

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZIKOS FAKULTETAS

Agnė Zdaniauskienė

MIELIŲ LĄSTELIŲ TYRIMAS PAVIRŠIAUS SUSTIPRINTOS RAMANO
SPEKTROSKOPIJOS METODU PANAUDOJANT AUKSO NANODALELES
SU IŠORINIŲ DIELEKTRIKO SLUOKSNIU

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Biofizikos studijų programa

Studentė

Agnė Zdaniauskienė

Leista ginti
Darbo vadovas

prof. habil. dr. Gediminas Niaura

Studijų komiteto pirmininkas

prof. habil. dr. Ričardas Rotomskis

Vilnius
2018

Turinys

| | |
|---|----|
| 1. Įvadas | 3 |
| 2. Literatūros apžvalga | 5 |
| 2.1. Mielės | 5 |
| 2.2. Mielių struktūra | 6 |
| 2.3. Savitvarkiai monosluoksniai ir jų formavimas | 9 |
| 2.4. Virpesinės spektroskopijos taikymas biologinių objektų tyrimuose | 11 |
| 2.5. Ramano sklaida | 12 |
| 2.6. Molekulių virpesiai | 15 |
| 2.7. Paviršiaus sustiprinta Ramano spektroskopija (PSRS) | 16 |
| 2.8. PSRS stiprinimo mechanizmai | 17 |
| 2.9. Nanodalelės | 20 |
| 2.10. Aukso nanodalelės su išoriniu dielektriko sluoksniu | 22 |
| 2.11. Nanodalelių su išoriniu dielektriniu sluoksniu pritaikymas PSRS tyrimuose | 28 |
| 3. Eksperimento metodika | 31 |
| 3.1. Medžiagos | 31 |
| 3.2. Aparatūra | 32 |
| 3.3. Au@SiO ₂ nanodalelių sintezė | 34 |
| 3.4. Bandinių paruošimas | 36 |
| 4. Eksperimento rezultatai ir jų aptarimas | 37 |
| 4.1. Au@SiO ₂ ND sintezė | 37 |
| 4.2. SiO ₂ sluoksnio storio kontrolė | 37 |
| 4.3. Au@SiO ₂ ND dydžio įvertinimas elektroninės sugerties metodu | 38 |
| 4.4. Au@SiO ₂ ND tyrimas HR – TEM mikroskopu | 39 |
| 4.5. Au@SiO ₂ ND pritaikymas savitvarkių monosluoksnių tyrimuose | 41 |
| 4.6. Au@SiO ₂ ND pritaikymas mielių ląstelių tyrimuose | 48 |
| 5. Pagrindiniai rezultatai ir išvados | 57 |
| 6. Literatūros sąrašas | 58 |
| Santrauka | 63 |
| Summary | 64 |

1. Įvadas

Mielių ląstelės yra labiausiai paplitę ir intensyviausiai tiriami eukariotinių sistemų modeliai, skirti fizikocheminiams tyrimams, medicinai. Tyrimų metu gauti rezultatai leidžia giliau suprasti analogiškų procesų eigą ir reguliavimą aukštesniuose eukariotuose. Gyvosios ląstelės ir mikroorganizmai, įmobilizuoti ant skirtingų paviršių, dažnai naudojami bioelektronikos prietaisų, tinkamų pritaikyti įvairiose srityse, pvz. bioanalizės, jutiklių, aplinkos ir maisto apsaugos srityse, kūrimui [1, 2]. Be to, mielės yra naudingi mikroorganizmai, dalyvaujantys fermentacijos procesuose – duonos, alaus, vyno, sūrio, ar gyvulių pašarų gamyboje [3 – 5]. Tyrimo objektu pasirinktos mielės *Metschnikowia* rūšies mielės augimo terpėje tam tikromis sąlygomis išskiria netirpų raudoną pigmentą pulcheriminą, ko pasekoje pasireiškia antimikrobinis aktyvumas prieš įvairius patogeninius mikroorganizmus. Ši unikali *Metschnikowia* rūšies mielių savybė gali būti pritaikoma vyno gamybos pramonėje, kuomet kontroliuojamas nepageidaujamų mielių rūšių kiekis fermentacijos procese [6].

Norint suprasti procesus, vykstančius atskirose mielių ląstelėse, ir gauti molekulinio lygmens informaciją, reikalingas neardantis, bet labai jautrus spektroskopinis tyrimo metodas. Infraraudonųjų spindulių ir Ramano spektroskopija siūlo skirtingus mielių, mikroorganizmų ar kitų biologinių objektų tyrimo būdus [7], tačiau tik paviršiaus sustiprinta Ramano sklaidos spektroskopija (PSRS) suteikia galimybę atlikti *in-situ*, vandeninėje terpėje biologinių sistemų tyrimus. PSRS leidžia tirti pačių mažiausių struktūrinių biologinių organizmų dalių sandarą ir funkcijas bei surasti jų tarpusavio ryšius. Vis dėlto, tradiciškai paviršiaus sustiprinta Ramano spektroskopija yra apribota Au, Ag ir Cu nanostruktūrinių paviršių tyrimais. Siekiant praplėsti metodo galimybes kitų metalų (Pt, Fe, Co) ir paviršių (gyvos ląstelės) tyrimuose, 2010 metais buvo pasiūlyta panaudoti Au ir Ag nanodaleles, apsaugotas plonu SiO₂ sluoksniu (Au@SiO₂, Ag@SiO₂). Šiuo atveju, nanodalelės branduolys atlieka Ramano spektrų stiprintuvo vaidmenį, o silicio oksido sluoksnis apsaugo nanodaleles nuo tarpusavio sąveikos ir tiesioginės sąveikos su tiriamuoju paviršiumi.

Darbo tikslas: susintetinti Au@SiO₂ nanodaleles bei jas išbandyti analizuojant savitvarčių monoslauksnių struktūrą ir funkciją. Ištirti mielių ląstelių struktūrą paviršiaus sustiprintos Ramano spektroskopijos metodu panaudojant Au@SiO₂ nanodaleles.

Darbo uždaviniai:

- Susintetinti sferoido formos, ~ 50 nm dydžio Au@SiO₂ nanodaleles bei optimizuoti sintezės eigą.
- Au@SiO₂ nanodalelių sintezės metu kontroliuoti SiO₂ sluoksnio storį.

- Įvertinti nanodalelių dydį bei struktūrą elektroninės sugerties ir elektronų pralaidumo mikroskopijos metodais.
- Susintetintas nanodaleles pritaikyti savitvarkių monosluoksnių ant lygių metalų paviršiaus PSRS tyrimams ir įvertinti monosluoksnių struktūrą bei funkciją.
- Susintetintas nanodaleles pritaikyti mielių ląstelių PSRS struktūros tyrimams.

Atlikus visą magistratūros studijų tiriamąjį darbą tikimasi, kad susintetintos nanodalelės bus plačiau naudojamos biologinių sistemų, ląstelių biofizikiniuose tyrimuose paviršiaus sustiprintos Ramano spektroskopijos metodu.

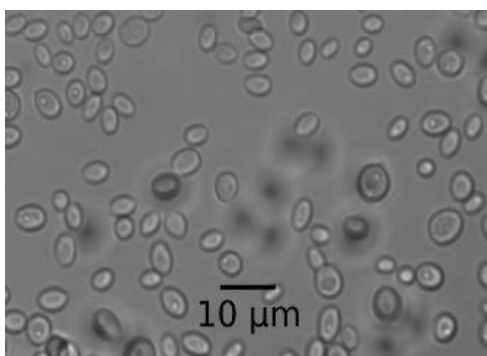
2. Literatūros apžvalga

2.1. Mielės

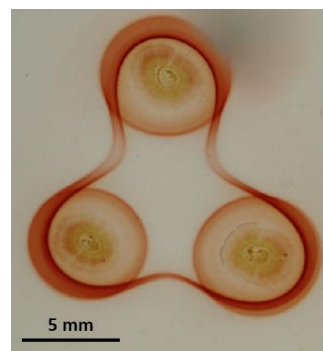
Mielės – eukariotiniai vienaląščiai organizmai, priklausantys grybų karalystei. Jos plačiai paplitę gamtoje (ore, vandenyje, dirvožemyje, gyvų organizmų žarnyne, augalų cukringose sultyse bei kitur) ir šiuo metu yra vieni iš intensyviausiai tiriamų mikroorganizmų. Mielių ląstelės yra po vieną arba sukibusios po kelias, paprastai elipsės formos nuo 1 iki 10 μm diametro dydžio (1 pav.). Aktyviai besidauginančios mielių ląstelės dalinasi asimetriškai, suformuodamos dukterinę ląstelę – pumpurą, kuriam atsikabinus motininėje ląstelėje lieka randas [8].

Metschnikowia rūšies mielės – tai pumpuruojančios vienaląstės mielės, priklausančios *Ascomycota* grybų tipui. Šios mielės aptinkamos miškuose ant įvairių uogų, vaisių, gėlių [6]. *Metschnikowia pulcherrima* išsiskiria tuo, kad sintetina pulcherimino rūgštį, kuri su laisva trivalente geležimi sudaro netirpų raudoną pigmentą pulcheriminą $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{Fe}_{2/3}$ [9]. Esant didesniai geležies kiekiui augimo terpėje pulcherimino rūgštį sintetinančios mielės formuoja įvairaus atspalvio rudas dangas. Priklausomai nuo augimo terpės sąlygų aplink mieles galima stebėti savaime susidarančius rudus žiedus [10]. Pati geležis yra būtina kvėpavimo ir kitų gyvybinių procesų palaikymui. Todėl *Metschnikowia pulcherrima* nuolat konkuruoja su kitais mikroorganizmais ir taip veikia kaip antagonistai [11].

Tarp pagrindinių priežasčių, lemiančių mielių patrauklumą įvairiems moksliniams tyrimams, yra ir tai, jog jos saugios, greitai auginamos naudojant paprastus kultivavimo metodus.



1 pav. *Metschnikowia pulcherrima* mielių ląstelių struktūra optiniu mikroskopu [12].



2 pav. *Metschnikowia pulcherrima* mielių ląstelių formuojami pigmentiniai žiedai (fotoaparato nuotrauka) [10].

2.2. Mielių struktūra

Mielių ląstelės sandara nesiskiria nuo visų kitų ląstelių, turinčių branduolį. Branduolys apgaubtas dvigubos membranos, ribosomos gana didelės, o genomai sudaryti iš chromosomų. Mielių ląstelę dengia apvalkalas, sudarytas iš trijų dalių: 1) plazminės membranos, 2) periplazminės ertmės ir 3) ląstelės sienelės [13].

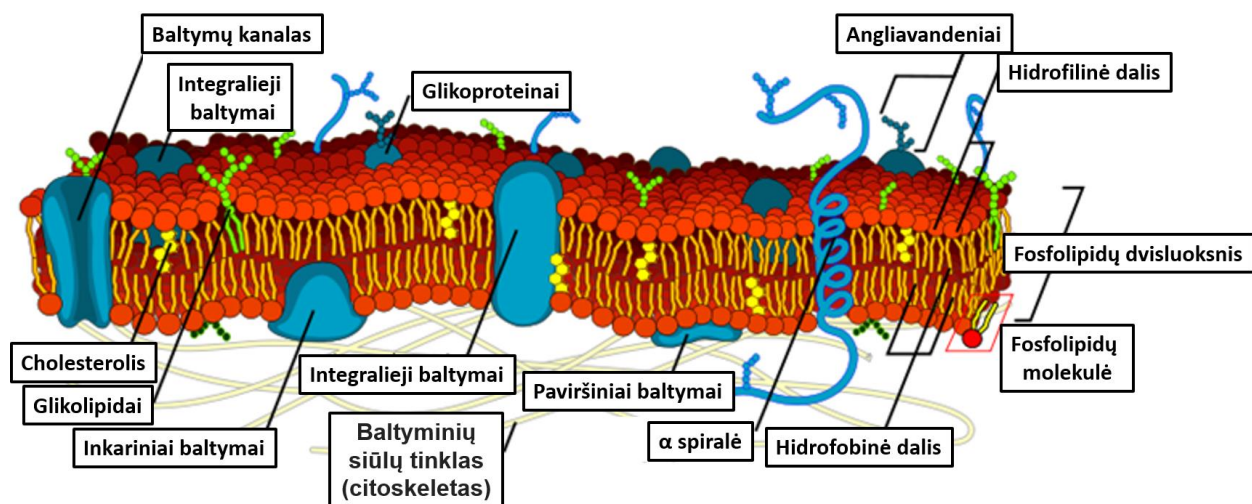
Plazminė membrana

Didžiąją dalį (apie 75–80 %) biologinių sistemų masės sudaro mažos molekulės: vanduo, aminorūgštys, angliavandeniai, lipidai ir įvairūs neorganiniai jonai. Likusią dalį – makromolekulės, kitaip vadinamos biologiniais polimerais. Tai peptidai ir baltymai (sudaryti iš aminorūgščių), DNR (deoksiribonukleorūgštys, sudarytos iš deoksiribonukleotidų), RNR (ribonukleorūgštys, sudarytos iš ribonukleotidų). Šie polimerai ir fosfolipidai yra ląstelės struktūros – membranos pagrindas. Visas ląsteles gaubia plazminė membrana, ji atskiria jos vidinę terpę nuo išorinės bei ląstelę nuo ląstelės [14].

Mielių, kaip ir kitų ląstelių, plazminė membrana susideda iš lipidų dvisluoksnio, kuriame yra paviršiniai, integralieji ir inkariniai baltymai. Paviršiniai baltymai silpnais elektrostatiniais ir (arba) vandeniliniiais ryšiais jungiasi prie membranos paviršiaus ir, pasikeitus aplinkos pH ar joninei jėgai, lengvai nuo jo atitrūksta. Integralieji baltymai vieną ar kelis kartus perveria membraną ir išskiriami tik ją suardžius. Inkariniai baltymai hidrofobiniu inkaru prijungti prie membranos dvisluoksnio ir gali judėti membranos paviršiuje [14].

Visi šie baltymai atlieka įvairias funkcijas: veikia kaip siurbliai, kanalai, receptoriai ir fermentai. Jie yra atsakingi už atrankią medžiagų pernašą, membranose vykstančias fermentines reakcijas, signalų priėmimą ir perdavimą ir kt. už atrankią medžiagų pernašą [14].

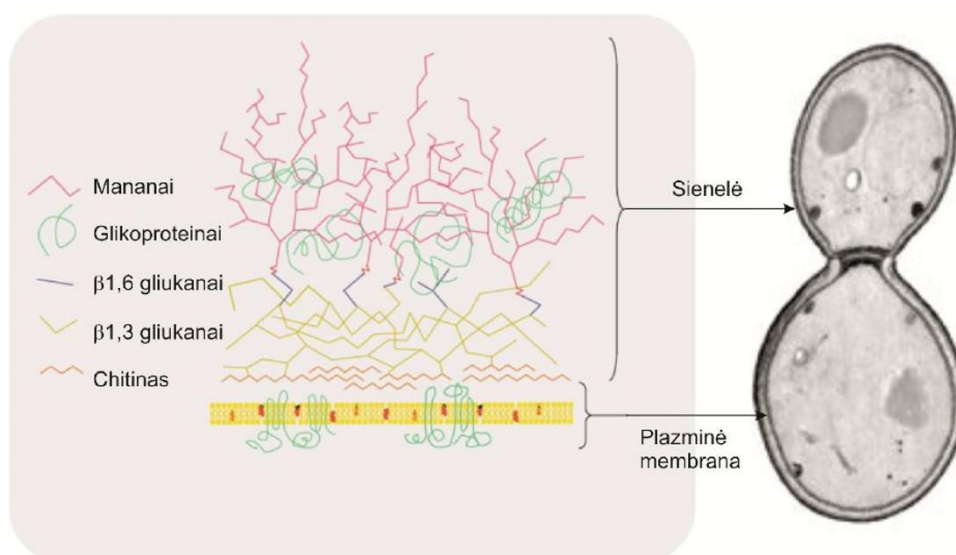
Beveik visi membranų lipidai yra amfifilinės molekulės. Tokių molekulių viena dalis yra hidrofilinė, kita – hidrofobinė. Dėl amfifilinių savybių fosfolipidai ir glikolipidai vandeniniuose tirpaluose sudaro dvisluoksnį. Kai vanduo iš visų pusių supa lipidų molekules, jos jungiasi taip, kad polinės galvutės būtų atsuktos į vandens pusę, o hidrofobinės uodegėlės paslėptos dvisluoksnio viduje. Lipidų dvisluoksnio hidrofobinės sritys nesiliečia su vandeniu. Membranų takumas priklauso nuo cholesterolio kiekio, kuris įvairiose membranose yra skirtingas. Daugiau cholesterolio turinčios membranos yra stangresnės. Cholesterolio molekulės hidrofobinė dalis yra įsiterpusi tarp fosfolipidų uodegėlių ir sudaro su jomis hidrofobinius ryšius, kurie suvaržo riebalų rūgščių grandinių judrumą. Hidrofilinė cholesterolio OH grupė vandeniliniu ryšiu jungiasi su riebalų rūgšties karboksigrupės deguonimi ir taip pat suvaržo fosfolipido molekulės judrumą membranos plokštumoje [14].



3 pav. Ląstelės plazminės membranos struktūra [adaptuota pagal [15]].

Ląstelės sienelė

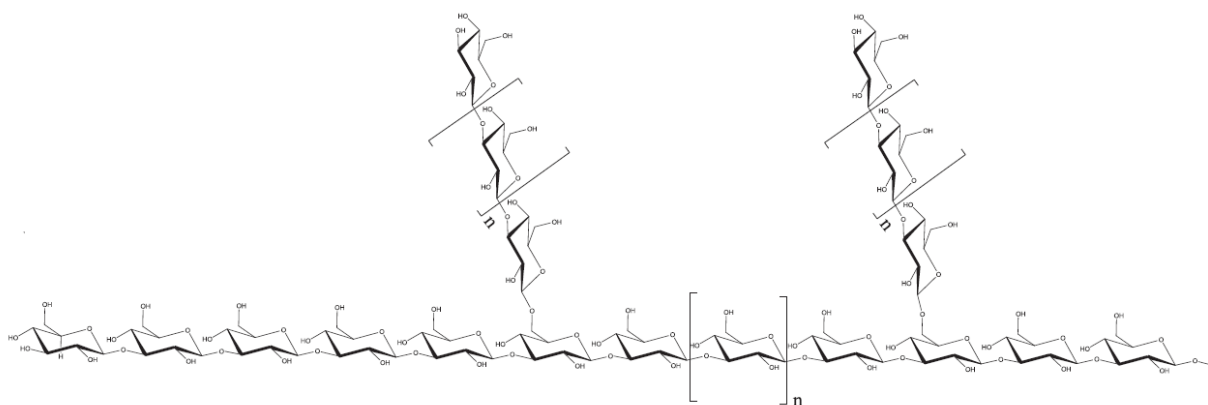
Mielių sienelė yra dinaminė organelė, nulemianti ląstelės formą ir integralumą ląstelei dalijantis ar augant. Tvirta, bet kartu ir labai elastinga ląstelės sienelė apsaugo nuo per didelio vandens patekimo į ląstelės vidų dėl susidarančio osmosinių slėgių skirtumo ląstelės viduje ir išorėje. Mielių ląstelės sienelė sudaryta daugiausiai iš vidinėje sienelės pusėje esančių β -gliukanų (angliavandeniai) ir išorinėje pusėje – manano-baltymų (mananooligosacharidų sujungtų su baltymais) (4 pav.). Ląstelės sienelės sudėtyje taip pat yra chitino (angliavandenis). Sienelės sudėtis priklauso nuo aplinkos išorinių sąlygų [13].



4 pav. Mielių ląstelių sienelės molekulinės sandaros schema [16].

β – gliukanai yra heterogeninė natūralių polisacharidų grupė [17]. Priimta manyti, kad pagrindinė šių polisacharidų pluoštų funkcija – suteikti sieniei mechaninį tamprumą. Mielių β –

gliukanai yra sudaryti iš β -(1,3)-D-gliukozės radikalo. Prie jo yra prisijungusios β -(1,6) šoninės grandinės (5 pav.). Mielių sienelės ekstraktuose β -1,3- gliukanas randamas šakotos struktūros, kurių pluoštai sujungiami per β -1,6 jungtį. Patį polisacharido pluoštą sudaro daugiau kaip 1500 gliukozės liekanų. β -1,3-gliukanas kovalentiškai sujungtas su kitais sienelės komponentais: neredukuoti galai sujungti su redukuotais chitino galais per β -1,4 ryšį; β -1,6-gliukanas ir β -1,3-gliukanas sujungti per nežinomą ryšį [18].



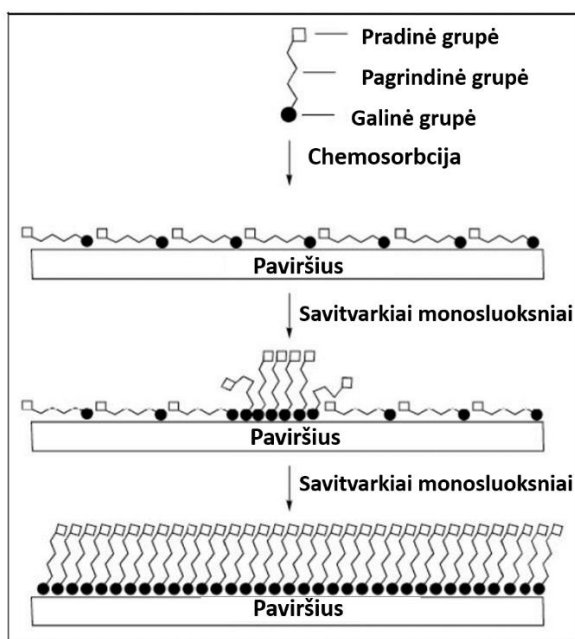
5 pav. Mielių ląstelių sienelių β -(1,3) ir β -(1,6)- gliukanų struktūriniai elementai [17].

Glikoproteinai yra baltymai, prie kurių kovalentiškai prijungtos viena ar kelios oligosacharidų grupės. Glikoproteinų prostetinę grupę sudaro angliavandeniai, todėl glikoproteinai gali skirtis angliavandeninės dalies kiekiu bei sudėtimi [18]. Angliavandenių šoninės grandinės, nepraleidžia per ląstelės sienelę makromolekulių iš aplinkos ir tokiu būdu yra lyg apsauginė siena nuo svetimų baltymų. Iš kitos pusės šie glikoproteinai nepraleidžia tirpių produktų iš ląstelės į aplinką. Toks limituotas ląstelės sienelės pralaidumas sąlygoja viduląstelinės mikroaplinkos susidarymą.

2.3. Savitvarkiai monosluoksniai ir jų formavimas

Praktikoje savitvarkiai monosluoksniai plačiai taikomi paviršių modifikavimui suteikiant suteikti jiems norimos ir kontroliuojamos savybės. Savitvarkius monosluoksnius sudarančios molekulės dėl savo struktūros geba spontaniškai sąveikauti su įvairiais paviršiais ir sudaryti tvarkingas struktūras. Vienas svarbiausių savitvarkių monosluoksnių pavyzdžių gyvoje gamtoje tai ląstelės membranų susidarymas iš lipido molekulių. Molekulės, formuojančios savitvarkius monosluoksnius ant aukso ar sidabro paviršiaus, paprastai sudarytos iš paviršiui aktyvios grupės (dažniausiai S-H), angliavandenilinės grandinės ir galinės funkcinės grupės [19].

Galima išskirti 3 pagrindinės savitvarkių monosluoksnių molekulių sudedamąsias dalis: pradinę grupę, pagrindinę grupę ir galinę grupę (6 pav.). Pradinė grupė yra gimininga paviršiui ir linkusi sąveikauti su juo. Sąveika gali būti tiek fizinė, tiek cheminė. Tiolių atveju susidaro metalas–siera ryšys, kuris stabilizuoja paviršiaus atomus ir keičia elektrines savybes [20] , [21]. Reikia pastebėti, kad metalas–siera ryšį sudaro ne tik tioliai, bet ir disulfidai, sulfidai, ditioliai ir kt. [20]. Pagrindinė grupė – tai angliavandenilinė grandinė, kurios ilgis gali kisti nuo kelių iki keliolikos anglies atomų. Dėl angliavandenilinės grandinės veikiančių sąveikų ši grupė lemia monosluoksnių savitvarką, taip pat veikia kaip fizinis barjeras tarp paviršiaus ir funkcinės grupės arba terpės komponentų. Priklausomai nuo angliavandenilinių grandinių ilgio ir sudėties, galima modifikuoti lokalias optines savybes, keisti elektrinį laidumą. Galinė grupė sąveikauja su aplinka ir apsprendžia savitvarkio monosluoksnių funkcines savybes. Vadinasi, keičiant funkcinę grupę (galinę grupę) galima keisti savitvarkio monosluoksnių paskirtį, o paviršiui suteikti norimas savybes [22].



6 pav. Savitvarkių monosluoksnių sudėtis ir susidarymo principinė schema [19].

Savitvarkio monosluoksnio formavimasis

Kitaip nei Langmuir – Blodgett plėvelės, tiolių sudaromus monosluoksnius yra lengviau paruošti. Nors abiem atvejais molekulių struktūra panaši, bet savitvarka skiriasi: Langmuir – Blodgett plėvelės susidaro oras/vanduo fazių riboje, dėl fizinės sąveikos su paviršiumi vėliau jas galima perkelti ant kieto paviršiaus, tuo tarpu tiolių savitvarkiai monosluoksniai dažniausiai yra formuojami iš tirpalo ant metalo paviršiaus, su kuriuo sudaro cheminius ryšius. Abiem atvejais savitvarka monosluoksniuose vyksta panašiai, tačiau dėl stiprios cheminės sąveikos su paviršiumi tiolių formuojami monosluoksniai yra tvarkingesni ir stabilesni lyginant su Langmuir- Blodgett plėvelėmis [23].

Vienas paprasčiausių savitvarkių monosluoksnių formavimo būdų yra naudojant praskiestus tiolinius tirpalus. Savitvarkių monosluoksnių formavimąsi galima skirstyti į tris žingsnius [20]: pradinės grupės sąveika su paviršiumi, angliavandenilinių grandinių išsitiesinimas ir galinių grupių orientacija (6 pav.). Dažniausiai naudojamas paviršius savitvarkiams monosluoksniams formuoti yra auksas, nes šis metalas lengvai prieinamas, inertiškas, sąlyginai lengvai nuvalomas ir naudojamas kituose tyrimuose, todėl duomenis galima lyginti tarpusavyje. Visgi formavimui naudojami ir kiti metalai: Ag, Cu, Pt, Pd, Hg, Fe ir puslaidininkiai: Si, GaAs, indžiu dengtas alavo oksidas, aukso ir sidabro koloidai [20].

2.4. Virpesinės spektroskopijos taikymas biologinių objektų tyrimuose

Svarbiausi virpesinės spektroskopijos metodai, taikomi biofizikiniuose tyrimuose – infraraudonoji (IR) spektroskopija, Ramano spektroskopija, suminio dažnio generacijos (SDG) spektroskopija, taip pat įvairios šių spektroskopijų atmainos. Virpesinė spektroskopija ypatinga tuo, kad ji nėra destruktivus tyrimo metodas, teikia molekulinio lygmens informaciją, jautri molekulių konformaciniams pokyčiams, kas leidžia tirti biologinius audinius realiu laiku įvairiai keičiant sąlygas.

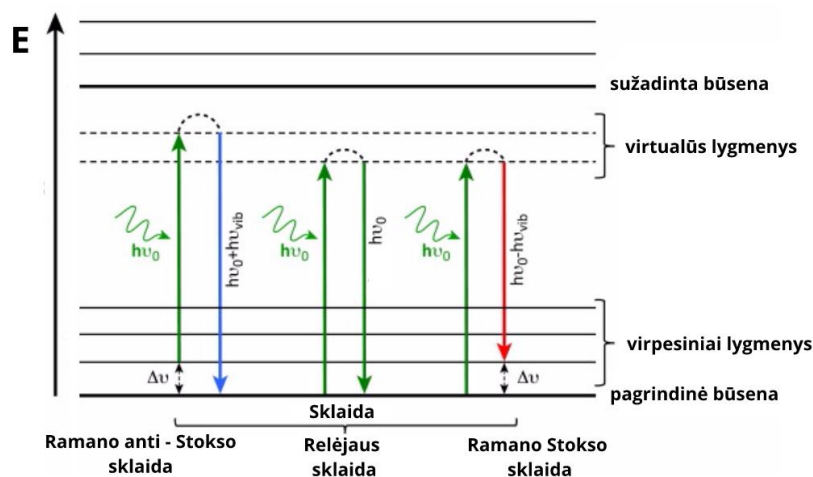
Ramano spektroskopija biologinių objektų tyrimams taikoma dėl galimybės tirti baltymų chromoforines grupes, esant mažoms baltymų koncentracijoms (10^{-7} - 10^{-9} M). Taip pat šis metodas suteikia specifinės informacijos apie visas tris (pradinė grupė, pagrindinė grupė ir galinė grupė) savitvarčių monosluoksnių molekulių sudedamąsias dalis. Vienas pagrindinių šio metodo privalumų – galimybė dirbti su vandeniniais tirpalais, priešingai infraraudonosios spektroskopijos (IR) atveju, kai reikia vengti vandens, kadangi intensyvios O-H valentinių ir H-O-H deformacinių virpesių sugerties juostos gali užgožti medžiagos virpesius. Galime teigti, kad paviršiaus sustiprinta Ramano spektroskopija yra vienas informatyviausių ir jautriausių adsorbuotų junginių tyrimo metodų, leidžiantis registruoti *in situ* vandeninėje terpėje virpesinius spektrus. Depolarizacijos laipsnio apskaičiavimas iš Ramano sklaidos spektrų suteikia informaciją apie normaliojo svyravimo tirpaluose simetriją, ko negalime išgauti iš IR spektrų. Žinoma, Ramano spektroskopija lengvai suderinama su mikroskopiniais metodais. Bandinių paruošimas eksperimentui nėra sudėtingas lyginant su IR metodu, o pats bandinio dydis gali būti tik keli μm . Pasinaudojant Ramano sklaidos reiškiniu galima nustatyti molekulinis virpesius regimajame spektre, t. y. matuoti patogioje spektro srityje.

2.5. Ramano sklaida

Ramano sklaidos reiškinį numatė Smekala (Smekal) 1923 m., tačiau eksperimentiškai šį reiškinį pirmas pastebėjo Ramanas 1928 m. ir tuomet reiškinys pavadintas jo vardu. Ramano sklaida – tai monochromatinės šviesos išsklaidymas medžiagoje, kurio metu pakinta spinduliuotės dažnis [24]. Išsklaidytos šviesos spektre atsiradusių naujų spektrinių linijų dažniai yra krintančiosios šviesos, sklaidančių medžiagos molekulių virpesių ir sukimosi šuolių dažnių kombinacija. Ramano sklaidos spektroskopija dažnai derinama su kitais tiriamaisiais metodais: FT-IR, fluorescencine analize, optine mikroskopija, SEM, AFM. Nustatant molekulių sandarą, Ramano sklaidos spektrai papildo IR spektrus, be to, IR spektre sugerties juostos skaitinė vertė gali sutapti su Ramano poslinkio verte dėl tų pačių virpesinių šuolių.

Pagrindinis Ramano sklaidos spektroskopijos privalumas tas, kad eksperimento metu nereikia naudoti IR srityje derinamų lazerių. Paprastai Ramano spektroskopijoje taikomi regimosios srities lazeriai. Išsklaidyta šviesa taip pat yra regimojoje spektro srityje, todėl sklaidos registracijai naudojami labai jautrūs matavimo prietaisai: fotodaugintuvai, CCD detektoriai. IR ir Ramano sklaidos spektrai yra skirtingos kilmės, todėl tų pačių virpesių aktyvumas šiuose spektruose yra skirtingas. IR spektruose simetrinių molekulių yra aktyvūs asimetriniai virpesiai, o Ramano sklaidos spektruose – simetriniai.

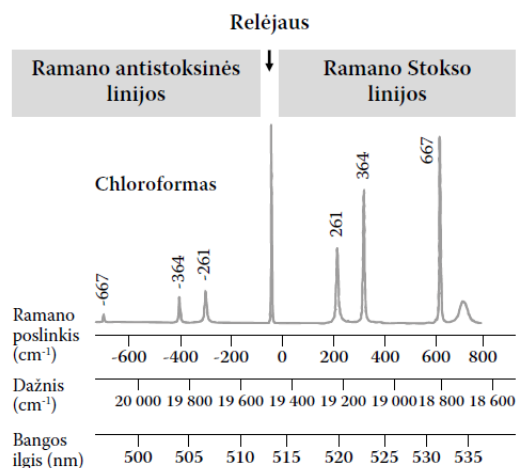
Kvantinė spinduliuotės teorija Ramano sklaidą aiškina šviesos kvantų ir medžiagos molekulių sąveika. Šviesos kvantai susiduria su įvairių virpesių energijos būsenų molekulėmis ir šviesa išsklaidoma visomis kryptimis. Ramano sklaida neelastinė, vadinasi jos metu keičiasi išsklaidytos šviesos bangos ilgis [24]. Nors molekulė ir gauna šviesos iš krintančios spinduliuotės, ji nėra sužadinama, t. y. sklindant bangai molekulė įgyja tam tikrą perteklinę energiją. Bangai prasklidus molekulė grįžta į pradinį energijos lygmenį (7 pav.). Dauguma susidūrimų – tai tamprieji susidūrimai, todėl išsklaidytųjų kvantų energija, kartu ir dažnis, nekinta. Ši šviesos sklaida vadinama klasikine arba Relėjaus sklaida. Tačiau mažą visų susidūrimų dalį gali sudaryti ir netamprieji susidūrimai, kurių metu kvantai dalį savo energijos ΔE atiduoda molekulei. Tuomet molekulė pereis į kitą vibracinį energijos lygmenį, o išsklaidyto kvanto energija pagal energijos tvermės dėsnį sumažės dydžiu ΔE . Išsklaidytos šviesos spektre matoma ilgabangė Ramano juosta $\nu_0 - \nu_{\text{vib}}$ dar vadinama Stokso juosta (7 pav.). Tačiau jei krintančios šviesos kvantas susiduria su molekule, kuri yra sužadintame virpesiniame lygmenyje, o po susidūrimo molekulė pereina į žemesnį energijos lygmenį, tuomet kvanto energija padidėja dydžiu ΔE (7 pav.). Išsklaidytos šviesos spektre matoma trumpabangė Ramano sklaidos juosta $\nu_0 + \nu_{\text{vib}}$, vadinama anti – Stokso juosta.



7 pav. Relėjaus ir Ramano sklaidos spektrų kilmės schema.

Ramano anti – Stokso juosta kambario temperatūroje visada yra mažiau intensyvi nei Ramano Stokso juosta (8 pav.), nes visi energiniai šuoliai, lemiantys anti – Stokso juostos intensyvumą, vyksta iš sužadintų virpesinių lygmenų, o į Ramano Stokso juostos stiprią pagrindinį indėlį įneša energinis šuolis iš nesužadinto virpesinio lygmens. Būtent šio lygmens užpilda yra didesnė už kitų lygmenų užpildą, kai sistemoje yra termodinaminė pusiausvyra [25].

Ramano sklaidos spektre abscisių ašį žymi Ramano poslinkis $\Delta\nu$, kuris reiškia, kad abscisių ašyje atidėję žadinančio ($h\nu_0$) ir emituoto [$h(\nu_0 - \nu_{vib})$] fotonų energijos skirtumą (cm^{-1}), gauname molekules virpesių spektrą (8 pav.), kuomet gautas dažnio poslinkis atitinka tam tikrą molekules virpesinį dažnį. Trumpiau tariant, poslinkis $\Delta\nu$ Ramano sklaidos spektre yra bangos skaičių skirtumas tarp Relėjaus linijos ir Ramano sklaidos linijų ($\Delta\nu = \frac{1}{\lambda_{\text{žad}}} - \frac{1}{\lambda_{\text{emit}}}$).



8 pav. Chloroformo Ramano sklaidos spektras Stokso ir anti – Stokso srityse [26].

Pagrindiniai sklaidos dėsningumai gali būti aprašyti remiantis klasikine mechanika. Šuolių tarp energijos lygmenų tikimybė Ramano šviesos sklaidos spektre susijusi su molekules polarizuojamumu, todėl ir Ramano sklaidos spektras gaunamas tik tada, kai dėl šuolių pasikeičia

molekulės poliarizuojamumas. Todėl intensyvios Ramano juostos atitinka nepolinių grupių, ypač aromatinių žiedų virpesius, kuriems vykstant žymiai kinta molekulės poliarizuojamumas.

Remiantis klasikine mechanika, molekulė, patekusi į viendažnės elektromagnetinės bangos kintantį elektrinį lauką, poliarizuojasi. Indukuotas dipolinis momentas yra proporcingas elektrinio lauko stipriui:

$$\boldsymbol{\mu} = \alpha \mathbf{E}, \quad (1)$$

čia α – molekulės poliarizuojamumas. Sukurto elektrinio lauko stipris tam tikrame erdvės taške yra periodinė laiko funkcija:

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t), \quad (2)$$

vadinasi ir indukuotas dipolinis momentas yra periodinė laiko funkcija. Dipolis, virpantis dažniu ν_0 , spinduliuos tokio paties dažnio elektromagnetines bangas, bet svarbu nepamiršti, kad molekulės branduoliai visada virpa tam tikru dažniu ν_{vib} aplink pusiausvyros padėtį, todėl atstumo tarp branduolių priklausomybė nuo laiko yra periodinė funkcija:

$$x = x_0 \cos[(2\pi\nu_{vib} t) + \varphi_0], \quad (3)$$

čia x – nuokrypis nuo pusiausvyros padėties, x_0 – virpesių amplitudė, φ_0 – pradinė fazė. Kintant atstumui tarp branduolių, molekulės poliarizuojamumas irgi kinta. Kai virpesių amplitudė maža, poliarizuojamumo modulis skleidžiamas Teiloro eilute pusiausvyros taško aplinkoje:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dx}\right)_e x + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2\alpha}{dx^2}\right)_e x^2 + \dots \quad (4)$$

Tuomet naudojantis (1) ir (3) išraiškomis, gauname indukuoto dipolinio momento modulį:

$$\mu = \left[\alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dx}\right)_e x_0 \cos(2\pi\nu_{vib} t + \varphi) \right] E_0 \cos(2\pi\nu_0 t). \quad (5)$$

Atlikus matematinius veiksmus gaunama išraiška, iš kurios nesunku pastebėti, kad molekulėje indukuotas dipolinis momentas kinta dažniais ν_0 , $\nu_0 + \nu_{vib}$, $\nu_0 - \nu_{vib}$.

$$\begin{aligned} \mu = & \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{d\alpha}{dx}\right)_e x_0 E_0 \cdot \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_{vib})t + \varphi_0] + \\ & + \left(\frac{d\alpha}{dx}\right)_e x_0 E_0 \cdot \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_{vib})t + \varphi_0]. \end{aligned} \quad (6)$$

Pirmas išraiškos narys aprašo Relėjaus sklaidą, antrasis Ramano anti – Stokso sklaidą, trečiasis – Ramano Stokso sklaidą [24].

2.6. Molekulių virpesiai

Viena svarbiausių tiriamosios medžiagos charakteristikų, kurią galima nustatyti iš Ramano sklaidos spektro, yra molekulės virpesinis dažnis $\tilde{\nu}$ (bangos skaičius), matuojamas atvirkštiniais centimetrais (cm^{-1}). Bangos skaičius, tiesiogiai susijęs su virpesio dažniu ν , matuojamu hercais (Hz):

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda}, \quad (7)$$

kur λ – bangos ilgis, o c – šviesos greitis.

Dviatomės molekulės atveju bangos skaičių lemia cheminio ryšio jėgos konstanta k ir redukuotoji masė μ :

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}. \quad (8)$$

Redukuotąją masę galima apskaičiuoti, žinant molekulės atomų mases m_1 ir m_2 :

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}, \quad (9)$$

Cheminio ryšio stiprio įtaka bangos skaičiui pasireiškia per k . Daugeliu atvejų stiprėjant cheminiam ryšiui – k didėja. tačiau bendrai k negalima tiesiogiai sieti su cheminio ryšio stipriu, kadangi pastarąjį nusako disociacijos energija, o k parodo molekulės potencinės energijos kreivės statumą netoli pusiausvyros padėties:

$$k = \left(\frac{d^2V}{dq^2} \right)_{q \rightarrow 0}, \quad (10)$$

kur q – branduolių poslinkis.

Dviatomėje molekulėje virpesiai gali vykti tik susitraukiant arba pailgėjant cheminiam ryšiui (valentiniai virpesiai). Tačiau daugiaatomėje molekulėje galimi ne tik valentiniai, bet ir cheminio ryšio deformacijos virpesiai. Daugiaatomių molekulių branduolių judesiai gali būti sudėtingi, tačiau visus juos galima apibūdinti kaip normaliuosius virpesius. Molekulės normaliųjų virpesių skaičių Γ galima nustatyti žinant jos atomų skaičių N . Kadangi kiekvienas atomas gali judėti 3-imis kryptimis, N -atomė molekulė turi $3N$ virpesinius laisvės laipsnius. Iš šio skaičiaus turime atimti 6 laisvės laipsnius, susijusius su translaciniu visos molekulės judėjimu 3-imis kryptimis ir sukimusi apie 3-is pagrindines ašis, einančias per gravitacijos centrą. Taigi netiesinės molekulės normaliųjų virpesių skaičius lygus [26]:

$$\Gamma = 3N - 6. \quad (11)$$

Kadangi tiesinei molekulei sukantis apie molekulinę ašį branduolių padėtis nekinta, jos normaliųjų virpesių skaičius lygus:

$$\Gamma = 3N - 5. \quad (12)$$

2.7. Paviršiaus sustiprinta Ramano spektroskopija (PSRS)

Esminis Ramano spektroskopijos trūkumas – mažas sklaidytos šviesos intensyvumas. Įprastos Ramano spektroskopijos atveju tik vienas iš $\sim 10^8$ fotonų virsta Ramano fotonu [27].

Ramano sklaidos intensyvumas I_R nusakomas lygtimi:

$$I_R = KI_L\alpha^2\nu_L^4 \quad (13)$$

kur: K – konstanta, I_L – žadinančios lazerio spinduliuotės intensyvumas, α – molekulės poliarizuojamumas, ν_L – žadinančios lazerio spinduliuotės dažnis. Tiriant pasirinktą bandinį galima kontroliuoti du parametrus, I_L ir ν_L . Didinti I_L galima tik iki tam tikro lygio, nes bandinys pradeda degti arba pakinta dėl fotocheminių procesų. Iš (13) lygties matosi, kad Ramano sklaidos intensyvumas smarkiai mažėja didėjant žadinančios lazerio spinduliuotės bangos ilgiui λ_L (mažėjant ν_L).

Vis dėlto Ramano spektroskopijos jautris labai padidėjo, kai buvo atrasta paviršiaus sustiprinta Ramano sklaida (*ang.* surface enhanced Raman scattering, SERS).

Pirmą kartą Ramano signalo sustiprėjimas pastebėtas Martino Fleishmanno 1974 m., kuomet tiriant piridiną, adsorbuotą ant sušierkštinto sidabro elektrodo elektrocheminėje celėje, gautas labai intensyvus signalas [28]. Tuomet manyta, kad toks Ramano signalo sustiprėjimas atsirado dėl padidėjusio elektrodo ploto. Vėliau tokia teorija buvo paneigta ir nustatyta, kad šiurkštus sidabro paviršius sustiprino piridino molekulės spektrą iki 10^5 – 10^6 karto. Nuspręsta, kad toks signalo padidėjimas neįmanomas be papildomo stiprinimo, nes Ramano sklaidos signalas nuo monosluoksnio adsorbuotos medžiagos yra per daug silpnas, kad jį būtų galima detektuoti tuometine aparatūra [29], [30]. Kiek vėliau dvi mokslininkų grupės patvirtino Ramano spektrų stiprinimą nanostruktūriniu metalo paviršiumi (Jeanmaris ir Van Duynas) arba metalo koloidais (Albrechtas ir Creightonas) [31].

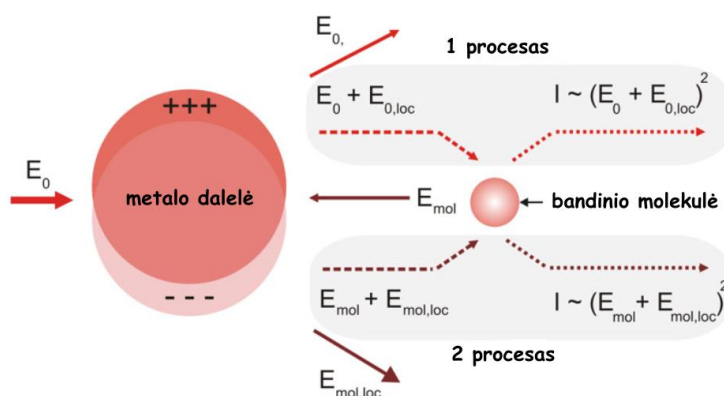
2.8. PSRS stiprinimo mechanizmai

Šiuo metu yra pripažinta, kad PSRS lemia mažiausiai du stiprinimo mechanizmai: elektromagnetinis ir cheminis (krūvio pernašos). Stiprinimo mechanizmai gali būti paaiškinti analizuojant jau anksčiau apibrėžtą sąryšį: $\mu = \alpha E$.

Ramano sklaidos intensyvumas proporcingas indukuoto elektrinio lauko dipolinio momento (μ) kvadratui, tai bet koks stiprinimas turi būti susijęs su molekulės poliarizacijos (α) padidėjimu arba su elektrinio lauko (E) sustiprėjimu [32].

Elektromagnetinis stiprinimas

Ramano signalo stiprinimas, susijęs su elektrinio lauko pokyčiu, vadinamas elektromagnetiniu. Elektromagnetinio lauko sužadimas ir stiprinimas vyksta dviem etapais (10 pav.), kai elektromagnetinė spinduliuotė (E_0), sąveikaudama su paviršiaus elektronais, sukelia lokalizuotus metalo kristalo paviršiuje esančių elektronų svyravimus, kitaip plazmonų rezonansą. Plazmonų rezonansui susidaryti reikalingas šiurkštus metalo paviršius, taip pat plazmonų osciliacija turi vykti statmenai paviršiui, dėl to sustiprėja elektromagnetinis laukas aplink tiriamąją molekulę ($E_0 + E_{0,loc}$), sustiprindamas jos Ramano signalus (E_{mol}). Sukelta molekulės Ramano sklaida taip pat gali poliarizuoti metalo daleles ir sukelti papildomą stiprinimą ($E_{mol} + E_{mol,loc}$). Kadangi Ramano signalo intensyvumas proporcingas žadinančio lauko kvadratui, tai elektromagnetinio stiprinimo proceso metu intensyvumas bus proporcingas $(E_0 + E_{0,loc})^2$ ir $(E_{mol} + E_{mol,loc})^2$ sandaugai [24].



9 pav. Elektromagnetinio stiprinimo schema [33].

Plazmonų rezonansas

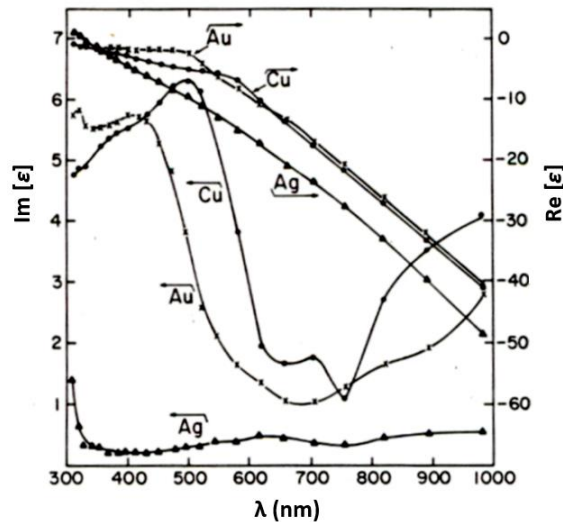
Elektromagnetinis stiprinimas susijęs su tam tikro laipsnio metalo paviršiaus šiurkštumu. PSRS eksperimentai įrodė, kad pagrindinį vaidmenį stiprinimo procese vaidina lokalizuotų paviršiaus plazmonų rezonansas, kitaip – lokalizuotų elektronų kolektyvinių virpesių sužadimas metalo dalelėje.

Panagrinėkime sferinę metalo nanodalelę, kurios matmenys (r) gerokai mažesni negu λ_L , t. y. $\lambda_L \gg r$. Sferinėje metalo dalelėje sukulto elektromagnetinio lauko priklausomybę nuo žadinančios lazerio spinduliuotės aprašo lygtis:

$$E_d = E_L \left(\frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_0} \right). \quad (14)$$

E_d – elektromagnetinis laukas dalelės paviršiuje, E_L – lazerio elektromagnetinis laukas, $\varepsilon(\omega)$ – nuo žadinančios spinduliuotės dažnio priklausoma metalo dielektrinė konstanta, ε_0 – terpės, supančios metalo dalelę, dielektrinė konstanta. Remiantis (10) išraiška, matome, kad plazmoninis rezonansas pasiekiamas tada, kai vardiklis lygus 0. Taigi galime užrašyti plazmonų rezonanso sąlygas taip:

$$\begin{aligned} \operatorname{Re}[\varepsilon(\omega)] &\approx -2\varepsilon_0; \\ \operatorname{Im}[\varepsilon(\omega)] &\text{ – mažas.} \end{aligned} \quad (15)$$



10 pav. Au, Ag, Cu metalų dielektrinių funkcijų priklausomybė nuo spinduliuotės bangos ilgio [34].

Trims pagrindiniams PSRS metalams (Ag, Au, Cu) šios abi sąlygos kaip tik ir yra tenkinamos regimojoje spektro srityje (10 pav.). Taip pat akivaizdu, kad PSRS spektrus nuo Ag paviršiaus galima registruoti visoje regimojoje spektro srityje, tuo tarpu Au ir Cu metalų atveju galioja sąlyga: $\lambda_L > 600$ nm.

Cheminis stiprinimas

Cheminis stiprinimas arba kitaip – krūvio perneša – siejamas su molekulės poliarizuojamumo padidėjimu, kai ji sąveikauja su metalo paviršiumi. Vadinasi, cheminis stiprinimas apima cheminio ryšio formavimąsi tarp metalo ir bandinio molekulės, kas padidina molekulės poliarizuotumą. Dėl metalo ir molekulės komplekso susidaro nauji krūvio pernešimo keliai – elektronai, esantys metalo Fermi lygmenyje šoka į žemiausią neužpildytą molekulės

energetinį lygmenį (LUMO). Elektronas, patekęs į LUMO orbitale, sužadina cheminio ryšio virpesius, o grįždamas į pagrindinę būseną išspinduliuoja fotoną, kuris įnešą indėlį į vieną iš Stokso juostų [32].

Cheminis stiprinimas galimas tik tada, kai molekulė tiesiogiai adsorbuojasi ant šiurkštaus metalo paviršiaus, todėl nuo medžiagos sąveikos su metalu pobūdžio priklauso cheminio stiprinimo dydis bei spektrinės juostos padėtis.

Apibendrinus Ramano spektrų stiprinimą galima aprašyti (16) formule, kuri apima abu mechanizmus:

$$G = G_{EM}G_{Ch} = F_{PSRS}F_L \frac{\sigma_{pav}}{\sigma} \quad (16)$$

kur G_{EM} ir G_{Ch} – elektromagnetinio ir cheminio stiprinimo faktoriai; F_L – lazerinės spinduliuotės stipris; F_{PSRS} – PSRS spinduliuotės stiprinimas; σ – Ramano sklaidos skerspjūvis (priklauso nuo molekulės prigimties); σ_{pav} – sąveikaujančios su metalo paviršiumi molekulės Ramano sklaidos skerspjūvis.

Cheminis stiprinimas gali atsirasti todėl, kad molekulei sąveikaujant su metalu gali susidaryti paviršiaus junginys, kurio poliarizuojamumas, o tuo pačiu ir σ_{pav} padidėja, lyginant su tirpale esančios molekulės σ .

Cheminio stiprinimo indėlis į PSRS spektrą yra nedidelis – vidutiniškai 100 kartų, tuo tarpu elektromagnetinio apie 1000 ir daugiau kartų [15], todėl galime modifikuoti (16) formulę ir išskleisti elektromagnetinio stiprinimo faktorių taip:

$$G_{EM} = F_{PSRS}F_L = \left| \frac{E_d(\omega_{PSRS})}{E_L} \right|^2 \left| \frac{E_d(\omega_L)}{E_L} \right|^2 \quad (17)$$

E_d – elektrinis laukas, veikiantis molekulę, E_L – išorinis žadinantis elektrinis laukas, ω_{PSRS} – paviršiaus sukkelto elektromagnetinio lauko dažnis, ω_L – lazerinės spinduliuotės dažnis.

Veikiant abiem stiprinimo faktoriams PSRS signalų intensyvumas išauga iki 10^6 , kai kuriais atvejais – rezonansinio PSRS atveju iki 10^9 , o atskiroms sidabro dalelėms galima pasiekti ir 10^{10} – 10^{12} stiprinimą [35].

Taigi PSRS reiškinį galima apibūdinti kaip žymų molekulės Ramano sklaidos intensyvumo padidėjimą, kai ji adsorbuojasi ant nelygaus metalinio paviršiaus arba yra netoli metalinio paviršiaus.

2.9. Nanodalelės

Metalai PSRS tyrimams yra šiurkštinami įvairiais būdais, kurių galutinis rezultatas – metalo paviršius padengtas mažomis metalo dalelėmis ar jų agregatais. Toks paviršius yra šiurkštus, o nelygumai generuoja plazmonų rezonansą. Dažniausiai yra naudojamos Au ir Ag nanodalelės, garantuojančios $G = 10^4 - 10^6$ stiprinimą [35].

Nanodalelėmis (ND) laikomi dariniai, kurių dydis varijuoja nuo 1 iki 100 nm [36]. Priklausomai nuo sintezės ir paruošimo metodikos bei funkcinių grupių, dalelės išlieka stabilios vandenyje (hidrozoliai) arba organiniame tirpiklyje (organozoliai).

Sintezė

Siekiant apsaugoti aukso nanodaleles nuo agregacijos bei kontroliuoti jų optines, elektrines ir katalizines savybes, Au ND yra modifikuojamos tam tikromis funkcinėmis organinėmis arba neorganinėmis molekulėmis. Todėl intensyviai vykdoma aukso nanodalelių sintezė skirtingais metodais, funkcionalizavimas bei paviršiaus tyrimai.

