

**Vilniaus universiteto
Fizikos fakulteto
Cheminės fizikos institutas**

Sonata Adomavičiūtė

**NERECEPTINIŲ VAISTŲ KRAUJYJE KIEKYBINĖ ANALIZĖ PAVIRŠIAUS SUSTIPRINTOS
RAMANO SKLAIDOS SPEKTRINIŲ METODŲ**

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Lazerinės fizikos ir optinių technologijų
studijų programa

Studentė	Sonata Adomavičiūtė
Darbo vadovas	prof. dr. (HP) Valdas Šablinskas
Leista ginti	2019-05-20
Recenzentas	dr. (HP) Gediminas Niaura
Cheminės fizikos instituto direktorius	prof. dr. (HP) Valdas Šablinskas

Vilnius 2019

Turinys

Įvadas	2
1 Literatūros apžvalga	3
1.1 Paviršiaus sustiprinta Ramano sklaida	3
1.1.1 Elektromagnetinis stiprinimas	6
1.1.2 Cheminis stiprinimas	9
1.2 Koloidinės nanodalelės	10
1.3 Kraujas ir jo komponentai	12
1.3.1 Kraujo <i>SERS</i> spektriniai tyrimai	13
1.3.2 Kraujo serumo <i>SERS</i> spektriniai tyrimai	15
1.3.3 Kraujo komponentų <i>SERS</i> aktyvumas	21
1.4 Aspirinas ir jo metabolizmas	22
2 Eksperimentinio tyrimo metodai	25
2.1 Medžiagos ir eksperimentinė įranga	25
2.2 Nanodalelių sintezė	25
2.3 Bandinių paruošimas	26
3 Rezultatai ir jų aptarimas	27
3.1 Koloidinių metalo nanodalelių sintezė	27
3.2 Kraujo <i>SERS</i> spektrai	32
3.3 Serumo <i>SERS</i> spektrai	36
3.4 Salicilo rūgšties kraujyje ir serume <i>SERS</i> spektrai	39
3.5 Terpės įtaka šlapimo rūgšties adsorbacijai ant koloidinių nanodalelių	44
3.6 Klinikiniai salicilo rūgšties kraujo serume <i>SERS</i> tyrimai	46
Išvados	49
Literatūros sąrašas	51
Santrauka	58
Summary	59

Įvadas

Įvairių cheminių junginių diagnostika biologiniuose skysčiuose yra aktuali šiuolaikinės medicinos problema, tai liečia ir vaistų likučių aptikimą kraujo bandiniuose [1–3]. Ypatingai tai aktualu nereceptinių vaistų atveju, nes netinkamas tokių vaistų vartojimas turi neigiamos įtakos pacientų sveikatai. Pvz., nesteroidinis priešuždegiminis nereceptinis vaistas - aspirinas tiek, Europoje tiek ir JAV vartojamas labai plačiai, nes yra daugelio vaistų veiklioji medžiaga [4]. Dažniausias jis vartojamas kaip: (I) analgetikas skausmo numalšinimui, (II) priešuždegiminis preparatas arba (III) kraują skystinanti medžiaga. Toks aspirino populiarumas, gerai išvystyta jo pardavimų rinka bei vartotojų žinių trūkumas privedė prie vis didėjančio apsinuodijimų aspirinu skaičiaus bei hospitalizacijos atvejų [5]. Šiuo metu vienas iš sunkumų su kuriuo klinikinės įstaigos susiduria, siekdamos greitai ir efektyviai diagnozuoti apsinuodijimo vaistais priežastį, yra ilga diagnostinių tyrimų trukmė. Dėl šios priežasties šiuolaikinėje medicinoje yra išaugęs sparčių diagnostikos priemonių (angl. *point of care*) poreikis. Tokio tipo tyrimuose virpesinės spektroskopijos metodai galėtų užimti svarbią vietą, tačiau dėl įvairių techninių problemų – šių metodų nepakankamai didelio jautrio, spektrų analizės sudėtingumo ir pan., jie šiuolaikiniuose klinikinuose tyrimuose yra naudojami tik epizodiškai [6]. Spektroinių metodų jautrį galima padidinti naudojant įvairias spektroinių signalų stiprinimo metodikas, iš kurių efektyviausios yra rezonansinė Ramano sklaida, paviršiaus sustiprinta IR spinduliuotės sugertis, bei paviršiaus sustiprinta Ramano sklaida (angl. *Surface Enhanced Raman Scattering - SERS*) [7]. Būtent *SERS* spektroskopijoje gali būti pasiekiamas efektyviausias (iki 10^9 kartų) spektroinių signalų stiprinimas [8]. Pagrindiniai privalumai, taikant *SERS* spektrinį metodą diagnostiniuose medicininuose tyrimuose, yra didelis metodo jautris, spektrinės analizės operatyvumas (*SERS* spektrų registravimo trukmė siekia kelias ar keliasdešimt minučių) bei ta aplinkybė, kad tyrimams yra reikalingas labai mažas (keli μ l biologinio skysčio) bandinio kiekis. Todėl, tinkamai parinkus koloidines metalo nanodaleles, šis metodas gali būti panaudojamas vaistų likučių žmogaus kraujo bandiniuose aptikimui. Paminėtos aplinkybės ir apsprendė šio darbo tikslą: Pritaikyti koloidinį *SERS* spektrinį metodą nereceptinio vaisto, aspirino, koncentracijos kraujyje diagnostiniams tyrimams.

Darbe sprendžiami tokie uždaviniai:

1. Pritaikyti koloidinių metalo nanodalelių sintezės standartines metodikas aspirino kraujyje diagnostiniams tyrimams *SERS* spektriniu metodu.
2. Nustatyti patikimus salicilo rūgšties (aspirino metabolito kraujyje) spektrinius *SERS* žymenis.
3. Įvertinti gydymo tikslams suvartojamų aspirino tablečių mažiausią *SERS* diagnostinę ribą.
4. Patikrinti aspirino tablečių suvartojimo *SERS* diagnostinio metodo galimybes, atliekant klinikiškus tyrimus.

1 Literatūros apžvalga

Elektromagnetinės spinduliuotės sąveika su medžiaga pasireiškia keliais būdais. Elektromagnetinė spinduliuotė medžiagoje gali būti išsklaidyta arba sugerta. Sklaida taip pat gali būti elastingė (kai nepakinta krantinčios ir išsklaidytos spinduliuotės dažnis, tik kryptis), vadinama Relėjaus sklaida, arba neelastingė - Ramano sklaida. Skirtingų medžiagų molekulės skirtingai sąveikauja su elektromagnetine spinduliuote, priklausomai nuo funkcinių grupių, atomų skaičiaus, orbitalių sanklodos ir t.t. Tai galima matyti sugerties ir/arba sklaidos spektruose, kurie specifiniai kiekvienai molekulei. Jais remiantis galima tiksliai atlikti kokybinę ir kiekybinę medžiagų analizę. Ramano sklaida - procesas, atrastas 1928 m. Kritęs fotonas sąveikauja su molekule, įvyksta perturbacijos (kurias plačiau aprašo kvantinės mechanikos perturbacijų teorija), dėl sąveikos išsklaidyto fotono dažnis pakinta. Medžiaga po sklaidos lieka pakitusioje energinėje būsenoje - sužadintame virpesiniame lygmenyje. Ramano sklaidos poslinkis priklauso nuo energijų skirtumo tarp sužadinto ir nesužadinto virpesinio lygmens. Tokio Ramano sklaidos metu įvykusio šuolio tikimybė yra maža ir dėl to Ramano sklaida yra labai mažo intensyvumo. Ramano sklaidos spektriniuose eksperimentuose yra naudojami didelės galios monochromatinės spinduliuotės šaltiniai - lazeriai. Proceso efektyvumą galima apibūdinti sklaidos efektyvumu skerspjūviu. Tai spinduliuotės stiprio arba galios, kurią generuoja molekulė, santykis su procesą sukeliančios spinduliuotės galia. O Ramano sklaidos efektyvusis skerspjūvis, σ_R , 10^{10} karto mažesnis už infraraudonosios (IR) spinduliuotės sugerties skerspjūvį ($\sigma_R \approx 10^{-31} \text{ cm}^2 \text{ sr}^{-1}$), efektyvumas labai mažas – taip išsklaidoma 10^{-5} kritusios spinduliuotės intensyvumo. Išsklaidytos šviesos intensyvumą, žinant efektyvųjį skerspjūvį galima aprašyti kaip priklausomą nuo kritusios spinduliuotės intensyvumo I_0 , ir efektyviojo skerspjūvio (σ) tam tikru kampu (Ω) [9]:

$$I = I_0 d\sigma / d\Omega. \quad (1)$$

Matome, jog Ramano sklaidos spektroskopija yra informatyvus metodas, pasižymintis specifiškumu molekulėms, tačiau nelabai efektyvus. Jo efektyvumas priklauso nuo krentančio į molekulę spinduliuotės elektromagnetinio lauko stiprio. Galima jį padidinti, padidinus sklaidą žadinančios spinduliuotės intensyvumą. 1974 metais atrastas *SERS* metodas leidžia padidinti Ramano sklaidos intensyvumą ir efektyvumą, taip pat Ramano sklaidos spektrinio metodo jautrį.

1.1 Paviršiaus sustiprinta Ramano sklaida

Piridino molekulių Ramano sklaidos efektyvumas labai sustiprėjo, kai molekulės buvo adsorbuotos ant šiurkštinto sidabro elektrodo [10]. Vėliau tyrinėta, kaip sidabras ir kiti taurieji metalai gali stiprinti elektrinį lauką. Ramano sklaidos stiprinimo efektas arti plazmoninių metalų nanodarinių paviršiaus vis dar nėra visiškai perprastas, nes jį sąlygoja keli efektai. Dabar manoma, jog stiprinimą sudaro du mechanizmai. Vis dėl to, didžiausią indėlį į Ramano sklaidos stiprinimą įneša elektromagnetinio stiprinimo komponentas. Yra nustatyta, jog didelio elektromagnetinio stiprinimo priežastimi

yra metale kuriamų paviršiaus plazmonų rezonansiniai reiškiniai [11].

Paviršiaus plazmonai (PP) – elektromagnetinių bangų sužadintos elektronų tankio osciliacijos ties metalo ir dielektriko paviršiumi. Jei tokie PP sužadinami makroskopinio dydžio metale ir susiejami su krentančia išorine elektromagnetinės spinduliuotės banga, jie gali skliti metalo ir dielektriko riba, suformuodami PP bangą. Jei metalo matmenys ne nano dydžio, tai, norint patenkinti rezonansui būtiną judesio kiekio tvermės dėsnį, reikalinga kitokia eksperimento konfigūracija - Otto geometrija, gardelės, bangolaidžiai [12]. Tokio atvejo čia nenagrinėsime.

Nano dydžio struktūrose, metalų nanodalelėms PP banga yra apribota jų matmenų – pati banga nesklinda paviršiumi ir jai sužadinti ypatingos geometrijos nereikia. Kai nanostruktūros dydis yra pusės PP bangos ilgio, sklaida gali lemti PP stovinčiųjų bangų susiformavimą [13]. Nanodalelėse plazmonų modos vadinamos lokalizuotais paviršiaus plazmonais (LPP) [14] sužadinamais tam tikro dažnio elektromagnetine banga, kurios dažnis sutampa su nanodalelės laisvųjų elektronų osciliacijų dažniu. Tai pasireiškia atitinkamomis LPP sugerties juostomis UV-Vis sugerties spektruose. Lenkto, kamuoto paviršiaus geometrijos struktūros (taip pat ir nanodalelės) pasižymi efektyvia palaikančia osciliuojančius elektronus jėga, sukeliančia elektronų rezonansą paviršiuje (lokalizuotas paviršiaus plazmonų rezonansas - LPPR) [12–14].

Tauriųjų metalų nanodalelių paviršiuje atsirandantį plazmonų rezonansą paaiškinti galima įsivaiduojant plokščią elektromagnetinę bangą krentančią į sferinę metalo nanodalelę. Sprendinius tokiai sistemai aprašė G. Mie, ir jie vadinami Mie sklaida [15]. Išsprendus Maksvelo lygtis metalo (indeksas m) ir dielektriko (indeksas d) riboje ir pritaikius kraštines sąlygas, gaunama sąlyga, kuri turi būti tenkinama, norint suformuoti LPP:

$$\epsilon_m(\omega) = -2\epsilon_d. \quad (2)$$

T.y. medžiagos, į kurią krinta spinduliuotė (šiuo atveju metalo) dielektrinė skvarba turi būti priešingo ženklo ir dvigubai didesnė nei medžiagos, iš kurios spinduliuotė krenta. Taigi, iš 2 lygties matome, jog turi būti tenkinamos ir sąlygos: $2|\epsilon_d| > |\epsilon_m|$ ir $\epsilon_m < 0$. Neigiamą dielektrinę skvarbą infraraudonojoje - ultravioletinėje srityje turi metalai. Juose esantys laisvieji elektronai menkai sąveikauja su jonais ir gali osciliuoti jų atžvilgiu. Taigi, jeigu krentančios spinduliuotės dažnis nėra didesnis už laisvųjų elektronų, arba plazmonų, dažnį, metalo plazmonai prisitaiko ir atkartoja - atspindi - spinduliuotę. T.y. metalai – puikūs laidininkai. Jų dielektrinė skvarba aprašoma Drude modeliu, o įskaičius menamąją dalį (slopimo koeficientą - γ), Drude – Sommerfield modeliu [16, 17]:

$$\epsilon_m(\omega) = 1 - (\omega_p^2/\omega^2) \rightarrow 1 - (\omega_p^2)/(\omega_p^2 + i\gamma\omega), \quad (3)$$

ir priklauso nuo išorinio elektromagnetinio lauko dažnio (ω), bei savojo laisvųjų elektronų osciliacijų dažnio (ω_p).

$$\omega_p^2 = (ne^2)/(\epsilon_0 m_f). \quad (4)$$

Plazmonų osciliacijų dažnis priklauso nuo elektronų koncentracijos n , ir efektinės masės m_f . Čia e - elektrono krūvis. Žinoma, visi metalai turi savitą plazmonų osciliacijos dažnį, tačiau kalbant apie *SERS*, nagrinėjami dažniausiai tėra keli - sidabras (Ag), auksas (Au), aliuminis (Al) ir varis (Cu). Plačiau skirtingų plazmoninių metalų savybes aptarsiu vėliau.

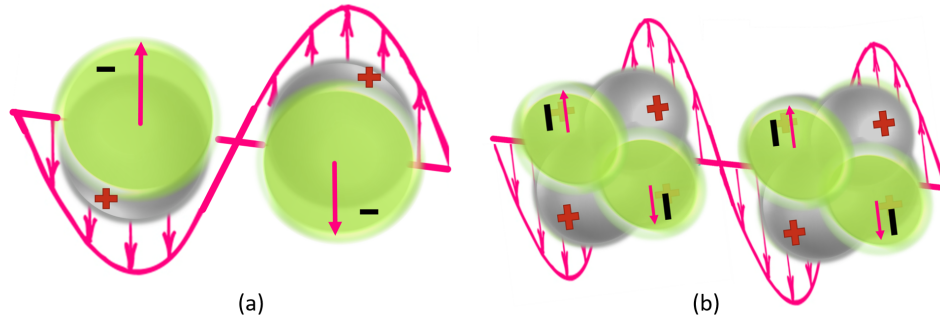
Sužadinus LPPR, tai galima pamatyti iš ekstinkcijos (arba toliau tekste vadinamų tiesiog sugerties) spektrų. Šviesai sklindant koloidiniame tirpale, elektromagnetinės bangos praranda energiją dėl sugerties ir sklaidos. Mažoms dalelėms lyginant su krentančios bangos ilgiu (aukso atveju toks dalelių dydis apie 25 nm) tik dipolinis Mie lygčių narys turi įtakos efektyviajam dalelės sugerties skerspjūviui, tada pagal Mie teoriją efektyvusis sugerties skerspjūvis [17, 18]:

$$\sigma_e = \frac{9V\epsilon_d^{3/2}}{c} \frac{\omega}{(\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_d)^2 + \epsilon_2(\omega)^2}. \quad (5)$$

Sugertis priklauso nuo sugerties efektyvumo ($\sigma_e = Q_e/\pi R^2$) pagal:

$$A = \frac{\pi R^2 Q_e N d}{\ln 10} = \frac{\pi R^2 Q_e N d}{2,303}. \quad (6)$$

Kur N - dalelių koncentracija, d - kiuvetės plotis (optinio kelio ilgis), ϵ_1 - realioji metalo dielektrinės skvarbos dalis, o ϵ_2 - menamoji. Dipolinis LPPR nanodalelei esant elektromagnetiniame lauke iliustruotas 1 paveikslėlyje ((a) dalyje). Nanodalelė yra pakankamai maža lyginant su bangos ilgiu, jos laisvieji elektronai osciluoja pagal išorinio elektromagnetinio lauko pokyčius.



1 pav. Dipolinio ir kvadrupolinio plazmonų rezonanso iliustracija. (a) - dipolinis rezonansas, (b) - kvadrupolinis.

Jeigu nanodalelė yra didesnė (100 nm ir daugiau), gali pasireikšti kvadrupolinis Mie lygčių narys (ilustruotas 1 pav. (b)).

Akivaizdu, kad elektromagnetinės spinduliuotės sugertis priklauso nuo dalelių koncentracijos (N), spindulio (R), dielektrinės skvarbos (ϵ). Tuo remdamiesi galime taikyti UV-Vis sugerties spektroskopiją siekdami nustatyti susintetintų nanodalelių dydį ir koncentraciją. Mie parodė, kad mažesnėms nei 10 nm dydžio dalelėms koloidinio tirpalo sugerties maksimumas yra ties 525 nm bangos ilgiu, nepriklausomai nuo nanodalelės dydžio. Kai nanodalelės dydis būna 20 – 100 nm, sugerties maksi-

mumas pasislenka į ilgesnių bangų pusę (batochrominis poslinkis). Didesnėms nei 100 nm dydžio dalelėms sugerties maksimumas dar labiau pasislenka link IR elektromagnetinių bangų srities, tirpalo spalva pakinta į mėlynę [13, 17].

1.1.1 Elektromagnetinis stiprinimas

Dėl bendro plazmonų ir išorinės spinduliuotės osciliavimo (atsirandančio LPPR) elektromagnetinis laukas arti nanodalelių paviršiaus labai sustiprėja. Kadangi Ramano sklaidoje dalyvauja du fotonai, krentantis ir išsklaidytas, stiprinimas priklauso nuo intensyvumo kvadrato (I^2) arba elektromagnetinio lauko stiprio ketvirtuoju laipsniu (E^4). Tokį elektromagnetinis lauko sustiprėjimą įvertinti galima stiprinimo faktoriumi (SF, angl. *enhancement factor* - EF) arba vietinio lauko intensyvumo stiprinimo faktoriumi (VLISF arba angl. *Local Field Intensity Enhancement Factor* - LFIEF) [8, 11, 19]. Kadangi Ramano sklaidos poslinkis (skirtumas tarp kritusio (ω_k) ir išsklaidyto (ω_i) dažnio) paprastai siekia iki 200 meV, sklaidos stiprinimą galime aprašyti kaip priklausomą nuo vieno, tarkim kritusio, elektromagnetinės bangos dažnio.

$$SF = SF(\omega_k) + SF(\omega_i) = (|E_P(\omega_k)|^2 |E_P(\omega_R)|^2) / (|E_0(\omega_k)|^2 |E_0(\omega_R)|^2) \approx |E_P(\omega_k)|^4 / |E_0(\omega_k)|^4. \quad (7)$$

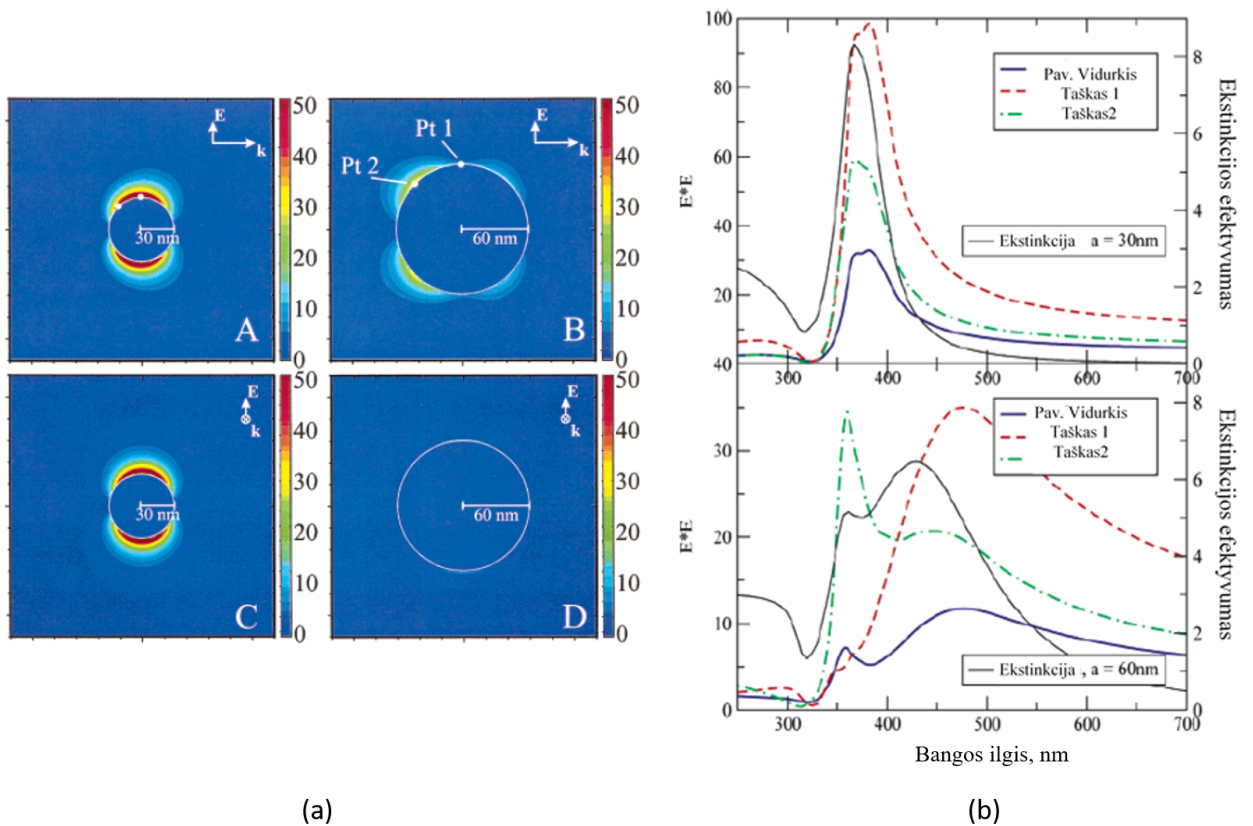
7 lygtyje aprašytas SERS stiprinimo faktorius SF, sudarytas iš dviejų dalių - stiprinimo faktoriaus krentančiai spinduliuotei SF(ω_k) ir išsklaidytai SF(ω_i). $E_0(\omega_k)$ - krentančios spinduliuotės elektromagnetinio lauko stipris paprastos Ramano sklaidos atveju, $E_0(\omega_R)$ - išsklaidytai elektromagnetinei spinduliuotei. $E_P(\omega_k)$ - atitinkamai elektromagnetinio lauko stipris krentančiai spinduliuotei SERS atveju ir $E_P(\omega_R)$ - išsklaidytai spinduliuotei SERS atveju.

Vis dėl to tokia SF išraiška yra gerai suprantama ir tiksli, nors įvertinti realų elektrinio lauko stiprį Ramano sklaidos ir SERS atveju sudėtinga. Eksperimentiškai įvertinti SF galima naudojantis išraiška [20]:

$$SF = \frac{I_P/N_P}{I_R/N_R} = \frac{I_P}{N_P} \cdot \frac{N_R}{I_R}, \quad (8)$$

kur N_P ir N_R apibūdina dalelių kiekį, atitinkamai SERS ir Ramano sklaidos atveju, nuo kurio vyksta sklaida: $N_P = (\text{molinis paviršiaus padengimas} \times \text{Avogadro skaičius} \times \text{lazerio dėmės dydis})$,

SF priklauso nuo vietinio elektrinio lauko šalia nanodalelių paviršiaus. 30 nm dydžio skersmens ir 60 nm dydžio skersmens Ag nanodalelėms elektrinis laukas yra apskaičiuotas remiantis Mie sklaidos teorija įskaitant multipolinius narius [17], pasirinkus 2 taškus (2 pav.).



2 pav. Dipolinio ir kvadrupolinio Mie sklaidos lygčių narių plazmonų rezonanso iliustracija. (a) - dipolinis rezonansas, (b) - kvadrupolinis. Čia E^*E - stiprinimo faktorius. Adaptuota iš [17].

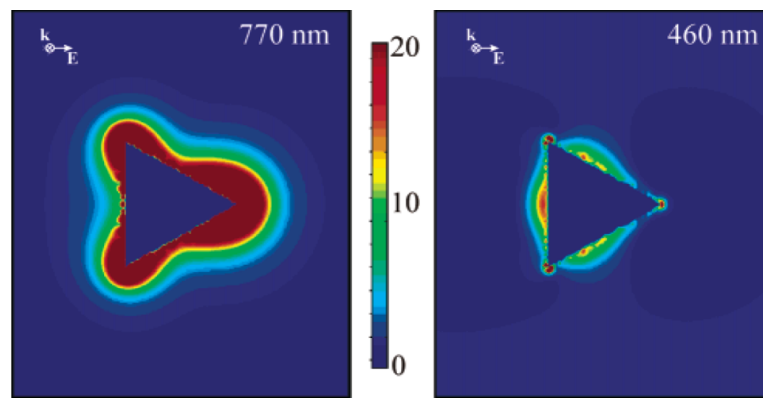
2 pav. (a), raudona spalva pažymėtas labiausiai sustiprėjęs elektromagnetinis laukas (žr. spalvų gamą paveikslėlio dešinėje). 30 nm dydžio dalelei taške 1 (Pt 1), esančiame išilgai išorinio elektromagnetinio lauko poliarizacijos krypties ir taške 2 (Pt 2), esančiame 45 laipsnių kampu nuo ašies bei aplink visą dalelę (Pav. vidurkis) pateikta ekstinkcijos efektyvumo ir SF priklausomybė nuo bangos ilgio. 30 nm dydžio dalelei gaunamas SF - 100, jos paviršiuje pasireiškia tik dipolinis narys. 60 nm dydžio dalelei matomas ir kvadrupolinis narys (matomas antras ekstinkcijos juostos maksimumas), jos SF mažesnis - 35.

Kai kur teigiama, jog didžiausias *SERS* SF gaunamas naudojant tam tikro dydžio, sidabro atveju apie 50 nm skersmens daleles [21]. Taip pat, literatūroje teigiama, jog norint pasiekti geriausią SF, reikėtų žadinti molekules šalia nanodalelių tokiu bangos ilgiu, kuris patenka į nanodalelių LPPR, matomą sugerties spektruose. Tačiau naujesni tyrimai parodė, jog nebūtinai yra taip [22]. Nustatyta, jog nėra tiesioginio ryšio tarp LPPR bangos ilgio ir *SERS* atsako. Šalia metalo nanodalelių egzistuoja ne tik šviesiosios modos - aptinkamos sugerties spektruose, tačiau ir tamsiosios modos - neaptinkamos registruojant spinduliuotę tolimajame lauke [22, 23]. Iš tiesų, SF registruojant *SERS* spektrą ir naudojant Ag koloidus net žadinant 785 nm bangos ilgio lazeriu gaunami intensyvūs *SERS* spektrai, nors sidabro koloidų plazmonų rezonanso dažniai dažniausiai yra srityje: 410 - 430 nm. Tamsiosios modos atsiranda dėl plazmonų hibridizacijos tarp nanodalelių. Dažnai tenka nagrinėti ne pavienes nanoda-

leles, o esančias tirpale arba agregavusias ant substrato. Tokių dalelių elektrinis laukas arti dalelės paviršiaus ir plazmonų rezonanso dažnis skiriasi nuo pavienių dalelių. Dviejų dalelių, esančių arti viena kitos, kuriamas elektrinis laukas gali stiprinti, arba silpninti vienas kitą ir keisti erdvinį lauko pasiskirstymą. Tokiose sistemose, plazmonų rezonansas yra pastumiamas į ilgabangę pusę, su intensyviausiu elektriniu lauku, esančiu ties tarpu tarp nanodalelių, dar vadinamu karštuoju tašku (angl. - *hot spot*) [8].

Ne sferinėms nanodalelėms, pvz. nanoprizmėms, žvaigždėms, nanokubams, nanovamzdeliams elektrinio lauko intensyvumo pagal Mie teoriją apskaičiuoti nepavyktų. Dėl šios priežasties taikomi kiti metodai [17].

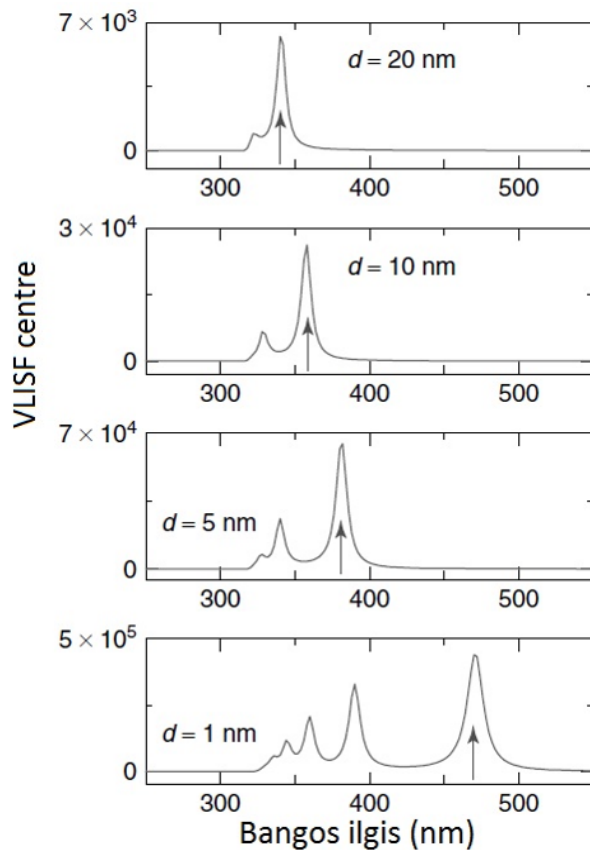
Pagal diskrečiojo dipolio aproksimacijos (DDA) metodą apskaičiuotas elektrinio lauko intensyvumas trikampės plokštelės formos nanodalelėms (krašto ilgis 100 nm, storis - 16 nm) pateiktas 3 pav. [17].



3 pav. Plazmonų rezonansas nanodalelėse, pasižyminčiose aštriais kampais. Adaptuota iš [17].

Apskaičiuotas elektrinio lauko SF naudojant du bangos ilgius - 770 nm (patenkantį į ekstinkcijos maksimumą) ir 460 nm. Matoma, kad elektrinis laukas yra kur kas stipresnis prie lenktos geometrijos ir aštrių kampų vietų. Tai vadinama šviečiančio strypo (angl. *lightning rod*) efektu.

VLISF priklausomybė nuo atstumo tarp sferinių dalelių (d), skaičiuota naudojantis elektrostatine aproksimacija [8], pateikta 4 pav. Matoma, kad atstumui tarp dalelių esant ≈ 1 nm, elektromagnetinis laukas sustiprėja $\approx 5 \times 10^5$ karto. Tačiau dalelėms tolstant viena nuo kitos, tarkim už 5 nm, stiprinimo faktorius sumažėja viena eile. Taip pat, paskaičiuota (bet čia nepateikta), jog nukrypus nuo karštojo taško zonos tik 2,6 laipsnio, elektrinio lauko stiprinimas sumažėja perpus. Tai parodo, jog tokio intensyviausio elektrinio lauko zonų plotas nanodalelėje, lyginant su visu paviršiaus plotu, yra labai nedidelis ir molekulei patekti būtent ant šios zonos tikimybė yra maža.



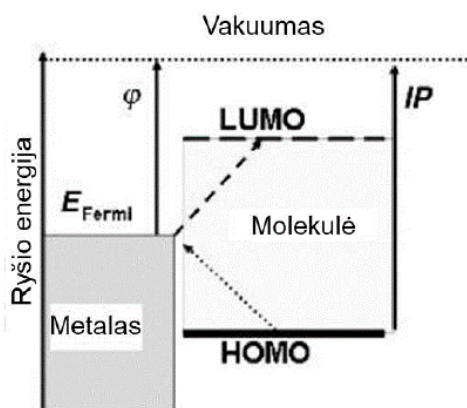
4 pav. VLISF karštajame taške tarp dviejų dalelių priklausomybė nuo atstumo. Adaptuota iš [8].

Egzistuoja ne tik elektromagnetinis molekūlės stiprinimas dėl sąveikos su plazmoninio metalo nanodalelėmis, bet ir cheminis. Molekulė gali adsorbuotis ant ND paviršiaus ir pasireikšti cheminis stiprinimas, susijęs su krūvio pernaša tarp metalo ir molekūlės. Paprastai elektromagnetinis stiprinimas siekia iki $10^6 - 10^7$ karto. O cheminis – 100 kartų [8].

1.1.2 Cheminis stiprinimas

Cheminis stiprinimas pasireiškia ant nanodalelės paviršiaus adsorbuotoms molekūlėms ir yra susijęs su rezonansiniu efektu. Molekulei adsorbavusis, t.y. prisijungus prie nanodalelės, gali būti sukuriamas krūvio pernašos kompleksas. Energiniai lygmenys tarp molekūlės HOMO ir LUMO ir metalo Fermi lygmens persiskirsto, molekūlės elektroninis lygmuo gali būti sužadintas ne tiesiogiai perkeliant elektroną iš LUMO į HOMO orbitales, bet per krūvio pernašos kompleksą dalyvaujant metalo Fermi lygmeniui (5 pav.) [8].

Tuomet žadinančios spinduliuotės dažnio energija gali būti artima elektroninei sugerčiai sužadinti reikalingos energijos. Susiformavęs krūvio pernašos tarp nanodalelės ir molekūlės kompleksas, gali padidinti Ramano sklaidos procesą iki 100 kartų. Net jeigu žadinančios bangos dažnio energija negali sužadinti elektroninės sugerties, tarp adsorbuotos molekūlės ir nanodalelės paviršiaus sukuriamas paviršiaus kompleksas – atsiranda stiprinamų virpesių atrankos taisyklės. Labiausiai stiprinami tie virpesiai, kurių poliarizuojamumas kinta statmena nanodalelės paviršiui kryptimi.



5 pav. Krūvio pernašos komplekso iliustracija. Adaptuota iš [8].

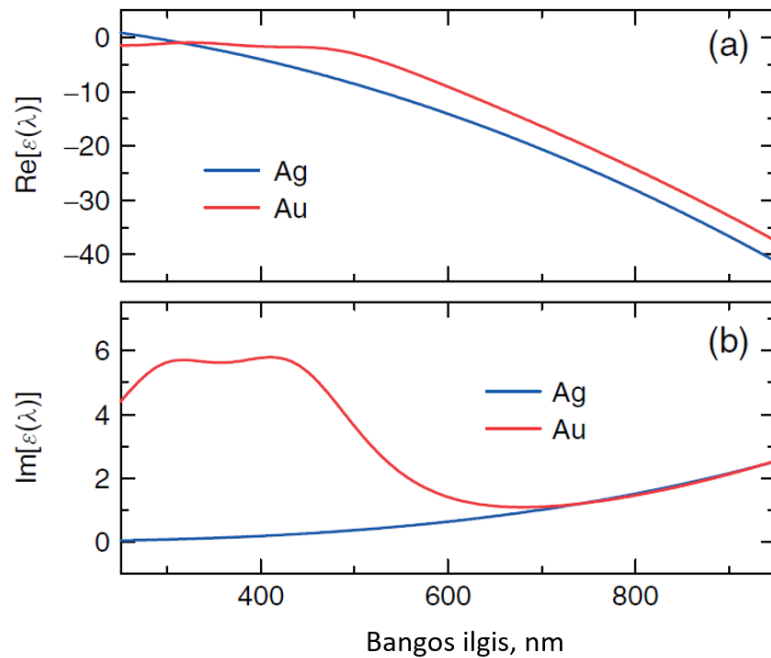
5 pav. pateikta krūvio pernašos komplekso energinių lygmenų diagrama, vaizduojanti metalo nanostruktūros Fermi lygmens energiją ir adsorbuotos molekulės HOMO – LUMO energinį tarpą.

Ramano sklaidos atrankos taisyklės išvedamos pagal kvantinės mechanikos postulatus. Molekulių virpesiai matomi Ramano sklaidos spektruose, kai bent viena iš poliarizuojamumo tenzoriaus komponentių kinta [8, 11] (poliarizuojamumas apibūdina molekulės savybę esant išoriniame monochromatinės elektromagnetinės spinduliuotės lauke indukuoti dipolinį momentą). *SERS* atveju atsiranda papildomos atrankos taisyklės. Kadangi jau aišku, jog net nedaug nutolus nuo nanodalelės paviršiaus, elektromagnetinio lauko stiprinimas susilpnėja, labiausiai stiprinami tų molekulės funkcinių grupių virpesinių modų intensyvumai, kuriomis molekulė orientuota arba adsorbavusis ant nanodalelės. Taip pat labiausiai stiprėja virpesiai, kurių transliacinis momentas sutampa su plazmonų osciliacijų kryptimi - yra statmenas nanodalelės paviršiui.

1.2 Koloidinės nanodalelės

Dažniausiai ir plačiausiai *SERS* spektriniuose tyrimuose naudojamos yra Au ir Ag nanodalelės. Dėl to šiame skyriuje šių dviejų plazmoninių metalų nanodalelių savybes ir panagrinėsiu. Kaip paminėta ankščiau, elektromagnetinio lauko stiprinimui šalia metalo nanodalelės svarbus parametras yra dielektrinės skvarbos funkcija. Tinkamas metalas turi pasižymėti neigiama realiaja dielektrinės skvarbos dalimi ir taip pat maža menamąja dalimi. Menamoji dalis nusako metalo nanodalelės sugertį, taigi ir elektromagnetinio lauko nuostolius. Būtent jie ir lemia mažesnę elektromagnetinio lauko stiprinimą.

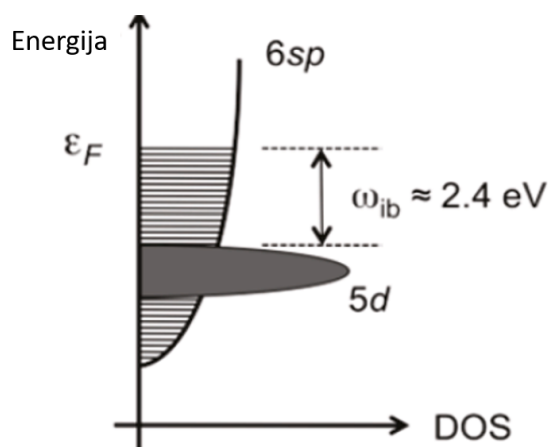
6 pav. pateikti dviejų tauriųjų metalų - sidabro (Ag) ir aukso (Au) dielektrinės skvarbos funkcijų grafikai. Matome, kad sidabro ir aukso realioji dielektrinės funkcijos dedamoji regimojoje srityje yra neigiama - tenkinama sąlyga sužadinti plazmonų rezonansui. Tačiau menamoji dielektrinės funkcijos dedamoji - atsakinga už sugertį, taigi ir spinduliuotės nuostolius Au, srityje iki 600 nm bangos ilgio, yra didesnė. Dėl to auksas laikomas tinkamu plazmoniniu metalu ilgesnių nei 600 nm bangos ilgis elektromagnetinių bangų srityje.



6 pav. Sidabro ir aukso dielektrinės skvarbos funkcijos (menama dalis apačioje, realioji – viršuje). Adaptuota iš [14].

Sidabras pasižymi maža realiąja dielektrinės skvarbos dalimi, taigi ir dideliu elektromagnetinio lauko stiprinimu. Galima paminėti, jog UV srityje (mažesnių bangos ilgių nei 350 nm) sidabro menamoji dielektrinės funkcijos dalis išauga, taigi stiprinimas nebėra toks didelis. Šioje srityje galima naudoti kitą metalą - Al, kuris pasižymi didesniu stiprinimu nei Ag.

Sidabro atveju menamąją dalį išreikšti galime šiek tiek pakeitę Drude modelį. Tačiau auksas Drude modeliu negali būti pilnai aprašytas, dėl savo elektronų juostos struktūros. Nanodalelei sąveikaujant su elektromagnetine spinduliuote, elektronai gali būti sužadinti į aukštesnę energinę juostą. Aukso atveju tokiam sužadininimui reikalingas dažnis yra artimas savajam plazmonų dažniui, kitiems metalams jis būna didesnis - UV srityje. Aukso tarpjuostinės pernašos paaiškinimas pateiktas 7 pav. $5d$ energijos lygmuo persikloja su $6sp$ hibridizuotu lygmeniu. $5d$ lygmenyje būsenų tankis (angl. *density of states* - DOS) didesnis, todėl fotonas gali sužadinti elektroną iš d lygmens į Fermi lygmenį. Energijų skirtumas lygus 2,4 eV - dėl tokios tarpjuostinės pernašos atsiranda sugertis, kai $\lambda < 600$ nm.



7 pav. Aukso tarpjuostinės pernašos paaiškinimas. DOS - būsenų tankis, ω_{ib} - energijų tarpaukso d ir Fermi lygmenų. Adaptuota iš [14].

Dėl didesnio realios dielektrinės sklaidos nario, Aukso LPPR juosta sugerties spektruose yra platesnė ir gaunamas elektromagnetinio lauko stiprinimas *SERS* spektroskopijoje mažesnis. Tačiau Au pasižymi kitu privalumu: jis mažiau oksiduoja palyginus su Ag, taigi Au nanodalelės yra stabilesnės.

1.3 Kraujas ir jo komponentai

Kraujas yra vienas iš biologinių skysčių, atliekantis transportinę funkciją t.y. padedantis transportuoti medžiagas tarp skirtingų kūno audinių. Jis sudarytas iš skystų (plazma) ir ląstelių komponentų. Ląsteliniai komponentai sudaro 40% - 50% kraujo tūrio. Ląstelinius komponentus sudaro trijų tipų ląstelės: eritrocitai, leukocitai ir kraujo plokštelės. Kraujo plazma sudaryta iš 91% - 92% vandens ir 7% proteinų. Likusią dalį sudaro mineralinės druskos, organiniai komponentai - angliavandeniai, lipidai (pernešami baltymais), amino rūgštys, nukleotidai ir didelis kiekis metabolitų. Plazmos funkcija yra palaikyti osmosinį spaudimą ir reguliuoti mineralų, angliavandenių, lipidų ir t.t. metabolizmą, palaikyti jonų pusiausvyrą. Taip pat apsaugoti nuo toksinų, patogenų ir ligos sukėlėjų, palaikyti kūno temperatūrą. Serumą nuo plazmos skiriasi tik tuo, jog yra gaunamas kai kraujui leidžiama sukrešėti, priešingai nei plazmos atskyrimo atveju. Tai taip pat skystasis kraujo komponentas, bet neturintis krešėjimo faktorių (fibrinogeno, protrombino ir kitų). Plazmos ir serumo pH dažniausiai yra 7,35 - 7,45.

Kraujo plazma ir serumas yra biologiniai skysčiai, dažniausiai naudojami diagnostikoje. Plazma gaunama centrifuguojant kraują kartu į jį įdėjus antikoagulantų - medžiagų, neleidžiančių kraujui sukrešėti. Serumą atskiriamas sukrešinus kraują. Tam dažniausiai naudojami specialūs indeliai, į kuriuos iškart paimamas kraujas yra sumaišomas su koaguliantais. Kraujo serume aptinkamas didžiulis skirtingų metabolitų kiekis - kolkas literatūroje pateikti virš keturių tūkstančių skirtingų medžiagų, esančių žmogaus kraujo serume [24]. Žmogaus serumo albuminas - labiausiai pasitaikantis (54%)

proteinas plazmoje ir serume. Kiti proteinais - globulinas, fibrinogenas (tik plazmoje), fermentai, hormonai ir t.t.

Norint taikyti spektrinę analizę biologiniams skysčiams sunkumai kyla dėl to, jog daugelio serume esančių metabolitų koncentracijos varijuoja apie +/- 50%, kai kurių - +/- 100% (tokių kaip D-gliukozė, L-laktino rūgštis, L-glutaminas, glicino) priklausomai nuo paciento savybių: amžiaus, lyties, genetinių savybių, kitų vaistų vartojimo, patologinių pakitimų, mitybos ir aktyvumo lygio. Taigi siekiant sukurti patikimą ir veikiantį diagnostinį metodą jį turi būti atsižvelgiama.

SERS spektroskopinė metodika, kurios metu naudojamos sidabro arba aukso nanodalelės, siekiant aptikti tam tikrai ligai būdingus biožymenis remiasi nanodalelių funkcionalizacija. Svarbu, kad būtent tos molekulės, kurių spektrinius žymenis norima aptikti būtų arti nanodalelės paviršiaus. Nanodalelių funkcionalizavimo procedūra yra sudėtinga ir ne visada lemia geriausias rezultatus. Spektrinis atsikartojamumas mažas, nes biologiniuose skysčiuose yra daug skirtingų biomolekulių, turinčių tas pačias funkcines frupes, kurios taip pat gali jungtis su funkcionalizuota nanodalele. Jei vieno paciento kraujyje ar jo skystuosiuose komponentuose yra skirtingas santykis tokų molekulių, tai gali pakeisti užregistruotus spektrinius duomenis. Galima taikyti *SERS* metodiką ir kitaip - naudoti ne funkcionalizuotas nanodaleles, leisti prie jų prisijungti kuo daugiau molekulių ir metabolitų, turinčių skirtingas funkcines grupes ir analizuoti gautus spektrus, ieškant biomolekulėms būdingų spektrinių žymenų. Tokie žymenys, tikimasi, sumažins skirtumus tarp pacientų ir leis gauti greitą diagnostikos rezultatą.

1.3.1 Kraujo *SERS* spektriniai tyrimai

Galimybė atlikti biologinių skysčių spektrinę analizę turi daug privalumų. Biologiniai skysčiai turi gausią sudėtį metabolitų, gali suteikti biocheminę ir biologinę informaciją. Pagal medžiagų kiekį arba tam tikrų medžiagų buvimą sprendžiama apie paciento būklę, sveikatą, diagnozuojamos ligos. Jie lengvai gaunami. Biologinių skysčių, dažniausiai kraujo ir jo komponentų, analizė atliekama pasinaudojant chromatografiniais metodais. Efektyvioji skysčių chromatografija (angl. *high performance liquid chromatography - HPLC*) įgalina aptikti mažas medžiagų koncentracijas kraujyje: nM, μM eilės - priklausomai nuo medžiagos. Tačiau galimybė aptikti medžiagas spektroskopiniais tyrimais yra daug žadanti ir labai patraukli.

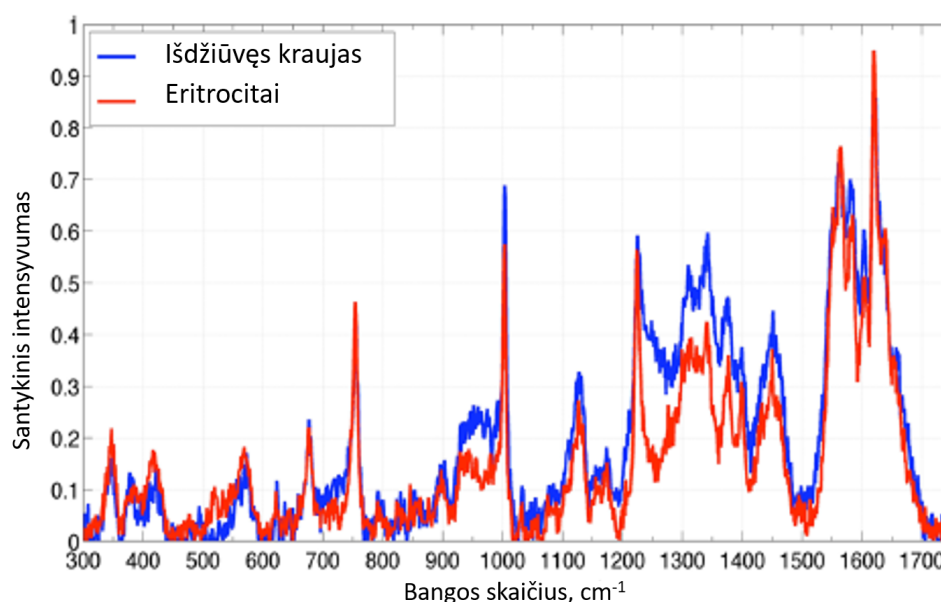
Spektrinė analizė, lyginant su chromatografiniais metodais pasižymi tokiais privalumais:

1. operatyvumu - spektrą užregistruoti galima greitai (spektrų registravimo trukmė siekia kelias ar keliasdešimt minučių), beveik iškart galima nustatyti, ar medžiaga yra kraujyje ir kokia jos koncentracija;
2. reikia labai nedidelio bandinio kiekio - užtenka laišuko kraujo, seilių ar kitų skysčių;
3. patys skysčiai nėra užteršiami pašalinėmis medžiagomis kaip naudojantis chromatografiniu metodu;
4. perspektyvu panaudoti kuriant greitą diagnostikos priemonių (angl. *point-of-care*) testus.

Dėl didelio skaičiaus komponentų, esančių kraujyje ir serume, spektrinė jų analizė, mechaniškai neišskiriant pavienių komponentų (kaip chromatografijos atveju) yra sudėtinga. Literatūroje vis dar nėra pateikta daug kraujo *SERS* spektrų ir straipsnių, analizuojančių spektrinę kraujo sudėtį, užregistruotą spektrine *SERS* metodika. Kraujo *SERS* spektrai analizuoti [25–27], darbuose. Kiek žinoma, serumo ir plazmos *SERS* spektrų literatūroje aptinkama daugiau [3, 28, 28–30, 30–33], tačiau ir jų analizė sudėtinga. Galima pradėti palyginant kraujo Ramano sklaidos ir *SERS* spektrus.

Tiek Ramano sklaidos spektrams gauti, tiek ir *SERS*, labai svarbus žadinančios bangos ilgis. *SERS* arba Ramano sklaidos spektrams registruoti dažniausiai žadinama regimąja ar artimąja infraraudonąja (785 nm) spinduliuote.

Žadinant 785 nm bangos ilgio lazeriu užregistruojamas prerezonansinis kraujo Ramano sklaidos spektras, kuriame matomos spektrinės juostos būdingos raudoniesiems kraujo kūneliams, tiksliau hemoglobiniui ir oksihemoglobiniui [34], [26]. 8 pav. pateiktas išdžiovinto kraujo Ramano sklaidos spektras yra beveik identiškas deoksiduotiems eritrocitams. Spektre taip pat matomos proteinų spektrinės juostos, amido I juosta ties 1650 cm^{-1} , CH_2 ir CH_3 deformacinės modos pirminių amino rūgščių grandinėje ties 1446 cm^{-1} , fenilalanino juosta ties 1004 cm^{-1} . Žadinant trumpesnių bangų ilgių lazeriais (488 nm, 514 nm, 568 nm, ir 633 nm) taip pat dominuoja hemoglobino ir oksihemoglobino rezonansinės Ramano sklaidos spektrinės juostos.

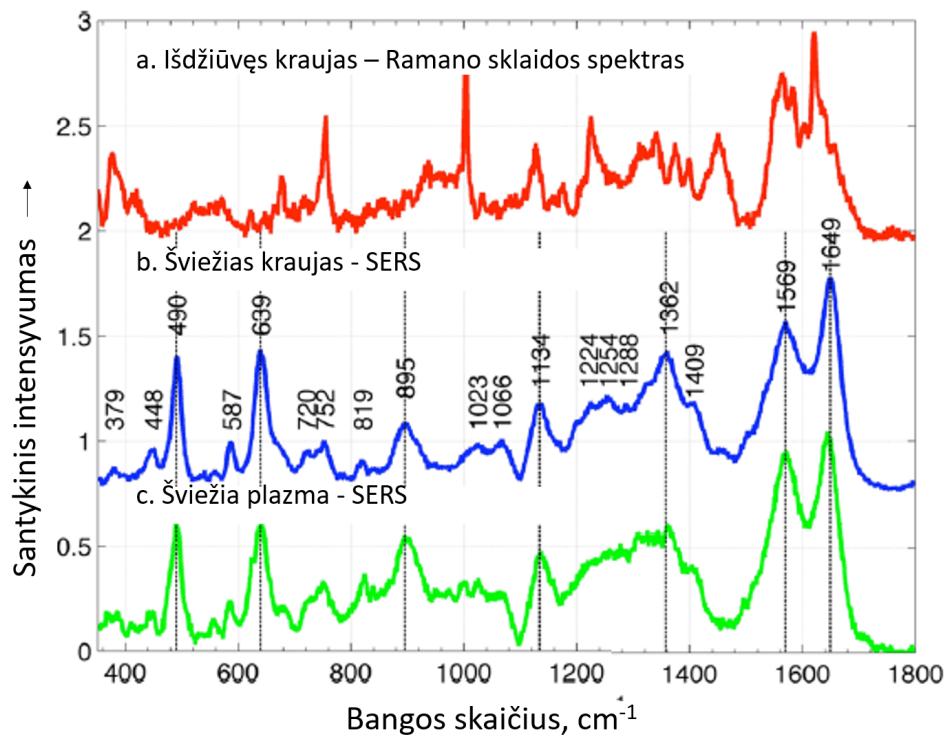


8 pav. Kraujo ir eritrocitų *SERS* spektrai. Adaptuota iš [26].

Visai kitokia situacija matoma kraujo *SERS* spektruose. Naudojant šią metodiką galima pamatyti ne tik eritrocitų spektrus, kas neišvengiama Ramano sklaidos atveju, tačiau aptinkamos mažos molekulės ir metabolitai, esantys kraujyje. Premasiri *et al.* [26] užregistruotuose *SERS* ir Ramano sklaidos kraujo spektruose, žadinant 785 nm bangos ilgio lazeriu, nėra tokių pat spektrinių juostų, kas reiškia, jog *SERS* spektrai gaunami ne dėl eritrocitų ar kitų ląstelių kraujo komponentų virpesinių modų.

Taip pat, 514,5 nm ir 785 nm bangos ilgio lazeriu žadinant kraujo Ramano sklaidą, užregistruoti spektrai skiriasi tarpusavyje [26]. Žadinant kraują 514,5 nm bangos ilgio lazeriu, *SERS* spektruose galima identifikuoti hemo grupę [25]. Boyd *et al.* teigia, kad žadinami kraują 532 nm bangos ilgio lazeriu, spektras gautas panašus į Ramano sklaidos spektrą [27].

Žadinant 785 nm bangos ilgio lazeriu kraujo *SERS* spektras gautas toks pat kaip plazmos [26] (9 pav.), kas parodo, jog kraujo *SERS* spektrinės juostos atsiranda dėl mažų molekulių, esančių ir serume, virpesinių modų. Kraujo *SERS* spektruose galima aptikti šlapimo rūgšties, hipoksantino, žmogaus serumo albumino (ŽSA) ir hemoglobininui būdingų spektrinių juostų [35].



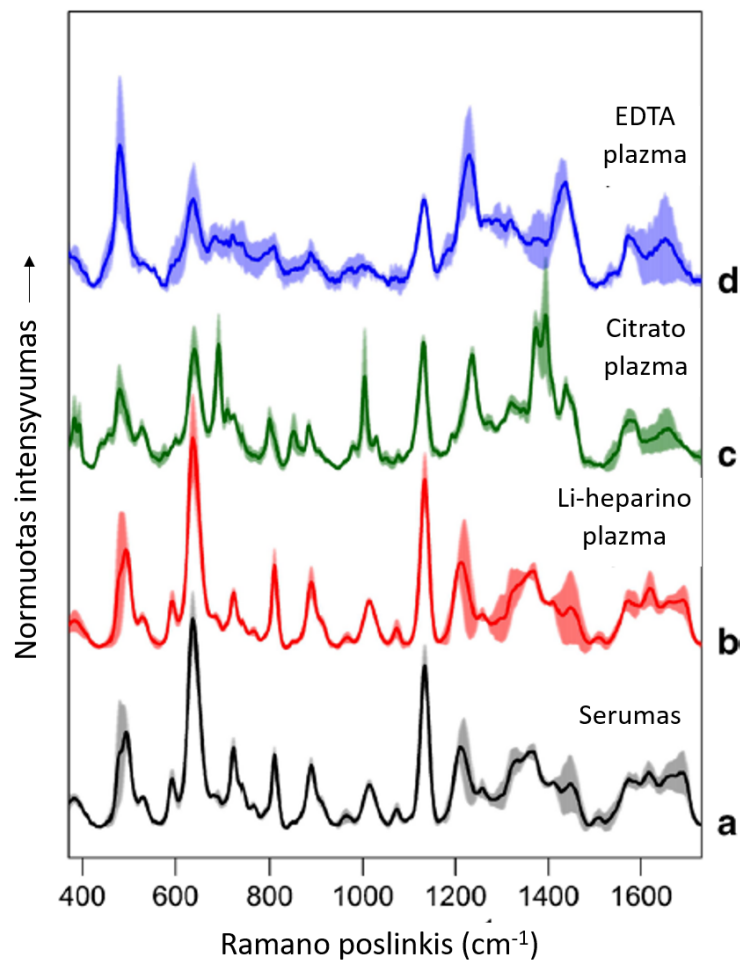
9 pav. Kraujo Ramano sklaidos (a), kraujo *SERS* (b) ir plazmos *SERS* (c) spektrai. Registruota žadinant 785 nm bangos ilgio lazeriu. Adaptuota iš [26].

