

**Raman-mikroskopia ja SERS-ilmio forensisessa
materiaalianalytiikassa**

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

Uusiutuvat luonnonvarat ja
elinympäristön kemia

11.12.2019

Toni Tikkanen

Tiivistelmä

Tässä Pro gradu -tutkielmassa oli tarkoitus selvittää pintavoimistettun Raman-spektroskopia - ilmiön (SERS) käyttömahdollisuuksia erilaisten forensiikassa tutkittavien materiaalien vertailu- ja materiaalitunnistustutkimuksissa. SERS-ilmiö perustuu pintaplasmoniresonanssi-ilmiöön (SPR) ja sen keskiössä ovat substraatteina toimivat hopea- ja kultananopartikkelit.

Työn kirjallisuusosassa käytiin kattavasti läpi Raman-spektroskopiaan ja SERS-menetelmään liittyvät keskeisimmät kokonaisuudet, kuten matemaattinen tausta, häiriöt ja laitteiston rakenne. SERS-menetelmässä tarkasteltiin substraattien, hot spottien ja aggregaation merkitystä ilmiön kannalta. SERS-menetelmän käyttömahdollisuuksia väriaineiden ja räjähdäaineiden tutkimuksissa tarkasteltiin kirjallisuudesta löytyneiden esimerkkien kautta.

Työn kokeellisessa osassa, ennen varsinaisia SERS-tutkimuksia, sitraattipelkistettyä hopeakolloidialia valmistettiin substraatiksi. Myös kaupallista kultakolloidialia kokeiltiin. Nanopartikkeleiden aggregoinnin vaikutusta SERS-ilmiön ilmentymiseen tutkittiin kaliumnitraatin ja natriumkloridin avulla. Hopeakolloidialin laatu varmistettiin mittaamalla siitä UV-Vis -spektri ja sen nanopartikkelijakauman kokoa selvitettiin pyyhkäisyelektronimikroskoopilla kuvantamalla.

Työhön valittiin näytematriiseiksi väriaineet ja räjähdäaineet. Väriaineiden SERS-tutkimus oli työn pääpainopiste ja näytteiksi valittiin punaiset spray- ja työkalumaalit sekä kuulakärkikynien ja tussien musteet. Räjähdäaineet valittiin, koska niiden forensiset tutkimukset ovat haastavia perinteisillä tutkimusmenetelmillä. Tutkittavaksi räjähdäaineeksi valittiin trinitrotolueeni (TNT) ja selvitettiin, voidaanko SERS-menetelmää hyödyntää räjähdäainejäämien tunnistamisessa laimeasta TNT-liuoksesta.

Työssä pystyttiin todistamaan, että SERS-menetelmä toimii ja sitä voidaan hyödyntää edellä mainittujen näytemateriaalien vertailututkimuksissa ja apuna materiaalin tunnistuksessa. SERS-menetelmän toiminta on vahvasti riippuvainen tutkittavan molekyylin rakenteesta, jolloin kaikista tuntemattomista spray- ja työkalumaalinäytteistä ei pystytty mittaamaan SERS-spektriä. Kuulakärkikynien ja musteiden spektrit onnistuttiin mittaamaan SERS:llä. Käsittelemättömästä TNT-liuoksesta ei saatu mitattua hyvää SERS-spektriä, mutta pH 13 -säädetyssä liuoksesta saatiin spektri mitattua. SERS-menetelmä soveltui hyvin spray- ja työkalumaalien sekä musteiden mittaauksessa. Menetelmän soveltuvuus osoittautui huonoksi TNT:n mittaauksessa. Räjähdäaineiden SERS-mittaus vaatii lisää tutkimusta.

Esipuhe

Tämän Pro gradu -tutkielman kokeellinen osa suoritettiin Keskusrikospoliisin Rikosteknisessä laboratoriossa Vantaalla vuoden 2019 huhti- ja syyskuun välisenä aikana. Työn ohjaajina toimivat Rikosteknisestä laboratorion rikoskemisti Miika Löfman ja Jyväskylän yliopistosta lehtori Jarmo Louhelainen. Työn kirjallinen osuus kirjoitettiin vuoden 2019 huhti- ja marraskuun välisenä aikana. Kirjallisuuden etsintään käytettiin mm. Google Scholar- ja ScienceDirect -hakukoneita.

Haluan kiittää Miika Löfmania asiantuntevasta perehdytyksestä ja työn ohjauksesta projektin aikana sekä rikosylikomisario Mika Bromsia, joka mahdollisti työn suorittamisen Rikosteknisessä laboratoriossa. Lisäksi haluan kiittää lähimpiä työtovereitani Rikosteknisestä laboratorion osta, jotka ovat kannustaneet ja auttaneet minua työhön liittyvissä asioissa. Erityskiitokset haluan osoittaa tyttöystävälleni ja perheelleni tuesta projektin aikana.

Vantaalla 11.12.2019

Toni Tikkanen

Sisällysluettelo

Tiivistelmä.....	I
Esipuhe	II
Käytetyt lyhenteet	V
Kirjallinen osa	1
1 Johdanto	1
2 Raman-spektroskopia.....	2
2.1 Periaate	2
2.1.1 Ramanin perusteoria.....	2
2.1.2 Molekyylien värähtely.....	6
2.2 Käytännön Raman-spektroskopiassa esiintyvät häiriöt.....	8
2.2.1 Absorptio.....	8
2.2.2 Fluoresenssi	8
2.2.3 Lämmön vaikutus, valohajoaminen ja laser-ablaatio.....	10
2.2.4 Ympäröivä valo ja taustasäteily	12
2.3 Laitteisto	12
3 SERS	14
3.1 Sähkömagneettiset mekanismit	16
3.2 Kemiallinen mekanismi	24
3.3 Hot spottien merkitys.....	26
3.4 Substraatit	27
3.4.1 Metalliset kolloidit/suspensiot.....	28
3.4.2 Metallilla päällystetyt pinnat	30
3.4.3 Nanolitografialla rakennetut metalliset pinnat	31
3.4.4 Mallinnustekniikka.....	32
3.5 Aggregaatio	34
4 Forensiset lähtökohdat	35
4.1 Maalit.....	37
4.2 Musteet ja asiakirjatutkimukset	39
4.3 Räjähdeaineet.....	42

4.4	Kuidut	46
	Kokeellinen osa	48
5	Työn suoritus ja tulokset	48
5.1	Käytetyt reagenssit ja laitteet	48
5.2	Hopeakolloidin synteesi	49
5.3	SERS-tutkimukset	52
5.3.1	Näytteiden valmistus	52
5.3.2	Aggregoinnin merkitys käytännön mittauksissa	54
5.3.3	Hopeakolloidin testaaminen rhodamiini 6G -molekyylin avulla	56
5.3.4	Spraymaalien SERS-tutkimukset	60
5.3.5	Työkalumaalien SERS-tutkimukset	65
5.3.6	Musteiden ja tussivärien SERS-tutkimukset	66
5.3.7	Räjähdeaineiden SERS-tutkimukset	71
5.3.8	SERS esimerkki forensisessä tutkimuksessa.....	74
6	Yhteenveto ja johtopäätökset	77
	Kirjallisuusluettelo	81
	Liitteet	87

Käytetyt lyhenteet

AEF	Analyyttinen voimistumiskerroin <i>Analytical efficient factor</i>
AgNP	Hopeananopartikkeli <i>Silver nanoparticle</i>
AN	Ammoniumnitraatti <i>Ammoniumnitrate</i>
AuNP	Kultananopartikkeli <i>Gold nanoparticle</i>
AuNR	Kultananosauva <i>Gold nanorod</i>
CT	Varauksen siirto <i>Charge transfer</i>
CTAB	Cetrimonium bromidi <i>Cetrimonium bromide</i>
DNT	Dinitrotolueeni <i>Dinitrotoluene</i>
EBL	Elektronisuihkulitografia <i>Electron beam lithography</i>
EF	Voimistumiskerroin <i>Efficiency factor</i>
EGND	Etyleeniglykolidinitraatti <i>Ethylene glycol dinitrate</i>
EM	Sähkömagneettinen säteily <i>Electromagnetic radiation</i>
FTIR	Fourier-muunnos infrapunaspektroskopia <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GC	Kaasukromatografia <i>Gas chromatography</i>
GC-MS	Kaasukromatografia-massaspektrometria <i>Gas chromatography mass spectrometry</i>

HMTD	Heksametyleenitriperoksididiamiini <i>Hexamethylene triperoxide diamine</i>
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia <i>High-performance liquid chromatography</i>
IC	Ionikromatografia <i>Ion chromatography</i>
IR	Infrapuna <i>Infrared</i>
LC	Nestekromatografia <i>Liquid chromatography</i>
LSPR	Lokalisoitunut pintaplasmoniresonanssi <i>Localized surface plasmon resonance</i>
MSP	Mikrospektrofotometria <i>Microspectrophotometry</i>
NP	Nanopartikkeli <i>Nanoparticle</i>
NR	Normaali Raman <i>Normal Raman</i>
NSL	Nanopallolitografia <i>Nanosphere lithography</i>
PAN	Polyakrylinitriili <i>Polyacrylonitrile</i>
PE	Polyetylenei <i>Polyethylene</i>
PEG	Polyetyleeniglykoli <i>Polyethylene glycol</i>
PET	Polyetyleenitereftalaatti <i>Polyethylene terephthalate</i>
PETN	Pentaerytritolitetraanitraatti <i>Pentaerythritol tetranitrate</i>
PMMA	Polymetyylimetakrylaatti <i>Poly(methyl methacrylate)</i>

PP	Polypropeeni <i>Polypropylene</i>
PTFE	Polytetrafluorieteeni <i>Polytetrafluoroethylene</i>
PVP	Polyvinyylipyrrollidoni <i>Polyvinylpyrrolidone</i>
R6G	Rhodamiini 6G <i>Rhodamine 6G</i>
RDX	Heksogeeni <i>Hexogen</i>
SEM	Pyyhkäisyelektronimikroskopia <i>Scanning electron microscopy</i>
SERRS	Pintavoimistettu resonanssi-Raman -spektroskopia <i>Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy</i>
SERS	Pintavoimistettu Raman-spektroskopia <i>Surface-enhanced raman spectroscopy</i>
SPR	Pintaplasmoniresonanssi <i>Surface plasmon resonance</i>
TATP	Triasetonitriperoksidi <i>Triacetone triperoxide</i>
TLC	Ohutlevykromatografia <i>Thin-layer chromatography</i>
TNT	Trinitrotolueeni <i>Trinitrotoluene</i>
UV	Ultravioletti <i>Ultraviolet</i>
UV/VIS	Ultravioletti/näkyvä valo <i>Ultraviolet/visible light</i>

Kirjallinen osa

1 Johdanto

Raman-spektroskopian mahdollisuudet forensisessä analytiikassa ovat alkaneet kiinnostamaan enemmän viimeisen kahden vuosikymmenen aikana. Ramanilla on suuri hyöty useisiin muihin käytettävissä oleviin menetelmiin nähden. Laitteiston kehittymisen myötä sen suurin vahvuus on, että se ei tuhoa näytettä *in situ* -tutkimuksessa. Raman-tekniikalla on myös suuri herkkyys ja se antaa yhdessä muiden tekniikoiden kanssa täydentävää tietoa tutkittavista yhdisteistä.^{1,2} Raman-spektroskopiaa käytetäänkin usein FTIR-spektroskopian kanssa yhdessä, jolloin tekniikat täydentävät toisiaan.³

SERS-menetelmässä on kyse Raman-spektroskopisesta ilmiöstä, jossa tekniikan herkkyyttä ja selektiivisyyttä kasvatetaan huomattavasti.⁴ Raman-signaalia voidaan saadaan parannettua 10^3 - 10^6 kertaiseksi metallisten nanorakenteiden avulla. Raman-sironnan intensiteetin kasvu perustuu pääasiassa metallisten nanopartikkeleiden luomiin lokalisoituneihin pintaplasmoniresonansseihin. Tämän lisäksi tutkittavan yhdisteen kemiallinen rakenne vaikuttaa siihen, kuinka hyvin se kiinnittyy nanopartikkelin pinnalle. Raman-spektroskopiassa yleisimpänä häiriötekijänä toimiva fluoresenssi saadaan myös minimoitua SERS:n avulla.^{1,4}

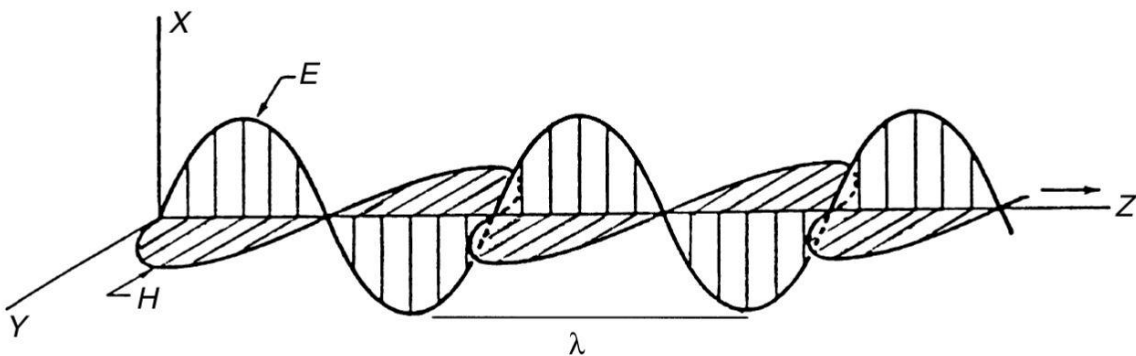
Pro gradu -tutkielman aiheena oli Raman-mikroskopiassa käytetyn SERS (Surface Enhanced Raman spectroscopy) -menetelmän sovellutukset forensisessä materiaalianalytiikassa. Työn tarkoituksena oli kartoittaa SERS-menetelmän soveltuvuutta erilaisten forensiikassa tutkittavien materiaalien rutiininomaiseen tutkimukseen. Työn forensisiksi materiaaleiksi valikoitui spray- ja työkalumaalit, tussien- ja kuulakärkikynien musteet sekä räjähdaineista TNT.

2 Raman-spektroskopia

2.1 Periaate

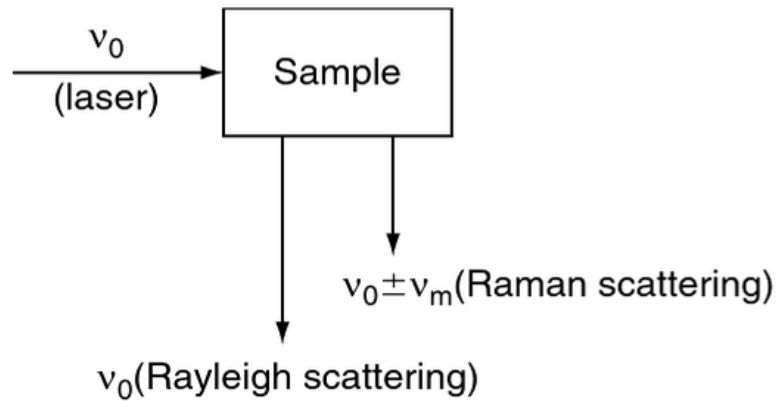
2.1.1 Ramanin perusteoria

Spektroskopiassa käsitellään sähkömagneettisen säteilyn (kuva 1) ja aineen vuorovaikutusta toisiinsa.⁵ Sähkömagneettinen säteily koostuu sähkömagneettisista aalloista, jotka ovat sähköisen ja magneettisen kentän synkronisoituja värähtelyjä.⁶ Spektroskopiassa voidaan tutkia erilaisia ilmiöitä, kuten absorptiota, emissiota, fluoresenssia tai sirontaa.⁵ Raman spektroskopiassa tutkimus perustuu sähkömagneettisen säteilyn sirontaan näytteestä, kun sitä kohdistetaan voimakkaalla UV-Vis tai IR-alueiden lasersäteellä.⁷



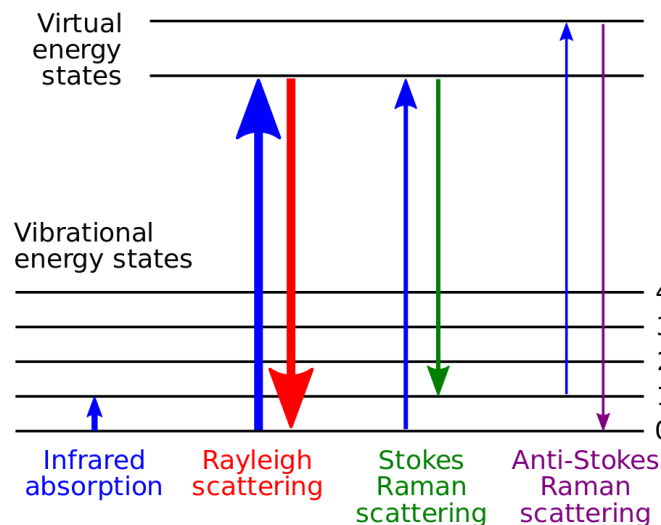
Kuva 1. Z-akselin suuntaan kulkeva sähkömagneettinen säde, jossa x-akselilla kulkee sähköisen komponentin aalto ja y-akselilla magneettisen komponentin aalto. Kahden samansuuntaisen aaltohuipun välistä etäisyyttä kutsutaan aallonpituudeksi, λ . Aallot kulkevat kohtisuoraa toisiinsa nähden.⁷ Copyright (2003) Elsevier B.V.

Valon sironta jakautuu Raman-spektroskopiassa kahteen tyyppiin: Rayleigh- ja Raman-sirontaan (kuva 2). Rayleigh-sironta on vahvaa elastista säteilyä ja sillä on suurin todennäköisyys tapahtua. Sen taajuus on sama kuin vaikuttavan lasersäteen (ν_0). Raman-sironta on taas epäelastista ja sillä on pienempi todennäköisyys tapahtua. Tämän takia sen taajuus on heikko, noin 10^5 pienempi kuin vaikuttavan säteen voimakkuus, ja se saa taajuudet $\nu_0 \pm \nu_m$, missä ν_m on molekyylille ominainen värähtelytaajuus. $\nu_0 - \nu_m$ ja $\nu_0 + \nu_m$ tiloja kutsutaan Stokes- ja anti-Stokes -siirtymiksi.^{7,8}



Kuva 2. Raman-spektroskopian valon sirontaperiaate.⁷ Copyright (2003) Elsevier B.V.

Raman-spektroskopiassa mitataan molekyylin värähtelytaajuuden (ν_m) siirtymää verrattuna vaikuttavan säteen taajuuteen (ν_0). Fotoni virittää molekyylin korkeaenergisemmälle virtuaalitalalle. Huoneen lämpötilassa suurin osa molekyyleistä on niiden värähtelyn perustilalla. Boltzmannin lain mukaan hyvin pieni osa molekyyleistä on kuitenkin virittyneinä kyseisessä lämpötilassa. Tämän ja Maxwell-Boltzmannin jakauman perusteella voidaan sanoa, että suurin osa molekyyleistä sijaitsee enemmän tilalla $\nu=0$ kuin tilalla $\nu=1$. On siis voitu todeta, että molekyyli todennäköisemmin vapauttaa vähemmän energiaa värähtelytilan virittymisen seurauksena (Stokes-siirtymä). Stokes-siirtymällä on näin suurempi intensiteetti kuin anti-Stokes-siirtymällä. Stokes- ja anti-Stokes-siirtymät vastaavat samoja siirtymiä, jolloin Raman-spektrissä nähdään intensiteetiltään suuremmat piikit eli Stokes-siirtymän piikit.^{7,8} Kuvassa 3 on esitetty energiatasodiagrammi Raman-spektroskopiassa esiintyville tiloille.



Kuva 3. Energiatasodiagrammi Raman-spektroskopiassa esiintyville tiloille.⁹

Klassinen Raman-teoria perustuu sähkömagneettisen säteilyn (laserin) sähköiseen osaan. Kaavassa 1 on esitetty sähköisen kentän E voimakkuuden vaihtelu ajan suhteen:⁷

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu_0 t, \quad (1)$$

missä E_0 on säteilyn amplitudi, ν_0 on säteilyn taajuus ja t on aika. Kaksiatomisen molekyylin altistuessa sähkömagneettiselle säteilylle, täytyy ottaa huomioon sähköinen dipolimomentti P , joka saadaan kaavan 2 mukaan:⁷

$$P = \alpha E = \alpha E_0 \cos 2\pi\nu_0 t, \quad (2)$$

missä α on verrannollisuuskerroin nimeltä polaroituvuus. Polaroituvuus on matemaattinen tensori, joka on riippuvainen kemiallisen sidoksen koosta ja ulottuvuuksista.¹⁰ Kun molekyyli värähtelee tietyllä taajuudella ν_m , sen ytimen siirtymää q tarkastellaan kaavan 3 mukaan:⁷

$$q = q_0 \cos 2\pi\nu_m t, \quad (3)$$

missä q_0 on värähtelyn amplitudi. Kun molekyyli värähtelee pienellä taajuudella, α on suoraan verrannollinen q nähden. Näin polaroituvuudelle α voidaan ilmoittaa kaavan 4 mukaan:⁷

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 + \dots, \quad (4)$$

missä α_0 on polaroituvuus ja $(\partial\alpha/\partial q)$ on α :n muutosnopeus verrattuna q :n muutokseen tasapainotilassa. Kun kaavat 2-4 yhdistetään, saadaan Raman-spektroskopian klassisen teorian mukainen kaava ilmiön sähköiselle dipolimomentille ja se on esitetty kaavassa 5:⁷

$$\begin{aligned}
P &= \alpha E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \\
&= \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \\
&= \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \cos 2\pi\nu_m \\
&= \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 E_0 [\cos\{2\pi(\nu_0 + \nu_m)t\} + \cos\{2\pi(\nu_0 - \nu_m)t\}]
\end{aligned} \tag{5}$$

Kaavan 5 ensimmäinen termi $\alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t$ esittää Rayleigh-sironnan oskilloivan dipolin, joka säteilee valoa taajuudella ν_0 . Toinen termi esittää Raman-sironnan taajuudella $\nu_0 + \nu_m$ (anti-Stokes) ja $\nu_0 - \nu_m$ (Stokes). Mikäli molekyylin polaroituvuus ei muutu ytimen värähtelyn mukana eli $(\partial\alpha/\partial q)_0$ on nolla, värähtely ei ole Raman-aktiivinen. Toisin sanoen, molekyyli on Raman-aktiivinen, kun sen polaroituvuuden muutosnopeus ja värähtely eivät saa arvoa nolla.⁷

Tutkimalla lisää Raman-tapahtuman kvanttimekaanista tulkintaa, voidaan todeta, että sirottuneen säteen voimakkuus P_s on yhtä suuri kuin johtuvien fotonien intensiteetin tuotannon I_0 ja ns. Raman-poikkileikkauksen, σ_R , arvo. Raman-poikkileikkaus voidaan ilmaista kaavan 6 avulla seuraavasti:¹¹

$$\sigma_R \propto \frac{1}{\lambda^4}, \tag{6}$$

missä λ on vaikuttavan lasersäteen aallonpituus. Tämän jälkeen sirottuneen säteen voimakkuus P_s voidaan ilmaista kaavan 7 avulla:

$$P_s \propto \frac{I_0}{\lambda^4}. \tag{7}$$

Kaavan 7 perusteella voidaan sanoa, että sirottuneen valon voimakkuuden ja vaikuttavan valon intensiteetin välillä on yhteys. Kuten on myös sirottuneen valon voimakkuuden ja käänteisen aallonpituuden neljännen potenssin välillä.¹¹

Raman-spektroskopiassa mittaus tapahtuu fokusoimalla näytteen pinnalle voimakasta lasersäteilyä. Sirottuneen säteilyn intensiteetti mitataan laitteella aallonpituuden funktiona. Raman-

spektrissä säteen intensiteetti on ilmaistu yleensä aaltoluvun $\Delta\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) funktiona. Aaltoluku saadaan selville, kun Raman-spektrometri laskee sirottuneen valon ja johtuvan lasersäteen välisen taajuuden erotuksen kaavan 8 mukaan:¹⁰

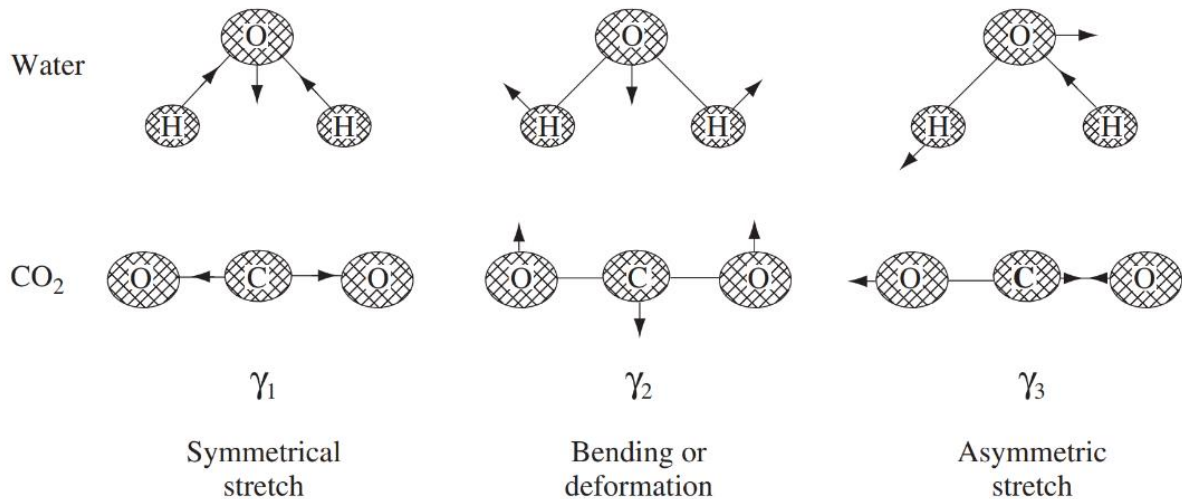
$$\Delta\tilde{\nu} = \nu_m - \nu_0 = \frac{\nu_m}{c} - \frac{\nu_0}{c}, \quad (8)$$

missä ν_m ja ν_0 ovat sirottuneen valon (mitattu) ja vaikuttavan lasersäteen taajuudet ja c on valonnopeus.

2.1.2 Molekyyliden värähtely

Mikäli molekyylien energia ei muutu esimerkiksi fotonien absorptioon ja sitä seuraavaan elektronin virittymisen kautta, molekyylin energia voi jakaantua moneen eri osaan tai ns. vapausasteiksi. Kolme näistä vapausasteista selittää molekyylin translaatiota avaruudessa ja kolme muuta selittävät molekyylin kiertoliikettä. Tämä toimii muille kuin lineaarisille molekyyille, joille on mahdollista vain kahdentyyppiset kiertoliikkeet. N vastaa atomien määrää molekyyliässä. Värähtelyjen vapausasteiden määrä ja näin ollen mahdollisten värähtelyjen määrä on $3N-6$ muille kuin lineaarisille molekyyille ja lineaarisilla molekyyilleillä tämä on vastaavasti $3N-5$. Kaksiatomiset molekyylit voivat siis värähdellä vain yhden sidoksen kautta (esim. happimolekyylillä, O_2).¹²

Esimerkki kolmiatomisten molekyylien värähdystiloista on esitetty kuvassa 4, jossa pallot esittävät atomeja ja viivat niiden välillä atomien välisiä sidoksia. Kyseinen malli on hyvin yksinkertainen ja atomien välisten sidosten värähtelytaajuutta voidaan ilmaista Hooken lain mukaan. Yksinkertaisesti Hooken laki selittää atomien massan ja niiden välisten sidosten voimakkuuden suhdetta molekyylin värähtelytaajuuteen. Mitä suurempi massa atomilla on, sitä pienemmän värähtelytaajuuden se saa. Mitä voimakkaampi sidos atomien välillä on, sitä suurempi värähtelytaajuus saadaan. Suurten atomien väliset heikot sidokset värähtelevät pienemmällä taajuudella kuin voimakkaat sidokset pienten atomien välillä.¹²



Kuva 4. Kolmiatomisilla molekyyeillä esiintyviä värähtelytiloja: symmetrinen venytys, symmetrinen taivutus ja epäsymmetrinen venytys. Esimerkkinä vesi ja hiilidioksidi.¹² Copyright (2005) John Wiley & Sons Ltd.

Kuvassa 4 on esitetty yksinkertainen malli molekyylien värähtelylle, joiden perusteella värähtelyspektrit yleensä tulkitaan. Molekyylit ovat kuitenkin kolmiulotteisia ja niitä ympäröi elektronipilvi. Kun molekyyli värähtelee, sen ympärillä oleva elektronipilvi muuttuu positiivisen ytimen paikan muuttuessa. Tämä muutos voi saada aikaan dipolimomentin tai polarisaation muutoksen molekyyliässä. Symmetrinen venytys siis todellisuudessa muuttaa kolmiatomisen molekyylin polarisaatiota merkittävästi ja samalla dipolimomentti pienenee. Tämä näkyy sidoksen voimakkaana Raman-sirontana ja samalla heikkona IR-absorptiona. Symmetrisen taivutuksen kohdalla tapahtuma on käänteinen eli dipolimomentti kasvaa ja polarisaatio pysyy lähes muuttumattomana. Tämä näkyy voimakkaana IR-absorptiona ja heikkona Raman-sirontana. Edellä käsiteltyä pohdintaa voidaan soveltaa helposti pienten molekyylien Raman-tulkinnassa, mutta suurempien ja monimutkaisempien molekyylien Raman-värähtelyjen tulkinnassa käytetään apuna tiheysfunktionaaliteoriaa (DFT), joka on teoreettinen laskutoimitus värähtelyjen selvittämiseksi. DFT:hen perustuvaa molekyyli- ja materiaalimallinnusta tehdään tietokoneella erilaisten ohjelmistojen avulla.¹²

2.2 Käytännön Raman-spektroskopiassa esiintyvät häiriöt

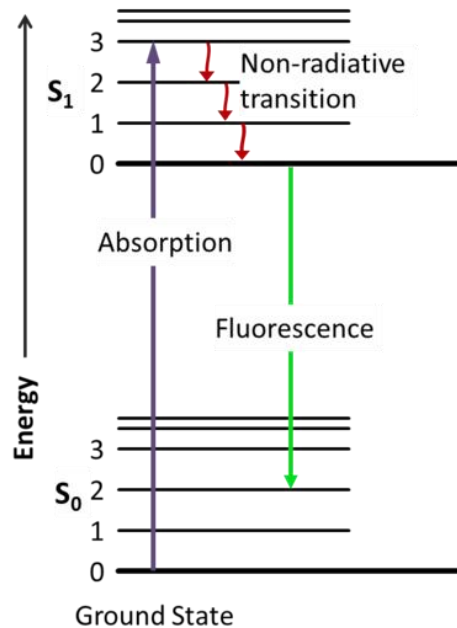
2.2.1 Absorptio

Laserilla säteilytetty näyte tai matriisi absorboi valoa, jos laserin aallonpituus osuu näytteelle ominaisen absorptiovyöhykkeen sisälle. Absorptiossa molekyyli absorboi säteilyä ja sen elektronit virittyvät korkeammalle tilalle. Säteily taajuus vaikuttaa siihen, virittykö molekyyli elektroniselle (UV-Vis) vai värähtelevälle (IR) viritystilalle. Virittyneen molekyylin palautuessa takaisin perustilalle, energia purkautuu suurimmalta osin säteilemättömästi lämpöenergiana ympäristöön. Koska näytteestä sirottuvan säteilyn voimakkuus on suoraan verrannollinen kohdistuvien fotonien määrään, voidaan sanoa absorption olevan selvästi ongelmallinen Raman-mittauksissa. Absorptiosta seuraavaa ongelmaa voidaan yrittää korjata vaihtamalla mittauksessa käytettävä laser toiseen.¹⁰

Myös Raman-sironta voi absorboitua tutkittavaan näytteeseen. Tällöin suositellaan, kuten edellä, toisella aallonpituudella suoritettavaa mittausta. Toinen vaihtoehto tässä tapauksessa on käyttää anti-Stokes -sirontaa mittauksissa.¹⁰

2.2.2 Fluoresenssi

Fluoresenssi luo vaihtelevan häiriön Raman-mittauksissa. Fluoresenssissa molekyyli virittyy sähkömagneettisen säteilyn vaikutuksesta korkeampienergiselle tilalle. Tämän jälkeen tapahtuu virityksen purkautumista säteilemättä alemmalle tilalle ja tästä edelleen elektroniselle perustilalle emittoimalla näkyvää säteilyä (kuva 5). Häiriö vaikuttaa Raman-mittauksissa, koska emittoituvalla säteilyllä on pienempi energia kuin vaikuttavalla lasersäteellä.¹⁰



Kuva 5. Fluoresenssitapahtuman energiadiagrammi.¹³

Fluoresenssista johtuvaa häiriötä voidaan yrittää poistaa muun muassa vaihtamalla laitteeseen pidemmän aallonpituuden laser. Pidemmän aallonpituuden säteilyn energia ei riitä virittämään molekyyliä energialtaan korkeammalle tilalle ja näin fluoresenssia ei tapahdu. Energialtaan heikomman laserin ongelmana taas on se, että Raman-sironta on heikompaa, jolloin signaali heikkenee. Mitä lähemmäksi laserin aallonpituus menee IR-aallonpituuksia, sitä heikompi Raman-intensiteetti saadaan.¹⁰

Laserin vaihdon sijasta voidaan fluoresenssin korjaukseen käyttää menetelmää (photobleach), jossa on ideana säteilyttää näytettä vähän aikaa ennen varsinaisen mittauksen suorittamista. Tämän seurauksena laser tuhoaa fluoresenssia aiheuttavat molekyylit tai yhdisteet lämmön tai valon avulla. Menetelmä toimii useimmiten, jos fluoresenssi johtuu analysoitavan näytteen molekyylien sijaan tutkittavan näytteen matriisista.¹⁰

Fluoresenssin haitallista vaikutusta voidaan eliminoida myös laiteteknisillä ratkaisulla. Yksi ratkaisu on käyttää aikariippuvaista mittaustekniikkaa. Fluoresenssi on varsin hidas prosessi verrattuna raman-sirottumiseen. Laiteteknisesti tämä antaa mahdollisuuden käyttää mittauksissa pulssitettua laseria ja detektoria, joka on mahdollista sulkea. Tällöin tietyn ajan sisällä

Raman-sironnan ilmentyessä, detektorin ovi on auki ja se sulkeutuu ennen kuin fluoresenssi ehtii saapua detektorille.¹⁰

Myös matemaattista ratkaisua on hyödynnetty fluoresenssiongelman poistoon. Menetelmän ideana on poistaa fluoresenssi mitatun spektrin taustalta ottamalla Raman-spektristä ensimmäisen tai toisen asteen derivaatta. Tällöin fluoresenssi poistuu, mutta siitä aiheutuva kohina ei. Tämä perustuu siihen tietoon, että fluoresenssin emissiovyön viivanleveys on suurempi kuin Raman-sironnan viivanleveys.¹⁰

Fluoresenssiongelman poistoon on esitetty myös ratkaisuna kahden erilaisen Raman-spektrin yhdistämistä. Tässä on ideana mitata kaksi erilaista Raman-spektriä käyttämällä kahta aallonpituudeltaan lähekkäistä laseria ja vähentämällä spektrit tämän jälkeen toisistaan. Muodostuvan spektrin derivaatta voidaan matemaattisesti muuttaa takaisin alkuperäiseksi spektriksi. Laskutoimituksien seurauksena fluoresenssi ja myös taustakohina saadaan poistettua lähes kokonaan.¹⁰

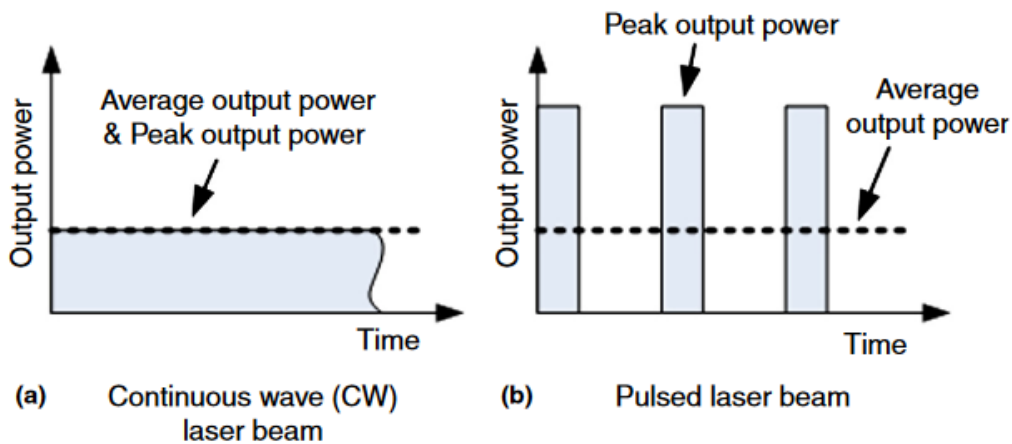
2.2.3 Lämmön vaikutus, valohajoaminen ja laser-ablaatio

Näyte voi kuumentua ja mahdollisesti vaurioitua, kun sitä säteilytetään laserilla. Raman-intensiteetti on verrannollinen lasersäteen voimakkuuteen ja usein käytetään mahdollisimman suurta laserin tehoa, jotta tutkittavasta yhdisteestä saadaan mitattua optimaalinen spektri.¹⁰

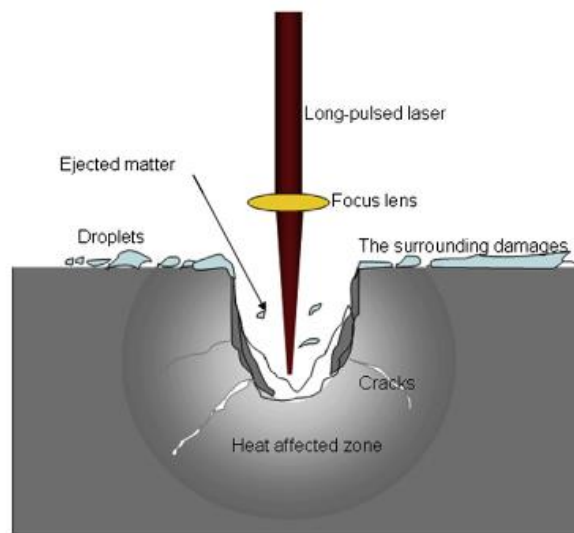
Jos energian siirtyminen näytteeseen on liian suurta, voi tapahtua näytettä vaurioittavia ilmiöitä. Tämä johtuu siitä, että näyte ei pysty siirtämään absorboidusta säteilystä syntyvää lämpöä tehokkaasti ympäristöönsä, jolloin lämpö kerääntyy pienelle alueelle ja näyte kuumenee. Lämmön kerääntyminen on tyypillistä kaikille lasereille, mutta erityisesti IR-alueen laserit ovat herkkiä tälle ilmiölle.¹⁰

Valohajoamista tapahtuu varsinkin lyhyillä aallonpituuden lasereilla. Tämä johtuu siitä, että laserin aallonpituuden energia on yhtä suuri kuin tutkittavan molekyylin välisten sidosten energia. Seurauksena tästä molekyylien väliset sidokset voivat hajota.¹⁰

Laser-ablaatiolla tarkoitetaan termistä tai ei-termistä ilmiötä, jossa intensiivisen jatkuvan tai pulssitetun lasersäteilyn (kuva 6) seurauksena kiinteästä näytteestä poistuu atomeja haihtamalla. Kuvassa 7 on esitetty ablaatioprosessi pulssitetulla laserilla. Laserin kohdistuessa näytteeseen erilaiset fysikaaliset prosessit, kuten absorptio, sironta, heijastus ja transmissio vaikuttavat tapahtumaan. Ablatio tapahtuu, kun näytteeseen kohdistuvan energian määrä saavuttaa sille kriittisen arvon (ablaatio raja-arvo). Ablatio tapahtuu todennäköisemmin lyhyen aallonpituuden laserilla, mutta myös tutkittavan näytteen materiaalilla on väliä.¹⁴ Ablatio näkyy näytteessä selvästi vauriona ja on kraatterin muotoinen.¹⁰



Kuva 6. Esimerkkikuva jatkuvan (a) ja pulssitetun (b) lasersäteilyn lähtötehon ilmentymisestä ajan funktiona.¹⁴ Copyright (2014) Elsevier B.V.



Kuva 7. Havainnekuva laser-ablaatiosta pulssitetulla laserilla (muokattu lähteestä).¹⁴ Copyright (2014) Elsevier B.V.

2.2.4 Ympäröivä valo ja taustasäteily

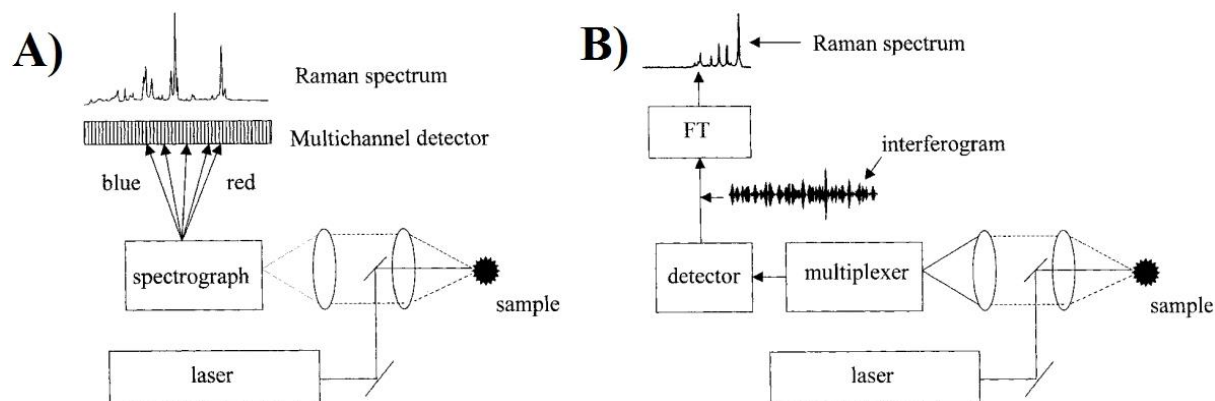
Raman-sironna on heikko tapahtuma, joten ympäröivä valo ja taustasäteily voivat helposti peittää sen eikä mittaus tästä syystä onnistu. Ympäröivällä valolla tarkoitetaan mittaustilan valosäteilyä. Taustasäteilyä taas syntyy tutkittavasta näytteestä. Ympäröivä valo voidaan helposti poistaa suorittamalla mittaukset pimeässä. Pimeä ympäristö saadaan usein aikaan laitteiston omilla ratkaisuilla, joissa mittaustilan luukku suljetaan ennen mittausta. Jos tämä ei jostain syystä onnistu, voidaan häiriötä yrittää poistaa pulssitetulla laserilla ja käyttämällä suljettavaa detektorilla, kuten fluoresenssin tapauksessa. Taustasäteilyä voidaan yrittää poistaa vaihtamalla laseria.¹⁰

2.3 Laitteisto

Erilaisten laitteiden valinta Raman-spektroskooppisiin mittauksiin perustuu hyvin pitkälle tarpeeseen käyttää tietyn aallonpituuden laseria, joka valitaan käytettävien menetelmien ja näytteiden perusteella. Laserin aallonpituus voi määrätä millainen spektrometri (dispersiivinen ja ei-dispersiivinen eli FT-Raman) ja detektori (yksi- ja monikanavainen) tarvitaan. Tämä taas vaikuttaa suoraan siihen, kuinka suuri signaali/kohina -suhde maksimissaan saadaan.¹⁵

Normaalilla Raman-tekniikalla (NR) tarkoitetaan mittaasetelmaa, jossa näytteet mitataan Raman-laitteella ilman erityistä näytteenkäsittelyä, mikä vaikuttaa Raman-spektrin ilmentymiseen. Raman-spektrometrit voidaan jakaa kahteen erilaiseen laitetyyppiin, dispersiivisiin ja ei-dispersiivisiin FT-Raman laitteisiin. Kummassakin laitetypissä pääperiaate on mitata Raman-intensiteetin (fotoneja sekunnissa) ja Raman-siirtymän (aaltoluku, cm^{-1}) välistä yhteyttä, mutta tämä saadaan aikaiseksi erilaisilla laiteratkaisuilla. Kummassakin laitetypissä voidaan käyttää samanlaista laseria ja näytemoduulia, ja niihin on mahdollista liittää käyttöön erilaista kuituoptiikkaa, mikroskooppeja sekä muita lisäosia. Lasereiden käytössä löytyy poikkeuksia, kun laserin aallonpituus lähestyy IR-alueita. FT-Raman-laitteissa käytetään 1064 nm IR-lasereita. Dispersiivisessä Raman-laitteessa ei käytetä IR-laseria, koska sen detektori ei pysty keräämään säteilyä tehokkaasti. Tekniikoiden erot tulevat esiin Raman-sironnan käsittelyssä mikroskooppioptiikan jälkeen. Dispersiivisessä tekniikassa tutkittavan sironnan aallonpituudet jaetaan spektrometrillä ja havaitaan joko yhdellä detektorilla tai monella rinnakkaisella detektorilla. FT-Raman tekniikassa aallonpituuksia ei jaeta tutkittavasta sironnasta vaan ne muutetaan niin,

että jokaisella aallonpituudella on tyypillinen modulaatiotaajuus. Modulaatiotaajuudet yhdistetään interferometrillä (kuva 8 b-kohta, multiplexer) ja yhdistetty signaali tunnistetaan detektorilla. Detektori muuttaa modulaatiotaajuudet interferogrammiksi, joka muutetaan Fouriermuunnoksella Raman-spektriiksi.¹⁵ Kuvassa 8 on esitetty dispersiivisen ja FT-Raman -spektrometrin kaavakuvat.



Kuva 8. Kaavakuvat dispersiivisestä (A) ja FT-Raman (B) -spektrometristä (muokattu lähteestä).¹⁵ Copyright (2000) John Wiley & Sons Inc.

Raman-spektroskopiassa valolähteenä toimii jatkuvatoiminen lasersäde. Lasereita löytyy UV-alueelta lähi-IR -alueelle saakka. Taulukkoon 1 on kerätty Raman-spektroskopiassa yleisesti käytössä olevien lasereiden tyypit ja niitä vastaavat aallonpituudet.^{16a}

Taulukko 1. Yleisimpiä Raman-spektroskopiassa käytössä olevia laser-tyyppejä ja niiden aallonpituusalueet (muokattu lähteestä)^{16a}

Laser	Laserin aallonpituusalue	Aallonpituus (nm)
Taajuus-tuplattu Ar ⁺	UV	244
Ar ⁺	VIS	488
Ar ⁺	VIS	514,5
Taajuus-tuplattu Nd ³⁺ :YAG tai Nd ³⁺ :YVO ₄	VIS	532
He-Ne	VIS	632,8
Diodi	lähi-IR	785
Diodi	lähi-IR	830
Diodi: Nd ³⁺ :YAG tai Nd ³⁺ :YVO ₄	lähi-IR	1064

Yleisimmin käytetty detektori kaupallisissa Raman-spektrometreissä (viritysväli alle 1000 nm) on monikanavainen CCD-ilmaisim. CCD-detektorit menettävät herkkyytensä, kun lähestytään

10000 cm^{-1} alempia taajuuksia, jotka ovat lähellä IR-aallonpituuksia. Lähi-IR -alueen viritysvalon aallonpituuksilla käytetään CCD-detektorin sijaan puolijohdepohjaisia detektoreja, kuten Ge tai InGaAs -detektoreja.^{16a}

3 SERS

SERS-ilmion nimi tulee sanoista Surface Enhanced Raman Spectroscopy (tai Scattering). Siinä on ideana voimistaa Raman-signaalia pääosin sähkömagneettisen säteilyn vaikuttaessa metallin kanssa. Vaikuttavan laserin kenttä voimistuu virittymisien kautta, joita kutsutaan plasmoniresonansseiksi (tai ts. pintaplasmoniresonansseiksi, SPR). Jotta analysoitava molekyyli vaikuttaisi metallin kanssa, sen tulee sitoutua siihen kemiallisesti tai olla hyvin lähellä sitä (suurin etäisyys noin 10 nm). Molekyylin kemiallinen sitoutuminen metallin pinnalle ei suoranaisesti ole SERS-ilmio, mutta sillä on suuri vaikutus SERS-ilmion tapahtumiseen. Esimerkiksi negatiivisesti varautunut väriaine ei pysty absorboitumaan negatiivisesti varautuneeseen hopeapartikkeliin sähköstaattisen repulsion seurauksena. Positiivisesti varautunut väriainemolekyyli taas pystyy liittymään hopean pinnalle. Negatiivisen varauksen tapauksessa SERS:ä ei siis tapahdu tai signaalin voimistuminen on heikkoa, mutta positiivisesti varautunut molekyyli voi antaa hyvin voimakkaan SERS-signaalin.^{17a,18-23}

Voimistuessaan Raman-signaali alkaa kilpailemaan intensiteetillään fluoresenssin intensiteetin kanssa. SERS-menetelmällä mitattu molekyyli ilmenee hyvin kapeina ja terävinä piikkeinä Raman-spektrissä toisin kuin fluoresenssi, jonka piikki on hyvin leveä. Tämä intensiteettien ero saa fluoresenssin ns. sammumaan eikä sitä havaita SERS-mittauksissa ihanteellisissa tilanteissa.²⁴

SERS-menetelmällä on monia hyötyjä fluoresenssin tukehduuttamisen lisäksi: SERS-spektrin suuri resoluutio mahdollistaa samanaikaisen monen yhdisteen analyysin, näytteenkäsittely on yksinkertaista, analyysin suorittaminen on nopeaa ja lisäksi sillä onnistuu *in situ*-mittausten suorittaminen. SERS:n toimivuus perustuu suoraan kontaktiin substraatin ja analyytin välillä. Substraattien teho laskee ajan saatossa hajoamisen seurauksena, ne voivat olla selektiivisiä tietyntylaisille analyyteille sekä niiden käyttökertojen määrät ja ikä ovat rajallisia. Substraateilla voi olla myös ongelmia tuottaa homogeenisia ja toistettavia SERS-signaaleja. SERS:llä on siis

omat rajoituksensa, mutta sen herkkyyden ja selektiivisyyden ansiosta sille on löydetty käyttökohteita tunnistettaessa monia erilaisia kemiallisia yhdisteitä, kuten bentseeni, tolueni, etyyli-bentseeni, ksyleenit, polysykliset aromaattiset hiilivedyt (PAH-yhdisteet), haihtuvat orgaaniset yhdisteet (VOC), raskasmetallin, myrkylliset tai radioaktiiviset kationit ja anionit, ioniset ravinneaineet, hyönteismyrkyt, huumeet, lääkeaineet ja räjähdäaineet.²⁴

Kuten edellä todettiin, suuri Raman-sironnan voimistuminen SERS-menetelmässä johtuu pääosin sähkömagneettisesta ja kemiallisista vuorovaikutuksista. Kyse on komplementaarista mekanismeista ja signaalin voimistuminen A voidaan esittää kaavan 9 mukaan:²⁰

$$A = A_{EM}A_{Chem}\theta, \quad (9)$$

missä A_{EM} on sähkömagneettisen kentän voimistuminen, A_{Chem} on kemiallisen resonanssin voimistuminen ja θ on kerroin, joka sisältää absorbanteista johtuvat peitot ja elektronikonfiguraatioiden uudelleenjärjestäytymiset metallin vaikutuksen alaisena.

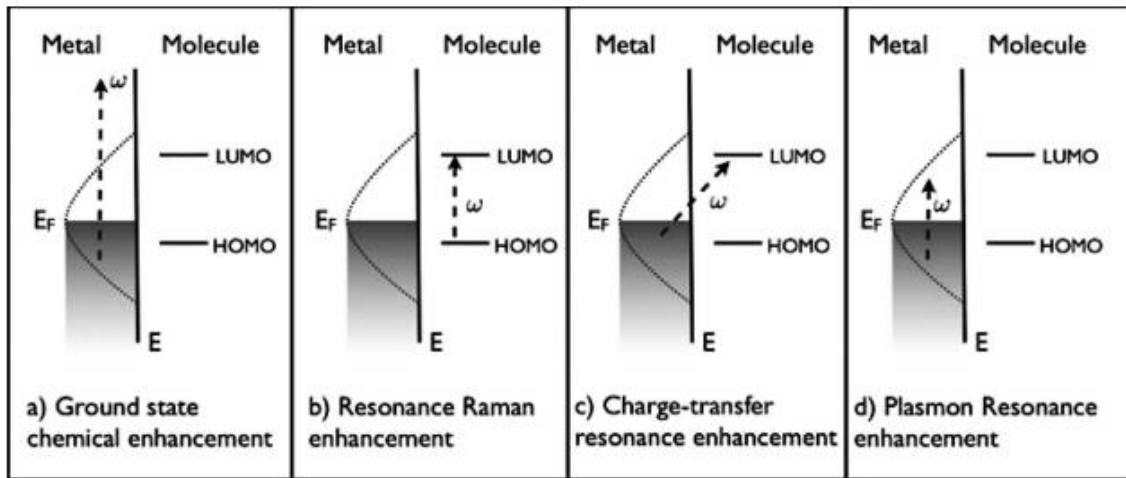
Kemiallinen signaalin voimistuminen A_{Chem} voidaan jakaa kahteen osaan kaavan 10 mukaan:²⁰

$$A_{Chem} = A_{CT}A_{AS}, \quad (10)$$

missä A_{CT} on elektronien varausten siirrosta johtuva voimistava kerroin. Kerroin A_{AS} on ns. ”aktiivisista kohdista” (active sites) johtuva voimistuminen, joka koostuu taajuuden funktiosta ja ”aktiivisten kohtien” määrästä metallin pinnalla.

Voimistumismekanismeja voidaan tutkia edellistä tarkemmin. Teoreettisesti SERS-signaalin voimistuminen voidaan jakaa neljään päämekanismiin ja ne on esitetty kuvassa 9. A-C -kohdissa kuvataan kemiallista voimistumista. A-kohdassa voimistuminen johtuu perustilaisten kemiallisten vuorovaikutusten kautta molekyylin ja nanopartikkelin välillä, jotka eivät liity virityksistä johtuviin tapahtumiin molekyyli-nanopartikkeli -systeemissä. B-kohdassa on kyse resonanssitapahtumasta, jossa viritysvaallon pituus on resonanssissa molekyylin siirtymän kanssa. Kohdassa c on kyse, jo edellä mainitusta, varausten siirrosta (CT), jossa viritysvaallon pituus on resonanssissa molekyyli-nanopartikkeli -systeemin varausten siirtymisen kanssa. Kohdassa d on kuvattu SERS-voimistumisen sähkömagneettista osaa (EM). Voimakas

paikallinen sähkökenttä syntyy, kun viritysvalon aallonpituus resonoi metallisen nanopartikkelin virittyvän plasmonin kanssa.²¹



Kuva 9. SERS-menetelmässä esiintyvien signaalia voimistavien mekanismien yhteenveto.²¹

Copyright (2008) Royal Society of Chemistry.

Kaikki edellä mainitut SERS-ilmion signaalia voimistavat ilmiöt ovat vahvasti riippuvaisia Raman-iritysvalon (laser) aallonpituudesta, joten ilmiöiden vaikutus mittauksissa on hyvin aallonpituusriippuvaista. Ilmiöitä on kuitenkin vaikea tutkia kokeellisesti, koska vain tietyt raja-arvot voidaan erottaa ja tutkia ilmiöiden takana.²¹ Luvuissa 3.1-3.5 käydään SERS-ilmiota läpi yksityiskohtaisemmin mekanismien, substraattien ja aggregaattien kautta.

3.1 Sähkömagneettiset mekanismit

SERS-menetelmän keskiössä ovat vuorovaikutukset niin valon ja molekyylin kuin valon ja metallin välillä. Plasman värähtelyt yhdessä sähköisten voimien kanssa osoittavat, että fotonit kytkeytyvät metallien johtavuuselektronien varauksien tiheysvärähtelyiksi. Jotta SERS-menetelmän sähkömagneettista mekanismia voidaan ymmärtää, täytyy asiaa käydä läpi alkaen harmonisen värähtelijän fysiikasta. Harmonisen värähtelijän mallin keskiössä on sen luonnollinen taajuus ω (kaava 11):²³

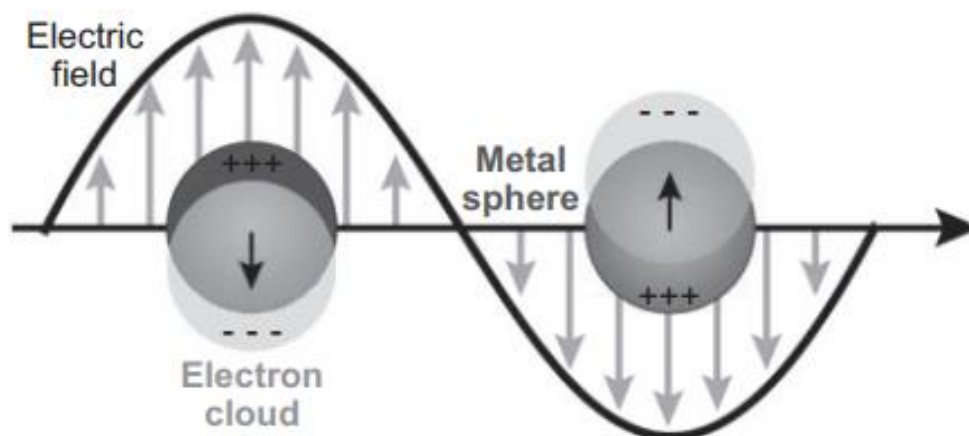
$$\omega = (k/\mu)^{1/2}, \quad (11)$$

jossa värähtely on selitetty voimavakiolla k ja systeemin redusoidulla massalla μ . Vastaavasti, lasersäteily ulkoisena voimana voi resonoivasti virittää metallin delokalisoituneet johtoelektronit (plasman värähtelyt). Metallisten nanopartikkelien plasman värähtelyjen resonanssitaajudet (plasmonit) ω_{\max} riippuvat muun muassa metallin ja ympäröivän aineen dielektrisestä funktiosta $\varepsilon_{\text{metal}}(\omega)$ ja $\varepsilon_{\text{m}}(\omega)$.²³

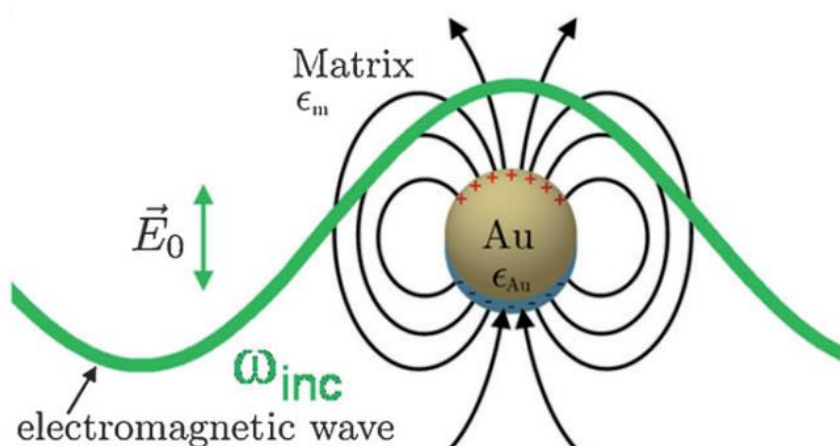
Kolloidisilla kulta- ja hopeananopartikkeleilla plasmonihuiput nähdään näkyvän valon alueella, jolloin ne virittyvät optisilla taajuuksilla n. 10^{14} - 10^{15} Hz. Resonanttisen virittymisen lisäksi saapuvan lasersäteen värähtelevä sähkökenttä saa metallin pinnalla olevat johtavuuselektronit värähtelemään, minkä seurauksena nanopartikkelin varaukset erottuvat (kuvat 10 ja 11). Tapah-tumaan vaikuttavat saapuvan lasersäteen kulmataajuus ω_{inc} ja amplitudi E_0 . Tämän tyyppistä resonanssia kutsutaan dipolaariseksi lokalisoituneeksi pintaplasmoniresonanssiksi (LSPR).²³ LSPR esiintyy, kun metallisten nanopartikkelien valenssielektronien kollektiivinen värähtely on resonanssissa vaikuttavan lasersäteilyn taajuuden kanssa (kuva 11).²² Indusoituneen dipolin voimakkuus $\mu_{\text{ind(metal)}}$ voidaan määritellä kaavan 12 mukaan:²³

$$\mu_{\text{ind}} = \alpha_{\text{metal}} E_0(\omega_{\text{inc}}), \quad (12)$$

missä α_{metal} on metallisen pallon polaroituvuus ja $E_0(\omega_{\text{inc}})$ on vaikuttavan sähkökentän voimakkuus. Lokalisoidun indusoidun dipolin μ_{ind} merkki muuttuu elektromagneettisen aallon kulmataajuuden ω_{inc} muuttuessa.²³



Kuva 10. Esimerkki pintaplasmoniresonanssi -ilmiöstä, kun sähkömagneettinen säteily vaikuttaa metallisten nanopartikkeleiden kanssa. Muokattu lähteestä.²² Copyright (2008) Annual Reviews.



Kuva 11. Kultananopartikkeli voimistaa signaalia dipolaarisen lokalisoitun pintaplasmoniresonanssin (LSPR) virittymisen kautta. Muokattu lähteestä.²³ Copyright (2014) WILEY-VCH.

Metallinen nanopartikkeli toimii siis ns. ”nanoantennina”, joka pystyy emittoimaan säteilyä samalla taajuudella kuin vaikuttavan lasersäteen kulmataajuus on. Toisin sanoen, kun resonoiva elastinen valo sirotaan metallisesta pallosta, paikallinen sähkökenttä $E_{loc}(\omega_{inc})$ voimistuu verrattuna vaikuttavaan sähkökenttään $E_0(\omega_{inc})$ lähellä metallista nanopartikkelia.²³

Pyöreän metallisen nanopartikkelin vaikutusta SERS-signaalin voimistamiseen voidaan tutkia tarkemmin kvasistaattisella lähestymistavalla, jossa otetaan huomioon nanopartikkelin säde a , säteilyttävä polaroitu valo z ja sen aallonpituus λ . Edellisen perusteella on päätelty, että na-

nanopartikkelin ympärillä oleva sähkökenttä on yhtenäinen ja tapahtuman sähköstatiikkaa voidaan tutkia Maxwellin yhtälöillä. Tämä lähestymistapa sopii hyvin SERS:n sähkömagneettisten mekanismien ennustamiseen, mutta rajoittuu ultraviolettivalon alueelle hyvin pienillä nanokoluokan partikkeleilla sidosten välisten siirtymien ja muiden virittymisien seurauksena. Sähkömagneettisen kentän voimakkuutta metallipartikkelin ulkopuolella (E_{out}) voidaan tutkia analyttisesti kaavan 13 avulla:²²

$$E_{\text{out}}(x, y, z) = E_0 \vec{z} - \alpha E_0 \left[\frac{\vec{z}}{r^3} - \frac{3z}{r^5} (x\vec{x} + y\vec{y} + z\vec{z}) \right], \quad (13)$$

missä x , y , ja z ovat koordinaatiston koordinaatit; r on elektromagneettisen kentän säteen pituus; \vec{x} , \vec{y} ja \vec{z} ovat koordinaatteja vastaavat vektorit; ja α on metallin polaroituvuus. Metallin polaroituvuus voidaan ilmoittaa SERS:n tapauksessa kaavan 14 mukaan:²²

$$\alpha = g a^3, \quad (14)$$

missä a on metallipallon säde. Muuttuja g on määritetty kaavan 15 mukaan:²²

$$g = \frac{\epsilon_{\text{in}} - \epsilon_{\text{out}}}{(\epsilon_{\text{in}} + 2\epsilon_{\text{out}})}, \quad (15)$$

missä ϵ_{in} on metallisen nanopartikkelin dielektrinen vakio ja ϵ_{out} on nanopartikkelin ympäröivän tilan dielektrinen vakio. Edellisten kaavojen perusteella voidaan todeta, että SERS:n signaalin voimistuminen on riippuvainen käytettävän lasersäteen aallonpituudesta. Tämä johtuu siitä, että metallisen nanopartikkelin dielektrisen vakion reaaliosa on vahvasti riippuvainen aallonpituudesta. Näin ollen, sähkömagneettisen kentän voimistuminen saa suurimman arvonsa, kun muuttuja g lähestyy nollaa. Kaavasta 13 huomataan myös, että magneettikentän voimistuminen vähenee nopeasti etäisyyden kasvaessa nanopartikkelista.²²

Tutkitaan seuraavaksi nanopartikkelin transmissio-ominaisuutta. Mie-teorian mukaan nanopartikkelin, jolla ei ole tiettyä muotoa, transmissiospektri $E(\lambda)$ voidaan ilmoittaa kaavan 16 mukaan:²²

$$E(\lambda) = \frac{24\pi^2 N a^3 \varepsilon_{\text{out}}^{3/2}}{\lambda \ln(10)} \left[\frac{\varepsilon_i(\lambda)}{(\varepsilon_r(\lambda) + \chi \varepsilon_{\text{out}})^2 + \varepsilon_i(\lambda)^2} \right], \quad (16)$$

missä ε_r ja ε_i ovat reaalin ja imaginaarinen osa metallisen nanopartikkelin dielektrisessä funktiossa ε_{in} , λ on aallonpituus, N on partikkelien määrä tietyssä tilavuudessa ja a on kappaleen säde. Myös tässä tapauksessa dielektrisen vakion reaaliosa on riippuvainen käytettävästä aallonpituudesta.²²

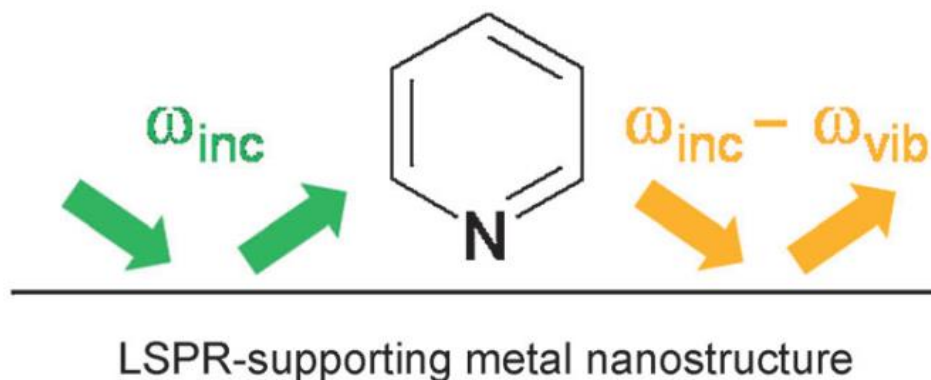
Kaava 16 on myös yleistetty pienten pallomaisten partikkelien kautta korvaamalla lukuarvo 2 kaavassa 15 χ :lla. χ on ns. ”muoto-tekijä”, joka selittää poikkeamaa pallomaisten hiukkasten geometrioissa suurempien kuvasuhteiden omaaville rakenteille. Tällainen oletamus on tehty, koska Mie-teoriaa ei pystytä ratkaisemaan analyttisesti muille kuin pallomaisille rakenteille. ”Muoto-tekijä” χ on yleistetty LSPR:n transmissiospektrin herkkyydeksi dielektrisessä ympäristössä, koska se voimistaa nanopartikkelin ulkopuolella vaikuttavaa dielektristä vakiota ε_{out} . Pallomaiselle kappaleelle χ saa arvon 2 ja se voi saada arvoja 20 asti riippuen metallisen kappaleen muodosta.²²

Suuren kuvasuhteen (suuri χ) omaavilla metalleilla, kuten hopea ja kulta, tavataan dielektrisiä resonanssiolosuhteita näkyvän valon aallonpituuksilla, kun metallin dielektrisen komponentin reaaliosan ε_r ja $-\chi\varepsilon_{\text{out}}$ -termillä ovat arvot lähellä toisiaan ($\varepsilon_r \approx -\chi\varepsilon_{\text{out}}$). Tästä syystä SERS on tavanomaisesti suoritettu olemassa olevalla Raman-laitteistolla tekemättä siihen muutoksia juuri kulta- ja hopean nanopartikkeleilla.²²

Edellisten kaavojen pohjalta voidaan siis tutkia vain pallomaisten kappaleiden transmissiospektrejä analyttisesti. Muun mallisille kappaleille transmissiospektrien tutkimiseen täytyy soveltaa approksimaatiota ja tätä tarkastelua varten on kehitetty numeerisia menetelmiä, jotka kuvaavat nanopartikkelia, jolla on äärellinen määrä (N) polaroituvia elementtejä (dipoleja).²²

Paikallisen sähkökentän vaikutusta molekyylin ja metallisen pallon välillä pitää myös tutkia, jotta voitaisiin ymmärtää täysin, kuinka signaali voimistuu SERS-menetelmässä (kuva 12). Kuten metallisen pallon tapauksessa, molekyylin dipolit voidaan indusoida (kaavan 12 termi α_{metal} korvataan termillä α_{molecule}). Indusoitu dipolimomentti μ_{ind} ja vaikuttava paikallinen sähkökenttä $E_{\text{loc}}(\omega_{\text{inc}})$ ovat vektorisia ominaisuuksia, kun taas elektroninen polaroituvuus α_{molecule} on sym-

metrinen toisen asteen tensori, jolla on kuusi määräävää komponenttia. Epäelastisen valonhajoamisen esiintyminen voidaan selittää klassisesti vaikuttavan sähkökentän $E_{loc}(\omega_{inc})$ modulaatiolla. Tässä käytetään apuna luonnollisen kulmataajuuden omaavaa värähtelevää molekyyliä ω_{vib} , jonka seurauksena mukaan tarkasteluun voidaan ottaa dipolimomentit: $\mu_{ind}(\omega_{inc})$, $\mu_{ind}(\omega_{inc} - \omega_{vib})$ ja $\mu_{ind}(\omega_{inc} + \omega_{vib})$, jotka vastaavat Raman-spektroskopiassa esiintyviä valon sirontatiloja Rayleigh, Stokes ja anti-Stokes.²³



Kuva 12. Sähkömagneettisen säteilyn ”tuleva” (vihreä) ja ”lähtevä” (oranssi) kenttä voimistuu pintaplasmoni resonanssi -ilmiötä tukevan metallisen nanomateriaalin avulla. Muokattu lähteestä.²³ Copyright (2014) WILEY-VCH.

Kuvassa 12 $\omega_{inc} - \omega_{vib}$ vastaa Raman-sironnoista Stokes-sirontaa ja siinä on otettu huomioon kulmataajuus yhdelle tietylle värähtelytilalle. Kuvan 12 vasen oranssi nuoli vastaa taajuudeltaan siirtynyttä säteilyä kohdassa $\omega_{inc} - \omega_{vib}$, joka voi itsessään virittää metallikolloidien pintaplasmoniresonanssin. Tähän lisätään valon elastinen sirottuminen metallista (kuvan 12 oikean puolimmäinen nuoli), jolloin emittoitunut säteily voidaan havaita sähkömagneettisen säteilyn pidemmällä aallonpituudella.²³

Kokonaisuudessaan SERS-signaalin intensiteetti riippuu niin ”tulevasta” kuin ”lähtevästä” kentästä. Kaavassa 17 on esitetty SERS-signaalin intensiteetille yksinkertaistettu kaava:²³

$$I_{SERS} = I_{inc}(\omega_{inc})I(\omega_{inc} - \omega_{vib}) = |E_{inc}(\omega_{inc})|^2 |E(\omega_{inc} - \omega_{vib})|^2. \quad (17)$$

Optimaalisen SERS-signaalin voimistumisen aikaansaamiseksi tarvitaan, että säteilyn taajuus kohdassa ω_{inc} ja Stokes-siirtyneen säteilyn taajuus kohdassa $\omega_{inc} - \omega_{vib}$ ovat resonanssissa metallisen nanopartikkelin plasmonipiikin kanssa. Kun vaikuttavan lasersäteilyn (ω_{inc}) ja Stokes-

sironnan ($\omega_{\text{inc}} - \omega_{\text{vib}}$) taajuudet ovat lähellä toisiaan ($\omega_{\text{inc}} \approx \omega_{\text{inc}} - \omega_{\text{vib}}$), voidaan SERS:n intensiteetille käyttää approksimaatiota $|E|^4$, jossa $I_{\text{SERS}} \approx |E(\omega_{\text{inc}})|^4$. Tämä approksimaatio toimii tyyppillisesti ω_{inc} :lle sinisen ja vihreän valon aallonpituusalueilla, mutta ei niin hyvin punaisen ja lähi-infrapunavalon alueilla.²³

E^4 voimistumista voidaan tarkastella tarkemmin seuraavasti. Sirottuneen valon intensiteetti on suoraan verrannollinen Raman-spektroskopiassa vaikuttavan magneettikentän voimakkuuteen E_0^2 . Koska tämä magneettikentän voimistuminen tapahtuu partikkelin pinnalla, Raman-intensiteetti on liitetty E_{out} :n absoluuttiseen neliöön, joka on arvioitu tapahtuvan partikkelin pinnalla. Kaavassa 18 on esitetty johdos $|\mathbf{E}_{\text{out}}|^2$ pyöreälle metallipallolle ja se on saatu käsittelemällä kaavoja 13-15:²²

$$|\mathbf{E}_{\text{out}}|^2 = E_0^2[|1 - g|^2 + 3\cos^2\theta(2\text{Re}(g) + |g|^2)], \quad (18)$$

missä θ on vaikuttavan magneettikentän vektorin ja nanopartikkelin pinnalla olevan molekyylin sijainnista syntyvän vektorin välinen kulma. Kulman suuruudella on väliä, sillä kentän voimistuminen on voimakkainta, kun θ on 0° tai 180° . Tämä vastaa tapahtumaa, jossa molekyyli osuu etenevän valonsäteen akselin tielle. Myös g :n arvolla on väliä. Kun g saa suuren arvon, $|\mathbf{E}_{\text{out}}|^2$ voidaan esittää kaavan 19 avulla seuraavasti:²²

$$|\mathbf{E}_{\text{out}}|^2 = 4E_0^2|g|^2. \quad (19)$$

Raman-sironnassa magneettikenttä indusoi nanopartikkelin pinnalla olevan molekyylin oskilloivan dipolin. Tämän seurauksena dipoli säteilee ja tällä säteilevällä valolla on pieni todennäköisyys Stokes-sirota molekyylin värähtelytaajuudella. Vaikka kaava 18 ilmaisee vaikuttavan sähkömagneettisen kentän voimistumisen, siinä ei oteta huomioon, että dipolista syntyvän säteilyn emissio voi myös voimistua. Emission intensiteetin voimistumisen selvittäminen matemaattisesti on monimutkainen laskutoimitus ja se voidaan ilmoittaa yksinkertaisemmin ensimmäisen asteen approksimaatiolla. Tämä on samankaltainen lähestymistapa kuin kaavassa 18, mutta se on arvioitu Ramanin Stokes-siirtymän taajuudella. Tämä approksimaatio voidaan ilmaista kaavan 20 avulla seuraavasti:²²

$$EF = \frac{|\mathbf{E}_{\text{out}}|^2 |\mathbf{E}'_{\text{out}}|^2}{|\mathbf{E}_0|^4} = 4|g|^2 |g'|^2, \quad (20)$$

missä heittomerkilliset suureet vastaavat magneettikentän arvioitua suuruutta sirottuneen säteilyn taajuudella. Edellistä lauseketta kutsutaan SERS:n sähkömagneettisen säteilyn (EM) teoreettiseksi voimistumiskertoimeksi (EF). EF tarkoittaa siis Raman-sironnan poikkileikkauksen (σ , kaava 6) suurenemisen voimakkuutta, kun molekyyli on absorboitunut SERS-aktiivisen substraatin pinnalle.²²

Jos Stokes-siirtymän suuruus on pieni, g ja g' ovat arviolta samalla aallonpituudella ja EF skaalautuu g^4 :ään. Tätä skaalautuvuutta kutsutaan yleisesti kirjallisuudessa E^4 -voimistumiseksi tai ns. sähkömagneettisen kentän voimistumisen neljänteen potenssiin nanopartikkelin päällä. Edellisen mallin avulla arvioituna $|g|$ saa arvon 10 pienen pallomaisen kappaleen tapauksessa, jolloin SERS EM -voimistumisen suuruus on luokkaa 10^4 - 10^5 . Korkeamman kertaluvun hopeanopartikkeleissa (AgNP) $|g|$ voi saada suuremman arvon, jolloin EM EF voi nousta jopa 10^8 suuruiseksi.²²

SERS:n voimistumiskerrointa ei yleensä selvitetä näin monimutkaisesti E^4 -approksimaatiolla normaaleissa laboratoriokokeissa. Yleensä on yksinkertaisempaa tarkastella voimistumiskerrointa analyttisen voimistumiskertoimen AEF mukaan (kaava 21):^{17b}

$$AEF = \frac{I_{\text{SERS}}/C_{\text{SERS}}}{I_{\text{RS}}/C_{\text{RS}}}, \quad (21)$$

missä I_{RS} ja I_{SERS} vastaavat NR-tekniikalla ja SERS-menetelmällä mitatuista molekyyleistä ilmenevää signaalien vahvuutta. Analyttisesti tarkastellessa tämä tarkoittaa Raman-spektreissä saatavien piikkien korkeutta tai pinta-alaa. C_{RS} ja C_{SERS} vastaavat näin analysoitavan molekyylin pitoisuutta. I_{RS} skaalautuu lineaarisesti vaikuttavan lasersäteiden tehokkuuden ja molekyylin konsentraation mukaan.

3.2 Kemiallinen mekanismi

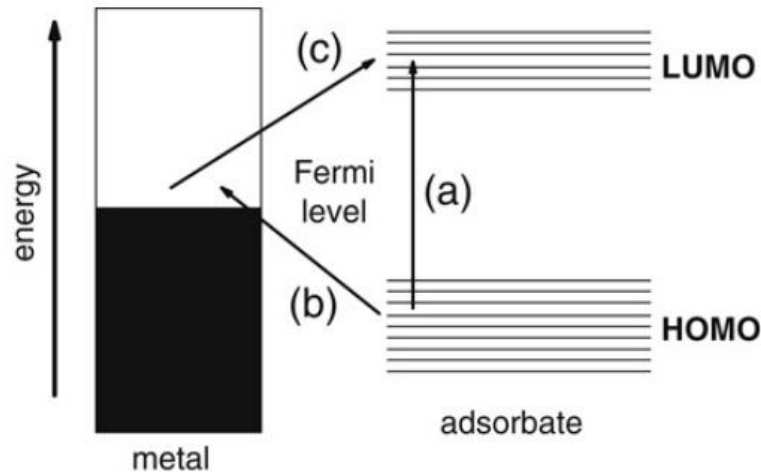
Sähkömagneettiset mekanismit selittävät suurimmalta osin SERS-ilmiön tapahtumisen. Näiden lisäksi tarvitsee kuitenkin ymmärtää, kuinka molekyyli vaikuttaa kemiallisesti metallisen nanopartikkelin kanssa. Sähkömagneettisen signaalin voimistumisen suuruus peittää kemiallisen signaalin voimistumisen alleen. Kemiallinen voimistuminen on tärkeää, koska se mahdollistaa sähkömagneettisen voimistumisen.^{17c,25} Kemiallisella sitoutumisella on tärkeä rooli SERS-ilmiössä senkin takia, että se määrää SERS-spektrin piikkien ilmentymisen (esim. Raman-siirtymät ja piikkien intensiteettien suhteet).²⁵

Molekyylin absorboituminen substraatin pinnalle voidaan jakaa näiden välisten vuorovaikutusten voimakkuuden perusteella fysisorptioon ja kemisorptioon. Fysisorptiolla tarkoitetaan fysiikaalista absorptiota, jossa vuorovaikutuksen entalpia on enemmän kuin -25 kJ/mol. Kemisorptiolla tarkoitetaan kemiallista absorptiota, jossa vuorovaikutuksen entalpia on vähemmän kuin -40 kJ/mol. Fysisorption tapauksessa Van der Waals -voimat ohjaavat tapahtumaa eikä molekyylin rakenteessa tapahdu muutoksia. Kemisorptiossa molekyylin ja pinnan välille voi muodostua uusi sidos. Kummassakin tapauksessa molekyylin elektroninen ja geometrinen rakenne muuttuu molekyylin ja pinnan välisten vuorovaikutusten seurauksena. Tämän seurauksena molekyylin värähtelytilojen Raman-poikkileikkaukset ovat yleensä erilaiset vapaisiin molekyylihin verrattuna.²⁵

SERS-menettelyn kemiallinen mekanismi ja signaalin voimistuminen perustuvat pääasiassa niin sanottuun varauksen siirtoon (CT). Varauksen siirtoa voidaan käydä läpi kolmenlaisen tapauksen kautta. Ensimmäinen tapaus on yksinkertainen ja siinä absorboituva molekyyli ei sitoudu kovalenttisesti metallin kanssa. Metallin toimii tässä tapauksessa ainoastaan häiriönä ja muuttaa vain hieman elektronien jakautumista molekyylin ympärillä. Tämä voi muuttaa molekyylin polaroituvuutta ja johtaa lopulta sen Raman-sironnan tehokkuuden muutokseen.^{17c}

Toisessa tapauksessa otetaan huomioon metallin ja molekyylin välille muodostuva kompleksi. Metallin ja molekyylin muodostavat pysyvämmän sidoksen joko suoraan kovalenttisesti tai epäsuoraan elektrolyytin avustuksella toistensa kanssa. Tämä voi saada aikaan suuren muutoksen molekyylin polaroituvuudessa, jonka voimakkuus riippuu käytettävissä olevien optisten siirtymien määrästä. Pällekkäin olevat molekyyliorbitaalit mahdollistavat ”uudet” epäsuorat siirtymät, jotka tarjoavat mahdollisuuden polaroituvuuden muutokselle molekyyllisessä. Kompleksin

on mahdollista saada aikaan myös uusi elektroninen tila, joka on resonanssissa tai lähellä resonanssia laserin kanssa. Tämä resonanssi voi johtaa tapahtumaan, jossa signaalin voimistuminen liittyy resonanssi-Raman -ilmiöön (SERRS).^{17c} Kuvassa 13 on esitetty kaavakuva toisesta tapauksesta.



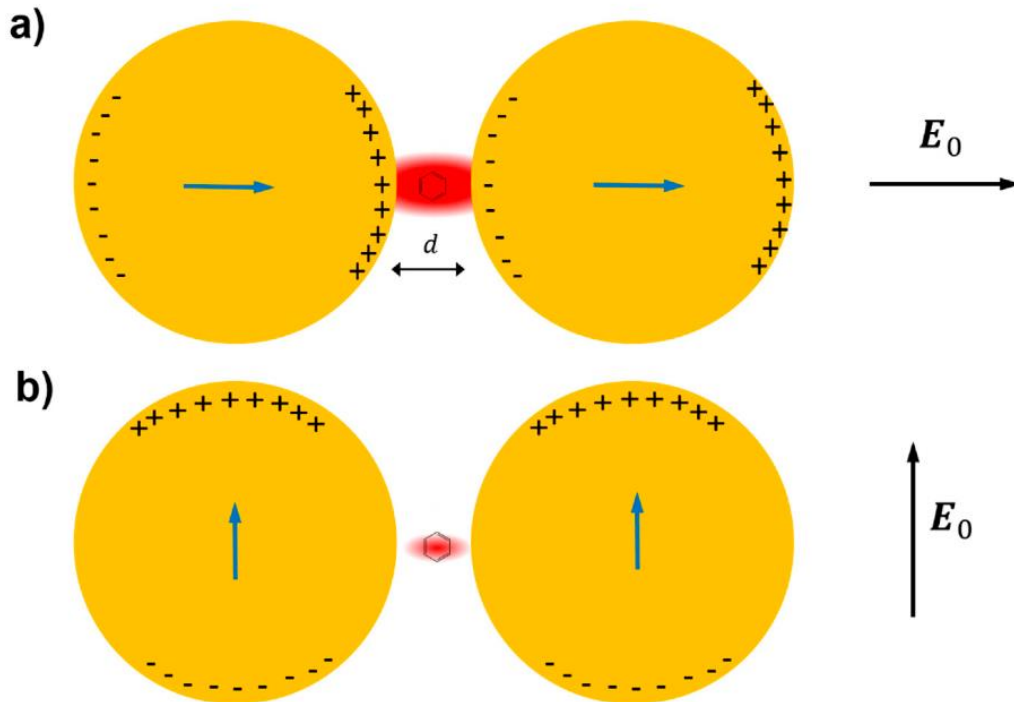
Kuva 13. Kaavakuva varauksen siirto -mekanismista SERS-ilmiössä. Laserin energia voi olla suoraan resonanssissa elektronin siirtymisen kanssa molekyyli-metalli-kompleksissa (kohta a). Tai se voi hyötyä epäsuorasta kytkeytymisestä (varauksen siirto) metallin kautta (kohta b ja c).^{17c} Copyright (2009) Elsevier B.V.

Kolmannessa tapauksessa on kyse edellisen tapauksen tarkemmasta selityksestä ja siinä otetaan mukaan valon vaikutus varauksen siirrossa. Siinä on kyse siis valo-ohjautuvasta varauksen siirrosta tutkittavan molekyylin ja metallin välillä. Näin voi tapahtua, kun metallin Fermi-taso (E_F) ja HOMO tai LUMO -energiat vastaavat käytettävän laserin energiaa.^{17c} Fermi-tasolla tarkoitetaan kiinteässä aineessa olevien elektronien kemiallista tai ts. sähkökemiallista potentiaalia.²⁶ Tällöin valo-ohjautuvan varauksen siirron mekanismi voi tapahtua HOMO-tason ja miehittämättömän tilan välillä lähellä Fermi-tason yläpuolta tai LUMO-tason ja miehitetyn tilan välillä lähellä Fermi-tason alareunaa. Kyseinen tapahtuma paljastettiin kokeiden avulla sähkökemiallisissa kennoissa, joissa pystyttiin muuttamaan energioita tutkittavan aineen ja metallin välillä ulkoisen potentiaalin avulla. Kokeiden avulla saatiin selville, että suurin SERS-intensiteetti saadaan aikaan eri potentiaaleilla eri laserin energioilla. Tästä on voitu päätellä, että SERS-mitauksissa tarvitaan erilaiset viritysolosuhteet riippuen käytettävästä laserin energiasta ja viritysolosuhteet säädetään ulkoisen potentiaalin avulla.^{17c}

3.3 Hot spottien merkitys

Sähkökentän voimistuminen on jakautunut plasmonisen materiaalin pinnalle hyvin epähomogeenisesti, ja se on lokalisoitunut pienille alueille, joita kutsutaan ns. ”hot spoteiksi”. Hot spotit ilmennetään yleensä pieniksi nanoaukoiksi nanopartikkelien välillä tai nanopartikkelin ja tutkittavan molekyylin pinnan välillä.²⁵

Kuvassa 14 on esitetty kuva siitä, kuinka hot spotit ilmentyvät nanopartikkelien välillä. Nanopartikkelien välille syntyy voimakas sähkökenttä, kun ne ovat lähelle toisiaan. Kun tutkittava molekyyli osuu tämän sähkökentän sisään, sähkökenttä voi vaikuttaa siihen eri tavoin, riippuen nanopartikkelien suuntautumisesta toisiinsa nähden. Kuvan 14 a-kohdassa sähkökenttä on polarisoitunut dimeerin pääakselin suuntaisesti, kun taas b-kohdassa se on polarisoitunut kohtisuoraan akselia vasten. Syntynyt sähkökenttä polarisoi nanopartikkeleja, jolloin nanopartikkelien vastakkaisille puolille muodostuu ylimääräisiä positiivisia ja negatiivisia varauksia. Akselin suuntaisessa polarisaatiossa lähekkäin olevat nanopartikkelit vähentävät pintojen varauksien eroa, jolloin niiden välillä oleva sähkökenttä voimistuu. Tämän lisäksi nanopartikkeleiden vastakkaismerkkiset varaukset lisäävät polarisaatiota partikkeleiden välissä. Kuvan 14 a-kohdassa nanopartikkeleihin vaikuttavat siis sekä ulkoinen sähkökenttä että indisoiduista varauksista johdettu polarisaatiovaikutus nanopartikkelien lähellä. Edellinen ei päde kuvan 14 b-kohdassa. Tässä tapauksessa sähkökenttä on polarisoitunut kohtisuoraan dimeerin akselia vastaan. Tämän seurauksena positiivisten ja negatiivisten varausten välimatka eri nanopartikkelien välillä on niin suuri, että samanlaista yhtenäistä sähkökentän voimistumista ei tapahdu kuin a-kohdassa. Toisin sanoen, b-kohdassa nanopartikkelien voimat eivät riitä pienentämään niiden välistä aukkoa tarpeeksi.²⁵



Kuva 14. Kahden nanopartikkelin muodostama dimeeri, joka on polarisoitunut ulkoisen sähkökentän E_0 seurauksena. Dimeerin välissä on pieni aukko, johon tutkittava molekyyli on asettautunut. Ulkoinen sähkökenttä voi olla polarisoitunut samaan suuntaan (a) tai kohtisuoraan (b) dimeerin akseliin nähden. Siniset nuolet nanopartikkelien sisällä vastaavat indusoitujen dipolien suuntaa.²⁵

3.4 Substraatit

SERS-ilmiön tapahtumisen suurin edellytys on toimivan substraatin käyttö. SERS-substraatilla tarkoitetaan yleisesti sellaista ainetta, joka saa aikaan signaalin voimistumisen NR-tekniikkaan verrattuna. Substraatit voidaan jakaa karkeasti neljään luokkaan: metalliset nanopartikkelit, tasomaiset metallilla päällystetyt pinnat, nanolitografialla rakennetut metalliset pinnat ja mallinustekniikka. Metalliset nanopartikkelit viittaavat usein kolloidisiin liuoksiin. Metallilla päällystetyt pinnat ovat yleensä nanokolloidilla päällystettyjä tasomaisia lasista, silikonista, metallista tai vastaavista materiaaleista valmistettuja levyjä. Rakennetut metalliset pinnat valmistetaan litografisin menetelmin kaivertamalla substraatin pinnalle kuviota tietyn muotin mukaan. Mallinustekniikassa metalliset nanopartikkelit liitetään tietynlaisen geometrisen muotin päälle.^{17d,24,27} Aikaisemmin myös metallisia elektrodeja käytettiin SERS-tutkimuksissa substraatteina, mutta ne ovat nykyään väistyneet uudempien substraattien tieltä.^{17d}

3.4.1 Metalliset kolloidit/suspensiot

SERS-tutkimuksissa käytettäviksi kolloideiksi ovat muodostuneet hopeasta (Ag) ja kullasta (Au) valmistetut kolloidiliuokset. Myös kuparia (Cu) käytetään jonkin verran SERS-tutkimuksessa. Näillä metalleilla on huomattu olevan parhaat ominaisuudet SERS-intensiteetin voimistamisen kannalta. Kolloidien parhaita puolia ovat niiden suhteellisen helppo ja halpa valmistaminen laboratoriossa kahteen muuhun substraattiluokkaan verrattuna.^{17d}

Kolloidisten metallien valmistamiseen löytyy erilaisia tapoja kemiallisista synteeseistä fysikaalisiin menetelmiin. Fysikaalisissa menetelmissä nanopartikkelien valmistus perustuu pulssitetun laserin ja nesteessä olevan bulkkimetallin väliseen vaikutukseen. Pulssitettua laseria säteilytetään nesteen (vesi tai orgaaninen liotin) peittämän metallin pinnalle, jolloin se absorboituu ja muodostuu plasmasoihtu, joka laajenee nopeasti ympäröivään nesteeseen paineaaltona ja hajoaa. Plasma saa metallin hajoamaan atomeiksi, jonka jälkeen metalliatomit vaikuttavat toistensa kanssa, yhdistyvät ja kasvavat nanopartikkelien kokoon. Fysikaalisten menetelmien etuna kemiallisiin nähden on se, että menetelmissä ei käytetä ylimääräisiä aineita ja näin epäpuhtauksien määrä on minimissään.²⁴

Kemialliset synteetit perustuvat yleisesti hopea- tai kultaionien pelkistämiseen vesiliuoksessa. Pelkistäminen voidaan tehdä käyttämällä erilaisia pelkistimiä, kuten sitraattia, natriumborohydridiä, hydratsiiniä tai hydroksyyliamiinin hydrokloridia.²⁴ Näistä pelkistimistä sitraattia on käytetty paljon kolloidisynteesissä. Erityisesti Lee ja Meiselin²⁸ sitraattipelkistettyjä hopeakolloideja on käytetty laajalti ja pitkään synteessin helppouden takia.^{17d} Kemiallisen synteessin yhteydessä käytetään suoja-ainetta (capping agent), joka liittyy nanopartikkelin pinnalle ja vähentää näin niiden kokoon kerääntymistä (ts. aggregoitumista) keskenään ajan mittaan. Tyypillisesti suojausaineina käytetään natriumsitraattia, dodekaanitiolia, polyetyleeniglykolia (PEG), cetrimonium bromidia (CTAB), tanniinihappoa, hydroksyyliamiinin hydrokloridia ja polyvinyylipyrrolidonia (PVP).²⁴

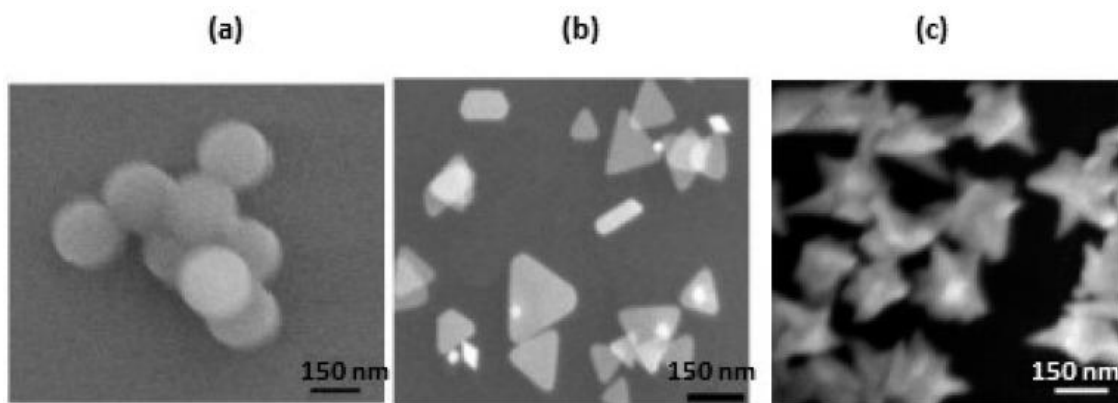
Nanopartikkelin koolla ja muodolla sekä virittävän laserin aallonpituudella on vaikutusta SERS-ilmiössä ilmentyvään intensiteetin kasvuun. Pienillä nanopartikkeleilla sähkönjohtavuuden tehokkuus ja valon sirottuneisuusominaisuudet voivat olla niin tehottomat, että SERS-signaalin voimistuminen voi olla huomattavasti pienempi kuin suuremmilla nanopartikkeleilla. SERS-ilmiön voimistuminen pienenee, kun nanopartikkelien koko lähestyy virittävän valon

aallonpituutta. Tämä tapahtuu, koska nanopartikkelit suosivat säteilyttömiä viritystiloja. Hopea ja kultananopartikkeleiden kokoa ja muotoa on tutkittu siltä kannalta, kuinka SERS-voimistumiskerroin (EF) muuttuu koon ja muodon muuttuessa.²⁴

Stamplecoskie *et al.*²⁹ ovat tutkineet pyöreiden hopeananopartikkelien optimaalista kokoa. Tutkimuksessa valmistettiin eri kokoisia nanopartikkelikolloideja käyttäen hyväksi ns. siementekniikkaa, jossa valmistettiin pieniä hopeananopartikkelisiemeniä ja tämän jälkeen niistä kasvatettiin eri kokoisia nanopartikkeleja L-askorbiinihapon avulla. Nanopartikkelien koot vaihtelivat 20 nm ja 70 nm välillä ja niiden tuottamaa signaalin voimistumista tutkittiin rhodamiini 6G -molekyylin (R6G) avulla. Hopeananopartikkelien optimaaliseksi kooksi löydettiin tässä tutkimuksessa noin 50 nm kokoiset partikkelit.

Hong ja Li³⁰ tutkivat omassa tutkimuksessaan pyöreiden kultananopartikkelien optimaalista kokoa erilaisissa olosuhteissa. Kultakolloidien valmistuksessa käytettiin hyväksi myös siementekniikka, jossa synteesisarjassa saatua pienempää partikkelia käytettiin siemenenä suurempien partikkelien valmistuksessa. Kultakolloidien kokojakauma vaihteli 17 nm ja 80 nm välillä. Voimistumiskerrointa tutkittiin 4-nitrotiofenolin (4-NTP) ja 4-aminotiofenolin (4-ATP) avulla. Kultananopartikkelien optimaaliseksi kooksi huomattiin noin 50 nm partikkelit, kun kolloidien konsentraatio ja pinta-ala pidettiin samana kokojakauman välillä. Kun partikkelien määrä pidettiin samana kokojakauman välillä, 80 nm partikkelit antoivat suurimman voimistumiskerroimen. Tulokset olivat samanlaiset kummallekin molekyylille.

Tian *et al.*³¹ ovat tutkineet eri muotoisten kultananopartikkelien vaikutusta SERS EF:n suuruuteen. Tutkittavina muotoina olivat pyöreän, kolmion ja tähden muotoiset partikkelit. Partikkelit valmistettiin samalla periaatteella kuin edellisissä esimerkeissä. Pyöreiden nanopartikkelien kohdalla on huomattu, että aggregoinnilla saadaan nostettua hot spottien määrää ja näin EF:ää. Tutkimuksessa saatiin selville, että eri muotoiset nanopartikkelit nostavat hot spottien määrää ilman aggregointia ja EF on suurempi kuin aggregoiduilla pyöreillä partikkeleilla. SERS EF oli tutkimuksen perusteella suurin tähden muotoisilla nanopartikkeleilla, seuraavaksi tulivat kolmion muotoiset ja viimeiseksi ympyrän muotoiset nanopartikkelit. Kuvassa 15 on esitetty TEM-kuvat eri muotoisista nanopartikkeleista.



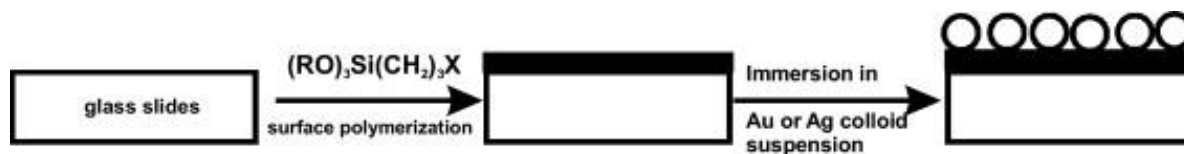
Kuva 15. Pyöreän (a), kolmion (b) ja tähden (c) muotoiset kultananopartikkelit kuvattuna TEM-tekniikalla.²⁴

3.4.2 Metallilla päällystetyt pinnat

Kolloidisten partikkelien hot spottien määrää voidaan lisätä helposti aggregoimalla niitä tiettyjen suolojen tai tutkittavan analyytin avulla. Kolloidien aggregointi luo ongelmia, jotka liittyvät EF:n heikkoon uusittavuuteen. Tämä tarkoittaa sitä, että mitattaessa saman pitoisuuden näytteellä ja käyttäessä samaa näytteenvalmistustekniikkaa, ei saada välttämättä samaa EF:ää. Toistettavuusongelmat voivat pienentyä, kun tietty pinta päällystetään metallilla. Pinnan päällystys metallilla voidaan tehdä muutamalla eri tavalla: Syntetisoidut kolloidit lisätään pinnan päälle, johon ne järjestäytyvät ja liittyvät pintaan. Nanopartikkelit voidaan myös kasvattaa kemiallisesti ja valokemiallisesti suoraan pinnan päälle.²⁷

Pinnan päälle liittyvät nanopartikkelit voivat sitoutua siihen kemiallisesti, sähköstaattisten tai kapillaaristen voimien avulla sekä liittämällä valmistettu nanopartikkelifilmi suoraan pinnan päälle. Kemiallisessa sitoutumisessa tietty molekyyli liitetään pintaan. Molekyylin toinen puoli liittyy pintaan ja toinen puoli jää vapaaksi, johon nanopartikkeli liittyy. Esimerkiksi lasilevyn päälle voidaan liittää amino- tai tioliryhmiä pintapolymerisaatio reaktiolla, jonka jälkeen lasi upotetaan nanopartikkelisuspensioon tietyksi ajaksi.²⁷ Lasin silylointiin voidaan käyttää esim. (3-merkaptopropyli)trimetoksisilaania (MPTMS) tai (3-aminopropyli)trimetoksisilaania (APTMS).²⁴ Päällystetyn pinnan SERS-ominaisuuksiin voidaan vaikuttaa muun muassa vaihtamalla lasin pinnalle liittyvä molekyyli, muuttamalla levyn inkubointiaikaa kolloidissa ja käyttämällä eri nanopartikkelipitoista kolloidia. Päällystettyjä pintoja on tutkittu paljon ja erilaisia

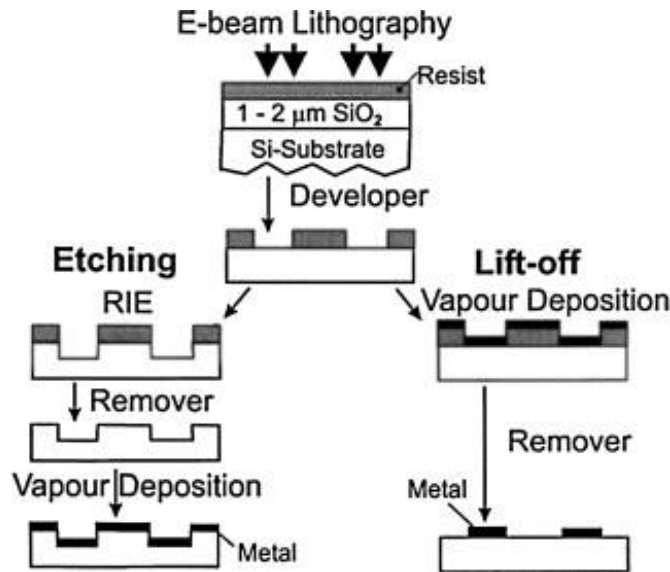
vaihtoehtoja on kokeiltu SERS-ilmiön kannalta. Pyöreiden nanopartikkelien lisäksi mm. saumamaisia nanopartikkeleita on kokeiltu.²⁷ Kuvassa 16 on esitetty kaavakuva päällystysprosessista.



Kuva 16. Kaavakuva lasilevyn pinnoituksesta kulta- ja hopean nanopartikkeleilla. X on CN, NH₂, 2-pyridiyyli, P(C₆H₅) tai SH. R on CH₃ tai CH₂CH₃.²⁷ Copyright (2011) Elsevier B.V.

3.4.3 Nanolitografialla rakennetut metalliset pinnat

Rakennetut metalliset pinnat eroavat suuresti päällystetyistä pinnoista. Rakennettujen pintojen valmistuksessa käytetään hyväksi niin sanottua nanolitografista menetelmää, jossa pinnan päälle kaiverretaan fyysisesti tietyn muotoinen kuvio. Kaiverruksessa on käytetty yleisesti ns. elektronisuihkulitografiaa (EBL), jossa kaiverrettavalle pinnalle ammutaan elektronisuihkua 10-50 keV voimakkuudella. Kaiverrettavana pintana käytetään esim. SiO_x/Si -yhdistelmää, joka on päällystetty positiivisesti tai negatiivisesti varatulla vastustusaineella. Vastustusaine auttaa halutun muodon rakentamisessa. Positiiviseen vastustusaineeseen voidaan rakentaa haluttu muoto, koska elektronisuihku pureutuu siihen. Negatiivisella vastustusaineella voidaan taas suojata ne pinnat, joita ei haluta kaivertaa. Positiivista vastustusainetta käytetään yleisemmin ja käytetyin positiivinen vastustusaine on polymetyylimetakrylaattia (PMMA). PMMA:han syövytetään haluttu muoto, kun siihen ammutaan elektronisuihkulla ja tämän jälkeen saadun muodon mukaan valmistetaan toimiva SERS-substraatti.²⁷ EBL-prosessi ja SERS-substraatin valmistus on esitetty kuvassa 17.



Kuva 17. Kaavakuva kahdesta eri tyylistä valmistaa SERS-substraatti EBL-menetelmällä. Vasen puoli vastaa ns. syövytystekniikkaa ja oikea puoli ns. nostotekniikkaa. Syövytystekniikassa kappale saa kauttaaltaan nanopartikkelikerroksen, kun taas nostotekniikassa nanopartikkelikerros sumutetaan tiettyihin kohtiin.²⁷ Copyright (2011) Elsevier B.V.

Kuvassa 17 on esitetty kaksi erilaista tapaa valmistaa SERS-substraatti. Kaavakuvan oikeanpuolimmaisessa haarassa on kyse ns. nostotekniikasta. Siinä metalliset nanopartikkelit asetetaan PMMA:n päälle sumutustekniikalla. Tämän jälkeen PMMA poistetaan ja EBL:lla syövytettyihin aukkoihin päässeet nanopartikkelit jäävät paikoilleen. Substraatti on näin valmis SERS-mittauksia varten. Kaavakuvan vasemmalla puolella, ns. syövyttämistekniikassa, EBL:lla syövytetty kappale asetetaan vetyfluorihappoa (HF) sisältävään astiaan. Tämän seurauksena paljaat aukot syöpyvät lisää ja ylimääräinen PMMA poistuu samalla käsittelyssä. Syövytetyn kappaleen päälle sumutetaan nanopartikkeleita samoin kuin nostotekniikassa, jolloin kappale peittyy kauttaaltaan nanopartikkeleihin.²⁷

3.4.4 Mallinnustekniikka

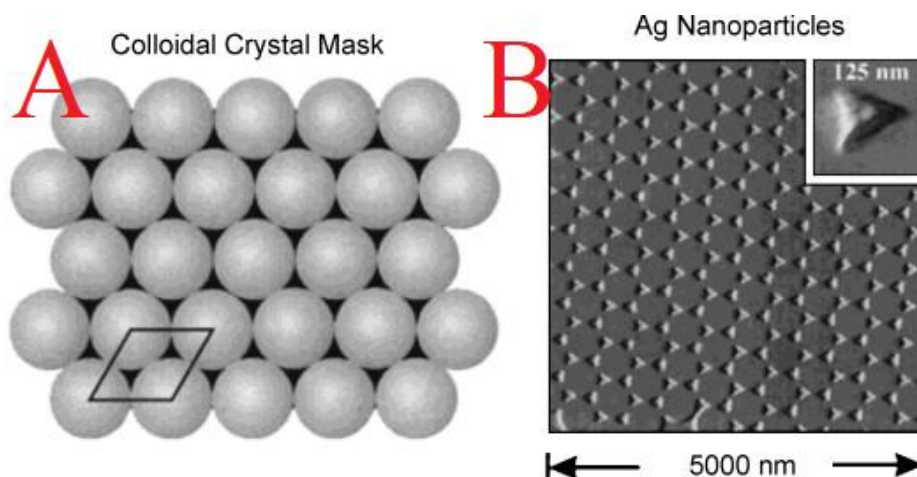
Rakennetut metalliset pinnat ovat ratkaisseet kolloidisilla nanopartikkeleilla ilmeneviä uusittavuusongelmia. Näiden substraattien ongelmana kuitenkin on se, että niitä ei ole helppo tuottaa massatuotantona nopeasti. Mallinnustekniikka on osittain ratkaissut tämän ongelman. Mallinnustekniikassa on ideana liittää metalliset nanopartikkelit tietynlaisen mallin pinnalle, joko säh-

kökemiallisesti vai käyttämällä nanopartikkelihöyryä. Mallinnustekniikka eroaa metallilla päällystetyistä pinnoista sillä, että tietyillä muodoilla pyritään parantamaan SERS EF:ää hot spotteja lisäämällä.²⁷

Sähkökemiallisessa menetelmässä metalli voidaan sitoa esimerkiksi anodisesta alumiinioksidista (AAO) tai huokoisista anodisista alumiinimembraaneista (PAA) valmistettuun substraattiin. AAO-substraatti valmistetaan käsittelemällä sitä korkealla jännitteellä happamassa liuoksessa, jolloin sen pinnalle muodostuu kymmenien nanometrien mittaisia, säännöllisesti järjestäytyneitä heksagonin muotoisia huokosia. Metallia liitetään kuvion pinnalle sähkökemiallisesti 10-25 V jännitteellä. Menetelmässä syntyy metallisia sauvoja tai kuutioita, jotka antavat suuren SERS EF:n.²⁷

Nanopartikkelihöyryn liittäminen kiinteään substraattimateriaaliin on myös osoittautunut toimivaksi menetelmäksi. Nanopartikkelihöyryn pohjalle on kehitetty muutamia tekniikoita, joilla saadaan muodostettua erilaisia substraatteja SERS:ä ajatellen. Yhdessä tekniikassa nanopartikkelihöyryn avulla voidaan kasvattaa hopeisia nanosauvoja suoraan substraatin päälle. Tekniikassa höyry ammutaan vinottain olevan substraatin pinnalle, jolloin muodostuu 500 nm pitkiä sauvoja.²⁷

Toinen yleisesti käytetty tekniikka nanopartikkelihöyryn käytössä on ns. nanopallolitografinen tekniikka (NSL). Siinä käytetään apuna itsestään järjestäytyviä nanopalloja, jotka asetellaan kiinteän tuen päälle. Seuraavaksi nanopallojen päälle sumutetaan ohut kerros kultaisia tai hopeisia nanopartikkeleita, jonka jälkeen nanorakenteiden päälle sumutetaan kestävä kerros metallia tukemaan nanopartikkeleista syntynyttä rakennetta. Lopuksi nanopallot poistetaan, jolloin jää jäljelle nanopartikkelista muotoutunut tietynlainen rakenne. Myös muun kuin pallon muotoisia nanorakenteita voidaan käyttää.²⁷ Kuvassa 18 näkyy esimerkki nanopallolitografialla valmistetusta substraatista.



Kuva 18. Kaavakuva (A) ja atomivoimamikroskoopilla (AFM) saatu kuva (B) nanopallolito-
grafialla (NSL) valmistettavasta substraatista. Muokattu lähteestä.²⁷ Copyright (2011) Else-
vier B.V.

3.5 Aggregaatio

Epästabiileille kolloidisille metallipartikkeleille on ominaista aggregoitua ajan kuluessa. Aggregoitumisella tarkoitetaan tapahtumaa, jossa pienet nanopartikkelit liittyvät yhteen ja muodostavat suurempia partikkeliryppäitä. Aggregoituminen tapahtuu hitaasti eikä partikkeleja saada tämän jälkeen erilleen. Aggregoitumisesta voi olla haittaa monissa nanopartikkelisoveluksissa, mutta SERS-ilmiön kannalta siitä on hyötyä. SERS-ilmiön kannalta onkin ajateltu, että ihanteellisin tilanne olisi pienien nanopartikkeliryppäiden muodostama stabiili liuos.^{17e}

Metallisten kolloidien stabiilisuus ja keskinäiset vuorovaikutukset voivat muuttua, kun ne altistetaan erilaisille olosuhteille. Yksi mahdollisuus aggregoitumiseen voi löytyä tutkittavasta molekyylistä, joka liittyessä kolloidiin voi muuttaa pinnan varausta ja edistää aggregoitumista.^{17e}

Toinen vaihtoehto on lisätä kolloidiseokseen passiivista elektrolyyttiä, kuten kaliumnitraatti (KNO_3). K^+ ja NO_3^- eivät reagoi kolloidiliuoksen kanssa, jolloin se on turvallinen vaihtoehto aggregoitumiseen. Kolloidin ionisuuden kasvu vaikuttaa Coulombisten vuorovaikutusten (sähköisesti varautuneiden kappaleiden välisten vuorovaikutuksien³²) pienenemiseen, mikä edesauttaa aggregoitumista.^{17e}

Kolmas vaihtoehto on käyttää aktiivista elektrolyyttiä. Aktiivisella elektrolyytillä tarkoitetaan ainetta, joka vaikuttaa suoraan liittymällä kolloidien pinnalle ja muuttamalla näin sen ominaisuuksia. SERS-ilmiön kannalta tärkeimmät aktiiviset elektrolyytit ovat Cl^- ja I^- anioneja sisältävät suolat, kuten kaliumkloridi (KCl) tai kaliumjodidi (KI). Kloridi-ioni pystyy liittymään tehokkaasti kolloidien pinnalle, jolloin stabiiloiva molekyyli (esim. sitraatti) irtoaa ja kolloidien ionivahvuus kasvaa (kuten KNO_3 tapauksessa) ja pinnan varaus muuttuu. Pinnan varauksen muuttuminen vaikuttaa merkittävästi kolloidien ja myös joidenkin analyyttien käyttäytymiseen liuoksessa.^{17e}

Aggregoitumisen estämiseen voidaan vaikuttaa lisäämällä kolloidiliuokseen polymeeriä tai pitkäketjuista ionista yhdistettä. Yhdisteiden lisäys vaikuttaa kolloidien pinnan varaukseen, kuten edellisten vaihtoehtojen kohdalla. Tämän lisäksi ne luovat ns. steerisen esteen kolloidipartikkelien välille. Este syntyy, kun nanopartikkelit eivät pääse toistensa lähelle niihin liittyneiden pitkäketjuisten molekyylien ansiosta. Erilaisia yhdisteitä käyttämällä voidaan vaikuttaa kolloidien stabiilisuuteen ja aggregoitumiseen. Optimoiduissa olosuhteissa kolloidi on stabiili ja siinä on osittain aggregoituneita partikkeleita.^{17e}

4 Forensiset lähtökohdat

Tässä työssä keskityttiin erilaisten pienten forensisten materiaalinäytteiden analytiikkaan Raman-spektroskopiolla. Englannin kielessä näistä materiaaleista käytetään nimitystä ”trace evidence”, eikä sille ole suomenkielistä vastinetta. Termiin voidaan liittää Rikosteknisessä laboratoriossa käytettäviä termejä, kuten ”vertailututkimukset”, ”hiukkastutkimukset”, ”jäämätutkimukset” tai ”materiaalin tunnistus”. ”Trace evidence” -termiä käytetään, kun puhutaan rikospaikalta, rikoksen tekijältä tai uhrilta löydettyä pientä määrää kiinteää materiaalia. Näitä materiaaleja ovat esimerkiksi maalit, lasit, kuidut, hiukset, ruutisavujäämät ja räjähdaineet.³³

Kaikkien näiden materiaalien forensisessä analyysissä käytetään yleisesti tunnettua Locard:n vaihtumisperiaatetta. Periaatteen mukaan, kun kaksi kappaletta koskettavat toisiaan, kappaleiden omat materiaalit sekoittuvat keskenään riippuen mm. tapahtuman voimakkuudesta ja materiaalien ominaisuuksista. Tämä tarkoittaa sitä, että kappaleen A materiaalia löytyy kappaleesta B ja toisinpäin. Materiaalien vaihtumisen perusteella voidaan tehdä johtopäätöksiä siitä,

että rikoksen tekijä ja rikoksen kohde (rikospaikka tai uhri) ovat mahdollisesti olleet yhteydessä toisiinsa.³³

Edellä mainittujen materiaalien forensisessä tutkimuksessa käytetään yleisesti ns. vertailuanalyysiä, jossa vertailunäytettä verrataan tunnettuun näytteeseen. Vertailun avulla pohditaan mahdollisuutta siihen, että mahdolliselta tekijältä taltioitu näyte on samanlaista kuin rikospaikalta taltioitu näyte. Esimerkiksi epäillyn tekijän vaatteista taltioitua lasin sirua voidaan verrata rikospaikalla rikotaan ikkunan lasiin tai autokolarin tutkinnassa voidaan vertailla uhrin auton maalia rikospaikalta poistuneen epäillyn auton maaliin. Vertailussa käytetään usein mikroskooppisia menetelmiä, joilla tunnistetaan materiaalista erilaisia ulkonäöllisiä, fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia. Vertailuanalyysiä voidaan tehdä myös vertaamalla näytettä tunnettuihin näytteisiin käyttämällä kaupallisia tai itse rakennettuja kirjastoja. Kirjastoihin vertaaminen toimii yleisesti kemiallisten ominaisuuksien vertailussa, jolloin puhutaan usein materiaalin tunnistuksesta.³³

Spektroskooppisia tekniikoita on käytetty pitkään apuna forensisessä tutkimuksessa. Erilaisia näytteitä voidaan tutkia spektroskopialla kvantitatiivisesti ja kvalitatiivisesti. Kvalitatiivisessa tutkimuksessa voidaan selvittää tutkittavan aineen koostumusta ja kvantitatiivisessa taas aineen pitoisuutta.⁵ Forensiikassa Raman-spektroskopiaa käytetään laajasti erilaisten näytetyyppien tutkimukseen.^{1,4,5} Luvuissa 4.1-4.4 käydään läpi forensiikassa Raman-spektroskopiaa ja SERS-ilmiötä käyttäviä tutkimusmuotoja ja tutkittavia näytetyyppejä. Kappaleissa keskitytään maalien, musteiden, räjähdäaineiden, ja kuitujen tutkimuksiin.

