

Sposób osadzania nanocząstek metalu na powierzchni w procesie elektrochemicznym, powierzchnia otrzymana tym sposobem i jej zastosowanie

Przedmiotem wynalazku jest sposób osadzania nanocząstek metalu na powierzchni w procesie elektrochemicznym, w którym wspomniana powierzchnia stanowi elektrodę pracującą i jest przynajmniej częściowo zanurzona w roztworze wodnym soli metalu, tworzącym roztwór elektrolitu, zaś wspomniane nanocząstki osadza się na wspomnianej powierzchni pod wpływem przyłożonego potencjału elektrycznego. Przedmiotem wynalazku jest także powierzchnia otrzymana tym sposobem oraz jej zastosowanie jako platformy do pomiarów powierzchniowo wzmocnionego efektu Ramana (ang. *Surface Enhanced Raman Scattering*, SERS) lub do pomiarów zlokalizowanego rezonansu plazmonów powierzchniowych (ang. *Localized Surface Plasmon Resonance*, LSPR).

Wzmocniona powierzchniowo spektroskopia Ramana, czyli SERS (ang. *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*), odkryta w 1974 roku [1] jest szybką, łatwą, niedestrukcyjną i selektywną metodą analizy jakościowej próbek. Polega ona na pomiarze intensywności światła ultrafioletowego, widzialnego oraz bliskiej podczerwieni, rozproszonego nieelastycznie na zaadsorbowanych na powierzchni podłoża cząsteczkach analitu. Wynikiem pomiaru jest widmo, które stanowi tzw. „odcisk palca” badanego związku. Okazało się, iż dzięki zastosowaniu podłoży o metalicznej, schropowanej w skali nanometrycznej powierzchni można uzyskać wzmocnienie intensywności efektywnego rozproszenia ramanowskiego o kilka rzędów wielkości ($10^2 - 10^6$, a nawet dla pewnych systemów $10^8 - 10^{15}$) [2] [3]. Jest to bardzo pożądany efekt, ponieważ można oznaczać substancje z roztworów o niskim stężeniu, co jest ważne np. w kryminalistyce lub medycynie, niemniej jednak technika SERS wykorzystywana jest w wielu innych dziedzinach nauki oraz przemysłu.

Wzmocnienie sygnału ramanowskiego zależy od wielu czynników, m.in.: chemicznego pochodzenia molekuly, częstości promieniowania wzbudzającego, ramanowskiego efektywnego przekroju czynnego, a szczególnie od rodzaju podłoża oraz stopnia chropowatości jego powierzchni, choć do dzisiaj nie jest wyjaśnione ostatecznie, na czym polega mechanizm wzmocnienia w technice SERS. Opisuje się go najczęściej dwoma mechanizmami: elektromagnetycznym (dominującym) – opartym na plazmonowym efekcie

powierzchniowym, oraz chemicznym – polegającym na przeniesieniu ładunku w obręb powierzchni metalu oraz zaadsorbowanej na niej cząsteczki.

Dla obu mechanizmów najistotniejsza jest właściwa powierzchnia podłoża, a szczególnie stopień jej schropowacenia, ponieważ występujące na niej nierówności szczególnie wpływają na efekt wzmocnienia sygnału ramanowskiego. Najbardziej odpowiednimi metalami tworzącymi powierzchnię do SERS są srebro, złoto i miedź, przy czym najlepsze efekty uzyskuje się dla srebra. Metale te, szczególnie srebro i złoto wykazują dużą stabilność, a także ich sygnały LSPRs (ang. *Localized Surface Plasmon Resonance* – zlokalizowane powierzchniowo rezonanse plazmonowe) występują w zakresie długości fal promieniowania widzialnego i bliskiej podczerwieni [4], w których obserwuje się sygnały rozproszenia Ramana.

Główne cechy jakie powinny posiadać podłoża do badań SERS to:

- powtarzalność,
- wysoki współczynnik wzmocnienia,
- jednorodność intensywności sygnału na całej powierzchni,
- stabilność w czasie,
- uniwersalność dla szerokiej grupy związków.

Istnieje szereg metod, dzięki którym uzyskuje się podłoża o wymaganych parametrach powierzchni, do analizy określonych związków lub grup związków, m.in.:

- elektrochemiczne, gdzie zachodzi modyfikacja elektrod, które są już podłożami, w określonych cyklach utleniania-redukcji (ORC),
- chemiczne trawienie, z wykorzystaniem światła lub zmian temperatury,
- nanoszenie koloidów metali, napylanie cienkich warstw metali na różnorodne powierzchnie, np. krzem, szkło, ITO,
- tworzenie matryc z wykorzystaniem litografii, np. polimerowych, o regularnych nierównościach.

Mimo ogromnej ilości publikacji naukowych oraz patentów opisujących sposoby otrzymywania podłoży sersowskich, dotychczas nie zaproponowano dobrej metody pozwalającej na produkcję podłoży, spełniających wszystkie powyższe warunki, a szczególnie powtarzalności intensywności sygnałów ramanowskich zbieranych z całej powierzchni a

także powtarzalności podłoży otrzymanych w kolejnych wykonanych seriach, dobrych dla szerokiej grupy analitów.

Początkowo, jak zostało to przedstawione w pracy [5] do otrzymania powierzchni aktywnych do badań powierzchniowo wzmacnianego efektu Ramana, wykorzystano metodę dwupulsową w celu elektroosadzenia na powierzchni ITO i węgla szklanego nanocząstek srebra i złota. Elektrolit zawierał, oprócz azotanu srebra, jony potasu oraz cyjankowe, natomiast analiza spektroskopowa otrzymanych podłoży wykazała, iż efekt wzmocnienia sygnałów pochodzi od lokalnych efektów powierzchniowych, w których główny udział biorą aglomeraty nanocząstek.

W publikacji [6] przedstawiona jest metoda dwupulsowa elektroosadzania nanocząstek srebra o określonych rozmiarach i gęstości upakowania na powierzchni szkła pokrytego warstwą przewodzącego tlenku – ITO, oraz pokazano zastosowanie tych podłoży jako platform do SERS, jednak przebieg procesu jest względnie długi (trwa ponad 1 godzinę). Ponadto, mimo stwierdzenia o powtarzalności nie zamieszczono żadnych potwierdzających ją danych, np. z przykładowej serii kilkunastu wykonanych tym sposobem podłoży, a jednorodność sygnałów wskazano tylko dla 6 miejsc losowych z 1 próbki w danych warunkach.

