

Nanočestice srebra i zlata na silaniziranom staklu kao čvrsti supstrati u SERS spektroskopiji

Ratkajec, Anastazija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:154799>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-10**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Anastazija Ratkajec

NANOČESTICE SREBRA I ZLATA NA SILANIZIRANOM STAKLU KAO ČVRSTI SUPSTRATI U SERS SPEKTROSKOPIJI

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2022.

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

Zahvale

Voljela bih se za početak beskonačno zahvaliti mentorici doc. dr. sc. Adriani Kendel koja je u svakom aspektu, profesionalnom i privatnom, osoba od divljenja. Za svo uloženo vrijeme, razumijevanje, trud, stručnost ali i prijateljstvo, te podršku tijekom moje zaključne akademske faze, od srca hvala.

Također, ovim putem želim izraziti zahvalu svim profesorima, docentima, asistentima i tehničarima na studiju koji su svojom voljom i radom sudjelovali u nesebičnom pružanju znanja i vještina.

Veliko hvala kolegama i životnim prijateljima stečenim na ovom uzbudljivom akademskom putu.

Na mentorstvu, „vjeri u Anastaziju i njenu ludu glavu“ i egzemplarnom prijateljstvu upućujem zahvalu najdražem kompanjerosu Josipu. Za buduće uspjehe!

Kika, Mel, Kata i Iva zaslužuju aplauz za bezbroj „sačuvanih mjesta“, dogodovština i situacija gdje su nam se male ruke složile, te prijateljstvo pruženo tijekom zajedničkog studija. Zauvijek ćete ostati dio mene!

Filipu želim zahvaliti na svim manifestiranim valovima pozitivne energije (~), na svakom tradicionalnom petku sa slikom Fenriz-a te svim zajedničkim trenucima provedenim uz najjači humor i najbolju glazbu.

(insert picture of Komodo dragon)

Bušljeti ovim putem zahvaljujem na ekspertizi u područjima kemije gdje sam „slabija“, svim neprespavanim noćima u Rijeci, nezaboravnim ručcima/večerama, izlascima i smijehu na ovom PMF-ovskom kemičarskom putu.

Na iskustvima i poukama koje me čine boljom osobom veliko hvala svim izvanrednim prijateljima s razmjene u Poljskoj i istraživačkog projekta u Portugalu.

Najboljoj prijateljici, susjedi udaljenoj tri kuće i dvije njive, curi koja je uz mene od samog početka želim masovno zahvaliti na strpljenju, razgovoru, razumijevanju i pouzdanosti, svakom usponu i padu te pruženoj sreći i radosti. Tihano, hvala na svemu!

Osobi bez koje ne bih bila ono što danas jesam. Osobi koja je definirala riječi „pravi prijatelj“, povjerenje i kompatibilnost. Osobi koja mi je pokazala što je ljubav. Zahvalu koju osjećam prema tebi, Valentino, nije moguće ljudski opisati, objasniti niti prenijeti, no svejedno BESKRAJNO HVALA! Sve već znaš.

Zahvaljujem roditeljima na neizmjerne podršci i strpljenju tijekom čitavog mog obrazovnog puta. Vi ste kao oslonac bili presudan faktor u cijeloj ovoj priči. Ovim putem također upućujem zahvalu svim ostalim članovima obitelji koji su navijali, vjerovali i mislili na mene u dalekom Zagrebu.

Šećeru na kraju koji se zove Patrik, a iz milja ga zovem bro.

Even with the often occurring physical distance between us, I know from the bottom of my heart that you will always be there for me anytime I need you. Among the many gifts my family gave me, the most precious one was you, an irreplaceable lill' piece of my life. Thank you for making me a big sis to the best brother imaginable. The bond between you and me is the world's most strongest one, and this is coming from a chemist.

Love you brother. ♡

Sadržaj

| | |
|---|-----------|
| SAŽETAK..... | IX |
| ABSTRACT | XI |
| § 1. UVOD..... | 1 |
| § 2. LITERATURNI PREGLED | 3 |
| 2.1. Ramanova spektroskopija | 3 |
| 2.2. Površinski pojačano Ramanovo raspršenje | 5 |
| 2.2.1. <i>Mehanizmi pojačanja</i> | <i>6</i> |
| 2.2.2. <i>Metalni supstrati</i> | <i>8</i> |
| 2.3. Modelne molekule | 11 |
| 2.3.1. <i>Metilensko modrilo</i> | <i>12</i> |
| 2.3.2. <i>4-aminotiofenol.....</i> | <i>13</i> |
| § 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 15 |
| 3.1. Kemikalije..... | 15 |
| 3.2. Priprava otopina modelnih molekula | 15 |
| 3.3. Priprava koloida..... | 16 |
| 3.3.1. <i>Koloidna suspenzija srebra.....</i> | <i>16</i> |
| 3.3.2. <i>Koloidna suspenzija zlata.....</i> | <i>16</i> |
| 3.4. Priprava silaniziranog stakla | 16 |
| 3.5. Priprava uzoraka za mjerenje..... | 17 |
| 3.5.1. <i>Priprava mjernih uzoraka u koloidnim suspenzijama</i> | <i>17</i> |
| 3.5.2. <i>Priprava mjernih uzoraka na silaniziranim staklima</i> | <i>18</i> |
| 3.6. Priprava uzoraka za određivanje reproducibilnosti..... | 18 |
| 3.7. Mjerni uređaji | 19 |
| § 4. REZULTATI I RASPRAVA | 20 |
| 4.1. Ramanovi spektri modelnih molekula | 20 |
| 4.1.1. <i>Metilensko modrilo</i> | <i>20</i> |
| 4.1.2. <i>4-aminotiofenol.....</i> | <i>23</i> |
| 4.2. Nanočestice srebra | 26 |
| 4.2.1. <i>Karakterizacija koloidne suspenzije srebra.....</i> | <i>26</i> |
| 4.2.2. <i>Koncentracijski ovisni SERS spektri u koloidnoj suspenziji srebra</i> | <i>28</i> |
| 4.3. Nanočestice zlata | 37 |
| 4.3.1. <i>Karakterizacija koloidne suspenzije zlata</i> | <i>37</i> |

| | |
|--|------------|
| 4.3.2. Koncentracijski ovisni SERS spektri u koloidu zlata | 38 |
| 4.4. Koncentracijski ovisni SERS spektri na čvrstim supstratima | 48 |
| 4.4.1. Silanizirano staklo s nanočesticama srebra | 48 |
| 4.4.2. Silanizirano staklo s nanočesticama zlata..... | 55 |
| 4.5. Reproducibilnost | 61 |
| § 5. ZAKLJUČAK | 65 |
| § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA..... | 67 |
| § 7. LITERATURNI IZVORI..... | 68 |
| § 8. DODATAK | XV |
| § 9. ŽIVOTOPIS | XIX |



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

NANOČESTICE SREBRA I ZLATA NA SILANIZIRANOM STAKLU KAO ČVRSTI SUPSTRATI U SERS SPEKROSKOPIJI

Anastazija Ratkajec

Istražena je SERS učinkovitost nanočestica srebra i zlata imobiliziranih na staklu silaniziranom (3-aminopropil)trimetoksisilanom, odnosno (3-merkaptopropil)trimetoksisilanom. Korištene nanočestice srebra i zlata pripremljene su redukcijom srebrova(I) nitrata hidroksilamin-hidrokloridom, odnosno tetraklorozlatne(III) kiseline trinatrijevim citratom te je nastalim koloidima određena SERS aktivnost. Kao modelne molekule odabrani su metilensko modriilo (**MetB**) i 4-aminotiofenol (**PATF**) čiji su koncentracijski ovisni SERS spektri snimljeni pri valnim duljinama pobude 532 i 785 nm na svim priređenim SERS supstratima. U koloidu srebra, kod obje valne duljine pobude, molekule **MetB** adsorbiraju se na metal središnjim fenotiazinskim sustavom, vezujući se preko atoma dušika. Uočeno je da u koloidu srebra molekule **PATF** nakon pobude pri 532 nm katalitički dimeriziraju u 4,4'-dimerkaptoazobenzen, dok se kod pobude pri 785 nm uočava smjesa monomera i dimera u spektru. Pri pobudi od 785 nm u koloidu zlata opažene su spektralne promjene pri nižim koncentracijama **MetB** koje upućuju na promjenu orijentacije molekula na površini i vezanje na površinu zlata preko atoma sumpora. U odnosu na koloidne suspenzije, nanočestice srebra i zlata imobilizirane na silaniziranom staklu nisu se pokazale reproducibilnim supstratima zbog neravnomjerne raspodjele nanočestica metala na površini stakla i samo otopine najvećih koncentracija daju vrpce u SERS spektrima.

(xix + 68 stranica, 40 slika, 9 tablica, 53 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: metilensko modriilo, nanočestice, SERS, srebro, zlato, 4-aminotiofenol

Mentor: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Ocjenitelji:

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

Datum diplomskog ispita: 26. rujna 2022.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

SILVER AND GOLD NANOPARTICLES ON SILANIZED GLASS AS SOLID SUBSTRATES IN SERS SPECTROSCOPY

Anastazija Ratkajec

The SERS efficiency of silver and gold nanoparticles immobilized on glass silanized with (3-aminopropyl)trimethoxysilane and (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane was investigated. Nanoparticles were prepared by reducing silver(I) nitrate with hydroxylamine hydrochloride, and tetrachloroauric(III) acid with trisodium citrate, respectively. For the prepared colloids the SERS activity was determined, as well. Methylene blue (**MetB**) and 4-aminothiophenol (**PATF**) were used as model molecules, whose concentration-dependent SERS spectra were recorded at excitation of 532 and 785 nm. In colloidal silver, **MetB** molecules were adsorbed on metal by the central phenothiazine system, binding through the nitrogen atom. In silver colloid **PATF** molecules catalytically dimerize into 4,4'-dimercaptoazobenzene after excitation at 532 nm, while spectra obtained from 785 nm showed a mixture of monomers and dimers. Using the excitation of 785 nm in the gold colloid, spectral changes were observed at lower concentrations of **MetB**, indicating orientation changes on the surface and binding to the gold surface via sulphur atoms. Compared to nanoparticles in colloidal suspensions, silver and gold nanoparticles immobilized on silanized glass did not prove to be reproducible substrates due to the uneven distribution of metal nanoparticles on the glass surface, therefore only solutions of the highest concentrations gave bands in SERS spectra.

(xix + 68 pages, 40 figures, 9 tables, 53 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: gold, methylene blue, nanoparticles, SERS, silver, 4-aminothiophenol

Mentor: Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor
 2. Dr. Željka Soldin, Professor
 3. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Snežana Miljanić, Professor

Date of exam: 26 September 2022

Anastazija Ratkajec

Diplomski rad

§ 1. UVOD

U Ramanovoj spektroskopiji laserska zraka pada izravno na uzorak te se upadno zračenje raspršuje uslijed interakcija s elektronskim oblakom molekula analita. Neelastično raspršeno zračenje se prikuplja, i nakon obrade dobiva se Ramanov spektar koji pruža kemijske i strukturne informacije o promatranoj molekuli.¹ Nedestruktivna priroda tehnike, selektivnost i mogućnost snimanja u vodenim otopinama čine Ramanovu spektroskopiju korisnom analitičkom metodom za kvalitativna i kvantitativna istraživanja organskih, anorganskih i bioloških sustava. Međutim, desetljećima je Ramanova spektroskopija bila nedovoljno iskorištena tehnika zbog slabije osjetljivosti te interferencija u spektru uzrokovanih fluorescencijom, koja ovisi o prirodi molekule analita i korištenoj valnoj duljini pobude. Kako bi se umanjili ili uklonili navedeni nedostaci metode, koriste se različite tehnike, a jedna od njih je i spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (engl. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS). U SERS tehnici molekule se smještaju na hrapavu površinu metala (obično srebro ili zlato) ili vrlo blizu nje pri čemu se intenzitet raspršenja zračenja pojačava i do 10^{13} u odnosu na klasičnu Ramanovu spektroskopiju.^{1,2,23} Način pripreme SERS supstrata intenzivno se istražuje u posljednja dva desetljeća s obzirom da je optimalan SERS supstrat od ključne važnosti za intenzivno pojačanje Ramanovog raspršenja za molekule analita.

Cilj diplomskog rada bio je pripremiti čvrste SERS supstrate u kojima su nanočestice srebra i zlata imobilizirane na silaniziranom staklu. Nanočestice su pripravljene u obliku koloida redukcijom srebrova(I) nitrata hidroksilamin-hidrokloridom, odnosno redukcijom tetraklorozlatne(III) kiseline trinatrijevim citratom. Pripremljenim nanočesticama srebra i zlata ispitana je SERS aktivnost kada se nalaze dispergirane u koloidnoj suspenziji, nakon čega su imobilizirane na prethodno silanizirani stakleni nosač, u svrhu dobivanja čvrstog SERS supstrata. Snimanjem koncentracijski ovisnih SERS spektara odabranih modelnih molekula na čvrstim supstratima ispitana je njihova primjenjivost kao supstrata za pojačanje Ramanovog raspršenja. Spektri modelnih molekula na čvrstim supstratima uspoređeni su sa spektrima dobivenim u koloidnim suspenzijama, kako bi se utvrdilo da li imobilizacija nanočestica doprinosi povećanju SERS aktivnosti supstrata.

Kao modelne molekule za ispitivanje SERS aktivnosti supstrata korišteno je metilensko modrilo i 4-aminotiofen. Obje molekule sadrže u svojoj strukturi atome sumpora i dušika kao

sastavne dijelove različitih funkcijskih skupina, što ih čini dobrim kandidatima za provjeru načina vezanja molekula na različite metale u odabranim metalnim supstratima.

Sva mjerenja provedena su uporabom pobudnog laserskog zračenja pri 532 i 785 nm. Za svaki supstrat istražena je reproducibilnost supstrata i određena granica detekcije. Opaženi SERS spektri modelnih molekula na različitim supstratima detaljno su analizirani i interpretirani te međusobno uspoređeni s obzirom na valnu duljinu zračenja i prirodu korištenog metala u SERS supstratu, kao i utjecaj korištenog supstrata na pojačanje Ramanovog raspršenja modelnih molekula.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Ramanova spektroskopija

Ramanova spektroskopija je metoda vibracijske spektroskopije koja daje informaciju o strukturi molekula analita. Metoda se temelji na detekciji neelastičnog raspršenja upadnog monokromatskog zračenja nakon interakcije zračenja s molekulom analita, pri čemu dolazi do promjene polarizabilnosti određenih vibracija molekule.¹⁻⁴

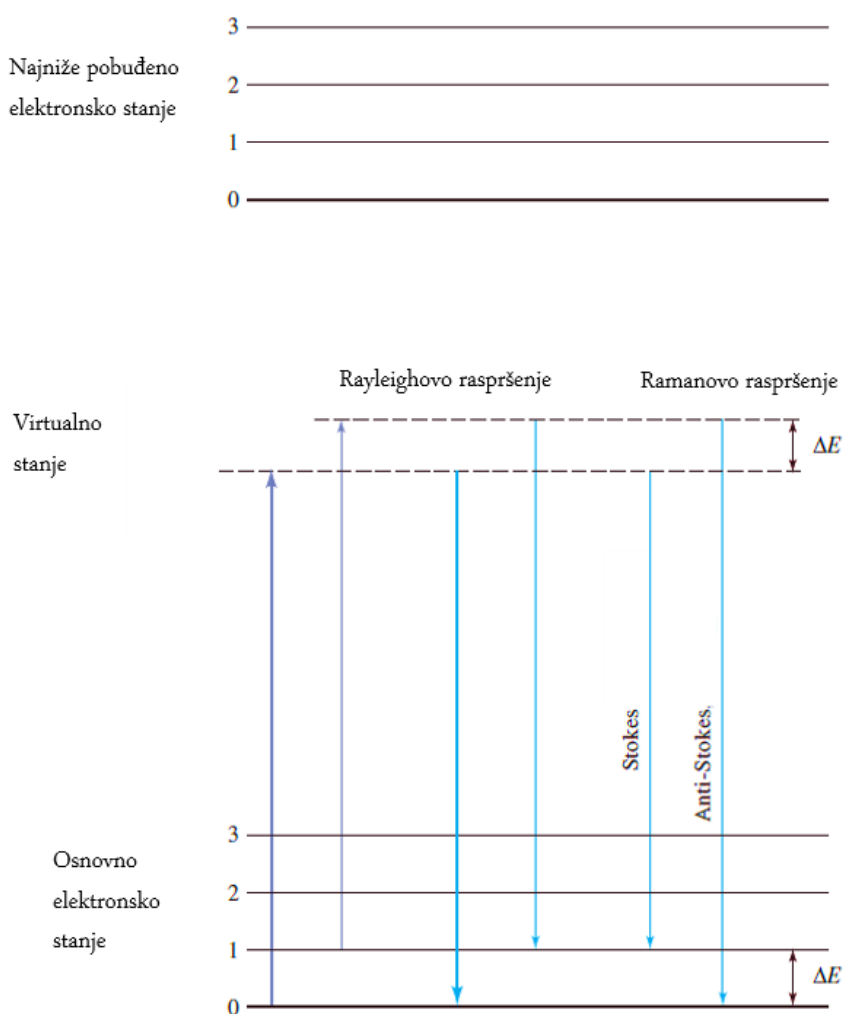
Usljed interakcije elektromagnetskog zračenje i materije, fotoni mogu proći kroz tvar, apsorbirati se ili raspršiti. Ukoliko energija upadnog fotona odgovara energijskoj razlici osnovnog stanja i pobuđenog stanja molekule, foton se može apsorbirati i molekula prelazi u pobuđeno stanje više energije. Spomenuta promjena (gubitak energije pobudnog zračenja) se određuje apsorpcijskom spektroskopijom.

Kod raspršenja, energija upadnog fotona ne treba odgovarati razlici energije između dvije energijske razine molekule, stoga se u Ramanovoj spektroskopiji kao pobuda koristi elektromagnetsko zračenje jedne frekvencije tj. monokromatsko zračenje u ultraljubičastom (UV), vidljivom (Vis) i bliskom infracrvenom (NIR) dijelu elektromagnetskog spektra.

Tijekom Ramanovog raspršenja elektromagnetsko zračenje interagirira s molekulom i iskrivljuje (polarizira) elektronski oblak oko atomskih jezgri, rezultirajući stvaranjem nestabilnog, visokoenergetskog i kratkotrajnog oblika molekule s promijenjenom elektronskom geometrijom, koja zatim oslobađa svjetlost u obliku raspršenog zračenja. Novonastalo kratkoživuće energijsko stanje naziva se virtualno stanje jer njegova energija ne odgovara niti jednom stvarnom energijskom stanju molekule i ovisi isključivo o frekvenciji korištenog lasera.

Razlikujemo dvije vrste raspršenja: elastično ili Rayleighovo raspršenje, te neelastično ili Ramanovo raspršenje. Najintenzivniji i najzastupljeniji oblik raspršenja, Rayleighovo raspršenje, pojavljuje se kada se oblak elektrona opusti bez nuklearnog kretanja unutar molekule. Radi se o elastičnom procesu gdje nema značajne promjene energije jer se molekula nakon pobude u virtualno stanje vraća u izvorno energijsko stanje i posljedično emitira zračenje vrlo slično energiji pobudnog zračenja. S druge strane, Ramanovo raspršenje je mnogo rjeđi i intenzitetom slabiji događaj koji uključuje samo jedan od 10^6 – 10^8 raspršenih fotona. Kod

Ramanovog raspršenja, u trenutku interakcije zračenja i elektrona, započinje i gibanje jezgara. Budući da su jezgre daleko teže od elektrona, dolazi do značajne promjene ukupne energije molekule prema nižoj ili višoj vrijednosti, ovisno o tome započinje li proces uz molekulu u osnovnom vibracijskom stanju (Stokesovo raspršenje) ili molekulu u pobuđenom vibracijskom stanju (anti-Stokesovo raspršenje). Tijekom Stokesovog raspršenja molekula se ne vraća u početno osnovno stanje nego u više vibracijsko stanje pa je raspršeno zračenje niže energije od upadnog zračenja. Nakon pobude iz vibracijskog višeg stanja, tijekom anti-Stokesovog raspršenja molekula se relaksira u vibracijsko stanje niže energije od početnog emitiranjem zračenja veće energije u odnosu na pobudno (slika 1).²⁻⁵



Slika 1. Shematski prikaz procesa raspršenja zračenja

Ramanova spektroskopija promatra promjenu energije između upadnih i raspršenih fotona povezanih sa Stokesovim i anti-Stokesovim prijelazima. To se obično izražava kao razlika valnih brojeva (Δcm^{-1}), stoga su mjerenja provedena korištenjem izvora zračenja različitih valnih duljina usporediva, dajući tako na svestranosti dizajnu i primjenjivosti Ramanovih instrumenata.

Kvantno mehanički, Stokesov i anti-Stokesov prijelaz su jednako vjerojatni procesi, no pri sobnoj temperaturi većina molekula nalazi se u osnovnom vibracijom stanju (Boltzmannova raspodjela), čime je Stokesovo raspršenje statistički vjerojatniji proces stoga su Stokesove vrpce intenzivnije u spektru i koriste se u uobičajenim analizama. U slučaju prekrivanja Stokesovog spektra fluorescencijom uzorka izazvanom pobudnim zračenjem u vidljivom području preferira se anti-Stokesov spektar. No, spektralna informacija ostaje ista neovisno o analiziranom raspršenju.¹⁻⁴

Ramanovo raspršenje se događa uslijed vibracija koje mijenjaju polarizabilnost molekule, pa simetrične vibracije funkcijskih supina bogatih elektronima uzrokuju najveće Ramanovo raspršenje, a vrpce koje im odgovaraju su najintenzivnije u spektrima.^{2,3} Ramanova spektroskopija je komplementarna metoda infracrvenoj spektroskopiji. No, s obzirom na drugačija izborna pravila, vrpce odgovarajućih vibracija, koje su intenzivne u Ramanovom spektru, bit će slabije u infracrvenom spektru i obrnuto. Za molekule s centrom simetrije vrijedi pravilo međusobnog isključenja, koje kaže da niti jedna vibracija ne može biti aktiva i u infracrvenom i u Ramanovom spektru.

Ramanova spektroskopija je svestrana ne destruktivna kvalitativna i kvantitativna metoda koja zahtijeva minimalnu pripremu uzorka te se može koristiti u svrhu strukturne analize spojeva u čvrstom stanju i otopini. Najznačajniji nedostaci metode su slaba osjetljivost, što onemogućuje detekciju analita niskih koncentracija u otopinama, te interferencije uzrokovane fluorescencijom obojanih uzoraka. Iz tih se razloga razvijaju tehnike koje bi umanjile navedene nedostatke, a jedna od takvih je spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja.

2.2. Površinski pojačano Ramanovo raspršenje

Spektroskopijom površinski pojačanog Ramanovog raspršenja promatra se raspršenje molekula analita adsorbiranih na hrapavu površinu metala. 1974. godine Fleischmann i suradnici su prvi puta, sasvim slučajno, detektirali značajno pojačanje Ramanovog raspršenja piridina na

hrapavoj srebrovoj elektrodi.¹⁵ Autori su pretpostavili da hrapavost uzrokuje povećanje površine elektrode čime se omogućuje adsorpcija većeg broja molekula piridina, što rezultira višestrukim pojačanjem Ramanovog raspršenja. Tri godine kasnije dokazano je da je hrapavost površine metala zaslužna za uočeno pojačanje, no ne zbog povećanja površine i adsorpcije, da bi u konačnici 1978. godine Moskovits objavio rad u kojem pojačanje raspršenja pripisuje pobudi površinski lokaliziranih plazmona na hrapavoj metalnoj površini.¹⁶⁻¹⁹ Fenomen je postao poznat kao površinski pojačano Ramanovo raspršenje (SERS).

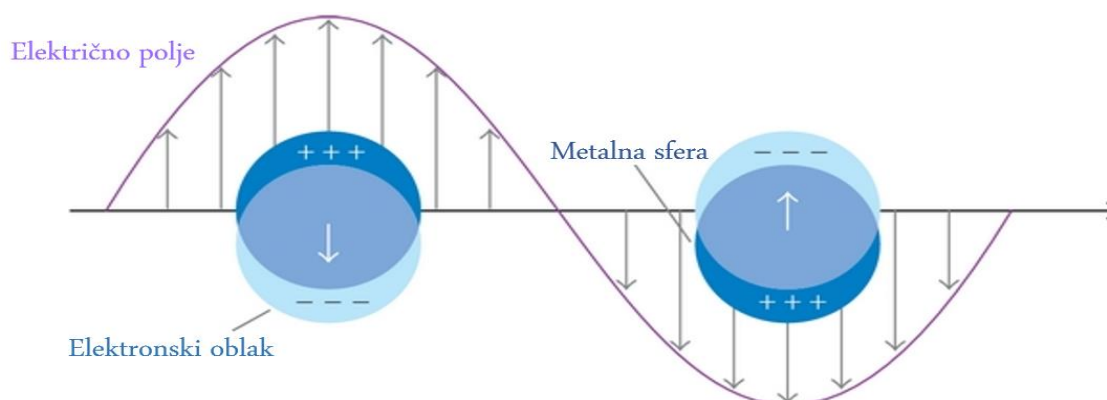
2.2.1. Mehanizmi pojačanja

Od otkrića SERS-a, mehanizam pojačanja Ramanovog raspršenja predmet je intenzivnog istraživanja i rasprave te se uglavnom opisuje pomoću dvije teorije¹ tj. mehanizma:

I. elektromagnetski mehanizam

II. kemijski mehanizam (mehanizam prijenosa naboja).

Površine metala prekrivene su vodljivim elektronima koji se mogu relativno slobodno gibati i stvaraju elektronski oblak uzduž površine metala. Elektromagnetski mehanizam pojačanja pojavljuje se uslijed značajne promjene lokalnog elektromagnetskog polja u blizini površine metala tijekom pobude elektromagnetskim zračenjem, a najizraženiji je ukoliko je metalna površina hrapava. Upadno elektromagnetsko zračenje pobuđuje i polarizira valentne elektrone na površini metalnih struktura čime dolazi do njihovog kolektivnog koherentnog osciliranja i stvaranja takozvanog površinskog plazmona. Do lokalizirane površinske plazmonske rezonancije (engl. *Localized Surface Plasmon Resonance*, LSPR) dolazi kada su titranja površinskih elektrona metala u rezonanciji s frekvencijom upadnog zračenja. Pri toj rezonantnoj frekvenciji najefikasnije se apsorbira i raspršuje upadno zračenje stvarajući snažno elektromagnetsko polje koje inducira vremenski ovisan dipol, odnosno promjenu polarizabilnosti u molekulama smještenim vrlo blizu površine metala. Rezultat je intenzivno pojačanje Ramanovog raspršenja (slika 2). Rezonantna frekvencija plazmona ovisi o gustoći slobodnih elektrona, vrsti metala i prirodni površine. Do najvećeg pojačanja raspršenja dolazi kada su oscilacije plazmona okomite na površinu metala, a to se najbolje ostvaruje upravo na hrapavim površinama. Stoga za analit adsorbiran i polariziran okomito na površinu metala očekujemo najintenzivnije Ramanove vrpce, dok vibracije u ravnini s metalnom površinom ne doprinose raspršenju.^{8,10,20}



Slika 2. Shematski prikaz lokalizirane površinske plazmonske rezonancije kao rezultat skupnih oscilacija delokaliziranih elektrona uslijed djelovanja vanjskog električnog polja

Elektromagnetsko pojačanje ne zahtijeva direktno vezanje analita na metalnu površinu nego udaljenost od 1 – 10 nm od supstrata, dakle radi se o dalekosežnom efektu koji je neosjetljiv na kemijsku prirodu analizirane molekule.

Ukoliko bi pojačanje raspršenja bilo posljedica samo elektromagnetskog mehanizma, efekt pojačanja trebao bi biti neovisan o kemijskoj prirodi adsorbiranih molekula, s obzirom da kemijska struktura analita nije definirana u elektromagnetskom modelu. No, pojava novih vrpci u SERS spektrima upućuje na postojanje i drugog mehanizam koji pretpostavlja stvaranje kemijske veze između analita i površine metalnog supstrata čime se mijenja polarizabilnost slobodne molekule. To je mehanizam kemijskog pojačanja tj. mehanizam prijenosa naboja gdje interakcijom upadnog zračenja i metalnog supstrata dolazi do izbijanja elektrona te nastanka takozvane „šupljine“. Izbijeni elektron prelazi na analit gdje se nakon kratkog zadržavanja ponovno vraća u metal. Molekula je ovim putem pobuđena u virtualno stanje, te se vraća u više vibracijsko stanje osnovnog elektronskog stanja što rezultira raspršenjem zračenja. Prijenos naboja omogućen je preklapanjem metalnih i molekulskih elektronskih valnih funkcija, dakle govorimo o mehanizmu kratkog doseg jer molekule moraju biti kemisorbirane na metalnu površinu. Prema tome, radi se o efektu 'prvog sloja' jer isključivo molekule vezane direktno na površinu supstrata (0,1 – 0,5 nm od površine) sudjeluju u kemijskom pojačanju. Važno je uočiti

da za razliku od elektromagnetskog mehanizma, kemijski mehanizam ovisi o prirodi molekule, odnosno njezinim strukturnim i elektronskim svojstvima.^{1,8,9}

Kao dominantni mehanizam smatra se elektromagnetski mehanizam, no mehanizam prijenosa naboja ne može se zanemariti jer daje faktor pojačanja do 10^2 puta u odnosu na klasično Ramanovo raspršenje. No, potpuni mehanizam pojačanja raspršenja Ramanovog zračenja još uvijek nije razjašnjen.

2.2.2. Metalni supstrati

Površinsko raspršenje opaža se primarno za molekule adsorbirane na hrapavoj površini metala, stoga je vrlo bitno odabrati odgovarajući metalni supstrat za SERS mjerenja. Značajke idealnog supstrata su visoka SERS aktivnost koja omogućava visoku osjetljivost, homogena raspodjela čestica koja osigurava jednoliko pojačanje uz što manja odstupanja, dobra stabilnost i reproducibilnost te čistoća. Konačno, proizvodnja SERS supstrata bi trebala biti jednostavna i jeftina. Nažalost, još uvijek ne postoji supstrat koji zadovoljava sve navedene uvjete pa se, ovisno o vrsti analize, primjenjuju supstrati odgovarajućih svojstava. Primjerice, ako je u fokusu određivanje molekula u tragovima, faktor pojačanja, odnosno SERS aktivnost supstrata je najbitnija značajka, dok je za kvantitativnu analizu bitna ponovljivost SERS mjerenja, odnosno reproducibilnost supstrata.²¹

U samim začetcima SERS-a, kao aktivni supstrati koristili su se koloidi zlata (Au), srebra (Ag) ili bakra (Cu) te folije/žice istih, koje su kemijski/elektrokemijski tretirani kako bi se stvorila aktivna hrapava površina. Plazmonske rezonantne frekvencije navedenih metala nalaze se u vidljivom i NIR dijelu spektra, a u navedenim područjima su i valne duljine pobudnog zračenja koje se koristi u Ramanovoj spektroskopiji. Sve do danas, srebro i zlato su ostali kao najčešće korišteni metali za pripravu SERS supstrata jer najintenzivnije raspršuju zračenje.

Kao SERS supstrati najčešće se koriste:

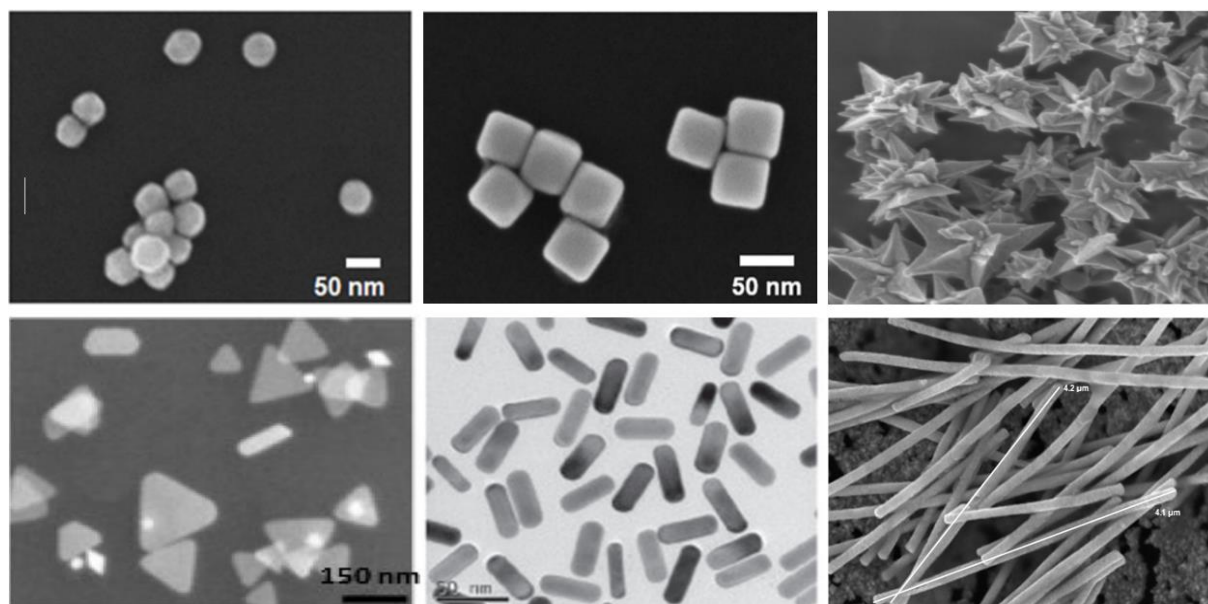
- (1) suspenzije metalnih nanočestica – koloidne suspenzije načinjene od uniformno dispergirane faze u disperznom mediju
- (2) metalne nanočestice imobilizirane na čvrstim podlogama – različito uređeni metalni filmovi
- (3) nanostrukture proizvedene izravno na čvrstim podlogama nanolitografijom – neravne metalne površine proizvedene elektrokemijskim putem

Supstrati korišteni u ovom diplomskom radu spadaju u prvu i drugu kategoriju pa će u nastavku biti detaljnije objašnjena njihova priprava i svojstva.¹⁰

Nanočestice plemenitih metala veličine 1–100 nm pokazuju vrlo zanimljiva optička svojstva koja jako ovise o obliku nanočestica. Nanočestice u koloidima su dovoljno male čestice da mogu biti uniformno dispergirane, ali i dovoljno velike da raspršuju svjetlo. Koloidne čestice su u stanju neprekidnog slučajnog gibanja koje se naziva Brownovo gibanje. Ovakve suspenzije odlikuje velik omjer površine i volumena što im daje jedinstvena fizikalno-kemijske svojstva. Iz navedenog razloga koloidne suspenzije metalnih nanočestica su najpopularniji SERS supstrati.²² Najučestalija metoda pripreme suspenzija metalnih nanočestica, točnije visoko stabilnih Ag, Au i Cu nanočestica (AgNP, AuNP i CuNP), jest kemijska redukcija metalnih soli, obično u vodenom mediju, korištenjem redukcijskih sredstava kao što su trinatrijev citrat, natrijev borhidrid, hidrazin ili hidroksilamin-hidroklorid. Često se koriste tvari koje se vežu na površinu nanočestice čime se sprječava agregacija (odbojnim ili steričkim silama), poput natrijevog citrata, dodekanetiola, polietilen-glikola (PEG), taninske kiseline, hidroksilamina-hidroklorida i polivinilpirolidona (PVP).

Veličina nanočestica može se kontrolirati jačinom i koncentracijom reducensa. Općenito, jača redukcijska sredstva, kao što je natrijev borhidrid, uzrokuju stvaranje manjih nanočestica, dok korištenjem slabijih reducensa, poput trinatrijevog citrata, nastaju veće nanočestice. Faze nukleacije i rasta tijekom kemijske reakcije određuju raspodjelu veličine čestica. Tijekom procesa nukleacije, atomi metala se spajaju tvoreći klastere, a na kraju kristalne jezgre. Prilikom koraka rasta, kristalne jezgre se povećavaju i tvore nanočestice.¹⁰

Oblik nanočestica može se kontrolirati dodavanjem surfaktanata tijekom sinteze, koji uzrokuju promjenu površinske energije i kontroliraju agregaciju čestica. Surfaktanti stabiliziraju specifične kristalne ravnine u rastućoj nanostrukтури i na taj način omogućuju ciljani rast na stabiliziranoj ravnini. Ovisno o odabranom surfaktantu i metalu, može se stvoriti širok raspon oblika nanočestica kao što su nanosfere¹¹, nanokocke¹¹, nanozvijezdice¹², nanotrokuti¹⁰, nanoštapići¹³ i nanošipke¹⁴ te mnogi drugi (slika 3).

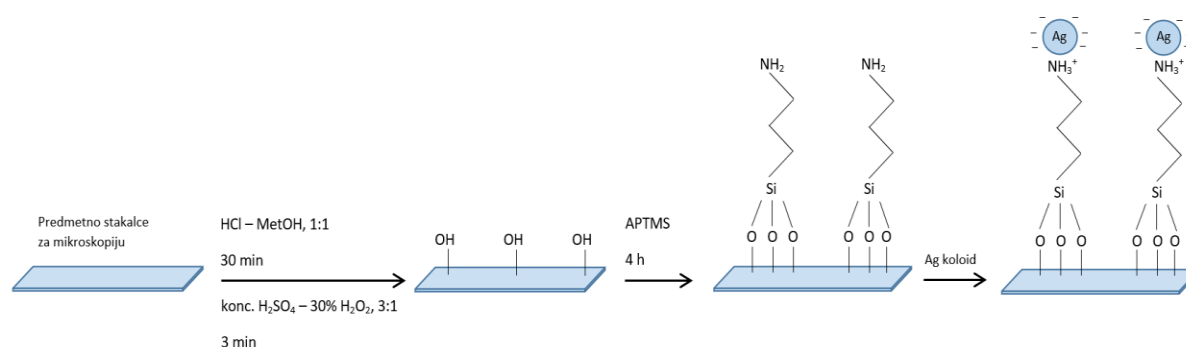


Slika 3. Oblici SERS metalnih supstrata snimljeni pretražnim elektronskim mikroskopom: 1) nanosfere, 2) nanokocke, 3) nanozvijezdice, 4) nanotrokuti, 5) nanoštapići, 6) nanošipke

Pojedinačne nanočestice uzrokuju određeno pojačanje raspršenja, no daleko jače pojačanje Ramanova raspršenja detektira se na tzv. aktivnim mjestima ili „vruće točke“ („hot spots“) koja nastaju između dvije blisko smještene nanočestice (udaljenost od približno 2 nm), nastale uslijed agregacije. „Vruće točke“ daju iznimno veliko SERS pojačanje reda veličine i do 10^{15} čime se omogućuje detekcija vrlo niskih koncentracija analita.²³

Stupanj agregacije teško je kontrolirati, stoga se metalne nanočestice često imobiliziraju na čvrste nosače čime se u teoriji osiguravaju stabilnija žarišta. Tako imobilizirane koloidne nanočestice na čvrstim materijalima čine relativno stabilne i efikasne SERS supstrate. Ukoliko se proces imobiliziranja odvija jednostavnijim metodama, dolazi do nasumičnog stvaranja i raspoređivanja željenih aktivnih mjesta uzduž površine podloge te se gubi na reproducibilnosti. Složenije tehnike pripreme rezultiraju visokom uređenošću, no gube na jednostavnosti i pristupačnosti. Jednostavnije metode najčešće uključuju kemijsku modifikaciju odabrane čvrste podloge (staklo, silicij, metal, papir itd.) prikladnim reagensom te uranjanje u koloidnu suspenziju željenih nanočestica metala kako bih se formirao površinski sloj. Predmetna stakalca za mikroskopiju čest su izbor za stakleni čvrsti nosač jer je priprema supstrata na ovaj način jeftina, jednostavna i ne zahtjeva specijaliziranu opremu.

Silanizacija, nakon temeljitog čišćenja predmetnih stakalca, uz pomoć bifunkcionalnih organosilana, učestala je laboratorijska praksa. (3-merkaptopropil)trimetoksisilana (MPTMS) i (3-aminopropil)trimetoksisilana (APTMS) se nerijetko koriste pri silanizaciji gdje se molekule silana za staklo vežu preko metoksi skupina čime se dobiva površinski monosloj amino ili tiolnih skupina koje posjeduju afinitet za vezanje nanočestica srebra ili zlata (slika 4). Silani s tiolnom skupinom većinom se koriste za vezanje nanočestica zlata, dok silani s amino skupinom pokazuju veći afinitet prema vezanju s nanočesticama srebra.²⁴



Slika 4. Shematski prikaz postupka imobilizacije nanočestica srebra na stakleni čvrsti nosač modificiran uz APTMS

Kao što je već spomenuto, zlato i srebro su najčešće korišteni metali za SERS supstrate zbog kemijske stabilnosti, kao i njihovih plazmotskih frekvencija. Poznato je da Ag nanočestice imaju intenzivnija plazmotska svojstva i bolji omjer raspršenja i apsorpcije od Au nanočestica slične veličine, što rezultira jačim SERS efektom. No, Ag nanočestice pokazuju slabiju kemijsku stabilnost, biokompatibilnost i netoksičnost koju posjeduju Au nanočestice.

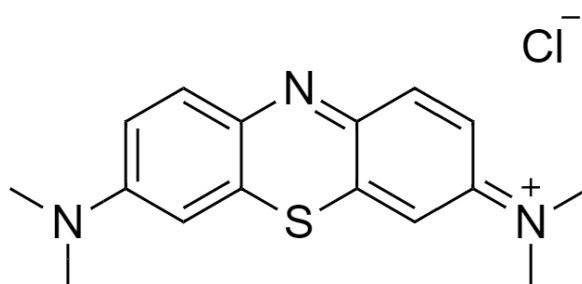
2.3. Modelne molekule

Kako bi se ispitala prikladnost novopripremljenih metalnih supstrata za primjenu u SERS spektroskopiji, koriste se modelne molekule. Najčešće su to aromatske molekule koje u svojoj strukturi sadrže heteroatom. Aromatska struktura bogata elektronima čini modelne molekule vrlo polarizabilnima, stoga intenzivno raspršuju zračenje, dok heteroatomi poput dušika i sumpora u strukturi omogućuju dodatno kemijsko vezanje s površinom srebra ili zlata. Ako je

modelna molekula nabijena, može se i elektrostatski vezati sa stabilizirajućim negativno ili pozitivno nabijenim ionima na površini nanočestica metala.

2.3.1. Metilensko modrilo

Tetrametiltionin-klorid, poznat kolokvijalno pod imenom metilensko modrilo (**MetB**), heterociklički je aromatski spoj molekulske formule $C_{16}H_{18}N_3S$ (slika 5).²⁵



Slika 5. Struktura metilenskog modrila

Središnji fenotiazinski sustav te dvije dimetilamino skupine čine strukturu ovog najvažnijeg predstavnika (bazičnih) tiazinskih bojila. **MetB** je čvrsta tamnozeleno kristalna tvar ili prah brončanog sjaja, koja otapanjem u vodi ili alkoholu rezultira tamnoplavim obojenjem.

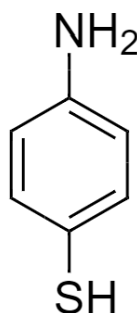
Metilensko se modrilo odlikuje nizom svojstava i funkcija. S obzirom da se radi o oksidacijsko-redukcijskom sredstvu, široko se koristi kao redoks indikator u analitičkoj kemiji. Otopine metilenskog modrila su plave u oksidirajućem okruženju, no izlaganjem redukcijskom sredstvu dolazi do njihova obezbojenja.

Nerijetko se koristi u medicinske svrhe jer pokazuje antioksidativna, antimalarijska, antidepresivna i kardioprotektivna svojstva. Intravenski oblik metilenskog modrila odobren je od strane FDA (engl. *Food and Drug Administration*) za liječenje pedijatrijskih i odraslih pacijenata sa stečenom methemoglobinemijom budući da reducira željezo(III) u željezo(II) čime methemoglobin pretvara u hemoglobin. Također je poznat i kao antidepresiv jer inhibira monoamin oksidazu čija je funkcija uklanjanje serotonina, dopamina, epinefrina i norepinefrina iz mozga. Istražena je i njeno upotreba kao antiseptika za mokraćne putove, te je lijek od potencijalnog interesa za liječenje bolesnika s Alzheimerovom bolešću.

U biokemiji metilensko modriilo nalazi primjenu kao boja za nukleinske kiseline zbog sposobnosti vezanja na DNA i RNA. Za razliku od etidijevog bromida koji se interkalira s nukleinskim kiselinama, metilensko modriilo djeluje kao kationska boja, i samo se elektrostatski veže na negativno nabijene dijelove nukleinske kiseline. Ovo reverzibilno bojenje minimizira smetnje kada se nukleinske kiseline prenose na hibridizacijske membrane. Također, ne interferira s analitom i nisko je toksičan. Osim za bojanje nukleinskih kiselina, služi i za bojanje bakterija te pekarskog kvasca. Komercijalno najrašireniju primjenu nalazi kao bojilo za papir, rjeđe i za pamuk, lan, konoplju i kožu.^{25, 26}

2.3.2. 4-Aminotiofenol

4-aminotiofenol (4-aminobenzentiol, p-aminotiofenol, **PATF**) je para- izomer aromatskog aminotiofenola molekulske formule C_6H_7SN koji je osjetljiv na izlaganje zraku i čuva se na hladnom (slika 6).



Slika 6. Struktura 4-aminotiofenola

4-aminotiofenol, zbog svoje strukture, vrlo je česta modelna molekula u SERS spektroskopiji, s obzirom da se odlikuje snažnom interakcijom s metalnim SERS supstratima te vrlo intenzivnim vrpčama u SERS spektrima. Objavljen je veliki broj SERS istraživanja o 4-aminotiofenolu koja se mogu podijeliti u četiri skupine:

- (1) teorijska i eksperimentalna istraživanja mehanizma pojačanja **PATP** na Au ili Ag supstratima
- (2) karakterizacija elektronskih svojstava spojeva metal/**PATP**/metal
- (3) modelna molekula za SERS na jednoj molekuli
- (4) modelna molekula za procjenu pojačanja raspršenja na novo razvijenim supstratima.

Posljednja navedena točka se odnosi na ulogu **PATP** u ovom radu, dakle kao modelna molekula za ispitivanje svojstva i usporedbe pojačanja raspršenja na pripremljenim supstratima.^{27,28}

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Srebrov(I) nitrat, p.a., Gram-Mol

Hidroksilamin-hidroklorid, p.a., Kemika

Natrijev hidoksid, p.a., T.T.T. doo

Trinatrijev citrat dihidrat, p.a., Kemika

Tetraklorozlatna(III) kiselina trihidrat, p.a., Sigma-Aldrich

3,7-bis(dimetilamino)fenotiazin-5-klorid (metilensko modriilo), p.a., Kemika

4-aminotiofenol ($w = 97,0 \%$), Sigma-Aldrich

Metanol, p.a., Alkaloid

Vodikov peroksid ($w = 30 \%$), p.a., T.T.T. doo

Sumporna kiselina ($w = 96 \%$), p.a., Fluka

Klorovodična kiselina ($w = 36,5 \%$) p.a Fluka

(3-aminopropil)trietoksisilan ($w = 97 \%$), p.a., Sigma-Aldrich

(3-merkaptopropil)trimetioksisilan ($w = 95 \%$), p.a., Sigma-Aldrich

3.2. Priprava otopina modelnih molekula

Početna ishodna otopina metilenskog modrila pripravljena je vaganjem čvrstog uzorka (0,00654 g) te otapanjem u deioniziranoj vodi (10,2232 mL), a ishodna otopina 4-aminotiofenola otapanjem krutog uzorka (0,00268 g) u metanolu (10,1037 mL). Pripremljene početne ishodne otopine modelnih molekula koncentracije, $c = 2,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, koriste se za pripravu novih ishodnih otopina manjih koncentracija (tablica 1).

Tablica 1. Koncentracije ishodnih otopina modelnih molekula

| c (ishodna otopina) / mol dm^{-3} |
|--|
| 2×10^{-3} |
| 2×10^{-4} |
| 2×10^{-5} |
| 2×10^{-6} |
| 2×10^{-7} |
| 2×10^{-8} |

3.3. Priprava koloida

3.3.1. Koloidna suspenzija srebra

Koloidna suspenzija srebra pripravljena je redukcijom srebrova(I) nitrata hidroksilamin-hidrokloridom prema postupku opisanom u literaturi.^{29,30} Srebrov(I) nitrat (0,03434 g) otopi se u deioniziranoj vodi (181,8 mL). Zatim se u zasebnoj staklenoj tikvici hidroksilamin-hidroklorid (0,03500 g) otopi u deioniziranoj vodi (20,6 mL) nakon čega se doda natrijev hidroksid (0,220 mL; 2 mol dm⁻³). Tako pripremljena bazična otopina reducensa brzo se ulije u otopinu srebrova(I) nitrata uz miješanje na magnetskoj miješalici do pojave sivo-smeđe koloidne suspenzije. Pripravljena suspenzija miješa se još 10 minuta na sobnoj temperaturi.

3.3.2. Koloidna suspenzija zlata

Koloidna suspenzija zlata pripravljena je redukcijom tetraklorozlatne(III) kiseline trinatrijevim citratom prema modificiranom Frenovom postupku opisanom u literaturi.³¹ Otopina pripremljena otapanjem tetraklorozlatne(III) kiseline trihidrata (0,10408 g) u deioniziranoj vodi (104,08 mL) dovedena je do vrenja uz snažno miješanje na magnetskoj miješalici, nakon čega je dodana otopina trinatrijevog citrata (0,11279 g otopljeno u 11,28 mL deionizirane vode; $w = 1$ %). Reakcijska smjesa poprima crveno-smeđu boju, te se kontinuirano miješa 15 minuta uz vrenje, nakon čega se hladi na sobnu temperaturu.

3.4. Priprava silaniziranog stakla

Predmetna stakalca za mikroskopiju očišćena su uranjanjem do pola visine u otopinu koja je sadržavala metanol i klorovodičnu kiselinu (1:1 v/v) u trajanju od 30 minuta. Nakon čišćenja, stakalca su tri minute bila uronjena u Piranha otopinu koju čine koncentrirana sumporna kiselina i vodikov peroksid (3:1 v/v) čime se postiže hidroksilacija površine stakla. Stakalca su dobro isprana deioniziranom vodom i osušena na zraku preko noći, a potom su uronjena 4 h do pola visine u otopinu MPMS ili APTMS u metanolu (5 % v/v) radi silanizacije. Suvišak silana, koji može uzrokovati prekomjernu agregaciju nanočestica pri uranjanju u koloidnu suspenziju, je višestruko ispran metanolom, te su stakalca sušena 1 h na 100°C u sušioniku.³²

3.5. Priprava uzoraka za mjerenje

3.5.1. Priprava mjernih uzoraka u koloidnim suspenzijama

Ishodne otopine iz tablice 1 služe za pripremu mjernih uzoraka širokog raspona radnih koncentracija navedenih u tablici 2. Mjerni uzorci su svježe pripremani neposredno prije snimanja u staklenim mikroepruvetama, a tijekom priprave koloidne su suspenzije miješane na magnetskoj miješalici kako bi se osigurala homogenost supstrata.

Ukoliko se priprema otopina metilenskog modrila, tada se za početak u mikroepruvetu pipetira odgovarajući volumen ishodne otopine i deionizirane vode do ukupnog volumena od 10 μL , dok se pri pripremi uzorka 4-aminotiofenola pipetira određen volumen ishodne otopine, deionizirane vode i metanola do ukupnog volumena 10 μL . Metanol se dodaje u količini koja osigurava 5%-tni udio u konačnoj otopini uzorka. Naposljetku se u mikropipetu dodaje željena koloidna suspenzija srebra ili zlata (90 μL).

Aluminijske posudice volumena 40 μL su korištene za snimanje SERS spektara, stoga se iz 100 μL prethodno opisanog pripremljenog uzorka pipetira 40 μL u aluminijske posudice.

Tablica 2. Koncentracije mjernih uzoraka u koloidnim suspenzijama

| c (uzorak za mjerenje) / mol dm^{-3} |
|---|
| 1×10^{-4} |
| 5×10^{-5} |
| 1×10^{-5} |
| 5×10^{-6} |
| 1×10^{-6} |
| 5×10^{-7} |
| 1×10^{-7} |
| 5×10^{-8} |
| 1×10^{-8} |
| 5×10^{-9} |
| 1×10^{-9} |
| 5×10^{-10} |

3.5.2. Priprava mjernih uzoraka na silaniziranim staklima

Kako bih se pripravili čvrsti metalni supstrati za SERS mjerenja uzoraka, prethodno silanizirana stakalca uranjaju se u odabranu suspenziju koloida srebra ili zlata sat vremena. Na taj način se stvara film nanočestica na površini ranije tretiranog stakla, gdje silani služe kao poveznice (linkeri) za metalne nanočestice. Predmetna stakalca za mikroskopiju silanizirana uz MPMS uranjaju se vertikalno do pola visine u koloidnu suspenziju nanočestica zlata, dok se u koloid srebra uranjaju predmetna stakalca za mikroskopiju tretirana uz APTMS. Pripremljeni čvrsti supstrati suše se 10 min na 100°C u sušioniku.²⁴

Istim postupkom opisanom u poglavlju 3.5.1. *Priprava mjernih uzoraka u koloidnim suspenzijama* pripremaju se uzorci za mjerenje na čvrstim nosačima, no umjesto koloidne suspenzije pipetira se isti volumen deionizirane vode, čime se dobiva jednak raspon koncentracija kao naveden u tablici 2. Mikropipetom se aplicira 5 µL uzorka za mjerenje na površinu horizontalno položenih čvrstih staklenih supstrata, unutar područja uranjanog u koloid. Nakon sušenja na zraku snimaju se SERS spektri na tri različita mjesta unutar „kapi“ uzorka na čvrstom nosaču.

3.6. Priprava uzoraka za određivanje reproducibilnosti

U svrhu određivanja reproducibilnosti pripreme uzorka i supstrata snimani su SERS spektri modelne molekule **PATF** određene koncentracije pri kojoj je opaženo najintenzivnije pojačanje raspršenja, $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, korištenjem pobude pri 785 nm. Za određivanje reproducibilnosti pripreme uzorka priređena su tri mjerna uzorka u koloidnoj suspenziji i tri mjerna uzorka na čvrstom supstratu te su im snimljeni SERS spektri. Reproducibilnost supstrata određuje se snimanjem SERS spektara tri puta za isti uzorak u koloidnoj suspenziji uz miješanje između svakog snimanja. Na čvrsti nosač je isti uzorak nanesen na tri različita mjesta kojima se snimaju SERS spektri.

3.7. Mjerni uređaji

UV/Vis spektrofotometar SPECORD 200 tvrtke Analytik Jena služio je za snimanje apsorpcijskih spektara u području 190 – 1100 nm uz razlučivanje od 1 nm. Uzorci su smješteni u kvarcne kivete duljine puta zračenja 0,2 cm.

Za mjerenje pH-vrijednosti koloidnih suspenzija korišten je Mettler Toledo MP 220 pH-metar s InLab®413 kombiniranom staklenom–kalomel elektrodom uz prethodno baždarenje otopinama pufera pH 4,00 i 7,00.

Ramanovi i SERS spektri dobiveni su uz pomoć konfokalnog Ramanovog mikroskop/spektrometra InVia tvrtke Renishaw opremljenog laserima koji emitiraju zračenje pri 532 i 785 nm, a maksimalna snaga iznosi 100 mW, odnosno 300 mW. Ovisno o mjernom uzorku, snaga lasera se mijenjala te je naznačena uz spektre. Spektri su snimani u području 100 – 3200 cm^{-1} uz vrijeme ekspozicije 10 s, te je prikupljena jedna akumulacija. Objektiv povećanja x5 korišten je za snimanje uzoraka koloidnih suspenzija, a objektiv povećanja x20 za uzorke na čvrstim nosačima. Program Wire 5.3 služio je za obradu dobivenih spektara.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ramanovi spektri modelnih molekula

4.1.1. Metilensko modriilo

Prije snimanja koncentracijski ovisnih SERS spektara modelnih molekula na različitim supstratima, za svaku modelnu molekulu je snimljen klasičan Ramanov spektar čvrste tvari i otopine množinske koncentracije, $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pri valnim duljinama pobude 785 i 532 nm (slika 11). Snaga lasera je tijekom snimanja spektara podešavana ovisno o uzorku u svrhu postizanja maksimalnog intenziteta uz sprječavanje raspada ili gorenja uzorka. Asignacija karakterističnih vrpce opaženih u Ramanovim spektrima nalaze se u tablici 3.

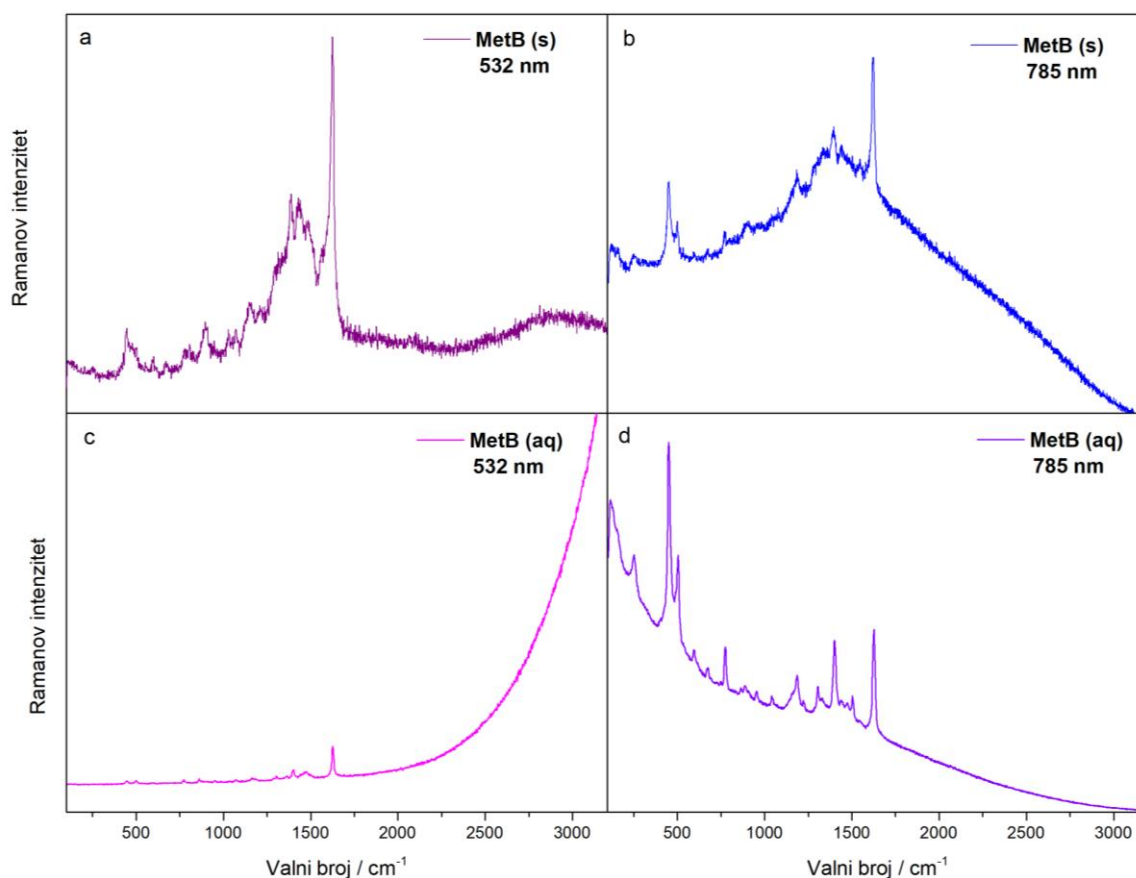
Ramanovi spektri krutine **MetB** malo se razlikuju kada se koriste pobude različitih valnih duljina. Tako spektar dobiven pri 785 nm ima izražene i bolje definirane vrpce u odnosu na spektar dobiven pobudom pri 532 nm.

Vrpce najvećeg intenziteta za krutinu snimljenu pri 532 nm nalaze se u području između $1350\text{--}1650 \text{ cm}^{-1}$. Simetrična istezanja C–C veza unutar središnjeg aromatskog sustava rezultiraju najintenzivnijom vrpcom pri 1623 cm^{-1} dok nesimetrična istezanja uzrokuju vrpce manjeg intenziteta pri 1490 cm^{-1} . Vrpce pri nižim valnim brojevima slabijeg su intenziteta i potječu od kombinacija svijanja i deformacija fenotiazinskog prstena, C–S istezanja i C–N svijanja. Među njima ističu se vrpce pri 445 cm^{-1} i 894 cm^{-1} koje odgovaraju C–N–C te C–H deformaciji. Nadalje, C–H savijanja u ravnini i izvan ravnine mogu se uočiti pri valnim brojevima od 1034 cm^{-1} , 1071 cm^{-1} , 1147 cm^{-1} i 1385 cm^{-1} , dok vrpce srednjeg intenziteta dimetilamino supstituenata na 1206 cm^{-1} i 1420 cm^{-1} potječu od vibracija istezanja C–N i C–H veza.

Valna duljina pobude pri 785 nm rezultira spektrom krutine **MetB** u kojem je bazna linija podignuta zbog fluorescencije uzorka. Naime, **MetB** apsorbira zračenje pri valnoj duljini od 665 nm (Dodatak, slika D1), nakon čega intenzivno fluorescira s maksimumom emisije pri 686 nm.³⁸ To uzrokuje prekrivanje Ramanovih vrpce u spektru. Usprkos tomu, jasno su vidljive karakteristične vrpce od kojih je najintenzivnija, kao i kod pobude pri 532 nm, vrpca simetričnog istezanja C–C veza središnjeg aromatskog sustava zabilježena pri 1622 cm^{-1} .

Uočljive su i dvije susjedne vrpce pri 451 cm^{-1} i 500 cm^{-1} koje pripadaju skeletnoj deformaciji C–N–C, odnosno deformaciji C–N–C dimetilamino skupine.^{4,35–37}

Ramanovi spektri vodenih otopina **MetB** množinske koncentracije $2 \times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$ pri valnim duljinama pobude 785 i 532 nm sadrže slabije vrpce u odnosu na spektar krutine. Pri 532 nm jedina jasno vidljiva vrpca jest istežanje C–C veza u aromatskom sustavu tj. najintenzivnija vrpca prethodno spomenutih spektara krutina. Spektar otopine metilenskog modrila uz pobudu pri 785 nm sadrži intenzivne vrpce koje se podudaraju s već spomenutim vrpcoma krutine uočenim u spektru snimljenom kod iste pobude. Do izražaja ponovno dolaze skeletne i dimetilamino deformacije pri 451 cm^{-1} i 504 cm^{-1} koje intenzitetom nadmašuju istežanje C–C veza središnjeg aromatskog sustava pri 1626 cm^{-1} .



Slika 11. Ramanovi spektri: a) čvrstog uzorka **MetB** pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 1,21 mW, b) čvrstog uzorka **MetB** pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 3,19 mW, c) vodene otopine **MetB** ($c = 2 \times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$) pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 1,21 mW i d) vodene otopine **MetB** ($c = 2 \times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$) pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 15,95 mW

Tablica 3. Assignacija Ramanovih spektara čvrstog uzorka **MetB** i vodene otopine **MetB** ($c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) pri valnim duljinama pobude 532 i 785 nm^{37,47,48}

| Valni broj / cm^{-1} | | | | Vibracija |
|-------------------------------|---------|----------------------------|---------|---|
| Čvrsti uzorak | Otopina | Čvrsti uzorak | Otopina | |
| $\lambda = 532 \text{ nm}$ | | $\lambda = 785 \text{ nm}$ | | |
| 1623 | 1626 | 1622 | 1626 | $\nu \text{ C-C}$ |
| 1490 | 1476 | | 1472 | $\nu \text{ C-C} +$ $\delta \text{ C-H}$ |
| 1420 | | | | $\nu \text{ C-N}^*$ |
| 1385 | 1399 | 1397 | 1400 | $\delta \text{ C-H}$ |
| | 1303 | | 1303 | $\nu \text{ C-N}^*$ |
| 1206 | | 1184 | 1185 | $\nu \text{ C-H}^*$ |
| 1147 | | | | $\nu \text{ C-C} +$ $\delta \text{ C-H}$ |
| 1071 | | 1068 | 1042 | $\delta \text{ C-H}$ |
| 1034 | 1014 | | 1019 | $\nu \text{ C-S} +$ $\delta \text{ C-H}$ |
| 894 | 861 | 904 | 889 | $\delta \text{ C-H}$ |
| 776 | | 770 | 775 | $\delta_{\text{oop}} \text{ C-H}$ |
| 663 | | | 673 | $\delta_{\text{oop}} \text{ C-H}$ |
| 592 | | | 596 | $\delta \text{ C-S-C}$ |
| | | 500 | 504 | $\delta \text{ C-N-C}^*$ |
| 445 | | 451 | 451 | $\delta \text{ C-N-C}$ |

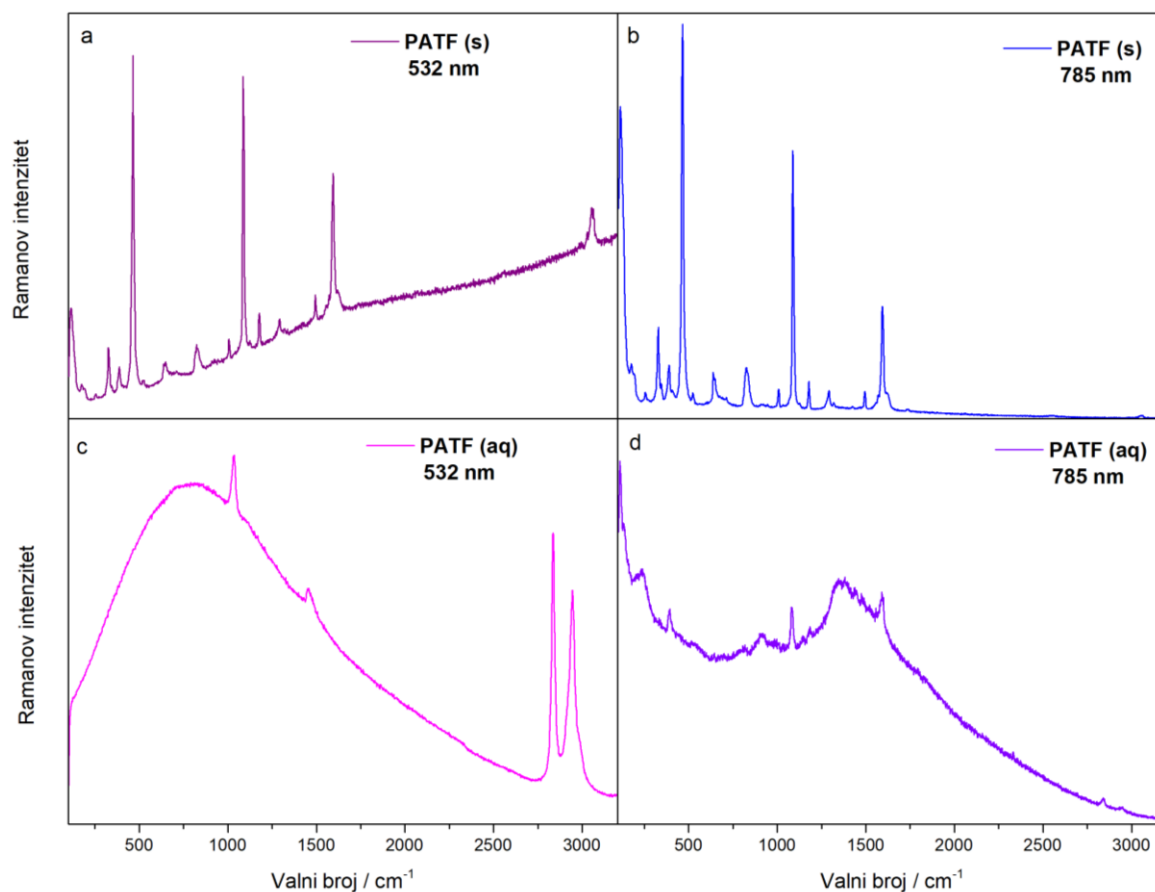
Kratice: ν – istezanje, δ – deformacija, oop – izvan ravnine, * – dimetialmino

4.1.2. 4-Aminotiofenol

Snimljeni su Ramanovi spektri čvrstog uzorka **PATF** i otopine **PATF** u metanolu množinske koncentracije 2×10^{-3} mol dm⁻³ pri valnim duljinama pobude 532 i 785 nm (slika 12) te su asignirane dobivene vrpce (tablica 4). U svrhu postizanja maksimalnog intenziteta vrpce, snaga lasera je tijekom snimanja spektara podešavana ovisno o potrebi uzorka.

Ramanovi spektri krutine dobiveni pobudama pri 532 i 785 nm vrlo su slični, osim što je u spektru dobivenom pri 532 nm podignuta bazna linija. Može se primijetiti nekoliko istaknutih vrpce karakterističnih za vibracije molekula 4-aminotiofenola, kao što su vibracije deformacije C–C–C veza benzenskog prstena pri 464 cm⁻¹ te istezanja C–S i C–C veza na 1087 cm⁻¹ i 1593 cm⁻¹. Deformacijama C–S veza pripisuju se slabe vrpce pri nižim valnim brojevima kod 328 cm⁻¹ i 387 cm⁻¹, a deformacijama okosnice benzenskog prstena odgovaraju slabe vrpce pri 633 cm⁻¹ i 1006 cm⁻¹. Uočene vrpce na 1291 cm⁻¹ i 1493 cm⁻¹ potječu od kombiniranih modova vibracija istezanja C–C i deformacije svijanja C–H veza. Ramanov spektar snimljen pobudom pri 532 nm sadrži vrpce oko 3050 cm⁻¹ koja nedostaje u spektru dobivenom uz pobudu pri 785 nm. Spomenuta vrpca je rezultat vibracije istezanja C–H veze.

Snimanje Ramanovih spektara otopina (slika 12c i 12d) rezultiralo je spektrima sa slabije intenzivnim vrpce spoja **PATF**. Karakteristične vrpce analita su blago prekrivene vibracijskim spektrom metanola korištenog tijekom pripreme otopina. Spektrom otopine **PATF** dobivenim pobudom pri 532 nm dominiraju intenzivne vrpce metanola pri oko 2836 i 2945 cm⁻¹ kao posljedica antisimetričnog i simetričnog istezanja C–H veza metilne skupine te slaba vrpca pri 1034 cm⁻¹ pripisana istezanju C–O veze otapala, dok se samo jedna vrpca pri 1456 cm⁻¹ pripisuje vibracijama istezanja C–C veza modelne molekule. Karakteristične se vrpce modelne molekule **PATF** vidljive u spektrima otopina dobivenim pobudom pri 785 nm poklapaju s dvjema najintenzivnijim vrpce iz spektra krutog uzorka, vibracijama istezanja C–S i C–C veza pri 1083 cm⁻¹ i 1581 cm⁻¹, dok vrpca vibracije deformacije C–C–C okosnice prstena oko 460 cm⁻¹ nije zamijećena.



Slika 12. Ramanovi spektri: a) čvrstog uzorka **PATF** pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 1,21 mW, b) čvrstog uzorka **PATF** pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 15,95 mW, c) otopine **PATF** u metanolu ($c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 1,21 mW i d) otopine **PATF** u metanolu ($c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 159,5 mW

Tablica 4. Asignacija Ramanovih spektara čvrstog uzorka **PATF** i otopine **PATF** u metanolu ($c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) pri valnim duljinama pobude 532 i 785 nm³⁹⁻⁴²

| Valni broj / cm^{-1} | | | | Vibracija |
|-------------------------------|---------|----------------------------|---------|--|
| Čvrsti uzorak | Otopina | Čvrsti uzorak | Otopina | |
| $\lambda = 532 \text{ nm}$ | | $\lambda = 785 \text{ nm}$ | | |
| 3051 | | | | |
| 1593 | | 1593 | 1593 | $\nu \text{ C-C}$ |
| 1493 | 1456 | 1494 | 1489 | $\nu \text{ C-C} + \delta \text{ C-H}$ |
| 1291 | | 1291 | | $\nu \text{ C-C} + \delta \text{ C-H}$ |
| 1177 | | 1178 | 1185 | $\delta \text{ C-H}$ |
| | | | | $\delta \text{ C-H}$ |
| 1087 | | 1088 | 1083 | $\nu \text{ C-S}$ |
| 1006 | | 1007 | | $\delta \text{ C-C} +$ $\delta \text{ C-C-C}$ |
| 827 | | 828 | | $\delta_{\text{oop}} \text{ C-H}$ |
| 644 | | 640 | | $\delta \text{ C-C-C}$ |
| 464 | | 466 | | $\delta \text{ C-C-C}$ |
| 387 | | 389 | 392 | $\delta \text{ C-S}$ |
| 328 | | 328 | | $\delta \text{ C-S}$ |

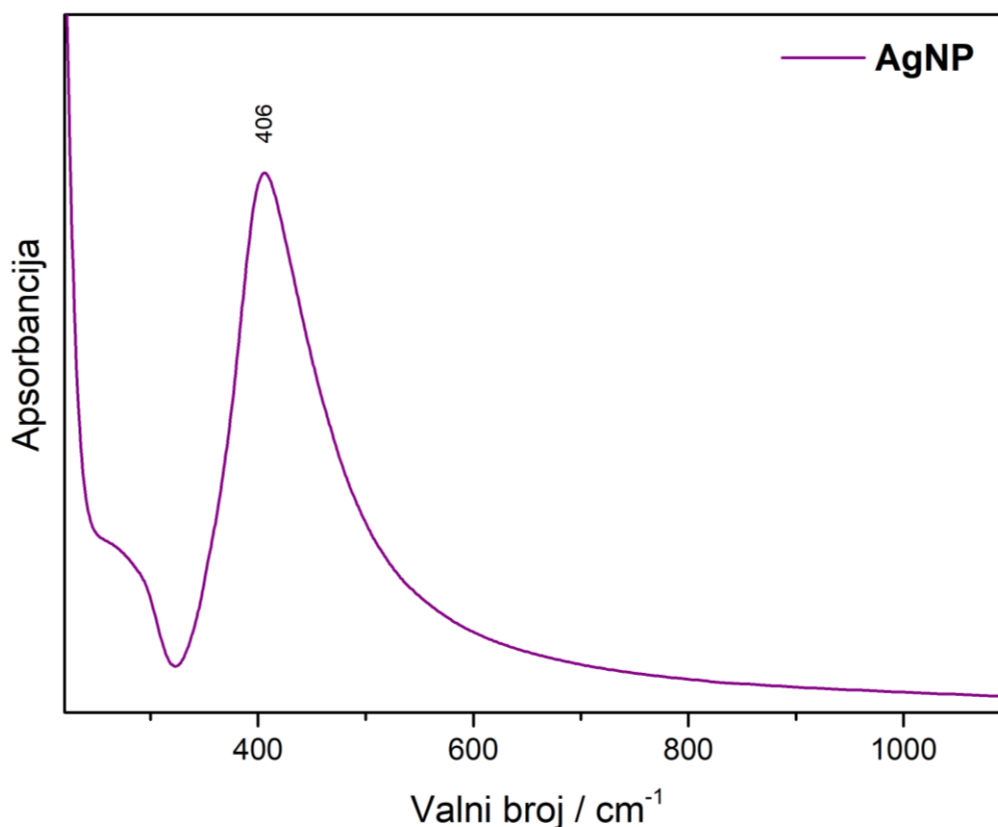
Kratice: ν – istezanje, δ – deformacija, oop – izvan ravnine

4.2. Nanočestice srebra

4.2.1. Karakterizacija koloidne suspenzije srebra

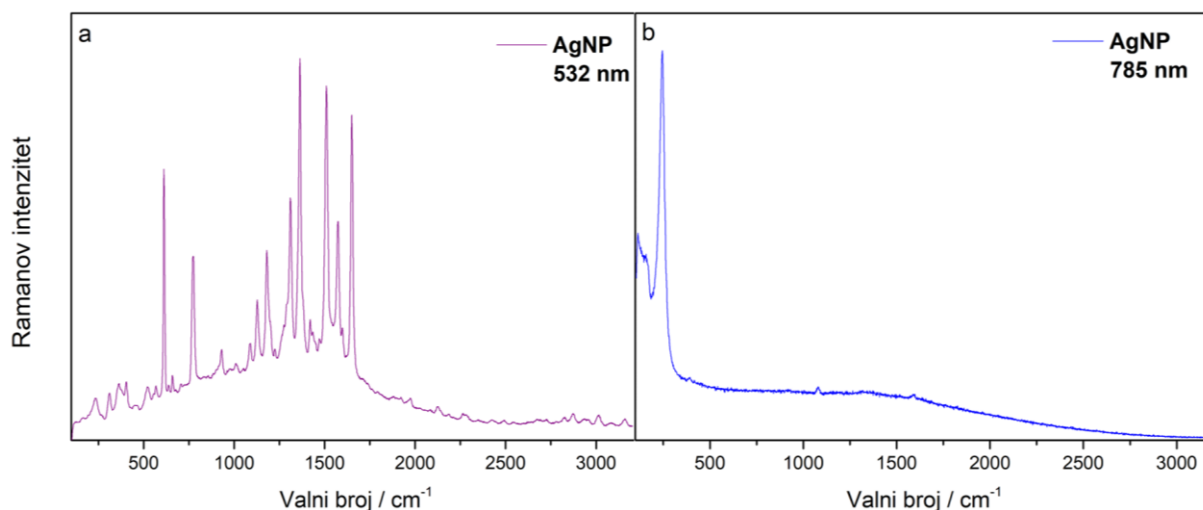
Kako bi se karakterizirala morfologija dobivenih nanočestica srebra korištena je UV/Vis spektroskopija za snimanje apsorpcijskog spektra koloidne suspenzije koji daje informaciju o veličini i obliku nanočestica. Vrijednost valne duljine maksimalne apsorpcije i intenzitet vrlo su osjetljivi na dimenziju, raspodjelu i oblik nanočestica. Također je izmjerena pH-vrijednost u svrhu određivanja stabilnosti koloidne suspenzije.

pH-vrijednost za koloidnu suspenziju nanočestica srebra s kloridnim ionima na površini iznosi 5,67. Snimanjem UV/Vis/NIR apsorpcijskog spektra (slika 7) određena je valna duljina maksimalne apsorpcije tj. valna duljina rezonancije plazmona pri 406 nm. Prema literaturi²⁹ ovi rezultati ukazuju na prilično monodispergirane koloidne nanočestice srebra veličine od 34 – 67 nm.



Slika 7. UV/Vis/NIR apsorpcijski spektar koloidne suspenzije nanočestica srebra

Ramanovi spektri pripremljene koloidne suspenzije srebra snimljeni su radi dodatne karakterizacije te lakšeg tumačenja SERS spektara modelnih molekula 4-aminotiofenola i metilenskog modrila. Spektri su snimljeni pri valnim duljinama pobude 532 i 785 nm te su prikazani na slici 8.



Slika 8. Ramanovi spektri koloidnih suspenzija nanočestica srebra: a) AgNP pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 1,21 mW i b) AgNP pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 3,19 mW

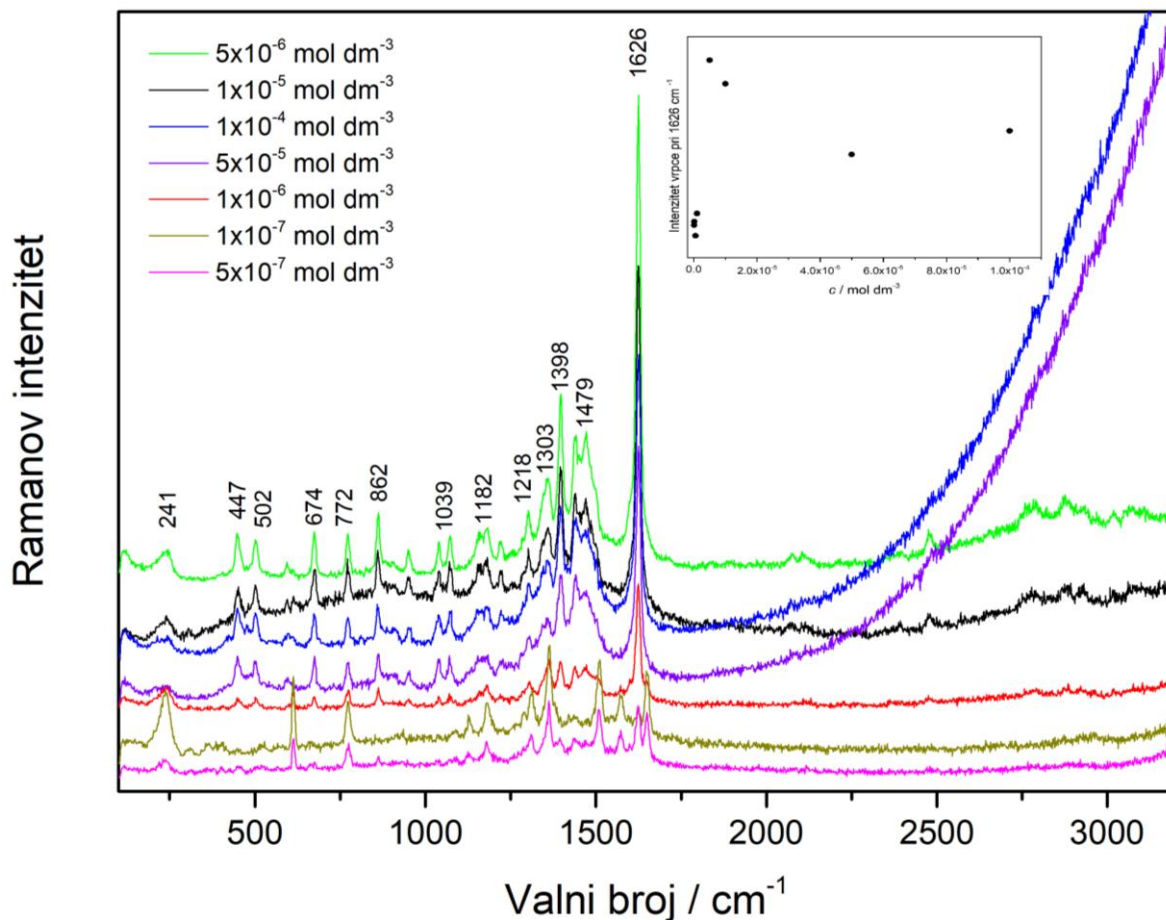
Korištenjem pobude pri 532 nm, u Ramanovom spektru koloidne suspenzije srebra javlja se čitav niz intenzivnih vrpca kod 232 cm^{-1} , 612 cm^{-1} , 773 cm^{-1} , 1181 cm^{-1} , 1311 cm^{-1} , 1363 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} , 1574 cm^{-1} i 1650 cm^{-1} . Podrijetlo ovih vrpca nije u potpunosti jasno, no pretpostavlja se da odgovaraju vibracijama aniona prisutnih u koloidu kao što su NO_3^- , Cl^- i iona hidroksilamina.³³ Vrpca pri 232 cm^{-1} pojavljuje se u literaturi ne samo u spektrima koloida pripremljenih redukcijom hidroksilamin-hidrokloridom nego također i kod koloida srebra gdje je reducens trinatrijev citrat, te se pripisuje vezi Ag – anion. U slučaju koloida pripremljenog u ovom radu, spomenuta vrpca potječe od veze između nanočestica srebra i kloridnih aniona koji okružuju metalne nanočestice. Spektri dobiveni pobudom pri 785 nm pokazuju isključivo vrpce istezanja Ag – Cl veze pri 149 cm^{-1} i 244 cm^{-1} , što se poklapa s literaturnim izvorima, dok su vrpce aniona i njihovih hidrolitičkih produkata pri 1081 cm^{-1} , 1363 cm^{-1} , 1575 cm^{-1} i 1650 cm^{-1} prisutne, no vrlo su slabog intenziteta. Zaostali ioni u sustavu vrlo vjerojatno imaju slabiji afinitet prema površini srebra u usporedbi s kloridnim anionom.^{34,35}

4.2.2. Koncentracijski ovisni SERS spektri u koloidnoj suspenziji srebra

Snimljeni su koncentracijski ovisni SERS spektri modelne molekule metilenskog modrila u svježe pripremljenoj koloidnoj suspenziji srebra, u koncentracijskom području $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³ uz pobudno zračenje pri 532 nm (slika 13) i 785 nm (slika 14).

SERS spektri dobiveni pobudom pri 532 nm pokazuju povećanje intenziteta vrpce u usporedbi s klasičnim Ramanovim spektrom ishodne otopine daleko veće množinske koncentracije, $c = 2 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³, snimane pri istoj pobudnoj valnoj duljini. Sve slabe vrpce u SERS spektrima pri valnim brojevima većim od 1700 cm⁻¹ su vrlo vjerojatno anomalne vrpce koje potječu od vrsta iz same koloidne suspenzije srebra, s obzirom da se položaji i intenziteti navedenih vrpca vrlo dobro poklapaju s vrpcama prisutnim u Ramanovom spektru koloida, dok izostaju u spektrima ishodnih otopina **MetB**. Najintenzivnije vrpce u SERS spektrima otopina metilenskog modrila javljaju se pri 1626 cm⁻¹ i 1398 cm⁻¹ te potječu od vibracija istezanja C–C veza i svijanja C–H veza fenotiazinskog sustava. Ostale izražajne vrpce također se pripisuju vibracijama središnjeg aromatskog sustava: 1479 cm⁻¹ istezanju C–C i deformaciji C–H veze, dok vrpca na 1218 cm⁻¹ potječe od istezanja C–N veze skeleta molekule. Na 1303 cm⁻¹ javlja se vrpca istezanja C–N veze iz dimetilamino skupine. Mnoge od navedenih vrpce imaju ili blagi pomak u položaju u odnosu na odgovarajući Ramanov spektar otopine, ili dolazi do cijepanja vrpce. Pomaci i cijepanja vrpce ukazuju na kemisorpciju molekula analita na površinu nanočestica srebra, budući da je kemijski mehanizam odgovoran za relativne pomake u SERS spektrima.³⁵ Blizina molekula analita metalnoj površini omogućena adsorpcijom uzrokuje uočeno pojačanje raspršenja zračenja gdje intenzitet vrpce u SERS spektrima uvelike ovisi o orijentaciji molekula na metalnom supstratu, a ne nužno o samoj koncentraciji analita. Prema teoriji, najveće pojačanje raspršenja zapaža se za molekule smještene okomito na metalni supstrat. Dobivene intenzivne vrpce u spektrima ukazuju na vezanje metilenskog modrila preko dušika fenotiazinskog sustava na nanočestice srebra, što omogućava smještanje planarnog aromatskog sustava okomito s obzirom na metalnu površinu. Također, pojava vrpce koju ne opažamo u Ramanovom spektru otopine **MetB**, pri 241 cm⁻¹, a koja prema literaturi potječe od istezanja Ag–N veze ukazuje na kemijsko vezanje modelne molekule s površinom srebra.³⁶ Da se molekula zaista preferirano i najefikasnije veže na površinu srebra preko dušika aromatskog sustava ukazuje i činjenica da smanjenjem koncentracije analita u sustavu ne dolazi do značajne promjene omjera intenziteta postojećih vrpce, niti dolazi do pomaka postojećih, odnosno pojave novih vrpce u SERS spektrima.

