

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**Detekce bakteriálních β -laktamáz pomocí
povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie**

Diplomová práce

Autor: Bc. David Řepka

Studijní program: N1407 Chemie

Studijní obor: Fyzikální chemie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

Rok: 2021

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s použitím odborné literatury a zdrojů uvedených v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

podpis

Rád bych tímto poděkoval vedoucímu práce panu doc. RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady. Dále bych rád poděkoval Mgr. Lucii Hochvaldové za připomínky a pomoc při vyhodnocování spekter a také Mgr. Kateřině Štymplové za pomoc při měření. Panu doc. RNDr. Robertu Pruckovi, Ph.D. děkuji za pomoc a rady při měření SERS spekter, paní Mgr. Janě Stráské za zhotovení TEM snímků a paní Karle Slavičkové za neustálou ochotu. Poděkování patří také za finanční podporu internímu grantu Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého IGA_PrF_2021_031. V neposlední řadě bych rád poděkoval i své rodině.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. David Řepka
Název práce	Detekce bakteriálních β -laktamáz pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie
Typ práce	Diplomová práce
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Klíčová slova	SERS, β -laktamáza, antibiotika, ampicilin, kompozit, koloidní stříbro
Počet stran	55
Počet příloh	0
Jazyk	český

Abstrakt:

Cílem práce bylo vyvinout metodu detekce rezistence bakterií, která by byla rychlejší než dosud využívané testy. Pro detekci enzymu produkovaného bakteriemi byly použity kompozity s polystyrenovými mikročásticemi s magnetickým jádrem a adsorbovanými nanočásticemi zlata nebo stříbra na povrchu, které byly redukovány buď kyselinou askorbovou nebo dopaminem. Měření probíhalo pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. Za využití kompozitů bylo možné pomocí Ramanovy spektroskopie detekovat přítomnost ampicilinu jako modelového β -laktamového antibiotika. Přidáním enzymu docházelo k vymizení charakteristických píků antibiotika, nicméně zároveň nedocházelo k detekci produktu degradace působením β -laktamázy.

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. David Řepka
Title	Detection of bacterial β -lactamases using surface enhanced Raman spectroscopy
Type of thesis	Master's thesis
Department	Department of Physical Chemistry
Supervisor	doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
The year of presentation	2021
Keywords	SERS, β -lactamases, antibiotics, ampicillin, composite, colloidal silver
Number of pages	55
Number of appendices	0
Language	Czech

Abstract:

The aim of this thesis was to develop faster detection method of bacterial resistance than now used tests. For enzymatic detection produced by bacterium were used composites of polystyrene microparticles with magnetic core and adsorbed gold or silver nanoparticles on surface, reduced by ascorbic acid or dopamine. The measurement was done using surface-enhanced Raman spectroscopy. We were able to measure presence of ampicillin as our model β -lactam antibiotic with the use of composites. Addition of enzyme resulted in disappearing of characteristics peaks of ampicillin but at the same time no product of the degradation by influence of β -lactamase was detected.

Obsah

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	DISPERZNÍ SOUSTAVY	10
2.2	KOLOIDNÍ SYSTÉM.....	10
2.2.1	Nanočástice.....	10
2.3	KINETICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ	11
2.3.1	Brownův pohyb	11
2.4	ELEKTRICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ.....	14
2.5	REOLOGICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ	15
2.5.1	Viskozita kapalin	15
2.5.2	Viskozita disperzních systémů	16
2.6	OPTICKÉ VLASTNOSTI KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ.....	17
2.6.1	Absorpce záření	17
2.6.2	Rozptyl záření.....	18
2.7	KOMPOZIT	18
2.7.1	Nanokompozity	19
2.8	ANTIBIOTIKA	20
2.8.1	β -laktamové antibiotika	20
2.8.2	Ampicilin	21
2.8.3	Bakteriální rezistence	22
2.8.4	Detekce β -laktamáz	22
2.9	POVRCHEM ZESÍLENÁ RAMANOVA SPEKTROSKOPIE	24
2.9.1	Elektromagnetický efekt.....	25

2.9.2	Chemický efekt.....	26
2.10	NANOČÁSTICE STŘÍBRA A ZLATA V SERS	26
2.11	PŘÍKLADY VYUŽITÍ SERS PRO DETEKCI ANTIBIOTIK	27
3	PRAKTICKÁ ČÁST	30
3.1	CHEMIKÁLIE	30
3.2	EXPERIMENTÁLNÍ VYBAVENÍ.....	30
3.3	PŘÍPRAVA VZORKŮ	31
3.3.1	Příprava anizometrických nanočástic stříbra.....	31
3.3.2	Příprava kompozitu na bázi grafenu s mezivrstvou polymeru	32
3.3.3	Příprava magnetického kompozitu se zlatými nanočásticemi.....	32
3.3.4	Příprava magnetického kompozitu se stříbrnými nanočásticemi	33
3.3.5	Příprava magnetického kompozitu s polyakrylovou kyselinou.....	33
3.3.6	Příprava magnetického kompozitu s PDDA.....	34
3.3.7	Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie.....	34
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
4.1	GRAFENOVÉ KOMPOZITY	36
4.2	MAGNETICKÉ POLYSTYRENOVÉ KOMPOZITY	37
4.3	KOLOIDNÍ STŘÍBRO	43
4.3.1	Přídavek enzymu ke koloidnímu stříbru.....	45
5	ZÁVĚR	47
6	SUMMARY	49
7	LITERATURA.....	51

Seznam zkratek

SPR	Povrchová plasmonová rezonance (z angl. Surface Plasmon Resonance – SPR)
PBP	Proteiny vázající penicilin (z angl. Penicillin Binding Proteins)
SERS	Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (z angl. Surface Enhanced Raman spectroscopy)
LUMO	Nejnižší neobsazený molekulární orbital (z angl. Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
LSPR	Lokalizovaná povrchová plasmonová rezonance (z angl. Localized Surface Plasmon Resonance)
AgNPs	Nanočástice stříbra
AuNPs	Nanočástice zlata
UV-VIS	Ultrafialová-viditelná oblast
GCN	Kyanografen
GO	Grafen oxid
GA	Grafenová kyselina
mPS-AuNPs	Magnetické polystyrenové mikročástice se zlatými nanočásticemi
mPS-AgNPs	Magnetické polystyrenové mikročástice se stříbrnými nanočásticemi
TEM	Transmisní elektronový mikroskop

1 Úvod

Správná a rychlá detekce rezistence bakterií je v lékařské praxi zásadní, neboť včasná diagnostika je klíčová k léčbě pacienta. V případech, kdy to není včas možné, nebo se jedná o infekci z více zdrojů, je zapotřebí využít širokospektrá antibiotika. Test na přítomnost a rezistenci bakterií je prováděn na základě růstu jejich kultur, a proto je časově relativně náročný. U rychleji rostoucích bakterií je možné laboratorně zjistit druh po jednom až několika málo dnech, v nejhroších případech se může jednat i o delší časový úsek.¹ Tyto časové prodlevy před podáním vhodného, a hlavně účinného léčiva, mohou vést k značnému zhoršení zdraví pacienta, popřípadě i smrti. Další problém nastává, pokud má pacient rezistentní druh bakterie na dané léčivo a jeho léčba je tak neúčinná a o to delší, což může vést opět ke zhoršení zdravotního stavu pacienta. Třetí a zdaleka ne nejmenší problém nastává při podávání širokospektrých antibiotik, kdy se zvyšuje šance na vyvinutí bakteriální rezistence.² Z těchto důvodů je zde snaha o vytvoření rychlejší a účinnější metody detekce rezistentních bakterií, aby od začátku mohly být podávány účinné léky. Právě rychlost nastavení správné léčby bakteriální infekce je mnohdy životně důležitá, protože se ukázalo, že prvních 6-12 hodin léčby je kritických pro život ohrožující infekce.³

Způsob detekce pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie se jeví díky svým vynikajícím detekčním schopnostem, relativní uživatelské přívětivosti a možnosti využití kompaktních přenosných zařízení jako vhodný. V neposlední řadě je vhodný i díky možné rychlosti měření analytu a tím pádem značné úspoře času. Cílem práce je tedy vyvinout způsob detekce bakterií se schopností vytvářet enzym β -laktamázu, který zamezuje antibakteriálním vlastnostem β -laktamových antibiotik, jakým je například ampicilin.

2 Teoretická část

2.1 Disperzní soustavy

Disperzní soustavy mají dvě složky, a to disperzní fázi a disperzní prostředí. Disperzní fáze je rovnoměrně rozptýlena v disperzním prostředí. Podle různých proměnných lze dále tyto soustavy třídit. Patří mezi ně například velikost částic disperzní fáze nebo skupenství jak fáze, tak i prostředí. Velikost částic je označována jako stupeň disperzity, kdy čím vyšší je, tím jsou částice disperzní fáze více rozptýleny. Převrácená hodnota lineárního rozměru dané částice pak odpovídá stupni disperzity. V závislosti na velikosti dělíme disperzní soustavy na hrubé, koloidní a analytické disperze. Hrubé disperze nesou označení systémy, které mají částice o velikosti větší jak 10^{-6} m. Koloidní disperze mají velikost částic mezi 10^{-9} a 10^{-6} m a poslední analytická disperze má rozměry částic menší než 10^{-9} m.

Dále můžeme disperzní soustavy dělit podle počtu jednotlivých fází, a to buď na homogenní nebo heterogenní. V případě, kdy se soustava označuje jako homogenní má alespoň dvě složky se stejnou fází. Naopak u heterogenní soustavy se vyskytují dvě složky, přičemž jedna je jako disperzní fáze rozptýlena v disperzním prostředí.^{4,5}

2.2 Koloidní systém

V této práci se využívá k detekci bakteriálních β -laktamáz mimo jiné i koloidní stříbro. Jedná se o heterogenní soustavu. S koloidním systémem je spojený výraz nanočástice, které tvoří disperzní fázi. Koloid má specifické vlastnosti a jako takový je využíván v několika odvětvích chemie. Mohou se dělit podle skupenství disperzní fáze či prostředí. V této práci se ale budu zabývat pouze koloidním systémem, kdy disperzní fáze je pevná látka a disperzní prostředí je kapalina.

2.2.1 Nanočástice

Nanočástice zažívají v posledních letech rozmach. Především díky své jednoduchosti přípravy a značnému množství využití. Zájem vzbudily především svými rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Přestože má nanočástice velmi malý rozměr je jejich povrch daleko větší. Pro příklad můžeme vzít kulovitou částici s poloměrem 10^{-2} m a postupně ji budeme zmenšovat. Tato částice bude mít na začátku celkový povrch o hodnotě

$12,6 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$. Po zmenšení částice na velikost 10^{-6} m bude povrch odpovídat $12,6 \text{ m}^2$ a pro velikost 10^{-9} m se povrch zvětší až na $12,6 \cdot 10^3 \text{ m}^2$ při zachování konstantního celkového objemu, tzn. že se zmenšováním roste počet částic, a proto i povrch. Na začátku je jen jedna částice.⁴ Zvětšení povrchu se odráží ve vlastnostech tím, že se zvětší celkové povrchové rozhraní systému. Označení nanočástic má materiál tehdy, pokud alespoň jeden jeho rozměr je menší než 100 nm .⁶

2.3 Kinetické vlastnosti koloidních systémů

2.3.1 Brownův pohyb

Částice v koloidním systému vykonávají nepravidelné pohyby. Jsou způsobeny nárazy disperzního prostředí na částice. Tento jev vypořádal Robert Brown, po kterém je pojmenovaný. S rostoucí teplotou a klesající velikostí částic roste intenzita Brownova pohybu a u částic s poloměrem $4 \mu\text{m}$ a větším není Brownův pohyb nadále pozorovatelný.⁷ Mimo jiné částice pod $4 \mu\text{m}$ vlivem Brownova pohybu vykonávají i rotační pohyb.⁷ Intenzitu pohybu také značně ovlivňuje viskozita disperzního prostředí, kdy její růst zamezuje pohybu částic v důsledku Brownova pohybu. Projevem tohoto jevu je sedimentace, difúze a odráží se také ve stabilitě koloidů.^{4,5}

2.3.1.1 Sedimentace

Sedimentace neboli usazování nastává u částic, u kterých převládne gravitační síla F_g , popřípadě se může sedimentace vyvolat působením odstředivé síly F_o například použitím centrifugy. Sedimentaci ovlivňuje vícero faktorů a proti jejímu působení pracuje několik sil. Mezi faktory ovlivňující sedimentaci patří hmotnost částic, hustota, jejich tvar a například také hustota prostředí. Síly působící proti sedimentující částici jsou F_{vz} tedy vztlaková síla a odpor prostředí F_η což jde zapsat do vztahu:

$$F_g = F_{vz} + F_\eta \quad (1)$$

Rovnovážnou rychlost sedimentace kulovité částice zjistíme postupným vyjádřením vztahu (1). Za gravitační sílu lze dosadit upravená vztlaková síla v případě kdy se vyrovnají (2) a odpor prostředí lze vyjádřit vztahem (3).

$$F_g = \frac{4}{3} \pi r^3 (\rho - \rho_0) g \quad (2)$$

$$F_\eta = 6\pi\eta r v \quad (3)$$

Rovnovážnou rychlost sedimentace v tedy získáme úpravou:

$$v = \frac{2r^2(\rho - \rho_0)g}{9\eta} \quad (4)$$

kde r je poloměr částice s hustotou ρ , η je dynamická viskozita prostředí s hustotou ρ_0 , g je gravitační zrychlení. Tyto vztahy platí pro větší částice s rozměry nad 1 μm , které nejsou ovlivněny Brownovým pohybem.⁵ Částice, na které působí Brownův pohyb a tím pádem na ně působí i difúze jsou kineticky stálé. To znamená, že se dokážou udržovat v celém objemu disperzní fáze. Tato stálost je způsobena právě působením difúze proti sedimentaci a gravitační síla není dost silná, proto musíme působit odstředivou silou:

$$F_o = m\omega x \quad (5)$$

kde m je hmotnost částice, ω je rychlost úhlového otáčení odstředivky a x je hodnota vzdálenosti částice kolmo od osy otáčení. Vyrovnáním sil platí vztah pro rychlost částice:

$$v = \frac{2r^2(\rho - \rho_0)\omega x}{9\eta} \quad (6)$$

Pro sedimentaci, která je ovlivněna Brownovým pohybem musíme přidat vliv difúzního toku. Difúzní tok působí proti koncentračnímu gradientu, který vzniká jako důsledek sedimentace a v rovnovážném stavu je difúzní tok roven sedimentačnímu. Pod vlivem difúze se částice bude pohybovat rychlostí v_{dif} dle vztahu:

$$v_{dif} = -\frac{D}{c} \cdot \frac{dc}{dx} \quad (7)$$

kde D je difúzní koeficient [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$] a c je molární koncentrace disperzní fáze [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]. Vztah pro sedimentační rovnováhu, kdy je rychlost difúze a sedimentace rovna, získáme úpravou vztahů (6) a (7):

$$\ln \frac{c_2}{c_1} = \frac{v_0 g}{k_B T} \cdot (\rho - \rho_0) \cdot (h_1 - h_2) \quad (8)$$

kde c_1 a c_2 jsou koncentrace částic ve vzdálenosti h_1 a h_2 , v_0 zastupuje objem kulovité částice, k_B je Boltzmanova konstanta a T je termodynamická teplota [K]. Naproti tomu sedimentační rovnováha vlivem odstředivé síly je ustálena daleko rychleji, protože zde mohou působit oproti gravitaci síly o několik řádů vyšší.

$$\ln \frac{c_2}{c_1} = \frac{v_o \omega^2}{2k_B T} \cdot (\rho - \rho_0) \cdot (x_2^2 - x_1^2) \quad (9)$$

kde hodnoty x jsou vzdálenosti od osy otáčení.^{4,5}

2.3.1.2 Difúze

Jeden z dalších důsledků Brownova pohybu je difúze. Je to snaha systému vyrovnat koncentrační gradienty, kdy směr difúze je vždy stejný, a to z prostředí, které má vyšší koncentraci do toho s nižší. I. Fickův zákon popisuje difúzi:

$$\frac{dn}{dt} = -SD \frac{dc}{dx} \quad (10)$$

kde S je plocha, $\frac{dn}{dt}$ je látkové množství látky podléhající difúzi v čase t a $\frac{dc}{dx}$ je koncentrační gradient. Albert Einstein odvodil vztah pro difúzní koeficient:

$$D = \frac{k_B T}{f} \quad (11)$$

Kde f je koeficient tření a můžeme odvodit výpočet pro velikost poloměru difundující částice r ze vztahu (11), kdy pro kulovitou částici platí:

$$r = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (12)$$

U částice, která je pod vlivem difúze v pohybu, lze určit skutečnou vzdálenost, kterou urazí v daném časovém intervalu Δt a nazývá se střední posuv částice $\bar{\Delta}$:

$$\bar{\Delta} = \sqrt{\frac{k_B T \Delta t}{3\pi\eta r}} \quad (13)$$

2.3.1.3 Osmóza

Osmóza je podobný děj jako difúze, jedná se snahu systému vyrovnat koncentrační gradienty s rozdílem, že u osmózy se nachází polopropustná membrána, přes kterou nemohou prostupovat větší částice. Přítomnost polopropustné neboli také semipermeabilní membrány, má za následek, že může prostupovat pouze rozpouštědlo a samotný jev osmózy má reverzní průběh oproti difúzi, tedy rozpouštědlo v systému s nižší koncentrací rozpouštěných látek přechází do systému s vyšší koncentrací látek. Osmotický tlak v pravých roztocích je popsán van't Hoffovou rovnicí:

$$\pi = cRT \quad (14)$$

kde π je osmotický tlak [Pa], R je univerzální plynová konstanta [$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$] a pro koloidní roztoky platí vztah:

$$\pi = \nu k_B T \quad (15)$$

kde ν je počet částic v jednotce objemu, N_A je Avogadrova konstanta [mol^{-1}]. Osmotický tlak je velmi malý u koloidních roztoků oproti tzv. pravým roztokům což vyplývá ze vztahu:

$$\frac{\pi_1}{\pi_2} = \frac{\nu_1}{\nu_2} = \frac{r_2^3}{r_1^3} \quad (16)$$

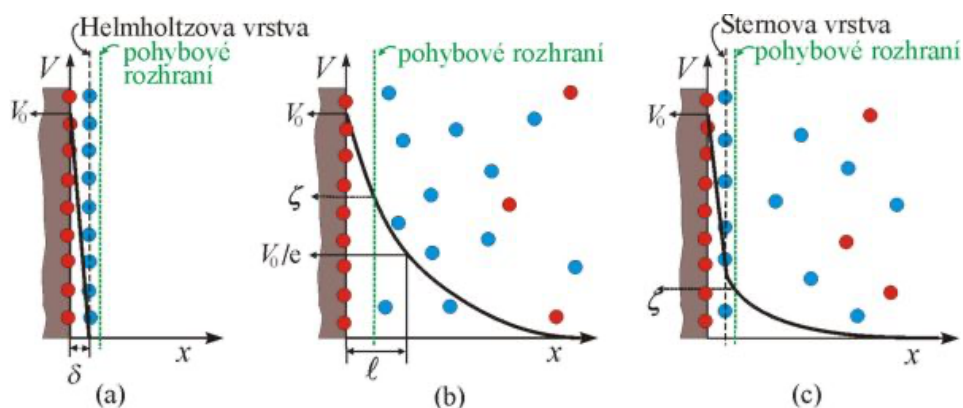
kdy se velikost osmotického tlaku výrazně mění s velikostí částic.^{4,5}

2.4 Elektrické vlastnosti koloidních systémů

Koloidní roztoky vykazují mimo jiné i elektrické vlastnosti. Každá částice kolem sebe tvoří tzv. elektrickou dvojvrstvu, kde se na fázovém rozhraní mezi částicí a disperzním prostředím vyskytují opačně nabitě náboje. První model elektrické dvojvrstvy byl vytvořen H. Helmholtzem, který předpokládal, že ionty na povrchu částice jsou fixní, stejně jako ionty s opačným nábojem, které se nachází v blízkosti částice.^{4,5} Tento model měl nedostatek v předpokladu fixních vrstev a právě díky již dříve zmíněným kinetickým vlastnostem je daný model nemožný.

Na obr. č. 1a) lze vidět Helmholtzův model, kde potenciál nabitého povrchu je označen V_0 a rozdíl elektrických potenciálů mezi povrchem a disperzním prostředím je označen V . Vzdálenost mezi vrstvami, tedy povrchem částice a prostředím disperze je označeno jako δ . Další model vypracovali Gouy a Chapman, kteří zahrnuli vliv difúze. Právě vlivem difúze nemůže nastat situace, kdy máme stejný počet iontů jak na povrchu, tak i na rozhraní disperzní fáze a došlo k rozdělení na vnitřní a vnější neboli difúzní vrstvu. Problémem tohoto modelu bylo pojetí iontů jako bodových nábojů, přičemž nepočítali se reálnými rozměry. Poslední model navrhnul Sternem již bere v potaz rozměry iontů a zavádí se tzv. Sternova vrstva. V této vrstvě se nachází ionty s opačným znaménkem než na povrchu částice a jsou zde vázány z větší části adsorpčními silami. Zbylé ionty se nachází v difúzní vrstvě, kde jsou k povrchu částice přitahovány elektrostatickými silami. Ionty ve vnitřní vrstvě jsou nepohyblivé a vrstva je oddělena od pohyblivé vnější vrstvy tzv.

pohybovým rozhraním. Právě v bodě na pohybovém rozhraní se odečítá hodnota elektrokinetického potenciálu, který má vliv na chování částice v elektrickém poli. Tento potenciál se nazývá i jako zeta potenciál (ζ).^{4,5,8}



Obrázek 1: Znáznornění modelů elektrické dvojvrstvy: a) Helmholtzův b) Gouyho-Chapmanův c) Sternův (převzato z⁸)

2.5 Reologické vlastnosti koloidních systémů

Reologie objasňuje chování hmoty pod vlivem vnějších mechanických vlivů, přesněji jde o její tok a deformaci. Dělí se na tři typy chování:

1. Elastické
2. Viskózní
3. Viskoelastické

První typ chování, tedy elastické, se vyskytuje např. u tuhých látek. Jedná se o deformaci hmoty, která je vratná, jakmile skončí působení vnější síly, která tuto deformaci způsobila. S druhým chováním se můžeme setkat u tekutin kdy po působení vnější síly nastává tok a dochází k nevratné deformaci, neboť po přerušení působení síly se kapalina nevrací. Posledním typem je viskoelastické chování, které je závislé na době působení síly. Tento typ chování se vyskytuje např. u některých druhů koloidních disperzí.^{4,7}

2.5.1 Viskozita kapalin

Newton popsal viskózní chování kapalin pomocí vztahu:

$$\tau_{xy} = -\eta \frac{du_x}{dy} \quad (17)$$

Kde τ_{xy} je tečné napětí ve směru osy x kolmo k ose y [$\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$], η je dynamická viskozita [$\text{Pa}\cdot\text{s}$] a $\frac{du_x}{dy}$ je gradient rychlosti. Reálné kapaliny mají dvojí proudění, a to laminární nebo turbulentní. U laminárního proudění dochází k pohybu částic ve vrstvách jedním směrem a tyto vrstvy jsou si rovnoběžné. Naopak u turbulentního proudění se částice pohybují i napříč vrstvami.⁹ U laminárního toku se částice ve středu pohybují nejrychleji a kapalina je zpomalována vnitřním třením, což je následek mezimolekulových sil. Toto chování je popsáno dynamickou viskozitou, přičemž podíl dynamické viskozity a hustoty kapaliny je nazývaný jako kinematická viskozita η_{kin} [$\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$]. Fluidita je pak název pro reciprokou dynamickou viskozitu.⁷

2.5.2 Viskozita disperzních systémů

Reologické chování koloidů se odvíjí od několika různých proměnných jako například velikosti, tvaru a koncentraci částic, viskozitě disperzního prostředí a vzájemného působení částic a působení částic na disperzní prostředí. Změnou velikosti částic se také výrazně mění viskozita disperzního prostředí.^{4,7} Pro popis viskozity disperzních soustav se využívají následující vzorce:

Tabulka 1: Seznam vztahů pro popis viskozity⁷

Relativní viskozita	$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0}$	(18)
Inkrement relativní viskozity	$\eta_i = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \eta_{rel} - 1$	(19)
Inherentní viskozita	$\eta_{inh} = \frac{\ln \eta_{rel}}{w_2}$	(20)
Redukovaná viskozita	$\eta_{red} = \frac{\eta_i}{w_2}$	(21)
Vnitřní viskozita	$[\eta] = \lim_{w_2 \rightarrow 0} \eta_{red} = \lim_{w_2 \rightarrow 0} \eta_{inh}$	(22)

kde η_0 je viskozita čistého prostředí a w_2 je hmotnostní koncentrace disperzní fáze.

