

Vilniaus universiteto
Fizikos fakulteto
Cheminės fizikos institutas

Domantas Dunajevs

SAVITVARKIŲ MONOSLUOKSNIŲ SU HISTIDINO FUNKCINE GRUPE TYRIMAS
PAVIRŠIAUS IR NANODALELIŲ, PADENGŲ IŠORINIŲ SLUOKSNIŲ, SUSTIPRINTOS
RAMANO SPEKTROSKOPIJOS METODAIS

Bakalauro studijų baigiamasis darbas

Taikomosios fizikos studijų programa

Studentas

Domantas Dunajevs

Leista ginti

2021-05-20

Darbo vadovas

prof. habil. dr. Gediminas Niaura

Konsultantas

dokt. Agnė Zdančiauskienė

Instituto direktorius

prof. dr. Valdas Šablinskas

Vilnius 2021

Turiny

1. Įvadas.....	3
2. Literatūros apžvalga	5
2.1. Ramano sklaida.....	5
2.2. Savitvarkiai monosluoksniai.....	7
2.3. UV-Vis spektroskopija	8
2.4. Junginiai su histidino grupe	9
3. Metodika.....	12
3.1. Reagentai	12
3.2. Bandinio paruošimas.....	12
3.2.1. Lygaus Au elektrodo paruošimas SHINERS eksperimentui.....	13
3.2.2. Šiurkštaus Au elektrodo paruošimas PSRS eksperimentui	14
3.2.3. Lygaus, monokristalinio Au elektrodo paruošimas SHINERS eksperimentui	14
3.3. Prietaisai.....	15
3.4. Kitos priemonės	16
4. Rezultatai ir jų aptarimas.....	17
4.1. Sidabro nanodalelių UV-Vis spektras.....	17
4.2. PSRS ir SHINERS rezultatų palyginimas	19
4.3. IMHA monosluoksnio SHINERS spektrai	22
4.4. IMHA monosluoksnio spektrai rūgščioje terpėje	24
4.5. IMHA monosluoksnio spektrai keičiant terpės rūgštingumą bei pK_a vertės nustatymas ...	25
5. Pagrindiniai rezultatai ir išvados	29
Bibliografija.....	30
Summary.....	33
Padėkos.....	34

1. Įvadas

Histidinas, viena iš svarbiausių baltymus sudarančių amino rūgščių, kuris, dėl savo ypatingos sandaros, dalyvauja įvairiose molekulinėse sąveikose. Daug dėmesio skiriama histidino funkcinei grupei – imidazolo žiedui, dalyvaujančiam metalo jonų koordinacijoje sudarant biologiškai svarbias molekules. Histidinas su kitomis amino rūgštimis ir metalų jonais gali sąveikauti keliais skirtingais būdais. Nuo histidino struktūros priklauso sąveikos su kitomis amino rūgštimis ir metalų jonais, todėl norint geriau suprasti histidino vaidmenį baltymų sąveikose reikalingi tolimesni tyrimai, kurie padėtų nustatyti junginių su histidino grupe struktūrą ir jos priklausomybę nuo terpės parametrų.

Medžiagų struktūrą bei savybes molekuliniame lygmenyje leidžia nustatyti įvairūs spektroskopiniai metodai. Vienas informatyviausių yra paviršiaus sustiprinta Ramano sklaidos spektroskopija (PSRS) – tai nedestruktyvus analizės metodas leidžiantis tirti molekules *in situ* vandeninėje terpėje. Deja, PSRS spektroskopija turi kelis trūkumus. Vienas svarbiausių trūkumų – ribotas PSRS aktyvių metalų pasirinkimas; taip pat šis metodas leidžia tirti tik sistemas adsorbuotas ant šiurkštaus paviršiaus, kas gali lemti tam tikrus spektrinius pokyčius. 2010 metais Ramano signalo stiprinimui pasiūlyta naudoti Au ar Ag nanodaleles apgaubtas kelių nm sluoksnio storio inertiniu apvalkalu [1]. Nauja metodika (ang. SHINERS – Shell-Isolated Nanoparticle-Enhanced Raman Spectroscopy) leidžia tirti sistemas adsorbuotas ant lygaus monokristalinio paviršiaus. SHINERS metodika remiasi tuo, kad nanodalelės centras atlieka signalo stiprinimo funkciją, o apvalkalas neleidžia dalelės branduoliams tiesiogiai sąveikauti tarpusavyje ir su tiriamuoju bandiniu.

Savitvarkiai monosluoksniai (SAM) leidžia suteikti paviršiams norimas ir modifikuojamas savybes. Naudojant SAM formuojančias medžiagas su tiolio grupe, kuri gali adsorbuotis metalo paviršiuje bei galine funkcine histidino grupe galima sukurti sistemą, kuri leidžia tirti imidazolo žiedo sąveikas su įvairiomis medžiagomis vandeninėje terpėje.

Šio darbo **tikslas**: ištirti savitvarkių monosluoksnių su histidino funkcine grupe struktūrą paviršiaus ir nanodalelių, padengtų išoriniu sluoksniu, sustiprintos Ramano spektroskopijos metodais bei nustatyti junginio struktūros pokyčius, esant skirtingam terpės rūgštingumui. Norint pasiekti darbo tikslą suformuluoti keturi **uždaviniai**:

1. Pritaikyti pašiurkštintą Au elektrodą savitvarkių monosluoksnių su histidino funkcine grupe struktūros tyrimams paviršiaus sustiprintos Ramano spektroskopijos metodu.
2. Pritaikyti Ag@SiO₂ nanodaleles savitvarkių monosluoksnių su histidino funkcine grupe ant lygių metalų paviršiaus struktūros tyrimams nanodalelių, padengtų išoriniu sluoksniu, sustiprintos Ramano spektroskopijos metodu.

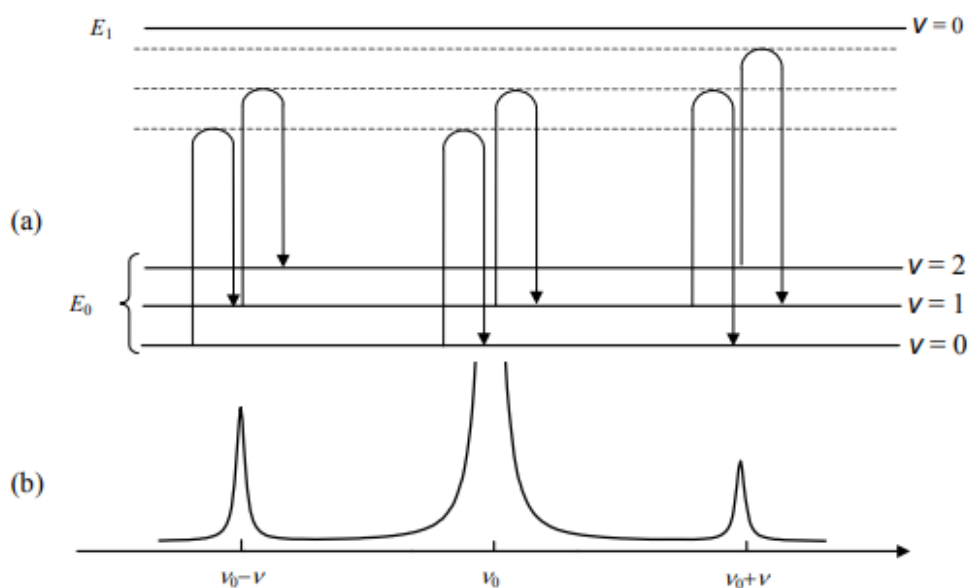
3. Palyginti skirtingas Ramano sklaidos stiprinimo metodikas, aptarti gautus rezultatus.
4. Palyginti skirtingo rūgštingumo terpėse registruojamus spektrus, aptarti terpės rūgštingumo indukuotus junginio su histidino funkcinė grupe struktūros pakitimus.

2. Literatūros apžvalga

2.1. Ramano sklaida

Vienas iš būdų nustatyti medžiagos struktūrą, sandarą, funkcines grupes bei sąveiką tarp molekulinų grupių yra Ramano spektroskopija, kuri plačiai naudojama srityse, kuriose svarbi nedestruktyvi analizė molekuliniam lygmenyje. Tai virpesių spektroskopijos metodas, paremtas neelastine šviesos sklaida (Ramano efektu), kuri atsiranda fotonams sąveikaujant su tiriamosios medžiagos elektronų debesėliu.

Fotono ir medžiagos sąveikos metu medžiagos elektronai įgyja papildomos energijos ir pereina iš pagrindinio elektroninio lygmens į virtualų lygmenį, kurio energija didesnė už pagrindinio elektroninio lygmens, tačiau žemesnė už sužadintojo. Molekulė su šia pertekline energija yra nestabili, todėl po kurio laiko medžiagos elektronai iš aukštesnės energijos lygmens pereina atgal į pagrindinį energijos lygmenį išspinduliuodami fotoną. Ramano spinduliuotės išeiga atitinka tik maždaug 10^{-5} krentančios spinduliuotės intensyvumo [2, 3]. Sąveikos metu fotonas gali netekti (Stokso juosta) arba įgyti (antistokso juosta) energijos, kuri atitinka virpesinio šuolio energiją $h\nu_{vib}$ (1 pav.). Dėl šios priežasties molekulės atomų virpesinė energija padidėja arba sumažėja.



1 pav. Ramano šuolių energinė diagrama (a) ir dviatomės molekulės Ramano spektras (b) [3].

Ramano spektroskopijoje aktyvūs tie virpesiai, kurių metu keičiasi molekulės poliarizuojamumas. Jei dviatomė molekulė yra apšviečiama, tai yra patenka į elektromagnetinį lauką, molekulė bus poliarizuojama ir joje bus indukuojamas dipolinis momentas P . Dydis P yra proporcingas elektromagnetinės bangos elektrinio lauko stipriui E , kuris yra periodiškai kintantis dydis, todėl indukuotą dipolinį momentą galime aprašyti šitaip [2]:

$$P = \alpha E = \alpha E_0 \cos 2\pi \nu_0 t, \quad (1)$$

kur α yra poliarizuojamumo konstanta. Poliarizuojamumas priklauso nuo visų virpesinių koordinačių, tad galima α išsiskleisti Teiloro eilute:

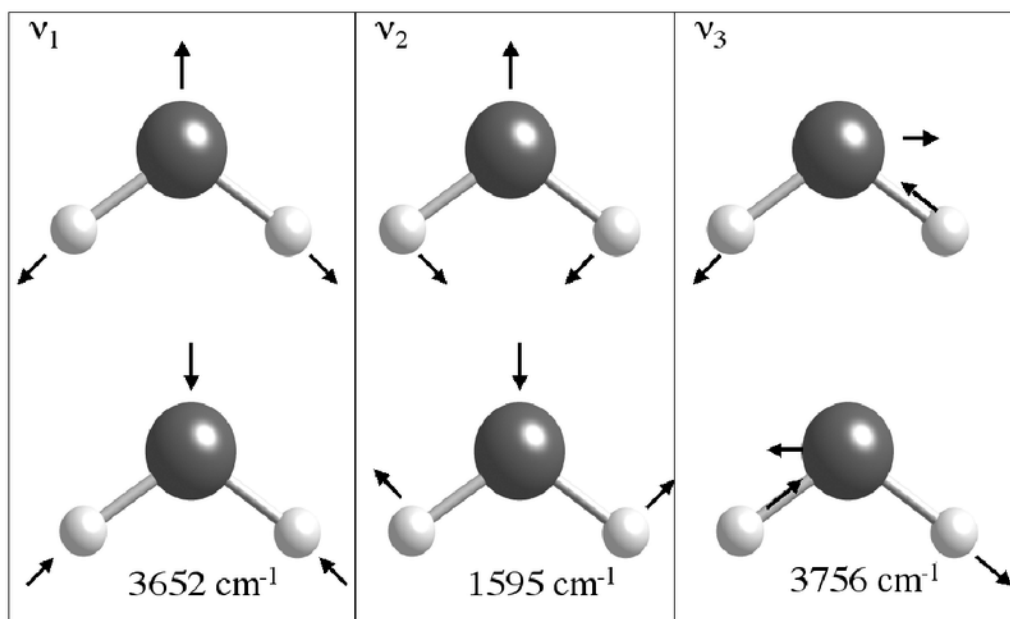
$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 + \dots, \quad (2)$$

čia $q = q_0 \cos 2\pi \nu t$ (ang. *nuclear displacement*), kur q_0 – molekulės virpesio amplitudė, ν_0 – molekulės virpesio dažnis. Galiausiai indukuotas dipolinis momentas P :

$$P = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi \nu_0 t + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 [\cos \{2\pi(\nu_0 + \nu)t\} + \cos \{2\pi(\nu_0 - \nu)t\}]. \quad (3)$$

Pirmasis narys aprašo spinduliavimą ν_0 dažniu (Reilėjaus sklaida), tuomet antrasis narys aprašo spinduliavimą $(\nu_0 + \nu)$ dažniu (antistoksinė Ramano sklaida) ir trečiasis narys aprašo spinduliavimą $(\nu_0 - \nu)$ dažniu (Stokso Ramano sklaida) [2, 3]. Spinduliuotės bangos dažnis kinta dėl molekulės branduolių virpesių, kurių metu atstumas tarp branduolių kinta periodiškai, o kintant atstumui tarp branduolių taip pat kinta ir poliarizuojamumas α .

