Prikladnost nanočestica zlata za analizu sterigmatocistina SERS spektroskopijom

Petrović, Petra

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:380089

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-01**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Petra Petrović

PRIKLADNOST NANOČESTICA ZLATA ZA ANALIZU STERIGMATOCISTINA SERS SPEKTROSKOPIJOM

Diplomski rad

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

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Laboratoriju za optiku i optički tanke filmove Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom prof. dr. sc. Snežane Miljanić i neposrednim voditeljstvom doc. dr. sc. Adriane Kenđel i dr. sc. Ivane Fabijanić.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Snežani Miljanić na razumijevanju, trudu, vodstvu i svim stručnim savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada. Veliko hvala i neposrednim voditeljicama doc. dr. sc. Adriani Kenđel te dr. sc. Ivani Fabijanić na pruženoj pomoći i podršci tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada. Neizmjerno sam zahvalna na pruženoj prilici izrade diplomskog rada u području znanosti koje me izrazito zanima i veseli.

Mojim prijateljima i kolegama, hvala za sve zajedničke trenutke koji su mi uljepšali sve godine studiranja, hvala i za svaku pomoć koju ste mi pružili.

Veliko hvala Matiji na bezuvjetnoj podršci, motivaciji i trudu da bude uz mene gotovo od prvog dana studiranja pa sve do kraja, da me natjera da vjerujem u sebe i sve što mogu ostvariti.

Najveće hvala mojoj obitelji, mami i tati koji su mi omogućili sve što mi je bilo potrebno kako bih završila studij. Hvala na pruženoj ljubavi, razumijevanju i neizmjernoj vjeri u moj uspjeh.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **X**
ABSTRACT ..... **XII**
§ 1. UVOD **1**
§ 2. LITERATURNI PREGLED **3**
2.1. Ramanova spektroskopija **3**
2.2. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja **6**
2.2.1. Mehanizmi pojačanja Ramanovog raspršenja *7*
2.2.2. SERS supstrati *9*
2.3. Sterigmatocistin **12**
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **16**
3.1. Kemikalije **16**
3.2. Mjerni uređaji **16**
3.3. Supstrati zlata **17**
3.3.1. Nanočestice zlata u suspenziji *17*
3.3.2. Nanočestice zlata na čvrstim nosačima *19*
3.4. Priprava otopina i mjernih uzoraka **21**
3.4.1. Priprava otopina *21*
3.4.2. Priprava mjernih uzoraka R6G *21*
3.4.3. Priprava mjernih uzoraka STC *22*
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA **23**
4.1. Ramanovi spektri **23**
4.1.1. Rodamin 6G *23*
4.1.2. Sterigmatocistin *25*
4.2. SERS spektri **29**
4.2.1. Nanočestice zlata u suspenziji *29*
4.2.2. Koncentracijski ovisni SERS spektri rodamina 6G *32*
4.2.3. Koncentracijski ovisni SERS spektri sterigmatocistina *38*
4.2.4. Nanočestice zlata na čvrstim nosačima *42*
§ 5. ZAKLJUČAK **54**
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA **56**
§ 7. LITERATURNI IZVORI **57**
§ 8. DODATAK ..... **XV**

§ 9. ŽIVOTOPIS XVII

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

PRIKLADNOST NANOČESTICA ZLATA ZA ANALIZU STERIGMATOCISTINA SERS SPEKTROSKOPIJOM

Petra Petrović

U svrhu analize sterigmatocistina (STC) spektroskopijom površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS) pripravljeni su supstrati zlata koji su sadržavali nanočestice dispergirane u suspenziji i imobilizirane na čvrstim nosačima. SERS učinkovitost metalnih supstrata testirana je s rodaminom 6G (R6G). U koloidnim suspenzijama zlata opaženo je intenzivno pojačanje Ramanovog raspršenja R6G nakon pobude zračenjem 785 nm, dok je pri pobudi zračenjem 532 nm spektre zasjenila fluorescencija rodaminske boje. Prisutnost agregirajuće soli u koloidnoj suspenziji nije utjecala na osjetljivost mjerenja R6G. U spektrima STC u koloidu zlata, neovisno o valnoj duljini pobude, nisu opažene vrpce STC, već vrpce metanola u kojem je pripravljena otopina STC, te vrpce citratnih iona i njihovih oksidacijskih/razgradnih produkata zaostalih nakon sinteze na površini nanočestica zlata. Karakteristične vrpce STC vrlo slabog intenziteta uočene su za najviše mjerene koncentracije STC u spektrima koloidnih uzoraka agregiranih amonijevim sulfatom. U spektrima čvrstih supstrata zlata na podlozi od stakla, snimljenim nakon pobude zračenjem 785 nm, dominira fotoluminescencija stakla. Slabo Ramanovo raspršenje R6G na supstratu zlata na staklu uočeno je nakon pobude pri 532 nm. Pojačanje Ramanovog raspršenja na nanočesticama zlata imobiliziranim na podlozi od aluminija nije opaženo niti za R6G niti za STC.

(xii + 62 stranice, 26 slika, 4 tablice, 31 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: čvrsti nosač, koloid, nanočestice zlata, rodamin 6G, SERS, sterigmatocistin

Mentor: prof. dr. sc. Snežana Miljanić
Neposredni voditelji: doc. dr. sc. Adriana Kenđel i dr. sc. Ivana Fabijanić, zn. sur.

Ocjenitelji:
1. prof. dr. sc. Snežana Miljanić
2. prof. dr. sc. Željka Soldin
3. doc. dr. sc. Đani Škalamera

Zamjena: doc. dr. sc. Adriana Kenđel

Datum diplomskog ispita: 15. srpnja 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

SUITABILITY OF GOLD NANOPARTICLES FOR STERIGMATOCYSTIN ANALYSIS BY SERS SPECTROSCOPY

Petra Petrović

In order to analyze sterigmatocystin (STC) by surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy, gold substrates were prepared containing nanoparticles dispersed in suspension and immobilized on solid supports. The SERS efficiency of metal substrates was tested with rhodamine 6G (R6G). In colloidal gold suspensions, an intense enhancement of R6G Raman scattering was observed at excitation of 785 nm, while the spectra were overshadowed by rhodamine dye fluorescence at excitation of 532 nm. The presence of an aggregating salt in the colloid did not affect the sensitivity of the R6G measurements. In the spectra of STC in the gold colloid, regardless of the excitation wavelength, STC bands were not observed, but bands of methanol, in which the STC solution was prepared, and bands of citrate ions and their oxidation/degradation products, which remained on the gold nanoparticles surface after the synthesis. Characteristic STC bands of very low intensity were observed for the highest measured STC concentrations in the spectra of colloidal samples aggregated with ammonium sulfate. The spectra of the solid gold substrates on a glass support, taken at 785 nm excitation, were dominated by photoluminescence of glass. Weak Raman scattering of R6G on the gold substrate on glass was observed after excitation at 532 nm. The enhancement of the Raman scattering on the gold nanoparticles immobilized on an aluminum support was not obtained for either R6G or STC.

(xii + 62 pages, 26 figures, 4 tables, 31 references, original in Croatian)
Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb
Keywords: solid support, colloid, gold nanoparticles, rhodamine 6G, SERS, sterigmatocystin

Mentor: Dr. Snežana Miljanić, Professor
Assistant mentors: Dr. Adriana Kenđel, Assistant Professor, and Dr. Ivana Fabijanić, Research Associate
Reviewers:
1. Dr. Snežana Miljanić, Professor
2. Dr. Željka Soldin, Professor
3. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
Substitute: Dr. Adriana Kenđel, Assistant Professor

Date of exam: 15 July 2021.

§ 1. UVOD

Sterigmatocistin (STC) je poliketidni mikotoksin, kancerogeni je prekursor aflatoksina B_1 (AFB_1) s kojim dijeli strukturne i biološke sličnosti. Sintetiziraju ga pretežno plijesni iz roda *Aspergillus*, a prvi je puta izoliran 1954. godine iz vrste *Aspergillus versicolor*.[1] STC je pronađen u hrani za ljude kao što su žitarice, kruh, zrna kave, začini, meso, razni sirevi, te u hrani za životinje. Detekcija i kvantitativno određivanje STC provodi se osjetljivim imunokemijskim ili kromatografskim metodama. Međutim, primjenu modernih tehnika kao što su LC-MS/MS i UHPLC-MS/MS ograničavaju visoki troškovi izvedbe, dok pri analizi jednostavnijim i jeftinijim imunokemijskim metodama, kao što je ELISA, mogućnost križne reaktivnosti strukturno sličnih spojeva utječe na pouzdanost rezultata. Iz tih razloga potrebno je razviti novu metodu za određivanje STC koja će biti ekonomična, osjetljiva i pouzdana.

Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (engl. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS) metoda je vibracijske spektroskopije koja se temelji na pojačanju Ramanovog raspršenja prilikom adsorpcije ili kemijskog vezanja analita na nanostrukturiranu površinu metala.[2] Ukoliko izostane interakcija analita sa SERS aktivnom površinom metala, izostaje pojačanje Ramanovog raspršenja, zbog čega su svojstva metalnih supstrata izuzetno važna. SERS spektroskopija je osjetljivija metoda od klasične Ramanove spektroskopije te omogućuje detekciju analita u mikro- i submikromolarnom koncentracijskom području, zbog čega nalazi primjenu u različitim područjima istraživanja.

Cilj ovog rada bio je pripraviti nanočestice zlata i ispitati njihovu primjenjivost kao supstrata za SERS analizu sterigmatocistina. Pripravljeni su supstrati koji su sadržavali zlatne nanočestice sfernog oblika dimenzije približno 50 nm, dispergirane u koloidnoj suspenziji i imobilizirane na čvrstim nosačima. Koloidna suspenzija zlatnih nanočestica pripravljena je redukcijom tetraklorozlatne(III) kiseline s trinatrijevim citratom i korištena je netretirana te agregirana dodatkom amonijeva sulfata neposredno prije mjerenja. Zlatne nanočestice imobilizirane na nosačima od stakla i aluminija preuzete su iz Laboratorija za optiku i optički tanke filmove Instituta Ruđer Bošković, gdje su pripravljene nanošenjem otopine tetraklorozlatne(III) kiseline i odgovarajućeg polimera na rotirajući nosač te žarenjem nastalog sloja. Pripravljenim supstratima istražena je SERS učinkovitost pomoću rodamina 6G (R6G) kao modelne molekule za SERS, te prikladnost za detekciju i određivanje STC. Sva mjerenja

provedena su nakon pobude zračenjem valnih duljina 532 i 785 nm. Opaženi SERS spektri detaljno su analizirani i interpretirani s obzirom na energiju pobudnog zračenja, svojstva pripravljenih supstrata zlata i strukturu istraživanih molekula.

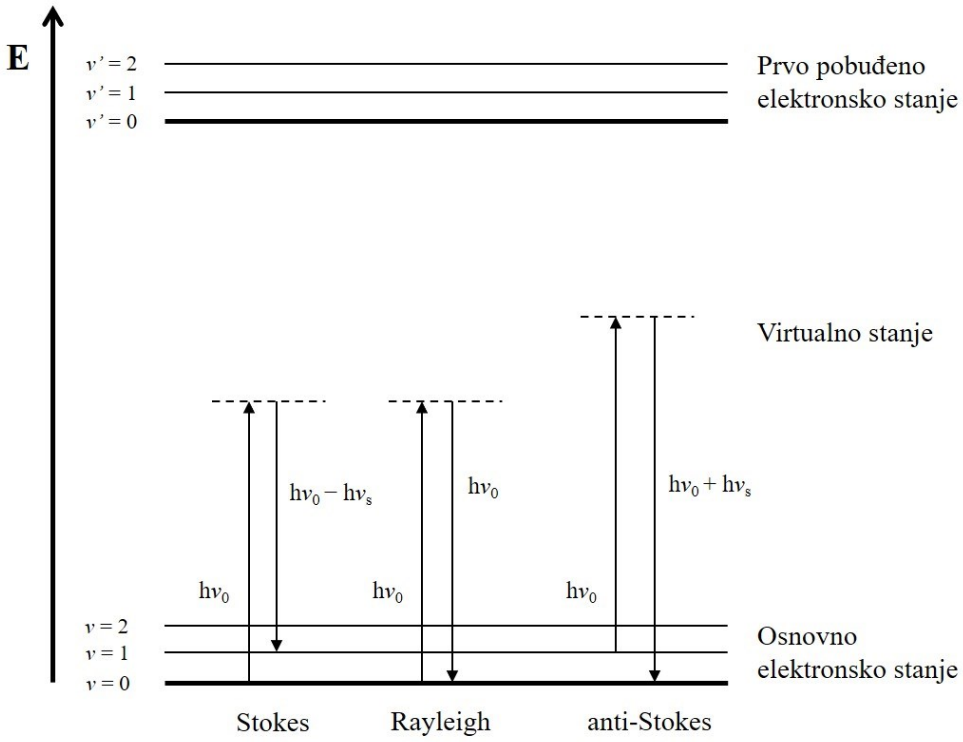
§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Ramanova spektroskopija

Ramanova spektroskopija je metoda vibracijske spektroskopije pomoću koje se molekule mogu identificirati na temelju spektra koji predstavlja njihov strukturni „otisak prsta“. Metoda se temelji na neelastičnom raspršenju elektromagnetskog zračenja uslijed interakcije zračenja s molekulom. Fenomen neelastičnog raspršenja prvi je postulirao Smekal 1923. godine, a Raman i Krishnan su ga prvi puta eksperimentalno opazili 1928. godine. U prvom eksperimentu sunčeva svjetlost fokusirana je teleskopom na tekući uzorak, a raspršeno zračenje sakupljano je drugom lećom koja je bila smještena u blizini uzorka. Sustavom optičkih filtera dokazano je da se frekvencija raspršenog zračenja razlikuje od frekvencije upadnog zračenja.[3]

Za razliku od infracrvene (IR) spektroskopije, u kojoj energija pobudnog zračenja mora odgovarati razlici energije između osnovnog i pobuđenog vibracijskog stanja, u Ramanovoj spektroskopiji to nije slučaj. Kao izvori zračenja u Ramanovoj spektroskopiji najčešće se koriste laseri koji emitiraju ultraljubičasto (UV), vidljivo (Vis) ili blisko infracrveno (NIR) zračenje, čija je energija veća od energije zračenja potrebne za pobudu molekule u više vibracijsko stanje. Nakon izlaganja analita pobudnom zračenju detektira se raspršeno zračenje, čija se energija razlikuje od energije pobudnog zračenja. Vibracije dozvoljene u Ramanovoj spektroskopiji su one pri kojima se mijenja polarizabilnost molekule, koja opisuje koliko se lako elektronski oblak može polarizirati pod utjecajem vanjskog električnog polja. Zračenje stupa u interakciju s molekulom i polarizira oblak elektrona oko jezgre, prilikom čega nastaje kratkoživuće stanje koje se naziva „virtualno stanje“. To stanje nije stabilno, zbog čega molekula brzo otpušta fotone. Nakon ozračivanja molekule monokromatskim laserskim zračenjem, zračenje se raspršuje na načine koji su prikazani na slici 1. Rayleighovo raspršenje je elastično raspršenje pri kojem su frekvencije pobudnog i raspršenog zračenja jednake. Ramanovo raspršenje je neelastično raspršenje pri kojem se frekvencija raspršenog zračenja razlikuje od frekvencije pobudnog zračenja. Razlikujemo dvije pojave: Stokesovo i anti-Stokesovo raspršenje. Ukoliko se molekule nakon pobude u virtualno stanje vraćaju u višu vibracijsku razinu osnovnog elektronskog stanja i emitirani foton ima frekvenciju manju od frekvencije pobudnog zračenja, govorimo o Stokesovom raspršenju. Ako se molekule, koje su

pobuđene u virtualno stanje iz više vibracijske razine, vraćaju u nižu vibracijsku razinu osnovnog elektronskog stanja i emitirani foton ima frekvenciju veću od pobudnog zračenja, govorimo o anti-Stokesovom raspršenju.[2]



Slika 1. Dijagram procesa raspršenja elektromagnetskog zračenja.

Dominantan proces je Rayleighovo raspršenje, jer je statistički najvjerojatnije. Naime, tek se jedan od 10^6–10^8 fotona rasprši neelastično. Vrpce koje odgovaraju Stokesovom i anti-Stokesovom raspršenju nalaze se simetrično s lijeve i desne strane Rayleighovog raspršenja, a njihovi intenziteti se razlikuju. Pri sobnoj temperaturi Stokesovo raspršenje je statistički vjerojatnije od anti-Stokesovog raspršenja zato što se, prema Boltzmannovoj raspodjeli, većina molekula pri sobnoj temperaturi nalazi u osnovnom vibracijskom stanju, a samo je mali broj molekula u pobuđenim vibracijskim stanjima osnovnog elektronskog stanja. Upravo zato su vrpce koje odgovaraju Stokesovom raspršenju intenzivnije od vrpci koje odgovaraju anti-Stokesovom raspršenju.[2]

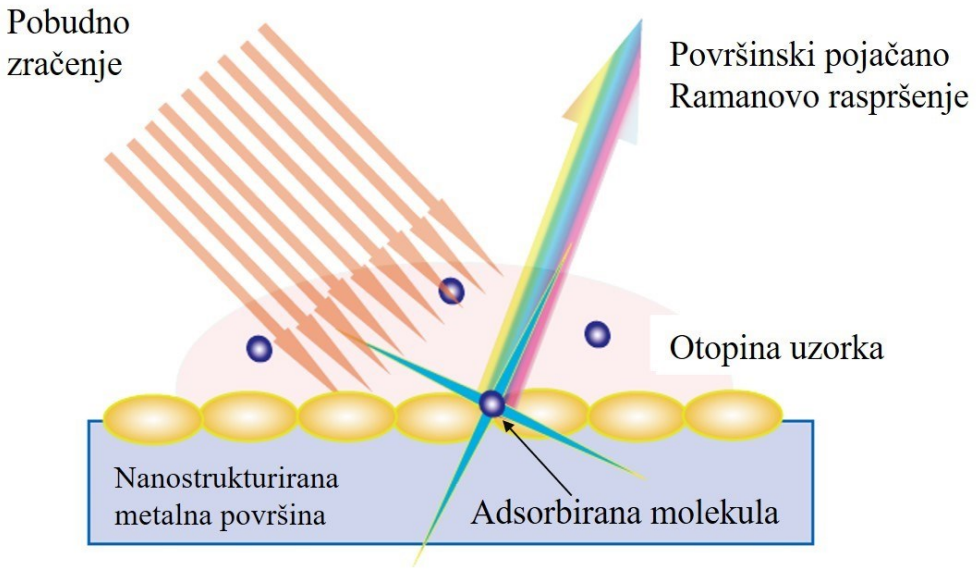
Ramanova spektroskopija i infracrvena (IR) spektroskopija su komplementarne metode, daju informacije o molekulskim vibracijama i strukturi molekule koje se međusobno nadopunjuju. Iako se u Ramanovoj spektroskopiji vibracije promatraju posredno, detekcijom raspršenog zračenja, opažene energije općenito odgovaraju energijama vibracija u IR

spektroskopiji. Izborna pravila za ove dvije metode se razlikuju, ali kemijska informacija koju daju je slična.[2] Glavna razlika između IR spektroskopije i Ramanove spektroskopije je u tome što je apsorpcija IR zračenja daleko vjerojatniji proces od Ramanovog raspršenja.[4] IR aktivne vibracije su one koje uzrokuju promjenu dipolnog momenta, dok su one koje uzrokuju promjenu polarizabilnosti Raman aktivne. Upravo zbog ove razlike u izbornim pravilima, intenzivne vrpce vibracija u Ramanovom spektru mogu biti puno slabijeg intenziteta u IR spektru i obrnuto. Također, za molekule koje posjeduju centar simetrije vrijedi dodatno pravilo međusobnog isključenja, prema kojem niti jedna vibracija ne može biti i IR i Raman aktivna. Općenito možemo reći da se kod simetričnih vibracija polarizabilnost više mijenja, uslijed čega nastaju intenzivne vrpce u Ramanovom spektru, dok je kod antisimetričnih vibracija promjena dipolnog momenta veća te su odgovarajuće vrpce intenzivne u IR spektru. Na primjer, prilikom simetričnog istezanja molekule CO_2 ne mijenja se dipolni moment molekule, ali se mijenja polarizabilnost, te je zbog toga vibracija aktivna u Ramanovom spektru, ali nije aktivna u IR spektru. S druge strane, prilikom antisimetričnog istezanja molekule CO_2, kao i deformacije navedene molekule, nema promjene polarizabilnosti, ali se značajno mijenja dipolni moment, zbog čega su ove vibracije IR aktivne. S obzirom na veliku razliku elektronegativnosti između atoma kisika i vodika te posljedično izraženu promjenu dipolnog momenta prilikom istezanja O−H veza, odgovarajuća vrpca izrazito je intenzivna u IR spektru, što ograničava snimanje IR spektara u vodenim otopinama. Jedna od velikih prednosti Ramanove spektroskopije upravo je mogućnost istraživanja vodenih otopina, budući da je vrpca istezanja O−H veze u Ramanovom spektru slaba i široka.

Glavni nedostatak Ramanove spektroskopije je slaba osjetljivost metode koja proizlazi iz male vjerojatnosti događanja neelastičnog raspršenja fotona. Upravo zbog toga sama primjena ove metode je ograničena. Drugi problem Ramanove spektroskopije je česta pojava fluorescencije. Laseri koji se koriste u Ramanovoj spektroskopiji, a emitiraju vidljivo pobudno zračenje, mogu uzrokovati fluorescenciju analita ili nečistoća prisutnih u uzorku, koja može dijelom ili potpunosti prekriti Stokesov dio Ramanovog spektra.[4] U svrhu povećanja osjetljivosti i učinkovitosti procesa Ramanova raspršenja razvijaju su nove metode. Od posebnog je interesa metoda površinski pojačanog Ramanovog raspršenja.

