



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Marina Ratkaj

**PRIMJENA SPEKTROSKOPIJE POVRŠINSKI
POJAČANOG RAMANOVOG RASPRŠENJA U
ISTRAŽIVANJU FARMACEUTSKI AKTIVNIH
TVARI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Marina Ratkaj

**APPLICATION OF SURFACE-ENHANCED RAMAN
SCATTERING SPECTROSCOPY IN RESEARCH
OF PHARMACEUTICALLY ACTIVE SUBSTANCES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Marina Ratkaj

**PRIMJENA SPEKTROSKOPIJE POVRŠINSKI
POJAČANOG RAMANOVOG RASPRŠENJA U
ISTRAŽIVANJU FARMACEUTSKI AKTIVNIH
TVARI**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Dr. sc. Snežana Miljanić, doc.

Zagreb, 2013.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Marina Ratkaj

APPLICATION OF SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING SPECTROSCOPY IN RESEARCH OF PHARMACEUTICALLY ACTIVE SUBSTANCES

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Dr. Snežana Miljanić, Asst. Prof.

Zagreb, 2013.

Zahvala

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Snežani Miljanić na sjajnom vodstvu, savjetima i pomoći koje mi je ukazala pri izradi ove disertacije.

Veliko hvala prof. dr. sc. Ernestu Meštroviću na pruženoj mogućnosti za izradu doktorskog rada, ukazanom povjerenju i stalnom poticaju.

Hvala dr. sc. Tomislavu Biljanu na idejama i stručnoj pomoći.

Hvala svim kolegama u PLIVI na korisnim raspravama, prenesenim iskustvima i savjetima.

Posebno hvala Edislavu za sve skuhanе kavice, post-it planove i poticajnu radnu atmosferu.

Hvala Frani za sve pohode na referadu.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci.

Najveće hvala Josipu na bezgraničnoj potpori, razumijevanju i ljubavi koju mi je pružio tijekom izrade ovog rada.

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	X
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Ramanova spektroskopija	3
2.2. Površinski pojačano Ramanovo raspršenje	5
2.2.1. Elektromagnetski mehanizam pojačanja	6
2.2.1.1. Rezonancija lokaliziranog površinskog plazmona	6
2.2.1.2. Faktor pojačanja	8
2.2.1.3. Utjecaj udaljenosti između molekule i metalne površine	10
2.2.1.4. Utjecaj pobudnog zračenja	11
2.2.2. Mehanizam prijenosa naboja.....	12
2.2.3. SERS supstrati.....	12
2.2.3.1. Priprema, karakterizacija i stabilnost koloida metala.....	13
2.2.3.2. Agregacija metalnih nanočestica u koloidnoj suspenziji	15
2.2.3.3. Bimetalni koloidi	15
2.3. Primjena površinski pojačanog Ramanovog raspršenja	16
2.3.1. Primjena SERS spektroskopije u biologiji i biokemiji	16
2.3.2. Primjena SERS spektroskopije u ekologiji i forenzici.....	17
2.3.3. Primjena SERS spektroskopije u istraživanju farmaceutski aktivnih tvari.....	18
2.4. Farmaceutski aktivne tvari odabrane za istraživanje.....	23
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	31
3.1. Kemikalije	31
3.2. SERS supstrati	32
3.2.1. Koloid srebra 1	32
3.2.2. Koloid srebra 2	34
3.2.3. Koloid zlata	35

3.2.4. Koloid bakra	37
3.2.5. Bimetalni koloid srebra i zlata.....	38
3.2.6. Koloid srebra funkcionaliziran nukleotidom	40
3.2.7. Zlatna pločica Klarite	42
3.2.8. Monokristal srebra.....	42
3.3. Priprava otopina i mjernih uzorka	42
3.3.1. Priprava otopina.....	42
3.3.2. Priprava derivata pregabalina	43
3.3.2.1. Priprava derivata pregabalina s fluorescaminom	43
3.3.2.2. Priprava derivata pregabalina s 2-iminotiolanom	43
3.3.3. Priprava mjernih uzoraka u koloidnim suspenzijama	44
3.3.4. Priprava mjernih uzorka na metalnim površinama	44
3.4. Mjerni uređaji i metode	45
3.4.1. Ramanova spektroskopija pri 1064 nm.....	45
3.4.2. Ramanova spektroskopija pri 785 nm.....	45
3.4.3. Ramanova spektroskopija pri 514 nm.....	45
3.4.4. UV/Vis spektrofotometrija	46
3.4.5. Mjerenje pH	46
3.4.6. Difrakcija rendgenskih zraka na polikristalnom uzorku	46
3.4.7. Nuklearna magnetska rezonancija.....	46
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	47
4.1. Entakapon	47
4.1.1. Ramanov spektar entakapona E.....	47
4.1.2. SERS spektri entakapona na metalnim površinama	49
4.1.3. SERS spektri entakapona na metalnim koloidima	51
4.1.4. Kvantitativna analiza izomera entakapona	57
4.1.4.1. Stabilnost izomera entakapona u otopini	57
4.1.4.2. Ramanovi spektri i SERS spektri izomera entakapona	58

4.1.4.3. Pouzdanost kvantitativnih SERS rezultata	61
4.1.4.4. Kvantitativna analiza	63
4.2. Sulfatiazol	65
4.2.1. Ramanov spektar sulfatiazola	65
4.2.2. SERS spektri sulfatiazola na metalnim koloidima	67
4.2.3. SERS spektar sulfatiazola na površini zlata	74
4.3. Skupina aktivnih farmaceuthkih tvori s tiolnom skupinom	77
4.3.1. Acetilcistein.....	77
4.3.1.1. Ramanovi spektri acetilcisteina	77
4.3.1.2. SERS spektri acetilcisteina.....	80
4.3.2. Cistein	82
4.3.2.1. Ramanovi spektri cisteina	82
4.3.2.2. SERS spektri cisteina.....	85
4.3.3. Glutation	88
4.3.3.1. Ramanovi spektri glutaciona	88
4.3.3.2. SERS spektri glutaciona.....	91
4.3.4. Usporedba aktivnih tvori u skupini.....	93
4.4. Pregabalin.....	94
4.4.1. Ramanov spektar pregabalina	94
4.4.2. Derivatizacija pregabalina fluorescaminom	96
4.4.3. Derivatizacija pregabalina 2-iminotiolanom.....	97
4.4.3.1. Ramanov spektar derivata pregabalina s 2-iminotiolanom.....	99
4.4.3.2. SERS spektar derivata pregabalina s 2-iminotiolanom	101
§ 5. ZAKLJUČAK.....	103
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	104
§ 7. LITERATURNI IZVORI	105
§ 8. DODATAK	XI
§ 9. ŽIVOTOPIS.....	XV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

PRIMJENA SPEKTROSKOPIJE POVRŠINSKI POJAČANOG RAMANOVOG RASPRŠENJA U ISTRAŽIVANJU FARMACEUTSKI AKTIVNIH TVARI

Marina Ratkaj

Istraživanje i razvoj, PLIVA Hrvatska d.o.o., Prilaz baruna Filipovića 29, 10000 Zagreb, Hrvatska

Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS) primijenjena je pri istraživanju sljedećih farmaceutski aktivnih tvari: entakapona, sulfatiazola, acetilcisteina, cisteina, glutationa i pregabalina. Pojačanje raspršenja zračenja entakapona i sulfatiazola istraživano je na površinama pripremljenih koloida srebra, zlata i bakra te komercijalno dostupne zlatne pločice *Klarite* i valjkastog monokristala srebra. SERS spektri ukazali su na različite načine adsorpcije farmaceutskih analita na metal, ovisno o strukturi molekule, okruženju i svojstvima metalnog supstrata. Pomoću zlatne pločice razvijena je SERS metoda za kvantitativno određivanje izomera entakapona u smjesi izomera *E* i *Z* u koncentracijskom području 1×10^{-5} – 1×10^{-3} mol dm⁻³. Raspršenje analita s tiolnom skupinom u strukturi istraženo je na pripremljenom bimetalnom koloidu srebra i zlata te nukleotidom funkcionaliziranom koloidu srebra. Različiti faktori pojačanja strukturno sličnih molekula, acetilcisteina (10^4), cisteina (10^5) i glutationa (10^3), pripisani su strukturom uvjetovanoj dostupnosti tiolne skupine za vezanje s površinom metala. U svrhu adsorpcije na metal i opažanja raspršenog zračenja, molekula pregabalina modificirana je s fluorescaminom i 2-iminotiolanom. Razvijena je SERS metoda za detekciju sintetiziranog derivata pregabalina s 2-iminotiolanom, te posredno pregabalina, na koloidu srebra pri niskim koncentracijama, do 9×10^{-7} mol dm⁻³. Primjena SERS spektroskopije rezultirala je razvojem osjetljivih i brzih metoda za identifikaciju, detekciju i kvantifikaciju različitih farmaceutski aktivnih sastojaka.

(XVI + 112 stranica, 62 slike, 12 tablica, 137 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102A, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: farmaceutski aktivne tvari / metalni supstrati / površinski pojačano Ramanovo raspršenje

Mentor: Dr. sc. Snežana Miljanić, doc., PMF

Ocjenitelji: Dr. sc. Ernest Meštrović, zn. savj., PLIVA i nasl. red. prof., PMF
Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof., PMF
Dr. sc. Snežana Miljanić, doc., PMF

Zamjena: Dr. sc. Goran Baranović, zn.savj., IRB

Rad prihvaćen: 04. prosinca 2013.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

APPLICATION OF SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING SPECTROSCOPY IN RESEARCH OF PHARMACEUTICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Marina Ratkaj

Research and development, PLIVA Croatia Ltd., Prilaz baruna Filipovića 29, 10000 Zagreb, Croatia

Surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy was applied in a research of the following pharmaceutically active substances: entacapone, sulfathiazole, acetylcysteine, cysteine, glutathione and pregabalin. An enhancement of scattered radiation of entacapone and sulfathiazole was studied on surfaces of the prepared silver, gold and copper colloids, as well as on the commercially available gold plate *Klarite* and cylindrical silver single crystal. The SERS spectra indicated different ways of adsorption of pharmaceutical analytes on the metal, depending on the structure of the molecules, the environment and the properties of the metal substrate. Using the golden plate a SERS method for quantitative determination of an entacapone isomer in a mixture of *E* and *Z* isomers in the concentration range 1×10^{-5} – 1×10^{-3} mol dm⁻³ was developed. Scattering of analytes with the thiol group in the structure was investigated using the prepared bimetallic colloid of silver and gold and the nucleotide-functionalized silver colloid. Various enhancement factors for structurally similar molecules, acetylcysteine (10^4), cysteine (10^5) and glutathione (10^3), were attributed to the structure-conditioned availability of the thiol group for attachment to the metal surface. In order to facilitate adsorption onto the metal and observe scattered radiation, the pregabalin molecule was modified with fluorescamine and 2-iminothiolane. A SERS method for detection of the synthesized 2-iminothiolane derivative of pregabalin, and indirectly pregabalin, on the colloid silver at concentrations as low as 9×10^{-7} mol dm⁻³ was developed. Application of SERS spectroscopy resulted in the development of sensitive and rapid methods for the identification, detection and quantification of various pharmaceutically active ingredients.

(XVI + 112 pages, 62 figures, 12 tables, 137 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: pharmaceutically active substances / metal substrates / surface-enhanced Raman scattering.

Supervisor: Dr. Snežana Miljanić, Asst. Prof., PMF

Reviewers: Dr. Ernest Meštrović, Scientific Advisor, PLIVA and Full Prof., PMF
Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Full Prof., PMF
Dr. Snežana Miljanić, Asst. Prof., PMF

Substitute: Dr. Goran Baranović, Scientific Advisor, IRB

Thesis accepted: December 4th 2013

§ 1. UVOD

Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (*surface-enhanced Raman scattering*, SERS) metoda je koja se razvija posljednjih tridesetak godina, a zahvaljujući vrlo visokoj osjetljivosti nalazi svoju primjenu u brojnim područjima kao što su kemijska i biokemijska analiza, medicina, forenzika i arheologija.^{1,2} SERS spektroskopijom opaža se vibracijski spektar karakterističan za molekulu smještenu na ili vrlo blizu metalne, nanostrukturirane površine. Ramanovo raspršenje molekula može se površinski pojačati i do 10^6 puta, a ukoliko se radi o kombinaciji površinskog pojačanja s pojačanjem koje nastaje uslijed rezonancije energije zračenja koju analit apsorbira i energije pobudnog zračenja (*surface-enhanced resonance Raman scattering*, SERRS), faktor ukupnog pojačanja može iznositi i 10^{14} puta, što u konačnici omogućuje detekciju jedne molekule analita.^{3,4}

Zahvaljujući detekciji analita pri iznimno niskim koncentracijama i sve dostupnijim i bolje karakteriziranim supstratima, SERS spektroskopija sve se češće primjenjuje i u farmaceutici.^{5,6} Trend u farmaceutskoj industriji je proizvodnja učinkovitih lijekova s minimalnim nuspojavama, radi čega se nove aktivne tvari često primjenjuju u vrlo malim dozama (primjerice 100 mg aktivnog sastojka u tableti, što iznosi oko 10% mase). Tako male količine aktivnog sastojka svakako su izazov analitičkim metodama s obzirom na zahtjev za brzom identifikacijom aktivne tvari i mogućih onečišćenja, određivanjem raspodjele tvari u tableti i utvrđivanjem interakcija aktivne tvari s pomoćnim tvarima. Također, sve prisutnija procesna analitička tehnologija zahtjeva brzo i učinkovito praćenje sinteze aktivnih sastojaka koje uključuje određivanje sadržaja i onečišćenja te praćenje tijeka reakcije. Analize konvencionalnim kromatografskim (HPLC) i spektroskopskim metodama često nisu jednostavne, te osjetljivost, selektivnost i brzina SERS spektroskopije ukazuju na potencijalnu uspješnu primjenu ove metode.^{5,6}

Važan aspekt istraživanja farmaceutski aktivnih tvari SERS spektroskopijom je i otkrivanje načina adsorpcije farmaceutskog analita na supstrat, s obzirom na moguću korelaciju interakcija s biološkim supstratom i spoznaje o mehanizmu biološkog djelovanja.^{2,6}

Primjena SERS spektroskopije u farmaceutskoj industriji u smislu alternative HPLC metodama ili standardnim spektroskopskim tehnikama za kvalitativno i kvantitativno praćenje kemijskih reakcija ili analize gotovih proizvoda prisutna je u literaturi u manjoj mjeri, iz razloga što metoda još uvijek zahtjeva pronalaženje i ugađanje sustava analizirane tvari i odgovarajućeg supstrata.

Svrha ovog rada je istraživanje aktivnih farmaceutskih sastojaka spektroskopijom površinski pojačanog Ramanovog raspršenja, usmjereno na razvoj osjetljivih i brzih SERS metoda za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju različitih farmaceutskih tvari. Pri tome će se istražiti strukturno različite aktivne tvari: entakapon, sulfatiazol, acetilcistein, cistein, glutation i pregabalin, adsorbirane na pripravljene i komercijalno dostupne SERS supstrate. U svrhu opažanja raspršenog zračenja analita koji se ne vežu na uobičajene metalne supstrate, analiti će se derivatizirati, a površine metala modificirati.

Pojačanje raspršenja zračenja entakapona i sulfatiazola istražiti će se na površinama pripremljenih koloida srebra, zlata i bakra te komercijalno dostupne zlatne pločice *Klarite* i valjkastog monokristala srebra, a u svrhu razvoja visoko osjetljivih identifikacijskih i kvantifikacijskih metoda, kao i stjecanje uvida u mehanizam adsorpcije odabranih analita na različite površine metala.

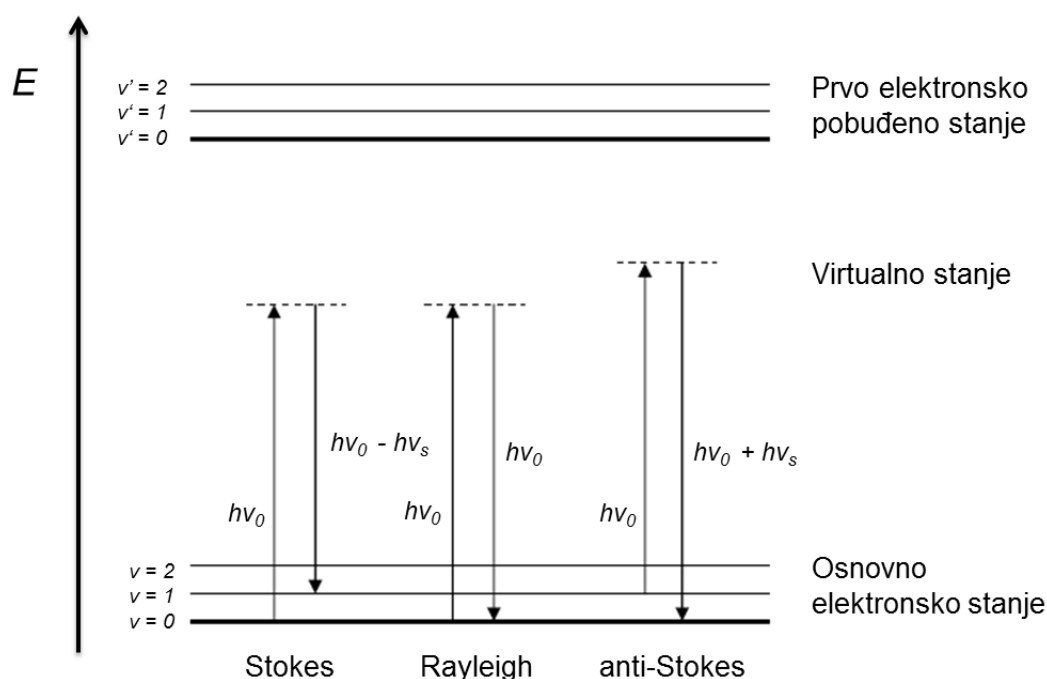
Raspršenje analita s tiolnom skupinom u strukturi istražiti će se na pripremljenom bimetalnom koloidu srebra i zlata te nukleotidom funkcionaliziranom koloidu srebra. Tijekom razvoja metode za identifikaciju strukturno sličnih tiolnih molekula, izračunat će se faktori pojačanja pojedinog metalnog supstrata te istražiti utjecaj strukture analita na vezanje s površinom metala.

Molekula pregabalina modificirati će se fluorescaminom i 2-iminotiolanom. Površinski pojačano Ramanovo raspršenje derivata istražiti će se na koloidu srebra u svrhu posredne identifikacije pregabalina pri niskim koncentracijama

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Ramanova spektroskopija

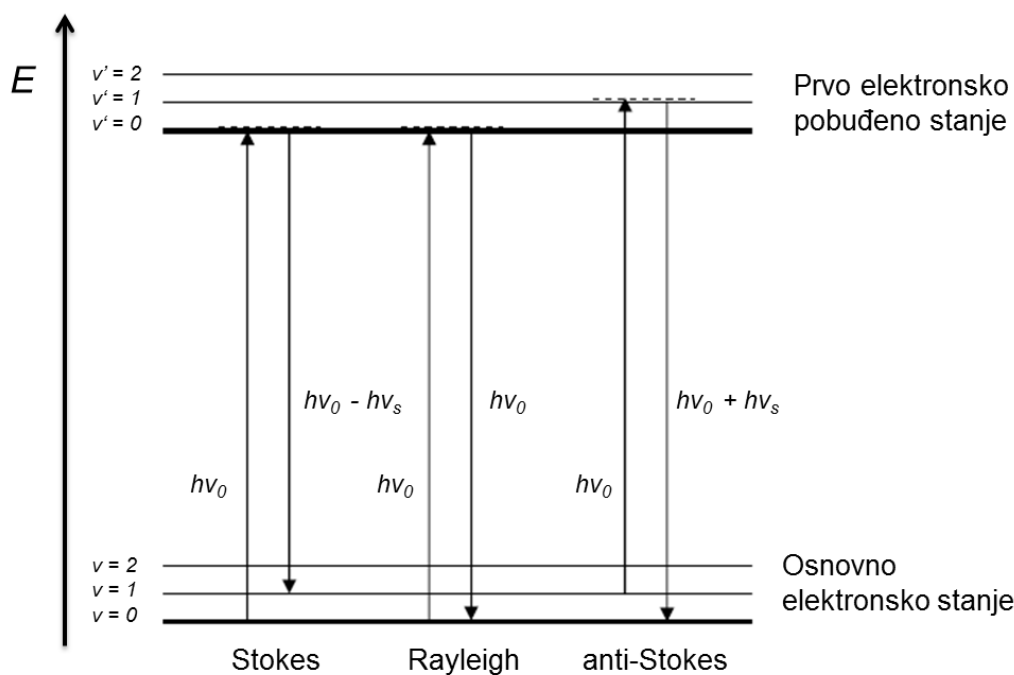
Ramanova spektroskopija temelji se na neelastičnom raspršenju elektromagnetskog zračenja uslijed njegove interakcije s vibracijskim modovima molekule.^{7,8} Vibracije dozvoljene u Ramanovom spektru one su pri kojima se mijenja polarizabilnost molekule. Ukoliko se uzorak ozrači monokromatskim zračenjem, zračenje se raspršuje na načine prikazane na slici (Slika 1). Rayleighovo raspršenje podrazumijeva elastično raspršenje zračenja pri kojem su frekvencije pobudnog i raspršenog zračenja jednake. Ramanovo raspršenje je neelastično raspršenje pri kojem se frekvencija raspršenog zračenja razlikuje od frekvencije pobudnog zračenja. Ukoliko se molekule nakon pobude u virtualno stanje vraćaju u viši vibracijski nivo osnovnog elektronskog stanja, emitirani foton manje je frekvencije od pobudnog te se pojava naziva Stokesovo raspršenje. Pri anti-Stokesovom raspršenju frekvencija emitiranog fotona veća je od frekvencije pobudnog fotona, budući se molekule pobuđene u virtualno stanje iz početnog, višeg vibracijskog nivoa, vraćaju u niži vibracijski nivo osnovnog elektronskog stanja.



Slika 1. Mehanizmi različitih procesa raspršenja svjetla.

Proces Ramanovog raspršenja manje je vjerojatan od elastičnog Rayleighovog raspršenja jer se tek jedan od 10^6 – 10^8 fotona neelastično raspršuje. Također, prema Boltzmannovoj raspodjeli, pri sobnoj temperaturi većina molekula u osnovnom je elektronskom stanju, dok je vrlo mali broj molekula u pobuđenom stanju odnosno višim nivoima osnovnog stanja. Ramanov proces koji se temelji na Stokesovom neelastičnom raspršenju tako je pri sobnoj temperaturi vjerojatniji od anti-Stokesovog procesa.

U slučaju da je energija upadnih (i raspršenih) fotona bliska energiji elektronskih prijelaza u molekuli, zračenje se rezonantno raspršuje. Virtualno stanje tada rezonira s jednim od realnih elektronskih stanja molekule što rezultira pojačanjem raspršenja s molekule za nekoliko redova veličine. Rezonantno Ramanovo raspršenje može se opaziti za bilo koju molekulu koja apsorbira zračenje valne duljine koje je jednaka ili bliska valnoj duljini pobudnog zračenja lasera (Slika 2).



Slika 2. Dijagram procesa rezonantnog Ramanovog raspršenja.

Ukoliko je energija pobudnog zračenja dovoljna za prijelaz između elektronskih stanja, pobudno zračenje se apsorbira. Pri povratku u osnovno elektronsko stanje, osim gubitka energije otpuštanjem topline, pojedine molekule mogu emitirati zračenje. Fluorescencija kao način deaktivacije molekule iz pobuđenog u osnovno stanje vrlo često zasjenjuje Stokesovo raspršenje.

2.2. Površinski pojačano Ramanovo raspršenje

Jedan od najvećih nedostataka Ramanove spektroskopije je slaba osjetljivost metode. Povećanje intenziteta Ramanovog raspršenja može se postići rezonantnom pobudom te površinskim pojačanjem. Rezonantno raspršeno zračenje intenzivnije je od normalnog Ramanovog raspršenja 10^2 do 10^4 puta, a koristi se pri istraživanju različitih tvari među kojima i biološki važnih molekula, stanica i virusa. Međutim, za postizanje rezonancije koriste se laseri zračenja manjih valnih duljina od uobičajenog za Ramanovu spektroskopiju, vidljivog i bliskog infracrvenog zračenja. Laseri velike energije, posebice one ultraljubičastog dijela spektra, mogu uzrokovati raspad uzorka te pojavu fluorescencije.⁹

Drugi način povećanja osjetljivosti proizlazi iz efekta pojačanja raspršenog zračenja molekula analita koje se nalaze u neposrednoj blizini površine metalnih nanostrukture. Efekt površinski pojačanog Ramanovog raspršenja otkrili su Fleischmann, Hendra i McQuillan 1974. godine.^{10,11} Primijećeno je naime da je Ramanov spektar molekule piridina adsorbirane na srebrnoj elektrodi neobično visokog intenziteta. Teorijsko objašnjenje fenomena ubrzo su ponudili Jeanmaire i Van Duyne,¹² te Albrecht i Creighton.¹³

Od otkrića pojačanja raspršenog zračenja molekule na površini metala istraživanje površinski pojačanog Ramanovog raspršenja proširilo se, uz srebro, i na druge metale, primjerice zlato, bakar, platinu, aluminij i alkalijske metale, te se zajedno sa srodnom granom plazmonike značajno razvilo. Najvažniji razlog za razvoj SERS tehnike upravo je njena primjenjivost u različitim granama prirodnih znanosti. Pojačanjem intenziteta raspršenog zračenja molekule na metalnom supstratu povećava se osjetljivost Ramanove spektroskopije i omogućava strukturna analiza molekula na temelju vibracijskog spektra. Budući spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja uz izuzetnu osjetljivost pruža i informacije o strukturi molekula, ona je idealna detekcijska tehnika za istraživanje različitih kemijskih i bioloških sustava. Dodatna prednost SERS spektroskopije je i gašenje fluorescencije molekula blizu metalne površine, uslijed prijenosa energije s molekule na metal.²

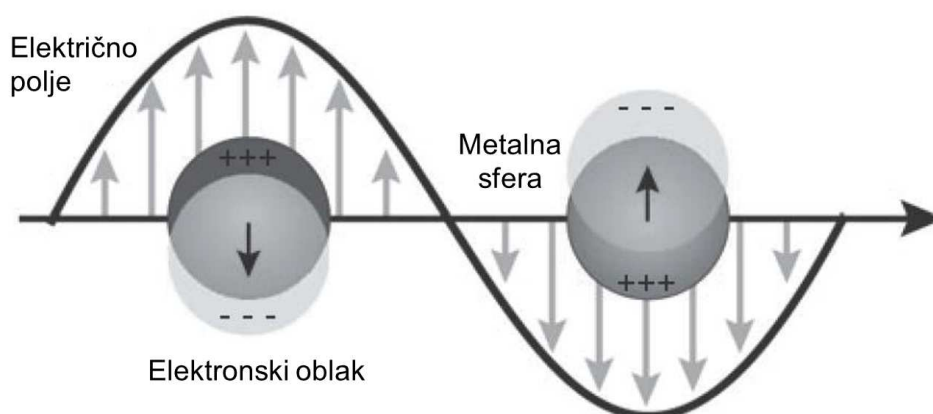
Iako je površinski pojačano Ramanovo raspršenje prilično opsežno i vrlo aktivno područje istraživanja, sam mehanizam pojačanja raspršenog zračenja još uvijek nije sasvim razjašnjen. Postoje dvije opće prihvaćene teorije koje objašnjavaju fenomen pojačanja raspršenja: elektromagnetski mehanizam i mehanizam prijenosa naboja, pri čemu se smatra da elektromagnetsko pojačanje značajnije doprinosi ukupnom pojačanju.¹

2.2.1. Elektromagnetski mehanizam pojačanja

Prilikom interakcije elektromagnetskog vala s metalnom površinom, jakost polja na površini drugačija je od jakosti polja udaljenog od površine. Ukoliko je površina metala nepravilna, zračenje može pobuditi lokalizirane površinske plazmone, što rezultira pojačanjem elektromagnetskog polja u blizini površine. Pod pretpostavkom da se pojačava jakost upadnog i raspršenog zračenja (dakako različitih valnih duljina), moguće je opaziti vrlo visoki intenzitet Ramanovog raspršenja. Pojačanje signala koje proizlazi iz pojačanja polja pobudnog i raspršenog zračenja osnova je teorije elektromagnetskog mehanizma.³

2.2.1.1. Rezonancija lokaliziranog površinskog plazmona

Rezonancijom oscilacija valentnih elektrona metalnih nanočestica s frekvencijom pobudnog zračenja nastaju lokalizirani površinski plazmoni (Slika 3).



Slika 3. Lokalizirani površinski plazmoni.³

Razumijevanje karakterističnog ekstinkcijskog spektra (apsorpcija i raspršenje) metalne nanočestice može biti vrlo složeno s obzirom da na njegov intenzitet i položaj utječu dielektrično okruženje te veličina i oblik nanočestice. Značajke lokaliziranih površinskih plazmona koje izravno utječu na elektromagnetsko pojačanje mogu se razmotriti kvazistatičnim pristupom koristeći sfernu nanočesticu radijusa a , izložene zračenju valne duljine λ polariziranom u smjeru osi z , pri čemu je dugovalna granica $a/\lambda < 0,1$. Pri navedenim uvjetima pretpostavlja se da je električno polje oko metalne nanočestice jednoliko.

Rješenje Laplacove jednadžbe za jakost polja oko nanočestice je:

$$E_v(x, y, z) = E_0 \hat{z} - \alpha E_0 \left[\frac{\hat{z}}{r^3} - \frac{3z}{r^5} (x\hat{x} + y\hat{y} + z\hat{z}) \right] \quad (1)$$

pri čemu su x, y i z Kartezijeve koordinate, r je radijalna udaljenost, $\hat{x}, \hat{y}, \hat{z}$ su Kartezijevi jedinični vektori, a α je polarizabilnost metala izražena kao:

$$\alpha = ga^3 \quad (2)$$

a g je definiran s:

$$g = \frac{\varepsilon_u - \varepsilon_v}{(\varepsilon_u + 2\varepsilon_v)} \quad (3)$$

ε_u je dielektrična konstanta metalne nanočestice, dok je ε_v dielektrična konstanta vanjskog okruženja. Pojačanje ovisi o valnoj duljini, budući su realni dijelovi dielektrične konstante metalne nanočestice njena funkcija. Polje se pojačava kako se nazivnik u izrazu 3 približava nuli ($\varepsilon_u \approx -2\varepsilon_v$). Također, iz jednadžbe 1 proizlazi kako se pojačanje polja smanjuje s r^{-3} , što znači da postoji konačni volumen oko nanočestice unutar kojeg se postiže pojačanje.³

Prema Mie teoriji ekstinkcijski spektar $E(\lambda)$ nanočestice proizvoljnog oblika opisan je sljedećim izrazom:

$$E(\lambda) = \frac{24\pi^2 Na^3 \varepsilon_v^{3/2}}{\lambda \ln(10)} \left[\frac{\varepsilon_i(\lambda)}{(\varepsilon_r(\lambda) + \chi \varepsilon_v)^2 + \varepsilon_i(\lambda)^2} \right] \quad (4)$$

gdje su ε_r i ε_i realna odnosno imaginarna komponenta dielektrične funkcije metala ε_u . Realni dio dielektrične konstante metala ovisi o valnoj duljini. Ova je jednadžba izvedena iz rješenja za malu sferu zamjenom faktora u jednadžbi 2, koji se u jednadžbi 3 pojavljuje kao ε_v , s χ . χ je faktor oblika koji uračunava razliku između geometrija sferne čestice i struktura s višim omjerom duljine i širine. Ova se aproksimacija uvodi jer se Mie teorija ne može primijeniti na čestice koje nisu sfernog oblika. Budući χ pojačava ε_v , faktor oblika generalizira se kao osjetljivost lokaliziranih površinskih plazmona na dielektrično okruženje. Vrijednost veličine χ je 2 za sferu, no u slučaju drugih geometrija njegova vrijednost doseže i 20.¹⁴

Uvjet dielektrične rezonancije ($\epsilon_r \approx -\chi\epsilon_v$) postiže se u vidljivom dijelu spektra za čestice s visokim omjerom duljine i širine (visoka vrijednost χ), a koje su od metala kao što su srebro i zlato. Budući se ekstinkcijski spektri analitički mogu riješiti samo za sfere i sferoide, rješenja se za ostale geometrije moraju pretpostaviti.¹⁴

2.2.1.2. Faktor pojačanja

U Ramanovoj spektroskopiji intenzitet raspršenog zračenja linearno je ovisan o intenzitetu polja pobudnog zračenja, E_0 .^{2,7} Budući se električna polja pojačavaju na površini metalnih nanočestica, apsolutna vrijednost kvadrata polja evaluiranog na površini nanočestice utječe na Ramanov intenzitet. Iz jednadžbi 1–3 za malu metalnu sferu vanjsko polje je jednako:

$$|E_v|^2 = E_0^2 \left[|1 - g|^2 + 3 \cos^2 \theta (2 \operatorname{Re}(g) + |g|^2) \right] \quad (5)$$

gdje je θ kut između vektora polja upadnog zračenja i vektora položaja molekule na površini. Električno polje jače je okomito na metalnu površinu, nego paralelno s njom. Prema tome se i najveće pojačanje raspršenog zračenja opaža za molekule adsorbirane i polarizirane okomito na metalnu površinu. Ukoliko je vrijednost g velika, maksimalno se pojačanje polja približava:

$$|E_v|^2 = 4E_0^2 |g|^2 \quad (6).$$

U Ramanovoj spektroskopiji polje pobudnog zračenja inducira oscilirajući dipol u molekuli koja se nalazi na površini. Dipol potom emitira zračenje te postoji vjerojatnost da će emitirano zračenje biti frekvencije umanjene za vibracijsku frekvenciju molekule (Stokesovo raspršenje). Iako jednadžba 5 daje opći izraz za pojačanje pobudnog polja, zračenje koje molekula emitira također može biti pojačano.

Aproksimacija prvog reda za intenzitet pojačanog polja emitiranog zračenja slična je izrazu 5, uz razliku evaluacije pri Stokesovoj frekvenciji:

$$EF = \frac{|E_v|^2 |E'_v|^2}{|E_0|^4} = 4|g|^2 |g'|^2 \quad (7)$$

gdje se crtano označeni simboli odnose na veličine polja pri frekvenciji raspršenja.

Jednadžba 7 definira se kao teorijski faktor pojačanja EF (*enhancement factor*). Ukoliko je Stokesov pomak malen g i g' su približno jednake vrijednosti te je faktor pojačanja reda veličine g^4 . U literaturi ovaj se izraz obično označava kao E^4 odnosno četvrta potencija pojačanog polja na površini čestice. Uz pretpostavku da je $|g|$ otprilike 10 za malu sferu u danom modelu, površinsko pojačanje iznosi između 10^4 i 10^5 . Vrijednost $|g|$ veća je za visoko uređene srebrne nanostrukture za koje se faktor pojačanja uslijed elektromagnetskog mehanizma može približiti i 10^8 .¹⁵ Uzrok visokog faktora pojačanja međusobne su rezonancije površinskih plazmona koje rezultiraju lokaliziranim točkama vrlo jakih polja, tzv. *vrućim točkama*. U *vrućim točkama* polja su katkad jakosti dovoljne za detekciju jedne molekule analita.²

Teorijsko razmatranje površinski pojačanog Ramanovog raspršenja svakako je korisno za utvrđivanje uzroka pojačanja E^4 , no u praksi je češće jednostavnije eksperimentalno, analitički procijeniti faktor pojačanja nego ga teorijski predvidjeti za određeni SERS supstrat. Faktor pojačanja promatranog SERS sustava može se opisati sljedećom jednadžbom:

$$EF = \frac{[I_{SERS} / N_{površina}]}{[I_{NRS} / N_{vol}]} \quad (8)$$

Pri određenoj valnoj duljini pobudnog zračenja izraz 8 opisuje prosječno pojačanje Ramanovog raspršenja koje uključuje pojačanje kako pobudnog tako i raspršenog zračenja. Pri tome je I_{SERS} intenzitet površinski pojačanog Ramanovog raspršenja, $N_{površina}$ broj molekula na metalnom supstratu, I_{NRS} intenzitet normalnog Ramanovog raspršenja, a N_{vol} broj molekula u mjerenom volumenu analita. Praktično, za dani supstrat i molekulu analita, potrebno je izmjeriti I_{SERS} i I_{NRS} neovisno, pri pažljivo odabranim parametrima instrumenta.

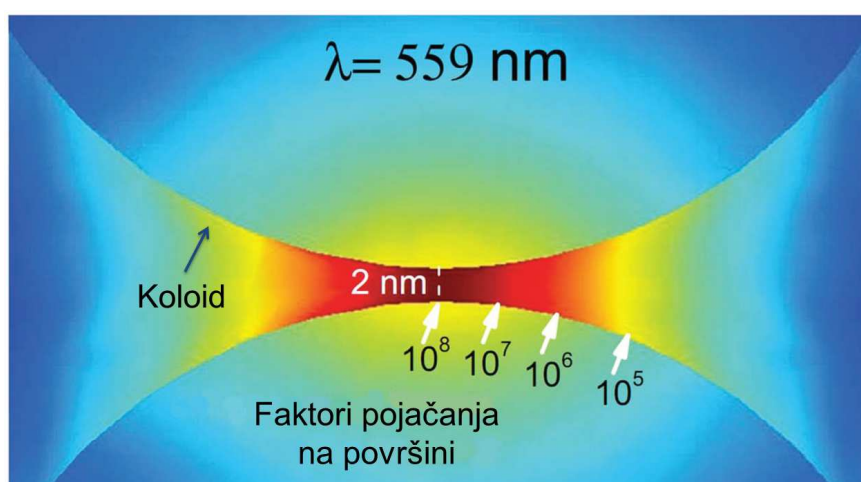
2.2.1.3. Utjecaj udaljenosti između molekule i metalne površine

Udaljenost između molekule analita i metalne površine kritičan je faktor pri opažanju površinski pojačanog Ramanovog raspršenja. Elektromagnetski mehanizam ne zahtijeva direktnu vezu analita i metalne površine kako bi se opazio SERS signal, već smještanje molekule blizu površine metala. Direktan kontakt analita i SERS supstrata često nije niti moguć zbog molekula receptora koje su primarno vezane na metalni supstrat. Molekule receptora koriste se za postizanje biokompatibilnosti supstrata ili za specifično vezanje odgovarajućeg bioanalita.¹⁶

Uzimajući u obzir činjenicu da se jakost polja oko male metalne sfere smanjuje s r^{-3} i aproksimaciju faktora pojačanja E^4 , jakost polja proporcionalna je s r^{-12} . S obzirom da je ukupna površina metalne sfere razmjerna kvadratu radijusa sfere, r^2 , eksperimentalno opaženo pojačanje intenziteta tada je proporcionalno s r^{-10} :

$$I_{SERS} = \left(\frac{a+r}{a} \right)^{-10} \quad (9)$$

pri čemu je I_{SERS} intenzitet površinski pojačanog Ramanovog raspršenja, a je prosječni parametar nanostrukture, a r je udaljenost analita od površine.¹⁷ Ovisnost pojačanja raspršenog zračenja o udaljenosti između molekule i površine metala još je izraženija kod spomenutih *vrućih točaka* koje su izuzetno lokalizirane. Slika 4 prikazuje vruću točku dimera metalnih nanočestica, pri čemu minimalni pomak položaja adsorbiranog analita može rezultirati drastično slabijim raspršenjem zračenja.¹⁸

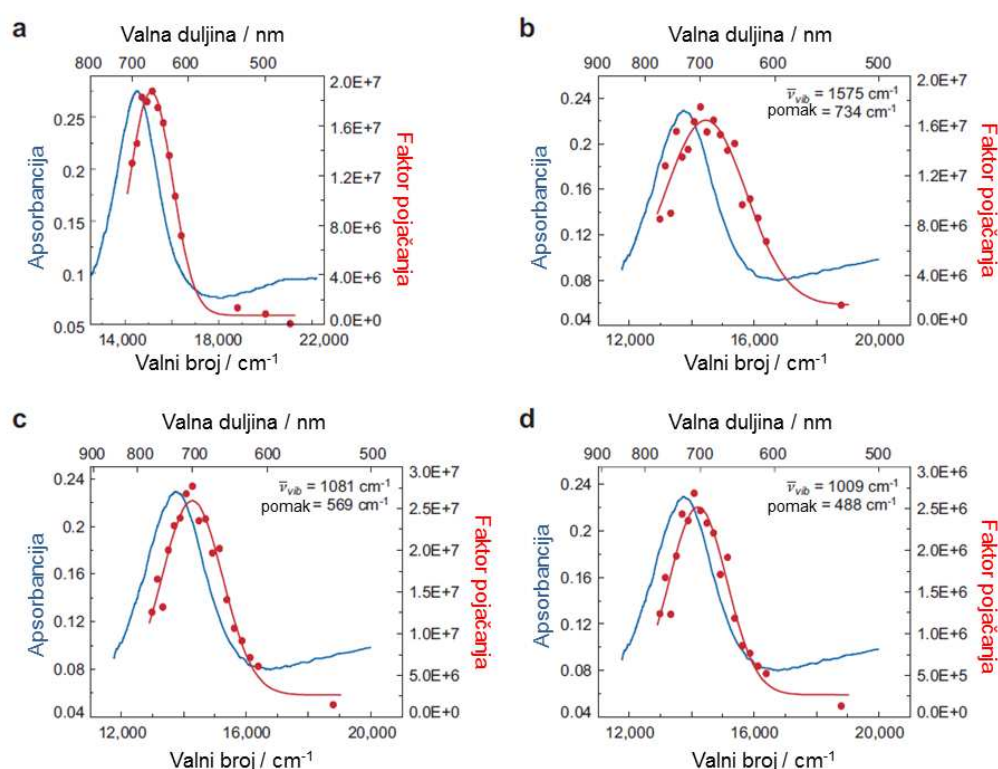


Slika 4. Faktori pojačanja raspršenog zračenja molekule na različitim mjestima na površini dimera metalnih nanočestica.

2.2.1.4. Utjecaj pobudnog zračenja

Aproksimacija faktora pojačanja E^4 predviđa kako je u svrhu opažanja pojačanja raspršenog zračenja idealno koristiti pobudno zračenje one valne duljine koja se podudara s frekvencijom lokaliziranih površinskih plazmona metalnog supstrata, tzv. rezonancijsku frekvenciju. U praksi međutim to nije slučaj. Kako bi se postiglo maksimalno pojačanje potrebno je pojačati pobudno, ali i raspršeno zračenje, koja su u slučaju Ramanovog raspršenja različitih valnih duljina. U slučaju kada energija molekulskih vibracija odgovara području otiska prsta ($500\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$) aproksimacija o zanemarivom Stokesovom pomaku više ne vrijedi, kao niti aproksimacija E^4 .

Slika 5 prikazuje apsorpcijski spektar površinskih plazmona supstrata i profil faktora pojačanja u ovisnosti o valnoj duljini pobudnog zračenja, za vrpce pri 1575 , 1081 i 1009 cm^{-1} u spektru benzentiola.



Profili pojačanja ukazuju kako se najveći faktor pojačanja opaža kada je frekvencija pobudnog zračenja veća od frekvencije površinskih plazmona korištenog supstrata. Osim toga, s povećanjem energije vibracije povećava se i razlika između maksimuma profila pojačanja i apsorpcije plazmona. U slučaju svakog pojedinog vibracijskog moda, maksimalno pojačanje postignuto je pri energiji pobude koja je od energije površinskih plazmona veća za približno polovinu vrijednosti energije vibracije. Sve opaženo je u skladu s elektromagnetskim modelom pojačanja koji za maksimalno pojačanje predviđa pojačanje i upadnog i raspršenog zračenja. Polja pobudnog i raspršenog zračenja optimalno se pojačavaju kada su frekvencije oba zračenja obuhvaćene apsorpcijskim spektrom površinskih plazmona.³

2.2.2. Mehanizam prijenosa naboja

Mehanizam prijenosa naboja ili kemijski mehanizam pojačanja zahtjeva da je molekula analita kemijski vezana na metalni supstrat. Ovaj je mehanizam predložen kako bi se objasnile razlike u relativnim intenzitetima i položajima vrpce u SERS spektru u odnosu na vrpce odgovarajućih vibracijskih modova u normalnom Ramanovom spektru. Također, kemijskom mehanizmu pripisuju se neslaganja opaženih i izračunatih faktora pojačanja.

Kemijski mehanizam pojačanja raspršenog zračenja događa se uslijed prijenosa naboja koji podrazumijeva prijelaze elektrona iz Fermijeveg nivoa metala u nepopunjenu orbitalu molekule (i obrnuto). Interakcijom pobudnog zračenja s metalom nastaje par elektron-šupljina, iz kojeg elektron prelazi u analit. Nakon kratkotrajne pobude nastalog kompleksa, elektron se vraća natrag u metal, pri čemu se zračenje raspršuje.

Kemijskim vezanjem analita s metalom mogu nastati površinski kompleksni spojevi drugačijih svojstava od molekula analita. Pri tome novonastali kompleksi mogu imati elektronska stanja odgovorna za mogućnost rezonantnog Ramanovog raspršenja.

2.2.3. SERS supstrati

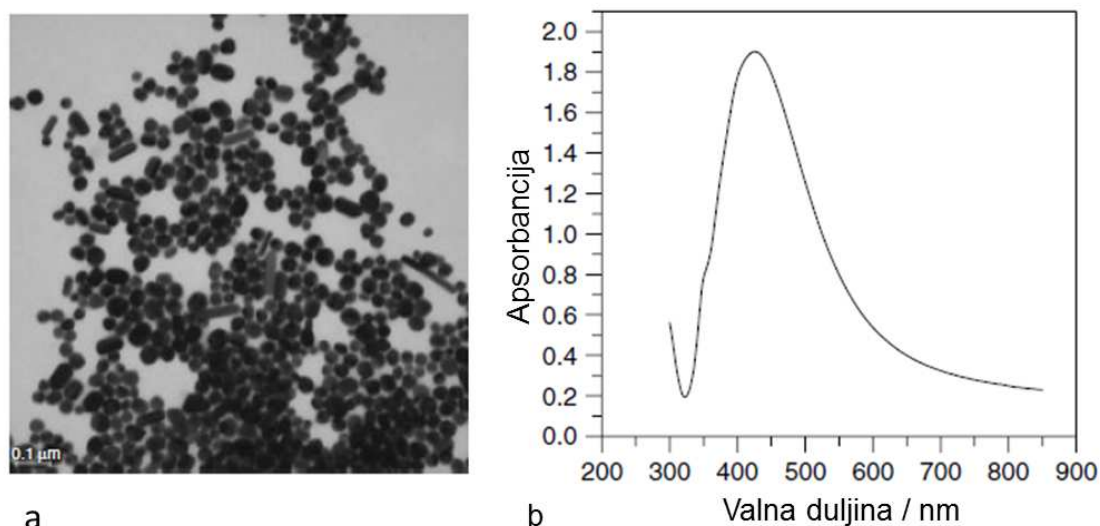
Paralelno s razvojem spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja razvijaju se i tehnike pripreme pogodnih metalnih supstrata. Prvi SERS supstrat bila je srebrna elektroda nepravilne površine, pripravljena elektrokemijski, cikličkom voltammetrijom.¹⁰ Ubrzo nakon otkrića pojačanja raspršenog zračenja s površine metala počeli su se koristiti metalni filmovi pripremljeni naparavanjem metala u vakuumu, a nedugo nakon zamijenile su ih metalne nanočestice različitih oblika i široke raspodjele veličina, pripremljene kemijskim reakcijama u

otopini.² U usporedbi s metalnim filmovima ili metalnim elektrodama, priprava koloida ne zahtijeva skupe komore za naparavanje niti postoji utjecaj oksidacijsko-redukcijskog ciklusa tijekom pripreme supstrata na molekulu analita.

Nanočestice su strukture dimenzija između 1 i 100 nm. U navedenom nano području metali posjeduju specifično svojstvo rezonantnih površinskih plazmona, te će se na njihovoj površini, uz uvjet da je ona nepravilna, raspršenje zračenja adsorbirane molekule analita pojačati. Tijekom posljednjih tridesetak godina razvijene su različite tehnike pripreme SERS supstrata kojima se pripremaju pažljivo dizajnirane metalne nanostrukture koje osim svojstva pojačanja raspršenog zračenja imaju i prednost reproducibilne izvedbe.¹⁹ Prema tehnikama pripreme SERS supstrati mogu se podijeliti u tri skupine: metalne nanočestice u suspenziji, metalne nanočestice imobilizirane na čvrstoj površini i nanostrukturirane metalne površine pripravljene primjerice nanolitografijom.²⁰ Zahvaljujući jednostavnoj i financijski povoljnoj pripravi, te jednostavnom rukovanju, unatoč nedostatku visoke reproducibilnosti metalni koloidi (nanočestice u suspenziji) najčešće su korišteni SERS supstrati. Različitim postupcima pripremaju se koloidne nanočestice različitih oblika i veličina. Budući parametri veličine i oblika nanočestice uvelike utječu na rezonantnu frekvenciju površinskih plazmona, odgovarajućom tehnikom moguće je pripremiti pogodne supstrate za odabrani mjerni sustav. Koloidi se mogu dodatno i agregirati u svrhu povećanja broja *vrućih točaka* u kojima se opaža najveće pojačanje raspršenja. Osim monometalnih nanočestica moguće je pripremiti kompozitne nanočestice od različitih metala koje u određenim mjernim sustavima bolje pojačavaju raspršeno zračenje. Pored jednostavne pripreme koloidi imaju i prednost mjerenja nakon pobude zračenjem većih snaga, što u slučaju metalnih površina kao SERS supstrata može uzrokovati spaljivanje uzorka. Također je važna i mogućnost snimanja uprosječenog SERS spektra uslijed Brownovog gibanja u koloidnoj suspenziji.²¹

2.2.3.1. Priprema, karakterizacija i stabilnost koloida metala

Sferne nanočestice zlata i srebra najčešće se pripremaju redukcijom kationa metala. Za pripravu koloida srebra najviše se koriste AgNO_3 ili Ag_2SO_4 , a za koloid zlata HAuCl_4 ili KAuCl_4 . U slučaju oba metala najčešće korišteni reducensi su natrijev citrat ili natrijev borhidrid. Koloid srebra pripremljen redukcijom srebrova nitrata s trinatrijevim citratom tijekom jednosatnog zagrijavanja uz refluks jedan je od najpopularnijih koloidnih SERS supstrata (Slika 6).^{21,22,23}



Slika 6. a) TEM slika i b) apsorpcijski spektar Ag koloida pripremljenog redukcijom srebrova nitrata s trinatrijevim citratom.²³

Koloidi pripremljeni opisanom redukcijskom metodom s trinatrijevim citratom stabilni su mjesecima, no budući se svojstva površine nanočestica mogu promijeniti unutar nekoliko dana, raspršenje zračenja s ranije pripremljenih koloida može se razlikovati i biti slabije od onog opaženog sa svježije pripremljenog supstrata. Za stabilnost koloidnih nanočestica odgovorne su kemijske vrste prisutne na njihovoj površini. Najčešće su to anioni zaostali na površini metala nakon redukcijskog postupka, primjerice citratni ioni, koji elektrostatskim odbojnim silama sprječavaju agregaciju nanočestica. U svrhu povećanja stabilnosti metalnih koloida u suspenziju se mogu dodati tvari poput polivinil alkohola ili natrijeva dodecil sulfata, koji okružuju nanočestice i sterički sprječavaju agregaciju.² Dodatak različitih surfaktanata za stabilizaciju ima međutim i svoje nedostatke. Naime, u SERS spektru mogu se opaziti i vibracije molekula surfaktanata, koje smještene uz površinu nanočestica mogu otežati ili potpuno onemogućiti adsorpciju molekula analita. Iz navedenih razloga, područje istraživanja molekula pogodnih za stabilizaciju koloida koje pritom ne ometaju adsorpciju analita i dalje je vrlo aktivno.

Najvažnija svojstva metalnih nanočestica u ulozi SERS supstrata su njihova veličina, morfologija, oblik, kristalna struktura, sastav te rezonantna frekvencija površinskih plazmona. Nanočestice se vizualiziraju elektronskom mikroskopijom, kao što su transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) ili skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM), koja pruža informacije o morfologiji, veličini i obliku čestica. Uz SEM i TEM često se koristi i mikroskopija atomske sile (*atomic force microscopy*, AFM) budući je boljeg vertikalnog razlučivanja te se može koristiti i na nevodljivim površinama. Za utvrđivanje sastava

nanočestica najčešće se koristi rendgenska disperzivna spektrometrija. Uz sastav, primjenom difrakcije rendgenskih zraka na polikristalnom uzorku, dobiva se informacija o kristalnoj strukturi supstrata. Spektralna svojstva nanočestica najlakše se procjenjuju UV/Vis apsorpcijskom spektroskopijom, kojom se određuje pogodna valna duljina pobude za odgovarajući SERS supstrat.^{2,21}

Osim sfernih metalnih nanočestica, variranjem uvjeta reakcija te korištenjem različitih surfaktanata pripremljene su koloidne čestice različitih oblika poput nanoštapića, nanopločica, prizmica, kockica, pa čak i nanocvijeća.² Tijekom pripreme određenih nanooblika često se koristi metoda cijepljenja reakcijske otopine pripremljenim nanočesticama koje usmjeravaju specifičnu kristalizaciju metalnih čestica.²

2.2.3.2. Agregacija metalnih nanočestica u koloidnoj suspenziji

Metalne nanočestice pojačavaju raspršeno zračenje molekula analita na njihovoj površini, no pojačanje se značajno povećava njihovom agregacijom. Agregiranjem pojedinačnih nanočestica u dimere ili grozdove omogućava se međusobna rezonancija površinskih plazmona i stvaranje *vrućih točaka* u kojima je elektromagnetsko polje izrazito jako. Koloidne nanočestice se najčešće agregiraju dodatkom anorganskih soli (KCl, NaCl, NaNO₃, NaClO₄), surfaktanata, organskih amina ili anorganskih kiselina u koloidnu suspenziju. Također, vrlo često sam analit može agregirati koloid.²¹

2.2.3.3. Bimetalni koloidi

Osim najčešće korištenih koloida srebra i zlata, redukcijskim postupcima pripremaju se i bimetalni koloidi, najčešće u obliku čestica sa srebrnom jezgrom i zlatnim omotačem i obrnuto. Rezonantna frekvencija površinskih plazmona bimetalnih nanočestica razlikuje se od one monometalnog koloida ovisno o debljini omotača, odnosno omjeru količina dvaju metala. Bimetalne čestice posjeduju kombinirana svojstva oba metala koja za određeni mjerni sustav mogu pojačati raspršenje više od čestica samo jednog metala.

Kompozitne nanočestice, osim od zlata i srebra, pripravljaju su i od drugih metala, među kojima su zanimljive one sa zlatnom jezgrom i vrlo tankim omotačem različitih prijelaznih metala. Upravo jezgra od zlata omogućava pojačanje raspršenog zračenja molekule analita adsorbirane na omotač od prijelaznog metala koji sam po sebi nije pogodan

SERS supstrat. Kombinacijom svojstava dvaju metala istražuje se adsorpcija analita na površinu prijelaznih metala, važna pri razumijevanju mehanizama katalitičkih reakcija.²⁴

2.3. Primjena površinski pojačanog Ramanovog raspršenja

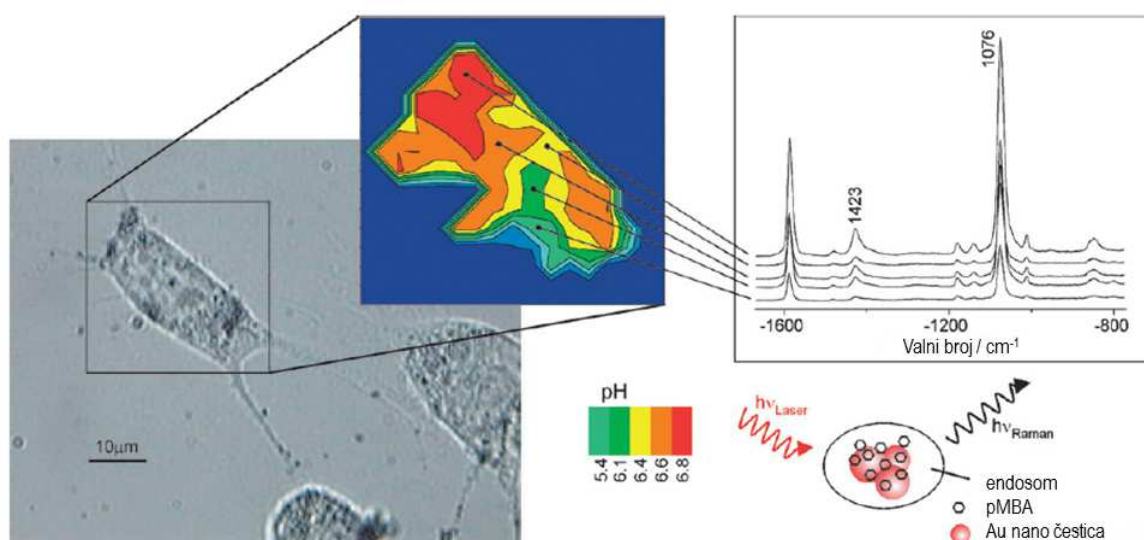
Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja primjenjuje se u različitim područjima poput biologije, biokemije, ekologije, forenzike, kemije materijala i elektrokemije. Uz činjenicu da se radi o jednostavnoj i vrlo osjetljivoj metodi, koja uz identifikaciju kemijske vrste pruža i informacije o strukturi analita, njenoj popularizaciji doprinio je i razvoj novih Ramanovih mjernih uređaja, od Ramanovih mikroskopa do prenosivih Ramanovih spektrometara.²⁵

2.3.1. Primjena SERS spektroskopije u biologiji i biokemiji

SERS spektroskopija u biologiji se prije svega primjenjuje za fundamentalna istraživanja koja se bave proučavanjem strukture, konformacije i prijenosa naboja biomolekula. Tako su primjerice proučavane strukture različitih fotoosjetljivih sustava pigment-protein kompleksa koristeći elektrodu od srebra.²⁶ Praktična primjena spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja uključuje biomedicinsku dijagnostiku, primjerice dijagnostiku tumora, te detekciju i kvantifikaciju proteina, DNA, pa čak i bakterija. Za detekciju bioloških molekula koriste se biosenzori koji se sastoje od nanočestica biokompatibilnog metala na koje su vezane molekule receptora odgovorne za specifično prepoznavanje i reakciju s analitom.²⁷ Pri tome nastaju SERS spektri drugačiji od onih kada reakcije s analitom nema. Opisanim biosenzorima mogu se detektirati i kvantificirati različite biološki važne molekule u stanicama čija prisutnost ili količina upućuju na odgovarajuća stanja organizma. Tako specifična antitijela, hormoni i proteini mogu ukazati na različite tumore, Alzheimerovu i Parkinsonovu bolest.^{28,29,30}

Jedna od važnih primjena biosenzora na temelju površinski pojačanog Ramanovog raspršenja je određivanje koncentracije glukoze u organizmu. Razvijen je naime biosenzor koji omogućava *in vivo* mjerenje glukoze u krvi, bez uzorkovanja, čime se značajno poboljšava kvaliteta života oboljelima od dijabetesa.^{25,31} Razvoj biosenzora kojim se specifično, bez interferencija mnoštva biomolekula prisutnih u krvi, može pouzdano i u realnom vremenu kvantitativno određivati analit značajan je napredak u bioanalitici.

Biosenzori se koriste i za SERS oslikavanja živih stanica i tkiva. Kemijske slike nastaju na temelju reakcija molekula receptora na površini metalnih supstrata s različitim ciljanim biomolekulama ili uslijed promjena molekulске strukture molekula na površini metala uzrokovanim različitim uvjetima u stanici. Primjer takvog biosenzora je agregat nanočestica zlata na čijoj su površini vezane molekule 4-merkaptobenzojeve kiseline, a čiji je SERS spektar pH ovisan. pH mapiranje žive stanice omogućava bolji uvid u metaboličke i fiziološke stanične procese (Slika 7).³²



Slika 7. Shematski prikaz oslikavanja žive stanice, obzirom na pH vrijednost, biosenzorom na temelju površinski pojačanog Ramanovog raspršenja.³²

2.3.2. Primjena SERS spektroskopije u ekologiji i forenzici

Visoka osjetljivost spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja omogućava detekciju vrlo niskih koncentracija analita, do čak jedne molekule.³² Upravo je visoka osjetljivost, uz brzinu tehnike i razvoj novih, manjih, prenosivih Raman spektrometara, razlog primjene SERS spektroskopije u analizi okoliša. Detektirati se naime mogu vrlo niske koncentracije različitih pesticida, herbicida, farmaceutski aktivnih molekula i drugih zagađivala u vodi, zraku i tlu. Uzorci vode vrlo se jednostavno mogu analizirati na terenu na prisutnost odgovarajućih zagađivala bez posebne pripreme uzorka, koristeći posebno dizajnirane membrane s koloidom srebra koje omogućavaju adsorpciju analita i opažanje SERS spektara.³³ Različite molekule u zraku, opasne po zdravlje ljudi i okoliša, detektiraju se nakon direktne adsorpcije iz uzorka zraka na SERS supstrat ili, ukoliko se sam analit ne adsorbira, koriste se specifično razvijeni supstrati s već vezanim molekulama receptora koje

vežu ciljane analite, kao što je slučaj i kod biosenzora. Koristeći SERS supstrate s receptorima, poput kaliksarena ili karbamata, u zraku se uspješno mogu detektirati niske količine različitih policikličkih aromatskih ugljikovodika kancerogenog djelovanja.³⁴

Srodna analizi uzoraka okoliša, forenzička su istraživanja niskih koncentracija droga te eksploziva i kemijskog oružja u uzorcima tla i zraka. Eksploziv poput dinitrotoluena može se detektirati SERS tehnikom u uzorku zraka, a njegova prisutnost u zraku koristi se pri lociranju mina tijekom razminiravanja.³⁵ Izrazito otrovni bojni plin iperit također se uspješno određuje u zraku SERS metodom pomoću prenosivog Ramanovog spektrometra koji omogućuje trenutnu analizu na terenu.³⁶

Forenzička analiza uključuje i istraživanje tvari poput pigmenata u novčanicama ili umjetninama koje mogu uputiti na krivotvorenje.²⁵ U svrhu zaštite identiteta originala vrijednih predmeta koriste se SERS nanooznake. To su funkcionalizirane sferne nanočestice zlata u malim kapsulama od silikona koje se mogu inkorporirati u različite materijale te koristiti za autentifikaciju različitih predmeta. Nanooznake se sve češće koriste iz sigurnosnih razloga za označavanje luksuznih predmeta poput umjetnina i nakita. Također se mogu se uklopiti u novčanice u procesu tiskanja.²⁵

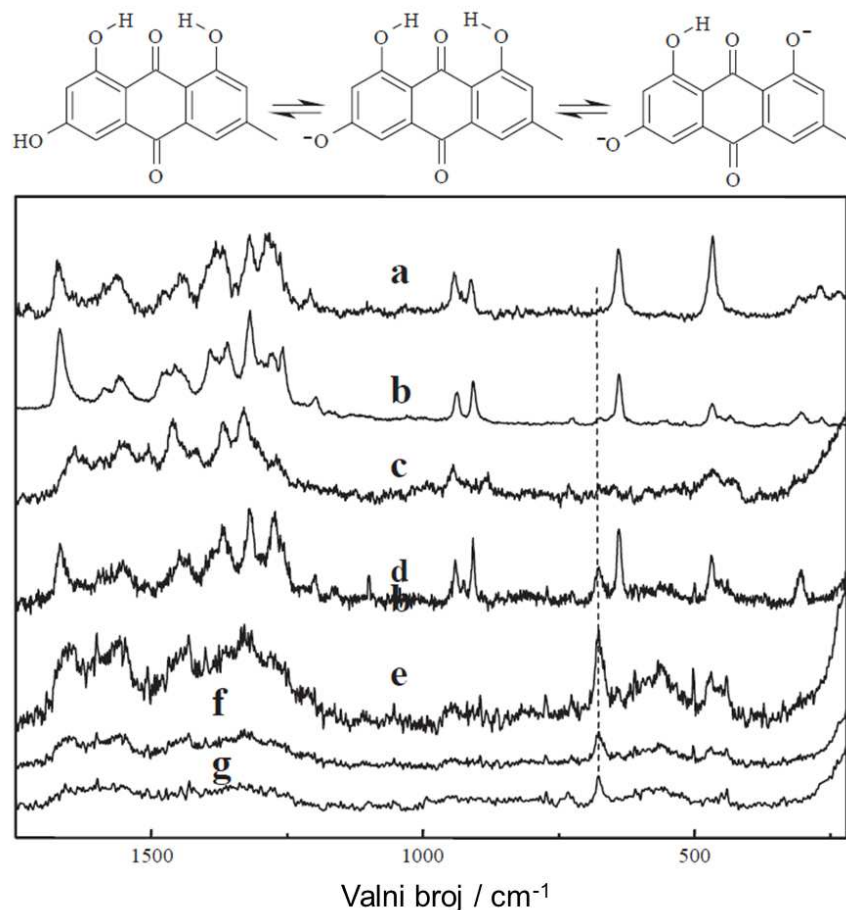
2.3.3. Primjena SERS spektroskopije u istraživanju farmaceutski aktivnih tvari

Cjelokupan razvoj lijeka, od sinteze i karakterizacije aktivne molekule do njene formulacije s pomoćnim tvarima i istraživanja svojstava gotovog proizvoda, zahtjeva brzu i učinkovitu analitičku podršku. Analiza sadržaja malih doza aktivnih molekula u gotovom lijeku, kao i praćenje vrlo niskih koncentracija onečišćenja u aktivnoj tvari predstavljaju izazov analitičkim metodama. SERS spektroskopija, zahvaljujući detekciji analita pri iznimno niskim koncentracijama i sve dostupnijim i bolje karakteriziranim supstratima, odgovara postavljenim zahtjevima te se sve češće primjenjuje u farmaceutskoj industriji.^{5,6,37,38} Osim visoke osjetljivosti, prednost pred konvencionalno korištenim kromatografskim metodama svakako je i brzina SERS tehnike, važan parametar u procesnoj analitičkoj tehnologiji koja se već standardno primjenjuje za praćenje tijeka sintetskih reakcija ili formulacijskih procesa. Također, SERS spektroskopija pruža informacije o molekulskoj strukturi analita, što kromatografske metode ne omogućavaju.

Važan aspekt istraživanja farmaceutski aktivnih tvari SERS spektroskopijom je i otkrivanje načina adsorpcije farmaceutskog analita na supstrat, s obzirom na moguću korelaciju interakcija s biološkim supstratom i spoznaje o mehanizmu biološkog djelovanja. U

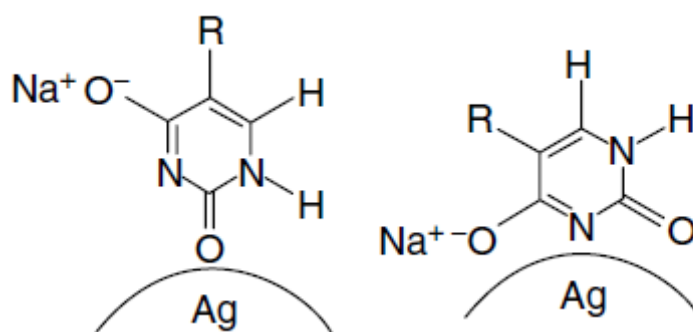
ovom se području primjena spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja za istraživanje farmaceutski aktivnih tvari uvelike preklapa s područjem biomedicine. Naime prvi korak u biomedicinskim istraživanjima interakcija lijeka s primjerice molekulama proteina u tijelu upravo je istraživanje same aktivne tvari SERS spektroskopijom, često pri različitim pH uvjetima koji utječu na oblik molekule i njezinu aktivnost u tijelu. Sve je više primjera SERS analiza farmaceutski aktivnih tvari u svrhu boljeg razumijevanja metabolizma i djelovanja lijeka. Primjena SERS tehnike tako je uvelike rasvijetlila interakciju antitumorskog lijeka emodina s proteinom albuminom.²¹ U prvoj fazi analizirani su SERS spektri emodina pri pH vrijednostima 4, 7 i 12, pri kojima je molekula u neutralnom, monoanionskom odnosno dianionskom obliku. Najznačajnije promjene u spektrima različitih strukturnih oblika emodina opažaju se za vrpce pri 1673 cm^{-1} koja se u spektru emodina u lužnatom mediju nalazi pri 1641 cm^{-1} , dok se vrpce u području $1360\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ s porastom pH vrijednosti pomiču prema većim valnim brojevima. S povećanjem pH medija primijećen je i pad intenziteta Ramanovog raspršenja. U tu je svrhu evaluiran intenzitet vrpce pri 679 cm^{-1} koristeći DMSO kao unutarnji standard. Navedene vrpce analizirane su i interpretirane i u SERS spektrima kompleksa emodin-albumin, u kojima su opažene zanimljive razlike u ovisnosti o količini masnih kiselina prisutnih u proteinu (Slika 8).

Na temelju spektralnih razlika zaključeno je da postoje dva različita aktivna mjesta u albuminu u koja se emodin veže te da na mjesto vezanja utječe prisutnost masnih kiselina. SERS spektroskopijom prikupljeni su važni podaci o interakcijama antrakinonskih lijekova s albuminima, te utjecaju liganada poput masnih kiselina na njihovo međudjelovanje.²¹



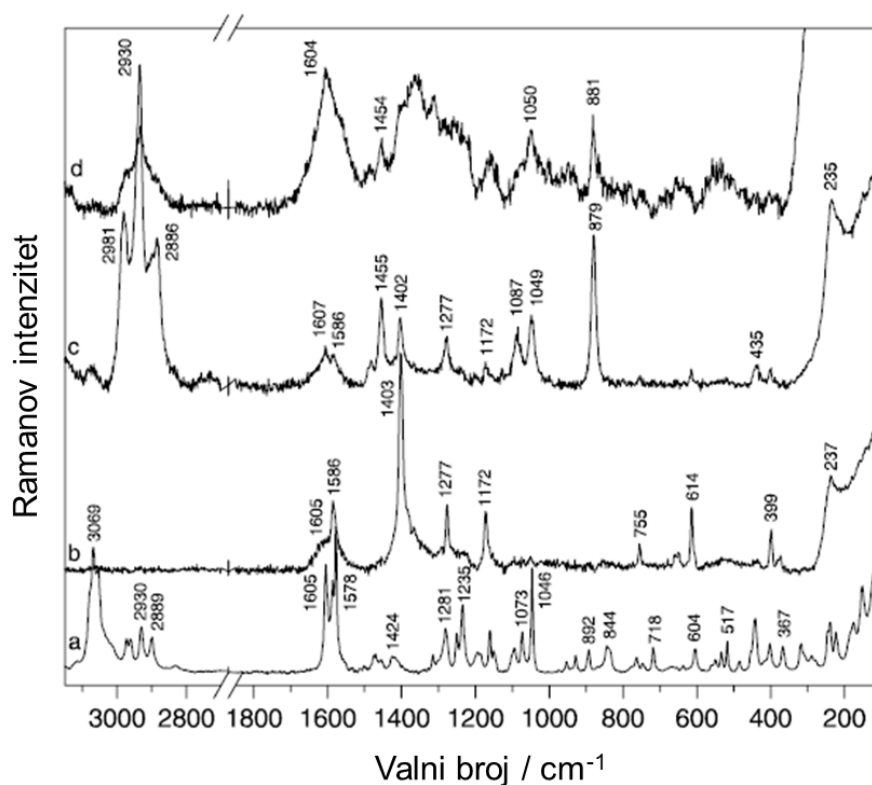
Slika 8. Strukturni oblici i kiselo-bazna ravnoteža emodina. SERS spektri emodina pri a) pH 4, b) pH 7 i c) pH 12. SERS spektri kompleksa: d) emodin/albumin 1/4, e) emodin/albumin 1/2, f) emodin/albumin-masna kiselina 1/2, g) emodin/albumin-masna kiselina 1/4.²¹

Na sličan su način analizirani SERS spektri različitih farmaceutski aktivnih tvari poput 5-fluoruracila, rivanola i vitamina B1.^{2,39,40} Primjer antitumorskog lijeka 5-fluoruracila iznimno je zanimljiv. SERS spektri 5-fluoruracila vezanog na koloid srebra pri različitim pH uvjetima ukazali su kako se istraživani analit na metalni supstrat adsorbira preko različitih funkcionalnih skupina. Tako se u kiselom mediju molekula 5-fluoruracila na površinu metala adsorbira preko keto skupine i dušika u prstenu, dok se u lužnatom mediju samo keto skupinom približava površini srebra (Slika 9).² Osim istraživanja načina adsorpcije 5-fluoruracila na metalne površine, SERS tehnikom moguće je odrediti njegovu koncentraciju u slini pacijenta.⁴¹



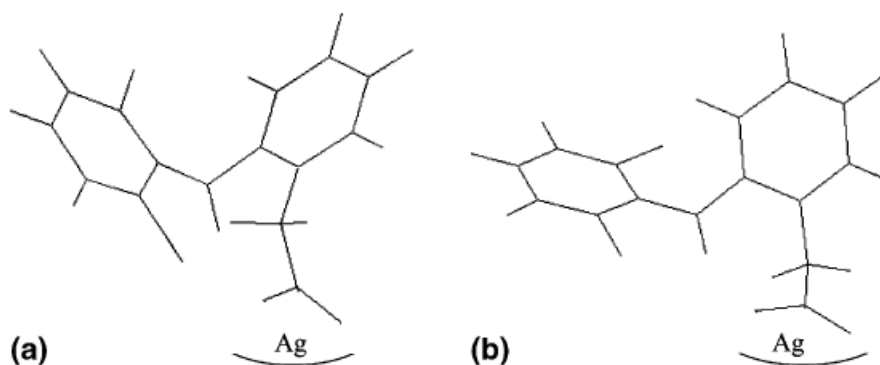
Slika 9. Načini adsorpcije 5-fluoruracila na površinu srebra.²

Istraživanje adsorpcije aktivne farmaceutske tvari na odabrani SERS supstrat interpretacijom SERS spektara, koristi se za stjecanje spoznaja o načinu vezanja u aktivno mjesto biomolekula. No, osim o funkcionalnoj skupini koja sudjeluje u interakciji, SERS spektri mogu pružiti i informaciju o konformaciji molekule na površini SERS supstrata. Izborna pravila na površini, prema kojima se pojačavaju vrpce onih vibracija molekule na površini metalnog SERS supstrata čiji je vektor promjene polarizabilnosti okomit na površinu metala, omogućavaju interpretaciju pojačanja odnosno gašenja pojedinih vrpca u SERS spektru ukazujući na položaj molekule na površini. Diklofenak natrij (natrijeva sol 2-(2-(2,6-diklorfenilamino)fenil)octene kiseline) poznati je analgetik čija je konformacija na površini srebra istražena spektroskopijom površinski pojačanog Ramanovog raspršenja. SERS spektri diklofenak natrija snimljeni su pri različitim pH vrijednostima, pri čemu su opažene značajne razlike u spektrima molekule u mediju pH višeg i nižeg od 6 (Slika 10).⁴²



Slika 10. a) FT-Ramanov spektar diklofenak natrija u čvrstom stanju. SERS spektri diklofenak natrija na Ag koloidu pri b) pH 2, c) pH 6 i d) pH 10.⁴²

Značajno pojačanje vrpce istezanja karboksilatnog aniona (1586 cm^{-1}) pri pH 2 upućuje na blizinu i okomit položaj karboksilne skupine u odnosu na srebrnu površinu. U spektrima molekule pri $\text{pH} > 6$ ta je vrpca značajno manjeg intenziteta, uslijed promjene položaja skupine prema površini metala. Također, promjene u intenzitetu vrpce vibracija CH skupina benzenskih prstenova upućuju na različit položaj aromatskih skupina uz površinu srebra u medijima različite pH vrijednosti (Slika 11).⁴²



Slika 11. Shematski prikaz molekulske strukture diklofenak natrija na površini srebra pri a) $\text{pH} < 6$ i b) $\text{pH} > 6$.⁴²

Primjenom ciljano pripremljenih supstrata srebra za pojačanje raspršenog zračenja, razvijene su i metode za detekciju tragova antipiretika poput paracetamola i acetaminofena, te različitih kemoterapijskih lijekova u samom organizmu pacijenta.^{43,44} Osim što je mogućnost praćenja koncentracije lijeka u organizmu važna za razumijevanje njegova mehanizma djelovanja, testiranje sline na prisutnost različitih farmaceutskih tvari poput probenecida pri vrlo niskim koncentracijama korisno je za doping kontrolu sportaša.⁴⁵

Istraživanje aktivnih farmaceutskih tvari podrazumijeva istraživanje djelovanja aktivne tvari i njenih svojstava, ali i razvoj i optimiranje sintetskog puta za njeno dobivanje. Sintetski postupak farmaceutski aktivnih tvari, koje su uglavnom male organske molekule, nerijetko uključuje katalizu. U svrhu razumijevanja katalitičkih procesa na površini metala, proučavanje načina vezanja te konformacije molekule na metalnoj površini može biti od velike koristi.

Glavna primjena SERS spektroskopije u farmaceutskoj industriji tijekom usavršavanja sinteze aktivne tvari već je spomenuta analitička. Uz istaknute prednosti visoke osjetljivosti i brzine, zahvaljujući kojima SERS spektroskopija predstavlja kvalitetnu alternativu kromatografskim metodama, važan faktor u kemijskoj industriji je i utrošak otapala za analizu. Za razliku od kromatografije, spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja zahtijeva minimalan utrošak kemikalija, što ju čini vrlo prihvatljivom u smislu *zelene kemije*.

2.4. Farmaceutski aktivne tvari odabrane za istraživanje

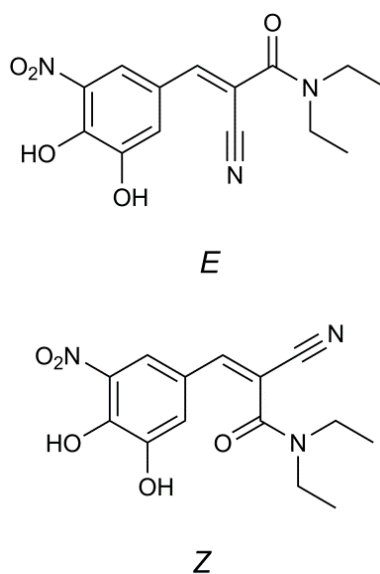
Kako bi se postiglo pojačanje Ramanovog raspršenja glavni uvjet koja mora biti zadovoljen je da se molekula analita nalazi vrlo blizu metalnog supstrata ili da se veže na njega. No, osim adsorpcije istraživane molekule na površinu metala s koje se raspršeno zračenje pojačava, analizu mogu otežavati i molekule analita koje same po sebi slabo raspršuju zračenje. Slabo Ramanovo raspršenje čest je problem upravo u detekciji biološki važnih molekula.⁴⁶

Aktivni farmaceutski sastojci male su organske molekule, koje poput molekula odabranih za istraživanje, entakapona i sulfatiazola, posjeduju funkcionalne skupine u strukturi kojima se efikasno adsorbiraju na jednostavne SERS aktivne supstrate. Međutim, postoji i čitav niz molekula koje se zahvaljujući svojoj strukturi ne mogu lako vezati s metalima i/ili slabo raspršuju zračenje. Razvoju SERS tehnike za detekciju farmaceutski aktivnih tvari koje se ne mogu samostalno adsorbirati ili loše raspršuju zračenje pristupa se na dva načina. Prvi pristup obuhvaća pripravu specifičnih SERS supstrata čija je površina

funkcionalizirana molekulama koje olakšavaju adsorpciju analita ili se pak radi o primjerice bimetalnim supstratima čija svojstva omogućavaju pojačanje raspršenog zračenja određenog analita. Drugi pristup uključuje modifikaciju strukture analita čime se pospješuje njegova adsorpcija na SERS aktivni supstrat te omogućava posredna identifikacija.

Entakapon (2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)-*N,N*-dietilakrilamid) aktivan je farmaceutski sastojak koji se koristi u liječenju Parkinsonove bolesti. Specifičnim i reverzibilnim vezanjem entakapona na katehol-O-metiltransferazu inhibira se spomenuti enzim čime se umanjuje deaktivacija molekule levodope, te omogućava njeno prevođenje u dopamin.⁴⁷

Entakapon postoji u dvije izomerne forme (Slika 12). Oba su izomera biološki aktivna, međutim zbog povoljnijeg sintetskog puta za dobivanje izomera *E*, te postizanja viših koncentracija u plazmi pacijenata u odnosu na izomer *Z*, izomer *E* koristi se kao farmaceutski aktivna tvar.^{47,48} Poznato je šest polimorfnih formi entakapona *E*: A, D, α , β , γ i δ .^{49,50,51} Forma A najstabilniji je polimorf entakapona *E*.⁴⁹



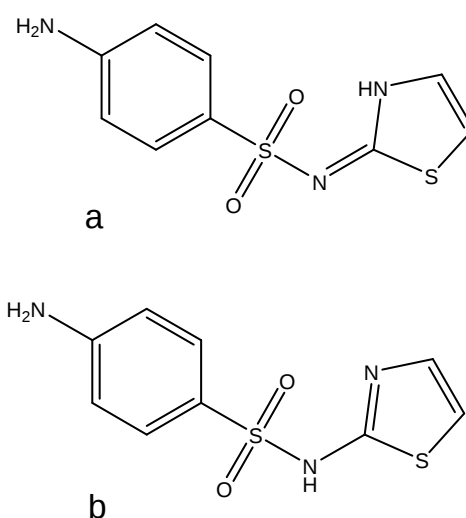
Slika 12. Strukturna formula izomera entakapona.

Strukturna različitost izomera entakapona, kao i različita svojstva polimorfa entakapona *E* predmet su brojnih nedavnih istraživanja. Kvantitativna analiza smjese izomera entakapona provedena je Ramanovom spektroskopijom za uzorke u čvrstom stanju, te primjenom kromatografije (HPLC) i spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja u otopini.⁵²⁻⁵⁵

Knoevenagelova kondenzacija 3,4-dihidroksi-5-nitrobenzaldehida i 2-cijano-*N,N*-dietilacetamida, kojom se sintetizira molekula entakapona, praćena je *in-line* Ramanovom spektroskopijom.⁵⁶ Nukleacija i kristalni rast pojedinih polimorfa entakapona *E* dobro je istraženo područje.^{48,57,58} Također, opisana je i kvantitativna analiza dvokomponentnog sustava polimorfnih formi A i D entakapona *E* Ramanovom spektroskopijom.⁵⁹

Sulfatiazol (4-amino-*N*-(1,3-tiazol-2-il)benzensulfonamid) aktivan je farmaceutski sastojak iz skupine sulfonamida, koji se u farmaceutskim pripravcima koriste zbog svojih antibakterijskih svojstava. Sulfonamidi inhibiraju dihidropteroat sintetazu, enzim ključan u sintezi folne kiseline, pri čemu nedostatak folata uzrokuje ugibanje mikroorganizama.⁶⁰ Sulfatiazol se najčešće primjenjuje u kremama, u kombinaciji sa sulfacetamidom i sulfbenzamidom.

Sulfatiazol postoji u dvije tautomerne forme, kao imid i kao tiazol (Slika 13). Analizom kristalne strukture dokazano je da u čvrstom stanju prevladava imidni tautomer s vodikom na dušiku tiazolnog prstena.⁶¹ U otopini je, međutim, sulfatiazol vjerojatnije prisutan kao tiazolni tautomer. Kvantno kemijskim računima funkcionala gustoće (*density functional theory*, DFT), pri nivou teorije B3LYP/6-31 G**, utvrđeno je kako je tiazolni tautomer energijski povoljniji od imidnog tautomera za 5,1 kJ mol⁻¹.⁶²



Slika 13. Strukturne formule sulfatiazola: a) imidni tautomer i b) tiazolni tautomer.

Zahvaljujući polimorfiji sulfatiazol je tema brojnih istraživanja još od otkrića 1939. godine. Sulfatiazol kristalizira u obliku pet kristalnih formi, te tvori više od stotinu različitih solvata.^{61,63,64} Polimorfne forme sulfatiazola, kao i njihove međusobne pretvorbe istraživane su različitim metodama, među kojima i vibracijskom spektroskopijom.

In-situ Ramanovom spektroskopijom i razlikovnom pretražnom kalorimetrijom praćena je temperaturom potaknuta polimorfna pretvorba formi I i III sulfatiazola.⁶⁵ Također, Ramanovom spektroskopijom te IR spektroskopijom u srednjem i bliskom infracrvenom području kvantitativno su analizirane ternarne smjese polimorfa I, III i V sulfatiazola.⁶⁶ Sadržaj sulfatiazola u gotovim pripravcima, u smjesi sa sulfanilamidom, kvantitativno je određen Ramanovom spektroskopijom.⁶⁷

Osim entakapona i sulfatiazola koji se očekivano lako adsorbiraju na metalne nanočestice preko cijano, odnosno sulfo skupine, odabrane su i farmaceutski aktivne tvari koje posjeduju tiolnu skupinu u strukturi. Tiolna skupina dobro je poznata u području nanotehnologije. Tioli se naime samoorganiziraju u uređene slojeve na različitim metalima, među kojima je najviše istraživano zlato.^{68,69} Iako je za određene istraživačke svrhe zlato po svojim svojstvima inferiorno primjerice srebru, ono je ipak metal od izbora iz nekoliko važnih razloga. Zlatni supstrati lako se pripremaju bilo da se radi o koloidima ili pak o površinama pripremljenim naparavanjem ili elektrodepozicijom. Također, zlato se vrlo lako obrađuje nanolitografskim tehnikama. Vrlo važna karakteristika zlata je i njegova inertnost, naime ono ne oksidira na temperaturama ispod svoje temperature tališta, ne reagira s atmosferskim kisikom niti s većinom kemikalija. Nadalje, zlato ima veliki afinitet vezanja s tiolima, ali istovremeno ne reagira s njima tvoreći primjerice metalne sulfide.⁷⁰ Velik broj analitičkih tehnika poput spektroskopske elipsometrije ili refleksijsko-apsorpcijske infracrvene spektroskopije kao supstrat koristi upravo zlato u obliku tankih filmova, što je vrlo prikladno za istraživanje na zlatu adsorbiranih monoslojeva molekula. Još jedna važna karakteristika, ponajviše za primjene u biologiji, je neotrovnost zlata za živu stanicu, što ga čini kompatibilnim i pogodnim za proučavanje bioloških sustava.⁶⁹

Bilo da se radi o zlatnim površinama pripremljenim na različite načine ili zlatnim nanočesticama, pokazano je da tioli na zlatu tvore samoorganizirani monosloj. Naime, nastaje kovalentna veza između zlata i sumpora, prilikom čega se tiolni vodik gubi u obliku molekule vodika ili, ako se reakcija odvija u mediju u kojem ima kisika, u obliku molekule vode.⁷¹ Nastala Au–S veza dovoljno je jaka za zadržavanje molekula tiola uređeno vezanih na površini metala. Reakcija tiola sa zlatom je reverzibilna, što omogućuje i desorpciju monosloja, a što je vrlo pogodna karakteristika, posebice u slučaju kad se uređeni monoslojevi koriste kao predložak za pripravu metalnih nanostrukture elektrodepozicijom.⁷²

Adsorpcija tiola na zlatnu površinu provodi se na različite načine, a ovisno o prirodi tiola i tipu zlatnog supstrata. Tioli se mogu adsorbirati na zlato naparavanjem ili jednostavnim uranjanjem zlatnog supstrata u otopinu tiola.⁶⁹

Također, zlatne nanočestice prekrivene tiolima mogu se pripremiti neposredno, redukcijom soli zlata popularnom Brust-Schiffrinovom metodom.^{68,73}

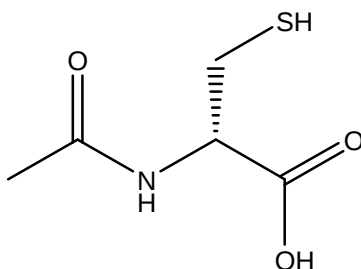
Zlatne nanočestice funkcionalizirane monoslojem molekula adsorbiranih preko tiolne skupine koriste se u različite svrhe. Prije svega, tioli sprječavaju agregaciju zlatnih nanočestica pa tako djeluju kao njihovi stabilizatori.⁷⁴ Funkcionalizirane nanočestice zlata koriste se kao biološke nanosonde za oslikavanje stanica.³² Ovisno o molekulskoj strukturi tiola, na metalnim površinama mogu se formirati nanostrukture koje potiču orijentiranu kristalizaciju ili usmjeravanje tekućih kristala.⁶⁸ Također, organski monosloj može služiti i kao predložak za izradu nanostrukturiranih metala elektrodepozicijom.⁶⁸

Čvrsto vezanje tiolne skupine na zlatni supstrat trebalo bi omogućiti i pojačanje raspršenja adsorbiranih molekula odnosno opažanje njihovih SERS spektara. U skupini farmaceutski aktivnih tvari dobro poznata molekula s tiolnom skupinom je acetilcistein, koji je odabran za istraživanje. Uz acetilcistein odabrane su još dvije strukturno vrlo slične i biološki važne molekule: cistein i glutation. Za potonje je pokazano kako doista tvore uređene monoslojeve na nanočesticama zlatnog koloida adsorpcijom preko tiolne skupine, pri čemu sprječavaju agregaciju nanočestica i omogućavaju njihovu primjenu pri istraživanju stanica karcinoma.⁷⁴

Osim poznatog vezanja tiolne skupine s površinom SERS supstrata od zlata, u literaturi su opisani prilagođeni supstrati pogodni za pojačanje raspršenog zračenja upravo molekula tiola, kao što su bimetalni koloid sa srebrnom jezgrom i zlatnim omotačem⁷⁵ te koloid srebra površine funkcionalizirane nukleotidima.⁷⁶ Općenito, bimetalne nanočestice posjeduju nešto drugačija svojstva od monometalnih nanočestica. Rezonantna frekvencija bimetalnog supstrata razlikuje se od rezonantne frekvencije supstrata pojedinog metala, a ovisi o vrsti metala koji čine bimetalni jezgra-omotač sustav, te o debljini omotača. Kombinacijom SERS aktivnosti oba metala može se postići pojačanje raspršenog zračenja koje nije opaženo s monometalnim supstratima ili povećati postojeće.^{2,77,78}

Osim bimetalnih nanočestica, kao aktivni SERS supstrat odabran je i koloid srebra koji se pripravlja redukcijom sa solima nukleotida, a za koji je utvrđeno da enantioselektivno veže *L*-enantiomer cisteina.⁷⁶ Opisani koloid srebra površine modificirane UTP nukleotidom korišten je za pojačanje raspršenja molekula s tiolnom skupinom i opažanje njihovih SERS spektra.

