

Nanočestice srebra kao SERS supstrati za analizu sterigmatocistina

Vrljić, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:774039>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Valentina Vrljić

**NANOČESTICE SREBRA KAO SERS
SUPSTRATI ZA ANALIZU
STERIGMATOCISTINA**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2020.

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

Zahvale

Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Snežani Miljanić na brojnim stručnim savjetima, strpljenju, potpori i riječima ohrabrenja tijekom izrade ovog diplomskog rada. Veliko hvala i neposrednoj voditeljici doc. dr. sc. Adriani Kendel na pruženoj pomoći i uloženom trudu te podršci i velikom razumijevanju tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Mojim dragim prijateljima i kolegama, hvala za sve zajedničke studentske trenutke i za svu ljubav i podršku koju ste mi pružili.

Mojoj obitelji, mami, tati i sestri, sačuvala sam posljednje ali najvažnije riječi hvale za podršku, trpljenje i vjeru tijekom svih godina studiranja.

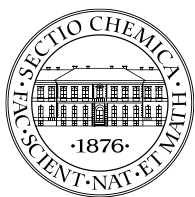
"Nismo svi stvoreni da radimo velike stvari, ali zato možemo raditi male stvari s puno ljubavi"

- sveta Majka Terezija -

Sadržaj

SAŽETAK	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Ramanova spektroskopija	3
2.2. Površinski pojačana Ramanova spektroskopija	7
2.2.1. <i>Mehanizmi pojačanja raspršenja.....</i>	<i>8</i>
2.2.2. <i>Metalni supstrati.....</i>	<i>10</i>
2.3. Sterigmatocistin	13
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. Kemikalije.....	16
3.2. Mjerni uređaji.....	17
3.3. Priprava supstrata srebra.....	18
3.3.1. <i>Priprava koloida srebra.....</i>	<i>18</i>
3.3.2. <i>Priprava otopina.....</i>	<i>20</i>
3.3.3. <i>Priprava mjernih uzoraka u koloidnim suspenzijama.....</i>	<i>20</i>
3.3.3.1. <i>Svježe pripravljena koloidna suspenzija.....</i>	<i>20</i>
3.3.3.2. <i>Koncentrirana koloidna suspenzija.....</i>	<i>21</i>
3.3.3.3. <i>Agregirana koloidna suspenzija.....</i>	<i>21</i>
3.3.4. <i>Priprava mjernih uzoraka na čvrstim nosačima.....</i>	<i>22</i>
3.3.4.1. <i>Stakleni filter-papir</i>	<i>22</i>
3.3.4.2. <i>Tretirano staklo.....</i>	<i>23</i>
3.3.4.3. <i>Silanizirano staklo.....</i>	<i>24</i>
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1. Ramanovi spektri.....	26
4.2. SERS učinkovitost i reproducibilnost supstrata srebra.....	29
4.2.1. <i>Svježe pripravljena koloidna suspenzija</i>	<i>29</i>
4.2.2. <i>Koncentrirana koloidna suspenzija</i>	<i>31</i>
4.2.3. <i>Agregirana koloidna suspenzija</i>	<i>33</i>
4.2.4. <i>Stakleni filter-papir.....</i>	<i>40</i>
4.2.5. <i>Tretirano staklo</i>	<i>42</i>
4.2.6. <i>Silanizirano staklo</i>	<i>45</i>

4.2.6.1. Koncentracijski ovisni SERS spektri sterigmatocistina.....	49
4.2.6.2. SERS spektri aflatoksina B ₁	51
§ 5. ZAKLJUČAK.....	52
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	53
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	54
§ 8. DODATAK.....	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS.....	XVI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

NANOČESTICE SREBRA KAO SERS SUPSTRATI ZA ANALIZU STERIGMATOCISTINA

Valentina Vrljić

U svrhu analize mikotoksina sterigmatocistina (STC) SERS spektroskopijom, istraženi su SERS supstrati temeljeni na nanočesticama srebra dispergiranim u koloidnoj suspenziji i imobiliziranim na čvrstom nosaču. Korišteni su svježe pripremljeni koloid srebra, koncentrirani koloid te koloid agregiran dodatkom anorganskih soli (kalcijeva nitrata, natrijeva klorida), dok su kao čvrsti nosači za nanošenje srebrovih nanočestica korišteni stakleni filter-papir, staklo tretirano s fluorovodičnom kiselinom te staklo silanizirano s (3-aminopropil)trimetoksisilanom. Nanočestice srebra pripravljene su redukcijom srebrova(I) nitrata s trinatrijevim citratom, odnosno hidroksilamin hidrokloridom. Niti s jednim od istraživanih supstrata nije uočeno pojačanje Ramanovog raspršenja STC (1×10^{-5} mol dm⁻³), što ukazuje da se molekule analita nisu adsorbirale na površinu nanočestica srebra bez obzira na vrstu supstrata. Privlačne elektrostatske interakcije između neutralnih molekula analita i sloja aniona na površini nanočestica srebra nisu bile moguće, niti je nastala kemijska veza između atoma kisika molekule analita i površine nanočestica srebra. SERS spektar aflatoksina B₁ (1×10^{-5} mol dm⁻³) također nije opažen.

(xii + 57 stranica, 25 slika, 3 tablice, 33 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: čvrsti nosač, koloid, nanočestice srebra, SERS, sterigmatocistin

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

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Snežana Miljanić
 2. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
 3. doc. dr. sc. Đani Škalamera
- Zamjena: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Datum diplomskog ispita: 29. rujna 2020.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

SILVER NANOPARTICLES AS SERS SUBSTRATES FOR STERIGMATOCYSTIN ANALYSIS

Valentina Vrljić

In order to analyze mycotoxin sterigmatocystin (STC) by SERS spectroscopy, SERS substrates based on silver nanoparticles dispersed in a colloidal suspension and immobilized on a solid support were investigated. Freshly prepared silver colloid, concentrated colloid and colloid aggregated by addition of inorganic salts (calcium nitrate, sodium chloride) were used, while glass filter paper, glass treated with hydrofluoric acid and glass silanized with (3-aminopropyl)trimethoxysilane were employed as solid carriers for the deposition of silver nanoparticles. Silver nanoparticles were prepared by reducing silver(I) nitrate with trisodium citrate or hydroxylamine hydrochloride. Enhancement of Raman scattering of STC ($1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) was not obtained with any of the investigated substrates, implying that the analyte molecules were not adsorbed on the silver nanoparticles surface regardless of the substrate type. Attractive electrostatic interactions between the neutral analyte molecules and the anion layer on the surface of the silver nanoparticles were not possible, nor was a chemical bond formed between the oxygen atoms of the analyte molecule and the surface of the silver nanoparticles. The SERS spectrum of aflatoxin B₁ ($1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) was also not observed.

(xii + 57 pages, 25 figures, 3 tables, 33 references, original in Croatian)

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

Keywords: colloid, SERS, silver nanoparticles, solid support, sterigmatocystin

Mentor: Dr. Snežana Miljanić, Professor

Assistant mentor: Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Snežana Miljanić, Professor
 2. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
 3. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

Date of exam: 29 September 2020.

§ 1. UVOD

Sterigmatocistin (STC) je mikotoksin, prekursor u biosintezi aflatoksina B₁ (AFB₁), kojeg sintetiziraju plijesni većinom iz roda *Aspergillus*.¹ STC toksično djeluje na jetru i bubrege uzrokujući hepatitis, odumiranje stanica i krvarenje, a dokazana su i kancerogena, mutagena i teratogena svojstva ovog spoja. Pojavljuje se u raznolikoj hrani, poput žitarica, kruha, zrna kave, grožđanog soka, mesa, sira, piva te hrane za životinje. Metode koje se primjenjuju za određivanje STC su imunokemijske i kromatografske metode, no one, iako su osjetljive, imaju svoje nedostatke, poput visokih troškova izvedbe (HPLC, LC-MS/MS) i moguće križne reaktivnosti strukturno sličnih spojeva (ELISA). Stoga je potrebno provesti daljnja istraživanja i razviti novu, osjetljivu, pouzdanu i ekonomski prihvatljivu metodu za analizu STC.

Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (engl. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS) je tehnika vibracijske spektroskopije kojom se opaža karakterističan vibracijski spektar molekule u blizini nanostrukturirane metalne površine, tj. metalnog supstrata.² Zahvaljujući pojačanju inače slabog Ramanovog raspršenja te mogućnostima detekcije mnogih analita pri niskim koncentracijama i analize vodenih otopina uzoraka i složenih smjesa, SERS metoda se primjenjuje u brojnim područjima. S obzirom na to da se pojačano Ramanovo raspršenje opaža samo za molekule vezane ili adsorbirane na površinu metala, svojstva metalnih supstrata značajno utječu na intenzitet SERS spektra.³

Cilj ovog rada bio je istražiti SERS supstrate temeljene na nanočesticama srebra u svrhu detekcije i kvantitativnog određivanja STC. Pripravljene su supstrati s nanočesticama srebra dispergiranim u koloidnoj suspenziji i imobiliziranim na čvrstim nosačima. Nanočestice srebra pripravljene su redukcijom srebrova(I) nitrata, u jednom slučaju s trinatrijevim citratom, a u drugom s hidroksilamin hidrokloridom. Koloidna suspenzija nanočestica srebra korištena je svježe pripravljena, koncentrirana te agregirana dodatkom anorganskih soli (kalcijeva nitrata i natrijeva klorida) neposredno prije mjerenja. Kao čvrsti nosači za imobilizaciju srebrovih nanočestica korišteni su stakleni filter-papir, staklo tretirano s fluorovodičnom kiselinom te staklo silanizirano s (3-aminopropil)trimetoksisilanom. Pripremljenim supstratima istražena je SERS učinkovitost te određena reproducibilnost. Sa supstratom najveće učinkovitosti snimljeni su koncentracijski ovisni SERS spektri STC i

SERS spektri AFB₁. Opaženi SERS spektri detaljno su analizirani i interpretirani s obzirom na svojstva pripremljenih supstrata srebra i molekulske strukture STC i AFB₁.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Ramanova spektroskopija

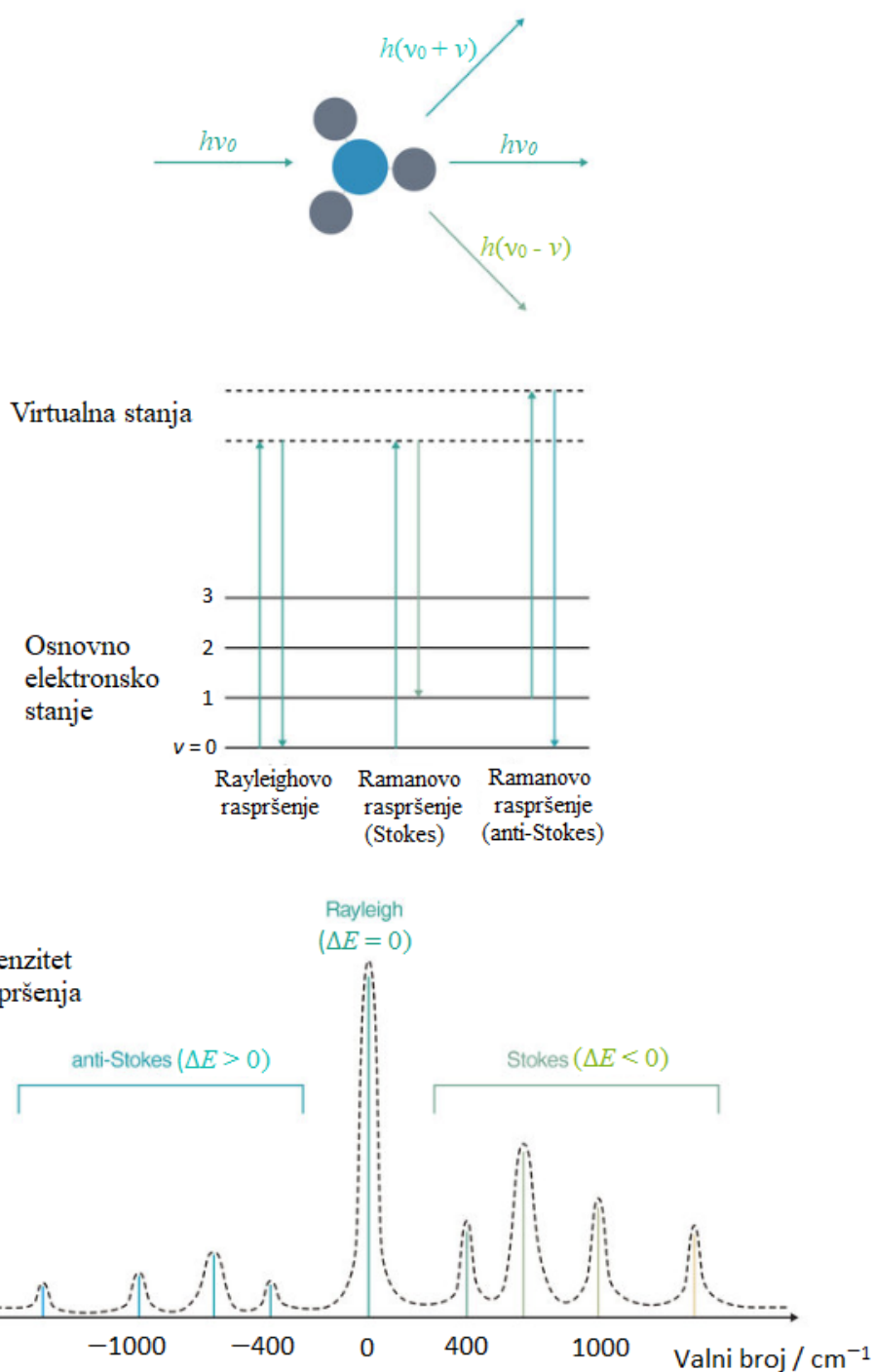
Ramanova spektroskopija je metoda vibracijske spektroskopije komplementarna infracrvenoj spektroskopiji pomoću koje se molekule mogu identificirati na temelju spektra koji je njihov strukturni „otisak prsta“. Osjetljivost, specifičnost, minimalna priprema uzorka i mogućnost analize *in situ* omogućavaju široku primjenu Ramanove spektroskopije. Metoda se temelji na fenomenu neelastičnog raspršenja zračenja uslijed interakcije zračenja s molekulom, kojeg je teorijski postavio A. G. Smekal 1923. godine, a eksperimentalno su ga opazili i dokazali C. V. Raman i K. S. Krishnan 1928. godine. Od tada neelastično raspršenje nosi naziv Ramanovo raspršenje, a spektroskopska metoda Ramanova spektroskopija.⁴ U njihovom pokusu sunčeva svjetlost je teleskopom fokusirana na tekući uzorak, a raspršeno zračenje je sakupljano drugom lećom koja je bila smještena u blizini uzorka. Korištenjem sustava optičkih filtera dokazano je da se frekvencija raspršenog zračenja razlikuje od frekvencije upadnog zračenja.

U Ramanovoj spektroskopiji uzorak se izloži laserskom monokromatskom zračenju, a detektira se raspršeno zračenje čija se energija razlikuje od energije pobudnog zračenja. Prilikom raspršenja zračenja upadni foton ne mora imati energiju koja odgovara razlici energije između dva energijska stanja molekule. Stoga se najčešće kao izvori zračenja koriste laseri koji mogu emitirati zračenje ultraljubičastog (UV), vidljivog (VIS) ili bliskog infracrvenog (NIR) područja.⁴ Energija takvog zračenja veća je od energije potrebne da bi se molekulu pobudilo u više vibracijsko stanje.

Međudjelovanjem zračenja s uzorkom nastaju dva tipa raspršenja, Rayleighovo i Ramanovo raspršenje (slika 1).⁴ Rayleighovo raspršenje podrazumijeva elastično raspršenje zračenja pri kojem su frekvencije pobudnog i raspršenog zračenja jednake. Ramanovo raspršenje je neelastično raspršenje tijekom kojeg je potaknuto kretanje jezgara, pa se, s obzirom da jezgre atoma imaju znatno veću masu od elektrona, frekvencija raspršenog zračenja razlikuje od frekvencije pobudnog zračenja. Kada je riječ o Ramanovom raspršenju razlikujemo Stokesovo i anti-Stokesovo raspršenje. Ukoliko se molekule nakon pobude u virtualno stanje vraćaju u više vibracijsko stanje osnovnog elektronskog stanja, raspršeni foton manje je frekvencije od pobudnog te se ta pojava naziva Stokesovo raspršenje. Pri anti-

Stokesovom raspršenju frekvencija raspršenog fotona veća je od frekvencije pobudnog fotona, budući da se molekule pobuđene u virtualno stanje iz početnog višeg vibracijskog stanja vraćaju u niže vibracijsko stanje osnovnog elektronskog stanja. Virtualno stanje je kratkoživuće energijsko stanje molekule te ne odgovara niti jednom stvarnom elektronskom stanju, i s obzirom da je nestabilno, slijedi vrlo brzo otpuštanje fotona. Energija virtualnog stanja ovisi o energiji zračenja izvora. I Stokesov i anti-Stokesov spektar sadrže iste informacije o energijama vibracija. U odnosu na Rayleighovo raspršenje, Ramanovo raspršenje rijetko se događa, s obzirom da se samo jedan od 10^6 – 10^8 upadnih fotona neelastično rasprši. Također, prema Boltzmannovoj raspodjeli, pri sobnoj temperaturi većina molekula se nalazi u osnovnom stanju najniže energije, dok je vrlo mali broj molekula u pobuđenom stanju, odnosno u višim vibracijskim stanjima osnovnog elektronskog stanja. Prema tome, pri sobnoj temperaturi uglavnom se opaža Stokesovo raspršenje, dok se pri višim temperaturama povećava doprinos anti-Stokesovog raspršenja jer su mnoge molekule već u višem vibracijskom stanju.

Ramanovo raspršenje se javlja kao rezultat interakcije upadnog fotona s električnim dipolom molekule što uzrokuje promjenu polarizabilnosti. Da bi vibracija molekule bila aktivna u Ramanovom spektru, tijekom vibracije mora doći do promjene polarizabilnosti, α . Polarizabilnost molekule opisuje koliko se lako elektronski oblak može polarizirati pod utjecajem vanjskog električnog polja.



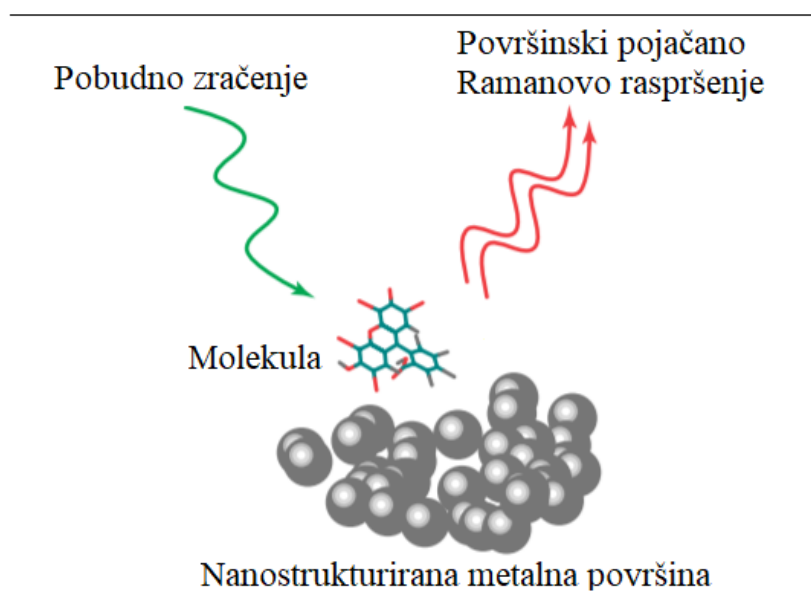
Slika 1. Dijagram Rayleighovog i Ramanovog raspršenja uz Ramanov spektar s prikazom pomaka anti-Stokesovih i Stokesovih vrpca te razlike u intenzitetima.⁵

Ramanova spektroskopija i infracrvena (IR) spektroskopija daju komplementarne informacije o molekulskim vibracijama i općenite tablice s valnim brojevima za asignaciju IR vrpce mogu se koristiti i prilikom asignacije vrpce u Ramanovom spektru. Međutim, s obzirom da za njih vrijede različita izborna pravila (vibracije koje uzrokuju promjenu dipolnog momenta su IR aktivne, a one koje uzrokuju promjenu polarizabilnosti su Raman aktivne), intenzivna vrpca u Ramanovom spektru može biti puno slabijeg intenziteta u IR spektru i obrnuto. Isto tako, za molekule s centrom simetrije vrijedi pravilo međusobnog isključenja, prema kojem niti jedna vibracija ne može biti i IR i Raman aktivna. Prema tome, vrpca istezanja veze C=C bit će intenzivnija u Ramanovom spektru jer dvostruka veza bogata elektronima spaja dva istovrsna atoma te se njenim istezanjem značajno mijenja polarizabilnost, dok će vrpca istezanja veze C=O biti slabijeg intenziteta u Ramanovom spektru u odnosu na IR spektar jer je promjena dipolnog momenta veća u odnosu na promjenu polarizabilnosti s obzirom da dvostruka veza povezuje dva različita atoma s velikom razlikom u elektronegativnosti. Zbog istog su razloga i vrpce vibracija polarnih skupina OH i NH u Ramanovom spektru široke i slabe, čime je omogućeno snimanje Ramanovih spektara vodenih otopina, što ovoj metodi daje veliku prednost pred IR spektroskopijom.

Bez obzira na prednosti Ramanove spektroskopije, primjena ove metode za rutinska analitička mjerenja je ograničena najviše zbog problema nedovoljne osjetljivosti i česte pojave fluorescencije. Za poboljšanje efikasnosti procesa Ramanovog raspršenja koristi se metoda površinski pojačanog Ramanovog raspršenja.

2.2. Površinski pojačana Ramanova spektroskopija

Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (engl. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS) je metoda kojom se opaža povećanje intenziteta Ramanovog raspršenja za molekule koje se nalaze u neposrednoj blizini ili su adsorbirane na metalne nanostrukture (slika 2). SERS fenomen su prvi opazili M. Fleischmann i suradnici 1974. godine koji su uočili značajno intenzivniji Ramanov signal piridina na površini hrapave srebrne elektrode i pripisali ga adsorpciji većeg broja molekula na veću površinu hrapave elektrode u odnosu na glatku površinu elektrode.² 1977. godine su dvije neovisne grupe znanstvenika, D. L. Jeanmarie i R. P. Van Duyne s jedne strane, te M. G. Albrecht i J. A. Creighton s druge strane, predložile da je hrapava priroda površine metala zaslužna za pojačanje Ramanovog raspršenja, a ne povećanje površine na koju se molekule piridina adsorbiraju. Zbog iznimnog pojačanja signala koji omogućuje direktnu identifikaciju jedne jedine molekule, interes za SERS metodu kao ultraosjetljivu analitičku tehniku neprestano raste.



Slika 2. Shematski prikaz SERS efekta za molekulu adsorbiranu na nanočestice metala.²

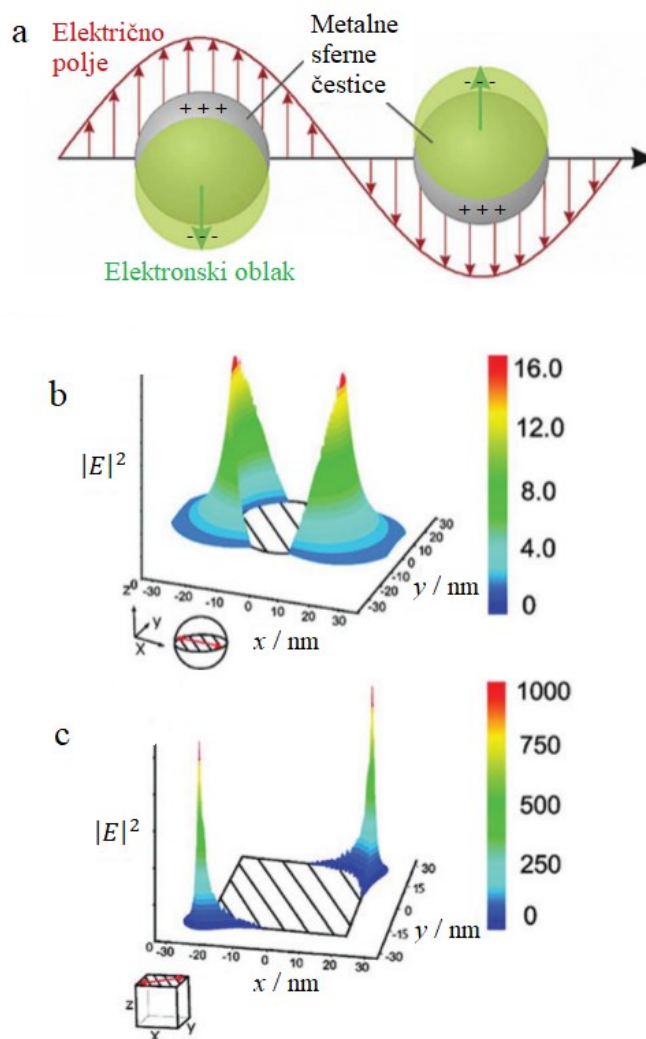
U odnosu na klasičnu Ramanovu spektroskopiju intenzitet raspršenog zračenja povećava se 10^4 do 10^6 puta, a u nekim slučajevima čak 10^7 do 10^{10} puta.² Uspješnost SERS metode uglavnom proizlazi iz interakcije molekule adsorbirane na površini i površine plazmonske nanostrukture, najčešće zlata (Au), srebra (Ag) ili bakra (Cu). Najčešće korišteni metali su

zlatu i srebru jer su stabilni na zraku, dok se na bakru stvaraju slojevi oksida što mijenja prirodu površine i predstavlja prostornu barijeru između analita i površine metala. S obzirom da se mjerni sustav sastoji od analita i metalnog supstrata, uspješnost SERS mjerenja i pojačanje Ramanovog raspršenja ovise o različitim parametrima kao što su: značajke metalnog supstrata, struktura i svojstva analita, način adsorpcije analita na površinu metala, te karakteristike pobudnog zračenja (frekvencija, snaga).

2.2.1. Mehanizmi pojačanja raspršenja

Iako je SERS prilično opsežno i vrlo aktivno područje istraživanja, sam mehanizam pojačanja raspršenog zračenja još uvijek nije sasvim razjašnjen. Dokazano je da su za pojačanje Ramanovog raspršenja zaslužna dva zasebna i jednako valjana mehanizama: elektromagnetski i kemijski.⁶ Prema elektromagnetskom mehanizmu pojačanje potječe od interakcije analita i površinskih plazmona metala, pri čemu je analit adsorbiran na površinu metala ili mu se nalazi vrlo blizu. Prema kemijskom mehanizmu ili mehanizmu prijenosa naboja, analit se kemijski veže na metalnu površinu, pri čemu se elektroni prenose s metala na analit i obrnuto te se polarizabilnost molekula analita povećava.

Površina metala prekrivena je vodljivim elektronima koji se mogu slobodno kretati uzduž površine, stvarajući elektronski oblak koji se proteže na određenoj udaljenosti od površine. Nakon interakcije s upadnim zračenjem elektroni počinju oscilirati, uslijed čega se polariziraju nanočestice metala. Oscilacije elektrona nazivaju se površinski plazmoni. Rezonancijom oscilacija valentnih elektrona nanočestica metala s frekvencijom upadnog zračenja nastaju lokalizirani površinski plazmoni, što rezultira nastajanjem snažnog elektromagnetskog polja oko metalne čestice ili nanostrukturirane površine (slika 3.a). Ovo jako elektromagnetsko polje inducira dipol u obližnjim molekulama, uslijed čega se povećava Ramanovo raspršenje adsorbiranih molekula. Na tome se zasniva teorija elektromagnetskog mehanizma. Jakost elektromagnetskog polja brzo opada udaljavajući se od površine metala, a priroda okolnog polja je vrlo heterogena.⁷ To dovodi do stvaranja SERS „vrućih mjesta“ (engl. *hot spots*) na vrhovima, rubovima i dodirnim točkama nanočestica (slike 3.b i 3.c). „Vruća mjesta“ su mjesta gdje se čestice dodiruju u nakupinama nanočestica i gdje jedan plazmon postaje zajednički plazmon dviju ili više čestica te ima novu rezonantnu frekvenciju. Na takvim se mjestima raspršeno Ramanovo zračenje još više pojačava.



Slika 3. a) Lokalizirani površinski plazmoni. b) Povećanje elektromagnetskog polja oko sferne nanočestice srebra. c) Povećanje elektromagnetskog polja na vrhovima kockaste nanočestice srebra.⁷

Električno polje okomito na nanostrukturiranu površinu metalnog supstrata je veće od polja paralelnog s površinom. Prema tome, vibracije s promjenom polarizabilnosti okomito na metalnu površinu rezultiraju najvećim pojačanjem raspršenog zračenja, dok vibracije u ravnini s metalnom površinom ne doprinose raspršenju.

Iako je elektromagnetski mehanizam dominantan u sveukupnom pojačanju raspršenog zračenja, njemu doprinosi i kemijsko pojačanje. Ono nastaje zbog prijenosa naboja koji podrazumijeva prijelaz upadnim fotonom pobuđenog elektrona iz Fermijeveg nivoa metala u nepopunjenu orbitalu molekule i obrnuto.⁶ Da bi se dogodio prijenos naboja molekula analita

mora biti kemijski vezana za metalni supstrat, što se većinom ostvaruje preko atoma kisika, dušika ili sumpora, kada nastaje novo elektronsko stanje. Prijenos naboja rezultira kratkotrajnim pobuđenim stanjem nastalog kompleksa, nakon čega se elektron vraća u metal popunjujući prethodno nastalu šupljinu, što je praćeno otpuštanjem fotona koji nosi informaciju o vibracijskom prijelazu molekule. Pojačanje prijenosom naboja u najboljem slučaju iznosi 100 puta, te je ograničeno na prvi sloj molekula analita vezanih na metal.

2.2.2. Metalni supstrati

SERS efekt otkriven je 1970-ih godina te su se prva istraživanja bavila razumijevanjem fenomena i razvojem tehnike u svrhu detekcije i identifikacije jedne jedine molekule. Daljnja istraživanja usmjerena su prema analitičkim primjenama, a razvoj nanoznanosti u 1990-im godinama dovodi do ubrzanog razvoja SERS supstrata za detekciju širokog raspona kemijskih i bioloških analita.³

Kako bi se SERS metodom uspješno detektirale molekule analita, najvažnije je odabrati dobar aktivni supstrat. Dobar aktivni supstrat ima hrapavu površinu, reproducibilan je, stabilan i robustan, a molekule analita se učinkovito adsorbiraju na njegovu površinu. Danas se kao SERS aktivni supstrati najčešće koriste: metalne nanočestice u suspenziji, metalne nanočestice imobilizirane na čvrstim nosačima te nanostrukture sintetizirane direktno na čvrstim nosačima procesom nanolitografije. U ostale aktivne supstrate koji se rjeđe koriste ili su se nekad koristili ubrajaju se elektrokemijski pripravljene elektrode hrapave površine i metalni filmovi pripremljeni naparavanjem metala u vakuumu. No, zahvaljujući jednostavnoj i financijski povoljnoj pripravi te jednostavnom rukovanju, unatoč nedostatku visoke reproducibilnosti, metalni koloidi (nanočestice u suspenziji) najčešće su korišteni SERS supstrati.

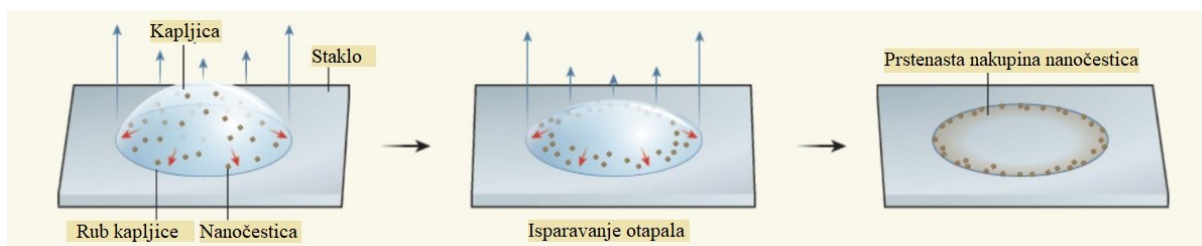
Različitim postupcima pripremaju se koloidne nanočestice različitih oblika i veličina, no najčešće se koristi kemijski postupak redukcije iona srebra ili zlata u otopini pomoću redukcijskih sredstava kao što su trinatrijev citrat, natrijev borhidrid, hidrazin ili hidroksilamin hidroklorid. Budući da morfološki parametri nanočestice, veličina i oblik, utječu na rezonantnu frekvenciju površinskih plazmona, odgovarajućom tehnikom moguće je pripremiti pogodne supstrate za odabrani mjerni sustav. Veličina nanočestica može se kontrolirati jačinom i koncentracijom redukcijskog sredstva budući da primjenom jačih redukcijskih sredstava, poput natrijeva borhidrida, nastaju manje nanočestice metala, dok

redukcijom slabijim reducensima, poput trinatrijeva citrata, nastaju veće nanočestice metala.³ Koloidi se mogu i dodatno agregirati u svrhu povećanja broja „vrućih mjesta“ na kojima se opaža najveće pojačanje raspršenja.

U svrhu optimizacije SERS učinkovitosti često je potrebno kontrolirati razmak između nanočestica, što je u slučaju koloida teško postići. Zbog toga se nanočestice imobiliziraju na čvrstim nosačima poput staklenih ili kvarcnih pločica te staklenog filter-papira.

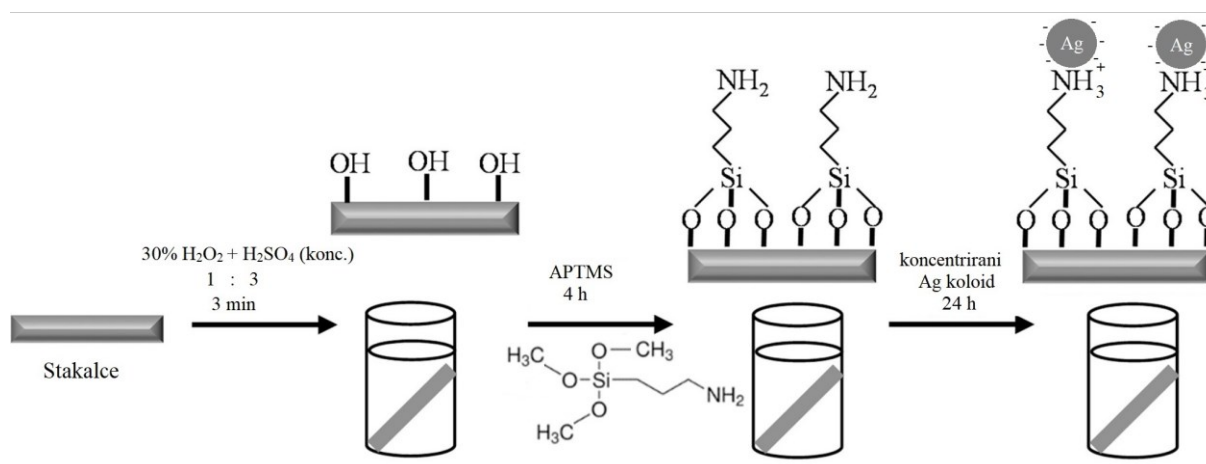
Porozni stakleni filter-papiri vrlo su korisni za izradu jeftinih i jednostavnih SERS supstrata koji se vrlo brzo mogu pripremiti i kojima je lako snimiti spektar, a uz to su i ekološki prihvatljivi. Nanočestice srebra se ravnomjerno nanose na površinu filter-papira tvoreći diskretne nakupine (otoke) koje doprinose SERS pojačanju.⁸ Najčešće korištene metode nanošenja nanočestica na filter-papir su nanošenje zračnim kistom te uranjanje filter-papira tijekom određenog vremena u suspenziju nanočestica.⁹ Metoda ispuštanja suspenzije nanočestica automatskom pipetom na filter-papir je jednostavna i brza, ali uzrokuje nastajanje nehomogenog sloja nanočestica na papiru i „coffee-ring“ efekta, pri čemu koncentracija nanočestica po jedinici površine nije jednolika. Posljedice toga su loša reproducibilnost pokrovnog sloja nanočestica i promjene SERS signala.

Kao stakleni čvrsti nosači mogu se koristiti predmetna stakalca za mikroskopiju koje je prvo potrebno temeljito i pažljivo očistiti, a zatim ih se primjerice može silanizirati pomoću bifunkcionalnih organosilana, (3-merkaptopropil)trimetoksisilana (MPTMS) i (3-aminopropil)trimetoksisilana (APTMS), ili tretirati fluorovodičnom kiselinom kako bi se postigao „coffee-ring“ efekt. Posljednjih godina se „coffee-ring“ efekt sve više koristi za detekciju molekula koje nisu Raman aktivne, slabo raspršuju zračenje ili imaju nizak afinitet prema metalnim supstratima. Naime, ovim efektom, nakon isparavanja otapala, nastaje samostalno posloženi prsten gusto složenih nanočestica metala, a time i puno veći broj „vrućih mjesta“ (slika 4) što dovodi do pojačanja signala i povećanja osjetljivosti.¹⁰ Priprava ovakvog supstrata je jeftina, jednostavna i ne zahtijeva nikakvu specijaliziranu opremu.



Slika 4. Shematski prikaz „coffee-ring“ efekta na staklenom čvrstom nosaču.¹¹

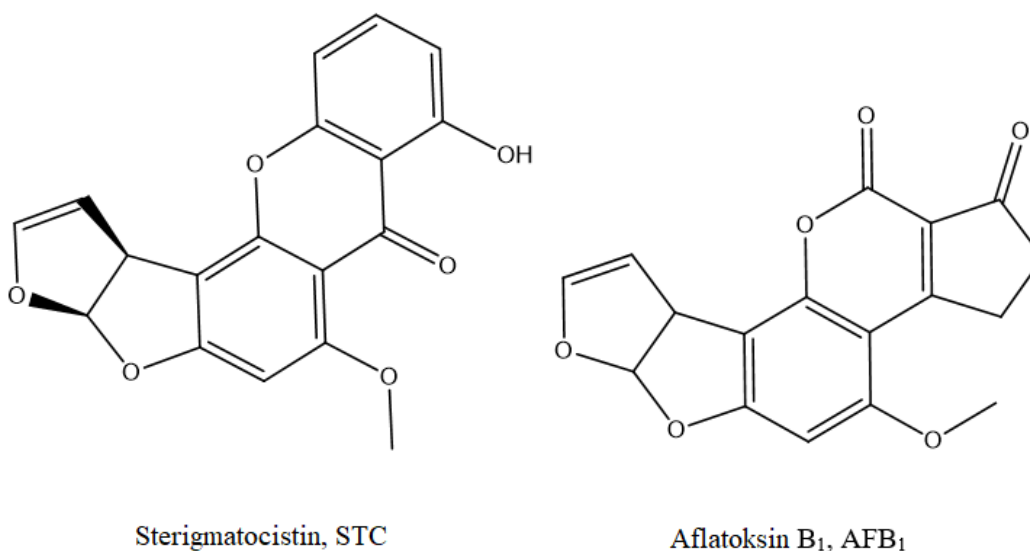
Prilikom silanizacije staklenih čvrstih nosača pomoću MPTMS ili APTMS, molekule silana se za staklo vežu preko metoksi skupina tvoreći monosloj, dok na površini ostaju amino ili tiolne skupine na koje se vežu nanočestice srebra ili zlata (slika 5). Time se mijenjaju površinska svojstva stakla jer nepolarne metilenske $-\text{CH}_2$ skupine površinu čine hidrofobnom pa se i nepolarne molekule mogu adsorbirati pomoću Van der Waalsovih interakcija.¹² Silani s tiolnom skupinom većinom se koriste za vezanje nanočestica zlata, dok silani s amino skupinom pokazuju veći afinitet vezanja s nanočesticama srebra. Također, protonirane amino skupine čine pozitivno nabijeni sloj, na koji se nanočestice s negativnim ionima na površini mogu lako vezati elektrostatskim interakcijama.¹³ Da bi se amino skupine protonirale potrebno je osigurati kiseliji pH. Površinske karakteristike nanočestica, njihova morfologija, ali i sastav, važni su parametri koji utječu na stvaranje jačih ili slabijih interakcija između sloja silana i nanosloja metalnih nanočestica.



