

Ispitivanje vezanja glukoamina za zlatne nanočestice Ramanovom spektroskopijom

Brljafa, Sandro

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:646910>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

Sandro Brljafa

ISPITIVANJE VEZANJA GLUKOZAMINA ZA
ZLATNE NANOČESTICE RAMANOVOM
SPEKTROSKOPIJOM

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
FIZIKA; SMJER NASTAVNIČKI

Sandro Brljafa

Diplomski rad

**Ispitivanje vezanja glukoamina za
zlatne nanočestice Ramanovom
spektroskopijom**

Voditelj diplomskog rada: Vlasta Mohaček Grošev, doc. dr. sc.

Ocjena diplomskog rada: _____

Povjerenstvo: 1. _____

2. _____

3. _____

Datum polaganja: _____

Zagreb, 2021.

ZAHVALJUJEM!

Mentorici doc. dr. sc. Vlasti Mohaček Grošev na pomoći, vremenu, konstantnoj dostupnosti i strpljenju tijekom ispravljanja mojeg diplomskog rada. Na nabavci materijala iz Amerike i Italije te angažiranosti oko organizacije mjerenja u različitim institucijama. Zahvaljujem na prilagođavanju mojem slobodnom vremenu te što sam bio uključen u svaki segment. Osjetio sam dašak toga kako je to biti znanstvenik na Institutu Ruđer Bošković. Hvala Vam na lijepoj uspomeni i na svemu čemu ste me naučili.

Članovima Laboratorija za molekulsku fiziku i sinteze novih materijala koji su me prihvatili i upoznali sa svojim projektima.

Suvoditelju diplomskog rada doc. dr. sc. Vedranu Đereku na pristupačnosti, savjetima i objašnjenjima vezanim uz diplomski rad koji su mi pomogli u boljem razumijevanju.

Doc. dr. sc. Maji Planinić na pomoći i sugestijama koje su bile od velike pomoći u metodičkom dijelu diplomskog rada. Zahvala i na prenesenom znanju na kolegijima iz Metodike nastave fizike, kvaliteta tih kolegija je briljantna.

Dr. Vincenzu Amendoli sa Sveučilištu u Padovi koji je donirao koloide zlatnih nanočestica korištene prilikom eksperimentalnih mjerenja.

Dr. sc. Vesni Blažek Bregović i dr. sc. Željki Petrović s Instituta Ruđer Bošković na snimanju UV-VIS spektara te na svim prenesenim informacijama vezanim uz uređaj i mjerenja.

Dr. sc. Marku Škrabiću sa Zavoda za fiziku i biofiziku Medicinskog fakulteta u Zagrebu na snimanju TEM mikroskopom te upoznavanju s uređajem i načinima snimanja.

Dipl. ing. Ivanu Mariću s Instituta Ruđer Bošković na snimanju DLS-a te zeta potencijala kao i na prenesenom znanju.

Prof. dr. sc. Snežani Miljanić i doc. dr. sc. Adriani Kendel s Kemijskog odsjeka PMF-a na pomoći pri snimanju SERS spektara.

Na kraju zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i Miški na silnoj motivaciji i podršci tijekom studija.

Sažetak

Vežanje molekula bilo za podloge koje sadrže nanočestično zlato, bilo za nanočestice zlata, primjenjuje se u forenzici, medicini, biologiji, arheologiji te u mnogim drugim područjima gdje se SERS (surface-enhanced Raman spectroscopy) koristi. U ovom diplomskom radu eksperimentalno se ispituje postoji li vežanje molekule glukoza-mina, molekule glukoze s NH_2 skupinom, za nanočestice zlata u vodenoj otopini. Ovaj modelni sistem služi za provjeru detekcije većih molekula poput hijaluronske kiseline te aminokiselina u vrlo malim količinama.

Ključne riječi: Raman, spektroskopija, vibracijski spektar, spektar, molekula

Glucosamine to gold nanoparticles binding studied using Raman spectroscopy

Abstract

Binding of molecules to substrates containing nanoparticle gold is used in forensics, medicine, biology, archeology and in many other fields where SERS (surface-enhanced Raman spectroscopy) is used. In this graduate thesis, it is experimentally investigated and studied whether there is a binding of a glucosamine molecule (a glucose molecule with the NH_2 functional group) to gold nanoparticles in water solution. This model system serves to check the possibility of detection of larger molecules such as hyaluronic and amino acids acid and serves to improve the detection of substances present in as small quantities as possible.

Keywords: Raman, spectroscopy, vibrational spectrum, spectrum, molecule

Sadržaj

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Uvod | 1 |
| 1.1 | SERS | 13 |
| 1.1.1 | Kemijsko pojačanje | 14 |
| 1.1.2 | Elektromagnetsko pojačanje | 14 |
| 2 | Metode korištene u radu | 17 |
| 2.1 | Priprava uzoraka | 18 |
| 2.2 | Ramanova spektroskopija | 24 |
| 2.3 | Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) | 27 |
| 2.4 | Dinamičko raspršenje svjetlosti - DLS metoda | 29 |
| 2.5 | ζ potencijal i određivanje naboja nanočestica | 31 |
| 2.6 | UV-VIS spektroskopija | 34 |
| 3 | Rezultati | 35 |
| 3.1 | Ramanovi spektri glukozamina u prahu i vodenoj otopini | 35 |
| 3.2 | SERS spektri glukozamina na zlatnim nanočesticama | 43 |
| 3.2.1 | Određivanje dimenzija zlatnih nanočestica u koloidnim otopinama | 43 |
| 3.2.2 | Potvrda vezanja molekula glukozamina na zlatne nanočestice mjerenjem zeta potencijala | 48 |
| 3.2.3 | Površinski pojačani Ramanovi spektri smjesa otopine glukozamina i koloida zlatnih nanočestica | 51 |
| 4 | Zaključak | 56 |
| 5 | Metodički dio | 58 |
| | Literatura | 71 |

Postoji više vrsta spektroskopskih metoda, neke su nam korisnije za proučavanje atomske strukture, a druge za proučavanje strukture molekula. Dovedemo li atomu energiju elektromagnetskim zračenjem ili sudarima s drugim česticama, atom prelazi u stanje više energije, koje može biti pobuđeno stacionarno stanje. Atom ili molekula u tom slučaju prelazi iz stanja niže energije u stanje više energije, pri tome je energija apsorbirana od međudjelovanja s elektromagnetskim zračenjem ili materijom jednaka prema formuli (1.1) razlici energija više i niže energijske razine:

$$E_{apsorbirana} = E_{više} - E_{niže} \quad (1.1)$$

U pobuđenom stanju atom ili molekula ostaje kratko vrijeme te se vraća u stanje niže energije, a pri tom prijelazu može emitirati energiju (1.2):

$$E_{emitirana} = E_{niže} - E'_{više} \quad (1.2)$$

Ovdje se kao stanje niže energije može pojaviti bilo ono početno stanje iz kojeg je molekula apsorbirala energiju, bilo neko drugo stanje.

Prema kvantnoj teoriji, najmanji iznos energije fotona naziva se kvantom energije i određen je izrazom (1.3):

$$E_{fotona} = h\nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (1.3)$$

gdje je h Planckova konstanta i iznosi $6,62 \cdot 10^{-34} J \cdot s$, $c \approx 3 \cdot 10^8 \frac{m}{s}$ je brzina svjetlosti, ν je frekvencija svjetlosti, a λ njena valna duljina. Relacija (1.3) opisuje energiju fotona. Za svaki prijelaz između dva stanja molekule postoji neka energija $E = h\nu$ fotona koja taj prijelaz uzrokuje (ako je prijelaz ostvaren).

Važno je spomenuti da su linijski atomski spektri posljedica diskretnih energijskih razina na kojima se mogu kretati elektroni. Kod molekula za razliku od atoma, osim navedenih prijelaza iz nižeg u više energijsko stanje te obrnuto, promjene se ne odnose samo na elektronsku energiju, nego i na energije rotacija i vibracija atomskih jezgri u molekulama. Ako se neka molekula sastoji od n atoma, položaji svih njenih atomskih jezgri opisani su s $3n$ koordinata te molekula ima $3n$ prostornih stupnjeva slobode. Od $3n$ stupnjeva slobode, 3 se odnose na translacije u odnosu na koordinatne osi u 3 smjera. Još 3 stupnja slobode odlaze na rotacije oko koordinatnih osi, ali ako se radi o linearnoj molekuli, onda ona ima samo 2

rotacijska stupnja slobode. [15]

Preostali stupnjevi slobode gibanja su vibracije atomskih jezgri.

Prema tome, broj vibracija nelinearne molekule s n atoma je: $N = 3n - 6$, dok je broj vibracija linearne molekule s n atoma: $N = 3n - 5$. Zaključujemo da će molekulski spektri biti složeniji od atomskih spektara. Jedna od metoda detekcije koji uključuju vibracijske prijelaze, ujedno i metoda kojom se bavimo u ovom radu, naziva se **Ramanova spektroskopija**, koju od ostalih spektroskopija razlikuje mehanizam nastanka spektra. Naziv je dobila prema indijskom znanstveniku C. V. Ramanu koji je s K. S. Krishnanom 1928. godine prvi uočio ovaj fenomen opisan u nastavku. Ramanovom se spektroskopijom promatraju neelastična raspršenja elektromagnetskog zračenja (dobivenog laserom najčešće iz vidljivog dijela spektra 400-800nm) na uzorku (molekulama), pri čemu se energija (valna duljina, valni broj i frekvencija) na molekuli raspršenog fotona razlikuje od energije (valne duljine, valnog broja i frekvencije) fotona upadnog elektromagnetskog zračenja, a ta energija odgovara prijelazima među vibracijskim razinama molekule. Valni broj fotona laserskog snopa je $\tilde{\nu}_0$. Molekula apsorbira taj foton te emitira neki drugi foton, valnog broja $\tilde{\nu}'$. Ako je njegova energija manja od energije fotona lasera, molekula prelazi u pobuđeno stanje energije za $hc\nu_M$ iznad energije osnovnog stanja. Takve fotone opisujemo kao Stokesovo raspršenje. Relaciju možemo zapisati preko valnog broja kao (1.4):

$$\tilde{\nu}' = \tilde{\nu}_0 - \nu_M \quad (1.4)$$

Gdje je ν_M valni broj koji leži u rasponu između rotacijskih, vibracijskih i elektronskih prijelaza, a $\tilde{\nu}_0$ je valni broj upadnog snopa.

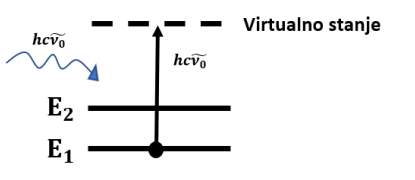
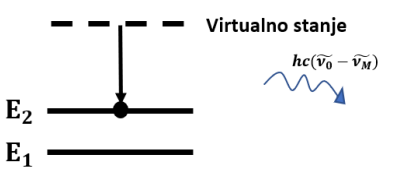
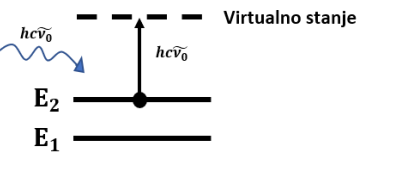
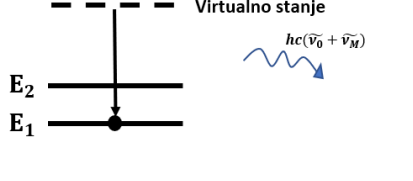
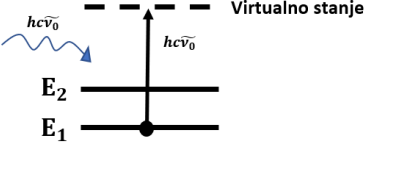
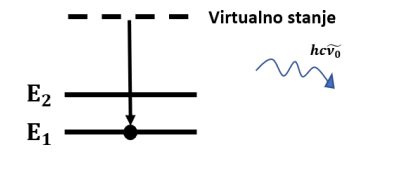
Također je moguće da nadolazeći foton apsorbira već pobuđena molekula: u tom slučaju emitirani foton valnog broja $\tilde{\nu}'$ može imati veću energiju od fotona (govorimo o anti-Stokesovom raspršenju). Relaciju možemo zapisati preko valnog broja kao (1.5):

$$\tilde{\nu}' = \tilde{\nu}_0 + \nu_M \quad (1.5)$$

U slučaju da imamo elastično raspršenje bez promjene energije (frekvencije i valne duljine), govorimo o Rayleighovom raspršenju (1.6):

$$\tilde{\nu}' = \tilde{\nu}_0 \quad (1.6)$$

U tablici (1.1) predočeni su mogući navedeni prijelazi:

| Vrsta raspršenja | Energija apsorpcije: $hc\tilde{\nu}_0$ | Energija emitiranog fotona: $hc(\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_M)$ |
|------------------------------------|---|--|
| Stokesovo Ramanovo raspršenje | Sustav prijelaza  |  |
| | Ukupna energija $hc\tilde{\nu}_0 + E_1$ | $hc(\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_M) + E_2$ |
| Anti-Stokesovo Ramanovo raspršenje | Sustav prijelaza  |  |
| | Ukupna energija $hc\tilde{\nu}_0 + E_2$ | $hc(\tilde{\nu}_0 + \tilde{\nu}_M) + E_1$ |
| Rayleighovo raspršenje | Sustav prijelaza  |  |
| | Ukupna energija $hc\tilde{\nu}_0 + E_1$ | $hc\tilde{\nu}_0 + E_1$ |

Tablica 1.1: Tablica

E_2 predstavlja više energijsko stanje molekule, dok E_1 predstavlja niže energijsko stanje molekule uz naglasak da se radi o vibracijskim prijelazima. Ako snop svjetlost djeluje na uzorak, svjetlost, odnosno foton može biti apsorbiran ili emitiran. Za apsorpciju ili emisiju nužno je da energija upadnog fotona odgovara razlici energija između osnovnog i pobuđenog stanja molekule.

Ono što predočuje tablica je to da kada se molekula podigne iz osnovnog stanja u virtualno stanje i ponovno se vrati na vibracijsko stanje više energije, raspršeni foton ima manju energiju od početnog stanja pa samim time i veću valnu duljinu od upadne, raspršenje je neelastično te otuda imamo gubitak energije. Takvo raspršenje nazivamo Stokesovim raspršenjem.

Ako je molekula na početku bila u višem vibracijskom stanju, a nakon raspršenja se vraća u osnovno stanje, raspršeni foton ima veću energiju pa zato i manju valnu duljinu od upadnog. Takvo raspršenje nazivamo anti-Stokesovim raspršenjem.

Danas su zlatne nanočestice gotovo nezaobilazan alat u proučavanju te nailazimo na njih u sve više i više znanstveno-istraživačkih radova. Kao što im samo ime govori, one su dimenzija nanoskale. Nanočestice nalaze praktičnu primjenu u molekularnoj biologiji, biomedicini, farmaciji, onkološkim testiranjima i terapijama. Osim u navedenim poljima koriste se i u analizi kemijskog sastava, u forenzici te u optici kod analize optičkih i fizičkih svojstava materijala. Nekoliko je razloga zbog kojih zlatne nanočestice uspješno koristimo u iznad navedenim, ali i mnogim drugim područjima istraživanja nanotehnologije, a glavni razlozi od njih su prema [2]:

- visoka fizikalna i kemijska stabilnost
- lakoća mijenjanja površinskih svojstava organskih i bioloških molekula
- mnoštvo optičkih svojstava vezanih uz površinske plazmone

Zlatne nanočestice imaju mnoštvo lako polarizabilnih vodljivih elektrona što je preduvjet za interakciju s elektromagnetskim poljima i generiranje nelinearnih optičkih pojava.

U usporedbi s ostalim organskim i anorganskim kromoforima (funkcionalnim skupinama koje dovode do apsorpcijskih vrhova), zlatne nanočestice veličina većih od 2 nm imaju velik udarni presjek te sposobnost da svu svjetlost pretvore u toplinu te da pojačaju elektromagnetsko polje na vrlo bliskoj udaljenosti od metalne površine. [2]

Karakteristična intenzivna svijetlo-crvena boja zlatnih nanočestica budila je interes u ljudima još u antičko doba, čemu možemo svjedočiti u raznim pronađenim ornamentima i posuđem toga vremena premazanima ili zlatnim nanočesticama ili njihovim legurama.

Primjer toga je Likurgova čaša sa slike (1.2) čiji nastanak datira u 4. stoljeće Nove ere. [2]



Slika 1.2: Likurgova čaša.

Slika preuzeta s: "File:British Museum The Lycurgus Cup 03 15022019 4320.jpg" by Vassil is marked with CC0 1.0"

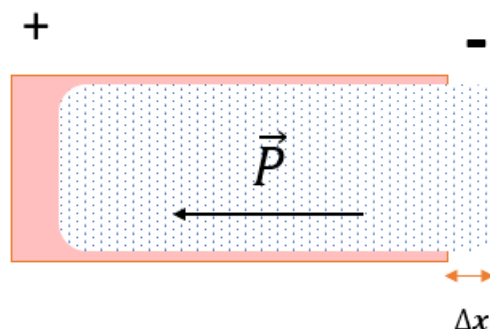
Prvi znanstvenik koji je povezoao optička svojstva nanočestica s njihovom dimenzijom je Michael Faraday, o čemu je održao i predavanje naziva "Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light" 1852. godine. On je svojim izvještajima nadahnuo Gustava Miea na pisanje teoretskog rada o zlatnim nanočesticama ranih 1900-tih te je taj rad relevantan i dan danas. [2]

Kao što je navedeno, jedno od svojstava zaslužnih za uspješnu primjenu nanočestica u detekciji jesu njihova optička svojstva vezana uz površinske plazmone, konkretno površinska plazmonska rezonanca o kojoj će biti riječi u nastavku.

Ako bismo sve elektrone u nekom kondenzatu (elektronski plin) pomaknuli za isti pomak Δx u odnosu na pozitivnu pozadinu i formiramo makroskopski dipol \vec{P} , nakon prepuštanja dipola povratnoj Coulombovoj sili, nastaje koherentno titranje cijelog sustava elektronskog plina koji nazivamo plazmom. Kvanti takvog kolektivnog titranja zovu se plazmoni.

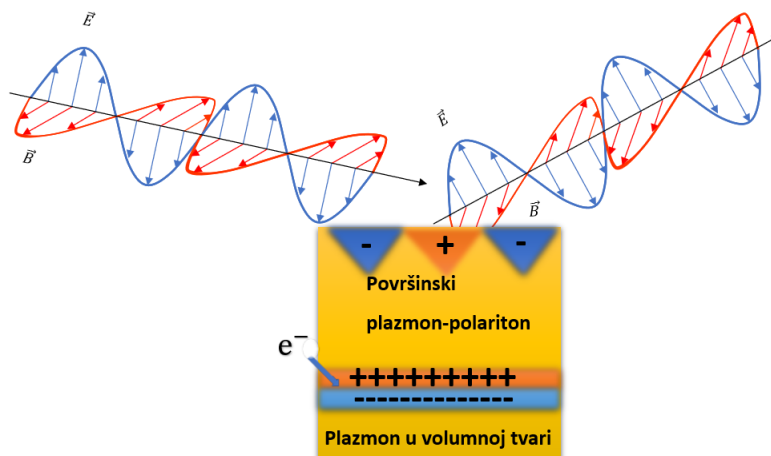
Pobuđivanje plazmona električnim poljem nije moguće ostvariti u tvarima karakteriziranim velikim brojem čestica u malom prostoru, tj. u volumnoj tvari, stoga duboko ispod površine metala nije dozvoljen proces pobuđivanja plazmona i tamo se krivulje disperzija plazmona i fotona nikada ne sijeku.

S druge strane, prisutnost površine u materijalima dopušta postojanje specifičnih modova titranja plazmona koji mogu biti pobuđeni vanjskim električnim poljem uzrokujući pomake Δx kondenzata elektronskog plina u odnosu na njihovu pozitivno nabijeno okruženje (1.3) te ravnotežni položaj.



Slika 1.3: Titranje plazme

Svjetlost, odnosno elektromagnetski val koji dolazi s velikim upadnim kutem ($\approx 90^\circ$) u odnosu na površinu, ima valni vektor gotovo paralelan površini. (Slika 1.4) Dolazi do interakcije vala sa slobodnim elektronskim plinom



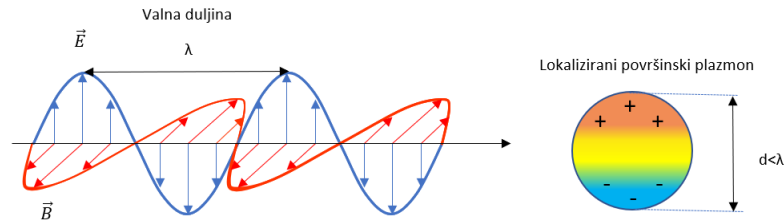
Slika 1.4: Pobuđivanje plazmona u volumnoj tvari uzrokuju slobodni elektroni, dok PSPP pobuđuje vanjski propagirajući elektromagnetski val.

Oscilacije u kojima imamo vezane elektromagnetske valove za površinske plazmone nazivamo propagirajući površinski plazmon-polaritoni (eng. *surface plasmon polaritons - PSPP*).

U slučaju zlatnih nanočestica dimenzija usporednih s dubinom prodiranja u metal (eng. *skin depth*) d koju definiramo kao (1.7), električno polje upadne svjetlosti može prodrijeti u metal i polarizirati vodljive elektrone (1.5) uz uvjet da je $d < \lambda$.

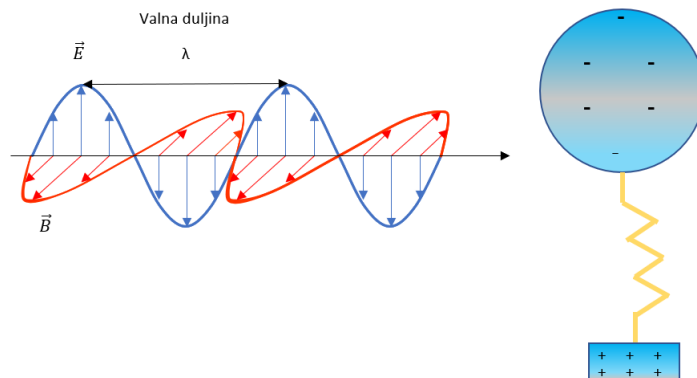
$$d = \sqrt{\frac{2}{\mu_0 \omega \sigma_0}} \quad (1.7)$$

Gdje je μ_0 magnetska permeabilnost vakuuma, ω je kutna frekvencija, a σ_0 vodljivost.



Slika 1.5: LSP pobuđivanje.

Za razliku od propagirajućih površinskih plazmon-polaritona, plazmoni u nanočesticama zlata dimenzija puno manjih od valne duljine svjetlosti su nepropagirajuća pobuđenja nazvana lokalizirani površinski plazmoni (eng. *localized surface plasmons - LSPs*). Takav koherentan pomak elektrona od pozitivno nabijene rešetke izaziva povratnu silu koja vraća polarizirane elektrone natrag prema pozitivnoj pozadini te se nanočestice ponašaju kao nanoantene [2]. Stoga se plazmon kod nanočestica može smatrati harmonijskim oscilatorom analognim masi na opruzi tjeranim prenesenom energijom vala s kojim je u rezonanci, a elektronski oblak oscilira kao dipol paralelno sa smjerom električnog polja elektromagnetskog zračenja kao na slici (1.6).



Slika 1.6: Analogija s harmonijskim oscilatorom.

Samo svjetlost koja ima frekvenciju blisku vlastitoj frekvenciji sustava pobudit će LSP jer se u tom slučaju događa maksimalni prijenos energije.

Slika (1.6) predstavlja jednostavan model mase na opruzi gdje je masa analogna gustoći elektrona, a konstanta elastičnosti Coulombovoj sili između elektrona i pozitivne pozadine. Model se koristi radi konceptualne predodžbe plazmonske sustava.

U slučaju zlatnih nanočestica sfernog oblika mnogo manjih od valne duljine svjetlosti, odziv elektronskog oblaka na prisutnost električnog polja može se iskazati sljedećim izrazom polarizabilnosti metala (1.8):

$$\alpha(\lambda) = 3\epsilon_m(\lambda)V_{NP}\frac{\epsilon(\lambda) - \epsilon_m(\lambda)}{\epsilon(\lambda) + \chi\epsilon_m(\lambda)} \quad (1.8)$$

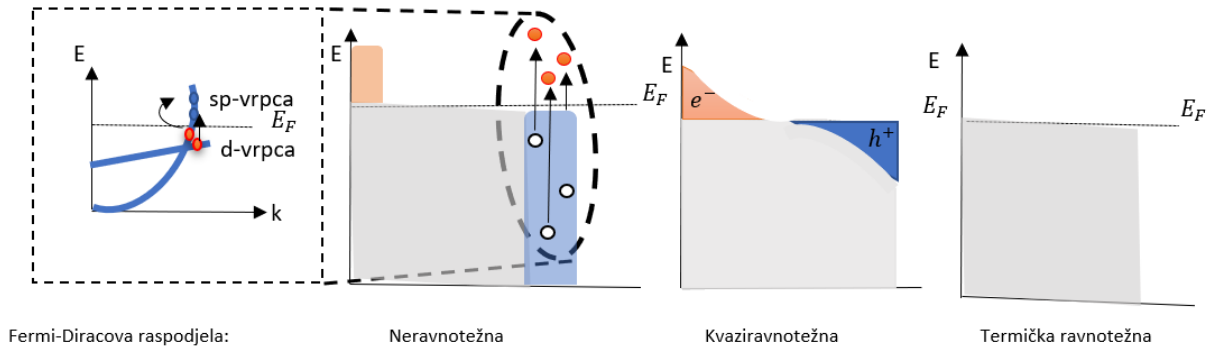
gdje je λ valna duljina svjetlosti, ϵ_m je dielektrična konstanta neapsorbirajućeg okolnog medija ($Im[\epsilon_m] = 0$), V_{NP} je volumen nanočestica, a χ je geometrijski faktor koji u slučaju sfernih nanočestica iznosi $\chi = 2$, [2].

Ovisnost dielektrične konstante o frekvenciji izražavamo kao zbroj realnog i imaginarnog dijela relacijom (1.9), [2]:

$$\epsilon(\omega) = Re[\epsilon(\omega)] + iIm[\epsilon(\omega)] \quad (1.9)$$

Realni dio govori nam o rezonantnoj frekvenciji plazmonske sustava, dok nam imaginarni dio govori o gubicima poput gušenja. No najveći gubici nastaju prilikom prelaska u više vrpce zbog stvaranja eksitona, odnosno vezanih stanja elektrona i šupljina.

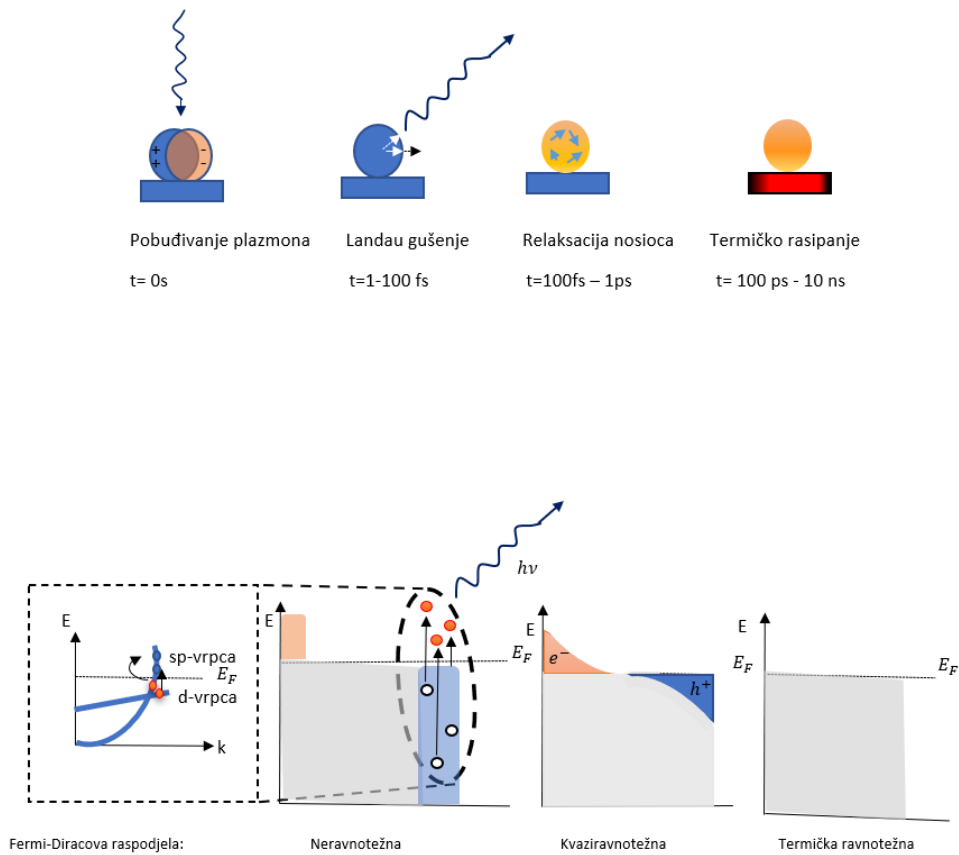
Eksitoni mogu nastati unutar zlata ili ako imamo prijelaz elektrona unutar iste vrpce (intraband) npr unutar d-vrpce ili između dviju različitih vrpce (interband). Slika (1.7):



Slika 1.7: Fermi-Diracove distribucije. Sivom bojom označeni su elektroni koji popunjavaju nivoe do Fermijeve energije, vrući elektroni označeni su crvenom bojom iznad i njihova raspodjela je iznad Fermijeve energije, dok je raspodjela vrućih šupljina prikazana plavom bojom ispod Fermijeve energije.

Fermijeva energija E_F je maksimalna energija do koje je sustav popunjen na $T = 0$. Na niskoj temperaturi samo mali broj fermiona sudjeluje u pobuđenjima zbog Paulijevog principa, nemaju dovoljno energije da pređu u više stanje, a stanja za koja imaju dovoljno energije već su popunjena. Povećanjem temperature imamo razmazanost Fermijeve raspodjele.

Na slici (1.8) vidimo evoluciju SPR relaksacije. Svaki dio slike (1.8) odgovora redom Fermi-Diracovim distribucijama sa slike (1.7).



Slika 1.8: Nakon pobuđenja LSP, eksitoni nestaju unutar 1-100 fs emisijom fotona ili kroz Landauovo gušenje uz formaciju vrućih nosioca elektrona i šupljina. Vrući nosioci prenose energiju elektron-elektron raspršenjima u trajanju od 100 fs do 1 ps. Naposljetku, toplina se prenosi unutar nanočestica fonon-elektron raspršenjem od nekoliko pikosekundi do nekoliko nanosekundi.

Iz relacije (1.8) možemo doći do kvazistatičkog izraza za udarni presjek sfernih zlatnih nanočestica (1.10): [2]

$$\sigma = \frac{18\pi [\epsilon_m(\lambda)]^{\frac{3}{2}} V_{NP}}{\lambda} \frac{Im[\epsilon(\lambda)]}{[Re[\epsilon] + 2\epsilon_m(\lambda)]^2 + Im[\epsilon(\lambda)]^2} \quad (1.10)$$

Iz te relacije nam je vidljivo da će svojstva plazmona ovisiti o dielektričnoj funkciji $\epsilon(\omega)$, udarni presjek se smanjuje s volumenom čestica i maksimalan je kad je nazivnik što manji, a to je u slučaju kada je $Re[\epsilon_{NP}(\omega) \approx -\chi\epsilon_m(\omega)]$ što je uvjet za lokalizirani SPR.

Nanočestice imaju maksimum optičke ekstinkcije na frekvenciji od SPR, što se događa na vidljivim valnim duljinama. Nanočestice se ponašaju poput nanoleća, elektromagnetsko polje u njihovoj blizini je pojačano i koristi za lokalizaciju svjetlosti na nanometarskoj skali.

Hoćemo li uopće imati Ramanov spektar neke molekule ovisi o tome hoće li vibracija molekule mijenjati njezinu polarizabilnost. Vibracija će biti aktivna u Ramanovom spektru isključivo ako vibracija uzrokuje promjenu polarizabilnosti molekule. Metali nemaju Ramanov spektar jer elektronske polarizacije nema u metalima. Pojačanje Ramanovog spektra koristeći metalne nanočestice naziva se SERS (engl. Surface-Enhanced Raman Scattering) ili u prijevodu površinski pojačano Ramanovo raspršenje. Ono se javlja ili prilikom vezanja molekula na metale ili ako se molekula nađe u neposrednoj blizini metala jer obje situacije mijenjaju polarizabilnost molekule.

Tvari mogu mijenjati kemijska i fizikalna svojstva promjenom dimenzija. Iz tog razloga u područje istraživanja i interesa došle su nanočestice čija se optička svojstva razlikuju od makroskopskih čestica iste tvari. Nanočestica je čestica nanometarskih dimenzija, tj. agregat ili nakupina atoma ili molekula do cca. 100 nm u dijametru. Za pojačanje signala najčešće se koriste nanočestice zlata ili srebra zbog spomenutih optičkih svojstava koja posjeduju kada ih svedemo na dimenzije nanoskale. Ovo pojačavanje signala jako nam je važno u slučaju da vršimo analizu uzorka jako male koncentracije i ideja je otkriti do koliko niske koncentracije nekog uzorka ga možemo detektirati.

Iz dobivenog Ramanovog spektra ne može se direktno odrediti struktura promatranih molekula kao i sama identifikacija molekule, no svaka molekula poput otiska prsta ima specifičan Ramanov spektar, pa se modeliranje molekule u različitim konformacijama i izračunavanjem teorijskog Ramanovog spektra može neke konformacije eliminirati, a neke predložiti kao vjerojatnije.

1.1 SERS

SERS efekt su 1973. godine na molekuli piridina koristeći elektrokemijsko hrapavo srebro kao supstrat prvi opazili Martin Fleischmann, Patrick J. Hendra i A. James McQuillan. [14]

Za poboljšanje efikasnosti ostvarenja procesa Ramanovog raspršenja koriste se površinska rezonantna Ramanova spektroskopija (engl. surface-enhanced resonance Raman spectroscopy ili SERRS) i površinski pojačano Ramanovo raspršenje (surface-enhanced Raman spectroscopy ili SERS).

Ramanovo raspršenje ima nisku efikasnost ostvarenja, njegov presjek je 10^{-29} do 10^{-31}cm^2 po molekuli, no može doseći efikasnost od $\approx 10^{-23} \text{cm}^2$ po molekuli u slučaju da je izvor pobuđenja u rezonanci s elektronskim prijelazima unutar molekule. [2]

Intrinzično niska efikasnost ostvarenja Ramanovog raspršenja može se osjetno poboljšati stavljanjem molekula u blizinu plazmonske nanočestice te u tom slučaju govorimo da je došlo do SERS efekta. Intenzitet Ramanovog SERS signala možemo izraziti sljedećim izrazima (1.11) i (1.12):

$$P_{Raman} = KNI\sigma_{Raman} \quad (1.11)$$

$$P_{SERS} = G_{SERS}P_{Raman} \quad (1.12)$$

gdje su P_{Raman} i P_{SERS} snage očitane detektorom, N broj osvijetljenih molekula, I je intenzitet laserskog snopa, σ_{Raman} je diferencijalni Ramanov udarni presjek, a K je konstanta proporcionalnosti koja u sebi uključuje kvantnu efikasnost detektora, propusnost spektrografa, geometriju i optiku sustava uključujući mjeru moći razlučivanja objektiva u slučaju da je mikroskop korišten. [2]

G_{SERS} se naziva ukupni SERS faktor pojačanja i predstavlja efekt plazmonske strukture. On ovisi o dvije veličine (1.13):

$$G_{SERS} = G_{em}G_{chem} \quad (1.13)$$

a to su pojačanje signala uzrokovano elektromagnetskim G_{em} te pojačanje signala uzrokovano kemijskim G_{chem} efektima, pri čemu su elektromagnetski efekti puno dominantniji.

1.1.1 Kemijsko pojačanje

Faktor kemijskog pojačanja G_{chem} odgovara promjeni Ramanovog udarnog presjeka adsorpcijom molekule na metalnoj površini. Kemijsko pojačanje izražavamo izrazom (1.14) kao omjer Ramanovog udarnog presjeka na metalu adsorbirane molekule (σ_{adsorb}) i Ramanovog udarnog presjeka slobodne molekule (σ_{Raman}). [2]

$$G_{chem} = \frac{\sigma_{adsorb}}{\sigma_{Raman}} \quad (1.14)$$

Faktor kemijskog pojačanja G_{chem} je broj manji od 100. Sam uzrok kemijskog pojačanja i dalje se razmatra i istražuje. Glavni argument koji podržava teoriju kemijskog pojačanja je nastanak stanja prijenosa naboja interakcijom metala i na njemu adsorbirane molekule jer to dovodi do promjene polarizabilnosti. Takav sustav može i rezonirati s laserom koji je izvor pobuđenja vodeći sustav prema rezonantno pojačanom Ramanovom signalu, [2].

1.1.2 Elektromagnetsko pojačanje

Pored kemijskog utjecaja, postoji i elektromagnetski utjecaj na pojačanje signala kod kojeg se promatra načelo pojačavanja elektromagnetskog polja u blizini metalnih nanočestica. Za pojačanje električnog polja zaslužna je površinska plazmonska rezonancija. Faktor elektromagnetskog pojačanja G_{em} doseže vrijednosti od $10^9 - 10^{10}$ (što je puno veće od kemijskog) unutar pojedine točke promatranja te ovisi o razmaku dviju nanočestica ili molekula. Primjerice za razmak od 2 nm kod dimera tvorenog od dviju zlatnih sfera dijametara od 50 nm, maksimalan faktor elektromagnetskog pojačanja G_{em} iznosi oko $3 \cdot 10^9$. A u slučaju da se faktor elektromagnetskog pojačanja usrednjuje po čitavoj površini dimera, njegova vrijednost reducira se za faktor 300. Iz tog razloga G_{SERS} izmjeren eksperimentalno usrednjavanjem za sve zlatne nanočestice supstrata može doseći vrijednosti $10^7 - 10^8$. To je jasni pokazatelj da elektromagnetsko pojačanje ima puno veći utjecaj na pojačanje signala od kemijskog [2].

Faktor elektromagnetskog pojačanja (G_{em}) možemo zapisati izrazom (1.15):

$$G_{em} = \left(\frac{E_{loc}(\nu_L)}{E_0} \right)^2 \left(\frac{E_{loc}(\nu_{Raman})}{E_0} \right)^2 \quad (1.15)$$

gdje je E_0 električno polje upadne svjetlosti, ν_L je frekvencija lasera, a $\nu_{Raman} = \nu_L - \nu_{Stokes}$ je frekvencija Ramanovog raspršenja za vibracijski mod energije frekvencije ν_{Stokes} . [2]

U slučaju pojedine odabrane molekule, E_{loc} se odnosi na iznos jakosti lokalnog električnog polja na odabranoj točki gdje se molekula nalazi.

Ako se elektromagnetski faktor pojačanja G_{em} odnosi na srednju vrijednost dobivenu od većeg broja molekula adsorbiranih na SERS supstratu, tada E_{loc} treba biti dobiven kao površinski prosjek kvadrata njegove apsolutne vrijednosti [2].

Izraz (1.15) pokazuje da povećanjem jakosti lokalnog električnog polja E_{loc} , supstrat metalnih nanočestica ima dvije uloge:

- pojačanje intenziteta svjetlosti na površini metalnih nanočestica (prvi član, pobuđenje)
- povećanje efikasnosti ostvarenja Ramanovog raspršenja (drugi član, emisija)

Formula se može pojednostavniti aproksimacijom u (1.16):

$$G_{em} \approx \left(\frac{E_{loc}(\nu_L)}{E_0} \right)^4 \quad (1.16)$$

s time da u tom slučaju je izraz uglavnom primjenjiv samo na modovima nižih frekvencija u području spektra vidljive svjetlosti. [2]

U pravilu G_{em} ima maksimum kada valna duljina i upadnog i SERS fotona pada u domenu za nastanak površinske plazmonske rezonance (SPR) nanočestica uz uvjet $\lambda_L < \lambda_{SPR} < \lambda_{Raman}$. [2]

Izraz (1.15) i njegova aproksimacija (1.16) daju dobru procjenu iznosa SERS elektromagnetskog pojačanja u većini slučajeva. No ne daju odgovor kod predviđanja svojstava polarizacije kod SERS zračenja pa da bi formula vrijedila potrebno je zanemariti polarizaciju Ramanovog raspršenja i orijentacije molekula u odnosu na polje. [2]

Na SERS signal također će utjecati svojstva uzorka s obzirom na to da svaka molekula može imati različitu orijentaciju u odnosu na površinu metalnih nanočestica. Sama orijentacija molekule može promijeniti vezanje molekule za električno polje i utjecati na pojačanje signala. [2]

Vibracije s promjenom polarizabilnosti okomitom na površinu su pojačane, dok su Ramanovi modovi orijentirani paralelno površini slabi ili nepojačani.

Najintenzivniji Ramanov signal javlja se kad imamo pojavu površinski pojačanog rezonantnog Ramanovog raspršenja (eng. *surface-enhanced resonant Raman scattering or SERRS*) u kombinaciji sa SERS efektom. [2]

Kod SERRS-a frekvencije pobuđenja preklapaju se s onim elektronskim prijelazima molekule uzorka.

Optičke apsorpcijske vrpce uzorka govore nam u kojim slučajevima ćemo u većini slučajeva imati uvjete za kombinaciju SERRS-a i SERS-a.

SERS je spektroskopska metoda koristi se zbog pojačavanja signala te stavlja naglasak na visoku preciznost i osjetljivost detekcije što nižih koncentracija nekog uzorka, primjerice prisutnosti štetnih organskih tvari u pitkoj vodi, zraku ili u organizmu, prisutnost bioloških materijala radi prevencije bioterorističkih napada te radi ranog dijagnosticiranja bolesti potrebno je usavršavanje detekcije tumorskih stanica.

Primjena Ramanove i SERS spektroskopije nalazi primjenu u forenzici gdje se dobiveni spektar uspoređuje s postojećima u bazi spektara te se tako određuje o kojoj tvari se radi, u medicini za detekciju toksina u organizmu te tumorskih stanica, u prehrambenoj industriji za analizu sastava namirnica, zatim u zaštiti okoliša, pitanje nacionalne sigurnosti i još mnoga druga područja. [5], [10], [17] i [23].

Cilj i motivacija ovog rada je ispitati s pomoću Ramanove spektroskopije veže li se molekula glukozamina (molekula glukoze s NH_2 skupinom) za nanočestično zlato te do koliko niske koncentracije to možemo detektirati što se može primijeniti za razvoj detekcije što manje koncentracije tvari te nalazi primjenu i u medicini jer bi ovaj modelni sistem poslužio za provjeru vezanja većih molekula i aminokiselina poput primjerice hijalurona. Glukozamin je šećerni amin i sastavni je dio hijaluronske kiseline koja ima ulogu vezanja vode u koži, on povećava vlažnost kože te smanjuje bore, sam glukozamin koristi se i u protuupalne svrhe kod sportaša.

2 Metode korištene u radu

Cilj eksperimentalnih metoda provedenih u ovom diplomskom radu čiji su rezultati diskutirani u poglavlju Rezultati je ispitati mogu li se molekule glukozamina vezati na zlatne nanočestice i pri koliko niskim koncentracijama je moguće detektirati SERS efekt.

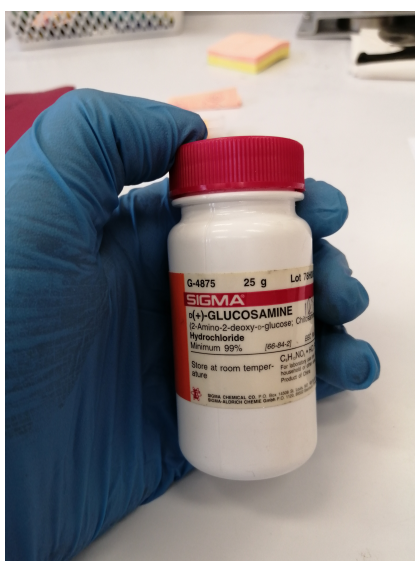
Zadaci i metode eksperimentalnog dijela diplomskog rada su:

- priprema 1 M otopine glukozamina i određivanje njene pH vrijednosti
- provedba centrifugiranja koloida s ciljem razdvajanja nanočestica po veličini, odvajajući supernatant od taloga
- određivanje veličine nanočestica u otopini zlatnih koloida korištenjem TEM i DLS metode
- određivanje zeta potencijala, odnosno naboja zlatnih nanočestica
- snimanje Ramanovog spektra otopina glukozamina u kapilarama (makrokomora) te Ramanovog spektra praha glukozamina
- snimanje SERS spektara smjesa otopina glukozamina različitih koncentracija i koloida sa zlatnim nanočesticama

2.1 Priprava uzoraka

Kako bismo detektirali tvari u što manjim koncentracijama, bitno je i precizno pripremiti otopine glukozamina točno određenih koncentracija kako bismo utvrdili granice detekcije.

Na slici (2.9) nalazi se D(+)-Glukozamin hidroklorid u prahu (dalje u tekstu glukozamin) koji je korišten u pripremi otopina različitih koncentracija.



Slika 2.9: D(+)-Glukozamin hidroklorid

Relativna molekulska masa glukozamina iznosi $M_r(C_6H_{13}NO_5 \times HCl) = 215,6g$.

Za pripremu jednomolarne (1 M) koncentracije određujemo omjer relativne molekulske mase i volumena V otapala (u našem slučaju deionizirana voda), u volumen od 1 mL za pripremiti jednomolarnu otopinu potrebno je dodati 0,2156 g glukozamina što smo izračunali iz omjera relativne molekulske mase glukozamina te jedne litre vode, odnosno: $\frac{M_r(C_6H_{13}NO_5 \times HCl)}{V(1000mL)} = \frac{215,6g}{1000mL} = 0,2156 \frac{g}{mL}$.

Masu potrebnu za pripremu 1 M otopine mjerimo digitalnom vagom sa sljedeće slike (2.10) koja ima preciznost desettisućinke grama tako da špatulicom iz bočice izvadimo prah glukozamina u plastičnu posudicu. Tariranjem vage na nulu s praznom posudicom omogućava nam direktno očitavanje mase glukozamina.



Slika 2.10: Vaga

Za pripremu 1mM otopine koja je tisućinka 1 M otopine potrebna nam je 1000 puta manja masa glukozamina, odnosno 0,2156 mg po mililitru otapala.

Za pripremu 0,1mM otopine potrebno je 0,02156 mg glukozamina po mililitru. Naposljetku bi nam za 0,01mM otopinu trebalo 0,002156 mg glukozamina po mililitru.

No vaga koju imamo na raspolaganju kao što je navedeno, ima preciznost do 0,0001 g, stoga nam je potreban veći volumen otapala od 1mL da bismo pripravili otopinu niže od 1M koncentracije. Uzmimo za primjer 1mM otopinu, za nju je potrebno 0,2156 mg po mililitru otapala, vaga ne mjeri toliko male iznose pa ćemo izračunati kolika masa je potrebna da bismo u 500 mL dobili 1mM koncentraciju otopine.

Za 500 mL volumena proširujemo brojnik i nazivnik omjera relativne molekulske mase i volumena s 500 za poznatu 1 M koncentraciju, odnosno

$$\frac{M_r(C_6H_{13}NO_5 \times HCl)}{V(500mL)} = \frac{0,2156g}{1mL} \cdot \frac{500g}{500mL} = 0,1078 \frac{g}{500ml}$$
, iz čega slijedi da nam za 500 mL volumena treba 0,1078 g kako bismo dobili 1mM otopinu.

Nakon što smo izvagali vagom mase, volumen otapala određujemo pipetom (slika 2.11) koja ima zapremninu točno određenog volumena za male volumene, dok za veće volumene ulijevamo vodu u posude s na sebi naznačenim volumenima.



Slika 2.11: Mikropipeta

Nakon što smo pripravili otopine glukozamina, kako bi se što bolje otopio u vodi, stavili smo ga u uređaj sa slike (2.12) koji pobuđuje posudu ultrazvučnim valovima visokog intenziteta frekvencija i tako pospješuje otapanje.



Slika 2.12: Ultrazvučna kupelj

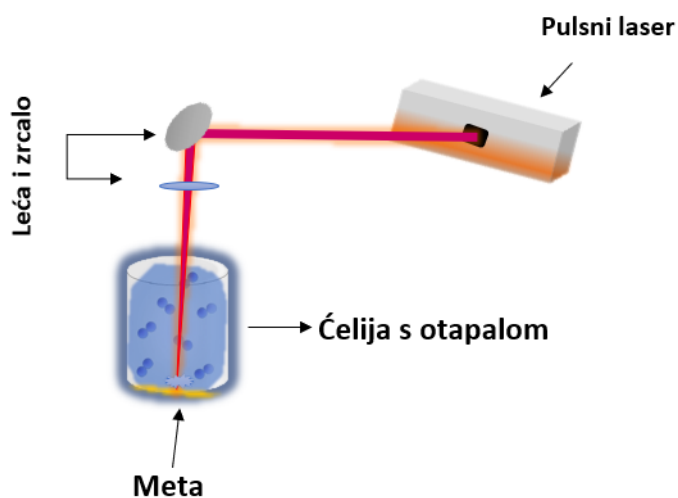
Nakon što smo pripravili otopine različitih koncentracija (1M, 1mM, 0,1 mM i 0,01mM), potrebni su nam i koloidi zlatnih nanočestica sa slike (2.13) koje je za potrebe diplomskog rada donirao dr. Vincenzo Amendola sa Sveučilišta u Padovi.



Slika 2.13: Koloid zlatnih nanočestica

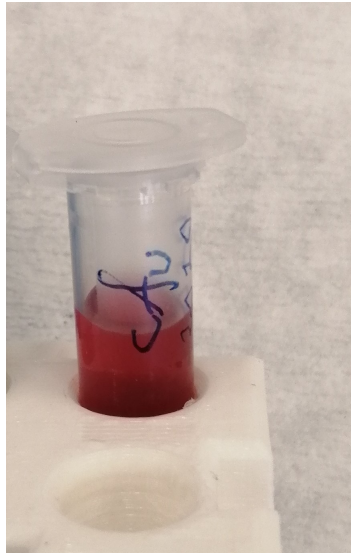
Čestice su pripremljene laserskom ablacijom (lat. *ablatio*: odnošenje) čiji postupak će biti opisan u nastavku prema opisu iz znanstvenog članka [1].

Postav potreban za lasersku ablaciju nalazi se na slici (2.14) i on se sastoji od pulsno lasersa, metalne mete (u našem slučaju zlata) u tekućini u kojoj će nanočestice biti raspršene i formirati koloid te optičkog sustava zrcala i leća koji fokusiraju pulsni laserski snop prema meti. S mete odstranjuje zlato u obliku plazme koja se kristalizira te srasta i raste do formiranja nanočestica. Koliko će nanočestica nastati ovisi o tome koliko je meta apsorbirala energije.



Slika 2.14: Postav za lasersku ablaciju

Nakon što smo zaprimili laserskom ablacijom dobivene koloide, pomoću pipete smo odmjerili u Eppendorf epruvete na slici (2.15).



Slika 2.15: Eppendorf epruveta s koloidom zlatnih nanočestica

Centrifugiranjem koloida (centrifugom UNIVERSAL 320, sl.2.16), postiže se razdvajanje čestica po veličini. Veće čestice završe na dnu epruvete i tvore talog, dok one manje budu na većoj visini i tvore supernatant.



(a)



(b)

Slika 2.16: Uređaj za centrifugiranje UNIVERSAL 320

Korištena postavke centrifugiranja su 720 RCF (relativno centrifugalno ubrzanje) u trajanju od 30 minuta.

Veličina RCF bezdimenzionalna je veličina koja se odnosi na silu koja djeluje na određenu masu kakvu bi ta ista masa osjećala kada bi bila prepuštena ubrzanju zbog djelovanja sile teže. Primjerice $rcf = 2500$ znači da su čestice podvrgnute ubrzanju $2500g$, gdje je $g \approx 10 \frac{m}{s^2}$ ubrzanje sile teže [8].

Ako zanemarimo interakciju između čestica i efekte difuzije, brzina sedimentacije v sfernih nanočestica izražava se preko (2.17):

$$v = c \frac{d^2(\rho_{NP} - \rho_L)}{\eta} g \cdot rcf \quad (2.17)$$

gdje c predstavlja bezdimenzionalni parametar koji ovisi o geometriji oblika nanočestica, d je dijametar, ρ_{NP} i ρ_L su gustoće nanočestica i otapala, dok je η viskoznost otapala [8].

RCF se linearno povećava s udaljenošću čestice od centra rotora prema izrazu (2.18):

$$rcf = (r_0 + x) \frac{\omega^2}{g} \quad (2.18)$$

gdje je r_0 radijus rotora, x je udaljenost čestice od centra, a ω je kutna brzina [8].

2.2 Ramanova spektroskopija

”Chandrasekhara Venkata Raman (1888.–1970. godine), bio je indijski fizičar, slika (2.17). Za otkriće (1928) neelastičnoga zračenja u spektru svjetlosti raspršene na tekućinama (Ramanov efekt) dobio je Nobelovu nagradu za fiziku 1930. Paralelno s Ramanom, efekt ”kombinacionog rasejanja” otkrili su u kvarcu ruski fizičari Landsberg i Mandeljštam. Zakasnili su s objavljivanjem rada par mjeseci iza Ramana, te nisu dobili Nobelovu nagradu. Efekt su otkrili prije Ramana.

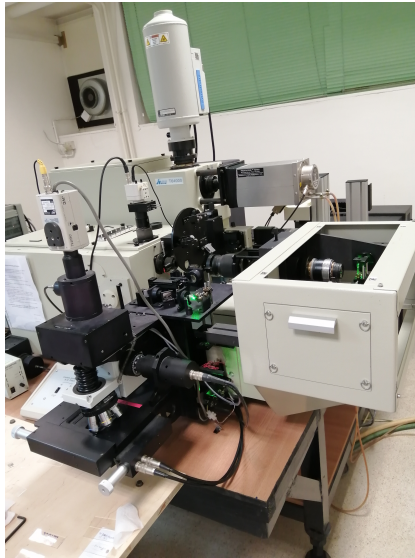
Raman je bio profesor fizike na Sveučilištu u Calcutti (1917.–1933. godine), potom je radio u Bangaloreu u Indijskom znanstvenom institutu (1933.–1948. godine), bio je osnivač i ravnatelj Ramanova istraživačkog instituta u Bangaloreu (1948.–1970. godine). Utemeljio je znanstveni časopis Indian Journal of Physics (1926. godine) i Indijsku akademiju znanosti (1934. godine). Radovi mu se uglavnom odnose na probleme iz optike, molekularne fizike i akustike. Bio je član Royal Society od 1924. i francuske Akademije znanosti od 1949.” [16]



Slika 2.17: C. V. Raman, preuzeto od: AshLin, CC BY-SA 3.0 <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>

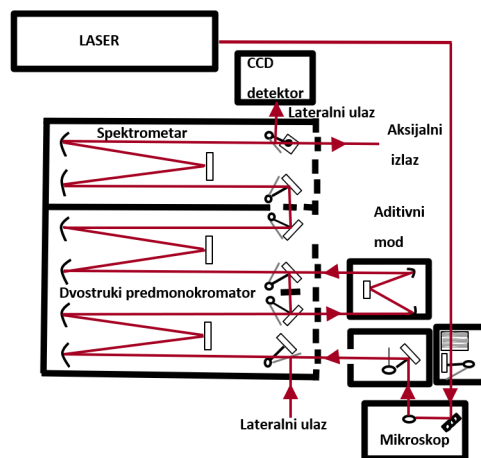
Prvi instrumenti korišteni za Ramanovu spektroskopiju sastojali su se od spektrometra s prizmom, živine lampe kao izvora monokromatske svjetlosti, te metalnih ploča kao detektora. Otkrićem dvostrukog i trostrukog monokromatora, plinskog lasera i fotoelektričnih detektora metoda je postala lakše dostupna za korištenje za širu upotrebu. Danas Ramanov spektrometar možemo pronaći u gotovo svim sferama istraživanja. [13]

U ovom diplomskom radu koristili smo dva Ramanova spektrometra. Prvi se nalazi na Institutu Ruđer Bošković i prikazan je na slici (2.18).



Slika 2.18: Ramanov spektrometar HORIBA Jobin Yvon model T64000

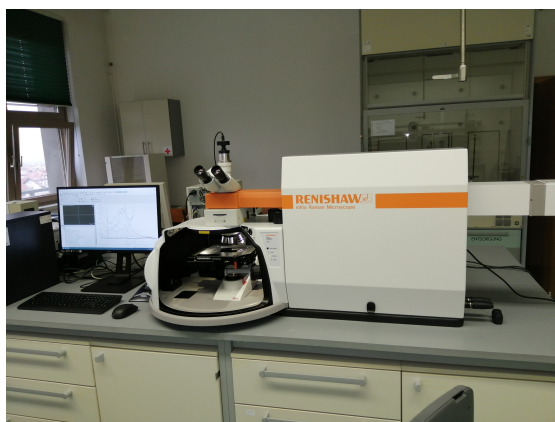
Uređaj sa slike shematski je pojednostavljeno prikazan na slici (2.19).



Slika 2.19: Optički dijagram za trostruki aditivni i jednostruki suptraktivni mod rada.

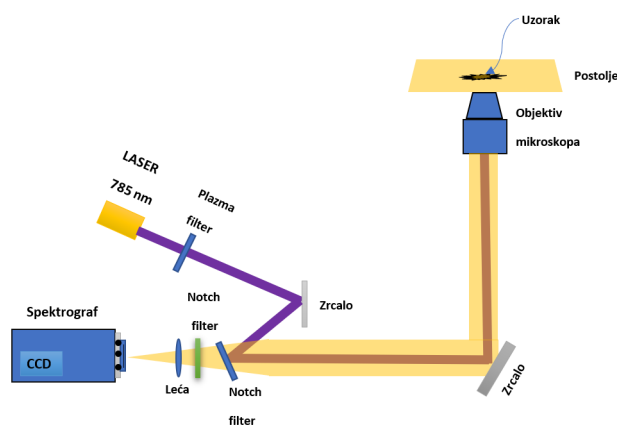
Uz spektrometar se koristi laser koji služi kao izvor monokromatske svjetlosti koja pada na uzorak. Ako je riječ o tekućini, uzorak se nalazi u kiveti. Prah se snima najčešće pod mikroskopom. Iduća komponenta je trostruki monokromator (slika 2.19) koji rastavlja na uzorku raspršeno svjetlo po valnim brojevima te CCD (eng. *charge-coupled device*) detektor koji bilježi svjetlo i elektronički signal pretvara u digitalni zapis spektra na računalu.

Osim spektrometra na Institutu Ruđer Bošković, za potrebe mjerenja korišten je i Ramanov spektrometar Renishaw InVia sa slike (2.20) s Kemijskom odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.



Slika 2.20: Ramanov spektrometar/mikroskop Renishaw inVia confocal Raman microscope

Shema navedenog uređaja prikazana je na slici (2.21):



Slika 2.21: Shema Ramanovog spektrometra

Pomoću ovog uređaja snimani su spektri smjesa otopina glukozamina i koloida zlatnih nanočestica. Smjese su pripravljene pomoću mikropipete miješanjem u malenim metalnim posudicama. Nakon što je pripravljena smjesa, prenesena je mala kap cca. $5\mu L$ na supstrat silicija te postavljena pod mikroskop unutar spektrometra. Snimljeni su Ramanovi spektri smjesa koloida i različitih koncentracija otopine, o kojima će biti više riječi u Rezultatima. Svrha snimanja različitih koncentracija iste otopine bila je u određivanju granice koncentracije glukozamina za koji se mogu detektirati njegovi vibracijski prijelazi.

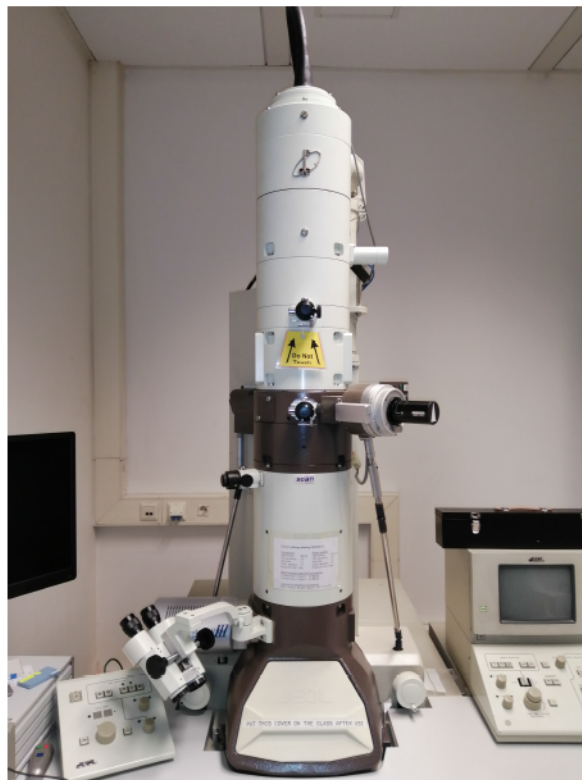
2.3 Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM)

Koristio se TEM uređaj smješten na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Transmisijskim elektronskim mikroskopom (eng. *Transmission Electron Microscopy*; *TEM*) snimani su koloidi uzoraka nanočestičnog zlata koji su prije samog snimanja nakapani na bakrene mrežice na slici (2.22). Uzorci su sušeni više sati.

Slika 2.22: Mrežica za snimani uzorak

U mjerenjima je korišten mikroskop JEM JEOL 1010 prikazan na slici (2.23) koji se nalazi na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

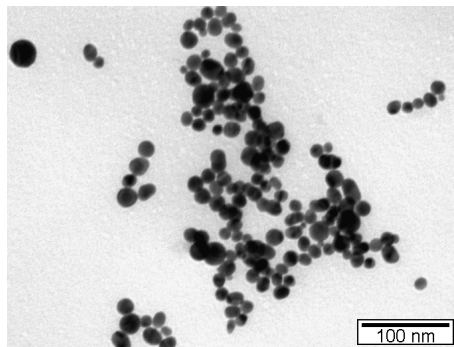


Slika 2.23: Transmisijski elektronski mikroskop JEOL JEM 1010

Iz De Broglieove hipoteze znamo da svako tijelo ima valnu duljinu koja je povezana s njegovom količinom gibanja.

Činjenica da materija ima valna svojstva primjenjuje se u znanosti u elektronskom mikroskopu. Znajući da kad nešto gledamo kroz mikroskop, najmanja veličina čestice koju možemo razlučeno promatrati je dimenzija korištene valne duljine. Dok optičkim mikroskopom možemo promatrati stvari usporedne s valnim duljinama vidljivog dijela spektra 400-800 nm, elektronski mikroskop može bilježiti puno manje objekte jer ubrzani elektroni imaju mnogo manju valnu duljinu od vidljive svjetlosti.

Nakon što snop elektrona prođe kroz uzorak na fluorescentnom zaslonu dobivamo sljedeću sliku (2.24) od uzorka raspršenih elektrona koja prikazuje nanočestice.



Slika 2.24: TEM slika uzorka koloida zlata

Detalji građe i funkcije samog uređaja opisani su u [18]: "TEM uređaji rade u visokom vakuumu i koriste kompliciranu optiku (sustav elektromagnetskih leća i apertura) u svrhu dobivanja što pravilnije slike bez aberacija. Također potrebna je detaljna priprema uzoraka koji su ograničeni debljinom i sposobnošću toleriranja vakuuma. Uzorci se prije snimanja uobičajeno deponiraju na bakrene mrežice s različitim debljinama folija (u ovisnosti o tipu uzorka) te se zatim bakrene mrežice postavljaju u posebno predviđene otvore na samom mikroskopu. Kao izvor elektrona uređaj koristi termoemisiju iz volframovog filameta spojenog na maksimalni radni napon od 100 kV čime se omogućava povećanje od 600000 puta". Slike dobivene elektronskim mikroskopom korištene su za određivanje veličine nanočestica i njihovih agregata što će biti komentirano u poglavlju Rezultati.

2.4 Dinamičko raspršenje svjetlosti - DLS metoda

Dinamičko raspršivanje svjetlosti (eng. *dynamic light scattering, DLS*) eksperimentalna je metoda koja istražuje kako se koherentna monokromatska svjetlost, raspršena na nanočesticama u koloidu, mijenja s vremenom. Vremenska funkcija korelacije intenziteta raspršene svjetlosti pri određenom kutu raspršenja daje informacije o veličini nanočestica u koloidu [7].

Raspršenje svjetlosti na nanočesticama u koloidu događa se zbog Brownovog gibanja i Tyndallovog efekta. Tyndallov efekt je raspršenje svjetlosti na sitnim lebdećim česticama u disperzivnim sustavima kao što su koloidi. Samu dinamiku nanočestica u koloidima opisuje Brownovo nasumično gibanje nanočestica koje su veće od atoma, ali nedovoljno velike da bismo ih opazili golim okom. Do gibanja dolazi zbog sudaranja molekula otapala s nanočesticama koloida [22].

Veće nanočestice gibat će se sporije i pomaci će im biti manji, dok će manje nanočestice imati veću brzinu kao i pomake. Povećanjem temperature koloida, brzina gibanja nanočestica povećat će se. Brzinu Brownovog gibanja nanočestica iskazujemo translacijskim koeficijentom difuzije D preko Stokes-Einsteinove relacije (2.19):

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (2.19)$$

gdje je $k_B \approx 1,38 \cdot 10^{-34} \frac{J}{K}$ Boltzmannova konstanta, T je temperatura, η je viskoznost otapala, a R hidrodinamički radijus [22].

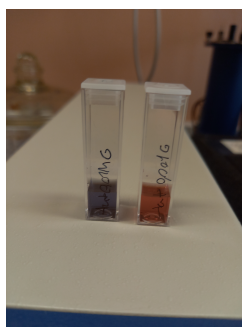
Radijus dobiven formulom (2.19) jest radijus koji vrijedi za nanočestice sfernog oblika. No u stvarnosti nanočestice nisu pravilne sfere, one su nepravilnog oblika te uz sebe imaju sloj tekućine koja će također utjecati na brzinu Brownovog gibanja i samim time utjecati i na veličinu čestice dobivenu mjerenjem.

U ovom diplomskom radu korištena je DLS metoda radi određivanja veličine zlatnih nanočestica u koloidu, te radijus nanočestica zlata s vezanim glukozaminom. Za određivanje veličine nanočestica korišten je uređaj Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical) (slika 2.25) s Instituta Ruđer Bošković.



Slika 2.25: Instrument Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical)

Mjerenje se provodi tako da se plastična kiveta (2.26) s 1mL koloida zlata postavi u komoru instrumenta (2.27).



Slika 2.26: Plastična kiveta s koloidom zlata i 1mM otopinom glukozamina (crvenkasta) te koloidom zlata i 10 mM otopinom glukozamina (siva)

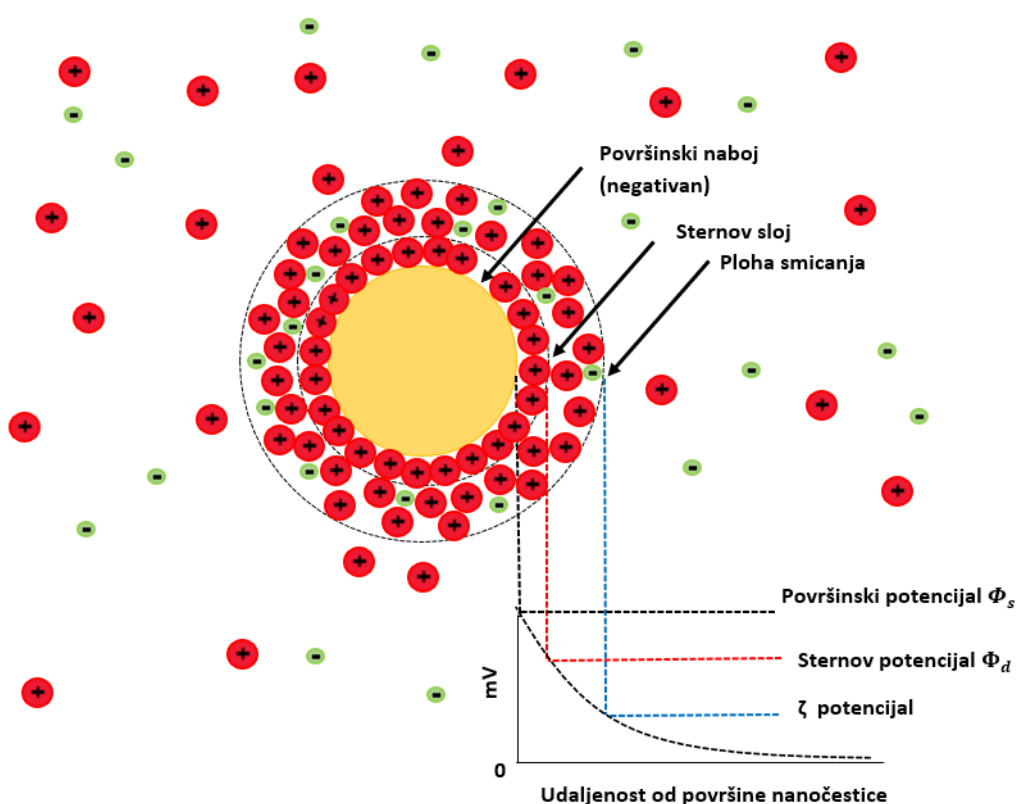


Slika 2.27: Utor za kivete instrumenta Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical)

Vidimo promjenu boje nakon što je u koloid zlata dodana 10 mM koncentracija glukozamina što nam govori da je došlo do stvaranja agregata većih dimenzija, pri čemu koloid mijenja boju. Optička svojstva dakle ovise o veličini nanočestica. Veličine nanočestica zlata dobivene ovom metodom te usporedba s rezultatima TEM metode bit će diskutirane u poglavlju Rezultati.

2.5 ζ potencijal i određivanje naboja nanočestica

Zeta potencijal koji još nazivamo i elektrokinetičkim potencijalom je potencijal plohe smicanja (slika 2.28) ili difuznog dvosloja po kojoj se koloid giba pod utjecajem električnog polja nabijene koloidne nanočestice. Ploha smicanja je granica koja razdvaja slobodne naboje (ili ione) koji su izvan granice plohe smicanja od onih naboja (ili iona) koje je privukla nabijena nanočestica te se gibaju s njom kao cjelina prema elektrodi (na kivetu) suprotnog naboja. Naboj nanočestice određuje prema kojoj se elektrodi se nanočestice gibaju [24].



Slika 2.28: Potencijal kao funkcija udaljenosti od površine nabijenih nanočestica u koloidu

Na temelju grafa sa slike (2.28) može se zaključiti da što su ioni dalje od površine nabijene nanočestice to je potencijal manjeg iznosa te se u beskonačnosti asimptotski približava nuli.

Zeta potencijal nastaje kao posljedica vezanja iona iz otapala na električki dvosloj (eng. *electrical double layer, EDL*). Električki dvosloj ima ulogu neutraliziranja površinskog naboja koji stvara električnu razliku potencijala između površine metalne nanočestice i otopine, a o čemu on ovisi bit će navedeno u nastavku. Potencijal površine metalne sfere naziva se površinski potencijal i označava se s Φ_s . Kroz Sternov sloj (sloj u kojem su slobodni naboji ili ioni jače vezani za nanočesticu za razliku od vanjskog sloja gdje su vezani slabije) potencijal je gotovo linearan, iznos mu se smanjuje približavanjem plohi smicanja. Potencijal na plohi smicanja bitan je jer se nalazi na granici koja odvaja vezane i slobodne ione. Gaussov zakon u materijalima glasi (2.20):

$$\nabla \cdot \mathbf{E} = \frac{\rho}{\epsilon_r \epsilon_0} \quad (2.20)$$

što fizikalno interpretiramo da je naboj (odnosno volumna gustoća naboja ρ) izvor ili ponor električnog polja \mathbf{E} . ϵ_r je relativna dielektrična permitivnost otapala, dok je ϵ_0 dielektrična permitivnost vakuuma i iznosi $8,854 \cdot 10^{-12} \frac{C}{Vm}$.

Matematički interpretirana jednačba (2.20) znači da operator divergencije $\nabla \cdot$ djeluje na električno polje \mathbf{E} .

Ukupan naboj $\rho = \sum_i^N n_i z_i e$ suma je svih prisutnih iona n_i naboja z_i .

Električno polje i potencijal povezani su relacijom (2.21):

$$\mathbf{E} = -\nabla \cdot \Phi \quad (2.21)$$

Kombinirajući relacije (2.20) i (2.21) slijedi (2.22):

$$\nabla \cdot (\nabla \cdot \Phi) = -\frac{\rho}{\epsilon_r \epsilon_0} \quad (2.22)$$

što je poznato kao Poissonova jednačba.

Pretpostavimo da vrijedi Boltzmannova raspodjela iona, tada njihovu koncentraciju zapisujemo kao omjer i -tog iona n_i te broja iona u ukupnom volumenu n_0 (2.23):

$$\frac{n_i}{n_0} = e^{-z_i \beta E_i} = e^{-\frac{z_i e \Phi}{k_B T}} \quad (2.23)$$

Uvrštavanjem (2.23) u Poissonovu jednadžbu (2.22) slijedi (2.24):

$$\nabla \cdot (\nabla \cdot \Phi) = -\frac{\sum_i^N n_i e^{-\frac{z_i e \Phi}{k_B T}} z_i e}{\epsilon_r \epsilon_0} \quad (2.24)$$

Za poseban slučaj simetričnih elektrolita ($z_1:z_2 = 1:1$), Poisson–Boltzmannova jednadžba (2.24) reducira se u (2.25), [9].

$$\nabla \cdot (\nabla \cdot \Phi) = \frac{2n_0 z e}{\epsilon_r \epsilon_0} \text{sh}(ze\beta\Phi) \quad (2.25)$$

gdje je $\beta = \frac{1}{k_B T}$.

Supstituiramo uvrštavajući bezdimenzionalne parametre $\Phi = ze\beta\Phi$ i $X = \frac{x}{L}$ iz čega slijedi (2.26):

$$\nabla \cdot (\nabla \cdot \Phi) = \kappa^2 L^2 \text{sh}(\Phi) \quad (2.26)$$

gdje je $\kappa = \sqrt{\frac{2z^2 e^2 n_0 \beta}{\epsilon_r \epsilon_0}}$ Debye-Hückelov parametar koji je povezan s debljinom električnog dvosloja preko Debyeve duljine $\lambda_d = \frac{1}{\kappa}$ te vidimo da ona ovisi o koncentraciji iona, temperaturi te permitivnosti [9].

Zeta potencijal određen je istim uređajem Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical) (slika 2.25) koji je korišten za mjerenja DLS-a. Dok su kod mjerenja DLS-a korištene plastične kivete, za mjerenja zeta potencijala korištene su kivete s elektrodama sa slike (2.29).



(a) Prazna kiveta



(b) Kiveta s koloidom

Slika 2.29: Kiveta za mjerenje zeta potencijala nanočestica

Eksperimentalno dobiveni zeta potencijal bit će komentiran u Rezultatima.

2.6 UV-VIS spektroskopija

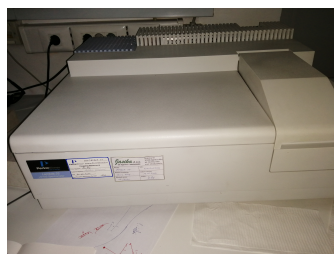
UV-VIS ili ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska spektroskopija je metoda kojom se dobiva apsorpcijski spektar uzorka u valnom području od 200 do 800 nm. Uzorak ima jedan ili više apsorpcijskih maksimuma koji odgovaraju prijelazima elektrona ili molekule iz osnovnog u više pobuđeno elektronsko stanje.

Uzorak se deponira u kivetu prikazanu na slici (2.30) prije stavljanja u mjerni uređaj.



Slika 2.30: Kiveta

Uređaj UV-VIS spektrofotometar na slici (2.31) sastoji se od izvora svjetlosti, monokromatora, držača kiveta u kojoj se nalazi uzorak te fotoelektričnog detektora.



Slika 2.31: UV-VIS spektrofotometar PerkinElmer (Lambda 25) korišten za snimanje otopina glukozamina.

Prema Beer-Lambertov zakonu, koji kaže da je apsorpcija (njen intenzitet) direktno proporcionalna koncentraciji i debljini kivete [16] možemo zaključiti da intenzitet signala UV-VIS spektra ovisi koncentraciji uzorka, debljini kivete te efikasnosti tvari da apsorbira snop svjetlosti. Taj zakon omogućuje da odredimo koncentraciju nekog spoja.

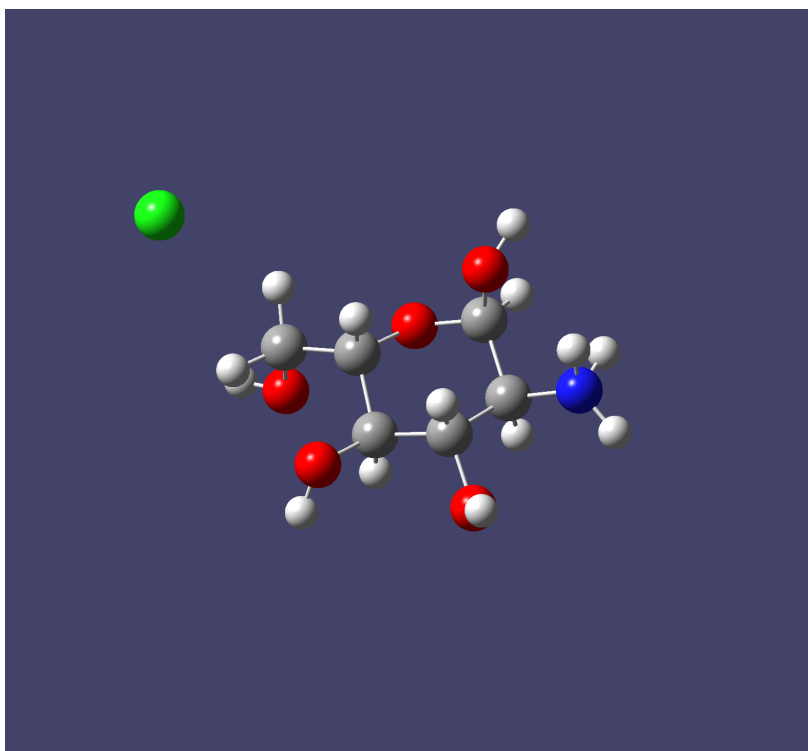
U ovom diplomskom radu snimljeni su transmisijski UV-VIS spektri glukozamina u vodenoj otopini te smjesi s koloidom, te refleksijski UV-VIS spektri praha glukozamina.

3 Rezultati

3.1 Ramanovi spektri glukozamina u prahu i vodenoj otopini

Kod opisa molekulskih vibracija promatramo periodička gibanja određene kemijske veze ili funkcionalne skupine unutar same molekule.

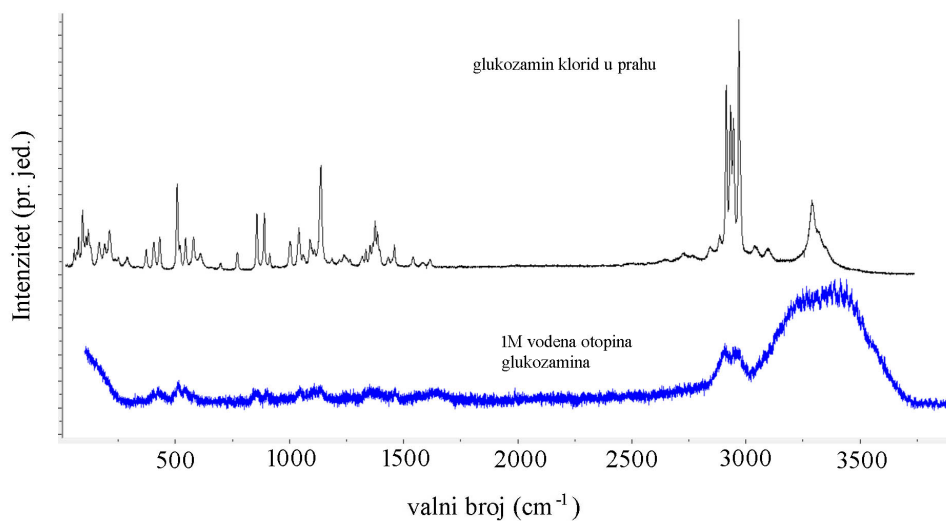
U eksperimentalnom dijelu diplomskog rada korišten je prah kristala glukozamin hidroklorida. U kristalu molekula ima strukturu prikazanu slikom (3.32).



Slika 3.32: Struktura glukozamin klorida

Kemijska formula glukozamina je $C_6H_{13}NO_5$. Na slici (3.32) atomi ugljika prikazani su sivom, vodika bijelom, dušika plavom te kisika crvenom bojom. Molekula glukozamina je u osnovi molekula glukoze u kojoj je jedna $-OH$ grupa zamijenjena amino grupom $-NH_2$. Navedene vibracije bit će definirane u nastavku te asignirane u tablici (3.2).

Slikom (3.33) prikazani su Ramanovi spektri praha i vodene otopine glukozamina dobivenih Ramanovim spektrometrom.



Slika 3.33: Ramanov spektar otopine i praha glukoze

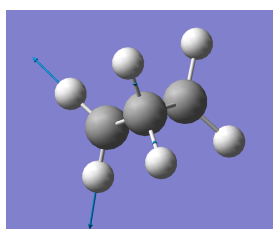
Energije molekularnih vibracija su diskretne i karakteristične za svaku atomsku orbitalu te svaka molekula ima svoj spektar poput otiska prsta po čemu ih razlikujemo jedne od drugih. Titranje svih atoma molekule u fazi karakterističnim vibracijama nazivamo normalnim modovima molekule.

Dvoatomske molekule imaju samo jednu karakterističnu vibraciju, dok molekule s N atoma imaju $3N - 6$ karakterističnih normalnih modova.

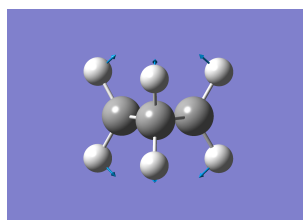
Neke od vibracija koje se općenito javljaju u molekulama prema [15] prikazane su na slikama 3.34, Lab. za molekulsku fiziku i sinteze novih materijala, IRB.

Na slikama 3.34 su predočene neke vibracije istezanja i savijanja $-CH_2$ grupa molekule ciklopropana:

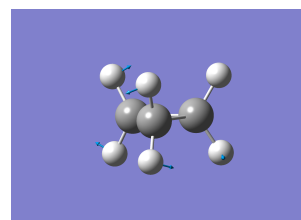
- istezanje: periodička promjena duljine neke kemijske veze. To je jedini način vibriranja dvoatomskih molekula
- savijanje (eng. *bending*): skraćeni izraz za vibraciju s deformacijama HCC kuteva
- ljuljanje (njihanje, zibanje, eng. *rocking*): druga vibracija s deformacijama HCC kuteva
- klaćenje (eng. *wagging*): treće moguće vibracije s deformacijama HCC kuteva
- uvijanje (torzija, eng. *twisting*): četvrte moguće vibracije s deformacijama HCC kuteva



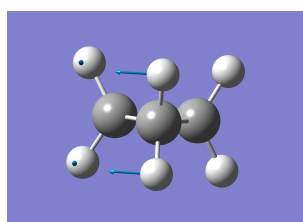
(a) Amplitude atoma u vibraciji istezanja



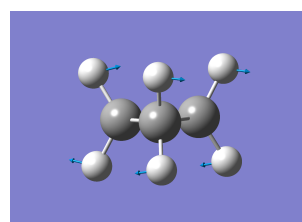
(b) Amplitude atoma u vibraciji savijanja



(c) Amplitude atoma u vibraciji ljuljanja



(d) Amplitude atoma u vibraciji klaćenja



(e) Amplitude atoma u vibraciji uvijanja

Slika 3.34: Amplitude atoma u vibracijama ciklopropana

Izračunate vrijednosti za kristalni prah su u boljem slaganju s opaženim vrijednostima praha, nego što su izračunate vrijednosti za slobodnu molekulu s vrijednostima opaženih vibracija vodene otopine. Izračunate vrijednosti izračunate su i stavljene na raspolaganje u Laboratoriju za molekulsku fiziku i sinteze novih materijala, IRB

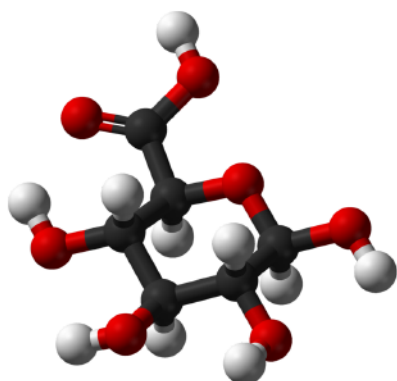
U tablici (3.2) predočena je usporedba opaženih vrpca u Ramanovim spektrima vodene otopine glukozamina (1M) i spektrima praha glukozamin hidroklorida s izračunatim vrijednostima normalnih modova slobodne molekule u neutralnom obliku i fonona u kristalu (provedeno u Lab. za molekulsku fiziku i sinteze novih materijala, IRB).

Skraćenice u tablici znače sljedeće: **vbr** (jako široka vrpca), **br** (široka vrpca), **sh** (rame), **s** (jak intenzitet), **ms** (srednje jak intenzitet), **w** (slab intenzitet) i **vw** (vrlo slab intenzitet).

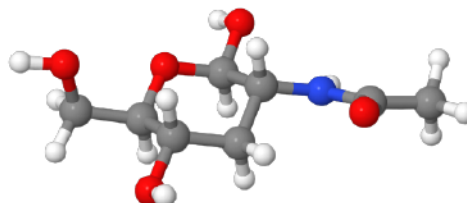
| Simetrija C_1 | Opažene Raman vrpce / cm^{-1} - otopina | Opažene Raman vrpce / cm^{-1} - kristal 295 K | Izračunati fononski modovi glukozamin hidroklorida (CRYSTAL09) | Izračunati normalni modovi glukozamina / cm^{-1} (Gaussian09) | Opis normalnog moda slobodne molekule |
|-----------------|---|---|--|---|---------------------------------------|
| | | | | | |
| | 3399 vbr | 3350 sh | 3331, 3321, 3307, 3302 | 3853,3827 | OH istezanje |
| | | | 3210, 3209, 3154, 3148 | 3821,3804 | OH istezanje |
| | 3257 vbr | 3290 | 3407,3408 | 3600 | Asimetrično istezanje NH_2 |
| | | | 3374,3377 | 3509 | Simetrično istezanje NH_2 |
| | | 3096 | 3079,3079, 3007,3008 | 3090,3077,3071 | CH istezanje |
| | | 3042 | 2985,2985,2994,2995 | 3056,3041 | CH istezanje |
| | 2972 | 2972 | 2966,2967 | 3018 | Simetrično CH_2 istezanje |
| | | 2969 | 2959,296 | 3007 | CH istezanje |
| | 2951 sh | 2945 | | | |
| | | 2933 | 2923,2923 | | |
| | 2908 | 2913 | | | |
| | 2875 sh | 2884 | | | |
| | | 2843 | | | |
| | | | 2517,2521* $N - H \cdots O$ | | |
| | | | | | |
| | 1639 br | | | | Savijanje H_2O |
| | | 1616 | 1614, 1612 | 1656 | Savijanje NH_2 |
| | 1552 | 1585 | | | |
| | | 1541 | 1551,1548,1537, 1536 | | |
| | | | | | |
| | 1475 | | | | |
| | 1461 | 1460 | 1440 | 1509 | Savijanje CH_2 |
| | | 1451 | 1423,1425,1438 | 1450 | Savijanje CH |
| | 1419 | 1432 | 1411,1411,1415,1417 | 1444 | CH i OH savijanje |
| | 1389 | | | 1431 | CH i OH savijanje |
| | | 1396 | | 1417 | CH_2 savijanje |
| | | 1385 | 1387,1388 | 1411,1409 | CH ljuljanje |
| | | 1375 | 1368 | 1375 | CH klaćenje |
| | 1356 | 1366 | 1361,1367 | 1367 | CH uvijanje |
| | 1332 | 1353 | 1350,1353,1358 | 1358 | CH i OH klaćenje |
| | | 1334 | 1331,1334,1342 | 1345 | CH savijanje |
| | 1276 | 1318 | 1317,1319,1327 | 1291 | CH_2 uvijanje |
| | 1261 | | 1279,1283,1296,1298 | 1286 | COH savijanje |
| | | 1265 | | 1277 | COH savijanje |
| | 1236 | | 1238,1248 | 1203 | COH savijanje |
| | | | 1211,1214,1231 | 1199 | NH_2 uvijanje |
| | 1189 | 1239 | 1164,1170,1182,1186 | 1181 | COH + CH savijanje |
| | 1137 | 1220 | 1136,1137,1144,1146 | 1163 | CCC savijanje |
| | 1110 | 1186 | 1123,1125,1127 | 1141 | CC istezanje |
| | | 1137 s | 1103, 1116 | 1120 | OCO i CC istezanje |
| | 1077 | 1109 | 1074,1086,1098 | 1112 | $N - C$ i CC istezanje |
| | 1048 | 1091 | 1055,1057,1065 | 1083 | $C - O$ istezanje |
| | | 1060 | 1042,1044,1045 | 1077 | CC i CN istezanje |
| | | 1041 | 1023, 1024 | 1069 | CH_2 ljuljanje |
| | | | 1000, 1004 | 1049 | CO i CC istezanje |
| | 982 | 1004 | | 1026 | NH_2 uvijanje + COH savijanje |
| | 964 | | | 1003 | CC istezanje |
| | | 937 vw | 915, 919 | 944 | Istezanje prstena |
| | 899 | 914 | 874 | | |
| | 862 | 889 ms | 869 | 887 | NH_2, CH_2 klaćenje |
| | | 857 ms | | | |
| | 847 | | 849, 850 | 877 | NH_2 klaćenje |
| | | | 795, 803 | 846 | CO istezanje |
| | 740 vw | 771 | 769, 770 | 765 | OCO savijanje |
| | | 698 | 695, 699 | 684 | CCC savijanje |
| | | | 643, 647 | | |
| | | 609 | 604, 608, 609, 613 | | |
| | 582 | 579 | 575, 580 | 576 | OCO i COO savijanje |
| | 543 | 544 | 536, 539 | 553 | Savijanje prstena |
| | 514 | 520 | 522, 522 | 516 | Savijanje prstena |
| | 496 sh | 508 s | 500, 502 | 505 | OCC savijanje |
| | 444 | | | 438 | Torzija OH |
| | 425 | 431 | 427 | 428 | Torzija OH |
| | | 411 sh | 409, 423 | 403 | Savijanje prstena |
| | 404 | 405 | 407, 409 | 378 | Torzija OH |
| | | 372 | 360, 364 | 348 | NH_2 ljuljanje, OH torzija |
| | 338 | 336 | 326, 353, 357 | 341 | OH torzija |
| | | | | 326 | NH_2 ljuljanje, OH torzija |
| | | 288 | 285, 295, 310 | 284 | Torzija oko $C_{15}C_{22}$ |
| | | 277 vw sh | 270, 280 | 271 | Torzija oko $C_{13}C_{21}$ |
| | | 249, 237 | 251, 255,261,265 | 256 | Torzija OH |
| | | | | 245 | Savijanje OCC |
| | | 212 | 214, 216, 221, 224 | 227 | Torzija OH |
| | | | | 216 | Torzija oko $C_{15}C_{22}$ |
| | | 190 | 198, 201 | | |
| | | 166 | 152, 157, 162, 168 | 149 | Torzija oko $C_{13}C_{21}$ |
| | | 128 sh | 137 | | |
| | | 118 | 120, 122, 124 | | |
| | | 108 | 102, 107 | 111 | Deformacija skeleta |
| | | 93 | 88 | 87 | Deformacija skeleta |
| | | 75 | 82 | | |
| | | 68 | 68 | | |
| | | 56 | 51, 62,63 | 56 | Torzija CH_2OH |
| | | | 44 | | |

Tablica 3.2: Usporedba opaženih vrpca u Ramanovim spektrima vodene otopine glukozamina (1M) i spektrima praha glukozamin hidroklorida s izračunatim vrijednostima normalnih modova slobodne molekule u neutralnom obliku i fonona u kristalu. (Izračunate vrijednosti dobivene u Laboratoriju za molekulska fiziku i sinteze novih materijala, IRB)

Hijaluronska kiselina građena je od D-glukuronske kiseline i N-acetil-D-glukoamina prikazanih shematski na slici (3.35) i jedan je od važnijih mukopolisaharida. [4].



(a) Glukuronska kiselina. Slika preuzeta od: "Benjah-bmm27, Public domain, via Wikimedia Commons"



(b) N-acetil-D-glukoamin. Slika preuzeta od: "Kevinjh, CC BY-SA 3.0, via Wikimedia Commons"

Slika 3.35: Sheme struktura molekula

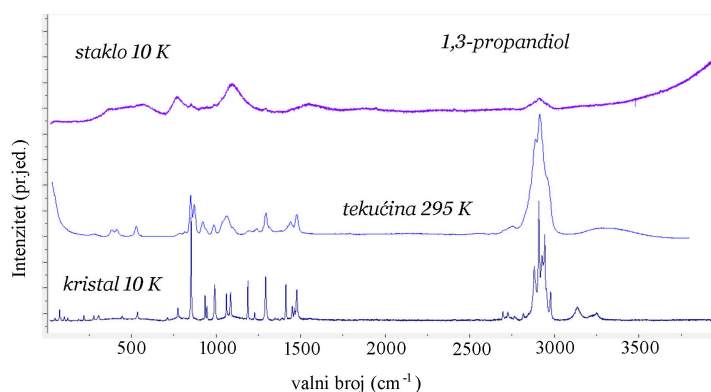
Nalazimo ju u sinovijskoj tekućini, koži, pupčanoj vrpici i vezivnim tkivima što je motivacija za njeno daljnje istraživanje [4]. Po slici (3.35) može se zaključiti da hijaluronska kiselina ima kompleksnu građu. Spektru koji bi davala sama hijaluronska kiselina bilo bi teško razaznati i asignirati vrpce, stoga se polazi od pristupa da se odvojeno promatraju spektri pojedinih sastavnica hijaluronske kiseline. Iz tog razloga spektroskopski analizirana molekula glukozamina polazište je za daljnja istraživanja vezana uz hijaluronsku kiselinu. Sam glukozamin koji gradi hijaluronsku kiselinu može se analizirati uspoređujući njegov spektar sa spektrom glukoze jer se strukturno razlikuju za $-NH_2$ skupinu. Glukozamin se od N-acetil-D-glukoamina razlikuje za $C=O$ skupinu koja kod glukozamina izostaje, stoga je od koristi uspoređivati njihove vrpce jer će se na većini mjesta preklapati jer su slične strukture. U tablici (3.2) navedeni su opisi modova slobodne molekule glukozamina promatrajući animacije izračunatih modova u GaussView programu te usporedbom s podacima iz članaka [4] i [11]. Valni brojevi opaženih vrpca očitani su direktno s grafova u programu LabSpec, a prijelazi su asignirani uspoređujući dobiveni spektar s izračunatim vrijednostima te s člancima [4] i [11]. Na opaženim vrpcama valnih brojeva iznad 3000cm^{-1} kod molekule glukozamina javljaju se simetrično i antisimetrično NH_2 istežanje te OH i CH istežanje.

U otopini nedostatak uskih vrpce obrazlaže se prisustvom razgranate mreže vodikovih veza. Na valnim brojevima u rasponu od $2800 - 3000\text{cm}^{-1}$ vrpce su jasno razaznate u slučaju praha, dok su kod otopine vrpce široke na tom rasponu. Vrijednosti izračunatih normalnih modova slobodne molekule više su od opaženih položaja vrpce u intervalu $2800 - 3000\text{cm}^{-1}$ za 200cm^{-1} ili više. Tablica (3.2). Može se pretpostaviti da su vrpce od D-glukuronske kiseline i α -D-glukoze prisutne kod glukozamina, ali pomaknute. Sljedeće opažene vrpce javljaju se ispod 1800cm^{-1} . Vrpce koje su opažene u rasponu od $1560 - 1475\text{cm}^{-1}$ su: savijanje $H - C - H$ kuteva u kristalu, odnosno $C - NH_2$ savijanje i savijanje $H - C - H$ u otopini. Vrpce na valnim brojevima $1460 - 960\text{cm}^{-1}$ imaju asignirane modove titranja, vibracije koje se javljaju u tom rasponu valnih brojeva su navedene u tablici (3.2). Vrpca valnog broja 899cm^{-1} nedostaje i u podacima iz članaka te nema dovoljno podataka da bi se asignirao mod titranja tom valnom broju. Kod vrpce na valnim brojevima 543 i 514cm^{-1} javlja se savijanje prstena, dok na još nižim valnim brojevima dominiraju vibracije torzije OH skupina i deformacije skeleta molekule. Svi ostali modovi vibracija po opaženim vrpce navedeni su u tablici (3.2).

Pridruživanje opisa vibracije svakoj opaženoj vrpce, osim što može pomoći pri analizi kompleksnijih molekula uspoređujući njihove vrpce s vrpce koje su poznate i asignirane u literaturi, pomoći će i u razumijevanju površinski pojačanog Ramanovog spektra glukozamina u otopini zlatnih nanočestica.

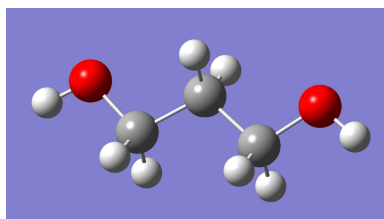
Na slici (3.33) uočavamo da se Ramanov spektar vodene otopine i praha glukozamina na nekim mjestima poklapaju, odnosno dolazi do vibracijskih prijelaza istih funkcionalnih skupina, dok se na nekim dijelovima razlikuju. To je zato što agregatno stanje utječe na Ramanov spektar.

Utjecaj agregatnog stanja na Ramanov spektar možemo vidjeti na primjeru molekule alkohola 1,3-propandiola, čiji su spektri na sobnoj temperaturi i na temperaturu od 10 K prikazani slikom (3.36):



Slika 3.36: Ramanovi spektri za različita agregatna stanja 1,3 propandiola. Iz arhive Lab. za molekulsku fiziku i sinteze novih materijala, IRB

Vrpce u spektru stakla vrlo su široke, jer se smrzavanjem 1,3-propandiola ograničava gibljivost atoma. Slika 3.37 prikazuje molekulu 1,3-propandiola. Kod stakla, za razliku od kristala imamo nered i smanjenu periodičnost strukturnih motiva pa su samim time vrpce šire.



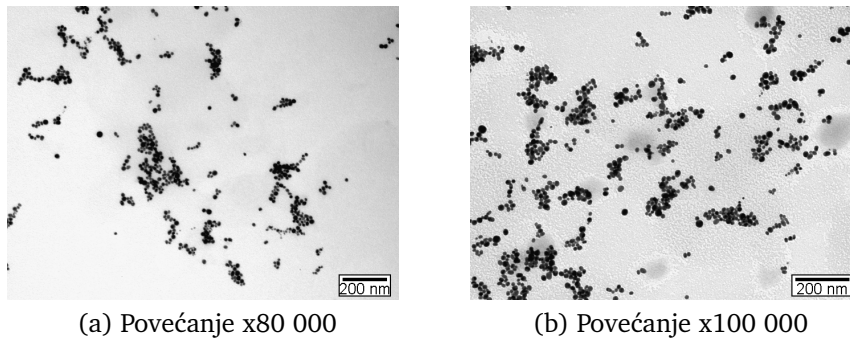
Slika 3.37: Strukturna shema 1,3-propandiola

Kristal predstavlja najuređenije strukturno stanje. Vrpce su uske i jasno razdvojene jer se vibracije odvijaju gibanjem u fazi svih molekula u kristalu. U tekućini molekule vrše slobodna translacijska i rotacijska gibanja, ali vibracije molekula međusobno nisu kolerirane kao u kristalu. Pridruživanje opisa vibracije svakoj opaženoj vrpci, pomoći će u razumijevanju površinski pojačanog Ramanovog spektra glukozamina u otopini zlatnih nanočestica.

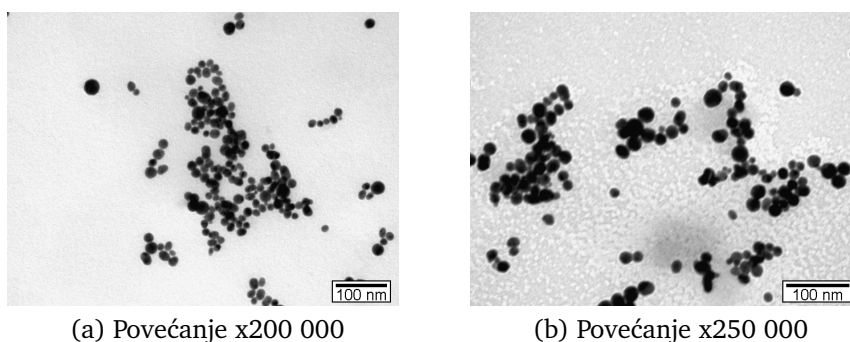
3.2 SERS spektri glukozamina na zlatnim nanočesticama

3.2.1 Određivanje dimenzija zlatnih nanočestica u koloidnim otopinama

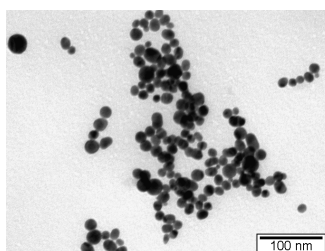
Na sljedećim slikama (3.38), (3.39) i (3.40) prikazane su slike zlatnih nanočestica u koloidu dobivenih TEM mikroskopom:



Slika 3.38: TEM snimka zlatnih nanočestica

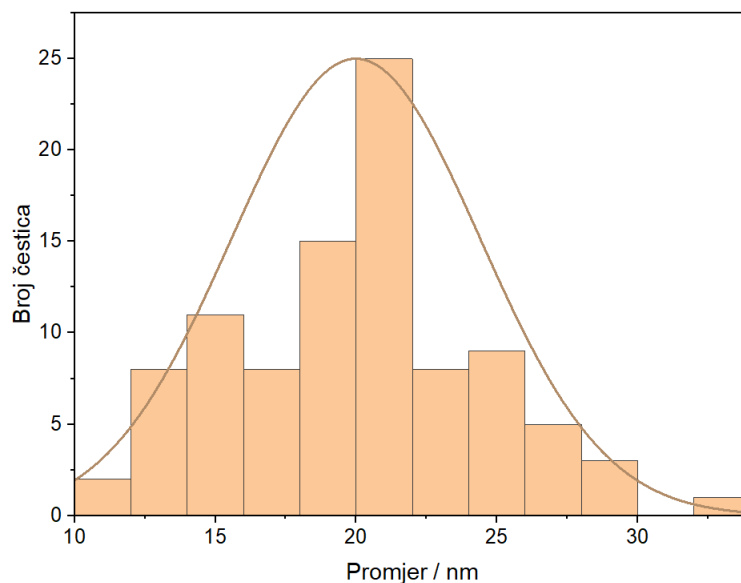


Slika 3.39: TEM snimka zlatnih nanočestica



Slika 3.40: TEM snimka zlatnih nanočestica
Povećanje x300 000

Koristeći softver za obradu slika ImageJ određena je distribucija promjera nanočestica prikazana sljedećim histogramom na slici (3.41).



Slika 3.41: Distribucija promjera zlatnih nanočestica u koloidu

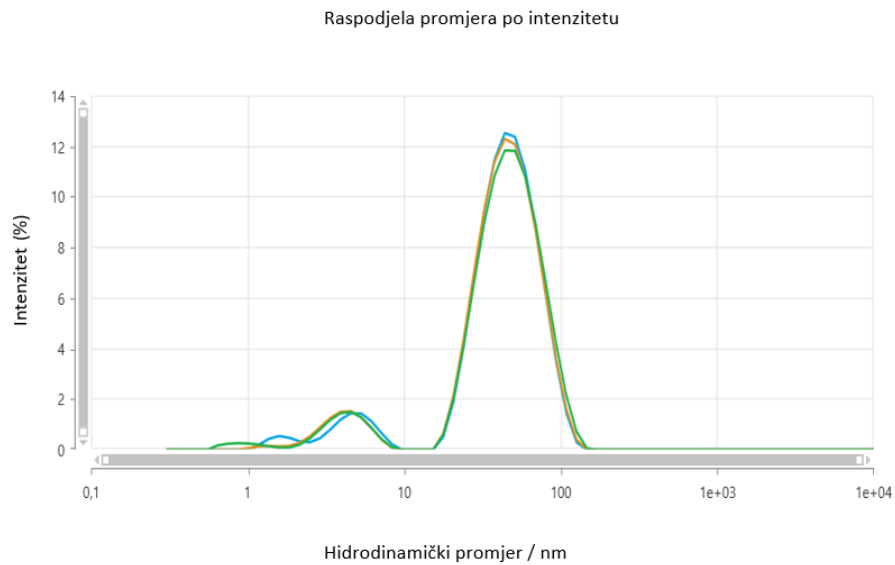
Statističkom obradom dobivena je srednja vrijednost promjera: 19,990 nm uz standardnu devijaciju od 4%. Po TEM slikama vidljivo je da su nanočestice približno sfernog oblika.

Pomoću metode dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS metoda) odredili smo hidrodinamičke promjere zlatnih nanočestica. Hidrodinamički promjer je takav promjer koji u svoje dimenzije ima uključen i utjecaj slojeva fluida koji ga okružuju i možemo predvidjeti da će on biti veći od promjera dobivenog TEM metodom s obzirom na to da je tamo uzorak koloida bio osušen. Mjerenja su izvršena za pet vrsta uzoraka:

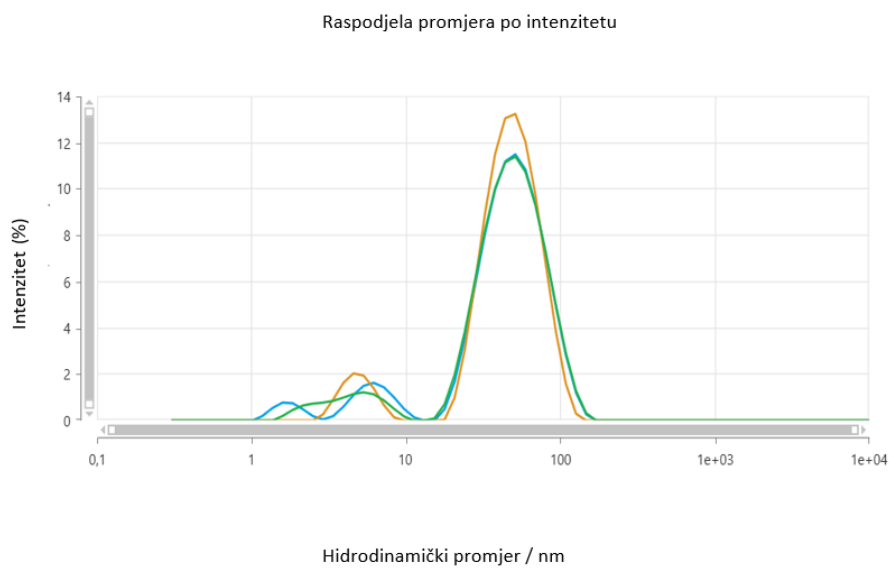
- čisti koloid zlata
- koloid zlata s vodom u omjeru volumena 1:1
- koloid zlata s 10mM otopinom glukozamina u omjeru volumena 1:1
- koloid zlata s 1mM otopinom glukozamina u omjeru volumena 1:1
- koloid zlata s 0,1mM otopinom glukozamina u omjeru volumena 1:1

Za svaki uzorak rađene su po tri serije od tri mjerenja promjera čestica pri različitim kutevima te jedna serija od pet mjerenja na jednom kutu.

Odabrane raspodjele veličine nanočestica u ovisnosti o intenzitetu prikazane su grafički na slici (3.42) i (3.43):

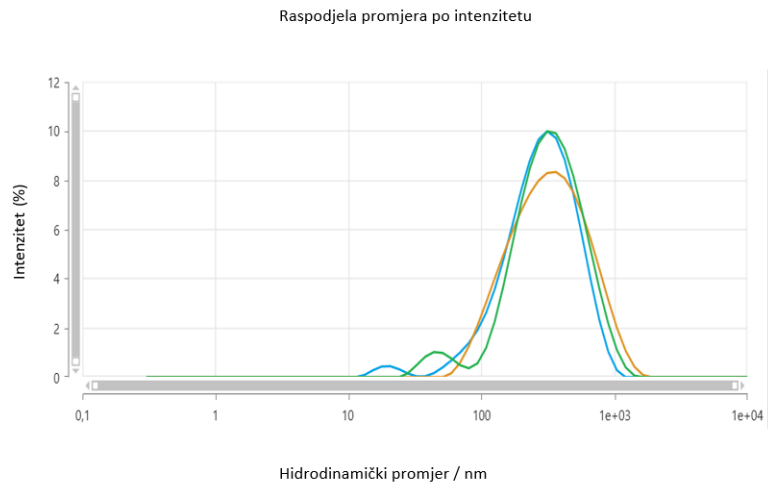


(a) Čisti koloid zlata

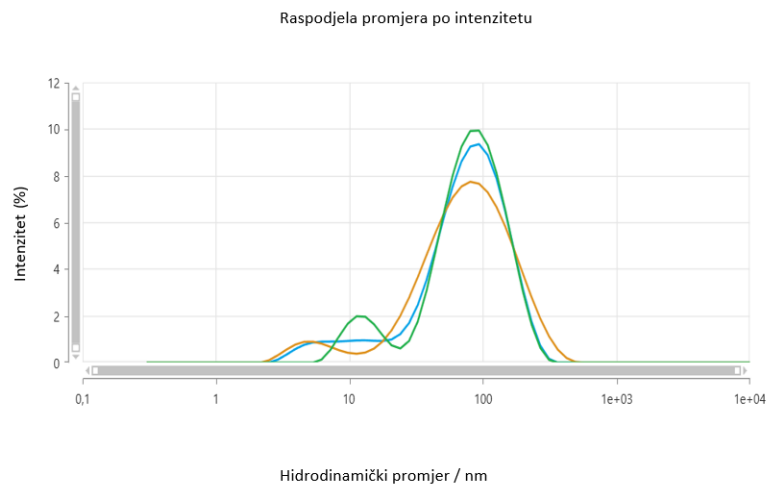


(b) Koloid zlata pomiješan s vodom

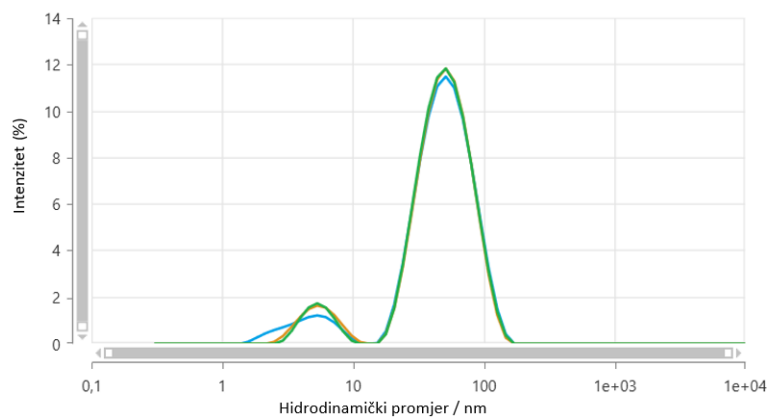
Slika 3.42: Raspodjele promjera po intenzitetu svjetlosti raspršene na nanočesticama



(a) Koloid zlata pomiješan s 10 mM otopinom glukozamina



(b) Koloid zlata pomiješan s 1 mM otopinom glukozamina



(c) Koloid zlata pomiješan s 0,1 mM otopinom glukozamina

Slika 3.43: Raspodjele promjera po intenzitetu svjetlosti raspršene na nanočesticama

Veličina čestica po pojedinoj seriji mjerenja po uzorcima izračunata je kao srednja vrijednost vrijednosti očitanih sa šiljaka distribucija.

Srednje vrijednosti izmjerenih hidrodinamičkih promjera za svaki od pet uzoraka predočene su u tablici (3.3):

| Vrsta uzorka | Čisti koloid zlata | | | | Koloid zlata pomiješan s vodom | | | |
|--|--------------------|-------|-------|-------|--------------------------------|-------|-------|-------|
| Kut /° | 174,7* | 174,7 | 90 | 12,78 | 174,7* | 174,7 | 90 | 12,78 |
| Visina kivete /mm | 0,64 | 4,64 | 4,64 | 4,64 | 4,64 | 4,64 | 4,64 | 4,64 |
| Srednja vrijednost hidrodinamičkog promjera d/nm | 71,97 | 50,42 | 51,64 | 53,63 | 56,20 | 53,24 | 54,34 | 63,52 |
| Procijenjeni dvosloj / nm | 25,99 | 15,22 | 15,83 | 16,82 | 18,10 | 16,63 | 17,17 | 21,77 |

| Vrsta uzorka | Koloid zlata s 0,1 mM otopinom glukozamina | | | | Koloid zlata s 1 mM otopinom glukozamina | | | | Koloid zlata s 10 mM otopinom glukozamina | | | |
|--|--|-------|-------|-------|--|-------|--------|--------|---|--------|--------|--------|
| Kut /° | 174,7* | 174,7 | 90 | 12,78 | 174,7* | 174,7 | 90 | 12,78 | 174,7* | 174,7 | 90 | 12,78 |
| Visina kivete /mm | 4,64 | 4,64 | 4,64 | 4,64 | 1,04 | 4,64 | 4,64 | 4,64 | 0,64 | 4,64 | 4,64 | 4,64 |
| Srednja vrijednost hidrodinamičkog promjera d/nm | 54,33 | 55,04 | 54,14 | 59,76 | 89,4 | 95,96 | 97,64 | 120,52 | 434,6 | 362,97 | 381,37 | 449,13 |
| Procijenjeni dvosloj / nm | 17,17 | 17,53 | 17,08 | 19,89 | 34,71 | 37,99 | 38,825 | 50,27 | 207,31 | 171,49 | 180,69 | 214,57 |

Tablica 3.3: Tablica srednjih vrijednosti hidrodinamičkih promjera za pet vrsta uzoraka pri različitim visinama kivete i kutevima raspršenja

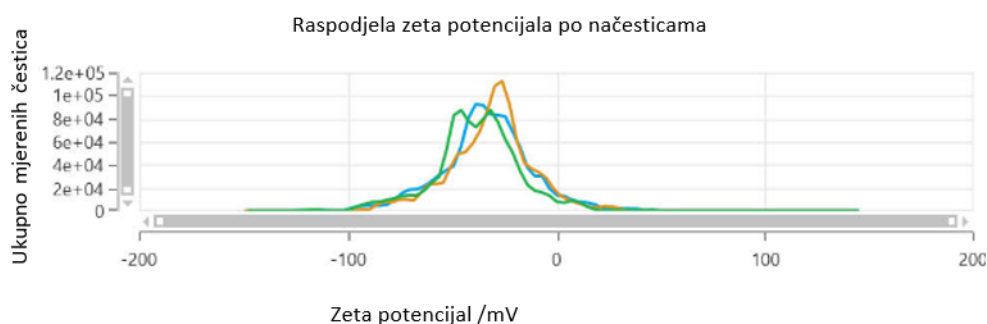
Uspoređujući vrijednosti promjera dobivenog TEM i DLS metodom procijenjena je debljina hidrodinamičkog dvosloja, kako jedan sloj dvosloja okružuje nanočesticu s lijeve, dok drugi s desne strane, procijenjeni dvosloji navedeni u tablici (3.3) izračunati su kao $\frac{1}{2}$ razlike promjera zlatnih nanočestica dobivenih DLS i TEM metodom, odnosno $d_{DLS} - d_{TEM}$.

Kao što je i predviđeno, zbog utjecaja slojeva fluida oko nanočestica zlata, hidrodinamički promjer je veći od promjera dobivenog TEM metodom mjerenja. Kod smjese veće koncentracije dobiven je veći hidrodinamički promjer po čemu možemo zaključiti da je došlo do stvaranja većih agregata nego kod niže koncentracije.

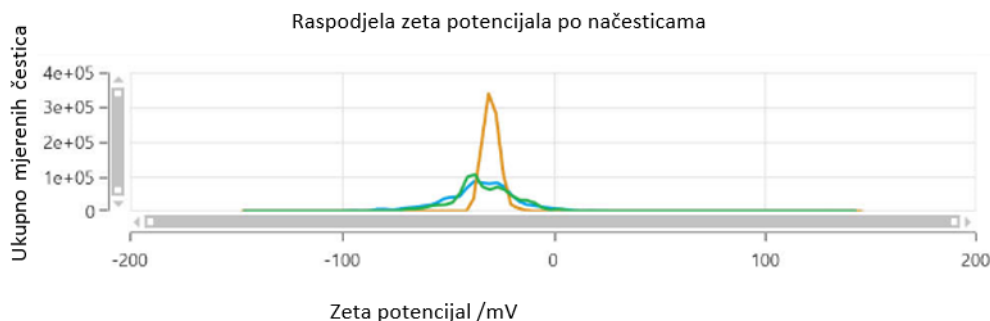
*Označava prosječnu vrijednost pet mjerenja na tom kutu.

3.2.2 Potvrda vezanja molekula glukozamina na zlatne nanočestice mjerenjem zeta potencijala

Nakon što su izmjereni hidrodinamički promjeri, izmjeren je i zeta potencijal. Za svaki od 5 vrsta uzoraka izmjerena je po jedna serija od tri mjerenja za svaki uzorak. Raspodjele izmjerenih vrijednosti zeta potencijala po česticama grafički su prikazane na slikama (3.44) i (3.45):

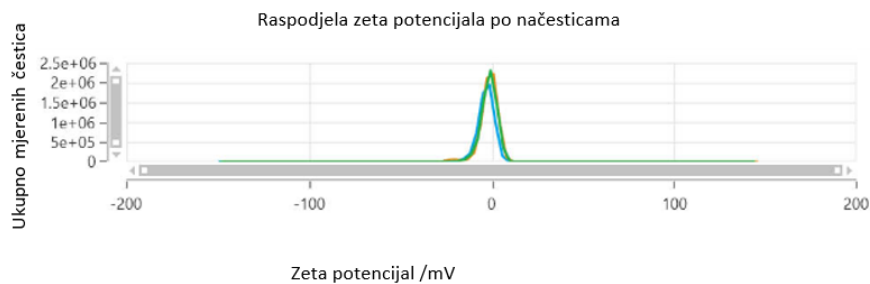


(a) Čisti koloid zlata, $-31,3mV$

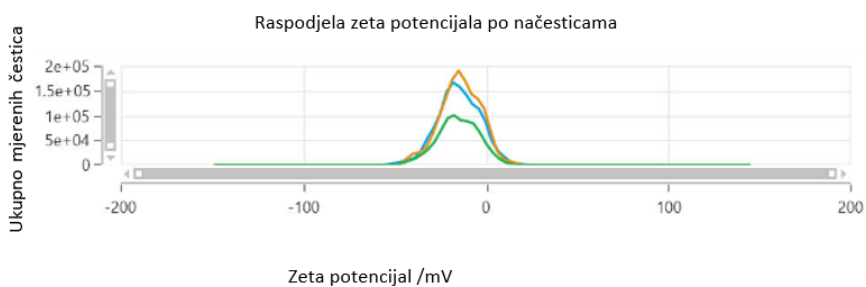


(b) Koloid zlata pomiješan s vodom, $-32mV$

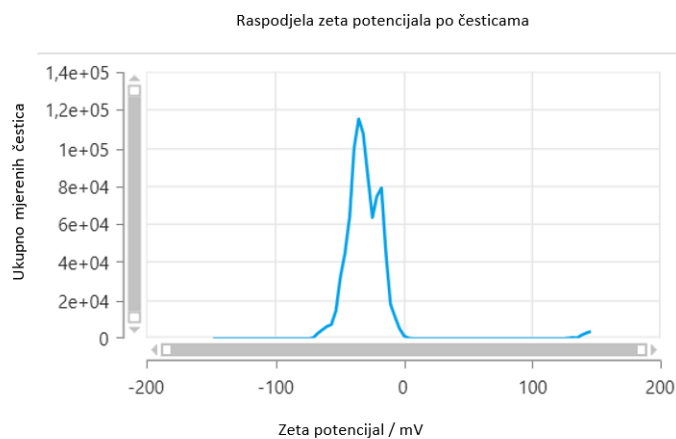
Slika 3.44: Raspodjele zeta potencijala za sve izučavane otopine



(a) Koloid zlata pomiješan s 10 mM otopinom glukozamina, $-1,8\text{mV}$



(b) Koloid zlata pomiješan s 1 mM otopinom glukozamina, $-14,7\text{mV}$



(c) Koloid zlata pomiješan s 0,1 mM otopinom glukozamina, $-28,35\text{mV}$

Slika 3.45: Raspodjele zeta potencijala za sve izučavane otopine

Prema [12] vrijednosti zeta potencijala mogu se interpretirati kao mjera elektrostatske stabilnosti smjese koloida i otopine ovisno u koji interval njihove vrijednost padne. Vrijednosti zeta potencijala smjesa koje imaju vrijednosti zeta potencijala od $0 - \pm 5$ mV smatraju se jako elektrostatski nestabilnima, odnosno repulzivna elektrostatska sila je slaba pa su sklone brzom taloženju, agregiranju i vezuju se i sam koloid postaje neutralnije nabijen što je slučaj kod koloida zlata pomiješanog s 10 mM otopinom glukozamina jer iznos njegovog zeta potencijala iznosi -1,8 mV. Nadalje se javlja početna elektrostatska nestabilnost pri vrijednostima od $\pm 10 - \pm 30$ mV. Smjese koloida zlata pomiješane 0,1 mM otopinom glukozamina (-28,35 mV) te s 1 m M otopinom glukozamina (-14,7 mV) pokazuju početnu elektrostatsku nestabilnost što je pokazatelj da može doći do vezivanja. Naposljetku se javlja srednja stabilnost u intervalu od $\pm 30 - \pm 40$ mV što je izmjereno za smjese zlatnih koloida s vodom (-32 mV) te kod čistog koloida (-31,3 mV) iz čega se zaključuje da je koloid elektrostatski stabilan i sporo agregira jer su sile repulzije među česticama dovoljno velike.

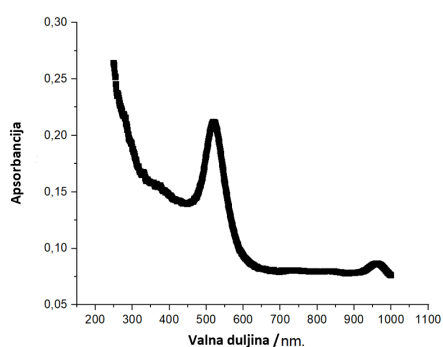
Iz vrijednosti zeta potencijala može se zaključiti da su zlatne nanočestice čistog koloida i smjese koloida s vodom negativno nabijene i stabilne, kulonska repulzija je dovoljno velika da čestice budu razdvojene jedne od drugih. Dok kod mješavine zlatnih koloida s glukozaminom imamo takve vrijednosti zeta potencijala da dolazi do vezanja pozitivno nabijenog glukozamina [21] na negativno nabijene zlatne nanočestice. O postojanju pozitivno nabijenog glukozamina zaključeno je temeljem $pH=4,5$ vrijednosti.

Molarne koncentracije anomera glukozamina αD^+ , βD^+ , α^0 i β^0 određene su metodom nuklearne magnetske rezonance [21]. U otopinama pH vrijednosti do 7, odnosno kiselim i neutralnim otopinama glukozamin je disociran na pozitivne ione $GlcN^+$, (oblik s NH_3^+), dok za pH vrijednosti iznad 7, odnosno u lužnatim otopinama postaje dominantna koncentracija iona $GlcN^0$ (oblik s NH_2 skupinom) [21]. Vodena otopina korištena u ovom diplomskom radu ima vrijednost $pH = 4$, određeno pH metrom na Institutu Ruđer Bošković. Glukozamin je dakle u vodenoj 1 M otopini oblika $GlcN^+$.

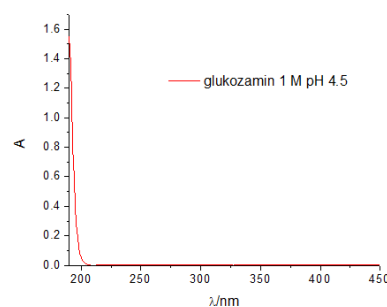
3.2.3 Površinski pojačani Ramanovi spektri smjesa otopine glukozamina i koloida zlatnih nanočestica

Kao što je već spomenuto optička svojstva koloida zlatnih nanočestica ovise o veličini nanočestica. Fizikalni razlog tome je interakcija svjetlosti s površinskim plazmonima (SPR). Površinski plazmoni apsorbiraju fotone valnih duljina vidljive svjetlosti koje su bliske njihovoj vlastitoj frekvenciji te dolazi do rezonance površinskih plazmona. Ovisno o valnoj duljini koju apsorbiraju, optička svojstva koloida ovise o dimenzijama nanočestica.

Na slici (3.46) nalazi se UV-VIS spektar koloida zlatnih nanočestica - slika (a) te otopine glukozamin klorida pH=4,5 vrijednosti - slika (b). UV-VIS spektri snimljeni su spektrofotometrom Shimadzu UV-3600 i PerkinElmer Lambda 35 smještenima na Institutu Ruđer Bošković.



(a) UV-VIS spektar koloida zlatnih nanočestica

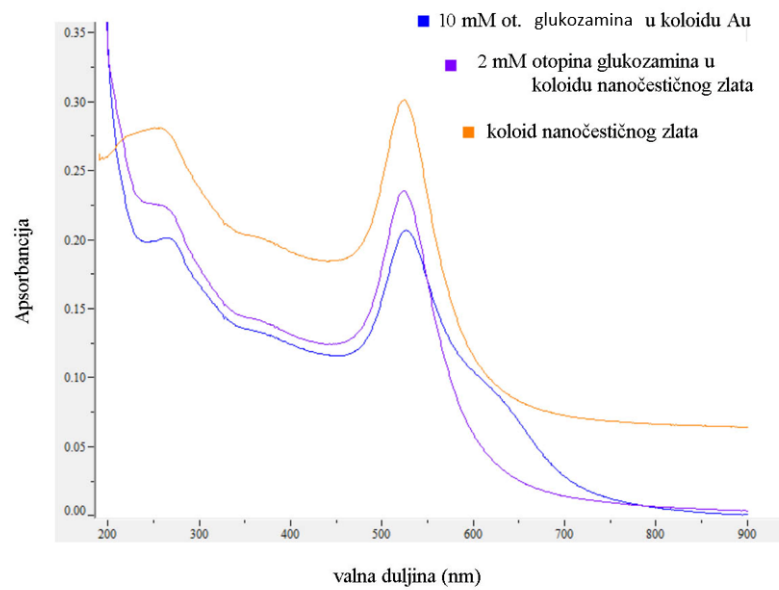


(b) UV-VIS spektar otopine glukozamin klorida

Slika 3.46: UV-VIS spektar otopine glukozamina i čistog koloida zlatnih nanočestica

Iz grafa je vidljiv maksimum apsorpcijske vrpce na valnoj duljini od cca. 520 nm što direktno pokazuje da na toj valnoj duljini postoji rezonancija zlatnih nanočestica. Ovaj maksimum ogovara koloidu bez glukozamina. Spektar otopine glukozamin klorida pH=4,5 ukazuje da otopina apsorbira svjetlost u UV dijelu spektra. Otopina glukozamin klorida ima maksimum na vrijednosti koja je manja od 190 nm.

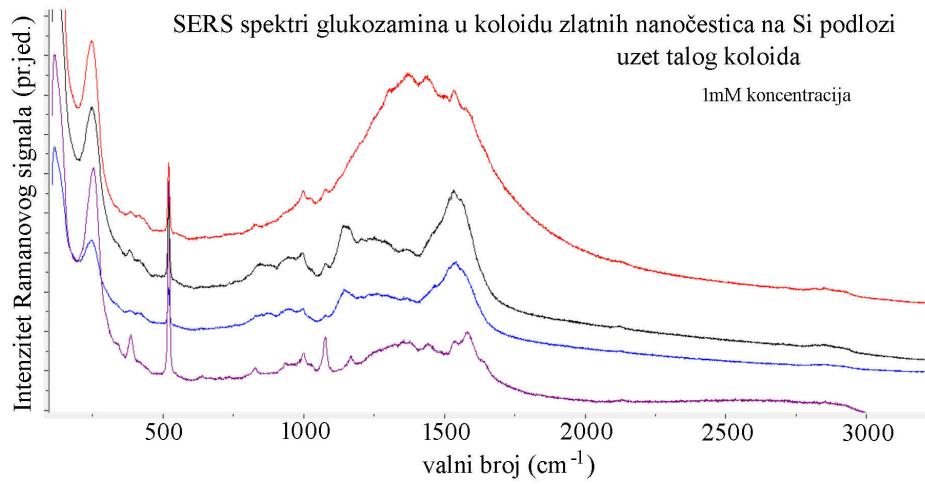
UV-VIS spektri smjesa 2 mM i 10mM otopine glukozamina i koloida zlatnih nanočestica pokazuje spektar, slika (3.47). Maksimum se nalazi na 523 nm.



Slika 3.47: UV-VIS spektri čistog zlatnog koloida i smjese s glukozaminom

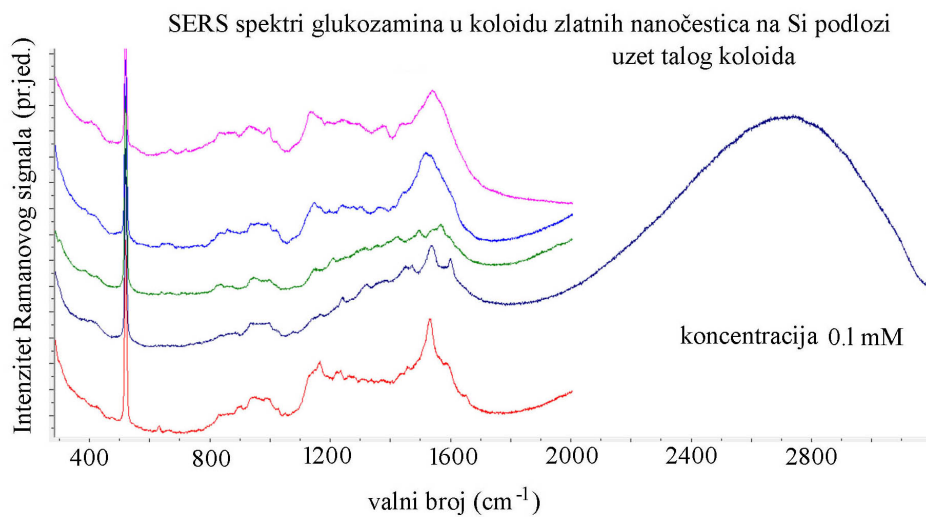
UV-VIS spektar smjese 2mM otopine glukozamina i koloida zlatnih nanočestica gotovo je identičan kao UV-VIS spektar zlata, dok kod 10 mM otopine glukozamina uočavamo rame što ukazuje na vezanje glukozamina na zlato i stvaranje agregata. Razlog tome su i velike dimenzije zlatnih nanočestica u smjesi 10 mM otopine, što su one veće, to je veća sposobnost apsorpcije svjetlosti.

Na slici (3.48) prikazan je SERS spektar glukozamina koncentracije 1 mM u koloidu zlatnih nanočestica.



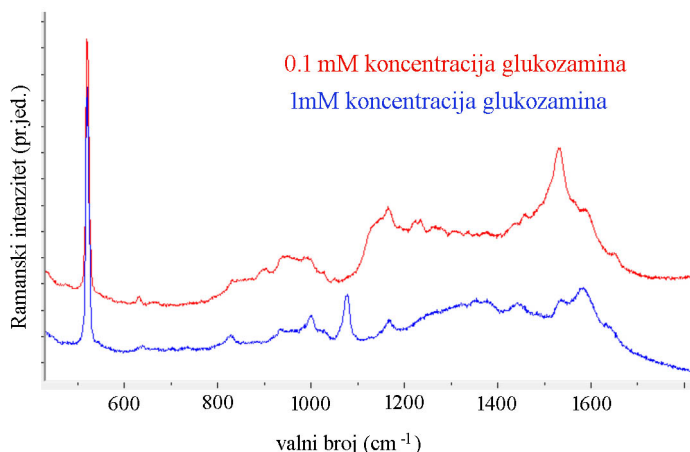
Slika 3.48: SERS glukozamina u koloidu zlata.

Na slici (3.49) prikazan je SERS spektar glukozamina koncentracije 0,1 mM u koloida zlatnih nanočestica.



Slika 3.49: SERS spektri glukozamina u koloidu zlata.

Na slici (3.50) uspoređujemo grafove SERS spektara glukozamina u koloidu zlata pri dvije različite koncentracije. Izabrana su dva reprezentativna spektra čiji će istaknuti modovi vibracija biti diskutirani u nastavku.



Slika 3.50: Usporedni SERS spektri koloida zlata za dvije različite koncentracije.

U tablici (3.4) istaknute su vrpce koje su značajne u SERS spektrima smjesa 0,1 mM i 1mM otopine glukozamina i koloida zlata prikazanih na slici (3.50). Sam spektar sastoji se od nekolicine ramena i širokih vrpca čije sastavnice (kojih može biti 2 ili više) ne možemo razaznati, stoga su izabrane one vrpce koje se mogu usporediti s vrpcama aktivnima i u Ramanovom spektru čistog glukozamina bez koloida, odnosno s izračunatim modovima slobodne molekule glukozamina.

| Opažene SERS vrpce / cm^{-1} 0,1 mM konc. glukozamina | Izračunati normalni modovi glukozamina / cm^{-1} (Gaussian09) | Opis normalnog moda |
|--|---|----------------------|
| 1165 | 1163 | <i>CCC</i> savijanje |
| 1227 | 1203 | <i>COH</i> savijanje |
| 1458 | 1450 | <i>CH</i> savijanje |
| 1531 | 1509 | $-NH_3^+$ savijanje |
| 1589 | 1509 | $-NH_3^+$ savijanje |

| Opažene SERS vrpce / cm^{-1} 1 mM konc. glukozamina | Izračunati normalni modovi glukozamina / cm^{-1} (Gaussian09) | Opis normalnog moda |
|--|---|---------------------------------|
| 998 | 1003 | <i>CC</i> istezanje |
| 1076 | 1077 | <i>CC</i> i <i>CN</i> istezanje |
| 1167 | 1163 | <i>CCC</i> savijanje |
| 1532 | 1509 | $-NH_3^+$ savijanje |
| 1581 | 1509 | $-NH_3^+$ savijanje |

Tablica 3.4: Usporedba opaženih vrpca u SERS spektrima otopine glukozamina (0,1 mM i 1 mM) u zlatnom koloidu s izračunatim vrijednostima normalnih modova slobodne molekule u neutralnom obliku (Lab. za molekulsku fiziku i sinteze novih materijala, IRB).

Mjerenjem zeta potencijala pokazano je da će se molekula glukozamina vezati za negativno nabijene zlatne nanočestice. Ovisno o orijentaciji na metalnoj površini adsorbirane funkcionalne grupe molekule doći će do pojačanja ili smanjenja intenziteta vibracijskog moda te grupe u SERS spektru u odnosu na intenzitet prijelaza u Ramanovom spektru čiste otopine glukozamin klorida. U tablici (3.4) odabrane su neke vrpce čiji će opisi modova biti navedeni i u nastavku uz pretpostavku orijentacije pojedine funkcionalne grupe molekule. Prema tablici (3.4) vidljivo je da se CCC savijanje javlja kod spektara obiju koncentracija na valnim brojevima u rasponu od $1165 - 1167\text{cm}^{-1}$. Pretpostavljeni način vibracije $-NH_3^+$ savijanja u otopini uočava se na valnim brojevima $1531 - 1589\text{cm}^{-1}$ gdje su vrpce najvećeg intenziteta što ukazuje da se ta grupa adsorbirala okomito na metalnu površinu. Kod Ramanovog spektra čiste otopine glukozamina te se vrpce ne opažaju jer su vrlo slabog intenziteta, pa se njihov nastanak i pojačani intenzitet može objasniti promijenjenom orijentacijom molekule prilikom njene adsorpcije na metalnu površinu. Orijehtacija molekule u odnosu na metalnu površinu može značajno promijeniti učinkovitost vezanja s lokalnim poljem, a samim time pojačati intenzitet vibracija. Vibracije s promjenom polarizabilnosti okomite na površinu su pojačanog intenziteta, dok su one orijentirane paralelno s metalnom površinom slabog ili nepojačanog intenziteta [2]. Samim time može se pretpostaviti orijentacija pojedine funkcionalne grupe molekule promatrajući intenzitete SERS spektra. One vrpce većeg intenziteta imat će grupe okomite na površinu, one srednje jakog intenziteta imat će grupe nagnute dok će one slabog intenziteta imati paralelne ili gotovo paralelne grupe u odnosu na metalnu površinu. Uspoređujući SERS spektre smjesa s Ramanovim spektrom otopine glukozamina bez koloida pretpostavljeni su i normalni modovi koji se ne preklapaju na obje koncentracije. Kod 0,1 mM koncentracije javlja se još i COH savijanje na 1227cm^{-1} te CH savijanje na 1458cm^{-1} , dok se kod 1 mM koncentracije javlja CC istežanje na $998 - 1076\text{cm}^{-1}$ te CN istežanje na 1076cm^{-1} . Vrijedi istaknuti da se vrpca jakog intenziteta na cca. 520cm^{-1} javlja zbog podloge od silicija. Intenzitet vrpce je u ovom slučaju veći za nižu koncentraciju otopine glukozamina što je glavni motiv korištenja ove metode jer do efekta dolazi i na niskim koncentracijama zbog rezonancije površinskih plazmona.

4 Zaključak

Ovim diplomskim radom nastojala se proučiti mogućnost detekcije jedne manje, a biološki važne molekule, poput glukozamina. Glukozamin spada u grupu aminošećera, u obliku N-acetil glukozamina spaja se s glukuronskom kiselinom i čini periodički ponavljajuću jedinicu velikog polimera hijaluronske kiseline. Ova se pak u nama nalazi u sinovijalnoj tekućini, vezivnom i epitelnom tkivu... Za detekciju glukozamina odabrana je metoda površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (eng. *Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS*) metodom miješanja vodene otopine glukozamina i koloida nanočestičnog zlata. Provedena je karakterizacija čistog nanočestičnog koloida zlata, te smjesa koloida i otopina glukozamina metodama transmisijske elektronske mikroskopije (TEM), dinamičkog raspršenja svjetla (DLS), apsorpcijskom spektroskopijom u ultraljubičastom i vidljivom području (UV-VIS). Transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM) i metodom dinamičkog raspršenja svjetla (DLS) utvrđeno je da se dimenzije nanočestica mogu razlikovati jer kod DLS metode dimenzijama doprinosi i sloj fluida oko nanočestica. TEM metodom prikazano je da se radi o nanočesticama aproksimativno sfernog oblika. UV-VIS metoda pokazala je da nanočestice zlata podliježu rezonanci površinskih plazmona na frekvenciji vidljive svjetlosti od cca. 520 nm što je korisno za praktične svrhe jer izvor zračenja spada u za ljude neinvazivne valne duljine. Odredivši zeta potencijal, pokazalo se da su zlatne nanočestice u koloidu negativno nabijene što je dodatni pokazatelj da se mogu vezati na pozitivno nabijeni glukozamin u otopini pH=4,5 vrijednosti.

Efekt vezanja molekule glukozamina za zlatnu nanočesticu manifestirao se pojačanim intenzitetom vrpce u vibracijskim SERS spektrima 0,1 mM i 1 mM otopina glukozamina sa zlatnim koloidom u odnosu na Ramanove spektre 1 M čiste vodene otopine glukozamina. Uspoređena je asignacija vrpce pripadajućih pojedinim atomskim grupama snimljenih na prahu glukozamin hidroklorida (gdje je glukozamin u obliku pozitivno nabijene molekule s $-NH_3^+$ grupom) iz literature [4], te s gibanjem normalnih modova izračunatih za neutralni oblik slobodne molekule glukozamina (ima $-NH_2$ grupu) u Laboratoriju za molekulsku fiziku i sinteze novih materijala, IRB.

Najintenzivnije vrpce opažene u SERS spektrima odgovaraju vrpčama na 1162 i 1530 cm^{-1} za 0.1 mM koncentraciju otopine, dok su u SERS spektru 1 mM otopine najjače vrpce na 1077, 1536 i 1582 cm^{-1} . Vrpca na 1162 cm^{-1} uključuje istezanje $C - N$ veze, vrpca na 1077 cm^{-1} klacanja $C - H$ veza i deformacijsko savijanje $C - N - H$ kuteva, dok su vrpce u intervalu 1531-1589 cm^{-1} sve pripisane savijanju $-NH_3^+$ grupe prema glukoznom prstenu. Pojačanje intenziteta ovih vrpca u SERS spektrima odgovaralo bi pretpostavci o okomitom vezanju molekula glukozamina na površinu zlatnih nanočestica.

Uočeno je da korištenje zlatnih koloida sa svojstvima površinske plazmonske rezonancije povećava intenzitet signala Ramanovog spektra što je bitno u slučajevima kad se raspolaže s niskom koncentracijom neke tvari. Intencija je da se SERS metoda pojačavanja signala iskoristi pri analizi niskih koncentracija tvari npr. u krvi i tjelesnim tekućinama. Metoda nalazi svoju svrhu i u detekciji eksplozivnih tvari kako bi se prevenirao teroristički napad. Nadalje, koristeći metodu može se utvrditi kvaliteta i izvornost nekog materijala. Najbitniji oslonac Ramanove spektroskopije leži u vibracijskoj analizi, svaka molekula je drugačije građena te će time funkcionalne skupine imati različite vibracijske prijelaze i davati specifičan Ramanov spektar. Poput otiska prsta taj spektar omogućava identifikaciju tvari kroz usporedbu s postojećom bazom spektara. Potvrđivanjem vezanja glukozamina za zlatne nanočestice ovaj rad otvara mogućnost daljeg usavršavanja metode radi postizanja bolje razlučivosti vibracijskih prijelaza pri nižim koncentracijama molekule.

5 Metodički dio

Astronomija je multidisciplinarna znanost koja se bavi istraživanjem nebeskih tijela, njihovih gibanja, nastanka i evolucije, kao i procesa koji se zbivaju u njima. Ona također proučava početak i sudbinu svemira. Većina disciplina astronomije utemeljena je na zakonima fizike (Newtonovi i Keplerovi zakoni, emisija i apsorpcija fotona...), zbog čega se najčešće naziva astrofizikom. Manje je astronomskih disciplina koje ne povezujemo direktno s fizikom, to je primjerice položajna astronomija, koja se bavi matematičkim rješenjima za određivanje položaja nebeskih tijela na nebeskom svodu. Jedna od suvremenijih astronomskih disciplina je kozmologija, ona istražuje nastanak i razvoj svemira. Uz multidisciplinarnost, astronomiju odlikuje i interdisciplinarnost. Pojedine astronomske discipline povezuju i objedinjuju istraživanja drugih znanosti, kao npr. arheoastronomija koja povezuje arheologiju i astronomiju. Zahvaljujući astronomskim otkrićima, možemo precizno predvidjeti mnoge astronomske pojave poput putanja asteroida, izmjene Mjesečevih mijena, Sunčevih i Mjesečevih pomrčina kao i pomrčina Jupiterovih mjeseca. [25] Nadalje, gledanjem u spektar dobiven propuštanjem svjetlosti kroz prizmu ili optičku rešetku opažamo spektralne linije. Te linije prvi je uočio 1814. godine njemački optičar Joseph von Fraunhofer u spektru Sunca, kao apsorpcijski spektar njegove atmosfere. Njemu u čast te linije nazvane su Fraunhoferove linije. Potom su te linije gledali Robert Wilhelm Bunsen i Gustav Robert Kirchhoff u emisijskim spektrima mineralnih uzoraka. Po položaju linija (ili njihovim bojama) mogli su se identificirati elementi jer je svaki spektar pojedinog elementa poput njegovog "otiska prsta". Mjerenjem intenziteta linija možemo odrediti kolika je koncentracija pojedinog elementa u uzorku. [28] Osim Fraunhofera, spektar Sunca protumačila je Cecilia Payne-Gaposchkin, otkrićem da su spektralni razredi zvijezda povezani s temperaturama atmosfera zvijezda i da su zvijezde načinjene uglavnom od vodika i helija, tj. da je vodik najrasprostranjeniji kemijski element u svemiru. [30] Danas znamo da živimo u galaksiji Mliječna staza, jednoj od milijardi galaksija rasprostranjenih svemirskim prostorom i većinom okupljenih u galaktička jata i superjata, koja se međusobno udaljavaju zbog širenja samog svemira za čije širenje znamo zbog Dopplerovog efekta i crvenog pomaka.

Prema teoriji Velikog praska smatramo da je svemir nastao iz singulariteta, točke beskonačne gustoće i temperature prije otprilike 14 milijardi godina, kada je počelo njegovo širenje, a koje je prema posljednjim istraživanjima ubrzano. Iako je astronomija došla do brojnih spoznaja o svijetu u kojemu živimo, ipak još nemamo odgovore na mnoga pitanja. Znanstvenim modelima nastojimo rastumačiti zbivanja u prirodi, a otvorena pitanja samo potiču razvoj sve pouzdanijih i savršenijih modela.

Astronomija je u mnogim gimnazijama fakultativni predmet koji omogućuje široki pregled područja astronomije i poučava se tijekom jednog polugodišta kroz 35 ili više sati. Predmet je osmišljen tako da zahtijeva minimum matematičkog i fizikalnog znanja, te može biti dostupan različitim uzrastima učenika. Astronomija se poučava u prvom i drugom razredu nadovezujući se na znanja, vještine i stavove stečene u nastavnim predmetima Matematika, Fizika, Kemija i Geografija. [25]

Ciljevi fakultativnog predmeta Astronomija su:

- poticanje interesa za fiziku i stjecanje temeljnih znanja potrebnih za razumijevanje fizikalnih fenomena, koncepata, zakona i teorija.
Prepoznavanje uloge fizike u razvoju astronomije te primjena stečenih znanja iz matematike i fizike
- upoznavanje s glavnim astronomskim teorijama o svemiru i prirodi nastanka svemirskih tijela kroz povijest astronomskih otkrića
- stjecanje znanja i razumijevanja o funkcioniranju svemira i svijeta oko sebe te vlastitoj ulozi u njemu
- uočavanje razlike između znanja i praznovjerja, te razlikovanje znanosti od pseudoznanosti
- učenje praktičnih vještina iz astronomije te njihova primjena na osnovna mjerenja i promatranja svemirskih tijela
- razvoj kritičko-logičkog i sustavnog razmišljanja te komunikacijskih vještina

Pojedine nastavne jedinice iz fakultativne nastave Astronomije mogu se odraditi i na redovnoj istraživački usmjerenom nastavi iz Fizike prilikom proširivanja sadržaja ili obrade dodatnih sadržaja i za to treba iskoristiti priliku kad god se ukaže. Jedan primjer nastavne jedinice gdje se nalazi poveznica fizike i astronomije bit će metodički obrađen u ovom poglavlju.

Nastavnu jedinicu u kojoj se primjenjuju znanja stečena iz emisijskih i apsorpcijskih spektara na fakultativnoj nastavi iz Astronomije svoje mjesto nalaze pri obradi građe planeta i nebeskih tijela (zvijezda), dok ih na redovnoj nastavi iz Fizike učenici mogu aplicirati kao prošireni nastavni sadržaj nakon što su prema kurikulumu obradili lekcije iz čestične prirode svjetlosti i napravili analizu Bohrova modela atoma i opisivanje kvantno-mehaničkog modela atoma te spektara. Prirodan slijed je aplicirati znanje o emisijskim i apsorpcijskim spektrima koristeći spektralnu analizu u našem slučaju pri istraživanju građe zvijezda. Nastavna jedinica nazvana Kemijski sastav zvijezda, zamišljena je kao aplikacija znanja o emisiji i apsorpciji na analizu kemijskog sastava zvijezda počevši od primjene spektralne analize na tvarima na Zemlji. Nastavna jedinica opisana u ovom radu može se obrađivati u svim tipovima gimnazija jer za nju nije nužno kompleksno matematičko znanje.

Predmetni ishodi koje će učenik ostvariti nakon sata su:

Određuje kemijski sastav zvijezda

- Razlikuje nastanak kontinuiranog i linijskog spektra.
- Opisuje i tumači Fraunhoferove linije.
- Uspoređuje poznate spektre iz literature s novim i nepoznatima.
- Opisuje kemijski sastav Sunca i ostalih zvijezda.
- Navodi važnija astronomska otkrića te astronomkinje i astronome koji su ih napravili.

FIZ SŠ D.3.8. Rješava fizičke probleme.

- Izabire potrebne informacije i primjenjiva fizička načela.
- Kvalitativno zaključuje povezujući manji broj osnovnih koncepata.

MEĐUPREDMETNI ISHODI (OČEKIVANJA MEĐUPREDMETNIH TEMA)

- osr B.3.2. Razvija komunikacijske kompetencije i uvažavajuće odnose s drugima.
- uku A.3.4. 4. Kritičko mišljenje – učenik kritički promišlja i vrednuje ideje uz podršku učitelja.

Nastavne metode koje se koriste u izlaganju sata u istraživački-usmjerenom nastavi Fizike su demonstracija pokusa, razredna rasprava i provođenje istraživanja u manjim skupinama.

Tijek nastavnog sata nastavne jedinice Kemijski sastav zvijezda

Sat započinjemo uvodnim problemom vezanim uz poznavanje spektara koji popraća opservacijski pokus te isticanje važnosti spektralne analize kao metode.

Uvodni problem: Koje boje je svjetlost koja dopire od Sunca do nas? Kakav spektar nam daje ta Sunčeva svjetlost?

Učenici iznose svoje zaključke, neki učenici iznose tvrdnju da je svjetlost koju Sunce emitira žute boje jer spektralna raspodjela zračenja Sunca odgovara temperaturi površine od otprilike 5700 K pa ima maksimum u žutom dijelu spektra, dok drugi tvrde da je svjetlost bijele boje. Većina učenika se slaže u pretpostavci da će Sunce dati kontinuirani spektar.

Opservacijski pokus: Projiciram učenicima Sunčev spektar sa slike (5.51).



Slika 5.51: Sunčev spektar.

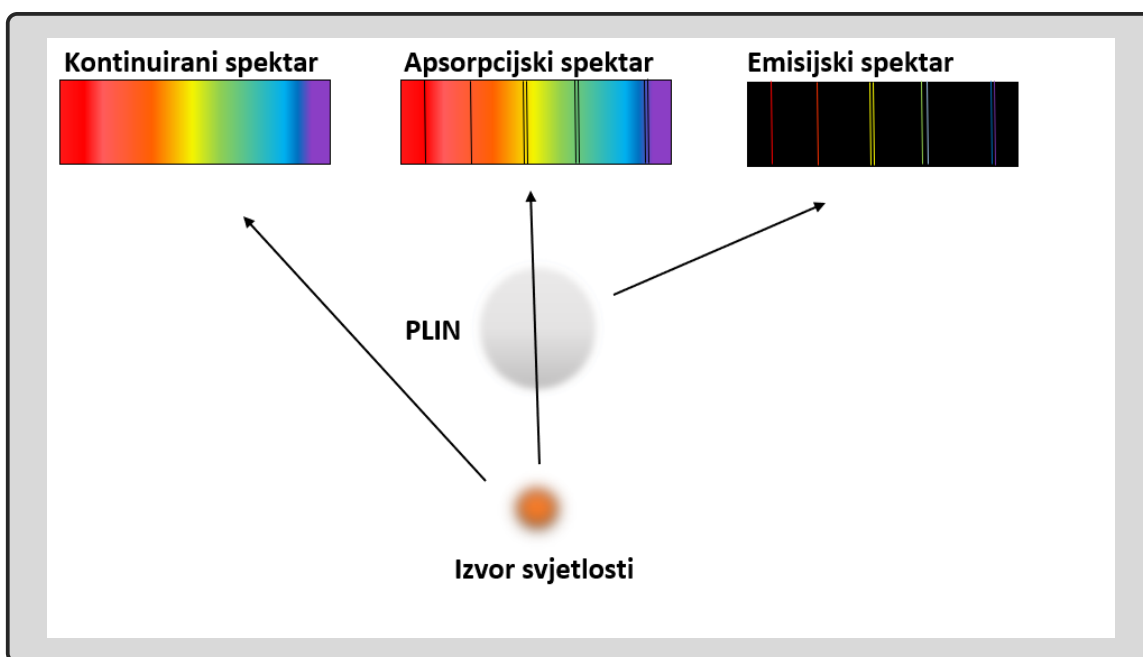
Slika preuzeta od: "Sunlight spectrum with Fraunhofer Lines" by yellowcloud is licensed under CC BY 2.0"

Kažem im da se na slici (5.51) nalazi Sunčev spektar te ih tražim da pažljivo pogledaju i prepoznaju o kakvom spektru je riječ.

Učenici se prisjećaju da se radi o apsorpcijskom spektru jer postoji niz tamnih linija.

Tražim ih da opišu i skiciraju kako nastaje kontinuirani, a kako apsorpcijski i emisijski spektar.

Učenici skiciraju načine nastanka spektara kao na Slici (5.52) te iskazuju da kontinuirani spektar dobivamo ako imamo izvor bijele svjetlosti te ga propustimo kroz spektrometar s prizmom, dok ćemo emisijski spektar dobiti u slučaju da imamo zagrijani plin čiju svjetlost propuštamo kroz spektrometar s prizmom i na kraju iskazuju da apsorpcijski spektar dobivamo ako izvor svjetlosti koja daje kontinuirani spektar propustimo kroz plin prije prolaska kroz spektrometar.



Slika 5.52: Pojednostavljena skica nastanka spektara

Pitam učenike što bi kod našeg Sunca bio izvor svjetlosti koja daje kontinuirani spektar i zašto ne dobivamo kontinuirani spektar već apsorpcijski.

Učenici iznose pretpostavku da središte Sunca predstavlja izvor svjetlosti koja daje kontinuirani spektar, ali Sunce ne emitira svjetlost izravno iz središta, već svjetlost koja dolazi iz središta do atmosfere Sunca prolazi kroz slojeve plinova te iz tog razloga nastaju apsorpcijske linije.

Uvodim pojam Fraunhoferovih linija kao linija koje nastaju prolaskom svjetlosti kroz Sunčeve slojeve gdje pritom dolazi do apsorpcije svjetlosti pojedinih valnih duljina koje vidimo kao tamne linije na apsorpcijskom spektru.

Iznosim učenicima povijesne činjenice o kemijskom sastavu nebeskih tijela astronoma prošloga stoljeća.

U 20. stoljeću pojedini astronomi smatrali su da su sva nebeska tijela u svemiru građena od istih kemijskih elemenata. Prema njihovom tadašnjem stavu, Sunce bi trebalo biti građeno od kemijskih elemenata od kojih je građena Zemljina kora. Jesu li tadašnji pojedini astronomi bili u pravu, provjerit ćemo u nastavku.

Središnji dio sata započinjemo istraživačkim pitanjem koje prati matematički opis te analizom spektara u manjim skupinama.

Istraživačko pitanje: Kako biste odredili od kojih se kemijskih elemenata sastoji zvijezda?

Učenici znaju da poput otiska prsta svaka tvar daje različiti spektar linija na različitim pozicijama. No potrebno je i odrediti o kojim se točno kemijskim elementima radi.

Ako je svjetlost različitih boja, što nam to govori o energijama njihovih fotona?

Učenici se prisjećaju izraza za energiju fotona (5.27) te zaključuju da mogu određenu boju svjetlosti povezati s valnom duljinom. Zaključuju da svjetlosti različitih boja imaju različitu energiju jer su različitih valnih duljina.

$$E_{fotona} = \frac{hc}{\lambda} \quad (5.27)$$

gdje je $h \approx 6,63 \cdot 10^{-34} Js$ Planckova konstanta, $c \approx 3 \cdot 10^8 \frac{m}{s}$ brzina svjetlosti, a λ valna duljina svjetlosti.

Nadalje, zaključuju da su položaji svijetlih ili tamnih linija direktan odraz razlike energijskih razina zastupljenih atoma. Atom prilikom vraćanja iz pobuđenog stanja energije E_2 u osnovno E_1 emitira svjetlost određene valne duljine (boje), odnosno apsorbira svjetlost (određene valne duljine) pri prijelazu iz osnovnog stanja energije E_1 u pobuđeno stanje više energije E_2 .

Prema 2. Bohrovom postulatu znaju da ta energija odgovara upravo razlici energija energijskih stanja (5.28):

$$E_{fotona} = E_2 - E_1 \quad (5.28)$$

Iz čega slijedi da je valna duljina λ jednaka (5.29):

$$\lambda = \frac{hc}{E_2 - E_1} \quad (5.29)$$

Razrednom raspravom zaključuju da analizom položaja linija u nepoznatom emisijskom spektru možemo dobiti kvalitativnu informaciju o sastavu nepoznatog uzorka usporedbom tih linija s postojećom bazom podataka spektara kemijskih elemenata.

Utječe li Zemljina atmosfera na Sunčev spektar? Ako da, kako bismo to mogli otkloniti?

Učenici predlažu da izuzmemo iz spektra Sunca one linije koje nastaju zbog prisustva kemijskih elemenata za koje znamo da se nalaze u atmosferi te ćemo tako dobiti čisti spektar Sunca.

Napominjem im da, iako je ideja dobra to ne možemo napraviti u bilo kojim uvjetima jer se možda neki kemijski elementi iz Zemljine atmosfere također nalaze i na Suncu.

Hoćemo li dobiti isti spektar ako je Sunce na različitim položajima?

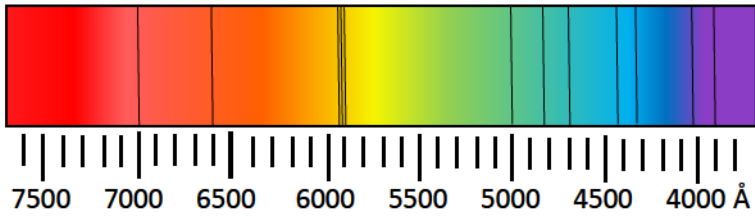
Učenici zaključuju da možemo usporediti spektar Sunca kad se Sunce nalazi na različitim položajima iznad Zemlje. Dok je Sunce iznad horizonta, linije koje uzrokuje Zemljina atmosfera bit će većeg intenziteta te ih tako možemo razlikovati od čistog Sunčevog spektra.

Učenicima dajem listić s apsorpcijskim spektrima dobivenim s različitih zvijezda kako bi provođenjem istraživanja u manjim skupinama analizom spektara utvrdili njihov nepoznat sastav. Ispod spektara zvijezda priloženi su i poznati emisijski spektri kemijskih elemenata iz literature.

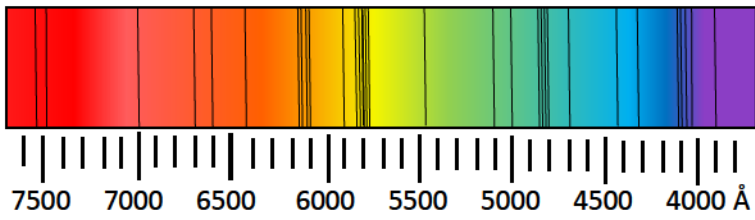
Na sljedeće dvije stranice priložen je Listić - Kemijski sastav zvijezda.

Listić – Kemijski sastav zvijezda

Zvijezda 1



Zvijezda 2



Vodik



Helij



Stroncij



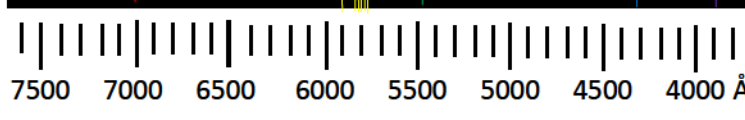
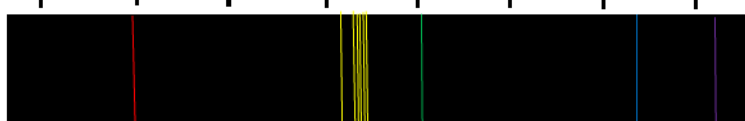
Kalcij



Natrij



Živa



Koje valne duljine nalazite u vodikovom spektru?

(Odgovor: U vodikovom spektru nalazimo sljedeće valne duljine: 4100, 4350, 4850 i 6550 Å.)

Nalazi li se vodik na zvijezdi 1? Kako znate?

(Odgovor: Vodik se nalazi na zvijezdi 1 jer se njegov emisijski spektar poklapa s apsorpcijskim spektrom zvijezde. Valne duljine svijetlih linija koje nalazimo u vodikovom emisijskom spektru slažu se s tamnim linijama apsorpcijskog spektra zvijezde 1.)

Nalazi li se vodik na zvijezdi 2? Kako znate?

(Odgovor: Vodik se također nalazi i na zvijezdi 2 kao i u prvom slučaju jer se njegov emisijski spektar poklapa s apsorpcijskim spektrom zvijezde. Valne duljine svijetlih linija koje nalazimo u vodikovom emisijskom spektru slažu se s tamnim linijama apsorpcijskog spektra zvijezde 2.)

Od kojih se kemijskih elemenata sastoji atmosfera zvijezde 1?

(Odgovor: Atmosfera zvijezde 1 sastoji se od helija, vodika i natrija.)

Od kojih se kemijskih elemenata sastoji atmosfera zvijezde 2?

(Odgovor: Atmosfera zvijezde 2 sastoji se od helija, vodika i žive.)

Od kojih se kemijskih elemenata ne sastoji niti jedna zvijezda?

(Odgovor: Kalcij i stroncij ne nalazimo ni na jednoj zvijezdi.)

Nakon provedbe istraživanja u manjim skupinama, učenicima tumačim da je kemijski sastav svih zvijezda zapravo vrlo sličan, većina zvijezdi sastoji se od vodika i helija, dok druge kemijske elemente nalazimo samo u tragovima.

U završnom dijelu sata slijedi evaluacija stečenog znanja te iznošenje povijesnih činjenica o astronomskim otkrićima i zaslugama.

Na kraju pitam učenike kako bi odredili koji kemijski elementi postoje na Suncu.

Učenici iznose zaključak da bismo trebali eksperimentalno dobiti apsorpcijski spektar Sunca te ga usporediti s emisijskim spektrima kemijskih elemenata iz literature, što bi nas dovelo do zaključka da se Sunce sastoji od vodika i helija. Učenicima govorim o otkriću helija, on je prvo otkriven na Suncu, a tek nakon toga na Zemlji. Otkriven je 1868. spektralnom analizom u Sunčevoj kromosferi, otkrio ga je francuski astronom Pierre Jules Janssen, a na Zemlji je otkriven 1895. kao uklopljeni plin u uranijevu mineralu klevajitu, otkrio ga je škotski kemičar William Ramsay. Uz vodik, drugi je najstariji i najzastupljeniji kemijski element u svemiru, nastao na početku stvaranja svemira. [27]

Demantiramo znanstvenike 20. stoljeća čiji stav da su sva nebeska tijela u svemiru građena od istih kemijskih elemenata odbacujemo.

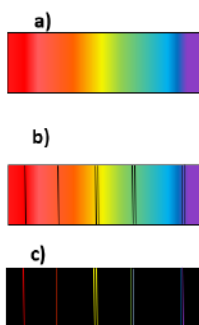
Koristim priliku za spomenuti Ceciliju Payne-Gaposchkin te njen doprinos razvoju spektralne analize zvijezda i utvrđivanju sastava zvijezda i koncentraciji i zastupljenosti pojedinih kemijskih elemenata u njima. Ona je otkrila da su glavni sastav zvijezda, uz male primjese ostalih elemenata, vodik i helij te da je vodik najzastupljeniji kemijski element u svemiru. Proučavanjem spektara zvijezda, uspjela je odrediti njihove temperature prema klasifikacijama. [30]

Osim nje treba istaknuti i Annie Jump Cannon koja je zaslužna za spektralnu klasifikaciju 350 000 zvijezda i dotaknuti se klasifikacije razreda zvijezda "OBAFGKM(RNS)" prema sjaju i veličini.

Na kraju pitanjima s karticama evaluiramo naučeno te ističemo važnost atomske spektroskopije za otkrića u astronomiji i astrofizici.

Učenici podižu kartice s odgovorima.

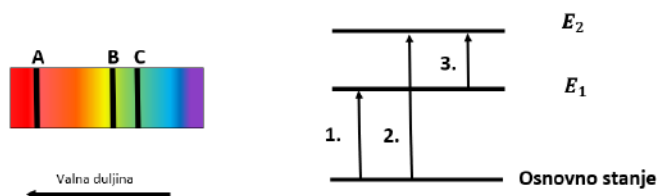
1. Kada svjetlost sa Sunca prolazi kroz prizmu nastaje koji od spektara sa slike 5.53?



Slika 5.53: Spektri

(Odgovor: b) je ispravan odgovor.)

2. Na lijevoj strani slike 5.54 prikazan je apsorpcijski spektar neke zvijezde, valne duljine povećavaju se s desna na lijevo. Na desnoj strani slike (5.54) nalaze se energijski prijelazi. Na koji prijelaz između nivoa se odnosi koja spektralna linija?



Slika 5.54: Spektar i prijelazi

| | A | B | C |
|----|---|---|---|
| a) | 3 | 1 | 2 |
| b) | 1 | 2 | 3 |
| c) | 2 | 1 | 3 |

(Odgovor: a) linija A ima najveću valnu duljinu te najmanju energiju, odgovara prijelazu 3.)

3. Atomska spektroskopija koristi se kod:

- a) određivanja starosti arheoloških artefakata
- b) praćenja brzina kemijskih reakcija
- c) određivanja raznih svojstava zvijezda

(Odgovor: c) Atomska spektroskopija zaslužna je za mnoga otkrića u astronomiji poput određivanja raznih svojstava zvijezda. Za praćenje brzine kemijskih reakcija koristi se molekulska spektroskopija, dok za određivanje starosti arheoloških uzoraka koristimo radioaktivno datiranje.)

Ne samo što na ovom satu učenici stječu nova znanja o astronomskim otkrićima, oni na jednostavan način koriste znanstvenu metodu detekcije kemijskih elemenata na nebeskim objektima udaljenima od Zemlje te to potiče interes učenika za fiziku jer spoznaju da mogu osnovna znanja koja su stekli na nastavi Fizike primijeniti i na stvaran život. I kao najvažnije, razvijaju kritičko-logičko razmišljanje.

Literatura

- [1] Amendola, V.; Meneghetti, M. : Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. // *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, 11, 3805–3821 — 3821
- [2] Amendola, Vincenzo ; Pilot, Roberto ; Frascioni, Marco ; Marago, Onofrio M. ; Iati, Maria. (2017). Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 29. 203002. 10.1088/1361-648X/aa60f3.
- [3] Beerov zakon. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2020. Pristupljeno 3. 1. 2021. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=6594>.
- [4] C.Y. She, N.D. Dinh, Anthony T. Tu, Laser raman scattering of glucosamine N-acetylglucosamine, and glucuronic acid, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Volume 372, Issue 2, 1974, Pages 345-357, ISSN 0304-4165.
- [5] Dayu Hu, Xiaosong Xu, Zeyin Zhao, Changqi Li, Ye Tian, Qiang Liu, Bo Shao, Shuo Chen, Yue Zhao, Ling Li, Huan Bi, Ang Chen, Cheng Fu, Xiaoyu Cui, Yu Zeng. Detecting urine metabolites of bladder cancer by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2021, 247 , 119108.
- [6] E. B. Wilson, J. C. Decious, P. C. Cross: *Molecular Vibrations*, Dover 1955.
- [7] Eiser, Erika. (2013). *Dynamic Light Scattering*. 10.1002/9781118683972.ch5.
- [8] Francesco Bonaccorso, Mirco Zerbetto, Andrea C. Ferrari, Vincenzo Amendola. Sorting Nanoparticles by Centrifugal Fields in Clean Media. *The Journal of Physical Chemistry C* 2013 117 (25), 13217-13229 DOI: 10.1021/jp400599g
- [9] Glawdel, Tomasz & Ren, Carolyn. (2015). Zeta Potential Measurement. 10.1007/978 – 1 – 4614 – 5491 – 51702.

- [10] Kai Wang, Yingjie Zhu, Jianfeng Wu, Lei Guo, Jianwei Xie. On-site detection of succinylcholine in biomedical matrix by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* 2018, 49 (9) , 1461-1468.
- [11] *Kovács A, Nyerges B, Izvekov V. Vibrational analysis of N-acetyl-alpha-D-glucosamine and beta-D-glucuronic acid. J Phys Chem B. 2008 May 8;112(18):5728-35. doi: 10.1021/jp710432d. Epub 2008 Apr 16. PMID: 18412409.*
- [12] Kumar, Ajeet; Dixit, Chandra Kumar (2017). "Methods for characterization of nanoparticles". *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*. pp. 43–58.
- [13] Long, D. A. *Raman Spectroscopy*, Great Britain : McGraw.Hill, Inc., 1977.
- [14] M. Fleischmann, P.J. Hendra, A.J. McQuillan, Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chemical Physics Letters*, Volume 26, Issue 2, 1974, Pages 163-166, ISSN 0009-2614
- [15] Molekulska spektroskopija,
<https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/f8d552c1-03ca-47a1-943a-61ea3e2d1bd0/molekulska-spektroskopija.html>
- [16] Raman, Chandrasekhara Venkata. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2020. Pristupljeno 3. 1. 2021.*
<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=51726>
- [17] Shelby R. Khandasammy, Marisia A. Fikiet, Ewelina Mistek, Yasmine Ahmed, Lenka *Halámková*, Justin Bueno, Igor K. Lednev. Bloodstains, paintings, and drugs: Raman spectroscopy applications in forensic science. *Forensic Chemistry* 2018, 8 , 111-133.
- [18] Škrabić, M. (2020). *Fotonički kristali od poroznog silicija kao SERS podloge za blisku infracrvenu pobudu (Disertacija)*. Preuzeto s
<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:542843>
- [19] TEM Instructions JEOL 1011; JEOL Ltd.: Akishima Tokyo 196, Japan, 1995;

- [20] Tian, Furong & Bonnier, Franck & Casey, Alan & Shanahan, Anne & Byrne, Hugh. (2014). Surface Enhanced Raman Scattering with gold nanoparticles: Effect of particle shape. *Anal. Methods*. 6. 10.1039/C4AY02112F.
- [21] *Virués*, Claudia & Hernandez, Javier & Higuera-Ciapara, I. & Martinez, Evelin & Olivares-Romero, J.Luis & Navarro, Rosa & Inoue, Motomichi. (2020). Formulation of anomerization and protonation in d-glucosamine, based on ¹H NMR. *Carbohydrate Research*. 490.107952.10.1016/j.carres.2020.107952.
- [22] Yousefi, Reza. (2016). *Dynamic Light Scattering (DLS)*.
- [23] Wei Luo, Caijun Wu, Siqi Huang, Xiliang Luo, Ruo Yuan, Xia Yang. Liquid Phase Interfacial Surface-Enhanced Raman Scattering Platform for Ratiometric Detection of MicroRNA 155. *Analytical Chemistry* 2020, 92 (23) , 15573-15578.
- [24] Williams, Paul. (2015). *Zeta Potential*. 10.1007/978 – 3 – 642 – 40872 – 4612 – 1.

Metodički dio:

- [25] Fakultativna nastava iz Astronomije. Priručnik za nastavnike i kurikulum. Nakladnik: IX. Gimnazija Zagreb
- [26] Građa Sunca, <https://eskola.zvezdarnica.hr/osnove-astronomije/sunce/grada-sunca/>
- [27] Helij. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2020. Pristupljeno 17. 1. 2021. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=24846>.
- [28] Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2020. Pristupljeno 9. 1. 2021. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=57368>.

- [29] Osnove atomske spektroskopije, edutorij e-skole, <https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/f8d552c1-03ca-47a1-943a-61ea3e2d1bd0/atomski-spektri.html>
- [30] Payne-Gaposchkin, Cecilia. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2020. Pristupljeno 9. 1. 2021. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=69754>
- [31] Sir Joseph Norman Lockyer
<https://www.britannica.com/biography/Joseph-Norman-Lockyer>
- [32] Spectral Analysis, Jacqueline Slay, Largo High School, Largo, MD
http://teacherlink.ed.usu.edu/tlnasa/reference/imaginedvd/files/imagine/docs/science/try_12/spectral.html