

Istraživanje interakcija berberina i papaverina s ribonukleotidima SERS spektroskopijom

Tikvenjak, Patricia

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:882475>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Patricia Tikvenjak

**ISTRAŽIVANJE INTERAKCIJA
BERBERINA I PAPAVERINA S
RIBONUKLEOTIDIMA SERS
SPEKTROSKOPIJOM**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc.
Snežane Miljanić i neposrednim voditeljstvom Petre Petrović, mag. chem.

Zahvale

Srdačno se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Snežani Miljanić na vodstvu, prenesenom znanju, uloženom vremenu i razumijevanju pri izradi ovog diplomskog rada.

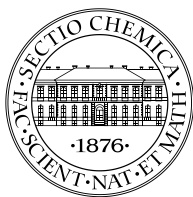
Veliko hvala i neposrednoj voditeljici Petri Petrović, mag. chem., što je bila uz mene svaki korak tijekom izrade eksperimentalnog dijela. Hvala Vam na prekrasnoj atmosferi u laboratoriju, svim savjetima i pruženoj podršci.

Najveće hvala mojim roditeljima koji su me bodrili tijekom cijelog školovanja i naučili da je znanje vrijednost koja je neotuđiva.

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Ramanova spektroskopija	2
2.2. Površinski pojačano Ramanovo raspršenje.....	5
2.2.1. <i>Mehanizmi pojačanja Ramanovog raspršenja.....</i>	<i>6</i>
2.2.2. <i>SERS supstrati.....</i>	<i>8</i>
2.3. Alkaloidi.....	12
2.3.1. <i>Berberin</i>	<i>12</i>
2.3.2. <i>Papaverin.....</i>	<i>14</i>
2.4. Ribonukleotidi	15
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. Kemikalije.....	19
3.2. Mjerni uređaji	19
3.3. Priprava koloidne suspenzije srebra	20
3.4. Priprava otopina i mjernih uzoraka.....	22
3.4.1. <i>Priprava otopina.....</i>	<i>22</i>
3.4.2. <i>Priprava mjernih uzoraka alkaloida.....</i>	<i>23</i>
3.4.3. <i>Priprava mjernih uzoraka ribonukleotida</i>	<i>24</i>
3.4.4. <i>Priprava mjernih uzoraka kompleksa alkaloid/ribonukleotid</i>	<i>25</i>
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. Ramanovi i SERS spektri alkaloida	26
4.1.1. <i>Berberin</i>	<i>26</i>
4.1.2. <i>Papaverin.....</i>	<i>33</i>
4.2. Ramanovi i SERS spektri ribonukleotida.....	39
4.2.1. <i>Adenozin-5'-monofosfat.....</i>	<i>40</i>
4.2.2. <i>Gvanozin-5'-monofosfat</i>	<i>44</i>
4.2.3. <i>Citidin-5'-monofosfat</i>	<i>48</i>
4.2.4. <i>Uridin-5'-monofosfat.....</i>	<i>51</i>
4.3. SERS spektri kompleksa alkaloid/ribonukleotid	55
§ 5. ZAKLJUČAK	66

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI)	68
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	XV
§ 8. DODATAK.....	XVIII
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

ISTRAŽIVANJE INTERAKCIJA BERBERINA I PAPAVERINA S RIBONUKLEOTIDIMA SERS SPEKTROSKOPIJOM

Patricia Tikvenjak

Istraženo je površinski pojačano Ramanovo raspršenje alkaloida (berberin i papaverin), ribonukleotida (AMP, GMP, CMP, UMP) i njihovih kompleksa u koloidu srebra pripremljenom redukcijom srebrova nitrata s trinatrijevim citratom i agregiranom magnezijevim sulfatom. Na temelju koncentracijski ovisnih SERS spektara predloženi su mehanizmi adsorpcije molekula na nanočestice srebra. Alkaloidi se adsorbiraju na površinu nanočestica uslijed privlačnih elektrostatskih interakcija između pozitivnog naboja u strukturi molekula te negativnog naboja stabilizirajućeg sloja citratnih iona, dok ribonukleotidi najvjerojatnije zamjenjuju citratne ione na površini i dušikovom bazom ostvaruju vezu s površinom srebra. Spektralne promjene u SERS spektrima kompleksa pripremljenih u molarnom omjeru [alkaloid]/[ribonukleotid] = 1/1 analizirane su u odnosu na izračunati spektar zbroja SERS spektara pojedinih molekula. Opažene promjene SERS intenziteta upućuju na nastanak kompleksa i njegovu orijentaciju na površini nanočestica srebra, međutim jednoznačno ne ukazuju na vrstu interakcija između alkaloida i ribonukleotida.

(69 + xxi stranica, 36 slika, 8 tablica, 42 literaturna 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: berberin, koloid, nanočestice srebra, papaverin, ribonukleotidi, SERS

Mentor: prof. dr. sc. Snežana Miljanić
Neposredni voditelj: Petra Petrović, mag. chem.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Snežana Miljanić
 2. prof. dr. sc. Željka Soldin
 3. doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
- Zamjena: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Datum diplomskog ispita: 30.09.2022.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

STUDY OF BERBERINE AND PAPAVERINE INTERACTIONS WITH RIBONUCLEOTIDES BY SERS SPECTROSCOPY

Patricia Tikvenjak

Surface-enhanced Raman scattering of alkaloids (berberine and papaverine), ribonucleotides (AMP, GMP, CMP, UMP) and their complexes was studied in silver colloid prepared by reduction of silver nitrate with trisodium citrate and aggregated with magnesium sulfate. Based on concentration-dependent SERS spectra, the adsorption mechanisms of molecules on silver nanoparticles were suggested. Alkaloids were adsorbed on the nanoparticles surface due to attractive electrostatic interactions between the positive charge in the structure of the molecules and the negative charge of the stabilizing layer of citrate ions, while ribonucleotides most likely replaced citrate ions on the surface and formed a bond with the silver surface via the nitrogen base. Spectral changes in the SERS spectra of the complexes prepared in the molar ratio [alkaloid]/[ribonucleotide] = 1/1 were analyzed with respect to the calculated spectrum of the sum of the SERS spectra of individual molecules. The observed changes in SERS intensity implied the formation of a complex and its orientation on the silver nanoparticles surface, however, the type of interactions between alkaloids and ribonucleotides were not unambiguously indicated.

(69 + xxi pages, 36 figures, 8 tables, 42 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: berberine, colloid, papaverine, ribonucleotides, SERS, silver nanoparticles

Mentor: Dr. Snežana Miljanić, Professor
Assistant mentor: Petra Petrović, mag. chem.

Reviewers:

1. Dr. Snežana Miljanić, Professor
 2. Dr. Željka Soldin, Professor
 3. Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

Date of exam: 30.09.2022.

Patricia Tikvenjak

Diplomski rad

§ 1. UVOD

Alkaloidi predstavljaju skupinu prirodnih spojeva, uglavnom sekundarnih metabolita biljaka, koji posjeduju jako farmakološko djelovanje te se već stoljećima koriste u tradicionalnoj, a u današnje vrijeme i u modernoj medicini. Osim farmakološkog djelovanja, utvrđeno je da se nakupljaju u stanicama tumora gdje tvore nekovalentne komplekse s nukleinskim kiselinama, pri čemu blokiraju procese replikacije, transkripcije i translacije genetskog materijala.¹

Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (engl. *surface-enhanced Raman spectroscopy*, SERS) je tehnika vibracijske spektroskopije korištena za detekciju i strukturnu analizu molekula kojom se dobiva vibracijski spektar karakterističan za molekulu, a temeljena je na pojačanju Ramanovog raspršenja uslijed adsorpcije ili kemijskog vezanja molekula analita na nanostrukturiranu metalnu površinu. SERS spektroskopija posjeduje mnoge prednosti u odnosu na klasičnu Ramanovu spektroskopiju, uključujući pojačanje raspršenog zračenja i gašenje fluorescencije što ju čini visoko osjetljivom metodom koja omogućava istraživanje analita u mikro- i submikromolarnom koncentracijskom području. Riječ je o suvremenoj metodi koja posjeduje širok spektar primjene, a uspješno se primjenjuje i za strukturnu analizu mononukleotida i oligonukleotida.^{2,3}

Svrha ovog rada je primijeniti spektroskopiju površinski pojačanog Ramanovog raspršenja pri istraživanju interakcija alkaloida berberina i papaverina s ribonukleotidima. Kao SERS aktivni supstrat korištene su nanočestice srebra pripravljene redukcijom srebrova(I) nitrata s trinatrijevim citratom koje su prema potrebi agregirane dodatkom magnezijevog sulfata neposredno prije mjerenja. U koloidnoj suspenziji srebra snimljeni su koncentracijski ovisni SERS spektri alkaloida (berberina i papaverina) te ribonukleotida (adenozin-5'-monofosfata, gvanozin-5'-monofosfata, citidin-5'-monofosfata i uridin-5'-monofosfata). Snimljeni spektri detaljno su asignirani i interpretirani s obzirom na mehanizam adsorpcije istraživanih molekula na površinu nanočestica srebra i prirodu pojačanja Ramanovog raspršenja. Zatim su snimljeni SERS spektri smjesa alkaloida i ribonukleotida pripremljenih u molarnom omjeru 1/1. Sva mjerenja provedena su nakon pobude zračenjem valne duljine od 785 nm. Spektralne razlike analizirane su u svrhu istraživanja interakcija i načina vezanja berberina i papaverina s ribonukleotidima.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

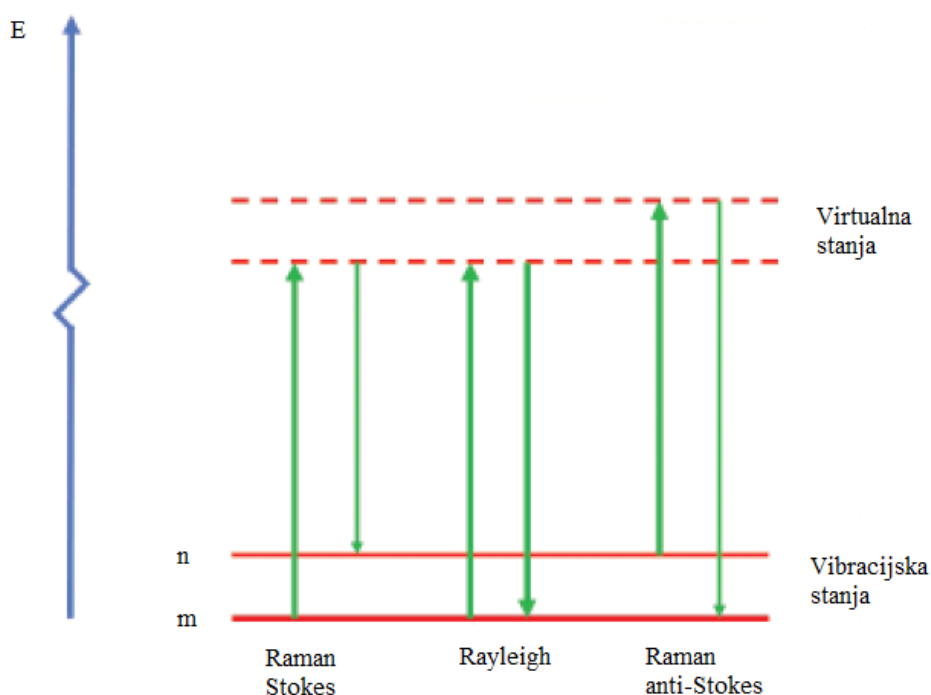
2.1. Ramanova spektroskopija

Ramanova spektroskopija je tehnika vibracijske spektroskopije koja se temelji na fenomenu neelastičnog raspršenja elektromagnetskog zračenja uslijed interakcije zračenja i molekule te omogućava identifikaciju molekula na temelju njihovog strukturnog „otiska prsta“.⁴ Fenomen neelastičnog raspršenja prvi je postavio A. Smekal 1923. godine, dok je eksperimentalno uočen po prvi puta 1928. godine od strane K. S. Krishnana i C. V. Ramana. Otada se fenomen naziva Ramanovo raspršenje. U izvornom eksperimentu, sunčeva svjetlost bila je teleskopom fokusirana na uzorak, koji je bio tekućina, te je uz njega postavljena druga leća koja je služila za prikupljanje raspršenog zračenja, a kao dokaz da je frekvencija raspršenog zračenja različita od frekvencije upadnog zračenja, što je osnovna karakteristika Ramanovog raspršenja, korišten je sustav optičkih filtera.⁵

Prilikom interakcije zračenja s tvari u vibracijskoj spektroskopiji foton se može apsorbirati, raspršiti ili proći kroz tvar bez interakcije. Ako energija upadnog fotona odgovara razlici energija osnovnog i pobuđenog stanja, foton se apsorbira i molekula prelazi u više vibracijsko stanje, što je ujedno i temelj infracrvene (IR) spektroskopije. S druge strane, ako energija upadnog fotona ne odgovara razlici energija između osnovnog i pobuđenog stanja foton se raspršuje. Raspršeno zračenje se sakuplja pod određenim kutem u odnosu na upadno zračenje, a efikasnost se povećava s četvrtom potencijom frekvencije upadnog zračenja. U procesu raspršenja, kao posljedica interakcije molekule s monokromatskim zračenjem, narušava se oblak elektrona oko jezgre pri čemu nastaje kratko živuće nestabilno stanje koje se naziva virtualno stanje, nakon čega dolazi do brzog otpuštanja fotona. Ako su frekvencije upadnog i raspršenog zračenja jednake, riječ je o elastičnom, odnosno Rayleighovom raspršenju, gdje u raspršenju sudjeluje elektronski oblak, nema promjene energije te se molekula iz virtualnog stanja vraća u isto energijsko stanje iz kojeg je pobuđena. No, ako su frekvencije upadnog i raspršenog zračenja različite, riječ je o neelastičnom ili Ramanovom raspršenju, kojim se potiče gibanje jezgara te se energija prenosi s upadnog fotona na molekulu ili s molekule na raspršeni foton. Razlikujemo Stokesovo i anti-Stokesovo raspršenje. Kod Stokesovog raspršenja molekula iz osnovnog vibracijskog stanja prelazi u

virtualno stanje te se vraća u više vibracijsko stanje, a kod anti-Stokesovog raspršenja molekula iz višeg vibracijskog stanja prelazi u virtualno stanje i vraća se u osnovno vibracijsko stanje. U Ramanovoj spektroskopiji mjeri se razlika energije između dvaju vibracijskih stanja, odnosno oduzima se energija raspršenog fotona od energije upadnog fotona.^{4,5} Na slici 1. shematski je prikazano Rayleighovo i Ramanovo raspršenje.

Rayleighovo raspršenje statistički je najvjerojatnije te stoga ono predstavlja dominantan proces. S druge strane, Ramanovo raspršenje inherentno je slab proces jer tek jedan od 10^6 – 10^8 fotona koji se raspršuju je Raman raspršen. Relativni intenziteti Stokesovog i anti-Stokesovog raspršenja ovise o popunjenosti stanja molekule. Pri sobnoj temperaturi, prema Boltzmannovoj raspodjeli, većina molekula se nalazi u osnovnom vibracijskom stanju, a tek mali dio je u pobuđenom vibracijskom stanju pa je u tom slučaju Stokesovo raspršenje statistički vjerojatniji proces te su vrpce koje pripadaju Stokesovom raspršenju znatno intenzivnije od vrpce koje pripadaju anti-Stokesovom raspršenju.^{4,5}



Slika 1. Shematski prikaz Rayleighovog i Ramanovog raspršenja.⁵

IR spektroskopija i Ramanova spektroskopija međusobno su komplementarne tehnike koje se koriste za dobivanje informacija o strukturi molekule na temelju vibracijskih prijelaza. Iako se IR i Ramanova spektroskopija međusobno nadopunjuju i kemijska informacija koju daju je

slična, postoje razlike koje utječu na to koja će tehnika biti optimalna u danom eksperimentu. U IR spektroskopiji kao izvor zračenja koristi se IR zračenje koje obuhvaća niz frekvencija i temelji se na apsorpciji zračenja, dok se Ramanova spektroskopija temelji na neelastičnom raspršenju monokromatskog zračenja, pri čemu se kao izvor zračenja koristi laser koji emitira zračenje u vidljivom (Vis), bliskom infracrvenom (NIR) ili ultraljubičastom (UV) području. Osnovno izborno pravilo Ramanove spektroskopije govori kako se Ramanovo raspršenje opaža uslijed vibracija koje mijenjaju polarizabilnost molekule, a polarizabilnost opisuje koliko se lako elektronski oblak oko molekule polarizira pod utjecajem vanjskog električnog polja. U tom slučaju vibracija će biti Raman aktivna i očituje se kao vrpca u Ramanovom spektru. U IR spektroskopiji vibracija će biti aktivna ako uzrokuje promjenu dipolnog momenta molekule. Kao posljedica različitih izbornih pravila, intenzivne vrpce vibracija u IR spektru mogu biti znatno manjeg intenziteta u Ramanovom spektru ili obrnuto. U Ramanovom spektru većeg intenziteta će biti simetrične vibracije zbog veće promjene polarizabilnosti i većeg raspršenja, dok su u IR spektru većeg intenziteta antisimetrične vibracije uslijed veće promjene dipolnog momenta. Osim toga, za molekule koje imaju centar simetrije postoji i dodatno izborno pravilo međusobnog isključenja, koje govori kako za takve molekule niti jedna vibracija ne može istovremeno biti i IR i Raman aktivna. IR i Ramanovi spektri nisu uvijek identični pa se njihovom usporedbom mogu dobiti vrijedne informacije o simetriji molekula. Važna prednost Ramanove spektroskopije je to što voda ne smeta pri snimanju Ramanovih spektara vodenih otopina jer voda slabo raspršuje zračenje te je vrpca istezanja veza O–H široka i slaba. Naprotiv, zbog velike razlike u elektronegativnosti između atoma vodika i atoma kisika promjena dipolnog momenta prilikom istezanja veza O–H vode je velika te je IR vrpca istezanja veza O–H vrlo intenzivna što predstavlja problem prilikom snimanja IR spektara vodenih otopina.^{4,5}

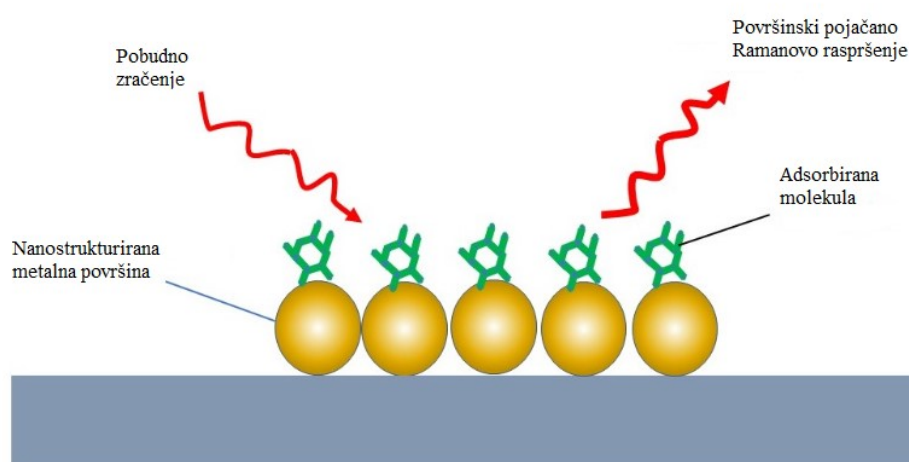
Osim mnogih prednosti, Ramanova spektroskopija također ima i nedostatke od kojih je najveća to što je neelastično raspršenje fotona malo vjerojatno te je Ramanovo raspršenje inherentno slab proces pa je i primjena Ramanove spektroskopije ograničena zbog slabe osjetljivosti. U današnje vrijeme koriste se laseri koji omogućavaju snimanje spektara uzoraka malih dimenzija velikom snagom zračenja. Međutim, oni mogu uzrokovati razgradnju uzorka, i pobuditi fluorescenciju analita ili nečistoća koje su prisutne u uzorku, što rezultira djelomičnim ili potpunim prekrivanjem Stokesovog dijela Ramanovog spektra, jer je čak i slaba fluorescencija intenzivnija u odnosu na Ramanovo raspršenje.^{4,6} Stoga je razvoj tehnika

površinski pojačanog Ramanovog raspršenja od iznimne važnosti, u kojima niska osjetljivost više nije ograničavajuće svojstvo Ramanove spektroskopije.⁷

2.2. Površinski pojačano Ramanovo raspršenje

Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS) je tehnika vibracijske spektroskopije koju karakterizira pojačanje intenziteta u odnosu na normalno Ramanovo raspršenje za molekule koje su vezane na nanostrukturiranu površinu metala ili se nalaze u njezinoj neposrednoj blizini (slika 2).⁸ Fenomen površinski pojačanog Ramanovog raspršenja prvi su uočili Fleischmann i suradnici 1974. godine u eksperimentu u kojem su opazili pojačanje Ramanovog raspršenja piridina adsorbiranog iz vodene otopine na srebrovu elektrodu hrapave površine. Taj su efekt pripisali povećanju površine elektrode uslijed hrapavosti što je omogućilo adsorpciju većeg broja molekula. 1977. godine Jeanmarie i Van Duyne te Albrecht i Creighton, neovisno jedni od drugih, dokazali su, proučavanjem faktora pojačanja Ramanovog raspršenja piridina, kako razlog pojačanja Ramanovog raspršenja ne leži samo u povećanju površine, već i u hrapavosti površine.^{8,9}

Kao SERS aktivne površine koriste se metali poput srebra i zlata, dok su bakar i željezo rjeđe korišteni jer u prisutnosti kisika tvore slojeve oksida pa se mijenja priroda površine, gubi se hrapavost i nastaje prostorna barijera između metalne površine i analita, što u konačnici rezultira lošijim pojačanjem Ramanovog raspršenja s tih podloga.^{9,10}



Slika 2. Shematski prikaz SERS efekta za molekulu adsorbiranu na nanostrukturiranu metalnu površinu.¹¹

Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja kombinira prednosti Ramanove spektroskopije, poput identifikacije molekula na temelju njihovog strukturnog otiska prsta, nedestruktivne analize, minimalne pripreme uzorka, mogućnosti provođenja analize u biološkim tekućinama, s obzirom da voda ne ometa mjerenje, s visokom osjetljivošću. U odnosu na klasičnu Ramanovu spektroskopiju intenzitet raspršenog zračenja povećava se do 10^6 , a ponekad i do 10^{10} puta, što omogućava primjenu SERS spektroskopije za proučavanje strukture analita pri niskim koncentracijama u uzorku, pa čak i identifikaciju jedne molekule u otopini (engl. *single molecule detection*).⁹ Međutim, interpretacija SERS spektra nije jednostavna, koji se u velikom broju slučajeva razlikuje od normalnog Ramanovog spektra. Molekula s centrom simetrije, vezanjem na SERS aktivnu površinu, gubi to svojstvo te se u SERS spektru mogu pojaviti nove vrpce, jer više ne vrijedi izborno pravilo međusobnog isključenja. Moguća je i promjena intenziteta vrpce u odnosu na normalni Ramanov spektar, što je posljedica orijentacije molekule na površini. Također je potrebno uzeti u obzir da veća osjetljivost SERS spektroskopije u odnosu na Ramanovu spektroskopiju može uzrokovati pojavu vrpce koje potječu od nečistoća prisutnih u uzorku.

2.2.1. Mehanizmi pojačanja Ramanovog raspršenja

Mehanizam površinski pojačanog Ramanovog raspršenja još uvijek nije sasvim jasan te je predloženo nekoliko teorija ovog efekta, no dvije dobro prihvaćene i jednako valjane teorije su elektromagnetski mehanizam i kemijski mehanizam. Opisani mehanizmi djeluju neovisno jedan o drugome, ali se često javljaju simultano.

Površina metala prekrivena je vodljivim elektronima koji se po njoj mogu slobodno kretati. Uslijed interakcije s elektromagnetskim zračenjem, elektroni počinju oscilirati, a te oscilacije se nazivaju površinskim plazmonima. Površinski plazmoni na malim jednolikim česticama ili hrapavim površinama imaju rezonantnu frekvenciju, koja ovisi o metalu te prirodi površine metala, pri kojoj najefikasnije apsorbiraju i raspršuju zračenje. Svaki metal ima karakterističnu rezonantnu frekvenciju, npr. rezonantna frekvencija plazmona Ag nalazi se u Vis području, te karakterističan omjer apsorpcije i raspršenja, pa je tako za plazmone Ag favorizirano raspršenje. Što se tiče prirode površine, na glatkoj površini se oscilacije odvijaju u ravnini površine metala te se zračenje apsorbira, a na hrapavoj površini oscilacije se javljaju odvijaju u ravnini i okomito na površinu metala te se zračenje apsorbira i raspršuje.