Edellä mainittujen esimerkkien lisäksi SERS-ilmiön on ajateltu soveltuvan muihinkin forensiikkaa käsittävien näytealueiden tutkimukseen ja joitakin on jo kokeiltu. Nämä muut alueet käsittävät huumeiden, biologisten näytteiden, ympäristönäytteiden, sormenjälkien, ruutisavujen ja kemiallisten aseiden tutkimukset.^{1,4}

4.1 Maalit

Forensiikassa tutkittavia maalinäytteitä ovat yleensä autojen maalit, murtovälineiden maalit (esim. sorkkaraudat), rikospaikoilta taltioidut maalit (esim. talojen maalit) ja spraymaalit. Maalien forensisessä tutkimuksessa analysoidaan yleisimmin maalien väriaineita ja pigmenttejä. Väriaineiden ja pigmenttien erona on se, että pigmentti sekoitetaan väliaineeseen kiinteänä partikkelina, mutta se ei sekoitu eikä reagoi kemiallisesti väliaineen kanssa. Väriaine taas absorboituu helposti väliaineeseen ja voi muodostaa kemiallisia sidoksia tämän kanssa. Maaleista löytyy väriaineiden ja pigmenttien lisäksi erilaisia side-, jatko- ja lisäaineita, jotka vaikuttavat maalin koostumukseen. IR-spektroskopiolla saadaan tietoa maalien sideaineista, pigmenteistä ja jatkeaineista. Maalien orgaanisten pigmenttien määrät ovat pieniä, joten niitä ei välttämättä saada mitattua IR:llä. Raman-spektroskopiolla saadaan helposti mitattua myös orgaanisia pigmenttejä. Mikroskoopi-Raman -tekniikka on hyvä vaihtoehto pienten näytteiden mittaamiseen, koska sillä saadaan kohdistettua mitta-alue paljon pienemmälle alueelle kuin FTIR-mikroskoopilla.^{2,34,35a}

Maalien SERS-tutkimuksessa on tarkoitus tutkia samoja ominaisuuksia kuin NR-tekniikalla. SERS-tekniikan hyöty maalien tutkimuksessa on sen ominaisuus vähentää NR-tekniikan häiriöitä, kuten fluoresenssia. SERS-tekniikassa maalien lisäaineet voivat vaikuttaa häiritsevästi mittauksessa.^{1,4} Fluoresenssia esiintyy erityisesti punaisten maalien tapauksessa. Myös jotkin keltaiset, oranssit ja ruskeat pigmentit voivat aiheuttaa mittauksessa fluoresenssia.³⁶

Kruglak *et al.*³⁶ ovat tutkineet punaisten automaalien (26 kpl) pigmenttejä Raman-spektroskopiolla ja menetelmän soveltuvuutta maalien identifioimiseen eri automalleista. Tutkimuksen perusteella tutkituista maaleista saatiin identifioitua pigmentti 13:sta (50 %) näytteestä. Toinen puoli otoksen näytteistä fluoresoi niin voimakkaasti, että niiden pigmenttejä ei saatu identifioitua.

Maalien SERS-ilmiötä ei ole suoranaisesti tutkittu auto-, työkalu-, spray- tai rakennusmaaleille. Erilaisten pigmenttien SERS-tutkimukseen vanhoissa taideteoksissa³⁷⁻⁴³ ja tekstiileissä⁴⁴ käytetyistä väreistä on kuitenkin tehty paljon tutkimusta. Pigmenttejä on myös tutkittu yleisesti ja siltä kannalta, kuinka erilaiset näytteenkäsittelyolosuhteet vaikuttavat SERS-spektrin ilmentymiseen.⁴⁵⁻⁴⁷

Bruni *et al.*⁴⁵ ovat tutkineet historiallisia orgaanisia väriaineita, joita eristettiin erilaisista kasveista. Eristettyjen väriaineiden näytteenvalmistuksessa SERS-tutkimusta varten kokeiltiin erilaisia aggregaatteja, joista parhaaksi koettiin natriumperkloriidi (NaClO_4). Tuloksista rakennettiin historiallisille väriaineille spektrikirjasto.

Ricci *et al.*⁴⁶ ovat tutkineet ionisten orgaanisten väriaineiden määrittämistä kvantitatiivisesti. Tulosten perusteella väriaineiden kvantitatiivinen mittaaminen on hyvin hankalaa, koska SERS-signaali ei muutu tässä tapauksessa lineaarisesti pitoisuuden funktiona. Ongelmana on yleensä SERS-signaalin satureituminen hyvin laimeillakin konsentraatioilla. Signaalin voimakkuuteen vaikuttaa muun muassa väriainemolekyylin rakenne, jolloin on mahdotonta rakentaa yhtä tiettyä tapaa väriaineiden mittaamiseen. Pienillä pitoisuuksilla (alle $1 \mu\text{M}$) väriainemolekyylit liittyvät ihanteellisesti nanopartikkelin pinnalle yksinkertaisella kerroksella. Tällainen yksinkertainen kerros ilmentää SERS-signaalia tehokkaasti, jolloin pitoisuuden suhde signaaliin saadaan paremmin selville. Pienillä pitoisuuksilla on siis mahdollista tutkia väriainepitoisuuksia kvantitatiivisesti, mutta kalibrointisuorasta ei saada ihanteellisen lineaarista. Kun molekyylikerroksia on useampia, kaikki molekyylit eivät sitoudu suoraan partikkelin pinnalle, jolloin signaalin voimistuminen ei ole enää verrattavissa pitoisuuteen ja signaali satureituu.

Pozzi *et al.*⁴⁷ ovat tutkineet luonnollisten punaisten väriaineseosten SERS-spektrejä ja voidaanko kahden samankaltaisen väriaineen seoksesta erottaa näille väriaineille tyypilliset spektrit. Väriaineista mitattiin SERS-spektrit puhtaana, jonka jälkeen niitä sekoitettiin eri sekoitus-suhteissa toisiinsa ja mitattiin uudelleen. Sekoitettujen näytteiden SERS-spektreistä selvitettiin väriaineille tyypillisiä piikkejä ja millä suhteella eri väriaineet saatiin tunnistettua minimissään. Toisilla väriaineilla tarvittiin 1:1 suhde, kun toisilla riitti 5:1 pitoisuudet, jotta kummallekin väriaineelle saatiin piikkejä identifioitua.

Muehlethaler *et al.*⁴⁸ ovat tehneet forensista tutkimusta väriaineiden määrittämisestä ajoneuvojen ajovalojen suojakuvuista SERS-tekniikalla. Ajovalojen kupujen vertailututkimus on yleisesti haastavaa. NR- ja IR-tekniikoilla saadaan yleensä tietoa vain kuvussa käytetystä muovista, joka on tutkimuksenkin perusteella pääasiassa polymetyylimetakrylaattia (PMMA). Kuvuissa käytettyjen väriaineiden pitoisuudet ovat hyvin pienet eikä perinteisten menetelmien erottelukyky riitä näiden tunnistamiseen. Tutkimukseen kerättiin 53 suojakupunäytettä, joista 23 oli tunnettuja punaisia, 6 tunnettuja oransseja, 18 tuntemattomia punaisia ja 6 tuntemattomia oransseja

näytteitä. Työssä tutkittiin ensin millä liuottimella väriaine saadaan liuotettua tehokkaasti muovista ja sen jälkeen, kuinka SERS-spektrin mittaaminen onnistuu uutetusta näytteestä. Tehokkaimmaksi liuottimeksi osoittautui asetoni. Tutkimuksessa saatiin eroteltua selvästi kolme erilaista väriainetta: solvent orange 60, solvent red 52 ja solvent red 111. Osasta näytteistä ei saatu eroteltua pigmenttiä puhtaana vaan ajateltiin, että ne voivat koostua väriaineiden sekoituksista.

4.2 Musteet ja asiakirjatutkimukset

Asiakirjatutkimukset käsittävät yleisesti väärennettyjen asiakirjojen tutkimusta ja myös käsialatutkimusta kirjoitetuista viesteistä ja allekirjoituksista. Asiakirjatutkimusten pääasiallinen tarkoitus on selvittää, ovatko tutkittavat dokumentit aitoja vai väärennöksiä. Käsialatutkimuksissa tutkitaan, onko kirjoitetun viestin tai allekirjoituksen kirjoittaja se henkilö, jonka esitetään kirjoittaneen sen. Asiakirja- ja käsialatutkimuksiin voi tulla monenlaisia näytteitä, kuten kirjeitä, kirjekuoria, paketteja, kalentereita, päiväkirjoja, henkilökortteja, sopimuksia tai testamentteja.^{35b,49}

Käsialatutkimuksissa voidaan tutkia itse käsialan lisäksi kirjoituksessa käytetyn musteen ominaisuuksia. Musteiden analyysi alkaa yleensä tutkimalla näytettä mikroskooppisilla tekniikoilla, joilla on tarkoitus selvittää kirjoituksesta käytetyn musteen väriä ja tyyppiä stereomikroskooppisesti morfologisten ominaisuuksien perusteella. Musteiden tunnistaminen morfologisesti vaatii paljon kokemusta. Se on tärkeä vaihe, koska sen perusteella tehdään päätös kemiallisten menetelmien käytöstä tutkimuksessa. Erilaisia kirjoitusvälineitä ja musteita on olemassa monenlaisia. Musteet voidaan jakaa kolmeen pääluokkaan: vedettömät tai glykolipohjaiset musteet (kuulakärkikynät), vesipohjaiset musteet (huopa-, geeli- ja pallokärkiset kynät) ja täytekyntien musteet. Myös tulostinmusteita voidaan tutkia kemiallisin menetelmin.^{35b,49}

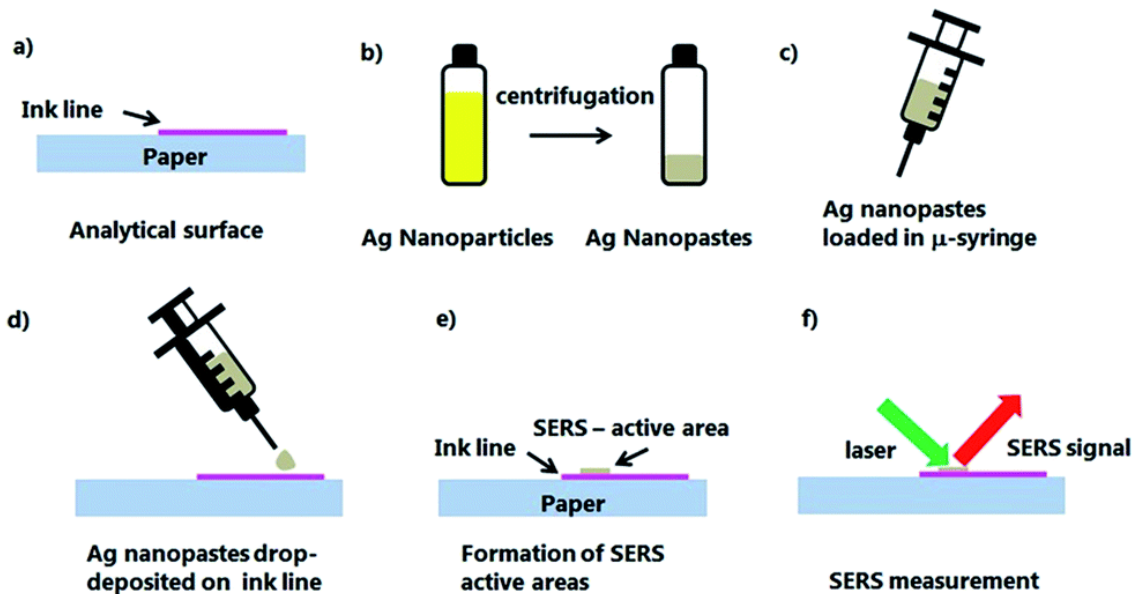
Musteet koostuvat kolmesta pääraaka-aineesta: väriaineista, liuottimista sekä hartseista ja muista lisäaineista. Musteiden väri saadaan aikaan, kuten maalien kohdalla, väriaineiden ja pigmenttien avulla. Musteissa käytetään usein eri värien sekoitusta, jolloin niihin saadaan oikea sävytys ja koostumus. Väriaineiden lisäksi tarvitaan liuotinta, jonka tehtävänä on tehdä seoksesta juokseva ja näin mahdollistaa musteella kirjoittaminen. Kirjoittamisen jälkeen liuotin haihtuu ja muste kuivuu paperin päälle. Nykyään musteissa käytetään liuottimina glykolia, al-

koholeja ja vettä. Liuotin vaikuttaa myös kynien toimintaperiaatteisiin ja usein käytetään monen liuottimen sekoitusta, jolloin saadaan haluttu koostumus. Hartsien tehtävänä on säätää musteen ominaisuuksia, kuten viskositeettia, käyttötarkoitukseen sopivaksi. Hartsit toimivat myös linkkinä musteen ja substraatin välillä. Muiden lisäaineiden, kuten biosidien, tensidien, voiteluaineiden ja säilöntäaineiden lisäämisellä saadaan musteiden koostumuksesta parempi ja kestävämpi.^{35b,49}

Musteiden kemiallisen analyysin ongelmana on yleisesti ollut se, että analyysit tuhoavat tutkittavan näytteen. Esimerkiksi TLC, GC-MS ja HPLC ja FTIR -tekniikoille on kehitelty menetelmiä musteiden analyysiin. Raman-spektroskopia on osoittautunut hyväksi vaihtoehdoksi edellisiin menetelmiin nähden, koska sillä on mahdollista tutkia mustetta suoraan paperin päältä tuhoamatta näytettä. NR-tekniikan ongelmana on, kuten maalienkin kanssa, musteiden heikko Raman-sirottuminen ja niiden mittauksessa voi esiintyä häiriönä fluoresenssia. Raman-mittaukset voivat myös tuhota näytteet, jos käytetään liian suurta laserin tehoa. Musteiden kohdalla onkin oltava erityisen tarkka, ettei näyte tuhoudu, jos mittaus tehdään suoraan paperin päältä.^{2,35b,49} Myös musteiden analysoimiseen SERS-tekniikalla forensiikan kannalta on tehty tutkimuksia.^{50,51}

Geiman *et al.*⁵¹ ovat tutkineet kuulakärkikynissä käytettäviä synteettisiä väriaineita SERS-tekniikalla. Työhön valittiin kymmenen väriainetta, jotka vastasivat kuulakärkikynien musteissa tyypillisesti esiintyviä väriaineryhmiä. Väriaineet mitattiin ensin NR-tekniikalla ja tämän jälkeen SERS:llä. Puhtaiden väriaineiden mittausten jälkeen siirryttiin oikean musteen tutkimukseen. Työn ideana oli erotella kuulakärkikynän musteen väriaineet ohutlevykromatografisesti (TLC) ja tämän jälkeen käyttää SERS:ä väriaineiden mittaukseen suoraan silikalevyn päältä. Kuulakärkikynällä piirrettiin rasti suodatinpaperille, muste liuotettiin etanoliin, liuosta pipetoitiin pieni määrä TLC-levyn päälle ja suoritettiin ajo. Eroteltujen väriaineiden päälle pipetoitiin pieni määrä konsentroitua kolloidia. SERS-mittaukset tehtiin kuivuneen kolloidin päältä. Työn tuloksissa huomattiin, että NR-tekniikalla saatiin mitattua vain yksi väriaine helposti ilman fluoresenssia tai muita häiriöitä. SERS-tekniikka toimi hyvin valittuihin väriaineisiin ja ne saatiin mitattua paremmin kuin NR-tekniikalla. Kuulakärkikynän musteen analyysissä onnistuttiin ja siitä löydettiin paljon yhtenäisyyttä tutkittujen väriaineiden kanssa.

Saviello *et al.*⁵⁰ ovat tutkineet historiallisten huopakynien (tussit) väriaineiden mittausta SERS-tekniikalla. Työhön valittiin kolme vanhaa kynää, väreiltään vaaleanpunainen, vihreä ja sininen. Kynien väriaineet oli tarkoitus mitata suoraan paperin päälle piirretystä viivasta. Työssä käytettiin konsentroitua hopeakolloidia tai ns. hopeakolloiditahnaa, jota pipetoitiin väriaineen päälle pieni määrä, annettiin kuivua ja mitattiin. Kolloidin konsentrointi tehtiin sentrifugoimalla valmistettua kolloidia, poistamalla supernatantti ja suspensoimalla kolloidi pieneen määrään vettä. Kuvassa 19 on esitetty koejärjestely väriaineen mittaamiseen paperin päältä SERS-tekniikalla. Tutkimuksessa saatiin rohkaisevia tuloksia väriaineiden *in situ* -mittauksiin paperin päältä. Kolloiditahnan käyttäminen mahdollisti väriaineiden mittaamisen, koska se muodosti paperin kuitujen päälle tiheän kerroksen hopeapartikkeleita eikä se imeytynyt niin tehokkaasti kuitujen väliin. Työssä käytettiin vesiliukoisia tusseja. Kolloidiliuoksen vesi liuotti tusseja, joka edesauttoi hopeapartikkeleiden sitoutumista väriainemolekyylien kanssa. Työssä onnistuttiin selvittämään vesiliukoisten tussien väriainekoostumuksia ja selvittämään eri väriaineiden piikkejä seoksista (sininen tussi). Työstä arveltiin olevan hyötyä sellaisiin tutkimuksiin, joissa analysoitaisiin erilaisten musteiden ja väriaineiden käyttäytymistä niiden vanhentuuksa.



Kuva 19. Kaaviokuva väriaineiden SERS-mittaukseen suoraan paperin päältä: Kynällä piirretyn viivan (kohta a) päälle annostellaan pieni määrä (kohdat c ja d) konsentroitua hopeakolloidia (kohta b), annetaan kolloidin kuivua (kohta e) ja tehdään mittaus (kohta f).⁵⁰ Copyright

(2018) The Royal Society of Chemistry.

4.3 Räjähdeaineet

Räjähdeaineiden analytiikassa esiintyy ongelmia verrattaessa monien muiden forensiikassa esiintyvien kemiallisten aineiden, kuten huumeiden, analyysihin. Räjähdeaineet ovat yleensä yksinkertaisen rakenteen omaavia yhdisteitä tai yhdisteiden seoksia, jotka koostuvat polttoaineesta ja hapettavasta aineesta. Niiden toiminta perustuu kykyyn hajota kemiallisesti ilman ulkoisien yhdisteiden vaikutusta (kuten ilman kanssa) vapauttaen suurella paineella lämpöä ja kaasua. Räjähdeaineet voidaan jakaa käyttäytymisensä perusteella korkean ja matalan luokan räjähdäaineiksi. Matalan luokan räjähdäaineet toimivat polttoaineina (esim. rakettimootoreissa ja ohjuksissa) ja niiden palamisnopeus on selvästi pienempi kuin korkean luokan räjähdäaineilla. Korkean luokan räjähdäaineet voidaan jakaa primäärisiin ja sekundäärisiin räjähdäaineisiin. Primääristen räjähdäaineiden tehtävänä on käynnistää sekundääristen räjähdäaineiden palaminen. Sekundääristen räjähdäaineet ovat pääraaka-aineita ja tuottavat suurimman osan räjähdäaineen voimasta. Sekundääriset räjähdäaineet voidaan jakaa vielä teollisuudessa käytettäviiin ja sotilaallisiin räjähdäaineisiin.^{16b,35c}

Räjähdeaineiden analysoiminen bulkinäytteistä on yksinkertaista ja helppoa. Bulkinäytteillä tarkoitetaan aineita, joita voidaan tunnustella sormin ja ne nähdään paljain silmin. Räjähdeainetutkimusten ongelmana yleensä onkin se, että niistä ei jää räjähdysen jälkeen jäljelle bulkinäytteen määrää nähtäväksi. Puhutaan niin sanotuista räjähdäainejäämistä ja niiden tutkimuksesta. Jäämäinetutkimuksessa analysoitavassa näytteessä voi olla räjähdäainetta mikro- tai nanogramman luokkaa.^{35c}

Räjähdeainejäämien tutkimuksen yksi suurimmista haasteista on se, kuinka näyte saadaan laboratorioon mahdollisimman kattavasti ja puhtaasti. Räjähdeaineen ominaisuudet vaikuttavat siihen, kuinka paljon räjähdyksessä jää räjähtämätöntä ainetta rikospaikalle tai kuinka suurelle alueelle räjähdäainejäämät leviävät. Mitä haihtuvampi tai räjähdysherkempi räjähdäaine on kyseessä, sitä vähemmän siitä jää ainejäämiä räjähdysen jäljiltä. Räjähdeainenäytteiden tutkimus alkaa selvittämällä räjähdysen keskipiste eli paikka missä räjähdäaine on sijainnut ennen räjähdystä. Räjähdyksen keskipisteestä tai sen välittömästä läheisyydestä on suurin mahdollisuus löytää räjähdäaineen jäämiä. Yleisin tapa näytteen keräyksessä on ottaa pyyhintänäytteitä rikospaikalta erilaisilta pinnoilta vedellä tai liuottimella pestyillä kuivilla tai kostutetuilla puuvillalappuilla. Toinen mahdollisuus on ottaa rikospaikalta räjähtänyttä materiaalia ja lähettää se laboratorioon.^{35c}

Räjähdeaineiden analyysi aloitetaan näytteiden uuttamisella liuottimiin, kuten asetoniin tai asetonitriliin. Erilaisia laimeampia uutto-olosuhteisiin ja uuttosarjoihin perustuvia menetelmiä on kehitelty. Näytteiden uuttamisella erilaisilla liuottimilla saadaan eroteltua näytteissä uuttautuvat kontaminaatiota aiheuttavat aineet. Uuttamisen jälkeen tapahtuu itse räjähdeaineiden analyysi ja tunnistaminen. Analyyseissä käytetään yleisesti kromatografisia tekniikoita, kuten ionikromatografiaa (IC), kaasukromatografiaa (GC) ja nestekromatografiaa (LC). Viimeisen kahden vuosikymmenen aikana myös Raman-spektroskopiaa ja erityisesti sen erikoistekniikoita on alettu tutkimaan räjähdeaineiden analytiikassa.^{16b,35c}

SERS-ilmiön soveltamista räjähdeainetutkimuksiin on tehty paljon. Zapata *et al.*⁵² ovat koonneet kattavan katsauksen SERS-ilmiöllä tutkituista perinteisistä räjähdeainemolekyyleistä ja muista räjähdeaineissa esiintyvistä aineista. SERS-ilmiötä on hyödynnetty muun muassa TNT-, DNT-, RDX-, PETN-, TATP- ja HMTD-molekyylien tutkimuksessa. Eniten näistä on tutkittu TNT:tä ja DNT:tä niiden aromaattisuuden vuoksi ja niitä on pystytty tunnistamaan jopa 10^{-17} - 10^{-13} M pitoisista näytteistä. Räjähdeaineiden SERS-tutkimuksessa on käytetty substraatteina paljon erilaisia pintoja ja muita kolloideista valmistettuja johdoksia. Myös pelkkien kolloidien käyttöä on tutkittu.

Räjähdeaineiden SERS-tutkimuksen kannalta kolloidisten nanopartikkeleiden käytössä on omat ongelmansa, erityisesti hopeisten nanopartikkeleiden kohdalla. Kneipp *et al.*⁵³ ovat tutkineet TNT:n mittaamista SERS-tekniikalla jo vuonna 1995. Työssä tutkittiin, kuinka TNT:n mitaus onnistuu sekoittamalla näytettä hopea- ja kultakolloidien kanssa. Kolloidien aggregointiin käytettiin 1 M NaCl:a ja valmistetut näytteet mitattiin erillisellä Raman-mittapöydällä lähi-IR-alueen aallonpituudella 830 nm. Työssä huomattiin, että kultainen kolloidi toimi hopeista paremmin mitattaessa TNT:tä. Kultaisella kolloidilla saatiin mitattua SERS-spektri jopa $7,5 \cdot 10^{-7}$ M näytteestä. Bulkki-TNT:n Raman-spektrissä nähdään kuusi tyypillistä piikkiä aaltoluville 1648, 1570, 1360, 1204, 837 ja 752 cm^{-1} . Hopeakolloidilla mitattaessa TNT:n Raman-spektrissä saatiin näkyviin vain piikki noin 800 cm^{-1} aaltoluville, joka vastaa tasosta pois päin tapahtuvia värähdyksiä. Kneipp *et al.*⁵³ arvioivat tämän johtuvan vahvasta sitoutumisesta hopean nanopartikkeleiden ja TNT-molekyylin välillä, minkä seurauksena vain selektiivinen kemiallinen voimistuminen nähdään. He arvelivat, että TNT:n absorboituminen johtaa hopeapartikkeleiden koaguloitumiseen, mikä johtaa suurempiin partikkeleihin, jotka eivät pysty tuottamaan SERS-signaalin voimistumisen sähkömagneettista osaa. Hopean jälkeen he kokeilivat kultakolloidia.

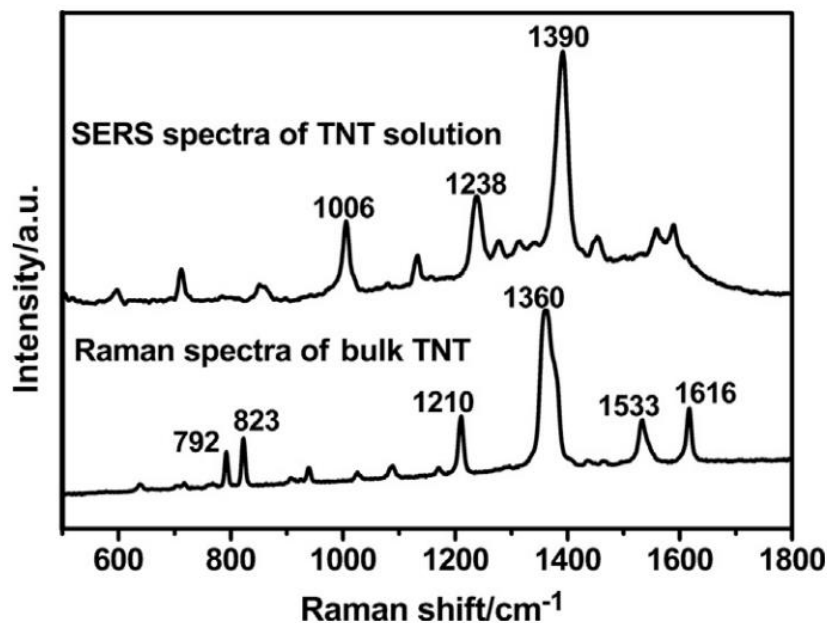
Kneipp *et al.*⁵³ kultakolloidimittauksissa saatiin näkyviin TNT:lle piikkejä lähellä niiden tyypillisiä aaltolukuja. Tämän arveltiin johtuvan siitä, että TNT-molekyylillä ei liity yhtä voimakkaasti kultapartikkelin pinnalle verrattaessa hopeaan. Molekyylin arveltiin olevan eri asennossa kultapartikkelin nähden, jolloin sähkömagneettinen signaalin voimistuminen on mahdollista tapahtua. Kultakolloidiin liittyneen TNT:n SERS-spektrissä nähtiin tyypilliset piikit aaltoluvuilla 1359 ja 1204 cm^{-1} . Aaltoluvulle 1275 cm^{-1} ilmestyi ylimääräinen piikki sekä toinen piikki lähellä 1600 cm^{-1} aaltopituutta voimistui huomattavasti. SERS-spektrissä oli myös huomattavaa, että 1000 cm^{-1} kohdalle nousi piikki, joka on huomattavasti pienempi bulkki-TNT:n spektrissä. Piikki ilmestyy bentseenirenkaan värähtelyistä ja tämän ajateltiin johtuvan molekyylin kohtisuorasta sitoutumisesta kultakolloidin pinnalle. Havaintojen perusteella ajateltiin yleisesti, että molekyylin symmetria muuttuu sen sitoutuessa kolloidin pinnalle.

Zhang *et al.*⁵⁴ ovat hakeneet toisenlaista näkökulmaa TNT:n SERS-mittaukseen hopeakolloidin avulla. Työn keskiössä oli erityisesti näyteliuosten olosuhteiden vaikutus SERS-näytteen valmistukseen ja itse mittaukseen. Työssä tutkittiin pH:n ja aggregaattina toimivan NaCl:n vaikutusta eri suuruus- ja pitoisuusluokissa TNT:n SERS-mittaukseen. pH:n säädössä käytettiin natriumhydroksidia (NaOH). Kuten Kneipp *et al.*⁵³ työssä, Zhang *et al.*⁵⁴ totesivat, että käsittelemättömästä TNT-liuoksesta valmistetusta näytteestä ei saatu mitattua järkevää spektriä hopeakolloidin kanssa. He ratkaisivat ongelman säätämällä liuoksen pH:ksi 13.

Zhang *et al.*⁵⁴ käyttivät mittauksissa 532 nm laseria ja he saivat bulkki-TNT:lle tyypilliset kuusi piikkiä aaltoluvuille 792, 823, 1210, 1360, 1533 ja 1616 cm^{-1} . TNT:n Raman piikkien vastaavat värähdykset samassa järjestyksessä ovat: C-H:n tasosta ulospäin suuntautuva värähtely, nitroryhmän symmetrinen saksivärähtely, C₆H₂-C värähtely, NO₂ symmetrinen venytysvärähtely, NO₂ asymmetrinen venytysvärähtely ja C=C aromaattinen venytysvärähtely. TNT:n Raman-spektri muuttuu selvästi, kun sen pH säädetään 13:een. Tässä tapauksessa molekyylillä voidaan tunnistaa kolmen pääpiikin avulla aaltoluvuilla 1006, 1238 ja 1390 cm^{-1} . Bulkki-TNT:n piikit 1210 ja 1360 cm^{-1} ovat siirtyneet hieman korkeammalle aaltoluvulle SERS-spektrissä sekä spektriin on ilmestynyt n. 1000 cm^{-1} kohdalle piikki, kuten tapahtui Kneipp *et al.*⁵³ mittauksissa.

Zhang *et al.*⁵⁴ pohtivat työssään pH-muutoksen vaikutusta TNT-molekyylin rakenteeseen. Kun näyteliuoksen pH muutetaan 13:een, molekyylillä käy läpi alkalisen hydrolyysin. Reaktiosta huo-

limatta TNT:n nitroaromaattiset rakenteet pysyvät ehjinä, koska SERS-spektrissä nähdään edelleen piikit, jotka vastaavat aaltoluvuilla 1360 ja 1006 cm^{-1} näkyviä piikkejä NR-tekniikalla mitatussa spektrissä. Kuvassa 20 on esitetty bulkki-TNT:n ja SERS-menetelmällä mitatun pH-säädetyin 10^{-6} M TNT-liuoksen Raman-spektrit. NaCl lisäys SERS-mittauksiin välttämätön, koska näytteistä, joihin ei lisätty NaCl:a ei saatu mitattua kyseistä spektriä. Alkalisen hydrolyysin arveltiin vaikuttavan TNT-molekyylin kykyyn absorboitua hopeakolloidin kanssa, jonka seurauksena Raman-signaalin voimakkuus kasvaa huomattavasti. Tutkijat totesivat myös, että TNT:n hydrolyysiprosessi on monimutkainen eikä siinä muodostuvia tuotteita täysin tunnettu vielä.



Kuva 20. Bulkki-TNT:n ja pH 13-säädetyin 10^{-6} M TNT-liuoksen Raman-spektrit.⁵⁴ Copyright (2014) Elsevier B.V.

Botti *et al.*⁵⁵ ja Liszewska *et al.*⁵⁶ ovat tutkineet räjähdäaineiden SERS-tutkimusta käyttämällä substraattina kaupallisia valmistettuja pintoja. Botti *et al.*⁵⁵ ovat tutkineet nitropohjaisten räjähdäaineiden määrittämistä Renishaw diagnostics:n Klarite[®]-substraatilla. Työssä tutkittuja molekyylejä olivat PETN, EGND, RDX ja TNT. Näytteistä valmistettiin laimennokset ja pipetoitiin pieni määrä näytettä substraatin päälle. Näytteen annettiin kuivua substraatin päällä ennen mittausta. Tutkittavat molekyylit saatiin määritettyä räjähdäainejäämille tyypillisistä määristä, jopa kymmenistä pikogrammoista.

Liszewska *et al.*⁵⁶ ovat arvioineet kaupallisten ja ei-kaupallisten SERS-substraattien käytettävyyttä räjähdainejäämien tutkimuksissa sekä sitä, pystytäänkö yhdisteitä tutkimaan kyseisistä substraateista. Ideana oli luoda työkaluja rikoksantorjuntaan ja sotilaallisiin sovellutuksiin, joissa pystyttäisiin tutkimaan räjähdainejäämiä suoraan räjähdyspaikalta kannettavilla Raman-spektrometreillä. Tutkittaviksi räjähdaineiksi valittiin AN, RDX ja TNT.

Liszewska *et al.*⁵⁶ työn kaupallisiksi tuotteiksi valittiin Klarite 312 (Renishaw diagnostics), RAM-SERS-AU (Ocean Optics) ja SERSitive (SERSitive). Ei-kaupalliset tuotteet valmistettiin päällystämällä GaN-pilareita ja -onkaloita Au-Ag -plasmonimateriaalilla. Klarite 312 toimi substraateista parhaiten. Sillä saatiin mitattua kaikki näytteet jäämätutkimuksien pitoisuustasolla eikä siitä aiheutunut tausta häirinyt mittauksissa. Muilla kaupallisilla tuotteilla syntyi ongelmia substraatin aiheuttamasta taustasta Raman-spektriin. SERSitive-substraatilla saatiin mitattua AN ja TNT, mutta RDX:ää ei saatu näkyviin, vaikka substraatin päälle lisättiin näytettä yli jäämätasoisuuden. SERSitive-substraatilla oman ongelman loi substraatin valmistuksessa käytettyjen materiaalien Raman-sironta. Taustan Raman-sironta oli vielä suurempi ongelma RAM-SERS-AU -substraatilla, jonka avulla ei saatu mitattua yhtään tutkittavista räjähdaineista. RAM-SERS-AU -substraatissa nanopartikkeliryppäät on kiinnitetty kuitujen päälle, joten tutkijat arvelivat, että analyysi absorboituu mahdollisesti kuituun ja kannettavilla Raman-spektrometreillä ei riitä kyky fokuoimaan laseria tarkasti nanopartikkeleiden päälle. GaN-pilarit toimivat toiseksi parhaiten käytetyistä substraateista. Niillä saatiin tutkittua kaikki aineet eikä siitä aiheutunut taustaspektri luonut ongelmia mittauksiin. GaN-onkalot eivät myöskään aiheuttaneet suurta taustaspektriä mittauksissa.

4.4 Kuidut

Kuitujen esiintyvyys on yleisesti ottaen suurta, mikä tekee niiden tutkimuksesta forensisesti mielenkiintoisen materiaalin. Kuitututkimukset käsittävät yleisesti kaikenlaiset kuitunäytteet eloperäisestä materiaalista synteettisiin materiaaleihin. Kuidut irtoavat helposti esim. rikoksen epäillyn ja uhrin vaatteista näiden koskettaessa toisiinsa. Tällöin on suuri mahdollisuus, että niitä löytyy ympäri rikospaikkaa, mikä tekee niistä hyvän työkalun vertailututkimuksiin rikospaikan ja rikoksen tekijän yhteyden selvittämiseksi.^{16c}

Kuidut voidaan jakaa kahteen pääryhmään: luonnollisiin ja synteettisiin kuituihin. Luonnolliset kuidut voidaan jakaa edelleen kasveista ja eläimistä peräisin oleviin kuituihin. Kasvipäriset kuidut koostuvat suurimmalta osin selluloosasta ja niitä voidaan jakaa eri lajeiksi, kuten puuvillaksi ja pellavaksi. Kasvipärisiä kuituja saadaan eristettyä kasvien lehdistä, varresta ja siemenkodasta. Eläinperäiset kuidut taas koostuvat keratiinista ja yleisin keratiinikuitu on villa. Forensisesti tärkeitä eläinperäisiä kuituja ovat myös ihmisten, koirien ja kissojen karvat.^{16c}

Synteettisten kuitujen kirjo on paljon suurempi kuin luonnollisten kuitujen. Yleisimpiä synteettisiä kuituja ovat polyesteri (PET), akryyli (PAN), polyamidit (nylonit), ja polyolefiinit: polyeteeni (PE), polypropyleeni (PP). Näiden lisäksi löytyy vähemmän yleisiä kuituja, kuten polyvinyylikloridi (PVC), polytetrafluoroeteeni (PTFE), polyuretaanit (Lycra[®], Spandex[®]) ja aromaattiset polyamidit (Kevlar[®]). Oman haasteen kuitujen tutkimuksessa luo myös kopolymeerit, jotka on syntetisoitu käyttäen kahta tai useampaa polymeeriä.^{16c}

Kuituja löytyy eri värisinä, mikä tuo lisäarvoa forensisten vertailututkimusten suorittamiselle. Kuitujen väriaineet lisäävät erottelukykyä niitä toisiinsa vertailtaessa, vaikka kuidun tyyppi olisi sama. Kuitututkimukset suoritetaan eri tekniikoilla, kuten stereomikroskooppisesti, vertailumikroskooppisesti, UV-VIS -spektroskooppisesti, fluoresenssimikroskooppisesti ja vibraati-spektroskooppisesti (IR, Raman).^{16c}

Kuitujen väriaineiden tutkimusta SERS-tekniikalla on myös tehty. Idone *et al.*⁵⁷ ja Jurasekova *et al.*⁵⁸ ovat tehneet historiallisten väriaineiden *in situ* -tutkimusta SERS-tekniikalla. Kummasakin työssä oli ideana lisätä kuidun päälle hopeananopartikkeleita ja mitata väriaine suoraan kuidun päältä ilman erityistä näytteenkäsittelyä. Zaffino *et al.*⁵⁹ ovat vertailleet kuiduista happohydrolyysillä käsiteltyjen ja käsittelemättömien historiallisten luonnollisten väriaineiden SERS-mittauksia. Happohydrolyysikäsittelyssä kuidut käsiteltiin vetyfluorihapon (HF) avulla, minkä jälkeen niiden päälle pipetoitiin hopeakolloidit. Työssä huomattiin, että happohydrolyysillä saatiin eri väriaineet esiin kuin käsittelemättömästä kuidusta.

Kurouski ja Van Duyne⁶⁰ ovat tutkineet, kuinka värjäytyistä hiuksista saataisiin tunnistettua käytetty väriaine. Tutkimuksessa värjättiin hiuksia erilaisilla mustilla ja sinisillä väriaineilla, minkä jälkeen niiden päälle pipetoitiin kultaisia nanosauvoja (AuNR). Hiukset tutkittiin tämän jälkeen SEM-tekniikalla ja huomattiin, että nanosauvat järjestäytyivät hiusten pinnalle. Raman-mittaukset suoritettiin *in situ* -tekniikalla hiusten pinnoilta. Työssä saatiin selville, että väriaineet

voidaan mitata suoraan hiusten päältä. Tulosten perusteella voitiin myös päätellä, oliko hiukset värjätty keinotekoisesti vai eivät.

Kokeellinen osa

5 Työn suoritus ja tulokset

Työn suoritus koostui pääosin kolloidisen hopealiuoksen valmistuksesta sekä sen toimivuuden ja soveltuvuuden testaamisesta SERS-ilmiön käytännön sovellutuksissa. Hopeisen kolloidin toimivuutta testattiin ensin rhodamiini 6G -molekyylin avulla, minkä jälkeen siirryttiin forensisten käytännön sovellutuksien testaamiseen. Käytännön soveltuvuutta testattiin ensin punaisen spray- ja työkalumaalien värien tutkimuksessa. Tämän jälkeen kokeiltiin, kuinka SERS-menetelmää voitaisiin hyödyntää kuulakärkikynien ja tussien musteissa esiintyvien väriaineidien tutkimuksessa. SERS-ilmiötä kokeiltiin väriainetutkimuksen lisäksi räjähdäaineen tutkimuksissa, joissa keskityttiin TNT:hen. SERS-ilmiötä sovellettiin myös muutamaa oikeaan forensiseen tutkimukseen, joista on esitetty yksi esimerkki luvussa 5.3.8.

5.1 Käytetyt reagenssit ja laitteet

Sitraattipelkistetyn hopeakolloidin valmistuksessa käytettiin trinatrium sitraatin dihydraattia (Sigma-aldrich, ≥ 99 %) ja hopeanitraattia (Sigma-aldrich, ≥ 99 %). Työssä käytettiin myös kaupallista pyöreätä kultakolloidia (NanopartzTM, 50 nm). Aggregoitumisen säätelyyn käytettiin kaliumnitraattia (Riedel-de Haën, ≥ 99 %) ja natriumkloridia (Sigma-aldrich; $\geq 99,5$ %). Liuosten valmistuksessa käytettiin 18,2 M Ω ionivaihdettua vettä, asetonia (Merck, 99 %), etanolia (Altia; 91,2 %), metanolia (Merck, 99 %) ja dikloorimetaania (Merck, 99 %). pH-arvon säätöön käytettiin 1 M NaOH -liuosta (valmis liuos). Ohutlevykromatografisissa ajoissa käytettiin ajolevyinä TLC Silica gel 60 F₂₅₄ -silikalevyjä (Merck, < 90 %) ja ajoliuoksena 70:35:30 suhteista etyyliasetatti-etanoli-vesi -liuosta (valmis liuos). Työssä käytettiin SERS-mittausalustana lasisia 76x26 mm kokoisia mikroskooppilevyjä (Menzel-Gläser). Työssä käytetyt näytteet otettiin Rikosteknisen laboratorion vertailumaali- ja räjähdäainekokoelmista. TNT:n (Forcit) puhtaus oli 99,3 %.

Työn pääanalyysilaitteena käytettiin Thermo Scientific:n DXRxi-Raman-mikroskooppia, jossa oli käytettävissä kaksi laseria aallonpituusalueilla, 532 ja 780 nm. DXRxi:n mikroskoopissa oli käytettävissä kolme objektiivia: 10x, 20x ja 50x -objektiivit. Kolloidin laadunvarmistuksessa käytettiin mikrospektrofotometristä laitteistoa (MSP) ja pyyhkäisyelektronimikroskooppia (SEM). MSP-laitteisto koostui Zeiss Axioplan 2-UV-mikroskoopista ja siihen liitetystä TIDAS-S-CCD -spektrofotometrillä. SEM-laitteena käytettiin JEOL:n JSM-IT300 -merkkistä laitetta. Muita työssä käytettyjä laitteita olivat VWR:n MU 6100 H -pH-mittari ja Eppendorf:n Centrifuge 5810 -sentrifugi.

5.2 Hopeakolloidin synteesi

Hopeakolloidisynteesi suoritettiin Lee-Meisel -synteesiä mukaillen.²⁸ Synteesi suoritettiin pelkistämällä hopeanitraatti trinatriumsitraatin dihydraatilla. Synteesi suoritettiin 5-kertaa pienemmällä määrällä kuin Lee-Meiselin synteesiohjeessa on sanottu. Hopeanitraatin vesiliuosta valmistettiin 100 ml. Ohjeen mukaan 100 ml kohden tuli punnita 18 mg AgNO_3 :a, mutta sitä punnittiin erehdyksissä 19,3 mg ensimmäiseen synteesierään. Tämä on mahdollisesti vaikuttanut hopeakolloidin nanopartikkelikokojakaumaan ja pitoisuuteen liuoksessa. Trinatriumsitraatista valmistettiin 1 m-% liuos 100 ml mittapulloon punnitsemalla 1 mg trinatriumsitraattia mittapulloon ja täyttämällä pullo merkkiin. Liuokset valmistettiin ionivaihdettuun veteen.

Ensimmäinen synteesi (E1) suoritettiin konepestyillä astioilla, joille ei tehty ylimääräistä hapopesua. Synteesilaitteistona toimi perinteinen refluksointilaitteisto (kuva 21). 250 ml kolviin lisättiin 100 ml tuoretta AgNO_3 -liuosta ja liuos lämmitettiin kiehuvaan. Kiehuvaan AgNO_3 -liuokseen lisättiin 2 ml 1 m-% trinatriumsitraatti-liuosta Pasteur-pipetillä hitaasti tipoittain. Lisäyksen jälkeen seosta refluksoitettiin tunnin ajan voimakkaasti sekoittaen. Seoksen lämmitys lopetettiin tunnin kuluttua ja sen annettiin jäähtyä refluksointilaitteistossa jatkuvasti sekoittaen, kunnes seos oli jäähtynyt huoneenlämpöön. Valmis jäähtynyt hopeakolloidi siirrettiin 100 ml säilöpulloon, joka vuorattiin alumiinifoliolla ja säilytettiin jääkaapissa. Hopeakolloidista valmistettiin myöhemmin toinen erä (E2) samalla menetelmällä. E2-erän hopeanitraattiliuokseen punnittiin 18,2 mg AgNO_3 :a.

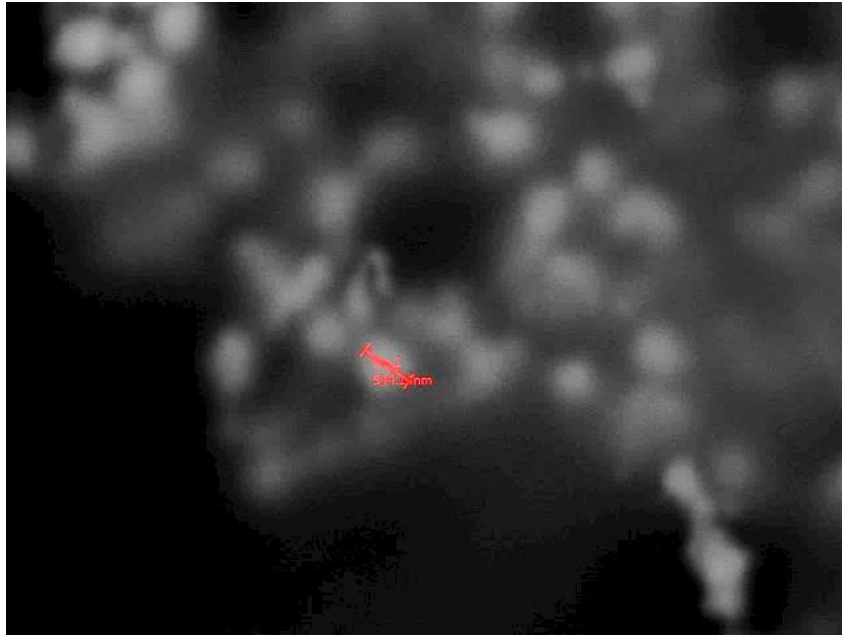


Kuva 21. Refluksointilaitteisto.

Hopeakolloidien laadunvarmistus suoritettiin mittaamalla niistä UV-Vis -spektrit (MSP-laitteistolla). Lee-Meisel -menetelmän mukaan kyseisten hopeakolloidien absorptiomaksimi tulisi olla aallonpituudella 420 nm.²⁸ Näytteestä pipetoitiin Pasteur-pipetillä pisara kvartsisen mikroskooppilasin päälle ja näytteen päälle asetettiin kvartsinen peitinlasi. Näytetausta mitattiin ultrapuhtaasta vedestä. Mittausalueeksi asetettiin 240-750 nm ja E1-hopeakolloidierän UV-Vis -spektrit löytyvät liitteestä 2. Kolloidin väri oli heikko, joten siitä ei saatu mitattua hyvää spektriä objektilasin päältä. Spektristä saadaan kuitenkin selville, että E1-hopeakolloidierän absorptiomaksimi osuu 410-420 nm kohdalle. E1-kolloidierästä mitattiin UV-VIS -spektrit vielä kahdesti muutaman kuukauden välein. Spektrien absorptiomaksimit pysyivät samana. E2-kolloidierän UV-VIS -spektrit löytyvät liitteestä 2 ja myös niistä nähdään, että absorptiomaksimit osuivat 410-420 nm kohdalle, kuten ensimmäisen erän kohdalla.

UV-Vis -spektrin lisäksi hopeakolloidi analysoitiin pyyhkäisyelektronimikroskoopilla (SEM), jonka avulla tutkittiin kolloidipartikkelien kokojakaamaa tarkemmin. Mittauksia varten kummastakin kolloidierästä pipetoitiin 2 µl näytettä SEM-näytealustan päälle ja annettiin kuivua. SEM-mittauksissa huomattiin, että nanopartikkelit kerääntyvät yhteen vesiliuoksen kuivuessa,

joten yksittäisen nanopartikkelin kokoa ei saada tällä menetelmällä ja näytteenkäsittelyllä selvitettyä. Kuvassa 22 näkyy 15000-kertainen suurennos E2-kolloidierästä. Kuvasta 22 nähdään, että nanopartikkelit ovat kerääntyneet yhteen ja muodostavat nanopartikkeliryppäitä, jotka näkyvät kuvassa harmaina kohtina. Partikkeliryppäiden yleinen kokoluokka oli mittausten perusteella noin 500 nm. Yhden nanopartikkeliryppään halkaisijaksi mitattiin 544 nm.



Kuva 22. SEM-kuva E2-kolloidierästä kuivatetun pisaran keskeltä nanopartikkeliryppäistä 15000x suurennoksella. Punainen mitta-asteikko vastaa 544 nm:ä.

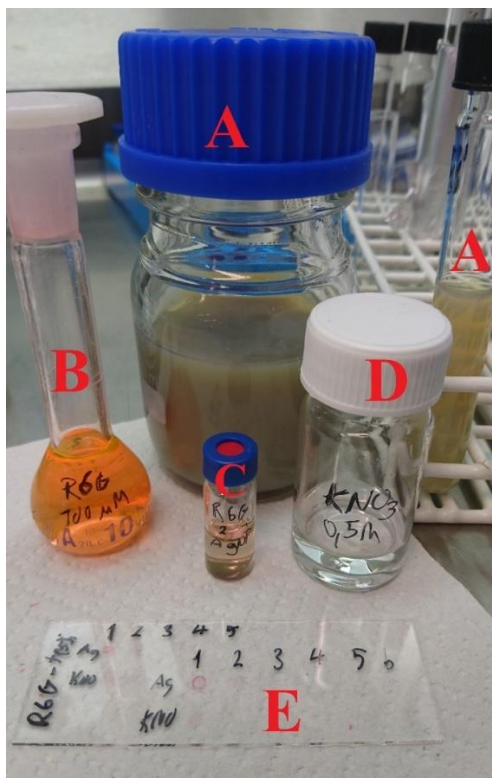
Kolloidinäytteistä tehtiin myös alkuaineanalyysi ja sen tulokset löytyvät liitteestä 3. Alkuaineanalyysin perusteella voidaan sanoa, että synteetit onnistuivat, koska näytteistä suurin osa oli hopeaa. Kummassakin erässä näkyi piikkejä alumiinille ja tuloksen pääteltiin johtuvan alumiinifoliosta, jota käytettiin kolloidien säilöpullojen suojaamiseen. Alumiinia pääsee ilmeisesti liukenemaan pieniä määriä liuokseen, kun säilöpulloja avattiin kolloidin pipetoinnin yhteydessä.

5.3 SERS-tutkimukset

5.3.1 Näytteiden valmistus

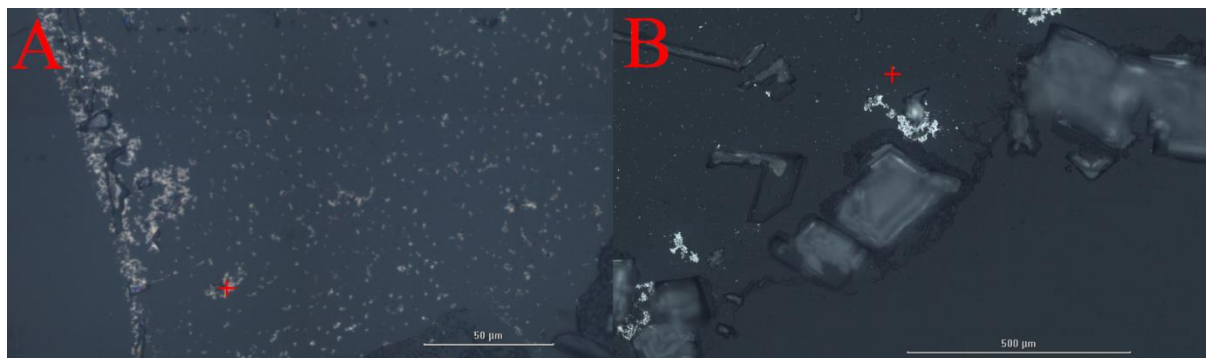
SERS-tutkimuksissa on yleensä vaatimuksena, että tutkittava näyte saadaan liuosmaiseen muotoon, jolloin näytemolekyylit pääsevät lähelle metallista nanopartikkelia. Työssä käytettiin liuottimina vettä, asetonia, metanolia ja dikloorimetaania.

Näytteiden valmistuksessa voidaan käyttää yhtenäistä tapaa, jossa tutkittava näyte, kolloidi ja aggregaatti sekoitetaan tietyissä suhteissa toistensa kanssa. Kirjallisuudesta voidaan ottaa esimerkkejä näytteen valmistukseen. Sekoitussuhteiden valinnassa ei ole yhtä oikeaa tapaa vaan ne pitää kokeilla kullekin näytetyypille erikseen. Näytteenvalmistus voidaan kuitenkin tehdä tiettyjen askeleiden mukaan kaikille näytetyypeille. Näytteenvalmistus eteni seuraavasti: hopeakolloidin (kuva 23a) sekaan pipetoitiin tutkittava näyte (kuva 23b) ja sekoitettiin (kuva 23c) n. 30 s ajan, minkä jälkeen seoksesta pipetoitiin 3 µl näyte etanolipestyn lasilevyn päälle (kuva 23e). Tämän jälkeen lisättiin 0,5 M KNO₃ (kuva 23d), sekoitettiin samoin kuin edellä n. 30 s ja pipetoitiin 3 µl lasilevyn päälle. Lasilevyn päälle pipetoitujen näytteiden annettiin kuivua täysin kuiviksi ennen Raman-mittauksia. Kuivuminen kesti noin 15 min.



Kuva 23. Rhodamiini 6G -molekyylin SERS-mittauksissa käytetyt materiaalit: AgNP-kolloidi (A), $1 \cdot 10^{-4}$ M R6G-liuos (B), sekoitettu näyte (C), 0,5 M KNO_3 -liuos (D) ja lasilevy, jolle pipetoidaan sekoitettu näyte (E). Koeputkessa (A) on pestyä AgNP-kolloidia.

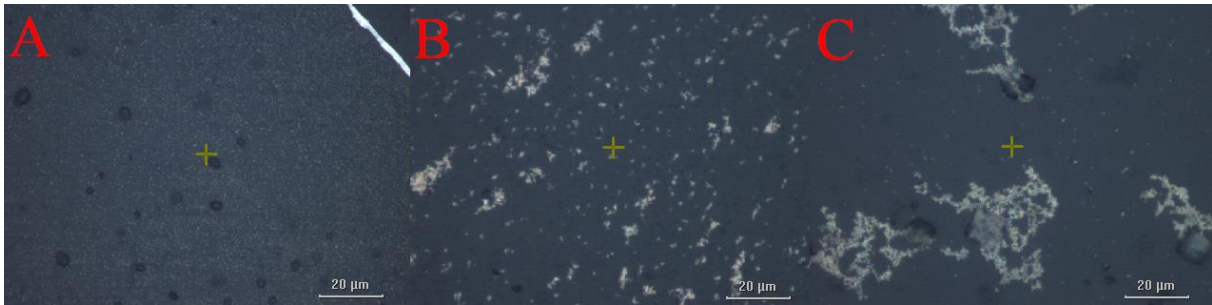
SERS-mittauksien suorituksessa käytettiin kahta tapaa. Perinteisellä manuaalisella kohdistuksella laser kohdistettiin haluttuun mittauskohtaan ja odotettiin, että saatiin mahdollisimman hyvä spektri. Hopeiset nanopartikkelit näkyivät mikroskoopissa kirkkaina alueina ja lasersäde kohdistettiin kirkkaan alueen päälle (kuva 24). Mittausparametrit säädettiin kullekin näytteelle optimaaliseksi seuraamalla näytteen ja kolloidin spektrin käyttäytymistä. Mittaukset aloitettiin käyttämällä pientä lasertehoa ja valotusaikaa. Jos näin ei saatu haluttua tulosta, nostettiin parametrien tehoja. Mittaukset suoritettiin pääasiassa 50x-objektiivilla, mutta joissakin tapauksissa jouduttiin vaihtamaan 20x-objektiiviin. Laimeimmilla näytteillä ei saatu signaalia 25 μm pinhole-valotusaukolla, jolloin valotusaukoksi vaihdettiin 50 μm pinhole. Normaalin mittaustavan lisäksi DXRxi-mikroskoopissa on mahdollisuus tehdä kuvantamismittauksia. Kuvantamista kehitettiin rhodamiini 6G -molekyylin mittauksissa eri vahvuisista liuoksista ja ideana oli testata, voidaanko kolloidin seasta löytää hot spotteja etenkin laimeista liuoksista.



Kuva 24. Mikroskooppikuvat SERS-mittaustapahtumasta. Punainen rasti vastaa laserin kohdistuskohtaa ja sen voi määrittää itse mittauksen aikana. Samasta näytteestä voidaan mittaustilassa mitata useita spektrejä näytteen eri kohdista. Vaaleat kohdat vastaavat kuivatettua hopeista kolloidia ja tutkittava näyte voidaan mitata näiden kohtien päältä. Kuvassa näkyy mikroskooppikuvat kahdesta eri näytteestä ja niistä nähdään, kuinka erilaiset molekyylit vaikuttavat näytteen valmistuksessa. A-kohdassa on 50x-objektiivilla otettu kuva R6G-molekyylin, hopeakolloidin ja KNO_3 :n seoksesta. B-kohdassa on 20x-objektiivilla otettu kuva karminin-punaisen pigmentin, hopeakolloidin ja KNO_3 :n seoksesta.

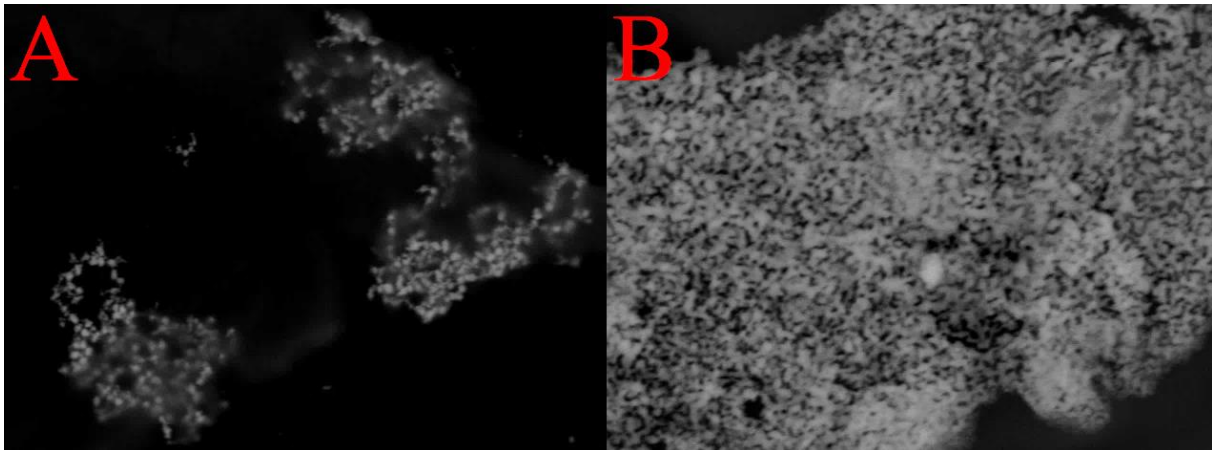
5.3.2 Aggregoinnin merkitys käytännön mittauksissa

Kuten kappaleessa 3.8 esitettiin, aggregoinnilla on suuri vaikutus käytännön SERS-mittausten suorittamisessa.^{17e} Kuvassa 25 on esitetty DXRxi-mikroskoopin kameralla otetut kuvat lasilevyn päälle kuivatetuista kolloideista pelkästään ja sekoitettuna 0,5 M KNO_3 :n sekä 0,6 M NaCl :n kanssa. Kuvasta nähdään, kuinka aggregaatin lisäys vaikutti nanopartikkeleiden kokoonkerääntymiseen. NaCl :lla saatiin suurempi määrä nanopartikkeleita kokoon kuin KNO_3 :lla.



Kuva 25. KNO_3 ja NaCl vaikutus nanopartikkeleiden käyttäytymiseen kokoon kerääntymisessä. Alkuperäisellä kolloidiliuoksella (A-kohta) ei juurikaan nähdä aggregoitumista. Kun kolloidiliuos on sekoitettu 0,5 M KNO_3 :n kanssa (B-kohta), nanopartikkelit selvästi aggregoituvat ja ne nähdään pieninä ryppäinä mikroskooppikuvassa. 0,6 M NaCl vaikutti KNO_3 :a enemmän aggregoitumiseen ja tämä nähdään mikroskooppikuvassa isompina ryppäinä (C-kohta).

KNO_3 :n vaikutusta aggregointiin tutkittiin myös SEM:llä. Kuvassa 26 on esitetty vertailu E2-kolloidierästä mitatuista näytteistä, joissa toinen näyte on mitattu ilman KNO_3 :a 3000-kertaisella suurennoksella ja toinen KNO_3 :n kanssa 6000-kertaisella suurennoksella. Kuvasta 26 huomataan, että aggregoidut nanopartikkelit ovat kerääntyneet enemmän yhteen kuin aggregoimattomat.

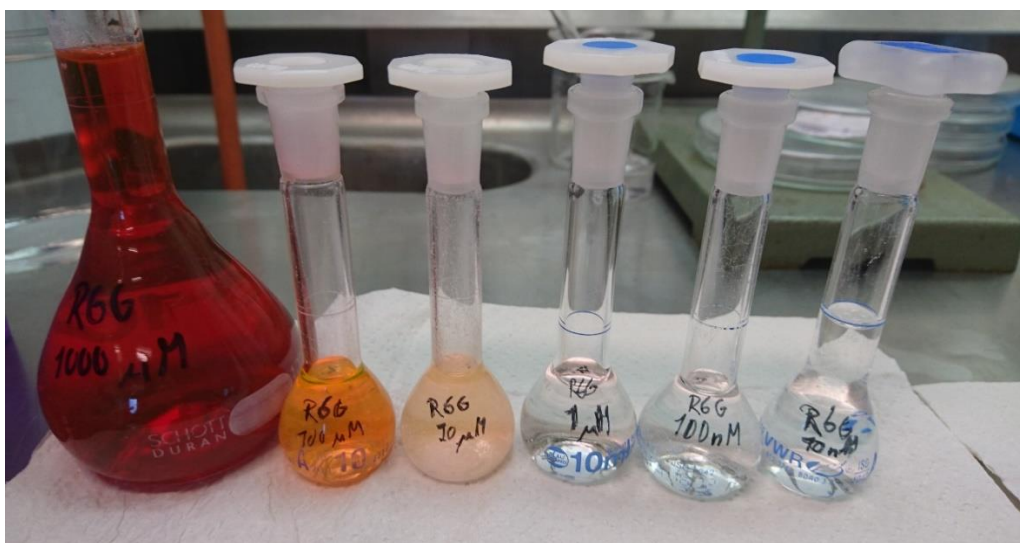


Kuva 26. N_2 -kolloidierästä mitatut SEM-kuvat aggregoimattomasta näytteestä 3000-kertaisella suurennoksella (A) ja KNO_3 :lla aggregoitu näyte 6000-kertaisella suurennoksella (B).

5.3.3 Hopeakolloidin testaaminen rhodamiini 6G -molekyylin avulla

SERS-substraattien testauksessa ja laadunvarmistuksessa käytetään yleisesti rhodamiini 6G -molekyylä (R6G). R6G on voimakkaasti fluoresoiva molekyyli, joka liittyy helposti SERS-substraattien pinnalle. SERS-substraatti saa fluoresenssin ns. sammumaan, jolloin R6G-molekyylin Raman-spektri tulee voimakkaasti esiin. R6G on yksi voimakkaimman SERS-intensiteetin ilmentävä molekyyli.⁶¹

Syntetisoidun AgNP-kolloidin testaamista varten R6G-molekyylistä valmistettiin veteen laimennossarja (10x laimennokset): $1 \cdot 10^{-3}$ M, $1 \cdot 10^{-4}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$ M, $1 \cdot 10^{-6}$ M; $1 \cdot 10^{-7}$ M ja $1 \cdot 10^{-8}$ M. Laimennossarjan kantaliuos ($1 \cdot 10^{-3}$ M) valmistettiin punnitsemalla 47,9 mg R6G:tä 100 ml mittapulloon, jonka jälkeen pullo täytettiin merkkiin. Laimennetut liuokset valmistettiin kantaliuoksesta 10 ml mittapulloihin. Laimennossarjan vahvin liuos oli väriltään vahvan punainen ja laimeimmasta näytteestä ei huomattu väriä paljaalla silmällä (kuva 27).



Kuva 27. Rhodamiini 6G:stä valmistettu laimennossarja.

R6G-liuoksista valmistettiin näyte SERS-tutkimuksiin 1,5 ml lasipulloon sekoittamalla 400 μ l edellä valmistettua AgNP-kolloidia, 200 μ l liuotettua tutkittavaa väriainetta ja 200 μ l 0,5 M KNO_3 :a, joka toimi aggregoivana aineena (kappale 3.8). Näytteen valmistus suunniteltiin Muehlethaler *et al.*⁴⁸ käyttämän menetelmän mukaan, jossa 4 μ l AgNP, 2 μ l tutkittava näyte ja 2 μ l 0,5 M KNO_3 sekoitettiin keskenään. Satakertaiset sekoitusmäärät valittiin käytännöllisistä syistä.

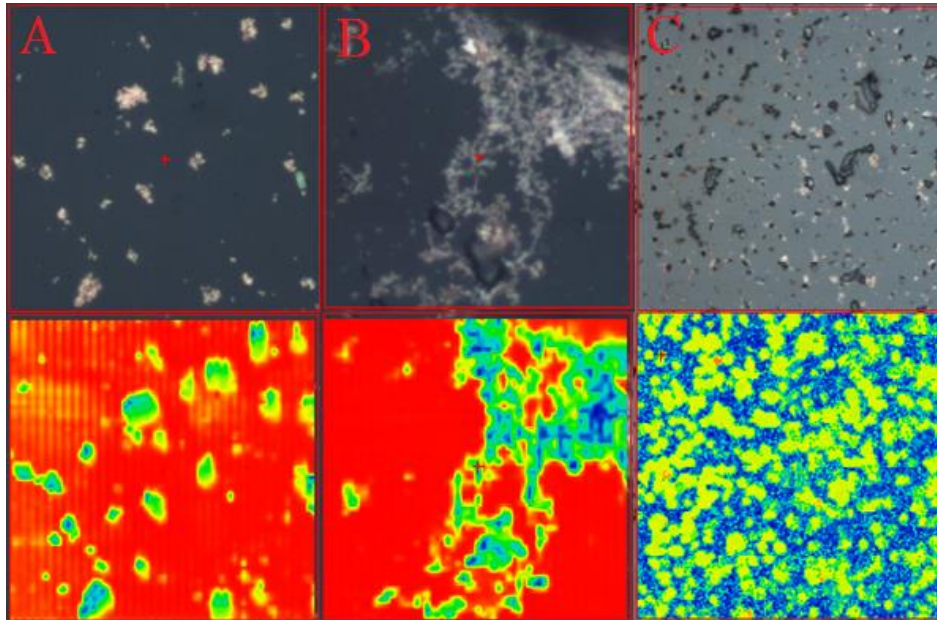
Tutkittavan näytteen pitoisuus pienenee näytteen valmistuksessa AgNP-lisäyksen jälkeen vielä kolminkertaisesti ja KNO₃-lisäyksen jälkeen nelinkertaisesti. Pipetointia (3 µl) ennen KNO₃:n lisäystä ei oteta tässä tapauksessa huomioon, vaikka se pienentää lopullista R6G-pitoisuutta. R6G-liuosten pitoisuudet on esitetty eri suureina taulukossa 2. Myöhemmin valmistettiin vielä 1 nM liuos (ei näy kuvassa 27).

Taulukko 2. Rhodamiini 6G:sta valmistetun laimennossarjan liuosten pitoisuudet ja näytteenkäsittelyn vaikutus lopulliseen liuospitoisuuteen

Mittapullopitoisuus		Pitoisuus näytteen valmistuksen jälkeen (AgNP)		Pitoisuus näytteen valmistuksen jälkeen (AgNP + KNO ₃)	
mol/l	µmol/l	mol/l	µmol/l	mol/l	µmol/l
1 · 10 ⁻³	1000	3,33 · 10 ⁻⁴	333,3	2,5 · 10 ⁻⁴	250
1 · 10 ⁻⁴	100	3,33 · 10 ⁻⁵	33,3	2,5 · 10 ⁻⁵	25
1 · 10 ⁻⁵	10	3,33 · 10 ⁻⁶	3,33	2,5 · 10 ⁻⁶	2,5
1 · 10 ⁻⁶	1	3,33 · 10 ⁻⁷	0,333 (333,3 nM)	2,5 · 10 ⁻⁷	0,25 (250 nM)
1 · 10 ⁻⁷	0,1 (100 nM)	3,33 · 10 ⁻⁸	0,033 (33,3 nM)	2,5 · 10 ⁻⁸	0,025 (25 nM)
1 · 10 ⁻⁸	0,01 (10 nM)	3,33 · 10 ⁻⁹	0,0033 (3,3 nM)	2,5 · 10 ⁻⁹	0,0025 (2,5 nM)
1 · 10 ⁻⁹	0,001 (1 nM)	3,33 · 10 ⁻¹⁰	0,00033 (0,33 nM)	2,5 · 10 ⁻¹⁰	0,00025 (0,25 nM)

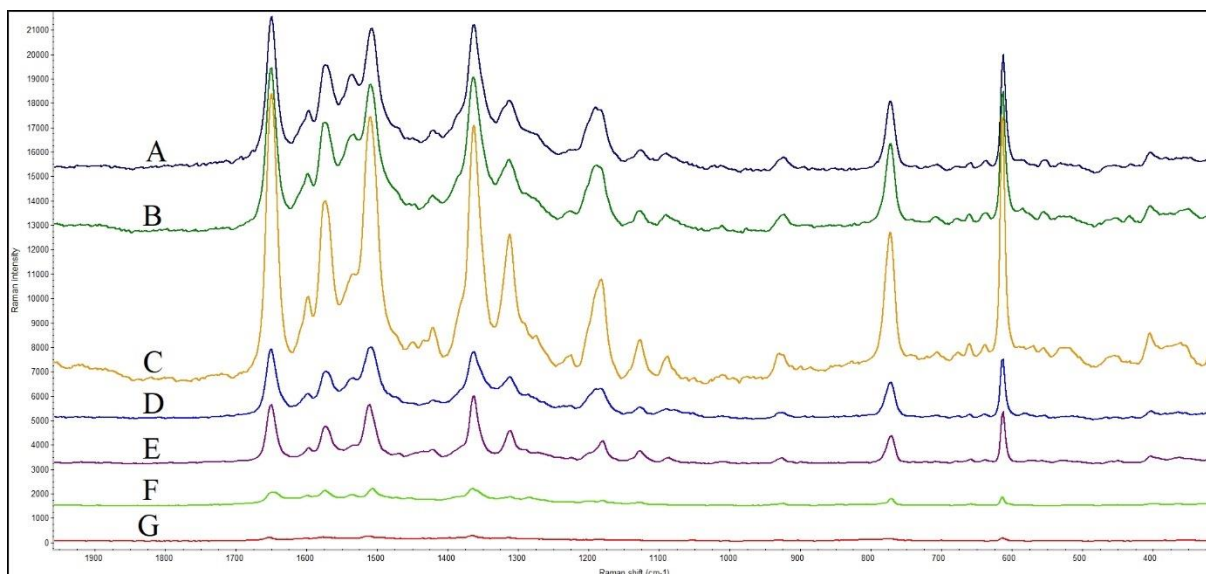
SERS-mittaukset suoritettiin ensin lasin päältä näytteestä, johon ei ollut lisätty KNO₃:a aggregaatiksi. Tämän jälkeen mitattiin näytteet, joihin KNO₃ oli lisätty. Niin aggregoimattomista kuin aggregoiduista näytteistä saatiin helposti mitattua kolme vahvinta R6G-näytettä. Laimemmilla liuoksilla aggregoinnista on selvästi hyötyä. Kun nanopartikkelit pakkautuvat lähemmäs toisiaan, tutkittava molekyyli löytyy todennäköisemmin mitattavista partikkelikimpuista. Mittaukset suoritettiin 532 nm laserilla ja mittaolosuhteissa objektiivi (50x), laserin voimakkuus (0,2 mW) ja valotustajuus (50 Hz) pysyivät samana kaikille näytteille. Mittaukset suoritettiin hyödyntämällä DXRxi-mikroskoopin kuvantamisominaisuutta, joka osoittautui varsin hyödylliseksi työkaluksi etenkin laimeiden liuosten mittauksessa. Kuvassa 28 on esitetty kuvantamisaluetta vastaavia kuvia 100 µM, 1 µM ja 10 nM näytteen mittauskohdista ja niitä vastaavat mikroskooppikuvat. Kuvantamiskuvissa nähdään hot spotit joko sinisinä tai punaisina kohtina nanopartikkeliryppäiden sisällä riippuen käytetyistä kuvankäsittelyparametreistä. Kuvantamisalueiden kuvissa nähtävät punaiset kohdat vastaavat valittua spektriä eniten. Spektrin valinnassa voidaan käyttää erilaisia säätimiä, joiden perusteella kuvan värit muuttuvat ja nähdään, missä kohtaa kuvannettua aluetta löytyy mahdollisesti samankaltainen spektri. Kuvannetulta alueelta voidaan esimerkiksi etsiä tiettyä piikkiä paikan, korkeuden tai leveyden avulla.

Ohjelmaan on myös mahdollista ladata vertailuspektri, jolloin kuvantamisalueelta etsitään samankaltaista spektriä. Jos alueelta löytyy asetettuja parametrejä vastaavia kohtia, ne näkyvät kuvassa punaisena. Siniset kohdat vastaavat parametrejä vähiten ja keltaiset kohdat ovat jotain tältä väliltä.

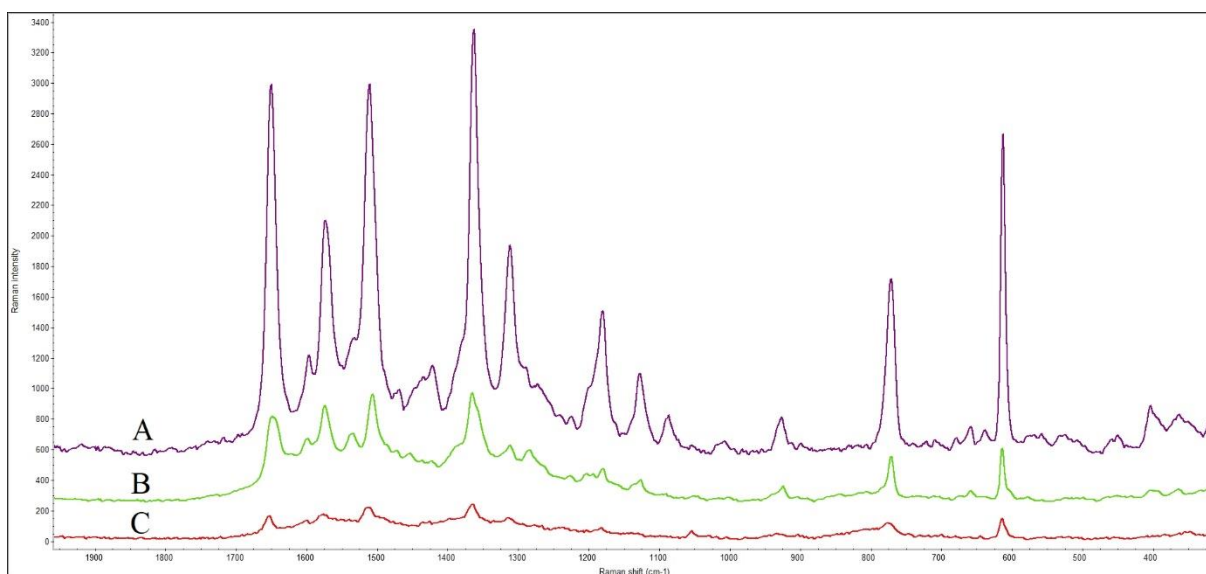


Kuva 28. Kuvantamalla tehdyt SERS-mittaukset A) 100 μM , B) 1 μM ja C) 10 nM liuoksista. Kohtien ylempi kuva esittää mikroskooppinäkömää mittauskohdasta ja alempi mittauskohtaa vastaava kuvantamisaluetta. A- ja B-kohdat on mitattu 50x-objektiivilla ja niissä hot spotit näkyvät sinisinä kohtina nanopartikkeliryppäiden sisällä. C-kohta on mitattu 20x-objektiivilla ja kyseisen liuoksen R6G-spektri on löydetty kuvantamiskuvassa vasemman yläkulman hot spotista punaisesta kohdasta.

Kuvassa 29 on esitetty Raman-spektrit kaikista kuvantamalla mitatuista R6G-laimennoksista ja kuvassa 30 näkyy kolmen laimeimman liuoksen spektrit.



Kuva 29. R6G-molekyylin vesiliuoksesta valmistettujen laimennosten Raman-spektrit vahvimhasta laimeimpaan: A) 1000, B) 100, C) 10, D) 1, E) 0,1; F) 0,01 ja G) 0,001 μM . Spekttrit on mitattu Raman-mikroskoopin kuvantamisominaisuudella, 532 nm laserilla ja 50x-objektiivilla (0,001 μM liuos mitattiin 20x-objektiivilla). Laserin teho ja valotustaajuus olivat samat kaikilla näytteillä: 0,2 mW ja 50 Hz.



Kuva 30. R6G-molekyylin vesiliuoksesta valmistetun laimennossarjan kolmen laimeimman liuoksen Raman-spektrit: A) 0,1; B) 0,01 ja C) 0,001 μM .

Kuvan 29 spektrit on skaalattu samaan intensiteettiasteikkoon, joten voidaan arvioida pitoisuuden vaikutusta SERS-spektriin. Kuvasta nähdään, että 10 μM näytteen spektrin Raman-intensiteetti on voimakkain, vaikka se ei ole pitoisuudeltaan vahvin näyte. Vahvemmat näytteet ovat niin vahvoja pitoisuuksiltaan, että ne mahdollisesti peittävät hopeakolloidin pinnan suurelta

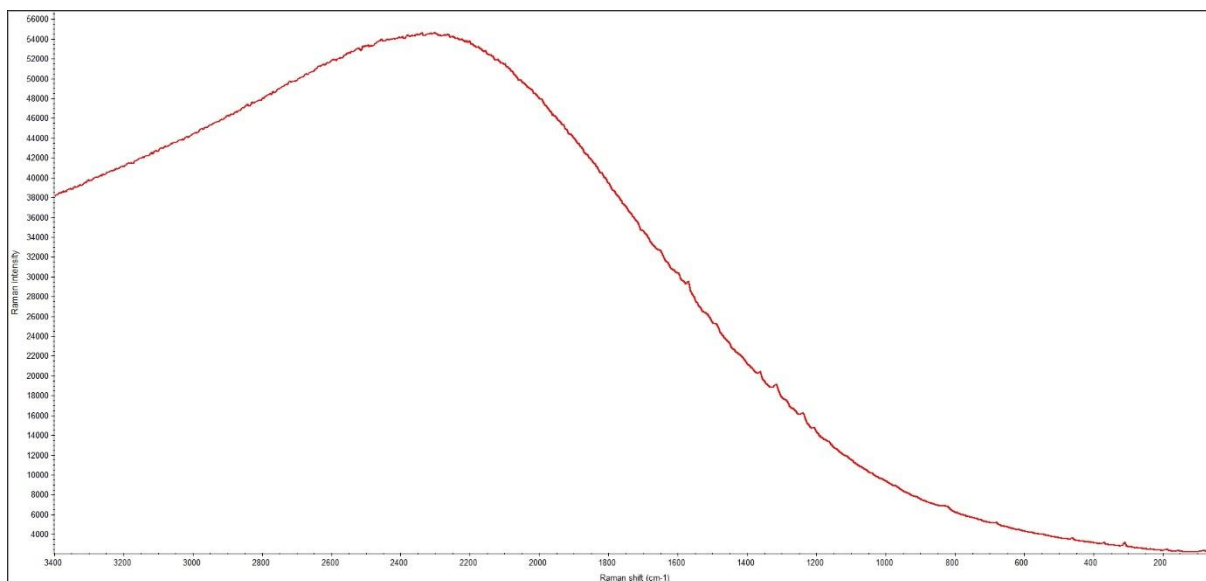
osin eikä pintaplasmoniresonanssi ilmenny voimakkaasti kerroksen läpi. Raman-sironnan intensiteetti on selvästi heikompi 10 μM laimeammilla liuoksilla. Kuvasta 30 voidaan nähdä, että vielä 0,1 μM liuksesta voidaan saada hyvä SERS-spektri. Kahdella laimeimmalla liuksella Raman-sironnan intensiteetti on jo huomattavasti alempi ja 1 nM liuksesta nähdään vain R6G:lle tyypilliset isoimmat piikit.

Kuvantamisalueiden kuvat tukevat mitattuja spektrejä. Näytteistä, joista saatiin mitattua hyvä SERS-spektri, voitiin kuvasta nähdä selvästi hot spottien paikkoja ja mittausta oli helppo ja nopea suorittaa. Kahdella laimeimmalla näytteellä kuvantamismittausten kesto kasvoi huomattavasti. Tämä johtui siitä, että hot spottien sijoittuminen kolloidiin oli harvempaa ja oikeiden hot spottien löytäminen kuvantamisalueelta oli vaikeaa. Laimeimmilla näytteillä jouduttiin siis kuvantamaan suurempia alueita, jotta spektri saatiin mitattua.

5.3.4 Spraymaalien SERS-tutkimukset

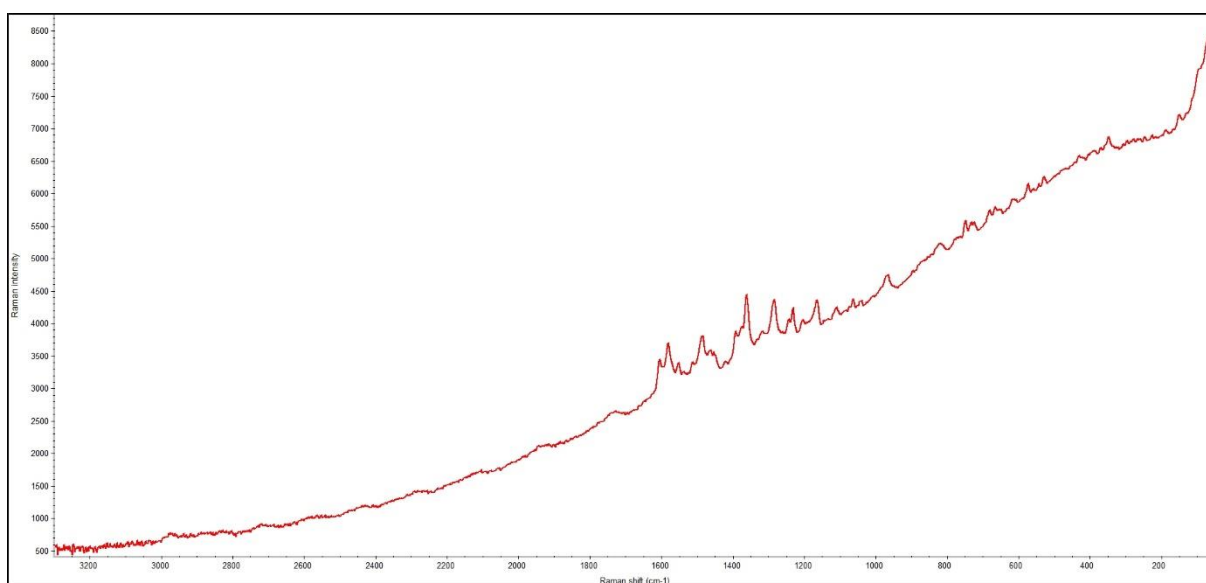
Ennen spraymaalien SERS-tutkimusta selvitettiin, kuinka punaisia, vaaleanpunaisia ja violetteja voidaan mitata DXRxi-Raman laitteella. Työssä käytettiin Rikosteknisen laboratorion spraymaalikirjastosta löytyneitä spraymaaleja. Nämä värit valittiin, koska punaisten värien mitaukset Ramanilla on oletettu haasteellisimmiksi niiden fluoresenssi- ja absorptio-ominaisuuksien perusteella.

Fluoresenssi voi nostaa Raman-spektrin pohjaviivaa niin paljon, että väristä syntyvät piikit jäävät pohjaviivan alle. Tämä vaikeuttaa spektrien vertailua, koska spektrissä näkyy joko spektrin suurimmat piikit tai piikkejä ei näy ollenkaan. Kuvassa 31 on esitetty NR-spektri punaiselle spraymaalille ja tämä on hyvin tyypillinen tilanne, kun punaisia spraymaaleja mitataan 532 nm laserilla. Fluoresenssia voidaan pienentää, kuten kappaleessa 2.2.2 on ilmaistu, vaihtamalla laser pidemmän aallonpituuden laseriksi.



Kuva 31. Voimakkaasti fluoresoivan punaisen spraymaalin NR-spektri lasilevyllä kuivatetun maalin päältä 532 nm laserilla. Voimakas fluoresenssi näkyy korkeana huippuna spektrissä.

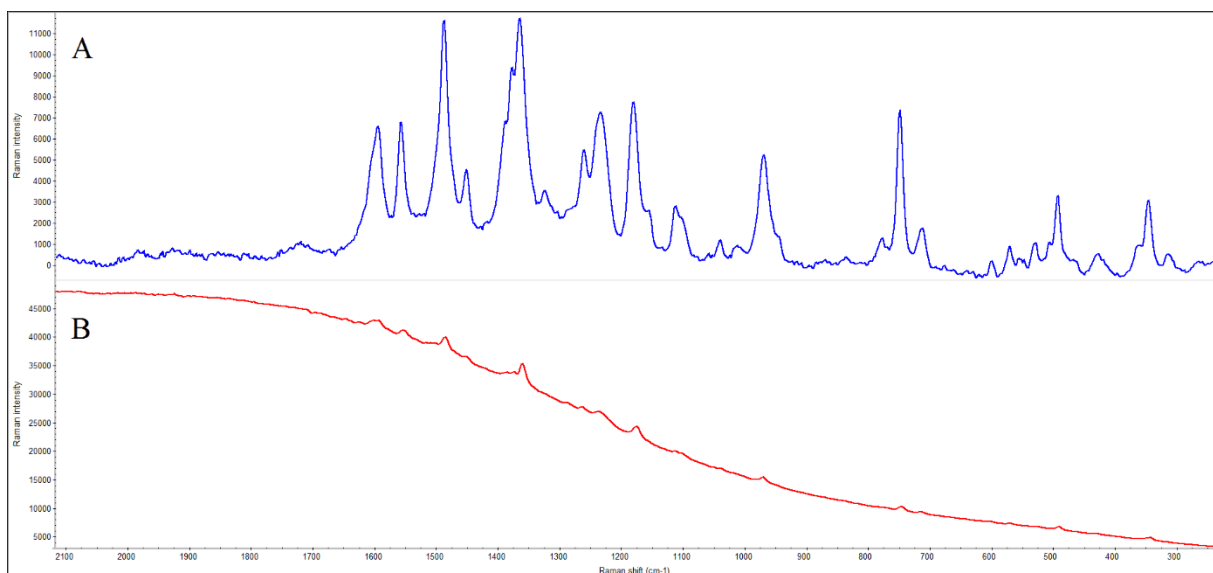
Rikosteknisellä laboratoriolla on käytössä toinen laser, aallonpituudella 780 nm, mutta myös pidemmän aallonpituuden laserilla on omat haasteensa punaisten maalien mittauksessa. 780 nm laser ei aiheuta yhtä paljon fluoresenssia kuin 532 nm laser, mutta väriaineiden Raman-sironta on yleensä heikompaa. Kuvassa 32 on esitetty punaisen spraymaalin esimerkksispektri mitattuna 780 nm laserilla. Tutkittavien värien ongelma ei rajoitu pelkästään spraymaaleihin, vaan NR-mittausten ja kolloidisynteesin jälkeen SERS-menetelmää sovellettiin spraymaalien lisäksi mm. punaisiin työkalumaaleihin.



Kuva 32. Punaisen spraymaalin NR-spektri lasilevyllä kuivatetun maalin päältä mitattuna 780 nm laserilla.

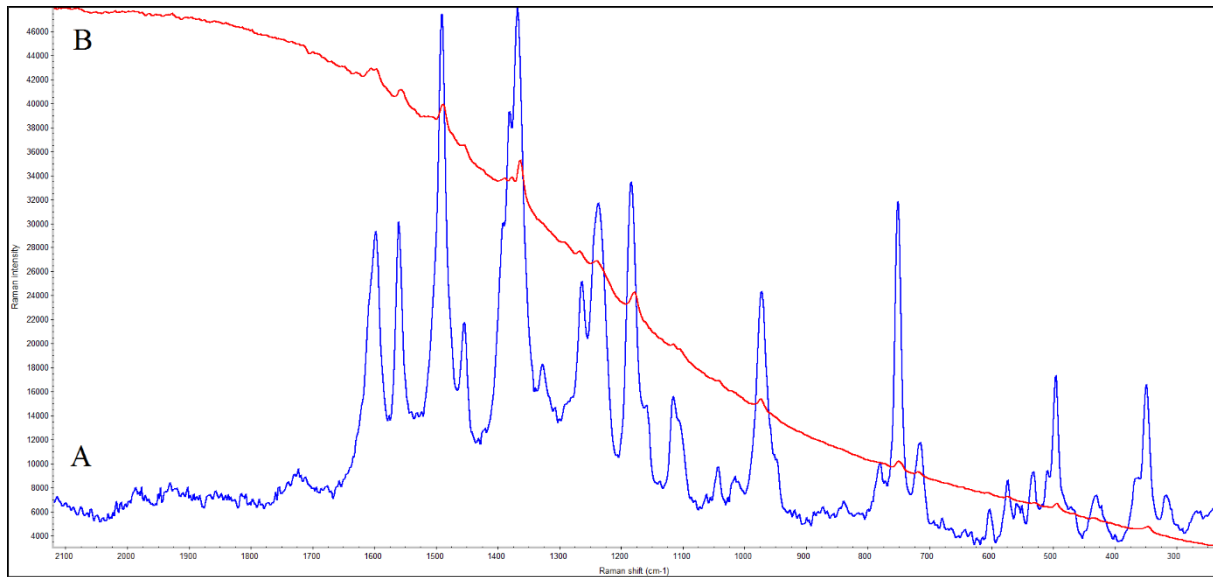
Alkumittauksissa tutkittiin myös erilaisten liuottimien liuotusominaisuuksia spraymaalien tapauksessa. Yksi vaihtoehto SERS-menetelmän mittauksessa on sekoittaa liuosmuodossa oleva näyte kolloidin kanssa. Tämän jälkeen seosta kuivatetaan pieni määrä lasilevyn päälle. Tähän vaihtoehtoon tarvitaan siis liuennutta maalia. Maalien liuottamiseen käytettiin lähinnä kahta liuotinta: asetonia ja metanolia. Nämä liuottimet valittiin siksi, että ne liukenevat pieninä määrinä veteen ja ne näin liukenivat hyvin kolloidiliuoksiin, jotka olivat vesiliuoksissa. Myös dikloorimetaania kokeiltiin, mutta oman haasteen tässä tapauksessa toi liuottimen liukenemattomuus veteen.

Alkumittausten jälkeen spraymaaleille tehtiin SERS-mittaukset. Näytteenvalmistus suoritettiin samoin kuin R6G-testeissä, jossa kolloidia, näytettä ja aggregaattia sekoitettiin suhteessa 4:2:2. Spraymaalien SERS-spektrit mitattiin perinteisellä manuaalisella tavalla, jossa mittauskohdat valittiin käsin. Mittausparametrit valittiin jokaisen spraymaalin kohdalla erikseen. Liitteessä 1 on esitetty taulukko, johon on kerätty käytettyjen spraymaalinäytteiden värit ja määrät. Kuvassa 33 on esitetty punaiselle spraymaalille SERS- ja NR-spektrit vertailtuna omilla intensiteettiasteikoillaan. Intensiteettiasteikolla tarkoitetaan yksikötöntä suuretta, jolla kuvataan mitatun molekyylin Raman-sironnan voimakkuutta. Mitä korkeamman intensiteetin molekyylin piikit saavat, sitä voimakkaammin sironna tapahtuu. Kuvassa 34 on esitetty samat spektrit päällekkäin intensiteettiasteikot maksimoituna.



Kuva 33. Punaisen spraymaalin SERS- (A) ja NR-spektrit (B) mitattuna 532 nm laserilla.

Vertailu omilla intensiteettiasteikoilla.



Kuva 34. Punaisen spraymaalin SERS- (A) ja NR-spektrit (B) mitattuna 532 nm laserilla.

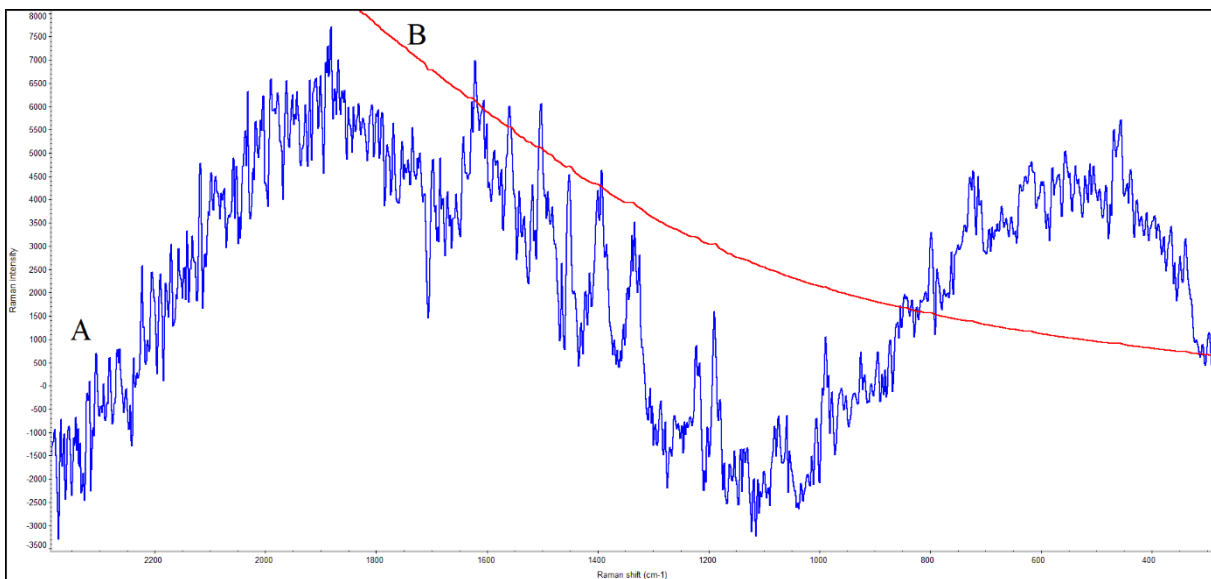
Vertailussa päällekkäin intensiteettiasteikko on maksimoitu kummassakin spektrissä.

Kuvista 33 ja 34 nähdään selvästi, kuinka punaisen spraymaalin spektri muuttuu NR- ja SERS-tekniikan välillä. NR-spektrissä nähdään voimakas fluoresenssi, joka nostaa signaalin intensiteetin yli 45000. NR-spektristä nähdään vain suurimmat piikit. Pienemmät piikit jäävät pohjaviivan peittämäksi. NR-spektrien vertailu samankaltaisista fluoresoivista näytteistä on mahdollista, mutta ei edullista. SERS-spektristä huomataan, että spraymaalin piikit tulevat paremmin esille ja ne erottuvat pohjaviivasta selvästi paremmin verrattuna NR-spektriin. Spektrien vertailun perusteella voidaan sanoa, että fluoresenssi ei häiritse juurikaan SERS-spektrissä.

Kuvissa 33 ja 34 on esitetty esimerkit ihanteellisesta tapauksesta, jossa punaisen spraymaalin väriainemolekyylit hyötyvät selvästi plasmoniresonanssista ja fluoresenssi vähenee. Kuvissa 35 ja 36 on esitetty tapaus punaisesta spraymaalista, jonka väriainemolekyylit ei pysty hyödyntämään plasmoniresonanssia läheskään yhtä voimakkaasti kuin edellä.



Kuva 35. Toisenlaisen punaisen spraymaalin SERS- (A) ja NR-spektrit (B) mitattuna 532 nm laserilla. Vertailu omilla intensiteettiasteikoilla.



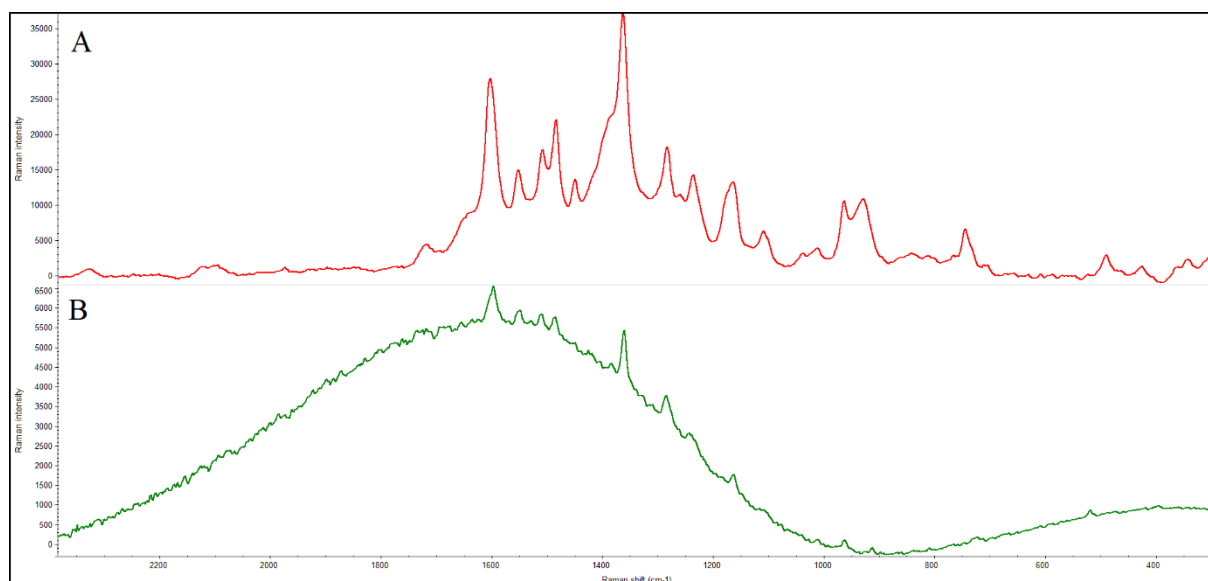
Kuva 36. Toisenlaisen punaisen spraymaalin SERS- (A) ja NR-spektrit (B) mitattuna 532 nm laserilla. Vertailussa päällekkäin intensiteettiasteikko maksimoitu kummassakin spektrissä. NR-spektri on siirretty vertailun vuoksi ylöspäin eikä se näy kokonaan.

Kuvan 35 NR-spektristä (B) nähdään, kuinka punainen spraymaali fluoresoi niin voimakkaasti, että siitä saadaan vain muutama pieni piikki näkyviin. Kuvassa 36 nähdään spektrien vertailua ja vertailun perusteella voidaan sanoa, että NR-spektrin suurimpien erottuvien piikkien paikoille löytyy vastaavia piikkejä SERS-spektrissä. SERS-spektristä huomataan, että väriainemolekyylille ei pysty hyödyntämään plasmoniresonanssia hyvin. Tässä tapauksessa fluoresenssia saadaan pienennettyä sen verran, että spektri saadaan paremmin esille kuin NR-spektrissä. Ei

voida kuitenkaan sanoa, että spektri olisi hyvä, koska fluoresenssia esiintyy edelleen ja pohjaviivan kohina on suurta.

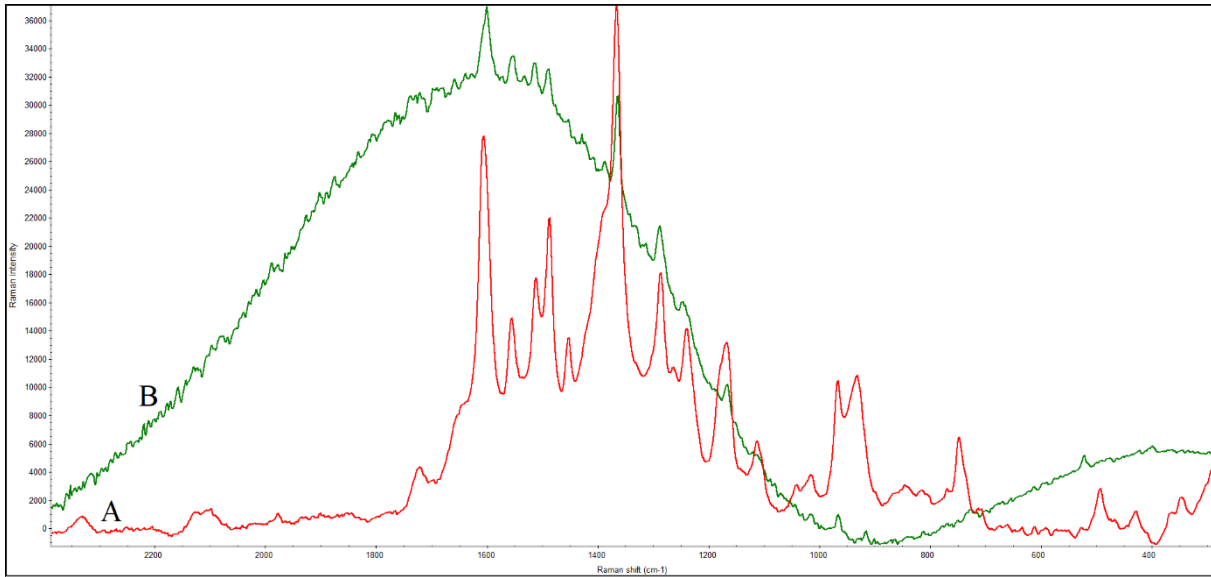
5.3.5 Työkalumaalien SERS-tutkimukset

Työkalumaalien tutkimus suoritettiin samoin kuin spraymaalien tapauksessa. Tutkitut työkalumaalit otettiin satunnaisella otannalla Rikosteknisen laboratorion työkalumaalikirjastosta. Tutkitut työkalumaalit olivat sorkkarautojen maaleja. Maalien liuottamisessa käytettiin samoja liottimia kuin spraymaalien tapauksessa. Jotkin sorkkarautojen maalit liukenivat hyvin asetoniin ja metanoliin, mutta otoksessa löytyi myös maaleja, jotka eivät lienneet käytettyihin liuottimiin. SERS-näytteet valmistettiin samoilla suhteilla kuin spraymaalien tapauksessa ja näytteenvalmistus tehtiin samoin, lasilevyn päälle pipetoiden. Kuvissa 37 ja 38 on esitetty yhdelle plasmoniresonanssia hyvin hyödyntävälle punaisen sorkkaraudan maalille esimerkkspektrit. Samoin kuin spraymaalien tapauksessa, sorkkarautojen maaleja pystytään mittaamaan SERS-tekniikalla. Mitatut työkalumaalit näkyvät liitteen 1 listassa.



Kuva 37. Punaisen sorkkaraudan SERS- (A) ja NR-spektrit (B) mitattuna 532 nm laserilla.

Vertailu omilla intensiteettiasteikoilla.



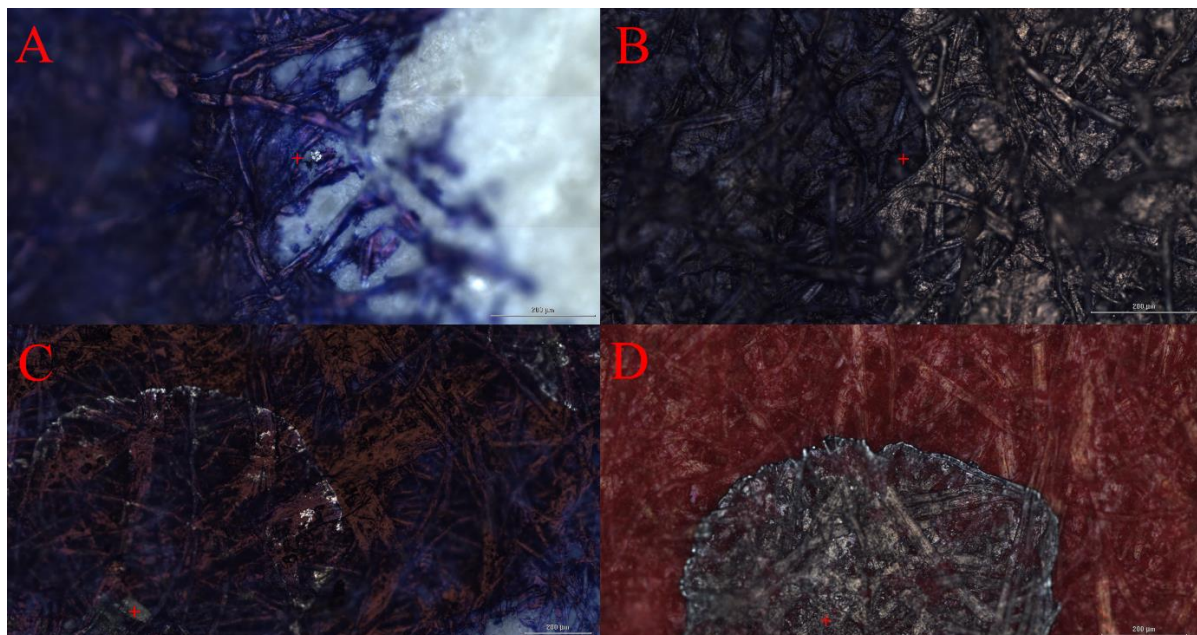
Kuva 38. Punaisen sorkkaraudan maalin SERS- (A) ja NR-spektrit (B) mitattuna 532 nm laserilla. Vertailussa päällekkäin intensiteettiasteikko on maksimoitu kummassakin spektrissä.

NR-spektri on siirretty vertailun vuoksi ylöspäin eikä se näy kokonaan.

5.3.6 Musteiden ja tussivärien SERS-tutkimukset

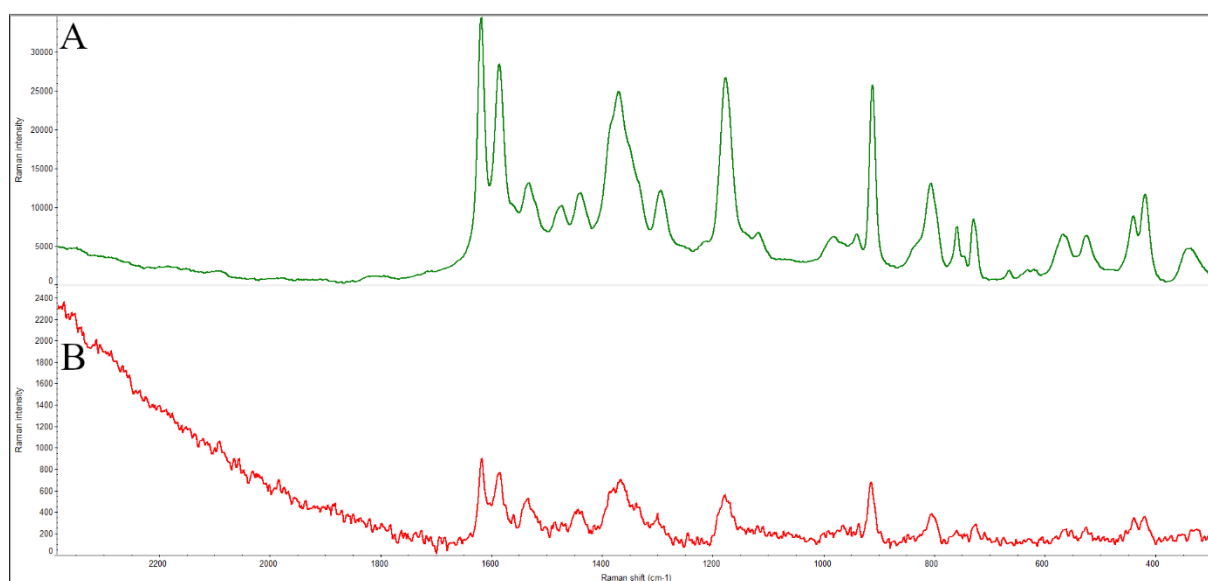
Musteiden ja tussien SERS-tutkimuksissa käytettiin pohjana Geiman *et al.*⁵¹ ja Saviello *et al.*⁵⁰ tutkimuksia. Kuulakärkikynien ja tussien SERS-tutkimukseen valittiin näytteet sattumanvaraisesti laboratoriotilojen työpöydiltä löytyneiden kynien joukosta. Liitteen 1 taulukkoon on kerätty käytetyt kuulakärkikynät ja tussit.

Musteiden ja tussivärien SERS-tutkimuksissa kokeiltiin, voidaanko kynällä paperin päälle piirretyn merkin päältä mitata musteen tai tussivärien Raman-spektri SERS-menetelmällä. Ennen SERS-mittauksia, näytteistä mitattiin vertailuspektrit NR-tekniikalla. Valmistetusta hopeakolloidista tehtiin ns. ”nanotahnaa” konsentroimalla kolloidia. Konsentroidi tehtiin sentrifugoidulla n. 5 ml kolloidia 15 min 20000 rpm nopeudella, minkä jälkeen supernatantti poistettiin lähes kokonaan ja nanopartikkelit suspensioitiin jäljelle jääneeseen vesimäärään. SERS-mittauksissa kolloidia pipetoitiin paperin päälle piirretyn merkin päälle pieni määrä (0,5-2 µl) nanotahnaa, annettiin sen kuivua ja mitattiin spektri kolloidin päältä. Menetelmän vaiheet on kuvattu kuvassa 19 (luku 4.2). Kuvassa 39 nähdään mikroskooppikameralla 20x-objektiivilla kuvattuja kuvia musteiden ja tussivärien päälle pipetoiduista nanotahna-kohdista.

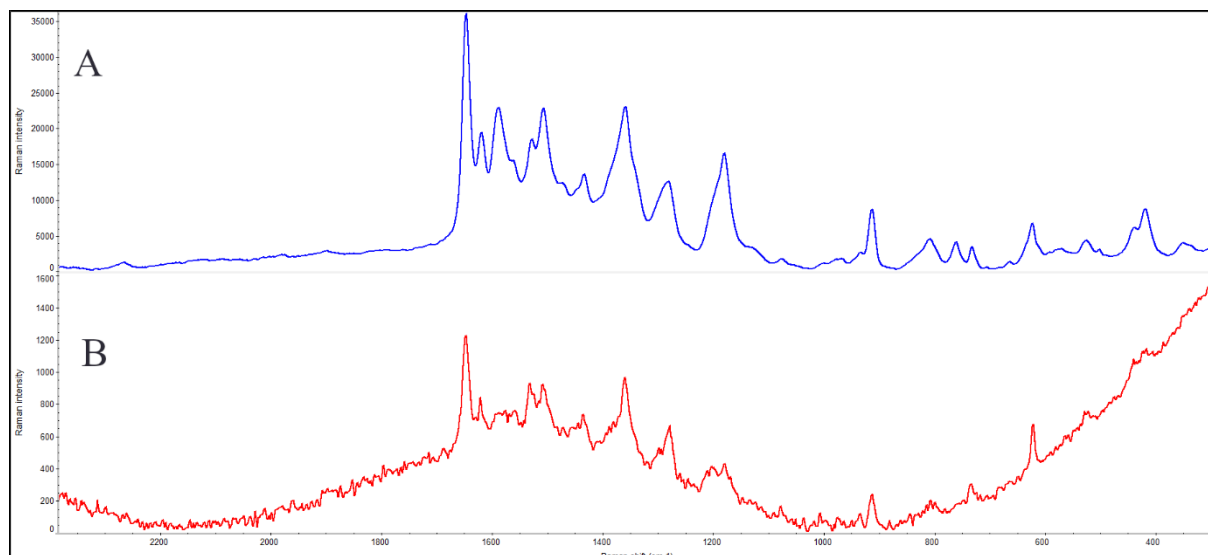


Kuva 39. Esimerkkikuva kuulakärkikynän (A), mustan tussin (B), geelikynän (C) ja punaisen tussin (D) päälle pipetoidusta nanotahna-kohdasta. Kuvat ovat kuvattu DXRxi-mikroskoopin kameralla 20x-objektiivilla.

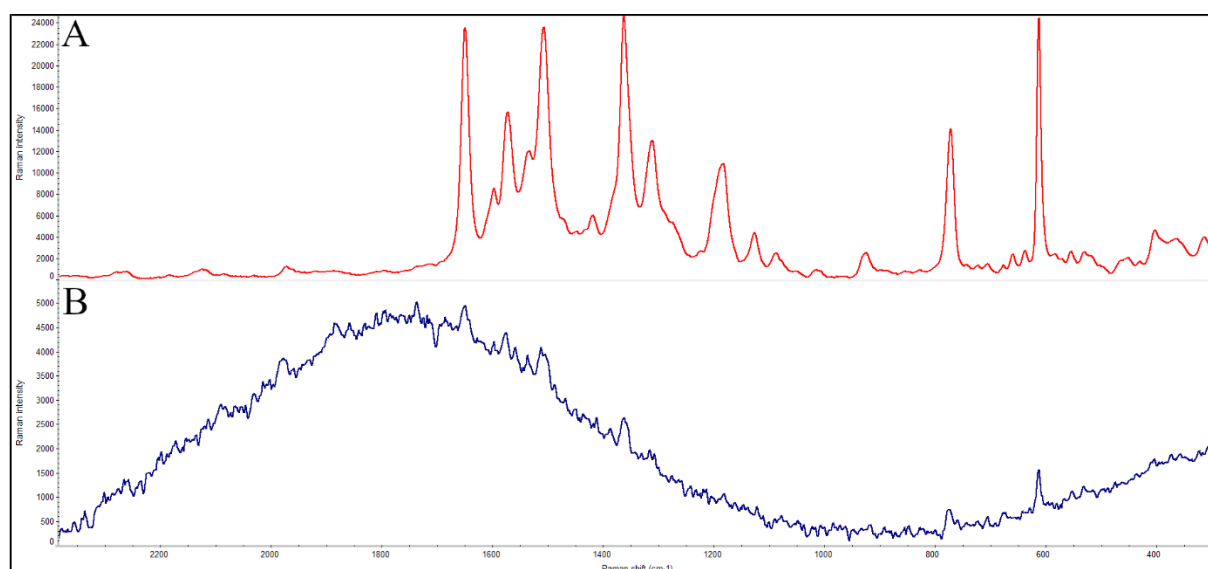
Nanotahna näkyy mikroskoopilla katsottaessa hopeisen värisenä kohtana. Kuulakärkikynän (kuva 39, A-kohta) viiva oli niin ohut, että nanotahna ei jäänyt kunnolla viivan päälle vaan imeytyi osin paperiin. Spektri pystyttiin kuitenkin mittaamaan helposti, vaikka hopeista kohtaa ei nähty selvästi. Kuvissa 40-42 on esitetty esimerkkejä kuulakärkikynän, mustan tussin ja punaisen tussin väriaineiden NR- ja SERS-spektreistä.



Kuva 40. Kuulakärkikynän sinisestä musteesta mitattu SERS- (A) ja NR-spektri (B). SERS-spektri mitattiin suoraan kuivuneen nanotahnan päältä mitattuna 532 nm laserilla.



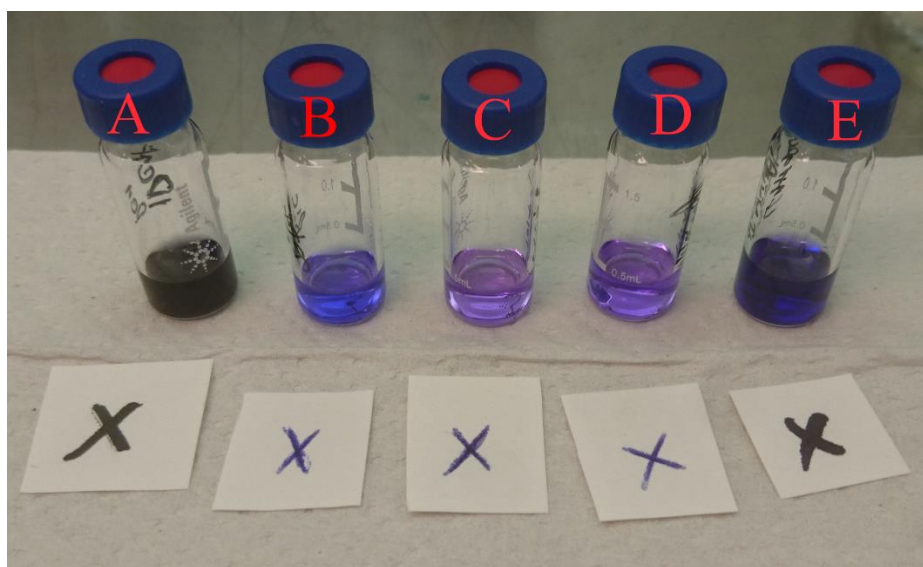
Kuva 41. Mustan tussin väriaineesta mitattu SERS- (A) ja NR-spektri (B). SERS-spektri mitattiin suoraan kuivuneen nanotahnan päältä mitattuna 532 nm laserilla.



Kuva 42. Punaisen tussin väriaineesta mitattu SERS- (A) ja NR-spektri (B). SERS-spektri mitattiin suoraan kuivuneen ”nanotahnan” päältä mitattuna 532 nm laserilla.

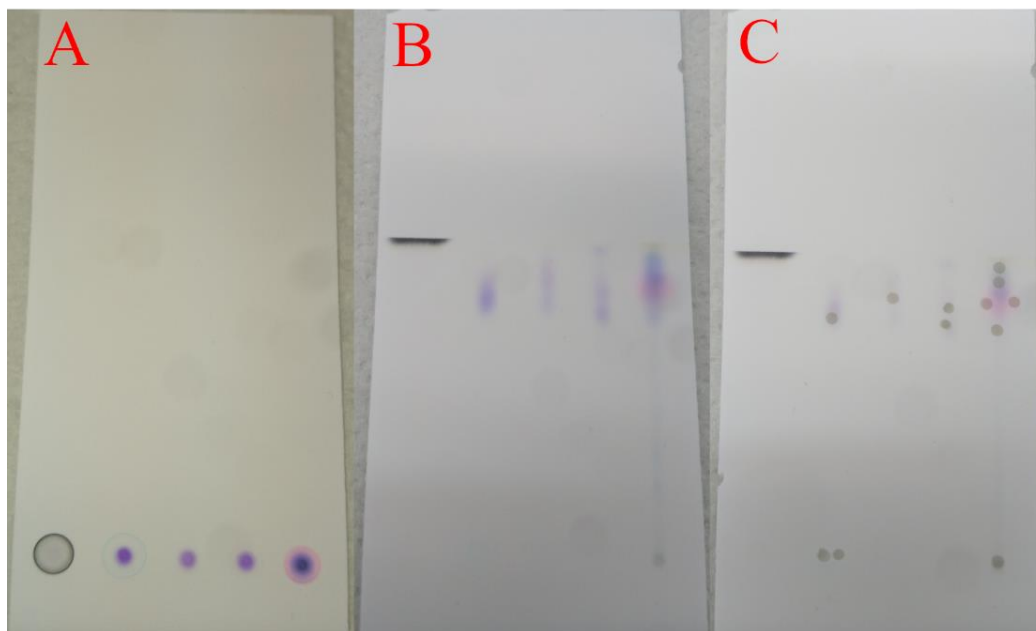
Kuulakärkikynän ja tussien spektrien vertailusta nähdään, kuinka piikkien intensiteetit vaihtelevat SERS- ja NR-spektrien välillä. Kuulakärkikynän ja mustan tussin spektreissä nähdään, että NR-tekniikalla saadaan väriaineelle tyypilliset piikit näkyviin, mutta piikkien intensiteetit eivät ole suuret ja pohjaviivan kohina haittaa mittauksissa. Spektrin perusteella myös musta tussi fluoresoi. Punaiselle tussille ei saada fluoresenssin takia hyvää spektriä NR-tekniikalla. Kaikkien väriaineiden SERS-spektrissä nähdään piikeille suuri intensiteetin nousu eikä spektreissä nähdä pohjaviivan kohinaa.

Edellisiä kokeita jalostettiin seuraavalle asteelle ja mukaan lisättiin ohutlevykromatografinen (TLC) lähestyminen musteiden ja tussien väriaineiden tutkimuksessa. TLC-testiin valittiin kolme kuulakärkikynää ja kaksi mustaa tussia. Kynillä piirrettiin rastit suodatinpaperille, minkä jälkeen värit uutettiin laimentamattomaan etanoliin pienissä lasisissa näytepulloissa. TLC-ajoissa käytettiin ajoliuoksena 70:35:30 suhteista etyyliasettaatti-etanoli-vesi -liuosta. TLC-ajokammioon laitettiin sopiva määrä ajoliuosta (noin puoli senttiä TLC-levyn ajoviivasta) ja annettiin liuoksen höyrystyä kammion sisällä rauhassa. Kuvassa 43 on esitetty TLC-kokeen alkuasetelma ennen TLC-mittauksia.



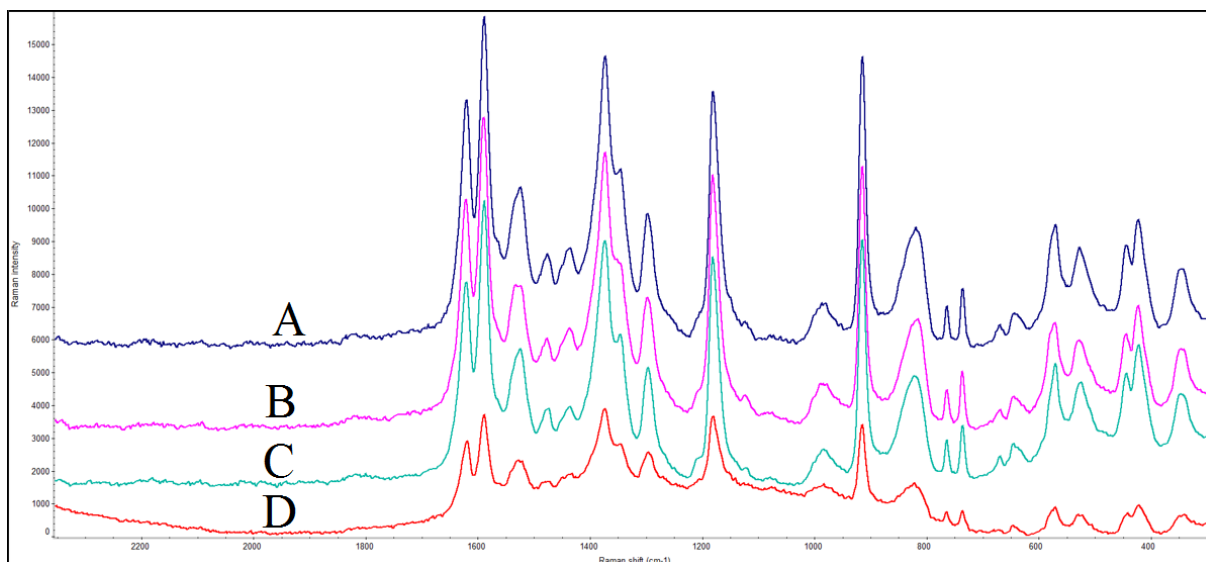
Kuva 43. TLC-SERS kokeen alkuasetelmat. Väriaineet ovat liuotettu papereilta etanoliin. A- ja E-kohdat ovat mustien tussien ja B-D -kohdat ovat sinisten kuulakärkikynien musteita ja väriaineita.

Uutetusta väriaineesta applikoitiin noin 5 µl ohuiden lasikapillaarien avulla TLC-levyn päälle pieni määrä kerrallaan niin, että mittauskohdat eivät levinneet laajoiksi ympyröiksi. Lisäysten välissä odotettiin hieman, että edellinen lisäys ehti kuivua. Kun kaikki applikoinnit oli tehty ja näytteiden annettu kuivua rauhassa, TLC-levy asetettiin ajokammion sisälle ja annettiin ajon tapahtua noin 15 min tai niin kauan, kun oltiin tyytyväisiä ajon tuloksiin. Väriaineiden erottamista ei enää huomattu 15 min ajon jälkeen. Ajon jälkeen TLC-levy otettiin pois ajokammion sisästä ja annettiin kuivua. Väriaineiden SERS-mittaus suoritettiin periaatteeltaan samoin kuin paperin päälle piirretyistä merkeistä. Nanotahnaa pipetoitiin 2 µl TLC-levyn päälle niille kohdille, mistä väriaine haluttiin mitata. Kuvassa 44 on esitetty TLC-levyt ennen ajoa, ajon jälkeen ja nanotahnan lisäyksen jälkeen.



Kuva 44. Kuulakärkikynien musteiden ja tussien väriaineiden ohutlevykromatografinen ajo. Näytteet applikoitiin levyn päälle (A), suoritettiin ajo (B) ja applikoitiin nanotahna väriaineiden päälle (C) haluttuihin mittauskohtiin. Näytteet on applikoitu samassa järjestyksessä kuin ne näkyvät kuvassa 43 eli reunimmaiseta täplät vastaavat mustia tusseja, ja näiden välissä on kuulakärkikynien musteet.

TLC-ajot onnistuivat hyvin. Kuulakärkikynien ja toisen mustan tussin värit kulkeutuivat hyvin ajoliuoksen mukana ja mustan tussin värit erottuivat. Vasemmalta katsottuna, ensimmäisen kuulakärkikynän musteessa erottuu selvästi kaksi väriainetta. Toisen mustan tussin väriaineet eivät erottuneet, koska ajoliuos oli tämän koostumukselle vääränlainen. SERS-spektrit ajettiin applikoitujen nanotahna-kohtien kohdalta. Kaikista näytteistä saatiin samanlainen SERS-spektri (kuva 45). Mustasta tussista ei saatu mitattua toista, selvästi punaisemman, väriainekohdan spektriä. Punaisempi kohta fluoresoi nanotahnasta huolimatta niin voimakkaasti, ettei spektriä saatu mitattua. Myös vasemmalta ensimmäisen kuulakärkikynän vaaleansinistä väriainetta yritettiin mitata (C-levy, kaksi vierekkäistä täplää mittauksen alkukohdassa), mutta siitäkään ei saatu mitattua spektriä.



Kuva 45. TLC-SERS -mittausten spektrit, joista A-C kohdat ovat kuulakärkikynien spektrejä, ja D-kohta kuvaa mustan tussin spektriä mitattuna 532 nm laserilla.

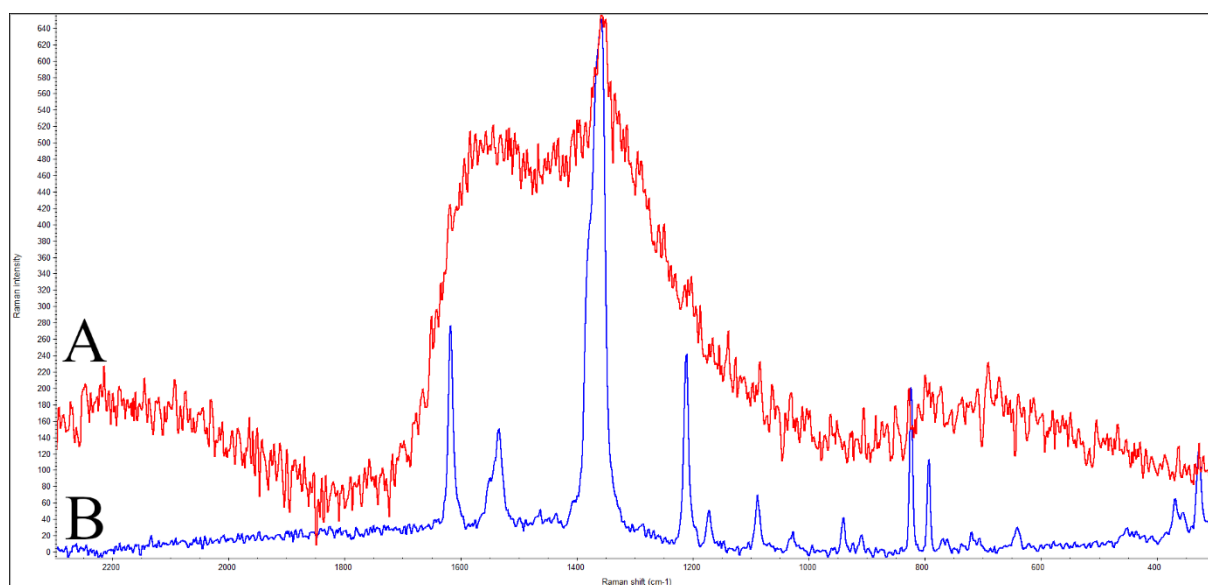
5.3.7 Räjähdeaineiden SERS-tutkimukset

Räjähdeaineiden SERS-tutkimus rajoitettiin yhteen räjähdeaineeseen, trinitrotolueeniin (TNT). TNT valittiin, koska se on eniten tutkittu räjähdeaine SERS-tekniikalla. Bulkki-TNT saatiin Rikosteknisen laboratorion vertailuainekokoelmasta. TNT-hiutaleet jauhettiin huumareessa hienoksi jauheeksi, josta valmistettiin 1000 μM kantaliuos asetoniin. Kantaliuoksesta laimennettiin 1 μM liuos, joka toimi tutkittavana näytteenä SERS-tutkimuksissa. TNT:n SERS-tutkimus ei juurikaan poikennut väriaineiden tutkimuksesta, koska näytteen valmistus tehtiin samoin, sekoittamalla kolloidia, tutkittavaa näytettä ja aggregaattia keskenään. Erona väriaineiden tutkimukseen oli se, että aggregointiaineena käytettiin 0,6 M NaCl -liuosta ja sekoitussuhteet olivat erilaiset.

TNT:n SERS-tutkimuksissa käytettiin substraatteina itse valmistettua hopeakolloidia ja kaupallista 50 nm kokoista kultakolloidia (Nanopartz™). TNT-molekyylin 1 μM liuosta yritettiin tutkia suoraan liuoksesta sekoittamalla sitä kolloidin ja aggregaatin kanssa. Näytteet valmistettiin suhteessa 8:1:1 kolloidia, NaCl:a ja näytettä, jolloin näytteen viimeinen pitoisuus voidaan ilmoittaa 1/10 laimennettuna, jos niin halutaan.

Kuvassa 46 on esitetty 1 μM TNT-liuoksen SERS-spektri ja bulkki-TNT:n NR-spektri skaalattuna samaan kuvaan. Kuvasta nähdään, että TNT:n SERS-spektrissä ilmenee ainoastaan yksi

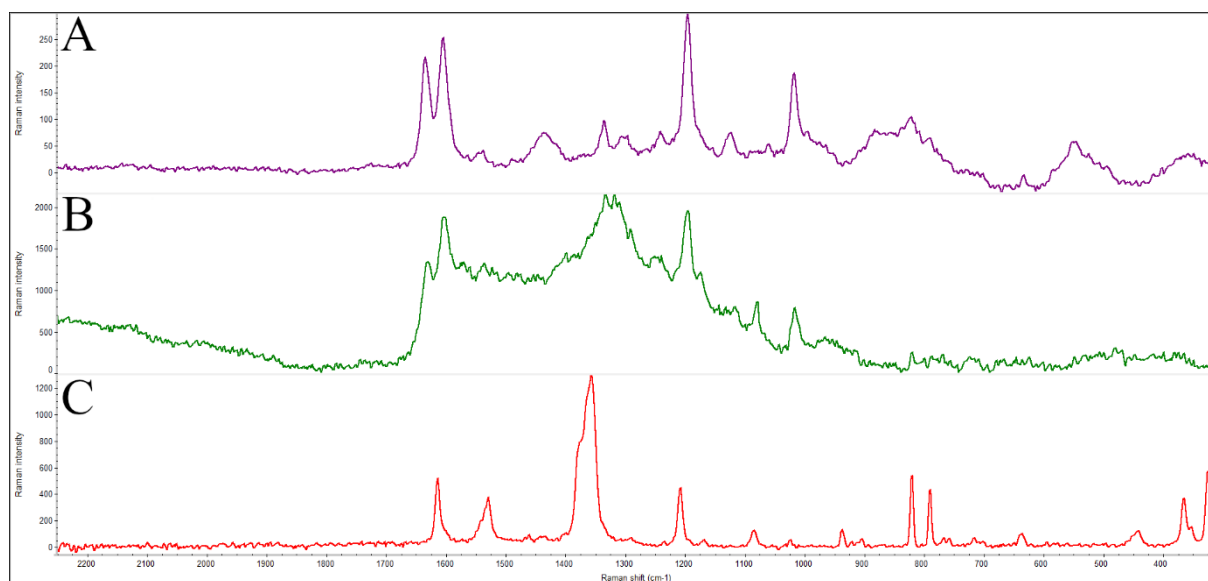
tunnistettava piikki aaltoluvulla 1360 cm^{-1} , joka vastaa NO_2 -ryhmän symmetristä venytysvärähtelyä. Tulos vastaa hyvin luvussa 4.3 esitettyjä havaintoja hopeakolloidin toiminnasta TNT-molekyylin SERS-tutkimuksissa. SERS-näytteen sekoitussuhteita vaihdeltiin ja kokeiltiin vaikuttavatko sekoitussuhteet TNT-molekyylin ilmentymisessä. Todettiin usean yrityksen jälkeen, että kuvan 46 spektri vastaa hopeakolloidilla saatavaa SERS-spektriä TNT:lle. SERS-spektristä voidaan myös erottaa kohoumia vastaamaan bulkki-TNT:n spektrin muista piikeistä, mutta nämä eivät ole vertailtavissa, koska ne jäävät osittain pohjan kohinan alle.



Kuva 46. Hopeakolloidin kanssa mitatun $1\ \mu\text{M}$ TNT-liuoksen SERS-spektri (A) ja bulkki-TNT:n NR-spektri (B) mitattuna 532 nm laserilla. Spektrit on skaalattu samaan kuvaan ja intensiteettiasteikko vastaa SERS-spektrin intensiteettiä.

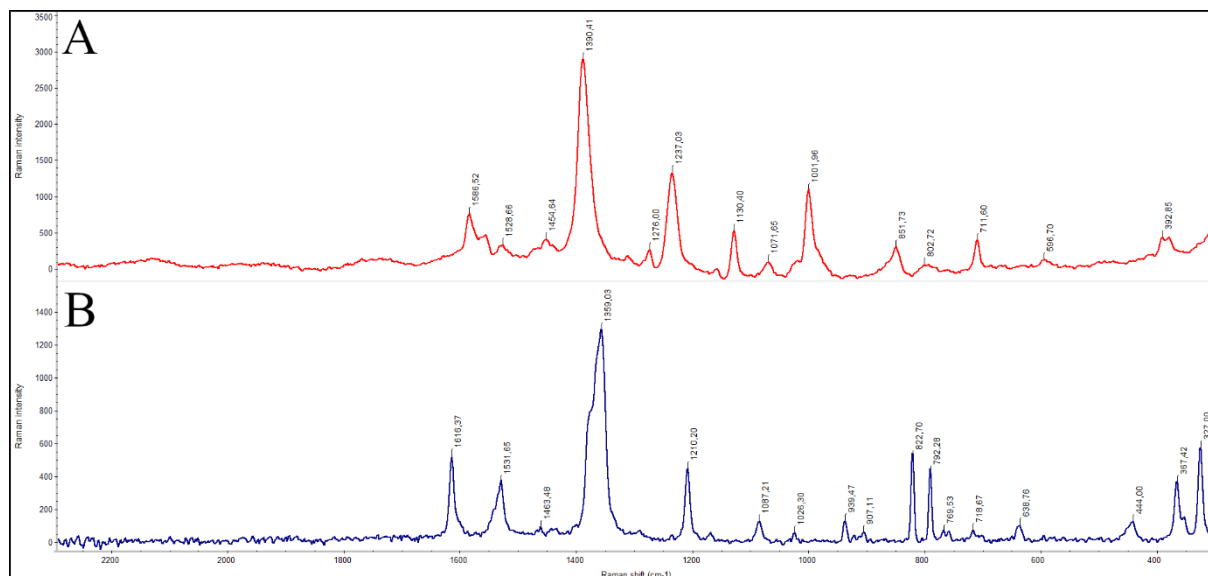
Hopeakolloidin lisäksi kokeiltiin kaupallisen 50 nm kokoisen kultakolloidin toimivuutta TNT:n SERS-määrittämisessä. Kuvassa 47 on esitetty $100\ \mu\text{M}$ TNT-liuoksen SERS-spektri, bulkki-TNT:n spektri ja kultakolloidin taustaspektri mitattuna 780 nm laserilla omilla intensiteettiasteikoillaan. Näytteet valmistettiin suhteessa 8:1:1, kuten edellä ja aggregaattina käytettiin NaCl :a. Kuvasta 47 nähdään kaupallisten tuotteiden käytöstä syntyviä ongelmia. Kaupallisiin tuotteisiin on lisätty erilaisia kolloidista stabiloivia yhdisteitä, joita ei itse tehdyssä kolloidissa ole. Nämä yhdisteet saattavat tulla näkyviin tilanteissa, joissa tutkittava molekyyli ei pysty liittymään tehokkaasti kolloidin pinnalle eikä näin syrjäytä stabiloivaa molekyyliä. Kuvan 47 A-spektri vastaa mittauksen taustaa ja se on mitattu kolloidin ja NaCl :n seoksesta. Kuvan 47 B-spektri vastaa varsinaista näytettä ja spektristä nähdään selvästi, että taustan piikit tulevat eniten

esille. Bulkki-TNT:n spektri on esitetty kuvan 47 C-kohdassa. Bulkki-TNT:lle tyypillisiä piikkejä voidaan tunnistaa SERS-spektristä vain yksi, aaltoluvulla n. 1085 cm^{-1} .



Kuva 47. Kaupallisen 50 nm kokoisen pyöreän kultakolloidin kanssa mitatun $100\ \mu\text{M}$ TNT-liuoksen SERS-spektri (B), bulkki-TNT:n NR-spektri (C) sekä mittauksen taustaspektri (A) (kultakolloidi + NaCl). Spektrit on mitattu 780 nm laserilla.

Käsittlemättömän TNT:n SERS-mittauksien jälkeen kokeiltiin Zhang *et al.*⁵⁴ tutkimuksessa käytettyä menetelmää, jossa $1\ \mu\text{M}$ TNT-liuoksen pH säädettiin arvoon 13 $1\ \text{M}$ NaOH-liuoksella ja tästä liuksesta mitattiin hopeakolloidin avulla SERS-spektri. Liuoksen väri muuttui prosessissa kirkkaasta hieman kellertäväksi. SERS-näytteen valmistus tehtiin samoin kuin aikaisemmin TNT-mittauksissa eli suhteessa 8:1:1. SERS-spektri mitattiin 780 nm laserilla. Kuvassa 48 on esitetty bulkki-TNT:n NR-spektri ja pH arvoon 13 säädetyn TNT-liuoksen SERS-spektri. Zhang *et al.*⁵⁴ artikkelissa esitettiin (luku 4.3), että pH arvoon 13 säädetyn TNT:n SERS-spektrissä nähtiin pääpiikit aaltoluvuilla 1390 , 1238 ja 1006 cm^{-1} . Itse mitatusta SERS-spektristä nähdään, että siitä löytyy lähes samoilla aaltoluvuilla piikit eli 1390 , 1237 ja 1002 cm^{-1} . Kuvan 48 mitattu SERS-spektri vastaa muutenkin profiililtaan kuvassa 20 näkyvää spektriä.

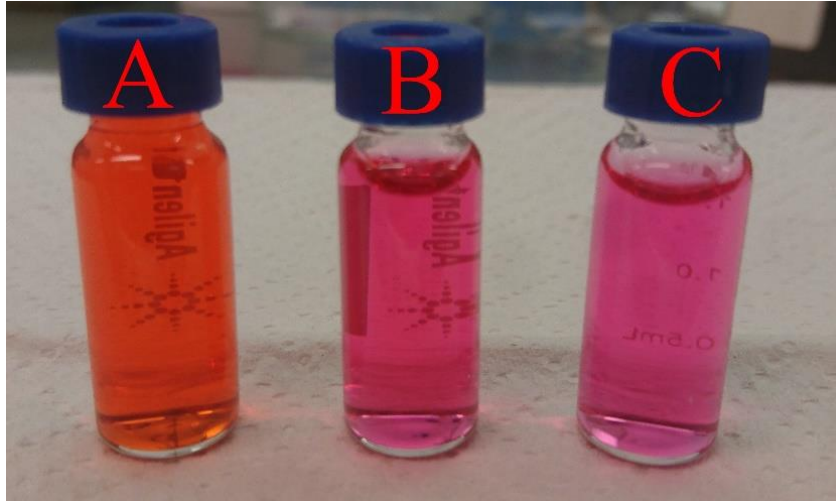


Kuva 48. pH arvoon 13 säädetyin 1 μM TNT-liuoksen hopeakolloidia käyttämällä saatu SERS-spektri (A) ja vastaavasti bulkki-TNT:n NR-spektri (B) mitattuna 780 nm laserilla.

5.3.8 SERS esimerkki forensisessä tutkimuksessa

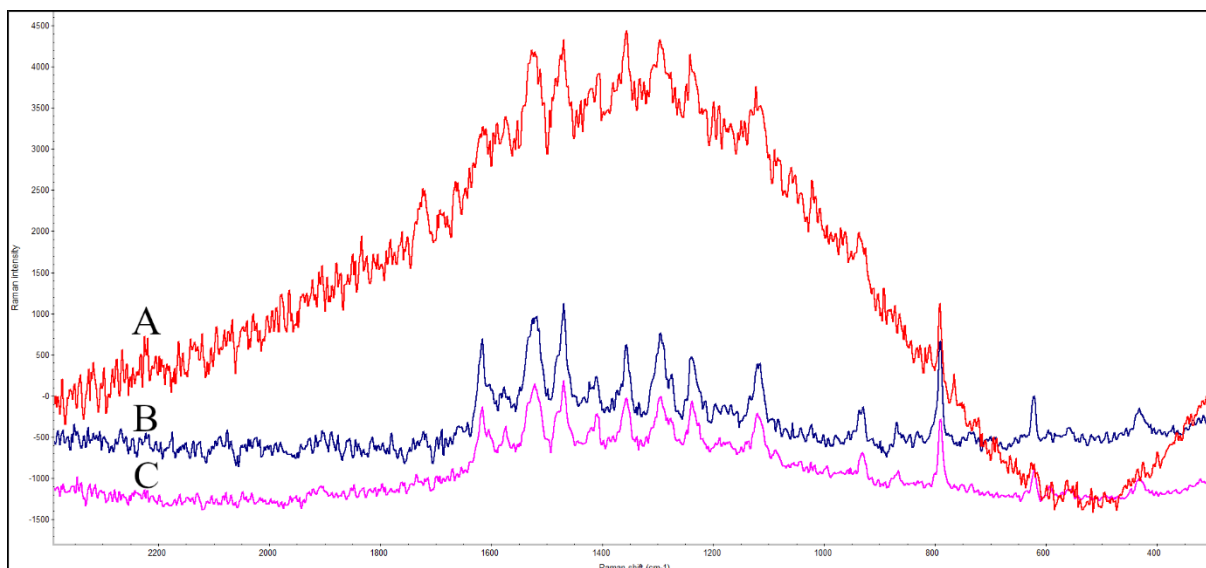
SERS-tekniikkaa sovellettiin muutamaa Rikostekniseen laboratorioon tulleeseen oikeaan rikostutkimukseen liittyvään työhön. Tässä luvussa kerrotaan yhden tällaisen työn esimerkki.

Työn lähtökohdat olivat, että vesistöön oli päässyt valumaan ainetta, joka oli värjänyt vesistön punaiseksi. Työssä kysyttiin mitä vesistöön valunut aine on ja onko se vesistölle vaarallista. Työn esitietojen pohjalta rajattiin mahdollisia väriaineita muutamaa esimerkkiaineeseen (basic red 14 ja 49), joita verrattiin tuntemattoman aineen valumapaikalta taltioituun punaiseksi värjättyyn kaivoveteen. Väriaineita laimennettiin ensin niin, että ne vastasivat sävyltään kaivovesinäytteen väriä ja niitä verrattiin toisiinsa värin perusteella (kuva 49). Kuvasta 49 nähdään, että basic red 49 -väriaineen väri näyttää silmin katsottuna kaivovesinäytteen väriltä ja basic red 14 -väriaineella väri on täysin erilainen.



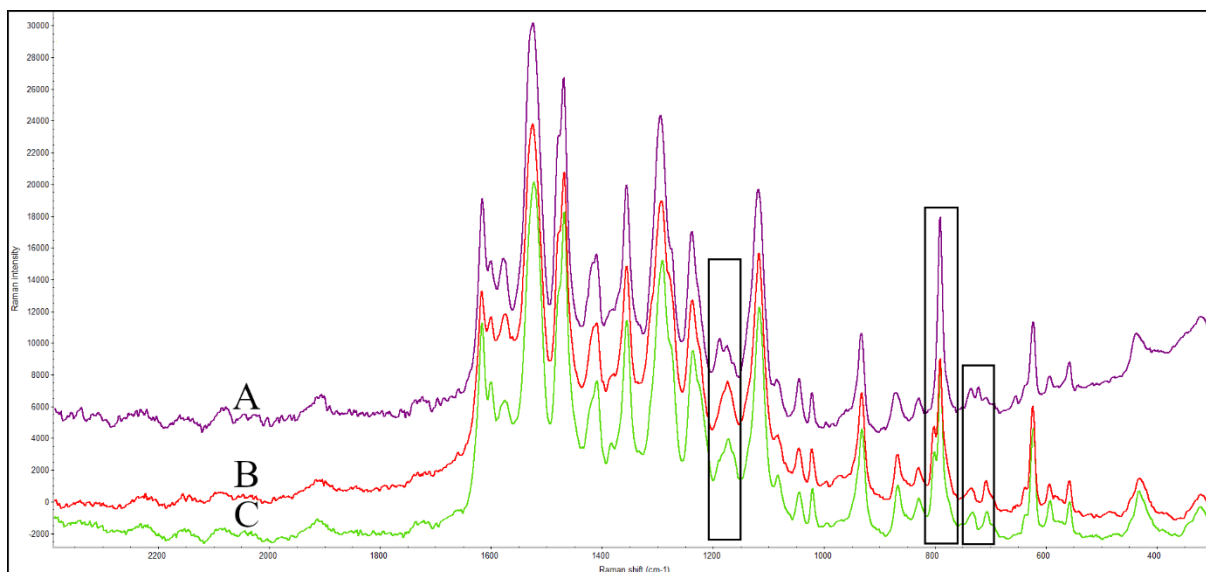
Kuva 49. Vertailuväriaineiden ja kaivovesinäytteiden visuaalinen vertailu. Kaivovesinäyte (C) on laimentamaton ja vertailuväriaineet laimennettiin vastaamaan kaivovesinäytteen vahvuutta. A-kohdassa on basic red 14 ja B-kohdassa basic red 49 -väriaineiden laimennetut näytteet.

Visuaalisen vertailun lisäksi näytteet mitattiin NR-tekniikalla ja tämän jälkeen SERS-tekniikalla. Näytteistä tehtiin petrimaljalle haihdutusjäännös NR-tekniikkaa varten. SERS-mittaukset ja näytteenkäsittelyt tehtiin samoin kuin aikaisemmin on esitetty värien mittausten tapauksissa. Kuvassa 50 on esitetty NR-tekniikalla mitattujen näytteiden spektrit. Kyseisen kuvan perusteella voitiin todeta jotain väriaineiden samanlaisuudesta. NR-spektreistä nähdään, että kuivaetuista näytteistä ei saatu mitattua hyvää spektriä, koska pohjaviivan kohina oli voimakasta eikä piikkien intensiteetti erottunut selvästi pohjaviivasta. Kaivovesi ja basic red 49 -väriaine käyttäytyivät samankaltaiseksi NR-mittauksissa, kun taas basic red 14 -väriaineella fluoresenssi oli voimakkaampaa ja spektrin pohjaviiva nousi selvästi enemmän. Myös spektrien piikit vastasivat paremmin toisiaan kaivoveden ja basic red 49 -väriaineen tapauksissa. Toisaalta spektrien vertailu oli hankalaa taustan kohinan takia.



Kuva 50. Kaivovesinäytteen (B) sekä basic red 49 (C) ja basic red 14 (A) -väriaineiden NR-spektrit mitattuna 532 nm laserilla.

Kuvassa 51 on esitetty näytteiden SERS-spektrit. SERS-spektreistä huomataan, että kaikille näytteille saatiin parannettua Raman-sironnan intensiteettiä huomattavasti ja spektrien vertailu oli helpompaa kuin edellä NR-spektrien tapauksessa. Kaupallisten väriaineiden SERS-spektrit osoittautuivat hyvin samankaltaisiksi (kuva 51, A- ja C-spektrit), mutta niistä löytyy hieman eroja aaltoluvuilla 1200-1150, 825-750 ja 750-700 cm^{-1} . Kaivovesinäytteen SERS-spektristä (kuva 51, B-kohta) nähdään, että se on samankaltainen kuin kaupallisten väriaineiden spektrit. Vertailtaessa spektrejä tarkemmin, kaivovesinäytteen nähdään osuvan basic red 49 -väriaineeseen. Kaivovesinäytteen spektrissä nähdään samat erot basic red 14 -väriaineeseen kuin nähtiin basic red 49 -väriaineella.



Kuva 51. Kaivovesinäytteen (B) sekä basic red 49 (C) ja basic red 14 (A) -väriaineiden SERS-spektrien vertailu. Spektrien eroavaisuudet näkyvät aaltoluviilla 1200-1150, 825-750 ja 750-700 cm^{-1} . Vertailtavat kohdat on merkitty mustien laatikoiden sisälle.

Forensisissä vertailututkimuksissa arvioidaan näytteiden samankaltaisuutta erilaisten menetelmien avulla. Lopputuloksena kirjoitettavassa lausunnossa arvioidaan mahdollisuutta sille, että epäilty näyte on samankaltaista tai erilaista materiaalia kuin vertailunäyte on. Jos väriaineiden samankaltaisuus lausuttaisiin vain Raman-tulosten perusteella, voitaisiin kaivovesinäytteen väriaineen sanoa olevan samankaltainen kuin basic red 49 -väriaine. Normaalisti tulos arvioidaan tutkimusten summana mm. Raman-, FTIR- ja TLC-mittaustulosten perusteella.

6 Yhteenveto ja johtopäätökset

Työn kirjallisuusosassa käytiin kattavasti läpi Raman-spektroskopiaa ja SERS-menetelmään liittyvät keskeisimmät ilmiöt. Kummankin tekniikan tarkastelu aloitettiin matemaattisella teoriolla. Raman-spektroskopian kohdalla tarkasteltiin tämän lisäksi menetelmään liittyviä häiriöitä ja laitteiston rakennetta. SERS-menetelmässä tarkasteltiin substraattien, hot spottien ja aggregaation merkitystä SERS-ilmiön ilmentymisessä. Raman- ja SERS-teorian lisäksi tarkasteltiin kirjallisuudesta löytyneiden esimerkkien avulla SERS-menetelmän käyttömahdollisuuksia väriaineiden (maalit, musteet ja kuitujen väriaineet) ja räjähdäaineiden tutkimuksissa.

Kokeellisen työn suoritus aloitettiin hopeakolloidien synteesillä. Työssä valmistettiin kaksi hopeakolloidierää. Kolloidiliuosten laadunvarmistuksena käytettiin UV/Vis-spektrofotometriaa ja

pyyhkäiselektronimikroskopiaa. Kolloideista mitattiin muutaman kuukauden välein UV/VIS-spektrit, joista tarkasteltiin kolloidiliuoksen absorptiomaksimia. Liuosten absorptiomaksimit vastasivat kirjallisuudessa esitettyjä arvoja. Kolloidit mitattiin pyyhkäiselektronimikroskopiolla, jolla saatiin mitattua nanopartikkelikasaumien kooksi noin 500 nm. Yksittäisen nanopartikkelin kokoa ei saatu mitattua. Laadunvarmistusmittausten perusteella voidaan sanoa, että synteesit onnistuivat hyvin.

Kolloidin kykyä ilmentää plasmoniresonanssia ja näin soveltuvuutta SERS-menetelmän toimintaan kokeiltiin seuraavaksi. R6G-molekyylistä valmistetuista vesiliuoksista mitattiin SERS-spektrit käyttämällä Raman-mikroskoopin kuvantamisominaisuutta. Kuvantaminen osoittautui hyväksi työkaluksi hot spottien määrittämiseksi kuivatetuista näytteistä. Hot spotit pystyttiin nähdä kuvantamalla helpommin vahvoista liuoksista. Laimeimmilla liuoksilla kuvantamisalueiden kokoja täytyi kasvattaa, koska hot spotteja esiintyi vähemmän liuoksien pitoisuuksien pienentyessä. Johtopäätöksenä SERS-mittausten suorittamisesta on, että vahvimmista liuoksista saadaan mitattua SERS-spektri ilman kuvantamista ja laimeimpien näytteiden kohdalla suositellaan kuvantamisen käyttämistä.

Tämän jälkeen siirryttiin punaisten spray- ja työkalumaalien SERS-tutkimuksiin. Väriaineiden tutkimus aloitettiin liuottamalla valittuja punaisia väriaineita erilaisiin liuottimiin, koska SERS-menetelmä vaatii näytteet liuosmuotoisena. Käytetyistä liuottimista asetoni pystyi parhaiten liuottamaan kiinteät maalit. Joillekin näytteille myös metanoli ja dikloorimetaani toimivat hyvin. Suuri osa valituista näytteistä ei liennut käytettyihin liuottimiin. Tämä pienensi näytteiden otantaa, joista saatiin SERS-mittaus tehtyä.

Liuenneista näytteistä testattiin SERS-menetelmää. Näytteet otettiin satunnaisesti Rikostekni- sen laboratorion vertailumaalikokoelmista, jotka sisältävät oikeissa töissä käytetyistä rikosvä- lineistä taltioituja maaleja. Tämän seurauksena maalien väriaineiden koostumuksesta ym. lisä- aineista ei ole tietoa. SERS-tutkimus eteni kokeiluperiaatteella eteenpäin eli näytteistä yritettiin mitata SERS-spektrit tietämättä, onnistuuko mittaus. Tulosten perusteella joistakin tutkituista näytteistä saatiin mitattua hyvät SERS-spektrit ja toisista ei saatu spektriä aikaiseksi tai spektri oli heikko. SERS-spektrin onnistuminen on vahvasti riippuvainen väriainemolekyylin koostu- muksesta. Johtopäätöksenä tuloksista on, että spray- ja työkalumaalien väriaineet vaihtelevat eikä voida sanoa yksiselitteisesti, että SERS-menetelmä toimii kaikille maaleille vaan, että SERS-menetelmä toimii vain, jos tutkitun näytteen väriaine on oikeanlainen.

Väriaineiden SERS-tutkimus laajennettiin kuulakärkikynien ja tussien musteiden väriaineiden tutkimukseen. Ensin kokeiltiin, voidaanko paperin päälle piirretyn merkin päältä mitata kyseisen kynän musteen väriaine SERS-tekniikalla. Tämän jälkeen väriaineet liuotettiin etanoliin ja ajettiin TLC-tekniikalla. TLC-levyn päältä kokeiltiin SERS-mittauksia. Hopeakolloidista valmistettu nanotahna toimi tarkoitukseensa hyvin ja sen avulla saatiin mitattua SERS-spektrit niin paperin päälle piirretystä merkistä kuin TLC:llä ajetusta väriainekohdasta. Kaikille kuulakärkikynien musteille saatiin mitattua TLC-spoteista samankaltainen SERS-spektri, joka vastasi myös suoraan paperin päältä mitattua SERS-spektriä.

Musteiden ja tussien SERS-mittauksissa ei ollut tärkeää se, mikä väriaine näytteistä saatiin mitattua vaan se, että SERS-spektri saadaan mitattua suoraan paperin ja TLC-levyn päältä. Väriaineet saatiin mitattua paperin päältä NR-tekniikalla, mutta piikkien intensiteetit olivat huomattavasti pienemmät mitä ne olivat SERS-menetelmän käytön jälkeen. TLC-levyllä ajettuja väriaineita ei saatu mitattua NR-menetelmällä, kun taas SERS:llä spektrit tulivat hyvin esiin. TLC- ja SERS-menetelmien yhdistäminen osoittautui toimivaksi yhdistelmäksi väriaineiden määrittämisessä.

Väriainemittausten jälkeen siirryttiin tarkastelemaan räjähdettäviä ja niiden mahdollisia SERS-käyttökohteita. Työhön valittiin räjähdettäviksi TNT, jota yritettiin mitata itse valmistetun hopeakolloidin ja kaupallisen kultakolloidin kanssa. Hopeakolloidin kanssa liuotetun TNT:n SERS-spektriin saatiin selvästi näkyviin vain aaltoluvulla 1360 cm^{-1} ilmentyvä piikki. Kaupallisen kultakolloidin käytössä ilmeni ongelmia sen sisältämien stabilointi- ja säilöntäaineiden seurauksena. Kultakolloidin kanssa sekoitetun TNT:n SERS-spektriin tuli esiin piikkejä, jotka eivät vastanneet bulkki-TNT:n spektriä. Ne osoittautuivat lopulta kolloiditaustasta johtuviksi piikeiksi.

Käsittlemättömän TNT-liuoksen SERS-tutkimusten jälkeen siirryttiin pH arvoon 13 säädetyn TNT-liuoksen mittauksiin. Kirjallisuudessa oli esitetty teorioita happohydrolysoitun TNT:n SERS-mittaukseen hopeakolloidilla. pH arvoon 13 säädetystä liuoksesta saatiin mitattua hyvä spektri, jossa piikkien intensiteetit erosivat huomattavasti pohjaviivan kohinasta. Mitattu spektri vastasi lähes identtisesti kirjallisuudessa esitettyä spektriä ja spektriä tunnistukseen

käytettyjen suurimpien piikkien siirtymät osuivat lähes täysin yksiin. Tämä oli hyvä onnistuminen, koska pystyttiin toistamaan kirjallisuudessa esitetty koeasetelma itse valmistetulla hopeakolloidilla.

Näytteiden mittausta helpotti, kun ne aggregoitiin eli niiden sekaan lisättiin ainetta, joka saa nanopartikkelit pakkautumaan lähemmäs toisiaan. Aggregoinnissa käytettiin apuna KNO_3 :a ja NaCl :a. Jotkin näytteet pystyttiin mittaamaan ilman aggregointia, mutta nämä olivat yleensä vahvoja liuoksia. Laimeimmat liuokset vaativat aggregoinnin.

Työssä kokeiltiin myös hopeisen kolloidin pesua. Tutkittujen näytteiden tapauksissa ei kuitenkaan huomattu eroa, käytettiinkö pestyä vai pesemätöntä kolloidia. Näytteiden SERS-spektrin ilmentyminen ei siis ollut riippuvainen pesusta. Suurin osa mittauksista tehtiin tämän perusteella pesemättömällä kolloidilla.

Työssä oli haasteita sellaisten näytteiden kanssa, jotka eivät liittyneet tehokkaasti kolloidin pinnalle. Tällaisten näytteiden mittauksessa tuli helposti esille näytteen taustasta nousevia piikkejä. Hopeinen kolloidi voi myös reagoida käytettävän viritysvalon kanssa, jolloin syntyy ylimääräisiä piikkejä ja spektri voi muuttua erilaiseksi. Ongelmien tunnistaminen oli yksi työn haastavimmista asioista, kun täytyi ymmärtää miten kolloidin ja viritysvalon käyttäytyminen vaikuttaa mitattavaan spektriin.

Työ osoittautui hyvin mielenkiintoiseksi ja haastavaksi suorittaa. Työtä alettiin rakentaa täysin alusta, koska SERS-tekniikan käyttöaste forensisissa Raman-tutkimuksissa on yleisesti ottaen vielä pieni. Tämä osittain antoi työn tekemiseen vapaat kädet, koska tietynlaista ennakkotietoa menetelmän toimivuudesta ei ollut. Työssä onnistuttiin tekemään kattava katsaus SERS-menetelmän toimivuudesta ja käytettävyydestä tietynlaisten forensisessä laboratoriossa käytettävien materiaalien suhteen. Työssä pystyttiin todistamaan, että SERS-menetelmä toimii ja siinä olisi hyvä jatkokehityksen kohde ja lisäys oikeisiin forensisiin tutkimuksiin. Erityisesti TLC- ja SERS-menetelmien yhdistäminen toimi hyvin ja se on työn suurin onnistuminen. Räjähdeainesten SERS-tutkimus vaatii vielä lisää kehitystä. Tutkittujen materiaalien otannat olivat pienet ja menetelmän kehityksen jatkon kannalta olisi tärkeä keskittyä yhden tietynlaisen näytematriisin SERS-kehitykseen. SERS-tekniikkaan löytyy myös kaupallisia substraattilevyjä, joita kannattaa kokeilla menetelmän kehityksessä tulevaisuudessa.

Kirjallisuusluettelo

1. Muehlethaler, C.; Leona, M. ja Lombardi, J. R., Review of Surface enhanced Raman scattering applications in forensic science, *Anal. Chem.*, **2016**, 88, 152–169.
2. Buzzini, P. ja Suzuki, E., Forensic applications of Raman spectroscopy for the in situ analyses of pigments and dyes in ink and paint evidence, *J. Raman Spectrosc.*, **2016**, 47, 16–27.
3. Zieba-Palus, J. ja Trzcińska, B. M., Application of infrared and raman spectroscopy in paint trace examination, *J. Forensic Sci.*, **2013**, 58, 1359–1363.
4. Fikiet, M. A.; Khandasammy, S. R.; Mistek, E.; Ahmed, Y.; Halámková, L.; Bueno, J. ja Lednev, I. K., Surface enhanced Raman spectroscopy: A review of recent applications in forensic science, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2018**, 197, 255–260.
5. Bumrah, G. S. ja Sharma, R. M., Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse, *Egypt. J. Forensic Sci.*, **2016**, 6, 209–215.
6. Electromagnetic radiation, Wikipedia, https://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic_radiation (30.5.2019).
7. Ferraro, J. R.; Nakamoto, K. ja Brown, C. W., *Introductory Raman Spectroscopy*, 2. painos, Elsevier Science & Technology, San Diego, Yhdysvallat, 2003, ss. 1–54 .
8. Schrader, B., *Infrared and Raman Spectroscopy*, VCH, Mörlenbach, Saksa, 1995, ss. 18–26.
9. Raman spectroscopy, Wikipedia, https://en.wikipedia.org/wiki/Raman_spectroscopy (29.4.2019).
10. Vandenberghe, P. ja Ando, D. J., *Practical Raman Spectroscopy : An Introduction*, John Wiley & Sons, Chennai, Intia, 2013, ss. 1–45.
11. Theory of Raman Scattering, BWTEK, <http://bwtek.com/raman-theory-of-raman-scattering> (11.6.2019).

12. Smith, E. ja Dent, G., *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*, John Wiley & Sons, Chippingham, UK, 2005, ss. 8–20.
13. Smith, Z. ja Roman, C., Fluorescence, Libretext, [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Radiative_Decay/Fluorescence](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Radiative_Decay/Fluorescence) (30.4.2019).
14. Zhang, D. ja Guan, L., Laser Ablation. Teoksessa: *Comprehensive Materials Processing*, Elsevier, 2014, vol. 4, ss. 125–169.
15. McCreery, R. L., *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, John Wiley & Sons, Yhdysvallat, 2000, ss. 73–94.
16. Chalmers, J. M.; Edwards, H. G. M. ja Hargreaves, M. D., *Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science*, 2. painos, John Wiley & Sons, Noida, Intia, 2012, a) ss. 22–28 b) 251–273 c) 153–155.
17. Le Ru, E. ja Etchegoin, P., *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy : And Related Plasmonic Effects*, Elsevier Science & Technology, Oxford, UK, 2009, a) ss. 1–3 b) 189–191 c) 258–261 d) 367–378 e) 403–407.
18. Fasolato, C., *Surface Enhanced Raman Spectroscopy for Biophysical Applications Using Plasmonic Nanoparticle Assemblies*, Springer Nature Switzerland AG, Cham, Sveitsi, 2018, ss. 19–56.
19. Schlücker, S. ja Kiefer, W., *Surface Enhanced Raman Spectroscopy : Analytical, Biophysical and Life Science Applications*, John Wiley & Sons, Singapore, 2010, ss. 1–60.
20. Kruszewski, S., Surface enhanced Raman scattering phenomenon, *Cryst. Res. Technol.*, **2006**, *41*, 562–569.
21. Jensen, L.; Aikens, C. M. ja Schatz, G. C., Electronic structure methods for studying surface-enhanced Raman scattering, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 1061–1073.
22. Stiles, P. L.; Dieringer, J. A.; Shah, N. C. ja Van Duyne, R. P., Surface-enhanced Raman spectroscopy., *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **2008**, *1*, 601–626.

23. Schlücker, S., Surface-enhanced Raman spectroscopy: Concepts and chemical applications, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2014**, *53*, 4756–4795.
24. Mosier-Boss, P., Review of SERS substrates for chemical sensing, *Nanomaterials*, **2017**, *7*.
25. Pilot, R.; Signorini, R.; Durante, C.; Orian, L.; Bhamidipati, M. ja Fabris, L., A review on surface-enhanced Raman scattering, *Biosensors*, **2019**, *9*.
26. Fermi level, EF, *IUPAC Compend. Chem. Terminol.*, **2014**, 2223, 2341.
27. Fan, M.; Andrade, G. F. S. ja Brolo, A. G., A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry, *Anal. Chim. Acta*, **2011**, *693*, 7–25.
28. Lee, P. C. ja Meisel, D., Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols, *J. Phys. Chem.*, **1982**, *86*, 3391–3395.
29. Stampleskoskie, K. G.; Scaiano, J. C.; Tiwari, V. S. ja Anis, H., Optimal size of silver nanoparticles for surface-enhanced raman spectroscopy, *J. Phys. Chem. C*, **2011**, *115*, 1403–1409.
30. Hong, S. ja Li, X., Optimal size of gold nanoparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy under different conditions, *J. Nanomater.*, **2013**, *2013*.
31. Tian, F.; Bonnier, F.; Casey, A.; Shanahan, A. E. ja Byrne, H. J., Surface enhanced Raman scattering with gold nanoparticles: Effect of particle shape, *Anal. Methods*, **2014**, *6*, 9116–9123.
32. Coulomb's law, Wikipedia, https://en.wikipedia.org/wiki/Coulomb%27s_law (4.9.2019).
33. Mistek, E.; Fikiet, M. A.; Khandasammy, S. R. ja Lednev, I. K., Toward Locard's exchange principle: Recent developments in forensic trace evidence analysis, *Anal. Chem.*, **2019**, *91*, 637–654.
34. Zieba-Palus, J. ja Michalska, A., Characterization of blue pigments used in automotive paints by Raman spectroscopy, *J. Forensic Sci.*, **2014**, *59*, 943–949.

35. Kobilinsky, L. ja Levine, L., *Forensic Chemistry Handbook*, John Wiley & Sons, Incorporated, Hoboken, Yhdysvallat, 2011, a) ss. 131–141 b) 225–250 c) 23–29.
36. Kruglak, K. J.; Dubnicka, M.; Kammrath, B.; Maxwell, V. ja Reffner, J. A., The evidentiary significance of automotive paint from the northeast: A Study of red paint, *J. Forensic Sci.*, **2019**, *64*, 1345–1358.
37. Brosseau, C. L.; Casadio, F. ja Van Duyne, R. P., Revealing the invisible: Using surface-enhanced Raman spectroscopy to identify minute remnants of color in Winslow Homer's colorless skies, *J. Raman Spectrosc.*, **2011**, *42*, 1305–1310.
38. Brosseau C.L.; Rayner K.S.; Casadio F.; Grzywacz C.M. ja Duyne R.P., Surface-enhanced Raman spectroscopy: A direct method to identify colorants in various artist media, *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 7443–7447.
39. Cesaratto, A.; Leona, M. ja Pozzi, F., Recent advances on the analysis of polychrome works of art: SERS of synthetic colorants and their mixtures with natural dyes, *Front. Chem.*, **2019**, *7*, 1–12.
40. Leona, M.; Stenger, J. ja Ferloni, E., Application of surface-enhanced Raman scattering techniques to the ultrasensitive identification of natural dyes in works of art, *J. Raman Spectrosc.*, **2006**, *37*, 981–992.
41. Cañamares, M. V.; Garcia-Ramos, J. V.; Domingo, C. ja Sanchez-Cortes, S., Surface-enhanced Raman scattering study of the adsorption of the anthraquinone pigment alizarin on Ag nanoparticles, *J. Raman Spectrosc.*, **2004**, *35*, 921–927.
42. Roh, J. Y.; Matecki, M. K.; Svoboda, S. A. ja Wustholz, K. L., Identifying pigment mixtures in art Using SERS: A treatment flowchart approach, *Anal. Chem.*, **2016**, *88*, 2028–2032.
43. Centeno, S. A. ja Shamir, J., Surface enhanced Raman scattering (SERS) and FTIR characterization of the sepia melanin pigment used in works of art, *J. Mol. Struct.*, **2008**, *873*, 149–159.
44. Bruni, S.; Guglielmi, V. ja Pozzi, F., Surface-enhanced raman spectroscopy (SERS) on silver colloids for the identification of ancient textile dyes: Tyrian purple and madder, *J. Raman Spectrosc.*, **2010**, *41*, 175–180.

45. Bruni, S.; Guglielmi, V. ja Pozzi, F., Historical organic dyes: A surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectral database on Ag Lee-Meisel colloids aggregated by NaClO₄, *J. Raman Spectrosc.*, **2011**, *42*, 1267–1281.
46. Ricci, M.; Trombetta, E.; Castellucci, E. ja Becucci, M., On the SERS quantitative determination of organic dyes, *J. Raman Spectrosc.*, **2018**, *49*, 997–1005.
47. Pozzi, F.; Zaleski, S.; Casadio, F. ja Van Duyne, R. P., SERS discrimination of closely related molecules: A systematic study of natural red dyes in binary mixtures, *J. Phys. Chem. C*, **2016**, *120*, 21017–21026.
48. Muehlethaler, C.; Cheng, Y. P.; Islam, S. K. ja Lombardi, J. R., Contribution of Raman and surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) to the analysis of vehicle headlights: Dye(s) characterization, *Forensic Sci. Int.*, **2018**, *287*, 98–107.
49. Braz, A.; López-López, M. ja García-Ruiz, C., Raman spectroscopy for forensic analysis of inks in questioned documents, *Forensic Sci. Int.*, **2013**, *232*, 206–212.
50. Saviello, D.; Alyami, A.; Trabace, M.; Giorgi, R.; Baglioni, P.; Mirabile, A. ja Iacopino, D., Plasmonic colloidal pastes for surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) of historical felt-tip pens, *RSC Adv.*, **2018**, *8*, 8365–8371.
51. Geiman, I.; Leona, M. ja Lombardi, J. R., Application of Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman scattering to the analysis of synthetic dyes found in ballpoint pen inks, *J. Forensic Sci.*, **2009**, *54*, 947–952.
52. Zapata, F.; López-López, M. ja García-Ruiz, C., Detection and identification of explosives by surface enhanced Raman scattering, *Appl. Spectrosc. Rev.*, **2016**, *51*, 227–262.
53. Kneipp, K.; Wang, Y.; Dasari, R. R.; Feld, M. S.; Gilbert, B. D.; Janni, J. ja Steinfeld, J. I., Near-infrared surface-enhanced Raman scattering of trinitrotoluene on colloidal gold and silver, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.*, **1995**, *51*, 2171–2175.
54. Zhang, C.; Wang, K.; Han, D. ja Pang, Q., Surface enhanced Raman scattering (SERS) spectra of trinitrotoluene in silver colloids prepared by microwave heating method, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2014**, *122*, 387–391.

55. Botti, S.; Almaguira, S.; Cantarini, L.; Palucci, A.; Puiu, A. ja Rufoloni, A., Trace level detection and identification of nitro-based explosives by surface-enhanced Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.*, **2013**, *44*, 463–468.
56. Liszewska, M.; Bartosewicz, B.; Budner, B.; Nasiłowska, B.; Szala, M.; Weyher, J. L.; Dziegielewska, I.; Mierczyk, Z. ja Jankiewicz, B. J., Evaluation of selected SERS substrates for trace detection of explosive materials using portable Raman systems, *Vib. Spectrosc.*, **2019**, *100*, 79–85.
57. Idone, A.; Gulmini, M.; Henry, A. I.; Casadio, F.; Chang, L.; Appolonia, L.; Van Duyne, R. P. ja Shah, N. C., Silver colloidal pastes for dye analysis of reference and historical textile fibers using direct, extractionless, non-hydrolysis surface-enhanced Raman spectroscopy, *Analyst*, **2013**, *138*, 5895–5903.
58. Jurasekova, Z.; Del Puerto, E.; Bruno, G.; García-Ramos, J. V.; Sanchez-Cortes, S. ja Domingo, C., Extractionless non-hydrolysis surface-enhanced Raman spectroscopic detection of historical mordant dyes on textile fibers, *J. Raman Spectrosc.*, **2010**, *41*, 1455–1461.
59. Zaffino, C.; Bruni, S.; Guglielmi, V. ja De Luca, E., Fourier-transform surface-enhanced Raman spectroscopy (FT-SERS) applied to the identification of natural dyes in textile fibers: An extractionless approach to the analysis, *J. Raman Spectrosc.*, **2014**, *45*, 211–218.
60. Kurouski, D. ja Van Duyne, R. P., In situ detection and identification of hair dyes using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), *Anal. Chem.*, **2015**, *87*, 2901–2906.
61. Kneipp, K.; Ozaki, Y. ja Tian, Z., *Recent Developments in Plasmon-Supported Raman Spectroscopy*, World Scientific Publishing Europe Ltd, Singapore, 2018, ss. 401–412.

Liitteet

Liite 1 Yhteenveto mitatuista näytteistä

Liite 2 MSP-laadunvarmistusmittaukset

Liite 3 SEM-laadunvarmistusmittaukset

Yhteenveto mitatuista näytteistä

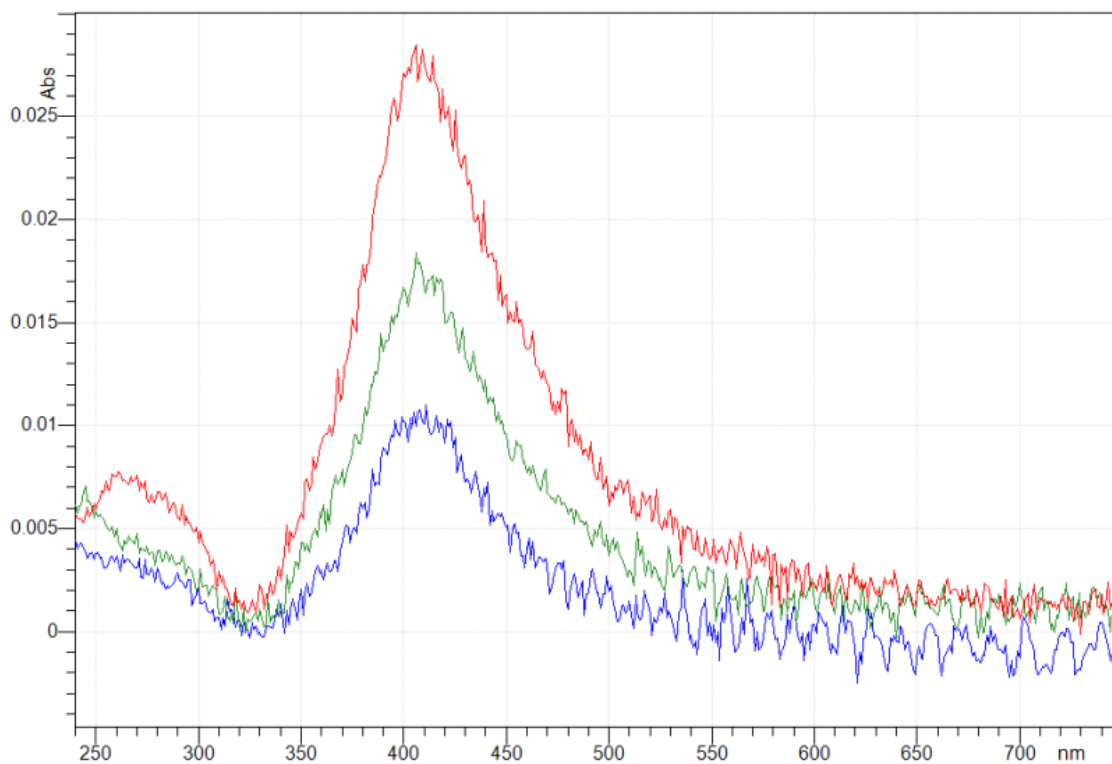
Yhteenveto työssä käytetyistä näytteistä ja niiden määristä.

Näyte	Kappalemäärä
Punainen pigmentti/väriaine	3
Punainen spraymaali	10
Violetti spraymaali	2
Vaaleanpunainen spraymaali	2
Punaisen sorkkaraudan maali	8
Oranssi sorkkaraudan maali	2
Sininen kuulakärkikynän muste	3
Sininen geelikynän muste	1
Punainen tussiväri	1
Musta tussiväri	1
Vaaleansininen tussiväri	1
Keltainen tussiväri	1
Trinitrotolueeni (TNT)	1

MSP-laadunvarmistusmittaukset

Hopeakolloidi erä 1 (E1)

11:23:12 13/11/2019

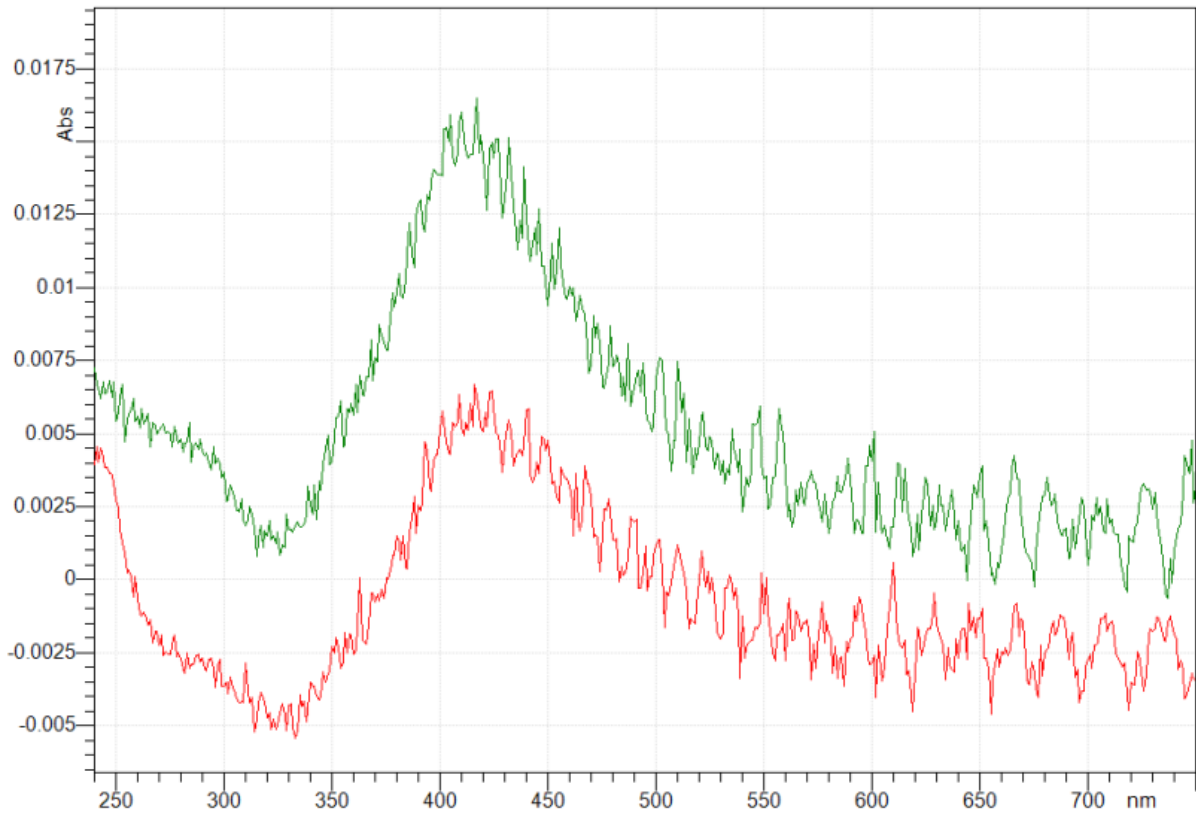


TITLE: Hopeakolloidi E1 toukokuu

TITLE: Hopeakolloidi E1 heinäkuu

TITLE: Hopeakolloidi E1 marraskuu

Ensimmäisen kolloidierän (E1) mikrospektrofotometrisesti mitatut UV-Vis -spektrit. Spektrit mitattiin touko-, heinä- ja marraskuussa 2019.



TITLE: Hopeakolloidi E2 heinäkuu

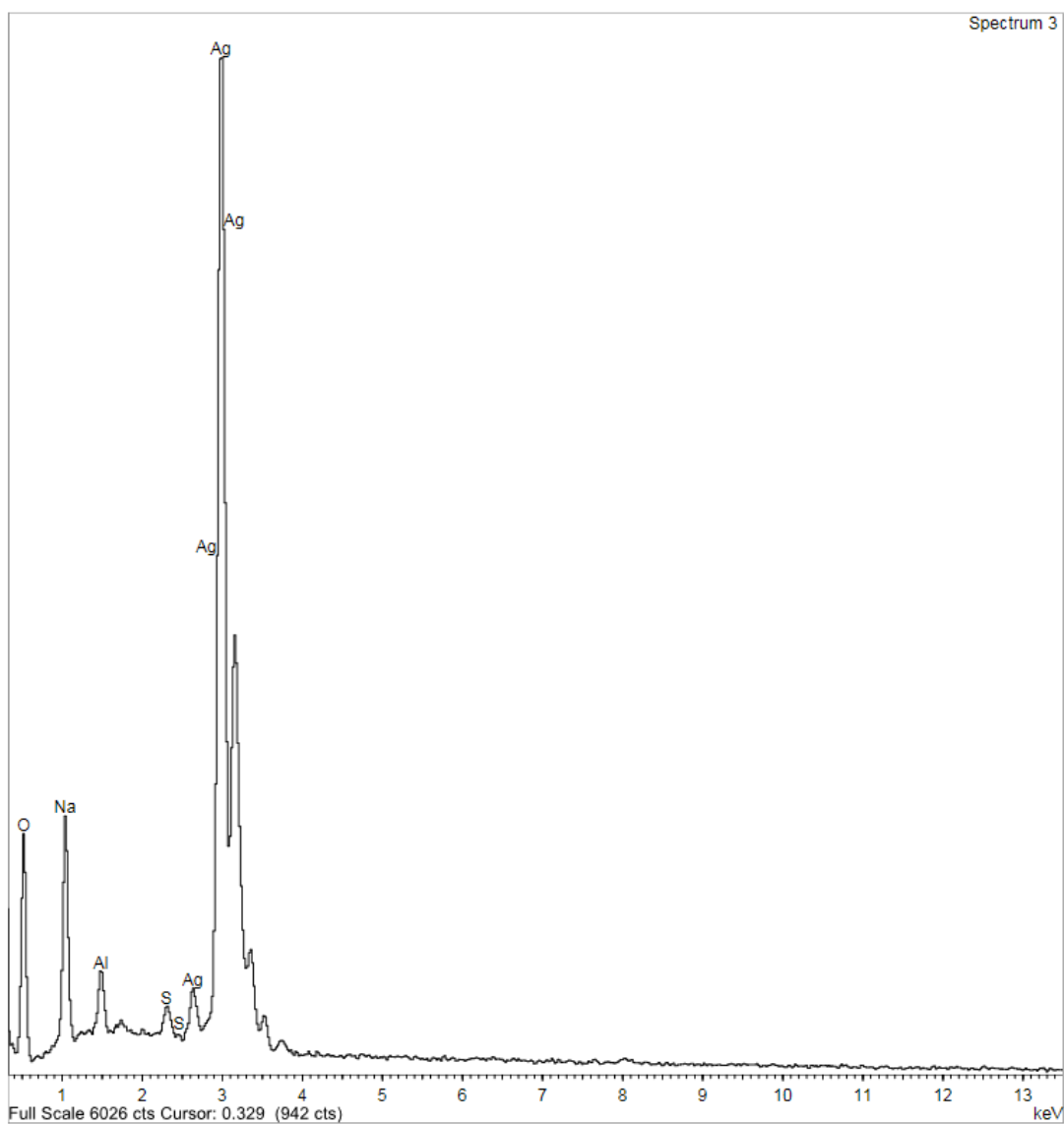
TITLE: Hopeakolloidi E2 marraskuu

Toisen kolloidierän (E2) mikrospektrofotometrisesti mitatut UV-Vis -spektrit. Spektrit mitattiin heinä- ja marraskuussa 2019.

SEM-laadunvarmistusmittaukset

Project: ToninGradu-AgNP-laatukontrolli-01-11-2019
Owner: rllabra
Site: Site of Interest 1

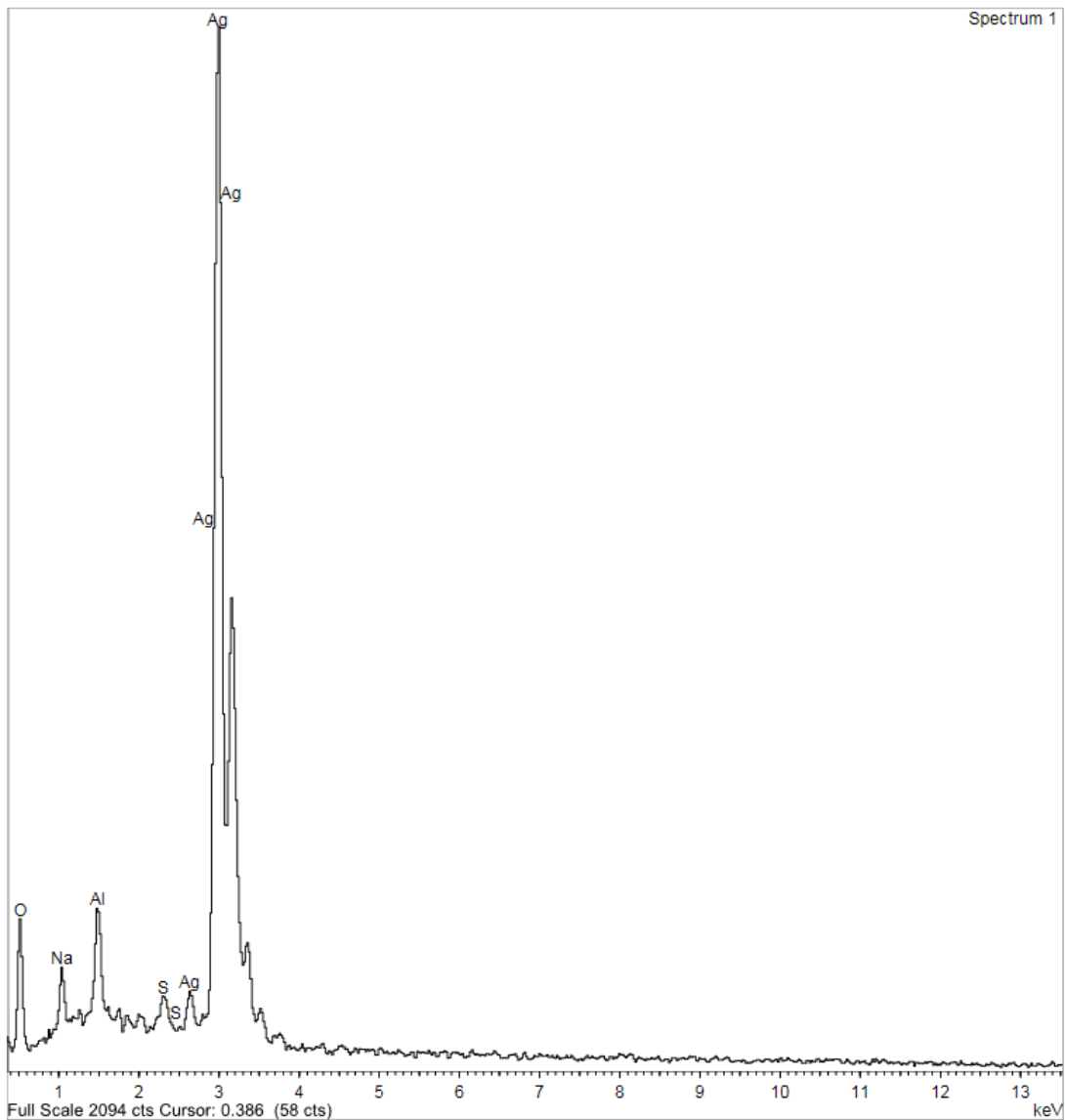
Sample: Sample 1
Type: Default
ID: N. 1 AgNP vanha era



Ensimmäisen kolloidierän (E1) pyyhkäiselektronimikroskoopilla mitattu spektri.

Project: ToninGradu-AgNP-laatukontrolli-01-11-2019
Owner: rtilabra
Site: Site of Interest 2

Sample: Sample 3
Type: Default
ID: N. 3 AgNP 11072019 uusi era



Toisen kolloidierän (E2) pyyhkäiselektronimikroskoopilla mitattu spektri.