W publikacji [7] opisano elektrochemiczną metodę nakładania nanocząstek srebra, dzięki której można otrzymać powtarzalne i jednorodne platformy do badań SERS, o określonym upakowaniu na powierzchni, jednak badane związki to głównie neuroprzekazniki, a proces oparty jest na woltamperometrii cyklicznej.

W literaturze [8] przedstawiono metodę produkcji podłoży do badań SERS polegającą na litograficznym utworzeniu polimerowej matrycy na ITO, a następnie elektroosadzaniu na niej metali szlachetnych, m.in. srebra, jednak mimo stwierdzenia o powtarzalności nie przedstawiono stopnia jej wyników SERS, a także pomiary wzmocnienia prowadzone były tylko dla jednego analitu, a mianowicie rodaminy 6G (R6G), więc nie wiadomo nic o uniwersalności tych platform.

Kolejną publikacją opisującą otrzymywanie podłoży do SERS metodą elektrochemiczną jest [9], gdzie autorzy otrzymują powierzchnie aktywne o różnych kształtach nanocząstek złota, przy czym badają różne czasy trwania procesu

elektrochemicznego. Pomimo wykazania zalet wytworzonych podłoży, a mianowicie dobrej powtarzalności sygnałów na widmie SERS zebranych z całej powierzchni, a także z kilku kolejnych podłoży, oraz ich stabilności w czasie, nie wskazano uniwersalności tych platform dla szerszego zakresu analitów. Dodatkowo, do procesu użyto wielu substratów, a samo podłoże jeszcze przed procesem wymaga napylenia filmu ze złota, co wydłuża czas produkcji.

W publikacji [10] autorzy przedstawiają elektrochemiczną metodę otrzymania podłoży do badań SERS. Mimo, iż proces jest prosty to czas jego trwania jest długi (ponad 1 godzinę), a pokazane widma są tylko dla jednego najprostszego analitu (rodamina). Dodatkowo, widmo roztworu wspomnianego analitu o stężeniu 10^{-10} M, które to stężenie jest limitem detekcji dla tych podłoży, jest bardzo słabe, ponadto nie zamieszczono porównania z widmem samego podłoża przed nałożeniem analitu.

Istnieje ogromny zakres pozycji literaturowych na temat podłoży do badań SERS, jednak nadal pojawiają się trudności w wyprodukowaniu bardzo dobrej platformy. Można także znaleźć zgłoszenia patentowe dotyczące powyższego tematu, których kilka istotnych zostanie przedstawionych poniżej.

Główne podejście opiera się na otrzymywaniu nanocząstek (nanostruktur) w procesie ich elektroosadzania na różnych podłożach, będących elektrodami, które są następnie zanurzone w konkretnych roztworach elektrolitów. Przykładowe wynalazki US7449757(B2) „Nanostructures with electrodeposited nanoparticles”, US20080081388(A1) „Composite nanostructure apparatus and method”, US20090101996(A1) „Nanostructures with electrodeposited nanoparticles” wskazują na różne techniki, dzięki którym można otrzymywać struktury nanocząstek metali o określonych rozmiarach i kształtach. Efekty takie można uzyskać, dobierając odpowiednie parametry, np. poprzez zmianę czasu trwania procesu i stężenia reagentów, dobór impulsów przykładanego potencjału, a także dodatek substancji wspomagającej proces.

W celu uzyskania najlepszej struktury powierzchni, jest ona często modyfikowana różnymi związkami. W przykładowym wynalazku US20120010411(A1) „Modified surface” powierzchnie modyfikowane są różnymi pochodnymi organicznymi lub organometalicznymi. W innym patencie US20120208722(A1) „Surface enhanced raman spectroscopy platforms and methods” poprzez modyfikacje i immobilizacje konkretnych związków otrzymuje się

biocujniki, jak również poprzez tworzenie filmów z unieruchomionymi związkami WO2004011672(A1) „Porous nanostructures film sensor”.

W literaturze, na przestrzeni wielu lat, spotyka się dużą liczbę metod pozwalających na uzyskanie konkretnych struktur nanocząstek, m.in. do SERS. Wykorzystywano do tego m.in. związki polimerowe lub pochodne organiczne, technikę litografii i napyłania próżniowego, a także otrzymywano kilka warstw nanocząstek na powierzchni, tak jak w przykładowych wynalazkach US20120217165(A1) „Metal deposition using seed layers”, WO2012026882(A1) „Substrate for optical sensing by surface enhanced raman spectroscopy (SERS) and methods for forming the same” oraz US8093065(B2) „Microbead optical sensor with layered plasmon structure for enhanced detection of chemical groups by SERS”.

Jednak jednymi z najbardziej powszechnych metod do produkcji nanocząstek i powierzchni z nich utworzonych są techniki elektrochemiczne. W przykładowym wynalazku NL 2009442 „Method for depositing metal nanoparticles on a surface, surface fabricated with the method, and the application thereof” nanocząstki osadzone są na powierzchni metodą woltamperometrii cyklicznej. Wiele istotnych parametrów jest uwzględnianych podczas prowadzenia procesów osadzania nanocząstek, jak np. dobór odpowiedniej wartości przykładowego potencjału, stężenia reagentów lub dodatek substancji redukujących.

Jednym z najbardziej istotnych parametrów procesów otrzymywania nanocząstek jest temperatura. Ze zgłoszenia patentowego P.408785 „Sposób osadzania nanocząstek metalu na powierzchni w procesie elektrochemicznym, powierzchnia otrzymana tym sposobem i jej zastosowanie” znany jest sposób otrzymywania powierzchni do badań SERS w procesie elektrochemicznym, w którym uwzględniony jest wpływ temperatury roztworu elektrolitu. Mimo, iż wiele parametrów jest dobrze kontrolowanych, nie pokazano uniwersalności podłoży dla różnych grup związków oraz nie przedstawiono szczegółowo widma samej powierzchni przed nałożeniem analitu. A co jest najistotniejsze, stopień powtarzalności w serii oraz jednorodności nie jest zachwycający (odchylenie standardowe wynosi max. 25%).

W związku z ogromną liczbą prac naukowych przedstawiających różnorodność metod uzyskiwania platform do badań SERS można łatwo zauważyć, iż istotny jest dostęp do podłoży powtarzalnych i najlepiej uniwersalnych dla szerokiej grupy analitów. Jednak mimo

wielu ujawnionych metod elektrochemicznych, wciąż nie udaje się otrzymać powierzchni, która spełnia wszystkie wymagane do analiz parametry tzn. zdolność do wysokiego wzmocnienia sygnału ramanowskiego, jednorodnego na całej powierzchni, która będzie otrzymywana powtarzalnie.

Celem wynalazku jest zatem opracowanie nowego sposobu osadzania nanocząstek metalu na powierzchni oraz przygotowania roztworu elektrolitu w procesie elektrochemicznym, który byłby pozbawiony wspomnianych wyżej wad znanych procesów.

Sposób osadzania nanocząstek metalu na powierzchni w procesie elektrochemicznym przy użyciu elektrody pracującej, odniesienia i pomocniczej, w którym powierzchnia stanowi elektrodę pracującą i jest przynajmniej częściowo zanurzona w roztworze wodnym zawierającym jony metalu, tworzącym roztwór elektrolitu, nanocząstki osadza się na powierzchni elektrody pracującej pod wpływem przyłożonego do niej zmiennego w czasie potencjału elektrycznego, zaś przed rozpoczęciem procesu elektrochemicznego roztwór elektrolitu ogrzewany jest do temperatury w zakresie od 5°C do 80°C, zgodnie z wynalazkiem charakteryzuje się tym, że elektroda pracująca ustawiona jest pod kątem od 45° do 110° w stosunku do elektrody pomocniczej, przyłożony potencjał elektryczny jest zmienny w czasie w sposób skokowy oraz że powierzchnia aktywna na elektrodzie pracującej jest ograniczona.

Korzystnie, roztwór elektrolitu ogrzewany jest do temperatury w zakresie od 40°C do 70°C, korzystniej w temperaturze 60°C.

Korzystnie, elektroda pracująca ustawiona jest pod kątem od 80° do 100° w stosunku do elektrody pomocniczej.

Korzystnie, zmiana potencjału przebiega w zakresie od -0,8V do -1,4V, albo od -0,6V do -1,2V, albo najkorzystniej od -0,7V do -1,3V.

Korzystnie, zmiana potencjału przebiega w powtarzalnych cyklach, korzystnie trójkątnych, korzystnie o czasie trwania 10 sekund.

Korzystnie, powierzchnia aktywna na elektrodzie pracującej wynosi od 9mm² do 66mm², korzystniej od 16mm² do 30mm².

Korzystnie, elektrody umieszcza się w roztworze elektrolitu po ogrzaniu go do wymaganej temperatury, przy czym korzystnie podczas umieszczania elektrod utrzymana jest szczelność układu oraz wymagana temperatura elektrolitu.

Korzystnie, proces elektrochemiczny prowadzony jest przez czas od 1 do 20 min, korzystnie w czasie od 8 do 18 min, korzystniej przez 15 min.

Korzystnie, w trakcie procesu elektrochemicznego roztwór powoli chłodzi się o 2°C - 3°C.

Korzystnie, w trakcie procesu elektrochemicznego roztwór jest równomiernie mieszany.

Korzystnie, jako elektrodę pracującą stosuje się płytkę szklaną pokrytą przewodzącym tlenkiem, korzystnie FTO (ang. *Fluorine-doped Tin Oxide*), korzystniej ITO (ang. *Indium Tin Oxide*).

Korzystnie, sposób obejmuje mycie elektrody pracującej przed procesem elektrochemicznym, korzystnie mycie w płuczce ultradźwiękowej w rozpuszczalnikach w kolejności: aceton, izopropanol, metanol, woda destylowana, w każdym przez czas od 5 do 25 minut, korzystnie 15 minut.

Korzystnie, stosuje się elektrodę odniesienia, korzystnie w postaci elektrody srebrnej, chlorosrebrnej lub drut srebrny.

Korzystnie, stosuje się elektrodę pomocniczą, korzystnie drucik platynowy lub siatkę platynową.

Korzystnie, sposób obejmuje mycie elektrody odniesienia i elektrody pomocniczej przed procesem elektrochemicznym, korzystnie mycie w płuczce ultradźwiękowej w każdym z rozpuszczalników: metanol, woda destylowana, korzystnie w każdym przez 15 minut.

Korzystnie, jony metalu są jonami metalu wybranego z grupy obejmującej Cu, Ag, Au, Al oraz Pt.

Korzystnie, stężenie jonów metalu wynosi 0,1mM – 3mM.

Korzystnie, źródłem jonów metalu jest AgNO₃ albo HAuCl₄ o stężeniu 0,3mM.

Korzystnie, wspomniany roztwór elektrolitu zawiera dodatkowo substancję wstępnie redukującą i stabilizującą jony metalu, korzystnie sól organiczną, korzystniej sól nieorganiczną.

Korzystnie, stężenie substancji wstępnie redukującej i stabilizującej jony metalu wynosi od 1mM do 10mM.

Korzystnie, solą organiczną jest cytrynian sodu, $C_6H_5Na_3O_7$, korzystnie o stężeniu 2,6mM.

Korzystnie, solą nieorganiczną jest siarczyn sodu, Na_2SO_3 , korzystnie o stężeniu 1,3mM.

Korzystnie, sposób obejmuje dodatkowy krok oczyszczania powierzchni z zanieczyszczeń, polegający na tym, że przeprowadza się poprzez wypalenie powierzchni z naniesionymi nanocząstkami metalu w temperaturze 200°C - 220°C w czasie 2 minut, najkorzystniej w temperaturze 210°C.

Przedmiotem wynalazku jest także powierzchnia pokryta nanocząstkami, korzystnie jednorodnie, otrzymana powyższym sposobem.

Korzystnie, pole powierzchni pokrytej nanocząstkami wynosi $9mm^2 - 66mm^2$, korzystniej $16mm^2 - 30mm^2$.

Korzystnie, średnia wielkość nanocząstek na powierzchni wynosi od 50nm do 400nm.

Korzystnie, nanocząstki mają kształt kulisto-owalny.

Zgodnie z wynalazkiem, powierzchnię otrzymaną powyższym sposobem korzystnie stosuje się jako platformę do pomiarów powierzchniowo wzmocnionego efektu Ramana (ang. *Surface Enhanced Raman Scattering*, SERS) lub do pomiarów zlokalizowanego rezonansu plazmonów powierzchniowych (ang. *Localized Surface Plasmon Resonance*, LSPR).

Przedmiotem tego wynalazku jest łatwy, tani i szybki sposób nakładania nanocząstek metalu na przewodzące podłoże, oczyszczanie powierzchni otrzymanego podłoża oraz wykorzystanie otrzymanej platformy w badaniach SERS i/lub LSPR. Dużą zaletą przedstawianej metody jest krótki czas trwania procesu oraz użycie do procesu ogólnie dostępnych i bezpiecznych substratów.

Sposób według wynalazku opiera się na procesie elektrochemicznym trójelektrodowym, gdzie pod wpływem przyłożonego zmiennego potencjału i w odpowiedniej temperaturze, na elektrodę pracującą nakładane są nanocząstki metalu z roztworu elektrolitu zawierającego jony tego metalu oraz korzystnie substancję wstępnie redukującą i stabilizującą jony metalu. Nieoczekiwanie okazało się, że do otrzymania dobrych platform konieczne jest ogrzanie roztworu elektrolitu przed rozpoczęciem procesu elektrochemicznego do temperatury w zakresie od 5°C do 80°C, korzystnie od 40°C – 70°C, korzystniej 60°. Ogrzewanie roztworu wpływa korzystnie na produkcję nanocząstek oraz ich rozmiary i odpowiednie rozmieszczenie na powierzchni.

Korzystne warianty wynalazku pozwalają na uzyskanie platform, które wykazują zarówno bardzo dobrą powtarzalność w zakresie serii, a także jednorodność intensywności sygnałów z pomiarów widm sersowskich z całej powierzchni platformy. Nieoczekiwanie okazało się że chłodzenie roztworu o 2°C – 3°C w trakcie procesu wpływa korzystnie na poprawę parametrów (w tym współczynnik wzmocnienia, powtarzalność, jednorodność) otrzymanych platform. Natomiast wzrost temperatury w trakcie procesu wpływa niekorzystnie na jakość podłoża.

Innym sposobem pozwalającym na poprawę parametrów, zwłaszcza jednorodności, jest umieszczanie elektrod w roztworze elektrolitu dopiero po ogrzaniu go do wymaganej temperatury, co zapobiega długotrwałemu ogrzewaniu się i przez to degradacji powierzchni elektrody pracującej poprzez działanie wysokiej temperatury.

Powierzchnia uzyskana tym sposobem ma strukturę nanocząstek srebra, jednak, jak powszechnie wiadomo, srebro szybko ulega utlenieniu, co prowadzi to do utworzenia tlenków srebra. Zjawisko to jest niepożądane przy wykorzystaniu otrzymanej powierzchni jako platformy SERS, ze względu widoczne sygnały tlenków srebra na widmie Ramana. W wyniku tego rzetelna analiza SERS badanej substancji na tych powierzchniach jest utrudniona, ponieważ otrzymane widma mogą zawierać sygnały pochodzące od tlenków srebra. W sposobie według tego wynalazku proponuje się prostą metodę umożliwiającą oczyszczenie otrzymanego podłoża SERS ze zbędnych zanieczyszczeń przy jednoczesnym nie naruszeniu struktury powierzchni. Otrzymane według powyższej metody podłoże SERS korzystnie umieszczone jest w piecu, gdzie następuje wypalenie jego powierzchni w odpowiednio wysokiej temperaturze, korzystniej wypalenie w czasie 2 minut w

temperaturze w zakresach 200°C - 220°C, a najkorzystniej w czasie 2 minut w temperaturze 210°C.

Kolejnym korzystnym wariantem jest ograniczenie powierzchni aktywnej na elektrodzie pracującej poprzez maskowanie fotolitograficzne. Choć technika ta jest ogólnie znana [11], [12], to w tym wynalazku zoptymalizowana geometria i wymiar powierzchni pozwoliły na zdecydowaną poprawę powtarzalności wyników.

W stanie techniki, tak jak w przykładowym wynalazku P.408785 „Sposób osadzania nanocząstek metalu na powierzchni w procesie elektrochemicznym, powierzchnia otrzymana tym sposobem i jej zastosowanie”, znane jest ułożenie elektrod w procesie elektrochemicznym w taki sposób, że elektroda odniesienia znajduje się najbliżej elektrody pracującej, naprzeciw której znajduje się elektroda pomocnicza. Natomiast w opisanym powyżej sposobie według wynalazku bardzo korzystne okazało się nowe ustawienie elektrod względem siebie podczas procesu elektroosadzania, gdzie elektroda pracująca ustawiona jest pod kątem od 45° do 100° w stosunku do elektrody pomocniczej, a najkorzystniej pod kątem 80°. Pozwoliło to na poprawę wizualną podłoży a dodatkowo na wzrost jednorodności intensywności sygnałów sersowskich na powierzchni.

Częstym problemem podczas otrzymywania podłoży SERS są zanieczyszczenia, jak przykładowo w publikacji [13], pochodzące od produktów ubocznych procesu. Przy użyciu soli organicznej (cytrynian sodu) jako substancji wstępnie redukującej i stabilizującej jony metalu w roztworze reakcyjnym, losowo można zauważyć na widmach Ramana organiczne zanieczyszczenia, które utrudniają solidną analizę spektroskopową. W związku z tym korzystnym wariantem tego wynalazku jest użycie soli nieorganicznej, czyli siarczynu sodu, dzięki czemu udało się wyeliminować zanieczyszczenia organiczne, które powstawały podczas procesu. Jest już znane wykorzystanie tej substancji jako reduktora [14] jednak nie w procesie otrzymywania podłoży do SERS technikami elektrochemicznymi.

Metoda pomiaru widm SERS

Widma Ramana były rejestrowane przy pomocy przenośnego spektrometru ramanowskiego typu i-Raman (BWTEK) sprzężonego z mikroskopem typu BAC151B (BWTEK). Aparaturę cechuje dobra zdolność rozdzielcza, natomiast długość fali światła wzbudzającego

wykorzystanego w pomiarach wynosiła 785nm. Spektrometr wyposażony jest w czuły detektor CCD. Podczas badań używano obiektywu ogniskującego promień lasera na próbce o powiększeniu 50x. Widma zbierane były w czasie od 1 do 4 sekund, natomiast moc lasera stosowanego do pomiarów o długości fali 785nm wynosiła od 4mW do 8mW dla pomiarów SERS i 20mW w przypadku rejestracji normalnych widm Ramana.

Współczynnik wzmocnienia

Współczynnik wzmocnienia (ang. *Enhancement Factor*, EF) określa stosunek integralnych intensywności (intensywności w maksimum) wniesionych przez molekuly zaadsorbowane na powierzchni do integralnych intensywności wniesionych przez molekuly będące w roztworze. Definiuje się go wyrażeniem:

$$EF = (I_{SERS}/I_{RAMAN})/(N_{SERS}/N_{RAMAN})$$

gdzie:

I_{SERS} - zmierzona intensywność integralna pasma w widmie SERS molekuł

zaadsorbowanych na powierzchni,

I_{Raman} - zmierzona intensywność integralna pasma w widmie Ramana molekuł

w roztworze,

N_{SERS} - określa liczbę zaadsorbowanych molekuł „oświetlonych” światłem lasera w celu otrzymania widma SERS,

N_{Raman} - określa liczbę molekuł w roztworze „oświetlonych” światłem lasera w celu otrzymania widma Ramana.

N_{Raman} – określono korzystając z wyrażenia:

$$N_{Raman} = (V_R \times d \times N_A)/M$$

gdzie:

V_R – objętość próbkowa, wzbudzona światłem lasera, która została wyliczona dla 1M roztworu, uwzględniając cechy spektralne układu tj. linia 785nm lasera, apertura i powiększenie obiektywu, głębokość ogniskowania, oraz rozmiar plamki lasera (42 μ m),

d – gęstość badanego analitu,

N_A – liczba Avogadro równa $6,02 \times 10^{23}$,

M – masa molowa badanego analitu.

N_{SERS} - zostało oszacowane na podstawie powierzchniowego pokrycia, z założeniem, że molekuly adsorbują się na powierzchni tworząc monowarstwę, oraz rozmiaru powierzchni oświetlonej przez laser, korzystając z wyrażenia:

$$N_{SERS} = N_m \times A$$

gdzie:

N_m - liczba molekuł znajdujących się w roztworze macierzystym, użytym do adsorpcji,

A – powierzchnia oświetlona przez laser, gdzie $A = \pi \times S$, przy czym S oznacza rozmiar plamki lasera.

Jednorodność (w obrębie jednej platformy)

Jednorodność oznacza powtarzalność widm SERS rejestrowanych w różnych wybranych punktach w obrębie jednego podłoża. Określana jest na podstawie zgodności pod względem intensywności i położenia odpowiednich pasm na zebranych kolejno widmach w tych samych warunkach pomiaru. Parametr ten wyznaczany jest poprzez obliczenie wartości odchylenia standardowego intensywności charakterystycznych pasm na widmach. Za jednorodne powierzchnie uznano te, dla których wartość odchylenia standardowego nie przekracza 17%.

Powtarzalność podłoży (w obrębie kolejnych platform)

Powtarzalność podłoży oznacza powtarzalność widm SERS rejestrowanych na różnych podłożach (np. na serii 30 platform). Określana jest na podstawie zgodności pod względem intensywności i położenia odpowiednich pasm na zebranych kolejno widmach w tych samych warunkach pomiaru. Parametr ten wyznaczany jest poprzez obliczenie wartości odchylenia standardowego intensywności charakterystycznych pasm na widmach. Za

powtarzalne serie podłoży uznano te, dla których wartość średniego odchylenia standardowego nie przekracza 17%.

Korzystne przykłady wykonania wynalazku

Wynalazek zostanie przedstawiony bardziej szczegółowo w korzystnych przykładach wykonania, z odniesieniem do załączonych rysunków, gdzie:

Fig. 1 przedstawia projekt ograniczonej powierzchni aktywnej na elektrodzie pracującej przygotowanej w procesie fotolitografii,

Fig. 2 przedstawia zdjęcie powierzchni podłoża według wynalazku ze skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM), wykonane w trzech powiększeniach, fig. 2a: 10 000, fig. 2b: 25 000 i fig. 2c: 100 000 razy,

Fig. 3 przedstawia widmo ramanowskie powierzchni otrzymanej w procesie elektrochemicznym według wynalazku, wykorzystując jako substancję wstępnie redukującą i stabilizującą a) cytrynian sodu ($C_6H_5Na_3O_7$) oraz b) siarczynu sodu (Na_2SO_3),

Fig. 4 przedstawia widmo ramanowskie powierzchni SERS otrzymanej według wynalazku w procesie z użyciem cytrynianu sodu a) przed jej oczyszczeniem, b) po oczyszczeniu przez wypalenie w temperaturze 210°C przez 2 minuty,

Fig. 5 przedstawia widmo ramanowskie powierzchni SERS otrzymanej według wynalazku w procesie z użyciem siarczynu sodu a) przed jej oczyszczeniem, b) po oczyszczeniu przez wypalenie w temperaturze 210°C przez 2 minuty,

Fig. 6 przedstawia widma kwasu para-merkaptobenzoesowego (PMBA) zaadsorbowanego z roztworu 10^{-6} M na powierzchni do pomiarów SERS według wynalazku rejestrowane z 30 kolejnych podłoży,

Fig. 7 przedstawia widmo amfetaminy zaadsorbowanej z roztworu 10^{-4} M na powierzchni do pomiarów SERS według wynalazku,

Fig. 8 przedstawia widmo L-feniloalaniny zaadsorbowanej z roztworu 10^{-3} M na powierzchni do pomiarów SERS według wynalazku,

Fig. 9 przedstawia widmo bakterii Escherichia coli o stężeniu 10^9 zarejestrowanej na powierzchni do pomiarów SERS według wynalazku.

Przykład 1

Przygotowanie ograniczonej powierzchni aktywnej na elektrodzie pracującej w procesie fotolitografii

Na wyczyszczonej płytce ITO, poprzez umycie w płuczce ultradźwiękowej kolejno w każdym z rozpuszczalników po 15 minut: aceton, izopropanol, metanol, woda, i osuszenie jej strumieniem azotu, naniesiono fotorezyst typu AZ ECI 3027 i wirowano przez 1 minutę z prędkością 4000 rpm, aż do uzyskania grubości $1,7\mu\text{m}$. Następnie warstwę fotorezystu wygrzano przez 90 sekund w temperaturze 90°C , po czym naświetlono ją 3 razy po 12 sekund z przerwą pomiędzy naświetleniami po 20 sekund, promieniowaniem UV przez przygotowaną przez nas maskę o określonej geometrii i powierzchni, i kolejny raz wygrzano ją przez 90 sekund w temperaturze 110°C . Tak naświetlony fotorezyst usunięto w wywoływaczu a niezabezpieczoną warstwę ITO strawiono w mieszaninie $\text{HCl}:\text{FeCl}_3:\text{H}_2\text{O}$ w stosunku objętościowym 1:3:1 w temperaturze 60°C . Proces trawienia wykonywano aż do całkowitego usunięcia warstwy ITO co kontrolowano mierząc przewodnictwo, a następnie umyto w wodzie destylowanej a pozostałą warstwę fotorezystu usunięto acetonem. Na koniec płytkę umyto w roztworze wodnym 20% etanoloaminy przez 30 minut w temperaturze 85°C i kilkakrotnie w wodzie destylowanej, po czym ją wysuszono.

W ogólności może być używany fotorezyst pozytywowy.

W ogólności fotorezyst może być wirowany w czasie od 40 do 80 sekund.

W ogólności fotorezyst może być wirowany z prędkością od 2000rpm do 5000rpm.

W ogólności fotorezyst może być naświetlany od 1 do 5 razy, w czasie od 5 do 20 sekund, z przerwą pomiędzy naświetleniami od 10 do 30 sekund.

Tak przygotowana płytka ITO, o ograniczonej powierzchni aktywnej stanowi elektrodę pracującą, w tym przypadku o powierzchni 20mm^2 .

Projekt takiej powierzchni przedstawiony jest na Fig. 1.

Przykład 2

Otrzymanie powierzchni z elektroosadzonymi nanocząstkami srebra z wykorzystaniem cytrynianu sodu ($C_6H_5Na_3O_7$)

Przygotowany wodny roztwór elektrolitu, zawierający azotan srebra o stężeniu 0,3mM oraz cytrynian sodu o stężeniu 2,6mM, ogrzano do temperatury 60°C. Utrzymywanie jednostajnego mieszania, wartości temperatury oraz szczelności układu należy kontrolować przez cały proces nakładania nanocząstek. Po osiągnięciu odpowiedniej temperatury, po uprzednim oczyszczeniu i wysuszeniu, w naczynku elektrochemicznym umieszczono trzy elektrody w ułożeniu takim, że elektroda pracująca, czyli przygotowana wcześniej w procesie fotolitografii płytka ITO o ograniczonej powierzchni aktywnej, ustawiona była pod kątem od 80° do 100° w stosunku do elektrody pomocniczej (siatka platynowa) a elektroda odniesienia (drucik srebrny) znajdowała się najbliżej elektrody pracującej. Następnie do elektrody pracującej przyłożono potencjał zmienny w czasie w taki sposób, że zmiana potencjału przebiegała skokowo od wartości -0,7V do -1,3V, po czym następował powrót do wartości -0,7V, a każdy taki cykl zmian (skok) trwał 10 sekund i powtarzał się przez okres trwania całego procesu, czyli przez 15 minut. Otrzymane podłoże z elektroosadzonymi nanocząstkami srebra przemyto wodą destylowaną oraz pozostawiono do wyschnięcia.

Uzyskano podłoża o regularnej, chropowatej strukturze, z kulisto-owalnymi nanocząstkami o wymiarach 50 – 400 nm, stabilne w czasie.

W ogólności zakres potencjałów przykładanych do elektrody pracującej może wynosić od -0,8V do -1,4V oraz -0,6V do -1,2V.

Zdjęcie SEM powierzchni przygotowanej w taki sposób przedstawione jest na Fig. 2.

Przykład 3

Otrzymanie powierzchni z elektroosadzonymi nanocząstkami srebra z wykorzystaniem siarczynu sodu (Na_2SO_3)

Przygotowany wodny roztwór elektrolitu, zawierający azotan srebra o stężeniu 0,3mM oraz siarczyn sodu o stężeniu 1,3mM, ogrzano do temperatury 60°C. Utrzymywanie jednostajnego mieszania, wartości temperatury oraz szczelności układu należy kontrolować

przez cały proces nakładania nanocząstek. Po osiągnięciu odpowiedniej temperatury, po uprzednim oczyszczeniu i wysuszeniu, w naczynku elektrochemicznym umieszczono trzy elektrody w ułożeniu takim, że elektroda pracująca, czyli przygotowana wcześniej w procesie fotolitografii płytka ITO o ograniczonej powierzchni aktywnej, ustawiona była pod kątem od 80° do 100° w stosunku do elektrody pomocniczej (siatka platynowa) a elektroda odniesienia (drucik srebrny) znajdowała się najbliżej elektrody pracującej. Następnie do elektrody pracującej przyłożono potencjał zmienny w czasie w taki sposób, że zmiana potencjału przebiegała skokowo od wartości $-0,7V$ do $-1,3V$, po czym następował powrót do wartości $-0,7V$, a każdy taki cykl zmian (skok) trwał 10 sekund i powtarzał się przez okres trwania całego procesu, czyli przez 15 minut. Otrzymane podłoże z elektroosadzonymi nanocząstkami srebra przemyto wodą destylowaną oraz pozostawiono do wyschnięcia.

Uzyskano podłoża o regularnej, chropowatej strukturze, z kulisto-owalnymi nanocząstkami o wymiarach $50 - 400$ nm, stabilne w czasie.

W ogólności zakres potencjałów przykładanych do elektrody pracującej może wynosić od $-0,8V$ do $-1,4V$ oraz $-0,6V$ do $-1,2V$.

Na widmie Ramana powierzchni uzyskanej tym sposobem nie zauważamy sygnałów należących do produktów ubocznych procesu, które możemy sporadycznie wykryć przy procesie z użyciem cytrynianu sodu, tak jak jest to pokazane na Fig. 3.

Przykład 4

Oczyszczenie otrzymanej powierzchni z elektroosadzonymi nanocząstkami srebra

Otrzymaną powierzchnię z nanocząstkami srebra umieszczono w piecu rurowym, gdzie wypalono ją przez 2 minuty w temperaturze $210^\circ C$.