Taigi keičiant žadinančios bangos ilgį, kraujo *SERS* spektruose galima pamatyti spektrines juostas, būdingas skirtingoms baltymų grupėms, metabolitams, kurių Ramano sklaidos spektruose nematytume. *SERS* spektroskopijos taikymas kraujui taip pat gali būti naudojamas teismo ekspertizėje, aptinkant kraujo pėdsakus ant rūbų ar kitų audinių net jei jie atskiesti santykiu 1:100000 [27, 35].

1.3.2 Kraujo serumo *SERS* spektriniai tyrimai

Kaip minėta anksčiau, serumas nuo plazmos skiriasi tik krešėjimo faktorių nebuvimu (juos sudaro daugiausia baltymai, fermentai). Išties, literatūroje pateiktų spektrų daugelio juostų padėtis ir forma vizualiai atrodo panašios. Be to, reikia nepamiršti, kad norint gauti kraujo plazmą, papildomai į kraują

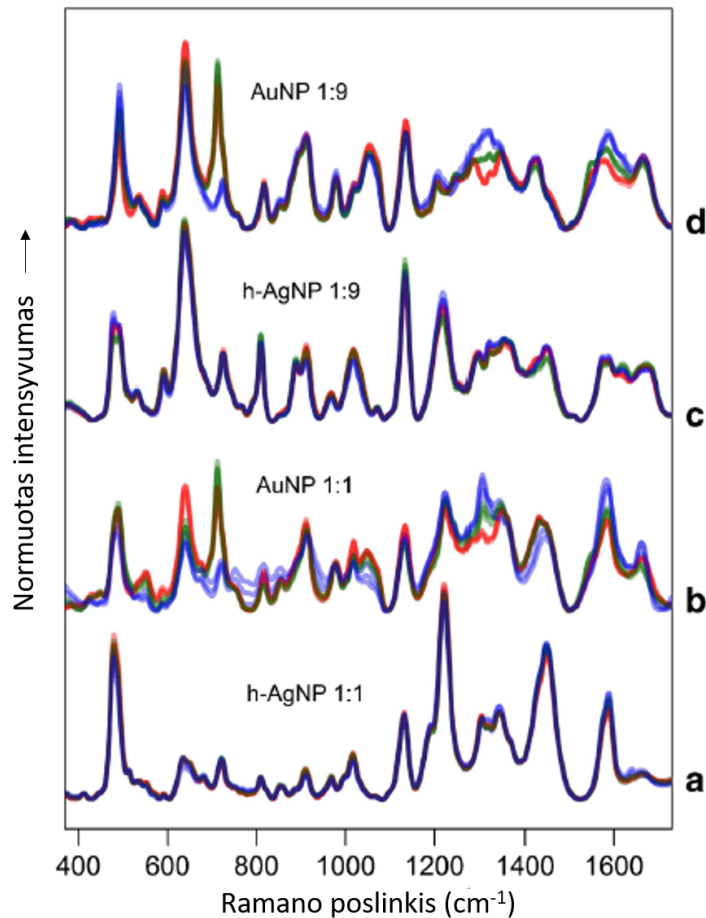
būtina įmaišyti antikoagulantų - pašalinių medžiagų. Jie gali apsunkinti spektrinę interpretaciją. Tarp jų dažniausiai naudojami EDTA (etilendiamintetraacto rūgštis) ir trinatris citratas. Heparinas, kitas dažnai naudojamas antikoaguliantas, nepakeičia užregistruojamų plazmos spektrų [28] (žiūrėti paveikslėlį 10). Paveikslėlyje matomos citratui ir EDTA būdingos intensyvios spektrinės juostos, kurios užgožia plazmos spektrines juostas. Heparino atveju *SERS* spektre nepastebimos pašalinės spektrinės juostos, nes šio eksperimento metu plazmos bandiniai buvo filtruoti siekiant gauti intensyvesnį *SERS* spektrą. Heparino molekulinė masė didelė ir jis išfiltruojamas iš bandinio kartu su plazmos baltymais. Gaunamas filtruotas plazmos spektras savo forma ir spektrinėmis juostomis panašus į serumo spektrą.



10 pav. *SERS* spektrai plazmos, gautos naudojant skirtingus antikoaguliantus. Iš apačios į viršų: serumas, plazma su heparinu, plazma su citratu, plazma su EDTA. Adaptuota iš [28].

Žadinančio bangos ilgio pasirinkimas *SERS* spektrams registruoti taip pat gali daryti įtaką gaunamiems rezultatams. Žadinant kraujo bandinius 514 nm spinduliuote gaunami karotinoidų rezonansinės paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos (PSRRS arba angl. *SERRS*) spektrai, nes šie bangos ilgiai patenka į karotinoidų sugerties juostą (400 nm - 530 nm) [28]. Serume jų koncentracija varijuoja nuo 0,2 iki 0,5 $\mu\text{mol/L}$ [36]. Bandinio filtravimas <3 kDa pašalina karotinoideus ir jų spektrinių juostų *SERS* spektre nebesimato.

Sunkumai norint analizuoti *SERS* serumo ar plazmos spektrus kyla dėl taikomų skirtingų eksperimentinių metodų, nuo ko gali priklausyti ir užregistruojamas *SERS* spektras. Literatūroje pateikti žmogaus plazmos *SERS* spektrai savo forma šiek tiek skiriasi (11 pav.) priklausomai nuo plazmos ir koloido maišymo santykio ir nuo eksperimento būdo (9 pav.).



11 pav. Kraujo plazmos *SERS* spektrai, užregistruoti naudojant koloidinį *SERS* metodą, kai plazmos ir nanodalelių maišymo santykis su Ag ir Au nanodalelėmis 1:9 ir 1:1. Adaptuota iš [28].

Dažnai literatūroje naudojama koloidinio *SERS* skystoje terpėje metodika. Serumo arba plazmos bandinys ir koloidinis aukso arba sidabro tirpalas maišomas santykiu 1:1 [3, 28, 30–33]. Santykiu 1:9 [28, 29] arba kitu. Prieš registruojant spektrą, palaukiama kelias valandas, kol metabolitai adsorbuosis ant nanodalelių paviršiaus. Registruojami tirpalo spektrai.

Naudojant tokį bandinio paruošimo būdą, reikia atsižvelgti į tai, kaip nanodalelės gali sąveikauti su biologinio skysčio molekulėmis.

1. Gali būti svarbu tai, jog koloido ir kraujo pH skiriasi, o gaunami *SERS* spektrai priklauso nuo terpės pH [37], nes nanodalelės dažniausiai (šiuose eksperimentuose) yra stabilizuotos elektrostatiškai, t.y. apvalkalu, kuris turi krūvį. Keičiant pH reguliuojama elektrostatinė sąveika tarp nanodalelės ir bandinio molekulių. Prie nanodalelių paviršiaus tuomet jungiasi tam tikros

molekulės, kurių jungimosi energija yra palankiausia.

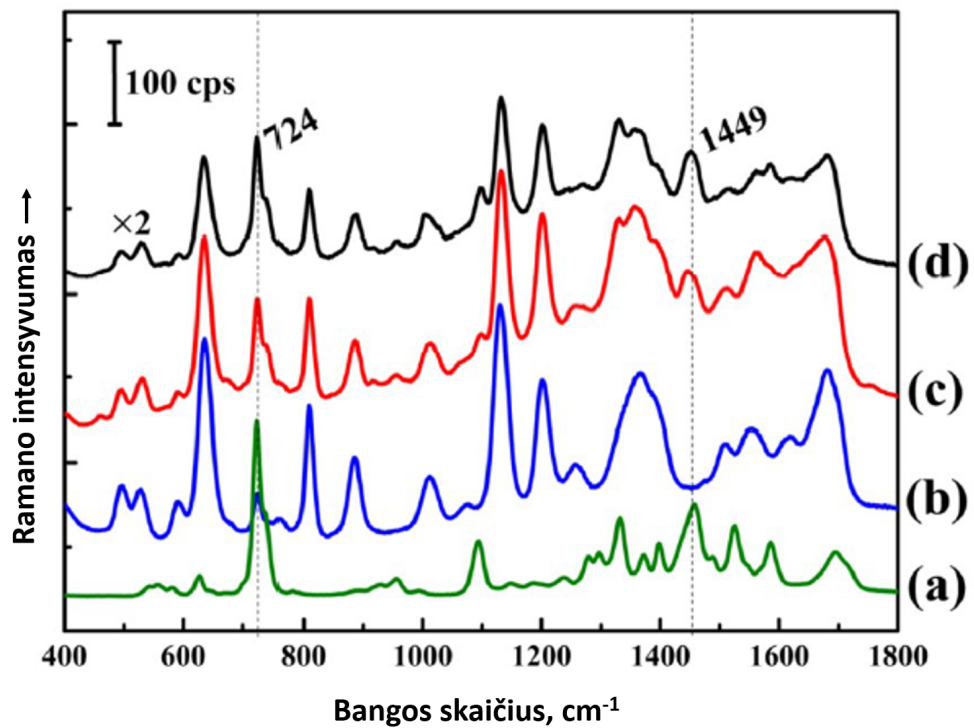
2. Taip pat, žinoma, jog žmogaus serumo albuminas (ŽSA) yra linkęs jungtis prie nanodalelių ir sudaryti „proteinų žiedą“ [38], tai gali trukdyti nanodalelių agregacijai. Nanodalelių agregacija gali būti sukeliama, kai dėl jų elektrostatinio krūvio atsirandanti joninė jėga sumažėja. Tai galima pasiekti tirpale atsiradus daugiau neutralių molekulių arba padidinus terpės joninę jėgą. Serume yra daug joninių medžiagų, galinčių sukelti nanodalelių agregaciją, tačiau ŽSA baltymai gali sutrukdyti. Dėl to bandiniai gali būti filtruojami [28].
3. Taip pat svarbus yra santykis tarp nanodalelių ir bandinio molekulių [28]. Jeigu nanodalelių kiekis nėra pakankamas, prie jų prisijungti gali molekulės, kurių giminiškumo jungimosi energija didžiausia - jos jungiasi sparčiausiai, tačiau jei nanodalelių yra daugiau, prie jų prisijungti taip pat gali ir kitokią jungimosi energiją turinčios molekulės - jos jungiasi lėčiau ir užregistruojamas kitoks spektras (žiūrėti 11 pav.).

Be to, tiriant kraujo *SERS* spektrus, verta paminėti, jog yra žinoma, kad nanodalelės gali praskverbti į ląstelių vidų ir stiprinti ląstelės viduje esančių komponentų Ramano sklaidą [39] (nors serume ląstelių būti nebeturėtų).

Premasiri *et al.* [26,40] eksperimento metodika skiriasi nuo prieš tai minėtos - ant paruošto substrato užlašinamas serumo bandinys ir išdžiovinamas. Spektras registruojamas žadinant 785 nm bangos ilgio lazeriu. Toks metodas neleidžia serumui maišytis su nanodalelėmis, dėl to galima užregistruoti kitokius spektrus. Šiuo atveju, nanodalelės nesimaišo su bandinio molekulėmis ir dominančios molekulės gali adsorbuotis tik ant paviršiaus.

Žinoma, jeigu prieš registruojant spektrą, atskiriame kraujo arba serumo komponentus, galime padidinti *SERS* jautrį norimoms aptikti medžiagoms, pavyzdžiui, globulinui, tokiu būdu galima nustatyti kraujo grupę iš plazmos *SERS* tyrimų [41,42].

Atrodo, kad ir užregistruojamos serumo ir plazmos spektrinės juostos vis dar nėra sutartinai ir nuodugniai išnagrinėtos. Vienuose spektruose dauguma juostų priskiriama šlapimo rūgščiai ir hipoksantinui tiriant serumą [28,29,32] ir plazmą [26] (žiūrėti 12 pav.).



12 pav. Serumo, šlapimo rūgštis ir hipoksantino SERS spektrų palyginimas. SERS spektrai iš apačios į viršų: (a) hipoksantinas; (b) šlapimo rūgštis; (c) serumas; (d) ašaros. Čia cps - fotonų skaičius per sekundę. (angl. *counts per second*). Adaptuota iš [32].

Kituose, publikuotuose anksčiau ir ne tik, straipsniuose, daugiausiai tiriančiuose vėžinius žymenis *SERS* metodika, spektrinės juostos preliminariai priskiriamos biomolekulėms: nukleorūgštims, proteinams, DNR molekulėms, fenilalaninui, adeninui, lipidams tiriant serumą [28,29,31,33,40,43–46], ir plazmą [3,47]. Tačiau tokia spektrinių juostų priskyrimas molekulėms neatrodo patikimas [28,32]. Patys autoriai nurodo, kad spektrinių juostų priskyrimas preliminarus, daugiausia remiamasi Ramano sklaidos [39,48,49] bei ŽSA [50] spektrinių *SERS* juostų padėtimi bei ląstelių *SERS* spektrais [39]. Nors vizualiai juostų padėtis ir forma atrodo panašios, skiriasi serumo ir plazmos spektrinių juostų padėties interpretacija. Serumo spektrinių juostų priskyrimas, apibendrintas pagal kelis autorius, priskiriančius serumo spektrines juostas biomolekulėms pateiktas 1 lentelėje. Pažymėtina, jog toks juostų priskyrimas gali būti netikslus, autoriai tas pačias spektrines juostas priskiria skirtingiems virpesiams ir nėra bendro sutarimo. Lentelėje pateiktos spektrinių juostų padėtys ir priskyrimai gauti užregistravus *SERS* spektrus naudojant sidabro nanodaleles.

1 lentelė. Serumo spektrinių juostų priskyrimas pagal literatūros šaltinius: [45] ir [40]. Žymėjimai: ν - valentinis virpesys, δ - deformacija plokštumoje, γ - deformacija ne plokštumoje, τ - sukimo virpesys. Trumpinys ŽSA - žmogaus serumo albuminas. Raidės nurodo, koku literatūros šaltiniu remtasi: [45] - A, [40] - B.

Spektrinės juostos maksimumo padėtis, cm^{-1}	Virpesinė moda	Molekulė
496	žiedo	L-Argininas ^A
579	$\nu(\text{S-S})$	ŽSA ^B
591	Amidas IV ^A	
630	$\delta(\text{C-C=O})$	Tirozinas ^B
638	$\tau(\text{C-C})$	Tirozinas ^A
725	-	Hipoksantinas ^A
807		Tirozinas ^B
813	$\nu(\text{C-C})$	Kolagenas ^A
888	$\delta(\text{C-O-H})$	D-galaktozaminas ^A
907	$\nu(\text{C-C})$	Peptidai ^B
1004	žiedo	Fenilalaninas ^{A,B}
1072	$\nu(\text{C-C})$	Lipidai ^A
1135		D-Manozė ^A
1206	$\nu(\text{C-C}_6\text{H}_5)$	Triptofanas ^A (tirozinas ^B)
1332	-	Triptofanas ^A
1365	-	Triptofanas ^A
1578	$\nu(\text{NH}_3)$	Fenilalaninas ^{A,B}
1655	$\nu(\text{C=O})$	Amidas I ^{A,B}

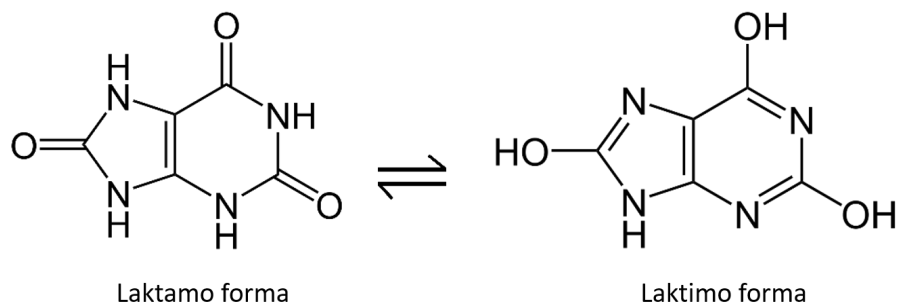
Apibendrinant, atrodo, jog serumo ir plazmos spektrai gaunami skirtingi, priklausomai nuo eksperimento metu naudojamos metodikos, ir nėra plačiai sutariama kokios molekulės kuria serumo ir plazmos *SERS* spektrus. Dėl to, labai svarbūs atrodo sistemingi kraujo ir jo komponentų *SERS* tyrimai. Prieš registruojant kraujo komponentų spektrus, reikėtų atsižvelgti į kelis dalykus:

1. Žadinančios spinduliuotės bangos ilgi. Galima užregistruoti *SERS* arba *SERRS* spektrus.
2. Bandinio paruošimo metodą - bandinys lašinamas ant substrato ir džiovinamas ar maišomas su nanodalelėmis ir registruojamas koloidinis *SERS* spektras skystoje terpėje.
3. Nanodalelių ir bandinio maišymo santykį, t.y. nanodalelių kiekį bandinyje.
4. Nanodalelių apvalkalo krūvį, teigiamą krūvį turintys metabolitai bus labiau linkę adsorbuotis ant neigiamą krūvį turinčių nanodalelių ir atvirkščiai [51].
5. Nanodalelių ir bandinio pH skirtumą.
6. Bandinyje esančių komponentų filtravimą, ŽSA ir kitų baltymų nufiltravimą, pagerinant nanodalelių agregaciją.

1.3.3 Kraujo komponentų *SERS* aktyvumas

Pastebėta, jog kraujo bandinių laikymas ir apdorojimas spektrinei informacijai yra labai svarbus. Geriausia paėmus kraują, jo spektrą registruoti iš karto, per kelias valandas arba atskirti komponentus. Laikant kraujo bandinį šaldytuve, tamsoje 4 °C temperatūroje, jame esančių ląstelių irimas nėra sustabdomas ir po 14 - 17 h kraujo spektre atsiranda hipoksantino būdingos spektrinės juostos. Toliau ilgėjant laikymo laikui, hipoksantino spektrinės juostos intensyvėja. Kol pasiekia maksimumą po apytiksliai 24 h. Lyginant su pradiniu bandiniu, hipoksantino koncentracija kraujyje išauga 50 - 100 kartų ir pasiekia apytiksliai 200 μM [26].

Kraujo serume, kaip minėta, *SERS* spektruose aktyviausia yra šlapimo rūgštis. Serumo spektrinės juostos beveik visos gali būti priskiriamos šlapimo rūgščiai. Šlapimo rūgštis (ŠR), arba uratas, yra heterociklinė organinė medžiaga, kurios cheminė formulė - C₅H₄N₄O₃. ŠR yra būdingas laktamo – laktimo tautomerizmas. Molekulėje vandenilio atomai gali būti prisijungę prie azoto atomų (laktamo tautomeris) arba deguonies atomų (laktimo tautomeris) (žr. 13 pav.). Šios molekulės rūgšties disociacijos konstanta, pK_a – 5,4. Tai yra silpna rūgštis, kuri praranda vandenilį ir tampa deprotonuota (tuomet vadinama uratu) pH esant 5,4 ir aukštesniam. Uratas – konjuguota ŠR bazė. Taigi, žmogaus kūne esant normaliam pH šlapimo rūgštis aptinkama deprotonuotos formos.



13 pav. Šlapimo rūgšties molekulės tautomerai - laktamo ir laktimo forma.

ŠR yra stiprus reduktorius ir antioksidantas. Tai vienas dažniausiai žmogaus kraujyje ir serume aptinkamų antioksidantų. ŠR žmogaus ir išsivysčiusių primatų organizmuose gaunama skaidant purinus - heterociklinius aromatinus junginius, sudarančius DNR ir RNR pagrindą (galutinis purinų metabolizmo produktas). Daugelis kitų žinduolių turi fermentą urikazę, kuri suskaido ŠR iki alantoino. ŠR formuojama kai fermentas oksiduoja oksipurinus (ksantiną, hipoksantiną) kepenyse, žarnyne, raumenyse ir kituose audiniuose. Šlapimo rūgštis aptinkama šlapime, kraujyje (normaliomis laikomos koncentracijos sritis 24 – 70 mg/L arba 140 - 420 μM) taip pat šios molekulės aptinkamos ir kituose audiniuose bei organuose. Šlapimo rūgštis mažai tirpi vandenyje. Maksimalus tirpumas – 60 mg/L (360 μM). Dėl ligos ar prastos mitybos padidėjus ŠR koncentracijai kraujyje ŠR kristalizuojasi ir iš šių kristalų susiformuoja inkstų akmenys. ŠR kristalų sankaupos sąnariuose sukelia artritą, podagrą (smailūs ŠR kristalai susiformuoja kapiliaruose, sąnariuose, odoje ir sukelia skausmą). ŠR yra šalinama per inkstus kartu su šlapimu.

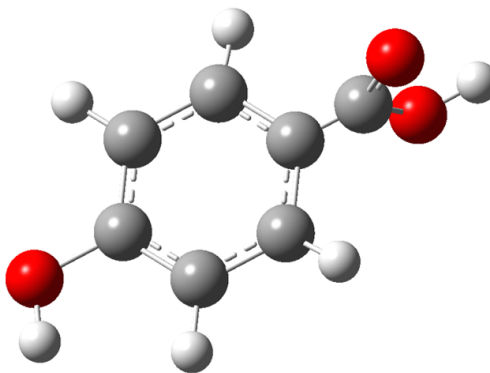
Mums ŠR svarbi dėl to, jog jos koncentracija kraujyje ir serume kinta priklausomai nuo mitybos, alkoholio vartojimo, medicininio gydymo (chemoterapija, radioterapija), fizinio aktyvumo, jeigu sergama inkstų, kepenų ligomis.

Dėl savo cheminės sudėties - konkrečiai dėl amidų, ŠR molekulė yra labai aktyvi *SERS* spektrose. Ji adsorbuojasi ant nanodalelės paviršiaus per amidinę grupę [52] (didžiausia ryšio energija, pakankama ryšiui susiformuoti, gaunama kai ŠR molekulė pasisukusi amidine grupe prie sidabro klusterio, sudaromi kompleksai) ir dėl jos serumo spektrų analizė ieškant vaistų - salicilo rūgšties (SA) molekulių žymenų, labai pasunkėja.

Vaistų, tokių kaip aspirinas ir salicilatai, vartojimas taip pat daro įtaką šlapimo rūgšties koncentracijai serume. Yra nustatyta, jog maža < 325 mg/dienai aspirino dozė padidina ŠR koncentraciją serume. Kuo mažesnė aspirino dozė, tuo labiau padidėja ŠR koncentracija (tirta po 24 h savaitę laiko tai pačiai aspirino dozei) [53]. Didesnė nei 325 mg/dienai aspirino dozė priešingai, sumažina ŠR koncentraciją kraujyje [54]. Kas iš tiesų apsunkina kiekybinį salicilo rūgšties kraujyje tyrimą neselektyviomis nanodalelėmis. Abi molekulės konkuruoja dėl prisijungimo vietos ant nanodalelės paviršiaus, taigi svarbi yra molekulių santykinė koncentracija.

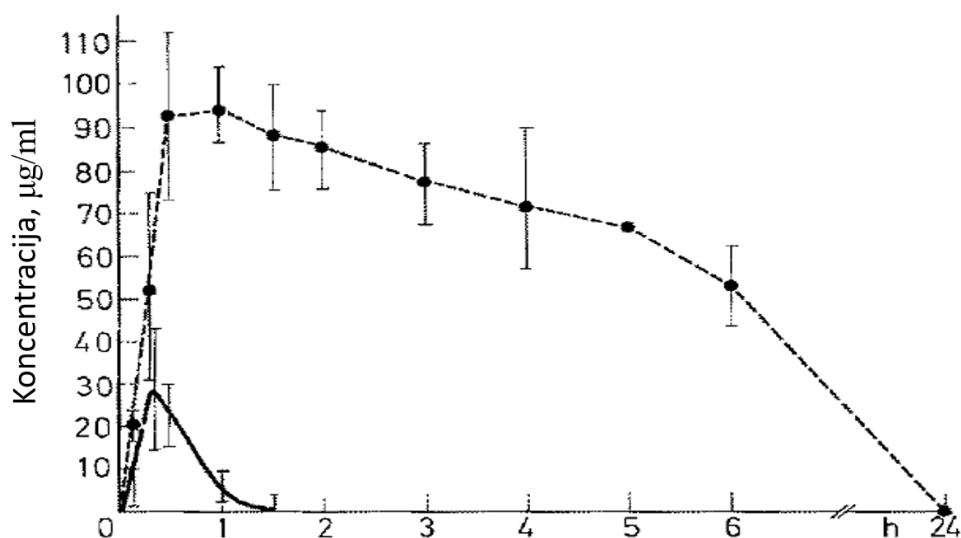
1.4 Aspirinas ir jo metabolizmas

Aspirinas ir salicilatai – vieni seniausiai naudojamų medikamentų. Nors aspirino vartojimas per pastaruosius dešimtmečius šiek tiek sumažėjo dėl kitų nesteroidinių priešuždegiminių vaistų išpopuliarėjimo bei aspirino siejimo su Reye sindromu (pasireiškia vaikams po infekcinės ligos) - jis nerekomenduojamas vaikams, sergantiems vėjaraupiais. Vis dėl to aspirinas išlieka plačiai vartojamas kaip analgetikas ir dėl kraują skystinančių ir krešėjimą mažinančių savybių. Reaguodamas su vandeniu, o paciento kraujyje ir veikiamas esterazių, aspirinas labai greitai – per 20 – 25 min virsta metabolitu, salicilo rūgštimi (molekulės struktūra pateikta 14 pav.). Aktyviojo aspirino metabolito – SA randama daugelyje kitų vaistų – salicilo rūgšties tepale, metilo salicilatuose, iš kurių vieno, dažniausiai perdozuojamo, „Oil of Wintergreen“ koncentracija labai didelė: 5 ml sirupo atitinka 7,5 g aspirino. Siekiant nustatyti perdozavimą salicilatais ir aspirinu, tiriama būtent SA koncentracija kraujyje, kraujo serume ar plazmoje.



14 pav. Salicilo rūgšties molekulės struktūra.

Salicilo rūgšties farmakokinetika: salicilatai šalinami su šlapimu. Įprastomis dozėmis (325 mg, 500 mg) pusė SA iš kraujo yra pašalinama per 3 - 5 valandas. Kraujyje SA aptinkama prisijungusi prie albumino. Prisijungusios rūgšties kiekis gali siekti iki 80% kraujo plazmoje (didelės dozės atveju). Dėl SA sąveikos su albuminu, salicilatai pasižymi nuo dozės priklausiančia kinetika. T.y. jei dozė didesnė (3,6 g) SA koncentracija sumažėja perpus po 12 - 16h (priklausomai nuo dozės ši trukmė gali padidėti iki 30 h stipraus apsinuodijimo atveju) ir SA farmakokinetika sulėtėja. Maksimalią koncentraciją SA kraujyje pasiekia po apytiksliai 0,5 h - 1 h, vartojant terapines, 500 mg, dozės - 0,17 mM [55]. Ir po 2h [56] vartojant 640 mg dozę - 0,3 mM. Ūmaus apsinuodijimo atveju priklausomai nuo dozės ir vaisto rūšies (šnypščiosios tabletės greičiau patenka į kraują) ši koncentracija išauga. Tačiau SA kinetika labai priklauso nuo paciento ir gali svyruoti. Vaisto farmakokinetika, išgėrus 1,2 g aspirino pateikta 15 pav.



15 pav. Aspirino (acetilsalicilo rūgšties) ir salicilo rūgšties (punktyrinė linija) farmakokinetika išgėrus 1,2 g aspirino dozę. Adaptuota iš [57].

15 pav. matoma, jog aspirino koncentracija plazmoje lyginant su SA yra maža, ir greitai mažėjanti. SA koncentracija serume pasiekia maksimalią 0,7 mM koncentraciją (grafike atitinka 95 µg/ml) anksčiau nei po 1h.

Toksiškumas: apsinuodijimas aspirinu ar kitais salicilatais nustatomas iš SA koncentracijos kraujyje arba kraujo plazmoje tiriant kraują po 3h – 4h arba 4h – 6h. Dozės kategorijos pagal skirtingo pavojingumo perdozavimą [58] ir aspirino metabolito koncentracijos kraujyje pateiktos 2 lentelėje.

2 lentelė. Salicilo rūgšties koncentracijos serume pagal pavojingumą. Adaptuota iš [59].

Toksiškumas	Koncentracija	Molinė konc., M	Laikas
Terapinė	100 µg/ml	0,7 mM	4-6 val.
Priešuždegiminė	100-400 µg/ml	iki 3 mM	
Pavojinga dozė	500 µg/ml	nuo 3,6 mM	
L. pavojinga dozė.	700 µg/ml	5 mM	
Mirtina dozė	1,6 mg/ml	11,5 mM	

Perdozavimas labiausiai pavojingas vaikams iki 6 metų amžiaus ir vyresnio amžiaus žmonėms (70 metų ir vyresni). Pagal 2017 m. Jungtinių valstijų duomenis, nuo aspirino ir kitų kraują skystinančių vaistų kasmet miršta 3000 vyresnio amžiaus (> 65 m.) žmonių [60]. Taip pat dažnai pasitaiko bandymų nusižudyti apsinuodijus vaistais [61].

Paprastai medikamentų perdozavimas pacientams nustatomas efektyviosios skysčių chromatografijos metodais (angl. *high performance liquid chromatography*). Jais galimas nustatyti mažiausias vaistų kiekis 25 µg/ml – 1 µg/ml. Tokia priemonė, SA koncentracijos nustatymui - (*Emit tox Salicylic Acid Assay* iš *Beckman Coulter*). Kitas komercinis produktas – *Lab Corp* kompanijos *Salicylate Serum Test* leidžia aptikti 5 µg/ml, bet tik po 2–3 dienų. *Neogen* kompanijos *Salicylates Acid Test* leidžia nustatyti – 1,1 µg/ml SA koncentracijos.

Tačiau klinikose medikamentų perdozavimo nustatymas užtrunka palyginus ilgai. Pacientai po vaistų vartojimo turi laukti 4 h kol bus paimtas kraujas, tuomet dar laukti, kol iš laboratorijos gaus tyrimų rezultatus. Laikas nuo atvykimo į ligoninę iki rezultatų gavimo trunka apie 370 minučių – 6 h [62]. Dėl to ieškoma būdų kaip pagreitinoti tyrimus ir gauti tikslius rezultatus (naudojami įvairūs greito testavimo metodai). Taip pat, chromatografiniams ir daugeliui kitų metodų taikyti į kraujo mėginius dar dedamos papildomos stabilizuojančios medžiagos (kalio fluorida, natrio fluorida), be to, paimamas didesnis kiekis kraujo iš paciento. *SERS* metodikai tereiktų 1 lašuko – 25 µl paciento kraujo ir jokio ilgo bei sudėtingo paruošimo.

2 Eksperimentinio tyrimo metodai

2.1 Medžiagos ir eksperimentinė įranga

1. Nanodalelių sintezei: trinatrio citratas ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) nehidrintas, pH 7,5 - 9, Merck (Vokietija); sidabro nitratas (AgNO_3), didelio grynumo, Merck (Vokietija); aukso chloridas (HAuCl_4), didelio grynumo, Merck (Vokietija); Polivinilpirolidonas K-30 (PVP K-30), Roth (Vokietija); natrio borohidridas (NaBH_4); cetilmetilamonio bromidas (CTAB); askorbo rūgštis.
2. pH ir joninėms jėgoms pakeisti: KCl, Sigma Aldrich (JAV); HCl 2M, Sigma Aldrich (JAV), NaOH 2M, Sigma Aldrich (JAV).
3. Kraujo bandinių paruošimui: Dicynone 250mg/2ml, 2 ml, injekcinis tirpalas, N50.
4. Bandiniams: acetilsalicilo rūgštis 99% grynumo, Alfa Aesar (JAV); salicilo rūgšties rūgštis 99% grynumo, Sigma Aldrich (Vokietija); acetaminofenas, Sigma Aldrich (Vokietija); Paracetamolis Actavis 500 mg tabletės; Aspirin Bayer 500 mg tabletės; šlapimo rūgštis 98% grynumo, Merck (Vokietija); hipoksantinas 98% grynumo, Merck (Vokietija); žmogaus kraujo serumas iš AB kraujo grupės vyro sukrešėjusio kraujo (Sigma Aldrich, JAV).
5. Įranga: kaitinama magnetinė maišyklė Cimarec, Thermo Scientific (JAV); Lambda 1050 UV-Vis spektrometras, Perkin Elmer (JAV); MultiRam FT-Raman spektrometras, Bruker (JAV); Heraeus megafuge 16 centrifuga, Thermo scientific (JAV); pH matuoklis; Whatman filtrinis popierius 2,7 μm (Merck, Vokietija).

Cheminėms reakcijoms buvo naudotas dejonizuotas vanduo ir bandinių paruošimui, valymui - etanolis. Koloidų indams plauti - karališkas vanduo.

2.2 Nanodalelių sintezė

1. Sidabro nanodalelių sintezė pagal Lee-Meisel metodą (Ag-cit) atlikta kaip nurodyta literatūroje [63]. Indas, kuriame sintetamos dalelės, uždengiamas nuo išorinių spindulių aliuminio folija, paruošiamas 100 ml tūrio 1 mM koncentracijos sidabro nitrato tirpalas. Jis užverdamas nuolat maišant magnetine maišykle. Į užvirusį tirpalą supilamas pašildytas 40 mM natrio citrato tirpalas (2 ml). Verdama 1 h, maišant 600 rpm greičiu.
2. Natrio borohidridu redukuotų sidabro nanodalelių (Ag-NaBH_4) sintezė (adaptuota iš Aherne *et al* protokolo [64]) atlikta dviem etapais. 1) Gaminamos sėklos - 0,12M PVP tirpalas (20 ml) užverdamas, įpilama 1 mM AgNO_3 tirpalo (4 ml), verdama 1 h maišant. Kai tirpalas atvėsta, į tirpalą (2 ml) įpilama 2,5 mM citrato tirpalo (2 ml) ir, galiausiai, kačių paruošto 10 mM natrio borohidrido tirpalo (0,059 ml). 2) Auginimas – į 6 kartus skiestą sėklų tirpalą (3 ml) įpilama 10 mM askorbo rūgšties tirpalo (75 μl) ir lėtai sulašinamas 0,5 mM AgNO_3 tirpalas (3ml).

3. Polimeru redukuotų ir dengtų sidabro (Ag-PVP) nanodalelių sintezė [65]. 1,25 g PVP ištirpinta 25 ml vandens. Į tirpalą nuolat maišant įdėta 1,27 g sidabro nitrato. Sintezė įvyko iškart, tačiau maišyta dar 1 h.
4. Polimeru redukuotų ir dengtų aukso nanodalelių (Au-PVP) sintezė [66]. 0,12 M PVP tirpalas (25 ml) užvirinamas, sumaišomas su užvirintu 1 mM HAuCl₄ tirpalu (25 ml). Verdama uždengtame folija inde 1 h. Po sintezės pašalinamas perteklinis polimero kiekis tirpale ir koncentruojama – skiedžiant dejonizuotu vandeniu ir nuimant supernatantą (kartojama 3 kartus).
5. Citratu stabilizuotų ir redukuotų Au nanodalelių (Au-cit) sintezė atlikta pagal Turkevich *et al.* [67] metodą.

2.3 Bandinių paruošimas

Susintetinti Ag-cit koloidai koncentruoti centrifuga. 30 ml koloido centrifuguojama 10 min 6500 G jėga, nuimama 20 ml supernatanto.

Ant švariai nuvalytos metanolio tirpalu aliuminio folijos užlašinamas 25 µl koloido lašiukas. Džiovinama kambario temperatūroje uždarame inde. Ant viršaus užlašinama 25 µl bandinio. Bandinys matuojamas kątik išdžiūvęs (jei nenurodyta kitaip).

Kraujo ir serumo *SERS* spektrams registruoti, kraujo bandiniai buvo imti iš savanorių piršto, gavus sutikimą. Kraujo *SERS* spektrams gauti, kraujas registruojamas neskiestas (iškart, neišdžiūvęs), skiedžiamas dejonizuotu vandeniu 5, 10, 20, 50 arba 100 kartų. Serumo *SERS* spektrams gauti, 0,2 ml kraujo maišoma su 25 µl dicynone tirpalo, paliekama sukrešėti ir centrifuguojama 10 min 4500 G jėga. Nuo viršaus nuimamas atsiskyres serumas.

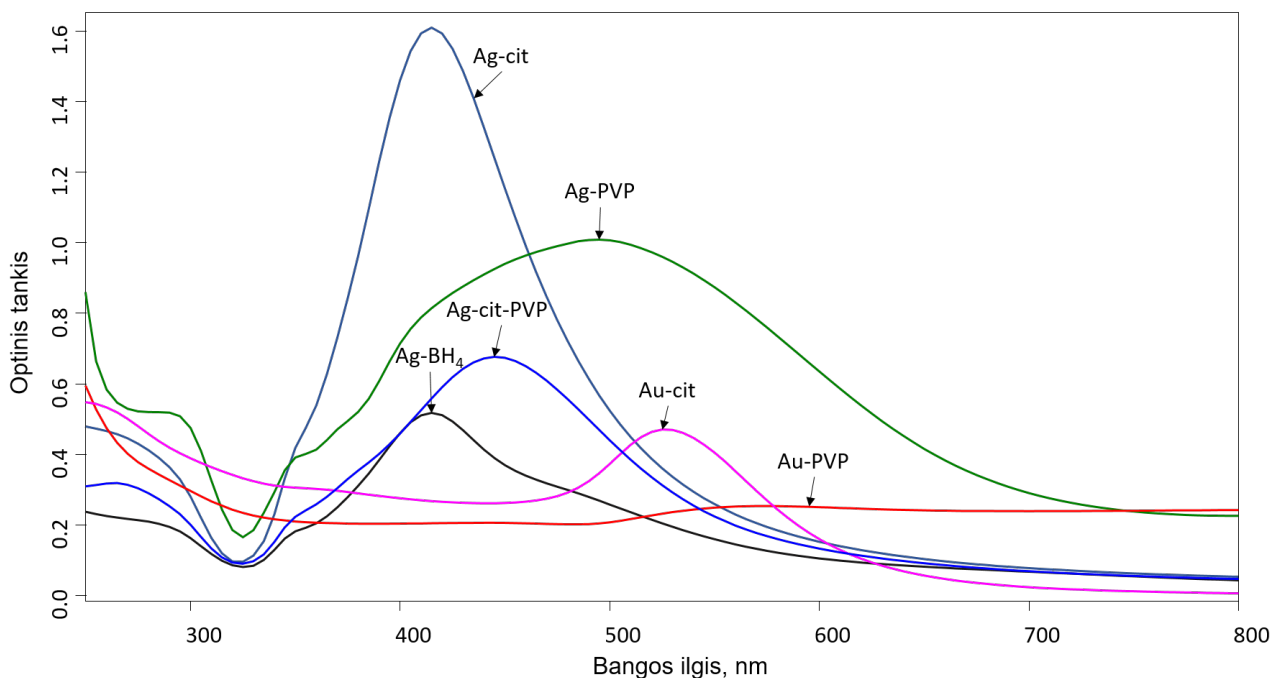
Klinikiniai tyrimai *SERS* spektriniu metodu atlikti nevalgius, iš ryto. Kraujo bandiniai paimti prieš aspirino vartojimą iš savanorio piršto, gavus sutikimą. Ir po 4 g aspirino vartojimo praėjus 30 min, 1 h ir 2 h.

Spektrai registruoti MultiRam FT-Raman spektrometru. Sklaida žadinama 1064 nm bangos ilgio Nd:YAG lazeriu 100 mW galia. Kraujo spktrai registruoti 70 mW galia. Lazero spindulio pluoštas sufokusuojamas į 100 µm diametro plotą ant bandinių. Apskaičiuotas lazerio intensyvumas - 1,3 kW/cm² arba mažesnis.

3 Rezultatai ir jų aptarimas

3.1 Koloidinių metalo nanodalelių sintezė

Nanodalelės buvo susintetintos naudojant skirtingus protokolus (žr. skyrių eksperimentinio tyrimo metodai). Buvo sintetintos Ag nanodalelės (Ag-cit, Ag-BH₄ Ag-PVP) stabilizuotos ir redukuotos atitinkamai citratu (cit), arba polimeru (PVP), redukuotos NaBH₄ ir stabilizuotos citratu (BH₄) ir Au nanodalelės (Au-cit ir Au-PVP). Sintezės metu gautų nanodalelių dydžiai įvertinti UV-Vis sugerties spektroskopijos metodu. Gauti sugerties spektrai pateikti 16 pav.



16 pav. *SERS* spektrams registruoti susintetintų nanodalelių sugerties spektrai. Sidabro nanodalelių: Ag-cit; Ag-PVP; Ag-cit-PVP; Ag-BH₄. Aukso nanodalelių: Au-cit; Au-PVP.

Sugerties spektrai nenormuoti, visi koloidai, išskyrus Au-PVP, buvo skiesti 6 kartus prieš registruojant sugerties spektrus. Taigi, akivaizdu, jog gaunamų nanodalelių koncentracija koloiduose skiriasi, dėl šios priežasties, prieš registruojant *SERS* spektrus, koloidai buvo koncentruojami centrifuguojant (Au-PVP ir Ag-PVP nanodalelės po sintezės buvo plaunamos nuo polimero liekanų). Taip pat matoma, jog sintezės metu gautų Au-PVP ir Ag-PVP nanodalelių sugerties maksimumas pasislinkęs į ilgabangę pusę. Kas gali reikšti, jog nanodalelės yra didelės, arba ne sferinės formos. Gautų nanodalelių sugerties juostų maksimumų padėtys, juostų plotis pusės aukštyje (FWHM) ir apskaičiuoti atitinkami nanodalelių dydžiai pateikti 17 pav.

Nanodalelės	Maks. padėtis, nm	FWHM, nm	Apskaičiuotas dydis, nm	Dydis iš TEM atvaizdų, nm
Ag-cit	410	85	~55	35-65
Ag-PVP	500	245	>100	-
Ag-BH ₄	415	95	~60	50-80
Ag-cit-PVP	445	125	~80	-
Au-cit	525	65	~25	~15
Au-PVP	560, 715	-	-	~300

17 pav. Susintetintų nanodalelių sugerties spektrų parametrai, įvertinto dydžio palyginimas su dydžiu iš TEM atvaizdų.

Nanodalelių dydžiai skaičiuoti remiantis literatūra [68, 69]. Ag nanodalelių dydžio įvertinimas atliktas naudojantis 9 formule

$$d = \sqrt{24,01 + 100(\lambda_{max}) - 385} + 4,9, \quad (9)$$

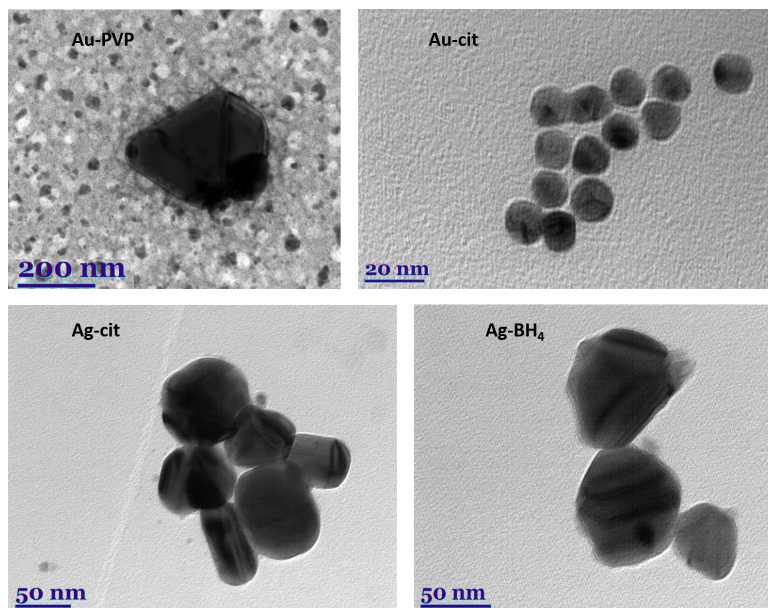
kur λ_{max} - sugerties juostos maksimumas, o d - nanodalelių skersmuo. Au-cit nanodalelių dydžiui įvertinti naudotasi 11 formule:

$$d = \exp\left(3 \cdot \frac{A_{max}}{A_{450}} - 2,2\right), \quad (10)$$

Čia A_{max} - optinio tankio maksimumo vertė, A_{450} optinio tankio ties 450 nm bangos ilgiu vertė. Skaitinės vertės formulėse nustatytos empiriškai. Deja, toks nanodalelių dydžio iš UV-Vis sugerties spektrų nustatymas yra preliminarus. Netikslumai atsiranda, jei:

1. nanodalelės yra ne sferinės formos;
2. mažesnės už elektronų laisvojo lėkio kelią metale (Au atveju nanodalelių dydis, kai jį tiksliai įvertinti sudėtinga yra mažesnis nei 25 nm, Ag - mažesnis nei 55 nm);
3. kitokia aplinkos terpės lūžio rodiklio vertė, pvz. nanodalelės dengtos polimeru (formulėse naudota lūžio rodiklio vertė 1,333);
4. nanodalelės ne monodispersiškos.

Tiksliau įvertinti nanodalelių dydį galima iš TEM atvaizdų (18 pav.). Au-PVP nanodalelių dydį sunku įvertinti, bet iš TEM atvaizdų matoma, jog jų forma nėra sferinė ir pati dalelė labai didelė - apie 200 nm skersmens. Ag-cit ir Ag-BH₄ nanodalelių dydžiai panašūs. Au-cit nanodalelės gaunamos kiek mažesnės - apie 15 nm skersmens.



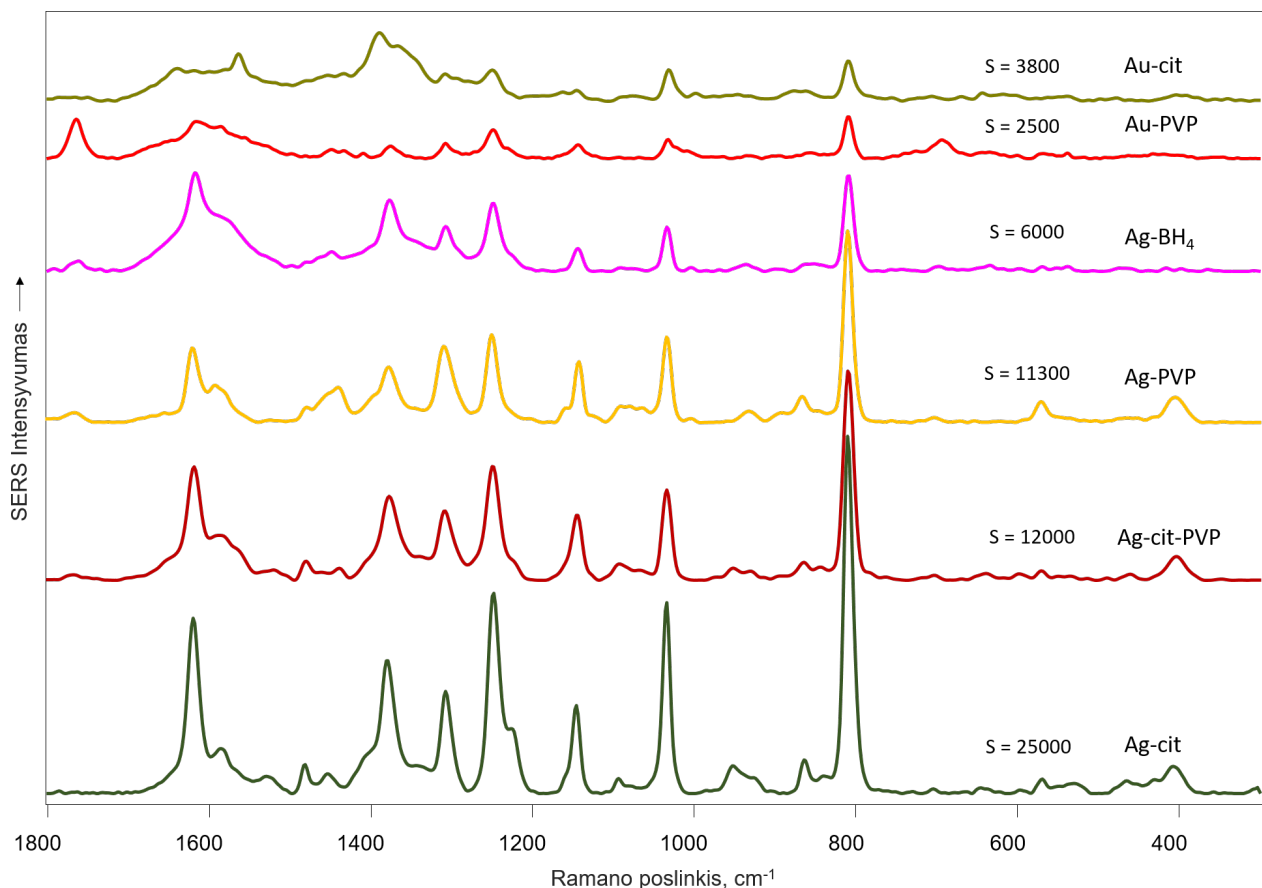
18 pav. Au-PVP, Au-cit, Ag-cit ir Ag-BH₄ nanodalelių TEM atvaizdai.

Siekiant įvertinti SA *SERS* spektrų stiprinimą tai pačiai SA koncentracijai ir spektrų kokybę naudojant skirtingas koloidines metalo nanodaleles, 25 μ l koloido buvo išdžiovinti ant aliuminio folijos. Ant viršaus užlašintas 25 μ l 1 mM SA tirpalas ir užregistruoti *SERS* spektrai. Spektrai pateikti 19 pav. Patogumo dėlei spektrai 19 pav. yra paslinkti vertikaliajoje skalėje. Visi spektrai registruoti 100 mW lazerio galia ir registruojant 700 spektrų. Šalia kiekvieno spektro pateiktas kiekybiškai įvertintas analitinis *SERS* stiprinimas juostai ties 1035 cm^{-1} (vėliau ją naudosime kaip spektrinį žymenį).

Analitinis *SERS* spektrų stiprinimas apskaičiuotas pagal 11 formulę:

$$S = \frac{I_{SERS} \cdot c_R}{I_R \cdot c_{SERS}} \quad (11)$$

Čia I_{SERS} - *SERS* spektrinės juostos intensyvumas, I_R atitinkamos Ramano sklaidos spektrinės juostos intensyvumas, c_{SERS} - bandinio koncentracija registruojant *SERS* spektrą, c_R - bandinio koncentracija registruojant Ramano sklaidos spektrą. Vis dėl to, toks *SERS* stiprinimo apskaičiavimas neatsižvelgia į tai, kad *SERS* yra paviršiaus spektroskopinis metodas. Dėl to, pagal 11 formulę gaunama vertė priklauso nuo bandinio paruošimo ir uždėjimo ant substrato būdo, nuo bandinio kiekio (t.y. ar ant substrato susidaro monosluoksnis bandinio molekulių, ar substratas padengiamas keliais sluoksniais). Apskaičiuota, jog šio tyrimo metu užlašinamas molekulių kiekis buvo $150 \cdot 10^{13}$. Substrato padengimas tuomet $417 \cdot 10^{13}$ molekulių/ cm^2 - $600 \cdot 10^{13}$ molekulių/ cm^2 (priklausomai nuo išdžiūvusio koloido lašo suformuoto ploto). Vienai molekulei tenkantis plotas $2,4 \cdot 10^{-16}$ cm^2 - $1,7 \cdot 10^{-16}$ cm^2 . Teoriškai paskaičiuotas SA molekulės dydis - 180 Å yra gerokai didesnis nei molekulei tenkantis plotas, taigi bandinio molekulės suformuoja kelis sluoksnius, ne monosluoksnį ant paviršiaus. Tačiau toks *SERS* stiprinimo įvertinimas mūsų tikslui puikiai tinka, nes leidžia surasti labiausiai stiprinančias koloidines nanodaleles esant toms pačioms sąlygoms.



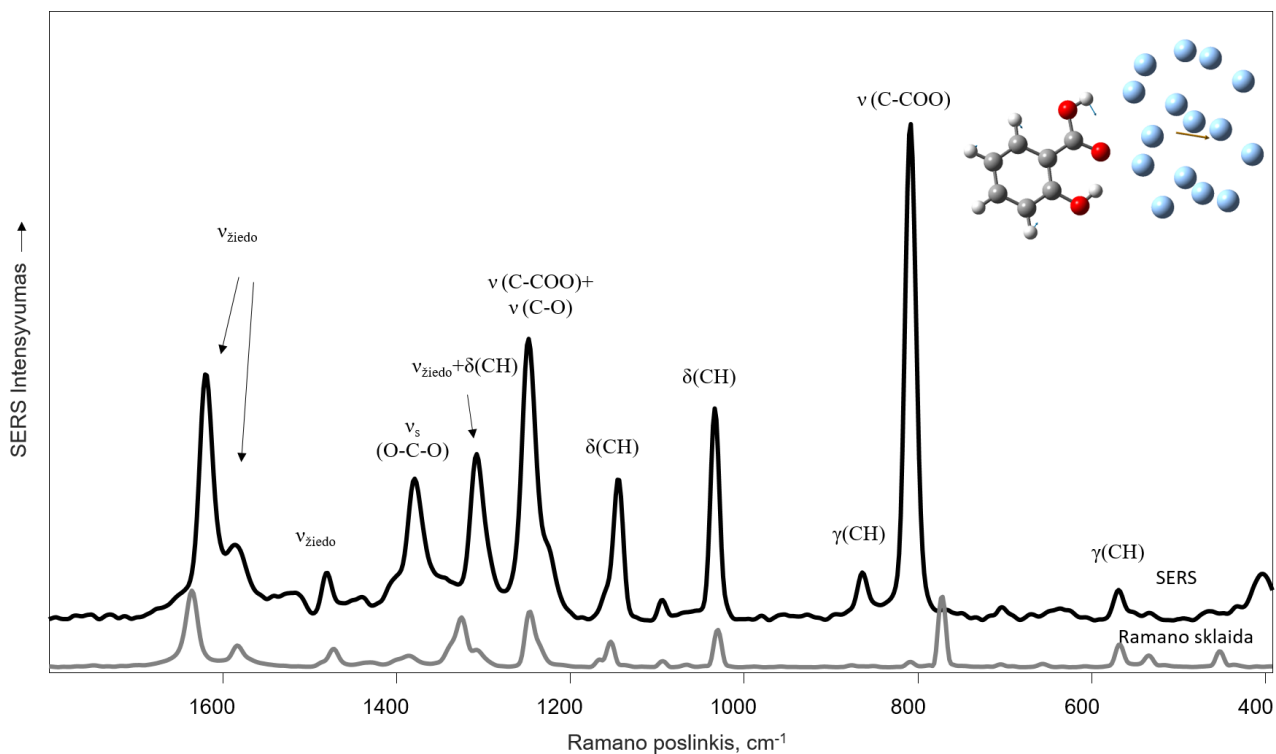
19 pav. 1 mM koncentracijos SA *SERS* spektrai, gauti *SERS* signalo stiprinimui naudojant įvairias koloidines metalo nanodaleles. S - stiprinimas, apskaičiuotas SA spektrinei juostai ties 1035 cm⁻¹.

Didžiausias stiprinimas, lygus 25000, gaunamas naudojant Ag-cit nanodaleles. Ypač stiprinimas susilpnėja naudojant Au koloidus, gali būti mažesnis 10 kartų.

Dėl didelio stiprinimo (25000) bei lengvo nanodalelių paruošimo, tolimesniam *SERS* spektrų registravimui buvo pasirinktos Ag-cit citratu stabilizuotos nanodalelės, sintetintos pagal Lee-Meisel metodą [63].

Užregistruoto SA *SERS* spektro spektrinių juostų priskyrimas konkreitiems molekulių virpesiams (20 pav.) yra atliktas naudojantis literatūros šaltiniu [70] ir teoriniais skaičiavimais (skaičiavimams naudota Gaussian programa, RB3LYP funkcionalas su LANL2DZ funkcijų baze). SA *SERS* spektras kartu su priskyrimu yra pateiktas 21 pav.

Pagal teorinių skaičiavimų duomenis, SA molekulė atsisuka į Ag klasterį karboksiline grupe.



20 pav. Salicilo rūgšties Ramano sklaidos (apačioje) ir *SERS* (viršuje) spektrai su spektrinių juostų priskyrimu konkreitiems molekulių virpesiams. Viršuje dešinėje - apskaičiuota SA molekulė su 15 atomų Ag klusteriu. Geltona rodyklė nurodo transliacinio dipolinio momento vektorių, mėlyna - atomų judėjimo vektorių.

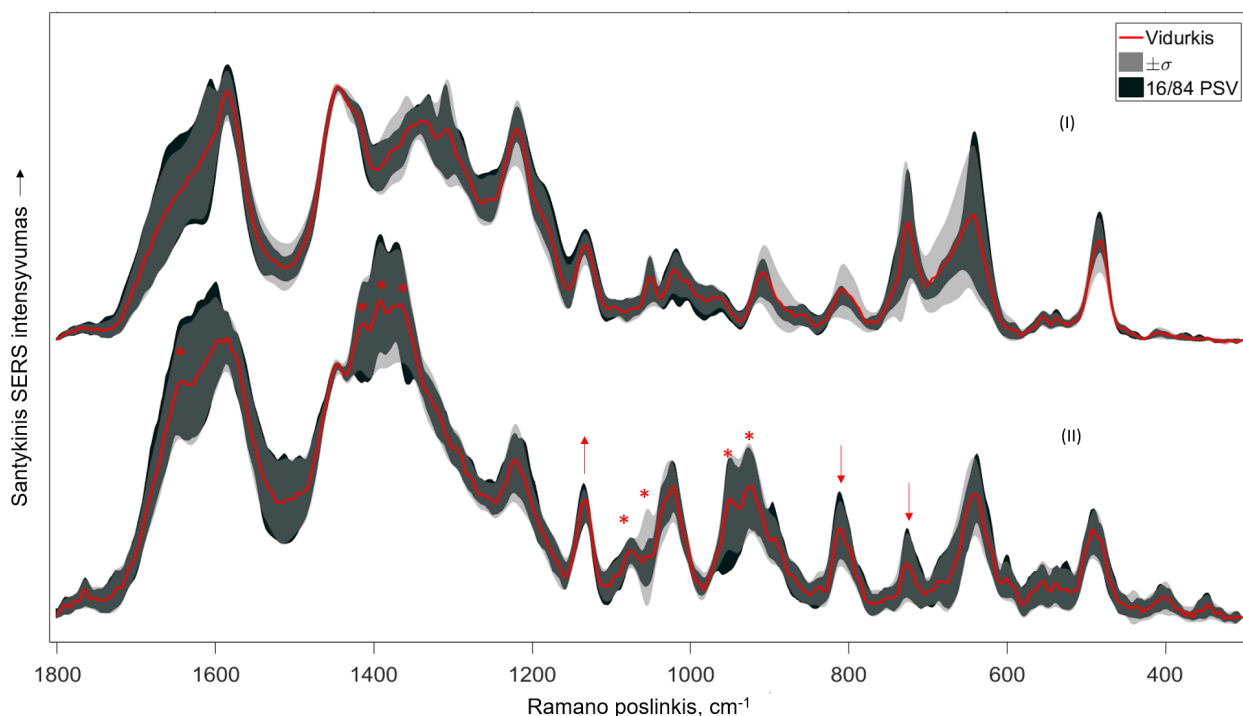
Juostos padėtis, cm^{-1}	Priskyrimas
569	δ_{ziedo}
809	$\nu(\text{C-COO})$
864	$\gamma(\text{CH})$
1034	$\delta(\text{CH})$
1094	$\delta(\text{CH})$
1145	$\delta(\text{CH})$
1248	$\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-COO})$
1308	$\nu_{\text{ziedo}}, \delta(\text{CH})$
1379	$\nu_s(\text{OCO})$
1480	ν_{ziedo}
1585	ν_{ziedo}
1619	ν_{ziedo}

21 pav. Salicilo rūgšties virpesinės modos ir virpesių priskyrimas molekulėms. Žymėjimai: ν - valentinis virpesys, ν_s - simetrinis valentinis virpesys, γ - deformacija ne plokštumoje, δ - deformacija plokštumoje.

20 pav. matomo SA ir Ag klasterio virpesinės modos ties 809 cm^{-1} (eksperimentiniame *SERS* spektre) transliacinio dipolinio momento vektoriaus kryptis leidžia nuspėti, kad bus stebimas *SERS* stiprinimo efektas. Vektorius, statmenas Ag klasterio paviršiumi reiškia, kad tokios virpesinės modos bus sustiprėjusios SA *SERS* spektruose. Tai patvirtina ir eksperimentiniai *SERS* spektrai: labiausiai sustiprėję yra karboksilo grupės $\delta(\text{CH})$ virpesiai.

3.2 Kraujo SERS spektrai

Šio tyrimo metu užregistruotus kraujo SERS spektrus pagal spektrų formą galima suskirstyti į dvi rūšis (žiūrėti 22 pav.) atitinkamai (I) ir (II). (II) formos kraujo SERS spektrai buvo užregistruoti, kai kraujo bandinys yra šviežias ir nedaug skiestas (skiedžiamas ne daugiau nei 10 kartų). Tačiau po kraujo bandinio paėmimo praėjus kelioms valandoms arba atskiedus jį daugiau nei 10 kartų, tarp užregistruojamų kraujo SERS spektrų pradeda dominuoti (I) formos spektrai. Taigi, galima manyti, jog (I) formos spektras būdingas bandiniams, kuriuose yra įvykusi hemolizė ir kraujo ląstelės bent dalinai yra suirusios. Apsaugoti kraujo bandinius nuo suirimo SERS spektrų registravimo metu sudėtinga, nes koloidinio tirpalo pH ir joninės jėgos skiriasi nuo kraujo, taip pat nanodalelės gali patekti į ląstelės vidų [39]. Siekiant registravimo metu nesukrešinti kraujo, jis skiedžiamas, kas taip pat gali pažeisti ląsteles. Kitais atžvilgiais kraujo SERS spektrai buvo registruoti tokiomis pat sąlygomis. Nanodalelių koloidinis tirpalas prieš registruojant spektrus buvo gaminamas naujas, prieš atliekant eksperimentą paimamas šviežias kraujo bandinys. Taigi, įtakos gaunamų spektrų formai gali turėti ir skirtingos sąlygos nanodalelių sintezės metu, t.y. gaunamos nanodalelės nežymiai skirtis, kraujo sudėtis taip pat šiek tiek skiriasi kiekvieno bandymo metu. Dėl nanodalelių ir kraujo sąveikos yra galimybė užregistruoti šiek tiek kitokius kraujo SERS spektrus.



22 pav. Kraujo, skiesto su vandeniu, SERS spektrai. Viršuje - (I) didesniu santykiu nei 1:9 skiestas kraujas, apačioje - (II) santykiu 1:9 skiestas kraujas. Raudona linija žymi suvidurkintą kraujo spektrą, šviesiai užšpalvinta zona - standartinį intensyvumo nuokrypį (σ). Tamsiai užšpalvinta zona - tarp 16/84 procentilių esančią intensyvumo spektrinę variaciją (PSV). Spektrai normuoti pagal spektrinės juostos ties 1445 cm^{-1} intensyvumą, kurios intensyvumas visuose bandiniuose mažiausiai kinta. Žvaigždutės žymisppektrines juostas, kurios pastebimos tik (II) formos kraujo SERS spektruose. Rodyklėmis nurodyti SERS spektrinių juostų intensyvumo pokyčiai (II) formos kraujo bandiniuose lyginant su (I).

Įdomu, kad savo forma ir juostų padėtimi (I) formos kraujo spektras gaunamas labai panašus į Bonifacio *et al.* [28] filtruoto serumo spektrą, skiestą santykiu 1:1 (palyginimui žiūrėti 11 pav.). Daugelio juostų padėtys sutampa, kai kurių juostų intensyvumai persiskirstę. Spektrinė juosta ties 1648 cm^{-1} išplatėjusi. Bonifacio *et al.* daugelį juostų priskyrė šlapimo rūgščiai ir hipoksantinui, kai bandinys buvo skiestas santykiu 1:9, tačiau kai bandinys skiestas santykiu 1:1 daugelis juostų nėra priskirtos, išskyrus ties 724 cm^{-1} esanti hipoksantino spektrinė juosta [26, 28]. Mano užregistruotuose kraujo ir serumo *SERS* spektruose hipoksantinui taip pat galima priskirti juostą ties 724 cm^{-1} (22 pav.), kurios intensyvumas gali skirtis priklausomai nuo bandinio laikymo laiko. Juostų, esančių ties 724 cm^{-1} ir 643 cm^{-1} santykinis intensyvumas nedaug skiriasi visuose spektruose, taigi gali būti, jog šios virpesinės modos bent iš dalies (spektrinę juostą kuria kelių molekulių virpesinės modos) atsiranda dėl tos pačios molekulės virpesių. Skiedžiant kraujo bandinį distiliuotu vandeniu (skiesta buvo 10, 20, 50 ir 100 kartų) kraujo ląstelių membrana turėjo suplyšti - įvykti hemolizė ir ląstelių viduje esančios medžiagos (taip pat ir hemoglobinas) patekti į išorę. Priskirti kraujo spektrines juostas labai sunku, kaip minėta, vien kraujo serume yra virš 4000 skirtingų metabolitų. Juostos 1150 cm^{-1} - 400 cm^{-1} srityje galbūt bent dalinai (juostos persiklojusios ir kuriamos kelių molekulių) galėtų būti atsiradusios dėl ląstelių citoplazmoje esančių molekulių virpesių [71] (eksperimento metu užregistruoti spektrai panašūs į pateiktus literatūroje).

(II) formos kraujo *SERS* spektre, lyginant su (I), matomi keli skirtumai. (II) spektre išryškėja intensyvi juosta ties 1649 cm^{-1} , būdinga amido I virpesiams [72, 73], atsiranda spektrinės juostos ties 942 cm^{-1} , 928 cm^{-1} (būdinga amino rūgščių C-COO^- virpesiams) ir juostos ties 1074 cm^{-1} , 1036 cm^{-1} . Atsiranda intensyvios ir plačios spektrinės juostos ties 1415 cm^{-1} , 1393 cm^{-1} , 1366 cm^{-1} . Sumažėja spektrinės juostos ties 1222 cm^{-1} intensyvumas. Padidėja spektrinės juostos intensyvumas ties 810 cm^{-1} ir 1133 cm^{-1} . Kai kurias šių spektrinių juostų galima priskirti proteinams būdingiems virpesiams. Juostų ties 724 cm^{-1} ir 653 cm^{-1} sumažėjusį intensyvumą galima sieti su mažesniu DNR kiekiu skystojoje kraujo dalyje dar ne visiškai suirus ląstelėms. Spektrinė juosta ties 483 cm^{-1} pasilenka į didesnių bangos skaičių pusę dėl ŠR juostų intensyvėjimo. ŠR spektrinės juostos išryškėja ties 496 cm^{-1} , 641 cm^{-1} , 812 cm^{-1} , 1074 cm^{-1} , 1136 cm^{-1} . Žinant, jog baltymai, tokie kaip ŽSA yra linę sudaryti proteinų žiedą aplink nanodalelę, galima manyti, jog (II) kraujo spektre matomi virpesiai atsiranda dėl arti nanodalelių esančių baltymų.

Literatūroje nurodytos *SERS* spektrinės juostos, tiriant DNR molekules ties 500 cm^{-1} , 650 cm^{-1} ir 1120 cm^{-1} [51] savo padėtimi ir forma atrodo panašios į užregistruotas spektrines juostas ties 483 cm^{-1} , 643 cm^{-1} , 1132 cm^{-1} . Taip pat, spektrinės juostos ties 910 cm^{-1} , 801 cm^{-1} , 723 cm^{-1} , 651 cm^{-1} , 478 cm^{-1} , 1585 cm^{-1} , 1445 cm^{-1} galėtų būti interpretuojamos kaip eritrocitų ir hemoglobino spektrinės juostos [50, 73]. 3 lentelėje pateiktos užregistruoto kraujo spektrinės juostos padėtys ir palygintos su literatūroje pateiktomis hemoglobino ir eritrocitų [73] (A) *SERS* spektrinėmis juostomis. *SERS* spektrai, pateikti literatūroje, buvo žadinami 785 nm bangos ilgio lazeriu (hemoglobinas nepasižymi intensyvia sugertimi $700 - 1200\text{ nm}$ bangos ilgio diapazone - t.y. gaunama nerezonansinė *SERS* sklaida). Autoriai taip pat nurodo, jog keičiant žadinančios bangos ilgį: 488 nm , 514 nm ,

633 nm ir 785 nm, užregistruojamame *SERS* spektre matomos vis silpnėjančios porfirino spektrinės juostos.

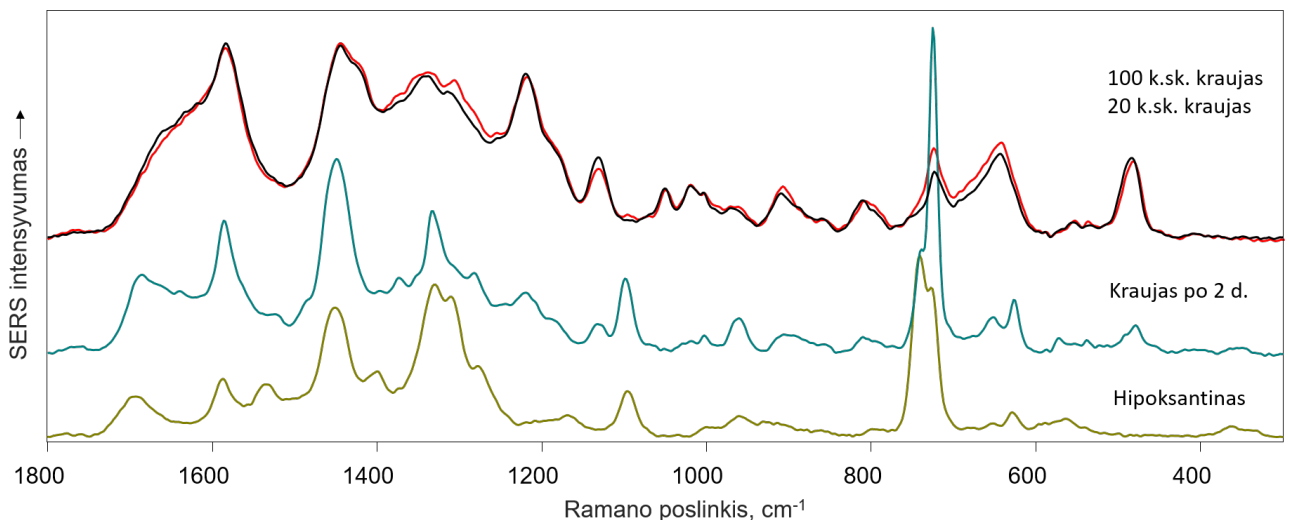
3 lentelė. Kraujo spektrinių juostų palyginimas su literatūroje priskirtomis hemoglobiniui (A), DNR (B), hipoksantinui (C) ir peptidams (D) būdingomis spektrinėmis juostomis pagal *SERS* sklaidos spektrus. Žvaigždutė žymi juostas, atsirandančias tik (II) rūšies kraujo *SERS* spektruose. Kiti žymėjimai: ν - valentinis virpesys, δ - deformacija plokštumoje, γ - deformacija ne plokštumoje, C_{β} - anglies atomas beta pozicijoje porfirinuose.

Kraujo spektrinės juostos padėtis, cm^{-1}	Lit. pateiktos sp. juostos padėtis, cm^{-1}	Virpesinė moda	Molekulė
483	478 ^A , 500 ^B	γ^A	Porfirinas ^A , DNR ^B
643	651 ^A , 650 ^B	$\nu(\text{C-S})$	Cisteinas (globinas) ^A , DNR ^B
723	722, 730 ^A , 724 ^C	$\delta(\text{COO}^-)^A$	Globinas (amino rūgštys) ^A , hipoksantinas ^C
801	801	pirolio žiedo kv.	Porfirinas ^A
810			
910	910	$\nu(\text{C-C})$	Globinas ^A
928*	924 ^A , 930 ^D	$\nu(\text{C-COO}^-)^A$	Amino rūgštys (globinas) ^{A,D}
942*			
1020			
1030*			
1051			
1075*			
1132*	1125	$\nu(\text{C}_{\beta}\text{-metil}), \nu(\text{C-C})$	Porfirinas ^A , DNR ^B
1182	1184	$\delta(\text{CH}_3)$	Treoninas (globinas) ^A
1220	1221-1285	amidai III ^D	
1320*			Globinas ^A
1339	1334	pirolio žiedo (dalis)	Porfirinas ^A
1366*			
1393*			Alifatiniai grupės (peptidai) ^D
1415*	1412	pirolio žiedo (dalis) ^A , $\nu(\text{COO}^-)^D$	Porfirinas ^A , Peptidas ^D
1445	1455	$\delta(\text{CH}_2)^A$	Porfirinas ^A , glutaminas ^D
1585	1580	skeleto	Porfirinas ^A
1610*			
1648, 1653*	1636-1664	amidai I	Proteinai, lipidai ^D

Palyginus hemoglobino Ramano sklaidos spektrus, kai žadinama 1064 nm bangos ilgio lazeriu su rezonansinės Ramano sklaidos spektrais [74], labiau matomos pirolio žiedo virpesinės modos, ir dvigubo ryšio valentinės modos. Tokios pat modos matomos ir eksperimento metu užregistruotuose kraujo *SERS* spektruose, taigi, galima manyti, jog 1064 nm bangos ilgiu užregistruotos *SERS* spektrinės juostos gali priklausyti hemoglobiniui, porfirinui. Kita vertus, šios spektrinės juostos taip pat gali

persikloti su peptidų spektrinėmis juostomis. Užregistruoti kraujo *SERS* spektrai taip pat palyginti su literatūroje pateiktais DNR [51] (B), kraujo [26] (C) ir peptidų, proteinų [72, 75] (D) *SERS* spektrais. Tačiau toks kraujo *SERS* spektrinių juostų priskyrimas tėra preliminarus.

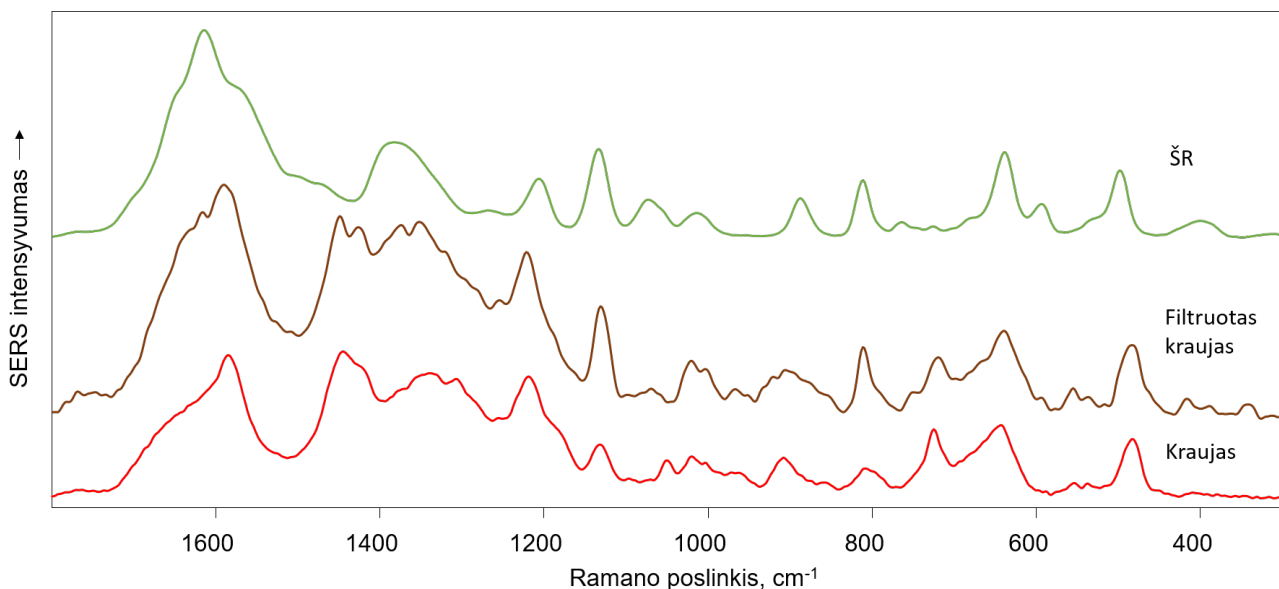
Ilgiau pastovėjusiuose kraujo bandinių *SERS* spektruose tampa matomos hipoksantino spektrinės juostos. Kraujo bandiniams pastovėjus net ir neilgą laiką, juose labai padidėja hipoksantino koncentracija. Nors spektrinė juosta ties 724 cm^{-1} yra pastebima *SERS* spektruose ne tik dėl hipoksantino molekulių virpesių (3 lentelė), tačiau santykinis juostos ties 724 cm^{-1} ir 643 cm^{-1} intensyvumas leidžia spręsti apie hipoksantino kiekio padidėjimą kraujyje. Tokie pokyčiai labai pastebimi *SERS* spektruose. Šviežio kraujo ir kraujo po 2 dienų bandinių *SERS* spektrai pateikti 23 pav.



23 pav. Kraujo *SERS* spektro laikinė evoliucija. *SERS* spektrai iš apačios į viršų: hipoksantino; kraujo po 2 d.; 20 kartų skiesto kraujo (juoda spalva) ir 100 kartų skiesto kraujo (raudona spalva).

Po 2 dienų kraujo spektre jau dominuoja hipoksantino spektrinės juostos, kai kurios kraujo ir serumo juostos spektre išlieka, tik jų intensyvumas sumažėja (greičiau prie nanodalelių adsorbuojasi hipoksantino molekulės). Hipoksantino juostos kraujo bandinyje tuo atveju, kai serumas nėra greitai atskiriamas nuo sukrešėjusių komponentų, pradeda matytis jau po kelių valandų [26]. Todėl visi kraujo bandiniai turi būti paimami švieži. Pagal hipoksantino juostos intensyvumą galima spręsti apie kraujo ir serumo stovėjimo laiką. Tolimesniuose spektriniuose *SERS* serumo eksperimentuose serumas dažniausiai atskiriamas labai greitai ir skiedžiamas, taigi hipoksantino toliau naudotuose serumo spektruose nebuvo matyti.

Bandinio, gauto išfiltravus kraują *SERS* spektras pateiktas 24 pav.



24 pav. Kraujo ir kraujo su filtravimo metu pašalintais baltymais *SERS* spektrų palyginimas. Iš apačios į viršų: kraujo spektras; filtruoto kraujo spektras; šlapimo rūgšties spektras.

Filtruojant kraują, skiestą su distiliuotu vandeniu, filtro poros yra pakankamai mažos, kad galėtų sulaikyti ląstelinius kraujo komponentus (eritrocitų skersmuo 6-9 μm , leukocitų - 7-20 μm , o trombocitų 1,5-3 μm). Taigi, galima manyti, jog dalis trombocitų vis dėl to galėjo būti nenufiltruoti. Tačiau skiedžiant vandeniu, kaip jau minėta, ląstelės turėjo hemolizuotis ir jų turinys patekti į skystąją kraujo dalį. Kartu su vandeniu filtruoto kraujo *SERS* spektre matomi keli pokyčiai bei atsiradusios intensyvesnės ŠR ir serumui būdingos spektrinės juostos: 1653 - 1614 cm^{-1} diapazone; 1134 cm^{-1} , 1073 cm^{-1} , 1014 cm^{-1} , 888 cm^{-1} , 812 cm^{-1} , petys ties 497 cm^{-1} .

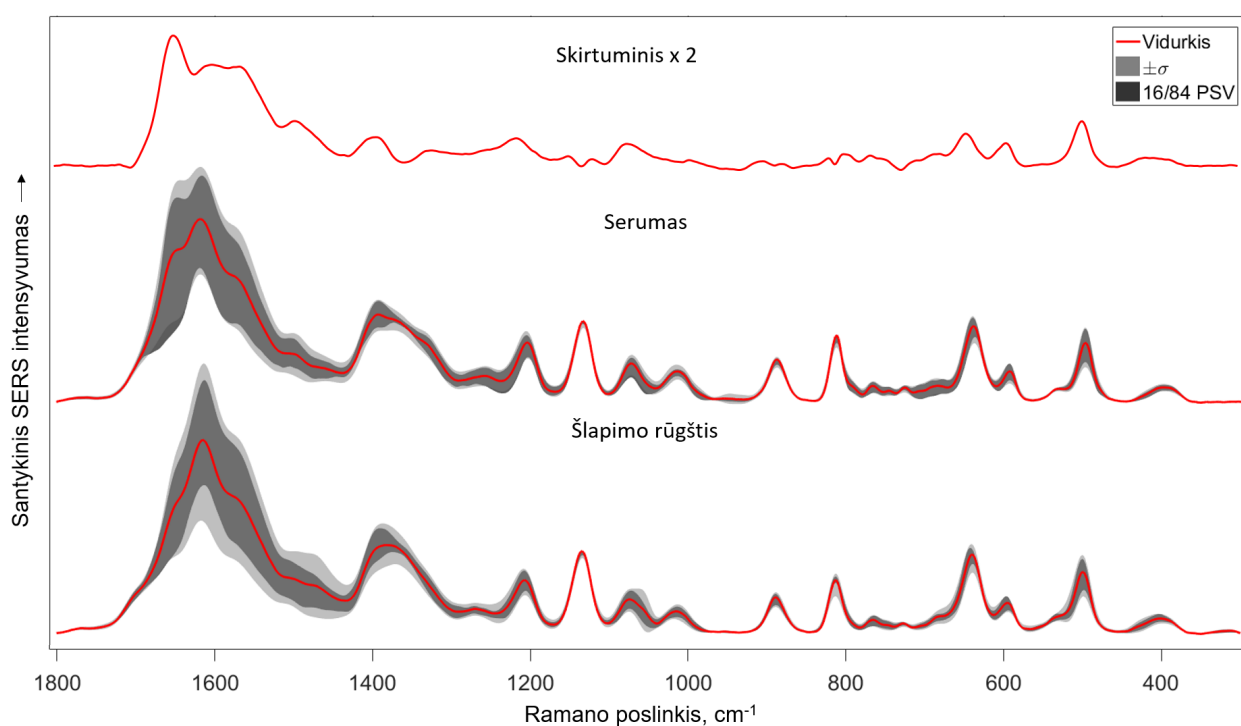
3.3 Serumo *SERS* spektrai

Kraujo spektrines juostas sunku priskirti molekulių virpesinėms modoms, patys kraujo *SERS* spektrai skiriasi tarpusavyje, standartinis nuokrypis didelis - ties 809 cm^{-1} esančia SA spektrine juosta $\sigma = 0,14$ ir sudaro 54% juostos intensyvumo. Siekiant užregistruoti pastovesnius *SERS* kraujo komponentų spektrus ir taip palengvinti vaisto pėdsakų analizę, iš kraujo buvo išskirtas serumas ir registruoti serumo *SERS* spektrai.

Kraujo serumo *SERS* spektruose matomos juostos beveik visos būdingos ŠR molekulių *SERS* spektrinėms juostoms. Šios molekulės labai aktyvios *SERS* spektruose, per amido grupes gali adsorbuotis ant nanodalelių. Iš tiesų visą vaistų pėdsakų aptikimą iš *SERS* serumo tyrimų apsunkina intensyvios matomos ŠR *SERS* spektrinės juostos serumo spektre. Kai kurios vaistų spektrinės juostos persikloja su ŠR virpesinėmis modomis ir atskirti jas tampa sunku. 25 pav. pateikti ŠR ir serumo *SERS* spektrai kartu su spektriniu standartiniu nuokrypiu ir spektrine variacija.

Siekiant aptikti vaistų molekulėms būdingas virpesines modas, matomas, *SERS* spektruose, svarbu palyginti serumo spektrus su ŠR molekulių ir žinoti, kurie nukrypimai serumo spektruose yra atsi-

randantys dėl ŠR molekulės kitokios orientacijos arba tautomero, kurie būdingi tik serumo spektrams ir atsirandantys dėl kitų molekulių virpesių. 25 pav. matoma, jog pačios ŠR *SERS* spektre pastebimi nuokrypiai nuo vidurkio didžiausi - 1650 cm^{-1} - 1436 cm^{-1} srityje (amido virpesiai, CH virpesiai). Tai nestebina, nes ŠR fiziologiniame pH gali egzistuoti dviejų tautomerų būsenos. Šioje srityje pokyčiai atsirasti gali dėl kitokios molekulės orientacijos. Šiuo atžvilgiu kraujo serumo spektrai mažiau varijuoja, bandinyje yra daugiau molekulių, galbūt ŠR molekulės orientacija nanodalelės atžvilgiu labiau apibrėžta. Vis dėl to, palyginus ŠR ir serumo *SERS* spektrus matomi ir keli pokyčiai: serumo *SERS* spektrinė juosta ties 1648 cm^{-1} kur kas intensyvesnė, juostos srityje 1650 cm^{-1} - 1436 cm^{-1} irgi intensyvesnės. Taip pat intensyvesnės spektrinės juostos ties 1499 cm^{-1} , 1394 cm^{-1} ir 1255 cm^{-1} , kurios atsiranda tikriausiai ne dėl ŠR molekulės virpesių.

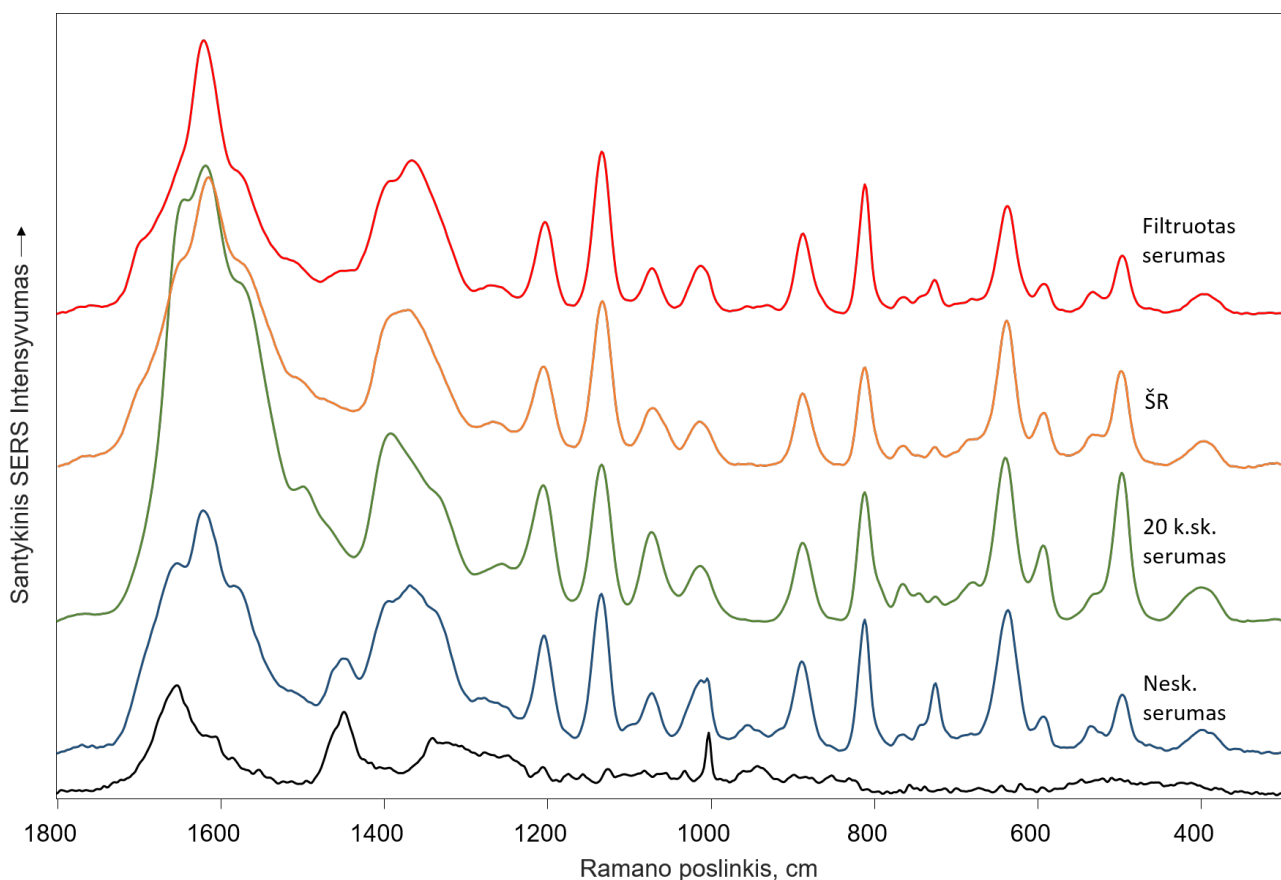


25 pav. Kraujo serumo ir šlapimo rūgšties *SERS* spektrų palyginimas. Apačioje - šlapimo rūgšties *SERS* spektras, viduryje - serumo *SERS* spektras, viršuje - skirtuminis serumo ir ŠR vidurkių spektras. Raudona linija žymi suvidurkintą spektrą, tamsiai užšpaltinta zona - standartinį nuokrypį nuo suvidurkinto spektro (σ), šviesiai užšpaltinta zona - tarp 16/84 procentilių esančią intensyvumo spektrinę variaciją (PSV). Spektrai normuoti pagal juostos ties 1134 cm^{-1} intensyvumą.

Kraujo serumo bandinys taip pat buvo filtruotas filtriniu popieriumi ir skiestas, norint surasti geriausią serumo bandinio paruošimo metodą. Nors filtrinio popieriaus porų dydis per didelis baltyms nufiltruoti, tačiau pokyčiai spektre vis tiek egzistuoja. Filtravimo ir skiedimo įtaka serumo *SERS* spektrams Serumo *SERS* spektrai, kai serumo spektras registruotas ant išdžiūvusio koloido, skiestas ir filtruotas, pateikti 26 pav.

Neskiesto serumo *SERS* spektruose matomos ir serumo Ramano sklaidos spektrui būdingos juostos ties 1450 cm^{-1} CH_2 , CH_3 deformaciniai virpesiai (lipidai/proteinai); ir 1004 cm^{-1} - fenilalanino

žiedo asimetriškas kvėpavimo virpesys [76]. Taip pat intensyvesnė spektrinė juosta ties 724 cm^{-1} tikriausiai atsiradusi dėl didesnės hipoksantino koncentracijos. Norint matyti tik *SERS* spektrines juostas, nepersiklojančias su Ramano sklaidos juostomis, serumas buvo skiestas distiliuotu vandeniu 2, 5, 10, 20, 50 ir 100 kartų. Ramano sklaidos spektrui būdingų serumo juostų nepastebėta, spektrų forma ir juostų padėtis nuo skiedimo nepriklauso, kai serumas skiedžiamas 10 ir daugiau kartų, taip pat skiestuose serumo bandiniuose nebėra matomas hipoksantinas. Taigi toliau savo darbe nagrinėsiu spektrus, kuriuose serumas skiestas 10 - 20 kartų.



26 pav. Filtruoto ir nefiltruoto serumo *SERS* spektrų palyginimas. Iš apačios į viršų: serumo Ramano sklaidos spektras; serumo *SERS* spektras; 10 k. skiesto serumo *SERS* spektras; skiesto ir filtruoto serumo *SERS* spektras. Spektrai normuoti pagal juostos ties 1134 cm^{-1} intensyvumą.

Serumą filtravus per filtrinį popierių gaunamas labai panašus spektras, taip pat būdingas ŠR, kaip ir turėtų būti, nes ŠR molekulė maža (168 Da), filtravimas jos neturėtų paveikti. Vis dėl to, įdomu tai, jog atsiranda matomi spektro pokyčiai srityje $1700 - 1230\text{ cm}^{-1}$. Spektrinė juosta ties 1647 cm^{-1} (amidai I virpesiai) nebėra pastebima, užtat išryškėja juosta ties 1707 cm^{-1} (taip pat amidai I virpesiai) taip pat sumažėja spektrinių juostų ties 1620 cm^{-1} , 1574 cm^{-1} (amidai II virpesiai), 1499 cm^{-1} (CH_2 , CH_3 virpesinės modos) juostos ties 1395 cm^{-1} (alifatiniai junginiai) intensyvumas. Spektrinė juosta, ties 724 cm^{-1} , būdinga hipoksantinui tampa intensyvesnė, galbūt dėl to, jog maža hipoksantino molekulė dabar gali lengviau adsorbuotis ant nanodalelių paviršiaus.

Filtravimui naudotas 2,7 μm porų dydžio filtrinis popierius, pagamintas iš medvilnės. Porų dydis per didelis, kad atskirtų serumo baltymus (kurių dydis iki 150 nm. Arba 66,5 kDa (ŽSA) - 1193 kDa (gama globulino)) nuo molekulių, tačiau yra žinoma, kad baltymai linę adsorbuotis ant celiuliozės skaidulų [77,78]. Filtruotas serumo kiekis buvo 0,5 ml, tokiaame kiekyje serumo yra daugiau nei 35 μg baltymų. Pagal [78] pateiktus duomenis (pH, filtravimo greitį), apskaičiuota, jog ant mano naudoto filtrinio popieriaus galėjo adsorbuotis daugiausia apie 27 μg baltymų (t.y. 77% esamų baltymų). Tuo, kad dalis baltymų adsorbavosi ant filtrinio popieriaus galima paaiškinti pokyčius, atsiradusius spektre. Taigi, serumo *SERS* spektre matoma ne tik ŠR, kaip buvo manyta iš pradžių, tačiau subtilūs spektriniai pokyčiai leidžia pastebėti ir baltymų *SERS* spektrines juostas, tačiau jas priskirti konkreitiems baltymams sudėtinga.

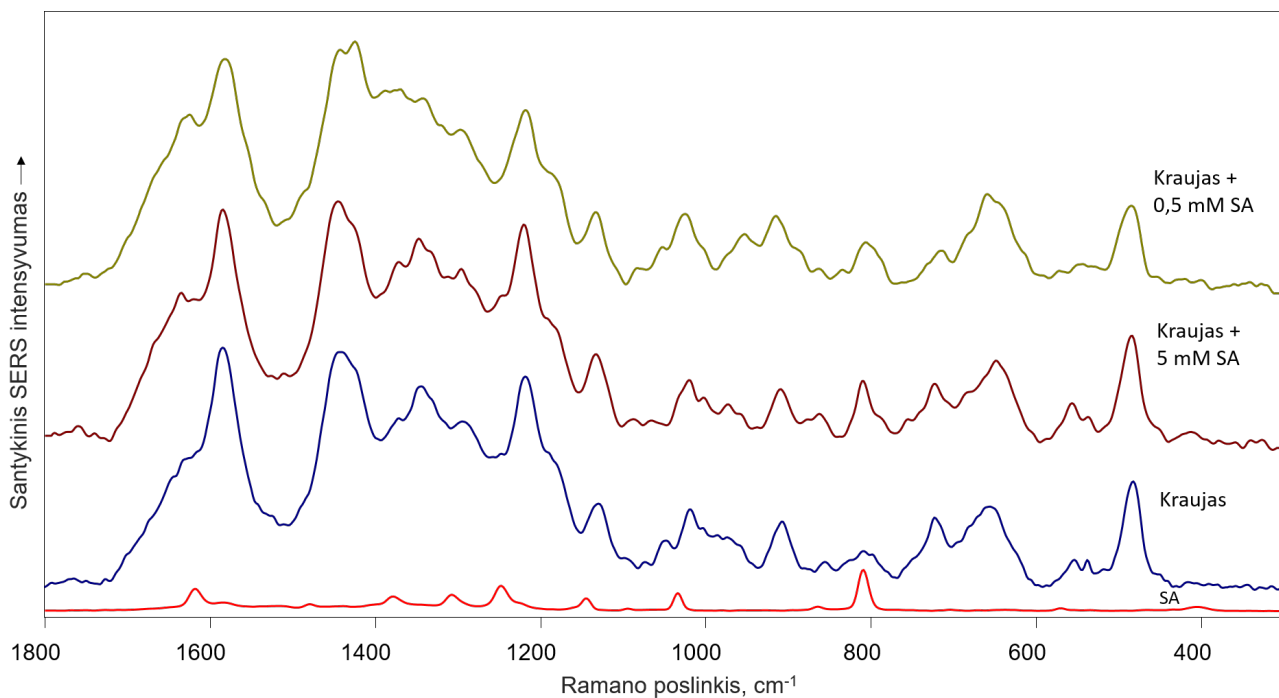
Apibendrintas serumo spektrinių juostų padėtis ir priskyrimas pateikti 4 lentelėje. Priskyrimas atliktas naudojantis literatūra [52,79] (šlapimo rūgštis) ir aukščiau pateikta spektrinių juostų analize.

4 lentelė. Serumo spektrinių juostų padėtis ir priskyrimas. Žvaigždutė žymi juostas, nepriklausiančias ŠR. Kiti žymėjimai: ν - valentinis virpesys, δ - deformacija plokštumoje, γ - deformacija ne plokštumoje, pl. - plokštumoje, nepl. - ne plokštumoje.

Spektrinės juostos padėtis, cm^{-1}	Virpesinė moda	Priskyrimas
411	δ (žiedo)	pl. žiedo deformacija
497	δ (C-N-C)	C-N-C; pl. žiedo deformacija
593	γ (N-H), žiedo	nepl. N-H; žiedo kvėpavimas
639	δ (C-O)	C-O, žiedo deformacija
765	γ (NH), žiedo	nepl. NH lenkimo; žiedo
812	δ (C-N), žiedo	C-N lenkimo; pl. žiedo deformacija
888	ν (C-N), δ (NH)	C-N valentinis; N-H lenkimo
1004*	žiedo	(fenilalaninas)
1012	ν (C-N)	C-N valentinis; žiedo
1073	ν (C-N), δ (OH)	C-N valentinis; OH lenkimo, mišri
1134	ν (C-N)	C-N valentinis; mišri
1206	δ (NH)	pl. N-H lenkimas; mišri
1260-1270		
1395	ν (C-N), δ (NH), δ (OH)	C-N valentinis; pl. NH, OH lenkimo
1504	ν (C-C)	C-C valentinis
1544*		
1574	ν (C-N), ν (C=C)	C=C, C-N valentinis
1617	ν (C=O)	C=O valentinis
1647*	ν (C=O), amidas I	C=O valentinis; amidas I

3.4 Salicilo rūgštis kraujyje ir serume *SERS* spektrai

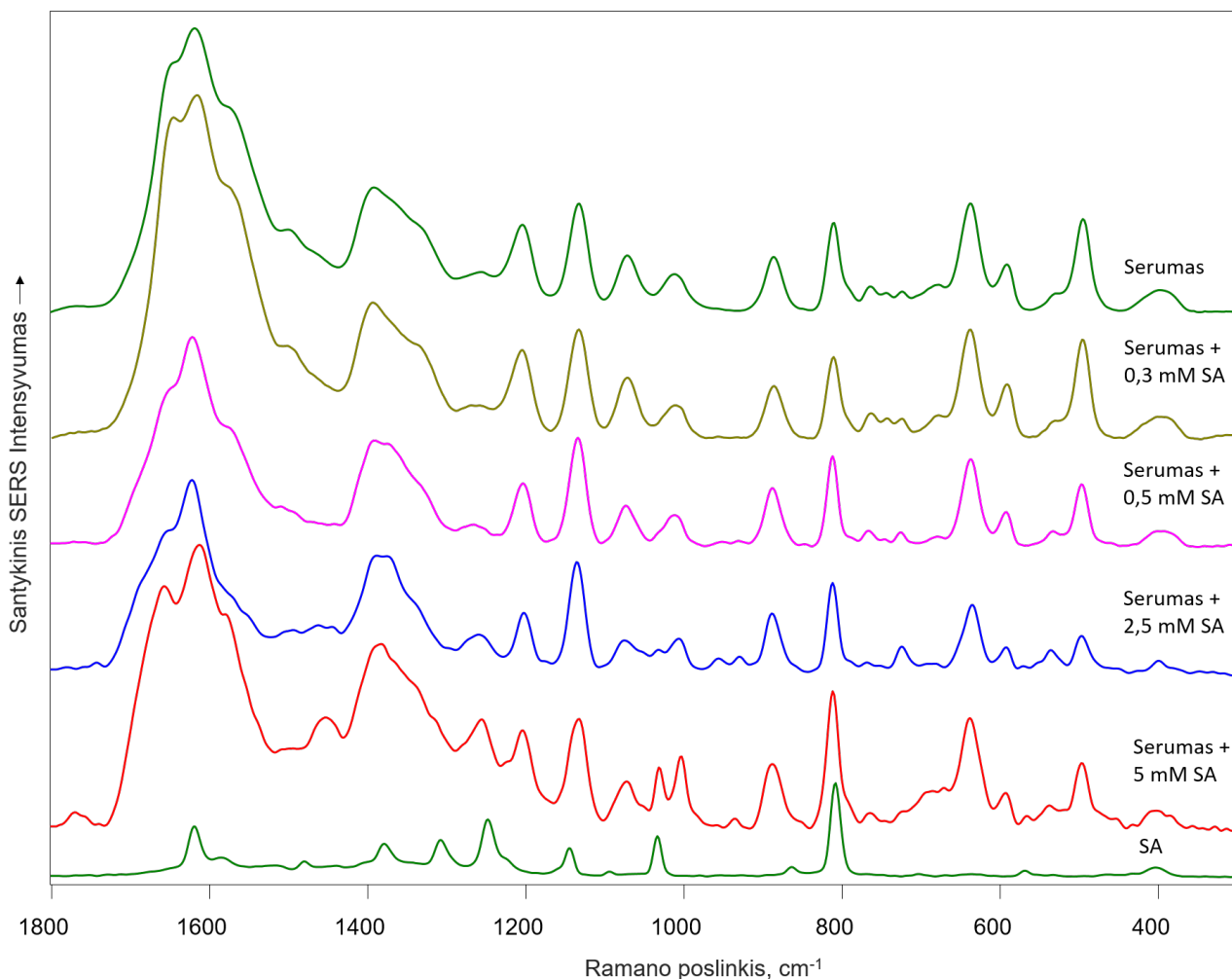
Siekiant nustatyti, kokie spektriniai žymenys gali būti naudojami aspirino perdozavimui iš kraujo *SERS* tyrimų nustatyti, vandeninis 10 mM SA tirpalas buvo sumaišytas su 10 kartų skiestu krauju. Kraujas buvo skiestas dejonizuotu vandeniu. Galutinė mišinio koncentracija - 20 kartų skiestas kraujas ir 5 mM SA. Užregistruoti spektrai palyginti su šviežio paprasto kraujo spektrais 27 pav.



27 pav. Kraujo ir kraujo mišinių su salicilo rūgšties vandeniniu tirpalu *SERS* spektrai. Iš apačios į viršų: 1 mM SA tirpalas vandenyje; 20 k. sk. kraujas; 20 k. sk. kraujas su 5 mM SA; 20 k. sk. kraujas su 0,5 mM SA.

Sumaišius kraują su SA, išryškėja SA virpesinė moda ties 809 cm^{-1} . Tačiau gryno kraujo *SERS* spektruose galimi dideli intensyvumo nukrypimai šioje srityje, apskaičiuotas standartinis nuokrypis sudaro 54% intensyvumo. Kraujo su SA spektrinės juostos ties 809 cm^{-1} intensyvumas patenka į standartinio nuokrypio zoną gryno kraujo *SERS* spektruose, tačiau vertinant užregistruotų spektrų duomenų pasiskirstymą šios spektrinės juostos intensyvumas akivaizdžiai didesnis 86 % atvejų. Taip pat matoma SA spektrinė juosta ties 1032 cm^{-1} ir 1252 cm^{-1} . Geresniam statistiniam įvertinimui reikėtų sukaupti didesnę gryno kraujo bandinių *SERS* spektrų kiekį, nors kol kas galima manyti, jog 20 kartų skiestuose kraujo spektruose galima aptikti 5 mM koncentracijos SA rūgšties molekules. Tačiau SA koncentracijai kraujyje esant mažesnei, SA spektriniai *SERS* žymenys neapstabimi ir SA kraujyje nebeaptinkama. Kraujo mišinio kartu su 0,5 mM SA koncentracija spektrinė juosta ties 809 cm^{-1} nebėra išskiriama.

Žmogaus kraujo serumas taip pat buvo maišytas su SA vandeniniu tirpalu ir stebėta, kaip ŠR ir kiti serumo komponentai ir SA sąveikauja. Spektrinių žymenų radimui nustatant SA vartojimą iš serumo *SERS* tyrimų, vandeninis 10 mM SA tirpalas buvo sumaišytas su neskiestu, 5, 10 kartų skiestu serumu. Pastebėta, kad geriausiai juostos atsiskiria ir mažesnė koncentracija aptinkama maišant 10 kartų skiestą serumą. Mišiniuose padarytos galutinės SA koncentracijos: 5 mM, 2,5 mM, 0,5 mM ir 0,15 mM. Užregistruoti spektrai palyginti su šviežio paprasto kraujo spektrais 28 pav.



28 pav. Serumo mišinių su skirtinga salicilo rūgšties vandeninio tirpalo koncentracija *SERS* spektrai. Salicilo rūgšties koncentracija kinta iš apačios į viršų: 5 mM; 2,5 mM; 0,5 mM ir 0,15 mM. Viršuje - serumo *SERS* spektras.

Kaip jau minėta, labai didelės SA koncentracijos ir aspirino perdozavimo šalutinis poveikis pasireiškia kraujo užrūgštėjimu, t.y. pH pokyčiu. Dėl to naudojant 5 mM koncentracijos SA tirpalą, jo pH nuo 2,4 buvo pakeistas iki 5,8, kitu atveju *SERS* spektro gauti nepavyko, mišinio pH buvo per žema ir tokioje pH ŠR būna protonuota (pKa - 5,6) ir baltymai denatūruoja (daugelis baltymų visiškai denatūruoja prie pH 4 [80]). Net ir sumaišius 5 mM SA tirpalą su serumu, dėl pernelyg žemos pH serumo spektras pasidaro panašus į neskiesto serumo *SERS* spektrą - matomos Ramano sklaidos spektrams būdingos spektrinės juostos ties 1004 cm^{-1} (fenilalaninas) ir plati spektrinė juosta ties 1454 cm^{-1} . ŠR nebe taip efektyviai adsorbuojasi ant nanodalelių. Serumo su SA *SERS* spektuose SA gali būti lengvai išskiriama pagal padidėjusį spektrinės juostos ties 810 cm^{-1} intensyvumą, atsiradusių juostą ties 1032 cm^{-1} , matomas spektrines juostas ties 1256 cm^{-1} ir 1389 cm^{-1} . Lyginant su serumo *SERS* spektrais, kuriuose SA koncentracija mažesnė, matoma, jog vienas geriausių spektrinių žymenų - juostos ties 1032 cm^{-1} intensyvumo didėjimas. Taip pat įdomu tai, jog juostų ties 1073 cm^{-1} ir 1013 cm^{-1} dublento intensyvumų santykis keičiasi priklausomai nuo SA koncentracijos. Kaip manoma, dėl intensyvesnės fenilalanino juostos ties 1004 cm^{-1} , kuri atsiranda pakitus

serumo pH. Vis dėl to, net plika akimi galima pastebėti serumo spektrinės juostos ties 1012 cm^{-1} kontūro pokytį, kai vandeniame tirpale SA koncentracija siekia $0,15\text{ mM}$. Kita intensyvi SA spektrinė juosta ties 809 cm^{-1} persikloja su serumo spektrine juosta, esančia ties 812 cm^{-1} . Tačiau serumo spektrinės juostos poslinkio priklausomybės nuo SA koncentracijos nepastebėta. Tik kai SA koncentracija 5 mM , šios juostos intensyvumas padidėja. Kai koncentracija mažesnė - vizualiai nesiskiria. Iš empirinių stebėjimų rezultatų pasirinkti spektriniai žymenys, kuriais remdamiesi galime aptikti SA *SERS* molekules serume (pateikti 5 lentelėje). Ieškant SA pėdsakų serume, nagrinėsime serumo *SERS* spektrinės juostos, esančios ties 1012 cm^{-1} , kontūrą, dubletą: 1012 cm^{-1} , 1073 cm^{-1} integrinį intensyvumą santyki ir spektrinės juostos ties 812 cm^{-1} integrinį intensyvumą (lyginant su spektrinės juostos į kurią normuoti spektrai - 1134 cm^{-1} - intensyvumu).

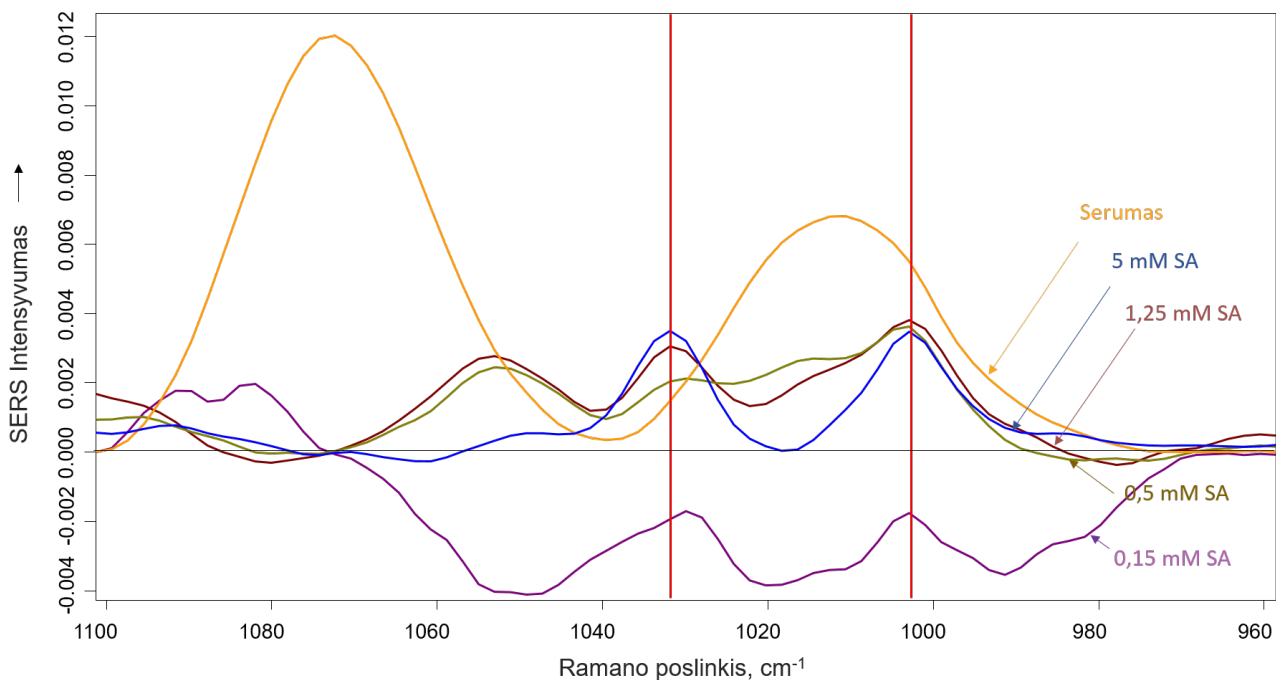
5 lentelė. Salicilo rūgšties kraujo serume galimi spektriniai žymenys. Skiltyje 1032 cm^{-1} žymima, ar galima išskirti SA juostą ties 1032 cm^{-1} aiškiai (M), ar matomas juostos petys (P), ar reikia naudoti kontūrų atskyrimo metodą (KA). Dubletas - santykinis integrinis juostos ties 1073 cm^{-1} ir 1012 cm^{-1} intensyvumas. 812 cm^{-1} - santykinis integrinis juostos ties 1134 cm^{-1} ir 812 cm^{-1} intensyvumas. Standartinis nuokrypis (σ) žymimas \pm ženklu.

Bandinys	1032 cm^{-1}	Dubletas	812 cm^{-1}
Serumas	0	$1,84 \pm 0,33$	$1,4 \pm 0,06$
Serumas + 5 mM SA	M	$0,72 \pm 0,12$	$1,04 \pm 0,25$
Serumas + $2,5\text{ mM}$	M	$0,95 \pm 0,18$	$1,42 \pm 0,07$
Serumas + 1 mM	P	$0,9 \pm 0,2$	$1,47 \pm 0,02$
Serumas + $0,7\text{ mM}$	P	$1,4 \pm 0,22$	$1,49 \pm 0,07$
Serumas + $0,15\text{ mM}$	KA	$1,67 \pm 0,3$	$1,61 \pm 0,04$

Iš 5 lentelės duomenų matoma, jog santykinis dubletas intensyvumas viršija 1,8 karto. O bandiniuose su serumu, įvertinus standartinį nuokrypį keičiasi nuo $0,6$ (5 mM) iki $1,6$ ($0,7\text{ mM}$) ir $1,9$ ($0,15\text{ mM}$) karto. Aiškus intensyvumo santykio didėjimas pastebimas didinant SA koncentraciją serumo ir SA mišiniuose, įvertinus ir standartinio nuokrypio vertę. Vertės, pateiktos 5 lentelėje apskaičiuotos išanalizavus po 10 *SERS* spektrų iš kiekvienos lentelėje pateiktos bandinių grupės. Kad galima būtų nustatyti SA koncentraciją iš dubletas santykinio intensyvumo tiksliau, reikėtų išanalizuoti serumo ir SA mišinių *SERS* spektrinių juostų kieki.

Spektrinės juostos ties 812 cm^{-1} santykinis intensyvumas lyginant su juosta ties 1134 cm^{-1} kinta mažiau (standartinis nuokrypis mažesnis), ir lyginant bandinius su skirtinga serumo koncentracija matoma priklausomybė tarp SA koncentracijos didėjimo ir intensyvumų santykio mažėjimo. Kai SA koncentracija didelė - 5 mM , santykinis intensyvumas mažiausias - 1. Mažėjant SA koncentracijai kraujyje, santykinis intensyvumas didėja iki $1,6$ (kai SA koncentracija bandiniuose yra $0,15\text{ mM}$). Tačiau palyginus gryno serumo ir serumo su SA bandinius, matoma, jog vien tik iš juostos ties 812 cm^{-1} ir ties 1134 cm^{-1} santykinio intensyvumo nustatyti, ar kraujo serume yra SA molekulių, ar ne, negalima.

Sirtuminiai spektrai, gauti iš mišinių su skirtinga SA koncentracija *SERS* spektrų atėmus serumo be SA *SERS* spektrą. Spektrai normuoti pagal juostos ties 1073 cm^{-1} intensyvumą. Rezultatai pateikti 29 pav.



29 pav. Serumo mišinių su skirtinga salicilo rūgšties vandeninio tirpalo koncentracija skirtingais *SERS* spektrai. Spektrai gauti iš mišinių spektrų atėmus serumo spektrą. Raudonos linijos žymi fenilalanino juostos ties 1004 cm^{-1} ir SA juostos ties 1032 cm^{-1} padėtis.

Raudona linija pažymėtos fenilalanino ties 1004 cm^{-1} ir SA ties 1032 cm^{-1} spektrinės juostos. Kai SA koncentracija didelė, tiek SA, tiek fenilalanino juostos gerai išskiriamos. Vis dėl to, kai SA koncentracija maža ($0,5\text{ mM}$ ir $0,15\text{ mM}$) SA spektrinė juosta slenkasi į mažesnės energijos pusę - pastebima ties 1030 cm^{-1} .

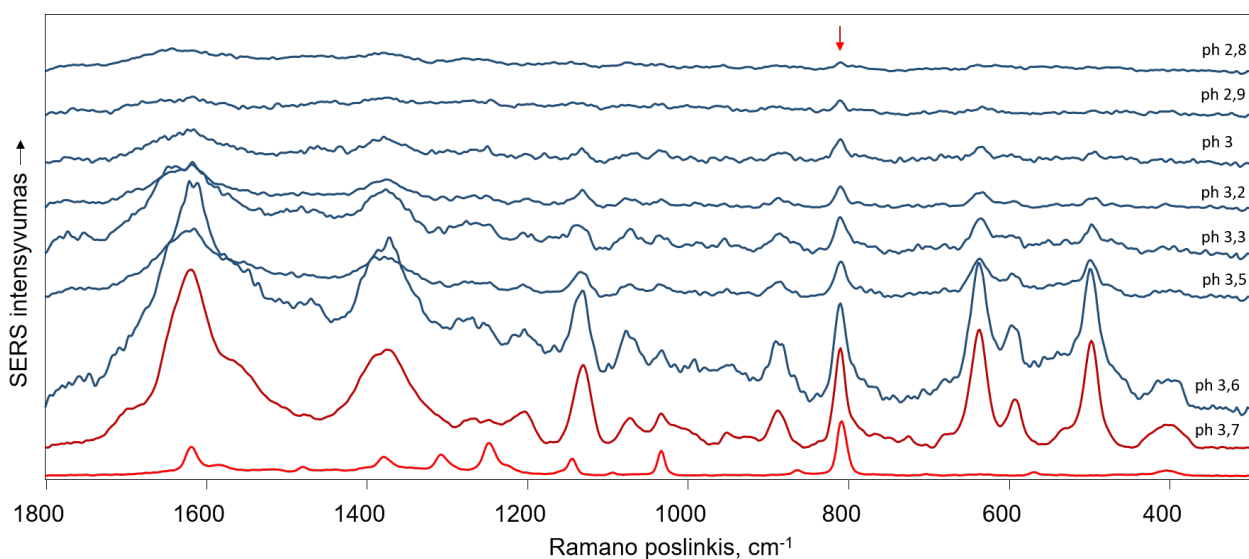
Apibendrinant aukščiau pateiktus serumo ir kraujo mišinių su SA *SERS* spektrų rezultatus, galima padaryti kelias išvadas:

1. Kraujo *SERS* spektrus sunku analizuoti, dėl to ir pastebimi spektriniai pokyčiai kraują sumaišius su SA nėra aiškūs. Didelės koncentracijos (5 mM) SA galima aptikti kraujo *SERS* spektruose. Tačiau mažesnės koncentracijos nebe.
2. Serumo *SERS* spektrines juostas galima priskirti daugiausia ŠR molekulėms, serumų *SERS* spektrų analizę, ieškant SA spektrinių žymenų atlikti lengviau.
3. SA spektriniai žymenys serumo *SERS* spektruose pasirinkti ir analizuojami trys - juostos ties 812 cm^{-1} poslinkis, juostos ties 1032 cm^{-1} petys ir juostų ties 1073 cm^{-1} ir 1012 cm^{-1} integrinis intensyvumų santykis.
4. SA su serumu mišinyje galima išskirti SA, kai SA koncentracija - $0,15\text{ mM}$. Tai atitinka 3 mM SA koncentraciją kraujyje.

Toliau darbe bus nuodugniau nagrinėjami pasirinkti spektriniai žymenys. Ieškoma būdų, kaip pagerinti SA *SERS* žymenų pastebimumą.

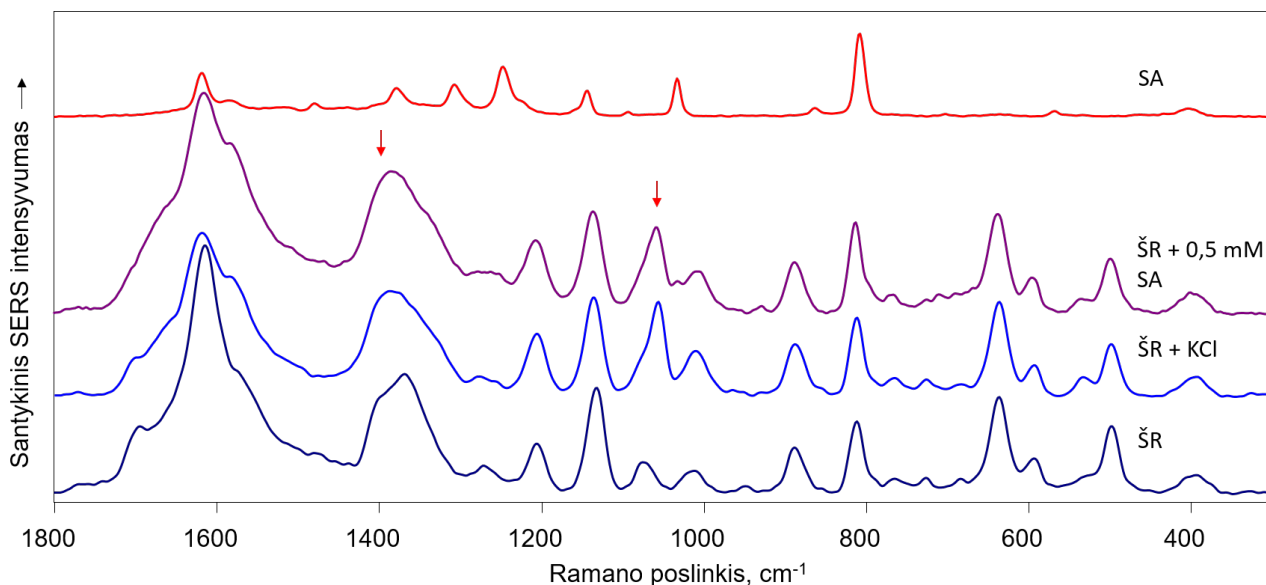
3.5 Terpės įtaka šlapimo rūgšties adsorbacijai ant koloidinių nanodalelių

400 μM ŠR ir 1 mM SA mišinio pH buvo keista, siekiant patikrinti, ar ŠR prasčiau adsorbuosis ant nanodalelių esant mažesniai pH (30 pav.). Salicilo rūgšties pKa - 2,98, o šlapimo rūgšties - 5,6. Jei pH nukrenta žemiau šios ribos (5,6), ŠR molekulės turėtų vis dar būti prisijungusios vandenilius, taigi, negalėti adsorbuotis ant nanodalelių paviršiaus. Kadangi SA pKa žemesnė, SA vis dar gali matytis SERS spektruose, nes SA molekulės vis dar bus netekusios vandenilio - joninės formos. 30 pav. matoma, jog pradinio tirpalo pH buvo 3,7 ir vis mažinant pH, ŠR molekulių spektrinių juostų intensyvumas mažėja. Kai pH vertė pasiekia 3,2 ŠR jau nelabai galima išskirti iš triukšmų, tačiau SA spektrinė juosta ties 812 cm^{-1} vis dar yra pastebima.



30 pav. 1 mM salicilo rūgšties ir 0,4 mM šlapimo rūgšties tirpalo SERS spektrai, keičiant pH. Apačioje pateiktas 1 mM salicilo rūgšties SERS spektras. Keista bandinio pH iš apačios į viršų: 3,7; 3,6; 3,5; 3,3; 3,2; 3; 2,9; 2,8. Rodykle pažymėta intensyviausia salicilo rūgšties spektrinė juosta ties 809 cm^{-1} .

ŠR tirpalas buvo maišytas su SA tirpalu, pasiekta galutinė 1 mM SA ir 0,4 mM ŠR koncentracija mišinyje. Gautas mišinys maišytas su nanodalelėmis santykiu 1:1. Kai 0,4 mM ŠR tirpalas maišomas su SA tirpalu matomas spektrinių juostų intensyvumo persiskirstymas. Siekiant pakeisti joninių jėgų pusiausvyrą gautuose tirpaluose ir nanodalelių paviršiaus krūvį, buvo pagamintas 0,05 M KCl tirpalas ir maišytas su SA ir ŠR mišiniais santykiu 1:4 (atitinkamai 1 dalis KCl, 4 dalys SA ir ŠR mišinio). Ir buvo tiriama SERS spektrų pokyčiai į mišinius pridėjus KCl (31 pav.).



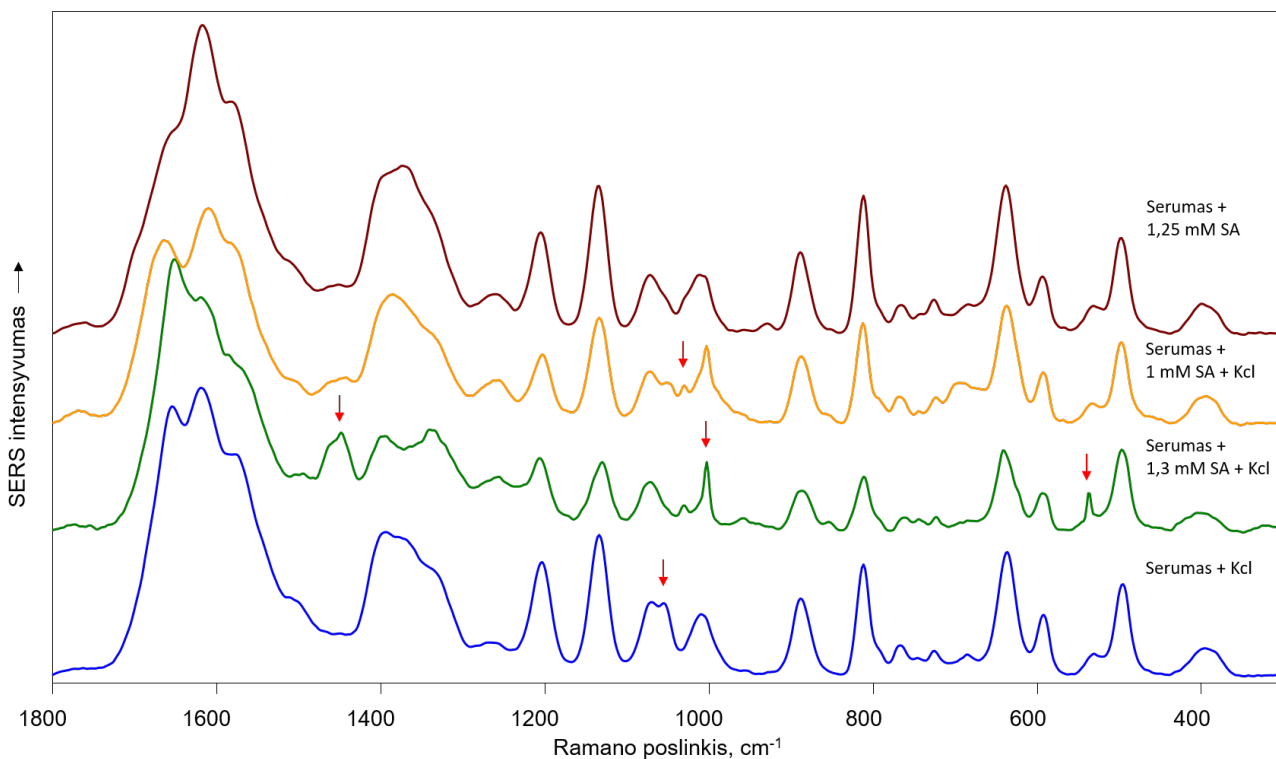
31 pav. SA spektrinių žymenų aptikimo tik ŠR ir SA mišinyje palyginimas, kai į mišinį įdėta KCl ir nieko nedėta. SERS spektrai iš apačios į viršų: ŠR; ŠR su KCl; ŠR su 0,5 mM SA tirpalu; 1 mM SA tirpalas. Rodyklėmis pažymėtos šlapimo rūgšties spektrinės juostos, kurios mišiniuose pakinta.

Chlorido jonai gerai adsorbuojasi ant nanodalelių paviršiaus ir dėl to gali pakeisti paviršiaus krūvį, bei paveikti paviršiaus aktyviausias zonas. Yra žinoma, kad dėl Cl^- koncentracijos bandinių su koloirdais tirpaluose kai kurių molekulių *SERS* signalas sustiprėja, kitų priešingai, susilpnėja [81, 82]. Tai susiję su pakeista nanodalelių paviršiaus struktūra ir elektrostatine jėga. Taigi, į bandinius įdėjus Cl^- jonų, galime susitiprinti kai kurių molekulių *SERS* signalą.

31 pav. matoma, jog tokia pati intensyvi spektrinė juosta ties 1050 cm^{-1} išryškėja į ŠR tirpalą įmaišius tiek KCl, tiek ir SA. Registruojant grynos ŠR su SA *SERS* spektrą, aiškiau pastebima ir SA spektrinė juosta ties 1034 cm^{-1} (serume ši spektrinė juosta pasislinkusi ties 1032 cm^{-1}). ŠR koncentracija panaši, kokia turėtų būti ir žmogaus kraujo serume - 0,4 mM. (serume: 1,5 mM - 0,4 mM), taigi SA adsorbiciją ant nanodalelių ir *SERS* intensyvumą slopina ne tik ŠR, tačiau ir kiti serumo komponentai. Nors spektrinė juosta, suintensyvėjanti ties 1050 cm^{-1} parodo, jog SA ir KCl ŠR *SERS* spektrines juostas pakeičia panašiai.

Iš 32 pav., matoma, jog į serumo bandinį su 1 mM SA koncentracija įdėjus KCl tirpalo, ŠR adsorbicija ant nanodalelių paviršiaus susilpnėja, spektre išryškėja fenilalanino ties 1004 cm^{-1} *SERS* spektrinė juosta. Tačiau aiškiai matoma tampa ir SA spektrinė juosta ties 1032 cm^{-1} . Šiek tiek sumažinus SA koncentraciją iki 1 mM, ŠR molekulės šiek tiek geriau adsorbuojasi ant nanodalelių, jų spektras intensyvesnis (skirtumus tikriausiai lemia subtilūs pH skirtumai), tačiau SA vis tiek matoma. Palyginimui pateiktas 1,3 mM SA ir serumo bandinio spektras viršuje, jame SA spektrinė juosta ties 1032 cm^{-1} nėra taip aiškiai matoma, ją pastebėti galima iš peties, atsirandančio juostoje, esančioje ties 1012 cm^{-1} . Gryno serumo bandinį sumaišius su KCl tirpalu SA spektrinės juostos nesimato, ŠR taip pat vis dar gali adsorbuotis ant nanodalelių paviršiaus. Atsiranda spektrinės juostos ties 1073 cm^{-1} persiskirstymas ir juosta ties 1050 cm^{-1} tampa matoma. Ši spektrinė juosta mišri (5 lentelė)

ir ties pagrindine smaile (1073 cm^{-1}). Panašūs rezultatai pastebėti ir maišant grynos ŠR tirpalą su KCl, tik spektrinių juostų persiskirstymas kur kas intensyvesnis ir labiau matomas. Tai nėra keista, nes kraujo serume yra daug kitpkių molekulių ir jonų, kurie gali palaikyti jonų pusiausvyrą stabilėnę. Taip pat, ŠR gali būti aptinkama prisijungusi prie ją pernešančių baltymų [38].



32 pav. SA spektrinių žymenų aptikimo serumo ir SA mišinyje palyginimas, kai į mišinį įdėta KCl ir nieko nedėta. SERS spektrai iš apačios į viršų: grynas serumas su KCl; serumo ir 1,3 mM SA mišinys su KCl; serumo ir 1 mM SA mišinys su KCl; serumo ir 1,3 mM SA mišinys. Rodyklėmis pažymėtos šlapimo rūgšties spektrinės juostos, kurios mišiniuose pakinta.

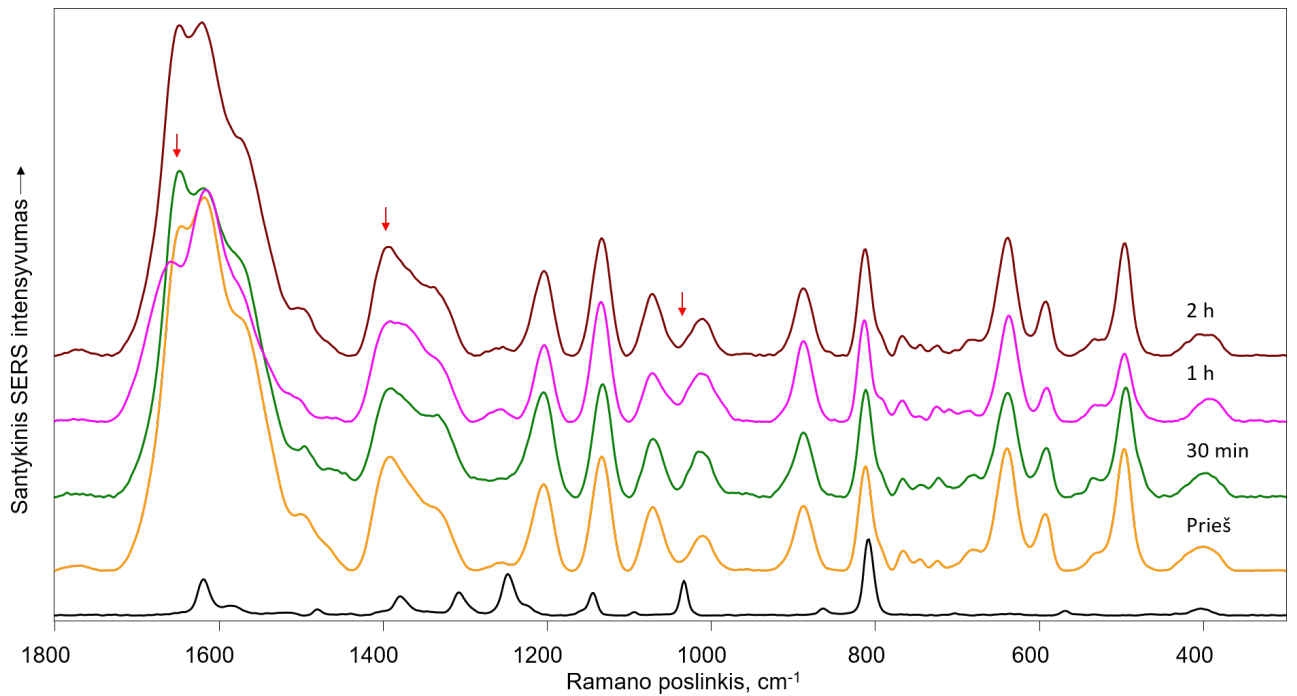
Apibendrinant šią rezultatų dalį galima pastebėti, jog SA spektrinis žymuo serumo *SERS* spektuose - juostos ties 812 cm^{-1} poslinkis, serumo ir SA mišinių spektuose yra nevalidus, tačiau SA ir ŠR spektuose, esant 1 mM SA koncentracijai galima pastebėti juostos poslinkį. Taip pat, norint pagerinti SA *SERS* spektrinius žymenis, galima bandyti mažinti serumo pH, taip sumažinant adsorbuotos ant nanodalelių šlapimo rūgšties kiekį. Taip pat, KCl pridėjimas į bandinius su serumu, galima padaryti juostos ties 1032 cm^{-1} spektrinį žymenį geriau matomą.

3.6 Klinikiniai salicilo rūgšties kraujo serume *SERS* tyrimai

Eksperimentai su serumu ir SA mišiniais atskleidė, jog SA gali būti aptinkama naudojantis *SERS* spektroskopija iš kraujo serumo tyrimų. Su mažiausia aptinkama riba - 0,15 mM, kas neskiestam serume atitinka 3 mM ir tai galima priskirti pavojingai vaisto kiekio koncentracijai (6 lentelė).

Ši hipotezė buvo tirta klinikinio tyrimo metu, naudojant paciento, suvartojusio 4 g aspirino, kraują. Kraujo bandinys buvo paimtas prieš suvartojant aspirino, tuomet po 30 min, po 1h ir po 2h nuo

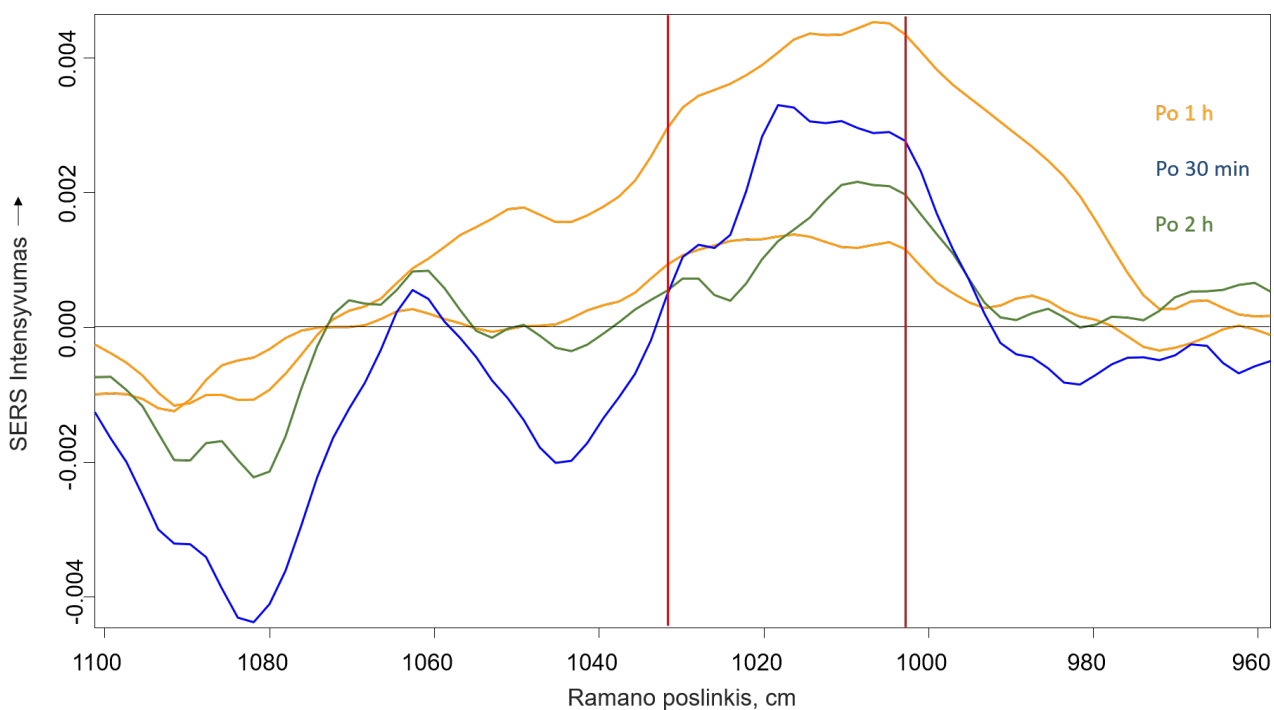
4 g aspirino dozės suvartojimo. Kraujo serumas atskirtas ir *SERS* spektrai registruoti iškart po kraujo bandinio paėmimo. Užregistruoti *SERS* spektrai pateikti 33 pav.



33 pav. Klinikinio tyrimo *SERS* spektroskopijos metodu rezultatai. Iš apačios į viršų pateikti serumo *SERS* spektrai, užregistruoti: prieš aspirino dozės suvartojimą; 30 min po 4 g aspirino dozės suvartojimo; po 1 h; ir po 2 h. Rodyklės žymi spektrinių pokyčių vietas. Spektrai normuoti pagal juostos ties 1134 cm⁻¹ intensyvumą.

Dubleto santykinis intensyvumas pastebimai sumažėja bandiniuose po 30 min ir po 1h lyginant su bandiniu, kai SA bandiniuose nėra. Bandinių *SERS* spektruose galima pastebėti spektrinės juostos petį ties 1032 cm⁻¹. Bandinyje po 2h šis petys matomas sunkiai, ir dubleto santykinis intensyvumas didesnis nei kituose bandiniuose. Taip pat pastebimi kiti spektriniai pokyčiai bandiniuose - spektrinės juostos ties 1650 cm⁻¹ ir ties 1398 cm⁻¹ intensyvumo pokyčiai. Aiškiausiai jie matomi bandiniuose po 1 h, kai SA koncentracija gaunama didelė. Kadangi šie spektriniai pokyčiai nėra pastebėti kituose spektruose tiriant SA ir serumo mišinius, į juos nėra atsižvelgta.

Kad būtų galima išnagrinėti spektrus nuodugniau, tuo tikslu reikalinga atlikti kontūrų atskyrimą arba analizuoti skirtuminius bandinių spektrus (34 pav.). Skirtuminiai spektrai gauti iš bandinių po 30 min, po 1 h ir po 2 h nuo aspirino suvartojimo *SERS* spektrų atėmus serumo prieš vartojimą *SERS* spektrą. Spektrai normuoti pagal juostos ties 1073 cm⁻¹ intensyvumą. Ties 1004 cm⁻¹ matomas padidėjęs spektrinio signalo intensyvumas, manoma, atsiradęs dėl fenilalanino spektrinės juostos. Taip pat akivaizdžiai matomas ir dubleto santykinio intensyvumo sumažėjimas, t.y. intensyvumo padidėjimas spektrinėje srityje: 1035 cm⁻¹ - 990 cm⁻¹. SA spektrinės juostos ties 1032 cm⁻¹ padėtis pažymėta raudona linija, tačiau skirtuminiuose spektruose petys matomas kiek kitoje vietoje - ties 1030 cm⁻¹.



34 pav. Skirtuminiai klinikinio tyrimo *SERS* spektrai, gauti atėmus serumo prieš aspirino vartojimą, spektrą. Žalia spalva pažymėti spektrai, užregistruoti po 2 h, oranžine - po 1 h, mėlyną - po 30 min nuo aspirino suvartojimo. Raudonos linijos žymi fenilalanino juostos ties 1004 cm^{-1} ir SA juostos ties 1032 cm^{-1} padėtis.

Dubleto santykinis intergrinis intensyvumas ir kiti žymenų parametrai apibendrinti 6 lentelėje.

6 lentelė. Salicilo rūgšties kraujo serume spektriniai žymenys. Skiltyje 1032 cm^{-1} žymima, ar galima išskirti SA juostą ties 1032 cm^{-1} aiškiai (M), ar matomas juostos petys (P), ar reikia naudoti kontūrų atskyrimo metodą (KA). Dubletas - santykinis integralinis juostos ties 1073 cm^{-1} ir 1012 cm^{-1} intensyvumas. 812 cm^{-1} - santykinis integrinis juostos ties 1134 cm^{-1} ir 812 cm^{-1} intensyvumas. Standartinis nuokrypis (σ) žymimas \pm ženklu.

	1032 cm^{-1}	Dubletas	812 cm^{-1}
Prieš	0	$1,8 \pm 0,31$	$1,45 \pm 0,03$
Po 30 min	KA	$1,46 \pm 0,25$	$1,46 \pm 0,11$
Po 1 h	KA	$1,23 \pm 0,2$	$1,54 \pm 0,07$
Po 2 h	KA	$1,53 \pm 0,1$	$1,37 \pm 0,01$

Iš 6 lentelės duomenų galima pastebėti, jog iš tiesų santykinis dubleto intensyvumas bandiniuose prieš aspirino vartojimą yra apie 1,8. Po 30 min - apie 1,46 ir po 1h nukrenta iki 1,2. Net atsižvelgus į standartinio nuokrypio vertes (prieš vartojimą - 1,5, po 1h - 1,4), matoma, jog po 1 h serume galima pastebėti SA pėdsakus ir SA koncentracija kraujyje yra didžiausia. Po 2 h SA koncentracija sumažėja, tačiau žinoma, jog ŠR kiekis kraujyje taip pat gali padidėti pavartojus aspirino. Be to, vertinant farmakokinetikos rezultatus labai svarbu atsižvelgti į kiekvieno asmens metabolinius skirtumus. Rezultatai gali smarkiai varijuoti.

Remiantis klinikinių tyrimų metu gautais rezultatais, aspirino likučius *SERS* spektroskopijos metodu galima aptikti iš serumo *SERS* spektrų analizės. Šio klinikinio tyrimo metu, pagal netiesioginius spektrinius pokyčius ir žymenis buvo nustatyta didesnė nei 3 mM salicilo rūgšties kraujyje koncentracija (žr. 5 lentelę) po 1 h nuo aspirino suvartojimo (kai salicilo rūgšties koncentracija turėtų būti

didžiausia). Kas atitinka suvartotą 4 g aspirino dozės farmakokinetiką. Tačiau po 30 min nuo aspirino suvartojimo taip pat galima aptikti salicilo rūgšties molekulių kraujyje. Apskaičiuota, jog tokiu būdu nustatytas SA molekulių kiekis kraujyje artimas 3 mM. Taigi, kol kas manoma, jog salicilo rūgšties detekcijos slenkstis iš kraujo *SERS* tyrimų - 3 mM. Tiksliesniems rezultatams galima taikyti statistinius metodus užregistravus kur kas daugiau *SERS* spektrų. Tačiau matoma galimybė aptikti salicilo rūgšties pėdsakus kraujo serume ir spektriniai pokyčiai priklausomai nuo salicilo rūgšties koncentracijos (kiekybiniam salicilo rūgšties molekulių nustatymui).

Pagrindiniai rezultatai ir išvados

1. Nustatyta, kad naudojantis šešiais skirtingais metodais susintetintas skirtingos formos ir dydžio Au ir Ag koloidines nanodaleles (Ag-cit, Ag-PVP, Ag-BH₄, Ag-cit-PVP ir Au-cit, Au-PVP), intensyviausias salicilo rūgšties *SERS* spektrinių juostų stiprinimas ($2,5 \cdot 10^4$) yra pasiekiamas 60 nm dydžio citratu stabilizuotų Ag nanodalelių atveju.
2. Nustatyta, kad patikimesni aspirino kraujyje žymenys gaunami tiriant ne paties kraujo, o jo serumo *SERS* spektrus, nes šiuo atveju yra paprastesnė spektrų interpretacija.
3. Nustatyti, aspirino kraujo serume žymenys yra spektrinių juostų ties 1032 cm^{-1} intensyvumas bei netiesioginiai žymenys - dubleto, sudaryto iš juostų ties 1073 cm^{-1} ir 1012 cm^{-1} intensyvumų santykis.
4. Atrastas, netiesioginis salicilo rūgšties kraujo serume *SERS* žymuo - fenilalanino spektrinės juostos ties 1004 cm^{-1} intensyvumas, kuris koreliuoja su salicilo rūgšties sukeltu kraujo pH sumažėjimu.
5. Iš modelinių salicilo rūgštis/serumas tirpalų bei iš realaus paciento kraujo serumo *SERS* tyrimų mažiausia *SERS* metodu aptikta salicilo rūgšties koncentracija kraujyje yra 3 mM, kuri indikuoja apie 4 standartinių aspirino tablečių suvartojimą 1 val. prieš tyrimą.

Literatūros sąrašas

- [1] L. Milevoj Kopčinović, Ž. Vogrinc, I. Kocijan, J. Culej, M. Aralica, A. Jokić, D. Antončić, M. Božović, Laboratory testing of extravascular body fluids in croatia: a survey of the working group for extravascular body fluids of the croatian society of medical biochemistry and laboratory medicine, *Biochem. medica*: **26**(3), 395–407 (2016).
- [2] S. Boukouris, S. Mathivanan, Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers, *Proteomics Clin Appl*. **9**(3-4), 358–367 (2015).
- [3] S. Feng, R. Chen, J. Lin, J. Pan, G. Chen, Y. Li, M. Cheng, Z. Huang, J. Chen, H. Zeng, Nasopharyngeal cancer detection based on blood plasma surface-enhanced raman spectroscopy and multivariate analysis, *Biosens. Bioelectron*. **25**(11), 2414–2419 (2010).
- [4] A. Soni, *Aspirin use among the adult US noninstitutionalized population, with and without indicators of heart disease, 2005* (Medical Expenditure Panel Survey, Agency for Healthcare Research and Quality, 2007).
- [5] S. Schmiedl, M. Rottenkolber, J. Hasford, D. Rottenkolber, K. Farker, B. Drewelow, M. Hippus, K. Saljé, P. Thürmann, Self-medication with over-the-counter and prescribed drugs causing adverse-drug-reaction-related hospital admissions: results of a prospective, long-term multi-centre study, *Drug Saf*. **37**(4), 225–235 (2014).
- [6] I. Pence, A. Mahadevan-Jansen, Clinical instrumentation and applications of raman spectroscopy, *Chem Soc Rev*. **45**(7), 1958–1979 (2016).
- [7] R. Aroca, *Surface-enhanced vibrational spectroscopy* (John Wiley & Sons, 2006).
- [8] P. L. Stiles, J. A. Dieringer, N. C. Shah, R. P. Van Duyne, Surface-enhanced raman spectroscopy, *Annu. Rev. Anal. Chem*. **1**, 601–626 (2008).
- [9] A. Mohammed, Theoretical studies of raman scattering, daktaro disertacija (2011).
- [10] A. J. McQuillan, The discovery of surface-enhanced raman scattering, *Notes Rec*. **63**(1), 105–109 (2009).
- [11] E. Le Ru, P. Etchegoin, *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and related plasmonic effects* (Elsevier, 2008).
- [12] J. Zhang, Nanostructures for surface plasmons, *Adv. Opt. Photonics* **4**, 157–321 (2012).
- [13] W. L. Barnes, A. Dereux, T. W. Ebbesen, Surface plasmon subwavelength optics, *Nature* **424**(6950), 824 (2003).

- [14] J. P. Camden, J. A. Dieringer, J. Zhao, R. P. Van Duyne, Controlled plasmonic nanostructures for surface-enhanced spectroscopy and sensing, *Acc. Chem. Res.* **41**(12), 1653–1661 (2008).
- [15] H. Horvath, Gustav mie and the scattering and absorption of light by particles: Historic developments and basics, *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* **110**(11), 787–799 (2009).
- [16] P. B. Johnson, R.-W. Christy, Optical constants of the noble metals, *Phys. Rev. B* **6**(12), 4370 (1972).
- [17] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, G. C. Schatz, The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment, *J. Phys. Chem. B*, **107**(3), 668–677 (2003).
- [18] P. G. Etchegoin, E. Le Ru, M. Meyer, An analytic model for the optical properties of gold, *J. Chem. Phys.* **125**(16), 164705 (2006).
- [19] T. Tsoulos, L. Han, J. Weir, H. Xin, L. Fabris, A closer look at the physical and optical properties of gold nanostars: an experimental and computational study, *Nanoscale* **9**(11), 3766–3773 (2017).
- [20] A. D. S. Indrasekara, S. Meyers, S. Shubeita, L. C. Feldman, T. Gustafsson, L. Fabris, Gold nanostar substrates for sers-based chemical sensing in the femtomolar regime, *Nanoscale* **6**(15), 8891–8899 (2014).
- [21] K. G. Stamplecoskie, J. C. Scaiano, V. S. Tiwari, H. Anis, Optimal size of silver nanoparticles for surface-enhanced raman spectroscopy, *J Phys Chem Lett.* **115**(5), 1403–1409 (2011).
- [22] S. L. Kleinman, B. Sharma, M. G. Blaber, A.-I. Henry, N. Valley, R. G. Freeman, M. J. Natan, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne, Structure enhancement factor relationships in single gold nano-antennas by surface-enhanced raman excitation spectroscopy, *JACS* **135**(1), 301–308 (2012).
- [23] D. Gómez, Z. Teo, M. Altissimo, T. Davis, S. Earl, A. Roberts, The dark side of plasmonics, *Nano letters* **13**(8), 3722–3728 (2013).
- [24] N. Psychogios, D. D. Hau, J. Peng, A. C. Guo, R. Mandal, S. Bouatra, I. Sinelnikov, R. Krishnamurthy, R. Eisner, B. Gautam, et al., The human serum metabolome, *PLoS one* **6**(2), e16957 (2011).
- [25] M. Casella, A. Lucotti, M. Tommasini, M. Bedoni, E. Forvi, F. Gramatica, G. Zerbi, Raman and sers recognition of β -carotene and haemoglobin fingerprints in human whole blood, *Spectrochim. Acta A* **79**(5), 915–919 (2011).

- [26] W. Premasiri, J. Lee, L. Ziegler, Surface-enhanced raman scattering of whole human blood, blood plasma, and red blood cells: cellular processes and bioanalytical sensing, *J. Phys. Chem. B* **116**(31), 9376–9386 (2012).
- [27] S. Boyd, M. F. Bertino, D. Ye, L. S. White, S. J. Seashols, Highly sensitive detection of blood by surface enhanced raman scattering, *J. Forensic Sci.* **58**(3), 753–756 (2013).
- [28] A. Bonifacio, S. Dalla Marta, R. Spizzo, S. Cervo, A. Steffan, A. Colombatti, V. Sergo, Surface-enhanced raman spectroscopy of blood plasma and serum using ag and au nanoparticles: a systematic study, *Anal. Bioanal. Chem.* **406**(9-10), 2355–2365 (2014).
- [29] S. Cervo, E. Mansutti, G. Del Mistro, R. Spizzo, A. Colombatti, A. Steffan, V. Sergo, A. Bonifacio, Sers analysis of serum for detection of early and locally advanced breast cancer, *Anal. Bioanal. Chem.* **407**(24), 7503–7509 (2015).
- [30] S. Feng, D. Lin, J. Lin, B. Li, Z. Huang, G. Chen, W. Zhang, L. Wang, J. Pan, R. Chen, et al., Blood plasma surface-enhanced raman spectroscopy for non-invasive optical detection of cervical cancer, *Analyst* **138**(14), 3967–3974 (2013).
- [31] D. Lin, S. Feng, J. Pan, Y. Chen, J. Lin, G. Chen, S. Xie, H. Zeng, R. Chen, Colorectal cancer detection by gold nanoparticle based surface-enhanced raman spectroscopy of blood serum and statistical analysis, *Opt. Express* **19**(14), 13565–13577 (2011).
- [32] P. Hu, X.-S. Zheng, C. Zong, M.-H. Li, L.-Y. Zhang, W. Li, B. Ren, Drop-coating deposition and surface-enhanced raman spectroscopies (dcdrs and sers) provide complementary information of whole human tears, *J. Raman spectrosc.* **45**(7), 565–573 (2014).
- [33] H. Han, X. Yan, R. Dong, G. Ban, K. Li, Analysis of serum from type ii diabetes mellitus and diabetic complication using surface-enhanced raman spectra (sers), *Appl. Phys. B* **94**(4), 667–672 (2009).
- [34] B. R. Wood, D. McNaughton, Resonance raman spectroscopy of erythrocytes, *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (2006).
- [35] W. R. Premasiri, Y. Chen, J. Fore, A. Brodeur, L. D. Ziegler, Sers biomedical applications: Diagnostics, forensics, and metabolomics, in *Frontiers and Advances in Molecular Spectroscopy* (Elsevier, 2018), 327–367.
- [36] R. S. Parker, Carotenoids in human blood and tissues, *J. Nutr.* **119**(1), 101–104 (1989).
- [37] M. Kazanci, J. P. Schulte, C. Douglas, P. Fratzl, D. Pink, T. Smith-Palmer, Tuning the surface-enhanced raman scattering effect to different molecular groups by switching the silver colloid solution ph, *Appl. Spectrosc.* **63**(2), 214–223 (2009).

- [38] J. S. Gebauer, M. Malissek, S. Simon, S. K. Knauer, M. Maskos, R. H. Stauber, W. Peukert, L. Treuel, Impact of the nanoparticle–protein corona on colloidal stability and protein structure, *Langmuir* **28**(25), 9673–9679 (2012).
- [39] Z. Huang, A. McWilliams, H. Lui, D. I. McLean, S. Lam, H. Zeng, Near-infrared raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer, *Int. J. Cancer* **107**(6), 1047–1052 (2003).
- [40] R. Liu, X. Zi, Y. Kang, M. Si, Y. Wu, Surface-enhanced raman scattering study of human serum on pva ag nanofilm prepared by using electrostatic self-assembly, *J. Raman Spectrosc.* **42**(2), 137–144 (2011).
- [41] A. Kamińska, A. Kowalska, P. Albrycht, E. Witkowska, J. Waluk, Abo blood groups' antigen–antibody interactions studied using sers spectroscopy: towards blood typing, *Anal. Methods* **8**(7), 1463–1472 (2016).
- [42] J. Wang, Y. Zeng, J. Lin, L. Lin, X. Wang, G. Chen, Z. Huang, B. Li, H. Zeng, R. Chen, Sers spectroscopy and multivariate analysis of globulin in human blood, *Laser Phys.* **24**(6), 065602 (2014).
- [43] S.-X. Li, Q.-Y. Zeng, L.-F. Li, Y.-J. Zhang, M.-M. Wan, Z.-M. Liu, H.-L. Xiong, Z.-Y. Guo, S.-H. Liu, Study of support vector machine and serum surface-enhanced raman spectroscopy for noninvasive esophageal cancer detection, *J. Biomed. Opt* **18**(2), 027008 (2013).
- [44] Y. Tan, B. Yan, L. Xue, Y. Li, X. Luo, P. Ji, Surface-enhanced raman spectroscopy of blood serum based on gold nanoparticles for the diagnosis of the oral squamous cell carcinoma, *Lipids Health. Dis.* **16**(1), 73 (2017).
- [45] D. Lin, H. Huang, S. Qiu, S. Feng, G. Chen, R. Chen, Diagnostic potential of polarized surface enhanced raman spectroscopy technology for colorectal cancer detection, *Opt. Express* **24**(3), 2222–2234 (2016).
- [46] B. Yan, B. Li, Z. Wen, X. Luo, L. Xue, L. Li, Label-free blood serum detection by using surface-enhanced raman spectroscopy and support vector machine for the preoperative diagnosis of parotid gland tumors, *BMC Cancer* **15**(1), 650 (2015).
- [47] D. Lin, J. Pan, H. Huang, G. Chen, S. Qiu, H. Shi, W. Chen, Y. Yu, S. Feng, R. Chen, Label-free blood plasma test based on surface-enhanced raman scattering for tumor stages detection in nasopharyngeal cancer, *Sci. Rep.* **4**, 4751 (2014).
- [48] Z. Movasaghi, S. Rehman, I. U. Rehman, Raman spectroscopy of biological tissues, *Appl. Spectrosc. Rev.* **42**(5), 493–541 (2007).

- [49] S. Li, Y. Zhang, Q. Zeng, L. Li, Z. Guo, Z. Liu, H. Xiong, S. Liu, Potential of cancer screening with serum surface-enhanced raman spectroscopy and a support vector machine, *Laser Phys. Lett.* **11**(6), 065603 (2014).
- [50] X. X. Han, H. Y. Jia, Y. F. Wang, Z. C. Lu, C. X. Wang, W. Q. Xu, B. Zhao, Y. Ozaki, Analytical technique for label-free multi-protein detection based on western blot and surface-enhanced raman scattering, *Anal. Chem.* **80**(8), 2799–2804 (2008).
- [51] D. van Lierop, Ž. Krpetić, L. Guerrini, I. A. Larmour, J. A. Dougan, K. Faulds, D. Graham, Positively charged silver nanoparticles and their effect on surface-enhanced raman scattering of dye-labelled oligonucleotides, *ChemComm* **48**(66), 8192–8194 (2012).
- [52] M. Pucetaite, M. Velicka, J. Pilipavicius, A. Beganskiene, J. Ceponkus, V. Sablinskas, Uric acid detection by means of sers spectroscopy on dried ag colloidal drops, *J. Raman Spectrosc.* **47**(6), 681–686 (2016).
- [53] D. Caspi, E. Lubart, E. Graff, B. Habet, Yaron, R. Segal, The effect of mini-dose aspirin on renal function and uric acid handling in elderly patients, *Arthritis Rheum.* **43**(1), 103–108 (2000).
- [54] C. Ben Salem, R. Slim, N. Fathallah, H. Hmouda, Drug-induced hyperuricaemia and gout, *Rheumatology* **56**(5), 679–688 (2016).
- [55] J. Nagelschmitz, M. Blunck, J. Kraetzschmar, M. Ludwig, G. Wensing, T. Hohlfeld, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of acetylsalicylic acid after intravenous and oral administration to healthy volunteers, *Clin. Pharmacol.* **6**, 51 (2014).
- [56] W. D. Masonx, N. Winer, Kinetics of aspirin, salicylic acid, and salicyluric acid following oral administration of aspirin as a tablet and two buffered solutions, *Journal of pharmaceutical sciences* **70**(3), 262–265 (1981).
- [57] L. Ross-Lee, M. Elms, B. Cham, F. Bochner, I. Bunce, M. Eadie, Plasma levels of aspirin following effervescent and enteric coated tablets, and their effect on platelet function, *Eur J Clin Pharmacol.* **23**(6), 545–551 (1982).
- [58] S. D. Waldman, *Atlas of Interventional Pain Management E-Book* (Elsevier Health Sciences, 2014).
- [59] G. A. Higgs, J. A. Salmon, B. Henderson, J. R. Vane, Pharmacokinetics of aspirin and salicylate in relation to inhibition of arachidonate cyclooxygenase and antiinflammatory activity, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**(5), 1417–1420 (1987).
- [60] L. Li, O. C. Geraghty, Z. Mehta, P. M. Rothwell, O. V. Study, Age-specific risks, severity, time course, and outcome of bleeding on long-term antiplatelet treatment after vascular events: a population-based cohort study, *The Lancet* **390**(10093), 490–499 (2017).

- [61] E. H. Crane, Highlights of the 2011 drug abuse warning network (dawn) findings on drug-related emergency department visits, in *The CBHSQ Report* (Substance Abuse and Mental Health Services Administration (US), 2013).
- [62] C. Dale, A. Aulaqi, J. Baker, R. Hobbs, M. Tan, C. Tovey, I. Walker, J. Henry, Assessment of a point-of-care test for paracetamol and salicylate in blood, *Qjm* **98**(2), 113–118 (2005).
- [63] P. Lee, D. Meisel, Adsorption and surface-enhanced raman of dyes on silver and gold sols, *J. Phys Chem Lett.* **86**(17), 3391–3395 (1982).
- [64] D. Aherne, D. M. Ledwith, M. Gara, J. M. Kelly, Optical properties and growth aspects of silver nanoprisms produced by a highly reproducible and rapid synthesis at room temperature, *Adv. Funct. Mater.* **18**(14), 2005–2016 (2008).
- [65] L. Mikac, M. Ivanda, M. Gotić, T. Mihelj, L. Horvat, Synthesis and characterization of silver colloidal nanoparticles with different coatings for sers application, *J. Nanopart. Res.* **16**(12), 2748 (2014).
- [66] M. Zhou, S. Chen, S. Zhao, Synthesis of icosahedral gold nanocrystals: a thermal process strategy, *J. Phys. Chem. Lett.* **110**(10), 4510–4513 (2006).
- [67] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech, Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited, *J. Phys. Chem. Lett.* **110**(32), 15700–15707 (2006).
- [68] Y. Q. He, S. P. Liu, L. Kong, Z. F. Liu, A study on the sizes and concentrations of gold nanoparticles by spectra of absorption, resonance rayleigh scattering and resonance non-linear scattering, *Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **61**(13-14), 2861-2866 (2005).
- [69] W. Haiss, N. T. Thanh, J. Aveyard, D. G. Fernig, Determination of size and concentration of gold nanoparticles from uv- vis spectra, *Anal. Chem.* **79**(11), 4215–4221 (2007).
- [70] J. Castro, J. Arenas, M. López-Ramírez, J. Otero, Detecting photoinduced electron transfer processes in the sers spectrum of salicylate anion adsorbed on silver nanoparticles, *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* **82**(4), 379–383 (2006).
- [71] K. Kneipp, A. S. Haka, H. Kneipp, K. Badizadegan, N. Yoshizawa, C. Boone, K. E. Shafer-Peltier, J. T. Motz, R. R. Dasari, M. S. Feld, Surface-enhanced raman spectroscopy in single living cells using gold nanoparticles, *Appl. Spectrosc.* **56**(2), 150–154 (2002).
- [72] D. Kurouski, T. Postiglione, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, I. K. Lednev, Amide i vibrational mode suppression in surface (sers) and tip (ters) enhanced raman spectra of protein specimens, *Analyst* **138**(6), 1665–1673 (2013).

- [73] D. Drescher, T. Büchner, D. McNaughton, J. Kneipp, SERS reveals the specific interaction of silver and gold nanoparticles with hemoglobin and red blood cell components, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**(15), 5364–5373 (2013).
- [74] H. Sato, H. Chiba, H. Tashiro, Y. Ozaki, Excitation wavelength-dependent changes in raman spectra of whole blood and hemoglobin: comparison of the spectra with 514.5-, 720-, and 1064-nm excitation, *JBO* **6**(3), 366–370 (2001).
- [75] S. Stewart, P. Fredericks, Surface-enhanced raman spectroscopy of peptides and proteins adsorbed on an electrochemically prepared silver surface, *Spectrochim. Acta A* **55**(7-8), 1615–1640 (1999).
- [76] R. d. C. F. Borges, R. S. Navarro, H. E. Giana, F. G. Tavares, A. B. Fernandes, L. Silveira Junior, Detecting alterations of glucose and lipid components in human serum by near-infrared raman spectroscopy, *RBE* **31**(2), 160–168 (2015).
- [77] H. Orelma, I. Filpponen, L.-S. Johansson, J. Laine, O. J. Rojas, Modification of cellulose films by adsorption of cmc and chitosan for controlled attachment of biomolecules, *Biomacromolecules* **12**(12), 4311–4318 (2011).
- [78] K.-S. Ha, H. Hinago, A. Sakoda, M. Suzuki, Adsorption of bovine serum albumin onto surface-modified carbon fibers and cellulose derivatives, in *Studies in Surface Science and Catalysis* (Elsevier, 1993), volume 80, 251–258.
- [79] B. L. Goodall, A. M. Robinson, C. L. Brosseau, Electrochemical-surface enhanced raman spectroscopy (e-sers) of uric acid: a potential rapid diagnostic method for early preeclampsia detection, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**(5), 1382–1388 (2013).
- [80] K. Wallevik, Reversible denaturation of human serum albumin by ph, temperature, and guanidine hydrochloride followed by optical rotation, *J. Biol. Chem.* **248**(8), 2650–2655 (1973).
- [81] Y.-S. Li, J. Cheng, Y. Wang, Surface-enhanced raman spectra of dyes and organic acids in silver solutions: chloride ion effect, *Spectrochimica acta. Part A* **56**(11), 2067–2072 (2000).
- [82] A. Otto, A. Bruckbauer, Y. Chen, On the chloride activation in sers and single molecule sers, *J. Mol. Struct.* **661**, 501–514 (2003).

NERECEPTINIŲ VAISTŲ KRAUJYJE KIEKYBINĖ ANALIZĖ SERS SPEKTRINIŲ METODŲ

Santrauka

Greitesniam aspirino perdozavimo nustatymui iš kraujo tyrimų yra reikalinga naudoti spartesnes priemones nei tradiciniai klinikiniai ir efektyviosios skysčių chromatografijos metodai. Tam tinkamas ir spektrinis *SERS* metodas, kuriuo galima aptikti mažas molekulių koncentracijas biologiniuose skysčiuose. *SERS* metodu gali būti pasiekiamas efektyvus (iki 10^9 kartų) spektrinių signalų stiprinimas išlaikant molekulių virpesinių modų specifiškumą. Pagrindiniai privalumai, taikant *SERS* spektrinį metodą diagnostiniuose mediciniuose tyrimuose, yra analizės operatyvumas, nereikalingas sudėtingas bandinio paruošimas ir tai, kad analizei užtenka mažo bandinio kiekio.

Atsižvelgiant į biologinių skysčių operatyvios analizės ir diagnostikos poreikį, šiame darbe išskirtas tikslas - pritaikyti koloidinį *SERS* spektrinį metodą nereceptinio vaisto, aspirino, koncentracijos kraujyje diagnostiniams tyrimams.

Šio darbo metu susintetintos nanodalelės, labiausiai stiprinančios salicilo rūgšties (aktyviojo aspirino metabolito) *SERS* spektrą, citratu dengtos Ag nanodalelės. Nustatyta, jog spektriniam *SERS* vaistų koncentracijos kraujyje nustatymui tinkamesnis ne kraujas, o kraujo serumas. Kraujo serumo spektrines *SERS* juostas galima priskirti daugiausia šlapimo rūgšties (kurios virpesinės modos labai aktyvios *SERS* spektruose) molekulėms. Aspirino koncentraciją kraujo serume galima nustatyti iš jo metabolito - salicilo rūgšties, spektrinių *SERS* žymenų. Vienas žymuo - spektrinės juostos ties 1032 cm^{-1} intensyvumas, kuri gali būti matoma kaip šlapimo rūgšties juostos ties 1012 cm^{-1} petys, nors esant mažoms salicilo rūgšties koncentracijoms jį sunku išskirti. Geresniam šios juostos išskyrimui galima naudoti kontūrų atskyrimo metodą. Taip pat pastebėtas kitas netiesioginis salicilo rūgšties *SERS* žymuo serumo *SERS* spektruose - fenilalanino spektrinės juostos ties 1004 cm^{-1} intensyvumo pokytis, kuris koreliuoja su SA sukeltu kraujo pH sumažėjimu. Fenilalanino spektrinės juostos intensyvumą galima pastebėti ir apskaičiuoti kaip dubletą, sudaryto iš juostų ties 1073 cm^{-1} ir 1012 cm^{-1} integrinį intensyvumą santykį. Taip pat egzistuoja santykinio intensyvumo kitimo priklausomybė nuo salicilo rūgšties koncentracijos serume. Taigi, yra galimybė atlikti kiekybinę salicilo rūgšties kraujyje nustatymą, kurio tikslumą galima pagerinti užregistravus daugiau kraujo serumo *SERS* spektrų ir pritaikius statistinius metodus. Iš modelinių tirpalų salicilo rūgštis/serumas bei iš realaus paciento kraujo serumo *SERS* tyrimų nustatyta mažiausia *SERS* metodu dar aptinkama rūgšties koncentracija kraujyje yra 3 mM, kuri indikuoja apie 4 standartinių aspirino tablečių suvartojimą 1 val. prieš tyrimą.

QUANTITATIVE ANALYSIS OF OTC DRUGS IN BLOOD BY MEANS OF SERS
SPECTROSCOPY

Summary

Over-the-counter (OTC) anti-inflammatory drugs, such as aspirin, are sold extensively throughout the world. Overdose and rapid use of this medication may lead to serious drug-induced liver injury and even death. The concentration of active metabolite of aspirin, salicylic acid, in patients' blood is commonly tested in clinical institutions, but the time from taking blood sample to diagnosis is far too long. In order to achieve accurate results faster, point-of-care testing methods are important. Surface enhanced Raman scattering (SERS) might be employed since it is capable to detect molecules by enhancing Raman scattering intensity by 10^9 times.

In this study, we found that citrate capped silver nanoparticles have the greatest enhancement of SERS signal of salicylic acid - the active metabolite of aspirin. Experiments with salicylic acid in blood and blood serum revealed that whole blood is not suitable for detection of drug traces, it is better to investigate blood serum instead. Spectral marker of salicylic acid was discovered - intensity of the spectral band at 1032 cm^{-1} . Also, additional spectral marker was revealed from spectral SERS investigations of the serum. The spectral band of phenylalanine at 1004 cm^{-1} which intensity correlates with pH level in blood changes because of salicylic acid concentration. Increased intensity in phenylalanine spectral band decreases the integral ratio of intensities between spectral bands at 1073 cm^{-1} and 1012 cm^{-1} that we can measure. So far the measurements of salicylic acid in serum as well as clinical trial revealed that concentrations of salicylic acid as low as 3 mM might be distinguished in blood by spectroscopic analysis. Such concentration of salicylic acid in blood indicates the consumption of 4 standard pills off aspirin 1 hour before clinical trial.