

# Grafeenioksidin funktionalisointi

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

Orgaanisen kemian pääaine

27.11.2014

Tiina Virtanen

## Tiivistelmä

Tämän pro gradu -tutkielman aiheena on grafeenioksidin kiehtova maailma. Tutkielman tavoitteena oli tehdä kattava kirjallisuuskatsaus grafeenioksidin funktionalisoinnista. Tutkielmassa käydään läpi grafeenioksidin tärkeimmät rakenteelliset piirteet, fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, kemialliset funktionalisointimenetelmät sekä sovelluskohteet bioteknologiassa ja muualla. Ominaisuuksien tarkastelussa on kiinnitetty erityistä huomiota hapetusasteen merkitykseen sekä grafeenioksidin fluoresenssiin. Kemiallisten funktionalisointimenetelmien osiossa keskitytään lähinnä epoksidi- ja hydroksyyli-ryhmien funktionalisointireaktioihin. Karboksyylihaporyhmien reaktioista on annettu myös muutamia esimerkkejä. Sovelluskohteiden osiossa esitellään puolestaan grafeenioksidin ja metallinanopartikkelien hybridimateriaaleihin perustuvia tunnistusalustoja sekä sensoreita. Viimeinen poikkitieteellisempi osio keskittyy grafeenioksidin mielenkiintoisiin sovelluskohteisiin bioteknologian alalla.



# Sisällysluettelo

<b>Esipuhe</b>	<b>vi</b>
<b>Käytetyt lyhenteet</b>	<b>vii</b>
<b>1 Johdanto</b>	<b>1</b>
<b>2 Grafeenioksidin ominaisuudet</b>	<b>3</b>
2.1 Rakenne . . . . .	3
2.2 Fysikaalis-kemialliset ominaisuudet . . . . .	5
2.3 Hapetusasteen vaikutus grafeenioksidin ominaisuuksiin . . . . .	6
2.4 Grafeenioksidin fluoresenssi . . . . .	10
<b>3 Kemiallinen funktionalisointi</b>	<b>14</b>
3.1 Epoksidien reaktiot . . . . .	15
3.1.1 Esimerkkejä epoksidien reaktioista [29] . . . . .	15
3.1.2 Malononitriili-hiilinukleofili . . . . .	17
3.1.3 Atsidifunktionalisointi . . . . .	18
3.1.4 Tiolifunktionalisointi . . . . .	21
3.1.5 Funktionalisointi ja pelkistys DMF:n avulla . . . . .	24

3.1.6	Oktadekyyliamiini . . . . .	26
3.1.7	1-(3-Aminopropyli)-3-metyyli-imidatsoliumbromidi . . . . .	28
3.1.8	3-Aminopropyylitrietoksisilaanin kiinnittäminen . . . . .	29
3.1.9	MA-POA2000 . . . . .	30
3.1.10	Polyaniliini sekä epoksidien karboksylointi . . . . .	31
3.1.11	Primääristen amiinien ja aminohappojen kiinnittäminen . . . . .	32
3.2	Hydroksyyliyhymien reaktiot . . . . .	33
3.2.1	Oktadekaani-O-alkylointi . . . . .	34
3.2.2	Isosyanaatti . . . . .	34
3.2.3	Erilaisia Claisen-reaktioita . . . . .	37
3.2.4	Dimetyyliamidi Claisen-toisiintumisen kautta . . . . .	40
3.2.5	Polyglyseroli ja magneettisten Fe/Au-nanopartikkelien kiinnittäminen . . . . .	42
3.3	Karboksylihappojen reaktiot . . . . .	44
3.3.1	Funktionalisointi atsidi-alkyyni-click-kemian avulla . . . . .	45
3.3.2	1-Bromibutaani . . . . .	47
3.3.3	Fullereeni ja porfyriini . . . . .	48

## **4 Hybridinanomateriaaleihin perustuvat sovellukset 51**

4.1	Tunnistusalustat ja sensorit . . . . .	51
4.1.1	G-FET-sensorit . . . . .	52
4.1.2	Kultananopartikkeleihin perustuva SERS-substraatti .	53
4.1.3	Kultananopartikkelit kysteiinidetektorissa . . . . .	55
4.1.4	Magneettisiin rautananopartikkeleihin perustuva sensori	58
4.1.5	Grafeenioksidin ja hopeananopartikkelien hybridima- teriaali . . . . .	59
<b>5</b>	<b>Grafeenioksidi bioteknologiassa</b>	<b>61</b>
5.1	Grafeenipohjaiset FRET-biosensorit . . . . .	62
5.1.1	ssDNA:n perustuva tunnistus . . . . .	65
5.1.2	Molekulaariset merkkivalot . . . . .	67
5.1.3	Aptameerit . . . . .	68
5.1.4	Virusten tunnistaminen . . . . .	69
5.1.5	Dopamiini - grafeenioksidin emission sammuttaja . . .	70
5.2	Grafeenipohjaiset materiaalit solututkimuksessa . . . . .	71
5.2.1	GO syöpälääkkeiden kuljettimena . . . . .	71
5.3	FET-transistorit biologisissa sovelluksissa . . . . .	73

<b>6 Yhteenveto</b>	<b>74</b>
<b>Liitteet</b>	<b>87</b>

## Esipuhe

Tämän pro gradu -tutkielman kirjallisuuskatsaus koottiin heinä- ja marraskuun 2014 välisenä aikana Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella, Nanoscience Centerissä orgaanisen kemian pääaineessa. Aihe on osa Nanoscience Centerissä tehtävää poikkitieteellistä tutkimusta. Tutkielman ohjaajana toimi professori Maija Nissinen. Kirjallinen materiaali koottiin Web of Science, SciFinder, Google Scholar ja Mendeley-hakukoneiden avulla. Aiheeseen liittyen tehtiin myös kokeellista tutkimusta, jonka tulokset on esitetty kesätyöraportissa (liite 1).

Suuret kiitokset ohjaajalleni Maija Nissiselle joustavuudesta, hyvistä neuvoista, kärsivällisyydestä ja mielenkiinnosta tutkielmaani kohtaan. Erikoiskiitokset professori Mika Pettersonille erittäin mielenkiintoisen yhteistyöprojektin tarjoamisesta. Lämpimät kiitokset Kaisa Helttuselle aiheeseen liittyneistä keskusteluista sekä kaikesta avusta projektiin liittyen. Haluan kiittää myös Jukka Aumasta, Andreas Johanssonia ja Juha Koivistoista hyvin sujuneesta, kokeelliseen osioon liittyneestä yhteistyöstä sekä tutkimusryhmän Tiia-Riikka Teroa ja Aku Suhosta mukavan työilmapiirin luomisesta. Kiitän myös Suomen Akatemiaa (proj. nro 2100001911) työni rahoittamisesta.

Lopuksi rakkaat kiitokset Johannekselle, perheelleni ja ystävälleni Johannalle kaikesta (vertais)tuesta ja kannustuksesta.

Jyväskylässä 27.11.2014

Tiina Virtanen

## Käytetyt lyhenteet

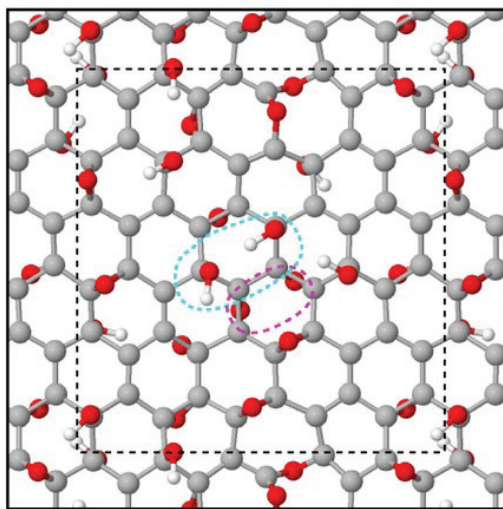
AFM	atomivoimamikroskopia
APTS	3-aminopropyylitrietoksisilaani
ATP	adenosiinitrifosfaatti
CNT	hiilinanoputki
DFT	tiheysfunktionaaliteoria
DMDA	<i>N,N</i> -dimetyyliasetamididimetyyliasetali
DMF	dimetyyliformamidi
DMSO	dimetyylisulfoksidi
cDNA	komplementaarinen DNA
dsDNA	kaksijuosteinen DNA
ssDNA	yksijuosteinen DNA
EDC	1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyli)karbodi-imidi
EIS	elektrokemiallinen impedanssispektroskopia
ELISA	entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys
FAM	fluoreseiiniamidiitti
FRET	fluoresenssin resonanssienergian siirto
FET	kanavatransistori
FTIR	Fourier-muunnos infrapunaspektrometria
GO	grafeenioksidi
HR	korkea erotuskyky
IC50	pitoisuus, jossa puolet reaktioista estyy
IR	infrapunaspektrometria
Me	metyyliryhmä
mRNA	lähetti-RNA
NADH	nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi
NIR	lähi-infrapuna
NMP	<i>N</i> -metyyli-2-pyrrolidoni
NMR	ydinmagneettinen resonanssi
MB	molekulaarinen merkkivalo
ODA	oktadekyyliamiini
OH	hydroksyyliiryhmä
PEG	polyetyleeniglykoli
Ph	fenyyliryhmä
PMDETA	<i>N,N,N',N'',N'''</i> -pentametyylidietyleenitriamiini
PTFE	polytetrafluorieteeni
PVP	polyvinyyli-pyrrolidoni

rGO	pelkistetty grafeenioksidi
SERS	pintavahvisteinen ramanspektroskopia
SH	tioliryhmä
S <sub>N</sub> 2	bimolekulaarinen nukleofilinen substituutio
<i>t</i> -Bu	tert-butyylili
TEM	läpäisyelektronimikroskopia
TEOA	trietyyli- <i>o</i> -asettaatti
TGA	termovaaka-analyysi
THF	tetrahydrofuraani
UV	ultraviolettivalo
Vis	näkyvä valo
XPS	röntgenfotoelektronispektroskopia
XRD	röntgendiffraktio

# 1 Johdanto

Hiilen yleisin allotrooppi grafiitti on kolmiulotteinen, jopa miljoonista grafeenikerroksista koostuva materiaali. Grafeenikerrosten hiiliatomit ovat järjestäytyneet hunajakakkoa muistuttaviksi tasorakenteiksi. Kun yksittäinen atominohut grafeenikalvo altistetaan voimakkaasti hapettaville olosuhteille, saadaan grafeenioksidia, uudeksi ihmeaineeksikin povattua materiaalia. [1]

Grafeenioksidin rakenne on esitetty kuvassa 1:



Kuva 1: DFT-laskennoissa käytetty grafeenioksidin mallirakenne, josta erottuvat grafeenilevyyn kiinnittyneet epoksidi- ja hydroksyyli-ryhmät (merkitty magentalla ja syaanilla). [2]

Grafeenioksidin historia ulottuu vuoteen 1859, jolloin brittiläinen kemisti B.C. Brodie [3] suoritti tutkimuksiaan grafiitin rakenteesta. Eräässä reaktiivisuuskokeessa käytetty kaliumkloroatin ja typpihapon yhdistelmä tuotti uutta kiteistä materiaalia, joka koostui hiilestä, vedystä ja hapesta. Materiaali dispersoitui puhtaaseen ja emäksiseen, mutta ei happamaan veteen. Brodie kuvasi ainetta grafiittiseksi hapoksi. Kyseessä oli tietävästi ensimmäinen.



mäinen raportoitu menetelmä grafeenioksidin syntetisoimiseen. Synteesistä on julkaistu sittemmin kehittyneemmät Staudenmaierin [4] ja Hummerin [5] versiot, jotka ovat edelleen käytössä erilaisine muunnelmineen. [6]

Grafeenioksidin syntetisoiminen on helppoa ja sen hydrofilisyys mahdollistaa aineen dispersoitumisen useisiin eri liuottimiin. Se omaa lisäksi ainutlaatuiset sähköiset ja optiset ominaisuudet. Grafeenioksidin kovalenttisesti sitoutuneilla, happea sisältävillä ryhmillä on voimakas vaikutus materiaalin elektronisiin, mekaanisiin ja sähkökemiallisiin ominaisuuksiin. [7]

Grafeenioksidin ominaisuuksia pystytään muokkaamaan edelleen kemiallisen funktionalisoinnin avulla. Funktionalisointimenetelmien kehitys on tuottanut laajan skaalan erilaisia grafeenijohdannaisia vaihtelevine ominaisuuksineen. [1, 6] Ala on kuitenkin vielä varsin nuori, joten tulevaisuuden syntetiikan kehitys saattaa johtaa merkittäviin edistysaskeliin grafeenijohdannaisten kentällä. Funktionalisoinnin kautta saavutettavilla ennennäkemättömillä erityispiirteillä on potentiaalia mitä mielikuvituksellisempiin sovelluksiin. [8]

Grafeenioksidin pohjautuvien nanomateriaalien erikoinen maailma tarjoaa kiehtovia mahdollisuuksia poikkitieteelliselle tutkimustyölle. Esimerkkinä mainittakoon nanotieteen ja bioteknologian rajapinnalla tehty tutkimus, joka on johtanut mekaanisten, optisten ja elektronisten laitteiden sekä biosensorien syntyyn. [8] Grafeenijohdannaisista on saatu valmistettua toiminnallisia biosysteemeitä, joihin on integroitu esimerkiksi nukleinihappoja, peptideitä, proteiineja ja jopa soluja. [9]

## 2 Grafeenioksidin ominaisuudet

### 2.1 Rakenne

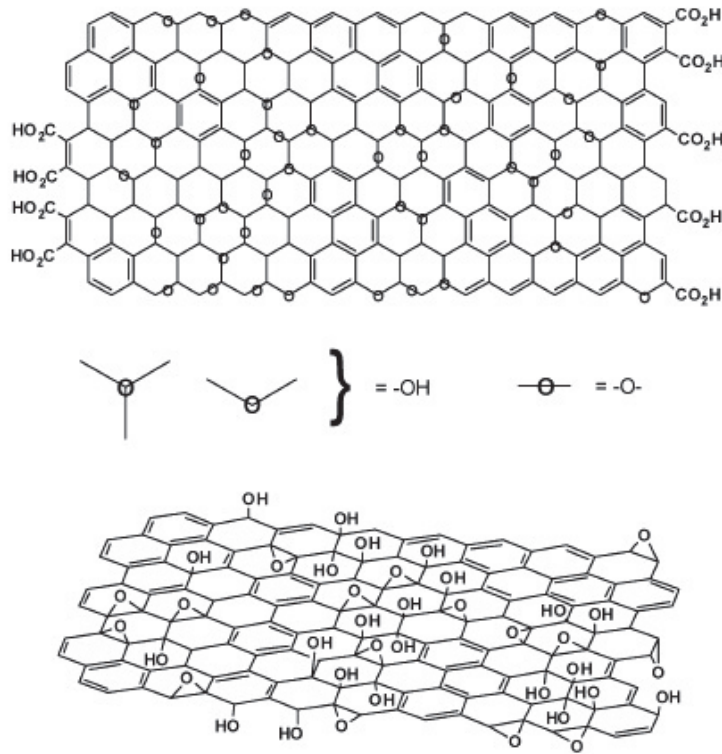
Grafeenioksidi (GO) sisältää useita reaktiivisia, happea sisältäviä ryhmiä, jotka mahdollistavat sen muokkaamisen kemiallisen funktionalisoinnin kautta. GO:n tarkkaa kemiallista rakennetta ei tunneta sen monimutkaisuudesta johtuen. Karakterisointi on osoittautunut vaikeaksi GO:n rakenteen amorfiisuuden ja stoikiometrian vaihtelun sekä riittävän tarkkojen analyysimenetelmien puutteen vuoksi. [6]

Vaikeuksista huolimatta GO:n rakennetta on kuitenkin opittu ymmärtämään ja sille on esitetty lukuisia eri malleja lähinnä alkuainekoostumuksen, reaktiivisuuden ja röntgendiffraktiomääritysten perusteella. [6] Malleista tunnetuin lienee Lerf-Klinowski -malli (kuva 2), joka on kehitetty pitkälti kiinteän tilan NMR-mittausten perusteella. [10, 11] GO:n NMR-spektreissä nähdään tertiäärisen alkoholin, epoksirenkaan ja alkeenien seoksen piikit. Mittausdatasta nousevat esiin myös GO-levyjen välinen, pinoutuneeseen rakenteeseen johtava vetysitoutuminen ja veden hyvin voimakas sitoutuminen epoksidi- ja hydroksyyliiryhmiin. [6, 10–15]

Epoksidi- ja hydroksyyliiryhmät sijaitsevat GO:n pinnalla. GO:n reunoilla on lisäksi hyvin pieniä määriä karboksyylihapo- ja ketoryhmiä. Rakenteessa saattaa olla myös erittäin pieniä määriä reunoilla sijaitsevia 5- ja 6-renkaisia laktoleita ja pinnalla esiintyviä estereitä. [6]

GO:n hapetusaste vaihtelee käytetyistä lähtömateriaaleista ja hapetusmenetelmistä riippuen. Hapetusasteella on merkittävä vaikutus GO:n ominaisuuks-

siin. [6] Osittainen hapettuminen näyttää olevan termodynaamisesti suotuisampaa tehtyjen DFT-laskujen perusteella täydelliseen hapettumiseen nähden. Epoksidien suhde alkoholeihin kasvaa hapetusasteen myötä. [16]

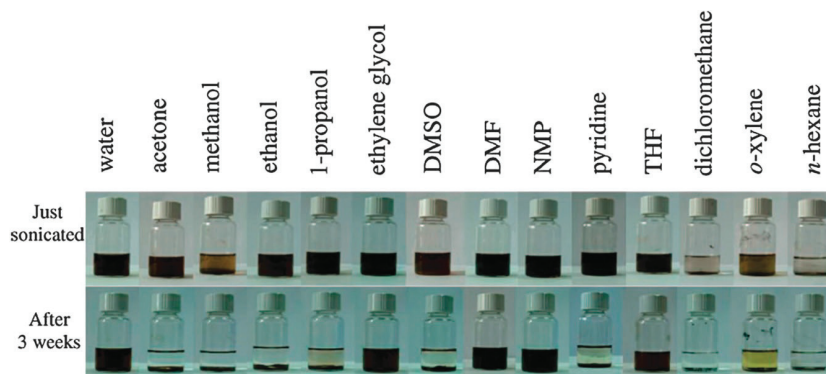


Kuva 2: GO:n rakenne Lerf-Klinowski-mallin [10, 11] mukaan. GO:n rakenne voidaan kuvailla yksittäiseksi grafeenimaiseksi kerrokseksi, jossa on satunnaisesti aromaattisia alueita ja hapettuneita alifaattisia alueita. Grafeenimaisen tason ylä- ja alapuolella on hydroksyyli- ja epoksiryhmiä ja levyn reunoilla karboksyylihapporyhmiä. [6]

Yksittäisen GO-levyn paksuus on AFM-tutkimusten perusteella noin 1 nm, joka on huomattavasti suurempi kuin ideaalisen grafeenin paksuus. Tämä johtuu happea sisältävistä funktionaalisista ryhmistä ja rakenteen ylä- sekä alapinnoille imeytyvästä vedestä. Kuivattujen näytteiden paksuus on diffraktiotutkimusten perusteella noin 0,6 nm. [17, 18]

## 2.2 Fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

Grafeenioksidi on sähköisesti eristävää materiaalia  $sp^3$ -sitoutumisen aiheuttamien johtavuuden häiriöiden vuoksi. Koska sähkönjohtavuus voidaan palauttaa palauttamalla  $\pi$ -verkosto, GO:n tärkeimpiin reaktioihin kuuluu sen pelkistäminen grafeenimaiseksi materiaaliksi (rGO). [6] Täysin pelkistetyn GO:n happipitoisuus on 7–8 %. Tämä johtuu erittäin stabiilien karbonyyli- ja eetteriryhmien muodostumisesta. [18] GO on termisesti melko epästabiilia ja hajoaa kuumennettaessa vapauttaen häkää ja hiilidioksidia. Näin ollen sitä voidaan pelkistää paitsi kemiallisesti, myös termisesti. Hiilidioksidin vapautuminen kuitenkin vaurioittaa GO:n rakennetta jättäen jälkeensä aukkoja ja topologisia virheitä. [6]



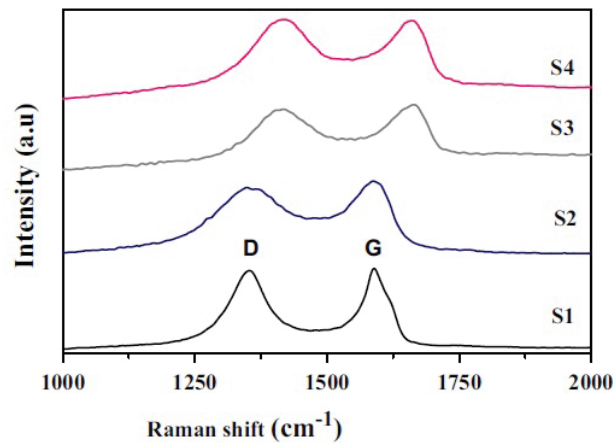
Kuva 3: GO:n liukoisuus eri liuottimiin. Ylemmän rivin kuvat on otettu tunnin sonikoinnin jälkeen. Ksyleeninäytteen väri johtuu liuottimen väristä. [6, 19]

GO:n käsittelylle ja johdannaisten valmistukselle tärkeä liukoisuus (kuva 3) riippuu sekä käytetystä liuottimesta että GO:n hapetusasteesta. Mitä suurempi GO:n pinnan polaarisuus on, sitä parempi myös liukoisuus on. Liukoisuus on yleensä suuruusluokkaa 1–4 mg/ml vedessä. Yhteen pakkautuneita GO-levyjä voidaan irrottaa toisistaan sonikoinnin avulla. [6]

## 2.3 Hapetusasteen vaikutus grafeenioksidin ominaisuuksiin

Grafeenioksidissa on kahdenlaisia hiilialueita,  $sp^2$ - ja  $sp^3$ -hybridisoituneita. Kunkin alueen sisällä kulkee erilaisia varauksensiirtoreittejä. Fotoluminesenssin emissio on riippuvainen  $sp^2$ -matriisin  $\pi$ - $\pi^*$ -siirtymistä. Luminesenssin ominaisuudet riippuvat voimakkaasti myös  $sp^2$ - ja  $sp^3$ -alueiden keskinäisestä suhteesta ja  $sp^2$ -alueiden koosta. [20]

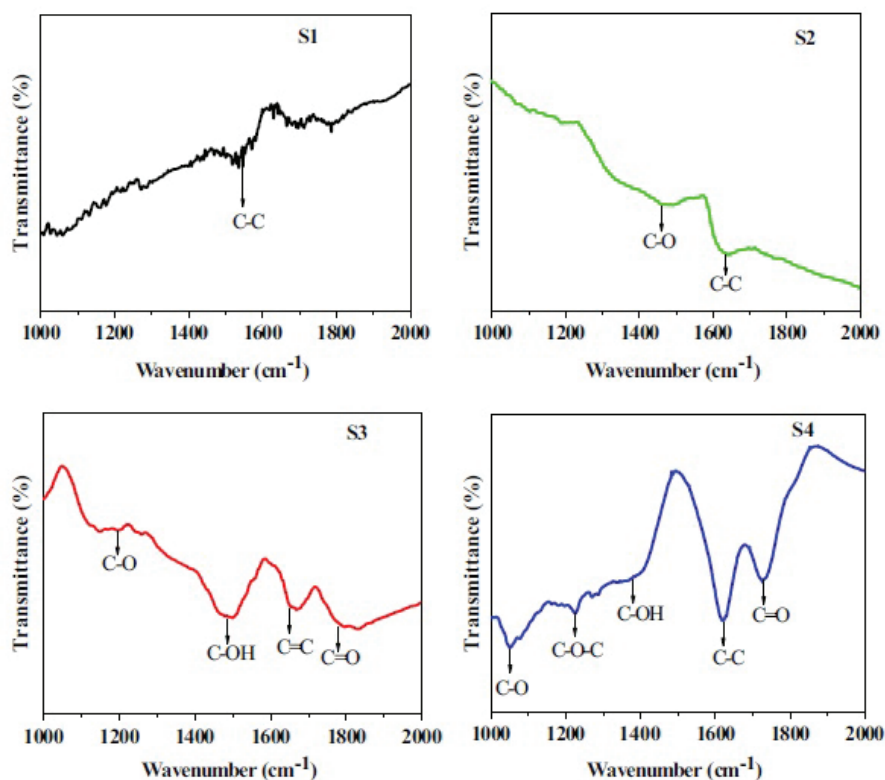
V. Gunasekaran *et al.* [20] ovat tutkineet hapetusasteen vaikutusta GO:n ominaisuuksiin. Eri hapetusasteet omaavat näytteet syntetisoitiin muokatulla Hummerin menetelmällä. [5, 21–23] Näytteiden analysoinnit tehtiin Raman-, FTIR-, XPS-, XRD- ja TEM-menetelmillä. Näytteistä mitattiin myös fotoluminesenssit. Hapetusasteen muutos vaikuttaa ensisijaisesti  $sp^2$ -klustereiden kokoon. Näytteiden  $sp^2$ -alueiden kokoja laskettiin olleen 15,96 nm, 12,53 nm, 16,09 nm ja 16,28 nm. [20]



Kuva 4: Eri hapetusasteet omaavien GO-näytteiden Raman-spektrit. Hapetusasteen kasvaminen johtaa D- ja G-piikkien siirtymiseen suuremmille aaltoluville. [20]

Hapetusasteen muutos havaitaan kuvan 4 Raman-spektreissä D- ja G-piikki-  
 en siirtymisenä. D-piikki on seurausta tasossa olevien  $sp^3$ -hiiliatomien hen-  
 gitysvärähtelystä. G-piikki johtuu puolestaan GO-levyn  $sp^2$ -hiiliatomien vä-  
 rähtelystä. Hapetusasteen kasvamista seuraava G- ja D-piikkien siirtyminen  
 (G:  $1591\text{ cm}^{-1} \rightarrow 1656\text{ cm}^{-1}$ , D:  $1349\text{ cm}^{-1} \rightarrow 1513\text{ cm}^{-1}$ ) johtuu uusien  
 $sp^3$ -alueiden muodostumisesta. [20]

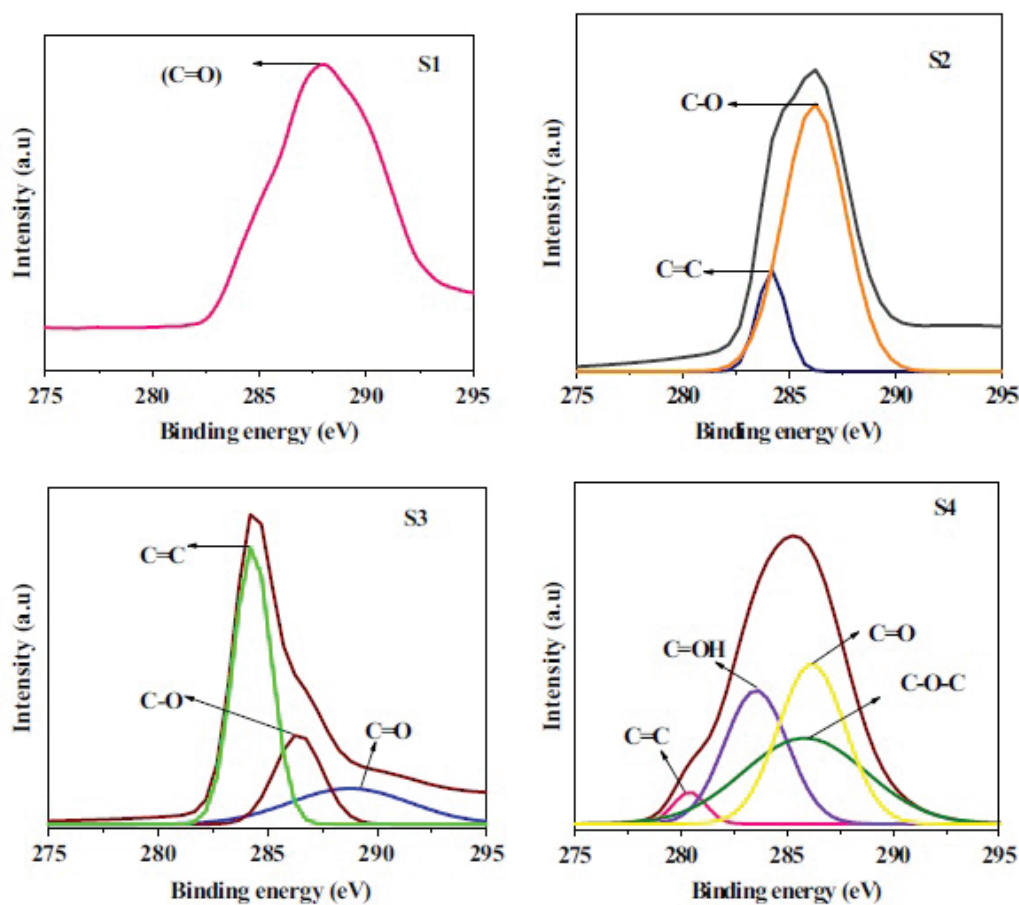
Kuvassa 5 nähdään eri näytteiden IR-spektrit. Spektreissä havaitaan selvästi  
 erilaisten C–O-sidosten syntyminen hapetusasteen kasvun myötä. [20]



Kuva 5: Eri hapetusasteet omaavien GO-näytteiden IR-spektrit. [20]

Grafeenioksidin XPS-spektrit on dekonvoluoitu gaussisella sovituksella nel-

jästä yksittäisestä piikistä koostuviksi (kuva 6). Piikkien tietyt sitoutumisenenergiat vastaavat tiettyjä funktionaalisia ryhmiä. Spektreistä havaitaan, että eri funktionaaliset ryhmät muodostuvat asteittain hapetuksen etenemisen myötä. Epoksidiryhmiä näyttää olevan vain kaikkein hapettuneimmassa näytteessä. [20]

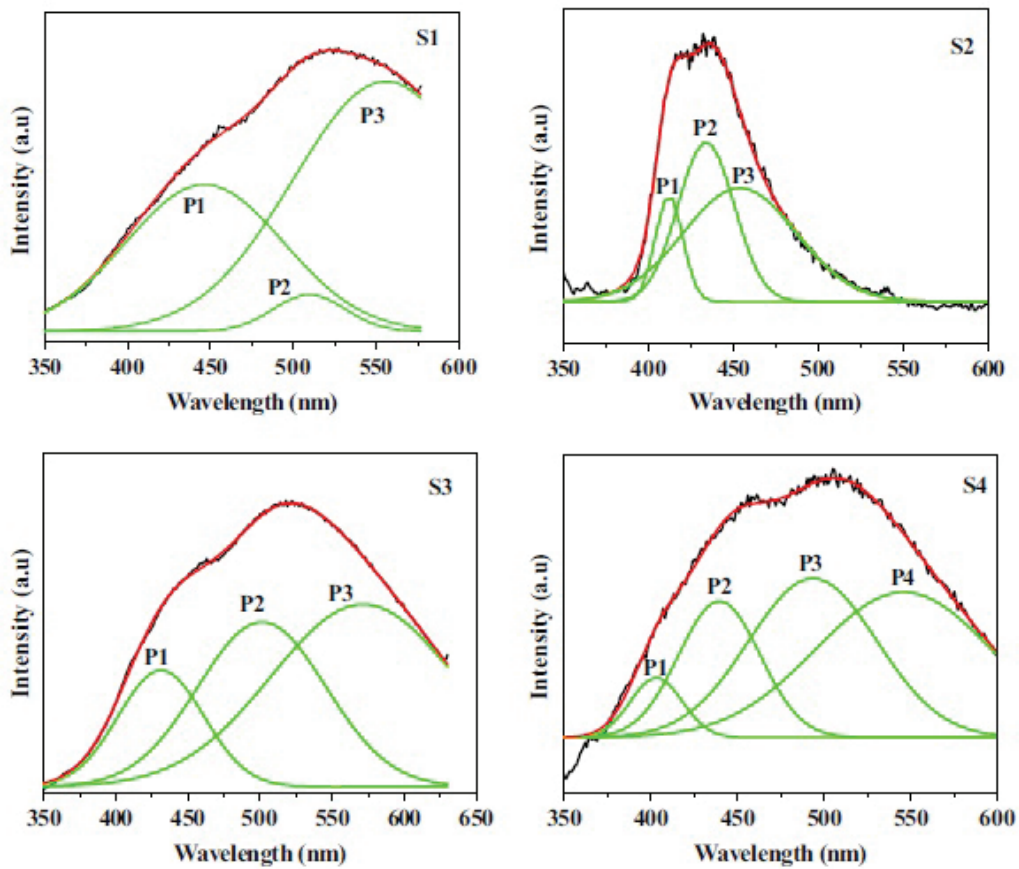


Kuva 6: Eri hapetusasteet omaavien GO-näytteiden XPS-spektrit.

Matalimmalla hapetusasteella olevan S1-näytteen spektri on seurausta pelkistä C=O-ryhmistä. Korkeimmalla hapetusasteella olevan S4-näytteen spektri on puolestaan seurausta useiden eri ryhmien (C=C, C-OH, C=O, C-O-C) yksittäisten spektrien yhteisvaikutuksesta. [20]

Fotoluminesenssispektrit mitattiin eksitaatioaallonpituudella 325 nm (kuva

7). Spektrin muoto muuttuu selkeästi hapettumisen myötä ja luminesenssin väri muuttuu lisäksi sinisestä punaiseksi. Laajat spektrit koostuvat useista komponenteista, jotka on selvitetty gaussisella dekonvoluoinnilla. Piikkien kohdat muuttuvat  $sp^2$ -klusterien koon kasvaessa. Ilmiö voi johtua joko elektroni-aukko-rekombinaatioista  $sp^2$ -alueilla tai varauksensiirtäjien rekombinaatioista hapettumattomilla alueilla ja niiden reunoilla. [20]



Kuva 7: Eri hapetusasteet omaavien GO-näytteiden fotoluminesenssin spektrit. P1, P2, P3 ja P4 ovat yksittäisten komponenttien Gaussisia sovituksia.[20]



## 2.4 Grafeenioksidin fluoresenssi

Grafeenioksidi on elektronisilta ominaisuuksiltaan hybridimateriaali, jossa esiintyy sekä johtavia  $\pi$ -tiloja että  $sp^2$ -hiiliä ja suuria  $sp^3$ -sitoutuneiden hiilien  $\sigma$ -tilojen välisiä energia-aukkoja. Ideaali grafeeni koostuu pelkistä  $sp^2$ -hybridisoituneista hiiliatomeista. Happea sisältävien ryhmien epäyhtenäinen leviäminen grafeenin pinnalle johtaa pienien (2–3 nm), järjestäytyneiden  $sp^2$ -klusterien muodostumiseen. Klustereita ympäröi  $sp^3$ -CO-matriisi. Pelkistymistä voidaan käyttää  $sp^2$ - ja  $sp^3$ -alueiden suhteiden ja energia-aukkojen muokkaamiseen. Eristävä GO voidaan siis muuttaa joko kemiallisesti tai termisesti puolijohteeksi ja edelleen metallimaiseksi grafeeniksi. Pelkistetyn GO:n laatu on kuitenkin heikompi puhtaaseen grafeeniin nähden, sillä se sisältää edelleen hieman happiatomeita, Stone-Wales-virheitä (eli pentagoni-heksagoni-pareja) ja CO:n tai CO<sub>2</sub>:n irtoamisen aiheuttamia reikiä. [18]

Grafeenille ominainen energia-aukkojen puuttuminen johtaa siihen, ettei grafeeni ole fluoresoiva (paitsi fononien avustuksella). GO:n heterogeeninen, energia-aukkoja sisältävä rakenne puolestaan mahdollistaa fluoresenssin NIR-, Vis- ja UV-alueilla. GO:lle luontainen ja muokattava fluoresenssi voi avata tien ennennäkemättömiin optisiin sovelluksiin esimerkiksi lääkeaineiden kuljetuksen tai elävien solujen kuvantamisen aloilla. [18]

GO:n fluoresenssi on seurausta lokalisoitujen elektronisten tilojen elektroni-reikä-parien useista erilaisista konfiguraatioista. Fluoresenssin tarkkaa mekanismia ei kuitenkaan tunneta. GO:n rakenteen  $sp^2$ -klusterien koko määrittää paikallisen energia-aukon suuruuden ja näin ollen myös emittoituvan fluoresenssin aallonpituuden. Koska GO:ssa esiintyy useita erikokoisia  $sp^2$ -klustereita, sen emissiolla on vyömäinen rakenne. Alle 1 nm kokoiset klusterit

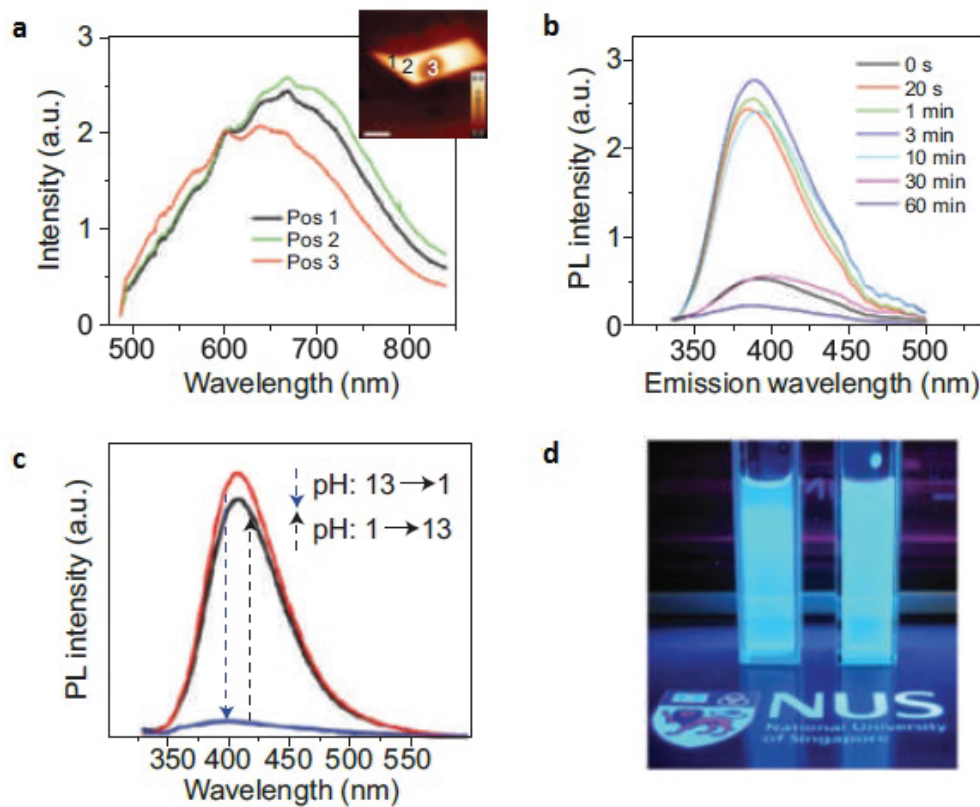
johtavat UV-Vis-alueen emissioon, kun taas suuremmat, yli 2 nm:n kokoiset klusterit johtavat Vis-NIR-alueen emissioon. [18]

Fluoresenssia on havaittu hyvinkin eri kokoisista GO-levyistä. Nanokokoluokan näytteistä on havaittu matalan energian (punaisen valon ja NIR-alueen) fluoresenssia. Leveydeltään 1–10  $\mu\text{m}$ :n kokoisilla levyillä on havaittu myös vastaavia ominaisuuksia eli levyn koko ei vaikuta kovinkaan paljoa GO:n emissioenergiaan. Emissiopiikin on havaittu punasiirtyvän NIR-aluetta kohti GO:n pelkistymisen ja siitä seuraavan intensiteetin vaimenemisen myötä. Happiplasmakäsitellyn grafeeninäytteen laaja punaisen valon ja NIR-alueen fluoresenssispektri on esitetty kuvassa 8a. [18]

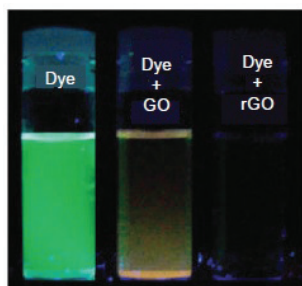
GO omaa myös heikon sinisen valon ja UV-alueen fluoresenssin (ohutkalvolla 390 nm ja liuoksessa 440 nm kohdalla), kun viritykseen käytetään UV-säteilyä. Eri tyyppisten näytteiden välinen siirtymä saattaa johtua matriisien dielektristen ominaisuuksien eroista. GO:n fluoresenssin intensiteettiä voidaan parantaa lyhyellä hydratsiinialistuksella (kuva 8b). Maksimaalinen fluoresenssin intensiteetti saavutetaan, kun GO:n annetaan pelkistyä vain hieman. [18]

Sinisen fluoresenssin on havaittu olevan pH-riippuvainen (kuva 8c). Fluoresenssi voidaan havaita jopa paljaalla silmällä korkeassa pH:ssa. Matala pH sammuttaa fluoresenssin lähes täysin. Ilmiö johtunee GO:n emissiivisten kohtien protonoitumisesta/deprotonoitumisesta. [18]

Vaikka GO on itse fluoresoiva, se voi sammuttaa muiden molekyylien fluoresenssin (kuva 9). Mitä pelkistyneempi GO on, sitä tehokkaampaa fluoresenssin sammuminen on. Sammuminen johtuu FRET-ilmiöstä (s. 62). Kyseistä ilmiötä voidaan hyödyntää FQM-kuvantamisessa (*Fluorescence Quenching*



Kuva 8: GO-näytteiden fluoresenssi. a) Happiplasmalla hapetetun grafeenilevyn fluoresenssi. Kuvassa nähdään aallonpituudella 473 nm viritetyn näytteen konfokaalinen fluoresenssikuva. Spektrit on mitattu kuvaan merkityistä kohdista. b) Hydratsiinihöyrylle altistetun GO-ohutkalvon fluoresenssispektrit. Fluoresenssin intensiteetti kasvaa 3 minuuttiin asti ja alkaa sen jälkeen laskea pelkistykseen edetessä. c) Grafeenin kvanttipisteiden fotoluminesenssi on pH-riippuvainen (sinisestä mustaan pH:n noustessa ja punaisesta siniseen pH:n laskiessa). d) Nanokokoluokan GO:n liuoksen sininen fluoresenssi. [18]



Kuva 9: GO pystyy sammuttamaan fluoroforien fluoresenssin hyvinkin tehokkaasti. [18]

*Microscopy*), jossa GO muodostaa tumman kontrastin verrattuna fluoresoivaan ympäristöön. Menetelmällä voidaankin tutkia yksittäisten GO-levyjen morfologisia ominaisuuksia. Kuvassa 9 nähdään, miten GO pystyy sammuttamaan erilaisten väriaineiden fluoresenssin. Puhdas grafeeni voi sammuttaa fluoresenssin noin 30 nm:n päästä. [18]

### 3 Kemiallinen funktionalisointi

Grafeenioksidin pintaan voidaan kiinnittää lukuisia funktionaalisia ryhmiä sekä kovalenttisesti että ei-kovalenttisesti. Kovalenttisessa funktionalisoinnissa voidaan hyödyntää GO:n karboksyylihappo-, epoksi- ja hydroksyyliiryhmiä. Tietty reagenssi voi reagoida useiden eri ryhmien kanssa. Reaktioiden selektiivisyyden osoittaminen voi olla hankalaa grafeenioksidin monimutkaisen rakenteen karakterisoinnin vaikeuden vuoksi. [6]

Rakenteensa ja hydrofiilisten ryhmiensä ansiosta GO on erinomainen isäntämatriisi pitkäketjuisille, alifaattisille hiilivedyille, siirtymämetalleille, hydrofiilisille molekyyileille ja polymeereille. Sillä on potentiaalia myös ohuiden, älykkäiden kalvojen valmistamisessa. [24]

Funktionalisoinnissa kannattaa yleensä välttää voimakkaasti emäksisiä olosuhteita, sillä ne käynnistävät GO:n pelkistymisen. Voimakkaasti emäksiset karbanioninukleofilit, organolitium- ja organokupraattireagenssit eivät siis toimi funktionalisoinnissa. Pelkistävät sivureaktiot johtunevat GO:iin imeytyneen veden ja sen pinnan tertiääristen alkoholien aiheuttamasta reagenssin hydrolyysistä, jota seuraa hydroksidipohjainen GO:n pelkistyminen. Epäsuotuisa sivureaktio tapahtuu jopa, kun GO:n hydroksyyliiryhmät asetyloidaan ja se kuivataan mahdollisimman hyvin. GO:n kosteutta ei oletettavasti voida poistaa täysin, joten emäksiset karbanionit reagoivat veden kanssa ennen kuin ne pääsevät reagoimaan GO:n epoksidirenkaiden kanssa. [25]

GO on suuren pinta-alansa ja erikoisten sähköisten ominaisuuksiensa ansiosta mielenkiintoinen matriisi myös metallinanopartikkeleille (Au, Ag, Pd, Pt, Ni, Cu). Toiminnalliset nanopartikkelit voivat toimia muun muassa joh-

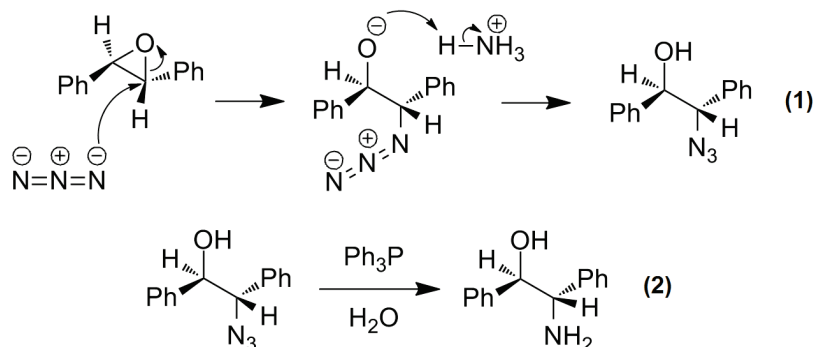
teina, fluoroforeina, magneetteina tai katalyytteinä. [26] Nanopartikkelien ongelmana on yleensä niiden epästabiilisuus, joka johtuu niiden suuresta pintaenergiasta. Luonnon pyrkimys energian minimoimiseen johtaa partikkelien spontaaniin aggregoitumiseen, mikä puolestaan johtaa partikkelien ominaisuuksien heikentymiseen tai katoamiseen tyystin. Ongelma voidaan ratkaista kiinnittämällä partikkelit niitä tukevaan matriisiin. Partikkelien voidaan myös antaa kasvaa suoraan sopivalle pinnalle. [26] Grafeenioksidimetallinanopartikkeli-hybrideillä on potentiaalia biolääketieteen, SERS-spektroskopian, energianvarastoinnin, sähkökemiallisen tunnistuksen ja katalyysin aloilla. [27]

### 3.1 Epoksidien reaktiot

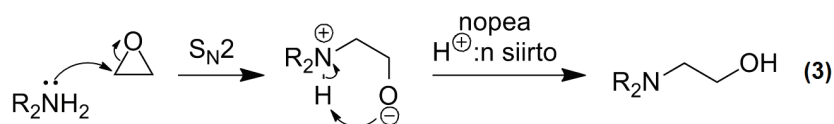
Grafeenioksidin epoksideja voidaan hyödyntää elektrofileinä ja muokata helposti renkaanavausreaktioiden kautta. Todennäköisin reaktiomekanismi on nukleofilin liittyminen  $\alpha$ -hiileen. Renkaanavausreaktion luonteesta johtuen kiinnittyneen funktionaalisen ryhmän viereen jää aina hydroksyyli-ryhmä. Tavallisimmin käytetyt reagenssit ovat amiineja, jotka voivat reagoida paitsi epoksidien, myös karboksyylihapojen kanssa. [6] Epoksidien renkaanavausreaktioita voidaan katalysoida hapoilla tai emäksillä. [28] Hiili-typpi-sidoksen labiilisuuden vuoksi funktionaaliset ryhmät irtoavat kuumennettaessa suhteellisen matalissa lämpötiloissa. [25]

#### 3.1.1 Esimerkkejä epoksidien reaktioista [29]

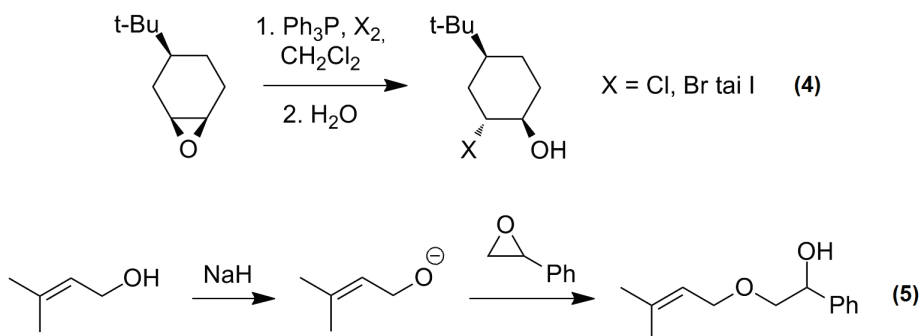
Epoksidit reagoivat atsidien kanssa muodostaen hydroksiatsidin (**1**), joka voidaan pelkistää edelleen primääriseksi amiiniksi trifenyylifosfinilla (**2**):



Epoksidit reagoivat  $S_N2$ -reaktiolla amiinien kanssa muodostaen aminoalkoholeja (3):



Epoksidirengas voidaan avata myös halideilla (4) tai alkoholeilla (5):



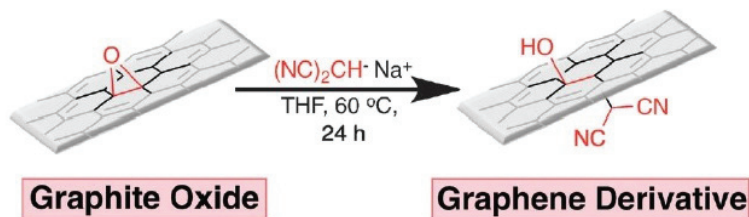
GO:n epoksidiryhmien funktionalisoinnissa on käytetty yksittäistapauksissa hiilinkleofiliä [25], atsidia [30] ja tioasetaattia [31]. GO:n epoksidiryhmien avauksessa käytetyt reagenssit ovat kuitenkin olleet pääsääntöisesti erilaisia

Reaktiot ovat kirjasta *Organic Chemistry* [29].

amiineita. Amiinien kautta on saatu kiinnitettyä pitkiä hiilivetyketjuja [32, 33], tietty ionineste [28], silaaniryhmiä [6, 34] ja polymeerejä [35, 36]. GO:iin on kiinnitetty myös pieniä primäärisiä amiineita sekä aminohappoja [24].

### 3.1.2 Malononitriili-hiilinkleofiili

Grafeenioksidin epoksidiryhmän funktionalisointireagenssina voidaan käyttää veden kanssa yhteensopivaa, anionista nukleofiiliä, malononitriiliä (kuva 10). Malonitriilin etuja ovat sen  $pK_a = 11.1$  (pienempi kuin veden), nitriliiryhmän helposti erottuva FTIR-venytys sekä mahdollisuus reaktion kvantitatiiviseen arviointiin XPS:n avulla typen kiinnittymisen ansiosta. [25]



Kuva 10: Malononitriilianionin additio GO:n epoksidirenkaaseen. [25]

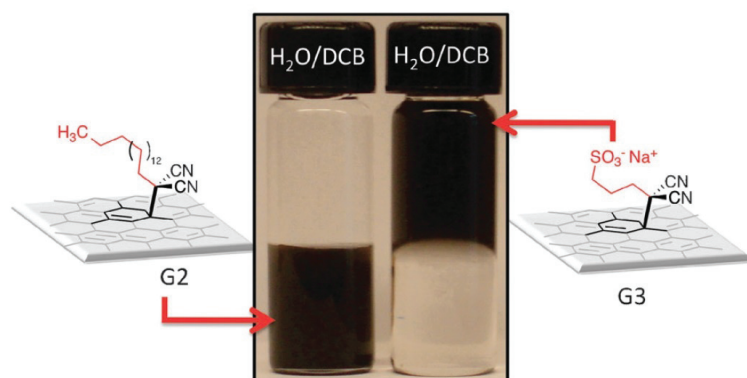
Synteesi suoritetaan sekoittamalla GO:a malononitriilin Na-suolan kanssa (1 eq GO:n jokaista hiiltä kohti) THF:ssä. Ruskea läpinäkyvä liuos muuttuu nopeasti läpikuultavan mustaksi dispersioksi. Reaktioseos jäädytetään ja tuote (G1) puhdistetaan sentrifugointien ja pesujen avulla. IR- ja XPS-analyysien perusteella malononitriilejä kiinnittyy yksi GO:n 46 hiiltä kohti. [25]

Saadun G1-tuotteen liukoisuutta voidaan parantaa malononitriiliryhmien alkyloinnilla. Anionisena alkylointireagenssina voidaan käyttää joko 1-jodihexaania tai 1,3-propaanisulfonyla. G1:n DMF-liuos deprotonoidaan NaH:lla



ja käsitellään 1-jodiheksaanilla tai 1,3-propaanisulfonylilla. Reaktio annetaan edetä 16 tuntia huoneenlämpötilassa, jonka jälkeen se sammutetaan ja GO-derivaatat G2 (heksadekaani) ja G3 (sulfonyaatti) voidaan eristää. [25]

G2 voidaan dispersoida helposti useisiin eri poolittomiin ja poolisiin orgaanisiin liuottimiin. G3 muodostaa puolestaan stabiilin dispersion vedessä. Veden ja orgaanisen faasin muodostamassa systeemissä G2 liukeneekin orgaaniseen kerrokseen. G3 liukenee vesikerrokseen (kuva 11). [25]



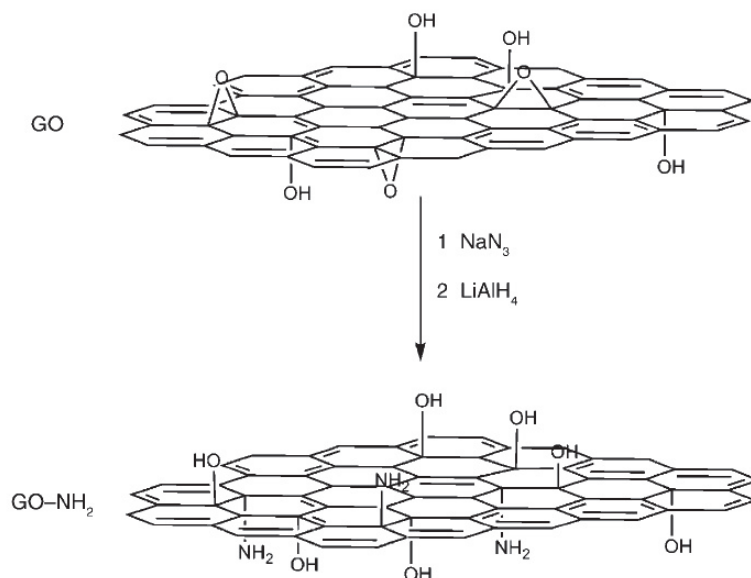
Kuva 11: G2:n ja G3:n liukoisuudet diklooribentseenin ja veden kaksoisfaasisysteemissä. [25]

### 3.1.3 Atsidifunktionalisointi

Epoksidirengas voidaan avata myös natriumatsidilla, joka saadaan edelleen pelkistettyä amiiniksi (kuva 12). Amiinifunktionalisoitu pinta muuttaa materiaalin johtavaksi. Resistiivisyys on silti seitsemän kertaa korkeampi kuin käsittelemättömällä grafeenilla. Konjugoitunut  $sp^2$ -verkosto palautuu siis vain enimmiltä osin pelkistuksen jälkeen. Amiiniryhmät voivat reagoida edelleen komplementaaristen ryhmien, kuten erilaisten elektrofilien kanssa. Atsidi-

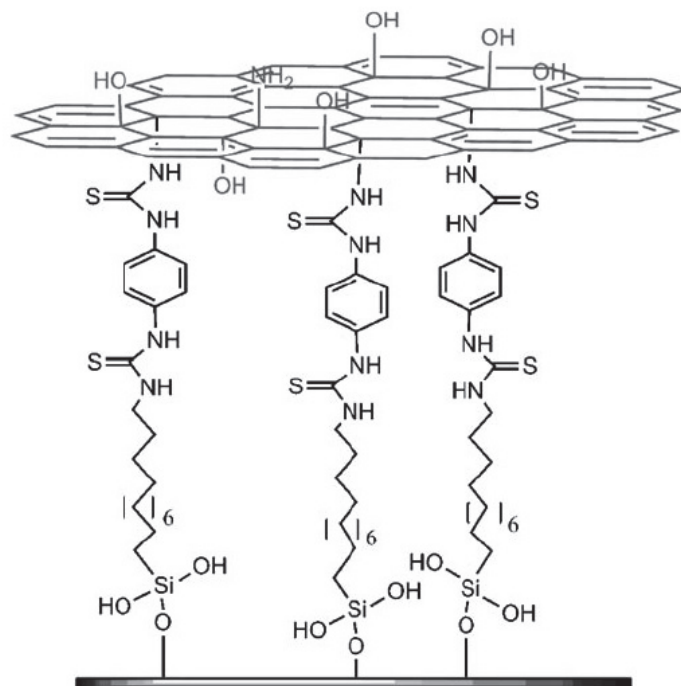
käsitelty GO voidaan funktionalisoida myös pitkillä alkyyliketjuilla click-kemian kautta. [30]

Atsidin lisäys suoritetaan refluksimalla GO:n ja natriumatsidin 1 : 1 vesi-asetonitriili-liuosta viikon ajan. N<sub>3</sub>-GO:n pelkistys tehdään lisäämällä LiAlH<sub>4</sub>:n vedetöntä TFH-liuosta. Pelkistyksen jälkeen rakenteessa on yksi typpi-atomi 14 hiilirengasta kohden. Kaikki atsidit pelkistyvät primäärisiksi amiineiksi. Lopullinen rakenne on esitetty kuvassa 12. [30]



Kuva 12: GO:n käsittely NaN<sub>3</sub>:lla ja LiAlH<sub>4</sub>:llä. [30]

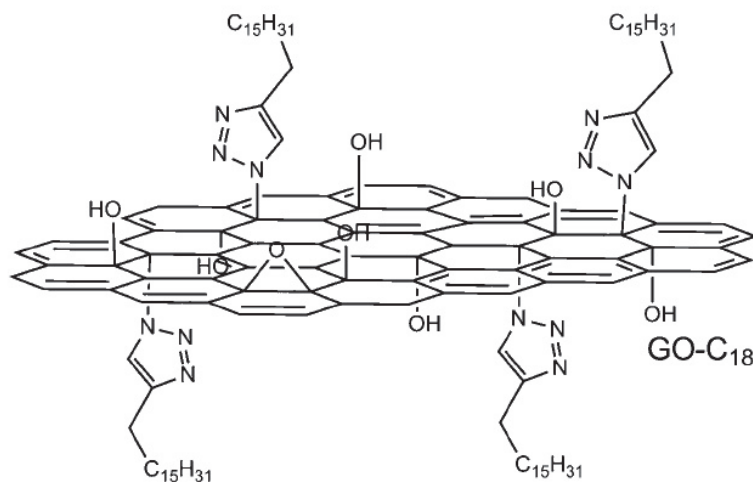
Saatu pelkistetty amiinirakenne on saatu kiinnitettyä kovalenttisesti SiO<sub>2</sub>-pintaan. GO-NH<sub>2</sub>:n DMF-dispersio kiinnitettiin kuviodulle (5x3 mm, raitoja) poly(di-metyylisiloksaani)-merkille (*stamp*). Merkillä olleet partikkelit siirrettiin SiO<sub>2</sub>-kerroksen päällä olleen isotiosyanaattiryhmäkerroksen päälle konformaationaalisen kontaktin avulla. Isotiosyanaattiryhmät reagoivat tunnetusti primääristen amiinien kanssa muodostaen tiourea-johdannaisia (kuva 13).



Kuva 13: SiO<sub>2</sub>-substraatin päällä olevan isotiosyanaattikerroksen kiinnittyminen GO-NH<sub>2</sub>-levyyn. [30]

AFM-kuvassa näkyi alueita, joihin yksittäisiä 1 nm:n paksuisia levyjä on kiinnittynyt. Kontrollikokeet suoritettiin printtaamalla SiO<sub>2</sub>-pinnalla ollutta funktionalisoimatonta GO:a isotiosyanaattipinnalle ja GO-NH<sub>2</sub>:a pelkälle SiO<sub>2</sub>-pinnalle. Kummassakaan tapauksessa ei tapahtunut kovalenttista sitoutumista. Muodostunutta rakennetta voidaan kenties hyödyntää sähköisissä laitteissa, kuten edullisissa ohutkalvotransistoreissa. [30]

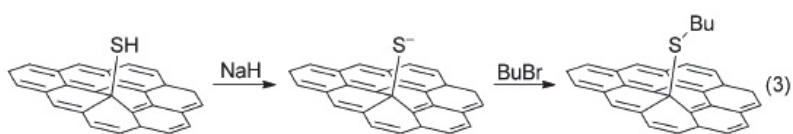
Pelkistämättömän N<sub>3</sub>-GO:n atsidiryhmiä voidaan hyödyntää erilaisissa click-kemian reaktioissa. N<sub>3</sub>-GO:iin voidaan kiinnittää esimerkiksi 1-oktadekyyni (kuva 14). Reaktio suoritetaan click-kemialle tyypillisissä olosuhteissa vesitert-butanoli-liuoksessa. Katalyytteinä toimivat natriumaskorbaatti ja kuparisulfaatti. [30]



Kuva 14: GO-C<sub>18</sub>-levyn rakenne. [30]

### 3.1.4 Tiolifunktionalisointi

H.R. Thomas *et al.* [31] toivat ensimmäistä kertaa esille mahdollisuuden rikin nukleofilien käyttöön GO:n epoksidirenkaiden avaamisessa. GO:n pintaan kiinnitettyjä tioliryhmiä voidaan muokata edelleen kemiallisesti esimerkiksi kiinnittämällä niihin alkyyliketjuja tai kultananopartikkeleita (kuva 15). [31]



Kuva 15: GO:n funktionalisointi tioliryhmillä ja sitä seuraava alkylointi. [31]

Kaliumtioasetaatti on hyvä nukleofilisen rikin lähde. Siihen kiinnittynyt asetaattiryhmä voidaan irrottaa helposti, jolloin jäljelle jää pelkkä -SH-ryhmä. Kaliumtioasetaatin ja GO:n reaktio voidaan suorittaa suhteellisen miedoisissa olosuhteissa, typen alla DMSO-liuoksessa (50 °C, 5 h). Reaktioseokseen

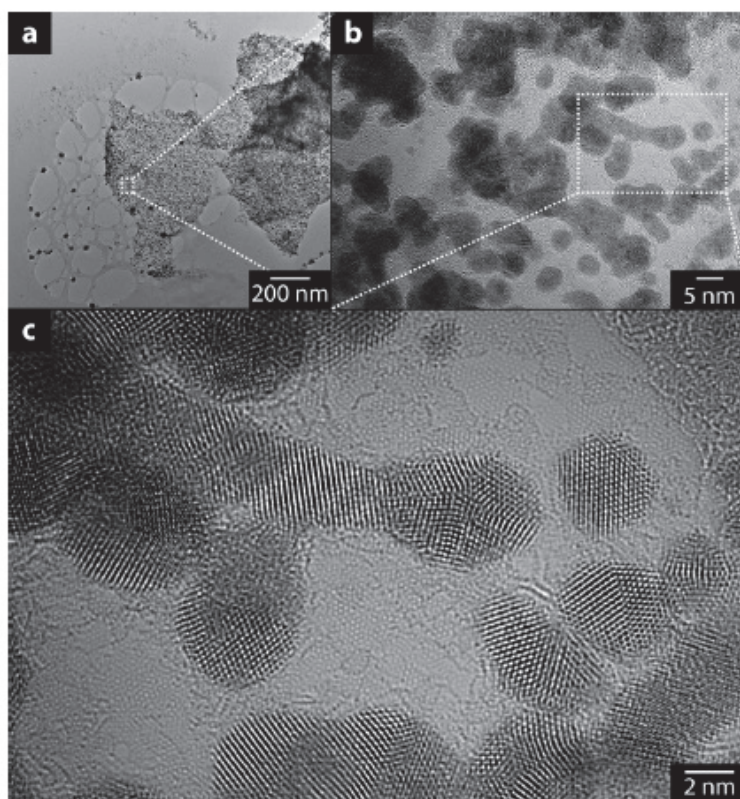
lisätään reaktion lopuksi 1 M HCl:a, minkä seurauksena tioasetaatti hydrolysoituu ja jäljelle jää pelkkä tioliryhmä. Tuotteen huolellinen pesu poistaa kaikki reagoimattomat reagenssit. [31]

Suurin osa tuotteen rikeistä on kovalenttisesti sitoutunut hiileen ja hydrolysoituneena tioliryhmäksi. Pieni osa rikistä esiintyy R-S-C-muodossa, mikä viittaa hydrolysoitumattomiin MeCOS-C-ryhmiin. Synteessissä käytetään typpi-ilmakehää epätoivottujen hapettumisen seurauksena syntyvien epäpuhauksien välttämiseksi. Pieni osa rikistä on kuitenkin S-S- ja S-O-sitoutuneissa muodoissa. GO:n funktionalisointi vähentää sen hygroskooppisuutta ja vetytositoutumista. [31]

Sekä hydroksidi- että epoksidiryhmien signaalit ovat huomattavasti pienemmät GO-SH:ssa kuin GO:ssa. Tämä johtuu luultavasti epoksidirenkaiden avautumisesta ja pelkistymisestä reaktion myötä, sillä tioasetaatit voivat toimia pelkistiminä tietyissä orgaanisen kemian reaktioissa. Kun alkuainekoostumusta seurataan reaktioajan funktiona, rikin määrän havaitaan lisääntyvän viiteen tuntiin asti, jonka jälkeen se alkaa pienentyä. Hapen osuus pienenee tasaisesti samanaikaisesti. Kun reaktion annetaan edetä 60 tuntia, tuotteessa ei ole käytännössä lainkaan rikkiä ja sen C/O suhde on samaa luokkaa, kuin 24 tunnin hydratsiinipelkistyksen myötä saatavalla materiaalilla. [31]

GO-SH:n pinta on nukleofiilinen, joten se voi reagoida elektrofiilien kanssa. Tiolit voidaan deprotonoida NaH:llä huoneenlämpötilassa ja N<sub>2</sub>-ilmakehässä. Seuraavan vaiheen funktionalisoinnin reagenssina voidaan käyttää bromibutaania, jolloin rakenteeseen saadaan kiinnitettyä alkylylietju tioetterin kautta (GO-SBu). Alkylylietjujen kiinnittyminen tioliryhmiin näyttää olevan täydellistä. Rakenteeseen jää vapaita hydroksyyliiryhmiä, joten nukleofiilisemmän tioliryhmän funktionalisointi on ilmeisesti helpompaa kuin hydrok-

syyliryhmän funktionalisointi. Funktionalisointireagensseina voidaan käyttää alkyylihalidien lisäksi muitakin elektrofilejä. Reaktioista mainittakoon suosittu tioli-eeeni-click-reaktio. [31]



Kuva 16: TEM-kuva GO-SH-pinnasta, jolle kultananopartikkelit ovat kiinnittyneet. a) Pienen suurennoksen TEM-kuva GO-SAu:sta. b) ja c) Suuremmat suurennot samalta alueelta.[31]

GO-SH-rakenteeseen voidaan kiinnittää myös kultananopartikkeleita. GO-SH kiinnitetään TEM-sirulle (*lacey carbon grid*), joka asetetaan  $\text{HAuCl}_4$ -liuokseen. Liuokseen lisätään pelkistimenä toimiva  $\text{NaBH}_4$ , jolloin kultananopartikkelit alkavat muodostua. Siru huuhdotaan vedellä ja asetonilla ja kuivataan ilmassa suodatinpaperin päällä. Kuvassa 16 nähdään saadun rakenteen TEM-kuva. Partikkelit jakautuvat pinnalle tasaisesti ja niiden tiheys

on suuri, mikä viittaa tioliryhmien tasaiseen jakautumiseen pinnalla. [31]

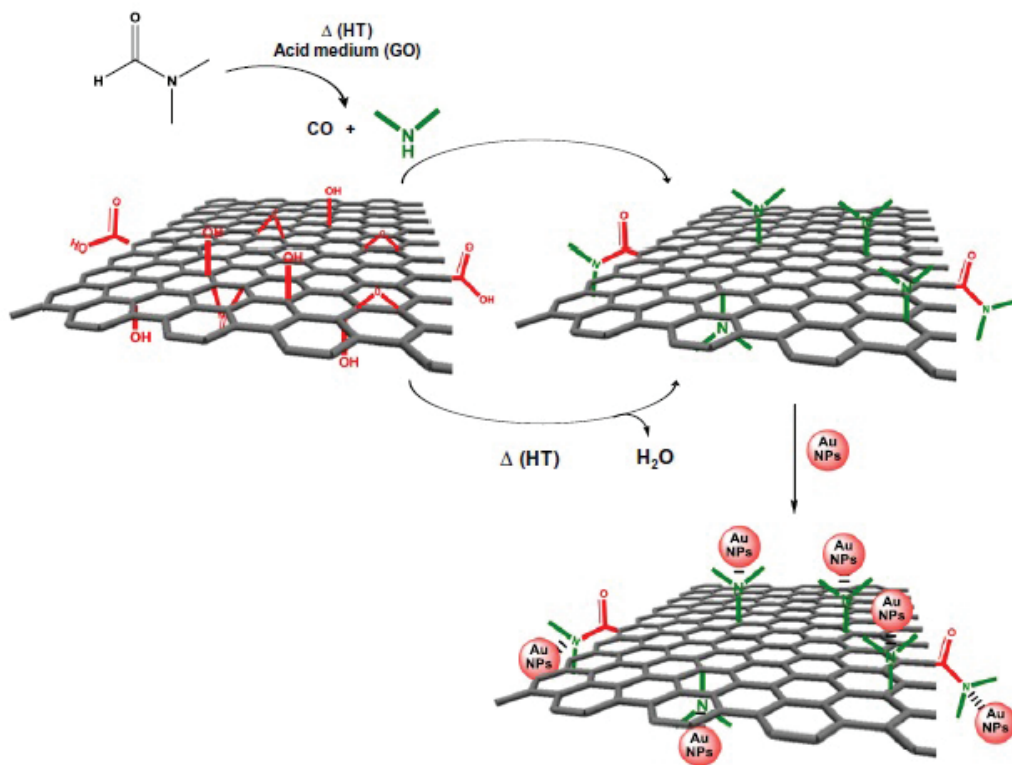
Kultananopartikkelien koko vaihtelee pienistä kulta-atomien muodostamista klustereista agglomeroituneisiin nanopartikkeleihin. Nanopartikkelien tyypillinen koko on kuitenkin välillä 5–10 nm. Kultananopartikkelien lisäksi pinnalle voidaan oletettavasti kiinnittää muitakin metallinanopartikkeleita. Muodostuvilla hybridimateriaaleilla on potentiaalia katalyyttisten ja sähkökemiallisten reaktioiden saralla. [31]

### 3.1.5 Funktionalisointi ja pelkistys DMF:n avulla

Grafeenioksidi voidaan pelkistää ja funktionalisoida samanaikaisesti myös lämmittämällä sitä kontrolloidusti DMF:ssä. Reaktio-olosuhteet edesauttavat DMF:n hajoamista dimetyyliamiineiksi. Dimetyyliamiinit voivat puolestaan reagoida GO:n karboksyylihappojen ja epoksidien kanssa muodostaen amiineja tai amideita. Funktionalisoinnin määrää voidaan kontrolloida lämpötilan ja reaktioajan kautta. [27]

GO:n funktionalisointi DMF:llä suoritetaan lisäämällä ja dispersoimalla GO:a kuivaan DMF:iin ultraäänikäsittelyllä ja kuumentamalla dispersiota 85–120 °C:ssa 1–5 päivää. Kiinnittyneet typpiryhmät voivat toimia kultananopartikkelien kiinnittymiskohtina. Kultananopartikkelien kiinnittäminen suoritetaan dispersoimalla modifioitu GO (2 mg) vedettömään DMF:iin (10 ml), jonka jälkeen kultananopartikkelien tolueeniliuos lisätään dispersioon. Funktionalisointi on esitetty kuvassa 17. [27]

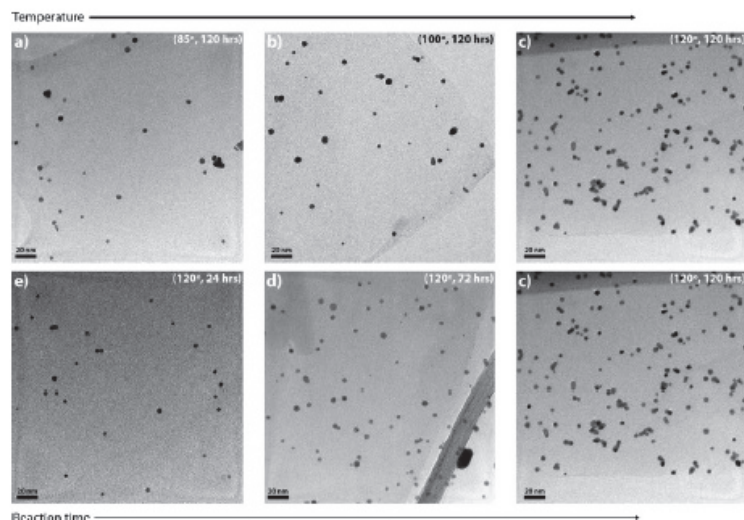
Kuvassa 18 nähdään, kuinka reaktioaika ja lämpötila vaikuttavat funktionalisoitumisasteeseen. Typen suhde hiileen lisääntyy enemmän suuremmissa



Kuva 17: GO:n samanaikainen funktionalisointi ja pelkistys DMF:n avulla. Kiinnittyneillä typpiryhmillä on suuri affiniteetti kultananopartikkeleita kohtaan. [27]

lämpötiloissa ja pidemmän reaktioajan myötä. Suurin funktionalisointisaste saavutetaan arvoilla  $T = 100 \text{ }^\circ\text{C}$  ja  $t = 5$  päivää. Tuotteessa on yksi typpi atomi 22 hiiltä kohden. [27]



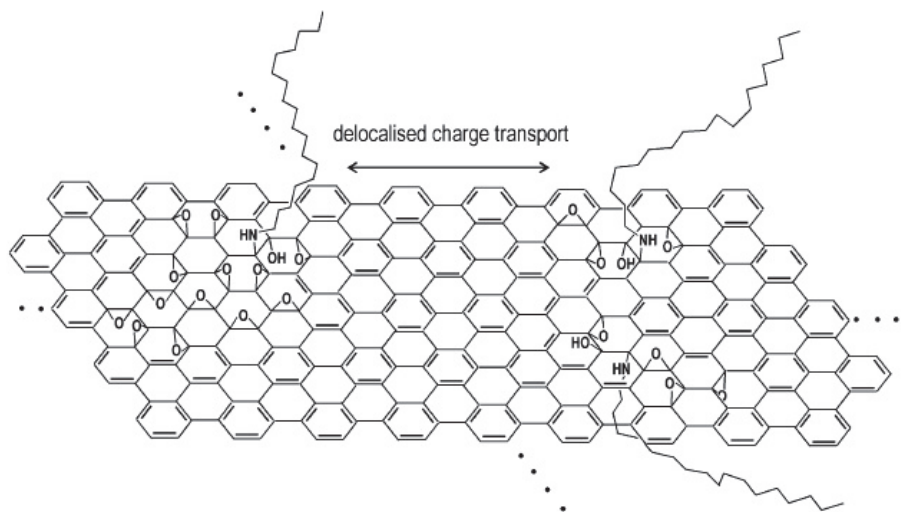


Kuva 18: TEM-kuvia eri reaktiolämpötilojen ja -aikojen jälkeen. Mitä suurempia lämpötilat ja reaktioajat ovat, sitä suurempi funktionalisoitumisastekin on. Kultananopartikkelit (koko noin 5 nm) erottuvat mustina pisteinä. [27]

### 3.1.6 Oktadekyyliamiini

Oktadekyyliamiinilla (ODA:lla) on nukleofiilina toimiva amiiniryhmä, joka pystyy liittymään epoksidirenkaaseen (kuva 19). ODA:lla on myös pitkä hiilivetyketju, joka pystyy alentamaan sillä funktionalisoidun GO:n pintaenergiaa huomattavasti. Tuote saadaan tästä johtuen liukenemaan orgaanisiin liuottimiin. Pinnasta saadaan jopa superhydrofobinen lyhyen lämpökäsittelyn jälkeen. Lämpökäsittely poistaa ylimääräiset (epästabiilimmat) happea sisältävät ryhmät. Muodostuva kalvo on itsepuhdistuva ja sillä on potentiaalia edulliseksi hydrofobiseksi pinnoitteeksi. [32]

Ensimmäisessä synteesissä GO ja oktadekyyliamiini (sekä mahdollisesti 13-diisopropyylkarbodi-imidi) sekoitetaan diklooribentseenissä tyypellä huuhtotussa reaktioastiassa. Reaktioseosta lämmitetään (80 °C) ja sonikoidaan ty-



Kuva 19: Oktadekyyliamiinilla funktionalisoidun GO:n rakenne. [33]

pen alla 24 tunnin ajan. Saadut ODA-GO-levyt voidaan puhdistaa ylimääräisistä reagensseista etanolilla ja toluenilla sekä useilla toistuvilla sakan dispersioinneilla liuottimiin, sentrifugoinneilla ja sonikoinneilla. Saanto on noin 50 %. Tuote liukenee tetrahydrofuraaniin, tolueniin, klooribentseeniin ja diklooribentseeniin. [33]

Osa labiileista happea sisältävistä ryhmistä ilmeisesti hajoaa reaktion aikana ja vain pieni osa ODA:sta sitoutuu GO:iin. [32] Alkuaineanalyysin perusteella oktadekyyliketjuja on kiinnittynyt yksi kahtatoista grafeenitason heksagonaalista yksikköä kohden. Tulos on varmistettu AFM- ja korkean resoluution STM-mittausten avulla. IR-spektrin perusteella amiini on reagoanut epoksidin, mutta ei karboksyylihapon kanssa. [33]

Sittemmin julkaistussa, yksinkertaisemmassa synteesissä GO dispersoidaan etanoliin, jossa on ODA:a. Suspensiota sonikoidaan 2 h ja ODA-GO erotetaan suodattamalla (nylonkalvo, 0,02  $\mu\text{m}$  Whatman). Tuote pestään etano-

lilla ylimääräisen ODA:n poistamiseksi. Saatu tuote kuivataan vakuuissa ja kuumennetaan 150 °C:ssa tunnin ajan. Lämpökäsitelty ODA-GO dispersioitiin etanoliin ja suodatettiin superhydrofobisen kalvon muodostamiseksi. [32]

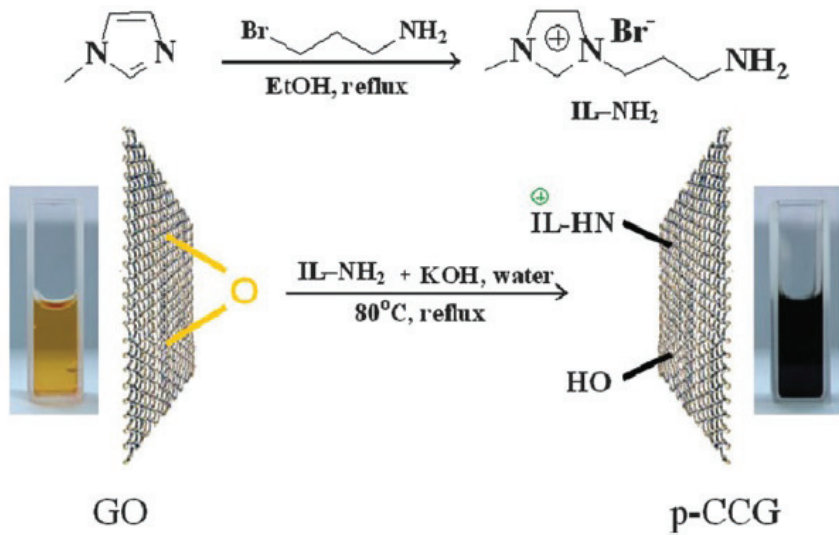
### 3.1.7 1-(3-Aminopropyli)-3-metyyli-imidatsoliumbromidi

Kaliumhydroksidilla katalysoidun epoksidin ja amiinipäätteisen ioninesteen (IL-NH<sub>2</sub>) nukleofiilisen renkaanavausreaktion pitäisi ainakin teoriassa tapahtua helposti. Näin kiinnitetyn ioninesteen kationit stabiloivat GO:n dispersoitumista liuottimiin hylkivien vuorovaikutusten myötä. GO:n funktionalisointi IL-NH<sub>2</sub>:lla on esitetty kuvassa 20. [28]

Kun IL-NH<sub>2</sub> lisätään GO:n vedessä olevaan dispersioon (0,5 mg/ml), havaitaan GO-levyjen ionisuolasta johtuva suolaefekti. Sameaan seokseen lisätään KOH ja sitä sonikoidaan 30 minuuttia, jonka aikana muodostuu homogeeninen ja läpinäkyvä liuos. Liuosta sekoitetaan lopuksi voimakkaasti 80 °C:ssa 24 tunnin ajan. Liuos sentrifugoidaan, pestään etanolilla ja vedellä sekä ilma-kuivataan. Jos synteesissä käytetään emäskatalyytin sijaan happokatalyyttiä (HCl), reaktioseos pysyy sameana katalyytin lisäyksen ja sitä seuraavan sonikoinnin jälkeen. Sameus kertoo reaktion epäonnistumisesta. [28]

Muodostuva tuote dispersoituu hyvin veteen, DMF:iin ja DMSO:iin muodostaen pitkäaikaisesti stabiileja dispersioita ultrasonikoinnin jälkeen. Liuokoisuus veteen ja useisiin orgaanisiin liuottimiin mahdollistaa funktionalisoidun GO:n hyödyntämisen erinäisissä sovelluksissa, kuten metallinanopartikkelien komposiiteissa tai grafeenipohjaisten materiaalien sähkökemiallisissa sovelluksissa. Funktionalisoitua GO:a voitaisiin hyödyntää esimerkiksi elektrodien

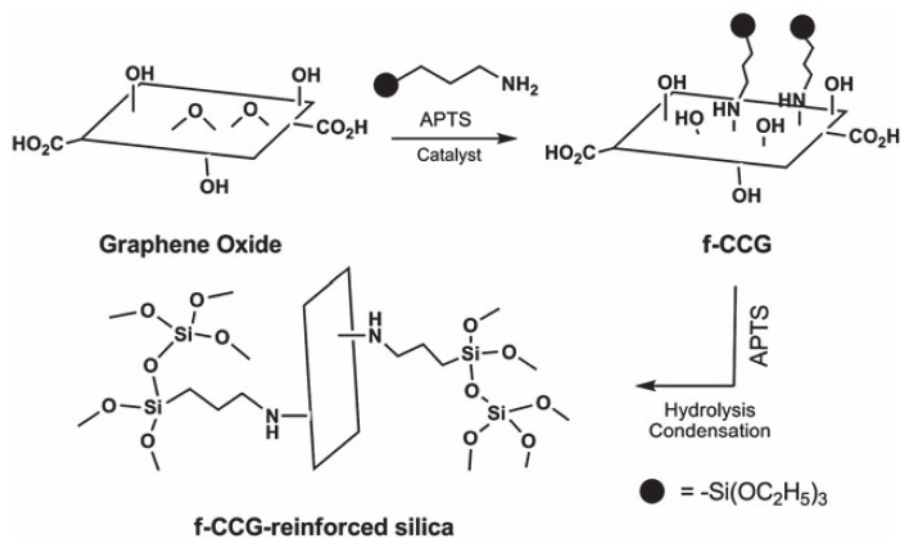
valmistuksessa. [28]



Kuva 20: Epoksidin funktionalisointi ioninesteellä (R = 3-(3-metyyli-imidatsolium)propaani). [6]

### 3.1.8 3-Aminopropyylitrietoksisilaanin kiinnittäminen

GO:n epoksidirenkaaseen on liitetty myös silaaniryhmä amiinin kautta. GO:n ja APTS:n reaktio etenee  $S_N2$ -substituution kautta (kuva 21). Funktionalisoidut levyt liukenevat veteen, etanoliin, dimetyyliformamidiin ja dimetyylisulfoksidiin. [6, 34]



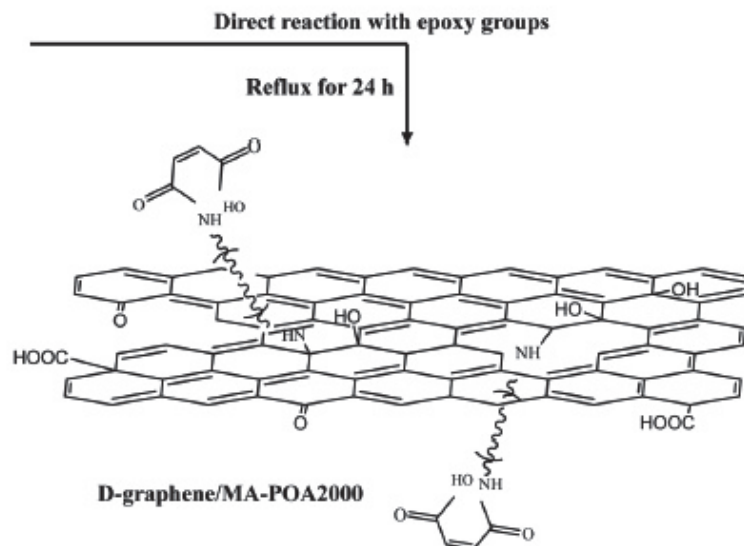
Kuva 21: GO:n epoksidin kovalenttinen funktionalisointi silaaniryhmillä. [6]

### 3.1.9 MA-POA2000

Epoksidin kovalenttinen funktionalisointi MA-POA2000-molekyylillä johtaa GO:n termisen stabiilisuuden parantumiseen. MA-POA on molekyylili, joka koostuu maleiininhydristä (MA) sekä siihen kiinnittyneestä molekyylipainon 2000 omaavasta poly(oksialkyleeni)-amiinista (POA2000). Jos samalla molekyylillä tehdään radikaalinen funktionalisointi, rakenteeseen muodostuu stabiilisuutta heikentäviä aukkoja. Kovalenttisen funktionalisoinnin reaktio on esitetty kuvassa 22. [35]

Synteesi suoritettiin lisäämällä 200 mg GO:a 100 ml:aan THF:a. Suspensiota sekoitettiin 1 tunti ja sonikoitiin 15 minuuttia. Ylimäärä MA-POA2000:a liuotettiin THF:iin ja lisättiin suspensioon. (Julkaisun näytteessä oli epoksidirenkaita arviolta 0.443 mmol.) Seosta refluksoitettiin 80 °C:ssa 24 tunnin ajan. Seos suodatettiin PTFE-kalvon läpi ja pestiin vedettömällä THF:lla useaan

kertaan ylimääräisen MA-POA2000:n poistamiseksi. Tuote kuivattiin vakuu-  
miunissa 80 °C:ssa yön yli. [35]



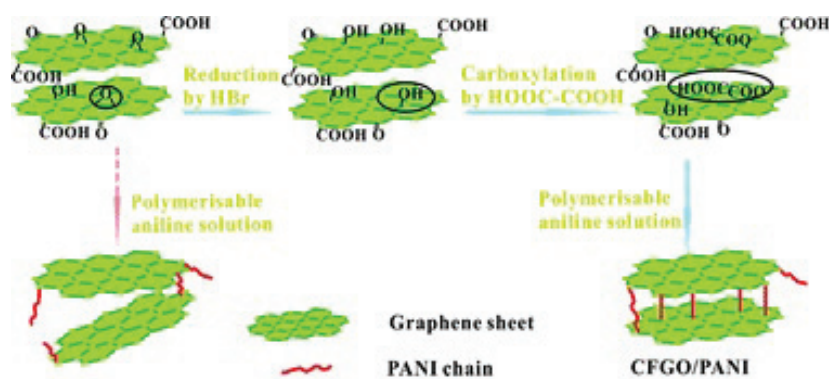
Kuva 22: GO:n epoksidin kovalenttinen funktionalisointi  
MA-POA2000-ryhmällä. [35]

### 3.1.10 Polyaniliini sekä epoksidien karboksylointi

Täysin uudenlainen ja helppo synteesi mahdollistaa GO:n ja polyaniliinin (PANI) komposiitin valmistamisen *in situ* polymerisaation avulla. [36] PANI-ketjun amiinityypet kiinnitetään GO:n pinnan ryhmiin, jotka on karboksyloitu oksaalihappokäsittelyllä. GO:n epoksidiryhmät muutetaan ensin hydroksyyliiryhmiksi väkevän HBr:n katalysoiman renkaanavausreaktion kautta. Kyseistä reaktiota seuraa OH-ryhmien karboksylointi oksaalihapon avulla (kuva 23). [36]

Karboksyylifunktionalisoitu-GO-PANI-komposiitti karakterisoitiin FTIR:n,

SEM:n, TEM:n, XRD:n, Ramanin ja TGA:n avulla. Rakenne osoittautui staabiiliksi ja erittäin tehokkaaksi varauksensiirtäjäksi. CFGO-PANI-materiaalista valmistetulla elektrodilla oli erinomainen sähkökemiallinen kapasitanssi rikkihapon vesiliuoksen elektrolyyttien kanssa. [36]



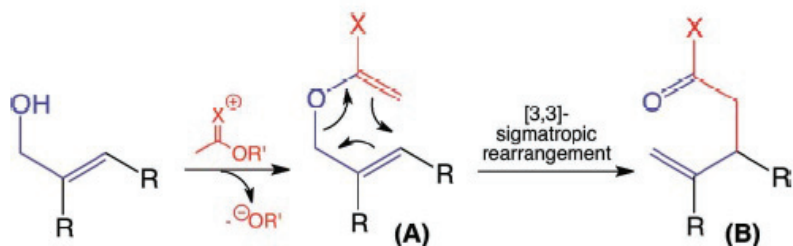
Kuva 23: GO:n epoksidien ja hydroksyylien karboksylointi sekä polyaniliinikomposiitin muodostuminen. [36]

### 3.1.11 Primääristen amiinien ja aminohappojen kiinnittäminen

Bourlinos *et al.* [24] ovat muokanneet GO:n pintaa sarjalla erilaisia primäärisiä amiineja (alifaattisten ketjujen pituudet  $n = 2, 4, 8, 12$ ) sekä aminohapoilla. Amiinit tai amiiniryhmän sisältävät molekyylit voidaan kiinnittää GO:n epoksidirenkasiin nukleofiilisellä substituutiolla vesidispersiossa. Reaktiot tapahtuvat yleensä helposti. Kun pintaa muokataan dodekyyliamiinia pidempiketjuisilla amiineilla, tarvittavat olosuhteet ovat rajummat luultavasti kineettisistä syistä johtuen. Muokatun pinnan ominaisuudet riippuvat käytetyn molekyylin ominaisuuksista. Esimerkiksi glysiinin natriumsuolamuodon glysiinaatin avulla GO:n pinnalle saadaan  $\text{COO}^-$ :n ansiosta paitsi negatiivinen varaus, myös kationinvaihtopaikka. [24]

## 3.2 Hydroksyyli-ryhmien reaktiot

Grafeenioksidin hydroksyyli-ryhmät voidaan muuttaa amideiksi tai estereiksi toisiintumisreaktioiden erilaisten muunnelmien kautta. Curtius- ja Hofmann-toisiintumisten stabiileina välivaiheina esiintyvät isosyanaatit reagoivat alkoholien tai amiinien kanssa muodostaen karbamaatti- tai urearyhmän. Claisen-toisiintuminen on puolestaan [3,3]-sigmatrooppinen reaktio, jossa hiili-happi-sidos uudelleenjärjestäytyy muodostaakseen uuden hiili-hiili-sidoksen (kuva 24). Uudelleenjärjestäytymisen tuotteena saadaan amidi- tai esteriryhmiä, jotka ovat kiinnittyneet grafeeniverkkoon vahvojen C–C-sidosten kautta. Tertiääristen amidien käyttöä kannattaa harkita, sillä ne eivät ole kovinkaan reaktiivisia mahdollista jatkumuokkausta ajatellen. [37, 38]



Kuva 24: Claisen-toisiintuminen. Allylvinyylietterin (A) kuumentaminen käynnistää [3,3]-sigmatrooppisen toisiintumisen tuottaen tyydyttymättömän karbonyylin (B). X on heteroatominen ryhmä, usein typpi- tai happipohjainen. R on usein hiilipohjainen funktionaalinen ryhmä, joka edustaa tässä tapauksessa grafeenimatriisia. [37]

Suurimmassa osassa GO:n funktionalisoinneista pinnan hydroksyyli- ja epoksidiryhmät muutetaan hiili-heteroatomi-sidoksiksi, jotka ovat melko epästabiileita ja poistuvat helposti pelkistävässä olosuhteissa. Claisen-toisiintumisen kautta tehtävän reaktion etuna on pelkistäviä olosuhteita hyvin sietävän C–C-sidoksen muodostuminen. Lisäksi reaktion seurauksena saatavia karbonyy-



liryhmiä voidaan muokata edelleen synteettisesti. Esteriryhmä voidaan esimerkiksi saippuoida helposti karboksyylihapoksi. Karboksyylihapo voidaan puolestaan muuttaa edelleen reaktiivisemmaksi happokloridiksi. [37]

### 3.2.1 Oktadekaani-O-alkylointi

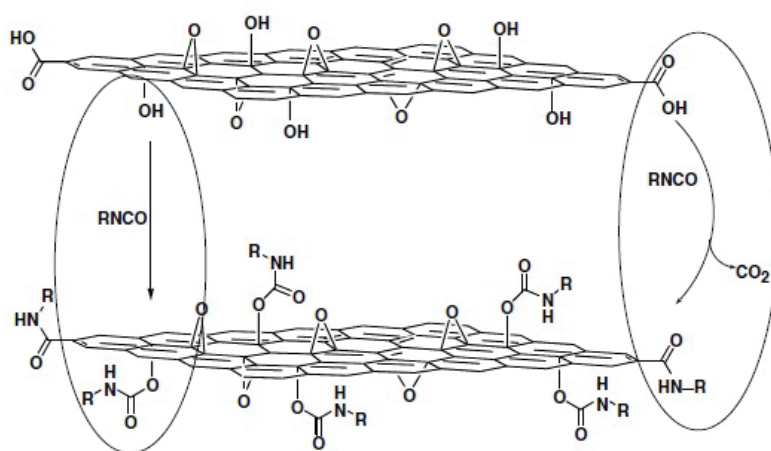
Orgaaninen funktionalisointi ja GO:n pelkistys rGO:ksi voidaan tehdä tietyillä reaktioilla samanaikaisesti. 1-bromioktadekaani reagoi GO:n hydroksyyli-ryhmien kanssa, jolloin pitkäketjuinen alkyyli-ryhmä kiinnittyy GO:n pintaan eetterihapen kautta (O-alkylointi). Pelkistyminen tapahtuu funktionalisoinnin kanssa samanaikaisesti pyridiinin toimesta. Tuote liukenee orgaanisiin liuottimiin. [39]

Synteesi suoritetaan GO:n ja DMF:n dispersiossa. Dispersioon lisätään 1-bromioktadekaani ja pyridiini, jonka jälkeen reaktioseosta kuumennetaan 115 °C:ssa 24 tunnin ajan. Tuote puhdistetaan lisäämällä seokseen etanolia, jonka jälkeen se suodatetaan ja pestään. Sakka liuotetaan THF:iin tai diklooribentseeniin 30 min sonikoinnilla. Oktadekyyliryhmät estävät funktionalisoidun GO:n aggregoitumisen, mikä mahdollistaa tuotteen liukenemisen orgaanisiin liuottimiin. Liukoisuus mahdollistaa tuotteen hyödyntämisen esimerkiksi tulevaisuuden orgaanisissa aurinkokennoissa tai valoa emittoivissa laitteissa. [39]

### 3.2.2 Isosyanaatti

Isosyanaattien kiinnittäminen GO:iin vähentää materiaalin hydrofilisyyttä ja mahdollistaa tuotteen dispersoimisen poolisiin aproottisiin liuottimiin.

Muita funktionaalisia ryhmiä, kuten syano-, ketoni- ja atsidosulfonyyliryhmiä sisältävien isosyanaattien kiinnittäminen mahdollistaa pinnan muokkaamisen edelleen. FT-IR- ja alkuaineanalyysimäärittysten perusteella isosyanaattikäsittely kohdistuu sekä karboksyyli- että hydroksyyliiryhmiin muodostaen amideita ja karbamaattiestereitä (kuva 25). Funktionalisointiastetta voidaan säädellä käytetyn isosyanaatin reaktiivisuuden ja reaktioajan kautta. [40]



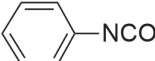
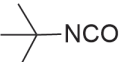
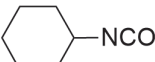
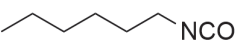
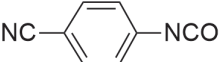
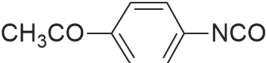
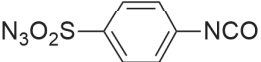
Kuva 25: Isosyanaattien reaktiot GO:n hydroksyyli- ja karboksyyliiryhmien kanssa. [40]

Tyypillisessä synteesissä GO lisätään kolviin, jossa on kuivaa DMF:a. Reaktioastiaan luodaan typpi-atmosfääri ja sinne lisätään haluttu isosyanaatti. (Kiinteät isosyanaatit lisätään kolviin GO:n kanssa ennen DMF:n lisäämistä.) Suspensiota sekoitetaan typen alla 24 tuntia ja tuote saostetaan dikloorimetaanista. Tuote ei dispersoidu lainkaan veteen, vaan poolisiin approottisiin liuottimiin, kuten DMF:iin, NMP:iin, DMSO:iin. Asetoni, dikloorimetaani, tolueni, tetrahydrofuraani, metanoli ja etanoli eivät myöskään dispersoi tuotetta. [40]

Jos oletetaan että suurin osa isosyanaateista reagoi GO:n hydroksyyliiryhmien

kanssa, hiilen ja typen suhdetta voidaan hyödyntää fuktionalisoitumisasteen laskemisessa. Eri isosyanaateilla saadut tulokset on esitetty taulukossa 1. Arvot kertovat kuinka monta grafeenihiiltä tuotteessa on kutakin isosyanaattia kohden. Funktionalisoitumisaste näyttää korreloivan hyvin suhteellisten reaktiivisuuksien kanssa. [40]

Taulukko 1: GO:n fuktionalisointiasteet eri isosyanaateilla

Isosyanaatti*	C/N-suhde
a) 	15,7 (**18,7)
b) 	20
c) 	16
d) 	18,3
e) 	12,4
f) 	7,6
g) 	16,1

\* Reaktio-olosuhteet: GO:a ja isosyanaattia sekoitettiin kuivassa DMF:ssä 24 tunnin ajan.

\*\* Reaktioaika oli 7 päivää.

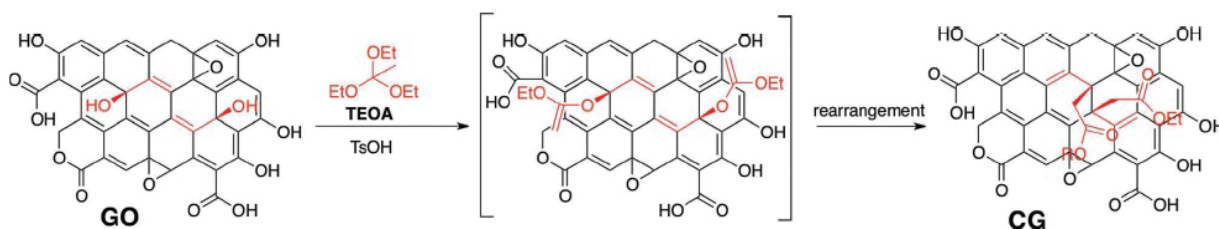
Osittain isosyanaateilla fuktionalisoidun GO:n hydroksyyli-ryhmät voidaan fuktionalisoida myös jollain toisella ryhmällä. Fenyyli-isosyanaatilla osittain fuktionalisoitu GO voidaan esimerkiksi fuktionalisoida vielä 4-syanofenyyli-isotiosyanaatilla (24 h reaktio). Tällöin kokonaisfuktionalisoitumisaste saadaan muutettua 15,7:stä 9,4:ään. [40]

Kun isosyanaateilla funktionalisoituja GO-näytteitä tutkittiin AFM:lla, niiden paksuus osoittautui samaksi kuin GO:n. Funktionalisoinnin vaikutusta GO:n paksuuteen ei siis pystytty havaitsemaan AFM:lla. GO-näytteet sisältävät usein pintaan kiinnittyneitä vesi- tai liuotinmolekyylejä, jotka häiritsevät paksuuden määrittystä. [40]

### 3.2.3 Erilaisia Claisen-reaktioita

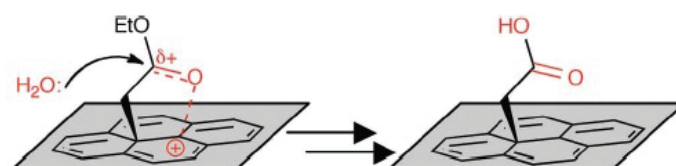
Johnson-Claisen-toisiintumisessa hydroksyyli-ryhmä korvataan esterillä. Liuottimena ja reagenssina voidaan käyttää trietyyli-*o*-asetaattia (TEOA). Kyseinen reagenssi muodostaa ensin vinyylieetterin ja katalyyttinä toimivan hapon läsnäollessa edelleen esterin (kuva 26). [37]

Raportoidussa synteesissä käytettiin kohtalaisesti hapetettua GO:a ( $C : O = 3 : 1$ ), sillä se on amfifilistä, mikä mahdollistaa GO:n paremman disper-soitumisen liuottimena käytettävään trietyyli-*o*-asetaattiin täysin hapetettuun GO:iin ( $C : O = 2 : 1$ ) verrattuna. Hieman trimetyyli-*o*-asetaattia kalliimpi TEOA valittiin reagenssiksi, koska sen korkeampi kiehumispiste on osoittautunut aiempien tutkimusten perusteella suostuisammaksi reaktiolle (108 °C vs. 142 °C). Etyyliesteri on lisäksi metyyliesteriä reaktiivisempi. [37]



Kuva 26: Johnson-Claisen-funktionalisoitu grafeenioksidi. TEOA kiinnittyy GO:iin muodostaen estereitä. [37]

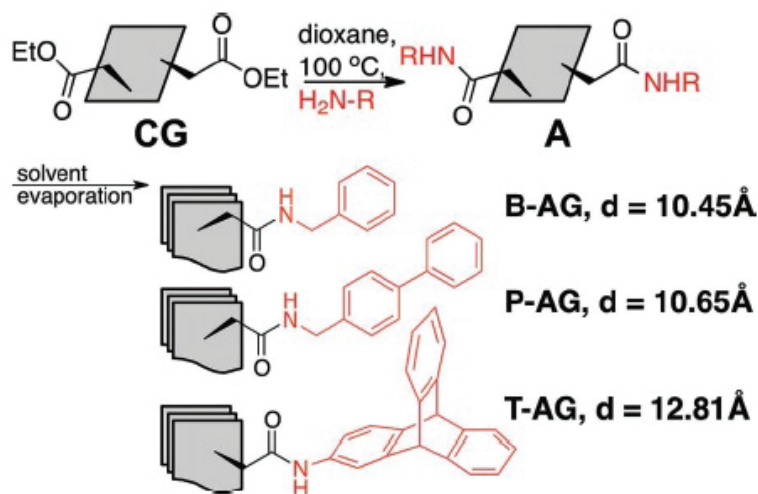
Synteesi suoritettiin refluksimalla GO:n, TEOA:n ja happokatalyyttinä toimivan TsOH:n dispersiota 36 tunnin ajan, minkä jälkeen jäädytetty reaktioseos sentrifugoitiin ja pestiin poolisilla, approottisilla liuottimilla (THF, asetoni). Tuotteen FTIR-, TGA-, XRD-, Raman- ja XPS-karakterisointien perusteella noin 10 % C–O-sidoksista muuttui C–C-sidoksiksi joko pelkistymisen tai funktionalisoinnin kautta. GO:n ionisoituvasta luonteesta johtuen happokatalyytti loi GO:n pintaan karbokationeita, jotka aktivoivat esterikarbonyylejä. Tämä edesauttoi veden nukleofiilistä liittymistä (kuva 27). [37]



Kuva 27: Claisen-toisiintuneen esterin aktivoituminen ja nukleofiilisen veden liittyminen. [37]

Synteesille löydettiin myös reitti, joka tuottaa suoraan karboksyylihapon. Synteesi suoritettiin siten, että 36 tunnin refluksionin jälkeen lämpimään reaktioseokseen lisättiin 1 M NaOH:a ja reaktioseosta sekoitettiin vielä 3 tuntia huoneenlämpötilassa. Tuote erotettiin sentrifugoimalla ja pesemällä ionivaihdetulla vedellä. [37]

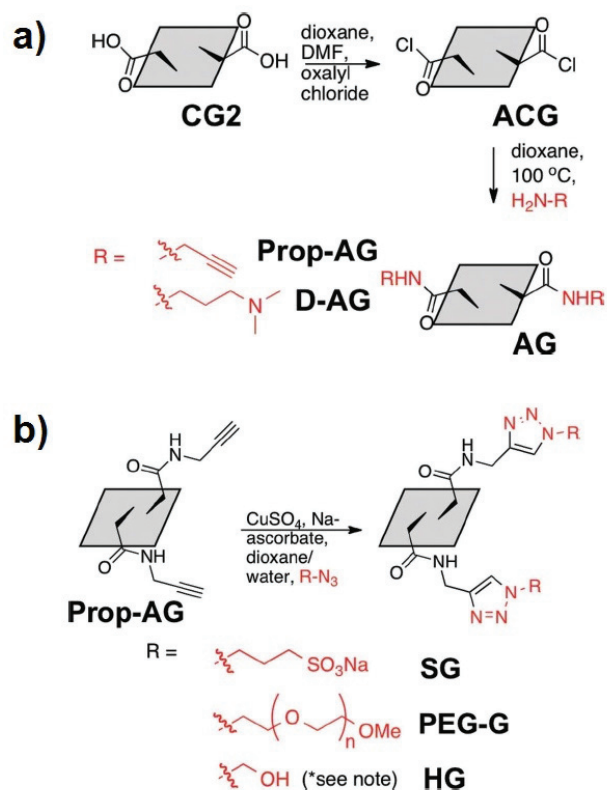
Karboksyylihappojohdannaisien voidaan antaa reagoida edelleen amiinien kanssa muodostaen amideita. Ensimmäisessä vaihtoehdossa amiinin annetaan reagoida suoraan esterin tai karboksyylihapon kanssa sekoittamalla reagensseja yön yli dioksaaniliuoksessa 100 °C:ssa. Tuotteena saadaan bentsyyliamidi- (B-AG), fenyylibentsyyliamidi- (P-AG) tai trityseeniamidi-GO:a (T-AG) (kuva 28). Funktionalisointisaste on noin 1 amidi 30 hiiltä kohden. [37]



Kuva 28: Bentsyylimidi- (B-AG), fenyylibentsyylimidi- (P-AG) tai trityseeniamidi-GO:n synteysi suoran amidoinnin kautta. [37]

Mahdollisia sovelluksia silmällä pitäen suoritettiin kaksi vaihtoehtoista amidointia. Propargyyliamidigrafeeni (Prop-AG) syntetisoitiin kuparipohjaisen click-reaktion substraatiksi. Dimetyyliaminopropyyliamidigrafeeni (D-AG) syntetisoitiin vesiliukoisen kationisen grafeenin saamiseksi. Reaktion tehostamiseksi osa karbonyyliryhmistä muutettiin oksalyylikloridin ja katalyyttinä toimivan DMF:n avulla reaktiivisimmiksi happoklorideiksi, jotka amidoitiin seuraavassa vaiheessa (kuva 29a). Funktionalisointumisaste oli noin yksi amidi 15 hiiltä kohden. [37]

Prop-AG voidaan funktionalisoida edelleen terminaalaisella alkyylillä click-kemian kautta. Terminaalinen alkyyni reagoi atsidiryhmän kanssa kupari-katalysoidun 1,3-dipolaarisen sykloaddition kautta. Atsideiksi valittiin sulfo-naattigrafeenin (SG) tuottava Na-3-atsidopropaani-1-sulfonaatti, atsidometanoli ja metoksipolyetyleeniglykoliatsidi (PEG-atsidi) (kuva 29b). [37]

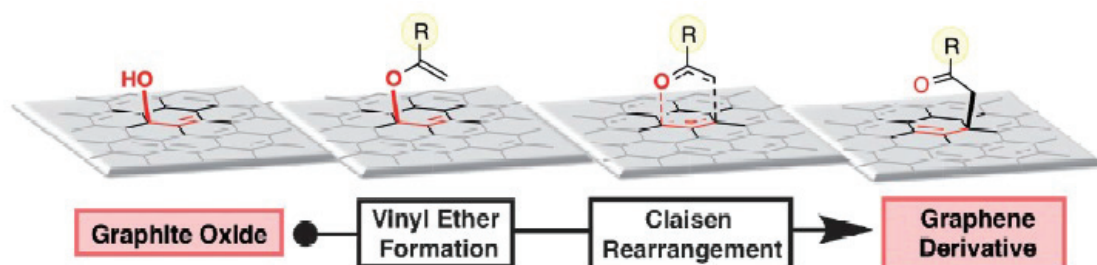


Kuva 29: a) Propargyylamidigrafeenin (Prop-AG) ja dimetyylipropyylamidigrafeenin (D-AG) synteesi happokloridivälivaiheen kautta. b) GO:n edelleenfunktionalisointi click-kemian avulla. [37]

### 3.2.4 Dimetyyliamidi Claisen-toisiintumisen kautta

Grafeenioksidin allyyliset OH-ryhmät voidaan muuttaa karbonyyliryhmiksi Eschenmoser-Claisen-toisiintumisen muunnelman kautta. Reaktion seurauksena allyyliset alkoholit muutetaan  $\gamma,\rho$ -tyydyttymättömiksi N,N-dimetyyliamideiksi. Reagenssina toimii N,N-dimetyyliasetamididimetyyliasetaaali (DM-DA). Kyseinen, kuvassa 30 esitetty reaktio on toimiva vaihtoehto, sillä sitä pystytään seuraamaan tehokkaasti typen lisäämisen ansiosta, lisäksi DMDA on spesifinen OH-ryhmiä kohtaan ja vinyyliryhmän siirtymään riittää pelkkä

lämpökäsittely. [38]



Kuva 30: GO:n pinnalla tapahtuva allyylinen hapelta hielle tapahtuva sidoksen vaihdos. Eschenmoser-Claisen-toisiintumisen muunnelma, R =  $N(CH_3)_2$ . [38]

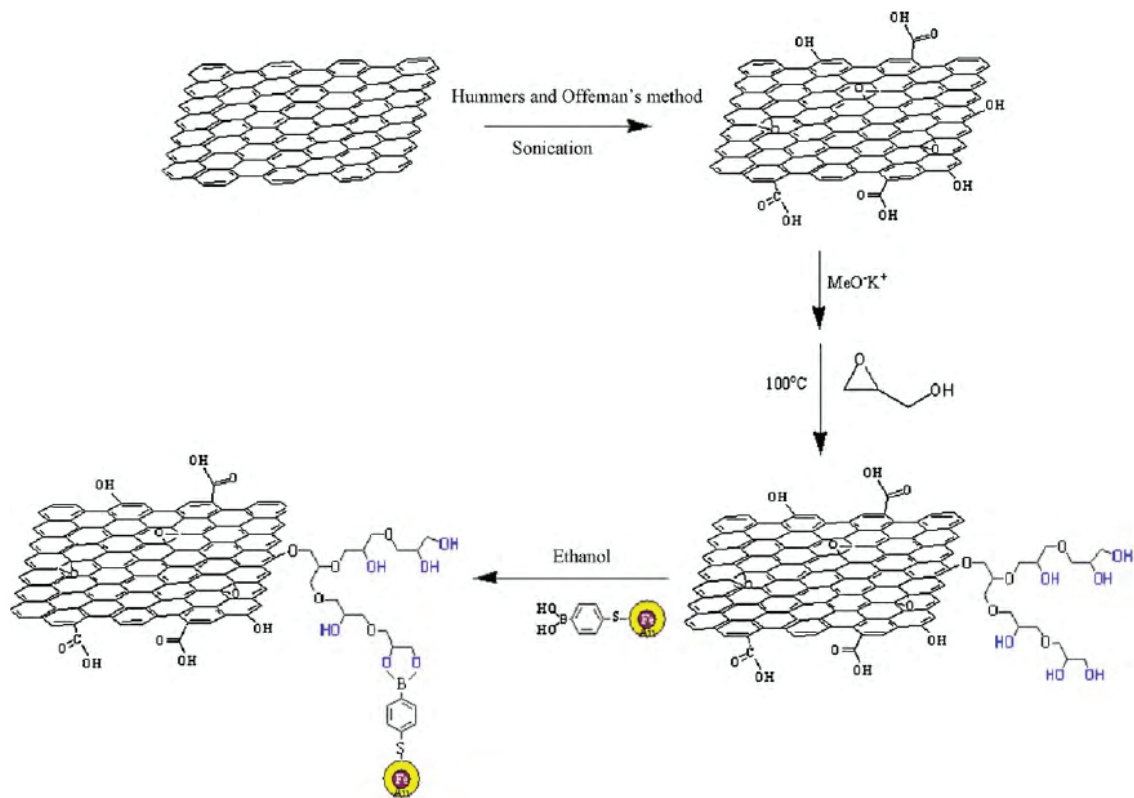
Synteesi suoritetaan sekoittamalla GO:n ja DMDA:n (2 eq jokaista GO:n happea kohden) THF-liuosta 60 °C:ssa 24 tunnin ajan. Läpinäkyvä liuos muuttuu reaktion edetessä mustaksi suspensioksi. Liukenematon tuote erotetaan toistuvien sentrifugointien sekä pesujen avulla ja kuivataan lopuksi. Synteesin saantoa saadaan parannettua nostamalla reaktiolämpötilaa. Liuottimina voidaan käyttää dioksaania (100 °C:ssa) tai diglyymiä (150 °C:ssa). Tyyppiä sisältäviä liuottimia kannattaa välttää tuotteen analysoinnin helpottamiseksi. Diglyymissä suoritettussa synteesissä typen kokonaisuus saatiin kasvamaan 3,1 %:iin ja hapen osuus laskemaan 11,1 %:iin. Rakenteessa on siis jokaista amidia kohden 23 hiiliatomia (yksi funktionaalinen ryhmä 1.25 nm<sup>2</sup> alalla). Eri analyysien perusteella DMDA näyttää toimivan paitsi siirtymäreagenssina, myös pelkistimenä. [38]

GO:n pintaan kiinnitetyt amidiryhmät voidaan saippuoida karboksylaattiryhmiksi voimakkaasti emäksisissä olosuhteissa (KOH, H<sub>2</sub>O, EtOH, refluksointi). Happojohdannainen voidaan saostaa happokäsittelyn avulla. GO:n amidien osuus pienenee reaktion myötä 3,1 %:sta 0,6 %:iin. [38]



### 3.2.5 Polyglyseroli ja magneettisten Fe/Au-nanopartikkelien kiinnittäminen

Grafeenioksidin hydroksyyliiryhmiin voidaan kiinnittää myös polyglyserolia. Synteesi perustuu glysidolin *in situ* renkaanavauksen polymerisaatioreaktioon. Polyglyseroliryhmiin voidaan kiinnittää edelleen magneettisia rautatimen ja kultakuoren omaavia nanopartikkeleita booriesterisidosten kautta (kuva 31). Kiinnitettävät nanopartikkelit on päällystetty 4-merkaptofenyyliboorihapolla. [41]



Kuva 31: PG-g-GO:n ja magneettisten Fe/Au-nanopartikkelien hybridirakenteen valmistaminen. [41]

Magneettiset nanopartikkelit ovat keränneet erityistä huomiota mielenkiin-

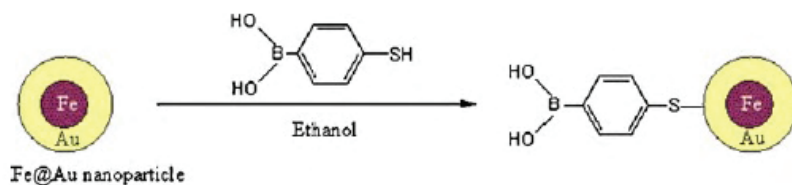
toisten ominaisuuksiensa ja potentiaalisten sovellustensa ansiosta. Niiden kiinnittämistä GO:n pintaan on kuitenkin tutkittu vain vähän. Partikkelien huono dispersoituvuus liuottimiin on hidastanut hybridimateriaalien kehitystyötä. [41]

Polyglyseroli on haaroittunut polymeeri, jota voidaan käyttää Fe/Au-nanopartikkelien templaattina. Kun polyglyseroli kiinnitetään GO:iin, saatu materiaali liukenee veteen polyglyserolin hydrofilisyyden ansiosta. Nanopartikkelit saadaan kiinnitettyä boorihapon ja polyglyserolin hydroksyyliyhmiesteröintireaktion kautta. [41]

Boorihapolla funktionalisoidut Fe/Au-partikkelit (kuva 32) valmistetaan käänteisellä misellireaktiolla typen alla. Käänteiset miselliliuokset valmistetaan käyttämällä setyyli(trimetyyli)ammoniumia pinta-aktiivisena aineena. Orgaanisena faasina käytetään oktaania ja 1-butanolia avustavana pinta-aktiivisena aineena sekä vesifaasin reagenssina.  $\text{FeSO}_4$  lisätään käänteiseen miselliliuokseen ja liuokseen lisätään toisessa käänteisessä miselliliuoksessa olevaa natriumboorihydridiä. Liuoksen väri muuttuu vihreästä mustaksi Fe-nanopartikkelien muodostumisen myötä. [41]

Kun seosta on sekoitettu noin tunnin ajan, siihen lisätään  $\text{HAuCl}_4$ :n miselliliuos. Tämän jälkeen liuokseen lisätään välittömästi vielä toisessa miselliliuoksessa oleva  $\text{NaBH}_4$ . Uusi liuos jätetään sekoittumaan huoneenlämpötilaan typen alle 12 tunniksi. Kun reaktioseokseen lisätään asetonia, sen misellit häiriytyvät, mikä johtaa nanopartikkelien saostumiseen. Tumma sakka erotetaan magneetin avulla ja pestään 1 : 1 kloroformi-metanoli-seoksella. Pesu poistaa ei-magneettiset partikkelit ja orgaaniset pinta-aktiiviset aineet. Ligandin lisääminen suoritetaan sekoittamalla 4-merkaptofenyliboorihappo ja Fe/Au-nanopartikkelit etanolissa. Liuotin haihdutetaan pyöröhaihduttimella

ja tumma jäämä pestään dietyylieetterillä ylimääräisen ligandin poistamiseksi ja kuivataan. [41]



Kuva 32: Ligandin kiinnittäminen Fe/Au-nanopartikkeleihin. [41]

Nanopartikkelit kiinnitetään funktionalisoituun GO:iin PG-g-GO:n etanolidispersiossa. Liuokseen lisätään tämän jälkeen etanoliin liuotetut nanopartikkelit. Mustaa seosta sekoitetaan huoneenlämpötilassa 2 tunnin ajan. Saatu musta sakka suodatetaan PTFE-kalvon läpi ja pestään etanolilla sekä vedellä. Tuote kuivataan 40 °C:ssa vakuumissa. [41]

Saatujen partikkelien rautaytimen koko on noin 16 nm HR-TEM-kuvien perusteella. Kultapinnoitteen paksuus on 3–5 nm. Partikkelit pyrkivät aggregoitumaan klustereiksi. Lopullinen hybridirakenne voidaan dispersoida veteen, jossa se pysyy stabiilina yli kolmen kuukauden ajan. [41]

### 3.3 Karboksyylihappojen reaktiot

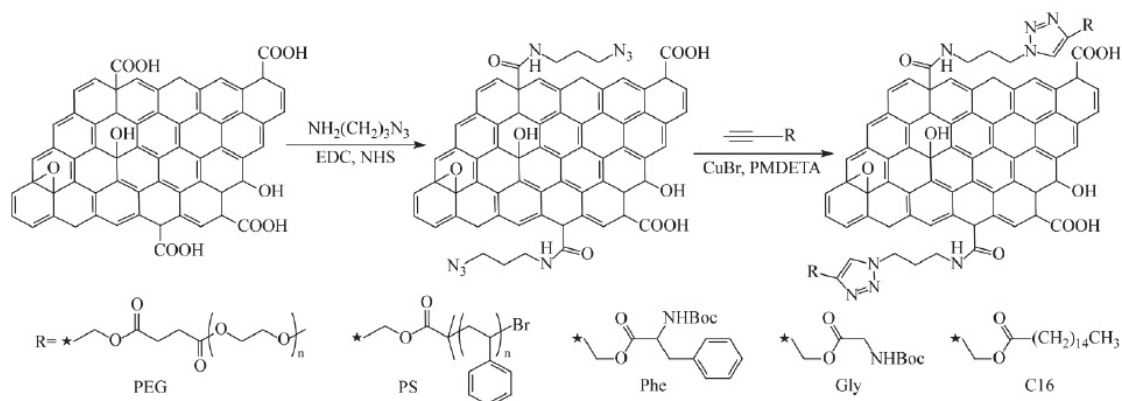
Julkaistuista reaktioista hyvin monessa hyödynnetään grafeenioksidin reunojen karboksyylihapporyhmiä. Karboksyylihappojen reaktiot edellyttävät yleensä happoryhmän aktivointia esimerkiksi tionyylikloridilla. Tämän jälkeen voidaan käyttää nukleofiilisten reagenssien, kuten amiinien tai hydroksyylien additiota, jolloin muodostuu amideita tai estereitä. GO:iin on kiinnitetty esimerkiksi pitkiä alifaattisia amiineja, jotka ovat lisänneet GO:n liukoi-

suutta orgaanisiin liuottimiin. [6] Myös useita eri kromoforeja on saatu kiinnitettyä amidisidosten kautta. Grafeenilla on kuitenkin taipumus sammuttaa orgaanisten väriaineiden ja kvanttipisteiden fluoresenssi, mikä rajoittaa niiden käyttöä. Ilmiötä voidaan kuitenkin mahdollisesti hyödyntää FRET-biosensoreissa. [1]

### 3.3.1 Funktionalisointi atsidi-alkyyni-click-kemian avulla

Click-kemian modulaarinen luonne, korkea selektiivisyys ja hyvät saannot tekevät siitä houkuttelevan menetelmän myös grafeenioksidin funktionalisoinnin tapauksessa. Useista eri click-reaktioista nostettakoon esille Cu-katalysoitu Huisgen 1,3-dipolaarinen atsidien ja alkyynien sykloadditio. [42] Kyseinen reaktio on stabiili dimerisoitumisen ja hydrolyysin suhteen. Lisäksi sitä on hyödynnetty menestyksekkäästi hiilinanoputkien modifioinnissa. GO:n click-reaktioita on vielä kuitenkin toistaiseksi tutkittu melko vähän. GO:iin voidaan kiinnittää atsidi-alkyyni-click-kemian avulla ainakin erilaisia lineaarisia polymeerejä, aminohappoja ja alifaattisia ketjuja. [42]

Synteesi suoritetaan lisäämällä GO:n vesiliuokseen 3-atsidopropan-1-amiini ( $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{N}_3$ ) sekä katalyyteiksi EDC ja NHS. Liuosta sekoitetaan 24 tuntia huoneenlämpötilassa ja tuote eristetään sentrifugoimalla ja pesemällä vedellä. Typen alla olevaan tuotteeseen (GO-N<sub>3</sub>) lisätään vettä ja alkyynipääteinen PEG, sekä DMF, CuBr ja PMDETA. Atsidin ja alkyynin välisen kytkenäreaktion annetaan edetä 150 minuutin ajan 60 °C:ssa öljyhauteessa. Tuote erotetaan sentrifugoimalla ja pesemällä DMF:lla. Tuote kuivataan vaakuumissa uunissa 60 °C:ssa yön yli. [42] Funktionalisointi on esitetty kuvassa 33.



Kuva 33: GO:n karboksyylihappojen funktionalisointi atsi-di-alkyyni-click-kemian avulla. [42]

GO:n karboksyylihapot reagoivat 3-atsidopropan-1-amiinin kanssa muodostaen GO- $\text{N}_3$ :n EDC-kondensaation kautta. Reaktion seuraavassa vaiheessa atsidiryhmä voi reagoida click-reaktion kautta alkyynipäätteisen polyeteleeniglykolin (PEG:n), polystyreenin, propargyyli-alkoholi-esteriöidyn palmitiinihapon (C16), glysiinin tai fenyylialaniinin kanssa tuottaen GO-PEG:n, GO-PS:n, GO-C16:n, GO-Gly:n tai GO-Phe:n. Reaktion etenemistä seurattiin FTIR-mittauksilla lämpötiloissa 25, 40 ja 60 °C ihanteellisten reaktioolosuh-teiden löytämiseksi. Reaktion etenemistä pystyttiin seuraamaan atsi-doabsorption ja standardipiikin avulla. Reaktio näyttää etenevän alussa hyvin nopeasti ja lopussa melko hitaasti. Lämpötilalla on merkittävä vaikutus reaktion etenemisen kannalta. 93 %:n konversio saavutetaan 25 °C:ssa 900 minuutin jälkeen, 40 °C:ssa 60 minuutin ja 60 °C:ssa jo 30 minuutin jälkeen. [42]

Eripainoiset alkyynipäätteiset PEG:t (350, 750 ja 1900 g/mol) reagoivat ongelmitta GO- $\text{N}_3$ :n atsidiryhmien kanssa (60 °C:ssa reaktioajalla 150 min). Joustavan ja ohuehkon polymeerin molekyyli-massalla ei siis ole suurta mer-

kitystä reaktion kannalta. Alkyynipäätteinen polystyreeni on puolestaan rakenteeltaan huomattavasti jäykempi ja paksumpi, mikä aiheuttaa voimakkaan steerisen esteen ja pienemmän kontaktimahdollisuuden. Reaktion tapahtuminen on siis huomattavasti epätodennäköisempää. Pienemmät, jäykät molekyylit, kuten fenyylialaniini, voidaan kiinnittää hyvinkin helposti. [42] Click-reaktioiden tapahtumiset voidaan varmistaa TGA-analyysien avulla.

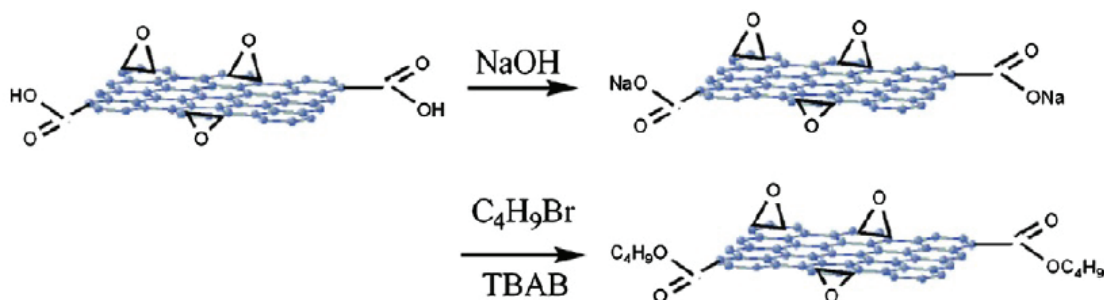
Raman-spektroskopia on tehokas työkalu grafeenin rakenteen ja elektronisten ominaisuuksien tutkimuksessa. Puhtaalla grafeenilla on voimakas E<sub>2g</sub>-moodista johtuva G-vyö kohdassa 1575 cm<sup>-1</sup> sekä heikompi epäjärjestäytyneiden hiiliatomien värähtelyjen aiheuttama D-vyö kohdassa 1330 cm<sup>-1</sup>. Kun grafeenia hapetetaan, sen Raman-spektrin G-vyö levenee ja siirtyy kohtaan 1595 cm<sup>-1</sup>. Myös D-vyö levenee ja sen intensiteetti kasvaa. Hiilimateriaalien laatua pystytään arvioimaan D- ja G-vöiden intensiteettien suhteen (ID/IG) avulla. Grafiitin ID/IG = 0.403 nousee hapetuksen myötä lukemaan 1.234. GO-N<sub>3</sub>:n suhde on 1.397 ja GO-PEG:n puolestaan 1.399, mikä kertoo funktionalisointisasteen kasvamisesta. GO-C16:n, GO-Gly:n ja GO-Phe:n vastaavat arvot ovat 1.404, 1.455 ja 1.486. [42]

GO:n alkuainekoostumusta voidaan tutkia XPS:n avulla. GO:n muuttumista GO-N<sub>3</sub>:ksi ja edelleen esimerkiksi GO-PEG:ksi voidaan seurata typen ja hiilen osuuksien avulla. Muodostuneista rakenteista saadaan tietoa myös TEM:n ja AFM:n avulla. [42]

### 3.3.2 1-Bromibutaani

Grafeenioksidin karboksyylihapporyhmät voidaan funktionalisoida myös 1-bromibutaanilla (kuva 34). Synteesi on skaalautuva ja se voidaan suorittaa

yhdessä faasissa ilman lisättyjä pinta-aktiivisia aineita. Synteesin lähtöaineet ovat suhteellisen halpoja. Tuote liukenee useisiin orgaanisiin liuottimiin, kuten kloroformiin ja tolueeniin. Muodostuvat suspensiot ovat stabiileja seitsemän päivän ajan. [43]



Kuva 34: GO:n karboksyylihappojen funktionalisointi 1-bromibutaanilla. [43]

Synteesi suoritettiin GO:n ja veden dispersiossa, johon lisättiin 0,1 M NaOH:a, 1-bromibutaania ja TBAB:a. Liuosta lämmitettiin 8 tuntia öljyhautella (100 °C) typen alla, jolloin dispersion keltaruskea väri muuttui pikkuhiljaa mustaksi. Jäähdytynyt liuos uutettiin kloroformilla, josta tuote saostettiin lisäämällä etanolia. [43]

### 3.3.3 Fullereeni ja porfyriini

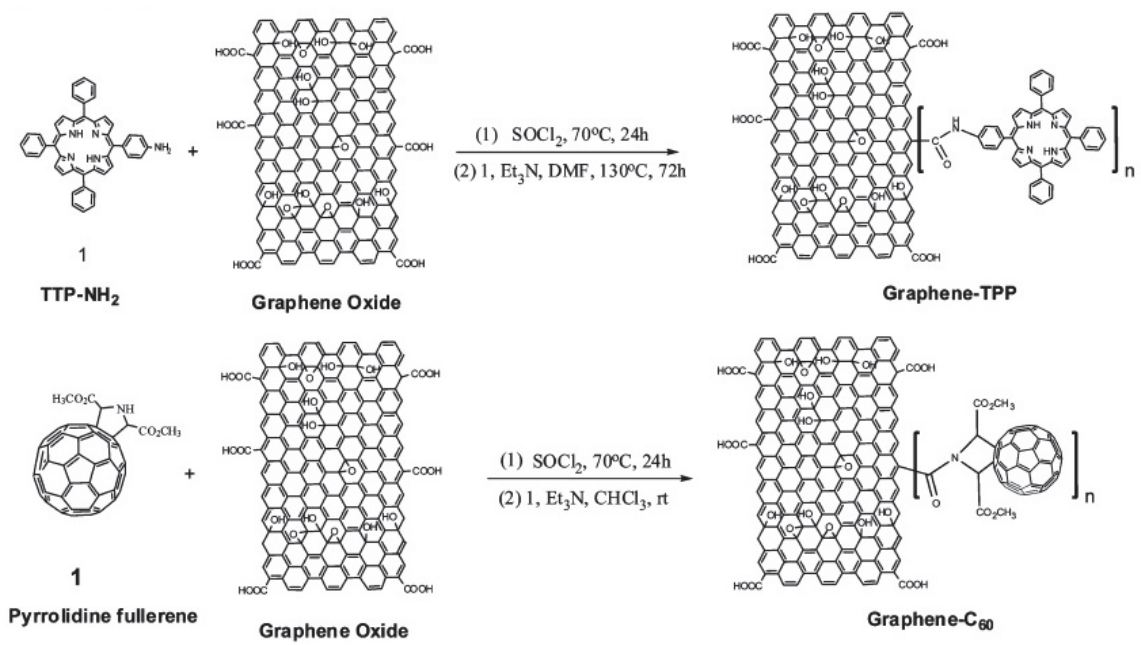
Kromoforeina toimivien porfyriinin ja fullereenin kovalenttinen kiinnittäminen GO:iin vahvistaa sen epälineaarisia optisia ominaisuuksia nanosekuntialueella. Ilmiötä voidaan mahdollisesti hyödyntää optisissa rajoittimissa ja kytkimissä. Nanohybridimateriaalissa yhdistyvät epälineaarinen vaste valon sähkökenttään ja valoindusoidun porfyriinin tai fullereenin ja GO:n välinen elektronin- tai energiansiirto. Porfyriinien ja fullereenien voimakas, epäline-

aarisesti käyttäytyvä absorptio johtuu niiden korkeamman viritystilan absorptioon suuremmasta todennäköisyydestä verrattuna perustilan absorptioon todennäköisyyteen. Myös pelkällä GO:lla on havaittu olevan epälineaarisesti käyttäytyviä optisia ominaisuuksia. [44]

Fullereenihybridin synteesissä hyödynnetään fullereeniin kiinnitetyn pyrrolidiinin OH-ryhmän ja GO:n reunoilla esiintyvän COOH-ryhmän kytkeäreaktiota (kuva 35). Porfyriini-GO-nanohybridin synteesi suoritetaan sekoittamalla amiini-funktionalisoitua porfyriiniä (TPP-NH<sub>2</sub>) ja GO:a dimetyyli-formamidissa. Tämä synteesi perustuu amidisidoksen muodostumiseen. Reagoimaton porfyriini pitää poistaa hyvin tarkasti liuotinpesuilla, sonikoinneilla ja suodatuksella. GO-C60:n synteesissä reaktio vaatii suuren pyrrolidiinifullereeniylimäärän käyttämistä. Reagoimattomat lähtöaineet poistetaan sentrifugointien ja pesujen avulla. Fullereeneja kiinnittyy suunnilleen yksi GO:n 104 hiiliatomi kohden. Porfyriinejä kiinnittyy vain yksi 874 hiiliatomi kohden. Keskimääräinen C60-C60-etäisyys on noin 3 nm. Porfyriinien vastaava etäisyys on noin 23 nm. [44]

GO:n ja kiinnitettyjen ryhmien välinen vuorovaikutus johtaa varauksensiirtoon fullereenin tai porfyriinin viritystilalta grafeenille. Tämä havaitaan fluoresenssin sammumisena ja energian vapautumisena. Intramolekulaarinen sammuminen johtuu systeemin laajentuneesta, konjugoituneesta  $\pi$ -verkostosta. Tällainen fotoindusoitu varauksensiirto johtaa tunnetusti epälineaaristen optisten ominaisuuksien parantumiseen. Vastaavalla hiilinanoputkien ja porfyriinien muodostamalla systeemillä on havaittu sama ilmiö. [44]





Kuva 35: GO:n funktionalisointi porfyriinillä ja fullereenillä. [44]

## 4 Hybridinanomateriaaleihin perustuvat sovellukset

### 4.1 Tunnistusalustat ja sensorit

Molekyylien sähköinen, nanokokoluokan materiaaleihin perustuva detektointi on herättänyt kiinnostusta useilla eri aloilla. Tutkijat ovat onnistuneet kehittämään viime vuosikymmenten aikana esimerkiksi piinanolankaan [45–47] ja hiilinanoputkiin [48–50] pohjautuvia sensoreita. [51] Näistä lupaavimmiksi ovat osoittautuneet hiilinanoputkiin perustuvat CNT-kanavatransistorit (*FET, field effect transistors*). Hiilinanoputkien käyttöön ja valmistukseen liittyy kuitenkin useita ongelmia. Ongelmat voidaan välttää käyttämällä hiilinanoputkien sijaan grafeenia tai grafeenipohjaisia materiaaleja. Grafeeniin pohjautuvien G-FET-transistorien odotetaan muodostuvan seuraavan sukupolven nanolaitteiksi. [51]

Grafeenijohdannaisten funktionaaliset ryhmät voivat toimia erilaisten metallinanopartikkelien nukleaatio- ja kasvukeskuksina. [52] Tämä on mahdollistanut ainutlaatuisten hybridinanomateriaalien kehityksen. Kyseisiä materiaaleja on alettu hyödyntää erilaisten sensorien pinnoitteina sekä tunnistusalustoina. Grafeenin ja metallinanopartikkelien hybridien etuna on komponenttien erinomaisten ominaisuuksien eli grafeenin suuren pinta-alan ja hyvän johtavuuden sekä metallinanopartikkelien katalyyttisen aktiivisuuden ja biologisen yhteensopivuuden yhdistyminen. [53]

Kultananopartikkelien ja GO:n muodostamaa nanokomposiittia on hyödynnetty SERS-substraattina. [51] Kultananopartikkelien ja PVP-ketjuilla mo-

difioidun GO:n nanokomposiitilla on sovelluksensa myös kysteisiin detektointiin käytetyn elektrodin pinnoitteena. [53] Toisenlaisen detektorin pinnoitteena on käytetty puolestaan magneettisten rautananopartikkelien ja pelkistetyt grafeenioksidin hybridimateriaalia. [54] Hopeananopartikkelien kiinnittäminen on taasen mahdollistanut grafeenilevyjen optisten ominaisuuksien muokkaamisen. [55]

#### 4.1.1 G-FET-sensorit

Hiilinanoputkiin pohjautuvilla CNT-FET-transistoreilla on korkea mekaaninen kestävyys, suuri pinta-ala sekä erikoiset sähköiset ominaisuudet. Hiilinanoputkien sivusuhte eli pituuden suhde halkaisijaan on lisäksi suuri. [56] Hiilinanoputkitransistoreita on käytetty muun muassa proteiinien [57, 58], glukoosin [59], DNA:n hybridisaation [60, 61] ja immunosensorien [62, 63] detektoinnissa. CNT-FET-transistorien ongelmana on niiden elektronisen luonteen voimakas riippuvuus hiilinanoputkien kiraalisuudesta ja kontaktimetallin ominaisuuksista. Koska kiraalisuuden kontrollointi on hankalaa, CNT-FET-sensorien tuottaminen ja stabiilisuus ovat ongelmallisia. CNT-FET-systeemeille tyypillinen absoluuttinen nieluvirta on luoksessa useista nanoampeereista useisiin kymmeneen nanoampeereihin. Liuoksissa voidaan käyttää vain pieniä nielu- ja porttijännitteitä liuoksen elektrolyysin ja elektrodien, kanavan sekä analyytin hapettumisen välttämisen vuoksi. [51]

Grafeeni on osoittautunut erittäin varteenotettavaksi ehdokaaksi hiilinanoputkien tilalle. Grafeenipohjaisten materiaalien tutkimus on osoittanut niiden sähköisen luonteen suuren herkkyyden ympäristön suhteen. Ne ovat lisäksi huomattavasti stabiilimpia kuin hiilinanoputkiin pohjautuvat systeemit

ja niiden nieluvirta on jopa 1000-kertaa suurempi. Mitä suurempi nieluvirta on, sitä pienemmät taustakohinan aiheuttamat häiriöt ovat. Grafeeniin perustuvat systeemit eivät kuitenkaan ole yhtä herkkiä kuin hiilinanoputkiin pohjautuvat, koska niiden pinta-alan suhde tilavuuteen on pienempi. [51]

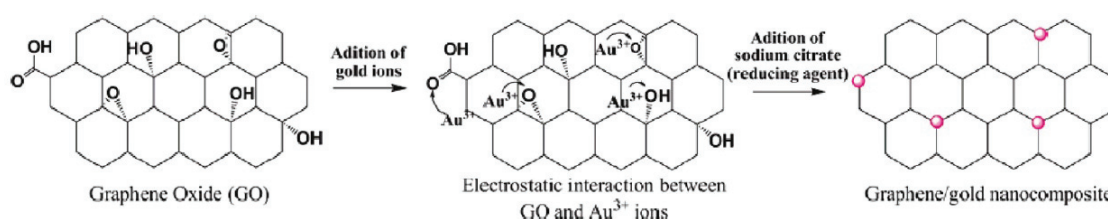
G-FET-sensorien toimintamekanismi perustuu kemiallisten partikkelien absorboitumiseen grafeenin pintaan. Partikkelit voivat toimia joko elektronien luovuttajina tai vastaanottajina, mikä johtaa muutoksiin grafeenin johtavuudessa. [51] Grafeenisensoreilla onkin saatu detektoitua kaasumolekyylejä [64, 65], biomolekyylejä [66, 67], glukoosia [68, 69], proteiineja ja negatiivisesti varautuneita bakteereita [70]. Koska G-FET-sensorien herkkyys riippuu niiden johtavuudesta, portin kapasitanssista, nielun jännitteestä ja kenttäefektin liikkuvuudesta, grafeenin yksöiskalvoon perustuvien sistemien pitäisi soveltua parhaiten kemiallisten ja biologisten partikkelien detektointiin. [51]

#### 4.1.2 Kultananopartikkeleihin perustuva SERS-substraatti

Grafeenioksidin happiryhmät voivat toimia kultananopartikkelien nukleaa-tiokeskuksina. G. Goncalves *et al.* [52] ovat tutkineet GO:n hapetusasteen vaikutusta kultananopartikkelien nukleatioon käyttämällä synteeseissä erityyppisiä grafeenijohdannaisia eli grafeenioksidia (GO), termisesti pelkistettyä grafeenia (GTR) ja hydratsiinipelkistettyä grafeenia (GHR). Grafeenin ja kullan nanokomposiittien synteeseissä on hyödynnetty yleisesti käytettyä kulta(III)kompleksin natriumsitraattipelkistystä. [52, 71]

Absorptiospektrien ja SEM-mittausten perusteella kultananopartikkelit kiinnittyvät GO:n ja GTR:n, mutta eivät GHR:n pintaan. GHR:n pinnalla ei havaita lainkaan partikkeleita. GO:n pinnalle kiinnittyneet partikkelit ovat le-

vittäytyneet tasaisesti ja niiden halkaisija on noin 20 nm. Agglomeroitumista ei havaita käytännössä lainkaan. GTR:iin kiinnittyneet nanopartikkelit ovat sen sijaan levittäytyneet huonosti. Partikkelit ovat agglomeroituneet noin 300 nm:n kokoisiksi alueiksi. Näin ollen happea sisältävillä funktionaalisilla ryhmillä näyttää olevan erittäin tärkeä rooli kultananopartikkelien kasvun ja kiinnittymisen kannalta (kuva 36). [52]

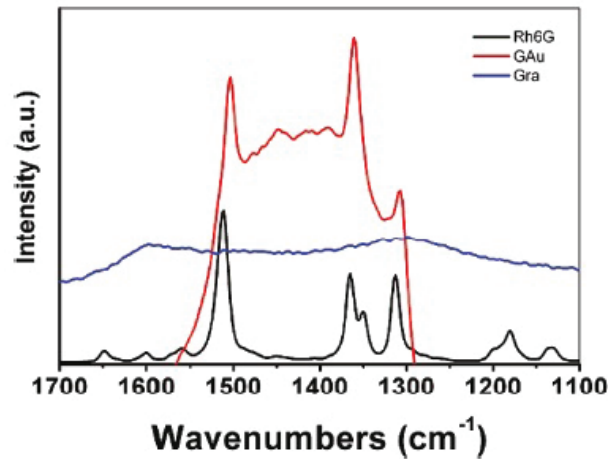


Kuva 36: Kultananopartikkelien nukleaatio GO:n pinnalla. [52]

Pintavahvisteinen Raman-sironta (*surface-enhanced Raman scattering*, SERS) on ilmiö, jossa metallin pinnalle kiinnittyneen molekyylin ramanspektri voi kasvaa voimakkuudeltaan miljoonakertaiseksi verrattuna esimerkiksi liuoksesta mitattuun spektriin. Metallipinta voi koostua metallisesta nanorakenteesta, nanopartikkeleista tai jalometalleista. Funktionalisoitujen kultananopartikkelien pinnalla tapahtuvaa SERS-ilmiötä on hyödynnetty muun muassa biomolekyylien, kuten proteiinien ja DNA:n detektoinnissa. Menetelmän etuna on se, että tutkittavaa ainetta tarvitaan hyvin vähän. SERS-efekti on seurausta kahden eri mekanismin yhdistelmästä. Sähkövahvisteinen mekanismi käsittää metallirakenteiden pintaplasmonien virittymisen. Kemiallinen vahvistus käsittää metallin ja analyytin välisen varauksensiirron mahdollistavan kompleksin muodostumisen. [52]

Edellä kuvattua, kullan ja GO:n muodostamaa nanokomposiittia voidaan hyödyntää SERS-substraattina. Soveltuvuutta on testattu rhodamiini 6G:n

kanssa laserin aallonpituudella 1064 nm. Kuvassa 37 nähdään saatu SERS-spektri, jossa havaitaan Raman-spektrin piikkien selektiivinen voimistuminen pelkkään RhG6-näytteeseen verrattuna. [52]



Kuva 37: GO-Au(np)-pinnalle adsorboituneen rhodamiini G6:n SERS-spektri (GAu), grafeenilevyllä adsorboituneen RhG6:n Raman spektri (Gra) ja kiinteän RhG6:n spektri (RhG6). [52]

GO:n pinnalle kiinnittyneiden kultananopartikkelien tiheys on TEM- ja AFM-kuvien perusteella melko pieni, noin 8,4 %. Havaittu SERS-signaali johtunee siis yksittäisten nanopartikkelien aiheuttamasta mekanismista. Ilmiötä voidaan kenties hyödyntää tulevaisuudessa biosensoreissa, kontrolloidussa lääkkeiden kuljetuksessa tai spektroskopisissa antureissa. [52]

#### 4.1.3 Kultananopartikkelit kysteiinidetektorissa

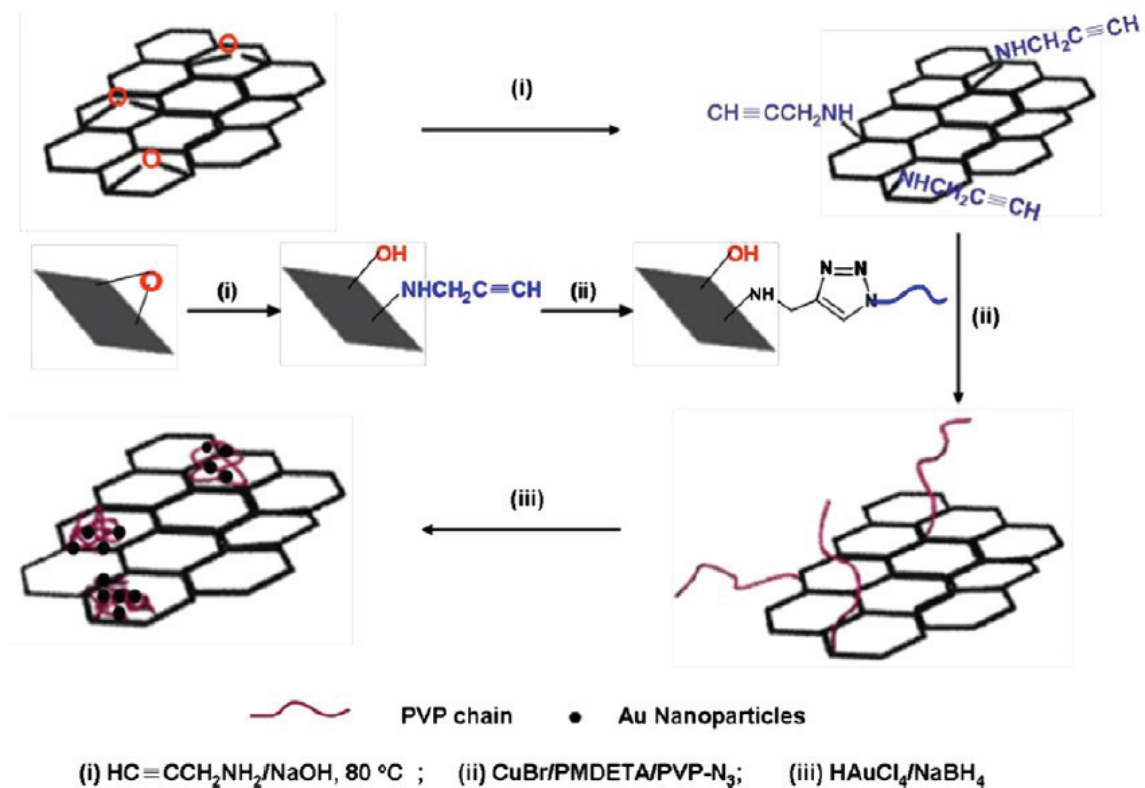
L-kysteini on rikkiä sisältävä aminohappo, jolla on merkittävä rooli paitsi biologisissa ja lääketieteellisissä järjestelmissä, myös elintarviketeollisuudessa. L-kysteiinin puute voi johtaa kasvun hidastumiseen, hiusten värin haalistumiseen, nesteen kertymiseen kudoksiin, uupumukseen ja maksavaurioihin.

[72–74] Biologisten näytteiden L-kysteiinin nopea ja selektiivinen tunnistaminen on tästä johtuen tärkeää. L-kysteiinin tunnistukseen voidaan käyttää sähkökemiallisia menetelmiä, joiden etuihin lukeutuvat käytön yksinkertaisuus, korkea herkkyys, erinomainen selektiivisyys ja *in vivo* tapahtuva reaalitavallinen määrittäminen. [53]

Aiempien tutkimusten perusteella pelkän hiilipinnan käyttäminen elektrodeissa johtaa hyvin huonoon tai jopa olemattomaan sähköiseen vasteeseen L-kysteiinin detektoinnissa. Kulta- ja platinaelektrodien ongelmana on puolestaan pinnan hapettumisesta johtuva korkea ylijännite, mikä heikentää selektiivisyyttä huomattavasti. Tästä johtuen elektrodien pintaa pitää muokata uusilla toiminnallisilla materiaaleilla, joilla on paitsi suuri pinta-ala, myös erinomainen katalyyttinen aktiivisuus. Detektoinnin tehokkuutta onkin jossain määrin parannettu käyttämällä elektrodien pinnalla nanohuokoista kultaa, boori-dopattuja hiilinanoputkia, polymeerikalvoja ja kuparioksidinanopartikkeleita. [53]

Grafeenin ja kultananopartikkelien nanohybridin etuna on komponenttien erinomaisten ominaisuuksien yhdistyminen. Modifioitujen elektrodien suorituskyky on voimakkaasti riippuvainen hybridin rakenteen morfologiasta. Näin ollen kultananopartikkelien samankokoisuus ja tiheys sekä grafeenin mittasuhteet vaikuttavat merkittävästi elektrodin toimintaan. Elektrodimateriaali voidaan valmistaa poly(vinyylipyrrolidonilla) funktionalisoidusta GO:sta, johon  $\text{HAuCl}_4$ :sta valmistetut kultananopartikkelit kiinnittyvät (kuva 38). [53]

Synteesi suoritettiin PGO:n vesidisersiona, johon lisättiin  $\text{HAuCl}_4$ -liuosta (0,01 %). Kultapartikkelit pelkistettiin  $\text{NaBH}_4$ :llä. Kultaionit absorboituvat PVP-ketjuihin koordinaatiosidosten kautta, jonka jälkeen ne voidaan pelkistää. Näin ollen kultananopartikkelien tiheyttä ja kokoa voidaan säätää PVP-



Kuva 38: Grafeeni-Au-nanohybridin synteesi. [53]

polymeeriketjujen määrän kautta. Veteen dispersoitua tuotetta voidaan käyttää GC-elektrodin (*glassy carbon*) pinnoittamiseen. [53]

Syntetisoidujen kultananopartikkelien koko on voimakkaasti riippuvainen PGO-templaateista. Kun templaattina on PGO5700/16, nanopartikkelien koko on noin 9 nm. Kun templaattina on PGO5700/8, nanopartikkelien koko on noin 30 nm. Suurempien partikkelien tiheys on huomattavasti pienempi, kuin pienempien. Pienemmät ja tiheämmässä olevat nanopartikkelit toimivat paremmin elektrodin pinnoitteena, sillä niiden vaste virtaan on voimakkaampi. L-CySH:n elektrokemialliset mittaukset kannattaa tästä johtuen suorittaa grafeeni-Au<sub>9</sub>/GCE-systeemillä. [53]



Kysteiinin tunnistus perustuu sen hapettumiseen elektrodilla. Reaktio etenee protonin irtoamisesta CyS-radikaalin muodostumiseen. Kun kaksi radikaalia reagoi keskenään, syntyy CySSCy-molekyyli. Liuoksen pH vaikuttaa luonnollisesti L-CysH:n elektrokemialliseen käyttäytymiseen ja deprotonoitumiseen. Korkeampi pH suosii ionisoitumista ja maksimivirta saavutetaan pH:ssa 7. Sensori pystyy havaitsemaan L-CySH:n virtsanäytteistä. Havaitut määrät olivat tutkimuksessa 96,2–103,6 % todellisesta määrästä, joten sensori on hyvin herkkä. Sensorin detektointiraja oli alhainen ja stabiilisuus sekä häiriöiden sietokyky olivat hyviä. [53]

#### 4.1.4 Magneettisiin rautananopartikkeleihin perustuva sensori

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-rGO-nanokomposiitti valmistetaan yksivaiheisella synteessillä, jossa yhdistyvät GO:n pelkistyminen ja Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-nanopartikkelien *in situ* muodostuminen. Uudenlainen nanohybridimateriaali yhdistää rGO-nanolevyjen elektroniset ominaisuudet Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-partikkelien erinomaisiin katalyyttisiin ominaisuuksiin. Komposiittia on tutkittu TEM-, XRD-, AGFM ja EIS-tekniikoilla. [54]

Magneettiipelkistetyn GO:n synteesi suoritettiin vesidispersiossa, johon lisättiin FeCl<sub>3</sub>- ja FeCl<sub>2</sub>-liuoksia. pH säädettiin arvoon 10 lisäämällä 30 % ammoniakkia ja pelkistys tehtiin hydratsiinihydraatilla. [54]

Komposiittia voidaan hyödyntää GC-elektrodin pinnoitteena. Materiaali soveltuu erilaisten elektroaktiivisten yhdisteiden sähkökemialliseen tunnistukseen. Yhdisteisiin lukeutuvat ainakin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NADH, nitriitti, dopamiini, askorbiinihappo ja virtsahappo. Elektrodin sähkökatalyyttinen aktiivisuus on erinomainen kaikkia edellä lueteltuja katalyyttejä kohtaan. [54]

#### 4.1.5 Grafeenioksidin ja hopeananopartikkelien hybridimateriaali

Grafeenioksidin pinnalle voidaan kasvattaa kultananopartikkelien lisäksi myös hopeananopartikkeleita. Muodostuvia nanopartikkeleita ei tarvitse funktionalisoida, koska GO stabiloituu niillä. Hopeananopartikkelien kiinnittäminen mahdollistaa grafeenilevyjen optisten ominaisuuksien muokkaamisen. Saadulla pinnalla on potentiaalia myös joustavien ja läpinäkyvien puolijohteiden tai puolimetallien valmistuksessa. [55]

GO:n ja hopean nanokomposiitti valmistetaan hopeaionien kemiallisella pelkistyksellä. Synteesi suoritetaan sekoittamalla  $10^{-3}$  M hopeasulfaatin vesiliuos  $10^{-3}$  M GO:n vesiliuokseen. Vedellä laimennettuun liuokseen lisätään  $10^{-1}$  M KOH-liuosta ja liuos kuumennetaan kiehuvaan, jolloin nanopartikkelit alkavat muodostua. Liuotin haihdutetaan lopuksi pyöröhaihduttimella. [55]

GO:n pintaan kiinnittyneet hydroksyyli-ryhmät tekevät siitä pelkistimen emäksisissä olosuhteissa. Fenoliset protonit ovat tunnetusti heikosti happamia ja deprotonoituvat emäksisissä olosuhteissa muodostaen fenolaattianioneita. Fenolaattianionit ovat voimakkaasti aktivoituja, mikä johtaa elektrofilisiin aromaattisiin substituutioreaktioihin. Elektronit siirtyvät hopeaioneille, jotka pelkistyvät ja muodostavat metallista hopeaa. Fenolaattianionit muuttuvat samanaikaisesti semikinoneiksi. Tästä johtuen synteesi suoritetaan pelkistysprosessin aktivoivassa KOH:n vesiliuoksessa. [55]

Mikäli hapetuksessa vaurioitunutta  $sp^2$ -verkostoa halutaan korjata ja johtavuutta parantaa, happea sisältävät ryhmät voidaan poistaa lopuksi 24 tunnin hydratsiinikäsittelyllä. Synteesin onnistuminen voidaan todeta UV/Vis-spektriin ilmestyvän absorptiopiikin avulla. Saatujen hopeananopartikkelien

koko on välillä 0,5–1,5 nm. Pintaan näyttää kiinnittyvän myös suurempia 3–12 nm:n kokoisia partikkeleita, mikä saattaa johtua pienten partikkelien agglomeroitumisesta. [55]

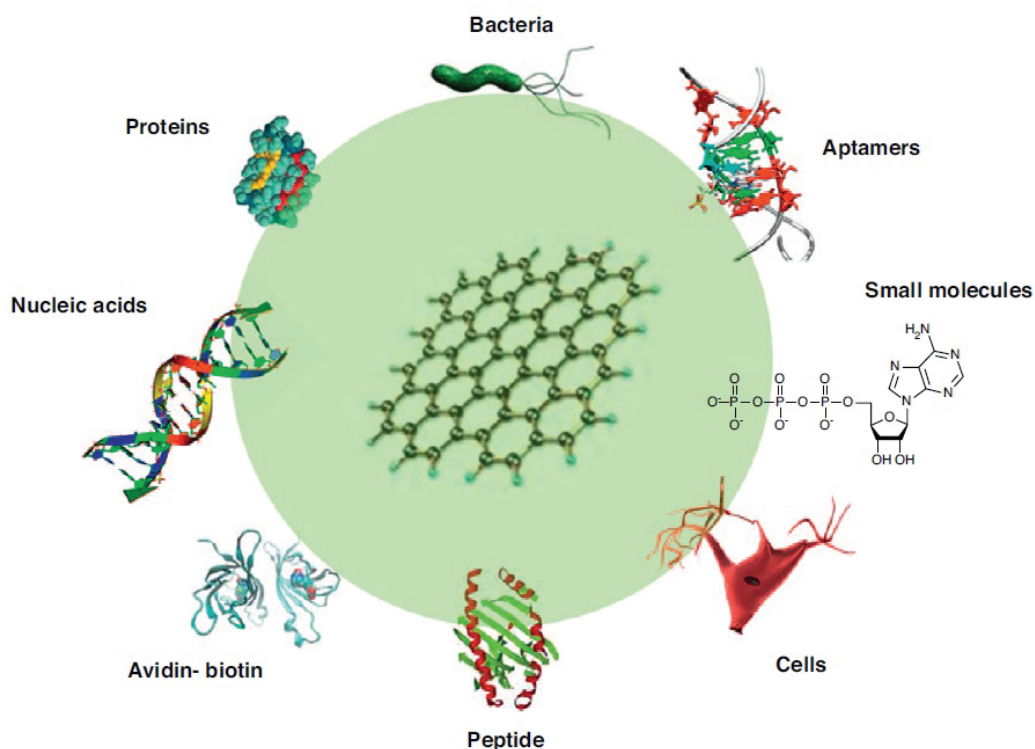
## 5 Grafeenioksidi bioteknologiassa

Grafeenipohjaisten materiaalien ainutlaatuiset ominaisuudet mahdollistavat niiden hyödyntämisen hyvinkin erilaisten biologisten molekyylien substraatteina. Grafeenin suotuisat ominaisuudet korostuvat etenkin bioelektroniikan, biosensorien ja lääketieteen aloilla. Biologinen muokkaus parantaa grafeenin bioyhteensopivuutta, liukoisuutta ja selektiivisyyttä. [9]

Grafeenia ja grafeenioksidia on yhdistelty useiden eri proteiinien kanssa. GO:iin on saatu kiinnitettyä esimerkiksi entsyymeitä. Piparjuuren peroksidaasi (*HRP*, *horseradish peroxidase*) ja lysotsyymi saadaan kiinnittymään GO:n happea sisältäviin ryhmiin spontaanisti. Kiinnitykseen ei siis tarvita minkäänlaista pinnan muokkausta tai kytkentäreagensseja. [9]

Proteiinien kiinnitys voitaisiin tehdä teoriassa myös tiettyjen vasta-aine/antigeeni- tai biotiini-avidini-parien avulla. Proteiineilla muokattuun GO:iin voidaan kiinnittää edelleen erilaisia metallisia nanopartikkeleita (esim. Au, Ag, Pd, Pt) sähköstaattisten vuorovaikutusten avulla. Proteiineja voidaan kiinnittää myös DNA:lla funktionalisoituun grafeeniin. Tästä esimerkkinä mainittakoon ssDNA:lla funktionalisoitu grafeeni, johon saadaan kiinnitettyä edelleen positiivisesti varautuneita sytokromi c -proteiineja. ssDNA-grafeeniin on saatu kiinnitettyä myös piparjuuren peroksidaasia. Saatua materiaalia on hyödynnetty sähkökemiallisen biosensorin elektrodin pinnoitusmateriaalina. [9]

GO:n funktionalisoinnissa voidaan käyttää myös muita biomolekyyliä, kuten peptideitä ja selluloosaa. Biohajoavilla luonnonpolymeereillä, kuten ligniini- ja selluloosajohdannaisilla päällystetyt grafeenilevyt ovat stabiileja jopa erit-



Kuva 39: Grafeenin tai sen johdannaisten funktionalisointeihin on käytetty onnistuneesti avidiini-biotiini-paria, peptideitä, nukleiinihappoja, proteiinejä, aptameerejä, pieniä molekyylejä, bakteereita ja soluja. Funktionalisointi voi tapahtua joko fysikaalisen adsorboitumisen tai kemiallisten sidosten kautta. [9]

täin konsentroituneissa vesiliuoksissa (0,6–2 mg/ml). Kyseisiä nanolevyjä voidaan käyttää biosensoreissa käytettävien entsyymien ja biomarkkereiden lisäsalustana tai lääkeaineiden kuljettimina. [9]

## 5.1 Grafeenipohjaiset FRET-biosensorit

GO:iin pohjautuvat biologiset sovellukset ovat keskittyneet lähinnä FRET-efektiin. Fluoresenssin resonanssienergiänsiirto (*FRET*, *fluorescent resonance*

*energy transfer*) on ilmiö, jossa fotonin eksitaatioenergia siirtyy luovuttajafluoroforilta vastaanottajamolekyylille. Prosessin tehokkuus,  $E$ , riippuu tyypillisesti luovuttajan ja vastaanottajan välisestä etäisyydestä,  $R$ , seuraavalla tavalla:

$$E = 1/(1 + (R/R_0)^6) \quad (1)$$

$R_0$  on etäisyys, jolla puolet energiasta siirtyy. Tyypilliset etäisyydet ovat välillä 2–6 nm. [75] Etäisyys on riippuvainen väriaineiden suhteellisesta järjestäytymisestä ja niiden spektrien luonteenpiirteistä. Transitiotilan dipoleiden rinnakkainen järjestäytyminen heikentää FRET-tehokkuutta ja kohtisuora järjestäytyminen voi estää ilmiön täysin. Optimaalinen kytkentä vaatii siis optimaalista järjestäytymistä. FRET-ilmiö edellyttää yleisesti ottaen myös luovuttajan emission ja vastaanottajan absorbanssin spektrien vastaavuutta. [75] Energian siirtymistä ei havaita, kun dipoli on eristävän pinnan läheisyydessä. Grafeenijohdannainen voi olla johde, puolijohde tai eriste rakenteestaan riippuen. [76]

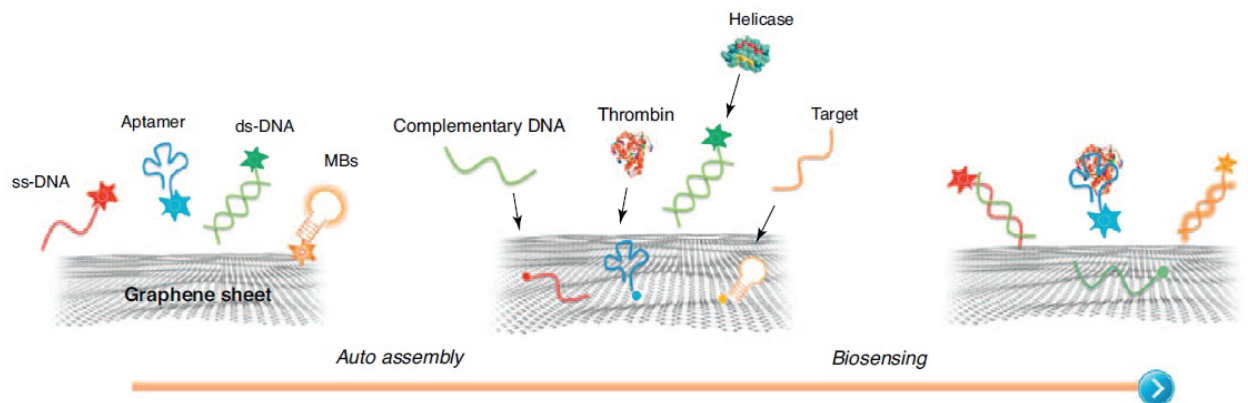
Energiansiirto on grafeenin tapauksessa  $r^4$ -riippuvaista ( $r =$  etäisyys). Tehokkuus on siis suurempi verrattuna FRET-ilmiölle tyypilliseen  $r^6$ -riippuvuuteen. Fluoresenssin on arveltu sammuvan jopa 30 nm etäisyydellä. Grafeenijohdannaisten suuri pinta-ala (n. 2620 m<sup>2</sup>/g grafeenille) mahdollistaa FRET-vastaanottajien suuren määrän.

FRET-ilmiötä voidaan käyttää työkaluna nanometrikokoluokan etäisyyksien ja muutosten mittauksissa sekä *in vivo*- että *in vitro* -määrityksissä. [9] Ilmiö-

tä on käytetty myös biomolekyylien rakenteiden ja vuorovaikutusten selvittämiseen, nukleiinihappojen analysointiin, signaalin transduktioon ja valon keräämiseen. [75]

Grafeeni pystyy sammuttamaan useiden eri fluoroforien säteilyn hyvin pienillä taustahäiriöillä ja suurella signaali-kohina-suhteella. [9] GO:n rakenne on optimaalinen paitsi kemiallisten väriaineiden, myös biologisten kohteiden fluorensenssin sammuttamiseen. [75] Grafeenipohjaiset biosensorit yhdistävät usein grafeenin suotuisat ominaisuudet nukleiinihappojen tunnistusominaisuuteen. Nukleiinihappojen emäsrenkaat vuorovaikuttavat grafeenin verkoston kanssa erittäin voimakkaasti muodostuvista  $\pi$ - $\pi$ -vuorovaikutuksista johtuen. Kaksijuosteinen DNA ei kuitenkaan pysty adsorboitumaan grafeenin pinnalle kovinkaan stabiilisti. Tämä johtuu DNA:n negatiivisesti varautuneen fosfaattirungon aiheuttamasta suojausfektistä. [9]

GO pystyy vuorovaikuttamaan erilaisten biomolekyylien kanssa ionisten ryhmiensä ( $-O^-$  ja  $-COO^-$ ) ja aromaattisten alueidensa ansiosta. Sitoutumisen astetta pystytään muokkaamaan säätämällä pH:ta. [18] GO-FRET-sensorien detektorajat ovat samaa luokkaa, kuin perinteisesti käytetyissä ELISA- ja mikrosiruteknologioissa. Koska GO vuorovaikuttaa voimakkaasti ssDNA:n, aptameerien ja peptidien kanssa, valtaosa tämänhetkisistä sovelluksista perustuu kyseisten molekyylien käyttämiseen antureina. [75] Analyytinä voi toimia myös esimerkiksi entsyymeihin lukeutuva trombiini tai toiminnallinen nukleiinihappo, kuten tietyn inhibiittoriproteiinin mRNA. [9] FRET-sensorien yleinen toimintaperiaate on esitetty kuvassa 40.



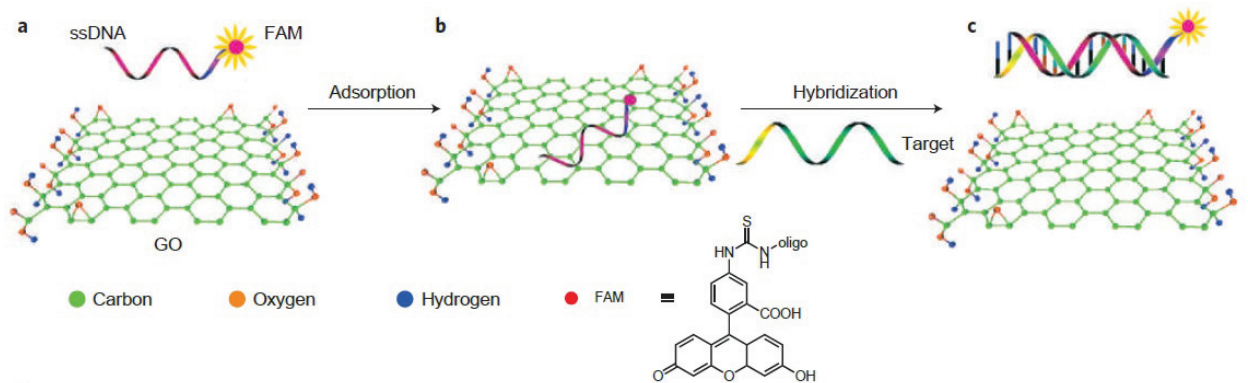
Kuva 40: Grafeenipohjaisten FRET-sensorien toimintaperiaate. Aptameerit, ssDNA ja molekylaariset merkkivalot (MBs) voivat adsorboitua grafeenin tai grafeenijohdannain pintaan. Antureiden päissä olevat fluoroforileimat sammuvat nopeasti niiden vuorovaikuttaessa grafeenin kanssa. Kun analyytti sitoutuu spesifiseen anturiin, anturin fluoresenssi palautuu. dsDNA pysyy puolestaan fluoresoivana kunnes entsyymi (esim. helikaasi) lisätään systeemiin. Kun entsyymi vapauttaa ssDNA:n, se pääsee vuorovaikuttamaan grafeenin kanssa ja fluoroforin fluoresenssi sammuu. [9]

### 5.1.1 ssDNA:n perustuva tunnistus

Fluoresenssin sammumista on käytetty yksijuosteisen DNA:n (ssDNA) ja biomolekyylien optisessa tunnistuksessa. Sensorin toiminta perustuu väriaineella merkityn ssDNA:n fluoresenssin sammumiseen sen sitoutuessa GO:iin. Väriaineella merkitty anturi-DNA muodostaa kohdemolekyylin kanssa kaksoiskierteisen DNA:n, jolloin rakenne jäykistyy ja konformaation muutos vapauttaa kaksoiskierteen GO:sta. Tällöin väriaineen fluoresenssi aktivoituu jälleen (kuva 41). [18]

Ensimmäinen julkaistu grafeenipohjainen FRET-biosensori perustuu fluoresiiniamiditilla (FAM) leimatun ssDNA:n adsorboitumiseen GO:n pintaan. FAM-fluoroforin ja GO:n välinen FRET-ilmiö johtaa FAM:n fluoresenssin





Kuva 41: GO:n fluoresenssin sammumiseen perustuva biosensori. a) Väriaineella (FAM) merkityn ssDNA:n fluoresenssi sammuu sen absorboitua GO:n pintaan. b) Kohdemolekyylin kiinnittyminen kytkee fluoresenssin takaisin päälle. c) Ilmiö johtuu väriaineella merkityn DNA:n konformaation muutoksesta. [18]

nopeaan sammumiseen. Anturi-ssDNA:n ja komplementaarisen ssDNA:n välinen sitoutuminen johtaa konformaatiomuutokseen, joka vapauttaa FAM-ssDNA:n GO:n pinnalta. Irronneen kompleksin fluoresenssi palautuu, jolloin komplementaarinen sitoutuminen voidaan havaita. [9]

Edellä esiteltyn menetelmään pohjautuen on kehitetty niin sanottuja moniväri-DNA-analyysijä. GO:n tasomainen pinta mahdollistaa eri väreillä leimattujen ss-DNA-anturien samanaikaisen sammumisen. Näin ollen eri sekvenssejä omaavien DNA-kohteiden sitoutumista voidaan tutkia samanaikaisesti. Grafeenipohjaista FRET-biosensoria on käytetty myös helikaasivälitteisen DNA-kaksoiskierrteen purkautumisen detektoinnissa. Koska GO-sitoutuu ennemmin ssDNA:han kuin dsDNA:han, fluoresoivan leiman sisältävä kaksijuosteinen DNA tulee valmistaa ensin. Kun dsDNA:n purkautuminen etenee, fluoresenssi pienenee ja sammuu lopulta täysin GO:n ja vapautuneiden ssDNA-juosteiden välisistä voimakkaista vuorovaikutuksista johtuen. Helikaasin aktiivisuutta voidaan siis seurata reaaliaikaisesti. [9]

### 5.1.2 Molekulaariset merkkivalot

Sekvenssispesifisen detektoinnin tavoittelu on johtanut molekulaaristen merkkivalojen (*MB*, *molecular beacons*) lisäämiseen sensoreihin. Molekulaarisessa merkkivalossa on tyypillisesti kaksi päätä, joista toiseen on kiinnitetty fluorofoori ja toiseen fluoresenssin sammuttaja. Päät ovat molekyylin peruskonformaatioissa vierekkäin, jolloin kokonaisuus ei fluoresoi. Konformaatio kuitenkin muuttuu, kun molekyyli kiinnittyy kohdenukleiinihappoihin, mikä johtaa fluoroforin syyttymiseen. Molekulaaristen merkkivalojen ainutlaatuiset termodynaamiset ominaisuudet ja spesifisyys ovat tehneet niistä erittäin suosittuja bioteknologian alalla. [9]

Merkkivalojen valmistaminen edellyttää kahden eri leiman kiinnittämistä, mikä on useimmiten haasteellista. Näin ollen merkkivalojen fluoresenssit voivat olla keskenään eri suuria ja jäännösfluoresenssin esiintyminen on mahdollista. Tämä rajoittaa detektointiherkkyyttä. Kyseinen ongelma voidaan ratkaista hyödyntämällä grafeenia jäännösfluoresenssin sammuttajana. Grafeeni toimii lisäksi erinomaisena alustana molekulaarisille merkkivaloille ja helpottaa niiden synteesiä ja puhdistusta. Molekulaaristen merkkivalojen ja grafeenin hybridiin perustuva FRET-sensori on pystynyt erottamaan kohde-DNA:t jopa yhden emäsparin tarkkuudella. Vastaavanlainen GO-pohjainen sensoria on yhdistetty lisäksi kvanttipistefluoroforeihin, mikä on mahdollistanut laajan absorptiospektrin ja kapean emissiospektrin saavuttamisen. Kyseisen sensorin selektiivisyys on hyvä ja herkkyys korkea. Kohde-DNA:n detektointiraja on vain 12 nM. Sensoria voidaan käyttää nukleiinihappojen määrän määrittämiseen ja yksittäisten nukleotidien polymorfian analysoimiseen. [9]

### 5.1.3 Aptameerit

Aptameerit ovat valikoituja yksijuosteisia oligonukleotidejä, jotka on eristetty sattumanvaraisesta DNA- tai RNA-kirjaston sekvenssistä *in vitro* -valintaprosessilla. Ne voivat kiinnittyä vain tiettyyn kohteeseen eli niiden spesifisyys on erittäin suuri. Aptameerien yhdistäminen FRET-biosensoreihin mahdollistaa ionien, pienten molekyylien ja proteiinien detektoinnin. [9] Väriaineleimattuja aptameerejä on hyödynnetty jopa loogisten porttien toiminoissa. [77, 78]

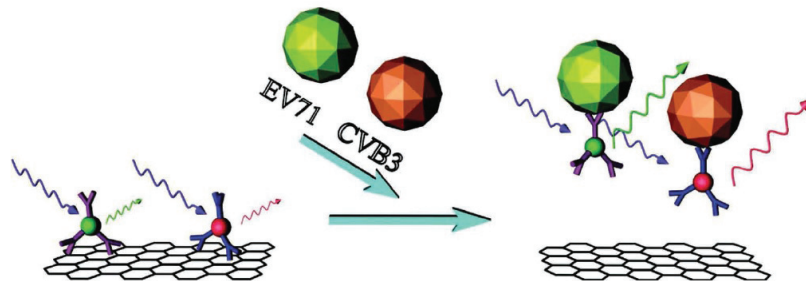
Hopeakationi voidaan esimerkiksi tunnistaa käyttämällä  $\text{Ag}^+$ -spesifistä aptameeriä. Kohteeseen kiinnittyminen aiheuttaa aptameerin konformaation muutoksen, mikä johtaa sen FAM:n fluoresenssin palautumiseen. Hopeaionit voidaan erottaa jopa liuoksesta, jossa on kymmenkertainen määrä muita metalli-ioneita. [9]

Toinen erittäin spesifinen FRET-sensori on kehitetty naudan trombiinin (*bovine thrombin*) detektointiin. Menetelmä perustuu FAM-leimattuun aptameerianturiin ja grafeeniin. Grafeenioksidi pelkistetään ensin natriumdodekyylibentseenisulfonaatilla (SDBS), jolloin saadaan SDBS-grafeenia. SDBS-grafeenia inkuboidaan tämän jälkeen FAM:lla leimatun trombiiniaptameerin kanssa. Kun liuokseen lisätään trombiini, havaitaan selkeä fluoresenssin palautuminen. Tämä johtuu pääosin trombiinin ja aptameerin muodostamasta kvadrupleksirakenteesta, joka vuorovaikuttaa heikosti grafeenin kanssa. Sensori havaitsee trombiinin sekä puskuriliuoksista (jopa 31,3 pM pitoisuudella), että seerumiliuoksista. [9]

#### 5.1.4 Virusten tunnistaminen

GO-donorin, Au(np)-akseptorien ja FRET-ilmiön yhdistelmää on hyödynnetty myös rotaviruksen havaitsemisessa (kuva 43). Havaitsemisessa käytetään vasta-aine-DNA-Au(np)-kompleksia. GO:n emissio sammuu, kun rotavirus kiinnittyy vasta-aineeseen. FRET-ilmiötä ei tapahdu, jos analyyttiä ei ole läsnä. Havaitsemisraja on samaa suuruusluokkaa, kuin tavallisesti käytetyillä ELISA-testeillä ( $10^5$  pfu mL<sup>-1</sup>). [75]

Kaksi eri virusta, enterovirus 71 (EV71) ja coxsackievirus B3 (CVB3), on pystytty havaitsemaan myös samanaikaisesti. Kvanttipisteiden ja vasta-aineiden kompleksit adsorboituvat ensin GO:n pintaan, jolloin ne sammuvat. Fluoresenssin emissio palautuu viruksen spesifisen tunnistuksen myötä. Virukset pystytään tunnistamaan samanaikaisesti, koska niiden tunnistuskompleksit ovat keskenään eri väriset (kuva 42). [75]

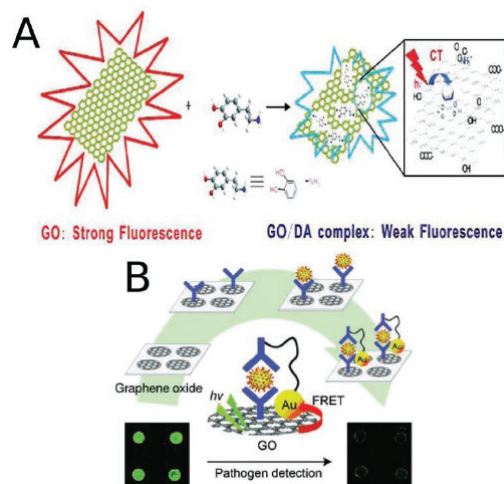


Kuva 42: Virusten EV71 ja CVB3 tunnistaminen. Kvanttipisteiden ja vasta-aineiden kompleksit adsorboituvat GO:n pintaan, jolloin niiden fluoresenssi sammuu. Kun sensori sitoutuu virukseen, sen fluoresenssi palautuu. Viruksille spesifisten sensorien poikkeavat värit mahdollistavat virusten samanaikaisen tunnistuksen. [75]

### 5.1.5 Dopamiini - grafeenioksidin emission sammuttaja

GO pystyy toimimaan paitsi fluoresenssin sammuttajana, myös fluoroforina. GO:n emissio on saatu sammumaan dopamiinilla. Tämä on seurausta dopamiinimolekyylien itsejärjestäytymisestä GO:n pinnalle. Dopamiinin sitoutuminen pystytään siis havaitsemaan ilman minkäänlaisia leimoja. Dopamiinin detektointiraja on 94 nM. [75]

Ilmiö ei johdu FRET-efektistä, koska dopamiinin absorptiospektri ja GO:n emissiospektri eivät vastaa toisiaan. Koska sekä GO:n että dopamiinin emissiointensiteetit laskevat sitoutumisen myötä, sammumisen täytyy olla seurausta muodostuvista sähköisistä vuorovaikutuksista. Vastaavaa ilmiötä on hyödynnetty myös rotaviruksen detektoinnissa (kuva 43).



Kuva 43: GO valoindusoidun varauksensiirron luovuttajana. A) GO fluoresenssin luovuttajana dopamiinin (DA) biotunnistuksessa. GO:n emissiospektri sammuu spesifisesti, kun systeemiin lisätään dopamiinia. B) GO FRET-ilmiön luovuttajana. Rotaviruksen havainnointisysteemi, jossa vasta-aineella päällystetyt GO-kohdat sammuvat patogeenin detektoinnin myötä. FRET-akseptorina toimii vasta-aine-DNA-Au(np)-kompleksi. [75]

## 5.2 Grafeenipohjaiset materiaalit solututkimuksessa

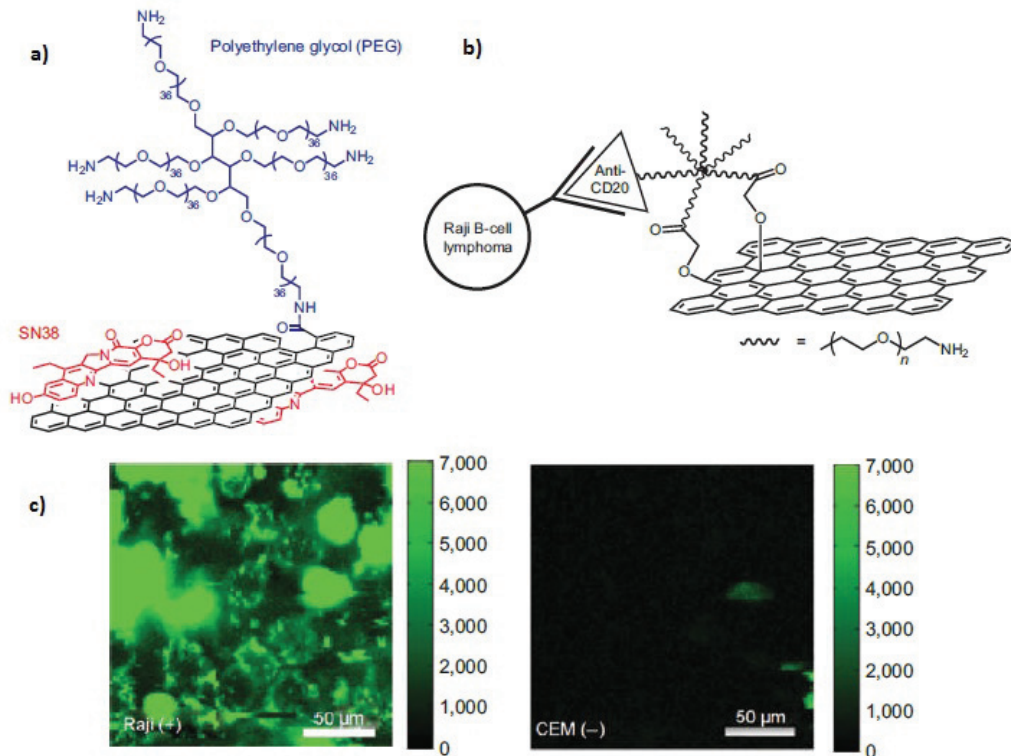
Grafeeni on lupaava kandidaatti hyvinkin moniin bioteknologiaan sovellettiin, kuten solujen ATP:n *in vivo* kohdentamiseen, mRNA:n *in situ* paikantamiseen, solujen reaaliaikaiseen tarkkailuun, lääkkeiden kuljetukseen ja solujen kuvantamiseen. Aptameeri-FAM/GO-systeemillä on pystytty tunnistamaan JB6 Cl 41-5a hiiren epiteelisolujen ATP. Kun valmistettu sensorialusta on yhdistetty laajan kentän fluoresenssimikroskooppiin, on saatu reaaliaikainen tunnistusalusta. [9]

ATP:n tunnistusta ATP-aptameerillä on käytetty GO-nanolevyjen ominaisuuksien ja hyötyjen tutkimuksen mallisysteeminä. GO-nanolevyt pystyvät toimimaan DNA-aptameerien kuljettimena eläviin soluihin. Se pystyy lisäksi suojaamaan oligonukleotidejä tehokkaasti entsyymaattiselta hajoamiselta kuljetuksen aikana. [9]

### 5.2.1 GO syöpälääkkeiden kuljettimena

Muokattua GO:a on kaavailtu veteen liukenemattomien lääkkeiden kuljettimiksi eläviin soluihin. Eräessä tutkimuksessa käytettiin nanokokoluokan GO:a, joka funktionalisoitiin ensin polyetyleeniglykolilla (PEG) liuokoisuuden ja stabiilisuuden parantamiseksi. Tuotteeseen kiinnitettiin vielä veteen liukenemattomia aromaattisia SN38-molekyylejä (kuva 44), joka on kemoterapioissa käytetyn irinotekaanin aktiivinen hajoamistuote. Lopullinen GO-PEG-SN38-kompleksi omaa korkean potentiaalinen ihmisen HCT-116-suolistosyöpäsolujen toiminnan salpaamiseen (IC<sub>50</sub>-arvo 6 nM). Kompleksin potentiaali on 1000 kertaa suurempi kuin irinotekaanin (CPT-11) ja samaa luokkaa kuin vapaan SN38:n. [9]

GO-PEG:iin kiinnitetty B-soluja kohtaan spesifinen vasta-aine Rituxan pysyy selektiivisesti tunnistamaan ja sitoutumaan B-imusolmuke-syöpäsoluihin. Syöpäsolut pystytään erottamaan muista soluista niihin sitoutuneen GO:n fluoresenssin kautta (kuva 44). [18]



Kuva 44: a) SN38:n kiinnittyminen GO-PEG:n pintaan  $\pi$ - $\pi$ -vuorovaikutusten kautta. b) Anti-CD20-vasta-aineeseen konjugoitunut GO-PEG kiinnittyy selektiivisesti Raji B-imusolmuke-syöpäsolujen CD20-pintareseptoreihin. c) CD20-positiivisten Raji-solujen (vasemmalla) ja CD20-negatiivisten CEM-T-solujen (oikealla) NIR-fluoresenssi sen jälkeen, kun näytettä on käsitelty GO-PEG-Rituxan-konjugaatilla. [18]

Syöpälääkkeiden lataus- ja kohdistustarkkuutta voidaan parantaa GO:n foorihappomuokkauksella (*FA*, *folic acid*). FA-konjugoituun GO:iin on saatu laadattua kontrolloidusti kahta eri syöpälääkettä, doksorubisiinia ja irinotekaa-nia. Lääkkeet on saatu kohdistettua spesifisesti ihmisen MCF-7-rintasyöpä-

soluihin. Sytotoksisuus on ollut huomattavasti suurempi kuin foolihapolla muokkaamattoman GO:n tapauksessa. [9]

PEG-muokattujen, nanokokoluokan grafeenilevyjen voimakasta optista NIR-alueen absorbanssia on hyödynnetty ultrakorkean *in vivo* syöpäsolun lääke-keenottokyvyn saavuttamisessa. Menetelmää voidaan hyödyntää valotermissä syöpähoidoissa. PEG-funktionalisoitujen nanografeenilevyjen käyttäytymistä hiirisoluissa on tutkittu fluoresenssikuvantamisen avulla. Kertyminen syöpäsoluihin osoittautui yllättävän suureksi. Bioyhteesopivilla nanokokoluokan grafeenilevyillä on näin ollen merkittävää potentiaalia tulevaisuuden syöpähoidoissa hyödyntämiseen. [9]

### 5.3 FET-transistorit biologisissa sovelluksissa

Grafeenijohdannaisia voidaan hyödyntää myös FET-transistoreissa. FET-transistoreihin perustuvat biosensorit ovat pystyneet tunnistamaan muun muassa nukleiinihappoja, proteiineja ja kasvutekijöitä. FET-laitteen ja mikrofluidististen kanavien yhdistelmällä on saatu havaittua jopa yksittäinen malariainfektoitunut punasolu. Sensoreissa käytettävät grafeenijohdannaiset funktionalisoidaan tunnistettavan kohteen mukaan spesifisillä nukleiinihapoilla, aptameereillä tai hiilihydraateilla. Sensorien toiminta perustuu sähköisen signaalin seurantaan. Niiden  $s/n$ -suhde (*signal/noise*) on suuri. [79]



## 6 Yhteenveto

Grafeenioksidi (GO) sisältää useita reaktiivisia, happea sisältäviä ryhmiä, jotka mahdollistavat sen muokkaamisen kemiallisen funktionalisoinnin kautta. Epoksidi- ja hydroksyyli-ryhmät sijaitsevat GO:n pinnalla. GO:n reunoilla on lisäksi hyvin pieniä määriä karboksyyli- ja ketoniryhmiä. [6] Eri funktionaaliset ryhmät muodostuvat asteittain hapetuksen etenemisen myötä. [20] Hapetusaste voi vaihdella paljonkin käytetyistä lähtömateriaaleista ja hapetusmenetelmistä riippuen. [6] Hapetusasteella on merkittävä vaikutus GO:n sähköisiin, optisiin ja kemiallisiin ominaisuuksiin. [18]

GO:n pintaan voidaan kiinnittää lukuisia funktionaalisia ryhmiä sekä kovalenttisesti että ei-kovalenttisesti. Kovalenttisessa funktionalisoinnissa voidaan hyödyntää GO:n karboksyyli-, epoksi- ja hydroksyyli-ryhmiä. Reaktioiden selektiivisyyden osoittaminen voi olla hankalaa grafeenioksidin monimutkaisesta rakenteesta johtuen. [6] Rakenteensa ja hydrofiilisten ryhmiensä ansiosta GO on erinomainen isäntämatriisi pitkäketjuisille, alifaattisille hiilivedyille, siirtymämetalleille, hydrofiilisille molekyyleille ja polymeereille. [24]

GO:n epoksidgeja voidaan muokata helposti renkaanavausreaktioiden kautta. Tavallisimmin käytetyt reagenssit ovat amiineja, jotka voivat reagoida paitsi epoksidgejen, myös karboksyyli- ja hydroksyyli-ryhmien kanssa. [6] Epoksidgejen renkaanavausreaktioita voidaan katalysoida hapoilla tai emäksillä. [28] GO:n epoksidgejen funktionalisoinnissa on käytetty yksittäistapauksissa hiilinukleofiiliä [25], bromattua hiilivetyketjua [39], atsidia [30] ja tioasettaattia [31]. GO:n epoksidgejen avauksessa käytetyt reagenssit ovat kuitenkin olleet pääsääntöisesti erilaisia amiineita. Amiinien kautta on saatu kiinnitettyä pit-

kiä hiilivetyketjuja [32, 33], tietty ionineste [28], silaaniryhmiä [6, 34] ja polymeerejä [35, 36]. GO:iin on kiinnitetty myös pieniä primäärisiä amiineita sekä aminohappoja [24].

GO:n hydroksyyliiryhmät voidaan muuttaa amideiksi tai estereiksi toisiintumisreaktioiden erilaisten muunnelmien kautta. Curtius- ja Hofmann-toisiintumisten stabiileina välivaiheina esiintyvät isosyanaatit reagoivat alkoholien tai amiinien kanssa muodostaen karbamaatti- tai urearyhmän. Claisen-toisiintumisessa on puolestaan kyse hiili-happi-sidoksen uudelleenjärjestäytymisestä, joka johtaa uuden hiili-hiili-sidoksen muodostumiseen. Uudelleenjärjestäytymisen tuotteena saadaan amidi- tai esteriryhmiä, jotka ovat kiinnittyneet grafeeniverkkoon vahvojen C–C-sidosten kautta. [37, 38]

Karboksyylihappojen reaktiot edellyttävät yleensä happoryhmän aktivointia esimerkiksi tionyylikloridilla. Tämän jälkeen voidaan käyttää nukleofiilisten reagenssien, kuten amiinien tai hydroksyylien additiota, jolloin muodostuu amideita tai estereitä. GO:iin on kiinnitetty esimerkiksi pitkiä alifaattisia amiineja, jotka ovat lisänneet GO:n liukoisuutta orgaanisiin liuottimiin. [6] Myös useita eri kromoforeja on saatu kiinnitettyä amidisidosten kautta. Grafeenilla on kuitenkin taipumus sammuttaa orgaanisen väriaineiden ja kvanttipisteiden fluoresenssi, mikä rajoittaa niiden käyttöä. Ilmiötä voidaan kuitenkin mahdollisesti hyödyntää FRET-biosensoreissa. [1]

Grafeenijohdannaisten funktionaaliset ryhmät voivat toimia erilaisten metallinanopartikkelien (Au, Ag, Pd, Pt, Ni, Cu) nukleaatio- ja kasvukeskuksina. [52] Tämä on mahdollistanut ainutlaatuisten hybridinanomateriaalien kehityksen. Grafeenin ja metallinanopartikkelien hybridien etuna on komponenttien erinomaisten ominaisuuksien eli grafeenin suuren pinta-alan ja hyvän johtavuuden sekä metallinanopartikkelien katalyyttisen aktiivisuuden ja bio-

logisen yhteensopivuuden yhdistyminen. [53] Toiminnalliset nanopartikkelit voivat toimia muun muassa johteina, fluorofooreina, magneetteina tai katalyytteinä. [26] Grafeenioksidi-metallinanopartikkeli-hybrideillä onkin potentiaalia biolääketieteen, SERS-spektroskopian, energian varastoinnin, sähkökemiallisen tunnistuksen ja katalyyysin aloilla. [27]

Grafeenipohjaisten materiaalien ainutlaatuiset ominaisuudet mahdollistavat niiden hyödyntämisen myös hyvinkin erilaisten biologisten molekyylien substraatteina. Grafeenin suotuisat ominaisuudet korostuvat etenkin bioelektronikan, biosensorien ja lääketieteen aloilla. Grafeenijohdannaisten bioyhteensopivuutta, liukoisuutta ja selektiivisyyttä voidaan parantaa biologisen muokkauksen avulla. GO:iin on saatu kiinnitettyä esimerkiksi entsyymeitä, peptideitä, proteiineja ja DNA:ta. [9]

GO:iin pohjautuvat biologiset sovellukset ovat keskittyneet lähinnä FRET-efektiin eli fluoresenssin resonanttien energiansiirtoon. [76] FRET-ilmiötä voidaan käyttää työkaluna nanometrikokoluokan etäisyyksien ja muutosten mitauksissa sekä *in vivo*- että *in vitro* -määrittelyissä. [9] Ilmiötä on käytetty myös biomolekyylien rakenteiden ja vuorovaikutusten selvittämiseen, nukleinihappojen analysointiin, signaalin transduktioon ja valon keräämiseen. [75]

Grafeenijohdannaisten sovelluskohteet ovat rajattomat ja niiltä voidaan odottaa suuria. GO:n kontrolloitujen funktionalisointimenetelmien kehittäminen asettaa kuitenkin haasteensa synteetikoille. Funktionalisointi ei ole kovinkaan helppoa GO:n rakenteen erikoislaatuudesta johtuen. Kehitystyötä on jarruttanut etenkin se, että kemiallisten sidosten muodostumisen ja stabiilisuuden osoittaminen on ollut vaikeaa. Funktionalisointimenetelmien lisäksi kehitettävää on siis myös analyysimenetelmissä. [8]

## Viitteet

- [1] V. Georgakilas, M. Otyepka, A. B. Bourlinos, V. Chandra, N. Kim, K. C. Kemp, P. Hobza, R. Zboril ja K. S. Kim, "*Functionalization of Graphene: Covalent and Non-Covalent Approaches, Derivatives and Applications*", *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 6156–6214.
- [2] S. Zhou ja A. Bongiorno, "*Origin of the Chemical and Kinetic Stability of Graphene Oxide*", *Sci. Rep.*, **2013**, *3*, 1–7.
- [3] B. C. Brodie, "*On the Atomic Weight of Graphite*", *R. Soc. Lond. Philos. Trans. Ser. I*, **1859**, *149*, 249–259.
- [4] L. Staudenmaier, "*Verfahren zur Darstellung der Graphitsäure*", *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1898**, *31*, 1481–1487.
- [5] W. S. Hummers ja R. E. Offeman, "*Preparation of Graphitic Oxide*", *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*, 1339–1339.
- [6] D. R. Dreyer, S. Park, C. W. Bielawski ja R. S. Ruoff, "*The chemistry of graphene oxide*", *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 228–240.
- [7] D. Chen, H. Feng ja J. Li, "*Graphene Oxide: Preparation, Functionalization, and Electrochemical Applications*", *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 6027–6053.
- [8] S. Eigler ja A. Hirsch, "*Chemistry with Graphene and Graphene Oxide—Challenges for Synthetic Chemists*", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 7720–7738.
- [9] Y. Wang, Z. Li, J. Wang, J. Li ja Y. Lin, "*Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology*", *Trends Biotechnol.*, **2011**, *29*, 205–212.

- [10] H. He, J. Klinowski, M. Forster ja A. Lerf, "A new structural model for graphite oxide", *Chem. Phys. Lett.*, **1998**, *287*, 53–56.
- [11] A. Lerf, H. He, M. Forster ja J. Klinowski, "Structure of Graphite Oxide Revisited", *J. Phys. Chem. B*, **1998**, *102*, 4477–4482.
- [12] H. He, T. Riedl, A. Lerf ja J. Klinowski, "Solid-State NMR Studies of the Structure of Graphite Oxide", *J. Phys. Chem.*, **1996**, *100*, 19954–19958.
- [13] A. Lerf, H. He, T. Riedl, M. Forster ja J. Klinowski, "<sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H MAS NMR studies of graphite oxide and its chemically modified derivatives", *Solid State Ionics*, **1997**, *101–103*, 857–862.
- [14] T. Szabó, O. Berkesi, P. Forgó, K. Josepovits, Y. Sanakis, D. Petridis ja I. Dékány, "Evolution of Surface Functional Groups in a Series of Progressively Oxidized Graphite Oxides", *Chem. Mater.*, **2006**, *18*, 2740–2749.
- [15] W. Cai, R. D. Piner, F. J. Stadermann, S. Park, M. A. Shaibat, Y. Ishii, D. Yang, A. Velamakanni, S. J. An, M. Stoller, J. An, D. Chen ja R. S. Ruoff, "Synthesis and Solid-State NMR Structural Characterization of <sup>13</sup>C-Labeled Graphite Oxide", *Science*, **2008**, *321*, 1815–1817.
- [16] D. W. Boukhvalov ja M. I. Katsnelson, "Modeling of Graphite Oxide", *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 10697–10701.
- [17] S. Stankovich, D. A. Dikin, R. D. Piner, K. A. Kohlhaas, A. Kleinhammes, Y. Jia, Y. Wu, S. T. Nguyen ja R. S. Ruoff, "Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide", *Carbon*, **2007**, *45*, 1558–1565.

- [18] K. P. Loh, Q. Bao, G. Eda ja M. Chhowalla, "*Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications*", *Nat. Chem.*, **2010**, *2*, 1015–1024.
- [19] J. I. Paredes, S. Villar-Rodil, A. Martínez-Alonso ja J. M. D. Tascón, "*Graphene Oxide Dispersions in Organic Solvents*", *Langmuir*, **2008**, *24*, 10560–10564.
- [20] T. Sakthivel, V. Gunasekaran ja S.-J. Kim, "*Effect of oxygenated functional groups on the photoluminescence properties of graphene-oxide nanosheets*", *Mater. Sci. Semicond. Process.*, **2014**, *19*, 174–178.
- [21] L. Shang Jingzh. and Ma, J. Li, W. Ai, T. Yu ja G. G. Gurzadyan, "*The Origin of Fluorescence from Graphene Oxide*", *Sci. Rep.*, **2012**, *2*, 1–8.
- [22] L. J. Cote, F. Kim ja J. Huang, "*Langmuir-Blodgett Assembly of Graphite Oxide Single Layers*", *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 1043–1049.
- [23] X. Zhou ja Z. Liu, "*A scalable, solution-phase processing route to graphene oxide and graphene ultralarge sheets*", *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 2611–2613.
- [24] A. B. Bourlinos, D. Gournis, D. Petridis, T. Szabó, A. Szeri ja I. Dékány, "*Graphite Oxide: Chemical Reduction to Graphite and Surface Modification with Primary Aliphatic Amines and Amino Acids*", *Langmuir*, **2003**, *19*, 6050–6055.
- [25] W. R. Collins, E. Schmois ja T. M. Swager, "*Graphene oxide as an electrophile for carbon nucleophiles*", *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 8790–8792.
- [26] T. V. Thu ja A. Sandhu, "*Graphene oxide as an advanced two-dimensional support for functional nanoparticles*", *AIP Conf. Proc.*, **2014**, *1585*, 136–140.

- [27] C. Bosch-Navarro, E. Coronado ja C. Martí-Gastaldo, "*Controllable coverage of chemically modified graphene sheets with gold nanoparticles by thermal treatment of graphite oxide with N,N-dimethylformamide*", *Carbon*, **2013**, *54*, 201–207.
- [28] H. Yang, C. Shan, F. Li, D. Han, Q. Zhang ja L. Niu, "*Covalent functionalization of polydisperse chemically-converted graphene sheets with amine-terminated ionic liquid*", *Chem. Commun.*, **2009**, 3880–3882.
- [29] J. Clayden, N. Greeves ja S. Warren, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, 2012. 435,438–439,470,781.
- [30] R. Salvio, S. Krabbenborg, W. J. Naber, A. H. Velders, D. N. Reinhoudt ja W. G. van der Wiel, "*The Formation of Large-Area Conducting Graphene-Like Platelets*", *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 8235–8240.
- [31] H. R. Thomas, A. J. Marsden, M. Walker, N. R. Wilson ja J. P. Rourke, "*Sulfur-Functionalized Graphene Oxide by Epoxide Ring-Opening*", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 7613–7618.
- [32] Z. Lin, Y. Liu ja C.-p. Wong, "*Facile Fabrication of Superhydrophobic Octadecylamine-Functionalized Graphite Oxide Film*", *Langmuir*, **2010**, *26*, 16110–16114.
- [33] S. Wang, P.-J. Chia, L.-L. Chua, L.-H. Zhao, R.-Q. Png, S. Sivaramakrishnan, M. Zhou, R. G.-S. Goh, R. H. Friend, A. T.-S. Wee ja P. K.-H. Ho, "*Band-like Transport in Surface-Functionalized Highly Solution-Processable Graphene Nanosheets*", *Adv. Mater.*, **2008**, *20*, 3440–3446.
- [34] H. Yang, F. Li, C. Shan, D. Han, Q. Zhang, L. Niu ja A. Ivaska, "*Covalent functionalization of chemically converted graphene sheets via silane and its reinforcement*", *J. Mater. Chem.*, **2009**, *19*, 4632–4638.

- [35] M.-C. Hsiao, S.-H. Liao, M.-Y. Yen, P.-I. Liu, N.-W. Pu, C.-A. Wang ja C.-C. M. Ma, "Preparation of Covalently Functionalized Graphene Using Residual Oxygen-Containing Functional Groups", *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2010**, *2*, 3092–3099.
- [36] Y. Liu, R. Deng, Z. Wang ja H. Liu, "Carboxyl-functionalized graphene oxide-polyaniline composite as a promising supercapacitor material", *J. Mater. Chem.*, **2012**, *22*, 13619–13624.
- [37] S. A. Sydlik ja T. M. Swager, "Functional Graphenic Materials Via a Johnson-Claisen Rearrangement", *Adv. Funct. Mater.*, **2013**, *23*, 1873–1882.
- [38] W. R. Collins, W. Lewandowski, E. Schmois, J. Walish ja T. M. Swager, "Claisen Rearrangement of Graphite Oxide: A Route to Covalently Functionalized Graphenes", *Angew. Chem.*, **2011**, *123*, 9010–9014.
- [39] J. Liu, Y. Wang, S. Xu ja D. D. Sun, "Synthesis of graphene soluble in organic solvents by simultaneous ether-functionalization with octadecane groups and reduction", *Mater. Lett.*, **2010**, *64*, 2236–2239.
- [40] S. Stankovich, R. D. Piner, S. T. Nguyen ja R. S. Ruoff, "Synthesis and exfoliation of isocyanate-treated graphene oxide nanoplatelets", *Carbon*, **2006**, *44*, 3342–3347.
- [41] T. A. Pham, N. A. Kumar ja Y. T. Jeong, "Covalent functionalization of graphene oxide with polyglycerol and their use as templates for anchoring magnetic nanoparticles", *Synt. Met.*, **2010**, *160*, 2028–2036.
- [42] L. Koua, H. He ja C. Gao, "Click chemistry approach to functionalize two-dimensional macromolecules of graphene oxide nanosheets", *Nano-Micro Lett.*, **2010**, *2*, 177–183.



- [43] J. Shen, N. Li, M. Shi, Y. Hu ja M. Ye, "*Covalent synthesis of organophilic chemically functionalized graphene sheets*", *J. Colloid Interface Sci.*, **2010**, *348*, 377–383.
- [44] Z.-B. Liu, Y.-F. Xu, X.-Y. Zhang, X.-L. Zhang, Y.-S. Chen ja J.-G. Tian, "*Porphyrin and Fullerene Covalently Functionalized Graphene Hybrid Materials with Large Nonlinear Optical Properties*", *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 9681–9686.
- [45] Y. Cui, Q. Wei, H. Park ja C. M. Lieber, "*Nanowire Nanosensors for Highly Sensitive and Selective Detection of Biological and Chemical Species*", *Science*, **2001**, *293*, 1289–1292.
- [46] C. Li, M. Curreli, H. Lin, B. Lei, F. N. Ishikawa, R. Datar, R. J. Cote, M. E. Thompson ja C. Zhou, "*Complementary Detection of Prostate-Specific Antigen Using In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanowires and Carbon Nanotubes*", *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 12484–12485.
- [47] G. Zheng, F. Patolsky, Y. Cui, W. U. Wang ja C. M. Lieber, "*Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays*", *Nat. Biotechnol.*, **2005**, *23*, 1294–1301.
- [48] K. Besteman, J.-O. Lee, F. G. M. Wiertz, H. A. Heering ja C. Dekker, "*Enzyme-Coated Carbon Nanotubes as Single-Molecule Biosensors*", *Nano Lett.*, **2003**, *3*, 727–730.
- [49] R. J. Chen, S. Bangsaruntip, K. A. Drouvalakis, N. Wong Shi Kam, M. Shim, Y. Li, W. Kim, P. J. Utz ja H. Dai, "*Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors*", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2003**, *100*, 4984–4989.

- [50] F. N. Ishikawa, H.-K. Chang, M. Curreli, H.-I. Liao, C. A. Olson, P.-C. Chen, R. Zhang, R. W. Roberts, R. Sun, R. J. Cote, M. E. Thompson ja C. Zhou, "*Label-Free, Electrical Detection of the SARS Virus N-Protein with Nanowire Biosensors Utilizing Antibody Mimics as Capture Probes*", *ACS Nano*, **2009**, *3*, 1219–1224.
- [51] O. Yasuhide, M. Kenzo ja M. Kazuhiko. "Chemical and Biosensing Applications Based on Graphene Field-Effect Transistors". Teoksessa: *Physics and Applications of Graphene - Experiments*. Toim. M. Sergey. InTech, 2011, 509–524.
- [52] G. Goncalves, P. A. A. P. Marques, C. M. Granadeiro, H. I. S. Nogueira, M. K. Singh ja J. Grácio, "*Surface Modification of Graphene Nanosheets with Gold Nanoparticles: The Role of Oxygen Moieties at Graphene Surface on Gold Nucleation and Growth*", *Chem. Mater.*, **2009**, *21*, 4796–4802.
- [53] F. Xu, F. Wang, D. Yang, Y. Gao ja H. Li, "*Electrochemical sensing platform for L-CySH based on nearly uniform Au nanoparticles decorated graphene nanosheets*", *Mater. Sci. Eng. C*, **2014**, *38*, 292–298.
- [54] H. Teymourian, A. Salimi ja S. Khezrian, "*Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles/reduced graphene oxide nanosheets as a novel electrochemical and bioelectrochemical sensing platform*", *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, *49*, 1–8.
- [55] R. Pasricha, S. Gupta ja A. K. Srivastava, "*A Facile and Novel Synthesis of Ag-Graphene-Based Nanocomposites*", *Small*, **2009**, *5*, 2253–2259.
- [56] R. Saito, G. Dresselhaus ja M. S. Dresselhaus, *Physical Properties of Carbon Nanotubes*, World Scientific Publishing, 1998.

- [57] R. J. Chen, S. Bangsaruntip, K. A. Drouvalakis, N. Wong Shi Kam, M. Shim, Y. Li, W. Kim, P. J. Utz ja H. Dai, "*Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors*", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2003**, *100*, 4984–4989.
- [58] F. N. Ishikawa, H.-K. Chang, M. Curreli, H.-I. Liao, C. A. Olson, P.-C. Chen, R. Zhang, R. W. Roberts, R. Sun, R. J. Cote, M. E. Thompson ja C. Zhou, "*Label-Free, Electrical Detection of the SARS Virus N-Protein with Nanowire Biosensors Utilizing Antibody Mimics as Capture Probes*", *ACS Nano*, **2009**, *3*, 1219–1224.
- [59] K. Besteman, J.-O. Lee, F. G. M. Wiertz, H. A. Heering ja C. Dekker, "*Enzyme-Coated Carbon Nanotubes as Single-Molecule Biosensors*", *Nano Lett.*, **2003**, *3*, 727–730.
- [60] K. Maehashi, K. Matsumoto, K. Kerman, Y. Takamura ja E. Tamiya, "*Ultrasensitive Detection of DNA Hybridization Using Carbon Nanotube Field-Effect Transistors*", *Jpn. J. Appl. Phys.*, **2004**, *43*, L1558.
- [61] M. T. Martínez, Y.-C. Tseng, N. Ormategui, I. Loinaz, R. Eritja ja J. Bokor, "*Label-Free DNA Biosensors Based on Functionalized Carbon Nanotube Field Effect Transistors*", *Nano Lett.*, **2009**, *9*, 530–536.
- [62] A. Star, J.-C. P. Gabriel, K. Bradley ja G. Grüner, "*Electronic Detection of Specific Protein Binding Using Nanotube FET Devices*", *Nano Lett.*, **2003**, *3*, 459–463.
- [63] K. Maehashi, T. Katsura, K. Kerman, Y. Takamura, K. Matsumoto ja E. Tamiya, "*Label-Free Protein Biosensor Based on Aptamer-Modified Carbon Nanotube Field-Effect Transistors*", *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, 782–787.

- [64] R. Arsat, M. Breedon, M. Shafiei, P. Spizziri, S. Gilje, R. Kaner, K. Kalantar-zadeh ja W. Wlodarski, "*Graphene-like nano-sheets for surface acoustic wave gas sensor applications*", *Chem. Phys. Lett.*, **2009**, *467*, 344–347.
- [65] J. D. Fowler, M. J. Allen, V. C. Tung, Y. Yang, R. B. Kaner ja B. H. Weiller, "*Practical Chemical Sensors from Chemically Derived Graphene*", *ACS Nano*, **2009**, *3*, 301–306.
- [66] S. Alwarappan, A. Erdem, C. Liu ja C.-Z. Li, "*Probing the Electrochemical Properties of Graphene Nanosheets for Biosensing Applications*", *J. Phys. Chem. C*, **2009**, *113*, 8853–8857.
- [67] N. G. Shang, P. Papakonstantinou, M. McMullan, M. Chu, A. Stamboulis, A. Potenza, S. S. Dhesi ja H. Marchetto, "*Catalyst-Free Efficient Growth, Orientation and Biosensing Properties of Multilayer Graphene Nanoflake Films with Sharp Edge Planes*", *Adv. Funct. Mater.*, **2008**, *18*, 3506–3514.
- [68] J. Lu, L. T. Drzal, R. M. Worden ja I. Lee, "*Simple Fabrication of a Highly Sensitive Glucose Biosensor Using Enzymes Immobilized in Exfoliated Graphite Nanoplatelets Nafion Membrane*", *Chem. Mater.*, **2007**, *19*, 6240–6246.
- [69] C. Shan, H. Yang, J. Song, D. Han, A. Ivaska ja L. Niu, "*Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Biosensing for Glucose Based on Graphene*", *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 2378–2382.
- [70] N. Mohanty ja V. Berry, "*Graphene-Based Single-Bacterium Resolution Biodevice and DNA Transistor: Interfacing Graphene Derivatives with Nanoscale and Microscale Biocomponents*", *Nano Lett.*, **2008**, *8*, 4469–4476.

- [71] P. C. Lee ja D. Meisel, "Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols", *J. Phys. Chem.*, **1982**, *86*, 3391–3395.
- [72] Y. Dong, L. Pei, X. Chu, W. Zhang ja Q. Zhang, "Electrochemical behavior of cysteine at a CuGeO<sub>3</sub> nanowires modified glassy carbon electrode", *Electrochim. Acta*, **2010**, *55*, 5135–5141.
- [73] P. C. White, N. S. Lawrence, J. Davis ja R. G. Compton, "Electrochemically initiated 1,4 additions: a versatile route to the determination of thiols", *Anal. Chim. Acta*, **2001**, *447*, 1–10.
- [74] L. Nie, H. Ma, M. Sun, X. Li, M. Su ja S. Liang, "Direct chemiluminescence determination of cysteine in human serum using quinine–Ce(IV) system", *Talanta*, **2003**, *59*, 959–964.
- [75] E. Morales-Narváez ja A. Merkoçi, "Graphene Oxide as an Optical Biosensing Platform", *Adv. Mater.*, **2012**, *24*, 3298–3308.
- [76] X. Wu, H. Cao, B. Li ja G. Yin, "The synthesis and fluorescence quenching properties of well soluble hybrid graphene material covalently functionalized with indolizine", *Nanotechnology*, **2011**, *22*, 075202.
- [77] X. Liu, R. Aizen, R. Freeman, O. Yehezkeli ja I. Willner, "Multiplexed Aptasensors and Amplified DNA Sensors Using Functionalized Graphene Oxide: Application for Logic Gate Operations", *ACS Nano*, **2012**, *6*, 3553–3563.
- [78] M. Zhang ja B.-C. Ye, "A reversible fluorescent DNA logic gate based on graphene oxide and its application for iodide sensing", *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 3647–3649.
- [79] C. Chung, Y.-K. Kim, D. Shin, S.-R. Ryoo, B. H. Hong ja D.-H. Min, "Biomedical Applications of Graphene and Graphene Oxide", *Acc. Chem. Res.*, **2013**, *46*, 2211–2224.

# Liite 1: Kesätyöraportti

## Työn lähtökohdat

Grafeeni sopii ainutlaatuisten ominaisuuksiensa ansiosta erinomaisesti läpinäkyvän elektroniikan alustaksi. Grafeenin luontainen johtavuus voi kuitenkin aiheuttaa jossain tapauksissa ongelmia, jotka voidaan ratkaista hapettamalla osa grafeenista grafeenioksidiksi. Grafeenin pintaan tehtävät GO-kuvioinnit aiheuttavat energia-aukkoja, jotka tekevät materiaalin puolijohtavaksi.

Hapetus voidaan tehdä laserilla ilma-atmosfäärissä. Tähän mennessä on saatu piirrettyä 300 nm:n viivaa, joka saadaan mahdollisesti kavennettua jopa 150 nm:iin. Hapettuja kuvioita on tutkittu Ramanilla ja alkuaine-SEM:lla. Näytteitä on kuvattu myös laserilla (yksi grafeenikerros TEM-gridin päällä).

Karakterisoinnit ovat osoittaneet, että hapetusastetta pystytään muuttamaan kontrolloidusti. Prosessin alussa tapahtuu nopea hapettuminen, jonka jälkeen hapettuminen hidastuu. Aivan alussa on vaihe, jossa hapettumista ei tapahdu lainkaan. Hapettunut kohta muuttuu johteesta puolijohteeksi. Tarkempaa tietoa karakterisoinneista löytyy ennakkojulkaisusta ”Patterning and tuning of electrical and optical properties of graphene by laser induced two-photon oxidation” [1].

Tämän työn tarkoituksena on ollut kartoittaa kemiallisen lisämuokkauksen erilaisia mahdollisuuksia. Lisämuokkaus kannattanee tehdä kovalenttisella funktionalisoinnilla kovalenttisen sidoksen kestävän luonteen vuoksi. Perusajatuksena on kiinnittää sellaisia ryhmiä, jotka voidaan detektoida varmas-

ti jollakin menetelmällä. Kiinnittyminen voitaisiin havaita esimerkiksi piirretyn diffraktiokuvion aiheuttaman valon taittumisen muutoksena, grafeenin polarisaation muutoksena, kiinnitettävien fluoroforien fluoresenssina tai Raman aktiivisen ryhmän Raman-vasteena. Isoimmat molekyylit näkyvät myös AFM:lla. Ne saattavat myös muuttaa materiaalin sähköisiä ominaisuuksia, mikä voidaan havaita sähköisenä vasteena. Ihanteellinen reaktio voidaan suorittaa yksinkertaisesti upottamalla siru reaktioliuokseen ja nostamalla se pois.

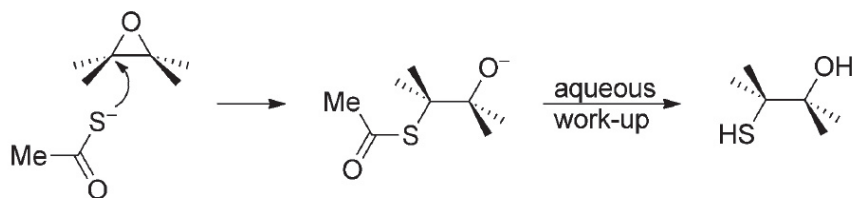
Fluoresoivien ryhmien ongelmana on niiden fluoresenssin erittäin todennäköinen sammuminen grafeenin toimesta. Hyvin pitkä linkkerimolekyyli saattaisi kuitenkin auttaa asiaa. Fluoresoivia molekyylejä voitaisiin detektoida laitoksen konfokaalimikroskoopilla. Mikroskoopeissa voidaan käyttää ainakin näkyvän valon aluetta sekä aallonpituuksia 405 ja 502 nm.

Grafeeni on materiaalina hydrofobinen, mutta hapetetun alueen ryhmät ovat hydrofilisiä. Aromaattiset molekyylit saattavat kiinnittyä grafeenin pintaan  $\pi$ - $\pi$ -vuorovaikutuksilla, mikä saattaa aiheuttaa ongelmia.

Projektin lopullisena tavoitteena on toimivan laitteen kehittäminen. Valmis siru voisi toimia esimerkiksi mikroanalyttisenä laitteena tai jonkin tietyn biomolekyylin ilmaisimena. Laitteessa olisi ihannetapauksessa aktiivinen virtalähde. Laite ei tarvitsisi tällöin ulkoista energiaa ja se voisi lähettää tietoa havaitsemistaan prosesseista.

## Valittu funktionalisointimenetelmä

Tutkittavaksi reaktioksi valittiin sivulla 21 esitelty tiolifunktionalisointi, jota seuraa kultananopartikkelien kiinnittyminen. Reaktio perustuu selektiiviseen, epoksidirenkaaseen kohdistuvaan nukleofiliseen hyökkäykseen. Nukleofilisen rikin lähteenä toimii kaliumtioasetaatti. Synteesi sisältää vesiliuoksessa tehtävän sammutusvaiheen, jonka pitäisi johtaa tioasetaatin hydrolysoitumiseen. Jäljelle jää vain grafeenin pintaan kiinnittynyt tioliryhmä. [2]



Kuva 1: Tioliryhmien kiinnittyminen  $S_N2$ -reaktiolla. [2]

Renkaanavausreaktion myötä pintaan jää myös hydroksyyliiryhmiä, joita voidaan niin ikään hyödyntää pinnan funktionalisoinnissa. Pinnan tioliryhmiin voidaan kiinnittää kultananopartikkeleita. Partikkelit voidaan syntetisoida *in situ* GO-SH-pinnalla. Partikkelien pitäisi kiinnittyä selektiivisesti SH-ryhmiin. Kontrollikokeet ovat osoittaneet, että partikkelit eivät kiinnity tioleja sisältävään pintaan. Tulokset ovat yhteisiä aiempien tutkimusten kanssa. [2, 3]

Synteesin valintaa tukivat sen lyhyehkö 5 tunnin reaktioaika (verrattuna muihin, tavallisesti vuorokauden kestäviin reaktioihin), synteesin suorituksen yksinkertaisuus ja miedot olosuhteet ( $T = 50\text{ °C}$ ). Tarvittavien reagenssien määrät ja tuotteen puhdistus on kuvattu yksityiskohtaisesti, joten sen toistamisen pitäisi onnistua helposti. Kaikki tarvittavat reagenssit ja liuot-



timet (K-tioasetaatti, DMSO, HCl sekä kultananopartikkelivaiheen  $\text{HAuCl}_4$  ja  $\text{NaBH}_4$ ) olivat lisäksi jo valmiiksi saatavilla eli niitä ei tarvinnut tilailla erikseen.

Tuotteen etuna on sen karakterisoinnin helppous. Kultananopartikkelien kiinnittyminen on helppo nähdä TEM:lla. Kaisa Helttunen mittasi keväällä 2014 onnistuneesti samankaltaisia hopeananopartikkelinäytteitä, joissa hopeaytimen koko oli vain 1,2 nm. Tämän synteesin kultananopartikkelien koon pitäisi olla pääosin välillä 5–10 nm eli niiden voisi olettaa näkyvän erittäin hyvin.

## Käytetyt reagenssit

Reagenssi	Valmistaja	Puhtaus (%)
Asetoni	Sigma-Aldrich	$\geq 99,5$
Dietyylieetteri	Sigma-Aldrich	$\geq 99,5$
DMSO	Merck	$\geq 99$
$\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	99,9
Kaliumtioasetaatti	Aldrich	98
Natriumboorihydridi	Aldrich	99
Suolahappo	Sigma-Aldrich	min. 37

## Yleiset ohjeet

### GO-SH:n synteesi

GO (100 mg) dispersoidaan DMSO:iin (50 ml) tunnin sonikoinnin avulla. Liuos asetetaan typen alle. Liuosta sekoitetaan huoneenlämpötilassa ennen kaliumtioasetaatin ylimäärän (10 mg) lisäystä. Seos lämmitetään 50 °C:een ja reaktion annetaan edetä 5,5 tunnin ajan. Seos jäädytetään ja siihen lisätään 1 M HCl-liuosta (5 ml). Seos sentrifugoidaan välittömästi. Kiinteä tuote pestään asetonilla (3 x 20 min), dietyylieetterillä (2 x 10 min) ja vedellä (3 x 2 h). Musta hiutalemainen jauhe kuivataan vakuumissa huoneenlämpötilassa. Saanto on 69,7 mg.

### GO-SAu(np):n synteesi

GO-SH (2 mg) dispersoidaan DMSO:iin (10 ml) sonikoinnin avulla, jolloin muodostuu vaaleanruskea liuos. Kultasuolan liuos valmistetaan sonikoinnin

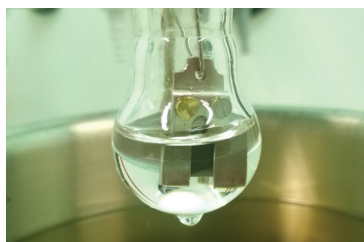
aikana liuottamalla  $\text{HAuCl}_4$  (5 mg) 1 ml:aan vettä. Kultasuolan liuokseen lisätään  $\text{NaBH}_4$  (2 mg). Liuos sekoitetaan välittömästi GO-SH:n dispersioon.

Liuos alkaa kuohua ja tummua välittömästi. Liuoksen annetaan sekoittua 5 minuutin ajan. Tumma sakka ja väritön supernatantti erotetaan sentrifugoimalla. Sakka pestään vedellä (2 x 5 min) ja asetonilla (2 x 5 min) sekä kuivataan vakuuissa. Saanto on 4 mg.

Ohjeesta puuttuneet reagenssien ja liuottimien tarkat määrät saatiin Jonathan P. Rourkelta [4].

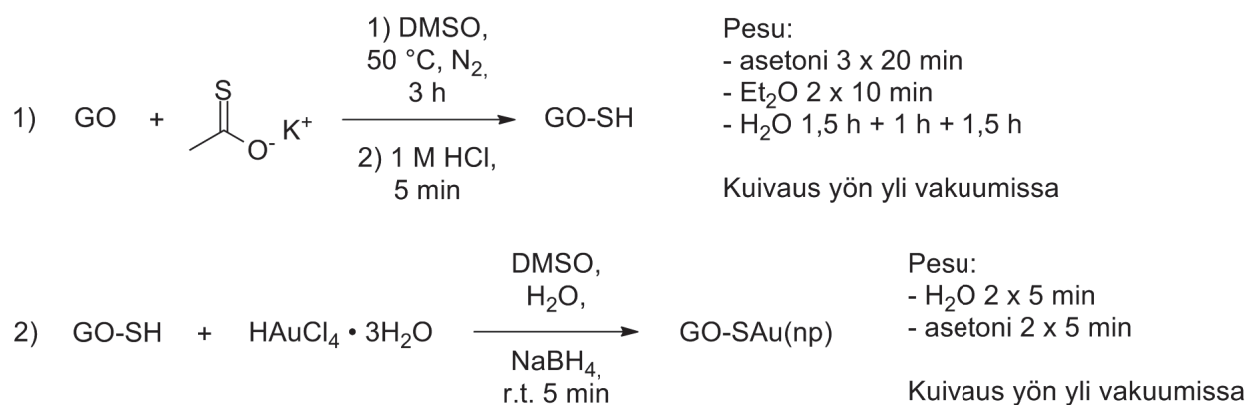
## Synteesien alustat

Reaktion alustana toimi kahden ensimmäisen näytteen kohdalla noin 3 mm x 3 mm -kokoinen siru. Siru oli kiinnitetty alla olevassa kuvassa näkyvälle, hieman laajemmalle alustalle, joka saatiin kiinnitettyä edelleen yksinkertaiseen telineeseen. Kolmannen näytteen siru oli hieman suurempi ja rakenteeltaan monimutkaisempi. Siruun oli rakennettu elektrodien välillä kulkevia johtimia. Kyseisellä sirulla ei ollut erillistä telinettä.



# Näyte 1

Synteesit suoritettiin seuraavan kaavion mukaisesti:



Kaliumtioasetaatin konsentraatio pidettiin samana kuin yleisen ohjeen mukaisessa GO-SH:n synteesissä (0,2 mg/ml). Synteesi suoritettiin 0,08-kertaisena eli liuotinmäärä oli 4 ml. Pesut suoritettiin pitämällä näytesirua magnetisauvalla sekoitetussa liuoksessa. Vesipesun kesto lyhennettiin alle puoleen.

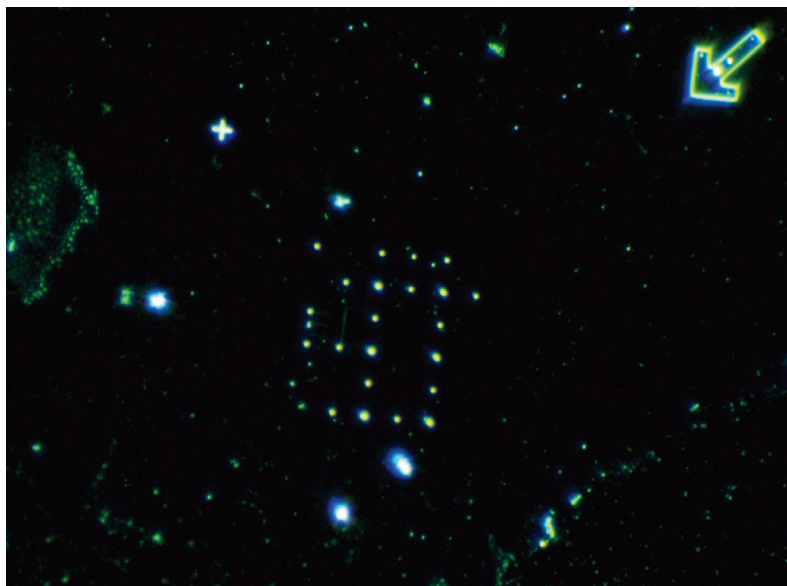
GO-SAu(np):n synteesi suoritettiin 0,4-kertaisilla ainemäärillä yleiseen ohjeeseen nähden. Kultasuolan määrää (pienen spaattelin kärjellinen) ei saatu punnittua, koska sillä oli taipumus tarttua kiinni spaatteliin ja hapettua. Siksi suola lisättiin suoraan 400 µl:aan vettä. Liuoksen kokonaispainon punnitseminen ei onnistunut myöskään, koska osa vedestä jäi vastavuoroisesti spaatteliin kiinni.

Andreas Johansson suoritti käsittelyjen jälkeen AFM-mittaukset. Sirun päällä oli erittäin paljon kultananopartikkeleita. Kaikki kultamarkkerit olivat lisäksi irronneet.

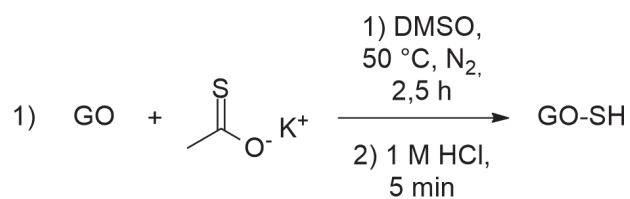
Sirua pestiin AFM-mittauksen jälkeen vielä lisää (3 x 1,5 h sekoitus asetonissa, 2 x 10 min sonikointi asetonissa, 1 x 20 min sonikointi etanolissa ja 1 x 20 min sonikointi kylläisessä NaCl-liuoksessa). Pesuja seurasi vielä 1 x 15 min sentrifugointi. Siru liukui osittain pois telineestään sentrifugoinnin myötä. Näkyvä kultananopartikkelikalvo hävisi osittain, mutta suuri osa partikkeleista oli edelleen kiinni sirun pinnalla. Kultavaiheen pesu ei luultavasti onnistunut synteesin liian suuresta konsentraatiosta johtuen. Konsentraatiota päätettiin pienentää seuraavan näytteen kohdalla.

## Näyte 2

Toisen näytteen GO-kuviointi näkyi ennen synteesiä hyvin pienenä jopa valomikroskoopilla (dark field, 50x suurennos) katsottaessa:

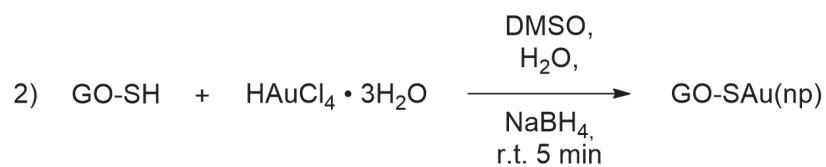


Synteesit suoritettiin seuraavan kaavion mukaisesti:



Pesu:  
- asetoni 3 x 20 min  
- Et<sub>2</sub>O 2 x 10 min  
- H<sub>2</sub>O 3 x 1 h

Kuivaus yön yli vetokaapissa



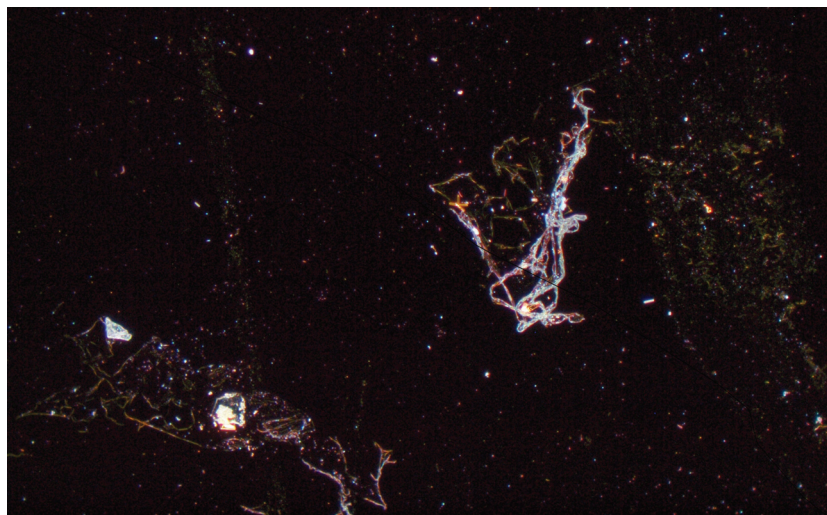
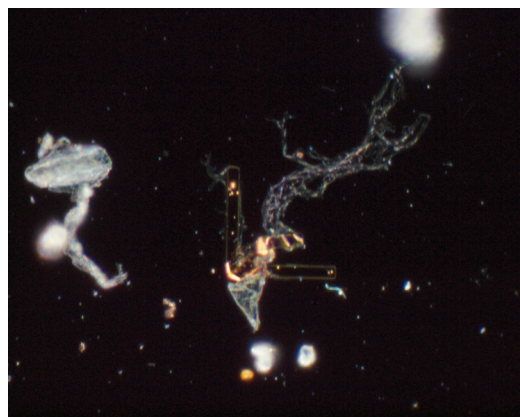
Pesu:  
- H<sub>2</sub>O 3 x 30 min  
- asetoni 3 x 30 min

Kuivaus yön yli vetokaapissa

Kaliumtioasetaatin konsentraatio laskettiin neljäsosaan edelliseen synteesiin

nähdän. Liuotinmäärä oli 10 ml. Myös HCl:n määrää pienennettiin samassa suhteessa. Vesipesun kesto oli (2 x 2 h). Reaktion annettiin edetä 2,5 tuntia.

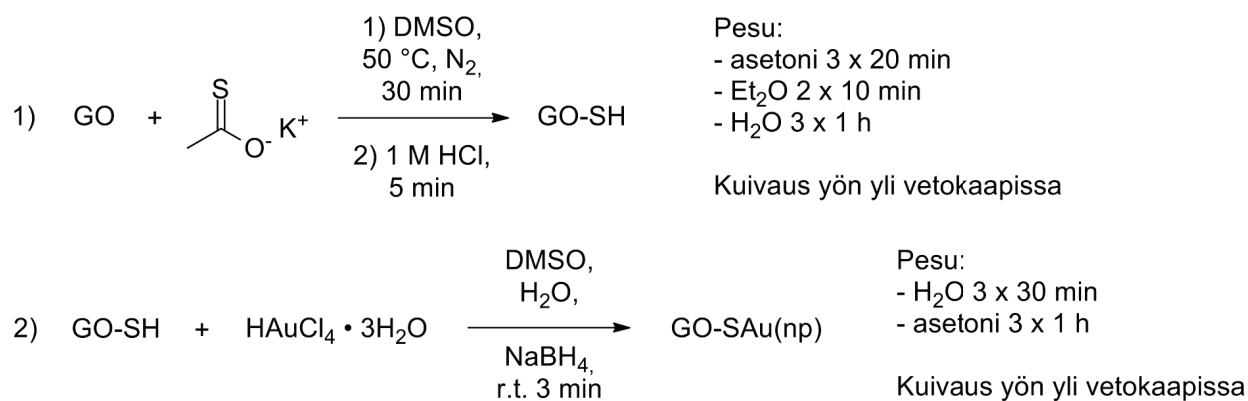
Näytettä tutkittiin valomikroskoopilla synteesin jälkeen. Kultamarkkerit ovat jälleen irronneet osittain. Tässä vaiheessa kaikki suurimmat markkerit olivat kuitenkin tallella. Pienemmistä markkereista kaksi on irronnut ja kaksi muuta näyttää liikkuneen:



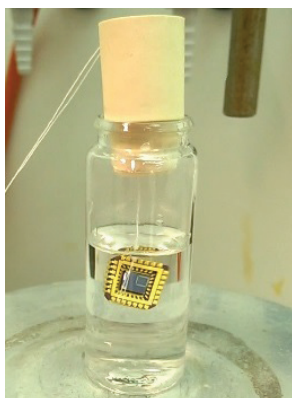
Näytteelle tehtiin myös AFM-mittaukset, joista ei saatu merkittävää tietoa.

## Näyte 3

Synteetit suoritettiin seuraavan kaavion mukaisesti:



GO-SH:n synteessin kaliumtioasetaatin konsentraatio laskettiin 0,6-kertaiseksi edelliseen synteisiin nähden (0,03 mg/ml). Liuotintamäärää pienennettiin puolet 10 ml:sta 5 ml:aan. Sekoitusnopeutta laskettiin radikaalisti minimiarvoon eli 50 rpm:aan. Myös reaktioaikaa laskettiin huomattavasti 2,5 tunnista 30 minuuttiin. Näytteen ripustus poikkesi lisäksi aiemmasta uudeltaisesta sirusta johtuen. Ripustus tehtiin polyesterilangalla.

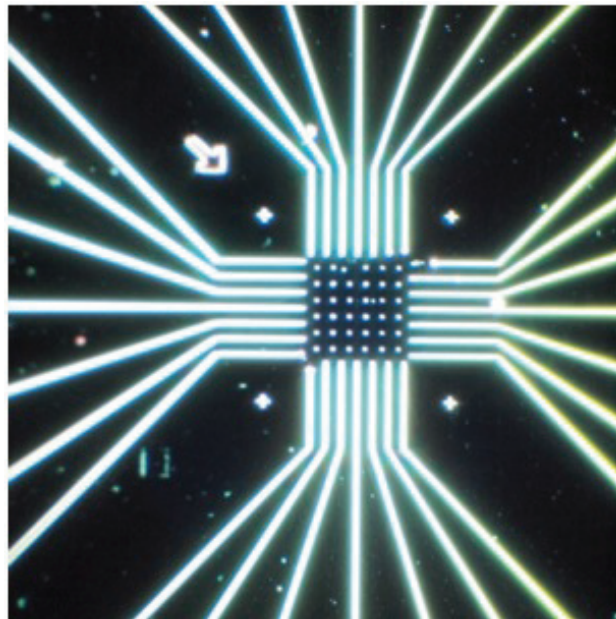




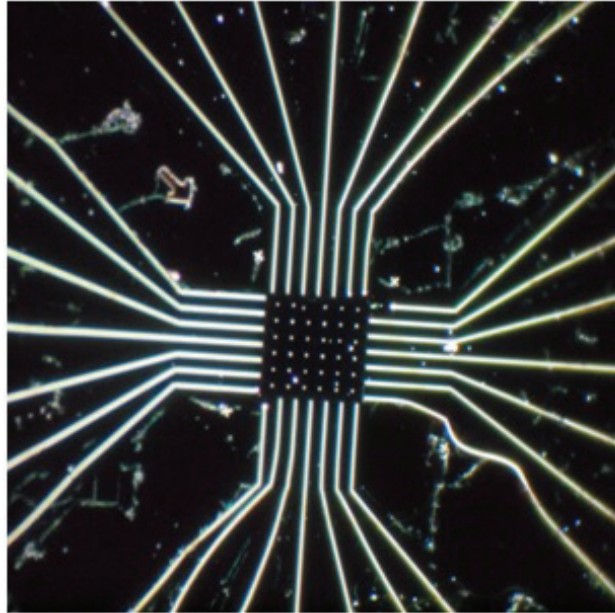
GO-SA<sub>Au</sub>(np):n synteesin liuottimen määrä oli sama kuin edellisessä synteesissä. Kultasuolan määrä vähennettiin 0,0065-kertaiseksi. Reaktioaikaa lyhennettiin 5 minuutista 3 minuuttiin.

Sirulla ei näkynyt valomikroskoopilla katsottaessa lainkaan kultananopartikkeleita. Vain pienimmät kultamarkkerinuolet olivat lähteneet liikkumaan. Pienemmät pistemäiset markkerit pysyivät kuitenkin paikallaan. GO-kuviota ei näkynyt missään vaiheessa.

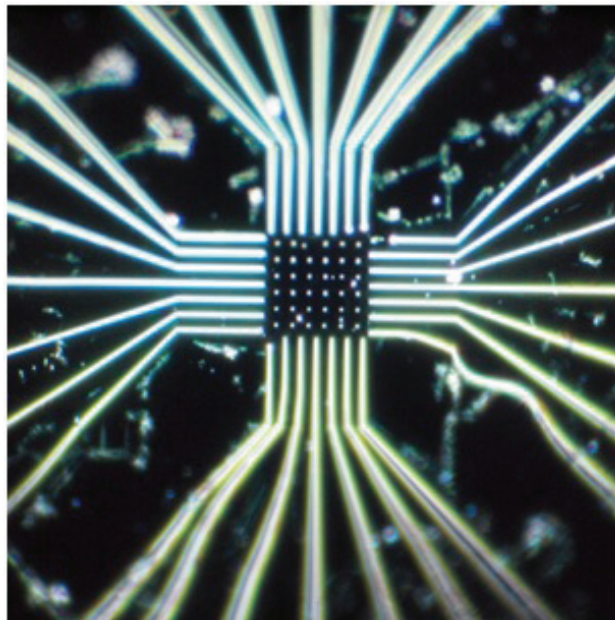
Juha Koivistoinen suoritti näytteen AFM-mittaukset. Pinnalla oli noin 10 nanometrinen paksuisia ja usean mikrometrin levyisiä läikkiä. Tuloksista on vaikea tehdä mitään tulkintoja. Kultananopartikkeleita muodostui tällä kertaa ainakin riittävän vähän ellei jopa liian vähän. Kullan konsentraatiota voinee nostaa jonkin verran.



Kuva 2: Kolmas ja viimeisin näyte ennen käsittelyä.



Kuva 3: Kolmas näyte tiolikäsittelyn jälkeen.



Kuva 4: Kolmas näyte kultavaiheen jälkeen.

# Synteesien ainemäärät

## Näyte 1

Reagenssit	M (g/mol)	n (mmol)	m/V
GO-näyte	?	?	?
DMSO (kuiva)	78,14	56,31	4 ml
Kaliumtioasetaatti	114,21	0,0070	0,0008 g
Suolahappo (1 M)	36,46	0,4 0	400 µl

Reagenssit	M (g/mol)	n (mmol)	m/V
GO-SH-näyte	?	?	?
DMSO (kuiva)	78,14	56,31	4 ml
HAuCl <sub>4</sub> · 3 H <sub>2</sub> O	393,83	?	?
Natriumboorihydridi	37,83	0,026	0,0010 g

\*Kultavaihe suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti. Siru lisättiin DMSO-liuokseen. H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>:n vesiliuos valmistettiin lisäämällä spaattelinkärjellinen kultasuolaa 400 µl:aan vettä. Kultasuolan liuokseen lisättiin NaBH<sub>4</sub>. Kirkkaankeltainen liuos muuttui hetkessä mustaksi, kuplivaksi suspensioksi. Suspensio lisättiin välittömästi sirun DMSO-liuokseen. Suspensiota sekoitettiin 5 minuuttia. Siru pestiin ja kuivattiin.

## Näyte 2

Reagenssit	M (g/mol)	n (mmol)	m/V
GO-näyte	?	?	?
DMSO (kuiva)	78,14	140,77	10 ml
Kaliumtioasetaatti	114,21	0,0044	0,0005 g
Suolahappo (1 M)	36,46	0,25	250 µl

Reagenssit	M (g/mol)	n (mmol)	m/V
GO-SH-näyte	?	?	?
H <sub>2</sub> O	18,02	291,06	5,245 ml
HAuCl <sub>4</sub> · 3 H <sub>2</sub> O	393,83	0,0025	0,0010 g
Natriumboorihydridi	37,83	0,066	0,0025 g

\*Kultavaihetta muokattiin yleiseen ohjeeseen nähden. H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>:n kantaliuos valmistettiin liuottamalla 0,0100 g kultasuolaa 2 ml:aan vettä (0,0127 M liuos). Kantaliuosta pipetoitiin 200 µl kolviin, jossa oli 5 ml vettä. NaBH<sub>4</sub>:n liuos valmistettiin liuottamalla 0,0050 g kyseistä ainetta 900 µl:aan vettä (0,15 M liuos). Liuoksesta otettiin 45 µl ja se lisättiin yhdessä erässä reaktiokolviin. Nanopartikkelit alkoivat muodostua välittömästi. Liuoksen väri muuttui kellertävästä punaiseksi ja edelleen violetiksi reaktion edetessä. GO-sirua pidettiin väriään muuttavassa liuoksessa 5 min ajan. Siru pestiin ja sen annettiin kuivua. Kultananopartikkeleita kiinnittyi edelleen melko paljon sirun pintaan.

### Näyte 3

Reagenssit	M (g/mol)	n (mmol)	m/V
GO-näyte	?	?	?
DMSO (kuiva)	78,14	70,39	5 ml
Kaliumtioasetaatti	114,21	0,0013	0,00015 g
Suolahappo (1 M)	36,46	0,075	75 µl

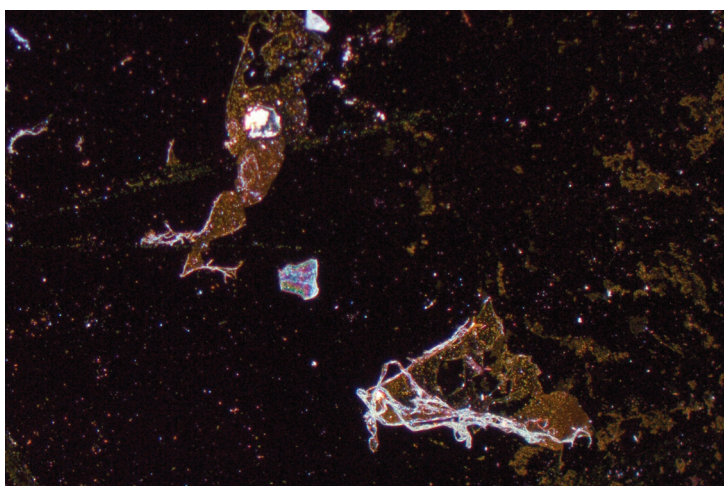
Reagenssit	M (g/mol)	n (mmol)	m/V
GO-SH-näyte	?	?	?
DMSO	78,14	70,39	5 ml
HAuCl <sub>4</sub> · 3 H <sub>2</sub> O	393,83	0,000016	0,0000062 g
Natriumboorihydridi	37,83	0,000046	0,0000017 g

\*Synteesi suoritettiin, kuten edellinenkin, muokattu synteesi. NaBH<sub>4</sub>-liuos valmistettiin liuottamalla 0,0020 g kyseistä ainetta 1440 µl:aan vettä. Reaktioastiaan lisättiin 10 ml DMSO:a ja 5 µl H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>:n kantaliuosta (0,0127 M) sekä 5 µl NaBH<sub>4</sub>-liuosta. Liuos näytti värittömältä, joten siihen lisättiin vielä 20 µl molempia liuoksia, jolloin muodostui pinkki liuos. Koska liuos vaikutti nyt liian konsentroituneelta, uuteen reaktioastiaan lisättiin 5 ml DMSO:a ja 500 µl edellä muodostunutta pinkkiä liuosta. Sirun annettiin olla hailakan vaaleanpunaisessa liuoksessa 3 minuuttia. Siru pestiin ja sen annettiin kuivua.

## Yhteenveto

Synteesi osoittautui odotettua haastavammaksi erittäin pienestä näytemäärästä johtuen. Tiolivaihe lienee hyvin herkkä reagenssien määrän ja reaktioajan suhteen kaliumtioasetaatin pelkistävästä luonteesta johtuen. Jos reaktion annetaan edetä liian kauan, kaliumtioasetaatti saattaa pelkistää GO-kuvion kokonaan pois. Pelkistymisen seuraaminen on hankalaa näytteen luonteesta johtuen. Reaktion seuraaminen voisi helpottua, jos GO-kuviot piirretäisiin alkuun hieman leveämmiksi, valomikroskoopilla näkyviksi. Tiolifunktionalisoidun alueen luulisi erottuvan grafeeniympäristöstä hapetetun alueen tavoin. Jos kuvio katoaa täysin, alue on luultavasti päässyt pelkistymään.

Tiolivaiheen pesu on myös hankalahko, sillä reaktion jäljiltä näyttää jäävän jonkinlaista tioliepäpuhtautta, joka ei irtoa pesuissa. Huomionarvoista on, että kyseistä epäpuhtautta ei näytä kiinnittyvän lisää tai irtoavan kultavaiheessa. Epäpuhtaus ei siis liene ilmasta laskeutunutta pölyä, ihosolukkoa tai muuta vastaavaa. Oletusta tukee myös kultananopartikkelien voimakas kiinnittyminen kyseiseen tioliepäpuhtauteen:



Tiolivaiheen jälkeen pinnalle jääneet epäpuhtausalueet ovat kauttaaltaan kultananopartikkelien peitossa. Muille alueille kiinnittyneet partikkelit näyttävät muodostavan enemmän pienempiä, klusterimaisia ryppäitä. Epäpuhtauden poisto on kuitenkin hankalaa, koska pesuajat eivät voi olla kovinkaan pitkiä kultamarkkerien epästabiiliudesta johtuen. Myöskään sentrifugointi ei tule kyseeseen.

Kultavaiheen haasteena on lähinnä sopivan konsentraation etsiminen. Jos konsentraatio on liian korkea, siru on käsittelyn jälkeen täynnä kultananopartikkeleita. Kiinnittyminen ei siis ole spesifistä kyseisessä tapauksessa. Ensimmäisen kokeilun konsentraatio osoittautui aivan liian korkeaksi, sillä siru oli kauttaaltaan kultananopartikkelien peitossa. Toisen kokeilun matalampi konsentraatio oli huomattavasti parempi, joskin edelleen liian korkea, kuten edellisen sivun kuvasta nähdään. Kolmannen kokeilun konsentraatio on saattanut olla liiankin matala.

Yleisen ohjeen mukainen kultananopartikkelisynteesi ei vaikuta kovinkaan toimivalta, sillä reaktio etenee hyvin nopeasti ja kulta pelkistyy parissa sekunnissa muodostaen mustan suspension. Muodostuvat partikkelit lienevät siis todella suuria. Kahden viimeisemmän näytteen kohdalla tehdyt kokeilut ovat johtaneet kontrolloidumpaan pelkistymiseen. Partikkelien kokojakauma lienee kuitenkin suuri, sillä reaktion alun pinkki väri viittaa kokoluokkaan 20 nm. Pelkistymisen lopussa muodostuva violetti väri viittaa taasen noin 100 nm kokoisiin partikkeleihin.

## Viitteet

- [1] J. Aumanen, A. Johansson, J. Koivistoinen, P. Myllyperkiö ja M. Pettersson, "*Patterning and tuning of electrical and optical properties of graphene by laser induced two-photon oxidation*", *arXiv.org, e-Print Arch. Condens. Matter*, **2014**.
- [2] H. R. Thomas, A. J. Marsden, M. Walker, N. R. Wilson ja J. P. Rourke, "*Sulfur-Functionalized Graphene Oxide by Epoxide Ring-Opening*", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 7613–7618.
- [3] C. Bosch-Navarro, E. Coronado ja C. Martí-Gastaldo, "*Controllable coverage of chemically modified graphene sheets with gold nanoparticles by thermal treatment of graphite oxide with N,N-dimethylformamide*", *Carbon*, **2013**, *54*, 201–207.
- [4] J. P. Rourke. Sähköpostikirjeenvaihto. 20.8.2014.



# Hopeananopartikkelien synteesi

Erikoistyö

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

Orgaanisen kemian pääaine

13.5.2014

Tiina Virtanen

## Tiivistelmä

Tämä erikoistyö käsittelee tiolisuojustujen hopeananopartikkelien synteesiä. Työn pääasiallisena tavoitteena on ollut  $(\text{PPh}_4)_4[\text{Ag}_{44}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{F})_{30}]^-$ ,  $\text{Cs}_4\text{Ag}_{44}(\textit{p}\text{-MBA})_{30}^-$  ja  $\text{Na}_4\text{Ag}_{44}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{F})_{30}$ -partikkelien valmistaminen kirjallisuudessa esitettyjen synteesien mukaisesti. Partikkelien ominaisuuksista on kerätty myös hieman kokeellista lisätietoa. Hopeananopartikkelien lisäksi valmistettiin pentyyliresorsinareeni-bis-tiakruunujen välituotteita sekä etyyliresorsinareeni-bis-tiakruunu.

# Sisällysluettelo

Esipuhe	iv
Käytetyt lyhenteet	1
1 Työn tarkoitus	2
2 Reaktiomekanismit	3
2.1 Tetrametoksiresorsinareenin valmistaminen happokatalysoidulla kondensaatiolla . . . . .	3
2.2 Tetrametoksiresorsinareenin tosylointi $S_N2$ -reaktiolla . . . . .	4
2.3 Bis-tiakruunun muodostuminen $S_N2$ -reaktiolla . . . . .	5
3 Käytetyt laitteet ja menetelmät	6
4 Käytetyt reagenssit	7
5 Synteetit	8
5.1 Resorsinareenit . . . . .	8
5.2 $(PPh_4)_4[Ag_{44}(SC_6H_4F)_{30}]$ (A) . . . . .	14
5.3 $Cs_4Ag_{44}(p-MBA)_{30}$ (B) . . . . .	33
5.4 $Na_4Ag_{44}(SC_6H_4F)_{30}$ (C) . . . . .	66

<b>6</b>	<b>Hopeananopartikkelien karakterisoinnit</b>	<b>68</b>
6.1	ESI-Q-TOF-massaspektrometria . . . . .	68
6.2	<sup>1</sup> H NMR -spektroskopia . . . . .	68
6.3	Termovaaka-analyysi . . . . .	70
6.4	Läpäisyelektronimikroskopia (TEM) . . . . .	71
<b>7</b>	<b>Yhteenveto</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>Valmistetut yhdisteet</b>	<b>79</b>

**Liitteet**

## Esipuhe

Tämä erikoistyö tehtiin lokakuun 2013 ja helmikuun 2014 välisenä aikana Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella, Nanoscience Centerissä orgaanisen kemian pääaineessa. Erikoistyön ohjaajina toimivat professori Maija Nissinen ja post doc -tutkija Kaisa Helttunen. Kirjallinen materiaali koottiin Web of Science ja Google Scholar -hakukoneiden sekä ohjaajien avustuksella.

Suuret kiitokset ohjaajilleni Maija Nissiselle ja Kaisa Helttuselle hyvistä neuvoista, kärsivällisyydestä ja mielenkiinnosta tutkielmaani kohtaan. Haluan kiittää myös Elina Kaleniusta kokeellisen osuuden MS-mittauksista ja Kirsi Salorinnettä nanopartikkelien synteesiin ja puhdistamiseen liittyvistä neuvoista.

Jyväskylässä 13.5.2014

Tiina Virtanen

## Käytetyt lyhenteet

Ac	asetaatti
APS	ammoniumpersulfaatti
Ar	argon
AuNP	kultananopartikkeli
$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	booritrifluoridieteraatti
<i>t</i> BuOK	kalium-tert-butoksidi
$\text{CDCl}_3$	deuteroitu kloroformi
$\text{CsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$	cesiumhydroksidimonohydraatti
DMF	dimetyyliformamidi
DMSO	dimetyylisulfoksidi
ESI-MS	sähkösumutus-ionisaatiomassaspektrometria
Et	etyyli
EtOAc	etyyliasetaatti
4-FTP	4-fluorotiofenoli
MeCN	asetonitrili
MeOH	metanoli
<i>p</i> -MBA	para-merkaptobentsoehappo
$\text{NaBH}_4$	natriumborohydridi
NaOH	natriumhydroksidi
$\text{NH}_4\text{OAc}$	ammoniumasetaatti
NMR	ydinmagneettinen resonanssi
PAGE	polyakryyliamidigeelielektroforeesi
$\text{PPh}_4\text{Br}$	tetrafenyylifosfoniumbromidi
SDS	natriumdodesyyli-sulfaatti
$\text{S}_\text{N}2$	toisen kertaluvun nukleofilinen substituutio
TEMED	<i>N,N,N,N'</i> -tetrametyleenidiamiini
THAM, TRIZMA®	tris(hydroksimetyyli)aminometaani
THF	tetrahydrofuraani
TMR	tetrametoksiresorsinareeni
Ts	<i>p</i> -tolueenisulfonyyli (tosyyli)
UV/Vis	ultravioletti/näkyvä valo
w/v	massakonsentraatio (massa/tilavuus)

# 1 Työn tarkoitus

Erikoistyön aihe on osa Jyväskylän yliopiston Nanoscience Centerissä tehtävää hopeananopartikkelien poikkitieteellistä tutkimusta. Työn tarkoituksena oli pyrkiä toistamaan kirjallisuudessa esitettyjä hopeananopartikkelien synteesejä [1–3] ja selvittämään optimaalisia reaktio-olosuhteita.

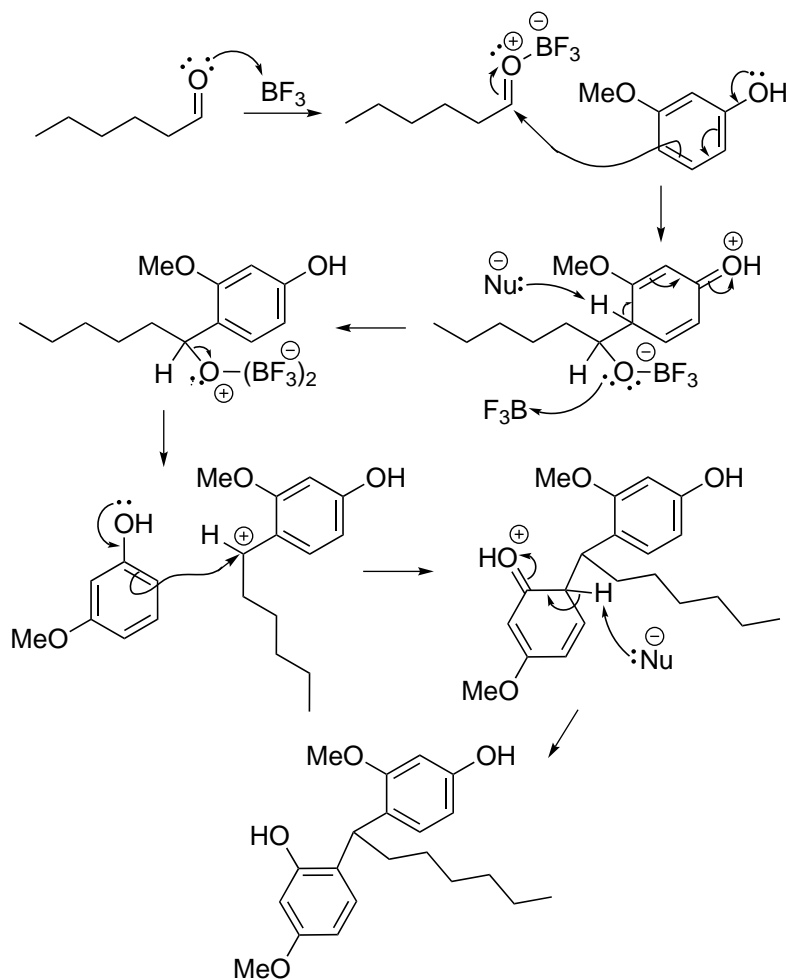
Valmistettuja hopeananopartikkeleita saatetaan tulevaisuudessa hyödyntää tiettyjen enterovirusten rakenteen ja toiminnan kuvantamisessa. Tällöin syntetisoidun partikkelien orgaanista pintakerrosta pyritään ensin muokkaamaan siten, että partikkelit kiinnittyvät ainoastaan enterovirusten pintaproteiinien rikkiä sisältäviin osiin. Virukseen kiinnittyneet hopeananopartikkelit näkyvät elektronimikroskooppikuvin tummina leimoina. Menetelmän avulla voidaan saada tietoa virusten kulkeutumisesta kudoksissa ja soluissa sekä niiden avautumismekanismeista solun sisällä. Kyseinen menetelmä on jo kehitetty Jyväskylän yliopiston Nanoscience Centerin aiemman poikkitieteellisen tutkimuksen tuloksena ja osoitettu toimivaksi Au<sub>102</sub>-kultananopartikkelien kohdalla.[4] Tulevaisuuden tavoitteena on korvata kultananopartikkelit hopeananopartikkeleilla edullisempien lähtöaineiden ja helpomman synteessin vuoksi.

Hopeananopartikkelien lisäksi valmistettiin pentyyliresorsinareeni-bis-tiakruunujen välituotteita [5] sekä etyyliresorsinareeni-bis-tiakruunu [6]. Resorsinareeni-bis-tiakruunuja yritetään tulevaisuudessa kompleksoida ligandisuojattujen hopeananopartikkelien kanssa.

## 2 Reaktiomekanismit

### 2.1 Tetrametoksisorsinareenin valmistaminen happokatalysoidulla kondensaatiolla

Tetrametoksisorsinareenit valmistetaan happokatalysoidulla kondensaatio-reaktiolla (kuva 1).



Kuva 1: Happokatalysoidun kondensaation reaktiomekanismi.[7, 8]

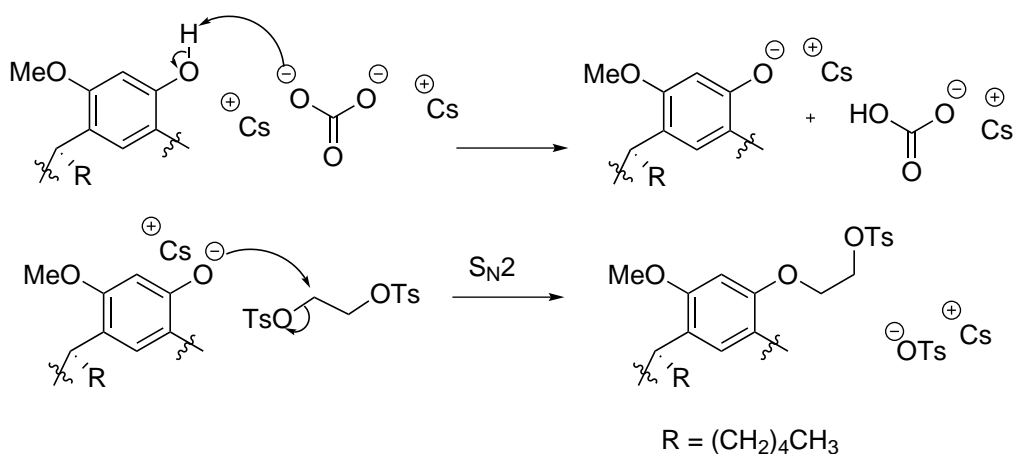
Tässä työssä lähtöaineina käytettiin 3-metoksisfenolia ja heksanaalia. Lewisin



happo  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  toimii katalyyttinä. Aldehydi reagoi hapon kanssa muodostaen karboksiumionin, joka reagoi edelleen aromaattisen renkaan kanssa elektrofiilisellä aromaattisella substituutiolla. Syntyvä bentsyylinen alkoholi muodostaa bentsyyllisen kationin, joka voi reagoida toisen aromaattisen renkaan kanssa. Tämä reaktiosarja toistuu lopulta muodostuvan tetrameerisen renkaan sulkeutumiseen saakka.[7, 8]

## 2.2 Tetrametoksisoresorsinareenin tosylointi $\text{S}_{\text{N}}2$ -reaktiolla

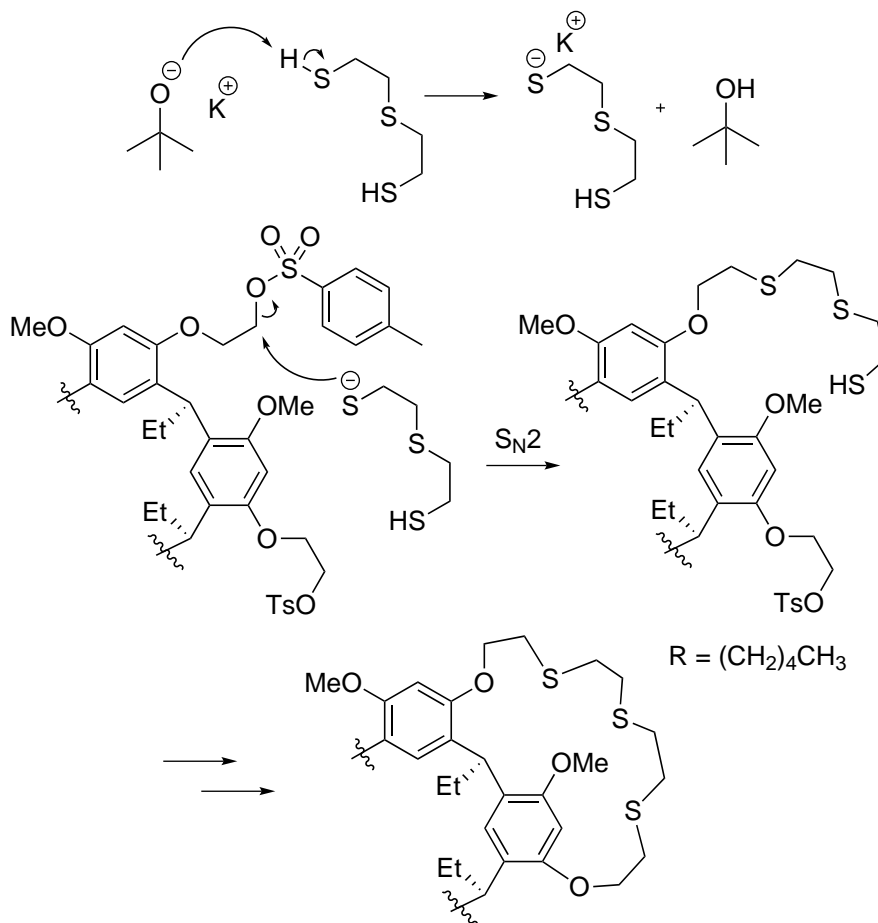
Tetrametoksisoresorsinareenin nukleofilinen hydroksyyliiryhmä saadaan tosyloitua  $\text{S}_{\text{N}}2$ -reaktiolla (kuva 2). Emäksenä toimiva cesiumkarbonaatti deprotonoi hydroksyyliiryhmän. Muodostuva alkoksidi pystyy liittymään tosyloidun etyleeniglykolin positiivisesti osittaisvarautuneeseen hiileen, mikä johtaa paremman lähtevän ryhmän eli tosyylin irtoamiseen  $\text{S}_{\text{N}}2$ -reaktion periaatteiden mukaisesti.[8]



Kuva 2: Tosylointireaktio  $\text{S}_{\text{N}}2$ -mekanismilla.[8]

## 2.3 Bis-tiakruunun muodostuminen $S_N2$ -reaktiolla

Bis-tiakruunun sillan muodostuminen tapahtuu niin ikään  $S_N2$ -reaktion kautta (kuva 3). Suoritetussa synteesissä emäksenä toimii kalium-*tert*-butoksidi, joka deprotonoi ensin sulfidin. Muodostuva emäksinen sulfidi liittyy positiivisesti osittaisvarautuneeseen hiileen, mikä johtaa erittäin hyvän lähtevän ryhmän eli tosyylin irtoamiseen  $S_N2$ -reaktion periaatteiden mukaisesti.[9]



Kuva 3: Bis-tiakruunun sillan muodostuminen  $S_N2$ -mekanismilla.[9]

### 3 Käytetyt laitteet ja menetelmät

Dikloorimetaani ja asetonitriili kuivattiin tislaamalla liuotin  $\text{CaCl}_2$ :n päällä. Liuottimet säilytettiin typpi-ilmakehässä 3 Å molekyyliseulojen päällä. Cesiumkarbonaatti kuivattiin uunissa 120 °C:ssa. Synteesituotteista mitattiin  $^1\text{H}$  NMR -spektrit Bruker AV 300 FT NMR -spektrometrillä. Mittaukset suoritettiin 30 °C:ssa ja liuottimena käytettiin  $\text{CDCl}_3$ :a. Sulamispisteet määritettiin Stuart SMP30 Melting Point Apparatus -laitteella. Kromatografiset puhdistukset tehtiin Teledyne ISCO:n Combi Flash Companion flash-kromatografilla.

Hopeananopartikkeleiden UV/Vis-mittaukset suoritettiin Perkin Elmer Lambda 850 -spektrofotometrillä. Sentrifugoinnit tehtiin Hermle Z 206 A -sentrifugilla (6000 rpm). Massaspektrit mitattiin ESI-Q-TOF QStar Elite, ABSciex -massaspektrometrillä. Termovaaka-analyysit suoritettiin PerkinElmer STA 6000 -termoanalysointilaitteella. Lämpäisielektronimikroskooppikuvat otettiin JEOL TEM 1400 -mikroskoopilla.

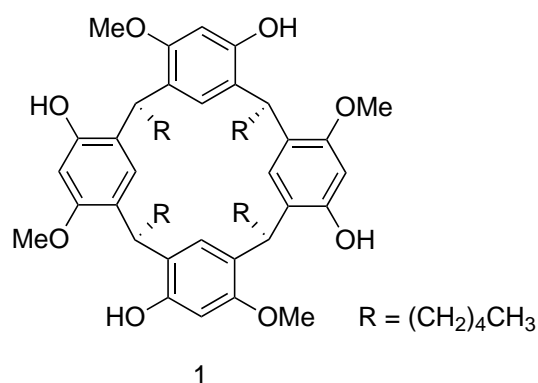
## 4 Käytetyt reagenssit

Reagenssi	Valmistaja	Puhtaus (%)
Akryyliamidi/bis-liuos	Bio-Rad	-
Asetonitrili	J.T. Baker	HPLC grade
BF <sub>3</sub> · Et <sub>2</sub> O	Aldrich	-
Bis(2-merkptoetyyli)sulfidi	Fluka	≥ 90
Cesiumhydroksidi monohydraatti	Aldrich	99
Dikloorimetaani	Sigma-Aldrich	≥ 99,9
DMF	VWR	99,9
Etanoli (abs.)	Altia	96,1
4-Fluorotiofenoli	Aldrich	98
Glysiini	Riedel-de-Haën	99
Heksaani	Rathburn	HPLC grade
Heksanaali	Merck	≥ 98
Hopeanitraatti	VWR	-
Hopeatrifluoroasettaatti	Aldrich	99,99
Kaliumtertbutoksidi	Aldrich	≥ 97,0
Metanoli	J.T. Baker	HPLC grade
3-Metoksifenoli	Aldrich	96
Natriumboorihydridi	Aldrich	99
Natriumhydroksidi	Fluka	≥ 98,0
<i>p</i> -Merkaptobentsoehappo	Aldrich	99
PPh <sub>4</sub> Br	Aldrich	97
TEMED	Bio-Rad	-
Trietyyliamiini	Sigma-Aldrich	≥ 99
TRIZMA®-emäs	Sigma	99,9
<b>Muut reagenssit</b>	<b>Valmistaja</b>	<b>Synteesikoodi</b>
TsC2TMR	Tiina Virtanen	TEX-006
Tosyloituu etyleeniglykoli	Riia Annala	OEO-045

## 5 Synteetit

### 5.1 Resorsinareenit

#### C5-tetrametoksiresorsinareeni [5]



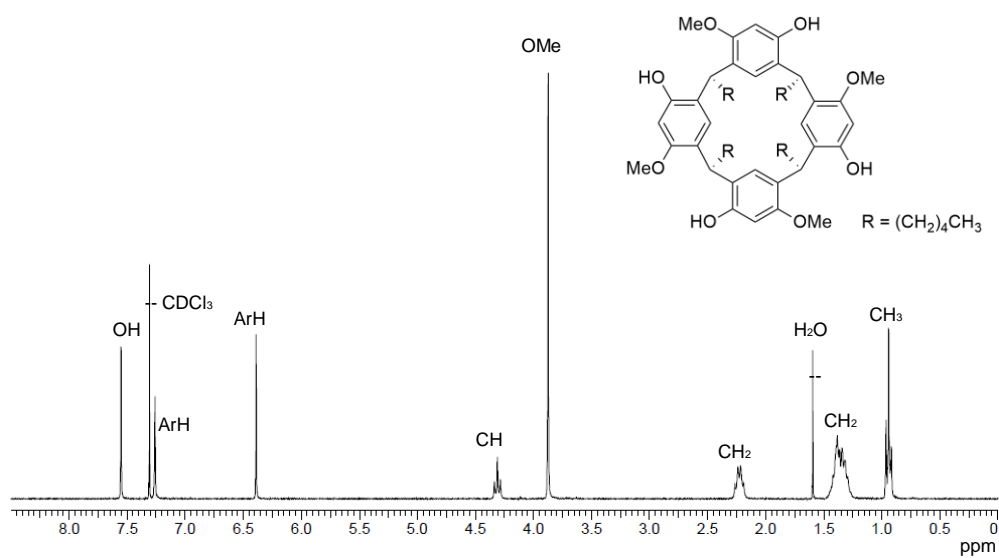
Synteesi suoritettiin typpi-ilmakehässä. 3-Metoksifenoli (0,08 mol, 9,0 ml) ja heksanaali (0,08 mol, 10,3 ml) liotettiin kuivaan dikloorimetaaniin (50 ml) huoneenlämpötilassa samalla sekoittaen.  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0,16 mol, 20 ml) lisättiin seokseen hitaasti tipoittain, jonka aikana seos alkoi refluksoitua ja muuttui keltaisesta ruskeaksi ja edelleen tummaksi viininpunaiseksi. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa kolme tuntia, jonka jälkeen siihen lisättiin 70 ml vettä. Orgaaninen kerros erotettiin erotussuppilolla ja pestiin kerran vedellä ja kerran kylläisellä natriumkloridiliuoksella sekä kuivattiin magnesiumsulfaatilla. Liuotin haihdutettiin seuraavana päivänä pyöröhaihduttimella. Jäljelle jäänyt tummanpunainen öljy liotettiin kuumaan etanoliin. Seos siirrettiin kiteytymään viileään. Valkoinen, suurikiteinen sakka suodatettiin imulla. Kiteiden annettiin kuivua vetokaapissa haihdutusmaljalla. Saanto oli 6,0 g (35 %) valkoisia kiteitä.

$M(C_{52}H_{72}O_8) = 825,12 \text{ g/mol}$

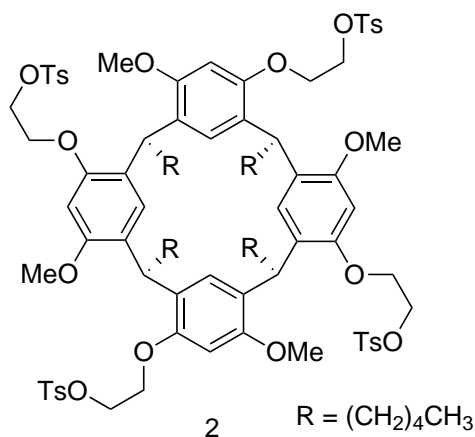
sp. 233,5–234,5 °C

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

$\delta$  0.94 (t,  $J = 6.80 \text{ Hz}$ , 12H), 1.24–1.47 (m, 24H), 2.18 (dd,  $J = 14.68, 7.95 \text{ Hz}$ , 8H), 3.87 (s, 12H), 4.31 (t,  $J = 7.89 \text{ Hz}$ , 4H), 6.39 (s, 4H), 7.26 (s, 4H), 7.30–7.32 (m, 4H) ppm



## C5-tetrametoksiresorsinareenipodandi tosyloiduilla etyleeniglykoliryhmillä



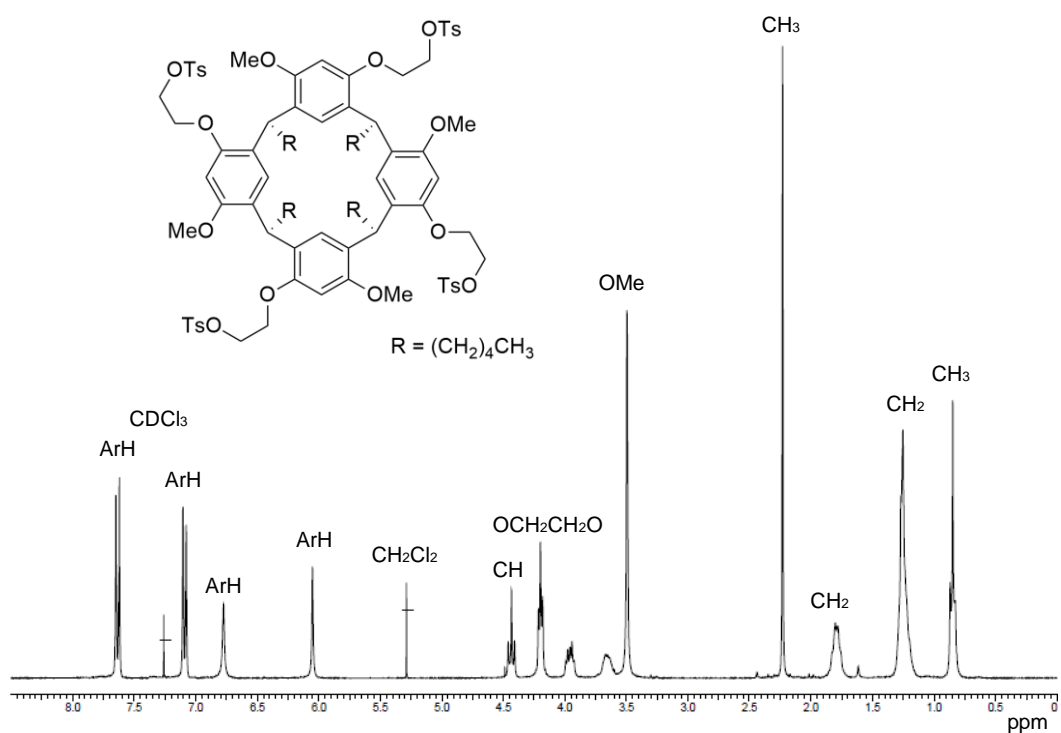
Synteesi suoritettiin typpi-ilmakehässä. Öljyhaude esilämmitettiin 100 °C:een. Tetrametoksiresorsinareenin (1,00 g, 1,43 mmol), kuivan cesiumkarbonaatin (3,16 g, 9,70 mmol) ja kuivan asetonitriilin (65 ml) suspensiota refluksoitettiin 30 minuuttia. Asetonitriiliin (30 ml) liuotettu tosyloitu etyleeniglykoli (1,89 g, 5,11 mmol) lisättiin seokseen tipoittain. Valkoista suspensiota refluksoitettiin 23 tuntia. Seos suodatettiin lämpimänä HyfloSuperin® läpi imulla. Liuottimet haihdutettiin pyöröhaihduttimella. Keltainen, hieman öljymäinen jäännös liuotettiin dikloorimetaaniin ja pestiin kahdesti vedellä ja kahdesti kyläisellä natriumkloridiliuoksella. Orgaaninen kerros kuivattiin magnesiumsulfaattilla. Liuotin haihdutettiin pyöröhaihduttimella. Raakatuote puhdistettiin kahdesti Flash-kromatografilla. (Ensimmäinen puhdistus: 40 g silikakolonne, etyyliasetaatti-heksaani, 0–3 min 25 % EtOAc, 5–8 min 30 % EtOAc, 10–13 min 40 % EtOAc, 16–20 min 100 % EtOAc. Toinen puhdistus: 24 g kolonne, etyyliasetaatti-heksaani, 0–4 min 25 % EtOAc, 7–11 min 30 % EtOAc, 13–17 min 40 % EtOAc, 19–22 min 100 % EtOAc.) Saanto oli 0,031 g valkoisia kiteitä + 0,15 g väritöntä öljyä (9 %).

$M(C_{88}H_{112}O_{20}S_4) = 1618,08 \text{ g/mol}$

sp. 89,0–97,0 °C

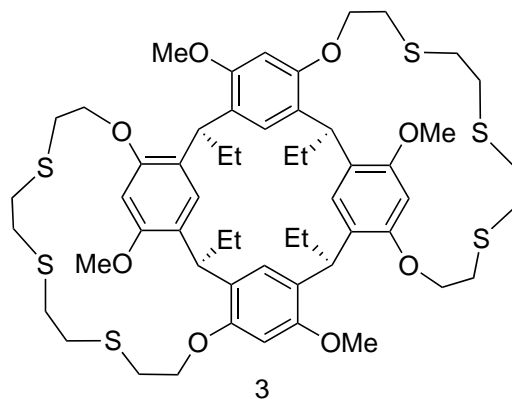
$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

$\delta$  0.85 (t,  $J = 6.35 \text{ Hz}$ , 12H), 1.15–1.32 (m, 24H), 1.79 (q,  $J = 6.30 \text{ Hz}$ , 8H), 2.23 (s, 12H), 3.49 (s, 12H), 3.59–3.74 (m, 4H), 3.90–4.01 (m, 4H), 4.20 (t,  $J = 4.94 \text{ Hz}$ , 8H), 4.43 (t,  $J = 7.57 \text{ Hz}$ , 4H), 6.05 (s, 4H), 6.77 (s, 4H), 7.09 (d,  $J = 8.14 \text{ Hz}$ , 8H), 7.63 (d,  $J = 8.27 \text{ Hz}$ , 8H) ppm





## C2-tetrametoksiresorsinareeni-bis-tiakruunu [6]



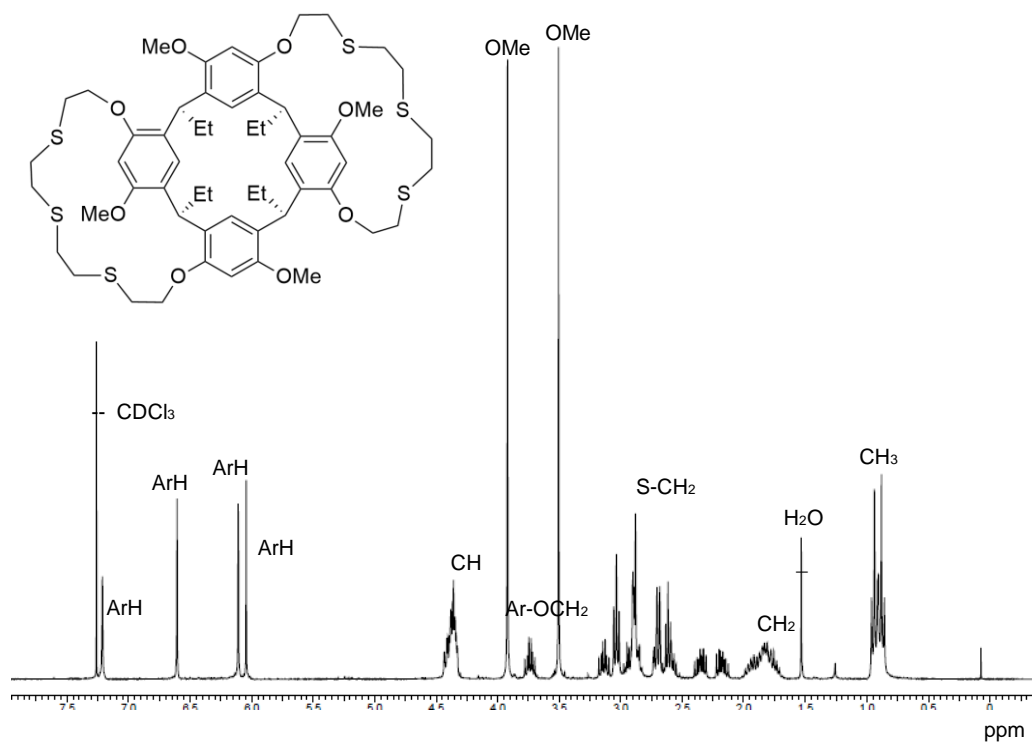
Synteesi suoritettiin typpi-ilmakehässä. Öljyhaude esilämmitettiin 110 °C:een. *t*BuOK:n (0,28 g, 2,5 mmol) ja kuivan asetonitrilin (60 ml) refluksoituvaan seokseen lisättiin tosyloidun C2-tetrametoksiresorsinareenin (0,40 g, 0,28 mmol) ja bis-(2-merkaptioetyyli)sulfidin (80 µl, 0,61 mmol) kuivaan asetonitriliin (2 x 10 ml) tehdyt liuokset voimakkaasti sekoittaen. Keltaista suspensiota refluksoititiin vajaat 23 tuntia. Seos suodatettiin lämpimänä HyfloSuperin® läpi imulla. Liuotin haihdutettiin pyöröhaihduttimella. Keltainen, hieman öljymäinen jäännös liuotettiin dikloorimetaaniin ja pestiin kerran vedellä, kerran 1 N HCl:lla ja kerran kylläisellä natriumkloridiliuoksella. Orgaaninen kerros kuivattiin magnesiumsulfaatilla. Liuotin haihdutettiin pyöröhaihduttimella. Raakatuote puhdistettiin kolmessa erässä Flash-kromatografiilla (24 g silikakolonni, etyyliasetaatti-heksaani, 0–5 min 50 % EtOAc, 8–12 min 100 % EtOAc). Tuote uudelleenkitetyttiin metanolin ja dikloorimetaanin seoksella. Saanto oli 0,019 g valkoisia kiteitä (6 %).

$$M(C_{56}H_{76}O_8S_6) = 1069,59 \text{ g/mol}$$

sp. 232,0–237,0 °C

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

$\delta$  0.88 (t,  $J = 7.28$  Hz, 6H), 0.94 (t,  $J = 7.28$  Hz, 6 H), 1.68–2.01 (m, 8H), 2.12–2.83 (m, 2H), 2.30–2.41 (m, 2H), 2.54–2.75 (m, 8H), 2.82–2.98 (m, 8H), 3.04 (t,  $J = 6.76$  Hz, 4H), 3.09–3.18 (m, 2H), 3.51 (s, 6H), 3.69–3.79 (m, 2H), 3.92 (s, 6H), 4.32–4.34 (m, 8H), 6.04 (s, 2H), 6.11 (s, 2H), 6.61 (s, 2H), 7.21 (s, 2H) ppm



## 5.2 $(\text{PPh}_4)_4[\text{Ag}_{44}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{F})_{30}]$ (A)

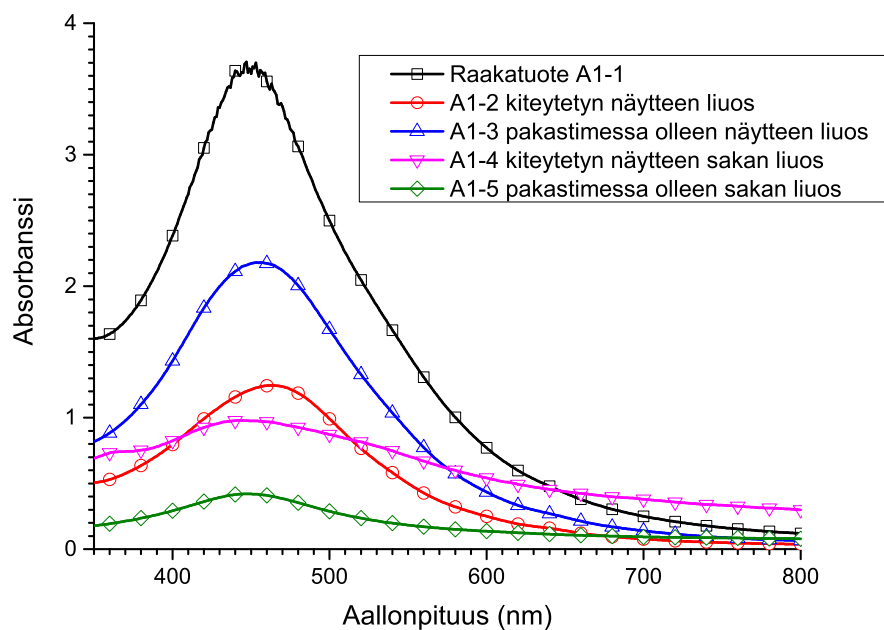
### Yleinen ohje[1]

Hopeanitraatti (20 mg, 0,12 mmol) liuotettiin metanoliin. Liuokseen lisättiin dikloorimetaania siten, että metanolin ja dikloorimetaanin suhde oli 1 : 4. Liuos viilennettiin jäähauteella 0 °C:een ja siihen lisättiin 4-fluorotiofenoli (10 µl, 0,094 mmol) ja tetrafenyylifosfoniumbromidi (12 mg, 0,019 mmol). 20 minuutin sekoituksen jälkeen lisättiin vielä nopeasti NaBH<sub>4</sub>:n vesiliuos (1 ml, 45 mg/ml, 0,0012 mol) ja trietyyliamiini (50 µl) voimakkaasti sekoittaen. Reaktioseosta sekoitettiin jonkin aikaa, jonka jälkeen reaktion annettiin edetä vähintään 16 tuntia 0 °C:ssa. Vesifaasi poistettiin ja orgaanisen faasin seos pestiin useaan kertaan vedellä. Orgaanisen faasin seos sentrifugoitiin. Supernatantti erotettiin ja sen päälle pipetoitiin kerros heksaania. Seos siirrettiin kiteytymään 4 °C:een. Mustat kiteet erotettiin dekantoinnalla.

### Erä A1

Synteesi suoritettiin kaksinkertaisilla ainemäärillä. Hopeanitraatti (40 mg, 0,24 mmol) liuotettiin dikloorimetaanin (10 ml) ja metanolin (10 ml) seokseen. Suola liukeni vain osittain. 4-Fluorotiofenolin (20 µl, 0,19 mmol) lisäyksen jälkeen muodostui limenvihertävä suspensio. NaBH<sub>4</sub>:n vesiliuoksen (5 ml, 45 mg/ml) ja trietyyliamiinin (100 µl) lisäyksen jälkeen seos muuttui tummanruskeaksi. Reaktioon annettiin edetä 17 tuntia 0 °C:ssa. Pesun jälkeen erotetusta orgaanisesta faasista mitatun UV/Vis-spektrin A1-1 (kuva 4) perusteella haluttuja nanopartikkeleita ei ollut muodostunut. Synteesi suoritettiin muuten yleisen ohjeen mukaan.

Koska synteesiohjeesta [1] ei ilmennyt, missä vaiheessa partikkelien pitäisi muodostua, näyte yritettiin kiteyttää partikkelien muodostumisen toivossa. Liuos jaettiin kahteen osaan. Toinen puoli jätettiin pakastimeen odottamaan ja toisesta haihdutettiin liuotin pois. Jäämä liuotettiin dikloorimetaaniin ja liukenematon sakka erotettiin. Liuos jäädytettiin ja sen päälle pipetoitiin heksaanikerros. Liuos jätettiin 4°C:een kiteytymään. Näytteeseen oli muodostunut välkkyviä, hopeanvärisiä kiteitä 15 päivän jälkeen. Liuos oli punertavanruskea. Pakastimessa olleeseen näytteeseen oli muodostunut tummanharmaata sakkaa. Sen liuos oli tummanruskea.



Kuva 4: Erän A1 UV/Vis-spektrit.

Sekä kiteytetty näyte että pakastimessa ollut verrokinäyte sentrifugoitiin kuuden päivän päästä. Tummanruskeat liuokset (kiteytysnäytteen (A1-2) liuos ja pakastimessa olleen näytteen liuos (A1-3)) otettiin talteen ja tummat

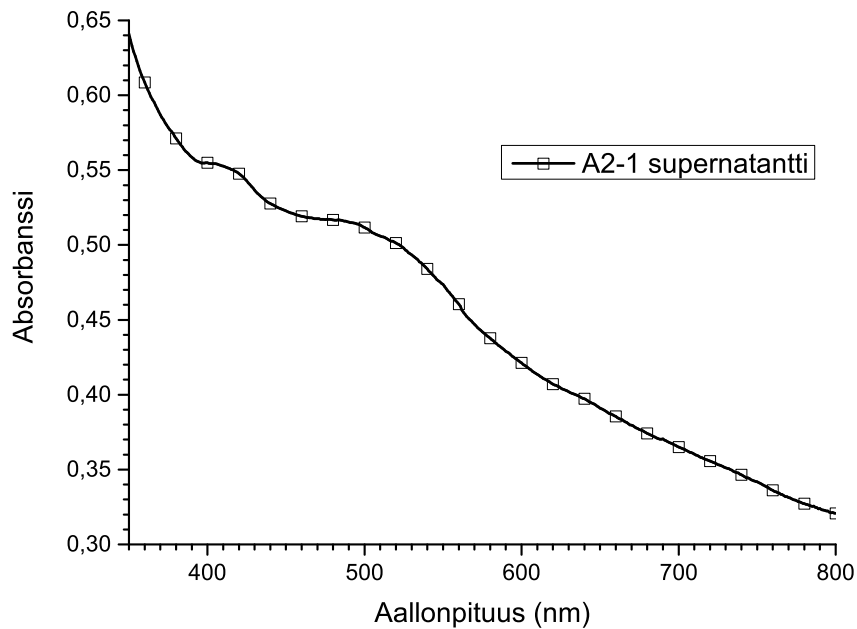
sakat liuotettiin dikloorimetaaniin. Kaikki sakka ei liennut. Kiteytysnäytteen sakan liuos (A1-4) oli ruskea. Pakastimessa olleen näytteen sakan liuos (A1-5) oli keltaruskea.

Kaikista neljästä liuksesta mitattiin UV/Vis-spektrit (kuva 4), joiden perusteella missään näytteessä ei ollut haluttuja nanopartikkeleita. Kaikkien näytteiden leveät absorptiopiikit ovat noin 450 nm:n kohdalla, mikä viitanee huomattavasti suurempien, luultavastin noin 60 nm:n kokoisten, plasmomisten hopeananopartikkelien muodostumiseen [10]. Kiteytettyjen näytteiden sakkojen punasiirtyneet UV/Vis-spektrit viittanevat lisäksi kyseisten näytteiden partikkelien aggregoitumiseen eli toisiinsa takertumiseen [11].

## **Erä A2**

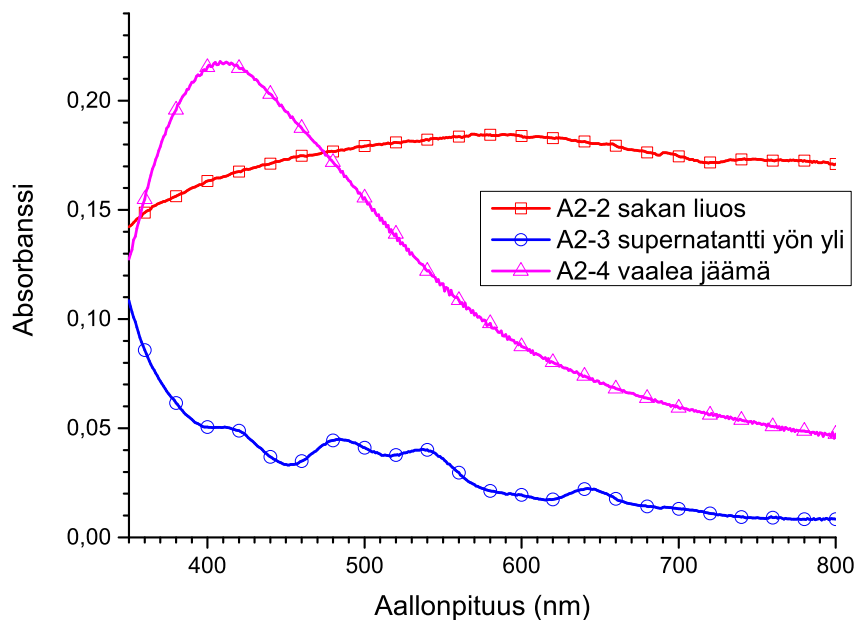
Hopeanitraatti (4,0 mg, 0,024 mmol) liuotettiin 10 ml:aan kuumaa metanolia. Synteesi suoritettiin muuten yleisen ohjeen mukaan 0,2-kertaisilla ainemäärillä. NaBH<sub>4</sub>:n vesiliuoksen lisäyksen jälkeen seos muuttui kellertävästä ruskeaksi ja edelleen kirkkaaksi, hieman harmahtavaksi liukseksi, jossa oli tummanharmaata sakkaa. Orgaaninen kerros muuttui pesun aikana harmaaksi suspensioksi. Suspensiota sentrifugoitiin 10 minuuttia, jolloin kirkas liuos ja musta sakka erottuivat. 30 minuutin sentrifugoinnin jälkeen liuos muuttui vaaleanpunaiseksi. UV/Vis-mittausten perusteella supernatantissa (A2-1) oli hieman hopeananopartikkeleita (kuva 5). Spektrissä nähtiin vain leveä piikki. Absorbanssin intensiteetti oli vain 0,50, joten partikkeleita muodostui hyvin vähän. Dikloorimetaaniin osittain liuotetussa sakassa (A2-2) ei ollut haluttuja partikkeleita (kuva 6).

Supernatantti jätettiin yön yli 4 °C:een jääkaappiin. Supernatantti muuttui



Kuva 5: Erän A2 supernatantin UV/Vis-spektri.

kirkkaaksi (A2-3) ja astian pohjalle muodostui vaaleankeltaista, hattaramaista sakkaa (A2-4). UV/Vis-mittausten perusteella sakka ei kuitenkaan ollut tuotetta (kuva 6). Supernatantin spektrin (A2-3) absorptiopiikit erottuivat huomattavasti selvemmin, mutta sen absorbanssi oli laskenut noin kymmenesosaan. Saostuneen osan spektri (A2-4) saattaa viitata 10-30 nm:n kokoisten, plasmonisten hopeananopartikkelien muodostumiseen [10]. Näin ollen supernatantista saostui suurempia hopeananopartikkeleita yön aikana.

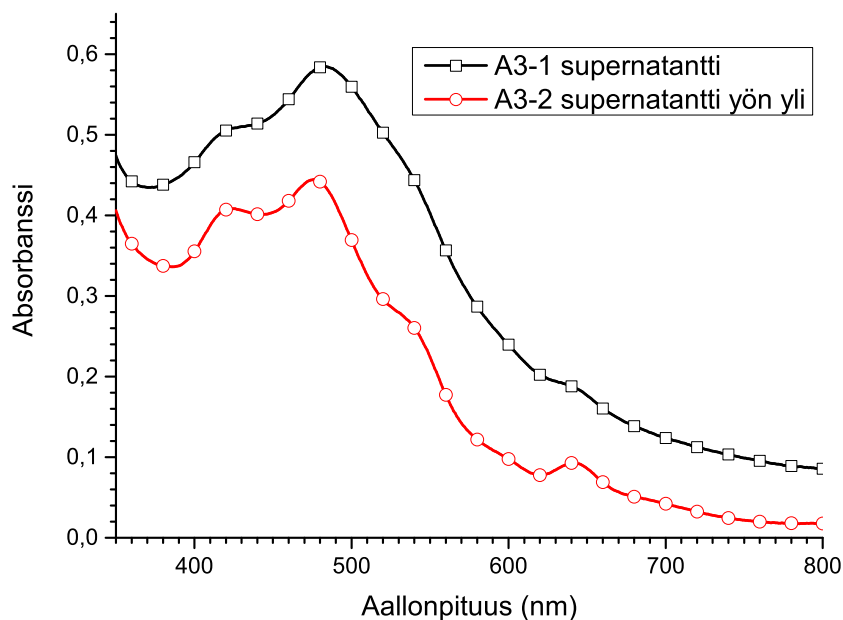


Kuva 6: Erän A2 muiden näytteiden UV/Vis-spektrit.

### Erä A3

Hopeanitraatti (4,0 mg, 0,024 mmol) liuotettiin 5 ml:aan kuumaa metanolia. 4-Fluorotiofenolia lisättiin vain neljäsosa (5  $\mu$ l, 0,047 mmol) edellisen synteesin määrästä. Tällöin Ag : ligandi = 1 : 2, mikä oli osoittautunut optimaaliseksi suhteeksi Bakr *et al.* tutkimuksissa [3]. Synteesi suoritettiin muuten yleisen ohjeen mukaan 0,2-kertaisilla ainemäärillä. NaBH<sub>4</sub>:n vesiliuoksen lisäyksen jälkeen liuos muuttui nopeasti kellertävästä tummankeltaiseksi ja edelleen ruskean kautta mustaksi. Lopulta muodostui kirkkaan liuoksen ja mustan sakan seos. Orgaaninen kerros muuttui pesun aikana tummanharmaaksi suspensioksi. Suspensiota sentrifugoitiin 2 x 10 minuuttia, jolloin kirkkaanpunainen liuos ja musta sakka erottuivat.

UV/Vis-mittausten (kuva 7) perusteella supernatantissa (A3-1) oli hieman hopeananopartikkeleita. Kun supernatanttia säilytettiin 4 °C:ssa, väri vaaleni yhden yön jälkeen haaleamman punaiseksi (A3-2). Astian pohjalle muodostui jälleen vaaleankeltaista, hattaramaista sakkaa. Supernatantti erotettiin ja sen päälle pipetoitiin kerros heksaania. Liuos muuttui vaaleanpunaiseksi ja sen pohjalle muodostui lisää vaaleankeltaista sakkaa.



Kuva 7: Erän A3 UV/Vis-spektrit.

Näytteitä ei laimennettu UV/Vis-mittauksia varten. Absorbanssien perusteella saannot (11 % ja 8%) olivat edelleen melko pieniä. Liuos on ilmeisesti ollut liian laimea partikkelien kiteytymiseen. Raakatuotteen supernatantin spektristä (A3-1) havaittiin huomattavasti pienentynyt plasmonisen hopean absorptio verrattuna edellisen erän A2:n vastaavaan spektriin (kuva 5). Tämä johtunee liuotinmäärien pienentämisestä ja ligandin määrän vähentämisestä.



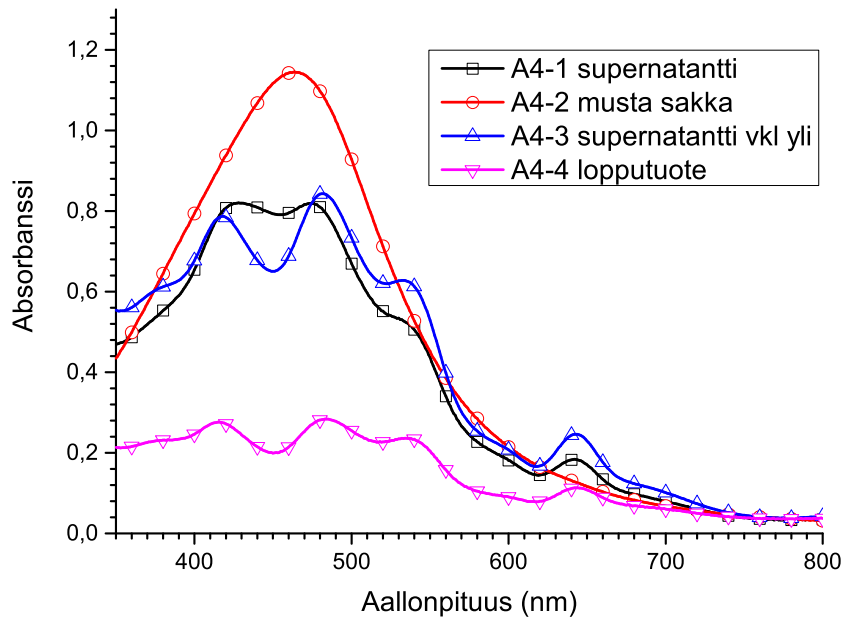
## Erä A4

Huonosti liukenevan hopeanitraatin sijaan käytettiin hopeatrifluoroasetaatia (5,5 mg, 0,025 mmol). Metanolia lisättiin 3 ml, koska pienemmän liuotinmäärän käyttäminen näytti parantavan saantoa. Myös 4-fluorotiofenolia lisättiin yhtä paljon kuin edellisessä synteesissä eli 5 µl, 0,047 mmol. Synteesi suoritettiin muuten yleisen ohjeen mukaan 0,2-kertaisilla ainemäärillä. Liuoksen väri lähti muuttumaan edellisiin synteesihin verrattuna huomattavasti hitaammin NaBH<sub>4</sub>:n vesiliuoksen lisäyksen jälkeen.

Puolen tunnin kuluttua lisäyksestä liuos oli vielä ruskea eikä musta. Punertava, tummanruskea orgaaninen kerros muuttui pesun aikana kuivuneen veren väriseksi suspensioksi. Suspensiota sentrifugoitiin 2 x 10 minuuttia, jolloin tumma, punertava liuos ja musta sakka erottuivat. Kuvan 8 UV/Vis-spektrin perusteella supernatantissa (A4-1) oli melko paljon hopeananopartikkeleita. Musta sakka (A4-2) ei ollut tuotetta (kuva 8).

Supernatantti jätettiin viikonlopun yli jääkaappiin. Supernatanttia sentrifugoitiin 2 x 10 minuuttia, jolloin tumma, viininpunainen liuos ja musta sakka erottuivat. Supernatantin spektrin (A4-3) perusteella saanto oli noin 0,0022 g eli 44 % (kuva 8). Sakka ei ollut tuotetta. Supernatantin päälle pipetoitiin kerros heksaania ja se jätettiin 4 °C:een kiteytymään. Sakkaa oli muodostunut kahden vuorokauden kuluttua. Ruskea, hieman punertava liuos pipetoitiin erilleen kahden vuorokauden päästä. Purkin pohjalle jääneen mustan sakan annettiin kuivua vetokaapissa pari tuntia. Pieni määrä sakkaa liuotettiin kyvetissä 2,5 ml:aan dikloorimetaania. Spektrin (A4-4) perusteella sakka oli tuotetta (kuva 8).

Hopeatrifluoroasetaatin käyttäminen hopeanitraatin sijaan paransi saantoa



Kuva 8: Erän A4 UV/Vis-spektrit.

erittäin paljon. Tämä johtunee hopeasuolojen liukoisuuseroista. Niukkaliukoinen hopeanitraatti ei liennut kuin kuumaan metanoliin ja luultavasti saostui sieltä osittain ulos dikloorimetaanin ja jäähauteen lisäämisen jälkeen. Hopeatrifluoroasetatti sen sijaan liukeni huoneenlämpöiseen metanoliin hyvin nopeasti. Myös hopeapartikkeleiden hitaammasta pelkistymisestä ja muodostumisesta kertovat hitaammat värinmuutokset ovat olennainen havainto.

## Erä A5

Synteesi suoritettiin 20-kertaisilla ainemäärillä. Liuottimien määrän vaikutuksen tutkimiseksi liuotinmääriä ei kuitenkaan lisätty edelliseen synteesiin

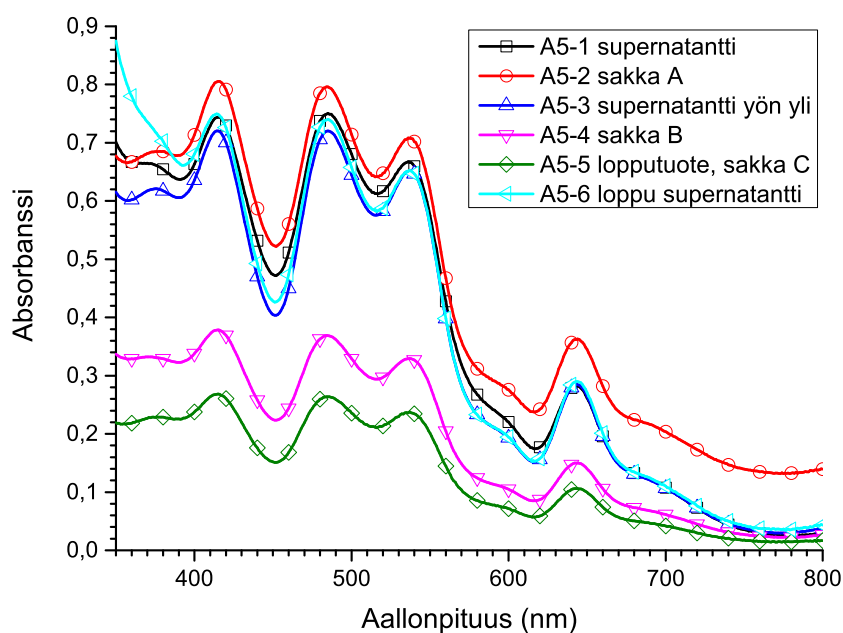
verrattuna samassa suhteessa eli hopeasuola (104,2 mg, 0,47 mmol) liuotettiin 60 ml:n sijaan 5 ml:aan metanolia. Hopeanitraatin sijaan käytettiin jälleen hopeatrifluoroasettaattia ja 4-fluorotiofenolia lisättiin 100 µl (Ag : ligandi = 1 : 2). Synteesi suoritettiin muuten yleisen ohjeen mukaisesti. NaBH<sub>4</sub>:n vesiliuoksen lisäämisen jälkeen liuoksen väri muuttui melko nopeasti limenvihreästä keltaiseksi ja edelleen ruskeaksi. Seos oli vielä ruskea, kun se jätettiin yön yli jäähauteessa jääkaappiin.

Tumma, aavistuksen punertava seos pestiin ja sentrifugoitiin (2 x 10 minuuttia). Tumma liuksesta ja tumma sakasta mitattiin UV/Vis-spektrit, joiden perusteella molemmissa oli hopeananopartikkeleita (supernatantissa 0,0181 g eli 19 %). Supernatantti (A5-1) ja sakan A dikloorimetaaniliuos (A5-2) jätettiin yön yli 4 °C:een odottamaan.

Supernatantti siirrettiin uuteen purkkiin, koska aiempaan purkkiin oli muodostunut tummaa ja kellertävää sakkaa B. Sakasta B osa liukeni dikloorimeetaaniin. Supernatantista (A5-3) ja sakan B dikloorimetaaniliuksesta (A5-4) mitattiin UV/Vis-spektrit (kuva 9), joiden perusteella molemmissa oli tuotetta. Supernatantin päälle pipetoitiin heksaanikerros ja se jätettiin 4 °C:een kiteytymään. Sakkojen A ja B liukset yhdistettiin ja sentrifugoitiin liukenemattoman sakan erottamiseksi. Liuos erotettiin ja suurin osa liuottimesta haihdutettiin pois Ar-virtauksella. Punaisen liuoksen päälle pipetoitiin kerros heksaania ja se jätettiin 4 °C:een kiteytymään. Liuos muuttui yön aikana värittömäksi ja sen pohjalle muodostui mustaa sakkaa A+B.

Sekä supernatantin että sakan A+B liukset pipetoitiin erilleen kahden vuorokauden jälkeen lopputuotteen sakan C (A5-5) ja sakkojen A+B erottamiseksi. Sakkojen annettiin kuivua vetokaapissa pari tuntia ja niistä sekä pinkistä supernatantista (A5-6) mitattiin UV/Vis-spektrit (kuva 9), joiden pe-

rusteella kaikissa oli hopeanopartikkeleita. Supernatantissa niitä oli enää hyvin vähän. Lopputuotteen (sakan C) saanto oli 0,0073 g. Sakan A+B saanto oli 0,0247 g. Yhteenlaskettu saanto on 0,0320 g (34 %). Liuottimien määrän pienentäminen nopeutti pelkistymistä ja pienensi saantoa.



Kuva 9: Erän A5 UV/Vis-spektrit.

## Erä A6

1. päivä: Synteesi suoritettiin edelliseen erään A5 verrattuna 5-kertaisilla ainemäärillä eli yleiseen ohjeeseen nähden 100-kertaisilla ainemäärillä. Liuottimien määrän vaikutuksen tutkimiseksi liuotinmääriä lisättiin edelliseen synteesiin nähden 2,4-kertaisiksi. Pelkistimenä toimivan  $\text{NaBH}_4$ :n määrän (4,50 g, 119,0 mmol) vaikutusta tutkittiin puolittamalla sen ainemäärä. Ohjeen [1] mukaan  $\text{NaBH}_4$ :n ainemäärän tulisi olla 100-kertainen hopean ainemäärään

nähdän. Bigioni *et al.* artikkelin [2] vesiliuoksessa suoritettavassa synteesissä ainemäärä on kymmenkertainen hopean ainemäärään nähden. Stellaci *et al.* artikkelissa [3] DMF-liuoksessa suoritettavan synteesin  $\text{NaBH}_4$ :n ainemäärä on vain nelinkertainen hopeasuolaan nähden.

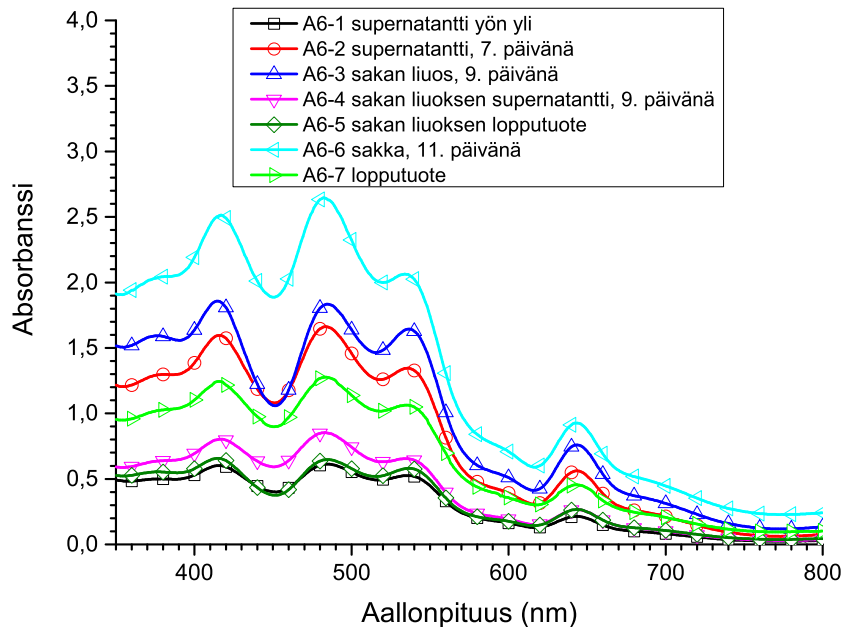
Hopeatrifluoroasetaatti (520,9 mg, 2,36 mmol) liuotettiin 60 ml:aan metanolia. 4-Fluorotiofenolia lisättiin 500  $\mu\text{l}$  (Ag : ligandi = 1 : 2). Synteesi suoritettiin muuten yleisen ohjeen mukaisesti.  $\text{NaBH}_4$ :n vesiliuoksen jälkeen liuoksen väri muuttui suhteellisen hitaasti limenvihreästä keltaiseksi ja edelleen ruskeaksi. Seos oli väriltään ruskea, kun se jätettiin yön yli jäähauteessa jääkaappiin.

2. päivä: Seos pestiin ja sentrifugoitiin 2 x 10 minuuttia. Supernatantista mitattiin UV/Vis-spektri, jonka perusteella siinä oli hopeananopartikkeleita. Sakka liuotettiin dikloorimetaaniin. Sakan liuos ja supernatantti jätettiin 4 °C:een.

3. päivä: Supernatantti sentrifugoitiin ja siitä mitattiin kuvassa 10 oleva UV/Vis-spektri (A6-1), jonka perusteella saanto oli noin 10 %. Supernatantin päälle pipetoitiin heksaanikerros ja se jätettiin 4 °C:een odottamaan.

7. päivä: Viininpunainen supernatantti sentrifugoitiin jälleen vaalean sakan erottamiseksi. Supernatantin UV/Vis-spektrin (A6-2) perusteella saanto oli edelleen 10 % (46 mg). Liuoksen päälle pipetoitiin noin 40 ml heksaania ja se jätettiin 4 °C:een kiteytymään.

9. päivä: Toisena päivänä 4 °C:een jätetystä sakan liuoksesta mitattiin kuvassa 10 oleva UV/Vis-spektri (A6-3), jonka perusteella nanopartikkelit olivat säilyneet. Liuos sentrifugoitiin ja supernatantista mitattiin kuvan 10 uusi



Kuva 10: Erän A6 UV/Vis-spektrit.

UV/Vis-spektri (A6-4), jonka perusteella yli puolet nanopartikkeleista saostui pois sentrifugoinnin aikana. Liuoksen päälle pipetoitiin heksaanikerros ja se jätettiin 4 °C:een kiteytymään.

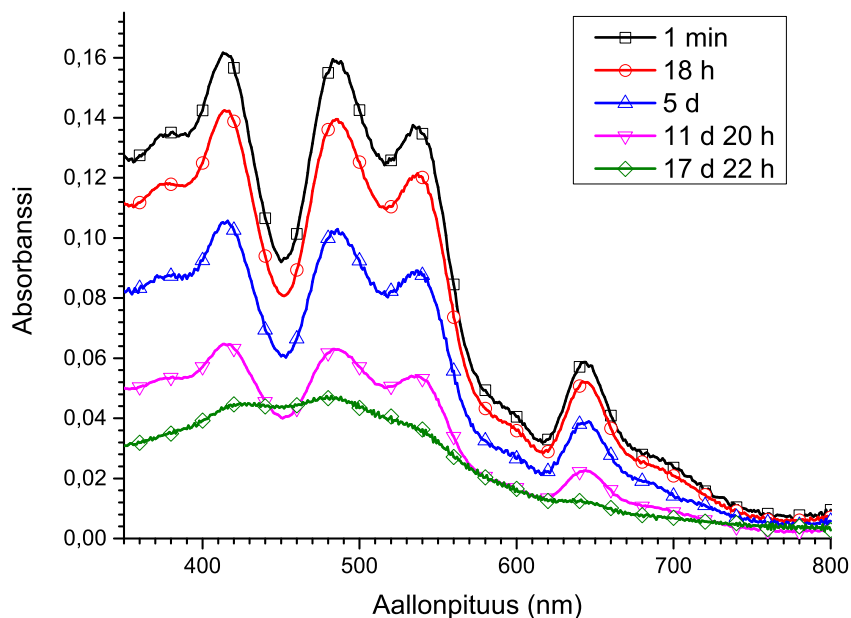
10. päivä: Koska supernatanttiliuokseen ei ollut muodostunut vielä kukaan, supernatantti haihdutettiin typpivirralla alle 100 ml:n tilavuuteen ja sen päälle pipetoitiin heksaanikerros. Edellispäivän sakan liuos oli sen sijaan jo kiteytynyt. Sakasta mitattiin kuvan 10 UV/Vis-spektri (A6-5) dikloorimetaanissa. Muodostunut sakka oli lopputuotetta.

11. päivä: Vaaleanpunertava supernatantti pipetoitiin erilleen ja mustasta sakasta (→ ruskea liuos) mitattiin dikloorimetaanissa kuvan 10 UV/Vis-spektri (A6-6), jonka perusteella siinä oli haluttuja nanopartikkeleita. Koska sakan

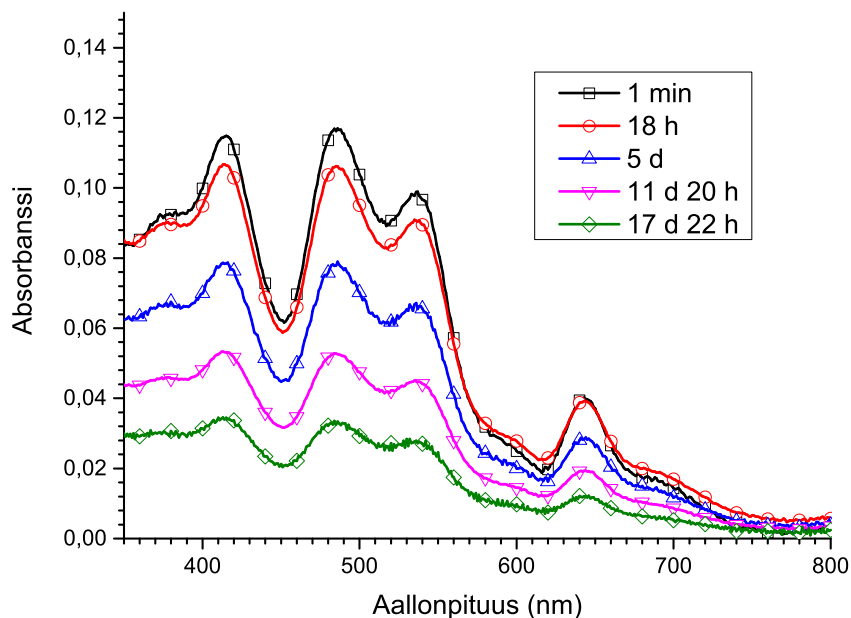
liuksen väri oli poikkeava, sakka liuotettiin dikloorimetaaniin ja uutettiin kolmesti vedellä epäpuhtauksien poistamiseksi. Liuotin haihdutettiin pois typpivirralla. Sakan seassa oli hopeanvärisiä epäpuhtauksia, joten se liuotettiin uudelleen dikloorimetaaniin ja kiteytettiin heksaanin avulla.

15. päivä: 11. päivänä kiteytymään jätetyn näytteen kirkas liuotin pipetoitiin pois, jolloin jäljelle jäi musta sakka. Sakan seassa oli epäpuhtautena hieman hopeista sakkaa. Sakasta mitattiin UV/Vis-spektri (A6-7) dikloorimetaanissa (kuva 10). Lopullinen saanto oli 52 mg (46 %) epäpuhdasta tuotetta.

Partikkelien stabiilisuutta testattiin liuottamalla pieni määrä sakkaa kahteen eri liuottimeen, dimetyyliformamidiin ja asetoniin. Näytteistä mitattiin kuvien 11 ja 12 UV/Vis-spektrit.



Kuva 11: Partikkelien stabiilisuus dimetyyliformamidissa.



Kuva 12: Partikkelien stabiilisuus asetonissa.

Mittaukset tehtiin minuutin kuluttua sakan liukenemisestä ja toistettiin 18 tunnin, viiden päivän, yhdentoista päivän ja 20 tunnin, sekä 17 päivän ja 22 tunnin kuluttua. Partikkelien pitoisuus laski tasaisesti kokeen aikana. Dimetyyliformamidin tehdyn näytteen viimeisen spektrin (17 d 22 h) muoto on muuttunut hieman, mikä viitannee jonkin mittausalueella (350–800 nm) absorboivan tuotteen muodostumiseen. Spektrien perusteella partikkelit ovat hieman stabiilimpia asetonissa kuin dimetyyliformamidissa. Asetonissa olleet partikkelit ovat säilyneet puhtaina vielä lähes 18 päivän jälkeen. Dimetyyliformamidissa olleet partikkelit ovat sen sijaan alkaneet hajota tai aggregoitua jossain vaiheessa 12 päivän jälkeen.

Synteesin liuotinmääriä kasvatettiin edelliseen vastaavaan synteesiin verrattuna. Pelkistimenä toimivan  $\text{NaBH}_4$ :n määrä sen sijaan puolitettiin. Saanto



oli ensimmäisen UV/Vis-mittauksen perusteella vain noin 10 %. Huono saanto johtunee  $\text{NaBH}_4$ :n määrän vähentämisestä. Lopullinen saanto oli kuitenkin 46 %, mikä johtunee tuotteen epäpuhtaudesta.

### **Erä A7**

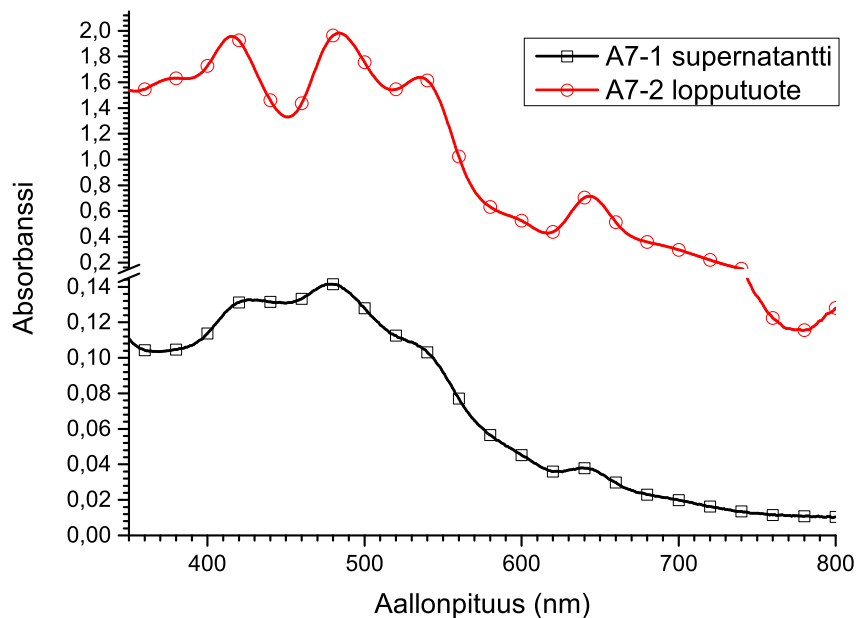
Synteesi suoritettiin parhaiten onnistuneen erän A4 mukaan, kaksinkertaisilla ainemäärillä (11,1 mg, 0,050 mmol hopeatrifluoroasetaattia) kyseiseen synteesiin nähden eli 0,4-kertaisilla ainemäärillä yleiseen ohjeeseen nähden.  $\text{NaBH}_4$ :n vesiliuos lisättiin yhdessä erässä, jolloin muodostui heti mustan sakan ja kirkkaan liuoksen seos. Seokseen lisättiin vielä trietyyliamiini ja se jätettiin yön yli 4 °C:een.

Seos pestiin ja orgaaninen kerros sentrifugoitiin (1 x 10 min). Supernatantista mitattiin kuvan 13 UV/Vis-spektri (A7-1), jonka perusteella saanto oli vain 1,2 mg (12 %). Supernatantin päälle pipetoitiin heksaanikerros ja se jätettiin 4 °C:een kiteytymään. Kiteytyneestä sakasta mitattiin UV/Vis-spektri 21 päivän jälkeen (A7-2). Sakka oli lopputuotetta.

Huono saanto ja nopea värinmuutos mustaksi johtunevat  $\text{NaBH}_4$ :n vesiliuoksen liian nopeasta lisäyksestä, joka johti liian nopeaan pelkistymiseen.

### **Erä A8**

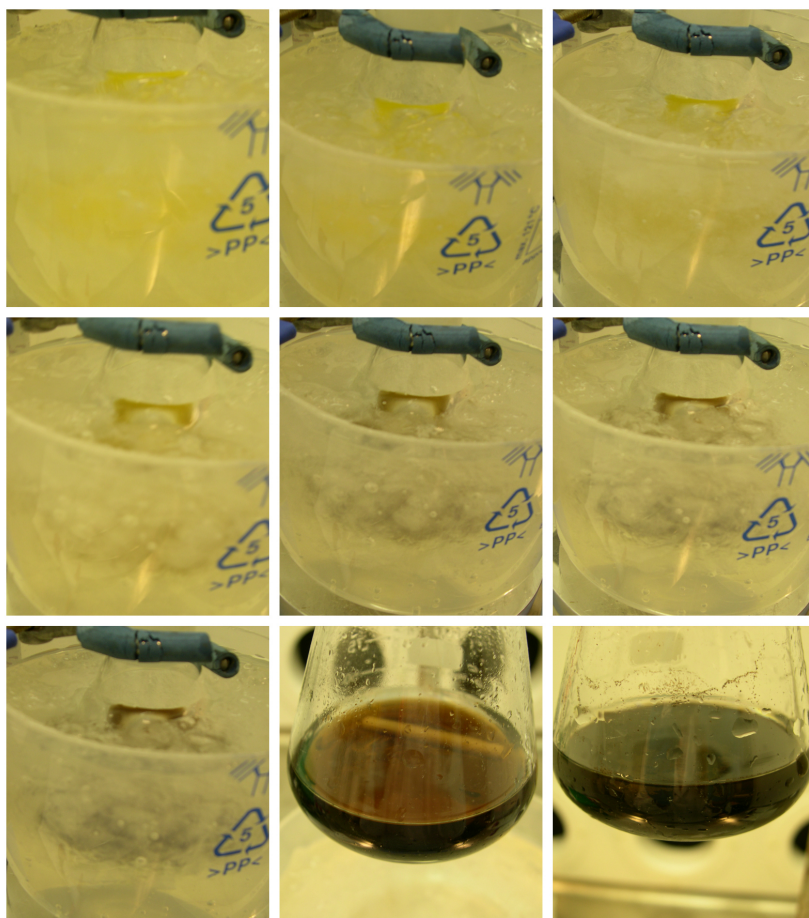
Synteesi suoritettiin parhaiten onnistuneen erän A4 mukaan, kaksinkertaisilla ainemäärillä kyseenomaiseen synteesiin nähden eli 0,4-kertaisilla ainemäärillä yleiseen ohjeeseen nähden (11,0 mg, 0,050 mmol trifluoroasetaattia). Trietyyliamiini lisättiin poikkeuksellisesti ennen  $\text{NaBH}_4$ :n vesiliuoksen



Kuva 13: Erän A7 UV/Vis-spektrit.

lisäämistä. Liuoksen väri lähti muuttumaan huomattavasti hitaammin aiempien erien synteeseihin verrattuna. Värimuutos on esitetty kuvasarjassa 14. Liuos oli vielä 40 minuuttia lisäyksen jälkeen ruskea. Liuos jätettiin yön yli jäähauteessa 4 °C:een.

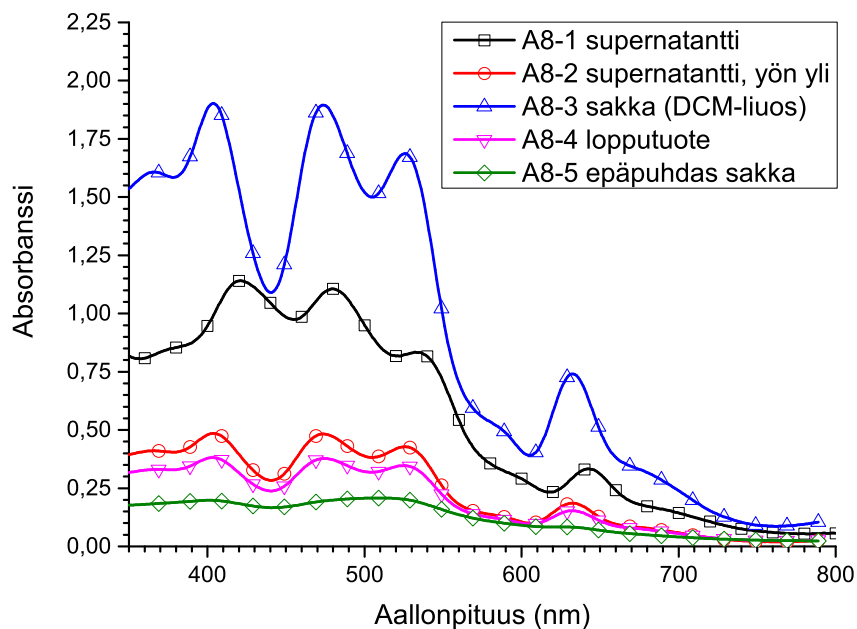
Hyvin tumma, aavistuksen punertava ruskea liuos sentrifugoitiin (1 x 15 min). Supernatantti ja hyvin pieni määrä tummaa sakkaa erottuivat. Supernatantista (A8-1) mitattiin UV/Vis-spektri (kuva 15), jonka perusteella saanto oli 6,8 mg (68%) eli parempi kuin aiemmissa erissä. Supernatanttiin alkoi muodostua nopeasti kelluvaa, höttöistä sakkaa, joten se sentrifugoitiin uudestaan (1 x 15 min). Supernatantin päälle pipetoitiin heksaanikerros ja se jätettiin 4 °C:een kiteytymään.



Kuva 14: Reaktioseoksen värinmuutos  $\text{NaBH}_4$ :n lisäyksen jälkeen.

Supernatanttiin oli muodostunut yön aikana lisää kelluvaa sakkaa, joten se sentrifugoitiin jälleen (1 x 15 min). Supernatantista (A8-2) ja sakasta (A8-3) mitattiin UV/Vis-spektrit, joiden perusteella molemmissa oli haluttuja nanopartikkeleita. Sakka liuotettiin dikloorimetaaniin. Kaikki sakka ei liuenut. Molempien liuosten päälle pipetoitiin heksaanikerrokset ja ne jätettiin  $4^\circ\text{C}$ :een kiteytymään.

Molempiin liuoksiin oli muodostunut mustaa sakkaa kolmen päivän jälkeen. Sakan näytteen kirkas liuos ja varsinaisen näytteen punainen liuos pipetoitiin



Kuva 15: Erän A8 UV/Vis-spektrit.

erilleen. Sakkojen annettiin kuivua reilut kaksi tuntia vetokaapissa. UV/Vis-mittausten perusteella varsinaisen näytteen lopputuote (A8-4) oli kunnossa. Sakan liuksesta saostetut partikkelit (A8-5) olivat epäpuhtaita.

Synteesin perusteella pelkistymistä hidastava trietyyliamiini kannatti selkeästi lisätä jo ennen  $\text{NaBH}_4$ :n vesiliuoksen lisäämistä.

Taulukossa 1 on esitetty kaikkien synteesien saannot:

Taulukko 1: Synteesien saannot UV/Vis-spektrien perusteella.

<b>Erä</b>	<b>Käytetty ainemäärä (mmol)</b>	<b>Saanto (%)</b>
A1	0,24	0
A2	0,024	2
A3	0,024	11
A4	0,025	44
A5	0,47	34*
A6	2,36	10
A7	0,050	12
A8	0,050	68
		*lopputuotteen saanto

### 5.3 Cs<sub>4</sub>Ag<sub>44</sub>(*p*-MBA)<sub>30</sub> (B)

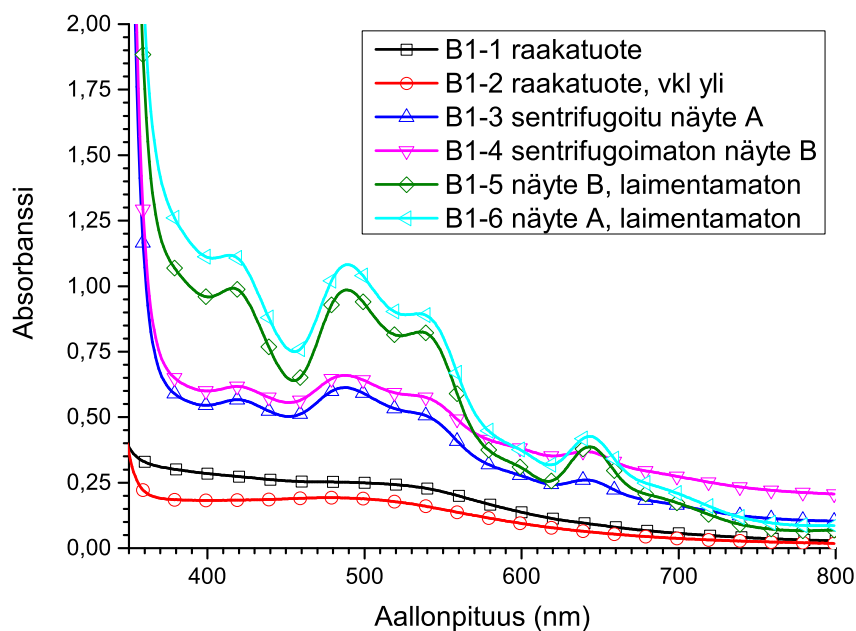
#### Yleinen ohje[2]

*p*-Merkaptobentsoehapon (154,2 mg, 1,0 mmol) etanoliliuokseen (12 ml) lisättiin hopeanitraatin (42,5 mg, 0,25 mmol) vesiliuos (21 ml), jolloin muodostui vaalean kellertävä suspensio, jota sekoitettiin 20 minuuttia–3,5 tuntia. Liuoksen pH nostettiin lisäämällä CsOH · H<sub>2</sub>O:n (50 % w/v) vesiliuosta. Seos muuttui lisäyksen aikana ensin sakeammaksi valkoiseksi suspensioksi ja edelleen kirkkaaksi, vaaleankeltaiseksi liuokseksi, kun pH oli 9. pH nostettiin vielä 12:een etanolin deprotonoimiseksi ja prekursorin stabiloimiseksi. Muodostuneeseen prekursoriliuokseen lisättiin NaBH<sub>4</sub>:n (94,6 mg, 2,5 mmol) vesiliuos (9 ml) hitaasti tipoittain, jolloin liuos muuttui vähitellen tummankeltaiseksi ja edelleen ruskean kautta tumman viininpunaiseksi. Reaktion annettiin edetä tunnin ajan ja liuoksesta mitattiin UV/Vis-spektri. Liuos jätettiin 4 °C:een odottamaan. Liuos sentrifugoitiin kiinteiden epäpuhtauksien erottamiseksi ja siihen lisättiin dimetyyliformamidia hopeananopartikkelien saostamiseksi. Muodostunut sakka liuotettiin etikkahapon 1 %:een DMF-liuokseen.

#### Erä B1

Synteesi suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti 4,3-kertaisilla ainemäärillä (0,18 g, 1,07 mmol hopeanitraattia). Muodostunut vaalea sakka liukeni vasta pH:ssa 12. Lopullinen pH oli 12,5. NaBH<sub>4</sub>:n (94,6 mg, 2,5 mmol) vesiliuoksen lisäyksen jälkeen tapahtunut värinmuutos oli nopea. Reaktion annettiin edetä 2 h 15 min:a. Tummosta, viininpunertavasta liuoksesta mitattiin kuvan 16 UV/Vis-spektri (B1-1), jonka perusteella haluttuja nanopartikkeleita ei ollut muodostunut. Liuos jätettiin 4 °C:een odottamaan viikonlopun yli.

UV/Vis-mittauksen (B1-2) perusteella partikkeleita ei ollut edelleenkään muodostunut viikonlopun aikana. 90 ml liuoksesta sentrifugoitiin. Supernatantti A otettiin talteen. Sekä supernatantti A että sentrifugoimaton liuos B jätettiin 4 °C:een odottamaan. Dimetyyliformamidilla laimennetuista näytteistä mitattiin UV/Vis-spektrit (B1-3 ja B1-4) kolmen päivän kuluttua. Molemmissa näytteissä oli haluttuja nanopartikkeleita. Näytteistä mitattiin myös laimentamattomat spektrit (B1-5 ja B1-6). Näytteet sentrifugoitiin (2 x 5 min).



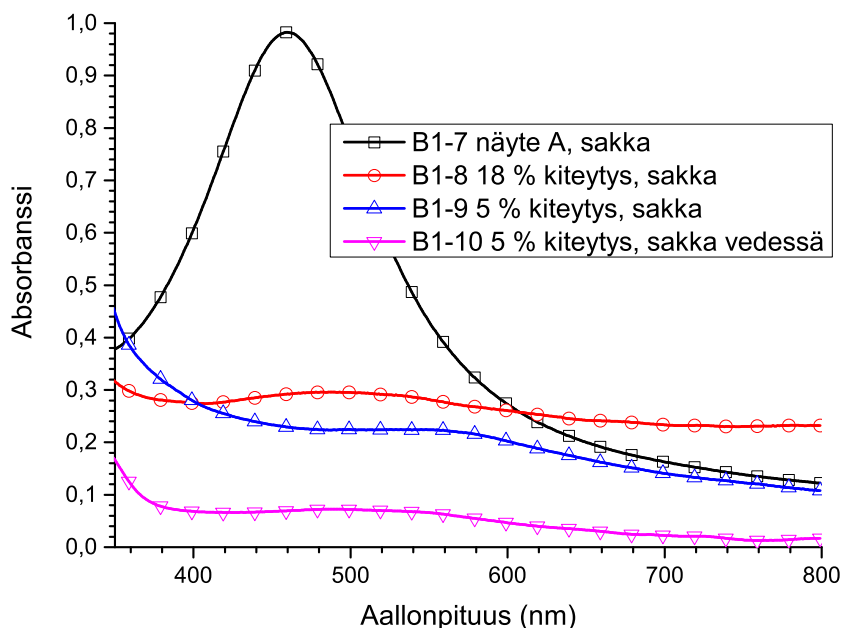
Kuva 16: Erän B1 liuosten UV/Vis-spektrit.

Näyte A jätettiin 4 °C:een odottamaan. Näyte B yritettiin kiteyttää lisäämällä siihen dimetyyliformamidia. Näytteitä tehtiin kaksi. Ensimmäisessä, 5 %:ssa liuoksessa, oli 10 ml näyteliuosta ja 190 ml dimetyyliformamidia. Toisessa, 18 %:ssa liuoksessa, oli 90 ml näyteliuosta ja 410 ml dimetyylifor-

mamidia. Molemmat liuokset vietiin 4 °C:een odottamaan. Niihin muodostui pikkuhiljaa hienojakoista, vaaleanpunertavaa sakkaa.

Näytteestä A haihdutettiin ylimääräistä vettä pois Ar-virralla 11. ja 12. päivänä. Näytteeseen muodostui tummaa sakkaa. Näyte haihdutettiin noin 70 ml:n tilavuuteen ja siihen lisättiin noin 430 ml dimetyyliformamidia.

18. päivä: Näyte A sentrifugoitiin erissä vaaleanpunertavan sakan erottamiseksi. Jäljelle jäi punertavanharmaa sakka (B1-7). Myös näytteen B molemmat laimennokset sentrifugoitiin.



Kuva 17: Erän B1 sakkojen UV/Vis-spektrit.

22. päivä: Sentrifugoinneissa erottuneet punertavat sakat liuotettiin DMF:n 1 % etikkahappoliuokseen. Kaikki sakka ei liuennut. Seokset olivat vaaleanpunaiset ja hieman sameat. Näytteistä mitattiin kuvan 17 UV/Vis-spektrit



(B1-7 sekä B1-8 ja B1-9), jotka eivät näyttäneet toivotuilta. Kun astiaa, jossa 5 % näyte oli ollut sakkaamisvaiheessa, huuhdottiin vedellä, syntyi kirkkaan-punainen liuos. Myös kyseisestä liuksesta mitattiin UV/Vis-spektri (B1-10), jonka perusteella siinäkään ei ollut haluttuja nanopartikkeleita.

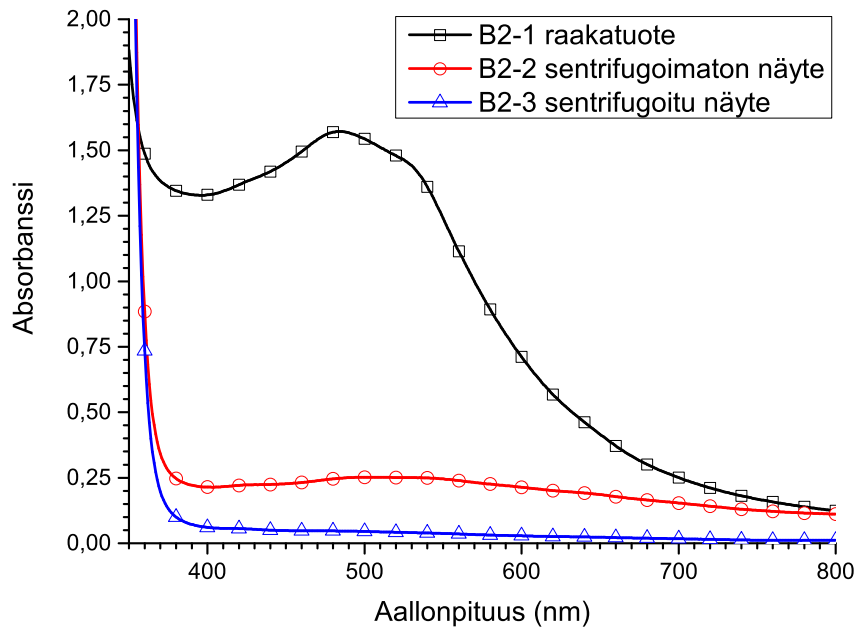
Synteesissä muodostui haluttuja nanopartikkeleita, mutta huomattavasti yleisen ohjeen artikkelissa [2] kuvattua hitaammin. Synteesin ohjeen mukaan partikkelien olisi pitänyt muodostua jo tunti  $\text{NaBH}_4$ :n vesiliuoksen lisäyksen jälkeen. Partikkelit muodostuivat kuitenkin vasta kuuden päivän jälkeen. Sekoituksen puuttuminen saattoi vaikuttaa reaktion hitauteen. Lisäksi partikkelit luultavasti hajosivat ainakin osittain kiteytysvaiheen aikana. Kiteytysliuokset olivat myös todennäköisesti aivan liian laimeita. Haluttuja partikkeleita saattoi kuitenkin hyvinkin muodostua kiteytysastian pohjalle, koska astian huuhtomiseen käytetty vesi värjäytyi punaiseksi. Partikkelit kuitenkin oletettavasti hajosivat jo ennen UV/Vis-mittausta joutuessaan liian matalaan pH:seen.

## **Erä B2**

Synteesi suoritettiin yleisen ohjeen mukaan yksinkertaisilla ainemäärillä (0,042 g, 0,25 mmol hopeanitraattia). Synteesi suoritettiin typpi-ilmakehässä muutoin paitsi  $\text{CsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ :n (50 % w/v) vesiliuoksen lisäyksen aikana. Liuoksen annettiin sekoittua 20 minuuttia ennen emäksen lisäämistä. pH oli tässä vaiheessa 2,5. pH nousi emäksen lisäyksen aikana ensin 7:ään, jolloin muodostui enemmän sakkaa. pH nostettiin edelleen 12,9:ään, jolloin sakka liukeni ja muodostui vaaleankellertävä liuos. Liuosta sekoitettiin  $\text{NaBH}_4$ :n vesiliuoksen lisäyksen jälkeen yksi tunti, jonka jälkeen siitä mitattiin kuvan 18 UV/Vis-

spektri (B2-1). Liuos jätettiin 4 °C:een odottamaan.

Liuos sentrifugoitiin viikon kuluttua ja vietiin jälleen 4 °C:een odottamaan. Liuoksesta mitattiin UV/Vis-spektri (B2-2) viiden päivän kuluttua. Liuos oli tällöin vaaleanpunainen. Näytteessä ei kuitenkaan ollut spektrin perusteella haluttuja nanopartikkeleita. Liuos sentrifugoitiin uudelleen ja siitä mitattiin uusi UV/Vis-spektri (B2-3), joka näytti niin ikään huonolta. Väri oli muuttunut tällöin vaaleankellertäväksi.



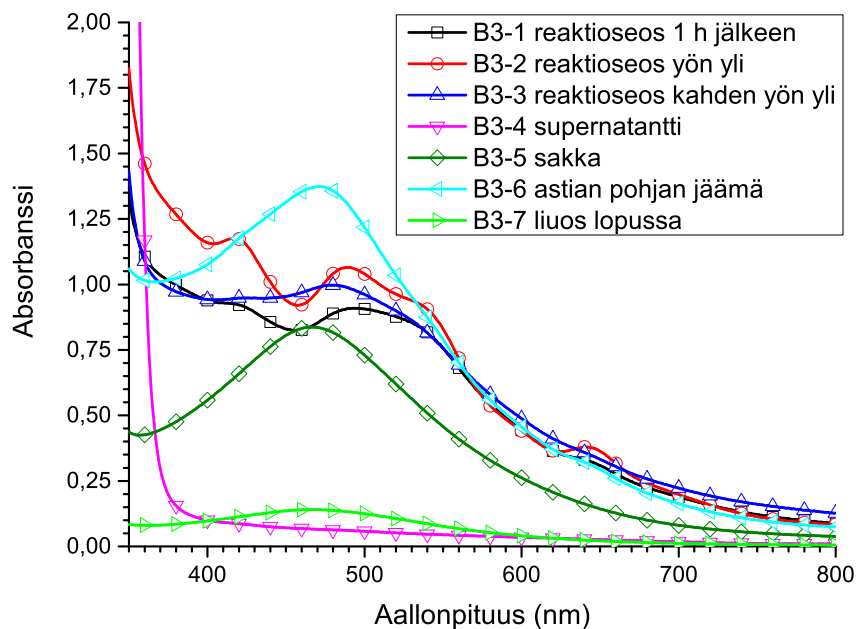
Kuva 18: Erän B2 UV/Vis-spektrit.

Vaaleanpunaisen värin perusteella haluttuja nanopartikkeleita oli ilmeisesti jälleen muodostunut. Partikkelit kuitenkin hajosivat liian pitkän säilytyksen aikana.

### Erä B3

Synteesi suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti yksinkertaisilla ainemäärillä (0,042 g, 0,25 mmol). Hopeanitraatin vesiliuos lisättiin *p*-MBA:n etanoliliuokseen hyvin hitaasti tipoittain. Muodostunutta vaaleankeltaista suspensiota sekoitettiin 20 minuuttia. Liuoksen pH (2,08) nostettiin lisäämällä CsOH · H<sub>2</sub>O:n (50 % w/v) vesiliuosta. Liuos muuttui ensin laimennetun maidon näköiseksi ja edelleen valkoiseksi suspensioksi. Suspensio muuttui vaaleankeltaiseksi liuokseksi > 20 tipan lisäyksen jälkeen pH:ssa 12,60. Myös NaBH<sub>4</sub>:n vesiliuos lisättiin hyvin hitaasti tipoittain. Reaktioseos muuttui vähitellen tummankeltaiseksi ja edelleen ruskean kautta tummaksi viininpunaiseksi. Reaktioon annettiin edetä 1 h ja liuoksesta mitattiin kuvan 19 UV/Vis-spektri (B3-1), jonka perusteella saanto oli noin 50 %. Liuos jätettiin yön yli 4 °C:een odottamaan.

UV/Vis-mittaus toistettiin seuraavana päivänä (B3-2). Spektrin perusteella saanto oli hieman suurempi eli 55 %. Liuos jätettiin yön yli 4 °C:een odottamaan ja UV/Vis-mittaus toistettiin jälleen seuraavana päivänä (B3-3). Spektri oli muuttunut epämääräisemmäksi eli osa partikkeleista oli jo ehtinyt hajota tai muodostaa suurempia klustereita. Partikkelit vähenivät edelleen seuraavien päivien aikana. Näyte sentrifugoitiin kolmen päivän kuluttua ja vaaleankeltaisesta supernatantista (B3-4) sekä veteen liuotetusta sakasta (B3-5) mitattiin UV/Vis-spektrit. Myös reaktioseoksen astian pohjan jäämistä mitattiin UV/Vis-spektri (B3-6). Ainoastaan kolvin pohjan jäämissä oli hieman haluttuja nanopartikkeleita. Kyseiseen näytteeseen lisättiin dimetyyliformamidia ja se jätettiin 4 °C:een odottamaan. Punertavanruskeasta, tummasta liuoksesta mitattiin UV/Vis-spektri (B3-7), jonka perusteella näytteessä ei ollut enää haluttuja nanopartikkeleita. Liuos heitettiin pois.



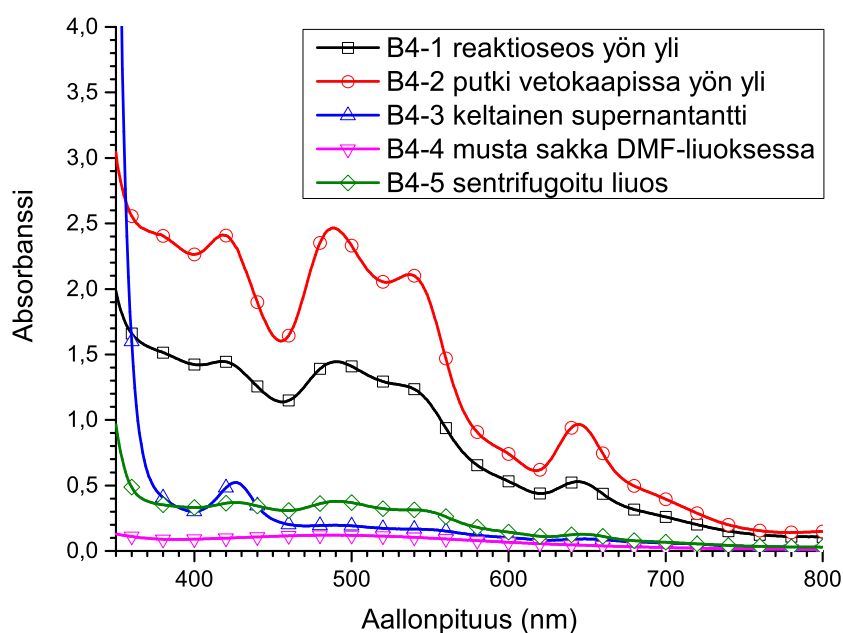
Kuva 19: Erän B3 UV/Vis-spektrit.

Synteesin perusteella saanto näyttäisi olevan parhaimmillaan reaktioseoksen hauduttua yhden yön yli, eikä heti reaktion lopussa kuten artikkelissa [2] annetaan ymmärtää. Myöhemmissä synteesissä B7 saatiin kuitenkin eri tulos.

#### Erä B4

Synteesi suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti yksinkertaisilla ainemäärillä (0,043 g, 0,25 mmol hopeanitraattia). Hopeanitraatin vesiliuos lisättiin *p*-MBA:n etanoliliuokseen pasteur-pipetillinen kerrallaan. Muodostuneen vaaleankeltaisen suspension annettiin sekoittua 10 minuuttia. Liuoksen pH (2,08) nostettiin lisäämällä CsOH · H<sub>2</sub>O:n (50 % w/v) vesiliuosta. Liuos muuttui valkoiseksi suspensioksi ja edelleen vaaleankeltaiseksi liuokseksi (pH > 11).

NaBH<sub>4</sub>:n vesiliuos lisättiin tipoittain. Reaktioseos muuttui vähitellen tummankeltaiseksi ja edelleen ruskean kautta tumman viininpunaiseksi. Reaktio annettiin edetä 1 h. Reaktion lopussa 150 µl liuosta ja 2,85 ml vettä pipetoitiin koeputkeen ja jätettiin yön yli vetokaappiin. Lopun seoksesta annettiin olla 4 °C:ssa yön yli.



Kuva 20: Erän B4 UV/Vis-spektrit.

Sekä reaktioseoksesta (B4-1) että vetokaapissa olleesta näytteestä (B4-2) mitattiin kuvan 20 UV/Vis-spektrit seuraavana päivänä. Tumman ruskeanpuhertavaa jääkaapissa ollutta reaktioseosta sentrifugoitiin 1 x 10 minuuttia. Supernatantin (n. 44 ml) päälle kaadettiin noin 40 ml dimetyyliformamidia, jolloin muodostui suspensio. Seos jätettiin noin puoleksi tunniksi 4 °C:een kietytymään, jonka jälkeen sitä sentrifugoitiin 1 x 10 minuuttia. Keltainen supernatantti kaadettiin pois ja musta sakka liuotettiin etikkahapon 1 % DMF-

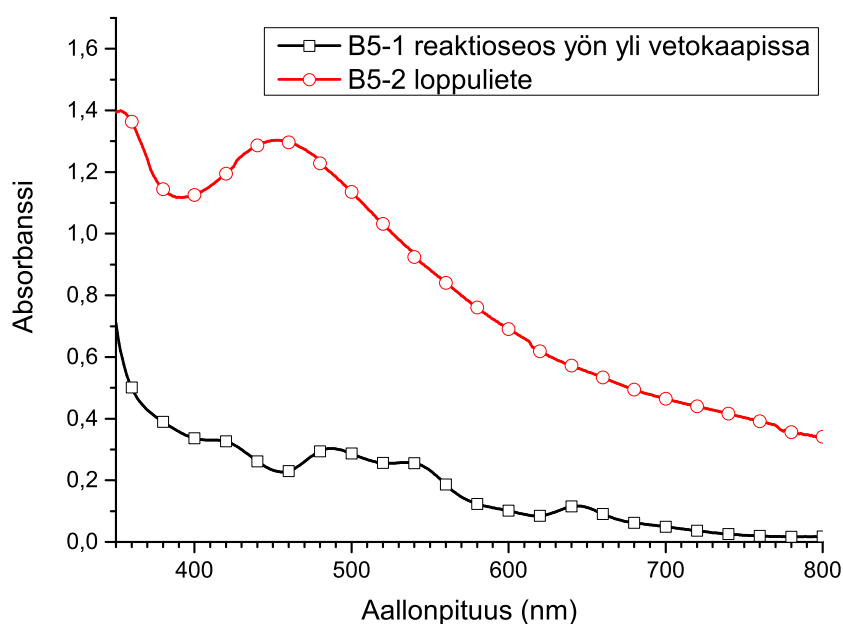
liuokseen. Sakka liukeni hitaasti ja osa sakasta jäi liukenematta. Keltaisesta supernatantista (B4-3) ja sakan punertavan tummanharmaasta seoksesta (B4-4) mitattiin UV/Vis-spektrit, joista havaittiin, ettei niissä ollut haluttuja nanopartikkeleita. Keltainen supernatantti tummui seuraavien tuntien aikana vetokaapissa rusehtavaksi. Seos sentrifugoitiin liukenemattoman sakan erottamiseksi, jolloin saatiin pinkki liuos, josta mitattiin UV/Vis-spektri (B4-5). Spektrin perusteella näytteessä osoittautui olevan nanopartikkeleita. Nanopartikkelit hajosivat myöhemmin säilytyksen aikana.

Vetokaapissa yön yli olleen näytteen spektri (B4-2) näytti jostain syystä paremmalta, kuin 4 °C:ssa säilytetyn reaktioseoksen spektri (B4-1). Näytteen teossa lienee tapahtunut jokin sekaannus, koska myöhempien havaintojen perusteella partikkelien olisi pitänyt hajota hyvin nopeasti vesiliuokseen joutuessaan. Sentrifugoinnissa erottunut keltainen supernatantti sisältänee sivutuotteena muodostuvia suurempia, plasmonisia hopeananopartikkeleita spektrin (B4-3) muodon ja liuoksen voimakkaan keltaisen värin perusteella [10].

## Erä B5

Synteesi suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti yksinkertaisilla ainemäärillä vastaavalla tavalla kuin edellinen erä B4 (0,042 g, 0,25 mmol hopeanitraattia). Ennen CsOH · H<sub>2</sub>O:n lisäystä suspensiota sekoitettiin 25 minuuttia. NaBH<sub>4</sub>:n vesiliuoksen lisäyksen jälkeen reaktion annettiin edetä vertailun vuoksi yön yli vetokaapissa. Reaktioseoksen kuvan 21 UV/Vis-spektri (B5-1) mitattiin seuraavana päivänä. Spektrin perusteella saanto oli noin 16 %. Liuosta sentrifugoitiin 10 minuuttia liukenemattoman sakan erottamiseksi. Su-

pernatantin päälle kaadettiin noin 40 ml DMF:a, jolloin muodostui sakkaa. Suspension annettiin kiteytyä noin neljä tuntia 4 °C:ssa. Suspensiota sentrifugoitiin 15 minuuttia ja keltainen supernatantti pipetoitiin pois. Musta sakka yritettiin liuottaa 1 % etikkahapon DMF-liuokseen. Sakka ei juurikaan liennut. Seos jätettiin viikonlopun yli 4 °C:een.



Kuva 21: Erän B5 UV/Vis-spektrit.

Sakka ei ollut liennut neljän päivän jälkeen. Seokseen lisättiin ensin muutama tippa etikkahappoa. Sakka ei liennut edelleenkään, joten seokseen lisättiin noin 2 ml vettä sakan liuottamiseksi, jolloin muodostui tumma, viininpunainen liuos. Liuos jätettiin yön yli pakastimeen odottamaan.

Ylimääräinen liuotin haihdutettiin typpivirralla seuraavana päivänä. Jäljelle jäi tummanruskeaa, kuivaneen lietteen näköistä sakkaa. UV/Vis-mittaus (B5-2) suoritettiin kahden päivän kuluttua. Spektrin perusteella näytteessä

ei ollut haluttuja partikkeleita.

UV/Vis-mittausten perusteella saanto oli yli kahdeksan kertaa huonompi, kuin edellisessä erässä B4, jossa reaktioseoksen annettiin olla jääkaapissa, eikä vetokaapissa yön yli. Näin ollen matalampi lämpötila ilmeisesti suosii partikkelien muodostumista.

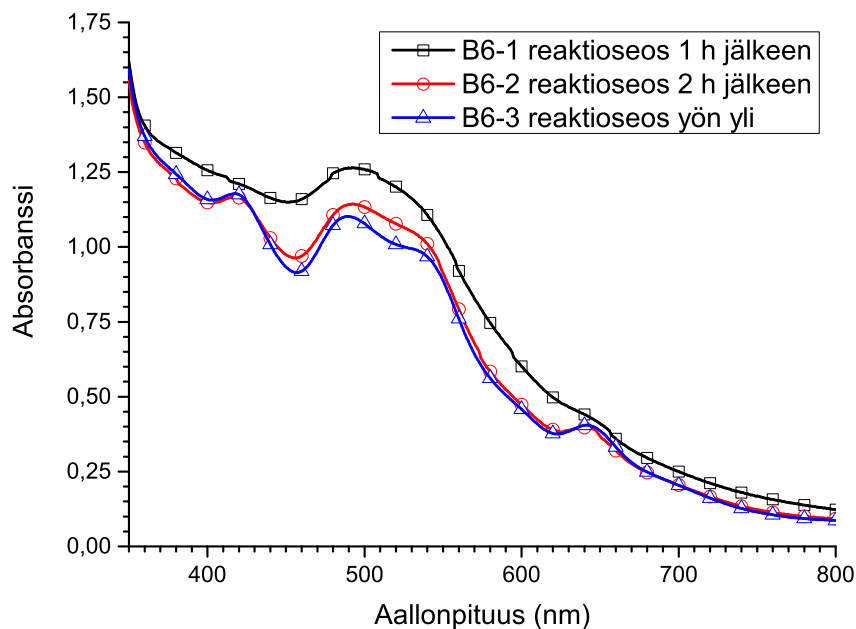
## **Erä B6**

Synteesi suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti kaksinkertaisilla ainemäärillä (0,085 g, 0,50 mmol). Ennen CsOH · H<sub>2</sub>O:n lisäystä suspensiota sekoitettiin 1,5 tuntia. Suspension ulkonäkö ei juurikaan muuttunut tuona aikana. Kun CsOH · H<sub>2</sub>O:ta lisättiin 45 tippaa, liuoksen pH nousi noin yhdeksään ja liuos kirkastui kokonaan. Aiemmin liuos jäi tässä vaiheessa hieman sameaksi. Kun emästä lisättiin vielä 4 tippaa, pH nousi yli yhteentoista. NaBH<sub>4</sub>:n lisäyksen jälkeen liuoksen väri muuttui melko hitaasti. Liuoksesta mitattiin kuvan 22 UV/Vis-spektrit 1 h (B6-1) ja 2 h (B6-2) pelkistimen lisäyksen jälkeen. Reaktioseos jätettiin yön yli 4 °C:een odottamaan.

UV/Vis-mittaus toistettiin seuraavana päivänä (B6-3). Spektrin perusteella saanto oli 0,0591 g (52 %). Tumma, viininpunainen liuos sentrifugoitiin (1 x 10 min). Musta sakka, jota erottui vähemmän kuin aiemmin heitettiin pois. Supernatantti jaettiin kahteen osaan:

1. Saostus lisäämällä 40 ml DMF:a.
  2. Saostus AuNP-menetelmää [12] soveltaen ammoniumasetaatilla ja metanolilla.
- 
1. Sakan annettiin muodostua 1 h 20 min, minkä jälkeen seos sentrifugoitiin





Kuva 22: Erän B6 reaktioseoksen UV/Vis-spektrit.

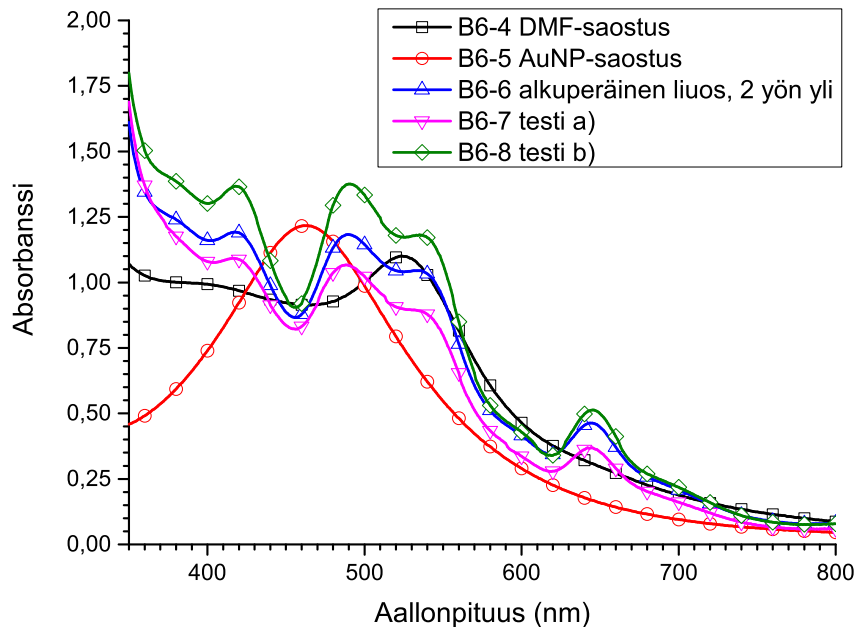
(1 x 15 min). Musta sakka ja keltainen supernatantti erottuivat. Sakka liuotettiin veteen ja sille mitattiin kuvan 23 UV/Vis-spektri (B6-4). Spektrin perusteella pääteltiin, ettei nanopartikkeleita enää ollut. <sup>1</sup>

2. Koska edellisen saostustesti ei onnistunut, liuos jaettiin jälleen useampaan osaan. Tässä kokeessa 9 ml liuosta ja 1 ml 2 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -liuosta yhdistettiin. Seos alkoi kuplia rauhallisesti. Seokseen lisättiin 5 ml metanolia. Muodostuneesta mustasta sakasta mitattiin UV/Vis-spektri (B6-5), jonka perusteella siinä ei ollut nanopartikkeleita. <sup>2</sup>

Alkuperäisestä liuksesta mitattiin seuraavana päivänä UV/Vis-spektri (B6-

<sup>1</sup>Myöhemmän tiedon valossa (katso s.52) partikkeleita oli todennäköisesti sittenkin, mutta ne hajoivat joutuessaan liian happamiin olosuhteisiin veteen.

<sup>2</sup>Supernatantti oli vaaleanpunainen, joten tässäkin tapauksessa partikkeleita oli todennäköisesti sittenkin.



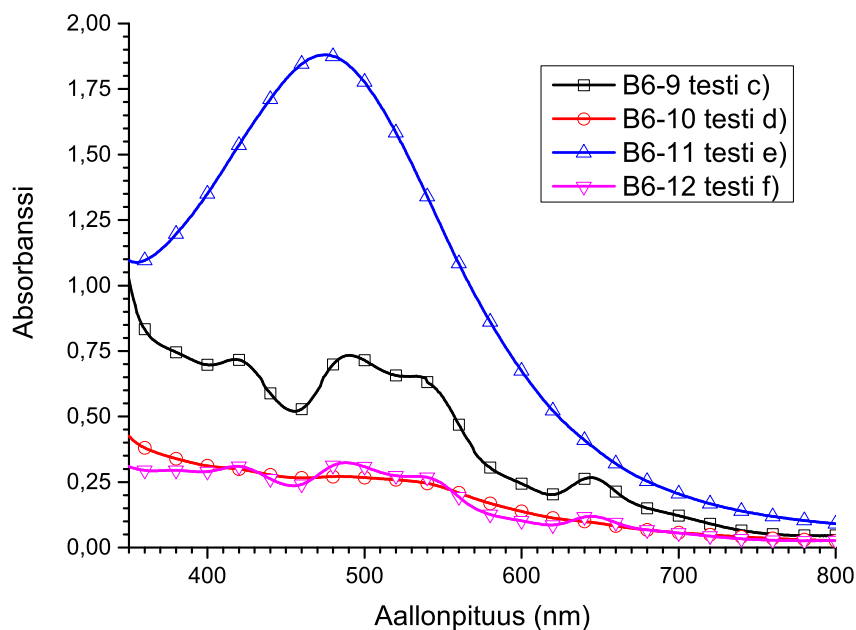
Kuva 23: Erän B6 saostuskokeiden UV/Vis-spektrejä.

6), jonka perusteella partikkelit olivat säilyneet. Saostuskokeita tehtiin lisää:

- a) 5 ml liuosta + 1 ml MeOH tipoitain sekoituksen kanssa (B6-7)
- b) 5 ml liuosta + 1 ml DMF tipoitain sekoituksen kanssa (B6-8)
- c) 5 ml liuosta + 2 ml MeOH tipoitain sekoituksen kanssa (B6-9)
- d) 5 ml liuosta + 2 ml DMF tipoitain sekoituksen kanssa (B6-10)
- e) 5 ml liuosta + 2 ml heksaanikerros (B6-11)

Liuokset a) ja b) sentrifugoitiin noin 1,5 tunnin jälkeen. Sakkaa ei erottunut. Kaikki liuokset jätettiin viikonlopun yli jääkaappiin odottamaan. Liuoksista mitattiin kuvien 23 ja 24 UV/Vis-spektrit (B6-7–B6-10) kolmen päivän kuluttua. Mittausten perusteella kaikissa liuoksissa oli vähän partikkeleita. Näytteen d) musta sakka ja vaalea, kellertävä supernatantti olivat erottuneet

viikonlopun aikana. Näytteen e):n sakan UV/Vis-spektri (B6-12) (kuva 24) mitattiin seuraavana, seitsemäntenä päivänä.



Kuva 24: Erän B6 saostuskokeiden UV/Vis-spektrejä.

8. päivä: Loput 5 ml liuksesta (f) kaadettiin sentrifuugiputkeen, johon lisättiin vielä 2,5 ml dimetyyliformamidia, jolloin muodostui tummaa sakkaa. Seos sentrifugoitiin heti (1 x 10 min). Rusehtavan oranssi supernatantti pipetoitiin pois ja mustan sakan päälle lisättiin 90 µl etikkahappoa. Sakka ei liennut. Seos sentrifugoitiin (1 x 10 min), jolloin hieman vaaleanpunertava supernatantti ja musta sakka erottuivat. Seos jätettiin jääkaappiin odottamaan. Sakka ei liennut seuraavan viikon aikanakaan.

14. päivä: Näyte (f) oli edelleen suspensio. Näytteestä mitattiin UV/Vis-spektri (B6-12), jonka perusteella siinä oli tuotetta. Näytteiden a) ja c) sakat liuotettiin veteen, jolloin saatiin ruskea liuos. UV/Vis-spektrien perusteella

näytteissä ei ollut tuotetta. Sakasta b) saatiin sen sijaan viininpunainen liuos, jossa oli tuotetta. Näytteet b) ja f) sentrifugoitiin (1 x 10 min), jolloin saatiin:

b) musta sakka + kellertävä, kirkas supernatantti, supernatantti pipetoitiin pois

f) musta sakka + punainen supernatantti

Nanopartikkelit hajosivat myöhemmin säilytyksen aikana.

Tämä oli ensimmäinen kerta, kun synteessin alkuvaihe onnistui hyvällä saannolla. Näin ollen prekursoriliuoksen sekoitusajalla on hyvin merkittävä rooli synteessissä. Aiemmin prekursoriliuosta sekoitettiin vain 10-25 minuuttia, jolloin Ag(I)-*p*-MBA:ta ei oletettavasti ehtinyt muodostua riittävästi. Tämä näkyi emäksen lisäysvaiheessa siten, että liuos oli vielä hieman samea pH:ssa 9. Nyt kun prekursoriliuoksen annettiin sekoittua huomattavasti kauemmin eli 1,5 tuntia, liuos muuttui kirkkaaksi jo pH:ssa 9, eikä vasta pH:ssa 12, kuten aiemmissa synteisy yrityksissä. Sakkauskokeiden perusteella MeOH:n käyttö DMF:n sijaan saostajana voitaneen unohtaa. Saostukset heksaanikerrosta ja AuNP-menetelmää käyttämällä saattavat olla varteenotettavia vaihtoehtoja.

Yleisen ohjeen artikkelin [2] tekijöistä Anil R. Desireddy ja Terry Bigioni vastasivat ystävällisesti Kaisa Helttusen lähettämään sähköpostiviestiin ohjeen täsmennyksistä. Viestin mukaan tarvittava etikkahappomäärä saattaa vaihdella eri näytteiden välillä. Etikkahappo kehoitettiin lisäämään tipoittain klusterit sisältävään dimetyyliformamidiliuokseen sekoituksen kanssa. Lisäksi DMF-saostuksessa parhaaksi suhteeksi oli havaittu 1 osa dimetyyliformamiidia ja 2 osaa liuosta.

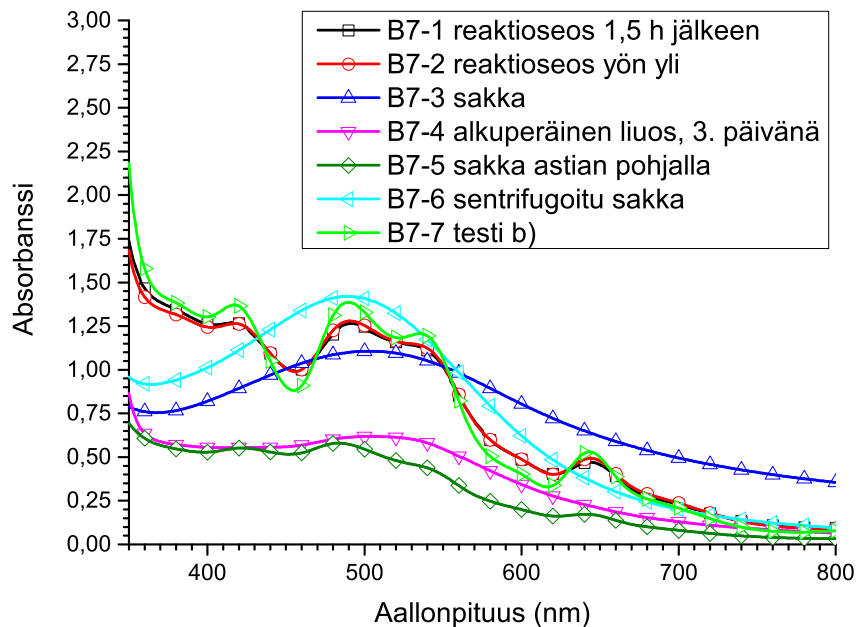
## Erä B7

Synteesi suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti kaksinkertaisilla ainemääri-  
lä (0,085 g, 0,50 mmol). Prekursoriliuoksen annettiin sekoittua 3,5 tuntia.  
Emäksen lisäsvaiheessa valkoinen prekursorisakka liukeni kokonaan pH:ssa  
8. Liuoksen väri muuttui melko hitaasti  $\text{NaBH}_4$ :n lisäyksen aikana ja sen  
jälkeen. Reaktioseoksesta mitattiin kuvan 25 UV/Vis-spektri 1,5 h  $\text{NaBH}_4$ :n  
lisäyksen jälkeen (B7-1). Reaktioseoksesta mitattiin seuraavana päivänä UV/  
Vis-spektri (B7-2), jonka perusteella partikkelien pitoisuus oli pysynyt sama-  
na, kuin edellisenä päivänä. Saanto (61 %) oli spektrin perusteella hieman  
parempi kuin edeltävässä erässä B6. Seos sentrifugoitiin (1 x 15 min) mus-  
tan sivutuotesakan erottamiseksi. Sakasta mitattiin UV/Vis-spektri (B7-3).  
Supernatantti jaettiin jälleen osiin saostuskokeita varten.

- a) 5 ml liuosta + 2 ml asetonia, sakkasi heti
- b) 5 ml liuosta + 2 ml MeCN, sakkasi heti
- c) 5 ml liuosta + 2 ml THF, muodostui THF-kerros, sakkasi myös

UV/Vis-mittausten perusteella sakat a), b) ja c) olivat jotakin muuta kuin  
haluttua tuotetta. Lopun liuoksen astiaan oli muodostunut hopeapeili iltä-  
päivän aikana.

Alkuperäisestä liuksesta mitattiin seuraavana päivänä UV/Vis-spektri (B7-  
4), jonka perusteella siinä ei ollut enää partikkeleita. Liuos sentrifugoitiin.  
Astian pohjalle jäi hieman mustaa sakkaa. Astian pohjalle jääneestä sakas-  
ta ja sentrifugoinnissa erottuneesta sakasta mitattiin UV/Vis-spektrit (B7-5  
ja B7-6). Spektrin perusteella astian pohjalle jääneessä sakassa oli hieman  
nanopartikkeleita. Sentrifugoinnissa erottuneessa sakassa ei ollut nanopar-  
tikkeleita.



Kuva 25: Erän B7 UV/Vis-spektrit.

9. päivä: Näytteen b) UV/Vis-mittaus (B7-7). Viininpunainen liuos ja hieman mustaa sakkaa. Spektrin perusteella näytteessä oli tuotetta.

Nanopartikkelit hajosivat myöhemmin säilytyksen aikana. Saostuskokeiden perusteella myös asetonitriili näyttää sopivan saostusliuottimeksi. Reaktioseoksesta saatu supernatantti kannattaa ilmeisesti saostaa mahdollisimman nopeasti, sillä sen sisältämät nanopartikkelit lähtevät hajoamaan hyvin nopeasti.

## Erä B8

Synteesi suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti yksinkertaisilla ainemäärillä (0,042 g, 0,25 mmol). Prekursoriliuoksen annettiin sekoittua 2 tuntia. Sakka

liukeni kokonaan pH:ssa 8. Liuoksen annettiin sekoittua 1,5 tuntia  $\text{NaBH}_4$ :n lisäyksen jälkeen. Reaktioseoksen värinmuutos on esitetty kuvasarjassa 26. Reaktioseoksesta mitattiin kahden tunnin kuluttua kuvan 27 UV/Vis-spektri (B8-1), jonka perusteella saanto (32 %) oli kohtalainen. Reaktioseos sentrifugoitiin heti (1 x 15 min), eikä aiempien erien tapaan seuraavana päivänä.

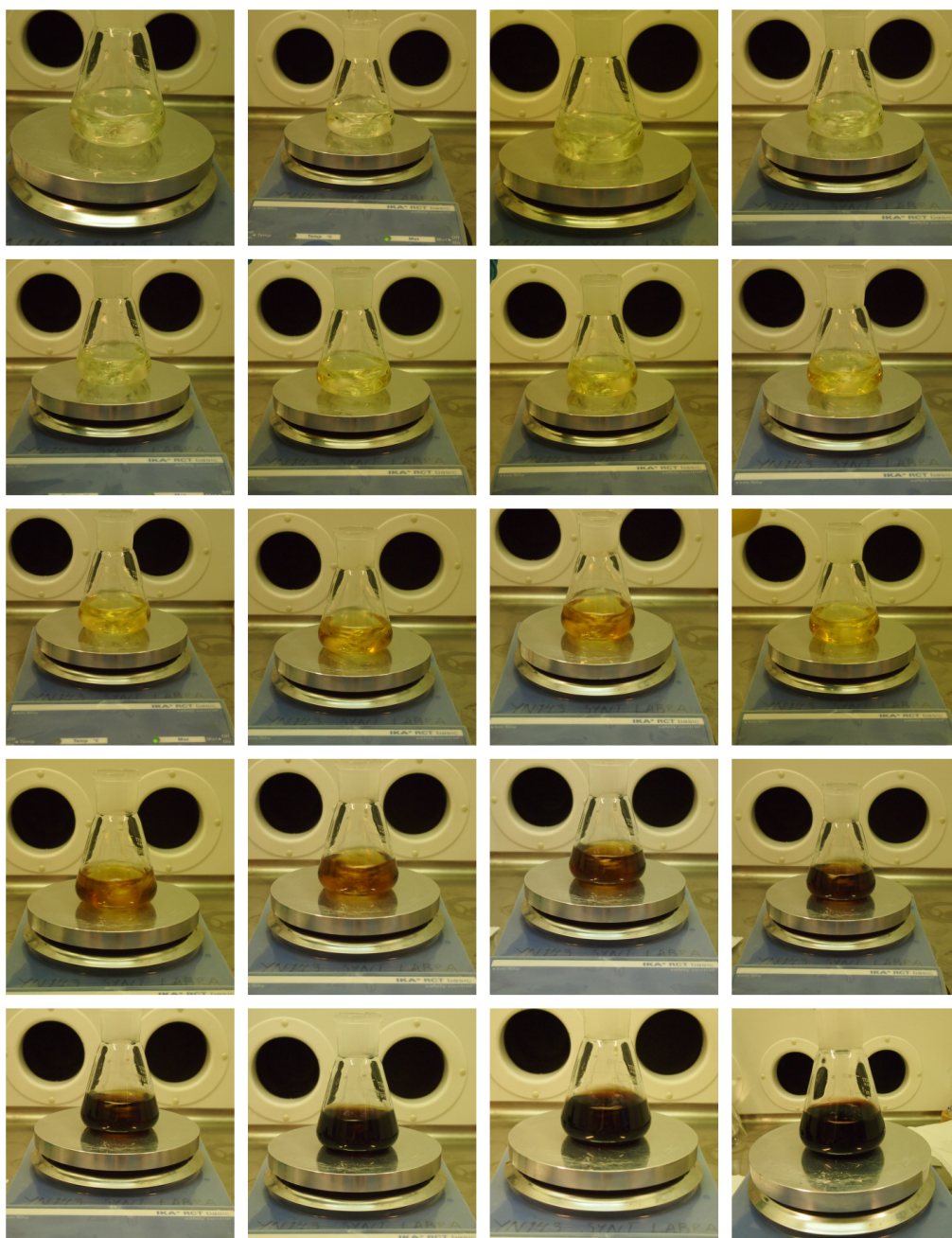
Supernatanttiin lisättiin hitaasti sekoituksen kanssa 21 ml DMF:a, jolloin muodostui sakkaa. Seos sentrifugoitiin välittömästi (1 x 10 min), jolloin musta sakka ja coca-colan värinen supernatantti erottuivat. Sakasta mitattiin UV/Vis-spektri (B8-2), jonka perusteella se oli tuotetta. Sakka yritettiin liuottaa 1 % etikkahapon DMF-liuokseen. Vain hyvin pieni osa sakasta liukeni. Seos (17 ml DMF) jätettiin yön yli 4 °C:een.

Seos kaadettiin seuraavana päivänä sentrifuugiputkeen. Astian pohjalle jääneestä sakasta A (B8-3) ja sentrifugoinnissa erottuneesta sakasta B (B8-4) mitattiin UV/Vis-spektrit emäksisissä vesiliuoksissa, koska partikkelit olivat ilmeisesti epästabiileja, kun pH oli <11. Sakat olivat tuotetta.

Sakat saatiin liukenemaan, kun etikkahappoa lisättiin riittävästi. Näin saatiin tummat, viininpunaiset liuokset. Liuoksista mitattiin UV/Vis-spektri (B8-5 ja B8-6)) emäksisissä olosuhteissa. Liuoksissa oli tuotetta. Liuokset jätettiin 4 °C:een odottamaan.

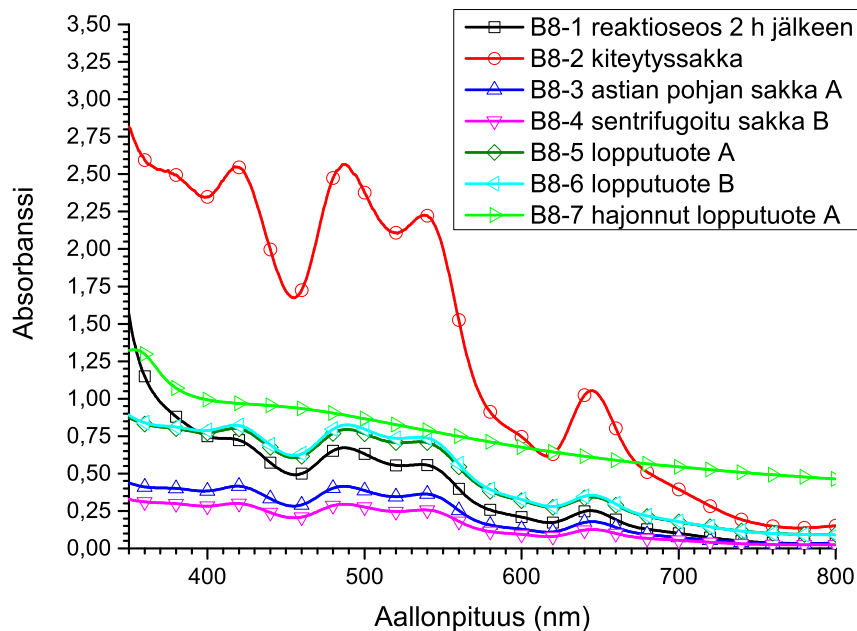
6. päivä: Molempien astioiden pohjalle oli muodostunut ruskeaa, tahmeaa sakkaa, joka ei ollut UV/Vis-mittausten perusteella tuotetta. Tuotteen A hajonneen lopputuotteen spektri (B8-7) on esitetty kuvassa 27. Erottunut liuos oli hieman rusehtava ja kirkas.

Viimeistään tämän synteesin kohdalla selvisi emäksisten olosuhteiden merki-



Kuva 26: Reaktioseoksen värinmuutos  $\text{NaBH}_4$ :n lisäyksen jälkeen.





Kuva 27: Erän B8 UV/Vis-spektrit. Näytteet B8-3–B8-7 on mitattu emäksisissä olosuhteissa.

tys partikkelien stabiilisuuden kannalta, mikä ilmeni yleisen ohjeen artikkelin [2] ”Supplementary Information” PAGE-ajoa käsittelevässä osuudessa:

*„The aqueous clusters were not stable at normal gel pH intermediate pH 10 was chosen for this this experiment. This allowed a large fraction of the clusters to remain unchanged over the course of a gel run. – instability of the clusters at the lower pH conditions needed to run the gel. The highest band (with the largest clusters) resembled the plasmonic Ag nanoparticles that are produced from  $M_4Ag_{44}(p-MBA)_{30}$  clusters when they are destabilized by dissolving them in water-methanol solutions at pH 10.”*



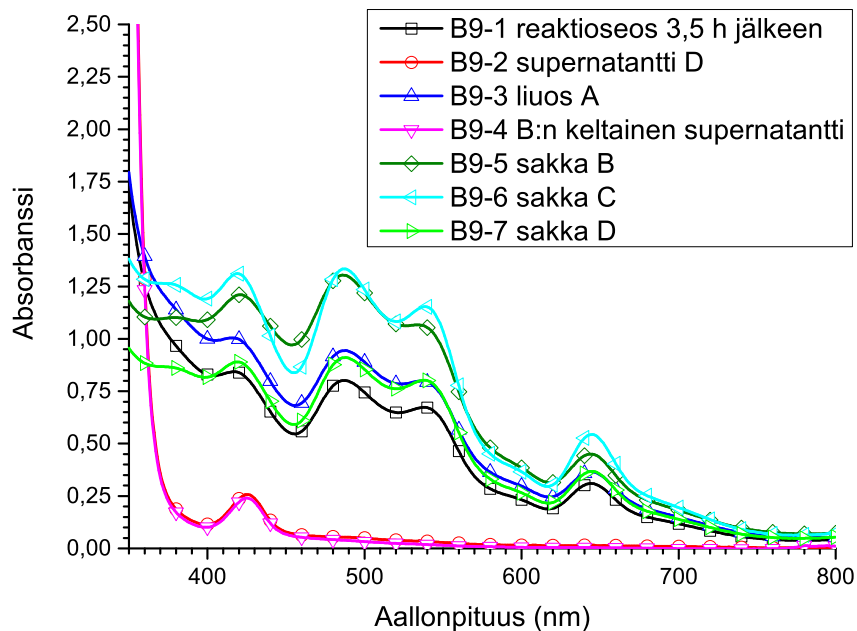
Kuva 28: Erän B8 vaalea prekursoriliuos, viinipunainen reaktioseos synteessin lopussa ja sakan A musta lopputuote.

## Erä B9

Synteesi suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti yksinkertaisilla ainemäärillä (0,042 g, 0,25 mmol). Prekursoriliuoksen annettiin sekoittua 2,5 tuntia. Liuoksen annettiin sekoittua 3,5 tuntia  $\text{NaBH}_4$ :n lisäyksen jälkeen. Tummasta, viininpunaisesta liuksesta mitattiin kuvan 29 UV/Vis-spektri (B9-1), jonka perusteella saanto oli 38 %. 14 ml liuosta (= A) otettiin erilleen ja jätettiin yön yli 4 °C:een odottamaan. Loput liuksesta sentrifugoitiin liukenemattoman sakan erottamiseksi. Sentrifugoidun näytteen liuos jaettiin kahteen noin 12,5 ml osaan. Molempiin liuksiin lisättiin 6 ml dimetyyliformamidia. Toinen muodostuneista seoksista (= B) jätettiin yön yli 4 °C:een odottamaan. Toinen seoksista sentrifugoitiin, jolloin musta sakka ja coca-colan näköinen supernatantti erottuivat. Supernatantista mitattiin UV/Vis-spektri (B9-2), jonka perusteella siinä ei ollut nanopartikkeleita. Sakka (= C) ja supernatantti (= D) jätettiin yön yli 4 °C:een odottamaan.

Seos B sentrifugoitiin seuraavana päivänä, jolloin vaaleankeltainen supernatantti ja musta sakka erottuivat. Supernatantti pipetoitiin pois. Supernatantti D sentrifugoitiin (pohjalle oli erottunut sakkaa), jolloin keltainen supernatantti ja musta sakka erottuivat, kuten B:ssä. UV/Vis-mittausten perusteella kaikissa muissa näytteissä, paitsi keltaisissa supernatanteissa oli haluttuja partikkeleita eli A:n liuos (B9-3) sekä B-, C- ja D-sakat (B9-5–B9-7) olivat tuotetta.

Liuos A jaettiin kahteen 7 ml:n osaan. Puolet liuksesta (= A) jätettiin edelleen jääkaappiin odottamaan. Toiseen puoleen lisättiin 3,5 ml dimetyyliformamidia (= E) ja se jätettiin yön yli jääkaappiin odottamaan. D-sakkaan lisättiin 20  $\mu\text{l}$  etikkahappoa, jolloin se liukeni. Liuokseen lisättiin 2 ml DMF:a, jolloin sakka palasi. Seokselle mitattiin kuvan 30 UV/Vis-spektri (B9-8), jon-



Kuva 29: Erän B9 UV/Vis-spektrejä. Näytteet on mitattu emäksisissä olosuhteissa.

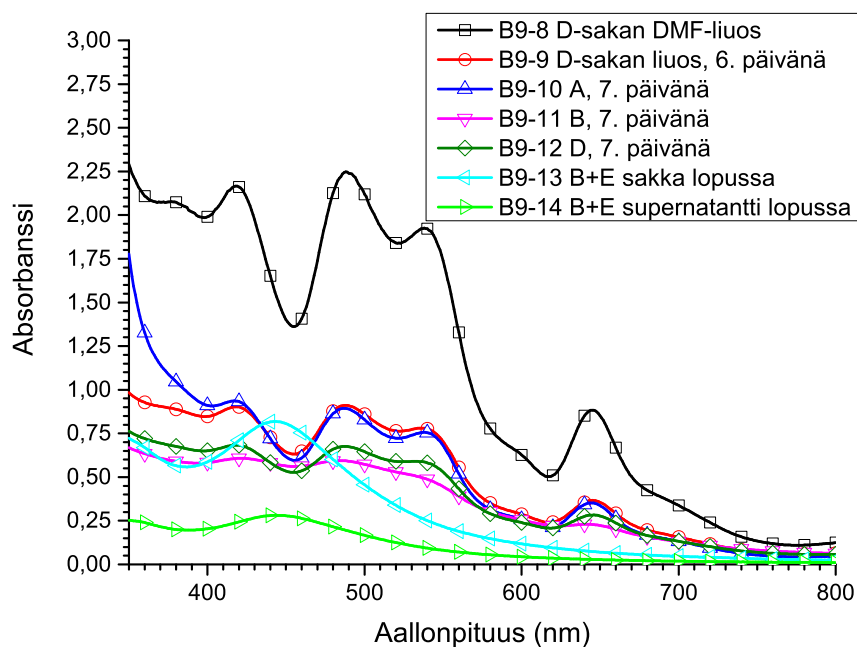
ka perusteella tuote oli säilynyt.

3. päivä: D-sakka ei ollut liennut. Seokseen lisättiin vettä kunnes sakka liukeni. Liuos jätettiin jääkaappiin odottamaan.

6. päivä: D-sakan liuksesta mitattiin UV/Vis-spektri (B9-9), jonka perusteella partikkelit olivat säilyneet. Pohjalle oli kuitenkin muodostunut tummaa öljymäistä saostumaa, joka ei ollut tuotetta.

C-sakkaan lisättiin pari tippaa CsOH-liuosta ja 1 ml vettä sekä 40 µl etikkahappoa ja 2 ml DMF:a, jolloin muodostui rusehtava liuos.

B-sakkaan lisättiin 2 ml DMF:a, 60 µl etikkahappoa ja 1 ml vettä, jolloin saatiin viininpunainen, tumma liuos.

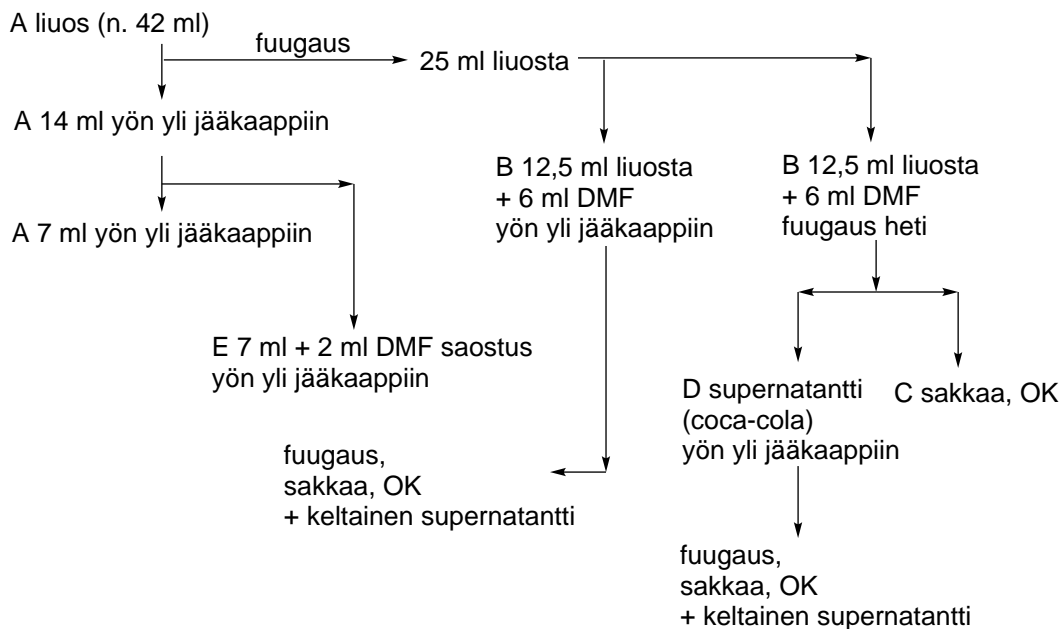


Kuva 30: Erän B9 UV/Vis-spektrejä. Näytteet on mitattu emäksisissä olosuhteissa.

7. päivä: UV/Vis-mittaukset näytteistä A, B ja D (B9-10–B9-12). Spektrien perusteella vain näyte A oli kunnossa. Etikkahapon pitoisuus ei siis saisi luultavasti olla suurempi kuin 1 %.

Sakat B ja E yhdistettiin ja niihin lisättiin 3 ml DMF:a, 30 µl etikkahappoa ja 50 µl vettä. Seos jätettiin vetokaappiin sekoittumaan vajaaksi kolmeksi tunniksi. Sakka ei liuennut. Seokseen lisättiin vielä 3,5 ml vettä, mutta sakka ei edelleenkään liuennut. Seos alkoi näyttää ruskealta. Seos sentrifugoitiin ja erottuneista sakasta (B9-13) ja supernatantista (B9-14) mitattiin UV/Vis-spektrit. Partikkelit olivat tuhoutuneet.

Saostuskokeita selventävä kaavio on esitetty kuvassa 31:



Kuva 31: Kaavio erän B9 saostuskokeista.

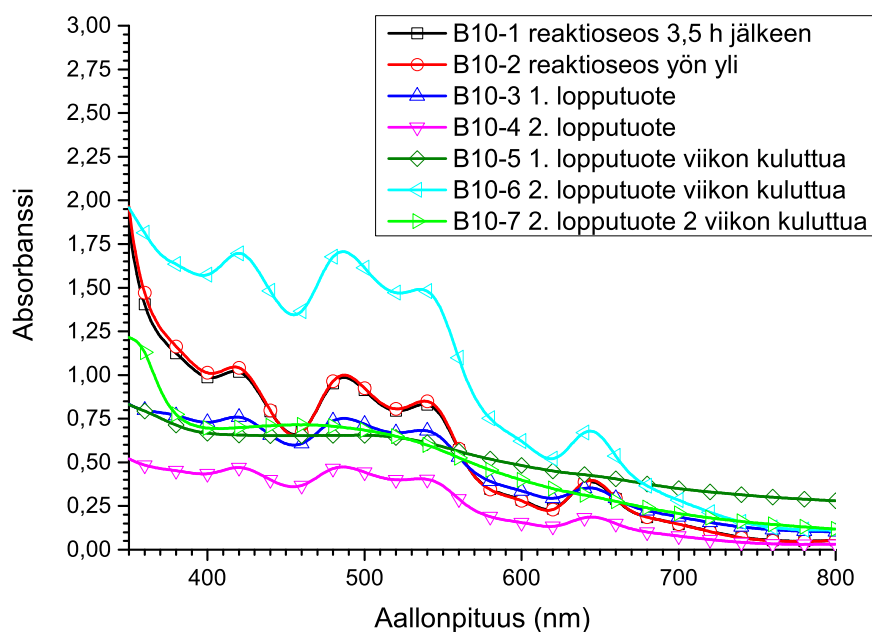
Saostuskokeiden perusteella reaktion kannattaa antaa edetä yön yli. 38 %:n saanto nousi tällöin 45 %:iin. Kun dimetyyliformamidisaostus on tehty, muodostunutta seosta ei kannata sentrifugoida heti. Tällöin muodostuva cocacolan näköinen supernatantti sisältää vielä melko paljon saostumattomia nanopartikkeleita. Lopputuotteen happokäsittelyt epäonnistuivat. Partikkelit saatiin kyllä liukenemaan DMF-liuokseen, kun etikkahappoa lisättiin riittävän paljon. Partikkelit kuitenkin hajosivat näissä olosuhteissa. Tästä johtuen liuotin pitänee haihduttaa pois heti happokäsittelyn jälkeen.

## Erä B10

Synteesi suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti yksinkertaisilla ainemäärillä (0,042 g, 0,25 mmol hopeanitraattia). Prekursoriliuoksen annettiin sekoit-

tua 1h 40 min:a. Liuoksen annettiin sekoittua 3,5 tuntia  $\text{NaBH}_4$ :n lisäyksen jälkeen. Tumma, viininpunaisesta liuksesta mitattiin kuvan 32 UV/Vis-spektri (B10-1). Näyte valmistettiin liuottamalla 150  $\mu\text{l}$  reaktioseoksen liuosta 185  $\mu\text{l}$ :aan vettä (pH 11). Reaktioseos jätettiin yön yli  $4^\circ\text{C}$ :een odottamaan.

Reaktioseoksesta mitattiin uusi UV/Vis-spektri (B10-2) seuraavana päivänä. Näyte valmistettiin liuottamalla 150  $\mu\text{l}$ :aa reaktioseoksen liuosta 235  $\mu\text{l}$ :aan vettä (pH 11). Seos sentrifugoitiin (1 x 15 min). Tumma, rusehtava sakka heitettiin pois. Liuos jaettiin kahteen noin 19 ml osaan. Liuoksiin lisättiin 9 ml dimetyyliformamidia partikkelien saostamiseksi. Seokset sentrifugoitiin 1,5 tunnin kuluttua. Musta sakka ja ruskea supernatantti erottuivat. Supernatantit jätettiin yön yli  $4^\circ\text{C}$ :een odottamaan.



Kuva 32: Erän B10 UV/Vis-spektrit. Näytteet on mitattu emäksisissä olosuhteissa.

Toiselle sakoista tehtiin happokäsittely lisäämällä 1,5 ml DMF:a ja yhteensä 400 µl etikkahappoa 20 µl:n erissä. Liuoksessa oli tällöin 26 % etikkahappoa. Koska sakka ei edelleenkään liennut, seokseen lisättiin vielä 200 µl:aa vettä. Liuotinta alettiin haihduttaa heti Ar-virralla. Kaikki liuotin ei ehtinyt haihtua. Liuotinta jäi noin 1 ml. Seos jätettiin 4 °C:een odottamaan. Kirkas liuos ja musta sakka erottuivat yön aikana, joten suurin osa liuottimesta voitiin pipetoida pois. Loput liuottimesta haihdutettiin Ar-virralla. Näyte jätettiin hieman kosteaksi.

Aiempiin supernatantteihin oli muodostunut lisää sakkaa, joten ne sentrifugoitiin. Toiselle osalle sakasta tehtiin myös happokäsittely. Sakkaan lisättiin 600 µl:aa dimetyyliformamidia ja 160 µl:aa etikkahappoa. Liuoksessa oli tällöin 26 % etikkahappoa. Koska sakka ei edelleenkään liennut, seokseen lisättiin vielä 200 µl:aa vettä. Liuotin haihdutettiin heti pois Ar-virralla.

UV/Vis-mittausten (B10-3 ja B10-4) perusteella sakat kestivät happokäsittelyn ja olivat vielä seuraavanakin päivänä kunnossa. Ensin happokäsitelty sakka oli kuitenkin tuhoutunut viikon kuluttua happokäsittelystä (B10-5). Päivää myöhemmin happokäsitelty sakka oli tuolloin vielä kunnossa (B10-6). Sekin oli kuitenkin tuhoutunut tästä viikkoa myöhemmin (B10-7).

Myöhemmin happokäsitelty näyte säilyi luultavasti paremmin, koska se jätettiin hieman kosteammaksi kuin aiemmin happokäsitelty näyte. Ensin happokäsitelty näyte pääsi todennäköisesti kuivamaan liikaa, jolloin partikkelit hajosivat.



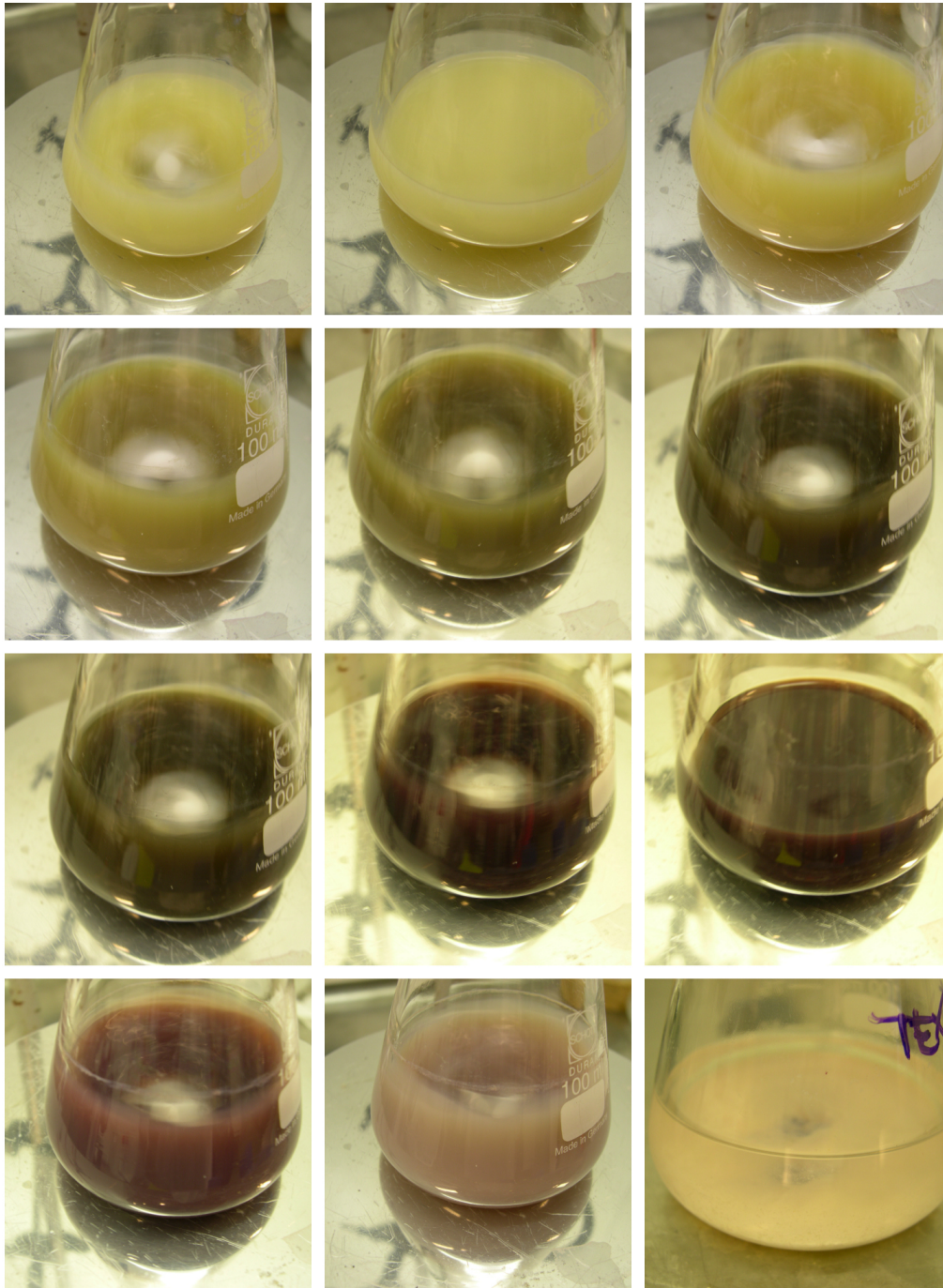
## Erä B11

Synteesi suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti yksinkertaisilla ainemäärillä (0,042 g, 0,25 mmol hopeanitraattia). CsOH:n sijaan emäksenä käytettiin NaOH:a. Prekursoriliuoksen annettiin sekoittua 4 tuntia. Kun suspensioon lisättiin noin 20 tippaa NaOH:n vesiliuosta, pH nousi nopeasti yli yhteen toista, mutta sakka ei liennut lainkaan. Seokseen lisättiin vielä 20 tippaa CsOH:n vesiliuosta, mutta sakka ei liennut edelleenkään. Kun suspensioon lisättiin NaBH<sub>4</sub>:n vesiliuos, sen väri lähti muuttumaan hitaasti vaaleankellertävästä tummankeltaiseksi ja edelleen ruskean kautta marjapuuron väriseksi. Seoksessa oli koko ajan vaaleaa sakkaa. Seoksen annettiin sekoittua 3,5 tuntia. Seos oli vielä vähän kolmen tunnin jälkeen marjapuuron värinen, mutta vaaleni nopeasti sen jälkeen. Jäljelle jäi vaaleanruskea liuos, jossa oli hyvin hienoa, vaaleanpunaista sakkaa. Värimuutokset on esitetty kuvassa 33. Kuvan 34 UV/Vis-spektrin perusteella sakassa ei ollut partikkeleita.

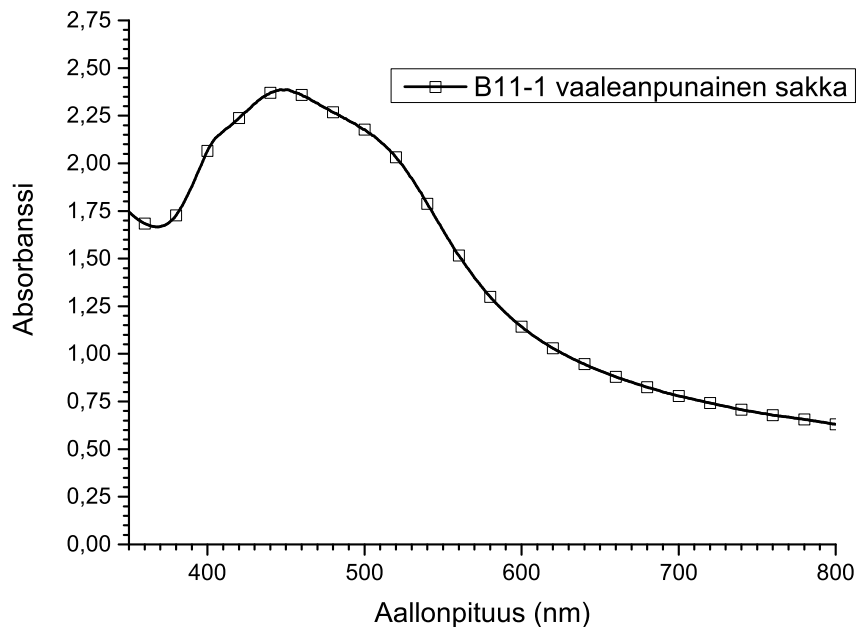
NaOH ei ilmeisesti pystynyt liuottamaan muodostunutta prekursoria, mikä vaikutti reaktion etenemiseen melko radikaalisti. NaBH<sub>4</sub>:n vesiliuoksen lisäyksen jälkeen tapahtuneet värimuutokset olivat kuitenkin vastaavat kuin CsOH:a käytettäessä. Näin ollen oikeaa tuotetta pääsi siis oletettavasti muodostumaan, mutta se hajosi reaktion edettyä liian kauan.

## Erä B12

Synteesi suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti yksinkertaisilla ainemäärillä (0,042 g, 0,25 mmol hopeanitraattia). Prekursoriliuoksen annettiin sekoittua 1,5 tuntia. Liuoksen annettiin sekoittua 3,5 tuntia NaBH<sub>4</sub>:n lisäyksen jälkeen. Tumma, viininpunaisesta reaktioseoksesta mitattiin kuvan 35 UV/Vis-spektri (B12-1), jonka perusteella saanto oli 19 %. Reaktioseos jätettiin yön



Kuva 33: Reaktioseoksen värinmuutos  $\text{NaBH}_4$ :n lisäyksen jälkeen.

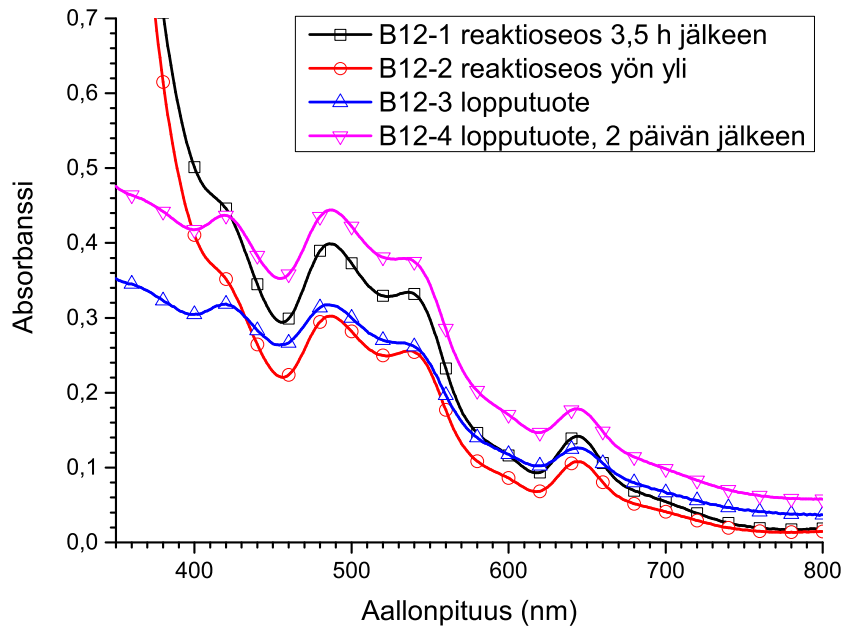


Kuva 34: Erän B11 UV/Vis-spektri. Näyte on mitattu emäksisissä olosuhteissa.

yli 4 °C:een odottamaan.

Reaktioseoksesta mitattiin uusi UV/Vis-spektri (B12-2) seuraavana päivänä. Seos sentrifugoitiin (1 x 15 min) liukenemattoman sakan erottamiseksi. Ruskeaa sakkaa erottui hyvin vähän. Liuokseen (38 ml) lisättiin 19 ml dimeyyliformamidia. Seos jätettiin 3,5 tunniksi 4 °C:een saostumaan. Seos sentrifugoitiin, jolloin musta sakka ja punertavanruskea supernatantti erottuivat. Sakka ja supernatantti jätettiin yön yli 4 °C:een odottamaan. Supernatantti sentrifugoitiin uudelleen seuraavana päivänä, jolloin musta sakka ja rusehtavan punertava supernatantti erottuivat. Erottuneet sakat yhdistettiin ja jätettiin pienen nestemäärän kera 4 °C:een odottamaan viikonlopun yli.

6. päivä: Supernatantti oli edelleen punertava, joten siihen lisättiin hieman li-



Kuva 35: Erän B12 UV/Vis-spektrit. Näytteet on mitattu emäksisissä olosuhteissa.

sää dimetyyliformamidia partikkelien saostamiseksi. Sakalle tehtiin happokäsittely lisäämällä 600 µl:aa dimetyyliformamidia ja 100 µl etikkahappoa sekä 80 µl vettä. Liuottimet haihdutettiin heti Ar-virralla.

Happokäsittelystä lopputuotteesta mitattiin UV/Vis-spektri (B12-3) seuraavana päivänä. UV/Vis-mittaus toistettiin vielä tästä seuraavana päivänä (B12-4). Mittausten perusteella partikkelit olivat säilyneet. Puolet näytteestä otettiin erilleen ja säilöttiin DMSO:n alle 4 °C:een. Toinen puoli säilytettiin normaalisti 4 °C:ssa.

Lopputuotteelle suoritettiin PAGE-ajo Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell -laitteella. Geeli valmistettiin laitevalmistajan ohjeen mukaisesti ilman 10 % SDS:n lisäämistä. Geelin valmistukseen käytetyt aineet olivat seuraavat:

Taulukko 2: PAGE-geelin valmistukseen käytettyjen aineiden määrät:

	<b>4 % kokoojageeli</b>	<b>20 % erottelugeeli</b>
30 % Akryyliamidi/bis	0,26 ml	2,64 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	0,50 ml	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	1,5 ml
H <sub>2</sub> O	1,2 ml	1,77 ml
TEMED	2 µl	3 µl
10 % APS	10 µl	30 µl
Kokonaistilavuus	2 ml	6 ml

Puskuriliuoksena käytettiin tavallista tris-emäksen (25 mM THAM) ja glysiinin (192 nM) liuosta pH:ssa 8,8. Liuosta valmistettiin yksi litra. Näyteliuosta pipetoitiin ensimmäiseen kaivoon 1 µl, toiseen 2 µl, kolmanteen 10 µl ja viimeiseen 5 µl. Ajojännite oli 130 V. Virta oli alussa 23 A ja lopussa 9 A. Ajo kesti 65 minuuttia. Ajettu geeli on kuvassa 36. Partikkelit hajosivat ilmeisesti jo heti ajon alussa joutuessaan liian happamiin olosuhteisiin, sillä näyteliuos muuttui rusehtavaksi. Ajossa ei kuitenkaan voitu käyttää vaadittua pH:ta 11, koska se olisi voinut olla haitallinen laitteistolle. Geelin perusteella näytteeseen mahdollisesti muodostuneet suurimmat partikkelit ovat ilmeisesti jääneet kaivon pohjalle ja kokoojageeliin. Geelissä voidaan nähdä useita himmeämpiä eri partikkelikokoja edustavia viivoja. Suurin osa partikkeleista on kuitenkin kulkenut loppuun saakka, eikä kunnollista erottumista ole saatu aikaiseksi eli geelistä ei saada irti mitään hyödyllistä tietoa. Onnistunut ajo vaatisi vähintäänkin korkeamman pH:n.



Kuva 36: PAGE-geeli ajon jälkeen.

## 5.4 $\text{Na}_4\text{Ag}_{44}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{F})_{30}$ (C)

### Yleinen ohje[3]

Hopeatrifluoroasetaatti (7,89 mg, 0,0375 mmol) liuotettiin 3,6 ml:aan dimetyyliformamidia ja liuosta sekoitettiin 5 minuuttia. Liuokseen lisättiin 4-fluorotiofenoli (7.61  $\mu\text{l}$ , 0,0714 mmol) ja sitä sekoitettiin vielä 15 minuuttia. Reaktioseokseen lisättiin 30 minuutin aikana sekoitettu  $\text{NaBH}_4$ :n (5,4 mg, 0,143 mmol) DMF-liuos. Reaktioseosta sekoitettiin kolme tuntia, jonka jälkeen siihen lisättiin vielä 2,1 ml ionivaihdettua vettä. Reaktioseosta sekoitettiin minuutti ja se vietiin  $-18^\circ\text{C}$ :een säilytykseen. Lopputuote muodostui 3–7 päivän kuluessa. Tuotteen muodostumista seurattiin UV/Vis-mittauksilla.

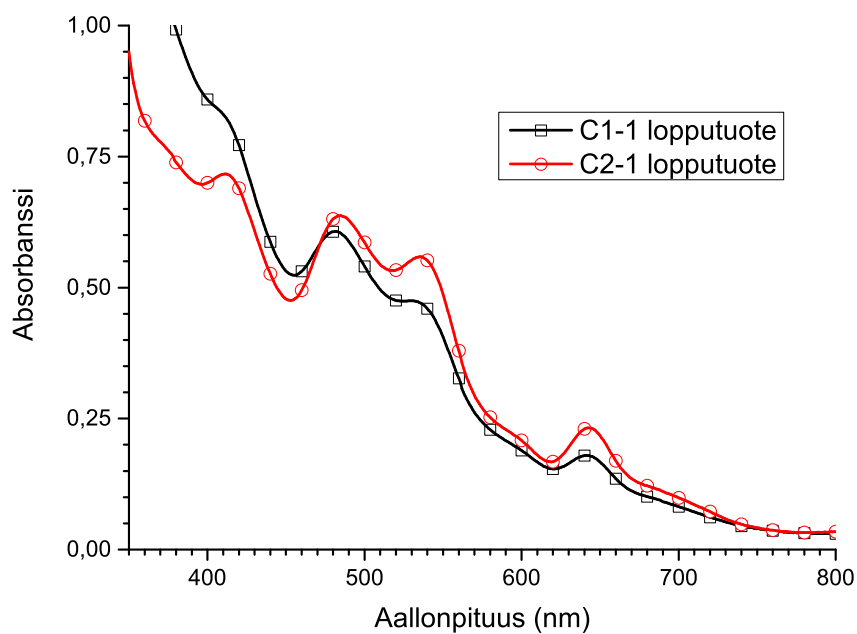
### Erä C1

Synteesi suoritettiin yleisen ohjeen mukaan yksinkertaisilla ainemäärillä (8,3 mg, 0,038 mmol hopeatrifluoroasetaattia). Liuos muuttui sameammaksi ja vaaleankeltaiseksi 4-fluorotiofenolin lisäyksen jälkeen.  $\text{NaBH}_4$ :n lisäyksen jälkeen liuos puolestaan kirkastui ja muuttui kullankeltaiseksi. Liuos oli tummanruskea ennen veden lisäämistä. Reaktioseoksesta mitattiin kuvan 37 UV/Vis-spektri kuuden päivän kuluttua. Spektrin perusteella haluttuja partikkeleita oli muodostunut.

### Erä C2

Synteesi suoritettiin yleisen ohjeen mukaan kolminkertaisilla ainemäärillä (23,8 mg, 0,11 mmol hopeatrifluoroasetaattia). Liuos muuttui sameammaksi

ja vaaleankeltaiseksi 4-fluorotiofenolin lisäyksen jälkeen.  $\text{NaBH}_4$ :n lisäyksen jälkeen liuos puolestaan kirkastui ja muuttui ruskeaksi. Liuos oli muuttunut tummanruskeaksi jo 10 minuuttia  $\text{NaBH}_4$ :n lisäyksen jälkeen. Liuos oli tummanpunainen ennen veden lisäämistä. Reaktioseoksesta mitattiin kuvan 37 UV/Vis-spektri viiden päivän kuluttua. Spektrin perusteella haluttuja partikkeleita oli muodostunut.



Kuva 37: Erien C1 ja C2 lopputuotteiden UV/Vis-spektrit.