Tak przygotowana i oczyszczona powierzchnia stanowi podłoże do badań SERS, a widma ramanowskie takich powierzchni przedstawiono na Fig. 4 i Fig. 5.

Przykład 5

Otrzymanie powierzchni z elektroosadzonymi nanocząstkami złota

Przygotowany wodny roztwór elektrolitu, zawierający kwas tetrachlorozłotowy o stężeniu 0,3mM oraz cytrynian sodu o stężeniu 2,6mM lub siarczyn sodu o stężeniu 1,3mM, ogrzano do temperatury 60°C. Utrzymywanie jednostajnego mieszania, wartości temperatury oraz szczelności układu należy kontrolować przez cały proces nakładania nanocząstek. Po osiągnięciu odpowiedniej temperatury, po uprzednim oczyszczeniu i wysuszeniu, w naczynku elektrochemicznym umieszczono trzy elektrody w ułożeniu takim, że elektroda pracująca, czyli przygotowana wcześniej w procesie fotolitografii płytka ITO o ograniczonej powierzchni aktywnej, ustawiona była pod kątem od 80° do 100° w stosunku do elektrody pomocniczej (siatka platynowa) a elektroda odniesienia (chlorosrebrowa) znajdowała się najbliżej elektrody pracującej. Następnie do elektrody pracującej przyłożono potencjał zmienny w czasie w taki sposób, że zmiana potencjału przebiegała cyklicznie w zakresie wartości $-0,8V \div 0,5V$, w ilości 25 cykli z prędkością 100mV/s. Otrzymane podłoże z elektroosadzonymi nanocząstkami złota przemyto wodą destylowaną oraz pozostawiono do wyschnięcia.

W ogólności ilość cykli zmian potencjałów przyłożonych do elektrody pracującej może wynosić od 10 do 30 cykli, z prędkością od 80 do 140 mV/s.

Tak przygotowana powierzchnia stanowi podłoże do badań SERS.

Przykład 6

Otrzymanie powierzchni z elektroosadzonymi nanocząstkami złota na warstwie elektroosadzonych nanocząstek srebra (hybryda)

Przygotowany wodny roztwór elektrolitu, zawierający azotan srebra o stężeniu 0,3mM oraz cytrynian sodu o stężeniu 2,6mM lub siarczyn sodu o stężeniu 1,3mM, ogrzano do temperatury 60°C. Utrzymywanie jednostajnego mieszania, wartości temperatury oraz szczelności układu należy kontrolować przez cały proces nakładania nanocząstek. Po osiągnięciu odpowiedniej temperatury, po uprzednim oczyszczeniu i wysuszeniu, w naczynku elektrochemicznym umieszczono trzy elektrody w ułożeniu takim, że elektroda pracująca, czyli przygotowana wcześniej w procesie fotolitografii płytka ITO o ograniczonej powierzchni aktywnej, ustawiona była pod kątem od 80° do 100° w stosunku do elektrody pomocniczej (siatka platynowa) a elektroda odniesienia (druć srebrny) znajdowała się najbliżej elektrody pracującej. Następnie do elektrody pracującej przyłożono potencjał zmienny w czasie w taki

sposób, że zmiana potencjału przebiegała skokowo od wartości $-0,7V$ do $-1,3V$, po czym następował powrót do wartości $-0,7V$, a każdy taki cykl zmian (skok) trwał 10 sekund i powtarzał się przez okres trwania całego procesu, czyli przez 15 minut. Otrzymane podłoże z elektroosadzonymi nanocząstkami srebra przemyto wodą destylowaną oraz pozostawiono do wyschnięcia.

Następnie w wodnym roztworze elektrolitu, zawierającym kwas tetrachlorozłotowy o stężeniu $0,3mM$ oraz cytrynian sodu o stężeniu $2,6mM$ lub siarczyn sodu o stężeniu $1,3mM$ umieszczono tak przygotowaną powierzchnię z nanocząstkami srebra jako elektrodę pracującą w ułożeniu takim, że elektroda ta ustawiona była pod kątem od 80° do 100° w stosunku do elektrody pomocniczej (siatka platynowa) a elektroda odniesienia (chlorosrebrowa) znajdowała się najbliżej elektrody pracującej. Następnie do elektrody pracującej przyłożono potencjał stały w czasie o wartości $-0,3V$ przez 400 sekund. Otrzymane podłoże z elektroosadzonymi nanocząstkami złota na warstwie nanocząstek srebra przemyto wodą destylowaną oraz pozostawiono do wyschnięcia.

W ogólności zakres potencjałów przykładanych do elektrody pracującej przy elektroosadzaniu nanocząstek srebra może wynosić od $-0,8V$ do $-1,4V$ oraz $-0,6V$ do $-1,2V$.

W ogólności wartość stałego potencjału przykładanego do elektrody pracującej w celu naniesienia warstwy nanocząstek złota może wynosić od $-0,5V$ do $-0,2V$, w czasie od 300 do 500 sekund.

Tak przygotowana powierzchnia stanowi podłoże do badań SERS.

Przykład 7

Widma Ramana powierzchni do badań SERS

Powierzchnię SERS zbadano za pomocą spektroskopii ramanowskiej i rejestrowano widma ramanowskie z kilkunastu losowych miejsc z tej powierzchni. Pomiary wykonano w warunkach: laser o linii wzbudzającej 785 nm i mocy 20 mW , o czasie akumulacji 4 sekund.

Wszystkie widma były prawie identyczne, natomiast przykładowe dla powierzchni z nanocząstkami srebra i złota przedstawiono na Fig. 3, Fig. 4 i Fig. 5.

Przykład 8

Widma SERS kwasu para-merkaptobenzoesowego (PMBA)

Do roztworu analitu kwasu para-merkaptobenzoesowego o stężeniu 10^{-6} M zanurzono kolejnych 30 powierzchni SERS. Następnie podłoża wysuszono i na każdym zarejestrowano po kilkanaście widm ramanowskich z różnych punktów powierzchni. Fig. 6 przedstawia 30 widm zaadsorbowanego analitu, uśrednionych dla każdej powierzchni, odpowiednio dla 30 kolejnych podłoży.

Rejestrowane widma wykazywały bardzo dobrą powtarzalność. Pasma charakterystyczne dla kwasu para-merkaptobenzoesowego (1078 i 1590 cm^{-1}) były widoczne i bardzo intensywne na każdym widmie, co potwierdza jednorodność i powtarzalność sygnałów na powierzchni SERS według tego wynalazku. Oszacowano także współczynnik wzmocnienia (EF) według definicji powyżej dla kwasu para-merkaptobenzoesowego, który jest rzędu 10^5 - 10^6 .

Przykład 9

Widmo SERS amfetaminy

Do roztworu analitu amfetaminy o stężeniu 10^{-4} M zanurzono powierzchnię SERS. Następnie podłoże wysuszono i zarejestrowano widma ramanowskie. Fig. 7 przedstawia przykładowe widmo zaadsorbowanego analitu.

Rejestrowane widma wykazywały dobrą powtarzalność. Główne pasma charakterystyczne dla amfetaminy (1001 i 1029 cm^{-1}) były dobrze widoczne na każdym widmie. Dodatkowo można zauważyć dużo słabsze pasma przy przesunięciach 838 , 950 , 1205 , 1605 cm^{-1} .

Przykład 10

Widmo SERS L-feniloalaniny

Do roztworu analitu L-feniloalaniny o stężeniu 10^{-3} M zanurzono powierzchnię SERS. Następnie podłoże wysuszono i zarejestrowano widma ramanowskie. Fig. 8 przedstawia przykładowe widmo zaadsorbowanego analitu.

Rejestrowane widma wykazywały dobrą powtarzalność. Główne pasma charakterystyczne dla L-feniloalaniny (1001 i 1029 cm^{-1}) były dobrze widoczne na każdym widmie. Dodatkowo można zauważyć dużo słabsze pasma przy przesunięciach 620 , 1200 , 1602 cm^{-1} .

Przykład 11

Widmo SERS bakterii *Escherichia coli*

Roztwór bakterii *Escherichia coli* o stężeniu 10^9 naniesiono na powierzchnię SERS. Następnie zarejestrowano widma ramanowskie. Fig. 9 przedstawia przykładowe widmo mierzonej substancji.

Rejestrowane widma wykazywały dobrą powtarzalność. Główne pasmo charakterystyczne dla *E. coli* (729 cm^{-1}) było dobrze widoczne na każdym widmie. Dodatkowo można zauważyć pasma o mniejszej intensywności przy przesunięciach 570 , 650 , 954 , 1093 , 1332 cm^{-1} .

Bibliografia

Odnośniki numeryczne w nawiasach kwadratowych odnoszą się do następujących pozycji:

- [1] M. Fleischmann, P. J. Hendra, and A. J. McQuillan, "Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 26, no. 2, pp. 163–166, May 1974.
- [2] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 78, no. 9, pp. 1667–1670, Mar. 1997.
- [3] S. Nie and S. R. Emory, "Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering," *Science*, vol. 275, no. 5303, pp. 1102–1106, Feb. 1997.
- [4] B. Sharma, R. R. Frontiera, A.-I. Henry, E. Ringe, and R. P. Van Duyne, "SERS: Materials, applications, and the future," *Mater. Today*, vol. 15, no. 1–2, pp. 16–25, Jan. 2012.
- [5] W. Plieth, H. Dietz, A. Anders, G. Sandmann, A. Meixner, M. Weber, and H. Kneppel, "Electrochemical preparation of silver and gold nanoparticles: Characterization by

- confocal and surface enhanced Raman microscopy," *Surf. Sci.*, vol. 597, no. 1–3, pp. 119–126, Dec. 2005.
- [6] J.-C. Bian, Z. Li, Z.-D. Chen, H.-Y. He, X.-W. Zhang, X. Li, and G.-R. Han, "Electrodeposition of silver nanoparticle arrays on ITO coated glass and their application as reproducible surface-enhanced Raman scattering substrate," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 258, no. 5, pp. 1831–1835, Dec. 2011.
- [7] M. Siek, A. Kaminska, A. Kelm, T. Rolinski, R. Holyst, M. Opallo, and J. Niedziolka-Jonsson, "Electrodeposition for preparation of efficient surface-enhanced Raman scattering-active silver nanoparticle substrates for neurotransmitter detection," *Electrochimica Acta*, vol. 89, pp. 284–291, Feb. 2013.
- [8] S. Wang, L.-P. Xu, Y. Wen, H. Du, S. Wang, and X. Zhang, "Space-confined fabrication of silver nanodendrites and their enhanced SERS activity," *Nanoscale*, vol. 5, no. 10, pp. 4284–4290, May 2013.
- [9] S. Choi, M. Ahn, and J. Kim, "Highly reproducible surface-enhanced Raman scattering-active Au nanostructures prepared by simple electrodeposition: Origin of surface-enhanced Raman scattering activity and applications as electrochemical substrates," *Anal. Chim. Acta*, vol. 779, pp. 1–7, May 2013.
- [10] J.-C. Bian, Z.-D. Chen, Z. Li, F. Yang, H.-Y. He, J. Wang, J. Z. Y. Tan, J.-L. Zeng, R.-Q. Peng, X.-W. Zhang, and G.-R. Han, "Electrodeposition of hierarchical Ag nanostructures on ITO glass for reproducible and sensitive SERS application," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 258, no. 17, pp. 6632–6636, Jun. 2012.
- [11] S. E. Lyshevski, "Nano- and Micro-Electromechanical Systems", CRC Press, Second Edition, Jan. 2005.
- [12] E. Rozniecka, M. Jonsson-Niedziolka, A. Celebanska, J. Niedziolka-Jonsson, M. Opallo, "Selective electrochemical detection of dopamine in a microfluidic channel on carbon nanoparticulate electrodes", *Analyst*, vol. 139, pp. 2896-2903, 2014.
- [13] K. L. Norrod, K. L. Rowlen, "Removal of carbonaceous contamination from SERS-active silver by self-assembly of decanethiol", *Anal. Chem.*, vol. 70, pp. 4218-4221, 1998.

[14] J. V. Goshu, Yu. V. Tsarev, V. V. Kostrov, "Sewage treatment for chromium(VI) disposal by combined reduction with sodium sulfite in the presence of solid adsorbents", *Catalysis in Industry*, vol. 2, no. 2, pp. 126-130, 2010.

Podziękowanie

Badania wykonano w ramach projektu współfinansowanego ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach Programu Badań Stosowanych (PBS2/A1/8/2013).

Twórcy pragną podziękować za współpracę Centralnemu Laboratorium Kryminalistycznemu Policji w Warszawie.