Slika 5. Shematski prikaz postupka imobilizacije nanočestica srebra na stakleni čvrsti nosač modificiran s APTMS.¹⁴

2.3. Sterigmatocistin

Sterigmatocistin (STC) je sekundarni toksični metabolit različitih nitastih gljivica uključujući rodove *Aschersonia*, *Emericella*, *Botryotrichum*, *Chaetomium* i druge, ali najčešći rod koji ga proizvodi je *Aspergillus*.¹⁵ STC se može naći u sirovoj, prerađenoj hrani i stočnoj hrani najčešće zbog loših skladišnih uvjeta. Danas postoji relativno malo podataka o kemijskoj karakterizaciji STC. Njegova strukturna sličnost s aflatoksinom B₁ (AFB₁) (slika 6), dobro poznatim kancerogenom, potaknula je istraživanja vezana za STC u kontekstu hepatokarcinogeneze te je, prema dostupnim podacima, STC klasificiran kao tip 2B kancerogen i naveden je kao rizičan faktor karcinoma želuca i ostalih bolesti gastrointestinalnog sustava.



Slika 6. Strukture sterigmatocistina i aflatoksina B₁.

Aflatoksini su grupa hepatotoksičnih, kancerogenih, mutagenih i teratogenih mikotoksina koje većinom proizvodi plijesan *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* i *Aspergillus nomius*. Toksični su i kancerogeni za životinje i ljude jer uzrokuju oštećenje DNA i imaju teratogena svojstva koja uzrokuju malformacije mnogih organa embrija.¹⁶ Aflatoksini, kao najučestaliji mikotoksini detektirani u ljudskoj i životinjskoj hrani, privlače puno pažnje zbog učestale pojave u mnogim poljoprivrednim proizvodima (žitarice, pamuk, kikiriki). STC je prekursor u biosintezi AFB₁.

Podaci o prisutnosti STC u hrani i hrani za životinje su ograničeni, te je od strane Europske agencije za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA), s ciljem procjene rizika izloženosti ljudi ovom mikotoksinu, dana preporuka za prikupljanje podataka o njegovoj pojavnosti uz primjenu visokoosjetljivih analitičkih metoda. STC je do sada pronađen u hrani za životinje, žitaricama, kruhu, orašastim plodovima, zrnima kave, začinima, pivu te siru.¹⁷

Visoka prisutnost STC u radnim i kućnim prostorima opasna je za zdravlje respiratornog sustava. Mehanizam toksičnosti ovog mikotoksina još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Postoji ograničeni broj studija koji demonstriraju toksičnost STC u ribama, štakorima i majmunima. Patološke promjene kod riba uključivale su krvarenja i otoke škrge te krvarenje jetre i gušterače.¹⁵ Nakon oralnog tretmana štakora s ³H-STC, radioaktivnost je zabilježena uglavnom u jetri, želucu, bubrezima, dvanaesniku i plućima. U istraživanju provedenom na majmunima, redoviti unos STC uzrokovao je kronični hepatitis nakon četiri do šest mjeseci trajanja tretmana, a nastavak tretmana uzrokovao je agresivni hepatitis.¹⁷ Mehanizam toksičnosti najvjerojatnije se sastoji od mnogih transformacija i interakcija s različitim metama, uključujući nekovalentna i kovalentna vezanja s DNA. Transformacije podrazumijevaju stvaranje reaktivnih dijelova, poput epoksi skupine i katehola, preko kojih se molekula može kovalentno vezati za DNA. STC i aflatoksini su mutageni jer im je meta stanična DNA. Iako je utvrđeno da se i STC i aflatoksin AFB₁ većinom kovalentno vežu za gvanin na DNA pomoću enzima, riješene strukture jasno pokazuju da se aromatski mikotoksini interkaliraju između parova baza gvanin-citozin (GC) u molekuli DNA, što sugerira da nekovalentne interakcije slaganja (aromatski *stacking*) mogu prednjačiti pred kovalentnim vezanjima. Dakle, pri vezanju STC mijenja se struktura DNA. Visoka toplinska stabilnost na taj način promijenjene molekule DNA i planarna aromatska struktura STC upućuju da je interkalacija između parova baza najvjerojatniji način vezanja.

Za kvantitativno određivanje mikotoksina razvijeno je nekoliko metoda, od kojih se najviše koriste kromatografske i imunokemijske metode: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC), tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom (engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS) i enzimoimunokemijska analiza (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA).¹⁶ Prednosti tih metoda kvantitativne analize su selektivnost, osjetljivost, pouzdanost i niska granica detekcije. No, svaka od njih ima svoje nedostatke. HPLC metoda

je skupa, posebice imunoafinitetne kolone ograničenog roka trajanja. ELISA metodama nedostaje konačna potvrda i mogućnost točne kvantifikacije, a nedostatak je i moguća križna reaktivnost strukturno sličnih spojeva. Navedene metode nisu praktične niti pogodne za analizu u realnom vremenu zbog dugog trajanja analize, složenosti i potrebe za stručnim osobljem. Zbog toga je potrebno razviti metodu koja je osjetljiva, brza, pouzdana i ekonomski prihvatljiva, što odlikuje SERS metodu.

Provedeno je nekoliko istraživanja u kojima je molekula AFB₁ uspješno detektirana SERS metodom, ali uz korištenje skupih i ne tako jednostavnih metalnih supstrata. Neki od tih modificiranih supstrata su primjerice biočipovi hrapave metalne površine s imobiliziranim biomolekulama koje selektivno vežu AFB₁, a čija se površina oslikava pomoću mikroskopa,¹⁸ mreža srebrovih nanoštapića¹⁶ ili SERS čipovi s aptamerima.¹⁹ Aptameri, koji se još nazivaju i umjetna antitijela, su mali ligandi koji se sastoje od kratkih oligonukleotida i vežu ciljanu molekulu s visokim afinitetom. Supstrati bazirani na aptamerima specifično prepoznaju molekulu AFB₁, vrlo su reproducibilni i imaju veliki omjer signala prema šumu. Pri takvoj izvedbi metode ovisnost intenziteta SERS spektara o koncentraciji AFB₁ linearna je u koncentracijskom rasponu od 1×10^{-6} do 1 ng cm^{-3} , dok granica detekcije iznosi $0,4 \text{ fg cm}^{-3}$.¹⁹ Plazmonske samoorganizirajuće trodimenzionalne nanostrukture, poput posloženih srebrovih nanoštapića (engl. *nanorods*), sadrže nanočestice jednakih veličina i oblika, te se odlikuju jakim međučestičnim plazmanskim sprezanjima i reproducibilnim „vrućim mjestima“.²⁰ Granica detekcije na taj način izvedenih SERS mjerenja AFB₁ iznosi $5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, dok je linearno područje u rasponu koncentracija od 5×10^{-5} do $2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.¹⁶ Za razliku od aflatoksina B₁, sterigmatocistin do sada nije istraživani primjenom SERS spektroskopije.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Srebrov nitrat, p.a., Gram-Mol
Trinatrijev citrat dihidrat, p.a., Kemika
Kalcijev nitrat tetrahidrat, p.a., Kemika
Natrijev klorid, p.a., Kemika
Hidroksilamonijev klorid, p.a., Kemika
Natrijev hidroksid, p.a., Kemika
Acetonitril, za HPLC, J. T. Baker
Fluorovodična kiselina (1%), p.a., Riedel-de Haën
Metanol, p.a., Fluka
Klorovodična kiselina, p.a., Fluka
Sumporna kiselina, p.a., Fluka
Vodikov peroksid (30 %), p.a., T.T.T.
(3-aminopropil)trimetoksisilan, p.a., Aldrich
Sterigmatocistin, za HPLC, Cayman Chemical Company
Aflatoksin B₁, za HPLC, Sigma-Aldrich

Laboratorijsko posuđe za pripremu koloida srebra i snimanje uzoraka oprano je deterdžentom (Kemex), isprano običnom vodom, destiliranom vodom, 5%-tnom otopinom dušične kiseline te Milli-Q deioniziranom vodom.

3.2. Mjerni uređaji

Pomoću UV/VIS spektrofotometra SPECORD 200 tvrtke Analytik Jena snimljeni su apsorpcijski spektri koloidnih suspenzija srebra uz korištenje kvarcnih kiveta duljine puta zračenja 1 cm. Spektri su snimljeni u području između 200 i 1100 nm uz razlučivanje od 1 nm.

Mettler Toledo MP220 pH metar s InLab 413 kombiniranom elektrodom korišten je za mjerenje pH vrijednosti koloida. Uređaj je prije mjerenja baždaren s otopinama pufera pH 7,00 i 4,00.

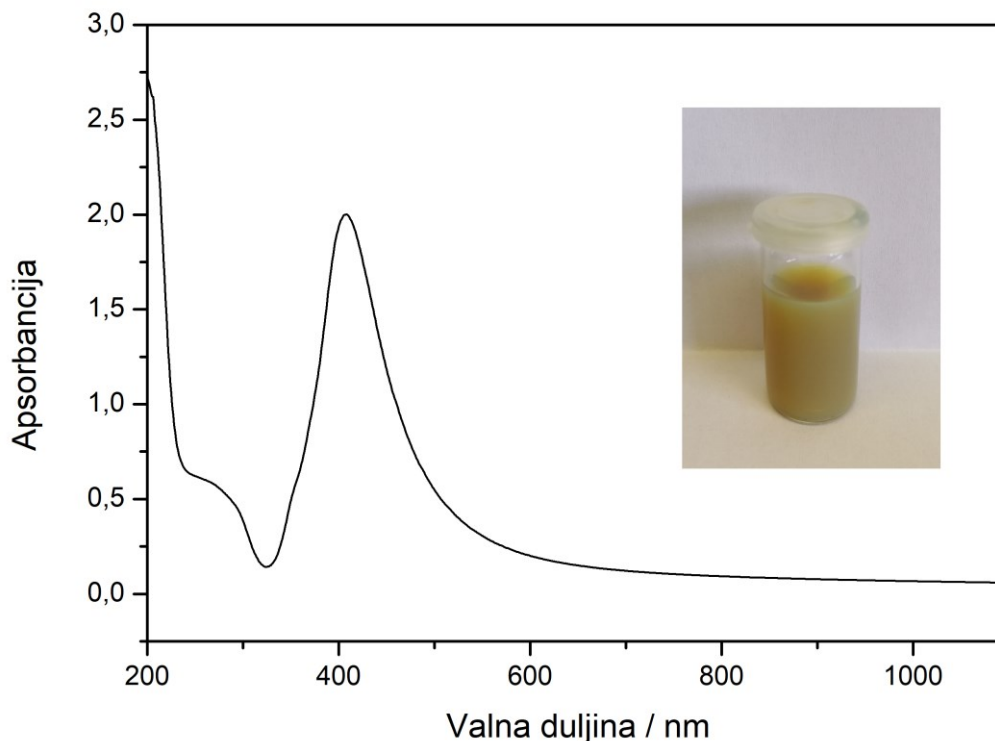
Za snimanje Ramanovih i SERS spektara korišten je interferometar EQUINOX 55 tvrtke BRUKER, opremljen s Ramanovim modulom FRA 106/S i Nd:YAG laserom koji emitira zračenje pri 1064 nm. Prilikom snimanja čvrstih uzoraka i uzoraka na staklenom filter-papiru snaga emitiranog zračenja bila je 100 mW, dok je prilikom snimanja uzoraka u koloidnim suspenzijama i na tretiranim staklima snaga lasera bila 500 mW. Uzorci pripremljeni u koloidnim suspenzijama snimani su u kiveti od kvarca, iza koje je postavljena zrcalna pločica kako bi se postigla refleksija raspršenog zračenja prema detektoru. Za snimanje čvrstih praškastih uzoraka korišten je nosač od aluminijske legure. Uzorci pripremljeni na čvrstim SERS supstratima pričvršćeni su za nosač koji se nalazi na putu zrake lasera u prostoru za uzorak. Pomicanjem nosača podešavan je fokus laserske zrake na uzorku prije snimanja spektra. Spektri su snimani u području 3500–100 cm^{-1} uz razlučivanje od 4 cm^{-1} , a rezultat su uprosječivanja 128 snimaka.

3.3. Priprava supstrata srebra

3.3.1. Priprava koloida srebra

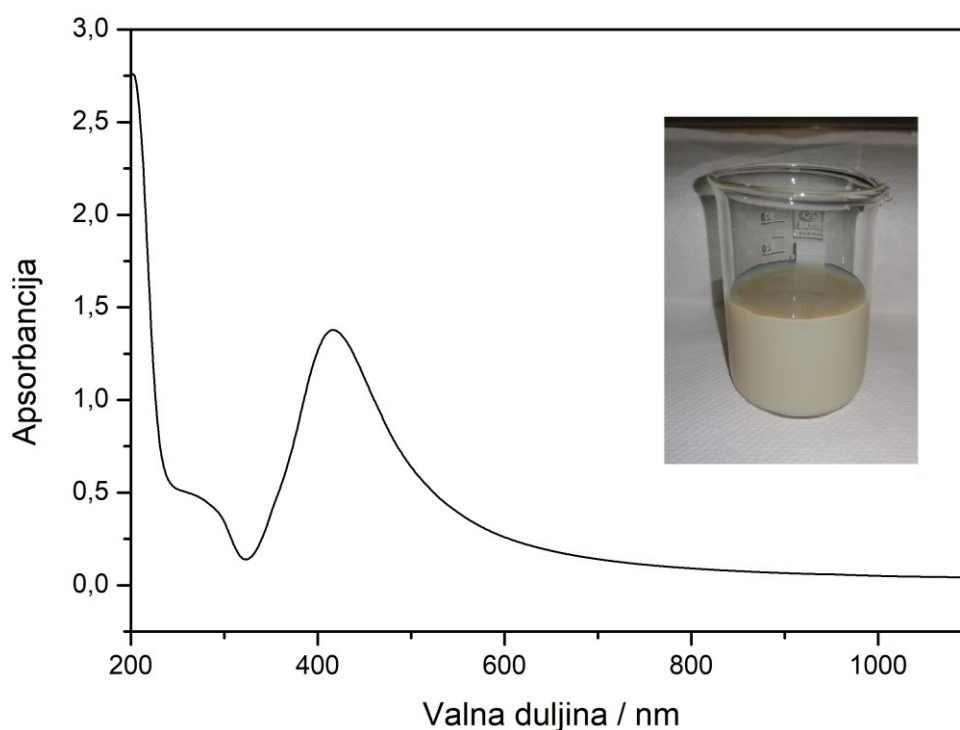
Pripravljene su koloidi srebra koji su se razlikovali prema anionima na površini nanočestica: u jednom slučaju su srebrove nanočestice bile prekrivene slojem citratnih iona (AgNP_cit), a u drugom slučaju su površinski sloj činili kloridni ioni (AgNP_Cl).

Koloid srebra s površinskim slojem citratnih iona pripremljen je redukcijom srebrova(I) nitrata s trinatrijevim citratom, tako da je 200 mL vodene otopine AgNO_3 koncentracije $1,06 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ zagrijano do vrenja na uljnoj kupelji, a potom dodano 4 mL 1%-tne otopine trinatrijeva citrata uz neprestano miješanje.²¹ Smjesa se dalje miješala uz vrenje 60 minuta, pri čemu se bezbojna otopina zamutila i poprimila smeđe sivu boju. U svrhu karakterizacije pripremljenog koloida snimljen je UV/VIS apsorpcijski spektar koloida i izmjeren mu je pH. pH koloidne suspenzije iznosio je 6,88, a valna duljina maksimalne apsorpcije koloida, koja odgovara plazmonske rezonancije nanočestica srebra i inače se javlja u području 390–430 nm, iznosila je 408 nm (slika 7).



Slika 7. Apsorpcijski spektar AgNP_cit.

Koloid srebra s površinskim slojem kloridnih iona pripremljen je redukcijom srebrova nitrata s hidroksilamin hidrokloridom.²² Prvo je pripravljeno 360 mL vodene otopine AgNO_3 koncentracije $1,11 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, a potom 40 mL vodene otopine hidroksilamin hidroklorida koncentracije $0,024 \text{ mol dm}^{-3}$ u koju se dodalo 0,88 mL otopine natrijevog hidroksida koncentracije 2 mol dm^{-3} . Zalužena otopina hidroksilamin hidroklorida brzo se dodala u otopinu srebrovog nitrata uz snažno miješanje na magnetskoj miješalici. Nakon par sekundi reakcijska smjesa poprimila je smeđe sivu boju te se miješanje nastavilo 10 minuta. pH koloidne suspenzije iznosio je 6,08, a valna duljina rezonancije plazmona 416 nm (slika 8).



Slika 8. Apsorpcijski spektar AgNP_Cl.

3.3.2. Priprava otopina

Ishodne otopine sterigmatocistina koncentracija $0,015 \text{ mol dm}^{-3}$ i $0,0058 \text{ mol dm}^{-3}$ pripravljene su na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu otapanjem odgovarajuće mase čvrstog uzorka u acetonitrilu (MeCN) u kojem je STC dobro topljiv. Razrjeđivanjem ishodne otopine STC ($c = 0,0058 \text{ mol dm}^{-3}$) pripravljena je otopina koncentracije $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, koja je poslužila za pripravu uzoraka STC u koloidnim suspenzijama ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ i $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$).

Razrjeđivanjem ishodne otopine STC ($c = 0,015 \text{ mol dm}^{-3}$) u MeCN pripravljena je otopina koncentracije $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pomoću koje su pripremljene otopine STC za snimanje koncentracijski ovisnih SERS spektara na silaniziranim stakalcima ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ i $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$).

3.3.3. Priprava mjernih uzoraka u koloidnim suspenzijama

Za pripravu mjernih uzoraka u koloidnim suspenzijama korišteni su svježe pripremljeni, koncentrirani i agregirani koloid s površinskim slojem citratnih iona. Za vrijeme pripreme uzoraka koloid se neprestano miješao na magnetskoj miješalici te su sustavi koloid-analit pripremani neposredno prije snimanja spektra.

3.3.3.1. Svježe pripravljena koloidna suspenzija

Mjerni uzorak STC ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u svježe pripravljenoj koloidnoj suspenziji pripremljen je miješanjem $400 \mu\text{L}$ koloida AgNP_cit, $90 \mu\text{L}$ deionizirane vode i $10 \mu\text{L}$ otopine STC ($c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$). U svrhu određivanja reproducibilnosti, spektar uzorka snimljen je 5 puta uz mućkanje sadržaja u kiveti između dva snimanja. Zatim je 5 puta iznova pripremljen isti mjerni uzorak i svakom je snimljen spektar. Radi lakše asignacije spektara te opažanja vrpci koje potječu od acetonitrila i koloida, pripravljena su i tri dodatna mjerna uzorka, od kojih je jedan sadržavao samo koloidnu suspenziju, drugi $400 \mu\text{L}$ koloidne suspenzije, $90 \mu\text{L}$ deionizirane vode i $10 \mu\text{L}$ MeCN, a treći $10 \mu\text{L}$ MeCN i $490 \mu\text{L}$ deionizirane vode.

3.3.3.2. Koncentrirana koloidna suspenzija

Koncentrirana koloidna suspenzija je dobivena centrifugiranjem koloida brzinom od 5000 rpm tijekom 15 minuta, te odvajanjem supernatanta od taloga tako da je 85% supernatanta uklonjeno, a 15% preostalog supernatanta promiješano s talogom pomoću automatske mikropipete i prebačeno u Erlenmeyerovu tikvicu. Na taj je način od 70 mL svježe pripremljenog koloida dobiveno 10,5 mL koncentriranog koloida. Mjerni uzorci su pripremljani jednako kao uzorci sa svježe pripremljenom koloidnom suspenzijom te su im spektri snimljeni na isti način.

3.3.3.3. Agregirana koloidna suspenzija

Za agregiranje koloidnih nanočestica korištene su anorganske soli: natrijev klorid (NaCl) i kalcijev nitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$). Pripremljeno je 10 mL otopine NaCl koncentracije 0,1111 mol dm^{-3} i 10 mL otopine $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ koncentracije 0,0111 mol dm^{-3} s obzirom da je u svaki mjerni uzorak ukupnog volumena 500 μL pipetirano po 45 μL tih otopina te je konačna koncentracija soli bila 1×10^{-2} mol dm^{-3} , odnosno 1×10^{-3} mol dm^{-3} .

Prvi mjerni uzorak nije sadržavao analit te je pripremljen miješanjem 400 μL koloidne suspenzije, 10 μL MeCN, 45 μL $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ i 45 μL NaCl. Drugi mjerni uzorak je pripremljen s otopinom analita umjesto otapala prema sljedećem redoslijedu dodavanja: 10 μL otopine STC ($c = 5 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}), 400 μL koloidne suspenzije, 45 μL $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ i 45 μL NaCl. Nadalje, istražena je reproducibilnost pripreme uzorka i mjerenja snimanjem 5 spektara istog uzorka uz mućkanje sadržaja u kiveti između dva snimanja i pripravom još jednog istog uzorka. Sljedeća dva mjerna uzorka pripremljena su u svrhu istraživanja utjecaja pojedine anorganske soli na agregaciju nanočestica, a sastojala su se od: 10 μL otopine STC ($c = 5 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}), 400 μL koloidne suspenzije, 45 μL $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ i 45 μL deionizirane vode, odnosno 10 μL otopine STC ($c = 5 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}), 400 μL koloidne suspenzije, 45 μL NaCl i 45 μL deionizirane vode. Koncentracija STC u svim uzorcima bila je 1×10^{-5} mol dm^{-3} .

Na isti način pripremljeni su mjerni uzorci s koncentriranom koloidnom suspenzijom.

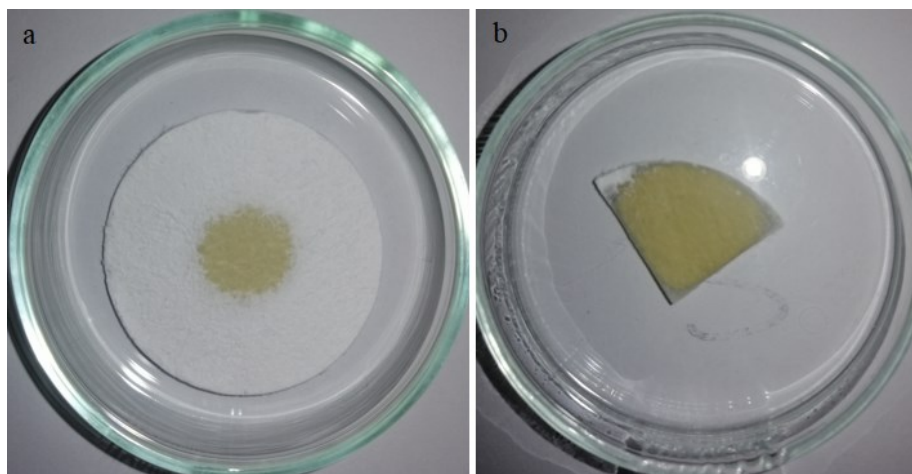
3.3.4. Priprava mjernih uzoraka na čvrstim nosačima

Imobilizacija nanočestica na čvrste nosače omogućava da one međusobno budu u neposrednoj blizini. Kao čvrsti nosači korišteni su: stakleni filter-papir, staklo tretirano fluorovodičnom kiselinom i silanizirano staklo. Na stakleni filter-papir i staklo tretirano fluorovodičnom kiselinom imobilizirane su nanočestice srebra s citratnim ionima na površini, dok su na silanizirana stakla imobilizirane nanočestice s citratnim i one s kloridnim ionima na svojoj površini.

3.3.4.1. Stakleni filter-papir

Whatman GF/A stakleni filter-papir načinjen od borosilikatnog stakla, promjera 37 mm i veličine pora 1,6 μm , korišten je kao čvrsti nosač. Aktivni SERS supstrat pripremljen je nanošenjem alikvota koloida srebra direktno na površinu staklenog filter-papira pomoću automatske mikropipete.

Filter-papir prerezan je na četvrtine na koje je zatim pipetirano 100 μL ili koloidne suspenzije ili uzorka sterigmatocistina ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u koloidu. Uzorak je sadržavao 80 μL koncentrirane koloidne suspenzije srebra, 18 μL deionizirane vode i 2 μL otopine STC ($c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$). Alikvot koloida ili uzorka u koloidu mikropipetom je polako ispuštan na površinu filter-papira kako bi se kontrolirala brzina upijanja i širenje uzorka, tako da nastali radijus bude uvijek $\sim 1 \text{ cm}$ (slika 9). Nakon nanošenja uzorka filter-papiri su se sušili na zraku oko 30 minuta. Spektar svakog filter-papira snimljen je više puta, svaki put usmjeravajući zraku lasera na drugo mjesto na papiru.



Slika 9. a) Alikvot koloida na cijelom staklenom filter-papiru radi vizualizacije širenja uzorka po papiru. b) Alikvot uzorka sterigmatocistina u koncentriranom koloidu srebra na četvrtini staklenog filter-papira.

3.3.4.2. Tretirano staklo

Kao drugi tip čvrstih nosača korištena su predmetna borosilikatna stakalca za mikroskopiju tvrtke Thermo Scientific. Kako bi se uklonio površinski sloj oksida te nagrizanjem postigla neravna površina, stakalca su uronjena u 1%-tnu fluorovodičnu kiselinu do polovice visine 20 minuta,¹⁰ nakon čega su uronjena do jednake visine u deioniziranu vodu dodatnih 20 minuta i na kraju osušena na zraku. Na jedno stakalce pipetirano je 100 μL svježe pripravljene koloidne suspenzije srebra te na jedno isti volumen koncentrirane koloidne suspenzije. Na tri tretirana stakalca pipetirano je po 100 μL uzorka sterigmatocistina ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) koji je sadržavao 80 μL koloidne suspenzije srebra, 18 μL deionizirane vode i 2 μL otopine STC ($c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$). Na preostala tri tretirana stakalca pipetiran je jednaki volumen uzoraka koji su umjesto svježe pripremljenog koloida sadržavali koncentrirani koloid. Slijedilo je sušenje pripremljenih mjernih uzoraka 2 sata pri sobnoj temperaturi. Nakon sušenja na nekim je stakalcima nastali prsten nanočestica srebra bio izrazito lijepo vidljiv (slika 10). Svakom uzorku je snimljeno više spektara usmjeravajući zraku lasera na različita mjesta na nastalim prstenovima.



Slika 10. „Coffee-ring“ efekt na stakalcima tretiranim fluorovodičnom kiselinom na koja je pipetirano po 100 μL uzorka sterigmatocistina ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u koncentriranom koloidu srebra.

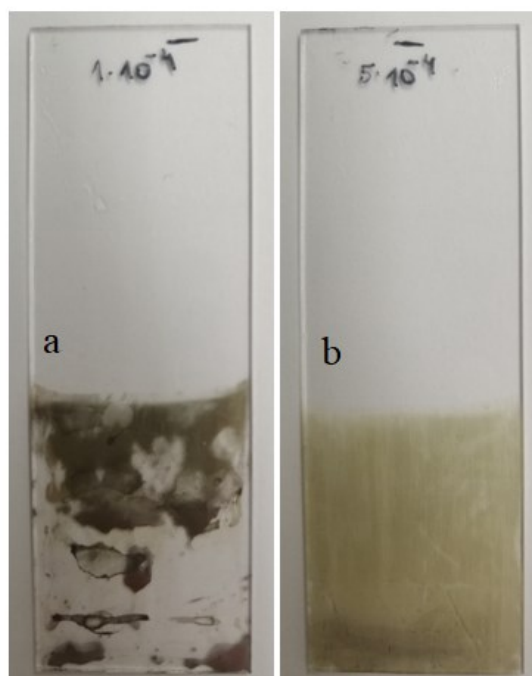
3.3.4.3. Silanizirano staklo

Prije samog postupka silanizacije, predmetna stakalca su očišćena dvjema različitim metodama (tablica 1).

Tablica 1. Metode čišćenja stakalaca.

Metoda	Koraci
I ²³	Uranjanje 30 min u 1:1 MeOH : HCl ($V_{\text{uk}} = 60 \text{ mL}$)
	Ispiranje u H ₂ O, sušenje na zraku
	Inkubacija 30 min u konc. H ₂ SO ₄ ($V = 60 \text{ mL}$)
	Ispiranje u H ₂ O, sušenje na zraku
II ²⁴	Uranjanje 30 min u 1:1 MeOH : HCl ($V_{\text{uk}} = 60 \text{ mL}$)
	Uranjanje 3 min u Piranha otopinu: 3:1 konc. H ₂ SO ₄ : 30% H ₂ O ₂ ($V_{\text{uk}} = 200 \text{ mL}$)
	Ispiranje u H ₂ O, sušenje na zraku

Silanizacija supstrata je provedena uranjanjem očišćenih stakalaca u 50 mL otopine APTMS u metanolu ($\varphi = 5\%$) tijekom 4 sata.¹² Potom su stakalca temeljito isprana u metanolu da bi se uklonio višak silana, koji može uzrokovati agregaciju nanočestica pri uranjanju u koloidnu suspenziju,²⁵ te sušena u sušioniku 1 sat na 100 °C. Silanizirana stakalca su zatim okomito uronjena do jednake visine u koloidnu suspenziju kako bi se nanočestice srebra vezale za površinu. Pri prvoj pripravi SERS supstrata 8 stakalca je bilo uronjeno u svježe pripremljeni koloid AgNP_cit 1 sat, dok je pri drugoj pripravi po 8 stakalca uronjeno u koncentrirane koloide AgNP_cit i AgNP_Cl u trajanju od 24 sata. Tijekom prve priprave stakalca su sušena u sušioniku 10 min na 100 °C, a tijekom druge su sušena na zraku pri sobnoj temperaturi. Nakon sušenja su nanočestice AgNP_Cl bile većinom ravnomjerno raspoređene po površini stakalca, s nešto debljim slojem pri dnu stakalca, dok su nanočestice AgNP_cit bile nejednoliko vezane i grupirane na pojedinim mjestima (slika 11). Na područja stakalca s najviše nanočestica automatskom mikropipetom je pipetirano po 75 μL otopina STC koncentracija $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ i $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Navedene otopine nanosene su na SERS supstrate pripravljene s oba koloida, AgNP_cit i AgNP_Cl. Također, mjerni uzorci na svakom od pripremljenih supstrata pripravljene su i s otopinom aflatoksina B₁ ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$).

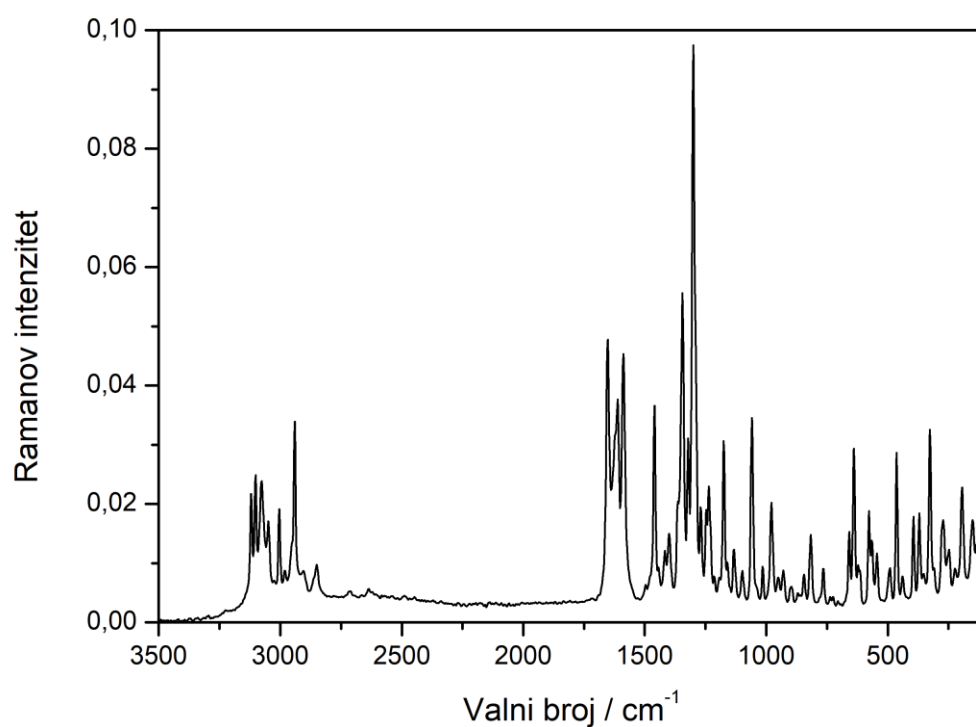


Slika 11. Silanizirana stakalca s imobiliziranim nanočesticama srebra: a) AgNP_cit i b) AgNP_Cl.

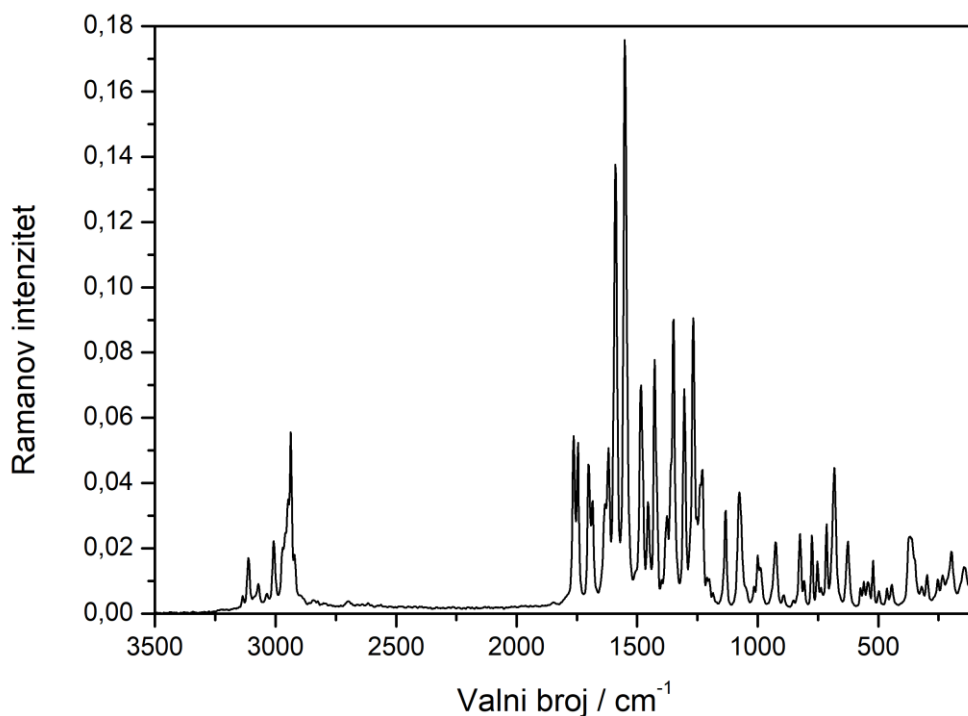
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ramanovi spektri

Snimljeni su Ramanovi spektri čvrstih uzoraka sterigmatocistina (slika 12) i aflatoksina B₁ (slika 13). Opažene vibracijske vrpce asignirane su u tablici 2.



Slika 12. Ramanov spektar čvrstog uzorka sterigmatocistina.

Slika 13. Ramanov spektar čvrstog uzorka aflatoksina B₁.

U Ramanovim spektrima sterigmatocistina i aflatoksina B₁ opažene su vrpce slabog do srednjeg intenziteta u području 3120–2900 cm⁻¹ koje odgovaraju istezanju veza C–H aromatskih i metilnih skupina. U spektru sterigmatocistina vrpca srednjeg intenziteta pri 1652 cm⁻¹ pripisana je istezanju veze C=O, dok u spektru aflatoksina B₁ na istu vibraciju upućuju dvije srednje intenzivne vrpce, jedna pri 1765 cm⁻¹ te druga pri 1746 cm⁻¹, koje potječu od dvije karbonilne skupine u strukturi. Vrpce pri 1685 cm⁻¹ i 1618 cm⁻¹ u spektru AFB₁ te vrpca pri 1611 cm⁻¹ u spektru STC odgovaraju istezanju veza C=C u prstenovima. Dvije najintenzivnije vrpce u spektru AFB₁ pri 1589 cm⁻¹ i 1551 cm⁻¹ su posljedica istezanja veza između atoma ugljika u prstenovima (ν C–C–C i ν C–C). Kod obje molekule deformacijske vibracije u ravnini aromatskih CH skupina doprinose intenzivnim vrpcama pri 1459 cm⁻¹ i 1427 cm⁻¹, a jednako intenzivnim vrpcama pri 1344 cm⁻¹ i 1349 cm⁻¹, uz istezne vibracije veza C–C okosnice prstenova, doprinose i istezanja veza C–O. Molekula sterigmatocistina, za razliku od molekule aflatoksina B₁, u strukturi sadrži hidroksilnu skupinu, pa se stoga u spektru opažaju i dodatne vrpce deformacije OH skupine pri 1416 cm⁻¹ i 659 cm⁻¹. Na deformacijske vibracije izvan ravnine aromatskih CH skupina i deformacije prstenova upućuju vrpce u području nižih valnih brojeva od 900 cm⁻¹ do 640 cm⁻¹.

Tablica 2. Asignacija osnovnih vibracijskih vrpci u Ramanovim spektrima čvrstih uzoraka sterigmatocistina i aflatoksina B₁.

Valni broj / cm ⁻¹		Vibracija ^{16,26}
STC	AFB ₁	
3102	3112	v C–H (aromatski)
3004	3007	v C–H (aromatski)
2940	2937	v _{as} C–H (CH ₃)
	2921	v _s C–H (CH ₃)
1652	1765	v C=O piran
	1746	v C=O ciklopten
	1685	v C=C
1611	1618	v C=C
1587	1589	v C–C, v C–C–C
	1551	v C–C, deformacije prstena
	1484	v C–C, deformacije prstena
	1454	δ _{as} CH ₃
1459	1427	v C=C, δ _{ip} C–H (prsten)
1416		δ _{ip} O–H
1400	1376	δ _s CH ₃
1344	1349	v C–O, v C–C (okosnica prstenova)
1300	1304	δ _{ip} C–H (prsten)
1269	1267	δ _{ip} C–H (prsten)
	1230	δ _{ip} C–H ₂ (prsten)
1175	1133	v C–O–C(H ₃), v C–O–C (prsten)
1059	1076	v C–C–C, deformacija prstena
979	1000	δ _{ip} C–O, v C–C
929	925	disanje prstena, v C–O
817	825	δ _{oop} C–H (prsten)
659		δ _{oop} O–H
640	682	deformacija prstena

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

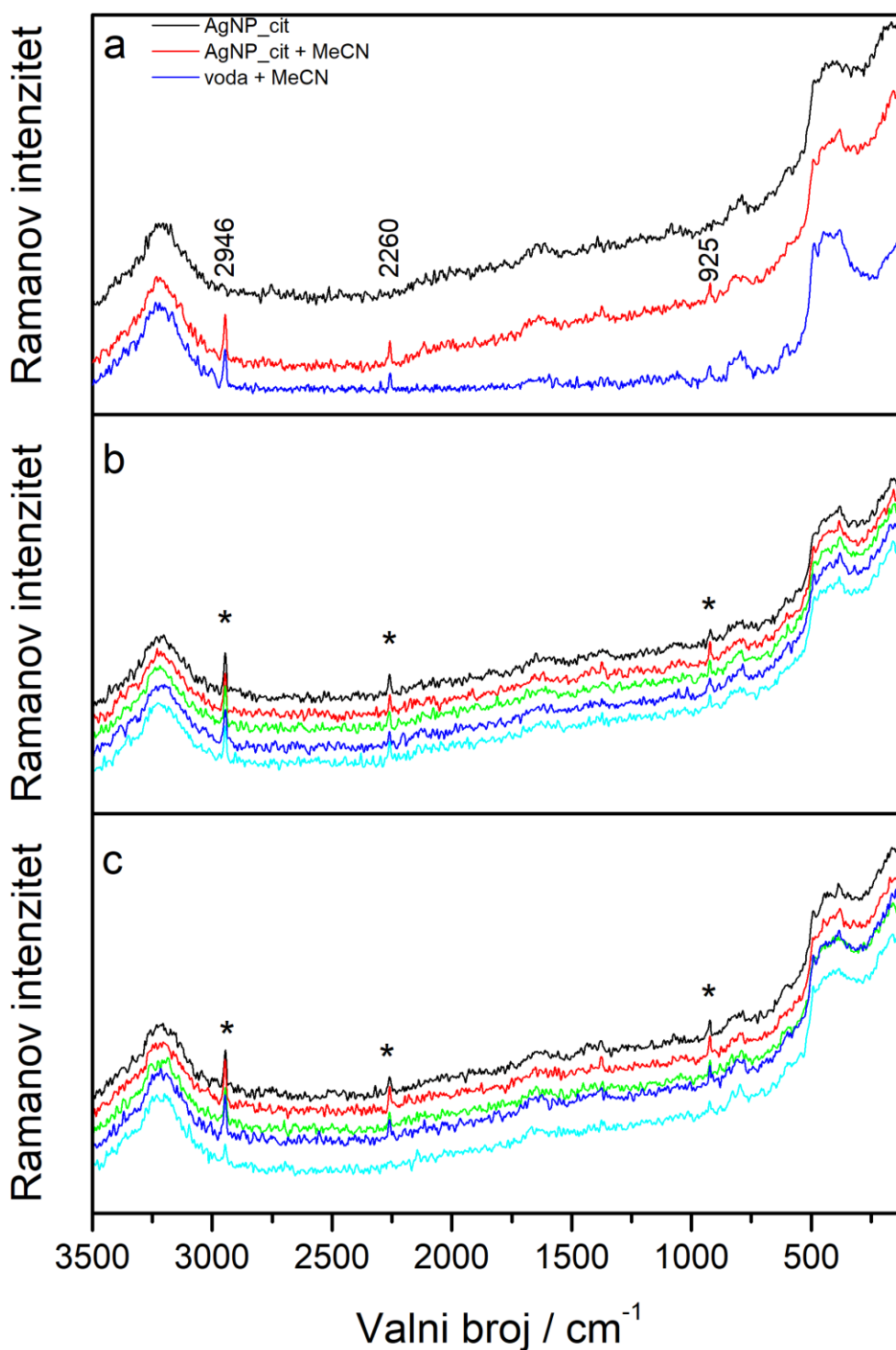
4.2. SERS učinkovitost i reproducibilnost supstrata srebra

4.2.1. Svježe pripravljena koloidna suspenzija

Za istraživanje pogodnosti koloidne suspenzije srebra kao SERS supstrata za analizu STC korišten je koloid AgNP_cit, pripremljen redukcijom srebrovih iona s trinatrijevim citratom. Odabran je radi jednostavne pripreme i visoke SERS učinkovitosti za velik broj analita.

Mjerni uzorak STC ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) pripremljen je miješanjem koloidne suspenzije AgNP_cit, deionizirane vode i otopine STC u acetonitrilu. U svrhu usporedbe sa spektrom uzorka STC i eliminacije vrpce koje potječu od otapala i koloida, snimljeni su spektri koloidne suspenzije AgNP_cit, zatim MeCN u koloidu ($\varphi = 2\%$) i MeCN u deioniziranoj vodi ($\varphi = 2\%$) (slika 14.a). U spektru koloida opažena je široka vrpce istezanja molekula vode ($3500\text{--}3000 \text{ cm}^{-1}$) i podignuta bazna linija uslijed raspršenja zračenja na nanočesticama srebra. U spektru smjese MeCN i koloida uočene su vrpce acetonitrila: pri 2946 cm^{-1} koja je pripisana istezanju veza C–H metilne skupine, pri 2260 cm^{-1} koja odgovara istezanju veze $\text{C}\equiv\text{N}$ i pri 925 cm^{-1} kojoj doprinosi vibracija istezanja veze C–C. Ramanov spektar acetonitrila nalazi se u Dodatku (slika D1). Kako bi se utvrdilo jesu li vrpce acetonitrila u spektru opažene zbog pojačanja Ramanovog raspršenja uslijed vezanja molekula MeCN na površinu srebra ili je koncentracija MeCN u smjesi s koloidom dovoljna za opažanje Ramanovog spektra, snimljen je spektar acetonitrila u vodi u jednakom volumnom omjeru. Približno jednaki intenziteti vrpce MeCN u smjesama s koloidom i s vodom ukazuju da se molekule MeCN nisu vezale na nanočestice srebra.

U svrhu određivanja reproducibilnosti supstrata i mjerenja snimljeni su spektri jednog mjernog uzorka STC ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) pet puta uz mućkanje sadržaja u kiveti između dva snimanja (slika 14.b). Također, za testiranje ponovljivosti pripreme uzorka isti mjerni uzorak STC ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) nanovo je pripremljen pet puta i svakom je uzorku snimljen spektar (slika 14.c). Svi snimljeni spektri nalikuju jedan drugome i u njima se uočavaju jedino vibracijske vrpce MeCN, tj. otapala, na slikama označene asteriskom. Opaženi rezultati dovode do zaključka da se molekule STC nisu adsorbirale na AgNP_cit. Najvjerojatniji razlog tomu je što nanočestice srebra na površini imaju negativno nabijeni sloj citratnih iona, a STC je neutralna molekula, zbog čega elektrostatsko privlačenje izostaje.

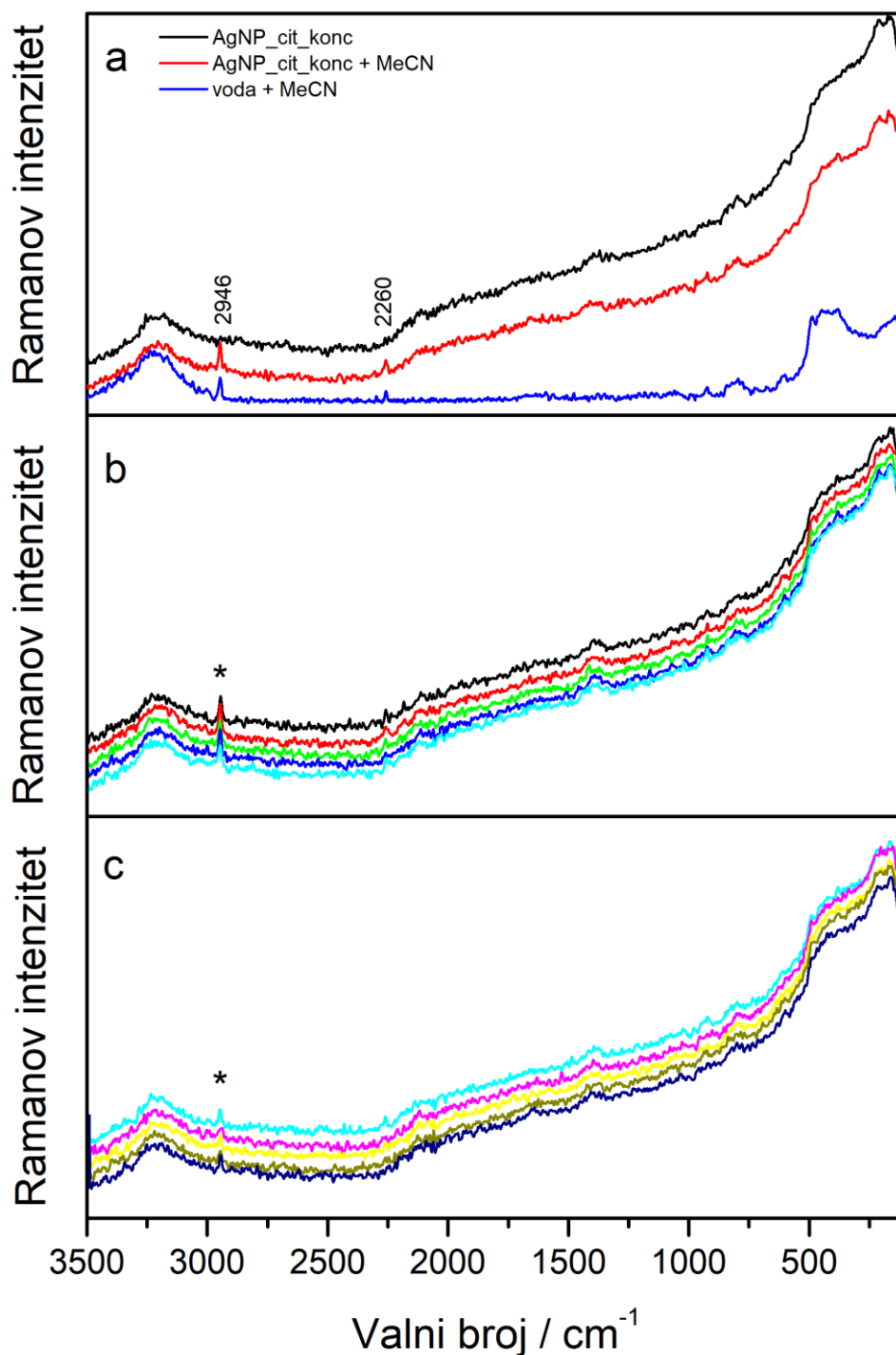


Slika 14. a) SERS spektri svježe pripremljenog koloida AgNP_cit (crno), smjese MeCN i koloida AgNP_cit ($\varphi(\text{MeCN}) = 2\%$) (crveno), smjese MeCN i deionizirane vode ($\varphi(\text{MeCN}) = 2\%$) (plavo). b) SERS spektri jednog uzorka STC ($1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u koloidu AgNP_cit snimljeni pet puta. c) SERS spektri pet uzoraka STC ($1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u koloidu AgNP_cit. Asteriskom su označene vibracijske vrpce MeCN. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.

4.2.2. Koncentrirana koloidna suspenzija

Nakon centrifugiranja i ukoncentriravanja koloida AgNP_cit pripremljen je mjerni uzorak STC ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u koncentriranoj koloidnoj suspenziji srebra. U snimljenim spektrima uzoraka MeCN u koncentriranom koloidu i MeCN u vodi, koji nisu sadržavali analit, uočavaju se vrpce koje upućuju na prisutnost MeCN (slika 15.a).

Kao i u slučaju uzorka u svježe pripremljenoj koloidnoj suspenziji, SERS spektri STC ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u koncentriranom koloidu AgNP_cit snimljeni su pet puta uz mućkanje sadržaja u kiveti između dva snimanja (slika 15.b). Nadalje, isti mjerni uzorak STC ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) je nanovo pripremljen još pet puta i svakom uzorku je snimljen spektar (slika 15.c). S obzirom da koncentrirana koloidna suspenzija sadrži veću koncentraciju nanočestica u jedinici volumena, nanočestice se nalaze bliže jedna drugoj te stvaraju veći broj „vrućih mjesta“ blizu kojih se molekule analita mogu lakše i češće naći te na njih adsorbirati. Međutim, karakteristične vrpce STC niti u ovom slučaju nisu uočene (slike 15.b i 15.c) što ukazuje da se molekule analita zbog svoje neutralnosti ne adsorbiraju na površinu nanočestica nego ostaju u otopini.

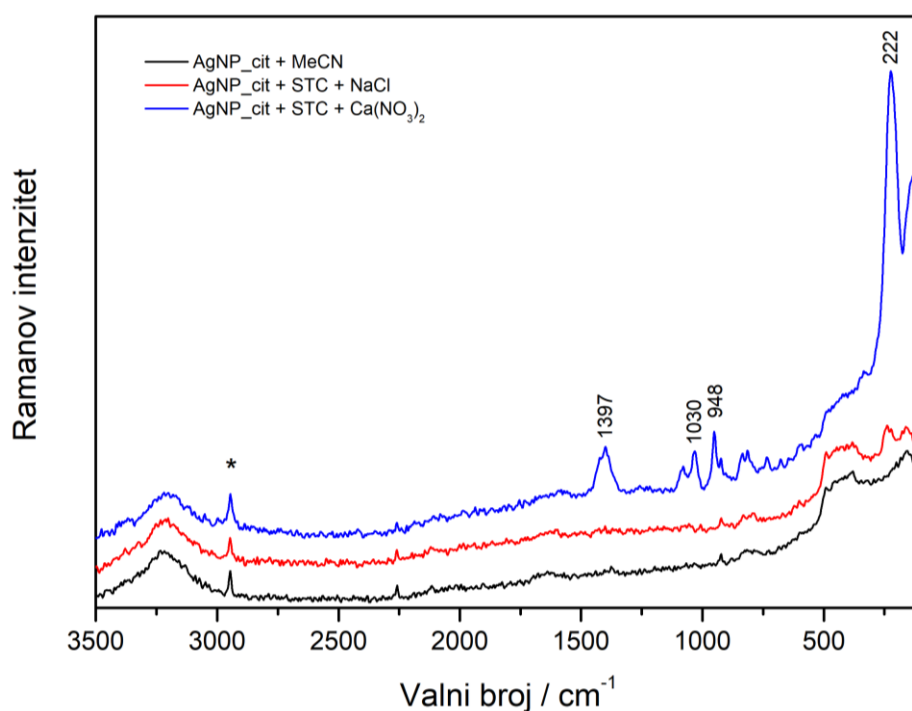


Slika 15. a) SERS spektri koncentriranog koloida AgNP_cit (crno), smjese MeCN i koncentriranog koloida AgNP_cit ($\varphi(\text{MeCN}) = 2\%$) (crveno), smjese MeCN i deionizirane vode ($\varphi(\text{MeCN}) = 2\%$) (plavo). b) SERS spektri jednog uzorka STC ($1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u koncentriranom koloidu AgNP_cit snimljeni pet puta. c) SERS spektri pet uzoraka STC ($1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u koncentriranom koloidu AgNP_cit. Asteriskom su označene vibracijske vrpce MeCN. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.

4.2.3. Agregirana koloidna suspenzija

Budući da pojačanje Ramanovog raspršenja molekula STC nije opaženo niti u svježe pripremljenom niti u koncentriranom koloidu, koloid AgNP_cit je agregiran dodatkom vodenih otopina natrijeva klorida ($c = 0,1111 \text{ mol dm}^{-3}$) i kalcijeva nitrata ($c = 0,0111 \text{ mol dm}^{-3}$) u svrhu povećanja broja „vrućih mjesta“. Negativni citratni ioni na površini nanočestica srebra stabiliziraju koloid jer uslijed elektrostatskog odbijanja negativno nabijenog površinskog sloja čestice ostaju dispergirane u otopini. Dodatkom dovoljne koncentracije natrijevih ili kalcijevih iona negativno nabijeni ioni na površini se u potpunosti ili djelomično neutraliziraju, čime se odbojne sile među nanočesticama smanjuju što omogućava njihovu agregaciju.

Istražen je utjecaj pojedine anorganske soli na agregaciju nanočestica srebra. Snimljeni su spektri mjernih uzoraka STC ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u koloidu AgNP_cit, koji su sadržavali NaCl ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$), odnosno $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), te su uspoređeni sa spektrom STC u neagregiranom koloidu (slika 16).

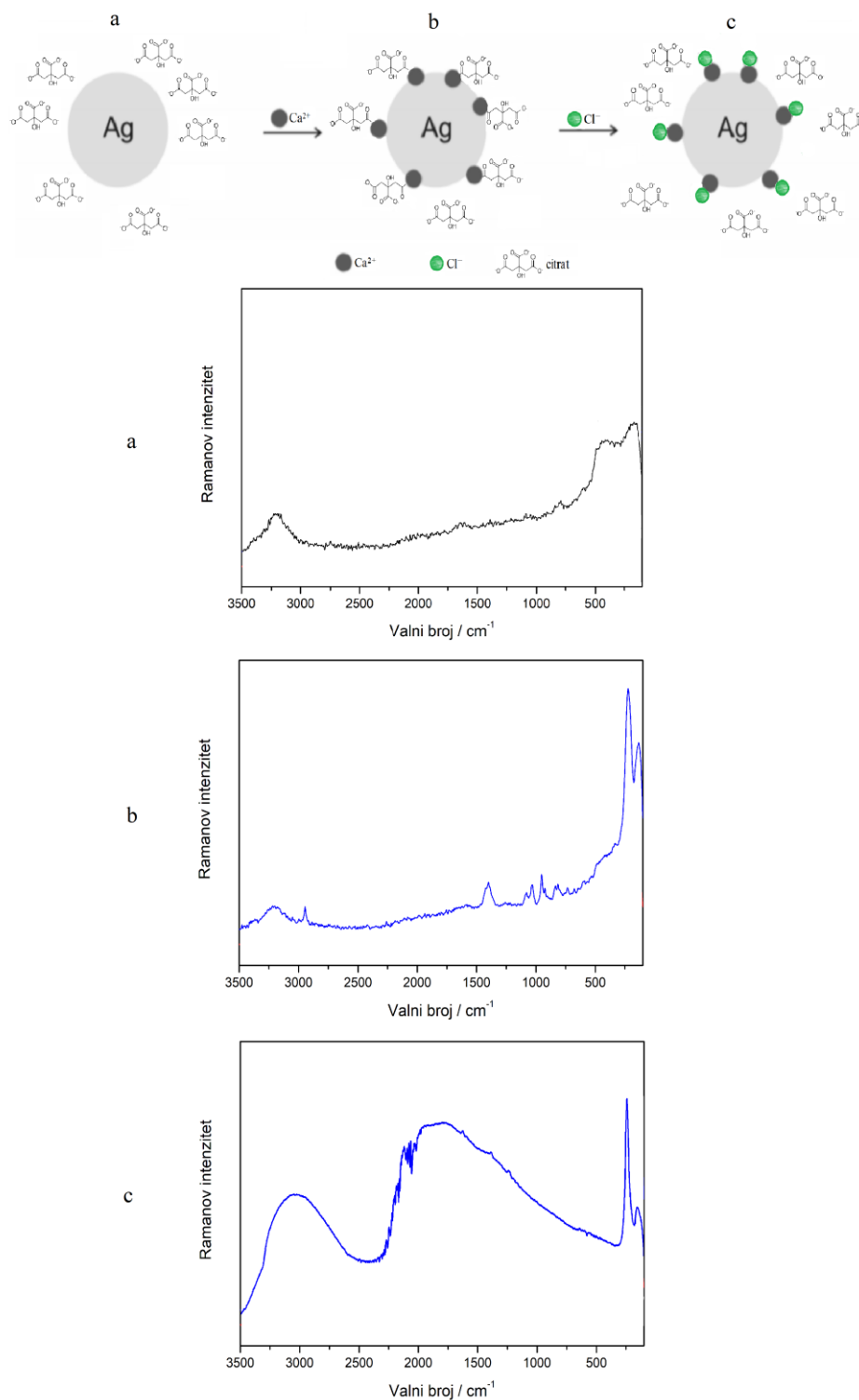


Slika 16. SERS spektri STC ($1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u neagregiranom koloidu AgNP_cit (crno), u koloidu AgNP_cit agregiranom s NaCl ($1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) (crveno) i u koloidu AgNP_cit agregiranom s $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) (plavo). Asteriskom je označena vibracijska vrpca MeCN. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.

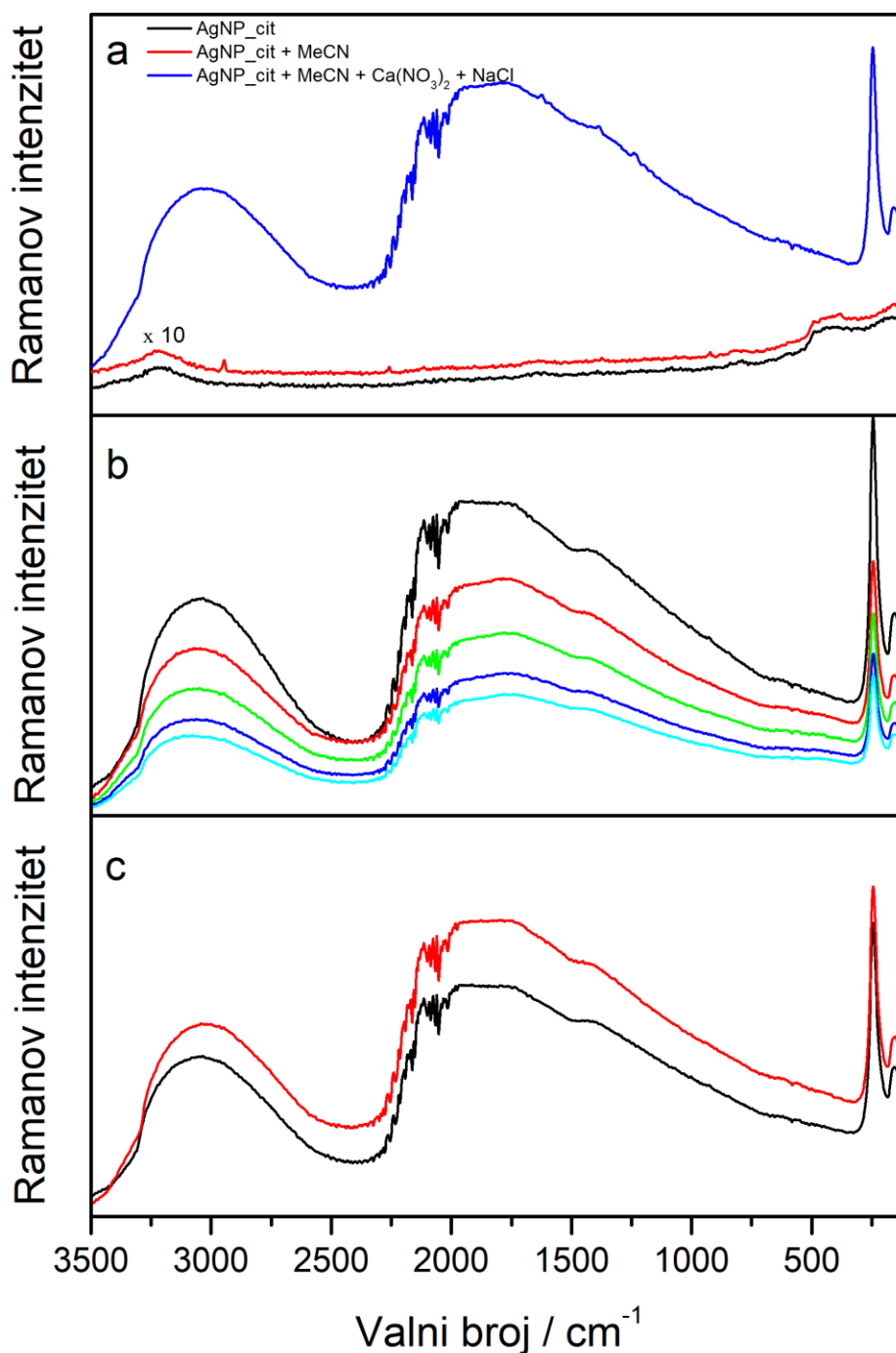
U spektrima nisu opažene vibracijske vrpce analita, što upućuje da niti agregiranjem koloida molekule STC nisu ostale zarobljene između nanočestica niti zadržane blizu njihove površine. Također, neutralizacijom površinskog naboja na nanočesticama nije potaknuta adsorpcija STC na površinu srebra. Međutim, može se primijetiti da su neke anorganske soli bolja agregirajuća sredstva od drugih, što ovisi o nabojnom broju kationa. Što je veći nabojni broj kationa nanočestice s površinskim slojem aniona bolje agregiraju te je za agregaciju potrebna manja koncentracija tih iona od iona manjeg nabojnog broja.²⁷ Prema tome, dodatkom iona Ca^{2+} nanočestice srebra bolje agregiraju nego dodatkom iona Na^+ , na što upućuje spektar koloida AgNP_cit u kojeg je dodan $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. U tom su spektru uočene vibracijske vrpce citratnih iona koji čine površinski sloj na nanočesticama srebra, a koje se ne uočavaju u SERS spektru neagregiranog koloida. Za pretpostaviti je da se uslijed agregacije nanočestica citratni ioni nalaze na „vrućim mjestima“ te se Ramanovo raspršenje citratnih iona pojačava. Vrpca pri 1397 cm^{-1} odgovara vibracijama deformacije metilenske skupine i simetričnom istezanju COO^- skupine. U Ramanovom spektru trinatrijeva citrata vrpca simetričnog istezanja COO^- skupine nalazi se pri 1417 cm^{-1} te je vrlo intenzivna i oštra (slika D2), dok je u opaženom SERS spektru ona široka i pomaknuta prema nižim valnim brojevima što upućuje na interakciju između karboksilata i površine srebra.²¹ Vrpca pri 1030 cm^{-1} odgovara istezanju veze C–O, a vrpca pri 948 cm^{-1} istezanju veza C–COO. Vrpce pri nižim valnim brojevima odgovaraju vibracijama okosnice molekule, dok je vrpca pri 222 cm^{-1} pripisana vibraciji istezanja veze Ag–O. U spektru koloida AgNP_cit agregiranom s NaCl vrpce vibracija citratnih iona izostaju. Osim slabije agregacije ionima Na^+ dodatkom NaCl u odnosu na $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, izostanak vrpce citratnih iona u spektru može se pripisati i djelomičnoj zamjeni citratnih iona na površini srebra s kloridnim ionima.²⁸ Na to upućuje vrpca istezanja veze Ag–Cl pri 238 cm^{-1} .

Kako bi se istražili procesi na površini nanočestica uslijed dodatka agregirajućih soli, snimljeni su SERS spektri koloida AgNP_cit u kojeg je prvo dodana otopina $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($c = 1 \times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$), a zatim otopina NaCl ($c = 1 \times 10^{-2}\text{ mol dm}^{-3}$) (slika 17).²⁸ Zamjena citratnih iona kloridnim ionima na površini agregiranih nanočestica doprinosi opažanju pojačanog Ramanovog raspršenja analita s obzirom da su kloridni ioni manji od citratnih te sterički manje ometaju približavanje molekula analita nanočesticama srebra.²⁹ U prisutnosti iona Ca^{2+} nanočestice srebra agregiraju te se stvaraju SERS aktivna mjesta na kojima se pojačava raspršenje zračenja citratnih iona (slika 17.b). Dodatkom NaCl u agregirani koloid kloridni

ioni se vežu na ista SERS aktivna mjesta zamjenjujući citratne ione, čije vrpce sada izostaju iz spektra (slika 17.c). Zamjena se događa jer ioni Cl^- imaju veći afinitet prema srebru od citratnih iona. U spektru se opaža jedino intenzivna vrpca pri 247 cm^{-1} koja odgovara istezanju veze $\text{Ag}-\text{Cl}$.



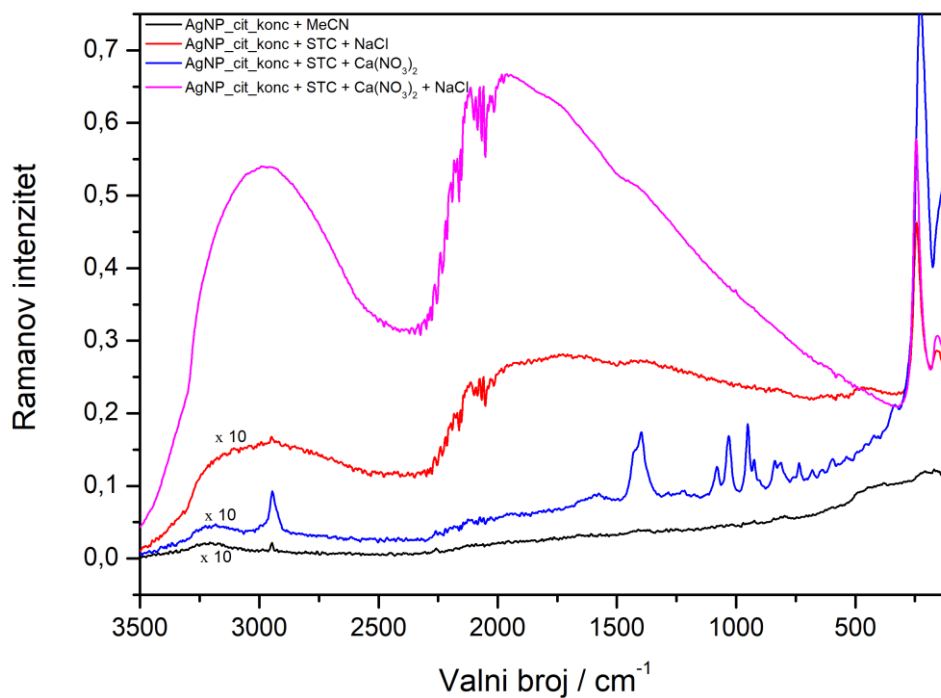
Slika 17. Shematski prikaz procesa na površini nanočestica srebra tijekom dodatka agregirajućih soli $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ i NaCl . a) Ramanov spektar svježe pripremljenog koloida AgNP_cit. b) SERS spektar citratnih iona nakon agregacije nanočestica srebra s ionima Ca^{2+} . c) Intenzivna SERS vrpca istezanja veze Ag-Cl nakon zamjene citratnih iona kloridnim ionima na površini nanočestica srebra.



Slika 18. a) SERS spektri svježe pripremljenog koloida AgNP_cit (crno), MeCN u koloidu AgNP_cit (crveno) te MeCN u agregiranom koloidu u kojem je redom dodan Ca(NO₃)₂ (1 × 10⁻³ mol dm⁻³) i NaCl (1 × 10⁻² mol dm⁻³). b) SERS spektri jednog uzorka STC (1 × 10⁻⁵ mol dm⁻³) u agregiranom koloidu AgNP_cit snimljeni pet puta. c) SERS spektri dva uzorka STC (1 × 10⁻⁵ mol dm⁻³) u agregiranom koloidu AgNP_cit. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.

U spektrima uzoraka STC ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) pripremljenih u koloidu agregiranom s $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) i NaCl ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) nisu opažene vrpce analita (slike 18.b i 18.c). Niti djelomična neutralizacija negativnog naboja površinskog sloja nije pospješila adsorpciju STC na nanočestice srebra. Također, veličina citratnih iona zasigurno otežava prilazak molekula analita površini SERS supstrata, a time i eventualno kemijsko vezanje s površinom srebra preko atoma kisika. Međutim, niti pri manjim steričkim smetnjama, odnosno u pristnosti manjih kloridnih iona na površini nanočestica, nije opažen spektar STC. Ponovljivost susprata i mjerenja je istražena snimanjem istog uzorka pet puta uz mućkanje sadržaja u kiveti između dva snimanja. Smanjenje intenziteta spektara tijekom vremena pripisano je agregaciji nanočestica, odnosno nastajanju agregata koji se spuštaju na dno kivete i nestaju iz fokusa laserske zrake.³⁰

Agregiranje koloidnih nanočestica anorganskim solima provedeno je i u koncentriranoj koloidnoj suspenziji srebra. Pripremljena su tri mjerna uzorka STC ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u koncentriranom koloidu AgNP_cit koji su agregirani na sljedeći način: jedan uzorak s $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), drugi s NaCl ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$), a treći s obje soli. Međutim, u snimljenim spektrima nisu uočene karakteristične vrpce analita, što ukazuje da niti u ovom slučaju nije došlo do vezanja molekula STC na nanočestice srebra (slika 19). U spektru uzorka u kojem je AgNP_cit agregiran samo s $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ javljaju se vibracijske vrpce citrata, dok se u spektru uzorka u kojem je AgNP_cit agregiran samo s NaCl pojavljuje se samo intenzivna vrpca pri 247 cm^{-1} koja odgovara vibraciji istezanja veze Ag-Cl i upućuje na zamjenu citratnih iona na površini nanočestica kloridnim ionima. Zadnje potvrđuje i spektar uzorka u kojem je AgNP_cit agregiran s oba agregirajuća sredstva, u kojem nedostaju vrpce citrata, dok je intenzivna vrpca pri 247 cm^{-1} i dalje prisutna.

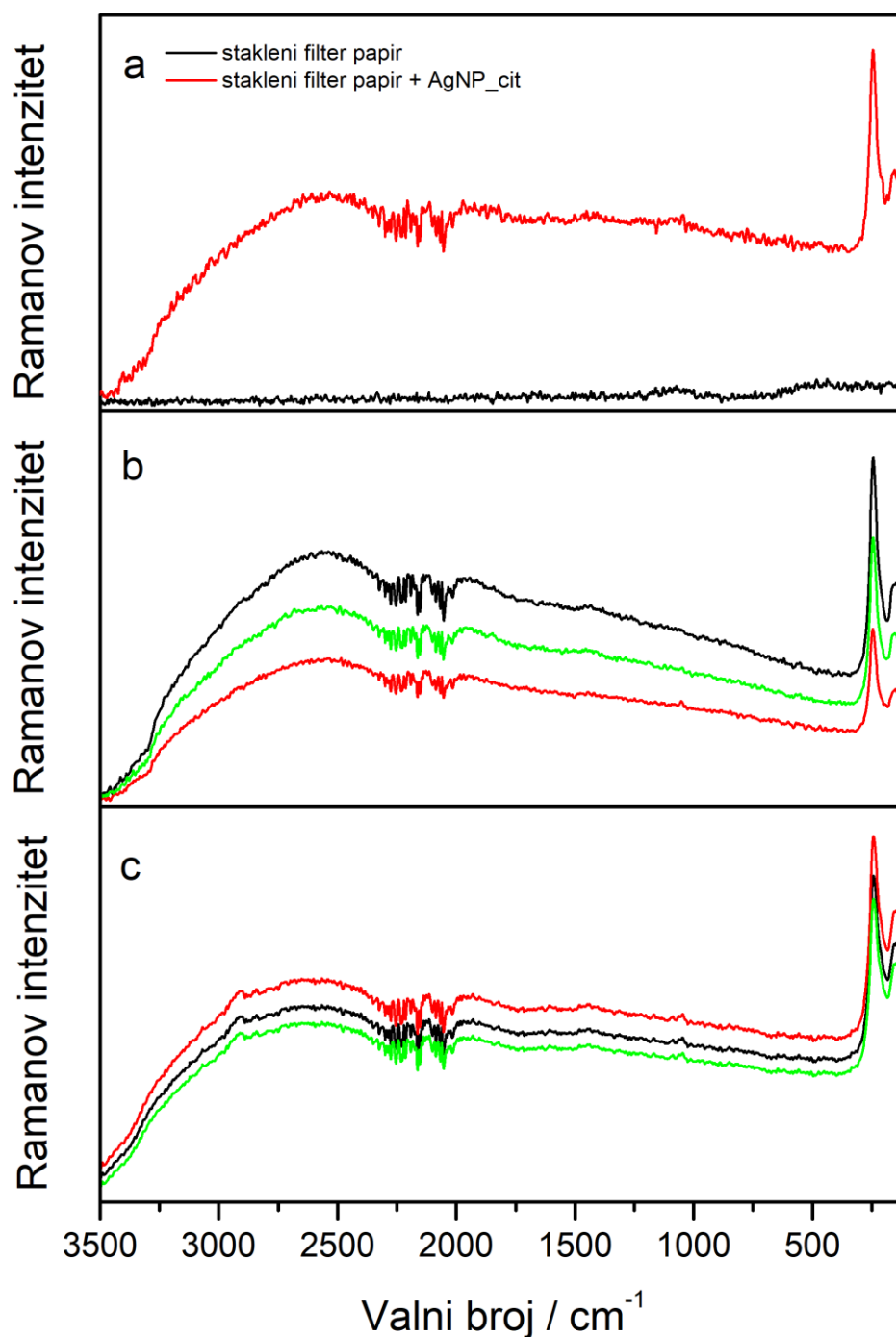


Slika 19. SERS spektri: MeCN u koncentriranom koloidu AgNP_cit (crno), STC (1×10^{-5} mol dm^{-3}) u koncentriranom koloidu AgNP_cit agregiranom s NaCl (1×10^{-2} mol dm^{-3}) (crveno), STC (1×10^{-5} mol dm^{-3}) u koncentriranom koloidu AgNP_cit agregiranom s $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (1×10^{-3} mol dm^{-3}) (plavo), STC (1×10^{-5} mol dm^{-3}) u koncentriranom koloidu AgNP_cit agregiranom s $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (1×10^{-3} mol dm^{-3}) i NaCl (1×10^{-2} mol dm^{-3}) (rozo).

4.2.4. Stakleni filter-papir

Imobilizacijom nanočestica na čvrsti nosač pripremaju se SERS supstrati nepokretnih te po mogućnosti ravnomjerno i gusto raspoređenih nanočestica, čime se povećava broj „vrućih mjesta“ na kojima se Ramanovo raspršenje analita pojačava. Osim toga, nanošenje i sušenje otopine analita na površini SERS supstrata omogućava da se i neutralne molekule analita smještaju blizu nanočestica metala, što je neophodno za pojačanje Ramanovog raspršenja.

Stakleni filter-papir odabran je kao čvrsti nosač s obzirom da staklo slabo raspršuje zračenje, a struktura isprepletenih staklenih niti osigurava neravnu površinu nužnu za opažanje raspršenog zračenja. Kako bi se utvrdile eventualne interferencije nosača, snimljeni su spektri čistog staklenog filter-papira i staklenog filter-papira na koji je nanesen koloid AgNP_cit. Na staklenom filter-papiru se ne opaža Ramanovo raspršenje³¹ te u spektru nisu uočene vrpce borosilikatnog stakla (slika 20.a). U spektru filter-papira sa slojem AgNP_cit uočava se podignuta bazna linija uslijed raspršenja zračenja na nanočesticama srebra, dok intenzivna vrpca pri 245 cm^{-1} , pripisana istezanju veze Ag–O, ukazuje na vezanje nanočestica srebra sa OH skupinama stakla (slika 20.a).



Slika 20. a) Ramanovi spektri staklenog filter-papira (crno) i staklenog filter-papira sa slojem AgNP_cit (crveno). b) SERS spektri jednog uzorka STC (1×10^{-5} mol dm⁻³) na staklenom filter-papiru sa slojem AgNP_cit snimljen tri puta. c) SERS spektri tri uzorka STC (1×10^{-5} mol dm⁻³) na staklenom filter-papiru sa slojem AgNP_cit. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.

Mjerni uzorci pripremljeni su nanošenjem koloidne suspenzije AgNP_cit koja je sadržavala STC ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na stakleni filter-papir. U SERS spektrima uzoraka STC nisu uočene karakteristične vrpce analita, iako je zračenje fokusirano na različita, okom vidljiva mjesta nanošenja uzorka na supstratu (slike 20.b i 20.c). Naime, uzorak je nanesen ispuštanjem koloidne suspenzije mikropipetom na filter-papir, za koji je nakon sušenja bilo vidljivo nakupljanje nanočestica na rubovima. Na nehomogenu raspodjelu nanočestica na staklenom filter-papiru upućuje bazna linija različitog intenziteta u spektrima snimljenim na tri različita mjesta na supstratu jednog uzorka (slika 20.b). Međutim, spektri tri uzorka STC pripravljena na isti način nalikuju jedan drugome i ukazuju na ponovljivost pripreme uzorka i mjerenja kada se zračenje fokusira na mjesta najvećih nakupina nanočestica na supstratu (slika 20.c).

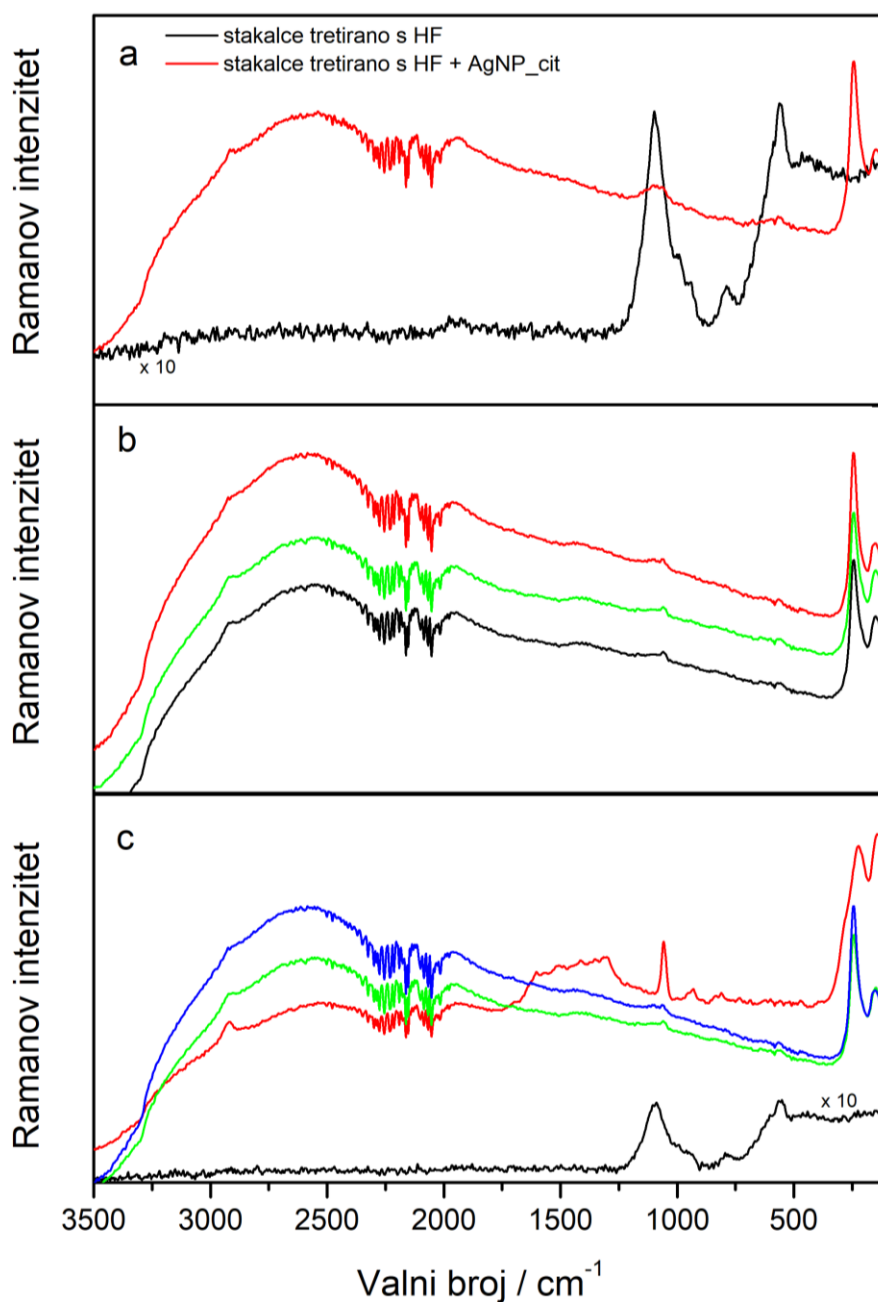
4.2.5. Tretirano staklo

Uz stakleni filter-papir, kao nosač nanočestica srebra istraženo je i stakalce za mikroskopiju debljine 1 mm tretirano s fluorovodičnom kiselinom. Nagrizanje kiselinom provedeno je u svrhu formiranja neravne površine stakla. Ispuštanjem koloidne suspenzije na tretiranu površinu stakla, nastaju prstenovi nanočestica srebra uslijed „coffee-ring“ efekta. Usmjeravanjem zrake lasera na rub prstena gdje su nanočestice gusto posložene stvarajući „vruća mjesta“, moguće je opaziti pojačanje Ramanovog raspršenja analita.

Snimljeni su spektri čistog tretiranog stakalca i tretiranog stakalca s koloidom AgNP_cit (slika 21.a). U Ramanovom spektru stakalca opaža se intenzivna vrpca pri 1093 cm^{-1} pripisana istezanju veza Si–O u tetraedrima SiO_4 u strukturi borosilikatnog stakla, slaba vrpca oko 750 cm^{-1} pripisana istezanju veza B–O u tetraedrima BO_4 te vrpca oko 600 cm^{-1} koja odgovara istezanju veza B–O u prstenastim metaboratnim skupinama.³² U spektru stakalca s koloidom AgNP_cit vrpca pri 1098 cm^{-1} potječe od isteznih vibracija Si–O stakla, dok je podignuta bazna linija posljedica raspršenja zračenja na nanočesticama srebra. Intenzivna vrpca pri 244 cm^{-1} može se pripisati istezanju veze Ag–O nastale vezanjem nanočestica srebra s OH skupinama na površini stakalca.

Mjerni uzorci pripremljeni su nanošenjem koncentrirane koloidne suspenzije AgNP_cit koja je sadržavala STC ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na tretirano stakalce. Jednom uzorku snimljeni su spektri na tri različita mjesta na prstenu nanočestica (slika 21.b). Spektri nalikuju

jedan drugome no niti u jednom nisu opažene vrpce STC. Nadalje, spektri tri uzorka STC, svi koncentracije $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, međusobno se razlikuju (slika 21.c). Razlike u spektrima posljedica su otežanog fokusiranja laserske zrake na uski prsten nanočestica. Primjerice, u jednom spektru opažene su vrpce koje se mogu pripisati citratima, poput intenzivne vrpce oko 1030 cm^{-1} i vrpce oko 1397 cm^{-1} koja je prekrivena drugim vrpcama u tom području. Vrpce u području $1650\text{--}1300 \text{ cm}^{-1}$ slabo su razlučene i mogu potjecati od analita, čiji je spektar u tom spektralnom području bogat vrpcama istezanja i deformacija prstenova (slika 12).



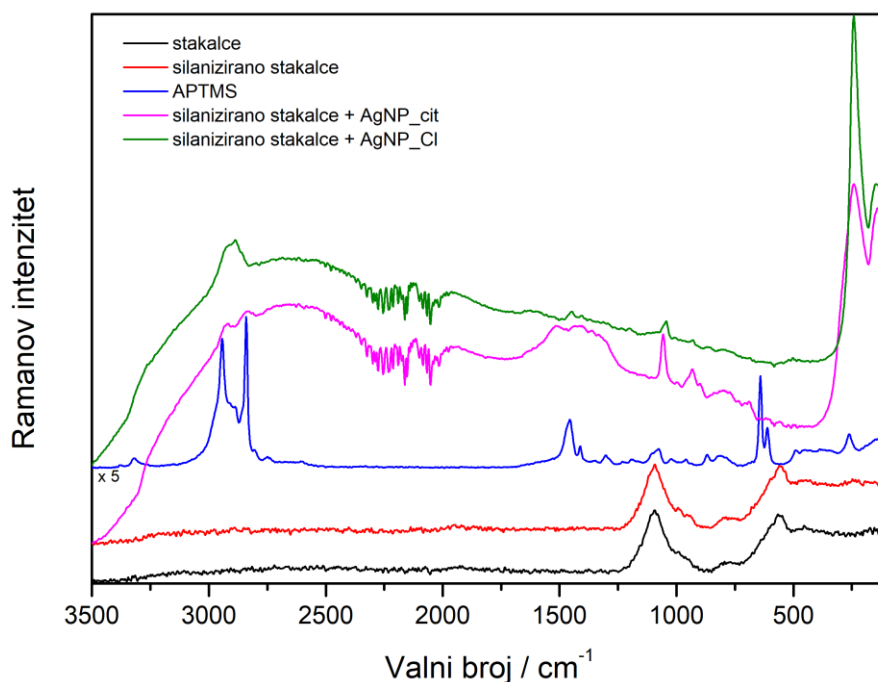
Slika 21. a) Ramanovi spektri stakalca tretiranog s HF (crno) i tretiranog stakalca s koloidom AgNP_cit (crveno). b) SERS spektri jednog uzorka STC (1×10^{-5} mol dm⁻³) u koncentriranom koloidu AgNP_cit na tretiranom stakalcu snimljeni tri puta. c) SERS spektri četiri uzorka STC (1×10^{-5} mol dm⁻³) u svježem ili koncentriranom koloidu AgNP_cit na tretiranim stakalcima. Spektri su razmaknuti radi preglednosti.

Pomakom ruba prstena izvan fokusa zrake lasera, snimljen je spektar stakla (slika 21.c). Snimljeni spektri upućuju na lošu reproducibilnost mjerenja primjenom SERS supstrata s „coffee-ring“ efektom pri postojećim eksperimentalnim uvjetima i konfiguraciji instrumenta.

4.2.6. Silanizirano staklo

Kako bi se postigla bolja SERS učinkovitost i reproducibilnost te homogena i gusta raspodjela nanočestica srebra na nosaču, površina stakalca za mikroskopiju silanizirana je pomoću (3-aminopropil)trimetoksisilana. Na taj način je na površini stvoren monosloj protoniranih amino skupina koje vežu nanočestice srebra ili elektrostatskim interakcijama s negativno nabijenim ionima na površini nanočestica ili nastajanjem kemijske veze Ag–N s nanočesticama srebra.²⁵ Prema tome, molekule silana na površini stakla omogućuju stvaranje homogenog i gustog sloja nanočestica s mnoštvom „vrućih mjesta“ na koja se mogu smjestiti neutralne molekule STC.

Na silanizirana stakalca su imobilizirane nanočestice srebra s citratnim ionima i one s kloridnim ionima na svojoj površini. Najprije su snimljeni spektri čistog stakalca i silaniziranog stakalca, a zatim spektri silaniziranih stakalaca s vezanim nanočesticama srebra (slika 22). Spektri stakalca i silaniziranog stakalca su jednaki, sa širokom vrpcom pri 1093 cm^{-1} koja odgovara istezanju veza Si–O u strukturi stakla. Vrpce vibracija silana nisu opažene u spektru silaniziranog stakla jer je vezan u vrlo tankom sloju, nedovoljnom za detekciju normalnom Ramanovom spektroskopijom. Spektar silana APTMS snimljen je za usporedbu (slika 22), kako bi se asignirale njegove vibracijske vrpce, koje se javljaju u spektrima silaniziranih stakalaca s imobiliziranim nanočesticama srebra (tablica 3).



Slika 22. Ramanovi spektri stakalca (crno), silaniziranog stakalca (crveno) i APTMS (plavo) te SERS spektri silaniziranih stakalaca s koloidom AgNP_cit (ružičasto), odnosno koloidom AgNP_Cl (zeleno). Spektri su razmaknuti radi preglednosti.

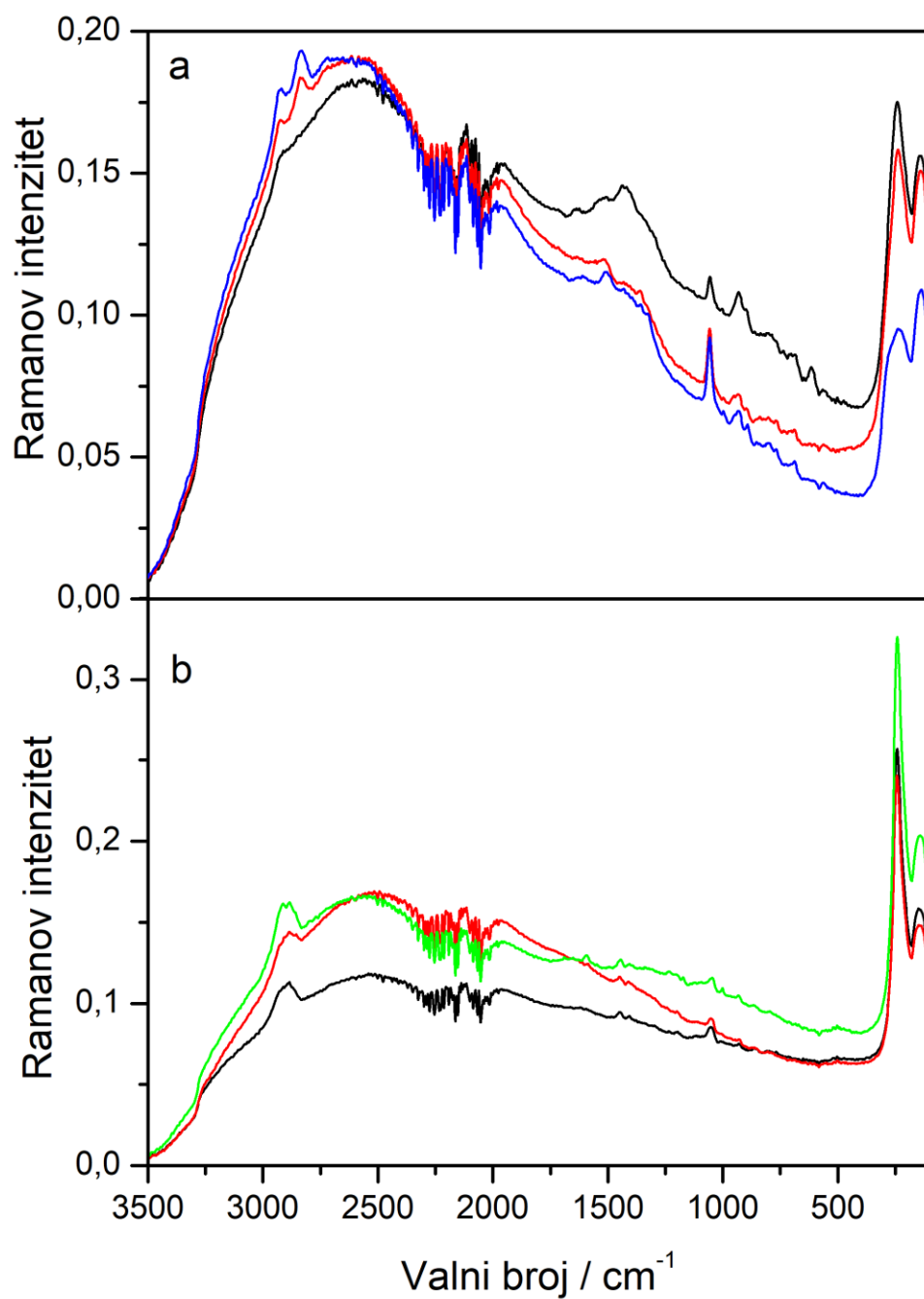
Tablica 3. Asignacija osnovnih vibracijskih vrpci u Ramanovom spektru APTMS.³³

Valni broj / cm^{-1}	Vibracija
3329	ν NH_2
2966	ν_{as} CH_3
2893	ν_{s} CH_2
2843	ν_{s} CH_3
1455	δ_{as} CH_3
1076	δ OCH_3
1044	ν C-O
641	ν_{s} Si-OCH_3
611	ν_{as} Si-OCH_3

Kratice: ν istezanje; δ deformacija; as antisimetrično; s simetrično.

Spektri silaniziranih stakalaca s imobiliziranim nanočesticama srebra ukazuju da nanočestice srebra pojačavaju Ramanovo raspršenje aniona na površini nanočestica, s jedne strane, i silana na koji su vezane, s druge strane. Tako su u spektru silaniziranog stakla s AgNP_cit pojačane vrpce citratnih iona u području 1650–1300 cm^{-1} te pri 932 cm^{-1} , dok je intenzivna vrpca pri 1057 cm^{-1} osim citratu (1030 cm^{-1}), dijelom pripisana i silanu (1076 cm^{-1} , 1044 cm^{-1}). U spektru silaniziranog stakalca s AgNP_Cl vrlo jaka vrpca pri 242 cm^{-1} odgovara istezanju veze Ag–Cl na površini nanočestica, dok vrpce slabog intenziteta oko 1445 cm^{-1} i 1044 cm^{-1} potječu od silana.

Mjerni uzorci pripremljeni su ispuštanjem otopine STC ($c = 1 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) u acetonitrilu na pripravljene SERS susprate. Dodatne poteškoće prilikom snimanja spektra stvarala je raspodjela nanočestica srebra na silaniziranom staklu koja nije bila homogena, posebice u slučaju AgNP_cit, kada su se nakon sušenja supstrata nanočestice grupirale na određenim mjestima. S obzirom da su prije imobilizacije nanočestica srebra stakla silanizirana na isti način neovisno o vezanju AgNP_cit, odnosno AgNP_Cl, može se pretpostaviti da su svojstva nanočestica (veličina nanočestica, spontana agregacija, površinski sloj iona) utjecala na raspodjelu i vezanje nanočestica na površinu silaniziranog stakla. Također, ispuštanjem alikvota otopine analita na stakalce teško je bilo kontrolirati zadržavanje otopine na mjestu najvećeg broja nanočestica te se zbog niske viskoznosti otapala nije moglo spriječiti razlijevanje otopine po većoj površini stakla. SERS spektri STC ($c = 1 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) nisu opaženi na silaniziranim stakalcima niti s AgNP_cit niti s AgNP_Cl (slika 23). Vrpce u spektrima pripisane su površinskom sloju aniona i silanu.

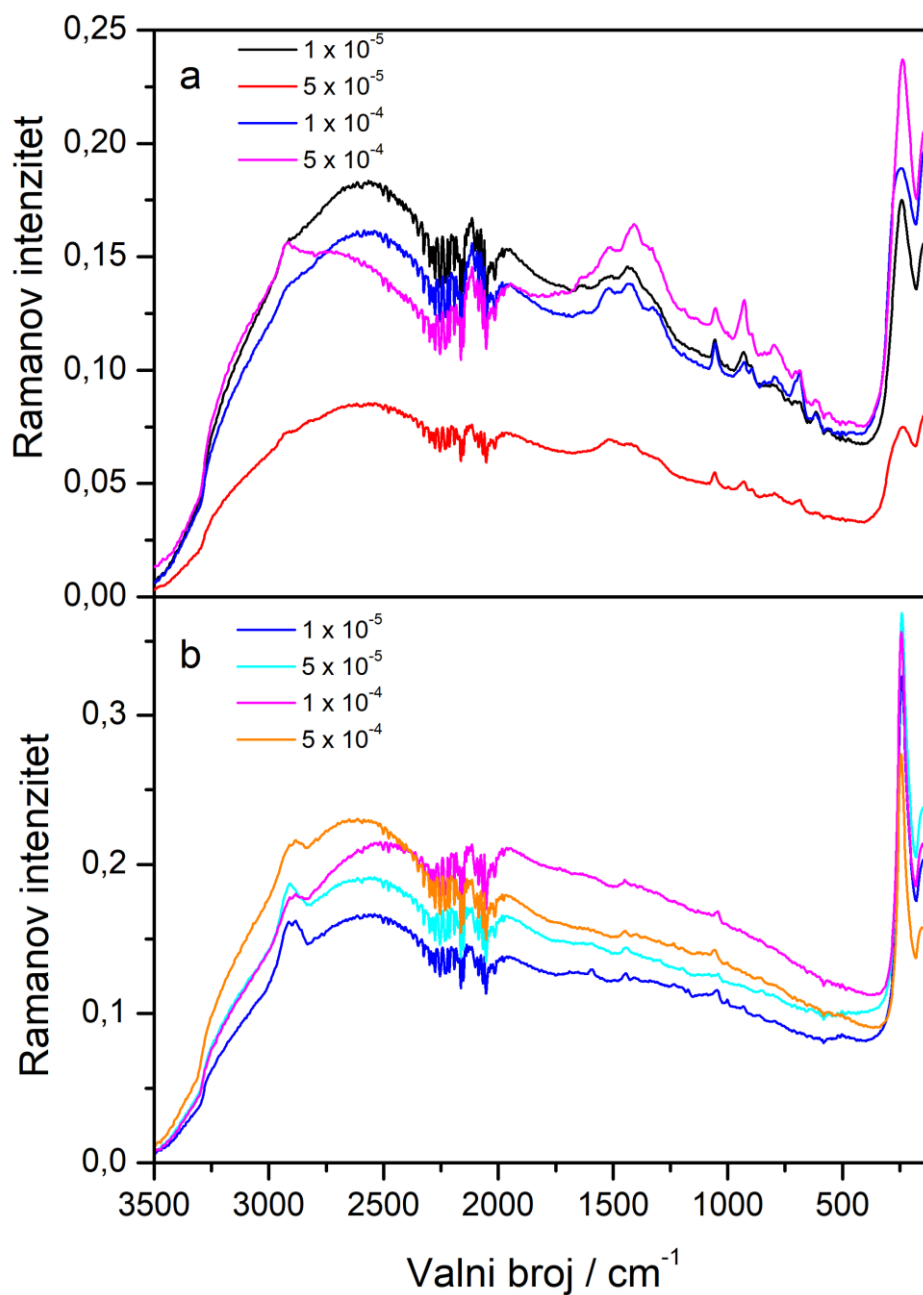


Slika 23. a) SERS spektri jednog uzorka STC ($1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na silaniziranom stakalcu s AgNP_cit snimljeni tri puta. b) SERS spektri jednog uzorka STC ($1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na silaniziranom stakalcu s AgNP_Cl snimljeni tri puta.

4.2.6.1. Koncentracijski ovisni SERS spektri sterigmatocistina

S obzirom da na SERS supstratima pripremljenim imobilizacijom nanočestica srebra na silaniziranom staklu nisu bili opaženi spektri otopine STC koncentracije $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, snimljeni su koncentracijski ovisni SERS spektri za niz uzoraka rastućih koncentracija, $1 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Međutim, vrpce analita nisu uočene u snimljenim spektrima te su, kao i u prethodnim slučajevima, bile pojačane samo vrpce citratnih i kloridnih iona te silana (slika 24).

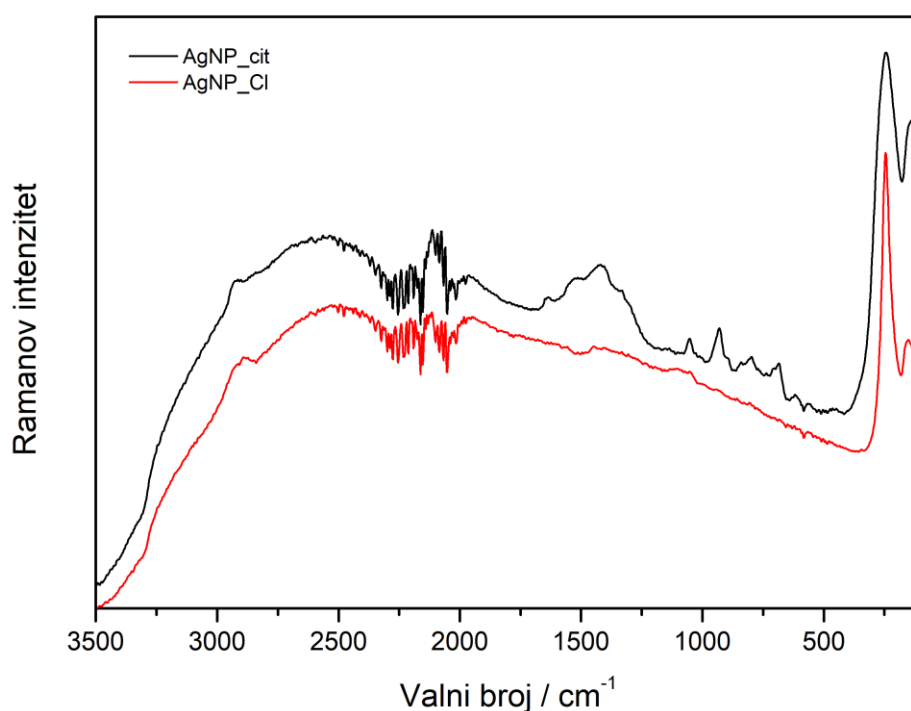
Na temelju snimljenih i analiziranih spektara može se zaključiti da nanočestice srebra s površinskim slojem aniona, citrata i klorida, nisu pogodni SERS supstrati za analizu sterigmatocistina. Molekule STC nisu se adsorbirale na površinu nanočestica srebra bile one dispergirane ili agregirane u koloidnoj suspenziji ili imobilizirane na čvrstom nosaču.



Slika 24. a) Koncentracijski ovisni SERS spektri STC (1×10^{-5} – 5×10^{-4} mol dm⁻³) na silaniziranom stakalcu s AgNP_cit. b) Koncentracijski ovisni SERS spektri STC (1×10^{-5} – 5×10^{-4} mol dm⁻³) na silaniziranom stakalcu s AgNP_Cl.

4.2.6.2. SERS spektri aflatoksina B₁

Budući da su provedena istraživanja u kojima je aflatoksin B₁ uspješno detektiran SERS metodom,^{16,18,19,26} snimljeni su SERS spektri otopine AFB₁ ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu na SERS supstratima pripremljenim imobilizacijom nanočestica srebra AgNP_cit i AgNP_Cl na silaniziranom staklu (slika 25).



Slika 25. SERS spektri AFB₁ ($1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na silaniziranim stakalcima s AgNP_cit (crno) i AgNP_Cl (crveno). Spektri su razmaknuti radi preglednosti.

U snimljenim spektrima nisu uočene karakteristične vrpce AFB₁ (tablica 2), što ukazuje da se molekule AFB₁ nisu adsorbirale na nanočestice srebra. To dovodi do zaključka da u ovom radu korišteni supstrati ne mogu omogućiti adsorpciju neutralnih molekula analita na negativno nabijenu površinu supstrata niti dovoljnu osjetljivost detekcije mikotoksina koji slabo raspršuju zračenje u uzorcima mikromolarnih koncentracija.

§ 5. ZAKLJUČAK

U svrhu analize sterigmatocistina SERS spektroskopijom istražena je mogućnost primjene različitih SERS supstrata temeljenih na nanočesticama srebra. Pripravljene su SERS supstrate s nanočesticama srebra dispergiranim u koloidnoj suspenziji i imobiliziranim na čvrstom nosaču, a obuhvatili su: svježe pripravljenu, koncentriranu i agregiranu koloidnu suspenziju te nanočestice na staklenom filter-papiru, nagrizanom staklu i silaniziranom staklu. Nanočestice srebra pripravljene su redukcijom srebrova(I) nitrata s trinatrijevim citratom, odnosno hidroksilamin hidrokloridom. S pripremljenim supstratima istražena je reproducibilnost mjerenja te SERS učinkovitost za analizu sterigmatocistina. Supstrat s nanočesticama srebra imobiliziranim na silaniziranom staklu korišten je i za snimanje SERS spektara strukturno sličnog mikotoksina, aflatoksina B₁, koji je do sada već uspješno detektiran SERS metodom.

Snimljeni su i asignirani Ramanovi spektri krutih uzoraka STC i AFB₁.

Niti s jednim supstratom nije opažen SERS spektar STC jer se molekule mikotoksina nisu adsorbirale niti vezale na površinu nanočestica srebra. S obzirom da su molekule STC neutralne, ne pokazuju afinitet prema nanočesticama srebra koje na površini imaju negativne ione, citrate i kloride, te elektrostatsko privlačenje izostaje. S druge strane, pretpostavka da citratni ioni na površini nanočestica sterički ometaju prilaz površini srebra molekulama analita nije potvrđena jer se molekule STC nisu uspjele približiti niti nanočesticama s manjim kloridnim ionima.

Molekule STC, jednako kao i molekule AFB₁, u svojoj strukturi sadrže kisikove atome kojima potencijalno mogu stvarati kemijske veze sa srebrom, no to se nije dogodilo. Niti molekule AFB₁, za koje je vezanje preko kisikovih atoma dokazano, nisu se uspješno adsorbirale na nanočestice srebra imobilizirane na silaniziranom staklu. Može se zaključiti da je za adsorpciju neutralnih molekula STC i AFB₁ na površinu metala potrebno koristiti složenije SERS supstrate s površinom metala modificiranom za specifično prepoznavanje tih molekula i reproducibilnim „vrućim mjestima“.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AFB₁ – aflatoksin B₁

AgNP_cit – nanočestice srebra s površinskim slojem citratnih iona

AgNP_cit_konc – koncentrirane nanočestice srebra s površinskim slojem citratnih iona

AgNP_Cl – nanočestice srebra s površinskim slojem kloridnih iona

AgNP_Cl_konc – koncentrirane nanočestice srebra s površinskim slojem kloridnih iona

APTMS – (3-aminopropil)trimetoksisilan

as – antisimetrična vibracija

δ – deformacijska vibracija

EFSA – Europska agencija za sigurnost hrane

ELISA – enzimoimunokemijska analiza

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

ip – u ravnini

IR – infracrveno zračenje

LC-MS/MS – tekućinska kromatografija spregnuta s tandemnim spektrometrom masa

Nd:YAG – itrij-aluminijev granat dopiran s neodimijem

v – istezna vibracija

NIR – blisko infracrveno zračenje

MPTMS – (3-merkaptopropil)trimetoksisilan

oop – izvan ravnine

s – simetrična vibracija

SERS – površinski pojačano Ramanovo raspršenje

STC – sterigmatocistin

UV – ultraljubičasto zračenje

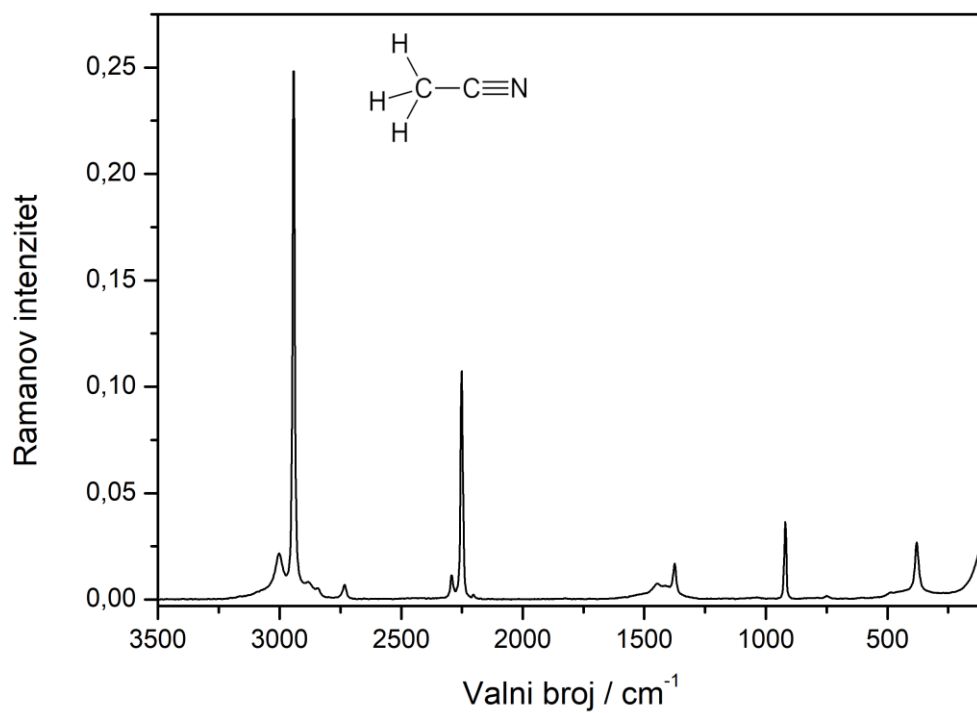
VIS – vidljivo zračenje

§ 7. LITERATURNI IZVORI

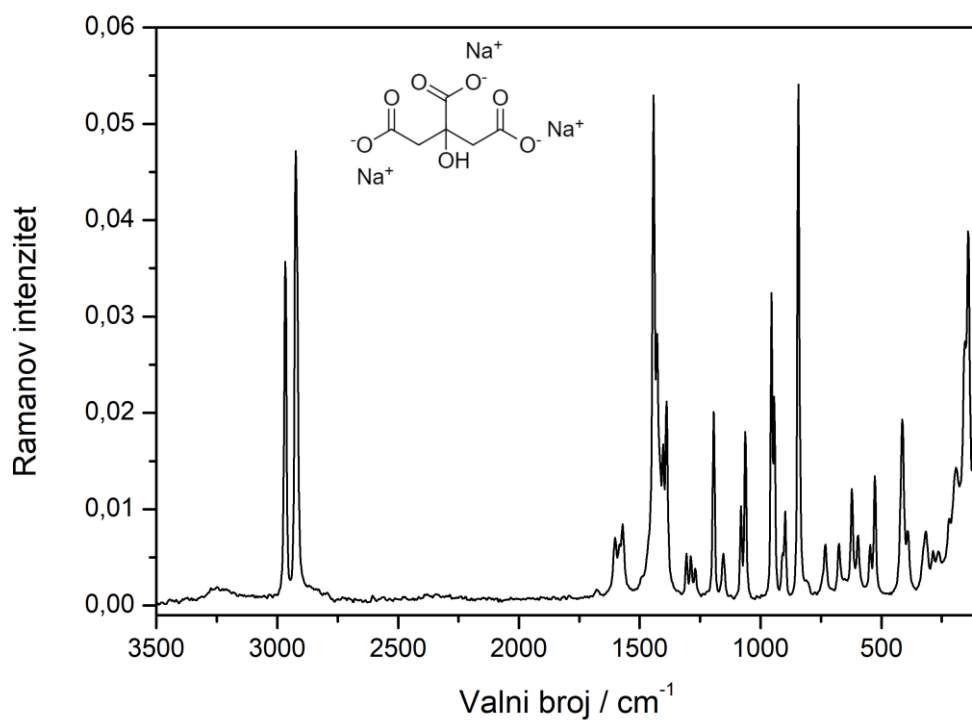
1. C. H. D. Nieto, A. M. Granero, M. A. Zon, H. Fernández, *Food Chem. Toxicol.* **118** (2018) 460–470.
2. S. Schlücker, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2011.
3. P. A. Mosier-Boss, *Nanomaterials* **7** (2017) 142–171.
4. B. P. Kafle, *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry*, Elsevier, 2019, str. 245–260.
5. <https://www.chadloh.com/raman-spectroscopy> (datum pristupa 3. kolovoza 2020.)
6. R. Aroca, *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*, Wiley, West Sussex, 2006.
7. I. Bruzas, W. Lum, Z. Gorunmez, L. Sagle, *Analyst* **143** (2018) 3990–4008.
8. D. Deng, Q. Lin, H. Li, Z. Huang, Y. Kuang, H. Chen, J. Kong, *Talanta* **200** (2019) 272–278.
9. A. Bolz, U. Panne, K. Rurack, M. Buurman, *Anal. Methods* **8** (2016) 1313–1318.
10. L. Zhang, P. Li, X. Bu, J. Wu, X. Zhang, B. Zhao, Y. Tian, *Anal. Bioanal. Chem.* **410** (2018) 7599–7609.
11. <https://www.nicepng.com/maxp/u2q8t4o0w7o0a9y3/> (datum pristupa 11. kolovoza 2020.)
12. O. Peron, E. Rinnert, M. Lehaitre, P. Crassous, C. Compere, *Talanta* **79** (2009) 199–204.
13. V. T. Noronha, F. A. Sousa, A. G. S. Filho, C. A. Silva, F. A. Cunha, H. Koo, P. B. A. Fechine, A. J. Paula, *J. Phys. Chem. C* **121** (2017) 11300–11311.
14. N. A. Bakar, M. M. Selleh, A. A. Umar, J. G. Shapter, *Methods* **4** (2017) 486–491.
15. D. Jakšić, M. Š. Klarić, I. Crnolatac, N. Š. Vujičić, V. Smrečki, M. Gorecki, G. Pescitelli, I. Piantanida, *Mar. Drugs* **17** (2019) 629–646.
16. X. Wu, S. Gao, J. S. Wang, H. Wang, Y. W. Huang, Y. Zhao, *Analyst* **137** (2012) 4226–4234.
17. T. Lešić, I. Kmetič, M. Kiš, A. Vulić, N. Kudumija, M. Zadravec, T. Murati, J. Pleadin, *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **14** (2019) 105–112.
18. A. E. Grow, L. L. Wood, J. L. Claycomb, P. A. Thompson, *J. Microbiol. Methods* **53** (2003) 221–233.

19. Q. Li, Z. Lu, X. Tan, X. Xiao, P. Wang, L. Wu, K. Shao, W. Yin, H. Han, *Biosens. Bioelectron.* **97** (2017) 59–64.
20. Y. Yuan, N. Panwar, S. H. K. Yap, Q. Wu, S. Zeng, J. Xu, S. C. Tjin, J. Song, J. Qu, K. T. Yong, *Coord. Chem. Rev.* **337** (2017) 1–33.
21. C. H. Munro, W. E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, P. C. White, *Langmuir* **11** (1995) 3712–3720.
22. V. Chis, M. M. Venter, N. Leopold, O. Cozar, *Vib. Spectrosc.* **48** (2008) 210–214.
23. J. J. Cras, C. A. Rowe-Taitt, D. A. Nivens, F. S. Ligler, *Biosens. Bioelectron.* **14** (1999) 683–688.
24. S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji, *Nanoscale* **5** (2013) 7328–7340.
25. N. Hajdukova, M. Prochazka, J. Štepanek, M. Špírková, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **301** (2007) 264–270.
26. K. M. Lee, T. J. Herrman, Y. Bisrat, S. C. Murray, *J. Agric. Food Chem.* **62** (2014) 4466–4474.
27. M. Baalousha, Y. Nur, I. Romer, M. Tejamaya, J. R. Lead, *Sci. Total Environ.* **454** (2013) 119–131.
28. A. Stefanu, S. D. Iancu, V. Moisoiu, N. Leopold, *Rom. Rep. Phys.* **70** (2018) 1–10.
29. L. Mikac, M. Ivanda, M. Gotić, T. Mihelj, L. Horvat, *J. Nanopart. Res.* **16** (2014) 1–13.
30. A. Fargašova, R. Pucek, V. Ranc, A. Panaček, L. Kvitek, R. Zboril, *RSC Adv.* **5** (2015) 9737–9744.
31. J. Chu, A. J. Marsden, R. J. Young, M. A. Bissett, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11** (2019) 31338–31345.
32. W. L. Konijnendijk, J. M. Stevels, *J. Non-Cryst. Solids* **20** (1976) 193–224.
33. A. Rauter, L. S. Perše, B. Orel, B. Bengu, O. Sunetci, A. Š. Vuk, *J. Electroanal. Chem.* **703** (2013) 97–107.

§ 8. DODATAK



Slika D1. Ramanov spektar acetonitrila.



Slika D2. Ramanov spektar trinatrijeva citrata.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Valentina Vrljić

Datum rođenja: 05. lipnja 1996.

Mjesto rođenja: Pula, Hrvatska

Obrazovanje

2002–2010 Osnovna škola Kaštanjer, Pula

2010–2014 Srednja škola Opća Gimnazija, Pula

2014–2018 Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2018– Diplomski sveučilišni studij Kemija, smjer: istraživački, grane: analitička kemija i biokemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb