

# Istraživanje stabilnosti i SERS učinkovitosti nanočestica zlata pripremljenih u puferu HEPES

---

Gudan, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2025

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:217:918446>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-27**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Nikolina Gudan

**ISTRAŽIVANJE STABILNOSTI I SERS  
UČINKOVITOSTI NANOČESTICA ZLATA  
PRIPREMLJENIH U PUFERU HEPES**

**Diplomski rad**

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

Zagreb, 2025.



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

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Zaklade Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti  
pod nazivom „Zlatne nanozvezdice kao metalni supstrati u SERS spektroskopiji“.



## **Zahvale**

*Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Adriani Kenđel na uloženom vremenu i trudu, brojnim savjetima i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala mojim roditeljima na neizmjernoj podršci i ljubavi koju su mi pružali tijekom cijelog školovanja.*

*Hvala od srca mojem Marku što je uvijek moj oslonac i najveća potpora.*

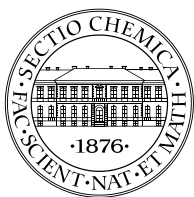


# Sadržaj

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>SAŽETAK .....</b>                                                         | <b>IX</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                        | <b>XI</b> |
| <b>§ 1. UVOD .....</b>                                                       | <b>1</b>  |
| <b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>                                        | <b>2</b>  |
| 2.1. Ramanova spektroskopija .....                                           | 2         |
| 2.2. Površinski pojačano Ramanovo raspršenje .....                           | 4         |
| 2.2.1. Teorije SERS-a .....                                                  | 5         |
| 2.2.2. Metalni supstrati .....                                               | 7         |
| 2.3. Modelne molekule za SERS mjerenja .....                                 | 9         |
| 2.3.1. Rodamin 6G .....                                                      | 9         |
| 2.3.2. (E)-1,2-di(piridin-4-il)eten .....                                    | 10        |
| <b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>                                         | <b>11</b> |
| 3.1. Kemikalije .....                                                        | 11        |
| 3.2. Mjerni uređaji .....                                                    | 11        |
| 3.3. Priprava koloidnih suspenzija .....                                     | 12        |
| 3.3.1. Sinteza nemodificiranih koloida zlata .....                           | 12        |
| 3.3.2. Sinteza modificiranih koloida zlata .....                             | 12        |
| 3.4. Priprava otopina i mjernih uzoraka .....                                | 13        |
| <b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>                                        | <b>14</b> |
| 4.1. Ramanovi spektri modelnih molekula .....                                | 14        |
| 4.1.1. Rodamin 6G .....                                                      | 14        |
| 4.1.2. (E)-1,2-di(piridin-4-il)eten .....                                    | 15        |
| 4.2. Nemodificirane koloidne suspenzije zlata .....                          | 17        |
| 4.2.1. Karakterizacija nemodificiranih koloidnih suspenzija zlata .....      | 19        |
| 4.2.2. SERS učinkovitost nemodificiranih koloidnih suspenzija zlata .....    | 20        |
| 4.2.3. Vremenska stabilnost nemodificiranih koloidnih suspenzija zlata ..... | 26        |
| 4.2.4. Faktor pojačanja .....                                                | 31        |
| 4.3. Modificirane koloidne suspenzije zlata .....                            | 31        |
| 4.3.1. Karakterizacija modificiranih koloidnih suspenzija zlata .....        | 35        |
| 4.3.2. SERS učinkovitost modificiranih koloidnih suspenzija zlata .....      | 38        |
| 4.3.3. Vremenska stabilnost modificiranih koloidnih suspenzija zlata .....   | 45        |
| 4.3.4. Faktor pojačanja .....                                                | 53        |

---

|                                            |      |
|--------------------------------------------|------|
| § 5. ZAKLJUČAK.....                        | 55   |
| § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA ..... | 57   |
| § 7. LITERATURNI IZVORI.....               | 58   |
| § 8. ŽIVOTOPIS .....                       | XIII |



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### ISTRAŽIVANJE STABILNOSTI I SERS UČINKOVITOSTI NANOČESTICA ZLATA PRIPREMLJENIH U PUFERU HEPES

Nikolina Gudan

UV/VIS i SERS spektroskopijom istražena je stabilnost tijekom vremena i SERS učinkovitost koloidnih nanočestica zlata nastalih reakcijom tetraklorozlatne(III) kiseline i 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetilensulfonske kiseline (HEPES). Kao modelne molekule korišteni su rodamin 6G (**R6G**) i (E)-1,2-di(piridin-4-il)eten (**BPE**). Koloidi zlata pripremljeni su sa i bez dodatka srebrova(I) nitrata te su uspoređeni s koloidima kojima su dodani stabilizatori nanočestica; cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB), odnosno *N,N*-di-(3-aminopropil)butan-1,4-diamin (spermin). U svim pripremljenim koloidima najjače pojačanje raspršenja zračenja opaženo je za molekule **BPE**, zbog karakteristične strukture bez naboja. Molekule **R6G** daju intenzivne spektre samo u nemodificiranim koloidima zbog elektrostatskog odbijanja pozitivno nabijenih molekula **R6G** i molekula stabilizatora koje okružuju nanočestice u modificiranim koloidima. CTAB se pokazao kao bolji stabilizirajući agens nanočestica zlata u odnosu na spermin. Dodatak  $\text{AgNO}_3$  tijekom sinteze koloida rezultira nastankom nanočestica koje intenzivnije pojačavaju raspršenje zračenja, u usporedbi s koloidima bez dodatka srebrova(I) nitrata.

(xiii + 59 stranica, 49 slika, 11 tablica, 34 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: cetiltrimetilamonijev bromid, HEPES, koloid zlata, spermin

Mentor: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Adriana Kendel
  2. prof. dr. sc. Željka Soldin
  3. doc. dr. sc. Morana Dulić
- Zamjena: prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Datum diplomskog ispita: 27. veljače 2025.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Chemistry

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE STABILITY AND SERS EFFICIENCY OF GOLD NANOPARTICLES PREPARED IN HEPES BUFFER

Nikolina Gudan

The UV/VIS and SERS spectroscopy were used to investigate the stability over time and the SERS efficiency of colloidal gold nanoparticles formed by the reaction of tetrachloroauric(III) acid and 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethylenesulfonic acid (HEPES). Rhodamine 6G (**R6G**) and (E)-1,2-di(pyridin-4-yl)ethene (**BPE**) were used as model molecules. Gold colloids were prepared with and without the addition of silver(I) nitrate and were compared with colloids to which nanoparticle stabilizers were added; cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and *N,N*-di-(3-aminopropyl)butane-1,4-diamine (spermine). In all prepared colloids, the strongest radiation scattering enhancement was observed for **BPE** molecules, due to their characteristic uncharged structure. **R6G** molecules give intense spectra only in unmodified colloids due to electrostatic repulsion between positively charged **R6G** molecules and stabilizer molecules surrounding the nanoparticles in modified colloids. CTAB has been shown to be a better stabilizing agent for gold nanoparticles than spermine. The addition of AgNO<sub>3</sub> during the synthesis of the colloids results in nanoparticles that enhance the scattering of radiation more intensely compared to colloids without the addition of silver(I) nitrate.

(xiii + 59 pages, 49 figures, 11 tables, 34 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: cetyltrimethylammonium bromide, HEPES, gold colloid, SERS, spermine

Mentor: Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor
  2. Dr. Željka Soldin, Full Professor
  3. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Snežana Miljanić, Full Professor

Date of exam: February 27, 2025



## § 1. UVOD

Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja<sup>1</sup> (eng. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS) je vrlo moćna i korisna tehnika vibracijske spektroskopije. Kao i klasična Ramanova spektroskopija, SERS spektroskopija se temelji na neelastičnom raspršenju zračenja do kojeg dolazi prilikom interakcije zračenja s molekulom. S obzirom da je najveći nedostatak Ramanove spektroskopije slaba osjetljivost metode zbog vrlo malog broja neelastično raspršenih fotona, SERS tehnika nalazi široku primjenu zbog visoke osjetljivosti i mogućnosti određivanja vrlo niskih koncentracija analita. U SERS spektroskopiji dolazi do pojačanja Ramanovog raspršenja za faktor  $10^6$  do  $10^{10}$ , u odnosu na klasičnu Ramanovu spektroskopiju, kada su molekule analita u neposrednoj blizini ili direktno adsorbirane na hrapavu metalnu površinu. Kao aktivni SERS supstrati najčešće se koriste nanočestice zlata ili srebra dispergirane u koloidnim suspenzijama ili imobilizirane na čvrstim nosačima.<sup>2</sup> Koloidne nanočestice metala uglavnom se sintetiziraju redukcijom soli metala odgovarajućim redukcijskim sredstvom, dok se za povećanje stabilnosti nastalih nanočestica koriste različiti stabilizirajući agensi.

Cilj ovog diplomskog rada je istražiti stabilnost i primjenjivost pripremljenih koloida zlata kao aktivnih metalnih supstrata za SERS spektroskopiju. Koloidne suspenzije nanočestica zlata sintetizirane su redukcijom tetraklorozlatne(III) kiseline pomoću 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetilensulfonske kiseline (HEPES) na dva načina, sa i bez dodatka srebrova(I) nitrata. Dio tako pripremljenih koloidnih nanočestica je modificiran dodatkom stabilizirajućih tvari; cetiltrimetilamonijevog bromida (CTAB), odnosno *N,N*-di-(3-aminopropil)butan-1,4-diamina (spermin). Za određivanje učinkovitosti pripremljenih koloidnih suspenzija zlata kao aktivnih supstrata u SERS spektroskopiji korištene su dvije modelne molekule; rodamin 6G i (E)-1,2-di(piridin-4-il)eten. Snimljeni su koncentracijski ovisni SERS spektri otopina modelnih molekula u svim pripremljenim koloidima te je određena granica detekcije i faktor pojačanja za sve sintetizirane metalne supstrate. Vremenska stabilnost svih pripremljenih koloidnih suspenzija promatrana je UV/Vis spektroskopijom, dok je pomoću vremenski ovisnih SERS spektara odabrane molekule promatrano ponašanje koloida kao aktivnih SERS supstrata tijekom vremena.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

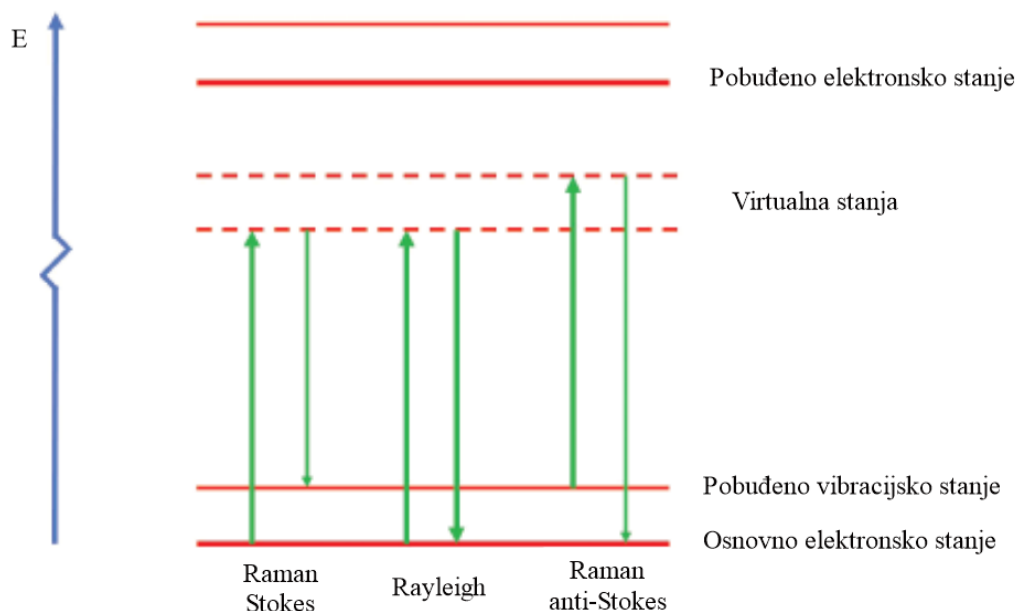
### 2.1. Ramanova spektroskopija

Ramanova spektroskopija je metoda vibracijske spektroskopije koja se temelji na neelastičnom raspršenju elektromagnetskog zračenja i omogućuje strukturnu karakterizaciju velikog broja spojeva.<sup>3</sup> Fenomen neelastičnog raspršenja svjetlosti prvi je teorijski predvidio Smekal 1923. godine, a eksperimentalno su ga dokazali Raman i Krishnan 1928. godine. Eksperiment je proveden na način da je sunčeva svjetlost fokusirana teleskopom na uzorak, a uz uzorak je postavljena druga leća kako bi sakupila raspršeno zračenje. Pomoću sustava optičkih filtera dokazano je da se frekvencija raspršenog zračenja razlikuje od frekvencije upadnog zračenja što je osnovna značajka Ramanove spektroskopije.

Ramanova spektroskopija i infracrvena (eng. *infrared*, IR) spektroskopija su komplementarne tehnike vibracijske spektroskopije budući da obje pružaju informacije o vibracijskim i rotacijskim prijelazima u molekuli, ali su principi tih metoda različiti. IR spektroskopija je apsorpcijska tehnika kod koje energija upadnog fotona mora odgovarati razlici energija između osnovnog i pobuđenog vibracijskog stanja, kako bi došlo do apsorpcije fotona i prijelaza molekule u više vibracijsko stanje. U Ramanovoj spektroskopiji interakcijom zračenja i molekule dolazi do raspršenja zračenja pri čemu energija upadnog fotona ne mora odgovarati energijskoj razlici između osnovnog i pobuđenog vibracijskog stanja molekule. Kao izvor zračenja koriste se laseri koji emitiraju monokromatsko ultraljubičasto (eng. *ultraviolet*, UV), vidljivo (eng. *visible*, Vis) ili blisko infracrveno (eng. *near-infrared*, NIR) zračenje.<sup>3,4</sup>

Ozračivanjem molekule monokromatskim zračenjem dolazi do interakcije upadnog fotona i molekule čime se narušava elektronski oblak oko jezgara te molekula prelazi u virtualno stanje. To je nestabilno, kratkoživuće stanje iz kojeg se fotoni otpuštaju u obliku raspršenog zračenja. Virtualno stanje nije stvarno energijsko stanje molekule, već nastaje pod utjecajem vanjskog izvora zračenja i njegova energija određena je frekvencijom upadnog zračenja. Zračenje se može raspršiti na dva načina, elastično i neelastično (slika 1). Kod elastičnog raspršenja zračenja, promjena energije tijekom raspršenja je neznatna te se molekula iz virtualnog stanja vraća u prvotno energijsko stanje iz kojeg je pobuđena. Taj proces raspršenja zračenja je dominantan i naziva se elastično, odnosno Rayleighovo raspršenje. Neelastično raspršenje zračenja javlja se kada je u procesu raspršenja potaknuto gibanje jezgara čime dolazi

do prijenosa energije s upadnog fotona na molekulu ili s molekule na raspršeni foton. U tom slučaju se energija raspršenog fotona razlikuje od energije upadnog fotona. Neelastično raspršenje naziva se Ramanovo raspršenje i to je slab proces jer se samo jedan od  $10^6$ – $10^8$  upadnih fotona neelastično rasprši. Raspršenje koje nastaje pobuđivanjem molekule iz osnovnog vibracijskog stanja osnovnog elektronskog stanja u virtualno stanje, nakon čega slijedi povratak molekule u više vibracijsko stanje osnovnog elektronskog stanja naziva se Stokesovo raspršenje. To je proces prilikom kojeg molekula prima energiju od upadnog fotona te energija raspršenog fotona odgovara razlici energije upadnog fotona i energije prijelaza između dva vibracijska stanja. Kada se molekula pobuđuje iz višeg vibracijskog stanja osnovnog elektronskog stanja u virtualno stanje te se vraća u osnovno vibracijsko stanje, tada se zbiva anti-Stokesovo raspršenje te se energija prenosi s molekule na raspršeni foton. Intenzitet Stokesovog i anti-Stokesovog raspršenja ovisan je o broju molekula u osnovnom i pobuđenom vibracijskom stanju. Prema Boltzmannovoj raspodjeli, pri sobnoj temperaturi se većina molekula nalazi u vibracijskom stanju najniže energije zbog čega su Stokesovo raspršenje i odgovarajuće vrpce u spektru intenzivnije od anti-Stokesovog.<sup>3,5</sup>



Slika 1. Energijski dijagram Rayleighovog i Ramanovog raspršenja zračenja<sup>3</sup>

Prema osnovnom izbornom pravilu Ramanove spektroskopiji, vibracije aktivne u Ramanovom spektru su one uslijed kojih dolazi do promjene polarizabilnosti elektronskog oblaka oko

molekule. Kod simetričnih vibracija javljaju se najveće promjene polarizabilnosti što rezultira intenzivnim raspršenjem zračenja. Za usporedbu, u IR spektroskopiji dolazi do apsorpcije IR zračenja i pojave vrpca u spektru samo ako se tijekom vibracija mijenja električni dipolni moment molekule te su intenzivnije antisimetrične vibracije zbog veće promjene dipolnog momenta. Zbog spomenutih različitih izbornih pravila, iste vibracije rezultiraju vrpcama različitih intenziteta u Ramanovom i IR spektru, pa tako vrpca određene vibracije može biti vrlo intenzivna u jednom spektru, a slabijeg intenziteta u drugom. Također, postoji dodatno izborno pravilo za molekule koje posjeduju centar simetrije, pravilo međusobnog isključenja, prema kojemu molekule s centrom simetrije ne mogu imati niti jednu vibraciju aktivnu i u infracrvenom i u Ramanovom spektru.<sup>3</sup>

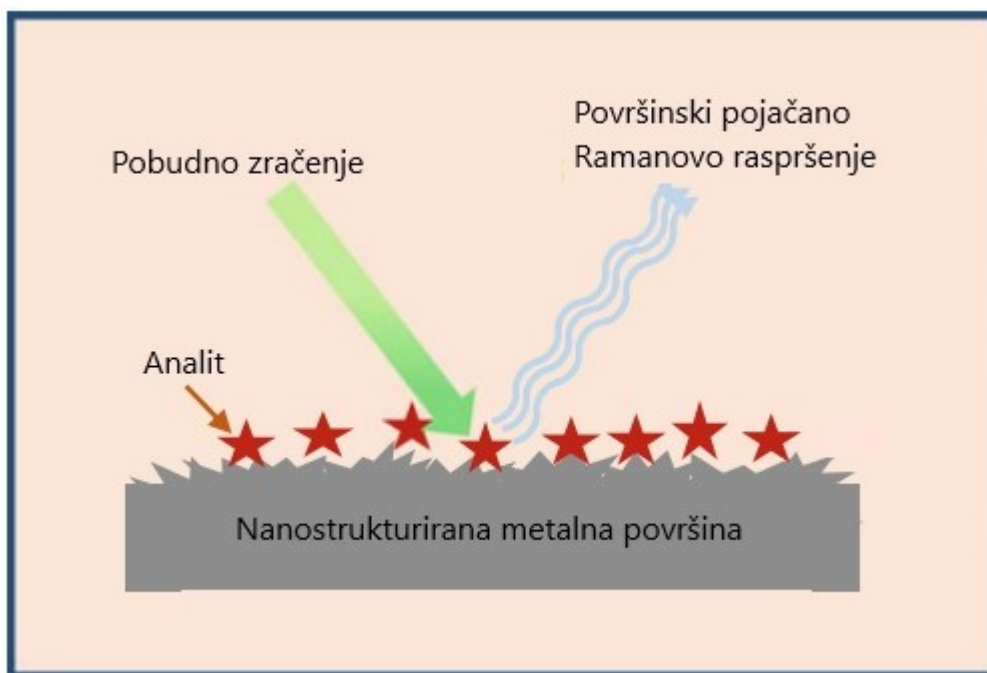
Najveći nedostaci Ramanove spektroskopije su slaba osjetljivost metode te utjecaj fluorescencije koja može prekriti Ramanov spektar. Kako bi se umanjili navedeni nedostaci, razvijaju se različite tehnike Ramanove spektroskopije, a jedna od njih je i spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja.

## 2.2. Površinski pojačano Ramanovo raspršenje

Fenomen površinskog pojačanja Ramanovog raspršenja prvi put su uočili 1974. godine Fleischmann i suradnici. Snimali su Ramanov spektar piridina adsorbiranog iz vodene otopine na srebrovu elektrodu hrapave površine i primijetili neočekivano visoki intenzitet Ramanovog raspršenja. Autori su opaženi efekt pripisali povećanju površine elektrode uslijed hrapavosti čime je postignut veći broj adsorpcijskih mjesta. Dvije skupine znanstvenika, Jeanmarie i Van Duyne te Albrecht i Creighton, dokazali su 1977. godine da je sama hrapavost površine metala odgovorna za pojačanje Ramanovog raspršenja, a ne samo povećanje površine elektrode.<sup>1</sup>

Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja je tehnika vibracijske spektroskopije u kojoj dolazi do pojačanja neelastično raspršenog zračenja za faktor  $10^6$  do  $10^{10}$ , u odnosu na klasičnu Ramanovu spektroskopiju, kada se molekule analita nalaze vrlo blizu ili su adsorbirane na hrapavu metalnu površinu. Na slici 2 shematski je prikazan SERS efekt. SERS metoda kombinira svojstva klasične Ramanove spektroskopije, poput strukturne karakterizacije molekula, minimalnu pripremu uzorka i istovremenu detekciju različitih analita s visokom osjetljivošću, što omogućava detekciju mikromolarnih i nižih koncentracija analita u vodenim otopinama te je, uz odgovarajući supstrat, moguća čak i detekcija na razini jedne molekule.<sup>6</sup> Na uspješno određivanje molekula analita SERS spektroskopijom utječe vrsta

metalnog supstrata, hrapavost površine metala, adsorpcija analita na površinu supstrata, odnosno interakcija između analita i supstrata te valna duljina pobudnog zračenja.



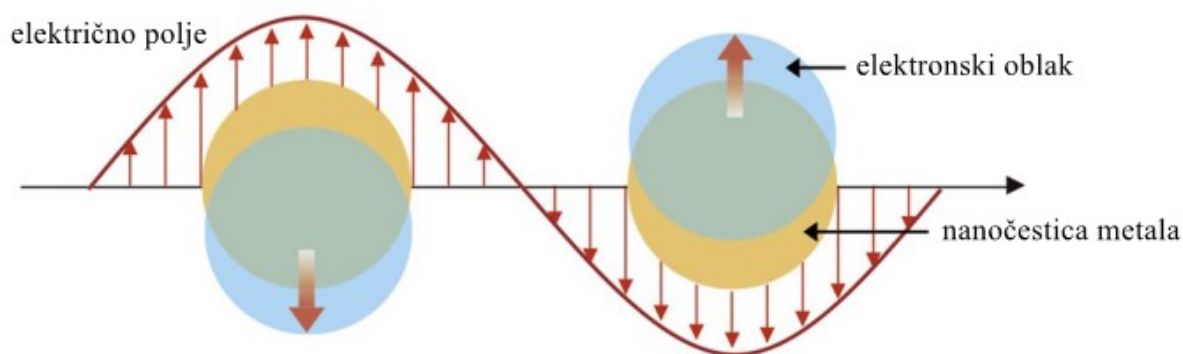
Slika 2. Shematski prikaz SERS efekta<sup>7</sup>

### 2.2.1. Teorije SERS-a

U literaturi su opisana dva osnovna mehanizma odgovorna za pojačanje Ramanovog raspršenja u SERS spektroskopiji; mehanizam elektromagnetskog pojačanja i mehanizam kemijskog pojačanja (mehanizam prijenosa naboja).

Do efekta elektromagnetskog pojačanja dolazi na nanostrukturiranoj metalnoj površini. Površina metala prekrivena je vodljivim elektronima koji se slobodno mogu kretati po površini. Uslijed interakcije zračenja s vodljivim elektronima na metalnoj površini, elektroni počinju koherentno oscilirati te nastaju površinski plazmoni. Lokalizirana površinska plazmonska rezonancija nastaje kada su kolektivne oscilacije valentnih elektrona metalne nanočestice u rezonanciji s frekvencijom upadnog zračenja (slika 3). U mehanizmu elektromagnetskog pojačanja, analit je adsorbiran ili se nalazi u neposrednoj blizini površine metala. Pobuda površinskih plazmona povećava lokalno električno polje oko molekule adsorbirane na metalnu površinu što dovodi do veće polarizacije molekule te do pojačanja Ramanovog raspršenja. Ukupno električno polje na površini metala sastoji se od električnog polja okomitog na površinu

i od električnog polja koje je paralelno metalnoj površini i utvrđeno je da do najvećeg pojačanja Ramanovog raspršenja dolazi za molekule koje su adsorbirane i polarizirane okomito na površinu metala.<sup>8</sup> Povećanjem udaljenosti između analita i površine metala smanjuje se jakost električnog polja zbog čega je manje pojačanje raspršenja zračenja. U odnosu na klasično Ramanovo raspršenje zračenja, faktor pojačanja za elektromagnetsko pojačanje Ramanovog raspršenja iznosi  $10^8$ - $10^{10}$ . Elektromagnetsko pojačanje može se detektirati i za molekule analita koje nisu u direktnom kontaktu s površinom metala. Na pojačanje Ramanovog raspršenja zračenja također utječe veličina i oblik čestica metala te način na koji čestice stvaraju nakupine (agregate). Najintenzivnije pojačanje raspršenja zračenja stvara se na „vrućim točkama“ (eng. *hot spots*), odnosno mjestima gdje se čestice metala dodiruju ili formiraju agregate.<sup>9,10</sup>



Slika 3. Shematski prikaz lokalizirane površinske plazmonske rezonancije<sup>11</sup>

Mehanizam kemijskog pojačanja, ili mehanizam pojačanja uslijed prijenosa naboja, zahtijeva nastajanje kemijske veze između molekule analita i površine metalnog supstrata. Vezanjem analita na metalnu površinu, stvaraju se nove i vrlo polarizabilne površinske vrste te dolazi do prijenosa naboja s površine metala na molekulu i/ili s molekule na površinu metala. Uslijed interakcije s elektronima metala, povećava se polarizabilnost molekule što dovodi do pojačanja Ramanovog raspršenja. Mehanizam kemijskog pojačanja u potpunosti je ovisan o samoj molekuli analita, odnosno o njezinoj strukturi i kemijskim svojstvima. Kemijsko pojačanje smatra se efektom kratkog doseg a zato što do kemijskog pojačanja dolazi samo iz prvog sloja

molekula analita vezanih na površinu metala. Faktor pojačanja za kemijsko pojačanje Ramanovog raspršenja iznosi  $10^2$ - $10^4$  u odnosu na klasično Ramanovo raspršenje.<sup>9,10</sup>

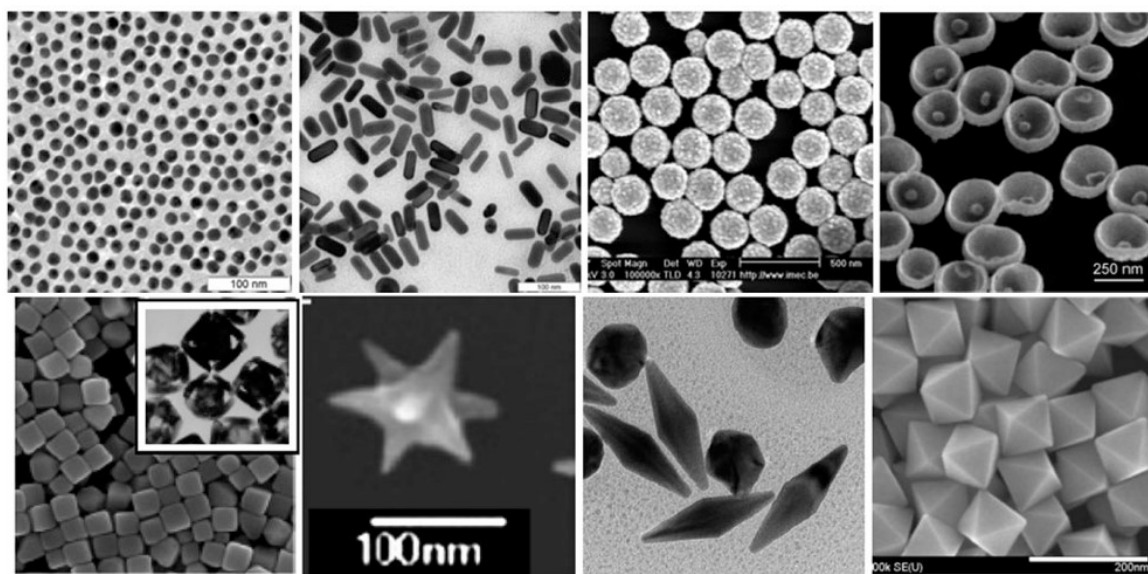
U većini slučajeva, ukupnom pojačanju Ramanovog raspršenja doprinose i elektromagnetsko i kemijsko pojačanje, pri čemu se elektromagnetskim mehanizmom postiže znatno veći efekt pojačanja.

### 2.2.2. Metalni supstrati

Za uspješan SERS eksperiment potrebno je odabrati odgovarajući metalni supstrat. Dobar SERS supstrat treba imati hrapavu površinu kako bi došlo do pojačanja Ramanovog raspršenja, mora biti stabilan duži vremenski period kako bi se mogao iskoristiti za više analiza te mora dati reproducibilan SERS signal. Najčešće korišteni metali za pripremu SERS supstrata su zlato i srebro zbog njihove inertnosti, visokog faktora pojačanja i stvaranja površinskih plazmona u Vis ili NIR području elektromagnetskog spektra. Rjeđe se koriste metali bakar i aluminij jer na zraku stvaraju sloj oksida koji djeluje kao barijera između metala i analita te mijenja prirodu površine i afinitet analita prema površini metala.<sup>6</sup> SERS supstrati koji se najviše primjenjuju su nanočestice metala dispergirane u koloidnim suspenzijama ili imobilizirane na čvrstim nosačima te nanostrukture izravno pripravljene na čvrstim nosačima.<sup>2</sup>

Koloidne suspenzije nanočestica metala mogu se pripremiti fizikalnim ili kemijskim metodama. Primjer fizikalne metode je pulsna laserska ablacija u kojoj se metal stavlja na dno otopine te se površina metala ozrači pulsnim laserom.<sup>6</sup> Procesi zagrijavanja i fotoionizacije mijenjaju agregacijsko stanje metala te se formiraju tekuće kapljice, para ili oblak plazme. Zatim dolazi do kondenzacije atomiziranog materijala, što dovodi do stvaranja nanočestica. Prednost ove metode je nastajanje nanočestica koje na svojoj površini ne sadrže ionske ili organske vrste. Kemijska sinteza nanočestica provodi se redukcijom soli metala pri čemu se koriste različiti reducensi, uglavnom anorganske soli ili puferi (citrat, natrijev borohidrid, hidrazin, pufer HEPES).<sup>2</sup> Koloidne suspenzije nanočestica mogu se tijekom vremena nepovratno agregirati, te se u svrhu povećanja stabilnosti nastalih nanočestica, tijekom sinteze dodaju različiti stabilizirajući agensi koji se vežu na površinu nanočestice, poput polimera, surfaktanata i proteina.<sup>12</sup> Kao stabilizirajući agens može djelovati i sami reducens (primjerice: trinatrijev citrat, pufer HEPES). Često korišteni stabilizirajući agensi u reakcijama sinteze nanočestica zlata su poli(*N*-vinilpirolidon) (PVP), poli(etilen-glikol) (PEG) i cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB). Kada se kao SERS supstrati koriste koloidne suspenzije nanočestica metala, važno je uzeti u obzir površinski naboj nanočestice te naboj molekule

analita. Najveće pojačanje Ramanovog raspršenja uočava se kada je detektirana molekula analita suprotnog naboja od naboja metalne nanočestice gdje elektrostatsko privlačenje dovodi molekulu analita vrlo blizu površine metala.<sup>13</sup> Na veličinu nanočestica najviše utječe jakost i koncentracija reducensa. Općenito vrijedi da jači reducensi dovode do nastajanja manjih nanočestica, dok slabiji reducensi stvaraju veće nanočestice. Oblik nanočestica može se kontrolirati dodatkom surfaktanata tijekom njihove sinteze jer oni mijenjaju površinsku energiju i kontroliraju agregaciju čestica. Pažljivim odabirom metala i surfaktanta, mogu se pripremiti različiti oblici nanočestica; sferne nanočestice, nanoštapići, nanokockice, nanozvezdice, nanotrokuti, nanoploče, nanožice... (slika 4).<sup>14</sup>



Slika 4. Slike nanočestica zlata različitih oblika nastale pretražnim elektronskim mikroskopom i transmisijским elektronskim mikroskopom<sup>15</sup>

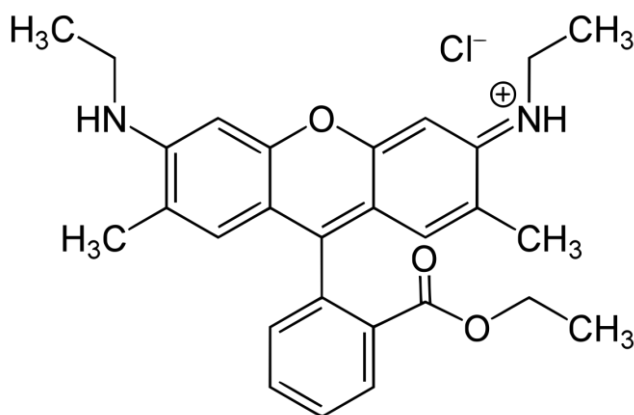
Imobilizacija nanočestica na čvrste nosače je metoda pripreme SERS supstrata koja omogućuje približavanje nanočestica u metalnom supstratu. Pogodna je za pripravu nanočestica sfernog oblika koje trebaju agregirati da bi došlo do pojačanja Ramanovog raspršenja. Primjer takve metode je imobilizacija nanočestica zlata ili srebra na površinu kvarca, u kojoj se nanočestice sintetiziraju redukcijom tetraklorozlatne(III) kiseline ili srebrovog nitrata pomoću trinatrijevog acetata. Površina kvarca silanizira se korištenjem (3-merkaptopropil)trimetoksisilana (MPTMS). Zatim se silanizirani supstrat uroni u suspenziju nanočestica zlata ili srebra pri čemu se nanočestice vežu na sulfhidridnu skupinu. Također, površina nosača može se silanizirati pomoću (3-aminopropil)trimetoksisilana (APTMS) i u tom

slučaju, nanočestice ostvaruju vezu sa silaniziranim supstratom preko amino skupina. Osim kvarca, kao čvrsti nosač, može se upotrijebiti staklo, papir ili aluminij. Prednost ove metode je kontrolirana imobilizacija nanočestica na površini nosača pri čemu nastaju supstrati veće reproducibilnosti.<sup>2,6</sup>

## 2.3. Modelne molekule za SERS mjerenja

### 2.3.1. Rodamin 6G

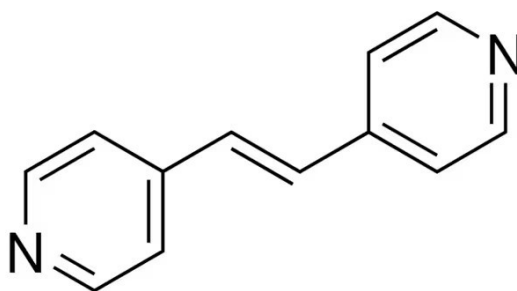
**R6G** je pozitivno nabijena molekula koja se sastoji od dva kromofora, ksantena i karboksifenilne skupine (slika 5). **R6G** je jedna od najčešće korištenih fluorescentnih boja koja jako apsorbira zračenje u vidljivom dijelu spektra te ima visoki prinos fluorescencije. Maksimum apsorpcije **R6G** u vodenim otopinama nalazi se oko 530 nm. Koristi se kao laserski medij i fluorescentni obilježivač.<sup>16</sup> Također se primjenjuje kao bojilo u kozmetičkoj i tekstilnoj industriji te u tiskarstvu. Molekula rodamina 6G je vrlo prikladna za istraživanje učinkovitosti različitih SERS supstrata jer intenzivno raspršuje zračenje.<sup>17,18</sup> Uslijed adsorpcije molekule **R6G** na hrapavu površinu metala, dolazi do gašenja fluorescencije te se u SERS spektru opažaju intenzivne vrpce vibracija promatrane molekule.



Slika 5. Struktura rodamina 6G

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

(E)-1,2-di(piridin-4-il)eten (**BPE**) je organski spoj koji se često koristi u reakcijama organske sinteze, posebno za pripravu polimera koji u svojoj strukturi sadrže piridin.<sup>19</sup> Također se primjenjuje kao građevna jedinica supramolekulskih sustava te u dizajniranju luminescentnih metalnih kompleksa.<sup>20</sup> Molekula **BPE** u svojoj strukturi sadrži dva piridinska prstena povezana preko etilenske skupine (slika 6). U SERS spektroskopiji, **BPE** se primjenjuje kao stabilna modelna molekula za testiranje učinkovitosti SERS supstrata. Molekula se adsorbira na površinu metala preko dušikovog atoma piridina.



Slika 6. Struktura (E)-1,2-di(piridin-4-il)etena (**BPE**)

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Kemikalije

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

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

Tetraklorozlatna(III) kiselina trihidrat,  $\geq 99,9\%$ , Sigma-Aldrich

Srebrov nitrat, p.a., Gram-Mol

Cetiltrimetilamonijev bromid, p.a., Sigma-Aldrich

*N,N*-di-(3-aminopropil)butan-1,4-diamin tetrahidroklorid, p.a., Sigma-Aldrich

Rodamin 6G, p.a., Fluka

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

### 3.2. Mjerni uređaji

Ramanovi i SERS spektri snimljeni su korištenjem disperzivnog inVia Ramanovog spektrometra tvrtke Renishaw koji je spregnut s konfokalnim optičkim mikroskopom Leica i opremljen laserima valnih duljina 785 i 532 nm. Za snimanje spektara korišten je laser koji emitira zračenje pri 785 nm, maksimalne snage 300 mW. Snaga lasera se prilagodila vrsti uzorka te je naznačena u opisu slike. Korišten je objektiv povećanja  $\times 5$ , a spektri su snimani u području  $100\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ . Za snimanje čvrstih praškastih uzoraka korišten je aluminijski nosač, a za snimanje tekućih uzoraka korištene su aluminijske posudice volumena  $40\text{ }\mu\text{L}$ . Svaki mjerni uzorak je sniman tri puta i prikazani spektri su usrednjena vrijednost snimanja.

Apsorpcijski spektri koloidnih suspenzija zlata snimljeni su pomoću UV/Vis spektrometra SPECORD 200 tvrtke Analytik Jena. Korištena je kiveta od kvarca duljine puta zračenja  $0,2\text{ cm}$ . Spektri su snimani u području  $400\text{--}800\text{ nm}$  s razlučivanjem od  $1\text{ nm}$ .

pH vrijednost koloida izmjerena je pH metrom tvrtke Mettler Toledo s InLab®413 kombiniranom staklenom-kalomel elektrodom. Prije mjerenja pH metar je baždaren s otopinama pufera pH vrijednosti  $7,00$  i  $4,00$ .

Slike dobivene pretražnim elektronskim mikroskopom (model Jeol, JSM 7000F) snimljene su na Institutu Ruđer Bošković, u Zavodu za kemiju materijala.

### 3.3. Priprava koloidnih suspenzija

Prije same sinteze koloidnih nanočestica zlata potrebno je bilo pripremiti pufer HEPES pH vrijednosti 7,4. U tu svrhu otopljeno je 5,95232 g čvrste tvari HEPES-a u 200,0 mL Milli-Q deionizirane vode, a željena pH vrijednost postignuta je dodavanjem otopine natrijevog hidroksida ( $c = 1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Na kraju, pripravljena otopina pufera nadopunjena je Milli-Q deioniziranom vodom do 250,0 mL.

#### 3.3.1. Sinteza nemodificiranih koloida zlata

Koloidna suspenzija nanočestica zlata (**AuNP**) pripravljena je miješanjem 6,0 mL Milli-Q deionizirane vode s 4,0 mL pufera HEPES ( $c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4), nakon čega je u otopinu dodano 40  $\mu\text{L}$  tetraklorozlatne(III) kiseline ( $c = 5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ). Otopina je lagano promiješana te je ostavljena na sobnoj temperaturi sat vremena.

Koloidna suspenzije zlata s dodatkom srebrovog(I) nitrata (**AuNP\_Ag**) pripremljena je na prethodno opisan način pri čemu je nakon dodatka tetraklorozlatne(III) kiseline dodano još i 8  $\mu\text{L}$  srebrovog nitrata ( $c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ).

#### 3.3.2. Sinteza modificiranih koloida zlata

Modificirane koloidne suspenzije zlata, koje su dodatno stabilizirane molekulom CTAB (**AuNP\_CTAB**), odnosno molekulom spermina (**AuNP\_spermin**), sintetizirane su na sličan način kao i nemodificirani koloidi. Nakon miješanja pufera i zlatne kiseline, pripremljeni koloid je stajao sat vremena na sobnoj temperaturi, a zatim je tako sintetiziranoj koloidnoj suspenziji dodano 1200  $\mu\text{L}$  otopine CTAB-a ( $c = 2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ), odnosno 1200  $\mu\text{L}$  otopine spermina ( $c = 2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) i ostavljeno je na sobnoj temperaturi preko noći.

Za sintezu modificiranih koloida zlata s dodatkom srebrovog(I) nitrata, **AuNP\_Ag\_CTAB** i **AuNP\_Ag\_spermin**, u otopinu je, nakon dodatka tetraklorozlatne(III) kiseline, dodano i 8  $\mu\text{L}$  srebrovog(I) nitrata ( $c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). Tako pripravljena otopina je stajala sat vremena na sobnoj temperaturi, a zatim su dodane otopine stabilizirajućih tvari i pripravljene suspenzije su ostavljene na sobnoj temperaturi preko noći.

### 3.4. Priprava otopina i mjernih uzoraka

Ishodna otopina rodamina 6G (**R6G**) koncentracije  $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase čvrste tvari **R6G** u Milli-Q deioniziranoj vodi. Razrjeđivanjem ishodne otopine pripravljene su otopine **R6G** koncentracija:  $8 \times 10^{-8}$ ,  $8 \times 10^{-7}$ ,  $8 \times 10^{-6}$ ,  $8 \times 10^{-5}$  te  $8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  koje su korištene za pripravu mjernih uzoraka **R6G** u koloidnim suspenzijama.

Ishodna otopina (E)-1,2-di(piridin-4-il)etena (**BPE**) koncentracije  $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase krutine **BPE** u Milli-Q deioniziranoj vodi. Razrjeđivanjem ishodne otopine **BPE** pripravljene su otopine koncentracija  $8 \times 10^{-9}$ ,  $8 \times 10^{-8}$ ,  $8 \times 10^{-7}$ ,  $8 \times 10^{-6}$ ,  $8 \times 10^{-5}$  i  $8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  koje su korištene za pripravu mjernih uzoraka **BPE** u koloidnim suspenzijama.

Mjerni uzorci za snimanje SERS spektara priređeni su u aluminijskim posudicama volumena  $40 \text{ }\mu\text{L}$  na način da je pomiješano  $35 \text{ }\mu\text{L}$  koloidne suspenzije zlata i  $5 \text{ }\mu\text{L}$  otopine modelne molekule odgovarajuće koncentracije. Konačne koncentracije modelnih molekula, **R6G** i **BPE**, u uzorcima za SERS mjerenja iznosile su  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  i  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  te dodatno za **BPE**  $1 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ .

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

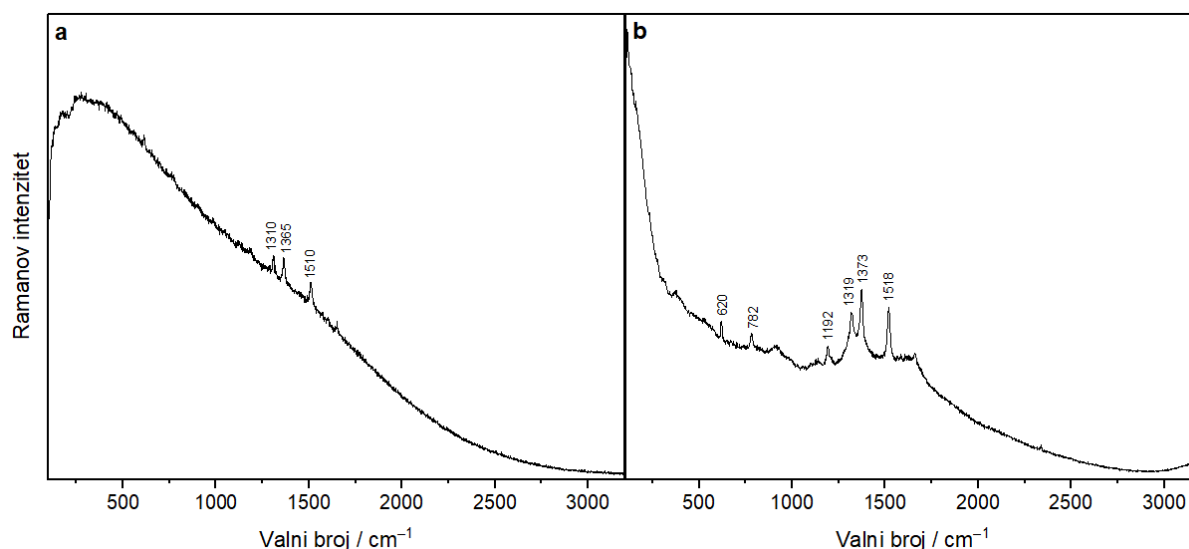
### 4.1. Ramanovi spektri modelnih molekula

#### 4.1.1. Rodamin 6G

Snimljeni su Ramanovi spektri krutine i vodene otopine rodamina 6G koncentracije  $2 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> pri valnoj duljini pobude od 785 nm. Dobiveni spektri prikazani su na slici 7, a asignacija opaženih vibracijskih vrpce dana je u tablici 1.

U Ramanovom spektru krutine **R6G** može se uočiti podignuta bazna linija zbog fluorescencije **R6G**. U spektru su opažene vrpce slabijih intenziteta koje odgovaraju vibracijama strukturnih motiva rodamina 6G. Tako vrpce pri 1650 i 1510 cm<sup>-1</sup> potječu od aromatskog istezanja CC veze u ksantenskom prstenu.<sup>17</sup> Vrpce pri 1365 i 1310 cm<sup>-1</sup> također doprinosi aromatsko istezanje CC veze ksantena te istezanje C-N veze etilamino skupine vezane na ksantenski prsten.<sup>21</sup> Vrpca veoma slabog intenziteta pri 612 cm<sup>-1</sup> pripisana je deformaciji u ravnini aromatskog prstena.

U Ramanovom spektru vodene otopine **R6G** koncentracije  $2 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> uočene su dvije dodatne vrpce, u odnosu na spektar krutine. Doprinos aromatskog istezanja CC veze ksantena pripisan je vrpce pri 1660 i 1518 cm<sup>-1</sup>, dok istezanja C-N veze rezultira vrpce pri 1373 i 1319 cm<sup>-1</sup>. Vrpca koja potječe od deformacije u ravnini prstena javlja se pri 620 cm<sup>-1</sup>. Vrpce pri 1192 i 782 cm<sup>-1</sup> pripisane su deformaciji u ravnini i izvan ravnine CH skupina aromata.<sup>17,21</sup>



Slika 7. Ramanovi spektri: a) krutine **R6G** snimljeni pri snazi lasera od  $3,19 \times 10^{-4}$  mW i b) otopine **R6G** ( $c = 2 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) pri snazi lasera od 319 mW

Tablica 1. Asignacija karakterističnih vrpce u Ramanovom spektru krutine i otopine **R6G**

| Valni broj / $\text{cm}^{-1}$ |                | Vibracija <sup>17,21</sup> |
|-------------------------------|----------------|----------------------------|
| Krutina                       | Vodena otopina |                            |
| 1650                          | 1660           | $\nu$ CC                   |
| 1510                          | 1518           | $\nu$ CC                   |
| 1365                          | 1373           | $\nu$ CC, $\nu$ C-N        |
| 1310                          | 1319           | $\nu$ CC, $\nu$ C-N        |
|                               | 1192           | $\delta_{\text{ip}}$ CH    |
|                               | 782            | $\delta_{\text{oop}}$ CH   |
| 612                           | 620            | $\delta_{\text{ip}}$ C-C-C |

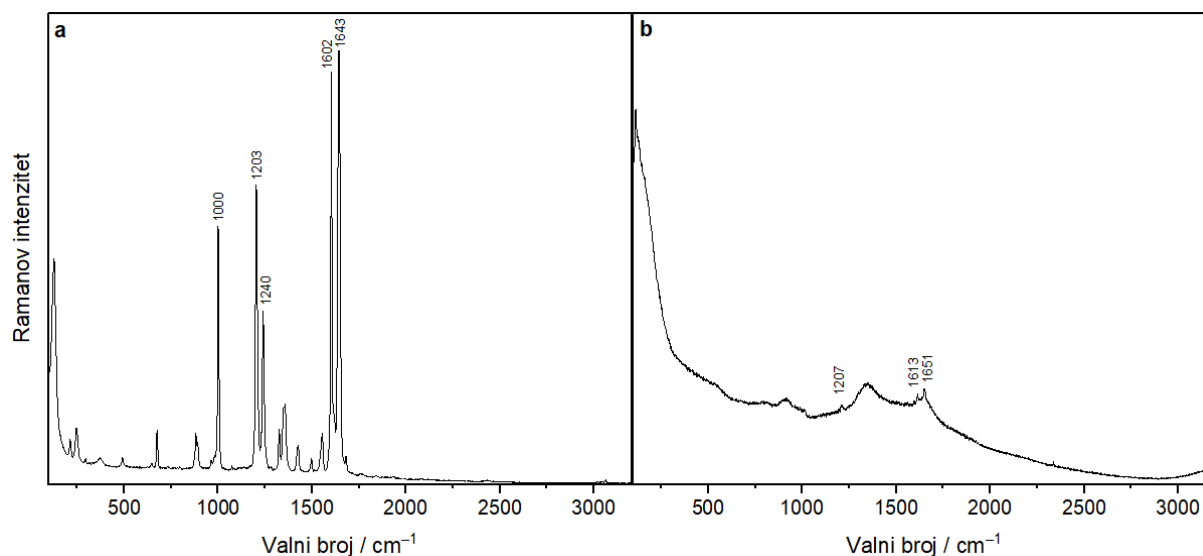
Kratice:  $\nu$  = istezanje;  $\delta$  = deformacija; ip = u ravnini; oop = izvan ravnine.

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

Snimljeni su Ramanovi spektri krutine i otopine (E)-1,2-di(piridin-4-il)etena koncentracije  $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  pri valnoj duljini pobude od 785 nm (slika 8, tablica 2).

U Ramanovom spektru krutine **BPE** uočavaju se vrlo intenzivne vrpce karakteristične za vibracije strukturnih motiva promatrane molekule. Dvije najintenzivnije vrpce u spektru nalaze se pri 1643 i 1602  $\text{cm}^{-1}$ . Vrpca pri većem valnom broju potječe od istezanja C=C veze etilena, dok intenzitetu vrpce pri 1602  $\text{cm}^{-1}$  doprinose istezanje CC veze u piridinskom prstenu i deformacija u ravnini CH skupina. Vrpce u spektru pri 1203 i 1000  $\text{cm}^{-1}$  rezultat su deformacije u ravnini C-N veze, istezanja C-C veze između piridinskog prstena i etilena te deformacije u ravnini prstena. Vrpca pri 1240  $\text{cm}^{-1}$  potječe od istezanja CC veza i deformacije u ravnini CH skupina piridina.<sup>20,22,23</sup>

Ramanov spektar vodene otopine **BPE** koncentracije  $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  pokazuje nekolicinu vrpce vrlo slabog intenziteta koje potječu od istezanja C=C veze etilena (1651  $\text{cm}^{-1}$ ), istezanja CC veza u prstenu piridina i deformacija u ravnini CH skupina (1613  $\text{cm}^{-1}$ ) te od deformacije u ravnini C-N veze i istezanja C-C veze između prstena i etilena (1207  $\text{cm}^{-1}$ ).



Slika 8. Ramanovi spektri: a) krutine **BPE** pri snazi lasera od 3,19 mW i b) otopine **BPE** ( $c = 1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) pri snazi lasera od 319 mW

Tablica 2. Asignacija karakterističnih vrpci u Ramanovom spektru krutine i otopine **BPE**

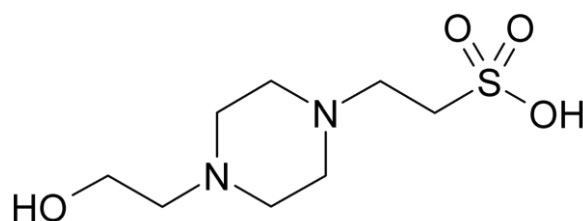
| Valni broj / $\text{cm}^{-1}$ |                | Vibracija <sup>20,22,23</sup>                                 |
|-------------------------------|----------------|---------------------------------------------------------------|
| Krutina                       | Vodena otopina |                                                               |
| 1643                          | 1651           | $\nu (\text{C}=\text{C})_e$                                   |
| 1602                          | 1613           | $\nu (\text{C}-\text{C})_p, \delta_{ip} \text{ CH}$           |
| 1553                          |                | $\nu \text{ C-N}, \delta_{ip} \text{ prsten}$                 |
| 1496                          |                | $\delta_{ip} (\text{CH})_p, \nu \text{ C-N}, \nu \text{ C-C}$ |
| 1425                          |                | $\delta_{ip} (\text{CH})_p, \nu (\text{C}-\text{C})_p$        |
| 1352                          |                | $\delta_{ip} \text{ CH}$                                      |
| 1324                          |                | $\delta_{ip} (\text{C}=\text{C})_e$                           |
| 1240                          |                | $\delta_{ip} (\text{CH})_p, \nu (\text{C}-\text{C})_p$        |
| 1203                          | 1207           | $\delta_{ip} \text{ C-N}, \nu \text{ C}_{prsten}-\text{C}_e$  |
| 1000                          |                | $\delta_{ip} \text{ prsten}$                                  |
| 881                           |                | $\delta_{oop} \text{ CH}, \delta_{oop} (\text{C}=\text{C})_e$ |
| 676                           |                | $\delta_{ip} \text{ prsten}$                                  |

Kratice:  $\nu$  = istezanje;  $\delta$  = deformacija; ip = u ravnini; oop = izvan ravnine; e = etilen; p = piridin.

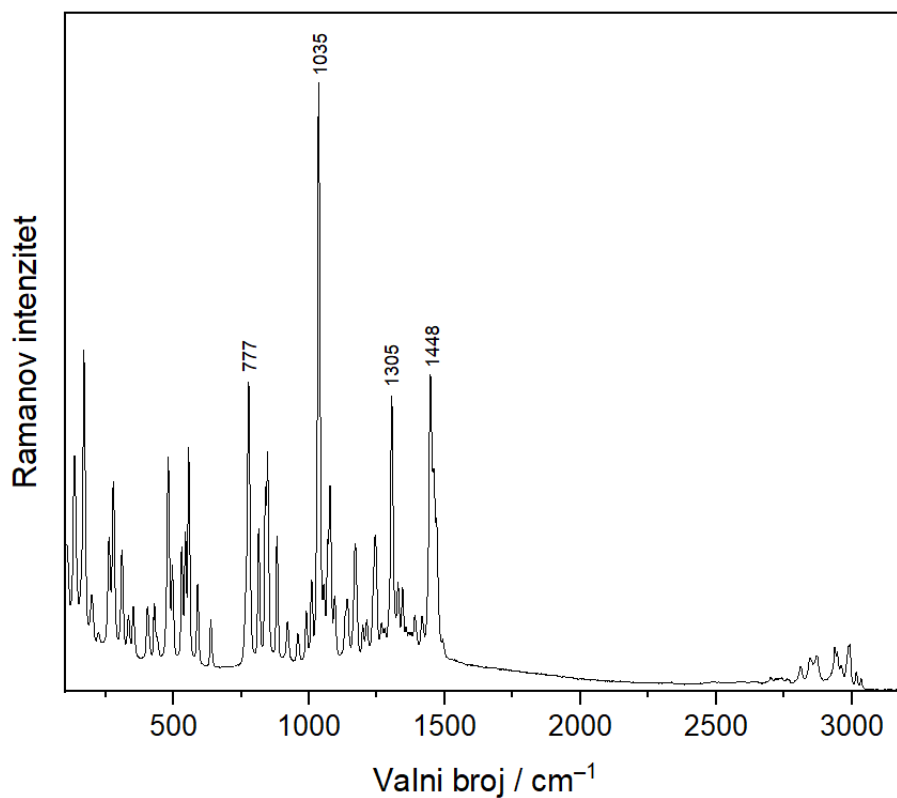
## 4.2. Nemodificirane koloidne suspenzije zlata

Nemodificirane nanočestice zlata, **AuNP** i **AuNP\_Ag**, sintetizirane su reakcijom tetraklorozlatne(III) kiseline i pufera HEPES (slika 9). Prilikom postupka priprave koloida, molekule pufera imaju višestruku ulogu; na dušikovim atomima piperazina generiraju se slobodni radikali te pufer djeluje kao reducens,<sup>24</sup> a istovremeno molekule pufera stabiliziraju nastale koloidne nanočestice. Molekule pufera HEPES vežu se preko dušikovih atoma na površinu nanočestice metala čime sprječavaju agregaciju nastalih metalnih nanočestica.<sup>25</sup> Tijekom sinteze koloida **AuNP\_Ag**, srebrov(I) nitrat dodatno potiče rast nanočestica određene morfologije, pri čemu nastaju monodispergirane nanočestice kontrolirane veličine.<sup>24</sup>

Prije detaljne karakterizacije nastalih koloidnih suspenzija, sama molekula HEPES-a je detaljno strukturno okarakterizirana pomoću Ramanove spektroskopije. Snimljeni Ramanov spektar krutine HEPES prikazan je na slici 10, a asignacija najznačajnijih vrpce dana je u tablici 3. Najintenzivnija vrpca u spektru pri  $1035\text{ cm}^{-1}$  potječe od simetričnog istezanja sulfonatne skupine. Vrlo intenzivne vrpce pri  $1448$  i  $1305\text{ cm}^{-1}$  pripisane su vibracijama striženja i uvijanja  $\text{CH}_2$  skupina, dok srednje intenzivnim vrpca pri  $1170$  i  $777\text{ cm}^{-1}$  doprinosi simetrično istezanje C-N veze, odnosno istezanje C-S veze.<sup>26,27</sup>



Slika 9. Struktura spoja HEPES



Slika 10. Ramanov spektar krutine HEPES snimljen pri snazi lasera od 319 mW

Tablica 3. Asignacija osnovnih vrpci u Ramanovom spektru krutine HEPES

| Valni broj / $\text{cm}^{-1}$ | Vibracija <sup>26,27</sup>        |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| 1448                          | $\delta_{\text{sc}}(\text{CH}_2)$ |
| 1305                          | $\delta_{\text{tw}}(\text{CH}_2)$ |
| 1170                          | $\nu_{\text{s}} \text{C-N}$       |
| 1035                          | $\nu_{\text{s}}(\text{SO}_3^-)$   |
| 777                           | $\nu \text{C-S}$                  |

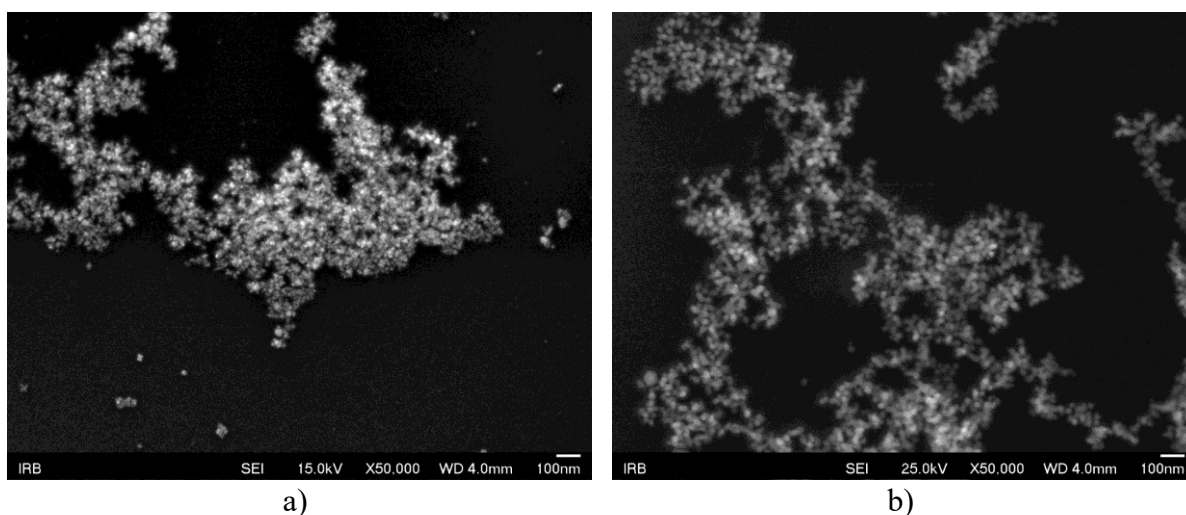
Kratice:  $\nu$  = istezanje;  $\delta$  = deformacija; sc = striženje; tw = uvijanje; s = simetrično.

#### 4.2.1. Karakterizacija nemodificiranih koloidnih suspenzija zlata

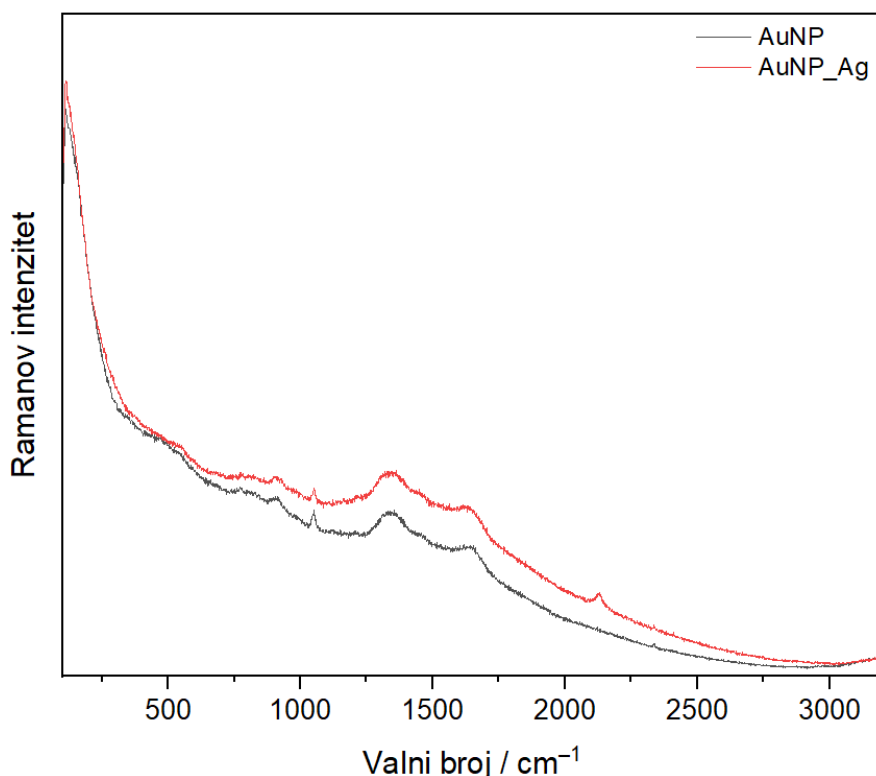
Za karakterizaciju pripremljenih koloidnih suspenzija zlata, snimljeni su Ramanovi spektri koloida korištenjem pobudnog zračenja pri 785 nm, UV/Vis apsorpcijski spektri te je koloidima izmjerena pH vrijednost. Morfologija pripremljenih metalnih nanočestica određena je snimanjem uzorka koloida pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa.

Nemodificiranom koloidu zlata bez dodatka srebrvog nitrata (**AuNP**), izmjerena pH vrijednost iznosila je 7,32, dok je plazmonski apsorpcijski maksimum pri 669 nm. Opažena valna duljina površinskog plazmona upućuje na prisutnost nanočestica različitih veličina i nepravilnog „razgranatog“ oblika, budući da je iz literature<sup>28</sup> poznato da čiste sfere zlata daju apsorpcijski maksimum oko 500 nm, dok zlatne nanozvezdice apsorbiraju oko 750 nm. Prilog tome je i SEM slika **AuNP** koloida (slika 11a) koja prikazuje nakupine (agregate) nanočestice nepravilnog „razgranatog“ oblika. U Ramanovom spektru koloida **AuNP** (slika 12) vidljiva je vrpca istezanja sulfonatne skupine iz HEPES-a pri 1050  $\text{cm}^{-1}$ .

Nemodificiranom koloidu zlata s dodatkom srebrvog nitrata (**AuNP\_Ag**), izmjerena pH vrijednost iznosila je 7,34 dok je maksimum apsorpcije UV/Vis zračenja na 616 nm. SEM slika (slika 11b) prikazuje nanočestice sličnih dimenzija, nepravilnog oblika, ali manje „razgranate“ morfologije, što je u skladu s manjom valnom duljinom apsorpcijskog maksimuma. Kada se  $\text{Ag}^+$  ioni dodaju tijekom sinteze zlatnih nanočestica, nastaju nanočestice koje su monodispergirane i manje sklone agregiranju.<sup>24</sup> U Ramanovom spektru koloida **AuNP\_Ag** (slika 12) također se može uočiti vrpca istezanja sulfonatne skupine HEPES-a.



Slika 11 . SEM slike koloida: a) **AuNP** i b) **AuNP\_Ag**



Slika 12. Ramanovi spektri nemodificiranih koloida zlata **AuNP** i **AuNP\_Ag** snimljeni pri snazi lasera od 31,9 mW

#### 4.2.2. SERS učinkovitost nemodificiranih koloidnih suspenzija zlata

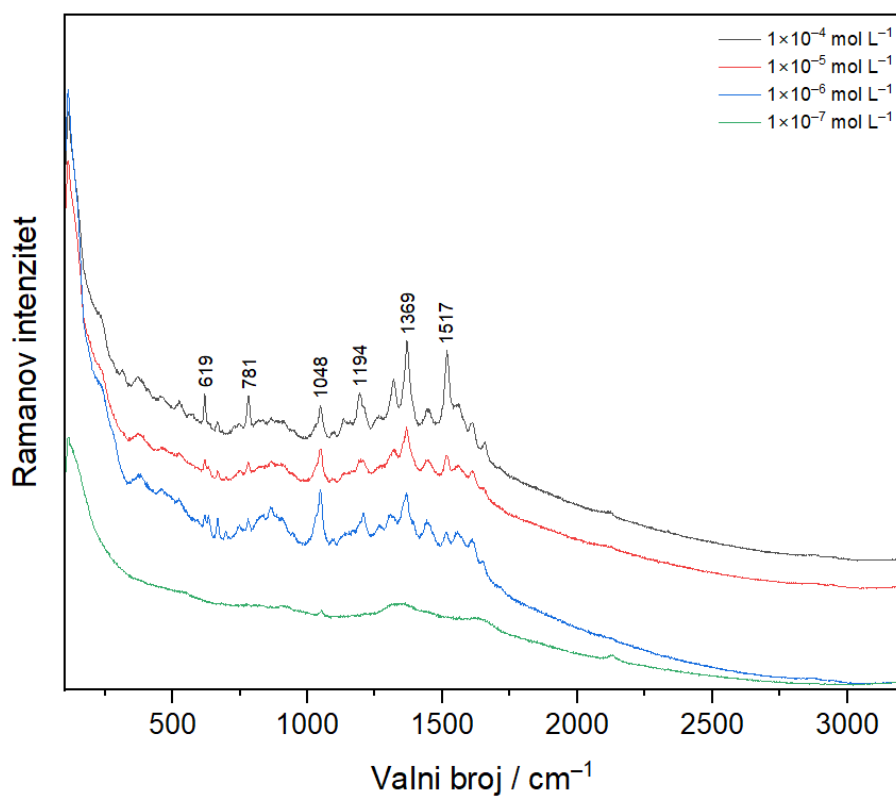
Kako bi se ispitala učinkovitost pripremljenih nemodificiranih koloidnih suspenzija zlata, **AuNP** i **AuNP\_Ag**, kao metalnih supstrata u SERS spektroskopiji, snimljeni su koncentracijski ovisni SERS spektri otopina modelnih molekula u promatranim koloidima zlata.

SERS spektri **R6G** u koloidu **AuNP** snimljeni su u koncentracijskom području  $1 \times 10^{-7}$ – $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> (slika 13). U dobivenim SERS spektrima za koncentracije modelne molekule  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  i  $1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> uočava se veći broj vrpca koje odgovaraju vibracijama molekule **R6G**. Molekula rodamina 6G sadrži pozitivno nabijenu skupinu u svojoj strukturi koja ostvaruje privlačne elektrostatske interakcije s negativno nabijenom sulfonatnom skupinom iz pufera HEPES<sup>29</sup>, što omogućava molekulama **R6G** da se približe površini nanočestica zlata. Za najintenzivniji SERS spektar **R6G** koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> prikazana je asignacija opaženih vrpca u tablici 4. Vrlo intenzivna vrpca pri 1517 cm<sup>-1</sup> i vrpca pri 1658 cm<sup>-1</sup> potječu od istezanja CC veza u aromatskom ksantenskom prstenu. Intenzitetu vrpca pri 1369 i 1319 cm<sup>-1</sup> doprinosi aromatsko istezanje CC veza ksantena i istezanje C-N veze između ugljikovog atoma ksantenskog prstena i dušikovog atoma etilamino skupine. Vrpce srednjeg intenziteta pri 1194

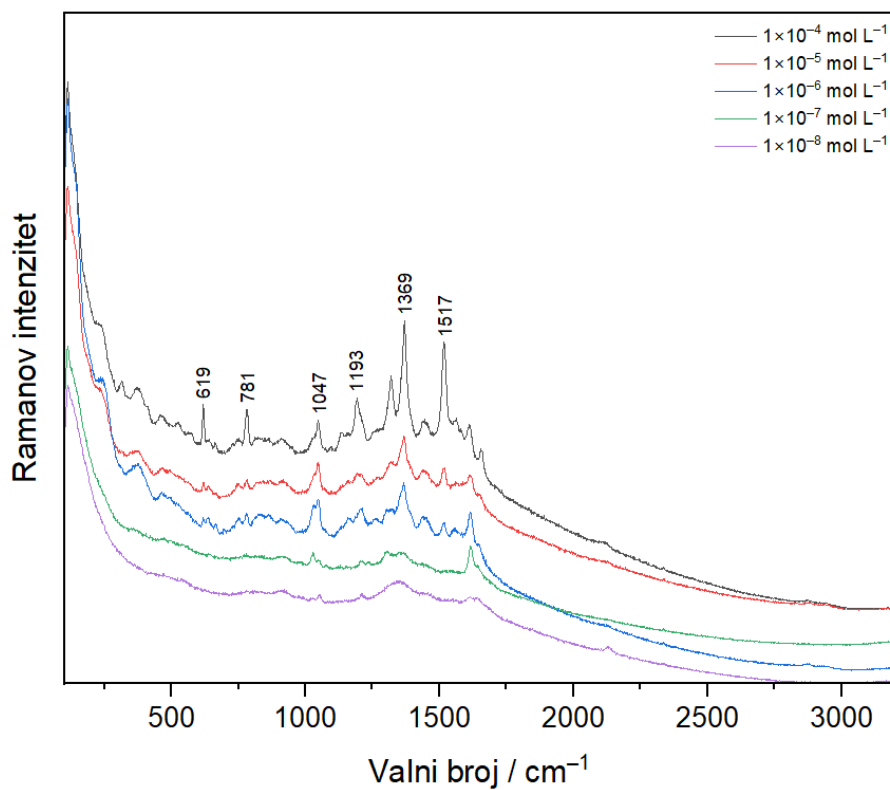
i  $781\text{ cm}^{-1}$  pripisane su deformaciji u ravnini i izvan ravnine aromatskim CH skupinama, dok vrpca pri  $619\text{ cm}^{-1}$  odgovara deformaciji u ravnini aromatskog prstena. U spektru se javlja i vrpca istezanja sulfonatne skupine iz molekule pufera HEPES pri  $1048\text{ cm}^{-1}$ .

Na slici 13 je vidljivo kako se smanjenjem koncentracije **R6G** u koloidnom sustavu smanjuju intenziteti vrpce spoja. No, uočeno je kako sve vrpce ne prate isti trend pada intenziteta te je najizraženija promjena uočena za vrpcu pri  $1517\text{ cm}^{-1}$  što upućuje na drugačiju orijentaciju molekule **R6G** na površini nanočestica u otopinama različitih koncentracija. Također se može uočiti kako se intenzitet vrpce istezanja sulfonatne skupine molekula HEPES-a koji okružuje nanočestice povećava sa smanjenjem koncentracije **R6G**. Granica detekcije za modelnu molekulu, odnosno najmanja koncentracija **R6G** koja je detektirana u koloidnoj suspenziji zlata **AuNP** pri odabranim uvjetima mjerenja, iznosi  $1 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$ . Spektar sljedeće niže koncentracije **R6G** odgovara spektru koloidne suspenzije zlata.

Koncentracijski ovisni SERS spektri **R6G** u koloidu **AuNP\_Ag** snimljeni su u koncentracijskom području  $1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$  (slika 14). U tablici 4 dana je asignacija najintenzivnijeg spektra **R6G** ( $1 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ ). SERS spektar modelne molekule, dobiven korištenjem supstrata s dodanim srebrovim(I) nitratom, izgledom vrlo nalikuje spektru **R6G** dobivenom u koloidu zlata bez dodanog  $\text{Ag}^+$ . Tako istezanja CC veza u ksantenskom prstenu rezultira vrpcama pri  $1657$  i  $1517\text{ cm}^{-1}$ , dok vrpcama pri  $1369$  i  $1319\text{ cm}^{-1}$  doprinosi uz navedeno aromatsko istezanje također i istezanje C-N veze između ugljikovog atoma ksantena i dušikovog atoma etilamino skupine. Vrpce pri  $1193$  i  $781\text{ cm}^{-1}$  potječu od deformacije u ravnini i izvan ravnine aromatskih CH skupina, a vrpca pri  $619\text{ cm}^{-1}$  od deformacije u ravnini aromatskog prstena. Smanjenje koncentracije **R6G** u koloidu zlata rezultira smanjenjem intenziteta određenih vrpce u SERS spektrima, što je i u ovom supstratu najintenzivnije za vrpcu vibracije ksantena pri  $1517\text{ cm}^{-1}$ . Smanjenjem koncentracije modelne molekule u koloidu uočeno je povećanje intenziteta vrpca istezanja CC veza aromata oko  $1600\text{ cm}^{-1}$ . Sve navedeno ide u prilog tezi da se molekule rodamina 6G različito orijentiraju na površini zlata, ovisno o koncentraciji u kojoj su prisutne u sustavu. Najniža koncentracija **R6G** za koju su uočene karakteristične vrpce spoja u spektru snimljenom u koloidu zlata **AuNP\_Ag**, pri odabranim uvjetima mjerenja, je  $1 \times 10^{-7}\text{ mol L}^{-1}$ . Koloidne nanočestice pripremljene dodatkom srebra(I) nitrata tijekom sinteze, pokazuju veću SERS efikasnost, dakle intenzivnije pojačavaju raspršenje zračenja, što rezultira nižom granicom detekcije, odnosno većom osjetljivošću supstrata na rodamin 6G, u odnosu na koloid sintetiziran bez dodatka  $\text{Ag}^+$  iona.



Slika 13. Koncentracijski ovisni SERS spektri **R6G** snimljeni u koloidu **AuNP** pri snazi lasera od 319 mW



Slika 14. Koncentracijski ovisni SERS spektri **R6G** snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag** pri snazi lasera od 319 mW

Tablica 4. Asignacija vrpca u SERS spektrima **R6G** koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> u koloidima zlata **AuNP** i **AuNP\_Ag**

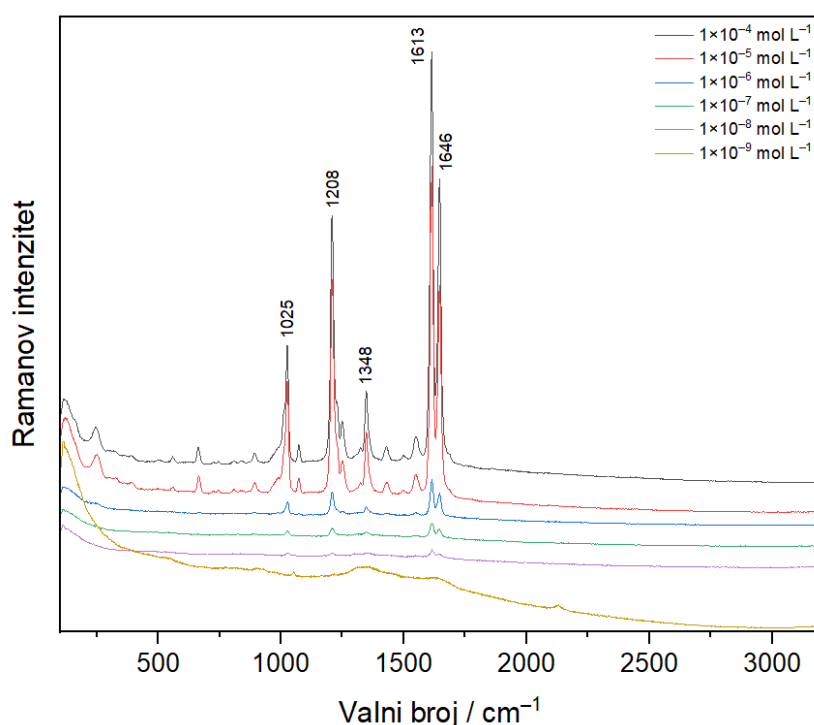
| Valni broj / cm <sup>-1</sup> |                | Vibracija <sup>17,21</sup>                     |
|-------------------------------|----------------|------------------------------------------------|
| <b>AuNP</b>                   | <b>AuNP_Ag</b> |                                                |
| 1658                          | 1657           | v CC                                           |
| 1517                          | 1517           | v CC                                           |
| 1369                          | 1369           | v CC, v C-N                                    |
| 1319                          | 1319           | v CC, v C-N                                    |
| 1194                          | 1193           | δ <sub>ip</sub> CH                             |
| 1048                          | 1047           | v <sub>s</sub> (SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) |
| 781                           | 781            | δ <sub>oop</sub> CH                            |
| 619                           | 619            | δ <sub>ip</sub> C-C-C                          |

Kratice: v = istezanje; δ = deformacija; ip = u ravnini; oop = izvan ravnine; s = simetrično.

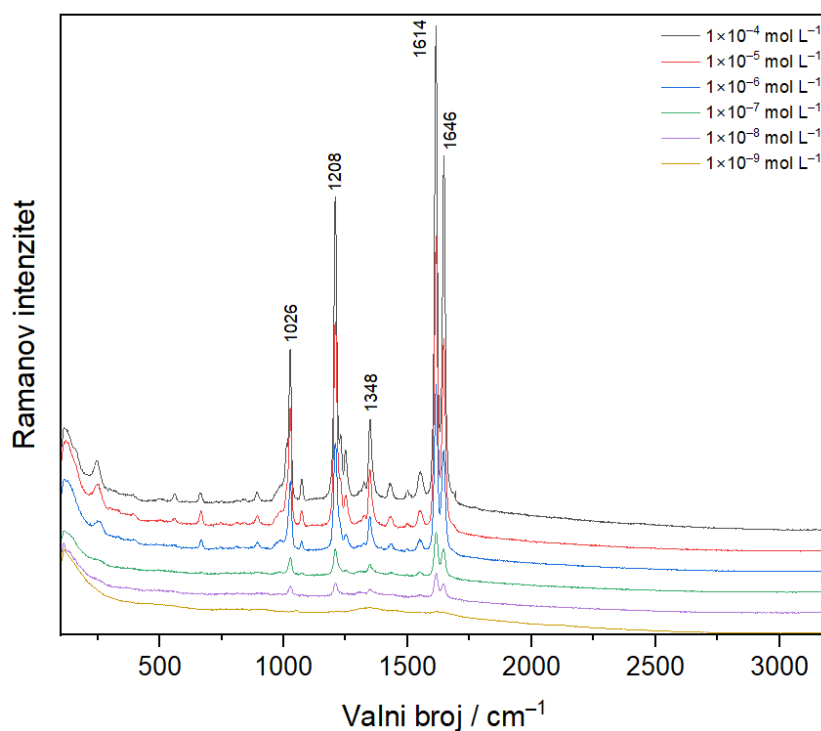
Koncentracijski ovisni SERS spektri modelne molekule **BPE** u koloidu **AuNP** snimljeni su u području  $1 \times 10^{-9}$ – $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> (slika 15). U spektrima su opažene vrpce karakteristične za vibracije molekule **BPE**. Najintenzivniji SERS spektar dobiven je za koncentraciju  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, te je asignacija opaženih vrpca prikazana u tablici 5. Intenzivna vrpca pri 1613 cm<sup>-1</sup> potječe od vibracije istezanja CC veze u piridinskom prstenu te deformacije u ravnini CH skupina. U spektru su vidljive i dvije intenzivne vrpce koje potječu od istezanju C=C veze etilena (1646 cm<sup>-1</sup>) te deformacije u ravnini C-N veze i istezanje C-C veze između prstena piridina i etilena (1208 cm<sup>-1</sup>). Intenzivnoj vrpca pri 1025 cm<sup>-1</sup> te slabije intenzivnoj vrpca pri 664 cm<sup>-1</sup> doprinosi deformacija u ravnini piridinskog prstena, dok vrpca pri 1348 cm<sup>-1</sup> potječe od deformacije u ravnini CH skupina piridinskog prstena. Vrpce manjeg intenziteta pripisane su istezanju C-N veze (1550 cm<sup>-1</sup>), istezanju CC veze i deformaciji u ravnini CH skupina u prstenu (1429 i 1251 cm<sup>-1</sup>), deformaciji u ravnini C=C veze etilena (1323 cm<sup>-1</sup>) te deformaciji izvan ravnine CH skupina i C=C veze etilena (893 cm<sup>-1</sup>). Dodatna vrpca koja se javlja u spektru pri 1073 cm<sup>-1</sup> potječe od pufera HEPES, a odgovara simetričnom istezanju sulfonatne skupine. Kako se smanjuje koncentracija **BPE** u koloidu zlata, slabije je pojačanje Ramanovog raspršenja te su i vrpce slabijeg intenziteta. Nije uočena pojava novih vrpca niti promjene u omjerima intenziteta postojećih vrpca u spektru, koje bi upućivale na promjenu orijentacije molekula na površini

metala. Granica detekcije za modelnu molekulu **BPE** u koloidnoj suspenziji zlata **AuNP**, pri odabranim eksperimentalnim uvjetima, je  $1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ .

Koncentracijski ovisni SERS spektri molekule **BPE** u koloidu **AuNP\_Ag** snimljeni su u koncentracijskom području  $1 \times 10^{-9}$ – $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  (slika 16). U tablici 5 prikazana je asignacija opaženih vrpca za najintenzivniji SERS spektar molekule **BPE** koncentracije  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Spektri **BPE** dobiveni korištenjem koloida s dodatkom  $\text{AgNO}_3$  vrlo nalikuju spektrima modelne molekule dobivenim u čistom **AuNP** koloidu. Tako su vrpce najvećeg intenziteta pripisane istezanju  $\text{C}=\text{C}$  veze etilena ( $1646 \text{ cm}^{-1}$ ), istezanju  $\text{CC}$  veze u prstenu piridina i deformaciji u ravni  $\text{CH}$  skupina ( $1613 \text{ cm}^{-1}$ ), deformaciji u ravni  $\text{C}-\text{N}$  veze i istezanju  $\text{C}-\text{C}$  veze između piridinskog prstena i etilena ( $1208 \text{ cm}^{-1}$ ) te deformaciji u ravni piridinskog prstena ( $1026 \text{ cm}^{-1}$ ). Također, u spektru se javlja vrpca pri  $1073 \text{ cm}^{-1}$  koja odgovara istezanju sulfonatne skupine iz pufera HEPES. Kao granica detekcije u odabranim eksperimentalnim uvjetima, za modelnu molekulu **BPE** u koloidu zlata **AuNP\_Ag**, određena je koncentracija  $1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ .



Slika 15. Koncentracijski ovisni SERS spektri **BPE** snimljeni u koloidu **AuNP** pri snazi lasera od 31,9 mW



Slika 16. Koncentracijski ovisni SERS spektri **BPE** snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag** pri snazi lasera od 31,9 mW

Tablica 5. Asignacija vrpci u SERS spektrima **BPE** koncentracije  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  u koloidima zlata **AuNP** i **AuNP\_Ag**

| Valni broj / $\text{cm}^{-1}$ |         | Vibracija <sup>20,22,23</sup>                                 |
|-------------------------------|---------|---------------------------------------------------------------|
| AuNP                          | AuNP_Ag |                                                               |
| 1646                          | 1646    | $\nu (\text{C}=\text{C})_e$                                   |
| 1613                          | 1614    | $\nu (\text{C}-\text{C})_p, \delta_{ip} \text{ CH}$           |
| 1550                          | 1552    | $\nu \text{ C-N}, \delta_{ip} \text{ prsten}$                 |
| 1429                          | 1429    | $\delta_{ip} (\text{CH})_p, \nu (\text{C}-\text{C})_p$        |
| 1348                          | 1348    | $\delta_{ip} \text{ CH}$                                      |
| 1323                          | 1323    | $\delta_{ip} (\text{C}=\text{C})_e$                           |
| 1251                          | 1250    | $\delta_{ip} (\text{CH})_p, \nu (\text{C}-\text{C})_p$        |
| 1208                          | 1208    | $\delta_{ip} \text{ C-N}, \nu \text{ C}_{prsten}-\text{C}_e$  |
| 1073                          | 1073    | $\nu_s (\text{SO}_3^-)$                                       |
| 1025                          | 1026    | $\delta_{ip} \text{ prsten}$                                  |
| 893                           | 891     | $\delta_{oop} \text{ CH}, \delta_{oop} (\text{C}=\text{C})_e$ |
| 664                           | 661     | $\delta_{ip} \text{ prsten}$                                  |

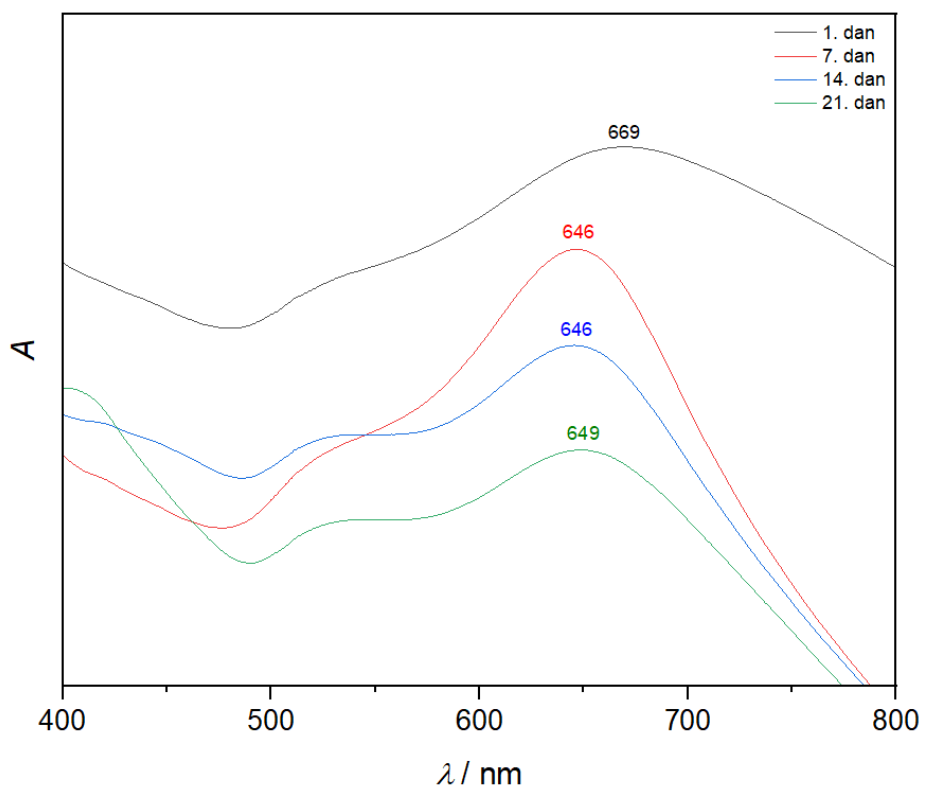
Kratice:  $\nu$  = istezanje;  $\delta$  = deformacija; ip = u ravnini; oop = izvan ravnine; e = etilen; p = piridin.

#### 4.2.3. Vremenska stabilnost nemodificiranih koloidnih suspenzija zlata

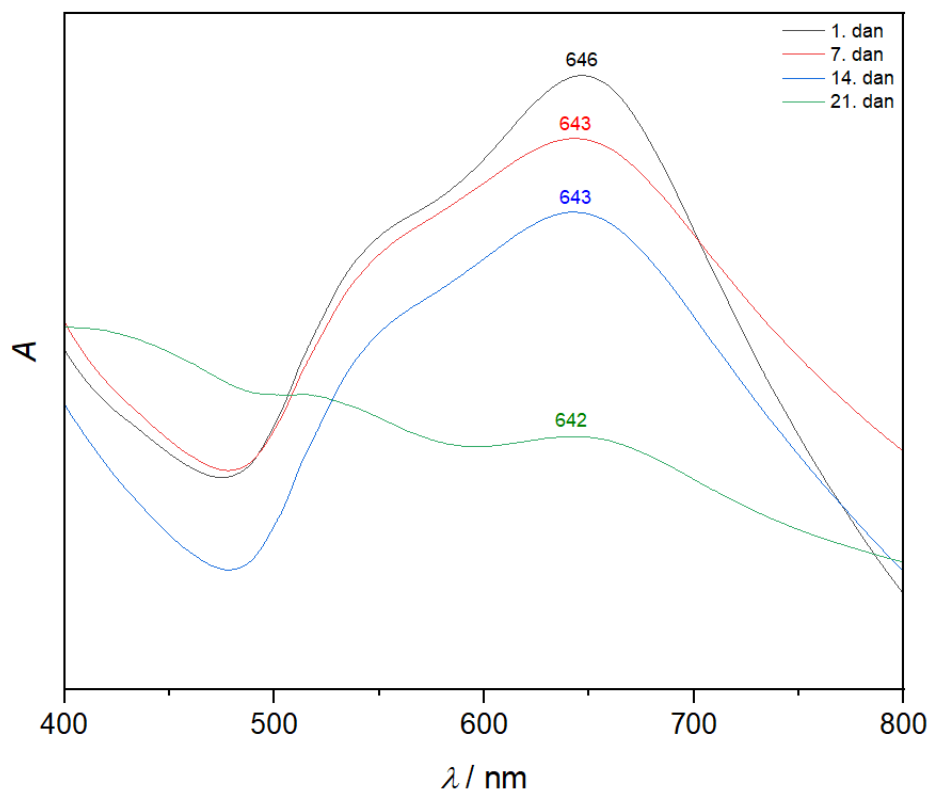
Jedna od bitnih značajki dobrog SERS supstrata je stabilnost tijekom vremena.<sup>2</sup> Kako bi se odredio utjecaj protoka vremena na stabilnost i učinkovitost pripremljenih koloidnih suspenzija zlata, snimljeni su vremenski ovisni UV/Vis i Ramanovi spektri. Također, snimljeni su i vremenski ovisni SERS spektri kako bi se istražilo mijenja li se tijekom vremena učinkovitost pripremljenih koloida kao SERS supstrata. Za snimanje vremenski ovisnih SERS spektara odabrana je modelna molekula **BPE** koncentracije  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Svi vremenski ovisni spektri snimani su prvog, sedmog, četrnaestog te dvadeset prvog dana, računavši od dana pripreve koloida.

Vremenski ovisni UV/Vis spektri nemodificiranog koloida **AuNP** (slika 17) pokazuju kako je došlo do značajnog pomaka valne duljine apsorpcijskog maksimuma za koloid snimljen sedmi dan (646 nm) u odnosu na svježe pripremljeni koloid (669 nm). Uočen je plavi pomak u iznosu od 23 nm. Daljnjim starenjem koloida nema toliko značajnih promjena u položaju apsorpcijskog maksimuma. Promatrajući vremenski ovisne UV/Vis spektre koloida zlata **AuNP\_Ag** (slika 18), vidljivo je kako tijekom vremena ne dolazi do značajnijeg pomaka valne duljine apsorpcijskog maksimuma. Kao što je ranije spomenuto, u slučaju koloida **AuNP\_Ag**, dodatak iona srebra tijekom sinteze rezultira stvaranjem nanočestica koje su stabilnije i manje sklone agregaciji, što je vrlo vjerojatno razlog zašto je pripremljeni koloid stabilniji duži vremenski period, u odnosu na izvorno pripremljeni koloid **AuNP**.

Za oba koloida je uočeno da tijekom vremena dolazi do smanjenja vrijednosti apsorpcije uslijed taloženja nanočestica što je pokazatelj nestabilnosti pripremljenih koloidnih suspenzija nemodificiranih nanočestica zlata.

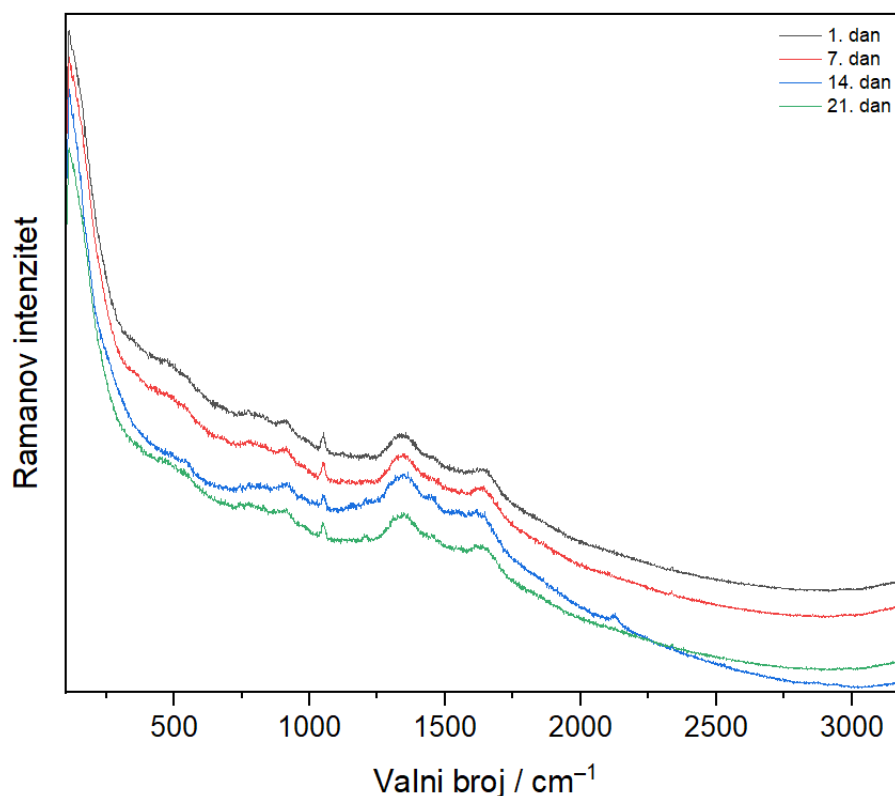


Slika 17. Vremenski ovisni UV/Vis apsorpcijski spektri koloidne suspenzije zlata **AuNP** snimljeni u rasponu valnih duljina od 400 do 800 nm

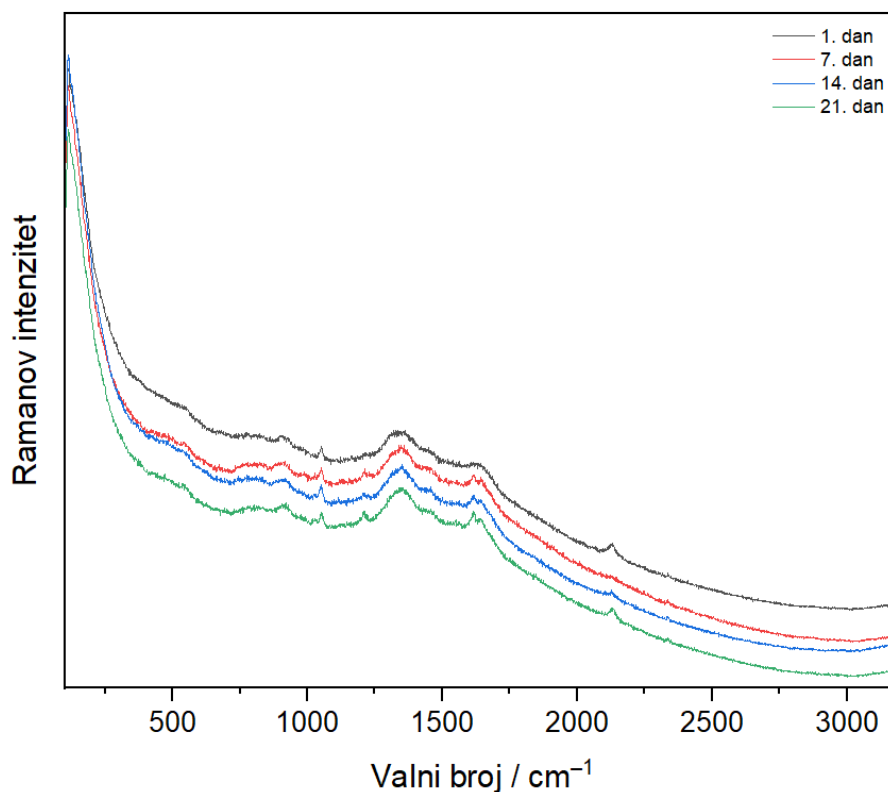


Slika 18. Vremenski ovisni UV/Vis apsorpcijski spektri koloidne suspenzije zlata **AuNP\_Ag** snimljeni u rasponu valnih duljina od 400 do 800 nm

Vremenski ovisni Ramanovi spektri koloidnih suspenzija **AuNP** i **AuNP\_Ag**, prikazani na slikama 19 i 20, pokazuju da nema značajnih promjena u izgledu spektra tijekom vremena, osim pojačanja vrpci koje potječu od vibracijskih modova molekula HEPES-a smještenih na površini nanočestica.



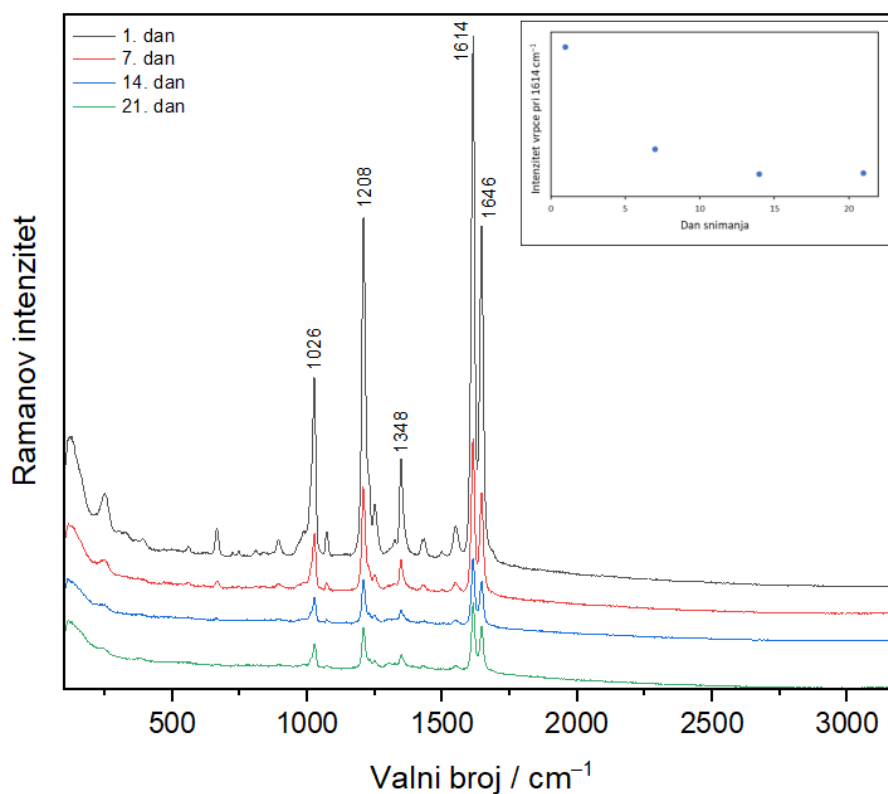
Slika 19. Vremenski ovisni Ramanovi spektri koloidne suspenzije zlata **AuNP** snimljeni pri snazi lasera od 31,9 mW



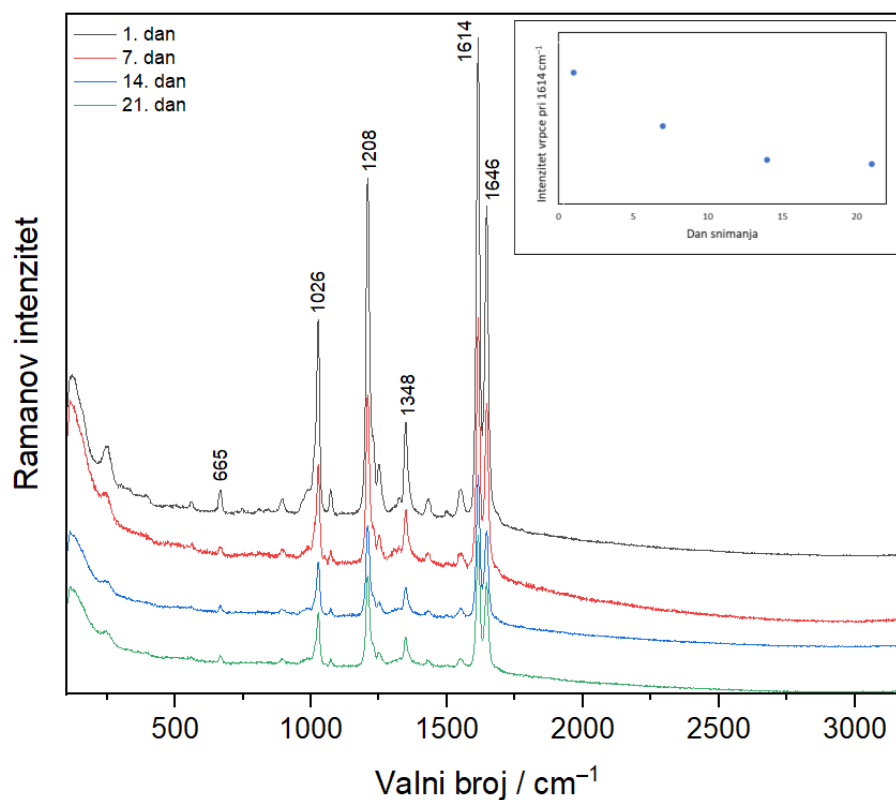
Slika 20. Vremenski ovisni Ramanovi spektri koloidne suspenzije zlata **AuNP\_Ag** snimljeni pri snazi lasera od 31,9 mW

Vremenski ovisni SERS spektri modelne molekule **BPE** koncentracije  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  snimljeni u koloidima zlata **AuNP** i **AuNP\_Ag** prikazani su na slici 21 i 22. Iz dobivenih spektara može se zaključiti kako se tijekom vremena smanjuje učinkovitost sintetiziranih koloida zlata kao SERS supstrata jer je uočeno smanjenje intenziteta vrpca **BPE** u spektrima snimanim u različitim danima. Umetak u slici 21, koji prikazuje ovisnost intenziteta karakteristične vrpce za **BPE** o danu snimanja, pokazuje značajan pad intenziteta vrpce između prvog i sedmog dana za koloid **AuNP**, što je u skladu s ranije opisanim promjenama u UV/Vis spektrima navedenog koloida. Opaženo je potvrda nestabilnosti koloidnih nanočestica **AuNP** tijekom vremena. Iz slike 22 i pripadajućeg umetka uočava se postepeno smanjenje intenziteta vrpca **BPE** tijekom vremena korištenjem **AuNP\_Ag** kao metalnog supstrata, što je posljedica taloženja koloidnih nanočestica, odnosno pokazatelj nestabilnosti koloidne suspenzije kroz duži vremenski period.

Iz UV/Vis spektara nemodificiranih koloida i SERS spektara molekula **BPE** snimljenih u navedenim koloidima, može se zaključiti da je koloidna suspenzija nanočestica zlata s dodatkom srebrovog(I) nitrata pokazala veću stabilnost tijekom vremena, u odnosu na izvorno pripremljeni koloid **AuNP**.



Slika 21. Vremenski ovisni SERS spektri **BPE** ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) snimljeni u koloidu zlata **AuNP** pri snazi lasera od 31,9 mW



Slika 22. Vremenski ovisni SERS spektri **BPE** ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) snimljeni u koloidu zlata **AuNP-Ag** pri snazi lasera od 31,9 mW

#### 4.2.4. Faktor pojačanja

Faktor pojačanja<sup>7</sup> (eng. *enhancement factor*, EF) definira se kao vrijednost pojačanja Ramanovog raspršenja kada je molekula adsorbirana na aktivni SERS supstrat. Vrijednost faktora pojačanja ovisi o korištenom SERS supstratu, izvoru pobudnog zračenja i molekuli analita, a vrijednosti faktora uglavnom se nalaze u rasponu  $10^3$ - $10^{14}$ . SERS faktor pojačanja izračunat je pomoću sljedeće jednadžbe:

$$EF = \frac{I_{SERS} c_{sol}}{I_{sol} c_{SERS}}$$

gdje  $I_{SERS}$  označava intenzitet vrpce u SERS spektru,  $I_{sol}$  intenzitet vrpce u Ramanovom spektru otopine modelne molekule, a  $c$  je koncentracija modelne molekule u otopini ( $c_{sol}$ ) ili koloidnoj suspenziji ( $c_{SERS}$ ).<sup>30</sup>

Za izračun faktora pojačanja pojedinih koloidnih suspenzija zlata kao SERS supstrata, korištena je modelna molekula **BPE** ( $c_{sol} = 1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) te je kao referentna vrpca odabrana intenzivna vrpca pri  $1614 \text{ cm}^{-1}$ .

Za koloid **AuNP** izračunati faktor pojačanja iznosi 1442,0, a za koloid **AuNP\_Ag** 2842,5. Dobivene vrijednosti faktora pojačanja upućuju na zaključak da su sintetizirani koloidi zlata učinkoviti SERS supstrati, no nedostatak ovih nemodificiranih koloida je nestabilnost tijekom vremena što rezultira bitno slabijom SERS učinkovitošću već nakon nekoliko dana od pripreve koloida.

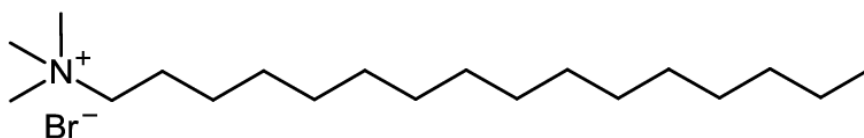
### 4.3. Modificirane koloidne suspenzije zlata

Nemodificirani koloidi, **AuNP** i **AuNP\_Ag**, pokazali su se kao učinkoviti SERS supstrati, ali nestabilni tijekom vremena. Može se zaključiti da molekule HEPES-a koje okružuju nanočestice zlata u ovim koloidima nisu dostatne za stabilizaciju nanočestica zlata tijekom dužeg vremenskog razdoblja. Kako bi se povećala stabilnost koloidnih suspenzija, u koloidne sustave se dodaju stabilizirajuće molekule čiji zadatak je sprječavanje agregacije i taloženja nanočestica. U ovom radu kao stabilizirajuće molekule korišteni su cetiltrimetilamonijev bromid i spermin.

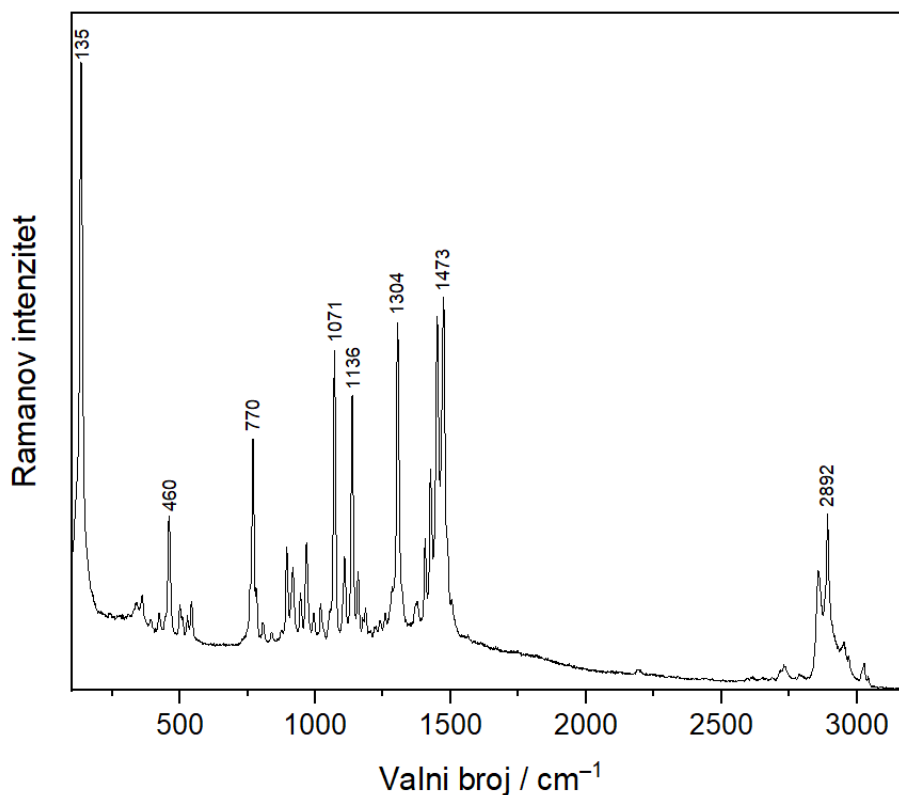
Sintetizirane su četiri modificirane koloidne suspenzije nanočestica zlata, **AuNP\_CTAB**, **AuNP\_Ag\_CTAB**, **AuNP\_spermin** i **AuNP\_Ag\_spermin**. Sinteza koloida provedena je na jednak način kao i sinteza nemodificiranih koloida, odnosno reakcijom tetraklorozlatne(III)

kiseline i pufera HEPES, uz dodatak molekula CTAB-a i spermina za dodatnu stabilizaciju nastalih koloidnih nanočestica zlata.

Cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) je kationski surfaktant čija je struktura prikazana na slici 23. Njegova uloga je stabilizacija nanočestice u koloidnim suspenzijama, odnosno sprječavanje agregacije nanočestica koje bi moglo rezultirati taloženjem.<sup>31</sup> Ramanov spektar krutine CTAB prikazan je na slici 24, a asignacija osnovnih vrpca dana je u tablici 6. Vrpca simetričnog istezanja C-H veze skupine CH<sub>3</sub> se javlja pri 2892 cm<sup>-1</sup>, dok je vrpca simetričnog istezanja C-H veze skupine CH<sub>2</sub> na 2857 cm<sup>-1</sup>. Najintenzivnije vrpce u spektru pripisane su deformaciji CH<sub>2</sub> skupina alifatskog lanca (1473 i 1450 cm<sup>-1</sup>) te uvijanju (1304 cm<sup>-1</sup>) i klaćenju CH<sub>2</sub> skupina (1136 i 1071 cm<sup>-1</sup>). Vrpce pri 1136 i 1071 cm<sup>-1</sup> imaju i doprinos antisimetričnog, odnosno simetričnog istezanja CC veze. Vibracijska vrpca pri 967 cm<sup>-1</sup> pripisana je zibanju CH<sub>2</sub> skupina, vrpca pri 895 cm<sup>-1</sup> zibanju CH<sub>3</sub> terminalne skupine, dok je vrpca pri 770 cm<sup>-1</sup> pripisana zibanju CH<sub>3</sub> skupina vezanih na dušikov atom.<sup>32</sup>



Slika 23. Struktura molekule CTAB



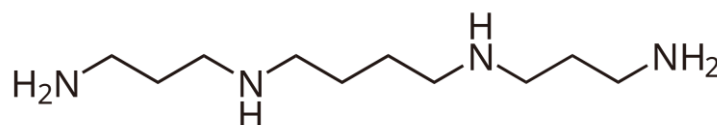
Slika 24. Ramanov spektar krutine CTAB snimljen pri snazi lasera od 159,5 mW

Tablica 6. Asignacija vrpce u Ramanovom spektru krutine CTAB

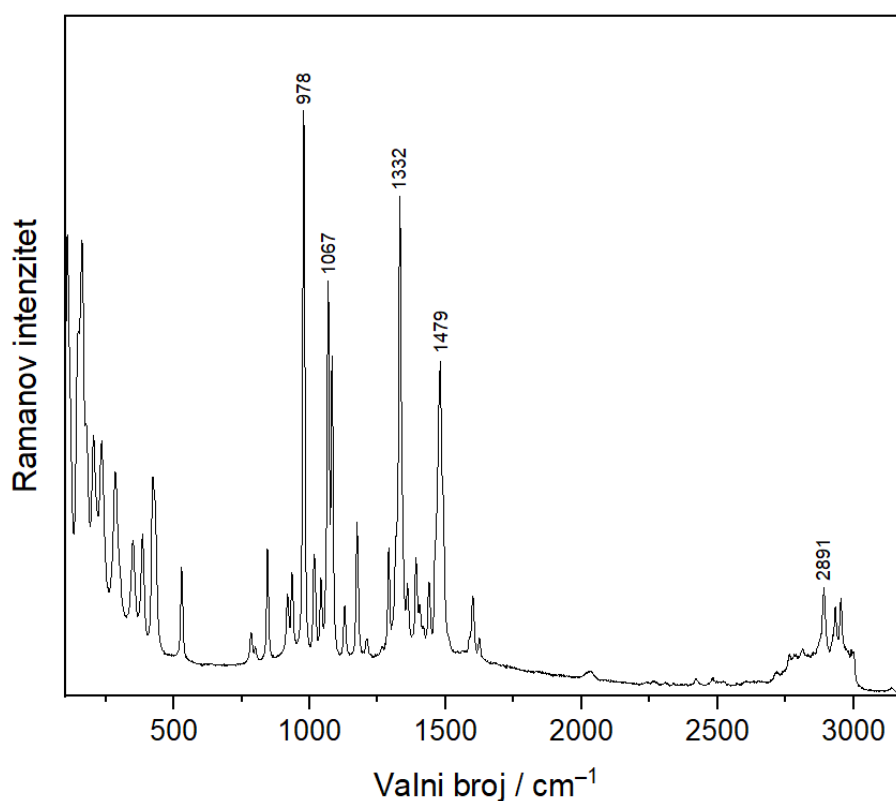
| Valni broj / $\text{cm}^{-1}$ | Vibracija <sup>32</sup>                                              |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 2892                          | $\nu_s \text{C-H (CH}_3\text{)}$                                     |
| 2857                          | $\nu_s \text{C-H (CH}_2\text{)}$                                     |
| 1473                          | $\delta \text{CH}_2$                                                 |
| 1450                          | $\delta \text{CH}_2$                                                 |
| 1304                          | $\delta_{\text{tw}} \text{CH}_2$                                     |
| 1136                          | $\nu_{\text{as}} \text{CC}, \delta_{\text{wg}} \text{CH}_2$          |
| 1071                          | $\nu_s \text{CC}, \delta_{\text{wg}} \text{CH}_2$                    |
| 967                           | $\delta_{\text{rc}} \text{CH}_2$                                     |
| 895                           | $\delta_{\text{rc}} \text{CH}_3$                                     |
| 770                           | $\delta_{\text{rc}} \text{CH}_3 \text{ (N}^+(\text{CH}_3)_3\text{)}$ |
| 460                           | $\nu \text{C-N}$                                                     |

Kratice:  $\nu$  = istežanje;  $\delta$  = deformacija; s = simetrično; as = antisimetrično; tw = uvijanje; wg = klaćenje; rc = zibanje.

Na slici 25 prikazana je struktura *N,N*-di-(3-aminopropil)butan-1,4-diamina (spermina) koji je korišten kao drugi stabilizirajući agens pri sintezi nanočestica zlata. Spermin je poliamin koji se između ostalog koristi za stabilizaciju nanočestica u koloidima srebra.<sup>33</sup> Snimljen je Ramanov spektar krutine spermina tetrahidroklorida (slika 26) te su asignirane osnovne vrpce (tablica 7). Vrpce najvećeg intenziteta pripisane su deformacijskim vibracijama CH<sub>2</sub> skupina, odnosno striženju (1479 cm<sup>-1</sup>), klaćenju (1332 cm<sup>-1</sup>) i uvijanju (1174 cm<sup>-1</sup>) te istezanju CC veze (1082 i 978 cm<sup>-1</sup>) i istezanju C-N veze (1067 cm<sup>-1</sup>).



Slika 25. Struktura spermina



Slika 26. Ramanov spektar krutine spermina tetrahidroklorida snimljen pri snazi lasera od 159,5 mW

Tablica 7. Asignacija vrpce u Ramanovom spektru krutine spermina tetrahidroklorida

| Valni broj / $\text{cm}^{-1}$ | Vibracija                        |
|-------------------------------|----------------------------------|
| 2891                          | $\nu$ C-H ( $\text{CH}_2$ )      |
| 1479                          | $\delta_{\text{sc}} \text{CH}_2$ |
| 1332                          | $\delta_{\text{wg}} \text{CH}_2$ |
| 1174                          | $\delta_{\text{tw}} \text{CH}_2$ |
| 1082                          | $\nu$ C-C                        |
| 1067                          | $\nu$ C-N                        |
| 978                           | $\nu$ C-C                        |

Kratice:  $\nu$  = istežanje;  $\delta$  = deformacija;  $\text{tw}$  = uvijanje;  $\text{wg}$  = klaćenje;  $\text{sc}$  = striženje.

#### 4.3.1. Karakterizacija modificiranih koloidnih suspenzija zlata

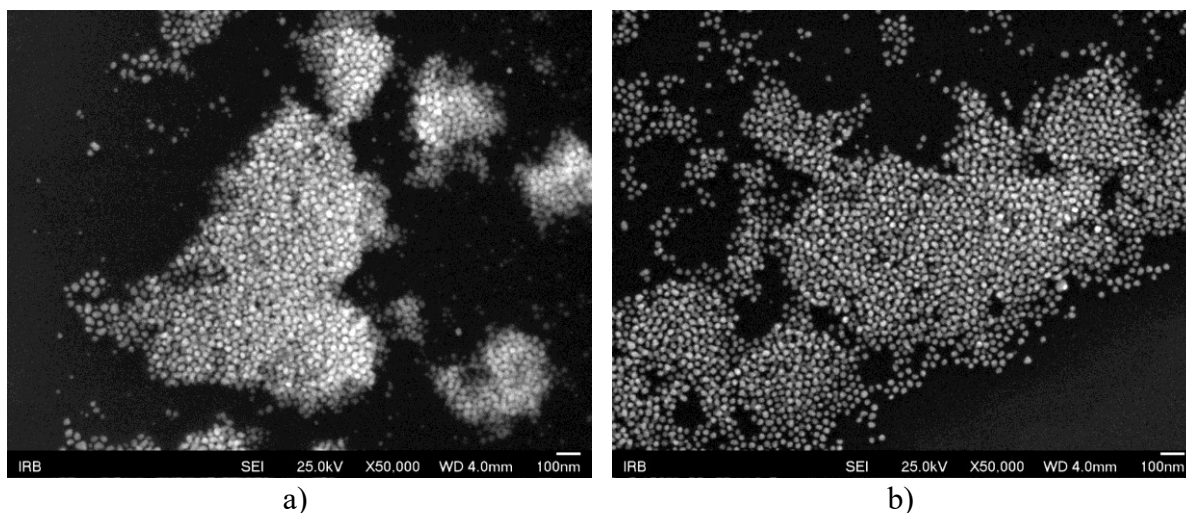
Svim pripremljenim modificiranim koloidnim suspenzijama nanočestica zlata snimljeni su Ramanovi spektri korištenjem pobudnog zračenja pri 785 nm, UV/Vis apsorpcijski spektri te je koloidima izmjerena pH vrijednost. U tablici 8 navedene su pH vrijednosti modificiranih koloida zlata te izmjerene valne duljine maksimuma apsorpcije zračenja. Kako bi dobili detaljniji uvid u morfologiju nanočestica nakon dodatka stabilizirajućih molekula, snimljene su slike pretražnim elektronskim mikroskopom svake koloidne suspenzije.

Tablica 8. Izmjerene pH vrijednosti i valne duljine maksimuma apsorpcije zračenja modificiranih koloida zlata

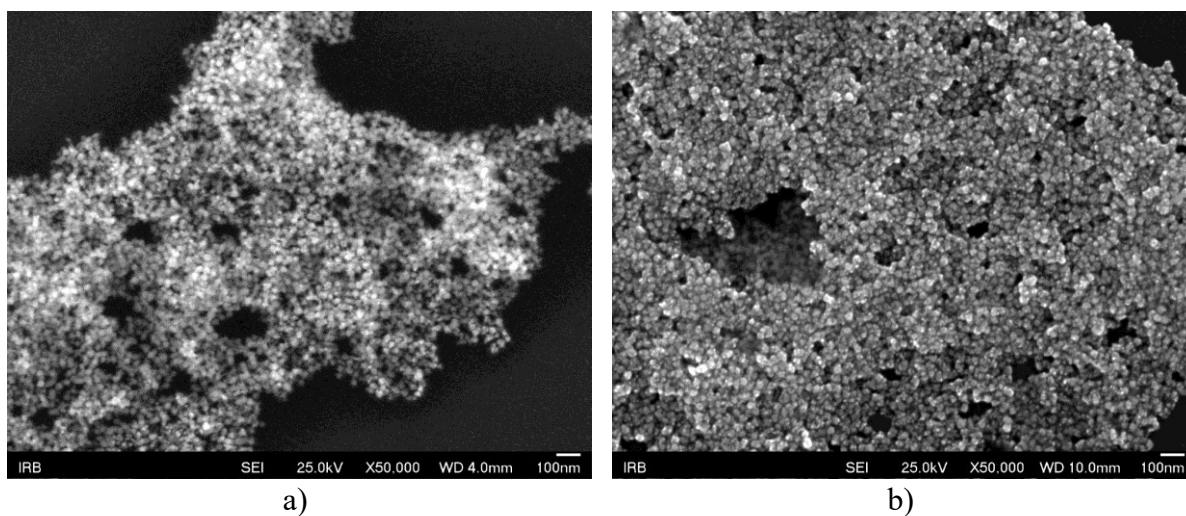
| Koloid                 | pH vrijednost | $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ |
|------------------------|---------------|------------------------------------|
| <b>AuNP_CTAB</b>       | 7,32          | 543                                |
| <b>AuNP_Ag_CTAB</b>    | 7,31          | 556                                |
| <b>AuNP_spermin</b>    | 7,27          | 643                                |
| <b>AuNP_Ag_spermin</b> | 7,27          | 634                                |

Dobivene vrijednosti apsorpcijskih maksimuma u UV/Vis spektrima ( $\sim 550 \text{ nm}$ ) za koloidne sustave u kojima je dodan CTAB kao stabilizator nanočestica upućuju na nastanak sferičnih nanočestica, što je u skladu s literaturom<sup>28</sup> i SEM slikama dobivenim za koloidne **AuNP\_CTAB**

i **AuNP\_Ag\_CTAB** (slika 27). Kada se tijekom sinteze koloida doda spermin (koloidi **AuNP\_spermin** i **AuNP\_Ag\_spermin**) nastaju nanočestice nepravilnog „razgranatog“ oblika (slika 28) što je u skladu s valnim duljinama apsorpcijskog maksimuma prikazanih u tablici 8.



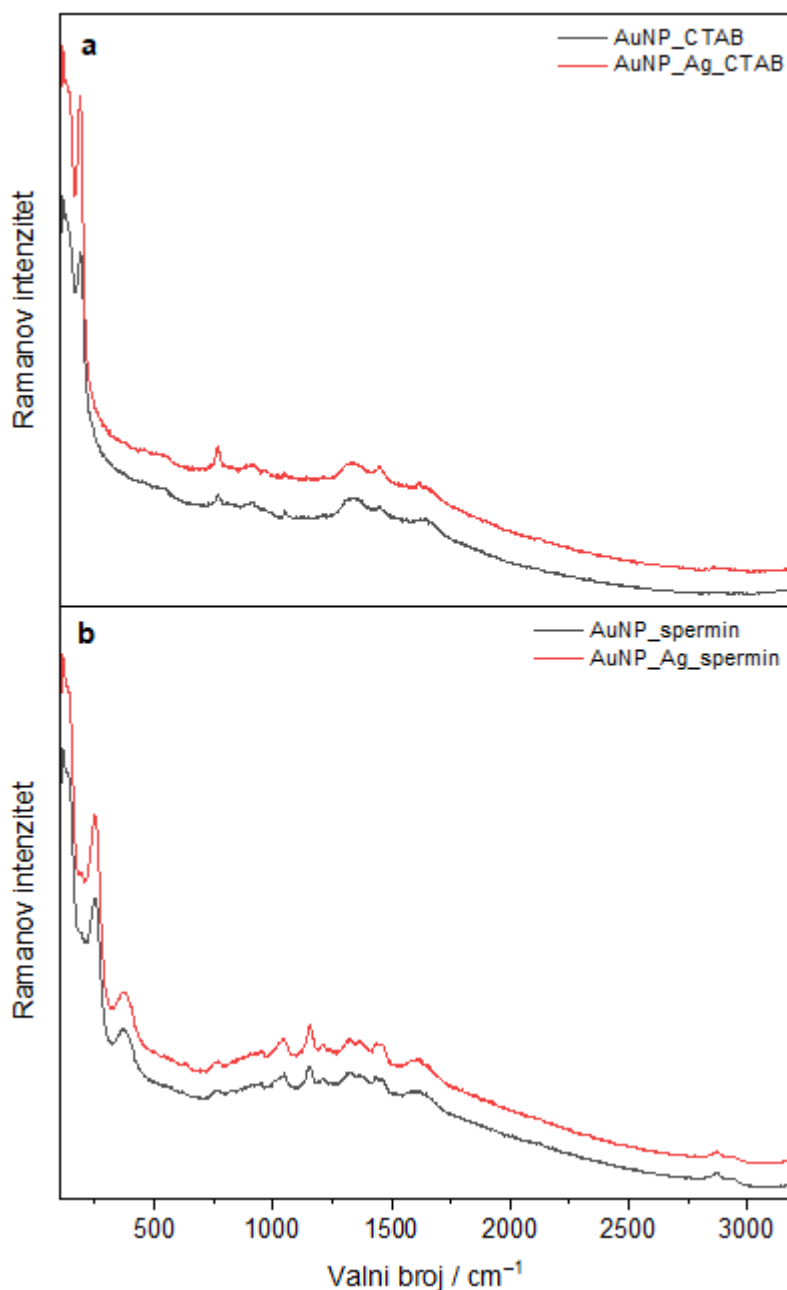
Slika 27. SEM slike koloida: a) **AuNP\_CTAB** i b) **AuNP\_Ag\_CTAB**



Slika 28. SEM slike koloida a) **AuNP\_spermin** i b) **AuNP\_Ag\_spermin**

Ramanovi spektri modificiranih koloidnih nanočestica zlata prikazani su na slici 29. Kod koloida **AuNP\_CTAB** prisutna je vrpca pri  $1052\text{ cm}^{-1}$  koja odgovara istezanju sulfonatne skupine HEPES-a te vrpca pri  $769\text{ cm}^{-1}$  koja potječe od molekule CTAB-a, a rezultat je deformacije zibanja  $\text{CH}_3$  skupina vezanih na dušikov atom. Spomenute vrpce prisutne su i kod koloida s dodatkom srebrovog nitrata, **AuNP\_Ag\_CTAB** gdje je još dodatno pojačana vrpca

pri  $1448\text{ cm}^{-1}$  koja se pripisuje deformaciji  $\text{CH}_2$  skupina alifatskog lanca molekule CTAB. U Ramanovim spektrima koloida **AuNP\_spermin** i **AuNP\_Ag\_spermin** uočene su vrpce koje potječu od istežanja sulfonatne skupine iz molekule HEPES ( $1049\text{ cm}^{-1}$ ) te od deformacije  $\text{CH}_2$  skupina spermina ( $1155\text{ cm}^{-1}$ ). Uočene vrpce molekula CTAB-a i spermina u spektrima koloida upućuju na uspješno vezanje molekula stabilizatora na nanočestice zlata.



Slika 29. Ramanovi spektri modificiranih koloida zlata: a) **AuNP\_CTAB** i **AuNP\_Ag\_CTAB** i b) **AuNP\_spermin** i **AuNP\_Ag\_spermin** snimljeni pri snazi lasera od  $319\text{ mW}$

#### 4.3.2. SERS učinkovitost modificiranih koloidnih suspenzija zlata

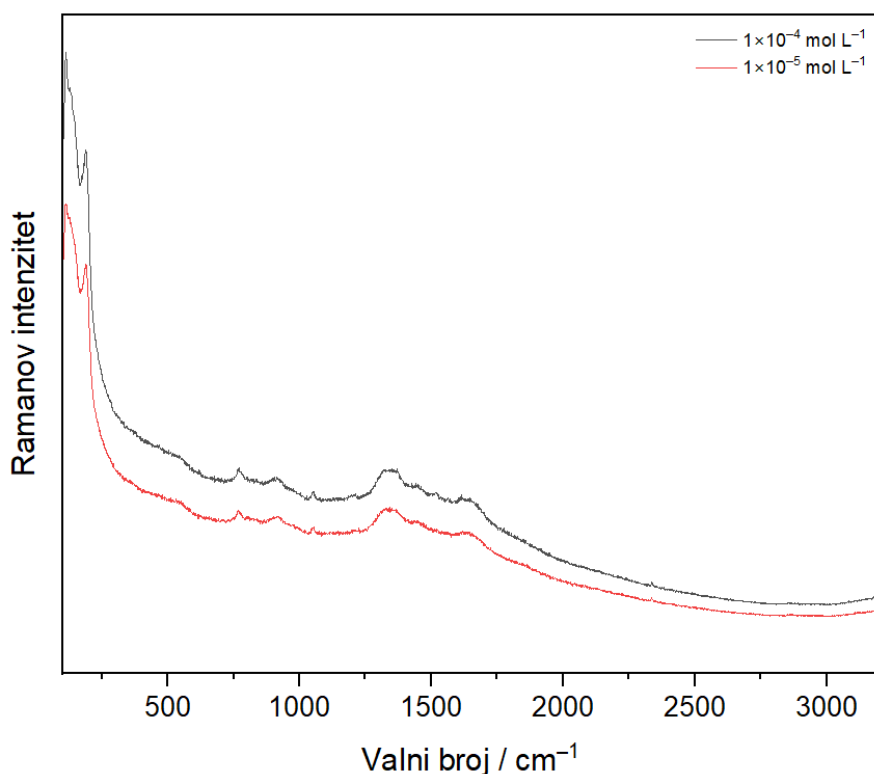
Snimljeni su koncentracijski ovisni SERS spektri modelnih molekula, **R6G** i **BPE**, u modificiranim koloidnim suspenzijama zlata, **AuNP\_CTAB**, **AuNP\_Ag\_CTAB**, **AuNP\_spermin** i **AuNP\_Ag\_spermin**, kako bi se odredila učinkovitost pripremljenih koloida kao aktivnih SERS supstrata.

Koncentracijski ovisni SERS spektri **R6G** u koloidu **AuNP\_CTAB** snimljeni su za koncentracije **R6G**  $1 \times 10^{-4}$  i  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> (slika 30). U spektrima nisu uočene vrpce karakteristične za vibracijske modove molekule **R6G**, već dobiveni spektri odgovaraju Ramanovom spektru samog koloida **AuNP\_CTAB**. Pretpostavlja se da je razlog tome elektrostatsko odbijanje između pozitivno nabijene modelne molekule i pozitivno nabijene molekule CTAB-a te sterička smetanja lanca molekule CTAB-a koji onemogućava približavanje molekula rodamina 6G površini nanočestica zlata.

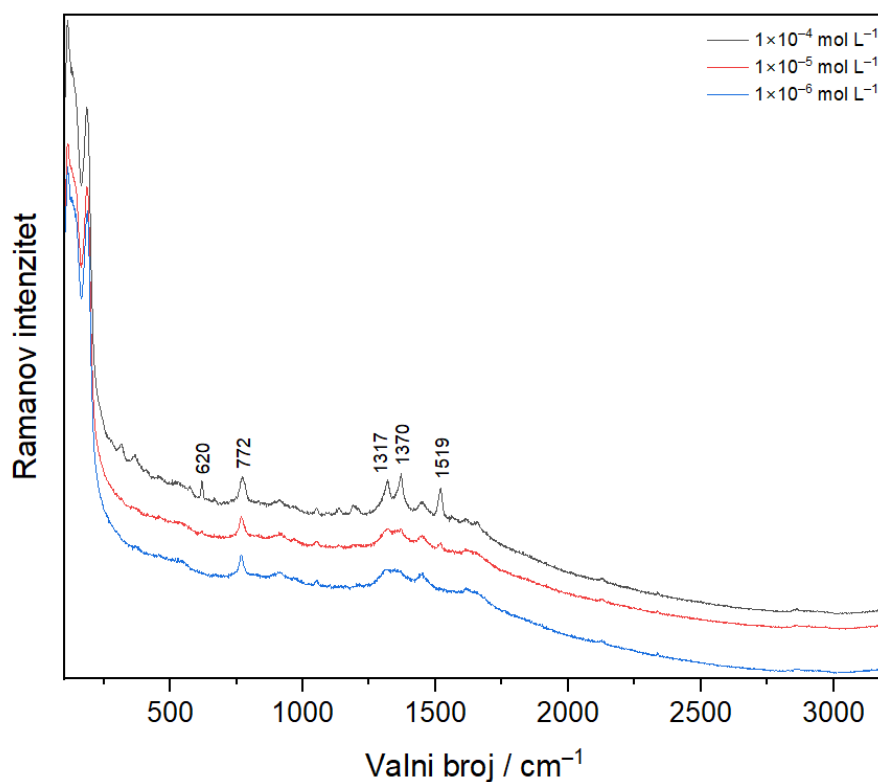
Koncentracijski ovisni SERS spektri **R6G** u koloidu **AuNP\_Ag\_CTAB** snimljeni su u koncentracijskom području  $1 \times 10^{-6}$ – $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> i prikazani su na slici 31. U dobivenim spektrima uočavaju se vrpce karakteristične za vibracije molekule **R6G**, ali su znatno manjeg intenziteta nego vrpce u spektrima dobivenim korištenjem nemodificiranog koloida zlata **AuNP\_Ag** (slika 14). Asignacija opaženih vrpce u spektru **R6G** koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> prikazana je u tablici 9. Vibracijske vrpce koje odgovaraju aromatskom istezanju CC veze u ksantenskom prstenu nalaze se pri 1660 i 1519 cm<sup>-1</sup>, dok se vrpce koje potječu od istezanja C-N veze između ugljikovog atoma ksantena i dušikovog atoma etilamino skupine nalaze pri 1370 i 1317 cm<sup>-1</sup>. Također, uočene su vrpce koje su pripisane deformaciji u ravnini aromatskih CH skupina (1190 cm<sup>-1</sup>) te deformaciji u ravnini aromatskog prstena (620 cm<sup>-1</sup>). Prilično intenzivna vrpca pri 772 cm<sup>-1</sup> potječe od deformacije zibanja CH<sub>3</sub> skupina iz molekule CTAB. U SERS spektru **R6G** koncentracije  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> uočene su dvije vrpce vrlo slabog intenziteta koje potječu od vibracija molekule **R6G** te je ta koncentracija određena kao granica detekcije za **R6G** u koloidu zlata **AuNP\_Ag\_CTAB**. Pretpostavlja se da, kada se koristi CTAB kao stabilizirajuća molekula, nanočestice zlata dobivene uključivanjem iona srebra u sintezu su učinkovitiji SERS supstrat za detekciju rodamina 6G, u odnosu na izvorno pripremljene nanočestice. Uključivanjem AgNO<sub>3</sub> u proces sinteze vrlo vjerojatno nastaju nanočestice optimalnije morfologije koje učinkovitije pojačavaju neelastično raspršenje.

U koloidima zlata **AuNP\_spermin** i **AuNP\_Ag\_spermin** snimljeni su koncentracijski ovisni SERS spektri **R6G** za koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  i  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> (slike 32 i 33). U dobivenim

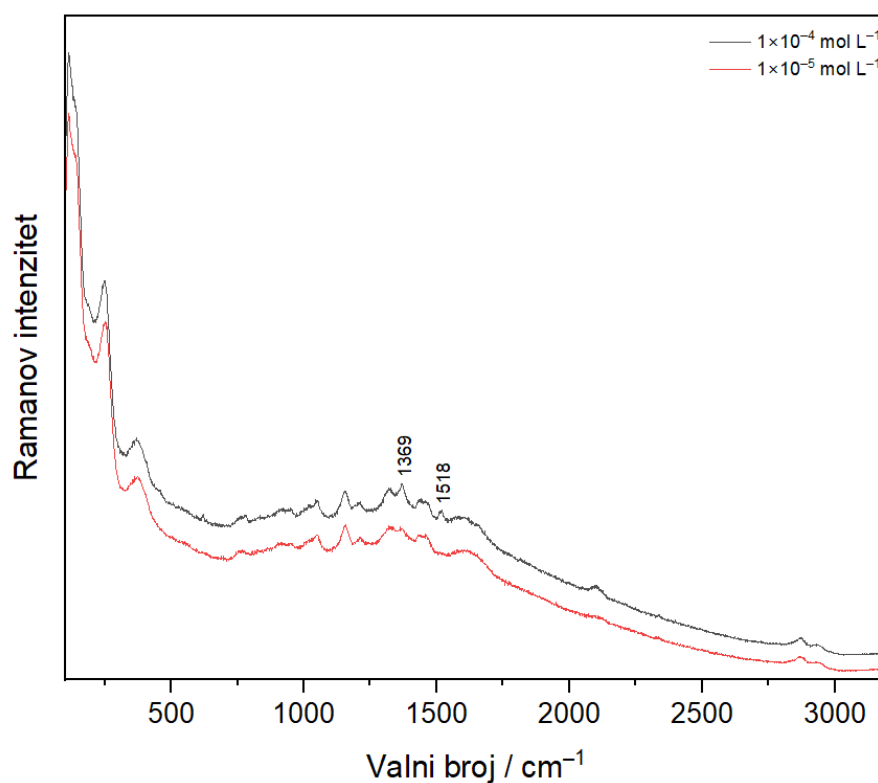
SERS spektrima uočene su vrpce vrlo slabog intenziteta, koje odgovaraju vibraciji molekule **R6G**, samo za najveću koncentraciju **R6G**,  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , te je asignacija tih vrpce prikazana u tablici 9. Spektri snimljeni u oba koloida zlata, **AuNP\_spermin** i **AuNP\_Ag\_spermin**, pokazuju prisutnost vrpce **R6G** koje odgovaraju istezanju CC veze u aromatskom ksantenskom prstenu ( $1518 \text{ cm}^{-1}$ ), istezanju C-N veze između ugljikovog atoma ksantena i dušikovog atoma etilamino skupine ( $1370 \text{ cm}^{-1}$ ) te deformaciji aromatskog prstena ( $619 \text{ cm}^{-1}$ ). Također, u spektrima se uočavaju vrpce koje potječu od pufera HEPES ( $1050 \text{ cm}^{-1}$ ) te vrpce koje odgovaraju deformaciji  $\text{CH}_2$  skupina iz molekule spermina ( $1154 \text{ cm}^{-1}$ ). Slabo pojačanje raspršenja **R6G** u ovim koloidima vrlo vjerojatno je posljedica elektrostatskog odbijanja između pozitivnog naboja molekule **R6G** i pozitivnog naboja spermina<sup>34</sup> zbog čega se modelna molekula ne može dovoljno približiti metalnoj površini. Granica detekcije **R6G** u koloidnim suspenzijama zlata **AuNP\_spermin** i **AuNP\_Ag\_spermin** iznosi  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Spektri niže koncentracije **R6G**  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  odgovaraju Ramanovim spektrima korištenih koloida zlata.



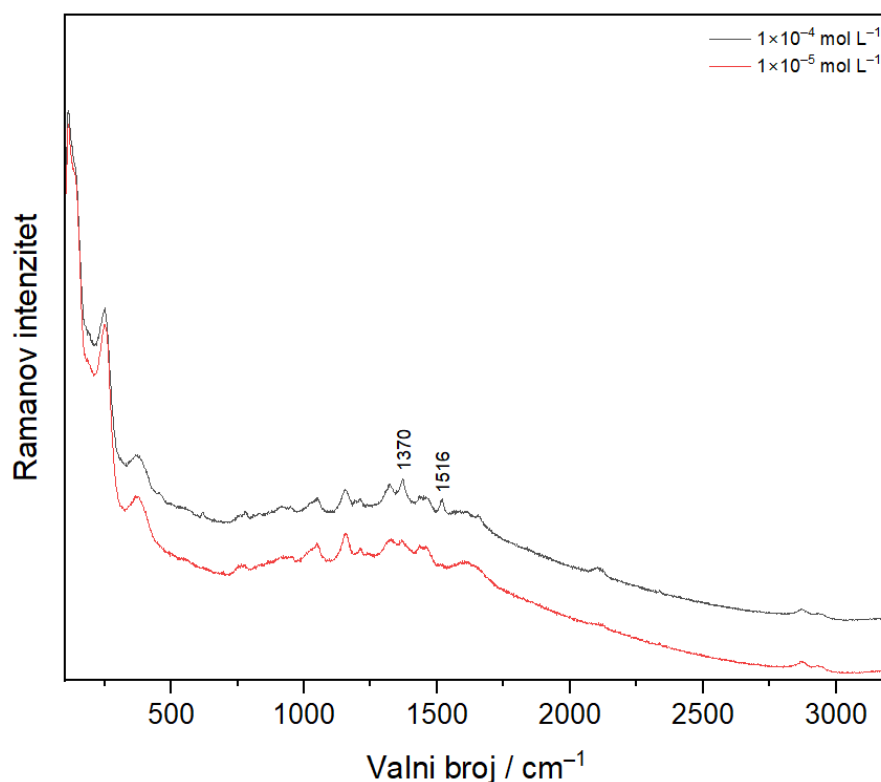
Slika 30. Koncentracijski ovisni SERS spektri **R6G** snimljeni u koloidu **AuNP\_CTAB** pri snazi lasera od 319 mW



Slika 31. Koncentracijski ovisni SERS spektri **R6G** snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag\_CTAB** pri snazi lasera od 319 mW



Slika 32. Koncentracijski ovisni SERS spektri **R6G** snimljeni u koloidu **AuNP\_spermin** pri snazi lasera od 319 mW



Slika 33. Koncentracijski ovisni SERS spektri **R6G** snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag\_spermin** pri snazi lasera od 319 mW

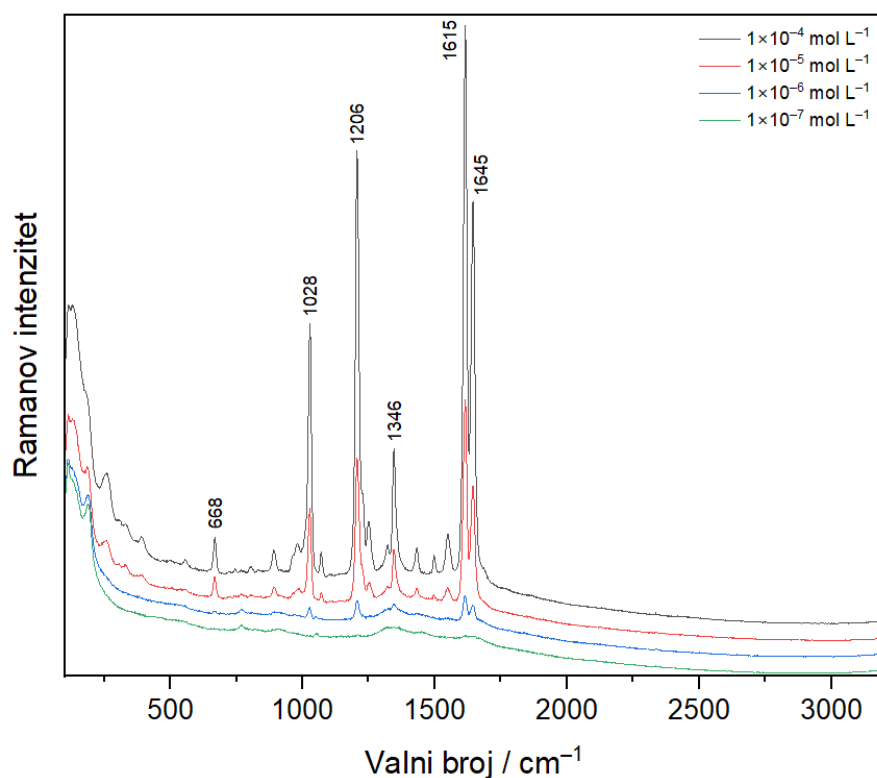
Tablica 9. Asignacija vrpci u SERS spektrima **R6G** koncentracije  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  u koloidima zlata **AuNP\_Ag\_CTAB**, **AuNP\_spermin** i **AuNP\_Ag\_spermin**

| Valni broj / $\text{cm}^{-1}$ |                     |                        | Vibracija <sup>17,21</sup>         |
|-------------------------------|---------------------|------------------------|------------------------------------|
| <b>AuNP_Ag_CTAB</b>           | <b>AuNP_spermin</b> | <b>AuNP_Ag_spermin</b> |                                    |
| 1660                          |                     |                        | $\nu \text{ CC}$                   |
| 1519                          | 1518                | 1516                   | $\nu \text{ CC}$                   |
| 1370                          | 1369                | 1370                   | $\nu \text{ CC}, \nu \text{ C-N}$  |
| 1317                          |                     |                        | $\nu \text{ CC}, \nu \text{ C-N}$  |
| 1190                          |                     |                        | $\delta_{\text{ip}} \text{ CH}$    |
|                               | 1154                | 1153                   | $\delta \text{ CH}_2$              |
| 1050                          | 1051                | 1051                   | $\nu_{\text{s}} (\text{SO}_3^-)$   |
| 772                           |                     |                        | $\delta_{\text{re}} \text{ CH}_3$  |
| 620                           | 619                 | 619                    | $\delta_{\text{ip}} \text{ C-C-C}$ |

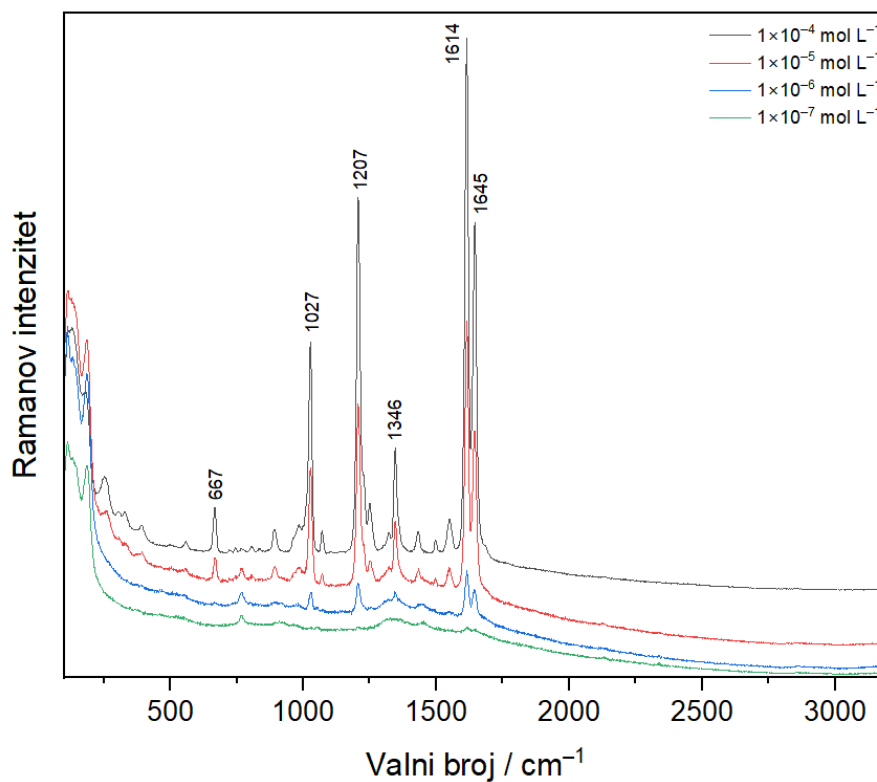
Kratice:  $\nu$  = istezanje;  $\delta$  = deformacija; ip = u ravni; s = simetrično; re = zibanje.

Koncentracijski ovisni SERS spektri modelne molekule **BPE** u koloidima zlata **AuNP\_CTAB** i **AuNP\_Ag\_CTAB** snimljeni su u koncentracijskom području  $1 \times 10^{-7}$ – $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> (slike 34 i 35). Dobiveni spektri pokazuju vrlo intenzivne vrpce koje odgovaraju vibracijama molekule **BPE** čija asignacija je prikazana u tablici 10. Najintenzivnije vrpce u spektrima pripisane su vibraciji istezanja CC veze u prstenu piridina i deformaciji u ravnini CH skupina ( $1615\text{ cm}^{-1}$ ) te istezanju CC veze između piridinskog prstena i etilena te deformaciji u ravnini C-N veze ( $1206\text{ cm}^{-1}$ ). Vrlo intenzivnoj vrpci pri  $1645\text{ cm}^{-1}$  doprinosi istezanja C=C veze etilena, dok su vrpce pri  $1028$  i  $668\text{ cm}^{-1}$  rezultat deformacije u ravnini piridinskog prstena. Vrpca srednjeg intenziteta pri  $1346\text{ cm}^{-1}$  pripisana je deformaciji u ravnini CH skupina prstena piridina. Smanjenje koncentracije molekula **BPE** u modificiranim koloidima zlata rezultira slabljenjem intenziteta vrpce spoja u dobivenim spektrima. Najmanja koncentracija modelne molekule **BPE** koja je detektirana u koloidnoj suspenziji zlata **AuNP\_CTAB** iznosi  $1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Za supstrat **AuNP\_Ag\_CTAB** dobivena je ista granica detekcije, ali za mjerenja u ovom supstratu je korišten laser pobudnog zračenja dvostruko manje snage, nego za sva ostala mjerenja koloida s CTAB-om, iz čega proizlazi da je **AuNP\_Ag\_CTAB** vrlo učinkovit supstrat za detekciju molekula **BPE** SERS spektroskopijom.

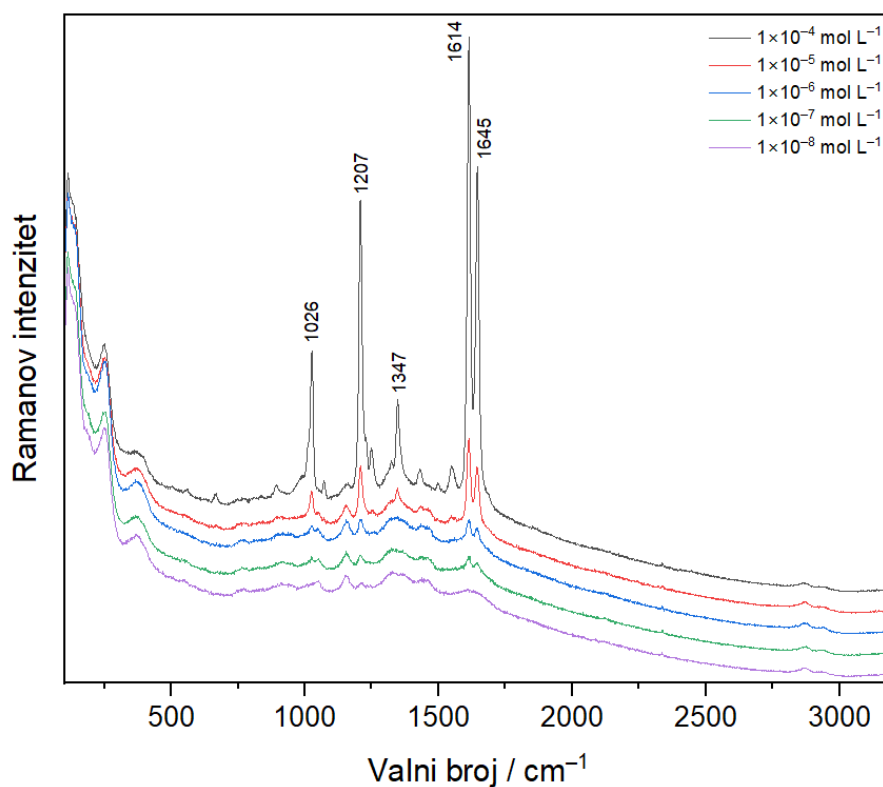
Koncentracijski ovisni SERS spektri molekule **BPE** snimljeni su u koncentracijskom području  $1 \times 10^{-8}$ – $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> u koloidu **AuNP\_spermin** (slika 36) te u koncentracijskom području  $1 \times 10^{-7}$ – $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> u koloidu **AuNP\_Ag\_spermin** (slika 37). Assignacija opaženih vrpce u spektrima **BPE** koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> prikazana je u tablici 10. Vibracijskim vrpčama najvećeg intenziteta doprinosi istezanje C=C veze etilena ( $1645\text{ cm}^{-1}$ ), istezanje C-C veze u piridinskom prstenu i deformacija u ravnini CH skupina ( $1614\text{ cm}^{-1}$ ), deformacija u ravnini C-N veze i istezanje CC veze između prstena piridina i etilena ( $1207\text{ cm}^{-1}$ ) te deformacija u ravnini piridinskog prstena ( $1026\text{ cm}^{-1}$ ). Srednje intenzivne vrpce pri  $1347\text{ cm}^{-1}$  pripisane su deformaciji u ravnini CH skupina piridinskog prstena. Granica detekcije modelne molekule **BPE** u koloidu zlata **AuNP\_spermin** iznosi  $1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, dok u koloidu **AuNP\_Ag\_spermin** iznosi  $1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>.



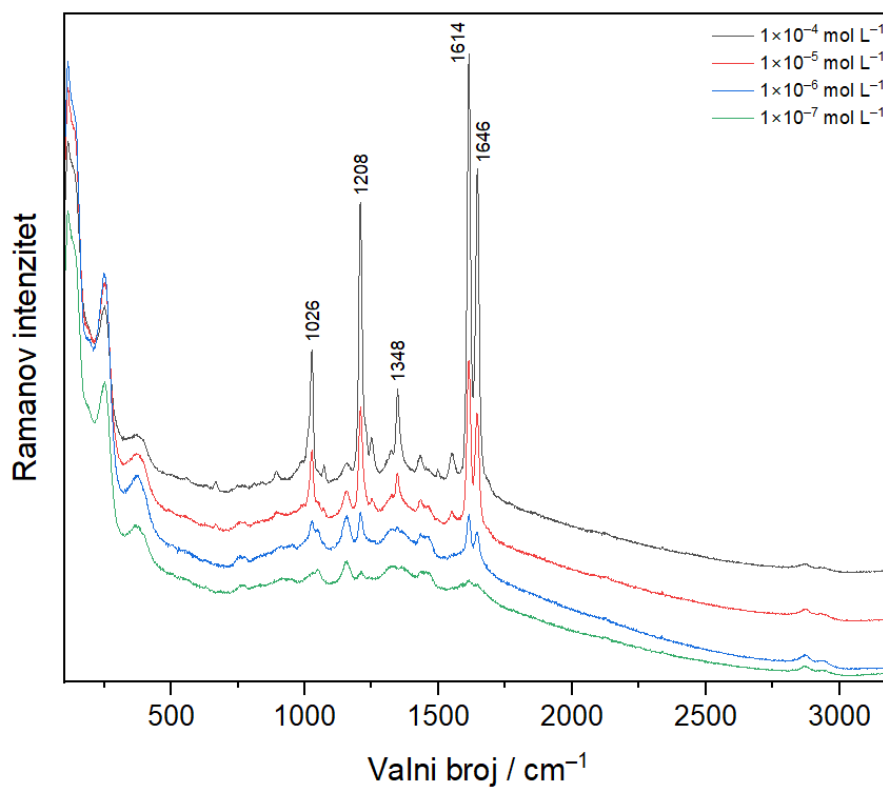
Slika 34. Koncentracijski ovisni SERS spektri **BPE** snimljeni u koloidu **AuNP\_CTAB** pri snazi lasera od 319 mW



Slika 35. Koncentracijski ovisni SERS spektri **BPE** snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag\_CTAB** pri snazi lasera od 159,5 mW



Slika 36. Koncentracijski ovisni SERS spektri **BPE** snimljeni u koloidu **AuNP\_spermin** pri snazi lasera od 319 mW



Slika 37. Koncentracijski ovisni SERS spektri **BPE** snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag\_spermin** pri snazi lasera od 319 mW

Tablica 10. Asignacija vrpce u SERS spektrima **BPE** koncentracije  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  u modificiranim koloidima zlata

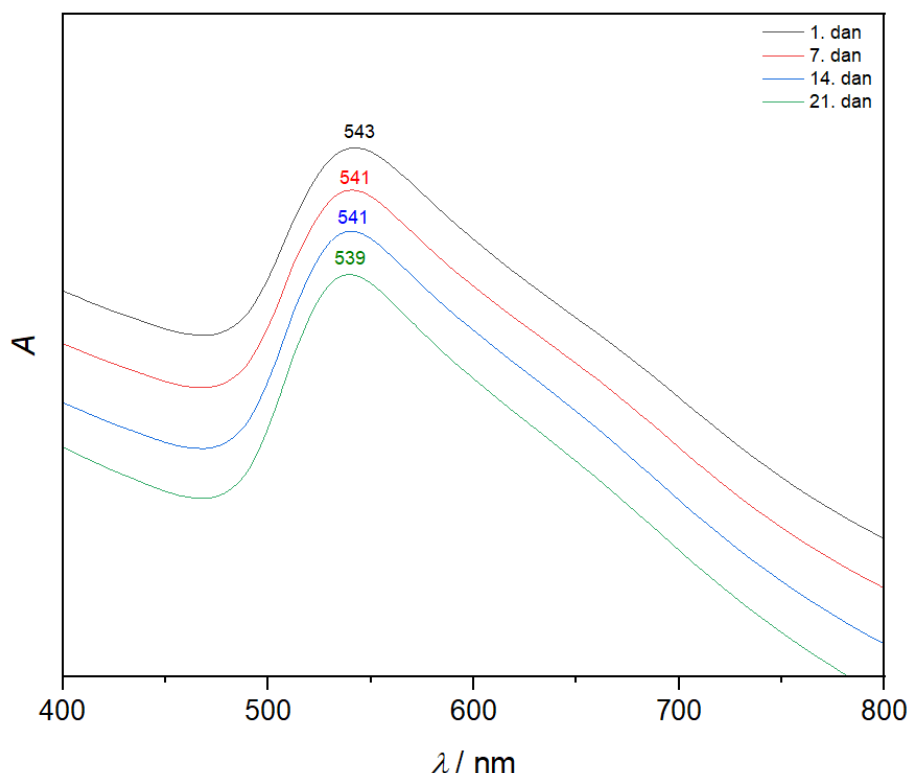
| Valni broj / $\text{cm}^{-1}$ |              |              |                 | Vibracija <sup>20,22,23</sup>                                                                  |
|-------------------------------|--------------|--------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AuNP_CTAB                     | AuNP_Ag_CTAB | AuNP_spermin | AuNP_Ag_spermin |                                                                                                |
| 1645                          | 1645         | 1645         | 1646            | $\nu (\text{C}=\text{C})_{\text{e}}$                                                           |
| 1615                          | 1614         | 1614         | 1614            | $\nu (\text{C}-\text{C})_{\text{p}}, \delta_{\text{ip}} \text{CH}$                             |
| 1550                          | 1550         | 1550         | 1550            | $\nu \text{C}-\text{N}, \delta_{\text{ip}} \text{prsten}$                                      |
| 1498                          | 1498         | 1498         | 1498            | $\delta_{\text{ip}} (\text{CH})_{\text{p}}, \nu \text{C}-\text{N},$<br>$\nu \text{C}-\text{C}$ |
| 1432                          | 1433         | 1431         | 1432            | $\delta_{\text{ip}} (\text{CH})_{\text{p}},$<br>$\nu (\text{C}-\text{C})_{\text{p}}$           |
| 1346                          | 1346         | 1347         | 1348            | $\delta_{\text{ip}} \text{CH}$                                                                 |
| 1321                          | 1320         | 1322         | 1323            | $\delta_{\text{ip}} (\text{C}=\text{C})_{\text{e}}$                                            |
| 1251                          | 1251         | 1250         | 1251            | $\delta_{\text{ip}} (\text{CH})_{\text{p}},$<br>$\nu (\text{C}-\text{C})_{\text{p}}$           |
| 1206                          | 1207         | 1207         | 1208            | $\delta_{\text{ip}} \text{C}-\text{N},$<br>$\nu \text{C}_{\text{prsten}}-\text{C}_{\text{e}}$  |
| 1028                          | 1027         | 1026         | 1026            | $\delta_{\text{ip}} \text{prsten}$                                                             |
| 891                           | 892          | 892          | 893             | $\delta_{\text{oop}} \text{CH},$<br>$\delta_{\text{oop}} (\text{C}=\text{C})_{\text{e}}$       |
| 668                           | 667          | 666          | 667             | $\delta_{\text{ip}} \text{prsten}$                                                             |

Kratice:  $\nu$  = istezanje;  $\delta$  = deformacija; ip = u ravni; oop = izvan ravnine; e = etilen; p = piridin.

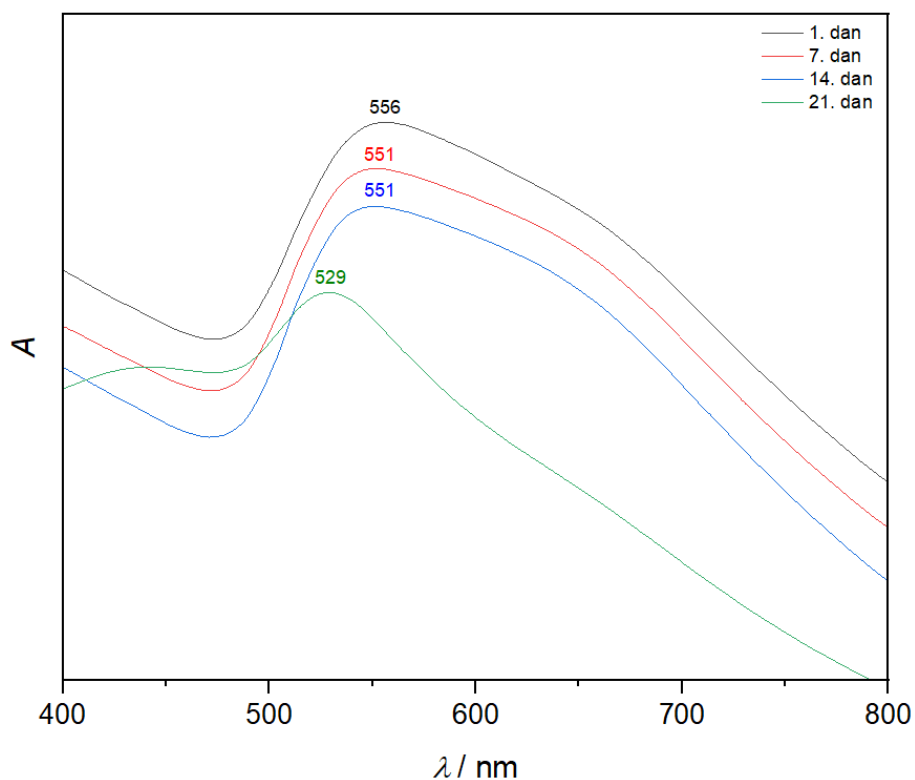
#### 4.3.3. Vremenska stabilnost modificiranih koloidnih suspenzija zlata

Kako bi se istražila vremenska stabilnost modificiranih koloidnih suspenzija zlata, **AuNP\_CTAB**, **AuNP\_Ag\_CTAB**, **AuNP\_spermin** i **AuNP\_Ag\_spermin**, snimljeni su vremenski ovisni UV/Vis i Ramanovi spektri pripremljenih koloida zlata te vremenski ovisni SERS spektri modelne molekule **BPE** koncentracije  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Svi vremenski ovisni spektri snimani su prvog, sedmog, četrnaestog te dvadeset prvog dana, računavši od dana pripreme koloida.

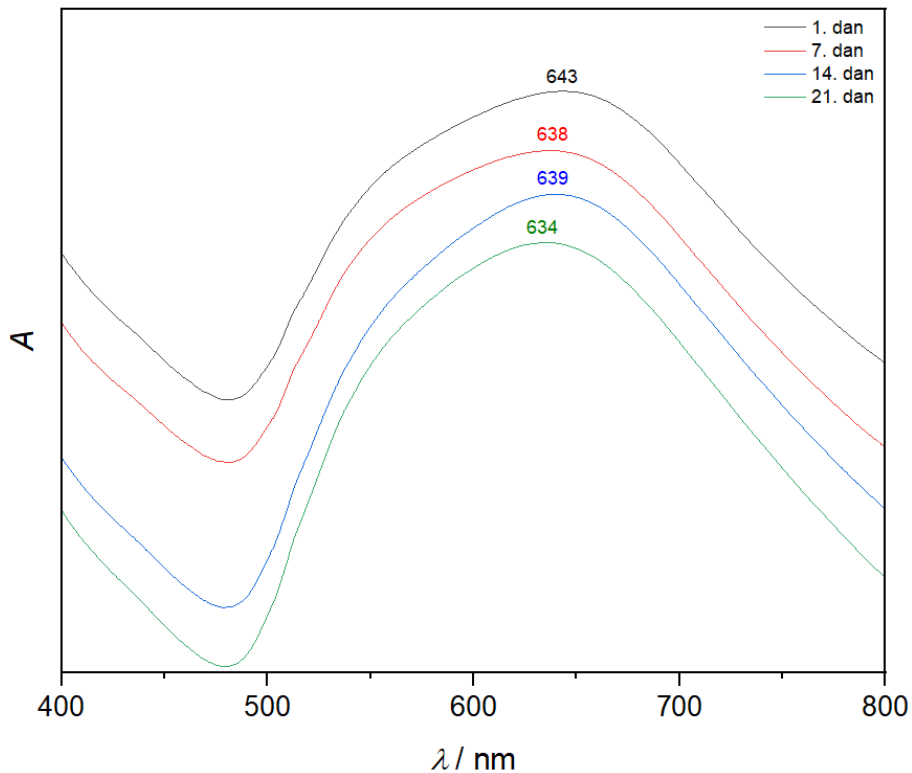
Vremenski ovisni UV/Vis apsorpcijski spektri koloida zlata **AuNP\_CTAB** (slika 38) pokazuju da tijekom vremena ne dolazi do značajne promjene u valnoj duljini apsorpcijskog maksimuma, dok je iz spektara koloida **AuNP\_Ag\_CTAB** (slika 39) vidljivo kako tijekom prva tri snimanja također nema veće promjene u položaju maksimuma apsorpcije, ali je dvadeset prvog dana došlo do većeg pomaka apsorpcijskog maksimuma prema nižoj vrijednosti valne duljine. Iz vremenski ovisnih UV/Vis spektara koloida **AuNP\_spermin** (slika 40), može se uočiti da je starenjem koloida došlo do promjene položaja apsorpcijskog maksimuma i zamijećen je plavi pomak od 9 nm. Vremenski ovisni UV/Vis spektri koloida **AuNP\_Ag\_spermin** (slika 41), pokazuju kako je tijekom vremena došlo do značajnije promjene položaja valne duljine maksimuma apsorpcije, pri čemu razlika između prvog i dvadeset prvog dana snimanja iznosi 118 nm. Iz opisanog se može zaključiti da, u odabranim eksperimentalnim uvjetima, cetiltrimetilamonijev bromid uspješno stabilizira promatrane nanočestice zlata kroz duži vremenski period, dok korištenje spermina kao stabilizatora rezultira taloženjem nanočestica nakon nekoliko dana od priprave koloida.



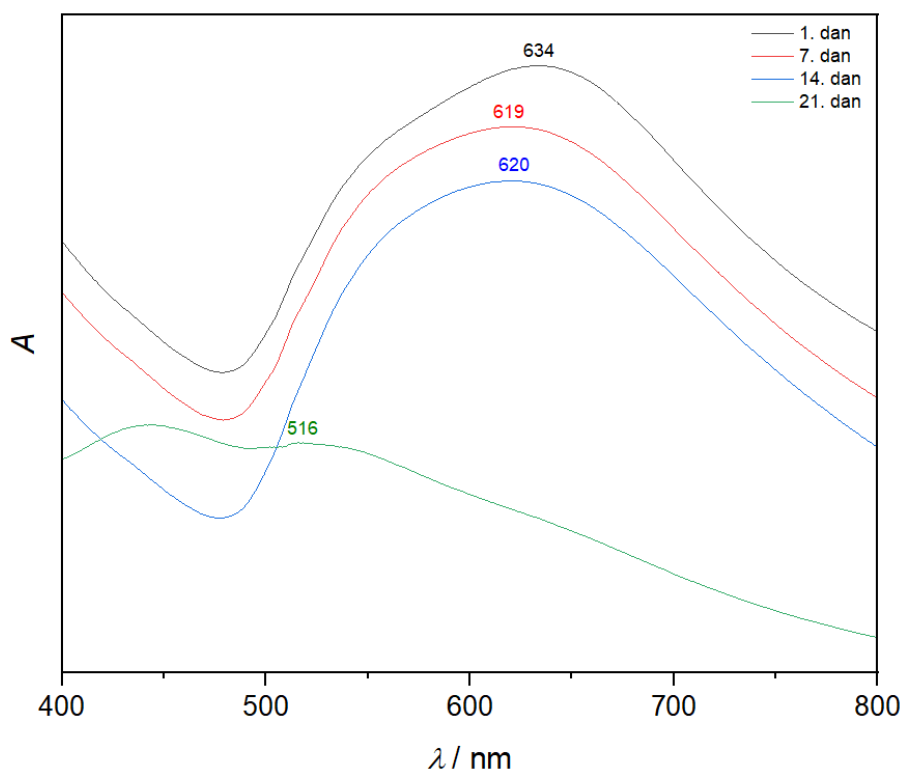
Slika 38. Vremenski ovisni UV/Vis apsorpcijski spektri koloidne suspenzije zlata **AuNP\_CTAB** snimljeni u rasponu valnih duljina od 400 do 800 nm



Slika 39. Vremenski ovisni UV/Vis apsorpcijski spektri koloidne suspenzije zlata **AuNP\_Ag\_CTAB** snimljeni u rasponu valnih duljina od 400 do 800 nm

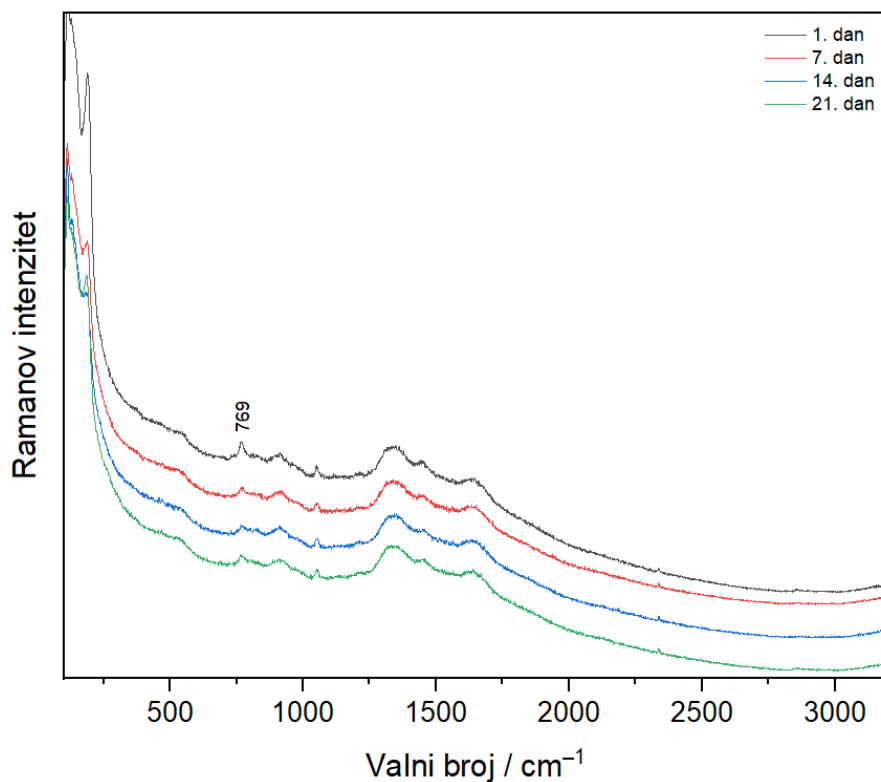


Slika 40. Vremenski ovisni UV/Vis apsorpcijski spektri koloidne suspenzije zlata **AuNP\_spermin** snimljeni u rasponu valnih duljina od 400 do 800 nm

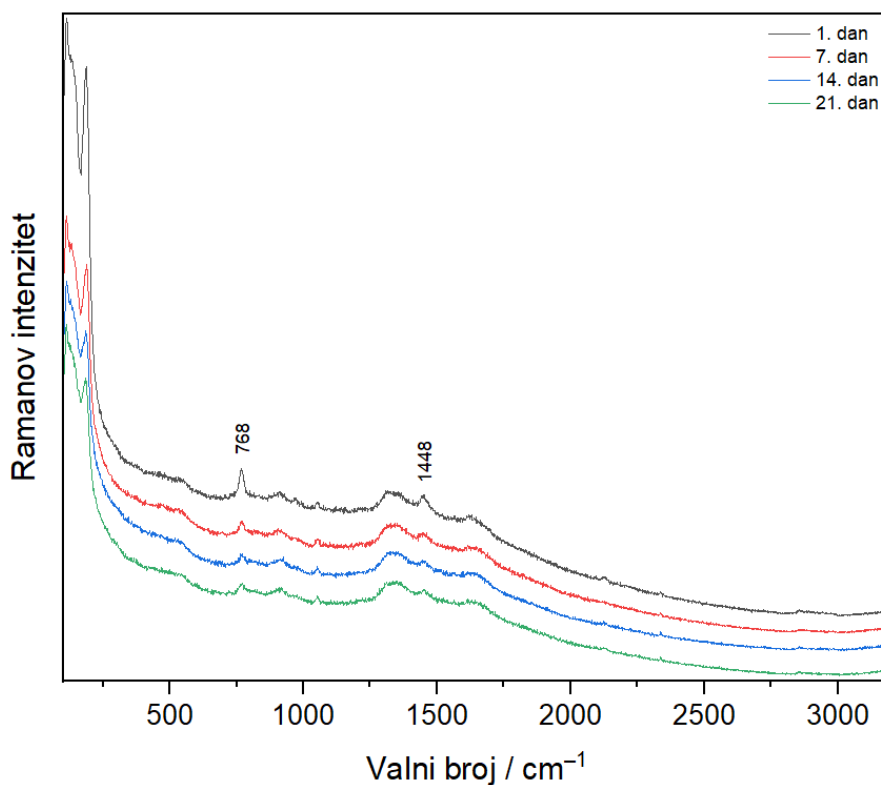


Slika 41. Vremenski ovisni UV/Vis apsorpcijski spektri koloidne suspenzije zlata **AuNP\_Ag\_spermin** snimljeni u rasponu valnih duljina od 400 do 800 nm

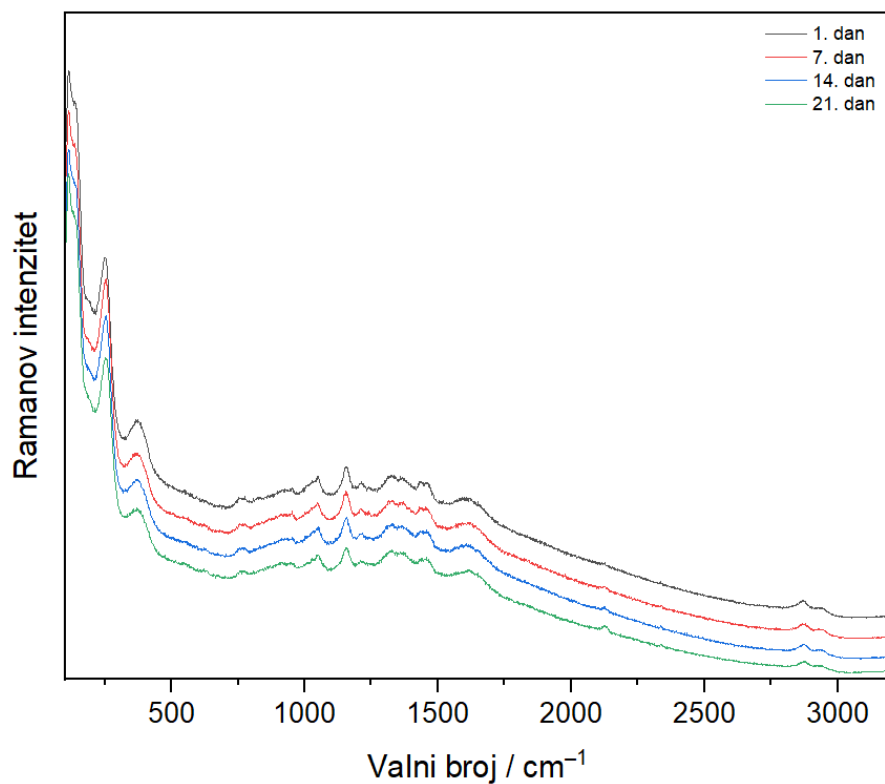
Vremenski ovisni Ramanovi spektri koloida zlata **AuNP\_CTAB** prikazani su na slici 42, a koloida zlata **AuNP\_Ag\_CTAB** na slici 43. Dobiveni spektri pokazuju kako starenjem koloida ne dolazi do značajnih promjena, jedino su vrpce pri  $769$  i  $1448\text{ cm}^{-1}$ , koje potječu od vibracije molekule CTAB, većeg intenziteta u spektrima snimanih prvog dana, dok se tijekom vremena njihov intenzitet smanjuje. U vremenski ovisnim Ramanovim spektrima koloida zlata **AuNP\_spermin** (slika 44), nisu uočene promjene uslijed starenja koloida. Na slici 45 prikazani su vremenski ovisni Ramanovi spektri koloida **AuNP\_Ag\_spermin**, iz kojih je vidljivo kako tijekom vremena dolazi do pojačanja anomalnih vrpca koloidne suspenzije, što je u skladu s UV/Vis spektrima ovog koloida i zaključka da koloid **AuNP\_Ag\_spermin** nije stabilan tijekom dužeg vremenskog perioda.



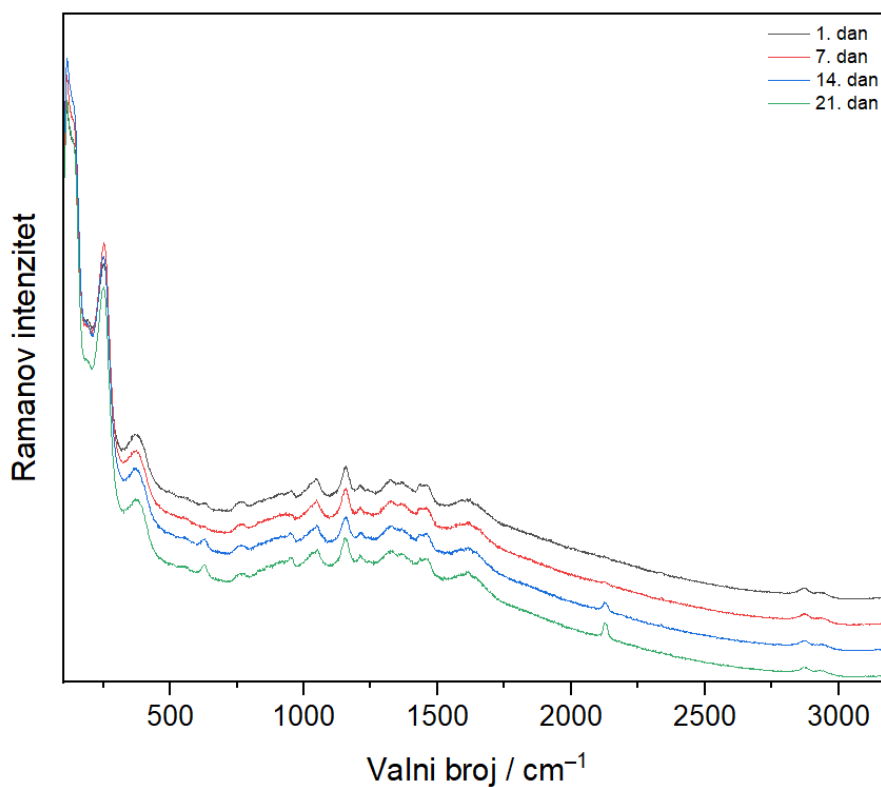
Slika 42. Vremenski ovisni Ramanovi spektri koloidne suspenzije zlata **AuNP\_CTAB** snimljeni pri snazi lasera od 319 od mW



Slika 43. Vremenski ovisni Ramanovi spektri koloidne suspenzije zlata **AuNP\_Ag\_CTAB** snimljeni pri snazi lasera od 159,5 mW

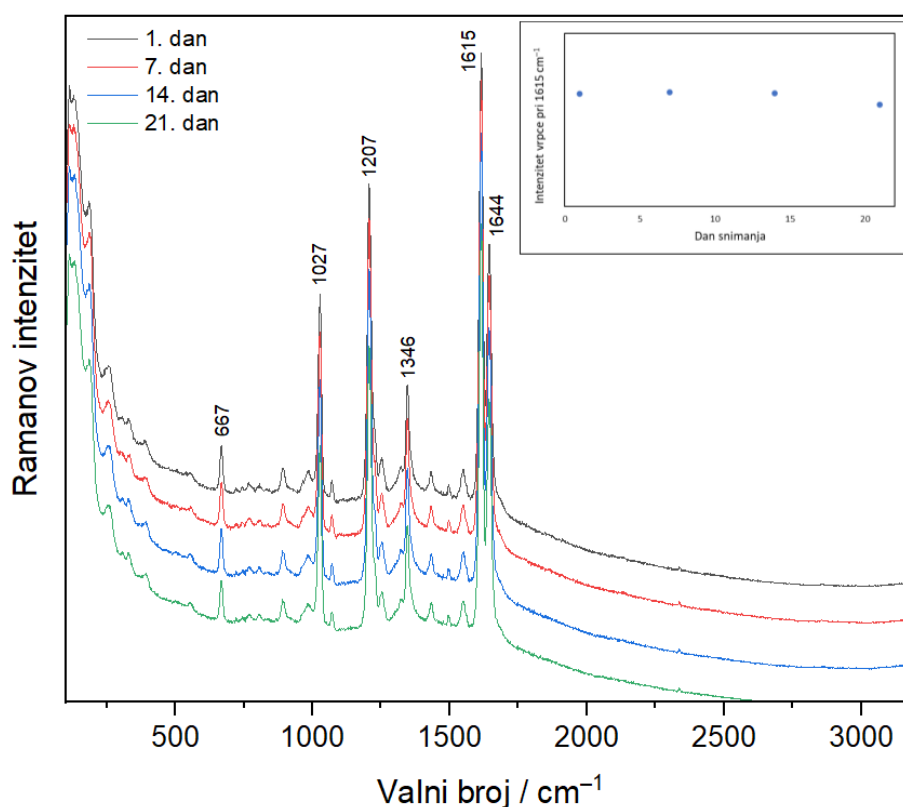


Slika 44. Vremenski ovisni Ramanovi spektri koloidne suspenzije zlata **AuNP\_spermin** snimljeni pri snazi lasera od 319 mW

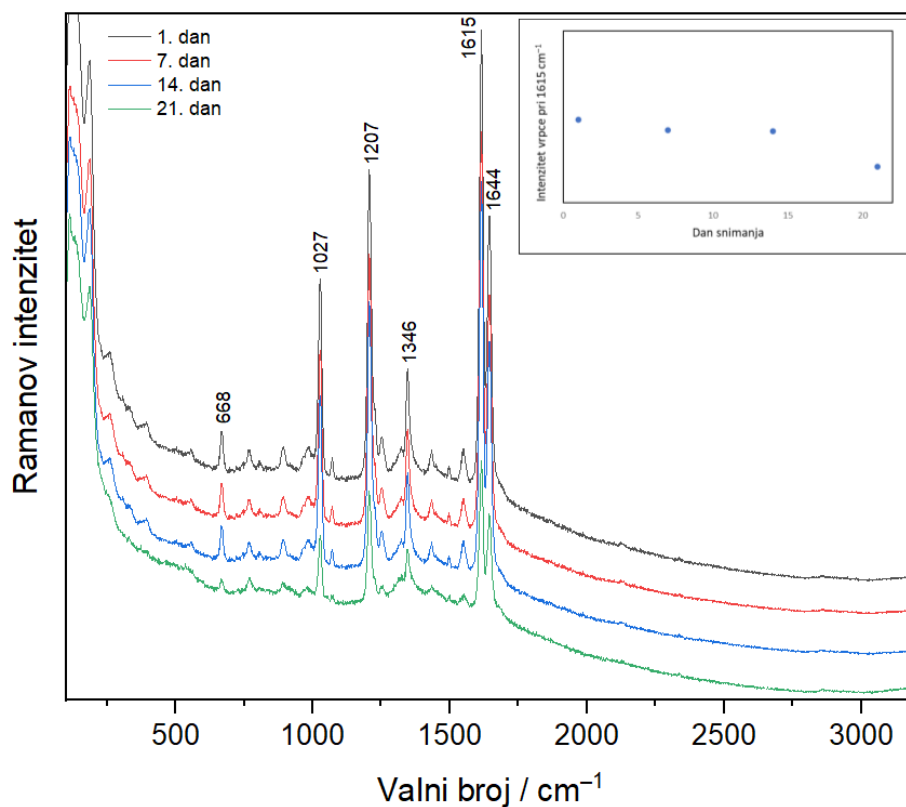


Slika 45. Vremenski ovisni Ramanovi spektri koloidne suspenzije zlata **AuNP\_Ag\_spermin** snimljeni pri snazi lasera od 319 mW

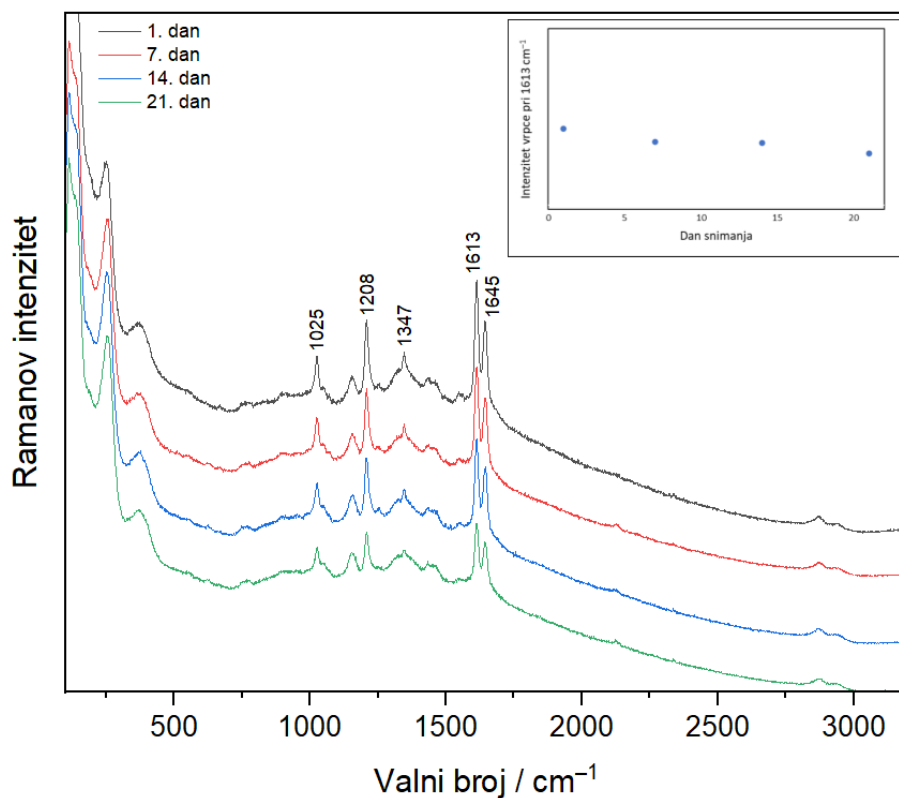
Vremenski ovisni SERS spektri modelne molekule **BPE** koncentracije  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, snimljeni u modificiranim koloidnim suspenzijama zlata, **AuNP\_CTAB**, **AuNP\_Ag\_CTAB**, **AuNP\_spermin** i **AuNP\_Ag\_spermin**, prikazani su na slikama 46-49. U svim dobivenim spektrima može se uočiti da su vibracijske vrpce molekule **BPE** približno jednakog intenziteta kod prva tri mjerenja, a tek je kod dvadeset prvog dana snimanja vidljiv mali pad intenziteta vrpce. Može se pretpostaviti da dodatak molekula stabilizatora u metalni supstrat stabilizira nanočestice tijekom vremena, omogućujući tako njihovo dulje korištenje kao učinkovitih i reproducibilnih SERS supstrata.



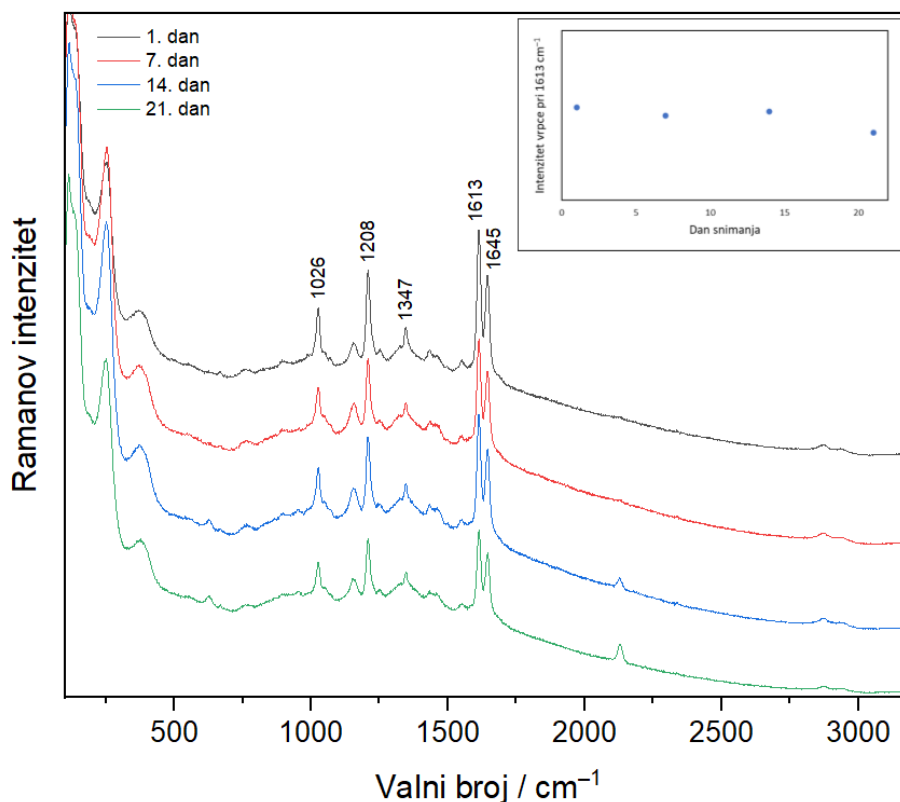
Slika 46. Vremenski ovisni SERS spektri **BPE** ( $c = 1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) snimljeni u koloidu **AuNP\_CTAB** pri snazi lasera od 319 mW



Slika 47. Vremenski ovisni SERS spektri **BPE** ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag\_CTAB** pri snazi lasera od 159,5 mW



Slika 48. Vremenski ovisni SERS spektri **BPE** ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) snimljeni u koloidu **AuNP\_spermin** pri snazi lasera od 319 mW



Slika 49. Vremenski ovisni SERS spektri **BPE** ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) snimljeni u koloidu **AuNP\_Ag\_spermin** pri snazi lasera od 319 mW

#### 4.3.4. Faktor pojačanja

Faktor pojačanja za modificirane koloidne suspenzije zlata izračunat je na jednak način kao i za nemodificirane koloide zlata. Također je za izračun faktora pojačanja pojedinih koloida korištena modelna molekula **BPE** ( $c_{\text{sol}} = 1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) te je kao referentna vrpca odabrana intenzivna vrpca pri  $1614 \text{ cm}^{-1}$ .

U tablici 11 nalaze se izračunati faktori pojačanja modificiranih koloida zlata. Uspoređujući dobivene vrijednosti, vidljivo je kako do većeg pojačanja raspršenja zračenja dolazi kod koloidnih suspenzija nanočestica zlata koje su dodatno stabilizirane CTAB-om, nego sperminom. Također, u slučaju koloida **AuNP\_CTAB** i **AuNP\_Ag\_CTAB** te koloida **AuNP\_spermin** i **AuNP\_Ag\_spermin**, veće vrijednosti faktora pojačanja dobivene su u koloidima s dodatkom srebra(I) nitrata što se može objasniti nastankom nanočestica zlata optimalne morfologije koje učinkovitije pojačavaju Ramanovo raspršenje.

Tablica 11. Izračunati faktori pojačanja modificiranih koloida zlata za modelnu molekulu BPE

| Koloid zlata    | Faktor pojačanja (EF) |
|-----------------|-----------------------|
| AuNP_CTAB       | 2057,0                |
| AuNP_Ag_CTAB    | 3513,2                |
| AuNP_spermin    | 588,4                 |
| AuNP_Ag_spermin | 849,0                 |

## § 5. ZAKLJUČAK

Sintetizirane su koloidne suspenzije nanočestica zlata redukcijom tetraklorozlatne(III) kiseline pomoću 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetilensulfonske kiseline (pufera HEPES), pri čemu su koloidi pripremljeni sa i bez dodatka srebrova(I) nitrata. Za sintezu modificiranih koloidnih nanočestica zlata korišteni su spojevi cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) i *N,N*-di-(3-aminopropil)butan-1,4-diamin tetrahidroklorid (spermin). Istražena je učinkovitost svih pripremljenih koloidnih suspenzija nanočestica zlata kao učinkovitih SERS susprata pomoću dvije modelne molekule, rodamina 6G (**R6G**) i (E)-1,2-di(piridin-4-il)etena (**BPE**), snimanjem koncentracijski ovisnih SERS spektara. Određena je granica detekcije te je izračunat faktor pojačanja za sve koloide zlata.

Najveće pojačanje Ramanovog raspršenja za modelnu molekulu **R6G** dobiveno je korištenjem nemodificiranih koloida zlata, **AuNP** i **AuNP\_Ag**. Kod modificiranih koloida zlata, pojačanje raspršenja **R6G** je znatno slabije te u slučaju koloida **AuNP\_CTAB** u potpunosti izostaju vrpce koje odgovaraju vibraciji rodamina 6G. S obzirom da je **R6G** pozitivno nabijena molekula, u nemodificiranim koloidima zlata dolazi do elektrostatskog privlačenja s negativno nabijenom sulfonatnom skupinom pufera HEPES, što omogućuje adsorpciju **R6G** na površinu koloidnih nanočestica zlata. U modificiranim koloidima korišteni stabilizirajući agensi, CTAB i spermin tetrahidroklorid, također sadrže pozitivan naboj u svojoj strukturi zbog čega dolazi do odbojnih elektrostatskih interakcija između pozitivnih naboja molekule **R6G** i stabilizirajućih molekula što otežava približavanje modelne molekule površini nanočestica zlata.

Za razliku od rodamina 6G, druga korištena modelna molekula daje vrlo intenzivne vrpce karakteristične za strukturne motive **BPE** u svim sintetiziranim koloidima zlata. Budući da je modelna molekula neutralna, vrlo vjerojatno ne dolazi do elektrostatskog odbijanja između molekula koje stabiliziraju nanočestice i smještene su na njihovoj površini te molekula **BPE**. Iz tog su razloga vrpce karakteristične za vibracije molekule **BPE** vidljive u koloidima koji su stabilizirani samo molekulama HEPES-a (**AuNP** i **AuNP\_Ag**), ali i u modificiranim koloidima gdje CTAB i spermin imaju ulogu stabilizatora (**AuNP\_CTAB**, **AuNP\_Ag\_CTAB**, **AuNP\_spermin**, **AuNP\_Ag\_spermin**).

Vremenski ovisni SERS spektri molekule **BPE** snimljeni u nemodificiranim koloidima zlata, **AuNP** i **AuNP\_Ag**, pokazuju da tijekom vremena dolazi do značajnog pada intenziteta vrpce spoja što znači da starenjem koloida dolazi do smanjenja njihove učinkovitosti kao SERS supstrata. Navedeno je potvrđeno i pomacima valnih duljina apsorpcijskih maksimuma u UV/Vis spektrima nemodificiranih koloida. Dodatak stabilizirajućih agenasa u koloide povećava stabilnost nanočestica zlata tijekom vremena te njihovu učinkovitost kao SERS supstrata, pri čemu veću stabilnost pokazuju supstrati u koje su dodane molekule CTAB-a, gdje su zamijećene minimalne razlike u intenzitetu SERS vrpca molekule **BPE** tijekom vremena, kao i mali pomaci apsorpcijskog maksimuma u UV/Vis spektrima.

Dodatak srebrova(I) nitrata tijekom sinteze koloida rezultira nastankom čestica kontrolirane veličine, koje intenzivnije pojačavaju raspršenje zračenja, što je vidljivo iz većeg faktora pojačanja i nižih granica detekcije za modelne molekule, kada se uspoređuju koloidi pripremljeni s dodatkom  $\text{AgNO}_3$  i bez dodatka  $\text{AgNO}_3$  tijekom sinteze.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

APTMS - (3-aminopropil)trimetoksisilan

as – antisimetrična vibracija

AuNP – nanočestice zlata

AuNP\_Ag – nanočestice zlata sa srebrovim nitratom

AuNP\_Ag\_CTAB – nanočestice zlata sa srebrovim nitratom i cetiltrimetilamonijevim bromidom

AuNP\_Ag\_spermin – nanočestice zlata sa srebrovim nitratom i sperminom

AuNP\_CTAB – nanočestice zlata s cetiltrimetilamonijevim bromidom

AuNP\_spermin – nanočestice zlata sa sperminom

BPE – (E)-1,2-di(piridin-4-il)eten

CTAB – cetiltrimetilamonijev bromid

$\delta$  – deformacija

ip – u ravnini

v – istezanje

NIR – blisko infracrveno zračenje

MPTMS - (3-merkaptopropil)trimetoksisilan

oop – izvan ravnine

PEG - poli(etilen-glikol)

PVP - poli(N-vinilpirolidon)

R6G – rodamin 6G

s – simetrična vibracija

SERS – površinski pojačano Ramanovo raspršenje

UV – ultraljubičasto zračenje

Vis – vidljivo zračenje

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. A. Saletnik, B. Saletnik, C. Puchalski, *Molecules* **26** (2021) 1537–1553.
2. P. A. Mosier-Boss, *Nanomaterials* **7** (2017) 142–172.
3. E. Smith, G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2019. str. 1–7.
4. H. Vašková, *Int. J. Math. Models Methods Appl. Sci.* **5** (2011) 1205–1212.
5. Z. Xu, Z. He, Y. Song, X. Fu, M. Rommel, X. Luo, A. Hartmaier, J. Zhang, F. Fang, *Micromachines* **9** (2018) 361–384.
6. R. Pilot, R. Signorini, C. Durante, L. Orian, M. Bhamidipati, L. Fabris *Biosensors*, (2019) 57–157.
7. D. Kumar Singh, M. Pradhan, A. Materny, *Modern Techniques of Spectroscopy*, Springer, Sydney, 2021, str. 185–193.
8. S. Y. Ding, E. M. You, Z. Q. Tian, M. Moskovits, *Chem. Soc. Rev.* **46** (2017) 4042–4076.
9. E. Smith, G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2019. str. 119–128.
10. Z. Huang, J. Peng, L. Xu, P. Liu, *Nanomaterials* **14** (2014) 1417–1437.
11. S. Tokonami, Y. Yamamoto, H. Shiigi, T. Nagaoka, *Anal. Chim. Acta* **716** (2012) 76–91.
12. Z. A. Nurakhmetova, A. N. Azhkeyeva, I. A. Klassen, G. S. Tatykhanova, *Polymers* **12** (2020) 2625.
13. M. Kahraman, E. R. Mullen, A. Korkmaz, S. Wachsmann-Hogiu, *Nanophotonics* **6** (2017) 831–852.
14. N. D. Israelsen, C. Hanson, E. Vargis, *Nanomater. Nanodevices* **2015** (2014) 124582.
15. N. Khlebtsov, L. Dykman, *Chem. Soc. Rev.* **40** (2011) 1647–1671.
16. F. M. Zehentbauer, C. Moretto, R. Stephen, T. Thevar, J. R. Gilchrist, D. Pokrajac, K. L. Richard, J. Kiefer, *Spectrochim. Acta, Part A* **121** (2014) 147–151.
17. T. Vosgröne, A. J. Meixner, *ChemPhysChem* **6** (2005) 154–163.
18. W. E. Smith, C. Rodger, u J. C. Lindon (ur.), *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Academic Press, 1999, str. 2822–2827.
19. [https://www.chembk.com/en/chem/trans-1,2-Bis\(4-pyridyl\)ethylene](https://www.chembk.com/en/chem/trans-1,2-Bis(4-pyridyl)ethylene) (datum pristupa 13. siječnja 2025.)

20. Z. Zhuang, X. Shi, Y. Chen, M. Zuo, *Spectrochim. Acta, Part A* **79** (2011) 1593–1599.
21. M. Baia, L. Baia, S. Astilean, *Chem. Phys. Lett.* **404** (2005) 3–8.
22. Z. Zhuang, J. Cheng, H. Jia, J. Zeng, X. Han, B. Zhao, H. Zhang, G. Zhang, W. Zhao, *Vib. Spectrosc.* **43** (2007) 306–312.
23. W. Yang, J. Hulteen, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne, *J. Chem. Phys.* **104** (1996) 4313–4323.
24. D. W. Mulder, M. M. Phiri, A. Jordaan, B. C. Vorster, *R. Soc. Open Sci.* **6** (2019) 190160.
25. M. H. So, C. M. Ho, R. Chen, C. M. Che, *Chem. Asian J.* **5** (2010) 1322–1331.
26. W. Xi, A. J. Haes, *J. Am. Chem. Soc.* **141** (2019) 4034–4042.
27. J. Sharmi Kumar, T. S. Renuga Devi, G. R. Ramkumaar, A. Bright, *Spectrochim. Acta, Part A* **152** (2016) 509–522.
28. A. Swarnapali, D. S. Indrasekara, R. Thomas, L. Fabris, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17** (2015) 21133–21142.
29. M. Häring, M. M. Pérez-Madrigal, D. Kühbeck, A. Pettignano, F. Quignard, D. D. Díaz, *Molecules* **20** (2015) 4136–4147.
30. M. J. Canamares, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, M. Castillejo, M. Oujja, *J. Colloid Interface Sci.* **326** (2008) 103–109.
31. W. Jin, G. Liang, Y. Zhong, Y. Yuan, Z. Jian, Z. Wu, W. Zhang, *Nanoscale Res. Lett.* **14** (2019) 2–11.
32. K. Kalyanasundaram, J. K. Thomas, *J. Phys. Chem.* **80** (1976) 1462–1473.
33. M. Turino, N. Pazos-Perez, L. Guerrini, R. A. Alvarez-Puebla, *RSC Adv.* **12** (2022) 845–859.
34. Y. Hayashi, H. Sugiyama, A. Suganami, K. Higashi, K. Kashiwagi, K. Igarashi, S. Kawauchi, Y. Tamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **441** (2013) 999–1004.

## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Nikolina Gudan

Datum rođenja: 18. prosinca 1998.

Mjesto rođenja: Zabok

### Obrazovanje

2009–2013      Osnovna škola Bedekovčina, Bedekovčina

2013–2017      Gimnazija Antuna Gustava Matoša, Zabok

2017–2022      Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2022-            Diplomski sveučilišni studij Kemija, smjer: istraživački; smjer Analitička kemija i Biokemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2019            Otvoreni dan Kemijskog odsjeka