2.2. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja

Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (engl. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS) je metoda kojom se opaža povećanje intenziteta Ramanovog raspršenja za molekule koje se nalaze u neposrednoj blizini ili su adsorbirane na nanostrukturiranu površinu metala (slika 2). Ovaj fenomen prvi puta su opazili Fleischman i suradnici 1974. godine. Uočili su pojačanje Ramanovog raspršenja piridina adsorbiranog iz vodene otopine na srebrovu elektrodu hrapave površine i taj su efekt pripisali povećanju površine elektrode uslijed hrapavosti, koja je omogućila adsorpciju većeg broja molekula. Nekoliko godina kasnije, 1977. godine, Jeanmarie i Van Duyne te neovisno Albrecht i Creighton objasnili su da razlog pojačanja nije samo povećanje površine, već upravo i sama hrapavost površine.[2]



Slika 2. Shema SERS efekta za molekulu adsorbiranu na nanostrukturiranu metalnu površinu.[5]

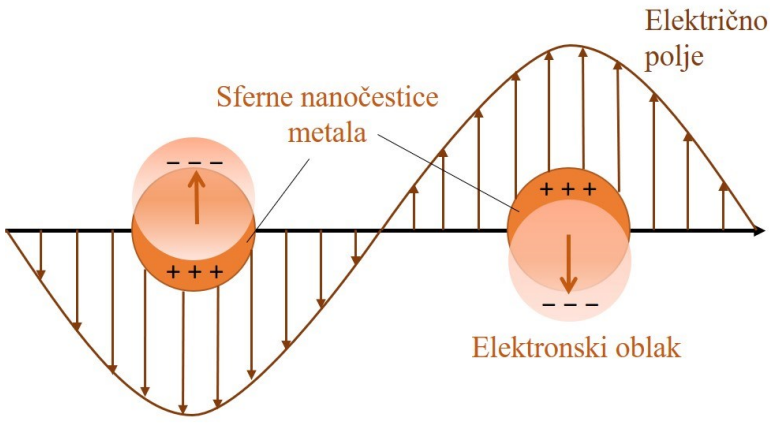
Zahvaljujući izrazitom pojačanju signala koji omogućuje direktnu identifikaciju jedne molekule u uzorku, ova metoda se smatra jako osjetljivom. U odnosu na klasičnu Ramanovu sprektroskopiju intenzitet raspršenog zračenja povećava se 10^4 do 10^6 puta, u nekim slučajevima čak i 10^7 do 10^{10} puta.[3] Za pripravu SERS aktivnih metalnih supstrata najčešće se koriste zlato i srebro zbog svoje stabilnosti, dok su željezo i bakar manje zastupljeni zbog stvaranja sloja oksida na površini koji mijenja njena svojstva te predstavlja prostornu barijeru između analita i površine metala. Uspješnost SERS eksperimenta ovisi o vrsti metala,

hrapavosti površine, strukturi i svojstvima analita, načinu adsorpcije analita na površinu metala te frekvenciji i snazi pobudnog zračenja.

2.2.1. Mehanizmi pojačanja Ramanovog raspršenja

Mehanizam površinski pojačanog Ramanovog raspršenja još uvijek nije sasvim razjašnjen. Postoje dvije teorije koje objašnjavaju fenomen pojačanja raspršenja: elektromagnetski mehanizam, koji se temelji na plazmonskoj rezonanciji, i kemijski mehanizam, koji se temelji na prijenosu naboja s metala na molekulu i/ili s molekule na metal.[2]

Metalna površina prekrivena je vodljivim elektronima koji se mogu slobodno kretati uzduž površine te stvaraju elektronski oblak koji se proteže na određenoj udaljenosti od površine. Prilikom interakcije elektromagnetskog zračenja s površinom metala elektroni počinju oscilirati, uslijed čega se nanočestica metala polarizira.[6] Oscilacije elektrona nazivaju se površinski plazmoni. Lokalizirani površinski plazmoni nastaju rezonancijom oscilacija valentnih elektrona metala s frekvencijom upadnog zračenja (slika 3). Nastajanje lokaliziranih površinskih plazmona rezultira pojačanjem elektromagnetskog polja u blizini površine metala, uslijed čega se Ramanovo raspršenje molekula adsorbiranih na površinu povećava. Jakost električnog polja se smanjuje udaljavanjem od površine metala. Priroda okolnog polja je vrlo heterogena, zbog čega na vrhovima, rubovima i dodirnim točkama nanočestica nastaju takozvana „vruća mjesta“ (engl. *hot spots*), na kojima su elektromagnetska polja izuzetno jaka. U nakupinama nanočestica (agregatima) na tim mjestima se čestice dodiruju te jedan plazmon postaje zajednički plazmon dviju ili više nanočestica i ima novu rezonantnu frekvenciju. Upravo na takvim „vrućim mjestima“ Ramanovo raspršenje se dodatno pojačava.



Slika 3. Lokalizirani površinski plazmoni.

Električno polje okomito na površinu metala je veće od polja koje je paralelno s površinom. Dakle, vibracije kod kojih se promjena polarizabilnosti događa okomito na metalnu površinu rezultiraju najvećim pojačanjem Ramanovog raspršenja,[7] dok vibracije u ravnini s metalnom površinom ne doprinose raspršenju.[2] Osim orijentacije molekule na površini metala, bitna je i udaljenost molekule od metala. Elektromagnetski mehanizam ne zahtijeva direktnu vezu između analita i metalne površine kako bi se opazio SERS signal, već je bitno smještanje molekule u blizini metalne površine. Što se molekula nalazi dalje od metalne površine, pojačanje raspršenja je slabije. Ovisnost pojačanja raspršenog zračenja o udaljenosti između analita i površine metala još je izraženija u slučaju SERS aktivnih „vrućih mjesta".

Elektromagnetski mehanizam dominantan je u ukupnom pojačanju Ramanovog raspršenja, ali njemu pridonosi i kemijsko pojačanje, koje se naziva još i mehanizam prijenosa naboja. Ono podrazumijeva kemijsku vezu između molekule analita i metalnog supstrata.[4] Smatra se da nastankom takve veze nastaju nove površinske vrste koje čine analit i atomi metalne površine. Zbog toga je moguć prijenos naboja s metalne površine na molekule analita i/ili s molekula analita na metal. Uslijed interakcije s elektronima metala povećava se polarizabilnost molekule. Samo pojačanje Ramanovog raspršenja događa se uslijed prijenosa naboja koji podrazumijeva prijelaze elektrona iz Fermijevog nivoa metala u nepopunjenu orbitalu molekule, i obrnuto. Nakon interakcije metala s pobudnim zračenjem nastaje par elektron-šupljina, iz kojeg elektron prelazi na molekulu analita. Nakon kratkotrajne pobude nastale vrste, elektron se vraća natrag u metal pri čemu se zračenje raspršuje.[8] Kemijsko pojačanje Ramanovog raspršenja doprinosi ukupnom pojačanju s faktorom pojačanja do 10^2 puta u odnosu na klasično Ramanovo raspršenje. Također, kemijsko pojačanje ograničeno je samo na prvi sloj molekula analita kemijski vezanih s metalom.

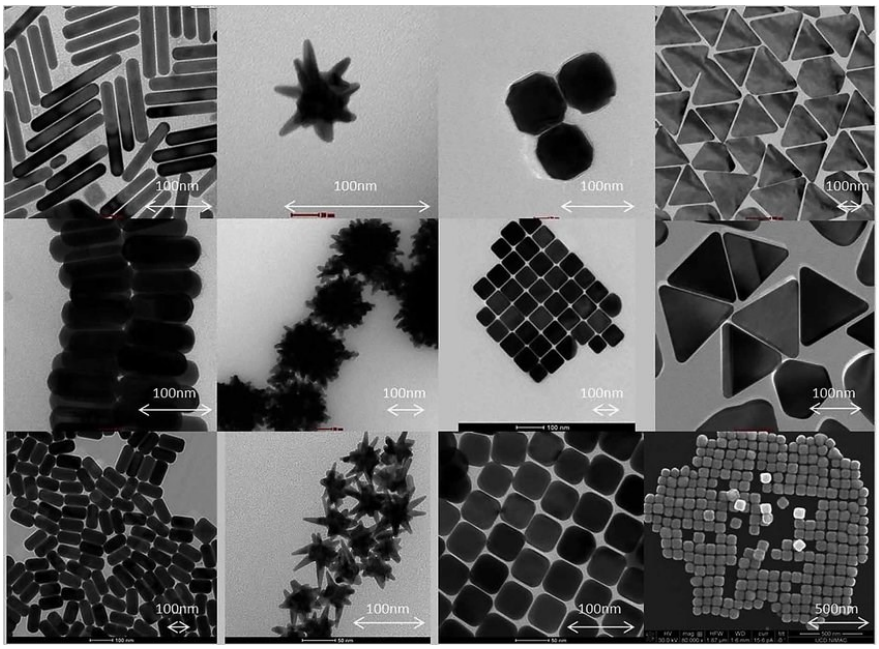
2.2.2. SERS supstrati

Efekt površinski pojačanog Ramanovog raspršenja otkriven je 70-ih godina prošlog stoljeća te su rana istraživanja bila usmjerena na razumijevanje procesa pojačanja, a kasnija istraživanja na analitičku primjenu. Prednosti metode površinski pojačanog Ramanovog raspršenja su jednostavna priprema mjernih uzoraka, brzina analize, mogućnost identifikacije analita *in situ* te mogućnost istovremene višekomponentne analize.[2] Međutim, SERS tehnika ima i svoje nedostatke koji uključuju nužnu adsorpciju ili kemijsko vezanje analita na SERS aktivnu površinu te ograničenja vezana uz homogenost i reproducibilnost te selektivnost i stabilnost SERS supstrata.

Za uspješno pojačanje Ramanovog raspršenja najvažniji je učinkoviti SERS supstrat koji mora imati hrapavu površinu. Prvi SERS supstrati bili su koloidi zlata, srebra ili bakra te folije ili žice od navedenih metala, koje su kemijski ili elektrokemijski modificirane u svrhu priprave hrapave površine. Danas SERS supstrate možemo podijeliti u tri kategorije: suspenzije nanočestica metala, metalne nanočestice imobilizirane na čvrstim nosačima i nanostrukture pripravljene direktno na čvrstim nosačima postupkom nanolitografije.[9]

Suspenzije metalnih nanočestica mogu se pripraviti kemijskim ili fizikalnim metodama. Fizikalna metoda koja se najčešće koristi je pulsna laserska ablacija plemenitih metala u tekućem mediju. Najveća prednost ove metode je nastanak stabilnih nanočestica koje ne sadrže organske ili ionske vrste na površini. Sinteza nanočestica kemijskim putem uglavnom se sastoji od redukcije iona zlata ili srebra u otopini uz korištenje reducensa kao što su trinatrijev citrat, hidrazin ili hidroksilamin hidroklorid. Veličina nanočestica može se kontrolirati koncentracijom i jačinom reducirajućeg reagensa. U pravilu jači reducensi uzrokuju nastajanje manjih nanočestica, a slabiji reducensi većih nanočestica. Tijekom procesa nukleacije, atomi metala se grupiraju i formiraju klastere iz kojih nastaje kristalna jezgra, koju nazivamo sjemenom nanočestica, koje raste do konačne veličine nanočestica. Oblik nanočestica moguće je kontrolirati dodatkom različitih surfaktanata tijekom sinteze koji uzrokuju promjenu površinske energije i kontroliraju agregaciju čestica. Surfaktanti stabiliziraju specifične plohe kristala u rastućoj nanostrukturi i tako omogućavaju kontrolirani rast na toj ravnini. Ovisno o vrsti surfaktanta i metalu, osim nanočestica sfernog oblika mogu se sintetizirati i nanočestice u obliku štapića, kockica, trokutića, pločica i zvjezdica (slika 4). Veličina i oblik nanočestica utječu na pojačanje Ramanovog raspršenja. Kako se dimenzija nanočestica povećava, povećava se i intenzitet SERS signala. Najveće pojačanje Ramanovog raspršenja uočeno je za zvjezdaste

nanočestice, pri čemu je opažen trend pojačanja raspršenog zračenja: nanosfere < agregirane nanosfere < trokutaste nanočestice << zvjezdaste nanočestice.[9] Intenzivan SERS na zvjezdastim nanočesticama pripisuje se velikom broju intrinzičnih „vrućih mjesta“ po jednoj nanočestici. Kao što je ranije opisano, „vruća mjesta“ su mjesta na nanostrukturiranoj površini na kojima su elektromagnetska polja vrlo jaka u odnosu na okolinu i ključna su za maksimalno pojačanje Ramanovog raspršenja.



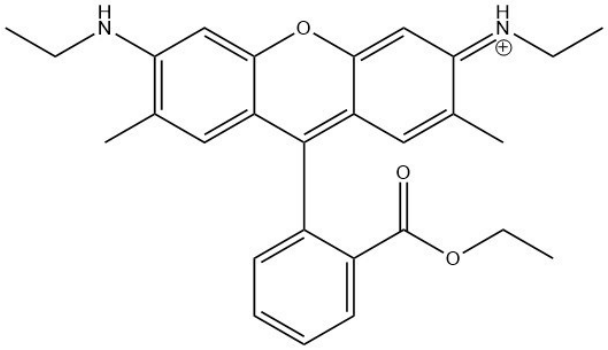
Slika 4. TEM i SEM fotografije nanočestica zlata različitih veličina i oblika.[10]

Imobilizacija metalnih nanočestica na čvrste nosače jedna je od metoda kojom se može pojačati SERS signal, osobito sfernih nanočestica. Na taj način nanočestice se dovode u neposrednu blizinu jedna drugoj i nastaje veliki broj SERS aktivnih „vrućih mjesta“. Metode za pripravu takvih SERS supstrata uključuju pripravu i vezanje nanomaterijala na čvrstu podlogu, koja može biti od stakla, kvarca, papira, silicija i aluminija. Metoda imobilizacije može uključivati „kemijski lanac“ kako bi se nanočestice metala pričvrstile za podlogu. Nanočestice se priređuju redukcijom $HAuCl_4$ ili $AgNO_3$ s trinatrijevim citratom. Površina staklenog nosača silanizira se (3-merkaptopropil)trimetoksisilanom (MPTMS) ili (3-aminopropil)trimetoksisilanom (APTMS), pri čemu se molekule silana vežu za staklo preko metoksi skupina stvarajući monosloj. Na površini ostaju tiolne ili amino skupine s kojima nanočestice zlata ili srebra ostvaruju veze. Pri tome se mijenjaju površinska svojstva stakla jer

nepolarne $-CH_2-$ skupine površinu čine hidrofobnom, uslijed čega se i nepolarne molekule mogu adsorbirati na površinu supstrata Van der Waalsovim interakcijama.

Nanočestice metala sintetiziraju se relativno lako i jednostavno, a daju dobro pojačanje Ramanovog raspršenja. Međutim, kako bi se dobili još intenzivniji SERS signali provodi se agregacija nanočestica u svrhu povećanja broja „vrućih mjesta“ u sustavu. Agregacija nanočestica uobičajeno se provodi dodatkom anorganskih soli kao što su KCl, NaCl, $NaNO_3$, $MgSO_4$ i $(NH_4)_2SO_4$ ili organskim aminima kao što je poli-L-lizin.[2] Priređene nanočestice obično imaju površinski naboj koji stabilizira koloidnu suspenziju. Dodatkom agensa za agregaciju taj naboj se uklanja zbog reakcije s površinom nanočestica (u slučaju anorganskih soli) ili prevlačenja polimera preko nanostrukturirane površine. Na taj način postiže se kontrolirana agregacija nanočestica. Međutim, ponekad i sam analit može potaknuti agregaciju nanočestica što rezultira pojačanjem Ramanovog raspršenja.

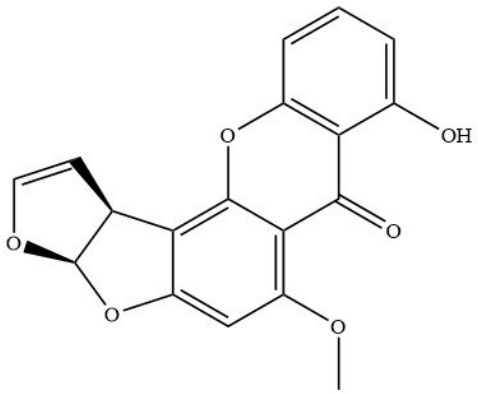
Prikladnost novopripravljenih metalnih supstrata za primjenu u SERS spektroskopiji ispituje se pomoću molekula aromatske strukture koja ih čini vrlo polarizabilnima i zahvaljujući kojoj intenzivno raspršuju zračenje. Osim strukturnih jedinica bogatih elektronima, modelne molekule za SERS često sadrže heteroatome u strukturi, poput dušika i sumpora kojima se mogu kemijski vezati s površinom srebra i zlata, te nose naboj, najčešće pozitivan radi ostvarivanja elektrostatskih interakcija sa stabilizirajućim, većinom negativno nabijenim ionima na površini nanočestica metala. Primjer skupine spojeva koji imaju navedena svojstva su rodamini. Rodamini se ubrajaju u ksantenske boje, a međusobno se razlikuju prema supstituentima na ksantenskom sustavu i fenilnom prstenu.[11] Najpoznatiji su rodamin 6G (R6G), rodamin 3B i rodamin 3G. R6G često je korišten u istraživanjima različitih SERS supstrata te detekcije jedne molekule.[12] Zahvaljujući ksantenskoj jezgri kroz koju je delokaliziran pozitivan naboj molekule (slika 5), molekula R6G vrlo je polarizabilna i jako raspršuje zračenje.



Slika 5. Struktura rodamina 6G (R6G).

2.3. Sterigmatocistin

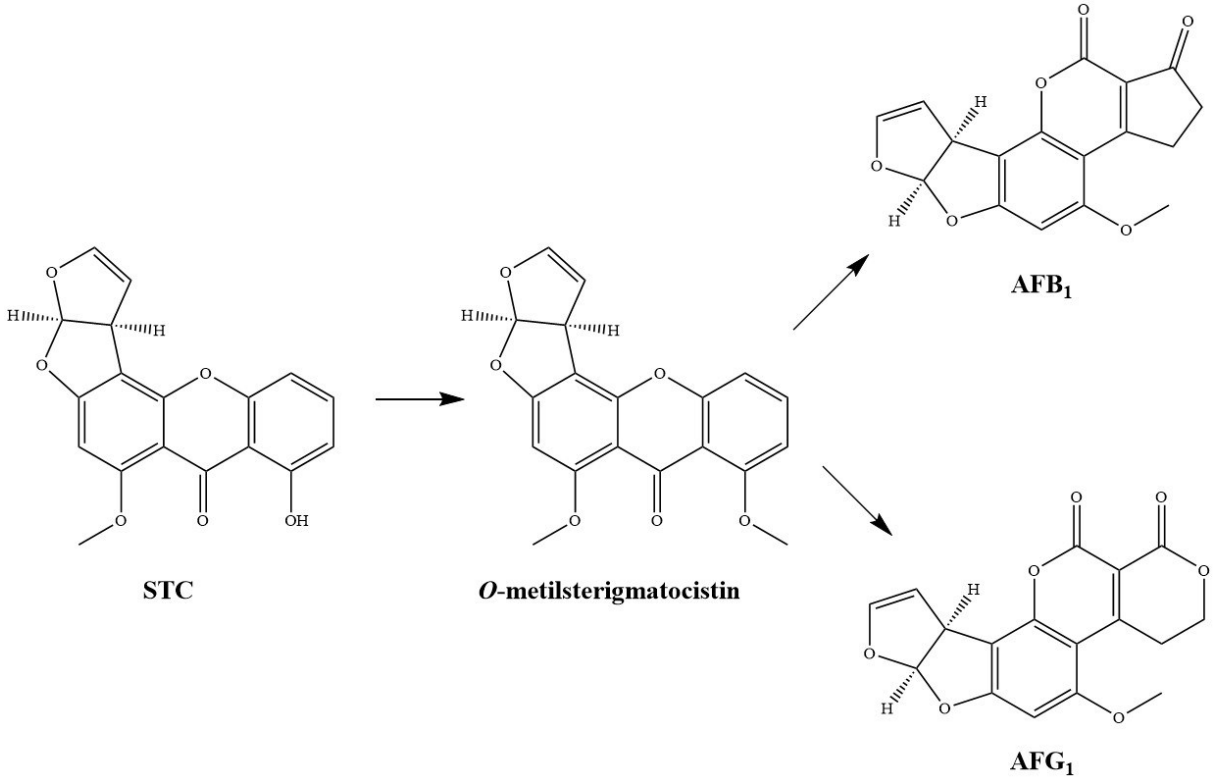
Sterigmatocistin (STC) je mikotoksin kojeg proizvodi nekoliko vrsta nitastih gljivica koje pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Botryotrichum*, *Humicola* i *Penicillium*, a čija je struktura prikazana na slici 6.[13] STC je pronađen u hrani za ljude, kao što su žitarice i proizvodi bazirani na žitaricama, zrna kave, začini, orašasti plodovi, sirevi, kao i hrani za životinje. Kontaminaciju hrane obično uzrokuju loši uvjeti skladištenja i/ili sakupljanja sirovina.[14] Kako bi se osigurala sigurnost hrane za zdravlje ljudi i životinja, postoje odluke o maksimalno dozvoljenim količinama mikotoksina u hrani, ali takva odluka nije donesena za STC. Niti jedna država Europske unije nema regulativu o dozvoljenoj količini STC u hrani niti provodi službenu kontrolu hrane na ovaj mikotoksin. Podatci o prisutnosti ovog mikotoksina u hrani za ljude i životinje su ograničeni zbog čega je Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA) izdala preporuku za prikupljanje dodatnih podataka o njegovoj pojavnosti primjenom visoko osjetljivih analitičkih metoda.[15]



Slika 6. Struktura sterigmatocistina (STC).