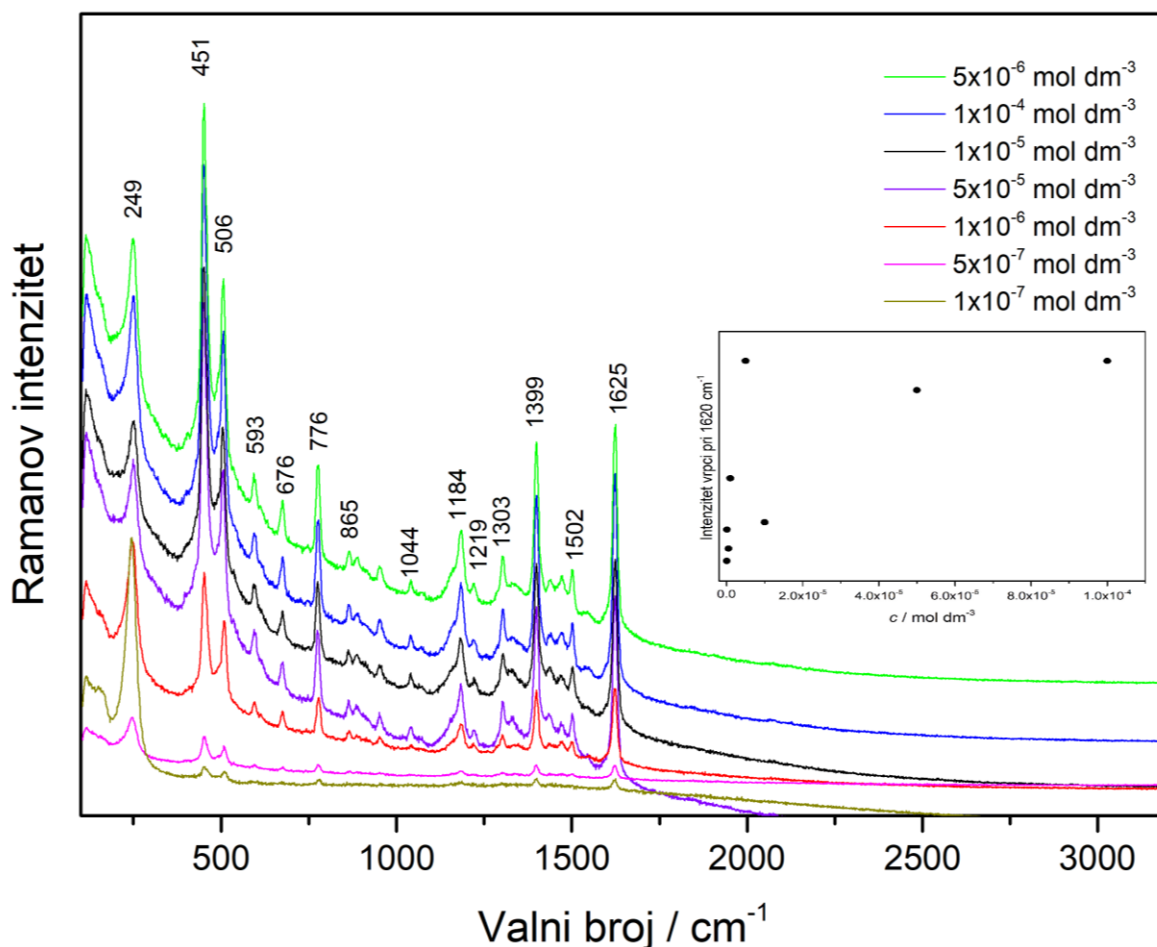
Za uspješnu adsorpciju molekula analita na metalnu površinu zaslužan je i pozitivan naboj promatrane molekule **MetB**, koja je stoga elektrostatski privučena negativno nabijenim kloridnim ionima smještenim oko koloidnih nanočestica. Promatranjem ovisnosti intenziteta vrpce istezanja C–C veza pri 1623 cm^{-1} o koncentraciji modelnih molekula, uočena je nelinearna promjena intenziteta vrpce s promjenom koncentracije molekula **MetB** u sustavu (dodatak na slici 13). Naime, vidljivo je da spektar uzorka množinske koncentracije $c = 5 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$ pokazuje vrpce najvećeg intenziteta, u odnosu na spektre svih ostalih koncentracija molekula **MetB**. Ovo zapažanje se tumači „gustoćom“ slaganja molekula analita na površinama nanočestica koja je vrlo visoka pri većim koncentracijama analita. Prisutnost velikog broja molekula onemogućuje optimalnu okomitu orijentaciju prema metalu te na nanočesticama postoji velik broj molekula **MetB** koje se slažu na različite načine, pod kutem, u odnosu na površinu metala. Smanjenjem koncentracije molekula analita dostupan je veći prostor za uspostavu najoptimalnijeg okomitog položaja prema površini metala što rezultira intenzivnim pojačanje Ramanovog raspršenja. U SERS spektru **MetB** koncentracije $c = 5 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$ uočen je najveći intenzitet vrpce, dakle može se pretpostaviti da su kod navedene koncentracije molekule spoja okomito smještene u odnosu na površinu metala. Nadalje, pri vrlo niskim koncentracijama molekula analita prisutan je sve manji broj molekula koje sada imaju na raspolaganju širok raspon načina orijentacije prema površini srebra, te se molekule mogu smjestiti pod nekim kutem ili čak u paralelan položaj za koji promjena polarizabilnosti ne doprinosi raspršenju zračenja. To uzrokuje smanjenje intenziteta vrpce molekula **MetB** u SERS spektrima niže koncentracije. Najniža koncentracija za koju se opažaju karakteristične vrpce **MetB** u koloidnoj suspenziji srebra pri valnoj duljini pobude 532 nm iznosi $5 \times 10^{-7}\text{ mol dm}^{-3}$ što smatramo detekcijskom granicom za promatrani sustav. Assignacija karakterističnih vrpce **MetB** u SERS spektru koncentracije, $c = 5 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$, koja pokazuje najintenzivnije vrpce, navedena je u tablici 5.



Slika 13. SERS spektri spoja **MetB** različitih koncentracija ($1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u koloidnoj suspenziji srebra pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 0,12 mW

SERS spektri otopina **MetB** snimljeni u koncentracijskom rasponu $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ pobudom pri 785 nm daju vrlo intenzivne vrpce analita, u odnosu na Ramanov spektar otopine metilenskog modrila koncentracije, $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Vrlo veliko pojačanje Ramanovog raspršenja analizirane boje ukazuje na uspješnu adsorpciju molekula analita na koloidne nanočestice srebra. Korištenje pobude pri 785 nm ne rezultira anomalnim vrpcama koloida u spektru otopina **MetB** različitih koncentracija, dok su dobivene vrpce spoja lijepo definirane i intenzivne. Nova vrpca pri 249 cm^{-1} koji pripada vibraciji istezanja veze Ag–N između površine srebra i molekule **MetB** dokaz je da i kemijski mehanizam pojačanja utječe na SERS spektar modelnog spoja. Najintenzivnije vrpce u spektru nalaze se pri 451 cm^{-1} i 506 cm^{-1} , a potječu od vibracije deformacije C–N–C veze fenotiazinskog prstena, odnosno deformacije dimetilamino skupine. Vrpce kod 1399 cm^{-1} i 1625 cm^{-1} odgovaraju vibracijama

aromatskog dijela metilenskog modrila, svijanju C–H u ravnini i istežanju C–C veza. S obzirom da smanjenje koncentracije ne rezultira nastankom novih vrpca u SERS spektrima **MetB**, kao i u prethodno opisanim SERS spektrima modelne molekule dobivenim pobudom pri 532 nm, pretpostavlja se da nema značajne promjene u načinu smještanja molekule na površini srebra. Najintenzivnije vrpce uočene su u SERS spektru otopine koncentracije, $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, dok je određena granica detekcije $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. Asignacija karakterističnih vrpca može se pronaći u tablici 5.



Slika 14. SERS spektri spoja **MetB** različitih koncentracija ($1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u koloidnoj suspenziji srebra pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 0,32 mW

Tablica 5. Asignacija osnovnih vrpca u SERS spektrima otopina **MetB** koncentracije 5×10^{-6} mol dm⁻³ u koloidnoj suspenziji srebra, pri valnim duljinama pobude 532 i 785 nm^{35,36}

| Valni broj / cm ⁻¹ | | Vibracija |
|---|--------------------|-------------------------------|
| $c = 5 \times 10^{-6}$ mol dm ⁻³ | | |
| $\lambda = 532$ nm | $\lambda = 785$ nm | |
| 1626 | 1625 | v C–C |
| 1479 | 1502 | v C–C |
| 1398 | 1399 | δ C–H |
| 1303 | 1303 | v C–N* |
| 1218 | 1219 | v C–N |
| 1182 | 1184 | δ C–H* |
| 1039 | 1044 | v C–S + δ C–H |
| 862 | 885 | δ C–H |
| 772 | 776 | v C–S + δ_{oop} C–H |
| 674 | 676 | δ_{oop} C–H |
| 593 | 593 | δ C–S–C |
| 502 | 506 | δ C–N–C* |
| 447 | 451 | δ C–N–C |
| 241 | 249 | v Ag–N |

Kratice: v – istezanje, δ – deformacija, oop – izvan ravnine * – dimetalmino

U koloidnoj suspenziji srebra snimljeni su koncentracijski ovisni SERS spektri modelne molekule **PATF** u području koncentracija 1×10^{-8} – 1×10^{-4} mol dm⁻³ uz pobudno zračenje pri 532 nm (slika 15) i 785 nm (slika 16). Asignacija osnovnih vrpca u najintenzivnijem SERS spektru **PATF** (5×10^{-6} mol dm⁻³) navedena je u tablici 6.

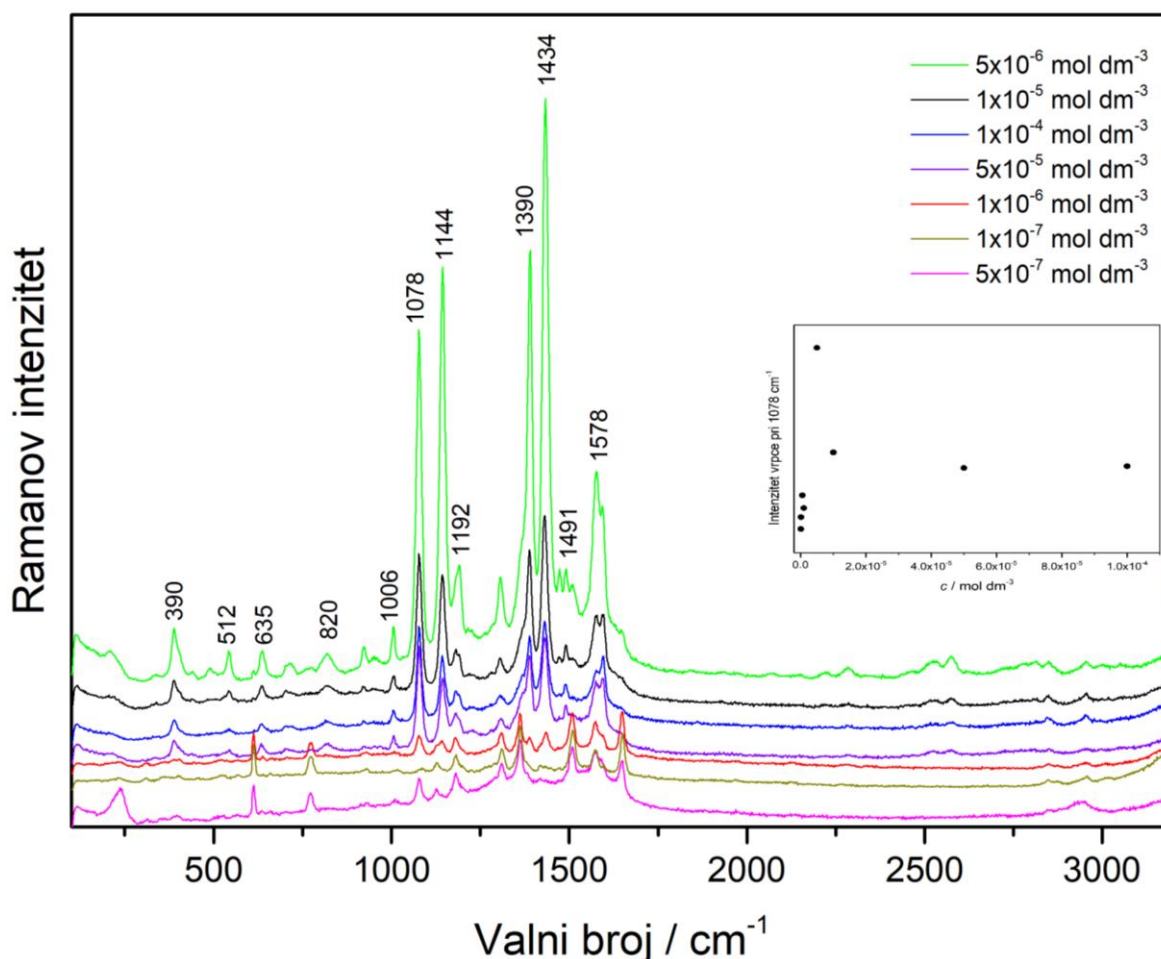
Korištenje pobude pri 532 nm rezultira SERS spektrima modelne molekule u kojima se vrlo jasno primjećuju vrpce karakteristične za 4-aminotiofenol, kao što su vibracije istezanja C–S veze na 1078 cm⁻¹ i C–C veza pri 1578 cm⁻¹. Vrpce u SERS spektrima su značajno intenzivnije

u odnosu na vrpce u Ramanovom spektru ishodne otopine **PATF**. SERS spektri otopina 4-aminotiofenola pokazuju nelinearnu ovisnost intenziteta vrpce o koncentraciji mjernih otopina, što je grafički prikazano na umetku slike 15 kao ovisnost intenziteta vrpce vibracije istezanja C–S veze modelne molekule pri 1078 cm^{-1} o koncentraciji analita. Granica detekcije je $1 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$ budući da je to najniža množinska koncentracija pri kojoj su opažene vrpce **PATF** u SERS spektrima. S obzirom na sve spomenuto, može se zaključiti da su se molekule spoja uspješno adsorbirale na površinu metalnog supstrata. Pojačan intenzitet vrpce istezanja C–S veze pri 1078 cm^{-1} govori o smještanju molekule na površinu metala i vezanju preko atoma sumpora te pojačanju uslijed interakcije s elektromagnetskim poljem metala.⁵⁴ U prilog navedenom ide i pojava vrpce deformacije C–S veza srednjeg intenziteta pri 390 cm^{-1} .

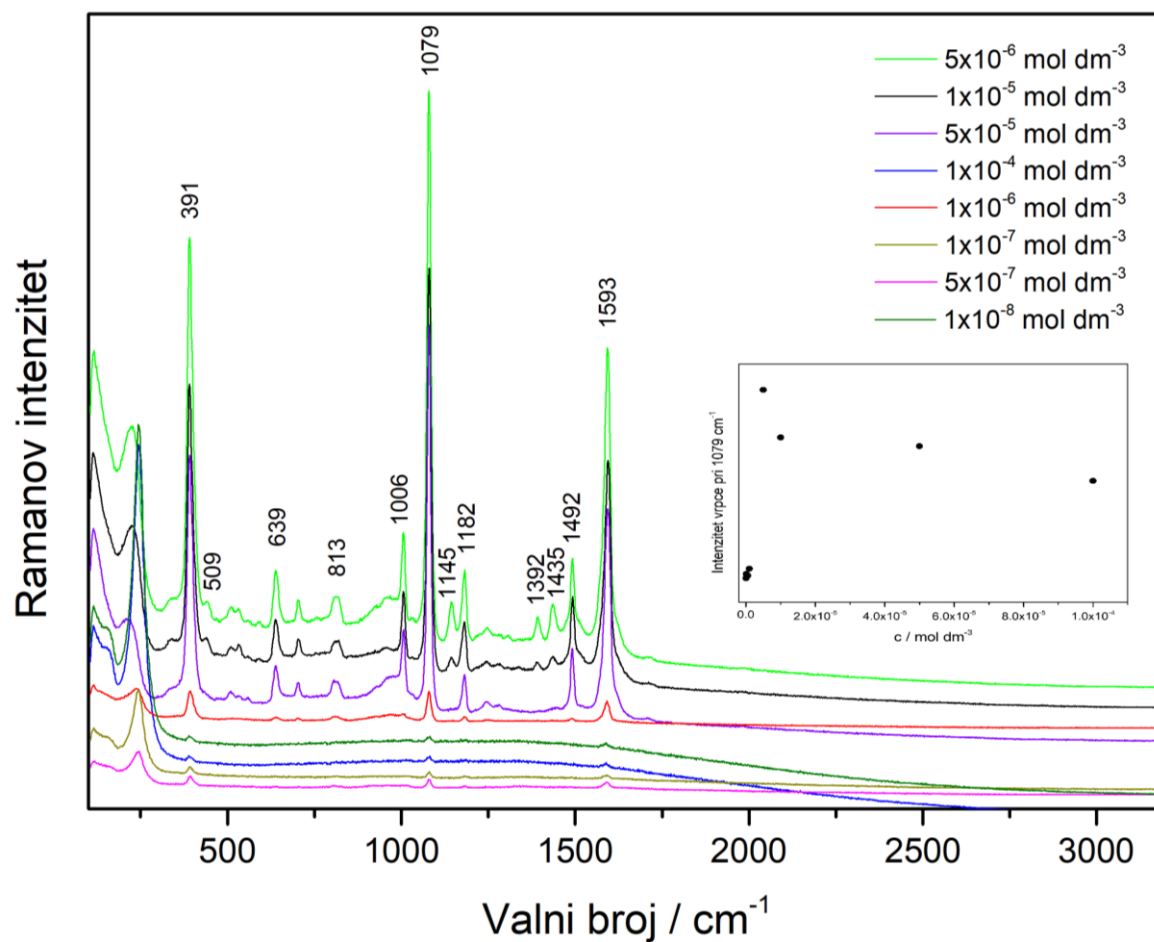
Primjetna je velika razlika u izgledu koncentracijski ovisnih SERS spektara snimanih pri pobudi 532 nm, u odnosu na Ramanove spektre krutine i otopine. U SERS spektrima dobiveni pobudom pri 532 nm javlja se nekolicina vrlo intenzivnih vrpca koje izostaju u Ramanovim spektrima. Radi se o vrpcama na 1144 cm^{-1} , 1390 cm^{-1} i 1434 cm^{-1} . Tradicionalno tumačenje pripisuje te vrpce deformaciji benzenskog prstena u ravnini kao posljedica djelovanja mehanizma kemijskog pojačanja, no novija istraživanja⁴⁴ ukazuju kako se radi o vrpcama istezanja veze –N=N– dimera 4,4'-dimerkaptoazobenzena (**DMAB**) nastalog katalitičkom reakcijom dimerizacije molekula **PATF** na površini metala pod utjecajem laserskog zračenja, što rezultira vrpcama pri 1390 cm^{-1} i 1432 cm^{-1} . Vrpca kod 1144 cm^{-1} potječe od deformacije C–H veze izvan ravnine i posljedica je promjene nagiba molekule u odnosu na metalnu površinu uslijed dimerizacije.⁵⁰ Zanimljivo je da, prema literaturi, dimerizacija molekula analita prvenstveno je otkrivena na čvrstim supstratima korištenjem veće snage lasera, dok je u ovom radu zamijećena u koloidnoj suspenziji snimljenoj pri snazi lasera od 1 mW. Smanjenje koncentracije molekula 4-aminotiofenola u mjernim sustavima ne rezultira značajnim pomacima niti promjenom omjera intenziteta postojećih vrpca, što ukazuje na eventualne vrlo male promjene orijentacije molekula na površini nanočestica srebra.

SERS spektri otopina 4-aminotiofenola dobiveni pobudom pri 785 nm ne pokazuju toliko izrazite promjene u odnosu na Ramanov spektar krutine i otopine snimane kod iste pobude, kao što je bilo u prethodno opisanom slučaju kod pobude pri 532 nm. U SERS spektrima otopina **PATF** dobivenim pobudom pri 785 nm javljaju se vrpce specifične za 4-aminotiofenol pri 1079 cm^{-1} i 1593 cm^{-1} , i značajno su intenzivnije u odnosu na vrpce dimera **DMAB** pri 1145 cm^{-1} , 1392 cm^{-1} i 1435 cm^{-1} . Pretpostavlja se da korištenjem lasera veće valne duljine, manji broj

molekula **PATF** podliježe dimerizaciji pa se na površini metala nalaze i dimeri **DMAB** i monomerne molekule **PATF** i stoga je rezultirajući spektri kombinacija vrpca dimera i monomera. U spektru je uočena i srednje intenzivna vrpca pri 228 cm^{-1} koja odgovara istezanju veze između atoma sumpora molekule **PATF** i površine srebra. Vrlo intenzivna vrpca na 391 cm^{-1} potječe od vibracije deformacije C–S veze i upućuje na zaključak da je molekula analita orijentirana prema nanočestici na način da je tiolni dio strukture smješten vrlo blizu metalne površine. Vrpce u SERS spektrima dobiveni pobudom pri 785 nm ne pokazuju linearni porast s porastom koncentracije (umetak u slici 16) te je najveći intenzitet uočen za uzorak koncentracije, $c = 5 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$. Granica detekcije iznosi $1 \times 10^{-7}\text{ mol dm}^{-3}$.



Slika 15. SERS spektri spoja **PATF** različitih koncentracija ($1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4}\text{ mol dm}^{-3}$) u koloidnoj suspenziji srebra snimljeni pri valnoj duljini pobude 532 nm , snaga lasera $1,21\text{ mW}$



Slika 16. SERS spektri spoja **PATF** različitih koncentracija ($1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³) u koloidnoj suspenziji srebra snimljeni pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 3,19 mW

Tablica 6. Asignacija osnovnih vrpci u SERS spektrima otopina **PATF** množinske koncentracije $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ u koloidnoj suspenziji srebra, pri valnim duljinama pobude 532 i 785 nm⁴⁰

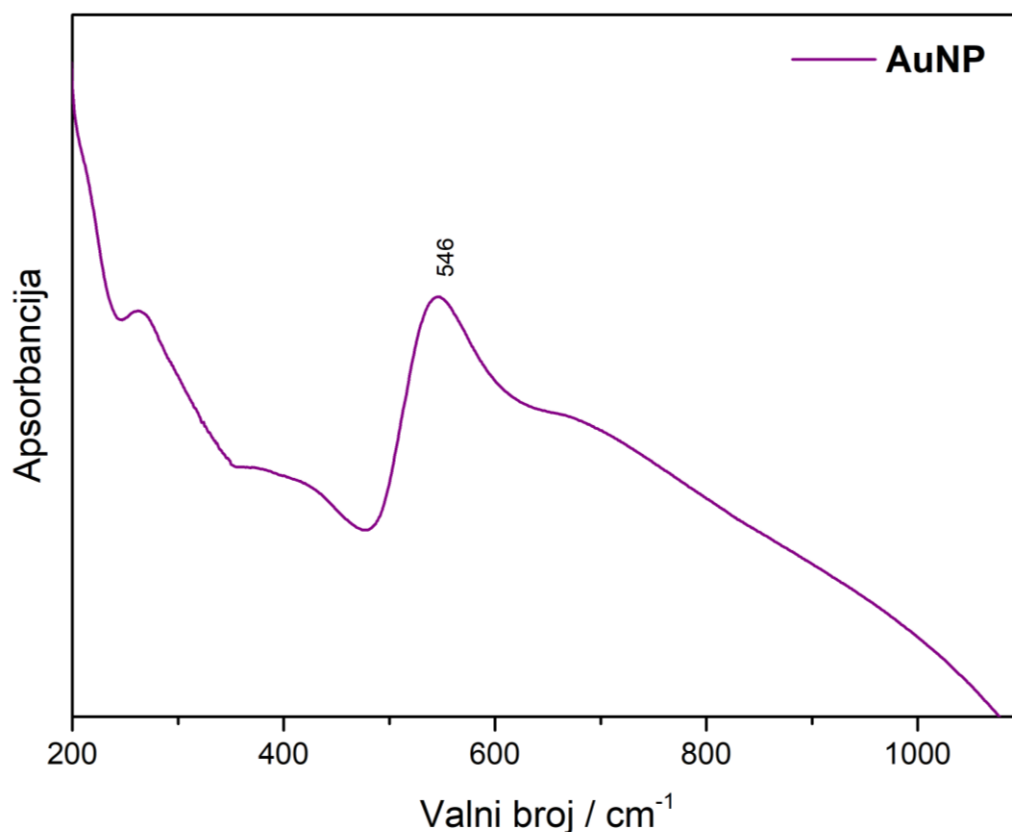
| Valni broj / cm^{-1} | | Vibracija |
|--|----------------------------|--|
| $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ | | |
| $\lambda = 532 \text{ nm}$ | $\lambda = 785 \text{ nm}$ | |
| 1578 | 1593 | $\nu \text{ C-C}$ |
| 1491 | 1492 | $\nu \text{ C-C} +$ $\delta \text{ C-H}$ |
| 1434 | 1435 | $\delta \text{ -N=N-}^*$ |
| 1390 | 1392 | $\delta \text{ -N=N-}^*$ |
| 1192 | 1182 | $\delta \text{ C-H}$ |
| 1144 | 1145 | $\delta \text{ C-H}$ |
| 1078 | 1079 | $\nu \text{ C-S}$ |
| 1006 | 1006 | $\delta \text{ C-C} +$ $\delta \text{ C-C-C}$ |
| 820 | 813 | $\delta_{\text{oop}} \text{ C-H}$ |
| 635 | 639 | $\delta \text{ C-C-C}$ |
| 512 | 509 | $\delta \text{ C-C-C}$ |
| 390 | 391 | $\delta \text{ C-S}$ |

Kratice: ν – istezanje, δ – deformacija, oop – izvan ravnine, * – DMAB

4.3. Nanočestice zlata

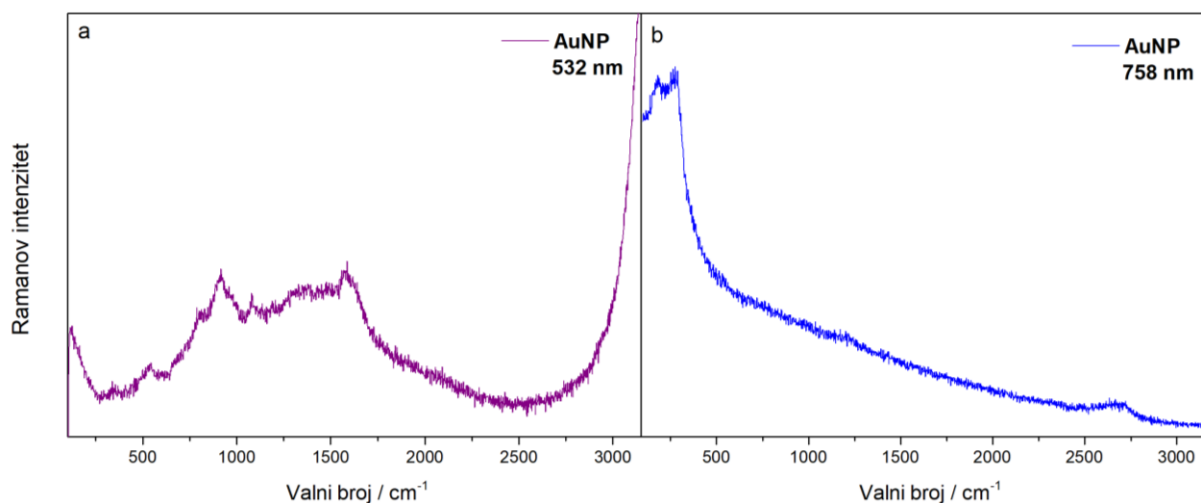
4.3.1. Karakterizacija koloidne suspenzije zlata

Koloidnoj suspenziji nanočestica zlata s citratnim ionima na površini izmjeren je pH = 3,37. Snimanjem UV/Vis/NIR apsorpcijskog spektra (slika 9) određena je valna duljina maksimalne apsorpcije tj. valna duljina rezonancije plazmona pri 546 nm.



Slika 9. UV/Vis/NIR apsorpcijski spektar koloidne suspenzije nanočestica zlata

Ramanovi spektri pripremljene koloidne suspenzije nanočestica zlata pri valnim duljinama pobude 532 i 785 nm prikazani su na slici 10. Spektar dobiven pobudom pri 532 nm sadrži nekolicinu širokih vrpca slabog intenziteta koje se mogu pripisati vibracijama citratnih aniona i njihovih razgradnih produkata pri sljedećim valnim brojevima: 544 cm^{-1} , 916 cm^{-1} i 1587 cm^{-1} . Nakon pobude pri 785 nm, u spektru se pojavljuje karakteristična intenzivna vrpca istezanja Au–O veze pri 253 cm^{-1} koja nastaje između atoma kisika citratnih aniona i površine nanočestice zlata, koje okružuju i stabiliziraju citratni anioni.³⁴



Slika 10. Ramanovi spektri koloidnih suspenzija nanočestica zlata: a) AuNP pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 60,5 mW i b) AuNP pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 159,5 mW

4.3.2. Koncentracijski ovisni SERS spektri u koloidu zlata

Snimljeni su koncentracijski ovisni SERS spektri modelne molekule **MetB** u pripremljenoj koloidnoj suspenziji zlata u koncentracijskom rasponu $5 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³ pri valnim duljinama pobuda od 532 nm (slika 17) i 785 nm (slika 18).

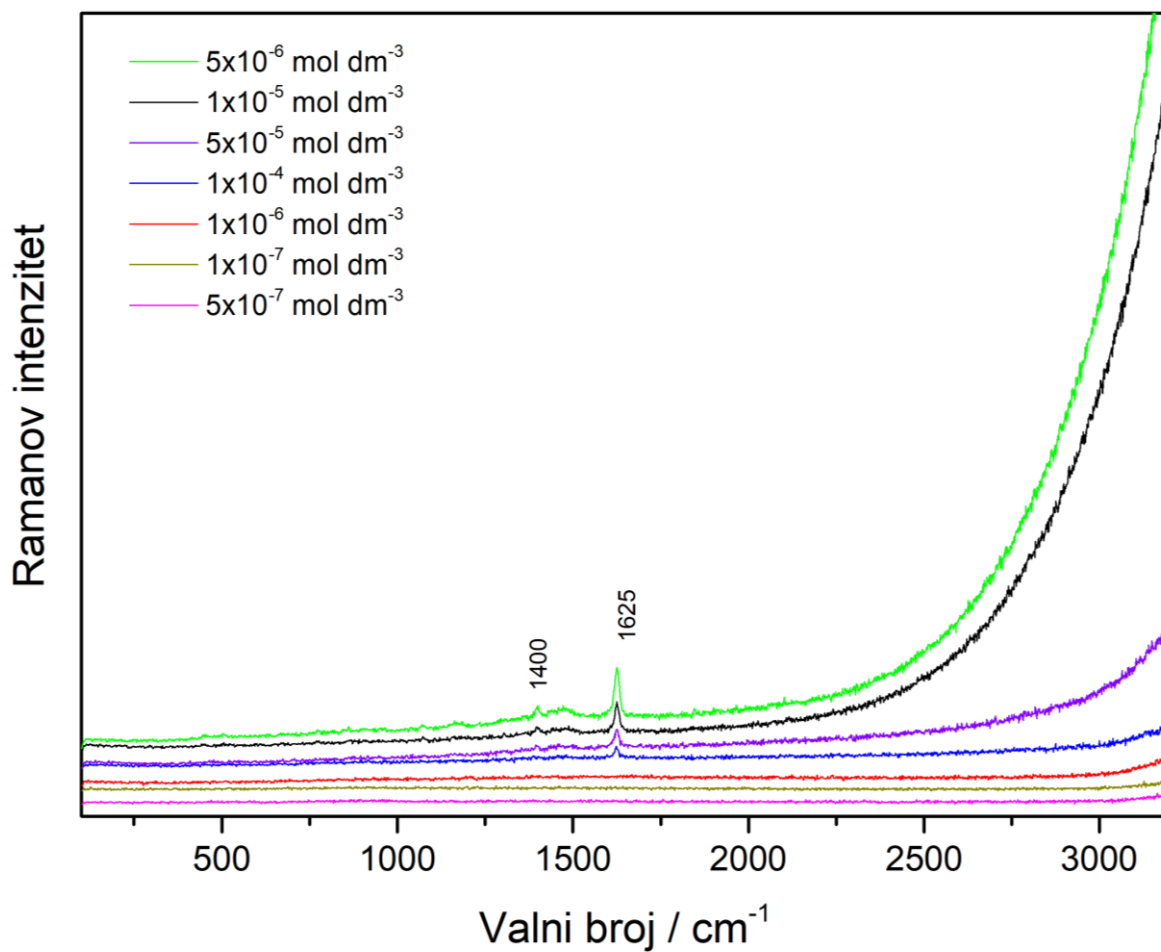
Korištenje pobude pri 532 nm rezultira SERS spektrima u kojima se javljaju samo dvije slabe vrpce vibracija promatrane modelne molekule, a to su istezanja C–C veze središnjeg aromatskog sustava pri 1625 cm⁻¹ te deformacije C–H veze na 1400 cm⁻¹. Spektri su vrlo slični Ramanovom spektru ishodne otopine metilenskog modrila. Mali broj uočenih vrpca objašnjava se fluorescencijom uzorka gdje nije moguće koristiti pobudu veće snage jer dolazi do zasićenja detektora, a spektri dobiveni pri maloj snazi pobude sadrže mali broj slabih vrpca molekula **MetB**. Najniža koncentracija analita u kojoj su vidljive vrpce analita je ista ona pri kojoj se pojavljuju najintenzivnije vrpce u analiziranoj seriji otopina, $c = 5 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³. U ovom supstratu intenziteti vrpca u spektrima također se ne mijenjaju linearno s promjenom koncentracije i granica detekcije je koncentracija kod koje je uočeno najveće pojačanje raspršenja.

Spektre **MetB** dobivene snimanjem uz laser pobudne valne duljine pri 785 nm odlikuju vrlo definirane i intenzivne karakteristične vrpce analita, što nije bio slučaj u Ramanovom spektru ishodne otopine **MetB** mnogo veće koncentracije, $c = 2 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³, nego što su

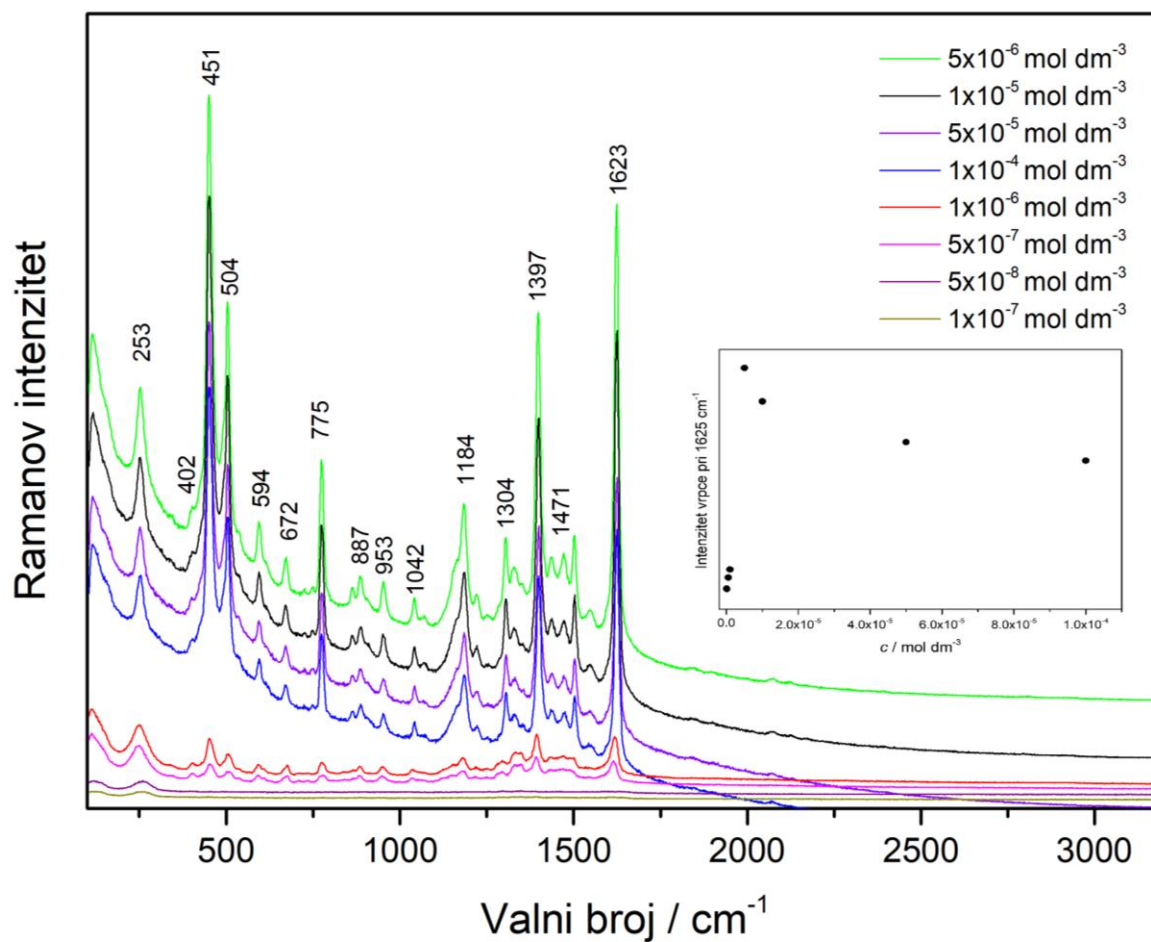
koncentracije mjernih uzoraka za SERS mjerenja, dobiven pri istoj pobudi. Važno je naglasiti da je snaga pobude za SERS spektre par redova veličine manja od snage pobude kojom je dobiven Ramanov spektar otopine **MetB**. Navedeno je dokaz uspješne adsorpcije modelnih molekula na površinu koloidnog zlata. SERS spektri najviših koncentracija **MetB** u mjernim uzorcima prilično nalikuju SERS spektrima istih promatranih koncentracija dobivenih u koloidu srebra. Najintenzivnije vrpce su pri 451 cm^{-1} i 1625 cm^{-1} te potječu od deformacija C–N–C veze i istežanja C–C fenotiazinskog sustava, a slijede ih vrpce na 1397 cm^{-1} i 504 cm^{-1} koje se pripisuju deformacijama C–H veza u ravnini i C–N–C dimetilamino supstituenata. Uočava se i niz karakterističnih vrpca nešto slabijeg intenziteta u području od $500 - 1200\text{ cm}^{-1}$ koje također odgovaraju profilu spektra u koloidu srebra pri koncentracijama većim od $5 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$. U mjernim uzorcima koncentracije $1 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$ i nižim dolazi do značajnih promjena u SERS spektrima na zlatnim nanočesticama. Javlja se nova vrpca pri 402 cm^{-1} , koja pri većim koncentracijama **MetB** u koloidu zlata nije uočena, a odgovara vibraciji deformacije C–S–C veze fenotiazinskog prstena. Također, u spektrima pri niskim koncentracijama analita dolazi do promjene omjera intenziteta postojećih vrpca (Dodatak, slika D3). Usporedbom intenziteta vrpca pri 402 cm^{-1} , 451 cm^{-1} , 504 cm^{-1} i 596 cm^{-1} , koje redom odgovaraju vibracijskim modovima deformacija C–S–C veza, C–N–C veza, C–N–C veza dimetilamino skupina i C–S–C veza, za koncentraciju $c = 5 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$ dobivamo sljedeće odnose: $\delta(\text{C–S–C}) : \delta(\text{C–N–C}) : \delta(\text{C–N–C}^*) : \delta(\text{C–S–C}) = 0,33 : 1 : 0,67 : 0,31$, dok isti omjer intenziteta navedenih vrpca za koncentraciju, $c = 5 \times 10^{-7}\text{ mol dm}^{-3}$, iznosi: $\delta(\text{C–S–C}) : \delta(\text{C–N–C}) : \delta(\text{C–N–C}^*) : \delta(\text{C–S–C}) = 0,67 : 1 : 0,7 : 0,53$. Iz navedenog je jasno vidljiv porast intenziteta vrpca kojima pridonose deformacije C–S–C, u odnosu na intenzitete vrpca koje potječu od C–N–C deformacija. Također, analizom intenziteta vrpca na 672 cm^{-1} , 775 cm^{-1} , 887 cm^{-1} , 953 cm^{-1} koje pripisujemo redom deformacijama C–H veza izvan ravnine, kombiniranim vibracijama istežanja C–S uz deformacije C–H izvan ravnine, deformaciji C–H veza u ravnini i deformaciji C–S–C veza okosnice središnjeg aromatskog sustava, dobiva se sljedeći odnos intenziteta vrpca za veću, a potom manju koncentraciju metilenskog modrila: $\delta_{\text{oop}}(\text{C–H}) : \nu(\text{C–S})/\delta_{\text{oop}}(\text{C–H}) : \delta(\text{C–H}) : \delta(\text{C–S–C}) = 0,59 : 1 : 0,52 : 0,48$ i $\delta_{\text{oop}}(\text{C–H}) : \nu(\text{C–S})/\delta_{\text{oop}}(\text{C–H}) : \delta(\text{C–H}) : \delta(\text{C–S–C}) = 0,95 : 1 : 1 : 0,95$. Ponovno se uočava vrlo značajan porast intenziteta vrpca kojima pridonose vibracije deformacija C–S–C skeleta fenotiazina i C–H veza izvan ravnine. Nadalje, najintenzivnija vrpca pri nižim koncentracijama sada potječe od deformacije C–H veza, a ne C–N–C okosnice fenotiazina te je također

zabilježen jasan pomak položaja spomenutih vrpca u području $500 - 1200 \text{ cm}^{-1}$. Sve navedeno upućuje na promjenu orijentacije molekula metilenskog modrila na površini metala pri nižim koncentracijama, pri čemu se vežu na površinu zlata preko atoma sumpora, što je bitno drugačije slaganje molekula analita na površini zlata, u odnosu na zapaženo pri većim koncentracijama **MetB**. Vrlo se vjerojatno kod većih koncentracija metilenskog modrila u koloidu, molekule spoja orijentiraju prema zlatu i vežu preko atoma dušika u čijem susjedstvu nema supstituenata. Pri nižim koncentracijama **MetB** u sustavu je prisutan daleko manji broj molekula te se one mogu slobodnije pozicionirati na površini metala, neovisno o prisutnim dimetilamino skupinama s obje strane prstena. Upravo zbog okolnih supstituenata molekula ne zauzima apsolutno okomitu konfiguraciju već pod kutom čime zapravo dolaze do izražaja deformacije C–H veza izvan ravnine. Osim toga, poznato je da zlato posjeduje veći afinitet prema atomu sumpora nego atomu dušika, na što ukazuje vrpca pri 253 cm^{-1} , koja pri nižim koncentracijama postaje široka i prilično intenzivna. Spomenutoj vrpca sada doprinosi, osim vibracije istezanje Au–O veze između metala i atoma kisika iz citrata koji okružuju i stabiliziraju nanočestice, također i vibracija istezanja Au–S veze, kao dokaz vezanja **MetB** na zlato preko atoma sumpora fenotiazinskog sustava.

Trend ovisnosti intenziteta vrpca u SERS spektrima o koncentraciji analita (umetak u slici 18) prisutnog u koloidu zlata nije linearan kao ni u prethodnim koncentracijskim analizama. Ovisnost je praćena za Ramanov intenzitet vrpce pri 1625 cm^{-1} . Koncentracija pri kojoj je zabilježen SERS spektar s najintenzivnijim vrpcama je $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, dok ustanovljena detekcijska granica iznosi $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. Detaljna asignacija SERS spektara dobivenih pobudom pri 785 nm nalazi se u tablici 7.



Slika 17. SERS spektri spoja **MetB** različitih koncentracija u koloidnoj suspenziji zlata, snimljeni pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 1,2 mW



Slika 18. SERS spektri spoja **MetB** različitih koncentracija u koloidnoj suspenziji zlata, snimljeni pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 0,12 mW

Tablica 7. Asignacija osnovnih vrpci u SERS spektrima otopina **MetB** množinske koncentracije $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ i $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ u koloidnoj suspenziji zlata, pri valnoj duljini pobude 785 nm³⁹⁻⁴²

| Valni broj / cm^{-1} | | Vibracija |
|--|--|--------------------------------------|
| $\lambda = 785 \text{ nm}$ | | |
| $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ | $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ | |
| 1623 | 1618 | v C–C |
| 1502 | | v C–C |
| 1471 | | v C–C + δ C–H |
| 1397 | 1394 | δ C–H |
| 1304 | 1293 | v C–N* |
| 1184 | 1180 | δ C–H* |
| 1042 | 1036 | v C–S + δ C–H |
| 953 | 953 | δ C–S–C |
| 887 | 886 | δ C–H |
| 775 | 777 | v C–S + δ_{oop} C–H |
| 672 | 677 | δ_{oop} C–H |
| 594 | 596 | δ C–S–C |
| 504 | 506 | δ C–N–C* |
| 451 | 453 | δ C–N–C |
| 402 | 402 | δ C–S–C |
| 253 | 250 | v Ag–S |

Kratice: v – istezanje, δ – deformacija, oop – izvan ravnine * – dimetialmino

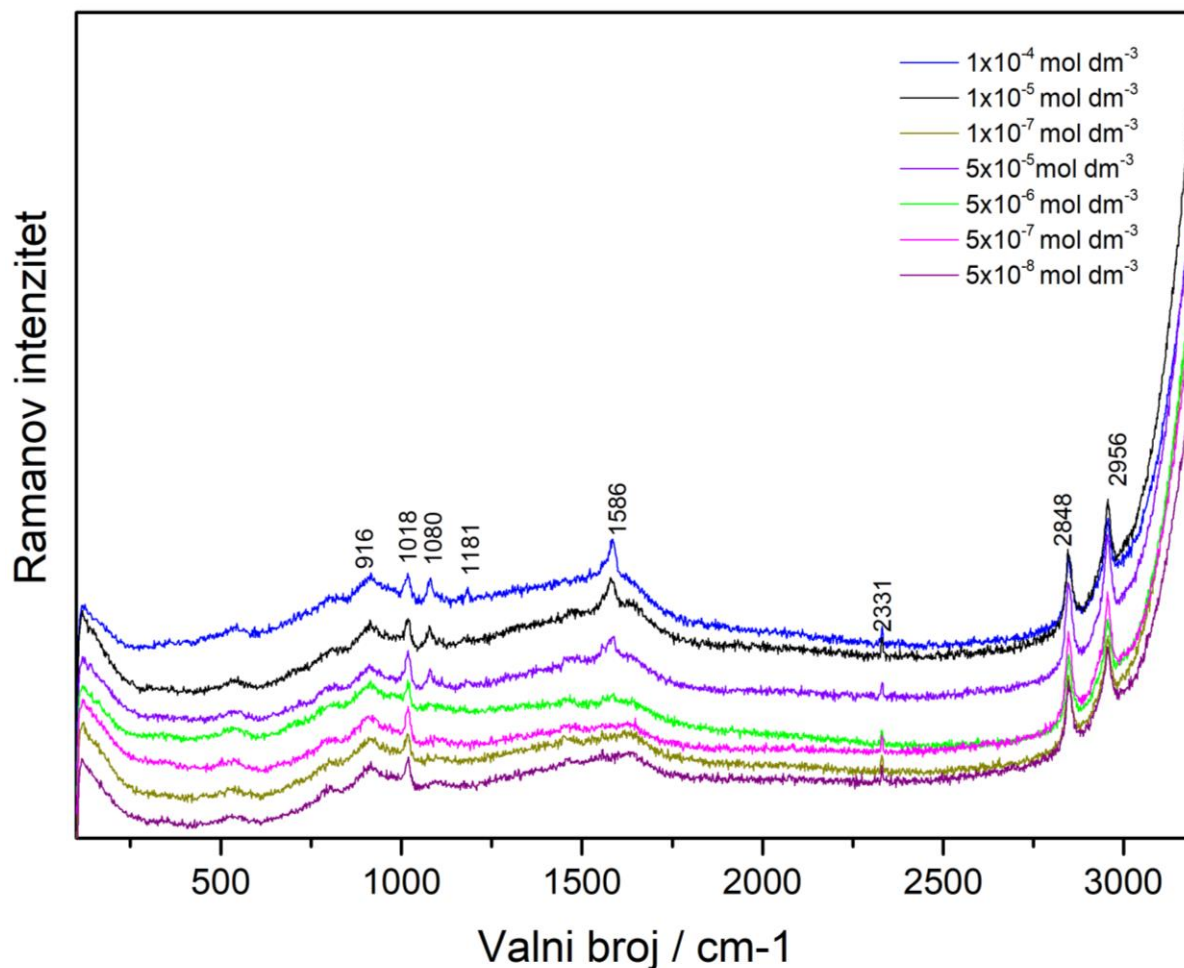
Koncentracijski ovisni SERS spektri modelne molekule **PATF** u pripremljenoj koloidnoj suspenziji zlata, u području množinskih koncentracija $5 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, snimljeni su pri valnim duljinama pobude od 532 nm (slika 19) i 785 nm (slika 20). Detaljna asignacija se nalazi u tablici 8.

SERS spektri dobiveni pobudom pri 532 nm sadrže mali broj vrpca slabog intenziteta koje odgovaraju vibracijama modelne molekule **PATF**. Uočene su vrpce istezanja C–S i C–C veza na 1080 cm^{-1} i 1586 cm^{-1} . Nazire se i vrpca na 1181 cm^{-1} koja potječe od deformacija C–H veza. Zanimljivo, u spektru su vidljive karakteristične vrpce metanola pri 1018 cm^{-1} , 2484 cm^{-1} i 2956 cm^{-1} , mada je njegov volumni udio u sustavu samo 5 %. Najveće pojačanje Ramanovog raspršenja zabilježeno je u uzorku najveće koncentracije, $c = 1 \times 10^{-4}\text{ mol dm}^{-3}$, dok je koncentracija, $c = 1 \times 10^{-5}\text{ mol dm}^{-3}$ posljednja u nizu u čijem su SERS spektru vidljive vrpce 4-aminotiofenola i ona se smatra granicom detekcije za promatrani supstrat i modelnu molekulu.

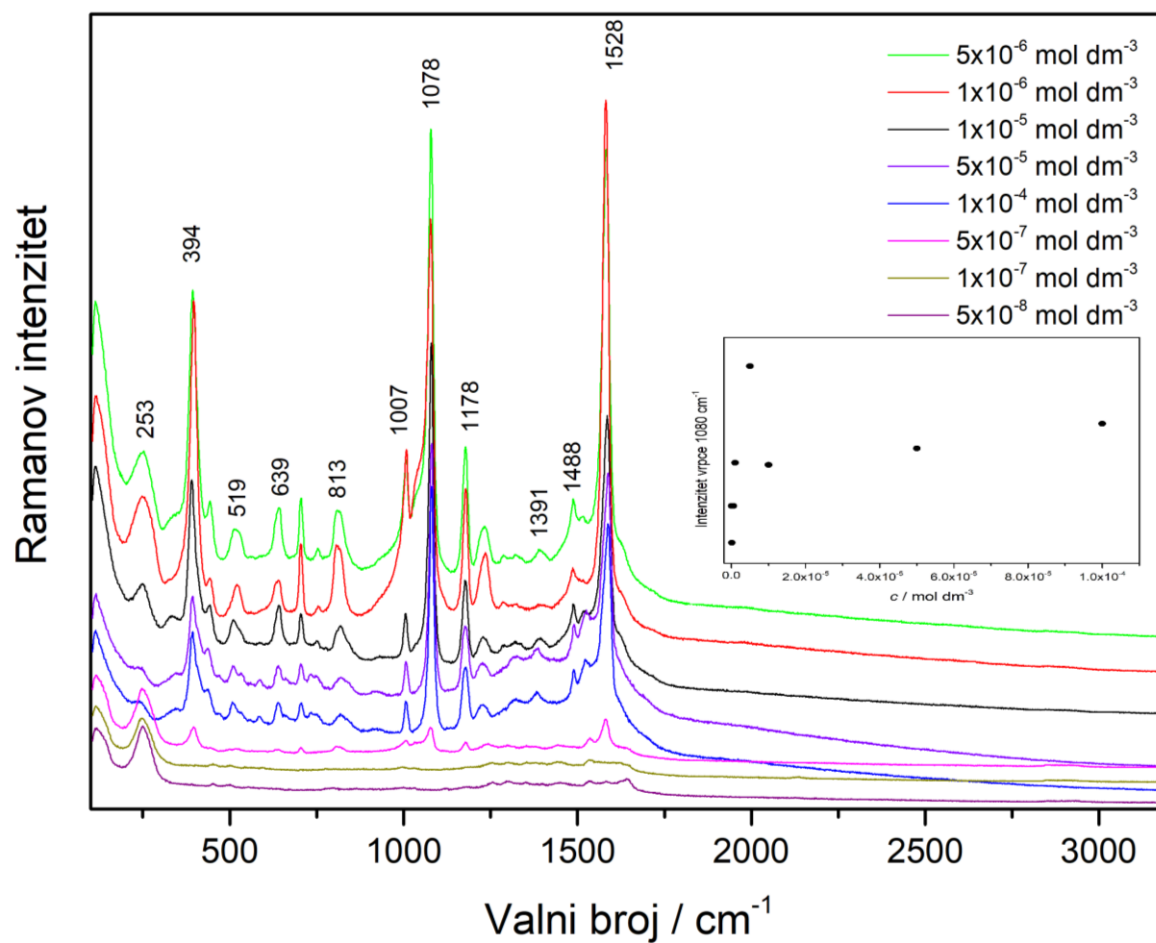
U koncentracijski ovisnim SERS spektrima modelne molekule **PATF**, dobivenim pri pobudi od 785 nm, uočene su vrlo oštre i intenzivne vrpce analita, gdje se najviše ističu vrpce istezanja C–S i C–C veza na 1078 cm^{-1} i 1582 cm^{-1} . Vrpca pri 1078 cm^{-1} korištena je za utvrđivanje ovisnosti intenziteta vrpce u SERS spektrima o koncentraciji (umetak u slici 20) i uočeno je da uzorak koncentracije, $c = 5 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$, najintenzivnije raspršuje zračenje. Pri nižim valnim brojevima, u SERS spektrima se javlja široka vrpca na 253 cm^{-1} . Iako i Ramanov spektar čistog koloida zlata pokazuje vrpce oko 250 cm^{-1} koja se pripisuje vezi zlato – kisik iz citratnih iona koji okružuju nanočestice, ovdje se pretpostavlja da uočenoj vrpce u SERS spektrima pridonosi i istezanje Au–S veze, s obzirom na intenzivne vrpce koju potječu od vibracija istezanja C–S veze i upućuju na zaključak da je tiolni dio molekula **PATF** smješten jako blizu površine zlata. Uočeno je da smanjenjem koncentracije molekula **PATF** u mjernim uzorcima dolazi do manje promjene u omjeru intenziteta vrpce kod 1078 cm^{-1} (istezanje C–S veze) i 1528 cm^{-1} (istezanje C–C veze) u korist vrpce pri nižem valnom broju, što je dodatan dokaz da se smanjenjem koncentracije molekule 4-aminotiofenola optimalnije smještaju prema površini zlata, povezujući se s metalom preko atoma sumpora.

U SERS spektrima **PATF** u koloidu zlata nisu zamijećene vrpce koje odgovaraju dimeru **DMAB** u području od $1140 - 1440\text{ cm}^{-1}$, a javljaju se u spektrima dobivenim na nanočesticama srebra. Iz literature je poznato da spomenuti vibracijski modovi ovise o valnoj duljini pobudnog zračenja, prirodi metalnog supstrata i pH-vrijednosti okolnog medija. Navodi se kako spomenute vibracije nisu vidljive u SERS spektrima snimanim uz korištenje nanočestica zlata pri kiselom pH, dok su iste vidljive za koloid srebra pri također kiselom pH.⁵¹ Profili SERS spektara otopina **PATF** dobivenih na srebru pri pobudama 532 i 785 nm su vrlo slični, dok za zlato ta sličnost među spektrima različitih pobuda izostaje. Uočeno je da neovisno o vrsti

metala, u svim promatranim SERS supstratima molekule **PATF** se vežu preko sumpora tiolne skupine s nanočesticama i srebra i zlata.



Slika 19. SERS spektri spoja **PATF** različitih koncentracija (5×10^{-8} – 1×10^{-4} mol dm⁻³) u koloidnoj suspenziji zlata snimljeni pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 60,5 mW



Slika 20. SERS spektri spoja **PATF** različitih koncentracija ($5 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u koloidnoj suspenziji zlata snimljeni pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 3,19 mW

Tablica 8. Asignacija osnovnih vrpci u SERS spektrima otopina **PATF** koncentracije 1×10^{-4} mol dm⁻³ i 5×10^{-6} mol dm⁻³ u koloidnoj suspenziji zlata, pri valnim duljinama pobude 532 i 785 nm^{39,41,42}

| Valni broj / cm ⁻¹ | | Vibracija |
|---|---|----------------------------------|
| $c = 1 \times 10^{-4}$ mol dm ⁻³ | $c = 5 \times 10^{-6}$ mol dm ⁻³ | |
| $\lambda = 532$ nm | $\lambda = 785$ nm | |
| 1586 | 1582 | ν C–C |
| | 1488 | ν C–C |
| | 1391 | ν C–C + δ C–H |
| 1181 | 1178 | δ C–H |
| 1080 | 1078 | ν C–S |
| 1018 | 1007 | δ C–C + δ C–C–C |
| | 813 | δ_{oop} C–H |
| | 639 | δ C–C–C |
| | 519 | δ C–C–C |
| | 394 | δ C–S |
| | 253 | ν Au–O / ν Au–S |

Kratice: ν – istezanje, δ – deformacija, oop – izvan ravnine

4.4. Koncentracijski ovisni SERS spektri na čvrstim supstratima

Prethodno opisane nanočestice srebra i zlata dispergirane u koloidnim suspenzijama pokazale su se kao uspješni SERS supstrati koji rezultiraju spektrima bogatim intenzivnim vrpčama modelnih molekula, s mikromolarnim granicama detekcije. Nedostatak koloida kao supstrata u spektroskopiji površinski pojačanog Ramanovog raspršenja je prvenstveno stabilnost jer koloidi stajanjem podliježu agregaciji što dovodi do slabije ponovljivosti rezultata, ako se ne koriste svježe pripravljene suspenzije u SERS analizama. Također, priličan problem je analiza dobivenih spektara zbog anomalnih vrpca koje potječu od redukcijskog sredstva i vrsta u suspenziji nastalih prilikom reakcije stvaranja nanočestica, a koje također dobro raspršuju zračenje te mogu biti i u kompeticiji s molekulama analita za vezanje na metalnu površinu. Primjer je Ramanov spektar koloida srebra (slika 8) koji sadrži velik broj anomalnih vrpca koje potječu isključivo od vibracija vrsta u pripremljenoj koloidnoj suspenziji. Kako bi nanočestice ostale u dispergiranom obliku, i radi sprječavanja prekomjerne agregacije i potencijalnog taloženja, nanočestice u koloidu zahtijevaju tvari koje će ih stabilizirati. Najčešće su to nabijeni ioni koji elektrostatskim odbijanjem sprječavaju taloženje nanočestica, ali istovremeno omogućavaju elektrostatsko privlačenje suprotno nabijenih molekula analita koje se na taj način približavaju nanočesticama metala. No, opisano je nepogodno za neutralne molekule ili molekule naboja jednakog naboju stabilizirajućih iona, jer vrste oko nanočestica sterički i elektrostatski sprječavaju da se molekule analita približe nanočesticama na udaljenost koja je potrebna da bi došlo do pojačanja Ramanovog raspršenja.

Korištenjem čvrstih supstrata može se smanjiti dio navedenih nedostataka koloidnih suspenzija kao SERS supstrata. Čvrsti supstrati su stabilniji jer nema mogućnosti dodatne agregacije i taloženja nakon pripreme supstrata. Također, manji je utjecaj vrsta nastalih nakon redukcije na izgled SERS spektra. S obzirom na izvedbu čvrstih supstrata, u teoriji je moguće određivanje različitih molekula, bez obzira na naboj. U ovom radu čvrsti supstrati su pripremani na način da su se nanočestice metala imobilizirale na silanizirane staklene nosače.

4.4.1. Silanizirano staklo s nanočesticama srebra

Tretiranjem mikroskopskog stakalca klorovodičnom kiselinom i Piranha otopinom dolazi do nagrizanja površine i stvaranja neravne i hidrofилne površine. U svrhu imobilizacije koloidnih nanočestica srebra na pripremljeni nosač, provodi se postupak silanizacije (3-

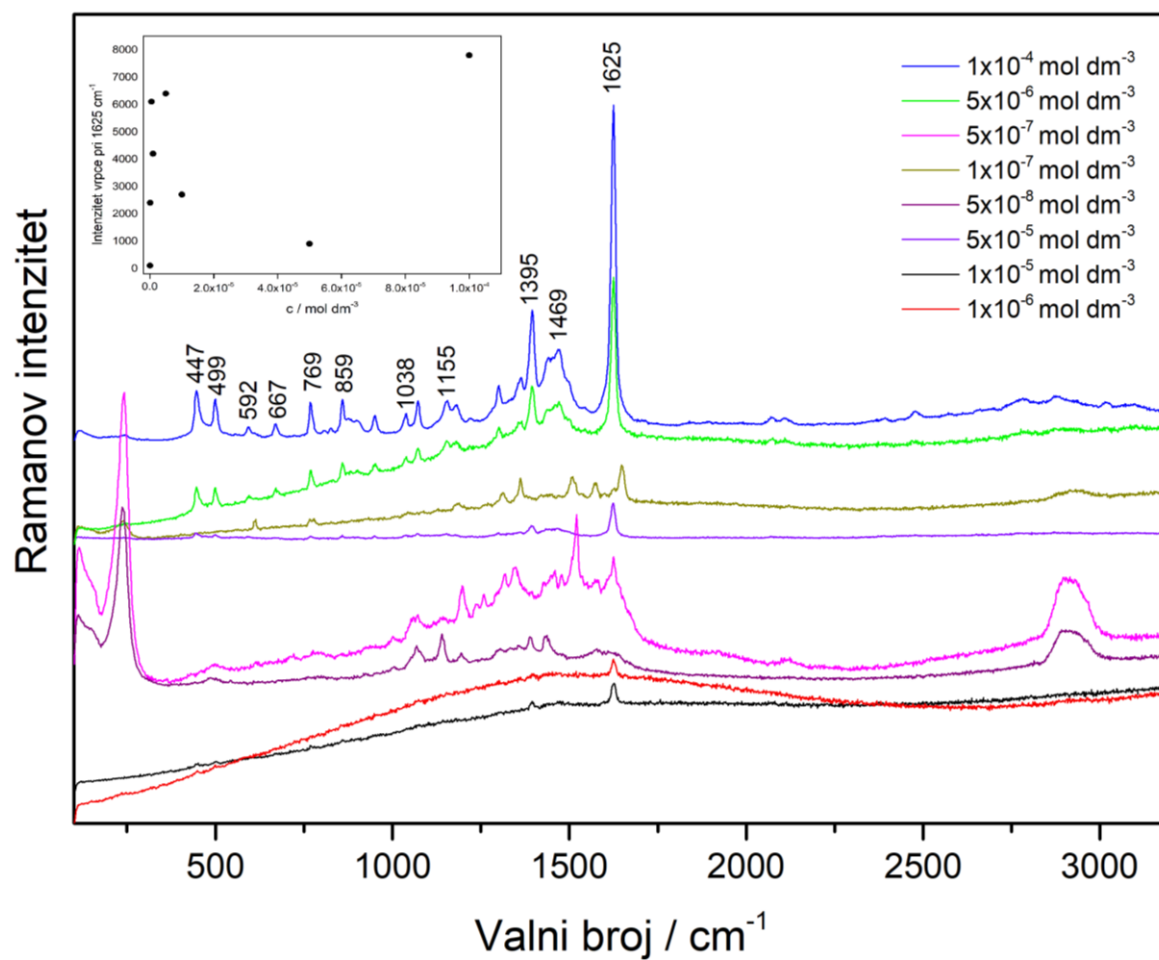
aminopropil)trimetoksisilanom (APTMS) čime se uvode primarne amino skupine na površinu stakla. Uranjanjem silaniziranog stakla u koloidnu suspenziju nanočestice srebra vežu se uslijed elektrostatskih interakcija pozitivno nabijenog dušika amino skupina i negativno nabijenih kloridnih iona na površini nanočestica srebra. Uz elektrostatske interakcije imobilizaciji nanočestica srebra doprinose i van der Waalsove sile te slabe kovalentne veze. O uspješnosti interakcije Ag–N ide u prilog pojava vrpce oko 250 cm^{-1} u Ramanovom spektru silaniziranog stakla s nanočesticama (Dodatak, slika D6) u usporedbi sa isključivo silaniziranim staklom (Dodatak, slika D5). Mikropipetom se aplicira mjerni uzorak na površinu čvrstog supstrata u jednu točku, gdje se nakon sušenja snimaju površinsko pojačani Ramanovi spektri na tri mjesta.

Kako bi se odredio doprinos raspršenja tretiranog stakla u spektrima uzorka, snimljeni su Ramanovi spektri stakla neposredno prije silaniziranja pri pobudama od 532 i 785 nm (Dodatak, slika D4). Uočavaju se karakteristične vrpce koje potječu od kombinacije istežanja i deformacije veza Si–O–Si oko 550 cm^{-1} , 1350 cm^{-1} i 1850 cm^{-1} . Radi usporedbe također su snimljeni spektri čvrstog supstrata nakon imobilizacije koloidnog srebra pri obje valne duljine pobude (Dodatak, slika D3).

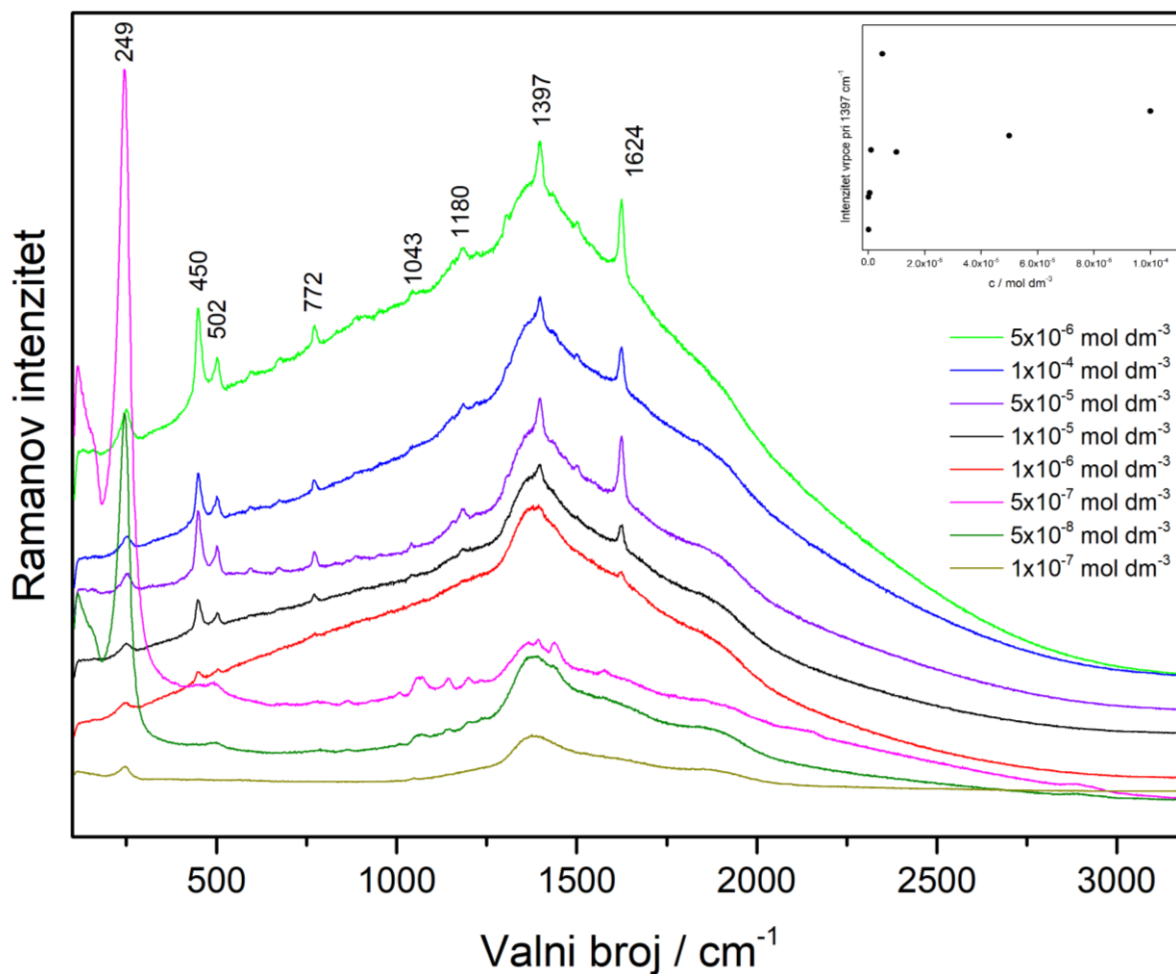
SERS spektri metilenskog modrila, snimani u koncentracijskom rasponu $5 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} na čvrstom supstratu s imobiliziranim nanočesticama srebra pri obje valne duljine pobude prikazani su na slikama 21 i 22.

Korištenjem pobudnog zračenja pri 532 nm profili dobivenih SERS spektara različitih koncentracija **MetB** bitno se razlikuju (slika 21). Karakteristične vrpce metilenskog modrila vrlo su intenzivne i dobro definirane u SERS spektru snimljenom pri najvećoj koncentraciji analita, $c = 1 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} . Najintenzivnije vrpce javljaju se pri 1625 cm^{-1} i 1395 cm^{-1} te potječu od vibracija istežanja C–C veza u aromatskom sustavu, odnosno deformacija C–H vezanih na fenotiazinski sustav. Nagli pad intenziteta vrpce u spektru sljedeće niže koncentracije pa zatim daljnji porast intenziteta vrpce u spektrima otopina manjih koncentracija upućuje na nehomogenost pripremljenog čvrstog supstrata s nanočesticama srebra. Tome u prilog ide i povećanje bazne linije u pojedinim spektrima te pojava vrpca u spektrima najnižih istraživanih koncentracija **MetB** koje se podudaraju s vrpcama uočenim u Ramanovim spektrima silaniziranih stakalca (Dodatak, slika D6). Osim nejednolične raspodjele nanočestica srebra po čvrstom nosaču, opisane promjene u spektrima su posljedica ponegdje jako tankog sloja nanočestica na staklenim nosačima, zbog čega se pojavljuju u spektrima vrpce samog supstrata.

U SERS spektrima modelne molekula **MetB** dobivenima pri pobudi od 785 nm uočena je široka intenzivna vrpca oko 1400 cm^{-1} koja se pripisuje fotoluminescenciji stakla. Također, uočeno je podizanje bazne linije zbog fluorescencije modelne molekule. No, unatoč spomenutome, u SERS spektrima se javljaju karakteristične vrpce za **MetB**. Vrpce istezanja veza C–C aromatskog sustava su prisutne na 1642 cm^{-1} , dok je također vrlo izražajna vibracija deformacije C–N–C veze na 450 cm^{-1} . Pri 502 cm^{-1} i 1180 cm^{-1} uočavaju se vibracije deformacija dimetilamino supstituenata. Vrpca oko 250 cm^{-1} prisutna je u Ramanovom spektru čistog metalnog supstrata (Dodatak, slika D6), no u SERS spektrima **MetB** na čvrstom supstratu postaje široka, što upućuje na vezanje modelnih molekula na nanočestice srebra. Najintenzivnije vrpce nalaze se u spektru najveće koncentracije, dok je granica detekcije određena pri koncentraciji, $c = 1 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$. Spektri **MetB** različitih koncentracija, dobiveni pobudom pri 785 nm, kao i u slučaju pobude kod 532 nm, ne pokazuju pravilan trend promjene intenziteta vrpce ovisno o koncentraciji, te potvrđuju tezu o nehomogenosti pripremljenog čvrstog supstrata srebra.



Slika 21. SERS spektri spoja **MetB** različitih koncentracija na nanočesticama srebra imobiliziranim na staklu, pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 0,086 mW



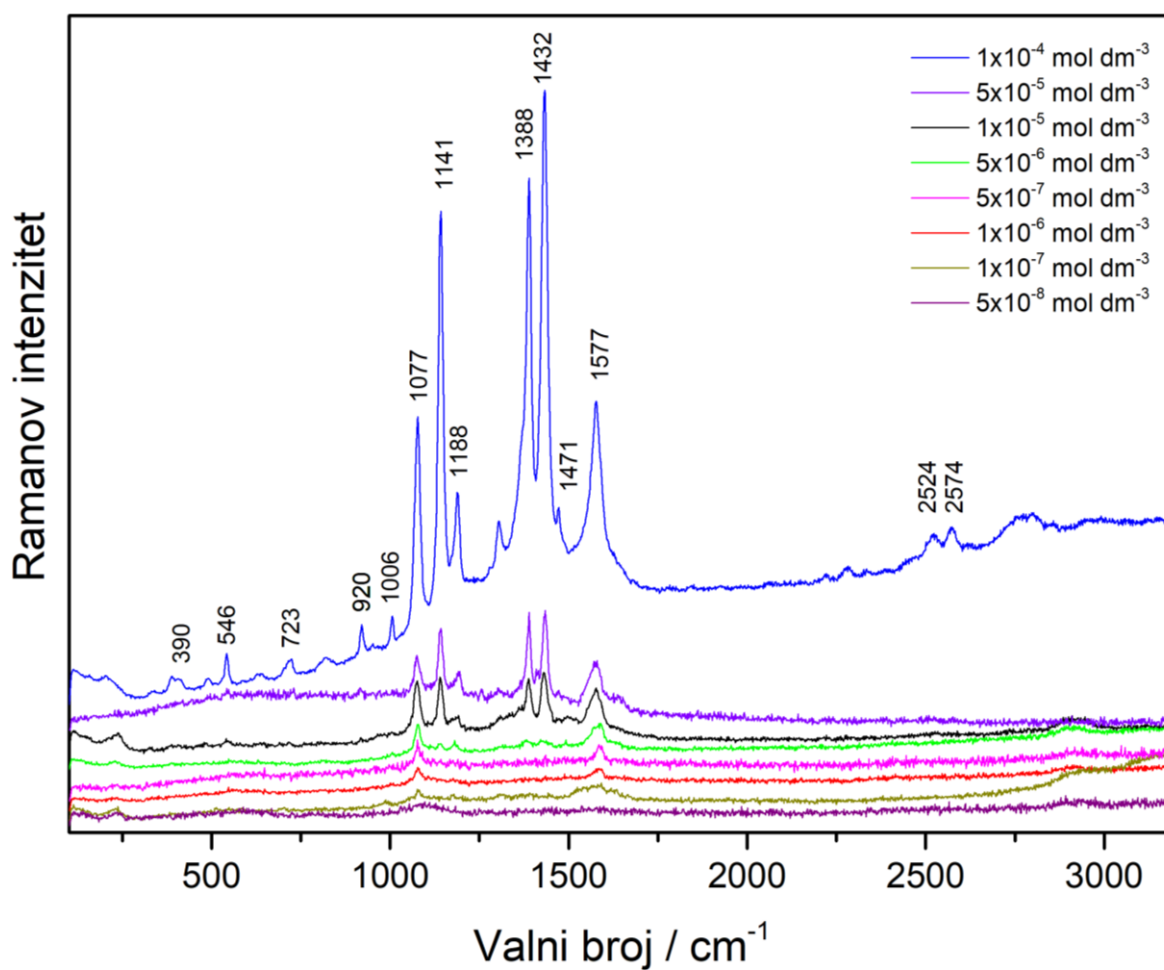
Slika 22. SERS spektri spoja **MetB** različitih koncentracija na nanočesticama srebra imobiliziranim na staklu, pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 0,195 mW

Snimljeni su SERS spektri modelne molekule **PATF** u rasponu koncentracija 5×10^{-8} – 1×10^{-4} mol dm⁻³ na nanočesticama srebra imobiliziranim na silaniziranom staklu, pri valnim duljinama pobude 532 i 785 nm (slike 23 i 24).

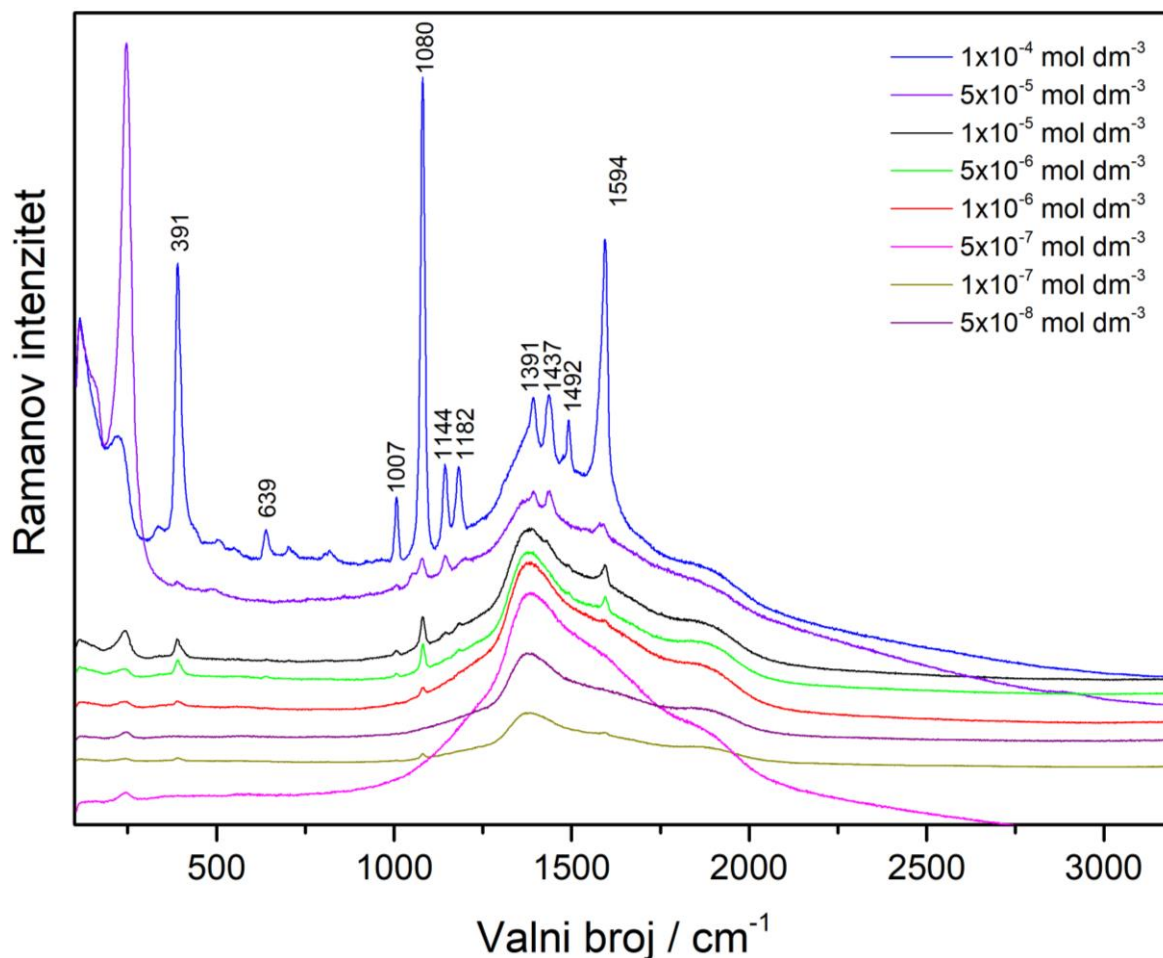
Među SERS spektrima **PATF** dobivenima pobudom pri 532 nm, posebno se ističe spektar najveće koncentracije, $c = 1 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³, koji sadrži jasno definirane te vrlo intenzivne vrpce, podrijetlom od vibracijskih modova promatrane modelne molekule. Tako se pri višim valnim brojevima oko 1500 cm⁻¹ javljaju vrpce istezanja C–C veze u aromatu, dok se vrpce deformacija C–H javljaju pri 1006 cm⁻¹ i 1188 cm⁻¹. Istezanje C–S veze doprinosi vrpci pri 1077 cm⁻¹, a njena deformacija rezultira vrpcom na 390 cm⁻¹. Osim navedenih, vrlo su

intenzivne vrpce koje odgovaraju dimeru **DMAB** na 1141 cm^{-1} , 1388 cm^{-1} i 1432 cm^{-1} . Smanjenje koncentracije molekula 4-aminotiofenola u sustava rezultira padom intenziteta vrpce, tako da je koncentracija, $c = 1 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$ posljednja u kojoj su uočene vrpce modelne molekule.

Pobudno zračenje pri 785 nm rezultira SERS spektrima **PATF** u kojima se također zapaža široka vrpca u području $1400\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$, kao i kod SERS spektara **MetB**, i nastaje zbog fotoluminescencije stakla koje služi kao čvrsta podloga za imobilizaciju metalnih nanočestica. Kao i kod prethodno opisanih spektara nastalih pobudom pri 532 nm , i nakon pobude laserom pri 785 nm , mjerni uzorak najveće koncentracije, $c = 1 \times 10^{-4}\text{ mol dm}^{-3}$, najintenzivnije raspršuje zračenje i daje spektar bogat vrpcama analita. Uočene su sve karakteristične vrpce **PATF**, pa tako najintenzivnije pri 1080 cm^{-1} i 1595 cm^{-1} pripisujemo vibracijama istezanja C–S i C–C veza, dok vrpca na 391 cm^{-1} odgovara deformaciji C–S veze. Spomenute vrpce su pokazatelji da se molekula **PATF** veže na površinu metala preko atoma sumpora tiolne skupine. Kao i u ranije opisanim SERS spektrima koloidne suspenzije srebra pri istoj pobudi, vrpce pripisane dimeru **DMAB** intenzitetom su daleko slabije od vrpca pri 1080 cm^{-1} i 1595 cm^{-1} , vrlo vjerojatno zbog manjeg broja molekula koje podliježu dimerizaciji zbog korištenja lasera veće valne duljine. Smanjenjem koncentracije, intenziteti vrpca u SERS spektru drastično padaju i spektrom dominira vrpca fotoluminescencije stakla oko 1400 cm^{-1} .



Slika 23. SERS spektri spoja **PATF** različitih koncentracija na nanočesticama srebra imobiliziranim na staklu, pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 0,086 mW



Slika 24. SERS spektri spoja **PATF** različitih koncentracija na nanočesticama srebra imobiliziranim na staklu, pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 0,195 mW

4.4.2. Silanizirano staklo s nanočesticama zlata

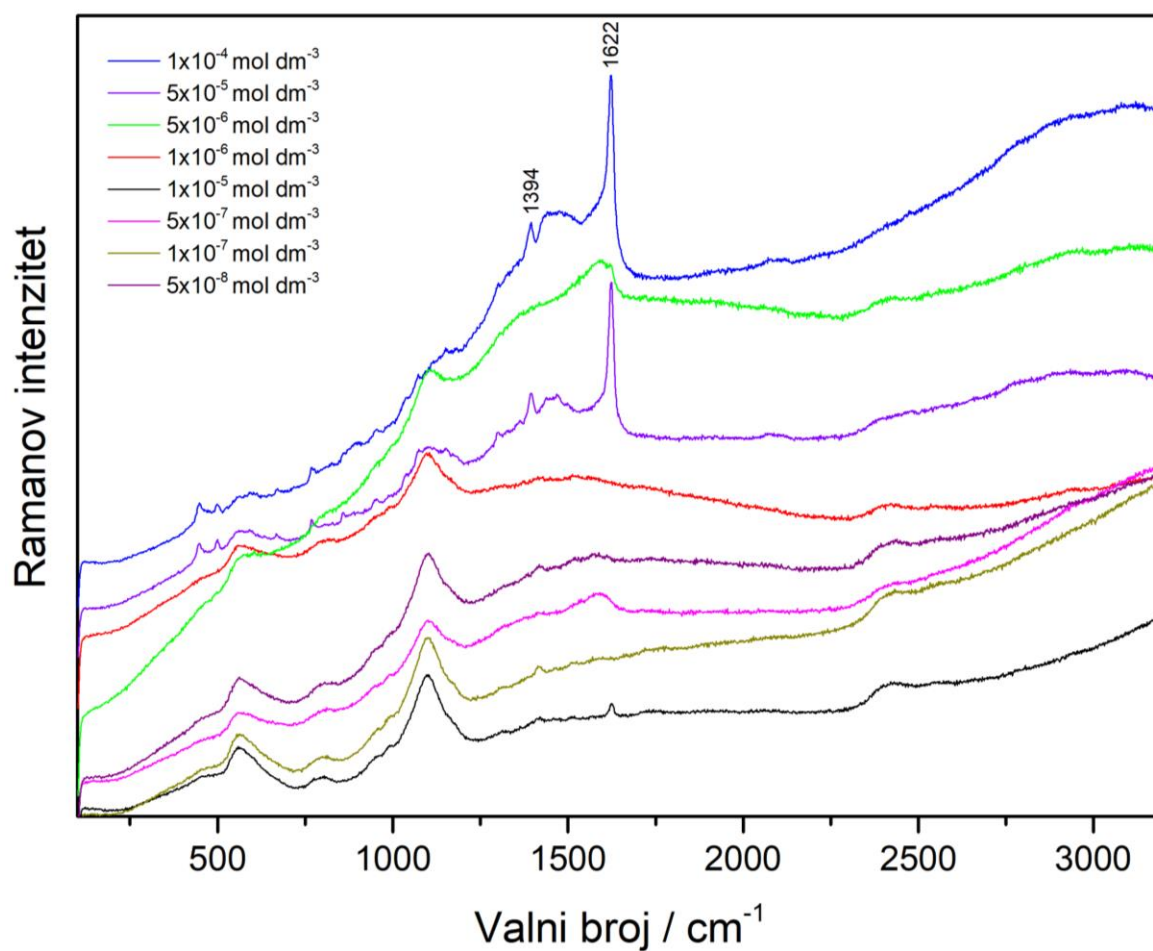
Kako bi se imobilizirale koloidne nanočestice zlata na stakleni nosač, provodi se postupak silanizacije (3-merkaptopropil)trimetoksisilanom (MPMS) pri čemu se uvode tiolne skupine na površinu stakla. Uranjanjem silaniziranog stakla u koloidnu suspenziju, dolazi do elektrostatskih interakcija između tiolne skupine silana i negativno nabijenih citratnih iona na površini nanočestice zlata. Dokaz uspješne silanizacije je pojava vrpce istezanje veze Au–S oko 250 cm^{-1} u Ramanovom spektru silaniziranog stakla s nanočesticama zlata (Dodatak, slika D8), dok navedena vrpca nedostaje u spektru samog silaniziranog stakla (Dodatak, slika D7). Mikropipetom se aplicira uzorka za mjerenje na površinu čvrstih staklenih supstrata u jednu točku gdje se nakon sušenja snimaju površinsko pojačani Ramanovi spektri na tri mjesta. Kako

bi se odredio doprinos raspršenja tretiranog stakla u spektrima, snimljeni su Ramanovi spektri stakla neposredno prije silaniziranja pri pobudama od 532 i 785 nm (dodatak, slika D4).

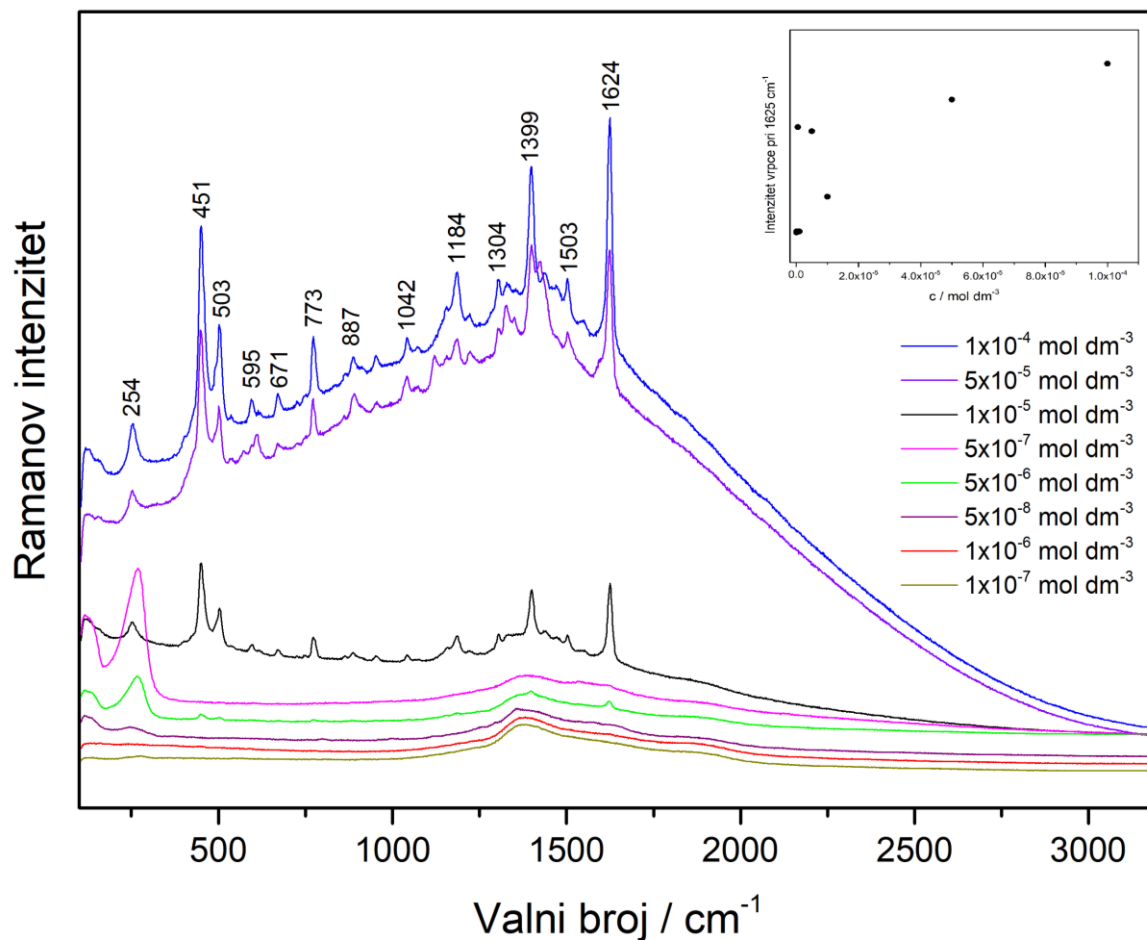
Koncentracijski ovisni SERS spektri **MetB** na silaniziranom staklu modificiranom nanočesticama zlata, u koncentracijskom rasponu $5 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³, snimljeni su pri valnim duljinama pobudnog zračenja 532 i 785 nm te su prikazani na slikama 25 i 26.

SERS spektre **MetB** snimljene pri valnoj duljini lasera 532 nm na čvrstom supstratu karakterizira fluorescencija modelne molekule, zbog koje je podignuta bazna linija, te istaknute vrpce samog čvrstog supstrata, dok karakteristične vrpce vibracija modelne molekule izostaju u većini spektara. Isključivo u spektrima najvećih koncentracija se pojavljuju vrpce koje potječu od **MetB**, i to istežanje C–C veze unutar središnjeg aromatskog sustava pri 1622 cm⁻¹ te antisimetrična istežanja C–H na 1394 cm⁻¹. Uočavaju se i vrpce vrlo slabih intenziteta koje potječu od modova skeletnih deformacija C–N–C pri 451 cm⁻¹ i svijanja C–N–C dimetilamino skupine na 504 cm⁻¹.

Analizom SERS spektara molekule **MetB** dobivenih pobudom pri 785 nm opažen je velik broj vrpca modelne molekule u spektrima viših koncentracija, kojima je i podignuta bazna linija zbog fluorescencije molekula analita i raspršenja staklenog nosača. Već spomenuto, najintenzivnije vrpce potječu od vibracija fenotiazinskog sustava (1624 cm⁻¹ i 1399 cm⁻¹) te deformacije C–N–C veza dimetilamino skupine (451 cm⁻¹). Smanjenjem koncentracije pada intenzitet vrpce metilenskog modrila pa tako najniža koncentracija pri kojoj su još vidljive vrpce spoja iznosi, $c = 5 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³. Daljnje smanjenje koncentracije rezultira spektrima koji pokazuju samo raspršenje tretiranog staklenog supstrata nanočesticama zlata. SERS spektri molekula **MetB** dobiveni korištenjem silaniziranog stakla modificiranog s nanočesticama zlata kao supstrata ne pokazuju promjene u orijentaciji molekula pri nižim koncentracijama, kao što je to bilo zapaženo u SERS spektrima **MetB** dobivenim u koloidu zlata, vrlo vjerojatno jer se na čvrstom supstratu ne vidi spektar koncentracije kod koje je zabilježena promjena u koloidu. Također, sušenjem otopine analita na imobiliziranim nanočesticama zlata, molekule **MetB** zauzimaju optimalnu orijentaciju, koja je pri većim koncentracijama takva da je fenotiazinski sustav okomit na nanočestice i povezuje se s njima preko atoma dušika aromatskog sustava, kao što je utvrđeno u koloidu zlata.



Slika 25. SERS spektri spoja **MetB** različitih koncentracija na nanočesticama zlata imobiliziranim na staklu, pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 4,3 mW

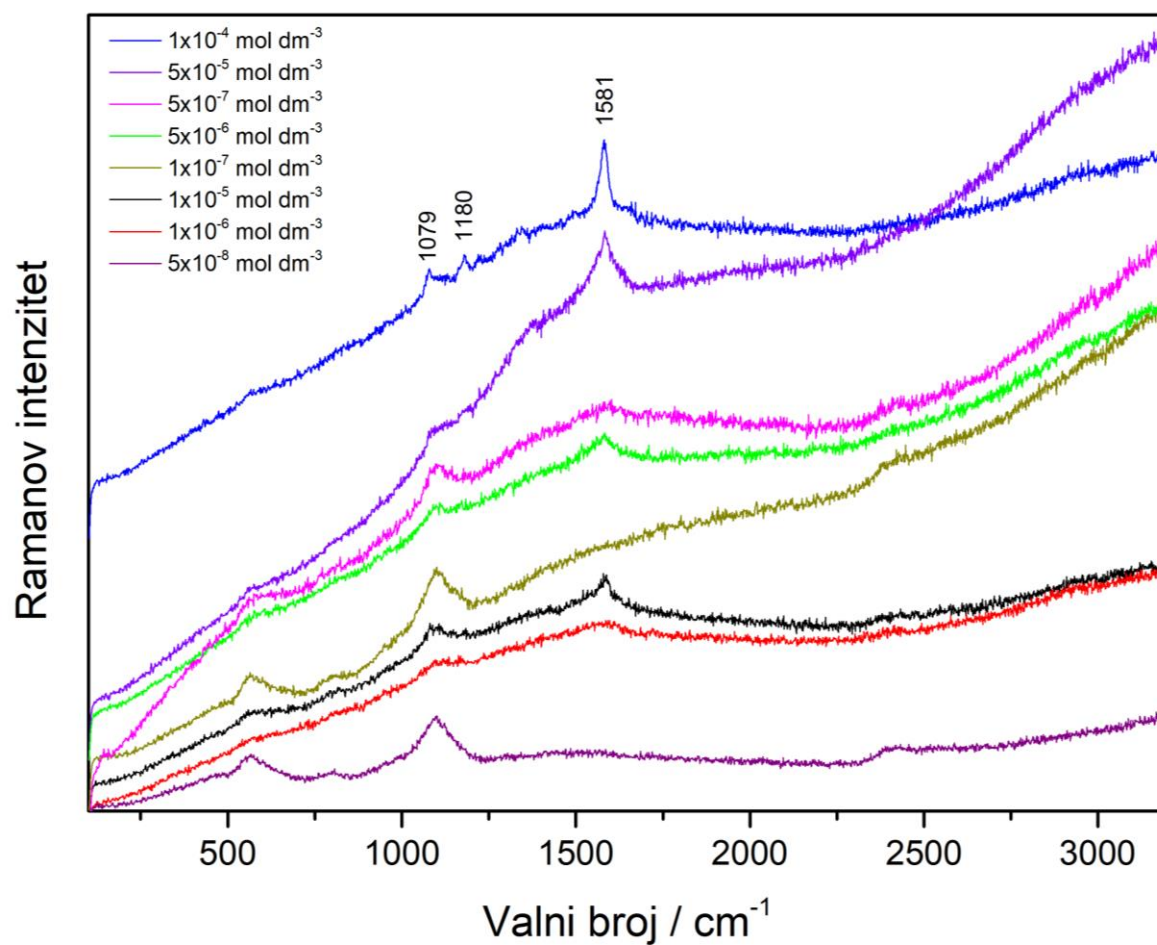


Slika 26. SERS spektri spoja **MetB** različitih koncentracija na nanočesticama zlata imobiliziranim na staklu, pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 0,0975 mW

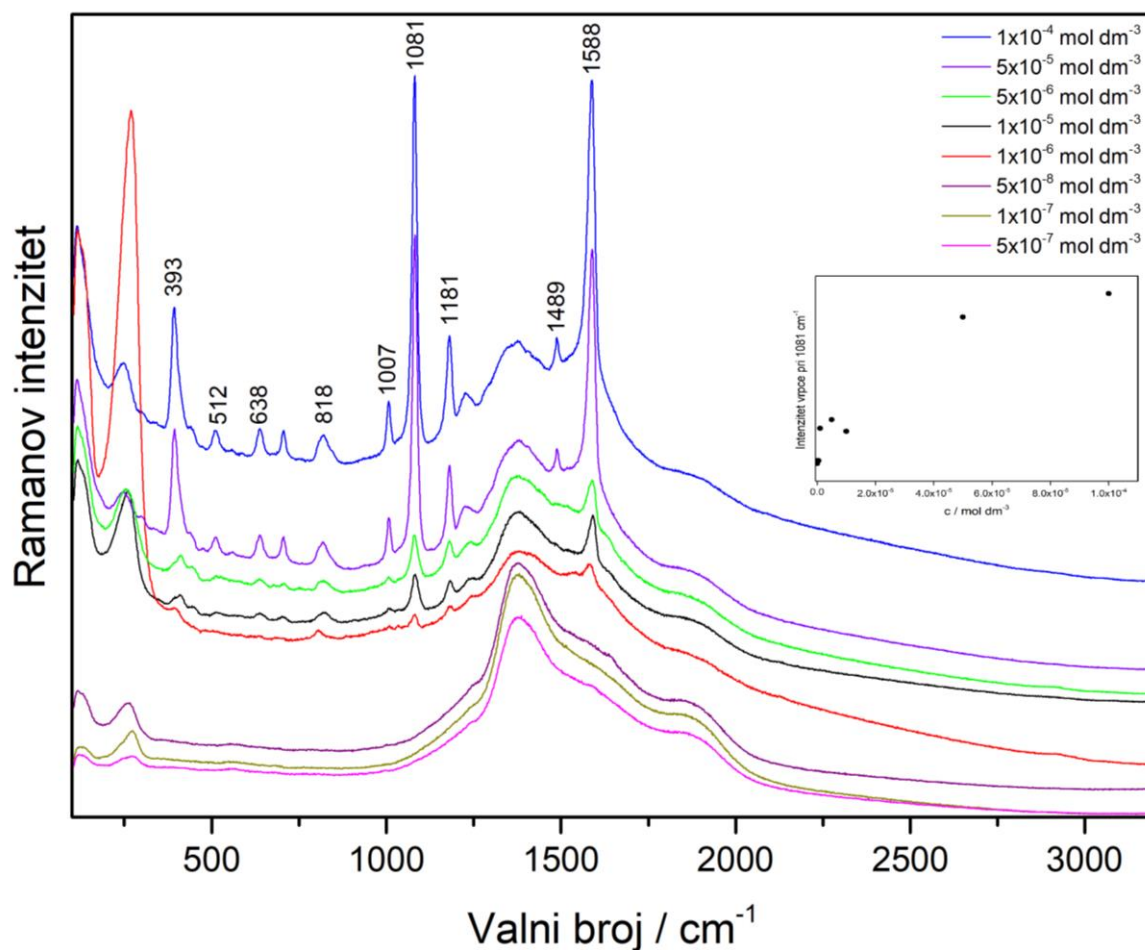
Za modelnu molekulu **PATF** također su snimljeni koncentracijski ovisni SERS spektri u rasponu $5 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³ na silaniziranom staklu modificiranom nanočesticama zlata pri valnim duljinama pobudnog zračenja 532 i 785 nm. Dobiveni spektri su prikazani na slikama 27 i 28.

Pobuda pri 532 nm ne rezultira karakterističnim SERS spektrima modelne molekule **PATF**. U spektru najveće koncentracije, $c = 1 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³, jasno je vidljiva samo jedna srednje intenzivna vrpca pri 1581 cm⁻¹ koja potječe od vibracija C–C veze aromatskog prstena **PATF**, dok se jedva naziru slabe vrpce koje su intenzitetom dominirale u prethodno opisanim SERS analizama **PATF**, a koje pripadaju vibracijama istezanja C–S veze na 1079 cm⁻¹ te deformacijama C–H aromata na 1180 cm⁻¹.

Pri valnoj duljini pobude 785 nm SERS spektri **PATF** na silaniziranom staklu s nanočesticama zlata, koncentracija 1×10^{-4} i 5×10^{-5} mol dm⁻³, sadrže velik broj karakterističnih vrpca modelne molekule. U spektru se javlja intenzivna vrpca pri 393 cm⁻¹ koja potječe od vibracije deformacije C–S veze i dokaz je vezanja molekula **PATF** preko atoma sumpora tiolne skupine na površinu zlata. Prisutne su i intenzivne vrpce pri 1081 cm⁻¹ i 1588 cm⁻¹ koje potječu od istezanja C–C i C–S veza. U spektrima nedostaju vrpce koje bi upućivale na katalitičku dimerizaciju **PATF** u **DMAB**, što je također bio slučaj za SERS spektre u koloidnoj suspenziji zlata pri istoj pobudi. Pri nižim valnim brojevima prisutne su vrlo jasne karakteristične vrpce istezanja i deformacija skeleta aromatskog prstena i C–H skupina na 512 cm⁻¹, 638 cm⁻¹ i 818 cm⁻¹. Da je optimalna orijentacija **PATF** postignuta vezanjem preko sumpora upućuje pad intenziteta vrpca pri 393 cm⁻¹, 1081 cm⁻¹ i 1588 cm⁻¹ prilikom smanjenja koncentracije analita na supstratu. Možemo zaključiti da se smanjenjem koncentracije molekule analita ne uspijevaju pravilno usmjeriti na površinu imobiliziranih nanočestica. Nadalje, omjer intenziteta vrpca ostaje sačuvan u seriji koncentracija gdje se pojavljuju karakteristične vrpce analita te nije zabilježena pojava novih vrpca pa se pretpostavlja da nije došlo do promjene orijentacije molekula **PATF** na metalnoj površini. Spektri najnižih koncentracija odgovaraju spektrima supstrata korištenog za analizu. Također, kroz cijelu seriju spektara vidljiva je široka vrpca u području oko 1360 cm⁻¹ kao posljedica fotoluminescencije stakla.



Slika 27. SERS spektri spoja **PATF** različitih koncentracija na nanočesticama zlata mobiliziranim na staklu, pri valnoj duljini pobude 532 nm, snaga lasera 0,86 mW

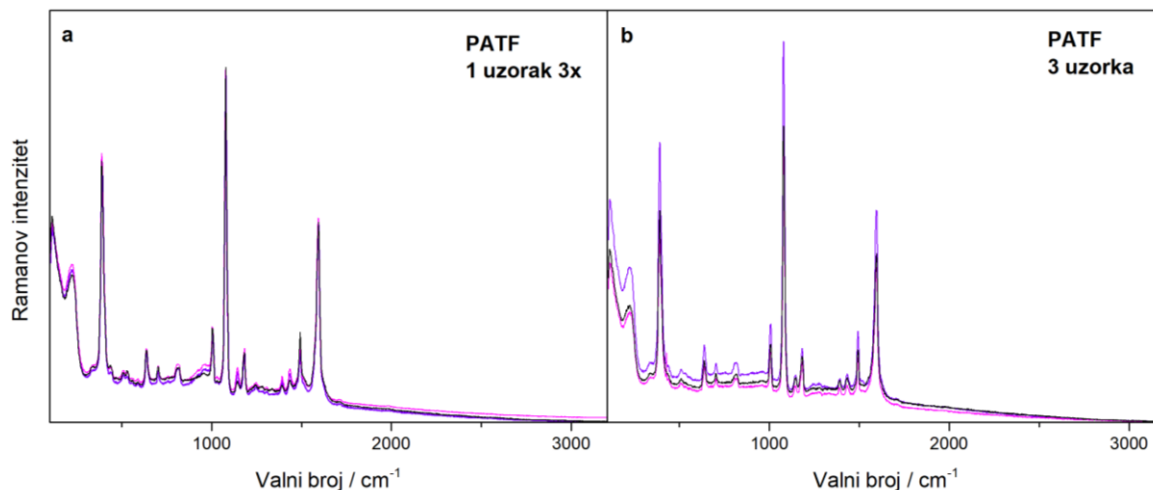


Slika 28. SERS spektri spoja **PATF** različitih koncentracija na nanočesticama zlata mobiliziranim na staklu, pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 0,975 mW

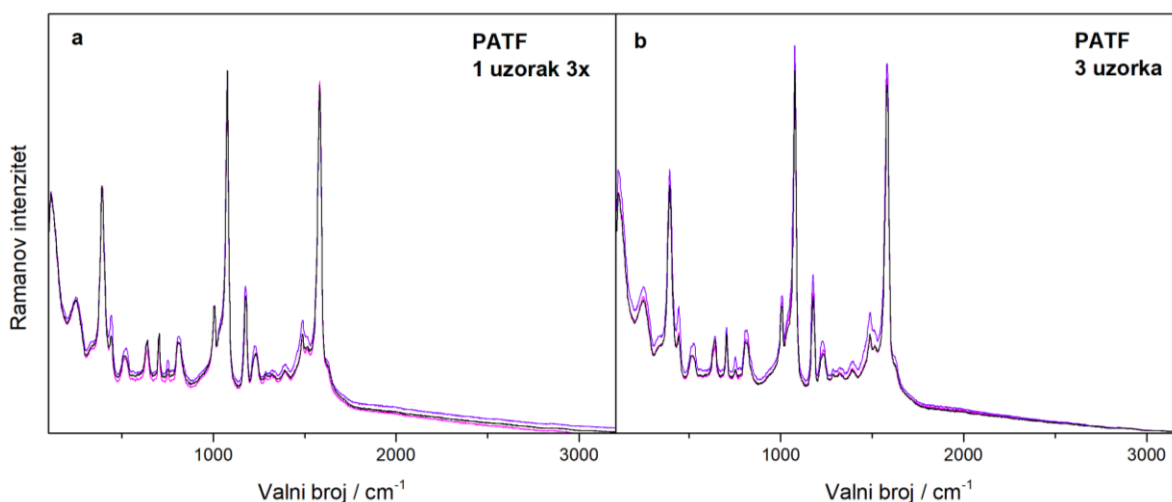
4.5. Reproducibilnost

Za određivanje reproducibilnosti korištenih supstrata i načina pripreme uzorka, odabrana je modelna molekula **PATF**. Pripremljeni su uzorci **PATF** množinske koncentracije 5×10^{-6} mol dm⁻³ u svrhu ispitivanja ponovljivosti SERS mjerenja provedenih na analiziranim metalnim supstratima u koloidnim suspenzijama i na čvrstim supstratima pri valnoj duljini pobude 785 nm. Kako bi se istražila reproducibilnost supstrata jedan uzorak sniman je tri puta u slučaju koloidne suspenzije uz miješanje između snimanja, dok se za analizu čvrstih supstrata isti uzorak snima na tri zasebna mjesta na istom nosaču. Informacija o ponovljivosti pripreme mjernih uzoraka dobivena je snimanjem tri zasebno pripremljena uzorka na isti način u

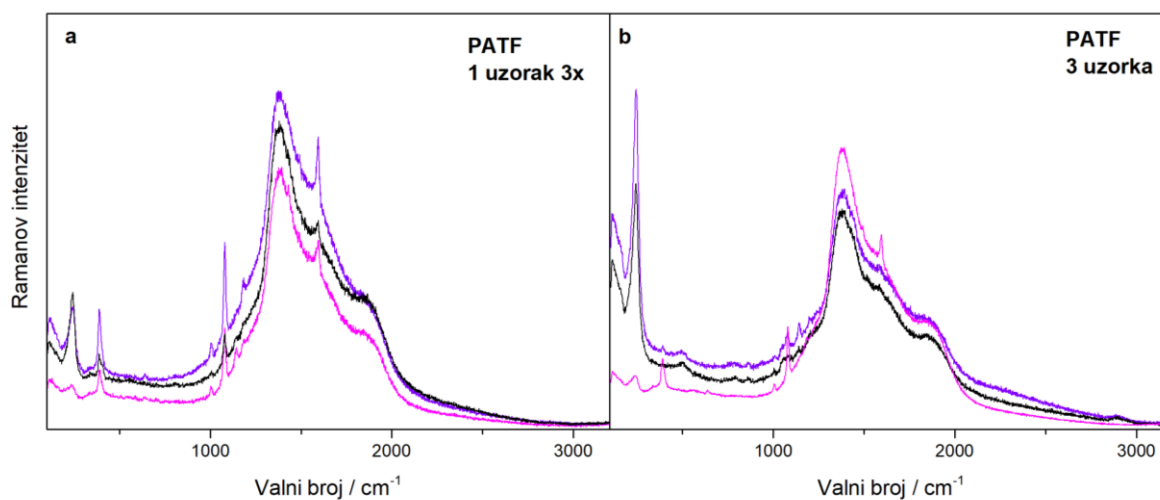
koloidnoj suspenziji i na modificiranom staklenom nosaču. Reproducibilnost je izražena kao standardno odstupanje intenziteta vrpce pri 1080 cm^{-1} za **PATF** i priložena u tablici 9. Dobiveni spektri vidljivi su na slikama 29–32.



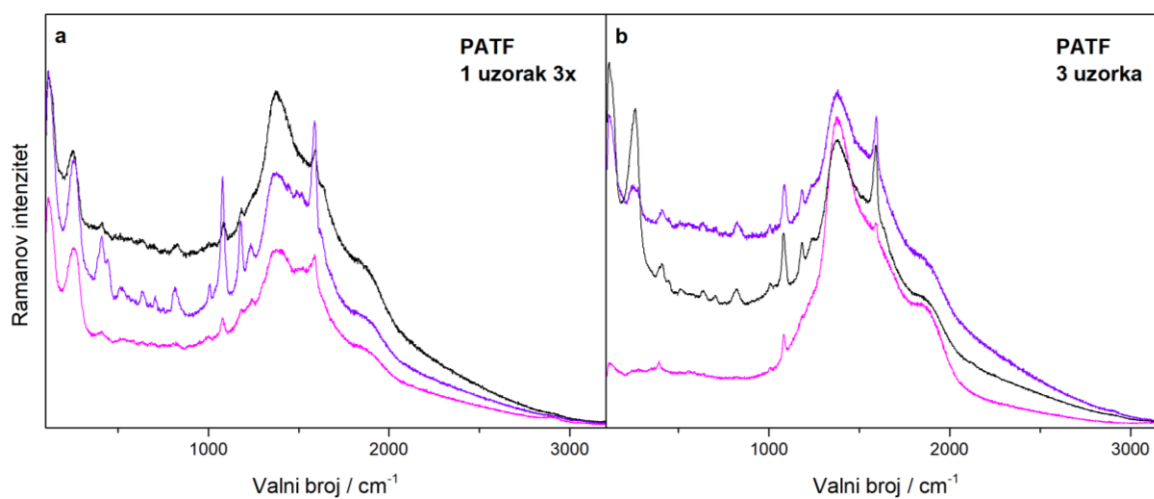
Slika 29. SERS spektri u koloidnoj suspenziji nanočestica srebra: a) otopina **PATF** ($c = 5 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$) jedan uzorak sniman tri puta pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 3,19 mW i b) otopina **PATF** ($c = 5 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$) tri uzorka snimana pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 3,19 mW



Slika 30. SERS spektri u koloidnoj suspenziji nanočestica zlata: a) otopina **PATF** ($c = 5 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$) jedan uzorak sniman tri puta pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 159,5 mW i b) otopina **PATF** ($c = 5 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$) tri uzorka snimana pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 159,5 mW



Slika 31. SERS spektri na nanočesticama srebra imobiliziranim na staklu: a) otopina **PATF** ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) jedan uzorak sniman tri puta pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 0,195 mW i b) otopina **PATF** ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) tri uzorka snimana pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 0,195 mW



Slika 32. SERS spektri na nanočesticama zlata imobiliziranim na staklu: otopina **PATF** ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) jedan uzorak sniman tri puta pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 0,975 mW i b) otopina **PATF** ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) tri uzorka snimana pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 0,975 mW

Tablica 9. Reproducibilnost metalnih supstrata izražena pomoću standardnog odstupanja intenziteta vrpce pri 1080 cm^{-1} za **PATF** kod pobude pri 785 nm

| <i>SERS supstrat</i> | PATF | |
|---------------------------|------------------|------------------|
| | Jedan uzorak | Tri uzorka |
| Koloid AgNP | 59795 ± 879 | 46250 ± 377 |
| Koloid AuNP | 84686 ± 1598 | 87984 ± 1459 |
| AgNP na tretiranom staklu | 3441 ± 250 | 3470 ± 1275 |
| AuNP na tretiranom staklu | 22159 ± 5432 | 15080 ± 6414 |

Koloidna suspenzija nanočestica srebra kao SERS supstrat pokazuje bolju reproducibilnost u odnosu na koloidnu suspenziju nanočestica zlata. Također, općenito su koloidne suspenzije pokazale bolju ponovljivost u SERS analizi od ekvivalentnih čvrstih supstrata s imobiliziranim nanočesticama. Opaženo se može objasniti nehomogenom distribucijom tj. neravnomjernom imobilizacijom nanočestica metala na površini čvrstog supstrata, a time i samih „vrućih točaka“ koje su ključne za pojačanje raspršenja zračenja. Također, prilikom mjerenja čvrstih supstrata laserski snop se proizvoljno fokusirao u određenu mjernu točku u dvodimenzionalnoj postavi. U suprotnosti, u koloidnoj suspenziji imamo trodimenzionalni volumen u kojem su nanočestice dispergirane i „vruće točke“ agregata dostupnije su molekulama analita te laserska zraka prolazi cijelom duljinom medija.

Bolju reproducibilnost pripreme mjernog uzorka ponovno prikazuje koloid srebra nad koloidnom zlata. Također, suspenzije nanočestica metala odlikuju se boljom ponovljivošću u usporedbi s čvrstim modificiranim supstratima. Čvrsti supstrat s imobiliziranim nanočesticama zlata ima daleko najslabiju reproducibilnost pripreme supstrata. Objašnjenje se ponovno svodi na činjenicu da jednolikost osigurava ponovljivost mjerenja, što izostaje velikim djelom za čvrste supstrate pripremane na način opisan u ovom radu.

§ 5. ZAKLJUČAK

SERS učinkovitost nanočestica srebra i zlata imobiliziranih na silaniziranim staklima istražena je pomoću modelnih molekula, metilenskog modrila i 4-aminotiofenola. Nanočestice srebra korištene za pripremu čvrstih supstrata dobivene su redukcijom srebrova(I) nitrata hidroksilamin-hidrokloridom, dok su nanočestice zlata dobivene redukcijom tetraklorozlatne(III) kiseline trinatrijevim citratom. Radi usporedbe s nanočesticama na čvrstim supstratima, istražena je i SERS aktivnost nanočestica dispergiranih u koloidnim suspenzijama. Za svaki supstrat snimljeni su koncentracijski ovisni SERS spektri, određene granice detekcije te reproducibilnost mjerenja.

U koloidnoj suspenziji srebra opaženo je intenzivno pojačanje Ramanovog raspršenja molekula **MetB** pri obje valne duljine pobude. Pozitivno nabijene molekule metilenskog modrila elektrostatski su privučene negativno nabijenim kloridnim ionima na površini nanočestica srebra, gdje najintenzivnije vrpce u spektrima potječu od vibracija fenotiazinskog sustava zbog okomitog smještanja aromatskog sustava na površinu metala, pri čemu se atom dušika fenotiazinskog sustava kemijski veže s nanočesticama srebra. Koncentracijski ovisni SERS spektri **MetB** na nanočesticama srebra u koloidnoj suspenziji ne pokazuju linearnu ovisnost intenziteta vrpce o koncentraciji što upućuje na različite orijentacije molekula metilenskog modrila na površini metala. SERS spektri modelne molekula **PATF** dobiveni pri obje valne duljine pobude u koloidu srebra sadrže vrpce koje ukazuju na adsorpciju i vezanje molekula preko sumpora tiolne skupine na površinu metala. Ne uočava se linearna ovisnost intenziteta vrpce o koncentraciji, niti promjena omjera intenziteta postojećih vrpce. Međutim, pobuda pri 532 nm rezultira intenzivnim vrpcama koje nastaju uslijed vibracija veza dimera 4,4'-dimerkaptoazobenzena nastalog katalitičkom reakcijom dimerizacije molekula 4-aminotiofenola na površini srebra. Spomenute vrpce su daleko manjeg intenziteta i gotovo izostaju korištenjem pobude pri 785 nm, što upućuje na ovisnost katalitičke dimerizacije **PATF** o vrsti metala i valnoj duljini pobudnog zračenja.

Koloidna suspenzija zlata intenzivno pojačava Ramanovo raspršenje modelnih molekula samo kod pobude pri 785 nm. SERS spektri **MetB** u koloidu zlata pokazuju najveće koncentracijski ovisne promjene u spektrima gdje pojava novih vrpce, zajedno s promjenom omjera intenziteta postojećih vrpce upućuje na drugačije slaganja molekula **MetB** na površini

zlata, u odnosu na površinu srebra. Kod većih koncentracija analita pretpostavlja se adsorpcija metilenskog modrila na površinu zlata preko dušika fenotiazinskog sustava, jednako kao što se veže na nanočestice srebra. No, pri nižim koncentracijama **MetB** dolazi do promjene orijentacije molekula i aromatski sustav se drugačije smješta na nanočestice zlata pri čemu nastaje kemijska veza između površine zlata i sumpora fenotiazinskog sustava. SERS spektri modelne molekule **PATF** snimljeni u koloidu zlata ne pokazuju vrpce dimera uočenog na nanočesticama srebra, čime se potvrđuje ovisnost katalitičke dimerizacije o prirodi metala. Spektri modelnih molekula u koloidu zlata dobiveni pri pobudi 532 nm pokazuju mali broj vrpca jako slabog intenziteta.

Nanočestice srebra i zlata imobilizirane na silaniziranim staklima pokazuju slabiju SERS aktivnost, u odnosu na nanočestice dispergirane u koloidnim suspenzijama. Kod obje valne duljine pobude karakteristične vrpce modelnih molekula zapažene su samo u SERS spektrima najviših koncentracijama **MetB** i **PATF**. Korištenje čvrstog supstrata s imobiliziranim nanočesticama srebra rezultira dimerizacijom molekula **PATF** kod pobude pri 532 nm. Kod pobude pri 785 nm u spektrima se javlja široka vrpca fotoluminescencije stakla koja prekriva možebitne vrpce modelnih molekula.

Nanočestica srebra i zlata imobilizirane na čvrstom supstratu pokazuju slabu ponovljivost zbog nehomogeno dispergiranih nanočestica i njihovih agregata po površini tretiranog staklenog nosača, dok nanočestice dispergirane u koloidnoj suspenziji pokazuju izvrsnu reproducibilnost supstrata. Veliku ulogu u uočenoj slaboj ponovljivosti čvrstih supstrata ima proizvoljan odabir točke fokusiranja laserske zrake na dvodimenzionalnoj čvrstoj podlozi, dok kod koloidnih suspenzija nanočestica laserska zraka prolazi kroz trodimenzionalan volumen. Zadovoljavajuća ponovljivost pripreve uzorka pokazala se za koloide, a vrlo niska reproducibilnost zabilježena je u slučaju čvrstih supstrata gdje ponovno ključnu ulogu igra neravnomjerna imobilizacija nanočestica na površini silaniziranog stakla.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

(ar) – aromat

AgNP – srebrne nanočestice

AuNP – zlatne nanočestice

DMAB – 4,4'-dimerkaptoazobenzen

EM – elektromagnetsko

FDA – Američka uprava za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

IR – infracrvena

LSPR – lokalizirane površinske plazmonske rezonancije (engl. *Localized Surface Plasmon Resonance*)

MetB – metilensko modrilo

NIR – blisko infracrveno

NP – nanočestice

oop – izvan ravnine

PATF – 4-aminotiofenol

SERS – površinski pojačano Ramanovo raspršenje (engl. *Surface-enhanced Raman scattering*)

UV – ultraljubičasto

Vis – vidljivo

δ – deformacija

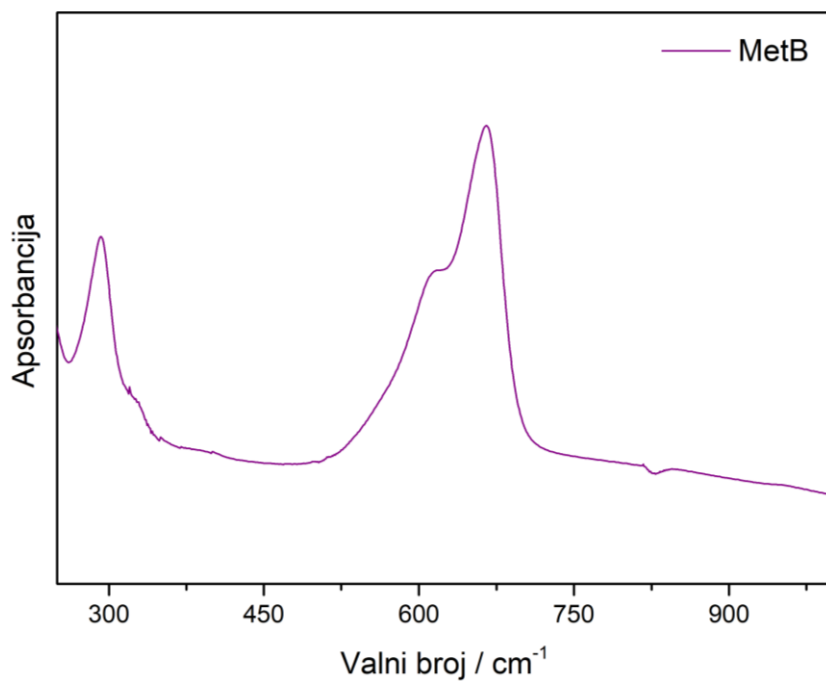
v – istezna vibracija (svijanje)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

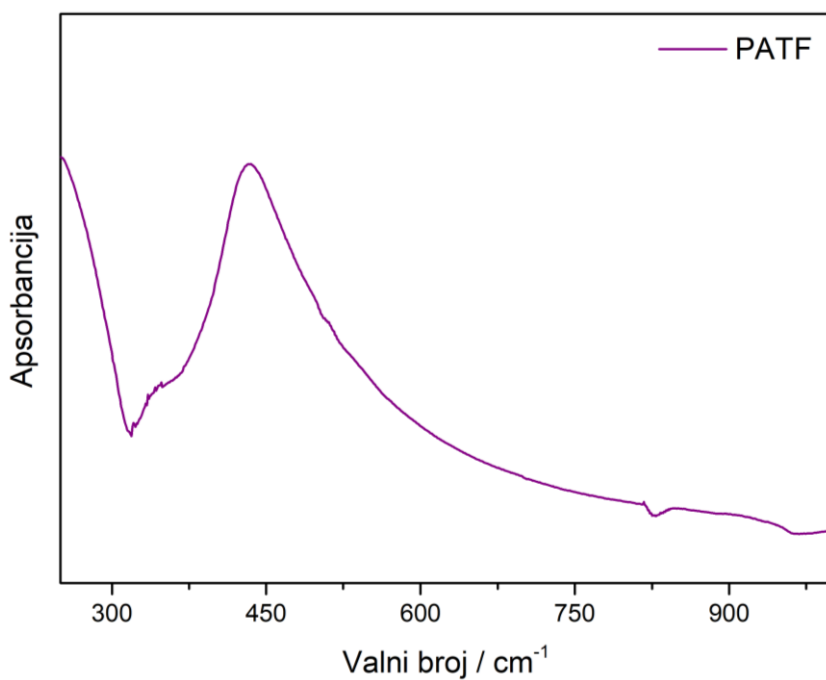
1. R. Aroca, *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2006.
2. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, Cengage Learning, Australia, 2018.
3. W. E. Smith, *Chem. Soc. Rev.* **5** (2008) 873–1076
4. L. Mikac, *Površinski pojačano Ramanovo raspršenje: od koloidne otopine do stabilnog supstrata*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
5. J. R. Ferraro, K. Nakamoto, *Introductory Raman spectroscopy*, Elsevier Science, 2012.
6. Z. Li, T. Shegai, G. Haran, H. Xu, *ACS Nano*, **3**(3) (2009) 637–642.
7. D. L. Jeanmaire, R. P. Van Duyne, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **84** (1977) 1–20.
8. W. E. Smith, *Chem. Soc. Rev.* **37** (5) (2008) 113–121.
9. X. Wang, W. Shi, G. She, L. Mu, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**(17) (2012) 5891–0.
10. P. A. Mosier-Boss, *Nanomaterials* **7**(6) (2017) 142.
11. H. B. Jeon, P. V. Tsalu, J. W. Ha, *Sci. Rep.* **9**(1) (2019) 13635.
12. H. I. Khan, M. U. Khalid, A. Abdullah, A. Ali, A. S. Bhatti, S. U. Khan, W. Ahmed, *J. Vac. Sci. Technol., B: Nanotechnol. Microelectron.: Mater., Process., Meas., Phenom.* **36**(3) (2018) 03E101.
13. C. Wang, C. Yu, *Rev. Anal. Chem.* **32**(1) (2012) 1–14.
14. <https://cssnt-upb.ro/gold-nanowires/?lang=en> (datum pristupa 20. svibnja 2022.)
15. M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.* **26** (1974) 163–166.
16. D. L. Jeanmaire, R. P. Van Duyne, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **84** (1977) 1–20.
17. M. G. Albrecht, J. A. Creighton, *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 5215–5217.
18. M. Moskovits, *J. Chem. Phys.* **69** (1978) 4159–4161.
19. M. Kerker, *Acc. Chem. Res.* **17** (1984) 271–277.
20. S. L. Kleinman, R. R. Frontiera, A. I. Henry, J. A. Dieringer, R. P. Van Duyne, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15** (2013) 21–36.
21. <https://www.iso.org/standard/44278.html> (datum pristupa 20. svibnja 2022.)
22. A. Shiohara, Y. Wang, L. M. Liz-Marzán, *J. Photochem. Photobiol. C.* **21** (2014) 2–25.
23. O. Péron, E. Rinnert, M. Lehaitre, P. Crassous, C. Compère, *Talanta* **79**(2) (2009) 199–204.
24. <https://www.britannica.com/science/methylene-blue> (datum pristupa 20. svibnja 2022.)
25. <https://www.drugs.com/monograph/methylene-blue.html> (datum pristupa 20. svibnja 2022.)
26. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Aminothiophenol> (datum pristupa 20. svibnja 2022.)

27. Y. F. Huang, D.Y. Wu, H. P. Zhu, L. B. Zhao, G. K. Liu, B. Ren, Z. Q. Tian, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**(24) (2012) 8485.
28. N. Leopold, B. Lendl, *J. Phys. Chem. B* **107** (2003) 5723–5727.
29. R. Stiuftuc, C. Iacovita, C. M. Lucaciu, G. Stiuftuc, A. G. Dutu, C. Braescu, N. Leopold, *Nanoscale Res. Lett.* **8**(1) (2013)
30. Z. Ye, C. Li, Y. Xu, S. E. Bell, *The Analyst* **144**(2) (2019) 448–453.
31. S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji, *Nanoscale* **5**(16) (2013) 7328.
32. X. Dong, H. Gu, F. Liu, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol.* **88** (2012) 97–101.
33. S. Sánchez-Cortés, J. V. García-Ramos, *J. Raman Spectrosc.* **29**(5) (1998) 365–371.
34. X. Dong, H. Gu, J. Kang, X. Yuan, J. Wu, *J. Mol. Struct.* **984**(1-3) (2010) 396–401.
35. G. N. Xiao, S. Q. Man, *Chem. Phys. Lett.* **447**(4-6) (2007) 305–309.
36. M. del Pilar Rodríguez-Torres, L- Díaz-Torres, S. Romero-Servin, *Int. J. Mol. Sci.* **15**(10) (2014) 19239–19252.
37. S. Selvam, I. Sarkar, *J Pharm Anal.* **1** (2017) 71–75.
38. M. Baia, F. Toderas, L. Baia, J. Popp, S. Astilean, *Chem. Phys. Lett.* **422**(1-3) (2006) 127–132.
39. M. Osawa, N. Matsuda, K. Yoshii, I. Uchida, *J. Phys. Chem.* **98**(48) (1994) 12702–12707.
40. Z. Zhu, T. Zhu, Z. Liu, *Nanotechnology* **15**(3) (2004) 357–364.
41. X. Hu, T. Wang, L. Wang, S. Dong, *J. Phys. Chem. C*, **111**(19) (2007) 6962–6969.
42. Y. F. Huang, H. P. Zhu, G. K. Liu, D. Y. Wu, B. Ren, Z. Q. Tian, *J. Am. Chem. Soc.* **132**(27) (2010) 9244–9246.
43. X. Tian, L. Chen, H. Xu, M. Sun, *RSC Adv.* **2**(22) (2012) 8289.
44. A. D. McFarland, M. A. Young, J. A. Dieringer, R. P. Van Duyne, *J. Phys. Chem. B* **109**(22) (2005) 11279–11285.
45. A. Merlen, V. Gadenne, J. Romann, V. Chevallier, L. Patrone, J. C. Valmalette, *Nanotechnology* **20**(21) (2009) 215705.
46. S. Dutta Roy, M. Ghosh, J. Chowdhury, *J. Raman Spectrosc.* **46**(5) (2015) 451–461.
47. S. B. Ikramova, Z. N. Utegulov, K. K. Dikhanbayev, A. E. Gaipov, R. R. Nemkayeva, V. G. Yakunin, V. P. Savinov, V. Y. Timoshenko, *Int. J. Mol. Sci.* **23**(5) (2022) 2590.
48. M. R. Shattique, M. Stepanova, *Plasmonics*, **15**(2) (2019) 427–434.
49. P. Xu, L. Kang, N. Mack, *Sci Rep* **3** (2013) 2997.
50. K. Kim, K. L. Kim, D. Shin, J. Y. Choi, K. S. Shin, *J. Phys. Chem. C.* **116**(7) (2012) 4774–4779.
51. T. H. Nguyen, P. Zhou, A. Mustapha, M. Lin, *The Analyst* **141**(18) (2016) 5382–5389.
52. E. de Santos, F. A. Sigoli, I. O. Mazali, *J. Braz. Chem. Soc.* **26**(5) (2015) 831–1053
53. B. K. Shrestha, A. J. Haes, *J. Opt.* **17**(11) (2015) 114017.

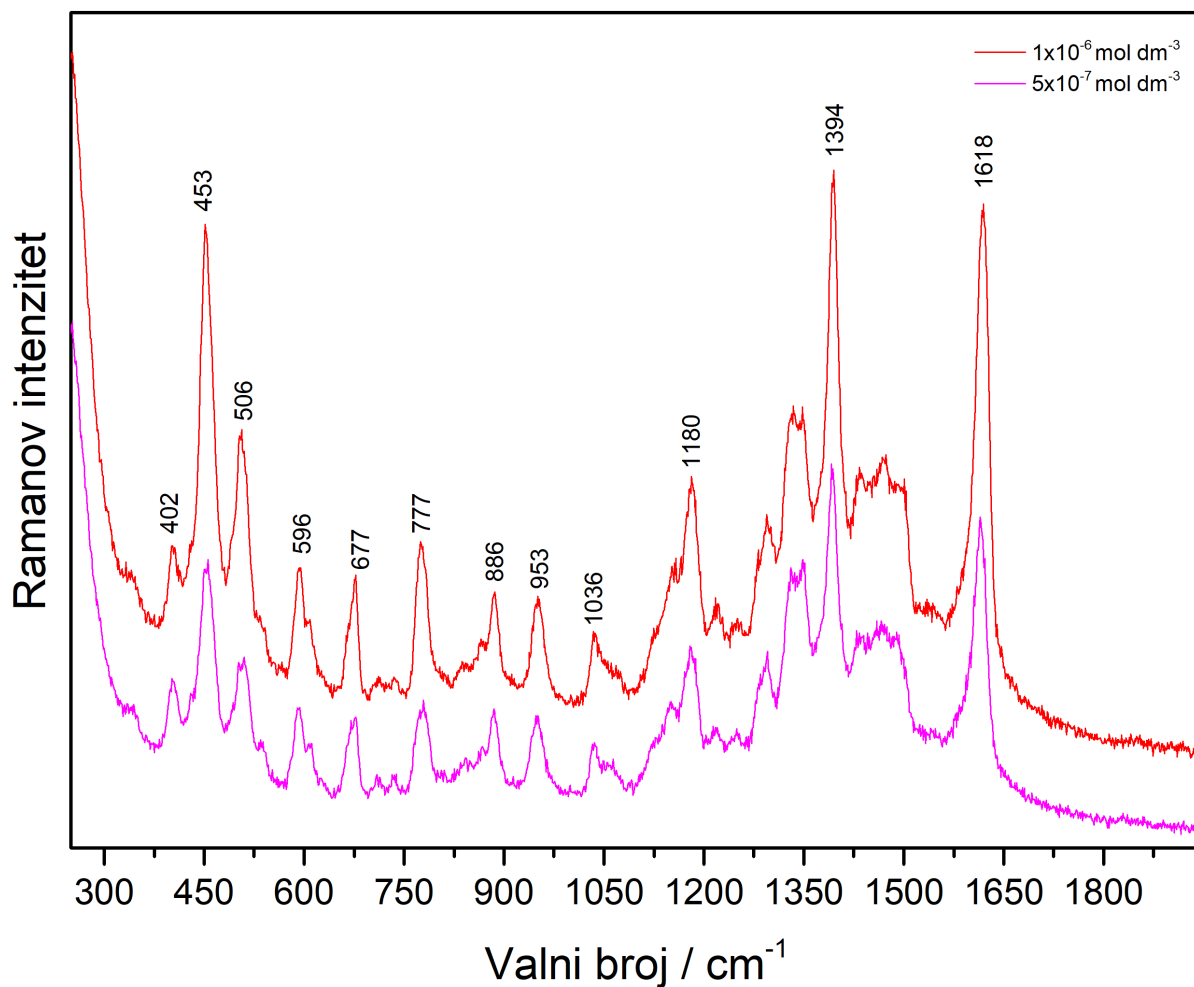
§ 8. DODATAK



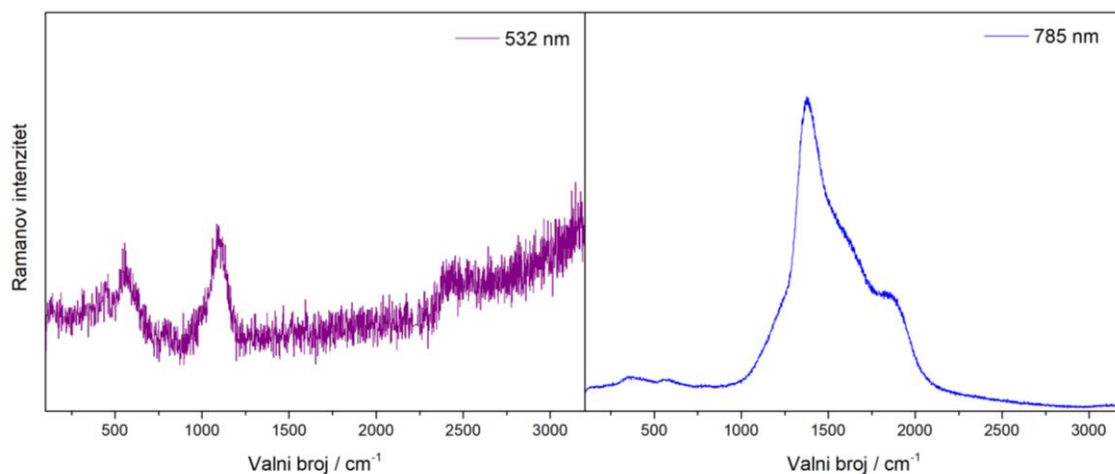
Slika D1. UV/Vis/NIR apsorpcijski spektar modelne molekule **MetB**



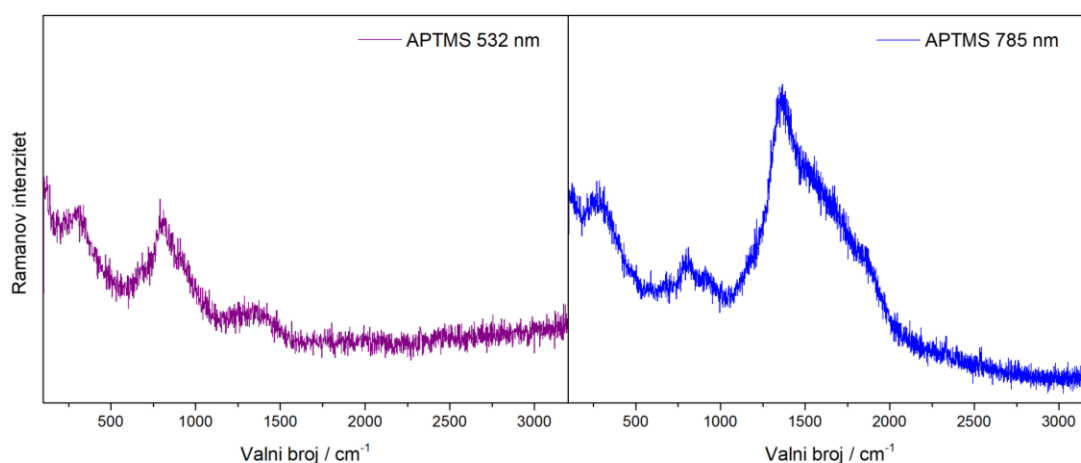
Slika D2. UV/Vis/NIR apsorpcijski spektar modelne molekule **PATF**



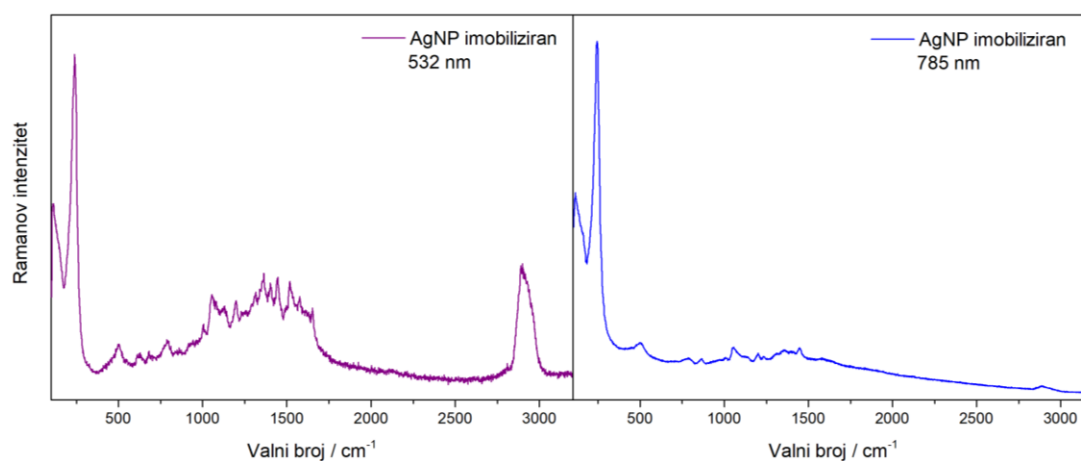
Slika D3. Uvećani dio SERS spektara spoja **MetB** za množinske koncentracija $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ i $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ u koloidnoj suspenziji zlata snimljeni pri valnoj duljini pobude 785 nm, snaga lasera 0,12 mW



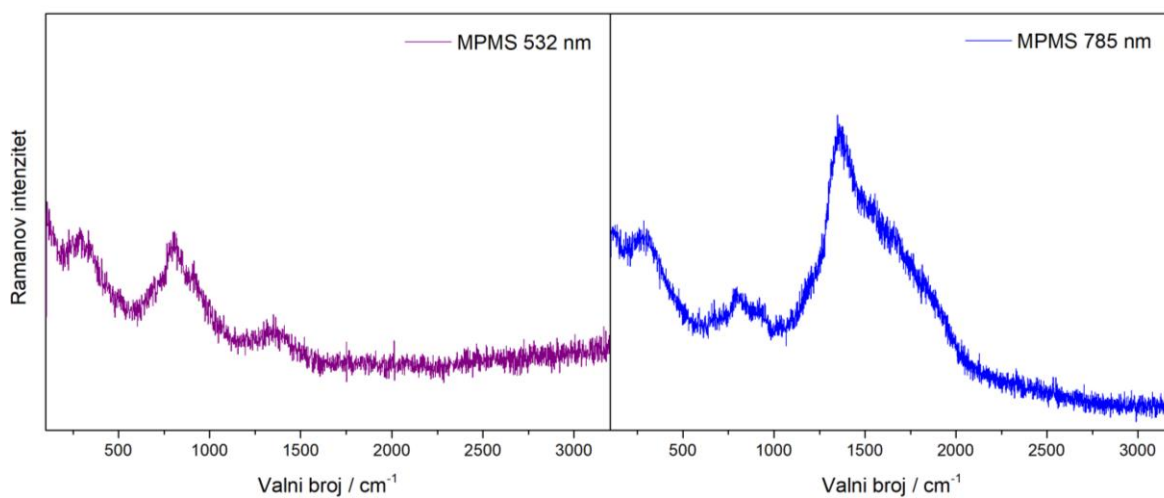
Slika D4. SERS spektri snimljeni za staklo nakon tretiranja klorovodičnom kiselinom i Piranha otopinom



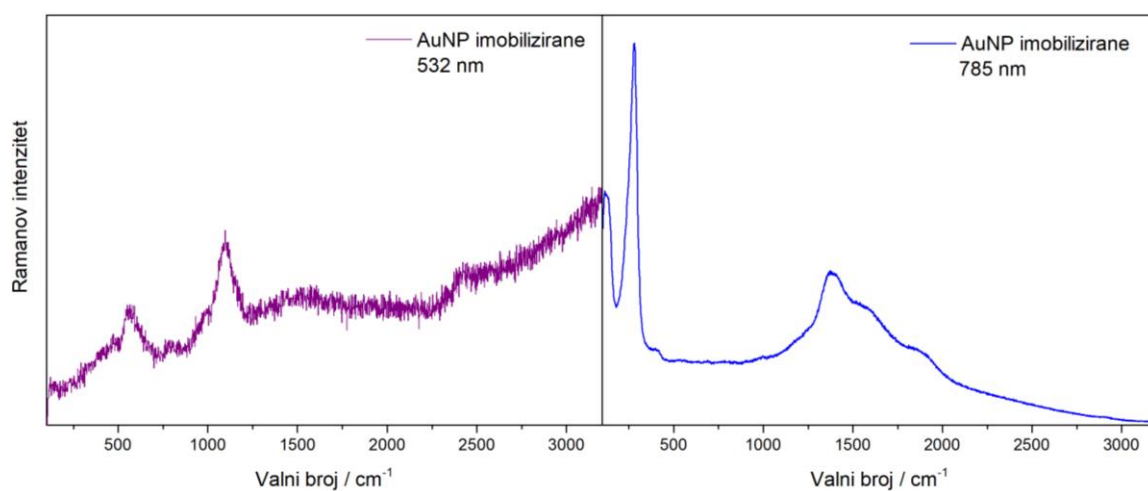
Slika D5. SERS spektri snimljeni za staklo nakon silaniziranja uz APTMS (Ag)



Slika D6. SERS spektri snimljeni za staklo nakon imobilizacije AgNP na površini



Slika D7. SERS spektri snimljeni za staklo nakon silaniziranja uz MPMS (Au)



Slika D8. SERS spektri snimljeni za staklo nakon imobilizacije AuNP na površini

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Anastazija Ratkajec

Datum rođenja: 01. prosinca 1997. godine

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2004. – 2012. Osnovna škola Popovača, Popovača
2012. – 2016. X. Gimnazija „Ivan Supek“, Zagreb
2016. – 2019. Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
2020. – 2021. Erasmus+ studentska razmjena, University of Lodz, Faculty of chemistry, Lodz, Poland
2022. Research project, University of Coimbra, Department of Chemical Engineering, Coimbra, Portugal
2022. – Research project, University of Sharjah, Research Institute of Medical & Health Sciences (RIMHS), Sharjah, United Arab Emirates
2019. – Diplomski sveučilišni studij Kemija; smjer: istraživački, grane: analitička kemija i biokemija, Kemijski odsjek Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2019. 3. Ljetna škola kemije, Rijeka
2019. Jesenska škola kemije, Varaždin
2020. 4. Zimska škola kemije, Rijeka
2021. 5. Ljetna škola kemije, Rijeka
2021. Studentska škola kemije, Rijeka
2022. 6. Ljetna škola kemije, Rijeka