Ramano spektroskopijoje fiksuojami molekulę sudarančių atomų virpesiai. Bendrai visi molekulę sudarančių atomų virpesiai gali būti aprašyti normaliaisiais virpesiais. Normalieji virpesiai toliau skirstomi į valentinius ir deformacinius. Valentinių virpesių metu kinta ryšio tarp atomų ilgis, o deformacinių virpesių metu kinta kampas tarp molekulę sudarančių atomų. Bendru atveju valentinių virpesių dažnis didesnis nei deformacinių virpesių. 2 pav. pademonstruoti dviatomės molekulės normalieji virpesiai [4].



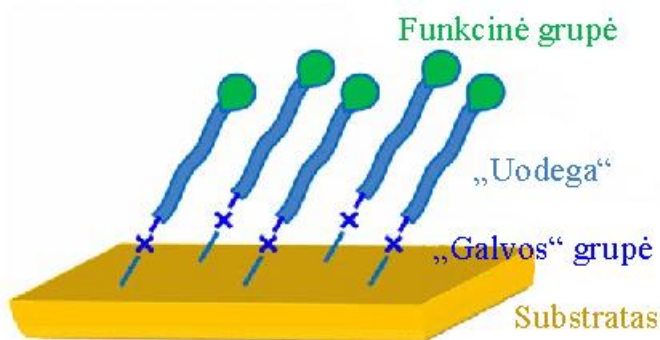
2 pav. Vandens molekulės normalieji virpesiai. Mažieji atomai yra vandenilio atomai. Rodyklės vaizduoja kiekvieno atomo judėjimo kryptį [4].

Ramano sklaida pasižymi mažu intensyvumu, eksperimentų metu fiksuojamas labai silpnas signalas. Signalui sustiprinti pasitelkiami įvairūs metodai, vienas jų – paviršiaus sustiprinta Ramano spektroskopija (toliau PSRS, ang. SERS – Surface Enhanced Raman Spectroscopy). PSRS metu padidėja Ramano sklaidos intensyvumas molekulei esant ant arba netoli nanostruktūruoto metalinio paviršiaus. Šis stiprinimas susijęs su lokalizuotu paviršiaus plazmonų rezonansu – kolektyviniu elektronų virpesių sužadiniu metalo dalelėje [5]. Spinduliuotės stiprinimas geriausiai pasireiškia Au, Ag ir Cu metalams ir stipriai priklauso nuo paviršiaus morfologijos. Geras stiprinimas galimas tik keliems metalams, o pačią stiprinimo gebą lemia paviršiaus nanostruktūros forma, dydis ir išsidėstymas, todėl PSRS metodas apribotas tam tikrais metalais ir priklauso nuo jų struktūros. Šis sustiprintos Ramano sklaidos metodas tradiciškai yra kontaktinis, tai reiškia, kad sklaidos fotonus stiprinantis paviršius yra taip pat ir pagrindas tyrimo objektui. Tokiu atveju neišvengiama sistemos perturbacijų, kadangi gali vykti krūvio pernaša iš paviršiaus į molekulę ar atvirkščiai, o tai sumažins rezultatų tikslumą.

Pakankamai nauja Ramano sklaidos stiprinimo metodika, sukurta 2010 metais [1], naudoja apvalkalu izoliuotas nanodaleles signalo stiprinimui (ang. SHINERS – Shell-Isolated Nanoparticle-Enhanced Raman Spectroscopy). Šiam metodui naudojamos Au arba Ag nanodalelės su kelių nanometrų storio chemiškai ir elektriškai inertiniu apvalkalu (tai gali būti tokios medžiagos kaip SiO₂, Al₂O₃, MnO₂, TiO₂). Šis metodas pasižymi keletu privalumų. Naudojamas išorinis nanodalelės apvalkalas neleidžia tiesiogiai sąveikauti tiriamam objektui su metalu, dėl to išvengiamas galimas kontaktinis potencialų skirtumas, krūvio pernaša. Tuo pačiu apvalkalas padidina pačių nanodalelių stabilumą – nustatyta, kad aukso nanodalelės dengtos silicio dioksidu (Au@SiO₂) išliko stabilios virš 240 valandų, kai aukso nanodalelės be apvalkalo tokiose pačiose sąlygose pilnai agregavosi jau po 15 minučių [6]. Taip pat keičiant apvalkalo sluoksnio storį galima kontroliuoti tarpą tarp nanodalelių ir tiriamo objekto. Naudojant SHINERS metodą Ramano sklaida stiprinama dėl lokalizuotų paviršiaus plazmonų rezonanso [7].

2.2. Savitvarkiai monosluoksniai

Daugumoje mokslo ir technologijų sričių labai svarbūs paviršiai bei sąveikos su jais. Paviršiams modifikuoti ir suteikti jiems norimas bei kontroliuojamas savybes plačiai taikomi savitvarkiai monosluoksniai (ang. SAM – Self-Assembled Monolayer). Savitvarkos metu labai plonas molekulinis sluoksnis formuojasi ant paviršiaus dėl adsorbcijos iš tirpalo arba garų, tuomet dėl savo struktūros savitvarkius monosluoksnius sudarančios molekulės spontaniškai sąveikaudamos su paviršiumi ir tarpusavyje geba sudaryti tvarkingas struktūras. Savitvarkiai monosluoksniai labai patrauklūs dėl paprasto ir patogaus jų formavimo būdo. 3 pav. pavaizduota SAM struktūra.



3 pav. Savitvarkio monosluoksnio struktūra [adaptuota pagal [8]].

Savitvarkį monosluoksnį formuojanti medžiaga įprastai turi tris pagrindines dalis [8, 9]:

1. „Galvos“ grupę, kuri molekulę pritvirtina prie substrato. Molekulė imobilizuojama ant paviršiaus dėl sąveikos tarp „galvos“ grupės ir substrato. Vienas iš pavyzdžių yra tiolio ($R-SH$) „galvos“ grupės ir aukso sąveika, kurios metu molekulė įsitvirtina ant aukso paviršiaus susidarant kovalentiniam cheminiam ryšiui.

2. „Uodegą“, kuri jungia galvos grupę su funkicine grupe. Ši dalis lemia molekulių tarpusavio sąveiką ir orientaciją bei leidžia suteikti gerai apibrėžtą sluoksnio storį.

3. Funkcinę grupę, kuri sudaro išorinį SAM sluoksnį. Paviršiui suteikti norimas ir kontroliuojamas savybes padeda būtent specifinės funkcinės grupės parinkimas.

Pastebėta, kad savitvarkiai monosluoksniai formuojasi keliomis fazėmis [10]. Pirmoji fazė greita, trunka keletą minučių, ir jos metu didžioji dalis molekulių adsorbuojasi ant substrato. Antrosios fazės metu, kuri trunka keletą valandų, molekulės tvarkingai išsidėsto dėl van der Waals'o sąveikos jėgų.

2.3. UV-Vis spektroskopija

UV-Vis spektroskopija remiasi šviesos sugertimi vykstant elektroniniams šuoliams atomuose ir molekulėse. Kaip ir nusako pavadinimas, šuolius žadina regimojo ir greta esanti ultravioletinio spektro šviesa.

Vienas iš svarbiausių ultravioletinės–regimosios spektroskopijos srityje naudojamų dėsnių yra Lamberto–Bero, kuris nusako santykį tarp spinduliuotės sugerties ir bandinio koncentracijos.

$$A = \varepsilon lc, \quad (4)$$

čia:

A – optinis tankis;

ε – molinis silpimo koeficientas ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$);

l – optinio kelio ilgis (cm);

c – mėginio koncentracija (M).

Bendru atveju ši priklausomybė yra tiesinė, tačiau pasiekus didesnes mėginių koncentracijas tiesinė priklausomybė nebegalioja ir pasireiškia didelės paklaidos. UV–Vis spektruose abscisių ašyje atidedamas spinduliuotės bangos ilgis, nm, ordinačių ašyje atidedamas optinis tankis A , kuris yra dešimtainis logaritmas santykio į bandinį kritusios šviesos intensyvumo su bandinį praėjusios šviesos intensyvumu. Didelė dalis spektrinių prietaisų prie didesnių optinio tankio verčių įsisotina (didėjant koncentracijai nebedidėja sugertis), o virš maždaug 2 optinių vienetų nebegalioja tiesinis Lamberto–Bero dėsniumas ir įsivyrąja didelės paklaidos.

Nanodalelės pasižymi ypatingomis optinėmis savybėmis, kurias lemia dalelių dydis, forma, koncentracija bei aglomeracija. Priklausomai nuo dalelių dydžio, formos, metalo, gaunamas skirtingas UV–Vis sugerties spektras, todėl užregistravus nanodalelių UV–Vis sugerties spektrą, nustatius sugerties maksimumą atitinkantį bangos ilgį ir remiantis literatūra [11] galime spręsti, ar susintetintos dalelės yra tinkamo dydžio SHINERS eksperimentams.

2.4. Junginiai su histidino grupe

Iš visų natūralių amino rūgščių, sudarančių baltymus, viena svarbiausių yra histidinas. Dėl savo unikalios molekulinės struktūros jis dalyvauja daugelyje biologinių procesų. Histidinas turi funkcinę grupę – imidazolo žiedą, kuris geba koordinuoti metalų jonus taip formuodamas biomolekulių aktyvius centrus, todėl imidazolo žiedui skiriamas ypatingas dėmesys. Histidinas turi dvi skirtingas protonuotas formas ir su kitomis amino rūgštimis bei metalų jonais gali sąveikauti penkiais skirtingais būdais [12]. Ši dinamiška struktūra reikalauja tolimesnių tyrimų.

Svarbūs organinių junginių sąveiką aprašantys parametrai yra šių junginių rūgštinės ir bazinės savybės. Viena iš pagrindinių, Brionstedo ir Laurio, rūgštingumo ir bazingumo teorija sieja protonų (H^+ atomų) pernašą su junginių rūgštingumu ir bazingumu [13]. Rūgšties disociacijos konstanta aprašoma taip:

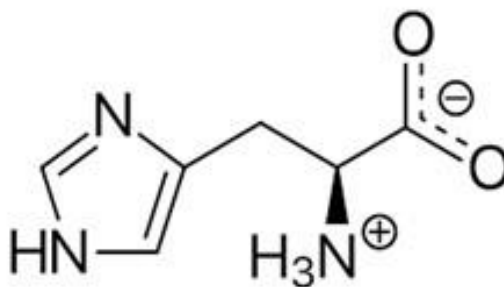
$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]}, \quad (5)$$

čia HA – rūgštis, A^- – rūgšties konjuguotoji bazė, H^+ – vandenilio jonas. Dydžiai laužtiniuose skliaustuose yra koncentracija pusiausvyroje padėtyje. Dažniausiai rūgšties disociacijos konstantai išreikšti naudojamas neigiamas K_a logaritmas:

$$pK_a = -\log_{10} K_a = \log_{10} \frac{[HA]}{[A^-][H^+]}. \quad (6)$$

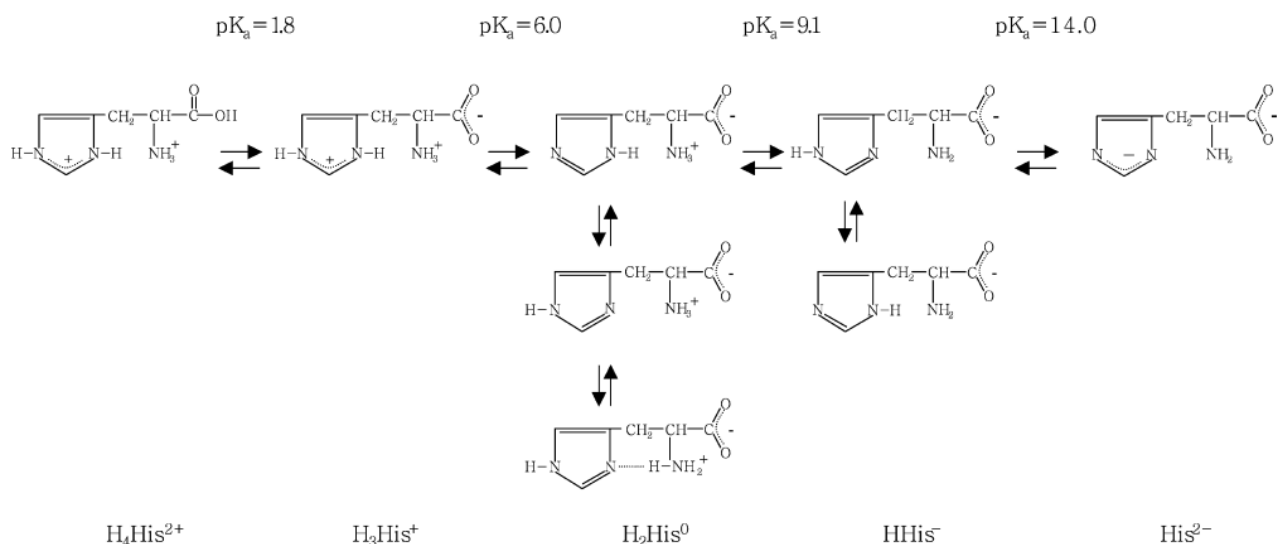
Kuo mažesnė pK_a vertė, tuo rūgštis stipresnė. Rūgšties disociacijos konstanta pK_a leidžia suprasti kuri, protonuota ar deprotonuota, molekulės forma yra dominuojanti terpėje. Jei terpės pH yra mažesnis už molekulės pK_a vertę, tuomet molekulė terpėje dominuoja protonuotoje formoje. Tuo tarpu jei terpės pH vertė didesnė už molekulės pK_a vertę, tuomet molekulė terpėje dominuoja deprotonuotoje formoje.

Terpės rūgštingumas (pH vertė, kuri nurodo H^+ jonų koncentraciją terpėje) lemia molekulės struktūrą, reakcingumą ir funkcinės grupės orientaciją, kadangi yra tiesiogiai susijęs su molekulės protonacija/deprotonacija. Pati imidazolo žiedo erdvinė orientacija yra svarbus faktorius peptidų gebai lankstytis ir susijusi su jų antrine ir tretine struktūra. Histidinas gali koordinuoti metalų jonus ir sudaryti gyvybiškai svarbių, tokių kaip hemoglobinas, biomolekulių centrus. Imidazolo žiedo buvimas suteikia tris papildomas sritis protonacijai/deprotonacijai bei metalų jonų prisijungimui be jau esančių dviejų amino rūgščių galų (NH_2 ir $COOH$). Arti neutralaus pH imidazolo žiedas turi vieną protonuotą ir vieną deprotonuotą azoto atomą, kaip pavaizduota 4 pav. Lanksti histidino struktūra leidžia jam būti keliose skirtingose formose, kurios priklauso nuo terpės pH vertės [14].



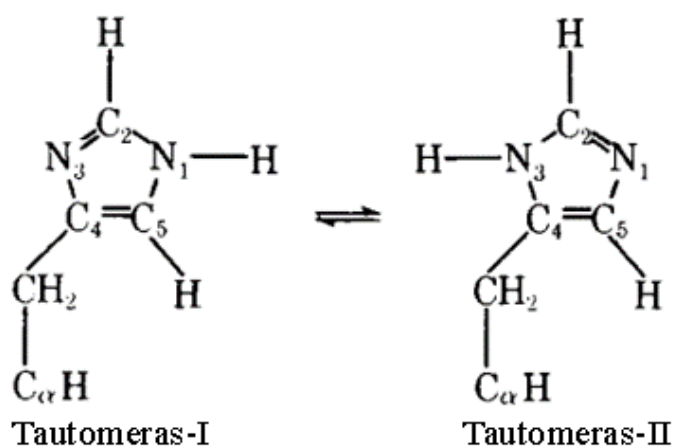
4 pav. Histidino struktūrinė formulė esant neutraliai pH terpei.

Skirtingos histidino struktūros pavaizduotos 5 pav. Histidinas egzistuoja keliose skirtingose tautomerinėse formose, priklausomai nuo to, kuris imidazolo žiedo azoto atomas protonuotas, kadangi šie azoto atomai nėra identiški.



5 pav. Skirtingos L-histidino struktūros priklausomai nuo protonacijos/deprotonacijos [14].

Tautomerai skiriami pagal tai, kuris azoto atomas protonuotas. Galimi keli žymėjimai tautomerinėms formoms atskirti, N^π , kai protonuotasis azoto atomas yra arčiau CH_2 grupės arba N^τ , kai protonuotas kitas azoto atomas. Alternatyvus žymėjimas pateiktas 6 pav. tautomeras-I turi protonuotą N_1 azoto atomą, o tautomero-II atveju protonuotas arčiau CH_2 grupės esantis N_3 azoto atomas.



6 pav. Histidino tautomerinės formos [adaptuota pagal [15]].

Savitvarkius monosluoksnius formuojančios molekulės su paviršiui aktyvia „galvos“ grupe ir modifikuojama galine funkcinė grupe naudojamos bioelektroninių prietaisų vystyme. Naudojant SAM su metalui aktyvia tioline grupe ir histidino funkcinė grupe galima sukurti sistemą imidazolo žiedo sąveikoms su įvairiais tirpalo komponentais nagrinėjimui. Norint gerai suprasti histidino vaidmenį baltymų sąveikoje ir elektrinio lauko įtaką biomolekulių struktūrai svarbu tirti monosluoksnius su histidino funkcinė grupe suformuotus ant metalo paviršiaus.

3. Metodika

3.1. Reagentai

Visos aukso elektrodų ruošimui paviršiaus ir nanodalelių, padengtų išoriniu sluoksniu, sustiprintos Ramano spektroskopijos metodais naudotos medžiagos (Merck, Vokietija) ir medžiagos naudotos SHINERS eksperimentams skirtingo rūgštingumo terpėse pateiktos 1 lentelėje. Tirpalai ruošti dejonizuotame vandenyje (18,2 MΩ·cm, Millipore).

1 lentelė. Eksperimentų metu naudotos medžiagos

Medžiaga	Cheminė formulė	Naudota koncentracija	Grynumas
Etanolis	CH ₃ CH ₂ OH	grynas	≥ 99,5 %
Sieros rūgštis	H ₂ SO ₄	0,5 M	95 %
Natrio chloridas	NaCl	0,1 M	99,5 %
N-(2-(1H-imidazol-4-il)etil)-6-merkaptiheksanamidas	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ OS	10 ⁻³ M	99,5 %
Aliuminio oksidas	Al ₂ O ₃	grynas	99,99 %
Sunkus vanduo	D ₂ O	grynas	99,99 atomų % D
Deuterio chloridas	DCl	1M	≥99,99 % atomų % D
Natrio deuterio oksidas	NaOD	2 %	99,99 atomų % D
Buferinis tirpalas	KD ₂ PO ₄ +Na ₂ SO ₄	0,05 M + 0,1 M	98 atomų % D + 99 %

3.2. Bandinio paruošimas

Eksperimentams naudoti trijų skirtingų rūšių Au paviršiai:

1. Au elektrodas nupoliruotas iki lygaus paviršiaus – SHINERS eksperimentams;
2. Pašiurkštintas Au elektrodas – PSRS eksperimentams;
3. Lygus aukso paviršius, suformuotas magnetroninio garinimo būdu – SHINERS eksperimentams.

Ramano spektroskopijos tyrimams ypač svarbus sistemos švarumas, todėl aukso elektrodo paruošimas užėmė didelę laiko dalį. Elektrodas buvo elektrochemiškai valomas ir šiurkštinamas trijų

elektrodų celėje, kur darbinio Au elektrodo potencialas buvo matuotas Ag/AgCl, 3 M KCl elektrodo atžvilgiu, o pagalbinis elektrodas – Pt viela.

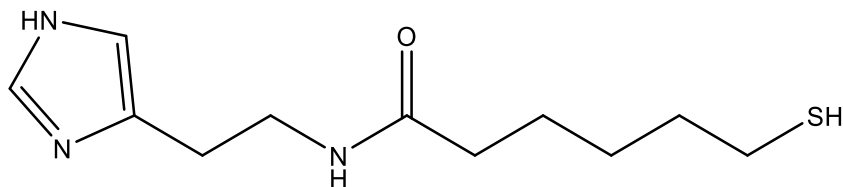
Tiek PSRS, tiek SHINERS eksperimentai atlikti vandeninėje terpėje, todėl prieš atliekant matavimus elektrodai buvo įmerkami į dejonizuotą vandenį.

SHINERS eksperimentai keičiant terpės rūgštingumą buvo atliekami naudojant aukso plokštelę. Ant laboratorinio stiklelio magnetroninio garinimo metu stiklelis pirmiausia buvo padengtas 2 nm storio chromo pasluoksniu, tuomet užgarinta 180 nm aukso danga.

3.2.1. Lygaus Au elektrodo paruošimas SHINERS eksperimentui

Pirmiausia Au (99,99 %) darbinis elektrodas šveičiamas 0,2 μm šlifavimo popieriumi, plaunamas vandeniu, tuomet apie 10 minučių poliruojamas 0,05–0,3 μm Al_2O_3 milteliais ant tam tikslui skirto poliravimo pado (Buchler, JAV) ir 8 minutes veikiamas ultragarsu vandens ir etanolio mišinyje (1:1), vėl plaunamas vandeniu. Toliau Au elektrodas valomas elektrochemiškai ciklinant 0,5 M H_2SO_4 rūgštyje, skleidžiant potencialą (0→2→0) V srityje, 100 mV/s greičiu, procesas vykdomas 5 ciklus ir skleidžiant potencialą (0→1,66→0) V, 100 mV/s greičiu, kai procesas vykdomas 10 ciklų. Po to elektrodas plaunamas vandeniu ir redukuojamas 0,1 M NaCl tirpale išlaikant potencialą ties –0,9 V.

Po Au elektrodo redukavimo šis plaunamas vandeniu ir tirpikliu (etanoliu), ir tuomet elektrodas merkiamas į monosluoksniu formavimo tirpalą, kuriame ištirpinta savitvarkius monosluoksnius formuojantis junginys su histidino funkcine grupe, angliavandenilinėje grandinėje įterpta amido grupe (stabilaus ir tvirto monosluoksniu formavimui) ir aukso paviršiui aktyvia S–H dalimi. Būtent toks modelinis junginys susintetintas norint geriau ištirti histidino struktūrą ir jos pokyčius dėl išorinių veiksnių. Šis junginys, N-(2-(1H-imidazol-4-yl)ethyl)-6-mercaptohexanamide (trumpinys – IMHA), susintetintas Organinės chemijos skyriuje, Fizinių ir technologijos mokslų centre. Grynumas 99,99 %, molekulinė masė 241,35306. IMHA struktūrinė formulė pateikta 7 pav.



7 pav. IMHA junginio struktūrinė formulė.

Elektrodas monosluoksniu formavimo tirpale laikytas apie 72 valandas.

Paruoštas lygus elektrodas naudojamas SHINERS eksperimentui, tad gausiai nuplovus viršsluoksnius etanoliu ir dejonizuotu vandeniu ant nusodinto monosluoksniu reikia uždėti Ag@SiO₂

nanodaleles, kurios stiprins signalą eksperimento metu. Automatine pipete paimama 3 μ l nanodalelių ir atsargiai uždedama ant elektrodo paviršiaus, nepaliekiant pipetoriaus galiuku. Palaukiama 10 minučių ir elektrodas vėl gausiai plaunamas dejonizuotu vandeniu. Po šio žingsnio jau galima atlikti nanodalelių, padengtų išoriniu sluoksniu, sustiprintos Ramano spektroskopijos matavimus.

3.2.2. Šiurkštaus Au elektrodo paruošimas PSRS eksperimentui

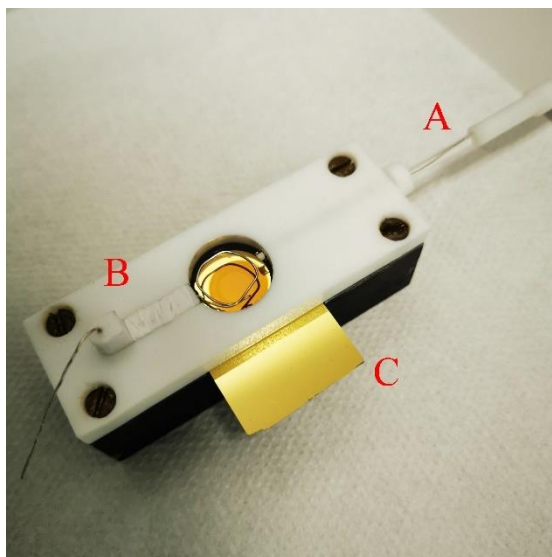
Paviršiaus sustiprintos Ramano spektroskopijos tyrimui buvo naudojamas šiurkštintas elektrodas. Elektrodui valyti naudojama aukščiau aprašytą metodiką, tačiau po elektrodo redukavimo 0,1 M NaCl tirpale išlaikant potencialą ties $-0,9$ V atliekamas elektrocheminis šiurkštinimas 0,1 M NaCl tirpale užduodant potencialą $(-0,3 \rightarrow 1,3 \rightarrow -0,3)$ V srityje. Šiurkštinimo metu potencialas išlaikomas 30 s ties neigiama potencialo verte ir 2 s tiek teigiama potencialo verte, ciklai kartojami apie 10 minučių.

Po Au elektrodo šiurkštinimo šis plaunamas vandeniu ir tirpikliu (etanoliu), ir merkiamas į sodinimo tirpalą, kuriame ištirpinta savitvarkius monosluoksnius formuojanti medžiaga – IMHA. Elektrodas sodinimo tirpale laikytas 72 valandas.

Šiurkštinto elektrodo atveju nusodinus monosluoksnį ir gausiai nuplovus viršsluoksnius etanoliu bei dejonizuotu vandeniu jau galima atlikti paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos matavimus, čia šiurkštus paviršius stiprina Ramano sklaidos signalą.

3.2.3. Lygaus, monokristalinio Au elektrodo paruošimas SHINERS eksperimentui

Eksperimentui magnetroninio garinimo metu laboratorinis stiklelis pirmiausia buvo padengtas 2 nm storio chromo pasluoksniu, tuomet užgarinta 180 nm aukso danga. Plokštelė po magnetroninio garinimo iš karto merkiama į savitvarkį monosluoksnį formuojantį IMHA 10^{-3} M tirpalą, kuriame yra laikoma 72 valandas. Ištraukus plokštelę iš sodinimo tirpalo, aukso plokštelė gausiai plaunama etanoliu ir dejonizuotu vandeniu siekiant pašalinti viršsluoksnius. Nuplovus viršsluoksnius aukso plokštelė įstatoma į trijų elektrodų elektrocheminę celę.



8 pav. Surinkta trijų elektrodų celė. A – Ag/AgCl, 3 M KCl elektrodas (palyginimo elektrodas), B – Pt viela (pagalbinis elektrodas), C – aukso plokštelė (darbinis elektrodas).

Surinkus celę ji plaunama dejonizuotu vandeniu, tuomet ant aukso plokštelės paviršiaus dedamos Ag@SiO₂ nanodalelės, kurios stiprins signalą eksperimento metu. Automatine pipete paimama 3 µl nanodalelių ir atsargiai uždedama ant plokštelės paviršiaus, nepaliekiant pipetoriaus galiuku. Palaukiama apie 10 min ir celė vėl gausiai plaunama dejonizuotu vandeniu. Tuomet kelis kartus praskalaujama sunkiu vandeniu. Naudojamos celės talpa 1 ml. Į celę pripilama buferinio tirpalo kartu su natrio sulfatu joninei jėgai palaikyti (KD₂PO₄+Na₂SO₄), kurio pD vertė 5,5.

Celė prijungiama prie potenciostato, darbinio elektrodo potencialas matuojamas/keičiamas Ag/AgCl, 3 M KCl palyginamojo elektrodo atžvilgiu, pagalbinis elektrodas – Pt viela, o darbinis elektrodas yra pati aukso plokštelė. Pirmiausia trumpam laiko tarpui (iki 60 s) palaikomas –0,7 V potencialas, kad nešvarumai ar kiti adsorbatai būtų pašalinti nuo tiriamojo paviršiaus. Dabar galima pradėti SHINERS matavimus, kai keičiamas terpės rūgštingumas ir palaikomas pastovus išorinis elektrinis laukas.

3.3. Prietaisai

Tiriant savitvarkius monosluoksnius Ramano sklaidos, PSRS ir SHINERS spektrai registruoti HyperFlux PRO Plus (Tornado Spectral Systems, Kanada) spektrometru su termoelektriškai šaldomu (–40 °C) CCD detektoriumi kambario temperatūroje (20 ± 2°C). Spektrų sužadinimui ir Ramano sklaidos surinkimui naudotas šviesolaidinis kabelis. Diodinio lazerio, generuojančio žadinančią spinduliuotę, bangos ilgis 785 nm. Eksperimentams taikyta 180° geometrija. Lazerinės spinduliuotės galia ties bandiniu buvo 50 mW. Lazerio spindulys fokusuojamas į 80 – 100 µm skersmens dėmę ant tiriamojo bandinio paviršiaus. Santykinis Ramano sklaidos

intensyvumas kalibruotas pagal baltos šviesos (Raman Calibration Kit, SN WL043, Tornado, Toronto, Kanada) intensyvumo standartą. Ramano spektrų bangos skaičių ašis kalibruota pagal polistireno plėvelės standarto (ASTM E 1840) Ramano sklaidos spektrą. Registruojant spektrus integravimo laikas svyravo nuo 7,5 s iki 540 s. Virpesiniai spektrai apdoroti GRAMS/AI 8.0 (Thermo Scientific Inc., JAV) kompiuterine programa.

UV–Vis matavimai registruoti naudojant Lambda 25 UV–VIS (Perkin Elmer Inc., JAV) spektrometrą. Tyrimams naudotos kvarcinės kiuvetės, optinio kelio ilgis 1 cm. Tiriant susintetintas sidabro nanodaleles į kiuvetes supiltas dalelių ir palyginamasis tirpalas. Palyginamuoju tirpalu buvo dejonizuotas vanduo. Sugerties spektrai registruoti 200 – 1100 nm srityje. Matavimai atlikti kambario temperatūroje ($20 \pm 2^\circ\text{C}$).

3.4. Kitos priemonės

Reagentai sverti analizinėmis svarstyklėmis (KERN & Sohn GmbH, JAV). Naudotos automatinės pipetės (1 ml, 100 μl , 10 μl), vienkartiniai indai (15 ml, 50 ml) ir stikliniai indai (200 ml, 50 ml). Elektrodo ruošimui naudotas šlifavimo popierius (0,2 μm), poliravimo padas (Buchler, JAV), valymas po poliravimo atliktas ultragarsinėje vonelėje. Elektrodo valymui ir šiurkštinimui naudota trijų elektrodų elektrocheminė celė ir potenciostatas (Zahner Zennium, Vokietija). Buferinio tirpalo rūgštingumo matavimas atliktas naudojant pH matuoklį (Mettler Toledo, Šveicarija).

4. Rezultatai ir jų aptarimas

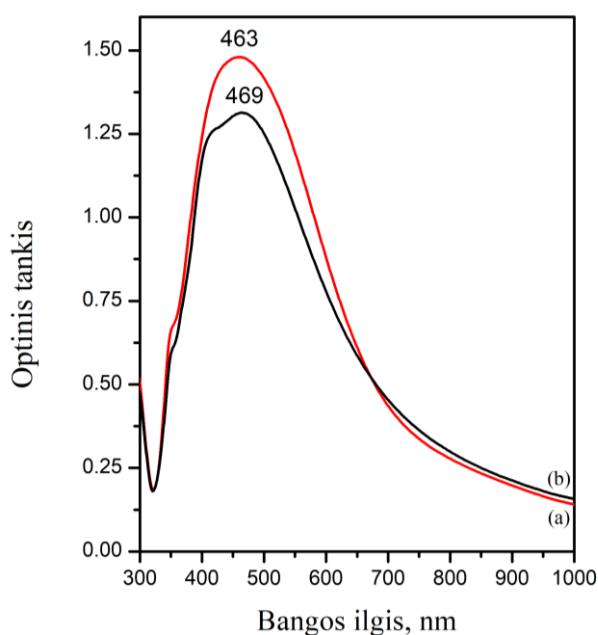
Atliktų eksperimentų metu UV–Vis spektroskopijos pagalba įvertintas Ag@SiO₂ nanodalelių dydis. Palyginti PSRS ir SHINERS metodai tiriant junginį su histidino grupe. SHINERS metodu nustatyti junginio su histidino grupe struktūros pokyčiai esant skirtingai terpei (H₂O ir D₂O). SHINERS metodu nustatyti junginio su histidino grupe struktūros pokyčiai esant skirtingam terpės rūgštingumui bei nustatyta histidino žiedo disociacijos konstantos pK_a vertė.

4.1. Sidabro nanodalelių UV-Vis spektras

Nanodalelių, padengtų išoriniu sluoksniu, sustiprintos Ramano sklaidos tyrimui naudojamos nanodalelės iš Au, Ag arba Cu metalų, kurie išsiskiria iš kitų metalų tuo, kad gerai stiprina signalą regimojoje srityje. Sidabro nanodalelės ypatingai patrauklios, nes gali būti parenkamos taip, kad gerai stiprintų signalą visame regimosios šviesos ruože [11].

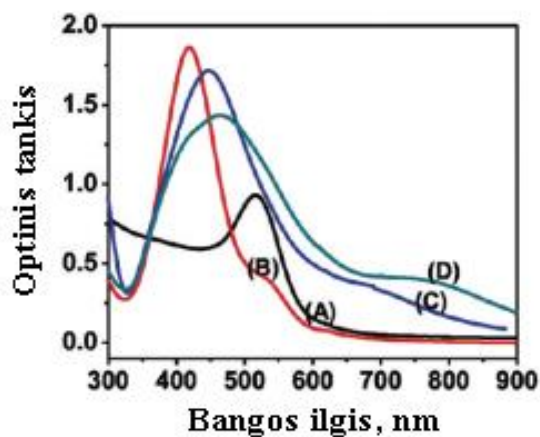
Sustiprintos Ramano sklaidos eksperimentams naudotos sidabro nanodalelės su plonu silicio dioksido apvaskalu (Ag@SiO₂), kur nanodalelės sidabro branduolys atlieka signalo stiprinimo funkciją, o išorinis apvaskalas neleidžia branduoliui tiesiogiai sąveikauti su tiriamuoju junginiu.

Nanodalelių optinės savybės priklauso nuo jų formos, dydžio, aglomeracijos bei koncentracijos ir pačio metalo prigimties, ultravioletinės – regimosios šviesos spektroskopija yra tinkamas metodas nustatyti, ar dalelės tinkamos SHINERS eksperimentams. 9 pav. pavaizduoti tyrimuose naudotų Ag nanodalelių UV–Vis spektrai.



9 pav. Sidabro nanodalelių (a) ir sidabro nanodalelių su silicio dioksido apvaskalu (b) UV–Vis spektrai.

Nanodalelių be išorinio apvalkalo UV–Vis spektro sugerties maksimumas yra ties 463 nm, o nanodalelių su apvalkalu – 469 nm. Ramano sklaidos signalo stiprinimui naudotos Organinės chemijos skyriuje, Fizinių ir technologijos mokslų centre susintetintos 85 ± 5 nm dydžio sidabro nanodalelės su išoriniu silicio dioksido sluoksniu, kurio storis ~ 3 nm. Straipsnyje apie greitą nanodalelių koncentracijos ir dydžio nustatymą [16] randamos nanodalelių sugerties maksimumo padėties ir nanodalelių dydžio koreliacijos lentelės duomenimis 80 nm dalelių sugerties maksimumas yra ties 458,3 nm, o 90 nm dalelių – 474,6 nm. Lentelėje rasti duomenys visai gerai sutampa su eksperimentiškai nustatytais sugerties maksimumo padėtimis. Taip pat literatūroje apie Ag@SiO₂ naudojimą SHINERS metodui [11] galime pastebėti ne tik panašią sugerties maksimumo padėties ir nanodalelės dydžio priklausomybę, bet ir UV–Vis spektro platėjimą ir poslinkį į didesnių bangos ilgių pusę didėjant dalelių dydžiui (pavaizduota 10 pav.).

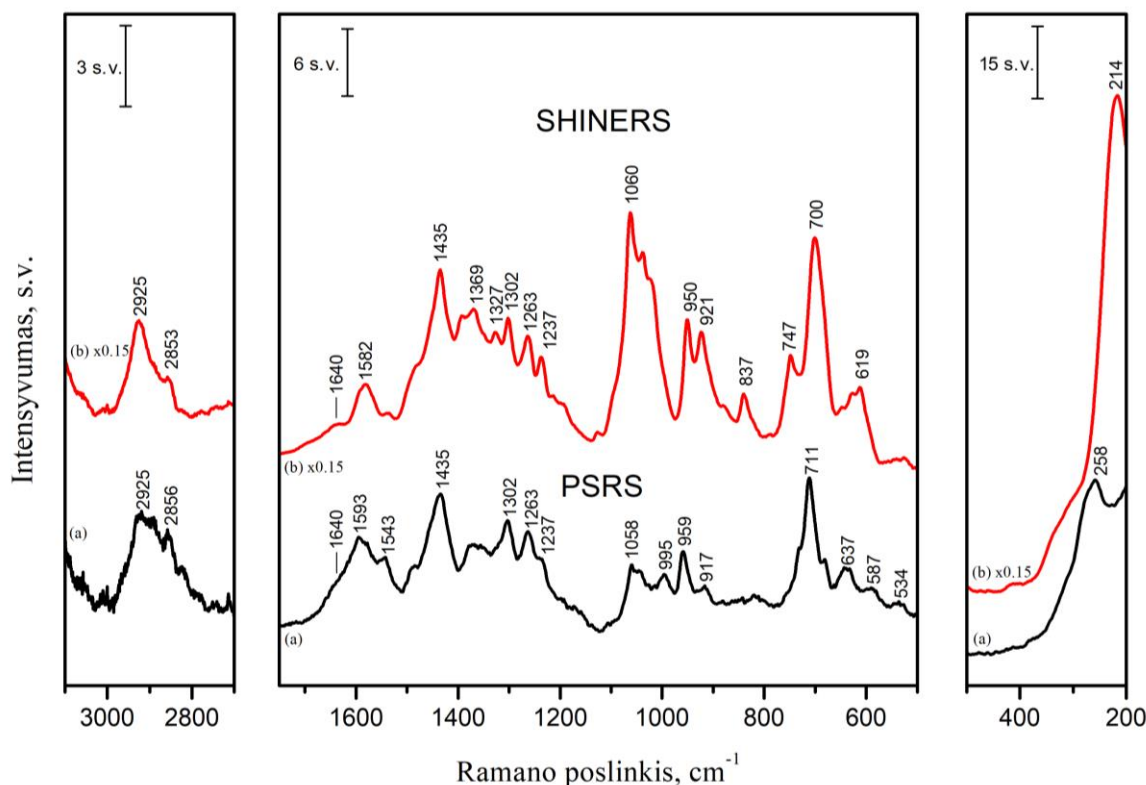


10 pav. UV–Vis sugerties spektras 12 nm Au branduolio (A, juoda spalva), 50 ± 5 nm Ag nanodalelės (B, raudona spalva), 70 ± 5 nm Ag nanodalelės (C, mėlyna spalva), 100 ± 10 nm Ag nanodalelės (D, žalia spalva) [adaptuota pagal [11]].

Iš 9 pav. matome, kad Ag nanodalelių be apvalko ir su apvalkalu UV–Vis kreivės labai panašios, todėl galime daryti išvadą, kad SiO₂ apvalkalas pakankamai plonas ir neturi žymaus poveikio dalelių optinėms savybėms.

4.2. PSRS ir SHINERS rezultatų palyginimas

Monosluoksnį formuojančios medžiagos IMHA tyrimui naudoti du Ramano sklaidos stiprinimo metodai – paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos ir nanodalelių, padengtų išoriniu sluoksniu, sustiprintos Ramano sklaidos metodai. IMHA monosluoksnio, adsorbuoto ant šiurkštaus Au elektrodo ir adsorbuoto ant lygiai nupoliruoto Au elektrodo, spektrai vandeninėje terpėje palyginti 11 pav.



11 pav. IMHA monosluoksnio, adsorbuoto ant pašiurkštinto Au elektrodo, PSRS spektras (a) ir IMHA monosluoksnio, adsorbuoto ant nupoliruoto Au elektrodo, SHINERS spektras (b).

Iš karto pastebėta, kad SHINERS spektras daug intensyvesnis nei PSRS bei yra mažiau triukšmingas. Spektrų kaupimo laikas 540 s ir 63 s atitinkamai PSRS ir SHINERS metodams. PSRS metodu priklausomai nuo apšviečiamos elektrodo vietos gauti skirtingo intensyvumo spektrai, tačiau virpesinių juostų dažniai nekito. Tuo tarpu SHINERS metodo atveju keičiant apšviečiamo ploto vietą gauti praktiškai identiško intensyvumo spektrai ir nestebėti virpesinių juostų poslinkiai – nanodalelių, padengtų išoriniu sluoksniu, sustiprintos Ramano sklaidos metodas monosluoksnio tyrime pasižymėjo geresniu signalo stiprinimo atsikartojamumu.

Spinduliuotės stiprinimas priklauso nuo atstumo tarp tiriamojo objekto ir nanostruktūrų [5], todėl PSRS metodo atveju geriau išsiskiria virpesiai, esantys arčiau šiurkštinto elektrodo paviršiaus, o SHINERS metodu – geriau stiprinami virpesiai, esantys šalia stiprinimą atliekančių nanodalelių su

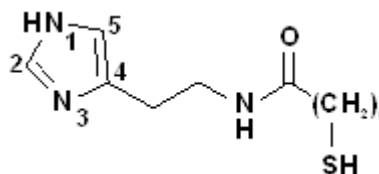
inertiniu apvalkalu. PSRS metodu gautame spektre aiškiai matosi valentinio Au-S virpesio juosta, kai tuo tarpu SHINERS spektre ji neišskiriama. Virpesinių juostų priskyrimas pateiktas 2 lentelėje.

2 lentelė. IMHA charakteringų virpesinių juostų priskyrimas atlikus matavimus PSRS ir SHINERS metodais

PSRS H ₂ O, cm ⁻¹	SHINERS H ₂ O, cm ⁻¹	SHINERS D ₂ O, cm ⁻¹	Virpesys [11], [14–18]
2925	2925	2925	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$
2856	2853	2854	$\nu_s(\text{CH}_2)$
	1640	1640	Am I
1593	1582	1571	Im $\nu(\text{C}_4=\text{C}_5)$ (Tautomeras-II)
1435	1435	1435	$\delta(\text{CH}_2)$ žirklinis
		1387	
	1369	1367	$\delta(\text{CH}_2)$; $\nu(\text{Im})$ (Tautomeras-II)
	1327	1331	Im $\nu(\text{C-N})$; $\omega(\text{CH}_2)$
1302	1302	1297	t(CH ₂)
1263	1263	1257	Im $\beta(\text{C}_2-\text{H})$ (Tautomeras-II)
1237	1237	1234	$\nu(\text{Im})$
1058	1060	1060	$\nu(\text{C-C})_T$; $\nu(\text{C-N})$
995			
959	950	950	$\nu(\text{C-C})$
917	921	921	$\chi(\text{Im})$
	837	837	r(CH ₂)
	747	747	r(CH ₂)
711	700	700	$\nu(\text{C-S})_T$
637	619	619	$\nu(\text{C-S})_G$
587			
258			$\nu(\text{Au-S})$
	214	219	

ν – valentinis, δ – deformacinis, β – plokštuminis deformacinis, χ – neplokštuminis deformacinis, ω – vėduoklinis deformacinis, t – sukamasis deformacinis, r – švytuoklinis deformacinis, s – simetrinis, as – asimetris, **Im**- imidazolo žiedas, **Am I** – amidas I, **T** – trans, **G** – goš.

IMHA imidazolo žiedo anglies atomų numeracija pateikiama 12 pav.



12 pav. Imidazolo žiedo anglies atomų numeracija IMHA junginyje.

Metilo grupės simetrinis valentinis virpesys $\nu_s(\text{CH}_2)$ SHINERS spektre (2853 cm⁻¹) pasislinkęs į šiek tiek trumpesnių bangos skaičių pusę lyginant su PSRS spektru (2856 cm⁻¹). Posingis gali būti siejamas su tvarkingesniu SAM išsidėstymu, kai šis adsorbuojamas ant lygaus aukso paviršiaus.

Skirtingi histidino tautomerai gali būti identifikuojami iš charakteringų Ramano juostų [19, 20]. Valentinio $\nu(\text{C}_4=\text{C}_5)$ virpesio histidino tautomerui-II juosta yra ties $1588\text{--}1583\text{ cm}^{-1}$ [22]. Virpesys aiškiai išskiriamas SHINERS spektre, tačiau PSRS spektre tai gana plati juosta. $\nu(\text{C}_4=\text{C}_5)$ juostos padėtis PSRS spektre yra pasislinkusi į tolimesnių bangos skaičių pusę lyginant su SHINERS spektru – tai parodo, kad imidazolo žiedo aplinka tirtose sistemose yra skirtinga.

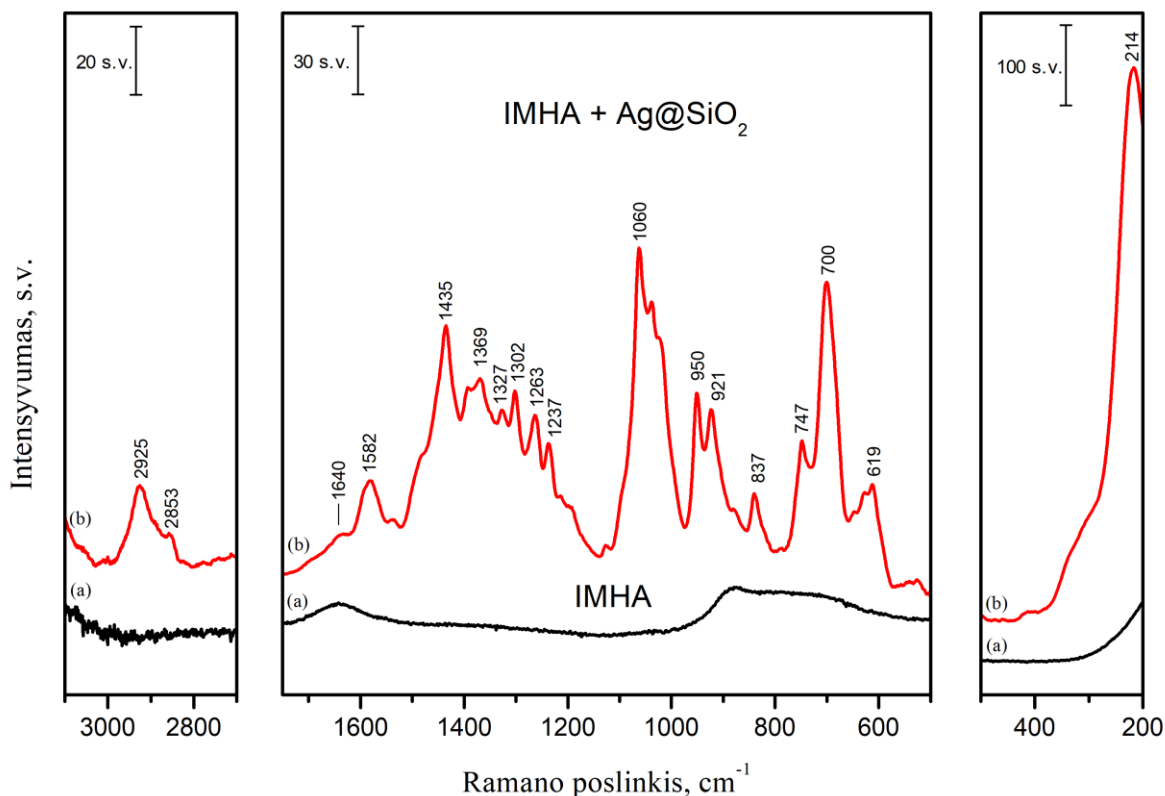
Labai intensyvi juosta ties 700 cm^{-1} priskiriama $\nu(\text{C-S})_{\text{T}}$ valentiniam adsorbuotos molekulės virpesiui *trans* konformacijoje, Atitinkama *goš* konformacijos juosta $\nu(\text{C-S})_{\text{G}}$ yra ties 619 cm^{-1} . 3,9 karto už $\nu(\text{C-S})_{\text{G}}$ didesnis $\nu(\text{C-S})_{\text{T}}$ virpesinės juostos stipris nurodo, kad adsorbuotos molekulės yra daugiausia *trans* konformacijos.

Amido grupės virpesinės juostos nėra aiškiai išskirtos nei PSRS nei SHINERS spektruose. Labai nežymi juosta ties 1640 cm^{-1} gali būti priskiriama amido-I virpesiui, kuris pagrinde siejamas su C=O valentiniu virpesiu [23]. Santykinai žemas virpesio dažnis siejamas su stipria C=O amido grupės vandeniline sąveika monosluoksnyje. Nedidelis amido-I virpesinės juostos intensyvumas gali būti susijęs su beveik lygiagrečiu C=O išsidėstymu paviršiaus atžvilgiu.

SHINERS monosluoksnio spektre santykinis $\nu(\text{C}_4=\text{C}_5)$ juostos ties 1582 cm^{-1} ir $\delta(\text{CH}_2)$ juostos ties 1435 cm^{-1} virpesių intensyvumas yra didesnis nei tų pačių juostų intensyvumas PSRS spektre. Remiantis paviršiaus atrankos taisyklėmis [24] galime manyti, kad imidazolo žiedo $\text{C}_4=\text{C}_5$ grupė yra labiau statmena paviršiaus atžvilgiu lygaus aukso elektrodo atveju (SHINERS spektras) lyginant su šiurkščiu elektrodu.

4.3. IMHA monosluoksnių SHINERS spektrai

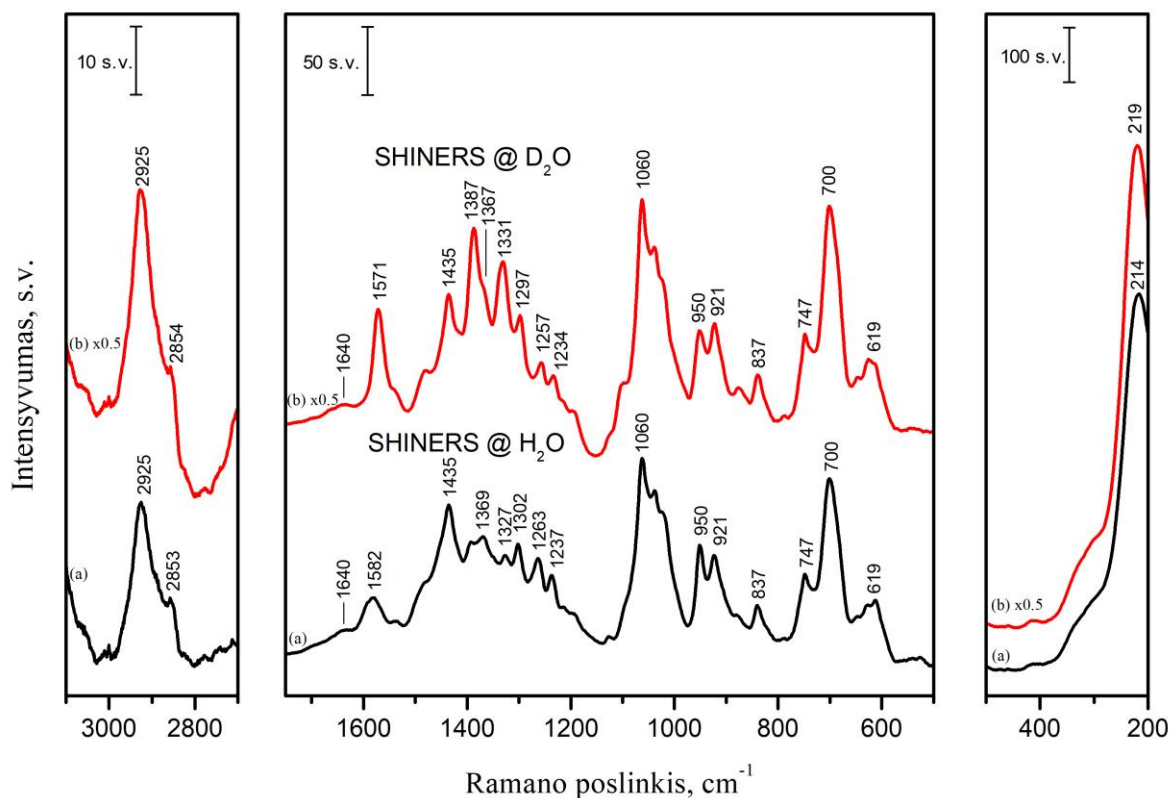
Toliau dėl gero signalo/triukšmo santykio ir viena eile geresnio signalo stiprinimo junginys su histidino grupe tirtas tik nanodalelių, padengtų išoriniu sluoksniu, sustiprintos Ramano sklaidos metodu. IMHA, adsorbuoto ant nupoliruoto Au elektrodo, Ramano sklaidos spektras ir IMHA, adsorbuoto ant nupoliruoto Au elektrodo, naudojant Ag@SiO_2 nanodaleles signalo stiprinimui pavaizduotas 13 pav.



13 pav. IMHA monosluoksnių, adsorbuoto ant nupoliruoto Au elektrodo, Ramano spektras vandeninėje terpėje (a) ir IMHA monosluoksnių, adsorbuoto ant nupoliruoto Au elektrodo, SHINERS spektras vandeninėje terpėje naudojant Ag@SiO_2 nanodaleles signalui stiprinti (b).

Kaip ir buvo galima tikėtis, lygus Au elektrodo paviršius nesustiprina Ramano sklaidos.

Siekiant patikimiau priskirti virpesines juostas, IMHA junginio spektras buvo registruotas vandens ir sunkaus vandens terpėse (14 pav.). Spektrų lyginimas H_2O ir D_2O terpėse ypatingai palengvina virpesių priskyrimą funkcinėms grupėms, turinčioms lengvai pakeičiamus vandenilio atomus. Tiriamame IMHA junginyje tai yra amido grupė ir vandeniliai, sudarantys ryšius su imidazolo žiedo N_1 ir N_3 atomais (atomų numeracija pateikta 12 pav.).



14 pav. IMHA monosluoksnio, adsorbuoto ant nupoliruoto Au elektrodo, SHINERS spektras vandenyje (a) ir IMHA monosluoksnio, adsorbuoto ant nupoliruoto Au elektrodo, SHINERS spektras sunkiame vandenyje (b).

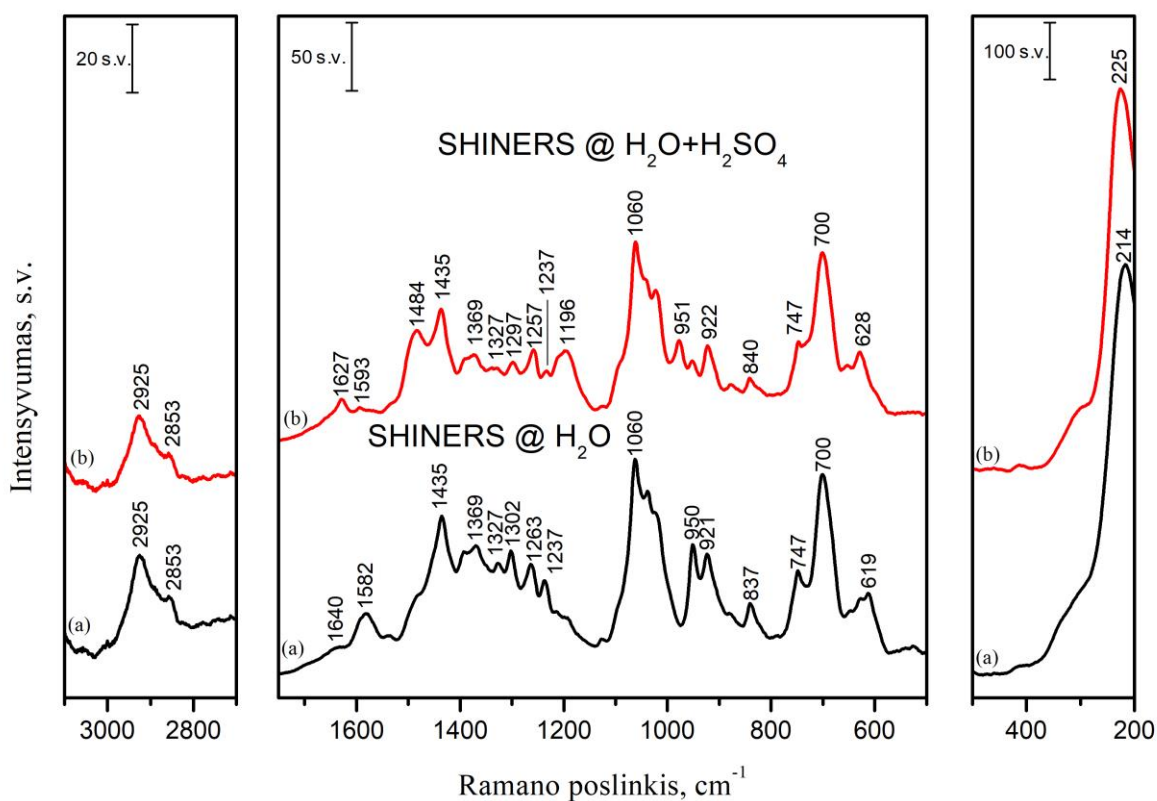
Histidino tautomerui-II būdinga $\nu(\text{C4}=\text{C5})$ virpesinė juosta ties $1588\text{--}1583\text{ cm}^{-1}$ [22] gerai regima H_2O ir D_2O terpėse užregistruotuose SHINERS spektruose.

Kita tautomerui-II būdinga juosta yra ties 1263 cm^{-1} ir 1257 cm^{-1} SHINERS spektruose, užregistruotuose atitinkamai H_2O ir D_2O terpėse. Ši juosta gerai sutampa su literatūroje pateikiamomis vertėmis – H_2O terpėje virpesys nustatytas $1265\text{--}1260\text{ cm}^{-1}$, o D_2O terpėje šio virpesio dažnis $1258\text{--}1256\text{ cm}^{-1}$ [22].

Remiantis eksperimentų duomenimis nustatyta, kad IMHA junginys tvarkingiau išsidėstė formuodamas SAM ant lygaus Au elektrodo; dominuoja histidino tautomero-II forma, kuriai charakteringi virpesiai matomi $1588\text{--}1583\text{ cm}^{-1}$ ir $1265\text{--}1260\text{ cm}^{-1}$ ruožuose; didžioji dalis adsorbavusių monosluoksnį formuojančių IMHA molekulių yra *trans* konformacijos – valentinio $\nu(\text{C-S})_{\text{T}}$ (700 cm^{-1}), *trans* konformacijai priklausančio, virpesio juostos stipris 3,9 karto didesnis už *gaš* konformacijai būdingo valentinio $\nu(\text{C-S})_{\text{G}}$ (619 cm^{-1}) virpesio juostos stiprį.

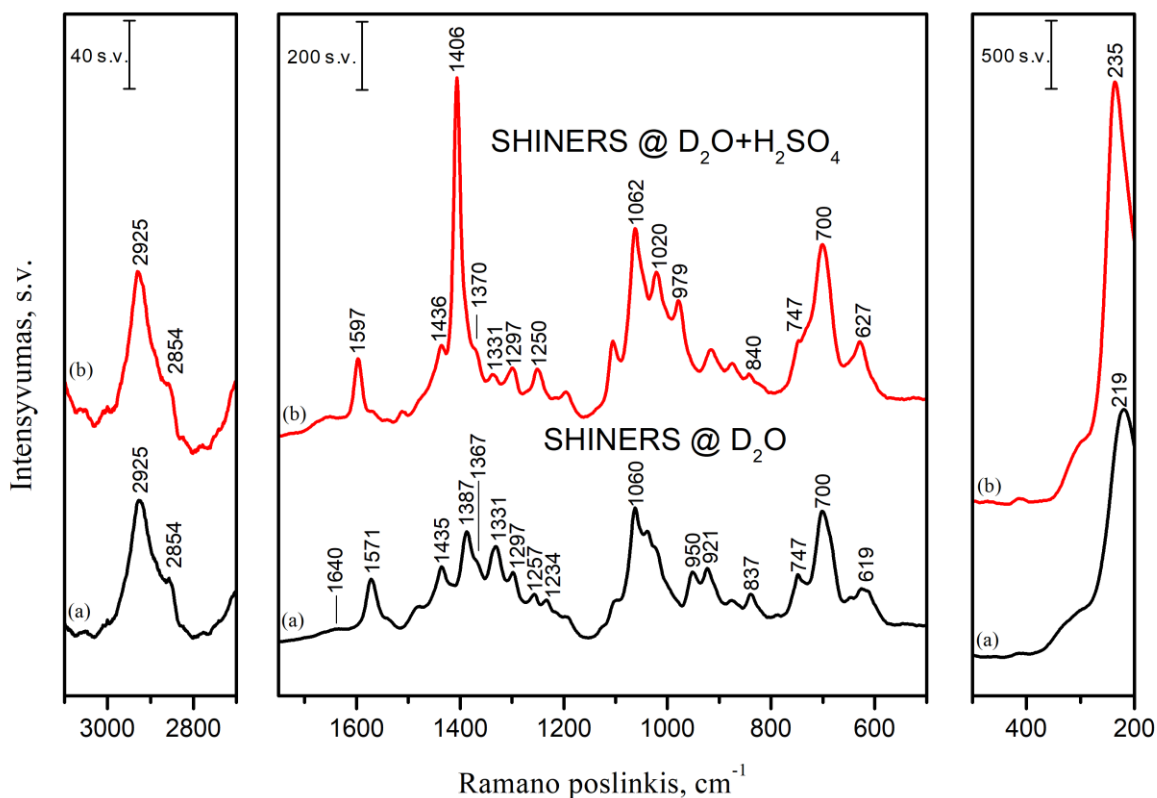
4.4. IMHA monosluoksnių spektrai rūgščioje terpėje

Siekiant ištirti imidazolo žiedo protonavimo procesą, IMHA monosluoksnių, adsorbuoto ant nupoliruoto Au elektrodo, spektrai buvo registruojami rūgščioje terpėje. Parūgštinus terpę tikimės, kad išryškės juostos, kurios indikuotų histidino struktūros pokyčius, susijusius su imidazolo žiedo protonacija. Tiek vandens, tiek sunkaus vandens atveju terpės rūgštinimui buvo įlašinta sieros rūgštis H_2SO_4 . Parūgštinto vandens pH 2,65 (15 pav. (b)).



15 pav. IMHA monosluoksnių, adsorbuoto ant nupoliruoto Au elektrodo, SHINERS spektras vandenyje (a) ir rūgštintame vandenyje (pH 2,65) (b).

Toliau eksperimentas buvo kartojamas H_2O pakeičiant į D_2O . Parūgštinto sunkaus vandens pD 2,64 (16 pav. (b)).



16 pav. IMHA monosluoksniu, adsorbuoto ant nupoliruoto Au elektrodo, SHINERS spektras sunkiame vandenyje (a) ir rūgštintame sunkiame vandenyje (pD 2,64) (b).

Naudojant rūgštintą sunkų vandenį matoma intensyvi juosta ties 1406 cm⁻¹ – tai yra aiškus pilnai protonuoto imidazolo žiedo spektrinis žymuo [22]. Taigi, naudojant sunkų vandenį mus dominanti vidurinė bangos skaičių sritis rūgštinant terpę geriau apibrėžiama, todėl toliau eksperimentuose buvo naudojamas sunkus vanduo.

4.5. IMHA monosluoksniu spektrai keičiant terpės rūgštingumą bei pK_a vertės nustatymas

Kaip jau anksčiau pastebėta monosluoksnis tvarkingiau išsidėsto ant lygaus Au paviršiaus, todėl naudosime ne šlifotą, lygų, aukso elektrodą, o stiklo plokštelę su magnetroniniu būdu suformuota aukso danga. Tokiu būdu suformuotos aukso dangos paviršius yra daug lygesnis nei poliruotas aukso elektrodas. Aiškus imidazolo žiedo protonavimo spektrinis žymuo pastebėtas naudojant sunkų rūgštintą vandenį (16 pav. (b)), todėl toliau eksperimentas atliekamas sunkiame vandenyje.

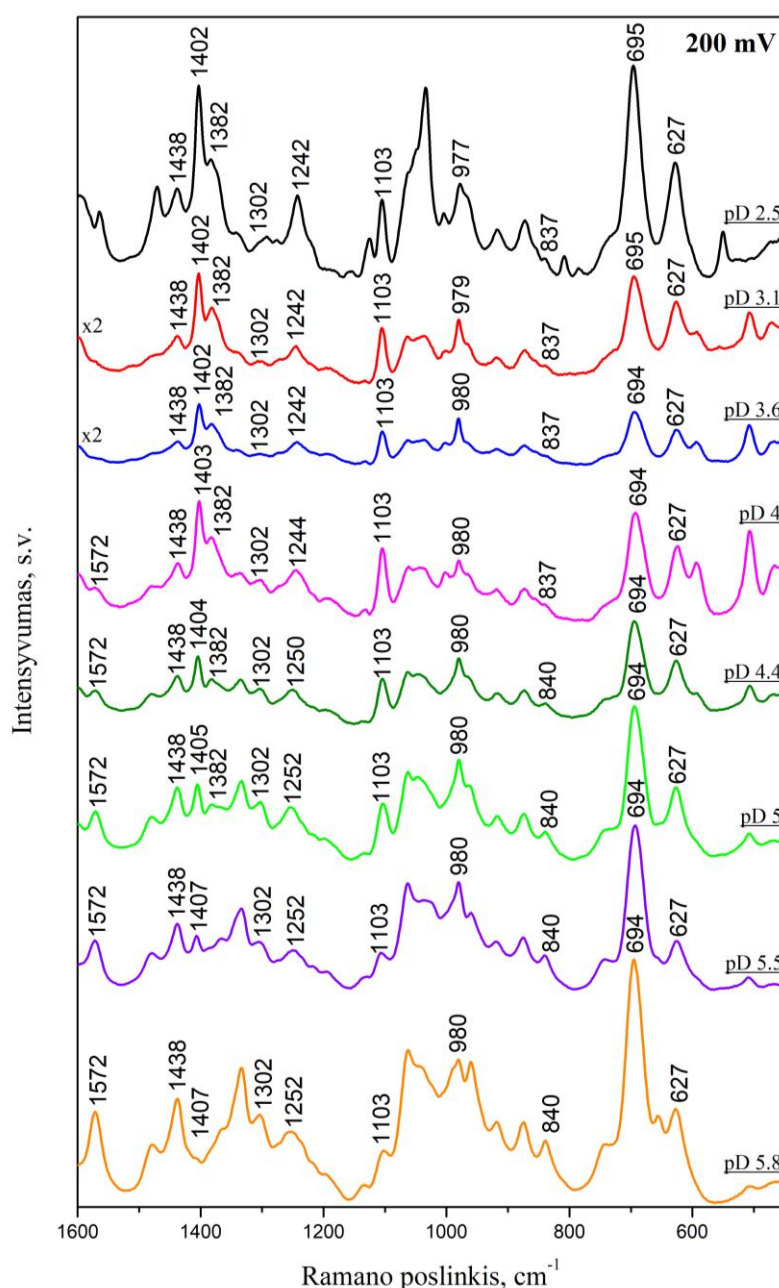
Eksperimentai buvo atliekami naudojant 8 pav. pavaizduota trijų elektrodų celę, kuri pripildyta deuteruoto buferinio tirpalo (KD₂PO₄ + Na₂SO₄). Terpė rūgštinama naudojant DCl ir

šarminama naudojant NaOD. Spektrai registruojami 2,5÷5,8 pD ruože. Terpės pD vertė nustatoma naudojant tipinį pH matuoklį ir taikant formulę, aprašytą literatūroje [25]:

$$pD = pH \text{ vertė} + 0,40. \quad (7)$$

Pusiausvyroje būsenoje darbinio elektrodo potencialas celėje yra apie 200 mV (stacionarus potencialas), todėl spektrinių matavimų metu buvo nustatytas 200 mV darbinio elektrodo potencialas.

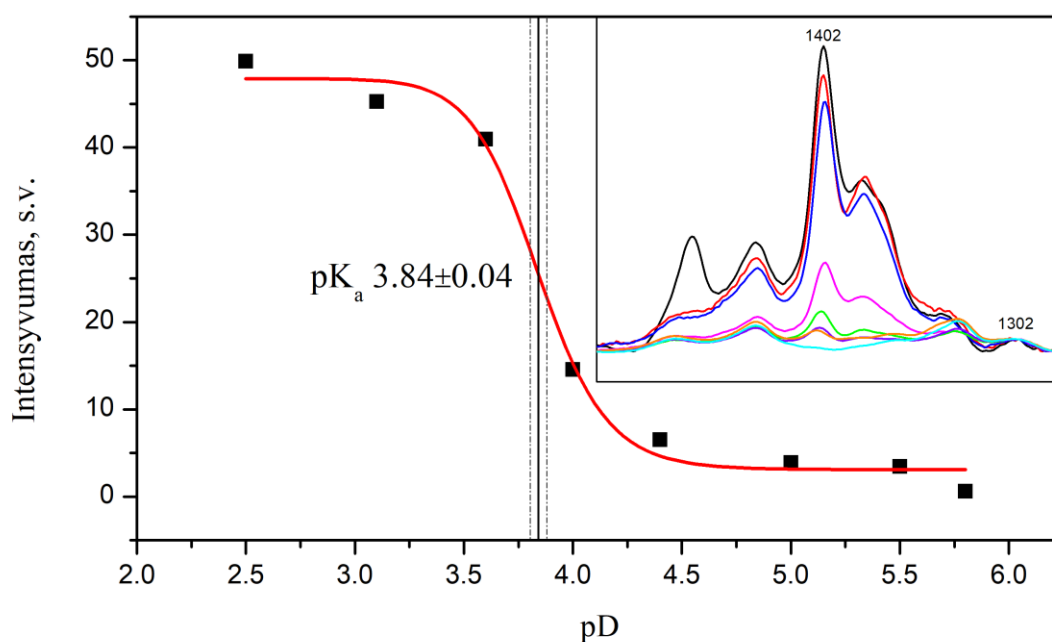
Literatūroje randama, kad histidinas egzistuoja penkiose skirtingose formose, priklausomai nuo terpės pH vertės [14], kurios pateiktos 5 pav. Arti neutralios pH vertės histidino imidazolo žiedas turi vieną protonuotą ir vieną deprotonuotą azoto atomą, žemesniame už 6,5 pH abu azoto atomai protonuoti [22].



17 pav. IMHA monosluoksniu spektrai 450-1600 cm⁻¹ srityje esant skirtingai terpės pD vertei.

Monosluoksnis išlieka stabilus tirtų pD verčių srityje, kadangi visuose spektruose matoma intensyvi juosta ties 695 cm^{-1} susijusi su valentiniu C–S virpesiu atitinkančiu molekulinės grupės S–C–C *trans* konformaciją. Mažėjant pD vertei galima išskirti du aiškius kitimus susijusius su imidazolo žiedo deuteravimu. Virpesys ties 1407 cm^{-1} intensyvėja ir pasislenka į 1402 cm^{-1} pD vertei pasiekus 2,5; ši charakteringa juosta indikuoja, kad imidazolo žiedas yra pilnai deuteruotas [22]. Nežymus virpesio dažnio sumažėjimas gali būti susijęs su teigiamą krūvį turinčių žiedų atsiradimu ir jų sąveika monosluoksnyje. Kitas spektrinis kitimas susijęs su aukšto dažnio juostos ties 1572 cm^{-1} stiprio mažėjimu. Tautomerui-I būdinga spektrinė juosta ties 1572 cm^{-1} [14, 15] mažėjant pD išnyksta, kadangi imidazolo žiedo struktūra pakinta.

IMHA monosluoksnio imidazolo žiedo pK_a vertei nustatyti buvo analizuojama SHINERS juostos ties $1402\text{--}1407\text{ cm}^{-1}$ stiprio priklausomybė nuo terpės pD vertės. Tam tikslui pasiekti spektrų stipriai buvo sunormuojami pagal CH_2 deformacinio virpesio juostą ties 1302 cm^{-1} , kurios dažnis ir pusplotis nekito eksperimentų metu. Gauta juostos santykinio stiprio nuo pD vertės priklausomybė yra sigmoidinio pavidalo (18 pav.). Aproximavus priklausomybę ir nustačius funkcijos perlinkio tašką galima rasti junginio rūgšties disociacijos konstantos pK_a vertę [26].



18 pav. Imidazolo žiedo virpesio ties $1402\text{--}1407\text{ cm}^{-1}$ santykinio stiprio priklausomybė nuo terpės pD vertės ir jos aproksimacija naudojant sigmoidinės formos funkciją. Intarpe parodyta kaip kinta sunormuoti SHINERS spektrai kintant tirpalo pD.

SHINERS spektroskopijos metodu nustatyta IMHA junginio imidazolo žiedo monosluoksnyje pK_a vertė yra $3,84 \pm 0,04$. Ši monosluoksnio rūgšties disociacijos konstantos vertė yra žymiai mažesnė už literatūroje dažnai sutinkamą histidino, esančio tirpale, $6,5\text{ p}K_a$ vertę [12].

Reikia pažymėti, kad tyrimo objektas yra ne histidinas tirpale, o monosluoksnį formuojantis junginys su histidino funkcinė grupe (IMHA). Kelios priežastys gali lemti imidazolo žiedo pK_a sumažėjimą monosluoksnyje. Visu pirma, žemėjant tirpalo pH, monosluoksnyje atsiranda teigiamų krūvių, sustiprėja elektrostatinė stūma ir monosluoksnis destabilizuojasi. Dėl šios priežasties gali sumažėti imidazolo žiedo pK_a . Antra, dielektrinė skvarba fazių riboje prie elektrodo paviršiaus yra sumažėjusi [27], tai taip pat gali turėti įtakos protonavimo procesui. Trečia, pK_a reikšmę gali keisti elektrinis laukas egzistuojantis fazių riboje Au/SAM/tirpalas. Taip pat reikia pažymėti, kad skirtingi pK_a nustatymo metodai gali duoti šiek tiek skirtingas pK_a vertes [27].

5. Pagrindiniai rezultatai ir išvados

1. Lyginant savitvarkio monosluoksnio (SAM) suformuoto iš tiolio molekulių su histidino galine funkcinė grupe ir amido grupe grandinėje (IMHA junginys) paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos (PSRS) ir nanodalelių, padengtų išoriniu sluoksniu, sustiprintos Ramano sklaidos (SHINERS) spektrus, nustatyta:
 - Dėl didesnio spinduliuotės stiprinimo esant arčiau nanostruktūrų PSRS metodu labiau stiprinami tie virpesiai, kurie yra arčiau šiurkštaus elektrodo paviršiaus – PSRS metodu užregistruotame spektre aiškiai matoma valentinio Au-S virpesio juosta.
 - SHINERS savitvarkio monosluoksnio spektruose H₂O ir D₂O terpėse identifikuotos dvi histidino tautomerui-II būdingos virpesinės juostos – 1588–1583 cm⁻¹ ir 1265–1260 cm⁻¹ srityse. IMHA monosluoksnyje dominuoja histidino tautomero-II forma.
 - S–C–C molekulinės grupės *trans* konformacija vyrauja ir lygaus ir šiurkštaus aukso elektrodo eksperimentuose.
 - Ant lygaus elektrodo adsorbuotas monosluoksnis tvarkingesnis nei ant šiurkštaus elektrodo. Tai parodo $\nu_s(\text{CH}_2)$ virpesio poslinkis iš 2856 cm⁻¹ PSRS spektre į 2853 cm⁻¹ SHINERS spektre bei $\nu(\text{C}4=\text{C}5)$ juostos ties 1582 cm⁻¹ ir $\delta(\text{CH}_2)$ juostos ties 1435 cm⁻¹ santykinis intensyvumas, kuris rodo, kad imidazolo žiedas labiau statmenas paviršiaus atžvilgiu.
2. PSRS ir SHINERS metodais gaunamų spektrų palyginimas leidžia nustatyti visos SAM formuojančios molekulės struktūrą, kadangi metodai geriau stiprina skirtingas junginio dalis. SHINERS metodas, kuriam naudotos Ag@SiO₂ dalelės, pasižymėjo geresniu signalo/triukšmo santykiu bei vienos eilės geresniu stiprinimu nei PSRS metodas.
3. Eksperimentų metu nustatytas monosluoksnio imidazolo žiedo protonacijos žymuo SHINERS spektruose ties 1402–1407 cm⁻¹, naudojant D₂O tirpiklį.
4. Pirmą kartą SHINERS metodu nustatyta savitvarkio monosluoksnio ant aukso elektrodo galinės imidazolo grupės pK_a vertė $3,84 \pm 0,04$.

Bibliografija

- [1] J. F. Li *et al.*, “Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy,” *Nature*, vol. 464, no. 7287, pp. 392–395, 2010, doi: 10.1038/nature08907.
- [2] J. R. Ferraro, K. Nakamoto, and C. W. Brown, “Introductory Raman Spectroscopy: Second Edition,” 2003, p. 434.
- [3] J. Šablinskas, V. Čeponkus, “Modernioji molekulių virpesinė spektrometrija,” p. 240, 2014.
- [4] P. Schroeder, “Infrared spectroscopy in clay science,” *Teach. clay Sci.*, vol. 11, no. January 2002, pp. 181–206, 2002.
- [5] G. Niaura, “Paviršiumi sustiprinta Ramano spektroskopija,” *Paviršiaus optinė Spektrosk.*, pp. 113–150, 2008.
- [6] J. F. Li, J. R. Anema, T. Wandlowski, and Z. Q. Tian, “Dielectric shell isolated and graphene shell isolated nanoparticle enhanced Raman spectroscopies and their applications,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, no. 23, pp. 8399–8409, 2015, doi: 10.1039/c5cs00501a.
- [7] S. Y. Ding *et al.*, “Nanostructure-based plasmon-enhanced Raman spectroscopy for surface analysis of materials,” *Nat. Rev. Mater.*, vol. 1, no. 6, p. 16, 2016, doi: 10.1038/natrevmats.2016.21.
- [8] F. Mastrangelo, G. Fioravanti, R. Quaresima, R. Vinci, and E. Gherlone, “Self-Assembled Monolayers (SAMs): Which Perspectives in Implant Dentistry?,” *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, vol. 02, no. 05, pp. 533–543, 2011, doi: 10.4236/jbnb.2011.225064.
- [9] S. Watcharinyanon, “Structure of Self-Assembled Monolayers on Gold Studied by NEXAFS and Photoelectron Spectroscopy,” 2008, p. 69.
- [10] D. K. Schwartz, “Mechanisms and Kinetics of Self-Assembled Monolayer Formation,” *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 52, pp. 107–137, 2001, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.52.1.107>.
- [11] V. Uzayisenga *et al.*, “Synthesis, characterization, and 3D-FDTD simulation of Ag@SiO₂ nanoparticles for shell-isolated nanoparticle-enhanced raman spectroscopy,” *Langmuir*, vol. 28, no. 24, pp. 9140–9146, 2012, doi: 10.1021/la3005536.
- [12] S. M. Liao, Q. S. Du, J. Z. Meng, Z. W. Pang, and R. B. Huang, “The multiple roles of histidine in protein interactions,” *Chem. Cent. J.*, vol. 7, no. 1, pp. 9–11, 2013, doi: 10.1186/1752-153X-7-44.
- [13] V. Jakubkienė, “Organinė chemija,” 2009, p. 156.

- [14] J. G. Mesu, T. Visser, F. Soulimani, and B. M. Weckhuysen, "Infrared and Raman spectroscopic study of pH-induced structural changes of L-histidine in aqueous environment," *Vib. Spectrosc.*, vol. 39, no. 1, pp. 114–125, 2005, doi: 10.1016/j.vibspec.2005.01.003.
- [15] I. Ashikawa and K. Itoh, "Raman spectra of polypeptides containing L-histidine residues and tautomerism of imidazole side chain," *Biopolymers*, vol. 18, no. 8, pp. 1859–1876, 1979, doi: 10.1002/bip.1979.360180804.
- [16] D. Paramelle, A. Sadovoy, S. Gorelik, P. Free, J. Hobley, and D. G. Fernig, "A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra," *Analyst*, vol. 139, no. 19, pp. 4855–4861, 2014, doi: 10.1039/c4an00978a.
- [17] D. A. Carter and J. E. Pemberton, "Raman spectroscopy and vibrational assignments of 1- and 2-methylimidazole," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 28, no. 12, pp. 939–946, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-4555(199712)28:12<939::AID-JRS186>3.0.CO;2-R.
- [18] G. Zhu, X. Zhu, Q. Fan, and X. Wan, "Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 78, no. 3, pp. 1187–1195, 2011, doi: 10.1016/j.saa.2010.12.079.
- [19] S. Martusevičius, G. Niaura, Z. Talaikyte, and V. Razumas, "Adsorption of L-histidine on copper surface as evidenced by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy," *Vib. Spectrosc.*, vol. 10, no. 2, pp. 271–280, 1996, doi: 10.1016/0924-2031(95)00025-9.
- [20] M. A. Bryant and J. E. P. Pemberton, "Surface Raman Scattering of Self-Assembled Monolayers Formed from 1-Alkanethiols at Ag," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 113, no. 10, p. 3629, 1991, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21755320>.
- [21] I. Matulaitiene, Z. Kuodis, O. Eicher-Lorka, and G. Niaura, "SERS characterization of imidazole ring terminated self-assembled monolayer formed from lipoic acid histamide on silver electrode," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 700, pp. 77–85, 2013, doi: 10.1016/j.jelechem.2013.04.017.
- [22] H. Takeuchi, "Raman structural markers of tryptophan and histidine side chains in proteins," *Biopolym. - Biospectroscopy Sect.*, vol. 72, no. 5, pp. 305–317, 2003, doi: 10.1002/bip.10440.
- [23] Z. Kuodis *et al.*, "Reflection Absorption Infrared Spectroscopy Characterization of SAM Formation from 8-Mercapto-N-(phenethyl)octanamide Thiols with Phe Ring and Amide Groups," *Molecules*, vol. 25, no. 23, 2020, doi: 10.3390/molecules25235633.
- [24] V. M. Hallmark and A. Campion, "Selection rules for surface Raman spectroscopy: Experimental results," *J. Chem. Phys.*, vol. 84, no. 6, pp. 2933–2941, 1986, doi:

10.1063/1.450274.

- [25] P. K. Glasoe and F. A. Long, "Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide," *J. Phys. Chem.*, vol. 64, no. 1, pp. 188–190, 1960, doi: 10.1021/j100830a521.
- [26] J. Reijenga, A. van Hoof, A. van Loon, and B. Teunissen, "Development of methods for the determination of pK_a values," *Anal. Chem. Insights*, vol. 8, no. 1, pp. 53–71, 2013, doi: 10.4137/ACI.S12304.
- [27] I. Matulaitiene, Z. Kuodis, A. Matijoška, O. Eicher-Lorka, and G. Niaura, "SERS of the Positive Charge Bearing Pyridinium Ring Terminated Self-Assembled Monolayers: Structure and Bonding Spectral Markers," *J. Phys. Chem. C*, vol. 119, no. 47, pp. 26481–26492, 2015, doi: 10.1021/acs.jpcc.5b07687.
- [28] K. P. Fears, S. E. Creager, and R. A. Latour, "Determination of the Surface pK of Carboxylic-acid and Spectroscopy," *Langmuir*, vol. 24, no. 23, pp. 837–843, 2008.

Summary

Domantas Dunajevus

SURFACE ENHANCED AND SHELL-ISOLATED SURFACE ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPIC STUDY OF SELF-ASSEMBLED MONOLAYERS WITH HISTIDINE FUNCTIONAL GROUP

Histidine is an amino acid with a unique structure that allows it to take part in various molecular interactions. The focus is on the side chain of histidine – the imidazole ring, which coordinates many metal ions. The **main aim** of this study was to identify the molecular structure of the self-assembled monolayer (SAM) formed from N-(2-(1H-imidazol-4-yl)ethyl)-6-mercaptohexanamide (IMHA) that contains a histidine side chain in an aqueous solution applying surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy (SHINERS) methods and to determine the pK_a value of IMHA monolayer.

The **main tasks** were:

1. To apply a roughened Au electrode for SERS measurements.
2. To apply Ag@SiO₂ nanoparticles for SHINERS measurements.
3. To compare the different results of SERS and SHINERS spectra.
4. To compare SHINERS spectra registered at different pH (pD) values and evaluate the pK_a of IMHA monolayer.

During this study, it was found that the symmetric stretching vibration of methylene groups is at slightly lower wavenumbers in the SHINERS spectrum (2853 cm^{-1}) compared with the SERS spectrum. This result is remarkably related to a higher level of ordering for SAM prepared on smooth Au substrate. Histidine II-tautomer form is dominant in the IMHA monolayer as indicated by bands at $1588\text{--}1583\text{ cm}^{-1}$ and $1265\text{--}1260\text{ cm}^{-1}$.

SHINERS spectra were registered at different pD values, which demonstrated the protonation of the imidazole ring as indicated by the band at $1402\text{--}1407\text{ cm}^{-1}$ and allowed to determine for the first time the pK_a value of IMHA monolayer at gold electrode by SHINERS method ($pK_a = 3,84 \pm 0,04$).

Padėkos

Už pagalbą konsultuojant visais iškilusiais teoriniais ir praktiniais klausimais nuoširdžiai dėkoju doktorantei Agnei Zdaniauskienei. Taip pat dėkoju kitiems bendradarbiams, kurie susintetino tirtą junginį, nanodaleles, paruošė monokristalinį Au elektrodą, pakonsultavo kilus klausimams.