

Istraživanje interakcija pirenskog derivata poliamina spektroskopijom površinski pojačanog Ramanova raspršenja

Hudika, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:617640>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-14**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Petra Hudika

**Istraživanje interakcija pirenskog derivata
poliamina s dvolančanim polinukleotidima
spektroskopijom površinski pojačanog
Ramanova raspršenja**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistra kemije

Zagreb, 2021. godina

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

Veliko hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Adriani Kendel na odabiru teme, ugodnoj radnoj atmosferi, utrošenom trudu i vremenu, stručnim savjetima i prijedlozima te velikom strpljenju koje mi je pružila tokom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala svim kolegicama i kolegama koji su olakšali i uljepšali sve godine studiranja.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na pruženoj podršci, razumjevanju i strpljenju tokom studiranja.

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Nukleinske kiseline.....	3
2.1.2. <i>Građa nukleinskih kiselina.....</i>	<i>4</i>
2.1.3. <i>Vrste nukleinskih kiselina i njihova funkcija.....</i>	<i>7</i>
2.2. Male molekule koje se vežu u nukleinske kiseline.....	8
2.2.1. <i>Interkalatori</i>	<i>8</i>
2.2.2. <i>Molekule koje se vežu u utore</i>	<i>11</i>
2.2.3. <i>Metode istraživanja interakcija malih molekula s DNA</i>	<i>13</i>
2.3. Površinski pojačano Ramanovo raspršenje.....	13
2.3.1. <i>Ramanova spektroskopija</i>	<i>13</i>
2.3.2. <i>Spektroskopija površinski pojačanog Ramanova raspršenja (SERS)</i>	<i>15</i>
2.3.2.1. <i>Povijest</i>	<i>15</i>
2.3.2.2. <i>Metalni supstrati.....</i>	<i>16</i>
2.3.2.3. <i>Teorije</i>	<i>17</i>
2.3.2.4. <i>Izborna pravila.....</i>	<i>18</i>
2.3.2.5. <i>Primjena SERS tehnike.....</i>	<i>19</i>
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. Kemikalije.....	20
3.2. Mjerni uređaji	20
3.3. Istraživani spoj	21
3.4. Priprava koloidne suspenzije srebra	22
3.5. Priprava otopina i mjernih uzoraka.....	22
3.5.1. <i>Priprava otopina spoja</i>	<i>22</i>
3.5.2. <i>Priprava otopina polinukleotida.....</i>	<i>22</i>
3.5.3. <i>Priprava mjernih uzoraka u koloidnim suspenzijama.....</i>	<i>23</i>
3.5.4. <i>Reproducibilnost</i>	<i>24</i>
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. Karakterizacija koloidne suspenzije srebra	25
4.2. FT-Ramanovi spektri spoja 1.....	28

4.3. SERS spektri spoja 1.....	30
4.3.1. <i>Koncentracijska ovisnost</i>	<i>30</i>
4.3.2. <i>Svježe pripravljena koloidna suspenzija</i>	<i>30</i>
4.3.3. <i>Koncentrirana koloidna suspenzija.....</i>	<i>33</i>
4.3.4. <i>Agregirana koloidna suspenzija.....</i>	<i>35</i>
4.3.5. <i>Utjecaj pufera</i>	<i>40</i>
4.4. SERS spektri spoja 1 i dvolančanih polinuleotida	41
4.4.1. <i>SERS spektri spoja 1 i i polinukleotida poli dAdT–poli dAdT.....</i>	<i>42</i>
4.4.2. <i>SERS spektri spoja 1 i i polinukleotida poli dGdC–poli dGdC.....</i>	<i>45</i>
4.4.3. <i>SERS spektri spoja 1 i i polinukleotida poli rA–poli rU</i>	<i>49</i>
4.4.4. <i>SERS spektri smjese spoja 1 i DNA.....</i>	<i>51</i>
4.4.4.1. <i>SERS spektri smjese spoja 1 i DNA na koncentriranom koloidu</i>	<i>51</i>
4.4.4.2. <i>SERS spektri smjese spoja 1 i DNA na agregiranom koloidu s MgSO₄.....</i>	<i>54</i>
4.4.4.3. <i>Reproducibilnost mjerenja</i>	<i>56</i>
§ 5. ZAKLJUČAK	59
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	62
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	64
§ 8. DODATAK	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XVII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

ISTRAŽIVANJE INTERAKCIJA PIRENSKOG DERIVATA POLIAMINA S
DVLANČANIM POLINUKLEOTIDIMA SPEKTROSKOPIJOM POVRŠINSKI
POJAČANOG RAMANOVA RASPRŠENJA

Petra Hudika

Spektroskopijom površinski pojačanog Ramanova raspršenja (SERS) istraživane su interakcije *N,N,N*-tri(8-piren-1-il-[3,7-diazaokt-1-il])amina (spoj **1**) s polinukleotidima. Kao metalni supstrati korišteni su svježe pripremljeni, koncentrirani i agregirani koloid. Spoj **1** najintenzivnije raspršuje zračenje pri koncentraciji 5×10^{-6} mol dm⁻³ u koncentriranom koloidu te je navedeni supstrat korišten pri pripravi smjesa s polinukleotidima. Smjese su pripremane na dva načina; kod prvog načina u koloid je dodan istraživani spoj, a zatim odabrani polinukleotid, dok se kod drugog načina prvo pripremio kompleks spoja **1** i polinukleotida, koji je zatim dodan u koloidnu suspenziju. Dobiveni SERS spektri svih smjesa nisu sadržavali nove vrpce koje bi odgovarale vibracijama polinukleotida. Adsorpcija molekula spoja **1** na nanočestice je prilično jaka i dodatak polinukleotida slabo utječe na intenzitet i položaj vrpca. Kompleks spoj **1**/polinukleotid daje slabe vrpce poliaminskog derivata čak i pri velikom suvišku polinukleotida, vrlo vjerojatno zbog interkaliranja pirenskog sustava između parova baza DNA analoga, dok nevezani dio molekule spoja **1** ostaje blizu metalne površine.

(xvii + 66 stranica, 36 slika, 9 tablica, 76 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: koloid, nanočestice srebra, SERS, piren, poliamin, polinukleotidi

Mentor: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Adriana Kendel
 2. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
 3. izv. prof. dr. sc. Ivana Biljan
- Zamjena: prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Datum diplomskog ispita: 26. veljače 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

SURFACE-ENHANCED RAMAN STUDY OF THE INTERACTIONS BETWEEN PYRENE DERIVATIVE OF POLYAMINE AND DOUBLE-STRANDED POLYNUCLEOTIDE

Petra Hudika

Surface-enhanced Raman scattering (SERS) was used for studying interactions between pyrene derivative of polyamine (**1**) and polynucleotides. Freshly prepared, concentrated and aggregated colloids were used as metal substrates. Compound **1** scattered radiation most intensively at concentration of 5×10^{-6} mol dm⁻³ in concentrated colloid, which was therefore used in the preparation of mixtures with polynucleotides. The mixtures were prepared in two ways; firstly, **1** was added to the colloid, followed by adding selected polynucleotide, while in the second method **1**/polynucleotide complex was prepared, and then mixed with the colloid. The obtained SERS spectra of all mixtures showed lack of polynucleotides bands. The polyamine adsorption on the silver was quite strong and the addition of polynucleotides poorly effected the bands intensity and position. The compound **1**/polynucleotide complex yielded weak bands originating from compound **1**, even with a large excess of polynucleotides, most likely due to intercalation of pyrene part between base pairs of DNA analoges, while unbonded part of polyamine molecules remain close to metal surface.

(xvii + 66 pages, 36 figures, 9 tables, 76 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: colloid, SERS, silver nanoparticles, pyrene, polyamine, polynucleotides

Mentor: Dr. Adriana Kendel., Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor
 2. Dr. Biserka Prugovečki, Professor
 3. Dr. Ivana Biljan, Associate Professor
- Substitute: Dr. Snežana Miljanić, Professor

Date of exam: 26th of February, 2021.

§ 1. UVOD

Nakon otkrića uloge nukleinskih kiselina u nasljeđivanju osobina, veliki dio znanstvenih istraživanja usmjeren je na proučavanje strukture i uloge nukleinskih kiselina u organizmu. Osim osobina, moguće je naslijediti i „greške“ genetskog koda koje rezultiraju različitim bolestima.¹ Jedna od najsmrtonosnijih bolesti današnjice je karcinom. Poput većine lijekova, i antitumorski lijekovi, uz ciljano dobro djelovanje, uzrokuju određenu štetu na zdravim stanicama.² Radi toga se nastoje modificirati postojeći lijekovi da bi imali minimalni ili nikakav štetni utjecaj na zdrave stanice, a preciznije djelovanje na bolesne. Aktivne molekule se u stanici najčešće vežu s deoksiribonukleinskom kiselinom (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) što rezultira oštećenjem DNA i izaziva smrt stanice.¹ Zbog toga se provode istraživanja u svrhu određivanja točnog mjesta i načina interakcije aktivne molekule DNA različitim spektroskopskim metodama poput UV/Vis apsorpcijske i fluorescencijske spektroskopije, nuklearne magnetske rezonancije, spektroskopije linearnog i cirkularnog dikroizma te mnogih drugih.³ Poseban naglasak se stavlja na metode koje omogućavaju mjerenja u biološkim uvjetima. Jedna od takvih je Ramanova spektroskopija čija je prednost mogućnost snimanja vodenih otopina uzorka.⁴ Nedostatak je potreba za visokom koncentracijom analita te sposobnost fluorescencije istraživanih molekula.⁴ Spektroskopijom površinski pojačanog Ramanova raspršenja (engl. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS) opaža se spektar molekule smještene vrlo blizu ili vezane s metalnom površinom.⁵ Osim što se adsorpcijom djelomično gasi fluorescencija istraživanih molekula, pojačanje raspršenja i do 10^6 puta omogućava snimanje otopina mikromolarnih koncentracija.⁵ Sve navedeno čini SERS vrlo zanimljivom i pogodnom metodom za istraživanje interakcija malih molekula i nukleinskih kiselina.^{3,5} Cilj ovog rada je proučiti način vezanja pirenskog derivata poliaminske molekule s polinukleotidima pomoću spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja. Nakon vibracijske karakterizacije pirenskog derivata poliamina i odabira odgovarajuće suspenzije nanočestica srebra, promatrat će se kako različiti načini pripreme smjese istraživanog spoja i polinukleotida utječu na izgled SERS spektara. Suspenzija nanočestica srebra omogućit će pojačano raspršenje zračenja molekula te omogućiti rad s koncentracijama spoja **1** (*N,N,N*-tri(8-piren-1-il-[3,7-diazaokt-1-il])amin) mikromolarnih vrijednosti u vodenim otopinama. Mjerni uzorci će se pripremati na dva načina; kod prvog će se promatrati kako

dodatak polinukleotida utječe na SERS spektar male molekule, dok će se kod drugog načina pripreme uzorka promatrati pojačanje Ramanova raspršenja prethodno pripremljenog kompleksa istraživanog spoja i polinukleotida. S obzirom da vibracijski spektri omogućavaju uvid u strukturu molekula prije i poslije interakcije, očekuje se da će promjene u spektrima otkriti način i mjesto vezanja molekula istraživanog spoja **1** s polinukleotidima.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Nukleinske kiseline

Nukleinske kiseline su biomakromolekule čija glavna zadaća je pohrana, prijenos i ekspresija genetičke informacije. Razlikujemo dvije vrste nukleinskih kiselina; deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA) i ribonukleinsku kiselinu (engl. *ribonucleic acid*, RNA). DNA je nositelj genetičke upute odgovorne za razvoj stanica, dok RNA sudjeluje u sintezi proteina i u drugim staničnim procesima.

2.1.1. Povijest nukleinskih kiselina

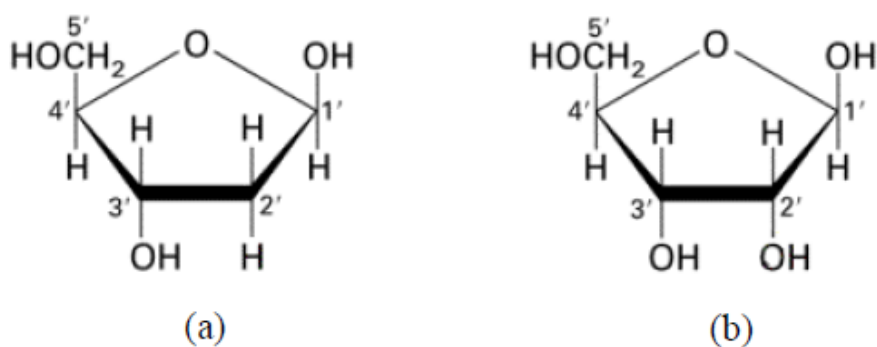
Deoksiribonukleinsku kiselinu prvi je izolirao i opisao švicarski liječnik Friedrich Miescher 1869. godine.⁶ Prilikom ispitivanja kemijskog sastava leukocita primjetio je talog nepoznate tvari, za kojeg je dokazao da nije ni lipid, ni protein, te da ne sadrži sumpor, no sadrži veću količinu fosfora. Budući da je tvar izolirao iz staničnih jezgri, nazvao ju je *nuklein*.⁶ Miescher je na početku pretpostavljao da je *nuklein* odgovaran za prenošenje nasljednih osobina, no kasnije je tu pretpostavku odbacio.⁶ 1879. Albrecht Kossel počeo je proučavati sastav *nukleina*. Otkrio je da je *nuklein* građen od fosforne kiseline, šećera pentoze i dušične baze.⁶ Hidrolizama i drugim tehnikama uspio je izolirati dušične baze, prvo adenin, zatim gvanin, timin, citozin i uracil u sastavu *nukleina*. Zaključio je da uloga *nukleina* nije pohrana, ni izvor energije.^{7,8} 1889. godine Richard Altmann je dokazao kako *nuklein* ima svojstva kiseline i promijenio mu naziv u *nukleinska kiselina*.⁷ 1944. godine Oswald Avery otkrio je da nisu proteini zaslužni za prijenos osobina iz starih stanica u nove, već da je za to zaslužna nepoznata tvar.⁹ Pedesetih godina 20. stoljeća Erwin Chargaff otkrio je da se tvar odgovorna za prijenos nasljednih osobina razlikuje među vrstama. Kasnija njegova otkrića poznata su kao Chargaffova pravila i temelje se na eksperimentu kojim je dokazano da se u DNA uvijek nalazi ista količina adenina i timina.¹⁰ Chargaffovo otkriće temelj je uparivanja dušičnih baza. 1951. godine Roslind Franklin započela je svoj rad u rendgenskoj kristalografiji snimajući rendgenske difrakcijske slike deoksiribonukleinske kiseline. Njezine slike dokazale su da nukleinska kiselina ima oblik uzvojnice.¹¹ 1951. i 1952. godine Alfred Hershey i Martha

Chase proveli su niz eksperimenata na virusima koji su zarazili bakterije (bakteriofagi) te su dokazali da su geni sačinjeni od DNA.¹²

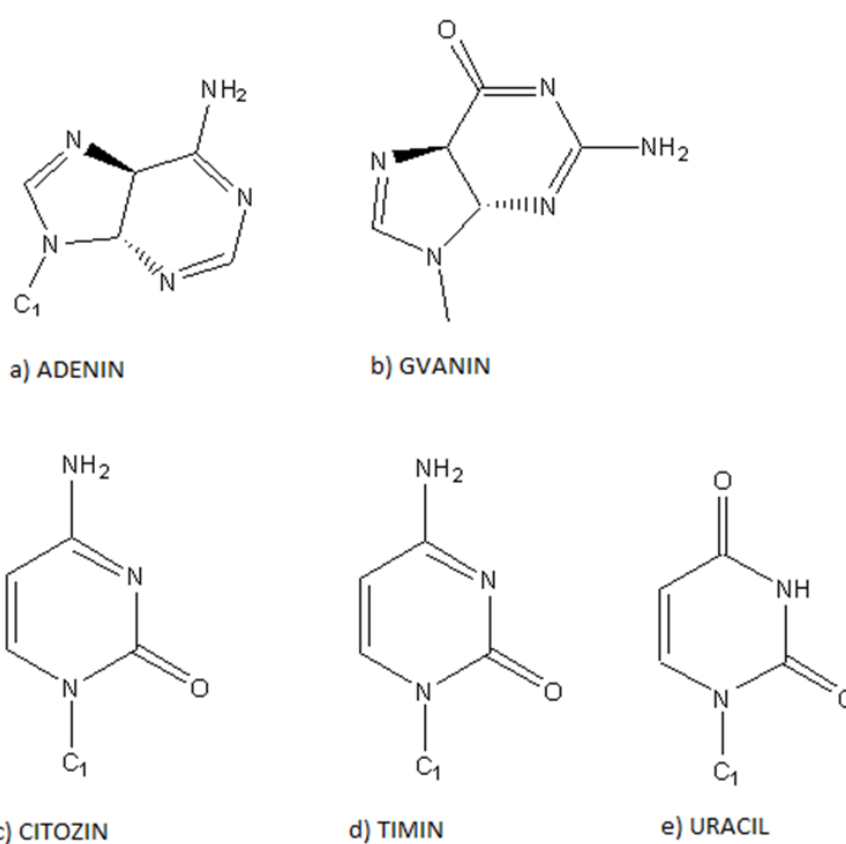
1953. godine James D. Watson i Francis H. Crick predstavili su deoksiribonukleinsku kiselinu u obliku dvostruke uzvojnice koja se sastoji od dva međusobno antiparalelna lanca povezana vodikovim vezama preko parova baza.¹² Njihov model objašnjava da prilikom repliciranja dolazi do pucanja vodikovih veza između dušičnih baza. Svaki lanac DNA služi kao kalup za stvaranje komplementarnog, novog lanca.¹² 1958. godine Matthew Meselson i Franklin W. Stahl dali su potvrdu za mehanizma replikacije DNA provodeći eksperiment replikacije nukleinske kiseline u bakteriji *Escherichia Coli*.¹³

2.1.2. Građa nukleinskih kiselina

Osnovna razlika u građi DNA i RNA je broj polinukleotidnih lanaca od kojih se sastoje; deoksiribonukleinska kiselina se sastoji od dva komplementarna lanca, dok ribonukleinsku kiselinu gradi jedan polinukleotidni lanac.¹ Podjedinica polinukleotidnog lanca je nukleotid. Svaki nukleotid sastoji se od tri dijela: šećera, dušične baze i fosfatne skupine.¹ Riboza je šećer koji gradi ribonukleotid, a 2-deoksiriboza je šećer koji gradi deoksiribonukleotid (slika 1). Šećeri koji grade nukleinske kiseline su β -D-stereoizomeri, derivati su furanoze, nisu planarni te mogu biti u konformaciji stolice ili omotnice.¹⁴ U konformaciji omotnice jedan ugljikov atom nalazi se izvan ravnine, dok se u konformaciji stolice jedan C-atom nalazi iznad, a drugi ispod ravnine simetrije. Ako je atom koji odstupa iz ravnine simetrije smješten na istoj strani kao dušična baza i C'-4 i C'-5 atomi šećera, tada se opisana konformacija naziva *endo*-konformacija. Ako je atom koji više odstupa smješten na suprotnoj strani, onda je to *exo*-konformacija.¹⁴ Šećeri su u nukleinskim kiselinama povezani fosfodieterskim mostovima.¹ Šećer iz jednog nukleotida povezuje se -OH skupinom 3'-C-atoma (koja je esterificirana fosfatnom skupinom) s -OH skupinom na 5'-C-atomu susjednog šećera. Dušične baze koje grade nukleotide (slika 2) planarne su strukture i derivati su purina (adenin, gvanin) te pirimidina (citozin, timin, uracil).¹⁵ RNA grade baze adenin, gvanin, citozin i uracil, dok se u DNA nalaze adenin, gvanin, citozin i timin. Šećer povezan s dušičnom bazom čini nukleozid, dok se nukleozid povezan s fosfatnom skupinom naziva nukleotid.¹⁶



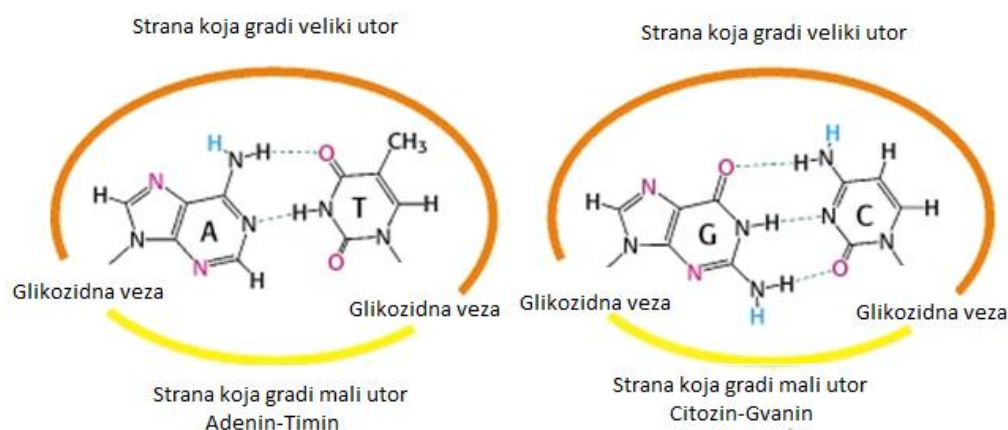
Slika 1. Šećeri u nukleinskim kiselinama: a) deoksiriboza, b) riboza



Slika 2. Dušične baze: a) adenin, b) gvanin, c) citozin, d) timin, e) uracil

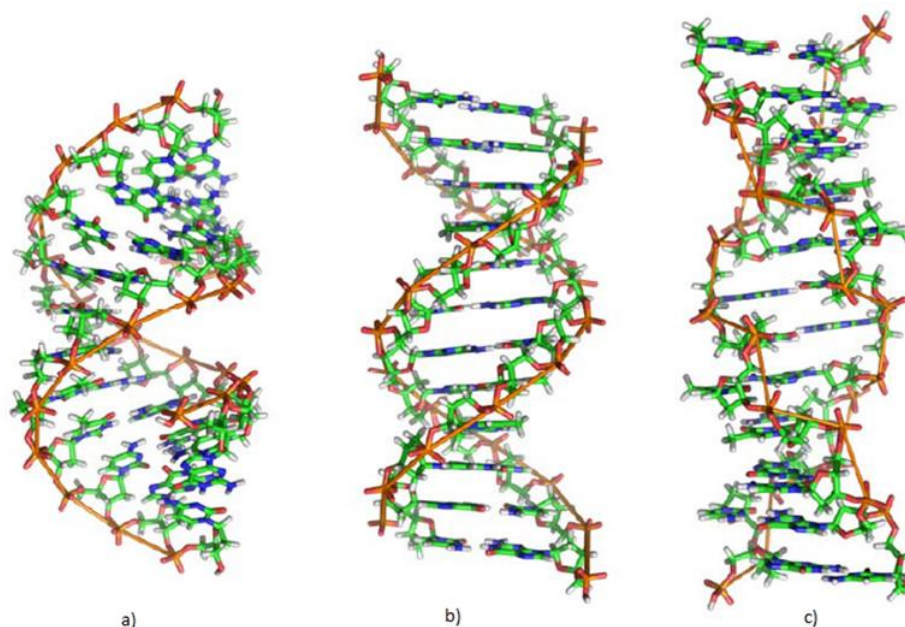
Šećer i dušična baza povezani su glikozidnom vezom i čine okosnicu polimera. Okosnice DNA i RNA negativno su nabijene.¹ Nukleotidi jednog lanca uparuju se s nukleotidima drugog lanca vodikovim vezama ostvarenim preko dušičnih baza. U DNA molekuli adenin i timin povezuju se s dvije, a gvanin i citozin s tri vodikove veze. U RNA molekuli uspostavljaju se tri vodikove veze između gvanina i citozina jednako kao i u DNA, te dvije veze između

adenina i uracila. Proces povezivanja dušičnih baza zove se komplementarno sparivanje baza.¹⁷ Dvostruku uzvojniju stabiliziraju vodikove veze i hidrofobne interakcije. Svaki komplementarni par baza sudjeluje u izgradnji dva utora, malog i velikog utora (slika 3).¹ Lanci u DNA su suprotno usmjereni te jedan kraj lanca ima slobodnu 5'-OH skupinu, a drugi slobodnu 3'-OH skupinu. U DNA molekuli fosfatna okosnica s vezanim šećerima smještena je s vanjske strane, a dušične baze se nalaze s unutarnje strane dvostruke uzvojnice.



Slika 3. Komplementarni parovi baza s prikazanim utorama¹⁸

Molekula DNA može postojati u nekoliko oblika, a neki od najčešćih su A-DNA, B-DNA i Z-DNA (slika 4). Kod B-DNA veliki utor je širok i gotovo jednako dubok kao mali utor.¹⁹ A-DNA molekula ima dubok i uzak veliki utor te širok i vrlo plitak mali utor. Z-DNA molekula ima dubok i uzak veliki utor, no vrlo plitak mali utor. Vodikovim vezama mogu se ostvariti specifične interakcije s malim molekulama koje se vežu u utore i zato je bitno poznavanje oblika i veličine utora. B-DNA i A-DNA su desne uzvojnice, dok je Z-DNA lijeva uzvojnica.¹



Slika 4. Strukture DNA: a) A-DNA, b) B-DNA, c) Z-DNA²⁰

2.1.3. Vrste nukleinskih kiselina i njihova funkcija

Glavna uloga DNA u organizmu je dugotrajna pohrana informacija.¹ Osim uloge u nasljeđivanju osobina, DNA je odgovorna i za postavljanje odgovarajućih smjernica za proizvodnju proteina koji su neophodni za pravilno funkcioniranje našeg tijela.²¹ Kod eukariota većina DNA se nalazi u jezgri stanica, a manji dio u mitohondrijima i kloroplastima. Molekula DNA se omata oko proteina (histon) stvarajući kromatin.²² Kromatini se dalje kondenziraju namotavanjem te nastaju nove tvorevine zvane kromosomi.²² Kromosomi izgledom podsjećaju na slovo X i na krajevima su molekule DNA koje se nazivaju telomere.¹ Telomere štite krajeve kromosoma od oštećenja i skraćuju se svakom replikacijom DNA. Svaki dio DNA koji kodira određeni protein zove se gen i geni čine samo 3 % ljudske DNA.²³ Preostala DNA je malo manje razumljiva i istražena. DNA je uključena u regulaciju procesa transkripcije i translacije.¹

U organizmu postoje različite vrste RNA nukleinskih kiselina. Osnovne vrste su: glasnička RNA (engl. *messenger* RNA, mRNA), transportna RNA (engl. *transfer* RNA, tRNA) te ribosomska RNA (engl. *ribosomic* RNA, rRNA). Glasnička RNA sudjeluje u sintezi proteina prenoseći informaciju za sintezu proteina.¹ mRNA sudjeluje u translaciji, a tRNA u transportu aktiviranih aminokiselina do ribosoma gdje nastaje peptidna veza.¹ Redoslijed aminokiselina određen je mRNA. Ribosomska RNA se nalazi u ribosoma, ima strukturnu

ulogu i glavni je katalizator sinteze proteina.¹ RNA se nalazi i u telomerazama, enzimima koji održavaju telomere.^{1,21}

2.2. Male molekule koje se vežu u nukleinske kiseline

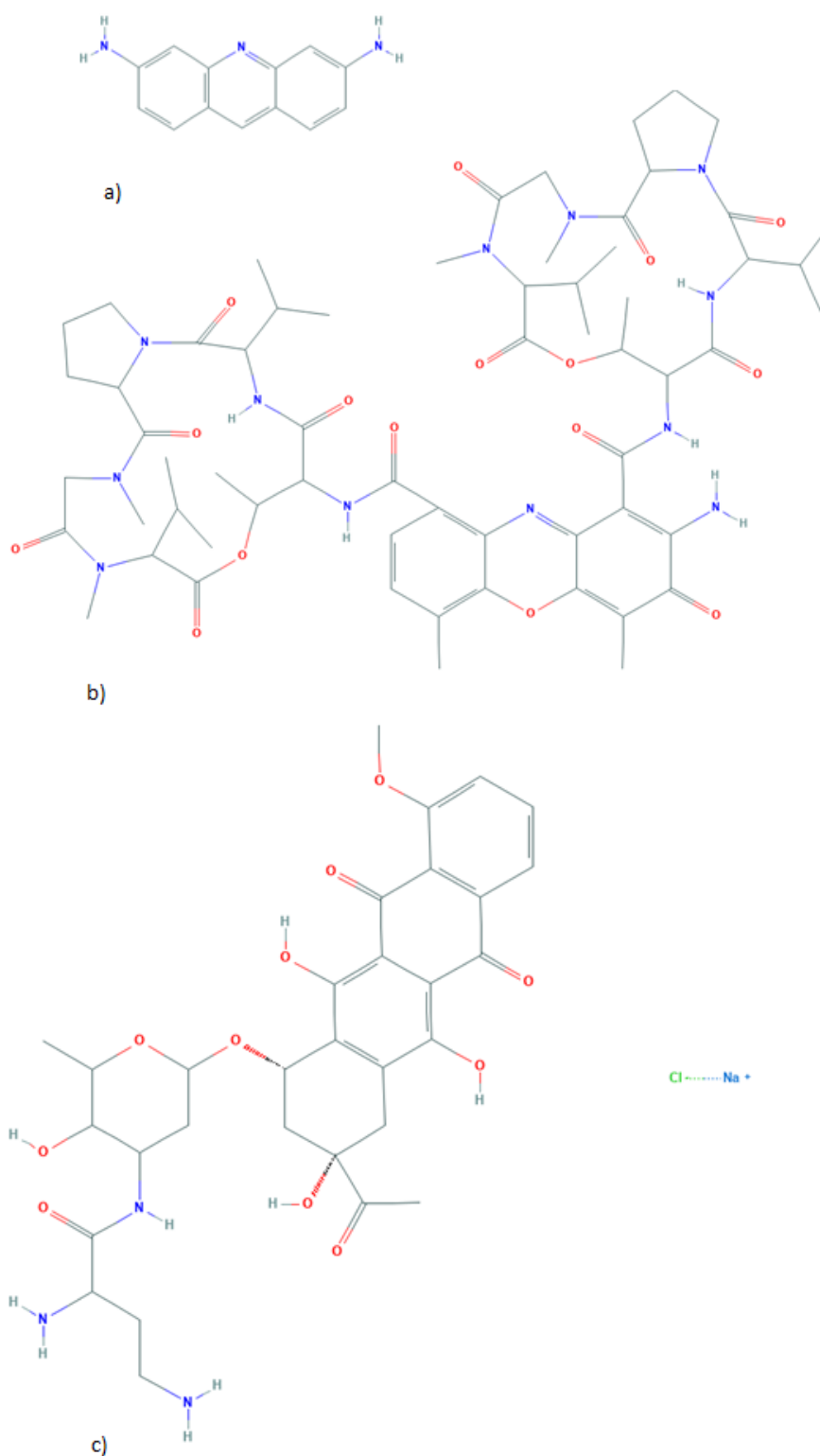
Male organske molekule koje imaju ulogu antitumorskih lijekova mogu na tri različita načina djelovati na stanice karcinoma.²⁴ Prvi način je stvaranje interakcija s transkripcijskim faktorima i polimerazom.²⁵ Drugi način je stvaranje kompleksa s DNA pri čemu nastali kompleks ometa transkripciju.^{23,26} Treći način je neposredno vezanje molekula s DNA poput liganda.^{23,26} Molekule koje se vežu poput liganda razlikuju se po načinu i mjestu vezanja te po svojoj strukturi. Tako se mogu vezati u utore, umetati između parova baza (interkalatori), vezati kovalentno s DNA ili se mogu vezati privremeno kao enzimi koji uzrokuju kidanje lanca DNA.^{23,26} Molekule koje sadrže metal mogu ostvarivati s DNA kovalentne i nekovalentne interakcije.²⁷ Interkaliranje i vezanje u utore spadaju u povratno vezivanje, dok kovalentne interakcije spadaju u nepovratno vezivanje.^{23,26} Neke molekule se mogu i interkalirati i vezati u utore. Način vezanja ovisi o oslobođenoj energiji prilikom stvaranja kompleksa te o strukturi, obliku i slijedu baza u DNA.²⁸ Male molekule koje se vežu s DNA su najčešće poliamini po strukturi te vezanjem stabiliziraju konformaciju DNA.

2.2.1. Interkalatori

Interkalatori su aromatski spojevi koji u svojoj strukturi sadrže nekoliko heteroatoma (najčešće dušika) sa sposobnošću stvaranja nekovalentnih interakcija.^{25,29} Interkaliranje se provodi na način da se planarni aromatski sustav umeće između parova baza ne ometajući vodikove veze između komplementarnih dušičnih baza.³⁰ Maksimalni broj molekula koje se mogu interkalirati u molekulu DNA/RNA određuje se po principu pravila susjednog isključenja.²⁶ Po tom pravilu čak i u velikoj koncentraciji malih molekula, svako drugo mjesto za interkaliranje u DNA zavojnici je prazno.²⁶ Molekule koje se interkaliraju u DNA, mjestu interkaliranja približavaju se kroz veliki i mali utor. Stabilnost kompleksa DNA/interkalator je veća što je interkalator pozitivnije nabijen.³¹ Interkalator se uspješno zadržava na mjestu vezanja pomoću elektrostatskih interakcija, aromatskih interakcija, vodikovih veza te pomoću prijenosa naboja. Aromatsko slaganje baza rezultira batokromnim pomacima u apsorpcijskim

spektrima kompleksa nastalog kompleksa molekula/DNA.³² Interkaliranje karakterizira mala selektivnost prema različitim slijedovima dušičnih baza.

Neki od jednostavnijih interkalatora su: proflavin, etidijev bromid, akridin, aunorubicin, adriamicin (slika 5a).²⁶ Složeniji interkalatori su molekule poput aktinomicina, daunomicin (slika 5b), doksorubicina.²⁶ Neke molekule koje se interkaliraju mogu se dvostruko (bis-akridin, daunomicin) ili višestruko interkalirati, te se nazivaju bisfunkcionalni interkalatori ili višefunkcionalni interkalatori (slika 5c).^{33,34} Interkalatori koji sadrže metal stvaraju nekovalentne interakcije s DNA. Na interkaliranje kompleksa metala utječu planarnost liganda i geometrija koordinacije metalnog atoma i atoma donora kojim je metal okružen.^{1,35} Interkalatori uzrokuju produženje veza između parova baza za 3,4 do 6,8 Å, djelomično odmotavanje uzvojnice te mogu izazvati i promjenu konformacije šećera.²³

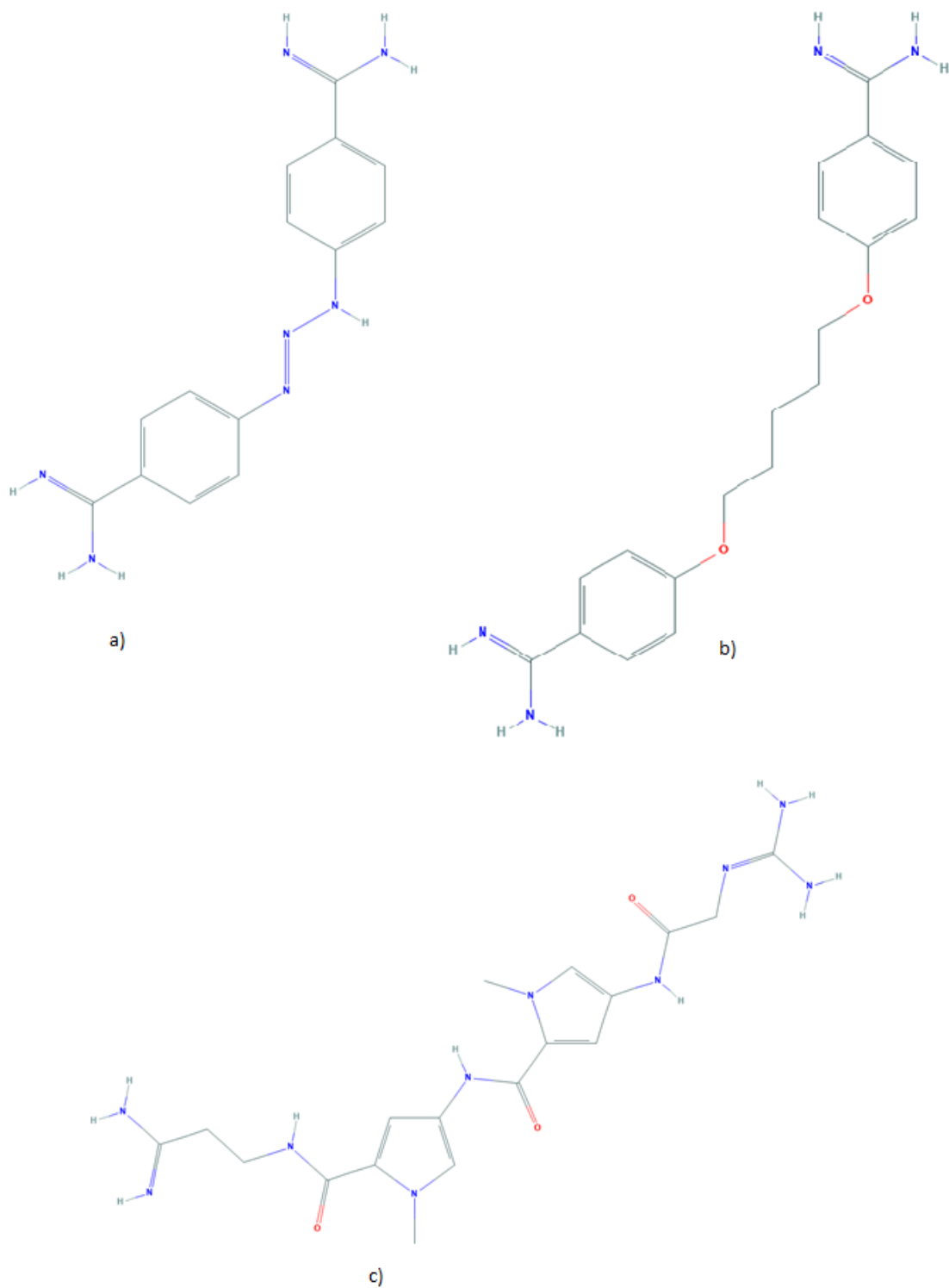


Slika 5. Primjeri interkalatora: a) jednostavni interkalator - proflavin klorid,³⁶ b) složeni interkalator – aktinomocin,³⁷ c) bifunkcionalni inkalator – daunomicin³⁸

2.2.2. Molekule koje se vežu u utore

Molekule koje se vežu u utore preferiraju dijelove DNA bogate slijedovima baza adenin-timin.²⁶ Strukturu takvih spojeva karakteriziraju aromatski prstenovi u zakrivljenom središnjem dijelu, pozitivno nabijene skupine te donori vodika na konveksnom kraju. Molekule su zakrivljenog oblika što pogoduje vezanju u strukturu DNA. Vezanje male molekule u duboki i uski mali utor AT para stabilizirano je, između ostalog, van der Waalsovima silama i hidrofobnim efektom. Vodikove veze između dušičnih baza utora i skupina malih molekula utječu na selektivnost male molekule te uz elektrostatske interakcije pozitivno nabijenih skupina s fosfatima okosnice dodatno doprinose stabilizaciji kompleksa mala molekula/DNA.^{26,31}

Primjeri molekula koje se vežu u utore su: berenil, leksitromicin, pentamidin, cisplatin i netropsin (slika 6).^{39,40} Ovisno o slijedu baza u DNA, u isti utor mogu se vezati jedna ili dvije molekule. Molekule koje imaju pozitivan naboj na oba kraja vežu se samo u omjeru 1/1.³¹ Suprotno od interkalatora, molekule koje se vežu u utore izazivaju male strukturne promjene DNA. Molekule koje se vežu u utore zbog svoje selektivnosti prema određenim slijedovima mogu se koristiti u svrhu otkrivanja slijeda baza u polinukleotidima.²⁶



Slika 6. Molekule koje se vežu u utore: a) berenil,⁴¹ b) pentamidin⁴² i c) netropsin⁴³

2.2.3. Metode istraživanja interakcija malih molekula s DNA

Pri istraživanju interakcija malih organskih molekula i nukleinskih kiselina primjenjuju se različite analitičke metode. Najčešće se koriste metode apsorpcijska i fluorescencijska spektroskopija, spektroskopija linearnog i cirkularnog dikroizma, spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije, infracrvena i Ramanova spektroskopija, spektrometrija masa, različite elektroforeze te niz drugih metoda.⁴⁴ Svaka od navedenih metoda ima svoje prednosti i nedostatke te na različit način doprinosi razumijevanju načina vezivanja i/ili mjesta vezanja aktivnih malih molekula s nukleinskim kiselinama.^{1, 26}

Metode vibracijske spektroskopije omogućavaju uvid u molekulsku strukturu antitumorskih spojeva, no potreba za simulacijom bioloških uvjeta korištenjem vode kao otapala ograničava korištenje infracrvene spektroskopije u istraživanju vezanja antitumorskih lijekova s DNA. Ramanovom spektroskopijom mogu se snimati vodene otopine, no potrebna je visoka koncentracija analita, a dobivanje odgovarajućeg spektra otežava i fluorescencija istraživanih malih molekula. Spektroskopijom površinski pojačanog Ramanovog raspršenja raspršeno zračenje pojačava se i do milijun puta u odnosu na normalno Ramanovo raspršenje i gasi se fluorescencija, što omogućava istraživanja strukture molekula pri niskim koncentracijama u vodenim otopinama te se navedena metoda nameće kao vrlo atraktivna metoda pri istraživanju prepoznavanja i vezanja biomolekula.⁴⁵

2.3. Površinski pojačano Ramanovo raspršenje

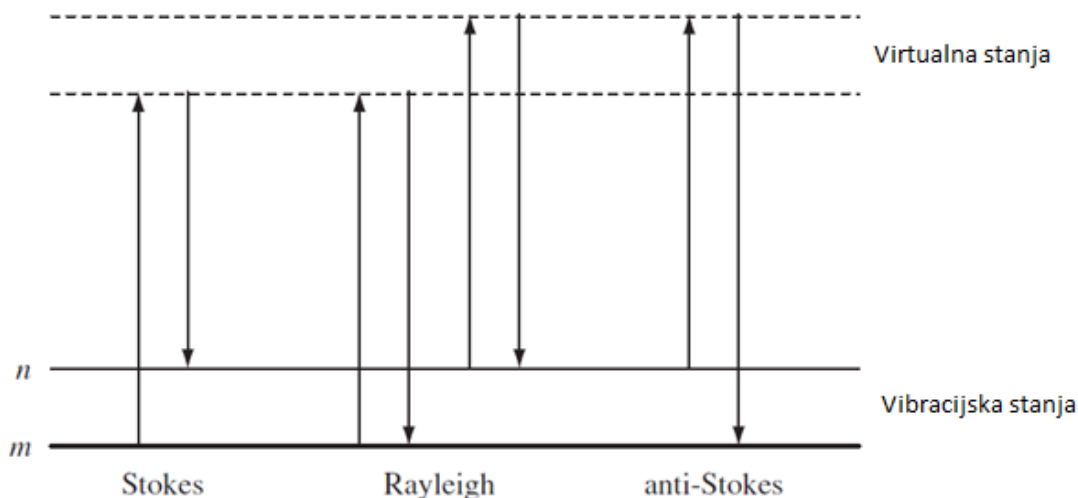
2.3.1. Ramanova spektroskopija

Ramanova spektroskopija metoda je vibracijske spektroskopije koja se koristi za određivanje strukture molekula. Razvoj Ramanove spektroskopije počinje 1923. godine kada je Smekal opisao fenomen neelastičnog raspršenja, a eksperimentalno su ga objasnili Raman i Krishnan 1928. godine.⁴⁵

Nakon ozračivanja molekule monokromatskim izvorom zračenja, zračenje se može raspršiti na dva načina, elastično i neelastično.⁴⁶ Kod elastičnog (Rayleighovog) raspršenja upadni i raspršeni foton zračenja imaju istu energiju (slika 7).⁴ Do neelastičnog raspršenja dolazi kad se prilikom utjecaja vanjskog izvora zračenja osim elektronskog oblaka pobudi i gibanje jezgara. Postoje dvije vrste neelastičnog ili Ramanova raspršenja; Stokesovo i anti-

Stokesovo raspršenje.⁴ Kod Stokesovog raspršenja upadni foton zračenja ima veću energiju od raspršenog fotona, dok kod anti-Stokesovog raspršenja upadni foton ima manju energiju zračenja od izlaznog fotona. Samo jedan od 10^6 – 10^8 fotona se neelastično rasprši.⁴⁶

Pri sobnoj temperaturi većina molekula se nalazi u osnovnom vibracijskom stanju. Nakon pobude monokromatskim zračenjem, molekule prelaze u kratkoživuće virtualno stanje.² Energija virtualnog stanja ne odgovara niti jednom energijskom stanju molekule i njegova energija ovisi o energiji upadnog zračenja.^{46,47} Obzirom da je virtualno stanje nestabilno, molekule se u njemu kratko zadržavaju te se prilikom vraćanja molekule u niže energijsko stanje energija otpušta u obliku raspršenog zračenja. Kada molekula iz osnovnog vibracijskog stanja prelazi u virtualno stanje pa se iz njega vraća u više vibracijsko stanje, zbiva se Stokesovo raspršenje i energija prelazi s fotona na molekulu. Ako se pak pri procesu raspršenja energija prenosi s molekule na raspršeni foton riječ je o anti-Stokesovu raspršenju, pri čemu molekula iz višeg vibracijskog stanja prelazi u virtualno stanje i iz njega se vraća u osnovno vibracijsko stanje (slika 7). Stokesov i anti-Stokesov spektar sadrže iste informacije o energijama vibracije.⁴⁵



Slika 7. Dijagram Ramanovog i Rayleighovog raspršenja zračenja⁴⁸

Vibracije funkcionalnih skupina javljaju se u infracrvenom i Ramanovom spektru pri sličnim valnim brojevima. Najčešće vibracije koje daju intenzivne vrpce u Ramanovim spektrima imaju mali intenzitet u IR spektru. To pravilo se ne odnosi na molekule s centrom simetrije za koje vrijedi pravilo isključenja.⁴ Kod takvih molekula, vibracijama kod kojih se mijenja

polarizabilnost, ne dolazi do promjene električnog dipolnog momenta. Stoga se odgovarajuće vibracijske vrpce pojavljuju u Ramanovom spektru, a ne pojavljuju u IR spektru i obrnuto. Pravilo isključenja korisno je kod razlikovanja *cis*- i *trans*- izomera.⁴

Intenzitet Ramanovog raspršenja može se opisati formulom:⁴

$$I=Kl\alpha^2v^4$$

I–intenzitet Ramanovog zračenja

K–konstanta

l–snaga lasera

α –polarizabilnost

v–frekvencija upadnog zračenja

Iako je velika prednost ove nedestruktivne metode jednostavna priprema uzorka i mogućnost snimanja vodenih otopina, glavni nedostatak Ramanove spektroskopije je slaba osjetljivost. Pojačanje osjetljivosti moguće je korištenjem novih tehnika Ramanove spektroskopije, a jedna od njih je i spektroskopija površinski pojačanog Ramanova raspršenja.⁴⁶

2.3.2. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanova raspršenja (SERS)

Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja vrlo je osjetljiva i jednostavna metoda koja se koristi u različitim područjima (ekologiji, forenzici, farmaciji, biologiji, biokemiji, elektrokemiji i kemiji materijala). Pojačanje intenziteta Ramanova raspršenja opaža se kod molekula smještenih vrlo blizu ili adsorbiranih na aktivnu metalnu površinu.^{46,47} U odnosu na klasičnu Ramanovu spektroskopiju, intenzitet raspršenja povećava se i do 10⁶ puta.⁴⁶

2.3.2.1. Povijest

Površinski pojačano Ramanovo raspršenje prvi su otkrili M. Fleischman i suradnici 1974. godine.⁴⁹ Proučavali su i objasnili intenzivno Ramanovo raspršenje piridina adsorbiranog na hrapavu srebrnu elektrodu. Fleischman i suradnici smatrali su da je pojačanje raspršenja posljedica povećanja površine elektrode zbog hrapavosti te vezanja većeg broja molekula piridina na hrapavu površinu, u odnosu na glatku.⁴⁶ D. L. Jeanmarie i R. P. Van Duyne te M.

G. Albrecht i J. A. Creighton dokazali su da povećanje osjetljivosti nije samo rezultat povećanja površine, budući da je poboljšanje intenziteta bilo reda veličine 10^6 , a povećanju površine metala pripisuje se pojačanje intenziteta reda veličine $10^{45,50}$. Dakle, povećanje površine metala nije bio uzrok drastičnom pojačanju raspršenog zračenja, već se radilo o efektu poznatom kao površinsko pojačanje raspršenja.

2.3.2.2. Metalni supstrati

Površinsko raspršenje zračenja opaža se za molekule koje su adsorbirane na površini metala koji apsorbiraju zračenje u vidljivom području elektromagnetskog spektra.⁵¹ Postoji niz zahtjeva koje metal mora ispunjavati da bi bio učinkovit SERS supstrat i idealna aktivna površina. Ne postoji metalni supstrat koji zadovoljava svaki zahtjev, pa se supstrat bira ovisno o vrsti analize.⁵² Važno je da postoji učinkovita adsorpcija analita na površinu metala što omogućava visoku osjetljivost. Metalni supstrat mora biti dobre stabilnosti, čistoće i reproducibilnosti. Metali koji se u prisutnosti zraka pretvaraju u okside (npr. željezo) nisu dobre aktivne površine. Stvaranjem oksida adsorbirane čestice udaljavaju se od površine metala, efekt površinskog pojačanja slabi, te adsorpcija nije jednolika. Mjehurići kisika i dušika, ako su prisutni u otopinama u kojima se nalazi koloidna suspenzija i istraživani spoj, zbog svog kemijskog djelovanja mogu ometati SERS učinak.⁵²

Srebro se pokazalo kao dobar supstrat za SERS. Uz srebro, najčešće se koristi zlato, a rijede litij, natrij, bakar, platina i aluminij. Hrapave površine najčešće dolaze u obliku agregiranih koloidnih suspenzija, elektroda, čvrstih podloga obloženih metalnim nanočesticama, filmova itd.⁵³

Od svih oblika metalnih supstrata najčešće se primjenjuju koloidne nanočestice zbog svoje financijske dostupnosti te jednostavnosti pripreme.⁵² Različitim postupcima mogu se pripremiti nanočestice određenog oblika i veličine. Koloidne suspenzije pripremaju se redukcijom metalnih spojeva sa solima poput trinatrijevog citrata, EDTA i natrijevog borhidrida.⁵³ Osjetljivost tehnike dodatno se povećava dodatkom elektrolita u koloidnu suspenziju. Najčešće se dodaju soli koje sadrže kloridne, citratne, nitratne, perkloratne i boratne ione.⁵⁴ Elektroliti olakšavaju vezanje analita na koloid smanjujući elektrostatsku barijeru te stvaraju agregate nanočestica.⁵³

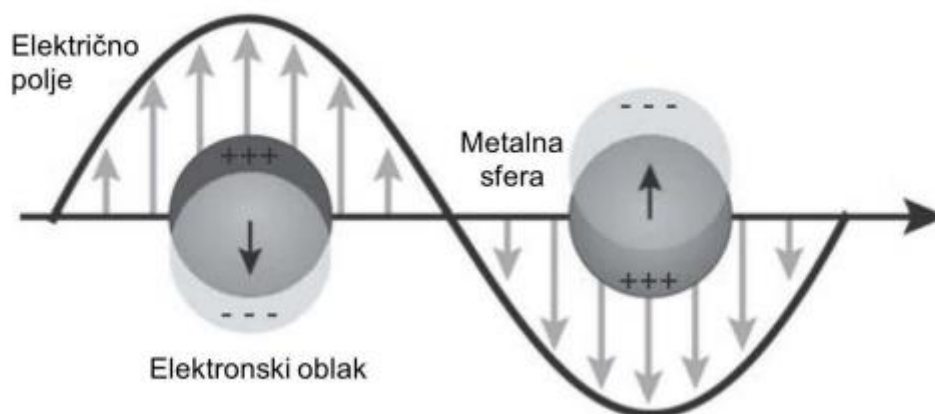
2.3.2.3. Teorije

Mehanizam pojačanja raspršenja zračenja još uvijek nije dovoljno razjašnjen. Postoji velik broj teorija koje opisuju kako dolazi do SERS efekta. Većina autora prihvaća dvije teorije; teoriju o elektromagnetskom mehanizmu i teoriju o mehanizmu prijenosa naboja. Elektromagnetsko pojačanje potječe od interakcije površinskih plazmona i analita. Mehanizam prijenosa naboja temelji se na kemijskom vezanju analita na metalnu površinu te se omogućava prijenos elektrona s analita na metal i obrnuto.⁵⁵ Smatra se da elektromagnetski mehanizam više doprinosi ukupnom pojačanju raspršenja.⁵⁶

Površine metala prekrivene su elektronima koji se mogu relativno slobodno gibati uzduž površine stvarajući elektronski oblak (slika 8). Interakcijom električnog polja upadnog zračenja i elektronskog oblaka koji se nalazi na metalu dolazi do polarizacije slobodnih elektrona te se inducira dipol metalne čestice. Elektroni počinju koherentno oscilirati i te oscilacije nazivaju se površinski plazmoni.^{52,55,57} Oni imaju rezonantnu frekvenciju pri kojoj najefikasnije apsorbiraju i raspršuju zračenje.⁵³ Rezonantna frekvencija ovisi o gustoći slobodnih elektrona, vrsti metala i o prirodi površine. Oscilacije plazmona moraju biti okomite na površinu da bi došlo do pojačanja raspršenja, a okomite oscilacije ostvaruju se na hrapavim površinama.⁵³ Na glatkim površinama oscilacije su paralelne pa ne dolazi do raspršenja, već do apsorpcije zračenja.⁵³ Elektromagnetski mehanizam ne zahtjeva da je čestica vezana na metalnu površinu, već da je dovoljno blizu površine. Iznimno jako električno polje nastaje na mjestu gdje se čestice dodiruju i ta mjesta nazivaju se vruće točke (eng. *hot spots*).⁵⁸ Najjače raspršenje je među česticama metala koje su udaljene 1–2 nm, a pojačanje na vrućim točkama može biti i do 10^{12} puta.⁵³

Mehanizam prijenosa naboja pretpostavlja kemijsku vezu između molekule i metalnog supstrata. Nastankom veze dolazi do premještanja elektrona, tj. naboja s Fermijeveg nivoa metala u nepopunjenu orbitalu molekule, koji se zatim vraća u metal.⁴⁷ Dakle, interakcijom zračenja s metalom dolazi do izbijanja elektrona i nastanka šupljine. Elektron prelazi na analit, kratko se zadržava na analitu te vraća u metal pri čemu dolazi do raspršenja zračenja.⁴⁸ Kemijskim mehanizmom objašnjavaju se relativne razlike u intenzitetima i položajima vrpce u SERS spektru u odnosu na vrpce odgovarajućih vibracijskih modova u običnom Ramanovom spektru te mu se pripisuje i neslaganje opaženih i izračunatih faktora pojačanja. Mehanizam prijenosa naboja kratkog je dosega, ograničen samo na prvi sloj molekula koje su vezane za

nanočestice, dok je elektromagnetski mehanizam primjećen i kod viših slojeva.⁵⁵ Ukupnom pojačanju raspršenja doprinose i elektromagnetski i kemijski mehanizam.



Slika 8. Shematski prikaz površinskih plazmona metalne sfere s naznačenim pomakom elektronskog oblaka obzirom na jezgru⁵⁶

2.3.2.4. Izborna pravila

U SERS spektru mogu se javiti nove vrpce kojih nema u klasičnom Ramanovom spektru, postojeće mogu postati intenzivije ili slabije, a neke vrpce mogu i nestati. Intenzitet vrpce ovisi o položaju molekula analita na površinama nanočestica. Najjače raspršenje događa se kad su vibracije polarizirane okomito na površinu, a do raspršenja ne dolazi kad su vibracije polarizirane paralelno s površinom.⁵²

Adsorpcijom molekule na površinu dolazi do promjene geometrije molekule i promjene normalnih vibracija. Najizraženiju promjenu geometrije pokazuju molekule koje imaju centar simetrije, koje vezanjem gube centar simetrije te dolazi do pojave novih vrpce.⁴

Raspršenje zračenja molekula koje sadrže kromofor može se dodatno pojačati, ako se pobudi zračenjem frekvencije koja odgovara energiji elektronskog prijelaza kromofora. Ova tehnika se naziva površinski pojačano rezonantno Ramanovo raspršenje gdje se može pojačati raspršenje do reda veličine 10^{14} .⁵²

SERS tehnika je selektivna tehnika koja detektira samo one molekule koje se smještaju blizu metalne površine, ali postaje i specifična kad je na metalnu površinu adsorbirana molekula koja stvara specifičnu vezu s molekulama analita.

2.3.2.5. Primjena SERS tehnike

Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja pronalazi primjenu u različitim prirodnim granama poput kemije, biologije, ekologije,^{59,60} forenzike, prehrambene tehnologije i medicine. Glavna ekološka prednost ove tehnike je ta što je za provedbu ispitivanja potrebna mala količina kemikalija.^{61,62} SERS tehnika ima široku primjenu zato što se radi o osjetljivoj i jednostavnoj tehnici koja uz identifikaciju kemijske vrste daje uvid u strukturu analita. Visoka osjetljivost omogućava detekciju do gotovo jedne molekule u sustavu

SERS tehnika može se koristiti kod biomedicinske dijagnostike (za dijagnostike tumora, Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti, za detekcije i kvantifikacije DNA, proteina, bakterija). Za detekciju bioloških molekula koriste se biosenzori koji su građeni od kompatibilnih nanočestica metala na koji su vezani receptori koje specifično prepoznaju analit stvarajući s njim karakterističnu vezu. Jedan od važnijih biosenzora je onaj za prepoznavanje glukoze u krvi koji omogućava mjerenje šećera u krvi *in vivo*.^{63,64}

Zbog mogućnosti snimanja vodenih otopina vrlo malih koncentracija, SERS spektroskopija je sve češće metoda izbora kod istraživanja interakcija bilo modelnih polinukleotida s malim, potencijalno antitumorskim molekulama, bilo nukleinskih kiselina izoliranih iz živih stanica. Dokazano je da promjene u izgledu SERS spektara mogu ukazivati na vezanja malih organskih molekula s polinukleotidima. Molekule koje se vežu u utore pokazuju nove vrpce u SERS spektrima koje potječu od atoma i skupina dušičnih baza s kojima ostvaruju vodikove veze. Molekule koje se umeću između parova baza udaljuju aktivne male molekule od površine metala što rezultira smanjenjem intenziteta vrpce u SERS spektrima antitumorske molekule.^{65,66,67} Dakle, usporedbom spektra male organske molekule prije i nakon dodatka nukleinske kiseline moguće je odrediti mjesto i način vezanja molekule s DNA/RNA.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Srebrov nitrat, p.a., Kemika

Trinatrijev citrat dihidrat, p.a., Kemika

Kalcijev nitrat, p.a., Kemika

Natrijev klorid, p.a., Kemika

Magnezijev sulfat, p.a., Kemika

Natrijev kakodilat, p.a., Sigma

Poli dAdT–poli dAdT, p.a., Sigma

Poli dGdC–poli dGdC, p.a., Sigma

Poli rA–rU, p.a., Sigma

DNA izolirana iz timusa teleta (engl. *calf thymus* DNA, ct–DNA), p.a., Sigma

Laboratorijsko posuđe za pripremu koloida i otopina modelnih molekula oprano je otopinom deterdženta (Kemex), isprano dušičnom kiselinom ($w(\text{HNO}_3)=5\%$) te deioniziranom Milli-Q vodom.

Kvarcne kivete, korištene za pripremu i snimanje mjernih uzoraka, prane su dušičnom kiselinom ($w(\text{HNO}_3)=5\%$) te temeljito ispirane deioniziranom Milli-Q vodom.

3.2. Mjerni uređaji

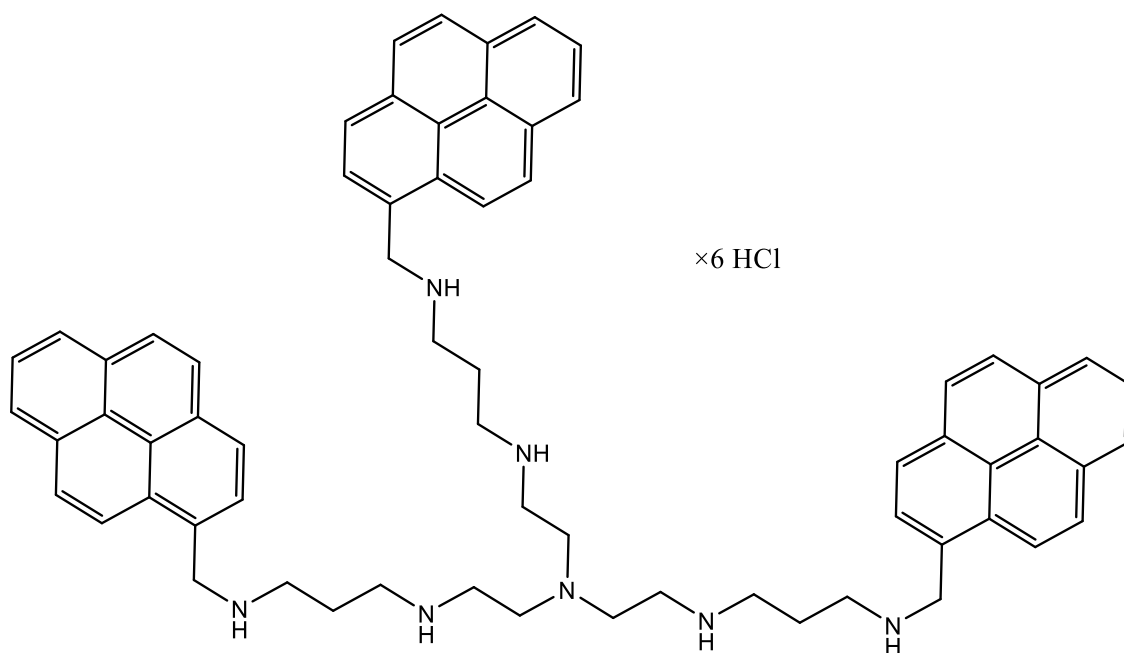
Apsorpcijski spektar koloidne suspenzije snimljen je pomoću UV/VIS spektrofotometra SPECORD 200 tvrtke Analytik Jena. Korištene su kvarcne kivete duljine puta zračenja 1 cm. Spektri su snimljeni u području između 200 i 1100 nm uz razlučivanje od 1 nm.

pH vrijednost koloidne suspenzije određena je na Mettler Toledo MP220 pH metru s InLab 413 kombiniranom elektrodom. Uređaj je prije mjerenja baždaren s otopinama pufera pH 7,00 i 4,00.

Za snimanje Ramanovih i SERS spektara korišten je interferometar EQUINOX 55 tvrtke BRUKER, opremljen s Ramanovim modulom FRA 106/S i Nd:YAG laserom koji emitira zračenje pri 1064 nm. Prilikom snimanja čvrstih uzoraka snaga emitiranog zračenja bila je 300 mW, dok je prilikom snimanja uzoraka u koloidnim suspenzijama snaga lasera bila 500 mW. Uzorci pripremljeni u koloidnim suspenzijama snimani su u kiveti od kvarca iza koje je postavljena zrcalna pločica kako bi se postigla refleksija raspršenog zračenja prema detektoru. Za snimanje čvrstih praškastih uzoraka korišten je nosač od aluminijske folije. Spektri su snimani u području 3500–100 cm^{-1} uz razlučivanje od 4 cm^{-1} , a rezultat su uprosječenja 128 snimaka.

3.3. Istraživani spoj

Spoj *N,N,N*-tri(8-piren-1-il-[3,7-diazaokt-1-il])amin (Spoj **1**) sintetiziran je u grupi prof. Garice-Espana (Sveučilište u Valenciji, Španjolska; publiciranje sinteze u tijeku). Uzorak spoja **1** je dobiven iz Laboratorija za biomolekularne interakcije i spektroskopiju Instituta Ruđer Bošković (voditelj laboratorija: dr. sc. Ivo Piantanida).



Slika 9. Struktura spoja **1**

3.4. Priprava koloidne suspenzije srebra

Koloidna suspenzija srebra pripravljena je redukcijom srebrova nitrata s trinatrijevim citratom prema modificiranom Lee-Meislovom postupku.⁶¹ Srebrov nitrat (36 mg) otopljen je u deioniziranoj vodi (200 cm³). Otopina je zagrijana do vrenja na uljnoj kupelji. U vruću otopinu dodana je topina trinatrijevog citrata ($w(\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) = 1\%$) (4 cm³). Reakcijska smjesa miješa se uz vrenje 60 min pri čemu boja reakcijske smjese prelazi iz bezbojne u smeđe sivu.

3.5. Priprava otopina i mjernih uzoraka

3.5.1. Priprava otopina spoja

Ishodna otopina spoja **1** koncentracije $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pripravljena je otapanjem 0,00179 g krute tvari u 1 ml deionizirane vode. Za priprava mjernih uzoraka različitih koncentracija dodatno su pripravljene otopine nižih koncentracija ($1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ te $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) razrjeđivanjem ishodne otopine spoja **1**.

3.5.2. Priprava otopina polinukleotida

Ishodne otopine ct-DNA, dvolančanih polinukleotida (poli dGdC–poli dGdC, poli dAdT–poli dAdT i poli rA–poli rU) pripravljene su u kakovitom puferu pH 7,0 ionske jakosti $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$. Posebno, otopina ct-DNA je po otapanju sonificirana i filtrirana kroz filter pora $0,45 \mu\text{m}$, kako bi u filtratu bili samo kraći fragmenti dvolančane DNA do par stotina parova baza, karakteristične B–DNA sekundarne strukture. Koncentracije ishodnih otopina polinukleotida određene spektrofotometrijski, izražene kao koncentracije fosfata bile su sljedeće: $c(\text{ct–DNA}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{poli dAdT–poli dAdT}) = 4,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{poli dGdC–poli dGdC}) = 1,73 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{poli rA–poli rU}) = 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

3.5.3. Priprava mjernih uzoraka u koloidnim suspenzijama

Za pripravu mjernih uzoraka u koloidnim suspenzijama kao SERS supstrati korišteni su svježe pripremljeni, koncentrirani i agregirani koloid. Za vrijeme pripreme uzoraka koloid se neprestano miješao na magnetskoj miješalici, a uzorci za mjerenje su pripremani neposredno prije snimanja spektra.

Koncentrirana koloidna suspenzija je dobivena centrifugiranjem koloida brzinom od 5000 okretaja po minuti tijekom 15 minuta, nakon čega se odvaja supernatant od taloga tako da je 85 % supernatanta uklonjeno, a 15 % preostalog supernatanta se promiješalo s talogom. Tako je od 70 mL svježe pripremljenog koloida dobiveno 10,5 mL koncentriranog koloida.

Uzorci za mjerenje SERS spektara spoja **1** različitih koncentracija pripremljeni su miješanjem 400 μL svježe pripremljene ili koncentrirane koloidne suspenzije i odgovarajućeg volumena ishodnih otopina spoja **1** te nadopunjavanjem deioniziranom vodom do ukupnog volumena od 500 μL . Koncentracije spoja **1** u uzorcima za SERS mjerenje bile su 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 5×10^{-6} , 1×10^{-6} , 5×10^{-7} i 1×10^{-7} mol dm^{-3} .

Mjerni uzorci ispitivanih spojeva koncentracija 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 5×10^{-6} , 1×10^{-6} , 5×10^{-7} i 1×10^{-7} mol dm^{-3} u agregiranoj koloidnoj suspenziji pripremljeni su na način da su mikropipetom redom dodani i promiješani određeni volumen odgovarajuće otopine spoja **1**, zatim deionizirana voda, 400 μL svježe pripremljenog koloida srebra, te ukupno 50 μL agregirajućeg sredstva. Za agregaciju koloida srebra korištene su vodene otopine kalcijevog nitrata (1×10^{-3} mol dm^{-3}) i natrijevog klorida (1×10^{-2} mol dm^{-3}). Soli za agregaciju dodavane su prema redosljedu prema kojem je prvo dodan kalcijev nitrat, a zatim natrijev klorid u jednakom volumenu. Ukupni volumen svakog mjernog uzorka iznosio je 500 μL .

Uzorci za mjerenje SERS spektara smjesa spoja **1** i dvolančanih polinukleotida pripremljeni su na dva načina. U prvom slučaju 50 μL otopine spoja **1** ($c = 5 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) pomiješano je s 400 μL koncentrirane koloidne suspenzije srebra, nakon čega je dodano 25 μL otopine odgovarajućeg polinukleotida ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}) i 25 μL kakodilatnog pufera. U drugom slučaju pomiješani su najprije odgovarajući volumeni otopina spoja **1** i polinukleotida u puferu, a zatim je dodano 400 μL koncentrirane koloidne suspenzije srebra. Koncentracija otopina polinukleotida (poli dAdT – poli dAdT, poli dGdC – poli dGdC, poli rA – poli rU, ct-DNA) za pripravu smjesa spoj **1**/polinukleotid omjera 1/1 i 1/5 bila je 1×10^{-4} mol dm^{-3} , a za

smjese omjera 1/10 1×10^{-3} mol dm⁻³. Koncentracija spoja **1** u svim uzorcima bila je 5×10^{-6} mol dm⁻³.

Uzorci za mjerenje koloida s MgSO₄ pripremani su na način da je molarni omjer spoja **1**/DNA iznosio 1/1, koncentracija spoja **1** u sustavu je bila 5×10^{-6} mol dm⁻³, a kao supstrat je korišten svježe pripremljeni koloid. Koncentracija otopine magnezijeva sulfata u sustavu je iznosila 0,1 mol dm⁻³.

3.5.4. Reproducibilnost

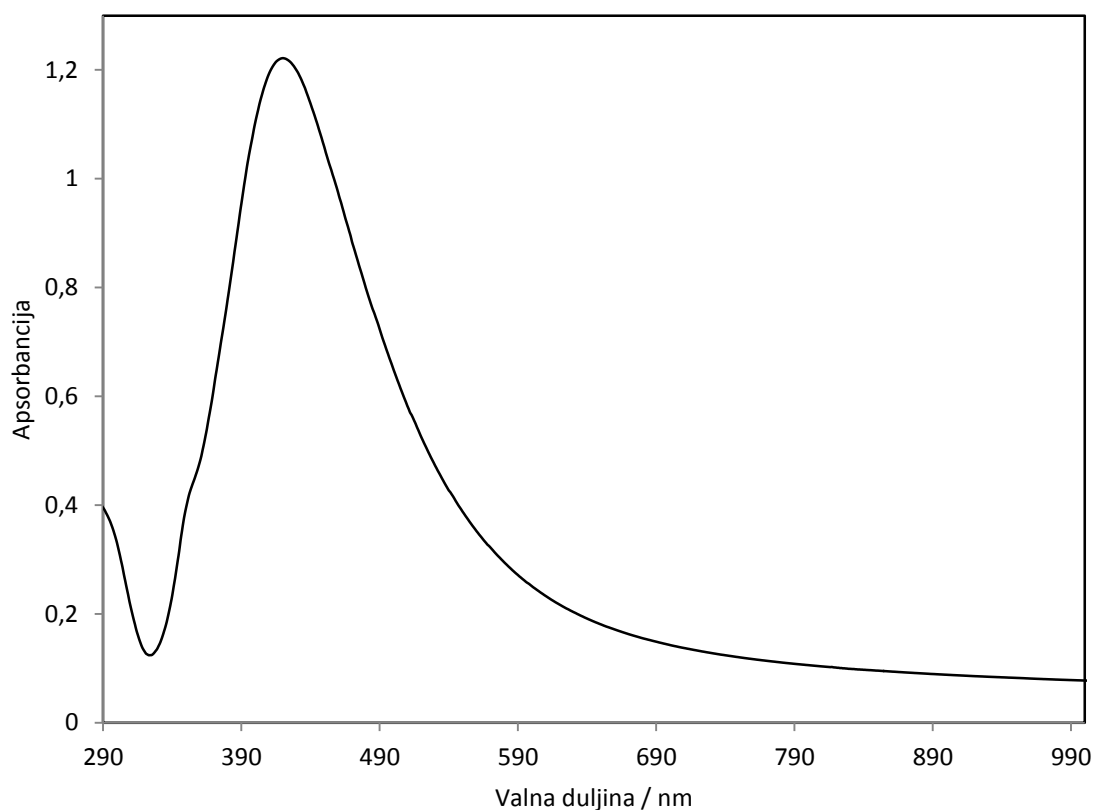
Za određivanje reproducibilnosti mjerenja pripremljeni su uzorci smjesa spoja **1** i DNA koncentracijskih omjera 1/10 na oba načina, pri čemu su korišteni metalni supstrat i koncentracija spoja **1** pri kojima je opažen najintenzivniji SERS spektar. Tri mjerna uzorka smjese pripremljena su na isti način. Potom je provedeno snimanje jednog mjernog uzorka tri puta, a za preostala dva mjerna uzorka provedeno je samo po jedno snimanje.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Karakterizacija koloidne suspenzije srebra

Koloid je pripremljen redukcijom srebrovog nitrata s trinatrijevim citratom. Prilikom redukcije srebrovih iona nastaju acetondikarboksilna kiselina i acetocena kiselina.⁶⁸ Zajedno s citratima djeluju kao stabilizirajući agensi koji se nalaze na površinama nanočestica srebra.

Valna duljina maksimalne apsorpcije koloidne suspenzije izmjerena je pri 420 nm, a pH vrijednost je iznosila 6,83.

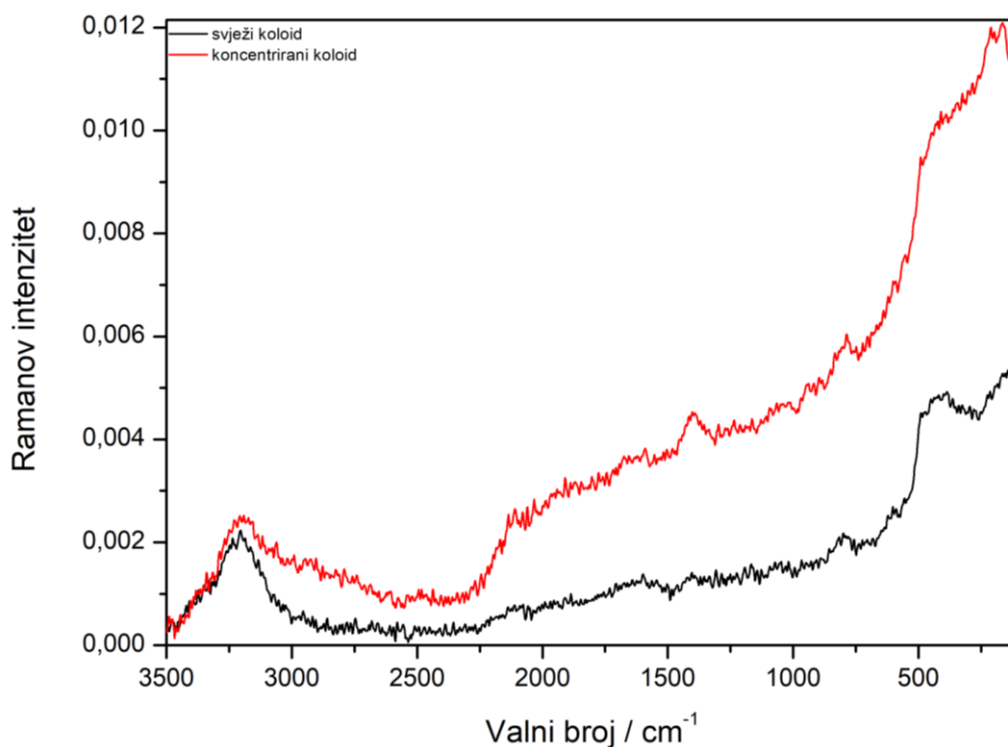


Slika 10. Apsorpcijski spektar koloidne suspenzije srebra

Ramanovi spektri svježe pripremljenog i koncentriranog koloida srebra prikazani su na slici 11. U oba spektra upečatljiva je široka vrpca srednjeg intenziteta u području između 3500 i 3000 cm^{-1} koja odgovara istezanju O–H veze iz vode.⁵³

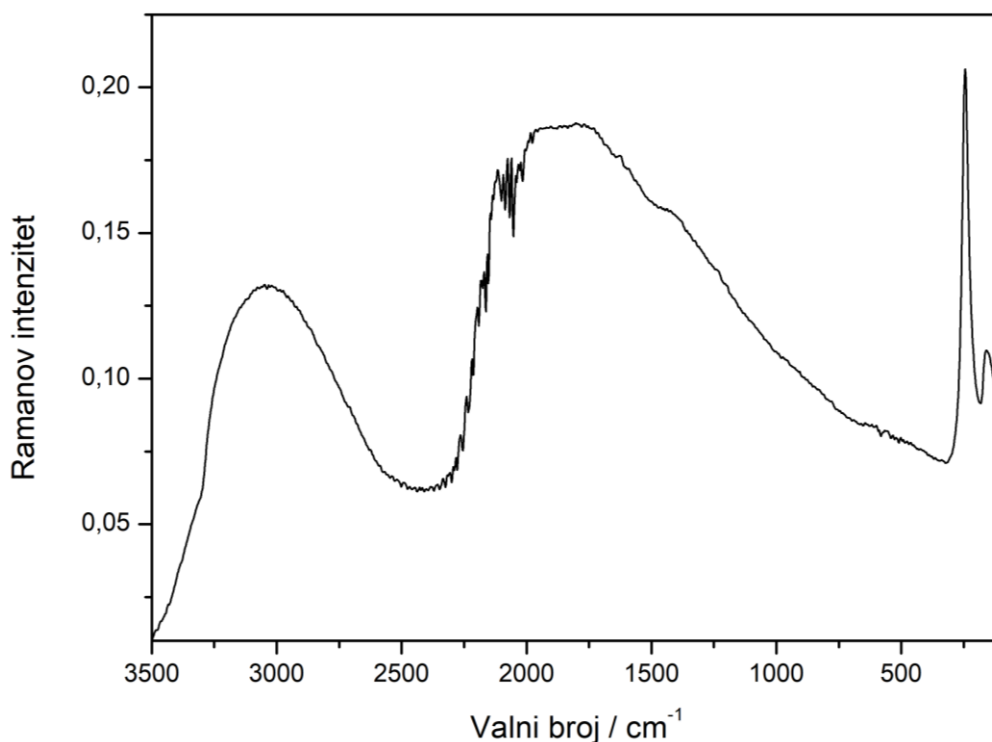
U spektrima svježe pripremljenog koloida nisu uočene vrpce koje bi se mogle pripisati karakterističnim vibracijama citratnih iona koji se nalaze na površini nanočestica srebra, zbog kojih nanočestice nose negativan naboj. Kako je trinatrijev citrat korišten kao reducirajući agens u pripravi koloida, nakon redukcije zaostali citratni ioni se smještaju na nanočestice srebra i na taj način ih stabiliziraju i sprječavaju njihovu agregaciju.⁶⁰ Ramanov spektar trinatrijeva citrata prikazan je na slici D1 u Dodatku. U spektru koloida također nisu uočene niti karakteristične vrpce vibracija nitratne skupine (spektar srebrovog nitrata prikazan je na slici D2).

U spektru koncentrirane suspenzije srebra, pripravljene centrifugiranjem svježeg koloida, uočava se podignuta bazna linija, koja se pripisuje jačem raspršenju zračenja na većem broju nanočestica srebra u jednakom volumenu suspenzije (slika 11). Vrpce oko 1400 i 800 cm^{-1} odgovaraju vibracijskim modovima citratnih aniona koji su pojačani uslijed nastanka agregata gdje približavanje nanočestica može rezultirati nastankom potencijalnih „vrućih točaka“ u kojima je pojačanje raspršenja zračenja vrlo intenzivno.^{60,69}



Slika 11. Ramanovi spektri svježe pripravljene i koncentrirane koloidne suspenzije srebra

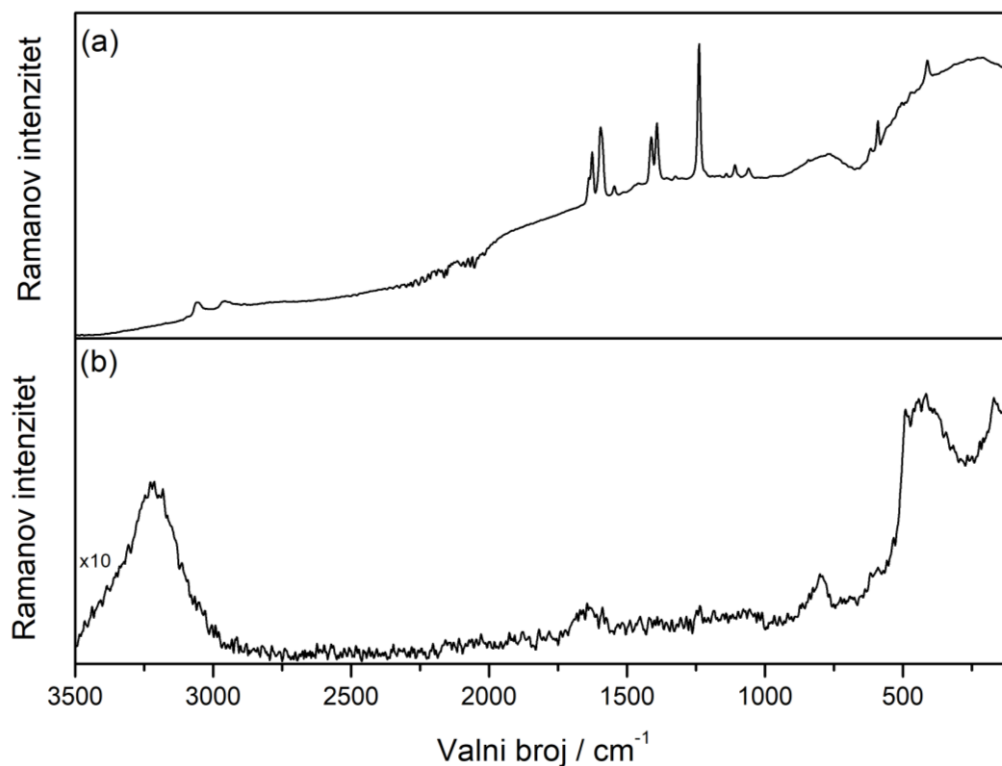
Na slici 12 prikazan je spektar koloida srebra agregiranog s kalcijevim nitratom ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) i natrijevim kloridom ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$). Pozitivno nabijeni ioni kalcija neutraliziraju negativno nabijene citratne ione na površini nanočestica srebra, što rezultira agregacijom nanočestica.⁵³ Dodani kloridni ioni istiskuju slabo vezane citratne anione s površine nanočestica te se molekule analita mogu približiti metalnoj površini. U spektru se opaža oštra intenzivna vrpca pri približno 240 cm^{-1} koja odgovara istezanju veze Ag–Cl, a rezultat je kemijskog vezanja kloridnih iona na površinu srebra.⁵³



Slika 12. Ramanov spektar agregirane koloidne suspenzije srebra

4.2. FT-Ramanovi spektri spoja 1

Snimljeni su Ramanovi spektri krutog uzorka spoja **1** te njegove vodene otopine koncentracije $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ (slika 13).



Slika 13. Ramanovi spektar (a) čvrste tvari spoja **1** i (b) vodene otopine spoja **1**, $c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

U Ramanovom spektru molekule spoja **1**, koja na krajevima tri aminometilenska lanca sadrži pirenski sustav, opažaju se dvije slabe vrpce u području $3060\text{--}2950 \text{ cm}^{-1}$ koje se pripisuju istezanjima C–H veza pirenskih prstenova te metilenskih skupina (tablica 1). Srednje intenzivne vrpce na 1627 , 1596 i 1412 cm^{-1} potječu od istezanja C–C veza u aromatskom sustavu dok je vrpca na 1546 cm^{-1} pripisana deformaciji NH skupine iz aminometilenskih lanaca.⁷⁰ Deformacija metilnih skupina daje vrpca na 1392 cm^{-1} . Najintenzivnija vrpca u spektru na 1239 cm^{-1} potječe od vibracijskih modova pirenskog sustava. U području $1150\text{--}1050 \text{ cm}^{-1}$ javljaju se vrpce svijanja C–H veza pirenskih prstenova u ravnini.⁷¹ Širokom spletu vrpce u području oko 800 cm^{-1} doprinose deformacije CH veza pirenskog sustava te modovi svijanja i istezanja

poliaminskih lanaca.⁷¹ Pri nižim valnim brojevima nalaze se vrpce koje odgovaraju deformacijama aminometilenskih lanaca i torzijama pirenskih prstenova.

Tablica 1. Vrpce Ramanovog spektra čvrste tvari i vodene otopine spoja **1** ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3})^{68, 70, 71}

Valni broj / cm^{-1}		Vibracija
Krutina	Otopina	
3059		$\nu =\text{C-H}$ piren
2957		$\nu \text{C-H}$ (CH_2)
1639sh		νCC piren
1627	1630b	νCC piren
1596		νCC piren
1546		δNH_2
1412		νCC piren
1392		δCH_2
1239	1234	$\nu \text{CC}/\delta_{\text{ip}} =\text{C-H}$ piren
1140		$\nu \text{C-N-C}$, $\delta_{\text{ip}} =\text{C-H}$ piren
1108		$\delta_{\text{ip}} =\text{C-H}$ piren
1059		$\delta_{\text{ip}} =\text{C-H}$ piren
843b		$\delta_{\text{oop}} =\text{C-H}$ piren, $\nu \text{C-N-C}$
770b		δCH_2 , $\delta_{\text{oop}} =\text{C-H}$ piren
590		ν piren
410		ν piren, δCNC

Kratice: ν -istezanje; δ -deformacija; sh-rame; b-široko; ip-u ravnini; oop-izvan ravnine.

U vodenoj otopini spoja **1** koncentracije $c = 1 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} vidljive su vrlo slabe vrpce koje odgovaraju karakterističnim vibracijskim modovima pirenskog sustava oko 1630 i 1240 cm^{-1} .⁷¹

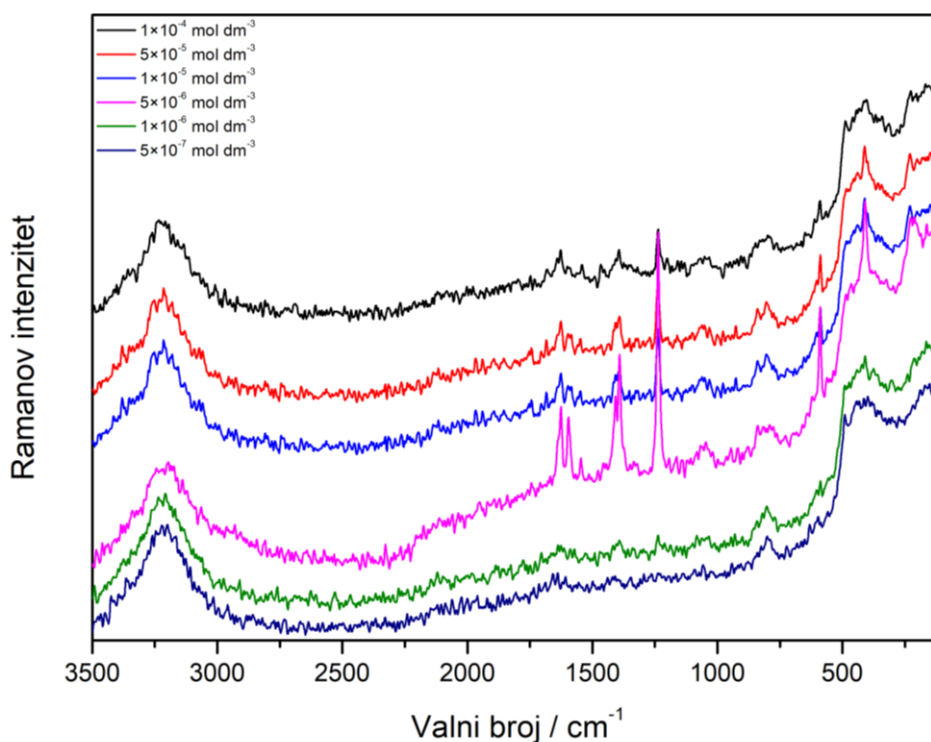
4.3. SERS spektri spoja **1**

4.3.1. Koncentracijska ovisnost

Uvjet za površinsko pojačanje raspršenog zračenja, odnosno opažanje SERS spektara molekule je vezanje ili blizina molekule i metalne površine. U svrhu odabira prikladnog SERS supstrata istražena je koncentracijska ovisnost spoja **1** u svježoj, koncentriranoj i agregiranoj koloidnoj suspenziji srebra s ciljem određivanja koncentracije spoja pri kojoj je raspršenje zračenja najjače i vpcu u spektru su najintenzivnije, a s ciljem da se odredi optimalna koncentracija spoja za pripremu smjese s polinukleotidima.

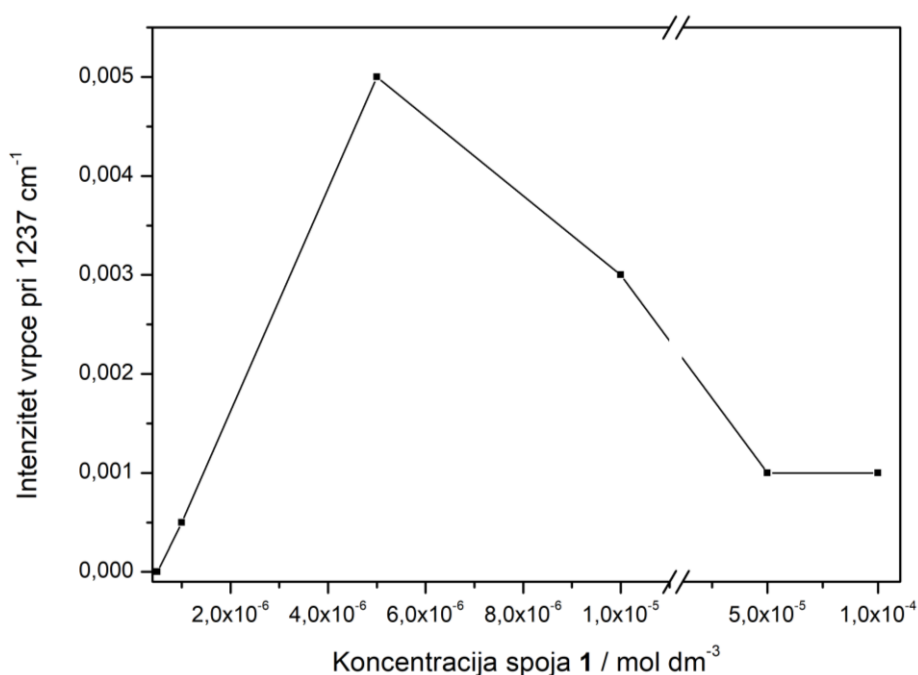
4.3.2. Svježe pripravljena koloidna suspenzija

Dobiveni SERS spektri spoja **1** u svježem koloidu u koncentracijskom području $5 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³ prikazani su na slici 14.



Slika 14. SERS spektri spoja **1** različitih koncentracija na svježem koloidu. Spektri su razmaknuti radi preglednosti

Pozitivno nabijene molekule spoja **1** elektrostatski su privučene negativno nabijenim citratnim ionima te se nalaze blizu metalne površine što rezultira pojačanjem raspršenja zračenja. Intenzitet površinski pojačanog raspršenog zračenja spoja **1** ovisi o koncentraciji spoja u koloidnoj suspenziji, no pri tome ne prati linearan trend. Na to vrlo jasno ukazuje prikaz ovisnosti intenziteta vrpce na 1238 cm^{-1} , koja potječe od vibracija pirenskog sustava, o koncentraciji spoja **1** u mjernom uzorku prikazan na slici 15.⁷¹



Slika 15. Ovisnost intenziteta vrpce na 1238 cm^{-1} o koncentraciji spoja **1** u suspenziji svježeg koloida

Koloidni uzorak najveće istraživane koncentracije spoja **1**, $c(\mathbf{1}) = 1 \times 10^{-4}\text{ mol dm}^{-3}$, slabo raspršuje zračenje. Smanjenjem koncentracije, intenzitet vrpce u spektrima raste, što znači da se raspršenje zračenja pojačava i dostiže svoj maksimum kod koncentracije $5 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$. Daljnjim smanjenjem koncentracije intenzitet vrpce slabi i SERS spektar uzorka najmanje koncentracije, $c(\mathbf{1}) = 5 \times 10^{-7}\text{ mol dm}^{-3}$, odgovara spektru čistog svježe pripremljenog koloida.

Molekule s planarnim aromatskim motivima u svojoj strukturi vrlo često su podložne agregaciji pri višim koncentracijama u vodenim otopinama.^{53,65} U strukturi spoja **1** svaki od aminometilenskih lanaca završava s pirenskim sustavom i vrlo vjerojatno se kod mjerne otopine najveće koncentracije pirenski prstenovi „slažu“ jedan na drugi tvoreći agregate. Takvi složeni sustavi se na različite načine orijentiraju prema metalnoj površini, te je stoga i raspršenje

zračenja slabije. Smanjenjem koncentracije ravnoteža se pomiče prema monomerima. Pojedinačne molekule lakše zauzimaju optimalne položaje prema srebrovim nanočesticama i rezultat toga su intenzivnije vrpce u SERS spektrima. Smanjenjem koncentracije osobito se pojačavaju vrpce vibracijskih modova pirena što upućuje na okomito smještanje pirenskih prstenova na površinu metala.⁴⁶ Daljnjim smanjenjem koncentracije u sutavu je prisutan manji broj molekula spoja **1** koje se na različite načine mogu orijentirati prema površini srebra, čak i paralelno s površinom, što ne doprinosi pojačanju raspršenja u SERS spektroskopiji.

U tablici 2 prikazana je asignacija vrpca spoja **1** u SERS spektrima mjernih uzoraka različitih koncentracija, pripremljenih u svježoj koloidnoj suspenziji. Radi usporedbe, prikazane se i vrpce u Ramanovom spektru krutine **1**, s obzirom da SERS spektar otopine pirenskog derivata poliamina pokazuje samo nekolicinu vrpca zbog niske koncentracije.

Tablica 2. Vibracijske vrpce u FT-Ramanovom spektru čvrstog uzorka i SERS spektrima spoja **1** različitih koncentracija u svježem koloidu^{68,70,71}

FT Raman	Valni broj / cm^{-1}						Vibracija
	SERS						
Spoj 1	1×10^{-4} mol dm^{-3}	5×10^{-5} mol dm^{-3}	1×10^{-5} mol dm^{-3}	5×10^{-6} mol dm^{-3}	1×10^{-6} mol dm^{-3}	5×10^{-7} mol dm^{-3}	
1627	1627	1626	1627	1626	1628		v CC piren
1596		1598	1598	1596			v CC piren
1546	1542	1548	1549	1546			δ NH ₂
1412		1408	1409	1407			v CC piren
1392	1394	1392	1394	1392	1394		δ CH ₂
1239	1237	1238	1239	1237	1240		v CC/ δ_{ip} =C-H piren
843	848	842	843	839	841		δ_{oop} =C-H piren, v C-N-C
	799	804	803	792	804	801	Citrati
590	590	589	591	590	594		v piren
410		413	410	411	417		v piren, δ CNC
	236	230	233	226			v Ag-Cl; v Ag-N

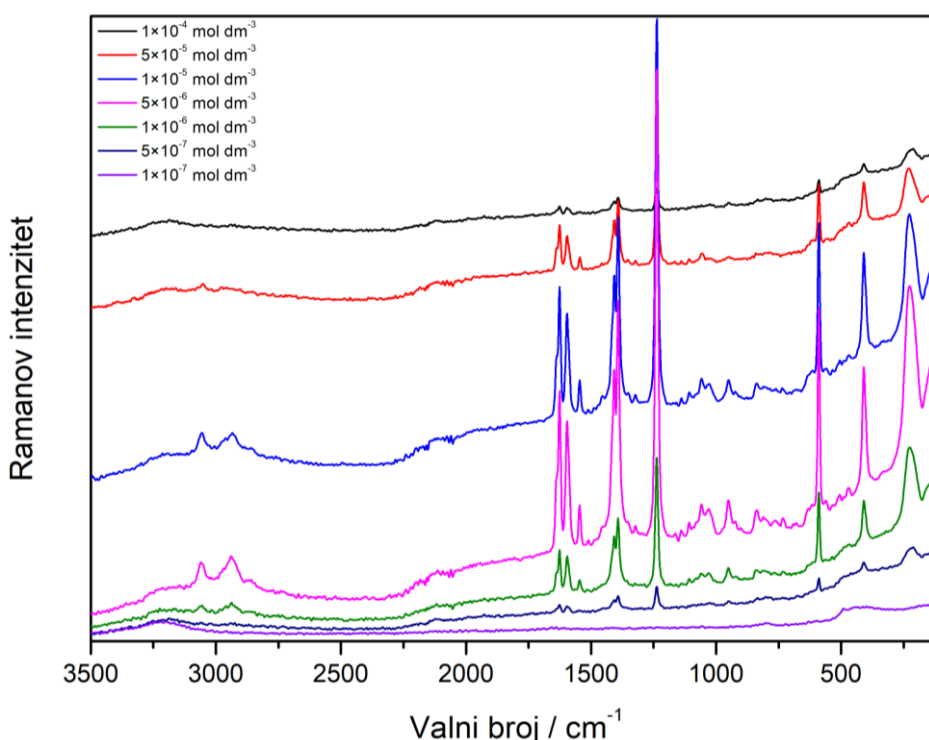
Kratice: v-istezanje; δ -deformacija; ip-u ravnini; oop-izvan ravnine.

Vrpce u SERS spektrima, čiji intenziteti rastu smanjenjem koncentracije spoja **1** u mjernom uzorku, potječu većinom od vibracijskih modova pirena i smještene su oko 1630, 1600, 1410 i

590 cm^{-1} i dokaz su promijene orijentacije molekula spoja **1** na nanočesticama srebra. Nova široka vrpca koja se javlja u spektru pri 800 cm^{-1} ne potječe od istraživanih spoja, već odgovara vibraciji citratnih aniona i njihovih oksidacijskih produkata zaostalih na površini nanočestica.⁶⁸ U području niskih valnih brojeva opažaju se vrpce oko 240 cm^{-1} kojima doprinose istezanja Ag–Cl veze između nanočestica srebra i kloridnih iona iz spoja **1**, te Ag–N veze nastale vezanjem dušika iz poliaminskih lanaca s površinom srebra.⁵³

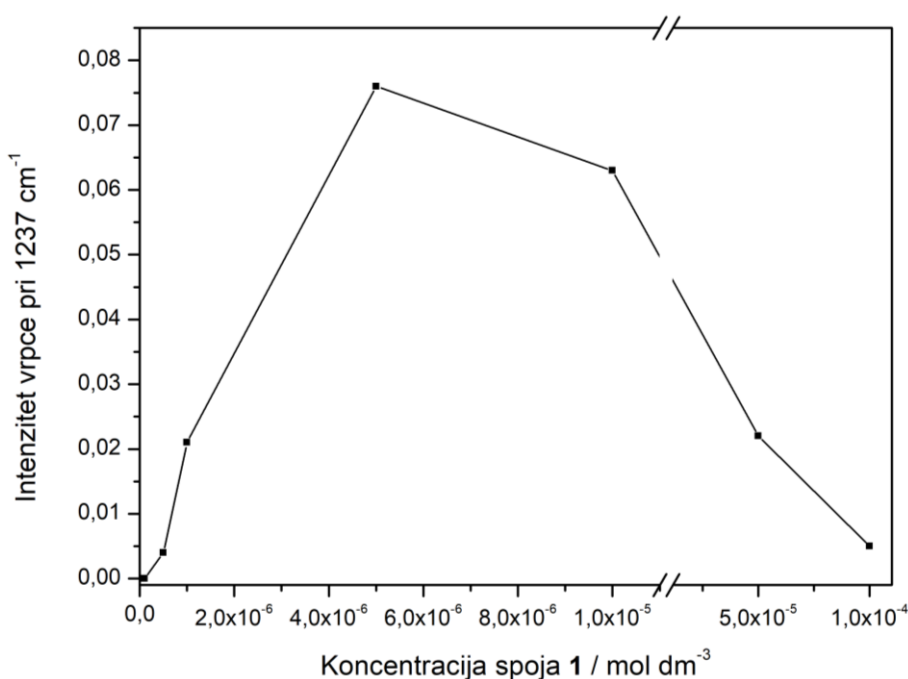
4.3.3. Koncentrirana koloidna suspenzija

Koncentracijski ovisni SERS spektri spoja **1** (1×10^{-7} – 1×10^{-4} mol dm^{-3}) u koncentriranoj koloidnoj suspenziji srebra (prikazani na slici 16) očekivano su jačeg intenziteta od spektara snimljenih u svježem koloidu srebra. Centrifugiranjem koloidne suspenzije povećan je broj nanočestica u odnosu na isti volumen svježeg koloida te uklonjen suvišak citratnih iona, čime je omogućena spontana agregacija nanočestica srebra. Agregiranjem nanočestica nastaju mjesta vrlo jakih električnih polja, tzv. vruće točke,^{46,72} na kojima adsorbirane molekule spoja **1** intenzivno raspršuju zračenje.



Slika 16. Koncentracijski ovisni SERS spektri spoja **1** na koncentriranom koloidu. Spektri su razmaknuti radi preglednosti

Vrpce u SERS spektrima spoja **1** u koncentriranoj koloidnoj suspenziji prate trend sličan onome kad je korišten svježe pripremljen koloid kao metalni supstrat, te nije primjećena linearna promjena intenziteta promjenom koncentracije (slika 17). U koncentriranoj koloidnoj suspenziji srebra najintenzivniji SERS spektar opažen je pri koncentraciji $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, jednako kao i u svježem koloidu, no znatno jačeg intenziteta (vrpca na 1238 cm^{-1} je gotovo 15 puta intenzivnija u koncentriranom koloidu, u odnosu na svježi koloid). U koncentriranom koloidu uočene su vrpce slabog intenziteta spoja **1** i kod koncentracije $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, što je niža koncentracija nego u svježem koloidu.



Slika 17. Ovisnost intenziteta vrpce na 1238 cm^{-1} o koncentraciji spoja **1** u suspenziji koncentriranog koloida

U tablici 3 dan je popis i pripadajuća asignacija vrpca spoja **1** različitih koncentracija korištenjem koncentriranog koloida kao SERS supstrata. Smanjenjem koncentracije spoja **1** u SERS spektrima se pojačava raspršenje zračenja i proviruju vrpce pri višim valnim brojevima koje potječu od CH istežanja lanaca i aromatskog sustava.⁷¹ Najintenzivnije vrpce potječu od vibracija pirena i podupiru teoriju o optimalnom okomitom smještaju pirenskih prstenova na površinu metala gdje je promjena polarizabilnosti najveća.

U SERS spektrima su vidljive nove vrpce oko 1300 i 950 cm^{-1} koje su rezultat vibracijskih modova citratnih aniona.⁶⁸ Vrpce su jasno definirane i javljaju se kod svih

istraživanih koncentracija što upućuje na zaključak da se prilikom agregacije koloidnih čestica pojačavaju ne samo vrpce spoja **1** nego i anomalne vrpce ostalih molekulskih vrsta u otopini, ako su dovoljno blizu metalne površine srebrne nanočestice.

Nova vrpca pri oko 225 cm^{-1} potječe od veze Ag–N čime je dokazano da pojačanje Ramanova raspršenja ovisi, uz elektromagnetski, i o kemijskom mehanizmu.⁵³

Tablica 3. Vibracijske vrpce u FT-Ramanovom spektru čvrstog uzorka i SERS spektrima spoja **1** različitih koncentracija u koncentriranom koloidu^{68,70, 71}

		Valni broj / cm^{-1}						Vibracija
FT Raman	SERS							
Spoj 1	1×10^{-4} mol dm^{-3}	5×10^{-5} mol dm^{-3}	1×10^{-5} mol dm^{-3}	5×10^{-6} mol dm^{-3}	1×10^{-6} mol dm^{-3}	5×10^{-7} mol dm^{-3}	1×10^{-7} mol dm^{-3}	
3059		3053	3056	3063	3058			$\nu =\text{C-H}$ piren
2957			2935	2938				$\nu \text{C-H}$ (CH_2)
1627	1626	1626	1626	1626	1626	1626		νCC piren
1596	1595	1596	1596	1596	1596	1596		νCC piren
1546	1546	1545	1546	1546	1546			δNH_2
1412	1408	1407	1407	1407	1407	1407		νCC piren
1392	1392	1392	1392	1392	1392	1392		δCH_2
1239	1238	1237	1237	1237	1238	1238		νCC piren $\delta_{\text{ip}} =\text{C-H}$ piren
1140	1141	1139	1139	1139	1141			$\nu \text{C-N-C}$, $\delta_{\text{ip}} = \text{C-H}$ piren
1108	1101	1107	1107	1108	1107			$\delta_{\text{ip}} =\text{C-H}$ piren
1059	1055	1057	1058	1059	1060			$\delta_{\text{ip}} =\text{C-H}$ piren
	1020	1022	1026	1029	1030			citrati
	939	948	950	951	951	950	950	citrati
843	841	841	839	838	840			$\delta_{\text{oop}} =\text{C-H}$ piren, $\nu \text{C-N-C}$
590	589	589	589	589	589	589		ν piren
410	410	410	410	410	410	410		ν piren, δCNC
	227	229	227	227	226	213		$\nu \text{Ag-N}$

Kratice: ν -istezanje; δ -deformacija; ip-u ravnini; oop-izvan ravnine.

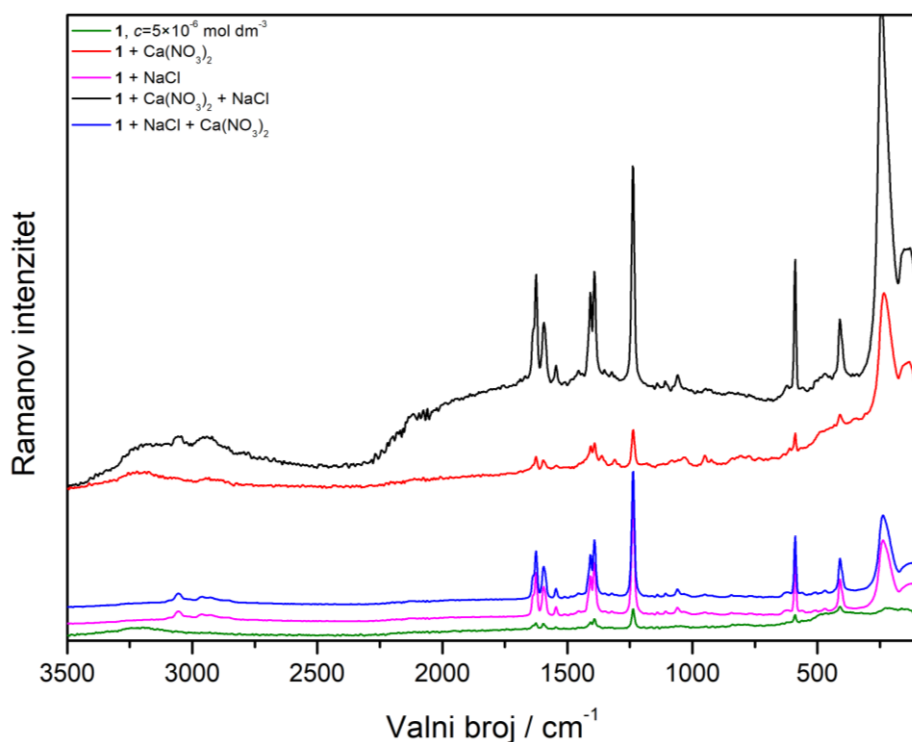
4.3.4. Agregirana koloidna suspenzija

U svježem koloidu citratni anioni se nalaze na površini nanočestica te uslijed elektrostatskih odbijanja stabiliziraju nanočestice srebra koje ostaju dispergirane u otopini. Iz literature je

poznato da agregacija nanočestica rezultira stvaranjem mjesta, poznatih kao „vruće točke“⁷² (engl. *hot spots*), između dviju ili više metalnih nanočestica, u kojima je iznimno povećanje raspršenja.⁶² Agregacija se može spontano izazvati koncentriranjem samog koloida (povećanjem broja nanočestica u volumenu suspenzije gdje se dio citratnih iona odvaja iz sustava u supernatantu) ili dodavanjem poznatih agregirajućih agensa.⁷³ Dodatkom određenih anorganskih soli, naboj citrata se neutralizira te nestaju odbojne sile među nanočesticama, koje se onda mogu lakše približiti i stvarati agregate. SERS spektri spoja **1** u koncentriranom koloidu znatno su intenzivniji u odnosu na spektre u svježe pripremljenom izvornom koloidu, što navodi na zaključak da spontana agregacija pogoduje pojačanju raspršenja zračenja, stoga je ispitan utjecaj ciljane agregacije koloidnih nanočestica na izgled spektra istraživanog spoja.

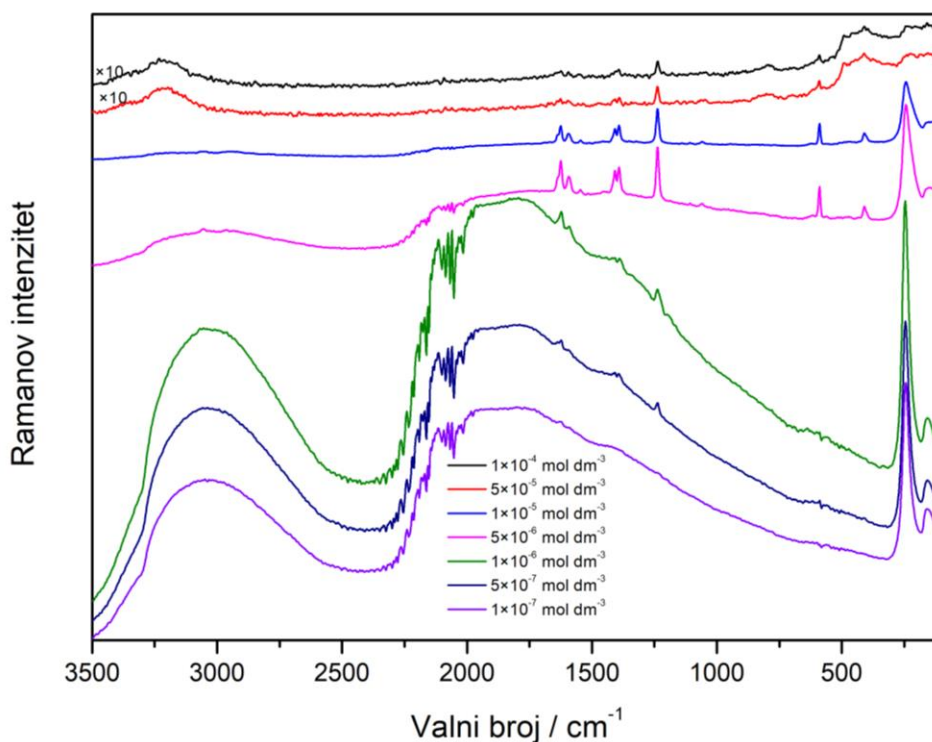
Prije snimanja koncentracijski ovisnih SERS spektara u agregiranom koloidu, ispitan je utjecaj agregirajućih sredstava na pojačanje raspršenja zračenja. Kao agregirajuća sredstva korišteni su natrijev klorid ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) i kalcijev nitrat ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) koji su u različitom redosljedu, bilo sami, bilo u kombinaciji, dodavani u mjerni uzorak spoja **1** u svježe pripremljenom koloidu. Izabrana koncentracija istraživanog spoja je bila $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, budući da je kod te koncentracije raspršenje zračenja bilo najintenzivnije.

SERS spektar otopina **1** ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) u svježem koloidu prikazan je da dnu slike 18 i sadrži karakteristične vrpce pirenskog sustava. Dodatak otopine NaCl u koloidni sustav dolazi do pojačanja raspršenja zračenja i porasta intenziteta vrpce spoja **1**. Dodatak otopine $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ u isti mjerni uzorak ne rezultira značajnijom promjenom izgleda SERS spektra. Kada se u uzorak spoja **1** u svježe pripremljenom koloidu doda otopina kalcijeva nitrata, pojačanje Ramanovog raspršenja nije puno intenzivnije u odnosu na uzorak spoja **1** bez agregirajućeg sredstva, ali se u spektru javljaju nove vrpce koje odgovaraju vibracijama citratnih aniona (oko 950 cm^{-1}).⁶⁸ Za pretpostaviti je da se citratni anioni nalaze na mjestu „vrućih točaka“ i zato dolazi do pojačanja raspršenja citratnih iona. Dodatkom otopine NaCl u isti mjerni uzorak rezultira intenzivnim povećanjem intenziteta vrpca u SERS spektru istraživanog spoja. Pretpostavlja se da ioni natrija svojih pozitivnim nabojem neutraliziraju negativno nabijene citratne ione na površini nanočestica te se nanočestice mogu približiti jedna drugoj i potiče se agregacija. Dodani kloridni ioni zamjenjuju citratne ione na površini metala i na taj način smanjuju steričku barijeru (obzirom da su manji od citratnih aniona) između metalne površine i molekula spoja **1**.⁶¹ Nova, izrazito pojačana vrpca u spektru oko 240 cm^{-1} potječe od Ag-Cl veze i dokaz je djelomične zamjene citratnih iona kloridnima.



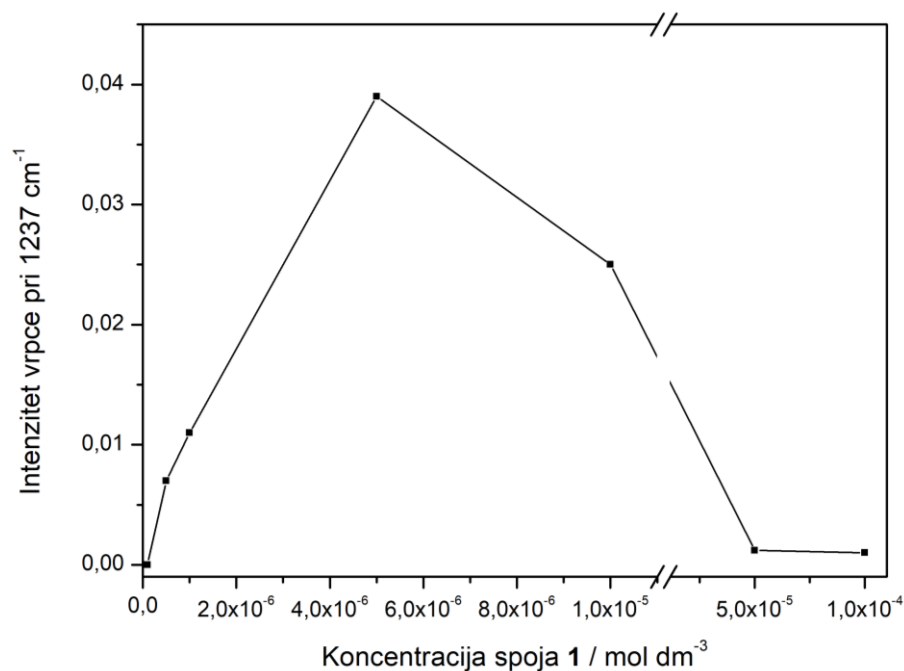
Slika 18. SERS spektri spoja **1** (5×10^{-6} mol dm⁻³) u svježe pripremljenom koloidu srebra: bez agregirajućeg sredstva (zeleno), s NaCl ($c = 1 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³) (rozo), s NaCl ($c = 1 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³) i Ca(NO₃)₂ ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³) (plavo), s Ca(NO₃)₂ ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³) (crveno), s Ca(NO₃)₂ ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³) i NaCl ($c = 1 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³) (crno). Spektri su razmaknuti radi preglednosti

Budući da je dodatak kombinacije agregirajućih sredstava, gdje je prvo u sustav dodan kalcijev nitrat, a zatim natrijev klorid, rezultirao najjačim pojačanjem Ramanova raspršenja u mjernom uzorku istraživanog spoja, koncentracijski ovisni spektri spoja **1** na agregiranom koloidu pripremani su dodatkom agregirajućih agensa navedenim redoslijedom. Dobiveni SERS spektri otopina spoja **1** prikazani su na slici 19.



Slika 19. Koncentracijski ovisni SERS spektri spoja **1** na agregiranom koloidu. Spektri su razmaknuti radi preglednosti

SERS spektri svih mjernih uzorka u ispitivanom koncentracijskom području 1×10^{-7} – 1×10^{-4} mol dm^{-3} pokazuju pojačanje intenziteta Ramanova raspršenja, ali intenzitet vrpce se ne mijenja linearno s povećanjem koncentracije, što je vidljivo sa slike 20. Porast bazne linije uslijed smanjenja koncentracije spoja **1** u mjernim uzorcima pripisuje se pojačanju raspršenja zračenja na agregiranim nanočesticama. Najintenzivnije vrpce uočene su kod mjernog uzorka spoja **1** koncentracije, $c = 5 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} i odgovaraju vibracijskim modovima pirenskih prstenova (tablica 4) te ukazuju na adsorpciju aromatskog sustava okomito na metalnu površinu nanočestica. Pri svim ostalim koncentracijama, većim i manjim od $c(\mathbf{1}) = 5 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} molekule se smještaju pod kutem u odnosu na površinu srebra, bilo zbog agregata, bilo zbog malog broja molekula u uzorku, te je intenzitet raspršenog zračenja slabiji. Koncentracija u kojoj se još uvijek detektiraju vrpce istezanja spoja **1** je $c = 5 \times 10^{-7}$ mol dm^{-3} , dok spektar niže koncentracije odgovara Ramanovom spektru agregiranog koloida. Intenzivna vrpca oko 240 cm^{-1} dokaz je kemijskog vezanja kloridnih iona iz agregacijskog sredstva (NaCl) s površinom srebrovih nanočestica.⁵⁷



Slika 20. Ovisnost Intenziteta odabrane vrpce o koncentraciji spoja u suspenziji agregiranog koloida

Tablica 4. Vibracijske vrpce u FT-Ramanovom spektru čvrstog uzorka i SERS spektrima spoja **1** različitih koncentracija u agregiranom koloidu.^{68,70,71}

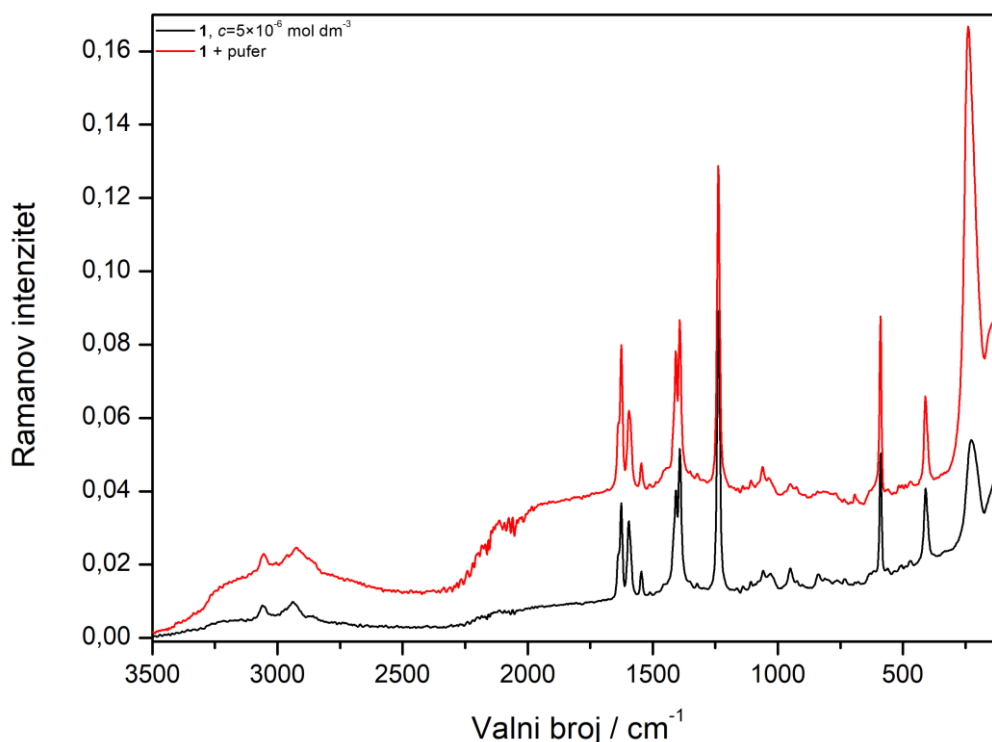
		Valni broj / cm ⁻¹						Vibracija
FT Raman		SERS						
Spoj 1	1 × 10 ⁻⁴ mol dm ⁻³	5 × 10 ⁻⁵ mol dm ⁻³	1 × 10 ⁻⁵ mol dm ⁻³	5 × 10 ⁻⁶ mol dm ⁻³	1 × 10 ⁻⁶ mol dm ⁻³	5 × 10 ⁻⁷ mol dm ⁻³	1 × 10 ⁻⁷ mol dm ⁻³	
				3055				v =C-H piren
1627	1624	1626	1625	1626	1623			v CC piren
1596	1594	1597	1594	1593				v CC piren
1546	1554	1536	1545	1546				δ NH ₂
1412		1408	1408	1408				v CC piren
1392	1393	1391	1392	1392				δ CH ₂
1239	1237	1238	1238	1238	1238	1238		v CC piren δ _{ip} =C-H piren
1059			1059	1060				δ _{ip} =C-H piren
590	590	590	589	589				v CC piren
410	410	411	410	410				v piren, δ CNC
	242	224	244	243	246	245	244	v Ag-Cl

Kratice: v-istezanje; δ-deformacija; ip-u ravnini; oop-izvan ravnine.

Uspoređujući intenzitete vrpca u SERS spektrima otopina istraživanog spoja različitih koncentracija u svježe pripremljenom, koncentriranom i agregiranom koloidu zapaža se da spektar koncentracije spoja **1**, $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, najefikasnije raspršuje zračenje u koncentriranom koloidu. Iz tog razloga se navedena koncentracija istraživanog spoja koristila kao radna koncentracija za pripremu uzoraka smjesa spoja **1** s polinukleotidima, dok je za SERS aktivan supstrat odabrana koncentrirana koloidna suspenzija srebra.

4.3.5. Utjecaj pufera

Budući da su ishodne otopine dvolančanih polinukleotida pripremljene u kakodilatnom puferu, istražen je utjecaj pufera na SERS spektar otopine spoja **1** odabrane koncentracije koja će biti korištena za pripremu smjesa s DNA/RNA analozima. Na slici 21 su prikazani SERS spektri spoja **1** u vodi i u kakodilatnom puferu koncentracije, $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.



Slika 21. SERS spektri spoja **1** s kakodilatnim i bez kakodilatnog pufera

SERS spektri poliaminske molekule bez i s puferom su vrlo slični. Dodatak pufera uzrokuje agregaciju koloidnih nanočestica što rezultira povećanje bazne linije samog koloida (slika D3). Kada su u promatranom sustavu i molekule spoja **1**, agregati nanočestica stvaraju područja u kojima dolazi do snažnog pojačanja Ramanova raspršenja što rezultira porastom intenziteta vrpca

spoja **1**. U spektru nije zamjećen pomak postojećih niti pojava novih vrpca. Razlike u omjeru intenziteta vrpca istezanja CC veza u pirenskom sustavu kod 1627 i 1596 cm^{-1} (omjer I_{1627}/I_{1596} iznosi 1,20 u sustavu bez pufera te 2,06 u uzorku s puferom)⁷¹ objašnjavaju se promjenom orijentacije molekula istraživanog spoja na površini metala uslijed agregacije nanočestica uzorkovane ionima u sastavu pufera. Dokaz tome je i pojava intenzivne vrpce na 239 cm^{-1} koja vrlo vjerojatno potječe od Ag–O veze i prekriva vrpcu kemisorpcije spoja **1** sa srebrom koja se nalazi na 227 cm^{-1} u SERS spektru spoja **1** u vodi.

4.4. SERS spektri spoja **1** i dvolančanih polinuleotida

Pri istraživanju interakcija molekula spoja **1** s dvolančanim polinukleotidima korišteni su polinukleotidi strukture uzvojnice, poli dAdT–poli dAdT, poli dGdC–poli dGdC, poli rA–poli rU i ct-DNA. ct-DNA nalazi se u živim stanicama i 58 % njezine strukture čine adenin-timin parovi baza, a 42 % GC parovi baza. S obzirom na sastav DNA, izabrani su sintetski alternirajući polinukleotidi poli(dAdT)₂ i poli (dGdC)₂, koji predstavljaju dvije krajnosti s različitim mogućnostima za vezanje malih molekula. Za usporedbu s DNA, kao ribonukleinska kiselina odabran je polinukleotid poli rA–poli rU.

Kao SERS supstrat korištena je koncentrirana koloidna suspenzija srebra. Koncentracija malih molekula u mjernim uzorcima je iznosila 5×10^{-6} mol dm^{-3} , dok su molarni omjeri smjese u kojima je koncentracija polinukleotida izražena kao koncentracija fosfata bili 1/1, 1/5 te 1/10 u korist polinukleotida.

Polinukleotidi su velike molekule koje nose negativan naboj zbog iona fosfata koji grade okosnicu, te se zbog elektrostatkog odbijanja s negativnim citratnim ionima na površini nanočestica molekule polinukleotida ne mogu fizički približiti metalnoj površini da bi došlo do pojačanja Ramanova raspršenja. Molekule spoja **1** su pozitivno nabijene zbog protoniranih amino skupina u poliaminskim lancima te mogu djelomično neutralizirati negativno nabijene fosfatne ione. Kako bi se otkrio način interakcije molekula spoja **1** s polinukleotidima, molekule nukleinskih kiselina se moraju na neki način približiti metalnoj površini kako bi se dobio uvid u mjesto vezanja. Iz tog razloga smjese istraživanog spoja i DNA/RNA analoga pripremane su na dva načina.

U prvom načinu modificirala se površina srebra na način da se u koloidnu suspenziju prvo dodao spoj **1**, a zatim odabrani polinukleotid. Pretpostavlja se da će pozitivno nabijene molekule spoja **1** neutralizirati negativno nabijene citratne ione na površini srebra, nakon čega se dodana molekula polinukleotida može približiti nanočesticama uslijed interakcije s poliaminskim molekulama.

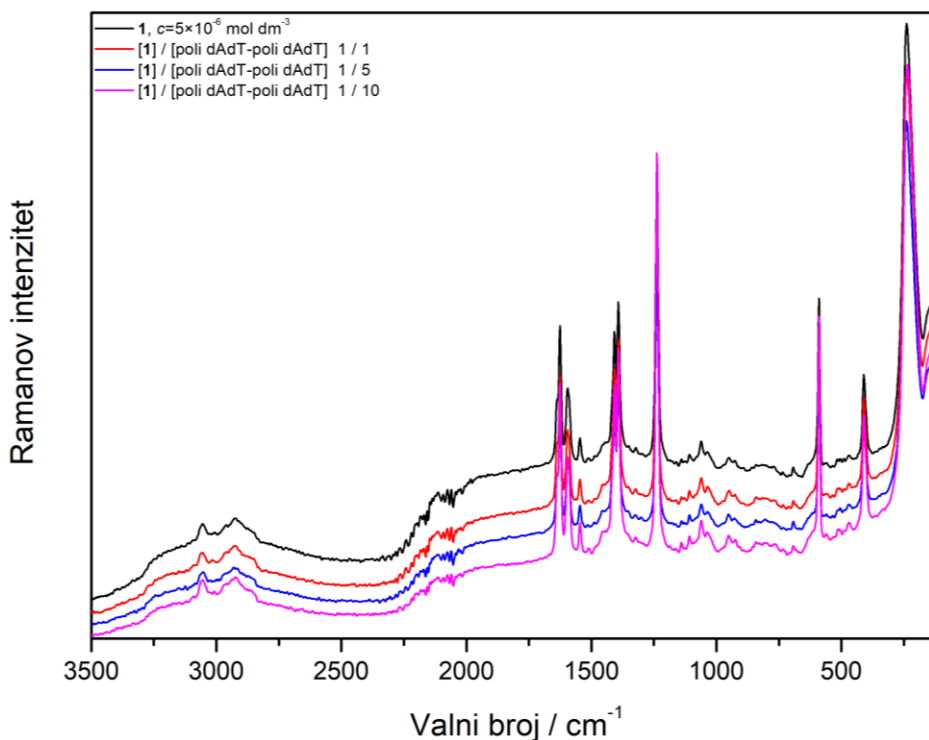
U drugom načinu pripreve, prvo su izmješani određeni volumeni otopine istraživanog spoja i polinukleotida, a zatim je tako pripremljen kompleks dodan u koloidnu suspenziju. Ovdje bi pozitivno nabijene molekule spoja **1** vezanjem neutralizirale negativno nabijene molekule polinukleotida te tako smanjile elektrostatsko odbijanje citratnih iona s površine srebra s fosfatnim ionima iz okosnice polinukleotida.

Kod oba načina pripreve promatrano je kako povećanje koncentracije molekula polinukleotida utječe na SERS spektar mjernih uzoraka smjesa **1**/polinukleotid.

4.4.1. SERS spektri spoja **1** i polinukleotida poli dAdT–poli dAdT

Iz literature je poznato da male molekule koje se vežu bilo u mali, bilo u veliki utor dvolančanih DNA polinukleotida, ostvaraju vodikove veze s atomima i skupinama u utorima koji ne sudjeluju u komplementarnom sparivanju baza. Takav način interakcije se u SERS spektrima manifestira pojavom novih vrpci koje se pripisuju polinukleotidu te upućuju na skupine smještene najbliže koloidnim nanočesticama, koje su ujedno i mjesto vezanja malih molekula.⁶⁶ Za razliku od molekula koje se vežu u utore, interkalirajuće molekule, uslijed svoje kondenzirane aromatske strukture, intenzivno raspršuju zračenje pa SERS spektar interkalatora vrlo često prekriva spektar polinukleotida. Stoga se pri istraživanju interkaliranja već pripremljeni kompleks dodaje u koloidnu suspenziju srebra, a smanjenje intenziteta raspršenog zračenja ukazuje na ovaj način vezanja. Umetanjem između parova baza polinukleotida, mala molekula se udaljava od površina srebra te intenzitet Ramanovog raspršenja postaje slabiji.⁷³

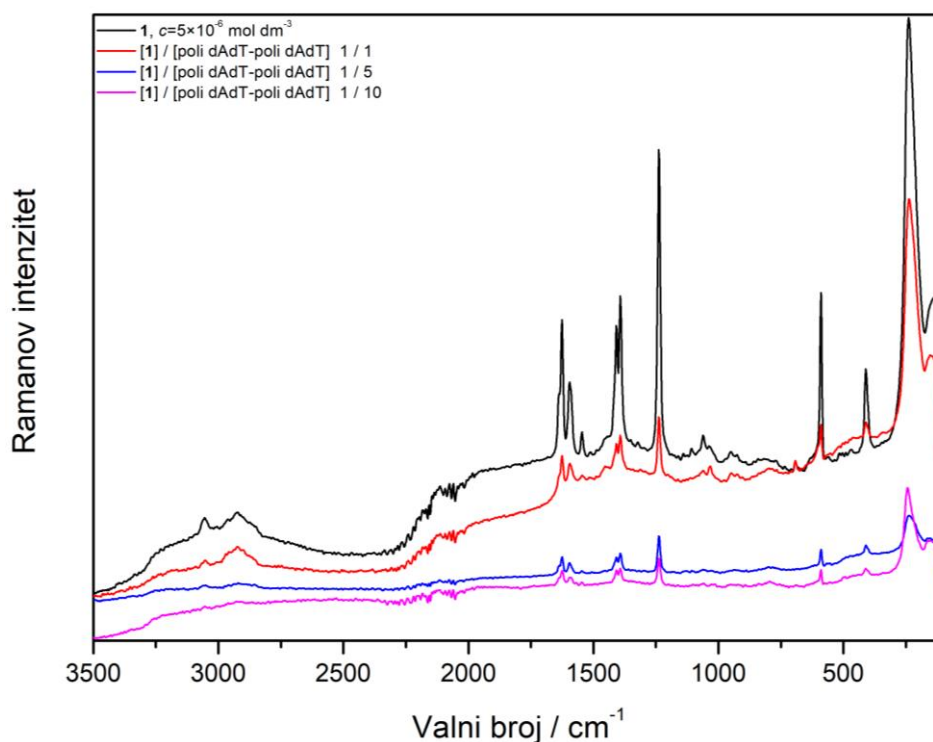
Mjerni uzorci smjesa spoja **1** i polinukleotida AT različitih molarnih omjera, pripremljenih na prvi način, prikazani su na slici 22. Za usporedbu je prikazan i SERS spektar istraživanog spoja **1**, $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.



Slika 22. SERS spektri spoja **1** i smjesa spoja **1** s poli dAdT–poli dAdT. Smjese su pripravljene na prvi način pripreve. Spektri su razmaknuti radi preglednosti

Dodatak polinuklotida u koloidnu otopinu istraživanog spoja (1. način pripreve) ne rezultira nastankom novih vrpce niti pomakom postojećih vrpce spoja **1** (tablica 5). Bez obzira na povećanje koncentracije polinukleotida AT u sustavu, SERS spektri su vrlo slični spektru čistog spoja **1** u puferu. To je pokazatelj da su molekule istraživanog spoja čvrsto adsorbirane na površini srebra. Pirenski prstenovi znatno pojačavaju Ramanovo raspršenje i prekrivaju možebitne vrpce polinukleotida. Veći porast intenziteta vrpce u smjesi omjera spoj **1**/poli dAdT–poli dAdT 1/10 ukazuje bilo na promjenu položaja molekule istraživanog spoja na površini nanočestica srebra uslijed neke vrste vezanja s molekulama polinukleotida ili su rezultat dodatne agregacije nanočestica nakon dodatka nukleinske kiseline.

Slika 23 prikazuje SERS spektre smjesa spoja **1** i poli dAdT–poli dAdT različitih molarnih omjera, pripremljenih na drugi način, gdje su prethodno izmješane otopine istraživanog spoja i polinukleotida, a zatim se u sustav dodala koncentrirana koloidna suspenzija srebra.



Slika 23. SERS spektri spoja **1** i smjesa spoja **1** s poli dAdT–poli dAdT. Smjese su pripravljene na drugi način priprave. Spektri su razmaknuti radi preglednosti

Slika 23 pokazuje da već kod omjera spoj [1]/[polinukleotid] 1/1 dolazi do primjetnog pada intenziteta vrpce koje odgovaraju vibracijama pirenskog sustava i poliaminskih lanaca istraživanog spoja (tablica 5). Daljnje povećanje sadržaja polinukleotida AT u mjernom uzorku sve više smanjuje intenzitet vrpce spoja **1**, no, i kod najvećeg omjera spoj **1**/polinukleotid 1/10, vrpce spoja se još uvijek naziru. Niti u jednom SERS spektru pripremljenog kompleksa ne uočavaju se nove vrpce koje bi potjecale od vibracija bilo okosnice bilo dušičnih baza nukleinske kiseline. Iako mjerni uzorci s i bez polinukleotida sadrže jednaku koncentraciju malih molekula ($5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$), prilično se razlikuju u intenzitetu vrpce spoja **1**. To je vrlo vjerojatno posljedica fleksibilne strukture istraživanog spoja koja omogućuje da prilikom stvaranja kompleksa spoj **1**/polinukleotid AT jedan ili više pirenskih sustava stvara interakcije s polinukleotidom AT (najvjerojatnije interkliranjem pirenskog sustava između parova baza te vezanjem pozitivnih lanaca na fosfatnu okosnicu), dok se slobodni lanac ili više njih približi aromatskim dijelom površini nanočestica i daje vidljive vrpce spoja **1** u svim SERS spektrima.

Tablica 5. Vibracijske vrpce u SERS spektrima smjesa spoja **1** s poli dAdT–poli dAdT različitih molarnih omjera^{67,68,70,71}

Valni broj / cm^{-1}							Vibracija
Spoj 1	[spoj 1]/[poli dAdT–poli dAdT]						
	1. način pripreve uzorka			2. način pripreve uzorka			
5×10^{-6} mol dm^{-3}	1/1	1/5	1/10	1/1	1/5	1/10	
3055	3056	3058	3055	3059			$\nu =\text{C-H}$ piren
2927	2927	2930	2931	2928			$\nu \text{C-H (CH}_2\text{)}$
1639sh	1638sh	1641sh	1640sh				νCC piren
1626	1626	1626	1626	1625	1625	1625	νCC piren
1596	1595	1595	1595	1595	1595	1594	νCC piren
1546	1546	1546	1546	1545	1546	1546	δNH_2
1407	1408	1408	1408	1407	1408	1408	νCC piren
1392	1392	1392	1392	1392	1392	1392	δCH_2
1237	1238	1238	1238	1238	1238	1238	$\nu \text{CC}/\delta_{\text{ip}} =\text{C-H}$ piren
1139	1140	1141	1140				$\nu \text{C-N-C}$, $\delta_{\text{ip}} =\text{C-H}$ piren
1108	1108	1108	1108				$\delta_{\text{ip}} =\text{C-H}$ piren
1059	1061	1061	1061	1063	1062	1059	$\delta_{\text{ip}} =\text{C-H}$ piren
1030	1036	1034	1034	1032	1029	1030	Citrati
951	950	952	952	949	938	950	Citrati
589	590	590	590	590	590	590	ν piren
410	411	411	412	410	410	411	ν piren, δCNC
239	238	239	236	236	238	243	$\nu \text{Ag-O}/ \nu \text{Ag-N}$

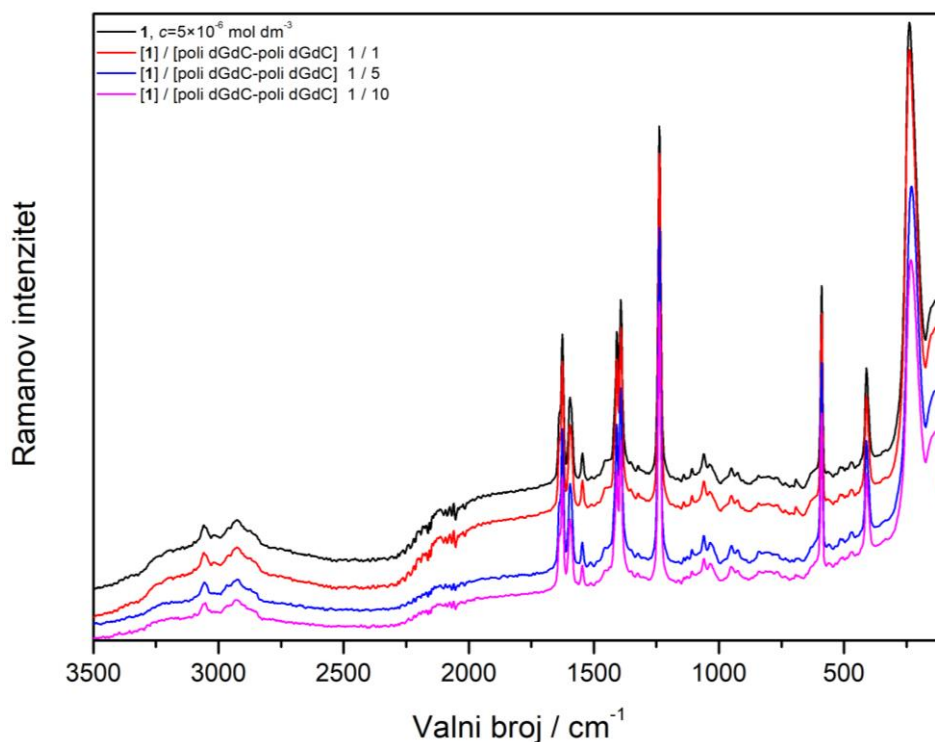
Kratice: ν -istezanje; δ -deformacija; sh-rame; ip-u ravnini; oop-izvan ravnine.

4.4.2. SERS spektri spoja **1** i polinukleotida poli dGdC–poli dGdC

SERS spektri koncentrirane koloidne suspenzije spoja **1** u koju je dodan polinukleotid poli dGdC–poli dGdC prikazani su na slici 24. Koncentracija molekula spoja **1** u sustavu je bila $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, dok se koncentracija polinukleotida mijenjala od $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (molarni omjer 1/1) do $5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (omjer 1/10 u korist polinukleotida).

Kao i u slučaju prethodno promatrane alternirajuće AT sekvence, profil SERS spektra spoja **1** gotovo se ne mijenja dodatkom polinukleotida s gvaninom i citozinom. Molekule istraživanog spoja jako intenzivno raspršuju zračenje te najintenzivnije vrpce u svim spektrima

odgovaraju istežanju C–C veza pirenskih prstenova kod 1626, 1596 te 1407 cm^{-1} te vrpca na 1237 cm^{-1} kojoj uz istežanje aromatskog prstenova doprinosi i vibracija svijanja C–H veze aromata u ravnini (tablica 6).⁷¹ Nisu zapažene nove vrpce u odnosu na spektar čistog spoja **1** radne koncentracije $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, dok se slabe promjene intenziteta mogu pripisati različitim slaganjima molekula istraživanog spoja na površini nanočestica nakon dodatka polinukleotida u sustav.

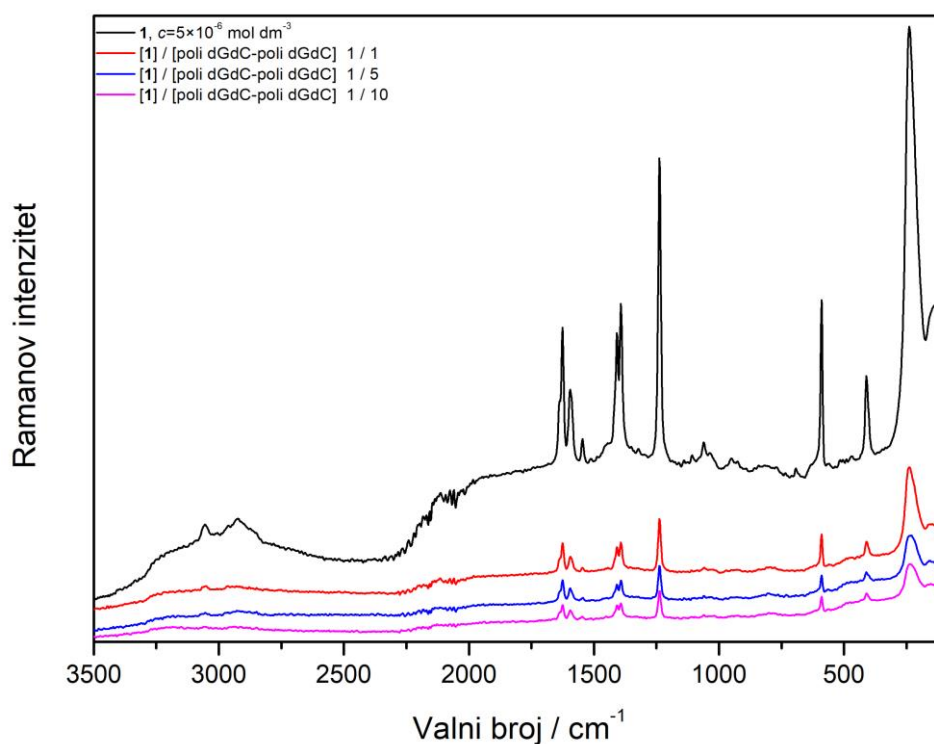


Slika 24. SERS spektri spoja **1** i smjese spoja **1** s poli dGdC–poli dGdC. Smjese su pripravljene na prvi način pripreve. Spektri su razmaknuti radi preglednosti

Drugi način pripreve smjese spoja **1** i polinukleotida GC, gdje se prethodno pripremljeni kompleks spoj/polinukleotid doda u koloidnu suspenziju, rezultira značajnim promjenama u intenzitetima vrpce spoja **1** u SERS spektrima (slika 25). Ostaju vidljive samo vrpce istežnih vibracija aromatskog sustava (tablica 7) što podupire tezu da se molekule spoja **1** samo djelomično vežu s polinukleotidom, dok je slobodni pirenski sustav privučen srebru uslijed elektrostatkih interakcija negativno nabijenih citratnih aniona na površini nanočestice i pozitivno nabijenih aminoskupina u lancu molekule spoja **1**.⁴⁶ Uočeno je da kod polinukleotida GC već i kod omjera [spoj **1**]/[polinukleotid] 1/1 dolazi do snažnog smanjenja intenziteta vrpce i daljnji dodatak molekula polinukleotida slabo utječe na promjenu intenziteta vrpce spoja **1**. Usporedba

sa SERS spektrima polinukleotida s adeninom i timinom, pripremljenih također na drugi način (slika 25) upućuje na zaključak da molekule spoja **1** stvaraju stabilniji kompleks s polinukleotidom GC već kod molarnog omjera [spoj **1**]/polinukleotid 1/1. Kod kompleksa spoja s poli dAdT–poli dAdT stabilniji kompleks nastaje kod molarnog omjera 1/5 u korist polinukleotida.

Nedostatak novih vrpci u SERS spektrima smjesa eliminira vezanje u utore kao način interakcije istraživane molekule s polinukleotidom poli dGdC–poli dGdC.



Slika 25. SERS spektri spoja **1** i smjesa spoja **1** s poli dGdC–poli dGdC. Smjese su pripravljene na drugi način priprave. Spektri su razmaknuti radi preglednosti

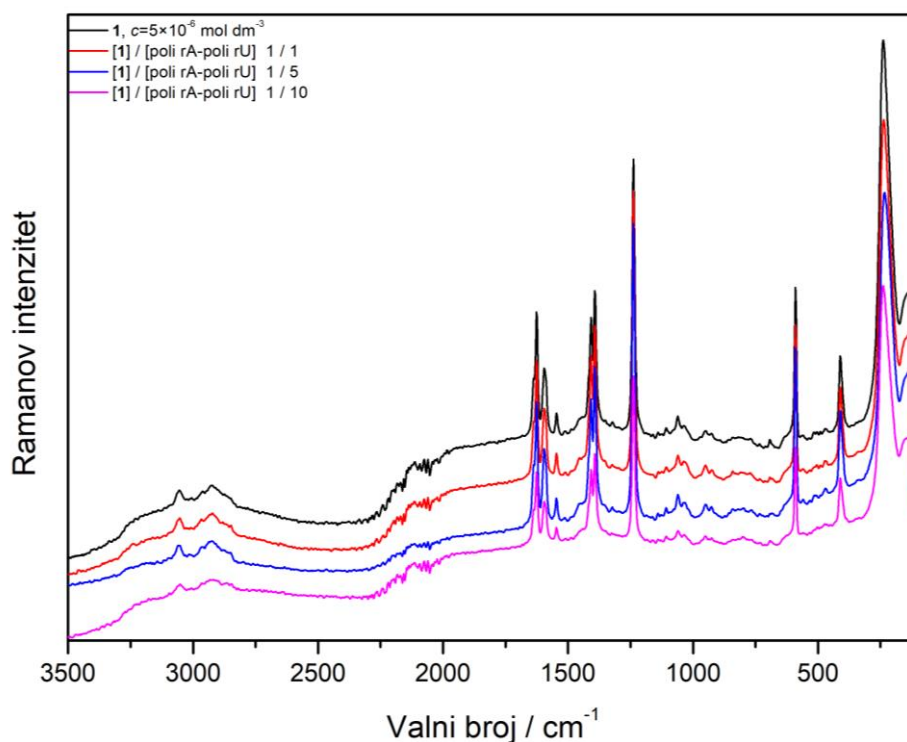
Tablica 6. Vibracijske vrpce u SERS spektrima smjesa spoja **1** s poli dGdC–poli dGdC različitih molarnih omjera^{67,68,70,71}

Valni broj / cm^{-1}							Vibracija
Spoj 1	[spoj 1]/[poli dGdC–poli dGdC]						
	1. način pripreve uzorka			2. način pripreve uzorka			
5×10^{-6} mol dm^{-3}	1/1	1/5	1/10	1/1	1/5	1/10	
3055	3055	3057	3056				ν =C–H piren
2927	2927	2929	2931				ν C–H (CH_2)
1639sh	1641sh	1640sh	1641sh				ν CC piren
1626	1626	1626	1626	1625	1625	1625	ν CC piren
1596	1595	1595	1596	1595	1595	1595	ν CC piren
1546	1546	1546	1546	1546	1545	1547	δ NH_2
1407	1408	1408	1408	1408	1408	1407	ν CC piren
1392	1391	1392	1391	1391	1392	1392	δ CH_2
1237	1238	1238	1238	1238	1238	1238	ν CC/ δ_{ip} =C–H piren
1139	1140	1141	1140				ν C–N–C, δ_{ip} = C–H piren
1108	1107	1108	1008				δ_{ip} =C–H piren
1059	1060	1061	1060				δ_{ip} =C–H piren
1030	1034	1035	1035	1025	1027	1028	citrati
951	950b	950b	951b	950b	949b	950b	citrati
589	590	590	590	590	590	590	ν piren
410	411	411	411	410	411	410	ν piren, δ CNC
239	239	230	233	239	232	236	ν Ag–O/ ν Ag–N

Kratice: ν -istezanje; δ -deformacija; sh-rame; ip-u ravnini; oop-izvan ravnine.

4.4.3. SERS spektri spoja **1** i i polinukleotida poli rA–poli rU

Mjerni uzorci smjesa spoja **1**, $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ i polinukleotida poli rA–poli rU različitih molarnih omjera, pripremljenih tako da na koloid prvo dodamo spoj **1** te zatim polinukleotid poli rA–poli rU, prikazani su na slici 26. Iz SERS spektara je vidljivo da molekule spoja **1**, privučene svojim pozitivnim poliaminskim lancima k negativno nabijenim nanočesticama, izrazito pojačavaju Ramanovo raspršenje. Pretpostavlja se da je njihova adsorpcija na metalnoj površini vrlo jaka i dodatak RNA polinukleotida ne utječe bitno na spektar stoga su spektri smjesa spoj **1**/RNA analog gotovo identični spektru čistog spoja **1** u puferiranoj koloidnoj suspenziji. Kao i u istraživanju interakcija malih molekula i prethodno navedenih polinukleotida, najintenzivnije vrpce u spektru potječu od aromatskih prstenova (tablica 7) i njihovi pomaci, s obzirom na položaj vrpca u čistom spoju **1**, su zanemarivi.

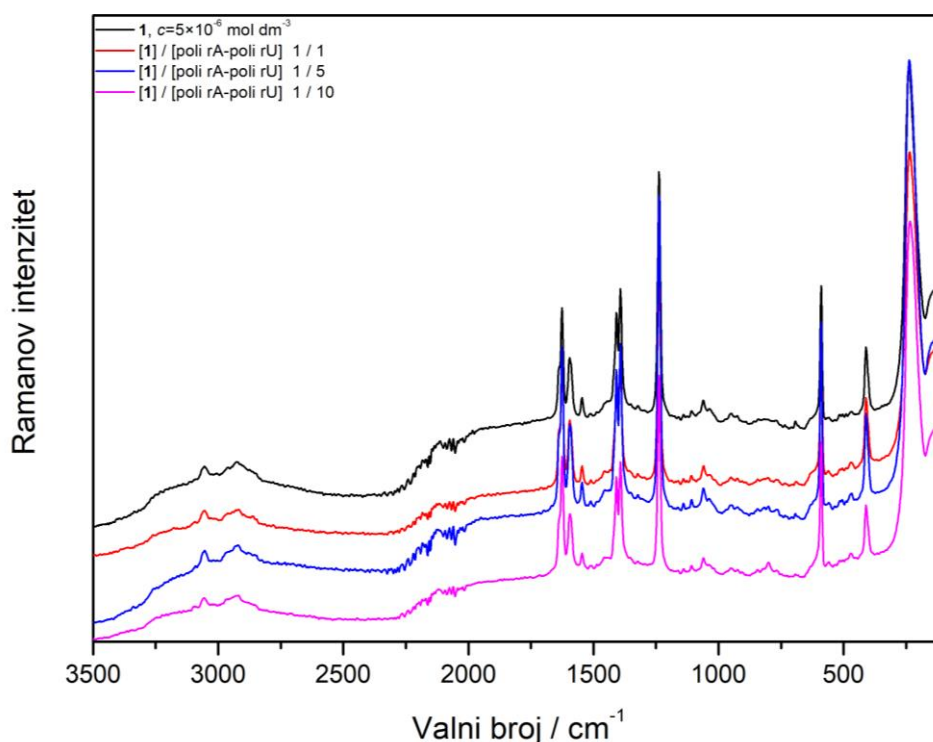


Slika 26. SERS spektri spoja **1** i smjesa spoja **1** s poli rA–poli rU. Smjese su pripravljene na prvi način priprave. Spektri su razmaknuti radi preglednosti

SERS spektri kompleksa spoj **1**/polinukleotid AU u koloidnoj suspenziji, pripremljenih tako da pomješamo spoj **1** s polinukleotidom poli rA–poli rU te tu smjesu dodamo u koloid, prikazani su na slici 27, a asignacija uočenih vibracijskih vrpca dana je u tablici 7. Dobiveni

spektri kompleksa spoj **1**/ poli rA–poli rU prema položaju i intenzitetu vrpce jako nalikuju SERS spektru čistog istraživanog spoja. Intenzivne vrpce spoja **1** javljaju se i u spektrima u kojima je polinukleotid s adeninom i uracilom čak u deseterostrukom suvišku, promatrajući koncentracijske omjere. Intenzitet vrpce koje odgovaraju vibracijskim modovima pirenskih prstenova i aminometilenskih lanaca se pojača kod omjera [spoj **1**]/[poli rA–poli rU] 1/1 i 1/5, da bi zatim malo pao kod najvećeg molarnog omjera u korist polinukleotida. No, razlike su intenzitetima su vrlo male i najvjerojatnije su posljedica promjene položaja molekule poliamina na površini metalne nanočestice, a ne interakcije s polinukleotidom AU.

Pretpostavlja se da se poli rA–poli rU slabo ili nikako veže s pirenskim derivatom poliamina, te su SERS spektri kod oba načina pripreme smjesa vrlo slični SERS spektru čistog spoja **1** u koncentriranoj koloidnoj suspenziji.



Slika 27. SERS spektri spoja **1** i smjesa spoja **1** s poli rA–poli rU. Smjese su pripravljene na drugi način pripreve. Spektri su razmaknuti radi preglednosti

Tablica 7. Vibracijske vrpce u SERS spektrima smjese spoja **1** s poli rA–poli rU različitih molarnih omjera^{67,68,70,71}

Spoj 1 5×10^{-6} mol dm ⁻³		Valni broj / cm ⁻¹					Vibracija	
		[spoj 1]/[poli rA–poli rU]						
		1. način pripreve uzorka			2. način pripreve uzorka			
	1/1	1/5	1/10	1/1	1/5	1/10		
3055	3055	3057	3056	3059	3059	3056	v =C–H piren	
2927	2927	2929	2931	2927	2927	2928	v C–H (CH ₂)	
1639sh	1643sh	1643sh	1641sh	1640sh	1638sh	1640sh	v CC piren	
1626	1626	1626	1626	1625	1625	1625	v CC piren	
1596	1595	1595	1595	1595	1594	1594	v CC piren	
1546	1546	1546	1546	1546	1546	1546	δ NH ₂	
1407	1408	1408	1407	1408	1408	1408	v CC piren	
1392	1392	1392	1392	1392	1393	1391	δ CH ₂	
1237	1238	1238	1238	1238	1238	1238	v CC/δ _{ip} =C–H piren	
1139	1140	1141	1140	1141	1139	1140	v C–N–C, δ _{ip} = C–H piren	
1108	1109	1108	1111	1108	1108	1108	δ _{ip} =C–H piren	
1059	1061	1060	1060	1060	1060	1060	δ _{ip} =C–H piren	
1029	1032	1033	1034	1033	1033	1031	citrati	
951	950	950	951	951	948	951	citrati	
589	590	591	590	549	549	590	v piren	
410	410	410	411		412	411	v piren, δ CNC	
239	237	234	248	236	238	235	v Ag–O/ v Ag–N	

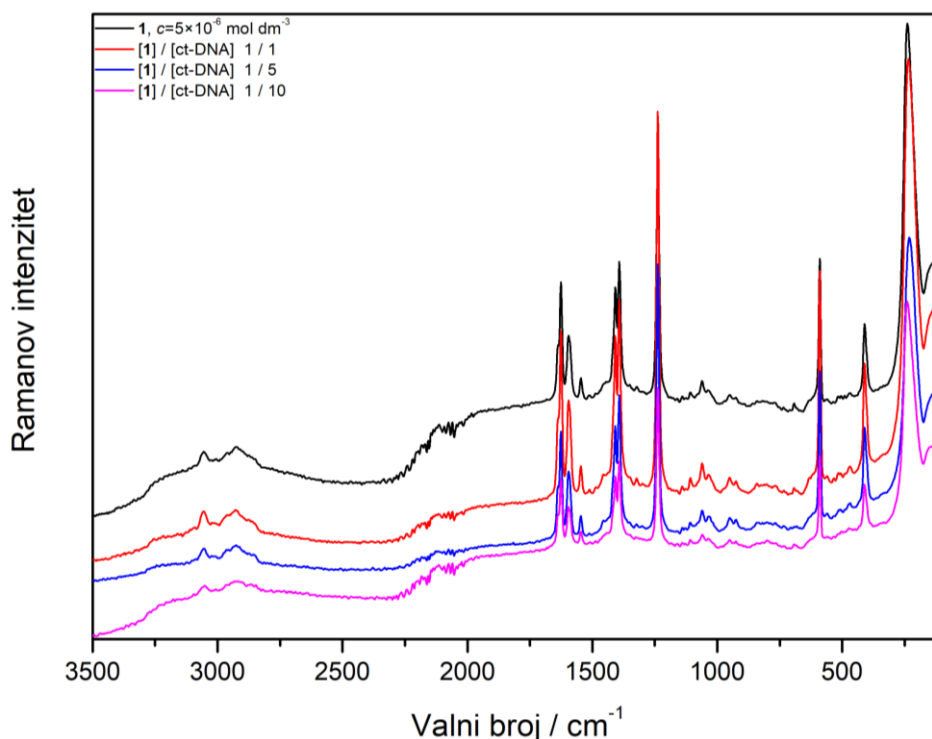
Kratice: v-istezanje; δ-deformacija; sh-rame; ip-u ravnini; oop-izvan ravnine.

4.4.4. SERS spektri smjese spoja **1** i DNA

4.4.4.1. SERS spektri smjese spoja **1** i DNA na koncentriranom koloidu

Prethodno promatrani DNA i RNA polinukleotidi su sintetskog podrijetla i služe kao modelne molekule za promatranje načina i mjesta vezanja malih molekula u nukleinske kiseline. ct-DNA (engl. *Calf thymus* DNA) je nukleinska kiselina izolirana iz telećeg timusa i njezinu strukturu čine gotovo podjednako parovi baza adenin-timin i gvanin-citozin.

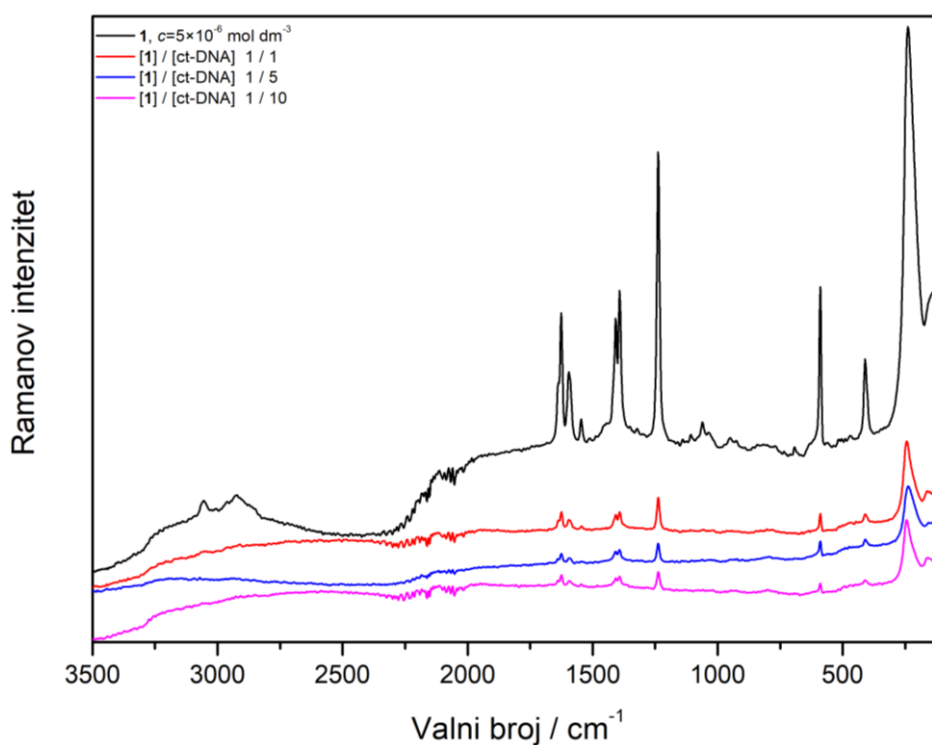
SERS spektri smjesa spoja **1** s DNA pripremljeni na prvi način (modifikacijom površine nanočestica istraživanim spojem, nakon čega slijedi dodatak DNA) prikazani su na slici 28. Kao i u svim prethodno promatranim uzorcima smjesama spoja **1** i polinukleotida pripremljenih na prvi način, dobiveni SERS spektri su po položaju i intenzitetu vrpca vrlo slični spektru čistog spoja **1** u koncentriranoj koloidnoj otopini. U spektrima nema novih vrpca niti značajnog pomaka postojećih vrpca spoja **1** (tablica 8).



Slika 28. SERS spektri spoja **1** i smjesa spoja **1** s DNA. Smjese su pripravljene na prvi način pripreve. Spektri su razmaknuti radi preglednosti

Drugi način pripreve uzorka smjesa istraživanog spoja s DNA, gdje se prethodno pripremljeni kompleks spoj **1**/DNA doda u koloidnu suspenziju (slika 29), rezultira SERS spektrima čiji profil vrlo nalikuje spektrima s polinukleotidom poli dGdC–poli dGdC prikazanim na slici 25. Već prvi dodatak otopine polinukleotida, gdje je omjer u smjesi spoj **1**/DNA 1/1, rezultira značajnim padom intenziteta vrpce vibracijskih modova istraživanog pirenskog derivata poliamina. Ostaju vidljive samo vrpce koje većinom potječu od istezanja i svijanja pirenskih prstenova u području 1650–1250 cm⁻¹.⁷¹ Povećanje udjela molekula DNA u kompleksu spoj **1**/DNA ne utječe značajno na promjenu intenziteta vrpce spoja **1** koje ostaju vidljive i u SERS spektru gdje je koncentracija DNA čak deset puta veća od koncentracije male molekule. Pretpostavlja se vezanje

dijela molekule spoja **1** u DNA, dok se dio molekule spoja poliamina, koji ne sudjeluje u interakciji s polinukleotidom, približava površini srebra i doprinosi vrpčama u SERS spektrima. S obzirom na sličnost spektara smjesa istraživanog spoja s polinukleotidom poli dGdC–poli dGdC i DNA, vrlo vjerojatno se molekule spoja **1** vežu slično u DNA kao u polinukleotid GC; interkaliranjem pirenskog sustava među parove baza DNA, dok pozitivno nabijeni lanci neutraliziraju negativnu okosnicu i tako omogućavaju da se kompleks spoj **1**/ DNA približi srebru i dijelovi molekule spoja **1**, koji se ne vežu s polinukleotidom, pojačavaju Ramanovo raspršenje.



Slika 29. SERS spektri spoja **1** i smjesa spoja **1** s poli DNA. Smjese su pripravljene na drugi način priprave. Spektri su razmaknuti radi preglednosti

Tablica 8. Vibracijske vrpce u SERS spektrima smjesa spoja **1** s DNA različitim molarnih omjera^{67,68,70,71}

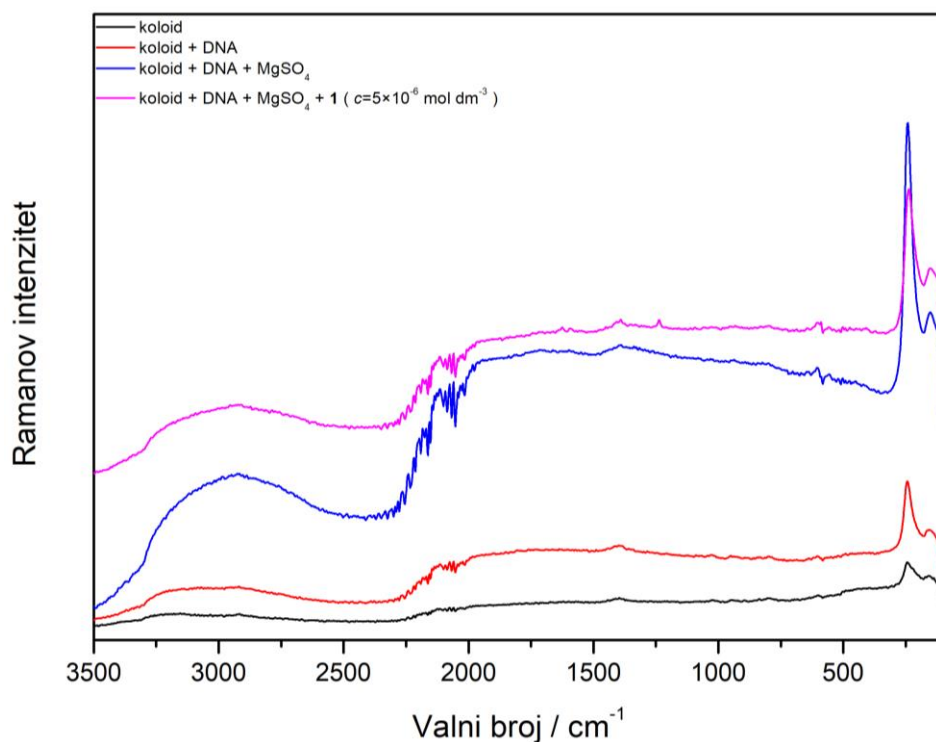
Spoj 1 5×10^{-6} mol dm ⁻³		Valni broj / cm ⁻¹					Vibracija
		[spoj 1]/[ct-DNA]					
		1. način pripreme uzorka			2. način pripreme uzorka		
	1:1	1:5	1:10	1:1	1:5	1:10	
3055	3055	3057	3056				v =C-H piren
2927	2927	2929	2931				v C-H (CH ₂)
1639sh	1641sh	1640sh	1641sh				v CC piren
1626	1626	1626	1625	1625	1625	1625	v CC piren
1596	1595	1595	1595	1594	1593	1595	v CC piren
1546	1546	1546	1544	1547	1545	1544	δ NH ₂
1407	1408	1408	1407	1408	1407	1407	v CC piren
1392	1392	1393	1392	1393	1392	1392	δ CH ₂
1237	1238	1238	1238	1238	1238	1238	v CC/δ _{ip} =C-H piren
1139	1139	1141	1140				v C-N-C, δ _{ip} =C-H piren
1108	1107	1108					δ _{ip} =C-H piren
1059	1061	1061	1056	1062	1059	1056	δ _{ip} =C-H piren
1029	1031	1034	1035	1031	1030	1030	citrati
951	951b	950b	958b	951b	949b	955b	citrati
589	590	590	590	590	590	590	v piren
410	411	410	411	410	412	411	v piren, δ CNC
239	239	238	241	238	244	244	v Ag-O/ v Ag-N

Kratice: v-istezanje; δ-deformacija; sh-rame; ip-u ravnini; oop-izvan ravnine.

4.4.4.2. SERS spektri smjese spoja **1** i DNA na agregiranom koloidu s MgSO₄

Koloidne nanočestice srebra, pripravljene redukcijom srebrova nitrata trinatrijevim citratom, nose negativan naboj citratnih iona adsorbiranih na površinu metalne površine. Molekule DNA su također negativno nabijene zbog fosfatnih skupina u svojoj okosnici i elektrostatsko odbijanje sprječava približavanje molekule DNA površini srebra da bi došlo do pojačanja Ramanova raspršenja, te nije moguće snimiti SERS spektar u sintetiziranoj koloidnoj suspenziji srebra kod uvjeta mjerenja navedenih u ovom radu. Međutim, u literaturi je opisan postupak agregacije nanočestica srebra, koje nose negativan naboj, otopinom magnezijeva sulfata, što je rezultiralo

pojačanjem Ramanovog raspršenja polinukleotida.^{74,75,76} Agregacija koloidnih nanočestica srebra magnezijevim sulfatom provodi se na način da se najprije polinukleotid dodaje u koloidnu suspenziju, pri čemu se adsorbira na površinu srebra. Istovremeno kloridni ioni, koji se inače nalaze na površini stabilizirajući nanočestice srebra pripravljene redukcijom srebrova nitrata s hidroksilamin-hidrokloridom, otpuštaju se u suspenziju. Potom se dodaje MgSO_4 koji agregira nanočestice s polinukleotidima na površini. Magnezijev sulfat izabran je pri tome kao sredstvo za agregiranje jer sulfatni ioni imaju mali afinitet vezanja sa srebrom te ne ometaju vezanje polinukleotida, a smatra se da naboj magnezijeva iona inducira jaču agregaciju od jednostruko nabijenih kationa (agregirajući učinak Mg^{2+} iona na svježe pripravljenu koloidnu suspenziju srebra prikazan je na slici D4). Opisan način pripreme mjernog uzorka korišten je i u ovom radu, s razlikom da se umjesto kloridnih iona, na površini nanočestica nalaze negativni citratni ioni. Dobiveni SERS spektri su prikazani na slici 31.



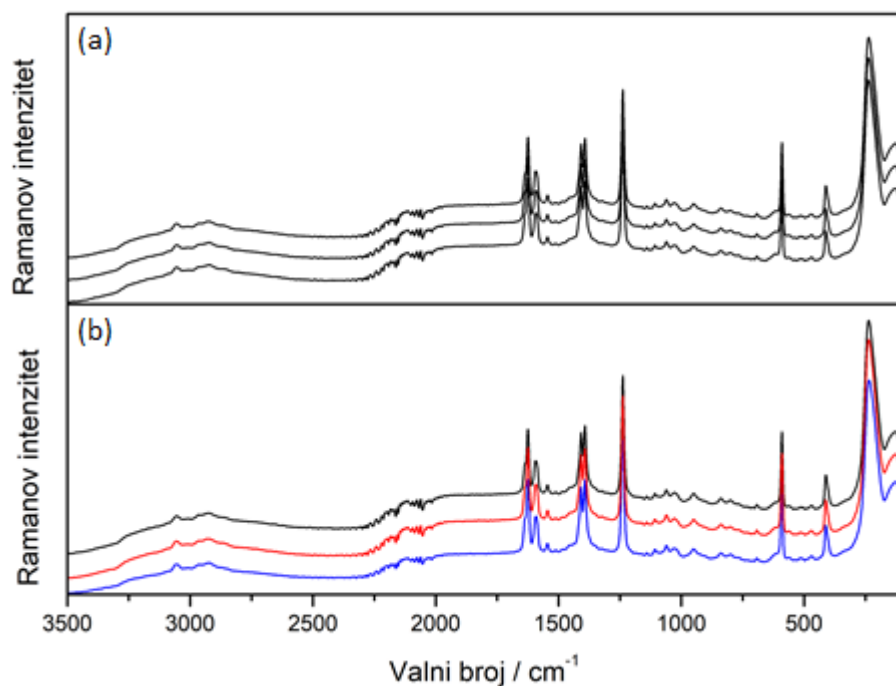
Slika 30. Spektri svježe pripravljenog koloida; prije dodatka agregirajućeg sredstva (crno), nakon dodatka DNA ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) (crveno), uz dodatak DNA i MgSO_4 , nakon dodatka DNA, MgSO_4 i spoja **1**. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti

Spektar svježe koloidne suspenzije, prikazan crnom linijom, sadrži samo široke vrpce koje odgovaraju vibracijskim modovima vode. Dodatak DNA u svježi koloid rezultira agregacijom nanočestica srebra, na što upućuje blagi porast bazne linije te se javlja vrpca koja odgovara vibraciji citratnih iona oko 1400 cm^{-1} .⁶⁸ Vrpca oko 240 cm^{-1} vrlo vjerojatno potječe od istezanja veze srebro–kisik iz pufera. Daljnji dodatak magnezijevog sulfata u uzorak koloida s DNA rezultira dodatnom agregacijom nanočestica, ali nisu vidljive vrpce u spektru koje bi se mogle pripisati vibracijama građevnih dijelova nukleinske kiseline. Vrlo vjerojatno su citratni anioni snažno adsorbirani na površinu nanočestica i teško se zamjenjuju s molekulama polinukleotida.

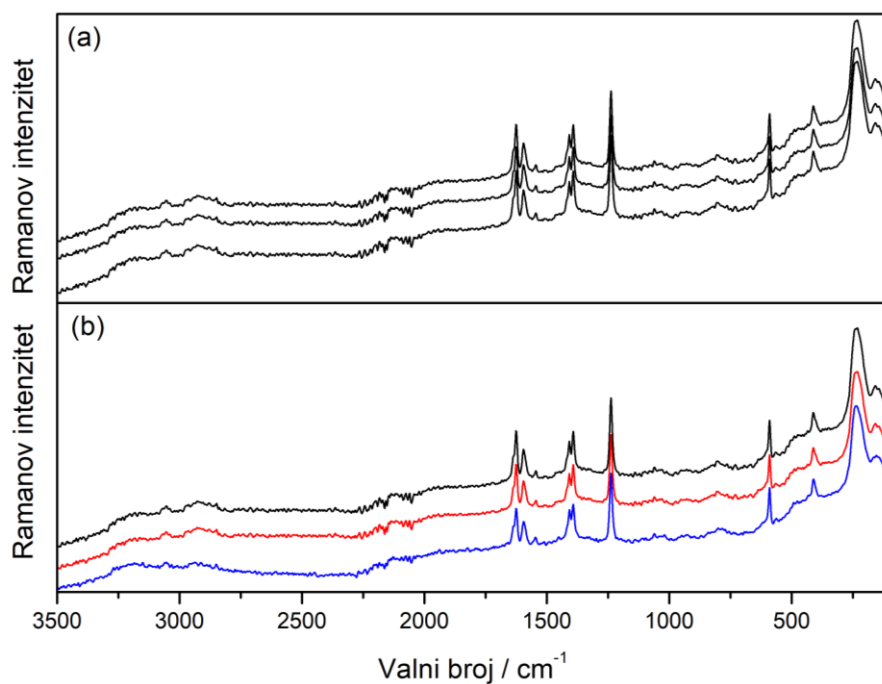
Dodatak spoja **1** koncentracije $5 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$ u agregiranu koloidnu suspenziju otopine DNA, gdje je omjer [spoj **1**]/[DNA] 1/1, rezultira slabim vrpcama koje potječu od vibracija aromatskih prstenova u strukturi spoja **1**. Vrlo vjerojatno molekule DNA stvaraju interakcije s molekulama istraživanog spoja, dok slobodni lanci male molekule ne mogu zbog steričke smetnje velike molekule DNA doći bliže površini srebra i zato je pojačanje raspršenja znatno slabije u odnosu na spektre smjesa istog molarnog omjera spoj **1**/DNA pripravljene na prethodno opisana dva načina pripreme.

4.4.4.3. Reproducibilnost mjerenja

Za određivanje reproducibilnosti mjerenja pripremljeni su uzorci smjesa spoja **1** i DNA omjera [spoj **1**]/[DNA] 1/10 u koncentriranom koloidu. Smjese su pripravljene na oba načina i u svim smjesama koncentracija istraživanog spoja bila je $c = 5 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$. Za svaki način pripreme smjese pripremljen je isti uzorak tri puta i snimljeni SERS spektri ukazuju na ponovljivost pripreme uzorka, dok spektri jednog pripremljenog uzorka snimanog tri puta daju informaciju o reproducibilnosti korištenog supstrata (slike 31 i 32). Reproducibilnost mjerenja s nanočesticama srebra u koncentriranoj koloidnoj suspenziji smjesa spoja **1** izražena je kao standardno odstupanje intenziteta vrpce pri 1237 cm^{-1} .

Slika 31. SERS spektar spoja **1** s DNA, 1. način pripreme:

(a) jedan uzorak snimljen 3 uzorka, (b) tri uzorka

Slika 32. SERS spektar spoja **1** s DNA, 2. način pripreme:

(a) jedan uzorak snimljen 3 uzorka, (b) tri uzorka

Dobivene vrijednosti standardnog odstupanja intenziteta vrpce pri 1237 cm^{-1} prikazane su u tablici 9. Vidljivo je da je korištenjem koncentrirane koloidne suspenzije srebra ponovljivost pripreve uzorka zadovoljavajuća, dok se i sam supstrat pokazao kao odgovarajući za pripravu smjese s polinukleotidima, bez obzira radi li se o modifikaciji površine nanočestica spojem pa zatim dodatkom polinukleotida, ili mjerenjem SERS spektara prethodno pripravljenog kompleksa spoj **1**/DNA u koloidu.