U opisu elektromagnetskog pojačanja analit je adsorbiran na ili se nalazi vrlo blizu metalne površine pri čemu nastaju interakcije između analita i površinskih plazmona te se temelji na plazmonskoj rezonanciji. Elektromagnetski mehanizam aproksimira se modelom metalne sfere koja simbolizira nanočesticu metala prekrivenu vodljivim elektronima. Prilikom ozračivanja nanostrukturirane hrapave metalne površine laserom određene valne duljine nastaju površinski plazmoni. Pri rezonantnoj frekvenciji plazmona, oko molekule adsorbirane na površini metala javlja se jako električno polje što uzrokuje jaču polarizaciju molekule te se Ramanovo raspršenje adsorbirane molekule pojačava. Električno polje u svakoj točki sastoji se od komponente okomite na površinu i komponente paralelne s površinom pri čemu je električno polje okomito na površinu veće u odnosu na ono paralelno s površinom. Stoga je orijentacija molekule na površini metala važna te je najveće pojačanje Ramanovog raspršenja uočeno za adsorbiranu molekulu polariziranu okomito na površinu. Također, jakost električnog polja opada s udaljenošću molekule od površine metala što utječe na intenzitet Ramanovog raspršenja molekule pa je pojačanje tim manje čim je molekula udaljenija od metalne površine. Pojačanje raspršenja zračenja, osim o frekvenciji, ovisi i o veličini i obliku čestica metala te načinu na koji se čestice organiziraju u nakupine. Najveće pojačanje Ramanovog raspršenja uočava se na mjestima gdje se čestice dodiruju ili stvaraju nakupine, odnosno agregate. Riječ je o takozvanim *hot spots* ili „vrućim točkama“ gdje su električna polja veoma jaka pa se raspršeno zračenje izrazito povećava. U agregatima plazmon postaje zajednički plazmon više od jedne nanočestice i ima novu rezonantnu frekvenciju.^{9,12} Frekvencija plazmona se smanjuje s porastom veličine čestice pa dimeri, trimeri itd. posjeduju plazmonsku rezonanciju pri nižim frekvencijama u usporedbi s pojedinačnim česticama. Elektromagnetsko pojačanje Ramanovog raspršenja dužeg je dometa i moguće ga je opaziti za nekoliko slojeva molekula analita blizu površine metala. U odnosu na klasično Ramanovo raspršenje faktor pojačanja raspršenja iznosi i do 10^{10} . Neovisno je o vrsti molekula analita te je to svojstvo karakteristično za SERS supstrat.⁹

Kemijski mehanizam, odnosno mehanizam pojačanja uslijed prijenosa naboja, pretpostavlja da je analit kemijski vezan na metalnu površinu. Kemijska veza najčešće se ostvaruje preko atoma dušika, kisika ili sumpora. Stvaranjem kemijske veze između molekule analita i metalne površine nastaju nove površinske vrste i omogućava se prijenos naboja s metalne površine na molekulu analita i s molekule analita na metalnu površinu. Naime, uslijed interakcije s elektronima metala povećava se polarizabilnost molekule, a prijenos naboja

podrazumijeva prijelaz elektrona iz Fermijevog nivoa metala u energijski najnižu nepopunjenu molekulsku orbitalu i obrnuto. Nakon kratkotrajne pobude slijedi povratak elektrona u metal pri čemu se zračenje raspršuje. Kemijsko pojačanje Ramanovog raspršenja kratkog je dometa i ograničeno je na prvi sloj molekula analita. U odnosu na klasično Ramanovo raspršenje faktor pojačanja raspršenja iznosi 10^2 - 10^4 što upućuje na veći doprinos elektrokemijskog mehanizma ukupnom pojačanju Ramanovog raspršenja.⁹

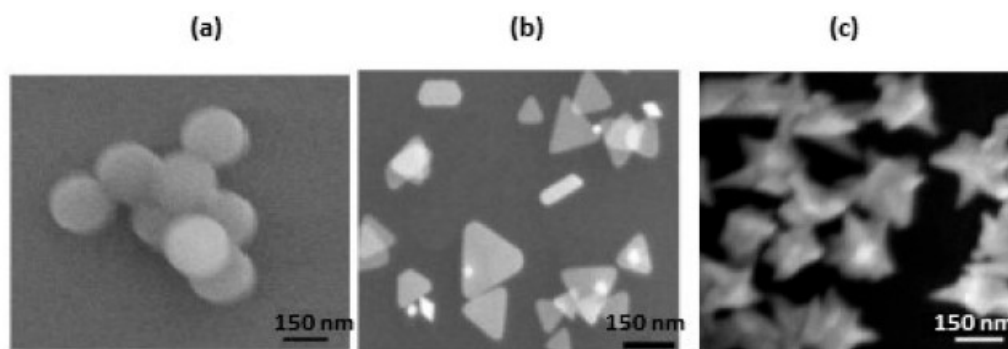
Elektromagnetsko i kemijsko pojačanje obično se tretiraju kao zasebni fenomeni, ali granica između njih više nije tako jasna kao što je to ranije bilo prezentirano. U današnje vrijeme znanstvenici pokušavaju kreirati jedinstvenu teoriju mehanizma pojačanja Ramanovog raspršenja.

2.2.2. SERS supstrati

Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja od velike je važnosti u analitičkoj kemiji, no i dan danas ključni korak za širu primjenu SERS tehnike je uspješna priprava SERS supstrata. SERS supstrat mora imati hrapavu površinu, biti kemijski stabilan i robustan, priprema treba biti jednostavna i rezultirati reproducibilnim supstratom velikog faktora pojačanja Ramanovog raspršenja. Prvi korišteni SERS supstrat bila je hrapava srebrova elektroda pripremljena elektrokemijskom cikličkom voltametrijom.¹⁰ Danas najčešće korišteni SERS supstrati su suspenzije metalnih nanočestica, metalne nanočestice imobilizirane na čvrstim nosačima i nanostrukture pripremljene izravno na čvrstim nosačima nanolitografskim postupkom.¹³

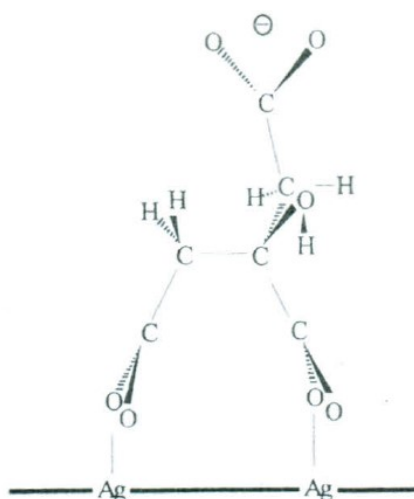
Suspenzije metalnih nanočestica moguće je pripremiti fizikalnim ili kemijskim metodama. Često korištena fizikalna metoda je pulsna laserska ablacija plemenitih metala u tekućem mediju. Ovom tehnikom, nanočestice Ag, Au ili Cu pripremaju se stavljanjem mete u vodu ili organsko otapalo. Laserski impulsi fokusirani na metu se apsorbiraju pri čemu se stvara oblak plazme koji se brzo širi u okolnu tekućinu uz emisiju udarnih valova, hladi i razgrađuje tijekom nano do mikrosekundi. Atomizirani materijal uklonjen s mete reagira s vrstama prisutnim u tekućini što dovodi do nukleacije, rasta i stvaranja nanočestica. Prednost ove tehnike je nastanak stabilnih nanočestica koje na površini ne sadrže organske niti ionske vrste. Kemijska sinteza SERS aktivnih nanočestica obično se provodi redukcijom iona Ag ili Au u otopini, korištenjem redukcijskih sredstava poput trinatrijevog citrata, hidrazina ili hidroksilamin hidroklorida, čije su glavne prednosti jednostavna priprema i karakterizacija

nanočestica.⁹ Veličina nanočestica može se kontrolirati jačinom i koncentracijom korištenog redukcijskog reagensa. Jača redukcijska sredstva daju manje nanočestice, dok slabija redukcijska sredstva, kao što je i trinatrijev citrat, daju veće nanočestice. Faze nukleacije i rasta tijekom kemijske redukcije određuju raspodjelu veličine čestica. Tijekom faze nukleacije, atomi metala se grupiraju i tvore klastere te na kraju nastaje kristalna jezgra, a tijekom faze rasta kristalna jezgra raste i nastaju nanočestice. Oblik nanočestica može se kontrolirati dodavanjem surfaktanata tijekom sinteze koji uzrokuju promjenu površinske energije i kontroliraju agregaciju čestica. Surfaktant stabilizira specifične kristalne ravnine u rastućoj nanostrukтури i na taj način omogućuje kontrolirani rast u toj ravnini. Ovisno o surfaktantu i odabranom metalu, mogu se pripraviti nanočestice različitog oblika poput nanosfera, nanotrokuta, nanožica i nanozvijezda itd. (slika 3). Na pojačanje Ramanovog raspršenja utječu oblik i veličina nanočestica. Najveće pojačanje Ramanovog raspršenja prisutno je u slučaju nanozvijezda, a razlog leži u velikom broju intrinzičnih aktivnih mjesta (engl. *hot spots*) po nanočestici. Također, s povećanjem dimenzija nanočestica uočava se veće pojačanje Ramanovog raspršenja.¹³ Općenito, metalne nanočestice pojačavaju Ramanovo raspršenje, no za dodatno pojačanje SERS signala važna je agregacija koloida metala jer formiranjem agregata dviju ili više nanočestica nastaju brojna SERS aktivna mjesta i sprežu se električna polja, te se također mijenja naboj površine metala što je posebice korisno u slučaju negativno nabijenih analita koji se, za razliku od pozitivno nabijenih, ne adsorbiraju lako na površinu nanočestica već uglavnom zaostaju u suspenziji. Uobičajeni način agregacije koloidnih nanočestica podrazumijeva dodavanje anorganskih soli, poput KCl, NaCl, NaBr, NaNO₃ i MgSO₄, surfaktanata, etanola ili organskih amina u koloidnu suspenziju.¹⁰ Sintetizirane, ili komercijalne, agregirane nanočestice pri prikladnim uvjetima značajno pojačavaju Ramanovo raspršenje.⁹



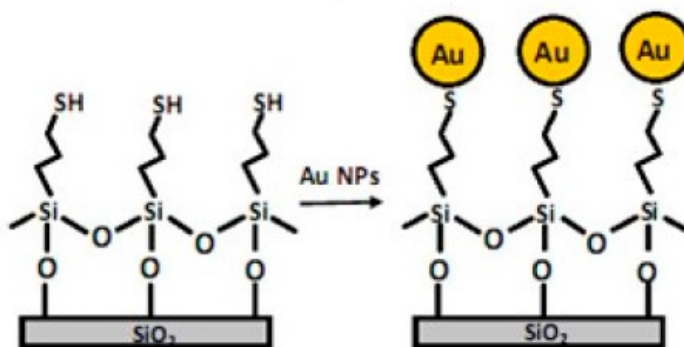
Slika 3. SEM fotografije nanočestica zlata: a) nanosfere, b) nanotrokuti i c) nanozvijezde.¹³

Koloidne suspenzije Ag veoma su često korištene kao SERS supstrati, a najčešće se pripremaju redukcijom srebrova nitrata s trinatrijevim citratom. Postupak sinteze osmislili su Lee i Meisel,¹⁴ a potom su ju modificirali Munro i sur.¹⁵ Citrati reduciraju srebrove ione, nastaju acetondikarboksilna kiselina i acetocetna kiselina koje se zajedno sa suviškom citratnih iona adsorbiraju na površinu nanočestica te tako djeluju kao stabilizirajući agensi. Površina koloidnih nanočestica Ag negativno je nabijena (slika 4). Koloidi pripremljeni ovom metodom stabilni su tijekom vremena. Nisu uočene promjene u UV/Vis apsorpcijskom spektru niti u SERS spektru koloida dva mjeseca nakon pripreme koloida.¹⁵



Slika 4. Shematski prikaz površine koloidnih nanočestica srebra pripremljenih redukcijom srebrova nitrata s trinatrijevim citratom.¹⁵

Osim u suspenziji, pripravljene koloidne nanočestice mogu se koristiti kao SERS supstrati imobilizirane na čvrstom nosaču. Time se postiže dodatno pojačanje Ramanovog raspršenja, posebno korisno za sferične nanočestice. Imobilizacijom nanočestica na čvrstoj podlozi, one se dovode u neposrednu blizinu te se tako povećava broj SERS aktivnih mjesta. U tu svrhu primjenjuje se nekoliko strategija. Moguća je primjena „kemijskog lanca“ za sidrenje nanočestica Au ili Ag na kvarcnu podlogu. U ovoj metodi, nanočestice Au i Ag pripremaju se redukcijom HAuCl_4 ili AgNO_3 pomoću trinatrijevog citrata. Površina kvarcnog nosača silanizira se (3-merkaptopropil)trimetoksisilanom (MPTMS) koji se metoksi skupinama veže na kvarc. Nakon toga se silanizirani supstrat uranja u suspenziju nanočestica Au ili Ag, te nanočestice metala ostvaruju veze s tiolnim skupinama silana. Postupak imobilizacije nanočestica Au na kvarcni nosač prikazan je na slici 5. Također, pokazano je da se i (3-aminopropil)trimetoksisilan (APTMS) može koristiti za imobilizaciju nanočestica Au ili Ag. U tom slučaju, nanočestice se vežu na površinu silaniziranog supstrata preko amino skupina silana.¹³ APTMS i MPTMS se mogu koristiti i za imobilizaciju nanočestica na staklo, papir, silicij i aluminij. Kontrolirana imobilizacija nanočestica na površini poboljšava reproducibilnost SERS supstrata, a također je riječ o fleksibilnoj metodi jer se na podlogu mogu vezati nanočestice različitih veličina, oblika i sastava te se mogu proizvesti supstrati veće površine, reda veličine cm^2 .⁹



Slika 5. Shematski prikaz imobilizacije nanočestica Au na kvarcni supstrat.¹³

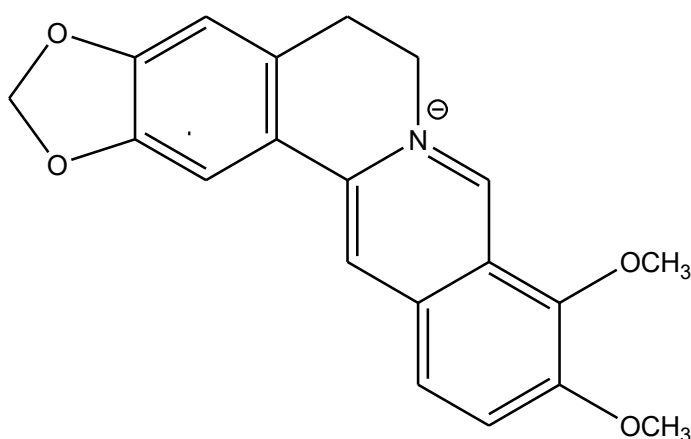
Visoko uređene metalne nanostrukture mogu se pripremiti korištenjem nanolitografije i srodnih litografskih tehnika. Riječ je o elegantnom, moćnom i brzom načinu pripreme SERS supstrata koji omogućava izvanrednu kontrolu veličine i oblika nanočestica te razmaka

između nanočestica, i rezultira supstratima velike površine koje karakterizira veliko pojačanje Ramanovog raspršenja i kemijska stabilnost.^{12,13}

2.3. Alkaloidi

2.3.1. Berberin

Berberin (BBR) je benzilizokinolinski alkaloid s molarnom masom $336,3612 \text{ g mol}^{-1}$ čija je struktura prikazana na slici 6. BBR je krutina svijetlo žute boje s talištem pri 145 °C . Topiv je u vrućoj vodi i metanolu, slabo topiv u hladnoj vodi i etanolu, a netopiv u benzenu, eteru, kloroformu i drugim organskim otapalima. Osjetljiv je na svjetlost i toplinu; kada je izložen svjetlosti i visokoj temperaturi sklon je razgradnji.^{16,17}



Slika 6. Struktura berberina (BBR).

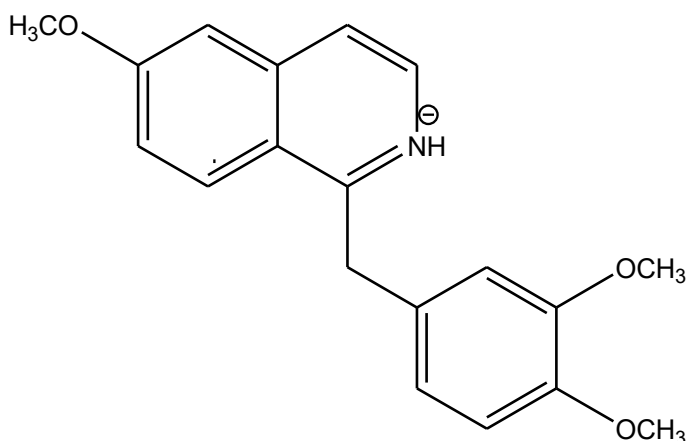
Tijekom godina, prirodni spojevi, obično dobiveni iz biljaka, često su korišteni za liječenje širokog spektra poremećaja. Biljke imaju raznolik spektar medicinskih i bioloških funkcija što ih čini idealnim izvorom za razvoj lijekova, s obećavajućim terapijskim prednostima. Alkaloidi su sekundarni metaboliti biljaka koji imaju raznolika farmakološka djelovanja. Riječ je o skupini prirodnih tvari koje se stoljećima koriste u tradicionalnoj, a u današnje vrijeme i modernoj medicini. Izokinolinski alkaloidi su druga najčešća skupina biljnih

alkaloida koji imaju protuupalno, analgetsko, antimikrobno, antitumorsko i antioksidativno djelovanje, ali i mnoga druga. BBR je jedan od najistraživanijih izokinolinskih alkaloida koji se od davnina koristi u kineskoj i ajurvedskoj medicini, a pronalazimo ga u rizomima, korijenju i kori stabljika raznih ljekovitih biljaka poput *Berberis aquifolium*, *Hydrastis canadensis*, *Coptis berberis*, *Berberis vulgaris* i *Berberis aristata*. Riječ je o farmakoforu koji potencijalno može doprinijeti razvoju novih terapijskih lijekova za razne poremećaje. Dokazano je da ima antimikrobni učinak na široki spektar vrsta, kao što su gljivice, klamidije, bakterije, protozoe i virusi, te je koristan u terapiji raznih stanja kože i očiju. Također, posjeduje i antimalarijska, antihipertenzivna, antioksidativna, protuupalna, antiaritmička, anti-HIV i antitumorska svojstva. Pokazao se korisnim u liječenju Alzheimerove bolesti i sindroma policističnih jajnika. Opsežna znanstvena istraživanja pokazala su sposobnost BBR-a da modulira višestruke stanične mete uključene u etiologiju raznih poremećaja pa stoga pokazuje povoljno preventivno i terapijsko djelovanje za liječenje najrazličitijih bolesti. Djeluje na raznolike molekularne mete poput transkripcijskih faktora, faktora rasta, citokina, enzima i gena koji reguliraju staničnu proliferaciju i apoptozu te na upalne faktore.¹⁸ Njegov najveći nedostatak je niska bioraspoloživost kada se primjenjuje oralno; stoga su u praksi različite strategije temeljene na nanotehnologiji za povećanje bioraspoloživosti BBR-a. Nadalje, istodobna primjena s određenim lijekovima dovodi do njegove povećane apsorpcije.¹⁷

BBR u biljnim ekstraktima i biološkim tekućinama analiziran je pomoću UV-Vis apsorpcijske spektroskopije, tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), tankoslojne kromatografije (TLC), kapilarne elektroforeze (CE) i tekućinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom (LC-MS).¹⁶ Berberin jako fluorescira što ograničava korištenje Ramanove spektroskopije za njegovu identifikaciju. S druge strane, SERS spektroskopija pokazala je svoj potencijal u analizi prirodnih boja. Ova tehnika kombinira visoku osjetljivost s gašenjem fluorescencije što ju čini veoma atraktivnom. Također, BBR je pozitivno nabijen, pokazuje veliki afinitet prema nanočesticama srebra što ga čini pogodnim za SERS spektroskopiju. Jedan od primjera korištenja SERS spektroskopije za analizu BBR je istraživanje adsorpcije berberina na nanočestice srebra i njegove identifikacije u drevnom tekstilu.¹⁹

2.3.2. Papaverin

Papaverin (PPV) je benzilizokinolinski alkaloid s molarnom masom $339,1471 \text{ g mol}^{-1}$ čija je struktura prikazana na slici 7. PPV je krutina bijele boje s talištem pri $224 \text{ }^\circ\text{C}$. Dobro je topiv u etanolu i kloroformu, topiv je u acetonu, a slabo topiv u vodi i ugljikovom tetrakloridu.²⁰



Slika 7. Struktura papaverina (PPV).

PPV je prirodan nenarkotički spoj dobiven iz biljke *Papaver somniferum*, općenito poznat kao opijumski mak. Mak je često korišten kao biljni lijek u kineskoj i indijskoj medicini zbog svojih analgetskih učinaka. Unatoč tome što je ekstrahirano iz sjemena maka, farmakološka aktivnost PPV-a ne posjeduje narkotička svojstva i analgetski učinak.²¹ Desetljećima se koristi kao relaksator mišića te vazodilatator za liječenje cerebralnih vazospazama, subendokardijalne ishemije i erektilne disfunkcije. Vazodilatacijski učinak PPV-a pripisuje se inhibiciji cikličkih nukleotidnih fosfodiesteraza, s rezultirajućim porastom unutarstaničnih razina cAMP-a i cGMP-a popraćenih s padom Ca^{2+} . Vazodilatacijsko djelovanje jedan je od korisnih efekata korištenja papaverina za i COVID-19 pacijente sa srčanim poremećajima.²³ Također, istraživanja su pokazala da može inhibirati rast stanica i potencijalno inducirati staničnu smrt u staničnim linijama raka, ali specifični učinci na biokemijske putove zasad nisu objašnjeni.²¹ Antivirusni učinak širokog spektra još je jedno svojstvo ovog spoja koje se u posljednje vrijeme sve više ističe.

Najčešće korištene tehnike za detekciju papaverina su tekućinska ili plinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom (LC-MS, GC-MS). Također, već neko vrijeme se za detekciju opijatskih analita od forenzičke važnosti koristi i SERS spektroskopija koja ima sposobnost kombiniranja prednosti Ramanove spektroskopije s visokom osjetljivošću i gašenjem fluorescencije što ju čini moćnim alatom u forenzici. Sok biljke maka, koji se koristi za dobivanje opijuma, sadrži više alkaloida uključujući morfin, kodein, iz kojih se dobiva i heroin koji izaziva veliku ovisnost. Ovisnost o opijatima je ozbiljan medicinski i društveni problem sa značajnim ekonomskim posljedicama. Unatoč velikim naporima, oni koji trguju opijatima konstantno pronalaze nove načine za njihovo prenošenje preko granice. S obzirom na to da se papaverin pročišćava iz soka maka, njegova prisutnost u uzorku može poslužiti za identifikaciju osoba odgovornih za rane faze ove složene trgovine; onih koji uzgajaju, beru i dobivaju lateks iz maka te je predloženo korištenje SERS spektroskopije za detekciju papaverina što bi bilo korisno i u svrhu smanjenja trgovine opijatima.²⁴

2.4. Ribonukleotidi

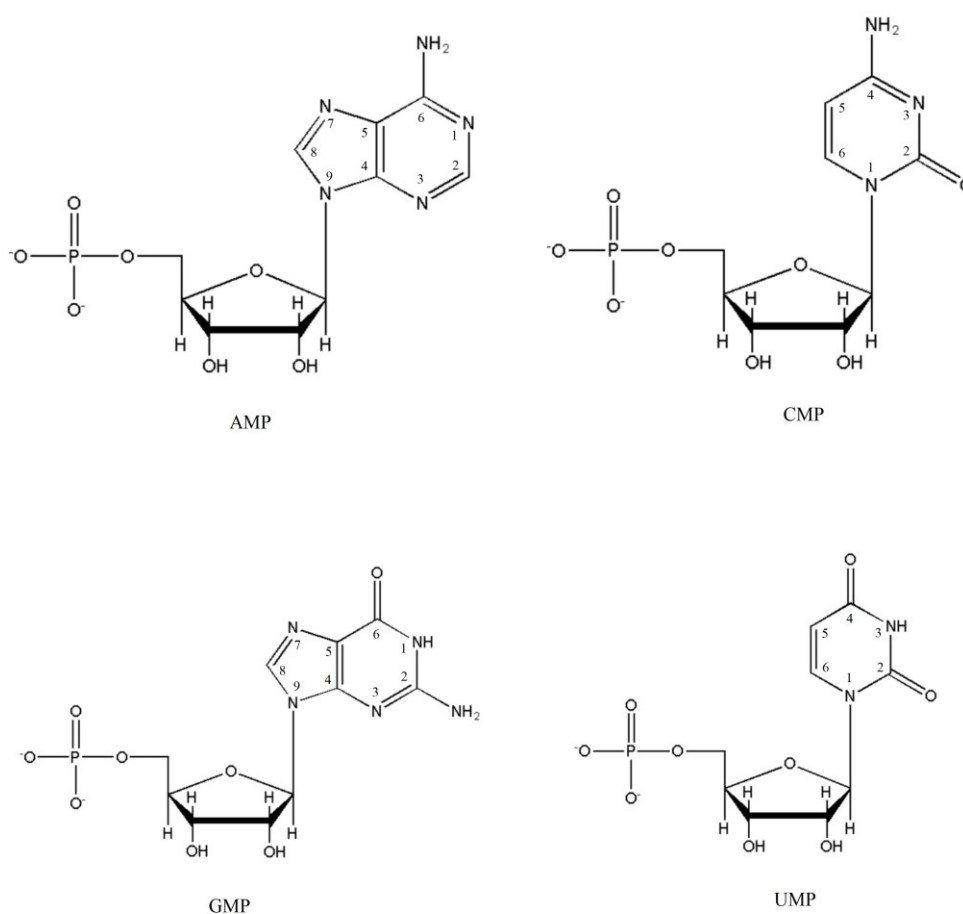
Nukleinske kiseline, deoksiribonukleinska i ribonukleinska, su dugi polimeri koji imaju funkciju molekularnih spremišta genetskih informacija. Sposobnost pohranjivanja i prijenosa genetskih informacija s generacije na generaciju temeljni je uvjet za život.^{25,26}

Za otkriće nukleinskih kiselina 1860-tih godina zaslužan je švicarski kemičar Johann Friedrich Miescher koji ju je izolirao iz bijelih krvnih stanica. Ovu supstancu nazvao je nuklein, neznajući da je otkrio molekularnu osnovu života. Nadalje, 1881. godine njemački biokemičar Albrecht Kossel nuklein je nazvao nukleinskom kiselinom i dao joj kemijsko ime, deoksiribonukleinska kiselina. Također je izolirao 5 nukleotida koji su građevni blokovi DNA i RNA. U 20. stoljeću Phoebus Levene otkrio je poredak triju komponenti nukleotida (fosfat-šećer-baza), a također je otkrio da RNA sadrži ribozu, a DNA deoksiribozu. 1944. godine Erwin Chargaff dokazao je da su molarni omjeri purinskih i pirimidinskih baza gotovo uvijek jednaki, no međusobni omjeri pojedinačnih baza nisu pa nukleotidna kompozicija varira ovisno o vrsti.^{27,28}

Ove biomakromolekule su izgrađene od velikog broja međusobno povezanih sličnih jedinica. Svaka monomerna jedinica unutar polimera je nukleotid, a svaki nukleotid sastoji se

od 3 komponente: šećera pentoze, fosfatne skupine i dušične baze. Šećer u RNA je D-riboza koja, za razliku od 2'-deoksi-D-riboze u DNA, na C-2' atomu sadrži OH skupinu. U nukleotidima, obje vrste pentoza su u obliku β -furanoze (zatvoreni peteročlani prsten). Također, prsten nije planaran već se pojavljuje u konformaciji „stolice“ i „omotnice“.

Dvije baze u RNA derivati su purina – adenin (A) i gvanin (G), a dvije pirimidina – citozin (C) i uracil (U). Osim šećerne jedinice, druga važna razlika između DNA i RNA je ta što se u RNA umjesto timina (T) nalazi uracil (U) koji je nemetilirani oblik timina. Purinske i pirimidinske baze su aromatske i planarne molekule. Jedinica koja se sastoji od baze vezane na šećer naziva se nukleozid. U svakom od nukleozida je N-9 purina ili N-1 pirimidina vezan na C-1' šećera N-glikozidnom vezom. Ako je struktura napisana na standardni način, baza leži iznad ravnine šećera, odnosno konfiguracija N-glikozidne veze je β . Nukleozid povezan esterskom vezom preko C-5' atoma s jednom ili više fosfatnih skupina je nukleotid. U prirodnim nukleotidima uobičajeno mjesto vezanja fosfata je OH skupina na C-5' položaju šećera pri čemu nastaje nukleozid-5'-fosfat. Četiri ribonukleotida su adenzin-5'-monofosfat (AMP), citozin-5'-monofosfat (CMP), gvanozin-5'-monofosfat (GMP) i uridin-5'-monofosfat (UMP), prikazani na slici 8.^{25,26}



Slika 8. Struktura ribonukleotida: adenzin-5'-monofosfat (AMP), citidin-5'-monofosfat (CMP), gvanozin-5'-monofosfat (GMP) i uridin-5'-monofosfat (UMP).

Zahvaljujući pružanju strukturnih podataka pri submikromolarnim koncentracijama, primjena SERS spektroskopije u svrhu proučavanja biomolekula konstantno raste. Nukleinske kiseline proučavane su SERS tehnikom iz različitih razloga, uključujući otkrivanje načina vezanja s biološki aktivnim malim organskim molekulama. Brojna istraživanja usmjerena su i na strukturnu analizu građevnih komponenti nukleinskih kiselina. SERS spektri purinskih i pirimidinskih baza lako su opaženi zbog njihove sposobnosti koordinacije Ag ili Au, što rezultira učinkovitom adsorpcijom na metalnu površinu uobičajenih SERS supstrata. Također, pokazano je da šećer u strukturi nukleozida ne utječe na afinitet molekula prema metalnoj površini, pri čemu baze imaju dominantan doprinos u vezanju s metalom pa šećerna skupina ima mali utjecaj na Ramanov spektar u kojem dominiraju vrpce vibracija baza. S druge strane,

zbog odbojnih sila koje se javljaju između negativno nabijenog fosfata u strukturi nukleotida i anionskog sloja na površini većine metalnih nanočestica, SERS spektri mononukleotida zahtjevniji su za snimanje.² U tu se svrhu stoga ne primjenjuju općenito najčešće korišteni SERS supstrati pripremljeni Lee-Meisel metodom, odnosno koloidi srebra reducirani s trinatrijevim citratom i agregirani s halogenidnom soli (npr. NaCl, KCl). To je u skladu sa zapažanjem da su agregirani koloidi ovog tipa neprikladni za detekciju anionskih analita budući da halogenidni ioni tvore čvrsto vezan površinski sloj koji odbija anione. No, otkriveno je da koloidi srebra pripremljeni redukcijom s trinatrijevim citratom mogu pojačati Ramanovo raspršenje anionskih analita kada su agregirani s MgSO_4 . Sulfatni ioni se ne vežu na površinu Ag pa anionski analiti mogu zauzeti vezna mjesta na površini izmjenom sa slabo vezanim citratnim ionima zaostalim tijekom redukcije. Također, utvrđeno je da višestruko nabijeni kationi, u ovom slučaju Mg^{2+} , potiču jaču agregaciju u odnosu na jednostruko nabijene katione.²⁹

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Srebrov(I) nitrat, p.a., Gram - Mol

Trinatrijev citrat dihidrat, p.a., Kemika

Magnezijev sulfat heptahidrat, p.a., Kemika

Berberin klorid, ≥ 98 %, Sigma - Aldrich

Papaverin hidroklorid, ≥ 98 %, Sigma - Aldrich

Adenozin-5'-monofosfat dinatrijeva sol, $\geq 99,9$ %, Sigma - Aldrich

Citidin-5'-monofosfat dinatrijeva sol, $\geq 99,9$ %, Sigma - Aldrich

Gvanozin-5'-monofosfat dinatrijeva sol hidrat, $\geq 99,9$ %, Sigma - Aldrich

Uridin-5'-monofosfat dinatrijeva sol, $\geq 99,9$ %, Sigma - Aldrich

Klorovodična kiselina (36,5 %), p.a., Gram - Mol

3.2. Mjerni uređaji

Ramanovi i SERS spektri snimljeni su korištenjem *inVia* Ramanovog spektrometra tvrtke *Renishaw* spregnutog s konfokalnim optičkim mikroskopom *Leica*. Kao izvor zračenja korišten je laser koji emitira zračenje pri 785 nm, maksimalne snage 300 mW. Tijekom snimanja spektara snaga lasera podešavana je ovisno o uzorku i naznačena je u opisu slike. Čvrsti praškasti uzorci snimljeni su na aluminijskom nosaču za Ramanovu spektroskopiju čvrstih uzoraka, dok su tekući uzorci snimljeni u aluminijskim posudicama za termogravimetrijsku analizu volumena 40 μ L. Za snimanje je korišten objektiv povećanja $\times 5$. Spektri su snimani u području 100–3200 cm^{-1} uz vrijeme izlaganja zračenju lasera od 10 s. Program Wire 5.3 korišten je za analizu i obradu spektara.

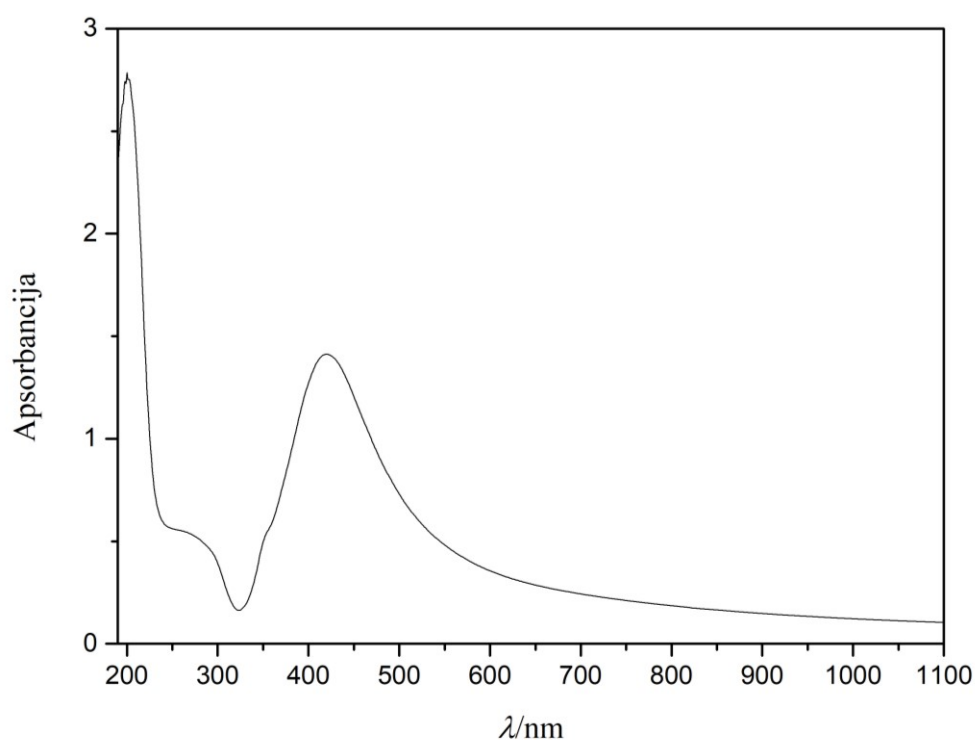
Apsorpcijski spektri neagregirane i agregirane koloidne suspenzije nanočestica srebra snimljeni su pomoću UV/Vis/NIR spektrofotometra *SPECORD 200* tvrtke *Analytik Jena*. Korištena je kvarcna kiveta s duljinom puta zračenja 0,2 cm. Spektri su snimani u području 190–1100 nm s razlučivanjem od 1 nm.

pH-vrijednost neagregiranog i agregiranog koloida izmjerena je pomoću Mettler Toledo MP 220 pH metra s kombiniranom staklenom-kalomel elektrodom. Prije mjerenja uređaj je baždaren s otopinama pufera pH 7,00 i 4,00.

3.3. Priprava koloidne suspenzije srebra

Koloidna suspenzija nanočestica srebra (AgNP_cit) pripravljena je prema modificiranom Lee-Meisel postupku.¹⁵ Srebrov(I) nitrat (0,018 g) otopio se u Milli-Q deioniziranoj vodi (100 mL) te se otopina zagrijavala na uljnoj kupelji do vrenja. Potom se u vruću otopinu dodala 1%-tna otopina trinatrijevog citrata (2 mL) i reakcijska smjesa je zagrijavana uz miješanje pomoću magnetske mješalice sljedećih 90 minuta, pri čemu se boja smjese promijenila iz prozirne u žuto-zelenu, a naposljetku u sivu.

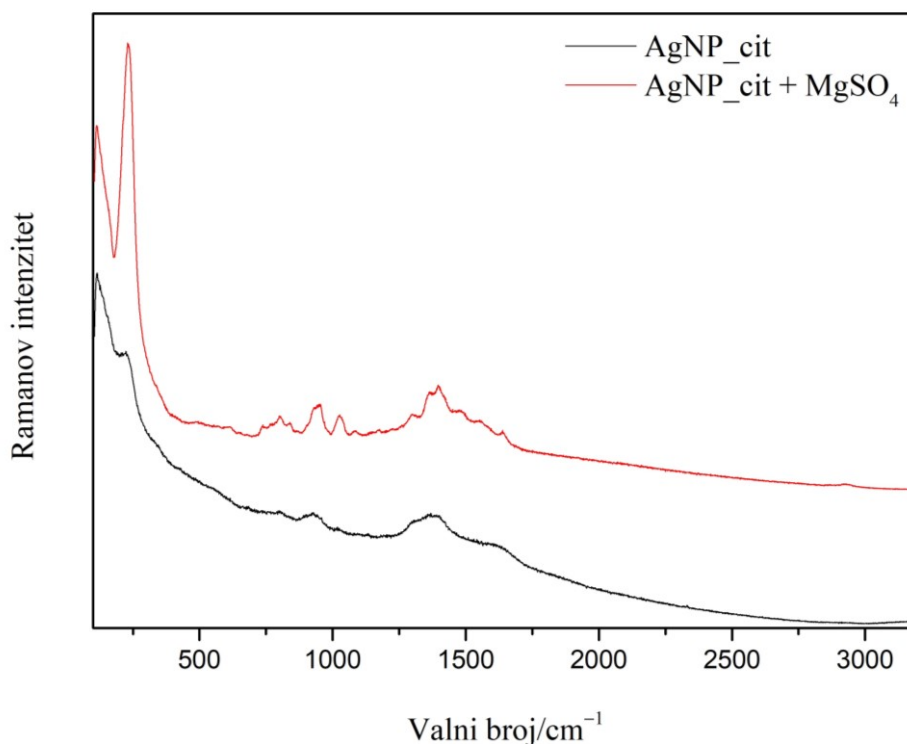
U svrhu karakterizacije pripravljenog koloida, snimljen je UV/Vis apsorpcijski spektar koloidne suspenzije te mu je izmjerena pH-vrijednost. pH-vrijednost pripravljene koloidne suspenzije Ag iznosila je 8,00, a valna duljina rezonancije plazmona Ag bila je 436 nm (slika 9). Koloid agregiran s magnezijevim sulfatom ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pripremljen je zadržavajući iste volumne omjere sastojaka kao i u mjernim uzorcima za snimanje SERS spektara analita (1 mL deionizirane vode, 3 mL koloida i 1 mL magnezijevog sulfata), pri čemu je umjesto vodenih otopina analita dodana deionizirana voda. pH-vrijednost agregiranog koloida Ag iznosila je 7,00, a UV/Vis spektar nije bilo moguće snimiti jer su se agregirane nanočestice taložile na dno kivete.



Slika 9. UV/Vis apsorpcijski spektar koloidne suspenzije nanočestica Ag.

Snimljeni su Ramanovi spektri koloida srebra i koloida srebra agregiranog s magnezijevim sulfatom (slika 10). Uzorak koloida volumena 100 μL bez agregirajućeg sredstva pripremljen je miješanjem 40 μL Milli-Q deionizirane vode i 60 μL koloida, a s agregirajućim sredstvom miješanjem 20 μL Milli-Q deionizirane vode, 60 μL koloida i 20 μL vodene otopine MgSO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Koloid je tijekom pripreve uzoraka miješan pomoću magnetske mješalice, a Ramanovi spektri snimljeni su neposredno nakon pripreve.

U Ramanovom spektru koloidne suspenzije srebra uočava se slaba vrpca deformacije vode pri približno 1630 cm^{-1} te brojne vrpce slabijeg intenziteta koje najvjerojatnije potječu od citratnih iona i njegovih oksidacijskih ili razgradnih produkata na površini koloidnih nanočestica pri 802 , 933 i 1390 cm^{-1} u slučaju neagregiranog koloida, odnosno pri 1395 , 1355 , 1285 , 1020 , 949 , 840 , 799 i 738 cm^{-1} uz dodatak agregirajućeg reagensa.³⁰ Intenzivna vrpca pri 230 cm^{-1} pripisana je istežanju Ag–O veze nastale između nanočestica srebra i kisikovih atoma u strukturi kemijskih vrsta na površini nanočestica srebra. Agregacijom nanočestica srebra uočeno je pojačano Ramanovo raspršenje vrsta na površini nanočestica zaostalih nakon sinteze koloida.



Slika 10. Ramanovi spektri koloidne suspenzije nanočestica Ag: a) bez agregirajućeg agensa pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 300 mW, b) u prisutnosti agregirajućeg agensa MgSO₄ (0,1 mol L⁻¹) pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 15 mW. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

3.4. Priprava otopina i mjernih uzoraka

3.4.1. Priprava otopina

Pripravljene su ishodne otopine alkaloida berberina i papaverina koncentracije 1×10^{-3} mol L⁻¹ otapanjem čvrste tvari u Milli-Q deioniziranoj vodi. Razrjeđivanjem ishodnih otopina alkaloida pripravljene su otopine koncentracija 5×10^{-4} mol L⁻¹, 5×10^{-5} mol L⁻¹, 5×10^{-6} mol L⁻¹, 5×10^{-7} mol L⁻¹ i 5×10^{-8} mol L⁻¹ koje su korištene za pripremu mjernih uzoraka u svrhu snimanja koncentracijski ovisnih SERS spektara.

Ishodne otopine ribonukleotida (AMP, GMP, CMP i UMP) koncentracije 1×10^{-3} mol L⁻¹ pripravljene su otapanjem čvrste tvari u Milli-Q deioniziranoj vodi. Razrjeđivanjem ishodne otopine pripravljene su otopine koncentracija 5×10^{-4} mol L⁻¹, 5×10^{-5} mol L⁻¹, 5×10^{-6} mol

L^{-1} i $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ koje su korištene za pripremu mjernih uzoraka za snimanje koncentracijski ovisnih SERS spektara.

Otopina magnezijevog sulfata koncentracije $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase čvrste tvari u Milli-Q deioniziranoj vodi.

3.4.2. Priprava mjernih uzoraka alkaloida

Za pripremu mjernih uzoraka alkaloida berberina i papaverina korištena je pripravljena koloidna suspenzija nanočestica srebra. Pripravljene su mjerni uzorci volumena $100 \mu\text{L}$ miješanjem vodene otopine odgovarajućeg alkaloida, čija je koncentracija ovisila o konačnoj koncentraciji alkaloida u mjernom uzorku, koloidne suspenzije i Milli-Q deionizirane vode za snimanje koncentracijski ovisnih SERS spektara bez dodatka agregacijskog sredstva, odnosno miješanjem vodene otopine alkaloida, koloidne suspenzije i vodene otopine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ magnezijevog sulfata u slučaju snimanja koncentracijski ovisnih SERS spektara uz dodatak agregirajućeg sredstva. Omjer volumena alkaloid / koloid / voda, odnosno alkaloid / koloid / agregirajuće sredstvo iznosio je 1/3/1. Nakon dodatka svih komponenti u semimikro epruvetu smjesa je promiješana pipetom, a potom je alikvot od $40 \mu\text{L}$ otpipetiran u aluminijsku posudicu. Konačne koncentracije alkaloida u mjernim uzorcima iznosile su $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ i $5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. Priprava mjernih uzoraka alkaloida s odgovarajućim volumenima pojedinih komponenti prikazana je u tablici 1. Koloid je tijekom pripreme mjernih uzoraka miješan pomoću magnetske mješalice, a SERS spektri mjernih uzoraka snimani su neposredno nakon pripreme.

Tablica 1. Priprava mjernih uzoraka alkaloida berberina i papaverina za snimanje koncentracijski ovisnih SERS spektara bez agregirajućeg agensa i u prisutnosti agregirajućeg agensa MgSO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

$V(\text{alkaloid}) / \mu\text{L}$ ($c / \text{mol L}^{-1}$)	$V(\text{H}_2\text{O}) / \mu\text{L}$	$V(\text{koloid}) / \mu\text{L}$	$V(\text{H}_2\text{O}) / \mu\text{L}$ ili $V(\text{MgSO}_4) / \mu\text{L}$	$c(\text{alkaloid})_{\text{kon}} /$ mol L^{-1}
20 (5×10^{-4})	0	60	20	1×10^{-4}
10 (5×10^{-4})	10	60	20	5×10^{-5}
20 (5×10^{-5})	0	60	20	1×10^{-5}
10 (5×10^{-5})	10	60	20	5×10^{-6}
20 (5×10^{-6})	0	60	20	1×10^{-6}
10 (5×10^{-6})	10	60	20	5×10^{-7}
20 (5×10^{-7})	0	60	20	1×10^{-7}
10 (5×10^{-7})	10	60	20	5×10^{-8}
20 (5×10^{-8})	0	60	20	1×10^{-8}
10 (5×10^{-8})	10	60	20	5×10^{-9}

Pripravljeni su mjerni uzorci papaverina koncentracije $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ u kiselom koloidu tako što je razrijeđivanjem koncentrirane 36% klorovodične kiseline pripravljena 10% HCl nakon čega je koloid zakiseljen dodatkom 2 kapi 10% HCl. Mjerni uzorak je zatim pripremljen na prethodno opisan način miješanjem vodene otopine papaverina, koloidne suspenzije zakiseljene s klorovodičnom kiselinom i vodene otopine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ magnezijevog sulfata.

3.4.3. Priprava mjernih uzoraka ribonukleotida

Za pripravu mjernih uzoraka ribonukleotida (AMP, GMP, CMP i UMP) korištena je pripravljena koloidna suspenzija nanočestica Ag. Pripravljeni su mjerni uzorci volumena 100 μL miješanjem vodene otopine odgovarajućeg ribonukleotida, čija je koncentracija ovisila o konačnoj koncentraciji ribonukleotida u mjernom uzorku, koloidne suspenzije i vodene otopine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ magnezijevog sulfata za snimanje koncentracijski ovisnih SERS spektara. Omjer volumena ribonukleotid/koloid/ agregirajuće sredstvo iznosio je 1/3/1. Nakon dodatka svih komponenti u semimikro epruvetu smjesa je promiješana pipetom, a potom je alikvot od 40 μL otpipetiran u aluminijsku posudicu. Konačne koncentracije ribonukleotida u mjernim uzorcima iznosile su $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ i $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Priprava mjernih uzoraka ribonukleotida s odgovarajućim volumenima pojedinih komponenti prikazana je u tablici 2. Koloid je tijekom pripreve mjernih uzoraka miješan pomoću magnetske mješalice, a SERS spektri mjernih uzoraka snimani su neposredno nakon pripreve.

Tablica 2. Priprava mjernih uzoraka ribonukleotida (AMP, GMP, CMP i UMP) za snimanje koncentracijski ovisnih SERS spektara u prisutnosti agregirajućeg agensa MgSO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

$V(\text{ribonukleotid}) / \mu\text{L}$ ($c / \text{mol L}^{-1}$)	$V(\text{koloid}) / \mu\text{L}$	$V(\text{MgSO}_4) / \mu\text{L}$	$c(\text{ribonukleotid})_{\text{kon}} / \text{mol L}^{-1}$
20 (5×10^{-4})	60	20	1×10^{-4}
20 (5×10^{-5})	60	20	1×10^{-5}
20 (5×10^{-6})	60	20	1×10^{-6}
20 (5×10^{-7})	60	20	1×10^{-7}

3.4.4. Priprava mjernih uzoraka kompleksa alkaloid/ribonukleotid

Mjerni uzorci kompleksa alkaloid/ribonukleotid u koncentracijskom omjeru 1/1 volumena $100 \mu\text{L}$ pripremljeni su miješanjem $10 \mu\text{L}$ vodene otopine alkaloida koncentracije $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ i $10 \mu\text{L}$ vodene otopine ribonukleotida koncentracije $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (koje su pripravljene razrjeđenjem otopine koncentracije $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), $60 \mu\text{L}$ koloidne suspenzije i $20 \mu\text{L}$ otopine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ magnezijevog sulfata. Nakon dodatka svih komponenti u semimikro epruvetu smjesa je promiješana pipetom, a potom je alikvot od $40 \mu\text{L}$ otpipetiran u aluminijsku posudicu. Konačna koncentracija alkaloida i ribonukleotida u mjernim uzorcima iznosila je $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Koloid je tijekom pripreve mjernih uzoraka miješan pomoću magnetske mješalice, a SERS spektri mjernih uzoraka snimani su neposredno nakon pripreve.

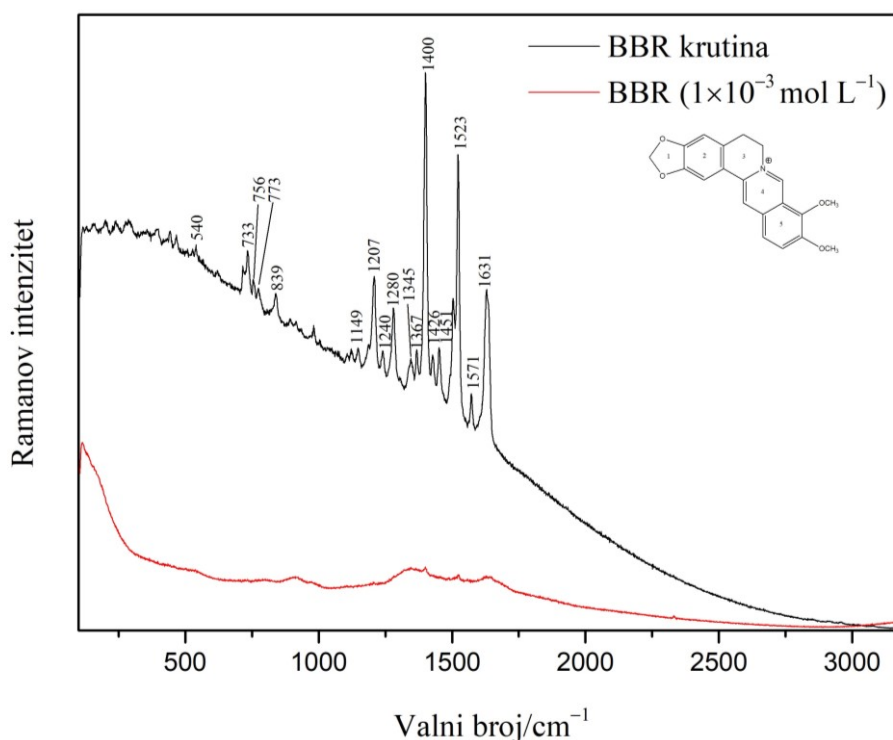
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ramanovi i SERS spektri alkaloida

Snimljeni su Ramanovi spektri čvrstog uzorka i vodene otopine (1×10^{-3} mol L⁻¹) te SERS spektri berberina i papaverina u koncentracijskom području 1×10^{-7} – 1×10^{-4} mol L⁻¹ u koloidnoj suspenziji srebra bez agregirajućeg reagensa te u koncentracijskom području 5×10^{-9} – 1×10^{-4} mol L⁻¹ za berberin i 5×10^{-8} – 1×10^{-4} mol L⁻¹ za papaverin u prisutnosti agregirajućeg reagensa MgSO₄ (0,1 mol L⁻¹) pri valnoj duljini pobude 785 nm. Opažene vibracijske vrpce u spektrima asignirane su na temelju literaturnih podataka.

4.1.1. Berberin

Iako Ramanovom spektru čvrstog uzorka berberina doprinosi fluorescencija, na što ukazuje uzdignuta bazna linija, uočene su vibracijske vrpce koje potječu od spoja (slika 11). Intenzivna vrpca pri 1400 cm⁻¹ i slaba vrpca pri 1345 cm⁻¹ pripisane su istezanju jednostrukih veza C–C prstenova. Vrlo jaka vrpca pri 1571 cm⁻¹, srednje jaka vrpca pri 1631 cm⁻¹ i slaba vrpca pri 1523 cm⁻¹ potječu od istezanja aromatskih veza C=C uz doprinos deformacije prstena u ravnini.^{30,31} Vrpce srednjeg intenziteta pri 1207 i 1280 cm⁻¹ odgovaraju istezanju veza C–N, pri čemu prvoj vrpici doprinosi klaćenje CH₂ skupine prstena 3, a drugoj vrpici deformacija metoksi skupina.³⁰ Među slabim vrpcama u području nižih valnih brojeva ističe se vrpca pri 733 cm⁻¹, koja je pripisana vibraciji “disanja” prstenova 2 i 3.³⁰ Opažene vibracijske vrpce asignirane su u tablici 3.



Slika 11. Ramanovi spektri čvrstog uzorka berberina pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 1,5 mW i vodene otopine berberina ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 300 mW. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

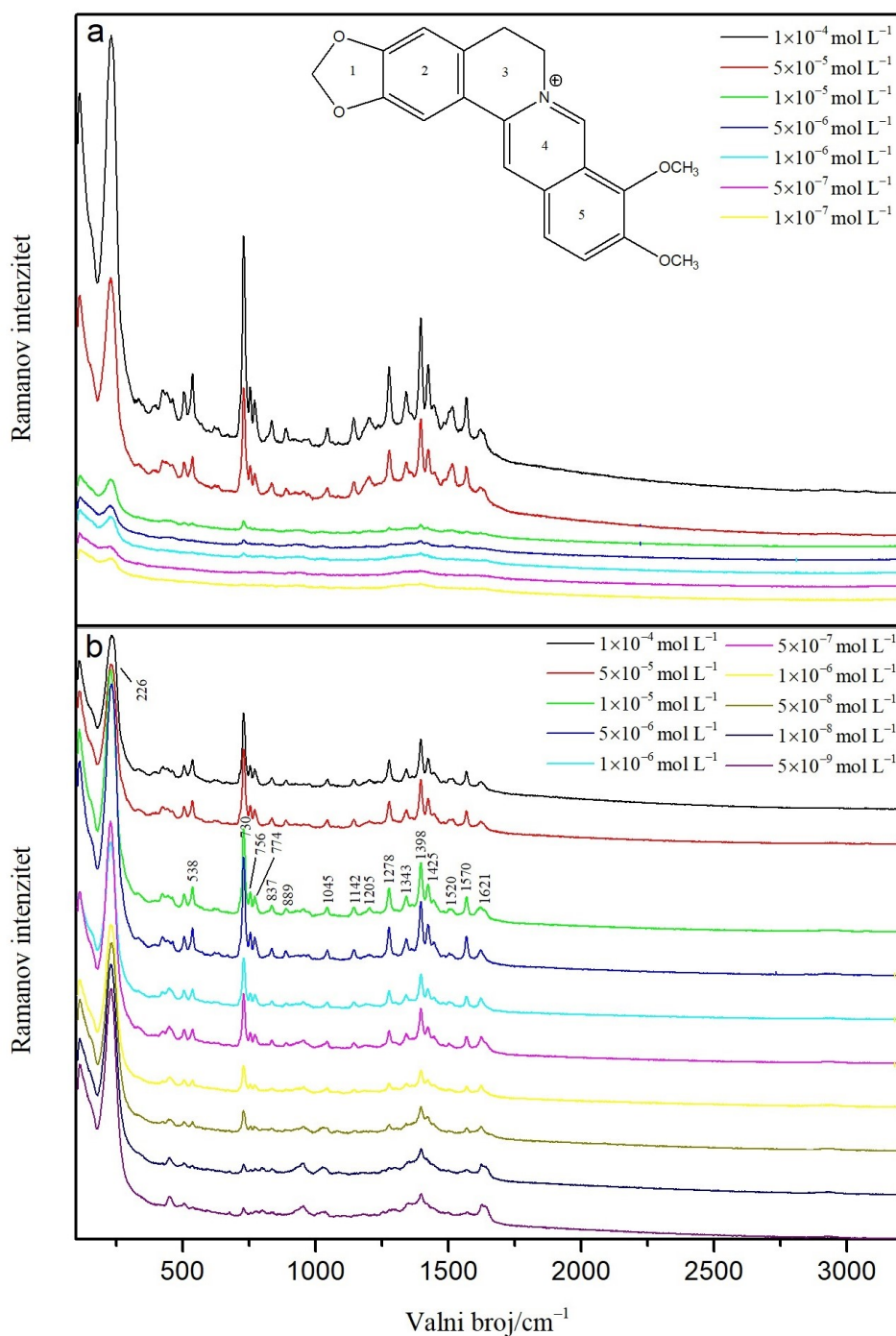
U Ramanovom spektru vodene otopine BBR ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) uočene su vrlo slabe vrpce spoja pri 1399 i 1521 cm^{-1} (slika 11), pri čemu Ramanov spektar većinom odgovara spektru vode. Koncentracija vodene otopine BBR $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preniska je za opažanje Ramanovog raspršenja organske molekule, što je posljedica slabe osjetljivosti Ramanove spektroskopije. Stoga su u svrhu detekcije berberina Ramanovom spektroskopijom, snimljeni SERS spektri spoja u koloidnoj suspenziji srebra. Dodatno, koloid je agregiran pomoću agregirajućeg sredstva MgSO_4 s ciljem nastanka SERS aktivnih mjesta i pojačanja Ramanovog raspršenja.

SERS spektar berberina koncentracije $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ razlikuje se od Ramanovog spektra čvrstog uzorka i vodene otopine (slika 12). Nove vrpce uočene su pri 889 i 1045 cm^{-1} te pripisane isteznoj vibraciji prstena 1 i svijanju CH skupina prstena 5, odnosno deformaciji izvan ravnine CH skupina prstenova 4 i 5.³¹ Vrpca prisutna u Ramanovom spektru pri 1240 cm^{-1} nije opažena u SERS spektru. Nadalje, za razliku od Ramanovog spektra, u SERS spektru dominira vrpca deformacijske vibracije prstenova 2 i 3 pri 731 cm^{-1} , dok su vrpce istezanja aromatskih veza i deformacija prstenova u ravnini pri 1523, 1570 i 1625 cm^{-1} slabog

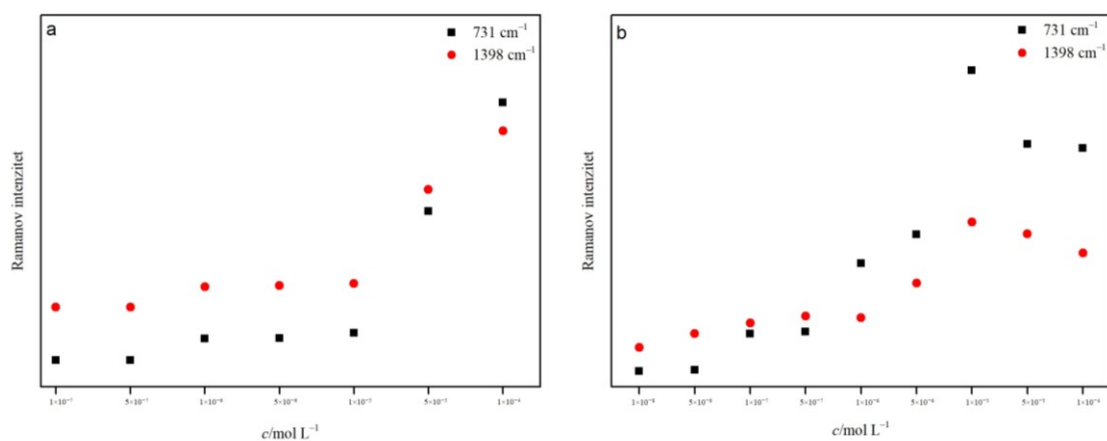
intenziteta. Jak intenzitet zadržala je vrpca pri 1398 cm^{-1} koja odgovara istežanju veza C–C. Intenzivna vrpca pri 226 cm^{-1} u SERS spektru pripisana je istežanju veze Ag–N nastale između nanočestica srebra i dušikovog atoma u molekuli berberina. Prisutnost, odnosno odsutnost pojedinih vrpca u SERS spektru berberina u odnosu na Ramanov spektar te razlike relativnog intenziteta vrpca u SERS i Ramanovom spektru posljedica su orijentacije molekula i izbornih pravila na površini koja vrijede u SERS spektroskopiji.³⁰ Opisane spektralne razlike ukazuju na smještanje berberina na površini nanočestica srebra rubnim dijelom molekule na kojem se nalazi pozitivno nabijen dušikov atom. Može se pretpostaviti da se adsorpcija molekula berberina na površinu nanočestica metala odvija uslijed elektrostatskog privlačenja između pozitivno nabijenog dušika u strukturi berberina te negativno nabijenih citratnih iona na površini nanočestica srebra. Također, vrpca istežanja veze Ag–N upućuje da pojačanju raspršenja zračenja doprinosi i kemijski mehanizam.

S ciljem praćenja utjecaja koncentracije molekula berberina na površinsko pojačanje Ramanovog raspršenja grafički je prikazana ovisnost intenziteta vrpca pri 731 i 1398 cm^{-1} o koncentraciji berberina (slika 13). Zbog preglednosti na osi x nije prikazana realna koncentracijska skala niti su na osi y navedene vrijednosti Ramanovog intenziteta. Za uzorke koji nisu sadržavali agregirajuće sredstvo, opažena je linearna ovisnost Ramanovog intenziteta o koncentraciji berberina, pri čemu smanjenjem koncentracije intenzitet raspršenog zračenja slabi. S druge strane, za uzorke agregirane s MgSO_4 , uočena je nelinearna promjena intenziteta raspršenog zračenja s koncentracijom, pri čemu najveće raspršenje ne karakterizira uzorak najveće mjerene koncentracije $1 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$, već uzorak koncentracije $5 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$, pa se može pretpostaviti da je pri toj koncentraciji površina nanočestica srebra optimalno prekrivena molekulama BBR. Uočena nelinearna promjena intenziteta s koncentracijom može se objasniti različitim smještanjem molekula berberina na površini nanočestica. Uvjet za pojačanje Ramanovog raspršenja je smještanje analita blizu nanostrukturirane površine metala, pri čemu se uslijed orijentacije molekula polariziranih okomito na površinu nanočestica Ramanovo raspršenje najviše pojačava. Pri niskoj koncentraciji molekule na površini nanočestica imaju više prostora na raspolaganju te se polažu paralelno površini metala, pri čemu promjena polarizabilnosti ne doprinosi raspršenju zračenja. S povećanjem koncentracije, molekule se prvotno smještaju pod kutem u odnosu na površinu i slabo raspršuju zračenje, a pri koncentraciji $5 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$ orijentiraju se gotovo okomito na površinu metala, kada promjena polarizabilnosti rezultira najvećim pojačanjem raspršenja.

Intenzitet raspršenog zračenja slabi s daljnjim porastom koncentracije uslijed „gustog“ slaganja molekula na nanočesticama, što uzrokuje narušavanje optimalne orijentacije na površini nanočestica te se molekule smještaju pod kutem u odnosu na površinu metala.² Granica detekcije berberina u koloidnoj suspenziji srebra bez dodatka agregirajućeg reagensa iznosi 1×10^{-6} mol L⁻¹, s obzirom da je to najniža mjerena koncentracija za koju su opažene vrpce koje potječu od analita. Kada je riječ o SERS spektrima uz dodatak agregirajućeg sredstva, pri najnižoj mjerenoj koncentraciji 5×10^{-9} mol L⁻¹ još uvijek se opažaju vrpce pripisane vibracijama berberina. Opaženo se može objasniti činjenicom da se dodatkom anorganske soli pospješuje agregacija nanočestica, nastaju brojna SERS aktivna mjesta odgovorna za pojačanje raspršenog zračenja i poboljšanje osjetljivosti mjerenja. No, u spektrima s agregirajućim sredstvom prisutne su i vrpce koje potječu od citratnih iona koje interferiraju vrpčama berberina i čiji intenzitet raste kako se koncentracija analita smanjuje, što otežava analizu spektara pri nižim koncentracijama.



Slika 12. SERS spektri berberina u koloidnoj suspenziji srebra: a) u koncentracijskom području 1×10^{-7} – $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ bez agregirajućeg reagensa pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 30 mW, b) u koncentracijskom području 5×10^{-9} – $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ u prisutnosti agregirajućeg reagensa MgSO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 15 mW. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.



Slika 13. Ovisnost SERS intenziteta vrpci pri 731 i 1398 cm^{-1} o koncentraciji berberina u koloidnoj suspenziji srebra: a) bez agregirajućeg reagensa, b) u prisutnosti agregirajućeg reagensa MgSO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Tablica 3. Asignacija osnovnih vibracijskih vrpca u Ramanovom spektru čvrstog uzorka i vodene otopine (1×10^{-3} mol L⁻¹) te SERS spektru berberina (1×10^{-5} mol L⁻¹) pri valnoj duljini pobude 785 nm.

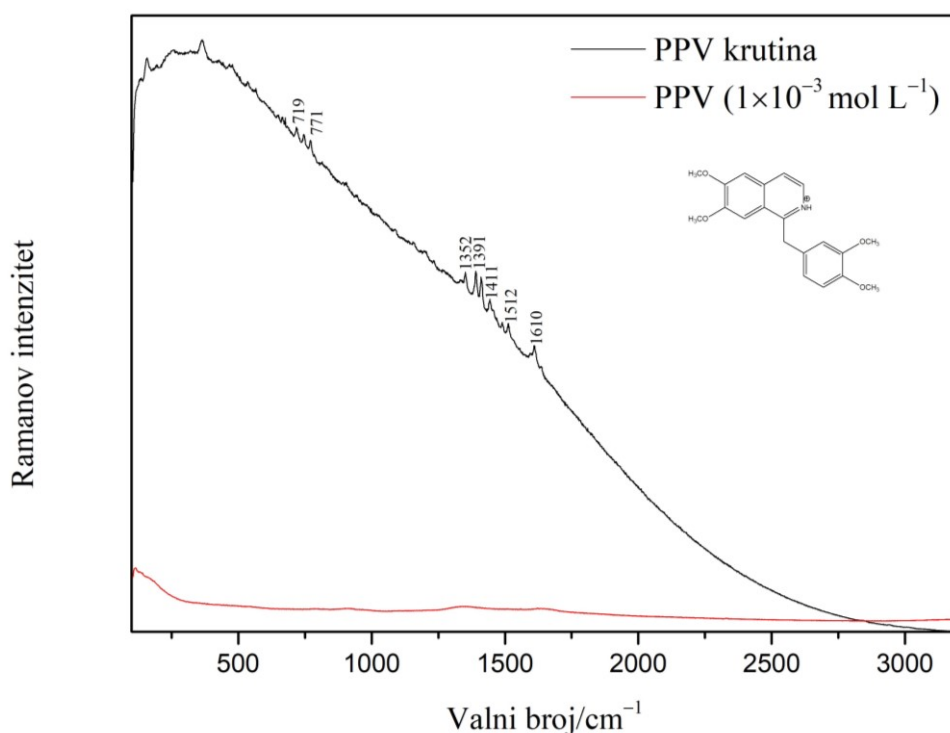
Valni broj/cm ⁻¹		Vibracija ^{30,31}
Čvrsti uzorak	1×10^{-5} mol L ⁻¹	
	226	v Ag-N
540	538	δ_{oop} CN, δ_{ip} prsteni
733	731	δ_{oop} prsten 2 i 3
756	756	„disanje“ prstena 1
773	774	δ_{ip} prsteni, ν_{as} O-CH ₂ -O
839	837	v C-O, δ_{ip} CH (prsten 2 i 3)
	889	v prsten 1, δ_{oop} CH (prsten 5)
	1045	δ_{oop} CH (prsten 4 i 5)
1149	1142	δ_{wg} CH (prsten 4 i 5)
1207	1205	v C-N, δ_{wg} CH ₂ (prsten 3)
1240		v C-N
1280	1278	v C-N, δ_{rc} O-CH ₃
1345	1343	v C-C (prsten 2 i 3), v C-N
1367		v C-C (prsten 3 i 4), v C-O (OCH ₃)
1400	1398	v C-C, v C-N
1426	1425	v C-N, v C-C (prsten 2, 3 i 5), v C-O (OCH ₃)
1451		δ_{ip} prsteni
1523	1520	δ_{ip} prsteni, v C=C (prsten 5), δ_{sc} CH ₂ (prsten 1)
1571	1570	δ_{ip} prsteni, v C=C (prsten 2)
1631	1621	v C=C (prsten 4), δ_{sc} CH ₃

Kratice: v, istežanje; δ , deformacija; as, antisimetrično; s, simetrično; ip, u ravnini; oop, izvan ravnine; sc, striženje; rc, zibanje; wg, klaćenje; tw, uvijanje.

4.1.2. Papaverin

Ramanovom spektru čvrstog uzorka papaverina značajno doprinosi fluorescencija, na što ukazuje uzdignuta bazna linija, no uočene su i vrpce slabog intenziteta koje potječu od spoja (slika 14). Vrpca pri 719 cm^{-1} pripisana je deformaciji izokinolinskog prstena izvan ravnine i zibanju CH_2 skupine, dok vrpca pri 771 cm^{-1} potječe od deformacije izokinolinskog prstena u ravnini i zibanja CH_3 skupine.³² Istezanje veza C–C i C–N uz doprinos deformacije CH skupina izokinolinskog prstena u ravnini pripisano je vrpci pri 1352 cm^{-1} . Vrpce pri 1411 i 1512 cm^{-1} potječu od isteznih vibracija izokinolinskog prstena uz doprinos deformacije u ravnini CH skupina i deformacije CH_3 skupine, dok vrpca pri 1391 cm^{-1} potječe od isteznih vibracija benzenskog prstena, klacjenja CH_2 skupina i zibanja CH_3 skupine. Vrpca pri 1610 cm^{-1} pripisana je isteznim vibracijama C=C veza.³² Opažene vibracijske vrpce asignirane su u tablici 4.

U Ramanovom spektru vodene otopine papaverina ($1 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$) nisu uočene vrpce koje odgovaraju vibracijama analita (slika 14). Ramanov spektar ishodne vodene otopine papaverina odgovara spektru vode. Kao i u slučaju vodene otopine berberina, koncentracija otopine $1 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ preniska je za opažanje Ramanovog spektra papaverina te je izostanak vrpce analita rezultat slabe osjetljivosti Ramanove spektroskopije. Shodno tome, snimljeni su SERS spektri papaverina u koloidnoj suspenziji srebra, u kojima je moguće uočiti vrpce koje potječu od analita uslijed pojačanja Ramanovog raspršenja.



Slika 14. Ramanovi spektri čvrstog uzorka papaverina pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 1,5 mW i vodene otopine papaverina ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 300 mW. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

U SERS spektru papaverina koncentracije $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, pojedine vrpce su izostale, u odnosu na Ramanov spektar čvrstog uzorka, no uočene su i nove koje nisu prisutne u Ramanovom spektru (slika 15). Nova vrpca slabog intenziteta pri 1190 cm^{-1} potječe od deformacije u ravnini CH skupina benzenskog prstena i svijanja CH_2 skupine, dok se vrpca pri 1090 cm^{-1} javila kao posljedica deformacije u ravnini CCN i CH skupina izokinolinskog prstena uz doprinos istezanja veze C–O metoksi skupine. Nadalje, deformacija u ravnini CH skupina izokinolinskog prstena i istezanje veze C–O metoksi skupine doprinose slaboj vrpci pri 1041 cm^{-1} , dok vrlo slaba vrpca pri 952 cm^{-1} odgovara deformaciji izvan ravnine CH skupina.^{32,33} Vrpca pri 732 cm^{-1} pripisana je deformaciji u ravnini izokinolinskog prstena.³³ Pri valnim brojevima nižim od 500 cm^{-1} prisutne su vrpce deformacije kostura molekule. Vrlo intenzivna vrpca pri 232 cm^{-1} pripisana je istezanju veze Ag–N nastale između nanočestica srebra i dušikovog atoma u molekuli papaverina.

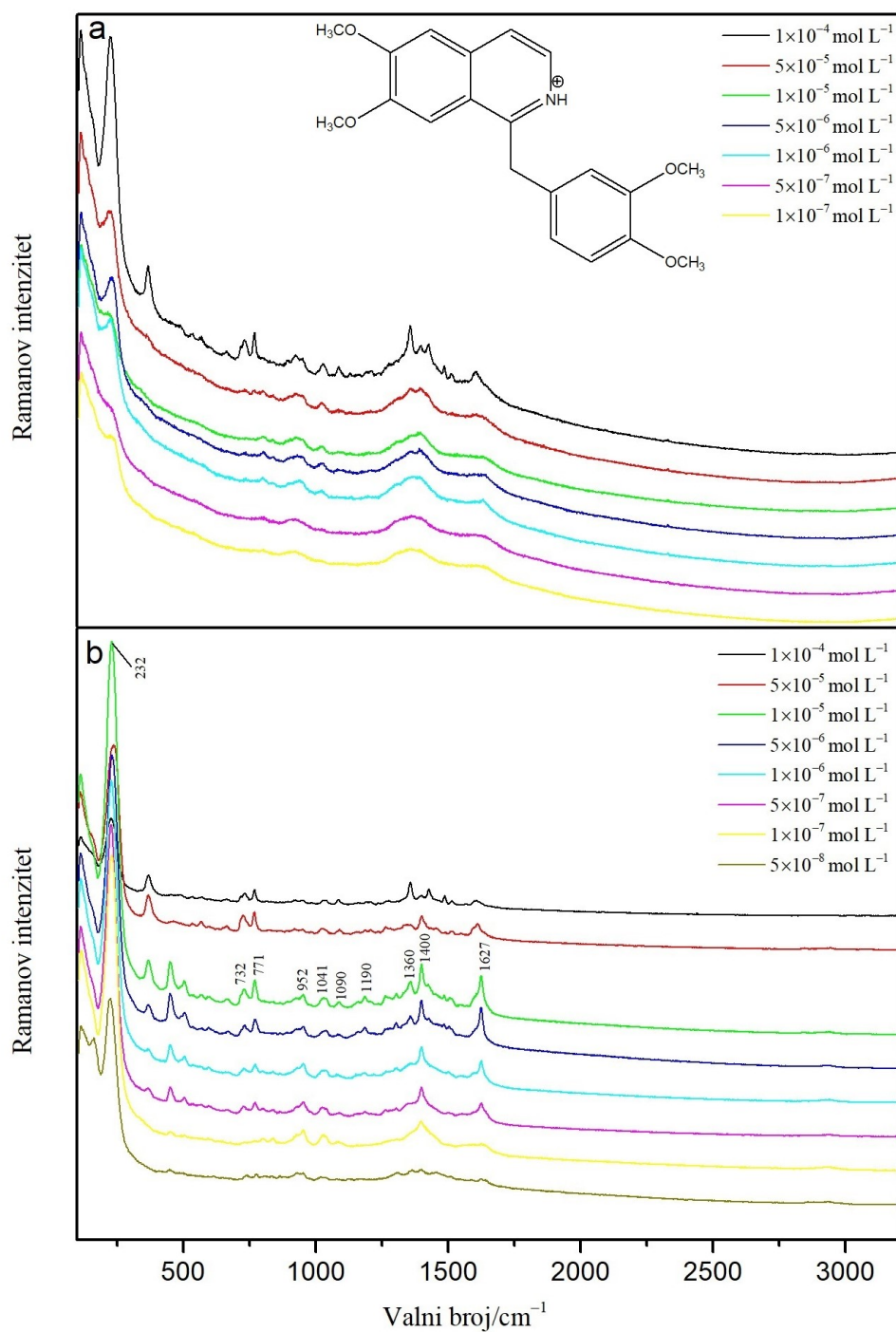
Utjecaj koncentracije molekula na površinsko pojačanje Ramanovog raspršenja grafički je prikazan kao ovisnost intenziteta vrpce pri 771 i 1360 cm^{-1} o koncentraciji papaverina (slika

16). Zbog preglednosti na osi x nije prikazana realna koncentracijska skala niti su na osi y navedene vrijednosti Ramanovog intenziteta. U SERS spektru papaverina u koloidu srebra bez agregirajućeg sredstva, vrpce papaverina jasno se opažaju za uzorak najviše mjerene koncentracije 1×10^{-4} mol L⁻¹, u kojem dominiraju vrpce pri 770 i 1358 cm⁻¹, dok SERS spektri uzoraka nižih koncentracija većinom odgovaraju spektru koloidne suspenzije srebra. S druge strane, u SERS spektrima uzoraka uz dodatak agregirajućeg sredstva uočena je nelinearna promjena intenziteta raspršenog zračenja s koncentracijom, pri čemu najveće raspršenje ne karakterizira uzorak najveće mjerene koncentracije 1×10^{-4} mol L⁻¹, već uzorak koncentracije 1×10^{-5} mol L⁻¹, što upućuje da je pri toj koncentraciji površina nanočestica srebra optimalno prekrivena okomito položenim molekulama PPV. Granica detekcije papaverina u koloidnoj suspenziji srebra bez agregirajućeg reagensa iznosi 5×10^{-5} mol L⁻¹, s obzirom da je to najniža mjerena koncentracija za koju je opažena prisutnost vrpce koje potječu od PPV, dok u agregiranoj koloidnoj suspenziji srebra granica detekcije iznosi 5×10^{-7} mol L⁻¹. Opaženo se može objasniti činjenicom da se dodatkom anorganske soli pospješuje agregacija nanočestica, nastaju brojna SERS aktivna mjesta što uzrokuje pojačanje raspršenog zračenja i povećava osjetljivost mjerenja. No, u SERS spektrima s agregirajućim sredstvom značajan je doprinos vrpce koje potječu od citratnih iona na površini nanočestica, koje interferiraju vrpce papaverina i čiji intenzitet raste kako se koncentracija analita smanjuje, što otežava analizu spektara pri nižim koncentracijama i određivanje granice detekcije.

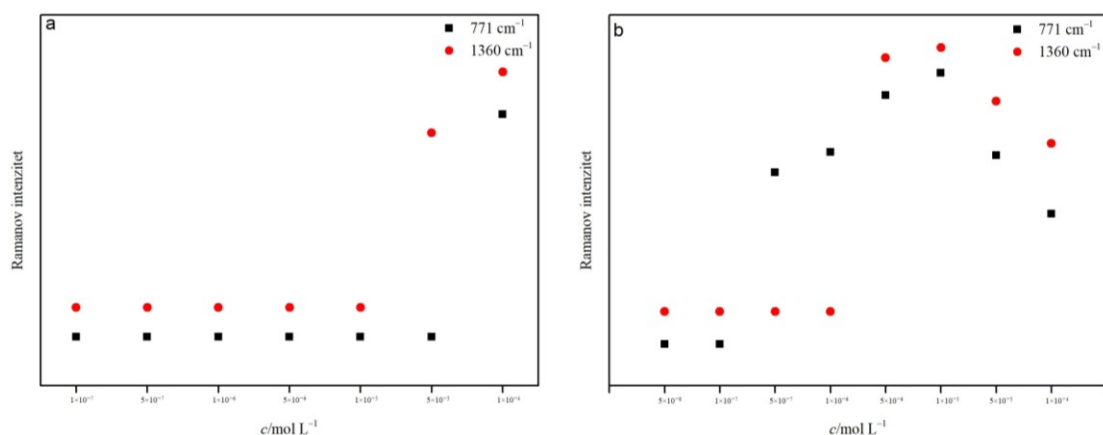
Na temelju intenzivnih vrpce izokinolinskog prstena u SERS spektru može se pretpostaviti da se papaverin adsorbira na površinu nanočestica srebra aromatskim dijelom molekule s dušikom orijentiranim prema površini. Također, intenzivna vrpca istezanja veze Ag–N nastale između atoma dušika i srebra upućuje na doprinos kemijskog mehanizma.

Nadalje, promjenom koncentracije PPV u agregiranom koloidu mijenja se relativni odnos intenziteta vrpce izokinolinskog sustava u SERS spektru. U odnosu na spektar najveće mjerene koncentracije 1×10^{-4} mol L⁻¹, sa smanjenjem koncentracije povećava se intenzitet vrpce pri 1400 i 1627 cm⁻¹, a smanjuje intenzitet vrpce 732 i 771 cm⁻¹. Koncentracijski ovisne spektralne razlike većinom se pripisuju promjeni orijentacije molekula na površini nanočestica. Međutim, SERS spektar PPV (pK_a = 6,4) pri nižim koncentracijama odgovara SERS spektrima PPV u kiselom mediju pH < 5 objavljenim u literaturi.²⁴ S obzirom na mogućnost protoniranja i deprotoniranja dušika izokinolinskog dijela molekule (pK_a = 6,4) snimljen je SERS spektar PPV u koloidnoj suspenziji srebra zakiseljenoj s klorovodičnom

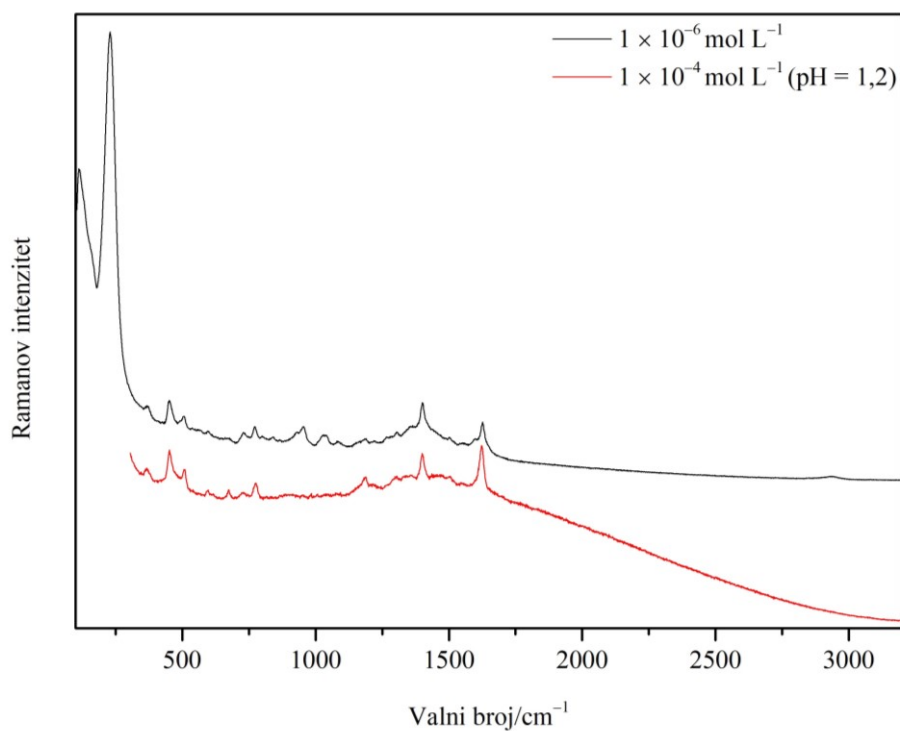
kiselinom. Snimljeni spektar PPV najveće mjerene koncentracije $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ u kiselom mediju ($\text{pH} = 1,2$) vrlo je sličan spektru PPV 100 puta niže koncentracije $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ u neutralnoj koloidnoj suspenziji srebra ($\text{pH} = 7,00$) (slika 17). Može se pretpostaviti da u neutralnom mediju pri koncentraciji $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ SERS spektru doprinose većinom deprotonirane molekule PPV, pri koncentracijama $5 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ deprotonirane i protonirane molekule PPV, dok se pri koncentracijama nižim od $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ opaža spektar protoniranih molekula, koje se zahvaljujući pozitivnom naboju u strukturi zadržavaju bliže negativno nabijenim nanočesticama srebra s koje se Ramanovo raspršenje pojačava.



Slika 15. SERS spektri papaverina u koloidnoj suspenziji srebra: a) u koncentracijskom području $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ bez agregirajućeg reagensa pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 300 mW, b) u koncentracijskom području $5 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ u prisutnosti agregirajućeg reagensa MgSO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 30 mW. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.



Slika 16. Ovisnost SERS intenziteta vrpci pri 771 cm^{-1} i 1360 cm^{-1} o koncentraciji papaverina u koloidnoj suspenziji srebra: a) bez agregirajućeg reagensa, b) u prisutnosti agregirajućeg reagensa MgSO_4 ($0,1\text{ mol L}^{-1}$).



Slika 17. SERS spektri papaverina ($1 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$) u koloidnoj suspenziji srebra pri $\text{pH} = 1,2$ i papaverina ($1 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$) pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 30 mW . Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

Tablica 4. Assignacija osnovnih vibracijskih vrpca u Ramanovom spektru čvrstog uzorka papaverina i SERS spektru papaverina (1×10^{-5} mol L⁻¹) pri valnoj duljini pobude 785 nm.

Valni broj/cm ⁻¹		Vibracija ^{32,33}
Čvrsti uzorak	1×10^{-5} mol L ⁻¹	
	232	v Ag–N
719		δ_{oop} prsteni, δ_{rc} CH ₂
	732	δ_{ip} prsten 1
771	771	δ_{ip} prsten 1, δ_{rc} CH ₃
	952	δ_{oop} CH
	1041	δ_{ip} (prsten 1), v C–O (OCH ₃)
	1090	δ CCN (prsten 1), δ_{ip} CH (prsten 1), v C–O (OCH ₃)
	1190	δ_{ip} CH (prsten 2), δ_{tw} CH ₂
1352	1360	v C–C, v C–N, δ_{ip} CH (prsten 1)
1391		v prsten 2, δ_{wg} CH ₂ , δ_{rc} CH ₃
1411	1400	v prsten 1, δ_{ip} CH
1512		v prsten 1, δ_{as} CH ₃
1610	1627	v C=C

Kratice: v, istežanje; δ , deformacija; as, antisimetrično; s, simetrično; ip, u ravnini; oop, izvan ravnine; sc, striženje; rc, zibanje; wg, klaćenje; tw, uvijanje; prsten 1, izokinolinski prsten; prsten 2, benzenski prsten.

4.2. Ramanovi i SERS spektri ribonukleotida

SERS spektroskopija se pokazala kao važna tehnika za karakterizaciju bioloških materijala, no unatoč velikom broju radova objavljenih u ovom području, jedna vrlo važna klasa biomolekula, mononukleotidi, vrlo je slabo zastupljena u literaturi.²⁹ Detekcija vrsta koje nose negativan naboj pomoću SERS spektroskopije općenito nije veoma uspješna zbog elektrostatskih odbojnih interakcija između analita i stabilizirajućeg anionskog sloja, koje sprječavaju učinkovitu adsorpciju molekula analita na metalnu površinu. Kako bi se prevladao ovaj nedostatak, u koloid se obično dodaje agregirajući reagens koji neutralizira površinski naboj i uzrokuje nastajanje agregata nanočestica s brojnim SERS aktivnim mjestima na

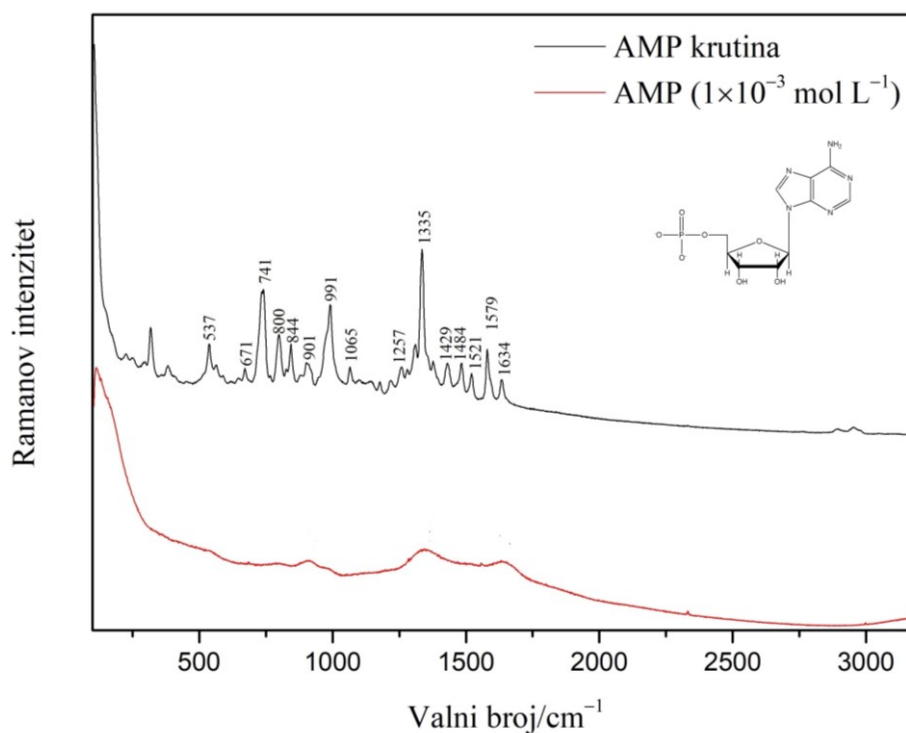
kojima su električna polja vrlo jaka. Ribonukleotidi su odabrani s ciljem proučavanja površinski pojačanog Ramanovog raspršenja jer sva četiri mononukleotida imaju jednak strukturni dio odgovaran za anionski karakter molekule, fosfatnu skupinu, no razlikuju se prema dušičnoj bazi odgovornoj za adsorpciju molekule na metalnu površinu. Osim toga, budući da su mononukleotidi građevni blokovi nukleinskih kiselina, poznavanje pojačanja Ramanovog raspršenja njihovih strukturnih elemenata korisno je za buduća SERS istraživanja biomakromolekula.³⁵

Snimljeni su Ramanovi spektri čvrstog uzorka i vodene otopine (1×10^{-3} mol L⁻¹) te SERS spektri adenzin-5'-monofosfata (AMP), gvanozin-5'-monofosfata (GMP), citidin-5'-monofosfata (CMP) i uridin-5'-monofosfata (UMP) u koncentracijskom području 1×10^{-7} – 1×10^{-4} mol L⁻¹ u koloidnoj suspenziji srebra agregiranoj s MgSO₄ (0,1 mol L⁻¹), nakon pobude zračenjem pri 785 nm. Opažene vibracijske vrpce u spektrima asignirane su na temelju literaturnih podataka o nukleotidima te dušikovim bazama i nukleozidima.

4.2.1. Adenzin-5'-monofosfat

U Ramanovom spektru čvrstog uzorka AMP vrlo jaka vrpca pri 1335 cm⁻¹ pripisana je isteznim vibracijama peteročlanog prstena adenina, dok istezanja šesteročlanog prstena doprinose vrpcama srednjeg intenziteta u području 1600–1350 cm⁻¹ (slika 18).^{2,35} Slabe vrpce pri 1634, 1034 i 553 cm⁻¹ odgovaraju redom striženju, zibanju i klaćenju amino skupine. Vrpce pri 991 i 844 cm⁻¹ potječu od antisimetričnog i simetričnog istezanja veza C–O riboze, dok je vrpca pri 1429 cm⁻¹ rezultat deformacije hidroksilnih skupina riboze.^{36,37} Slaba vrpca pri 1065 cm⁻¹ pripisana je istezanju veze N9–C između peteročlanog prstena adenina i riboze.³⁷ Intenzivna vrpca pri 741 cm⁻¹ potječe od “disanja” aromatskog sustava.³⁵

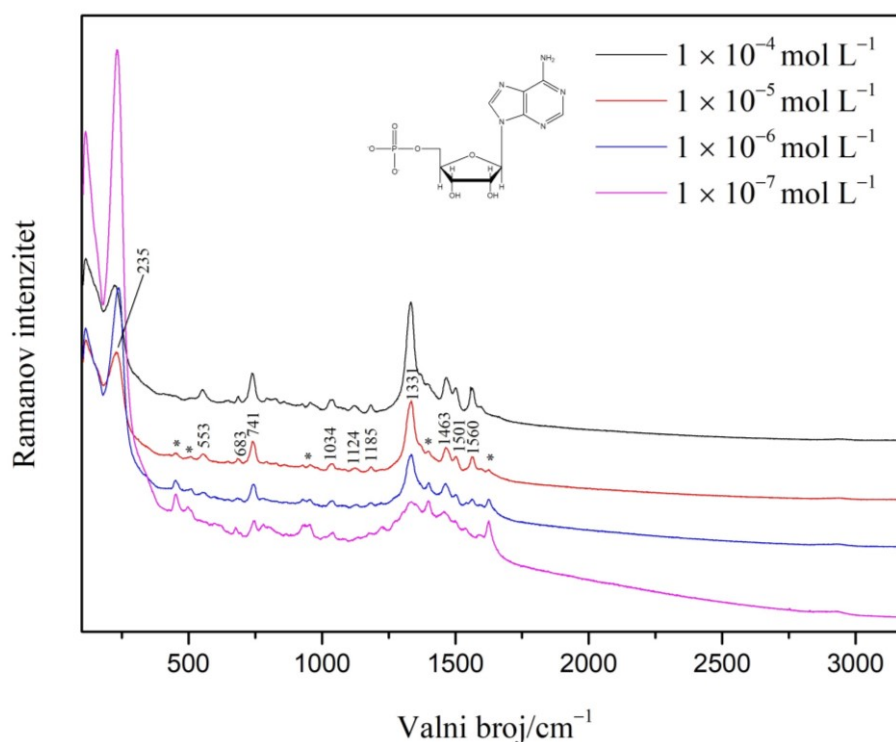
U Ramanovom spektru vodene otopine AMP (1×10^{-3} mol L⁻¹) nisu opažene vrpce ribonukleotida, već vrpce vibracijskih modova vode (slika 18), što je posljedica niske osjetljivosti Ramanove spektroskopije.



Slika 18. Ramanovi spektri čvrstog uzorka i vodene otopine ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) AMP pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 300 mW. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

Nadalje, snimljeni su SERS spektri AMP u koncentracijskom području 1×10^{-7} – $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Spektri su snimljeni u koloidu srebra agregiranom pomoću MgSO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) s ciljem nastanka SERS aktivnih mjesta i lakše adsorpcije negativno nabijenih molekula. U SERS spektru AMP ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) dominiraju vrpce istezanja dušikove baze, peteročlanog prstena adenina pri 1331 cm^{-1} te šesteročlanog prstena pri 1463 , 1501 i 1560 cm^{-1} (slika 19).^{2,35} U području nižih valnih brojeva ističe se vrpca “disanja” aromatskog sustava pri 741 cm^{-1} .³⁵ SERS vrpcoma ribonukleotida interferiraju vrpce citratnih iona na površini nanočestica srebra, osobito pri nižim koncentracijama. Vrpce citratnih iona opažene su pri 448 , 519 , 956 , 1400 i 1626 cm^{-1} (*), čiji intenzitet raste kako se koncentracija analita smanjuje.^{35,38} Opažene vibracijske vrpce asignirane su u tablici 5.

Uočena je linearna promjena intenziteta raspršenog zračenja s promjenom koncentracije AMP, pri čemu je Ramanovo raspršenje najjače za najveću mjerenu koncentraciju AMP ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), koje smanjenjem koncentracije slabi.



Slika 19. SERS spektri AMP u koloidnoj suspenziji srebra u koncentracijskom području $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ u prisutnosti agregirajućeg reagensa MgSO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 30 mW. Vrpce koje potječu od citratnih iona označene su s (*). Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

SERS spektar reflektira način na koji su molekule adsorbirane na površini metala pa je moguće da se u SERS spektrima jave vrpce koje nisu uočene u Ramanovom spektru, dok pojedine vrpce, koje su prisutne Ramanovom spektru, izostanu. Nukleotidi sadrže različite strukturne jedinice kojima bi se potencijalno mogli vezati na površinu nanočestica srebra, a uključuju sustav prstena dušikove baze, heterocikličke i egzocikličke atome dušika te kisik karbonilne skupine.³⁷ S obzirom na vrpce opažene u SERS spektru, među kojima dominiraju vibracijske vrpce dušikove baze, i s obzirom na izborna pravila na površini prema kojima su najintenzivnije vrpce vibracija onih skupina koje su položene okomito na površinu metala, pretpostavlja se da se molekula AMP dušikovom bazom smješta okomito na površinu,² što je i sterički i elektrostatski najpovoljnije.³⁵ Pri tome nisu uočene vrpce koje potječu od fosfatne skupine i riboze, što upućuje na to da su šećer i fosfatna skupina udaljeni od SERS aktivne metalne površine. U SERS spektru također je prisutna je vrlo jaka vrpca pri 235 cm^{-1} koja potječe od istezanja veze Ag–N. Na temelju porijekla i intenziteta vibracijskih vrpce koje su

opažene u SERS spektru može se pretpostaviti da se AMP orijentira prema površini nanočestica srebra purinskom bazom pri čemu ostvaruje vezu sa srebrom preko N7 atoma peteročlanog prstena. Također, s obzirom na prisutnost vrpce pripisanih vibracijskim modovima NH₂ skupine, vrlo je vjerojatno da vezanju doprinosi amino skupina na šesteročlanom prstenu, što ide u prilog činjenici da je prilično teško da N7 atom ostvaruje kontakt s površinom bez dodatnog kontakta NH₂ skupine i površine.³⁷

Tablica 5. Asignacija osnovnih vibracijskih vrpca u Ramanovom spektru čvrstog uzorka AMP i SERS spektru AMP (1×10^{-5} mol L⁻¹) pri valnoj duljini pobude 785 nm.

Valni broj/cm ⁻¹		Vibracija ^{2,35,36,37}
Čvrsti uzorak	1×10^{-5} mol L ⁻¹	
	235	v Ag–N
	448	citrati
	510	citrati
537	553	δ prsten (6); prsten (5); δ _{wg} NH ₂
671	683	δ prsten (6); prsten (5)
741	741	„disanje“ prstena
800		δ prsten (6)
844		v _s C–O (riboza)
901		δ prsten (6); prsten (5)
	956	citrati
991		v _{as} C–O (riboza)
	1034	δ _{rc} NH ₂ ; δ prsten (5)
1065		v N9–C _{riboza}
	1124	v C–N, δ N–H
	1185	v C–N, δ C–H, δ N–H
1257		v C ₆ –NH ₂
1335	1331	v prsten (5)
1377		v prsten (C6–N1)
	1400	citrati
1429		δ OH (riboza)
1484	1463	v prsten (6)
1521	1501	v prsten (6)
1579	1560	v prsten (6)
1634	1626	δ _{sc} NH ₂ ; citrati

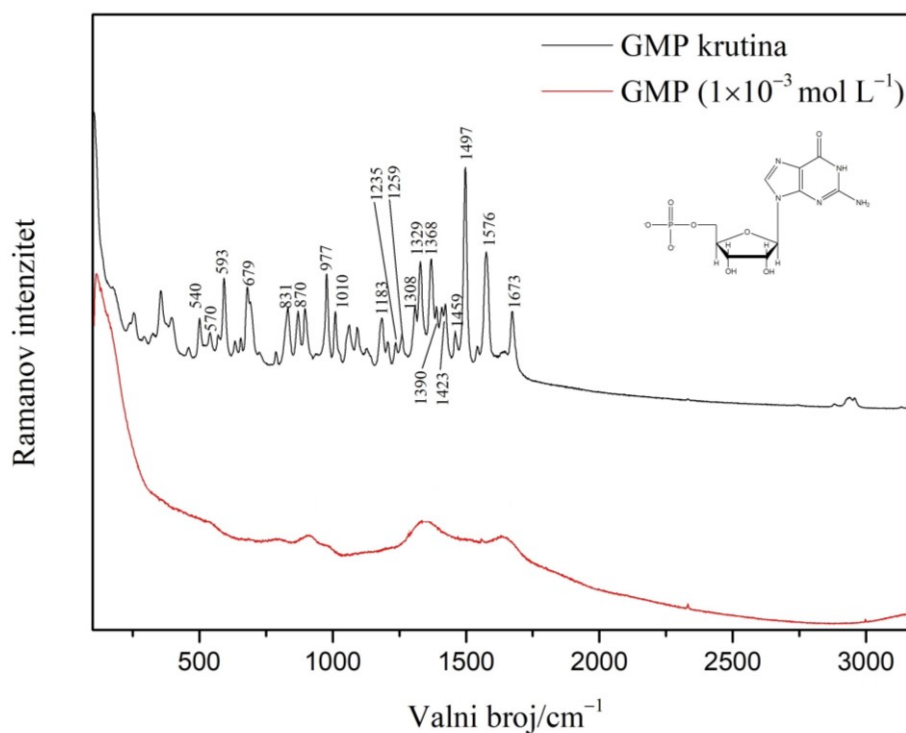
Kratice: v, istežanje; δ, deformacija; as, antisimetrično; s, simetrično; ip, u ravnini; oop, izvan ravnine; sc, striženje; rc, zibanje; wg, klaćenje; tw, uvijanje.

4.2.2. Gvanozin-5'-monofosfat

U Ramanovom spektru čvrstog uzorka GMP vrpca umjerenog intenziteta pri 1673 cm⁻¹ pripisana je istežanju karbonilne skupine te dijelom deformaciji amino skupine gvanina (slika

20).² Jaka vrpca pri 1497 cm^{-1} i srednja vrpca pri 1576 cm^{-1} odgovaraju isteznim vibracijama šesteročlanog prstena gvanina, dok vrpce srednjeg intenziteta pri 1368 i 1329 cm^{-1} potječu od istezanja petočlanog prstena gvanina.^{2,35} “Disanje” aromatskog sustava doprinosi vrpci pri 679 cm^{-1} .³⁵ Intenzivna vrpca pri 977 cm^{-1} potječe od simetričnog istezanja fosfatne skupine.³⁵

U Ramanovom spektru vodene otopine GMP ($1 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$) nisu uočene vibracijske vrpce ribonukleotida, već spektar otopine odgovara spektru vode (slika 20).

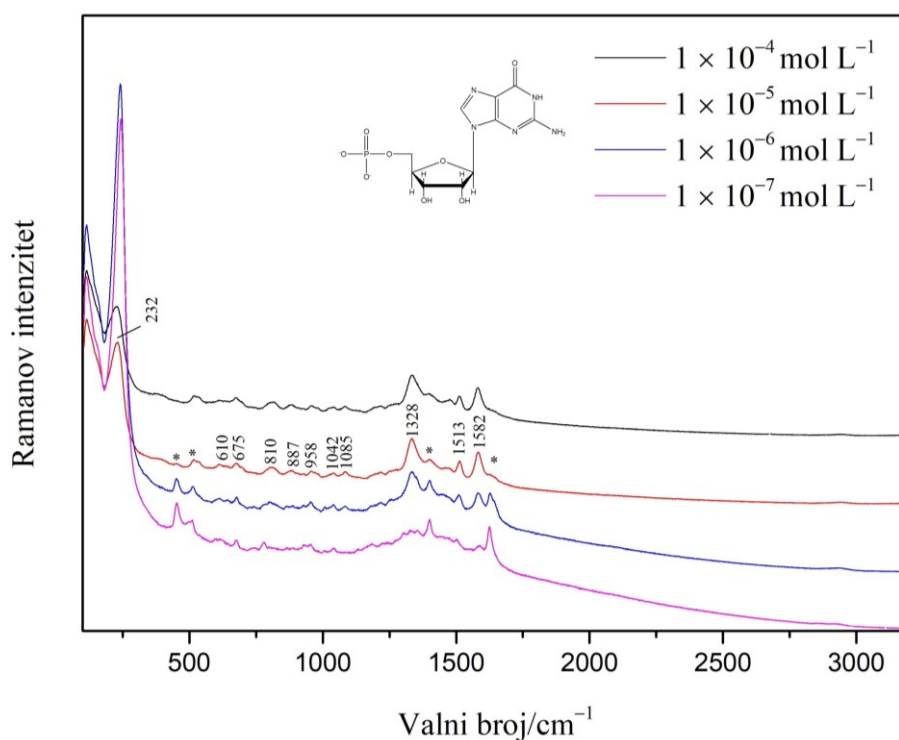


Slika 20. Ramanovi spektri čvrstog uzorka i vodene otopine ($1 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$) GMP pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 300 mW . Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

SERS spektri GMP snimljeni su u koncentracijskom području 1×10^{-7} – $1 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$, u koloidu srebra agregiranom pomoću MgSO_4 ($0,1\text{ mol L}^{-1}$). U spektru prevladavaju široke vrpce među kojima se ističu vrpce istezanja gvanina, petočlanog prstena pri 1328 cm^{-1} i šesteročlanog prstena pri 1512 i 1582 cm^{-1} (slika 21).³⁵ Ostale vrpce u spektru većinom su slabog intenziteta. Također, u SERS spektru GMP koncentracije $1 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ uočene su i interferirajuće vrpce citratnih iona pri 454 , 516 , 1402 i 1633 cm^{-1} (*), koje su intenzivnije pri nižim koncentracijama GMP.^{35,38} Opažene vibracijske vrpce asignirane su u tablici 6.

Pojačanje Ramanovog raspršenja približno je jednako za uzorke GMP koncentracija $1 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ i $1 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$, nakon koje smanjenjem koncentracije slabi.

Na temelju vrpce opaženih u SERS spektru, u kojem dominiraju vibracijske vrpce dušikove baze, i s obzirom na izborna pravila na površini prema kojima su najintenzivnije vrpce vibracija skupina koje su položene okomito na površinu metala, pretpostavlja se da se molekule GMP dušikovom bazom gvanina smještaju okomito na površinu.² Pri tome nisu uočene vrpce koje potječu od fosfatne skupine i tek slaba vrpca istezanja veze N9–C između peteročlanog prstena i riboze je uočena pri 1042 cm^{-1} , što upućuje na to da su šećer i fosfatna skupina udaljeni od SERS aktivne metalne površine. U SERS spektru prisutna je vrlo jaka vrpca pri 232 cm^{-1} koja potječe od istezanja veze između srebra i heteroatoma, Ag–O ili Ag–N. Iako literaturni podaci sugeriraju da GMP ostvaruje vezu sa srebrom preko kisikova atoma karbonilne skupine,³⁸ u SERS spektru opaža se tek rame istezanja veze C=O pri 1633 cm^{-1} , kojem interferira vrpca koloida. S druge strane, prisutne su intenzivne vrpce pri 1328 i 1582 cm^{-1} koja su pripisane istezanju prstenova gvanina, što uz prisutnost intenzivne vrpce istezanja veze između srebra i heteroatoma, ukazuje na vezanje GMP putem dušikovih atoma s površinom nanočestica srebra i nastajanje veze Ag–N.



Slika 21. SERS spektri GMP u koloidnoj suspenziji srebra u koncentracijskom području $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ u prisutnosti agregirajućeg reagensa MgSO_4 ($0,1\text{ mol L}^{-1}$) pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 30 mW . Vrpce koje potječu od citratnih iona označene su s (*). Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

Tablica 6. Asignacija osnovnih vibracijskih vrpca u Ramanovom spektru čvrstog uzorka GMP i SERS spektru GMP (1×10^{-5} mol L⁻¹) pri valnoj duljini pobude 785 nm.

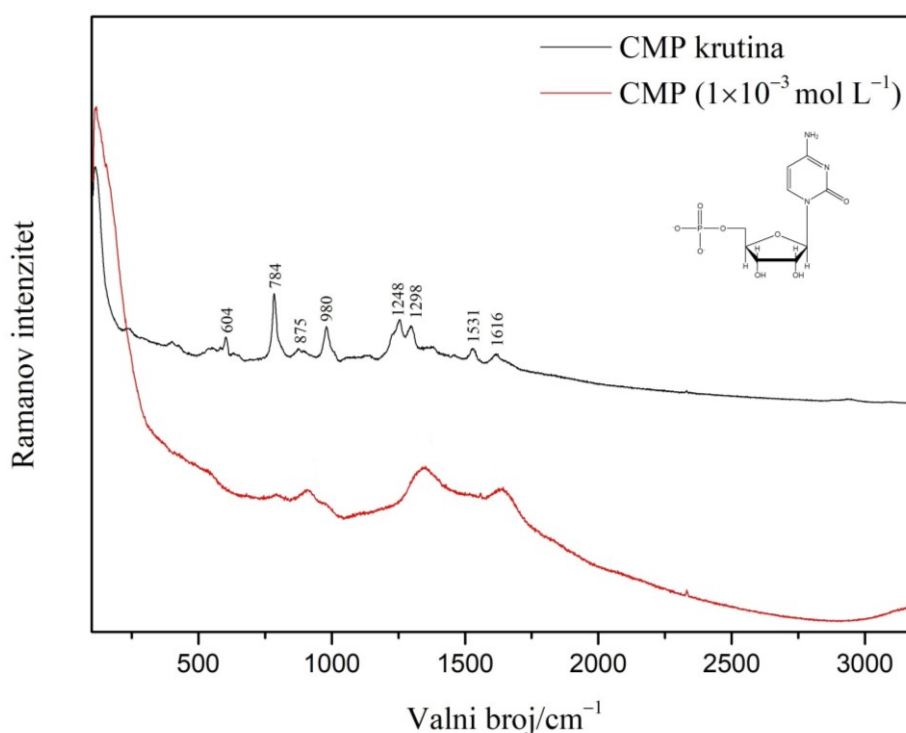
Valni broj/cm ⁻¹		Vibracija ^{2,35,39}
Čvrsti uzorak	1×10^{-5} mol L ⁻¹	
	232	v Ag–N
	454	citrati
	516	citrati
540		δ prsten (6)
570		δ prsten (C2–N3–C4)
593	610	δ prsten (6)
679	675	“disanje“ prstena
831	810	δ prsten (6)
870	887	δ prsten (6)
897		δ prsten (6)
	958	δ _{rc} NH ₂ ; δ prsten (5)
977		v _s PO ₃ ²⁻
1010		v _{as} C–O (riboza)
	1042	v N–C _{riboza}
1092	1085	v prsten
1183		v prsten (5)
1235		δ _{ip} C8–H
1259		δ _{ip} N9–H; v prsten (5)
1308		v prsten (5)
1329	1328	v prsten (5)
1368		δ _{ip} N1–H; v prsten (6)
1390		v prsten (5)
	1402	citrati
1423		v prsten (6)
1459		v prsten (5)
1497	1513	v prsten (5); v prsten (6)
1576	1582	v prsten (6) (C–N1)
	1633	citrati
1673		v C=O; δ _{sc} NH ₂

Kratice: v, istežanje; δ, deformacija; as, antisimetrično; s, simetrično; ip, u ravnini; oop, izvan ravnine; sc, striženje; rc, zibanje; wg, klaćenje; tw, uvijanje.

4.2.3. Citidin-5'-monofosfat

U Ramanovom spektru čvrstog uzorka CMP vrpca srednjeg intenziteta pri 1616 cm^{-1} pripisana je istezanju karbonilne skupine citozina (slika 22).³¹ Isteznim vibracijama prstena, koje uključuju najveći doprinos istezanja veza N3–C4 i N1–C2–N3, odgovaraju jake vrpce pri 1298 i 1248 cm^{-1} , dok deformacija aromatskog prstena (C2–N3–C4) odgovara vrpci umjerenog intenziteta pri 604 cm^{-1} .³⁵ Vrlo jaka vrpca pri 784 cm^{-1} posljedica je “disanja” aromatskog prstena.³⁵ Jaka vrpca pri 980 cm^{-1} potječe od simetričnog istezanja fosfatne skupine.³⁵

Ramanov spektar vodene otopine CMP ($1 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$) nije opažen te spektar otopine odgovara spektru vode (slika 22).



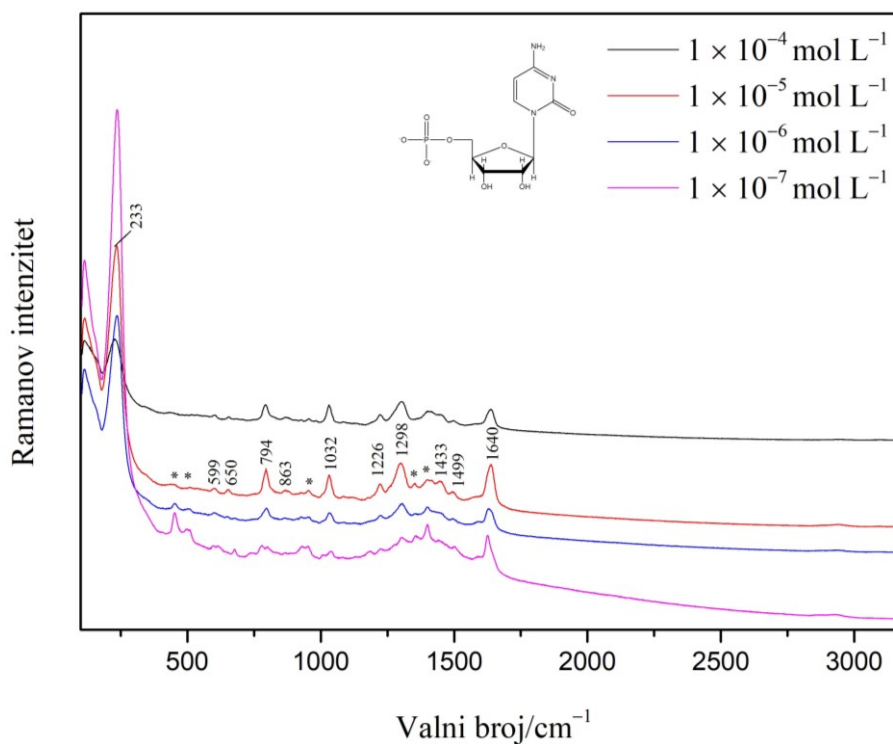
Slika 22. Ramanovi spektri čvrstog uzorka i vodene otopine ($1 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$) CMP pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 300 mW . Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

SERS spektri CMP snimljeni su u koncentracijskom području 1×10^{-7} – $1 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$, u koloidu srebra agregiranom pomoću MgSO_4 ($0,1\text{ mol L}^{-1}$). U SERS spektru CMP koncentracije $1 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ opaža se jaka vrpca istezanja karbonilne skupine pri 1640 cm^{-1} (slika 23).³¹ Vrpce istezanja prstena opažene su pri 1298 i 1226 cm^{-1} ,³⁵ dok „disanje“ citozina

doprinosi jakoj vrpici pri 794 cm^{-1} .³⁵ U spektru se ističe i jaka vrpca istezanja veze N1–C, između dušikove baze i riboze, pri 1032 cm^{-1} .² U SERS spektru uzorka koncentracije $1\times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ uočene su interferirajuće vrpce citratnih iona pri 446, 501, 956, 1353 i 1400 cm^{-1} (*) čiji intenzitet raste sa smanjenjem koncentracije ribonukleotida.^{35,38} Opažene vibracijske vrpce asignirane su u tablici 7.

Na temelju vrpici opaženih u SERS spektru može se pretpostaviti da se molekula CMP aromatskim sustavom citozina smješta okomito na površinu, dok vezu sa srebrom ostvaruje preko dušikova atoma (N3) i kisika C=O skupine.² Na to ukazuje i vrlo jaka vrpca pri 233 cm^{-1} koja se pripisuje istezanju veza Ag–O i Ag–N.³⁵

Na temelju SERS spektara CMP u koncentracijskom području 1×10^{-7} – $1\times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ nije opažena linearna ovisnost Ramanovog intenziteta o koncentraciji CMP, već je uočeno da se sa smanjenjem koncentracije povećava intenzitet raspršenog zračenja do koncentracije $1\times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$, nakon koje se smanjuje, a što ukazuje da je pri koncentraciji $1\times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ postignuta optimalna pokrivenost nanočestica srebra molekulama CMP. Uočeno se može objasniti različitim smještanjem molekula CMP u odnosu na površinu nanočestica srebra.



Slika 23. SERS spektri CMP u koloidnoj suspenziji srebra u koncentracijskom području $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ u prisutnosti agregirajućeg reagensa MgSO₄ (0,1 mol L⁻¹) pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 30 mW. Vrpce koje potječu od citratnih iona označene su s (*). Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

Tablica 7. Asignacija osnovnih vibracijskih vrpca u Ramanovom spektru čvrstog uzorka CMP i SERS spektru CMP (1×10^{-5} mol L⁻¹) pri valnoj duljini pobude 785 nm.

Valni broj/cm ⁻¹		Vibracija ^{2,35,37,39}
Čvrsti uzorak	1×10^{-5} mol L ⁻¹	
	233	v Ag–O; v Ag–N
	446	citrati
	501	citrati
604	599	δ prsten (C2–N3–C4)
	650	δ C=O
784	794	“disanje“ prstena
875	863	v prsten
	956	citrati
980		v _s PO ₃ ²⁻
	1032	v N–C _{riboza}
1248	1226	v prsten (N1–C2–N3)
1298	1298	v prsten (N3–C4)
	1353	citrati
	1400	citrati
	1443	δ OH (riboza)
1531	1499	v prsten
1616	1640	v C2=O

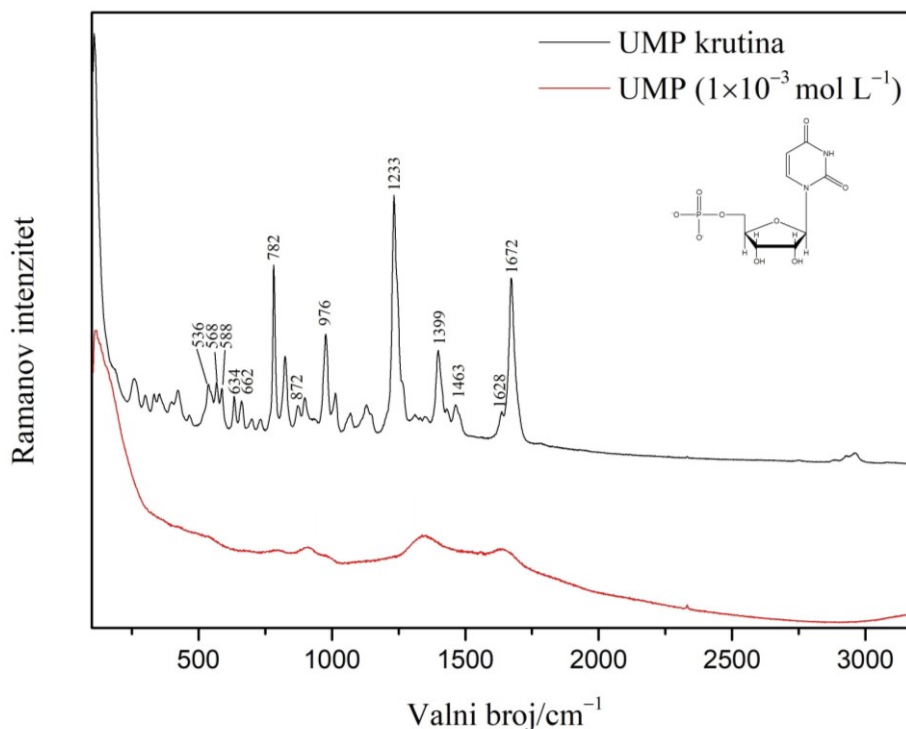
Kratice: v, istežanje; δ, deformacija; as, antisimetrično; s, simetrično; ip, u ravnini; oop, izvan ravnine; sc, striženje; rc, zibanje; wg, klaćenje; tw, uvijanje.

4.2.4. Uridin-5'-monofosfat

Slično spektru CMP, u Ramanovom spektru čvrstog uzorka UMP vrpca slabog intenziteta pri 1628 cm⁻¹ pripisana je istežanju karbonilne skupine C2=O (slika 24). Intenzivna vrpca pri 1672 cm⁻¹ pripisana je istežanju druge karbonilne skupine C4=O u strukturi te istežanju veze C5=C6 prstena. Vrlo jaka vrpca pri 1233 cm⁻¹ odgovara istežanju prstena uracila, s osobitim doprinosom N1–C2–N3 skupine.² Intenzivna vrpca pri 782 cm⁻¹ potječe od “disanja” aromatskog prstena, dok vrpce u rasponu 670–560 cm⁻¹, uz vrpcau pri 590 cm⁻¹, potječu od

deformacijskih vibracija uracila.³⁵ U Ramanovom spektru čvrstog uzorka prisutna je i vrpca simetričnog istežanja fosfatne skupine pri 976 cm^{-1} .³⁵

Nije opažen Ramanov spektar vodene otopine UMP ($1 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$) (slika 24).

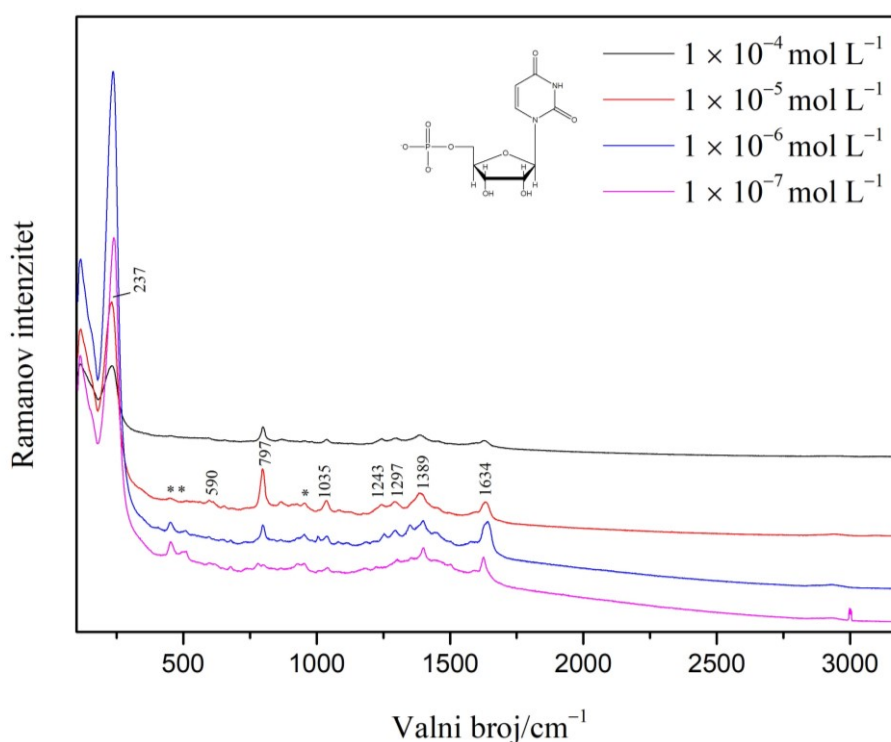


Slika 24. Ramanovi spektri čvrstog uzorka i vodene otopine ($1 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$) UMP pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 300 mW. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

SERS spektri UMP snimljeni su u koncentracijskom području 1×10^{-7} – $1 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$, u koloidu srebra agregiranom pomoću MgSO_4 ($0,1\text{ mol L}^{-1}$). Vrpca „disanja“ aromatskog prstena pri 797 cm^{-1} najvećeg je intenziteta u SERS spektru, dok istežne vibracije prstena doprinose vrpama srednje intenziteta pri 1243 i 1297 cm^{-1} te širokoj vrpci pri 1389 cm^{-1} . U spektru se opaža vrpca istežanja veze N1–C veze između dušikove baze i riboze pri 1035 cm^{-1} te vrpca istežanja karbonilnih skupina pri 1634 cm^{-1} .² U SERS spektrima UMP koncentracije $1 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ uočene su interferirajuće vrpce citratnih iona pri 451 , 510 i 955 cm^{-1} (*), čiji intenzitet raste kako se koncentracija ribonukleotida smanjuje.^{35,38} Opažene vibracijske vrpce asignirane su u tablici 8.

Slično CMP, pojačanje Ramanovog raspršenja UMP ne prati linerano povećanje koncentracije u području 1×10^{-7} – $1 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$, pri čemu najveće raspršenje karakterizira uzorak koncentracije $1 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$.

Vrpce opažene u SERS spektru UMP upućuju na smještanje prstena uracila blizu površine nanočestica srebra NH i C=O skupinom. U SERS spektru javlja se samo jedna vrpca istežanja C=O skupine, što može biti posljedica toga da obje karbonilne skupine vibriraju jednakim frekvencijama ili da je samo jedna vibracija vidljiva.³⁹ Može se pretpostaviti se da se dušikova baza orijentira prema površini srebra C2=O skupinom pri čemu se druga karbonilna skupina C4=O smješta gotovo paralelno površini metala pa vibracijska vrpca ove karbonilne skupine izostaje. U spektru nisu uočene vrpce koje potječu od fosfatne skupine, što upućuje na to da je fosfatna skupina udaljena od SERS aktivne metalne površine. Na preferirano vezanje molekula UMP s površinom srebra preko kisika upućuje i veoma intenzivna vrpca pri 237 cm^{-1} koja potječe od istežanja Ag–O veze.³⁵



Slika 25. SERS spektri UMP u koloidnoj suspenziji srebra u koncentracijskom području $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ u prisutnosti agregirajućeg reagensa MgSO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 30 mW. Vrpce koje potječu od citratnih iona označene su s (*). Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

Tablica 8. Asignacija osnovnih vibracijskih vrpca u Ramanovom spektru čvrstog uzorka UMP i SERS spektru UMP ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) pri valnoj duljini pobude 785 nm.

Valni broj/cm ⁻¹		Vibracija ^{2,35,37}
Čvrsti uzorak	$1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	
	237	v Ag–O
	451	citrati
	510	citrati
536		δ prsten
568		δ prsten (C2–N3–C4)
588	590	δ prsten (C2–N3–C4)
634		δ prsten
662		δ prsten
782	797	“disanje“ prstena
872	868	δ _{oop} C6–H
	955	citrati
976		v _s PO ₃ ²⁻
	1035	v N1–C _{riboza}
1233	1243	v prsten (N1–C2–N3)
	1297	v prsten (N3–C4)
	1389	v prsten (C–C;C–N)
1399		δ _{ip} N3–H
1463		v prsten
1628	1634	v C2=O
1672		v C4=O; v C5=C6

Kratice: v, istežanje; δ, deformacija; as, antisimetrično; s, simetrično; ip, u ravnini; oop, izvan ravnine; sc, striženje; rc, zibanje; wg, klaćenje; tw, uvijanje.

4.3. SERS spektri kompleksa alkaloid/ribonukleotid

Istraživanje interakcija malih molekula s nukleinskim kiselinama već je duže vrijeme područje interesa mnogih istraživačkih skupina diljem svijeta. U provedenim istraživanjima DNA je više zastupljena zbog činjenice da čini genetski materijal stanice. S druge strane, RNA je gotovo zanemarena jer se smatralo da je njezina uloga u ekspresiji gena i drugim staničnim aktivnostima minimalna te da je riječ o strukturi koja ima ulogu samo u procesu transkripcije. Osim toga, na to je utjecala i činjenica da RNA tvori raznolike i složene strukture koje je bilo teško karakterizirati u usporedbi s dvostrukom spiralnom zavojnicom DNA.⁴⁰ Međutim, u skorije vrijeme RNA dobiva na važnosti pa su stoga danas istraživanja o ciljanom vezanju malih molekula s RNA područje od iznimnog interesa.⁴¹ Zbog toga je bitno razumijevanje interakcija malih molekula s različitim strukturama RNA, ali i samim ribonukleotidima kao njihovim građevnim jedinicama. Alkaloidi posjeduju potencijal za primjenu u terapijske svrhe, a nedavno je zabilježena i njihova interakcija s RNA strukturama. Mnogi alkaloidi pokazuju izvrstan afinitet vezanja s RNA, što je moguće iskoristiti za razvoj terapeutika usmjerenih na RNA.⁴⁰

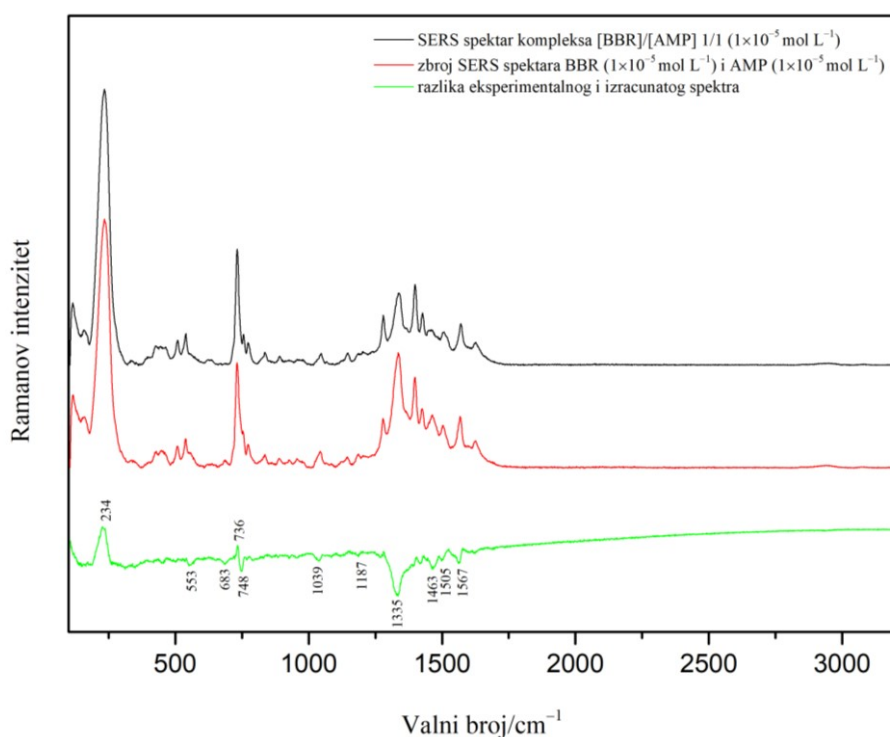
Pripremljene su smjese alkaloida i ribonukleotida u molarnom omjeru [alkaloid]/[ribonukleotid] = 1/1 pri čemu je konačna koncentracija alkaloida i ribonukleotida u mjernim uzorcima iznosila 1×10^{-5} mol L⁻¹. Potom su snimljeni njihovi SERS spektri u koloidnoj suspenziji srebra agregiranoj s MgSO₄ (0,1 mol L⁻¹) pri valnoj duljini pobude 785 nm. U svrhu istraživanja interakcija i načina vezanja berberina i papaverina s ribonukleotidima, spektri kompleksa analizirani su na način da su uspoređeni sa spektrom sume spektara pojedinih komponenti (alkaloida i ribonukleotida). Točnije, analiziran je spektar razlike eksperimentalnog SERS spektra kompleksa alkaloid/ribonukleotid i izračunatog spektra zbroja normaliziranih SERS spektara alkaloida i ribonukleotida.

Berberin i ribonukleotidi mogu ostvariti različite interakcije. Četiri atoma kisika u BBR sposobni su za stvaranje vodikovih veza, djelujući kao akceptori vodikove veze, s vodikom NH₂ skupine AMP, GMP i CMP te s vodikom NH skupine GMP i UMP, ali i s vodikom OH skupina šećera pri čemu ribonukleotidi, odnosno šećer djeluju kao donori vodikove veze. Moguće su i elektrostatske interakcije između pozitivno nabijenog atoma dušika u strukturi BBR s negativno nabijenim kisikom fosfatne skupine ribonukleotida ili s kisikom karbonilne

skupine GMP, CMP i UMP. Također, moguće su i π -interakcije slaganja aromatskih dijelova alkaloida s dušikovim bazama ribonukleotida.

Usporedbom SERS spektra smjese BBR i AMP sa spektrom zbroja SERS spektara pojedinačnih molekula uočene su spektralne razlike, koje se većinom odnose na promjene intenziteta vrpce. U SERS spektru smjese intenzivnija je vrpca pri 234 cm^{-1} koja potječe od istezanja veze Ag–N obje molekule u smjesi. Vrpce pri 736 cm^{-1} doprinose deformacije prstenova BBR i „disanje“ adenina AMP bez veće promjene u intenzitetu u odnosu na izračunati spektar. Međutim, vrpce pri 1335 , 1463 , 1505 i 1563 cm^{-1} , koje uglavnom potječu od isteznih vibracija dušikove baze AMP, prigušene su u eksperimentalnom SERS spektru kompleksa, dok vrpca deformacije prstenova izvan ravnine pri 683 cm^{-1} u potpunosti izostaje. Usporedbom spektara nije zamijećena pojava novih vrpce niti značajan pomak vrpce u SERS spektru smjese u odnosu na spektre pojedinačnih spojeva, no opisane spektralne razlike ukazuju na nastajanje kompleksa, pri čemu najvjerojatnije dominiraju π -interakcije slaganja.

Na temelju izbornih pravila SERS spektroskopije, promjene intenziteta SERS vrpce upućuju na promjene položaja molekule na površini nanočestica srebra. Pretpostavlja se da interakcijom alkaloida i ribonukleotida nastali kompleks ima drugačiju orijentaciju na površini nanočestica u odnosu na pojedine molekule, zbog čega su različiti vibracijski modovi različito pojačani u spektru. S obzirom da BBR posjeduje na atomu dušika pozitivan naboj u strukturi, može se pretpostaviti da se nastali kompleks smješta berberinom blizu površine metala, pri čemu se adsorpcija molekula berberina na površinu nanočestica srebra odvija uslijed elektrostatskog privlačenja između pozitivnog naboja u molekuli berberina te negativnog naboja citratnih iona na površini nanočestica srebra. Iako su ribonukleotidi negativno nabijeni zbog fosfatne skupine koja nosi negativan naboj, u kompleksu BBR/AMP pozitivno nabijeni BBR pomaže djelomično neutralizirati negativno nabijeni ribonukleotid i olakšava adsorpciju kompleksa na površinu.⁴²

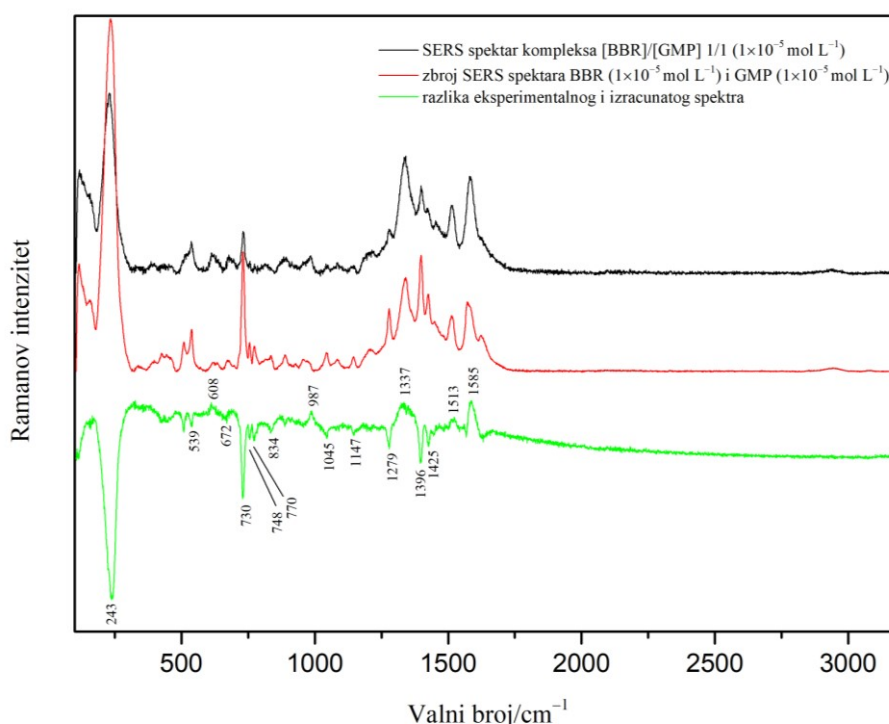


Slika 26. SERS spektar kompleksa [berberin]/[AMP] 1/1 ($c(\text{berberin}) = c(\text{AMP}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u koloidnoj suspenziji srebra u prisutnosti agregirajućeg reagensa MgSO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) nakon pobude zračenjem pri 785 nm , spektar zbroja SERS spektara berberina ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) i AMP ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) te razlika eksperimentalnog i izračunatog spektra. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

U SERS spektru smjese BBR i GMP uočene su spektralne razlike koje se većinom odnose na promjene intenziteta SERS vrpce pojedinih molekula. Vrpca deformacije šesteročlanog prstena GMP pri 608 cm^{-1} te vrpce istezanja peteročlanog, odnosno šesteročlanog prstena i istezanja veze C–N1 pri 1337 , 1513 i 1585 cm^{-1} intenzivnije su u SERS spektru kompleksa BBR/GMP u odnosu na sumu spektara pojedinih molekula. S druge strane, vrpce BBR pri 730 , 1396 i 1425 cm^{-1} , koje odgovaraju deformaciji izvan ravnine prstenova 2 i 3 te isteznim vibracijama veza C–C, C–N i C–O, značajno su slabijeg intenziteta. U SERS spektru smjese opaženo je i slabljenje vrpce pri 243 cm^{-1} , koja potječe od istezanja veze između dušikova atoma i površine srebra. U spektru razlike nova vrpca pri 987 cm^{-1} može se pripisati istezanju fosfata ili pomaku vrpce koja odgovara deformaciji amino skupine GMP (958 cm^{-1}).

Kao i u prethodnom slučaju, može se pretpostaviti da adsorpciju kompleksa BBR/GMP na površinu na nanočestica srebra olakšavaju elektrostatske privlačne interakcije između

pozitivnog naboja u molekuli berberina te negativnog naboja citratnih iona na površini nanočestica srebra. Međutim, za razliku od kompleksa BBR/AMP, opažen je suprotan trend promjene intenziteta vrpce dušikove baze, koji ukazuje da se nastali kompleks BBR/GMP smješta dušikovom bazom ili okomito ili bliže površini srebra u odnosu na molekulu BBR. Također se osim π -interakcija može pretpostaviti doprinos drugih interakcija, primjerice vodikovih veza, potencijalno ostvarenih između vodika egzocikličke NH_2 skupine ili NH skupine šesteročlanog prstena GMP i atoma kisika u strukturi BBR.

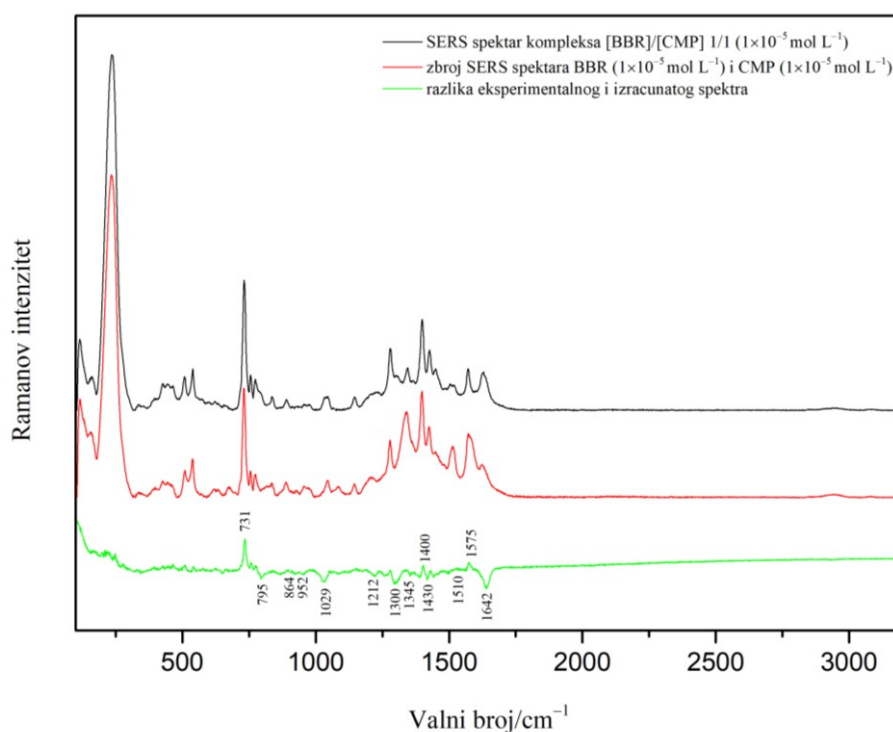


Slika 27. SERS spektar kompleksa [berberin]/[GMP] 1/1 ($c(\text{berberin}) = c(\text{GMP}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u koloidnoj suspenziji srebra u prisutnosti agregirajućeg reagensa MgSO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) nakon pobude zračenjem pri 785 nm, spektar zbroja SERS spektara berberina ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) i GMP ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) te razlika eksperimentalnog i izračunatog spektra. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

Usporedbom eksperimentalnog SERS spektra smjese BBR i CMP u odnosu na spektar zbroja SERS spektara pojedinih molekula, uočene su određene razlike. U SERS spektru smjese intenzitet vrpce BBR pri 731 cm^{-1} i 1400 cm^{-1} , koje odgovaraju deformacijskim i isteznim vibracijama prstenova 2 i 3 berberina, veći je u odnosu na izračunati spektar, dok su vrpce

vibracije dušikove baze CMP pri 1300 i 1430 cm^{-1} slabijeg intenziteta. Također, u spektru razlike opaža se vrpca pri 1642 cm^{-1} , koja je posljedica pomaka bilo vrpce istezanja karbonilne skupine CMP (1637 cm^{-1}) bilo istezanja veza C=C prstena 4 berberina uslijed interakcije. Može se pretpostaviti da BBR ostvaruje π -interakcije s citozinom, ali i vodikove veze s karbonilnom skupinom citozina.

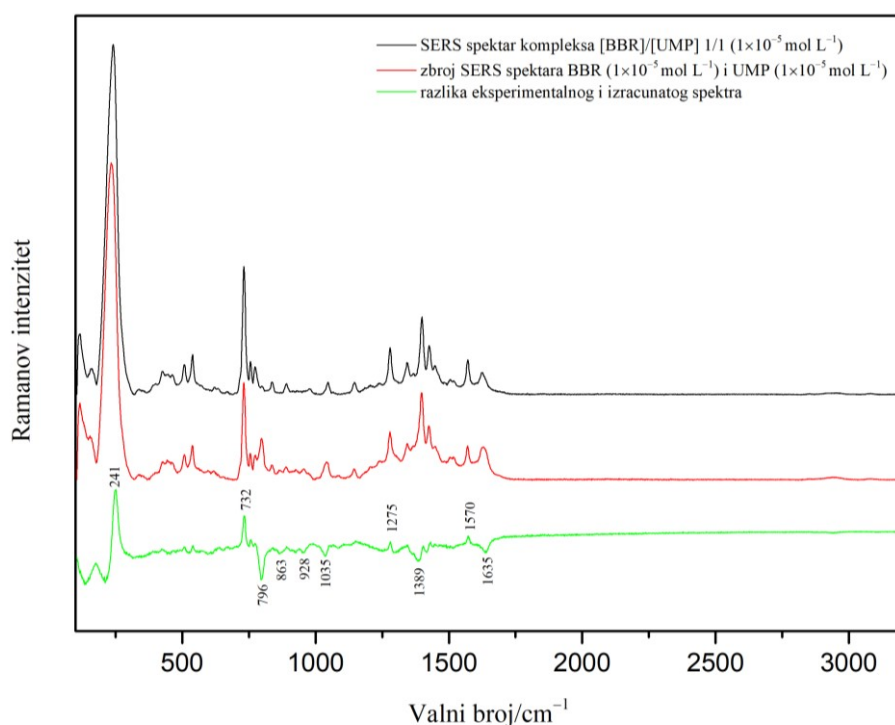
Kompleks BBR/CMP najvjerojatnije se smješta berberinom blizu površine srebra, pri čemu je adsorpcija molekula berberina na površinu nanočestica srebra vođena elektrostatskim privlačnim interakcijama između pozitivnog naboja u molekuli berberina te negativnog naboja citratnih iona na površini nanočestica srebra.



Slika 28. SERS spektar kompleksa [berberin]/[CMP] 1/1 ($c(\text{berberin}) = c(\text{CMP}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u koloidnoj suspenziji srebra u prisutnosti agregirajućeg reagensa MgSO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) nakon pobude zračenjem pri 785 nm, spektar zbroja SERS spektara berberina ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) i CMP ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) te razlika eksperimentalnog i izračunatog spektra. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

Spektralni motivi u spektru razlike eksperimentalnog i izračunatog spektra smjese BBR i UMP nalikuju onima u spektru razlike za smjesu BBR i CMP. Vrpce pri 732, 1275 i 1570

cm^{-1} , koje potječu od vibracijskih modova BBR i to redom od deformacije izvan ravnine prstenova 2 i 3, istežanja veze C–N i zibanja metoksi skupine te od deformacije u ravnini prstenova i deformacije metoksi skupine, jačeg su intenziteta, dok su vrpce pri 1035, 1389 i 1635 cm^{-1} , pripisane vibracijama prstena i istežanju karbonilne skupine UMP, slabijeg intenziteta. Stoga se pretpostavlja i sličan mehanizam adsorpcije kompleksa na površinu nanočestica srebra berberinom bliže površini metala, te nastajanje kompleksa uslijed π -interakcija i vodikovih veza.

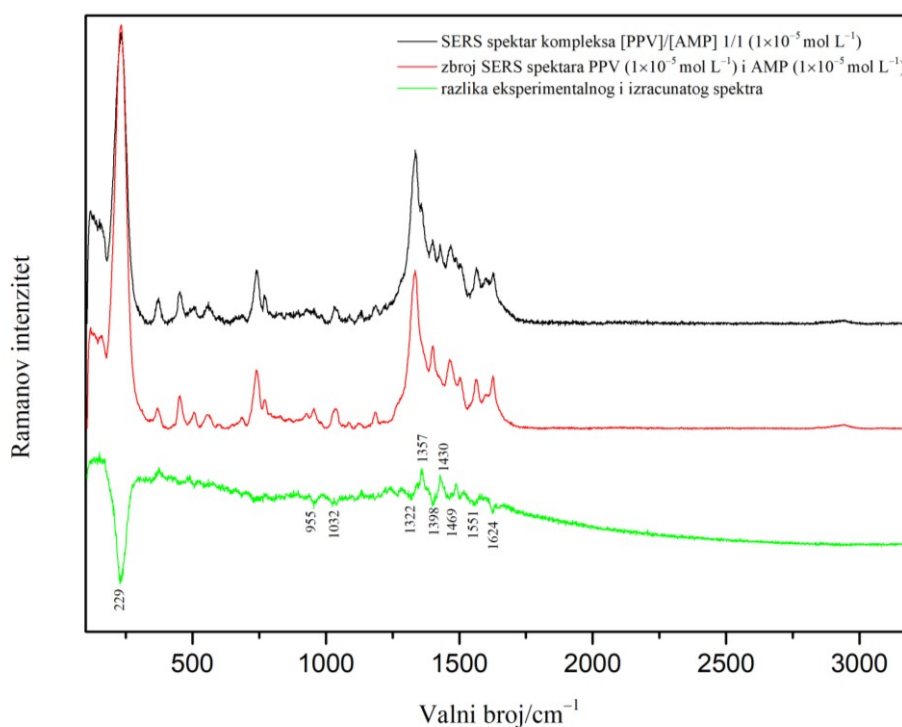


Slika 29. SERS spektr kompleksa [berberin]/[UMP] 1/1 ($c(\text{berberin}) = c(\text{UMP}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u koloidnoj suspenziji srebra u prisutnosti agregirajućeg reagensa MgSO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) nakon pobude zračenjem pri 785 nm , spektr zbroja SERS spektara berberina ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) i UMP ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) te razlika eksperimentalnog i izračunatog spektra. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

Papaverin može s ribonukleotidima ostvarivati interakcije na više različitih načina. Četiri atoma kisika u PPV i atom dušika u izokinolinskom prstenu PPV sposobni su za stvaranje vodikovih veza, djelujući kao akceptori vodikove veze, s vodikom NH_2 skupine AMP, GMP i CMP te s vodikom NH skupine GMP i UMP, ali i s vodikom OH skupine šećera pri čemu ribonukleotidi, odnosno šećer djeluju kao donori vodikove veze. Moguće su i elektrostatske

interakcije između pozitivno nabijenog atoma dušika, kada je prisutan u protoniranom obliku u strukturi, s negativno nabijenim kisikom fosfatne skupine ribonukleotida ili s kisikom karbonilne skupine GMP, CMP i UMP. Također, moguće su i π -interakcije slaganja aromatskih djelova alkaloida s dušikovim bazama ribonukleotida.

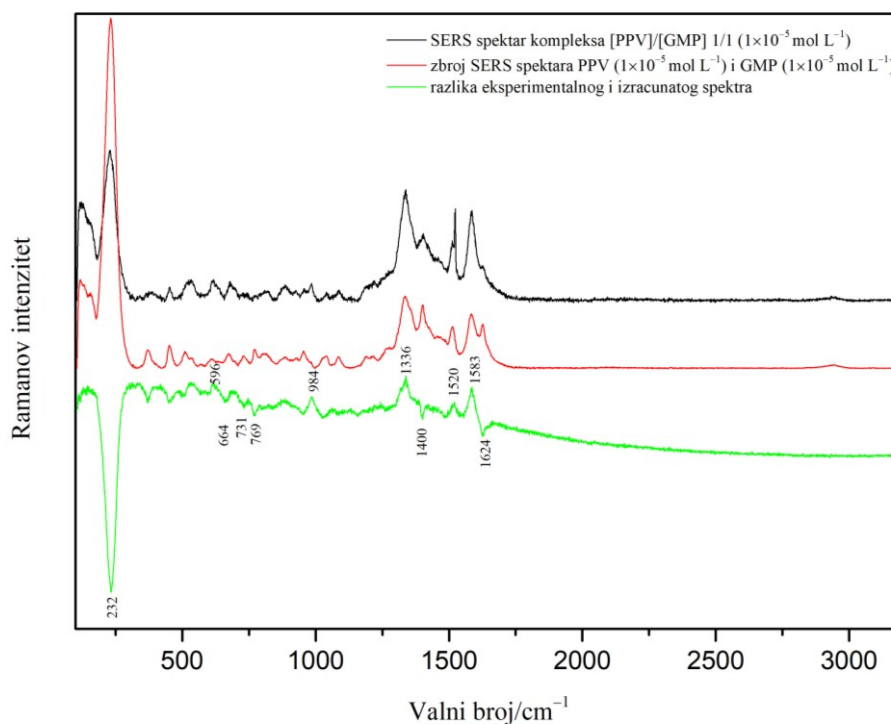
Usporedbom eksperimentalnog SERS spektra smjese PPV i AMP i spektra zbroja SERS spektara pojedinih molekula opažene su određene razlike. U SERS spektru kompleksa PPV/AMP uočen je slabiji intenzitet vrpce pri 1322, 1398, 1469, 1551 i 1624 cm^{-1} koje potječu od vibracijskih modova ribonukleotida. S druge strane, uočena je intenzivnija vrpca pri 1357 cm^{-1} koja potječe od isteznih vibracija C–C i C–N veza papaverina. Također, u spektru kompleksa PPV/AMP opažena je nova vrpca pri 1430 cm^{-1} koja nije prisutna u izračunatom spektru, a najvjerojatnije je posljedica isteznih vibracija izokinolinskog prstena papaverina. Može se pretpostaviti da kompleks nastaje uslijed π -interakcija izokinolinskog sustava i dušikove baze AMP te vodikovih veza između kisika PPV i vodika NH_2 skupine AMP. Intenzivnije SERS vrpce papaverina ukazuju da se nastali kompleks smješta izokinolinskim sustavom PPV bliže površine srebra.



Slika 30. SERS spektar kompleksa [papaverin]/[AMP] 1/1 ($c(\text{papaverin}) = c(\text{AMP}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u koloidnoj suspenziji srebra u prisutnosti agregirajućeg reagensa MgSO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) nakon pobude zračenjem pri 785 nm, spektar zbroja SERS spektara papaverina ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) i AMP ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) te razlika eksperimentalnog i izračunatog spektra. Spektari su razmaknuti zbog preglednosti.

Usporedbom eksperimentalnog i izračunatog SERS spektra smjese PPV i GMP, vrpce deformacije u ravnini izokinolinskog prstena PPV pri 731 i 769 cm^{-1} nisu opažene u eksperimentalnom spektru kompleksa, u kojem je i vrpca istezanja izokinolinskog prstena pri 1400 cm^{-1} slabijeg intenziteta. Nadalje, u spektru PPV/GMP uočena je slabija vrpca pri 1624 cm^{-1} , koja potječe od vibracijskih modova obje molekule. S druge strane, intenzivnije su vrpce deformacijskih vibracija aromatskog sustava gvanina pri 596 cm^{-1} te isteznih vibracija peteročlanog prstena pri 1336 i 1520 cm^{-1} i šesteročlanog prstena GMP pri 1583 cm^{-1} . U eksperimentalnom SERS spektru kompleksa PPV/GMP prisutna je vrpca pri 984 cm^{-1} koja nije uočena u spektru zbroja spektara pojedinih molekula, a može se pripisati istezanju fosfata ili pomaku vrpce koja odgovara deformaciji amino skupine GMP (958 cm^{-1}).

S obzirom da u spektru kompleksa dominiraju vrpce ribonukleotida, može se pretpostaviti da se nastali kompleks PPV/GMP smješta dušikovom bazom ili okomito ili bliže površini srebra u odnosu na izokinolinski sustav PPV. Osim π -interakcija između aromatskih sustava, PPV i GMP mogu ostvariti vodikove veze između kisika metoksi skupina PPV i vodika NH_2 skupine ili NH skupine GMP.

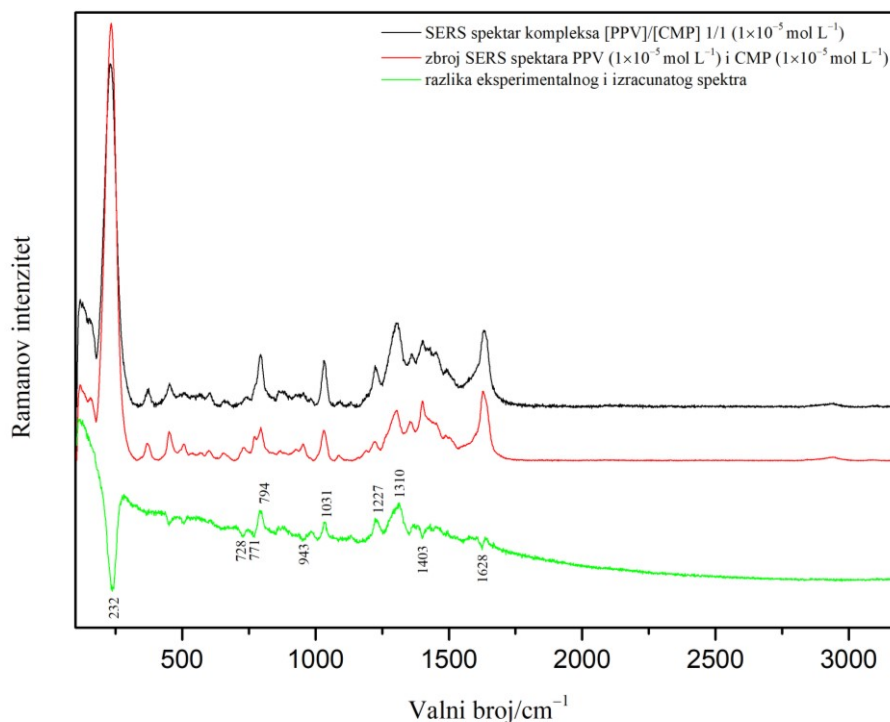


Slika 31. SERS spektar kompleksa [papaverin]/[GMP] 1/1 ($c(\text{papaverin}) = c(\text{GMP}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u koloidnoj suspenziji srebra u prisutnosti agregirajućeg reagensa MgSO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) nakon pobude zračenjem pri 785 nm, spektar zbroja SERS spektara papaverina ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) i GMP ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) te razlika eksperimentalnog i izračunatog spektra. Spektari su razmaknuti zbog preglednosti.

U eksperimentalnom SERS spektru smjese PPV i CMP dominira spektar ribonukleotida. Usporedbom s izračunatim spektrom intenzivnije vrpce CMP opažene su pri 794, 1031, 1227 i 1310 cm^{-1} , te su pripisane redom „disanju“ prstena dušikove baze, istezanju veze C–N između riboze i dušikove baze i isteznoj vibraciji veza N1–C2–N3 prstena. Naprotiv, u SERS spektru kompleksa PPV/CMP vrpce slabijeg intenziteta pri 728, 943, 1403 i 1628 cm^{-1} pripisane su vibracijskim modovima PPV. Važno je istaknuti da u SERS spektru kompleksa

nije opažena vrpca deformacijske vibracije u ravnini prstena PPV i zibanja OCH₃ skupine pri 771 cm⁻¹.

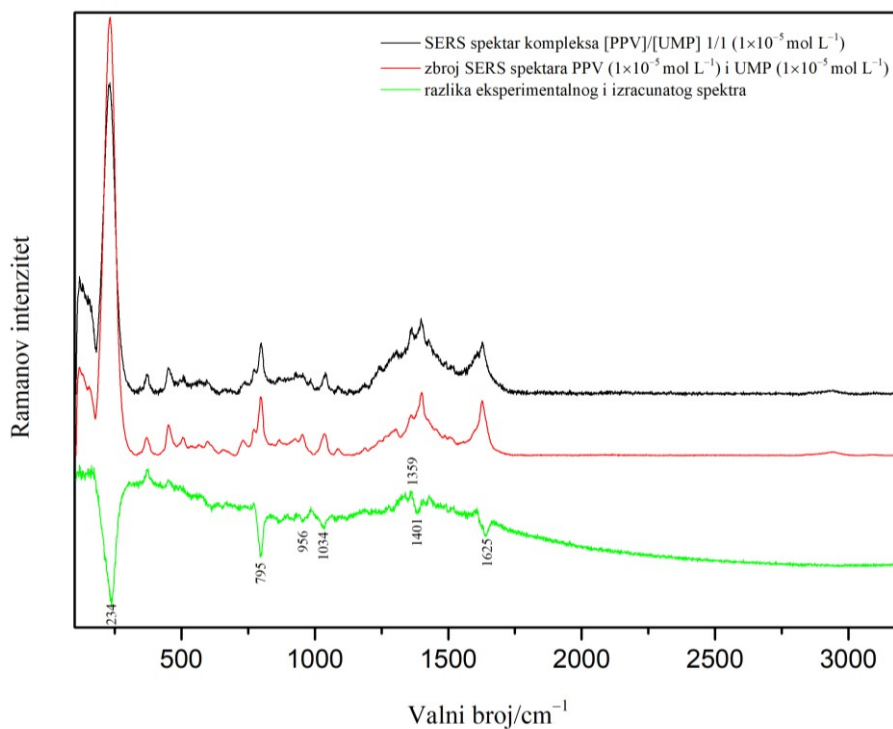
Ekperimentalni spektar kompleksa PPV/CMP ukazuje da se kompleks smješta dušikovom bazom bliže ili povoljnijom orijentacijom površini nanočestica srebra nego PPV. Pri nastajanju kompleksa interakcije između PPV i CMP mogu uključiti π -interakcije slaganja i vodikove veze.



Slika 32. SERS spektar kompleksa [papaverin]/[CMP] 1/1 ($c(\text{papaverin}) = c(\text{CMP}) = 1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) u koloidnoj suspenziji srebra u prisutnosti agregirajućeg reagensa MgSO₄ (0,1 mol L⁻¹) nakon pobude zračenjem pri 785 nm, spektar zbroja SERS spektara papaverina (1×10^{-5} mol L⁻¹) i CMP (1×10^{-5} mol L⁻¹) te razlika eksperimentalnog i izračunatog spektra. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

Usporedbom eksperimentalnog SERS spektra smjese PPV i UMP s izračunatim spektrom smjese, uočen je slabiji intenzitet vrpce pri 795, 1034 i 1630 cm⁻¹, koje potječu od vibracijskih modova UMP, te vrpce pri 956 i 1400 cm⁻¹, koje potječu od izokinolinskog sustava PPV. Veći intenzitet uočen je samo za vrpce pri 1359 cm⁻¹ pripisanu isteznim vibracijama veza C–C i C–N PPV.

Može se pretpostaviti da se nastali kompleks PPV/UMP smješta blizu površine nanočestica srebra izokinolinskim prstenom papaverina. Kompleks najvjerojatnije nastaje uslijed π -interakcija između PPV i UMP, pri čemu ne treba zanemariti i eventualni doprinos vodikovih veza.



Slika 33. SERS spektar kompleksa [papaverin]/[UMP] 1/1 ($c(\text{papaverin}) = c(\text{UMP}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) u koloidnoj suspenziji srebra u prisutnosti agregirajućeg reagensa MgSO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) nakon pobude zračenjem pri 785 nm, spektar zbroja SERS spektara papaverina ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) i UMP ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) te razlika eksperimentalnog i izračunatog spektra. Spektri su razmaknuti zbog preglednosti.

§ 5. ZAKLJUČAK

Istraženo je površinski pojačano Ramanovo raspršenje alkaloida (berberina i papaverina) i ribonukleotida (AMP, GMP, CMP i UMP) te njihovih kompleksa (alkaloid/ribonukleotid 1/1). Kao SERS aktivni supstrat korištene su nanočestice srebra pripravljene redukcijom srebrova(I) nitrata s trinatrijevim citratom, koje su prema potrebi agregirane dodatkom magnezijeva sulfata ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) neposredno prije mjerenja. Sva mjerenja provedena su nakon pobude zračenjem 785 nm .

Snimljeni su i asignirani Ramanovi spektri čvrstih uzoraka i vodenih otopina ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) svih istraživanih spojeva. Ramanovi spektri spojeva u otopini nisu opaženi i odgovaraju spektru otapala (voda), što je posljedica slabe osjetljivosti Ramanove spektroskopije.

Nadalje, snimljeni su koncentracijski ovisni SERS spektri berberina i papaverina (5×10^{-9} – $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) i predloženi mehanizmi adsorpcije istraživanih molekula na površinu nanočestica srebra. Molekule BBR adsorbiraju se na površinu nanočestica srebra uslijed privlačnih elektrostatskih interakcija između pozitivnog naboja na atomu dušika u strukturi BBR te negativnog naboja stabilizirajućeg sloja citratnih iona. Vrpca istezanja veze Ag–N opažena u SERS spektrima BBR ukazuje da pojačanju raspršenog zračenja doprinosi i kemijski mehanizam. Promjene u koncentracijski ovisnim spektrima pripisane su promjeni orijentacije, odnosno položaja molekula BBR na površini nanočestica srebra.

SERS spektri papaverina ukazuju da se molekule PPV adsorbiraju na površinu nanočestica srebra izokinolinskim sustavom. Tome doprinosi nastajanje veze Ag–N između atoma dušika izokinolinskog sustava i površine srebra, ali i privlačne elektrostatske interakcije između negativno nabijenog sloja citratnih iona na površini nanočestica i protoniranih molekula PPV ($\text{pK}_a = 6,4$) u koloidu neutralne pH-vrijednosti. Promjene u koncentracijski ovisnim SERS spektrima PPV posljedica su stoga, ne samo različite orijentacije molekula na površini nanočestica, već i kemijske vrste adsorbirane na površini metala, pri čemu protonirane molekule PPV većim dijelom doprinose spektru pri nižim koncentracijama ($< 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).

SERS spektri purinskih ribonukleotida sugeriraju da se molekule AMP i GMP smještaju dušikovom bazom okomito prema površini nanočestica srebra, pri čemu AMP ostvaruje vezu s površinom najvjerojatnije preko N7 atoma peteročlanog prstena, a GMP preko N1 atoma

šesteročlanog prstena. Pirimidinski ribonukleotidi, CMP i UMP, također su dušikovom bazom orijentirani prema površini nanočestica srebra. CMP vezu sa srebrom ostvaruje preko atoma N3 i kisika C2=O skupine, dok UMP vezu sa srebrom ostvaruje preko dušikova atoma NH skupine i kisika C2=O skupine. U koncentracijski ovisnim SERS spektrima (1×10^{-7} – 1×10^{-4} mol L⁻¹) intenzitet raspršenog zračenja smanjuje se s koncentracijom AMP i GMP te je najveći za najveću mjerenu koncentraciju (1×10^{-4} mol L⁻¹), za razliku od CMP i UMP za koje je najjače Ramanovo raspršenje uočeno za uzorke koncentracije 1×10^{-5} mol L⁻¹, pri kojoj je postignuta optimalna pokrivenost površine nanočestica srebra.

Nadalje, SERS spektroskopijom istraženo je nastajanje kompleksa alkaloida i ribonukleotida pripremljenih u molarnom omjeru [alkaloid]/[ribonukleotid] = 1/1 ($c(\text{alkaloid}) = c(\text{ribonukleotid}) = 1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). Spektri su analizirani na temelju razlike eksperimentalnog SERS spektra kompleksa i izračunatog spektra sume SERS spektara pojedinih molekula. Opažene promjene, većinom intenziteta SERS vrpca, ukazale su na nastanak kompleksa i njegov položaj na površini nanočestica. Tako se nastali kompleksi berberina s AMP, CMP i UMP smještaju berberinom bliže površini srebra, dok spektar kompleksa s GMP ukazuje na povoljniji položaj ribonukleotida na površini metala. Papaverin se izokinolinskim sustavom nalazi bliže površini srebra u kompleksima s AMP i UMP, dok su kompleksi PPV s GMP i CMP dušikovim bazama orijentirani prema metalnim nanočesticama. Iako se može pretpostaviti da kompleksi alkaloida i ribonukleotida nastaju uslijed π -interakcija aromatskih sustava alkaloida i dušikovih baza, vodikovih veza između kisikovih i dušikovih atoma alkaloida i amino ili hidroksilnih skupina ribonukleotida te elektrostatskih interakcija između pozitivnog naboja u strukturi alkaloida i negativno nabijenog fosfata ribonukleotida, uočene spektralne promjene jednoznačno ne upućuju na vrstu interakcije. Za točnije određivanje interakcija potrebno je primijeniti ostale metode strukturne analize, što je izvan opsega istraživanja ovog diplomskog rada.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

AgNP_cit – nanočestice srebra s površinskim slojem citratnih iona

AMP – adenzin-5'-monofosfat

APTMS – (3-aminopropil)trimetoksisilan

as – antisimetrična vibracija

BBV – berberin

CMP – citidin-5'-monofosfat

δ – deformacijska vibracija

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

GMP – gvanozin-5'-monofosfat

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

ip – u ravnini

IR – infracrveno zračenje

λ_{\max} – valna duljina maksimalne apsorpcije

GC-MS – plinska kromatografija spregnuta s spektrometrom masa

LC-MS – tekućinska kromatografija spregnuta s spektrometrom masa

MPTMS – (3-merkaptopropil)trimetoksisilan

v – vibracija istezanja

NIR – blisko infracrveno zračenje

oop – izvan ravnine

PPV – papaverin

RNA – ribonukleinska kiselina

rc – zibanje

s – simetrična vibracija

sc – striženje

SERS – površinski pojačano Ramanovo raspršenje

tw – uvijanje

UMP – uridin-5'-monofosfat

UV – ultraljubičasto zračenje

Vis – vidljivo zračenje

wg – klačenje

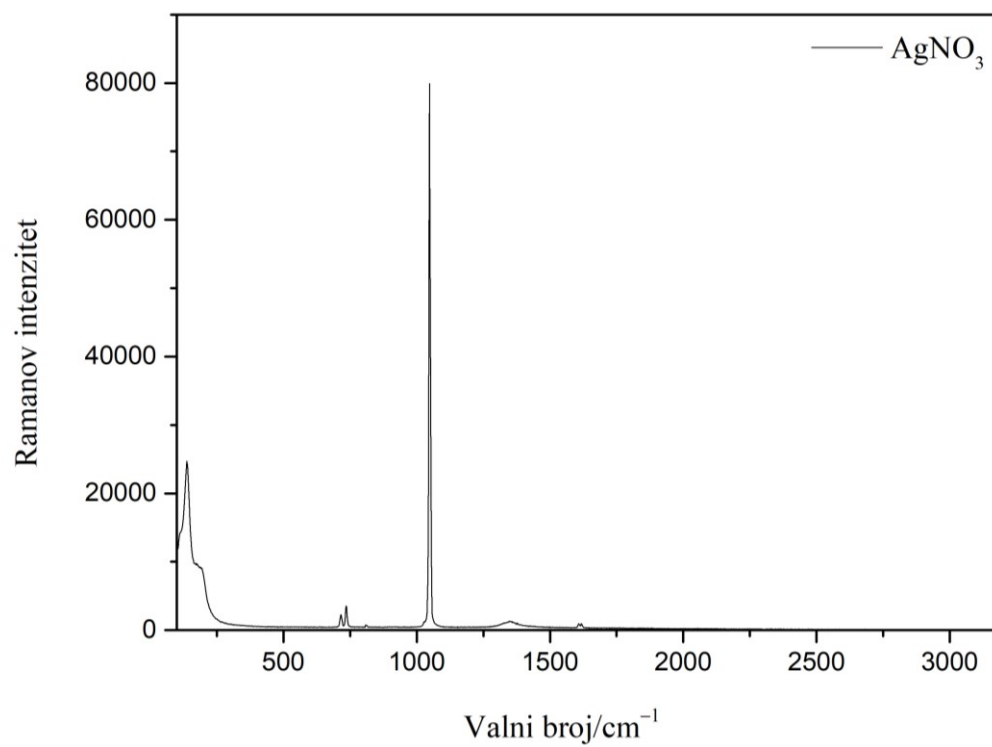
§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. M. Wink, *Diversity* **12** (2020) 175.
2. S. Miljanić, A. Dijanošić, I. Matić, *Spectrochim. Acta A* **137** (2015) 1357–1362.
3. S. Dick, S. E. J. Bell, *Faraday Discuss.* **205** (2017) 517–536.
4. B. P. Kafle, *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry*, Elsevier, Amsterdam, 2019, str. 245–259.
5. E. Smith, G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2005, str. 1–7.
6. R. L. McCreery, *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, Wiley-Interscience, Columbus, 2000, str. 1–5.
7. S. Y. Ding, X. M. Zhang, B. Ren, Z. Q. Tian, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2019, str. 1–34.
8. J. Langer, D. J. de Aberasturi, J. Aizpurua, R. A. Alvarez-Puebla, B. Auguie, J. J. Baumberg, G. C. Bazan, S. E. J. Bell, A. Boisen, A. G. Brolo, J. Choo, D. Cialla-May, V. Deckert, L. Fabris, K. Faulds, F. J. Garcia de Abajo, R. Goodacre, D. Graham, A. J. Haes, C. L. Haynes, M. Kall, J. Kneipp, N. A. Kotov, H. Kuang, E. C. Le Ru, J. F. Li, X. Yi Ling, S. A. Maier, T. Mayerhofer, M. Moskovits, K. Murakoshi, J. M. Nam, S. Nie, Y. Ozaki, I. Pastoriza-Santos, J. Perez-Juste, J. Popp, A. Pucci, S. Reich, B. Ren, G. C. Schatz, T. Shegai, L. L. Tay, K. G. Thomas, Z. Q. Tian, R. P. Van Duyne, T. Vo-Dinh, Y. Wang, K. A. Willets, C. Xu, H. Xu, Y. Xu, Y. S. Sakamoto, B. Zhao, L. M. Liz-Marzan, *ACS Nano* **14** (2020) 28–117.
9. R. Pilot, R. Signorini, C. Durante, L. Orian, M. Bhamidipati, L. Fabris, *Biosensors* **9** (2019) 57.
10. S. Schückler, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2011.
11. <https://www.nikalyte.com/applications-of-nanoparticles/> (datum pristupa 25. lipnja 2022.)
12. S. Schückler, *Angew. Chem* **53** (2014) 2–42.
13. P. A. Mosier-Boss, *Nanomaterials* **7** (2017) 142–171.
14. P. C. Lee, D. Meissel, *J. Phys. Chem.* **86** (1982) 3391–3395.

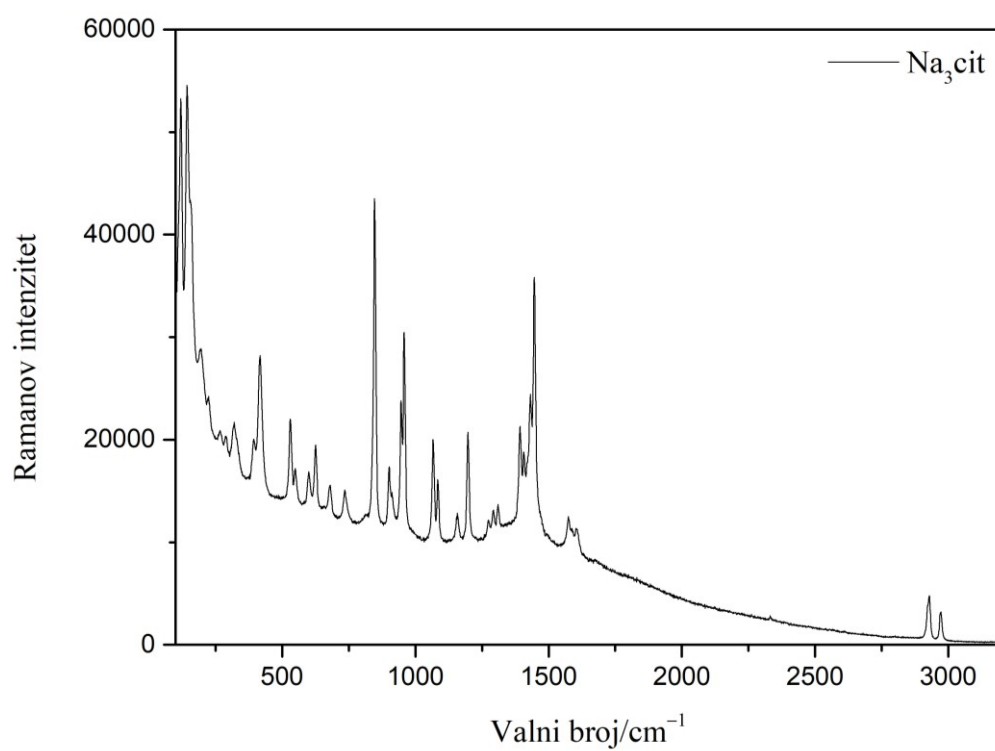
15. C. H. Munro, W. E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, P.C. White, *Langmuir* **11** (1995) 3712–3720.
16. A. Byju Thomas, S. Deshkar, L. Kothapalli, S. Kamble, S. Chitlange, *Istanbul J Pharm* **51** (2020) 141–153.
17. A. Rauf, T. Abu-Izneid, A. A. Khalil, M. Imran, Z. A. Shah, T. B. Emran, S. Mitra, Z. Khan, F. A. Alhumaydhi, A. S. M. Aljohani, I. Khan, M. M. Rahman, P. Jeandet, T. A. Gondal, *Molecules* **26** (2021) 7368.
18. T. Behl, S. Singh, N. Sharma, I. Zahoor, A. Albarrati, M. Albratty, A. M. Meraya, A. Najmi, S. Bungau, *Molecules* **27** (2022) 3705.
19. M. V. Canamares, J. R. Lombardi, M. Leona, *J. Raman Spectrosc.* **39** (2008) 1907-1914.
20. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Papaverine> (datum pristupa 3. srpnja 2022.)
21. D. A. Gomes, A. M. Joubert, M. H. Visagie, *Molecules* **26** (2021) 6388.
22. M. Milusheva, V. Gledacheva, M. Batmazyan, S. Nikolova, I. Stefanova, D. Dimitrova, K. Saracheva, D. Tomov, V. Chaova-Gizdakova, *Sci. Pharm.* **90** (2022) 37.
23. M. Valipour, H. Irannejad, S. Emami, *Drug Dev Res.* (2022) 1–5.
24. R. Y. Mirsafavi, K. Lai, N. D. Kline, A. W. Fountain, M. Moskovits, *Anal. Chem.* **89** (2017) 1684–1688.
25. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Springer Nature, New York, 2005, str. 273–302.
26. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 107–111.
27. <https://www.yourgenome.org/stories/the-discovery-of-dna> (datum pristupa 29. lipnja 2022.)
28. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/discovery-of-dna-structure-and-function-watson-397> (datum pristupa 29. lipnja 2022.)
29. S. E. J. Bell, N. M. S. Sirimuthu, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 15580–15581.
30. N. D. Strekal, I. G. Motevich, J. W. Nowicky, S. A. Maskevich, *J. Appl. Spectrosc.* **74** (2007) 31–37.
31. M. Leona, J. R. Lombardi, *J. Raman Spectrosc.* **38** (2007) 853–858.
32. N. Leopold, J. R. Baena, M. Bolboaca, O. Cozar, W. Kiefer, B. Lendl, *Vib. Spectrosc.* **36** (2004) 47–55.

33. S. Cinta Pinzaru, N. Leopold, I. Pavel, W. Kiefer, *Spectrochim. Acta, Part A* **60** (2004) 2021–2028.
34. S. Miljanić, M. Ratkaj, I. Avdejev, K. Meglič, A. Kendel, *Croat. Chem. Acta* **88** (2015) 387–396.
35. E. Papadopoulou, S. E. J. Bell, *J. Phys. Chem.* **114** (2010) 22644–22651.
36. K-H. Cho, S-W. Joo, *Bull. Korean Chem. Soc.* **29** (2008) 69–75.
37. S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, *J. Raman Spectrosc.* **29** (1998) 365–371.
38. K. Nakamoto, M. Tsuboi, G. Strahan, *Drug-DNA Interactions, Structures and Spectra*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2008, str. 42–59
39. C. Otto, T. J. J. van den Tweel, F. F.M. de Mul, J. Greve, *J. Raman Spectrosc.* **17** (1986) 289–298.
40. Md. Maidul Islam, G. Suresh Kumar, *J. Mol. Struct.* **875** (2008) 382–391.
41. G. Suresh Kumar, *J. Biosci.* **37** (2012) 539–552.
42. S. Miljanić, A. Dijanošić, I. Piantanida, Z. Meić, M. T. Albelda, A. Sornosa-Ten, E. Garcia-Espana, *Analyst* **126** (2011) 3185–3193.

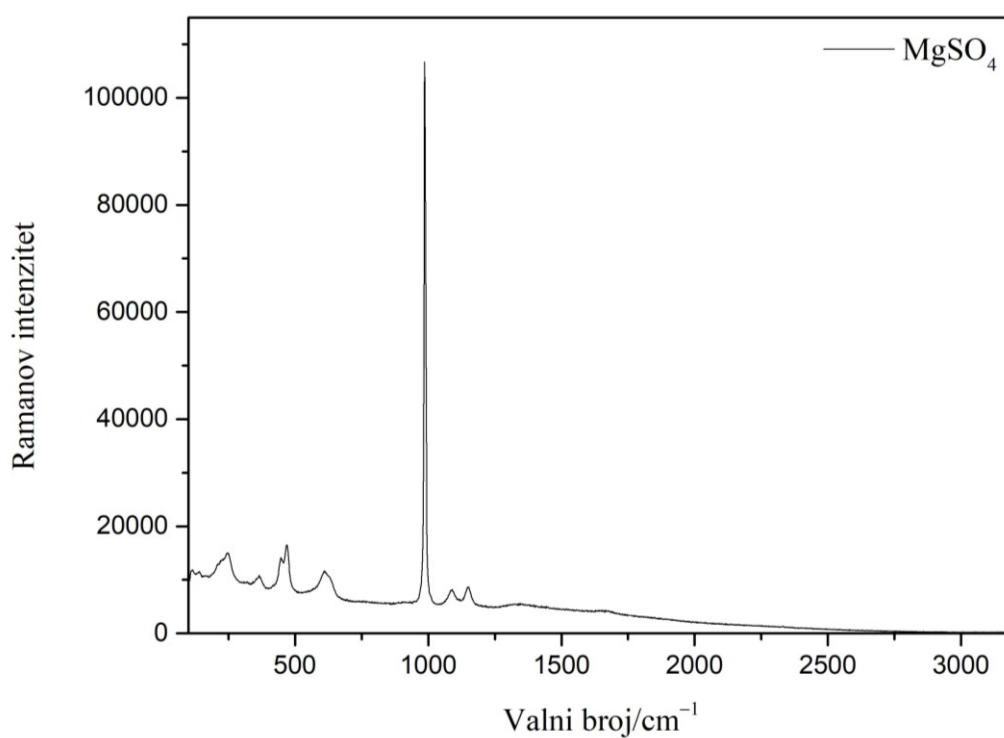
§ 8. DODATAK



Slika D1. Ramanov spektar čvrstog uzorka srebrova nitrata pri valnoj doljini pobude 785 nm i snazi lasera 3 mW.



Slika D2. Ramanov spekter čvrstog uzorka trinatrijeva citrata pri valnoj duljini pobude 785 nm i snazi lasera 300 mW.



Slika D3. Ramanov spektar čvrstog uzorka magnezijeva sulfata pri valnoj doljini pobude 785 nm i snazi lasera 150 mW.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Patricia Tikvenjak

Datum rođenja: 09. studeni 1998.

Mjesto rođenja: Zabok

Obrazovanje

2005–2013	Osnovna škola Stjepana Radića, Brestovec Orehovički
2013–2017	Gimnazija Antuna Gustava Matoša, Zabok
2017–2020	Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2020-	Diplomski sveučilišni studij Kemija; smjer: istraživački (grane: Analitička kemija i Biokemija), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2018	Otvoreni dan Kemijskog odsjeka
2021	Dan karijera na PMF-u: WISE (WorkIn' Science)