Koloidiniai nanodydžių eilės metalinių dalelių tirpalai gali būti gaunami dviem pagrindiniais būdais. Vienas iš jų yra vadinamas „iš viršaus į apačią“ (*ang.* top-down) būdas [37]. Tam tikro metalo nanodalelės gaunamos smulkinant įvairiais būdais pradinę medžiagą. Smulkinimo metu į tirpalą dedami koloidinio tirpalo stabilumą palaikantys junginiai. „Iš viršaus į apačią“ technologijoje labai plačiai naudojamas metalų garinimo būdas, kai plonas metalo sluoksnis ant kieto pagrindo užgarinamas vakuume. Vakuuminėje aplinkoje metalų dalelės, kurios yra garų pavidale, nusėda tiesiogiai ant paviršiaus ir kondensuojasi iki kietos būsenos. Tokiu būdu gaunamas plonas, plastiškas metalo sluoksnis. Antru nanodalelių tirpalų gavimo būdu yra vadinamas „iš apačios į viršų“ (*ang.* bottom-up), kai koloidinis tirpalas gaunamas redukuojant metalų druskas arba skaldant metastabilius organometalinius junginius. Tvarkingam nanostruktūrų augimo ir stabilumo užtikrinimui naudojami stabilizatoriai – polimerai arba paviršinio aktyvumo medžiagos [38].

Labiausiai paplitęs aukso nanodalelių sintezės metodas – cheminė metalų druskų redukcija iki neutralių metalo atomų vandeninėje terpėje esant stabilizuojantiems junginiams. Šį metodą 1951 m. pasiūlė J. Turkevich [39], o 1970 m. G. Frens jį patobulino [40]. Gaunamos sferinės, monodispersinės nanodalelės, kurių skersmuo yra iki ~ 20 nm. Didesnio dydžio dalelės pasižymi blogesnėmis monodispersiškumo charakteristikomis. Šios sintezės mechanizmas susideda iš trijų etapų: nanodalelės branduolio iš aukso atomų susidarymo, augimo ir aglomeracijos. Aukso nanodalelės gaunamos redukuojant tetrachloraukso rūgštį natrio citratu vandeninėje terpėje. Natrio citratas veikia kaip reduktorius ir stabilizatorius, nes neigiami citrato

jonai adsorbuojasi ant aukso nanodalelių, suteikdami joms neigiamą krūvį, kurio dėka dalelės stumia viena kitą ir taip yra išvengiama jų agregacijos. Kaip jau minėta anksčiau, dalelės gaunamos citrato pagalba yra sferinės ir iki 20 nm skersmens, o jų dydis kontroliuojamas keičiant reagentų koncentracijas.

Aukso nanodaleles galima susintetinti ir taip vadinamu Perrault ir Chan metodu. Jo esmė – tetrachloraukso rūgšties redukcija hidrochinonu vandeniniuose tirpaluose, kuriose yra nanodalelių branduolių, reikalingų tolimesniam Au ND augimui (*ang. seeds*). Stabilizatoriaus (pvz., natrio citrato) buvimas terpėje sąlygoja kontroliuojamą nanodalelių augimą. Dažniausiai, nanodalelių branduoliai yra sintetinės citratiniu metodu. Perrault ir Chan metodas papildo Turkevich-Frens sintezės metodą, kadangi praplečiamas monodispersinių dalelių dydžio intervalas – Turkevich-Frens metodu gaunamos dalelės yra iki 20 nm dydžio, o hidrochinoniniu Perrault ir Chan metodu – nuo 30 iki 250 nm dydžio.

Be aukso druskų redukcijos yra nemažai kitų būdų gauti koloidinėms aukso nanodalelėms: sonochemija, fotochemija bei auginimas terpėje esant mažų aukso nanodalelių, reikalingų nanodalelių augimui. Taip pat metalų nanodalelės gali būti padengtos įvairiais neorganiniais sluoksniais.

2.10. Aukso nanodalelės su išoriniu dielektriko sluoksniu

Siekiant praplėsti PSRS metodo galimybes kitų metalų (Pt, Fe, Co) ir paviršių (biologinės sistemos) tyrimuose, 2010 metais buvo pasiūlyta panaudoti Au ir Ag nanodaleles, apsaugotas plonu SiO₂ sluoksniu. Šiuo atveju, nanodalelės branduolys atlieka Ramano spektrų stiprintuvo vaidmenį, o silicio oksido sluoksniu apsaugo nanodaleles nuo tarpusavio sąveikos ir sąveikos su tiriamuoju paviršiumi, taip išvengiama cheminė sąveika ir galima krūvio pernaša. Tyrimo metu atstumas tarp Au branduolio ir tiriamojo paviršiaus lengvai kontroliuojamas SiO₂ sluoksniu pagalba. Metodika, kuomet naudojamos Au@SiO₂ dalelės pavadinta SHINERS (*ang.* shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy).

Norint parodyti SHINERS metodo privalumus, palyginkime giminingus PSRS metodus (11 pav.). Kontaktinio režimo atveju naudojamos įprastos aukso nanodalelės, ant kurių paviršiaus adsorbuojamos tiriamos molekulės, tačiau (a) dalelių sąveika su chemine aplinka yra neišvengiama, (b) gali vykti nepageidaujama krūvio pernaša, ir jei naudojamas metalinis paviršius, tai neišvengiamas ir kontaktinis potencialų skirtumas; taip pat (c) sąveika su tiriomomis molekulėmis gali iššaukti pokyčius registruojamuose spektruose. Adata sustiprinta Ramano spektroskopija (*ang.* tip – enhanced Raman spectroscopy, TERS) apjungia atominės jėgos mikroskopą ir PSRS spektrometrą, kur adata veikia tarsi mažas stiprintuvas/ zondas tuo pačiu metu. Nors ši technika ir pasižymi ypatingai aukšta erdvine skiriamąja geba, tačiau gaunamas Ramano signalas vis vien ganėtinai silpnas (tik 1 vienas adata veikia kaip stiprintuvas). SHINERS – izoliuoto režimo atveju nanodalelių branduoliai tampa tūkstančiais mažų stiprintuvų, kurie generuoja aukštą Ramano signalo stiprinimą kartu išvengiant kontaktinio režimo problemų.

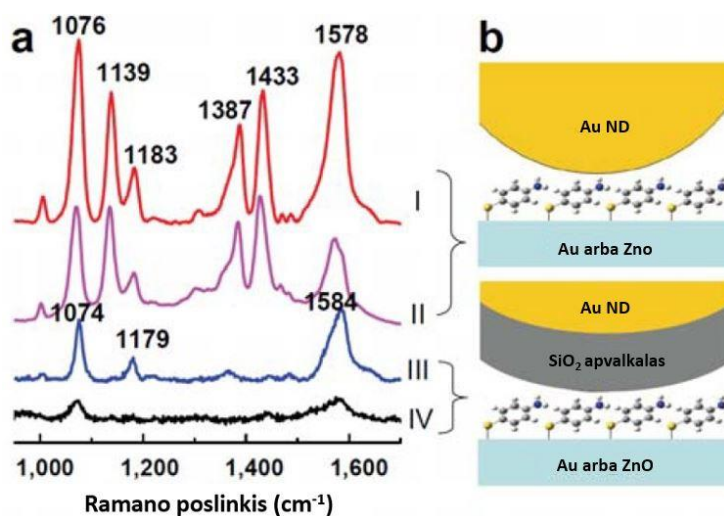


11 pav. Skirtingos schematinės paviršių konfigūracijos PSRS ir SHINERS eksperimentuose [41].

Iš tikrųjų, SHINERS technika apjungia kontaktinį ir nekontaktinį režimus, todėl toliau išskirkime pagrindinius SHINERS privalumus.

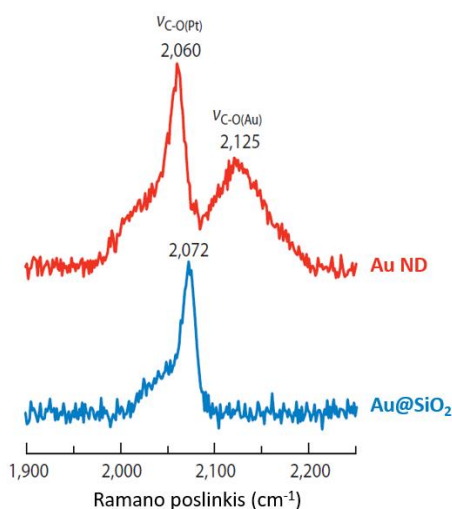
Atliekant savitvarkių monosluoksnių tyrimus nustatyta, kad auksinis nanodalelės branduolys išties negali tiesiogiai nesąveikauti su funkcinėmis grupėmis dėl branduolį supančio

inertinio apvalkalo. Kai kuriose molekulinėse sistemose fotokatalizinės reakcijos gali būti paskatintos tiesioginės sąveikos tarp molekulinės funkcinių grupių ir aukso nanodalelių, ko pasekoje pasikeičia molekulinė struktūra ar net susidaro nauji produktai. Vieno tokio tyrimo metu suformuotas 2-aminotiofenolio (PATP) monosluoksnis ant lygaus aukso ir cinko oksido paviršių (eksperimento konfigūracijos 12 pav. b). Monosluoksnio PSRS spektruose (I ir II kreivė) atsispindi klaidinga spektrinė informacija dėl PATP amino grupės ir Au ND tiesioginio kontakto, kuris sąlygoja galimą fotokatalizinę dimerizaciją aromatinuose amino junginiuose. Tokią sąveiką puikiai įrodo virpesinių juostų (1139 , 1387 ir 1433 cm^{-1}) registravimas PSRS spektruose. SHINERS spektruose analogiškų juostų nepastebima.



12 pav. PATP monosluoksnio PSRS ir SHINERS spektrai (a) esant skirtingoms eksperimento konfigūracijoms (b): I, II – lygus paviršius/PATP/Au ND; III, IV – lygus paviršius/ PATP/Au@SiO₂ [42].

Kitas eksperimentas patvirtino, kad SiO₂ apvalkalas neleidžia vykti krūvio pernašai tarp nanodalelės ir tiriamojo objekto. Tyrimo metu buvo adsorbuotos CO molekulės ant monokristalinio platinos paviršiaus ir užregistruoti PSRS, SHINERS spektrai naudojant nanodaleles be inertinio apvalkalo ir su juo. Jau anksčiau pastebėta, jog taikant plazmonines nanodaleles susiduriama su keliomis pagrindinėmis problemomis. Pirma, dėl tiriamo objekto adsorbcijos ant nanodalelės paviršiaus atsiranda papildomos virpesinės juostos registruojamuose spektruose. Antra, dėl elektrinio kontakto tarp Au nanodalelių ir monokristalinio metalinio paviršiaus vyksta krūvio pernaša, kas pakeičia paviršiaus elektroninę struktūrą, vyksta sistemos perturbacija – registruojamame spektre stebimas tiriamojo objekto virpesinių juostų poslinkis. Šios pagrindinės problemos iliustruotos 13 pav. CO adsorbcijai ant Pt(111) paviršiaus tirti panaudojus Au@SiO₂ nanodalelės išvengiamos anksčiau minėtos problemos.



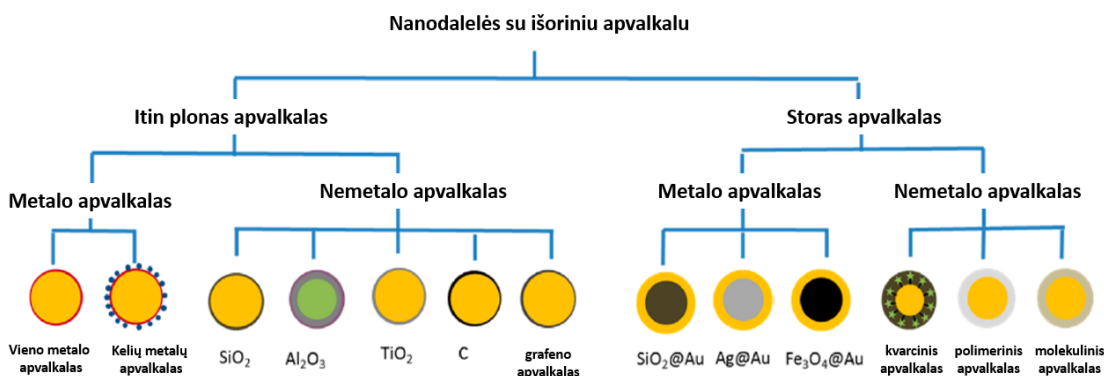
13 pav. Adsorbuoto anglies monoksido ant Pt(111) paviršiaus PSRS ir SHINERS spektrai [43].

Apibendrinant, SHINERS tinka bet kokiems metalams (ne tik auksui, sidabru ir variui, bet ir katalizei svarbiems – platina, paladis, nikelis, geležis ir kt.), svarbu tai, kad paviršiai gali būti lygūs ir monokristaliniai. SiO₂ apvalkalas apsaugo nuo tiesioginio nanodalelės kontakto su metalu ir nuo molekulių sąveikos su dalelėmis. Taip pat, naudojant izoliuotas daleles tampa galimi elektrocheminių sistemų *in-situ* tyrimai esant kontroliuojamam elektrodo potencialui vandeninėje terpėje ar biologinėje sistemoje.

Taigi SHINERS padeda įveikti pagrindinius PSRS metodo apribojimus ir suteikia galimybes sudėtingų, bet jau seniai mokslininkus dominančių, sistemų tyrimuose.

Nanodalelių su išoriniu apvalkalu įvairovė

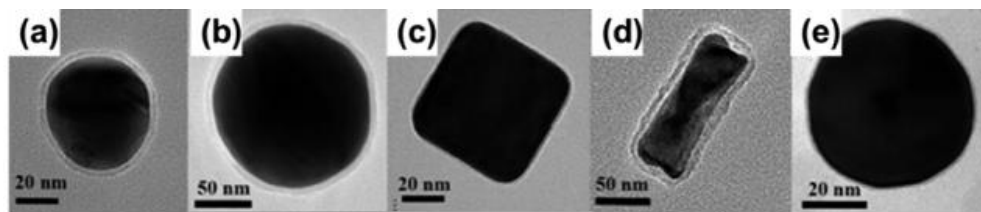
Nanodaleles, turinčias išorinį apvalkalą, galima suskirstyti pagal apvalkalo storį ir prigimtį (14 pav.).



14 pav. Nanodalelių su išoriniu apvalkalu klasifikavimo schema [44].

Taikant skirtingas sintezės procedūras ir reagentus galima gauti įvairių formų, dydžio, sudėties bei struktūros nanodaleles, taip pat apsaugotas išoriniu sluoksniu.

Kalbant apie nanodaleles, apgaubtas inertiniu apvaskalu, vienos populiariausių – 55 nm skersmens dydžio aukso branduolio dalelės su kelių nm storio SiO₂ apvaskalu. Tokio tipo daleles ganėtinai lengva susintetinti ir pritaikyti PSRS, kuomet daugeliui eksperimentų pakanka gaunamo signalo stiprinimo. 120 nm dydžio Au@SiO₂ sferos sintetamos tuo atveju, kai nepakanka signalo stiprinimo su mažesnio dydžio dalelėmis. Taip pat nustatyta, kad 120 nm skersmens aukso nanodaleles optimaliausia naudoti esant 633 nm žadinančiam spinduliuotės bangos ilgiui [44]. Nanokubus ir nanolazdeles galima pritaikyti biosensoriams. Kintant nanodalelių dydžiui ir pločio – ilgio santykiui paviršiaus plazmonų rezonanso sugerties maksimumas pasislenka iš regimosios į artimąją infraraudonąją sritį. Sidabro nanodalelės sintetamos dėl dviejų pagrindinių priežasčių: sidabras, kaip metalas, pasižymi didesniu Ramano spektrų stiprinimu, o paviršiaus plazmonų rezonansas gaunamas visoje regimojo spektro srityje [41]. Taip pat svarbu tai, jog nepriklausomai nuo dalelės branduolį sudarančio metalo ar jų mišinio, plonas išorinis apvaskalas gali būti formuojamas ne tik iš SiO₂, bet ir iš kitų medžiagų: grafeno, Al₂O₃ ar MnO₂. Skirtingas apvaskalas dažniausiai parenkamas dėl specifinės funkcinės paskirties [41].



15 pav. Skirtingų SHINERS tipų HR-TEM vaizdai: (a) 55 nm dydžio, sferos formos Au@SiO₂ ND, (b) 120 nm dydžio, sferos formos Au@SiO₂ ND, (c) Au@SiO₂ nanokubai, (d) Au@SiO₂ nanolazdelės, (e) Ag@SiO₂ ND [41].

Taigi didelė išoriniu apvaskalu padengtų nanodalelių įvairovė padaro SHINERS perspektyviu ir galingu įrankiu įvairiose mokslo srityse, pavyzdžiui, paviršiaus ir medžiagų moksle, biologinėje ir farmacinėje analizėje, maisto ar aplinkos apsaugoje.

Nanodalelių su išoriniu apvaskalu elektromagnetinis stiprinimas

Deja, kaip ir visi žinomi fizikiniai tyrimo metodai, SHINERS turi trūkumų. Pirma, norint gauti pakankamą Ramano signalo stiprinimą būtina užtikrinti, kad SiO₂ apvaskalas nebūtų per storas. Priešingu atveju atstumas nuo aukso branduolio iki tiriamo objekto tampa kritiškai didelis ir prarandamas signalas. Dėl šios priežasties verta panagrinėti, kaip kinta elektromagnetinio lauko stipris molekulės buvimo vietoje nuo atstumo d iki sferinės metalo nanodalelės.

Lazerinės spinduliuotės elektrinis laukas indukuoja dipolinį momentą $P(\omega)$ metalo nanodalelėje:

$$P(\omega) = \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_0} r^3 E_L \quad (18)$$

r – nanodalelės spindulys.

Elektrinio lauko stipris tolygus dalelėje ir silpnėja tolstant nuo jos. Atstumu d nuo sferinės nanodalelės indukuoto dipolio elektrinio lauko stipris E_{dip} aprašomas:

$$E_{dip} = r^3 \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_0} E_L \frac{1}{(r + d)^3} \quad (19)$$

Bendras molekulę veikiantis elektrinio lauko stipris E_d :

$$E_d = E_L + E_{dip} \quad (20)$$

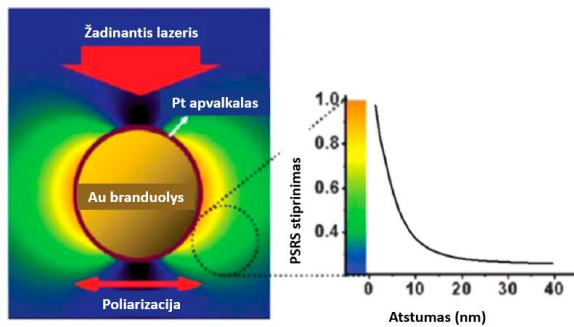
Prisimenant elektromagnetinio stiprinimo faktorių iš 2.6 skyriaus dar kartą užrašome:

$$G_{EM} = F_{PSRS} F_L = \left| \frac{E_d(\omega_{PSRS})}{E_L} \right|^2 \left| \frac{E_d(\omega_L)}{E_L} \right|^2 \quad (21)$$

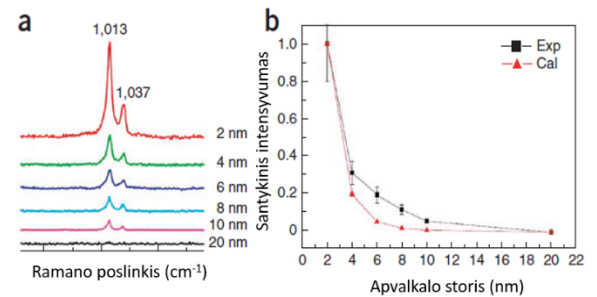
Toliau pasinaudoję 19 ir 20 išraiškomis perrašome 21 lygtį:

$$G_{EM} = \left| \frac{\varepsilon(\omega_L) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\omega_L) + 2\varepsilon_0} \right|^2 \left| \frac{\varepsilon(\omega_{PSRS}) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\omega_{PSRS}) + 2\varepsilon_0} \right|^2 \left(\frac{r}{r + d} \right)^{12}. \quad (22)$$

Taigi iš gautos 22 išraiškos galime pastebėti, kad tiesioginis molekulės kontaktas su metalo paviršiumi nėra būtina sąlyga PSRS spektrams gauti, tačiau tolstant molekulei nuo nanodalelės paviršiaus (storėjant išoriniam nanodalelės apvalkalui) stiprinimas žymiai mažėja. Paskutinis narys (21) lygtyje atspindi G_{EM} mažėjimo dėsningumą. Tą pačią tendenciją atspindi ir eksperimentiniai duomenys (16, 17 pav.).



16 pav. Elektromagnetinio lauko stiprio pasiskirstymo aplink Au@Pt nanodalelę FDTD simuliacija (kairė) ir PSRS stiprinimo priklausomybė nuo atstumo iki nanodalelės branduolio (dešinė) [45].



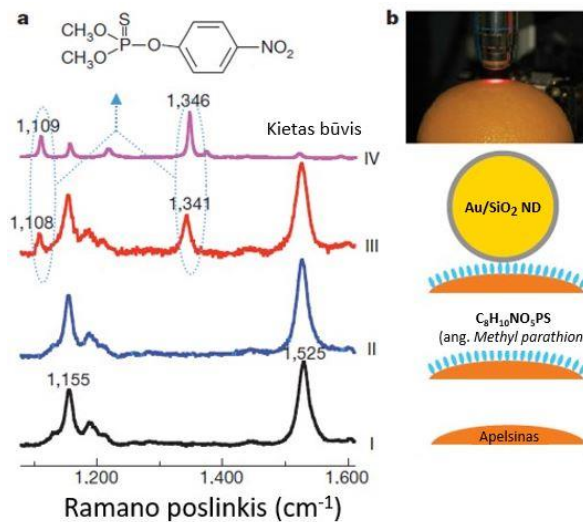
17 pav. SHINERS spektrų intensyvumo priklausomybė nuo apvalkalo storio. (a) adsorbuoto piridino SHINERS spektrai naudojant Au ND su skirtingu apvalkalo storio; (b) Santykinio 1013 cm^{-1} juostos intensyvumo priklausomybė nuo nanodalelės apvalkalo storio [46].

Nustatyta, kad izoliuotų, sferoido formos sidabro ir aukso nanodalelių G_{EM} siekia $10^6 - 10^7$ [47]. Vis dėlto, žymiai didesnius stiprinimus elektromagnetinė teorija numato deformuotiems sferoidams ar dimerams, ypač kai tarpas tarp nanodalelių siekia tik 1 nm [48]. Tačiau atsižvelgiant į tai, jog kokybiškas apvalkalas, gaubiantis nanodalelę, turi būti bent 2 nm, bendras tarpas tarp dalelių išauga iki 4 nm. Vadinasi, galima daryti išvadą, kad maksimalus elektromagnetinis stiprinimas prarandamas naudojant apvalkalais izoliuotas daleles, bet gerokai laimima kitais aspektais.

2.11. Nanodalelių su išoriniu dielektriniu sluoksniu pritaikymas PSRS tyrimuose

Žemės ūkio pramonėje naudojami pesticidai neigiamai veikia nervų sistemą, plaučius, silpnina imunitetą, ardo endokrininę sistemą ir sukelia vėžinius susirgimus. Todėl pesticidų aptikimas maisto pramonėje tampa vis labiau aktualus [49].

Mokslininkai pademonstravo, jog tikslus, greitas pesticidų aptikimas maisto produktuose gali būti atliekamas SHINERS metodu. Tyrimo metu nustatyta, kad švaraus apelsino ir apelsino su *parathion* pesticidais Ramano spektrai nesiskiria (18 pav.). Kur virpesinės juostos ties 1165 ir 1526 cm^{-1} priskiriamos natūraliems citrusinių vaisių karatinoidams. Tuomet aukso branduolio nanolazdelės (20x60 nm) su 2 nm storio SiO_2 apvaskalu buvo užlašintos ant apelsino žievelės ir užregistruoti SHINERS spektrai. Pastebėta, kad suintensyvėjo charakteringos *parathion* juostos ties 1109 ir 1339 cm^{-1} [42].

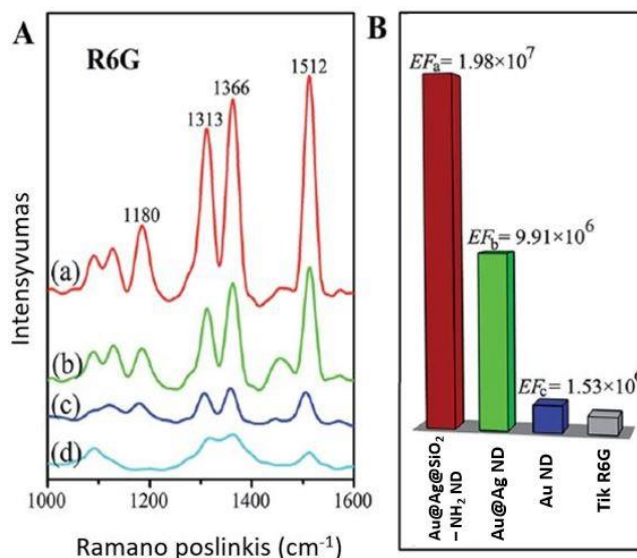


18 pav. *In situ* pesticidų tyrimai ant apelsino žievelės: (a) Švarios vaisiaus žievelės Ramano spektras – I; žievelės su parathion pesticide Ramano spektras – II; III žievelės su parathion SHINERS spektras; IV parathion Ramano spektras. (b) SHINERS eksperimento schema [42].

Tarp daugelio cheminių teršalų ypatingą vietą užima sunkieji metalų jonai. Sunkiųjų metalų jonai yra linkę kauptis gyvuosiuose organizmuose, pasižymi ilgalaikiu ir įvairiapusišku toksiniu poveikiu, keliančiu rimtą grėsmę gyvajai gamtai ir žmonių sveikatai. [50].

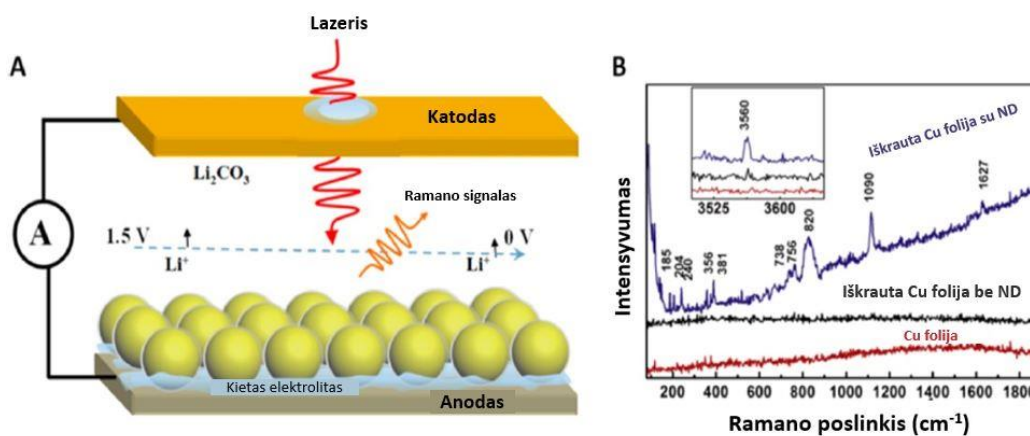
Pavojingiausių sveikatai Hg^{2+} jonų aptikimui įvairiuose vandens telkiniuose mokslininkai pasitelkė SHINERS metodą. Šiam tikslui susintetintos Au-Ag nanolazdelės, apgaubtos SiO_2 apvaskalu, kuris vėliau modifikuotas amino grupėmis. Eksperimento metu autoriai pasinaudojo R6G savybe – keisti struktūrą priklausomai nuo terpės pH (skirtingi izomerai). R6G per amino grupes prikabinamas prie nanodalelės, tuomet terpė parūgštinama, kad R6G forma pasikeistų į palankę kompleksų sudarymui su gyvsidabrio jonais. Susidarius kompleksui R6G atskyla ir Ramano spektruose pastebimas R6G spektro intensyvumo sumažėjimas. Autoriai taip pat palygino

Ramano spektrų stiprinimą su kitų rūšių nanodalelėmis. Tyrimo metu pasiekta Hg^{2+} jonų aptikimo riba siekia net $0,33 \text{ pmol L}^{-1}$ [51].



19 pav. A) R6G (1 mmol L^{-1}) PSRS spektras naudojant: Au@Ag@SiO₂-NH₂ nanolazdeles(a), Au@Ag nanolazdeles (b) ir Au nanolazdeles kaip PSRS pagrindą. (d) R6G (1 mmol L^{-1}) Ramano spektras. B) Užregistruotų Ramano spektrų virpesinės juostos 1512 cm^{-1} integrinių intensyvumų ir stiprinimo faktorių palyginimas [51].

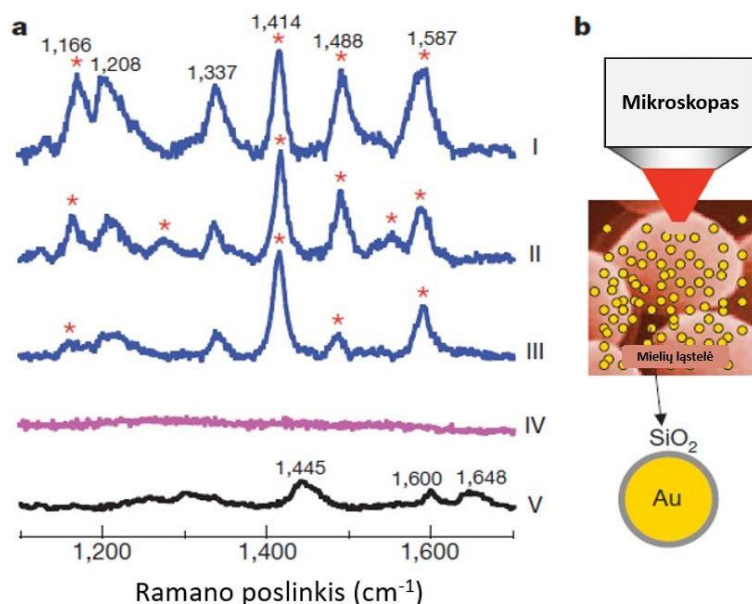
SHINERS taip pat gali būti taikomas tiriant energijos prietaisus, pvz. ličio jonų baterijas. Vienas esminių uždavinių, norint vystyti elektronikos prietaisus, yra energijos kaupimo prietaisų tobulinimas. Siekiant pagerinti ličio jonų baterijų talpą ir gyvavimo trukmę svarbu iširti ir nustatyti veiksnius, darančius įtaką redokso reakcijoms baterijų įkrovimo/išsikrovimo metu. Norint *in situ* stebėti redokso reakcijas ličiu praturtintuose katoduose, Hwang'o grupė panaudojo SHINERS techniką su Au@SiO₂ dalelėmis. Registruodami SHINERS spektrus mokslininkai galėjo tiesiogiai stebėti Li₂O susidarymą ant ličiu praturtinto katodo įkrovimo / iškrovimo proceso metu ir nustatyti proceso mechanizmą [52].



20 pav. *In situ* ličio baterijų SHINERS tyrimo principinė schema (A), Vario folijos ir iškrautos vario folijos Ramano spektrai su ir be nanolalelių (B) [52].

Kita, vis labiau mokslininkus masinanti, tyrimų sritis visgi susijusi su gyvų sistemų charakterizavimu. Gyvosios struktūros pasižymi ypatingu kompleksiskumu ir dinamika, todėl norint tirti tokias sudėtingas sistemas reikia pasitelkti tyrimo metodą, kuris kuo mažiau arba visiškai nesutrikdytų pačios sistemos, nepaveiktų molekuliniam lygmenyje vykstančių procesų. SHINERS metodas dar tik skinasi kelią į gyvųjų sistemų tyrimus, tačiau demonstruoja tikrai daug žadančius pirmuosius rezultatus.

Vienas pirmųjų gyvų ląstelių tyrimų SHINERS technika buvo atliktas 2010 metais [42]. Eksperimentams buvo pasirinktos mielių ląstelės (*Saccharomyces cerevisiae*), nes jos yra vienos plačiausiai tyrinėjamų eukariotinių organizmų modelių pradedant genetika ir baigiant biochemija. Didelį susidomėjimą kelia mielių ląstelių sienelės dėl jų jautrumo skirtingoms ląstelės biologinėms funkcijoms. 21 pav. pateikti mielių ląstelių SHINERŲ spektrai (kreivės I-III) iš skirtingų to paties mėginio vietų. Šie spektrai labai skiriasi nuo mielių ląstelių įprasto Ramano spektro (kreivė V), bet panašūs į mananams būdingus PSRS spektrus [53], kurie aptinkami mielių ląstelių sienelėse. Taip pat SHINERS spektruose yra keletas kitų smailių, priskiriamų amidams, baltymams ir amino rūgščių virpesiams, kurie siejami su gyvų ląstelių bioaktyvumu (baltymų sekrecija, judėjimas). Šie rezultatai rodo, kad SHINERS yra saugi, patogi technika, leidžianti *in situ* tirti ląstelių sieneles aptinkant baltymus ir stebint gyvų sistemų dinamiką bei mechanizmus.



21 pav. Mielių ląstelių *in situ* SHINERS tyrimas: a) I-III mielių ląstelės SHINERS spektrai skirtinguose taškuose, IV Au@SiO₂ nanodalelių Ramano spektras ir V mielių ląstelių Ramano spektras, žvaigždute pažymėtos juostos priskiriamos mananams; b) principinė eksperimento schema [42].

3. Eksperimento metodika

3.1. Medžiagos

Visos Au@SiO₂ nanodalelių sintetavimo procesui ir jų pritaikymui tyrimuose naudotos medžiagos pateiktos 1 lentelėje. Tirpalai ruošti dejonizuotame vandenyje (18,2 MΩ·cm, Millipore).

1 lentelė. Au@SiO₂ nanodalelių sintezės ir pritaikymo metu naudotos medžiagos.

| Medžiaga (ang.) | Cheminė formulė | Grynumas, % | Gamintojas | Naudota koncentracija |
|---|--|-------------|--|-----------------------|
| Tetrachloraukso rūgštis (Gold (III) chloride trihydrate) | HAuCl ₄ · 3H ₂ O | 99,99 | Sigma-Aldrich, JAV | 0,01 % (wt/vol) |
| Natrio citratas (Sodium citrate dihydrate) | HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂ · 2H ₂ O | 99 | Sigma-Aldrich, JAV | 1 wt% |
| (3-Aminopropil)trimetoksilanas (APTMS) | H ₂ N(CH ₂) ₃ Si(OCH ₃) ₃ | 97 | Sigma-Aldrich, JAV | 1 mM |
| Natrio silicio tirpalas arba skystas stiklas (Sodium silicate solution) | SiO ₂ | 27 | Sigma-Aldrich, JAV | 0.54 % (wt/wt) |
| Tiofenolis (Thiophenol) | C ₆ H ₆ S | ≥ 99 | Sigma-Aldrich, JAV | 10 ⁻² M |
| N-(6-Merkapto)heksilpiridinio chloridas (N-(6-mercapto)hexylpyridinium chloride) | C ₁₁ H ₁₈ ClNS | 78 | NFTMC, Organinės sintezės skyrius, Lietuva | 10 ⁻³ M |
| Etanolis (Ethanol) | CH ₃ CH ₂ OH | 96 | Sigma-Aldrich, JAV | 96 |

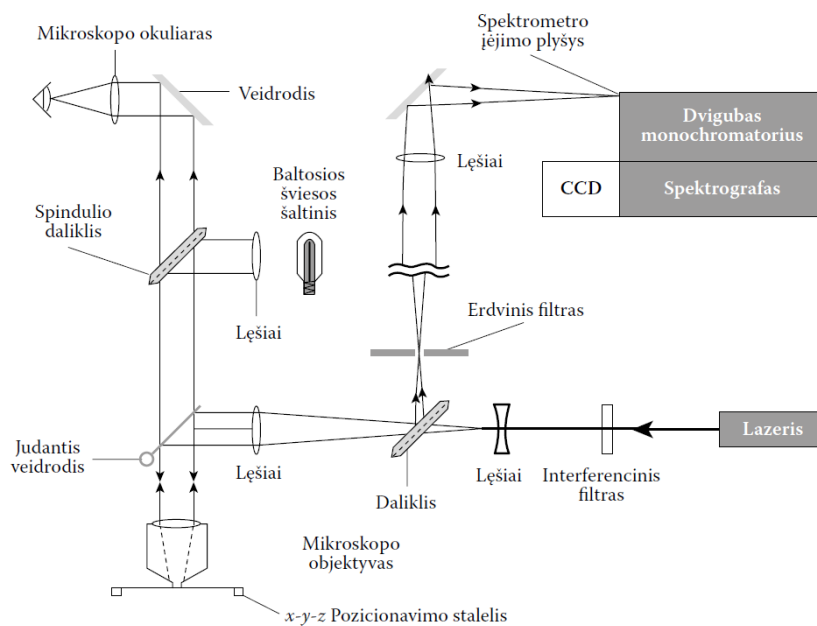
3.2. Aparatūra

Reagentai sverti analizinėmis svarstyklėmis (*KERN ABJ 220-4M*, KERN & Sohn GmbH, JAV). Tirpalų pH matuotas pH-metru (*Knick 766 Calimatic*, Vokietija). Tirpalai maišyti/kaitinti magnetine maišykle (*IKA-Werke GmbH & Co.KG*, Vokietija). Naudotos automatinės pipetės (1 ml, 100 μ l, 10 μ l), vienkartiniai indai (15 ml, 50 ml) ir stikliniai indai (200 ml, 50 ml). Frakcionavimui naudota mikrocentrifuga (*Eppendorf MiniSpin*, JAV). Spektroelektrocheminiams tyrimams naudotas potenciostatas (*AUTOLAB PGSTAT 101*, Nyderlandai).

Ramano spektrometrai

Tiriant savitvarkius monosluoksnius Ramano sklaidos ir PSRS spektrai registruoti dispersinio „Ešėlė“ (Echelle) tipo spektrometru *RamanFlex 400* (PerkinElmer Inc., JAV) su termoelektriškai šaldomu ($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$) CCD detektoriumi kambario temperatūroje ($20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Spektrų sužadimui ir Ramano sklaidos surinkimui naudotas šviesolaidinis kabelis. Diodinio lazerio, generuojančio žadinančią spinduliuotę, bangos ilgis 785 nm. Eksperimentams taikyta 180° geometrija, t. y. bandinį žadinantis fokusuotas lazerio spindulių pluoštas yra lygiagretus surenkamai išsklaidytai šviesai. Lazerinės spinduliuotės galia ties bandiniu 30 mW. Lazerio spindulys fokusuojamas į $\sim 200\text{ }\mu\text{m}$ skersmens dėmę ant tiriamojo bandinio paviršiaus. Santykinis Ramano sklaidos intensyvumas kalibruotas pagal NIST (National Institute of Standards and Technology) intensyvumo standartą SRM 2241, Ramano spektrų bangos skaičių ašis kalibruota pagal polistireno plėvelės standarto (ASTM E 1840) Ramano sklaidos spektrą. Registruojant Ramano sklaidos ir PSRS spektrus integravimo laikas svyravo nuo 100 iki 500 s. Virpesiniai spektrai apdoroti GRAMS/AI 8.0 (Thermo Scientific Inc., JAV) programiniu paketu.

Dėl patogaus spinduliuotės fokusavimo būdo į bandinį ir itin geros prietaiso skyros mielių ląstelių tyrimai atlikti Renishaw inVia Ramano spektrometru/ mikroskopu (Renishaw, UK) su termoelektriškai šaldomu ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) daugiakanaliu CCD detektoriumi kambario temperatūroje ($20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Prietaiso, kuriame Ramano spektrometras sujungtas su mikroskopu, principinė schema pateikta 8 pav. Ramano sklaidos žadinimui naudota diodinio lazerio spinduliuotė, kurios bangos ilgis 785 nm. Eksperimentams taikyta 180° geometrija. Ramano spektrų registravimui ir mikroskopinių vaizdų gavimui naudotas tolumo nuotolio $50\times/0,50$ skaitinės apertūros objektyvas, 1200 režiu/mm gardelė. Lazerinės spinduliuotės galia ties bandiniu – 0,9 mW, fokusavimo dėmė $\sim 1,9\text{ }\mu\text{m}$. Pasirinktas integravimo laikas 300 s. Ramano spektrų bangos skaičių ašis kalibruota pagal silicio virpesinę juostą ties $520,7\text{ cm}^{-1}$. Užregistruoti spektrai apdoroti GRAMS/AI 8.0 (Thermo Scientific Inc., JAV) programiniu paketu.



22 pav. Ramano mikroskopo principinė veikimo schema [26].

UV-VIS spektrofotometras

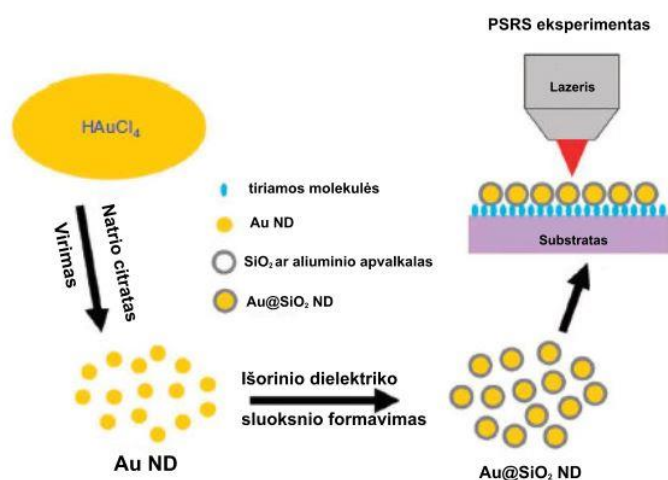
Matavimai atlikti naudojant spektrofotometrą *Lambda 25 UV-VIS* (Perkin Elmer Inc., JAV). Tyrimams naudotos stiklinės UV mikrokiuvetės. Optinio kelio ilgis 1 cm. Tiriant susintetintų aukso nanodalelių tirpalus, į kiuvetes buvo supilamas tiriamasis tirpalas ir palyginamasis tirpalas. Palyginamuoju tirpalu naudotas dejonizuotas vanduo. Šviesos sugerties spektrai registruoti 200 - 1100 nm srityje. Spektrofotometriniai matavimai atlikti kambario temperatūroje ($20 \pm 2^\circ\text{C}$).

Didelės skyros pralaidumo elektroninis mikroskopas (ang. *HR TEM*)

HR TEM vaizdai gauti *FEI Tecnai G2 F20 X-TWIN* didelės skyros pralaidumo elektroniniu mikroskopu su integruotu rentgeno spindulių energijos dispersijos (ang. EDS) spektroskopiniu detektoriumi, skirtu bandinių elementinei analizei. Mikroskopas naudoja Šotki tipo lauko emisijos elektronų šaltinį, kurio parinkta įgreitinimo įtampa – 150 kV.

3.3. Au@SiO₂ nanodalelių sintezė

Au ND su SiO₂ (Au@SiO₂) sluoksniu sintetamos dviejų pakopų metodu: iš pradžių 50 nm dydžio branduolys formuojamas redukuojant tetrachloraukso rūgštį natrio citratu vandeninėje terpėje. Vėliau išorinis SiO₂ apvalkalas formuojamas naudojant reikiamos koncentracijos (3-aminopropil)trimetoksilaną (APTMS), kuris sumaišomas su aukso koloidu kol susidaro amino grupių kompleksai su aukso paviršiumi ir tik tuomet į visą suspensiją įterpiamas skystas stiklas. Aukso ND su išoriniu dielektriko sluoksniu sintezės ir pritaikymo PSRS eksperimente schema pavaizduota 23 pav.



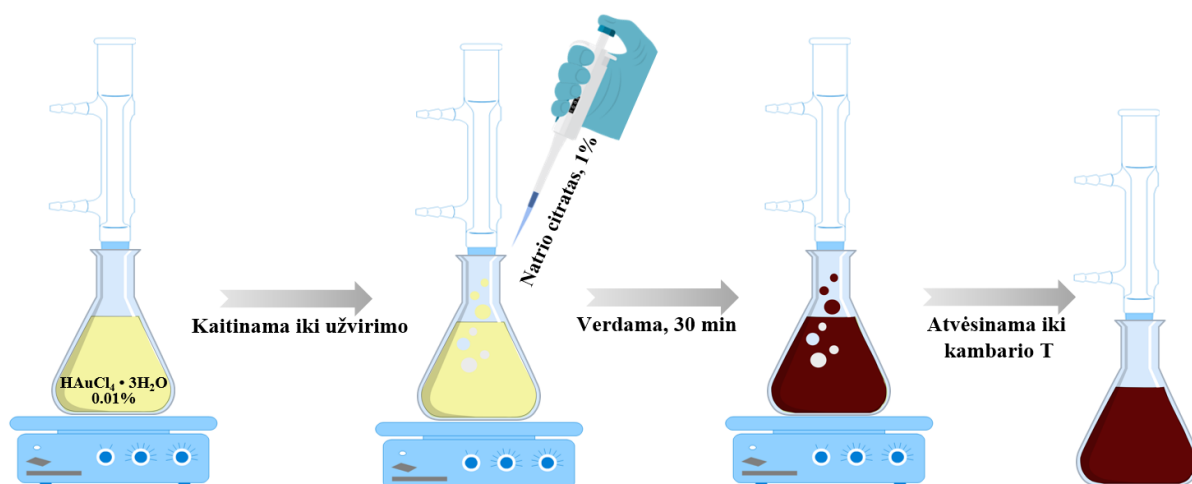
23 pav. Aukso nanodalelių su išoriniu dielektriko sluoksniu sintezės ir pritaikymo schema [46].

Au@SiO₂ nanodalelių paviršiaus morfologija nesudėtingai modifikuojama, tačiau tokios dalelės negali būti naudojamos eksperimentuose, kur tiriamų biologinių audinių pH aukštas, nes dalelės nėra visiškai inertiškos [42].

Sferinės formos aukso nanodalelės su išoriniu SiO₂ sluoksniu

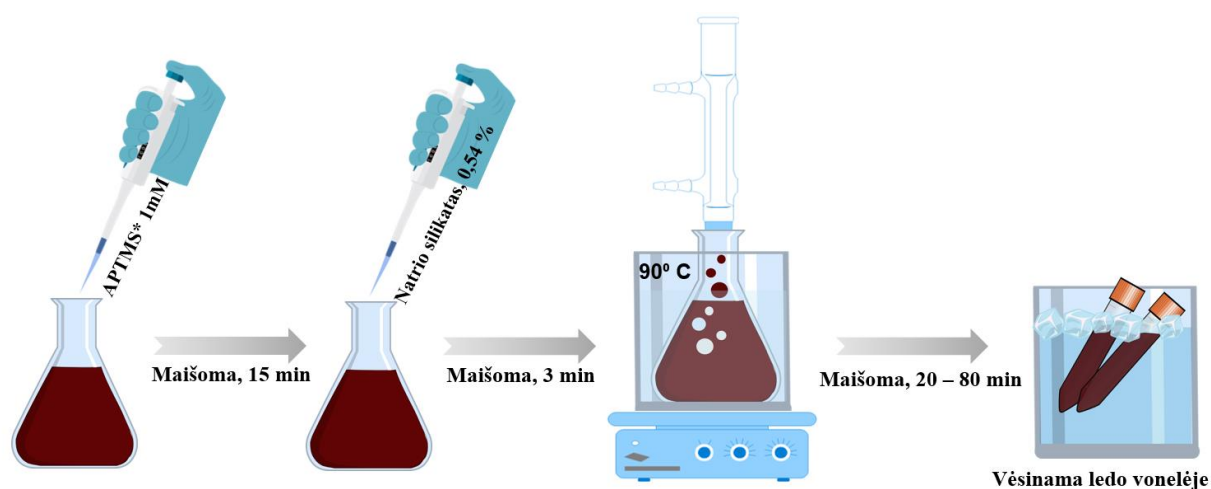
Au@SiO₂ nanodalelės (sferinės formos) sintetintos remiantis „*Nature*“ žurnale išspausdintu protokolu [46]. Nanodaleles siekta sintetinti taip, kad aukso branduolys būtų apie 50 nm dydžio, o SiO₂ apvalkalo storis – 2-3 nm.

Sintezė pradama aukso nanosferų formavimu redukuojant tetrachloraukso rūgštį natrio citratu vandeninėje terpėje (24 pav.). 0,01 % tetrachloraukso rūgšties vandeninis tirpalas supilamas į apvaliadugnę kolbą ir panardinamas į alyvos vonelę. Maišant magnetine maišykle tirpalas kaitinamas iki užvirimo. Tirpalui užvirus, greitai įpilama 1 % natrio citrato tirpalo (įpilamo natrio citrato kiekis lemia nanodalelių dydį, pvz. į 80 ml HAuCl_4 pilama 560 μl natrio citrato). Virimas maišant magnetine maišykle tęsiamas 30 min naudojant tekančio vandens vėsinimo sistemą. Po to gautas koloidinis tirpalas atvėsinamas iki kambario temperatūros.



24 pav. Principinė aukso nanodalelių (sferų) sintezės schema.

Išorinio dielektriko sluoksnio formavimas (25 pav.) pradamas į atvėsusį koloidinį tirpalą įpilant 1 mM APTMS tirpalo. Suspensija maišoma 15 min kambario temperatūroje. Praėjus 15 min supilamas skystas stiklas (0,54 %), kurio pH turi būti ~ 10,2, kitu atveju apvalkalas formuosis per greitai (pH < 8) arba per lėtai (pH > 11). Mišinys maišomas dar 3 min kambario temperatūroje. Toliau kolba patalpinama į 90 °C vandens vonelę ir maišant kaitinama 30 min. Šio sintezės etapo metu yra kontroliuojamas SiO_2 sluoksnio storis: kuo ilgesnį laiką vykdoma reakcija, tuo storesnis apvalkalas susidaro (pvz. po 30 min susiformuoja 2 nm storio SiO_2 , po 60 min – 4 nm). Po to visas turinys perpilamas į mažesnius mėgintuvėlius, kurie panardinami į ledo vonelę vykusios reakcijos sustabdymui. Atvėsinus tirpalą iki 4 °C temperatūros, viskas išdalinama į 1,5 ml tūrio vienkartinius mėgintuvėlius ir frakcionuojama. Mėgintuvėliuose esančios Au@SiO_2 ND frakcionuojamos centrifuguojant $\text{RCF} = 2,008 \cdot g$ pagreičiu (naudotos centrifugos atveju $\text{RPM} = 5400$ ap./min) du kartus po 15 min kambario temperatūroje (tarp centrifugavimų ištraukiami likę pašaliniai reagentai ir dalelės plaunamos dejonizuotu vandeniu).



25 pav. Principinė dielektriko sluoksnio formavimo ant aukso nanodalelių schema.

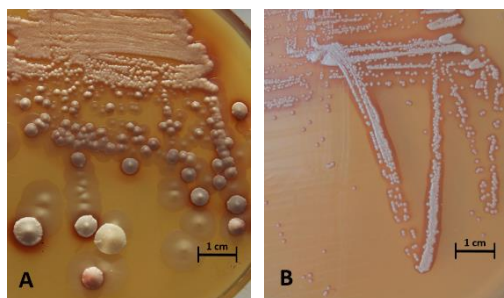
3.4. Bandinių paruošimas

Savitvarkių monosluoksnių formavimas

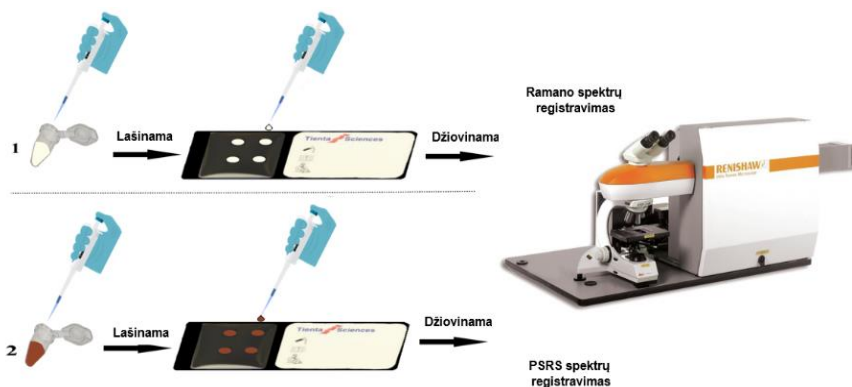
Eksperimentai pradėti nuo savitvarkių monosluoksnių formavimo naudojant tiofenolio ir N-(6-Merkapto)heksilpiridinio chlorido molekules. Tiofenolis adsorbuotas valandą laiko ant lygaus aukso paviršiaus iš etanolio, kai $C_{TF} = 10^{-2}$ M. Aukso paviršius magnetroninio garinimo būdu suformuotas ant stiklo plokštelės (naudotas 99,99% Au taikiny *Quorum 150T*). Po inkubacijos plokštelė su jau susiformavusiu monosluoksniu išimta iš tirpalo ir gausiai nuplauta etanolio pašalinant galimus viršsluoksnius. Analogiška procedūra atlikta ir su N-(6-Merkapto)heksilpiridinio chlorido junginiu, tik šiuo atveju adsorbato koncentracija tirpale mažesnė – $C_{MHP} = 10^{-3}$ M. Nuplautos plokštelės patalpinamos į specialias PSRS matavimams skirtas celes.

Mielių ląstelių bandinių paruošimas

Metschnikowia pulcherrima mielės augintos esant 50 – 150 mg/L geležies kietoje agarizuotoje terpėje skirtingoje temperatūroje iki pilno maistinių medžiagų įsisavinimo (Gamtos tyrimų centras, Botanikos Institutas) (26 pav.). Vėliau mielės špateliu paimamos iš kolonijos vidurio (0,004 g) ir ištirpinamos vandenyje (2 ml). Mielių mėginių paruošimas Ramano ir PSRS matavimams pateiktas 27 pav. Mielių tirpalas (7 μ L) užlašinamas ant nerūdijančio plieno plokštelės ir nudžiovinamas kambario temperatūroje (27 pav. 1). Tuomet ant išdžiūvusių mielių paskleidžiamos Au@SiO₂ nanodalelės (3 μ L) ir vėl nudžiovinama kambario temperatūroje (27 pav. 2).



26 pav. *Metschnikowia pulcherrima* (A) su didesniu pigmento kiekiu, (B) mažesniu.

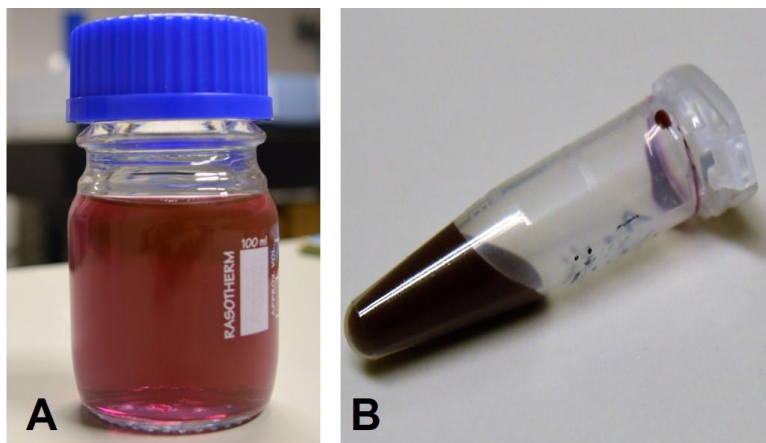


27 pav. Principinė mielių bandinių paruošimo schema.

4. Eksperimento rezultatai ir jų aptarimas

4.1. Au@SiO₂ ND sintezė

Au@SiO₂ ND susintetintos keliasdešimt kartų. 28 pav. vizualiai pateiktos Au@SiO₂ ND prieš ir po frakcionavimo centrifuguojant. Susintetintos dalelės be dydžio ar morfologijos pakitimų laikomos tamsoje 4 °C temperatūroje iki 30 dienų.

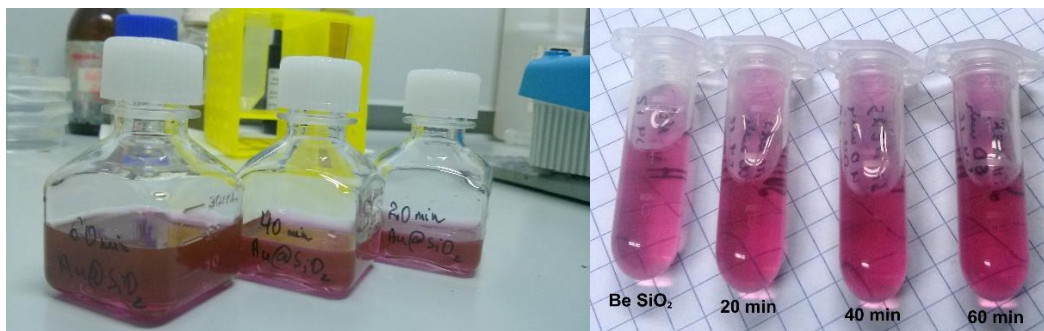


28 pav. Au@SiO₂ nanodalelės : A – prieš frakcionavimą, B – po frakcionavimo.

4.2. SiO₂ sluoksnio storio kontrolė

Inertinio išorinio sluoksnio storio kontroliavimas – vienas svarbiausių sintezės etapų, nes nuo jo priklauso Ramano signalo stiprinimo faktorius. Kuo sluoksnis storesnis, tuo Ramano signalo stiprinimo faktorius mažesnis, todėl sintezės metu būtina suformuoti optimalų apvalkalo storį: kaip įmanoma plonesnį, bet neporėtą. Kai SiO₂ apvalkalo storis pasiekia 10 ir daugiau nm, paviršiaus plazmonų rezonanso elektromagnetinis laukas tampa per silpnas, kad stiprintų registruojamą Ramano sklaidos signalą.

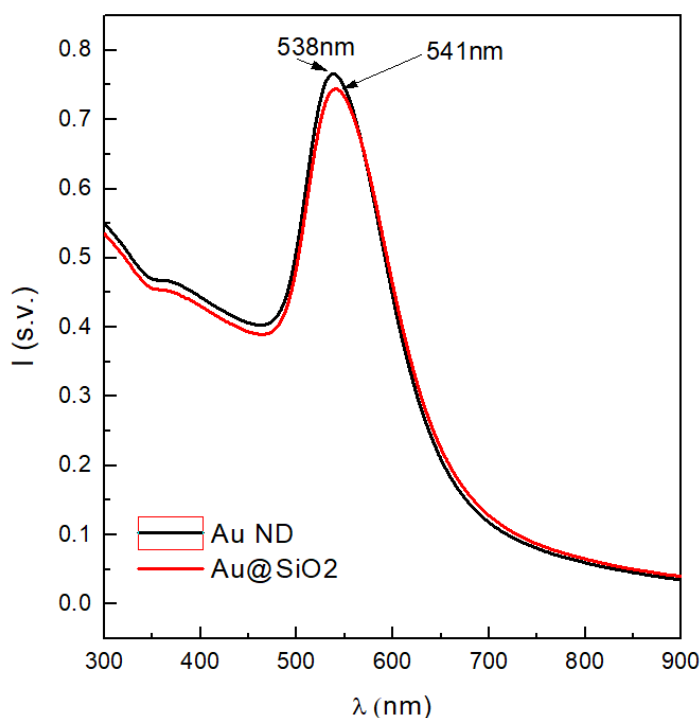
SiO₂ sluoksnio storį galima įvertinti vizualiai: storėjant apvalkalui pastebimas koloidinio tirpalo spalvos pokytis – tirpalo spalva tamsėja (29 pav.).



29 pav. Au@SiO₂ nanodalelės esant skirtingiems SiO₂ sluoksnio storiams po skirtingo sluoksnio formavimo laiko sintezės metu.

4.3. Au@SiO₂ ND dydžio įvertinimas elektroninės sugerties metodu

Siekiant įvertinti, ar Au@SiO₂ ND susintetintos reikiamo dydžio (50 nm), užregistruoti susintetintų nanodalelių UV-VIS elektroninės sugerties spektrai 300 – 900 nm srityje: Au nanodalelių ir Au nanodalelių su dielektriko sluoksniu (30 pav.). SiO₂ sluoksnis formuotas 30 min 90 °C temperatūroje (tokį pat rezultatą galima gauti ir sluoksnį formuojant 2 dienas kambario temperatūroje). Sugerties spektrai registruoti prieš frakcionavimą centrifuguojant, palyginamuoju tirpalu naudotas dejonizuotas vanduo.



30 pav. Au nanodalelių (juodas, sugerties maksimumas ties 539 nm) ir Au nanodalelių su išoriniu dielektriko sluoksniu (raudonas, sugerties maksimumas ties 542 nm) UV-VIS sugerties spektrai 300 – 900 nm srityje.

Remiantis literatūroje pateikiamais eksperimentiniais duomenimis [54], 50 nm dydžio Au nanodalelių sugerties maksimumas UV-VIS spektre turi būti ties 535 nm ir kuo didesnis dalelių diametras, tuo sugerties maksimumas labiau slenkasi į ilgesnių bangų sritį. Atsižvelgus į tai, kad gautas sugerties maksimumas prieš išorinio sluoksnio formavimą yra ties 538 nm, galima daryti prielaidą, kad susintetintos dalelės yra šiek tiek didesnės nei 50 nm dydžio. Taip pat po išorinio dielektrinio sluoksnio suformavimo nanodalelių sugerties maksimumas pasislinko per kelis nm, kas patvirtina, jog sluoksnis yra suformuotas, tačiau apie patį sluoksnio storį ar morfologiją iš užregistruotų spektrų spręsti negalima.

Pasinaudojus 23 formule [55], skirta nanodalelių dydžio įvertinimui pagal sugerties spektro maksimumo ir intensyvumo ties 450 nm santykį, gauname vidutinį nanodalelių dydį.

$$d = e^{(B_1 \frac{I_{max}}{I_{450}} - B_2)} \quad (23)$$

B_1 ir B_2 koeficientai, nustatyti remiantis teoriniais skaičiavimais, kurie lygūs: $B_1 = 3,55$, $B_2 = 3,11$. Pagal 30 pav. $I_{max}=0,766$, $I_{450}= 0,406$, todėl apskaičiuotas nanodalelių diametras $d = 38$ nm.

Nanodalelių spindulį iš sugerties spektro duomenų galima įvertinti ir kitaip [56]:

$$R = \frac{V_f \lambda_{max}^2}{2\pi c \Delta\lambda} \quad (24)$$

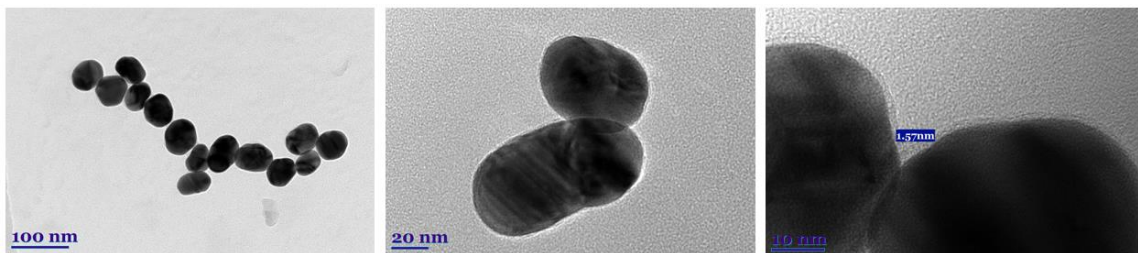
kur V_f – elektronų Fermi greitis metalo tūryje (Au atveju $V_f=1,39 \cdot 10^8$ cm/s), $\Delta\lambda$ - sugerties juostos pusplotis, λ_{max} – plazmonų rezonanso sugerties juostos maksimumo padėtis. Įstačius atitinkamus skaičius iš 30 pav. gauname, kad vidutinis dalelių spindulys $R = 22,5$ nm, o diametras – 45 nm.

Vis dėlto, tikslesniam nanodalelių dydžio ir morfologijos įvertinimui reikia pasitelkti kitą metodą – didelės skyros pralaidumo elektroninį mikroskopą.

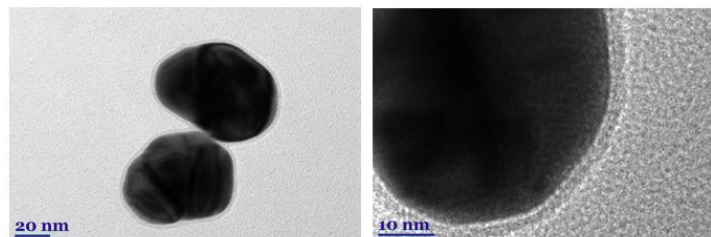
4.4. Au@SiO₂ ND tyrimas HR – TEM mikroskopu

Siekiant tiksliai įvertinti tiek dalelių dydį, tiek SiO₂ apvalkalo storio pokyčius nuo jo formavimo laiko, atlikti tyrimai HR – TEM mikroskopu.

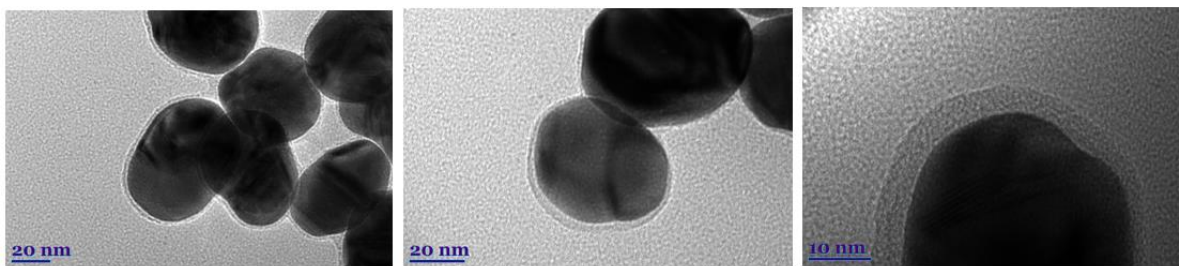
Iš HR – TEM mikroskopu užfiksuotų vaizdų (31 – 34 pav.) galima matyti, kad dalelių vidutinis dydis ≈ 50 nm, forma – netaisyklingos sferos, o SiO₂ apvalkalas storėja priklausomai nuo jo formavimo laiko.



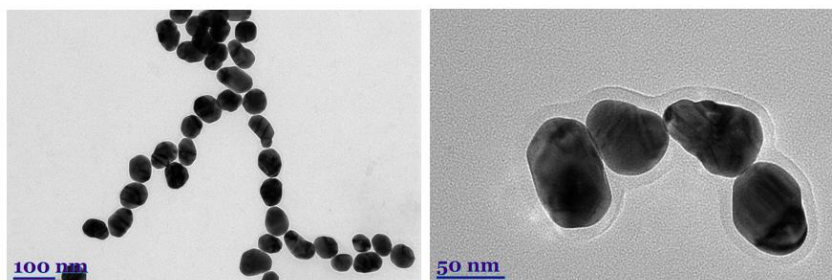
31 pav. Au@SiO₂ nanodalelių HR – TEM vaizdai, SiO₂ storis $\approx 1,5$ nm, formuotas 20 min.



32 pav. Au@SiO₂ nanodalelių HR – TEM vaizdai, SiO₂ storis ≈ 2 nm, formuotas 40 min.

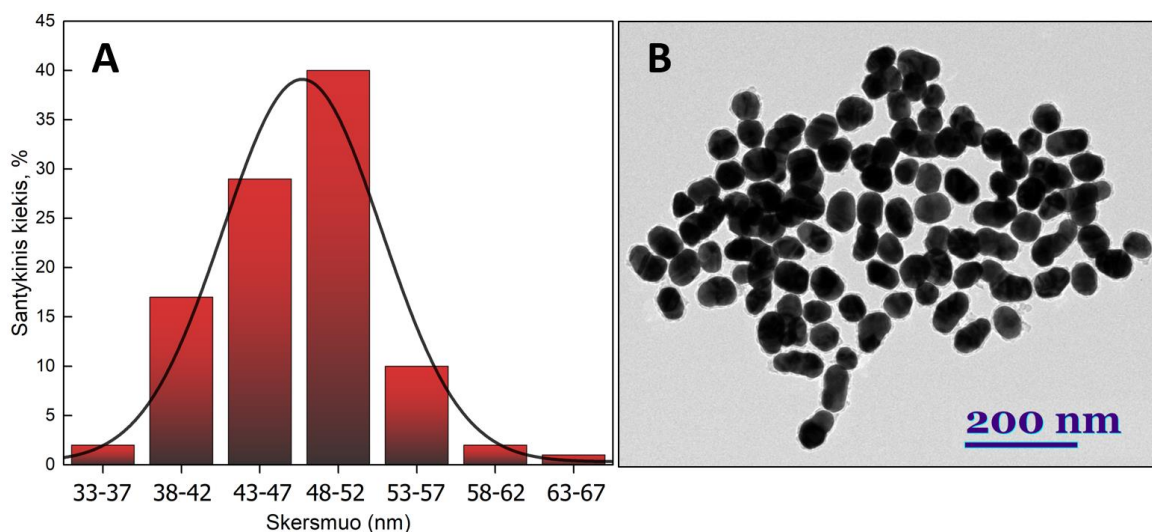


33 pav. Au@SiO₂ nanodalelių HR – TEM vaizdai, SiO₂ storis ≈ 4 nm, formuotas 60 min.



34 pav. Au@SiO₂ nanodalelių HR – TEM vaizdai, SiO₂ storis ≈ 10 nm, formuotas 80 min.

Atlikus išsamesnę TEM vaizdų analizę gautas dalelių dydžio pasiskirstymo grafikas (35 pav.). Dalelių skersmuo matuotas per trumpąją ašį. Nustatyta, kad vidutinis dalelių dydis yra 46 nm. Nanodalelių pasiskirstymo grafikas aproksimuotas Gauso funkcija, kur $R^2 = 0,92$.



35 pav. Au@SiO₂ nanodalelių dydžio pasiskirstymas (A), Au@SiO₂ nanodalelių HR – TEM vaizdas, naudotas dalelių dydžio įvertinimui (B).

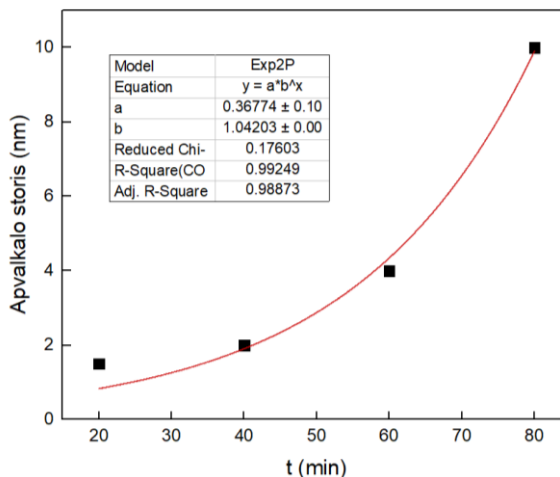
Įvertintas dalelių dydžio standartinis nuokrypis (25 išraiška), parodantis, kiek daug reikšmės skiriasi nuo vidutinės reikšmės.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}} = 6 \text{ nm} \quad (25)$$

x – imties vidurkis, n – imties dydis.

Toliau atlikta apvalkalo storio analizė, kuri parodė, kad apvalkalas iš tikrųjų storėja priklausomai nuo jo formavimo laiko sintezės metu. Nustatyta, jog apvalkalas storėja

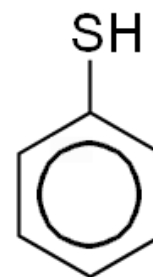
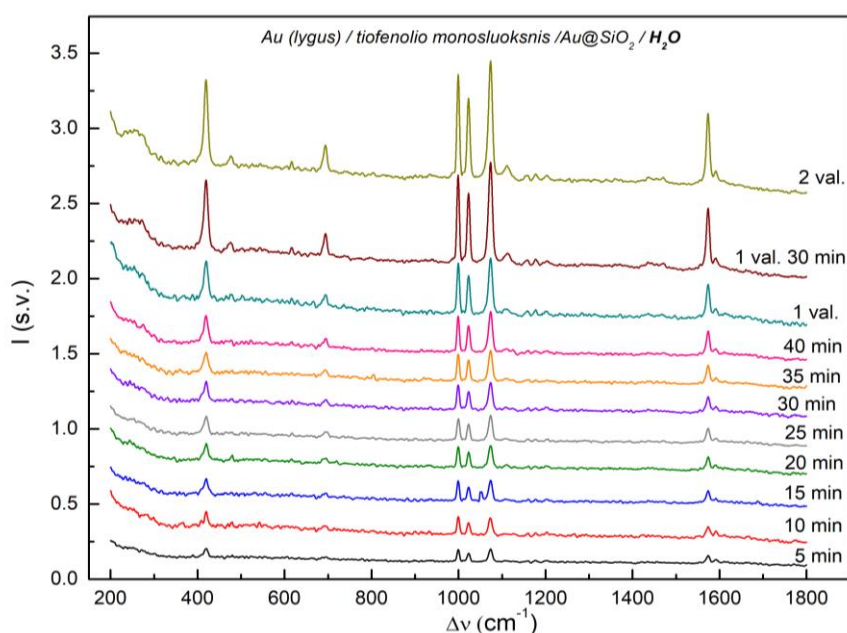
eksponentiniu dėsniu (36 pav.). 10 nm apvalkalo storis pasiekiamas per 80 min apvalkalo formavimo stadijos metu, vėliau apvalkalas tampa storesnis nei 10 nm ir tokios nanodalelės negali būti taikomos Ramano spektrų stiprinimui. Taip pat iš TEM vaizdų galima aiškiai matyti, po kiek laiko apvalkalo storis tampa optimalus PSRS tyrimams. Laikas, per kurį suformuojamas tinkamo (2 – 3 nm) storio dielektriko apvalkalas – 40 min.



36 pav. Au@SiO₂ nanodalelių apvalkalo storio priklausomybė nuo jo formavimo laiko cheminės sintezės metu.

4.5. Au@SiO₂ ND pritaikymas savitvarkių monosluoksnių tyrimuose

Pirma, Au@SiO₂ nanodalelės pritaikytos savitvarkių monosluoksnių ant lygaus aukso paviršiaus tyrimams. Ramano sklaidos spektrai registruoti in situ vandeninėje terpėje nuo lygus aukso paviršius, ant kurio adsorbuotas tiofenolio monosluoksnis. Siekiant sustiprinti Ramano sklaidos signalą į sistemą įleidžiamos Au@SiO₂ nanodalelės didesniu ir mažesniu santykiu su vandeniu.

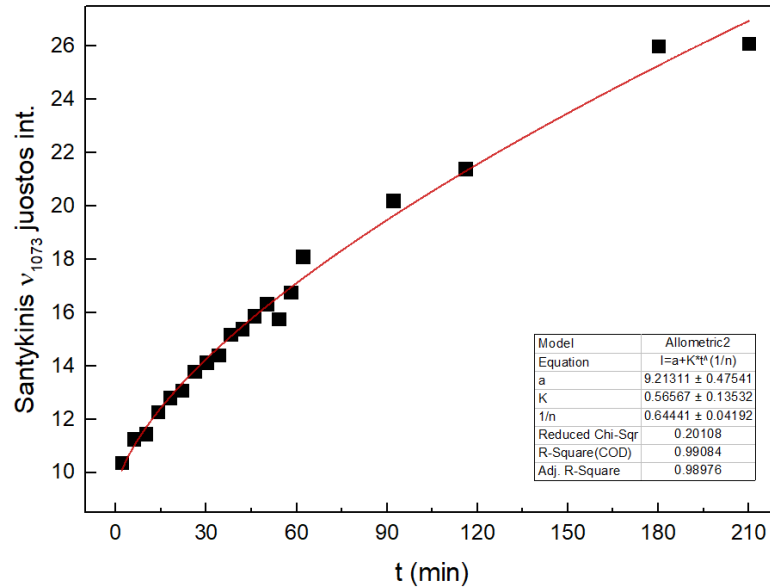


37 pav. Tiofenolio PSRS spektrų intensyvumo priklausomybė nuo laiko, po Au@SiO₂ dalelių įleidimo į sistemą (nanodalelių santykis su vandeniu 500 : 1) (kairėje); tiofenolio molekulinė struktūra (dešinėje).

Iš užregistruotų spektrų (37 pav.) matyti, kad spektrų intensyvumas proporcingai auga nuo laiko, praėjusio po Au@SiO₂ dalelių įleidimo į sistemą. Toks efektas pastebimas dėl vis didėjančio dalelių kiekio prie savitvarkio monosluoksnio ant aukso paviršiaus. Dalelių adsorbcijos ant paviršiaus įvertinimui pritaikyta Freundlich adsorbcijos izoterma:

$$\Gamma = KC^{1/n} \quad (26)$$

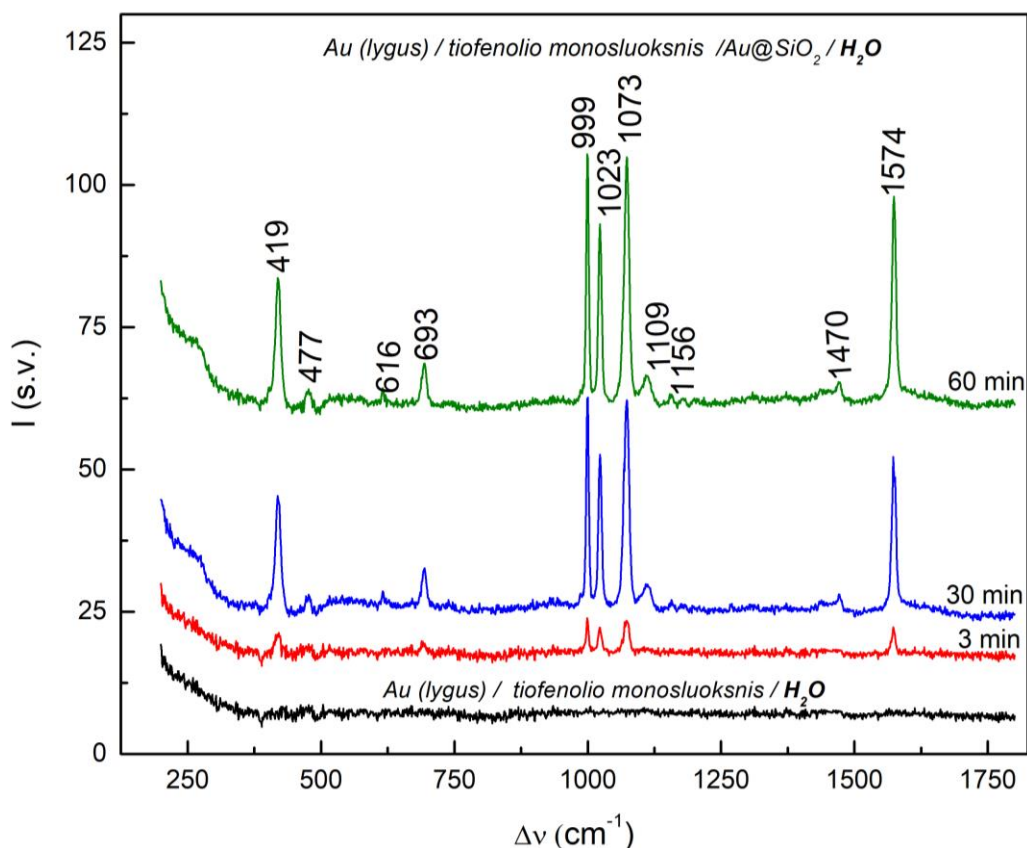
Kur C – koncentracija, n – konstanta.



38 pav. Tiofenolio virpesinės juostos 1073 cm⁻¹ intensyvumo priklausomybė nuo laiko, praėjusio po nanodalelių įleidimo į sistemą. Eksperimentiniai duomenys aproksimuoti Freundlich adsorbcijos izotermos kreive.

Dalelių adsorbcijos atveju padengimo laipsnį atitinka virpesinės juostos ties 1073 cm⁻¹ santykinis intensyvumas po tam tikro laiko nuo dalelių įleidimo į sistemą. 38 pav. pateikti Freundlich adsorbcijos izotermos koeficientai. Didėjant nanodalelių ant paviršiaus padengimo laipsniui, didėja ir $1/n$ konstanta, kuri šiuo atveju yra 0,6.

Kitas svarbus aspektas tas, jog nėra aiškios koreliacijos tarp dalelių santykio su vandeniu ir spektrų intensyvumo. 39 paveiksle pateikti PSRS spektrai gauti esant mažesnei koncentracijai nei 38 pav., tačiau spektrų intensyvumas priešingas: kur mažesnė dalelių koncentracija sistemoje, ten intensyvesni spektrai po vienodo laiko nuo dalelių įleidimo į sistemą. Tai galima paaiškinti gana paprastai: 39 pav. užregistruoti spektrai žadinančiai spinduliuotei pataikius į dalelių klasterį, kuris sugeneravo didesnę PSRS spektrų stiprinimą. Vadinasi, laikas nuo dalelių įleidimo nėra kritinis, nes nuo jo nedaug priklauso spektrų intensyvumas, maksimalų stiprinimą galima gauti ir po 60 min nuo dalelių įleidimo į sistemą. Vis dėlto, dalelių kiekis Ramano sklaidos žadinimo taške itin svarbus ir geriau, kai pataikoma į dalelių sankaupą.



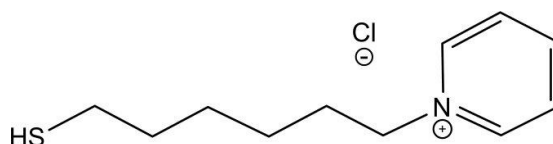
39 pav. Tiofenolio PSRS spektrų intensyvumo priklausomybė nuo laiko, po Au@SiO₂ dalelių įleidimo į sistemą (nanodalelių santykis su vandeniu 800 : 1).

Verta pastebėti, kad užregistruotuose spektruose nėra jokių pašalinių virpesinių juostų, kurios atspindėtų priemaišų egzistavimą sistemoje, o tiofenolio molekulių virpesių dažniai sutampa su pateiktais literatūroje (2 lentelė).

2 lentelė. Svarbiausių tiofenolio spektrinių juostų priskyrimas [57].

| $\Delta\nu, \text{cm}^{-1}$ | Virpesys |
|-----------------------------|---|
| 419 | C–S valentinis ir žiedo deformacija plokštumoje |
| 477 | C–S deformacinis ne plokštumoje |
| 616 | Žiedo deformacija plokštumoje |
| 693 | Žiedo deformacija ne plokštumoje |
| 999 | Žiedo deformacija ne plokštumoje ir C–H deformacinis ne plokštumoje |
| 1023 | Žiedo deformacija plokštumoje ir C–C simetrinis valentinis |
| 1073 | C–C asimetrinis valentinis |
| 1156 | C–H deformacinis plokštumoje |
| 1470 | C–H deformacinis plokštumoje |
| 1574 | C–C simetrinis valentinis |

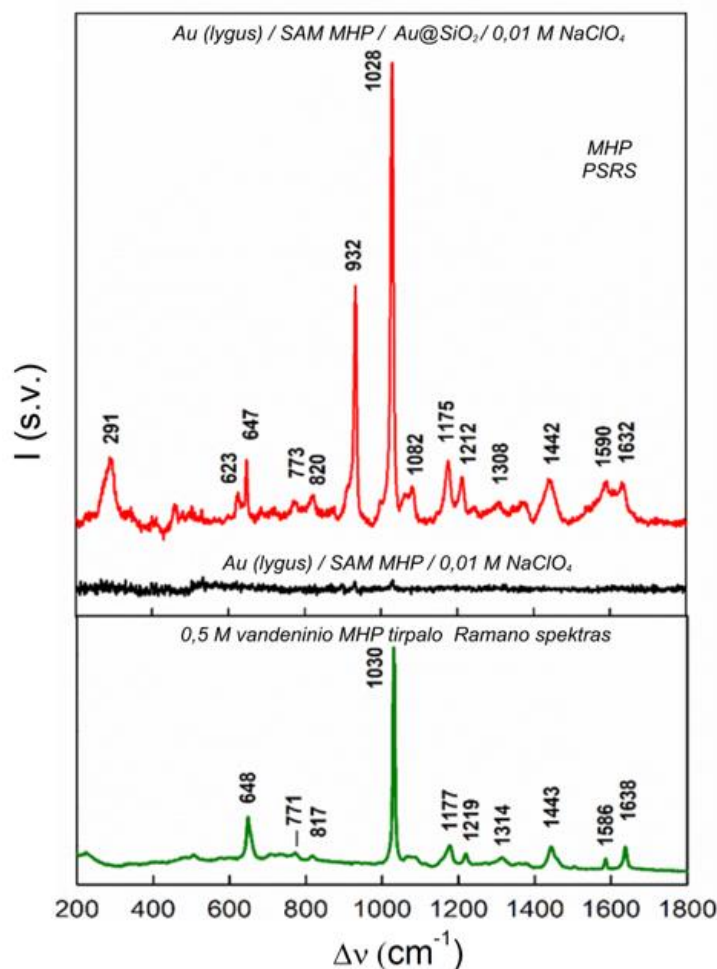
Toliau Au@SiO₂ dalelės pritaikytos sudėtingesnių sistemų tyrimuose, kur savitvarkius monosluoksnius sudarė N-(6-Merkapto)heksilpiridinio chlorido (MHP) molekulės. Ši cheminį junginį sudaro trys pagrindinės dalys: tiolio grupė, anliavandenilinė grandinė (–CH₂)₆– ir teigiamai įkrautas piridinio žiedas (40 pav.). Per tiolinę grupę siera kovalentiškai jungiasi su aukso paviršiumi ir sudaro savitvarkį monosluoksnį. Toks junginys eksperimentams pasirinktas dėl to, kad piridinio žiedas ir jo krūvis yra stabilūs, taip pat iš ankstesnių tyrimų jau žinoma, kad žiedas elektrostatiškai pritraukia neigiamas daleles, tokias kaip anijonai, amino rūgštys, nedideli baltymų peptidai ir kiti. Taigi junginys yra tinkamas ne tik fundamentiniams tyrimams, bet gali būti panaudojamas biojutiklių gamyboje ar kitur [58, 59]. Vis dėlto, monosluoksnių panaudojimą biotechnologiniuose procesuose stabdo molekulinės informacijos trūkumas apie junginio stabilumą ir gebėjimą pritraukti neigiamai įkrautas daleles esant skirtingiems elektrodo potencialams.



40 pav. N-(6-merkapt)heksilpiridinio (MHP) chlorido molekulinė struktūra [60].

Siekdami nustatyti elektrocheminio potencialo daromą įtaką MHP monosluoksniui ir funkcionalumui, pirmą kartą atlikti SHINERS tyrimai su monosluoksniu gaunant spektrinę informaciją nuo lygaus aukso paviršiaus *in situ* spektroelektrocheminėje celėje.

Iš pradžių užregistruotas 0,5 M vandeninio MHP tirpalo Ramano sklaidos spektras (41 pav.). Po to MHP adsorbuotas ant lygaus aukso paviršiaus ir Ramano sklaidos spektrai registruoti *in situ* vandeninėje terpėje. Siekiant sustiprinti Ramano sklaidos signalą į sistemą įleistas Au@SiO₂ nanodalelės (3 μl), inkubuotos 15 min ir gausiai išplautos vandeniu. Taip gautas plonas dalelių sluoksnis ant MHP savitvarkio monosluoksniui. Prieš PSRS spektrų registravimą sistemos vandeninė terpė pakeista 0,01 M NaClO₄ tirpalu, kad vėliau būtų galima atlikti elektrocheminius tyrimus.



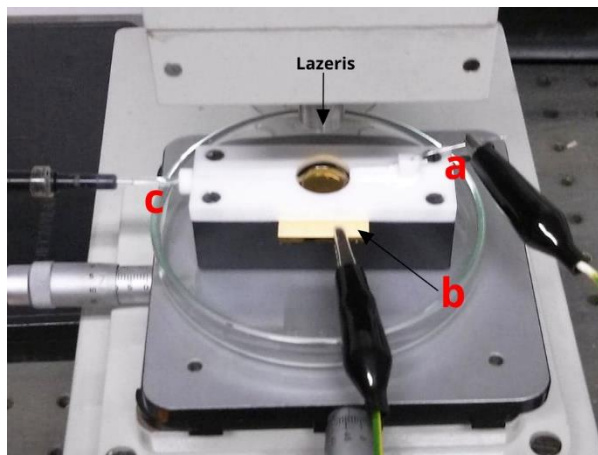
41 pav. MHP Ramano ir PSRS spektrų palyginimas esant skirtingoms sistemos konfigūracijoms.

Iš užregistruotų spektrų nesunku pastebėti, kad Au@SiO₂ nanodalelės padeda efektyviai sustiprinti Ramano sklaidos signalus. PSRS spektas švarus, nesimato jokių priemaišinių junginių smaيليų, o visos virpesinės juostos, priskiriamos atskiroms MHP molekules dalims, aiškiai matosi.

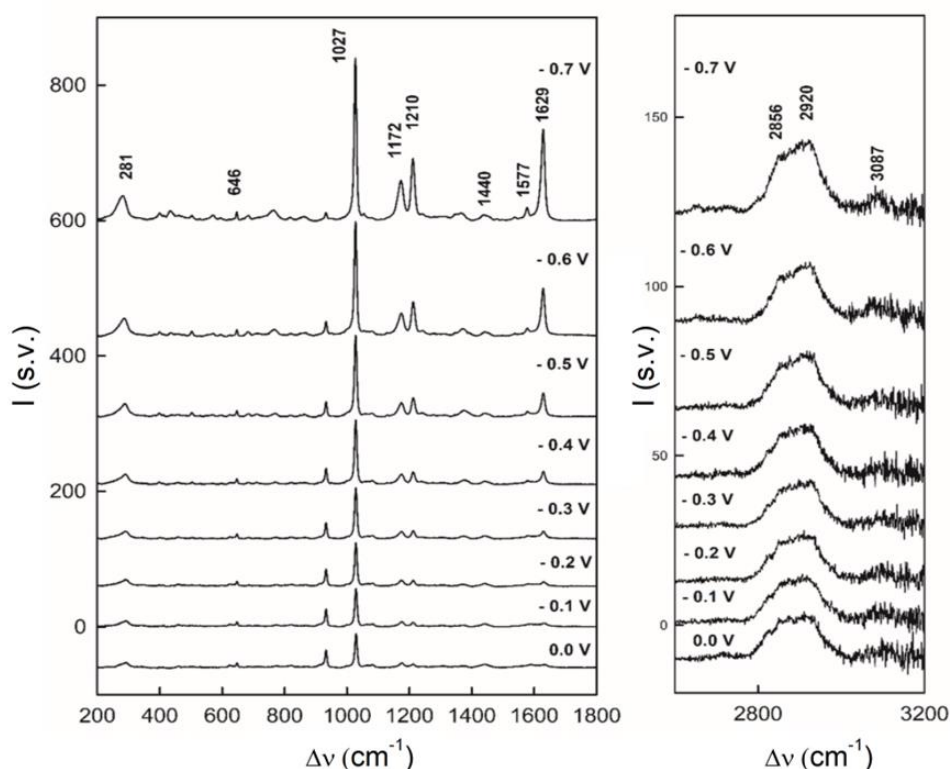
Pati intensyviausia poliarizuota juosta tirpalo spektre stebima ties 1030 cm⁻¹ ir atitinkamai ties 1028 cm⁻¹ paviršiaus spektre priklauso trigonalinei žiedo kvėpavimo modai. Depoliarizuoti valentiniai žiedo virpesiai stebimi ties 1632 ir 1590 cm⁻¹. Piridinio žiedo C–H grupių deformacinis svyravimas plokštumoje yra ties 1212 cm⁻¹ PSRS spektre ir atitinkamai 1219 cm⁻¹ tirpalo spektre. Dar viena iš įdomesnių virpesinių juostų yra ties 291 cm⁻¹, atspindinti Au-S kovalentinio ryšio egzistavimą. 932 cm⁻¹ smailė, priskiriama perchlorato tirpalui, kuri rodo, kad perchlorato anijonai yra pritraukti, fazių riboje susiformuoja joninės poros. Kitų virpesinių juostų priskyrimai atitinka pateiktus literatūroje [22].

Sėkmingai pritaikius Au@SiO₂ nanodalelės PSRS eksperimentuose, atlikti MHP savitvarkio monosluoksniu elektrocheminiai tyrimai, keičiant elektrodo potencialą nuo stacionaraus iki -0,7 V ir nuo stacionaraus iki +0,5 V. PSRS elektrocheminiai tyrimai atlikti trijų elektrodų tefloninėje celėje (42 pav.). Darbinis elektrodas – stiklo plokštelė, padengta 200 μm Au

99,99 % sluoksniu, ant kurio suformuotas savitvarakis monosluoksnis; pagalbinis elektrodas – 99,99 % platinos viela; palyginamasis – Ag/AgCl elektrodas, užpildytas 3M KCl tirpalu. Darbinio elektrodo paviršiaus potencialas kontroliuotas naudojant potenciostatą.



42 pav. Spektroelektrocheminio eksperimento celė ir geometrija: a – pagalbinis Pt elektrodas, b – darbinis Au elektrodas su MHP monosluoksniu, c- palyginamasis elektrodas.

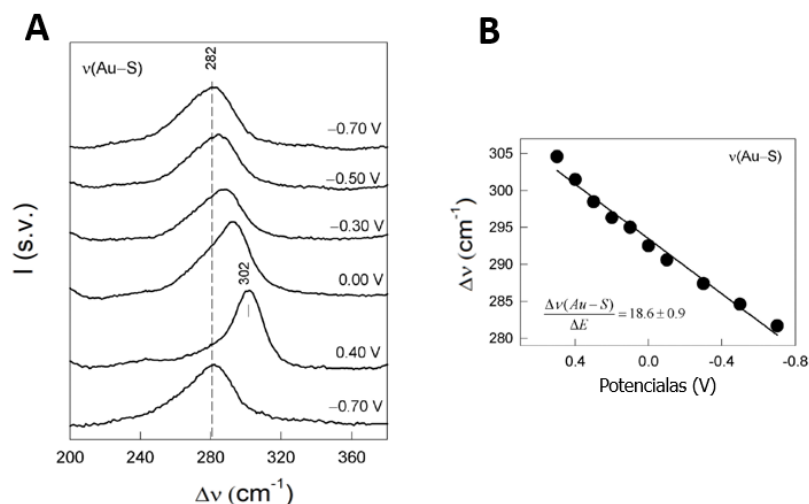


43 pav. MHP monosluoksniu, adsorbuoto ant lygaus Au elektrodo, su Au@SiO₂ nanodalelėmis PSRS spektrai, esant skirtingiems elektrodo potencialams pirštų atspaudų (200 – 1800 cm⁻¹) ir aukšto dažnio (2700 – 3200 cm⁻¹) srityse. Spektrai registruoti 0,01 M NaClO₄ tirpale.

Iš užregistruotų spektrų (43 pav.) pastebima, kad žiedo kvėpavimo moda ties 1027 cm⁻¹ intensyvėja prie labiau neigiamų elektrodo potencialo verčių, o šalia esanti perchlorato juosta 932 cm⁻¹ priešingai – silpnėja. Tai reiškia, kad prie neigiamo potencialo MHP molekulės teigiamai įkrauta galinė piridinio grupė užlinksta link paviršiaus ir taip sumažėja angliavandenilinės

grandinės trans konformerų dalis. Perchlorato anijonai išstumiami toliau nuo paviršiaus, nes piridinio žiedo grupė nebegali pritraukti anijonų iš tirpalo [60].

Kita įdomi tendencija nustatyta žemo dažnio srityje analizuojant Au-S valentinio virpesio pokyčius, nes būtent šio ryšio spektrai nuo monosluoksniu ant lygaus Au elektrodo gauti pirmą kartą. Taip pat ši sąveika kelia didelį susidomėjimą, nes lemia pačio junginio struktūrą.

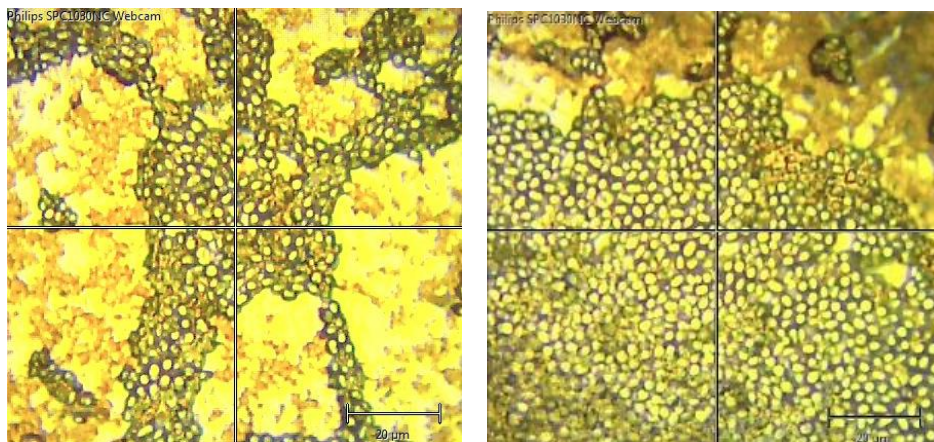
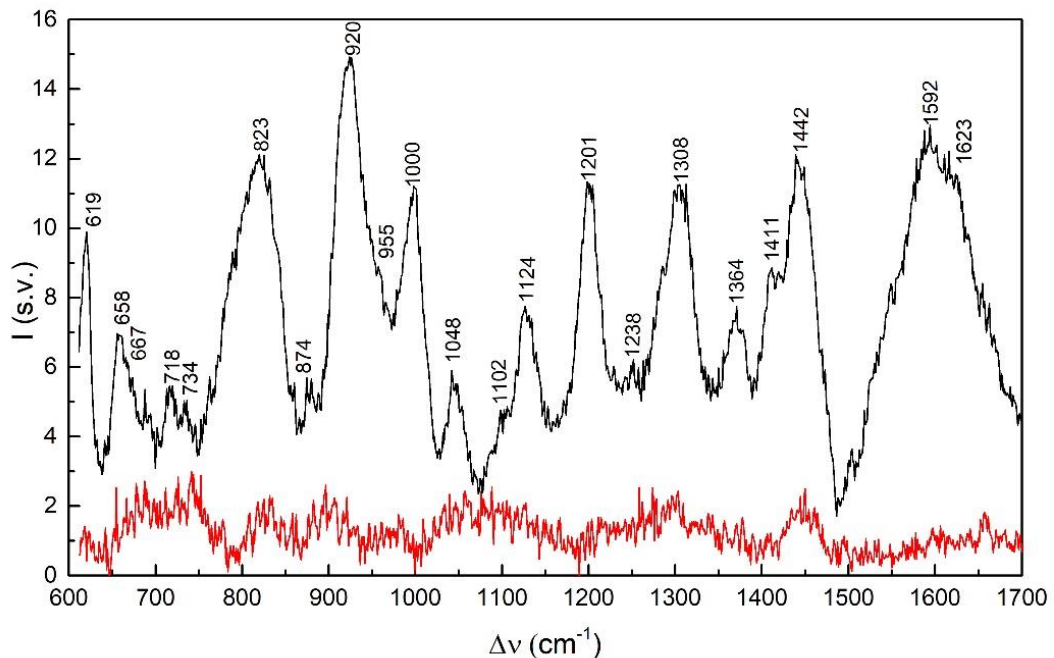


44 pav. MHP monosluoksniu, adsorbuoto ant lygaus Au elektrodo, su Au@SiO₂ nanodalelėmis PSRS spektrai, Au-S virpesių srityje (A) ir $\nu(\text{Au-S})$ virpesio dažnio priklausomybė nuo elektrodo potencialo (B). Spektrai registruoti 0,01 M NaClO₄ tirpale.

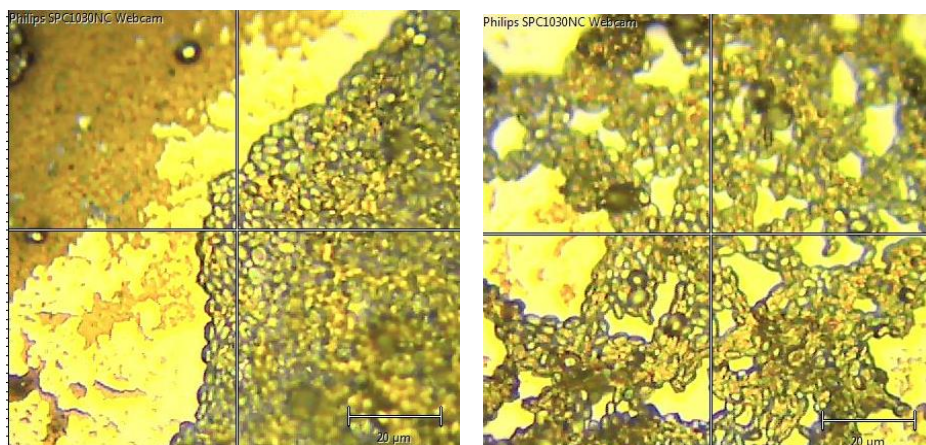
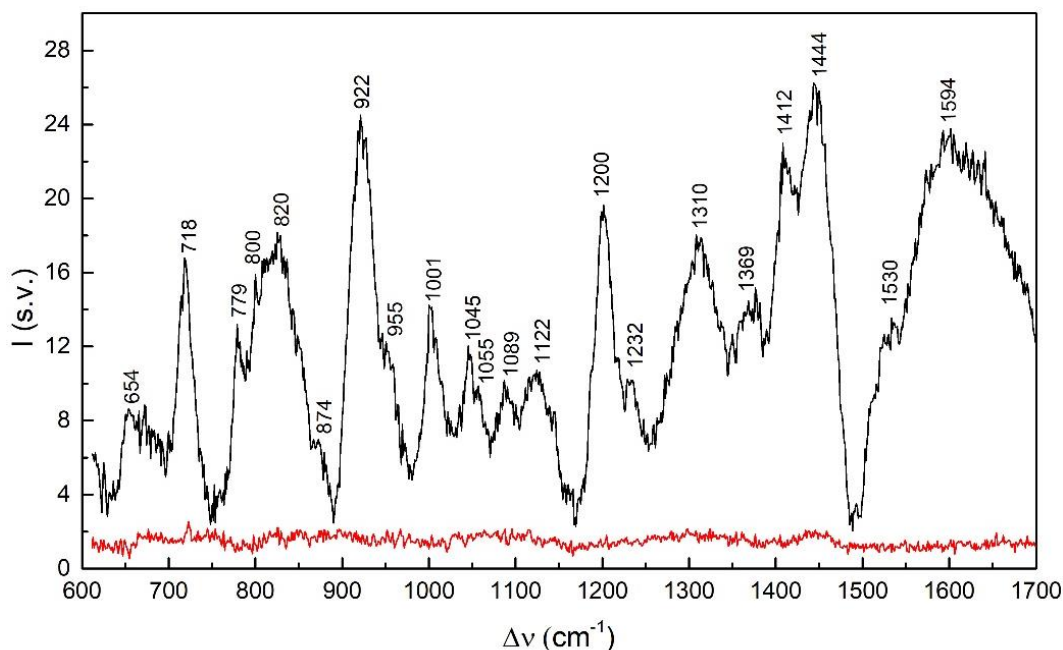
Pastebėta, jog priklausomai nuo elektrodo potencialo keičiasi Au-S virpesinės juostos dažnis ir pusplotis. Virpesinės juostos pusplotis stipriai siaurėja, kai elektrodo potencialas neigiamėja, todėl galima teigti, kad prie teigiamo elektrodo potencialo adsorbcijos vieta tampa homogeniškesnė. Kalbant apie Au-S virpesinės juostos dažnio pokytį galima pasakyti, kad jį lemia du pagrindiniai efektai. Pirmas, virpesinis Štarko efektas, kuomet cheminio ryšio dipolis veikiamas elektriniu lauku. Tačiau yra žinoma, kad Au-S ryšio dipolis yra mažas, todėl Štarko efektas negali pilnai paaiškinti sąlygoto $18,6 \pm 0,9$ cm⁻¹ polinkio. Antra, mūsų nuomone, vyksta cheminio ryšio stiprio grįžtama moduliacija elektrodo potencialu.

4.6. Au@SiO₂ ND pritaikymas mielių ląstelių tyrimuose

Išbandžius Au@SiO₂ nanodaleles savitvarkių monosluoksnių sturktūros, funkcijos nustatymui ir įsitikinus dalelių veiksmingumu, ištirta sudėtinga biologinė sistema – *Metschnikowia* rūšies mielių ląstelės. Kiek žinoma, pirmą kartą užregistruoti dviejų *Metschnikowia pulcherrima* mielių bandinių – su didesne ir mažesne pulcherimino pigmento koncentracija terpėje – Ramano ir PSRS spektrai. 45 ir 46 pav. pateikti mielių spektrai be dalelių ir su Au@SiO₂ nanodalelėmis. Pastebėta, kad registruojant tik mielių spektrus atsiranda didelis fluorescencinis fonas ir jokios virpesinės informacijos gauti nepavyksta. Tačiau ant mielių užlašinus nanodalelių fonas išnyksta, Ramano spektrai sustiprėja ir pavyksta užregistruoti intensyvius, informatyvius PSRS spektrus. Visi spektrai registruoti mikroskopo pagalba optiškai sufokusavus lazerinę spinduliuotę į ląstelės centrą.



45 pav. Mielių A (daugiau pigmento) (raudonas) ir mielių A su Au@SiO₂ ND (juodas) Ramano spektrai 600 – 1700 cm⁻¹ srityje. Apačioje mielių A mikroskopo nuotraukos su Au@SiO₂ (kairėje) ir be jų (dešinėje), centre pažymėta spektro registravimo vieta.

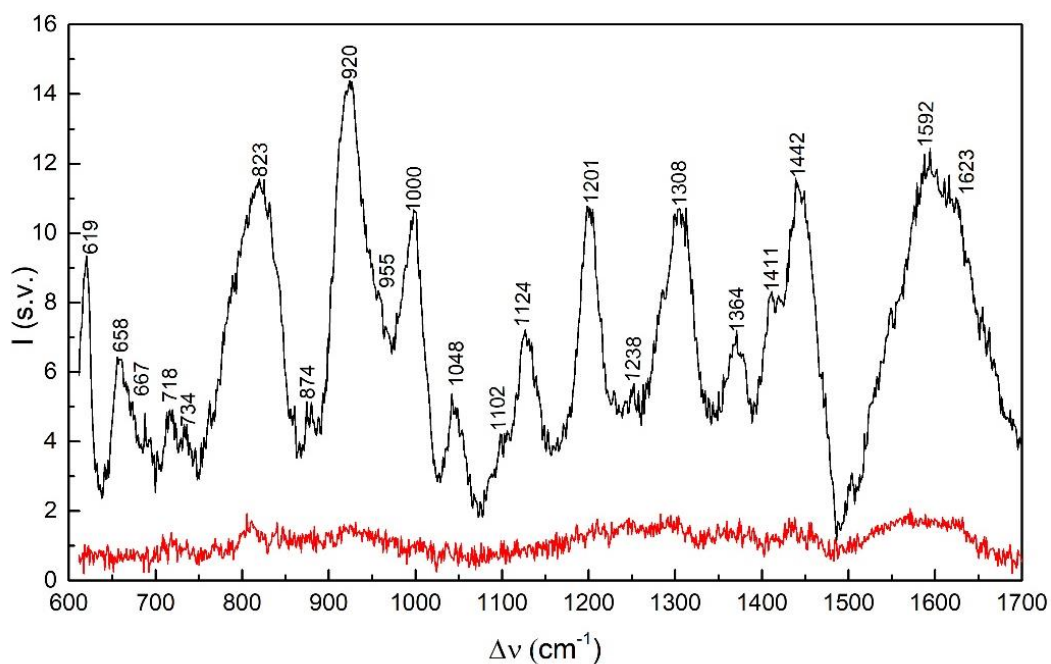


46 pav. Mielių B (mažiau pigmento) (raudonas) ir **mielių B** su Au@SiO₂ ND (juodas) Ramano spektrai 600 – 1700 cm⁻¹ srityje. Apačioje **mielių B** mikroskopo nuotraukos su Au@SiO₂ (kairėje) ir be jų (dešinėje), centre pažymėta spektro registravimo vieta.

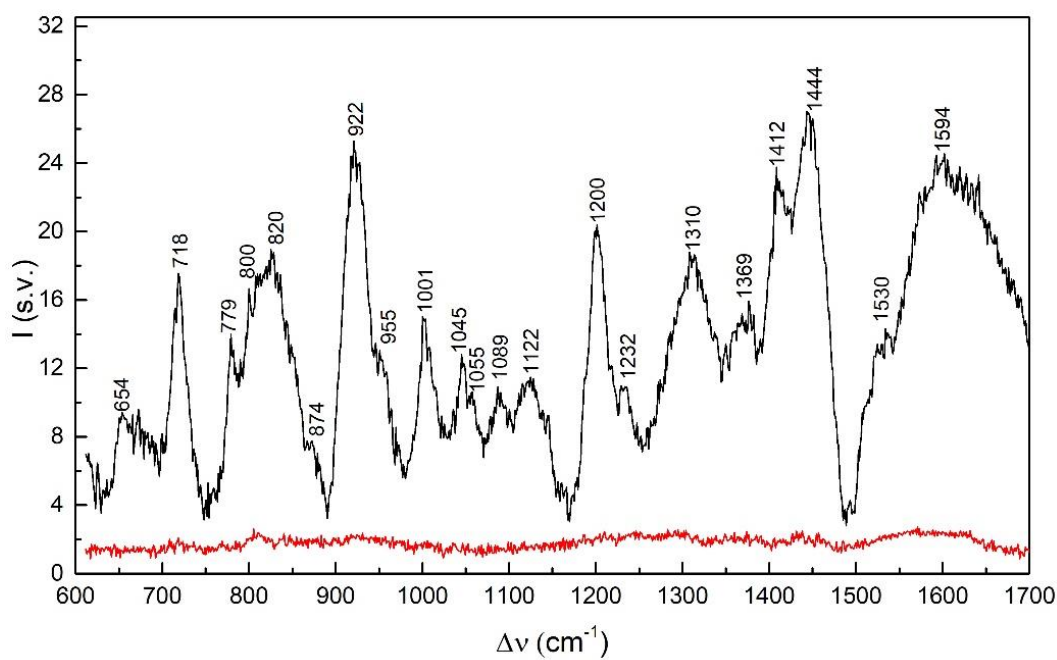
Abiejų bandinių atveju (mielės A ir mielės B) registruojant Ramano spektrus fluorescencinis fonas yra vienodai aukštas (spektruose fonas atimtas). Sustiprinus Ramano spektrus išsiskyrė intensyvios virpesinės juostos, kurių dažnių priskyrimai pateikti 3 lentelėje. Šalia pateiktos Ramano mikroskopu užfiksuotos mielių nuotraukos, kur galima pastebėti, kad užlašinus nanodalelių ant pačių mielių vaizdas nežymiai pakinta, dalelės džiūdamos suformuoja skirtingo dydžio saleles.

Vis dėlto, prieš panaudojant Au@SiO₂ nanodaleles Ramano spektrų sustiprinimui kiekvieną kartą užregistruoti ir pačių dalelių Ramano spektrai. 47 ir 48 pav. palyginti skirtingų mielių bandinių ir pačių nanodalelių Ramano spektrai. Galime pastebėti, kad dalelės turi savo

specifinį spektrą, tačiau virpesinių juostų intensyvumas yra itin mažas lyginant su mielių PSRS spektrais.

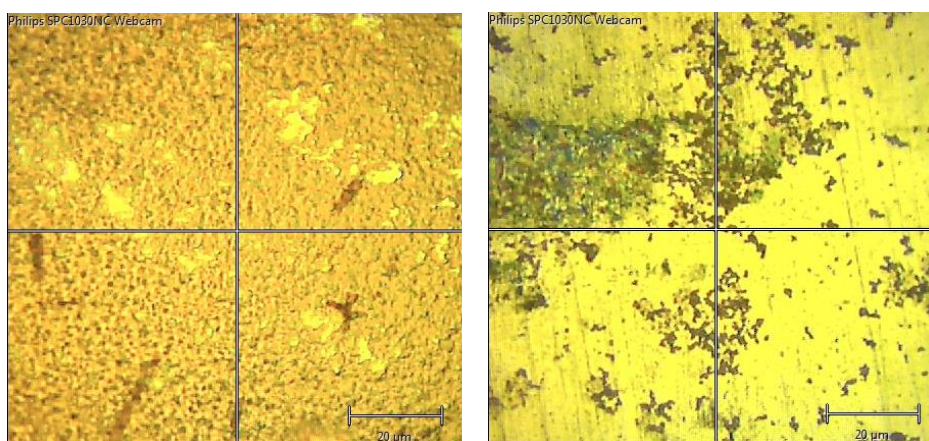
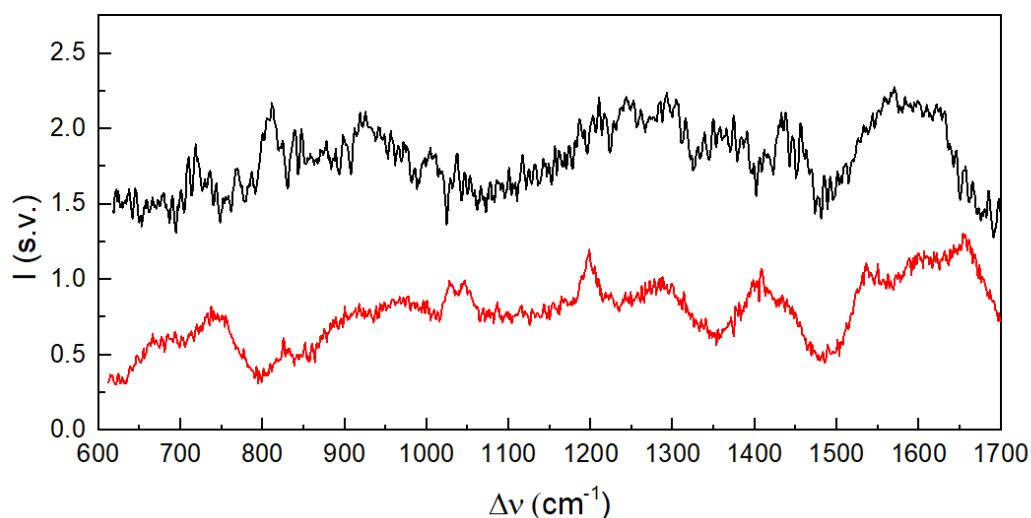


47 pav. Mielis A (daugiau pigmento) su Au@SiO₂ ND (juodas) ir Au@SiO₂ ND (raudonas) Ramano spektrai 600 – 1700 cm⁻¹ srityje.



48 pav. Mielis B (mažiau pigmento) su Au@SiO₂ ND (juodas) ir Au@SiO₂ ND (raudonas) Ramano spektrai 600 – 1700 cm⁻¹ srityje.

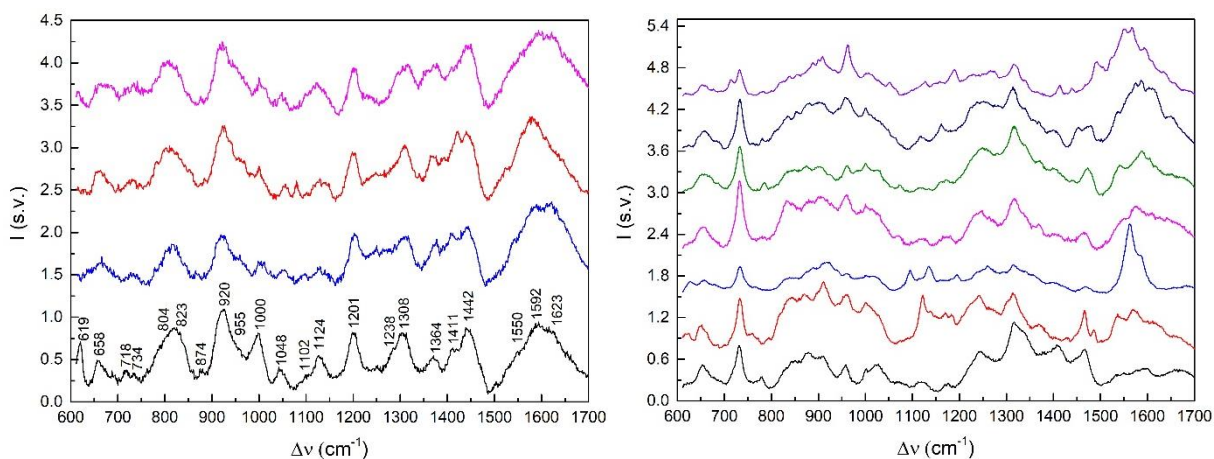
Siekiant įsitikinti, ar Au@SiO₂ dalelės tikrai atlieka savo pagrindinę funkciją – stiprina Ramano spektrus, bet ir chemiškai nesąveikauja su mielių ląstelėmis, panaudotos ir Au nanodalelės be išorinio apvalkalo.



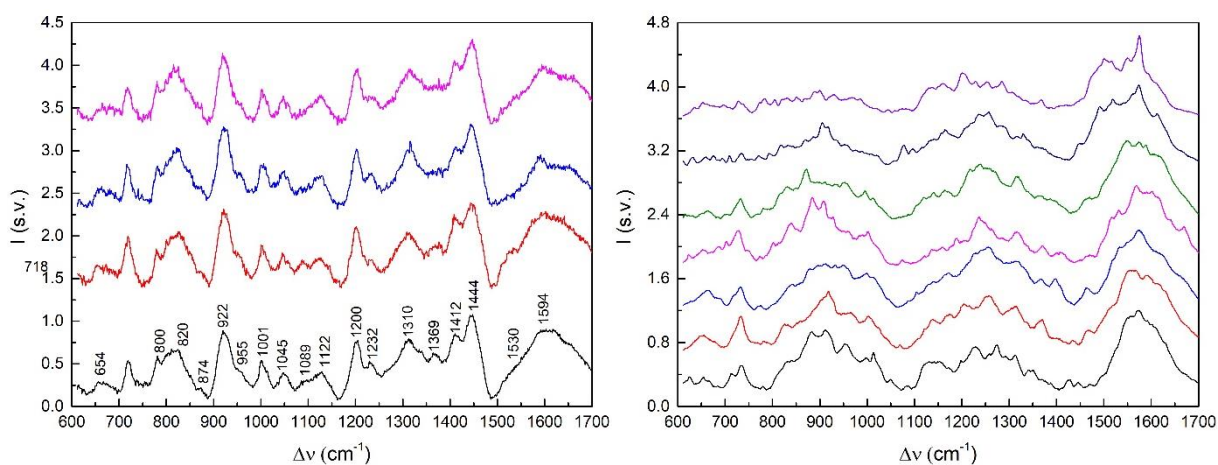
49 pav. Au (raudonas) ir Au@SiO₂ (juodas) nanodalelių Ramano spektrai 600 – 1700 cm⁻¹ srityje. Apačioje kairėje Au@SiO₂ ND mikroskopo nuotrauka, dešinėje – Au ND.

Pirma, užregistruoti Au@SiO₂ ir Au ND Ramano spektrai (49 pav.) jas užlašinus, vėliau nudžiovinus ant analogiškos plokštelės kaip ir mielių bandiniai. Nustatyta, kad Au ND atveju virpesinės juostos yra labiau išreikštos, signalo/triukšmo santykis didesnis. Iš greta esančių mikroskopo nuotraukų galima aiškiai matyti, kad Au nanodalelės džiūdamos agregavosi ir suformavo juodas dėmes, priešingai Au@SiO₂, kai dalelės pasklidusios gana homogeniškai, šviesios spalvos. Toks vizualinis įrodymas tik patvirtina, kad išorinis inertinis apvalkalas neleidžia dalelėms agreguotis net ir visiškai iš jų terpės pasišalinus vandeniui.

Nepaisant to, kad Au nanodalelės arėgavosi dar prieš jų panaudojimą ląstelių tyrime, užregistruoti PSRS mielių spektrai su Au ir Au@SiO₂ nanodalelėmis analogiškomis sąlygomis. Spektrai registruoti skirtingose mėginių vietose, iš atsitiktinių ląstelių pakartojant po kelis kartus.



50 pav. Mielių A (daugiau pigmento) su Au@SiO₂ ND (kairė) ir su Au ND (dešinė) Ramano spektrai 600 – 1700 cm⁻¹ srityje.

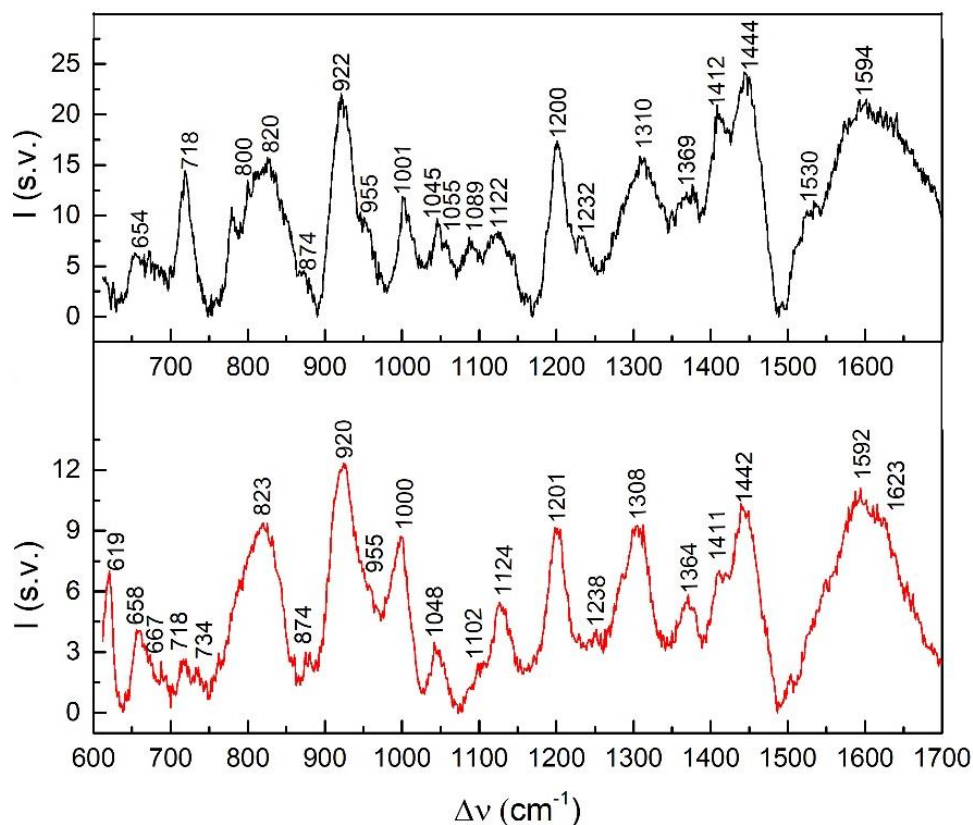


51 pav. Mielių B (mažiau pigmento) su Au@SiO₂ ND (kairė) ir su Au ND (dešinė) Ramano spektrai 600 – 1700 cm⁻¹ srityje.

Iš užregistruotų spektrų (50, 51 pav.) matoma aiški tendencija, kad spektrai, kur naudotos Au@SiO₂ kartu su mielių ląstelėmis atsikartoja, pagrindinių virpesinių juostų dažniai nekinta, neatsiranda papildomų juostų dėl sąveikos su dalelėmis. Juodi spektrai apačioje gauti suvidurkinus 5 vienas po kito užregistruotus spektrus iš to paties taško.

Priešinga situacija su Au nanodalelėmis: spektrai neatsikartoja, kinta virpesinių juostų dažniai, dėl sąveikos su metalo dalelėmis atsiranda papildomų juostų, užregistruoti spektrai nesutampa su spektrais, kur naudotos Au@SiO₂ ND.

Toliau atliktas mielių A ir mielių B Ramano spektrų palyginimas (52 pav.). Vertinant bendrais bruožais galima išskirti, kad mielių A spektras mažiau intensyvus, daugiau juostų išsiskyrė žemesnių dažnių srityje. Abiejų bandinių dauguma virpesinių juostų dažnių tarpusavyje sutampa arba skiriasi per kelis atvirkštinius centimetrus.

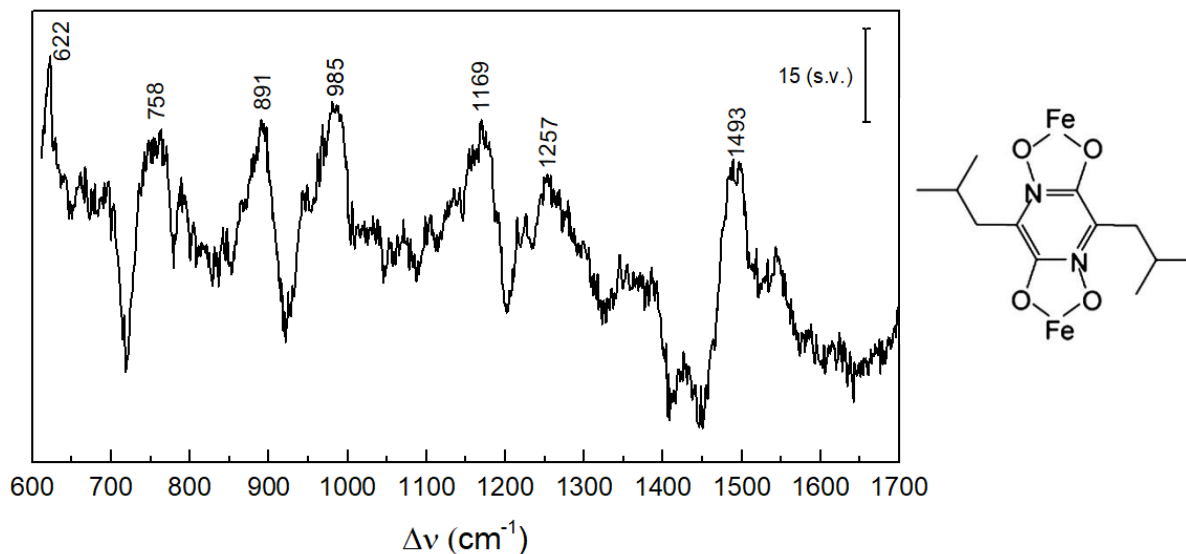


52 pav. Mielių A (daugiau pigmento) su Au@SiO₂ ND (raudonas apačioje) ir **mielių B** (mažiau pigmento) su Au@SiO₂ ND (juodas viršuje) Ramano spektrų palyginimas 600 – 1700 cm⁻¹ srityje.

Remiantis literatūra atliktas spektrinių juostų priskyrimas, 3 lentelėje pateikti virpesių dažniai bei jų interpretacijos. Išanalizavus užregistruotus paviršiaus sustiprintus Ramano sklaidos spektrus galima visus virpesius išskirstyti į keturias grupes pagal tai, kam šie priskiriami: baltymai, lipidai, aminorūgštys ir pigmentas (pulcheriminas). Mielių ląstelių spektrinės juostos priskirtos, remiantis mielių ląstelės sienelės modeliu (4 pav.).

Plačiai žinoma, kad mananai, esantys mielių sienelės išorėje kovalentiškai sujungti su baltymais ir sudaro mananoproteinus. Aminorūgštys – fenilalaninas, tirozinas, triptofas, histidinas ir kt. yra mananoproteinuose, kurie turi chromoforines grupes. Viena iš svarbesnių charakteringų baltymams priskiriamų juostų – amidas III 1238 cm⁻¹, parodo metodo jautrumą antrinei baltymų struktūrai. Taip pat yra virpesinė juosta, atspindinti aminorūgštis, turinčias fenilo funkcinę grupę. Aštri smailė ties 1000 cm⁻¹ – fenilalanino žiedo valentinis virpesys. Lipidams priklauso stipri, aiškiai išsiskyrusi smailė ties 1442 cm⁻¹ (CH₂ deformacinis virpesys). Spektuose galima pastebėti ir fosfolipidų hidrofiliinę galvutę charakterizuojančių virpesinių juostų srityje 823 – 874 cm⁻¹. Kitaip tariant, spektuose yra virpesinės informacijos ir apie pagrindinę ląstelės membranos sudedamąją dalį. Šalia fosfolipidams priskirtų juostų yra neitin intensyvi juosta ties 800 cm⁻¹ literatūroje priskiriama gliukozės žiedui angliavandenių struktūroje. Deja, negalima išskirti 1602 cm⁻¹ juostos, kuri parodytų ląstelės mitochondrijų metabolinį aktyvumą, kuri dar vadinama

Ramano spektroskopijos gyvybės žymeniu. Nors ir yra žinoma, jog 1602 cm^{-1} žymuo visada aptinkamas kartu su lipidais, tačiau aiškiai pasakyti, ar ši virpesinė juosta užregistruotame spektre yra – negalime. Įprastai ši juosta identifikuojama pagal ergosterolio būvimą ląstelėje.



53 pav. Mielių A (daugiau pigmento) su Au@SiO₂ ND ir **mielių B** (mažiau pigmento) su Au@SiO₂ ND skirtuminis Ramano spektras 600 – 1700 cm⁻¹ srityje (kairėje) ir pigmento pulcherimino molekulinė struktūra (dešinėje).

52 pav. užregistruotuose spektruose išsiskiria ir keletas kitų juostų: 622, 667, 734, 1102, 1550 cm⁻¹. Visos šios juostos išryškėja tik mielių A spektruose (daugiau pigmento turinčios mielės), kas verčia manyti, kad tai pigmento pulcherimino virpesinės juostos. Vis dėlto, užregistruoti pačio pulcherimino Ramano spektro nepavyko, nes registruojant iš mielių išskirto pigmento spektrą, susidurta su keliomis problemomis: aukštas fluorescencinis fonas ir juostų interferencija nepriklausomai nuo žadinančio lazerio bangos ilgio.

Siekiant kitais būdais identifikuoti pigmento pulcherimino virpesines juostas suformuotas mielių A (daugiau pigmento) ir mielių B (mažiau pigmento) su Au@SiO₂ ND skirtuminis Ramano spektras (53 pav.). Skirtuminiame spektre išryškėjo keletas virpesinių juostų, kurios gali būti priskirtos pulcherimino virpesiams. Viena intensyviausių juostų ties 622 cm⁻¹ priskirta žiedo deformaciniam virpesiui, kita virpesinė moda 1169 cm⁻¹ atspindi C-N virpesius. Taip pat verta paminėti ir vieną labiausiai išreikštą juostą – 1493 cm⁻¹, kuri siejama su C=N ryšio virpesiais [32].

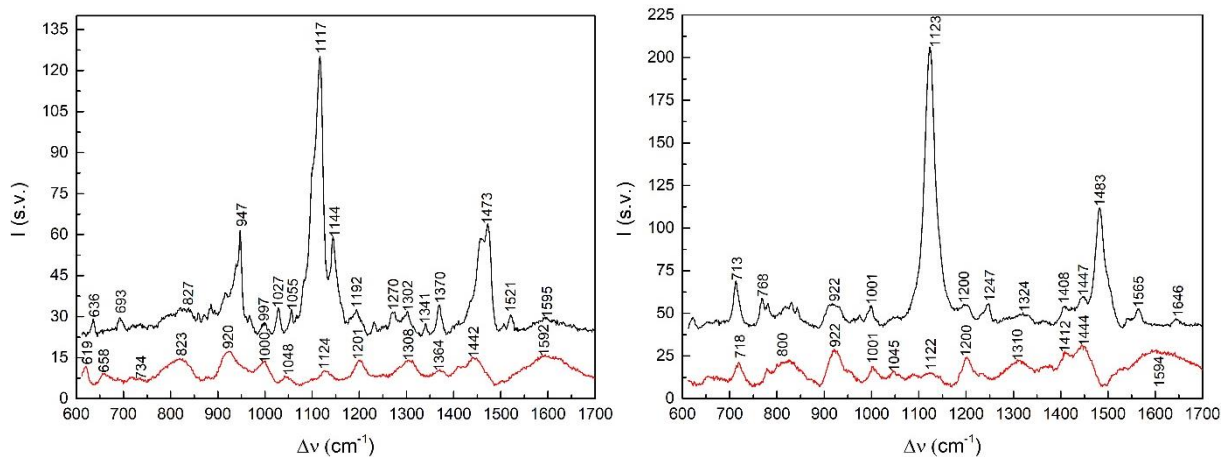
Taigi amidinės juostos, C-N, baltymų skeleto ir aminorūgščių virpesiai, visi jie yra susiję su gyvos ląstelės bioaktyvumu, kas leidžia teigti, kad SHINERS metodas leidžia *in situ* sekti ląstelės biocheminių procesų eigą.

3 lentelė. Mielių A ir mielių B (*Metschnikowia pulcherrima*) spektrinių juostų priskyrimas.

| Mielės A (daugiau pigmento) | Mielės B (mažiau pigmento) | Virpesys* | Pastabos* |
|-----------------------------------|----------------------------------|---|-------------------------------|
| 622 | | | Pigmentas |
| 658 | 654 | C-S | Baltymai, goš konformacija |
| 667 | | C-S | Baltymai, pigmentas |
| 718 | 718 | C-O grupė ir/arba $CN^+(CH_3)_3$ | Lipidai |
| 734 | | | Pigmentas |
| 779 | 779 | | |
| 804 | 800 | O-P-O valentinis | |
| 823 | 820 | O-P-O asimetrinis valentinis ir/arba tirozino žiedo kvėpavimo, CH_2 švytuoklinis | Lipidai |
| 874 | 874 | C-C-N simetrinis valentinis | Lipidai |
| 920 | 922 | C-C ir C-O valentinis | Baltymai/lipidai |
| 955 | 955 | C-C ir C-O valentinis | Baltymai |
| 1000 | 1001 | Fenilalanino simetrinis žiedo kvėpavimo, C-C valentinis | Baltymai |
| 1048 | 1045 | C-N valentinis ir/arba C-C grandinės valentinis | Baltymai ar lipidai |
| | 1055 | C-N valentinis ir/arba C-C grandinės valentinis | Baltymai / lipidai |
| | 1089 | C-N valentinis | Baltymai |
| 1102 | | O=P=O, C-C grandinės valentinis | Lipidai, pigmentas |
| 1124 | 1122 | C-N valentinis | Baltymai |
| 1201 | 1200 | C-N valentinis | Baltymai |
| 1238 | 1232 | Amidas III | Baltymai |
| 1308 | 1310 | CH_2/CH_3 , aromatinio žiedo valentinis/sukamasis deformacinis | Lipidai / baltymai |
| 1364 | 1369 | CH_3 simetrinis valentinis (alaninas, tirozinas) | Lipidai |
| 1411 | 1412 | COO^- simetrinis valentinis | Baltymai |
| 1442 | 1444 | CH_2 deformacinis | Lipidai |
| | 1530 | COO^- asimetrinis valentinis | Baltymai |
| 1550 | | | Pigmentas |
| 1592 | 1594 | | Aromatinės aminorūgštys |
| 1623 | | Aromatinio žiedo valentinis, NH_2 deformacinis | Baltymai |

*Spektrinių juostų priskyrimai atlikti remiantis: [53], [61-82].

Taip pat registruojant mielių ląstelių spektrus pavyko aptikti ir dvi kardinaliai kitokias ląsteles. Vizualiai šios ląstelės nuo įprastų nesiskiria, todėl jos aptiktos atsitiktinai. Šių ląstelių spektrai išsiskiria ypatingai dideliu intensyvumu, kuris lyginant su ankstesniais mielių A ir mielių B spektrais, skiriasi mažiausiai 6 kartais (54 pav.).



54 pav. Mielis A (daugiau pigmento) su Au@SiO₂ ND įprastos – raudonas, ir galimai mirusios ląstelės – juodas, Ramano spektrų palyginimas (kairėje). **Mielis B** (mažiau pigmento) su Au@SiO₂ ND įprastos – raudonas, ir galimai mirusios ląstelės – juodas, Ramano spektrų palyginimas (dešinėje) 600 – 1700 cm⁻¹ srityje.

Užregistruotuose spektruose ypatingai išsiskyrė kelios juostos, kurios analogiškos tiek mielis A, tiek mielis B spektruose. Virpesinės juostos ties 1473 (mielis A) ir 1483 cm⁻¹ (mielis B) susijusios su galimai suirusių ląstelių DNR/RNR. Šie virpesiai priskiriami A arba G bazių valentiniams žiedų virpesiams [83]. Intensyviausia juosta mielis A spektre 1117 cm⁻¹ atspindi PO₂ simetrinius valentinius, lipidams priskiriamus virpesius, o 1123 cm⁻¹ juosta mielis B spektre – angliavandenilinės grandinės trans konformacijos virpesiai.

Taigi tokie ryškūs spektriniai pokyčiai verčia manyti, jog tai mirusios ląstelės, kurių išorinė sienelė suirusi ir dėl to pavyksta užregistruoti daugiau virpesinių juostų. Galimai suirusi sienelė nebesaugo pačios ląstelės organelių ir kitų struktūrinių elementų, kurių virpesius ir pavyko detektuoti.

5. Pagrindiniai rezultatai ir išvados

1. Įsisavinta ir optimizuota Au@SiO₂ nanodalelių sintetinio eiga. Iš UV-VIS sugerties spektrų apskaičiuotas Au branduolio dydis (45 nm). Remiantis TEM nuotraukomis, įvertintas vidutinis nanodalelių skersmuo (46 ± 6 nm).
2. Nanodalelių sintezės metu dielektriko sluoksnio storis yra kontroliuojamas ir jis svyruoja nuo 1,3 iki 10 nm. Nustatyta, kad išorinis apvalkalas storėja eksponentiškai priklausomai nuo jo formavimo laiko sintezės metu. Optimalus tinkamai suformuoto išorinio dielektriko sluoksnio storis yra 2 – 3 nm, kuris suformuojamas per 40 min.
3. Au@SiO₂ nanodalelės pritaikytos PSRS eksperimente *in-situ* vandeninėje terpėje esant konfigūracijai: lygus auksas/tiofenolio savitvarkis monosluoksnis/Au@SiO₂/vanduo. Gauta, kad Au@SiO₂ nanodalelės padeda sustiprinti Ramano sklaidos signalą. PSRS spektrų intensyvumas labai priklauso nuo Au@SiO₂ nanodalelių koncentracijos žadinimo taške. Nustatyta, kad PSRS spektrų stiprio įsisotinimas gali būti pasiekiamas po 60 min nuo dalelių įleidimo į sistemą. Au@SiO₂ nanodalelių adsorbcijos priklausomybė nuo laiko aproksimuota Freundlich adsorbcijos izotermos kreive su parametru $1/n = 0,6$.
4. Au@SiO₂ nanodalelės pritaikytos PSRS eksperimente keičiant elektrodo potencialą *in-situ* vandeninėje terpėje konfigūracijoje: lygus auksas/ MHP savitvarkis monosluoksnis/ Au@SiO₂/0,01M NaClO₄. Pastebėta, kad nanodalelės, su išoriniu dielektriko sluoksniu puikiai tinka elektrocheminiams tyrimams, padeda nustatyti ir įvertinti monosluoksnio sandarą bei funkciją. Taip pat Au@SiO₂ ND į sistemą neįneša jokio nepageidaujamo indėlio. Nustatyta, kad Au-S ryšio bangos skaičius mažėja neigiamėjant potencialui (18,6 ± 0,9 cm⁻¹), kas siejama su cheminio ryšio stiprio kitimu.
5. Au@SiO₂ nanodalelės pritaikytos *Metschnikowia pulcherrima* mielių tyrimuose. Pirmą kartą užregistruoti *Metschnikowia pulcherrima* PSRS spektrai. Remiantis gautais rezultatais identifikuota mielių ląstelių sienelė ir joje esantys funkciniai elementai (baltymai, lipidai, aminorūgštys). Nustatyta, kad spektrai, kuomet naudotos Au@SiO₂ ND kartu su mielių ląstelėmis atsikartoja, virpesinių juostų dažniai nekinta, neatsiranda papildomų juostų dėl cheminės sąveikos su dalelėmis. Aminorūgščių, C-N, amidiniai virpesiai atspindi gyvos ląstelės bioaktyvumą, vykstančią baltymų sekreciją, antrinės struktūros kitimą, todėl SHINERS metodas leidžia *in situ* sekti ląstelės biocheminių procesų eigą.

6. Literatūros sąrašas

- [1] **T. Satyanarayana, G. Kunze** (Eds.). *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer, Netherlands (2009).
- [2] **A. Adeniran, M. Sherer, K. E. J. Tyo**. Yeast-based biosensors: design and applications. *FEMS Yeast Research*. 15, 1-15 (2015).
- [3] **S. K. Nandy, R.K. Srivastava**. A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. *Microb. Research* 207, 83-90 (2018).
- [4] **M. Arevalo-Villena, A. Briones-Perez, M.R. Corbo, M. Sinigaglia and A. Bevilacqua**. Biotechnological application of yeasts in food science: Starter cultures, probiotics and enzyme production. *J. of Appl. Microbiol.* 123, 1360-1372 (2017).
- [5] **G. C. Shurson**. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification Methods. *Animal Feed Science and Technology* 235, 60-76 (2018).
- [6] **L. Oro, M. Ciani, F. Comitini**. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 116, 1209–17 (2014).
- [7] **H. U. Gremlich and B. Yan** (Eds.). *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*. Marcel Dekker, New York, 24 (2001).
- [8] **H. Feldmann**. Yeast: molecular and cell biology. *Psł.* 1-8, 175-178 (2012).
- [9] **A. J. Kluyver, J.P. Van der Walt, and A.J. Van Trietv, Pulcherrimin**. The Pigment of *Candida Pulcherrima*. *Botany* 39, 583 (1953).
- [10] **V. Melvydas, R. Stanevičienė, A. Balynaitė, J. Vaičiūnienė, R. Garjonytė**. Formation of self-organized periodic patterns around yeasts secreting a precursor of a red pigment. *Microbiological Research*. 193, 87-93 (2016).
- [11] **Z. Naturforsch, C. S. Ener, B. Türke**. Isolation and characterization of new *Metschnikowia pulcherrima* strains as producers of the antimicrobial pigment pulcherrimin. Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Uludag University 64(5-6), 405-10 (2009).
- [12] <https://eurekabrewing.wordpress.com/2015/06/22/hello-my-name-is-metschnikowia-pulcherrima/> žiūrėta 2018 03 28
- [13] **Klis, F. M., A. Boorsma and P. W. De Groot**. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23(3), 185-202 (2006).
- [14] **G. Streckytė, J. Didžiapetrienė, V. Kirvelienė, S. Bagdonas, R. Rotomskis**. Fotosensibilizacija biosistemose: taikymas ir perspektyvos. Vilnius : "Progretus" Poligrafijos centras. *Psł.* 19-26 (2008).
- [15] <https://biologydictionary.net/plasma-membrane/> žiūrėta 2018 03 28
- [16] **A. Stirkė**. Cheminio ir elektrinio poveikių *saccharomyces cerevisiae* mielių ląstelių savybėms tyrimas. Daktaro disertacija, Vilnius. *Psł.* 18 (2013).
- [17] **A. B. Samuelsen, J. Schrezenmeir, and S. H. Knutsen**. Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: A review. *Mol. Nutr. Food Res.*, 58, 183-193 (2014).
- [18] **G. Lesage, ir H. Bussey**. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(2), 317-343 (2006).
- [19] **F. Schreiber**. Structure and growth of self-assembling monolayers. *Progress in Surface Science* 65. *Psł.* 151-256 (2000).

- [20] **A. Ulman**. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem. Rev.* 96. 1533–1554 (1996).
- [21] **J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whiteside**. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* 105, 1103 – 1169 (2005).
- [22] **I. Matulaitienė**. Adsorbuotų ant metalo paviršiaus monosluoksnių su piridinio funkcinė grupe struktūros ir sąveikos su tirpalo komponentais tyrimas virpesinės spektroskopijos metodais. Daktaro disertacija, Vilnius. Psl. 19-22, 48-51 (2013).
- [23] **N. K. Chaki, M. J. Sharma, K. Vijayamohan**. Applications of self-assembled monolayers in materials chemistry. *Proc. Indian. Acad. Sci.* 113, 659 – 670 (2001).
- [24] **V. Šablinskas, J. Čeponkus**. Modernioji molekulių virpesinė spektrometrija. Vilnius. Psl. 33-37, 163-168 (2014).
- [25] **V. Gulbinas**. Šviesos sukelti molekuliniai vyksmai ir jų lazerinė spektroskopija. Vilnius. Psl. 162-163 (2008).
- [26] **G. Niaura**. Ramano spektroskopijos taikymas pigmentų nustatymui kultūros vertybėse, Muziejinių eksponatų priežiūra I dalis, Meno kūrinių technikos tyrimai, Lietuvos muziejų asociacija. Vilnius. Psl. 153-173 (2008).
- [27] **B. Schrader, D. Bougeard**, Eds. *Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications*. New York: John Wiley & Sons (1995).
- [28] **M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan**. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem. Phys. Lett.* 26(2), 163-166 (1974).
- [29] **R. P. Van Duyne**, Applications of Raman spectroscopy in electrochemistry. *J. Physique* 38, 239–252 (1977).
- [30] **M. G. Albrecht, J. Creighton**. Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 5215–5217 (1977).
- [31] **E. Smith, G. Dent**, *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. England: John Wiley & Sons Ltd. Psl. 210 (2005).
- [32] **J. R. Ferraro, K. Nakamoto, C. W. Brown**. *Introductory Raman spectroscopy*. Elsevier. (2003).
- [33] <http://www.silmeco.com/knowledge-base/surface-enhanced-raman-scattering/> žiūrėta 2017 01 09.
- [34] **P.B. Johnson, R.W. Christy**. Optical Constants of the Noble Metals, *Phys. Rev. B: Solid State*, 6, 4370 (1972).
- [35] **V. Vaičiuskas, G.-J. Babonas, Z. Kuprionis, G. Niaura, V. Šablinskas**. Paviršiaus optinė spektroskopija. Vilnius : TEV. Psl. 186 (2008).
- [36] <http://www.news-medical.net/life-sciences/What-are-Nanoparticles.aspx> ,žiūrėta 2017 01 09
- [37] **E. Gaffet, M. Tachikart, O. ElKedim, R. Rahouadj**. Nanostructural materials formation by mechanical alloying: Morphologic analysis based on transmission and scanning electron microscopic observations. *Materials Characterization* (1996).
- [38] **J. Zhou, J. Ralston, R. Sedev, D.A. Beattie**. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *Journal of Colloid and Interface Science* 251–26 (2009).
- [39] **J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier**. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* (1951).

- [40] **G. Frens.** Particle size and sol stability in metal colloids, *Colloid & Polymer Science* 250(7), 736-741 (1972).
- [41] **J. F. Li, J. R. Anema, T. Wandlowski and Z. Q. Tian.** Dielectric shell isolated and graphene shell isolated nanoparticle enhanced Raman spectroscopies and their applications. *Chemical Society reviews* 44 23, 8399-409 (2015).
- [42] **J. F. Li, Y. F. Huang, Y. Ding, S. B. Li, Z. L. Yang, X. S. Zhou, F. R. Fan, W. Zhang, Z. Y. Zhou, D. Y. Wu, B. Ren, Z. L. Wang, Z. Q. Tian.** Shelled-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy, *Nature*, 464 (2010).
- [43] **J. R. Anema, J. F. Li, Z.L. Yang, B. Ren, Z. Q. Tian.** Shell-Isolated Nanoparticle-Enhanced Raman Spectroscopy: Expanding the Versatility of Surface-Enhanced Raman Scattering. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 4, 129–150 (2011).
- [44] **J.F. Li, Y. J. Zhang, S. Y. Ding, R. Panneerselvam, and Z. Q. Tian.** Core–Shell Nanoparticle-Enhanced Raman Spectroscopy. *Chemical Reviews* 117 (7), 5002-5069 (2017).
- [45] **Z. Q. Tian, B. Ren, J. F. Li, Z. L. Yang.** Expanding Generality of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy with Borrowing SERS Activity Strategy. *Chem. Commun.* 3514–3534 (2007).
- [46] **J. F. Li, X. D. Tian, S. B. Li, J. R. Anema, Z. L. Yang, Y. Ding, Y. F. Wu, Y. M. Zeng, Q. Z. Chen, B. Ren, Z. L. Wang & Z. Q. Tian.** Surface analysis using shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy. *Nature Protocols* 141 (2013).
- [47] **K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld.** Surface-enhanced Raman scattering and biophysics. *J. Phys.: Condens. Matter*, 14, R597–R624 (2002).
- [48] **H. Xu, J. Aizpurua, M. Kall, P. Apell.** Electromagnetic contributions to single molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering. *Phys. Rev. E*, 62 4318–4324 (2000).
- [49] **D. Gunnell, M. Eddleston, MR. Phillips, F. Konradsen.** The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC Public Health* 7, 357 (2007).
- [50] **S. Bose-O'Reilly, KM. McCarty, N. Steckling, B. Lettmeier.** Mercury exposure and children's health". *Current problems in pediatric and adolescent health care.* 40 (8), 186 –215 (2010).
- [51] **P. Y. Ma, F. H. Liang, Q. P. Diao, D. Wang, Q. Q. Yang, D. J. Gao, D. Q. Song, X. H. Wang.** Selective and Sensitive SERS Sensor for Detection of Hg²⁺ in Environmental Water Base on Rhodamine-Bonded and Amino Group Functionalized SiO₂-Coated Au-Ag Core-Shell Nanorods. *RSC Adv.*, 5, 32168–32174 (2015).
- [52] **S. Hy, F. Felix, J. Rick, W. N. Su, B. J. Hwang.** Direct *In Situ* Observation of Li₂O Evolution on Li-Rich High-Capacity Cathode Material, Li[NixLi(1–2x)/3Mn(2 x)/3O₂] (0 ≤ x ≤ 0.5). *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 999–1007 (2014).
- [53] **A. Sujith et al.** Surface enhanced Raman scattering analyses of individual silver nanoaggregates on living single yeast cell wall. *Appl. Phys. Lett.* 92, 103901 (2008).
- [54] <http://www.cytodiagnosics.com/store/pc/Introduction-to-Gold-Nanoparticle-Characterization-d3.htm> žiūrėta 2018 03 28
- [55] **W. Haiss, N.T. K. Thanh, J. Aveyard, D. G. Fernig.** Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra. *Analytical Chemistry*, 79 (11), 4215-4221 (2007).
- [56] **D. Manikandan, S. Mohan, P. Magudapathy, K.G.M. Nair.** Blue shift of plasmon resonance in Cu and Ag ion-exchanged and annealed soda-lime glass: an optical absorption study. *Physica B*, 325, 86–91(2003).

- [57] **Shujin Li, Deyin Wu, Xiaoyan Xu and Renao Gu.** Theoretical and experimental studies on the adsorption behavior of thiophenol on gold nanoparticles. *J. Raman Spectrosc.*, 38, 1436–1443 (2007).
- [58] **P. Lamberg, J. Hamit-Eminovski, M.D. Toscano, O. Eicher-Lorka, G. Niaura, T. Arnebrant, S. Shleev, T. Ruzgas.** Electrical activity of cellobiose dehydrogenase adsorbed on thiols: Influence of charge and hydrophobicity. *Bioelectrochemistry*, 115, 26–32 (2017).
- [59] **V. Krikstolaityte, P. Lamberg, M.D. Toscano, M. Silow, O. Eicher-Lorka, A. Ramanavicius, G. Niaura, L. Abariute, T. Ruzgas, S. Shleev.** Mediatorless carbohydrate/oxygen biofuel cells with improved cellobiose dehydrogenase based bioanode. *Fuel Cells*, 14, 792–800 (2014).
- [60] **A. Zdaniauskienė, T. Charkova, I. Matulaitienė, O. Eicher-Lorka, A. Matijoška, M. Skapas, A. Selskis, G. Niaura.** Electrochemical Shell-Isolated Nanoparticle-Enhanced Raman Spectroscopy: Bonding, Structure, and Ion-Pairing of the Positive Charge Bearing Pyridinium Ring Terminated Monolayer at Smooth Gold Electrode. *The Journal of Physical Chemistry C*, 122 (2), 1234–1242 (2018).
- [61] **S. Uusitalo, A. Popov, Y.V. Ryabchikov, O. Bibikova, H.L. Alakomi, R. Juvonen, V. Kontturi, S. Siitonen, A. Kabashin, I. Meglinski, J. Hiltunen, A. Laitila.** Surface-enhanced Raman spectroscopy for identification and discrimination of beverage spoilage yeasts using patterned substrates and gold nanoparticles. *J. Food Engineer.* 212, 47–54 (2017).
- [62] **K. Kołataj, J. Krajczewski, A. Kudelski.** Silver nanoparticles with many sharp apexes and edges as efficient nanoresonators for shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy, *J. Phys. Chem. C* 121, 12383–12391 (2017).
- [63] **L.P. Hackett, L.L. Goddard, G.L. Liu.** Plasmonic nanocone arrays for rapid and detailed cell lysate surface enhanced Raman spectroscopy analysis, *Analyst* 142, 4422–4430 (2017).
- [64] **N. Erjavec, G. Pinato, K. Ramser.** Raman spectroscopy as a tool for detecting mitochondrial fitness, *J. Raman Spectrosc.* 47, 933–939 (2016).
- [65] **L. Mikoliunaite, R.D. Rodriguez, E. Sheremet, V. Kolchuzhin, J. Mehner, A. Ramanavicius, D.R.T. Zahn.** The substrate matters in the Raman spectroscopy analysis of cells, *Sci. Reports* 5, 13150 (2015).
- [66] **J. Li, G. Ma, H. Liu, H. Liu.** Yeast cells carrying metal nanoparticles, *Mater. Chem. Phys.* 207, 373–379 (2018).
- [67] **L. Dedelaite, R.D. Rodriguez, E. Andriukonis, M. Hietschold, D.R.T. Zahn, A. Ramanavicius.** Surfaces functionalized by graphene oxide nanosheets for single cell investigations, *Sens. Actuators B: Chem.* 255, 1735–1743 (2018).
- [68] **I. Espagnon, D. Ostrovskii, R. Mathey, M. Dupoy, P.L. Joly, A. Novelli-Rousseau, F. Pinston, O. Gal, F. Mallard, D.F. Leroux.** Direct identification of clinically relevant bacterial and yeast microcolonies and macrocolonies on solid culture media by Raman spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 19, 027004 (2014).
- [69] **A.F. Chrimes, K. Khoshmanesh, S.Y. Tang, B.R. Wood, P.R. Stoddart, S.S.E. Collins, A. Mitchell, K. Kalantar-zadeh.** In situ SERS probing of nano-silver coated individual yeast cells, *Biosens. Bioelectron.* 49, 536–541 (2013).
- [70] **Y.F. Chiu, C.K. Huang, S. Shigeto.** In vivo probing of the temperature responses of intracellular biomolecules in yeast cells by label-free Raman microspectroscopy, *ChemBioChem* 14, 1001–1005 (2013).
- [71] **L. Chiu, F. Hullin-Matsuda, T. Kobayashi, H. Torii, H. Hamaguchi.** The origin of the 1602 cm⁻¹ Raman band of yeasts; contribution of ergosterol, *J. Biophotonics* 5, 724–728 (2012).

- [72] **L. Bednářová, J. Palacký, V. Bauerová, O. Hrušková-Heidingsfeldová, I. Pichová, P. Mojzeš.** Raman microspectroscopy of the yeast vacuoles, *Spectrosc. Internat. J.* 27, 503–507 (2012).
- [73] **M. Culha, M. Kahraman, D. Çam, I. Sayin, K. Keseroğlu.** Rapid identification of bacteria and yeast using surface-enhanced Raman scattering, *J. Raman Spectrosc.* 42, 462–465 (2010).
- [74] **L. Chiu, M. Ando, H. Hamaguchi.** Study of the 'Raman spectroscopic signature of life' in mitochondria from budding yeast, *J. Raman Spectrosc.* 41, 2–3 (2010).
- [75] **A. Sujith, T. Itoh, H. Abe, K. Yoshida, M.S. Kiran, V. Biju, M. Ishikawa.** Imaging the cell wall of living yeast cells using surface-enhanced Raman spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 1803–1809 (2009).
- [76] **T.K. Bhowmick, G. Pyrgiotakis, K. Finton, A.K. Suresh, S.G. Kane, B. Moudgil, J.R. Bellare.** A study of the effect of JB particles on *Saccharomyces cerevisiae* (yeast) cells by Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.* 39, 1859–1868 (2008).
- [77] **O. Samek, K. Mlynarikova, S. Bernatova, J. Ježek, V. Krzyžánek, M. Šiler, P. Zemánek, F. Růžička, V. Holá, M. Mahelová.** *Candida parapsilosis* biofilm identification by Raman spectroscopy, *Int. J. Mol. Sci.* 15, 23924–23935 (2014).
- [78] **I. Sayin, M. Kahraman, F. Sahin, D. Yurdakul, M. Culha.** Characterization of yeast species using surface-enhanced Raman scattering, *Appl. Spectrosc.* 63, 1276–1282 (2009).
- [79] **G.B. Junk, I.S. Kang, Y.J. Lee, D. Kim, H.K. Park, G.J. Lee, C. Kim.** Label-free noninvasive characterization of osteoclast differentiation using Raman spectroscopy coupled with multivariate analysis, *Current Optics and Photonics* 1, 412–420 (2017).
- [80] **B. Li, M.Q. Lu, Q.Z. Wang, G.Y. Shi, W. Liao, S.S. Huang.** Raman spectra analysis for single mitochondria after apoptosis process of yeast cells stressed by acetic acid, *Chin. J. Anal. Chem.* 43, 643–650 (2015).
- [81] **I. Notingher.** Raman spectroscopy of cell-based biosensors, *Sensors* 7, 1343–1358 (2007).
- [82] **K.M. Syamala, H. Abe, Y. Fujita, K. Tomimoto, V. Biju, M. Ishikawa, Y. Ozaki, T. Itoh.** Inhibition assay of yeast cell walls by plasmon resonance Rayleigh scattering and surface-enhanced Raman scattering imaging, *Langmuir* 28, 8952–8958 (2012).
- [83] **M. J. Benevides, S. A. Overman, G. J. Thomas.** Raman, polarized Raman and ultraviolet resonance Raman spectroscopy of nucleic acids and their complexes. *J. Raman Spectrosc.* 36, 279–299 (2005).

Agnė Zdaniauskiė

Mielų Ląstelių Tyrimas Paviršiaus Sustiprintos Ramano Spektroskopijos Metodu Panaudojant Aukso Nanodaleles su Išoriniu Dielektriko Sluoksniu

Santrauka

Paviršiaus sustiprinta Ramano spektroskopija (PSRS) yra vienas informatyviausių tyrimo metodų, leidžiančių *in situ* vandeninėje terpėje tirti biologines sistemas. PSRS suteikia galimybę tirti pačių mažiausių struktūrinių biologinių organizmų dalių sandarą ir funkcijas bei surasti jų tarpusavio ryšius. Vis dėlto, tradiciškai paviršiaus sustiprinta Ramano spektroskopija yra apribota Au, Ag ir Cu nanostruktūrinių paviršių tyrimais. Siekiant praplėsti metodo galimybes kitų metalų (Pt, Fe, Co) ir paviršių (gyvos ląstelės) tyrimuose, 2010 metais buvo pasiūlyta panaudoti Au ir Ag nanodaleles, apsaugotas plonu SiO₂ sluoksniu (Au@SiO₂, Ag@SiO₂). Šiuo atveju, nanodalelės branduolys atlieka Ramano spektrų stiprintuvo vaidmenį, o silicio oksido sluoksnis apsaugo nanodaleles nuo tarpusavio cheminės sąveikos ir tiesioginės sąveikos su tiriamuoju paviršiumi.

Pagrindinis šio darbo **tikslas** – susintetinti Au@SiO₂ nanodaleles bei jas išbandyti analizuojant savitvarkių monosluoksnių struktūrą ir funkciją. Ištirti mielių ląstelių struktūrą paviršiaus sustiprintos Ramano spektroskopijos metodu panaudojant Au@SiO₂ nanodaleles.

Pagrindiniai **rezultatai ir išvados**. Eksperimento metu tirtos *Metschnikowia* rūšies mielės, sintetinančios pulcherimino rūgštį, kuri su laisva trivalente geležimi sudaro netirpų raudoną pigmentą pulcheriminą. To pasekoje pasireiškia šio tipo mielių antimikrobinis aktyvumas prieš įvairius patogeninius mikroorganizmus. Susintetintos sferinės formos, 46 ± 6 nm dydžio aukso nanodalelės su išoriniu dielektriko sluoksniu (~ 3 nm). Au@SiO₂ND pritaikytos savitvarkių monosluoksnių tyrimams, kurių metu nustatyta bei įvertinta monosluoksnių sandara, funkcija.

Pirmą kartą užregistruoti *Metschnikowia pulcherrima* PSRS spektrai. Remiantis gautais rezultatais identifikuota mielių ląstelių sienelė ir joje esantys funkciniai elementai (baltymai, lipidai, aminorūgštys). Nustatyta, kad spektrai, kuomet naudotos Au@SiO₂ ND kartu su mielių ląstelėmis atsikartoja, virpesinių juostų dažniai nekinta, neatsiranda papildomų juostų dėl cheminės sąveikos su dalelėmis. Aminorūgščių, C-N, amidiniai virpesiai atspindi gyvos ląstelės bioaktyvumą, vykstančią baltymų sekreciją, antrinės struktūros kitimą, todėl SHINERS metodas leidžia *in situ* sekti ląstelės biocheminių procesų eigą.

Agnė Zdaniauskienė

Surface Enhanced Raman Spectroscopic Analysis of Yeasts Cells by Using Dielectric-Shell Isolated Gold Nanoparticles

Summary

Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) is one of the most sensitive vibrational spectroscopic method for in situ studies of biological systems in aqueous solutions. SERS provides the opportunity to study the structure and functions of the smallest structural parts of biological organisms and find their interrelations. However, large enhancement can be provided only by roughened surfaces and nanoparticles of Ag, Au or Cu metals. Consequently, Tian et al. suggested a novel SERS technique named “shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy” (SHINERS). The method is based on enhancement of Raman signal by strong electromagnetic field provided by gold core nanoparticles surrounded by a few nanometer thick inert silica shell (Au@SiO₂). The shell prevents chemical and electrical contacts among plasmonic core and probe substrate, analyst or environment.

The main aim of this work: to synthesize the Au@SiO₂ nanoparticles and apply them to probe the function and structure of self-assembled monolayers; to investigate the structure of yeast cells by surface-enhanced Raman spectroscopy using Au@SiO₂ nanoparticles.

The main results and conclusions. Yeasts *Metschnikowia* spp. are capable to produce a red pigment when iron (III) ions present in the growth media. They are potential biocontrol agents against various pathogenic microorganisms. In this work synthesized spherical gold nanoparticles with 46 ± 6 nm core size and SiO₂ shell of ~ 3 nm thickness. In the process of the experiment shell-isolated nanoparticles were applied for studies of self-assembled monolayers and the structure and function of monolayers was determined.

Synthesized Au@SiO₂ nanoparticles allowed to obtain significantly enhanced SHINERS spectra of *Metschnikowia* spp. compared to the Raman spectra. Based on the results, the yeast cell wall and its functional elements (proteins, lipids, amino acids) were identified. It has been determined that spectra, when used Au@SiO₂ NPs in combination with yeast cells, demonstrate the repeatability, vibrational bands do not change, there are no additional bands due to chemical interactions with nanoparticles. Amino acids, C-N, amide vibrations indicate the bioactivity of the living cell. Consequently, SHINERS technique allow to collect molecular level information from yeast for a better understanding of their cell wall biochemical structures.