## 6 Hopeananopartikkelien karakterisoinnit

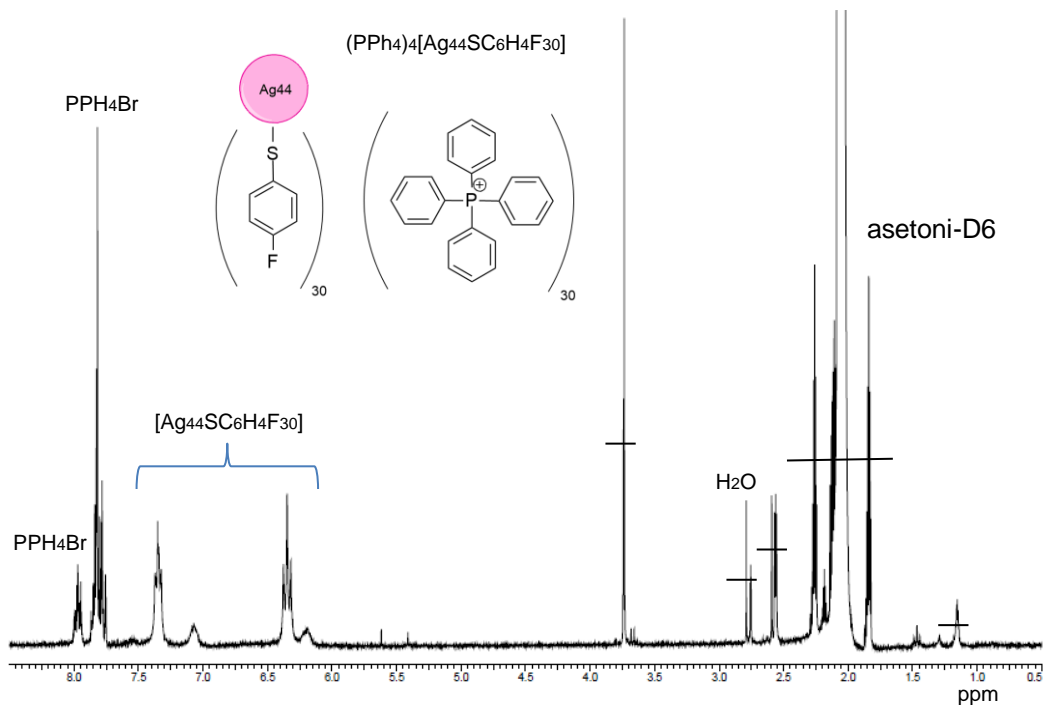
### 6.1 ESI-Q-TOF-massaspektrometria

(PPh<sub>4</sub>)<sub>4</sub>[Ag<sub>44</sub>(SC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>F)<sub>30</sub>]-partikkeleista mitattiin liitteiden 1 ja 2 massaspektrit ESI-Q-TOF QStar Elite, ABSciex -massaspektrometrillä negatiivisella polarisaatiolla. Mittaukset suoritti Elina Kalenius. Näytteinä käytettiin erien A5 ja A6 lopputuotteita. Kantaliuokset valmistettiin liuottamalla 1 mg tuotetta 1 ml:aan dikloorimetaania. Erän A5 mittaussuoksessa oli näytettä ja asetonitriliä suhteessa 1 : 5. Olosuhteita optimoitiin erän A6 mittausta varten. Erän A6 mittaussuoksessa oli näytettä ja asetonitriliä suhteessa 1 : 10. Mittaukset tuottivat helposti tulkittavat spektrit, joista pystytään tunnistamaan valtaosa piikeistä. Erän A5 spektrin peruspiikkinä on pilkeioni [Ag<sub>43</sub>(SC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>F)<sub>28</sub>]<sup>3-</sup> m/z-arvolla 2733,1357. Pehmentämällä mittaolosuhteita erän A6 peruspiikiksi on saatu tuotteen molekyyli-ioni [Ag<sub>44</sub>(SC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>F)<sub>30</sub>]<sup>3-</sup> m/z-arvolla 2853,4473.

### 6.2 <sup>1</sup>H NMR -spektroskopia

Erän A6 (PPh<sub>4</sub>)<sub>4</sub>[Ag<sub>44</sub>(SC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>F)<sub>30</sub>]-partikkeleista mitattiin myös <sup>1</sup>H NMR -spektri.

Yläkentän siirtymät  $\delta$  1.15 (s, 8H), 1.29 (s, 1 H), 1.47 (t, 2H), 1.84 (quin, 27H), 2.05 (quin, 5182H), 2.08 (m, 408H), 2.12 (m, 63H), 2.18 (quin, 10 H), 2.26 (quin, 29 H), 2.28 (q, 5H), 2.56 (t, 15H), 2.59 (s, 5H), 2.75 (t, 5H), 2.79 (s, 3H) ja 3.74 (t, 21H) ppm kuuluvat epäpuhtauksille ja liuottimille. Klusterin siirtymät  $\delta$  6.20 (s, 9H), 6.35 (t, 44 H), 7.07 (s, 10H) ja 7.35 (t, 42H)



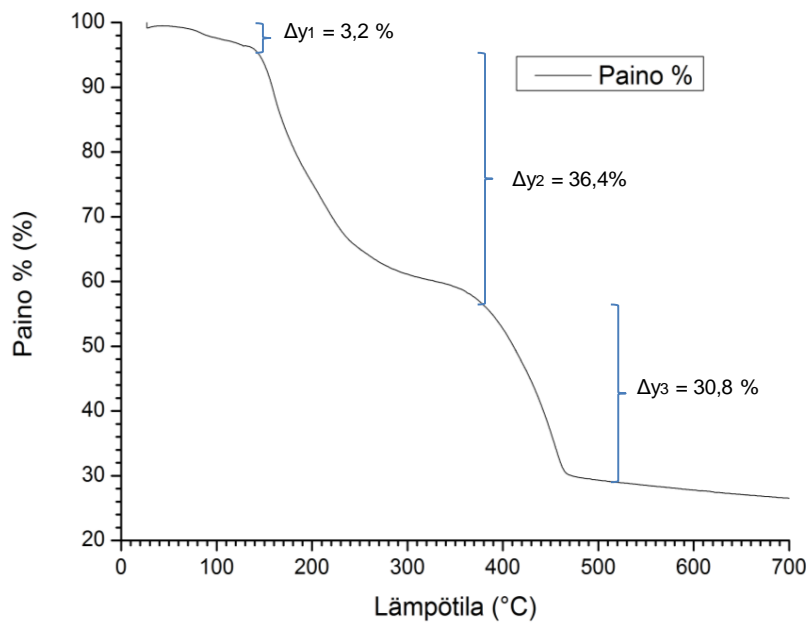
Kuva 38:  $^1\text{H}$  NMR erän A6 partikkeleille asetoni- $\text{D}_6$ :ssa 300 MHz:llä.

ppm sekä vastakationi  $\text{PPh}_4\text{Br}$ :n siirtymät  $\delta$  7.74–7.87 (m, 64H), 7.93–8.01 (m, 17H) ppm havaitaan alakentällä.

Integraalit vastaavat melko hyvin vastakationien ja klusterien keskinäistä suhdetta.  $(\text{PPh}_4)_4[\text{Ag}_{44}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{F})_{30}]$ -kompleksissa vastakationeissa on yhteensä 80 protonia ja klusterissa 120 protonia. Spektrin integraalien perusteella vastakationissa on yhteensä 81 protonia ja klusterissa 105 protonia eli suhde on oikeaa kokoluokkaa. Lisäksi klusterin ligandeista joka viides on muista ligandeista poikkeavalla tavalla ulompana klusterin ytimestä (kuva 46). Näin ollen kyseisten ligandien protonit ovat kemiallisesti erilaisissa ympäristöissä. Tästä johtuen spektrissä näkyvät myös siirtymät  $\delta$  6.20 (s, 9H) ja 7.07 (s, 10H). Integraalien suhteet tukevat tulkintaa.

### 6.3 Termovaaka-analyysi

Erän A5  $(\text{PPh}_4)_4[\text{Ag}_{44}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{F})_{30}]$ -partikkeleille tehtiin myös termovaaka-analyysi (kuva 39).



Kuva 39: Erän A5 partikkelien termovaaka-analyysi.

Ensimmäinen massan putoaminen  $\Delta y_1$  johtunee liuottimien poistumisesta.  $\Delta y_2$  ja  $\Delta y_3$  ovat seurausta orgaanisten yhdisteiden haihtumisesta. Klusteri alkaa siis hajota osittain 138 °C:ssa. Lopullinen hajoaminen alkaa 400 °C:ssa.

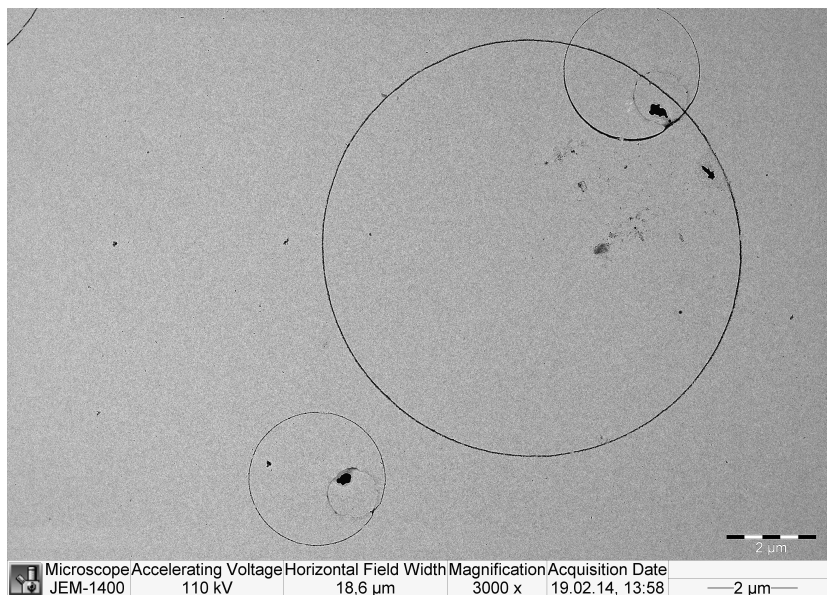
## 6.4 Lämpöelektronimikroskopia (TEM)

Näytteiden valmistuksen ja kuvantamisen suoritti Kaisa Helttunen. Kuvantamisessa käytettiin 110 kV kiihdytysjännitettä sekä hiilipäällysteistä 200 mesh kuparihiloja ja 300 mesh holey carbon -hiloja.  $(\text{PPh}_4)_4[\text{Ag}_{44}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{F})_{30}]$ -partikkelit liuotettiin dikloorimetaaniin.  $\text{Cs}_4\text{Ag}_{44}(p\text{-MBA})_{30}$ -partikkelit liuotettiin veteen pH:ssa 12. Veden pH nostettiin lisäämällä CsOH:a. Näyteliuokset pipetoitiin hiloille, jonka jälkeen hilojen annettiin kuivua.

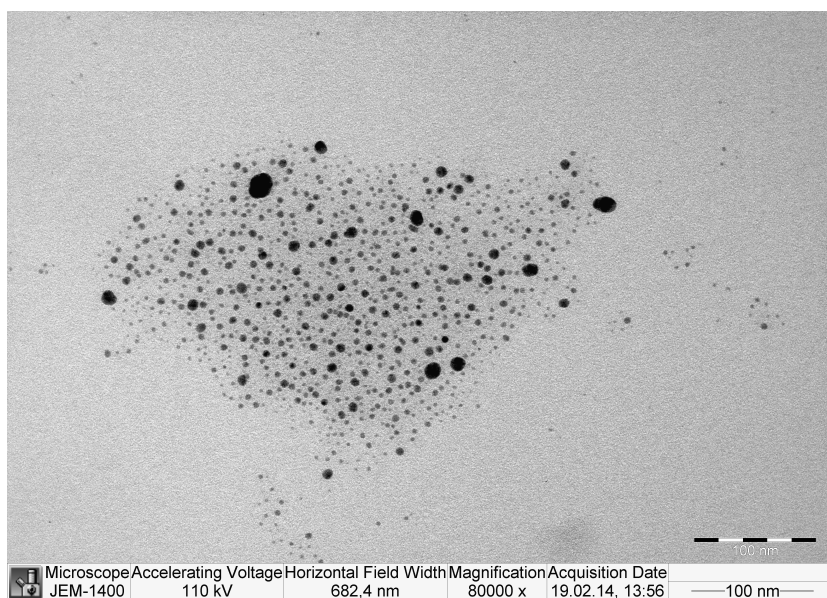
### Erän A6 4-FTP-partikkelit

Näyte liuotettiin dikloorimetaaniin ja pipetoitiin 200 mesh ja 300 mesh hiloille. Pisaroiden annettiin kuivua. Kuvan 40 perusteella klusterit olivat kasaantuneet pisaroiden kuivumisreunoille 200 mesh hilalla. Partikkelit muodostivat lisäksi yksittäisiä kasaumia (kuva 41).

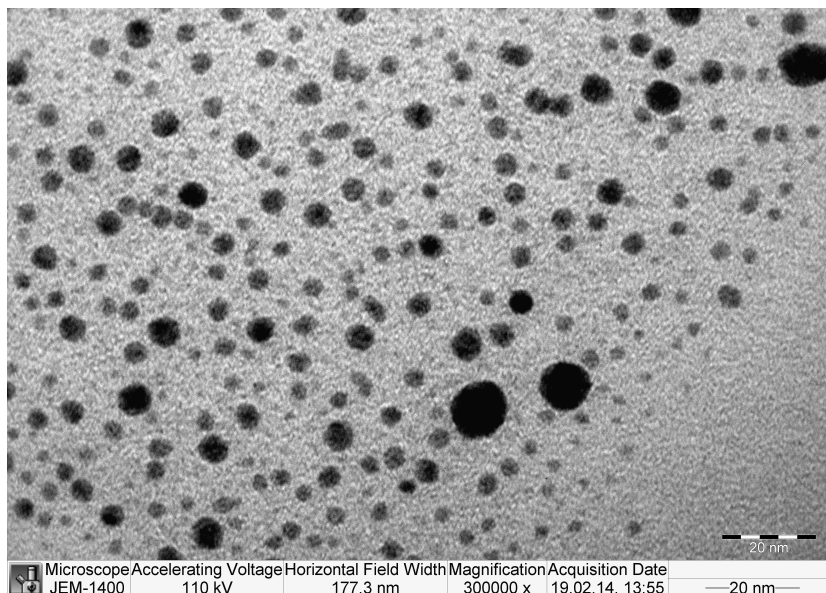
Partikkelin 44 hopea-atomin muodostaman ytimen halkaisija on 1.3 nm [3]. Kuvassa 42 näkyy paljon kokonaishalkaisijaltaan alle 4 nm:n partikkeleita, mutta myös hyvinkin erikokoisia, suurempia ryppäitä. Suuremman silmäkoon hilan (mesh 300) käyttäminen ei näytä vaikuttavan partikkelien levittäytymiseen (kuva 43).



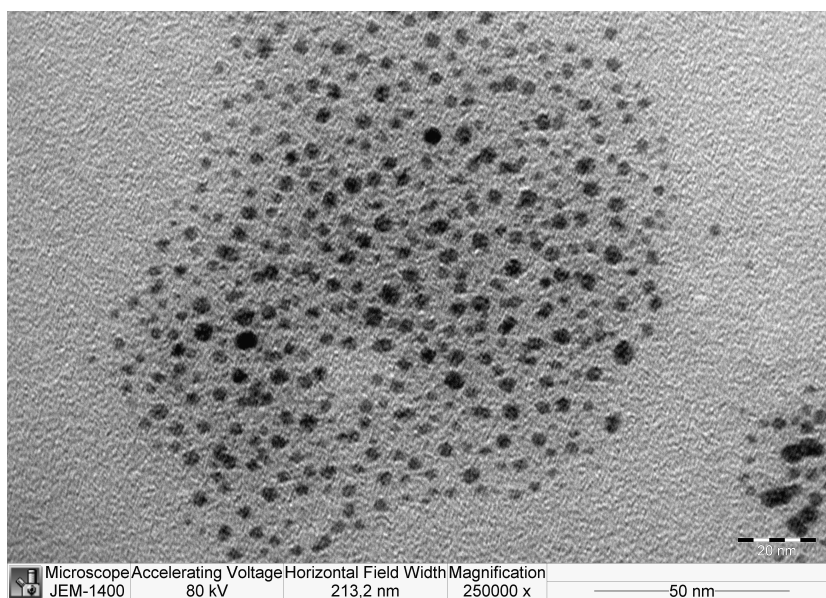
Kuva 40: Erän A6 klusterit kasaantuivat pisaroiden kuivumisreunoille.



Kuva 41: Erän A6 partikkelien muodostama kasauma.



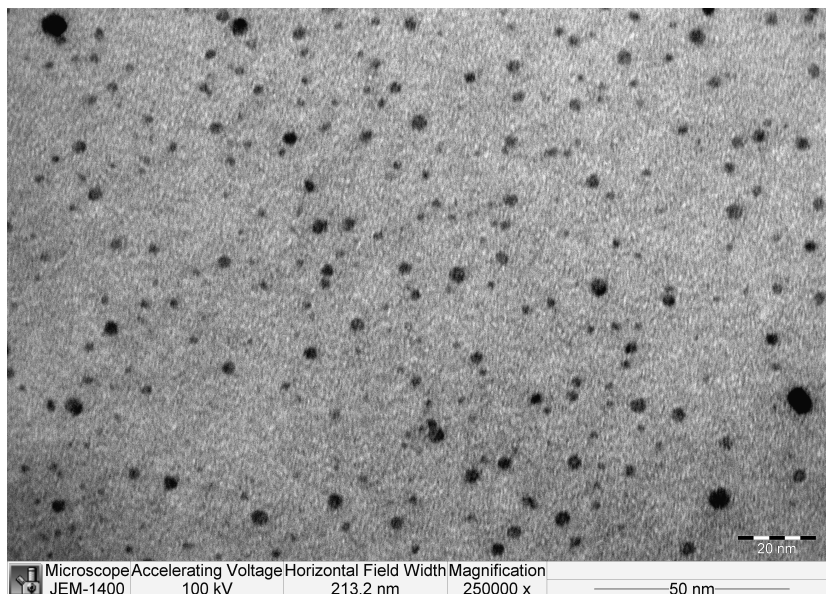
Kuva 42: Suurennus erän A6 partikkeleista 200 mesh hilalla.



Kuva 43: Erän A6 partikkeleita 300 mesh hilalla.

### Erän B6 *p*-MBA-partikkelit

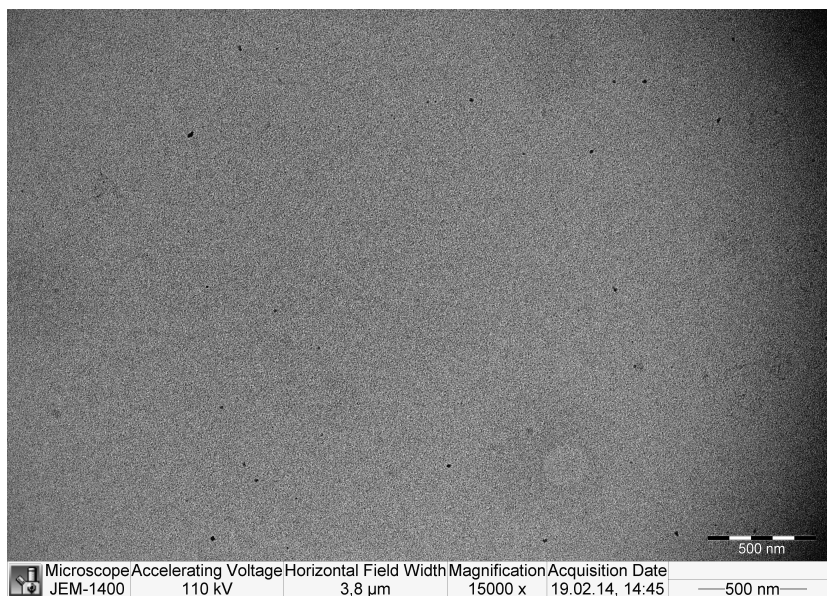
Näyte liotettiin veteen (pH 12) ja pipetoitiin 300 mesh hilalle. Pisaroiden annettiin kuivua. *p*-MBA-partikkelin hopeaytimen halkaisija on noin 1.2 nm [3]. Kuvassa 44 näkyy etupäässä kokonaishalkaisijaltaan alle 4 nm:n partikkeleita, mutta myös hieman suurempia ryppäitä.



Kuva 44: Erän B6 partikkeleita 300 mesh hilalla.

### Erän B12 *p*-MBA-partikkelit

Näyte liotettiin veteen (pH 12) ja pipetoitiin 200 mesh hilalle. Pisaroiden annettiin kuivua. Näytteestä ei saatu hyviä kuvia. Kontrasti oli todella huono ja klustereita ei näkynyt selvästi (kuva 45). Liuoksen väri näytti rusehtavalta eli klusterit olivat todennäköisesti menneet pilalle ennen TEM-näytteen valmistamista.



Kuva 45: TEM-kuva erän B12 partikkeleista.



## 7 Yhteenveto

Työn pääasiallisena tavoitteena oli valmistaa ligandisuojattuja hopeanano-partikkeleita kirjallisuudessa esitettyjen synteesien mukaisesti [1–3] ja kerätä tietoa näiden partikkelien ominaisuuksista.

Rasvaliukoisten  $(\text{PPh}_4)_4 [\text{Ag}_{44}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{F})_{30}]$ -partikkelien synteesi osoittautui melko helposti toistettavaksi ja hyvin toimivaksi. Kyseisten partikkelien synteesin avainasioiksi osoittautuivat hopeasuolan liukoisuus (erä A4) ja pelkistymisvaiheen nopeus. Saanto parani huomattavasti, kun niukkaliukoisen hopeanitraatin sijaan käytettiin hyvin liukenevaa hopeatrifluoroasettaattia. Niukkaliukoinen hopeanitraatti ei liuennut kuin kuumaan metanoliin ja luultavasti saostui sieltä osittain ulos dikloorimetaanin ja jäähauteen lisäämisen jälkeen. Hopeatrifluoroasettaatti sen sijaan liukeni huoneenlämpöiseen metanoliin hyvin nopeasti.

Pelkistymisvaihe on kuitenkin kriittisimmässä asemassa, sillä liian nopea reaktio johtaa väärän tuotteen muodostumiseen. Työssä havaittiin, että pelkistymisvaihetta hillitsevä trietyyliamiini kannattaa lisätä joko ennen natriumboorihydridiä tai samanaikaisesti sen kanssa. Pelkistymisvaiheen nopeutta pystytään havainnoimaan synteesin värinmuutosten avulla. Myös liuotinmäärät vaikuttavat jonkin verran synteesin kulkuun. Metanolin ja dikloorimetaanin suhteen tulee olla 1 : 4. Erän A5 liuottimien määrän pienentäminen nopeutti pelkistymistä ja pienensi saantoa. Liuosten säilytysolosuhteissa reaktioseoksen sentrifugoinnin jälkeen on edelleen optimoitavaa, sillä sentrifugoituihin näytteisiin alkaa muodostua hyvinkin nopeasti vaaleaa, höttöistä sakkaa. Kyseinen sakka on ilmeisesti partikkelien hajoamistuotetta, sillä liuosten absorbanssit pienenevät sakan muodostumisen myötä.

Vesiliukoisten  $\text{Cs}_4\text{Ag}_{44}(\text{p-MBA})_{30}$ -partikkelien synteesi osoittautui huomattavasti haastavammaksi. Työtä hankaloitti melkoisesti partikkelien varsin heikoksi osoittautunut stabiilisuus. Työn aikana ilmeni, että partikkelit ovat vesiliuksissa stabiileja vain pH:n 11 yläpuolella. Näin ollen partikkelien liuostilan kemia pitäisi suorittaa äärimmäisen nopeasti. Tämä estänee kyseisten partikkelien käytön biologisissa sovelluksissa. Partikkelit pilaantuvat tämän lisäksi kuivuessaan.

Prekursoriliuoksen riittävän pitkä muodostumisaika ja prekursorien liukoisuus emäslisäyksen myötä osoittautuivat niin ikään hyvin tärkeiksi seikoiksi. Yön yli hautuneiden reaktioseosten saannot ovat olleet UV/Vis-spektrien perusteella parhaita, kun prekursoriliuosta on sekoitettu 3,5 tuntia. Esimerkiksi erässä B6 prekursoriliuoksen sekoitusaika oli vain 1,5 tuntia ja saanto 52 %. Samoilla ainemäärillä tehtyä erää B7 sekoitettiin 3,5 tuntia ja saanto oli 61 %. Prekursori saadaan liukenemaan käyttämällä emäksenä nimenomaan cesiumhydroksidia.

Myös pidempi reaktioaika  $\text{NaBH}_4$ :n lisäyksen jälkeen edistää partikkelien muodostumista. Erän B9 kokeiden perusteella reaktion kannattaa edetä yön yli. 38 %:n saanto nousi tällöin 45 %:iin. Sama havainto tehtiin myös esimerkiksi erän B6 kohdalla, jolloin saanto nousi 50 %:sta 55 %:iin.

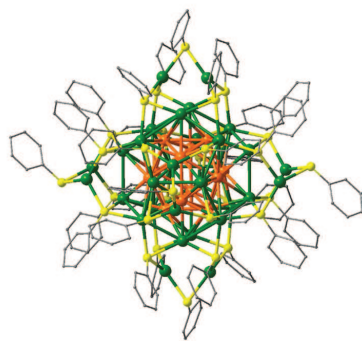
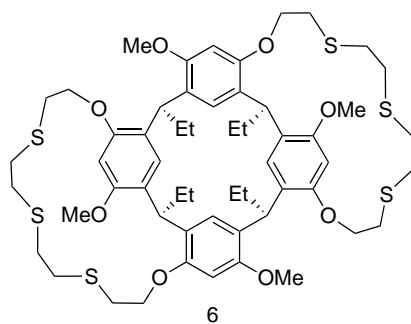
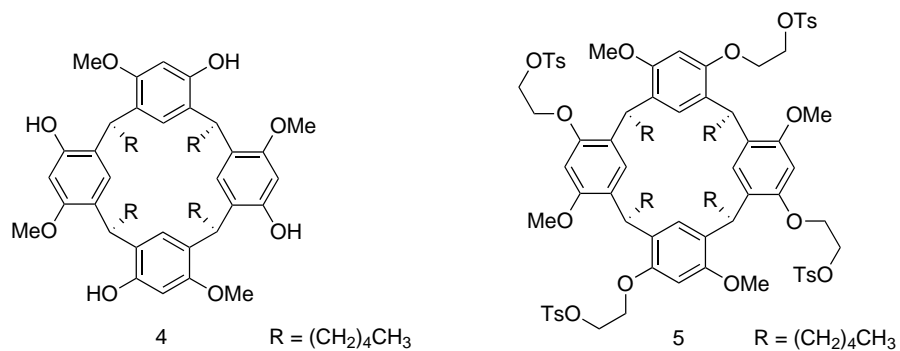
Partikkelien pitoisuus ei nouse enää käytännössä ensimmäisen yön jälkeen, joten partikkelit kannattaa saostaa tämän jälkeen. Saostettuja partikkeleita ei kannata sentrifugoida heti, vaan ennemmin usean tunnin kuluttua. Erän B9 kokeissa havaittiin, että heti sentrifugoitujen näytteiden supernatantteihin jäi vielä melko paljon nanopartikkeleita, jotka saostuivat seuraavan yön aikana. Sama havainto tehtiin myös esimerkiksi erän B10 kohdalla.

Loppuvaiheen happokäsittelyn merkitys jäi tämän työn perusteella pimentoon, sillä hapon lisäys lähinnä heikensi partikkelien stabiilisuutta entisestään. Partikkelit eivät myöskään lienneet dimetyyliformamidiin suurienkaan happolisäysten jälkeen. Synteesiohjeen artikkelin [2] mukaan partikkelien pitäisi liueta jo dimetyyliformamidin 1 %:een etikkahappoliuokseen. Saannot jäivät myös huomattavasti lähteessä esitettyjä pienemmiksi. Tämä johtunee kuitenkin pienistä ainemääristä, koska saanto paranee suurempia ainemääriä käytettäessä.

Hopeananopartikkeleiden lisäksi valmistettiin resorsinareeni-bis-tiakruunujen välituotteet alakehän viiden hiilen alkylylietjulla [5] sekä resorsinareeni-bis-tiakruunu alakehän kahden hiilen alkylylietjulla [6]. Resorsinareeni-bis-tiakruunuja yritetään tulevaisuudessa kompleksoida ligandisuojusten hopeananopartikkelien kanssa. Tosyloidun välituotteen ja bis-tiakruunun saannot (9 ja 6 %) olivat tuntemattomaksi jääneestä syystä todella huonot. Tetrame-toksiresorsinareenin synteesi sujui sen sijaan hyvin ja saanto oli kohtalaiset 35 %.

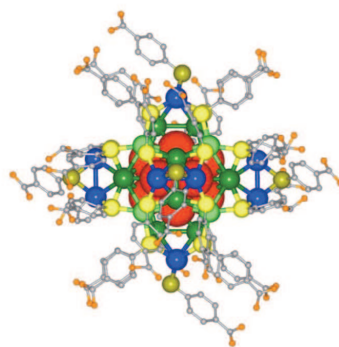
Suoritettut synteesit osoittautuivat kaiken kaikkiaan hyvinkin herkiksi prosesseiksi. Työsarkaa löytyy edelleen etenkin vesiliuokoisten partikkelien kohdalla.

## 8 Valmistetut yhdisteet



$\text{Ag}_{44}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{F})_{30}$  [1]

7



$\text{Ag}_{44}(\text{p-MBA})_{30}$  [2]

8

Kuva 46: Valmistettujen yhdisteiden rakenteet.

## Viitteet

- [1] H. Yang, Y. Wang, H. Huang, L. Gell, L. Lehtovaara, S. Malola, H. Häkkinen ja N. Zheng, "*All-thiol-stabilized Ag<sub>44</sub> and Au<sub>12</sub>Ag<sub>32</sub> nanoparticles with single-crystal structures*", *Nat. Commun.*, **2013**, *4*, 1–8.
- [2] A. Desireddy, B. E. Conn, J. Guo, B. Yoon, R. N. Barnett, B. M. Monahan, K. Kirschbaum, W. P. Griffith, R. L. Whetten, U. Landman ja T. P. Bigioni, "*Ultrastable silver nanoparticles*", *Nature*, **2013**, *501*, 399–402.
- [3] O. M. Bakr, V. Amendola, C. M. Aikens, W. Wenseleers, R. Li, L. Dal Negro, G. C. Schatz ja F. Stellacci, "*Silver Nanoparticles with Broad Multiband Linear Optical Absorption*", *Angew. Chem.*, **2009**, *121*, 6035–6040.
- [4] V. Marjomäki, T. Lahtinen, M. Martikainen, J. Koivisto, S. Malola, K. Salorinne, M. Pettersson ja H. Häkkinen, "*Site-specific targeting of enterovirus capsid by functionalized monodisperse gold nanoclusters*", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2014**.
- [5] M. J. McIldowie, M. Mocerino, B. W. Skelton ja A. H. White, "*Facile Lewis Acid Catalyzed Synthesis of C<sub>4</sub> Symmetric Resorcinarenes*", *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 3869–3871.
- [6] K. Salorinne, E. Nauha ja M. Nissinen, "*Resorcinarene Bis-Thiacrowns: Prospective Host Molecules for Silver Encapsulation*", *Chem. Asian J.*, **2012**, *7*, 809–817.
- [7] R. Bruckner, *Advanced organic chemistry: reaction mechanism*, San Diego (CA): Academic Press, 2002. 414–417.

- [8] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren ja P. Wothers, *Organic chemistry*, Oxford, UK: Oxford University Press, 2001. 420, 547–577 ja 597–598.
- [9] J. Clayden, N. Greeves ja S. Warren, *Organic chemistry*, 2nd Ed. Oxford, UK: Oxford University Press, 2012. 354–355 ja 479–480.
- [10] nanoComposix. *Silver Nanoparticles: Optical Properties*. URL: <http://nanocomposix.eu/pages/silver-nanoparticles-optical-properties> (viitattu 27.02.2014).
- [11] Cytodiagnosics. *Silver Nanoparticle Properties*. URL: [http://www.cytodiagnosics.com/silver\\_nanoparticle\\_properties.php](http://www.cytodiagnosics.com/silver_nanoparticle_properties.php) (viitattu 27.02.2014).
- [12] Y. Levi-Kalisman, P. D. Jadzinsky, N. Kalisman, H. Tsunoyama, T. Tsukuda, D. A. Bushnell ja R. D. Kornberg, "*Synthesis and Characterization of Au<sub>102</sub>(p-MBA)<sub>44</sub> Nanoparticles*", *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 2976–2982.

## Liitteet

# LIITE 1: Erän A5 ESI-MS mittaukset (1/2)

TEX-023

20.1.2014

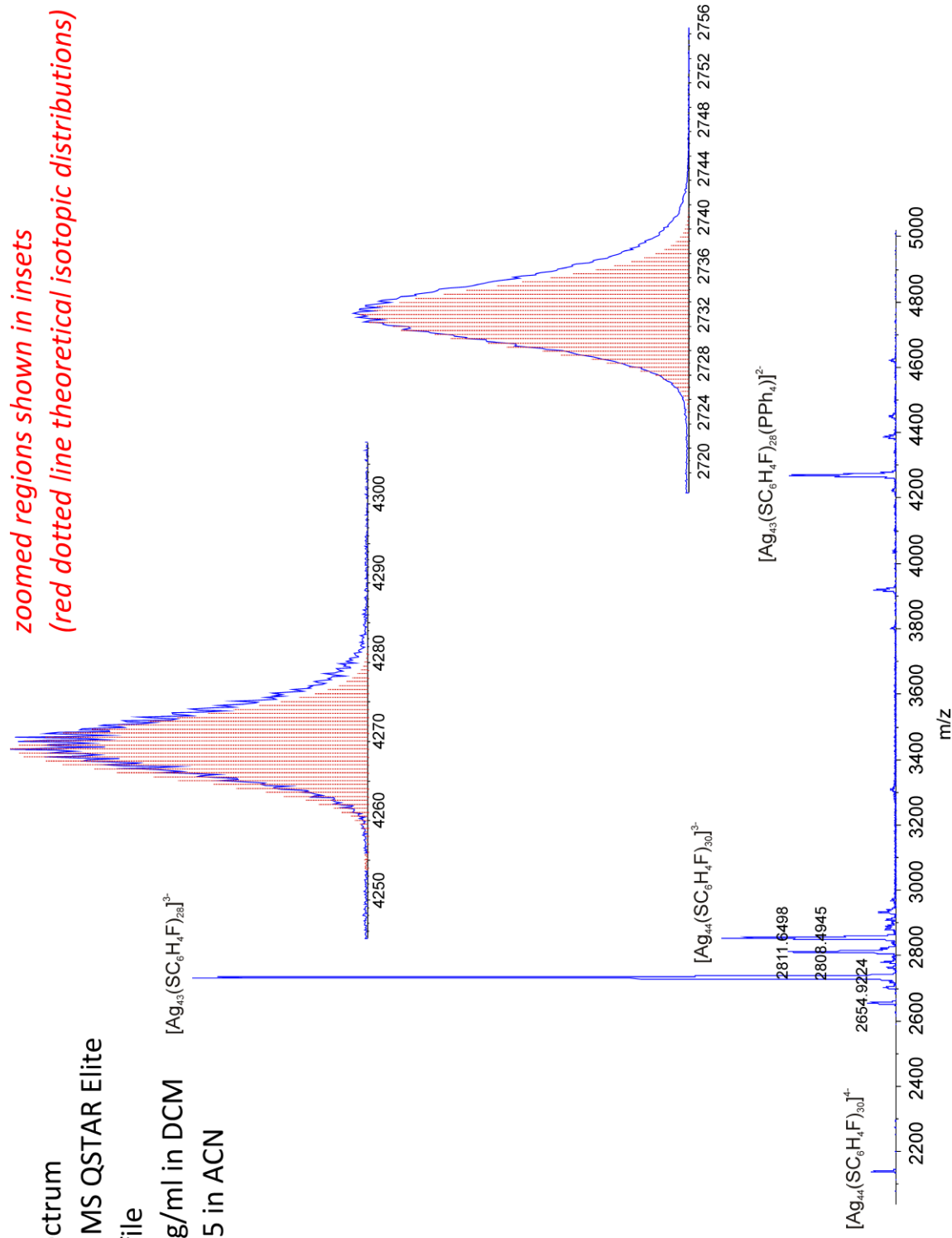
Profile spectrum

ESI-Q-TOF MS QSTAR Elite

ESI (-) profile

Stock: 1 mg/ml in DCM  $[\text{Ag}_{13}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{F})_{28}]^{3-}$

Sample: 1:5 in ACN





# LIITE 1: Erän A5 ESI-MS mittaukset (2/2)

**TEX-023**

20.1.2014

Profile spectrum

ESI-Q-TOF MS QSTAR Elite

ESI (-) profile

Stock: 1 mg/ml in DCM

Sample: 1:5 in ACN

ion	charge	composition	m/z (theor, ma)	MW (theor, Da)	m/z (exp, ma)	MW (exp, Da)	$\Delta(m/z)$	$\Delta(Da)$
[Ag <sub>44</sub> (SC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F) <sub>30</sub> ] <sup>4-</sup>	4	C <sub>180</sub> H <sub>120</sub> S <sub>30</sub> Ag <sub>44</sub> F <sub>30</sub>	2139,9684	8559,8736	2140,35	8561,384	-0,38	-1,51
[Ag <sub>42</sub> (SC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F) <sub>27</sub> ] <sup>3-</sup>	3	C <sub>162</sub> H <sub>108</sub> S <sub>27</sub> Ag <sub>42</sub> F <sub>27</sub>	2654,3525	7963,0575	2654,9224	7964,7672	-0,57	-1,71
[Ag <sub>41</sub> (SC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F) <sub>29</sub> ] <sup>3-</sup>	3	C <sub>174</sub> H <sub>116</sub> S <sub>29</sub> Ag <sub>41</sub> F <sub>29</sub>	2703,3854	8110,1562	2702,7259	8108,1777	0,66	1,98
[Ag <sub>43</sub> (SC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F) <sub>28</sub> ] <sup>3-</sup>	3	C <sub>168</sub> H <sub>112</sub> S <sub>28</sub> Ag <sub>43</sub> F <sub>28</sub>	2732,988	8198,964	2733,1357	8199,4071	-0,15	-0,44
[Ag <sub>44</sub> (SC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F) <sub>29</sub> ] <sup>3-</sup>	3	C <sub>174</sub> H <sub>116</sub> S <sub>29</sub> Ag <sub>44</sub> F <sub>29</sub>	2810,957	8432,871	2811,6498	8434,9494	-0,69	-2,08
[Ag <sub>44</sub> (SC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F) <sub>30</sub> ] <sup>3-</sup>	3	C <sub>180</sub> H <sub>120</sub> S <sub>30</sub> Ag <sub>44</sub> F <sub>30</sub>	2853,291	8559,873	2854,0201	8562,0603	-0,73	-2,19
[Ag <sub>42</sub> (SC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F) <sub>26</sub> ] <sup>2-</sup>	2	C <sub>156</sub> H <sub>104</sub> S <sub>26</sub> Ag <sub>42</sub> F <sub>26</sub>	3918,0275	7836,055	3918,5175	7837,035	-0,49	-0,98
[Ag <sub>43</sub> (SC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F) <sub>28</sub> (PPh <sub>4</sub> )] <sup>2-</sup>	2	C <sub>192</sub> H <sub>132</sub> S <sub>28</sub> Ag <sub>43</sub> F <sub>28</sub> P	4269,0474	8538,0948	4269,0416	8538,0832	0,01	0,01
[Ag <sub>44</sub> (SC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F) <sub>29</sub> (PPh <sub>4</sub> )] <sup>2-</sup>	2	C <sub>198</sub> H <sub>136</sub> S <sub>29</sub> Ag <sub>44</sub> F <sub>29</sub> P	4387,2506	8774,5012	4387,0693	8774,1386	0,18	0,36
[Ag <sub>44</sub> (SC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F) <sub>30</sub> (PPh <sub>4</sub> )] <sup>2-</sup>	2	C <sub>204</sub> H <sub>140</sub> S <sub>30</sub> Ag <sub>44</sub> F <sub>30</sub> P	4450,5016	8901,0032	4449,1873	8898,3746	1,31	2,63
[Ag <sub>46</sub> (SC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F) <sub>31</sub> (PPh <sub>4</sub> )] <sup>2-</sup>	2	C <sub>210</sub> H <sub>144</sub> S <sub>31</sub> Ag <sub>46</sub> F <sub>31</sub> P	4621,9075	9243,815	4621,0676	9242,1352	0,84	1,68

## LIITE 2: Erän A6 ESI-MS mittaukset (1/2)

TEX-026

4.2.2014

Profile spectrum

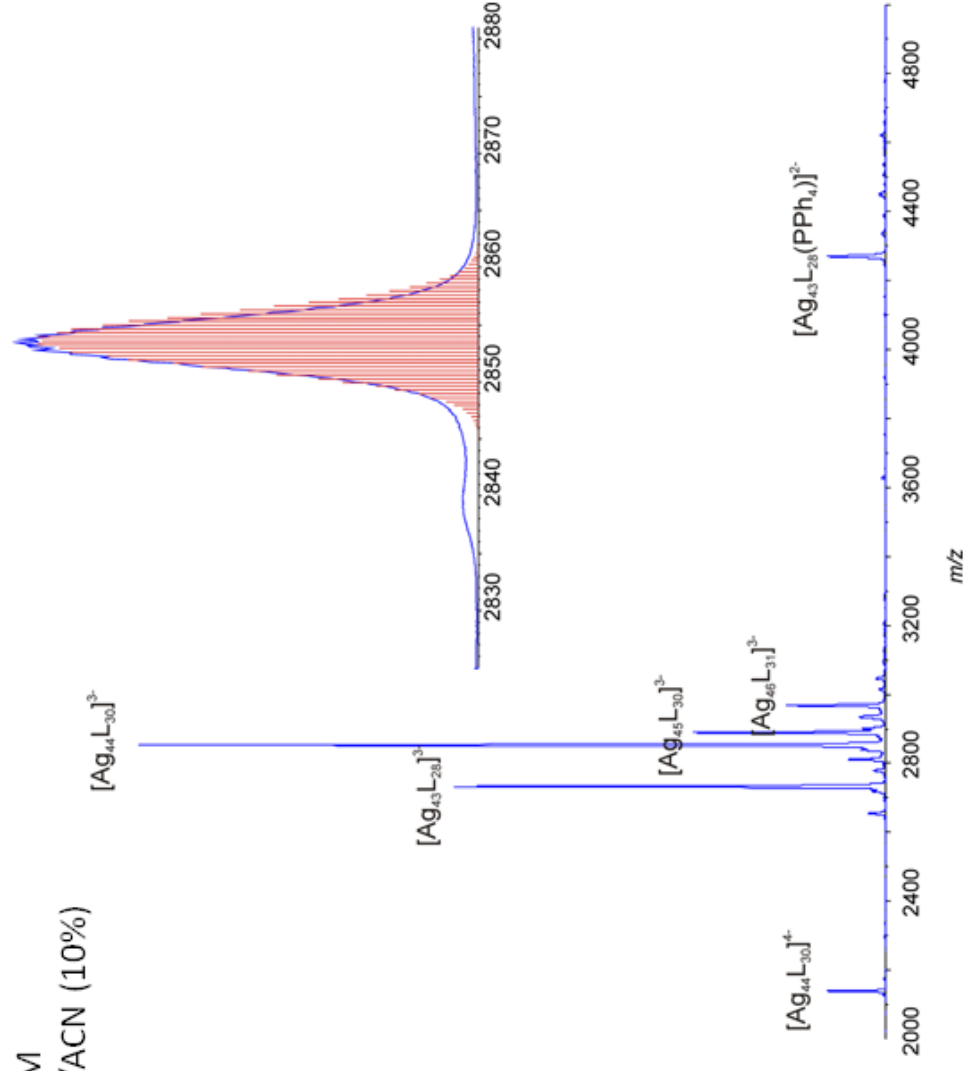
ESI-Q-TOF MS QSTAR Elite

ESI (-) profile

Stock: 1 mg/ml in DCM

Sample: 1:10 in DCM/ACN (10%)

*zoomed region shown in inset  
(red line theoretical isotopic distribution)*



## LIITE 2: Erän A6 ESI-MS mittaukset (2/2)

TEX-026

4.2.2014

Profile spectrum

ESI-Q-TOF MS QSTAR Elite

ESI (-) profile

Stock: 1 mg/ml in DCM

Sample: 1:10 in DCM/ACN (10%)

ion	charge (-)	composition	m/z (theor, ma)	MW (theor, Da)	m/z (exp, ma)	MW (exp, Da)	$\Delta$ (m/z)	% (r.l.)
$[\text{Ag}_{44}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{F})_{30}]^{4-}$	4	$\text{C}_{180}\text{H}_{120}\text{S}_{30}\text{Ag}_{44}\text{F}_{30}$	2139,9684	8559,8736	2140,32	8561,294	-0,3551	3,6
$[\text{Ag}_{43}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{F})_{28}]^{3-}$	3	$\text{C}_{168}\text{H}_{112}\text{S}_{28}\text{Ag}_{43}\text{F}_{28}$	2732,988	8198,964	2732,7661	8198,2983	0,2219	26,6
$[\text{Ag}_{44}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{F})_{29}]^{3-}$	3	$\text{C}_{174}\text{H}_{116}\text{S}_{29}\text{Ag}_{44}\text{F}_{29}$	2810,957	8432,871	2811,2417	8433,7251	-0,2847	2,3
$[\text{Ag}_{44}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{F})_{30}]^{3-}$	3	$\text{C}_{180}\text{H}_{120}\text{S}_{30}\text{Ag}_{44}\text{F}_{30}$	2853,291	8559,873	2853,4473	8560,3419	-0,1563	45,9
$[\text{Ag}_{45}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{F})_{30}]^{3-}$	3	$\text{C}_{180}\text{H}_{120}\text{S}_{30}\text{Ag}_{45}\text{F}_{30}$	2889,5926	8668,7778	2889,5382	8668,6146	0,0544	11,8
$[\text{Ag}_{46}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{F})_{31}]^{3-}$	3	$\text{C}_{186}\text{H}_{124}\text{S}_{31}\text{Ag}_{46}\text{F}_{31}$	2968,228	8904,684	2967,8368	8903,5104	0,3912	6,1
$[\text{Ag}_{43}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{F})_{28}(\text{PPH}_3)]^{2-}$	2	$\text{C}_{192}\text{H}_{132}\text{S}_{28}\text{Ag}_{43}\text{F}_{28}\text{P}$	4269,0474	8538,0948	4269,2412	8538,4824	-0,1938	3,6

## Silver Nanoparticles: Optical Properties

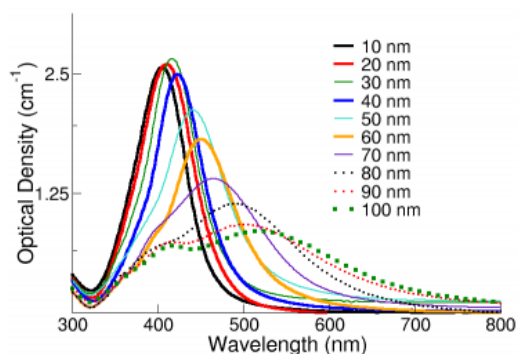
Silver nanoparticles absorb and scatter light with extraordinary efficiency. Their strong interaction with light occurs because the conduction electrons on the metal surface undergo a collective oscillation when they are excited by light at specific wavelengths. This oscillation is known as a surface plasmon resonance (SPR), and it causes the absorption and scattering intensities of silver nanoparticles to be much higher than identically sized non-plasmonic nanoparticles. Silver nanoparticle absorption and scattering properties can be tuned by controlling the particle size, shape, and the local refractive index near the particle surface.

Table of contents:

- [The Effect of Size on Optical Properties](#)
- [The Effect of Local Refractive Index on Optical Properties](#)
- [The Effect of Aggregation on Optical Properties](#)

### The Effect of Size on Optical Properties

The optical properties of spherical silver nanoparticles are highly dependent on the nanoparticle diameter. The [extinction](#) spectra of 10 sizes of [NanoXact Silver](#) nanoparticles at identical mass concentrations (0.02 mg/mL) are displayed in the figure below. Smaller nanospheres primarily absorb light and have peaks near 400 nm, while larger spheres exhibit increased scattering and have peaks that broaden and shift towards longer wavelengths (known as red-shifting).



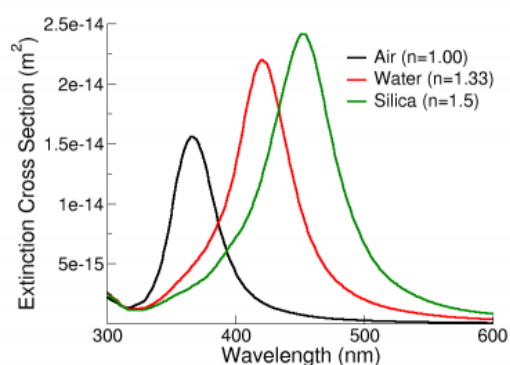
Extinction (the sum of scattering and absorption) spectra of NanoXact silver nanoparticles with diameters ranging from 10 - 100 nm at mass concentrations of 0.02 mg/mL. BioPure nanoparticles have optical densities that are 50-times larger.)

[Back to top](#)

### The Effect of Local Refractive Index on Optical Properties

Silver nanoparticle optical properties also depend on the refractive index near the nanoparticle surface. As the refractive index near the nanoparticle surface increases, the nanoparticle extinction spectrum shifts to longer wavelengths (known as red-shifting). Practically, this means that the nanoparticle extinction peak location will shift to shorter wavelengths (blue-shift) if the particles are transferred from water ( $n=1.33$ ) to air ( $n=1.00$ ), or shift to longer wavelengths if the particles are transferred to oil ( $n=1.5$ ). The figure below displays the extinction spectrum of a 50 nm silver nanosphere as the local refractive index is increased. Increasing the refractive index from 1.00 to 1.60

results in an extinction peak shift of over 90 nm, moving the peak from the ultraviolet to the visible region of the spectrum.



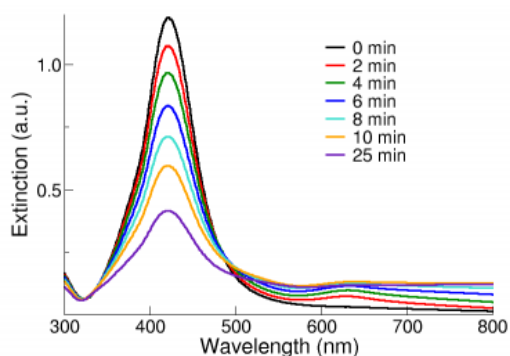
Extinction spectra of 50 nm silver nanospheres in air, water, and silica. As the refractive index of the medium increases, the nanoparticle spectrum shifts to longer wavelengths.

Similarly, the extinction peak can be tuned by coating aqueous nanoparticles with nonconducting shells including silica ( $n=1.5$ ), biomolecules ( $n=1.4-1.45$ ), or aluminium oxide ( $n=1.58-1.68$ ).

[Back to top](#)

## The Effect of Aggregation on Optical Properties

The optical properties of silver nanoparticles change when particles aggregate and the conduction electrons near each particle surface become delocalized and are shared amongst neighbouring particles. When this occurs, the surface plasmon resonance shifts to lower energies, causing the absorption and scattering peaks to red-shift to longer wavelengths. UV-Visible spectroscopy can be used as a simple and reliable method for monitoring the stability of nanoparticle solutions. As the particles destabilize, the original extinction peak will decrease in intensity (due to the depletion of stable nanoparticles), and often the peak will broaden or a secondary peak will form at longer wavelengths (due to the formation of aggregates). In the figure below, the extinction spectrum of 50 nm NanoXact silver is monitored as sodium carbonate is added to the solution (20 mM salt concentration). The rapid and irreversible change in the extinction spectrum clearly demonstrates that the nanoparticles are agglomerating. UV/Visible spectroscopy can be used as a characterization technique that provides information on whether the nanoparticle solution has destabilized over time.



Extinction spectrum of 50 nm NanoXact silver nanoparticles undergoing aggregation.

Unaggregated silver nanoparticles will have a yellow color in solution. If the particles aggregate, the solution will appear grey. Dried nanoparticles are aggregated and in nearly all cases cannot be redispersed as individual particles.

[Back to top](#)



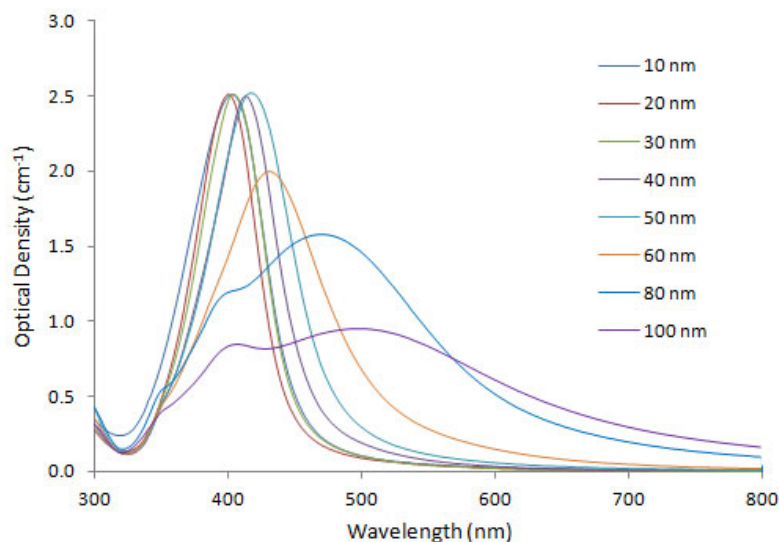


Figure 1. Silver nanoparticle size dependant surface plasmon resonance. Note the red-shift of the absorption maximum as the gold nanoparticle size increases.

The aggregation state of silver nanoparticles also has significant effect on their optical properties. This fact can be used to monitor the stability of silver nanoparticles, both over time, and upon addition of salt-containing buffers, which at high enough concentrations cause particle aggregation. As shown in the absorbance spectra in Figure 2, aggregation is indicated by a decrease in the primary peak, and an increase in the red region.

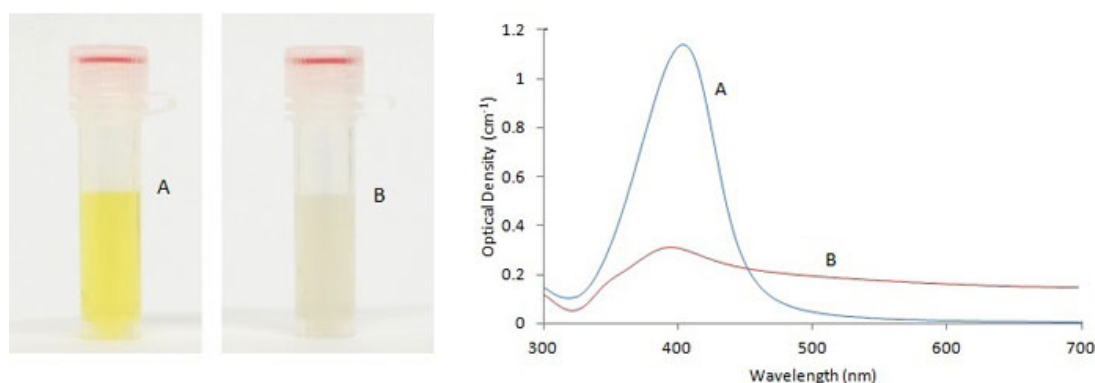


Figure 2. Visual appearance and UV-VIS spectra of monodisperse (A) and sodium chloride (NaCl) induced agglomeration (B) of 10nm silver nanoparticles.

## Comparison of Silver Nanoparticles vs. Gold Nanoparticles

Both **silver nanoparticles** and **gold nanoparticles** are commonly employed in optical detection for their surface plasmon resonance effect. The plasmon excitation efficiency of silver nanoparticles is known to be even more pronounced than that of gold nanoparticles, as shown in their stronger, sharper plasmon resonance peaks at the same particle concentration. Silver nanoparticles thus can render better sensitivity for some applications, such as localized surface plasmon resonance or surface enhanced Raman scattering detection.

Silver nanoparticles may also be advantageous over gold nanoparticles, when used in combination with fluorescence emission detection. Most fluorophores emits at a wavelength above 500 nm. However, the plasmon resonance absorbance of gold nanoparticles is primarily in the range of 500-600 nm, and hence can quench the detectable fluorescence to some extent, when the fluorescent dyes are close to the particle surface. This issue of fluorescence quenching is minimized for silver nanoparticles, as their plasmon resonance absorbance is mostly below 500 nm, with little overlapping with the emission wavelength of most fluorescent dyes. Figure 3 shows images of fluorescent gold and silver nanoparticles, labeled with the same amount of **Cyto633 fluorescent dye**. The fluorescent signal from silver is about 4 times stronger than that of gold.



Figure 3. Gold (A) and silver nanoparticles (B) surface-modified with the same amount of Cyto633 fluorescent dye.

With their different wavelengths of plasmon resonance, silver and gold nanoparticles, or particles of different size or shapes, can also be used together for multiplexed detection, taking advantage of the extended range of detection spectrum. Figure 4 shows dark field microscope images of Cytodiagnosics silver nanoparticles, gold nanoparticles and gold nano-urchins.

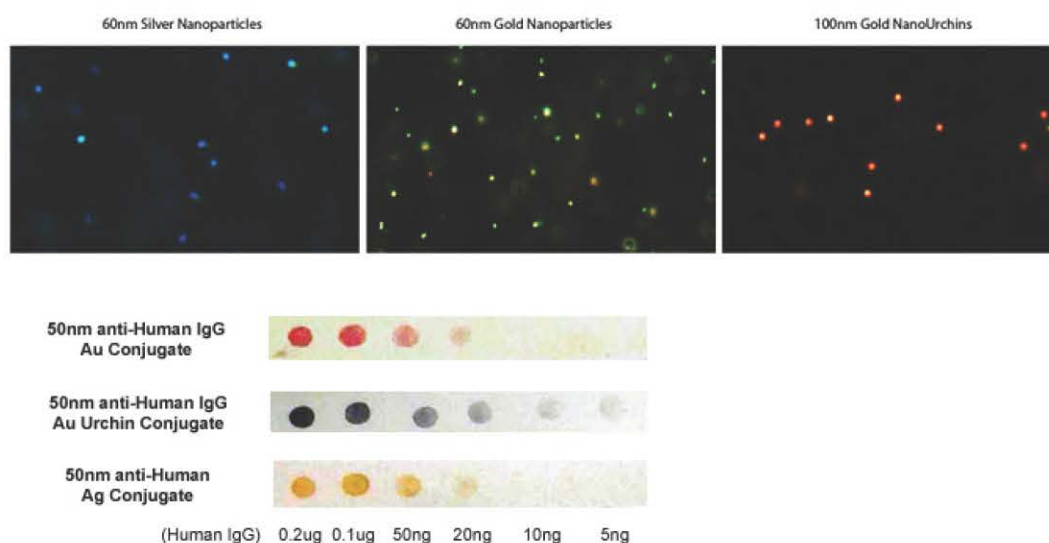


Figure 4. This image highlights the difference in appearance between silver nanoparticles, gold nanoparticles and gold nanourchins in darkfield microscopy (top) and in a immunodot blot assay (bottom).

Table I. Summary of optical and physical properties of Cytodiagnosics silver nanoparticles of various sizes.

Diameter (nm)	Peak SPR Wavelength (nm)	NPS/ml	Wt. Conc (mg/ml)	Size Dispersity (+/-nm)	Particle Volume (nm <sup>3</sup> )	Surface Area (nm <sup>2</sup> )	Surface/Volume Ratio	Particle Mass (g)	Molar Mass (g/mol)	Molar Concentration
10	390-405	~3.6E+12	2.0E-02	<18%	5.24E+02	3.14E+02	0.600	5.49E-18	3.31E+06	5.98E-09
20	390-410	~4.6E+11	2.0E-02	<15%	4.19E+03	1.26E+03	0.300	4.39E-17	2.65E+07	7.64E-10
30	400-410	~1.4E+11	2.0E-02	<15%	1.41E+04	2.83E+03	0.200	1.48E-16	8.93E+07	2.32E-10
40	405-425	~5.7E+10	2.0E-02	<15%	3.35E+04	5.03E+03	0.150	3.52E-16	2.12E+08	9.47E-11
50	410-430	~2.9E+10	2.0E-02	<12%	6.54E+04	7.85E+03	0.120	6.87E-16	4.13E+08	4.28E-11
60	425-450	~1.7E+10	2.0E-02	<12%	1.13E+05	1.13E+04	0.100	1.19E-15	7.14E+08	2.82E-11
80	440-480	~7.1E+09	2.0E-02	<12%	2.68E+05	2.01E+04	0.075	2.81E-15	1.69E+09	1.18E-11
100	480-520	~3.6E+09	2.0E-02	<10%	5.24E+05	3.14E+04	0.060	5.49E-15	3.31E+09	5.98E-12

- © 2014 Cytodiagnosics Inc.
- Privacy
- Terms
- Quality Policy
- Ordering Information
- Distributors
- Contact Us



Global Message

Quick View