Sterigmatocistin je biološki prekursor aflatoksina B_1 (AFB_1) i aflatoksina G_1 (AFG_1) koji pripadaju skupini jednih od najopasnijih poznatih kancerogenih mikotoksina - aflatoksinima. U biosintezi, STC brzo prelazi u *O*-metilsterigmatocistin koji je direktan prekursor AFB_1 i AFG_1 (slika 7).[15] STC pokazuje brojne sličnosti u kemijskoj strukturi i biološkoj aktivnosti s aflatoksinima, a posebno s AFB_1. Dimenzije i apsolutna konfiguracija bisdihidroksifuranskog dijela molekule jako su slične u obje molekule što ukazuje na to da se i metabolička aktivacija zbiva na istom mjestu. Upravo su strukturne sličnosti između STC i AFB_1 potaknule

istraživanja vezana za kancerogenost sterigmatocistina koji je zatim klasificiran kao kancerogen tip 2B.



Slika 7. Biotransformacija sterigmatocistina u aflatoksin B_1 i aflatoksin G_1.[15]

Mehanizam toksičnosti sterigmatocistina još uvijek nije u potpunosti objašnjen. Proveden je ograničen broj istraživanja *in vivo* i *in vitro* kako bi se razjasnilo djelovanje ovog mikotoksina. Pokazano je da u stanicama raka jetre kod ljudi, HepG2, nakon dodatka niske koncentracije STC nastaju reaktivne kisikove vrste, što upućuje na oksidativni stres u stanicama. Također, zabilježena je i peroksidacija masti. Ova opažanja rezultat su i istraživanja provedenih u štakora i pilića.[15] Genotoksičnost STC istraživana je *in vitro* u bakterijama te stanicama sisavaca i ljudi, a *in vivo* u miševima, štakorima i ribama. U svim slučajevima dokazana je mutagenost ovog mikotoksina, odnosno potaknuta je mutacija gena i aberacija kromosoma. Općenito, mehanizam toksičnosti STC uključuje niz signalnih puteva koji su povezani s različitim negativnim posljedicama na stanice kao što su oksidativni stres, oštećenja DNA i zaustavljanje staničnih ciklusa. Moguće su promjene molekulske strukture sterigmatocistina kojima nastaju reaktivne skupine, kao što je epoksi skupina, preko koje se STC može vezati za DNA. Riješene strukture nastalih spojeva pokazale su da se aromatski

mikotoksini interkaliraju između parova baza gvanin-citozin u molekuli DNA. Ovo opažanje upućuje na postojanje nekovalentnih interakcija slaganja koje su zastupljenije od kovalentnih veza. Na isto ukazuje visoka toplinska stabilnost strukturno promijenjene molekule DNA. Visoka koncentracija STC u radnim i kućnim prostorima vrlo je opasna za zdravlje respiratornog sustava ljudi i životinja.[16]

Za kvantitativno određivanje mikotoksina koriste se kromatografske i imunokemijske metode: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC), tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS) i ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*).[1] Sve češće se istražuje i primjena sofisticiranih metoda kao što su masena spektrometrija visoke razlučivosti i plinska kromatografija spregnuta s tandemnom masenom spektrometrijom (GC-MS/MS). Ove metode imaju brojne prednosti, od kojih su najvažnije selektivnost, osjetljivost, pouzdanost i niska granica detekcije. Međutim, kromatografske metode su skupe jer koriste posebne imunoafinitetne kolone relativno kratkog roka trajanja, dok metode koje uključuju masenu spektrometriju također nisu financijski isplative zbog visoke cijene instrumenata te troškova analize. Nedostaci ELISA metoda su mogućnost križne reaktivnosti strukturno sličnih spojeva te nemogućnost točne kvantifikacije. S obzirom da je poželjno skratiti vrijeme analize te provesti mjerenje u realnom vremenu, kao i učiniti metodu što osjetljivijom, pouzdanijom i ekonomski prihvatljivijom, navedene metode nisu praktične. SERS metodu odlikuju navedene prednosti, što ju čini posebno zanimljivom u istraživanju mikotoksina. AFB_1 uspješno je detektiran SERS metodom, ali uz korištenje skupih i dodatno modificiranih metalnih supstrata.[1] Neki od njih su biočipovi hrapave metalne površine na kojoj su imobilizirane biomolekule koje selektivno vežu AFB_1, te zahtijevaju oslikavanje površine mikroskopom. Iako detekcijska granica iznosi 8 pg mL^{-1}, osnovni nedostatak razvijene metode za određivanje AFB_1 SERS spektroskopijom je visoka cijena metalnih supstrata.[15] Još jedan primjer modificiranog supstrata su SERS čipovi s aptamerima.[17] Aptameri su mali ligandi, sastoje se od kratkih oligonukleotida, a za ciljanu molekulu vežu se s visokim afinitetom. Ovakvi supstrati specifično prepoznaju spomenuti mikotoksin i vrlo su reproducibilni. Granica detekcije AFB_1 u ovakvoj izvedbi iznosi 0,4 fg mL^{-1}, a ovisnost intenziteta SERS signala o koncentraciji je linearna u koncentracijskom rasponu 1×10^{-6} do 1 ng mL^{-1}. U svrhu SERS analize AFB_1 korištene su i trodimenzionalne nanostrukture posloženih srebrovih nanoštapića koji imaju svojstvo samoorganizacije u složenije

nanostrukture.[18] Ovakvi sustavi odlikuju se jakim međučestičnim plazmonskim sprezanjima i reproducibilnim „vrućim mjestima“. Pri ovakvoj izvedbi metode ovisnost intenziteta SERS spektara o koncentraciji AFB_1 je linearna u koncentracijskom rasponu 5×10^{-5} do 2×10^{-3} mol L^{-1}, a granica detekcije iznosi 5×10^{-5} mol L^{-1}. Koliko je poznato, sterigmatocistin do sada nije uspješno analiziran SERS metodom. Međutim, nedavna istraživanja koja opisuju određivanje neutralnih molekula poput naftalena, trinitrotoluena te fluorantena upotrebom nemodificiranih nanočestica zlata kao SERS supstrata, upućuju na mogućnost detekcije STC.[19] Naime, STC je strukturno sličan navedenim molekulama: nema naboj te ima planarnu, aromatsku strukturu.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Tetraklorozlatna(III) kiselina trihidrat, ≥ 99,9 %, Sigma – Aldrich
Trinatrijev citrat dihidrat, p.a., Sigma – Aldrich
Rodamin 6G, p.a., Fluka
Amonijev sulfat, p.a., Kemika
Sterigmatocistin, za HPLC, Cayman Chemical Company
Metanol, p.a., Fluka

3.2. Mjerni uređaji

Apsorpcijski spektar koloidne suspenzije zlata snimljen je pomoću UV/Vis/NIR spektrofotometra SPECORD 200 tvrtke Analytik Jena. Korištena je kvarcna kiveta duljine puta zračenja 0,2 cm. Spektri su snimljeni u području između 190 i 1100 nm uz razlučivanje od 1 nm.

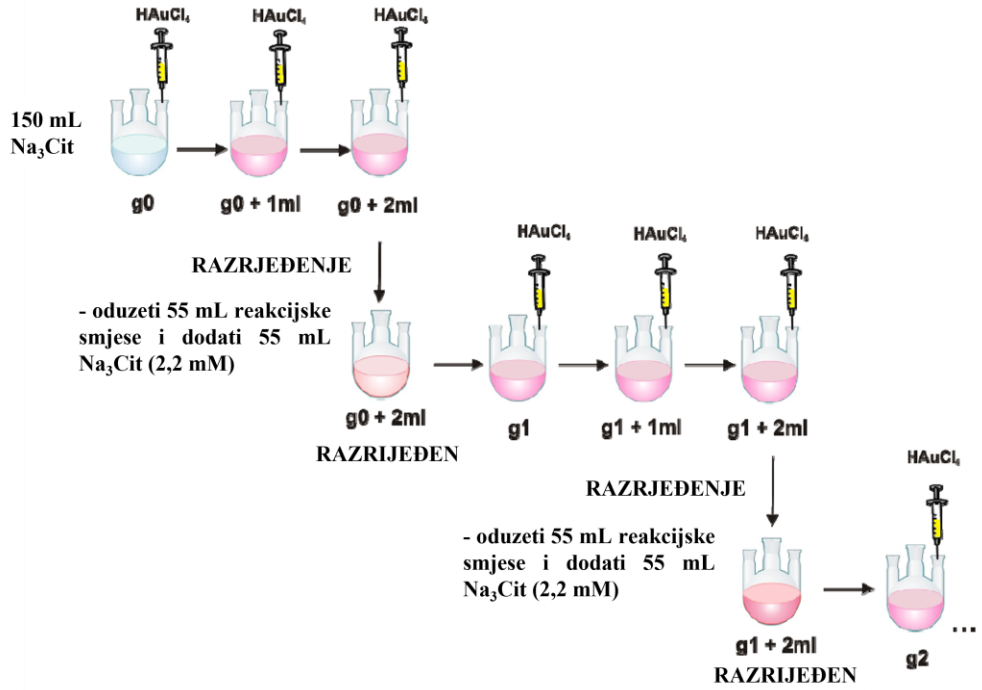
Mettler Toledo MP 220 pH metar s InLab®413 kombiniranom staklenom-kalomel elektrodom korišten je za mjerenje pH vrijednosti koloida. Uređaj je prije mjerenja baždaren s otopinama pufera pH 7,00 i 4,00.

Za snimanje Ramanovih i SERS spektara korišten je *inVia* Ramanov spektrometar tvrtke *Renishaw* spregnut s konfokalnim optičkim mikroskopom *Leica* i opremljen laserima koji emitiraju zračenje pri 532 i 785 nm, maksimalne snage 100, odnosno 300 mW. Prilikom snimanja spektra snaga lasera podešavana je ovisno o uzorku te je naznačena u opisu slike. Za snimanje Ramanovih i SERS spektara u koloidnim suspenzijama korišten je objektiv povećanja ×5, a za snimanje spektara na čvrstim supstratima objektiv povećanja ×20. Tekući uzorci snimani su u aluminijskim posudicama za termogravimetrijsku analizu volumena 40 µL, dok su čvrsti praškasti uzorci snimani na aluminijskom nosaču za Ramanovu spektroskopiju čvrstih uzoraka. Spektri su snimani u području 0−3200 cm^{-1} uz vrijeme izlaganja zračenju lasera od 10 s. Položaj vrpci u spektru analiziran je u programu Wire 5.3.

3.3. Supstrati zlata

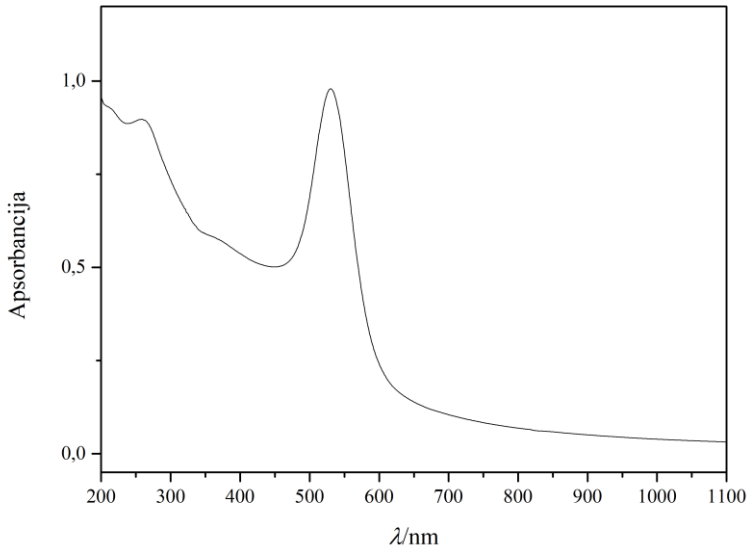
3.3.1. Nanočestice zlata u suspenziji

Koloidna suspenzija nanočestica zlata s površinskim slojem citratnih iona (AuNP_cit) pripravljena je u Laboratoriju za optiku i optički tanke filmove Instituta Ruđer Bošković kinetički kontroliranom sintezom iz sjemena nanočestica, koja se temelji na redukciji tetraklorozlatne(III) kiseline s trinatrijevim citratom (slika 8).[20] Otopina trinatrijevog citrata volumena 150 mL i koncentracije $2{,}2\times10^{-3}$ mol L^{-1} zagrijana je do vrenja u okrugloj tikvici. U otopinu koja je ključala 3 minute dodan je 1 mL otopine $HAuCl_4 \times 3H_2O$ koncentracije $2{,}5\times10^{-2}$ mol L^{-1} uz neprestano miješanje na magnetskoj miješalici. Bezbojna otopina poprimila je sivo-plavu boju, koja se daljnjim zagrijavanjem promijenila u crvenu. U ovom koraku nastalo je sjeme nanočestica zlata koje svakim sljedećim korakom sinteze raste. Nakon 10 minuta dodan je još 1 mL otopine zlatnog prekursora, a temperatura je snižena na 83 °C te održavana približno konstantnom tijekom cijelog postupka. Nakon 15 minuta, dodan je još 1 mL otopine $HAuCl_4 \times 3H_2O$. Nakon isteka sljedećih 15 minuta, uzet je alikvot od 55 mL reakcijske smjese i u tikvicu dodano 55 mL otopine trinatrijevog citrata. Izuzeti alikvot sadrži generaciju nanočestica određene veličine. Opisani postupak se ponavlja te svakim ciklusom nastaje nova generacija nanočestica koja se veličinom razlikuje od prethodne. Očekivana veličina nanočestica po generacijama i pripadajuće valne duljine plazmonske rezonancije navedeni su u Dodatku (Tablica D1). Tijekom sinteze ciklus je ponavljan šest puta, kada je sintetizirana šesta generacija nanočestica dvostrukim dodatkom zlatnog prekursora u smjesu pete generacije, a čija predviđena dimenzija iznosi približno 54 nm.



Slika 8. Shematski prikaz sinteze nanočestica zlata s površinskim slojem citratnih iona.[20]

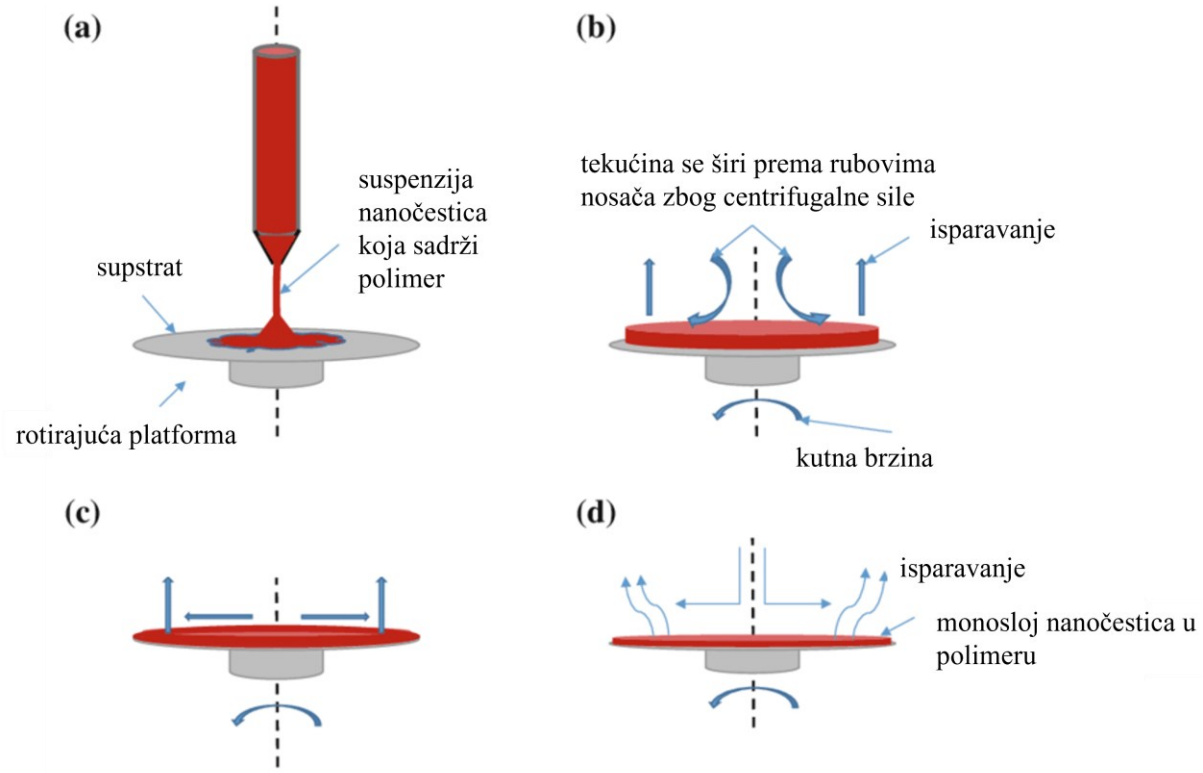
U svrhu karakterizacije koloida zlata snimljen je UV/Vis apsorpcijski spektar koloidne suspenzije i izmjerena mu je pH vrijednost. pH vrijednost koloidne suspenzije nanočestica zlata iznosila je 4,41, a valna duljina rezonancije plazmona iznosila je 530 nm (slika 9).



Slika 9. Apsorpcijski spektar AuNP_cit.

3.3.2. Nanočestice zlata na čvrstim nosačima

Supstrati nanočestica zlata na čvrstim nosačima preuzeti su iz Laboratorija za optiku i optički tanke filmove Instituta Ruđer Bošković, gdje su prethodno priređeni postupkom „spiniranja“. „Spiniranje“ je tehnika u kojoj se otopina spoja metalnog iona (prekursora metala) i odgovarajućeg polimera u organskom otapalu, nanosi na suhi čisti čvrsti nosač, smješten na rotirajućoj platformi (slika 5).[21] Tijekom vrtnje tekuća smjesa se zbog centrifugalne sile širi prema rubovima nosača, a otapalo isparava, pri čemu nastaje monosloj nanočestica na čvrstom nosaču.

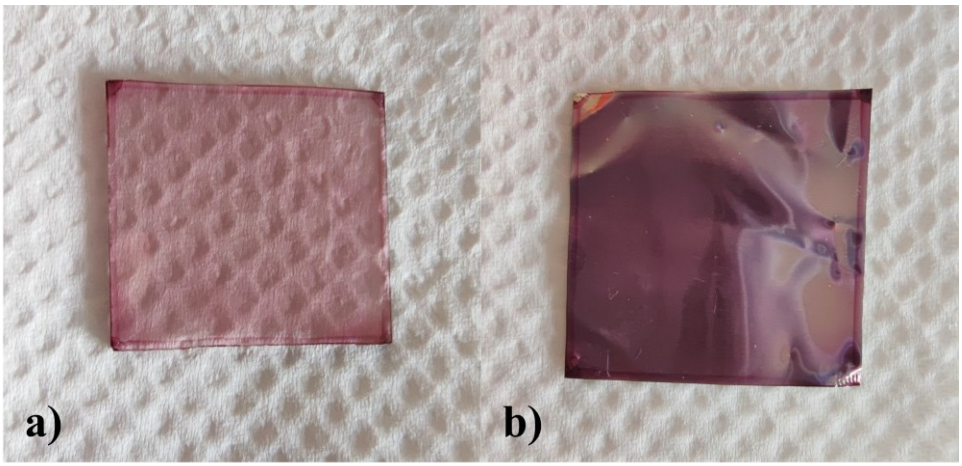


Slika 10. Shema postupka „spiniranja“ nanočestica na čvrste supstrate.[22]

Čvrsti supstrati zlata korišteni u ovom radu pripravljeni su „spiniranjem“ etanolnih otopina $HAuCl_4$ s polivinilpirolidonom (PVP) te $HAuCl_4$ sa stiren akrilonitrilom (SAN) na očišćena i osušena mikroskopska stakalca i aluminijsku foliju. Nakon nanošenja otopine na rotirajući čvrsti nosač provedeno je žarenje supstrata na temperaturi od 260 °C u vremenu od 20 minuta. Pri opisanoj pripravi čvrstih supstrata polimeri imaju dvojaku ulogu: reduciraju ione zlata u svrhu nastajanja zlatnih nanočestica te stabiliziraju nastale nanočestice. Tijek reakcije ovisi o

temperaturi te se brzina reakcije povećava s porastom temperature. Međutim, temperatura je ključna i za kontrolu dimenzije nanočestica, pri čemu pri višim temperaturama nastaju veće nanočestice. Žarenje pri previsokim temperaturama (iznad 300 °C), međutim, može izazvati oksidaciju nanočestica, dok žarenje pri temperaturama nižim od 100 °C nije učinkovito jer je potrebno ukloniti otapalo iz sustava. Kako korištena otapala sadrže mali udio vode, bolje je žariti pri temperaturama većim od vrelišta vode.

S polimerom PVP pripravljeni su supstrati zlata na nosačima od stakla i aluminija, dok je s polimerom SAN pripravljen samo supstrat na predmetnom stakalcu. U opisanom procesu supstrati su korišteni odmah po primitku i bez dodatnih modifikacija, a prikazani su na slici 11.



Slika 11. Fotografije supstrata zlata pripravljenih s polimerom PVP na čvrstim nosačima od: a) stakla i b) aluminija.

3.4. Priprava otopina i mjernih uzoraka

3.4.1. Priprava otopina

Pripravljena je ishodna otopina rodamina 6G ($c = 1\times10^{-3}$ mol L^{-1}) otapanjem čvrste tvari R6G u Milli-Q deioniziranoj vodi. Razrjeđivanjem ishodne otopine R6G priređene su otopine različitih koncentracija ($c = 1\times10^{-6}$ mol L^{-1}, 1×10^{-5} mol L^{-1}, 1×10^{-4} mol L^{-1}) koje su korištene za pripravu mjernih uzoraka R6G u koloidnim suspenzijama pri snimanju koncentracijski ovisnih SERS spektara.

Ishodna otopina sterigmatocistina ($c = 1{,}2\times10^{-3}$ mol L^{-1}) pripremljena je otapanjem čvrste tvari sterigmatocistina u metanolu uz zagrijavanje u vodenoj kupelji. Razrjeđivanjem ishodne otopine STC priređene su otopine ($c = 1{,}2\times10^{-4}$ mol L^{-1}, $1{,}2\times10^{-5}$ mol L^{-1}, $1{,}2\times10^{-6}$ mol L^{-1}) koje su korištene za pripravu mjernih uzoraka STC u koloidnim suspenzijama pri snimanju koncentracijski ovisnih SERS spektara.

Pripravljena je otopina amonijevog sulfata koncentracije 1 mol L^{-1} otapanjem čvrste tvari $(NH_4)_2SO_4$ u Milli-Q deioniziranoj vode.

3.4.2. Priprava mjernih uzoraka R6G

Za pripremu mjernih uzoraka R6G u koloidu zlata korištena je pripravljena koloidna suspenzija nanočestica zlata stabiliziranih slojem citratnih iona na površini, AuNP_cit. Za snimanje SERS spektra priređeno je 39,6 μL uzorka u aluminijskoj posudici, tako da je pomiješano 33 μL suspenzije AuNP_cit, 3,3 μL vodene otopine R6G, čija je koncentracija ovisila o konačnoj koncentraciji R6G u mjernom uzorku, te 3,3 μL Milli-Q deionizirane vode ili vodene otopine $(NH_4)_2SO_4$ ($c = 1$ mol L^{-1}), ovisno o tome jesu li snimani SERS spektri bez ili uz dodatak agregacijskog sredstva. Smjesa u aluminijskoj posudici promiješana je pipetom nakon dodatka svih sastojaka. Konačne koncentracije R6G u mjernim uzorcima iznosile su: $c = 1\times10^{-5}$ mol L^{-1}, 5×10^{-5} mol L^{-1}, 5×10^{-6} mol L^{-1}, 1×10^{-6} mol L^{-1}, 5×10^{-7} mol L^{-1}, 1×10^{-7} mol L^{-1}, 5×10^{-8} mol L^{-1} i 1×10^{-8} mol L^{-1}. SERS spektri mjernih uzoraka bez agregacijskog sredstva snimani su neposredno nakon priprave uzoraka, dok su spektri uzoraka s amonijevim sulfatom konačne koncentracije 0,1 mol L^{-1}, snimani nakon inkubacije pri sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta.

Za snimanje SERS spektara na čvrstim supstratima zlata korištena je otopina R6G koncentracije 1×10^{-5} mol L^{-1}. Kap otopine volumena 5 μL pipetirana je direktno na čvrsti supstrat te osušena stajanjem na zraku. Mjerenja su provedena neposredno nakon sušenja kapi.

3.4.3. Priprava mjernih uzoraka STC

Mjerni uzorci STC u koloidu zlata pripremljeni su s istom koloidnom suspenzijom AuNP_cit i u istom omjeru sastojaka kao i mjerni uzorci R6G. Za snimanje SERS spektara priređeno je 48 μL uzorka u semimikro epruveti, tako da je pomiješano 40 μL koloidne suspenzije, 4 μL metanolne otopine STC, čija je koncentracija ovisila o konačnoj koncentraciji STC u uzorku, te 4 μL Milli-Q deionizirane vode ili vodene otopine $(NH_4)_2SO_4$ (c = 1 mol L^{-1}), ovisno o tome jesu li snimani SERS spektri bez ili uz dodatak agregacijskog sredstva. Nakon miješanja uzorka pipetom, alikvot od 40 μL pipetiran je u aluminijsku posudicu. Konačne koncentracije STC u mjernim uzorcima iznosile su: $c = 1\times10^{-4}$ mol L^{-1}, 5×10^{-5} mol L^{-1}, 1×10^{-5} mol L^{-1}, 5×10^{-6} mol L^{-1}, 1×10^{-6} mol L^{-1}, 5×10^{-7} mol L^{-1}, 5×10^{-7} mol L^{-1} i 1×10^{-8} mol L^{-1}. SERS spektri mjernih uzoraka bez agregacijskog sredstva snimani su neposredno nakon priprave uzoraka, dok su spektri uzoraka s amonijevim sulfatom konačne koncentracije 0,1 mol L^{-1}, snimani nakon inkubacije pri sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta.

Za snimanje SERS spektara na čvrstim supstratima zlata korištena je otopina STC koncentracije $1{,}2\times10^{-3}$ mol L^{-1}. Kap otopine volumena 5 μL otopine pipetirana je na čvrsti supstrat te osušena stajanjem na zraku. Mjerenja su provedena neposredno nakon sušenja kapi.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ramanovi spektri

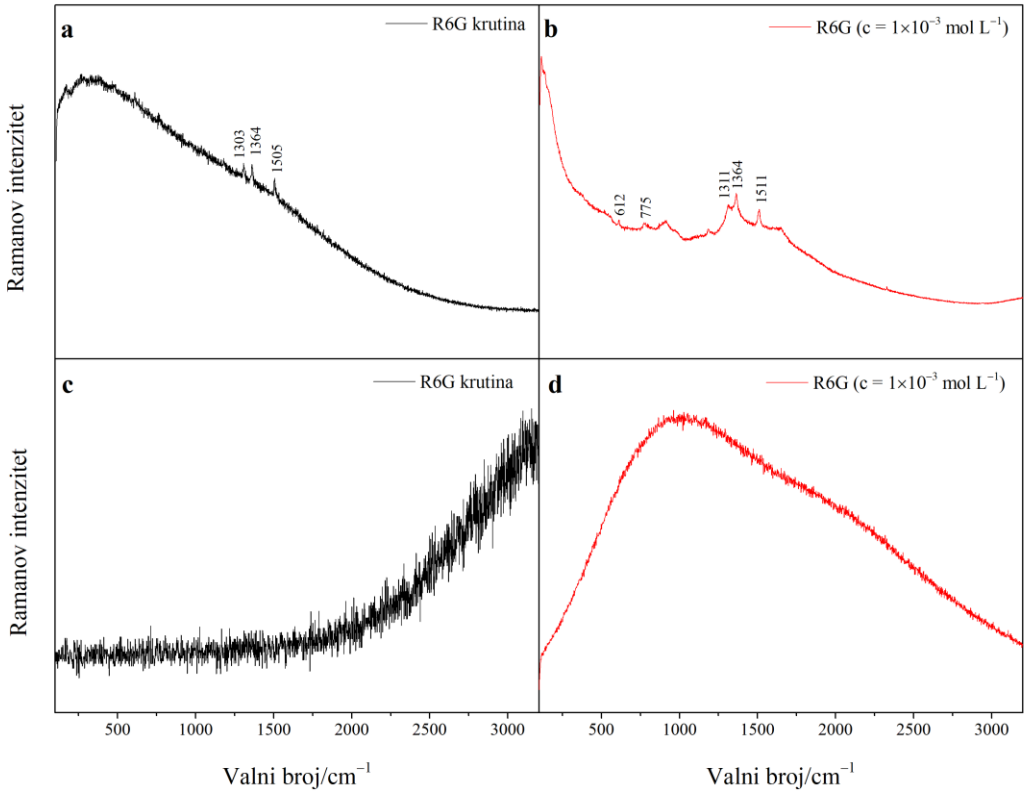
4.1.1. Rodamin 6G

Snimljeni su Ramanovi spektri čvrstog uzorka i vodene otopine rodamina 6G koncentracije 1×10^{-3} mol L^{-1} pri valnim duljinama pobude 785 i 532 nm (slika 12), a opažene vibracijske vrpce asignirane u tablici 1.

Ramanovi spektri R6G razlikuju se ovisno o valnoj duljini pobude. Pri snimanju spektra čvrstog uzorka pobudnim zračenjem valne duljine 532 nm, nije bilo moguće detektirati signal, koji je pri većoj snazi lasera uzrokovao zasićenje detektora, dok je pri manjoj snazi lasera potpuno izostao. U spektru otopine R6G pri istoj valnoj duljini pobude, također nisu uočene vrpce koje bi odgovarale vibracijama spoja, već široka vrpca fluorescencije R6G koja je prekrivala čitavo spektralno područje. Opisana opažanja pripisana su svojstvima apsorpcije i emisije zračenja rodaminske boje. R6G apsorbira zračenje pri 526 nm, nakon čega intenzivno fluorescira.[23] S obzirom da je valna duljina pobude, 532 nm, blizu valnoj duljini maksimuma apsorpcije R6G, pobuđuju se elektronski prijelazi u molekuli i odgovarajući procesi, koji otežavaju detekciju Ramanovog raspršenja.

Iako fluorescencija značajno doprinosi i spektru čvrstog uzorka R6G snimljenom nakon pobude pri 785 nm, na što ukazuje uzdignuta bazna linija, ipak su uočene slabe vrpce koje potječu od spoja. Vrpce pri 1505 i 1364 cm^{-1} pripisane su istezanjima CC veza aromatskog ksantenskog sustava, dok vrpci pri 1303 cm^{-1}, osim istezanja okosnice aromatskog sustava, doprinosi i istezanje C−N veze između ugljika ksantena i dušika etilamino skupine.[23] Vrlo slabe vrpce pri 764 i 612 cm^{-1} potječu od deformacija izvan ravnine aromatskih CH skupina.[24]

U Ramanovom spektru vodene otopine R6G ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}) snimljenom pri valnoj duljini pobude 785 nm, opažene su vrpce slabog intenziteta. Kao i u spektru čvrstog uzorka, vrpce su pripisane istezanjima ksantenskog sustava (1511, 1354 i 1311 cm^{-1}) te deformacijama aromatskih CH skupina (775 i 612 cm^{-1}).



Slika 12. Ramanovi spektri: a) čvrstog uzorka R6G pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 0,003 mW, b) vodene otopine R6G (c = 1×10^{-3} mol L^{-1}) pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 0,003 mW, c) čvrstog uzorka R6G pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 0,001 mW, i d) vodene otopine R6G (c = 1×10^{-3} mol L^{-1}) pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 0,001 mW.

Tablica 1. Asignacija osnovnih vibracijskih vrpci u Ramanovim spektrima čvrstog uzorka i vodene otopine R6G ($c = 1\times10^{-3}$ mol L^{-1}) pri valnoj duljini pobude 785 nm.

Valni broj / cm^{-1}		**Vibracija**[13,24]
Čvrsti uzorak	**Vodena otopina**	
1505	1511	ν CC (xr)
1364	1364	ν CC (xr)
1303	1311	ν C−N
764	775	δ_{oop} CH (ar)
612	612	δ_{oop} CH (ar)

Kratice: ν – istezanje; δ – deformacija; oop – izvan ravnine; xr – ksanten; ar – aromatsko.

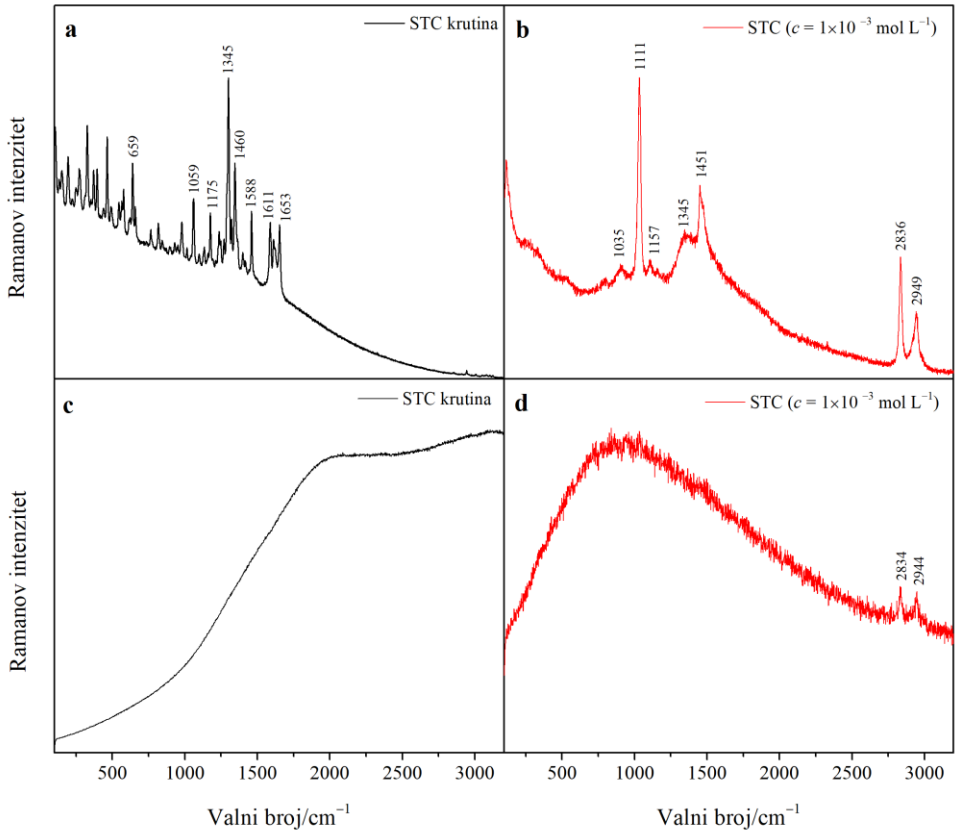
4.1.2. Sterigmatocistin

Snimljeni su Ramanovi spektri čvrstog uzorka i otopine STC u metanolu koncentracije 1×10^{-3} mol L^{-1} pri valnim duljinama pobude 785 i 532 nm (slika 13). Opažene vibracijske vrpce asignirane su u tablici 2.

U Ramanovim spektrima STC snimljenim pri valnoj duljini pobude 532 nm nisu uočene vrpce koje bi odgovarale vibracijama spoja. Ramanov spektar čvrstog uzorka nije opažen, a motiv uzlazne bazne linije pri većim valnim brojevima može se pripisati mogućoj razgradnji spoja uslijed apsorpcije pobudnog zračenja. U Ramanovom spektru metanolne otopine STC ($c = 1\times10^{-3}$ mol L^{-1}) uočene su dvije vrpce vrlo slabog intenziteta pri 2834 i 2944 cm^{-1}, koje odgovaraju simetričnom i antisimetričnom istezanju C−H veza otapala.[25] Ramanov spektar metanola prikazan je u Dodatku (slika D1). Izostanak spektra otopine STC rezultat je slabe osjetljivosti Ramanove spektroskopije za koju je koncentracija $c = 1 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} nedovoljna za opažanje Ramanovog raspršenja, pri čemu otopinu veće koncentracije nije bilo moguće pripraviti zbog slabe topljivosti spoja.

Za razliku od spektra pri 532 nm, Ramanov spektar čvrstog uzorka STC snimljen nakon pobude pri 785 nm, bogat je vrpcama koje odgovaraju vibracijama molekule. Vrpce slabog intenziteta u spektralnom području 2940–3102 cm^{-1} pripisane su istezanjima C−H veza metilne skupine i aromatskih CH skupina. Vrpca srednjeg intenziteta pri 1653 cm^{-1} odgovara vibraciji istezanja karbonilne skupine, dok je vrpca pri 1611 cm^{-1} pripisana istezanju dvostrukih C=C veza u prstenovima. Intenzivne vrpce uočene su pri 1588 i 1460 cm^{-1} te odgovaraju istezanjima

aromatskih CC veza i deformacijama prstenova. Sterigmatocistin u strukturi sadrži hidroksilnu skupinu, čije su vrpce vibracija uočene pri 1414 i 659 cm^{-1} te pripisane deformaciji OH skupine u ravnini i izvan ravnine. Kao glavni strukturni elementi u molekuli STC prisutni su šesteročlani i peteročlani prstenovi s kisikom, na koje ukazuju vrpce istezanja C−O, C−C−C te C−O−C veza uočene pri 1345, 1175 i 1059 cm^{-1}. Vrpce u području nižih valnih brojeva, 900–600 cm^{-1}, upućuju na vibracije deformacija izvan ravnine aromatskih CH skupina i svijanje prstenova,[1] dok vrpce ispod 600 cm^{-1} potječu od vibracija i torzije čitave molekule.



Slika 13. Ramanovi spektri: a) čvrstog uzorka STC pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 30 mW, b) metanolne otopine STC (c = 1×10^{-3} mol L^{-1}) pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 30 mW, c) čvrstog uzorka STC pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 10 mW, i d) metanolne otopine STC (c = 1×10^{-3} mol L^{-1}) pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 10 mW.

U Ramanovom spektru metanolne otopine STC ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}) uočene su vrpce koje odgovaraju vrpcama metanola (2949, 2836, 1451, 1157, 1111 i 1035 cm^{-1}). Jedino se vrpca pri 1345 cm^{-1}, koja je intenzivnija u odnosu na široko rame pri istom valnom broju u spektru otapala, može pripisati isteznim vibracijama okosnice prstenova STC molekule.

Tablica 2. Asignacija osnovnih vibracijskih vrpci u Ramanovim spektrima čvrstog uzorka i otopine STC ($c = 1\times10^{-3}$ mol L^{-1}) pri valnim duljinama pobude 785 i 532 nm.

Valni broj / cm^{-1}			**Vibracija**[1,25]
785 nm		**532 nm**	
Čvrsti uzorak	**Otopina**	**Otopina**	
3102			ν C−H (ar)
3006			ν C−H (ar)
	2949*	2944*	ν_{as} C−H (metanol)
2940			ν_{as} C−H (CH_3)
	2836*	2834*	ν_{s} C−H (metanol)
1653			ν C=O
1610			ν C=C
1588			ν CC
	1451*		δ_{as} CH_3 (metanol)
1460			ν CC, δ_{ip} CH (prsten)
1414			δ_{ip} OH
1399			δ_{s} CH_3
1345	1345		ν C−O, ν C−C (okosnica prstenova)
1300			δ_{ip} CH (prsten)
1270			δ_{ip} CH (prsten)
1175			ν C−O−CH_3, ν C−O−C (prsten)
1059			ν C−C−C, δ prsten
	1157*		δ CH_3 (metanol)
	1111*		δ CH_3 (metanol)
	1032*		ν C−O (metanol)
979			δ_{ip} C−O, ν C−C
	912*		ν C−O (metanol)
817			δ_{oop} CH (prsten)
659			δ_{oop} OH
640			δ prsten

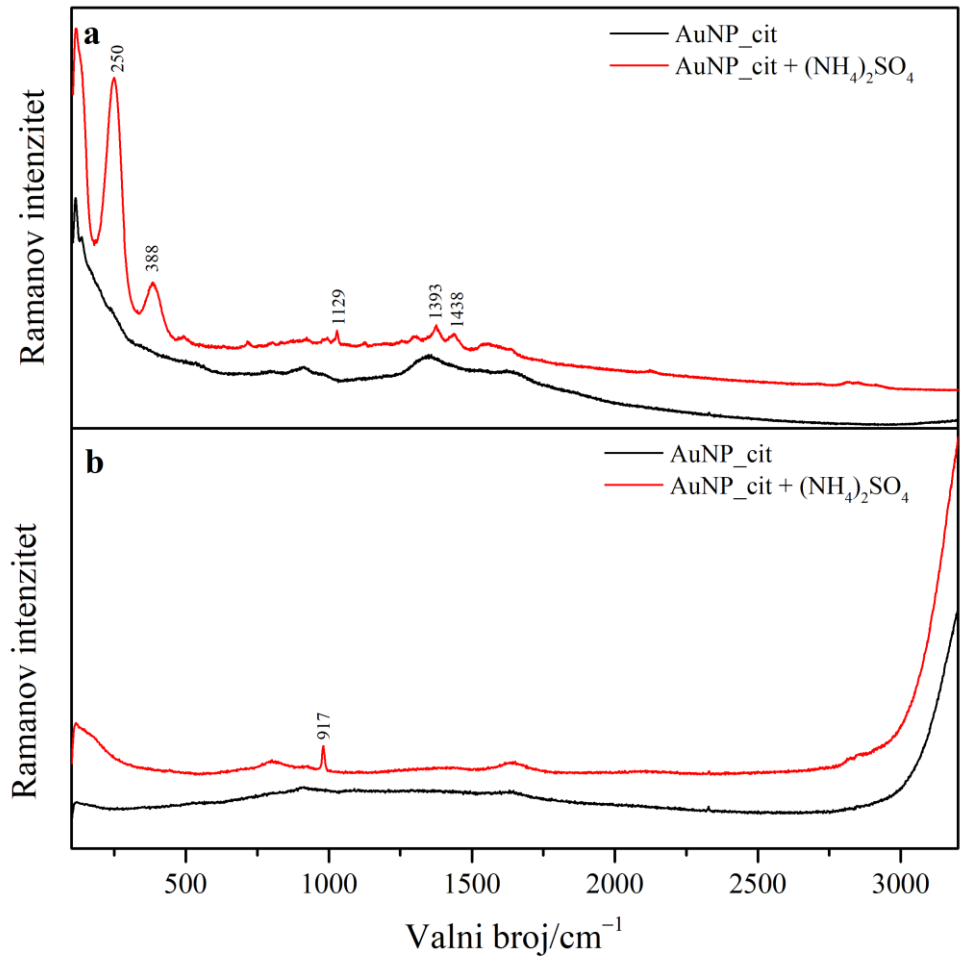
Kratice: ν – istezanje; δ – deformacija; as – antisimetrično; s – simetrično; ip – u ravnini; oop – izvan ravnine.

