Površinski pojačano Ramanovo raspršenje: od koloidne otopine do stabilnog supstrata

Mikac, Lara

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:679353

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-19**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Lara Mikac

SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING: FROM THE COLLOID TO THE STABLE SUBSTRATE

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Lara Mikac

POVRŠINSKI POJAČANO RAMANOVO RASPRŠENJE: OD KOLOIDNE OTOPINE DO STABILNOG SUPSTRATA

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Mile Ivanda

Zagreb, 2016.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Lara Mikac

SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING: FROM THE COLLOID TO THE STABLE SUBSTRATE

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Mile Ivanda, PhD

Zagreb, 2016.

Zahvaljujem mentoru dr. sc. Mili Ivandi na odabiru teme, stručnim i svim ostalim savjetima te uloženom trudu i vremenu koje mi je posvetio pri izradi ove disertacije.

Posebno hvala dr. sc. Marijanu Gotiću na svim konstruktivnim primjedbama i savjetima.

Hvala svim članovima Laboratorija za molekulsku fiziku koji su na bilo koji način pridonijeli izradi ovog rada.

Hvala svima koji su pomogli u praktičnoj izvedbi rada, posebno kolegama iz Laboratorija za sintezu novih materijala, Laboratorija za optiku i tanke slojeve, Laboratorija za sintezu i procese samoorganizacije organskih molekula, Laboratorija za tehnologiju mesa i ribe (PBF) te kolegama iz Messine.

Hvala mojim prijateljima. Hvala društvu s ručka za zabavne pauze.

Hvala Domagoju na tehničkoj podršci.

I najvažnije, hvala mojoj obitelji.

Zagreb, 2016.

Lara Mikac

Marti i Bruni

“No thief, however skillful, can rob one of knowledge, and that is why knowledge is the best and safest treasure to acquire.”

L. Frank Baum

„The more that you read, the more things you will know. The more that you learn, the more places you'll go.“

Dr. Seuss

SADRŽAJ

SADRŽAJ ..... **XI**

POPIS SLIKA ..... **XV**

POPIS TABLICA ..... **XX**

SAŽETAK ..... **XXI**

ABSTRACT ..... **XXIII**

1 UVOD **1**

2 LITERATURNI PREGLED **4**

2.1 UVOD U RAMANOVU SPEKTROSKOPIJU 4
2.1.1 Otkriće *4*
2.1.2 Teorija Ramanovog raspršenja *4*
2.1.3 Instrumentacija *10*
2.2 POVRŠINSKI POJAČANO RAMANOVO RASPRŠENJE 11
2.2.1 Otkriće *12*
2.2.2 Mehanizmi pojačanja *12*
2.2.3 Plazmonski materijali *17*
2.2.4 Elektrokemijsko površinski pojačano Ramanovo raspršenje *18*
2.3 METALNE NANOČESTICE 20
2.3.1 Nanotehnologija *20*
2.3.2 Nanočestice *20*
2.3.3 Koloidne otopine *22*
2.3.4 Kvantne točke *25*
2.3.5 Sigurnost *26*
2.4 METODE PRIPREME SUPSTRATA ZA POVRŠINSKI POJAČANO RAMANOVO RASPRŠENJE 26
2.4.1 Kemijska sinteza koloidnih nanočestica *27*
2.4.2 Metalne elektrode *29*
2.4.3 Filmovi metalnih otoka *30*
2.4.4 Litografske metode dobivanja čvrstih podloga *31*
2.5 OGRANIČENJA SERS-A 36
2.5.1 Surfaktanti *36*
2.5.2 Elektrostatske i hidrofobne interakcije *37*
2.6 POROZNI SILICIJ 38
2.6.1 Povijest *38*
2.6.2 Dobivanje poroznog Si *39*
2.6.3 Tipovi poroznog Si *46*
2.6.4 Tipovi silicija s obzirom na dopant *47*
2.6.5 Orijentacija *47*
2.6.6 Priprema samostojećeg PSi *48*
2.6.7 Toksičnost i biokompatibilnost *48*
2.6.8 Metode depozicije metala na porozni silicij *49*
2.7 PRIMJENA SPEKTROSKOPIJE POVRŠINSKI POJAČANOG RAMANOVOG RASPRŠENJA 54
2.7.1 Medicina *54*
2.7.2 Biosenzori *55*

2.7.3 Umjetnost *57*
2.7.4 Nanooznake *58*
2.7.5 Ispitivanje pogonskih goriva *58*
2.7.6 Mehaničko hvatanje *58*
2.7.7 SERS jedne molekule *60*
2.7.8 UV SERS *60*
2.7.9 Vrhom pojačana Ramanova spektroskopija (TERS) *61*
2.8 ISTRAŽIVANI SPOJEVI 62
2.8.1 Histamin *62*
2.8.2 Aflatoksini *63*

3 EKSPERIMENTALNI DIO 65

3.1 KEMIKALIJE 65
3.2 PRIPREMA I ČIŠĆENJE UZORAKA 65
3.3 TESTNE MOLEKULE 66
3.3.1 Piridin *66*
3.3.2 Rodamin 6G *67*
3.3.3 Metilensko modrilo *68*
3.4 ISTRAŽIVANI SPOJEVI 69
3.4.1 Histamin *69*
3.4.2 Aflatoksin B1 ..... *69*
3.5 PRIPRAVA KOLOIDNIH SUSPENZIJA SREBRA 71
3.5.1 Priprema srebrnih nanočestica korištenjem citrata (AGC) *71*
3.5.2 Priprema srebrnih nanočestica korištenjem askorbinske kiseline (AGA) *71*
3.5.3 Priprema srebrnih nanočestica korištenjem borhidrida (AGBH) *71*
3.5.4 Priprema srebrnih nanočestica korištenjem aminodekstrana (AGD) *72*
3.5.5 Priprema srebrnih nanočestica korištenjem PVP-a (AGP) *72*
3.5.6 Priprema srebrnih nanočestica korištenjem glukoze (AGG) *72*
3.5.7 Priprema srebrnih nanočestica „cvjetnog“ izgleda (AGF) *72*
3.5.8 Priprema zlatnih nanočestica (AUC) *73*
3.6 PRIPREMA POROZNOG SILICIJA 74
3.6.1 Priprema uzoraka makroporoznog silicija *74*
3.6.2 Priprema uzoraka mezoporoznog silicija i depozicija srebra *76*
3.7 PRIPREMA AGFON PODLOGA 77
3.8 PRIPREMA UZORAKA ZA SERS MJERENJA 78
3.8.1 Priprema analita u koloidnoj suspenziji *78*
3.8.2 Priprema analita na krutim podlogama *78*
3.9 MJERNI UREĐAJI 79
3.9.1 Snimanje UV/Vis apsorpcijskih spektara *79*
3.9.2 Određivanje pH vrijednosti *79*
3.9.3 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) *79*
3.9.4 Transmisijska elektronska mikroskopija *80*
3.9.5 Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS) *80*
3.9.6 Snimanje Ramanovih i SERS spektara *80*

4 REZULTATI I RASPRAVA 82

4.1 KOLOIDNE SUSPENZIJE KAO SERS SUPSTRATI 82
4.1.1 Karakterizacije koloida *82*

4.1.2 SERS mjerenja *89*
4.2 POROZNI SI KAO SERS SUPSTRAT 98
4.2.1 Priprema makroporoznog silicija kao predloška za depozicije srebra i zlata *98*
4.2.2 SERS mjerenja *102*
4.2.3 Formiranje Ag kristala na mezoporoznom Si *105*
4.3 UREĐENI MONOSLOJ POLISTIRENSKIH MIKROSFERA KAO PREDLOŽAK ZA DEPOZICIJU SREBRA I ZLATA 112
4.3.1 SERS mjerenja *119*
4.4 PRIMJENA METODE POVRŠINSKI POJAČANOG RAMANOVOG RASPRŠENJA 123
4.4.1 Detekcija histamina u ribi *123*
4.4.2 Detekcija aflatoksina B1 ..... *126*
4.4.3 Detekcija nepoznate tekućine *128*
5 ZAKLJUČAK 129
6 POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA 132
7 LITERATURNI IZVORI 134
8 PRILOZI 146
9 ŽIVOTOPIS 149

POPIS SLIKA

Slika 1 Shematski prikaz tri tipa raspršenja svjetlosti na molekuli pobuđenoj fotonom. ΔE_i, ΔE_e i ΔE_v su redom energija upadnog fotona, raspršenog fotona i vibracijska energija molekule.[14] 5
Slika 2 Shematski prikaz SERS efekta s molekulom piridina adsorbiranom na srebro. Vidi se upadna laserska zraka i Ramanovo raspršenje te promjena njihovih intenziteta zbog pojačanog polja na Ag površini uslijed površinskih plazmonskih pobuda.[25] 12
Slika 3 Shematski prikaz a) površinske plazmonske rezonancije i b) lokalizirane površinske plazmonske rezonancije koja je rezultat kolektivnih oscilacija delokaliziranih elektrona uslijed djelovanja vanjskog električnog polja.[37] 14
Slika 4 Shematski prikaz različitih mehanizama pojačanja u SERS-u.[39] 15
Slika 5 Približni intervali valnih duljina gdje su Ag, Au i Cu dobro karakterizirani i omogućavaju SERS.[44] 18
Slika 6 Shema elektrokemijske ćelije s potenciostatom za in situ SERS: RE – referentna elektroda, WE – radna elektroda, CE – protuelektroda.[51] 19
Slika 7 a) Likurgova čaša, 4. st. pr. Kr., b) srednjevjekovni obojeni prozor i c) Deruta keramika, 15. st. 20
Slika 8 Shematski prikaz električnog dvosloja na površini nanočestice.[57] 24
Slika 9 Shematski prikaz steričke stabilizacije. 24
Slika 10 Podjela energetskih nivoa kod kvantnih točaka uslijed efekta kvantnog zatočenja; poluvodički energijski procjep se povećava sa smanjenjem veličine nanokristala.[58] 25
Slika 11 Shematski prikaz utjecaja nanočestica od 20 i 100 nm na stanicu.[59] 26
Slika 12 Mikrografije različitih nanostruktura.[61] 27
Slika 13 Mikrografije različitih nanočestica.[13] 28
Slika 14 Shematski prikaz različitih metoda depozicije nanosfera u monosloju. 32
Slika 15 Sile koje sudjeluju u organiziranju sferičnih čestica u otopini na supstratu. F_c je kapilarna sila između čestica u tankom filmu tekućine čija je debljina jednaka promjeru čestice. F_d je hidrodinamička sila koja vuče uronjene čestice prema unutarnjem području. Ovu silu stvara hidrodinamički tok (J_S) otapala koji kompenzira otapalo hlapljenjem s tanjih područja.[103] 33
Slika 16 Shematski prikaz konveksnog samouređivanja (samoudruživanja).[116] 35
Slika 17 Shematski prikaz elektrokemijske ćelije za pripremu poroznog Si.[151] 39
Slika 18 Ovisnost gustoće struje o potencijalu kod elektrokemijskog jetkanja silicija u HF elektrolitu na umjereno dopiranom p-tipu Si (h^+ - šupljina u valentnoj Si vrpci).[154] 41
Slika 19 Morfološke karakteristike poroznog silicija.[155] 42
Slika 20 Shematski prikaz elektrokemijskih reakcija u procesu nastajanja poroznog Si u otopini fluoridnih iona.[151] 43
Slika 21 Shematski prikaz elektrokemijskih reakcija kod nastajanja PSi (jača struja ili manja koncentracija F^-).[151] 43
Slika 22 Utjecaj osnovnih parametara jetkanja na morfologiju poroznog Si. 45
Slika 23 Jedinična ćelija silicija. Dvije bitne kristalne ravnine prikazane su desno: stranica kocke (označena crtkano) odgovara (100) ravnini, dok dijagonala kocke (označena točkasto) odgovara (111) ravnini. 48

Slika 24 Shematski prikaz e-*beam* evaporacije. Metal za depoziciju stavlja se u lađicu (engl. *crucible*), filament se zagrijava, a korištenjem magnetskog polja e^- se usmjeravaju na supstrat.[176] .51
Slika 25 Shematski prikaz pulsne laserske depozicije.[178] 52
Slika 26 Princip depozicije vrtnjom: a) postavljanje uzorka, b) ubrzavanje, c) konstantna vrtnja i d) isparavanje otapala (sušenje).....53
Slika 27 Dijagnostika jedne bakterije *S. sureus* bazirana na SERS metodi.[181] 55
Slika 28 Shematski prikaz SERS detekcije ovalbumina (OVA) u mlijeku na Ag dendriti-antitijela kompleksima.[182] 56
Slika 29 a) Ag film (200 nm) na 880 nm Si nanosferama (AgFON); b) SEM prikaz AgFON; c) shematski prikaz SESORS senzora.[44] 57
Slika 30 Van Goghova "Gospođa Rouliln ljulja kolijevku" (1889). Cvjetovi su originalno obojeni svjetlo ljubičastom bojom eozin Y. A) SERS s PDMS-Ag koloidnim filmom; SERS spektri 10^{-4}M standardne otopine 1) eozina Y, 2) alizarina, 3) karminske kiseline s laserom 532 nm; B) Shematski postav eksperimenta; C) SEM prikaz PDMS-Ag koloidnog filma.[190] 57
Slika 31 Shematski prikaz promjene debljine polimera (PAA) pokrenute promjenom pH koja dovodi do različite udaljenosti među česticama.[198] 59
Slika 32 Prikaz vrhom pojačane Ramanove spektroskopije (TERS).[213] Snažno polje stvara se na oštrom metalnom vrhu. 61
Slika 33 Pretvorba histidina u histamin djelovanjem enzima histidin dekarboksilaze.....63
Slika 34 Struktura molekule piridina. 66
Slika 35 Ramanov spektar piridina (vrijeme snimanja 10 s).....67
Slika 36 Struktura molekule rodamina 6G.....67
Slika 37 Struktura molekule metilenskog modrila. 68
Slika 38 Struktura molekule histamin dihidroklorida.....69
Slika 39 Strukture molekula aflatoksina.....70
Slika 40 Priprema srebrnih nanočestica redukcijom s citratima u uljnoj kupelji. 71
Slika 41 Izgled a) otopine nakon miješanja MBA i srebrovog nitrata i b) konačne suspenzije. 73
Slika 42 a) Ćelija za elektrokemijsko jetkanje u plastičnoj posudi i b) uređaj Keithley za kontrolu struje i napona prilikom elektrokemijskog jetkanja.....74
Slika 43 Uređaj za pulsnu lasersku ablaciju (IPCF, Messina, Italija); umetnuta slika prikazuje uzorke neposredno prije pulsne laserske ablacije. 76
Slika 44 a) Komercijalna suspenzija mikrosfera; b) i c) evaporator za depoziciju filmova srebra i zlata. 77
Slika 45 a) Skenirajući elektronski mikroskop Jeol JSM 7000F; b) uzorci poroznog Si pripremljeni za skenirajući elektronski mikroskop.....80
Slika 46 Ramanovi spektrometri a) Horiba Jobin Yvon T64000 i b) HR800.....81
Slika 47 Uzorci poroznog silicija (prvi red uzoraka bez deponiranog srebra i drugi red uzoraka s Ag) spremni za mjerenje Ramanovom spektroskopijom.....81
Slika 48 SEM slika AGF koloida (povećanje 33 000×). 83
Slika 49 UV–vidljivi spektar sintetiziranih srebrnih nanočestica. Uzorci označeni zvjezdicom razrijeđeni su vodom (uzorak AGA 10 puta; uzorci AGD i AGG 300 puta). 84
Slika 50 SEM slike a) AGC (povećanje 25 000×), b) AGA (povećanje 70 000×), c) AGBH (povećanje 50 000×), d) AGD (povećanje 1900×), e) AGP (povećanje 50 000×) i f) AGG (povećanje 60 000×). 85

Slika 51 TEM slike a) AGA, b) AGBH, c) AGP i d) AGG uzoraka. 86
Slika 52 Raspodjele veličine srebrnih čestica za a) AGC, b) AGA, c) AGBH, d) AGD, e) AGP i f) AGG uzorke izračunate iz odgovarajućih SEM mikrografija (Slika 50). 87
Slika 53 Raspodjele veličine srebrnih čestica za a) AGA, b) AGBH, c) AGG i d) AGP uzorke izračunate iz odgovarajućih TEM mikrografija (Slika 51). 88
Slika 54 SERS intenziteti vrpce piridina na 1008 cm^{-1} kao funkcija volumena koloida u logaritamskoj skali od 1 do 900 µL. Iscrtkane linije dodane su kao vizualna pomoć. Omjer agregirajućeg sredstva i koloida održavan je konstantnim tijekom eksperimenta. 90
Slika 55 SERS intenziteti piridina na 1008 cm^{-1} kao funkcija različitih agregirajućih sredstava i njihovih koncentracija za AGC, AGA, AGBHc i AGDd uzorke. Koncentracija piridina bila je konstantna tijekom eksperimenta. 91
Slika 56 SERS intenziteti vrpci piridina na 1008 i 1036 cm^{-1} kao funkcija koncentracije piridina u logaritamskoj skali u AGC, AGA i AGDd uzorcima. 93
Slika 57 Kalibracijska krivulja SERS intenziteta piridina (1008 cm^{-1}) u AGA uzorku na 532 nm u odnosu na njegovu koncentraciju prema Langmuirovoj izotermi. 93
Slika 58 UV-vidljivi apsorpcijski spektar koloidnog uzorka AGC s natrijevim nitratom (plava linija) i natrijevim borhidridom (crvena linija). 96
Slika 59 Agregacijski profili za AGA i AGC u vremenu prilikom dodavanja a) nitrata (1 mol L^{-1}) i b) borhidrida (0,1 mol L^{-1}) kao agregirajućeg sredstva. 97
Slika 60 SERS spektri piridina a) u AGC uzorku snimani jedan za drugim 25 minuta nakon dodatka 0,1 mol L^{-1} $NaBH_4$ (najviša vrpca = najduže vrijeme) i b) snimani unutar 19 sati nakon dodatka 1 mol L^{-1} $NaNO_3$ (od vrha prema dnu redom 0, 30, 50, 90 i 120 min te 19h; λ=514,5 nm). 98
Slika 61 Ćelija za elektrokemijsko jetkanje silicija (napravljena u Laboratoriju za molekulsku fiziku, IRB) za vrijeme jetkanja. 98
Slika 62 Shematski prikaz eksperimenata. 99
Slika 63 SEM mikrografije srebrnih nanostruktura deponiranih na PSi (uzorak #2) a) iz 0,01 M $AgNO_3$ otopine kroz dvije minute i b) kapanjem srebrovog koloida (povećanje 30 000×); raspodjele veličine čestica prikazane su kao umetnute slike. 100
Slika 64 SEM slike PSi uzoraka nakon ablacije srebrom: a) 30 000 pulseva, uzorak #1 (povećanje 30 000×), b) 30 000 pulseva, uzorak #2 (povećanje 43 000×), c) 45 000 pulseva, uzorak #2 (povećanje 33 000×) i d) 45 000 pulseva, uzorak #3 (povećanje 30 000×) s odgovarajućim raspodjelama veličine čestica (umetci). 101
Slika 65 SEM slike uzoraka poroznog Si nakon ablacije sa zlatom: a) uzorak #2 (povećanje 15 000×) i c) uzorak #3 (povećanje 13 000×) s odgovarajućim raspodjelama veličine čestica (umetci). 101
Slika 66 a) SERS spektri 10^{-8} M R6G na PSi, uzorak #2 za različita vremena uranjanja u $AgNO_3$ i za različite koncentracije (vrijeme raste od vrha prema dolje; koncentracija 10^{-3} M prikazana na dnu) (514,5 nm; 1 mW; vrijeme snimanja 10 s, osima ako nije drugačije navedeno; b) graf ovisnosti SERS intenziteta 612 cm^{-1} i 776 cm^{-1} R6G vrpci o vremenu uranjanja; pune točke - 10^{-3} M $AgNO_3$. 102
Slika 67 a) SERS spektri R6G (10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} i 10^{-9} M od vrha prema dolje) na PSi uzorku #2 s uranjanjem; 1 mW; b) SERS spektri R6G (10^{-6}, 10^{-7} i 10^{-8} M od vrha prema dolje) na PSi uzorku #2 s Ag koloidom; 6 mW; (514,5 nm, vrijeme snimanja 10 s). 103
Slika 68 SERS spektri MB: a) 10^{-6}, 10^{-8} i 10^{-10} M (od vrha prema dolje) na PSi uzorku #1 nakon Ag ablacije (30 000); 0.6 µW (D4) i 6 µW (D3); b) 10^{-8} i 10^{-10} M (od vrha prema dolje) na PSi uzorku #1

nakon Ag ablacije (45 000); c) 10^{-6}, 10^{-8} i 10^{-10} M (od vrha prema dolje) na PSi uzorku #2 nakon Ag ablacije (45 000) i d) 10^{-8} i 10^{-10} M (od vrha prema dolje) na PSi uzorku #3 nakon Ag ablacije (45 000), (633 nm, 6 μW, osim ako je drugačije navedeno, vrijeme snimanja 10 s). 104
Slika 69 SERS spektri MB (10^{-6} i 10^{-8} M od vrha prema dolje) na PSi uzorku #2 nakon ablacije sa zlatom (30 000 pulseva); (633 nm; 60 μW; vrijeme snimanja 10 s). 105
Slika 70 SEM slike Ag nanočestica dobivenih uranjanjem PSi 1 min u 10^{-3} M $AgNO_3$ (a i f povećanje 150 000×; b, c, d i e povećanje 200 000×). 107
Slika 71 SEM slike Ag nanočestica dobivenih uranjanjem PSi 1 min u 10^{-2} M $AgNO_3$ (a, b, c i e povećanje 50 000×; d i f povećanje 75 000×). 107
Slika 72 a) promjer Ag čestica (za oba sloja) formiranih 1 min uranjanjem u 10^{-2} M $AgNO_3$ u ovisnosti o struji jetkanja i b) promjer Ag agregata u drugom sloju u odnosu na promjer Ag čestica u prvom sloju. 109
Slika 73 Ramanovi spektri različitih uzoraka mezoporoznog Si (0,5, 1, 2, 5, 8, 12 i 15 mA/cm^2 odozgo prema dolje; λ=514,5 nm). 109
Slika 74 SERS spektri 10^{-8} M rodamina 6G na mezoporoznom Si: a) Ag deponiran 1 min uranjanjem u 10^{-2} M $AgNO_3$ i b) Ag deponiran 1 min uranjanjem u 10^{-3} M $AgNO_3$ (λ=514,5 nm). 110
Slika 75 SERS intenzitet 10^{-6} M R6G na mezoporoznom Si (1 i 5 mA cm^{-2}) i kristalnom Si u ovisnosti o vremenu uranjanja u $AgNO_3$ (10^{-2} i 10^{-3} M): a) vrpca na 1360 cm^{-1} i b) vrpca na 1648 cm^{-1}. 111
Slika 76 Izgled nanosfera od 370 nm nakon sušenja i prije naparavanja srebra. 112
Slika 77 Shematski prikaz: a) slaganja u heksagonskoj gustoj slagalini i b) varijacije debljine deponiranog sloja metala duž površine sfere. 114
Slika 78 SEM slika polistirenskih sfera (1 μm): crveno područje – sfere nisu organizirane u heksagonsku gustu slagalinu, plava područja – poddomene u monosloju, zelene strelice – defekti u monosloju (povećanje 1700×). 116
Slika 79 SEM slike polistirenskih sfera: a) sfere 1000 nm sa 180 nm srebra (povećanje 33 000×), b) sfere 370 nm sa 80 nm srebra (povećanje 33 000×), c) sfere 1000 nm sa 180 nm srebra (povećanje 70 000×) i d) sfere 370 nm sa 80 nm srebra (povećanje 100 000×). Na slici se vidi organizacija sfera u heksagonsku gustu slagalinu. 117
Slika 80 SEM slike polistirenskih sfera: a) 1000 nm s Ag filmom 120 nm i b) 350 nm s Ag filmom 200 nm (povećanje 95 000×). 117
Slika 81 Polistirenske sfere veličine 1000 nm i 370 nm pomiješane zajedno, nakon depozicije 80 nm srebra: a) povećanje 30 000×, b) povećanje 8000×. 118
Slika 82 Izgled mikrosfera od 370 nm nakon naparavanja različitih debljina srebra (a) i mikrosfera od 370 i 1000 nm pomiješanih zajedno nakon naparavanja različitih debljina srebra (b). 119
Slika 83 SERS spektri R6G na uzorku 180 nm / 1000 nm: a) 10^{-6} M, b) 10^{-8} M i c) 10^{-9} M, d) 10^{-6} M na uzorku s Ag bez sfera i Ramanovi spektri e) monosloja mikrosfera (1 μm) i f) 180 nm Ag na sferama 1000 nm (λ=514,5 nm; 0,5 mW; vrijeme snimanja 30 s; objektiv 100 x). 120
Slika 84 SERS spektri R6G na uzorku 80 nm / 350 nm: a) 10^{-6} M, b) 10^{-8} M, c) 10^{-9} M i d) R6G 10^{-5} M na uzorku s Ag bez sfera (λ=514,5 nm; 0,5 mW; vrijeme snimanja 30 s; 100 x). 121
Slika 85 SERS spektri R6G na uzorku 80 nm / (350 nm + 1000 nm): a) 10^{-6} M, b) 10^{-8} M i 10^{-9} M (λ=514,5 nm; 0,5 mW; vrijeme snimanja 30 s; 100 x). 121

Slika 86 SERS spektri piridina: a) na uzorku 180 nm / 1000 nm: 1) 1,2 M, 2) 0,12 M, 3) 1,2 × 10^{-2} M, 4) 1,2 × 10^{-3} M i 5) 1,2 × 10^{-4} M i b) na uzorku 80 nm Ag / (350 nm + 1000 nm): 6) 1,2 M, 7) 0,12 M, 8) 1,2 × 10^{-2} M, 9) 1,2 × 10^{-3} M i 10) 1,2 × 10^{-4} M (*λ*=514,5 nm; 0,5 mW; 10 s; 50 x). 122
Slika 87 SERS spektri piridina a) na uzorku 80 nm / 350 nm: 1) 1,2 M, 2) 0,12 M, 3) 1,2 × 10^{-2} M, 4) 1,2 × 10^{-3} M, 5) 1,2 × 10^{-4} M i b) na uzorku 160 nm / 350 nm: 6) 1,2 M, 7) 0,12 M, 8) 1,2 × 10^{-2} M, 9) 1,2 × 10^{-3} M i 10) 1,2 × 10^{-4} M (*λ*=514,5; 0,5 mW; vrijeme snimanja 10 s; 50 x). 123
Slika 88 Ramanovi spektri histamin dihidroklorida: a) prah (vrijeme snimanja 6 s, 100×) i b) 2 M otopina (*λ*=514,5 nm; vrijeme snimanja 60 s). 123
Slika 89 SERS spektri histamina (10^{-3} M) u području 1050 do 1650 cm^{-1} u različitim koloidnim suspenzijama (*λ*=514,5 nm). 124
Slika 90 SERS spektri različitih koncentracija histamina u AGC koloidnoj suspenziji: a) 10^{-2} M, b) 10^{-3}, c) 10^{-4}, d) 10^{-5}, e) 5 × 10^{-6} i f) voda (514,5 nm; 60 s). 125
Slika 91 SERS spektri: a) 10^{-3} mol L^{-1} histamina u ribljem ekstraktu u AGC koloidu: 1) ekstrakt tretiran s NaOH, 2) ekstrakt tretiran sa smolom za anionsku izmjenu i 3) ekstrakt bez tetmana i b) histamina u ribljem ekstraktu nakon obrade smolom za anionsku izmjenu: 4) 10^{-2} M, 5) 10^{-3} M, 6) 10^{-4} M, 7) 10^{-5} M i 8) ekstrakt (514,5 nm). 126
Slika 92 SERS spektar AFB1 u AGC koloidu: a) 6×10^{-3} M, b) 6×10^{-4} M i c) metanol u AGC koloidu (514,5 nm; vrijeme snimanja 120 s). 127
Slika 93 Spektri tekućine X: a, b i c – SERS spektri različitih koncentracija tekućine X i d – Ramanov spektar tekućine X (*λ*=514,5 nm). 128

POPIS TABLICA

Tablica 1 Karakteristike nekih SERS supstrata s obzirom na podatke iz literature.[41] Kratice: MFON – metalni filmovi na nanosferama; TERS – vrhom pojačana Ramanova spektroskopija; SHINERS – *shell-isolated nanoparticle enhanced Raman spectroscopy*; Fs – femtosekundno.....16
Tablica 2 Tipovi koloida.....22
Tablica 3 Faktori pojačanja, EF, dobiveni na srebrnim filmovima različite debljine i pri različitim valnim duljinama pobude.[88] 30
Tablica 4 Faktori pojačanja na AgFON supstratima različitih debljina srebra i promjera nanočestica.[88] 31
Tablica 5 Entalpije nekih Si-X veza.....40
Tablica 6 Karakteristični Ramanovi modovi piridina.....66
Tablica 7 Karakteristični Ramanovi modovi rodamina 6G.....68
Tablica 8 Karakteristični Ramanovi modovi metilenskog modrila.....68
Tablica 9 Karakteristični Ramanovi modovi histamina.....69
Tablica 10 Karakteristične SERS vrpce aflatoksina B1 prema.[220] 70
Tablica 11 Karakterizacija pripremljenih koloidnih otopina srebra. (Za računanje srednje vrijednosti i standardne devijacije veličine Ag čestica izmjereno je najmanje pedeset čestica na SEM i TEM slikama.) 88
Tablica 12 R^2 vrijednosti, adsorpcijske konstante i maksimalni SERS intenziteti za dvije vrpce piridina (1008 i 1036 cm^{-1}) i dvije R6G vrpce (612 i 776 cm^{-1}) na tri pobude (488, 532 i 514,5 nm). 92
Tablica 13 Granice detekcije (LOD) piridina uz dodatak $NaNO_3$ (1 mol L^{-1}) i $NaBH_4$ (0,1 mol L^{-1}) kao agregirajućih sredstava. 95
Tablica 14 Promjeri Ag čestica (± pogreška) za dvije $AgNO_3$ koncentracije (izmjerenih na SEM slikama) formiranih na površini uzoraka PSi koji su dobiveni jetkanjem s različitim gustoćama struje, *I*. Kod veće koncentracije dani su promjeri Ag NČ za prvi i drugi sloj. 108

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

POVRŠINSKI POJAČANO RAMANOVO RASPRŠENJE: OD KOLOIDNE OTOPINE DO STABILNOG SUPSTRATA

Lara Mikac
Centar izvrsnosti za napredne materijale i senzore (CEMS)
Laboratorij za molekulsku fiziku
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb, Hrvatska

Supstrati za površinski pojačano Ramanovo raspršenje (SERS) pripremljeni su na tri različita načina: *(i)* sintezom koloidnih suspenzija srebra, *(ii)* depozicijom srebra na prethodno elektrokemijski jetkan silicij i *(iii)* naparavanjem srebra na monosloj polistirenskih mikrosfera. Koloidne suspenzije sintetizirane su redukcijom srebrove soli ($AgNO_3$) s različitim reducirajućim sredstvima. Prvi tip čvrstih podloga dobiven je depozicijom metala na porozni silicij metodom uranjanja u otopinu $AgNO_3$, nanošenjem koloidne suspenzije srebra ili postupkom pulsne laserske ablacije. Drugi tip čvrstih SERS supstrata dobiven je depozicijom monodisperznih polistirenskih sfera (350 i 1000 nm) u monosloju na hidrofilnu staklenu podlogu te naparavanjem različitih debljina metalnih filmova pomoću evaporatora. Sve pripremljene podloge testirane su na SERS aktivnost korištenjem testnih molekula (piridin, rodamin 6G, metilensko modrilo). Za koloidnu suspenziju gdje je veličina Ag čestica iznosila oko 40 nm i uz korištenje natrijevog borhidrida kao agregirajućeg sredstva postignut je faktor pojačanja za piridin reda veličine 10^6. Za podloge bazirane na poroznom Si najniže dobivene granice detekcije su 10^{-10} mol L^{-1} za metilensko modrilo (uz pobudu 633 nm) i 10^{-9} mol L^{-1} za rodamin 6G (uz pobudu 514,5 nm). Za supstrate bazirane na polistirenskim sferama najbolje postignute granice detekcije su 10^{-9} mol L^{-1} za rodamin 6G i $1{,}2 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} za piridin. Sintetizirane koloidne SERS podloge primijenjene su za određivanje niskih koncentracija histamina i aflatoksina B1.

(xxiii + 151 stranice, 93 slike, 14 tablica, 249 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: koloid/ nanočestice/ polistirenske sfere/ porozni silicij/ površinski pojačano Ramanovo raspršenje/ supstrat/

Mentor: dr. sc. Mile Ivanda, zn. savj.

Rad prihvaćen:
Ocjenitelji:

1. Izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić, PMF
2. Dr. sc. Mile Ivanda, IRB
3. Prof. dr. sc. Predrag Novak, PMF

Zamjena: Dr. sc. Marijan Gotić, IRB

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING: FROM THE COLLOID TO THE STABLE SUBSTRATE

Lara Mikac
Center of Excellence for Advanced Materials and Sensing Devices
Molecular Physics Laboratory
Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54, Zagreb

The substrates for surface enhanced Raman scattering (SERS) were prepared in three different ways: *(i)* the synthesis of silver colloidal suspension, *(ii)* the deposition of silver on the previously electrochemically etched silicon and *(iii)* vapor deposition of silver on a monolayer of polystyrene microspheres. Colloidal suspensions were synthesized by reduction of silver salts ($AgNO_3$) with various reducing agents. The first type of solid substrates was obtained by the deposition of metal on the porous silicon using immersion plating method, by applying Ag colloidal solution or by pulsed laser ablation. Another type of solid SERS substrates was prepared by deposition of monodisperse polystyrene spheres (350 and 1000 nm) in a monolayer on a hydrophilic glass surface. Different thicknesses of metal films were evaporated on the substrates using e-beam deposition. All prepared substrates were tested for their SERS activity using the test molecules (pyridine, rhodamine 6G, methylene blue). For the colloidal suspension where the size of Ag particles was about 40 nm and with the use of sodium borohydride as aggregating agent the enhancement factor for pyridine of the order of 10^6 was reached. For the substrates based on porous Si the lowest limits of detection obtained were 10^{-10} mol L^{-1} for methylene blue (with 633 nm excitation) and 10^{-9} mol L^{-1} for rhodamine 6G (with 514.5 nm excitation). For substrates based on polystyrene spheres best achieved detection limits were 10^{-9} mol L^{-1} for rhodamine 6G and 1.2×10^{-3} mol L^{-1} for pyridine. Synthesized colloidal SERS substrates have been applied for the detection of low concentrations of histamine and aflatoxin B1.

(xxiii pages+151, 93 figures, 14 tables, 249 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: colloid/ nanoparticles/ polystirene spheres/ porous silicon/ substrates/ surface enhanced Raman spectroscopy/

Supervisor: Dr. Mile Ivanda, Senior Scientist

Thesis accepted:

Reviewers:

1. Dr. Snežana Miljanić, Assoc. Prof., PMF
2. Dr. Mile Ivanda, Senior Scientist, IRB
3. Dr. Predrag Novak, Full Professor, PMF

Substitute: Dr. Marijan Gotić, Senior Scientist, IRB

1 UVOD

Potreba za detekcijom niskih koncentracija različitih molekula sve je više prisutna u različitim područjima. Tako se mnogi organski zagađivači u zraku i u vodi moraju detektirati pri vrlo niskim koncentracijama.[1] U prevenciji terorističkih napada poželjno je otkriti ekstremno niske koncentracije eksploziva.[2] U prehrambenoj industriji analiza biogenih amina (npr. histamina, kadaverina, spermina) važna je zbog njihove toksičnosti te korištenja kao indikatora stupnja svježine ili pokvarenosti hrane.[3] Izazov nanomedicine je razvoj osjetljivih i brzih metoda detekcije tumorskih markera pri vrlo niskim koncentracijama.[4]

U današnje je vrijeme velik broj spektroskopskih tehnika dostupan za analizu različitih materijala i supstancija. Među njima je i Ramanova spektroskopija kao moćna analitička tehnika koja omogućava identifikaciju i kvantifikaciju velikog broja molekula čak i u kompleksnim matricama. Osjetljivost i specifičnost ove metode od velikog je znanstvenog i praktičnog značenja u mnogim poljima moderne tehnologije. Ramanovi spektri sastoje se od vrpci koje odgovaraju vibracijskim i rotacijskim prijelazima specifičnim za molekulsku strukturu te stoga daju kemijski „otisak prsta“ za identifikaciju analita. Svojstva materijala mogu se odrediti analizom spektara ili se spektri uspoređuju s postojećim bazama spektara kako bi se identificirala nepoznata supstancija.

Otkriće spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (engl. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS) od strane Fleischmanna i suradnika 1974. privuklo je znatnu pozornost zbog velikog pojačanja inače slabog Ramanovog signala. Veliki korak na području razvoja SERS-a bila je i detekcija jedne molekule što je pošlo za rukom Kneipp, Nieu i Emoryju 1997. godine. Uspješno su detektirane pojedinačne molekule biološki relevantnih spojeva poput adenina, kratkih peptida i alkalne fosfataze.[5,6,7] Veliko pojačanje, mogućnost detektiranja jedne molekule mnogih analita, mogućnost analize vodenih otopina uzoraka kao i mogućnost analize smjesa ukazala je na važnost SERS-a.

Budući da materijali koji se koriste kao SERS supstrati i njihova geometrija igraju ključnu ulogu u fenomenu površinskog pojačanja, mnogo istraživanja posvećeno je razvoju i karakterizaciji SERS supstrata. Najčešće korišteni supstrati za SERS su koloidne otopine srebra i zlata. Ipak, kod koloidnih otopina postoje problemi poput stabilnosti i slabe reproducibilnosti uslijed nekontrolirane agregacije čestica.[8,9] Supstrati koji se vrlo često

upotrebljavaju su grube metalne površine, no iako su stabilni osjetljivost im je manja u usporedbi s koloidima.[10,11] Metalni filmovi napareni na čvrste podloge daju reproducibilne površine za pojačanje signala.[12] Mnogi supstrati su osjetljivi na zrak ili na druge načine imaju ograničeno vrijeme upotrebe te stoga zahtijevaju posebnu opremu za proizvodnju ili iskustvo u sintezi i vješto rukovanje.

Za uspješnu detekciju analita površinski pojačanom Ramanovom spektroskopijom najbitniji su dobar odabir metala i odgovarajuća nanostruktura supstrata koji određuju ukupno pojačanje Ramanovog raspršenja. Postoji velik broj metoda proizvodnje SERS supstrata, a u novije vrijeme razvijaju se pristupačnije podloge i jednostavnije postupci proizvodnje. Pored toga, motiv za osmišljavanje jednostavnih SERS podloga je i razvoj prijenosnih Ramanovih spektrometara te korištenje SERS-a u području medicine, forenzike, sigurnosti, prehrambene industrije, zaštite okoliša itd. Na ovaj je način moguće smanjiti troškove i vrijeme analize, posebno za uzorke koji se mogu degradirati ili na drugi način promijeniti između točke uzorkovanja i laboratorija u kojem se analiziraju. Stoga razvoj jednostavnih metoda pripreme SERS supstrata pruža priliku povećanja broja znanstvenih područja u kojima bi se mogao koristiti SERS.

Pri izradi jednostavnih SERS podloga treba obratiti pažnju na četiri smjernice: proizvodnja supstrata korištenjem opreme i regensa koji se uobičajeno nalaze u kemijskim laboratorijima, minimalna obuka ili iskustvo potrebni za proizvodnju, jednostavan transport ili proizvodnja na mjestu uzorkovanja te jednostavna integracija u analitički sustav.[13]

SERS je metoda koja se koristi već niz godina, a posljednja istraživanja na tom području uglavnom idu u sljedećim smjerovima:

- izrada novih 'općenitih' SERS aktivnih podloga (za raznovrsne analite) te višestruko korištenje iste podloge
- poboljšanje SERS-a jedne molekule i povećanje granica osjetljivosti
- bolje razumijevanje mehanizama uključenih u SERS
- korištenje SERS-a za unutarstanično oslikavanje (engl. *imaging*), dijagnostiku i daljnja potraga za novim aplikacijama.

Cilj ove doktorske disertacije je poboljšanje i unapređenje postojećih analitičkih metoda dobivanja SERS supstrata kako i razvoj inovativnih procedura za identifikaciju

molekula. Poseban je naglasak stavljen na detekciju molekula koje su bitne u prehrambenoj industriji. Svi prethodno spomenuti koncepti i terminologija detaljno su objašnjeni u ovom radu.

Praktični rad ove disertacije podijeljen je na tri osnovna dijela. Prvi dio obuhvaća pripremu koloidnih otopina srebra te korištenje koloidnih otopina u površinski pojačanoj Ramanovoj spektroskopiji. U ovom su dijelu detaljno opisana svojstva pripremljenih koloidnih otopina kao i način pripreme uzoraka za SERS. U drugom je dijelu objašnjeno dobivanje čvrstih podloga elektrokemijskim jetkanjem silicija. Na ovakve podloge različitim je metodama naneseno srebro te je njihova učinkovitost za površinski pojačano Ramanovo raspršenje ispitana testnim molekulama, metilenskim modrilom i rodaminom 6G. Treći se dio bavi pripremom čvrstih podloga na bazi monodisperznih polistirenskih sfera koje se u monosloju deponiraju na hidrofilnu podlogu. Na takve je podloge potom napareno srebro (ili zlato) u različitim debljinama te je istraženo pojačanje Ramanovog signala testnih molekula na tim podlogama. Na kraju, istražena je moguća primjena ovih supstrata za detekciju niskih koncentracija različitih neželjenih supstancija u hrani. SERS supstrat također je uspješno korišten za detekciju nepoznate tekućine.

2 LITERATURNI PREGLED

2.1 Uvod u Ramanovu spektroskopiju

Ramanovo raspršenje je vibracijska spektroskopska tehnika koja omogućava identifikaciju supstancija detekcijom neelastičnog raspršenja svjetla na molekuli pobuđenoj laserskom zrakom. Od otkrića Ramanovog raspršenja dvadesetih godina prošlog stoljeća, a uslijed napretka tehnologije, Ramanova spektroskopija postala je važna tehnika s mnogim područjima primjene. Razlog tome je veliki broj informacija koje pruža, minimalna priprema uzoraka te mogućnost *in situ* analize. No, problemi poput nedovoljne osjetljivosti i česte pojave fluorescencije ograničili su upotrebu Ramanove spektroskopije prilikom rutinskih analitičkih mjerenja.

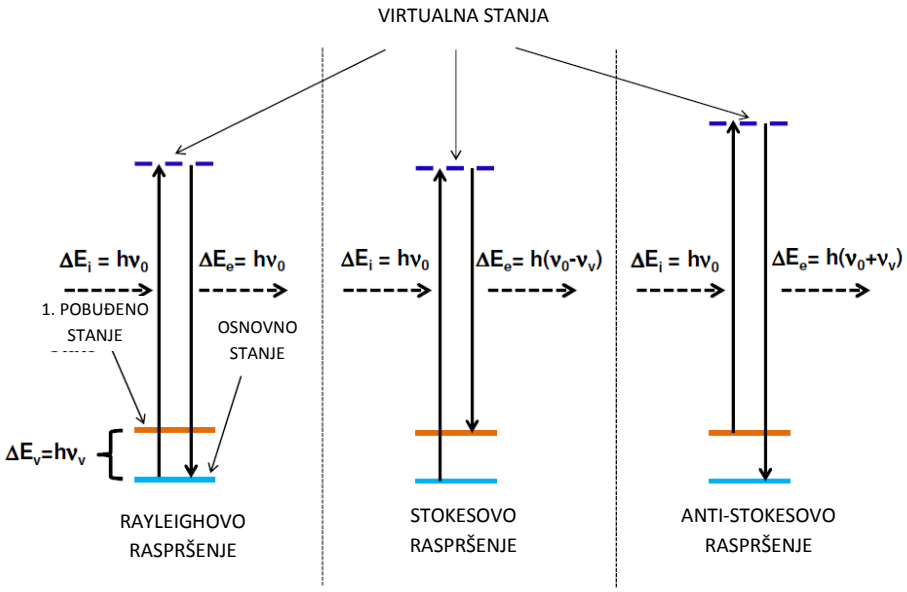
2.1.1 Otkriće

Ramanovo raspršenje ili Ramanov efekt je neelastično raspršenje fotona. Ime efekta potječe od indijskog fizičara C.V. Ramana koji je efekt otkrio 1928. godine, premda su prve ideje o neelastičnom raspršenju svjetla nastale još ranije. Raman je koristio sunčevu svjetlost fokusiranu pomoću teleskopa kako bi dobio dovoljno dobar intenzitet raspršenog signala. Važnost ovog otkrića ubrzo je otkrivena te je za otkriće ovog efekta Raman dobio Nobelovu nagradu za fiziku već 1930. Unutar godine i pol od objave otkrića objavljeno je više od 150 radova koji spominju Ramanov efekt. Od tada je Ramanovo raspršenje utjecalo na brojne važne tehnologije, a jedna od njih je Ramanova spektroskopija.

2.1.2 Teorija Ramanovog raspršenja

Većina svjetla koja prolazi kroz prozirnu supstanciju je Rayleigh raspršena (ime dolazi od Lorda Rayleigha koji je fenomen objasnio 1871). Ovo je efekt elastičnog raspršenja što znači da svjetlost niti dobiva niti gubi energiju za vrijeme raspršenja te ostaje iste valne duljine. U Rayleighovom raspršenju foton intereagira s molekulom polarizirajući elektronski oblak i podižući ga u virtualna energetska stanja. Ovo stanje traje vrlo kratko (10^{-14} sekundi) i molekula se ubrzo vraća u osnovno stanje otpuštajući foton. Otpuštanje fotona ide u svim smjerovima. Budući da se molekula vraća u osnovno stanje, otpuštena energija jednaka je energiji pobudnog fotona. Stoga raspršeno svjetlo ima istu valnu duljinu kao i upadno.

Za razliku od Rayleighovog, Ramanovo raspršenje je neelastično jer fotoni svjetlosti gube ili dobivaju energiju za vrijeme procesa raspršenja i stoga im se povećava ili smanjuje valna duljina. Ako se molekula podigne iz osnovnog u virtualno stanje i ponovno padne na vibracijsko stanje više energije tada raspršeni foton ima manju energiju od početnog pa zato i veću valnu duljinu (Slika 1). Ovo se naziva Stokesovim raspršenjem. Ako je molekula već na početku u višem vibracijskom stanju, a nakon raspršenja se vraća u osnovno stanje, raspršeni foton ima veću energiju pa zato i manju valnu duljinu. Ovo je anti-Stokesovo raspršenje.



Slika 1 Shematski prikaz tri tipa raspršenja svjetlosti na molekuli pobuđenoj fotonom. ΔE_i, ΔE_e i ΔE_v su redom energija upadnog fotona, raspršenog fotona i vibracijska energija molekule.[14]

Samo jedan od 10^7 fotona je Stokes raspršen pa je ova pojava zamaskirana daleko rasprostranjenijim Rayleighovim raspršenjem gdje je na svakih 10 000 upadnih fotona jedan foton Rayleigh raspršen.[15] Količina anti-Stokesovog raspršenja još je manja. Razlika u intenzitetu Stokesove i anti-Stokesove komponente proizlazi iz inicijalno različitog broja molekula u svakom stanju. Populacija slijedi Boltzmannovu raspodjelu

$$N \propto e^{-\frac{E}{k_B T}} \qquad \textbf{(2-1)}$$

Stoga ima eksponencijalno manje molekula koje su u višem energijskom vibracijskom stanju. Kako ovo ima utjecaj na anti-Stokesovo raspršenje, intenzitet tog raspršenja je mnogo manji, a razlika intenziteta ovisi o razmještanju energijskih nivoa. Tako su za bliže raspoređene vibracijske nivoe Stokesovo i anti-Stokesovo raspršenje sličnih intenziteta. Za

vibracijske nivoe, koji su udaljeniji, anti-Stokesov signal je značajno slabiji od Stokesovog signala. Omjer se smanjuje povećanjem temperature, a razlika intenziteta može se iskoristiti za mjerenje temperature. Stokesovo i anti-Stokesovo raspršeno svjetlo pomaknuto je na jednaku udaljenost, ali na suprotne strane Rayleighovog raspršenog svjetla. Stoga je i spektar simetričan u odnosu na valnu duljinu korištenog svjetla, osim s obzirom na razliku u intenzitetu. U Ramanovoj spektroskopiji uobičajeno je prikazivati samo Stokesovu polovicu spektra zbog jačih intenziteta.

Za poboljšanje efikasnosti procesa Ramanovog raspršenja koriste se rezonantna Ramanova spektroskopija (engl. *resonance Raman spectroscopy*, RRS) i površinski pojačano Ramanovo raspršenje (SERS) (poglavlje 2.2).[16] Ramanova spektroskopija uobičajeno se izvodi sa zelenim, crvenim ili bliskim infracrvenim laserima. Ove su valne duljine ispod prvih elektronskih prijelaza većine molekula. Situacija se mijenja ako su valne duljine lasera koji služe za pobudu unutar elektronskog spektra molekule. U tim se slučajevima intenzitet nekih Raman aktivnih vibracija povećava za faktor 10^2-10^4. Tipičan Ramanov presjek je između 10^{-31} i 10^{-29} cm^2 po molekuli. Za razliku od Ramanovog, fluorescentne boje imaju presjek približno 10^{-15} cm^2 po molekuli. Stoga rezonantno Ramanovo raspršenje može drastično povećati presjek. Tako na primjer presjek rodamina 6G pri λ=532 nm može iznositi 10^{-23} cm^2 po molekuli.[17] Ovo rezonantno pojačanje (ili rezonantni Ramanov efekt) može biti vrlo korisno. Rezonantno pojačanje ne počinje na točno definiranoj valnoj duljini. Pojačanje od 5 do 10 puta uočava se čak i ako je pobuda lasera nekoliko stotina valnih brojeva ispod elektronskog prijelaza molekule.

2.1.2.1 ***Aktivni modovi***

Ramanov spektar je prikaz Ramanovog pomaka u odnosu na intenzitet raspršenja. Dvoatomne molekule imaju samo jedan vibracijski mod jer imaju samo jedan stupanj slobode. Za molekulu s N atoma broj osnovnih vibracijskih stanja dan je s n = 3N-6 za nelinearne molekule (npr. H_2O) i n = 3N-5 za linearne molekule (npr. CO_2). Svaki mod daje karakterističan pomak frekvencije. U svakom neelastičnom procesu ima više Ramanovih linija nego što ima osnovnih modova zbog višestrukih pobuđenja drugog reda i kombinacijskih modova. Stoga svaka molekula ima jedinstven vibracijski spektar (tj. otisak prsta, engl. *fingerprint*) ovisno o svom sastavu. Iako su vibracijski modovi najzastupljeniji, Ramanovo raspršenje uključuje i elektronske prijelaze kao i rotacije molekula na kojima se dešava raspršenje.

Ramanov pomak ovisi o razmacima energija modova molekule. Ipak, nisu svi modovi aktivni tj. ne pojavljuju se u Ramanovom spektru. Da bi mod bio Raman aktivan mora doći do promjene polarizabilnosti, α, molekule, tj.

$$\left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_e \neq 0 \qquad \textbf{(2-2)}$$

gdje je q normalna koordinata, a e ravnotežni položaj. Ovo je spektroskopsko izborno pravilo Ramanove spektroskopije. U slučaju infracrvene (IR) spektroskopije spektroskopsko izborno pravilo je promjena dipolnog momenta. Kod molekula s centrom simetrije vibracije koje su Raman aktivne nisu IR aktivne i obratno. Ovo se naziva pravilo međusobnog isključenja, a ove se dvije tehnike smatraju komplementarnima. Kod kompleksnih molekula koje nisu simetrične, svi normalni modovi su i Raman i IR aktivni. To ipak ne znači da se modovi vide jer jače veze mogu zasjeniti slabije. Ako je kemijska veza jako polarizirana, mala promjena njene duljine (kao što se događa za vrijeme vibracije) imat će samo mali dodatni efekt na polarizaciju. Vibracije koje uključuju polarne veze (C-O, N-O, O-H) stoga dovode do slabog Ramanovog raspršenja. Suprotno tome, relativno neutralne veze (C-C, C-H, C=C) doživljavaju velike promjene polarizabilnosti za vrijeme vibracije. Kako dipolni moment ne osjeća takve promjene, vibracije koje uključuju ovakve tipove veza dovode do jakog Ramanovog raspršenja, ali imaju slabi IR spektar.[18] Ramanova (i IR) aktivnost kompliciranijih molekula može se odrediti koristeći njihovu simetriju i teoriju grupa.

2.1.2.2 *Ramanovo raspršenje na molekulama*

Kod Ramanovog raspršenja na molekulama (ne uzima se u obzir interakcija s okolinom), frekvencija raspršenog zračenja pomaknuta je za iznos frekvencije vibracijskih, rotacijskih ili elektronskih prijelaza u njima. Iz dobivenih Ramanovih spektara može se odrediti struktura promatranih molekula kao i dobiti informacije o kvantitativnoj analizi.

Raspršenjem elektromagnetskog zračenja na molekulama inducira se njihov vremenski ovisan dipol

$$\mu = \alpha \mathrm{E} \qquad \textbf{(2-3)}$$

gdje je α polarizabilnost molekule, a E električno polje ulaznog zračenja čija je vremenska ovisnost dana s

$$E = E_0 \cos \omega_0 t \qquad \textbf{(2-4)}$$

Ako se promatrana molekula nalazi u vibracijskom modu opisanom frekvencijom ω_m i duljinom vibrirajuće veze q,

$$q = q_0 \cos \omega_m t \quad \textbf{(2-5)}$$

tada je za male promjene duljine veze polarizabilnost dana kao njena linearna funkcija i može se razviti u Taylorov red

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q + \ldots \quad \textbf{(2-6)}$$

Uvrštavanjem (2-4) i (2-6) u (2-3) za oscilirajući električni dipol molekule dobiva se

$$\mu = \alpha_0 \ E_0 \cos \omega_0 t + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 \cos \omega_0 t \cos \omega_m t \quad \textbf{(2-7)}$$

Prvi član u (2-7) je Rayleighovo zračenje oscilirajućeg dipola i ima frekvenciju upadnog polja ω_0. Drugi član, koji je posljedica inducirane promjene polarizabilnosti, može se napisati u obliku

$$\mu^{ind} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 \{ \cos[(\omega_0 + \omega_m)t] + \cos[(\omega_0 - \omega_m)t] \} \quad \textbf{(2-8)}$$

te se na taj način dobiju dvije komponente zračenja dipola, anti-Stokesovo i Stokesovo Ramanovo raspršenje.[14] Presjek za ovo raspršenje je između 10^{-30} i 10^{-25} cm^2 po molekuli.[19]

2.1.2.3 *Ramanovo raspršenje na kristalima*

U kristalima se vibracije kvantiziraju kao **fononi**, modovi određeni kristalnom strukturom. Spektroskopska izborna pravila i dalje se primjenjuju, točnije samo fononi s promjenom polarizabilnosti su Raman aktivni. Fononi imaju manje frekvencije nego vibracije u plinovima što rezultira manjim promjenama valnih brojeva. Iz ovih se promjena dobivaju strukturne informacije. Kada elektromagnetsko zračenje dođe na kristalni uzorak, njegovo električno polje može izazvati mikroskopsku polarizaciju u tom uzorku. Ako je električno polje ravni val opisan frekvencijom ω_i i valnim vektorom k_i,

$$E(r,t) = E(k_i, \omega_i) \cos(k_i \cdot r - \omega_i t) \quad \textbf{(2-9)}$$

i polarizacija koju taj val izaziva

$$P(r,t) = P(k_i, \omega_i) \cos(k_i \cdot r - \omega_i t) \quad \textbf{(2-10)}$$

dobiva se linearna veza između upadnog zračenja i polarizacije,

$$P(k_i, \omega_i) = \varepsilon_0 \chi(k_i, \omega_i) E(k_i, \omega_i) \quad \textbf{(2-11)}$$

gdje je χ električna susceptibilnost promatranog sustava. Upadno elektromagnetsko zračenje raspršuju fononi koji se mogu opisati relacijom

$$u(r,t)=u(q,\omega_q)\cos(q\cdot r-\omega_q t). \quad \textbf{(2-12)}$$

Ako je njihova amplituda mala u usporedbi s konstantom kristalne rešetke, lokalna se promjena susceptibilnosti može razviti u Taylorov red

$$\chi(k_i,\omega_i,u)=\chi^{(0)}(k_i,\omega_i)+\left(\frac{\partial\chi}{\partial u}\right)_{u=0}u(r,t)+... \quad \textbf{(2-13)}$$

Tako dobivena susceptibilnost sastoji se od dva dijela, neovisnog i perturbiranog fononima. Uvrštavanjem (2-13) u (2-11) za polarizaciju se dobiva

$$P(r,t,u)=P^{(0)}(r,t)+P^{(ind)}(r,t,u) \quad \textbf{(2-14)}$$

gdje su

$$P^{(0)}(r,t)=\chi^{(0)}(k_i,\omega_i)\varepsilon_0 E(k_i,\omega_i)\cos(k_i\cdot r-\omega_i t) \quad \textbf{(2-15)}$$

i

$$P^{(ind)}(r,t,u)=\left(\frac{\partial\chi}{\partial u}\right)_{u=0}u(r,t)\varepsilon_0 E(k_i,\omega_i)\cos(k_i\cdot r-\omega_i t). \quad \textbf{(2-16)}$$

Uvrštavanjem (2-12) u (2-16) i korištenjem izraza za umnožak kosinusa, za fononima induciranu polarizaciju slijedi

$$P^{(ind)}(r,t,u)=\frac{1}{2}\varepsilon_0\left(\frac{\partial\chi}{\partial u}\right)_{u=0}u(q,\omega_q)E(k,\omega_i)\times\left\{\cos\left[(k_i+q)\cdot r-(\omega_i+\omega_q)t\right]+\cos\left[(k_i-q)\cdot r-(\omega_i-\omega_q)t\right]\right\} \quad \textbf{(2-17)}$$

Zračenje emitirano uslijed polarizacije $P^{(ind)}$ sastoji se od dva vala, Stokes pomaknutog vala s valnim vektorom $k_S = (k_i - k_q)$ i frekvencijom $\omega_S = (\omega_i - \omega_q)$ te anti-Stokes pomaknutog vala s valnim vektorom $k_{AS} = (k_i + k_q)$ i frekvencijom $\omega_{AS} = (\omega_i + \omega_q)$. Te dvije linije u spektru simetrično su raspoređene oko Rayleighove linije i čine Ramanovo raspršenje prvog reda. Član polarizacije proporcionalan drugoj derivaciji susceptibilnosti daje Ramanovo raspršenje drugog reda.

Kod Ramanovog raspršenja vrijede zakoni očuvanja energije

$$\omega_i=\omega_s\pm\omega_q \quad \textbf{(2-18)}$$

i impulsa

$$k_i=k_s\pm q. \quad \textbf{(2-19)}$$

Energije fonona mnogo su manje od energija ulaznog i raspršenog fonona, $\omega_q << \omega_i$, ω_S pa je $\omega_i \sim \omega_S$. Za valni vektor iz (2-19), u terminima recipročnog prostora i prve Brillouinove zone (Brillouinova zona je primitivna ćelija u recipročnom prostoru), slijedi da

je $q \sim 0$ pa se Ramanovim raspršenjem mogu detektirati samo oni fononi čiji je ukupni moment gotovo jednak nuli, odnosno nalazi se u centru Brillouinove zone. Kod Ramanovog raspršenja drugog reda, u kojem sudjeluju dva fonona, valni se vektori moraju zbrojiti u nulu.

2.1.2.4 ***Ramanovo raspršenje na nanokristalima***

Smanjenjem kristalnih struktura do nanometarskih dimenzija dolazi do efekta fononskog zatočenja (engl. *phonon confinement*). Lokaliziranjem fononske valne funkcije uvodi se neodređenost u njegov impuls čime se relaksira izborno pravilo iz (2-19). U ovom slučaju, osim fonona iz centra Brillouinove zone, u Ramanovom raspršenju mogu sudjelovati i fononi za koje je $q>0$. Njihova prisutnost uzrokuje crveni pomak i nesimetrično širenje Ramanove linije promatrane nanostrukture u odnosu na onu cjelokupnog (engl. *bulk*) materijala.

Iz pomaka Ramanove linije može se odrediti veličina nanokristala (L) odgovornih za njega. Relacija koja daje taj odnos za porozni silicij je

$$\Delta p = -A\left(\frac{a}{L}\right)^{\gamma} \qquad \textbf{(2-20)}$$

gdje je Δp pomak Ramanove linije poroznog u odnosu na Ramanovu liniju kristalnog Si, a konstanta njegove rešetke, dok su A i γ parametri koji opisuju vibracijsko zatočenje zbog konačne veličine nanokristala.[20] Njihove vrijednosti za sferne nanokristale su 47,41 cm^{-1} i 1,44.

2.1.3 Instrumentacija

Izbor odgovarajuće valne duljine izvora svjetlosti u Ramanovoj spektroskopiji vrlo je bitan, a može biti u rasponu od bliskog infracrvenog (NIR) do ultraljubičastog (UV) područja. Kao izvor svjetlosti danas se koriste laseri (engl. *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*). Laseri su pogodni zbog svoje velike snage, monokromatske svjetlosti (samo jedna valna duljina) i koherentne zrake (elektromagnetski valovi međusobno su u istoj fazi i šire se u istom smjeru).

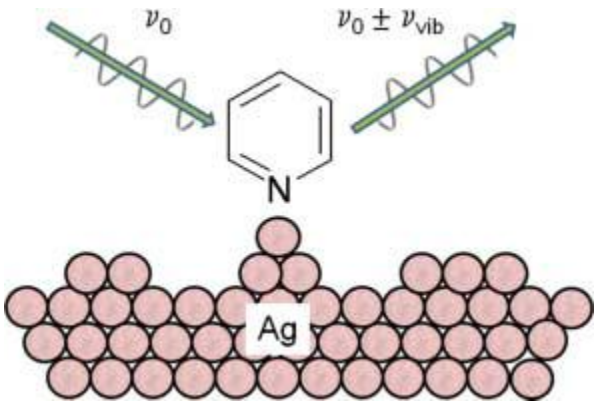
Prednost korištenja NIR lasera (λ>700 nm) u Ramanovoj spektroskopiji je supresija fluorescencije koja može zamaskirati Ramanov signal. Nedostatak NIR pobude je smanjenje osjetljivosti (budući da je efikasnost Ramanovog raspršenja proporcionalna λ^{-4}, raspršenje je 5 puta efikasnije na 532 nm u odnosu na 785 nm). Prednost lasera u vidljivom području je

lakše rukovanje. Kod pobuda UV laserima (244 – 364 nm) Ramanov spektar leži bliže laserskoj liniji dok je fluorescencija pomaknuta na veće valne duljine, stoga nema preklapanja spektara i fluorescencija ne predstavlja problem. Pored toga povećana je osjetljivost zbog veće efikasnosti raspršenja. Ipak, budući da je energija po fotonu veća, potrebno je obratiti pažnju na zagrijavanje i degradaciju uzorka. Mnogi spektrometri već dolaze s više lasera koji se mogu mijenjati i koristiti po potrebi. S obzirom na prirodu medija koji se koristi za stvaranje laserske zrake, laseri se dijele na lasere s čvrstom jezgrom (engl. *solid state*), lasere s bojilima (engl. *dye laser*), lasere sa slobodnim elektronima (engl. *free electron*) te plinske, poluvodičke i kemijske lasere.

Kao detektori svjetlosti koriste se fotomultiplikatori i CCD (engl. *charge-coupled devices*). Fotomultiplikatori su spori jer mogu registrirati samo jednu valnu duljinu u danom vremenu, dok su CCD detektori brzi, osjetljivi i mogu odjednom mjeriti cijeli spektar, ali samim time su i skuplji. U Ramanovoj spektroskopiji bitno je spriječiti prekrivanje signala zaostalim (engl. *stray*) svjetlom daleko intenzivnijeg Rayleighovog raspršenja. U tu se svrhu koriste interferencijski (engl. *notch*) filteri koji propuštaju valne duljine samo iznad približno 100 cm^{-1} u odnosu na lasersku zraku. Ovi se filteri ne mogu koristiti za promatranje niskofrekventnih pomaka (koje proizvode fononi niskih frekvencija) pa se koriste dvostruki ili trostruki spektrometri.

2.2 Površinski pojačano Ramanovo raspršenje

Površinski pojačano Ramanovo raspršenje (engl. *Surface-Enhanced Raman Scattering*, SERS) je tehnika kod koje dolazi do povećanja presjeka Ramanovog raspršenja na molekulama adsorbiranima na ili u neposrednoj blizini metalnih nanostruktura.[21,22] Povećanje presjeka rezultira povećanjem intenziteta eksperimentalno mjerenog Ramanovog signala. Pojačanje Ramanovog signala objašnjava se elektromagnetskim i kemijskim mehanizmom pojačanja u prisutnosti metalnih nanostruktura, no mehanizam nije u potpunosti rasvijetljen.[23,24] Intenzitet signala određuje zamršena veza između površinske strukture i optičkih karakteristika (Slika 2).



Slika 2 Shematski prikaz SERS efekta s molekulom piridina adsorbiranom na srebro. Vidi se upadna laserska zraka i Ramanovo raspršenje te promjena njihovih intenziteta zbog pojačanog polja na Ag površini uslijed površinskih plazmonskih pobuda.[25]

2.2.1 Otkriće

SERS fenomen prvi put su opazili Fleischmann i suradnici 1974. godine te su objavili da je Ramanov signal piridina značajno poboljšan na površini hrapave srebrne elektrode.[21] Tri godine kasnije grupa Jeanmariea i Van Duynea te grupa Albrechta i Creightona, prve predlažu da je hrapava površina metala zaslužna za povećanje Ramanovog presjeka molekule, a ne povećanje površine na koju se adsorbira piridin.[22,26] Moskovits pripisuje povećanje Ramanovog presjeka uzbudi površinskih plazmona na hrapavoj površini elektrode.[27] Drugi važan korak na polju SERS-a bio je objavljivanje detekcije jedne molekule od Kneipp te Nie i Emory 1997. godine.[28,29] Veliko pojačanje signala te osjetljivost do 'jedne molekule', dovela je do velikog interesa za SERS. U današnje se vrijeme SERS kombinira s drugim tehnikama te se mnogo radi na njegovoj primjeni.

2.2.2 Mehanizmi pojačanja

Općenito je prihvaćeno da su za pojačanje Ramanovog raspršenja u SERS efektu odgovorna dva mehanizma: (*i*) mehanizam elektromagnetskog pojačanja, kod kojeg je električno polje koje osjeća adsorbirana molekula u blizini metalne površine znatno snažnije nego što bi bilo bez metalne površine, i (*ii*) kemijsko (ili elektronsko) pojačanje uslijed promjene polarizabilnosti zbog interakcije adsorbirane molekule i metalne površine.[30]

2.2.2.1 ***Elektromagnetsko pojačanje (EM)***

Mehanizam elektromagnetskog pojačanja uglavnom se zasniva na pojačanju elektromagnetskog polja u blizini metalne površine zbog površinske plazmonske rezonancije.[31,32] Male metalne čestice ili nanostrukturirana površina polariziraju se upadnim oscilirajućim elektromagnetskim valom svjetlosti. Uslijed toga vodljivi elektroni na metalnoj

površini kolektivno osciliraju stvarajući površinski plazmon. Ova oscilacija vodljivih elektrona, također poznata kao **lokalizirana površinska plazmonska rezonancija** (LSPR, engl. *Localized Surface Plasmon Resonance*) se dešava kada su kolektivna titranja valentnih elektrona metala u rezonanciji s frekvencijom upadnog svjetla (Slika 3a). Lokalizirani površinski plazmon omogućava rezonantnoj valnoj duljini da se apsorbira i rasprši na metalu, stvarajući pritom snažno elektromagnetsko polje oko metalne čestice ili nanostrukturirane površine.[33] Ovo jako elektromagnetsko polje inducira dipol u obližnjim molekulama te na taj način povećava Ramanovo raspršenje na adsorbiranim molekulama.

Teorija pojačanja lokalnog polja modelirana je na maloj metalnoj sferi s promjerom mnogo manjim od valne duljine pobudne svjetlosti. Električno polje inducirano laserom može se opisati jednadžbom

$$E_{ind} = \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_0} E_{laser} \qquad \textbf{(2-21)}$$

gdje je $\varepsilon(\omega)$ dielektrična konstanta metalne sfere, a ε_0 dielektrična konstanta okolnog medija. Kad se realni dio $\varepsilon(\omega)$ približava $-2\varepsilon_0$, dešava se rezonancija. U vidljivom dijelu spektra dielektrične konstante zlata i srebra zadovoljavaju ove rezonantne uvjete.

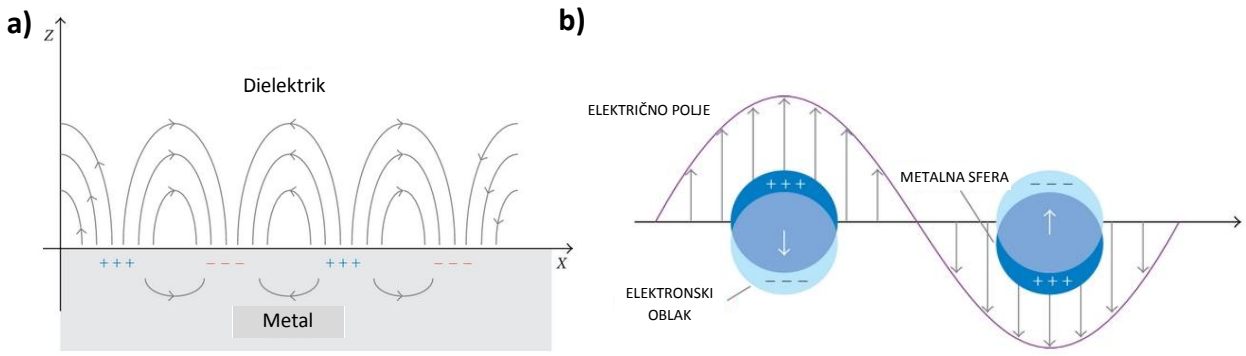
Veličina pojačanja ovisi o materijalu od kojeg je napravljen supstrat, ali i o veličini i obliku struktura, kao i o valnoj duljini korištenoj za pobudu. Tako su za valne duljine pobude iz vidljivog dijela spektra, metali Ag, Au i Cu, kao i alkalijski metali vrlo dobri materijali za SERS supstrate. Al i In daju dobra pojačanja u širokom dijelu spektra, od infracrvenog do ultraljubičastog, dok Ga daje mjerljiva pojačanja samo u IR području.[34]

Elektromagnetsko pojačanje je dalekosežan efekt i neosjetljiv je na kemijsku prirodu molekule koja se želi analizirati. Pored modela površinske plazmonske rezonancije, postoje i drugi mehanizmi elektromagnetskog pojačanja koji djeluju uz SPR efekt i zajedno rezultiraju vrlo velikim pojačanjima. To su efekt gromobrana (engl. *lighting-rod*), kod kojeg se jako elektromagnetsko polje stvara na točkama zakrivljenja tj. na oštrim vrhovima ili uglovima, i efekt slike (engl. *image field effect*, IFE) kod kojeg dolazi do polarizacije metalne površine induciranim dipolnim momentom adsorbirane molekule.

Budući da je Ramanov intenzitet molekule ili kristala proporcionalan upadnom elektromagnetskom polju, faktor pojačanja svake molekule ili kristala opisan je s

$$EF \approx t|E(\omega)|^2 \, |E(\omega')|^2 \quad \textbf{(2-22)}$$

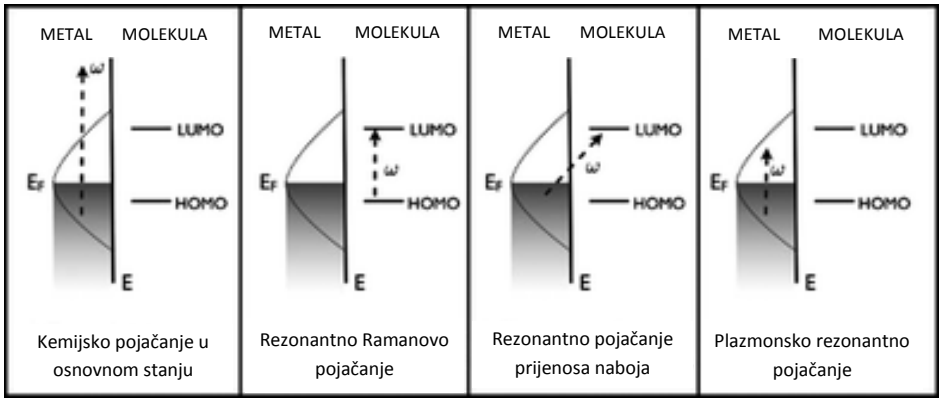
gdje $E(\omega)$ predstavlja faktor pojačanja električnog polja pri pobudi frekvencije ω, a $E(\omega')$ daje faktor pojačanja Ramanovog raspršenja na Stokesovoj frekvenciji ω'. Kad je $\omega=\omega'$ pojačanje je otprilike $|E(\omega')|^4$. Pojačanje je moguće čak i za molekule koje nisu u izravnom kontaktu s metalnom površinom. Pojačanje se može prikazati kao $[r/(r+d)]^{12}$, pri čemu je d udaljenost od metalne sfere radijusa r.[35,36] Slika 3b shematski je prikaz plazmonskih oscilacija za male metalne sfere.



Slika 3 Shematski prikaz a) površinske plazmonske rezonancije i b) lokalizirane površinske plazmonske rezonancije koja je rezultat kolektivnih oscilacija delokaliziranih elektrona uslijed djelovanja vanjskog električnog polja.[37]

2.2.2.2 *Kemijsko pojačanje*

Osim elektromagnetskog, pojačanje Ramanovog signala molekule adsorbirane na metalnu površinu može se objasniti kemijskim ili elektronskim pojačanjem do kojeg dolazi uslijed povećanja Ramanovog presjeka u kontaktu s metalnom nanostrukturom.[12] Mehanizam kemijskog pojačanja (engl. *chemical enhancement*, CE) tvrdi da interakcija između molekule koja se adsorbira i metalne površine dovodi do promjene polarizabilnosti, α, te molekule zbog prijenosa naboja (engl. *charge transfer*, CT), σ ili π vezanja na metal ili interakcije putem adatoma (atomi adsorbirani na metalnu površinu).[38] U CT modelu preklapanje metalnih i molekulskih elektronskih valnih funkcija dovodi do procesa prijenosa naboja. U ovom slučaju Fermijev nivo metala nalazi se između najviše okupirane molekulske orbitale (HOMO) i najniže neokupirane molekulske orbitale (LUMO) adsorbirane molekule. Prijenos naboja između HOMO i LUMO adsorbirane molekule može ići alternativnim putem preko Fermijevog nivoa metala (Slika 4).



Slika 4 Shematski prikaz različitih mehanizama pojačanja u SERS-u.[39]

Za postizanje kemijskog pojačanja molekule moraju biti kemisorbirane na metalnu površinu. Osnovna razlika između elektromagnetskog i kemijskog pojačanja je činjenica da je kemijski efekt kratkog dosega (0,1 nm – 0,5 nm), tj. CE se smatra efektom 'prvog sloja' jer samo molekule direktno na metalu 'osjećaju' kemijsko pojačanje. Kemijsko pojačanje ovisi o mjestu adsorpcije, geometriji vezanja i energetskim nivoima molekule. Stoga se CE može koristiti za objašnjenje promjena u relativnom intenzitetu Ramanovih vrpci u SERS-u kao i za rasvjetljavanje zašto se za različite molekule dobivaju različita pojačanja. Veliki pomaci i nove vrpce u spektru također se mogu objasniti CE mehanizmom.[40] Generalno je prihvaćeno da je faktor doprinosa CE mehanizma SERS pojačanju za većinu uzoraka 10 do 10^3.

2.2.2.3 *Žarišta*

Sposobnost SERS-a za detekciju jedne molekule leži u formiranju regija s iznimno visokim pojačanjem koje se zovu aktivna mjesta ili žarišta (engl. *hot spots*). Ova mjesta s velikim pojačanjem pojavljuju se na spoju između dvije ili više plazmonskih struktura koje se ili dodiruju ili su na vrlo malom razmaku. Kod koloidnih otopina ovakve se strukture obično formiraju dodavanjem soli, čime se potiče agregacija nanočestica. Dokazivanje postojanja i proučavanje svojstava SERS žarišta su komplicirani zbog molekula koje doprinose ukupnom signalu bez da se zapravo nalaze u žarištu. Pored toga, SERS podloge bez žarišta, poput filmova srebra u formi otoka (engl. *Ag island films*, AgIF) mogu postići pojačanje ukupnog signala oko 10^3 puta dok SERS podloge sa žarištima mogu dati prosječno pojačanje od oko 10^6. U Tablici 1 dana je usporedba nekih tipova SERS supstrata.

Tablica 1 Karakteristike nekih SERS supstrata s obzirom na podatke iz literature.[41] Kratice: MFON – metalni filmovi na nanosferama; TERS – vrhom pojačana Ramanova spektroskopija; SHINERS – *shell-isolated nanoparticle enhanced Raman spectroscopy*; Fs – femtosekundno.

SERS supstrat	Pojačanje (EF)	Procijenjena veličina procjepa / nm	Cijena	Specifičnost prema analitu	SM osjetljivost
Filmovi otoka	10^4	10 - 100	$$	ne	da
Periodični niz čestica	10^7	10 - 100	$$	ne	ne
Nanoštapići	10^3-10^7	-	$	ne	ne
Nanoškoljke	~10^6	-	$	ne	ne
MFON	10^3-10^{11}	0,1 - 10	$$	ne	ne
Fs lasersko jetkanje	<10^9	-	$$	ne	ne
E-beam litografija	10^3-10^5	1 - 100	$$	ne	ne
Nanožice	10^2-10^3	5 - 100	$$	ne	ne
Agregirani koloidi	10^6-10^{10}	0 - 10	$	ne	da
DNA hibridizacija	10^8-10^{12}	1 - 100	$$	da	da
Ugrađeni polimer	~10^5	10 - 100	$	ne	ne
SiO_2 omotane jezgre	10^6-10^8	0 - 10	$$	da	ne
Nanoprsti	10^{10}-10^{11}	0 - 10	$$	ne	ne
TERS	10^4-10^9	0 - 100	$	ne	da
SHINERS	10^5-10^8	1 - 10	$$	ne	ne

2.2.2.4 *Faktor pojačanja (EF)*

U znanstvenim se radovima često objavljuju izvještaji o novim supstratima za SERS, no ponekad je teško procijeniti važnost rezultata jer ne postoji uobičajen način mjerenja učinkovitosti supstrata. Stoga je van Duyneova grupa iznijela prijedloge za računanje faktora pojačanja (engl. *enhancement factor*, EF) različitih SERS podloga.[41] Na ovaj bi se način moglo uspoređivati aktivnosti različitih SERS podloga. Općenito, postoji nekoliko načela za utvrđivanje *EF* koja bi se trebala usvojiti:

1) Jasno definirati kako je određen faktor pojačanja. Najjednostavnija definicija *EF* je omjer intenziteta analita na metalnoj površini i analita koji nije adsorbiran na metalnu površinu,

$$\mathrm{EF_{SERS}} = \frac{\mathrm{I_{SERS}}/\mathrm{N_{SERS}}}{\mathrm{I_{NRS}}/\mathrm{N_{NRS}}} \qquad \textbf{(2-23)}$$

gdje su I_{SERS} i I_{NRS} intenziteti u SERS i normalnoj Ramanovoj spektroskopiji (NRS), a N_{SERS} i N_{NRS} brojevi molekula u SERS i NRS uvjetima. I_{SERS} i I_{NRS} trebaju biti normalizirani na odgovarajuća vremena integracije kao i snage lasera koje se koriste u eksperimentu. Ovo zahtijeva precizno mjerenje veličine laserskog spota i određivanje aktivacijskog volumena SERS i NRS uzoraka. Ovom se temom detaljno

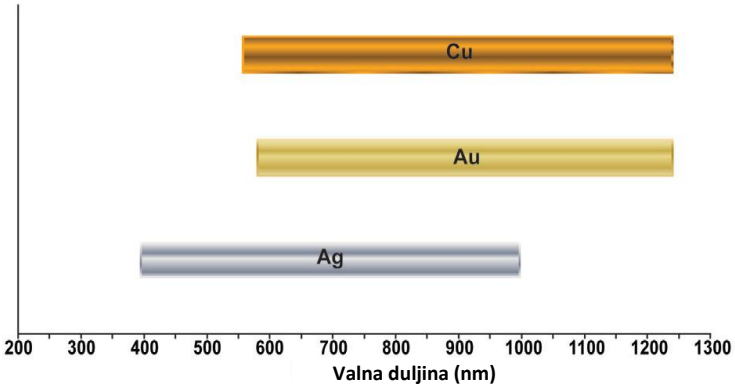
pozabavio Le Ru.[42] Za određivanje N_{SERS} i N_{NRS} potrebno je pažljivo odrediti probni volumen, prekrivenost površine kao i referentnu koncentraciju.

2) Unatoč činjenici da na nekim podlogama značajan postotak signala potječe od malog dijela ukupnih molekula, sve molekule na površini doprinose ukupnom signalu. U idealnom slučaju trebalo bi raditi s površinama zasićenim molekulama jer se tako ograničava učinak slučajne adsorpcije na žarišta. Osim toga, kod zasićenih površina najviše se molekula nalazi u žarištima te tako doprinose najboljem SERS signalu.
3) Poželjno je koristiti analit koji daje dobar signal i ima dobro definiranu površinsku kemiju. Za Au i Ag površine obično se koriste tioli, posebno tiofenol i njegovi derivati. Ostale pogodne molekule su rodamin 6G, piridin i 1,2-di(4-piridil)etilen (BPE). Poželjno je koristiti analit bez ili s malom fluorescencijom kako bi usporedba SERS i normalnog Ramanovog signala bila jednostavnija.

Ponekad je zbog fluorescencije nemoguće dobiti Ramanov spektar dok se u blizini metalne površine fluorescencija gasi. U tom slučaju rezonantni Ramanov presjek mora se eksperimentalno odrediti korištenjem stimuliranih metoda ili mora biti procijenjen ekstrapoliranjem nerezonantnog Ramanovog presjeka.[17,43] Problem se dešava i kada je analit slab Ramanov raspršivač te ne daje signal bez SERS pojačanja. U ovakvim se slučajevima Ramanov presjek procjenjuje teorijskim proračunima koji se mogu ili ne moraju kvantitativno slagati s eksperimentom. Izazov u računanju EF predstavlja i određivanje broja molekula koje doprinose SERS signalu. U računu treba uzeti u obzir hrapavost površine, ukupnu površinu i gustoću pakiranja molekula. Stoga je najbolje procijeniti najveći mogući broj molekula koje doprinose SERS signalu, čime se dobiva donja granica faktora pojačanja.

2.2.3 Plazmonski materijali

Uspješnost SERS metode uglavnom proizlazi iz interakcije molekule adsorbirane na površini i površine plazmonske nanostrukture, najčešće zlata (Au), srebra (Ag) ili bakra (Cu). Najčešće korišteni materijali su zlato i srebro jer su stabilni na zraku dok je bakar reaktivniji. Sva tri metala imaju lokalizirane površinske plazmonske rezonancije koje pokrivaju većinu vidljivog i bliskog infracrvenog spektra valnih duljina, gdje se pojavljuje glavnina Ramanovih vrpci (Slika 5).



Slika 5 Približni intervali valnih duljina gdje su Ag, Au i Cu dobro karakterizirani i omogućavaju SERS.[44]

Tijekom posljednjih godina znanstvenici nastoje optimizirati strukture i konfiguracije podloga u svrhu maksimiziranja faktora pojačanja. Stvaraju se novi plazmonski materijali (s negativnom realnom komponentom i malom pozitivnom imaginarnom komponentom dielektrične konstante) kao i razni oblici koji pokazuju dobro SERS pojačanje.[45,46] Pored navedenih, kao plazmonski supstrati koriste se i alkalijski metali (Li, Na, K, Rb i Cs), zatim Al, Ga, In, Pt, Rh i metalne slitine.[47] Neki od ovih metala su vrlo reaktivni što otežava njihovu upotrebu. Noviji materijali, kao što je grafen, poluvodiči kao TiO_2 i kvantne točke pokazuju SERS aktivnost iako se ne uklapaju u tradicionalne SERS podloge. [48-50]

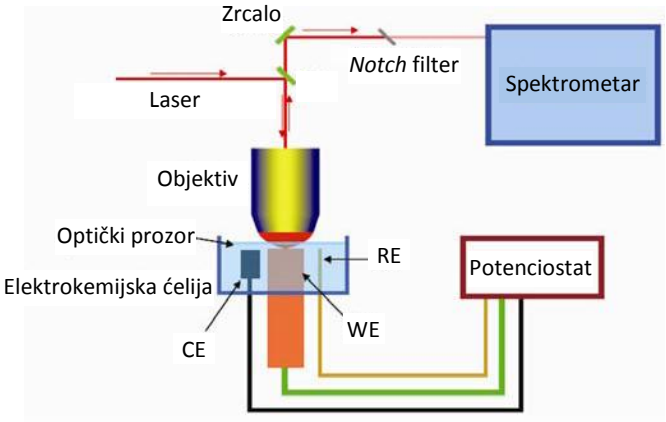
2.2.4 Elektrokemijsko površinski pojačano Ramanovo raspršenje

Elektrokemijsko površinski pojačano Ramanovo raspršenje (engl. *Electrochemical SERS, EC-SERS*) je posebna grana SERS tehnike koja se sastoji od nanostrukturiranih elektroda i elektrolita.[51] S analitičkog gledišta, EC-SERS pruža bitne informacije za određivanje adsorpcijskih konfiguracija ili reakcijskih mehanizama u elektrokemiji.

Kao što je već spomenuto, pojačanje signala u SERS-u dolazi od dalekosežnog elektromagnetskog pojačanja (EM) koje daje veći doprinos i kemijskog pojačanja (CE) koje je kraćeg dometa. Međutim, u slučaju elektrokemijskih sustava kemijsko pojačanje također igra veliku ulogu. U ovakvim sustavima i kemijsko, kao i elektromagnetsko pojačanje, u određenoj se mjeri mijenjaju promjenom potencijala što dovodi do ekstremnih promjena u strukturi i u svojstvima. EC-SERS je vrlo složen sustav, a njegova karakteristika je snažna ovisnost intenziteta SERS signala o elektrodnom potencijalu. Promjena potencijala može

rezultirati promjenom pokrivenosti i/ili orijentacije molekule, a obje promjene dovode do promjene SERS intenziteta.

U tipičnom EC-SERS postavu, proučava se elektrokemijski sustav za vrijeme mijenjanja elektrodnog potencijala uz bilježenje spektralnog odziva. Na dobivenim podacima analiziraju se promjene intenziteta kao i njihova učestalost što izravno odražava promjenu pokrivenosti površine, orijentacije molekule, strukture, sastava i morfologije. Najčešće analizirani sustavi su anorganske i organske molekule te biomolekule u vodenim otopinama. Slika 6 prikazuje shemu tipičnog EC-SERS eksperimentalnog postava. Elektrokemijska ćelija se sastoji od tri elektrode: SERS aktivne radne elektrode, inertne protuelektrode i referentne elektrode (obično zasićena kalomel elektroda (SCE) ili Ag/AgCl elektroda). Sve tri elektrode trebaju biti u geometrijskom položaju kako bi se omogućio učinkoviti Raman i točno elektrokemijsko mjerenje.



Slika 6 Shema elektrokemijske ćelije s potenciostatom za in situ SERS: RE – referentna elektroda, WE – radna elektroda, CE – protuelektroda.[51]

Prva molekula koja je korištena za dobivanje SERS efekta u elektrokemijskoj ćeliji bio je piridin te se otad piridin često koristi za potvrdu SERS aktivnosti. Relativni intenziteti i pomaci u frekvenciji osnovnih vrpci piridina osjetljivi su na elektrodni potencijal i na površinska svojstva metala koji se koristi kao SERS supstrat. Ovi fenomeni ne mogu se tumačiti isključivo EM pojačanjem već treba uzeti u obzir doprinos CE pojačanja. Tian i njegova grupa proveli su sustavne SERS studije piridina na različitim metalnim površinama te su pokazali kako se EC-SERS može koristiti za karakterizaciju površinske adsorpcije i molekula-metal interakcije.[52] Njihovo je istraživanje pokazalo da su frekvencije i intenziteti piridina u SERS-u povezani s kemijskom interakcijom između piridina i metalne površine te orijentacije prilikom adsorpcije.

2.3 Metalne nanočestice

2.3.1 Nanotehnologija

Područje koje se bavi materijalima s nanometarskim dimenzijama naziva se nanotehnologija. Nanotehnologija je sasvim slučajno korištena u prošlosti pa su tako u Rimsko doba dobivani obojeni stakleni predmeti te kasnije obojeni stakleni prozori miješanjem Au i Ag oksida.[53] Slika 7 prikazuje neke primjere korištenja nanotehnologije u prošlosti. Likurgova čaša (Slika 7a) mijenja boju (crveno/zeleno) ovisno o tome prolazi li svjetlo kroz čašu ili dolazi izvana. Ovo neobično svojstvo potječe od male količine zlatnih i srebrnih koloidnih čestica u staklu. Prvi nanotehnolozi, iako toga nesvjesni, bili su srednjovjekovni izrađivači vitraža (Slika 7b). Crvenu boju stakla postizali su zlatnim nanočesticama (NČ), dok su srebrnim nanočesticama dobivali 'duboku' žutu boju. Za vrijeme renesanse čestice bakra i srebra koristile su se za proizvodnju obojenih metalnih glazura koje su omogućile da se svjetlo s površine keramike odbija na različitim valnim duljinama, dajući izgled 'prelijevanja' (Slika 7c). Nanotehnologija je bitna iz dva razloga: (*i*) nanostrukturirani materijali imaju veliki omjer površine i volumena te stoga induciraju kemijske i fizikalne reakcije, i (*ii*) efekta kvantnog zatočenja koji opisuje utjecaj smanjenja veličine na elektronska stanja materijala što dovodi do novih optičkih i fizikalnih svojstava.



Slika 7 a) Likurgova čaša, 4. st. pr. Kr., b) srednjevjekovni obojeni prozor i c) Deruta keramika, 15. st.

2.3.2 Nanočestice

Metalne nanočestice (NČ) vrlo su zanimljive zbog svojstava koja ovise o njihovoj veličini i obliku. Posebno su važna njihova optička svojstva zbog kojih NČ privlače pažnju znanstvenika posljednjih nekoliko desetljeća. Stoga je važno objasniti pojmove koji su ušli u upotrebu u posljednje vrijeme. Nanočestica je čestica nanometarskih dimenzija, tj. agregat atoma ili molekula, veličine između 1 i 100 nm.[54] Ako sve dimenzije materijala nisu

nanometarske, materijal se često naziva nanostrukturiranim, npr. tanke žice i tanki filmovi. Nanokristal je čvrsti materijal s barem jednom dimenzijom u nanometarskom rasponu. U proizvodnji nanočestica postoje dva pristupa: (*i*) od vrha prema dolje (engl. *top-down*) i (*ii*) od dna prema vrhu (engl. *bottom-up*). U prvom se pristupu materijal usitnjava do nanometarskih dimenzija, dok u drugom slučaju nanočestice nastaju od atoma ili molekula, što uključuje rast iz sjemena (engl. *seed growth method*) ili kemijsku redukciju. Osnovni problem kod stvaranja nanomaterijala je kontrola njihova oblika, agregacije ili precipitacije i stabilizacija.

Nanočestice imaju posebna fizikalna i kemijska svojstva. One su karakterizirane magičnim brojem koji predstavlja specifičan broj atoma u nakupini stabilnih nanočestica. Tako npr. najstabilnija nakupina Pb ima 7 ili 11 atoma.[55] Kod smanjivanja veličine metala do nanometarskih veličina, gustoća stanja energetskih nivoa mijenja se iz kontinuirane u diskretnu te energetski nivoi postaju odvojeni energetskim razlikama većima od termalne energije k_BT. U ovom se slučaju energetski nivoi mogu kvantnomehanički opisati česticom u kutiji (engl. *particle in a box*). Ovaj je fenomen poznat i kao efekt kvantnog zatočenja. Svaka je nakupina karakterizirana svojom veličinom koja stvara njen vlastiti efekt kvantnog zatočenja.

2.3.2.1 *Ag nanočestice*

Ag nanočestice bitne su u bazičnim istraživanjima kao i u industrijskoj primjeni iz sljedećih razloga:

- površinska plazmonska rezonancija srebra leži u vidljivom spektru
- srebro je antibakterijski agens koji se koristi u industriji za prevenciju rasta bakterija
- koristi se kao optička prevlaka zbog reflektivnosti
- srebro je jedini plemeniti metal kojem se SPR frekvencija može podesiti na bilo koju željenu valnu duljinu u vidljivom području, mijenjanjem raspodjele gustoće, veličine i dielektričnih svojstava okolnog medija.

Oblik SPR apsorpcijske vrpce ovisi uglavnom o obliku Ag nanočestica. Za male čestice, EM val je uniforman na cijeloj čestici i svi se elektroni pokreću u fazi stvarajući dipol-dipol oscilacije čime nastaje jedna apsorpcijska vrpca. Kako se veličina čestice duž jedne osi povećava, polje preko čestice postaje neuniformno i stoga razdoblje zakašnjenja

proširuje rezonanciju dipola te pobuđuje višepolne rezonancije kao kvadrupolnu i oktopolnu, čime nastaje spektar s više vrpci.

2.3.3 Koloidne otopine

Koloidne otopine su otopine koje sadrže dovoljno male čestice da mogu biti uniformno dispergirane, ali i dovoljno velike da raspršuju svjetlo. Koloidne otopine treba razlikovati od kemijskih otopina koje sadrže potpuno otopljene čestice veličina manjih od nanometra. Koloidne čestice u stanju su neprekidnog slučajnog gibanja koje se naziva Brownovo gibanje. Odbojne elektrostatske sile ili sterički efekti održavaju čestice u suspenziji. Koloidi se mogu formirati u svim kombinacijama tekućine, krutine i plina osim u kombinaciji plin – plin. Neki česti koloidi navedeni su u Tablici 2.

Tablica 2 Tipovi koloida.

Dispergirana faza	Disperzno sredstvo	Tip (primjer)
Tekućina	Plin	Aerosol (magla)
Tekućina	Tekućina	Emulzija (mlijeko)
Tekućina	Krutina	Gel (želatina)
Plin	Tekućina	Pjena (šlag)
Plin	Krutina	Čvrsta pjena (stiropor)
Krutina	Plin	Aerosol (dim)
Krutina	Tekućina	Sol (koloidno srebro, krv)
Krutina	Krutina	Čvrsti sol (rubin)

2.3.3.1 ***Stabilnost koloida***

Koloidne čestice zbog Brownovog gibanja sudaraju se jedna s drugom. Stoga je stabilnost koloida uvjetovana interakcijama između čestica za vrijeme sudara. Dvije osnovne vrste interakcija su privlačenje i odbijanje. U slučaju kada dominira privlačenje, čestice prianjaju jedna uz drugu i dolazi do srastanja i formiranja agregata. Kada dominira odbijanje sustav je stabilan i ostaje u dispergiranom obliku. Slične čestice međusobno se privlače van der Waalsovim silama pa su zato koloidne disperzije stabilne samo ako dovoljno jake odbojne sile neutraliziraju van der Waalsovo privlačenje.

Deryagin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) teorija navodi da stabilnost čestice u otopini ovisi o ukupnoj potencijalnoj energiji (V_T) sustava. V_T se izražava kao suma nekoliko doprinosa,

$$V_T = V_A + V_R + V_S \quad \textbf{(2-24)}$$

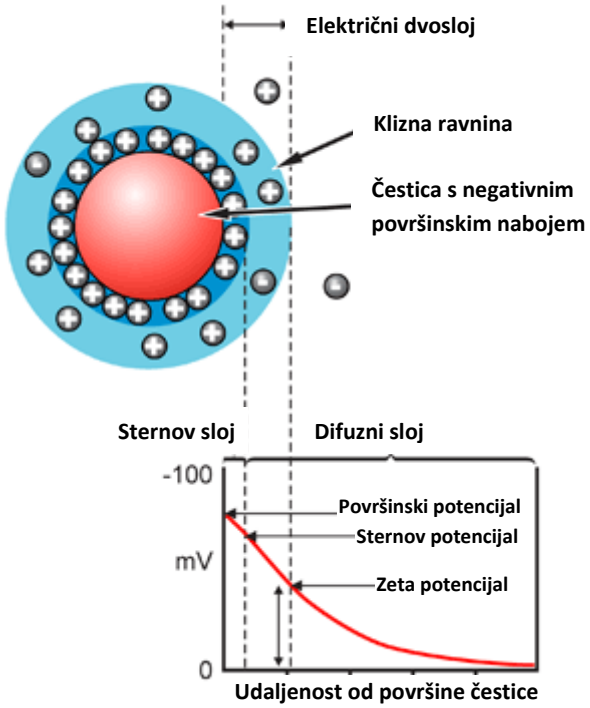
gdje V_S predstavlja potencijalnu energiju zbog otapala (manjeg značaja), V_R odbojne sile električnog dvosloja i V_A privlačne van der Waalsove sile. Stoga je stabilnost koloidnog sustava određena sumom V_A i V_R u trenutku kada se čestice nađu u blizini zbog Brownovog gibanja. Ako su odbijanja među česticama dominantna, koloid će biti stabilan. Stabilizacija u koloidu može se postići elektrostatski, sterički ili njihovom kombinacijom.

2.3.3.1.1 Elektrostatska stabilizacija

Dispergirane čestice u vodenim koloidima obično imaju određeni naboj, a taj je naboj „zaklonjen“ povećanom koncentracijom iona suprotnog naboja blizu površine. Točnije, svaka čestica okružena je električnim dvoslojem čime dolazi do elektrostatske stabilizacije. Ovaj sloj suprotno nabijenih iona pomiče se zajedno s nanočesticama. Unutar koloidne disperzije dvostruki sloj formira se kako bi se neutralizirao naboj na površini nanostrukture (Slika 8). S druge strane, dvosloj uzrokuje elektrokinetički potencijal na površini nanočestica. Jakost potencijala povezana je s površinskim nabojem i debljinom dvosloja. U Sternovom sloju potencijal opada približno linearno, zatim eksponencijalno u difuznom sloju te se približava nuli na imaginarnoj granici dvosloja. Zeta potencijal (ili elektrokinetički potencijal) je mjera „efektivnog“ električnog naboja na površini čestice. Zeta potencijal smatra se važnijim od površinskog potencijala i koristi se kao mjera elektrostatske stabilnosti:

- 0 - ± 5 mV – čestice agregiraju
- ± 5 - ± 20 mV – minimalno stabilne čestice
- ± 20 - ± 40 mV – umjereno stabilne čestice
- > ± 40 mV – vrlo stabilne čestice.[56]

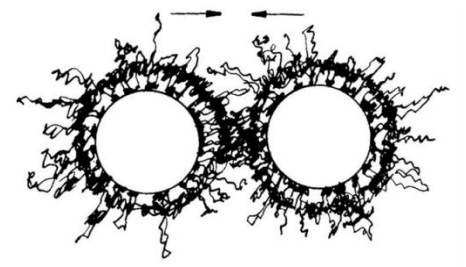
Vrijednost naboja na površini nanočestice ovisi o pH otopine. Površinski naboj može se smanjiti do nule na određenim pH vrijednostima (izoelektrična točka).



Slika 8 Shematski prikaz električnog dvosloja na površini nanočestice.[57]

2.3.3.1.2 Sterička stabilizacija

Stabilnost koloida može se postići dodavanjem makromolekula ili polimera koji se kemisorpcijom ili derivatizacijom vežu na površinu koloidnih čestica. Ovi spojevi stvaraju zaštitni omotač oko svake koloidne čestice te tako sprečavaju njihovu agregaciju (Slika 9). Sterički stabilizirani koloidi nisu osjetljivi na prisutnost elektrolita. Sterička stabilizacija jednako je učinkovita u vodenim i u nevodenim sustavima.



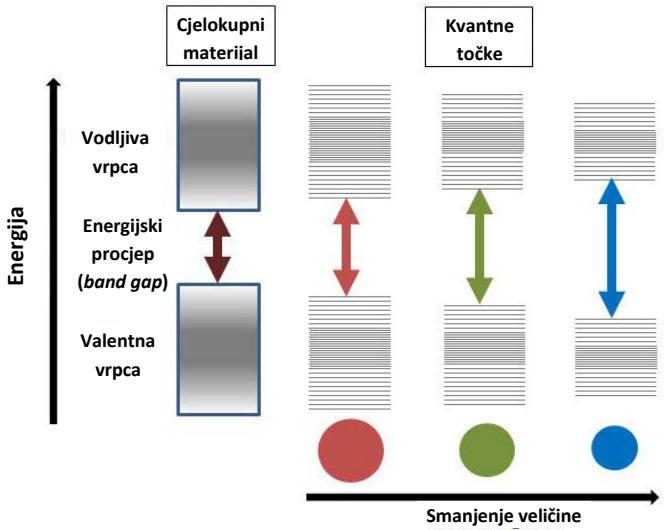
Slika 9 Shematski prikaz steričke stabilizacije.

Elektrostatska i sterička stabilizacija se mogu kombinirati, a rezultat je elektrosterička stabilizacija.

2.3.4 Kvantne točke

Kvantne točke (engl. *quantum dots*, QD) su sitne čestice ili nanokristali poluvodičkog materijala promjera od 2 do 10 nm (10 – 50 atoma). Otkrivene su 1980. Kvantne točke imaju jedinstvena svojstva, negdje između svojstava cjelokupnog (*bulk*) poluvodiča i diskretnih molekula, koja dijelom proizlaze iz velikog omjera površine i volumena. Bitno svojstvo ovih čestica je fluorescencija jer nanokristali mogu emitirati različite boje, ovisno o veličini čestica.

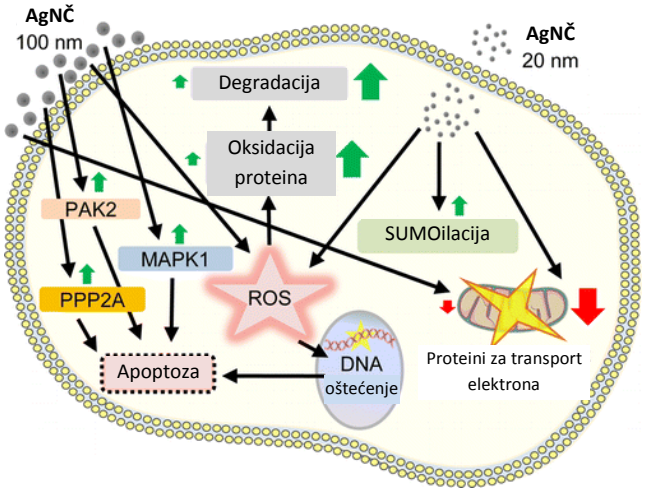
Zbog male veličine elektroni su u kvantnim točkama ograničeni na mali prostor (kvantna kutija). Kada je radijus poluvodičkog nanokristala manji od Bohrovog radijusa ekscitona (Bohrov radijus ekscitona je prosječna udaljenost između elektrona u vodljivoj vrpci i šupljine koju ostavlja za sobom u valentnoj vrpci) događa se kvantizacija energetskih nivoa prema Paulijevom principu isključenja (Slika 10). Kvantizirani energetski nivoi kvantnih točaka povezuju ih više s atomima nego cjelokupnim (*bulk*) materijalom pa se kvantne točke ponekad nazivaju 'umjetni atomi'. Sa smanjenjem veličine nanokristala razlika energije između najviše valentne vrpce i najniže vodljive vrpce se povećava. Stoga je potrebno više energije za pobudu kvantne točke. Posljedica toga je veća energija oslobođena prilikom vraćanja nanokristala u osnovno stanje, što rezultira promjenom boje. Rezultat ovog efekta je da kvantne točke istog materijala mogu emitirati bilo koju boju svjetlosti jednostavnom promjenom veličine. Zbog velike mogućnosti kontrole sinteze nanokristala, mogu se proizvesti kvantne točke koje emitiraju točno željenu boju svjetlosti.



Slika 10 Podjela energetskih nivoa kod kvantnih točaka uslijed efekta kvantnog zatočenja; poluvodički energijski procjep se povećava sa smanjenjem veličine nanokristala.[58]

2.3.5 Sigurnost

Korištenje nanočestica u prehrani, različitim materijalima (kozmetika i sl.) i kliničkim tretmanima drastično se pojačalo u posljednjem desetljeću. Time se povećala i izloženost ljudi nanočesticama što je ukazalo na važnost istraživanja molekularnih mehanizama koji se mijenjaju pod utjecajem nanočestica. Mnoge informacije ukazuju na potencijalni rizik od nanočestica. Nedavna istraživanja ukazuju da nanočestice veličine 20 nm ulaze u stanice i pritom uzrokuju različite procese (Slika 11), tj. utječu na biološke procese u organizmu, dok NČ od 100 nm ne ulaze.[59] Nanočestice predstavljaju potencijalnu opasnost za zdravlje te su potrebne detaljne studije o njihovom dugoročnom utjecaju.



Slika 11 Shematski prikaz utjecaja nanočestica od 20 i 100 nm na stanicu.[59]

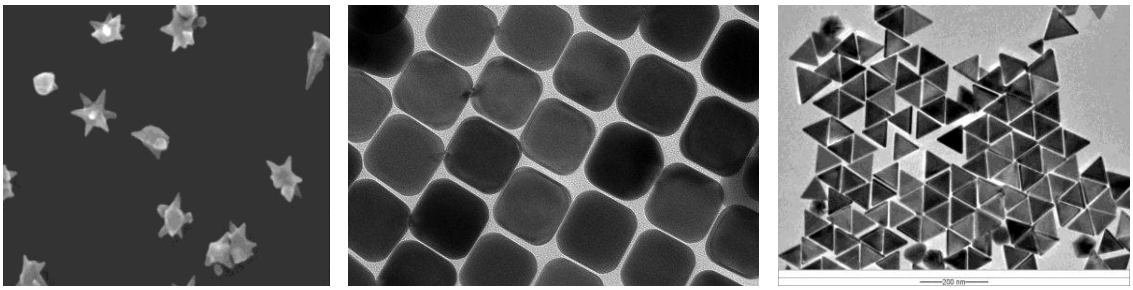
2.4 Metode pripreme supstrata za površinski pojačano Ramanovo raspršenje

Važno područje istraživanja u površinski pojačanoj Ramanovoj spektroskopiji je izrada SERS aktivnih podloga. Kao što je već opisano, dva su osnovna načina proizvodnje nanostruktura: „od vrha prema dolje“ i „od dna prema vrhu“. U „od vrha prema dolje“ pristupu kreće se od cjelokupnog (*bulk*) materijala koji se različitim procesima oblikuje u nanostrukture. Ovi procesi često rezultiraju nečistoćama i defektima. „Od dna prema vrhu“ pristup uključuje samoorganizirani rast atoma za nastanak željenog materijala. Općenito, SERS supstrati mogu se podijeliti u tri skupine: (1) suspenzije metalnih nanočestica, (2) metalne nanočestice imobilizirane na čvrstim supstratima i (3) nanostrukture proizvedene izravno na čvrstim podlogama. U slučaju prvih dvaju skupina teško je kontrolirati razmak

između nanočestica u svrhu optimizacije SERS aktivnosti. Metode predložaka daju vrlo uređene SERS podloge s kontroliranim razmakom nanočestica. Najčešće korištene metode predložaka su nanosferna litografija (NSL) i filmovi anodnog aluminijevog oksida (engl. *anodic aluminum oxide,* AAO). Osim toga, Langmuir-Blodgett (LB) tehnika može se koristiti za izradu vrlo dobro uređenih SERS podloga. U sljedećim poglavljima ukratko su razmotrene glavne kategorije SERS supstrata i s njima povezane metode proizvodnje.

2.4.1 Kemijska sinteza koloidnih nanočestica

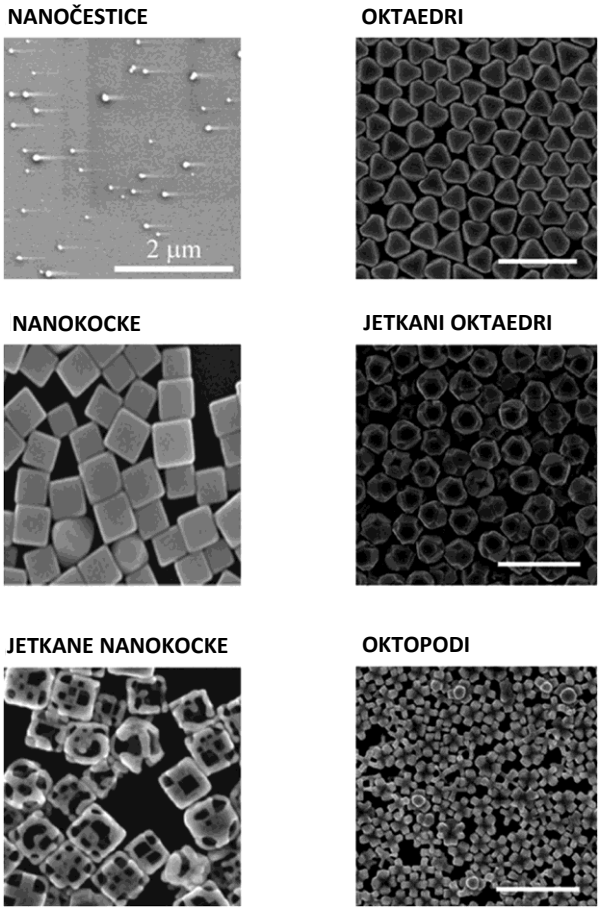
Uvjerljivo najpopularniji SERS supstrati, koji se koriste već nekoliko desetljeća, su koloidne nanočestice.[60] Koloidne suspenzije sastoje se od dispergirane faze raspodijeljene uniformno u disperznom mediju. Koloidi imaju velik omjer površine prema volumenu što koloidnim česticama daje jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva. Slika 12 prikazuje mikrografije različitih nanočestica.



Slika 12 Mikrografije različitih nanostruktura.[61]

Najčešće korištena metoda pripreme metalnih koloida u vodenim ili organskim otapalima je kemijska redukcija metalnih soli. Redukcija citratima vrlo je česta metoda za sintezu Ag i Au nanočestica te iako je jednostavna i brza, kao konačni produkt dobiva se heterogena smjesa s velikom raspodjelom veličine čestica.[62] Ovo se može iskoristiti i kao prednost ako postoji potreba za različitim maksimumima ekstinkcije. Koloidi se jednostavno agregiraju upotrebom otopina soli (npr. NaCl, KBr). Agregacija srebrovog koloida je bitna kod detekcije jedne molekule (SM SERS).[63] Kako bi se doskočilo problemu široke raspodjele veličina čestica, razvijene su metode za dobivanje monodisperznih metalnih nanočestica specifičnih oblika: nanoškoljke, trokutaste nanoprizme, kocke, bipiramide i zvijezde. [64,65,66,67,68] Osim citrata, ostali reducensi koji se koriste su borohidridi, askorbati i vodik. Redukcija metala je popularna metoda zbog jednostavnosti i brzine, često blagih reakcijskih uvjeta (sobna temperatura), dobrog iskorištenja i stabilnosti. Pored toga, mijenjanjem eksperimentalnih uvjeta mogu se kontrolirati veličina i geometrija nanočestica

što omogućava dobivanje čestica prema potrebama istraživača. Kontrola geometrije NČ složenija je od kontrole veličine: reakcijski uvjeti moraju se prilagoditi tako da je rast željene kristalne ravnine energetski povoljniji. Jedna od popularnijih metoda kontrole morfologije NČ je poliolna sinteza srebrnih nano-kocki prema Sun i Xia.[66] Sredstva za jetkanje kao i surfaktanti mogu se dodati u reakcijsku smjesu radi mijenjanja termodinamike reakcije i usmjeravanja rasta duž željene kristalne ravnine.[69] Grupa Xia i Yanga proizvele su neke od vrlo zanimljivih NČ (Slika 13): oktaedre i kuboktaedre, oktopode i varijacije ovih struktura.[70-72] Zanimljive i korisne morfologije čestica proizašle su i iz laboratorija El-Sayeda i Murphyja.[73-75] Budući da veličina, oblik i materijal NČ određuju karakteristike plazmonske rezonancije, značajan je napor napravljen u kontroli plazmonske rezonancije putem jezgra-ljuska (engl. *core-shell*) i legiranih čestica čemu je znatno pridonijela Halasova grupa.[76,77]



Slika 13 Mikrografije različitih nanočestica.[13]

2.4.1.1 ***Priprema koloida za SERS***

Nakon što se koloidne čestice sintetiziraju, SERS analiza provodi se miješanjem uzorka s koloidnom otopinom u kiveti. U određenim situacijama sušenje smjese pomaže poboljšanju adsorpcije analita na površine nanočestica što može poboljšati SERS signal. Pojedinačne nanočestice pružaju određeno SERS pojačanje, a to posebno vrijedi za nanostrukture s oštrim vrhovima. No, pojačanje je mnogo veće na tzv. aktivnim mjestima ili žarištima.[41] Žarišta su područja gdje se dvije nanočestice nalaze jedna blizu druge, na udaljenosti od otprilike 2 nm.[78] Žarišta stvaraju vrlo veliko SERS pojačanje što omogućava detekciju malih koncentracija analita. Kod koloidnih otopina agregacija nanočestica može se inducirati dodatkom agregirajućih agensa kao npr. klorida, bromida, nitrata i drugih ionskih vrsta, dodatak kojih dovodi do promjene zeta potencijala. Stupanj agregacije teško je kontrolirati te može doći do prevelike agregacije pri čemu se formiraju velike nakupine koje imaju smanjenu ili uopće nemaju plazmonsku aktivnost. Stabilnija žarišta mogu se dobiti depozicijom koloidnih nanostruktura na čvrste podloge. Metode deponiranja uključuju pipetiranje (stavljane kapi na čvrstu podlogu), namakanje (engl. *soaking*), printanje na podlozi (engl. *screen printing*), filtriranje i ink-jet printanje.[79-83] Međutim, osnovni problem kod ovih jednostavnih postupaka depozicije je taj da se žarišta stvaraju i raspoređuju nasumično duž supstrata. Kako bi se dobio ravnomjerniji raspored nanočestica, a samim tim i žarišta, znanstvenici su pribjegli drugim metodama, kao što su samouređenje (engl. *self-assembley*) i usmjerena organizacija (engl. *directed assembley*) (npr. Langmuir-Blodgett metoda).[83,84] Ipak, ove tehnike uključuju složenije procese pri izradi podloga.

2.4.2 Metalne elektrode

Nakon što je prvi put opisana metoda elektrokemijski ohrapavljenih elektroda (engl. *electrochemically roughened electrode*), korištena je u mnogim radovima za izradu SERS podloga. No, metoda se sve rjeđe koristi zbog postojanja jednostavnijih i reproducibilnijih metoda. Izrada elektrokemijski ohrapavljenih elektroda zahtijeva elektrode, izvor napajanja, generator signala za kontrolu izvora i otopinu u kojoj se nalaze elektrode. Svaka komponenta doprinosi ukupnoj hrapavosti i značajkama elektroda. U literaturi postoji nekoliko metoda elektrokemijskog hrapavljenja Au i Ag površina.[85,86] Jednom kad elektroda postane hrapava, lako ju je koristiti kao SERS supstrat. Otopina koja se želi analizirati deponira se na elektrodu ili se elektroda uranja u otopinu određeno vrijeme te se zatim suši. Kako SERS efekt ovisi o udaljenosti analita od podloge, ova metoda ima za posljedicu veću

koncentraciju molekula analita na nanostrukturiranoj površini elektrode čime se postiže bolji SERS signal. Hrapavost površine kao i SERS pojačanje ovise o broju i brzini oksidacijsko-redukcijskih ciklusa. Ovisno o postupcima koji se primjenjuju, elektroda može imati različitu hrapavost što rezultira nejednakim pojačanjem duž njene površine.[87]

2.4.3 Filmovi metalnih otoka

Klasa SERS supstrata koji su relativno stabilni u vremenu su filmovi metalnih otoka (engl. *metal island films*). Pripremaju se termalnom vakuumskom evaporacijom tankog sloja metala (obično manje od 20 nm) na krutu podlogu. Na ovaj način nastaje diskontinuirani sloj metala koji stvara izolirane otoke nanočestica na podlozi. Veličina nanočestica, njihov oblik i razmak određeni su temperaturom supstrata, brzinom depozicije kao i konačnom debljinom metalnog sloja.[88] Povećanjem količine deponiranog metala (npr. srebra), otoci nanočestica se spajaju i formiraju kontinuirani film čime se smanjuje broj neravnina na površini, a time i faktor pojačanja (Tablica 3). U usporedbi s metalnim koloidima, filmovi metalnih otoka pokazuju manja pojačanja Ramanovog raspršenja adsorbiranih molekula.

Tablica 3 Faktori pojačanja, EF, dobiveni na srebrnim filmovima različite debljine i pri različitim valnim duljinama pobude.[88]

Supstrat	Debljina filma / nm	Faktor pojačanja (EF) s obzirom na λ			
		488 nm	514,5 nm	614,3 nm	722 nm
Ag film	1,8	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,9 \pm 0,8) \times 10^4$	$< 10^2$	$< 10^2$
	3,5	$(1,0 \pm 0,8) \times 10^4$	$(4,8 \pm 0,6) \times 10^4$	$(7,1 \pm 1,9) \times 10^4$	$(9,7 \pm 3,8) \times 10^4$
	8,0	$(3,8 \pm 1,5) \times 10^4$	$(9,5 \pm 2,6) \times 10^4$	$(24 \pm 5,6) \times 10^4$	$(53 \pm 2,3) \times 10^4$
	16,0	-	$(1,8 \pm 0,5) \times 10^4$	$(8,2 \pm 1,7) \times 10^4$	$(35 \pm 6,7) \times 10^4$

2.4.3.1 ***Metalni filmovi na nanostrukturama***

Metalni filmovi na nanostrukturama (engl. *metal films over nanostrucutres*, MFON) uvelike su smanjili slabu reproducibilnost SERS supstrata. MFON supstrati pripremaju se iz suspenzije nanosfera koja se nekom od metoda (poglavlje 2.4.4.1) stavlja na krutu podlogu. Te se nanosfere zatim prekrivaju tankim slojem metala (gotovo isključivo Ag i Au) termalnom evaporacijom ili kemijskom depozicijom. Mogu se koristiti različite nanosfere, poput teflonskih, aluminijskih, od TiO_2, Si itd. Budući da je metal deponiran na nanočestice kao kontinuirani film, morfologija MFON supstrata određena je prvenstveno veličinom nanosfera. Veliki utjecaj ima i koncentracija nanosfera u suspenziji. Za svaku veličinu i koncentraciju nanosfera postoji optimalna debljina metalnog filma za pojačanje SERS signala (Tablica 4). MFON supstrati mogu imati faktor pojačanja reda veličine 10^7 kao što se

vidi u Tablici 4, što je dva do tri reda veličine bolje od filmova srebrnih otoka. Reproducibilnost MFON supstrata je dobra pa je tako za Al bazirane supstrate relativna standardna devijacija unutar 5%.

Tablica 4 Faktori pojačanja na AgFON supstratima različitih debljina srebra i promjera nanočestica.[88]

Supstrat	Debljina filma / nm	Faktor pojačanja (EF) s obzirom na promjer čestice			
		121 nm	264 nm	542 nm	870 nm
FON	100	2×10^6	4×10^6	5×10^6	-
	200	1×10^6	7×10^6	1×10^7	2×10^6
	400	1×10^6	-	8×10^6	4×10^6

2.4.4 Litografske metode dobivanja čvrstih podloga

Litografski procesi dobro su razrađeni postupci koji se često koriste pri proizvodnji SERS supstrata. Oni omogućavaju kontrolu strukture, veličine i oblika mikro i nanostruktura. Dvije su osnovne litografske metode pripremanja uniformnih nanočestica: nanosferna litografija (NSL) i litografija zrakom elektrona (engl. *electron beam litography*).

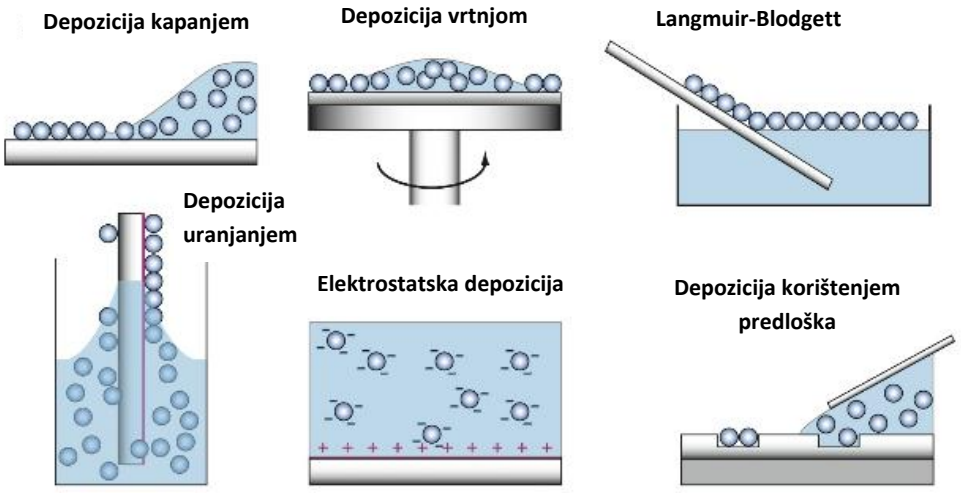
Korištenjem litografskih metoda nakon čega slijedi evaporacija Au ili Ag, dobiveni su vrlo uniformni i reproducibilni SERS supstrati.[89,90] Litografija zrakom elektrona obično je vezana s jetkanjem plazmom (engl. *plasma etching*) ili jetkanjem reaktivnim ionima (engl. *reactive ion etching*) kako bi se u konačnici stvorili nizovi nanočestica koji omogućuju nastajanje lokaliziranih površinskih plazmona za određenu valnu duljinu. Iako na ovaj način nastaju izuzetno reproducibilni SERS supstrati, nedostatak metode je sporost i visoki troškovi proizvodnje.

Suprotno tome, nanosferna litografija je znatno jeftinija i jednostavnija metoda koja daje faktore pojačanja veće od 10^8. Tehniku je uvela Van Duyneova grupa, a ona uključuje slaganje polistirenskih nanosfera (ili SiO_2 nanosfera) željenog promjera u pravilni niz koji se dalje koristi kao maska za stvaranje periodičnih nanostruktura.[91] Kao podloga može se koristiti indij kositar oksid (engl. *indium tin oxide*, ITO), ali i drugi materijali. Zlato ili srebro evaporiraju se kroz pukotine koje nastaju prilikom slaganja nanosfera, a nakon toga slijedi uklanjanje nanosfera, npr. soniciranjem u otapalu, te nastaju nanočestice s trokutastim otiskom. Nažalost, ovakve strukture zauzimaju samo 7% ukupne površine. Varijacija ove metode uključuje evaporaciju metala direktno na predložak od tijesno pakiranih nanosfera.[92]

Slična metoda uključuje korištenje polistirenskih nanosfera za stvaranje šupljina unutar sloja zlata deponiranog evaporacijom ili raspršivanjem.[93] Polistirenske sfere mogu služiti za proizvodnju nanozdjela i polumjeseca korištenjem metoda evaporacije pod kutom.[94,95] Metoda nakrivljenog kuta (engl. *oblique angle*), koju su prvi u laboratorij uveli Zhao i Dluhy, stvara nizove poredanih Ag nanoštapića koji su izvrsni SERS supstrati.[96] Ovakvi supstrati korišteni su za detekciju virusa, RNA i spajanje podloga s optičkim sondama.[97,98,99]

2.4.4.1 *Formiranje monosloja*

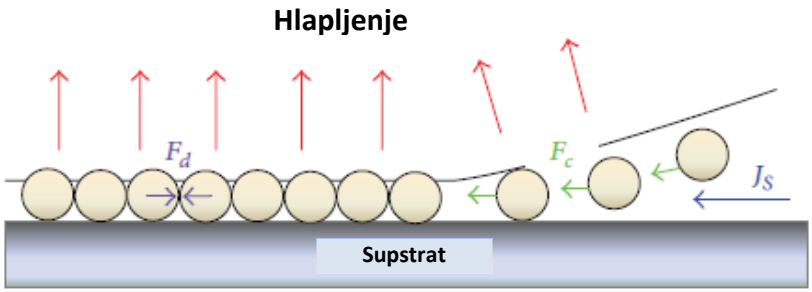
Samouređenje (engl. *self-assembly* ili *selforganization*) se definira kao spontana (bez pomoći vanjskih sila ili prostornog ograničenja) organizacija dvaju ili više komponenti u veće agregate pomoću kovalentnih i/ili nekovalentnih veza.[100] Osnovni nedostatak samouređenja je nastajanje defekata iz čega proizlazi i činjenica da su dobro uređena područja bez defekata relativno mala pa je stoga teško postići dobru ponovljivost. Tijekom proteklih godina mnoge su grupe radile na različitim strategijama poboljšanja kvalitete monoslojeva. Postoje različite tehnike kojima se nanosfere u monosloju deponiraju na krutu podlogu.[101] Slika 14 shematski prikazuje neke od metoda. Često korištene metode kojima se dobiva gusta heksagonska slagalina su depozicija kapanjem (ili samouređenje hlapljenjem otapala) (engl. *drop coating*), uranjanje (engl. *dip coating*), depozicija vrtnjom i konveksno samouređivanje (engl. *convective self-assembly*).



Slika 14 Shematski prikaz različitih metoda depozicije nanosfera u monosloju.

2.4.4.1.1 Samouređenje hlapljenjem otapala (engl. drop coating)

Metode hlapljenja temelje se na isparavanju otapala iz kapljice razrijeđene suspenzije koloidnih nanosfera nanesenih na supstrat (Slika 15). Isparavanje otapala potiče nastajanje meniskusa između čestica i stoga privlačne kapilarne sile dovode do samouređenja čestica u heksagonsku gustu slagalinu. Denkov i njegov tim došli su do bitnih saznanja o samouređenju čestica izravnim promatranjem koloida.[102] Otkrili su da su privlačne kapilarne sile i konveksan transport nanosfera faktori koji dominiraju procesom samouređenja, dok na kvalitetu dobivenih područja monosloja znatno utječe brzina isparavanja otapala.[103] Kontroliranjem temperature i vlažnosti sustava Micheletto i suradnici proizveli su monosloj koloida na blago nagnutom supstratu, no slaba kontrola procesa često rezultira višeslojnim strukturama.[104]



Slika 15 Sile koje sudjeluju u organiziranju sferičnih čestica u otopini na supstratu. F_c je kapilarna sila između čestica u tankom filmu tekućine čija je debljina jednaka promjeru čestice. F_d je hidrodinamička sila koja vuče uronjene čestice prema unutarnjem području. Ovu silu stvara hidrodinamički tok (J_S) otapala koji kompenzira otapalo hlapljenjem s tanjih područja.[103]

2.4.4.1.2 Depozicija uranjanjem

Na temelju svog rada na konvekcijskom uređenju koloidnih nanosfera tijekom isparavanja otapala, Nagayama i suradnici razvili su postupak stvaranja 2D koloidnih predložaka uranjanjem (engl. *dip coating*).[105] Brzina isparavanja kao i brzina izvlačenja supstrata, ključni su parametri za postizanje velikih 2D uređenih područja. U ovom se slučaju slojevi čestica nalaze s obje strane supstrata čime se povećava količina iskorištene suspenzije. Kako bi riješili ovaj nedostatak Nagao i suradnici projektirali su hibridnu metodu korištenjem hlapljenja i uranjanja.[106] Kap koloidne suspenzije položena je na supstrat koji se nakon toga naginje vertikalno dok se suspenzija ne osuši. Višeslojni supstrati dobivaju se ponavljanjem postupka.

2.4.4.1.3 Depozicija vrtnjom

Depozicija koloidne suspenzije na supstrat vrtnjom (engl. *spin coating*) može ubrzati proces hlapljenja otapala. Na kvalitetu i debljinu koloidnog sloja utječu brzina vrtnje, veličina sfera, stupanj vlaženja itd. Za dobivanje većih uređenih monoslojeva najčešće je potrebna brza vrtnja suspenzije. Vrtnja supstrata pri velikoj brzini znači da centripetalna sila u kombinaciji s površinskom napetosti otopine povlači tekućinu u jednoliki premaz. Tijekom vrtnje otapalo isparava te ostavlja željeni materijal na podlozi. Pokazalo se da je debljina filma obrnuto proporcionalna brzini vrtnje.[107] Štoviše, Rehg i Higgins te Dushkin i suradnici zaključili su da se većim brzinama isparavanja dobivaju uniformniji slojevi koloidnih kristala.[108,109] Chen i suradnici nedavno su objavili mnogo korisnih informacija za učinkovitu i kontroliranu proizvodnju uniformnih jednoslojnih ili višeslojnih filmova koloidnih kristala pomoću polistirenskih nanosfera različitih promjera.[110] Time su poboljšali razumijevanje odnosa između pokrivenosti supstrata u monosloju i brzine vrtnje.

2.4.4.2 ***Samouređenje na granici dvaju medija***

2.4.4.2.1.1 Granica zrak-tekućina

Langmuir-Blodgett depozicija se odnosi na dobivanje i prijenos monosloja nanosfera s granice zrak-tekućina na čvrsti supstrat kontroliranim povlačenjem supstrata. Korištenjem surfaktanata ili putem površinskih modifikacija nanosfera radi poboljšanja njihove hidrofobnosti, na površini tekućine formira se plutajući 2D kristalni film.[111,112] Na ovaj se način mogu dobiti monoslojevi makroskopskih dimenzija.

Kontrolirano hlapljenje razlikuje se od Langmuir-Blodgett postupka time što supstrat ostaje uronjen u tekućinu za vrijeme hlapljenja. Laganim naginjanjem supstrata, proizvedene su domene veće od 150 μm^2 (korištenjem PS sfera promjera 200 nm).[113]

2.4.4.2.1.2 Granica tekućina-tekućina

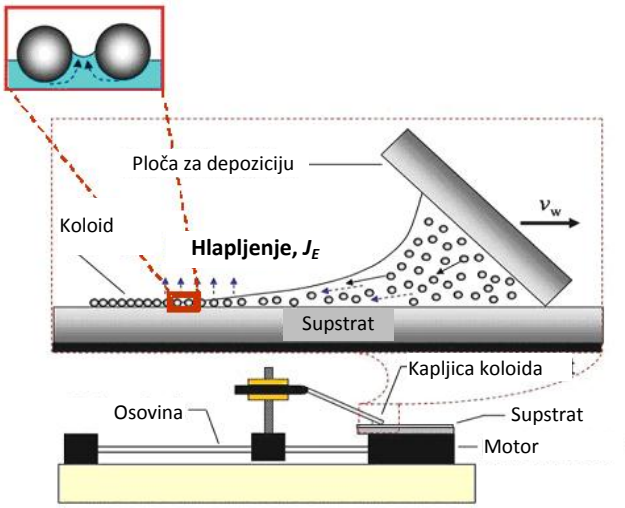
Samouređenje se također može odvijati na granici dvaju tekućina koje se ne miješaju.[114] Jednom kad su čestice zarobljene na ganici, one se samoorganiziraju u monosloj, nakon čega se monosloj deponira na supstrat uklanjanjem ili hlapljenjem jedne faze.

2.4.4.2.2 Elektroforetska depozicija

Kod elektroforetskog nanošenja koloidna suspenzija je smještena između dvije elektrode. Primijenjeno električno polje inducira migracije čestica te se samouređenje dešava na površini elektrode. Ova je metoda stoga ograničena na vodljive supstrate (npr. ITO staklo). Nastanak 2D i 3D koloidnih kristala istraživan je primjenom istosmjerne i izmjenične struje. Korištenje izmjenične struje omogućuje manipulaciju s bilo kojom vrstom čestica u bilo kakvom mediju i ima prednost korištenja polja visoke snage bez elektrolize vode.[115]

2.4.4.2.3 Konveksno samouređivanje

Kod konveksnog samouređivanja ploča se postavlja pod oštrim kutom neposredno iznad podloge dok se mali volumen suspenzije nanočestica nalazi u kutu koji tvore ploča i podloga (Slika 16).[116] Ploča se zatim povlači odgovarajućom brzinom (v_w) pri čemu povlači suspenziju. Isparavanje otapala iz tankog filma koji zaostaje nakon povlačenja ploče potiče protok (J_w) otapala prema rubu. Protok povlači čestice što dovodi do rasta tankog koloidnog kristala s jednim ili više slojeva. Ovim se postupkom mogu deponirati uniformni filmovi na nekoliko kvadratnih centimetara.



Slika 16 Shematski prikaz konveksnog samouređivanja (samoudruživanja).[116]

2.5 Ograničenja SERS-a

Postoji nekoliko problema SERS metode koji trenutno ograničavaju široku primjenu tehnike.[117] Da bi Ramanovo raspršenje analita bilo površinski pojačano, analit se mora nalaziti vrlo blizu SERS supstrata.[118] SERS-a neće biti ako se analit ne adsorbira ili ne dođe u blizinu supstrata što je slučaj s mnogim analitima. Pored toga, orijentacija molekula s obzirom na supstrat određuje koji će vibracijski modovi biti pojačani.[119] SERS spektar ponekad se razlikuje od klasičnog Ramanovog spektra, a time je otežana i njegova asignacija. U SERS spektru mogu se pojaviti nove vrpce, neke vrpce mogu postati vrlo slabe ili čak potpuno nestati.[120] Razlog tome su većinom izborna pravila za molekule na površini metala. Vibracije polarizirane okomito na površinu najintenzivnije raspršuju zračenje, dok vibracije paralelno s površinom ne doprinose raspršenju. Adsorpcijom molekula na površinu metala mijenja se geometrija molekule te dolazi do promjena normalnih vibracija. To je najizraženije za molekule s centrom simetrije, koje vezanjem na površinu gube to svojstvo pa više ne vrijedi pravilo međusobnog isključenja. Tad se u SERS spektru javljaju vrpce i onih vibracija koje su inače bile samo IR aktivne.

Još jedan problem SERS-a je nedovoljna reproducibilnost glede pojačanja. Varijabilnost SERS signala u manjoj se mjeri može smanjiti jednostavnim metodama prilikom snimanja spektara. Tako se na primjer laserski snop može konstantno pomicati. Ova se metoda zove *rastering* ili *rast scanning* i pokazala se učinkovitom.[121,122] Drugi je pristup osvjetljavanje većeg područja (mijenjanjem fokusa laserske zrake) pri čemu dolazi do pobude žarišta na većem području. Također je moguće snimati spektre na više različitih mjesta pa ih potom usrednjiti. Sve ove metode zapravo usrednjavaju SERS signal nad više žarišta čime se smanjuje varijabilnost.

Navedena ograničenja za sada smanjuju širu primjenu SERS-a, ali i predstavljaju područja budućeg razvoja ove metode.

2.5.1 Surfaktanti

SERS je efekt prvog sloja, točnije signal se pojačava samo na udaljenostima do 5 nm od metalne površine, a intenzitet eksponencijalno opada s udaljenošću.[123] Stoga je jasno da će što je analit bliže površini, pojačanje biti bolje. No, čak i ako su podloge za SERS pripremljene ultračistim metodama (npr. PVD), rad u dodiru s atmosferom ili otopinom koja

sadrži analit, dovodi do vezanja na površinu neželjenih vrsta kao što su O_2, CO_2, H_2O itd. To nije veliki problem za analite koji sadrže skupine poput tiola, amina, cijanida, karboksilnih kiselina i sl., koji imaju veći afinitet za Ag i Au koji su najčešće plazmonske površine. No, i u tim je slučajevima dokazano da se signal pojačava ako se iz otopina odstrane plinovi.[124] U slučaju koloidnih otopina potrebno je koristiti reducense i surfaktante za kontrolu veličine i oblika čestica, a ti spojevi mogu interagirati s Au i Ag česticama. Često korištena redukcija citratima, koji imaju slab SERS signal, daje koloide pogodne za različite primjene.[125] No, za bolju kontrolu veličine i oblika čestica potrebno je dodavati različite površinske agense. Kationski surfaktant cetil trimetilamonijev bromid (CTAB) jedan je od najčešće korištenih agensa za usmjeravanje rasta. CTAB se snažno veže za Au površinu i stvara dvosloj oko čestica te onemogućava prilaz većine analita.[126] Kako bi se dobio dovoljan SERS signal potrebno je nakon sinteze ukloniti CTAB, na primjer centrifugiranjem i ispiranjem ili korištenjem plazme kisika. Slična je situacija i s polimerom polivinilpirolidonom koji se gotovo u potpunosti može ukloniti centrifugiranjem.

2.5.2 Elektrostatske i hidrofobne interakcije

U slučaju metalnih koloida, čestice su okružene elektrostatskim dvoslojem. Stoga prije same interakcije s metalom, analit mora biti privučen od strane iona koji okružuju česticu. Kod npr. citratnih i borhidridnih koloida, metalne čestice su okružene negativnim ionima te za negativno nabijene analite dolazi do odbijanja. Ovaj se problem djelomično može riješiti aktivacijom koloida tj. dodavanjem otopine elektrolita poput nitrata, sulfata, perklorata, halida i sl. u svrhu smanjenja ionske jakosti sustava.[127] Dodavanje elektrolita vodi manjem elektrostatskom odbijanju površine i analita, no s druge strane utječe na stabilnost koloida. Korak dalje uključuje dodavanje mineralnih kiselina (HNO_3, H_2SO_4, $HClO_4$) radi smanjenja pH otopine čime se smanjuje ionska jakost, ali i povećava koncentracija protona. U opisanim slučajevima površina čestica ostaje negativno nabijena pa se za mijenjanje naboja iz negativnog u pozitivni moraju koristiti drugi pristupi.

Jedna od metoda promjene površinskog naboja uključuje korištenje alifatskih aminokiselina koje su zwitterioni i imaju mali presjek za SERS. Ovisno o pH medija, površinski naboj na česticama može se modificirati od +30 do -50 mV.[128] Bitno je naglasiti da se ne mogu koristiti sve aminokiseline jer cistein i metionin, koji sadrže tiolne grupe, čine Au i Ag površine neaktivnim. Opisane metode učinkovite su za polarne molekule s funkcionalnim grupama koje imaju dobar afinitet za zlato i srebro. Ipak, postoje mnogi važni

analiti koji nemaju afinitet za zlato i srebro i koji su jako hidrofobni. Jedan od klasičnih primjera su policiklički aromatski ugljikovodici (engl. *polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAH), opasni atmosferski onečišćivači, koji se sastoje od spojenih aromatskih prstena bez heteroatoma. PAH-ovi se ne mogu analizirati klasičnim SERS supstratima jer se ne zadržavaju na metalnim površinama. Stoga su razvijene nove metode koje uključuju funkcionalizaciju površina monoslojem hidrofobnih molekula. Najjednostavnija metoda uključuje stvaranje samoorganiziranog monosloja amino- ili tio- alifatskih lanaca. Ovi spojevi nisu topljivi u vodi pa se u ovom slučaju kao podloge preferiraju nanostrukturirani tanki filmovi.[129] Filmovi se mogu naknadno funkcionalizirati željenim ligandima. Na taj su način korištenjem alkilnih monoslojeva detektirani PAH-ovi i poliklorirani bifenili [130,131]

2.6 Porozni silicij

2.6.1 Povijest

Porozni silicij (PS, PSi) je poluvodički materijal kojeg čini mreža pora različitih promjera ugrađenih u sloj silicija. Porozni Si prvi se put spominje (iako ne pod tim imenom) 1956. A. Uhlir uočio je neobične depozicije na uzorcima anodiziranog silicija te je pretpostavio da odgovaraju oksidnim formama silicija. [132] Nedugo zatim, Turner je objavio detaljniju studiju o anodno formiranim filmovima na siliciju.[133] Tek 1971. Watanabe i Sakai objavili su rad u kojem po prvi put formirane filmove na površini silicija povezuju s poroznom strukturom.[134] Ključni trenutak za porozni silicij bio je kada je otkriveno da materijal fotoluminiscira, a fotoluminiscencija (PL) je bila pripisana amorfnim fazama prisutnim u poroznom mediju. Devedesetih godina Canhamov rad objasnio je PL pomoću kvantnog zatočenja (engl. *quantum confinement*) i izazvao obimna istraživanja.[135] Efekti kvantnog zatočenja nastaju kada pore postaju dovoljno velike da se počnu međusobno preklapati, stvarajući nanometarska vlakna silicija. Fotoluminiscencija (crvena do zelena) se događa na energijama koje su značajno veće od energijskog procjepa (engl. *band gap*) cjelokupnog (*bulk*) silicija (1,1 eV).

Porozni silicij ekstenzivno se istražuje proteklih tridesetak godina, a uzrok tome je njegova široka primjena, npr. u izradi mikroelektroničkih i optoelektroničkih uređaja, kemijskih i bioloških senzora te solarnih ćelija. [136-145] Zbog slobodnog volumena (koji može

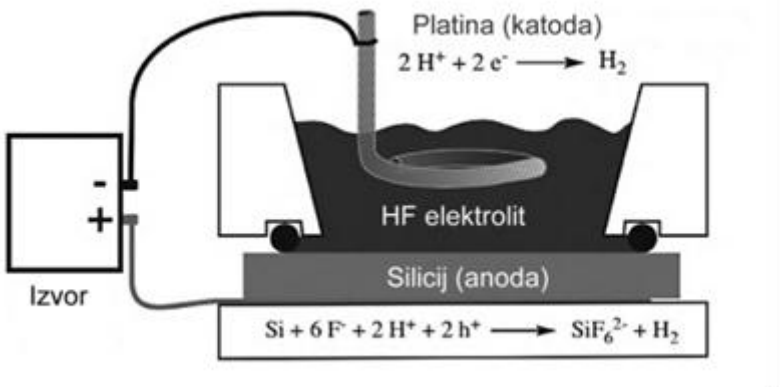
iznositi i više od 80 %) porozni Si može nositi 'teret' kao što su proteini, enzimi, lijekovi ili geni te se koristi u raznim sustavima primjene lijekova.[146]

2.6.2 Dobivanje poroznog Si

Porozni silicij može se pripremati jednostavno, jeftino i na više načina. Neke od tehnika uključuju kombinaciju fluorovodične i nitratne kiseline (engl. *stain etching*) te eroziju iskrom (engl. *spark erosion*) u prisutnosti jakog električnog polja.[147,148] Za dobivanje poroznog Si ipak se najčešće koristi elektrokemijska metoda koja omogućava dobivanje relativno velikih i homogenih slojeva. Elektrokemijska metoda također omogućava zadovoljavajuću kontrolu debljine i poroznosti nastalog poroznog filma.

2.6.2.1 ***Elektrokemijsko jetkanje***

Najpopularnija metoda dobivanja poroznog silicija je elektrokemijsko jetkanje (anodizacija) dopiranog kristalnog silicija u otopinama koje sadrže fluorid.[149] Postoji nekoliko tipova ćelija za jetkanje silicija od kojih je jedna prikazana na Slici 17. Ćelija za jetkanje napravljena je od teflona i sadrži katodu od platine i anodu koju čini Si pločica (*wafer*) koja je u kontaktu s elektrolitom. Elektrolit se sastoji od 48% fluorovodične kiseline (HF) u vodenoj otopini koja je razrijeđena etanolom u različitim koncentracijama. Korištenje DC izvora potrebno je radi konstantne koncentracije elektrolita na vrhu katode, čime se postiže bolja kontrola brzine korozije. Iako postoji nekoliko hipoteza glede mehanizma jetkanja općenito je prihvaćeno da su poluvodički nosači (rupe, šupljine) bitni za inicijalni oksidacijski korak prilikom nastajanja pora.[150]



Slika 17 Shematski prikaz elektrokemijske ćelije za pripremu poroznog Si.[151]

Nastajanje poroznog Si uključuje reakcije Si-Si, Si-H, Si-O i Si-F veza na površini kristalnog silicija.[151] Relativne jačine ovih veza dane su u Tablici 5. Pored relativne jačine kemijskih veza na površini, bitnu ulogu igra i elektronegativnost elementa. Si-H i Si-C veze čine površinu neaktivnom u vodenim otopinama dok je Si-F veza vrlo reaktivna. Elektronegativni elementi poput O i F formiraju polarne veze čineći Si atom podložan za nukleofilni napad. Površina svježe pripremljenog poroznog silicija prekrivena je najvećim dijelom Si-H vezama s malim udjelom Si-F i Si-O veza. Vodikom terminirana površina silicija je hidrofobna, a površina je hidrofilna kad su prisutne silanolne grupe (Si-OH) ili tanki oksidni sloj. Oksidni sloj na površini može se dobiti kemijskim putem pomoću HNO_3 ili otopinama koje sadrže H_2O_2.[152]

Tablica 5 Entalpije nekih Si-X veza.

Spoj	Veza	Entalpija / kcal mol^{-1}
$Me_3Si\text{-}SiMe_3$	Si-Si	79
$Me_3Si\text{-}CH_3$	Si-C	94
$Me_3Si\text{-}H$	Si-H	95
$Me_3Si\text{-}OMe_3$	Si-O	123
$Me_3Si\text{-}F$	Si-F	158

Silicij je termodinamički nestabilan na zraku i u vodi te spontano stvara oksidni sloj:

$$Si + O_2 \rightarrow SiO_2 \qquad \textbf{(2-25)}$$

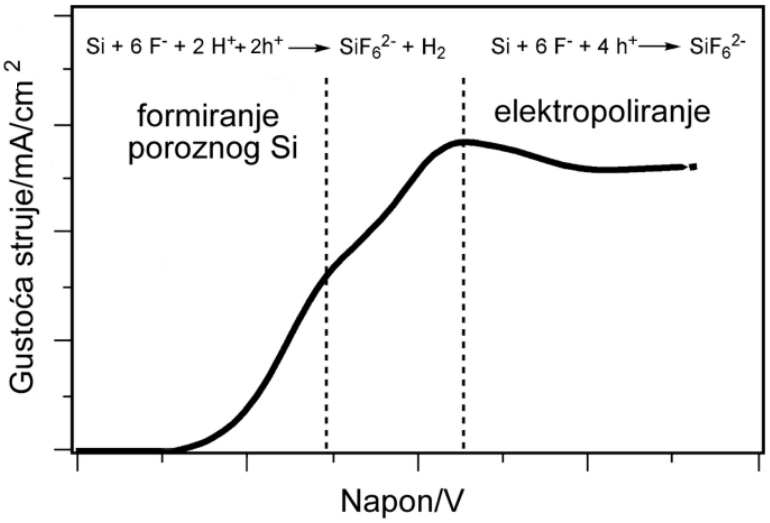
SiO_2 je izolator i stoga je za pripremu poroznog Si potreban aditiv koji će otopiti oksidni sloj i omogućiti elektrokemijsku oksidaciju. Si-F veza je stabilnija od Si-O veze te se u prisutnosti vodene otopine fluorovodične kiseline SiO_2 spontano otapa kao silicijev heksafluorid SiF_6^{2-}. Jednadžba (2-26) prikazuje reakciju koja se odvija na površini silicija za vrijeme jetkanja,

$$Si + 6HF \rightarrow H_2SiF_6 + H_2 + 2H^+ + 2e^- \qquad \textbf{(2-26)}$$

Ako je anodni potencijal veći, otapanje može ići putem anodnog oksidnog filma,

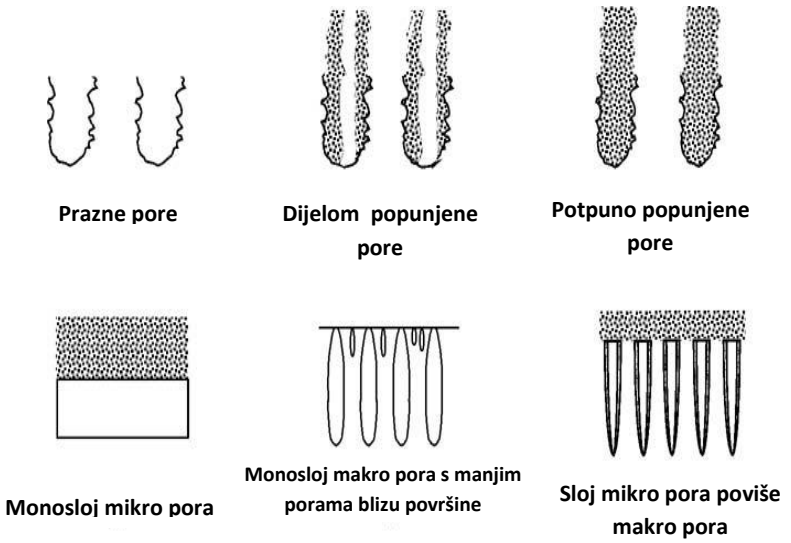
$$SiO_2 + 2HF_2^- + 2HF \rightarrow SiF_6^{2-} + 2H_2O \qquad \textbf{(2-27)}$$

Silicij se ne otapa u kiselim otopinama čak i ako otopina sadrži fluoridni ion. Iako je termodinamički izvedivo, otapanje silicija u vodenoj otopini HF je sporo osim u prisutnosti jakog oksidirajućeg sredstva (npr. O_2 ili NO_3^-), ili osim ako se reakcije oksidacije ne pokreću elektrokemijski. Kada se Si kemijski ili elektrokemijski jetka u otopini HF, izložena površina Si terminirana je H atomima. Površinske Si-H veze moraju se ukloniti oksidacijom kako bi se nastavilo jetkanje. U lužnatim otopinama, OH^- ion kao dobar nukleofil može napasti Si-H veze. Ove veze na PSi mogu se ukloniti i kationskim surfaktantom koji polarizira površinu i inducira nukleofilni napad vode čak i u kiselim otopinama.[153]



Slika 18 Ovisnost gustoće struje o potencijalu kod elektrokemijskog jetkanja silicija u HF elektrolitu na umjereno dopiranom p-tipu Si (h^+ - šupljina u valentnoj Si vrpci).[154]

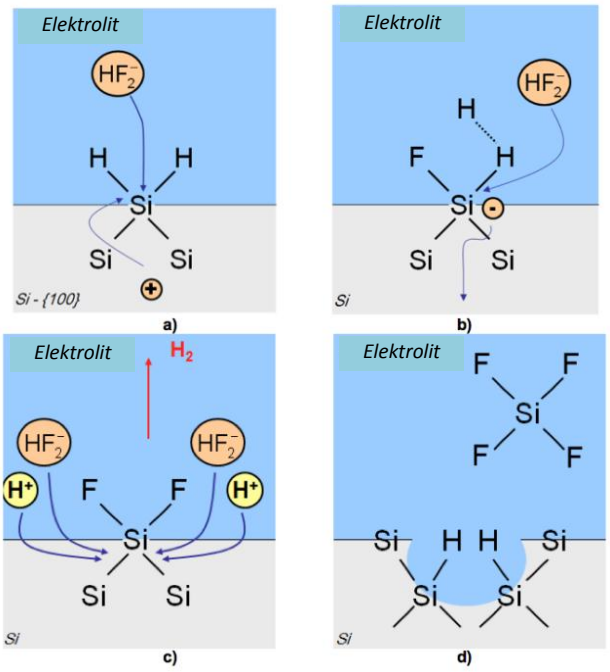
Nastanak poroznog silicija najbolje se može prikazati krivuljom ovisnosti I-V (Slika 18). Pri malim potencijalima struja se povećava eksponencijalno s povećanjem potencijala.[155] S daljnjim povećanjem potencijala struja dolazi do maksimuma i ostaje na približno istoj vrijednosti (tranzicijsko područje). Na potencijalima puno pozitivnijim od maksimuma površina je potpuno prekrivena oksidnim filmom i anodne reakcije se nastavljaju kroz formiranje i otapanje oksida dok je brzina reakcija ovisna o koncentraciji HF. Vodik nastaje u eksponencijalnom području, a brzina nastajanja se smanjuje s potencijalom te gotovo prestaje kod vrijednosti maksimuma. Porozni silicij formira se u eksponencijalnom području, ali ne pri potencijalima većim od potencijala maksimuma. Profil I-V krivulje sličan je za sve tipove silicija osim za slabo dopiran n-tip koji treba osvjetljavanje za stvaranje anodnih reakcija na površini.



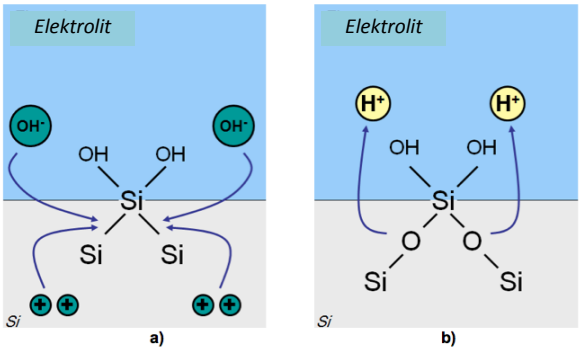
Slika 19 Morfološke karakteristike poroznog silicija.[155]

Za vrijeme jetkanja preferirano se otapaju vrhovi pora zbog lakog pristupa šupljinama. Zidovi pora, koji su dovoljno daleko od vrhova, nemaju dostupnih šupljina te se otapaju kemijski i to vrlo sporo, što ne ovisi o primijenjenom potencijalu već samo o vremenu provedenom u elektrolitu. Pore mogu biti različitih veličina i oblika od kojih su neki prikazani na Slici 19. U slučaju slabo dopiranog p-tipa mogu nastati dva sloja pora, mikro i makro pore, pri čemu su pore na površini manje od pora u cjelokupnom (*bulk*) Si. Ovakvo nastajanje dva sloja pora tumači se tranzicijom od početnog rasta pora do stabilnog rasta.

Slika 20 i Slika 21 prikazuju pojednostavnjeni mehanizam nastajanja pora u slučajevima kada u otopini postoje fluoridni ioni ili kada je njihova koncentracija mala. Proces započinje šupljinama u valentnoj vrpci koje putuju na površinu zbog primijenjenog električnog polja i difuzije (šupljine nastaju kada se e^- pomakne iz valentne vrpce i za sobom ostavi pozitivno nabijeno prazno mjesto). Kad šupljina dođe u blizinu Si atoma na površini, atom je podložan napadu nukleofilnih vrsta, primarno F^- i H_2O (Slika 20). Kada je koncentracija HF u elektrolitu mala, oksidirani Si atomi na površini se stvaraju toliko brzo da ih F^- ne stigne napasti pa molekule vode preuzimaju ulogu nukleofila (Slika 21). Mehanizam reakcije preusmjerava se na stvaranje Si-O i reakcija umjesto 2-elektronske postaje 4-elektronska. Manjak fluoridnih iona znači da se oksid ne može ukloniti s površine i na taj način izolatorski oksid zaustavlja propagaciju pora.



Slika 20 Shematski prikaz elektrokemijskih reakcija u procesu nastajanja poroznog Si u otopini fluoridnih iona.[151]



Slika 21 Shematski prikaz elektrokemijskih reakcija kod nastajanja PSi (jača struja ili manja koncentracija F^-).[151]

Kad se Si pločica uroni u otopinu HF, oksidni sloj se otapa i površina postaje H terminirana. Ovo izgleda neobično budući da znamo da je Si-F veza termodinamički najstabilnija (Tablica 5). Razlog ove proturječnosti leži u tome što je Si-F veza jako polarizirana zbog velike elektronegativnosti fluora te je time Si-F na površini puno podložniji napadu nukleofila nego Si-H. Drugim riječima, ako se fluoridni ion veže na Si atom, taj atom brzo napadaju drugi fluoridni ioni i miču s površine. Stoga za vrijeme jetkanja na površini Si dominiraju H terminirani Si atomi. Nakon jetkanja uzorci PSi na površini primarno sadrže Si-H, $Si-H_2$ i $Si-H_3$ grupe i samo tragove kisika ili fluora.

Osnovne karakteristike jetkanja mogu se sumirati u nekoliko točaka: u vodenim otopinama Si spontano reagira s vodom i stvara oksidni film koji čini površinu pasivnom;

HF otapa silicijev dioksid i aktivira površinu; fluoridi reagiraju i direktno s čistom Si površinom; u vodenim otopinama HF otapanje Si atoma može ići na dva načina, jedan je reakcija s HF, a drugi s H_2O; površina Si za vrijeme anodnog otapanja terminira se vodikom; zamjena vodika fluorom polarizira i oslabljuje daljnje Si-Si veze i olakšava napad HF ili H_2O; brzina uklanjanja površinskih Si atoma elektrokemijskim reakcijama ovisna je o orijentaciji (najsporija za (111) i brža za druge orijentacije).

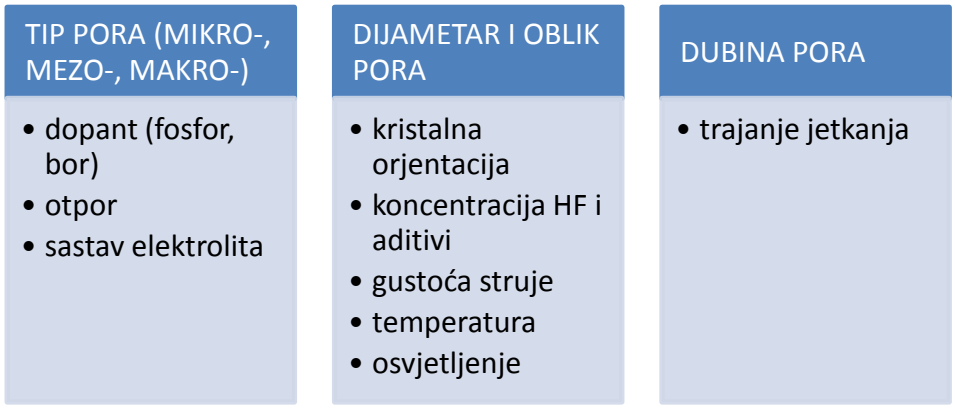
Proces kontrole nastajanja pora u poroznom siliciju vrlo je kompliciran jer na njega utječe niz faktora.[156] Ipak postoje neka generalna svojstva: a) pore se stvaraju ujednačeno i bez posebnog reda na površini Si osim ako uzorak na pločici nije unaprijed određen, b) struja preferirano teče prema dnu pora, c) zidovi pora postaju neaktivni što dovodi do otapanja Si primarno na mjestu dodira PSi i kristalnog Si, d) jednom kad su formirane pore se više ne preraspodjeljuju i ne rekonstruiraju i e) u svim uzorcima postoji raspodjela veličine pora, a ne samo jedna veličina pora. Kako parametri jetkanja utječu na konačni tip PSi te oblik, promjer i dubinu pora može se vidjeti na Slici 22. Poroznost konačnog PSi može se fino podešavati mijenjanjem parametara kao što su koncentracija elektrolita, struja jetkanja, vrijeme anodizacije, koncentracija dopanta itd.

2.6.2.2 *Gustoća struje*

Gustoća struje korištena u procesu elektrokemijskog jetkanja silicija osnovni je parametar koji diktira poroznost poroznog sloja silicija kad su svi ostali parametri konstantni. Silicijevi atomi otapaju se kao SiF_6^{2-} kompleksi koji zahtijevaju prisutnost F^- iona koji se nalaze u fluorovodičnoj kiselini te pozitivnih šupljina koje su u silicijevoj pločici. Gustoća struje određuje jesu li F^- ioni ili šupljine limitirajuća vrsta. U slučaju velikih gustoća struje, difuzija F^- iona na površinu je sporija od transporta šupljina. U ovom je slučaju gornja površina silicijevih atoma zasićena šupljinama te svaki ion koji dođe na površinu bude dočekan šupljinom. Ovaj se proces naziva elektropoliranje (engl. *electropolishing*), što je ekstremni slučaj otapanja silicija. Kada se gustoća struje smanji, prisutno je dovoljno F^- iona na površini i određen broj šupljina. Zbog tipične raspodjele električnog polja na nepravilnostima na površini, manje su šanse da šupljina dođe do površine pa stoga dolazi do nastanka pora u silicijskom supstratu.

2.6.2.3 *Vrijeme jetkanja*

Vrijeme jetkanja je parametar koji utječe na debljinu poroznog sloja. Ovisnost je linearna, tj. debljina se povećava s vremenom anodizacije.[157] Važno je naglasiti da, kako se debljina povećava, izloženost poroznog silicija elektrolitu je duža pa se stoga poroznost još malo povećava zbog dodatnog kemijskog otapanja sloja u HF-u. U slučajevima kad je debljina poroznog sloja nekoliko stotina mikrona, može doći do nastanka gradijenta poroznosti pri čemu je najveća poroznost pri vrhu uzorka i smanjuje se prema dnu (najmanja je na mjestu dodira poroznog Si i Si).



Slika 22 Utjecaj osnovnih parametara jetkanja na morfologiju poroznog Si.

2.6.2.4 *Kemijsko jetkanje*

Pored elektrokemijskog jetkanja za dobivanje PSi upotrebljava se još i jetkanje bez struje silicija u vodenim otopinama HNO_3 i HF.[158] U ovom su slučaju kemijske reakcije koje se dešavaju izuzetno kompleksne i teško ih se može kontrolirati što često rezultira tankim i nehomogenim slojevima pora. Kolasinski i suradnici napravili su značajan pomak u kemijskom jetkanju Si zamjenom HNO_3 s drugim oksidansima kao što su Ce^{4+}, Fe^{3+} i VO_2^+ uz pomoć kojih su dobili homogene slojeve pora.[159] Problem ove metode i dalje ostaje slaba reproducibilnost iako se ovom metodom proizvode komercijalno dostupni prašci poroznog silicija.

2.6.2.4.1 Kemijsko jetkanje u lužnatim otopinama

Lužnate otopine za jetkanje uglavnom se koriste za kemomehaničko poliranje i uklanjanje silicija na anizotropan način. Koriste se LiOH, NaOH, KOH, RbOH, CsOH i NH_4OH kao i vodene otopine organskih spojeva (etilen diamin, hidrazin). Svi spojevi imaju sličan mehanizam jetkanja koji se pripisuje OH^- i H_2O dok su kationi manje bitni. Za vrijeme jetkanja razvija se vodik. Dobivene morfologije variraju od mikronskih piramida (niže OH^- koncentracije) do glatkih, ovisno o sastavu otopine za jetkanje i gustoće dopiranja silicija.

2.6.2.4.2 Kemijsko jetkanje u kiselim otopinama

Kisele otopine za jetkanje koriste se za izotropno uklanjanje silicija.[152] Silicij je stabilan u kiselim otopinama koje ne sadrže fluoridni ion jer je površina silicija pasivizirana nativnim slojem oksida. Ako je u otopini prisutan samo fluoridni ion, brzina jetkanja je mala (manja od 0,1 nm/min). Brzina jetkanja se značajno povećava dodavanjem oksidirajućih sredstava. Već i otopljeni kisik u vodi može povećati brzinu jetkanja. Brzina se povećava dodavanjem H_2O_2, HNO_3, $NaNO_2$, $KBrO_3$ itd. Dodatak HNO_3 u HF (engl. *stain etching*) povećava brzinu jetkanja nekoliko redova veličine (do vrijednosti od čak 1500 μm/min za molni odnos HF i HNO_3 4,5:1). Ako se doda kiselina visoke viskoznosti, poput H_3PO_4, dobivaju se glatkije površine silicija.

2.6.3 Tipovi poroznog Si

Prema IUPAC-ovim standardima porozni silicij možemo klasificirati u tri skupine s obzirom na veličinu pora: **mikroporozni** ($\varphi \leq 2$ nm), **mezoporozni** ($2 < \varphi \leq 50$ nm) i **makroporozni** ($\varphi > 50$ nm). Budući da ova klasifikacija nije dovoljna za karakterizaciju materijala, oblik pora promatra se SEM ili TEM mikroskopijom. Važna karakterizacija poroznih materijala je udio praznina u ukupnom volumenu, tj. poroznost. U slučaju poroznog silicija izuzetna reaktivnost u bazičnim otopinama (KOH, NaOH) omogućava uklanjanje cijelog poroznog sloja te se na taj način može izračunati poroznost (P) jednostavnim mjerenjima mase uzorka

$$P = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_3} \qquad \textbf{(2-28)}$$

gdje je m_1 masa uzorka prije jetkanja, m_2 masa uzorka nakon jetkanja i m_3 masa uzorka nakon uklanjanja poroznog sloja.

Površina PSi terminirana je Si-H grupama neposredno nakon elektrokemijskog jetkanja. Ove se grupe s vremenom zamjenjuju s oksidnim grupama zbog izloženosti kisiku i vlazi u zraku. Sloj oksida na površini Si ima debljinu oko 7 nm. Iako se ova oksidacija može koristiti za dobivanje reproducibilnijih i stabilnijih površina, često se površina PSi funkcionalizira radi sprečavanja oksidacije ili radi selektivnog vezanja analita.

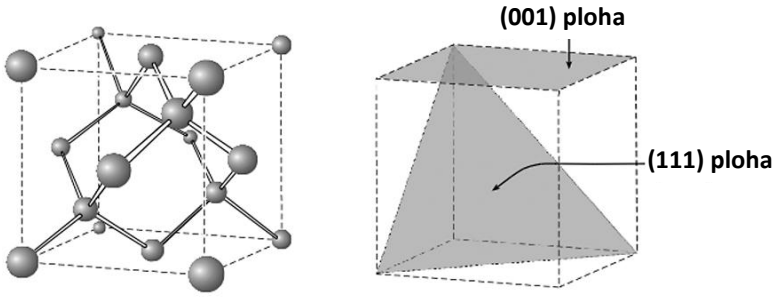
2.6.4 Tipovi silicija s obzirom na dopant

Dopanti (nekad se nazivaju nečistoće ili primjese) su elementi koji imaju jedan valentni e^- više ili manje od Si, a dodaju se u Si kako bi mu se povećala vodljivost. Silicij se najčešće dopira fosforom i borom. Fosfor ima jedan e^- više od Si i kad zamijeni Si atom u kristalnoj rešetki, elektron 'viška' donira u vodljivu vrpcu čime se povećava vodljivost silicija (n-tip). Na sličan način atom bora ulazi u kristalnu rešetku i povećava vodljivost doniranjem 'šupljine' valentnoj vrpci (p-tip). Slovo „n“ u n-tipu odnosi se na negativni naboj, dok slovo „p“ u p-tipu označava pozitivno nabijenu 'šupljinu'. Direktno vezana uz dopiranje je otpornost koja se izražava u ohm cm (Ωcm). Prilikom jetkanja silicija na stražnju stranu Si pločice mora se postaviti kontakt malog otpora što se postiže stavljanjem aluminijske folije. U mnogim je slučajevima potrebno napraviti omski kontakt na Si pločici prije jetkanja, a to se posebno odnosi na p-tip silicija.[151] Omski kontakt je spoj metala i poluvodiča koji ima zanemarivu otpornost kontakta u odnosu na otpornost samog poluvodiča. Omski kontakt dobiva se naparavanjem metala ili mehaničkom abrazijom. Za p-tip silicija najčešće se koristi naparavanje aluminijem u sloju od oko 200 nm. Nakon naparavanja potrebno je termalno aniliranje u inertnoj atmosferi ili vakuumu. Mehanička abrazija radi se utrljavanjem male količine galij/indija (Ga/In) u unaprijed izgrebanu površinu Si pločice, nakon čega se površina prekrije srebrnom bojom (lakom).

2.6.5 Orijentacija

Kristalni silicij ima strukturnu rešetku dijamanta u kojoj je svaki Si atom vezan na četiri druga Si atoma u tetraedarskoj koordinaciji. Jedinična ćelija prikazana je na Slici 23. Budući da silicij ima kubičnu simetriju, svih šest ravnina jedinične ćelije je ekvivalentno i zbog jednostavnosti označava se sa Millerovim indeksima (100). Porozni Si obično se

priprema iz (100) pločica , tj. pločice su polirane na (100) kristalnu ravninu. Pore primarno propagiraju u <100> smjeru kada se elektrokemijski jetka pločica polirana na (100) plohu.



Slika 23 Jedinična ćelija silicija. Dvije bitne kristalne ravnine prikazane su desno: stranica kocke (označena crtkano) odgovara (100) ravnini, dok dijagonala kocke (označena točkasto) odgovara (111) ravnini.

2.6.6 Priprema samostojećeg PSi

Samostojeći PSi (engl. *free-standing Si*) ne priprema se klasičnim jetkanjem. Iako porozni Si može transportirati električnu struju za jetkanje druge strane Si pločice, ne može održati struju uniformnom preko cijele površine pločice zbog povećanja otpornosti uzorka za vrijeme procesa jetkanja. Postoji nekoliko načina pripreme *free-standing* PSi, a najčešće se koristi elektrokemijsko jetkanje nakon kojeg slijedi puls elektropoliranja visoke struje koji oslobađa PSi kao *free-standing* pahulju.[160,161] Ovom se metodom ne dobivaju reproducibilne PSi membrane jer su pahulje različitih debljina, poroznosti, a time i fizičkih/(opto)elektroničkih svojstava. Napredak u reproducibilnosti postignut je uvođenjem miješanja elektrolita, vremena za 'odmor' tj. vremena u kojem se elektrolit ekvilibrira u porama za vrijeme jetkanja te uvođenjem 'žrtvene' Si pločice nakon jetkanja jedne, a prije jetkanja druge strane.[162,163]

2.6.7 Toksičnost i biokompatibilnost

Površina poroznog Si, kao što je već navedeno, sadrži Si-H, Si-H_2 i Si-H_3 skupine koje se lako mogu pretvoriti u silan (SiH_4) koji je reaktivan i otrovan. Pored toga SiH_x skupine lako oksidiraju u vodenim otopinama. Zbog toga je primjena poroznog Si u medicini i farmaceutici bila otežana. No Bayliss i mnogi drugi utvrdili su relativno nisku toksičnost, dobru razgradivost kao i topljivost degradacijskih nusprodukata PSi u različitim staničnim sustavima i u životinjama.[164,165] Danas je porozni Si obećavajući materijal za farmaceutsku

primjenu prvenstveno zbog niske toksičnosti kao i mogućnosti da se degradira u tijelu (za razliku od ugljikovih nanocjevčica koje se u organizmu ne metaboliziraju). Elektrokemijske metode primjene dozvoljavaju različite dizajne što se tiče rasporeda i veličine pora. Pored toga, površina svježe pripremljenog PSi lako se kemijski modificira različitim organskim ili biološkim molekulama (lijekovi, peptidi, antitijela, proteini itd.). Optička svojstva poroznog Si pružaju koristan uvid u *in vivo* istraživanja. Porozni Si fluorescira što omogućava dobivanje signala koji se mijenja uslijed promjene okoliša. Na taj se način razvijaju funkcionalni senzori za dijagnostičke ili terapeutske primjene. Jednostavnost kojom se PSi može integrirati u mikroelektroničke uređaje vodi k razvoju sofisticiranih uređaja za primjenu u medicini.[166]

2.6.8 Metode depozicije metala na porozni silicij

Prevlačenje supstrata metalnim filmovima koristi se za dobivanje karakteristika koje nisu prisutne u samom supstratu. Razvijene su mnoge metode za prevlačenje (tj. depoziciju, premazivanje) raznih vrsta materijala. Slojevi na površini također mogu nastati spontano, kao rezultat utjecaja okoline. Neke od često korištenih metoda depozicije koje se mogu primijeniti i na porozni Si opisane su u poglavlju 2.4.4.1.

2.6.8.1 ***Priprema površine (čišćenje)***

Pod pripremom površine zapravo se smatra njeno čišćenje. Razni kontaminanti ometaju dobro prianjanje deponiranog sloja na supstrat. Metode čišćenja mogu biti mehaničke (poliranje, brušenje itd.), kemijske (ispiranje u različitim otopinama) i fizikalne (ionsko raspršivanje, ultrasonično čišćenje). Izbor načina čišćenja ovisi o materijalima i cijeni.

2.6.8.2 ***Elektrokemijska i neelektrična depozicija***

Dobivanje metalnih nanostruktura na površini (i u porama) poroznog Si može se postići na više načina. Metode deponiranja metala koje se zbog svoje jednostavnosti često koriste su elektrokemijska depozicija (još nazvana elektroforeza, engl. *electroplating* ili elektrodepozicija) i neelektrična (engl. *electroless*) depozicija.

Elektrodepozicija stvara metalnu prevlaku na određenoj površini djelovanjem električne struje. To se postiže stavljanjem negativnog naboja na podlogu koja se prevlači (katoda) te njenim uranjanjem u otopinu koja sadrži sol metala koji će se deponirati. Kad

pozitivno nabijeni ioni metala iz otopine dođu do negativno nabijene podloge, ona im daje elektrone za redukciju u metalnu formu.[167]

Neelektrična depozicija može se podijeliti na tri tipa: galvanska izmjena (engl. *galvanic displacement*) ili depozicija uranjanjem (engl. *immersion plating*), supstratom katalizirana depozicija i autokatalitička depozicija.[168]

2.6.8.3 *Depozicija uranjanjem*

Depozicija uranjanjem je jednostavna metoda pripreme SERS supstrata u kojoj dolazi do stvaranja srebrnog filma na površini poroznog silicija uslijed slabih interakcija između metala i poluvodiča prema Volmer-Weberovom mehanizmu i opisanom modelu.[169,170] Kad se porozni Si stavi u vodenu otopinu $AgNO_3$, srebro se reducira prema reakciji

$$\mathbf{2\,Si_{surf} + H_2O \rightarrow Si-O-Si_{surf} + 2\,H^+_{aq} + 2\,e^-} \quad \textbf{(2-29)}$$

$$\mathbf{2\,Si-H_{surf} + H_2O \rightarrow Si-O-Si_{surf} + 4\,H^+_{aq} + 4\,e^-} \quad \textbf{(2-30)}$$

$$\mathbf{Ag^+_{aq} + e^- \rightarrow Ag_{surf}} \quad \textbf{(2-31)}$$

Vidimo da oksidacija Si na površini dovodi do pojave elektrona u otopini koji potom sudjeluju u redukciji iona srebra. Kao rezultat ovog procesa formiraju se jezgre Ag kristala preferirano na rubovima pora te se površina poroznog Si postupno prekriva slojem srebra. Porozni Si zanimljiv je supstrat za stvaranje SERS podloga iz više razloga. Nakon jetkanja površina je zasićena Si-H vezama, a rubovi pora u ovom slučaju predstavljaju posebnu vrstu površinskih defekata koji su zapravo područja povećane reaktivnosti i stimuliraju redukciju metalnih iona. Stoga se taloženje metala na površinu PSi odvija pri većoj brzini nego depozicija na običnu Si pločicu.[170] Proces nastanka srebrnih nanostruktura na poroznom Si ovisi o brojnim faktorima od kojih su najbitniji koncentracija srebrnih iona (Ag^+_{aq}) i vrijeme uranjanja.

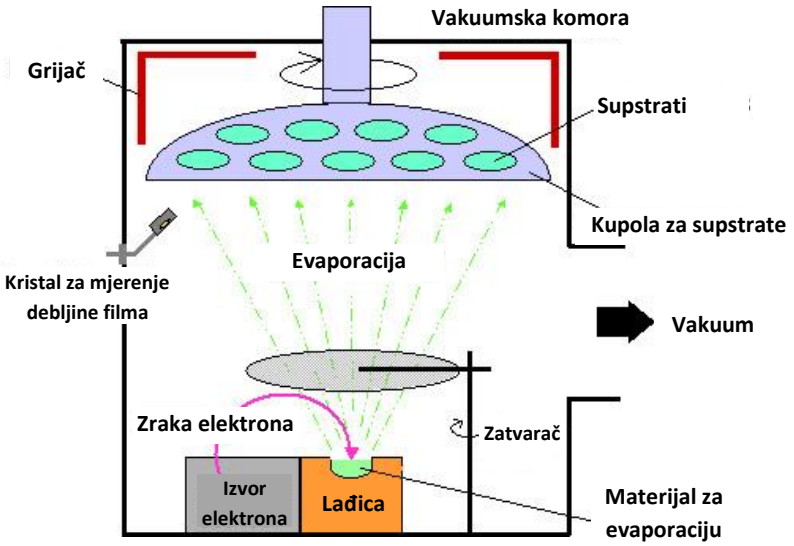
Kristalne strukture koje nastaju obično su fraktalne, dendritične ili poligonalne.[171] Nedostatak ove metode je nemogućnost kontrole reakcija što rezultira velikom varijabilnošću SERS pojačanja od točke do točke na istom supstratu kao i između dva supstrata istog materijala. Do sada su pripremljeni supstrati koji imaju reproducibilnost unutar 10-15 %.[172]

2.6.8.4 *Fizička depozicija (nanošenje) pare (PVD)*

Za depoziciju metala koriste se mehaničke i termičke metode koje zajedničkim imenom nazivamo metode fizičke depozicije para (engl. *physical vapor deposition*, *PVD*). U PVD procesima materijal koji se nanosi prevodi se u plinsku fazu elektronima, niskonaponskim lukom ili bombardiranjem ionima inertnog plina. Ova metoda uključuje evaporaciju zrakom elektrona (engl. *e-beam*), termalnu evaporaciju, pulsnu lasersku evaporaciju i magnetronsko raspršivanje. Kod raspršivanja generira se plazma između površine za prekrivanje i mete izrađene od materijala kojeg se deponira pod vakuumom. Ova metoda omogućava deponiranje na porozni Si.[173,174]

2.6.8.4.1 E-beam evaporacija

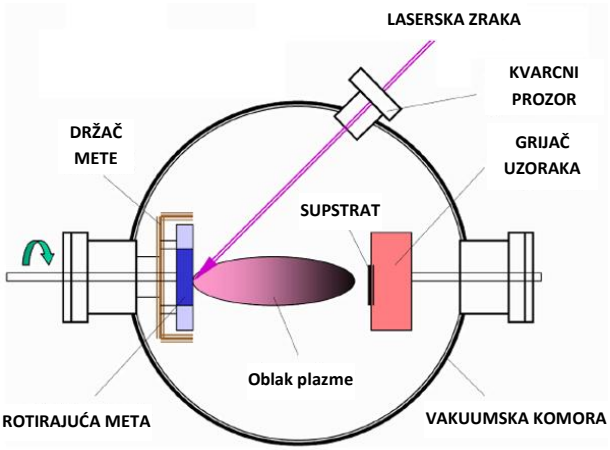
E-beam evaporacija je proces sličan termalnoj evaporaciji. U *e-beam* evaporaciji zraka elektrona velike kinetičke energije usmjerava se prema materijalu koji se evaporira (Slika 24). Uslijed udara, kinetička se energija pretvara u termalnu energiju, pri čemu se materijal grije iznad temperature vrelišta (sublimacije), što omogućava evaporaciju materijala i stvaranje filma na površini u koju udaraju evaporirani atomi.[175] Prednost ove metode je mogućnost korištenja veće kinetičke energije elektronske zrake, posljedica čega je deblji film deponiranog materijala.



Slika 24 Shematski prikaz e-*beam* evaporacije. Metal za depoziciju stavlja se u lađicu (engl. *crucible*), filament se zagrijava, a korištenjem magnetskog polja e^- se usmjeravaju na supstrat.[176]

2.6.8.4.2 Pulsna laserska depozicija/ablacija

U pulsnoj laserskoj depoziciji (engl. *pulsed laser deposition*, PLD) laser se koristi za ablaciju čestica s mete u depozicijskoj komori pod smanjenim tlakom i povišenom temperaturom (Slika 25). Obično se koriste pulsevi lasera velikih snaga (~108 W/cm^2) za taljenje, evaporaciju i ionizaciju materijala s površine mete. Ablacija (odstranjivanje) stvara oblak plazme koji se brzo širi od cilja do mete do površine supstrata.[177] Materijal se tada sakuplja na odgovarajuće smještenoj podlozi, kondenzira te dolazi do nastajanja tankog filma. Broj laserskih pulseva u direktnom je odnosu s debljinom deponiranog filma. Svojstva deponiranih filmova mogu se mijenjati variranjem pulseva, tlaka i temperature podloge.

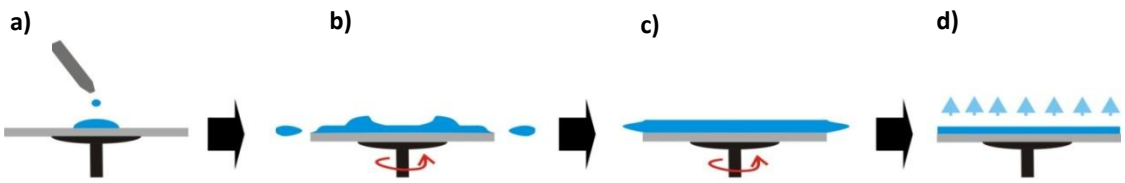


Slika 25 Shematski prikaz pulsne laserske depozicije.[178]

Metoda je brza, moguće je deponirati filmove kompleksnih materijala, a budući da se kao izvor energije koriste laseri, proces je izuzetno čist.[179] Depozicije se mogu raditi u inertnim, ali i u atmosferi reaktivnih plinova. Usprkos nizu prednosti, postoji i nekoliko nedostatka ove metode: debljina deponiranog filma je nejednolika, a može varirati i sastav filma; deponira se relativno mala površina (1 cm^2); procesi koji se javljaju unutar laserski proizvedene plazme nisu u potpunosti razjašnjeni; prilikom ablacije na meti nastaju makroskopske kuglice rastaljenog materijala (do 10 μm u promjeru) koje ako dođu na površinu štetno djeluju na svojstva deponiranog filma. Različite morfologije na površini, kao i različita optička svojstva, mogu se postići mijenjanjem tlaka Ar i vremena depozicije dok su ostali parametri konstantni. Pri stalnom Ar tlaku i pri manjem broju pulseva nastaju približno sferične čestice, dok povećanjem broja pulseva nastaju nakupine nanočestica. Tlak Ar ima sličnu ulogu u morfologiji deponiranog filma pri konstantnoj vrijednosti broja laserskih pulseva.

2.6.8.5 ***Depozicija vrtnjom***

Depozicija vrtnjom (engl. *spin coating*) proizvodi uniformni i tanki film koristeći brzu vrtnju supstrata na kojem se nalazi komponenta za depoziciju. Kao što je prikazano na Slici 26, uzorak se drži za nosač vakuumom, a nosač se zajedno s uzorkom vrti na različitim brzinama. Prilikom vrtnje uzorak se zbog velike centrifugalne sile raširi po nosaču. Time se formira tanki film, a višak uzorka se odbaci. Debljina filma može se kontrolirati prilagođavanjem brzine vrtnje.



Slika 26 Princip depozicije vrtnjom: a) postavljanje uzorka, b) ubrzavanje, c) konstantna vrtnja i d) isparavanje otapala (sušenje).

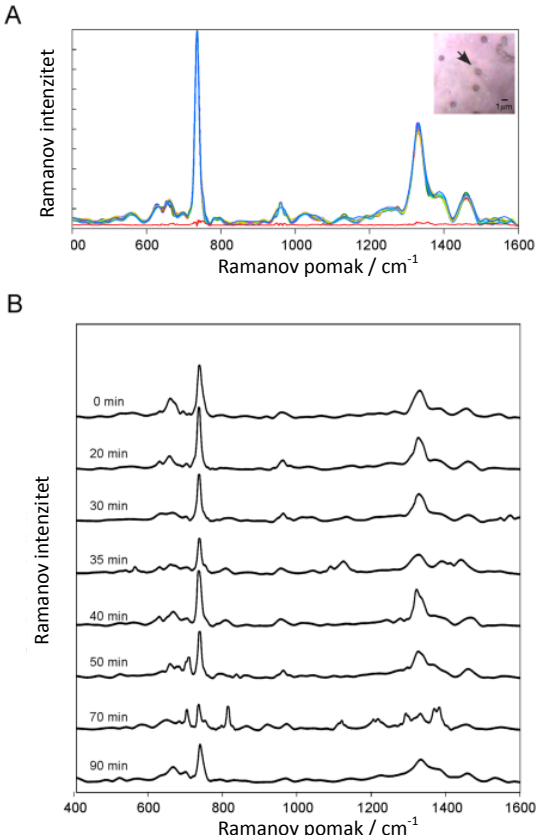
Za dobivanje dobrog SERS supstrata potrebno je površinu poroznog silicija homogeno prekriti slojem metala. Kako bi se iskoristilo važno svojstvo PSi, a to je njegova velika površina, nije poželjno u potpunosti ispuniti pore jer se time smanjuje dostupna površina. U idealnom slučaju, porozni SERS supstrat trebao bi imati metalni premaz na cijeloj površini Si bez začepljivanja pora. Kad metalni premaz ispuni pore silicija dolazi do gašenja luminiscencije. Ovo ne predstavlja problem za SERS jer sloj poroznog silicija služi kao mehanička potpora. No izazov u istraživanjima predstavlja potpuno prevlačenje pora srebrom (ili drugim metalom) bez njihovog začepljivanja. Razlog tome je slaba difuzija srebra na dno pora i reaktivnost PSi prema srebrovoj soli pri čemu dolazi do spontane depozicije srebra koje blokira ulaz u pore. Jednu od metoda kojom se ovaj problem može riješiti predložili su Chan i suradnici.[180] Ukratko, ova metoda uključuje šest koraka od kojih je prvi plazma oksidacija koja sprječava spontano nastajanje srebra jer na površini nastaje silicijev dioksid. Zatim se PSi uranja u 1 M otopinu srebrovog nitrata, a nakon vađenja višak $AgNO_3$ se uklanja dušikom. Porozni Si prekriven $AgNO_3$ tada se suši na 100 °C kako bi se uklonilo otapalo, a srebrov nitrat adsorbirao na zidove pora. Konačni korak je grijanje na 500 °C pri čemu dolazi do termalne dekompozicije $AgNO_3$ na metalno srebro.

2.7 Primjena spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja

Površinski pojačanim Ramanovim raspršenjem značajno se povećava signal inače slabog, ali strukturno bogatog Ramanovog raspršenja. Znanstvenici primjenjuju nekoliko metoda povećanja Ramanovog raspršenja, kao što su stimulirani Ramanov proces ili rezonantno pojačanje, ali najznačajnije pojačanje postiže se upravo SERS-om. SERS je danas vrlo osjetljiva tehnika, a mogućnost kombiniranja s drugim površinskim tehnikama omogućava proučavanje kako u fundamentalnim tako i u primijenjenim područjima istraživanja kao što su biologija, biokemija, elektrokemija, kataliza, korozija, polimeri, napredni materijali i senzori. Snaga SERS-a leži u mogućnosti identifikacije kemijskih vrsta i dobivanju strukturnih informacija u različitim poljima primjene. Ovdje su dani primjeri samo nekoliko zanimljivih primjena SERS-a u različitim područjima.

2.7.1 Medicina

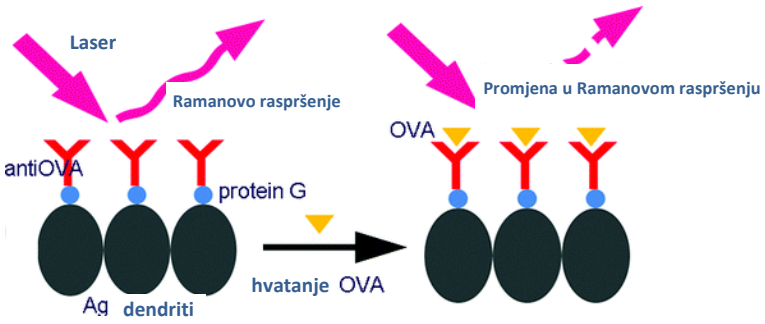
Liu i suradnici koristili su SERS Ag/aluminijev oksid (AAO) sustav za praćenje antibioticima uzrokovanih kemijskih promjena staničnih stijenki bakterija.[181] Njihova metoda omogućava identifikaciju bakterija otpornih na lijekove unutar jednog sata. Slika 27 prikazuje dijagnostiku jedne Gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* dobivenu SERS metodom. Slika 27a prikazuje jednu bakteriju snimljenu pod svjetlosnim mikroskopom pri čemu je SERS signal sniman svakih 10 minuta unutar 90 minuta. SERS profil reflektira molekulski sastav u blizini SERS supstrata, tj. sastav stanične stijenke. Aromatske grupe u staničnoj stijenci obično imaju veliki afinitet prema srebrnim česticama SERS supstrata. Slika 27b prikazuje SERS spektre jedne bakterije S. Aureus prilikom izlaganja antibiotiku vankomicinu koji aktivno uništava staničnu stijenku. SERS profil ukazuje na osjetljivost bakterije na antibiotik.



Slika 27 Dijagnostika jedne bakterije *S. sureus* bazirana na SERS metodi.[181]

2.7.2 Biosenzori

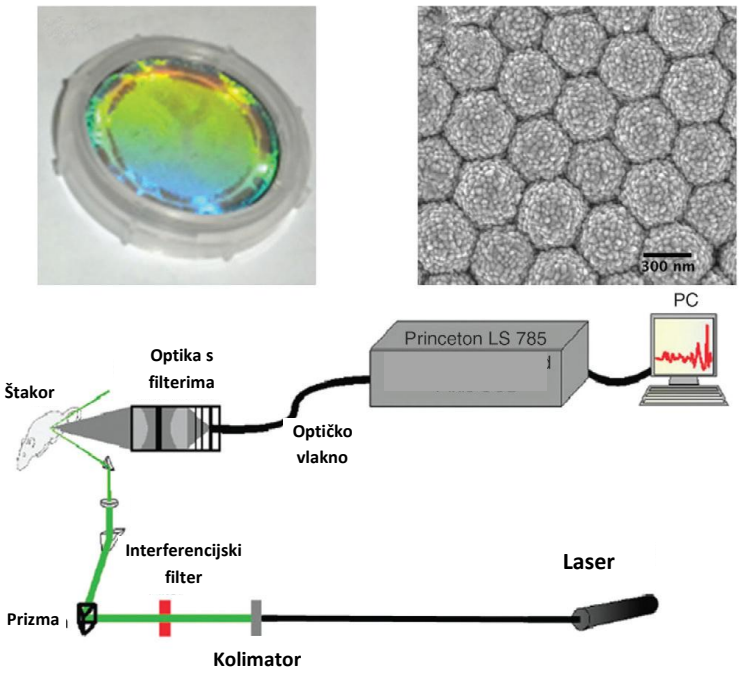
Biosenzor je senzor biološke prirode kod kojeg se analit detektira uslijed geometrijskih i/ili elektronskih promjena koje se dešavaju u različitim molekulama prethodno vezanim na nanostrukturiranu površinu. Biosenzori nisu nužno ograničeni samo na biološke uzorke. Upotreba bioloških materijala je skuplja, ali je opravdana izvanrednom kemijskom selektivnošću i biokompatibilnošću. Dizajn optičkih biosenzora nije jednostavan. Antitijela i nukleinske kiseline zahtijevaju vrlo dobro definirane podloge s obzirom na pH i ionski sastav, a ponekad i temperaturu. Upotreba antitijela kao senzornih elemenata relativno je nova metoda, a temelji se na strukturnim razlikama koje inducira antigen nakon stvaranja kompleksa s antitijelom (Slika 28). Ova se metoda uspješno primjenjuje za analizu malih količina analita u vrlo kompleksnim smjesama bez prethodne separacije ili pročišćavanja. Tako se npr. koristi za određivanje egzogenih proteina u mlijeku, ali i za analizu malih metabolita poput benzoilekgonina, kokainskog biomarkera.[182,183]



Slika 28 Shematski prikaz SERS detekcije ovalbumina (OVA) u mlijeku na Ag dendriti-antitijela kompleksima.[182]

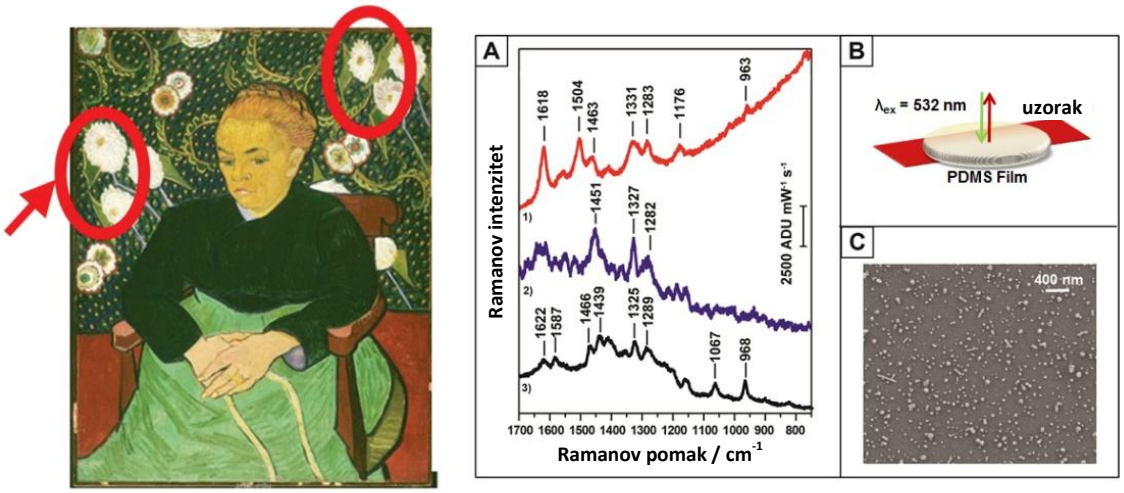
U posljednjih nekoliko godina na važnosti dobiva korištenje aptamera.[184] Aptameri su peptidi ili oligonukleotidi koji se vežu na određene molekule i formiraju jedinstvene sekundarne i tercijarne strukture. Aptamerima se mogu detektirati vrlo male promjene u strukturi ciljane molekule, kao što je prisutnost ili odsutnost određene funkcionalne skupine. Aptameri se mogu generirati za bilo koji ciljani protein, a također se mogu denaturirati i renaturirati.

SERS biosenzori koriste se za otkrivanje bolesti npr. tumora, Alzheimerove bolesti i Parkinsonove bolesti.[185-187] Mnogo je napravljeno na području SERS biosenzora za detekciju glukoze.[188] Dijabetes je značajan zdravstveni problem današnjice. To je bolest u kojoj tijelo ili ne proizvodi vlastiti inzulin (tip I) ili stanice postaju otporne na inzulin (tip II). Dijabetičari moraju kontrolirati razinu glukoze u krvi 3 do 10 puta dnevno. Razvoj *in vivo* senzora za glukozu omogućio bi kontrolu glukoze bez vađenja krvi i tako poboljšao kvalitetu života pacijenata. Van Duyneova grupa ostvarila je bitan napredak u razvoju *in vivo* SERS senzora glukoze. AgFON površina, funkcionalizirana dekantiolom i merkaptoheksanolom (DT/MH) i samoorganizirana u monosloj (SAM), može precizno detektirati glukozu u krvi čak i uz prisutnost drugih analita.[189] Bitan napredak postignut je kombinacijom AgFON DT/MH funkcionaliziranih SERS senzora s prostorno pomaknutom Ramanovom spektroskopijom (engl. *spatially offset Raman spectroscopy*, SORS) čime je dobiven površinski pojačan SORS (SESORS) (Slika 29). Ovakav senzor omogućava mjerenje glukoze u krvi kroz kožu živog štakora (Slika 29c). Implantirani senzori su točni i precizni te mogu mjeriti niske koncentracije glukoze.



Slika 29 a) Ag film (200 nm) na 880 nm Si nanosferama (AgFON); b) SEM prikaz AgFON; c) shematski prikaz SESORS senzora.[44]

2.7.3 Umjetnost



Slika 30 Van Goghova "Gospođa Roulil ljulja kolijevku" (1889). Cvjetovi su originalno obojeni svjetlo ljubičastom bojom eozin Y. A) SERS s PDMS-Ag koloidnim filmom; SERS spektri 10^{-4}M standardne otopine 1) eozina Y, 2) alizarina, 3) karminske kiseline s laserom 532 nm; B) Shematski postav eksperimenta; C) SEM prikaz PDMS-Ag koloidnog filma.[190]

SERS je prikladna metoda za identifikaciju prirodnih boja i premaza koji se nalaze u umjetničkim djelima.[191] U takvim je slučajevima količina uzorka obično svedena na minimum, a fluorescentna pozadina ometa standardna Ramanova mjerenja. Najčešće se

agregirani Ag koloid inkubira s pigmentom. Dobiveni spektar identificira se pretraživanjem spektralnih baza podataka.

Istraživanja na području kulturne baštine uključuju identifikaciju umjetnikovih materijala, otkrivanje krivotvorina te razumijevanje umjetnikove metodologije (Slika 30). U posljednjih se nekoliko godina SERS etablirao kao rutinska tehnika za identifikaciju organske crvene i žute boje u umjetničkim djelima. Razvoj na ovom području ide u smjeru identificiranja boje bez uklanjanja ili uništenja uzorka.

2.7.4 Nanooznake

SERS nanooznake, Au sfere funkcionalizirane molekulama i stavljene u silicijska kućišta mogu se koristiti za označavanje i određivanje autentičnosti različitih objekata. Ove se nanooznake koriste za osiguravanje autentičnosti pojedinih marki (*brand*), npr. za označavanje nakita i luksuzne robe.[192] Također ih se može stavljati u novčanice za vrijeme procesa printanja.[193]

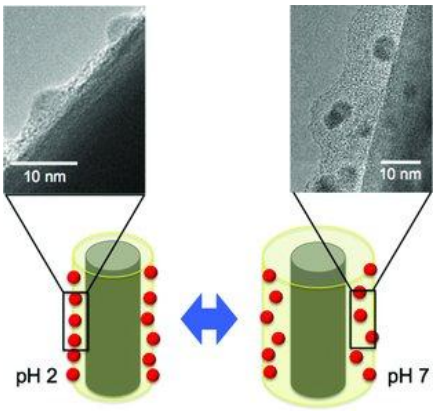
2.7.5 Ispitivanje pogonskih goriva

White i suradnici patentirali su 2007. način pripreme stabilnog i reproducibilnog srebrovog koloida.[194] Koloid je dobiven redukcijom srebrovog nitrata s hidroksilamin fosfatom i ima prosječne dimenzije čestica 20 nm i usku raspodjelu veličina od 10 do 30 nm.[195] Čestice su negativno nabijene jer se na površini nalaze fosfati. Reakcija je brza i odvija se na sobnoj temperaturi. Budući da je sinteza koloida reproducibilna, koloid se danas komercijalno koristi za kontroliranje kvalitete goriva. Nije rijedak slučaj da se goriva razrjeđuju. Kako bi se to spriječilo, u goriva su dodani markeri. White i suradnici razvili su aplikaciju za mjerenje markera u gorivima putem SERS-a kako bi se razotkrila ovakva zlouporaba. SERS instrumenti su prijenosni, daju visoku specifičnost i osjetljivost za markere u gorivima, a analiza je brza čista i neosporna.

2.7.6 Mehaničko hvatanje

Mehaničko hvatanje sastoji se od okruživanja aktivne površine odgovarajućim matriksom koji je sposoban hvatati i zadržati analit. Nakon hvatanja matrica se 'povlači' kemijski ili fizički, čime sve 'zarobljene' molekule nosi prema metalnoj površini. Reverzibilnost procesa određena je interakcijom analita i površine. Analiti s funkcionalnim

grupama koje imaju velik afinitet prema zlatu i srebru vežu se na površinu i time onemogućavaju ponovno korištenje senzora. Analiti sa slabim interakcijama sa zlatnim i srebrnim površinama mogu služiti kao višekratni senzori. Izrada polimernih kompozita s anorganskim nanočesticama za SERS aplikacije dugo je predstavljala problem jer se nije mogao postići zadovoljavajući broj nanočestica u polimeru.[196] Stoga se koriste pristupi poput derivatizacije (engl. *grafting*) polimera izravno na česticama, depozicija 'sloj po sloj', molekularni otisak polimera ili *in situ* redukcija metalnih iona unutar polimera. Najviše se koristi utjecaj pH i temperature te ionske jakosti. Polimer koji se najčešće koristi je poli-*N*-izopropilakrilamid (pNIPAM) koji je osjetljiv na temperaturne promjene.[197] Što se tiče materijala osjetljivih na pH, pokretač sužavanja ili širenja polimera su elektrostatske sile nastale na funkcionalnim skupinama (karboksilne ili amino) kao funkcija koncentracije protona. Npr. ako se detektiraju kationski analiti (amini) najviše se koriste poliakrilne kiseline.[198] Pri visokom pH, polimeri se šire zbog elektrostatskog odbijanja različito ioniziranih karboksilatnih skupina (Slika 31). Kada se pH snizi, karboksilati prelaze u karboksilne kiseline i polimer se sužava zbog stvaranja intra-molekularnih vodikovih veza. U slučaju anionskih analita, polikarboksilni polimeri zamjenjuju se amino polimerima kao što je polilizin.[199]



Slika 31 Shematski prikaz promjene debljine polimera (PAA) pokrenute promjenom pH koja dovodi do različite udaljenosti među česticama.[198]

Molekularni otisak polimera (engl. *molecularly imprinted polymers*, MIP) na nanostrukturiranu plazmonsku površinu sastoji se od depozicije tankog polimernog sloja s analitom ugrađenim u polimerni matriks. Analit se odstranjuje stvarajući prazninu koja savršeno replicira željenu molekulu. Prednost MIP metode je izuzetna selektivnost (po principu ključ-brava), ali su faktori pojačanja relativno slabi. Metoda je pogodna za srednje velike i velike analite, poput beta blokatora propranolola i TNT-a.[200,201]

2.7.7 SERS jedne molekule

Prve eksperiment na SERS-u jedne molekule (engl. *single molecule SERS,* SM SERS) izveli su Nie i Emory.[29] Oni su kombinirali SERS s transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM) i skenirajućom tunelirajućom mikroskopijom (STM) što im je omogućilo proučavanje odnosa između morfologije SERS aktivnih nanočestica i SERS efekta. Uočili su pojačanje Ramanovog signala čak do 10^{15} za jednu molekulu rodamina 6G adsorbiranu na Ag nanočestice. Tako je prije gotovo dvadeset godina SERS omogućio detekciju jedne molekule te na taj način došao do svojih krajnjih granica detekcije.[28] Van Duyneova grupa uvela je izotopološki pristup za potvrdu signala jedne molekule. Koristeći par molekula koji imaju kontrastni izotopni vibracijski potpis, moguće je razlikovati signale koji potječu od jedne od molekula.[202] Na ovaj su način detektirane boje rodamin 6G i *crystal violet* pri čemu su se uspoređivale smjese (50:50) njihovih izotopologa (H u odnosu na D terminirane). Za svaki spektar, dobiven je vibracijski potpis ili deuteriranog ili nedeuteriranog uzorka. Pored opažanja jedne molekule, dobivena su i druga dva važna zaključka: pojedinačna metalna čestica ne može dati SERS signal i nema korelacije između broja nanočestica u agregatu i intenziteta SM SERS signala. Iako je SM SERS postignut i za nerezonantne molekule, uglavnom se koristi za rezonantne boje.[203] Uvođenje tehnike „jedne molekule“ donijelo je novu dimenziju, posebno u biomedicinskim istraživanjima za proučavanje virusa, bakterija, proteina, DNK i RNK.

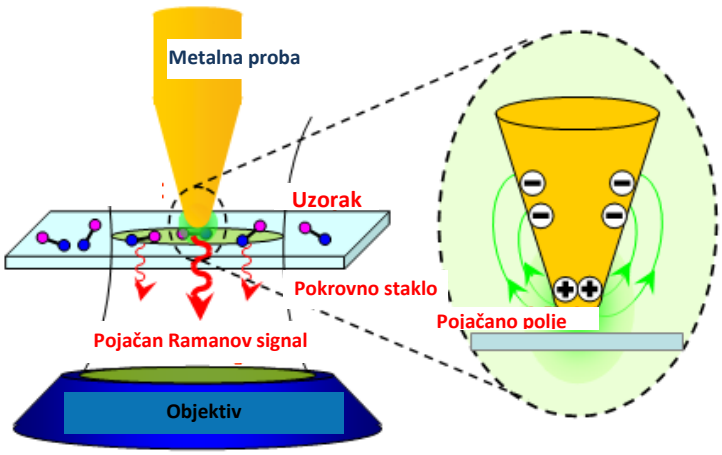
2.7.8 UV SERS

Pobuda SERS-a u području ultraljubičastih frekvencija je relativno neistraženo, ali i vrlo zanimljivo područje koje bi omogućilo rezonantnu detekciju brojnih bioloških molekula, uključujući proteine i DNK. Za većinu metala, uključujući Ag i Au, najveća pojačanja nalaze se u vidljivom (Vis) i bliskom infracrvenom području (NIR). Nekoliko je skupina pokušalo dobiti UV SERS, često s puno teškoća te je postizanje površinskog pojačanja u UV području i dalje izazov.[204,205] Potencijalno korisno bilo bi dobivanje SERS-a u dalekom UV području (DUV) čime bi se omogućilo proučavanje bioloških molekula koje imaju elektronske rezonancije u ovom području valnih duljina. Jedan od izazova UV SERS-a je pronalazak materijala koji dovodi do površinskog pojačanja u UV području. U tu su svrhu proučavani razni plazmonski materijali kao Pd/Pt, Ru, Rh, Co i Al.[204-207] Faktori pojačanja za prijelazne metale su reda veličine 10^2 što je značajno manje u usporedbi s Ag i Au u

vidljivom području. UV SERS je tehnika s puno potencijala, ali i nizom problema koje treba riješiti.

2.7.9 Vrhom pojačana Ramanova spektroskopija (TERS)

Vrhom pojačana Ramanova spektroskopija (engl. *tip-enhanced Raman spectroscopy*, TERS) je metoda visoke osjetljivosti (do jedne molekule) i prostorne rezolucije (~10 nm), kojom se istovremeno dobivaju podaci o topografiji kao i odgovarajuće spektralne informacije o uzorku.[208] Kombinacija informacija iz Ramanove spektroskopije s pojačanjem poznatim iz SERS-a i visoke rezolucije mikroskopije atomskih sila, čini ovu metodu pogodnom za istraživanje velikog broja kemijskih i bioloških uzoraka te različitih modernih materijala.[209] Ova metoda nije destruktivna i provodi se *in situ* te se može koristiti za praćenje raznih bioloških i fizioloških procesa *in vivo* u živoj stanici. U TERS-u je pojačanje elektromagnetskog polja lokalizirano na oštri metalni vrh koji je osvijetljen fokusiranim laserskim snopom (Slika 32). Kad se vrh približava uzorku stvara se lokalizirano područje površinskog pojačanja. To omogućava određivanje strukture i sastava uzorka s rezolucijom od nekoliko nm. Mehanizam pojačanja pripisuje se lokaliziranoj površinskoj plazmonskoj rezonanciji (LSPR) i efektu 'gromobrana'. TERS eksperimenti se obično provode modificiranjem skenirajuće tunelirajuće mikroskopije (engl. *scanning tunneling microscopy*, STM) ili mikroskopije atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*, AFM). TERS je inicijalno napravljen na molekulama boja da bi se kasnije analizirali lanci RNK, ugljikove nanocjevčice te vodikove veze među DNK bazama. [210-212]



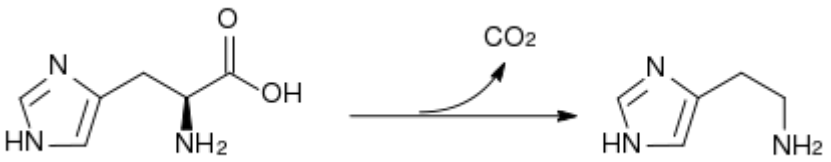
Slika 32 Prikaz vrhom pojačane Ramanove spektroskopije (TERS).[213] Snažno polje stvara se na oštrom metalnom vrhu.

Jedan od problema s kojim se TERS susreće je izračunavanje površine regije u kojoj dolazi do pojačanja, a s time i računanje faktora pojačanja. Drugi je problem nedostatak metode za dobivanje pouzdanih, dugotrajnih i robusnih TERS vrhova. Jedna od grana TERS-a koja daje obećavajuće rezultate je TERS pod visokim vakuumom (engl. *High-Vacuum TERS*).[214]

2.8 Istraživani spojevi

2.8.1 Histamin

Histamin spada u skupinu biogenih amina (BA). Biogeni amini su organske baze s alifatskim (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatskim (tiramin, feniletilamin) ili heterocikličkim (histamin, triptamin) strukturama. To su spojevi relativno malih molekulskih masa koji nastaju mikrobnom aktivnošću koja se prirodno odvija u hrani i pićima.[215] U nefermentiranim namirnicama poput voća, povrća, mesa, mlijeka i ribe, BA su endogenog porijekla i tada se nalaze u niskim koncentracijama. Visoke koncentracije BA mogu se naći u fermentiranoj hrani kao rezultat kontaminirajuće mikroflore. Njihova se aktivnost obično povećava za vrijeme kontrolirane ili spontane mikrobne fermentacije hrane ili tijekom kvarenja hrane. Osnovni put nastajanja biogenih amina je dekarboksilacija slobodnih aminokiselina mikrobnom enzimatskom aktivnošću. Količina i omjer nekih BA može poslužiti kao indikator kvalitete ili higijene hrane. Nekoliko karakterističnih BA indeksa (BAI) izračunava se iz količine najzastupljenijih BA u ribi – histamina (Him), putrescina (Put), kadaverina (Cad), spermidina (Spd), i spermina (Spm). Dodatni BA indeksi računaju se iz količine tiramina (Tym), Put, Him i Cad posebno za procjenu kvalitete tune. Unos miligramskih količina histamina u ljudski organizam, ovisno o pojedincima, može dovesti do sniženog ili povišenog krvnog tlaka, glavobolje ili anafilaktičkog šoka. Pored toga, unos diamina (Put i Cad) može sinergijski povećati toksični učinak histamina. S druge strane, fermentirane namirnice poput sira, kiselog kupusa, suhih kobasica i tzv. orijentalne fermentirane hrane (npr. soja sos ili pasta) dobivaju svoju konačnu teksturu, okus, izgled i pikantnost kao rezultat mikrobiološke fermentacije. Ovisno o početnim kulturama i uvjetima fermentacije neminovno se formiraju biogeni amini.[216] To je također slučaj i za alkoholna fermentirana pića kao što su pivo i vino.



Slika 33 Pretvorba histidina u histamin djelovanjem enzima histidin dekarboksilaze.

Određene bakterije proizvode enzim histidin dikarboksilazu za vrijeme svog rasta. Ovaj enzim reagira s histidinom, aminokiselinom koja se prirodno nalazi u ribljem mesu u većim ili manjim količinama, te stvara histamin (Slika 33). Bakterije stvaraju histamin u širokom temperaturnom rasponu. Nastanak histamina je brži na npr. 20 °C nego na 7 °C, a veoma je brz pri višim temperaturama, npr. 32 °C. Jednom kada je histidin dekarboksilaza prisutna u ribi, nastavlja proizvoditi histamin iako bakterije nisu aktivne. Enzim ostaje stabilan u zaleđenom stanju i može se reaktivirati vrlo brzo nakon otapanja. I enzim i bakterija inaktiviraju se kuhanjem, ali nastali histamin ne može se ukloniti niti kuhanjem niti zaleđivanjem. Propisane kritične granice količine histamina navedene su u odredbama Pravilnika (NN 46/94) i iznose 10 mg histamina na 100 g ribljeg mesa (100 mg/kg) za svježu morsku ribu i 20 mg histamina na 100 g ribljeg mesa za zamrznute morske ribe, riblje konzerve i slične proizvode (200 mg/kg). Ove vrijednosti u skladu su s vrijednostima propisanim u Europskoj uniji.

Biogeni amini najčešće se analiziraju tankoslojnom kromatografijom, plinskom ili tekućinskom kromatografijom, kapilarnom elektroforezom te enzimatskim i radioimunološkim metodama.[217] Danas se najviše koristi tekućinska kromatografija (HPLC). Budući da biogeni amini iz hrane nemaju zadovoljavajuću apsorpciju u vidljivom i ultraljubičastom području, niti imaju fluorescentna svojstva, obično se derivatiziraju prije detekcije. Općenito, uobičajene metode detekcije histamina su složene, skupe i zahtijevaju dosta vremena.

2.8.2 Aflatoksini

Aflatoksini (AF) su grupa hepatotoksičnih, karcinogenih, mutagenih i teratogenih mikotoksina koje proizvode *Aspergillus* sojevi (Slika 39).[218] Postoje četiri osnovna aflatoksina: AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2. Također postoji više od 20 drugih AF derivata, ali se samo četiri spomenuta pojavljuju u hrani. Nakon ulaska u organizam aflatoksini se mogu metabolizirati u jetri u reaktivne epokside ili hidroksilirati te postati manje štetan aflatoksin M1. Među aflatoksinima AFB1 ima najjaču toksičnost i kancerogenost za životinje i ljude te

je svrstan u prvu skupinu karcinogena zato što uzrokuje maligne tumore kod životinja kao i primarni hepatocelularni karcinom u ljudskim populacijama. Toksičnost i karcinogenost AFB1 povezane su s oštećivanjem DNK kao i malformacijama mnogih organa u embrijima. Aflatoksini uzrokuju probleme u poljoprivredi i dovode do značajnih ekonomskih gubitaka. Europska komisija postavila je maksimalne razine aflatoksina u žitaricama i uljaricama namijenjenim životinjskoj i ljudskoj potrošnji. Ove razine variraju ovisno o proizvodu, ali se kreću između 2 i 8 μg/kg za AFB1 te 4 i 15 μg/kg za ukupne aflatoksine.[219]

Trenutno dostupne metode za detekciju aflatoksina, kao što su tekućinska kromatografija (HPLC) i ELISA testovi, vrlo su selektivne i precizne s dovoljno dobrim granicama detekcije. Međutim, ovi postupci nisu praktični zbog dugog vremena analize, visokih troškova i složenosti analize. Stoga se provode brojne studije radi razvoja brze, jednostavne i jeftine metode detekcije AF s visokom osjetljivošću. U tom su pogledu obećavajuće spektroskopske metode zbog svoje brzine, specifičnosti i lake automatizacije.[220]

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Kemikalije

Korištene kemikalije: srebrov nitrat, p.a. (Kemika), trinatrijev citrat dihidrat, p.a. (Kemika), natrijev borhidrid, p.a. (Carlo Erba), DEAE-dekstran hidroklorid (aminodekstran), p.a. (Sigma-Aldrich), β-D(+)-glukoza, p.a. (Sigma-Aldrich), kalijev klorid, p.a. (Kemika), kalijev bromid, p.a. (Kemika), natrijev nitrat, p.a. (Kemika), poli(vinil pirolidon), PVP, M_r 10000, p.a. (Sigma-Aldrich), L-(+)-askorbinska kiselina, p.a. (Kemika), 4-merkaptobenzojeva kiselina, 99% (Sigma-Aldrich), natrijev hidroksid, p.a. (Kemika), klorovodična kiselina (36,5%), p.a. (Kemika), fluorovodična kiselina 48%, p.a. (Sigma-Aldrich), Polybead® polistirenske mikrosfere 1 μm, 2,5% (Polysciences Europe GmbH), Polybead® polistirenske mikrosfere 0,35 μm, 2,5% (Polysciences Europe GmbH), Triton® X-100, p.a. (Merck), etanol, p.a. (Kemika), aceton, p.a. (Kemika), pentan, p.a. (Kemika), 2-propanol, p.a. (Fluka), vodikov peroksid, 30%, p.a. (Gram-mol), nitratna kiselina, 65%, p.a. (Kemika), sumporna kiselina, 96% (Carlo Erba), piridin, p.a. (Kemika), rodamin 6G, p.a. (Exciton), metilensko modrilo, p.a. (Carlo Erba), histamin dihidroklorid, p.a. (Sigma-Aldrich), aflatoksin B_1, p.a. (Sigma-Aldrich), silicij (100), p-tip, dopiran borom, otpornost ~ 0,5-1 Ωcm, silicij (100), p-tip, dopiran borom, otpornost ~ 20 Ωcm.

3.2 Priprema i čišćenje uzoraka

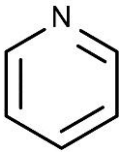
Laboratorijsko posuđe za pripravu koloida i mjerenje uzoraka oprano je otopinom deterdženta (Kemex), krom sumpornom kiselinom (zasićena vodena otopina kalijeva ili natrijeva dikromata pomiješana s koncentriranom sumpornom kiselinom), isprano običnom vodom, destiliranom vodom te deioniziranom vodom i potom ostavljeno preko noći u sušioniku na 105 ºC. U pokusima je korištena deionizirana voda otpornosti 18 MΩcm.

Uzorci za jetkanje (Si), kao i uzorci za depoziciju polistirenskih nanosfera (SiO_2) čišćeni su u ultrazvučnoj kupelji 15 minuta prvo u acetonu, a zatim u etanolu. Uzorci za koje je bio potrebno da su hidrofilni stavljeni su u ultrazvučnu kupelj 1 h u 2%-tnu otopinu NaOH. Nakon toga, uzorci su sonicirani u otopini H_2O:NH_4OH:H_2O_2=5:1:1 pri temperaturi od 80 ºC 20 minuta. Ova je otopina dio standardne RCA metode za čišćenje uzoraka, a također se koristi za dobivanje hidrofilnih površina. Uzorci su nakon čišćenja isprani velikom količinom redestilirane vode, a uzorci za koje je bio potrebno da ostanu hidrofilni

skladišteni su u redestiliranoj vodi. Si pločice za pripremu poroznog silicija čišćene su standardnom RCA metodom. Nakon soniciranja u otopini H_2O:NH_4OH:H_2O_2=5:1:1 (SC1) pri temperaturi od 80 ºC 20 minuta, uzorci su sonicirani 20 minuta u otopini H_2O:HCl:H_2O_2=5:1:1 (SC2) pri temperaturi od 80 ºC. SC1 služi za čišćenje organskih ostataka kao i uklanjanje čestica, čak i onih netopljivih. SC2 tretman učinkovito uklanja zaostale metalne ione.

3.3 Testne molekule

3.3.1 Piridin

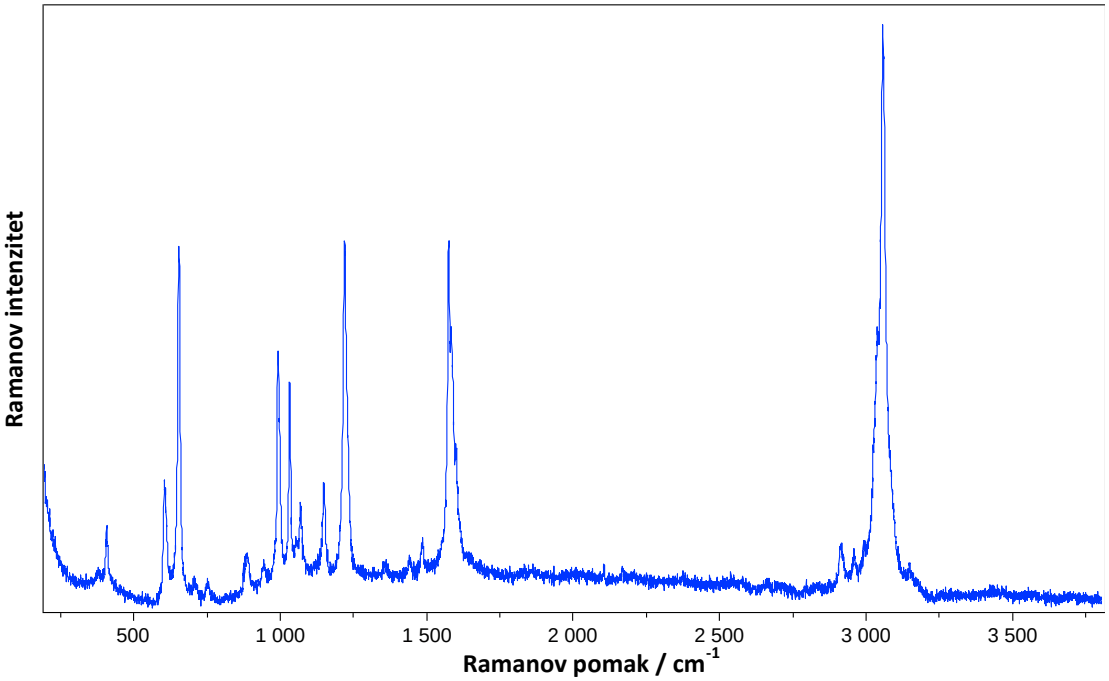


Slika 34 Struktura molekule piridina.

Piridin je aromatski spoj koji se koristi kao otapalo (Slika 34). Često se koristi za demonstraciju SERS-a zbog dobre adsorpcije na metalne površine. Također je atmosferski zagađivač i nalazi se u dimu cigareta. Maksimum UV apsorpcije piridina nalazi se između 330 i 350 nm. Ramanov spektar piridina snimljen je stavljanjem čistog uzorka (12,35 M) u kivetu u makro komoru spektrometra i prikazan je na Slici 35. U Tablici 6 dane su neke karakteristične Ramanove vibracije piridina.

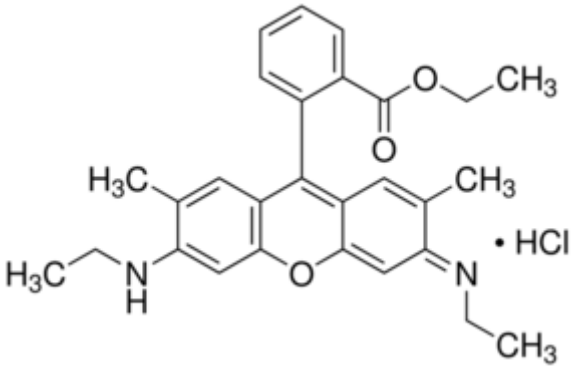
Tablica 6 Karakteristični Ramanovi modovi piridina.

Ramanov pomak / cm^{-1}	Vibracija
647	Deformacija prstena
987	Disanje prstena
1030	Trigonalno disanje prstena
1215	Vibracija prstena
1575	C=C istezanje



Slika 35 Ramanov spektar piridina (vrijeme snimanja 10 s).

3.3.2 Rodamin 6G



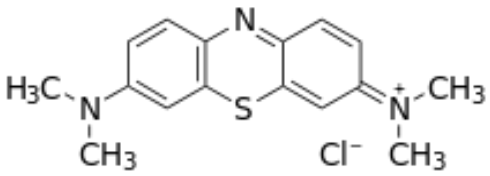
Slika 36 Struktura molekule rodamina 6G.

Rodamin 6G (R6G) pripada skupini jako fluorescentnih rodaminskih boja (Slika 36). Najčešća mu je forma rodaminov 6G klorid, kemijske formule $C_{27}H_{29}ClN_2O_3$. Apsorpcijski maksimum roadmina 6G nalazi se na približno 530 nm. U Tablici 7 dane su neke karakteristične Ramanove vibracije rodamina 6G.

Tablica 7 Karakteristični Ramanovi modovi rodamina 6G.

Ramanov pomak / cm^{-1}	Vibracija
614	C-C-C savijanje prstena u ravnini
776	C-H savijanje izvan ravnine
1130	C-H savijanje u ravnini
1270	C-O-C rastezanje
1365	Aromatsko C-C rastezanje
1509	Aromatsko C-C rastezanje
1575	Aromatsko C-C rastezanje
1652	Aromatsko C-C rastezanje

3.3.3 Metilensko modrilo



Slika 37 Struktura molekule metilenskog modrila.

Metilensko modrilo (MB) je heterociklički aromatski spoj molekulske formule $C_{16}H_{18}N_3SCl$ (Slika 37). Koristi se u različitim područjima, a posebno u medicini i biologiji. Maksimum apsorpcije nalazi mu se na približno 670 nm, ali apsorpcija ovisi o protonaciji, adsorpciji na druge materijale te stvaranju dimera i drugih agregata. Neke od karakterističnih Ramanovih vibracija metilenskog modrila dane su u Tablici 8.

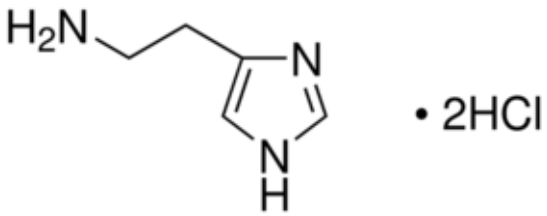
Tablica 8 Karakteristični Ramanovi modovi metilenskog modrila.

Ramanov pomak / cm^{-1}	Vibracija
445	C-N-C deformacija skeleta
1390	Simetrično C-N rastezanje
1442	Nesimetrično C-N rastezanje
1620	Rastezanje prstena

3.4 Istraživani spojevi

3.4.1 Histamin

Histamin (Slika 38) je amin koji u tijelu nastaje iz aminokiseline histidina kao dio lokalnog imunološkog odgovora. Histamin također obavlja nekoliko važnih funkcija u crijevima te djeluje kao neurotransmiter. Histamin dihidroklorid topljiv je u vodi, metanolu i etanolu. Apsorpcijski spektar histamina pokazuje maksimum na 211 nm. Ramanov spektar histamin dihidroklorida snimljen je na prahu i u vodenoj otopini (Slika 88), a karakteristične Ramanove vibracije histamina dane su u Tablici 9.



Slika 38 Struktura molekule histamin dihidroklorida.

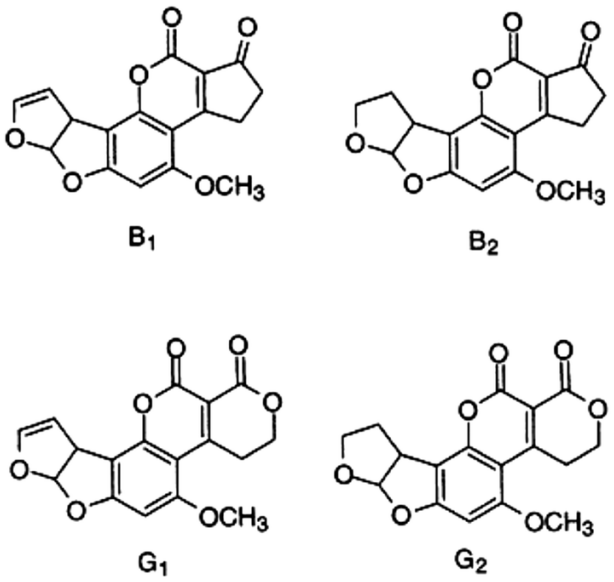
Tablica 9 Karakteristični Ramanovi modovi histamina.

Ramanov pomak / cm^{-1}	Vibracija
958	N-H savijanje izvan ravnine
989	C-H savijanje izvan ravnine
1170	Rastezanje prstena
1474	Rastezanje prstena
2913	C-H (C-H_2) istezanje
2938	C-H (C-H_2) istezanje
3118	C-H (C-H_2) istezanje

3.4.2 Aflatoksin B1

Aflatoksin B1 (Slika 39) spada u grupu mikotoksina koje proizvode *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus*. AFB1 je najviše hepatotoksičan i hepatokarcinogen od svih aflatoksina te se pojavljuje kao kontaminant u različitim vrstama hrane. AFB1 je bezbojan

do blijedo žuti kristal ili prah koji ima fluorescenciju u plavom području. Neke SERS vrpce AFB1 nalaze se u Tablici 10.



Slika 39 Strukture molekula aflatoksina.

Tablica 10 Karakteristične SERS vrpce aflatoksina B1 prema.[220]

Ramanov pomak / cm^{-1}	Vibracija
624	Deformacija prstena
752	C -H savijanje izvan ravnine
934	Disanje prstena
1086	C-C-C deformacija prstena
1147	C-H istezanje
1249	C-H_2 istezanje (prsten)
1274	C-H deformacija prstena
1303	C-H_2 istezanje (prsten)

3.5 Priprava koloidnih suspenzija srebra

3.5.1 Priprema srebrnih nanočestica korištenjem citrata (AGC)

Koloidna suspenzija srebra AGC pripravljena je redukcijom srebrova nitrata s trinatrijevim citratom prema izmijenjenom Lee-Meiselovom postupku.[60] Srebrov nitrat (90 mg) otopljen je u deioniziranoj vodi (500 cm^3) te je otopina zagrijana do vrenja (120 ºC) u trogrloj tikvici koja se nalazila na uljnoj kupelji (Slika 40). U vruću otopinu dodana je 1%-tna otopina trinatrijevog citrata (50 cm^3) te je reakcijska smjesa miješana 90 minuta uz refluks i propuhivanje s dušikom. Za vrijeme hlađenja na sobnu temperaturu otopina je i dalje miješana.



Slika 40 Priprema srebrnih nanočestica redukcijom s citratima u uljnoj kupelji.

3.5.2 Priprema srebrnih nanočestica korištenjem askorbinske kiseline (AGA)

Koloidna suspenzija srebra AGA pripremljena je redukcijom srebrova nitrata s askorbinskom kiselinom uz citrat kao stabilizirajuće sredstvo. Vodenoj otopini od 160 cm^3 koja je sadržavala askorbinsku kiselinu ($6{,}0\times10^{-4}$ M) i trinatrijev citrat ($3{,}0\times10^{-3}$ M) namješten je pH na 9-10 korištenjem 1 M NaOH. Ova je otopina držana na temperaturi od 30 ºC na uljnoj kupelji te joj je uz miješanje dodano 1,6 cm^3 0,1 M srebrovog nitrata. Nakon 15 minuta uočena je promjena boje otopine iz bezbojne u smeđu što je značilo da je reakcija nastajanja nanočestica gotova.

3.5.3 Priprema srebrnih nanočestica korištenjem borhidrida (AGBH)

Koloidna suspenzija srebra AGBH pripremljena je redukcijom srebrova nitrata s natrijevim borhidridom. Natrijev borhidrid dodan je u velikom suvišku kako bi osim redukcije srebra služio i za stabilizaciju nastalih nanočestica. 30 cm^3 0,002 M natrijevog

borhidrida stavljeno je u Erlenmeyerovu tikvicu na ledenu kupelj uz konstantno miješanje 30 minuta. 10 cm^3 0,001 M srebrovog nitrata dodano je kap po kap u otopinu borhidrida. Miješanje je zaustavljeno čim je dodan sav $AgNO_3$. Otopina je promijenila boju iz bezbojne u žutu.

3.5.4 Priprema srebrnih nanočestica korištenjem aminodekstrana (AGD)

Koloidna suspenzija srebra AGD pripremljena je korištenjem borhidrida kao reducirajućeg sredstva uz prisutnost aminodekstrana kao stabilizatora. 0,204 g aminodekstrana otopljeno je u 12 cm^3 50 mM vodene otopine $AgNO_3$. Ova je otopina miješana dok nije postala homogena. Tako pripremljena otopina dodavana je kap po kap u 48 cm^3 svježe pripremljenog 20 mM $NaBH_4$ koji je hlađen na ledenoj kupelji. Za vrijeme dodavanja reakcijska smjesa je snažno miješana na magnetskoj miješalici. Uočena je promjena boje iz bezbojne u svjetlo žutu pa potom u tamno zelenu.

3.5.5 Priprema srebrnih nanočestica korištenjem PVP-a (AGP)

Koloidna suspenzija srebra AGP pripremljena je otapanjem 2,5 g polivinilpirolidona u 50 cm^3 vode te dodavanjem 2,55 g srebrovog nitrata na sobnoj temperaturi. Unutar 2 sata koliko je trajala reakcija, otopina je promijenila boju iz svjetlo žute u tamno smeđu.

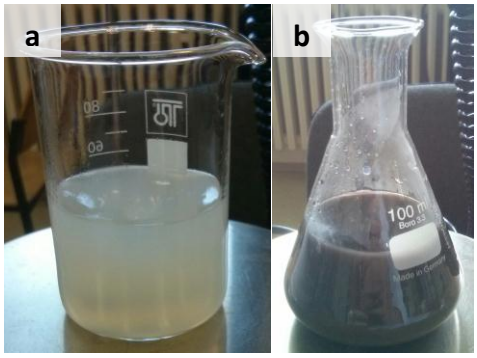
3.5.6 Priprema srebrnih nanočestica korištenjem glukoze (AGG)

Koloidna suspenzija srebra AGG pripremljena je reduciranjem srebrovog nitrata s glukozom u vodenoj otopini PVP-a uz NaOH koji ubrzava reakciju. Otopina PVP-a pripremljena je otapanjem PVP-a, glukoze i NaOH u 15 cm^3 vode. Ova je otopina uz miješanje zagrijana na 60 °C. 5 cm^3 0,01 M otopine srebrovog nitrata dodano je u PVP otopinu kap po kap. Nakon dodatka $AgNO_3$ reakcijska smjesa je miješana još 10 minuta. Konačna boja otopine bila je tamno crvena.

3.5.7 Priprema srebrnih nanočestica „cvjetnog“ izgleda (AGF)

Ova je koloidna otopina pripremljena tako da je 20 mL 1 mM otopine 4-merkaptobenzojeve kiseline (MBA) u etanolu pomiješano s 20 mL vodene otopine $AgNO_3$ (10 mM) uz konstantno miješanje.[221] Nakon 5 minuta dodano je 10 mL trinatrijevog citrat dihidrata (30 mM) te je sve miješano još 5 minuta. Na kraju je uz miješanje dodano 20 mL svježe pripremljene L-askorbinske kiseline (10 mM) te se miješanje nastavilo na sobnoj temperaturi još 5 minuta. Nakon toga, otopina je ostavljena da stoji još 1 sat (Slika 41). Nastale nanočestice su centrifugirane te ispirane više puta s vodom i s etanolom (5 min,

6000 okr/min) kako bi se uklonili neželjeni surfaktanti, posebno merkaptobenzojeva kiselina. Nakon ispiranja nanočestice su osušene u vakuum sušioniku te po potrebi redispergirane u odgovarajućem volumenu vode. Ramanovi spektri koloidnih suspenzija prije i nakon ispiranja etanolom prikazani su na Slici P2 u prilogu.



Slika 41 Izgled a) otopine nakon miješanja MBA i srebrovog nitrata i b) konačne suspenzije.

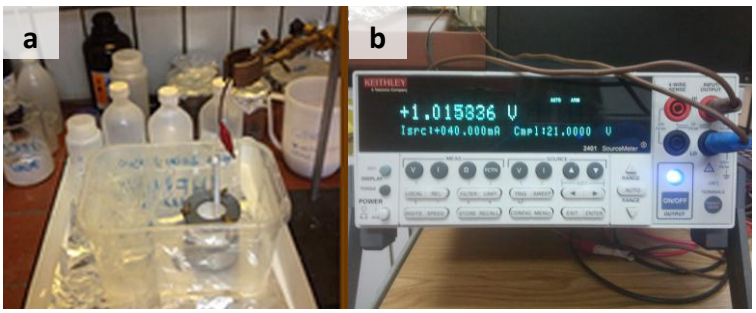
3.5.8 Priprema zlatnih nanočestica (AUC)

Koloid zlata pripravljen je redukcijom tetrakloroauratne(III) kiseline s trinatrijevim citratom korištenjem modificirane Lee-Meiselove metode.[60] U 10 mL deionizirane vode dodano je 20,5 μL 4 % otopine $HAuCl_4 \times 3\ H_2O$ te je otopina zagrijana do vrenja uz refluks i konstantno miješanje. U otopinu je zatim dodano 200 μL trinatrijevog citrata (1 %) i nakon 3 minute otopina je stavljena na ledenu kupelj te je nastala bistra intenzivno crvena suspenzija zlata.

Pripremljenim koloidnim suspenzijama izmjerena je pH vrijednost (Tablica 11) i snimljeni su UV/Vis spektri (Slika 49). Ramanovi spektri pripremljenih koloidnih suspenzija prikazani su na Slici P1 u prilogu. Široka vrpca između 3100 i 3600 cm^{-1} odgovara istezanju O-H veza vode.[222]

3.6 Priprema poroznog silicija

U svim eksperimentima porozni silicij je dobiven elektrokemijskim jetkanjem silicijevih pločica u fluorovodičnoj kiselini i pri određenoj gustoći struje. Elektrokemijska ćelija za jetkanje izrađena je od teflona, a napravljena je u Laboratoriju za molekulsku fiziku Instituta Ruđer Bošković. U elektrokemijskoj ćeliji silicij je anoda, dok je Pt žica katoda. Ćelija je dizajnirana tako da je područje jetkanja 2 cm^2. Prethodno očišćeni komadić kristalnog silicija (2,5 × 2,5 cm) smješten je na teflonski stalak oko 4 mm ispod isprepletene mreže od platine. Si pločica pažljivo je pričvršćena na mjesto pomoću O ringa. U ćeliju je potom stavljena odgovarajuća koncentracija fluorovodične kiseline. Keithley izvor korišten je za dobivanje konstantne struje (Slika 42).



Slika 42 a) Ćelija za elektrokemijsko jetkanje u plastičnoj posudi i b) uređaj Keithley za kontrolu struje i napona prilikom elektrokemijskog jetkanja.

3.6.1 Priprema uzoraka makroporoznog silicija

Silicijeve pločice (*waferi*) (100) p-tipa (dopirane borom) s otpornosti ~20 Ωcm i 525 ± 25 μm debljine izrezane su na komade ~2,5 × 2,5 cm te čišćene prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2. Elektrokemijski eksperimenti napravljeni su u teflonskoj ćeliji domaće izrade u 12% otopini fluorovodične kiseline u etanolu. Radna elektroda je silicijeva pločica dok je protuelektroda žica od platine. Električni kontakt na stražnjoj strani komada silicija napravljen je utrljavanjem Ga/In paste u prethodno izgrebane utore na Si pločici te premazivanjem srebrnim lakom. Gustoće struje kretale su se od 4 do 10 mA/cm^2 unutar 15 ili 30 minuta. Ovako pripremljeni porozni Si ispran je etanolom i osušen u struji dušika. Ovom metodom dobiven je porozni Si sa širinom pora većom od 50 nm što ga svrstava u kategoriju makroporoznog silicija.

3.6.1.1 ***Priprema SERS supstrata na makroporoznom Si***

3.6.1.1.1 Uranjanje u otopinu srebrovog nitrata (engl. immersion plating*)*

Kod ove depozicije srebra na makroporozni Si, uzorci PSi uronjeni su u 0,01 i 0,001 M otopinu srebrovog nitrata ($AgNO_3$). Ispitana su različita vremena uranjanja: 1, 2, 3, 4 i 5 minuta. Nakon uranjanja uzorci PSi isprani su vodom i osušeni na zraku pri sobnoj temperaturi.

3.6.1.1.2 Apliciranje koloidne suspenzije (engl. drop casting*)*

U slučaju apliciranja koloidne otopine, kap prethodno pripremljene koloidne suspenzije (AGC) stavljena je na makroporozni Si i osušena na sobnoj temperaturi. Koloidna suspenzije pripremljena je na način opisan u poglavlju 3.5.2.

3.6.1.1.3 Pulsna laserska ablacija (engl. pulsed laser ablation, PLA*)*

Srebrne i zlatne nanočestice na makrporoznom Si dobivene su pulsnom laserskom ablacijom krute mete u kontroliranoj Ar atmosferi (Slika 43). Uvjeti depozicije za ovaj eksperiment odabrani su temeljem prijašnjih studija uz korištenje KrF lasera (λ=248 nm, širina pulsa 25 ns, brzina ponavljanja 10 Hz).[223-225] Srebrne i zlatne mete pozicionirane su unutar vakuumske komore na rotirajućem držaču. Uzorci makroporoznog Si smješteni su na udaljenost od 35 mm od mete. Ar tlak bio je 70 Pa za depoziciju srebra i 100 Pa za depoziciju zlata. Gustoća energije lasera bila je otprilike 2,0 ± 0,2 Jcm^{-2}. Depozicija srebra izvedena je s 30000 i 45000 laserskih pulseva, dok je za depoziciju zlata upotrijebljeno 30000 laserskih pulseva. Na ravnim površinama s navedenim uvjetima morfologija dobivenih struktura odgovara uniformnoj raspodjeli gotovo sferičnih nanočestica. Ovdje se mogu očekivati drugačija uređenja nanočestica zbog specifične površinske morfologije makroporoznog Si.



Slika 43 Uređaj za pulsnu lasersku ablaciju (IPCF, Messina, Italija); umetnuta slika prikazuje uzorke neposredno prije pulsne laserske ablacije.

3.6.2 Priprema uzoraka mezoporoznog silicija i depozicija srebra

Silicijeve pločice (100) p-tipa (dopirane borom) s otpornosti ~0,5-1 Ωcm izrezane su na komade ~2,5 × 2,5 cm te čišćene prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2 i jetkane kao što je opisano u poglavlju 3.6.1. Elektrokemijsko jetkanje trajalo je 15 min u 12 % HF. Korištene su gustoće struje 0,5, 1, 2, 5, 8, 10, 12, 15, 20, 30 i 40 mA/cm^2. Ovom je metodom dobiven mezoporozni Si ($2 < \varphi \leq 50$ nm). Pripremljeni mezoporozni Si koji nije bio svježe pripremljen (kao i uzorci kristalnog Si) umočen je 1 min u 2 % HF/EtOH otopinu kako bi se uklonio oksidni sloj. Uzorci su isprani etanolom prije uranjanja u otopinu $AgNO_3$.

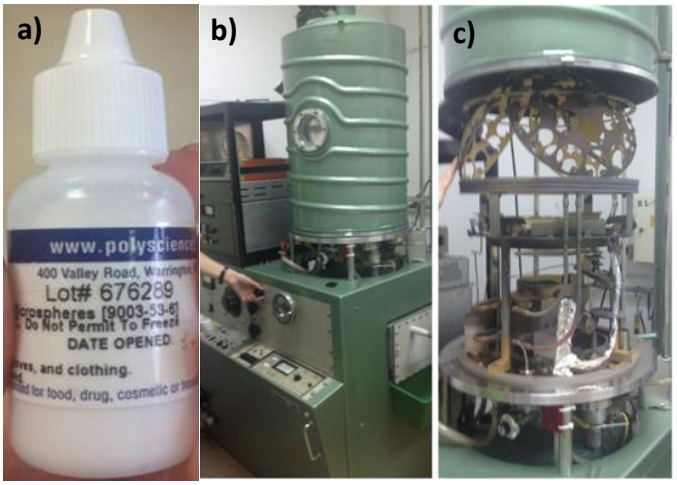
Srebro je deponirano na površinu mezoporoznog Si uranjanjem uzoraka u 0,01 M i 0,001 M otopinu srebrovog nitrata pri sobnoj temperaturi. Vremena uranjanja bila su 30, 60, 90, 120 i 300 s. Nakon uranjanja, uzorci mezoporoznog Si isprani su vodom i osušeni u struji dušika.

3.7 Priprema AgFON podloga

Kao podloga za depoziciju uređenih slojeva polistirenskih mikrosfera korištena su mikroskopska stakalca koja su prethodno izrezana na dijelove 1,25 × 2,5 cm te očišćena metodom opisanom u poglavlju 3.2. Kako je bilo potrebno da ovako očišćena stakalca ostanu hidrofilna do same depozicije mikrosfera, ona su čuvana u deioniziranoj vodi. Stakalca su izvađena iz vode neposredno prije eksperimenta kako bi ostala što više namočena.

Monodisperzne polistirenske sfere su koloidna suspenzija mliječno bijele boje kod koje same sfere na površini imaju slabi anionski naboj koji potječe od sulfatnih estera (Slika 44a). Polistirenske mikrosfere razrijeđene su s metanolom u koji je dodana otopina TritonX 100 u omjeru 1:400. Osim mikrosfera veličine 350 i 1000 nm, na krutu je podlogu aplicirana i smjesa obje veličine mikrosfera (16 μL mikrosfera od 1000 nm + 9 μL mikrosfera od 350 nm). Nakon aplikacije kapljice (engl. *drop coating*) odgovarajućeg volumena sfera na stakalce, kapljica je pomoću pincete blagim kružnim pokretima razlivena po cijeloj površini stakalca. Tako pripremljeno stakalce stavljeno je na ravnu podlogu u vakuum u atmosferu etanola na sušenje pri sobnoj temperaturi.

Nakon što su se podloge osušile, na njih su napareni filmovi srebra u različitim debljinama (Slika 44b i c). Na mikrosfere 1000 nm napareni su filmovi srebra debljine 120, 180 i 240 nm, dok su na mikrosfere veličine 350 nm, kao i na kombinaciju dvije veličine sfera, napareni slojevi srebra 80, 120, 160 i 200 nm.



Slika 44 a) Komercijalna suspenzija mikrosfera; b) i c) evaporator za depoziciju filmova srebra i zlata.

3.8 Priprema uzoraka za SERS mjerenja

3.8.1 Priprema analita u koloidnoj suspenziji

Koloidne suspenzije čuvane su na 4 °C, ali su prije snimanja Ramanovih spektara ostavljene na sobnoj temperaturi oko sat vremena. Neposredno prije korištenja lagano su promiješane kako bi se izbjegli efekti sedimentacije. Za dobivanje jednake koncentracije koloida u svrhu eksperimenata, uzorci AGD, AGP i AGG razrijeđeni su ultračistom vodom te su novonastali uzorci označani redom imenima AGDd, AGPd i AGGd. Koloid AGBH je istaložen centrifugiranjem (12000 rpm, 15 min) i redispergiran u manjem volumenu ultračiste vode (AGBHc).

Uzorci za SERS mjerenja pripremljeni su prije samog mjerenja. U plastičnu Eppendorf epruvetu mikropipetom je stavljeno 80 μL odgovarajućeg koloida i 10 μL agregirajućeg sredstva. Sustav je miješan trideset sekundi na miješalici (*vortex*) te je potom dodano 10 μL otopine analita i sve je ponovno miješano 30 sekundi. Pomoću šprice i tanke igle pripremljeni uzorak stavljen je u staklenu kapilaru (25 × 2 mm), a kapilara je stavljena u komoru Ramanovog spektrometra prilagođenu za snimanje tekućih uzoraka.

3.8.2 Priprema analita na krutim podlogama

Neposredno prije mjerenja određeni volumen analita (1 – 10 μL) mikropipetom je apliciran na krutu podlogu. Nakon sušenja kapljice, uzorak je stavljen pod mikroskop Ramanovog spektrometra. U nekim je slučajevima snimanje napravljeno prije nego se kapljica analita osušila. U pojedinim se slučajevima pokazalo pogodno inkubiranje analita sa SERS podlogom. U tu je svrhu porozni Si izrezan na manje komade (1,5 × 1,5 mm) i stavljen u eppendorf epruvetu u kojoj se nalazila otopina analita određene koncentracije te je ostavljen da stoji u otopini najmanje 20 minuta. Testirano je šest različitih vremena inkubacije (5, 15, 30, 60, 90 i 120 min) za 10^{-6} M R6G na poroznom Si prekrivenom s Ag. Najbolji Ramanov intenzitet postignut je za inkubaciju od 30 minuta (Slika P3 u prilogu). Inkubacije od 5, 15, 60 i 90 min dale su približno jednak signal, a inkubacija od 120 min rezultirala je najslabijim signalom. Stoga je za daljnja istraživanja korišteno vrijeme inkubacije od 30 minuta.

Kao testne molekule korišteni su piridin, rodamin 6G (R6G) i metilensko modrilo (MB). Raspon testiranih koncentracija bio je od 10^{-4} do 10^{-12} M za R6G i metilensko modrilo te 12 do 1,2 × 10^{-6} M za piridin. Kod piridina promatrane su dvije karakteristične SERS

vrpce na 1002 i 1036 cm^{-1}.[226] Područje snimanja spektara za R6G najčešće je bilo 300 – 1000 cm^{-1} gdje se nalaze neke od intenzivnijih vrpci rodamina (Tablica 7).[227] Područje interesa za MB bilo je 400 – 1800 cm^{-1} gdje se nalaze njegove karakteristične vrpce (Tablica 8).[228]

3.9 Mjerni uređaji

Kako bi se utvrdila fizikalno-kemijska svojstva pripremljenih nanočestica korištene su niže opisane tehnike.

3.9.1 Snimanje UV/Vis apsorpcijskih spektara

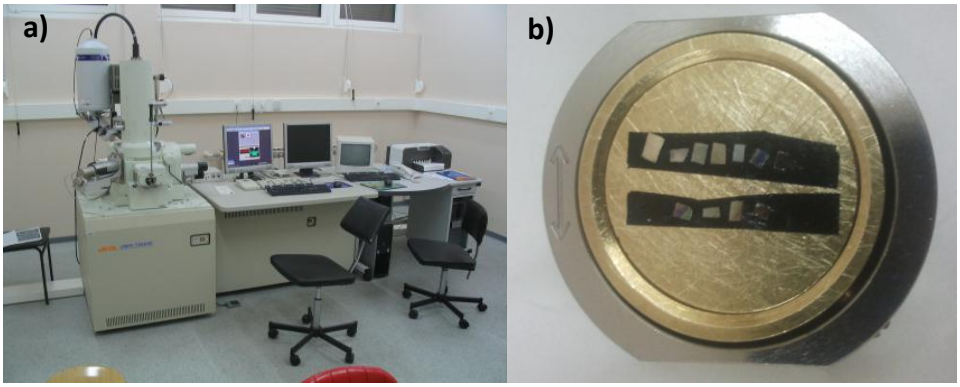
Apsorpcijski spektri koloidnih suspenzija srebra i zlata snimljeni su pomoću UV/Vis/NIR spektrofotometra (UV-3600, Shimadzu) na sobnoj temperaturi. Za mjerenja su korištene kvarcne kivete duljine puta zračenja 1,00 cm. Spektri su snimani u području između 200 i 1200 nm uz razlučivanje 1 nm.

3.9.2 Određivanje pH vrijednosti

Za mjerenja pH vrijednosti koloidnih suspenzija korišten je pH-metar s elektrodom. pH-metar je prije mjerenja baždaren otopinama pufera pH 4,005 i 7,00.

3.9.3 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Morfologija nanočestica određena je skenirajućim elektronskim mikroskopom (FE SEM, field emission scanning electron microscope, Jeol JSM 7000F) spojenim s energijskim disperzivnim spektrometrom (EDS, *Energy-dispersive spectroscopy*) (Slika 45a). Za koloidne suspenzije 10 μL suspenzije pipetirano je na silicijevu pločicu i osušeno pri sobnim uvjetima. Za krute podloge uzorak je ili direktno zalijepljen na nosač uzoraka ili izrezan na manje dijelove (Slika 45b). Korištenjem kompjuterskog programa ImageJ i modificiranog algoritma određene su veličina i raspodjela veličine čestica.[229]



Slika 45 a) Skenirajući elektronski mikroskop Jeol JSM 7000F; b) uzorci poroznog Si pripremljeni za skenirajući elektronski mikroskop.

3.9.4 Transmisijska elektronska mikroskopija

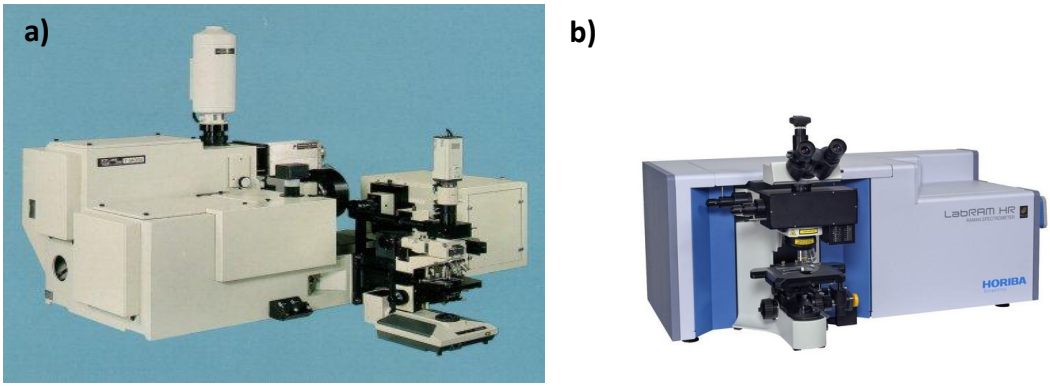
TEM (engl. *transmission electron microscopy*) mikrografije dobivene su korištenjem Zeiss EM mikroskopa. Uzorci za snimanje TEM slika pripremljeni su nanošenjem kapi suspenzije na ugljikom prevučenu bakrenu mrežicu i sušenjem pri sobnoj temperaturi.

3.9.5 Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS)

Metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS, engl. *Dynamic light scattering*) na Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) opremljenom sa zelenim laserom (532 nm) određena je raspodjela veličine dobivenih koloidnih čestica. Korištene su raspodjele po volumenu, a kao rezultat je prikazana srednja vrijednost šest mjerenja. Za vrijednost Zeta potencijala korištena je srednja vrijednost barem šest mjerenja.

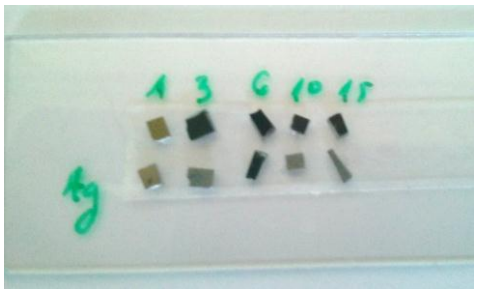
3.9.6 Snimanje Ramanovih i SERS spektara

U Laboratoriju za molekulsku fiziku Instituta Ruđer Bošković nalazi se Ramanov spektrometar T64000 tvrtke Horiba Jobin Yvon u kojeg je integriran trostruki spektrometar (Slika 46). T64000 može raditi u tri različita moda: dvostruki subtraktivni koji služi za mjerenje vrpci na niskim frekvencijama (obično od 2 do 5 cm^{-1}), trostruki aditivni (fokalna udaljenost 3×640 mm za ultravisoku spektralnu rezoluciju < 0,15 cm^{-1}) i direktni jednostruki spektrometar za veliki protok uzoraka sa slabim raspršenjem te za fluorescentna mjerenja.



Slika 46 Ramanovi spektrometri a) Horiba Jobin Yvon T64000 i b) HR800.

Ramanovi i SERS spektri snimljeni su Horiba Jobin Yvon HR800 i Horiba Jobin Yvon T64000 Ramanovim spektrometrima. Kao izvori zračenja korišteni su argonski laser, koji je emitirao zračenje pri 488 i 514,5 nm, diodni laser, koji je emitirao zračenje pri 532 nm te He-Ne laser s emisijom na 632,8 i 785 nm. U slučaju korištenja 'makro' komore spektrometra laserska zraka fokusirana je s lećom 100 mm u 90º geometriji. Snaga lasera na uzorku bila je oko 60 mW. Ramanova mjerenja napravljena su pri sobnoj temperaturi (Slika 47). Osim gdje je drugačije navedeno, spektri su snimani u triplikatu s vremenom snimanja između 1 i 30 s. Zbog smanjenja fotodegradacije uzoraka upotrijebljeni su filteri kako bi snaga lasera bila mala: oko 6 mW za 514,5 nm i 6 µW za 632,8 nm pobudu, osim ako je drugačije navedeno. Prilikom snimanja spektara s mikroskopom korišten je 100 × objektiv što je rezultiralo probnom površinom oko 1 mikrona.



Slika 47 Uzorci poroznog silicija (prvi red uzoraka bez deponiranog srebra i drugi red uzoraka s Ag) spremni za mjerenje Ramanovom spektroskopijom.

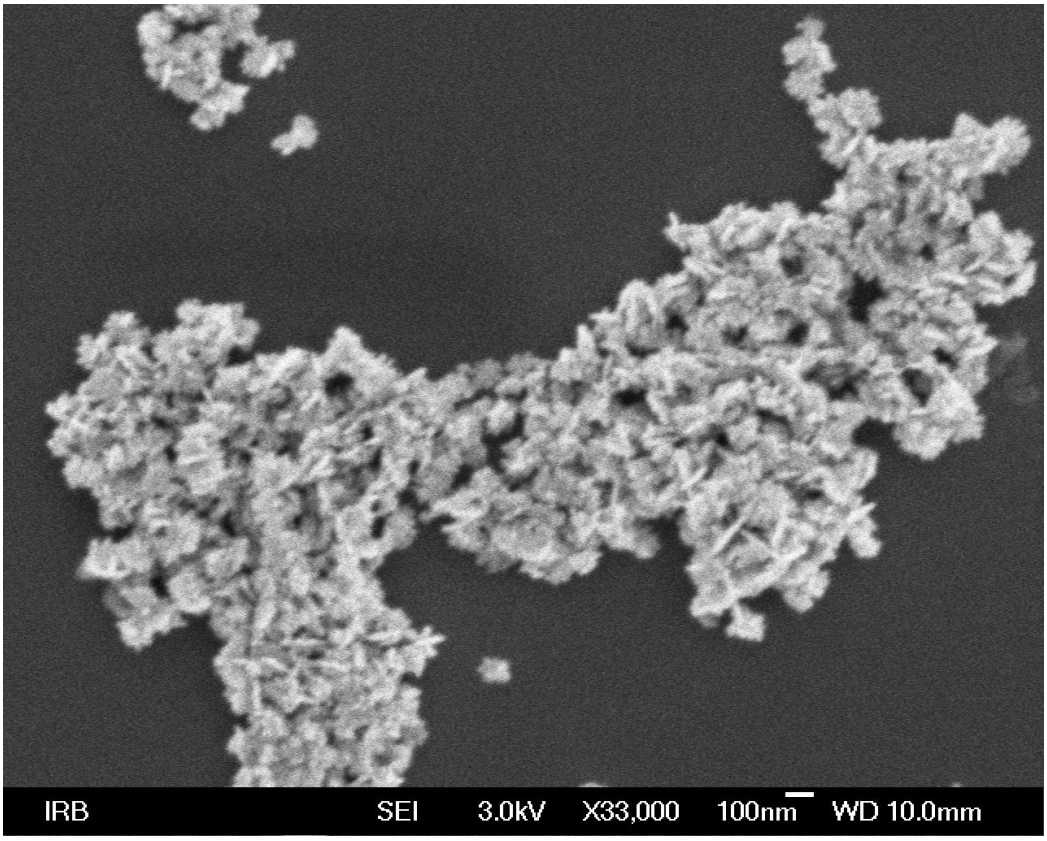
4 REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Koloidne suspenzije kao SERS supstrati

Srebrne nanočestice odgovarajućih veličina pripremljene su korištenjem različitih reducirajućih i stabilizirajućih sredstava. Srebrni koloid reduciran citratima pripremljen je stoga što su citratni koloidi najviše istraživani koloidi te zato što se pokazalo da su stabilni i efikasni kao SERS supstrati. Zbog slabe kontrole veličine nastalih Ag čestica, citratni koloidi obično imaju široku raspodjelu veličine sintetiziranih nanočestica. Kako bi se doskočilo ovom problemu pripremljeni su uzorci koji su reducirani askorbinskom kiselinom. Osim toga, ova se redukcija odvija na sobnoj temperaturi pa je jednostavnija. Uzorci reducirani s borhidridom pripremljeni su kako bi se izbjeglo postojanje citratnih iona na površini nanočestica što može otežati i smanjiti adsorpciju analita. Nadalje, Ag nanočestice sterički stabilizirane polisaharidom aminodekstranom proučavane su jer umreženi omotač aminodekstrana djeluje kao izvrsno sredstvo za stabilizaciju. Također, ove čestice imaju veliku potencijalnu primjenu u medicini. Važnu ulogu u medicini imaju i čestice stabilizirane biorazgradivim polimerom polivinilpirolidonom pa tako npr. mogu poslužiti kao linkeri za vezanje lijekova.[230] Koloid s Ag kristalima „cvjetnog“ izgleda sintetiziran je jer se iz literaturnih podataka moglo zaključiti da takvi koloidi daju velika pojačanja Ramanovog signala, čak do nivoa jedne molekule.[231] U sljedećem su poglavlju proučavana morfološka svojstva čestica dobivenih različitim metodama kemijske sinteze te je istražen njihov utjecaj na SERS.

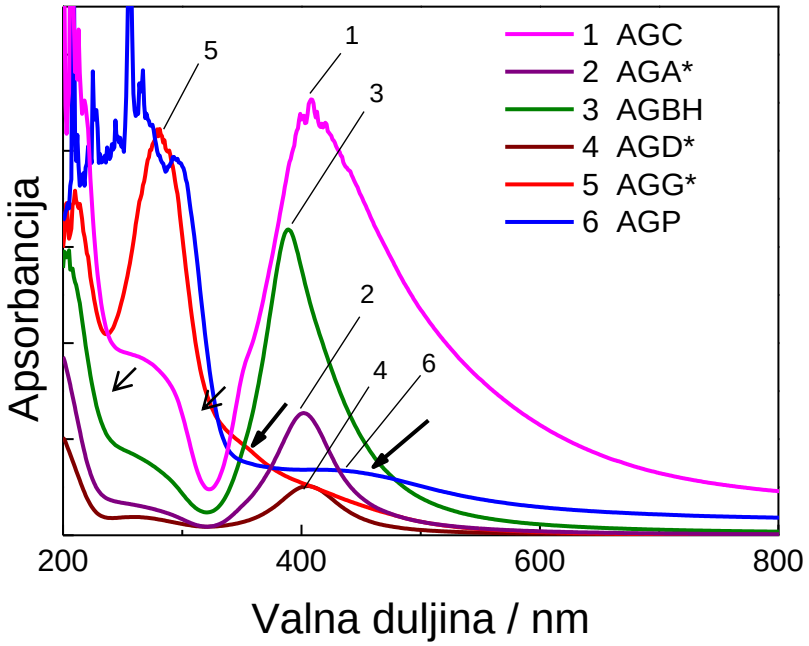
4.1.1 Karakterizacije koloida

Zlatni koloid (AUC) nije pokazao SERS pojačanje za testirane supstancije (piridin, R6G) pri pobudi 514,5 nm pa nije uključen u daljnja istraživanja (Slika P2c u prilogu). Srebrni koloid AGF nakon sinteze imao je priželjkivani izgled cvijeta s razgranatim „laticama“ (Slika 48). No, u sintezi AGF koloida koristi se 4-merkaptobenzojeva kiselina pa su se u spektru koloida pojavljivale vrpce merkaptobenzojeve kiseline, čak i nakon višestrukog obilnog ispiranja vodom i etanolom (Slika P2 a, b). Pokazalo se da ovo nije dobar način sinteze ovakvog koloida te ga iz navedenog razloga nije bilo moguće koristiti kao SERS supstrat.



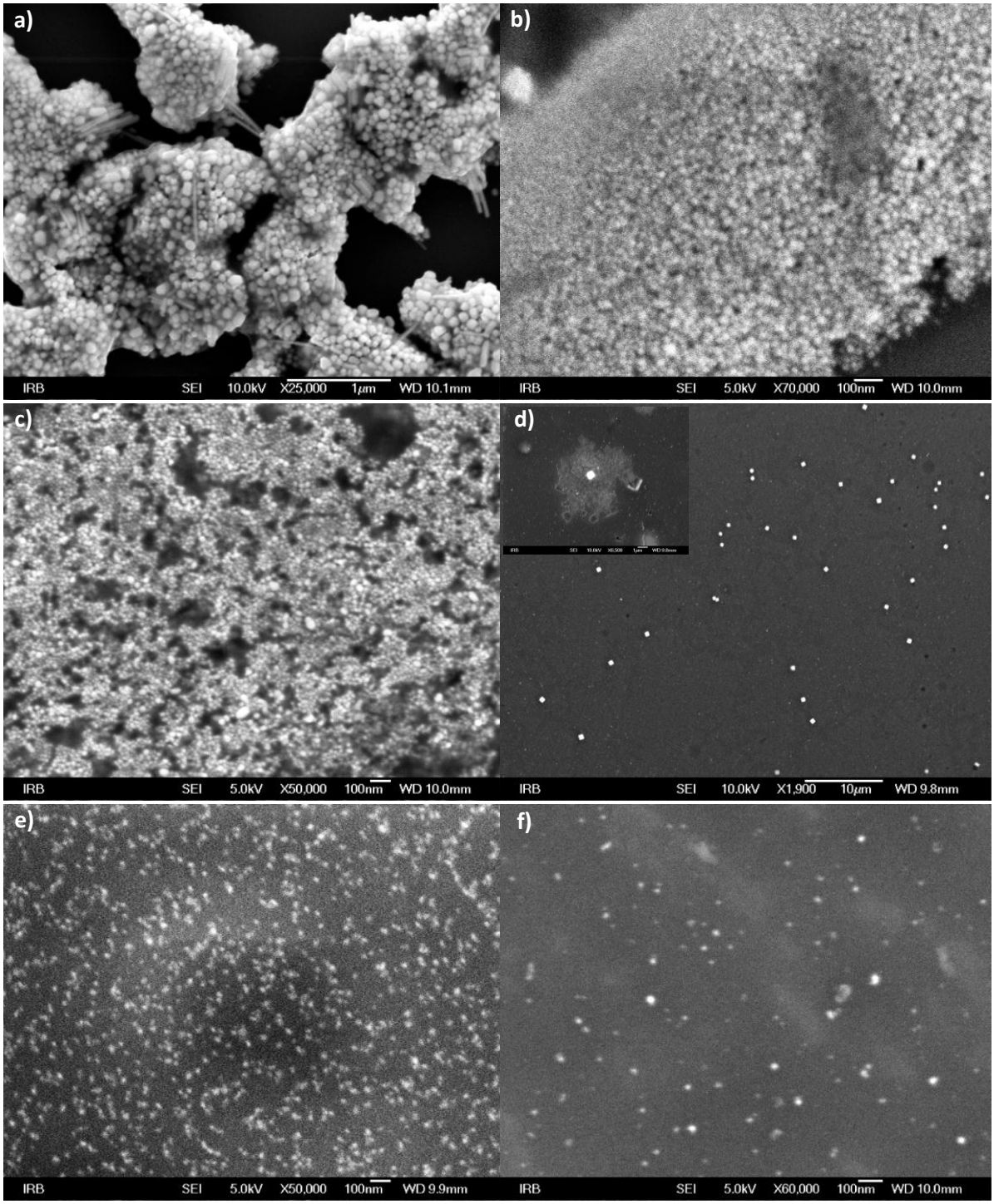
Slika 48 SEM slika AGF koloida (povećanje 33 000×).

Slika 49 prikazuje UV-Vis spektre sintetiziranih srebrnih nanočestica u rasponu od 200 do 800 nm. Apsorpcijska vrpca u vidljivom području između 350 i 550 nm tipična je za srebrne nanočestice. Uzorci AGC, AGA, AGBH i AGD imaju apsorpcijske maksimume na redom 407, 402, 390 i 410 nm. Uzorak AGC ima široku apsorpcijsku vrpcu što upućuje na neuniformnu raspodjelu veličine srebrnih nanočestica dok AGA, AGBH i AGD imaju manje vrijednosti za širinu na polovici visine (FWHM, engl. *full width at half maximum*) što upućuje na užu raspodjelu veličine. U slučaju uzoraka stabiliziranih s PVP-om (AGP i AGG) maksimum apsorpcije prekriven je apsorpcijom polimernih molekula. U tim se slučajevima apsorpcijske vrpce srebrnih nanočestica pojavljuju kao ‘ramena’ i na Slici 49 označene su sa strelicom.



Slika 49 UV–vidljivi spektar sintetiziranih srebrnih nanočestica. Uzorci označeni zvjezdicom razrijeđeni su vodom (uzorak AGA 10 puta; uzorci AGD i AGG 300 puta).

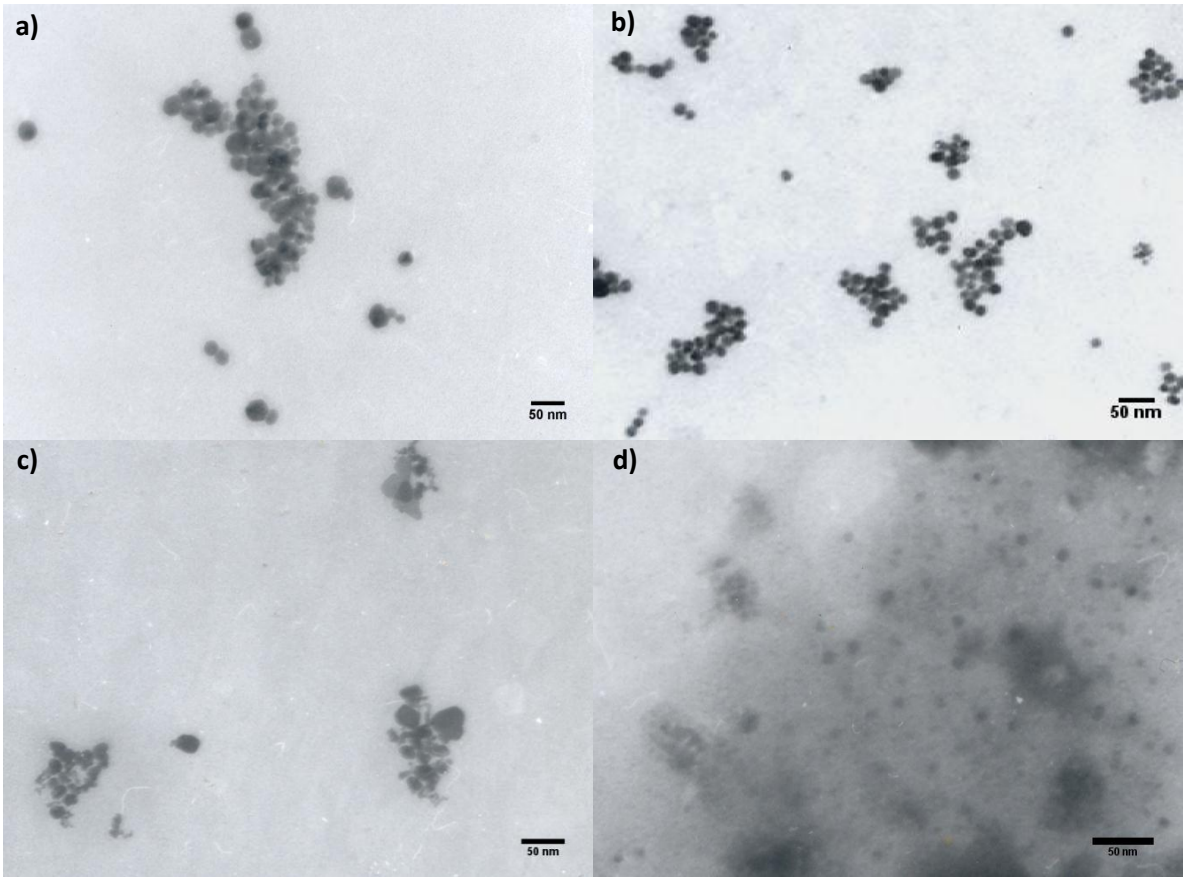
FE-SEM i TEM mjerenjima određene su veličine i morfologije srebrnih nanočestica pripremljenih s raznim reducirajućim i stabilizirajućim sredstvima. Na Slici 50 prikazane su SEM slike sintetiziranih nanočestica. Uzorak AGC koji je pripremljen redukcijom s citratom (Slika 50a) sastoji se od gotovo sferičnih nanočestica uz određeni udio štapićastih struktura. U slučaju sinteza s citratima teško je kontrolirati morfologiju Ag NČ pa je ove štapićaste strukture teško izbjeći. Na Slici 50b vide se u velikoj mjeri uniformne NČ, veličine 17 nm, koje su dobivene sintezom s askorbinskom kiselinom i citratom (uzorak AGA). Slika 50c prikazuje nanočestice veličine približno 11 nm dobivene redukcijom s $NaBH_4$ (uzorak AGBH). Slika 50d prikazuje SEM slike AGD uzorka koji je dobiven uz prisutnost aminodekstrana, polimera velike molekulske mase. U ovom su slučaju prisutne čestice srebra veličine 500 nm kao i mnogo manje svijetle točke koje predstavljaju male čestice srebra. Slika 50e prikazuje nanočestice veličine 12 nm dobivene redukcijom s citratom uz prisutnost PVP, dok se na Slici 50f može vidjeti nanočestice od 13 nm sintetizirane u smjesi glukoze i PVP.



Slika 50 SEM slike a) AGC (povećanje 25 000×), b) AGA (povećanje 70 000×), c) AGBH (povećanje 50 000×), d) AGD (povećanje 1900×), e) AGP (povećanje 50 000×) i f) AGG (povećanje 60 000×).

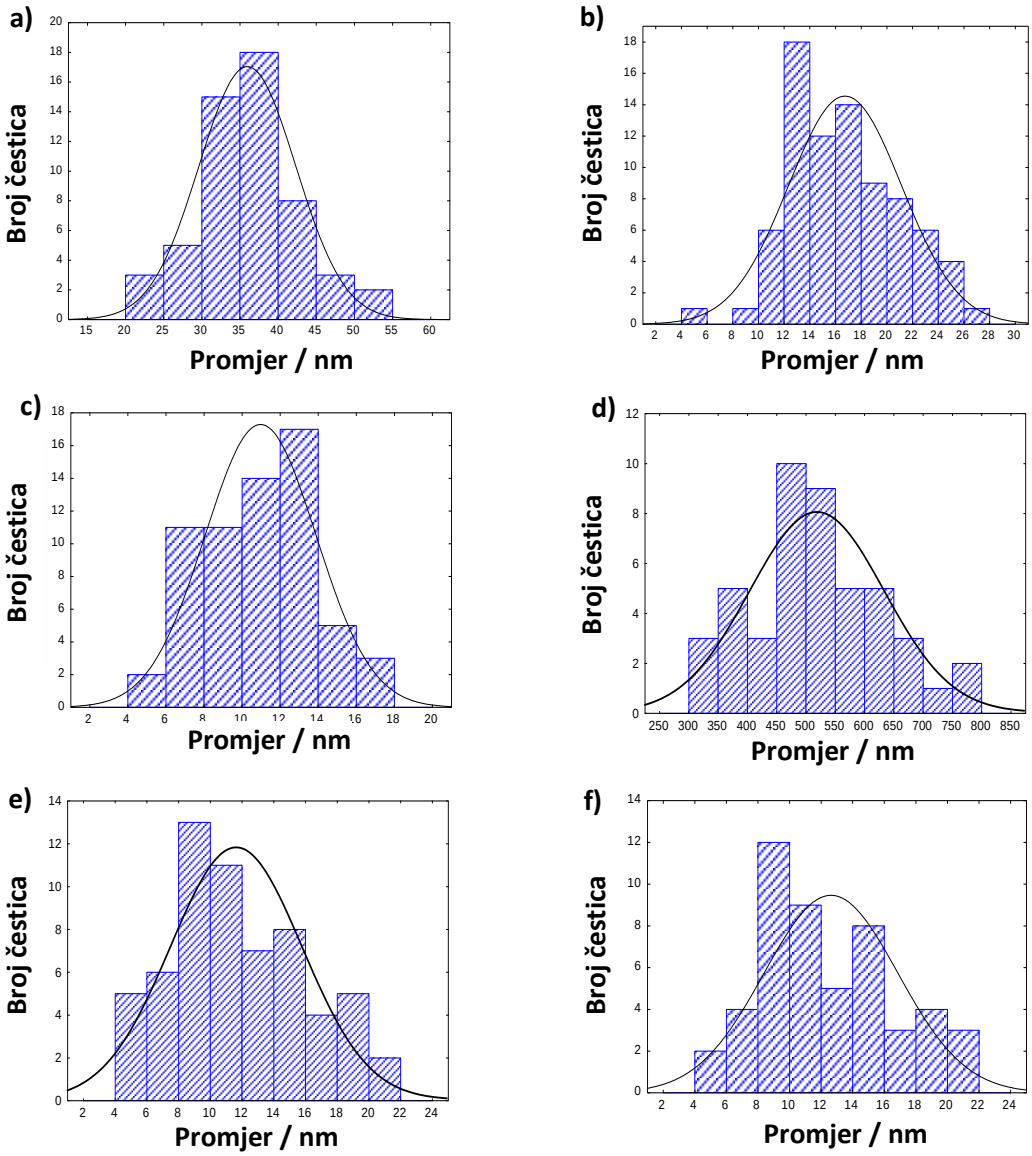
TEM mikrografije snimljene su za uzorke AGA, AGBH, AGG i AGP (Slika 51) budući da na SEM slikama tih uzoraka nije bilo jednostavno izmjeriti veličine čestica. Kod uzoraka AGA i AGBH na TEM slikama možemo vidjeti da su redukcijom srebra nastale sferične čestice (Slika 51a i b). Budući da se AGG uzorak sastoji od kompleksnog organskog

matriksa bilo ga je potrebno razrijediti kako bi se mogle vidjeti, a potom i izmjeriti srebrne nanočestice (Slika 51d). U AGP uzorku mogu se vidjeti čestice trokutastog oblika, ali i šire raspodjele veličine (Slika 51c) .

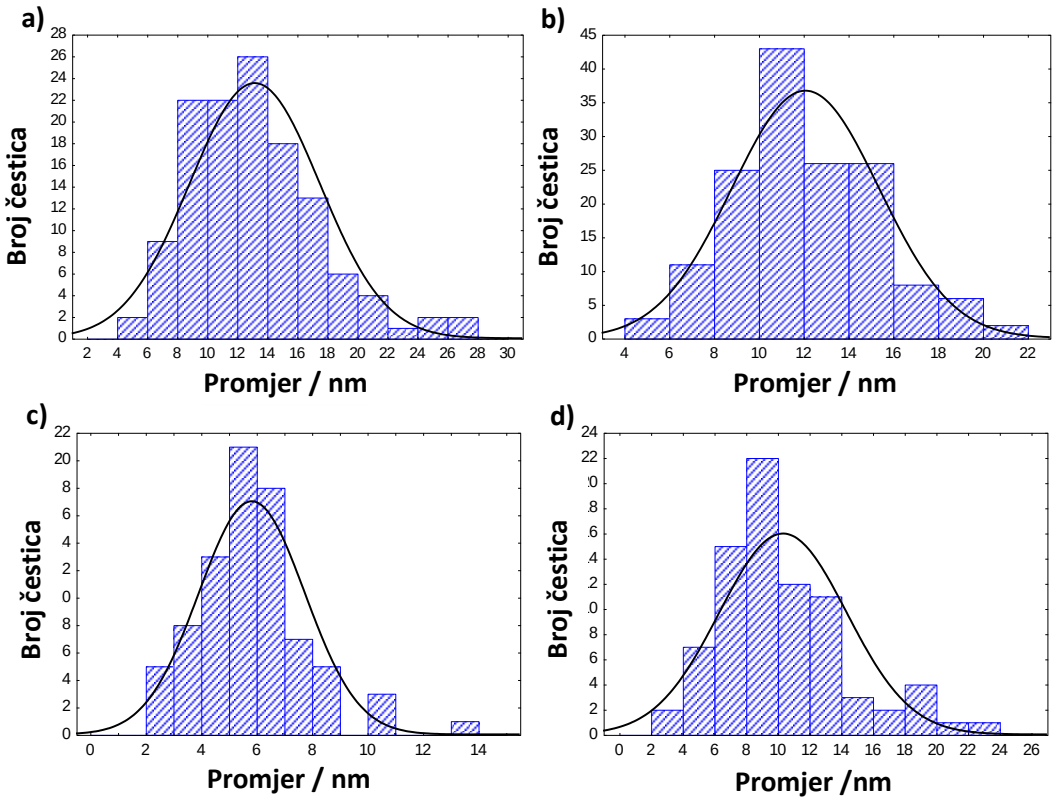


Slika 51 TEM slike a) AGA, b) AGBH, c) AGP i d) AGG uzoraka.

Slika 52 i Slika 53 prikazuju raspodjele veličina čestica koje su izračunate iz odgovarajućih SEM i TEM slika korištenjem kompjuterskog programa ImageJ. Izračunate srednje veličine čestica, kao i standardna devijacija dani su u Tablici 11. Raspodjele veličine čestica dobivenih iz SEM i TEM slika ne razlikuju se značajno, a najveća razlika uočena je za AGG uzorak.



Slika 52 Raspodjele veličine srebrnih čestica za a) AGC, b) AGA, c) AGBH, d) AGD, e) AGP i f) AGG uzorke izračunate iz odgovarajućih SEM mikrografija (Slika 50).



Slika 53 Raspodjele veličine srebrnih čestica za a) AGA, b) AGBH, c) AGG i d) AGP uzorke izračunate iz odgovarajućih TEM mikrografija (Slika 51).

Tablica 11 Karakterizacija pripremljenih koloidnih otopina srebra. (Za računanje srednje vrijednosti i standardne devijacije veličine Ag čestica izmjereno je najmanje pedeset čestica na SEM i TEM slikama.)

Uzorak (koloid)	Reducirajući/ Stabilizirajući agens	SEM / nm TEM / nm	Zeta / mV	Hidrodinamički promjer / nm	UV-Vis-NIR / nm	FWHM	Koncentracija Ag / mg L^{-1}	pH
AGC	citrat/citrat	35,8 ± 6,3	-33,4	14,6; 69,8	407	139	104	7,7
AGA	askorbinska kiselina/citrat	16,7 ± 4,4 13,1 ± 4,3	-46,8	5,4	402	62	107	7,9
AGBH	$NaBH_4$/borati$^-$	10,9 ± 2,9 12,1 ± 3,3	-10,1	2,87	390	62	27	7,5
AGD	$NaBH_4$/DEAE-dekstran	518 ± 114	39,5	473	410	60	10^3	8,2
AGP	PVP/PVP	11,6 ± 4,1 10,3 ± 4,0	-0,867	4,62	420	-	3×10^4	5,6
AGG	glukoza/PVP	12,6 ± 4,2 5,8 ± 1,9	-11,2	14,28	283	-	270	7,9

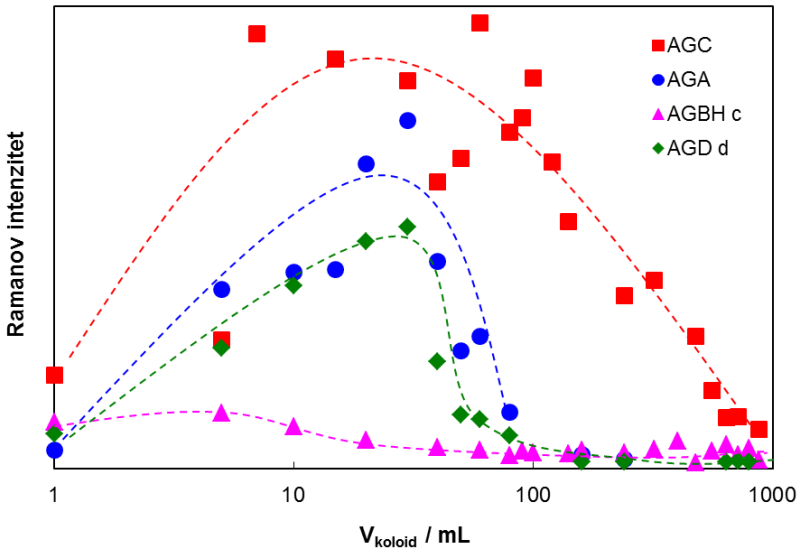
U Tablici 11 su također prikazane vrijednosti hidrodinamičkih promjera i zeta potencijala dobivene DLS mjerenjima. Za nanočestice s vrijednošću zeta potencijala iznad 20 mV i ispod - 20 mV (ili ± 30 mV ovisno o literaturnom izvoru) smatra se da se dovoljno elektrostatski odbijaju te stoga ostaju stabilne u otopini. Zeta potencijali uzoraka AGC, AGA i AGD su iznad ili ispod navedenih vrijednosti i stoga se oni mogu smatrati stabilnim bez tendencije da spontano agregiraju. Srebrne nanočestice u AGC i AGA uzorcima stabilizirane su negativnim citratnim ionima koji su adsorbirani na njihovu površinu. Citratni ioni uzrokuju odbojne sile među česticama i tako sprečavaju agregaciju. Uzorak AGD stabiliziran je sterički i elektrostatski velikim pozitivnim molekulama dietilaminoetil dekstrana. Negativni zeta potencijal AGBH uzorka upućuje na stabilizaciju čestica boratima. Uzorci stabilizirani PVP-om (AGP i AGG) imaju malu negativnu vrijednost zeta potencijala što implicira nakupljanje negativnog naboja na površini nanočestica, tako da je pored steričkog onemogućavanja agregacije koloidna stabilnost pojačana i elektrostatskim odbijanjem.

Vrijednosti hidrodinamičkih promjera u većini su slučajeva nešto niže od promjera izračunatih sa SEM slika. Budući da točan oblik i hidrodinamička svojstva nanočestičnih agregata nisu dovoljno poznati, može postojati sustavna razlika između izračunatog promjera i dimenzija dobivenih iz SEM mikrografija. Koloidi osušeni na zraku, kakvi se koriste u SEM mjerenjima, vjerojatno ne predstavljaju u potpunosti sustav u vodenoj suspenziji. U slučaju AGC uzorka postoje dvije vrijednosti promjera koje nas navode na zaključak da pored Ag sfera u suspenziji postoje i štapićaste čestice.

4.1.2 SERS mjerenja

Korištenjem piridina i rodamina 6G kao probnih molekula određena je SERS aktivnost koloida. Kako bi se postigla podjednaka koncentracija srebra u koloidima koloid AGD je razrijeđen (AGDd), a koloid AGBH je istaložen i redispergiran u manjem volumenu vode (AGBHc) kako bi im konačna koncentracija bila 100 mg L^{-1}. Za određivanje odgovarajućeg volumena koloida pogodnog za daljnju analizu, različiti volumeni AGC, AGA, AGDd i AGBHc uzoraka testirani su korištenjem 10 µL 0,12 M piridina (AGC i AGA) i 10 µL 1,2 M piridina (AGDd i AGBHc). Slika 54 prikazuje dobivene rezultate. Iz slike je vidljivo da postoji povećanje intenziteta s povećanjem volumena AGC uzorka do 7 µL, a nakon 100 µL intenzitet vrpce značajno se smanjuje. Između ova dva volumena točke

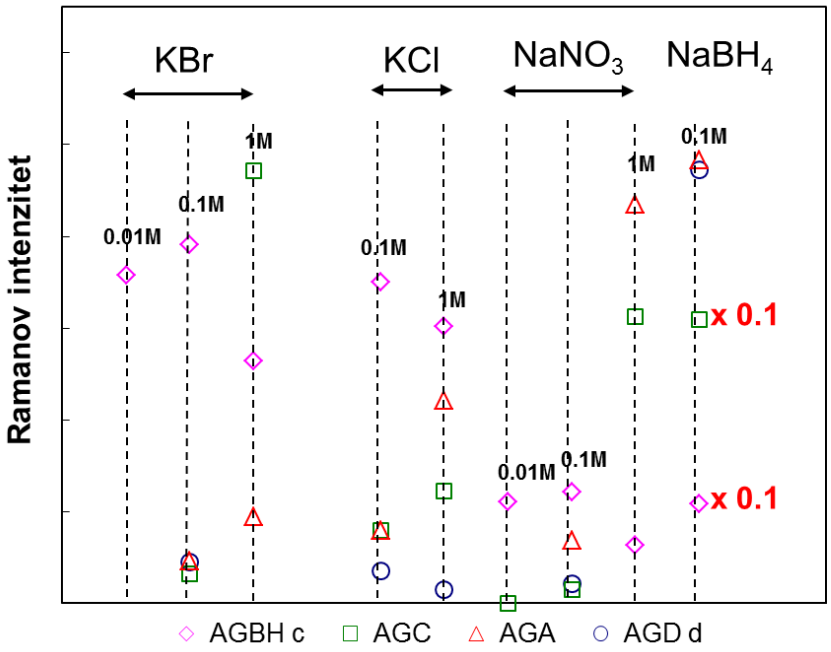
odstupaju tako da se ne može sa sigurnošću reći gdje se nalazi pravi maksimum intenziteta. Situacija je jasnija za druga dva uzorka, AGA i AGDd, gdje se maksimum intenziteta može jasno očitati i iznosi 30 µL. Kod AGBHc uzorka nije jednostavno reći gdje je maksimum jer se vrijednosti intenziteta ne mijenjaju značajno s promjenom volumena koloida u ispitivanom rasponu.



Slika 54 SERS intenziteti vrpce piridina na 1008 cm^{-1} kao funkcija volumena koloida u logaritamskoj skali od 1 do 900 µL. Iscrtkane linije dodane su kao vizualna pomoć. Omjer agregirajućeg sredstva i koloida održavan je konstantnim tijekom eksperimenta.

Kako bi se pronašlo optimalno agregirajuće sredstvo kao i njegova odgovarajuća koncentracija za SERS pojačanje, snimljeni su SERS spektri piridina korištenjem KBr, KCl i $NaNO_3$ u 0,01, 0,1 i 1 M koncentraciji te $NaBH_4$ u 0,1 M koncentraciji. Istražena su četiri uzorka: AGC, AGA (korišten je 0,12 M piridin), AGBHc i AGDd (korišten je 1,2 M piridin). Slika 55 prikazuje intenzitete SERS signala piridina uz različita agregirajuća sredstva. Intenzitet se značajno pojačao kad su u uzorak dodani Br^-, Cl^- ili NO_3^- ioni što potvrđuje pretpostavku da dodavanjem iona dolazi do agregacije ili promjene na površinama nanočestica. Što se tiče koncentracija, u slučaju KBr, KCl i $NaNO_3$, 1 M koncentracija daje bolje pojačanje za AGC i AGA uzorke, dok 0,1 M koncentracija daje bolje pojačanje za AGBHc i AGDd uzorke. Od tri vrste aniona NO_3^- (1 M) daje najveće pojačanje SERS signala za uzorke dobivene reduciranjem s askorbinskom kiselinom, a Br^- (1 M) za citratom reducirane uzorke. Dodavanje borhidrida rezultiralo je vrlo dobrim pojačanjem Ramanovog signala za AGA, AGDd i AGBHc uzorke i izuzetno velikim pojačanjem za AGC uzorak. Promjene u SERS spektrima piridina prilikom dodavanja različitih iona u različitim koncentracijama u koloidne suspenzije mogu se objasniti različitim stupnjevima agregacije

koloida kao i promjenama na površini srebrnih nanostruktura.[232] Fenomen različitog pojačanja uslijed dodavanja različitih aniona u koloid nije još u potpunosti razjašnjen.[233]



Slika 55 SERS intenziteti piridina na 1008 cm^{-1} kao funkcija različitih agregirajućih sredstava i njihovih koncentracija za AGC, AGA, AGBHc i AGDd uzorke. Koncentracija piridina bila je konstantna tijekom eksperimenta.

Kako bi se procijenila ovisnost koncentracije analita o intenzitetu Ramanovog signala, snimljeni su SERS spektri izabranih analita, piridina i rodamina 6G. Slika 56 prikazuje pojačani Ramanov intenzitet kao funkciju koncentracije dvije vrpce piridina na dvije valne duljine pobude. Oba analita tvore kompleks sa srebrnim nanočesticama u koloidu, tj. njihova adsorpcija na površinu nanočestica omogućena je stvaranjem van der Waalsovih interakcija. Ovu adsorpciju karakterizira jedna od adsorpcijskih izotermi koja opisuje prekrivenost površine kao funkciju tlaka ili koncentracije (pri čemu je najjednostavnija Langmuirova adsorpcijska izoterma). U SERS mjerenjima kad intenzitet dostiže maksimalnu vrijednost za zasićene koncentracije analita, odnosno kad analit formira monosloj na površini nanočestica, prekrivenost površine također dostiže svoj maksimum. Tako se koncentracijski ovisna kalibracijska krivulja može objasniti Langmuirovom adsorpcijskom izotermom:

$$I = \frac{I_{max} \cdot K \cdot c}{1 + K \cdot c} \qquad \textbf{(4-1)}$$

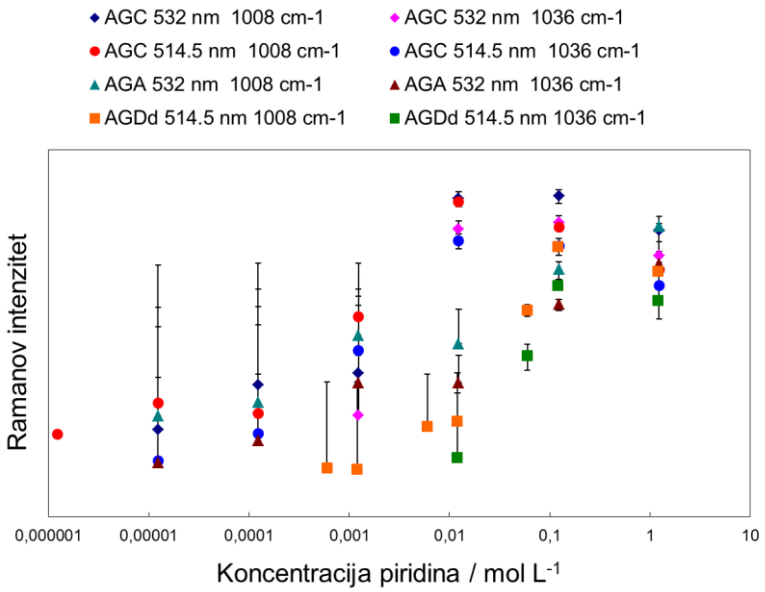
gdje su I, I_{max}, K and c redom Ramanov intenzitet analita, maksimalna vrijednost SERS intenziteta, adsorpcijska konstanta i koncentracija analita.[234] Pri niskim koncentracijama faktor $K \times c$ je mnogo manji od 1 pa jednadžba (4-1) ima linearan oblik s nagibom $K \times I_{max}$. Primjenom formule (4-1) za prilagodbu eksperimentalnih točaka, dobivene su adsorpcijska konstanta, K, i maksimalna vrijednost SERS intenziteta, I_{max}, za piridin i R6G. Slika 57 prikazuje kalibracijsku krivulju nacrtanu temeljem gore opisane metode. Adsorpcijske konstante i maksimalne vrijednosti SERS intenziteta izračunate su za dvije vrpce piridina (1008 i 1036 cm^{-1}) i dvije vrpce rodamina 6G (612 and 776 cm^{-1}), na tri valne duljine pobude (488, 532 i 514,5 nm) uz dodatak nitrata i borhidrida u AGC, AGA, AGBHc i AGDd uzorcima. Rezultati su prikazani u Tablici 12.

Tablica 12 R^2 vrijednosti, adsorpcijske konstante i maksimalni SERS intenziteti za dvije vrpce piridina (1008 i 1036 cm^{-1}) i dvije R6G vrpce (612 i 776 cm^{-1}) na tri pobude (488, 532 i 514,5 nm).

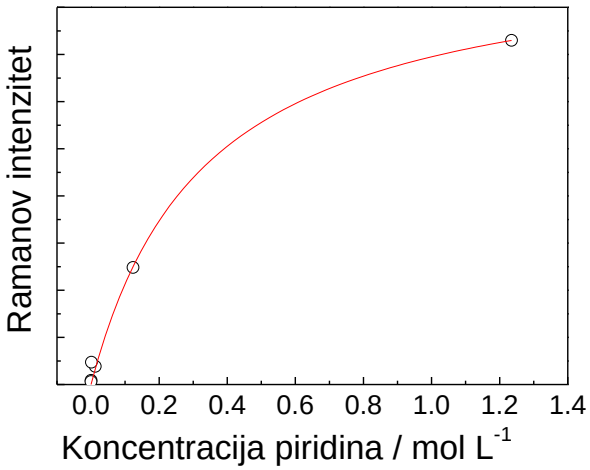
λ / nm	Uzorak		ν / cm^{-1}	R^2	I_{max}	K
532	AGC	Piridin (+nitrat)	1008	0,99604	7260 ± 570	23 ± 5
			1036	0,99351	3220 ± 190	91 ± 21
		Piridin (+borhidrid)	1008	0,93671	35400 ± 5500	185 ± 130
			1036	0,94419	17800 ± 2900	159 ± 115
		R6G (+borhidrid)	612	0,99993	621000 ± 29000	6748 ± 523
			776	0,99995	727000 ± 80000	3016 ± 430
	AGA	Piridin	1008	0,99780	5880 ($K \times I_{max}$)	
			1036	0,98690	5740 ($K \times I_{max}$)	
		Piridin (+borhidrid)	1008	0,99486	18500 ± 1060	3 ± 0,6
			1036	0,99712	7030 ± 290	3,4 ± 0,4
514,5	AGC	Piridin (+borhidrid)	1008	0,99810	2×10^6($K \times I_{max}$)	
			1036	0,90695	10500 ± 1880	258 ± 222
		R6G (+borhidrid)	612	0,99290	110 ($K \times I_{max}$)	
			776	0,99440	7×10^8 ($K \times I_{max}$)	
	AGBHc	Piridin (+borhidrid)	1008	0,93786	3200 ± 220	413 ± 154
			1036	0,94757	1430 ± 80	350 ± 110
		R6G (+borhidrid)	612	0,99972	44530 ± 2320	$1,5 \times 10^6$
			776	0,99988	39860 ± 1480	$1,4 \times 10^6$
	AGDd	Piridin (+borhidrid)	1008	0,99208	5310 ± 260	7,4 ± 1,4
			1036	0,99697	2730 ± 180	4,2 ± 1,1
		Piridin (+nitrat)	1008	0,97877	7530 ± 1510	1,3 ± 0,6
			1036	0,97896	$2,5 \times 10^4$ ($K \times I_{max}$)	
488	AGC	Piridin (+borhidrid)	1008	0,95949	1226 ± 150	6,7 ± 3,1
			1036	0,99276	988 ± 170	1,5 ± 0,6
	AGA	Piridin (+borhidrid)	1008	0,90809	740 ± 60	610 ± 265
			1036	0,90132	485 ± 40	360 ± 165

Iz rezultata u Tablici 12 možemo vidjeti da uzorci koloid-piridin u koje je dodan borhidrid postižu veće I_{max} vrijednosti od uzoraka u koje su dodani nitrati (ili nije dodano

agregirajuće sredstvo). Visoke I_{max} vrijednosti za R6G djelomično potječu od rezonantnog Ramanovog efekta na ovim valnim duljinama pobude.



Slika 56 SERS intenziteti vrpci piridina na 1008 i 1036 cm^{-1} kao funkcija koncentracije piridina u logaritamskoj skali u AGC, AGA i AGDd uzorcima.



Slika 57 Kalibracijska krivulja SERS intenziteta piridina (1008 cm^{-1}) u AGA uzorku na 532 nm u odnosu na njegovu koncentraciju prema Langmuirovoj izotermi.

Vrijednosti SERS faktora pojačanja izračunate su uspoređivanjem intenziteta odgovarajuće vrpce piridina (~1008 cm^{-1}) izmjerenog u SERS eksperimentu i iste vrpce izmjerene u vodenoj otopini piridina.

SERS faktor pojačanja definira se kao:

$$\mathrm{EF} = \frac{I_{SERS}}{I_{NR}} \cdot \frac{c_{NR}}{c_{SERS}} \qquad \textbf{(4-2)}$$

gdje su I_{SERS} i I_{NR} redom intenziteti vrpce piridina u SERS spektru i u normalnom Ramanovom spektru (u ovom slučaju 1008 cm^{-1}) dok je c koncentracija piridina u vodenoj otopini (c_{NR}) ili u koloidu (c_{SERS}). Ova se jednadžba može proširiti tako da se u obzir uzme broj molekula u aktivacijskom volumenu lasera:

$$\mathrm{EF} = \frac{I_{SERS}}{I_{NR}} \cdot \frac{c_{NR}}{c_{SERS}} \cdot \frac{N_{pir}}{N_{NP-pir}} \qquad \textbf{(4-3)}$$

pri čemu su N_{py} i $N_{NP\text{-}py}$ redom broj molekula piridina u vodenoj otopini i broj molekula piridina koje su adsorbirane na srebrne nanočestice u aktivacijskom volumenu lasera. Aktivacijski volumen lasera iznosi 9,8 × 10^{-7} cm^3 s obzirom na optički put od 500 μm u laserskom zraci od 50 μm. Broj molekula piridina (N_{py}) koje se nalaze u aktivacijskom volumenu lasera pri 0,1235 M je 7,35 × 10^{13}. Budući da znamo volumen Ag atoma (V_{Ag} = 1,713 × 10^{-2} nm^3) te na temelju toga možemo izračunati volumen srebrne nanočestice za AGC uzorak (pri čemu se uzima u obzir da je promjer 36 nm), možemo izračunati broj Ag atoma po nanočestici (1,42 ×10^6). Broj Ag atoma u aktivacijskom volumenu lasera je 5,68 × 10^{11} kod korištenih koncentracija AGC uzorka pa je iz toga izračunat broj nanočestica koji iznosi 4 × 10^5. Ukupna dostupna površina na ovim nanočesticama je 1,6 × 10^9 nm^2. Pod pretpostavkama da je površina molekule piridina 0,28 nm^2 (izračunato iz parametara jedinične ćelije) i da je došlo do potpune prekrivenosti Ag nanočestica, broj molekula piridina adsorbiranih na nanočestice u aktivacijskom volumenu lasera je 5,8 × 10^9 ($N_{NP\text{-}py}$). Na taj način, iz gore opisanih kalkulacija možemo dobiti omjer $N_{py}/N_{NP\text{-}py}$ koji iznosi 1,27 × 10^4.

Najbolje pojačanje Ramanovog signala piridina kad je kao agregirajuće sredstvo korišten nitrat (1 M) dobiveno je za AGC uzorak i iznosilo je 2,2 × 10^2. Uzimajući u obzir vrijednost omjera $N_{py}/N_{NP\text{-}py}$ koja iznosi 1,27 × 10^4, dobivamo EF vrijednosti koje su reda veličine 10^6. Uzorci AGA, AGBH, AGBHc i AGD pokazuju ponešto manja pojačanja signala od uzorka AGC. Potrebno je naglasiti da je najbolje pojačanje signala za AGA i AGBH uzorak postignuto bez dodatka nitrata, a mogući razlog leži u agregaciji koja se dešava uslijed dodatka samog piridina (što je vidljivo prilikom pripreme uzoraka).

Kod uzoraka kod kojih nije dodavan nitrat vrpca piridina pri 1008 cm^{-1} (vibracija disanja prstena) bila je slabija od vrpce na 1036 cm^{-1} (trigonalna deformacija prstena). S dodatkom nitrata (ili drugih agregirajućih sredstava) relativni intenziteti su se promijenili što bi mogla biti indikacija promjene površinskog naboja.[226] Uzorci koji su stabilizirani PVP-om nisu pokazali površinsko pojačanje Ramanovog signala za piridin, čak i kada su bili razrijeđeni. Vrlo je vjerojatno da nativni spojevi na površini pripremljenih nanočestica imaju veći afinitet za vezanje na srebrne čestice od samog piridina. Granica detekcije piridina u slučaju kad su korišteni AGC i AGA uzorci iznosila je $1,2 \times 10^{-4}$ mol/L^3 dok je za vodenu otopinu granica detekcije iznosila 0,12 mol/L^3. Uzorak AGBH imao je granicu detekcije red veličine veći od AGC i AGA uzoraka ($1,2 \times 10^{-3}$ mol/L^3) dok je za uzorak AGD granica detekcije piridina 6×10^{-4} mol/L^3. Kod ovog se uzorka granica detekcije nije promijenila niti nakon razrjeđivanja (AGDd).

Kad je kao agregirajuće sredstvo umjesto nitrata dodavan borhidrid, najniža izmjerena koncentracija piridina bila je dva reda veličine manja za AGC uzorak ($1,2 \times 10^{-6}$ mol/L^3) i red veličine manja za AGA uzorak ($1,2 \times 10^{-5}$ mol/L^3) od najnižih koncentracija izmjerenih bez borhidrida. Za uzorak AGBHc granica detekcije bila je 6×10^{-5} mol/L^3, a za razrijeđeni AGD uzorak (AGDd) granica detekcije bila je 6×10^{-4} mol/L^3. U Tablici 13 navedene su granice detekcije piridina za testirane koloidne suspenzije.

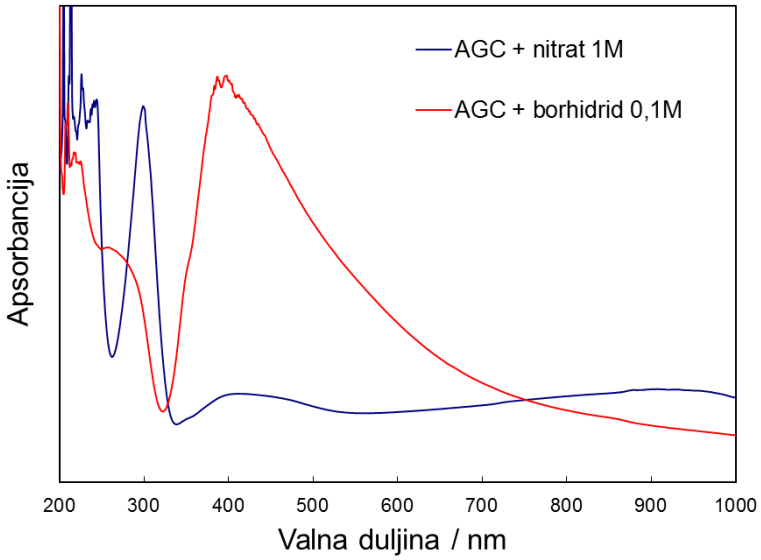
Što se tiče samih faktora pojačanja, najveća se promjena dogodila kod AGD uzorka (iako kod ovog uzorka nije bilo promjene što se tiče granice detekcije) kod kojeg se procijenjeni faktor pojačanja povećao 20 puta. Čini se da je AGD vrlo kompleksan uzorak koji se sastoji od malih srebrnih čestica i velikih aminodekstranom obloženih čestica te bi ga bilo potrebno dodatno istraživati. Za ostala dva uzorka promjena pojačanja je nešto slabija te za AGC uzorak konačni faktor pojačanja iznosi približno $1,3 \times 10^3$.

Tablica 13 Granice detekcije (LOD) piridina uz dodatak $NaNO_3$ (1 mol L^{-1}) i $NaBH_4$ (0,1 mol L^{-1}) kao agregirajućih sredstava.

Uzorak	LOD ($NaNO_3$) / mol L^{-1}	GD ($NaBH_4$) / mol L^{-1}
AGC	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-6}$
AGA	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-5}$
AGBHc	$1,2 \times 10^{-3}$	$6,0 \times 10^{-5}$
AGDd	$6,0 \times 10^{-4}$	$6,0 \times 10^{-4}$

4.1.2.1 *Dodavanje NaBH4*

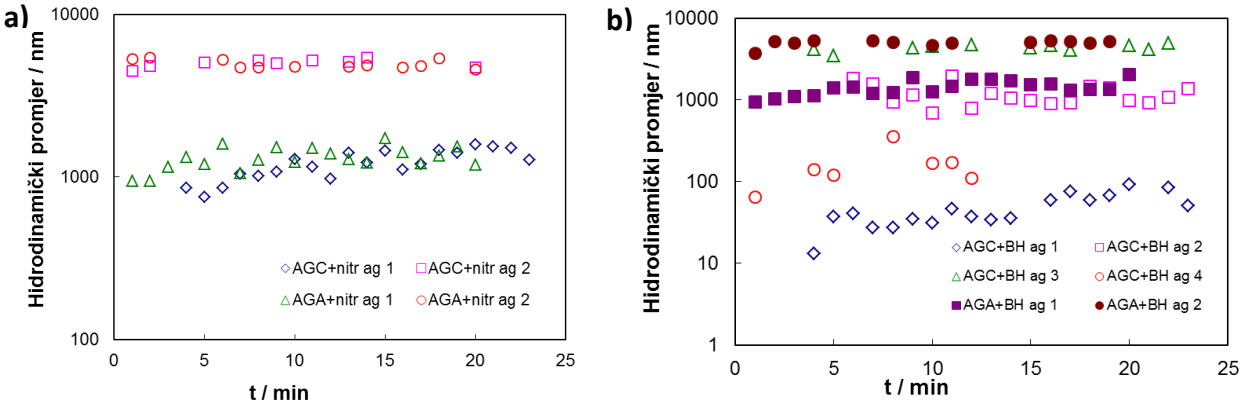
Budući da je primijećeno da dodavanje natrijevog borhidrida dovodi do vrlo dobrog pojačanja Ramanovog signala, pokušalo se pojasniti mehanizam borhidrida dodanog u smjesu koloida i analita. Slika 58 prikazuje apsorpcijski spektar koloidnog uzorka AGC uz dodatak natrijevog citrata i natrijevog borhidrida. Može se primijetiti da dodavanje 1 M $NaNO_3$ dovodi do smanjenja apsorpcije u području plazmonske rezonancije te se nova široka vrpca pojavljuje na području većih valnih duljina. Nakon dodatka 0,1 M $NaBH_4$ čini se da ne dolazi do promjene pozicije apsorpcijske vrpce već vjerojatno do promjene kemijskih svojstava na površini srebrnih nanočestica.



Slika 58 UV-vidljivi apsorpcijski spektar koloidnog uzorka AGC s natrijevim nitratom (plava linija) i natrijevim borhidridom (crvena linija).

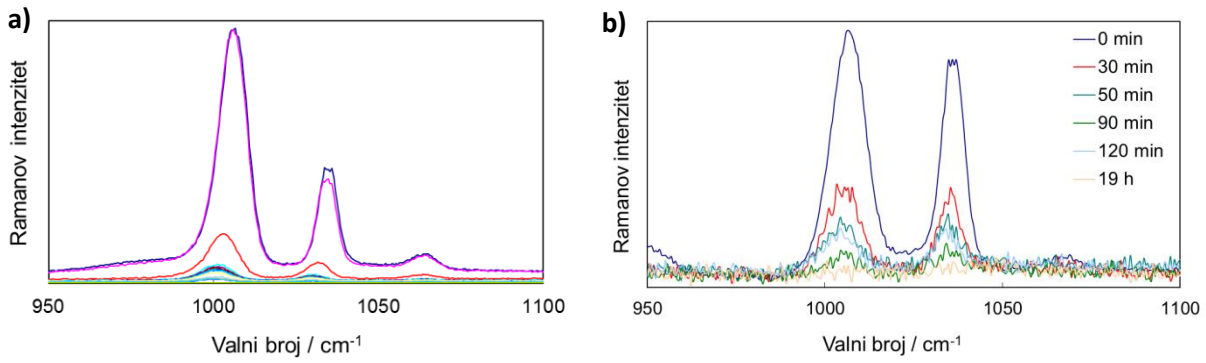
Kako bi se objasnilo ponašanje i agregacija čestica u koloidu napravljena su DLS mjerenja tijekom 20 minuta. Slika 59 prikazuje hidrodinamički promjer agregata koji su formirani u AGC i AGA uzorcima kada su kao agregirajuća sredstva dodani nitrat i borhidrid. Za razliku od uzorka AGA, dodatak borhidrida u AGC uzorak rezultirao je stvaranjem velikog broja agregata različitih veličina i nekoliko manjih agregata (Slika 59b). U slučaju dodatka nitrata u oba se uzorka formiraju dvije veličine agregata. Agregati imaju tendenciju sporog rasta tijekom mjerenog vremena. To pokazuje da veće pojačanje SERS signala korištenjem AGC uzorka i $NaBH_4$ može biti uzrokovano povećanjem broja aktivnih mjesta uslijed formiranja različitih nakupina Ag čestica. Pored toga, smjesa AGC, natrijevog nitrata i piridina ima zeta potencijal vrlo sličan potencijalu samog AGC uzorka (-34,4 mV).

Nasuprot tome, smjesa AGC uzorka, natrijevog borhidrida i piridina ima negativniji zeta potencijal (-42 mV). Dodavanje različitih agregirajućih sredstava u većoj ili manjoj mjeri utječe na površinski naboj nanočestica te time i na stupanj agregacije.



Slika 59 Agregacijski profili za AGA i AGC u vremenu prilikom dodavanja a) nitrata (1 mol L^{-1}) i b) borhidrida (0,1 mol L^{-1}) kao agregirajućeg sredstva.

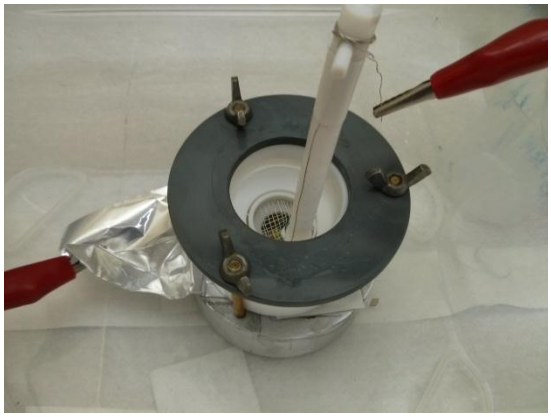
Prilikom snimanja spektara piridina uočeno je da za razliku od slučajeva kada se kao agregirajuća sredstva koriste Cl^-, Br^- ili NO_3^-, u slučaju borhidrida intenzitet obje promatrane vrpce raste s vremenom, do približno 30 minuta nakon dodatka. Slika 60 prikazuje SERS spektre piridina (0,12 M) u AGC uzorku snimane jedan za drugim kroz 25 minuta nakon dodatka 0,1 M borhidrida (a) i SERS spektre piridina (0,12 M) snimane unutar 19 sati nakon dodatka 1 M nitrata (b). To se može objasniti velikom reaktivnošću svježe otopljenog borhidrida koji vjerojatno određeno vrijeme i dalje reducira zaostalo srebro u smjesi. Također, ako se analiza ponovi nakon 24 sata nema značajnog smanjenja SERS intenziteta što nije slučaj kad su agregirajuće sredstvo halidni anioni ili nitrat. U tim slučajevima intenzitet pada na polovicu svoje vrijednosti unutar 30 minuta od prve analize.



Slika 60 SERS spektri piridina a) u AGC uzorku snimani jedan za drugim 25 minuta nakon dodatka 0,1 mol L^{-1} $NaBH_4$ (najviša vrpca = najduže vrijeme) i b) snimani unutar 19 sati nakon dodatka 1 mol L^{-1} $NaNO_3$ (od vrha prema dnu redom 0, 30, 50, 90 i 120 min te 19h; λ=514,5 nm).

4.2 Porozni Si kao SERS supstrat

Drugi tip proučavanih SERS supstrata bili su supstrati poroznog silicija s deponiranim česticama srebra i zlata. Porozni Si je materijal s nizom zanimljivih svojstava koji se već niz godina proučva u Laboratoriju za molekulsku fiziku. Stoga je razumljivo njegovo korištenje kao supstrata u površinski pojačanoj Ramanovoj spektroskopiji.

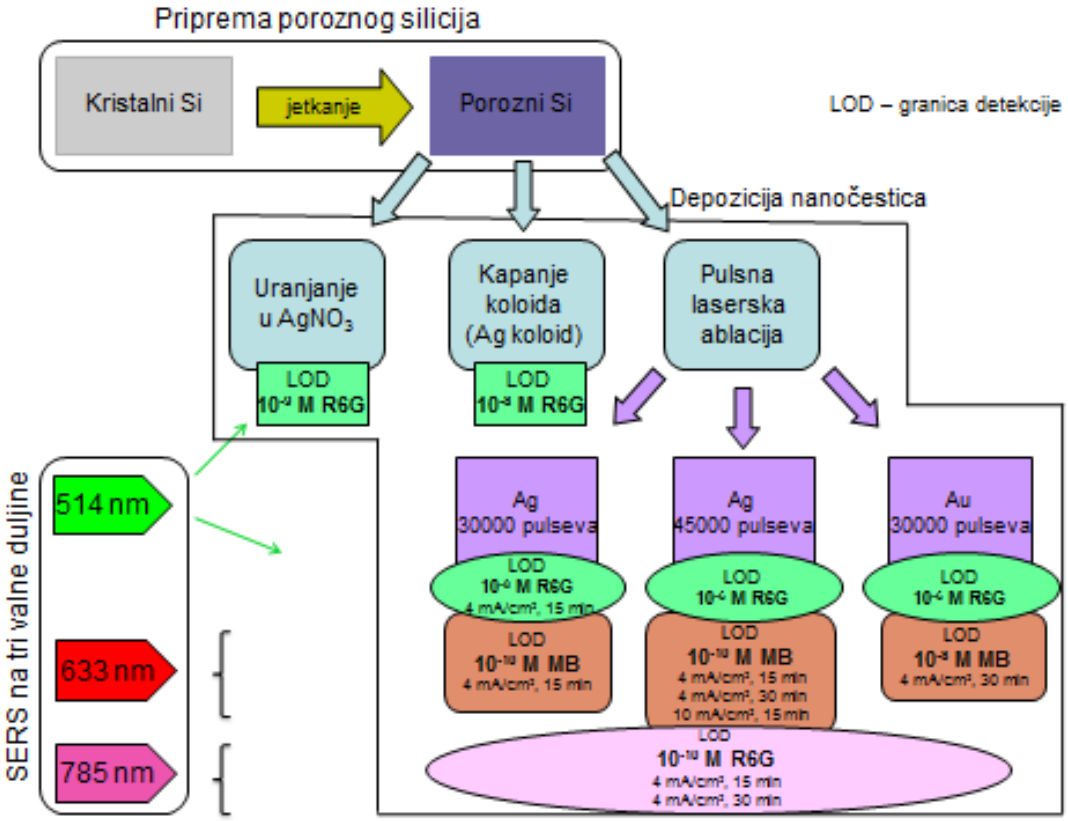


Slika 61 Ćelija za elektrokemijsko jetkanje silicija (napravljena u Laboratoriju za molekulsku fiziku, IRB) za vrijeme jetkanja.

4.2.1 Priprema makroporoznog silicija kao predloška za depozicije srebra i zlata

Elektrokemijskim jetkanjem uzoraka silicija (Slika 61) za gustoće struje 4 i 10 mA/cm^2 i vremena jetkanja 15 i 30 min dobivene su makroskopske pore, široke ~1 μm i

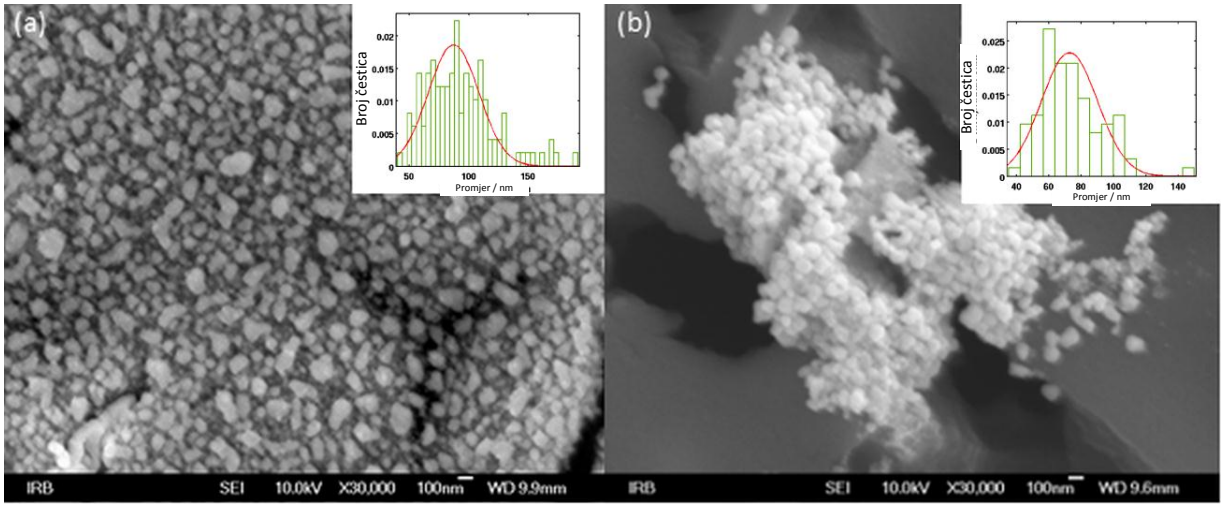
različitih dužina. Uzorci makroporoznog Si potom su obloženi srebrom (i zlatom) na tri načina: a) uranjanjem u otopinu $AgNO_3$, b) kapanjem otopine srebrovog koloida i c) laserskom ablacijom. U slučaju laserske ablacije promijenjen je materijal (srebro-zlato) i broj pulseva zbog bolje kontrole morfologije čestica. Za svaki od SERS supstrata određena je granica detekcije (LOD) za testne molekule (R6G i metilensko modrilo) korištenjem pobuda na 514,5 nm, 633 nm i 785 nm. Slika 62 prikazuje detaljnu shemu eksperimenta. Cilj je bio istražiti daje li porozni Si s metalnim česticama zadovoljavajuće pojačanje te je li pogodan kao SERS supstrat.



Slika 62 Shematski prikaz eksperimenata.

SEM mikrografije SERS supstrata dobivenih uranjanjem uzoraka PSi jetkanih 30 minuta pri 4 mA/cm^2 u 0,01 M $AgNO_3$ otopinu prikazane su na Slici 63a. Srebrni se sloj sastoji od homogeno raspoređenih nanočestica koje prekrivaju površinu pri čemu velike makro pore ostaju otvorene. Prosječna veličina nanočestica je oko 100 nm, ali su također prisutni neki agregati.

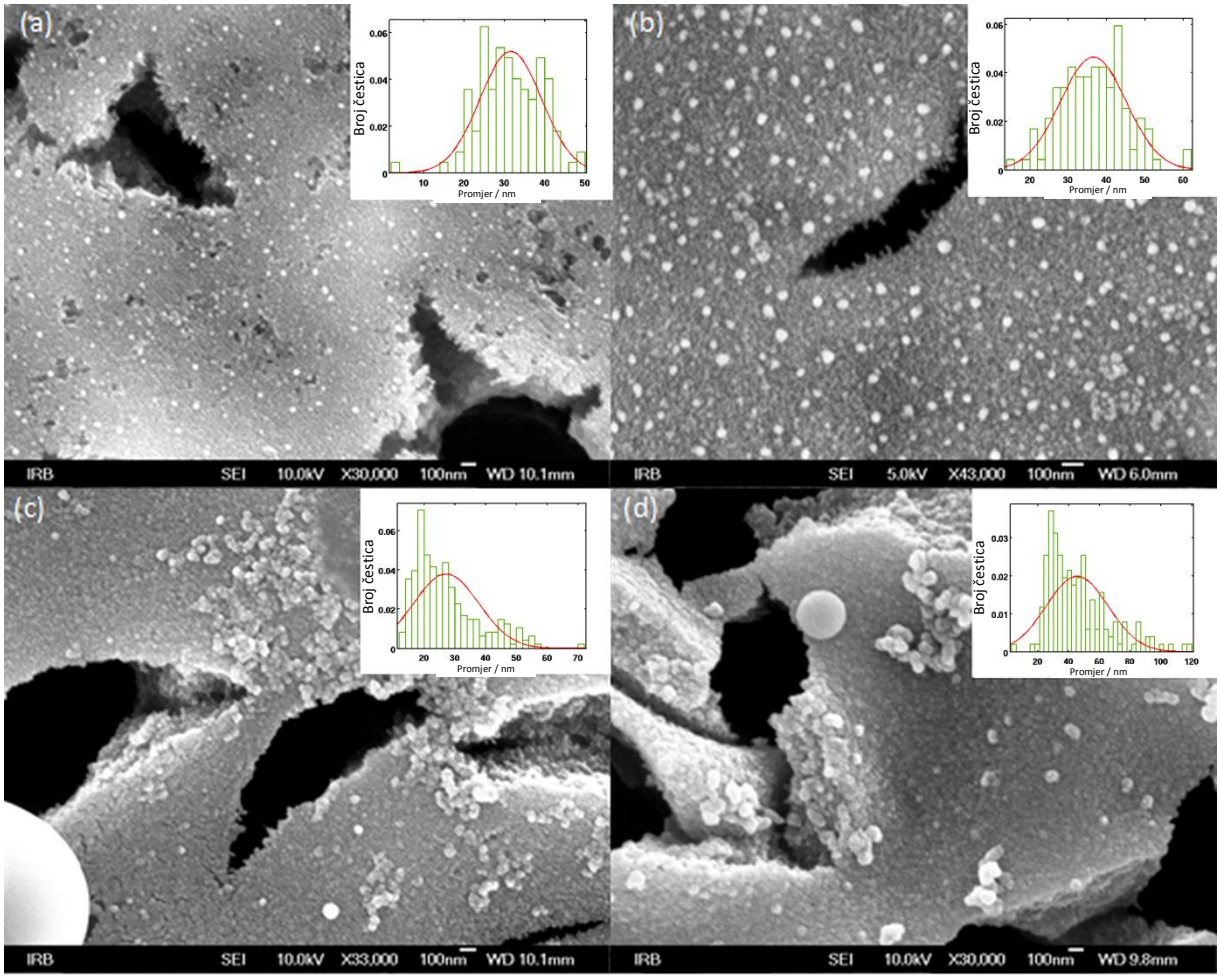
Na mikrografijama uzoraka poroznog Si na koje je kapnut koloid srebra AGC (Slika 63b) može se vidjeti formiranje mikronskih nakupina srebrnih nanočestica na otvorima pora. Prosječna veličina pojedinačne nanočestice je oko 70 nm, ali su prisutne i neke manje čestice.



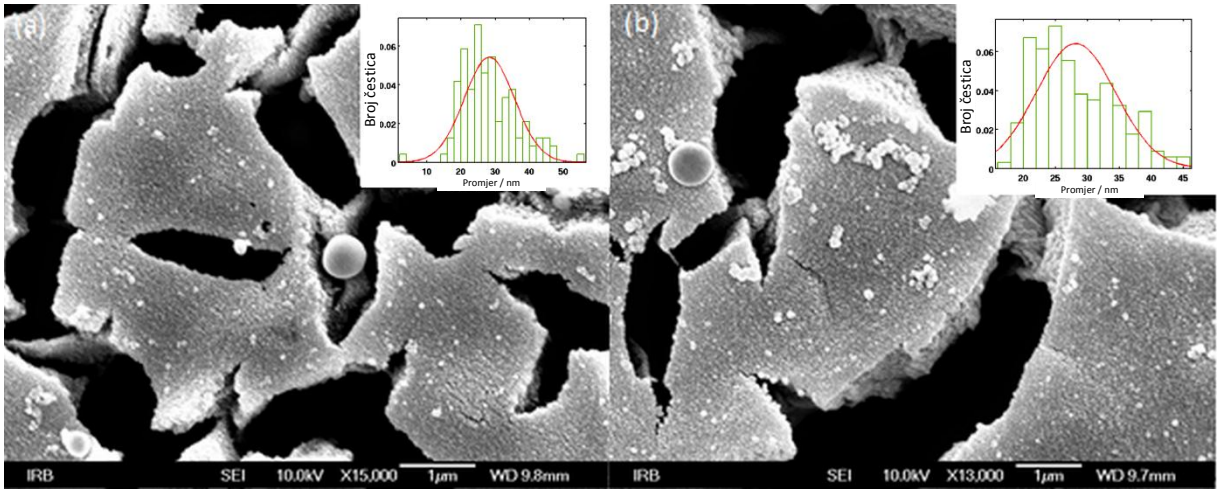
Slika 63 SEM mikrografije srebrnih nanostruktura deponiranih na PSi (uzorak #2) a) iz 0,01 M $AgNO_3$ otopine kroz dvije minute i b) kapanjem srebrovog koloida (povećanje 30 000×); raspodjele veličine čestica prikazane su kao umetnute slike.

Mikrografije uzoraka poroznog Si prekrivenih srebrom i zlatom pomoću laserske ablacije prikazane su na Slici 64 i Slici 65. Srednje vrijednosti veličine čestica na površini makroporoznog silicija za obje laserske ablacije srebrom kao i za ablaciju zlatom izračunate iz SEM slika su u rasponu od 20 do 40 nm. Također su izmjerene vrijednosti površinskih plazmona na staklenim supstratima koji su se nalazili u komori za ablaciju za vrijeme depozicije. Široke plazmonske vrpce (LSPR) nalaze se na 610, 890 i 680 nm za redom prvu i drugu ablaciju srebrom te ablaciju zlatom. Nadalje, kao što je vidljivo na Slici 64 i Slici 65, prisutne su veće sferične strukture koje se obično pojavljuju za vrijeme procesa ablacije.[223] Ove mikrometarske ili nanometarske čestice nastaju za vrijeme izbacivanja materijala s površine mete.

Ako uspoređujemo pore kod uzoraka koji su jetkani 15 i 30 minuta pri 4 mA/cm^2, (Slika P4 u prilogu), možemo vidjeti da su pore kod duže jetkanih uzoraka izdužene nekoliko mikrometara. Uzorci jetkani s gustoćom struje 10 mA/cm^2 (Slika 64d i Slika 65b) imaju šire pore, tj. veću poroznost.



Slika 64 SEM slike PSi uzoraka nakon ablacije srebrom: a) 30 000 pulseva, uzorak #1 (povećanje 30 000×), b) 30 000 pulseva, uzorak #2 (povećanje 43 000×), c) 45 000 pulseva, uzorak #2 (povećanje 33 000×) i d) 45 000 pulseva, uzorak #3 (povećanje 30 000×) s odgovarajućim raspodjelama veličine čestica (umetci).

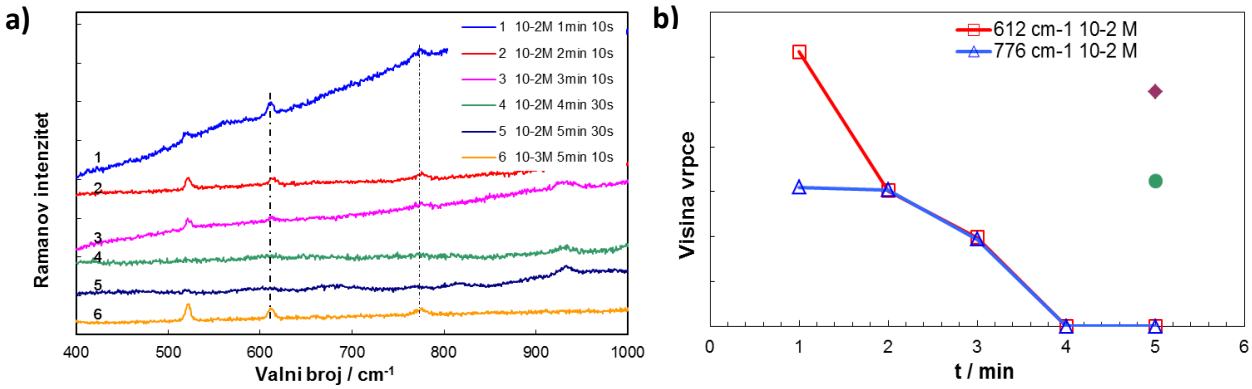


Slika 65 SEM slike uzoraka poroznog Si nakon ablacije sa zlatom: a) uzorak #2 (povećanje 15 000×) i c) uzorak #3 (povećanje 13 000×) s odgovarajućim raspodjelama veličine čestica (umetci).

4.2.2 SERS mjerenja

Sljedeći je korak bio testiranje srebrom i zlatom prekrivenih površina makroporoznog Si na SERS aktivnost korištenjem dvaju uobičajenih kromofora, rodamina 6G (R6G) i metilenskog modrila (MB), dvije probne molekule koje se često koriste u SERS testiranjima.[224,235]

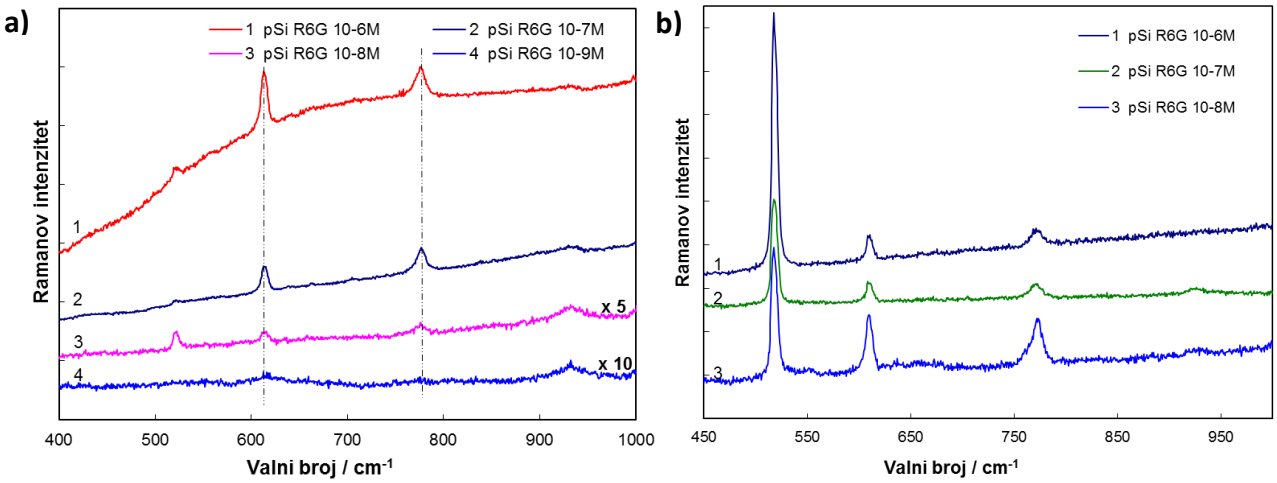
Kako bi se odredila efikasnost SERS supstrata, prvo je trebalo pronaći najbolje parametre kod uranjanja uzoraka makroporoznog Si u otopinu $AgNO_3$. U tu svrhu istraženo je pet različitih vremena uranjanja za 0,01 M otopinu $AgNO_3$ (1, 2, 3, 4 i 5 minuta) i jedan vremenski interval za 0,001 M otopinu (5 min) korištenjem 10^{-8} M otopine rodamina 6G. Najbolji Ramanov signal za R6G dobiven je kod PSi koji je bio uronjen 1 minutu u 0,01 M otopinu $AgNO_3$ (Slika 66). Signal se značajno smanjio za vremena uranjanja veća od 3 minute. Uranjanje u 0,001 M otopinu srebrovog nitrata u trajanju od 5 minuta dalo je sličan rezultat kao i uranjanje od 1 minute u koncentriraniju otopinu. U ovom slučaju 10^{-9} M koncentracija R6G nije se mogla detektirati što nije bio slučaj za uzorke PSi koji su bili uronjeni 1 min u 0,01 M otopinu. Zbog navedenog, kao i zbog manje fotoluminiscentne pozadine, u daljnjem je radu korišteno uranjanje u trajanju 2 min u 0,01 M otopinu srebrovog nitrata.



Slika 66 a) SERS spektri 10^{-8} M R6G na PSi, uzorak #2 za različita vremena uranjanja u $AgNO_3$ i za različite koncentracije (vrijeme raste od vrha prema dolje; koncentracija 10^{-3} M prikazana na dnu) (514,5 nm; 1 mW; vrijeme snimanja 10 s, osima ako nije drugačije navedeno; b) graf ovisnosti SERS intenziteta 612 cm^{-1} i 776 cm^{-1} R6G vrpci o vremenu uranjanja; pune točke - 10^{-3} M $AgNO_3$.

Ramanovi spektri za niz rastućih koncentracija rodamina 6G snimljeni su na supstratima pripremljenim uranjanjem u otopinu srebrove soli. Rezultati su prikazani na Slici 67a. Valna duljina pobude za ove uzorke bila je 514,5 nm što znači da je snimano površinski pojačano rezonantno Ramanovo raspršenje. Što se tiče granice detekcije za R6G na uzorcima

PSi dobivenim uranjanjem s gore opisanim uvjetima, moguće je bilo detektirati 10^{-9} M koncentraciju R6G. U svim su spektrima vidljive vrpce na 612 i 776 cm^{-1}, ali za 10^{-8} i 10^{-9} M koncentracije postoje razlike u području 1200 - 1700 cm^{-1} koje potječu od amorfnog ugljika.



Slika 67 a) SERS spektri R6G (10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} i 10^{-9} M od vrha prema dolje) na PSi uzorku #2 s uranjanjem; 1 mW; b) SERS spektri R6G (10^{-6}, 10^{-7} i 10^{-8} M od vrha prema dolje) na PSi uzorku #2 s Ag koloidom; 6 mW; (514,5 nm, vrijeme snimanja 10 s).

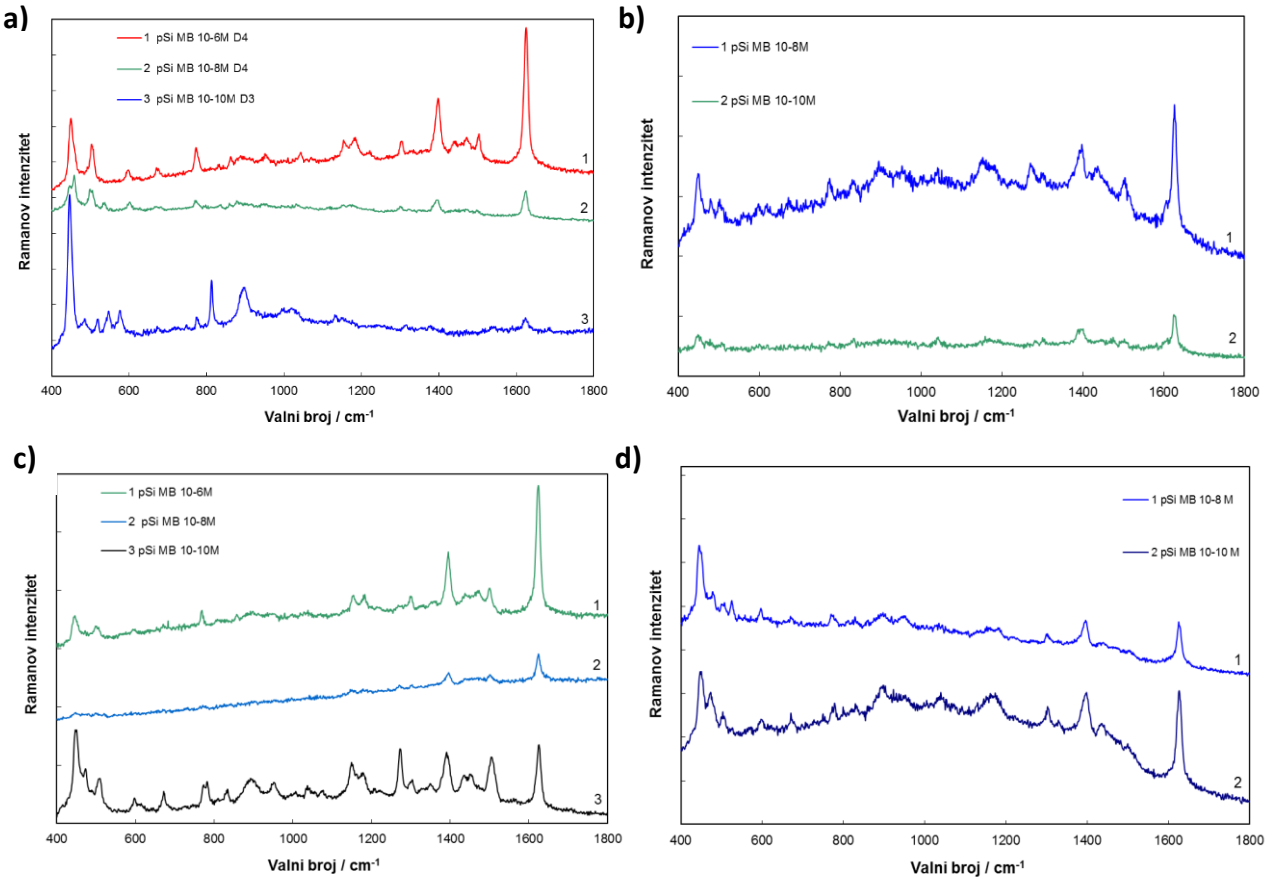
Druga istraživana metoda pripreme površina za SERS analizu bila je kapanje Ag koloida na površinu PSi pri čemu je R6G korišten kao testna molekula. Slika 67b prikazuje SERS spektre. R6G mogao se u ovom slučaju detektirati do koncentracije 10^{-8} M.

Na temelju prethodnih istraživanja očekivala se bolja efikasnost naših PSi uzoraka u crvenom i NIR području.[224,225] Ovo je bio razlog zbog kojeg su uzorci kod kojih je napravljena laserska ablacija testirani s metilenskim modrilom pri pobudi od 633 nm, što je rezultiralo rezonantnim SERS-om. Nadalje, dubina prodiranja u Si pri 633 nm je 3 μm, dok pri 514 iznosi 0,7 μm što nam omogućava bolji uvid u utjecaj pora kod poroznog Si.

Uzorci makroporoznog Si jetkani 15 i 30 minuta (s gustoćom struje 4 mA/cm^2) prekriveni su srebrnim nanočesticama koje su proizvedene laserskom ablacijom pomoću 30000 pulseva. Uzorci koji su jetkani 15 minuta pokazali su dobru SERS aktivnost s lijepim spektrom metilenskog modrila pri koncentraciji od 10^{-10} M (Slika 68a). S uzorkom koji je bio jetkan 30 minuta moglo se detektirati samo 10^{-6} M otopinu MB.

Dobro je poznato da duže jetkanje stvara dublje makropore, nakon čega dolazi do smanjenja poroznosti uslijed kemijskog otapanja PSi. U našem je slučaju došlo do povećanja

duljine pora kod dužeg jetkanja što je vidljivo na SEM slikama. Razlog zašto se, za depoziciju srebra od 30000 impulsa, 15 min jetkani uzorak pokazao bolji za SERS mjerenja od 30 min jetkanog uzorka, možda leži u činjenici da 30 min jetkan uzorak ima deblji porozni sloj te više analiziranih molekula može ući dublje u silicij. To bi moglo značiti da te molekule nisu dostupne za detekciju zbog relativno kratke dubine penetracije svjetlosti.



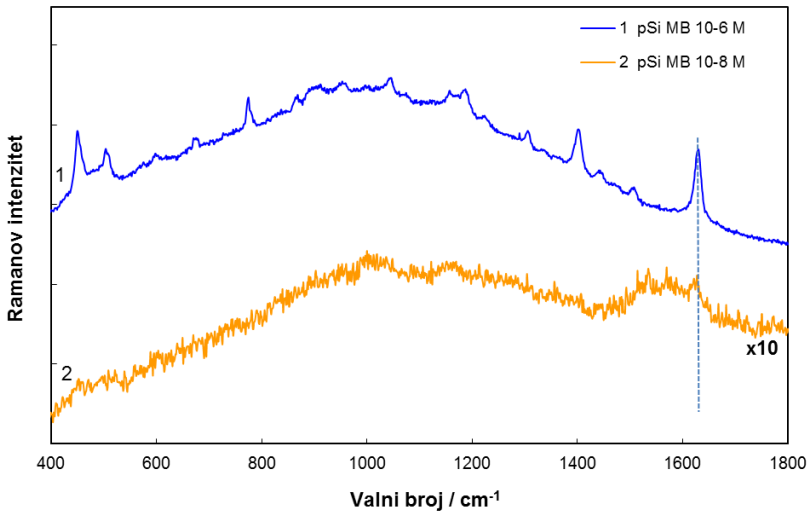
Slika 68 SERS spektri MB: a) 10^{-6}, 10^{-8} i 10^{-10} M (od vrha prema dolje) na PSi uzorku #1 nakon Ag ablacije (30 000); 0.6 µW (D4) i 6 µW (D3); b) 10^{-8} i 10^{-10} M (od vrha prema dolje) na PSi uzorku #1 nakon Ag ablacije (45 000); c) 10^{-6}, 10^{-8} i 10^{-10} M (od vrha prema dolje) na PSi uzorku #2 nakon Ag ablacije (45 000) i d) 10^{-8} i 10^{-10} M (od vrha prema dolje) na PSi uzorku #3 nakon Ag ablacije (45 000), (633 nm, 6 µW, osim ako je drugačije navedeno, vrijeme snimanja 10 s).

U sljedećem pokušaju pravljenja dobrog SERS supstrata na PSi koristila se laserska ablacija srebrom s većim brojem pulseva. U drugoj je ablaciji korišteno 45000 pulseva što je rezultiralo debljim slojem srebra. U ovom su slučaju uzorci jetkani 15 i 30 minuta pokazali dobru SERS aktivnost (Slika 68b i c), kao i uzorak jetkan s gustoćom struje 10 mA/cm^2 15 minuta (Slika 68d). Za ovaj je uzorak (uzorak #3, 45000 pulseva) primijećena vrpca pri

koncentraciji 10^{-12} M, no ne može se sa sigurnošću reći da ta vrpca pripada MB. Tako je granica detekcije metilenskog modrila za sva tri PSi uzorka pripremljena s 45000 pulseva između 10^{-10} M i 10^{-12} M.

Kod uzoraka nakon laserske ablacije zlatom najniža granica detekcije MB (za koju se može reći da se nalazi između 10^{-6} i 10^{-8} M) dobivena je na uzorku #2 (Slika 69).

Mjerenja na uzorcima makroporoznog Si nakon ablacije srebrom sa 45000 impulsa također su provedena s korištenjem pobudne linije 785 nm. U tim spektrima vrpca MB na 450 cm^{-1} nije bila prisutna. Vrpca metilenskog modrila na 1624 cm^{-1} jedva je detektirana pri koncentraciji 10^{-10} M u uzorku #1 i u uzorku #2 (Slika P5 u prologu). Valja napomenuti da je na uzorcima poroznog Si bez Ag nanostruktura na površini MB detektiran do koncentracije 10^{-4} M.



Slika 69 SERS spektri MB (10^{-6} i 10^{-8} M od vrha prema dolje) na PSi uzorku #2 nakon ablacije sa zlatom (30 000 pulseva); (633 nm; 60 µW; vrijeme snimanja 10 s).

4.2.3 Formiranje Ag kristala na mezoporoznom Si

Kao što je već opisano, jedna od metoda za dobivanje metalnih čestica na površini nekog supstrata je uranjanje u otopinu metalne soli. Depozicija metala ne porozni silicij dešava se mehanizmom elektrokemijskog istiskivanja.[170] Neke su grupe pokušale optimizirati ovu metodu kako bi dobile Ag kristale s dobrim SERS pojačanjem. Tako su Giorgis i suradnici te Panarin i suradnici proučavali duža vremena uranjanja, čak do 60 min, na Si pločicama male otpornosti.[236,237] Pored proučavanja vremena uranjanja, Virga i suradnici ispitivali su utjecaj temperature otopine $AgNO_3$ za dobivanje optimalnih supstrata

za SM detekciju.[238] Lü i suradnici proučavali su na koji način debljina poroznog sloja utječe na morfologiju nastalih srebrnih čestica.[239]

U ovom je poglavlju istraživano nastajanje srebrnih čestica na površini uzoraka mezoporoznog Si dobivenih jetkanjem s različitim gustoćama struje, a u svrhu optimizacije veličine Ag kristala za postizanje maksimalnog SERS signala. Za depoziciju srebra korištena je metoda uranjanja u otopinu Ag soli. Također je istraženo SERS pojačanje ovakvih supstrata na molekuli rodamina 6G. Proučavano je kako različite koncentracije srebrovog nitrata, kao i različita vremena uranjanja, utječu na formiranje Ag čestica, a samim tim i na pojačanje signala.

Uzorci mezoporoznog Si pripremljeni su elektrokemijskim jetkanjem uz različite gustoće struje (od 1 do 40 mA/cm^2) u 12 % HF (u etanolu) u trajanju 15 minuta. Nakon anodizacije srebro je na uzorke naneseno uranjanjem u otopinu $AgNO_3$. Kad se porozni Si stavi u otopinu $AgNO_3$ dešavaju se sljedeće reakcije:

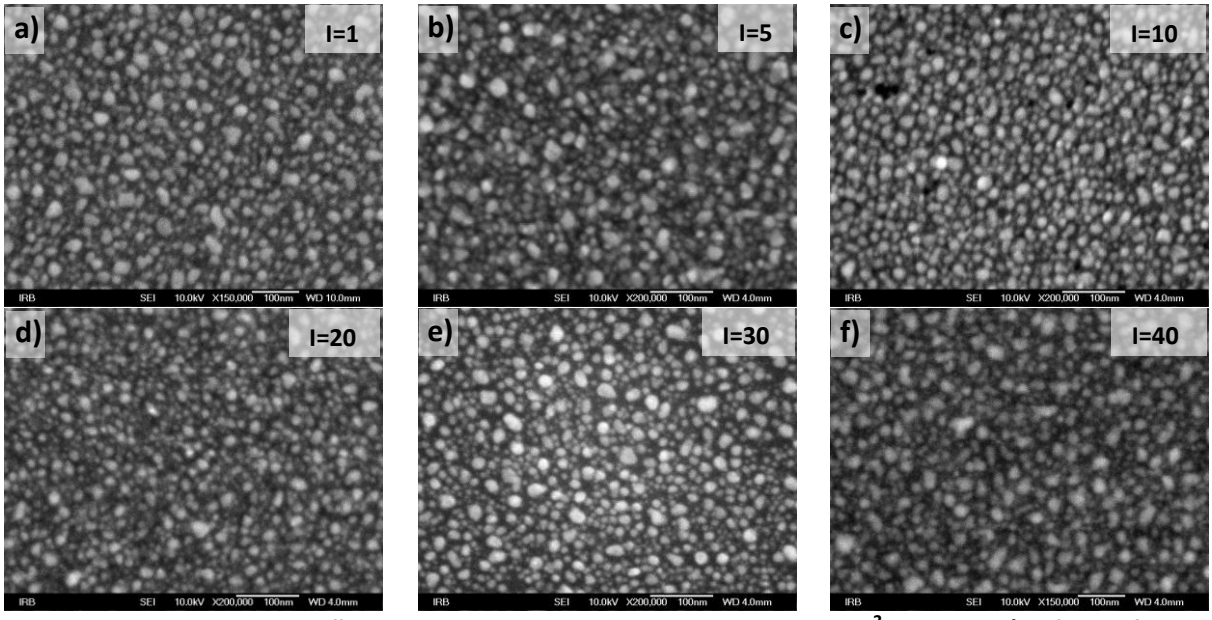
$$2\,Si_{surf} + H_2O \rightarrow Si-O-Si_{surf} + 2\,H^+_{aq} + 2\,e^- \quad \textbf{(4-4)}$$

$$2\,Si-H_{surf} + H_2O \rightarrow Si-O-Si_{surf} + 4\,H^+_{aq} + 4\,e^- \quad \textbf{(4-5)}$$

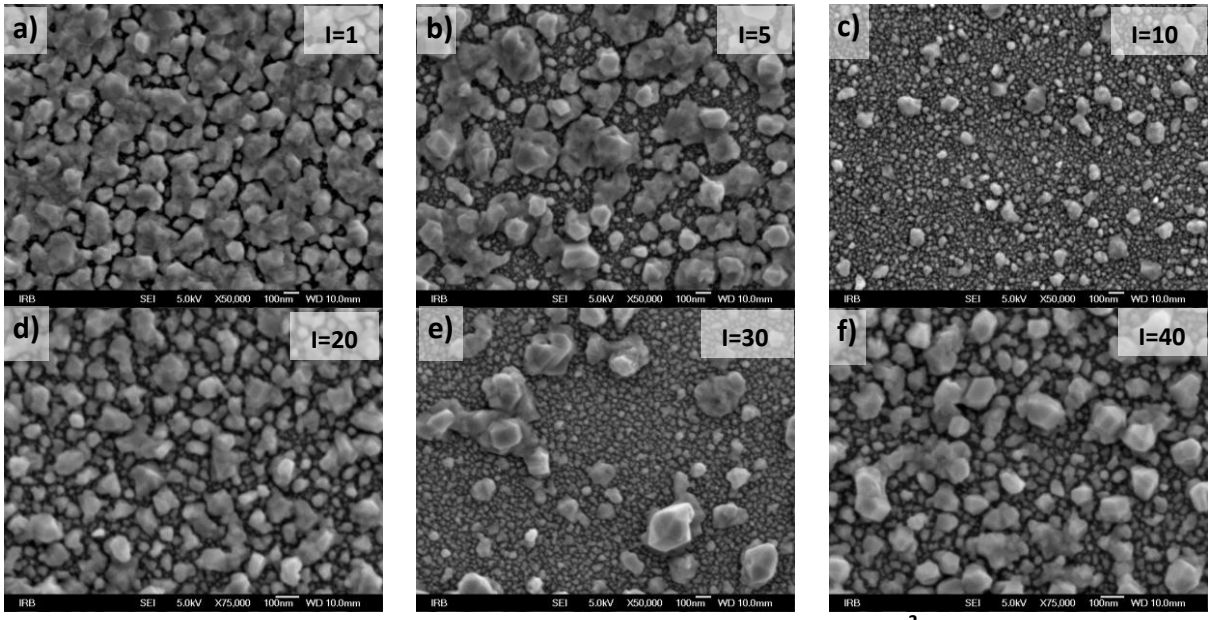
$$\boldsymbol{Ag^+_{aq} + e^- \rightarrow Ag_{surf}} \quad \textbf{(4-6)}$$

Redukcija srebra dešava se istovremeno s oksidacijom poroznog silicija. Stoga je kod uzoraka koji nisu svježe pripremljeni potrebno pretvoriti površinske Si-O veze u Si-H veze uranjanjem u razrijeđenu HF otopinu.

Slika 70 i Slika 71 prikazuju SEM mikrografije Ag nanočestica formiranih na uzorcima mezoporoznog Si jetkanima s različitim gustoćama struje, nakon uranjanja u dvije koncentracije srebrovog nitrata (10^{-3} i 10^{-2} M). U Tablici 14 navedeni su promjeri Ag NČ (zajedno sa širinom na polovici visine, FWHM, i pogreškama) izračunati sa SEM slika.



Slika 70 SEM slike Ag nanočestica dobivenih uranjanjem PSi 1 min u 10^{-3} M $AgNO_3$ (a i f povećanje 150 000×; b, c, d i e povećanje 200 000×).



Slika 71 SEM slike Ag nanočestica dobivenih uranjanjem PSi 1 min u 10^{-2} M $AgNO_3$ (a, b, c i e povećanje 50 000×; d i f povećanje 75 000×).

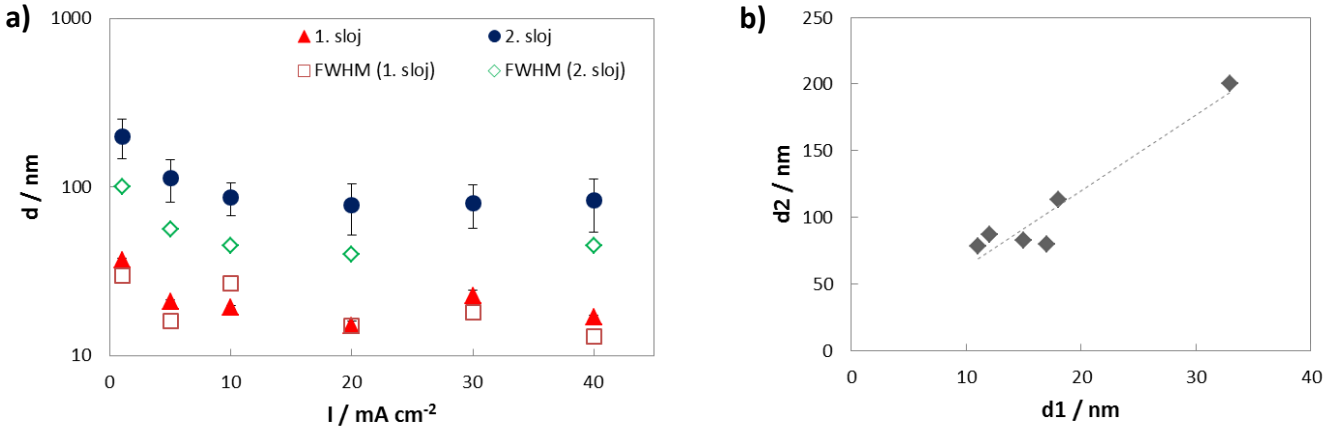
U ovom rasponu gustoća struje, za uranjanje u 10^{-3} M $AgNO_3$ koncentraciju, nema vidljivih agregata već samo jedan sloj sferičnih čestica. Pri višoj $AgNO_3$ koncentraciji vidimo da su se formirala dva sloja (Slika 71): pozadinski sloj, koji je formiran od manjih čestica i gornji sloj, koji se sastoji od Ag nakupina. Štoviše, u slučaju 5, 20 i 40 mA/cm^2 uzoraka, dominiraju agregati dok su manje NČ vidljive ispod gornjeg sloja. U slučaju uzorka

jetkanog s 1 mA/cm^2, vidimo da agregati rastu i spajaju se te formiraju kompaktan drugi sloj s procjepima širine oko 10 do 20 nm. Čini se da korištenjem manjih gustoća struje postižemo više defekata na površini silicija pa je stoga ubrzan rast Ag kristala. Jezgre nukleacije stvaraju se preferirano na rubovima pora iz čega proizlazi da različita poroznost rezultira različitom morfologijom deponiranih kristalića. Ovo je također razlog bržeg rasta Ag sloja na poroznom u odnosu na kristalni Si.

Tablica 14 Promjeri Ag čestica (± pogreška) za dvije $AgNO_3$ koncentracije (izmjerenih na SEM slikama) formiranih na površini uzoraka PSi koji su dobiveni jetkanjem s različitim gustoćama struje, *I*. Kod veće koncentracije dani su promjeri Ag NČ za prvi i drugi sloj.

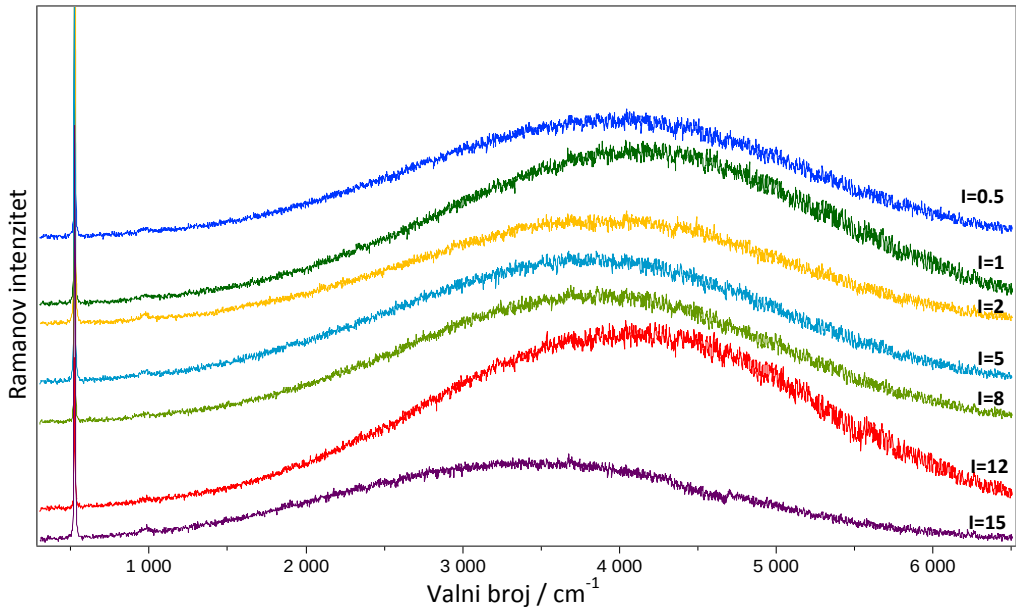
I / mA cm^{-2}	*c*($AgNO_3$) / mol L^{-1}					
	10^{-3}		10^{-2}			
	$d_{NČ}$ / nm	fwhm / nm	$d_{1.\ sloj}$ / nm	*fwhm* / nm	$d_{2.\ sloj}$ / nm	*fwhm* / nm
1	16,7 ± 0,8	22	36,6 ± 1,4	30	200 ± 52	100
5	10,7 ± 0,3	7	20,8 ± 0,6	16	113 ± 32	56
10	11,9 ± 0,2	8	19,3 ± 0,6	27	87 ± 19	45
20	9,5 ± 0,4	16,5	15,1 ± 1	15	78 ± 26	40
30	16,7 ± 0,5	9,5	22,6 ± 1,8	18	80 ± 23	-
40	17,0 ± 0,6	11	16,9 ± 0,4	13	83 ± 29	45

Slika 72a prikazuje srednje vrijednosti promjera čestica u dva nastala Ag sloja na mezoporoznom Si nakon tretmana od 1 min u $AgNO_3$. Vidimo da kristali nastali u donjem sloju pokazuju slično ponašanje kao i veći kristali u gornjem sloju s obzirom na korištene struje jetkanja. Veličina čestica smanjuje se do približno 10 - 15 mA/cm^2. Nakon ove vrijednosti nema značajnih promjena veličine Ag kristala s porastom struje jetkanja. Ovo pokazuje veliku osjetljivost rasta Ag kristala o parametrima jetkanja za gustoće struje do približno 15 mA/cm^2. Slika 72b prikazuje promjere većih Ag kristala u drugom sloju u ovisnosti o promjeru manjih kristala pozadinskog sloja. Vidljiva je jasna korelacija većih i manjih kristala s obzirom na njihovu veličinu.



Slika 72 a) promjer Ag čestica (za oba sloja) formiranih 1 min uranjanjem u 10^{-2} M $AgNO_3$ u ovisnosti o struji jetkanja i b) promjer Ag agregata u drugom sloju u odnosu na promjer Ag čestica u prvom sloju.

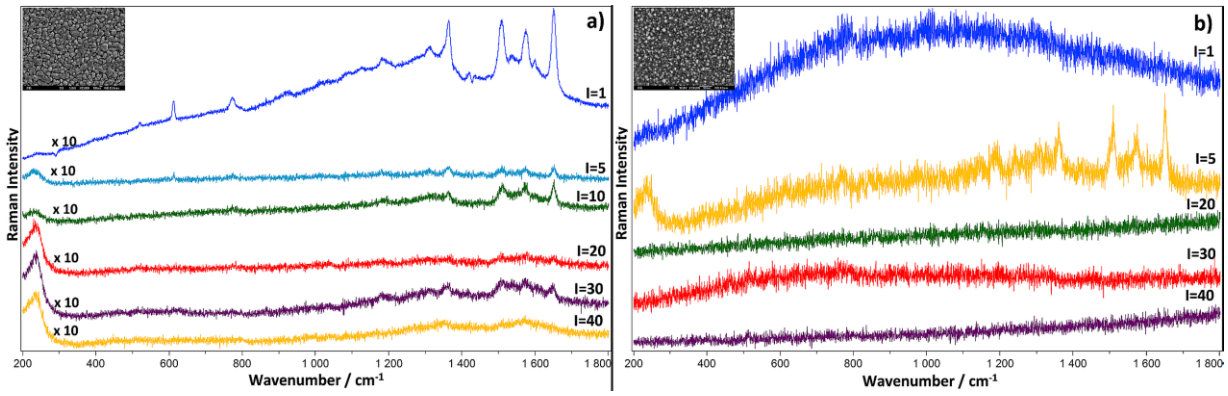
Kako bi se još detaljnije objasnila ovisnost rasta čestica o parametrima anodizacije u ovom području niskih struja, napravljen je niz mezoporoznih uzoraka jetkanih s 0,5, 1, 2 , 5, 8, 12 i 15 mA/cm^2. Na ovim su uzorcima ispitana fotoluminiscentna svojstva (Slika 73) kao i promjena intenziteta Si vrpce nakon depozicije srebra (1 min u 5×10^{-5} M $AgNO_3$). Nakon depozicije srebra fotoluminiscencija je u svim uzorcima gotovo u potpunosti nestala. Nakon depozicije srebra intenzitet Si vrpce optičkog fonona na 520 cm^{-1} smanjio se kod svih uzoraka približno 1,5 puta, dok je fotoluminiscencija gotovo u potpunosti nestala jer srebrni kristali privlače pobuđene elektrone čime eliminiraju mogućnost njihove rekombinacije sa šupljinama.



Slika 73 Ramanovi spektri različitih uzoraka mezoporoznog Si (0,5, 1, 2, 5, 8, 12 i 15 mA/cm^2 odozgo prema dolje; λ=514,5 nm).

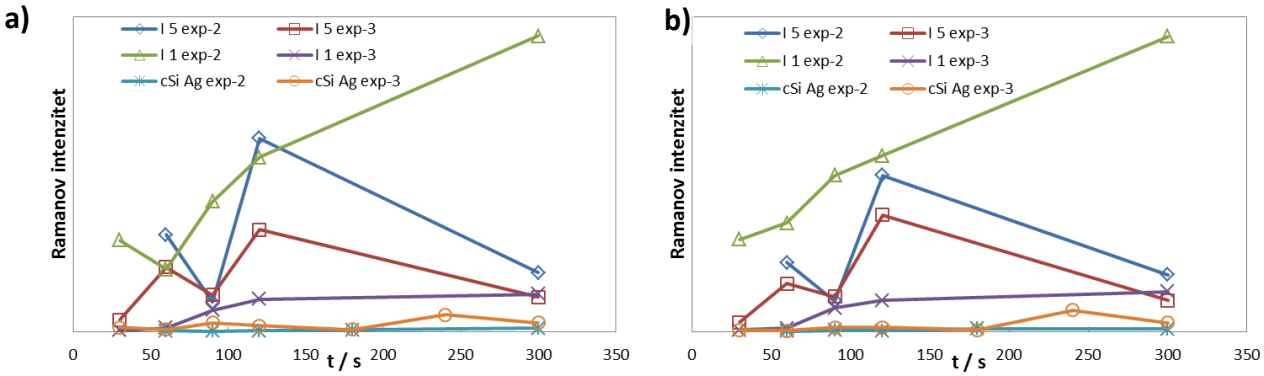
4.2.3.1 *SERS mjerenja*

Uzorci mezoporoznog Si s deponiranim srebrom ispitani su na SERS aktivnost korištenjem 10^{-8} M rodamina 6G. U slučaju uzoraka uronjenih 1 min u 10^{-3} M $AgNO_3$, najbolje SERS pojačanje R6G postignuto je za uzorak jetkan s I=5 mA/cm^2, ali, kao što se vidi na Slici 74b, razlika u SERS intenzitetu među uzorcima nije značajna. Ovo se podudara s činjenicom da se veličina Ag kristala ne mijenja značajno s promjenom struje jetkanja za uranjanje u nižu koncentraciju Ag^+. Daleko najbolji SERS intenzitet rodamina 6G za uzorke tretirane 1 min u 10^{-2} M $AgNO_3$ dobiven je za mezoporozni Si jetkan pri 1 mA/cm^2 (Slika 74a). Ovo je uzorak s dobrom prekrivenošću površine sa srebrom kod kojeg postoje velike nakupine približno udaljene par desetaka nm.



Slika 74 SERS spektri 10^{-8} M rodamina 6G na mezoporoznom Si: a) Ag deponiran 1 min uranjanjem u 10^{-2} M $AgNO_3$ i b) Ag deponiran 1 min uranjanjem u 10^{-3} M $AgNO_3$ (λ=514,5 nm).

U daljnjim se eksperimentima željelo ispitati kako SERS ovisi o vremenu uranjanja, tj. o vremenu nastajanja Ag kristala. U tu su svrhu izabrani uzorci koji su imali najbolje SERS pojačanje – uzorci dobiveni jetkanjem s 1 i 5 mA/cm^2 gustoćom struje. Ovi su uzorci tretirani s dvije koncentracije $AgNO_3$, 10^{-3} i 10^{-2} M, u vremenu od 30, 60, 90, 120 i 300 s. Zajedno s uzorcima poroznog Si tretirani su i uzorci kristalnog Si u istim koncentracijama i s uranjanjem od 30, 60, 90, 120, 180, 240 i 300 s. Rast Ag kristala na površini poroznog Si ovisi o količini pora, tj. njihovih rubova, na kojima preferirano nastaju Ag čestice. Budući da kristalni Si nema pore, rast kristala srebra u njegovom je slučaju puno sporiji. Iako su jednako tretirani otopinom $AgNO_3$, teško je uspoređivati porozni i kristalni Si jer njihova prekrivenost srebrom nije jednaka. Usporedba poroznog i kristalnog Si stoga je korištena samo kao gruba procjena.



Slika 75 SERS intenzitet 10^{-6} M R6G na mezoporoznom Si (1 i 5 mA cm^{-2}) i kristalnom Si u ovisnosti o vremenu uranjanja u $AgNO_3$ (10^{-2} i 10^{-3} M): a) vrpca na 1360 cm^{-1} i b) vrpca na 1648 cm^{-1}.

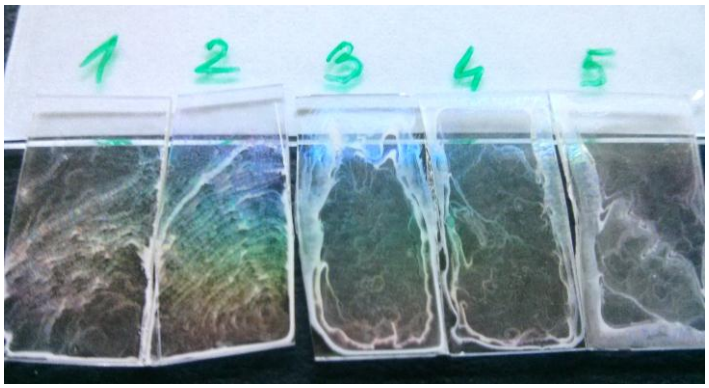
Slika 75 prikazuje SERS intenzitete dvije vrpce rodamina 6G: 1360 cm^{-1} i 1648 cm^{-1} na mezoporoznom Si i na kristalnom Si za različita vremena uranjanja. Najbolji SERS signal postignut je za uzorak jetkan s 1 mA/cm^2 i uronjen u 10^{-2} M $AgNO_3$ u trajanju od 300 s. Kod ovog uzorka za obje promatrane R6G vrpce SERS intenzitet raste linearno s vremenom uranjanja. Ovo bi moglo značiti da se na ovoj koncentraciji drugi sloj brzo formira te da SERS ovisi isključivo o rastu agregata srebra u tom sloju i nastajanju kanala među agregatima. Razlika u intenzitetu za uzorak jetkan s 1 mA/cm^2 i uzorka kristalnog Si koji su oboje uronjeni u 10^{-2} M $AgNO_3$ 300 s je oko 10^2.

Uzorak mezoporoznog Si jetkan s 1 mA/cm^2 i tretiran s 10^{-3} M $AgNO_3$ pokazao je značajno slabiji SERS signal od ostalih uzoraka, ali je također pokazao blago povećanje SERS intenziteta s produženim vremenom uranjanja. Uzorci jetkani s 5 mA/cm^2 i tretirani s 10^{-3} i 10^{-2} M $AgNO_3$ pokazali su sličan obrazac bez značajnih razlika. Za tretman od 90 s postoji pad u intenzitetu za obje $AgNO_3$ koncentracije. Nakon toga ponovno postoji pad SERS intenziteta za tretman od 300 s, ponovno za obje koncentracije. Budući da ovisnost nije linearna, čini se da je ovdje situacija malo kompliciranija. Moguće je da su pad i porast SERS intenziteta povezani s početkom formiranja drugog sloja srebra. Nastanak drugog Ag sloja kod uzorka jetkanog s 1 mA/cm^2 ide brže (Slika 71a i b) te je stoga drugi sloj kod ovog uzorka nakon 60 s već formiran. S druge strane, kod uzorka jetkanog s 5 mA/cm^2, pozadinski je sloj još uvijek dobro vidljiv nakon tretmana od 60 s u 10^{-2} M $AgNO_3$ te je potrebno duže vrijeme uranjanja kako bi se postigao optimalan razmak između kristala u drugom sloju. Iz navedenog vidljivo je da je za proizvodnju SERS supstrata s dobrim pojačanjem bitna pažljiva optimizacija parametara pripreme kao što su struja jetkanja i vrijeme uranjanja u $AgNO_3$.

4.3 Uređeni monosloj polistirenskih mikrosfera kao predložak za depoziciju srebra i zlata

Kao treća vrsta supstrata za površinski pojačano Ramanovo raspršenje u ovom su radu istraživani monoslojevi polistirenskih sfera s naparenim filmovima srebra. Proizvodnja ovakvih supstrata relativno je jednostavna i jeftina, a naš je zadatak bio istražiti koliki se faktor pojačanja može dobiti za testne molekule.

Iako postoje brojne metode za dobivanje monosloja polistirenskih mikrosfera na podlozi, u ovom je radu korištena metoda depozicije sfera hlapljenjem otapala (opisana u poglavlju 2.4.4.1.1) zbog svoje jednostavnosti i brzine. Za ovu je metodu karakteristično da se veliki broj mikrosfera deponira u debeli prsten oko ruba supstrata koji je vidljiv golim okom (Slika 76). Kao što je shematski prikazano na Slici 77a, sfere se prilikom depozicije organiziraju u heksagonsku gustu slagalinu (hcp, engl. *hexgonally closed pack*) na što upućuje i pojava duginih boja na uzorcima obaju veličina sfera (Slika 76). Do prelijevanja u duginim bojama dolazi zbog difrakcije svjetla, a ova nam pojava pruža izravnu informaciju koji je dio uzorka monokristal, a koji je polikristal. U heksagonskoj gustoj slagalini jedinična ćelija sastoji se od tri sloja atoma (u ovom slučaju sfera). U prvom i trećem sloju svaki atom blisko je okružen sa šest drugih atoma u istoj ravnini (a). Tri atoma u srednjem sloju smještena su u udubine između prvog i drugog sloja atoma (b). Struktura heksagonske guste slagaline dobiva se naizmjeničnim slaganjem a i b slojeva atoma (a-b-a-b-a-b...).



Slika 76 Izgled nanosfera od 370 nm nakon sušenja i prije naparavanja srebra.

Određivanje broja mikrosfera koje u monosloju mogu prekriti određenu površinu može se odrediti matematičkim izračunom. U slučaju supstrata veličine 1 cm × 1 cm broj sfera koje su poredane jedna pokraj druge u jednom redu je dan s:

$$broj\ sfera\ u\ jednom\ redu\ = \frac{1\ cm}{1000\ nm} \quad \textbf{(4-1)}$$

Budući da se mikrosfere pakiraju u heksagonskoj gustoj slagalini, razmak između svakog reda nije samo promjer mikrosfera, već se može odrediti korištenjem formule za visinu jednakostraničnog trokuta (pri čemu je stranica trokuta jednaka promjeru sfere). U tom je slučaju razmak između redova dan s:

$$razmak\ između\ redova\ = 1000\ nm\ \times \frac{\sqrt{3}}{2} \quad \textbf{(4-2)}$$

Iz toga dobivamo broj redova:

$$broj\ redova\ = \frac{1\ cm}{1000\ nm\ \times \frac{\sqrt{3}}{2}} \quad \textbf{(4-3)}$$

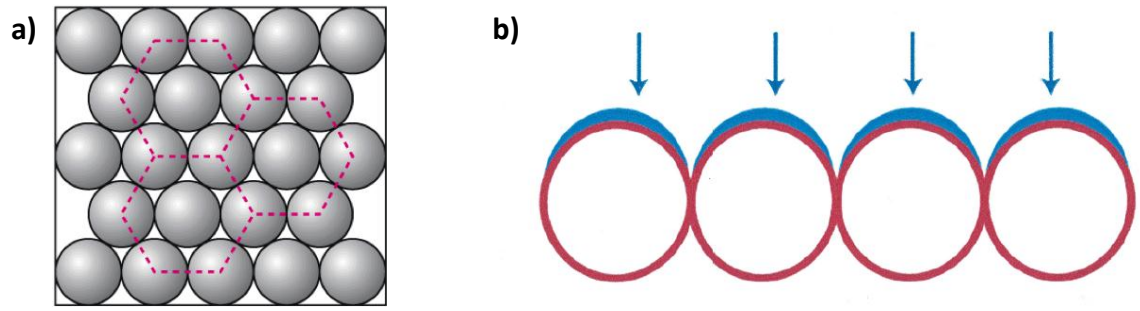
Stoga je ukupan broj mikrosfera koje su potrebne za prekrivanje supstrata u monosloju:

$$ukupan\ broj\ sfera = broj\ sfera\ u\ jednom\ redu\ \times broj\ redova$$
$$= \frac{1\ cm}{1000\ nm} \times \frac{1\ cm}{1000\ nm\ \times \frac{\sqrt{3}}{2}} \quad \textbf{(4-4)}$$

Iz toga proizlazi da ukupan broj potrebnih mikrosfera veličine 1000 nm za naš supstrat veličine 1,25 cm × 2,5 cm iznosi $3{,}61 \times 10^8$. Potreban broj sfera veličine 350 nm za istu veličinu supstrata iznosi $2{,}9 \times 10^9$.

Budući da je poznato da u 1 mL otopine polistirenskih sfera veličine 1000 nm ima $4{,}55 \times 10^{10}$ mikrosfera, potreban volumen otopine za tu veličinu supstrata iznosi 7,93 μL. 1 mL otopine polistirenskih sfera koje imaju veličinu 350 nm sadrži $1{,}06 \times 10^{12}$ sfera. Za gore navedenu veličinu supstrata broj potrebnih sfera za postizanje monosloja stoga iznosi 2,7 μL.

Ovaj je račun namijenjen samo gruboj procjeni volumena otopine mikrosfera potrebnog za prekrivanje supstrata monoslojem. Prevelika količina mikrosfera dovodi do stvaranja više slojeva dok premalo mikrosfera ima za posljedicu rijetko složene otoke mikrosfera. Eksperimentalno je utvrđeno da su supstrati koji su sadržavali približno 1,5-1,7 puta veći broj sfera od izračunatog imali najbolju pokrivenost površine.



Slika 77 Shematski prikaz: a) slaganja u heksagonskoj gustoj slagalini i b) varijacije debljine deponiranog sloja metala duž površine sfere.

Nakon određivanja potrebne količine mikrosfera pokušalo se odrediti koje je otapalo najpogodnije za razrjeđivanje nanosfera prilikom aplikacije na supstrat. U tu su svrhu korišteni voda, etanol te otopina Tritona X-100 u metanolu u omjeru 1:400. Treba napomenuti da se u slučaju kada otapalo nije korišteno, tj. kad su se koristile originalne sfere bez razrjeđivanja, otopina sfera nije mogla dobro razliti (razmazati) po cijeloj površini podloge što je rezultiralo podlogom s više slojeva. Isprobani su različiti omjeri razrjeđivanja sfera u metanolu (1:1, 1:2 i 1:3), no najbolje rezultate dalo je razrjeđenje 1:1 dok kod drugih omjera nije nastao monosloj već rijetko raspoređeni otoci sfera. Mnoge su grupe koristile Triton X-100 jer se pokazalo da povećava područje monosloja deponiranih sfera.[91] Ovaj surfaktant djeluje tako da smanjuje površinsku napetost i povećava hidrofilnost na površini polistirenskih kuglica. Triton reducira hidrofobne interakcije između polistirenskih čestica tako da one mogu formirati bolje složenu heksagonsku gustu slagalinu jer se čestice lakše slažu jedna pored druge.[240] Volumen korištenog Tritona X-100 u ovom radu prati metode koje su koristile druge grupe pa je tako za razrjeđivanje sfera korištena otopina metanol : TritonX 100 = 400 : 1 (u daljnjem tekstu nazvana otapalo).

Za konačnu depoziciju mikrosfera u slučaju većih sfera (1000 nm) za supstrat veličine 1,25 × 2,5 cm korišten je ukupni volumen od 25 µL (12,5 µL originalnih sfera + 12,5 µL otapala), dok je za manje sfere (350 nm) za isti supstrat korišten volumen od 9 µL (4,5 µL originalnih sfera + 4,5 µL otapala). U trećem slučaju obje veličine sfera su pomiješane prije aplikacije na podlogu. 16 µL mikrosfera od 1000 nm (već razrijeđenih otapalom u omjeru 1:1) pomiješano je s 9 µL mikrosfera od 350 nm (također razrijeđenih otapalom u omjeru 1:1).

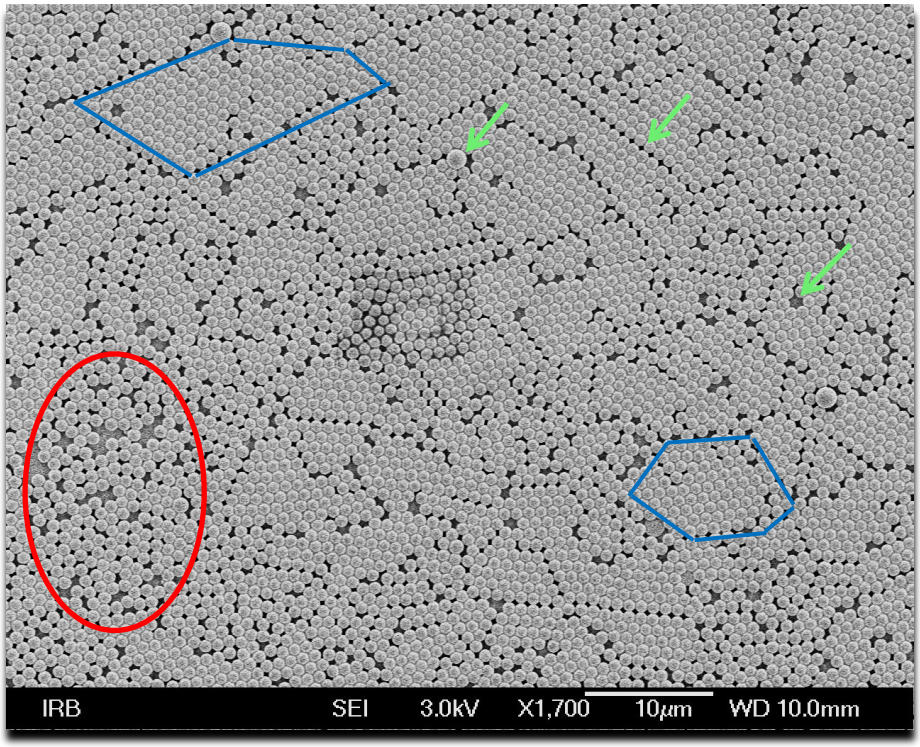
Nakon depozicije nanosfera na supstrat, aplicirana kap može se ostaviti da sama definira svoje granice ili se supstrat može uhvatiti pincetom i lagano rotirati kako bi se kap nanosfera rasporedila po čitavom supstratu. Prema nekim grupama ova metoda daje uniformniju depoziciju nanosfera.[241] Pored toga u mnogim je radovima navedeno kako je prilikom sušenja potrebno supstrat nagnuti u određenom smjeru i tako ga ostaviti.[242] Naginjanje (tiltanje) supstrata stvara gradijent na dnu kapljice i tako pomaže da se kap ujednačenije suši od vrha prema dnu. Stvaranje monosloja nanosfera tada bi trebalo ići red po red za razliku od slučajnog sušenja kapi na različitim lokacijama. Nakon pregledavanja supstrata pripremljenih na različite načine pomoću optičkog mikroskopa, zaključeno je da je optimalna površina monosloja sfera postignuta sušenjem u vakuum sušioniku u atmosferi etanola na ravnoj površini. Prema nekim istraživanjima, pojava prstena kave (engl. *coffee ring*), tj. nakupljanja čestica na rubu kapljice, može se izbjeći ili barem smanjiti sušenjem uzoraka u atmosferi para etanola.[243] U našem se slučaju također pokazalo da su uzorci uniformniji prilikom sušenja u atmosferi etanola. Domene monoslojeva mikrosfera imale su površine od stotinjak μm^2 što je daleko od idealnog slučaja prekrivenosti cijelog supstrata, ali nam je bilo dovoljno dobro za daljnje eksperimente. Potrebno je još napomenuti da površina samih polistirenskih sfera nije glatka. Visinska razlika nabora na sferama je približno 5 – 15 nm.

Na supstrate pripremljene na gore opisan način slojevi srebra različitih debljina napareni su pomoću *e-beam* evaporatora u Laboratoriju za optiku i tanke slojeve. Princip rada *e-beam* evaporatora opisan je u poglavlju 2.6.8.4.1. Na mikrosfere veličine 350 nm kao i na pomiješane sfere (350 nm + 1000 nm) napareni su filmovi srebra debljine 80, 120, 160 i 200 nm. Na mikrosfere veličine 1000 nm napareni su filmovi srebra debljine 120, 180 i 240 nm.

Prilikom deponiranja metala na nanosfere, jedan dio materijala prolazi kroz međuprostor između sfera te se deponira na supstrat. Kad se metalni film deponira na sfere, njegova debljina varira duž površine sfere (Slika 77b). Film je najdeblji u smjeru depozicije i postaje tanji prema dodirnim točkama sfera.[244]

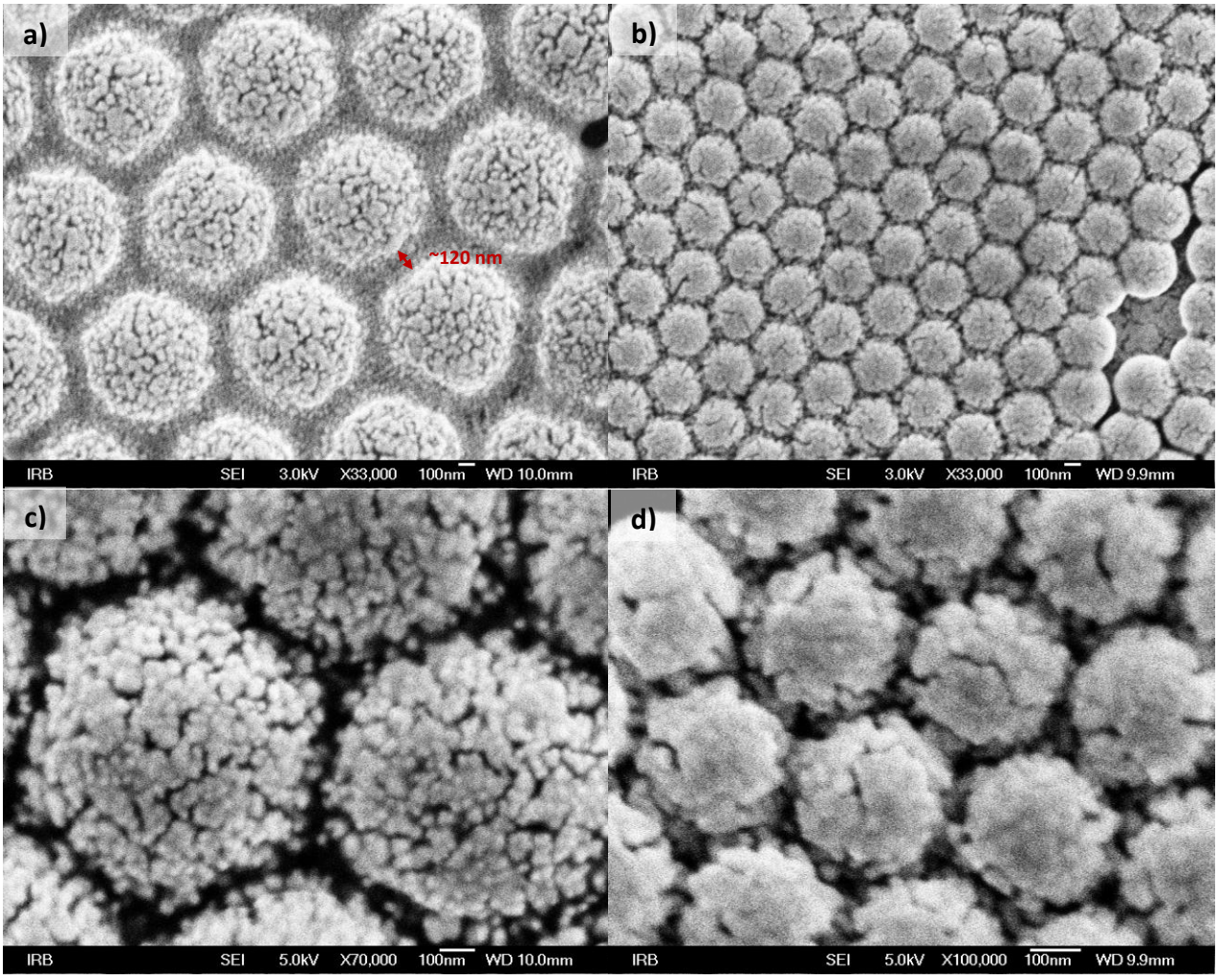
Slika 78 prikazuje SEM mikrografiju sloja polistirenskih sfera (1 μm). U donjem lijevom kutu (crveno područje) vide se sfere koje nisu organizirane u heksagonsku gustu slagalinu. Monosloj se sastoji od mnogih poddomena različitih veličina kao što su npr.

poddomene označene plavo. U domenama su također prisutni defekti koji potječu od dislokacija, promjena veličina sfera i praznina, a na slici su označeni zelenim strelicama.

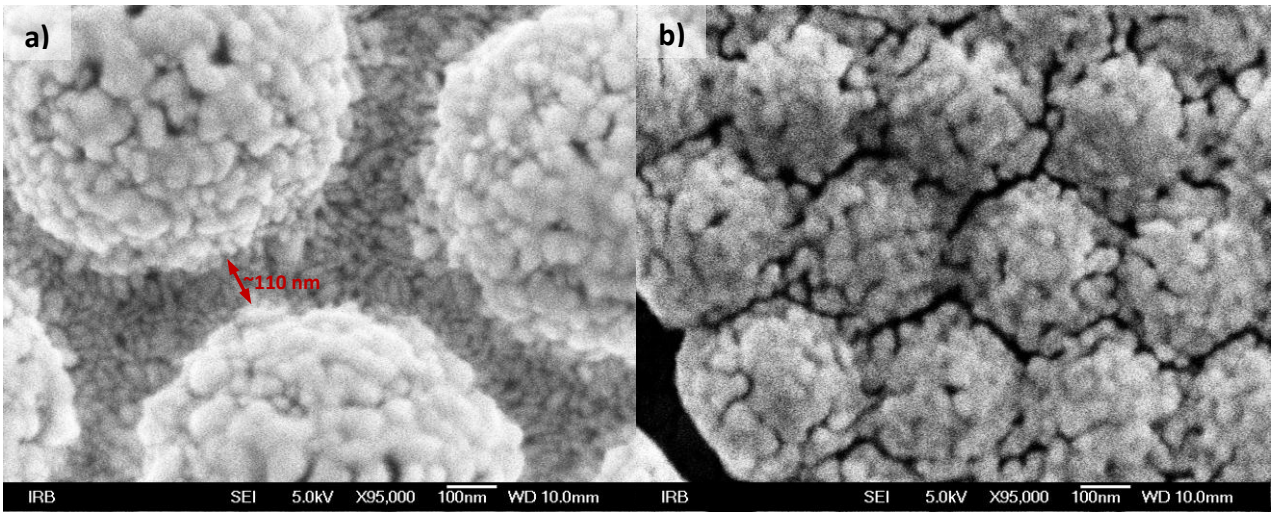


Slika 78 SEM slika polistirenskih sfera (1 μm): crveno područje – sfere nisu organizirane u heksagonsku gustu slagalinu, plava područja – poddomene u monosloju, zelene strelice – defekti u monosloju (povećanje 1700×).

Slika 79a i c prikazuju polistirenske sfere veličine 1000 nm s naparenim srebrom debljine 180 nm u različitim povećanjima. Ove su slike snimljene na različitim mjestima na uzorku, ali na oba je mjesta snimljeno područje monosloja. Očito je da razmak među sferama na različitim mjestima nije jednak. U uzorku koji je snimljen s manjim povećanjem (Slika 79a) najmanji razmak između pojedinih sfera iznosio je 120 ± 12 nm dok je kod uzorka snimljenog s većim povećanjem (Slika 79c) razmak među sferama iznosio 55 ± 7 nm. Budući da iz ovog možemo pretpostaviti da su na različitim mjestima na uzorku sfere različito udaljene iako su složene u heksagonsku gustu slagalinu, možemo očekivati promjene intenziteta signala na uzorku, tj. ovo bi moglo utjecati na reproducibilnost samog supstrata. U oba slučaja na površini mikrosfera formirale su se čestice srebra spojene u nakupine (42 ± 9 nm) između kojih su vidljivi brojni procjepi. Procjepi imaju širine približno 10 do 20 nm. Što se manjih sfera tiče (Slika 79b i d), razmak među sferama je 25 do 30 nm. Na sferama su opet vidljivi procjepi u filmu srebra (8 do 10 nm), ali u manjoj mjeri nego kod prethodnog uzorka.



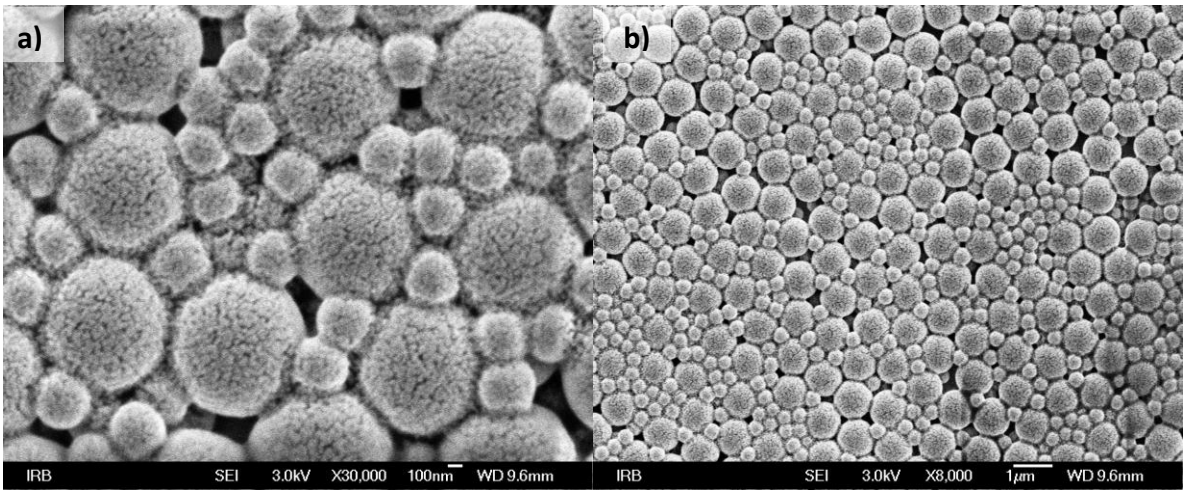
Slika 79 SEM slike polistirenskih sfera: a) sfere 1000 nm sa 180 nm srebra (povećanje 33 000×), b) sfere 370 nm sa 80 nm srebra (povećanje 33 000×), c) sfere 1000 nm sa 180 nm srebra (povećanje 70 000×) i d) sfere 370 nm sa 80 nm srebra (povećanje 100 000×). Na slici se vidi organizacija sfera u heksagonsku gustu slagalinu.



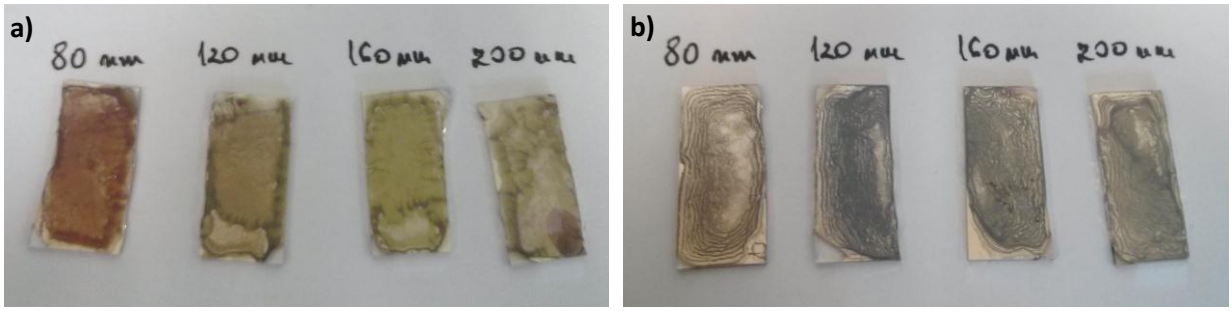
Slika 80 SEM slike polistirenskih sfera: a) 1000 nm s Ag filmom 120 nm i b) 350 nm s Ag filmom 200 nm (povećanje 95 000×).

Također su snimljene SEM slike za uzorke 120 nm / 1000 nm i 200 nm / 350 nm (Slika 80). Kod uzorka 120 nm / 1000 nm može se vidjeti da je najmanja vrijednost razmaka između pojedinih sfera otprilike 110 nm. Vidimo da razlike u udaljenosti pojedinih sfera za debljine filma od 180 nm i od 120 nm nisu velike. Postoje metode za smanjivanje razmaka među sferama, kao aniliranje, prekrivanje s SiO_2 i djelomično otapanje polistirena u organskim parama, ali proučavanje ovih metoda ostavljeno je za budući rad. Na podlozi ispod sfera naziru se štapićaste strukture dužine 33 ± 7 nm. Na samim sferama prisutne su Ag nakupine različitih veličina složene gusto jedne pored drugih (Slika 80a). Kod uzorka 200 nm / 350 nm (Slika 80b) vide se utori između sfera (13 nm ± 3 nm) dok su same sfere obložene kristalićima srebra veličine 30 do 40 nm.

Slika 81 prikazuje SEM slike uzorka 80 nm / (350 + 1000) nm. Vidljivo je da su se manje sfere nasumično rasporedile oko većih sfera što je rezultiralo neravnomjernim pakiranjem sfera. Kod većeg je pojačanja vidljivo (Slika 81a) da se struktura srebra na površini sfera sastoji od manjih čestica srebra. Manje sfere na nekim su mjestima priljubljene uz veće dok su na drugim mjestima razmaknute. Slika 82 prikazuje izgled uzoraka nakon naparavanja različitih debljina srebra.



Slika 81 Polistirenske sfere veličine 1000 nm i 370 nm pomiješane zajedno, nakon depozicije 80 nm srebra: a) povećanje 30 000×, b) povećanje 8000×.



Slika 82 Izgled mikrosfera od 370 nm nakon naparavanja različitih debljina srebra (a) i mikrosfera od 370 i 1000 nm pomiješanih zajedno nakon naparavanja različitih debljina srebra (b).

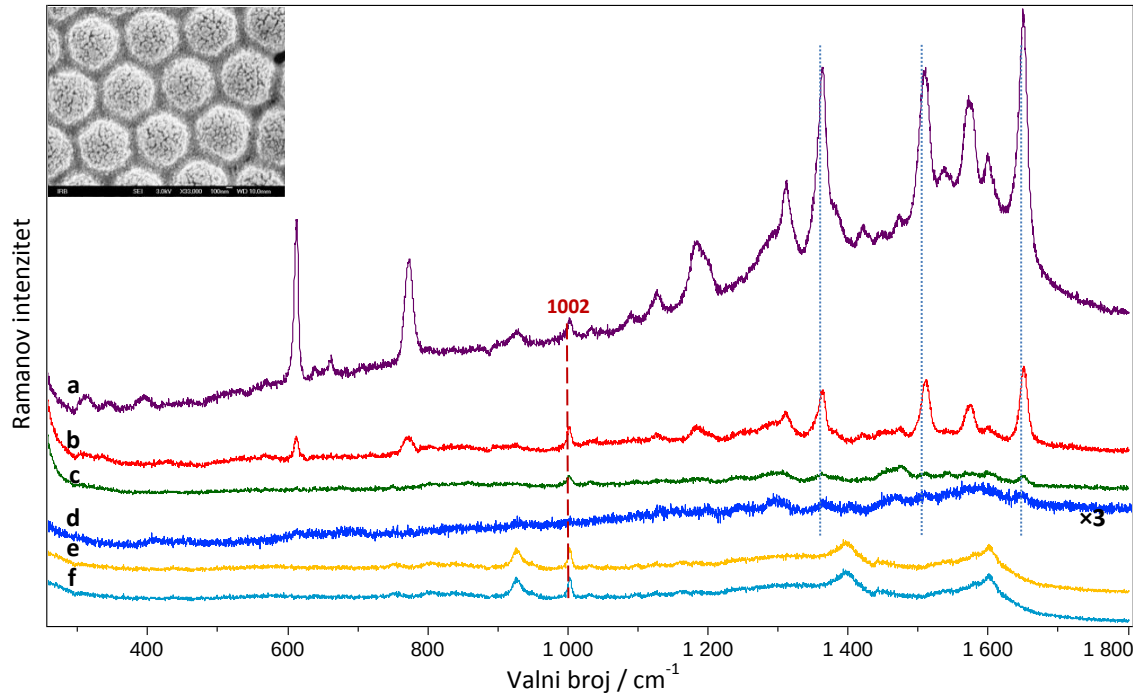
4.3.1 SERS mjerenja

Podloge pripremljene na gore opisani način testirane su kao SERS supstrati korištenjem rodamina 6G i piridina kao testnih molekula. Za testiranje podloga 2 μL odgovarajuće koncentracije testne molekule naneseno je pipetom na samu podlogu te se pričekalo da se kap osuši. U slučaju piridina takva metoda nije rezultirala spektrom pa je stoga spektar sniman na kapljici odmah nakon aplikacije.

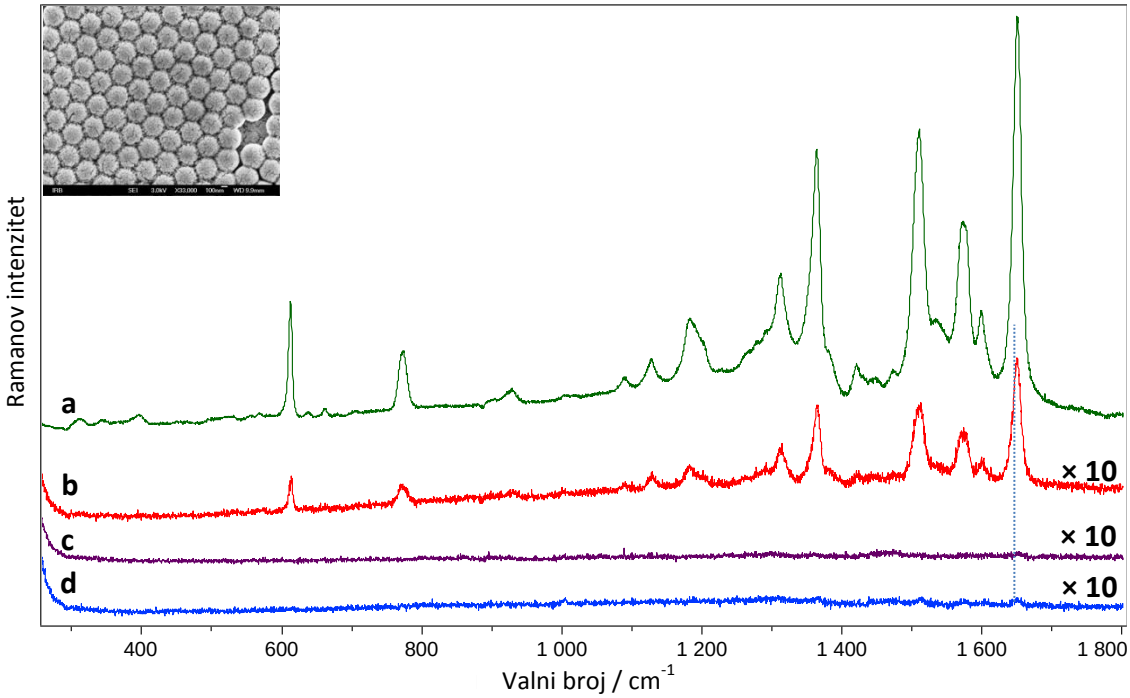
U slučaju podloga sa sferama od 1000 nm daleko najbolje pojačanje za rodamin 6G dobiveno je za napareni sloj srebra od 180 nm. Slika 83 prikazuje dobivene SERS spektre rodamina 6G nakon aplikacije na uzorak 180 nm / 1000 nm. Svi uzorci R6G snimani su korištenjem metode micanja laserskog snopa po uzorku koja je davala intenzivniji signal. Najniža koncentracija R6G koju se moglo detektirati na ovom uzorku je 10^{-9} M. Pored SERS spektara, Slika 84 prikazuje i spektar polistirenskih sfera (d) kao i njemu vrlo sličan spektar sfera s naparenim slojem srebra (180 nm) (e). Spektar sfera odgovara spektrima polistirena iz literature (intenzivna vrpca na ~ 1002 cm^{-1}).[245] No, pojavile su se i druge široke vrpce (927, 1390 i 1590 cm^{-1}) koje bi mogle potjecati od amorfnog ugljika, podloge ili produkata degradacije sfera iako je korištena mala snaga lasera (0,5 mW). Ovo ukazuje na veliku osjetljivost sfera i na potreban oprez glede odabira snage lasera prilikom snimanja spektara.

Kod podloga gdje su korištene sfere od 350 nm najbolji su rezultati dobiveni za napareni sloj srebra od 80 nm. Dobiveni spektri prikazani su na Slici 84. Intenziteti R6G vrpci za 10^{-6} i 10^{-8} M veći su kod ovog uzorka nego kod uzorka 180 nm / 1000 nm. Ipak, granica detekcije za R6G na uzorku 80 nm / 350 nm je negdje između 10^{-8} i 10^{-9} M budući da su intenziteti vrpci za 10^{-9} M koncentraciju vrlo slabi.

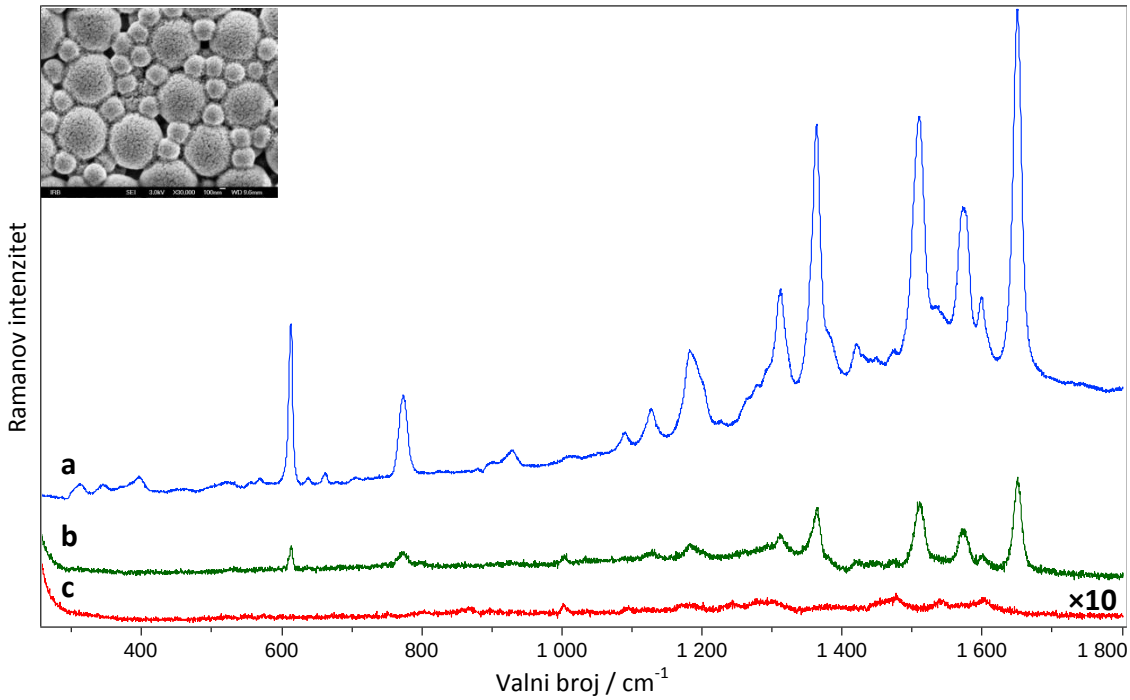
Ramanovi spektri R6G snimljeni su i na podlogama koje su pripremljene miješanjem sfera (350 + 1000 nm). U slučaju ovakvih podloga najbolje pojačanje Ramanovog signala dobiveno je za debljinu Ag filma od 80 nm (Slika 85). Intenzitet vrpce R6G na 1650 cm^{-1} za koncentraciju 10^{-6} M bio je u prosjeku 1,5 puta veći u odnosu na uzorak 80 nm / 350 nm i 9 puta veći u odnosu na uzorak 180 nm / 1000 nm. Najniža detektirana koncentraciju kod ovog je uzorka bila 10^{-8} M. Iako je najveći intenzitet R6G postignut kod uzorka 80 nm / (350 + 1000 nm), najbolja granica detekcije dobivena je za uzorak 180 nm / 1000 nm. Nije primijećeno da postoji ovisnost intenziteta vrpce rodamina 6G na 1650 cm^{-1} za koncentracije 10^{-6} i 10^{-8} M o debljini analiziranih slojeva, već su intenziteti varirali neovisno o debljini. Testirano je pojačanje Ramanovog signala rodamina 6G na podlogama na koje je na čisto stakalce (bez polistirenskih sfera) napareno srebro. U tom je slučaju najniža detektirana koncentracija rodamina 6G za debljinu filma 180 nm bila 10^{-6} M (Slika 83d), dok je za debljinu filma 80 nm bila 10^{-5} M (Slika 84d).



Slika 83 SERS spektri R6G na uzorku 180 nm / 1000 nm: a) 10^{-6} M, b) 10^{-8} M i c) 10^{-9} M, d) 10^{-6} M na uzorku s Ag bez sfera i Ramanovi spektri e) monosloja mikrosfera (1 µm) i f) 180 nm Ag na sferama 1000 nm (λ=514,5 nm; 0,5 mW; vrijeme snimanja 30 s; objektiv 100 x).



Slika 84 SERS spektri R6G na uzorku 80 nm / 350 nm: a) 10^{-6} M, b) 10^{-8} M, c) 10^{-9} M i d) R6G 10^{-5} M na uzorku s Ag bez sfera (λ=514,5 nm; 0,5 mW; vrijeme snimanja 30 s; 100 x).

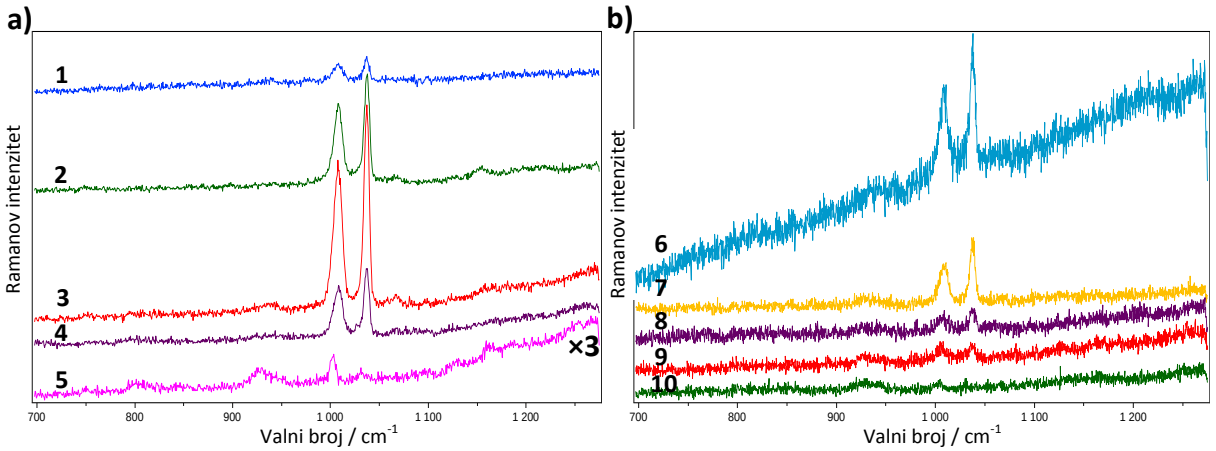


Slika 85 SERS spektri R6G na uzorku 80 nm / (350 nm + 1000 nm): a) 10^{-6} M, b) 10^{-8} M i 10^{-9} M (λ=514,5 nm; 0,5 mW; vrijeme snimanja 30 s; 100 x).

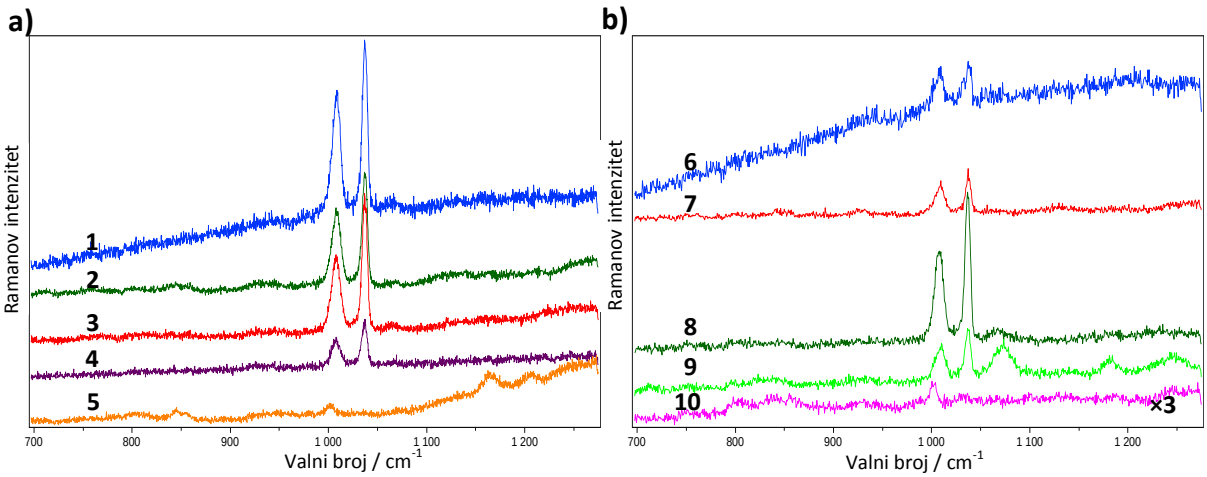
Druga molekula s kojom su testirane SERS podloge bio je piridin. Kao što je već napomenuto, snimao se spektar kapi piridina određene koncentracije prije nego se kap osušila. Treba napomenuti da su najbolja pojačanja dobivena za iste debljine filmove kao i u

slučaju rodamina 6G. Slika 86 prikazuje SERS spektre piridina na uzorku 180 nm / 1000 nm u području 700 do 1300 cm^{-1}. Najniža detektirana koncentracija piridina bila je 1,02 × 10^{-3} M. Na spektru 1,2 × 10^{-4} M piridina (Slika 86e) vidi se vrpca na 1002 cm^{-1} koja potječe od podloge (Slika 83e). Jednaka granica detekcije piridina (1,02 × 10^{-3} M) dobivena je za uzorke 80 nm / 350 nm i 160 nm / 350 nm (Slika 87a i b) te za uzorak 80 nm / (350 + 1000) nm (Slika 86b). U slučaju uzorka 80 nm / (350 + 1000) nm intenziteti vrpci bili su znatno niži nego kod ostalih uzoraka. Ako uspoređujemo intenzitete vrpci piridina pri koncentraciji 1,2 × 10^{-2} M, najbolje pojačanje dobiveno je na uzorku 80 nm / 1000 nm (gotovo dupli porast intenziteta) u odnosu na druga dva uzorka.

Uspoređivanjem SEM slika uzoraka koji su pokazali SERS pojačanje i uzoraka koji nisu dali pojačanje možemo zaključiti da su za dobro SERS pojačanje bitne male promjene u strukturi i veličini naparenih čestica srebra. Znatno pojačanje (2-3 reda veličine) SERS signala na uzorcima gdje je srebro napareno na sfere u odnosu na uzorke gdje je srebro napareno na čistu staklenu podlogu može se pripisati puno većoj površini koja je dostupna testnim molekulama za adsorpciju na srebro. Na uzorcima sa sferama prisutan je puno veći broj utora i pukotina u koje se mogu smjestiti molekule, a samim time postoji i više žarišta.



Slika 86 SERS spektri piridina: a) na uzorku 180 nm / 1000 nm: 1) 1,2 M, 2) 0,12 M, 3) 1,2 × 10^{-2} M, 4) 1,2 × 10^{-3} M i 5) 1,2 × 10^{-4} M i b) na uzorku 80 nm Ag / (350 nm + 1000 nm): 6) 1,2 M, 7) 0,12 M, 8) 1,2 × 10^{-2} M, 9) 1,2 × 10^{-3} M i 10) 1,2 × 10^{-4} M (λ=514,5 nm; 0,5 mW; 10 s; 50 x).

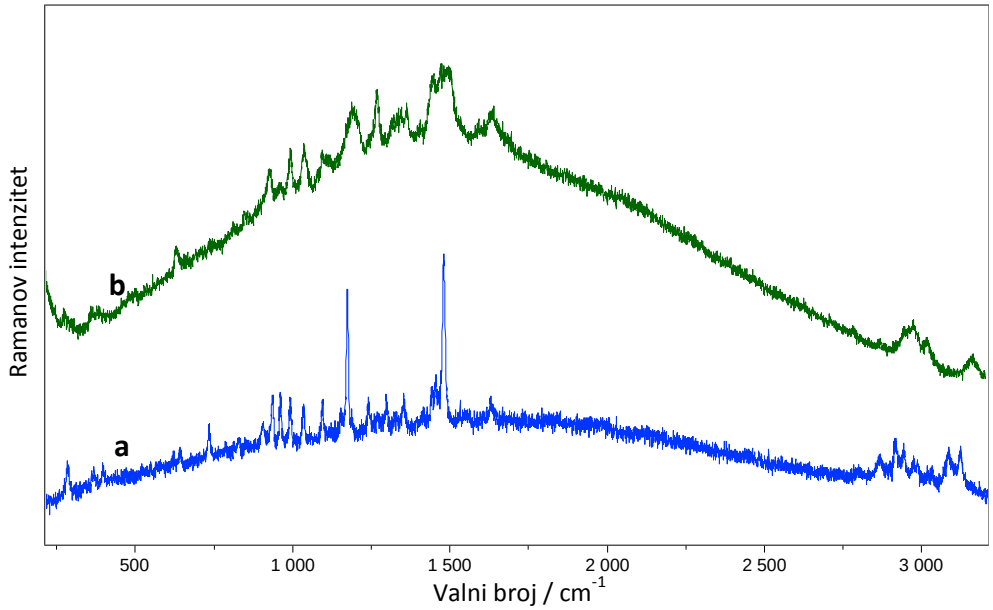


Slika 87 SERS spektri piridina a) na uzorku 80 nm / 350 nm: 1) 1,2 M, 2) 0,12 M, 3) 1,2 × 10^{-2} M, 4) 1,2 × 10^{-3} M, 5) 1,2 × 10^{-4} M i b) na uzorku 160 nm / 350 nm: 6) 1,2 M, 7) 0,12 M, 8) 1,2 × 10^{-2} M, 9) 1,2 × 10^{-3} M i 10) 1,2 × 10^{-4} M (*λ*=514,5; 0,5 mW; vrijeme snimanja 10 s; 50 x).

4.4 Primjena metode površinski pojačanog Ramanovog raspršenja

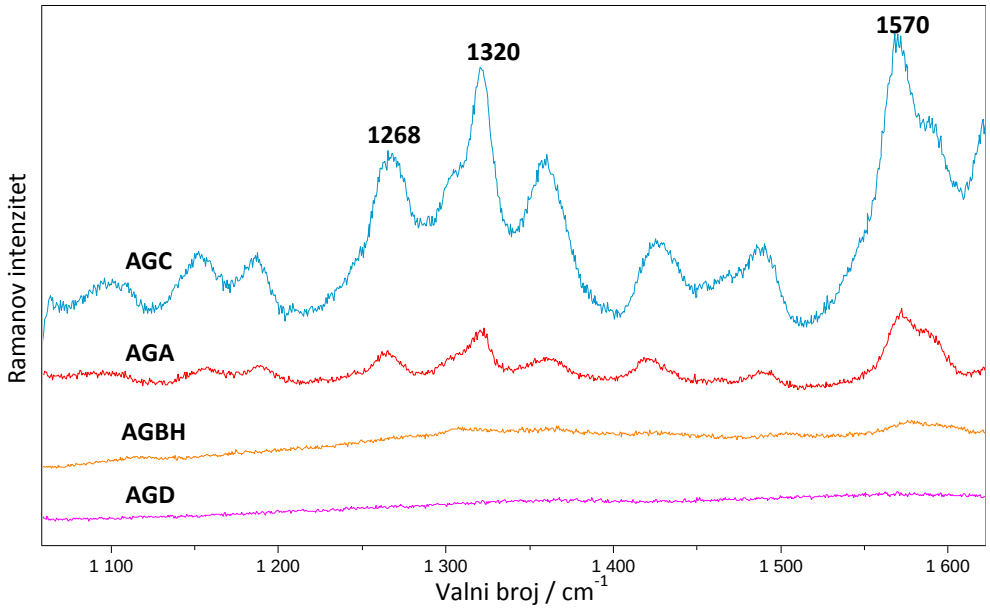
4.4.1 Detekcija histamina u ribi

Ramanovi spektri praha histamin dihidroklorida kao i 2 M vodene otopine snimljeni su korištenjem pobude 514,5 nm (Slika 88) te se podudaraju s ranije objavljenim podacima.[246]



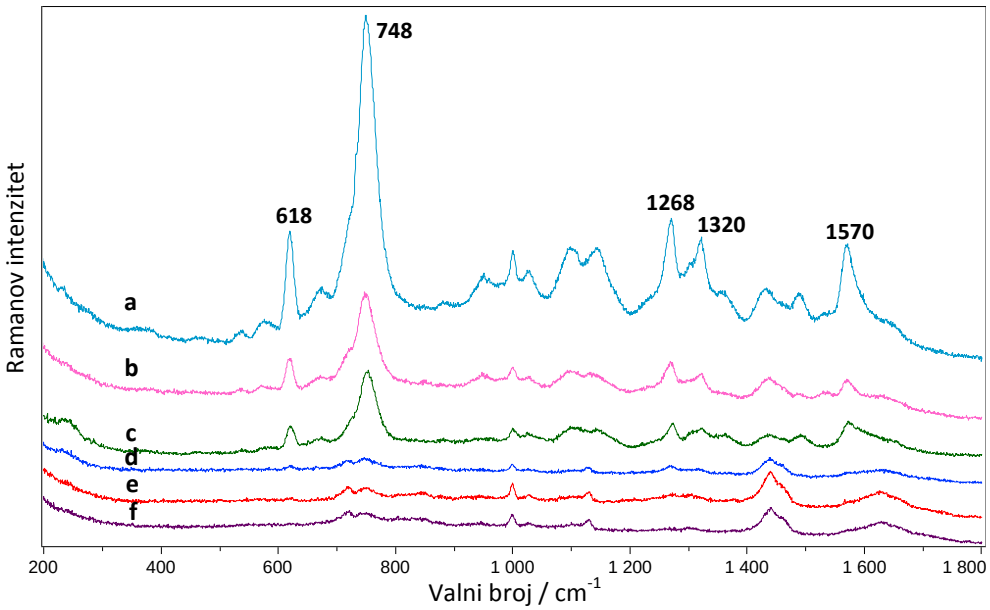
Slika 88 Ramanovi spektri histamin dihidroklorida: a) prah (vrijeme snimanja 6 s, 100×) i b) 2 M otopina (*λ*=514,5 nm; vrijeme snimanja 60 s).

Za snimanje SERS spektara histamina korištene su koloidne suspenzije AGC, AGA, AGD i AGBH koje su pokazale najbolje pojačanje za piridin i rodamin. Kao agregirajuće sredstvo korištena je otopina $NaBH_4$. Slika 89 prikazuje spektre 10^{-3} M otopine histamina u svakom od koloida u području od 1050 do 1650 cm^{-1} gdje se očekivalo nekoliko jakih vrpci. Najbolje pojačanje postignuto je za AGC koloid uz dodatak 0,23 M otopine $NaBH_4$ kao agregirajućeg sredstva. Koloid AGA također je rezultirao dobrim pojačanjem Ramanovog signala dok AGBH koloid ne daje gotovo nikakvo pojačanje. AGD koloid uopće ne daje pojačanje signala, čak ni u kombinaciji s drugim agregirajućim sredstvima. Ovi rezultati nisu neočekivani budući da se histamin u pH području korištenih koloidnih suspenzija (7,7 – 8,2) nalazi u formi monokationa. Stoga je vjerojatnije da je adsorpcija histamina na nanočestice ili agregate srebra koji imaju negativniji zeta potencijal lakša. U slučaju AGD, pored pozitivnog potencijala, adsorpciju dodatno otežava organski sloj oko NČ.



Slika 89 SERS spektri histamina (10^{-3} M) u području 1050 do 1650 cm^{-1} u različitim koloidnim suspenzijama (*λ*=514,5 nm).

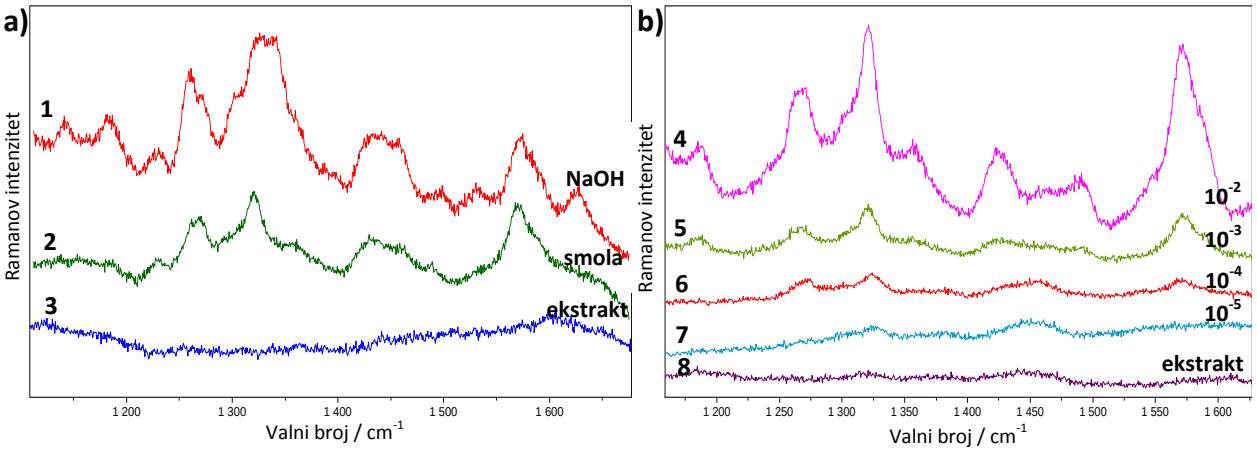
U daljnjem su radu snimljeni SERS spektri različitih koncentracija histamina u AGC koloidnoj suspenziji uz dodatak 0,23 M $NaBH_4$ uz vrijeme snimanja od 60 s u području od 400 do 1800 cm^{-1}. Slika 90 prikazuje SERS spektre histamina kao i njegove najintenzivnije vrpce koje će se promatrati u daljnjem radu: 618, 748, 1268, 1320 i 1570 cm^{-1}.



Slika 90 SERS spektri različitih koncentracija histamina u AGC koloidnoj suspenziji: a) 10^{-2} M, b) 10^{-3}, c) 10^{-4}, d) 10^{-5}, e) 5×10^{-6} i f) voda (514,5 nm; 60 s).

Potrebno je napomenuti da je u SERS spektrima došlo do značajnog pomaka Ramanovih vrpci i promjene u njihovom relativnom intenzitetu što je čest slučaj kod SERS mjerenja. Slične je rezultate objavio Davis sa suradnicima nakon proučavanja SERS spektara histamina na srebrnoj elektrodi te je pripisao vrpce na 1268, 1320 i 1570 cm^{-1} disanju i rastezanju imidazolnog prstena.[247] Granica detekcije za vodenu otopinu histamin dihidroklorida u AGC koloidnoj suspenziji je 5×10^{-6} mol/L. U daljnjim se eksperimentima pristupilo SERS mjerenjima histamina u ekstraktima ribljeg mesa. Budući da se za ekstrakciju histamina iz ribljeg mesa koriste $HClO_4$ ili trikloroctena kiselina, pH konačnog ekstrakta je nizak (1,4) što nepovoljno utječe na citratni koloid koji je stabilan u rasponu pH vrijednosti od 2 do 12.[127] Za prilagođavanje pH vrijednosti ekstrakta isprobane su dvije metode. U prvoj je metodi za neutralizaciju korištena ekvimolarna količina NaOH dok je u drugoj metodi korištena smola za anionsku izmjenu u OH^- obliku.

Slika 91 prikazuje SERS spektre histamina dodanog u ekstrakt koji nije tretiran te ekstrakt koji je tretiran s NaOH i smolom za anionsku izmjenu. Spektar histamina u ekstraktu koji nije tretiran ne pokazuje karakteristične vrpce histamina. Dodavanje ekvimolarne količine NaOH rezultiralo je SERS spektrom s intenzivnim vrpcama na 1260, 1325 i 1340 cm^{-1} koje vjerojatno potječu od supstancija preferirano vezanih na NČ srebra. Najbolji SERS spektar dobiven je korištenjem smole za anionsku izmjenu i u tom se spektru vide karakteristične vrpce histamina.



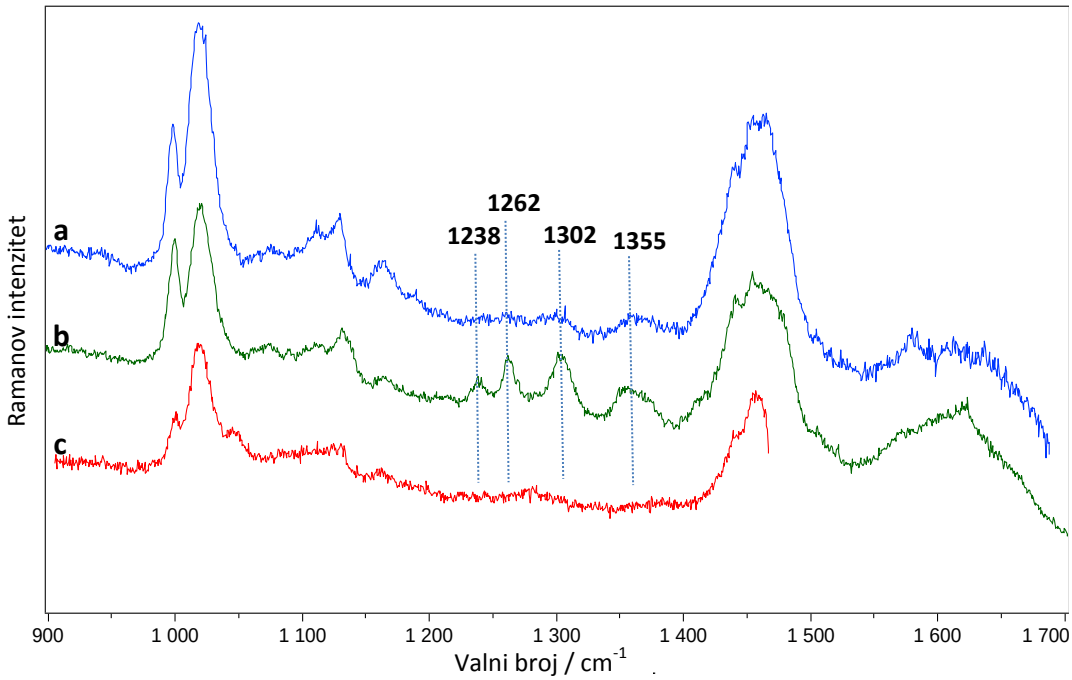
Slika 91 SERS spektri: a) 10^{-3} mol L^{-1} histamina u ribljem ekstraktu u AGC koloidu: 1) ekstrakt tretiran s NaOH, 2) ekstrakt tretiran sa smolom za anionsku izmjenu i 3) ekstrakt bez tetmana i b) histamina u ribljem ekstraktu nakon obrade smolom za anionsku izmjenu: 4) 10^{-2} M, 5) 10^{-3} M, 6) 10^{-4} M, 7) 10^{-5} M i 8) ekstrakt (514,5 nm).

Ovaj podatak nije neočekivan budući da smola za anionsku izmjenu pored perkloratnih iona veže i ostale nečistoće u obliku aniona pri čemu otpušta OH^- ione i povećava pH ekstrakta. Moguće je da perkloratni ioni kao i druge komponente ribljeg ekstrakta nepovoljno utječu na agregaciju NČ srebra i/ili adsorpciju histamina na NČ. Granica detekcije histamina u ribljem ekstraktu iznosi 10^{-4} mol/L što preračunato iznosi 111,2 mg/kg ribljeg mesa. Ova je vrijednost malo viša od pravilnikom propisane kritične granice količine histamina u svježoj ribi koja iznosi 100 mg/kg. Iako su potrebna daljnja poboljšanja ove metode, posebno glede granice detekcije i kvantifikacije, metoda površinski pojačanog Ramanovog raspršenja pokazala se jednostavnom i učinkovitom za detekciju histamina u ribljem mesu.

4.4.2 Detekcija aflatoksina B1

AFB1 kao i ostali aflatoksini ima kompleksnu molekulsku strukturu (Slika 39) pa je i njegova interakcija s Ag nanočesticama složena. Stoga je potrebno, ako se kao metoda detekcije koristi SERS, točno utvrditi vrpce svakog aflatoksina posebno. U ovom smo se dijelu usredotočili samo na analizu aflatoksina AFB1. Za SERS detekciju korištena je AGC koloidna suspenzija uz dodatak $NaBH_4$ kao agregirajućeg sredstva. Standard AFB1 otopljen je u metanolu. Slika 92 prikazuje SERS spektre negativne kontrole (metanola u koloidu uz agregirajuće sredstvo) te dvije koncentracije AFB1, 6×10^{-3} i 6×10^{-4} mol L^{-1}. Vidljivo je da se u spektru aflatoksina u promatranom području pojavljuje nekoliko vrpci kojih nema u negativnoj kontroli: 1238, 1262, 1303 i 1355 cm^{-1}. Wu i suradnici vrpcu na 1355 cm^{-1}

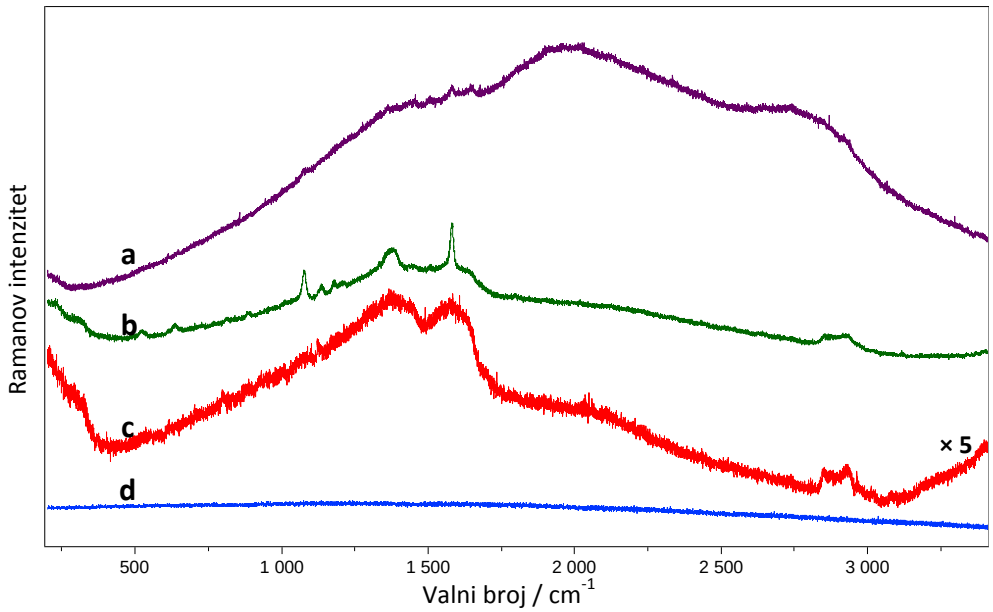
pripisali su deformacijskoj vibraciji CH_3, dok je vrpca na 1303 cm^{-1} pripisana C-H deformacijama u ravnini.[220] Vrpce na 1238 i 1262 cm^{-1} odgovaraju C-H deformaciji prstena te C-O-C i C-O-C(H_3) vibracijama.[220,248] U literaturi se navodi da u SERS spektrima dolazi do značajnog pomaka vrpci aflatoksina B1 u odnosu na konvencionalnu Ramanovu spektroskopiju.[248] Ovi pomaci Ramanovih vrpci mogu se pripisati prijenosu naboja između adsorbirane molekule aflatoksina i čestica srebra u kombinaciji s rezonantnom pobudom površinskih plazmona. U našem je slučaju zbog niske koncentracije standarda (6×10^{-3} mol L^{-1}) bilo nemoguće dobiti zadovoljavajući spektar AFB1 običnom Ramanovom spektroskopijom te stoga nismo bili u mogućnosti provjeriti ove navode. Najniža detektirana koncentracija AFB1 bila je 6×10^{-4} mol L^{-1}. Ova vrijednost razlikuje se približno za red veličine od 5×10^{-5} mol L^{-1} za AFB1 koji su dobili Wu i suradnici 2012. godine.[220] Budući da je AFB1 genotoksičan i karcinogen te se vrlo često pojavljuje u ljudskoj hrani, mnoga istraživanja idu u smjeru razvoja visoko osjetljive metode detekcije. 2015. godine Ko i suradnici objavili su rad u kojem su postigli granicu detekcije od 1 ng/mL (tj. $3{,}2 \times 10^{-10}$ mol L^{-1}) SERS baziranom imunoanalitičkom metodom korištenjem SiO_2-oklopljenih šupljih NČ zlata i magnetskih zrna.[249] Ovo pokazuje važnost SERS metode, posebno u razvoju osjetljivih metoda za detekciju opasnih supstancija u tragovima.



Slika 92 SERS spektar AFB1 u AGC koloidu: a) $6{\times}10^{-3}$ M, b) $6{\times}10^{-4}$ M i c) metanol u AGC koloidu (514,5 nm; vrijeme snimanja 120 s).

4.4.3 Detekcija nepoznate tekućine

Analiza pomoću SERS metode napravljena je za tekućinu nepoznatog sadržaja, nazvanu tekućina X. Ramanov spektar tekućine X nije rezultirao vrpcama (Slika 93, spektar d). Za daljnju je analizu kao SERS supstrat korištena koloidna suspenzija AGC (priprema opisana u poglavlju 3.5.1) uz $NaBH_4$ kao agregirajuće sredstvo. Uzorak tekućine X za SERS mjerenje pripremljen je na standardan način (opisano u poglavlju 3.8.1): 10 µL 0,1 M otopine $NaBH_4$ pomiješano je s 80 µL koloidne suspenzije te je nakon miješanja dodano 10 µL tekućine X. Slika 93a prikazuje dobiveni spektar. Na spektru su slabo vidljive pojedine vrpce, ali je prisutna znatna fotoluminiscentna pozadina. Potom je pripremljena tekućina X razrijeđena s milliQ vodom 10 × te je ovako razrijeđena otopina pomiješana s 10 µL 0,1 M otopine $NaBH_4$ i 80 µL koloidne suspenzije. Ovaj je spektar prikazan na Slici 93 pod b. U ovom su slučaju dobivene jasno vidljive vrpce na mjestu gdje su se u prethodnom spektru samo nazirale. Također je smanjen pozadinski signal. Dvije oštre i intenzivne vrpce nalaze se na 1075 cm^{-1} što je područje C-C i C-O-C vibracija i na 1580 cm^{-1} što bi moglo odgovarati C-C aromatskim ili C=C vibracijama. Napravljeno je još jedno razrjeđenje tekućine X tako da je prethodno razrijeđena tekućina X razrijeđena još 10 × te je snimljen spektar nakon miješanja s koloidom i agregirajućim sredstvom. Spektar ovog uzorka (Slika 93 pod c) nije pokazao poboljšanje u odnosu na prethodni uzorak pa se zaključuje da je optimalna koncentracija tekućine X za postizanje dobrog SERS pojačanja dobivena razrjeđivanjem 10 ×.



Slika 93 Spektri tekućine X: a, b i c – SERS spektri različitih koncentracija tekućine X i d – Ramanov spektar tekućine X (λ=514,5 nm).

5 ZAKLJUČAK

Niz srebrovih koloida različitih veličina čestica pripremljen je reduciranjem srebrovog nitrata s citratom, askorbinskom kiselinom, $NaBH_4$, PVP-om i glukozom uz prisutnost stabilizirajućeg sredstva. Koloidi su okarakterizirani s obzirom na njihovu morfologiju i SERS aktivnost. Rezultati UV-vidljive spektroskopije, mjerenja zeta potencijala, DLS-a i SEM-a potvrđuju da su nastale stabilne srebrne nanočestice određene veličine i naboja. Primjenom Langmuirove adsorpcijske izoterme, izračunate su adsorpcijske konstante, *K*, i maksimalne vrijednosti SERS intenziteta, I_{max}, piridina i rodamina 6G. Najbolje pojačanje Ramanovog signala za piridin postignuto je korištenjem srebrnih nanočestica veličine 40 nm koje su dobivene reduciranjem s citratom te su s citratom i stabilizirane. SERS signal testnih molekula još je više pojačan dodatkom natrijevog borhidrida kao alternativnog agregirajućeg sredstva. Najniže granice detekcije dobivene su za AGC (redukcija i stabilizacija citratom) i AGA (redukcija askorbinskom kiselinom, stabilizacija citratom) uzorke. SERS faktor pojačanja piridina izračunat je uzimajući u obzir broj molekula na srebrnim nanočesticama u aktivacijskom volumenu lasera te je za najbolji rezultat faktor procijenjen na 10^6.

Nekoliko različitih SERS supstrata pripremljeno je korištenjem makroporoznog silicija kao podloge. Makroporozni silicij dobiven je elektrokemijskim jetkanjem u fluorovodičnoj kiselini. SERS efikasnost supstrata testirana je korištenjem metilenskog modrila (MB) i rodamina 6G pri različitim valnim duljinama. Korištenjem pobude na 514,5 nm i rodamina 6G određene su granice detekcije za supstrate dobivene uranjanjem u otopinu $AgNO_3$ te za supstrate dobivene nanošenjem koloidne suspenzije na makroporozni Si. U prvom je slučaju granica detekcije iznosila 10^{-9} M dok je u drugom slučaju najniža detektirana koncentracija rodamina 6G bila 10^{-8} M.

Korištenjem pobude na 633 nm i metilenskog modrila određene su granice detekcije za uzorke makroporoznog Si na koje su Ag i Au naneseni laserskom ablacijom. Najizraženiju SERS aktivnost dali su uzorci nakon laserske ablacije s 45 000 pulseva kod kojih su dobiveni dobri spektri za koncentraciju MB 10^{-10} M. Ista granica detekcije dobiven je i za uzorak 4 mA/cm^2-15 min s Ag ablacijom od 30 000 pulseva. Za uzorke dobivene laserskom ablacijom zlatom najniža detektirana koncentracija bila je 10^{-8} M. Kod korištenja pobude u bliskom infracrvenom području (785 nm) granica detekcije za MB bila je 10^{-10} M

(uzorci 4 mA/cm^2- 15 i 30 min). Na temelju gore opisanog može se zaključiti da su korištenjem podloge makroporoznog Si dobiveni stabilni SERS supstrati.

Serija različitih uzoraka mezoporoznog Si pripremljena je jetkanjem uz korištenje različitih gustoća struje. Metoda depozicije uranjanjem koristila se za nanošenje srebra na uzorke mezoporoznog i kristalnog Si. Pažljivim odabirom parametara anodizacije moguće je utjecati na veličinu kristala srebra formiranih na mezoporoznom Si. Na ovaj je način moguće direktno utjecati na SERS pojačanje. Također su se proučavala različita vremena uranjanja mezoporoznog Si u 10^{-2} i 10^{-3} M otopinu $AgNO_3$. Najbolje pojačanje rodamina 6G dobiveno je za uzorak jetkan s I=1 mA/cm^2 i s uranjanjem od 300 s u 10^{-2} M otopinu $AgNO_3$. Čini se da nastajanje drugog sloja srebra na mezoporoznom Si ima bitnu ulogu kod SERS pojačanja. Omjer SERS signala rodamina 6G na mezoporoznom Si i na kristalnom Si uronjenom u 10^{-2} M $AgNO_3$ u vremenu od 300 s iznosi približno dva reda veličine u korist mezoporoznog Si. Optimizacijom parametara pripreme supstrata na bazi mezoporoznog Si, kao što su struja jetkanja i vrijeme uranjanja u $AgNO_3$, mogu se proizvesti SERS supstrati sa značajnim pojačanjem Ramanovog signala.

SERS supstrati pripremljeni su korištenjem monodisperznih polistirenskih sfera (350 i 1000 nm) koje su u monosloju deponirane na hidrofilnu podlogu. Za deponiranje sfera korištena je metoda evaporacije otapala zbog svoje jednostavnosti i brzine. Na tako pripremljene sfere evaporirani su filmovi srebra različitih debljina. Korištenjem testnih molekula, rodamina 6G i piridina, ispitana je SERS aktivnost ovakvih supstrata kao i optimalna debljina deponiranog filma srebra za postizanje najboljeg pojačanja. Najbolje pojačanje Ramanovog signala za obje testne molekule dobiveno je na filmu debljine 180 nm deponiranom na 1 μm sfere i filmu debljine 80 nm deponiranom na 350 nm sfere. Najniža detektirana koncentracija rodamina 6G bila je 10^{-9} mol L^{-1}, a piridina 1,2 × 10^{-3} mol L^{-1}. Korištenjem monodisperznih polistirenskih sfera zadovoljavajući SERS supstrati dobiveni su na brz i jednostavan način.

Površinski pojačana Ramanova spektroskopija (SERS) ima primjenu u različitim područjima i pobuđuje veliki znanstveni interes, posebno zato jer mnogi njeni aspekti nisu u potpunosti razjašnjeni. Mnogo se toga još može napraviti na području eksploatacije ove metode, pogotovo kod analiza niskih koncentracija spojeva. No, kritičan dio metode još uvijek je supstrat. U ovom su radu predstavljena tri reprezentativna primjera SERS podloga za koje je postignuto visoko pojačanje (EF). To uključuje podloge pripremljene kemijskim

putem (sinteza koloidnih suspenzija), podloge dobivene depozicijom srebra na prethodno elektrokemijski jetkan silicij te podloge dobivene naparavanjem srebra na monosloj polistirenskih mikrosfera. Uz veliki broj SERS podloga koje su dostupne na tržištu, smatramo da su podloge pripremljene na ovaj način dobro optimizirane te je moguća njihova komercijalna primjena. Daljnji napori na području SERS-a trebali bi prije svega ići u smjeru razvoja novih aplikacija s naglaskom na kvantifikaciju ili poboljšavanje postojećih tehnika. Također, višekratno korištenje SERS aktivnih podloga eliminiralo bi potrebu proizvodnje velikog broja supstrata.

6 POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AF – aflatoksini

BA – biogeni amini

CCD – detektori sakupljači naboja

CE – kemijsko pojačanje

DLS – dinamičko raspršenje svjetla

EDS – energijski disperzivni spektrometar

EF – faktor pojačanja

EM – elktromagnetsko pojačanje

FWHM – širina vrpce na polovici visine

IR – infracrveno zračenje

LOD – granica detekcije

LSPR – lokalizirana površinska plazmonska rezonancija

MB – metilensko modrilo

MFON – metalni film na nanostrukturi

NČ – nanočestica

NIR – blisko infracrveno zračenje

NSL – nanosferna litografija

PL – fotoluminiscencija

PLD – pulsna laserska depozicija

PNS – polistirenske nanosfere

PVD – fizička depozicija pare

PVP - polivinilpirolidon

R6G – rodamin 6G

RRS – rezonantna Ramanova spektroskopija

SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija

SERS – površinski pojačano Ramanovo raspršenje

SM – jedna molekula

TEM – transmisijska elektronska mikroskopija

UV – ultraljubičasto zračenje

VIS – vidljivo zračenje

7 LITERATURNI IZVORI

1. T. Q. N. Luong, T. A. Cao, D. Tran Cao, *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.*, **4** (2013) 015018.
2. L. Senesac, T. G. Thundat, *Mater. Today*, **11** (2008) 28-36.
3. J. Sun, Z. Qin, J. Liu, C. Zhang, H. Luo, *Analyst*, **12** (2014) 3154-3159.
4. F. Domenici, A. R. Bizzarri, S. Cannistraro, *Anal. Biochem.*, **421** (2012) 9-15.
5. K. Kneipp, H. Kneipp, V. B. Kartha, R. Manoharan, G. Deinum, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Phys. Rev. E*, **57** (1998) R6281-R6284.
6. K. Kneipp, H. Kneipp, S. Abdali, R. W. Berg, H. Bohr, *Spectrosc.*, **18** (2004) 433-440.
7. C. Ruan, W. Wang, B. Gu, *Anal. Chem.*, **78** (2006) 3379-3384.
8. S.-P. Chen, C. M. Hosten, A. Vivoni, R. L. Birke, J. R. Lombardi, *Langmuir*, **18** (2002) 9888-9900.
9. A. M. Michaels, Jiang, L. Brus, *J. Phys. Chem. B*, **104** (2000) 11965-11971.
10. Y. Jiao, D. S. Koktysh, N. Phambu, S. M. Weiss, *Appl. Phys. Lett.*, **97** (2010) 153125-153121-153125-153123.
11. K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. D. Ramachandra, M. S. Feld, *J. Phys.: Condens. Matter*, **14** (2002) R597.
12. T. Vo-Dinh, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **17** (1998) 557-582.
13. J. F. Betz, W. W. Yu, Y. Cheng, I. M. White, G. W. Rubloff, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **16** (2014) 2224-2239.
14. J. R. Ferraro, K. Nakamoto, C. W. Brown, *Introductory Raman Spectroscopy (Second Edition)*,Elsevier, 2003, str. 15-17.
15. R. Singh, *Phys. Persp.*, **4** (2002) 399-420.
16. S. A. Asher, *Anal. Chem.*, **65** (1993) 59A-66A.
17. S. Shim, C. M. Stuart, R. A. Mathies, *Chemphyschem*, **9** (2008) 697-699.
18. K. Nakamoto, "Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds" u *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Ltd, 2006, str. 150-194.
19. P. L. Stiles, J. A. Dieringer, N. C. Shah, R. P. Van Duyne, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **1** (2008) 601-626.
20. J. Zi, H. Buscher, C. Falter, W. Ludwig, K. Zhang, X. Xie, *Appl. Phys. Lett.*, **69** (1996) 200-202.

21. M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.*, **26** (1974) 163-166.
22. D. L. Jeanmaire, R. P. Van Duyne, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **84** (1977) 1-20.
23. J. R. Lombardi, R. L. Birke, *J. Phys. Chem. C*, **112** (2008) 5605-5617.
24. J. R. Lombardi, R. L. Birke, T. Lu, J. Xu, *J. Chem. Phys.*, **84** (1986) 4174-4180.
25. A. J. McQuillan, "The Discovery of Surface-Enhanced Raman Scattering" 2009, Vol. 63, str. 105-109.
26. M. G. Albrecht, J. A. Creighton, *J. Am. Chem. Soc.*, **99** (1977) 5215-5217.
27. M. Moskovits, *J. Chem. Phys.*, **69** (1978) 4159-4161.
28. K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Phys. Rev. Lett.*, **78** (1997) 1667-1670.
29. S. Nie, S. R. Emory, *Science*, **275** (1997) 1102-1106.
30. C. Yuen, W. E. I. Zheng, Z. Huang, *J. Innov. Opt. Health Sci.*, **01** (2008) 267-284.
31. M. Kerker, *Acc. Chem. Res.*, **17** (1984) 271-277.
32. J. Gersten, A. Nitzan, *J. Chem. Phys.*, **73** (1980) 3023-3037.
33. L. A. Dick, A. J. Haes, R. P. Van Duyne, *J. Phys. Chem. B*, **104** (2000) 11752-11762.
34. E. J. Zeman, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem.*, **91** (1987) 634-643.
35. S. L. McCall, P. M. Platzman, P. A. Wolff, *Phys. Lett. A*, **77** (1980) 381-383.
36. M. J. Weaver, S. Zou, H. Y. H. Chan, *Anal. Chem.*, **72** (2000) 38 A-47 A.
37. K. A. Willets, R. P. Van Duyne, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **58** (2007) 267-297.
38. A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn, W. Akemann, *J. Phys.: Condens. Matter*, **4** (1992) 1143-1212.
39. L. Jensen, C. M. Aikens, G. C. Schatz, *Chem. Soc. Rev.*, **37** (2008) 1061-1073.
40. T. Theophanides, J. Anastassopoulou, N. Fotopoulos, T. Cotton, G. Chumanov, J. Y. Wang, R. A. Uphaus, Fifth International Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Springer Netherlands, 1993, pp. 279-284.
41. S. L. Kleinman, R. R. Frontiera, A.-I. Henry, J. A. Dieringer, R. P. Van Duyne, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15** (2013) 21-36.
42. E. C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer, P. G. Etchegoin, *J. Phys. Chem. C*, **111** (2007) 13794-13803.
43. S. A. Meyer, E. C. L. Ru, P. G. Etchegoin, *J. Phys. Chem. A*, **114** (2010) 5515-5519.
44. B. Sharma, R. R. Frontiera, A.-I. Henry, E. Ringe, R. P. Van Duyne, *Mater. Today*, **15** (2012) 16-25.
45. A. Boltasseva, H. A. Atwater, *Science*, **331** (2011) 290-291.

46. K. M. Kosuda, J. M. Bingham, K. L. Wustholz, R. P. Van Duyne, D. L. Andrews, G. D. Scholes, G. P. Wiederrecht, "3.09 - Nanostructures and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy" u *Comprehensive Nanoscience and Technology*, Academic Press, Amsterdam, 2011, str. 263-301.
47. R. P. Van Duyne, J. C. Hulteen, D. A. Treichel, *J. Chem. Phys.*, **99** (1993) 2101-2115.
48. A. Musumeci, D. Gosztola, T. Schiller, N. M. Dimitrijevic, V. Mujica, D. Martin, T. Rajh, *J. Am. Chem. Soc.*, **131** (2009) 6040-6041.
49. R. Livingstone, X. Zhou, M. C. Tamargo, J. R. Lombardi, L. G. Quagliano, F. Jean-Mary, *J. Phys. Chem. C*, **114** (2010) 17460-17464.
50. X. Ling, L. Xie, Y. Fang, H. Xu, H. Zhang, J. Kong, M. S. Dresselhaus, J. Zhang, Z. Liu, *Nano Lett.*, **10** (2009) 553-561.
51. U. K. Sur, J. Chowdhury, *Curr. Sci.*, **105** (2013) 923-939.
52. D.-Y. Wu, B. Ren, Y.-X. Jiang, X. Xu, Z.-Q. Tian, *J. Phys. Chem. A*, **106** (2002) 9042-9052.
53. C. P. Poole, F. J. Owens, *Introduction to Nanotechnology*,John Wiley & Sons, 2003, str. 72-88.
54. Iso Iso/Ts 27687:2008 Nanotechnologies - Terminology and Definitions for Nano Objects - Nanoparticle, Nanofibre and Nanoplate.
55. M. A. Duncan, D. H. Rouvray, *Sci. Am.*, (1989) 110-115.
56. R. W. O'Brien, B. R. Midmore, A. Lamb, R. J. Hunter, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **90** (1990) 301-312.
57. A. Liese, L. Hilterhaus, *Chem. Soc. Rev.*, **42** (2013) 6236-6249.
58. D. Ioannou, D. K. Griffin, *2010*, **1** (2010) 5117.
59. T. Verano-Braga, R. Miethling-Graff, K. Wojdyla, A. Rogowska-Wrzesinska, J. R. Brewer, H. Erdmann, F. Kjeldsen, *ACS Nano*, **8** (2014) 2161-2175.
60. P. C. Lee, D. Meisel, *J. Phys. Chem.*, **86** (1982) 3391-3395.
61. P. R. Sajanlal, T. S. Sreeprasad, A. K. Samal, T. Pradeep, *Nano Rev.*, **2** (2011) 1-62.
62. Z. S. Pillai, P. V. Kamat, *J. Phys. Chem. B*, **108** (2003) 945-951.
63. J. A. Dieringer, K. L. Wustholz, D. J. Masiello, J. P. Camden, S. L. Kleinman, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.*, **131** (2008) 849-854.
64. S. J. Oldenburg, R. D. Averitt, S. L. Westcott, N. J. Halas, *Chem. Phys. Lett.*, **288** (1998) 243-247.
65. R. Jin, Y. Cao, C. A. Mirkin, K. L. Kelly, G. C. Schatz, J. G. Zheng, *Science*, **294** (2001) 1901-1903.

66. Y. Sun, Y. Xia, *Science*, **298** (2002) 2176-2179.
67. B. J. Wiley, Y. Xiong, Z.-Y. Li, Y. Yin, Y. Xia, *Nano Lett.*, **6** (2006) 765-768.
68. C. L. Nehl, H. Liao, J. H. Hafner, *Nano Lett.*, **6** (2006) 683-688.
69. C. H. Moran, M. Rycenga, Q. Zhang, Y. Xia, *J. Phys. Chem. C*, **115** (2011) 21852-21857.
70. X. Xia, J. Zeng, B. McDearmon, Y. Zheng, Q. Li, Y. Xia, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **50** (2011) 12542-12546.
71. A. Tao, P. Sinsermsuksakul, P. Yang, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **45** (2006) 4597-4601.
72. M. J. Mulvihill, X. Y. Ling, J. Henzie, P. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, **132** (2009) 268-274.
73. X. Huang, S. Neretina, M. A. El-Sayed, *Adv. Mater.*, **21** (2009) 4880-4910.
74. M. A. Mahmoud, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. Lett.*, **4** (2013) 1541-1545.
75. S. E. Lohse, C. J. Murphy, *Chem. Mater.*, **25** (2013) 1250-1261.
76. S. Lal, N. K. Grady, J. Kundu, C. S. Levin, J. B. Lassiter, N. J. Halas, *Chem. Soc. Rev.*, **37** (2008) 898-911.
77. C. S. Levin, J. Kundu, A. Barhoumi, N. J. Halas, *Analyst*, **134** (2009) 1745-1750.
78. W. Li, P. H. C. Camargo, X. Lu, Y. Xia, *Nano Lett.*, **9** (2008) 485-490.
79. W. W. Yu, I. M. White, *Analyst*, **137** (2012) 1168-1173.
80. W. W. Yu, I. M. White, *Anal. Chem.*, **82** (2010) 9626-9630.
81. L.-L. Qu, D.-W. Li, J.-Q. Xue, W.-L. Zhai, J. S. Fossey, Y.-T. Long, *Lab Chip*, **12** (2012) 876-881.
82. C. H. Lee, M. E. Hankus, L. Tian, P. M. Pellegrino, S. Singamaneni, *Anal. Chem.*, **83** (2011) 8953-8958.
83. K. W. Kho, Z. X. Shen, H. C. Zeng, K. C. Soo, M. Olivo, *Anal. Chem.*, **77** (2005) 7462-7471.
84. A. Tao, P. Sinsermsuksakul, P. Yang, *Nat. Nano.*, **2** (2007) 435-440.
85. M. E. Abdelsalam, P. N. Bartlett, J. J. Baumberg, S. Cintra, T. A. Kelf, A. E. Russell, *Electrochem. Commun.*, **7** (2005) 740-744.
86. D. D. Tuschel, J. E. Pemberton, J. E. Cook, *Langmuir*, **2** (1986) 380-388.
87. G. Sauer, U. Nickel, S. Schneider, *J. Raman Spectrosc.*, **31** (2000) 359-363.
88. H. Li, *Multilayer Sers Substrates and Their Application to Immuno-Nanosensors*,University of Maryland, Baltimore County, 2007, str. 17-28.
89. M. Kahl, E. Voges, S. Kostrewa, C. Viets, W. Hill, *Sens. Actuator B-Chem.*, **51** (1998) 285-291.

90. X. Dou, P.-Y. Chung, H. Sha, Y.-C. Lin, P. Jiang, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15** (2013) 12680-12687.
91. J. C. Hulteen, R. P. Van Duyne, *J. Vac. Sci. Technol., A*, **13** (1995) 1553-1558.
92. L. A. Dick, A. D. McFarland, C. L. Haynes, R. P. Van Duyne, *J. Phys. Chem. B*, **106** (2001) 853-860.
93. R. P. Johnson, S. Mahajan, M. E. Abdelsalam, R. M. Cole, J. J. Baumberg, A. E. Russell, P. N. Bartlett, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13** (2011) 16661-16665.
94. M. Xu, N. Lu, H. Xu, D. Qi, Y. Wang, L. Chi, *Langmuir*, **25** (2009) 11216-11220.
95. Y. Lu, G. L. Liu, J. Kim, Y. X. Mejia, L. P. Lee, *Nano Lett.*, **5** (2004) 119-124.
96. S. B. Chaney, S. Shanmukh, R. A. Dluhy, Y. P. Zhao, *Appl. Phys. Lett.*, **87** (2005).
97. P. Negri, A. Kage, A. Nitsche, D. Naumann, R. A. Dluhy, *Chem. Commun.*, **47** (2011) 8635-8637.
98. J. D. Driskell, A. G. Seto, L. P. Jones, S. Jokela, R. A. Dluhy, Y. P. Zhao, R. A. Tripp, *Biosens. Bioelectron.*, **24** (2008) 917-922.
99. H. V. Chu, Y. Liu, Y. Huang, Y. Zhao, *Opt. Express*, **15** (2007) 12230-12239.
100. J.-M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **29** (1990) 1304-1319.
101. P. Colson, C. Henrist, R. Cloots, *J. Nanomater.*, **2013** (2013) 19.
102. N. Denkov, O. Velev, P. Kralchevski, I. Ivanov, H. Yoshimura, K. Nagayama, *Langmuir*, **8** (1992) 3183-3190.
103. P. A. Kralchevsky, N. D. Denkov, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **6** (2001) 383-401.
104. R. Micheletto, H. Fukuda, M. Ohtsu, *Langmuir*, **11** (1995) 3333-3336.
105. A. S. Dimitrov, K. Nagayama, *Langmuir*, **12** (1996) 1303-1311.
106. D. Nagao, R. Kameyama, Y. Kobayashi, M. Konno, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **311** (2007) 26-31.
107. P. Jiang, M. J. McFarland, *J. Am. Chem. Soc.*, **126** (2004) 13778-13786.
108. Y. Zhao, J. S. Marshall, *Phys. Fluids*, **20** (2008) 043302.
109. C. D. Dushkin, G. S. Lazarov, S. N. Kotsev, H. Yoshimura, K. Nagayama, *Colloid. Polym. Sci.*, **277** (1999) 914-930.
110. J. Chen, P. Dong, D. Di, C. Wang, H. Wang, J. Wang, X. Wu, *Appl. Surf. Sci.*, **270** (2013) 6-15.
111. J. Rybczynski, U. Ebels, M. Giersig, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **219** (2003) 1-6.

112. W.-d. Ruan, Z.-c. Lu, N. Ji, C.-x. Wang, B. Zhao, J.-h. Zhang, *Chem. Res. Chinese U.*, **23** (2007) 712-714.
113. P. I. Stavroulakis, N. Christou, D. Bagnall, *Mater. Sci. Eng. B*, **165** (2009) 186-189.
114. L. M. Goldenberg, J. Wagner, J. Stumpe, B.-R. Paulke, E. Görnitz, *Langmuir*, **18** (2002) 5627-5629.
115. S. O. Lumsdon, E. W. Kaler, O. D. Velev, *Langmuir*, **20** (2004) 2108-2116.
116. K. Chen, S. V. Stoianov, J. Bangerter, H. D. Robinson, *J. Colloid Interface Sci.*, **344** (2010) 315-320.
117. D. Cialla, A. Marz, R. Bohme, F. Theil, K. Weber, M. Schmitt, J. Popp, *Anal. Bioanal. Chem.*, **403** (2012) 27-54.
118. N. E. Marotta, K. R. Beavers, L. A. Bottomley, *Anal. Chem.*, **85** (2013) 1440-1446.
119. M. Moskovits, J. S. Suh, *J. Phys. Chem.*, **88** (1984) 5526-5530.
120. R. Holze, *J. Solid State Electrochem.*, **11** (2007) 558-558.
121. B.-S. Yeo, T. Schmid, W. Zhang, R. Zenobi, *Appl. Spectrosc.*, **62** (2008) 708-713.
122. J. L. Abell, J. M. Garren, Y. Zhao, *Appl. Spectrosc.*, **65** (2011) 734-740.
123. R. A. Alvarez-Puebla, L. M. Liz-Marzan, *Chem. Soc. Rev.*, **41** (2011) 43-51.
124. M. Erol, Y. Han, S. K. Stanley, C. M. Stafford, H. Du, S. Sukhishvili, *J. Am. Chem. Soc.*, **131** (2009) 7480-7481.
125. C. H. Munro, W. E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, P. C. White, *Langmuir*, **11** (1995) 3712-3720.
126. R. A. Alvarez-Puebla, A. Agarwal, P. Manna, B. P. Khanal, P. Aldeanueva-Potel, E. Carbo-Argibay, N. Pazos-Perez, L. Vigderman, E. R. Zubarev, N. A. Kotov, L. M. Liz-Marzan, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **108** (2011) 8157-8161.
127. R. A. Alvarez-Puebla, E. Arceo, P. J. G. Goulet, J. J. Garrido, R. F. Aroca, *J. Phys. Chem. B*, **109** (2005) 3787-3792.
128. R. A. Alvarez-Puebla, R. F. Aroca, *Anal. Chem.*, **81** (2009) 2280-2285.
129. J. P. Camden, J. A. Dieringer, J. Zhao, R. P. Van Duyne, *Acc. Chem. Res.*, **41** (2008) 1653-1661.
130. C. Jones, K. Bantz, C. Haynes, *Anal. Bioanal. Chem.*, **394** (2009) 303-311.
131. K. C. Bantz, C. L. Haynes, *Vib. Spectrosc.*, **50** (2009) 29-35.
132. A. Uhlir Jr., *Bell Syst. Tech. J.*, **35** (1956) 333-347.
133. D. R. Turner, *J. Electrochem. Soc.*, **105** (1958) 402-408.
134. Y. Watanabe, Sakai, T., *Rev. Elec. Commun. Lab.*, **19** (1971) 899.
135. L. T. Canham, *Appl. Phys. Lett.*, **57** (1990) 1046-1048.

136. V. Torres-Costa, R. J. Martan-Palma, *J. Mater. Sci.*, **45** (2010) 2823-2838.
137. P. Steiner, F. Kozlowski, W. Lang, *Appl. Phys. Lett.*, **62** (1993) 2700-2702.
138. H. Shi, Y. Zheng, Y. Wang, R. Yuan, *Appl. Phys. Lett.*, **63** (1993) 770-772.
139. P. Menna, G. Di Francia, V. La Ferrara, *Sol. Energ. Mat. Sol.*, **37** (1995) 13-24.
140. M. Lipinski, S. Bastide, P. Panek, C. LÃ©vy-ClÃ©ment, *Phys. Status Solidi A*, **197** (2003) 512-517.
141. A. Jane, R. Dronov, A. Hodges, N. H. Voelcker, *Trends Biotechnol.*, **27** (2009) 230-239.
142. A. Foucaran, F. Pascal-Delannoy, A. Giani, A. Sackda, P. Combette, A. Boyer, *Thin Solid Films*, **297** (1997) 317-320.
143. K. S. Dancil, D. P. Greiner, M. J. Sailor, *J. Am. Chem. Soc.*, **121** (1999) 7925-7930.
144. R. T. Collins, P. M. Fauchet, M. A. Tischler, *Physics Today*, **50** (1997) 24-31.
145. S. Chan, P. M. Fauchet, Y. Li, L. J. Rothberg, B. L. Miller, *Phys. Status Solidi A*, **182** (2000) 541-546.
146. J. Salonen, A. M. Kaukonen, J. Hirvonen, V. P. Lehto, *J. Pharm. Sci.*, **97** (2008) 632-653.
147. É. Vázsonyi, E. Szilágyi, P. Petrik, Z. E. Horváth, T. Lohner, M. Fried, G. Jalsovszky, *Thin Solid Films*, **388** (2001) 295-302.
148. D. Rüter, W. Bauhofer, *J. Lumin.*, **57** (1993) 19-23.
149. B. D. Fahlman, *Materials Chemistry (2nd Ed.)*,Springer, 2011, str. 68-93.
150. R. L. C. Smith, S. D. J., *Appl. Phys*, **71** (1992) R1.
151. M. J. Sailor, "Fundamentals of Porous Silicon Preparation" u *Porous Silicon in Practice*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012, str. 1-42.
152. V. Lehmann, "The Chemical Dissolution of Silicon" u *Electrochemistry of Silicon*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002, str. 23-38.
153. C. A. Canaria, M. Huang, Y. Cho, J. L. Heinrich, L. I. Lee, M. J. Shane, R. C. Smith, M. J. Sailor, G. M. Miskelly, *Adv. Funct. Mater.*, **12** (2002) 495-500.
154. D. Q. Liu, D. J. Blackwood, *J. Electrochem. Soc.*, **159** (2012) H909-H911.
155. C. G. Vayenas, R. White, M. Gamboa-Adelco, G. Zhang, "Porous Silicon: Morphology and Formation Mechanisms" u *Modern Aspects of Electrochemistry*, Springer US, 2006, Vol. 39, str. 65-133.
156. G. Bomchil, A. Halimaoui, R. Herino, *Microelectron. Eng.*, **8** (1988) 293-310.
157. "Porous Silicon Science and Technology" u *Winter School Les Houches*, (ur.) Jacques Derrien Jean-Claude Vial, 1995, Vol. 1, str. 293-303.

158. M. T. Kelly, J. K. M. Chun, A. B. Bocarsly, *Appl. Phys. Lett.*, **64** (1994) 1693-1695.
159. K. W. Kolasinski, J. W. Gogola, *Conference Proceedings - ECS Transactions*, **33** (2011) 23-28.
160. D. T. Papadimitriou, C.; Nassiopoulou, A. G., *Sens. Actuators B*, **103** (2004) 356-361.
161. S.-Z. R. Lo, A. M.; Murphy, T. E., *Phys. Status Solidi A*, **206** (2009) 1273-1277.
162. F. B. D, A. Ramírez-Porras, *Advances in Chemical Sensors, Chapter 7: Surface-Functionalized Porous Silicon Wafers: Synthesis and Applications*,InTech, 2012, str. 153-168.
163. V. Chin, B. E. Collins, M. J. Sailor, S. N. Bhatia, *Adv. Mater.*, **13** (2001) 1877-1880.
164. S. C. Bayliss, R. Heald, D. I. Fletcher, L. D. Buckberry, *Adv. Mater.*, **11** (1999) 318-321.
165. A. Foraker, R. Walczak, M. Cohen, T. Boiarski, C. Grove, P. Swaan, *Pharmaceut. Res.*, **20** (2003) 110-116.
166. A. H. Mayne, S. C. Bayliss, P. Barr, M. Tobin, L. D. Buckberry, *Phys. Status Solidi A*, **182** (2000) 505-513.
167. V. r. Meille, *Appl. Catal. A*, **315** (2006) 1-17.
168. N. Koura, A. Kubota, *J. Met. Finish. Soc. Jpn.*, **36** (1985) 182-190.
169. G. Oskam, J. G. Long, A. Natarajan, P. C. Searson, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **31** (1998) 1927-1949.
170. F. A. Harraz, T. Tsuboi, J. Sasano, T. Sakka, Y. H. Ogata, *J. Electrochem. Soc.*, **149** (2002) C456-C463.
171. C. Carraro, R. Maboudian, L. Magagnin, *Surf. Sci. Rep.*, **62** (2007) 499-525.
172. A. Gutes, C. Carraro, R. Maboudian, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **1** (2009) 2551-2555.
173. X. Sun, N. Wang, H. Li, *Appl. Surf. Sci.*, **284** (2013) 549-555.
174. C. Baratto, G. Sberveglieri, E. Comini, G. Faglia, G. Benussi, V. La Ferrara, L. Quercia, G. Di Francia, V. Guidi, D. Vincenzi, D. Boscarino, V. Rigato, *Sens. Actuator B-Chem.*, **68** (2000) 74-80.
175. E. Danielson, J. H. Golden, E. W. McFarland, C. M. Reaves, W. H. Weinberg, X. D. Wu, *Nature*, **389** (1997) 944-948.
176. Http://Www.Jeol.Co.Jp/En/Science/Eb.Html (preuzeto 12.7.2015. god.)
177. M. N. R. Ashfold, F. Claeyssens, G. M. Fuge, S. J. Henley, *Chem. Soc. Rev.*, **33** (2004) 23-31.

178. Http://Www.Andor.Com/Learning-Academy/Pulsed-Laser-Deposition-an-Introduction-to-Pulsed-Laser-Deposition (preuzeto 12.9.2015. god.)
179. N. Wang, Y. Cai, R. Q. Zhang, *Mater. Sci. Eng. R-Rep.*, **60** (2008) 1-51.
180. S. Chan, S. Kwon, T. W. Koo, L. P. Lee, A. A. Berlin, *Adv. Mater.*, **15** (2003) 1595-1598.
181. T.-T. Liu, Y.-H. Lin, C.-S. Hung, T.-J. Liu, Y. Chen, Y.-C. Huang, T.-H. Tsai, H.-H. Wang, D.-W. Wang, J.-K. Wang, Y.-L. Wang, C.-H. Lin, *PLoS ONE*, **4** (2009) e5470.
182. L. He, T. Rodda, C. L. Haynes, T. Deschaines, T. Strother, F. Diez-Gonzalez, T. P. Labuza, *Anal. Chem.*, **83** (2011) 1510-1513.
183. M. Sanles-Sobrido, L. Rodriguez-Lorenzo, S. Lorenzo-Abalde, A. Gonzalez-Fernandez, M. A. Correa-Duarte, R. A. Alvarez-Puebla, L. M. Liz-Marzan, *Nanoscale*, **1** (2009) 153-158.
184. J. Chen, J. Jiang, X. Gao, G. Liu, G. Shen, R. Yu, *Chem. Eur. J.*, **14** (2008) 8374-8382.
185. A. M. Mohs, M. C. Mancini, S. Singhal, J. M. Provenzale, B. Leyland-Jones, M. D. Wang, S. Nie, *Anal. Chem.*, **82** (2010) 9058-9065.
186. M. E. Benford, I. H. Chou, H. T. Beier, M. Wang, J. Kameoka, T. A. Good, G. L. Cote, *Conference Proceedings*, **6869** (2008) 68690W68691-68690W-68695.
187. J.-H. An, W. A. El-Said, C.-H. Yea, T.-H. Kim, J.-W. Choi, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **11** (2011) 4424-4429.
188. K. Ma, J. M. Yuen, N. C. Shah, J. T. Walsh Jr, M. R. Glucksberg, R. P. Van Duyne, *Anal. Chem.*, **83** (2011) 9146-9152.
189. N. C. Shah, J. M. Yuen, O. Lyandres, M. R. Glucksberg, J. T. Walsh, R. P. Van Duyne, Chemical Analysis, 2010, pp. 421-443.
190. Http://Sites.Northwestern.Edu/Vanduyne/Research/Detecting-Organic-Dyestuffs-in-Art-with-Sers/ (preuzeto 6.4.2015. god.)
191. F. Casadio, M. Leona, J. R. Lombardi, R. Van Duyne, *Acc. Chem. Res.*, **43** (2010) 782-791.
192. R. Freeman, P. Smith, M. Natan, Google Patents Metal labelng for jewelry and codes for anticounterfiting and authenitication purpose, reading and decoding, 2005.
193. M. Natan, S. Norton, R. Freeman, S. Penn, I. Walton, Google Patents Nanoparticles as covert taggants in currency, bank notes, and related documents, 2006.
194. P. C. White, J. H. Hjortkjaer, Google Patents Preparation of metal colloids, 2009.
195. P. White, J. Hjortkjaer, *J. Raman Spectrosc.*, **45** (2013) 32-40.

196. H. Gehan, C. Mangeney, J. Aubard, G. Levi, A. Hohenau, J. R. Krenn, E. Lacaze, N. Felidj, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2** (2011) 926-931.
197. R. A. Alvarez-Puebla, R. Contreras-Caceres, I. Pastoriza-Santos, J. Perez-Juste, L. M. Liz-Marzan, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **48** (2009) 138-143.
198. M. K. Gupta, S. Chang, S. Singamaneni, L. F. Drummy, R. Gunawidjaja, R. R. Naik, V. V. Tsukruk, *Small*, **7** (2011) 1192-1198.
199. D.-Y. Wang, T.-S. Teng, Y.-C. Wu, Y.-C. Lee, K.-H. Chen, C.-H. Chen, Y.-C. Chang, C.-C. Chen, *J. Phys. Chem. C*, **113** (2009) 13498-13504.
200. K. Kantarovich, I. Tsarfati, L. A. Gheber, K. Haupt, I. Bar, *Anal. Chem.*, **81** (2009) 5686-5690.
201. E. L. Holthoff, D. N. Stratis-Cullum, M. E. Hankus, *Sensors*, **11** (2011) 2700-2714.
202. S. L. Kleinman, E. Ringe, N. Valley, K. L. Wustholz, E. Phillips, K. A. Scheidt, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.*, **133** (2011) 4115-4122.
203. E. J. Blackie, E. C. L. Ru, P. G. Etchegoin, *J. Am. Chem. Soc.*, **131** (2009) 14466-14472.
204. L. Cui, D.-Y. Wu, A. Wang, B. Ren, Z.-Q. Tian, *J. Phys. Chem. C*, **114** (2010) 16588-16595.
205. T. Dörfer, M. Schmitt, J. Popp, *J. Raman Spectrosc.*, **38** (2007) 1379-1382.
206. X.-F. Lin, B. Ren, Z.-L. Yang, G.-K. Liu, Z.-Q. Tian, *J. Raman Spectrosc.*, **36** (2005) 606-612.
207. K. Kneipp, M. Moskovits, H. Kneipp, Z.-Q. Tian, Z.-L. Yang, B. Ren, D.-Y. Wu, "Sers from Transition Metals and Excited by Ultraviolet Light" u *Surface-Enhanced Raman Scattering*, Springer Berlin Heidelberg, 2006, Vol. 103, str. 125-146.
208. T. Schmid, L. Opilik, C. Blum, R. Zenobi, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **52** (2013) 5940-5954.
209. K. F. Domke, B. Pettinger, *Chemphyschem*, **11** (2010) 1365-1373.
210. D. Zhang, K. F. Domke, B. Pettinger, *Chemphyschem*, **11** (2010) 1662-1665.
211. N. Hayazawa, T. Yano, H. Watanabe, Y. Inouye, S. Kawata, *Chem. Phys. Lett.*, **376** (2003) 174-180.
212. E. Bailo, V. Deckert, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **47** (2008) 1658-1661.
213. M. Zhang, J. Wang, Q. Tian, *Opt. Express*, **21** (2013) 9414-9421.
214. Z. L. Zhang, L. Chen, S. X. Sheng, M. T. Sun, H. R. Zheng, K. Q. Chen, H. X. Xu, *Front. Phys.*, **9** (2014) 17-24.
215. J. Kirschbaum, K. Rebscher, H. BrÃ¼ckner, *J. Chromatogr. A*, **881** (2000) 517-530.

216. M. Santos, H. Silla, *Int. J. Food Microbiol.*, **29** (1996) 213-231.

217. A. Onal, *Food Chem.*, **103** (2007) 1475-1486.

218. C. P. Kurtzman, B. W. Horn, C. W. Hesseltine, *Antonie van Leeuwenhoek*, **53** (1987) 147-158.

219. J. Quiles, L. Manyes, F. Luciano, J. Mañes, G. Meca, *J. Food Sci. Technol.*, (2015) 1-7.

220. X. Wu, S. Gao, J.-S. Wang, H. Wang, Y.-W. Huang, Y. Zhao, *Analyst*, **137** (2012) 4226-4234.

221. A. Dandapat, T. K. Lee, Y. Zhang, S. K. Kwak, E. C. Cho, D.-H. Kim, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **7** (2015) 14793-14800.

222. F. R. Dollish, W. G. Fateley, F. F. Bentley, *Characteristic Raman Frequencies of Organic Compounds*,Wiley, 1974, str. 443.

223. E. Fazio, F. Neri, P. M. Ossi, N. Santo, S. Trusso, *Appl. Surf. Sci.*, **255** (2009) 9676-9679.

224. C. D'Andrea, F. Neri, P. M. Ossi, N. Santo, S. Trusso, *Nanotechnology*, **20** (2009) 245606.

225. E. Fazio, F. Neri, C. D'Andrea, P. M. Ossi, N. Santo, S. Trusso, *J. Raman Spectrosc.*, **42** (2011) 1298-1304.

226. G. Cardini, M. Muniz-Miranda, M. Pagliai, V. Schettino, *Theor Chem Acc*, **117** (2007) 451-458.

227. P. Hildebrandt, M. Stockburger, *The Journal of Physical Chemistry*, **88** (1984) 5935-5944.

228. G.-N. Xiao, S.-Q. Man, *Chemical Physics Letters*, **447** (2007) 305-309.

229. L. Chunming, X. Chenyang, G. Changfeng, M. D. Fox, *Computer Vision and Pattern Recognition, 2005. CVPR 2005. IEEE Computer Society* **1**(2005) 430-436.

230. S. S. Patil, R. S. Dhumal, M. V. Varghese, A. R. Paradkar, P. K. Khanna, *Synth. React. Inorg. Metal-Org. Nano-Met. Chem.*, **39** (2009) 65-72.

231. H. Liang, Z. Li, W. Wang, Y. Wu, H. Xu, *Adv. Mater.*, **21** (2009) 4614-4618.

232. J. Homola, *Anal. Bioanal. Chem.*, **401** (2011) 2329-2330.

233. N. R. Yaffe, E. W. Blanch, *Vib. Spectrosc.*, **48** (2008) 196-201.

234. H. Schmidt, N. Bich Ha, J. Pfannkuche, H. Amann, H.-D. Kronfeldt, G. Kowalewska, *Mar. Pollut. Bull.*, **49** (2004) 229-234.

235. B. Fazio, C. D'Andrea, F. Bonaccorso, A. Irrera, G. Calogero, C. Vasi, P. G. Gucciardi, M. Allegrini, A. Toma, D. Chiappe, C. Martella, F. Buatier de Mongeot, *ACS Nano*, **5** (2011) 5945-5956.

236. F. Giorgis, E. Descrovi, A. Chiodoni, E. Froner, M. Scarpa, A. Venturello, F. Geobaldo, *Appl. Surf. Sci.*, **254** (2008) 7494-7497.

237. A. Y. Panarin, V. S. Chirvony, K. I. Kholostov, P. Y. Turpin, S. N. Terekhov, *J. Appl. Spectrosc.*, **76** (2009) 280-287.

238. A. Virga, P. Rivolo, F. Frascella, A. Angelini, E. Descrovi, F. Geobaldo, F. Giorgis, *J. Phys. Chem. C*, **117** (2013) 20139-20145.

239. C. Lü, J. Wang, X. Lü, Z. Jia, *Chin. Opt. Lett.*, **12** (2014).

240. Z. Lu, M. Zhou, *J. Colloid Interface Sci.*, **361** (2011) 429-435.

241. Z. Zhong, H. Zhang, X. Tang, Y. Jing, L. Zhang, S. Liu, *Physica E Low Dimens. Syst. Nanostruct.*, **40** (2008) 516-519.

242. J.-T. Zhang, L. Wang, X. Chao, S. S. Velankar, S. A. Asher, *J. Mater. Chem. C*, **1** (2013) 6099-6102.

243. M. Majumder, C. S. Rendall, J. A. Eukel, J. Y. L. Wang, N. Behabtu, C. L. Pint, T.-Y. Liu, A. W. Orbaek, F. Mirri, J. Nam, A. R. Barron, R. H. Hauge, H. K. Schmidt, M. Pasquali, *J. Phys. Chem. B*, **116** (2012) 6536-6542.

244. J. H. Yang, N. N. Yang, Y. X. Wang, Y. J. Zhang, Y. M. Zhang, Y. Liu, M. B. Wei, Y. T. Yang, R. Wang, S. Y. Yang, *Solid State Commun.*, **151** (2011) 1428-1432.

245. B. Jasse, R. S. Chao, J. L. Koenig, *J. Polym. Sci. Pol. Phys.*, **16** (1978) 2157-2169.

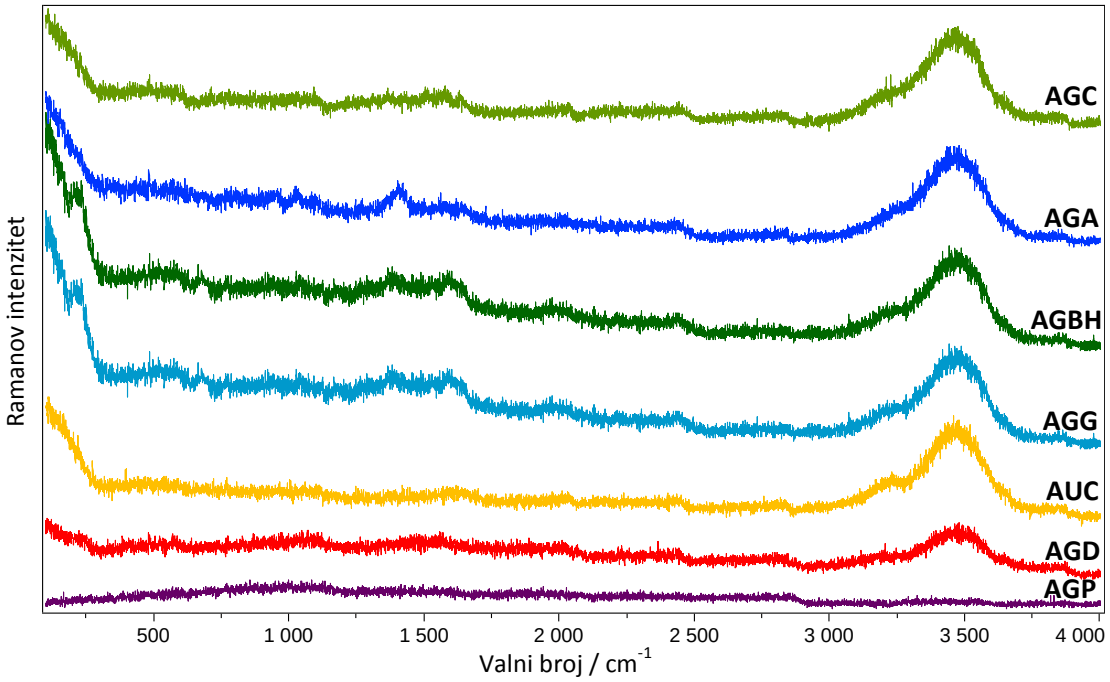
246. J. A. Collado, F. J. Ramírez, *J. Raman Spectrosc.*, **31** (2000) 925-931.

247. K. L. Davis, M. L. McGlashen, M. D. Morris, *Langmuir*, **8** (1992) 1654-1658.

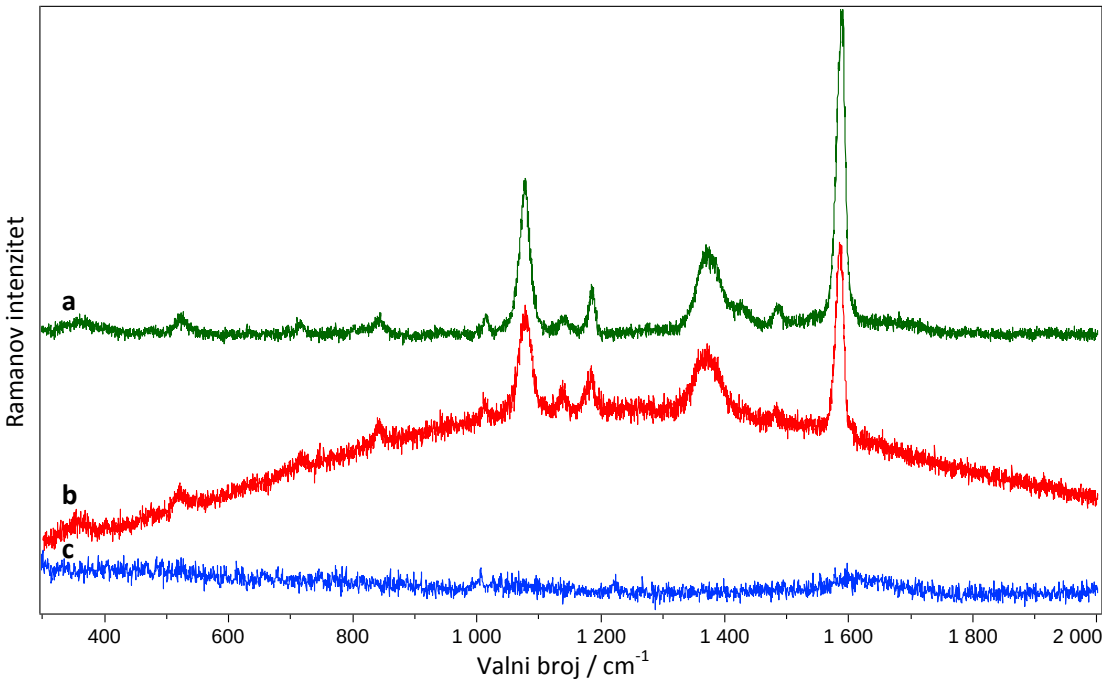
248. K.-M. Lee, T. J. Herrman, Y. Bisrat, S. C. Murray, *J. Agric. Food Chem.*, **62** (2014) 4466-4474.

249. J. Ko, C. Lee, J. Choo, *J. Hazard. Mater.*, **285** (2015) 11-17.

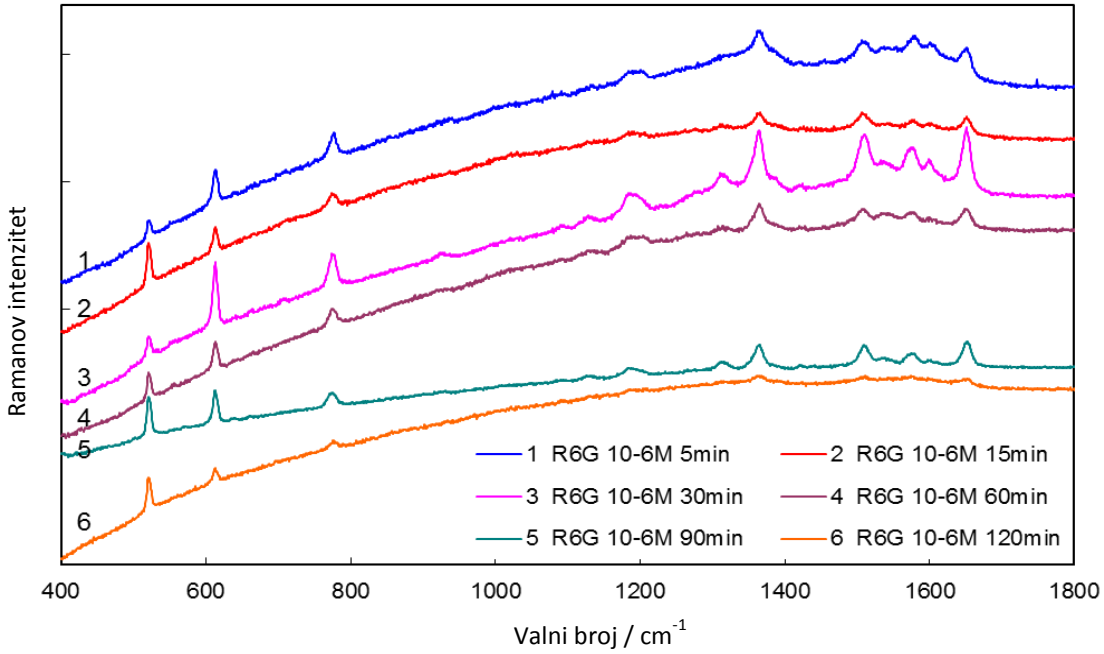
8 PRILOZI



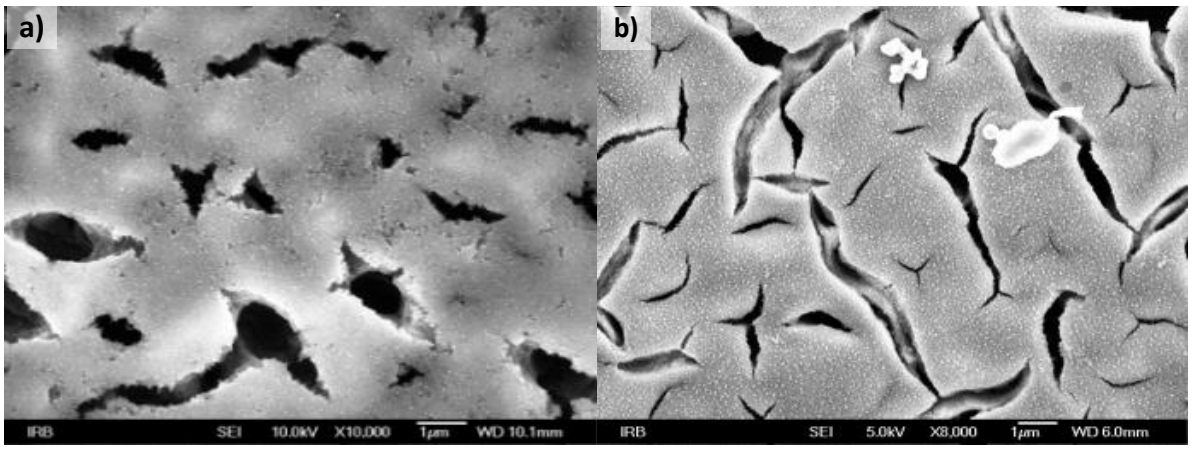
Slika P1 Ramanovi spektri koloidnih suspenzija (*λ*=514,5 nm); vrijeme snimanja 30 s osim AGP - 3s i AGG - 0,3 s).



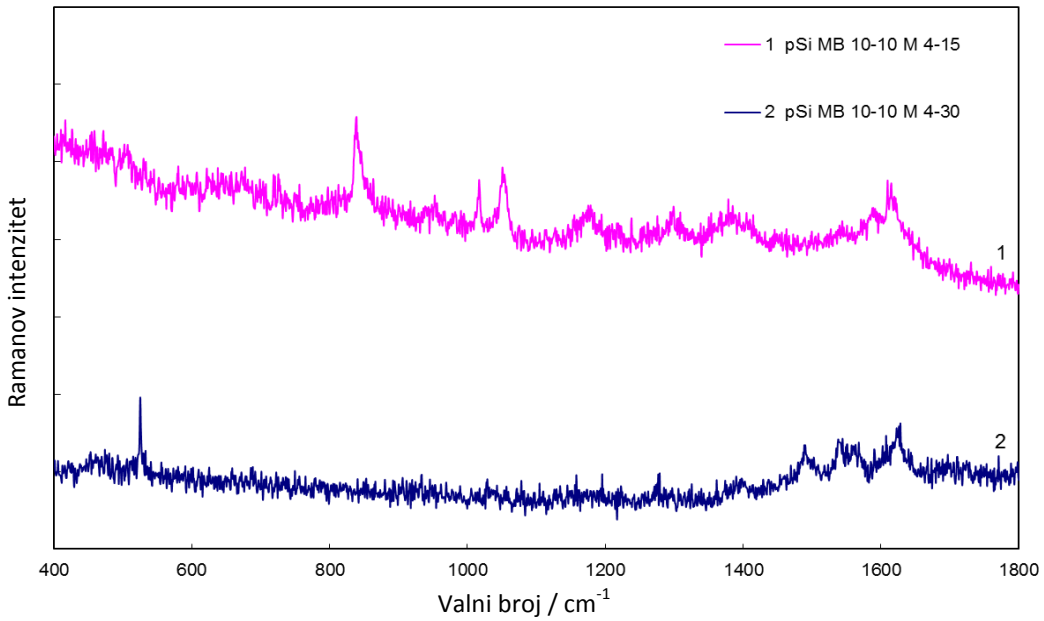
Slika P2 a) Ramanovi spektri AGF koloidne suspenzije prije i b) nakon ispiranja s etanolom; c) SERS spektar piridina (0,12 M) u zlatnom (AUC) koloidu (*λ*=514,5 nm).



Slika P3 SERS spektri 10^{-6} M R6G na makroporoznom Si (uzorak #2) za različita vremena inkubacije - 5, 15, 30, 60, 90 i 120 min (vrijeme se povećava odozgo prema dolje), (λ=514,5 nm; 1 mW; vrijeme snimanja 10 s).



Slika P4 SEM slike poroznog Si nakon ablacije s Ag (30 000 pulseva): a) uzorak #1 (povećanje 10 000×) i b) uzorak #2 (povećanje 8000×).



Slika P5 SERS spektri 10^{-10} M MB na makroporoznom Si nakon ablacije srebrom (45 000 pulseva): 1 – uzorak #1 (5 s, 600 µW) i 2 – uzorak #2 (10 s, 60 µW) na 785 nm.

9 ŽIVOTOPIS

Lara Mikac, djevojački Krizmanić, rođena je u Rijeci 12.9.1975. Osnovnu školu kao i Prirodoslovno-matematičku gimnaziju „Andrija Mohorovičić“ završila je u Rijeci. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, smjer kemija, upisala je 1994. godine. Nakon izrade diplomskog rada u Istraživačkom institutu Plive diplomirala je 2000. godine. Od 2001. godine radila je u Istraživačkom institutu Plive, tj. kasnije GlaxoSmithKline Istraživačkom centru Zagreb. U Laboratorij za molekulsku fiziku Instituta Ruđer Bošković prešla je u kolovozu 2009. godine. Koautor je četrnaest znanstvenih radova objavljenih u CC časopisima. Aktivno sudjeluje na kongresima u Hrvatskoj i inozemstvu. Član je Hrvatskog kemijskog društva te autor i koautor nekoliko posterskih priopćenja. Sudjelovala je kao organizator i predavač na školi Ramanove spektroskopije u okviru COST akcije *Nanospectroscopy* održane u rujnu 2015. Aktivno sudjeluje u popularizaciji znanosti u okviru Otvorenih dana Instituta Ruđer Bošković. Udana je i majka dvoje djece.

Radovi objavljeni u CC časopisima:

1. V. Borjanović, L. Bistričić, I. Pucić, L. Mikac, R.Slunjski, M. Jakšić, G. McGuire, A. Tomas Stanković, O. Shenderova, Proton-radiation resistance of poly(ethylene terephthalate)-nanodiamond-graphene nanoplatelet nanocomposites, *J. Mater. Sci.* **51** (2016) 1000-1016.
2. L. Mikac, M. Ivanda, M. Gotić, A. Maksimović, S. Trusso, C. D'Andrea, A. Foti, A. Irrera, B. Fazio, P. G. Gucciardi, *Croat. Chem Acta* **88** (2015) DOI: 10.5562/cca2769
3. L. Bistričić, V. Borjanović, M. Leskovac, L. Mikac, G. E. McGuire, O. Shenderova, N. Nunn, Raman spectra, thermal and mechanical properties of poly(ethylene terephthalate) carbon-based nanocomposite films, *J. Polym Res.* **22** (2015) 39
4. L. Mikac, M. Ivanda, M. Gotić, T. Mihelj, L. Horvat, Synthesis and characterization of silver colloidal nanoparticles with different coatings for SERS application, *J. Nanopart. Res*. **16** (2014) 2748-2761.
5. M. Ivanda, D. Car, L. Mikac, D. Ristić, V. Đerek, I. Đerđ, G. Štefanić, S. Musić, Acoustic vibrations of amorphous and crystalline ZrO_2-TiO_2 nanoparticles, *J. Mol. Struct.* **1073** (2014) 119-124.
6. L. Bistričić, V. Borjanović, L. Mikac, V. Dananić, Vibrational spectroscopic study of poly(dimethylsiloxane)-ZnO nanocomposites, *Vib. Spectrosc*. **68** (2013) 1-10.

7. V. Borjanović, L. Bistričić, L. Mikac, G.E. McGuire, I. Zamboni, M. Jakšić, O. Shenderova, Poymer nanocomposites with improved resistance to ionizing radiation, *J. Vac. Sci. Technol. B.* **30** (2012) 4; 041803-1-041803-13.
8. O. Gamulin, M. Balarin, M. Ivanda, M. Kosović, V. Đerek, L. Mikac, K. Serec, K. Furić, D. Krilov, Micro and nano structure of electrochemically etched silicon epitaxial wafers, *Croat. Chem. Acta* **85** (2012) 1; 101-106.
9. A. Moguš-Milanković, K. Sklepić, Ž. Skoko, L. Mikac, S. Musić, D.E. Day, Influence of Nanocrystallization on the Electronic Conductivity of Zinc Iron Phosphate Glass, *J. Am. Ceram. Soc.* **95** (2012) 1; 303-311.
10. L. Mikac, M. Ivanda, G. Štefanić, S. Musić, K. Furić, A.M. Tonejc, Spherical vibrational modes of ZrO_2–CuO nanoparticles, *J. Mol. Struct.* **993** (2011) 1/3; 198-202.
11. V. Stepanić, S. Koštrun, I. Malnar, M. Hlevnjak, K. Butković, I. Ćaleta, M. Dukši, G. Kragol, O. Makaruha-Stegić, L. Mikac, J. Ralić, I. Tatić, B. Tavčar, K. Valko, S. Zulfikari, V. Munić, Modeling Cellular Pharmacokinetics of 14- and 15-membered Macrolides with Physicochemical Properties, *J. Med. Chem.* **54** (2011) 3; 719-733.
12. V. Munić, Ž. Krelnerić, L. Mikac, V. Eraković Haber, Differences in assessment of macrolide interaction with human MDR1 (ABCB1, P-gp) using rhodamine-123 efflux, ATPase activity and cellular accumulation assays, *Eur. J. Pharm. Sci*. **41** (2010) 1; 86-95.
13. D. Nožinić, A. Milić, L. Mikac, J. Ralić, J. Padovan, R. Antolović, Assessment of Macrolide Transport Using PAMPA, Caco-2 and MDCKII-hMDR1 Assays, *Croat. Chem. Acta* **83** (2010) 323-331.
14. Khan, M. Zahirul, I.; D. Raušl, R. Zanoški, S. Zidar, J. Horvat Mikulčić, L. Krizmanić, M. Eškinja, B. Mildner, Z. Knežević, Classification of Loratadine Based on the Biopharmaceutics Drug Classification Concept and Possible in Vitro - in Vivo Correlation, *Biol. Pharm. Bull*. **27** (2004) 10; 1630-1635.

Poglavlja u knjizi:

1. L. Mikac, M. Ivanda, G. Štefanić, S. Musić, K. Furić, D. Car, Thermal Investigation of Copper-Doped-Zirconia Nanoparticles, *NanoFormulation*, Tiddy, Gordon; Tan, Reginald (ur.). London: Royal Society of London, RSC, 2012. Str. 188-193.

Posterska priopćenja na znanstvenim skupovima:

1. L. Mikac, M. Ivanda, M. Gotić, D. Ristić, V. Đerek, H. Gebavi, P.G. Gucciardi, C. D'Andrea, Preparation and characterization of SERS substrates: from colloids to solid substrates, *Proceedings of MIPRO 2015*, Biljanović, Petar; Skala, Karolj (ur.). Rijeka: Croatian Society for Information and Communication Technology, Electronics and Microelectronics - MIPRO, 2015.
2. L. Mikac, M. Ivanda, M. Gotić, A. Maksimović, C. D'Andrea, A. Foti, A. Irrera, B. Fazio, S. Trusso, P.G. Gucciardi, Metal nanoparticles deposited on porous silicon templates as novel substrates for SERS, 2nd Annual Conference on Optical Nanospectroscopy (COST MP1302), Dublin, Irska, 2015
3. L. Mikac, M. Ivanda, M. Gotić, Synthesis of silver nanoparticles by citrate-radiolytic technique and their application in SERS, XXIV. International Conference on Raman Spectroscopy, Jena, Njemačka, 2014.
4. L. Mikac, M. Ivanda, M. Gotić, T. Mihelj, Synthesis and Characterization of Silver Colloidal Nanoparticles with Different Coatings for SERS Application, 1st Annual Conference on the COST Action MP1302 Nanospectroscopy, Tuebingen, Njemačka, 2014
5. Tonejc, M. Ivanda, A. Tonejc, M. Bijelić, L. Mikac, G. Štefanić, S. Musić, Evidence of Phase Transition in ZrO_2–CuO nanoparticles revealed by HRTEM and SAED, *Proceedings MC 2013*, Rachel, Reinhard (ur.). Regensburg: Universitätsbibliothek - Publikationen der Universität Regensburg, 2013. 385-386.
6. L. Bistričić, V. Borjanović, L. Mikac, O. Shenderova, Raman spectra of poly(dimethylsiloxane) nanocomposites, *Book of Abstracts, 31st European Congress on Molecular Spectroscopy*, Nagy-Pora, Katalin; Chis, Vasile; Astilean, Simion; Cozar, Onuc (ur.). Cluj-Napoca: Publishing House Napoca star, 2012. 164-164.
7. L. Bistričić, V. Borjanović, L. Mikac, Micro-Raman Spectroscopy of poly(dimethylsiloxane) ZnO nanocomposites, *Book of Abstracts of 20th International Laser Physics Workshop*, Sarajevo, 2011. 05-P-02.
8. L. Bistričić, V. Borjanović, L. Mikac, I. Strizić, A. Tomas, V. Kralj, Ramanova spektroskopija ZnO nanokompozita i nanocijevi, *Knjiga sažetaka 7. Znanstvenog sastanka Hrvatskog fizikalnog društva*, Gajović A.; Tokić V.; Zorić M.; Maruščak T. (ur.). Zagreb: Hrvatsko fizikalno društvo, 2011. 173.