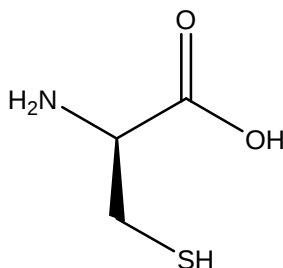
N-Acetil-*L*-cistein (2-acetamido-3-sulfanilpropanska kiselina) acetilirani je derivat aminokiseline cisteina (Slika 14). Primjenjuje se za liječenje kašlja, budući učinkovito cijepa disulfidne veze u sastavu bronhijalne sluzi, čime ju razrjeđuje.⁷⁹ Također, acetilcistein se koristi kod trovanja acetaminofenom uglavnom zbog antioksidativnog svojstva pri čemu se štiti jetra.⁸⁰ Pokazano je kako acetilcistein može pomoći i kod trovanja metil živom,⁸¹ te kako posjeduje i antitumorska svojstva.⁸²



Slika 14. Strukturna formula *N*-acetil-*L*-cisteina.

Acetilcistein nema izraženu polimorfiju, poznata je naime samo jedna njegova kristalna forma.^{83,84}

L-Cistein (2-amino-3-merkaptopropanska kiselina) neesencijalna je aminokiselina, čija je važna funkcija u organizmu vezana upravo uz njegovu tiolnu skupinu (Slika 15). Oksidacijom tiolne skupine nastaju disulfidne veze čime se stabilizira sekundarna struktura proteina.⁸⁵ S farmaceutskog aspekta cistein je vrlo važna molekula jer sudjeluje u biosintezi penicilina, te je polazni reagens u sintezi acetilcisteina.⁸⁶ Također, u organizmu cistein djeluje antioksidativno, čime štiti stanicu od oštećenja. Sudjeluje i u nastanku kože što ga čini vrlo pogodnim u liječenju opeklini i zacjeljenju postoperativnih rana.⁸⁷

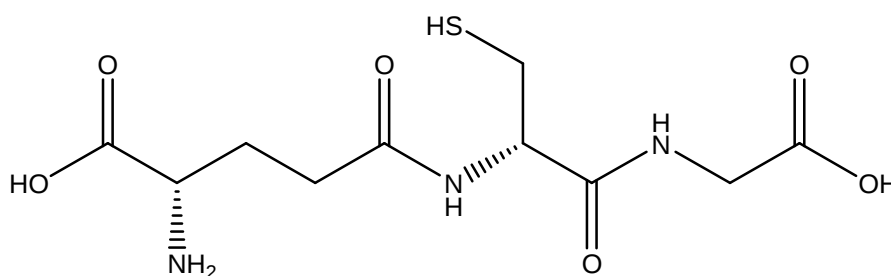


Slika 15. Strukturna formula *L*-cisteina.

U čvrstom stanju cistein pri normalnim uvjetima postoji u obliku dvije kristalne forme, rompskoj formi I i monoklinskoj formi II.^{88,89} Pri uvjetima vrlo visokih tlakova otkriveni su i dodatni metastabilni polimorfi cisteina, forme III i IV.⁹⁰

Zbog svoje biološke važnosti i reaktivnosti tiolne skupine cistein je predmet mnogobrojnih strukturnih istraživanja. Konformeri *zwitteriona* cisteina istraživani su neutronsom, Ramanovom i IR spektroskopijom.⁹¹ Temperaturno inducirani fazni prijelazi polimorfa cisteina s naglaskom na interakcije tiolne skupine praćeni su difrakcijom rendgenskih zraka i Ramanovom spektroskopijom.⁹² Provedena su i istraživanja SERS spektroskopijom cisteina i cistina primjenom različitih supstrata srebra.^{87,93}

Glutation (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicin) biološki je važan tripeptid (Slika 16). Glavni je izvor tiola u različitim tkivima, te djeluje antioksidativno reducirajući vodikov peroksid i druge perokside u stanici, čime štiti stanicu od oštećenja.⁹⁴ Različite studije pokazale su kako je razina glutathiona u tkivima povezana s različitim karcinomima, Alzheimerovom i Parkinsonovom bolesti.^{95,96,97}



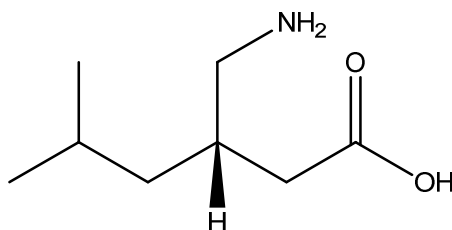
Slika 16. Strukturna formula glutathiona.

U čvrstom stanju glutathion pri normalnim uvjetima postoji u obliku jedne kristalne forme.⁹⁸ Pri uvjetima vrlo visokih tlakova, međutim, otkriveni su metastabilni polimorfi glutathiona, forme II i III.⁹⁹

Zbog svoje biološke važnosti, odnosno povezanosti razine glutathiona s različitim oboljenjima, koncentracija glutathiona u organizmu određuje se i prati različitim metodama poput masene spektrometrije, elektrokemijski ili fluorescencijskom spektroskopijom.⁴⁶ Također, glutathion se može odrediti i posredno SERS spektroskopijom, pri čemu se prati njegov utjecaj na agregaciju nanočestica srebra modificiranih molekulama rodamina.⁴⁶ SERS metoda u kombinaciji s pripravom supstrata zagrijavanjem također je korištena za proučavanje načina adsorpcije glutathiona na različite supstrate srebra.¹⁰⁰ Glutathion je analiziran i konvencionalnom SERS tehnikom primjenom zlatnog supstrata, međutim za opažanje SERS spektra 0,5 mM otopine glutathiona vrijeme snimanja spektra iznosilo je čak 30 min.¹⁰¹

U drugom pristupu razvoja SERS tehnike za analizu molekula koje same ne posjeduju svojstva nužna za njihovu detekciju, one se prevode u derivate poznate strukture i svojstava koji to omogućavaju. Primjer takve farmaceutski aktivne molekule je pregabalin.

Pregabalin (S-3-aminometil-5-metilheksanska kiselina) aktivna je farmaceutska tvar koja se koristi u liječenju anksioznosti, fibromialgije i neuropatske boli kod dijabetesa (Slika 17).^{102,103} U čvrstom stanju poznata je samo jedna kristalna forma pregabalina.¹⁰⁴



Slika 17. Strukturna formula pregabalina.

Pregabalin je odabran kao molekula za derivatizaciju zbog primarne amino skupine koja je vrlo pogodna za brzu i kvantitativnu reakciju s literaturno poznatim reagensima. Amino skupina jedna je od najučestalijih funkcionalnih skupina u strukturi aktivnih farmaceutskih tvari.

Fluorescamin i 2-iminotiolan dobro su poznati reagensi koji se u biokemiji koriste za označavanje polipeptida i proteina. Spomenute tvari odabrane su za derivatizaciju primarne amino skupine pregabalina jer reagiraju brzo, selektivno i kvantitativno.^{105,106,107} Odabrani SERS supstrat za analizu sintetiziranih derivata je koloid srebra pripremljen redukcijom srebrovog nitrata trinatrijevim citratom, budući prema literaturi i provedenim istraživanjima izrazito pojačava raspršeno zračenje, što je u slučaju detekcijske metode najvažniji faktor.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Tetraklorozlatna(III) kiselina trihidrat, 99,9%, Sigma-Aldrich

Srebrov nitrat, 99,0%, Sigma-Aldrich

Bakrov(II) sulfat, 99,0%, Sigma-Aldrich

Trinatrijev citrat, 99,0%, Sigma-Aldrich

Trinatrijev uridin trifosfat, > 80%, Sigma-Aldrich

3-Morfolinpropan-1-sulfonska kiselina, 99,5%, Sigma-Aldrich

Natrijev tetraborat dekahidrat, 99,5%, Sigma-Aldrich

Natrijev borhidrid, 98,0%, Sigma-Aldrich

Natrijev hidroksid, p.a., Kemika

Natrijev nitrat, p.a., Kemika

Natrijev klorid, p.a., Kemika

Entakapon, 99,9%, PLIVA Hrvatska d.o.o., sintetiziran prema ref. 108

Sulfatiazol, 98,0%, Sigma-Aldrich

L-Cistein 98,0%, Sigma-Aldrich

N-Acetil-L-cistein 99,0%, Sigma-Aldrich

Glutation, 98,0%, Sigma-Aldrich

Pregabalin, 99,9%, PLIVA Hrvatska d.o.o., sintetiziran prema ref. 109

Fluorescamin, 98,0%, Sigma-Aldrich

2-Iminotiolan, 98,0%, Sigma-Aldrich

Aceton, p.a., Kemika

Etanol, p.a., Kemika

Navedene kemikalije korištene su bez daljnjeg pročišćavanja. Voda za pripravu koloidnih suspenzija i mjernih uzoraka pročišćena je propuštanjem kroz Mili-Q kolonu za filtraciju i deionizaciju.

Laboratorijsko posuđe za pripravu koloida srebra prano je koncentriranom dušičnom kiselinom te temeljito ispirano deioniziranom vodom. Posuđe korišteno za pripravu koloida zlata prano je u zlatotopci te ispirano deioniziranom vodom.

3.2. SERS supstrati

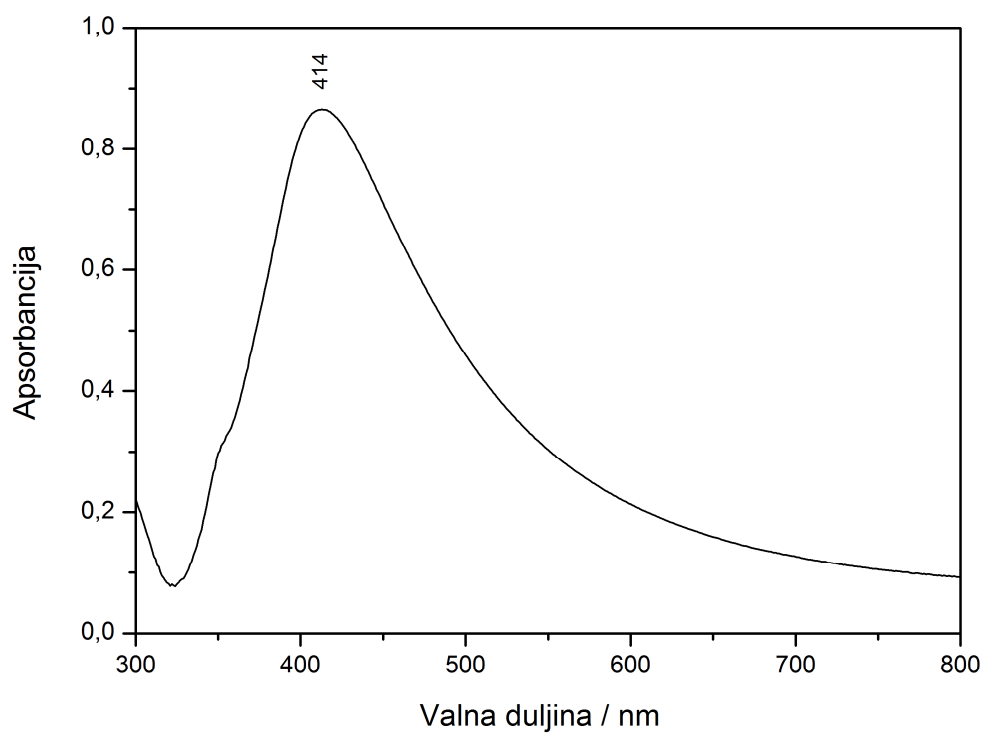
Pri istraživanju aktivnih farmaceutskih tvari kao SERS supstrati korištene su koloidne suspenzije srebra, zlata i bakra pripravljene prema literaturno opisanim postupcima. Također su pripremljeni i bimetalni koloid s jezgrom od srebra i omotačem od zlata, te koloid srebra površine funkcionalizirane uridin trifosfatom.

Osim koloidnih supstrata, za pojačanje raspršenog zračenja primijenjene su i SERS aktivne površine: zlatna pločica *Klarite* te monokristal srebra (ploha (100)).

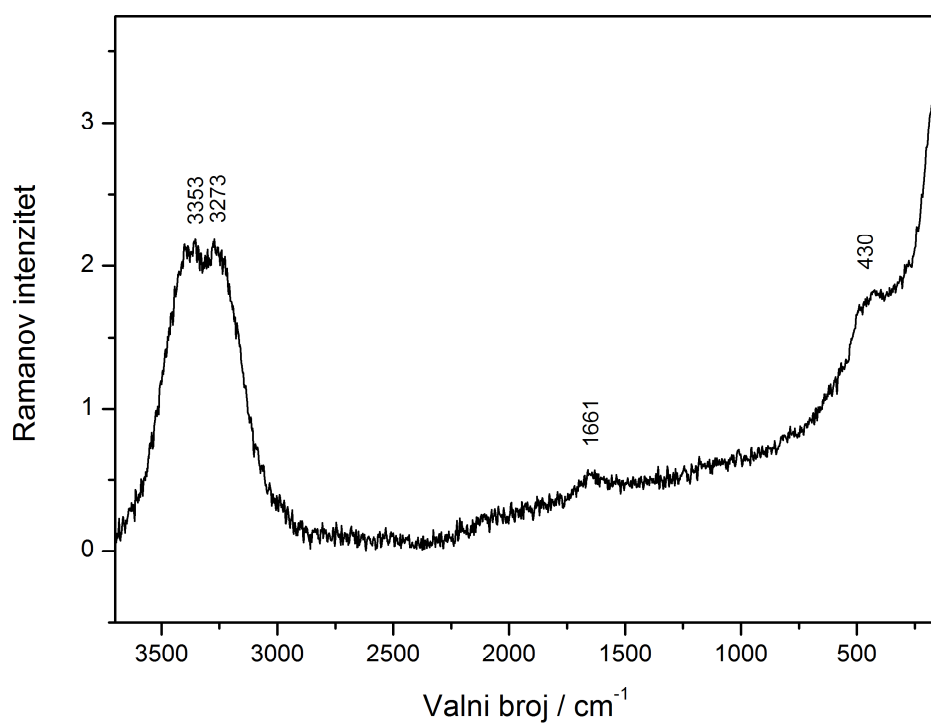
3.2.1. Koloid srebra 1

Koloid srebra 1 (Ag koloid 1) pripremljen je redukcijom srebrova nitrata s trinatrijevim citratom prema modificiranom Lee-Meislovom postupku.^{22,110} Otopina srebrova nitrata u deioniziranoj vodi ($c = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 40 \text{ mL}$) zagrijana je do vrenja. U otopinu je potom dodano 800 μL vodene otopine trinatrijeva citrata ($c = 5,6 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$). Reakcijska smjesa grijana je uz refluks 1 h. Pripremljenoj neprozirnoj, sivoj suspenziji srebra izmjerena je pH vrijednost 9,7 te joj je snimljen UV/Vis spektar (Slika 18). ApSORPCIJSKI maksimum sintetiziranog koloida, koji odgovara frekvenciji površinskih plazmona srebra, zabilježen je pri 414 nm.

Ramanov spektar pripravljene koloidne suspenzije srebra prikazan je na Slici 19. Široka vrpca između 3500 i 3100 cm^{-1} odgovara istezanju O–H veza vode, dok su vrlo slaba široka vrpca 1661 cm^{-1} kao i ona pri 430 cm^{-1} pripisane deformacijskim H–O–H modovima molekula vodenog medija.¹¹¹



Slika 18. UV/Vis apsorpcijski spektar Ag koloida 1.

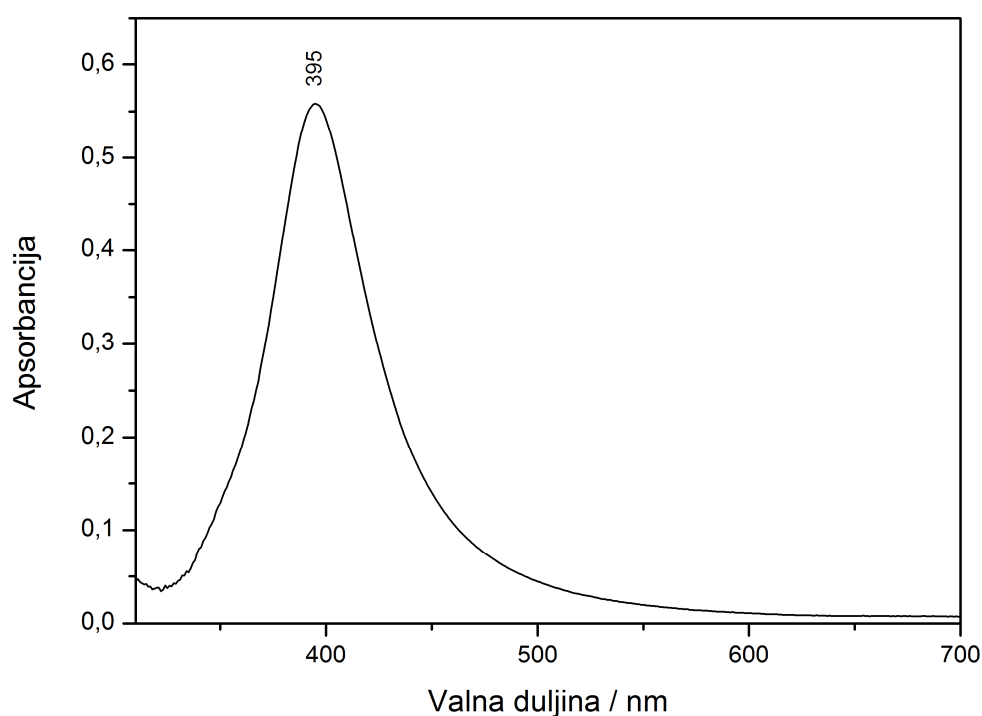


Slika 19. Ramanov spektar Ag koloida 1; pobuda pri 1064 nm.

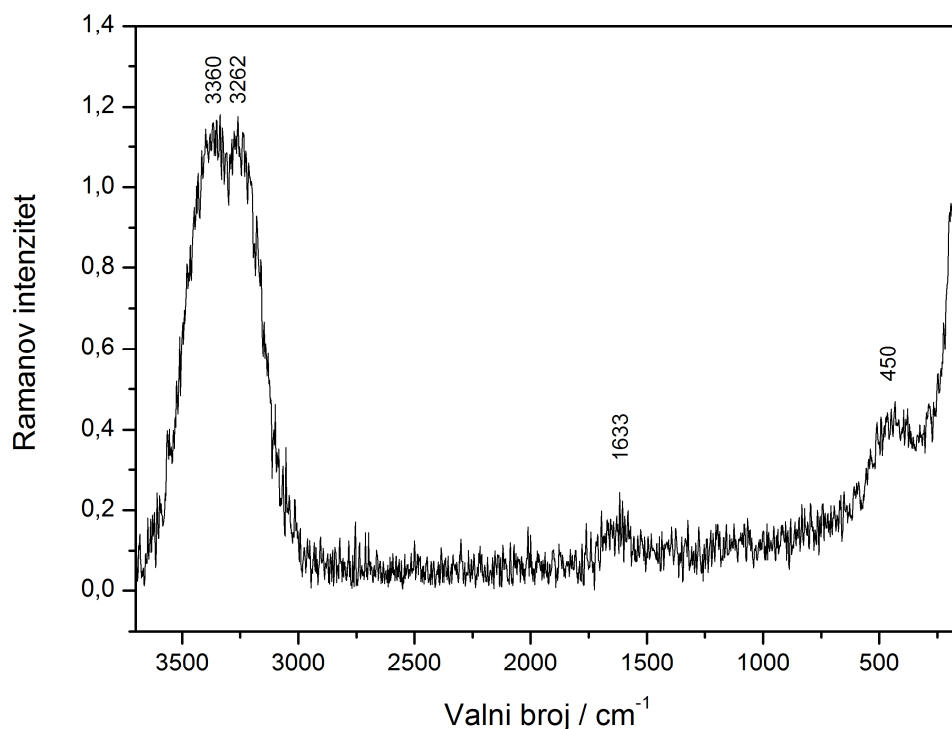
3.2.2. Koloid srebra 2

Koloid srebra 2 (Ag koloid 2) pripremljen je redukcijom srebrova nitrata s natrijevim borhidridom.¹¹⁰ Otopina srebrova nitrata u deioniziranoj vodi ($c = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 10 \text{ mL}$) dokapana je u 30 mL vodene otopine natrijeva borhidrida ($c = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) hladene u ledenoj kupelji. Reakcijska smjesa stajala je 1,5 h na sobnoj temperaturi, nakon čega je snažno miješana 10 min. Pripremljena neprozirna, žuto-siva suspenzija srebra, pH vrijednosti 8,3, karakterizirana je UV/Vis spektroskopijom (Slika 20). Koloid srebra 2 maksimalno apsorbira zračenje pri 395 nm.

U Ramanovom spektru pripravljene koloidne suspenzije srebra opažene vrpce pripisane su vibracijskim modovima vode: istezanju O–H veza pri približno 3300 cm^{-1} te deformacijama molekule vode pri 1633 i 450 cm^{-1} (Slika 21).



Slika 20. UV/Vis spektar Ag koloida 2.

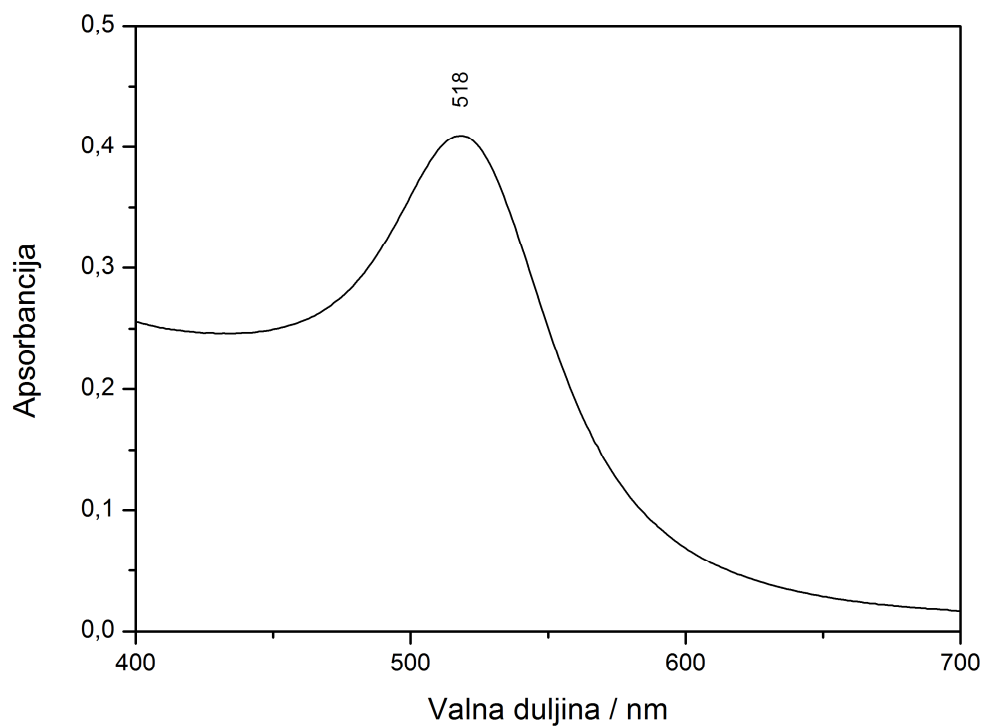


Slika 21. Ramanov spektar Ag koloida 2; pobuda pri 1064 nm.

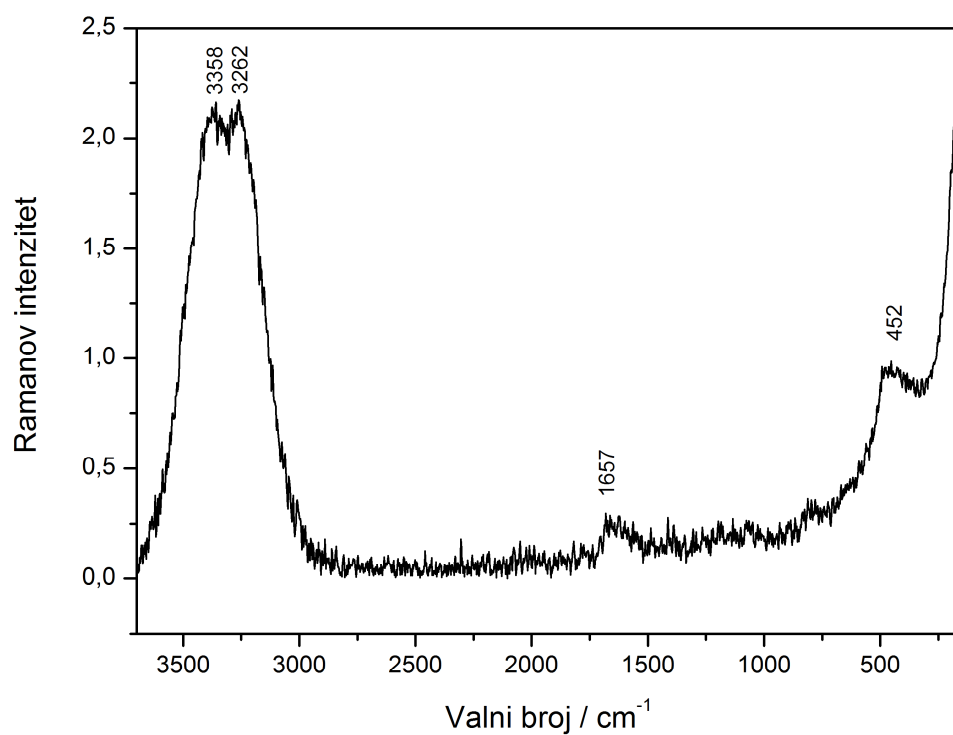
3.2.3. Koloid zlata

Koloid zlata (Au koloid) pripremljen je redukcijom tetraklorzlatne(III) kiseline s trinatrijevim citratom koristeći modificiranu Lee-Meislovu metodu.^{22,110} Vodena otopina tetraklorzlatne(III) kiseline ($c = 0,3 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 40 \text{ mL}$) zagrijana je do vrenja. U otopinu je potom dodana vodena otopina trinatrijeva citrata ($c = 5,6 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1 \text{ mL}$) i reakcijska smjesa miješana uz refluks 5 min. Pripremljena je bistra, intenzivno crvena suspenzija zlata, pH vrijednosti 5,9. Maksimalna apsorpcija sintetiziranog koloida, koja odgovara frekvenciji površinskih plazmona zlata, opažena je pri 518 nm (Slika 22).

Ramanov spektar Au koloida odgovara onom vodenog medija (Slika 23), pri čemu su vrpce u spektru pripisane isteznoj vibraciji ($3500\text{--}3100 \text{ cm}^{-1}$) i deformacijskim vibracijama (1657 i 452 cm^{-1}) molekule vode.¹¹¹



Slika 22. UV/Vis spektar Au koloida.

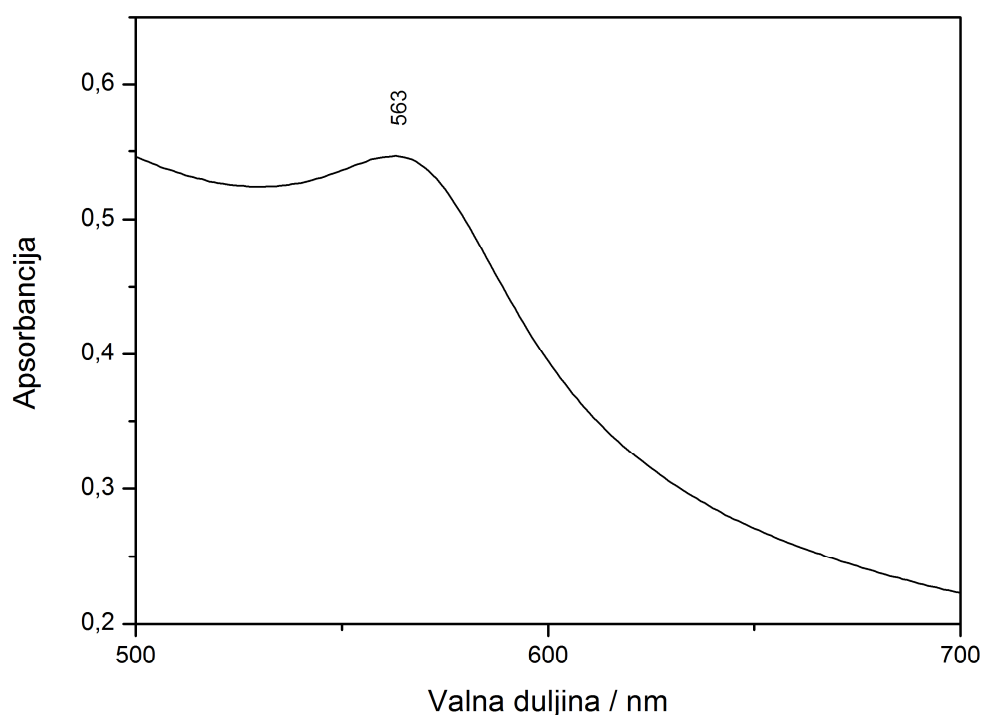


Slika 23. Ramanov spektar Au koloida; pobuda pri 1064 nm.

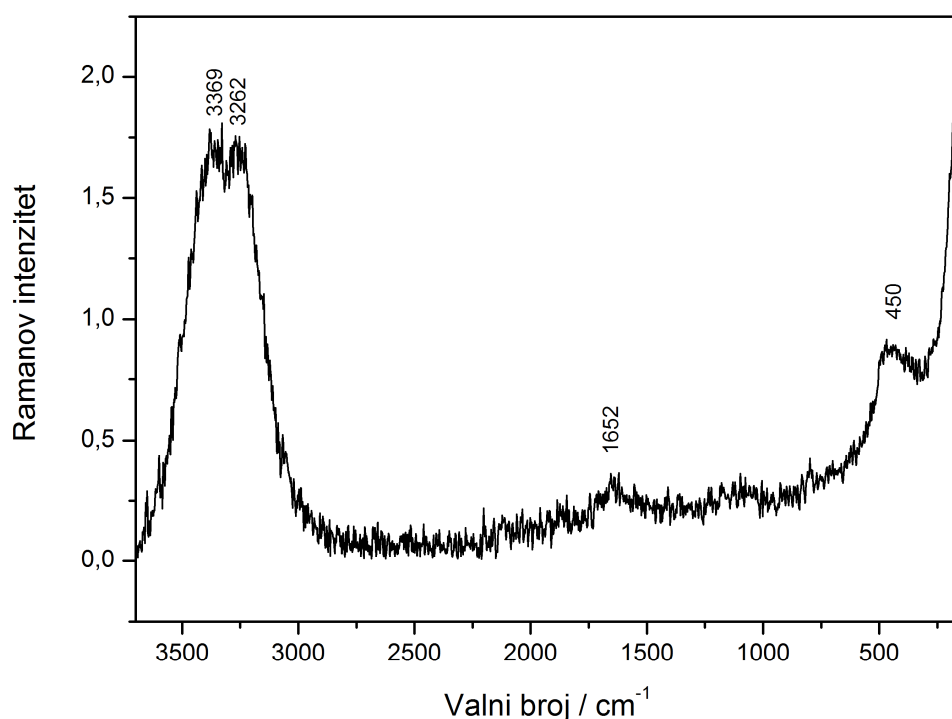
3.2.4. Koloid bakra

Koloid bakra (Cu koloid) pripravljen je redukcijom bakrova(II) sulfata s trinatrijevim citratom i natrijevim borhidridom.¹¹⁰ Otopina bakrova(II) sulfata ($c = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 5 \text{ mL}$) dodana je u otopinu trinatrijeva citrata ($c = 5,6 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 60 \text{ mL}$). U reakcijsku smjesu potom je dodana svježe pripremljena otopina natrijeva borhidrida ($c = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 30 \text{ mL}$) u natrijevoj lužini ($c = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$). Reakcijska smjesa stajala je 1,5 h pri sobnoj temperaturi. Pripremljena je bistra, tamno smeđa suspenzija bakra pH vrijednosti 11,6. Apsorpcijski maksimum pripremljenog koloida koji odgovara frekvenciji površinskih plazmona bakra zabilježen je pri 560 nm (Slika 24).

Ramanov spektar koloidne suspenzije bakra odgovara spektru vodenog medija, a opažene vrpce već opisanim vibracijskim modovima molekula vode (Slika 25).



Slika 24. UV/Vis spektar Cu koloida.

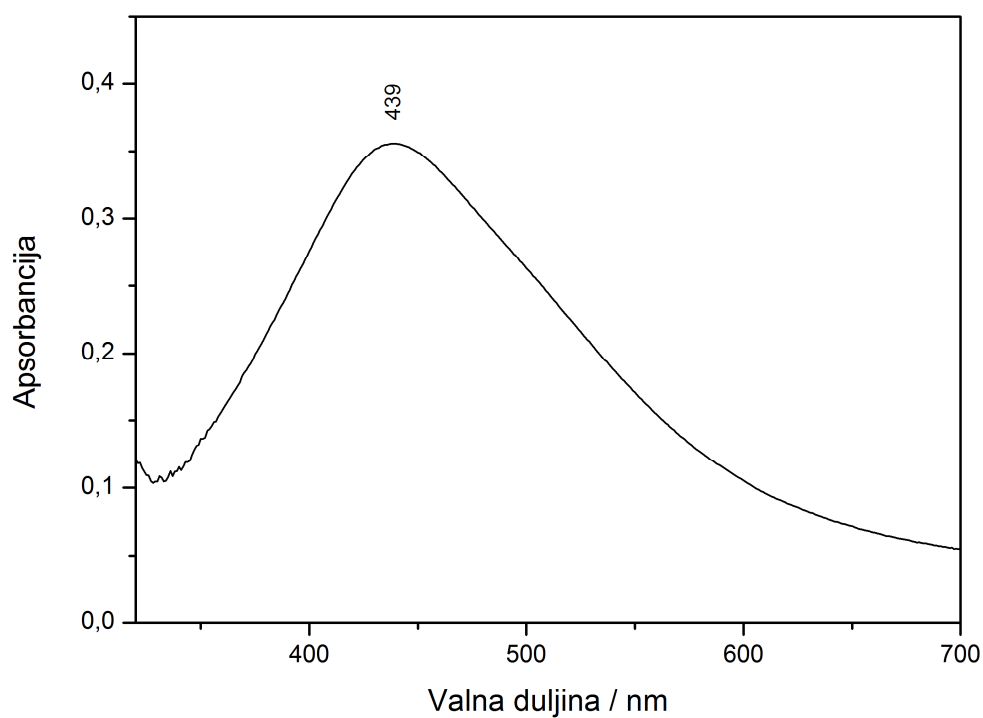


Slika 25. Ramanov spektar Cu koloida; pobuda pri 1064 nm.

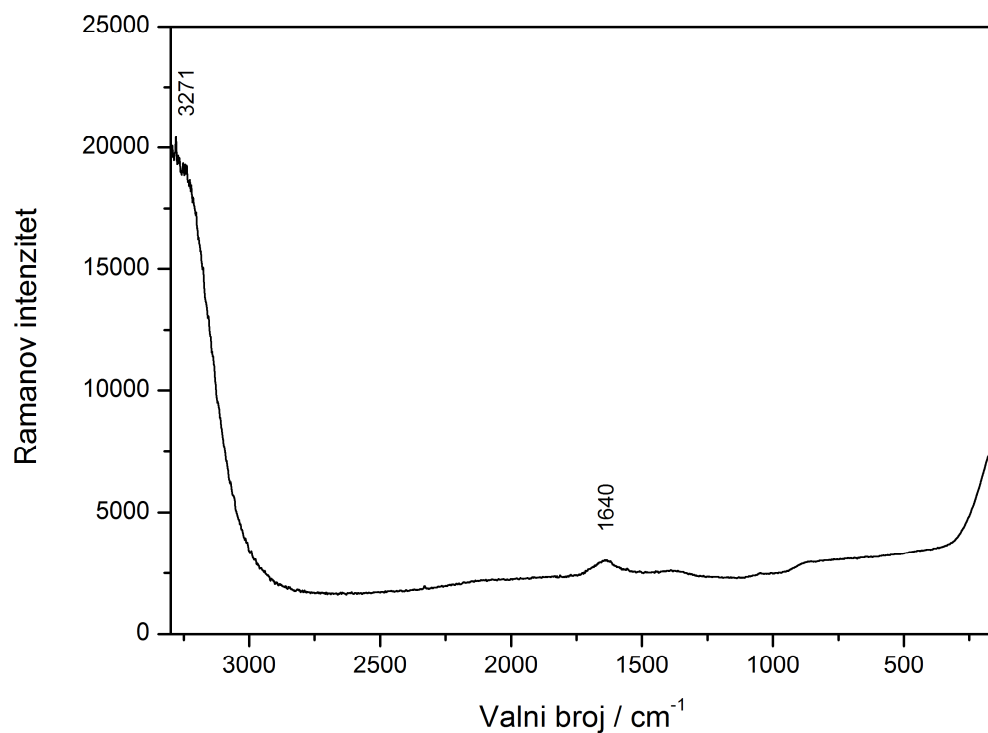
3.2.5. Bimetalni koloid srebra i zlata

Bimetalni SERS supstrat od srebra i zlata (Ag@Au koloid) pripremljen je modificiranom Lee-Meislovom metodom u dvije faze.⁷⁵ U prvoj fazi pripravljene su srebrne jezgre bimetalnih nanočestica metodom opisanom za Ag koloid **1**. Koloidna suspenzija srebra **1** centrifugirana je pri 3500 okretaj/min tijekom 30 min. Pažljivo odvojen žućkasti, opalescentni supernatant korišten je za daljnju pripremu bimetalnog supstrata. Supernatant ($V = 40$ mL) zagrijan je do vrenja. Istovremeno i trenutno su dodane vodene otopine trinitrijevog citrata ($c = 1,4 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³, $V = 8$ mL) i tetraklorzlatne(III) kiseline ($c = 8,3 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³, $V = 8$ mL). Reakcijska smjesa zagrijavana je uz refluks i miješanje 1 h. Pripremljena je sivo-narančasta suspenzija pH vrijednosti 9,8. Budući je Ag@Au koloid namijenjen za tiolne analite sklone stvaranju disulfidnih veza u lužnatim uvjetima, pH koloidne suspenzije (9,8) podešen je dodatkom pufera na vrijednost 7,0. MOPS pufer (pH = 7,0) prethodno je pripremljen otapanjem natrijeva nitrata ($c = 0,05$ mol dm⁻³) i 3-morfolinpropan-1-sulfonske kiseline ($c = 0,02$ mol dm⁻³) u deioniziranoj vodi.⁷⁶ Rezonantna frekvencija površinskih plazmona Ag@Au koloida opažena je u apsorpcijskom spektru pri 439 nm (Slika 26).

Ramanov spektar Ag@Au koloidne suspenzije pri pH 7,0 odgovara spektru vodenog medija (Slika 27).



Slika 26. UV/Vis spektar Ag@Au koloida.

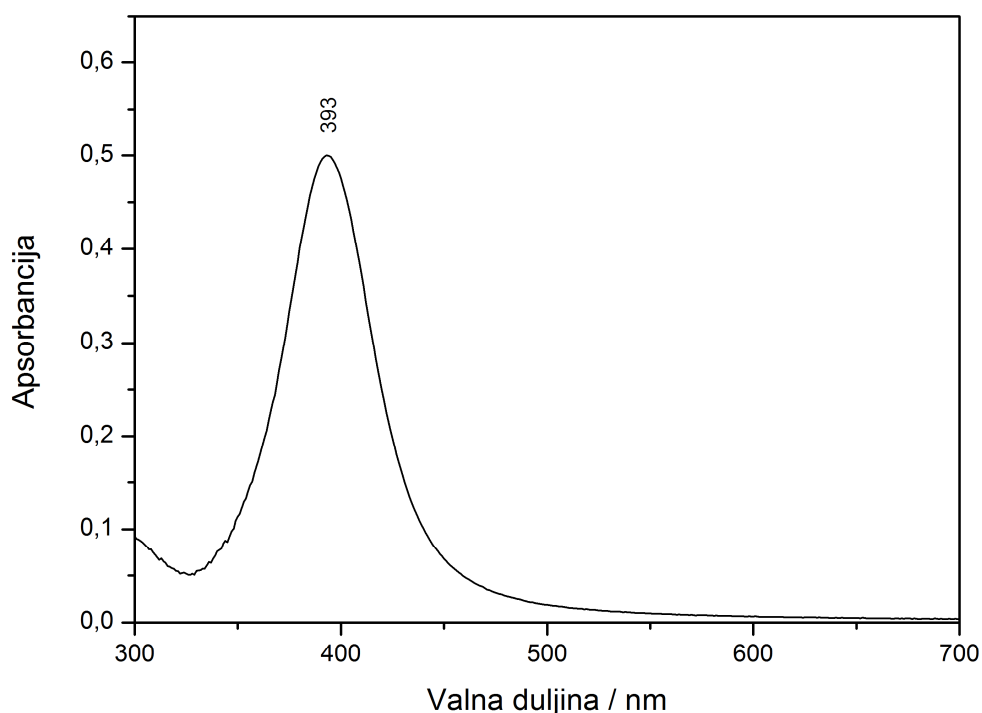


Slika 27. Ramanov spektar Ag@Au koloida; pobuda pri 785 nm.

3.2.6. Koloid srebra funkcionaliziran nukleotidom

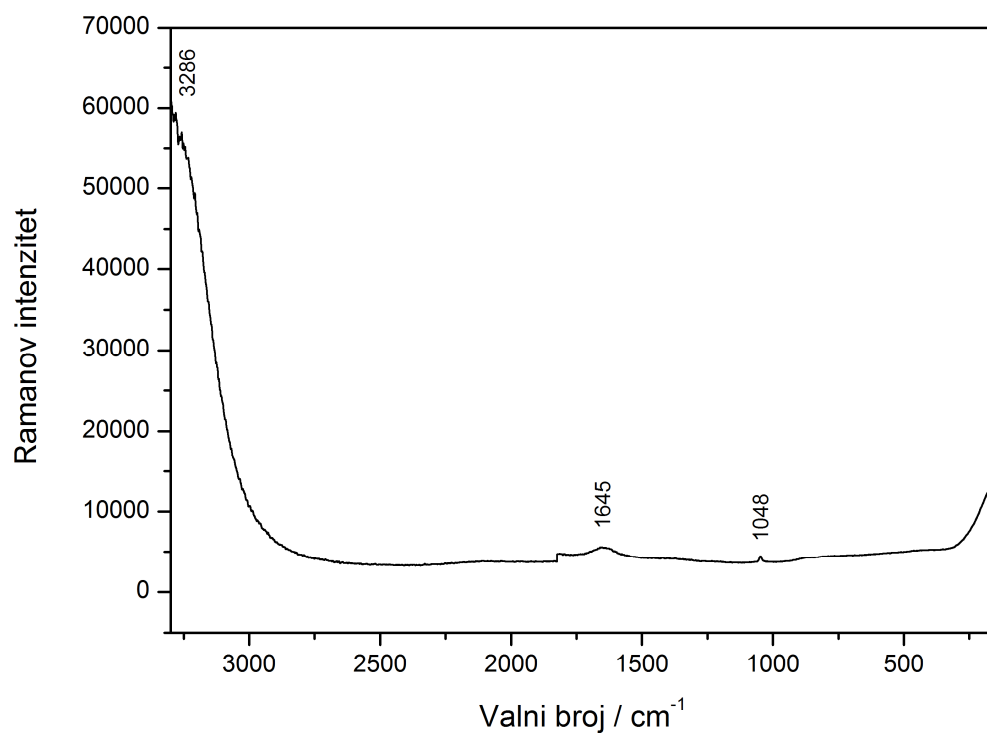
Nukleotidom funkcionalizirani koloid srebra (Ag koloid **3**) pripravljen je redukcijom srebrova nitrata natrijevim borhidridom u prisutnosti nukleozid trifosfata.⁷⁶ Pomiješani su jednaki volumeni vodenih otopina srebrova nitrata ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 62,5 \text{ }\mu\text{L}$) i uridin trifosfata (UTP) ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 62,5 \text{ }\mu\text{L}$). Nakon 30 min na sobnoj temperaturi smjesa je razrijeđena s 25 mL deionizirane vode. U reakcijsku je smjesu potom dodana svježe pripremljena vodena otopina natrijeva borhidrida ($c = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,5 \text{ mL}$) uz snažno miješanje. Pripremljena žuta suspenzija miješana je pri sobnoj temperaturi tijekom 30 min, te je inkubirana na temperaturi od 4°C tijekom 12 h. S obzirom da je pH vrijednost koloidne suspenzije iznosila 10,0, a u svrhu sprječavanja oksidacije tiolne skupine analita, neutralni medij (pH 7,0) podešen je dodatkom MOPS pufera.

Apsorpcijski maksimum koloida srebra površine funkcionalizirane nukleotidom zabilježen je pri 393 nm (Slika 28).



Slika 28. UV/Vis spektar Ag koloida **3**.

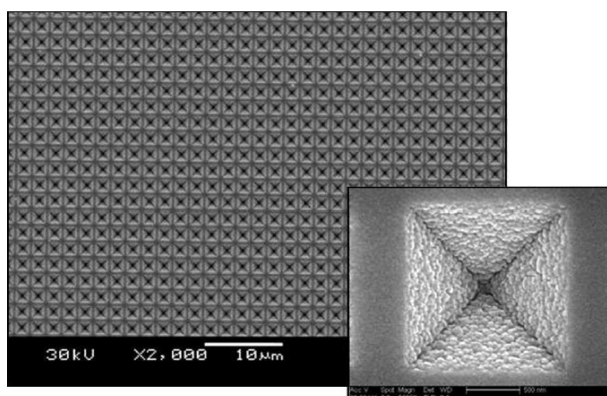
U Ramanovom spektru koloida srebra funkcionaliziranog s UTP opažene su vrpce vibracijskih modova molekule vode, istezanja pri 3286 cm^{-1} i svijanja pri 1645 cm^{-1} . Slaba vrpca pri 1048 cm^{-1} pripisana je antisimetričnom istezanju fosfatne skupine nukleotida na površini nanočestica srebra (Slika 29).¹¹¹



Slika 29. Ramanov spektar Ag koloida **3**; pobuda pri 785 nm.

3.2.7. Zlatna pločica Klarite

Zlatne pločice *Klarite* nabavljene su od tvrtke Renishaw Diagnostics (Glasgow, UK) te su korištene jednokratno. Površina zlatne pločice sastoji se od pravilno raspoređenih piramidalnih udubljenja (Slika 30). U udubinama i na spojevima stranica očekuje se najveće pojačanje Ramanovog raspršenja. Površina pločice nije ničime tretirana prije adsorpcije analita.



Slika 30. SEM slika površine zlatnog supstrata *Klarite*.¹

3.2.8. Monokristal srebra

Monokristalni valjčić srebra Ag (100), visine 10 mm i promjera 12 mm, kupljen je od tvrtke Goodfellow Ltd (Huntingdon, UK). Prije nanošenja analita odnosno SERS mjerenja, površina baze valjčića polirana je ultra finim brusnim papirom, ispirana acetonom, te sušena u struji dušika.

3.3. Priprava otopina i mjernih uzorka

3.3.1. Priprava otopina

Ishodna otopina entakapona *E* koncentracije 1×10^{-3} mol dm⁻³ pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase krute tvari u etanolu. Otopine nižih koncentracija (1×10^{-4} mol dm⁻³, 1×10^{-5} mol dm⁻³, 1×10^{-6} mol dm⁻³) korištene za pripravu mjernih uzoraka pripremljene su razrjeđivanjem ishodne otopine etanolom.

Ishodne otopine izomera entakapona *E* i *Z* koncentracije $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pripravljene su otapanjem odgovarajućih masa krute tvari u etanolu. Smjese izomera u rasponu od 0 do 100% izomera *Z*, odnosno izomera *E*, korištene za kvantitativna istraživanja, pripremljene su miješanjem odgovarajućih volumena pojedinih ishodnih otopina, pri čemu je ukupna koncentracija entakapona u svakoj smjesi iznosila $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Ishodna otopina sulfatiazola koncentracije $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase krute tvari u deioniziranoj vodi. Otopine nižih koncentracija ($1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) korištene za pripremu mjernih uzoraka pripremljene su razrjeđivanjem ishodne otopine deioniziranom vodom.

Ishodne otopine acetilcisteina, cisteina i glutathiona koncentracije $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ pripravljene su otapanjem odgovarajućih masa krutih tvari u deioniziranoj vodi. Za pripremu mjernih uzorka pripremljene su otopine nižih koncentracija ($1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) razrjeđivanjem ishodne otopine deioniziranom vodom.

3.3.2. Priprava derivata pregabalina

3.3.2.1. Priprava derivata pregabalina s fluorescaminom

Boratni pufer pripremljen je miješanjem $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ($c = 2,4 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) i klorovodične kiseline ($c = 8,8 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u deioniziranoj vodi.

Otopina pregabalina u boratnom puferu pH 9,0 ($c = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 700 \text{ }\mu\text{L}$) pomiješana je s otopinom fluorescamina u suhom acetonu ($c = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 700 \text{ }\mu\text{L}$). Otopina je inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi.

Reakcijski produkt s fluorescaminom daje intenzivno plavo obojenje pod UV svjetlom pri 365 nm.

Reakcijska otopina izravno je korištena za SERS mjerenja, bez izolacije produkta.

3.3.2.2. Priprava derivata pregabalina s 2-iminotiolanom

Otopina pregabalina u deioniziranoj vodi ($c = 0,10 \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1 \text{ mL}$) pomiješana je s otopinom 2-iminotiolana u deioniziranoj vodi ($c = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1 \text{ mL}$). Smjesa je inkubirana 1 h pri sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa uparena je do suha te je izoliran amorfni bijeli, smolasti produkt.

Molekulska struktura produkta potvrđena je NMR i Ramanovom spektroskopijom.

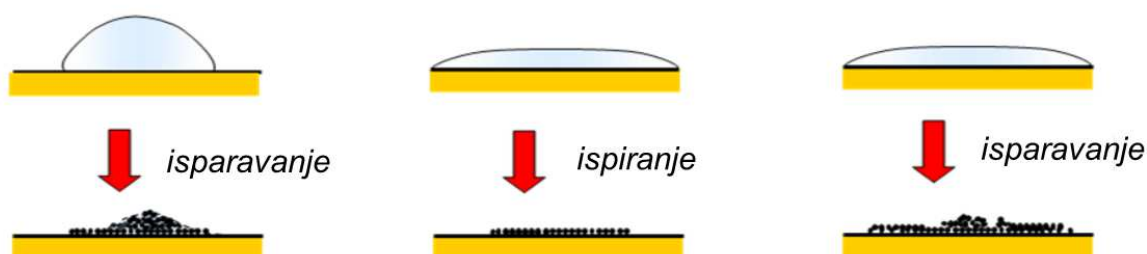
Ishodna otopina sintetiziranog derivata koncentracije $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase krute tvari u deioniziranoj vodi. Otopine nižih koncentracija za daljnja istraživanja ($1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) pripremljene su razrjeđivanjem ishodne otopine deioniziranom vodom.

3.3.3. Priprava mjernih uzoraka u koloidnim suspenzijama

Sustavi koloid-analit pripremani su neposredno prije samog mjerenja. U staklenoj viali ($V = 2 \text{ mL}$) mikropipetom redom su dodavani: $900 \text{ }\mu\text{L}$ koloidne suspenzije, $100 \text{ }\mu\text{L}$ agregacijskog agensa te $100 \text{ }\mu\text{L}$ otopine analita. Sustav je kratko promiješan te nanesen kapalicom u aluminijsku posudicu ili staklenu kapilaru ovisno o mjernom instrumentu. Za agregaciju metalnih koloida korištene su vodene otopine natrijevog nitrata ($c = 1,0 \text{ mol dm}^{-3}$) i natrijevog klorida ($c = 1,0 \text{ mol dm}^{-3}$).

3.3.4. Priprava mjernih uzorka na metalnim površinama

Analit se na metalne površine nanosio adsorpcijom iz kapljice otopine analita. Prilikom pripreme uzorka valjalo je voditi računa o viskoznosti otapala u kojem je analit otopljen. Naime viskozno otapalo može uzrokovati nastajanje više slojeva analita na SERS supstratu. Budući se raspršenje zračenja postiže iz monosloja molekula direktno adsorbiranih na površini metala u slučaju viskoznog otapala nakon sušenja i adsorpcije, višak molekula može se isprati (Slika 31). Također, može se koristiti i manje viskozno otapalo kako bi se postigla jednolika adsorpcija molekula analita na površini metala.



Slika 31. Adsorpcija molekula analita na površinu metala iz otapala različite viskoznosti.

Prije SERS mjerenja kap otopine analita ($V = 0,5 \mu\text{L}$) pažljivo je nanescena mikropipetom na sredinu zlatne pločice *Klarite*. Nakon što je otapalo isparilo spektri su snimani na različitim mjestima pločice.

U slučaju srebrnog monokristala kap otopine analita ($V = 0,5 \mu\text{L}$) nanescena je na ispoliranu bazu Ag valjčića te spektri snimani nakon isparavanja otapala.

3.4. Mjerni uređaji i metode

3.4.1. Ramanova spektroskopija pri 1064 nm

Za snimanje Ramanovih i SERS spektara korišten je FT-IR spektrometar s FT-Raman modulom NXR, model Nicolet 6700 tvrtke Thermo Electron Corporation, opremljen s Nd:YVO₄ laserom koji emitira zračenje pri 1064 nm, djeliteljem zrake od CaF₂, te detektorom od Ge hlađenim tekućim dušikom. Spektri su snimani nakon izlaganja zračenju lasera snage 1 W, u području 4000–155 cm⁻¹ pri razlučivanju 4,0 cm⁻¹, a rezultat su uprosječivanja 128 snimaka. Uzorci su snimani u staklenoj kapilari promjera 5 mm. Snimljeni spektri obrađeni su u programu OPUS 6.0.

3.4.2. Ramanova spektroskopija pri 785 nm

Ramanovi i SERS spektri snimani su pomoću Ramanovog spektrometra model RamanRXN1 tvrtke Kaiser Optical Systems, s laserskom diodom koja emitira zračenje pri 785 nm kao izvorom zračenja i termo-električno hlađenim uređajem s prijenosom naboja (*charge-coupled device*, CCD) kao detektorom. Pri usmjeravanju zračenja na uzorak korištena je sonda optičkih vlakana promjera 100 μm . Spektri su snimani nakon pobude zračenjem lasera snage 100 mW, u području 3450–150 cm⁻¹. Konačan Ramanov spektar rezultat je uprosječivanja 3 snimke uzorka tijekom 10 s izlaganja zračenju. Uzorci su snimani u aluminijskim posudicama volumena 500 μL koje ne daju odziv u Ramanovom spektru. Snimljeni spektri obrađeni su u programu OPUS 6.0.

3.4.3. Ramanova spektroskopija pri 514 nm

SERS spektri snimani su nakon pobude pri 514 nm pomoću Ramanovog spektrometra T64000 tvrtke Horiba JobinYvon u Laboratoriju za molekulsku fiziku Instituta Ruđer

Bošković. Spektri su snimani nakon pobude zračenjem lasera snage 20 mW, u području 2500–400 cm⁻¹ uprosječivanjem 3 snimke od kojih je svaka snimana 10 s. Za uzorke su korištene aluminijske posudice volumena 500 µL. Snimljeni spektri obrađeni su u programu OPUS 6.0.

3.4.4. UV/Vis spektrofotometrija

UV/Vis apsorpcijski spektri snimani su pomoću UV/VIS spektrofotometra Cary 300 Scan tvrtke Varian. Spektri su snimani u području između 200 i 800 nm. Korištene su standardne kvarcne kivete (10 mm × 10 mm).

3.4.5. Mjerenje pH

Za mjerenje pH vrijednosti korišten je pH metar tvrtke MeterLab (model PHM 240) s kombiniranom staklenom-kalomel elektrodom PHC 2001-8/11115-F-07. Uređaj je prije mjerenja baždaren s otopinama pufera pH 4,01, 7,00 i 10,01.

3.4.6. Difrakcija rendgenskih zraka na polikristalnom uzorku

Difraktogrami praha kristalnih uzoraka snimani su pomoću difraktometra za praškaste uzorke Philips X'Pert PRO X-ray, opremljenim s izvorom zračenja Cu, $\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$, i detektorom X'Celerator (2.022 °2 θ). Difraktogrami uzoraka na silicijskim pločicama snimani su u kutnom rasponu 2 θ od 3 do 40°, kontinuiranim snimanjem, brzinom 37 s po koraku, te veličinom koraka 2 θ od 0,0167°.

3.4.7. Nuklearna magnetska rezonancija

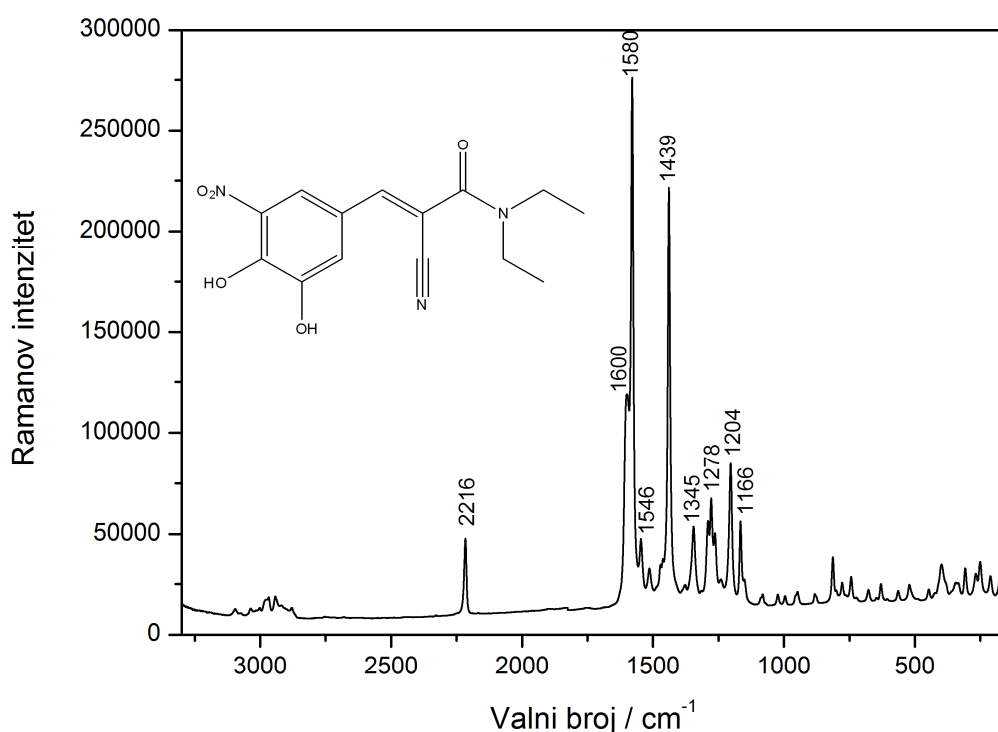
Jednodimenzionalni NMR spektri (¹H, ¹³C-APT) snimljeni su u tvrtki GALAPAGOS, Zagreb, Hrvatska, pomoću NMR spektrometra Avance DRX 400 tvrtke Bruker pri frekvencijama 400,1 i 100,6 MHz. Kao otapalo za pripravu mjernih uzoraka korišten je deuterirani dimetil-sulfoksid, DMSO-*d*₆.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Entakapon

4.1.1. Ramanov spektar entakapona E

Ramanov spektar entakapona E, polimorfa A prikazan je na Slici 32, a opažene vibracijske vrpce asignirane u Tablici 1.^{111,112}



Slika 32. Ramanov spektar entakapona E, polimorfa A; pobuda pri 785 nm.

Vrpca umjerenog intenziteta pri 2216 cm⁻¹ pripisana je istezanju C≡N veze. Srednje jaka vrpca pri 1600 cm⁻¹ odgovara istezanju C=O skupine konjugirane s dvostrukom C=C vezom i fenilnim prstenom, dok je vrlo jaka vrpca pri 1580 cm⁻¹ posljedica istezne vibracije benzena. Istezanje aromatskog prstena te svijanje metilne i metilenskih grupa rezultiraju intenzivnom vrpcom pri 1439 cm⁻¹. Vrpcoma u području 1300–1250 cm⁻¹ doprinose deformacijske vibracije CH skupina, kao i istezanja C–O veza. Na istezanje C–N veze upućuje vrpca pri 1204 cm⁻¹. Srednje jake vrpce opažene pri 1546 cm⁻¹ i 1345 cm⁻¹ posljedica su antisimetričnog odnosno simetričnog istezanja N–O veza.

Tablica 1. Vibracijske vrpce u Ramanovom spektru i SERS spektrima entakapona *E*.

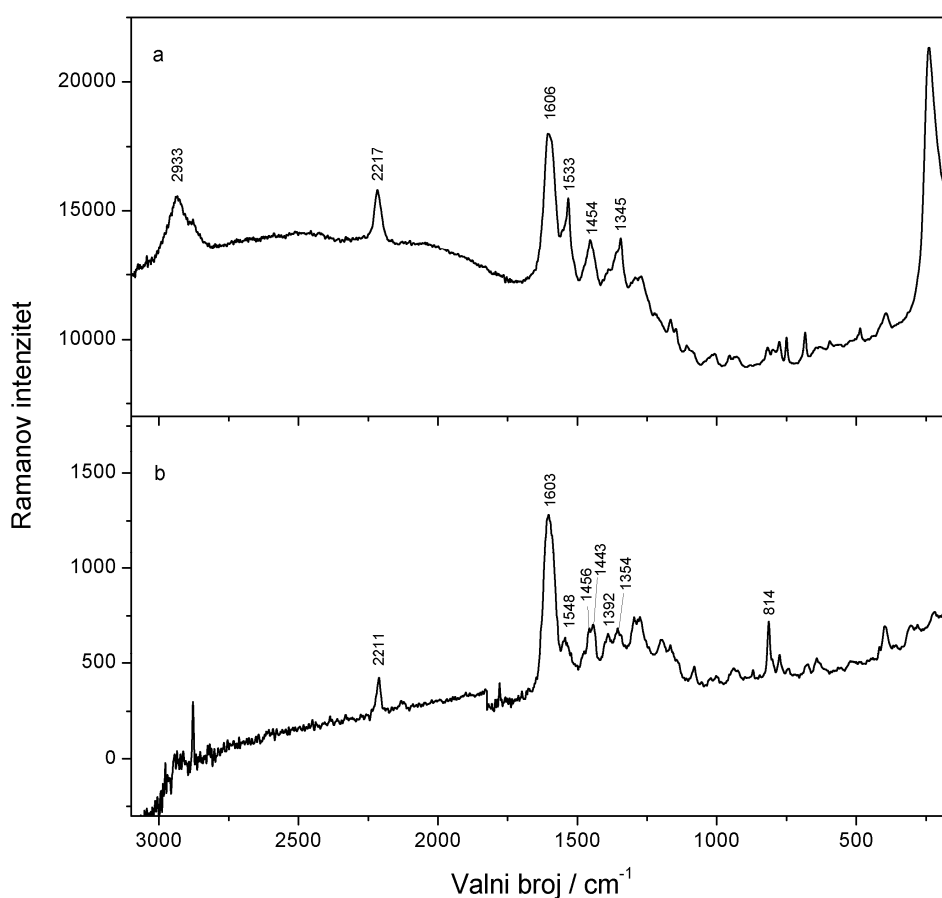
Valni broj / cm ⁻¹					Vibracija
Raman	SERS				
Čvrsto stanje Polimorf A	Au pločica	Ag valjčić	Ag koloid	Cu koloid	
3095 vw					ν C-H (prsten)
3037 vw					ν C-H (C=CH)
2978 w			2976 vw	2983 m	ν _{as} C-H (CH ₃)
2943 w		2933 m	2935 w	2936 s	ν _{as} C-H (CH ₂)
2880 vw		2879 w	2888 vw	2885 m	ν _s C-H (CH ₃ , CH ₂)
2216 m	2211 m	2217 m	2209 s	2202 w	ν C≡N
1600 m	1603 vs	1606 vs	1591 sh		ν C=O
1580 vs			1568 vs		ν CC (prsten)
				1556 s	ν _{as} N-O (NO ₂); ν CC (prsten)
1546 m	1548 m	1533 s	1503 s		ν _{as} N-O (NO ₂)
1439 s	1456 m	1454 m	1434 m	1459 s	ν CC (prsten); δ _{as} CH ₃ ; δ _{sc} CH ₂
	1443 s				ν CC (prsten)
	1392 m	1390 sh	1415 m	1408 m	ν CC (prsten)
		1355 sh	1348 sh		δ _s CH ₃
1345 m	1354 m	1345 m	1334 s	1331 s	ν _s N-O (NO ₂)
1291 m	1296 s	1292 w			δ _{wg} CH ₂
1278 m	1277 s	1271 w	1268 w	1270 w	δ _{ip} CH; ν C-OH
1264 m					δ _{ip} CH; ν C-OH
1204 m	1196 m		1212 w	1191 w	ν C-N
1166 m	1168 m	1166 w	1168 vw	1161 w	δ prsten
	1142 w	1146 w	1143 w	1130 vw	δ prsten
		1108 w	1104 vw		δ COH
1081 vw	1082 w	1089 sh		1089 vw	δ COH
				1049 w	ν _{as} C-C-O
1024 vw	1021 w		1025 vw		δ _{ip} CH
996 vw	1005 vw	1009 vw		989 vw	ν C-C
		954 vw	952 vw		δ _{ip} CH
948 vw	929 w		927 vw	923 vw	ν C-C≡N
882 vw	870 vw		880 vw	881 w	ν _s C-C-O
814 w	814 s	818 w	826 w	818 vw	δ _{oop} CH (C=CH)
	802 sh	799 w	793 vw		δ _{oop} CH
779 vw	774 m	776 w	775 w	777 vw	δ _{oop} CH
745 vw	743 vw	750 w	739 vw		δ _{oop} CH
677 vw	679 w	683 w	680 vw	692 vw	δ prsten
630 vw	640 w		647 vw	619 vw	δ prsten
564 vw		595 vw	572 vw		δ _{oop} CH
521 vw	520 vw		536 vw	532 vw	
447 vw			454 vw	435 vw	
399 w	397 m	394 w	388 vw		δ _{ip} C-C≡N
		239 vs			ν Ag-N
	218 vw				ν Au-N

Iako bi se na temelju molekulske strukture u spektru očekivala jaka vrpca simetričnog istezanja nitro skupine, njen intenzitet je slab. Naime, na izgled Ramanovog spektra entakapona *E* uvelike utječe njegova kristalna struktura. Kristalna struktura polimorfa A entakapona *E* opisana je u kristalografskoj bazi podataka *Cambridge* pod nazivom *OFAZUQ*.⁴⁹ Iz strukture je vidljivo da jedan kisikov atom nitro skupine sudjeluje u intramolekulskoj vodikovoj vezi s vodikom susjedne hidroksilne skupine, što otežava simetrično istezanje nitro skupine. Općenito, Ramanov spektar tvari ovisi o njezinoj kristalnoj strukturi, što vrlo često i omogućava razlikovanje polimorfa Ramanovom spektroskopijom.¹¹³ Prikaz vodikovih veza u kristalu entakapona *E* (polimorf A), nalazi se u Dodatku (Slika D1).

Entakapon *E* slabo je topljiv u vodi,⁴⁸ no dobre je topljivosti u etanolu. Zbog mogućnosti miješanja s vodenim koloidnim suspenzijama, te činjenice da je etanol poželjno otapalo u farmaceutskoj industriji, ishodne otopine entakapona *E* pripremljene su u etanolu. Koncentracija zasićene etanolne otopine entakapona *E* iznosila je $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, no nije bila dovoljna je za opažanje Ramanovog spektra.

4.1.2. SERS spektri entakapona na metalnim površinama

Površinsko pojačanje Ramanovog raspršenja entakapona opaženo je s površina zlatne pločice *Klarite* i monokristala srebra (Slika 33). Entakapon je adsorbiran na površine oba metalna supstrata iz etanolne otopine koncentracije $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Opažene vibracijske vrpce u SERS spektrima navedene su u Tablici 1. Razlike između Ramanovog spektra entakapona u čvrstom stanju i SERS spektara entakapona na metalnim površinama posljedica su slaganja molekula u kristalu te izbornih pravila na površini metala s koje se Ramanovo raspršenje pojačava. Umjesto dviju vrpce u području istezanja karbonilne skupine čvrste tvari, uočava se samo jedna jaka, široka vrpca pri 1603 cm^{-1} u SERS spektru entakapona na zlatnoj pločici, odnosno pri 1606 cm^{-1} u SERS spektru entakapona na srebrnom valjčiću, koja ukazuje na interakciju molekula s metalnom površinom. Također, u SERS spektru entakapona na zlatnoj pločici opažene su nove vrpce pri 1443 cm^{-1} i 1392 cm^{-1} te pripisane istezanjima benzenskog prstena. Orijentacija benzena okomito prema površini zlata uzrok je pojačanja opisanih vibracija.



Slika 33. SERS spektri entakapona na površini a) srebrnog valjčića i b) zlatne pločice; $c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, pobuda pri 785 nm.

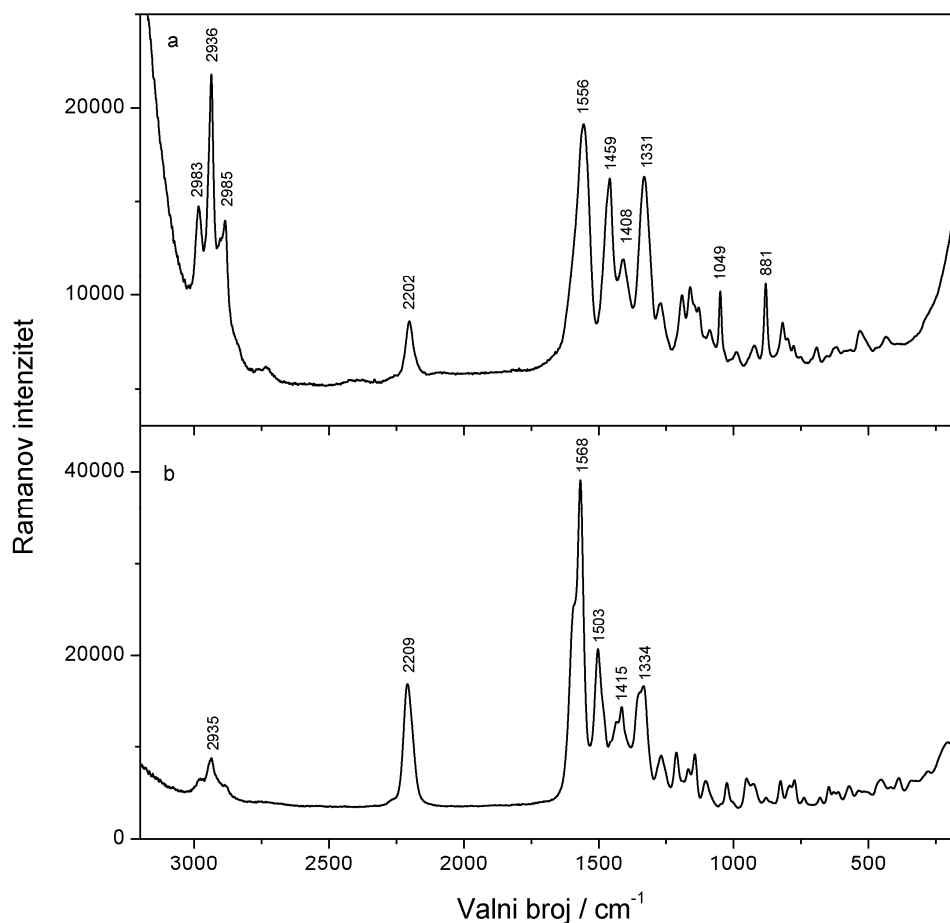
Istraživanjem kristalizacije entakapona na površini zlata utvrđeno je da se entakapon spontano adsorbira na metal, te da stvara uređene slojevite strukture, pri čemu se cijano skupina nalazi blizu površine metala.^{57,58} Slaba vrpca pri 218 cm^{-1} u SERS spektru entakapona na zlatnoj pločici pripisana je istezanju Au–N veze te ukazuje na slabu interakciju analita s metalom, dok vrlo jaka vrpca opažena pri 239 cm^{-1} u SERS spektru entakapona na srebrnom valjčiću potvrđuje nastanak Ag–N veze.

Raspršeno zračenje molekula entakapona intenzivnije je na površini srebra nego na površini zlata. SERS spektri entakapona na obje površine vrlo su slični, posebice s obzirom na oblik i relativni intenzitet već spomenute vrpce istezanja karbonilne skupine. Međutim, u SERS spektru entakapona na površini srebra opažene su intenzivne vrpce istezanja nitro skupine pri 1533 cm^{-1} i 1345 cm^{-1} . Budući benzenski prsten izomera *E* entakapona može biti orijentiran s nitro skupinom paralelno i antiparalelno u odnosu na cijano skupinu,⁴⁹ vjerojatno je da su molekule poprimile konformaciju s obje skupine na istoj strani blizu površine metala.

Iako spektralne sličnosti ukazuju na vezanje entakapona preko cijano skupine na obje metalne površine, i zlata i srebra, male razlike u spektrima ukazuju na različite konformacije molekula adsorbiranih na različitim metalnim površinama.

4.1.3. SERS spektri entakapona na metalnim koloidima

SERS spektri mjereni su u koloidnim suspenzijama srebra **1**, zlata i bakra. Budući pojačanje Ramanovog raspršenja nije opaženo sa svježe pripremljenih koloida, koloidi su agregirani dodatkom natrijevog klorida i natrijevog nitrata. Utvrđeno je da učinkovitost agregacije spomenutih soli ovisi o metalnim nanočesticama.¹¹⁴ Bez obzira na agregacijski agens, pojačanje raspršenog zračenja entakapona u koloidnim suspenzijama zlata nije opaženo. SERS spektri entakapona na koloidu bakra agregiranom s obje natrijeve soli nisu se razlikovali prema položaju i intenzitetu vibracijskih vrpca, dok je raspršenje entakapona na nanočesticama srebra bilo intenzivnije nakon agregacije s natrijevim nitratom. U svrhu usporedbe analizirani su SERS spektri entakapona na koloidima srebra i bakra agregiranim s natrijevim nitratom (Slika 34). Raspršeno zračenje entakapona s metalne površine najintenzivnije je pri koncentraciji $9 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.



Slika 34. SERS spektri entakapona na a) Cu koloidu i b) Ag koloidu **1**; $c = 9 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, pobuda pri 785 nm

SERS spektri entakapona na koloidima metala razlikuju se od onih na metalnim površinama, ali također i međusobno. Iako opažene pri nižim valnim brojevima, vrpce u području $1600\text{--}1550 \text{ cm}^{-1}$ u SERS spektru s Ag koloida **1** nalikuju vrpčama u Ramanovom spektru entakapona. Vrlo jaka vrpca pri 1568 cm^{-1} s ramenom pri 1591 cm^{-1} pripisana je složenoj vibraciji koja uključuje istezanje karbonilne skupine i benzenskog prstena. Antisimetrično i simetrično istezanje nitro skupine doprinosi intenzivnim vrpčama pri 1503 cm^{-1} odnosno 1334 cm^{-1} . Opaženi pomak prema nižim valnim brojevima, u odnosu na Ramanov spektar i SERS spektre s metalnih površina, ukazuje na položaj nitro skupina vrlo blizu nanočesticama, i moguću interakciju s površinom srebra.^{115,116} Uslijed interakcije s metalom, preraspodjela elektrona potaknuta je i u aromatskom dijelu molekule, što rezultira pojavom vrpce istezanja benzenskog prstena pri 1415 cm^{-1} .

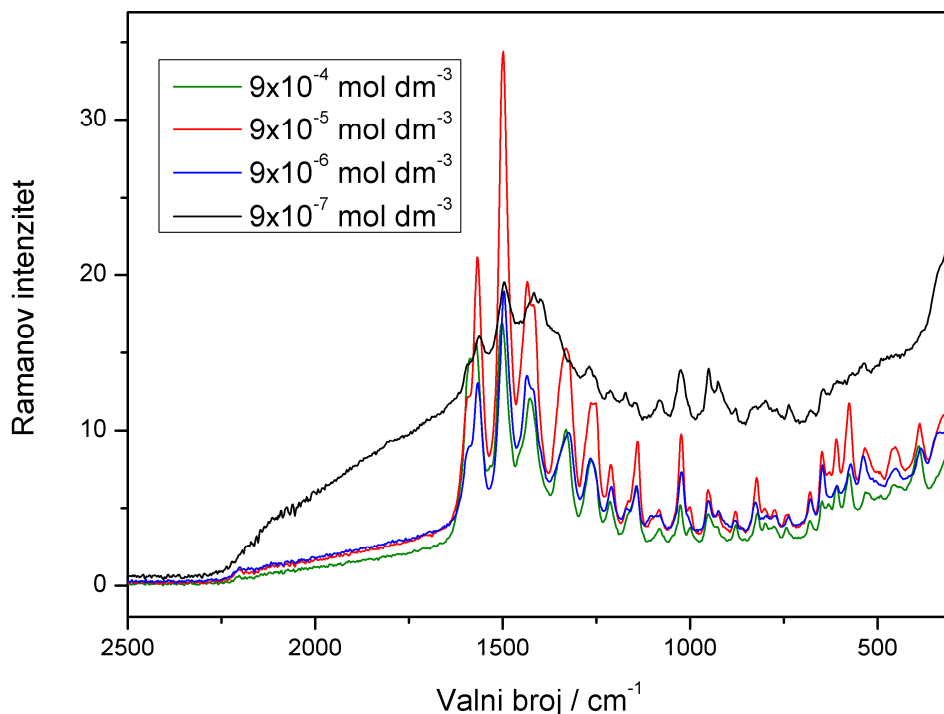
Za razliku od SERS spektra entakapona na površini srebrnog valjčića, vrpca u području niskih valnih brojeva, ispod 300 cm^{-1} , koja bi ukazivala na stvaranje kemijske veze između srebrne površine i dušikovog atoma u strukturi molekule nije opažena.

U koloidnoj suspenziji bakra SERS spektar entakapona potpuno je drugačiji od onog opaženog sa srebrnog koloida. Razlike u SERS spektrima istog analita na Ag i Cu supstratima pripisane su jačoj interakciji entakapona s površinom bakra, koja mehanizmom prijenosa naboja više doprinosi ukupnom pojačanju raspršenog zračenja.¹¹⁷ U spektru entakapona na nanočesticama bakra pojačane su vrpce u području visokih valnih brojeva $3000\text{--}2880\text{ cm}^{-1}$, a koje odgovaraju istezanju C–H veza metilnih i metilenskih skupina. Također, pojačana je i vrpca pri 1495 cm^{-1} koja odgovara deformaciji spomenutih alkilnih skupina. Vrpca oko 1600 cm^{-1} , pripisana istezanju C=O skupine, nije opažena, dok je intenzivna vrpca pri 1556 cm^{-1} pripisana antisimetričnom istezanju NO₂ skupine i istezanju benzena. Jaka vrpca simetričnog istezanja NO₂ skupine opažena je pri 1331 cm^{-1} . S obzirom na navedene vrpce i njima pripisane vibracije, vrlo je vjerojatno da se entakapon veže na bakrene nanočestice preko karbonilne skupine. Kao posljedica opisanog vezanja, vrpca vibracije C=O skupine potpuno je nestala ili se pomaknula prema nižim valnim brojevima i sakrivena je vrpcom pri 1556 cm^{-1} . Izostanak vrpce koja odgovara funkcionalnoj skupini koja sudjeluje u kemisorpciji molekule, opisan je za 4-aminobenzentiol koji se veže na bakreni supstrat preko atoma sumpora tiolne skupine.¹¹⁸ S obzirom da je bakar sklon oksidaciji, može se pretpostaviti da se kisikovi atomi približavaju bakrenoj površini.¹¹⁹ Nove vrpce opažene pri 1049 cm^{-1} i 881 cm^{-1} pripisane su antisimetričnom i simetričnom CCO istezanju, što dodatno potvrđuje kemisorpciju molekula entakapona na nanočestice bakra.¹¹² Opažene vrpce vibracijskih modova CH₂, CH₃ i CCO skupina mogu se pripisati i etanolu u kojem je uzorak entakapona pripremljen. Međutim, vrpce vibracijskih modova CCO skupine nisu opažene u SERS spektrima entakapona na Ag koloidu, dok su slabe vrpce u području visokih valnih brojeva opažene i pripisane istezanjima C–H veza dietilamino skupine analita. Iako bi prisutnost etanola mogla utjecati na SERS spektar entakapona, pretpostavlja se vezanje entakapona na površinu bakra preko karbonilne skupine.

Među istraženim SERS supstratima, koloid srebra pripremljen redukcijom srebrovog nitrata s natrijevim citratom, Ag koloid **1**, te agregiran natrijevim nitratom najjače raspršuje zračenje molekula entakapona. Najniža koncentracija pri kojoj je opažen SERS spektar entakapona iznosi $9 \times 10^{-7}\text{ mol dm}^{-3}$.

Treba napomenuti kako ovisnost intenziteta opaženog SERS spektra o koncentraciji analita nije linearna u cjelokupnom rasponu mjerenih koncentracija otopina entakapona. Naime, maksimalno pojačanje opaža se pri optimalnoj pokrivenosti površine SERS supstrata molekulama analita koje raspršuju zračenje.¹¹⁰

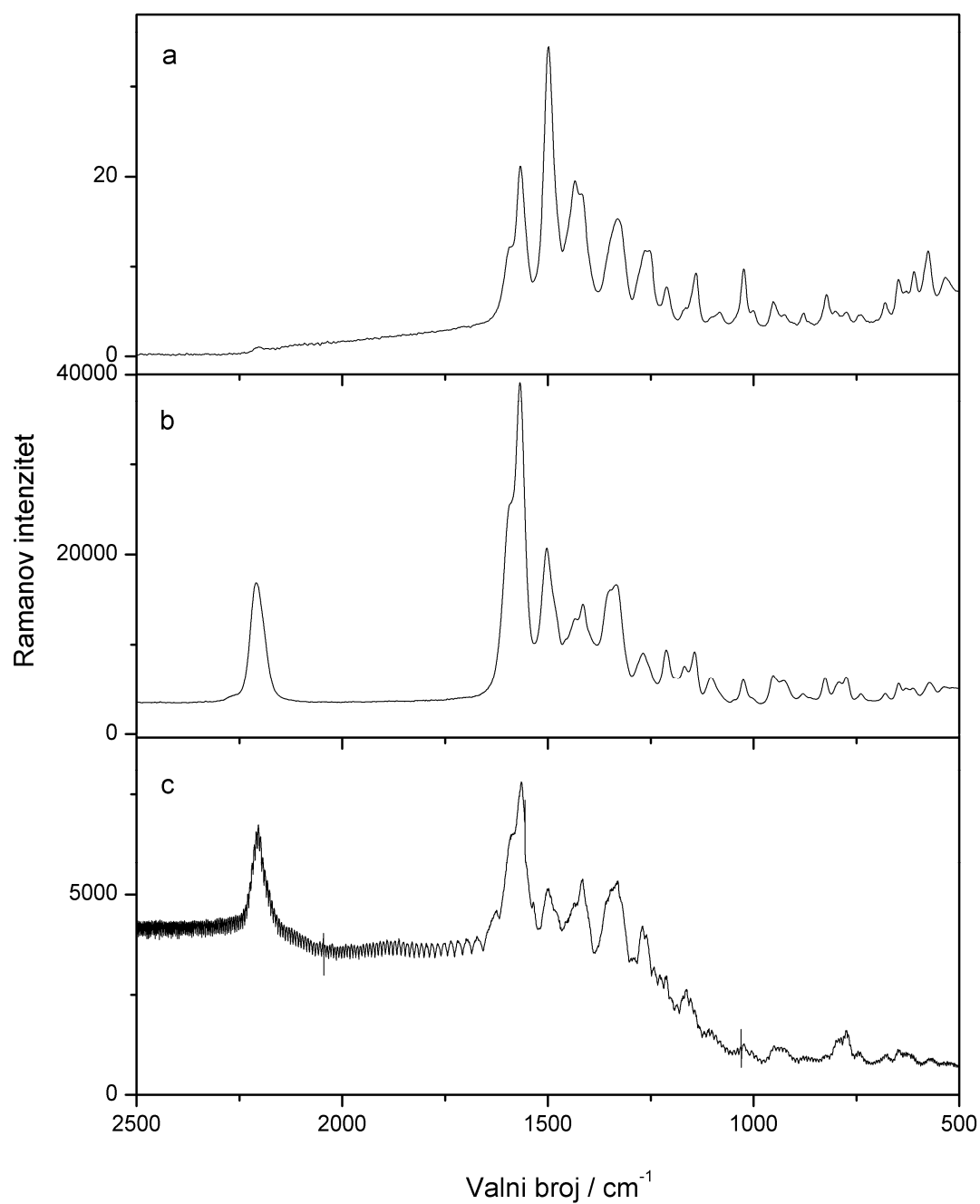
Različita istraživanja ukazala su kako je optimalna pokrivenost površine ona u kojoj su molekule adsorbirane na površinu supstrata u maksimalno jednom sloju, pa čak i u manjem broju od onog koji tvori spomenuti monosloj.^{110,120} Ukoliko je koncentracija analita u sustavu supstrat-analit veća od one pri kojoj se postiže optimalna pokrivenost, suvišak molekula analita reapsorbira raspršeno zračenje, što u konačnici rezultira smanjenim SERS intenzitetom. Također, u monosloju adsorbiranih molekula dipol-dipol interakcije između molekula analita umanjuju pojačanje raspršenog zračenja.¹¹⁰ Pri koncentracijama nižim od one pri kojoj se postiže optimalna pokrivenost supstrata, ovisnost intenziteta o koncentraciji analita postaje linearna.¹²¹ SERS spektar entakapona najvećeg intenziteta opažen je pri koncentraciji entakapona $9 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, dok je za više i za manje koncentrirane sustave intenzitet raspršenog zračenja bio manji (Slika 35).



Slika 35. SERS spektri entakapona na Ag koloidu **1** pri različitim koncentracijama entakapona; pobuda pri 1064 nm.

U koloidnoj suspenziji srebra u kojoj su nanočestice agregirane natrijevim nitratom, a koncentracija entakapona iznosila $9 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, istražen je utjecaj valne duljine pobudnog zračenja na SERS spektar. Korišteni su laseri tri valne duljine: 514 nm, 785 nm i 1064 nm. Budući intenzitet Ramanova raspršenja ovisi o četvrtoj potenciji frekvencije pobudnog zračenja, uporaba lasera manje valne duljine, odnosno veće frekvencije, rezultira intenzivnijim raspršenjem zračenja, a time i većom osjetljivosti metode. Rezonancija između pobudnog, najčešće vidljivog zračenja, i površinskih plazmona i/ili zračenja koje analit apsorbira, dodatno doprinosi povećanju intenziteta raspršenog zračenja. Nadalje, uporabom lasera u bliskom infracrvenom području smanjuje se vjerojatnost fluorescencije uzorka koja često zasjenjuje Ramanov spektar. Očekivano, pobudna zračenja različitih valnih duljina rezultirala su različitim pojačanjem pojedinih vibracijskih vrpce u SERS spektrima entakapona, ali i različitim ukupnim intenzitetom opaženih spektara (Slika 36). Zahvaljujući prednostima izvora zračenja i u Vis i u NIR području, najveći ukupni intenzitet i minimalna fluorescencija opaženi su nakon pobude laserom koji emitira zračenje pri 785 nm.

Nadalje, opažene su i razlike u relativnom intenzitetu vrpce, kao posljedica selektivne pobude analita zračenjem različitih valnih duljina. Kada valna duljina pobudnog zračenja odgovara valnoj duljini apsorbiranog zračenja, odnosno energiji elektronskog prijelaza, postižu se pre-rezonantni uvjeti i u spektru dominiraju vrpce dijela molekule koji, osim što raspršuje, i apsorbira zračenje. Tako je vrpca istezanja cijano skupine iznimno slabog intenziteta u SERS spektru snimljenom nakon pobude pri 1064 nm, a vrlo jakog u spektru snimljenom pri pobudi laserom valne duljine 514 nm. Maksimalan intenzitet vrpce pri 1568 cm^{-1} s ramenom pri 1591 cm^{-1} pripisane složenoj vibraciji koja uključuje istezanje karbonilne skupine, C=C veze i benzenskog prstena, opažen je nakon pobude zračenjem pri 785 nm.



Slika 36. SERS spektri entakapona, $c = 9 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, na Ag koloidu **1** snimljeni pobudnim zračenjem pri a) 1064 nm, b) 785 nm i c) 514 nm.

4.1.4. Kvantitativna analiza izomera entakapona

Iako su oba izomera entakapona biološki aktivna, samo se izomer *E* formulira i primjenjuje kao aktivna tvar. Izomer *Z* smatra se onečišćenjem i tijekom sinteze i u gotovom obliku lijeka. Kako bi se osigurala kvaliteta i pouzdana bioraspoloživost lijeka, praćenje količine izomera *Z* kako u aktivnoj tvari, tako i u gotovom proizvodu vrlo je važno.

Klasična Ramanova spektroskopija ograničena je slabom osjetljivošću, te se može primijeniti samo za analize sustava u čvrstom stanju ili zasićenih otopina.^{52,56} HPLC tehnike kojima se provodi kvantifikacija izomera entakapona u otopini osjetljive su i pouzdane,^{53,54} ali mogu biti dugotrajne i praćene velikim utroškom različitih otapala za analizu. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja uz korištenje reproducibilnog supstrata omogućava brzu i pouzdanu analizu u otopini pri niskim koncentracijama.

4.1.4.1. Stabilnost izomera entakapona u otopini

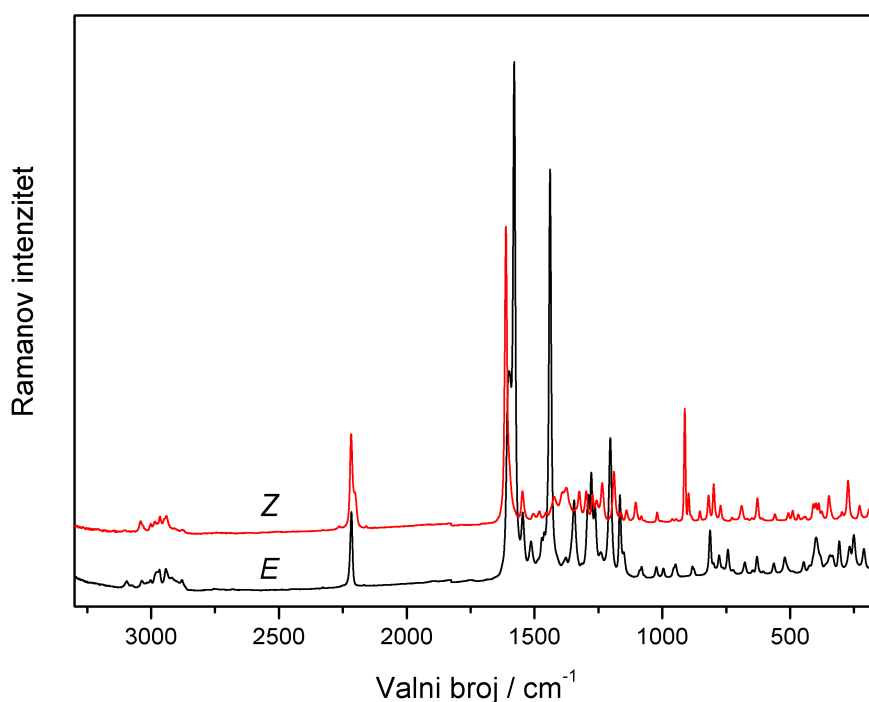
Stabilnost izomera entakapona u etanolu istražena je mjerenjem UV/Vis spektara etanolnih otopina izomera entakapona tijekom vremena, pri koncentraciji 6×10^{-5} mol dm⁻³. Spektri su snimljeni odmah nakon pripreme otopine, te nakon 24 sata i sedam dana stajanja pri sobnoj temperaturi. Oba izomera jako apsorbiraju zračenje u UV području, a apsorpcijske spektre karakteriziraju dva apsorpcijska maksimuma (Tablica 2). Apsorpcijska vrpca pri višim valnim duljinama, 388 nm (*E*) i 368 nm (*Z*), pripisana je $\pi^* \leftarrow \pi$ prijelazu elektrona fenilnog prstena i dvostruke C=C veze, dok apsorpcija dijela molekule s cijano i karbonilnom skupinom doprinosi apsorpcijskoj vrpci pri približno 300 nm. Tijekom vremena nije uočen značajniji pomak apsorpcijskih maksimuma koji bi upućivao na izomerizaciju entakapona u otopini (Tablica 2). Izomeri *E* i *Z* entakapona u etanolnoj otopini izloženi dnevnim svjetlom i sobnoj temperaturi stabilni su i ne podliježu interkonverziji.

Tablica 2. UV-Vis apsorpcijski maksimumi izomera entakapona.

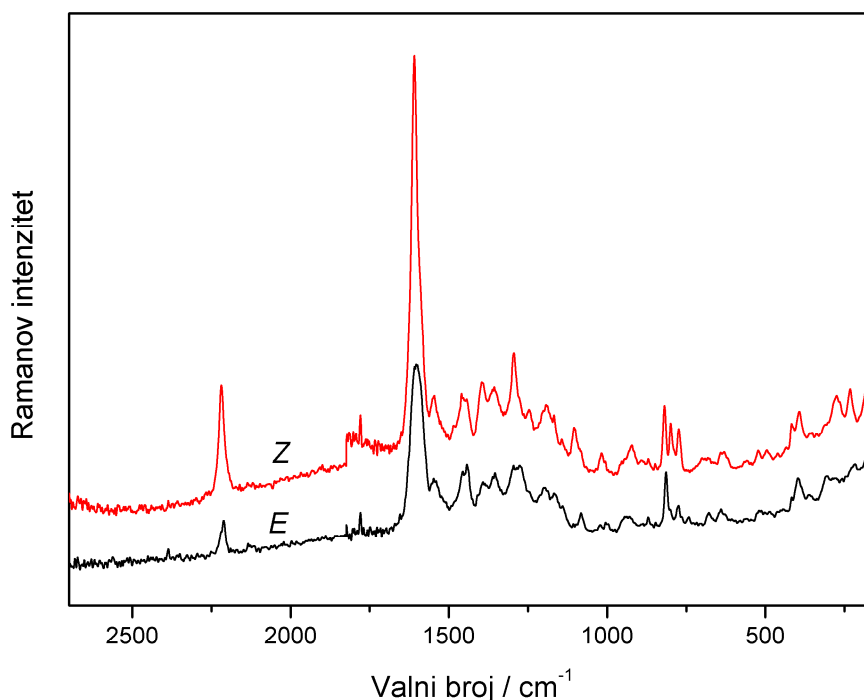
Vrijeme	<i>E</i>		<i>Z</i>	
	λ_1 / nm	λ_2 / nm	λ_1 / nm	λ_2 / nm
1 min	388	303	368	298
24 sata	389	303	370	300
7 dana	387	302	369	299

4.1.4.2. Ramanovi spektri i SERS spektri izomera entakapona

Ramanovi spektri zasićenih otopina izomera entakapona u etanolu ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) nisu opaženi. Međutim, adsorpcijom entakapona iz etanolne otopine na zlatni supstrat *Klarite* opaženi su SERS spektri oba izomera. Najniža izmjerena koncentracija izomera na površini zlatne pločice je $5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Uspoređeni su Ramanovi spektri izomera u kristalnom stanju i SERS spektri izomera na zlatnoj pločici (Slike 37 i 38).



Slika 37. Ramanovi spektri izomera entakapona u čvrstom stanju; pobuda pri 785 nm.



Slika 38. SERS spektri izomera entakapona adsorbiranih na zlatnom supstratu *Klarite* iz etanolne otopine ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), pobuda pri 785 nm.

Adsorpcijom molekula entakapona na zlatni supstrat *Klarite*, intramolekulske i intermolekulske interakcije prisutne u kristalnoj strukturi iščezavaju. Kada su na supstratu molekule kemisorbirane u monosloju, parametri vibracijskih vrpce najviše ovise o molekulskoj strukturi i orijentaciji strukturnih dijelova molekule u odnosu na metalnu površinu. Kao što se i Ramanovi spektri izomera razlikuju u čvrstom stanju, tako se i u SERS spektrima izomera *E* i *Z* očituju jasne razlike koje ukazuju da je i nakon adsorpcije izomera iz otopine na zlatnu pločicu, molekulska struktura izomera očuvana.

Značajne vrpce u Ramanovim spektrima izomera entakapona u čvrstom stanju i SERS spektrima izomera na zlatnoj pločici asignirane su u Tablici 3.^{111,112} Vrpce umjerenog intenziteta u SERS spektrima pri 2211 cm^{-1} i 2219 cm^{-1} pripisane su istezanju $\text{C}\equiv\text{N}$ skupine u strukturi izomera *E* odnosno *Z*. Najintenzivnije vrpce pri 1603 cm^{-1} (*E*) i 1609 cm^{-1} (*Z*) odgovaraju vibracijama istezanja konjugiranog sustava koji se sastoji od aromatskog prstena, dvostruke $\text{C}=\text{C}$ veze te karbonilne skupine. Vrpce antisimetričnog istezanja nitro skupina opažene su pri 1548 cm^{-1} (*E*) i 1546 cm^{-1} (*Z*), dok su vrpce koje potječu od odgovarajućeg simetričnog istezanja prisutne pri 1392 cm^{-1} (*E*) i 1396 cm^{-1} (*Z*). Značajne razlike između

SERS spektara izomera *E* i *Z* također se mogu uočiti u područjima 1320–1050 cm⁻¹ i 840–730 cm⁻¹, gdje vibracije supstituiranog fenilnog prstena doprinose opaženim vrpčama.

Tablica 3. Vibracijske vrpce u Ramanovim spektrima i SERS spektrima entakapona *E* i *Z*.

Valni broj / cm ⁻¹				Vibracija
Raman		SERS (<i>Klarite</i> supstrat)		
<i>E</i>	<i>Z</i>	<i>E</i>	<i>Z</i>	
2216 m	2217 s	2211 m	2219 m	ν C≡N
1580 vs	1612 vs	1603 s	1609 vs	ν C=O
1546 m	1547 m	1548 m	1546 w	ν _{as} N–O (NO ₂); ν CC
		1456 m	1460 m	δ _{as} CH ₃
1439 s	1423 w	1443 m	1445 m	δ _{sc} CH ₂
		1392 m	1396 w	ν _s N–O (NO ₂); ν CC
1345 m		1354 m	1356 m	δ _s CH ₃
1291 m	1298 w	1296 m	1295 s	δ _{wg} CH ₂
1264 m	1258 w	1277 m		δ _{ip} CH; ν C–OH
			1247 w	δ _{ip} CH; ν C–OH
1204 m	1189 m	1196 m	1193 w	ν C–N
1166 m	1162 w	1168 m	1168 m	δ prsten
	1104 w		1105 m	δ COH
1081 w	1082 w	1082 w	1085 sh	δ COH
1024 w	1020 m	1021 w	1018 vw	δ _{ip} CH
948 w		929 m	931 m	ν C–C≡N
814 w	819 w	814 m	819 m	δ _{oop} CH (CH=C)
	799 w	802 sh	799 m	δ _{oop} CH
779 w	772 w	774 m	774 w	δ _{oop} CH
745 w		743 vw		δ _{oop} CH

SERS spektar izomera *Z* entakapona intenzivniji je od spektra izomera *E*, što ukazuje na različiti položaj molekula na površini zlata. Prema izbornim pravilima na površini, vibracije s promjenom polarizabilnosti okomito na metalnu površinu rezultiraju najvećim pojačanjem raspršenog zračenja, dok vibracije u ravnini s metalnom površinom ne doprinose raspršenju. Stoga je intenzitet raspršenog zračenja molekule smještene pod kutom u odnosu na metalnu površinu manji od raspršenja okomito položene molekule. Za entakapon je već utvrđeno da samoorganiziranjem stvara sloj na metalnim površinama, pri čemu se molekule slažu s cijano skupinom orijentiranom prema površini zlata.^{57,58} Budući je cijano skupina u strukturi izomera *Z* manje sterički zaklonjena u odnosu na izomer *E*, molekule *Z* izomera lakše se vežu s metalom i na zlatnoj površini uspravnije su položene od molekula *E* izomera. Slabe vrpce opažene pri 232 cm⁻¹ (*Z*) i 218 cm⁻¹ (*E*) u SERS spektrima pripisane su istezanju nastale Au–N veze.

4.1.4.3. Pouzdanost kvantitativnih SERS rezultata

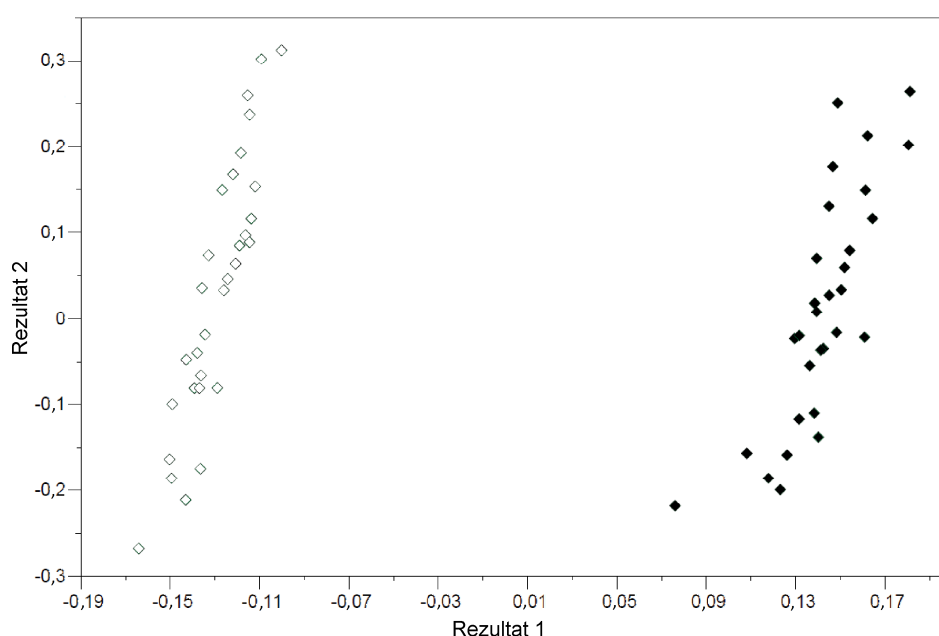
Varijabla koja najviše utječe na nesigurnost apsolutnog intenziteta signala u SERS spektroskopiji je faktor pojačanja supstrata. Varijacije intenziteta uzrokovane različitim pojačanjem raspršenog zračenja s iste površine metala mogu se riješiti uporabom vrlo reproducibilnih SERS supstrata. Međutim, valja razmotriti i ostale čimbenike koji utječu na intenzitet pojačanog Ramanovog raspršenja izuzev same koncentracije uzorka.

U svrhu uklanjanja faktora instrumenta, kao što su promjenjiva snaga lasera ili temperatura detektora, koji utječu na intenzitet Ramanovog raspršenja analita, najčešće se koristi unutarnji standard.² Kako bi se izbjeglo narušavanje sustava supstrat-analit u SERS spektroskopiji, prikladan unutarnji standard trebala bi biti molekula strukturno vrlo slična samom analitu, koja se adsorbira na supstrat na isti način kao i analit.² U dosad objavljenim SERS kvantitativnim mjerenjima, timina i nikotina, kao unutarnji standard korišten je kemijski slična i u SERS spektroskopiji dobro poznata molekula piridina.^{122,123} Budući piridin nije kemijski sličan molekuli entakapona, te se veže na SERS supstrat preko piridinskog dušika, dok entakapon ostvaruje vezu s metalom preko dušikovog atoma cijano skupine, piridin nije uveden u mjerni sustav. Uz nedostatak strukturne sličnosti, piridin kao unutarnji standard može utjecati i na SERS supstrat, u smislu moguće promjene njegovog svojstva pojačanja raspršenog zračenja analita, što svakako utječe na jednostavnost primjene cjelokupne tehnike. Iz navedenih razloga, unutarnji standard nije korišten u sustavu izomera entakapona. Uporabom iznimno reproducibilnih zlatnih pločica *Klarite* najznačajniji faktor u varijaciji intenziteta signala (pojačanje supstrata) sveden je na minimum. Varijacije proizašle iz Ramanovog mjernog sustava kompenzirane su oduzimanjem spektra pozadine od SERS spektara uzoraka. Kao pozadinski spektar korišten je Ramanov spektar čiste pločice *Klarite*. Ramanov spektar nove, čiste zlatne pločice oduzet je od SERS spektara izomera entakapona, snimljenih koristeći kao metalni supstrat upravo tu istu zlatnu pločicu.

Ranija istraživanja pokazala su da je korišten Ramanov mjerni sustav stabilan i pouzdan za kvantitativne analize provedene u različitim analitičkim sustavima bez dodatka unutarnjeg ili vanjskog standarda.¹²⁴ Kako bi se dodatno potvrdila stabilnost instrumentnog sustava, te pouzdanost pločica *Klarite*, određena je relativna standardna devijacija (RSD) intenziteta najintenzivnije vrpce u SERS spektru entakapona Z pri 1609 cm^{-1} , u skupu od 14 neobrađenih spektara. Po sedam SERS spektara izomera Z entakapona ($c = 1 \times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$) snimljeno je za dva neovisno pripremljena uzorka, odnosno koristeći dvije različite zlatne pločice *Klarite*.

Izračunata RSD vrijednost intenziteta vrpce u SERS spektru izomera Z iznosila je 2,1%. Budući je Ramanova spektroskopija uz spektralne varijacije od 1% do 4% uspješno primijenjena za kvantitativnu analizu farmaceutski aktivnih tvari,¹²⁵ vrijednost relativne standardne devijacije potvrđuje stabilnost sustava i mogućnosti korištenja snimljenih SERS spektara za pouzdanu kvantifikaciju metodom parcijalnih najmanjih kvadrata (*partial least square*, PLS).

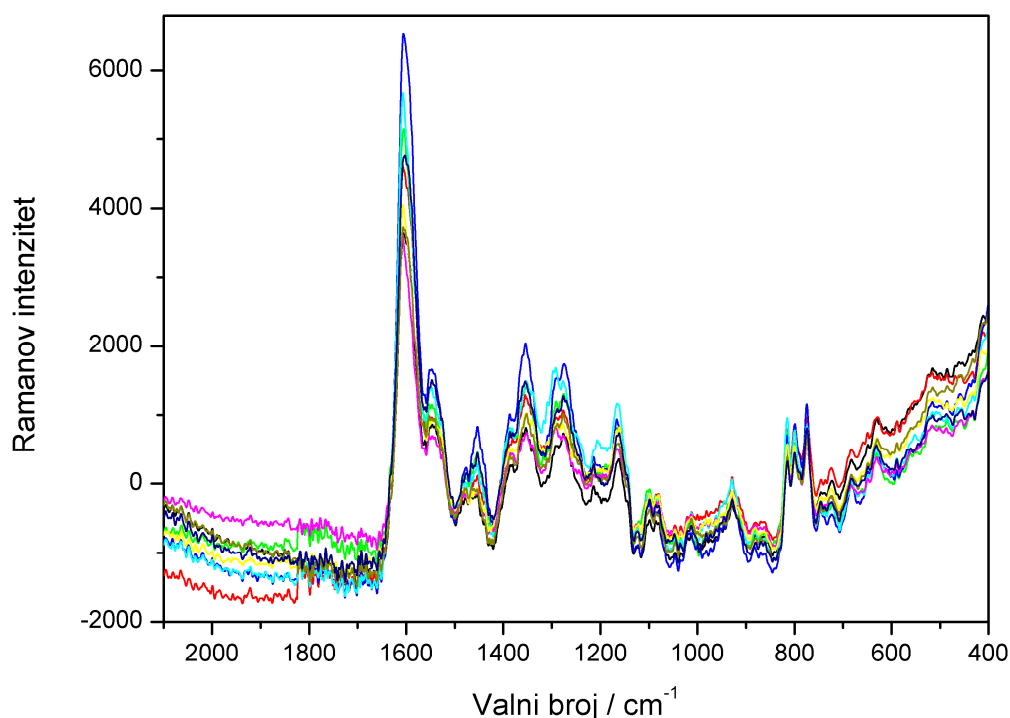
Kako bi se osigurala pouzdanost rezultata, prije pristupanja kvantitativnom modelu, moraju se evaluirati komponente sustava. Ukoliko se komponente u analiziranom višekomponentnom sustavu dovoljno dobro razlikuju, PLS regresija omogućava pouzdanu identifikaciju i kvantifikaciju pojedine komponente. Kako bi pokazali da su SERS spektri izomera E i Z entakapona uistinu različiti, te njihove smjese pogodne za multivarijantnu analizu, snimljeno je i analizirano 30 SERS spektara svakog izomera koncentracije 1×10^{-3} mol dm⁻³. PLS klasifikacijski prikaz rezultata ukazuje na odlično razlikovanje SERS spektara izomera E i Z entakapona (Slika 39). Svaka točka prikazuje SERS spektar u području između 2093 cm⁻¹ i 400 cm⁻¹, korigiran za višestruko raspršenje zračenja (*multiplicative scattering correction*, MSC).



Slika 39. PLS klasifikacijski prikaz razlikovanja SERS spektara izomera entakapona E (◇) i Z (◆) snimljenih s površine supstrata Klarite.

4.1.4.4. Kvantitativna analiza

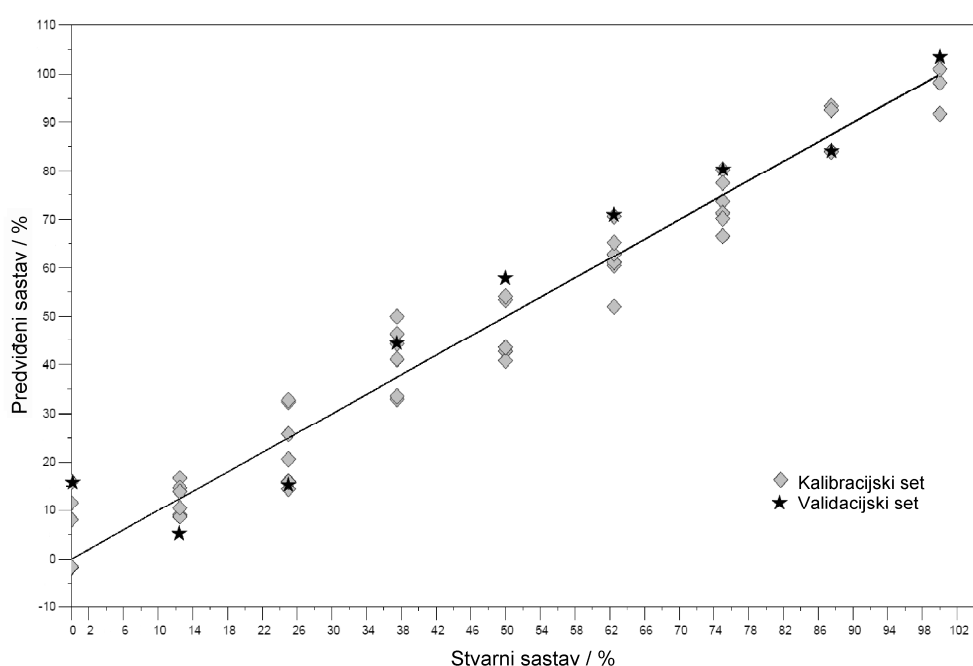
Razvijena je SERS metoda za kvantitativnu analizu dvokomponentnog sustava izomera *E* i *Z* entakapona, uz korištenje zlatnog SERS supstrata *Klarite*. Pripremljeno je devet smjesa izomera *E* i *Z* entakapona, masenih udjela izomera u rasponu od 0% do 100%, pri ukupnoj koncentraciji entakapona $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, te su snimljeni njihovi SERS spektri. Svaki je uzorak smjese snimljen sedam puta na različitim mjestima zlatne pločice, čime su ukupno snimljena 63 spektra. Iz dobivenog skupa nasumično je odabran po jedan spektar svake smjese za testni set od devet točaka kojim će se validirati PLS model. SERS spektri pojedine smjese korigirani su oduzimanjem pozadinskog spektra čiste pločice *Klarite* na koju je adsorbirana smjesa izomera. SERS spektri validacijskog seta kojima je oduzeta pozadina prikazani su na Slici 40.



Slika 40. SERS spektri validacijskog seta, korigirani oduzimanjem pozadinskog spektra.

Prije određivanja kvantitativnog PLS modela, spektri su obrađeni MSC postupkom. U računu je korišten dio spektra u kojem su opažene najveće razlike između spektara izomera, $2093\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$. Za modeliranje je korištena unakrsna validacija *leave-one-out*. Minimalna efektivna vrijednost pogreške unakrsne validacije iznosi 10,4% za izomer *Z* u smjesi, pri sedam latentnih varijabli.

Validacijski set također je obrađen koristeći korekciju za višestruko raspršenje, te potom predviđen PLS modelom. Na Slici 41 prikazani su predviđeni udjeli izomera Z u smjesama u odnosu na stvarne vrijednosti za kalibracijski i validacijski set podataka. Također, predviđene i stvarne vrijednosti udjela pojedinog izomera u smjesi za validacijski set podataka navedene su u Tablici 4. Efektivna vrijednost pogreške kalibracijskog seta iznosi 7,9% za izomer Z u smjesi, što odgovara apsolutnoj koncentraciji izomera Z od $7,9 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³, te 8,4% za validacijski set, što odgovara apsolutnoj koncentraciji od $8,4 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ izomera Z u uzorku.



Slika 41. Korelacija predviđenog sastava sa stvarnim sastavom pripremljenih smjesa izomera na temelju PLS analize SERS spektara smjesa izomera entakapona.

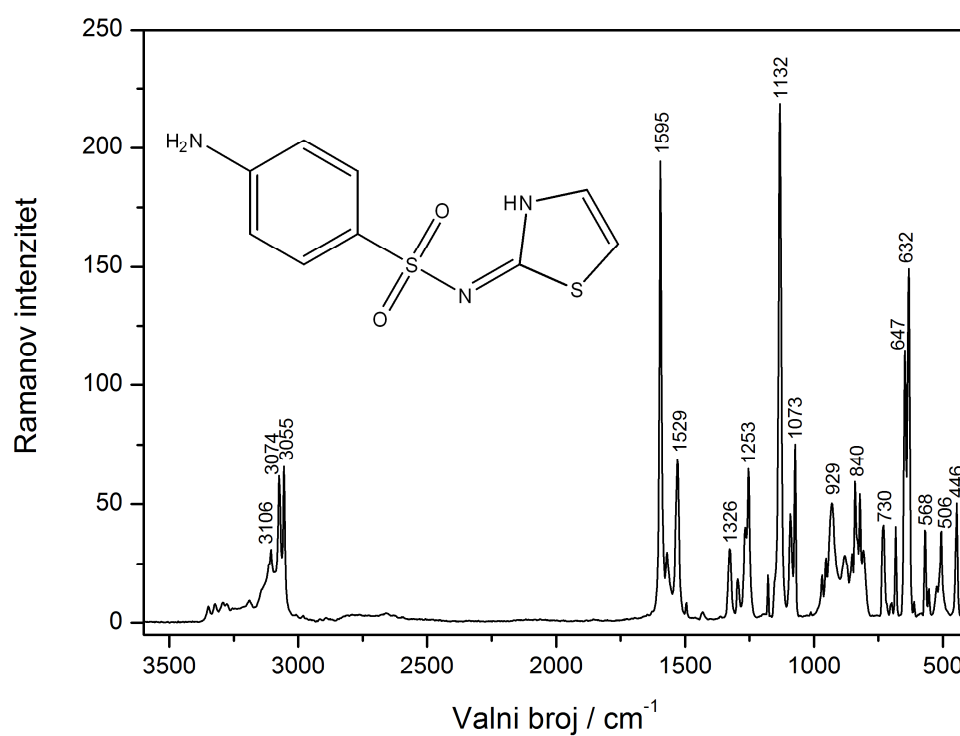
Tablica 4. Stvarne i predviđene vrijednosti udjela pojedinih izomera entakapona u validacijskom setu podataka.

Validacijski set Smjesa br.	Stvarna vrijednost / %		Predviđena vrijednost / %		Razlika / %	
	E	Z	E	Z	E	Z
1	100,0	0,0	103,6	-3,6	-3,6	3,6
2	87,5	12,5	84,2	15,8	3,3	-3,3
3	75,0	25,0	80,3	19,7	-5,3	5,3
4	62,5	37,5	71,0	29,0	-8,5	8,5
5	50,0	50,0	57,9	42,1	-7,9	7,9
6	37,5	62,5	44,6	55,4	-7,1	7,1
7	25,0	75,0	15,4	84,6	9,6	-9,6
8	12,5	87,5	5,3	94,7	7,2	-7,2
9	0,0	100,0	10,9	89,1	-10,9	10,9

4.2. Sulfatiazol

4.2.1. Ramanov spektar sulfatiazola

Snimljen je Ramanov spektar čvrstog uzorka sulfatiazola, polimorfa III, pobudom pri 1064 nm (Slika 42), a opažene vibracijske vrpce asignirane u Tablici 5.^{65,66,111}



Slika 42. Ramanov spektar sulfatiazola, polimorfa III; pobuda pri 1064 nm.

Tablica 5. Vibracijske vrpce u Ramanovom spektru i SERS spektrima sulfatiazola.

Valni broj / cm ⁻¹			Vibracija
Raman	SERS		
Čvrsto stanje Polimorf III	Au pločica	Ag koloid	
3400–3320			ν N–H
3106 w			ν C–H (prsten)
3074 m			ν C–H (prsten)
3055 m			ν C–H (prsten)
1595 s	1597 s	1590 s	ν CC (fenil), δ NH ₂
1570 w	1571 m		ν CC (prsten)
1529 m	1532 w	1510 w	ν C=N
1495 vw	1506 w	1489 w	ν CC (tiazol)
1326 w	1328 w		ν _{as} S–O (SO ₂)
1296 w		1305 vw	δ CH, δ CNC
1253 m	1253 w	1251 w	δ CH (fenil)
1178 w	1182 w	1181 m	δ CH (fenil)
1132 vs	1135 s	1113 m	ν _s S–O (SO ₂)
1091 w			δ CH, ν C–S
1073 m	1083 m	1076 vs	δ fenil
968 w	1007 w	1004 m	δ CH, δ NH
953 w		942 w	δ _{ip} CH
929 m	926 w		δ _{oop} CH
880 w			δ _{ip} CC
852 w			δ _{oop} CC
840 m	838 m	837 w	δ _{oop} CH
822 w	825 sh		δ _{oop} CH
808 w		772 w	δ _{ip} CC
730 w	738 w		δ _{wg} NH ₂
698 w		699 w	δ _{wg} NH
683 w	687 w		δ _{oop} CC (fenil)
647 s	645 sh	646 w	δ fenil
632 s	635 s	635 w	δ tiazol, δ fenil
568 w	566 w	566 w	δ _{oop} NH ₂
554 w	551 w		δ _{oop} NH ₂
506 w	509 w	518 vw	δ tiazol
446 w	448 w	448 vw	δ _{wg} SO ₂
417 w			δ tiazol, δ fenil
396 w	387 s	389 vs	δ fenil
377 w			
348 w	347 m		δ _{rc} SO ₂
302 w	294 s		δ _{oop} CCC
267 w	265 w		δ CNS
228 w			δ okosnica
213 w			
		200 w	ν Ag–N

Vrpce slabog intenziteta u području $3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ pripisane su istezanju N–H veza primarne i sekundarne amino skupine, dok vrpce umjerenog intenziteta u području $3106\text{--}3055\text{ cm}^{-1}$ odgovaraju istezanju C–H skupina na oba prstena u strukturi. Usljed istezanje fenilnog prstena opaža se jaka vrpca pri 1595 cm^{-1} . Srednje jaka vrpca pri 1529 cm^{-1} pripisana je istezanju imidne C=N veze. Vrlo jaka vrpca pri 1132 cm^{-1} odgovara simetričnom istezanju SO_2 skupine, dok se slaba vrpca odgovarajućeg antisimetričnog istezanja nalazi pri 1326 cm^{-1} . Jake vrpce pri 647 cm^{-1} i 632 cm^{-1} odgovaraju deformacijskim vibracijama prstena.

Prema podacima o kristalnoj strukturi polimorfa III sulfatiazola, dostupnim u kristalografskoj bazi podataka *Cambridge* pod nazivom *SUTHAZ17*, sulfatiazol u čvrstom stanju ima molekulsku strukturu u kojoj se na dušiku heteroaromatskog prstena nalazi vodik.^{61,63} Dodatna potvrda imidnom obliku sulfatiazola u čvrstom stanju nedostatak je jake vrpce istezanja monosupstituiranog tiazolnog prstena pri 1382 cm^{-1} ,^{111,126} kao i jake vrpce svijanja tiazolnog prstena pri 865 cm^{-1} u Ramanovom spektru.¹²⁶ Prikaz molekule sulfatiazola i vodikovih veza u kristalu forme III nalazi se u Dodatku (Slika D2).

Sulfatiazol je slabo topljiv u vodi ($< 0,1\text{ mg mL}^{-1}$ pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), međutim dovoljno za pripremu ishodnih vodenih otopina iz kojih se pripremaju mjerni uzorci za snimanje spektara tehnikom površinski pojačanog Ramanovog raspršenja. Iako koncentracija zasićene vodene otopine sulfatiazola iznosi $3\times 10^{-2}\text{ mol dm}^{-3}$, nedovoljna je za opažanje Ramanovog spektra.

4.2.2. SERS spektri sulfatiazola na metalnim koloidima

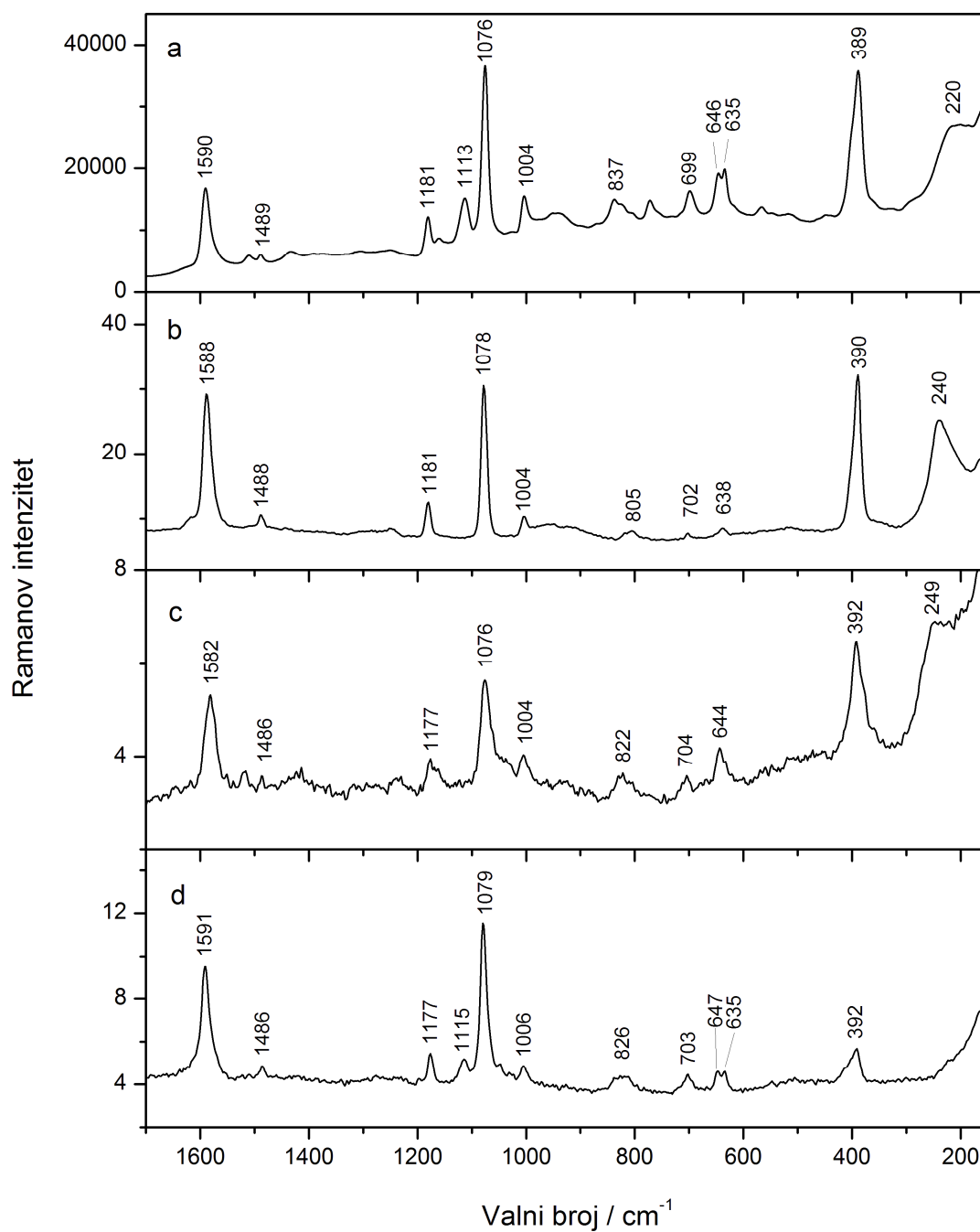
SERS spektri sulfatiazola mjereni su u koloidnim suspenzijama zlata, srebra, pripremljenim na dva načina, i bakra nakon pobude zračenjem pri 1064 nm . Sa svježe pripremljenih koloida površinsko pojačanje Ramanovog raspršenja sulfatiazola nije opaženo, zbog čega su metalne nanočestice agregirane natrijevim kloridom i natrijevim nitratom. Po dodatku natrijevih soli Ramanovo raspršenje sulfatiazola pojačano je u svim koloidnim suspenzijama (Slika 43). Najveće pojačanje raspršenog zračenja sulfatiazola opaženo je sa srebrnog koloida pripremljenog redukcijskim postupkom s trinatrijevim citratom, Ag koloid 1, i agregiranog natrijevim nitratom. Srebrni koloid pripremljen redukcijom srebrova nitrata s natrijevim borhidridom, Ag koloid 2, intenzivnije pojačava raspršenje sulfatiazola kada se kao agregirajući agens koristi natrijev klorid, no slabije od srebrnih nanočestica s citratnim ionima na površini. S bakrenim se koloidom postiže manje pojačanje nego s koloidnim suspenzijama

srebra, pri čemu bolje nakon agregacije s NaNO_3 . Iako slabog intenziteta opažen je SERS spektar sulfatiazola i sa zlatnog koloida, agregiranog natrijevim kloridom.

Za razliku od entakapona, SERS spektri sulfatiazola na koloidima različitih metala nalikuju jedan drugome (Slika 43). Značajnije spektralne razlike, posebice u položaju vrpce, nisu opažene (Tablica 6), što je neočekivano s obzirom na moguću prisutnost dvije tautomerne forme i protoniranje amino skupina u koloidnoj suspenziji zlata kisele pH vrijednosti. Jedina zamjetna razlika uočava se u slabijem relativnom intenzitetu vrpce pri približno 392 cm^{-1} u SERS spektru sulfatiazola na bakrenom koloidu u odnosu na SERS spektre opažene s drugih metalnih koloida. Budući je ta vrpca pripisana deformacijskim vibracijama prstenova u strukturi, njen smanjeni intenzitet može ukazivati na drugačiji položaj molekule na bakru u odnosu na smještanje molekule na površini ostalih metalnih supstrata.

Tablica 6. Vibracijske vrpce u SERS spektrima sulfatiazola.

Valni broj / cm^{-1}				Vibracija
Ag koloid 1	Ag koloid 2	Au koloid	Cu koloid	
1590 m	1588 s	1582 s	1591 s	ν CC (fenil), δ NH_2
1510 vw		1516 w		ν C=N
1489 vw	1488 w	1486 w	1486 w	ν CC (tiazol)
1305 vw	1298 vw, br			δ CH, δ CNC
1251 vw	1251 w	1231 vw, br		δ CH (fenil)
1181 mw	1181 m	1177 w	1177 mw	δ CH (fenil)
1113 m			1115 mw	ν_s S-O (SO_2)
1076 s	1078 s	1076 s	1079 s	δ fenil
1004 m	1004 w	1004 w	1006 mw	δ CH, δ NH
942 w	947 w, br	938 vw		δ_{ip} CH
837 mw	805 w	822 w	826 w, br	δ_{oop} CH
772 mw				δ_{ip} CC
699 mw	702 vw	704 w	703 w	δ_{wg} NH
646 m		644 w	647 w	δ fenil
635 m	638 w		635 w	δ tiazol, δ fenil
566 w			548 vw	δ_{oop} NH_2
518 w	512 w		508 vw	δ tiazol
448 vw				δ_{wg} SO_2
389 s	390 s	392 s	392 m	δ fenil
		249 s		ν Au-Cl
	240 s			ν Ag-Cl
200 ms				ν Ag-N



Slika 43. SERS spektri sulfatiazola na a) Ag koloidu 1, b) Ag koloidu 2, c) Au koloidu i d) Cu koloidu; $c(\text{sulfatiazol}) = 9 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, pobuda pri 1064 nm.

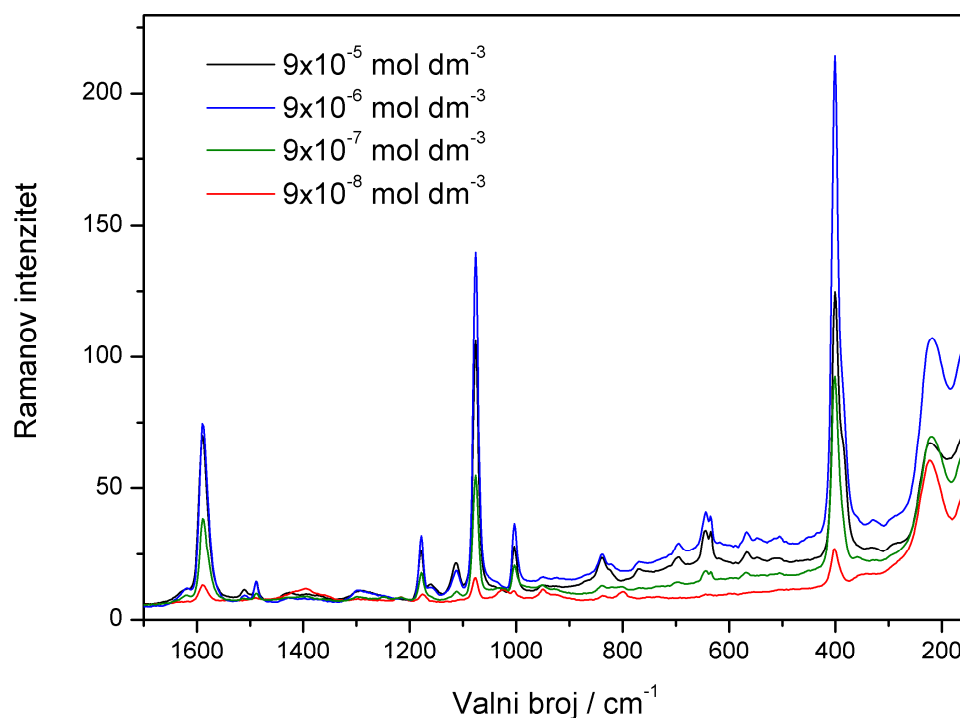
Uspoređene su vibracijske vrpce u Ramanovom spektru sulfatiazola i SERS spektru sulfatiazola na Ag koloidu **1** (Tablica 5). Jaka vrpca pri 1595 cm^{-1} u Ramanovom spektru sulfatiazola, pripisana istezanju benzenskog prstena te deformaciji primarne amino skupine, pomaknuta je prema nižoj vrijednosti, 1590 cm^{-1} , u SERS spektru sulfatiazola na koloidu srebra, što ukazuje na moguću interakciju molekule s površinom srebra preko NH_2 skupine i posljedičnu preraspodjelu elektrona aromatskog sustava. Pomak prema nižim valnim brojevima karakterizira i vrpcu simetričnog istezanja sulfonske skupine koja se u SERS spektru opaža kao srednje jaka vrpca pri 1113 cm^{-1} . S druge strane vrpca pri 1076 cm^{-1} koja potječe od deformacije fenilne skupine vrlo je jaka, za razliku od odgovarajuće vrpce pri 1073 cm^{-1} u Ramanovom spektru. Pojačanje intenziteta vrpce pri 1004 cm^{-1} i 646 cm^{-1} , koje također odgovaraju vibracijama benzenskoga prstena, upućuje na aromatske sustave položene blizu metalne površine, te povoljnu, okomitu orijentaciju prema površini metala. Vrlo jaka vrpca pri 389 cm^{-1} u SERS spektru sulfatiazola, pripisana deformacijskoj vibraciji fenilnog prstena, dodatno potvrđuje blizinu aromatskog prstena i metalnog supstrata.

U brojnim istraživanjima kompleksnih spojeva prijelaznih metala sa sulfatiazolom kao ligandom, pokazano je kako se sulfatiazol bilo u neutralnoj ili deprotoniranoj formi uglavnom veže na metale preko dušika tiazolnog prstena, ali i primarne amino skupine. U slučaju vezanja tiazolnim dušikom, katkad i sekundarna amino skupina u lancu sudjeluje u koordinaciji atoma metala, te se sulfatiazol veže bidentantno.¹²⁷⁻¹³³

Lužnate koloidne suspenzije srebra (Ag koloid **1**, pH = 9,7; Ag koloid **2**, pH = 8,3) i bakra (pH = 11,6) osiguravaju većinsku prisutnost neutralne forme sulfatiazola ($\text{p}K_1 = 2,32$; $\text{p}K_2 = 7,24$).⁶² Slični SERS spektri sulfatiazola opaženi u koloidnim suspenzijama različitih metala upućuju na sličan mehanizam adsorpcije molekule na površinu različitih koloida. Budući je vrpca, kojoj osim istezanja benzenskog prstena doprinosi i deformacija amino skupine, u SERS spektrima pomaknuta prema nižim valnim brojevima u odnosu na Ramanov spektar, a sama skupina je u sterički povoljnom položaju za približavanje metalnoj površini, može se pretpostaviti da se sulfatiazol adsorbira na metale preko primarne amino skupine, pri čemu se benzenski prsten smješta okomito u odnosu na površinu.

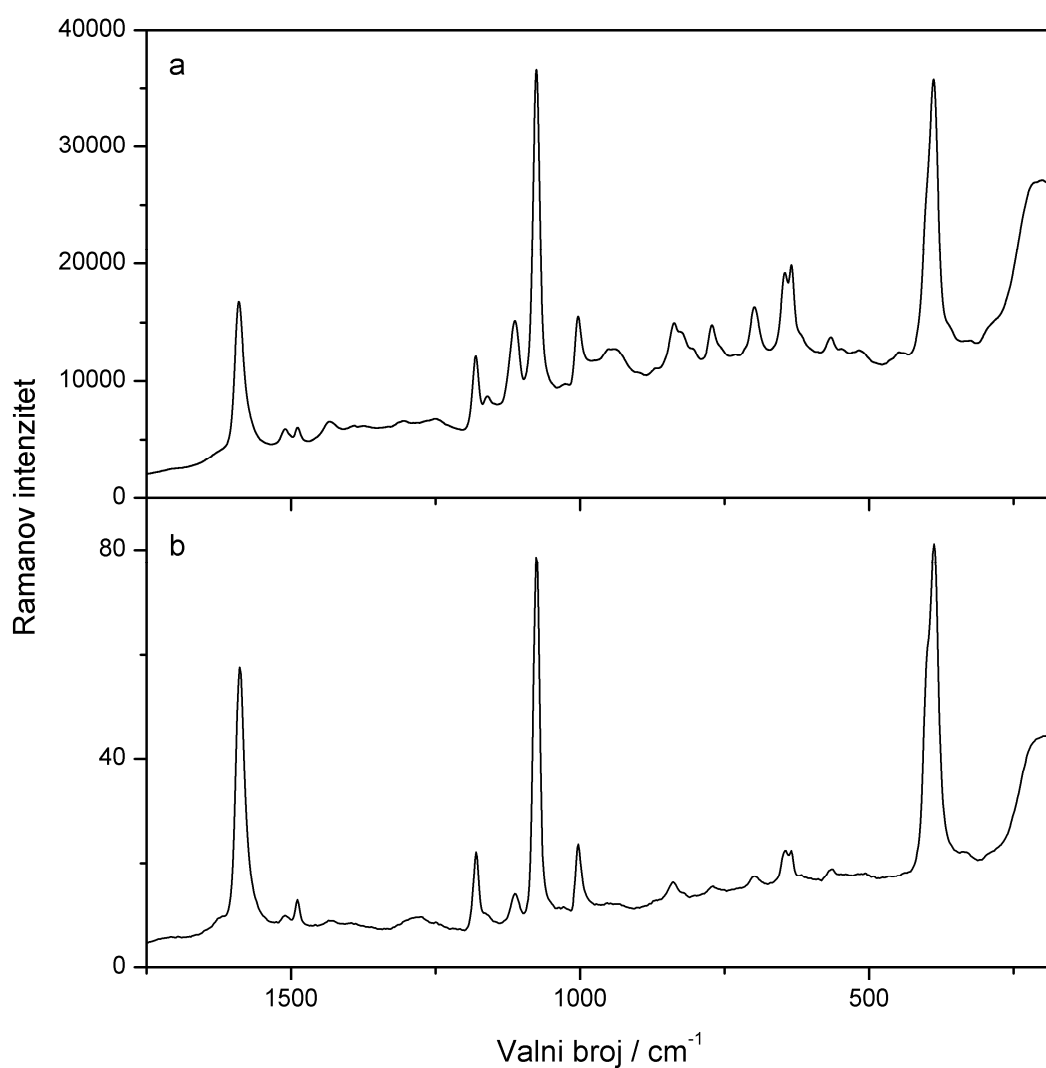
Jaka vrpca pri 220 cm^{-1} u SERS spektru sulfatiazola na Ag koloidu **1** pripisana je istezanju novonastale Ag–N veze. Vrpce pri 240 cm^{-1} i 249 cm^{-1} u SERS spektrima molekule na Ag koloidu **2** odnosno Au koloidu teško je nedvojbeno pripisati vezi sulfatiazola s metalnim supstratom, budući je za agregaciju ovih koloida korišten natrijev klorid te spomenute vrpce mogu potjecati i od istezanja Ag–Cl odnosno Au–Cl veze. Zanimljivo je kako vrpca u području $240\text{--}200\text{ cm}^{-1}$ nije prisutna u SERS spektru sulfatiazola na Cu koloidu. S obzirom da je i vrpca deformacije aromatskog prstena pri 392 cm^{-1} relativno slabija u odnosu na SERS spektre molekule na ostalim supstratima, može se pretpostaviti da se sulfatiazol kemijski ne veže na površinu bakra. Iako je SERS spektar sulfatiazola na zlatnom koloidu vrlo sličan onima na Ag i Cu koloidu, njegov intenzitet je značajno manji. Slabo pojačanje raspršenog zračenja sulfatiazola sa zlatne površine može se pripisati kiselom mediju koloidne suspenzije ($\text{pH} = 5,8$), u kojem je primarna amino skupina sulfatiazola protonirana. Zanimljiva je međutim sličnost SERS spektara sulfatiazola na zlatnom koloidu te na supstratima bakra i srebra, koja upućuje na isti način adsorpcije u svim slučajevima. Naime, s obzirom na mogućnost tautomerije, a u slučaju nepovoljno pozitivno nabijene primarne amino skupine, postoji mogućnost adsorpcije molekule sulfatiazola preko tiazolnog dušika. S obzirom da vrpce vibracijskih modova tiazolnog prstena nisu opažene, a u pretpostavljenom načinu adsorpcije sulfatiazola na površinu metala peteročlani je prsten udaljen od površine koloida, teško je zaključiti u kojem je tautomernom obliku sulfatiazol prisutan u istraživanim sustavima.

Kao i u slučaju entakapona ovisnost intenziteta SERS spektara o koncentraciji analita nije linearna, što je posljedica reapsorpcije raspršenog zračenja molekula analita prisutnih u suvišku s obzirom na broj molekula koje omogućavaju optimalnu pokrivenost metalnog supstrata, te koncentracijski ovisnog položaja molekula na površini metala. Koncentracija sulfatiazola pri kojoj se postiže optimalan položaj molekula i pokrivenost površine srebrnog koloida, a time i opaža najintenzivniji SERS spektar je $9 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$. Pri višim i nižim koncentracijama od $9 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$ intenzitet površinski pojačanog raspršenja slabi (Slika 44). Najniža koncentracija sulfatiazola na koloidu srebra za koju je opažen SERS spektar iznosi $9 \times 10^{-8}\text{ mol dm}^{-3}$.



Slika 44. SERS spektri sulfatiazola na Ag koloidu **1**, agregiranim otopinom natrijeva nitrata pri različitim koncentracijama sulfatiazola; pobuda pri 1064 nm.

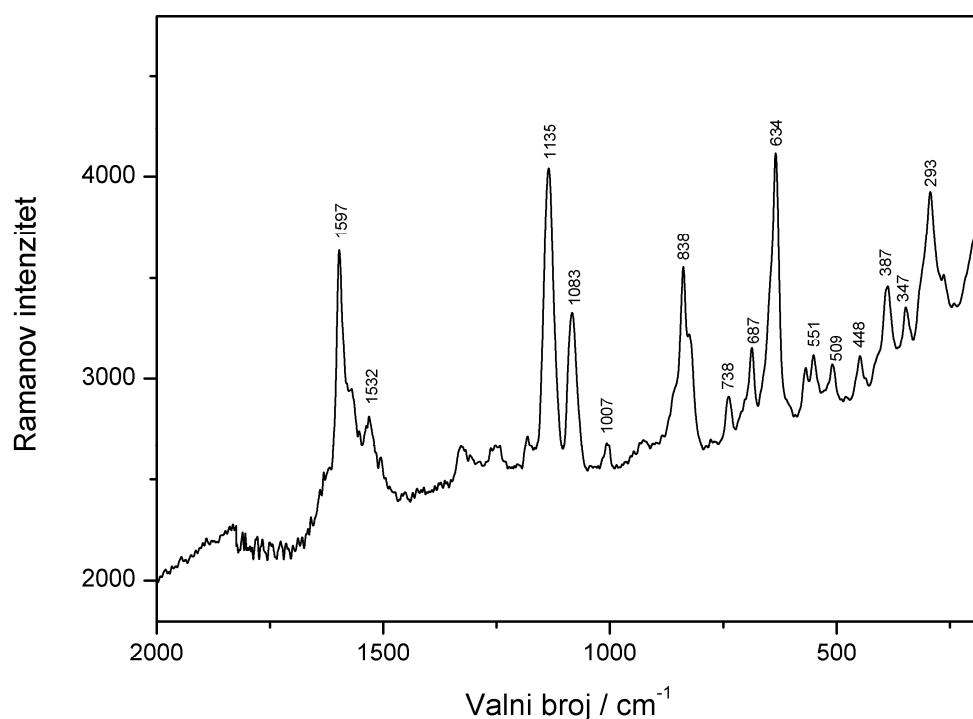
Utjecaj valne duljine pobudnog zračenja na površinsko pojačanje Ramanovog raspršenja sulfatiazola istraženo je pri koncentraciji analita 9×10^{-5} mol dm⁻³ u Ag koloidu **1** agregiranom s NaNO₃. SERS spektri sulfatiazola snimljeni su nakon pobude zračenjem lasera pri 785 nm i 1064 nm (Slika 45). Kao i u slučaju entakapona opažene su očekivane razlike u relativnim intenzitetima pojedinih vrpce, te razlika u cjelokupnom intenzitetu spektra. Pobudno zračenje valne duljine 785 nm, budući je veće energije od energije zračenja u NIR području, rezultira i spektrom višeg intenziteta. Iako razlike u relativnim intenzitetima vrpce nisu toliko izražene kao u slučaju SERS spektara entakapona, uočljivo je kako u spektru nakon pobude pri 1064 nm dominiraju vrpce pri 1590 cm⁻¹, 1076 cm⁻¹ i 389 cm⁻¹, kojima doprinose vibracijski modovi benzenskog prstena, dok su ostale vrpce u spektru relativno slabog intenziteta. Pobudom pri 785 nm, spomenute vrpce također su vrlo jake, ali relativna razlika u odnosu na intenzitet ostatka spektra nije toliko izražena.



Slika 45. SERS spektri sulfatiazola, $c = 9 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, na Ag koloidu **1** snimljeni pobudnim zračenjem pri a) 785 nm i b) 1064 nm.

4.2.3. SERS spektar sulfatiazola na površini zlata

Raspršeno zračenje sulfatiazola površinski je pojačano i sa zlatne pločice *Klarite*, pri koncentraciji sulfatiazola 1×10^{-4} mol dm⁻³. Budući je sulfatiazol analiziran na metalnim koloidima koristeći za pripravu mjernih uzoraka ishodnu otopinu sulfatiazola u vodi, ona je korištena i za adsorpciju molekula na pločicu *Klarite*. Kako bi se osiguralo vezanje molekula analita u jednom sloju na površini, pločica je nakon isparavanja vodene otopine sulfatiazola dodatno isprana vodom. SERS spektar snimljen je neposredno nakon sušenja zlatne pločice, te nakon dodatnog ispiranja čistom vodom. Također, sulfatiazol je adsorbiran i iz etanolne otopine iste koncentracije. U sva tri slučaja opaženi su SERS spektri jednakog položaja i intenziteta vrpce (Slika 46). Opažene vibracijske vrpce navedene su u tablici (Tablica 5).

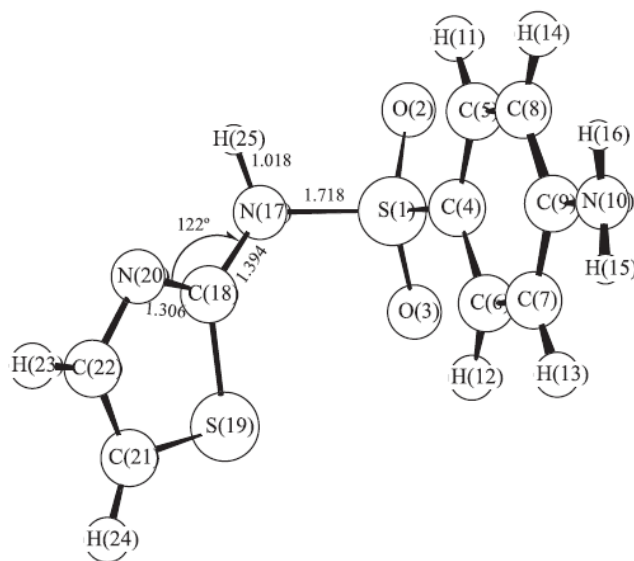


Slika 46. SERS spektar sulfatiazola na površini zlatne pločice *Klarite*; $c = 1 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³, pobuda pri 785 nm.

Zanimljiva je razlika između SERS spektara sulfatiazola na metalnim koloidima i metalnoj pločici. Naime, SERS spektar s površine pločice *Klarite* značajno nalikuje Ramanovom spektru tvari u čvrstom stanju. Vrpce koje odgovaraju simetričnom istezanju sulfonske skupine te deformaciji amino skupine nisu pomaknute prema nižim valnim brojevima u odnosu na Ramanov spektar, a vibracije prstenova nisu selektivno pojačane kao što je slučaj u SERS spektrima s koloida. Opažena razlika u SERS spektrima sulfatiazola na metalnim koloidima i pločici *Klarite* posljedica je medija koji okružuje analit. U koloidnim suspenzijama različitih pH vrijednosti, sulfatiazol može biti prisutan u neutralnom ili protoniranom stanju, što može utjecati na konformaciju molekule i njenu mogućnost adsorpcije na metalnu površinu. Također, interakcije s vodenim medijem koloidne suspenzije s jedne strane i ionima na površini dispergiranih metalnih nanočestica koji stabiliziraju koloidni sustav s druge strane, utječu na adsorpciju molekula i njen položaj na površini metala. Na pločici *Klarite*, za razliku od opisanih koloidnih suspenzija, nakon adsorpcije i sušenja na zraku okruženje molekule analita nalikuje onom u čvrstom stanju.

Razlike u SERS spektrima sulfatiazola opaženih s različitih supstrata upućuju na različiti položaj molekule na površini metala, odnosno adsorpciju preko različitih funkcionalnih skupina. S obzirom da jake vrpce u SERS spektru sulfatiazola na zlatnoj pločici, primjerice one pri 1571 cm^{-1} , 635 cm^{-1} , 387 cm^{-1} i 294 cm^{-1} , odgovaraju vibracijama oba prstena, iz izbornih pravila na površini proizlazi kako nijedan od prstena nije u položaju paralelnom površini metala. DFT računom, pri nivou teorije B3LYP/6-31+G**, pokazano je kako je najpovoljnija konformacija sulfatiazola ona pri kojoj kut između tiazolnog i benzenskog prstena iznosi 95° (Slika 47).⁶² U takvoj konformaciji sulfatiazol se može vezati na površinu metala na nekoliko načina.

S obzirom na afinitet vezanja tiazolnog i amino dušika s metalima,¹²⁷⁻¹³³ adsorpcija preko dušikovih atoma vjerojatnija je od adsorpcije preko kisikovih atoma sulfonske skupine. Također, intenzivne vrpce vibracija prstena upućuju na vezanje preko tiazolnog dušika, pri čemu su oba prstena u gotovo okomitom položaju u odnosu na površinu zlata. U takvom položaju i dušik sekundarne amino skupine, te u manjoj mjeri primarne amino skupine na benzenskom prstenu, mogu sudjelovati u adsorpciji molekule na površini metala.



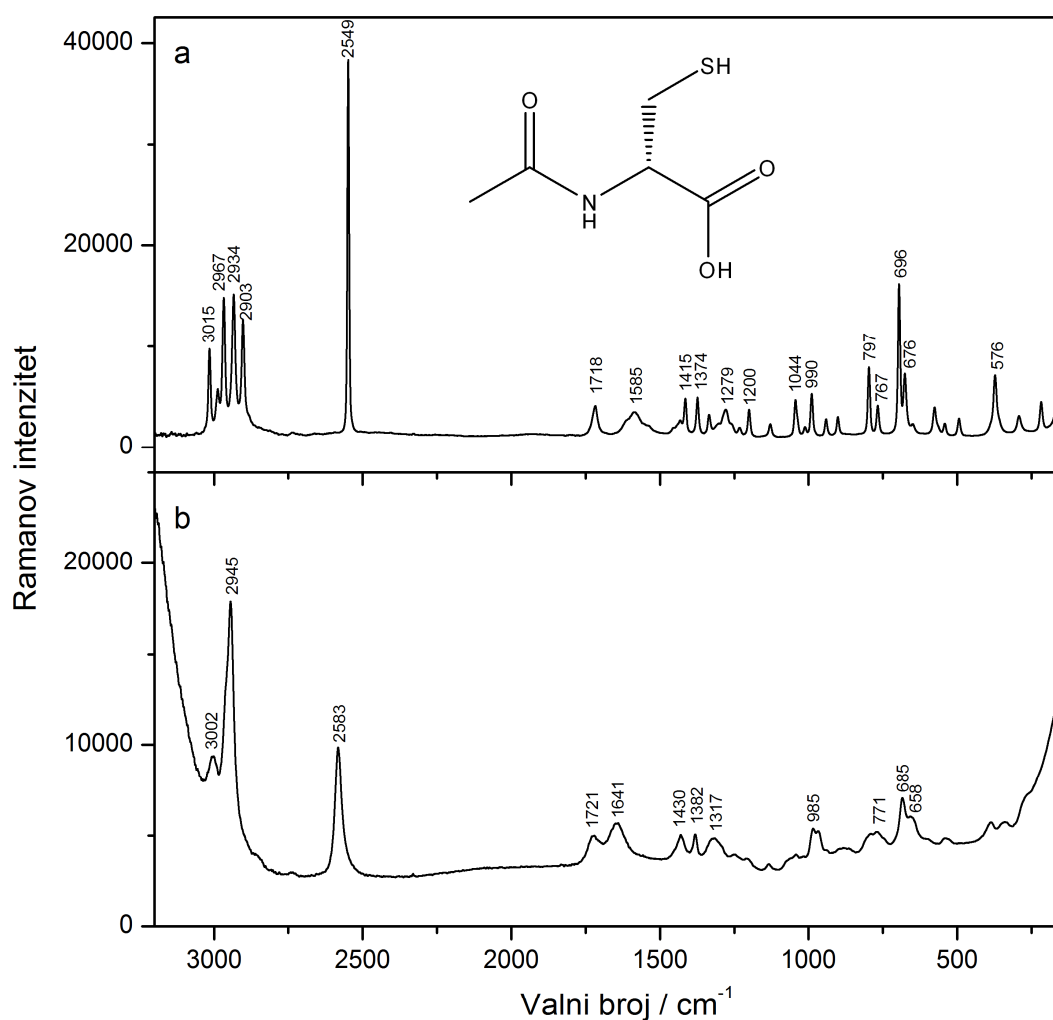
Slika 47. Struktura sulfatiazola izračunata programom B3LYP/6-31 + G^{**}.⁶²

4.3. Skupina aktivnih farmaceuthkih tvari s tiolnom skupinom

4.3.1. Acetilcistein

4.3.1.1. Ramanovi spektri acetilcisteina

Ramanovi spektri acetilcisteina u čvrstom stanju i njegove zasićene vodene otopine prikazani su na Slici 48, a opažene vibracijske vrpce asignirane u Tablici 7.^{93,111,112,134}



Slika 48. Ramanov spektar acetilcisteina u a) čvrstom stanju i b) zasićenoj vodenoj otopini, $c = 2,4 \text{ mol dm}^{-3}$; pobuda pri 785 nm.

U Ramanovom spektru acetilcisteina u čvrstom stanju dominira vrlo jaka vrpca pri 2549 cm^{-1} koja odgovara istezanju tiolne skupine. U odnosu na odgovarajuću vrpca u spektru vodene otopine, 2583 cm^{-1} , vrpca istezanja S–H veze nalazi se pri nižem valnom broju što upućuje na sudjelovanje SH skupine u intermolekularnoj interakciji.¹³⁴ Da se zaista radi o slaboj vodikovoj vezi s karbonilnim kisikom u karboksilnoj skupini susjedne molekule potvrđuje opis kristalne strukture acetilcisteina u kristalografskoj bazi podataka *Cambridge* pod nazivom *NALCYS11*.⁸⁴ Na slabu interakciju ukazuje i vrpca istezanja karbonila karboksilne skupine koja se javlja pri 1718 cm^{-1} i 1721 cm^{-1} u spektru čvrste tvari odnosno otopine. Zanimljiva razlika u Ramanovim spektrima je i položaj vrpce istezanja karbonila u amidnoj skupini, koja se opaža pri 1641 cm^{-1} u spektru otopine te pri 1585 cm^{-1} u spektru čvrste tvari, a ukazuje na jaku inter ili intramolekulsku interakciju u čvrstom stanju. Kristalna struktura potvrđuje da se radi o vodikovoj vezi između navedene karbonilne skupine i hidroksilne skupine susjedne molekule. Prikaz vodikovih veza u kristalu acetilcisteina nalazi se u Dodatku (Slika D3). Područje istezanja C–H veza također se razlikuje među spektrima. Naime, u spektru čvrste tvari opažaju se dobro razlučene vrpce simetričnih i antisimetričnih isteznih vibracija između 3015 i 2903 cm^{-1} , dok su u spektru otopine prisutne dvije široke vrpce pri 3002 cm^{-1} i 2945 cm^{-1} . Srednje jaka vrpca pri 696 cm^{-1} i 685 cm^{-1} , te nešto slabija vrpca pri 676 cm^{-1} i 658 cm^{-1} u spektru kristalne tvari, odnosno otopine, odgovaraju vibracijama istezanja C–S veze.

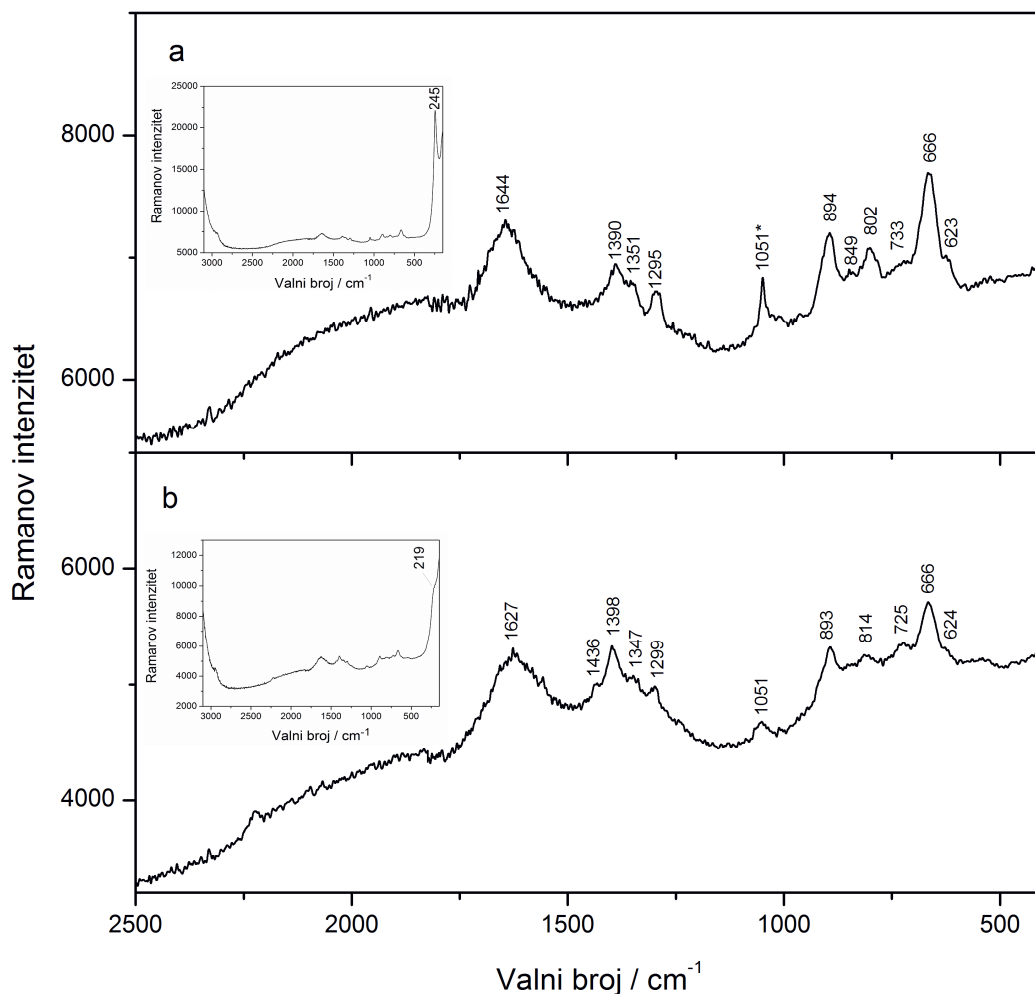
Tablica 7. Vibracijske vrpce u Ramanovim i SERS spektrima acetilcisteina.

Valni broj / cm^{-1}				Vibracija
Raman		SERS		
Čvrsta tvar	Zasićena vodena otopina	Ag@Au koloid	UTP koloid	
3015 m	3002 m, br			$\nu_{\text{as}} \text{ C-H (CH}_3\text{)}$
2967 m				$\nu_{\text{as}} \text{ C-H (CH}_2\text{)}$
2934 m	2945 s, br			$\nu_{\text{s}} \text{ C-H (CH}_3\text{)}$
2903 m				$\nu_{\text{s}} \text{ C-H (CH}_2\text{)}$
2549 vs	2583 m, br			$\nu \text{ S-H}$
1718 w	1721 w			$\nu \text{ C=O (COOH)}$
		1627 m	1644 m	$\nu_{\text{as}} \text{ CO}_2^-$
1585 w	1641 w			$\nu \text{ C=O (CONH)}$
1538 sh				$\delta \text{ N-H}$
1432 w	1430 w	1438 vw		$\delta_{\text{as}} \text{ CH}_3$
1415 w	1382 w			$\delta_{\text{wg}} \text{ CH}_2$
		1398 m	1390 w	$\nu_{\text{s}} \text{ CO}_2^-$
1374 w		1347 w	1351 sh	$\delta_{\text{s}} \text{ CH}_3$
1335 w				$\delta \text{ O-H}$
1279 w	1317 w, br	1299 w	1295 w	$\nu \text{ C-N}$
1232 vw	1248 vw			$\delta_{\text{rc}} \text{ CH}_2$
1200 w	1210 vw			$\delta_{\text{tw}} \text{ CH}_2$
1129 w	1134 w			$\nu \text{ C-O}$
1044 w	1042 vw	1051 w		$\nu \text{ C-N}$
1012 vw	1016 vw			$\delta \text{ NCH}$
990 w	985 w			
941 w	939 vw			$\delta \text{ S-H}$
902 w	898 vw, br	893 w	894 w	$\nu \text{ C-CO}_2$
		814 w	802 w	$\delta \text{ CO}_2^-$
797 m	793 w			$\nu \text{ C-C-C}$
767 w	771 w	725 w	733 vw, br	$\delta \text{ NH}$
696 m	685 w	666 m	666 m	$\nu \text{ C-S}$
676 m	658 w	624 sh, w	623 sh	$\nu \text{ C-S}$
576 w	596 sh			$\delta \text{ C=O}$
542 vw	541 w			
494 w				
373 m	386 w			$\delta \text{ C-C}$
293 w	340 w			$\delta \text{ C-S}$
			245 vs	$\nu \text{ Ag-S, } \nu \text{ Ag-Cl}$
		219 sh, s		$\nu \text{ Au-S, } \nu \text{ Au-Cl}$
218 w				$\gamma \text{ C-N}$

4.3.1.2. SERS spektri acetilcisteina

SERS spektar acetilcisteina nije opažen koristeći supstrate od zlata, poput Au koloida ili pločice *Klarite*, kao niti koloide srebra i bakra. Pojačanje raspršenog zračenja acetilcisteina postignuto je međutim s bimetalnog koloida i koloida srebra funkcionaliziranog nukleotidom, Ag koloid **3** (Slika 49). Koloidnim suspenzijama oba tipa prilagođenih supstrata održavana je neutralna pH vrijednost (pH = 7,0) dodatkom MOPS pufera, kako bi se spriječila dimerizacija acetilcisteina stvaranjem disulfidne veze. Koloidi su agregirani dodatkom natrijeva klorida neposredno prije dodatka analita. Pri pH 7,0 acetilcistein je prisutan u otopini u obliku *zwitteriona*.

U Ramanovim spektrima puferiranih koloida bez acetilcisteina nisu prisutne vrpce koje potječu od vibracija molekula pufera. U SERS spektrima acetilcisteina vrpca istezanja S–H veze nije opažena. Jaka vrpca istezanja C–S veze uočena je pri 666 cm^{-1} u SERS spektrima molekule u oba koloidna sustava, te vrlo slaba vrpca pri 623 cm^{-1} i 624 cm^{-1} u spektru molekule na površini Ag koloida **3**, odnosno Ag@Au koloida. U skladu s istraživanjem adsorpcije tiouree na površinu srebrne elektrode,¹³⁵ iščezavanje vrpce istezne vibracije SH skupine i pomak vrpce istezanja C–S veze prema nižim valnim brojevima u odnosu na Ramanov spektar, upućuje na nastanak veze sumporova atoma s metalom. U prilog novonastaloj vezi su i vrlo jaka vrpca pri 245 cm^{-1} u spektru acetilcisteina na koloidu srebra funkcionalizirane površine, pripisana istezanju Ag–S veze, odnosno rame pri 219 cm^{-1} u spektru tiolne molekule na bimetalnom koloidu pripisano istezanju Au–S veze. Treba napomenuti kako opaženim vrpcama doprinose i istezanja Ag–Cl odnosno Au–Cl veza, nastalih vezanjem kloridnih iona iz NaCl korištenog za agregaciju s površinom metala. Pri pH 7,0 koloidnih suspenzija karboksilna skupina acetilcisteina je deprotonirana. Široka vrpca pri 1644 cm^{-1} i 1627 cm^{-1} u SERS spektrima acetilcisteina na nukleotidom modificiranom koloidu srebra odnosno bimetalnom koloidu pripisana je antisimetričnom istezanju karboksilatnog aniona. Na odgovarajuću simetričnu vibraciju upućuje intenzivna vrpca pri 1390 cm^{-1} (Ag koloid **3**) odnosno pri 1398 cm^{-1} (Ag@Au koloid). Također, vrpca deformacijske vibracije CO_2^- skupine uočena je pri 802 cm^{-1} u spektru acetilcisteina na koloidu srebra odnosno pri 814 cm^{-1} na bimetalnim česticama. Vrpca pri 894 cm^{-1} (893 cm^{-1} u spektru Ag@Au sustava) odgovara istezanju C– CO_2 veze. Pojačanje vrpce različitih modova karboksilatnog aniona ukazuje na njegovu blizinu površini supstrata i povoljan položaj u odnosu na metalnu površinu. S obzirom na širinu vrpce antisimetričnog istezanja, karboksilatni anion najvjerojatnije sudjeluje s π elektronskim sustavom u vezi s metalima.¹³⁵



Slika 49. SERS spektar acetilcisteina na a) Ag koloidu **3** i b) Ag@Au koloidu; $c = 9 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} , pobuda pri 785 nm. Vrpca pri 1051 cm^{-1} u spektru a) potječe od istezanja fosfatne skupine nukleotida.

Iako su SERS spektri acetilcisteina na različitim supstratima vrlo slični, mogu se opaziti male razlike u položaju i relativnom intenzitetu pojedinih vrpca. Iako je predloženi isti način adsorpcije acetilcisteina na oba supstrata, spektralne razlike posljedica su svojstava metalnih supstrata te prirode površine i veličine nanočestica.

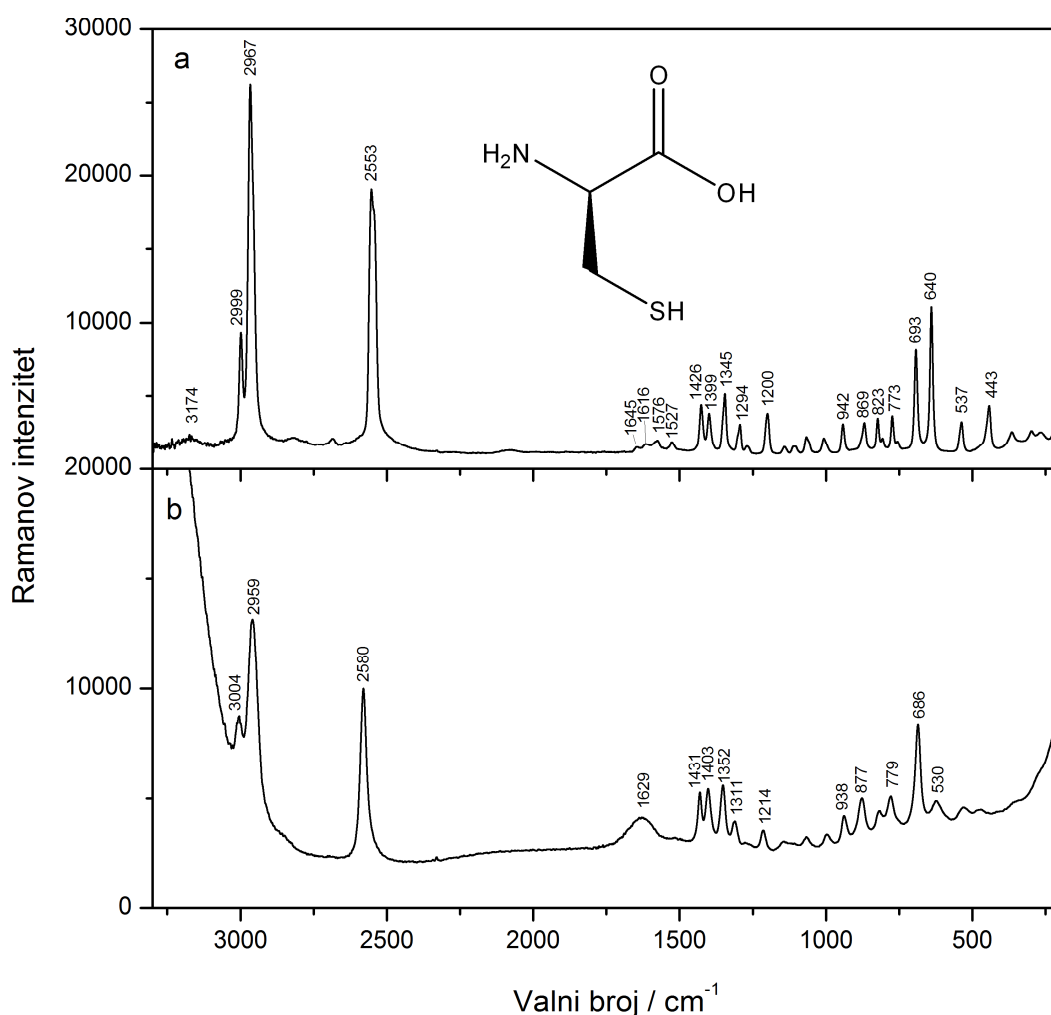
Najniža izmjerena koncentracija acetilcisteina u oba istraživana sustava iznosi 9×10^{-5} mol dm^{-3} , dok je spektar najvećeg intenziteta opažen pri koncentraciji acetilcisteina 9×10^{-4} mol dm^{-3} . Faktori pojačanja izračunati su pomoću intenziteta vrpce istezanja C–S veze, a iznose $2,2 \times 10^4$ za Ag koloid **3** i $1,8 \times 10^4$ za Ag@Au koloid, te ukazuju kako koloid srebra

funkcionaliziran nukleotidom raspršuje zračenje acetilcisteina nešto jače nego bimetalni koloid.

4.3.2. Cistein

4.3.2.1. Ramanovi spektri cisteina

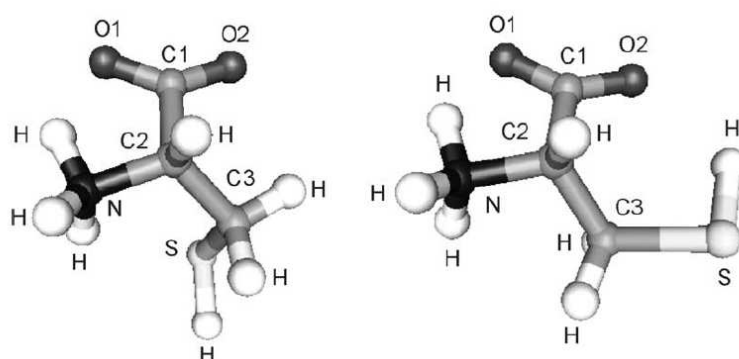
Ramanovi spektri cisteina kristalne forme I i zasićene vodene otopine prikazani su na Slici 50. Opažene vibracijske vrpce asignirane su u Tablici 8.^{87,91,92,93,111}



Slika 50. Ramanov spektar cisteina u a) čvrstom stanju, kristalna forma I, i b) zasićenoj vodenoj otopini, $c = 1,7 \text{ mol dm}^{-3}$; pobuda pri 785 nm.

U obje poznate kristalne forme cistein je u formi *zwitteriona*. S obzirom na pK_a vrijednosti cisteina koje iznose 2,05 za karboksilnu skupinu, 8,00 za tiolnu skupinu te 10,25 za amino skupinu,⁸⁵ cistein je u zasićenoj vodenoj otopini ($c = 1,7 \text{ mol dm}^{-3}$, $pH = 4,0$) također prisutan kao *zwitterion*.

Najintenzivnije vrpce u Ramanovim spektrima rompske forme I i zasićene vodene otopine cisteina nalaze se u području od 2500 do 3000 cm^{-1} . Jaka vrpca pri 2999 cm^{-1} u spektru kristalne tvari, odnosno 3004 cm^{-1} u spektru otopine pripisana je anisimetričnom istezanju CH_2 skupine, dok odgovarajuće simetrično istezanje doprinosi vrpcoma pri 2967 cm^{-1} odnosno 2959 cm^{-1} . Jaka vrpca pri 2553 cm^{-1} i 2580 cm^{-1} u spektrima čvrste tvari odnosno otopine odgovara istezanju SH skupine. Položaj vrpce spomenute vibracije pri nižem valnom broju ukazuje na interakciju tiolne skupine u čvrstom stanju. Vrpce vrlo slabog intenziteta u području od 1645 do 1527 cm^{-1} dobro su razlučene u spektru čvrste tvari, za razliku od jedne vrlo široke vrpce s vrhom pri 1629 cm^{-1} u spektru vodene otopine. Unutar tog područja vrpce su pripisane istezanju $\text{C}=\text{O}$ skupine, antisimetričnom istezanju karboksilatne skupine te deformaciji protonirane amino skupine (Tablica 8). U spektru kristalne tvari dvije vrpce srednjeg intenziteta pri 693 cm^{-1} i 640 cm^{-1} odgovaraju istezanju $\text{C}-\text{S}$ veze. Spomenuto istezanje u spektru otopine opaža se pri 686 cm^{-1} i 623 cm^{-1} . Na položaj vrpce istezanja $\text{C}-\text{S}$ veze utječe konformacija molekule cisteina, odnosno položaj SH skupine u odnosu na CH_2 skupinu. U istraživanoj rompskoj formi I, u asimetričnoj jedinici prisutna je samo jedna molekula cisteina i to u *gauche* konformaciji (Slika 51.a). Za usporedbu, u monoklinskoj formi II, u asimetričnoj jedinici prisutne su dvije molekule cisteina, od čega je jedna u *gauche*, a druga u *trans* konformaciji (Slika 51).^{88,89} U strukturi *trans* konformera $\text{C}-\text{C}$ torzijski kut iznosi 180° , dok u *gauche* konformaciji ima vrijednost između 0 i 90° .



Slika 51. Konformeri cisteina: a) *gauche* i b) *trans*.⁹¹

Tablica 8. Vibracijske vrpce u Ramanovim i SERS spektrima cisteina.

Valni broj / cm ⁻¹				Vibracija
Raman		SERS		
Čvrsto stanje Polimorf I	Zasićena vodena otopina	Ag@Au koloid	UTP koloid	
3174 vw				v _{as} NH ₃ ⁺
2999 ms	3004 s	2926 mw	2930 mw	v _{as} C-H (CH ₂)
2967 vs	2959 vs	2928 mw	2920 mw	v _s C-H (CH ₂)
2553 vs	2580 s			v S-H
1645 vw	1629 w, b			v C=O (CO ₂ ⁻)
1615 vw		1613 mw, b	1638 mw, b	v _{as} CO ₂ ⁻
1576 w	1517 vw			δ _{as} NH ₃ ⁺
1527 w	1498 vw			
1426 m	1431 mw			δ _{wg} CH ₂
1399 mw	1403 mw	1395 mw	1377 mw	v _s CO ₂ ⁻
1345 m	1352 mw	1346 mw	1349 mw	δ CH ₂
1294 w	1311 w	1294 mw	1290 mw	δ _{rc} CH ₂
1271 vw	1277 vw	1245 w		
1200 mw	1214 w	1191 vw		δ _{tw} CH ₂
1141 w	1143 w	1132 w		
1110 w				
1067 w	1067 w	1047 w	1048 w	δ NH ₃ , v C-N
1007 w	997 w	1003 vw	1027 w	
942 mw	938 w	955 w	970 sh	δ NCH
869 mw	877 mw	899 w	906 w	v C-CO ₂
823 mw	817 w	845 w	845 vw	
807 w		805 w	794 w	δ CO ₂
773 mw	779 mw	729 sh	736 w	v _s C-C-C
693 ms	686 ms	664 s	656 mw	v C-S
640 s	623 w			v C-S
537 mw	530 w	563 vw		δ _{rc} CO ₂
443 mw	471 w	419 vw		δ CCN
365 w				γ NH ₃
298 w				δ CCC
265 w				δ _{rc} CCC
			235 vs	v Ag-S, v Ag-Cl
		221 s		v Au-S, v Au-Cl
210 w				δ CCS

Budući je u molekuli cisteina moguća intramolekulska veza između karboksilne i tiolne skupine, frekvencija istezanja C–S veze ovisi o njihovoj interakciji odnosno orijentaciji obiju grupa.⁸⁷ Vrpce istezanja C–S veze u strukutri *trans* konformera nalazi se u području 760–720 cm^{-1} , dok se vrpca odgovarajuće vibracije *gauche* konformera javlja pri nižim valnim brojevima, 680–640 cm^{-1} .^{87,91} Opažene vrpce pri 693 cm^{-1} i 640 cm^{-1} u spektru kristalne tvari potvrđuju *gauche* konformaciju cisteina, na koju upućuju i vrpce pri 686 cm^{-1} i 623 cm^{-1} u

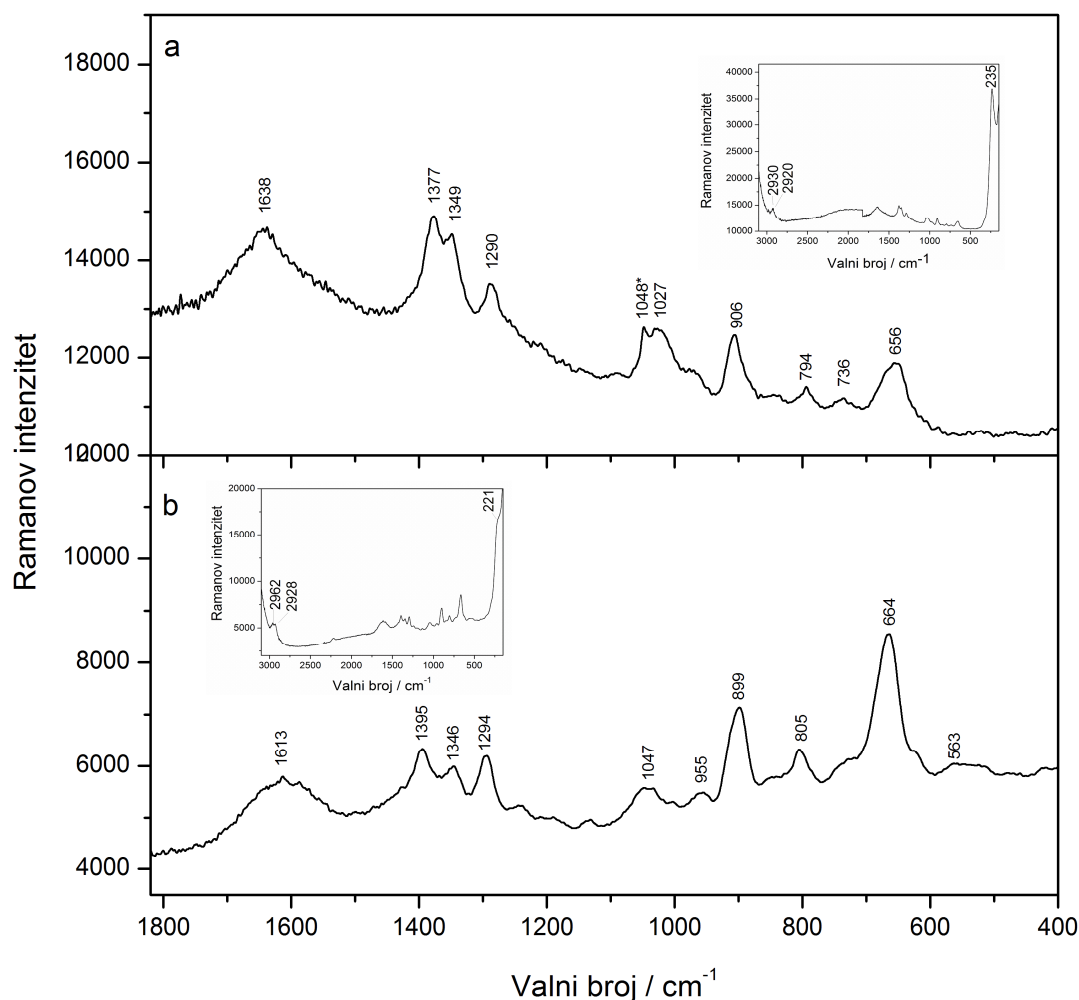
spektru zasićene vodene otopine. Prikaz vodikovih veza u kristalu ortorombske forme I cisteina nalazi se u Dodatku (Slika D4).

4.3.2.2. SERS spektri cisteina

Literaturno su poznata SERS istraživanja cisteina i njegovog dimera cistina na različitim koloidima srebra, pri čemu je cistein u istraživanim sustavima bio prisutan u obliku aniona i *zwitteriona*.^{87,135} U ovom istraživanju Ramanovo raspršenje cisteina površinski je pojačano koristeći bimetalni Ag@Au supstrat te nukleotidiom funkcionalizirani Ag koloid, a u svrhu korelacije rezultata sa strukturno sličnim analitima u skupini. Pojačanje raspršenja cisteina postignuto je s oba metalna supstrata (Slika 52). Dodatkom MOPS pufera koloidnim suspenzijama podešena je pH vrijednost 7,0, pri kojoj je cistein prisutan u obliku *zwitteriona*. Bimetalni koloid agregiran je dodatkom natrijeva klorida neposredno prije dodatka analita, dok je koloid srebra agregiran tek nakon adsorpcije cisteina na metal. Primijećeno je kako je redoslijed dodavanja soli za agregaciju i analita, u slučaju cisteina, vrlo bitan. Naime, dodatkom cisteina na neagregirani Ag koloid **3**, koloid se agregira uslijed adsorpcije molekula cisteina, što je praćeno pomakom UV/Vis apsorpcijskog maksimuma koloida prema većoj valnoj duljini, odnosno promjenom boje koloidne suspenzije iz žute u crvenu.⁷⁶ SERS spektar tako adsorbiranog cisteina ipak se ne opaža. Dodatkom natrijeva klorida, sustav koloid-cistein dodatno se agregira te se raspršeno zračenje adsorbiranih molekula cisteina pojačava. U slučaju dodatka otopine cisteina na prethodno agregirani Ag koloid **3**, cistein se ne adsorbira na metalni supstrat.

Najveća razlika u SERS spektrima cisteina u odnosu na Ramanov spektar tiolne molekule u otopini i čvrstom stanju je nestanak vrpce istezanja S–H veze koja je u spektru otopine prisutna pri 2580 cm^{-1} , a u spektru čvrste tvari pri 2553 cm^{-1} . Vrpca istezne vibracije C–S veze prisutna je kao jaka vrpca pri 664 cm^{-1} u spektru cisteina na bimetalnom koloidu, odnosno pri 656 cm^{-1} u spektru cisteina na koloidu srebra. Nestanak vrpce vibracije SH skupine u SERS spektrima zajedno s pojačanjem i pomakom vrpce istezanja C–S veze prema nižim valnim brojevima ukazuju na adsorpciju cisteina na koloide preko tiolne skupine. U prilog novonastalim vezama su i nove vrlo jake vrpce prisutne u SERS spektrima pri 235 cm^{-1} u spektru Ag-UTP sustava i 221 cm^{-1} u spektru Ag@Au sustava, pripisane istezanju Ag–S odnosno Au–S veze. Spomenutim vrpčama doprinose i istezanja veza metala i kloridnih iona iz agregacijskog agensa. Budući prilikom adsorpcije cisteina na supstrate SH veza nestaje,

moгуćnost intramolekulske interakcije i analize konformera cisteina na temelju položaja vrpce istezanja C–S veze išćezava.



Slika 52. SERS spektar cisteina na a) Ag koloidu **3** i b) Ag@Au koloidu; $c = 9 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³, pobuda pri 785 nm. Vrpca pri 1048 cm⁻¹ u spektru a) potjeće od istezanja fostatne skupine nukleotida.

Osim vrpce istezanja C–S veze u SERS spektrima pojaćane su i vrpce vibracijskih modova karboksilatnog aniona. Široka vrpca pri 1638 cm⁻¹ (Ag koloid **3**) i 1613 cm⁻¹ (Ag@Au koloid) pripisana je antisimetrićnom istezanju karboksilata. Vrpca odgovarajućeg simetrićnog istezanja pri 1377 cm⁻¹ u spektru Ag-UTP sustava, odnosno 1395 cm⁻¹ u spektru Ag@Au sustava također su pojaćane, kao i vrpce pripisane svijanju C–CO₂ skupine opaćene pri 906 cm⁻¹ odnosno pri 899 cm⁻¹. Pojaćanje vrpce vibracija karboksilatnog aniona ukazuje na

njegovu blizinu površini koloidnih supstrata i okomiti položaj u odnosu na površinu metala. Široka vrpca antisimetričnog istezanja karboksilatnog iona upućuje na interakciju π elektrona skupine s metalnom površinom.¹³⁵ Zanimljivo, osim vibracijskih vrpce karboksilatne skupine u SERS spektrima pojačane su i vrpce istezanja CH_2 skupine u području $2970\text{--}2920\text{ cm}^{-1}$.

Iako su SERS spektri cisteina na dva različita supstrata prilično slični, te je predloženi mehanizam adsorpcije molekula na površinu metala u oba slučaja isti, mogu se opaziti razlike u položaju i relativnom intenzitetu pojedinih vrpce. Primjerice vrpca istezanja C–S veze dominira u spektru sustavu bimetalnog koloida, dok je njen intenzitet u spektru molekule na površini srebra modificirane nukleotidom relativno manji, a vrpce karboksilatnog aniona značajno su intenzivnije. Spektralne razlike mogu se pripisati afinitetu tiola prema zlatu koje čini omotač bimetalnih nanočestica, te doprinosu interakcije karboksilatne skupine s površinom srebra pri adsorpciji molekula na površinu koloida srebra.

Najniža izmjerena koncentracija cisteina u oba istraživana sustava iznosi $9 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$. Usporedbom faktora pojačanja izračunatim za vrpce istezanja C–S veze i simetričnog istezanja CO_2^- skupine (Tablica 9), može se zaključiti da nukleotidom modificirani koloid srebra pojačava Ramanovo raspršenje cisteina bolje nego bimetalni koloid srebra i zlata.

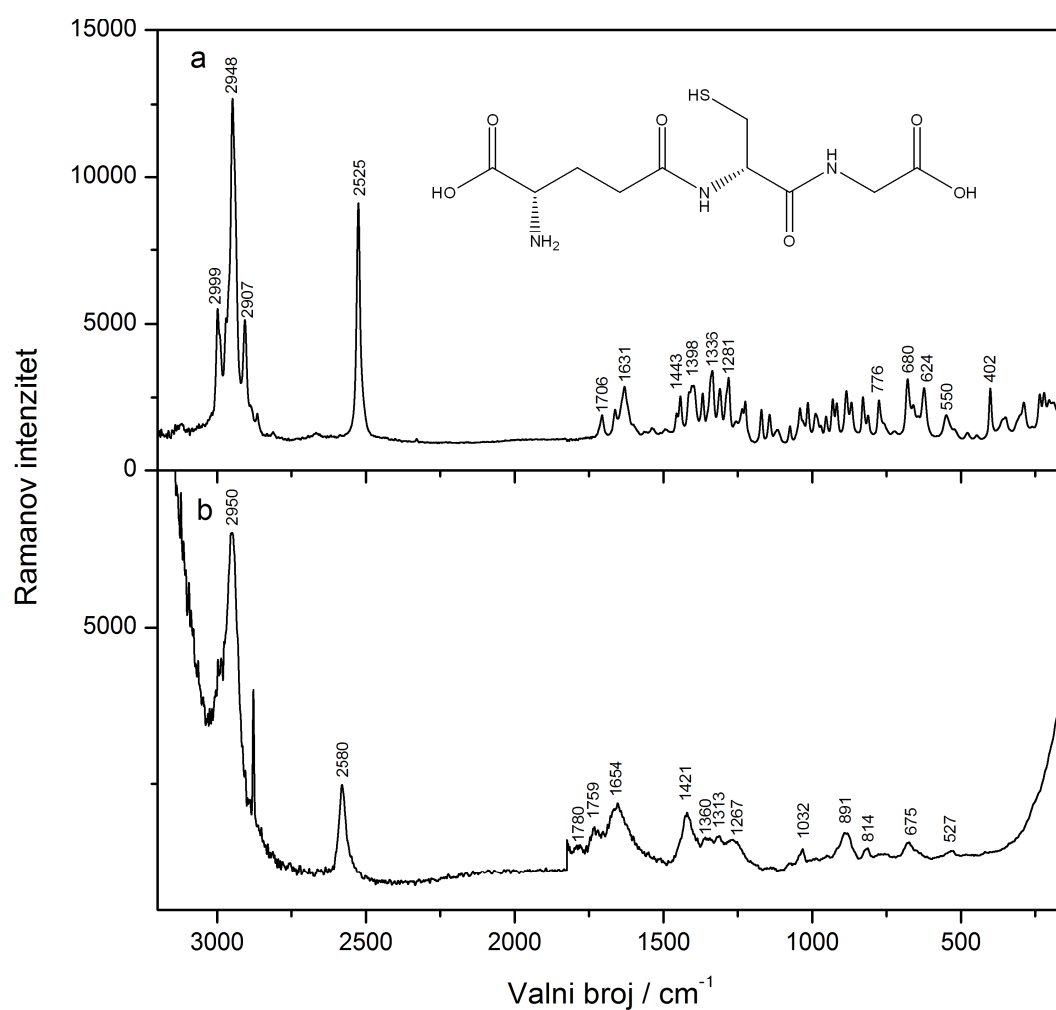
Tablica 9. Faktori pojačanja raspršenja cisteina u istraživanim koloidnim sustavima.

Koloidni sustav	Faktor pojačanja	
	$\nu\text{ C-S}$	$\nu_s\text{ CO}_2^-$
Bimetalni Ag@Au koloid	$1,9 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$
Nukleotidni UTP-Ag koloid	$2,7 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$

4.3.3. Glutation

4.3.3.1. Ramanovi spektri glutaciona

Snimljeni su Ramanovi spektri glutaciona kristalne forme I i zasićene vodene otopine (Slika 53). Opažene vibracijske vrpce asignirane su u Tablici 10.^{46,111,136}



Slika 53. Ramanov spektar glutaciona u a) čvrstom stanju, kristalna forma I, i b) zasićenoj vodenoj otopini, $c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$; pobuda pri 785 nm.

U čvrstom stanju glutation je u obliku *zwitteriona*. Molekule u kristalu međusobno su povezane mnogobrojnim vodikovim i Van der Waalsovima vezama, koje utječu na položaj vrpce vibracija skupina koje sudjeluju u interakcijama.^{98,136} Prikaz vodikovih veza u kristalu glutaciona nalazi se u Dodatku (Slika D5).

Četiri funkcionalne skupine glutaciona, među kojima su dvije karboksilne skupine, tiolna i amino skupina, mogu primati i otpuštati proton. Njihove pK_a vrijednosti su sljedeće: 2,05 za karboksilnu skupinu glutaminske kiseline, 3,40 za karboksilnu skupinu glicina, 8,72 za tiolnu skupinu te 9,49 za amino skupinu.¹⁰⁰ U zasićenoj vodenoj otopini, pri koncentraciji $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ i izmjerenoj vrijednosti $\text{pH} = 3,0$, glutation je s obzirom na navedene pK_a vrijednosti prisutan u obliku *zwitteriona*.

Najjače vrpce u Ramanovim spektrima glutaciona u čvrstom stanju i zasićenoj vodenoj otopini javljaju se u području od 2900 cm^{-1} do 3000 cm^{-1} . Vrlo jaka vrpca pri 2948 cm^{-1} , kao i jake vrpce pri 2999 cm^{-1} i 2907 cm^{-1} u spektru čvrste tvari, pripisane su istezanjima CH_2 skupina. Spomenuti vibracijski modovi, međutim, doprinose samo jednoj, ali vrlo jakoj i širokoj vrpci s vrhom pri 2950 cm^{-1} u spektru otopine. Jaka vrpca pri 2525 cm^{-1} u spektru glutaciona u čvrstom stanju i pri 2580 cm^{-1} u spektru otopine tiolne molekule odgovaraju istezanju SH skupine. Položaj vibracijske vrpce pri nižem valnom broju u spektru čvrste tvari ukazuje na sudjelovanje tiolne skupine u slaboj intra ili intermolekularnoj interakciji. Uvidom u kristalnu strukturu glutaciona, koja se pod nazivom *GLUTAS02* vodi u kristalografskoj bazi podataka *Cambridge*, potvrđeno je da se radi o slaboj vodikovoj vezi tiolne skupine jedne molekule s karboksilatnim anionom glutaminske kiseline susjedne molekule.⁹⁸ Vrpce istezanja karbonilnih skupina prisutne su u oba spektra u području $1710\text{--}1630 \text{ cm}^{-1}$ (čvrsto stanje) i $1780\text{--}1650 \text{ cm}^{-1}$ (otopina). Vrpca simetričnog istezanja glutamatnog aniona opaža se u spektru čvrste tvari pri 1398 cm^{-1} , dok je u spektru otopine prekrivena širokom vrpcom pri 1421 cm^{-1} kojoj doprinose i deformacije metilenskih skupina. Deformacijska vibracija karboksilatnog aniona javlja se pri 776 cm^{-1} i 768 cm^{-1} u spektru čvrstog stanja odnosno otopine. Mnoštvo vrpce u području $1500\text{--}750 \text{ cm}^{-1}$ pripisano je različitim deformacijskim modovima CH_2 i CH skupina te istezanjima veza koje čine okosnicu molekule. Vrpca pri 660 cm^{-1} u spektru čvrste tvari odnosno 675 cm^{-1} u spektru otopine odgovara istezanju C–S veze. Položaj vrpce pri nižem valnom broju u spektru kristalne tvari posljedica je već spomenute međumolekularne interakcije SH skupine s kisikom karboksilatnog aniona glutaminske kiseline.

Tablica 10. Vibracijske vrpce u Ramanovim i SERS spektrima glutationa.

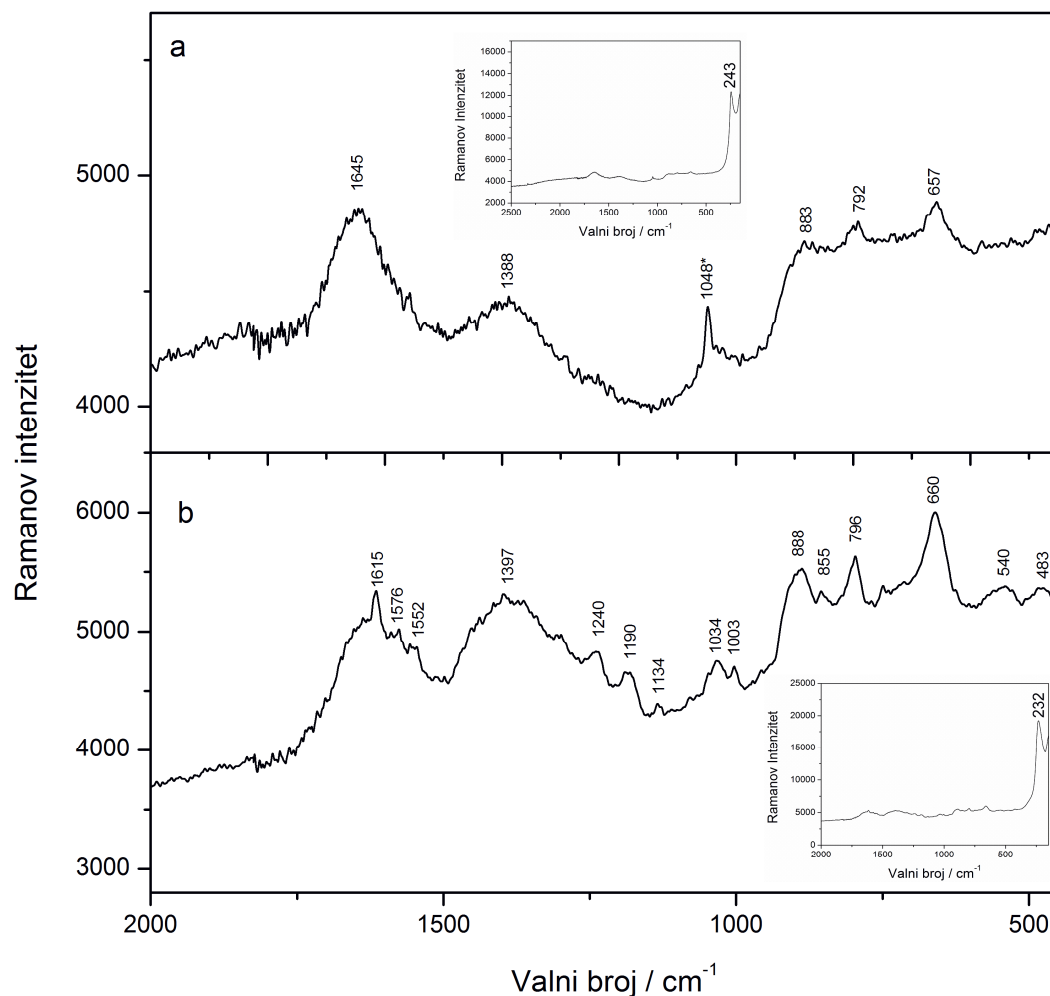
Valni broj / cm ⁻¹				Vibracija
Raman		SERS		
Čvrsto stanje Polimorf I	Zasićena vodena otopina	Ag@Au koloid	Ag koloid 3	
2999 sm	2950 vs			v _{as} C–H
2948 vs				v _{as} C–H, v _s C–H
2907 sm				v _s C–H
2525 s	2580 m			v S–H
1706 w	1780 w, 1759 w			v C=O
1662 w	1654 mw	1615 s, br	1645 mw, br	v C=O
1631 w				v C=O
1539 vw		1576 w, 1552 w		δ _{as} NH
1493 vw				δ _s NH ₃ ⁺
1443 w				δ CH ₂
1398 w	1421 mw	1397 w, br	1388 w, br	v _s CO ₂ ⁻
1368 w	1360 w			δ _{wg} CH ₂ ,
1336 w				v C–O, δ _{ip} NH
1310 w	1313 w			δ _{wg} CH ₂
1281 w	1267 w			δ _{tw} CH ₂
1256 vw				δ _{wg} CH ₂
1235 w		1240 w		δ _{rc} NH ₃ ⁺
1225 w				δ _{tw} CH ₂
1171 w		1190 w		δ CH, δ _{wg} CH ₂
1144 w				δ CH, δ _{tw} CH ₂
1117 vw		1134 vw		v C–N
1075 vw				v C–C
1041 w				δ _{rc} CH ₂ ; δ _{oop} C=O
1015 w		1003 vw		v C–C
989 w				v C–C; δ _{rc} CH ₂
953 vw				δ _{rc} CH ₂ ; δ _s CSH
931 w				δ CSH; δ _{rc} CH ₂
918 w	1032 w	1034 vw		v C–N
885 w	891 w	888 mw	883 mw	v C–C
868 w		855 vw		v C–N; v C–C
830 w				δ COH
812 vw	814 w			v C–N, δ _{rc} CH ₂
776 w	768 vw	796 mw	792 w	δ CO ₂ , δ _{wg} CO ₂
680 w	675 w	660 m	657 mw	v C–S
643 w				v C–C, δ _{oop} NH
624 w				δ _{oop} C=O
550 w	527 vw	540 w		δ _{oop} C=O; δ _{tw} C–N
478 w		483 w		δ COH; δ _{tw} C–N
447 vw				δ CCC
402 vw				δ CCC; δ CCN
351 w				δ CCO; δ CCN
			243 vs	v Ag–S, v Ag–Cl
		232 vs		v Au–S, v Au–Cl

4.3.3.2. SERS spektri glutationa

Površinski pojačano Ramanovo raspršenje glutationa istraženo je koristeći bimetalni koloid i nukleotidom funkcionalizirani koloid srebra (Slika 54). Kao i pri mjerenju ostalih tiolnih molekula, koloidne suspenzije oba prilagođena supstrata puferirane su pri pH 7,0, kako bi se spriječila oksidacija SH skupine, odnosno dimerizacija glutationa. Koloidi su agregirani natrijevim kloridom neposredno prije dodatka analita u sustav. Pri pH mjernog sustava obje karboksilne skupine glutationa su deprotonirane, dok je primarna amino skupina protonirana.

SERS spektri glutationa opaženi su s oba tipa prilagođenih supstrata, pri čemu većeg intenziteta s Ag@Au koloida nego s Ag koloida **3**. Izostanak vrpce istezanja SH skupine iz oba spektra praćen pojavom vrlo jake vrpce pri 243 cm^{-1} u spektru glutationa na koloidu srebra s UTP na površini, odnosno pri 232 cm^{-1} na bimetalnom supstratu, ukazuju na vezu sumporova atoma s površinom metala. Kao i slučaju prethodno istraženih tiola, vrpce istezanja metal-sumpor veze zasijenjene su vrpce istezanja veze kloridnih iona, koji potječu iz agregacijskog agensa, s metalom.

Vrlo široka vrpca u području $1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ u oba SERS spektra pripisana je istezanjima karbonilnih skupina, dok je široka vrpca u području između 1490 i 1300 cm^{-1} pripisana simetričnom istezanju karboksilatnog aniona glutaminske kiseline i deformacijama metilenskih skupina. Zanimljiva razlika u sveukupno sličnim SERS spektrima, upravo je razlika u relativnom intenzitetu ove dvije vrpce koja upućuju na različiti položaj molekula glutationa na površini koloida. Intenzivnija vrpca pri približno 1390 cm^{-1} u spektru glutationa na bimetalnom koloidu posljedica je povoljnije orijentacije CO_2^- iona glutaminskog dijela molekule za razliku od položaja iste skupine na površini koloida srebra. Vrpca slabog intenziteta pri 1237 cm^{-1} u SERS spektru Ag@Au sustava pripisana je deformacijskoj vibraciji NH_3^+ iona, dok je vrlo slaba vrpca pri 1134 cm^{-1} pripisana istezanjima C–N veza glutamina i glicina. U SERS spektrima glutationa na oba supstrata javlja se vrpca pri 888 cm^{-1} za bimetalni, odnosno pri 883 cm^{-1} za Ag-UTP supstrat, koja je pripisana istezanju C–C veze. Također prisutna u oba spektra je i vrpca pri 796 cm^{-1} za Ag@Au koloid (792 cm^{-1} za Ag koloid **3**) koja odgovara deformaciji CO_2^- iona smještenog vrlo blizu površine metalnog supstrata.



Slika 54. SERS spektar glutationa na a) Ag koloidu **3** i b) Ag@Au koloidu; $c = 9 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, pobuda pri 785 nm. Vrpca pri 1048 cm^{-1} u spektru a) potječe od istezanja fostatne skupine nukleotida.

Izračunati su i uspoređeni faktori pojačanja pomoću intenziteta vrpce istezanja C–S veze koja se u Ramanovom spektru zasićene otopine opaža kao slaba vrpca pri 675 cm^{-1} , dok se u SERS spektrima uslijed vezanja molekule na metalni supstrat, ona očekivano javlja pri nižim valnim brojevima i jačeg je relativnog intenziteta. U SERS spektru glutationa vezanog na bimetalni koloid vrpca istezanja C–S veze prisutna je pri 660 cm^{-1} dok se u spektru glutationa na površini koloida srebra modificiranog nukleotidom nalazi pri 657 cm^{-1} . Faktori pojačanja iznose $2,1 \times 10^3$ za Ag@Au koloid te $1,7 \times 10^3$ za Ag koloid **3**, što ukazuje da se raspršeno zračenje glutationa bolje pojačava s površine bimetalnog koloida.

4.3.4. Usporedba aktivnih tvari u skupini

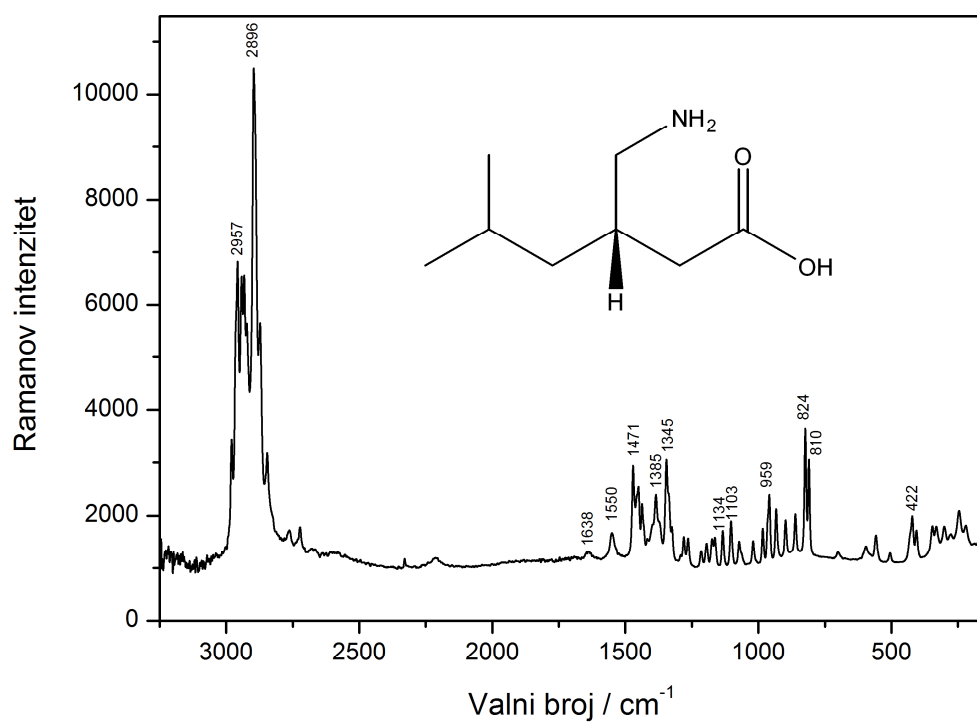
Odabrani spojevi u istraživanoj skupini tiolnih molekula strukturno su vrlo slični. Štoviše cisteinski dio molekule s tiolnom skupinom, preko koje se analiti vežu na metalne supstrate, zajednički je strukturama svih istraživanih molekula, na što upućuju i slični SERS spektri opaženi za sve tri tvari. Strukturna sličnost analita omogućava korelaciju faktora pojačanja primijenjenih SERS supstrata s njihovim molekulskim strukturama. U slučaju oba koloidna supstrata faktor pojačanja najveći je za cistein, a najmanji za glutatone što je u skladu s okruženjem tiolne skupine u strukturi svakog od analita, pri čemu su cisteinu i u manjoj mjeri acetilcisteinu adsorpcija i vezanje preko SH skupine sterički povoljniji nego što je to slučaj kod glutatona.

Zanimljivo je također kako različiti supstrati različito pojačavaju raspršenje sve tri analizirane tvari. Naime, nukleotidom funkcionalizirani koloid srebra pokazao se boljim supstratom za pojačanje raspršenog zračenja cisteina i acetilcisteina dok je intenzivniji SERS spektar glutatona opažen s bimetalnog koloida. Razlika u adsorpciji glutatona na korištene supstrate u odnosu na cistein i acetilcistein vjerojatno leži u spomenutom steričkom efektu, ali i dodatnom negativnom naboju koji glutatone nosi u pH uvjetima istraživanih sustava, a koji zasigurno utječe na mogućnost vezanja i konačnu orijentaciju molekule na površini.

4.4. Pregabalin

4.4.1. Ramanov spektar pregabalina

Ramanov spektar pregabalina u čvrstom stanju prikazan je na Slici 55, a opažene vibracijske vrpce asignirane u Tablici 11.¹¹¹



Slika 55. Ramanov spektar pregabalina; pobuda pri 785 nm.

Tablica 11. Vibracijske vrpce u Ramanovom spektru pregabalina.

Valni broj / cm^{-1}	Vibracija
2979 m	$\nu_{\text{as}} \text{C-H (CH}_3\text{)}$
2957 s	$\nu_{\text{as}} \text{C-H (CH}_2\text{)}$
2942 m	$\nu_{\text{as}} \text{C-H (CH}_2\text{)}$
2932 m	$\nu_{\text{s}} \text{C-H (CH}_3\text{)}$
2896 vs	$\nu_{\text{s}} \text{C-H (CH}_2\text{)}$
2872 m	$\nu_{\text{s}} \text{C-H (CH}_2\text{)}$
1638 vw, br	$\nu_{\text{as}} \text{CO}_2^-$
1550 w, br	δNH_3^+
1471 mw	$\delta \text{CH}_2; \delta \text{CH}_3$
1450 w	$\delta \text{CH}_2; \delta \text{CH}_3$
1385 w	$\nu_{\text{s}} \text{CO}_2^-$
1345 mw	$\nu \text{C-O}$
1281 w	$\delta_{\text{wg}} \text{CH}_2$
1263 w	$\delta_{\text{tw}} \text{CH}_2$
1163 w	$\delta_{\text{rc}} \text{NH}_3^+$
1134 w	δCCH_3
1103 w	$\nu \text{C-N}$
1021 w	$\delta_{\text{rc}} \text{CH}_2, \nu \text{C-N}$
984 w	$\delta_{\text{rc}} \text{CH}_2, \nu \text{C-C}$
959 mw	$\delta_{\text{rc}} \text{CH}_2$
933 w	$\delta_{\text{rc}} \text{CH}_2$
898 w	$\delta_{\text{rc}} \text{CCC}$
861 w	$\nu \text{C-C}$
824 mw	δCH_2
810 mw	$\nu \text{C-C}$
559 w	$\delta_{\text{rc}} \text{CO}_2^-$
422 w	δCCC

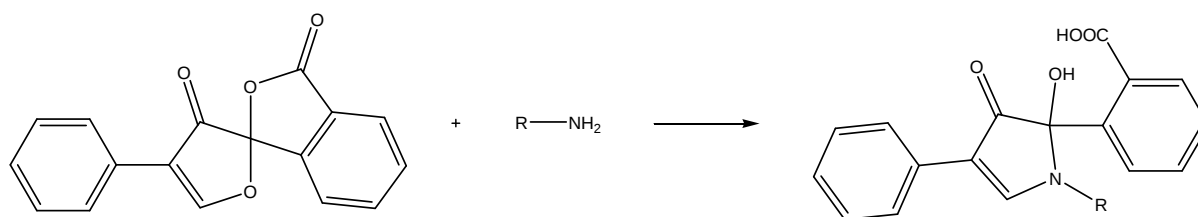
Kristalna struktura pregabalina, dostupna u kristalografskoj bazi podataka *Cambridge* pod nazivom *CIDDEZ*, otkriva kako je pregabalin u čvrstom stanju u obliku *zwitteriona*.¹³⁷ Prikaz molekule pregabalina i vodikovih veza u čvrstom stanju nalazi se u Dodatku (Slika D6).

U Ramanovom spektru pregabalina dominiraju vrlo jake vrpce istezanja C–H veza metilnih i metilenskih skupina u području između 2980 cm^{-1} i 2845 cm^{-1} . Slabe vrpce pri 1638 cm^{-1} i 1385 cm^{-1} pripisane su antisimetričnom odnosno simetričnom istezanju karboksilata. Srednje jaka vrpca pri 1471 cm^{-1} , kao i brojne slabe vrpce u području $1471\text{--}900 \text{ cm}^{-1}$, odgovaraju različitim deformacijskim vibracijskim modovima CH, CH₂ i CH₃ skupina koje prevladavaju u strukturi pregabalina.

Pregabalin je dobro topljiv u vodi.¹⁰⁴ Koncentracija zasićene vodene otopine pregabalina iznosi $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$, međutim nije bila dovoljna je za opažanje Ramanovog spektra.

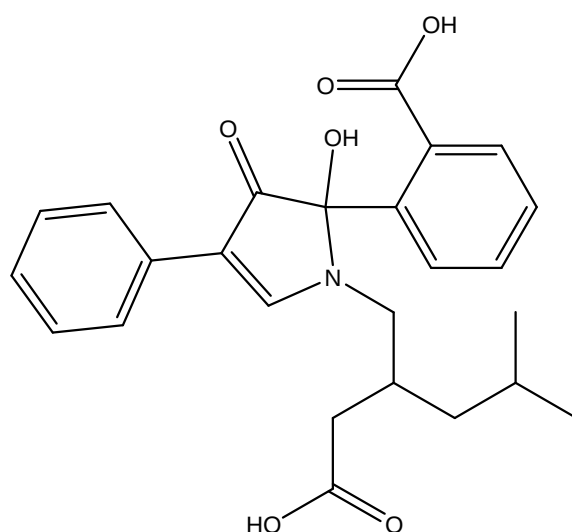
4.4.2. Derivatizacija pregabalina fluorescaminom

Fluorescamin (4'-fenilspiro[2-benzofuran-3,2'-furan]-1,3'-dion) derivatizacijski je reagens koji se u biokemiji koristi za označavanje polipeptida i proteina.^{105,106} Molekulska struktura fluorescamina i očekivana reakcija s molekulom primarnog amina prikazane su na Slici 56. Reakcija amina s fluorescaminom odvija se u vodenom mediju lužnate pH vrijednosti koja osigurava neutralno stanje amino skupine. Reakcija se vrlo lako prati budući je produkt reakcije fluorescentan, dok sam fluorescamin, kao i produkti njegove hidrolize, to nisu.



Slika 56. Molekulska struktura fluorescamina (lijevo) i očekivanog produkta s primarnim aminom (desno).

S obzirom da nije opažen SERS spektar pregabalina, molekula je derivatizirana s fluorescaminom. Reakcija fluorescamina s pregabalinom provedena je u boratnom puferu pri pH = 9,0 te koncentracijama pregabalina $c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i fluorescamina $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Reakcija je gotovo trenutna, naime, promatrarajući pod UV zračenjem ($\lambda = 365 \text{ nm}$) dodatkom otopine fluorescamina u otopinu pregabalina, reakcijska smjesa u trenutku poprima plavu boju. Molekulska struktura reakcijskog produkta prikazana je na Slici 57.

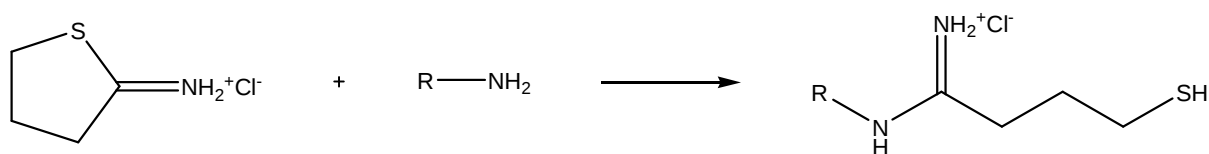


Slika 57. Molekulska struktura reakcijskog produkta pregabalina i fluorescamina.

Reakcijska otopina korištena je direktno za SERS mjerenja, bez prethodne izolacije produkta derivatizacije. Snimljen je Ramanov spektar reakcijske otopine koji odgovara spektru čiste vode. S obzirom na lužnati pH medij, kako otopine produkta tako i koloidne suspenzije srebra (Ag koloid **1**, pH = 9,7), karboksilne skupine derivata najvjerojatnije su deprotonirane. Unatoč mogućem vezanju molekule preko kisika karboksilatnih aniona s površinom metala, SERS spektar derivata pregabalina s fluorescaminom nije opažen. Odbojne elektrostatske interakcije molekule analita i negativno nabijenih citratnih iona koji okružuju nanočestice srebra u suspenziji najvjerojatniji su uzrok slabe adsorpcije derivata na Ag koloid **1** i izostanak pojačanja Ramanovog raspršenja.

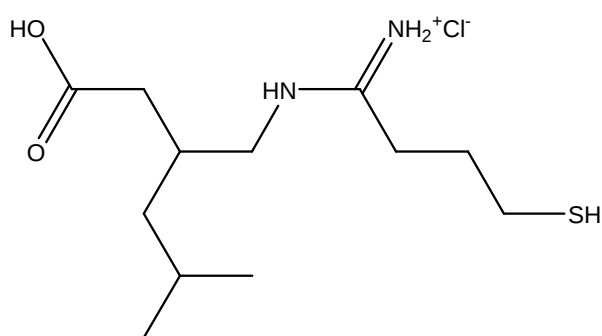
4.4.3. Derivatizacija pregabalina 2-iminotiolanom

2-Iminotiolan ili Trautov reagens derivatizacijski je reagens koji se kao i fluorescamin koristi većinom u biokemiji za označavanje polipeptida i proteina.¹⁰⁷ Također reagira s primarnim aminima pri čemu se otvara prsten u strukturi molekule reagensa (Slika 58). Reakcija primarnog amina s Trautovim reagensom odvija se u lužnatom vodenom mediju u kojem je amino skupina reaktanta neutralna. Reakcija je literaturno opisana kao brza i kvantitativna. Iako 2-iminotiolan podliježe i hidrolitičkom raspadu, reakcija s primarnom amino skupinom preferirana je u odnosu na hidrolizu.¹⁰⁷



Slika 58. Molekulska struktura 2-iminotiolana (lijevo) i očekivanog produkta s primarnim aminom (desno).

Reakcija Trautovog reagensa s pregabalinom provedena je u boratnom puferu pri pH = 8,0 i u čistoj deioniziranoj vodi pri pH = 7,0 te koncentracijama pregabalina $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ i 2-iminotiolana $c = 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$. Budući reakciju s Trautovim reagensom nije lako pratiti kao onu s fluorescaminom, reakcijski produkt s pregabalinom izoliran je kao smola, te je njegova struktura potvrđena NMR i Ramanovom spektroskopijom. Reakcijom u lužnatom mediju nastao je isti produkt kao i reakcijom u vodi (Slika 59).

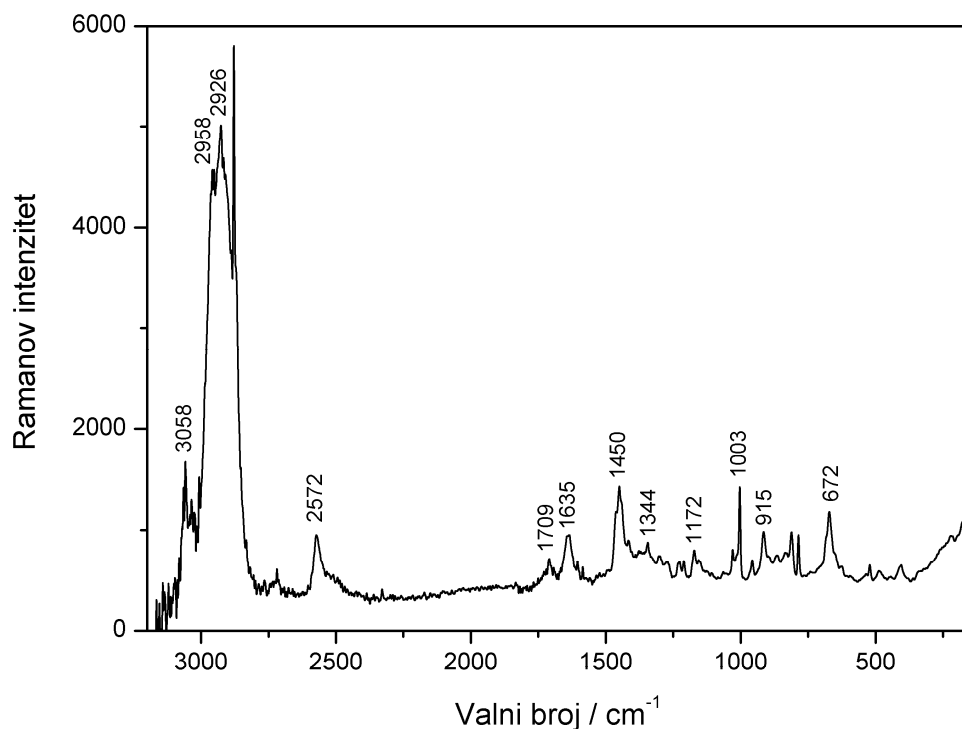


Slika 59. Molekulska struktura reakcijskog produkta pregabalina i 2-iminotiolana.

NMR analiza potvrdila je strukturu produkta reakcije pregabalina s Trautovim reagensom. Naime nestanak ugljikovog signala $\text{C}=\text{NH}_2^+$ prstena, koji je u ^{13}C spektru polaznog Trautovog reagensa prisutan pri 203,8 ppm, te pojava novog ^{13}C signala pri 167,1 ppm pripisanog iminskom ugljiku upućuju na uspješnu reakciju pregabalina i 2-iminotiolana. ^1H i ^{13}C NMR spektri reakcijskog produkta nalaze se u Dodatku (Slike D7 i D8).

4.4.3.1. Ramanov spektar derivata pregabalina s 2-iminotiolanom

Ramanov spektar derivata pregabalina s 2-iminotiolanom prikazan je na Slici 60. Opažene vibracijske vrpce navedene su u Tablici 12.¹¹¹



Slika 60. Ramanov spektar derivata pregabalina s Trautovim reagensom; pobuda pri 785 nm.

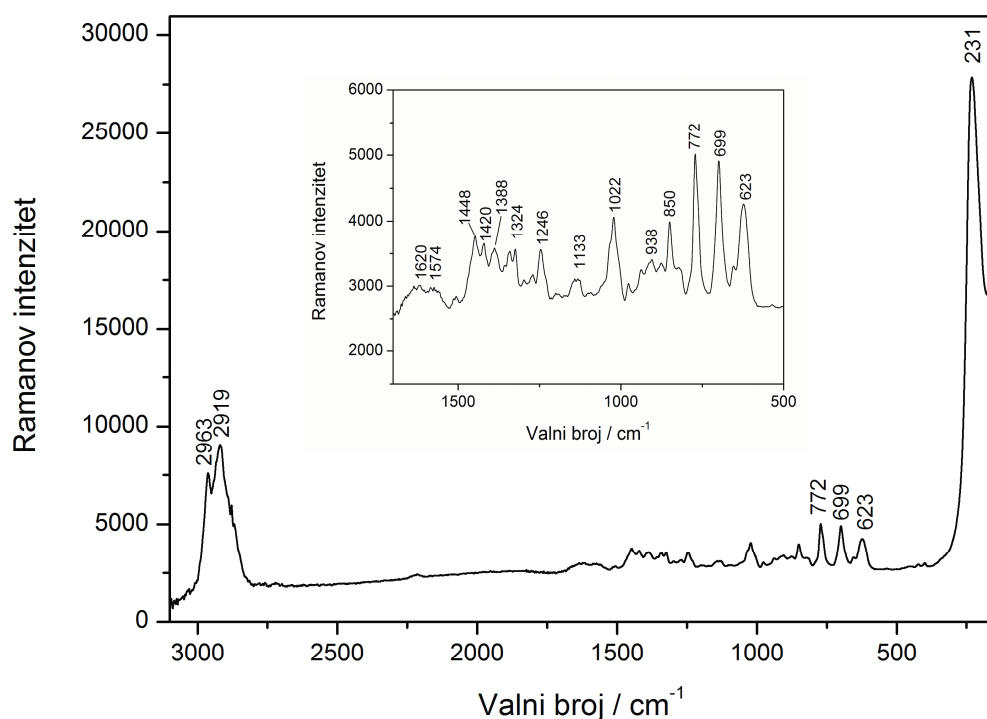
Budući je produkt izoliran u formi smole, za amorfnu tvar vibracijske vrpce očekivano su šire nego što je slučaj kod kristalnih tvari. U Ramanovom spektru pripremljenog derivata pregabalina dominiraju vrlo jake vrpce istezanja C–H veza metilnih i metilenskih skupina u području između 3000 cm^{-1} i 2850 cm^{-1} . Vrpca slabog do srednjeg intenziteta pri 2572 cm^{-1} odgovara istezanju SH skupine, dok je slaba vrpca pri 1709 cm^{-1} pripisana istezanju C=O skupine. Spomenute vrpce istezanja tiolne i karbonilne skupine potvrđuju reakciju pregabalina s 2-iminotiolanom te nastanak željenog derivata. Široka vrpca pri 1635 cm^{-1} pripisana je istezanju C=N veze imina. Srednje jaka vrpca pri 1450 cm^{-1} kao i brojne slabe vrpce u području $1450\text{--}780\text{ cm}^{-1}$ odgovaraju različitim deformacijskim vibracijskim modovima CH, CH₂ i CH₃ skupina koje prevladavaju u strukturi novonastale molekule. Umjerena vrpca pri 672 cm^{-1} posljedica je istezne vibracije C–S veze.

Tablica 12. Vibracijske vrpce u Ramanovom i SERS spektru derivata pregabalina s 2-iminotiolanom.

Valni broj / cm^{-1}		Vibracija
Raman	SERS	
3058 mw		ν C-H
2964 s, br	2963 m, br	ν C-H (CH_3)
2926 vs		ν C-H (CH_2)
2917 s	2919 vs	ν C-H (CH_3)
2910 m	2869 m	ν C-H (CH_2)
2572 m		ν S-H
1709 w		ν C=O
1635 m		ν C=N
	1620 w, br	$\nu_{\text{as}} \text{CO}_2^-$
	1574 w, br	δ NH
1450 w	1448 m	δ CH_2 ; δ CH_3
1416 w	1420 w	δ CH_2 ; δ CH_3
	1388 w	$\nu_{\text{s}} \text{CO}_2^-$
1344 w	1341 w	ν C-O
1304 w	1298 w	$\delta_{\text{tw}} \text{CH}_2$
1227 w	1246 w	$\delta_{\text{wg}} \text{CH}_2$
1211 w	1200 w	$\delta_{\text{tw}} \text{CH}_2$; δ CH
1172 w		$\nu_{\text{as}} \text{C-N-C}$
1157 w		ν C-O
1130 vw	1133 w, br	$\nu_{\text{s}} \text{C-N-C}$
1030 w	1022 w, br	$\delta_{\text{rc}} \text{CH}_2$
1003 m	977 w	ν C-C
957 w		$\delta_{\text{rc}} \text{CH}_2$; δ CSH
	938 w	$\delta_{\text{rc}} \text{CH}_2$
915 m	905 w	$\delta_{\text{rc}} \text{CCC}$
	877 w	ν C-CO ₂
864 w	850 w	ν C-C
812 wm	823 w	ν C-N; δ CH_2
786 wm	772 m	$\delta_{\text{rc}} \text{CH}_2$
	699 m	$\nu_{\text{s}} \text{C-C-C}$
672 m	623 m	ν C-S
521 w	533 vw	$\delta_{\text{ip}} \text{CCO}$
488 w	423 vw	$\delta_{\text{tw}} \text{CN}$
405 w	400 vw	δ CCC
	231 vs	ν Ag-S, ν Ag-Cl

4.4.3.2. SERS spektar derivata pregabalina s 2-iminotiolanom

Površinsko pojačanje Ramanovog raspršenja derivata pregabalina s 2-iminotiolanom opaženo je s koloida srebra pripremljenog redukcijom srebrova nitrata s trinatrijevim citratom, Ag koloid **1** (Slika 61). Prije dodatka otopine analita, koloid srebra agregiran je natrijevim solima, pri čemu se natrijev klorid pokazao učinkovitijim agregacijskim agensom. Vibracijske vrpce u SERS spektru derivata pregabalina na Ag koloidu **1** opisane su u Tablici 12.¹¹¹

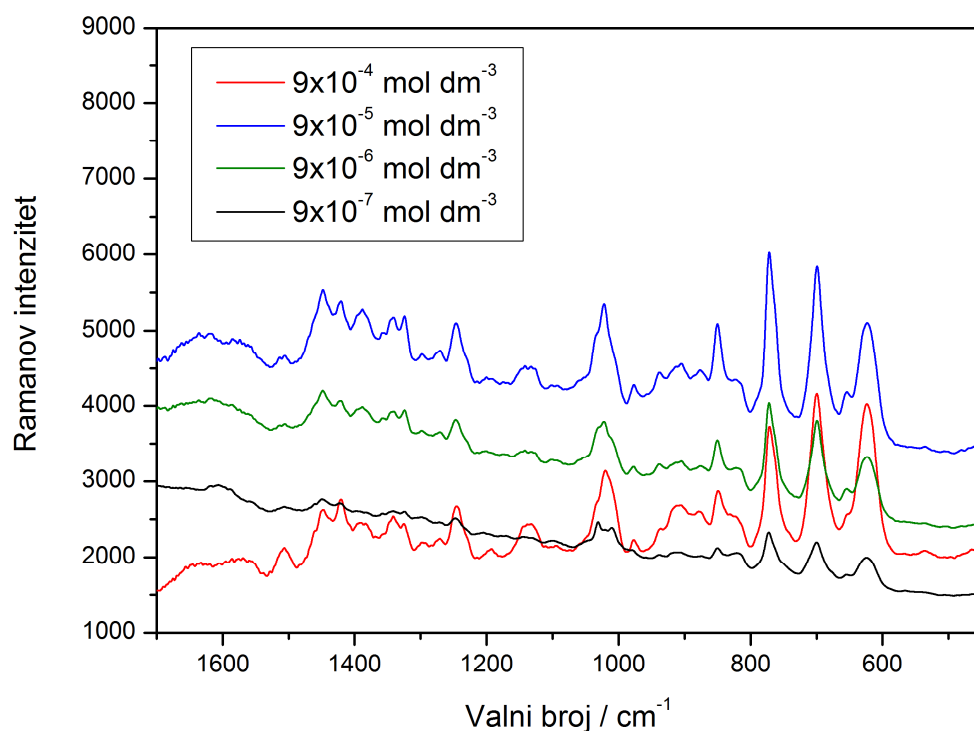


Slika 61. SERS spektar derivata pregabalina s 2-iminotiolanom na Ag koloidu **1**, $c = 9 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³; pobuda pri 785 nm.

U SERS spektru derivata pregabalina vrpca istezanja S–H veze nije prisutna. Vrpca istezanja C–S veze opažena pri 623 cm⁻¹, intenzivnija je i pomaknuta prema nižim valnim brojevima u odnosu na odgovarajuću vrpce u Ramanovom spektru derivata u čvrstom stanju. Izostanak vrpce istezanja tiolne skupine i pojačanje vrpce C–S istezanja upućuju na adsorpciju analita na supstrat srebra preko SH skupine, pri čemu nastaje Ag–S veza. Istezanje novonastale veze opaža se kao nova vrlo jaka vrpca pri 231 cm⁻¹, kojoj u velikoj mjeri doprinosi i istezanje Ag–Cl veze, nastale vezanjem klorida agregacijskog agensa s metalom. Najjače vrpce u SERS spektru odgovaraju vibracijama brojnih metilenskih skupina nastalih otvaranjem

tiolanskog prstena. Intenzivne vrpce u području oko 2900 cm^{-1} pripisane su istezanju CH_2 skupina, a vrpce pri 1448 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} i 772 cm^{-1} deformacijama odgovarajućih skupina.

U SERS spektru derivata pregabalina prisutna je i vrpca pri 2963 cm^{-1} koja odgovara istezanju metilnih skupina pregabalinskog dijela molekule, a što upućuje na blizinu izopropilnog lanca površini supstrata. Molekula derivata deprotonirana je u lužnatim uvjetima koloidne suspenzije ($\text{pH} = 9,7$), na što ukazuju i široke vrpce slabog intenziteta pri 1620 cm^{-1} i 1388 cm^{-1} pripisane antisimetričnom odnosno simetričnom istezanju karboksilatnog aniona. Iako prisutne u spektru, obje vrpce vibracija karboksilatnog aniona prilično su slabe iz čega proizlazi da karboksilat iako u blizini supstrata nije adsorbiran direktno na metalnu površinu. Derivat pregabalina s Trautovim reagensom na Ag koloidu **1** najintenzivnije raspršuje zračenje pri koncentraciji $9 \times 10^{-5}\text{ mol dm}^{-3}$, dok najniža izmjerena koncentracija derivatiziranog analita iznosi $9 \times 10^{-7}\text{ mol dm}^{-3}$ (Slika 62).



Slika 62. SERS spektri derivata pregabalina s 2-iminotiolanom na Ag koloidu **1** pri različitim koncentracijama; pobuda pri 785 nm.

§ 5. ZAKLJUČAK

Pripravljani su i karakterizirani koloidni SERS supstrati srebra, zlata i bakra. Uz komercijalno dostupne SERS supstrate: zlatnu pločicu *Klarite* te monokristal srebra valjkastog oblika, pripremljene koloidne suspenzije metala primijenjene su pri istraživanju farmaceutski aktivnih tvari entakapona i sulfatiazola.

S obzirom na metalni supstrat, valnu duljinu pobudnog zračenja i agens za agregaciju metalnih nanočestica, mjerni sustavi uspješno su optimirani za postizanje pojačanja raspršenog zračenja i opažanje SERS spektara analita pri niskim koncentracijama, entakapona do 9×10^{-7} mol dm⁻³ i sulfatiazola do 9×10^{-8} mol dm⁻³. Detaljnom analizom SERS spektara predloženi su mehanizmi adsorpcije analita na površinu metala, ovisni o molekulskoj strukturi analita, okruženju i prirodi površine metalnog supstrata.

Koristeći zlatnu pločicu *Klarite* kao SERS aktivni supstrat, razvijena je metoda za kvantitativno određivanje izomera entakapona u dvokomponentnom sustavu izomera *E* i *Z*. PLS modelom na temelju SERS spektara uspješno su procijenjeni udjeli pojedinih izomera u smjesi u koncentracijskom području 1×10^{-5} – 1×10^{-3} mol dm⁻³.

Pripravljani su i karakterizirani bimetalni koloid od srebra i zlata te nukleotidom funkcionalizirani koloid srebra, kao SERS supstrati namijenjeni istraživanju farmaceutski aktivnih tvari s tiolnom skupinom. Istraživani analiti, acetilcistein, cistein i glutation, uspješno su vezani na prilagođene supstrate te su opaženi njihovi SERS spektri. SERS spektri tiolnih molekula ukazali su na vrlo sličan mehanizam adsorpcije strukturno srodnih molekula na površinu metala. Izračunati su faktori pojačanja raspršenja tiolnih analita na odgovarajućim SERS supstratima (10^3 – 10^5) i korelirani sa složenosti molekulske strukture.

Farmaceutski aktivna tvar pregabalin derivatizirana je reakcijama s fluorescaminom i 2-iminotiolanom. Derivat s fluorescaminom ne adsorbira se na koloid srebra pa raspršenje zračenja izostaje, dok derivat pregabalina s 2-iminotiolanom intenzivno raspršuje zračenje s površine srebrnog supstrata. Na temelju površinski pojačanog Ramanovog raspršenja sintetiziranog derivata razvijena je metoda za posrednu detekciju pregabalina pri niskim koncentracijama, do 9×10^{-7} mol dm⁻³.

Uspješno razvijeni sustavi za SERS mjerenja niskih koncentracija različitih farmaceutski aktivnih tvari u svrhu njihove detekcije, identifikacije i kvantifikacije, ukazuju na mogućnost široke primjene SERS spektroskopije u različitim aspektima istraživanja i razvoja lijekova.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

UV – ultraljubičasto zračenje

VIS – vidljivo zračenje

IR – infracrveno zračenje

NIR – blisko infracrveno zračenje

v – istezna vibracija

δ – deformacijska vibracija

γ – torzija

s – simetrična vibracija

as – antisimetrična vibracija

ip – u ravnini

oop – izvan ravnine

sc – striženje

tw – uvijanje

wg – klaćenje

vw – vrlo slab intenzitet

w – slab intenzitet

m – srednji intenzitet

s – jak intenzitet

vs – vrlo jak intenzitet

br – široka vrpca

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. G. McNay, D. Eustace, W. E. Smith, K. Faulds i D. Graham, *Appl. Spectrosc.* **65** (2011) 825–837.
2. S. Schlüker, *Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications*, Wiley-VCH, Weinheim 2011.
3. P. L. Stiles, J. A. Dieringer, N. C. Shah i R. P. Van Duyne, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1** (2008) 601–626.
4. G. C. Shatz i R. P. Van Duyne, *Electromagnetic Mechanism of Surface-enhanced Spectroscopy*, u J. M. Chalmers i P. R. Griffiths (ur.), *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, 1. izd., John Wiley & Sons, Chichester, 2002, 759–774.
5. S. Šašić, *Pharmaceutical Applications of Raman spectroscopy*, 1. izd., Wiley Interscience, New Jersey, 2007.
6. M. Baia, S. Astilean i T. Iliescu, *Raman and SERS Investigations of Pharmaceuticals*, 1. izd., Springer-Verlag, Berlin, 2008.
7. J. R. Ferraro, K. Nakamoto i C. W. Brown, *Introductory Raman Spectroscopy*, 2. izd., Elsevier, San Diego, 2003.
8. H. Günzler i H.-U. Gremlich, *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*, prijevod 4. izd., Školska knjiga, Zagreb, 2006.
9. A. M. Schwartzberg i J. Z. Zhang, *Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)* u *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 2. izd., Taylor and Francis Online, 2009.
10. M. Fleischmann, P. J. Hendra i A. J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.* **26** (1974) 163–166.
11. A. J. McQuillan, *Notes Rec. R. Soc.* **63** (2009) 105–109.
12. D. L. Jeanmaire i R. P. Van Duyne, *J. Electroanal. Chem.* **84** (1977) 1–20.
13. M. G. Albrecht i J. A. Creighton, *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 5215–5217.
14. S. Link i M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 8410–8426.
15. A. D. McFarland, M. A. Young, J. A. Dieringer i R. P. Van Duyne, *J. Phys. Chem. B* **109** (2005) 11279–11285.
16. L. A. Dick, A. J. Haes i R. P. Van Duyne, *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) 11752–11762.
17. B. J. Kennedy, S. Spaeth, M. Dickey i K. T. Carron, *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 3640–3646.
18. E. C. Le Ru i P. G. Etchegoin, *J. Chem. Phys.* **130** (2009) 181101/1–4.

-
19. M. J. Banholzer, J. E. Millstone, L. Qin i C. A. Mirkin, *Chem. Soc. Rev.* **37** (2008) 885–897.
 20. M. Fan, G. A. S. Andrade i A. G. Brolo, *Anal. Chim. Acta* **693** (2011) 7–25.
 21. R. F. Aroca, R. A. Alvarez-Puebla, N. Pieczonka, S. Sanchez-Cortez i J. V. Garcia-Ramos, *Adv. Colloid Interface Sci.* **116** (2005) 45–61.
 22. P. C. Lee i D. Meisel, *J. Phys. Chem.* **86** (1982) 3391–3395.
 23. K. Faulds, R. E. Littleford, D. Graham, G. Dent i W. E. Smith, *Anal. Chem.* **76** (2004) 592–598.
 24. Z.-Q. Tian, B. Ren, J.-F. Li i Z.-L. Yang, *Chem. Comm.* (2007) 3514–3534.
 25. B. Sharma, R. R. Frontiera, A.-I. Henry, E. Ringe i R. P. Van Duyne, *Materials Today* **15** (2012) 16–25.
 26. R. Picorel, G. Chumanov, T. M. Cotton, G. Montoya, S. Toon i M. Seibert, *J. Phys. Chem.* **98** (1994) 6017–6022.
 27. A. El-Ansary i L. M. Faddah, *Nanotechnol. Sci. Appl.* **3** (2010) 65–76.
 28. D. S. Grubisha, R. J. Lipert, H.-Y. Park, J. Driskell i M. D. Porter, *Anal. Chem.* **75** (2003) 5936–5943.
 29. H. T. Beier, C. B. Cowan, I.-H. Chou, J. Pallikal, J. E. Henry, M. E. Benford, J. B. Jackson, T. A. Good i G. L. Coté, *Plasmonics* **2** (2007) 55–64.
 30. J.-H. An, W. A. El-Said, C.-H. Yea, T.-H. Kim i J.-W. Choi, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **11** (2011) 4424–4429.
 31. J. A. Dieringer, A. D. McFarland, N. C. Shah, D. A. Stuart, A. V. Whitney, C. R. Yonzon, M. A. Young, X. Zhang i R. P. Van Duyne, *Faraday Discuss.* **132** (2006) 9–26.
 32. J. Kneipp, H. Kneipp i K. Kneipp, *Chem. Soc. Rev.* **37** (2008) 1052–1060.
 33. J. S. Taurozzi i V. V. Tarabara, *Environ. Eng. Sci.* **24** (2007) 122–137.
 34. R. A. Álvarez-Puebla i L. M. Liz-Marzán, *Energy Environ. Sci.* **3** (2010) 1011–1017.
 35. J. M. Sylvia, J. A. Janni, J. D. Klein i K. M. Spencer, *Anal. Chem.* **72** (2000) 5834–5840.
 36. D. A. Stuart, R. B. Biggs i R. P. Van Duyne, *Analyst* **131** (2006) 568–572.
 37. S. Cîntă Pînzaru, I. Pavel, N. Leopold i W. Kiefer. *J. Raman Spectrosc.* **35** (2004) 338–346.
 38. T. Vankeirsbilck, A. Vercauteren, W. Baeyens, G. Van der Weken, F. Verpoort, G. Vergote i J. P. Remon. *Trends Anal. Chem.* **21** (2002) 869–877.

-
39. T. Iliescu, S. Pinzaru i W. Kiefer, *Talanta* **53** (2000) 121–124.
40. N. Leopold, S. Cinta-Pinzaru, M. Baia, E. Antonescu, O. Cozar, W. Kiefer i J. Pop, *Vib. Spectrosc.* **39** (2005) 169–176.
41. S. Farquharson, A. Gift, C. Shende, F. Inscore, B. Ordway, C. Farquharson i J. Murren, *Molecules* **13** (2008) 2608–2627.
42. T. Iliescu, M. Baia i W. Kiefer, *Chem. Phys.* **298** (2004) 167–174.
43. A. Gift, C. Shende, F. E. Inscore, P. Maksymiuk i S. Farquaharson, *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* **5261** (2004) 135–141.
44. J. G. Tagguenang, A. Kassu, A. Sharma i D. Diggs, *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* **6641** (2007) 66411X/1–66411X/6.
45. I. Izquierdo-Lorenzo, J. V. García-Ramos i S. Sanchez-Cortes, *J. Raman Spectrosc.* (2013), dio posebnog izdanja u sklopu konferencije ECONOS 2012.
46. G. G. Huang, M. K. Hossain, X. X. Han i Y. Ozaki, *Analyst* **134** (2009) 2468–2474.
47. H. M. Routtinen i U. K. Rinne, *J. Neurol.* **245** (1998) 25–34.
48. D. Škalec Šamec, E. Meštrović i A. Sander, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **26** (2012) 163–173.
49. J. Leppänen, E. Wegelius, T. Nevelainen, T. Järvinen, J. Gynther i J. Huuskonen, *J. Mol. Struct.* **56** (2001) 129–135.
50. M. S. M. Jaweed, R. A. R. Khan, R. P. Yadav i Z. G. Shaikh, Patentna prijava WO 2005/066117 A1.
51. D. Škalec-Šamec, M. Marinković, Z. Šiljković i M. Horvat, Patentna prijava WO 2007/135406 A1.
52. M. Marković, T. Biljan i D. Škalec Šamec, *Entacapone Isomer Quantification using Raman Spectroscopy*, Poster, XXIX EUCMOS 2008, Opatija, Hrvatska, 31.08.-05.09.2008., Knjiga sažetaka str. 244.
53. M. Yadav, P. Dixit, V. Trivedi, A. Gandhi, A. Senger, S. Guttikar, P. Singhal i P. S. Shrivastav, *J. Chromat. B* **877** (2009) 533–540.
54. N. Soukhova, Z. Kassymbek, S. Bradby, A. Martin-Esker, P. White i S. Wahab. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **54** (2011) 860–865.
55. M. Ratkaj, T. Biljan i S. Miljanić, *Appl. Spectrosc.* **66** (2012) 1468–1474.
56. P. Novak, A. Kišić, T. Hrenar, T. Jednačak, S. Miljanić i G. Verbanec, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **54** (2011) 660–666.
57. A. Kwokal, T. T. H. Nguyen i K. J. Roberts, *Cryst. Growth Des.* **9** (2009) 4324–4334.

-
58. A. Kwokal, D. Šišak i K. J. Roberts. *From oriented adsorption to the polymorph selectivity: Crystallization of Entacapone using Au(111) template*, Poster, Annual Conference of the British Association for Crystal Growth 2010. Manchester, UK; 05.09.-07.09.2010.
59. M. Marković i T. Biljan, *Quantitative Analysis of Entacapone Polymorphs by FT-Raman Spectroscopy*, Poster, XXI ICORS, London, Velika Britanija, 17.-22.08.2008., Knjiga sažetaka str. 1020–1021.
60. J. L. McCollough i T. H. Maren, *Antimicrob. Agents Chemother.* **3** (1973) 665–669.
61. T. Gelbrich, D. S. Hughes, M. B. Hursthouse i T. L. Threlfall, *Cryst. Eng. Comm.* **10** (2008) 1328–1334.
62. S. Bellu i M. Rizzotto, *Quim. Nova* **30** (2007) 1136–1142.
63. M. R. Abu Bakar, Z. K. Nagy, C. D. Rielly i S. E. Dann, *Int. J. Pharm.* **414** (2011) 86–103.
64. A. L. Bingham, D. S. Hughes, M. B. Hursthouse, R. W. Lancaster, S. Tavener i T. L. Threlfall, *Chem. Commun.* **7** (2001) 603–604.
65. H. R. H. Ali, H. G. M. Edwards i I. J. Scowen, *J. Raman Spectrosc.* **40** (2009) 887–892.
66. Y. Hu, A. Erxleben, A. G. Ryder i P. McArdle, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53** (2010) 412–420.
67. M. López-Sánchez, M. J. Ruedas-Rama, A. Ruiz-Medina, A. Molina-Díaz i M. J. Ayora-Cañada, *Talanta* **74** (2008) 1603–1607.
68. M. C. Daniel i D. Astruc, *Chem. Rev.* **104** (2004) 293–346.
69. J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo i G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **105** (2005) 1103–1169.
70. R. G. Nuzzo i D. J. Allara, *J. Am. Chem. Soc.* **105** (1983) 4481–4483.
71. M. Hasan, D. Bethell i M. Brust, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 1132–1133.
72. C. Vericat, G. A. Benitez, D. E. Grumelli, M. E. Vela i R. C. Salvarezza, *J. Phys.:Condens. Matter* **20** (2008) 184004/1–8.
73. P. J. G. Goulet i R. B. Lennox, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 9582–9584.
74. J. Gao, X. Huang, H. Liu, F. Zan i J. Ren, *Langmuir* **28** (2012) 4464–4471.
75. P. Singh, N. T. B. Thuy, Y. Aoki, D. Mott i S. Maenosono, *J. Appl. Phys.* **109** (2011) 094301/1–094301/7.
76. M. Zhang i B. Ye, *Anal. Chem.* **83** (2011) 1504–1509.

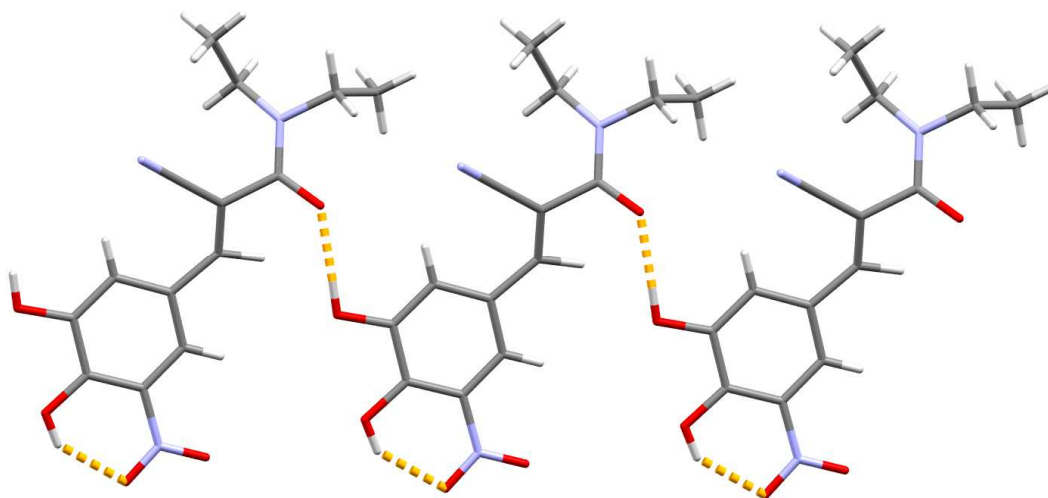
-
77. L. Rivas, S. Sanchez-Cortes, J. V. García-Ramos i G. Morrcillo, *Langmuir* **16** (2000) 9722–9728.
78. M. Mandal, N. R. Jana, S. Kundu, S. K. Ghosh, M. Panigrahi i T. Pal, *J. Nanopart. Res.* **6** (2004) 53–61.
79. P. J. Poole i P. N. Black, *Br. Med. J.* **322** (2001) 1–6.
80. B. M. Lautenburg, G. B. Corcoran i J. R. Mitchell, *J. Clin. Invest.* **71** (1983) 980–991.
81. N. Ballatori, M. W. Lieberman i W. Wang, *Environ. Health Persp.* **106** (1998) 267–271.
82. J. Zheng, J. R. Lou, X.-X. Zhang, D. M. Benbrook, M. H. Hanigan, S. E. Lind i W.-Q. Ding, *Cancer Lett.* **298** (2010) 186–194.
83. W. W. H. Kou i R. Parthasarathy, *Acta Cryst. B* **37** (1981) 1591–1596.
84. V. S. Minkov, E. V. Boldyreva, T. N. Drebuschak i C. H. Görbitz, *Cryst. Eng. Comm.* **14** (2012) 5943–5954.
85. J. M. Berg, J. L. Tymoczko i L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2002.
86. L. Sheffner Aaron, Patent US 3,091,569.
87. E. Podstawka, Y. Ozaki i L. M. Proniewicz, *Appl. Spectrosc.* **58** (2004) 570–580.
88. C. H. Görbitz i B. Dalhaus, *Acta Cryst. C* **52** (1996) 1756–1759.
89. K. A. Kerr, J. P. Ashmore i T. F. Koetzle, *Acta Cryst. B* **31** (1975) 2022–2026.
90. S. A. Moggach, D. R. Allan, S. J. Clarck, M. J. Gutmann, S. Parsons, C. R. Pulham i L. Sawyer, *Acta Cryst. B* **62** (2006) 296–309.
91. A. Pawlukojć, J. Leciejewicz, A. J. Ramirez-Cuesta i J. Nowicka-Scheibe, *Spectrochim. Acta A* **61** (2005) 2474–2481.
92. B. A. Kolesov, V. S. Minkov, E. V. Boldyreva i T. N. Drebuschak, *J. Phys. Chem. B* **112** (2008) 12827–12839.
93. G. Diaz Fleming, J. J. Finnerty, M. Campos-Vallete, F. Célis, A. E. Aliaga, C. Fredes i R. Koch, *J. Raman Spectrosc.* **40** (2009) 632–638.
94. C. Kerksick i D. Willoughby, *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2** (2005) 38–44.
95. A. L. Ortega, S. Mena i J. M. Estrela, *Cancers* **3** (2011) 1285–1310.
96. H. L. Martin i P. Teismann, *FASEB J.* **23** (2009) 3263–3272.
97. D. A. Butterfield, C. B. Pocernich i J. Drake, *Drug Develop. Res.* **56** (2002) 428–437.
98. C. H. Görbitz, *Acta Chem. Scand. B* **41** (1987) 362–366.

-
99. S. A. Moggach, A. R. Lennie, C. A. Morrison, P. Richardson, F. A. Stefanowicz i J. E. Warren, *Cryst. Eng. Comm.* **12** (2010) 2587–2595.
100. G. G. Huang, X. X. Han, M. K. Hossain, Y. Kitahama i Y. Ozaki, *Appl. Spectrosc.* **64** (2010) 1100–1108.
101. M. Larsson i J. Lindgren, *J. Raman Spectrosc.* **36** (2005) 394–399.
102. K. Rickels, M. H. Pollack, D. E. Feltner, R. B. Lydiard, D. L. Zimbroff, R. J. Bielski, K. Tobias, J. D. Brock, G. L. Zornberg i A. C. Pande, *Arch. Gen. Psychiatry* **62** (2005) 1022–1030.
103. D. M. Tassone, E. Boyce, J. Guyer i D. Nuzum, *Clin. Ther.* **29** (2007) 26–48.
104. European medicines agency EMEA, *European Public Assessment report; Scientific discussion for Lyrica –Pregabalin*, 2004.
105. S. Udenfriend, S. Stein, P. Böhlen, W. Dairman, W. Leimgruber i M. Weigele, *Science* **178** (1972) 871–872.
106. S. De Bernardo, M. Weigele, V. Toome, K. Manhart, W. Leimgruber, P. Böhlen, S. Stein i S. Udenfriend, *Biochem. Biophys.* **163** (1974) 390–399.
107. A. C. Alagon i T. P. King, *Biochem.* **19** (1980) 4341–4345.
108. A. Manikowski, Z. Larska i J. Jerkovic, Patentna prijava WO 2008/007093A1.
109. M. S. Hoekstra, D. M. Sobieray, M. A. Schwindt, T. A. Mulhern, T. M. Grote, B. K. Huckabee, V. S. Hendrickson, L. C. Franklin, E. J. Granger i G. L. Karrick, *Org. Proc. Res. Develop.* **1** (1997) 26–38.
110. R. Aroca, *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2006.
111. G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, John Wiley & Sons, New York, 2004.
112. F.R. Dollish, W.G. Fateley i F.F. Bentley, *Characteristic Raman Frequencies of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, New York, 1974.
113. L. Yu, S. M. Reutzel i G. A. Stephenson, *Pharm. Sci. Technol. Today* **1** (1998) 118–127.
114. K. Faulds, W. E. Smith, D. Graham i R. J. Lacey, *Analyst* **127** (2002) 282–286.
115. E. A. Carrasco Flores, M. M. Campos Vallette, R. E. C. Clavijo, P. Leyton, G. Díaz i R. Koch, *Vib. Spectrosc.* **37** (2005) 153–160.
116. V. Chiş, M. M. Venter, N. Leopold i O. Cozar, *Vib. Spectrosc.* **48** (2008) 210–214.
117. S. Sánchez-Cortés i J. V. García-Ramos, *Langmuir* **16** (2000) 764–770.

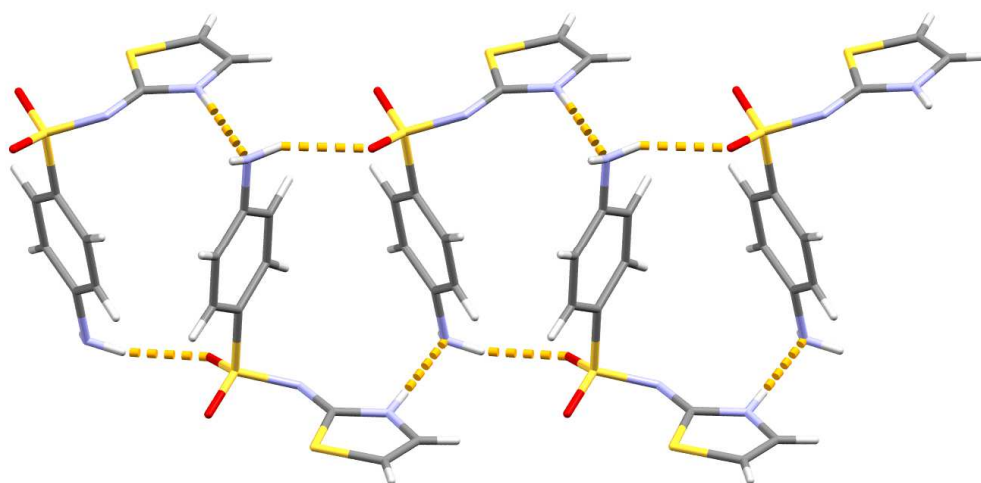
118. M. Dendisová-Vyškovská, V. Prokopec, M. Člupek i P. Matějka, *J. Raman Spectrosc.* **43** (2012) 181–186.
119. K.-H. Cho i S.-W. Joo, *Bull. Korean Chem. Soc.* **29** (2008) 69–75.
120. R. Aroca i D. Battisti, *Langmuir* **6** (1990) 250–254.
121. I. T. Shadi, B. Z. Chowdhry, M. J. Snowden i R. Withnall, *Spectrochim. Acta A*. **59** (2003) 2201–2206.
122. S. E. J. Bell i N. M. S. Sirimuthu, *Analyst* **129** (2004) 1032–1036.
123. L. Zhang, Q. Li, W. Tao, B. Yu i Y. Du, *Anal. Bioanal. Chem.* **398** (2010) 1827–1832.
124. J. H. Giles, D. A. Gilmore i M. Bonner Denton, *J. Raman Spectrosc.* **30** (1999) 767–771.
125. S. C. Park, M. Kim, J. Noh, H. Chung, Y. Woo, J. Lee i M. S. Kemper, *Anal. Chim. Acta* **593** (2007) 46–53.
126. M. Muniz-Miranda, M. Pagliai, F. Muniz-Miranda i V. Schettino, *Chem. Commun.* **47** (2011) 3138–3140.
127. S. Bellu, E. Hure, M. Trape, C. Trossero, G. Molina, C. Drogo, P. A. M. Williams, A. M. Atria, J. C. Muñoz Acevedo, S. Zacchino, M. Sortino, D. Campagnoli i M. Rizzotto, *Polyhedron* **24** (2005) 501–509.
128. E. K. Yetimoğlu, M. V. Kahraman, G. Bayramoğlu, O. Ercan i N. K. Apohan, *Radiat. Phys. Chem.* **78** (2009) 92–97.
129. J. Casanova, G. Alzuet, S. Ferrer, J. Latorre, J. A. Ramírez i J. Borrás, *Inorg. Chim. Acta* **304** (2000) 170–177.
130. J. Casanova, G. Alzuet, S. Ferrer, J. Borrás, S. García-Granda i E. Perez-Carreño, *J. Inorg. Biochem.* **51** (1993) 689–699.
131. J. Casanova, G. Alzuet, J. Latorre i J. Borrás, *Inorg. Chem.* **36** (1997) 2052–2058.
132. J. Casanova, G. Alzuet, J. Borrás, J. Timoneda, S. García-Granda i I. Cándano-González, *J. Inorg. Biochem.* **56** (1994) 65–76.
133. J. Casanova, G. Alzuet, J. Borrás, J. M. Amigó i T. Debaerdemaeker, *Z. Kristallogr.* **209** (1994) 271–273.
134. M. Picquart, Z. Abedinzadeh, L. Grajcar i M. H. Baron, *Chem. Phys.* **228** (1998) 279–291.
135. B. H. Loo, *Chem. Phys. Lett.* **89** (1982) 346–350.
136. W. Qian i S. Krimm, *Biopolymers* **34** (1994) 1377–1394.

-
137. N. Venu, P. Vishweshwar, T. Ram, D. Surya i B. Apurba, *Acta Cryst. C* **63** (2007) 306–308.

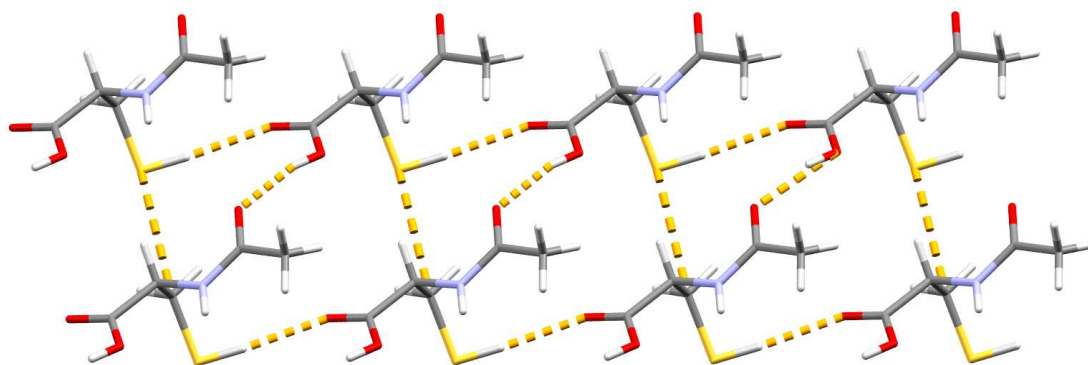
§ 8. DODATAK



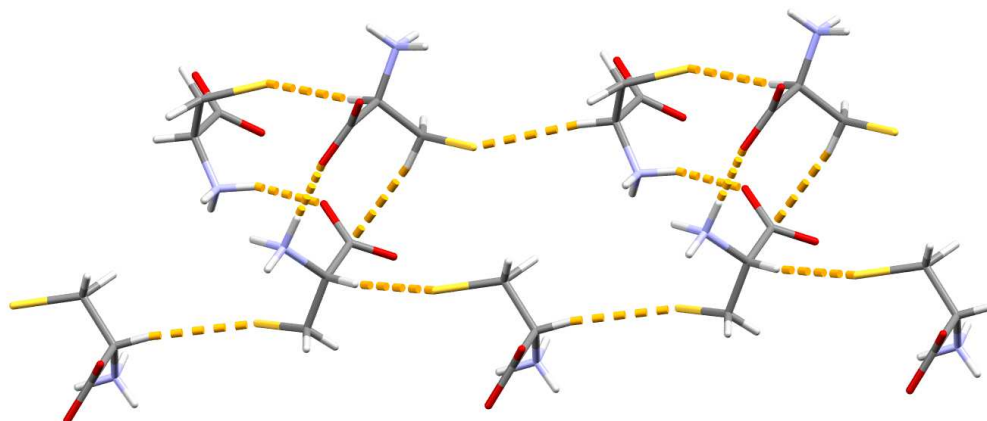
Slika D1. Vodikove veze u kristalnoj strukturi entakapona *E* (polimorf A, oznaka kristalografske baze podataka *Cambridge*: OFAZUQ).



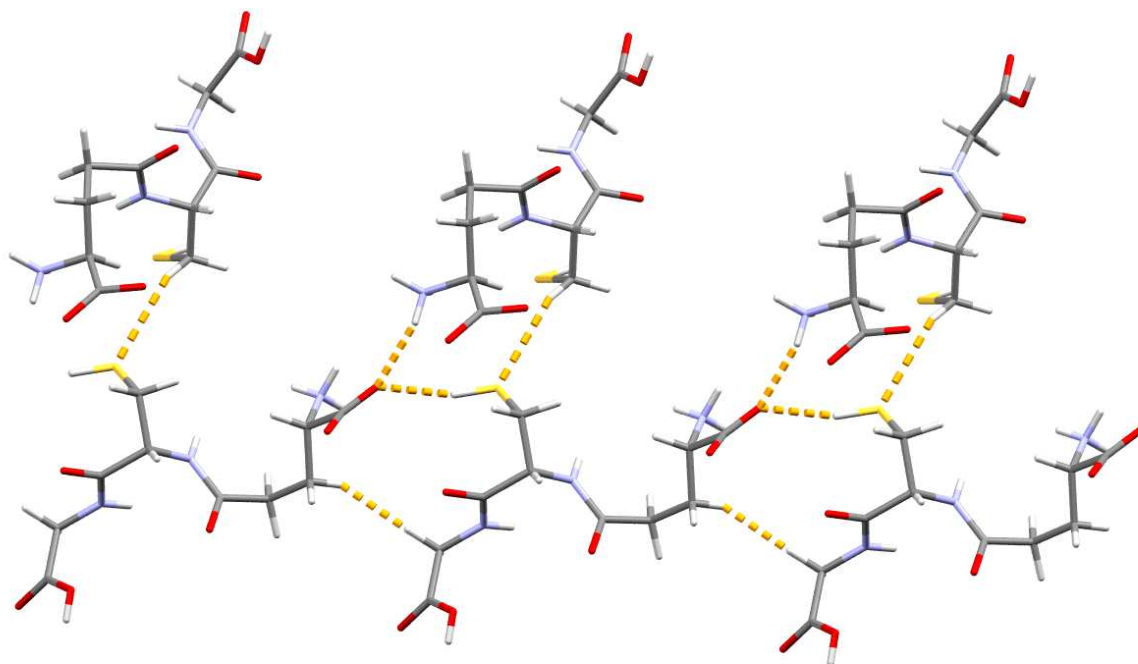
Slika D2. Vodikove veze u kristalnoj strukturi sulfatiazola (polimorf III, oznaka kristalografske baze podataka *Cambridge*: SUTHAZ17).



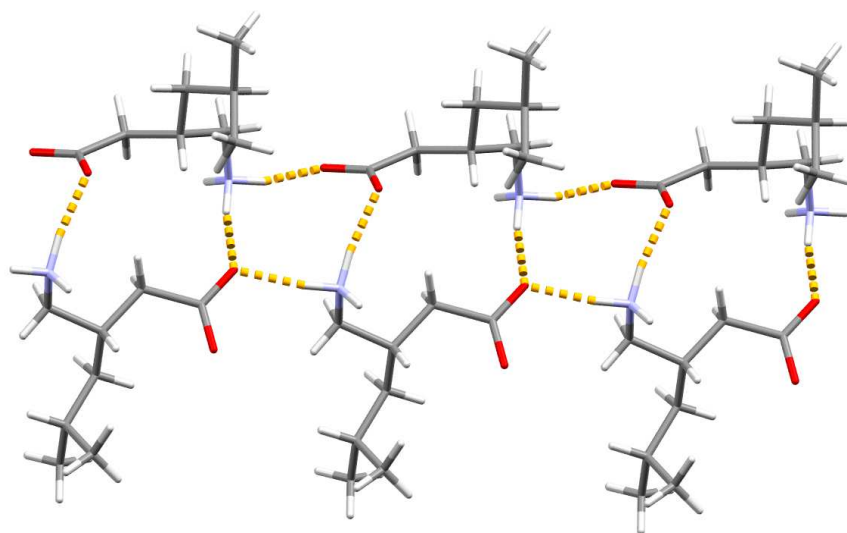
Slika D3. Vodikove veze u kristalnoj strukturi acetilcisteina (oznaka kristalografske baze podataka *Cambridge*: *NALCYS11*).



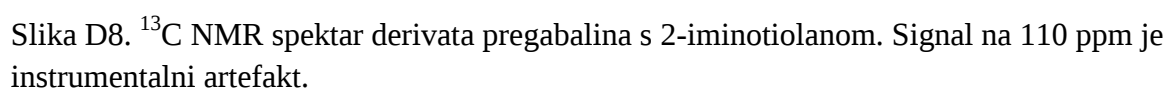
Slika D4. Vodikove veze u kristalnoj strukturi cisteina (polimorf I, oznaka kristalografske baze podataka *Cambridge*: *LCYSTN21*).



Slika D5. Vodikove veze u kristalnoj strukturi glutationa (polimorf I, oznaka kristalografske baze podataka *Cambridge*: *GLUTAS02*).



Slika D6. Vodikove veze u kristalnoj strukturi pregabalina (oznaka kristalografske baze podataka *Cambridge*: *CIDDEZ*).



§ 9. ŽIVOTOPIS

Marina Ratkaj rođena je 25.02.1984. godine u Zagrebu.

Obrazovanje:

2002.–2006. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, dipl. ing. kemije

1998.–2002. XV Gimnazija, Zagreb

Radno iskustvo:

2008.– danas, PLIVA Hrvatska d.o.o., Istraživanje i Razvoj, Voditelj tima

2007.–2008. PLIVA Hrvatska d.o.o., Istraživanje i Razvoj, Istraživač-analitičar

Nagrade i postignuća:

2011. Nagrada PLIVE

2006. Medalja Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta

2006. Nagrada dekana Prirodoslovno-matematičkog fakulteta za uspjeh u studiju

2005.–2006. Stipendija grada Zagreba

2002.–2005. Stipendija Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske

Sudjelovanja:

2012. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka PMF-a

2010., 2011., 2012. Otvoreni dan PLIVE

2004., 2005. Smotra Sveučilišta u Zagrebu

Znanstveni radovi u časopisima:

1. V. Vrdoljak, D. Milić, M. Cindrić, D. Matković-Čalogović, J. Pisk, M. Marković, P. Novak, Synthesis, Structure and Characterization of Dinuclear Pentacoordinate Molybdenum(V) Complexes with Thiosemicarbazone Ligands, *Z. Anor. Allg. Chem.* **635** (2009) 1242–1248.

2. M. Ratkaj, T. Biljan, S. Miljanić, Quantitative Analysis of Entacapone Isomers using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Partial Least Squares Regression, *Appl. Spectrosc.* **66** (2012) 1468–1474.

Priopćenja na znanstvenim skupovima:

1. M. Marković, T. Biljan, *Quantitative Analysis of Entacapone Polymorphs by FT-Raman Spectroscopy*, Poster, ICORS 2008, London, Velika Britanija, 17.–22.08.2008.
2. M. Marković, T. Biljan, D. Škalec Šamec, *Entacapone Isomer Quantification using Raman Spectroscopy*, Poster, EUCMOS 2008, Opatija, Hrvatska, 31.08.–05.09.2008.
3. Ž. Jelčić, M. Marković, K. Picker-Freyer, *Fractal Surface and Spectroscopic Characteristics of Lactose Blends*, Poster, APS Inhalation 2009, Nottingham, Velika Britanija, 23.–25.03.2009.
4. M. Marković, T. Biljan, *SERS Quantification of Entacapone Isomers*, Poster, ICORS 2010, Boston, SAD, 08.–13.08.2010.
5. M. Ratkaj, S. Miljanić, *Surface-Enhanced Raman Scattering of Entacapone on Silver, Gold and Copper Surfaces*, Poster, 23. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Osijek, Hrvatska, 21. –24.04.2013.

Patenti:

1. M. Marinković, M. Ratkaj, O. Franković, T. Mundorfer, *Polymorphs of saxagliptin hydrochloride and processes for preparing them*, patent US 8,410,288 B2, 02.04.2013.
2. M. Ratkaj, T. Biljan, M. Marinković, *Saxagliptin intermediates, Saxagliptin polymorphs, and processes for preparation thereof*, patent US 8,501,960 B2, 06.08.2013.
3. M. Ratkaj, G. Frenkel, *Crystal forms of O-desmethylvenlafaxine fumarate*, patent US 8,569,371 B2 29.10.2013.