4.2. SERS spektri

4.2.1. Nanočestice zlata u suspenziji

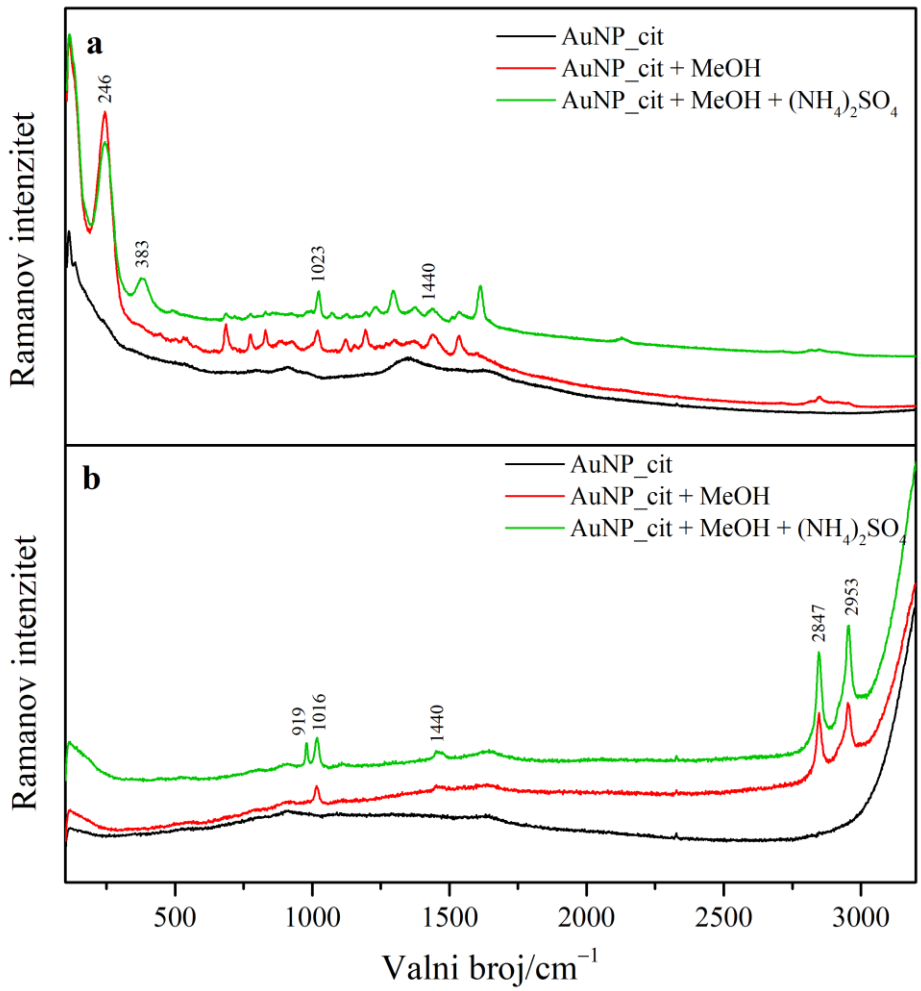
Snimljeni su Ramanovi spektri koloidne suspenzije nanočestica zlata stabiliziranih slojem citratnih iona na površini, bez agregirajućeg sredstva i nakon dodatka agregirajuće soli ($(NH_4)_2SO_4$, c = 0,1 mol L^{-1}) pri valnim duljinama pobude 785 i 532 nm (slika 14).

Neovisno o valnoj duljini pobudnog zračenja, u Ramanovim spektrima koloidne suspenzije zlata koja nije sadržavala agregirajuće sredstvo, nisu uočene vibracijske vrpce kemijskih vrsta u koloidu. U spektru koloida agregiranog s $(NH_4)_2SO_4$ (c = 0,1 mol L^{-1}), snimljenom pobudnim zračenjem pri 532 nm, opaža se slaba vrpca pri 917 cm^{-1}, koja odgovara simetričnom istezanju sulfatnog iona. Međutim, agregacijom nanočestica zlata, nakon pobude pri 785 nm, pojačano je Ramanovo raspršenje ionskih vrsta prisutnih u koloidu AuNP_cit. Intenzivna vrpca pri 250 cm^{-1} pripisana je istezanju Au−O veze nastale između nanočestica zlata i kisikovih atoma u citratnim ionima na površini nanočestica. Brojne vrpce slabog intenziteta najvjerojatnije potječu od citratnih iona i njihovih oksidacijskih ili razgradnih produkata[27] te odgovaraju sljedećim vibracijama: 876 cm^{-1} (δ_{oop} CH), 924 cm^{-1} (δ_{oop} COH), 1030 cm^{-1} (δ_{ip} CH), 1388 cm^{-1} (ν_s COO^-), 1559 cm^{-1} (ν_{as} COO^-). Dodatno, uočene su i vrpce koje potječu od vibracija agregirajuće anorganske soli: pri 493 cm^{-1} (δ_s SO_4^{2-}), 995 cm^{-1} (ν_s SO_4^{2-}), 1129 cm^{-1} (ν_{as} SO_4^{2-}) te pri 1393 i 1438 cm^{-1} (δ NH_4^+).[28] Vrpca srednjeg intenziteta pri 388 cm^{-1} ukazuje na Au−N vezu nastalu između zlatnih nanočestica i amonijevih iona.



Slika 14. Ramanovi spektri AuNP_cit bez i s $(NH_4)_2SO_4$ (c = 0,1 mol L^{-1}) pri valnoj duljini pobude: a) 785 nm, snaga lasera 15 mW, i b) 532 nm, snaga lasera 50 mW. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

Zbog slabe topljivosti sterigmatocistina u vodi, ishodne otopine STC koje su se koristile za pripravu mjernih uzoraka priređene su u metanolu. Kako bi se istražio utjecaj metanola na koloidnu suspenziju nanočestica zlata, snimljeni su Ramanovi spektri metanola u koloidu AuNP_cit bez i s agregirajućom soli te uspoređeni sa spektrom AuNP_cit (slika 15). Ramanovi spektri metanola pri obje valne duljine pobude prikazani su u Dodatku (slika D1). U spektru koloidne suspenzije nanočestica zlata koja je sadržavala metanol, snimljenom nakon pobude zračenjem 532 nm, opažene su vrpce metanola: intenzivne vrpce pri 2953 i 2847 cm^{-1} pripisane antisimetričnom i simetričnom istezanju C−H veza metilne skupine te slaba vrpca pri 1016 cm^{-1} pripisana istezanju C−O veze. U spektru snimljenom nakon izlaganja zračenju pri 785 nm, uz karakteristične vrpce metanola, javljaju se vrpce citratnih iona i njihovih oksidacijskih produkata te jaka vrpca pri 246 cm^{-1} koja upućuje na Au−O vezu. Nakon dodatka agregacijskog sredstva u koloid zlata s metanolom, u spektru pri 532 nm javlja se nova vrpca pri 919 cm^{-1} koja potječe od sulfatnog iona agregirajuće soli, dok nova vrpca pri 383 cm^{-1} u spektru snimljenom pri 785 nm ukazuje na vezanje amonijevog iona s površinom zlata. Spektar metanola u AuNP_cit koji sadrži agregirajuće sredstvo razlikuje se od spektra u koloidu zlata bez agregirajuće soli, što je moguća posljedica djelomične neutralizacije negativnog naboja stabilizirajućih aniona na površini nanočestica zlata i pojačanja Ramanovog raspršenja drugih kemijskih vrsta u suspenziji. Osim prepoznatljivih vrpci metanola pri 1023 i 1440 cm^{-1}, pripisanih istezanju C−O veze i deformaciji metilne skupine, opažene vrpce nije bilo moguće jednoznačno pripisati spojevima u koloidnoj suspenziji.



Slika 15. Ramanovi spektri metanola u koloidu AuNP_cit bez i s $(NH_4)_2SO_4$ (c = 0,1 mol L^{-1}) pri valnoj duljini pobude: a) 785 nm, snaga lasera 15 mW, i b) 532 nm, snaga lasera 50 mW. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

4.2.2. Koncentracijski ovisni SERS spektri rodamina 6G

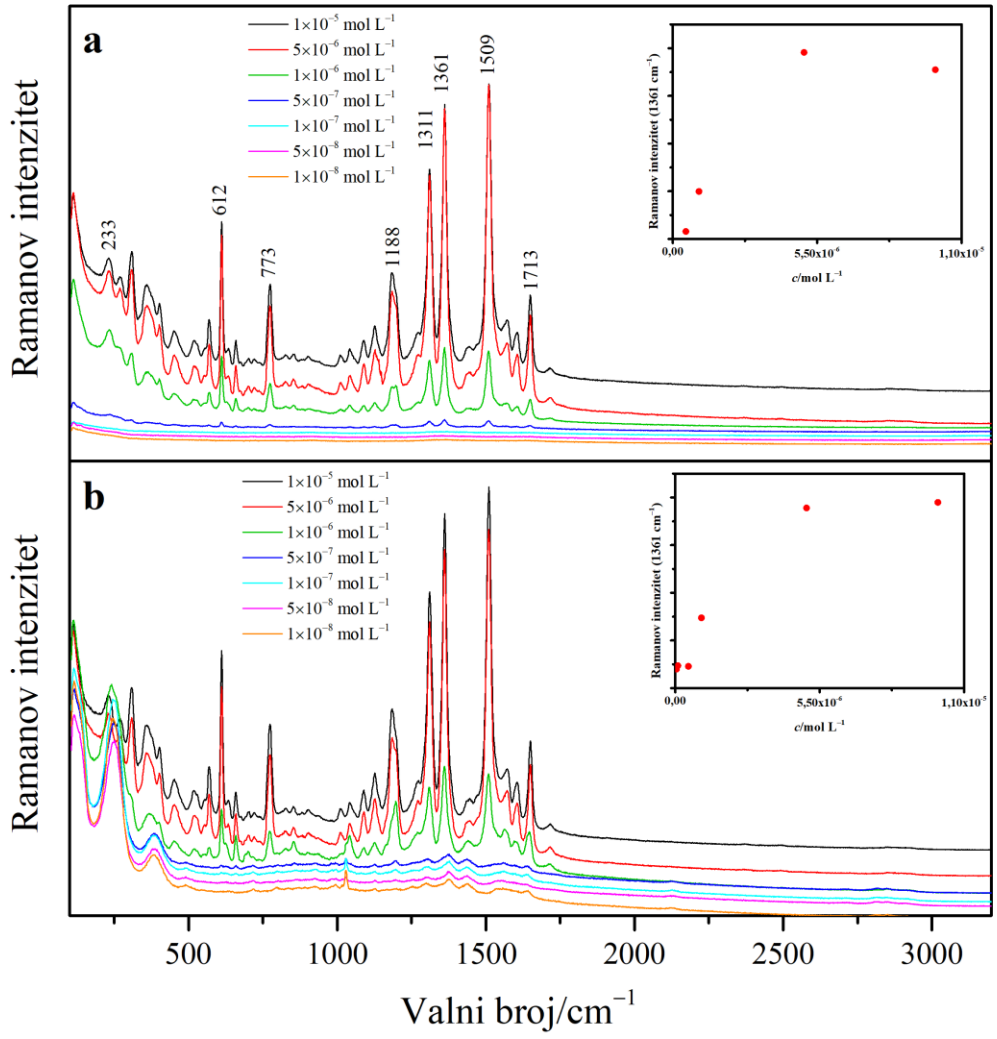
U svrhu testiranja učinkovitosti sintetiziranog koloida AuNP_cit kao SERS supstrata, snimljeni su SERS spektri rodamina 6G u rasponu koncentracija 1×10^{-8}–1×10^{-5} mol L^{-1}, bez i uz dodatak agregacijskog sredstva ($(NH_4)_2SO_4$, c = 0,1 mol L^{-1}) nakon pobude zračenjem 532 i 785 nm (slika 16).

Rodamin 6G je modelna molekula za ispitivanje učinkovitosti SERS supstrata koja zahvaljujući svojoj polarizabilnoj aromatskoj strukturi intenzivno raspršuje zračenje. Pri tome adsorpciju molekula na metalne supstrate omogućava ksantenski sustav i fenilna jezgra π-interakcijama s elektronima metala, te pozitivno nabijeni dušik etilamino skupina elektrostatskim interakcijama sa stabilizirajućim slojem negativnih iona koji se nalaze na površini većine nanočestica metala.

Opaženi SERS spektar rodamina 6G u koloidu AuNP_cit sadržavao je značajno veći broj vibracijskih vrpci nego Ramanovi spektri čvrstog uzorka i otopine (slika 16.a.). Asignacija osnovnih vrpci u najintenzivnijem SERS spektru R6G (5×10^{-6} mol L^{-1}) navedena je u tablici 3. U spektru dominiraju intenzivne vrpce vibracija ksantenskog sustava koje uključuju istezanja aromatskih CC veza (1361 i 1509 cm^{-1}) i C−O−C veza (1188 cm^{-1}) te deformacije izvan ravnine aromatskih CH skupina (612 i 773 cm^{-1}). Vrlo jaka vrpca pri 1311 cm^{-1} pripisana je istezanju C−N veze između ugljika ksantena i dušika etilamino skupine. Vrpca srednjeg intenziteta pri 1649 cm^{-1} odgovara istezanju fenilnog prstena, a vrlo slaba vrpca pri 1713 cm^{-1} istezanju C=O veze etilesterske skupine. Vrpce uočene u području 1010–1275 cm^{-1} pripisane su deformacijama u ravnini CH skupina. Na Au−N vezu između nanočestica zlata i dušikovog atoma u molekuli R6G ukazuje vrpca pri 233 cm^{-1}.

SERS spektri R6G opaženi su za uzorke koji su sadržavali koncentracije modelnih molekula 1×10^{-5} mol L^{-1}, 5×10^{-6} mol L^{-1}, 1×10^{-6} mol L^{-1} i 5×10^{-7} mol L^{-1}, dok pri nižim koncentracijama pojačanje Ramanovog raspršenja R6G nije uočeno. Kako bi se pratio utjecaj koncentracije molekula na površinsko pojačanje Ramanovog raspršenja, grafički je prikazana ovisnost intenziteta vrpce ksantena pri 1361 cm^{-1} o koncentraciji R6G (umetak na slici 16.a). Nije opažena linearna ovisnost Ramanovog intenziteta o koncentraciji R6G, pri čemu najveće raspršenje ne karakterizira uzorak najveće mjerene koncentracije (1×10^{-5} mol L^{-1}), već sljedeću nižu koncentraciju 5×10^{-6} mol L^{-1}. Uočeno se može objasniti različitim smještanjem molekula R6G na površini nanočestica zlata. Za pojačanje Ramanovog raspršenja nužan je položaj analita blizu nanostrukturirane površine metala, pri čemu orijentacija molekula okomito na površinu nanočestica rezultira najvećim pojačanjem Ramanovog raspršenja. Pri visokim koncentracijama molekule su „gusto“ složene na nanočesticama, ne mogu se optimalno rasporediti po površini nanočestica i smještaju se pod kutem u odnosu na metalnu površinu. Smanjenjem koncentracije molekule imaju više mjesta orijentirati se okomito na površinu, uslijed čega se Ramanovo raspršenje maksimalno pojačava. Daljnjim smanjenjem

koncentracije molekule se naginju prema površini ili mogu zauzeti položaj paralelno s površinom metala, u kojem slučaju promjena polarizabilnosti ne doprinosi raspršenom zračenju. Granica detekcije pri valnoj duljini pobude 785 nm za R6G u koloidnoj suspenziji nanočestica zlata bez dodatka agregacijskog sredstva iznosi 5×10^{-7} mol L^{-1}, budući da je to najniža mjerena koncentracija za koju je opažen spektar. Spektar prve sljedeće niže koncentracije R6G (1×10^{-7} mol L^{-1}) odgovara spektru samog koloida.



Slika 16. Koncentracijski ovisni SERS spektri R6G (1×10^{-8} –1×10^{-5} mol L^{-1}) snimljeni pri valnoj duljini pobude 785 nm: a) bez agregacijskog sredstva, snaga lasera 15 mW, i b) s $(NH_4)_2SO_4$ (c = 0,1 mol L^{-1}), snaga lasera 5 mW. Umetak: ovisnost intenziteta vrpce pri 1361 cm^{-1} o koncentraciji R6G. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

Može se pretpostaviti da se molekule rodamina 6G adsorbiraju na površinu nanočestica zlata uslijed elektrostatskog privlačenja između pozitivnog naboja u molekuli R6G i negativnog naboja citratnih iona na površini nanočestica zlata. S obzirom na mogućnost nastajanja veze s nanočesticama zlata, na koju upućuje vrpca Au−N veze, ukupnom raspršenju najvjerojatnije doprinosi i kemijski mehanizam.

SERS spektri rodamina 6G u koloidu AuNP_cit agregiranom s $(NH_4)_2SO_4$ nalikuju spektrima bez agregacijskog sredstva (slika 16.b). Položaji karakterističnih vibracijskih vrpci jednaki su ili se vrlo malo razlikuju (za 1 do 2 cm^{-1}) od položaja vrpci u spektrima bez amonijeva sulfata. Grafički prikaz ovisnosti intenziteta vrpce vibracije ksantena o koncentraciji R6G također nije linearan, međutim, spektri R6G koncentracija 1×10^{-5} i 5×10^{-6} mol L^{-1} na agregiranim nanočesticama zlata gotovo su istog intenziteta. Zanimljivo je također uočiti da granica detekcije, odnosno koncentracija pri kojoj su u spektru jasno vidljive vrpce R6G, iznosi 1×10^{-6} mol L^{-1}, što je više od one bez agregacijskog sredstva (5×10^{-7} mol L^{-1}). Naime, u spektru agregiranog koloida AuNP_cit opažaju se vrpce citratnih iona i njihovih oksidacijskih produkata koje interferiraju vrpcama R6G i otežavaju analizu spektara pri nižim koncentracijama.

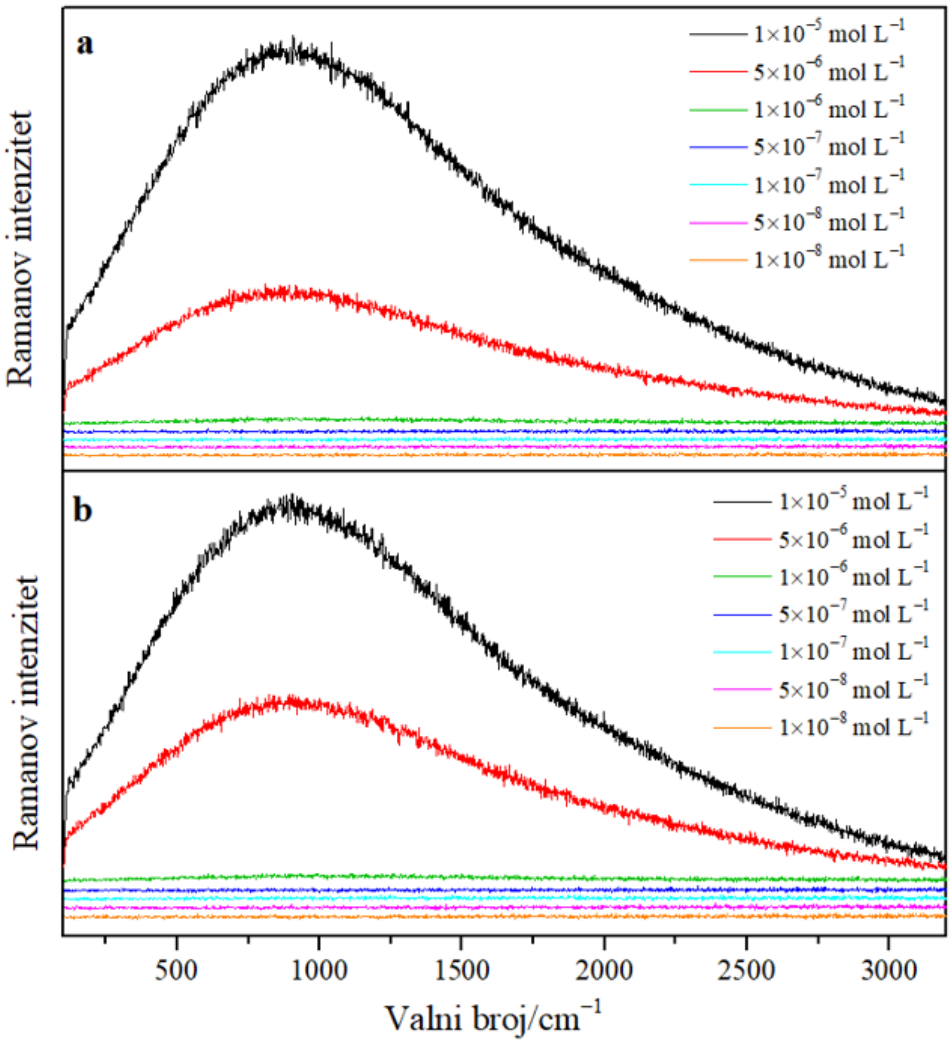
Iako se dodatkom anorganskih soli uobičajeno pospješuje agregacija nanočestica koja rezultira pojačanjem raspršenog zračenja i u konačnici većom osjetljivošću mjerenja, ovdje to nije slučaj. Može se pretpostaviti da rodamin 6G, koji nosi pozitivan naboj u strukturi, sam djeluje kao agregirajući agens, te ostvarivanjem elektrostatskih interakcija s citratnim anionima na površini metala djelomično neutralizira negativan naboj nanočestica i uzrokuje njihovu agregaciju. Doprinos prisutne agregirajuće soli pri tome je zanemariv.

Tablica 3. Asignacija osnovnih vibracijskih vrpci u SERS spektrima otopina R6G ($c = 5\times10^{-6}$ mol L^{-1}) uz i bez dodatka agregacijskog sredstva pri valnoj duljini pobude 785 nm.

Valni broj / cm^{-1}		**Vibracija**[23,24]
Bez dodatka $(NH_4)_2SO_4$	**Uz dodatak $(NH_4)_2SO_4$**	
1717	1720	ν C=O
1649	1649	ν CC (ar)
1605	1605	ν C−C, ν C−C−C
1574	1574	δ_{ip} N–H
1509	1509	ν CC (xr)
1361	1361	ν CC (xr)
1311	1310	ν C−N
1271	1263	δ_{ip} CH
1182	1183	ν C−O−C
1148		δ_{ip} CH
1140		
1124	1127	
1010	1010	
770	773	δ_{oop} CH
612	611	
570	570	δ prsten, torzije cijele molekule
518	517	
456	457	
381	366	
233	233	ν Au−N

Kratice: ν – istezanje; δ – deformacija; ip – u ravnini; oop – izvan ravnine, ar – aromatsko; xr – ksanten.

Istražena je SERS učinkovitost sintetiziranog koloida zlatnih nanočestica snimanjem SERS spektara rodamina 6G u istom rasponu koncentracija, $1\times10^{-8}-1\times10^{-5}$ mol L^{-1}, bez i uz dodatak agregacijskog sredstva ($(NH_4)_2SO_4$, c = 0,1 mol L^{-1}), pri valnoj duljini pobude 532 nm (slika 17). U SERS spektrima snimljenim pri ovoj valnoj duljini pobude nisu uočene vibracijske vrpce R6G, već samo fluorescencija uzorka koja u potpunosti prekriva Ramanovo raspršenje. Kao što je ranije navedeno, valna duljina lasera od 532 nm blizu je valnoj duljini apsorpcije R6G (λ_{max} = 526 nm) te je energija zračenja dovoljna za pobudu elektronskih prijelaza u molekuli odgovornih za apsorpciju i emisiju zračenja.



Slika 17. Koncentracijski ovisni SERS spektri R6G ($1\times10^{-8}-1\times10^{-5}$ mol L^{-1}) snimljeni pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 0,0001 mW: a) bez agregacijskog sredstva, i b) s $(NH_4)_2SO_4$ (c = 0,1 mol L^{-1}). Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

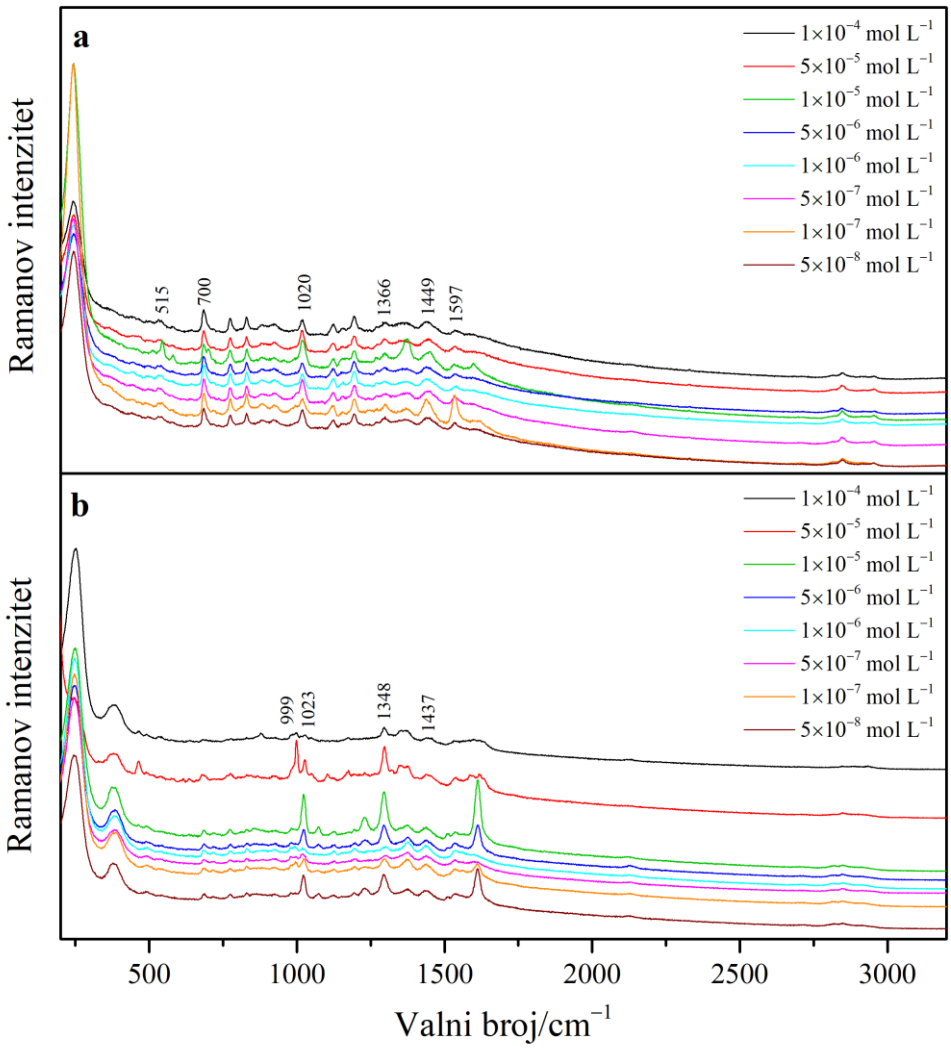
4.2.3. Koncentracijski ovisni SERS spektri sterigmatocistina

Istražena je prikladnost pripravljene koloidne suspenzije nanočestica zlata AuNP_cit za analizu sterigmatocistina. U tu svrhu snimljeni su SERS spektri STC u rasponu koncentracija 5×10^{-8}–1×10^{-4} mol L^{-1} u neagregiranom koloidu i koloidu agregiranom pomoću $(NH_4)_2SO_4$ (c = 0,1 mol L^{-1}) pri valnim duljinama pobude 785 i 532 nm. Koncentracijski ovisni SERS spektri sterigmatocistina prikazani su na slikama 18 (λ_{ex} = 785 nm) i 19 (λ_{ex} = 532 nm).

Svi spektri u neagregiranom koloidu AuNP_cit, neovisno o koncentraciji STC, snimljeni nakon pobude pri 785 nm nalikuju jedan dugome, odnosno spektru metanola u koloidnoj suspenziji nanočestica zlata bez sterigmatocistina (slika 18). Pri tome se u spektrima opažaju vrpce koje potječu od vibracija metanola pri 2961, 2845, 1449 i 1020 cm^{-1}, a redom odgovaraju antisimetričnom i simetričnom istezanju C−H veza metilne skupine, deformaciji CH_3 skupine te istezanju C−O veze. Vrpce metanola su u spektrima svih koncentracija STC jednakog intenziteta budući da je organsko otapalo u svim uzorcima prisutno u istom volumnom udjelu (φ = 8,3%). Ostale vrpce potječu od citratnih iona i njihovih oksidacijskih ili razgradnih produkata na površini nanočestica zlata. Iznimno se u spektru koncentracije STC 1×10^{-5} mol L^{-1} javljaju vrpce pri 1597, 1366, 700, 581, 545 i 515 cm^{-1}, koje nisu opažene u ostalim spektrima. Navedene vrpce u literaturi su opisane kao „rodaminu slične vrpce“ (engl. *rhodamine-like bands*) te su pripisane neidentificiranim kemijskim vrstama, strukturno sličnim rodaminima, koje se javljaju u spektrima suspenzija nanočestica metala najčešće pripravljenim redukcijom iona metala s trinatrijevim citratom.[27,29] Izostanak vibracijskih vrpci sterigmatocistina u spektrima mjernih uzoraka ukazuje da se molekule STC nisu adsorbirale na površinu nanočestica zlata. S obzirom da nanočestice zlata nose negativan naboj citratnih iona na površini, a STC je neutralna molekula, izostaje elektrostatsko privlačenje.

S obzirom da je u literaturi opisana uspješna detekcija aromatskih, neutralnih molekula primjenom agregiranih nanočestica zlata,[19] istraženo je pojačanje Ramanovog raspršenja STC u koloidu AuNP_cit agregiranom s $(NH_4)_2SO_4$. Negativno nabijeni citratni ioni na površini nanočestica zlata stabiliziraju koloid tako što uslijed elektrostatskog odbijanja negativno nabijenog površinskog sloja, nanočestice metala ostaju dispergirane u otopini. Dodatkom dovoljne koncentracije kationa, u ovom slučaju NH_4^+, negativan naboj iona na površini se u potpunosti ili djelomično neutralizira. Time se smanjuju odbojne sile između nanočestica metala i potiče agregacija, tijekom koje nastaju brojna SERS aktivna „vruća mjesta“. U SERS

spektrima STC koncentracija 1×10^{-4} i 5×10^{-5} mol L^{-1} opažaju se slabe vrpce pri 1348, 1173 i 999 cm^{-1}. Prve dvije vrpce mogu se pripisati istezanjima C−O, C−C i C−O−C veza prstenova u strukturi molekula STC, dok zadnja vrpca odgovara vibraciji disanja benzenskih jedinica. Smanjenjem koncentracije STC ($c < 5\times10^{-5}$ mol L^{-1}) spomenute vrpce nestaju te spektri odgovaraju spektru metanola u agregiranom koloidu AuNP_cit, u kojem uz vrpce metanola (1437, 1023 cm^{-1}), dominiraju vrpce citratnih iona i njihovih oksidacijskih ili razgradnih produkata. STC je organska, nenabijena, aromatska molekula koja agregira u vodenim otopinama pri koncentracijama većim 5×10^{-5} mol L^{-1}. Za nastajanje agregata zaslužne su disperzivne interakcije (Van der Waalsove sile i Londonove sile), kao i interakcije π-slaganja (engl. *π-stacking*).[30] Može se pretpostaviti da su upravo π-interakcije odgovorne za adsorpciju STC na nanočestica zlata, što je izraženije za asocirane molekule nego za monomere.

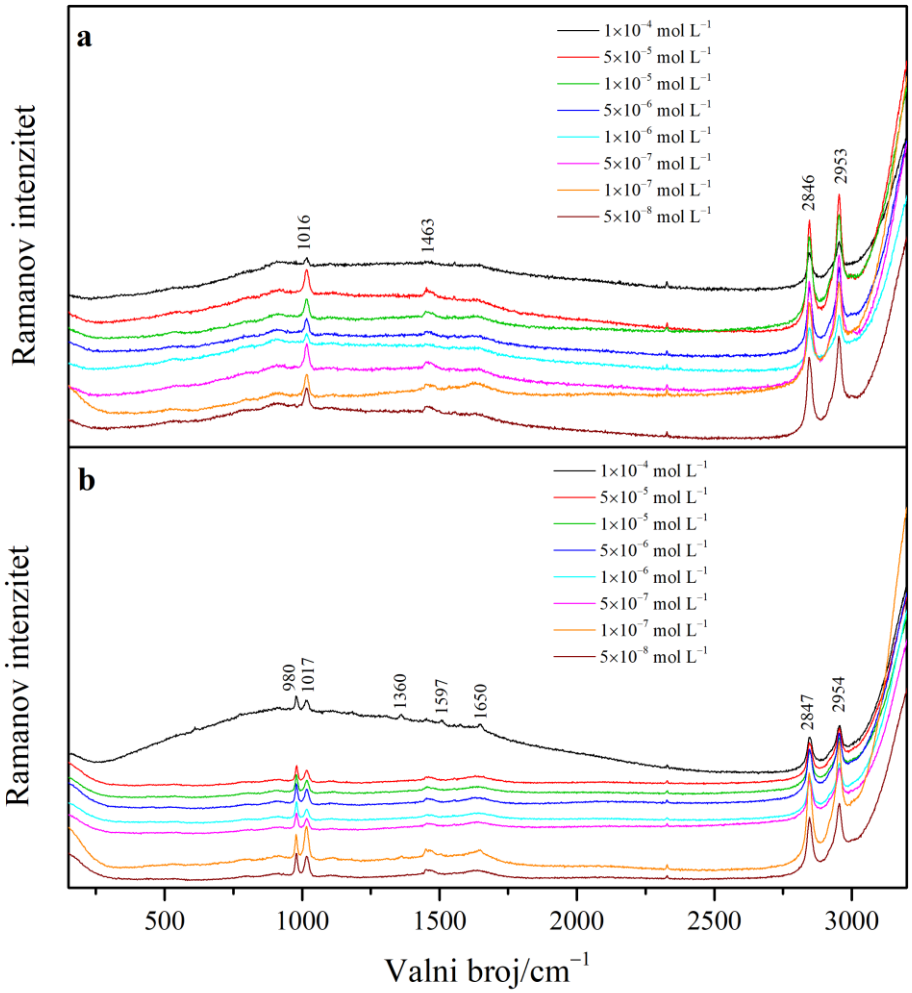


Slika 18. Koncentracijski ovisni SERS spektri STC (1×10^{-8} –1×10^{-5} mol L^{-1}) snimljeni pri valnoj duljini pobude 785 nm: a) bez dodatka agregacijskog sredstva, snaga lasera 150 mW, i b) uz dodatak $(NH_4)_2SO_4$ (c = 0,1 mol L^{-1}), snaga lasera 30 mW. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

Koncentracijski ovisni spektri STC snimljeni u koloidu AuNP_cit pri valnoj duljini pobude od 532 nm nalikuju jedan drugome, odnosno spektru metanola u neagregiranoj suspenziji nanočestica zlata. Jednako kao i nakon pobude pri 785 nm, u spektru su uočene samo vrpce koje potječu od organskog otapala (2953, 2846, 1463 i 1016 cm^{-1}).

Dodatkom agregirajuće soli ($(NH_4)_2SO_4$, c = 0,1 mol L^{-1}) u mjerni uzorak, u koncentracijski ovisnim SERS spektrima STC snimljenim nakon pobude pri 532 nm, dominiraju vrpce

metanola (2954, 2847, 1452 i 1017 cm^{-1}) te vrpca pri 980 cm^{-1} koja je pripisana simetričnom istezanje S−O veza sulfatnog aniona. Jedino su u spektru najveće koncentracije opažene vrlo slabe vrpce pri 1650, 1597 i 1360 cm^{-1}, koje se redom mogu pripisati istezanjima karbonilne skupine, aromatskih CC veza te jednostrukih C−C i C−O veza prstenastih struktura STC.



Slika 19. Koncentracijski ovisni SERS spektri STC (1×10^{-8} −1×10^{-5} mol L^{-1}) snimljeni pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 50 mW: a) bez agregacijskog sredstva, i b) uz dodatak $(NH_4)_2SO_4$ (c = 0,1 mol L^{-1}). Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

Izostanak adsorpcije molekula STC na testirane nanočestice zlata i posljedično pojačanja Ramanovog raspršenja može se pripisati svojstvima supstrata i molekule. Nanočestice zlata stabilizirane su slojem citratnih aniona na površini. S obzirom da je STC neutralna molekula izostaje elektrostatsko privlačenje uslijed kojeg se molekule smještaju blizu površini metala, što je nužno za pojačanje Ramanovog raspršenja. Također, citratni ioni te njihovi oksidacijski

i razgradni produkti na površini nanočestica mogu stvarati prostornu barijeru za spontano smještanje molekula blizu površine metala. Dodatkom agregacijskog sredstva opažene su vrlo slabe vrpce STC pri najvišim mjerenim koncentracijama, što je najvjerojatnije posljedica nastajanja SERS aktivnih mjesta na kojima su električna polja izrazito jaka. S obzirom da adsorpcija molekula nije vođena elektrostatskim interakcijama, može se pretpostaviti da su π-interakcije odgovorne za vezanje STC s površinom zlata.

4.2.4. Nanočestice zlata na čvrstim nosačima

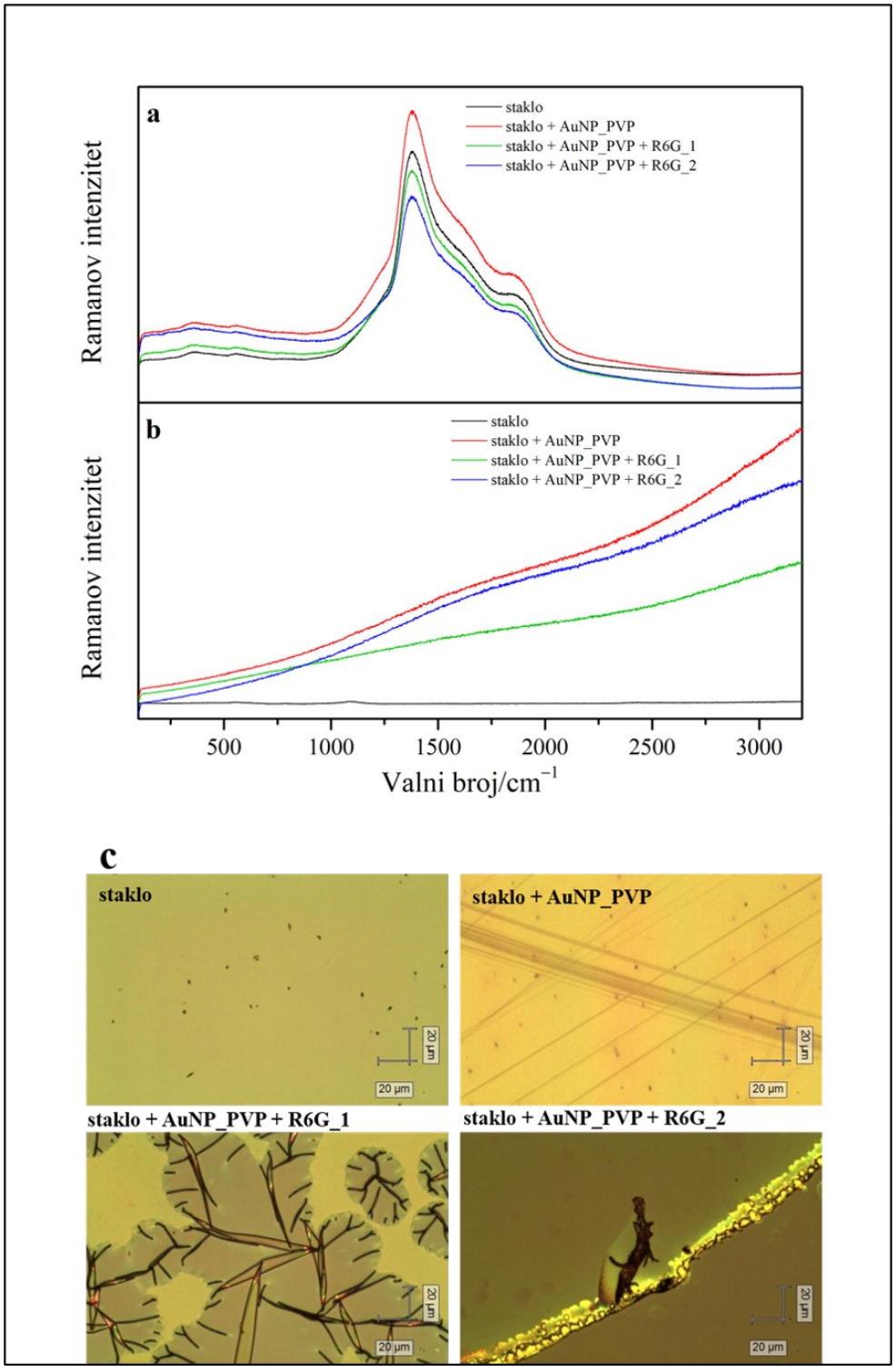
Čvrsti supstrati zlata preuzeti su iz Laboratorija za optiku i optički tanke filmove Instituta Ruđer Bošković. Pripravljeni su nanošenjem etanolne otopine koja je sadržavala $HAuCl_4$ i polimer PVP ili SAN na rotirajuće nosače od stakla i aluminija, koji su potom žareni. Imobilizacijom na čvrstim nosačima nanočestice zlata su nepokretne i u idealnom slučaju ravnomjerno i gusto raspoređene. Na taj način povećava se broj „vrućih mjesta“ na kojima se pojačava Ramanovo raspršenje molekula analita. Također, nanošenje i sušenje otopine analita na čvrstim SERS supstratima omogućava da se i neutralne molekule analita smještaju na površini nanočestica metala, što je glavni uvjet za pojačanje Ramanovog raspršenja.

4.2.4.1. Nanočestice zlata na nosaču od stakla

Kao nosač za čvrste supstrate zlata korišteno je predmetno silikatno stakalce za mikroskopiju debljine 1 mm. Otopina analita je nanošena na čvrsti supstrat zlata ispuštanjem iz mikropipete. Nakon isparavanja otapala stajanjem kapi na zraku, snimani su spektri osušene kapi. Kako bi se odredio doprinos raspršenja staklenog nosača, snimljeni su Ramanovi spektri predmetnog stakalca, pripravljenog čvrstog supstrata zlata na staklu i osušene kapi analita na čvrstom supstratu zlata, fokusiranjem zrake lasera na dva različita mjesta na kapi. Također su snimljene i fotografije mjesta na kojima su snimani spektri.

Snimljeni su spektri čvrstog supstrata zlata pripremljenog nanošenjem i žarenjem otopine $HAuCl_4$ i polimera PVP na staklu te osušene kapi otopine R6G ($c = 1\times10^{-5}$ mol L^{-1}) na odgovarajućem čvrstom supstratu zlata (slika 20). U spektru stakla snimljenom nakon pobude pri 785 nm uočena je široka vrpca fotoluminescencije stakla (1100−2000 cm^{-1}) koja prekriva očekivane vibracijske vrpce istezanja Si−O veza u strukturi stakla (~1093 cm^{-1}).[31] Spektri čvrstog supstrata zlata i osušene kapljice R6G ($c = 1\times10^{-5}$ mol L^{-1}) gotovo su jednaki spektru

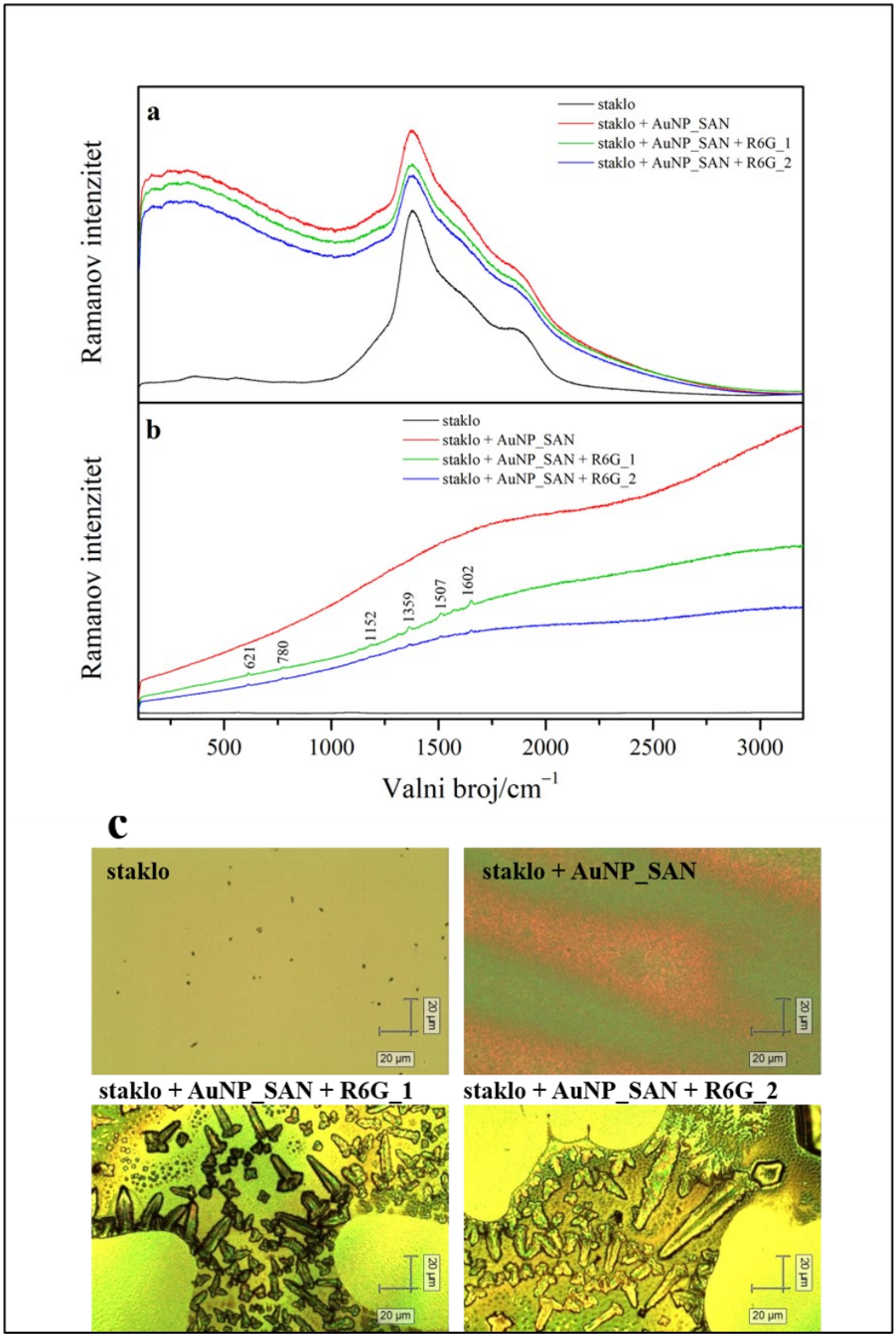
samog predmetnog stakla. Iako je pod mikroskopom vidljiva kristalizacija R6G nakon isparavanja otapala, nisu uočene vrpce koje potječu od vibracija molekula analita. Nakon pobude zračenjem 532 nm, u spektru stakla uočena je slaba vrpca pri 1101 cm^{-1} koja odgovara vibraciji istezanja Si−O veza u SiO_4 tetraedrima u strukturi stakla. U spektrima čvrstog supstrata zlata i osušene kapljice R6G opaža se uzlazna bazna linija uslijed apsorpcije zračenja, pri čemu vibracijske vrpce analita nisu uočene. Ovakvi rezultati ukazuju da se molekule analita nisu niti adsorbirale niti vezale za površinu imobiliziranih nanočestica zlata te da čvrsti supstrat zlata priređen na ovaj način nije prikladan za SERS analizu R6G.



Slika 20. Ramanovi spektri stakla, čvrstog supstrata zlata na staklu s polimerom PVP te sasušene kapljice R6G ($c = 1\times10^{-5}$ mol L^{-1}) na dva različita mjesta na supstratu: a) valna duljina pobude 785 nm, snaga lasera 3 mW, b) valna duljina pobude 532 nm, snaga lasera 1 mW, i c) fotografije mjesta snimanja spektara. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

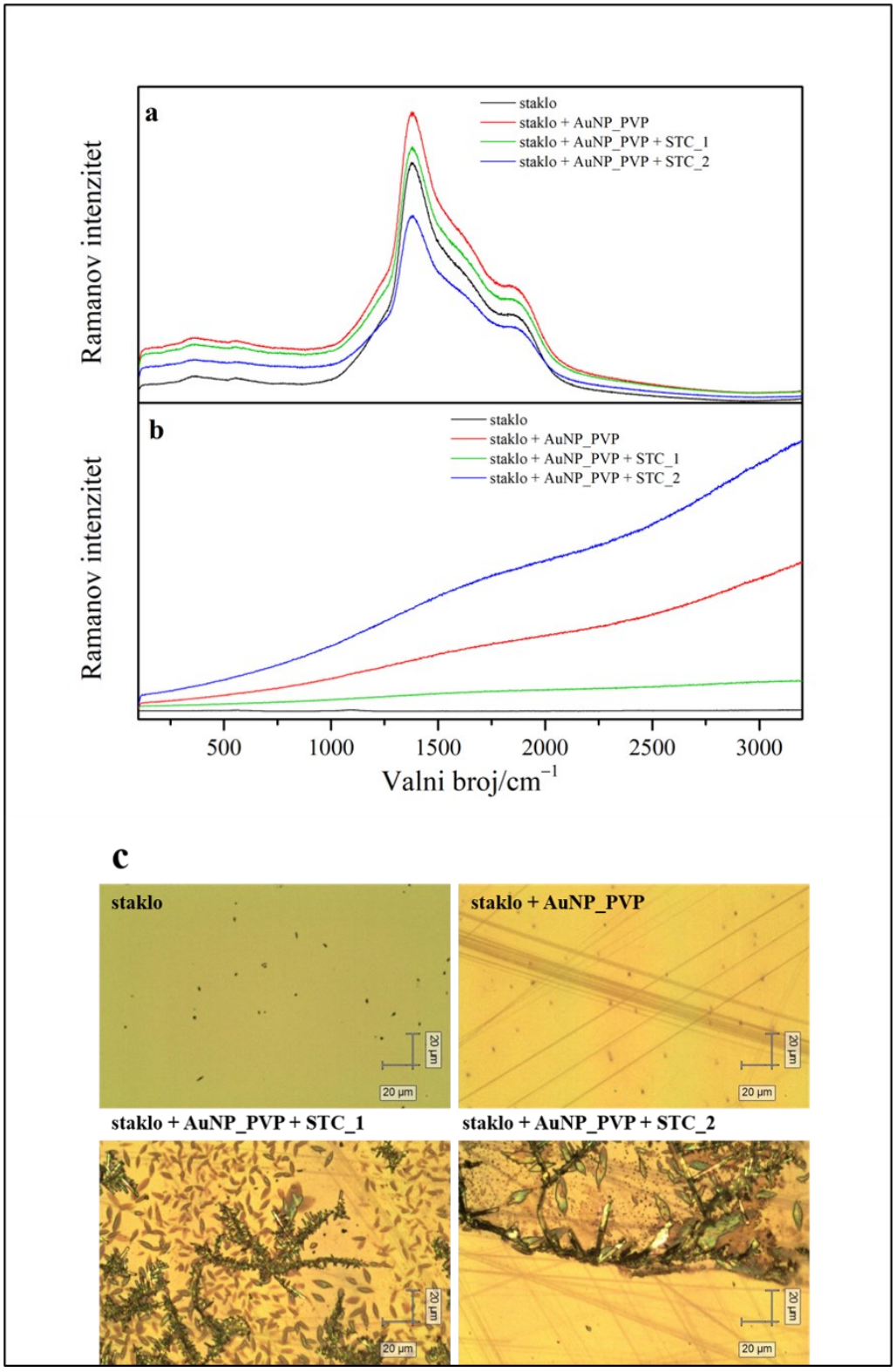
Nadalje, istražen je utjecaj polimera korištenog u pripravi čvrstog supstrata zlata na staklu. SAN je polimer hidrofobnijih svojstava od PVP pa su interakcije otapala i analita s površinom čvrstog supstrata zlata tijekom sušenja kapi otopine drugačije. Snimljeni su spektri čvrstog supstrata zlata pripremljenog nanošenjem i žarenjem otopine $HAuCl_4$ i polimera SAN na staklu te osušene kapi otopine R6G ($c = 1\times10^{-5}$ mol L^{-1}) na odgovarajućem čvrstom supstratu zlata (slika 21). U spektru čvrstog supstrata zlata, snimljenom nakon pobude pri 785 nm, dominira fotoluminescencija stakla, no u području nižih valnih brojeva, oko 500 cm^{-1}, opaža se i uzdignuta bazna linija. Spektri osušene kapljice R6G ($c = 1\times10^{-5}$ mol L^{-1}) odgovaraju spektru čvrstog supstrata zlata.

Međutim, u spektrima osušene kapljice R6G na čvrstom supstratu zlata na staklu pripravljenom s polimerom SAN, nakon pobude zračenjem 532 nm uočene su vrpce slabog intenziteta koje potječu od spoja. Vrpce pri 1602, 1507 i 1359 cm^{-1} pripisane su istezanju fenilne jezgre i ksantenskog sustava rodamina 6G. Navedene vrpce karakteristične su za rodaminsku boju te su bile su najintenzivnije i u Ramanovim i SERS spektrima R6G. Uočene su također slabe vrpce pri 1152, 780 i 621 cm^{-1} koje su pripisane deformacijama u ravnini i izvan ravnine aromatskih CH skupina. Za razliku od čvrstog supstrata zlata pripravljenog s polimerom PVP, čvrsti supstrat zlata s hidrofobnijim polimerom pogodan je za detekciju R6G nakon pobude pri valnoj duljini pobude 532 nm. Može se pretpostaviti da hidrofobniji polimer omogućava smještanje molekula R6G bliže najnočesticama zlata te da podudaranje energije pobudnog zračenja i energije apsorpcije R6G u ovom slučaju rezultira rezonantnim Ramanovim pojačanjem.

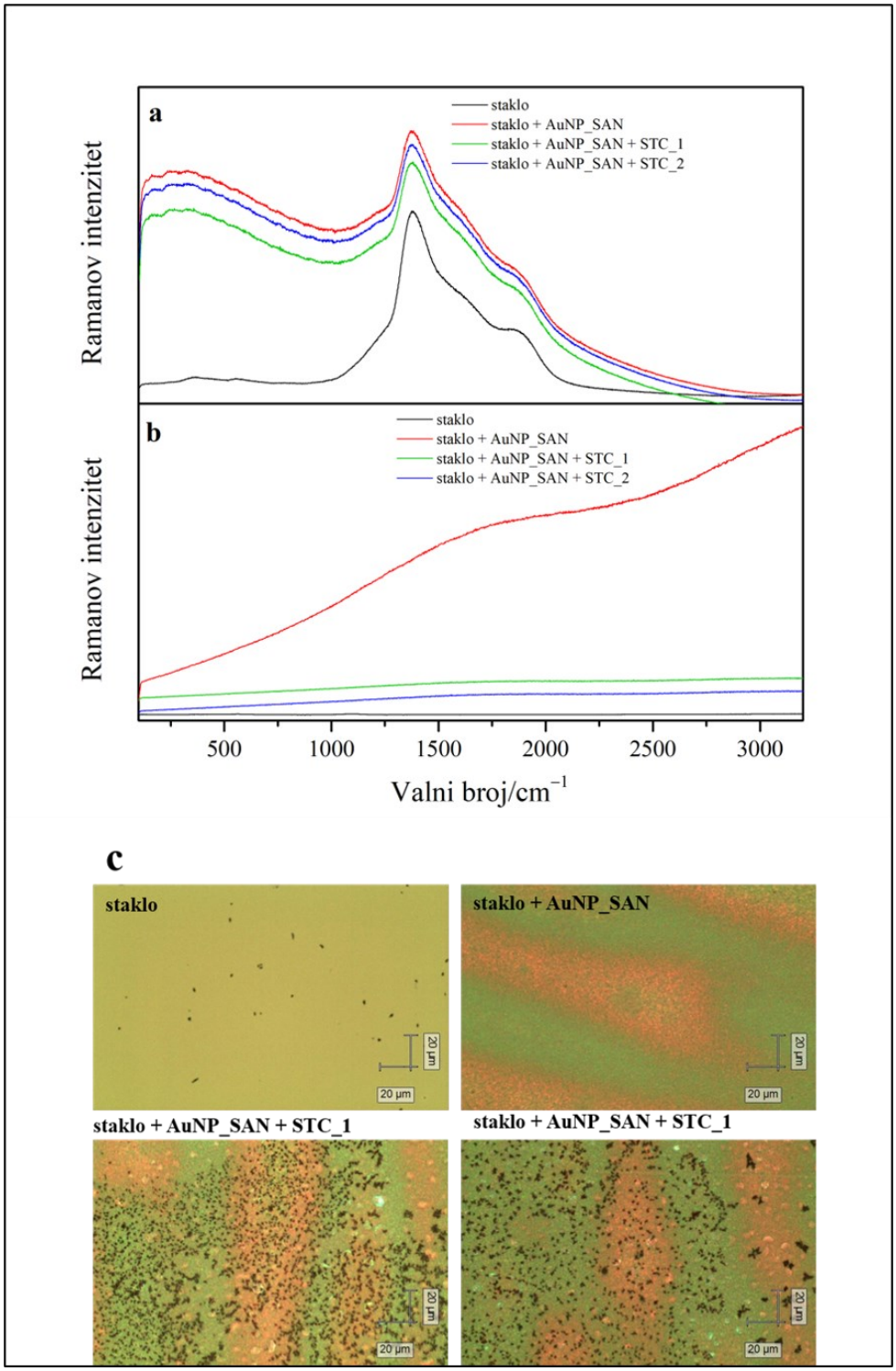


Slika 21. Ramanovi spektri stakla, čvrstog supstrata zlata na staklu s polimerom SAN te sasušene kapljice R6G ($c = 1\times10^{-5}$ mol L^{-1}) na dva različita mjesta na supstratu: a) valna duljina pobude 785 nm, snaga lasera 3 mW, b) valna duljina pobude 532 nm, snaga lasera 1 mW, i c) fotografije mjesta snimanja spektara. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

Istražena je prikladnost čvrstih supstrata zlata s polimerom PVP, odnosno SAN, kao SERS supstrata za sterigmatocistin. Pri tome su snimani Ramanovi spektri osušene kapi STC (c = 1,2×10^{-5} mol L^{-1}) na čvrstim supstratima zlata na staklu. U spektrima kapi STC, snimljenim pobudnim zračenjem pri 785 nm, dominira fotoluminescencija stakla te vibracijske vrpce spoja nisu uočene, neovisno o polimeru s kojim je pripravljen čvrsti supstrat zlata (slike 22.a i 23.a). Niti u spektrima snimljenim nakon pobude pri 532 nm, nisu opažene vibracijske vrpce STC, već samo uzlazna bazna linija uslijed apsorpcije i raspršenja zračenja na imobiliziranim nanočesticama zlata (slike 22.b i 23.b). Iako je na fotografijama vidljiva kristalizacija STC na površini čvrstih supstrata zlata, u snimljenim spektrima nisu uočene promjene. Rezultati dovode do zaključka da ovako priređeni supstrati zlata nisu prikladni za SERS analizu STC.



Slika 22. Ramanovi spektri stakla, čvrstog supstrata zlata na staklu s polimerom PVP te sasušene kapljice STC (c = 1,2×10^{-3} mol L^{-1}) na dva različita mjesta na supstratu: a) valna duljina pobude 785 nm, snaga lasera 30 mW, b) valna duljina pobude 532 nm, snaga lasera 10 mW, i c) fotografije mjesta snimanja spektara. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

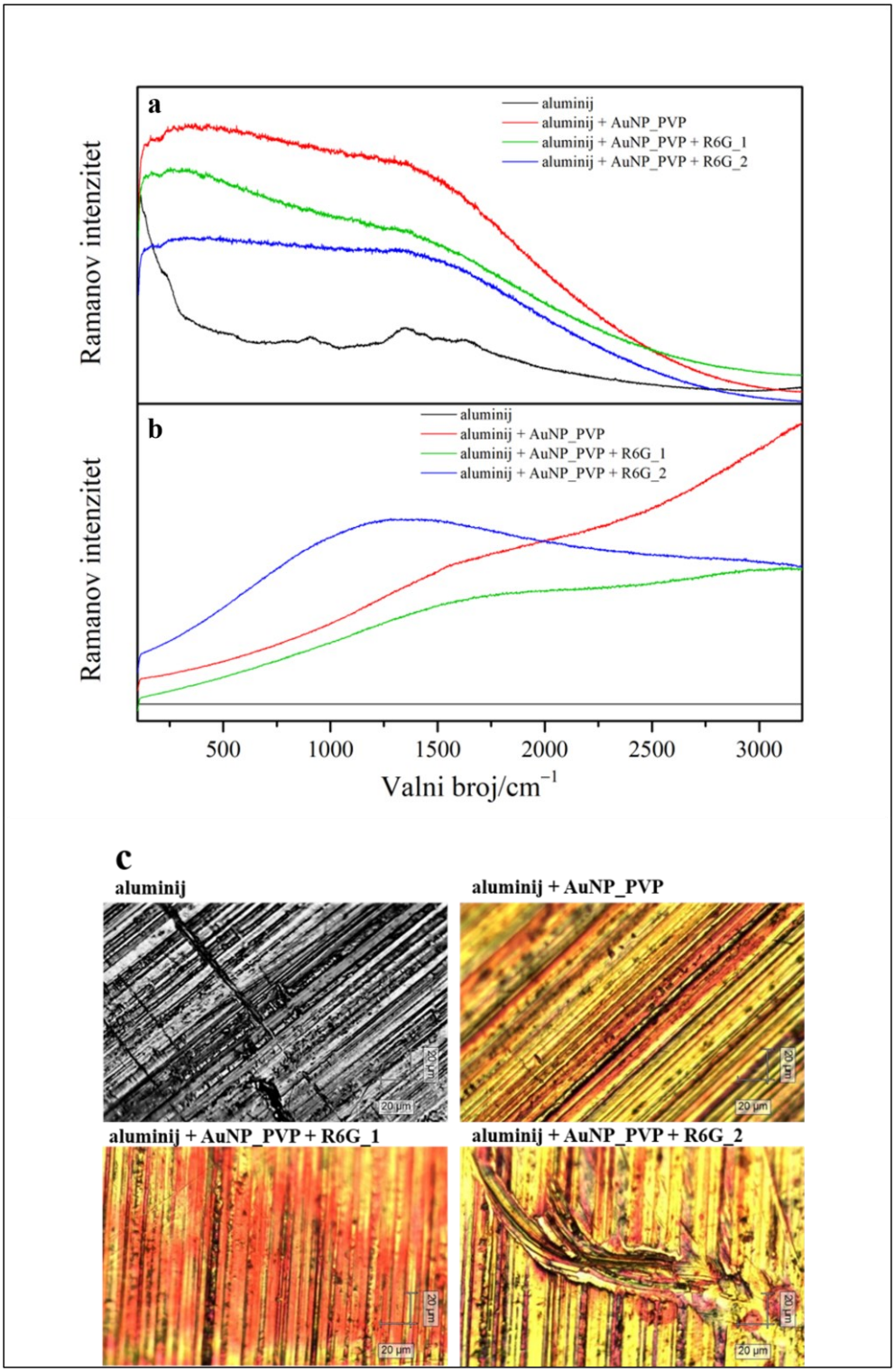


Slika 23. Ramanovi spektri stakla, čvrstog supstrata zlata na staklu s polimerom SAN te sasušene kapljice STC (c = 1,2×10^{-3} mol L^{-1}) na dva različita mjesta na supstratu: a) valna duljina pobude 785 nm, snaga lasera 30 mW, b) valna duljina pobude 532 nm, snaga lasera 10 mW, i c) fotografije mjesta snimanja spektara. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

4.2.4.2. Nanočestice zlata na nosaču od aluminija

Budući da u slučaju čvrstih supstrata zlata na staklu fotoluminescencija stakla interferira Ramanovom raspršenju prilikom snimanja spektara nakon pobude zračenjem 785 nm, potrebno je koristiti drugačiji materijal nosača. Stoga je kao potencijalni SERS supstrat istražen čvrsti supstrat zlata priređen „spiniranjem“ i žarenjem etanolne otopine $HAuCl_4$ i polimera PVP na aluminijskoj foliji.

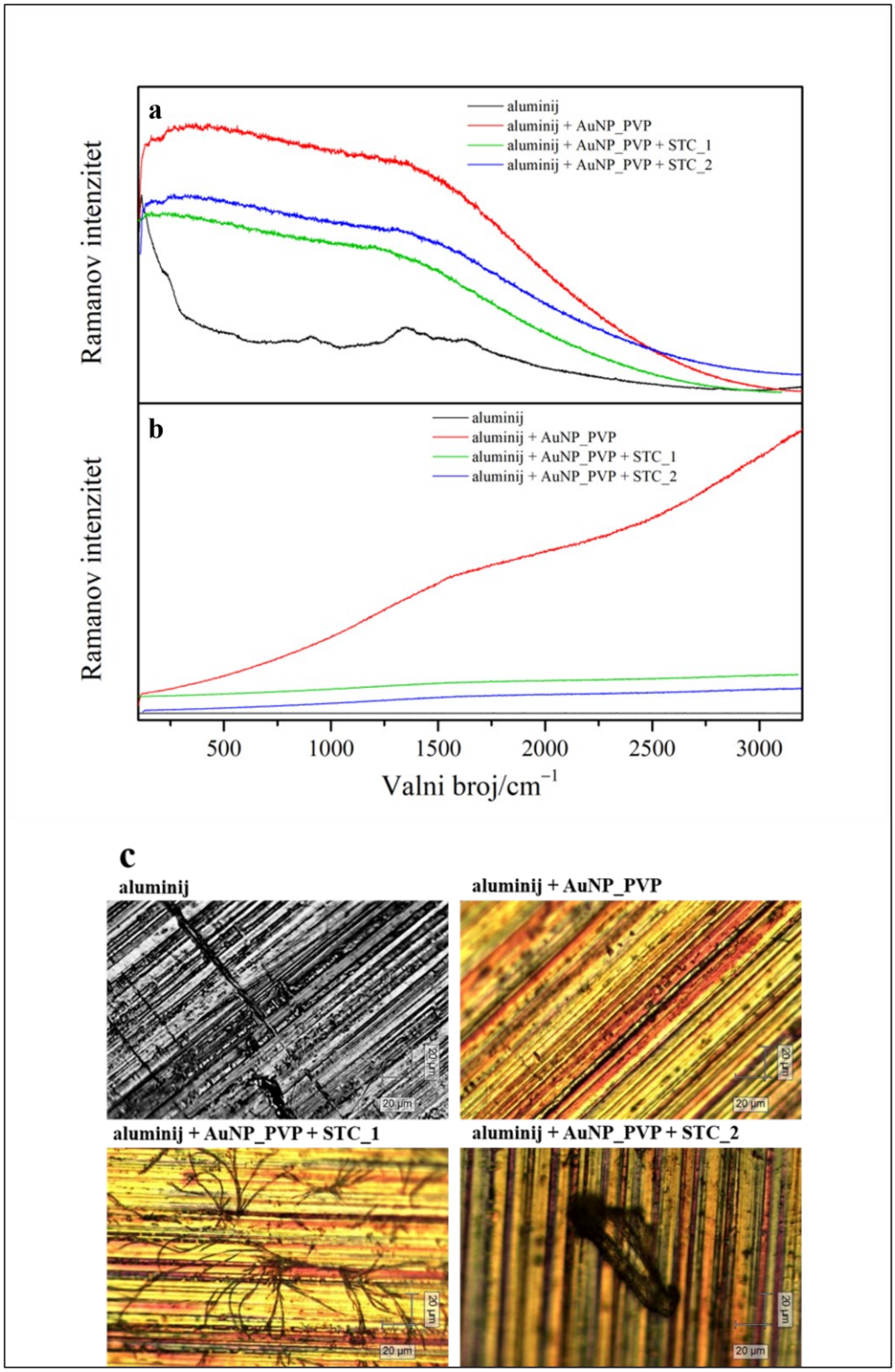
Snimljeni su Ramanovi spektri aluminijske folije, čvrstog supstrata zlata pripravljenog s polimerom PVP na aluminijskoj foliji i osušene kapi R6G ($c = 1\times10^{-5}$ mol L^{-1}) na dva različita mjesta na supstratu. Kao i u slučaju nanočestica zlata na nosaču od stakla, snimljene su fotografije mjesta na kojima je snimljen spektar. Ramanovi spektri čvrstog supstrata zlata na aluminiju, snimljeni nakon pobude zračenjem 532 nm i 785 nm, razlikuju se od spektara čistog aluminija (slika 24). Podignuta bazna linija u spektrima pri obje valne duljine pobude posljedica je apsorpcije i raspršenja zračenja na nanočesticama zlata. Spektri osušene kapi R6G razlikuju se po intenzitetu bazne linije, no vibracijske vrpce R6G nisu uočene. Na fotografijama snimljenim optičkim mikroskopom vidljivo je da površina aluminija nije potpuno glatka, već ju čine uzdužni žlijebovi, koji su posljedica proizvodnog procesa aluminijske folije. Na čvrstim supstratima zlata žlijebovi su obojani različitim nijansama žute, narančaste i crvene boje, što upućuje na nejednoliku raspodjelu nanočestica zlata na površini aluminijskog nosača. Nejednolika raspodjela nanočestica zlata i zadržavanje kapi u žlijebovima najvjerojatnije su uzrok različitog intenziteta spektara R6G, kojem zasigurno doprinosi i fluorescencija rodaminske boje prepoznatljiva u spektru nakon pobude Vis zračenjem (532 nm) na mjestu 2.



Slika 24. Ramanovi spektri aluminija, čvrstog supstrata zlata na aluminiju s polimerom PVP te sasušene kapljice R6G ($c = 1\times10^{-5}$ mol L^{-1}) na dva različita mjesta na supstratu: a) valna duljina pobude 785 nm, snaga lasera 3 mW, b) valna duljina pobude 532 nm, snaga lasera 0,0001 mW za spektar aluminija, snaga lasera 0,05 mW za ostale spektre, i c) fotografije mjesta snimanja spektara. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

Na isti način kao s R6G istražena je prikladnost čvrstog supstrata zlata na aluminijskom nosaču kao SERS supstrata za analizu sterigmatocistina. Jednako kao i u slučaju R6G, niti u jednom spektru osušene kapi STC (c = 1,2×10^{-3} mol L^{-1}) nisu uočene vrpce koje potječu od vibracija molekula analita (slika 25). Spektri STC snimljeni nakon pobude pri 785 nm odgovaraju onima R6G, što ukazuje da su posljedica apsorpcije i raspršenja zračenja na nanočesticama zlata imobiliziranim na aluminijskom nosaču, bez doprinosa optičkih svojstava analita. Međutim, za razliku od rodaminske boje, STC niti apsorbira pobudno zračenje pri 532 nm niti fluorescira, zbog čega odgovarajući spektralni motivi nisu opaženi u spektrima snimljenim nakon pobude Vis zračenjem. Iako su na fotografijama vidljive nitaste i kristalne strukture nastale sušenjem kapi STC, vibracijske vrpce molekula u spektrima nisu opažene.

Za pretpostaviti je da se molekule STC nisu niti adsorbirale niti kemijski vezale na površinu zlata, usprkos tome što se isparavanjem otapala na površini čvrstog supstrata smještaju bliže imobiliziranim nanočesticama zlata. Također je moguće da se nanočestice zlata u monosloju pripravljenom „spiniranjem“ otopine zlatnog prekursora i polimera te žarenjem, ne nalaze dovoljno blizu jedna drugoj za stvaranje SERS aktivnih „vrućih mjesta“ odgovornih za intenzivna pojačanja Ramanovog raspršenja.



Slika 25. Ramanovi spektri aluminija, čvrstog supstrata zlata na aluminiju s polimerom PVP te sasušene kapljice STC (c = 1,2×10^{-3} mol L^{-1}) na dva različita mjesta na supstratu: a) valna duljina pobude 785 nm, snaga lasera 3 mW, b) valna duljina pobude 532 nm, snaga lasera 0,0001 mW za spektar aluminija, snaga lasera 0,05 mW za ostale spektre, i c) fotografije mjesta snimanja spektara. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

§ 5. ZAKLJUČAK

U svrhu analize i detekcije sterigmatocistina spektroskopijom površinski pojačanog Ramanovog raspršenja istražena je primjena različitih supstrata temeljenih na nanočesticama zlata. Testirane su nanočestice zlata dispergirane u suspenziji i imobilizirane na čvrstim nosačima. Koloidna suspenzija sfernih nanočestica zlata pripravljena je kinetički kontroliranom redukcijom tetraklorozlatne(III) kiseline s trinatrijevim citratom te korištena svježa i agregirana otopinom amonijeva sulfata. Čvrsti supstrati zlata na nosačima od stakla i aluminija preuzeti su s Instituta Ruđer Bošković, gdje su pripravljeni tehnikom „spiniranja“ otopine koja je sadržavala zlatni prekursor $HAuCl_4$ i polimer polivinilpirolidon ili stiren akrilonitril te žarenjem. SERS učinkovitost pripravljenih supstrata istražena je s modelnom molekulom za SERS, rodaminom 6G, te je ispitana njihova prikladnost za analizu mikotoksina, sterigmatocistina.

Snimljeni su i asignirani Ramanovi spektri čvrstih uzoraka i otopina R6G i STC nakon pobude zračenjem 785 i 532 nm.

U suspenzijama nanočestica zlata opaženo je intenzivno pojačanje Ramanovog raspršenja R6G nakon pobude zračenjem 785 nm, dok je spektre snimljene pobudnim zračenjem 532 nm zasjenila fluorescencija rodaminske boje. Molekule R6G adsorbiraju se na nanočestice zlata uslijed privlačnih elektrostatskih interakcija između pozitivnog naboja u strukturi R6G i negativnog naboja stabilizirajućeg sloja citratnih iona na površini nanočestica. U koncentracijski ovisnim SERS spektrima nije opažena linearna promjena Ramanovog intenziteta s koncentracijom R6G, što je posljedica koncentracijski ovisne promjene orijentacije molekula na površini zlata. S obzirom da pozitivno nabijene molekule rodamina 6G same potiču agregaciju nanočestica i nastajanje SERS aktivnih „vrućih mjesta“, prisutnost agregirajuće soli u koloidnoj suspenziji nije utjecala na osjetljivost mjerenja.

U SERS spektrima mjernih uzoraka sterigmatocistina bez agregacijskog sredstva, snimljenim nakon pobude zračenjem 785 i 532 nm, nisu opažene vrpce STC, već vrpce metanola u kojem je pripravljena ishodna otopina STC, te vrpce citratnih iona i njihovih oksidacijskih ili razgradnih produkata zaostalih nakon sinteze na površini nanočestica zlata. Međutim, karakteristične vrpce STC vrlo slabog intenziteta uočene su u spektrima uzoraka najviših mjerenih koncentracija STC, agregiranih amonijevim sulfatom. S obzirom da su

molekule STC neutralne, izostaje elektrostatsko privlačenje s citratnim ionima na površini nanočestica zlata. Pri tome kemijske vrste na površini nanočestica dodatno otežavaju adsorpciju molekulama STC, stvarajući prostornu barijeru. Opaženo slabo Ramanovo raspršenje STC pripisuje se stoga iznimno jakim električnim poljima na SERS aktivnim „vrućim mjestima“ nastalim agregiranjem nanočestica zlata.

U spektrima čvrstih supstrata zlata na staklenoj podlozi, snimljenim nakon pobude zračenjem 785 nm, dominira fotoluminescencija stakla. Slabo Ramanovo raspršenje R6G uočeno je nakon pobude pri 532 nm, na supstratu zlata pripravljenom s hidrofobnijim polimerom, stiren akrilonitrilom, dok karakteristične vrpce STC nisu uočene u spektrima osušene kapi na čvrstom supstratu zlata na staklu neovisno o polimeru korištenom za pripravu supstrata. Pojačanje Ramanovog raspršenja nije opaženo niti za R6G niti za STC na nanočesticama zlata imobiliziranim na podlozi od aluminija, čemu je uzrok najvjerojatnije nejednolika i nedovoljno gusta raspodjela nanočestica.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AFB_1 – aflatoksin B_1

AFG_1 – aflatoksin G_1

APTMS – (3-aminopropil)trimetoksisilan

AuNP_cit – nanočestice zlata s površinskim slojem citratnih iona

ar – aromatsko

as – antisimetrična vibracija

δ – deformacijska vibracija

EFSA – Europska agencija za sigurnost hrane

ELISA – enzimoimunokemijska analiza

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

ip – u ravnini

IR – infracrveno zračenje

λ_{max} – valna duljina maksimalne apsorpcije

λ_{ex} – valna duljina pobudnog zračenja

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

ν – vibracija istezanja

NIR – blisko infracrveno zračenje

MPTMS – (3-merkaptopropil)trimetoksisilan

oop – izvan ravnine

PVP – polivinilpirolidon

R6G – rodamin 6G

s – simetrična vibracija

SAN – stiren akrilonitril

SERS – površinski pojačano Ramanovo raspršenje

STC – sterigmatocistin

UV – ultraljubičasto zračenje

Vis – vidljivo zračenje

xr – ksanten

§ 7. LITERATURNI IZVORI

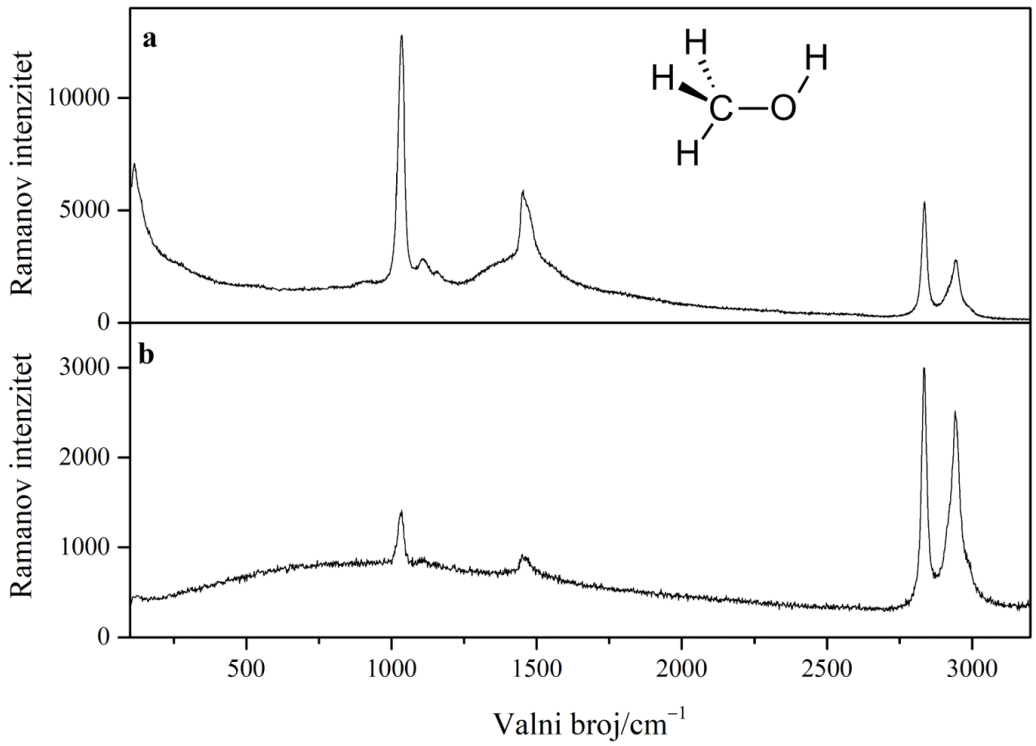
1. X. Wu, S. Gao, J.-S. Wang, H. Wang, Y.-W- Huang, Y. Zhao, *Analyst* **137** (2012) 4226–4234.
2. S. Schückler, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2011.
3. B. P. Kafle, *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry*, Elsevier, 2019, str. 245−260.
4. R. L. McCreery, *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, Wiley-Interscience, Columbus, 2000.
5. https://www.stjapan.de/accessories-1/raman-sers-substrates/ (datum pristupa 28. travnja 2021).
6. E. Le Ru, P. Etchegoin, *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects*, Elsevier, Oxford, 2009.
7. L. A. Dick, A. J. Haes i R. P. Van Duyne, *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) 11752−11762.
8. E. Smith, G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy – A Practial Approach*, John Wiley & Sons, Chichester, 2005.
9. P. A. Mosier-Boss, *Nanomaterials* **7** (2017) 142–171.
10. M. Bouloudenine, M. Bououdina, *Emerging Research on Bioinspired Materials Engineering*, IGI Global, 2016., 35–68.
11. S. Miljanić, A. Dijanošić, Z. Meić, *Spectrochimica Acta Part A* **75** (2010) 1008–1012.
12. T. Vosgröne, A. J. Meixner, *Journal of Luminescence* **107** (2004) 13–20.
13. C. H. D. Nieto, A. M. Granero, M. A. Zon, H. Fernández, *Food Chem. Toxicol.* **118** (2018) 460–470.
14. T. Lešić, I. Kmetič, M. Kiš, A. Vulić. N. Kudumija, M. Zadravec, T. Murati, J. Pleadin, *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **14** (2019) 105−112.
15. V. Zingales, M. Fernández-Franzón, M.-J. Ruiz, *Food and Chemical Toxicology* **146** (2020) 11180–111815.
16. J. Singh, A. Mehta, *Food Sci Nutr.* (2020) 1–22.
17. Q. Li, Z. Lu, X. Tan, X. Xiao, P. Wang, L. Wu, K. Shao, W. Yin, H. Han, *Biosens. Bioelectron.* **97** (2017) 59−64.

18. Y. Yuan, N. Panwar, S. H. K. Yap, Q. Wu, S. Zeng, J. Xu, S. C. Tjin, J. Song, J. Qu, K. T. Yong, *Coord. Chem. Rev.* **337** (2017) 1−33.
19. Z. Ye, C. Li, Y. Xu, S. Bell, *Analyst.* **144** (2019) 448–455.
20. N. G. Bastús, J. Comenge, V. Puntes, Langmuir **27** (2013) 11098–11105.
21. C. Gu, S.-Q. Man, J. Tang, Z. Zhao, Z. Liu, Z. Zheng, *Optik* **221** (2020) 165274–165282.
22. R. Das, A. Chanda, *Fabrication and Properties of Spin-Coated Polymer Films*, Springer, 2016., 287.
23. D. A. Hinckley, P. G. Seybold, D. P. Borris, *Spectrochimica Acta* **42A** (1986) 747–754.
24. C. Wu, E. Chen, J. Wei, *Colloids and Surfaces A: Physiochem. Eng. Aspects* **506** (2016) 450–456.
25. H. Vaskova, *Int. J. Biol. Biomed.* **8** (2014) 27–34.
26. M. Mabuchi, T. Takenaka, Y. Fujiyoshi, N. Uyeda, *Surface Science* **119** (1982) 150–158.
27. S. Sánchez-Corteś, J. V. García-Ramos, *J. Raman Spectrosc.* **29** (1998) 365–371.
28. P. Venkateswarlu, H. D. Bist, Y. S. Jain, *J. Raman Spectrosc.* **3** (1875) 141–151.
29. N. R. Yaffe, E. W. Blanch, *Vibrational Spectroscopy* **48** (2008) 196–201.
30. D. Jakšić, M. Šegvić Klarić, I. Crnolatac, N. Š. Vujičić, V. Smrečki, M. Górecki, G. Pescitelli, I. Piantanida, *Mar. Drugs* **17** (2019) 629–646.
31. D. Tuschel, *Spectroscopy* **31** (2016) 14–23.

§ 8. DODATAK

Tablica D1. Očekivana veličina sintetiziranih nanočestica zlata po generacijama uz pripadajuće valne duljine plazmonske rezonancije.[20]

Generacija AuNP_cit	Veličina nanočestica / nm	λ (plazmonska rezonancija) / nm
g0 (sjeme)	10,0 ± 1,0	518
g1	17,6 ± 1,2	521,5
g2	22,3 ± 2,2	523,5
g3	31,1 ± 2,8	525,5
g4	36,0 ± 2,4	527,5
g5	42,2 ± 2,3	530,5
g6	54,4 ± 3,3	535
g7	64,8 ± 3,4	540
g8	69,3 ± 4,5	542,5
g9	80,1 ± 5,4	546,5
g10	96,1 ± 5,6	555,5



Slika D1. Ramanovi spektri metanola snimljeni pri valnoj duljini pobude: a) 785 nm, snaga lasera 30 mW, i b) 532 nm, snaga lasera 1 mW.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Petra Petrović

Datum rođenja: 27. studenog 1994.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2001–2009	Osnovna škola Dobriše Cesarića, Zagreb
2009–2013	Srednja škola Zdravstveno učilište, smjer farmaceutski tehničar, Zagreb
2013–2019	Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
2019–	Diplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2014–2017	Otvoreni dan Kemijskog odsjeka
2014–2015	Volontiranje u studentskoj udruzi *Primus*
2016	Čarolije u kemiji, radionica