Tablica 9. Reproducibilnost mjerenja izražena pomoću standardnog odstupanja intenziteta vrpce pri 1237 cm^{-1} za smjese spoja **1** s DNA

	I_{1237}	
	1. način pripreve uzorka	2. način pripreve uzorka
Jedan uzorak	$0,251 \pm 0,005$	$0,0090 \pm 0,0004$
Tri uzorka	$0,252 \pm 0,006$	$0,0096 \pm 0,0007$

§ 5. ZAKLJUČAK

Snimljeni su i asignirani FT-Ramanovi spektri krutine i otopine spoja **1**. Milimolarna koncentracija vodene otopine istraživnog spoja bila je nedovoljna za opažanje normalnog Ramanovog raspršenja. Kako bi se pojačalo Ramanovo raspršenje otopine spoja **1** SERS tehnikom, potrebno je odabrati metalni supstrat koji je nužan za površinsko pojačanje raspršenog zračenja. Pripravljena je koloidna suspenzija srebra redukcijom srebrova nitrata trinatrijevim citratom. Dio koloidne suspenzije je centrifugiran, dio je agregiran anorganskim solima, dok je dio koloida korišten kao svježe pripravljen. Nanočestice srebra nose negativan naboj adsorbiranih citratnih iona i njegovih oksidacijskih produkata na površini. Djelovanje privlačnih elektrostatskih sila između aniona adsorbiranih na površini nanočestica srebra i pozitivnog naboja strukture ispitivanog spoja **1** uzrokuje približavanje spoja metalnoj površini nanočestica srebra.

Uzorci za SERS mjerenja spoja **1** pri različitim koncentracijama (1×10^{-7} – 1×10^{-4} mol dm^{-3}) pripremani su u koloidnim suspenzijama. U istraživnom koncentracijskom području molekule spoja **1** najintenzivnije raspršuju zračenje pri koncentraciji 5×10^{-6} mol dm^{-3} u svim koloidnim suspenzijama. S obzirom na izborna pravila na površini koja vrijede u SERS spektroskopiji, promjena intenziteta raspršenog zračenja u koncentracijski ovisnim spektrima pripisana je različitom smještaju molekula na površini srebra uvjetovanom ravnotežom agregacije i koncentracijom molekula na površini. Povećanje intenziteta sa smanjenjem koncentracije spoja **1** posljedica je pomaka ravnoteže agregacije prema monomerima istraživanih molekula, odnosno smanjivanja broja malih molekula na površini, koje se aromatskim sustavima smještaju okomito na površinu metala pri čemu najjače raspršuju zračenje. SERS spektri spoja **1** u koncentriranom koloidu pokazuju intenzivnije vrpce istraživnog spoja u odnosu na svježe pripravljeni koloid. U koloidu kojemu je agregacija nanočestica potaknuta dodavanjem anorganskih soli, uočeno je izrazito povećanje intenziteta bazne linije čime vrpce spoja **1** postaju manje uočljive u odnosu na spektre snimljene u koncentriranom koloidu. Kao supstrat za smjese s polinuklotidima izabrana je koncentrirana koloidna suspenzija. U prisutnosti kakodilatnog pufera nanočestice srebra agregiraju te se intenzitet raspršenog zračenja molekula na površini metala dodatno pojačava.

Uzorci za SERS mjerenja smjesa spoj **1**/polinukleotid različitih koncentracijskih omjera pripremani su na dva načina; kod prvog načina se na površinu nanočestica modificiranu molekulama spoja **1** dodao polinukleotid, dok se kod drugog načina prethodno pripremljen kompleks spoj **1**/polinukleotid dodavao u koloidnu suspenziju.

U SERS spektrima uzoraka smjesa spoja **1** s poli dAdT–poli dAdT, spoja **1** s poli dGdC–poli dGdC, spoja **1** s poli rA–poli rU te spoja **1** s ct–DNA, pripremljenih tako da je na koloid prvo dodan spoj, te onda polinukleotid, nisu uočene nove vrpce niti značajni pomaci položaja i intenziteta vrpce spoja poliaminske molekule. Molekule spoja **1** su vrlo vjerojatno čvrsto adsorbirane na površini srebra, te dodatak polinukleotida nema utjecaj na izgled spektra pa se ne može pretpostaviti moguća vrsta interakcija molekula spoja **1** i polinukleotida.

Kod drugoga načina pripreme uzorka, tj. kod dodavanja smjese polinukleotida i spoja **1** na koloid dolazi do promjena intenziteta vrpce. SERS spektar kompleksa **1**/poli dAdT–poli dAdT pokazuje smanjenje intenziteta vrpce spoja **1** povećanjem koncentracije dodanog alternirajućeg polinukleotida, vrlo vjerojatno uslijed vezanja spoja **1** s poli(dAdT)₂ pri čemu se molekula pirenskog derivata udaljava od površine srebra. Uzorci pripremljeni na isti način s polinukleotidom poli dGdC–poli dGdC pokazuju značajan pad intenziteta već pri najnižoj koncentraciji dodanog polinukleotida, što ukazuje da poli dGdC–poli dGdC stvara stabilan kompleks sa spojem **1** već pri najmanjem molarnom omjeru kompleksa spoj **1**/poli(dGdC)₂. Kod smjesa s oba DNA analoga prisutne su vrpce spoja čak i kada je u sustavu deset puta više polinukleotida u odnosu na istraživani spoj, što upućuje na zaključak da se jedan ili više pirenskih sustava interkalira među parove baza dvostruke uzvojnice, dok je i dalje dio molekule spoja **1** dovoljno blizu površine srebra da bi raspršio zračenje. Vezanje u utore je malo vjerojatan način interakcije, budući da nisu zamijećene nikakve nove vrpce koje bi potjecale od vibracijskih modova polinukleotida.

Oba načina pripreme uzorka spoja **1** s poli rA–poli rU rezultiraju SERS spektrima u kojima su vidljive samo intenzivne vrpce poliaminskog spoja te se može zaključiti da molekule pirenskog derivata poliamina pokazuju značajno veći afinitet prema DNA analogima, u odnosu na RNA polinuklotid.

SERS spektri smjesa spoja **1** s ct–DNA nalikuju spektrima spoja s poli dGdC–poli dGdC. Obzirom da u SERS spektrima interkalatora i ct–DNA na način vezanja ne upućuje pojava vrpce vibracija nukleinske kiseline, već promjena intenziteta raspršenog zračenja, umetanjem pirenskog sustava između parova baza uzvojnice, molekule spoja **1** udaljavaju se

od metalne površine, pri čemu raspršeno zračenje slabi. Uz interkaliranje, kao dominantan način vezanja, raspršenje zračenja opaženo pri suvišku ct-DNA u sustavu upućuje na samo djelomično vezanje malih molekula s ct-DNA.

SERS spektar ct-DNA nije zamijećen niti u svježe pripremljenoj koloidnoj suspenziji srebra, vrlo vjerojato zbog slabe zamjene snažno adsorbiranih citratnih iona na metalnoj površini s molekulama polinukleotida.

Oba načina pripreve uzorka smjesa spoj 1/DNA pokazuju zadovoljavajuću ponovljivost pripreve uzorka te reproducibilnost odabranog SERS supstrata.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

A – adenin

C – citozin

G – gvanin

T – timin

U – uracil

UV – ultraljubičasto zračenje

VIS – vidljivo zračenje

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

ct-DNA – fragmentirana DNA dobivena iz stanica telećeg

RNA – ribonukleinska kiselina

m-RNA – glasnička ribonukleinska kiselina

mi-RNA – mikro-ribonukleinska kiselina

r-RNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

si-RNA – mala skupina ribonukleinska kiselina

sn-RNA – mala nuklearna ribonukleinska kiselina

t-RNA – prijenosna ribonukleinska kiselina

d – deoksiribonukleotid

r – ribonukleotid

SERS – Površinski pojačano Ramanovo raspršenje

SERRS – Površinski pojačano rezonantno Ramanovo raspršenje

b – široko

ip – u ravninu

oop – van ravnine

sc – striženje

sh – rame

tw – savijanje

wg – mahanje

c – koncentracija

K – konstanta

I – intenzitet

α – polarizabilnost

δ – deformacija

γ – torzija

ν – vibracija

§ 7. LITERATURNI IZVORI

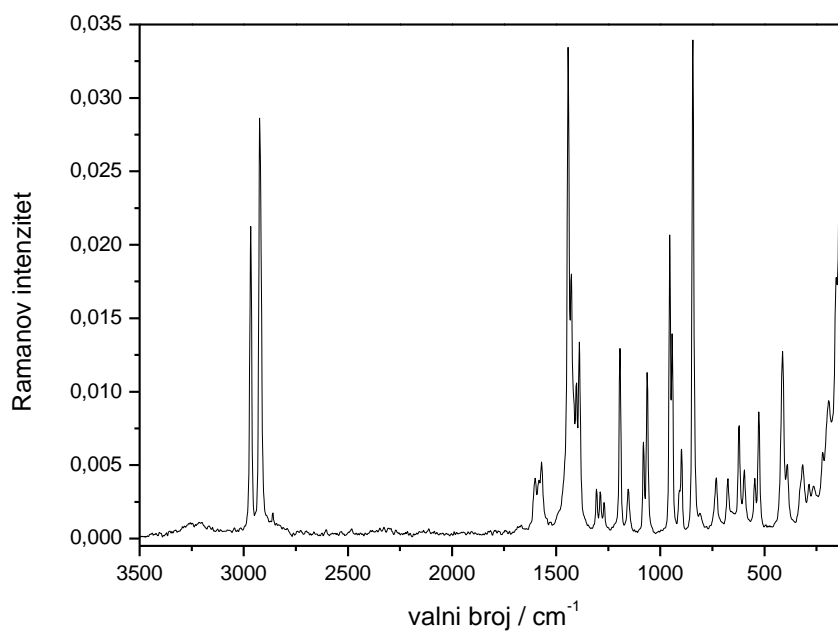
1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, Lubert Stryer, *Biokemija*, Školska Knjiga, Zagreb, 2013.
2. G. Cassinelli, *TJ*. **102** (2016) 226–235.
3. H.-C. Becker, B. Norde'n, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 11947–11952.
4. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA, Varaždin, 2013.
5. S. Cinta Pinzaru, I. Pavel, N. Leopold, W. Kiefer, *J. Raman Spectrosc.* **35** (2004) 338–346.
6. R. Dahm, *Hum. Genet.* **122** (2008) 565–581.
7. R. Dahn, *J. Dev. Biol.* **278** (2005) 274–288.
8. M. E. Jones, *Yale J. Biol. Med.* **26** (1953) 80–97.
9. M. Cobb, *Curr. Biol.* **24** (2014) 55–60.
10. K. Okamuna, J. Wei, S. W. Schener, *BMC Genomics.* **8** (2007) 160.
11. B. Maddox, *Nature.* **421** (2003) 407–408.
12. D. V. Valen, D. Wu, Y. J. Chen, H. Tuson, P. Wiggins, R. Phillips, *Curr. Biol.* **22** (2012) 1339–1343.
13. M. Meselson, F. W. Stahl, *PNAS.* **44** (1958) 671–682.
14. S. C. Harvey, M. Prabhakaran, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 6128–6136.
15. L. Clowney, S. C. Jain, A. R. Srinivasan, J. Westbrook, W. K. Olson, H. M. Berman, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996.) 509–518.
16. E. Frixione, L. Ruiz-Zamarripa, *J. Biol. Chem.* **294** (2019.) 2249–2255.
17. A. T. Krueger, E. T. Koal, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11** (2007.) 588–594.
18. <https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/14obk> (datum pristupa: 28. 1. 2021.)
19. R. Wing, H. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Nature.* **287** (1980.) 755–758.
20. A. Ghosh, M. Bansal, *Acta Cryst.* **D59** (2003.) 620–626.
21. S. Khan, M. W. Ullah, R. Siddique, G. Nabi, S. Manan, M. Yousaf, H. Hou, *Int. J. Genom.* **24** (2016) 1–14.
22. M. Jezek, E. Green, *Cells.* **8** (2019.) 199.

23. Adams RLP i suradnici, *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 11 izdanje, Chapman and Hall, London, 1992.
24. S. Rauf, J. J. Gooding, K. Akhtar, M. A. Ghauri, M. Rahrian, M. Anwar, A. M. Khalid, *J. Pharm. Biomed. Analysis* **37** (2005.) 205–217.
25. F. Gago, *Methods Enzymol.*, **14** (1998.) 277–292.
26. S. Neidle, *Principles of Nucleic Acid Structure*, 1. izdanje, Elsevier, London, 2008.
27. G. Bischoff, S. Hoffman, *Curr. Med. Chem.* **9** (2002.) 321–348.
28. L. Streckowski, B. Wilson, *Mutat. Res.* **623** (2007.) 3-13.
29. I. C. Gherghi, S. T. Girous, A. N. Voulgaropoulos, R. Tzimou-Tsitouridou, *J. Pharm. Biomed. Analysis* **61** (2003.) 103-112.
30. D. M. Neville, P. R. Davies, *J. Mol. Biol.* **17** (1966.) 57–74.
31. K. Nakamoto, M. Tsuboi, G. D. Strahan, *Methods Biochem. Analysis* **51** (2008.) 1–136.
32. P. Pakravan, S. Masoudian, *Iran. J. Pharm. Res.* **14** (2015.) 111–123.
33. S. Basu, S. Jana, S. Pande, T. Pal, *J. Colloid Interface. Sci.* **321** (2008) 288–293.
34. K. Nakamoto, M. Tsuboi, G. D. Strahan, *Methods Biochem. Analysis* **51** (2008.) 1–136.
35. H. Xu, K.-C. Zheng, Y. Chen, Y.-Z. Li, L.-J. Lin, H. Li, P.-X. Zhang, L.-N. Ji, *Dalton Trans.* **11** (2003) 2260–2268.
36. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7099#section=2D-Structuremolekule>
(datum pristupa: 7.2.2021.)
37. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Actinomycin> (datum pristupa: 7.2.2021.)
38. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/332956#section=Structures> (datum pristupa: 7.2.2021.)
39. M. A. Fuertes, C. Alonso, J. M. Perez, *Chem. Rev.* **103** (2002.) 645–662.
40. L.S.Lerman, *J.Mol. Biol.* **3** (1961.) 18–30.
41. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2354#section=2D-Structure> (datum pristupa: 7.2.2021.)
42. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4735#section=2D-Structure> (datum pristupa: 7.2.2021.)
43. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4461#section=2D-Structure> (datum pristupa: 7.2.2021.)
44. T. M. Davis, W. D. Wilson, M. Eriksson, B. Nordén, A. N. Lane, M. E. Peek, L. D. Williams, *Methods Enzymol.* **340** (2001) 22–290.

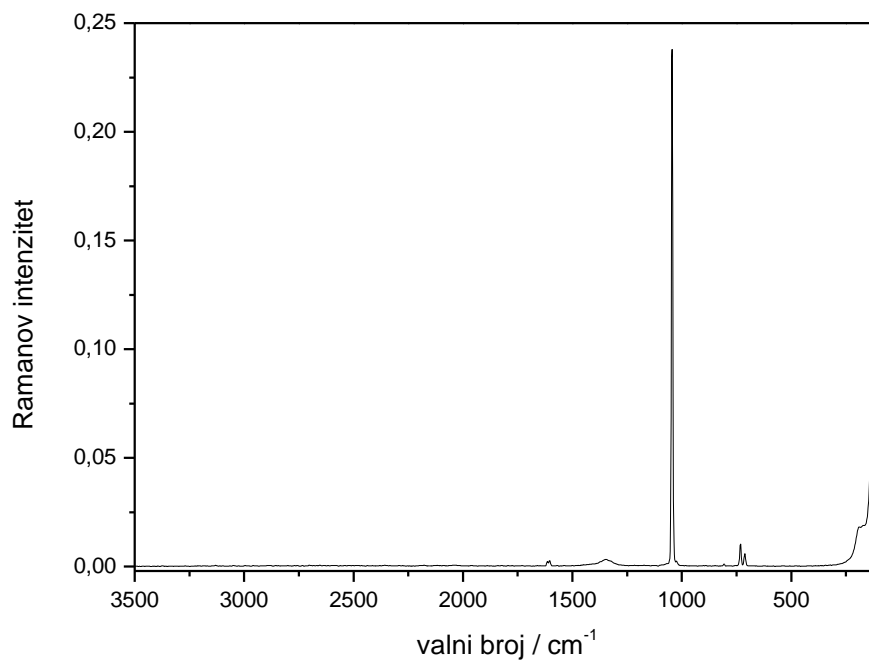
45. G. Keresztury, *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2002.
46. R. Aroca, *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*, 1. izdanje, J. Wiley & Sons, Ontario, 2006.
47. E. Smith, G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy—A Practical Approach*, England, 2005.
48. M. Ratkaj, *Primjena spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja u istraživanju farmaceutskih aktivnih tvari*, PMF, Sveučilište u Zagrebu, 2013.
49. P. Hendra, *RSC Advances* **141** (2016.) 4996–4999.
50. J. R. Lombardi. *RSC Advances* **205** (2017) 105–120.
51. H. Ehrenreich, H. R. Philipp. *Phys. Rev.* **128** (1962) 1622–1629.
52. L. Ouyang, W. Ren, L. Zhu i J. Irudayaraj, *Rev. Analysis Chem.* **36**(2017), 1–16.
53. A. Dijanošić, *Istraživanje interakcija malih molekula s polinukleotidima površinski pojačanom Ramanovom spektroskopijom*, PMF, Sveučilište u Zagrebu, 2013.
54. S. Sanches, J. V. Garcia–Ramos. *J. Raman Spectrosc.* **29** (1998) 365–371.
55. P. Kambhampati, C. M. Child, M. C. Foster, A. Champion, *J. Chem. Phys.* **108** (1998) 5013–5026.
56. K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao i G. C. Schatz, *J. Phys. Chem.* **107** (2003) 668–677.
57. A. Stefancu, S. D. Iancu, V. Moisoiu, N. Leopold, *Rom. Rep. in Phys.* **70** (2018) 1–10.
58. E. C. Le Ru, P. G. Etchegoin, *J. Chem. Phys.* **130** (2009), 1–5.
59. J. Kneipp, H. Kneipp, K. Kneipp, *Chem. Soc. Rev.* **37** (2008) 1052–1060.
60. B. Sharma, R. R. Frontiera, A. I. Henry, E. Ringe, R. P. Van Duyne, *Mater. Today* **15** (2012) 16–25.
61. J. M. Sylvia, J. A. Janni, J.D. Klein, K.M. Spencer, *Analysis Chem.* **72** (2000) 5834–5840.
62. J. S. Taurozzi, V. V. Tarabara, *Eng. Sci.* **24** (2007) 122–137.
63. H. T. Beier, C. B. Cowan, I.-H. Chou, J. Pallikal, J. E. Henry, M. E. Benford, J. B. Jackson, T. A. Good i G. L. Coté, *Plasmonics* **2** (2007) 55–64.
64. D. S. Grubisha, R. J. Lipert, H.-Y. Park, J. Driskell i M. D. Porter, *Analysis Chem.* **75** (2003) 5936–5943.
65. S. Miljanić, A. Dijanošić, I. Matosević, I. Piantanida, *Vib. Spec.* **57** (2011) 23–29.

66. A. Dijanošić, S. Miljanić, I. Piantanida, J. González-García, E. García-España, *J. Raman Spectrosc.* **45** (2014) 863–872.
67. A) S. Miljanić, A. Dijanošić, I. Piantanida, Z. Meić, M. T. Albelda, A. Sornosa-Ten i E. García-España, *Analyst.* **136** (2011) 3185–3193.
B) S. Šašić, *Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy*, 1. Izdanje, Wiley & Sons, New Jersey, 2007.
68. C. H. Munro, W. E. Smith, M. Garner, J. Clarkson i P. C. White, *Langmuir.* **11** (1995), 3712–3720.
69. S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, *J. Raman. Spectrosc.* **29** (1998) 365–371.
70. A. Bertoluzza, C. Fagnano, P. Finelli, M. A. Morelli, R. Simoni, R. Tosi, *J. Raman Spectrosc.* **14** (1983)
71. E. A. Carrasco F., M. Campos-Vallette, P. Leyton, G. Diaz, R. E. Clavijo, J. V. Garcia-Ramos, N. Inostroza, C. Domingo, S. Sanchez-Cortez, R. Koch, *J. Phys. Chem. A.* **107** (2003) 9611–9619.
72. S. L. Kleinman, R. R. Frontiera, A. Henry, J. A. Dieringer, R. P. Van Duyne, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15** (2013) 21-36
73. A) L. Guerrini, R. A. Alvarez-Puebla, *Cancers.* **11** (2019) 1–11.
B) S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, *J. Raman. Spectrosc.* **29** (1998) 365–371.
74. A) S. Dey, M. Trau, K. M. Koo, *Nanomaterials* **10** (2020) 1–15.
B) N. Leopold, A. Stefancu, K. Herman, I. S. Tódor, S. D. Iancu, V. Moisoiu, L. F. Leopold, *Nanomaterials* **9** (2018) 2236–2247.
75. H. Deng, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides, G. J. Thomas Jr., *Nucleic Acids Res.* **28** (2000) 3379–3385.
76. S. E. J. Bell, N. M. S. Sirimuthu, *JACS* **128** (2006) 15580–15581.

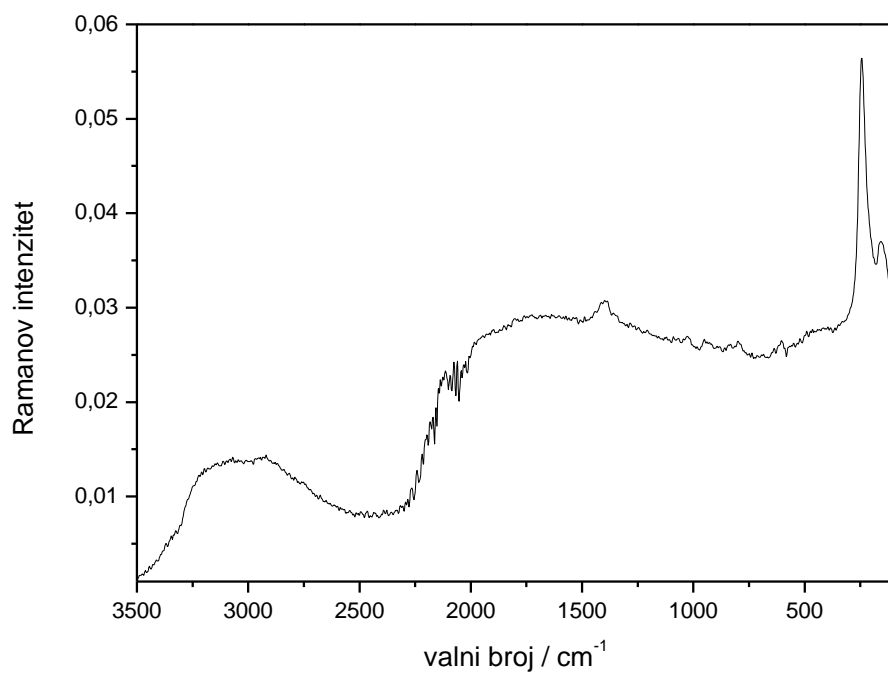
§ 8. DODATAK



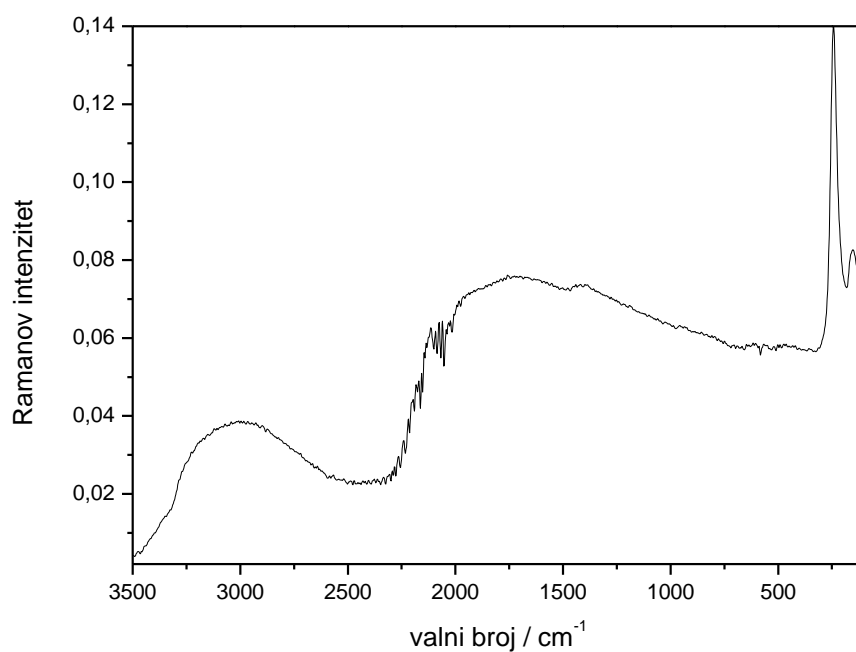
Slika D1. Ramanov spektar krutine trinatrijevog citrata



Slika D2. Ramanov spektar krutine srebrovog nitrata.



Slika D3. Spektar koncentriranog koloida nakon dodatka pufera.

Slika D4. Spektar svježe pripravljenog koloida nakon dodatka otopine MgSO₄ ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$).

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Petra Hudika

Datum rođenja: 3.6.1993.

Mjesto rođenja: Varaždin

Obrazovanje

2000.–2008. Osnovna škola Vladimira Nazora, Budinščina

2008.–2012. Medicinska škola, smjer Farmaceutski tehničar, Varaždin

2012.–2018. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno–matematički fakultet
Sveučilišta u Zagrebu

2018.–2021. Diplomski studij Kemija

Sudjelovanje u popularizaciji znanosti

2016.–2018. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka