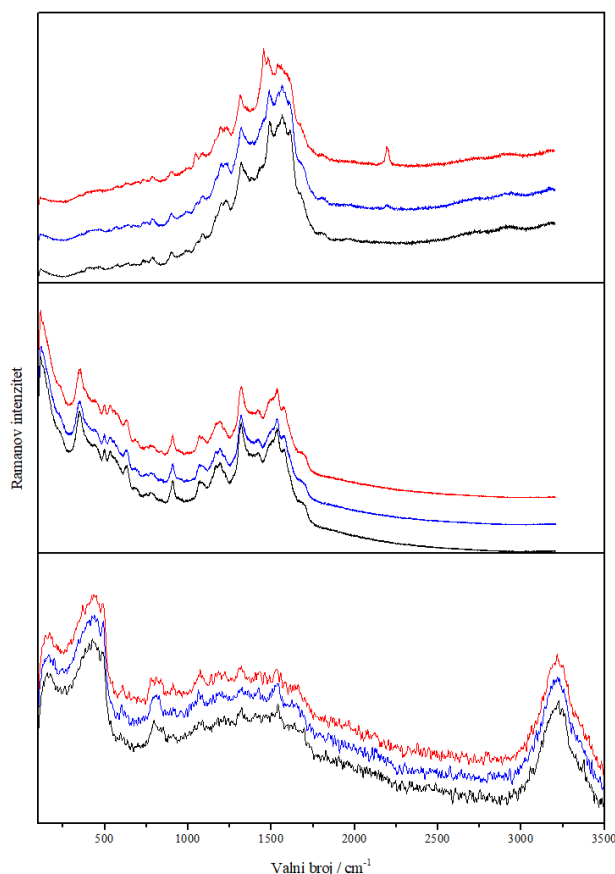
Slika 23. SERS spektri EB koncentracije $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (crno), $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (plavo) i $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (crveno) u koloidnoj suspenziji AuNP_PVP nakon pobude zračenjem pri 532, 785 i 1064 nm.

4.2.3. *5,5'-Bis[4-(bis(4-(*N,N,N*-trimetilamonij)-2,6-dimetilfenil)boril)-3,5-dimetilfeniletinil]-2,2'-ditiofen tetratriflat*

U svrhu testiranja učinkovitosti sintetiziranih koloida AgNP_cit, AgNP_PVP, AuNP_cit i AuNP_PVP kao SERS supstrata, snimljeni su SERS spektri novosintetiziranog tiofenskog derivata bis-triarilborana (DTB) u rasponu koncentracija 1×10^{-7} – 1×10^{-5} mol L⁻¹ nakon pobude zračenjem 532, 785 i 1064 nm. Prilikom snimanja spektara snaga lasera podešavana je ovisno o uzorku.

U SERS spektrima DTB u koloidu AgNP_cit, snimljenim nakon pobude zračenjem 532 nm, opažene su karakteristične vrpce spoja pri 1450 i 2202 cm⁻¹ za uzorke DTB koncentracija 1×10^{-5} i 1×10^{-6} mol L⁻¹ (Slika 24). Spektar najniže mjerene koncentracije (1×10^{-7} mol L⁻¹) snimljen nakon pobude Vis zračenjem, kao i spektri svih uzoraka DTB snimljeni pobudnim NIR zračenjem (785 i 1064 nm) odgovaraju spektru koloida s karakterističnim interferirajućim vrpcama.

Derivat triarilborana nosi četiri pozitivna naboja u strukturi koji mu olakšavaju adsorpciju na površinu nanočestica srebra prekrivenu citratnim anionima i njihovim razgradnim produktima te taninskom kiselinom. Opaženo je pojačanje raspršenog zračenja vibracija jako polarizabilnih funkcijskih skupina (trostruka veza, tiofen), kojem je također doprinijela veća energija pobudnog zračenja u Vis dijelu spektra i pre-rezonancija s plazmansom frekvencijom nanočestica srebra, u odnosu na pobudno NIR zračenje.

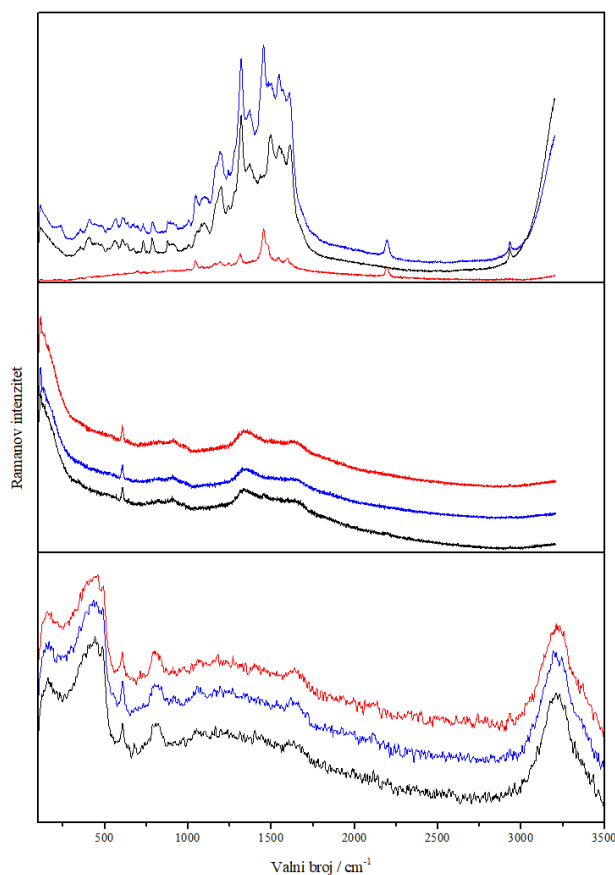


Slika 24. SERS spektri DTB koncentracije 1×10^{-7} mol L⁻¹ (crno), 1×10^{-6} mol L⁻¹ (plavo) i 1×10^{-5} mol L⁻¹ (crveno), u koloidnoj suspenziji AgNP_cit nakon pobude zračenjem pri 532, 785 i 1064 nm.

Slično SERS spektrima DTB u koloidu AgNP_cit, u SERS spektrima spoja u koloidnoj suspenziji nanočestica srebra s polimerom na površini, AgNP_PVP, snimljenim nakon pobude zračenjem pri 532 nm, opažene su karakteristične vrpce molekula DTB pri 1450 i 2202 cm⁻¹ za uzorke koncentracija 1×10^{-5} i 1×10^{-6} mol L⁻¹, dok spektar uzorka najniže koncentracije, 1×10^{-7} mol L⁻¹, odgovara spektru koloida (Slika 25). Nakon pobude zračenjem pri 785 i 1064 nm, snimljeni spektri uzorka DTB odgovaraju spektrima koloida s kakodilatnim puferom.

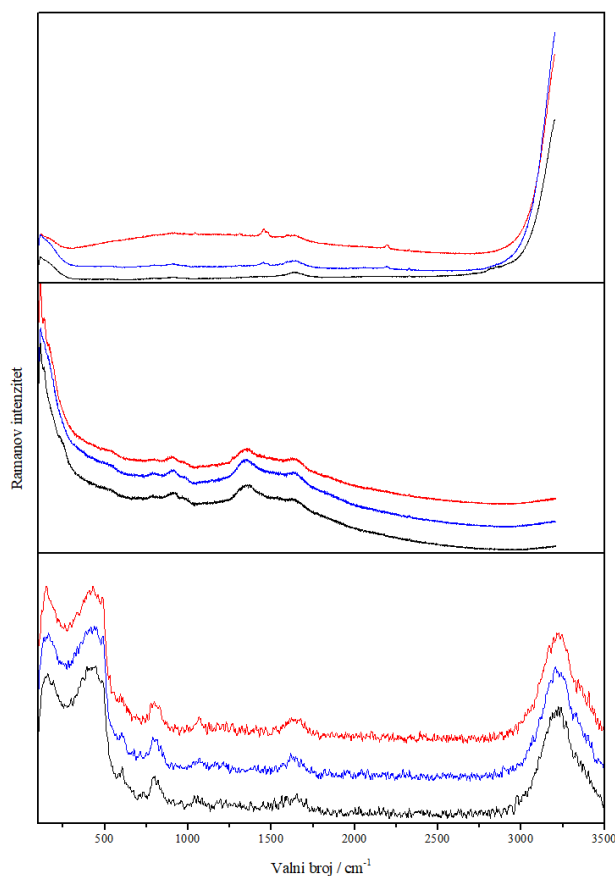
Opažanje površinski pojačanog raspršenog zračenja molekula DTB na nanočesticama srebra prekrivenih slojem neutralnog polimera, nakon pobude Vis zračenjem može se pripisati

visoko polarizabilnoj molekularnoj strukturi derivata triarilborana te većoj energiji pobudnog zračenja i pre-rezonaciji s koloidom srebra u odnosu na energiju NIR zračenja.



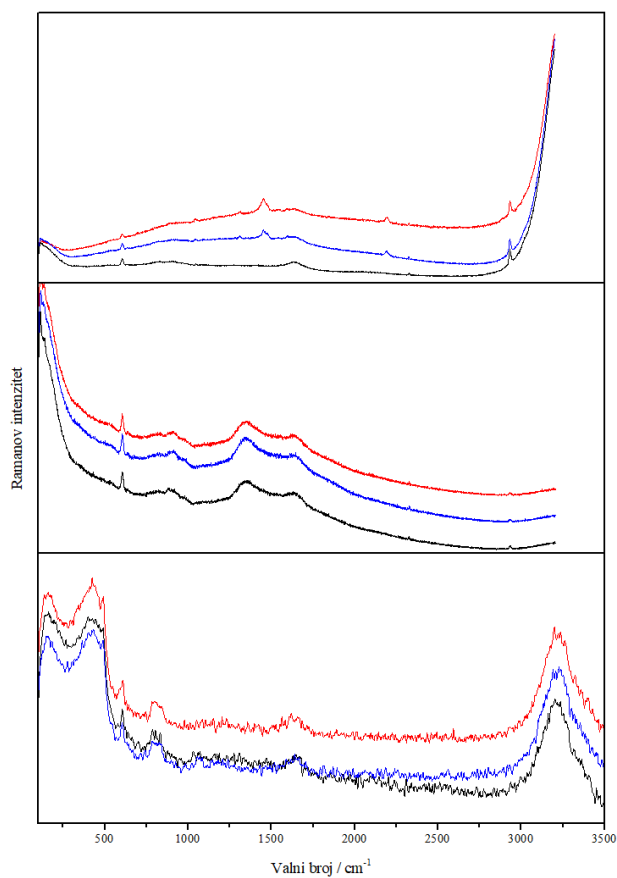
Slika 25. SERS spektri DTB koncentracije 1×10^{-7} mol L⁻¹ (crno), 1×10^{-6} mol L⁻¹ (plavo) i 1×10^{-5} mol L⁻¹ (crveno), u koloidnoj suspenziji AgNP_PVP nakon pobude zračenjem pri 532, 785 i 1064 nm.

U SERS spektrima DTB u koloidu AuNP_cit, snimljenim nakon pobude zračenjem pri 532 nm, uočavaju se vrlo slabe vrpce spoja pri 1453 i 2194 cm⁻¹ za uzorke koncentracija 1×10^{-5} i 1×10^{-6} mol L⁻¹ (Slika 26). Nakon pobude NIR zračenjem (785 i 1064 nm), karakteristične vrpce spoja nisu uočene.



Slika 26. SERS spektri DTB koncentracije 1×10^{-7} mol L⁻¹ (crno), 1×10^{-6} mol L⁻¹ (plavo) i 1×10^{-5} mol L⁻¹ (crveno), u koloidnoj suspenziji AuNP_cit nakon pobude zračenjem pri 532, 785 i 1064 nm.

Vrlo slabe vrpce spoja pri 1453 i 2200 cm⁻¹ opažene su u SERS spektrima DTB u koloidnoj suspenziji nanočestica zlata s polimerom na površini, AuNP_PVP, snimljenim nakon pobude zračenjem pri 532 nm, za uzorke koncentracija 1×10^{-5} i 1×10^{-6} mol L⁻¹ (Slika 27). U spektru DTB najniže mjerene koncentracije, 1×10^{-7} mol L⁻¹, snimljenom pri istim uvjetima, karakteristične vrpce spoja nisu uočene. Nakon pobude NIR zračenjem (785 i 1064 nm) snimljeni spektri odgovaraju spektru koloida s kakodilatnim puferom.



Slika 27. SERS spektri DTB koncentracije 1×10^{-7} mol L⁻¹ (crno), 1×10^{-6} mol L⁻¹ (plavo) i 1×10^{-5} mol L⁻¹ (crveno), u koloidnoj suspenziji AuNP_PVP nakon pobude zračenjem pri 532, 785 i 1064 nm.

§ 5. ZAKLJUČAK

Istražena je SERS učinkovitost koloidnih suspenzija nanočestica srebra i zlata dimenzija 20 nm. Istraživane nanočestice su se osim po vrsti metala, razlikovale prema kemijskim vrstama na površini odgovornim za njihovu stabilizaciju. Nanočestice metala sa slojem citratnih iona zaostalih nakon pripreve, NP_cit, nosile su negativan naboj, dok su nanočestice tretirane s polimerom (poli(vinilpirolidonom), NP_PVP, većinom bile neutralne. U SERS spektrima suspenzija nanočestica srebra opažene su vrpce citratnih iona i njihovih oksidacijskih i razgradnih produkata zaostalih nakon sinteze, dok iste nisu interferirale spektrima uzoraka u suspenzijama nanočestica zlata.

SERS učinkovitost sintetiziranih nanočestica testirana je pomoću rodamina 6G, etidijeva bromida i tiofenskog derivata bis-triarilborana pri tri valne duljine pobudnog zračenja 532, 785 i 1064 nm. Sve su molekule pozitivno nabijene te se adsorbiraju na nanočestice metala uslijed elektrostatskih privlačnih interakcija s negativno nabijenim citratnim ionima na površini. Pristup površini metala, međutim, sterički ometaju taninska kiselina (AgNP_cit i AuNP_cit) i poli(vinilpirolidon) (AgNP_PVP i AuNP_PVP), sastojci dodani tijekom ili nakon pripreve nanočestica.

SERS spektri najčešće su opaženi nakon pobude zračenjem 532 nm. Između dostupnih pobudnih zračenja (532, 785 i 1064 nm), Vis zračenje (532 nm) je zračenje najveće energije koje omogućava najosjetljivija mjerenja. Također, najbliže je plazmonske frekvenciji nanočestica metala ($\lambda(\text{AgNP}) = 420$ i 427 nm, $\lambda(\text{AuNP}) = 524$ i 525 nm) i omogućava pre-rezonantne uvjete mjerenja. Nedostatak primjene Vis zračenja je pobuda molekula koje emitiraju zračenje (R6G, EB), uslijed čega njihova fluorescencija prekriva raspršeno zračenje u SERS spektru. Iako se fluorescencija izbjegava primjenom pobudnog NIR zračenja (785 i 1064 nm), nakon pobude zračenjem 1064 nm nisu opaženi SERS spektri niti jedne molekule na bilo kojem od supstrata.

Primjećeno je također da je raspršeno zračenje na nanočesticama srebra češće pojačano primjenom pobudnog zračenja pri 532 nm, dok je u slučaju nanočestica zlata pojačanje Ramanovog raspršenja opaženo nakon pobude zračenjem pri 785 nm. Za pretpostaviti je da interakcijom nanočestica dimenzija 20 nm s istraživanim molekulama

nastaju nakupine nanočestica (agregati većih dimenzija) uslijed čega se plazmonska frekvencija smanjuje, odnosno valna duljina povećava.

Za zaključiti je da je površinski pojačano Ramanovo raspršenje složen fenomen koji ovisi o svojstvima molekule (molekulska struktura, spektralna svojstva), svojstvima nanočestica metala (veličina, naboj, kemijske vrste na površini, plazmonska frekvencija) i eksperimentalnim uvjetima (pobudno zračenje) te da je podešavanjem karakteristika supstrata i uvjeta mjerenja moguće opaziti jedinstveni SERS spektar molekula u mikromolarnom koncentracijskom području.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AgNP_cit – nanočestice srebra s citratnim ionima na površini

AgNP_PVP – nanočestice srebra s molekulama poli(vinilpirolidona) na površini

AuNP_cit – nanočestice zlata s citratnim ionima na površini

AuNP_PVP - nanočestice zlata s molekulama poli(vinilpirolidona) na površini

CD – kružni dikroizam (engl. *circular dichroism*)

dsDNA/RNA – dvolančana DNA/RNA (engl. *double stranded DNA/RNA*)

DTB – 5,5'-bis[4-(bis(4-(*N,N,N*-trimetilamonij)-2,6-dimetilfenil)boril)-3,5-dimetilfeniletinil]-2,2'-ditiolen tetratriflat

EB – etidijev bromid

δ – deformacijska vibracija

δ_{sc} – striženje

δ_s – simetrična deformacijska vibracija

ip – u ravnini

v – vibracija istezanja

NIR – blisko infracrveno zračenje

oop – izvan ravnine

PVP – poli(vinilpirolidon)

R6G – rodamin 6G

SERS – površinski pojačano Ramanovo raspršenje

ssDNA/RNA – jednolančana DNA/RNA (engl. *single stranded DNA/RNA*)

UV – ultraljubičasto zračenje

Vis – vidljivo zračenje

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. G. S. Bumbrah, R. M. Sharma, *Egypt. J. Forensic Sci.* **6** (2016) 209–215.
2. C. Raman, K. Krishnan, *Nature* **121** (1928) 501–502.
3. E. Smith, G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*, Wiley, New Jersey, 2005.
4. S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, *J. Raman Spectrosc.* **29** (1998) 365–371.
5. R. Pilot, R. Signorini, C. Durante, L. Orian, M. Bhamidipati, L. Fabris, *Biosensors.* **9** (2019) 57.
6. K. G. Stamplecoskie, J. C. Scaiano, V. S. Tiwari, H. Anis, *J. Phys. Chem.* **115** (2011) 1403–1409.
7. S. Hong, X. Li, *J. Nanomater.* **2013** (2013) 1–9.
8. <https://www.intechopen.com/chapters/72277> (datum pristupa 20. siječnja 2022.)
9. P. Rostron, D. Gerber, *Int. J. Eng. Tech. Res.* **6** (2016) 50–64.
10. <http://www-personal.umich.edu/~maungk/SERS.html> (datum pristupa 20. siječnja 2022.)
11. Y. Hong, Y.-M. Huh, D. S. Yoon, J. Yang, *J. Nanomater.* **2012** (2012) 1–13.
12. P. A. Mosier-Boss, *Nanomaterials* **7** (2017) 142.
13. M. J. Natan, *Faraday Discuss.* **132** (2006) 321–328.
14. X. M. Lin, Y. Cui, Y. H. Xu, B. Ren, Z.-Q. Tian *Anal. Bioanal. Chem.* **394** (2009) 1729–1745.
15. N. D. Israelsen, C. Hanson, E. Vargis, *Sci. World J.* **2015** (2015) 1–12.
16. K. Kneipp, Y. Ozaki, Z.-Q. Tian (ur.), *Recent Developments in Plasmon-Supported Raman Spectroscopy*, World Scientific, Singapore, 2018, str. 401–414.
17. G. S. S. Saini, S. Kaur, S. K. Tripathi, C. G. Mahajan, H. H. Thanga, A. L. Verma, *Spectrochim. Acta A* **61(4)** (2005) 653–658.
18. I. Piantanida, *Kem. Ind.* **52** (2003) 545–552.
19. S. Miljanić, A. Dijanošić, I. Matošević, I. Piantanida, *Vib. Spectrosc.* **57** (2011) 23–29.
20. M. Ferger, Ž. Ban, I. Krošl, S. Tomić, L. Dietrich, S. Lorenzen, F. Rauch, D. Sieh, A. Friedrich, S. Griesbeck, A. Kendel, S. Miljanić, I. Piantanida, T. Marder, *Chem. Eur. J.* **27** (2021) 5142–5159.

21. H. Masuhara, S. Kawata, F. Tokunaga (ur.), *Nano Biophotonics: Science and Technology*, Vol. 3, Elsevier, Amsterdam, 2007, str. 189–195.
22. F. J. Green, *Sigma Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators*, Aldrich Chem Company Library, Milwaukee, 1990, str. 318.
23. N. R. Yaffe, E. W. Blanch, *Vib. Spectrosc.* **48** (2008) 196–201.
24. C. B. Dhafer, A. Mezni, L. S. Smiri, *J. Tun. Chem. Soc.* **19** (2017) 152–157.
25. L. Vančo, M. Kadlečíková, J. Breza, M. Vojs, P. Michniak, M. Marton, *Vib. Spectrosc.* **90** (2017) 31–37.
26. C. H. Munro, W. E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, P. C. White, *Langmuir* **11** (1995) 3712–3720.

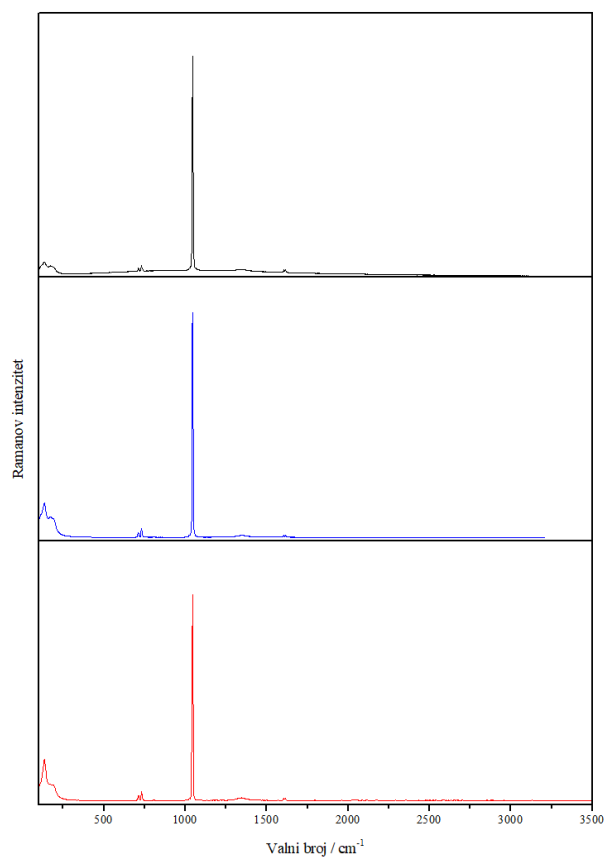
§ 8. DODATAK

Tablica D1. Očekivana veličina sintetiziranih nanočestica srebra po generacijama tijekom sinteze, uz pripadajuće valne duljine plazmonske rezonancije

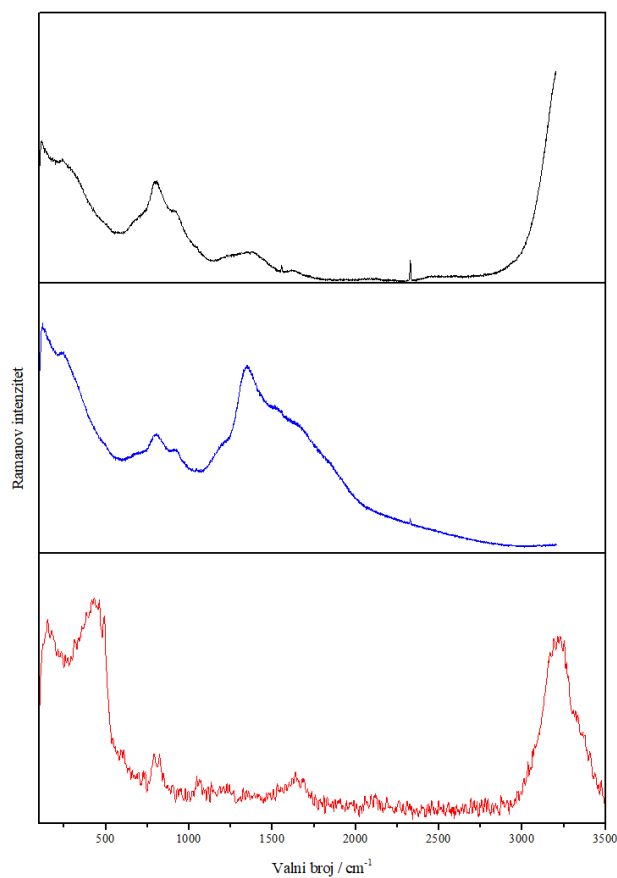
Generacija AgNP	Dimenzija nanočestica λ (plazmonska rezonancija)	
	/ nm	/ nm
g0 (sjeme)	14,8 ± 1,4	401
g1	19,7 ± 1,9	404
g2	24,0 ± 3,0	408

Tablica D2. Očekivana veličina sintetiziranih nanočestica zlata po generacijama tijekom sinteze, uz pripadajuće valne duljine plazmonske rezonancije

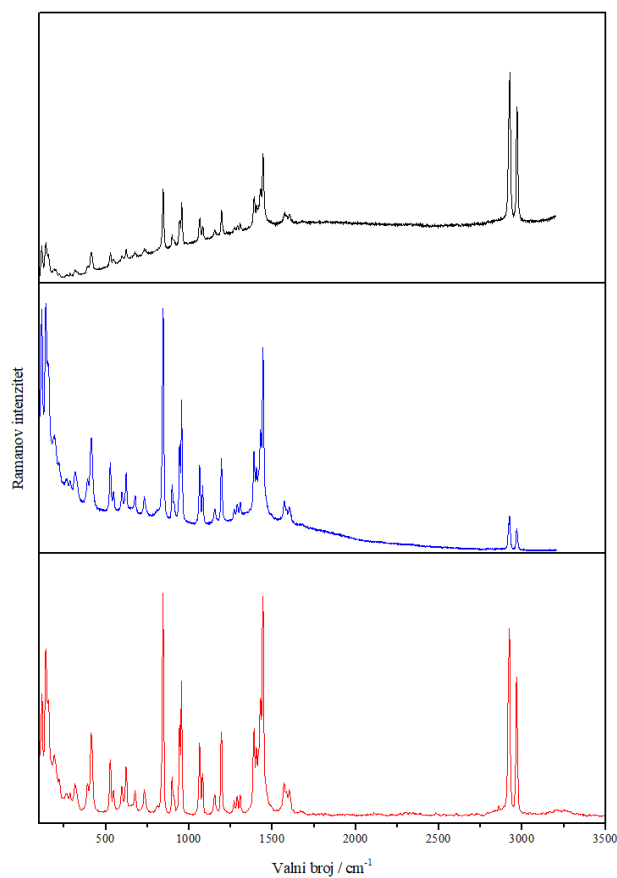
Generacija AuNP	Dimenzija nanočestica λ (plazmonska rezonancija)	
	/ nm	/ nm
g0 (sjeme)	10,0 ± 1,0	518
g1	17,6 ± 1,2	521,5
g2	22,3 ± 2,2	523,5



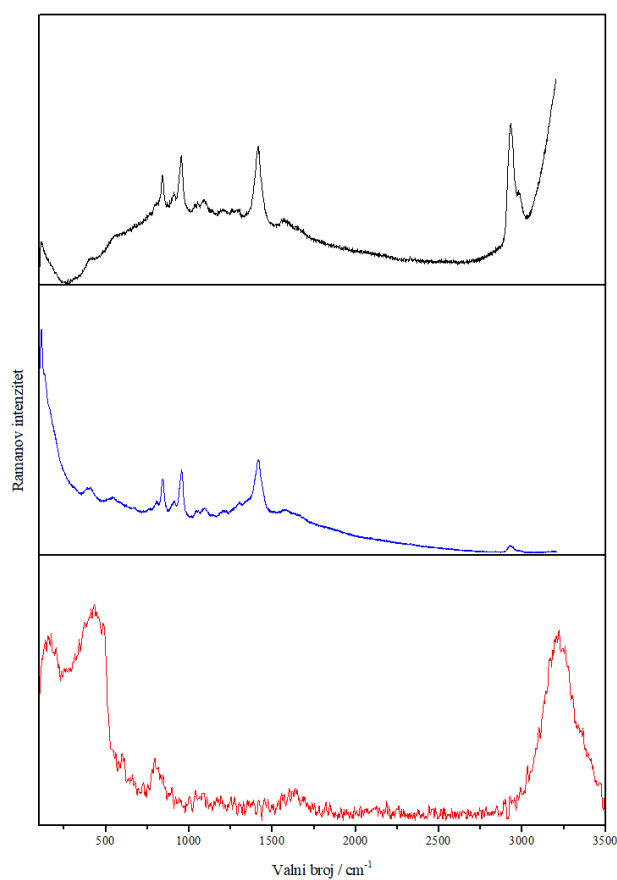
Slika D1. a) Ramanovi spektri čvrstog uzorka srebrova(I) nitrata nakon pobude zračenjem pri 532 nm (crno), 785 nm (plavo) i 1064 nm (crveno).



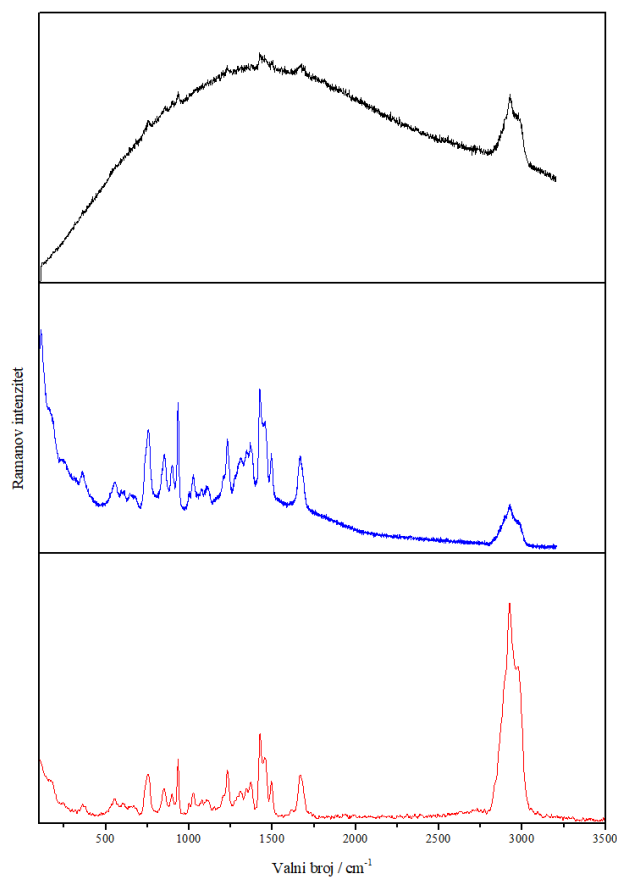
Slika D1. b) Ramanovi spektri otopine srebrova(I) nitrata, $c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, nakon pobude zračenjem pri 532 nm (crno), 785 nm (plavo) i 1064 nm (crveno).



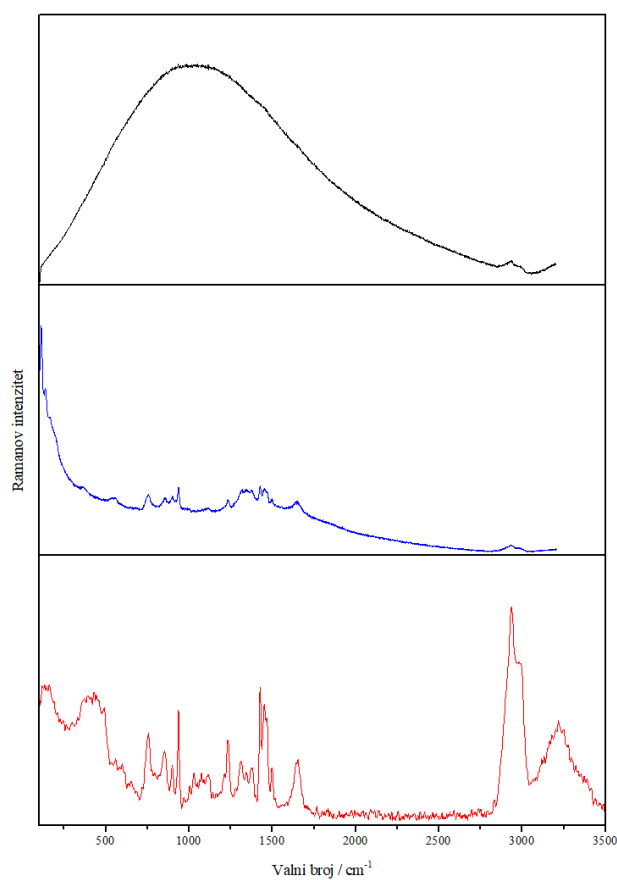
Slika D2. a) Ramanovi spektri čvrstog uzorka trinatrijeva citrata nakon pobude zračenjem pri 532 nm (crno), 785 nm (plavo) i 1064 nm (crveno).



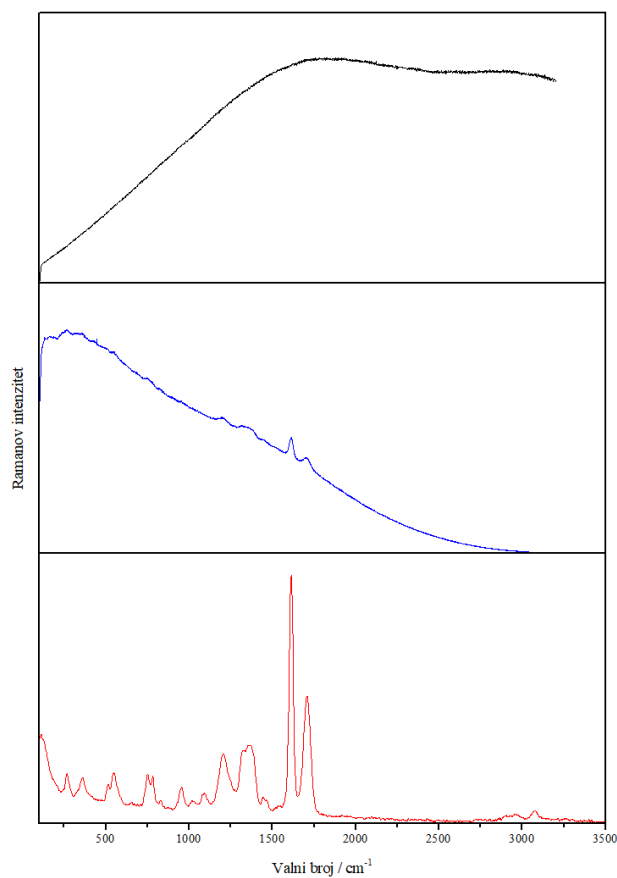
Slika D2. b) Ramanovi spektri otopine trinatrijeva citrata, $c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, nakon pobude zračenjem pri 532 nm (crno), 785 nm (plavo) i 1064 nm (crveno).



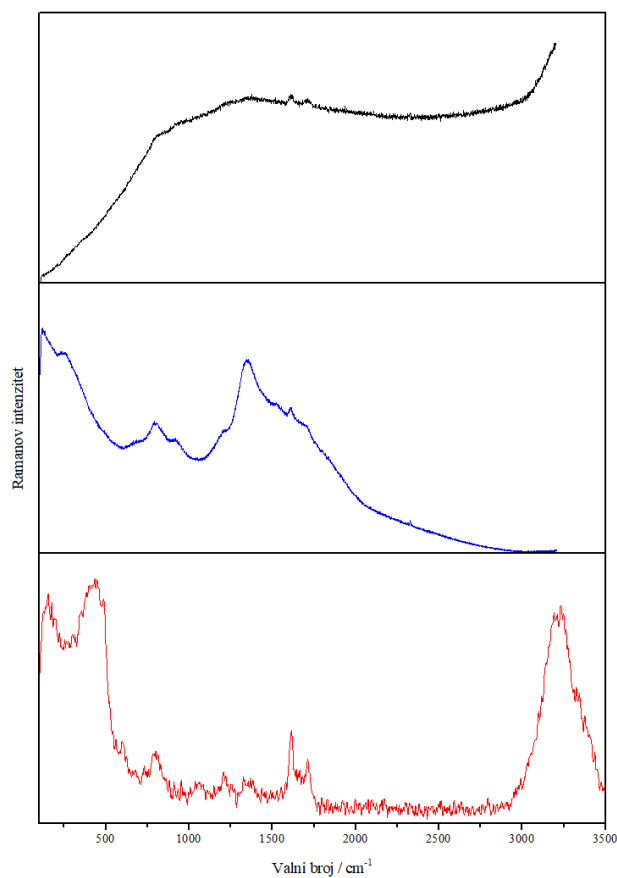
Slika D3. a) Ramanovi spektri čvrstog uzorka poli(vinilpirolidona) nakon pobude zračenjem pri 532 nm (crno), 785 nm (plavo) i 1064 nm (crveno).



Slika D3. b) Ramanovi spektri otopine poli(vinilpirolidona), $c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, nakon pobude zračenjem pri 532 nm (crno), 785 nm (plavo) i 1064 nm (crveno).



Slika D4. a) Ramanovi spektri čvrstog uzorka taninske kiseline nakon pobude zračenjem pri 532 nm (crno), 785 nm (plavo) i 1064 nm (crveno).



Slika D4. b) Ramanovi spektri otopine taninske kiseline, $c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, nakon pobude zračenjem pri 532 nm (crno), 785 nm (plavo) i 1064 nm (crveno).

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Antonija Kapusta

Datum rođenja: 13. srpnja 1996.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2003–2011 Osnovna škola Ivana Perkovca, Šenkovec

2011–2015 Gimnazija Lucijana Vranjanina, Zagreb

2015–2019 Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2019– Diplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2019 Otvoreni dani Kemijskog odsjeka