Einstein roku 1906 odvodil rovnici pro popis závislosti koncentrace disperzní fáze a viskozity na základě hydrodynamických představ:

$$\eta = \eta_0(1 + 2,5\varphi) \quad (23)$$

kde φ je objemový zlomek disperzní fáze. Tento výraz je pro velmi zředěné koloidní roztoky, kde částice jsou tuhá kulatá tělesa bez elektrického náboje a objemový zlomek je do 1 %.^{4,7}

2.6 Optické vlastnosti koloidních systémů

Koloidní systémy vykazují zajímavé optické vlastnosti. Po ozáření dochází ke dvěma možnostem interakce světla s částicemi. První z možností je pravá absorpce, kdy dochází k pohlcení záření a tím ke zvýšení vnitřní energie částice, což vyústí v přeměnu na teplo. Druhou možností je rozptyl světla, kdy je světlo zpětně emitováno.^{4,7}

2.6.1 Absorpce záření

Částice absorbují energetická kvanta záření, čímž se excitují valenční a vazebné elektrony. Následkem tohoto jevu je deexcitace elektronů, kdy se vyzařuje energie ve formě tepla nebo ve formě světla, tedy fluorescence nebo fosforescence. Absorpce je popsána Lambert-Beerovým zákonem:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon cl \quad (24)$$

kde A je absorbance, I je intenzita procházejícího záření, I_0 je intenzita dopadajícího záření, ε [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$] je molární absorpční koeficient, c [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$] je koncentrace látky a l [cm] je délka vrstvy, kterou prochází paprsek. U koloidních systémů ovlivňuje absorpci záření velikost disperzní fáze. Typické chování tak vykazují například nanočástice kovů, jako je stříbro nebo zlato. Se zvětšující se velikostí nanočástic dochází k posunu absorpčního maxima k vyšším vlnovým délkám.⁴

2.6.1.1 Povrchový plasmon

U kovových nanočástic je přítomnost tzv. povrchové plasmonové rezonance (z angl. Surface Plasmon Resonance – SPR). Jedná se o kolektivní oscilaci delokalizovaných povrchových elektronů.¹⁰ Plasmony se vyskytují napříč celým objemem kovových částic, ale pro optické vlastnosti jsou důležité povrchové, tedy ty na rozhraní částice a disperzní fáze. Oscilace povrchového plasmonu vyvolává vznik elektromagnetického pole, které interaguje s dopadajícím zářením do blízkosti nanočástice. Interakce spočívá ve společné rezonanci vzniklého elektromagnetického pole a dopadajícího záření.¹¹ Nanočástice kovů jako například zlato a stříbro mají zbarvení v disperzi právě díky absorpci viditelného záření o správné vlnové délce, která rezonuje s povrchovým plasmonem. Takováto interakce je využívána v technice povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (z angl. Surface

Enhanced Raman Spectroscopy – SERS). Pro správnou účinnost povrchového plasmonu musí být měřená molekula v blízkosti nanočástice kovu do vzdálenosti asi 10 nm.¹²

2.6.2 Rozptyl záření

Zde nedochází k excitacím elektronů, ale pohlcené kvantum energie je následně vyzářeno náhodně do všech směrů se stejnou vlnovou délkou. Jako první tento jev pozoroval John Tyndall, který si povšiml, že se světlo rozšiřuje do kužele po průchodu koloidním systémem. Samotný mechanismus je založen na indukci elektrického dipólu v částici díky elektromagnetickému poli, které má dopadající záření s tím, že takto indukovaný dipól emituje záření se stejnou vlnovou délkou. Odražený světelný paprsek je také částečně polarizován.⁴ Kvantitativním popisem pro podíl rozptylu světla na zeslabení intenzity dopadajícího záření ve směru pozorování je vztah:

$$-\log \frac{I}{I_0} = \tau d \quad (25)$$

τ je označení pro turbiditu soustavy, což je míra souhrnné energie, která je rozptýlena na všechny strany při průchodu světelného paprsku vrstvou suspenze o jednotkové tloušťce. Turbiditu ovlivňují parametry jako stupeň disperzity, vlnová délka dopadajícího světelného paprsku a optické vlastnosti koloidní soustavy.⁴

Rozptyl světla na koloidních částicích popsal Rayleigh. Podmínkou pro tuto teorii je však přítomnost dostatečně malých kulovitých nanočástic, které mají rozměr menší než $\frac{\lambda}{20}$, jsou od sebe dostatečně vzdáleny (jedná se tedy o velmi zředěný systém) a jsou elektricky nevodivé, izotropní a jejich polarizovatelnost si je ve všech směrech rovna.^{7,13} Podle této teorie závisí intenzita rozptylu nepřímo úměrně na λ^4 a přímo úměrně polarizovatelnosti α . Další závislostí je pozorovací vzdálenost R a pozorovací úhel Θ :

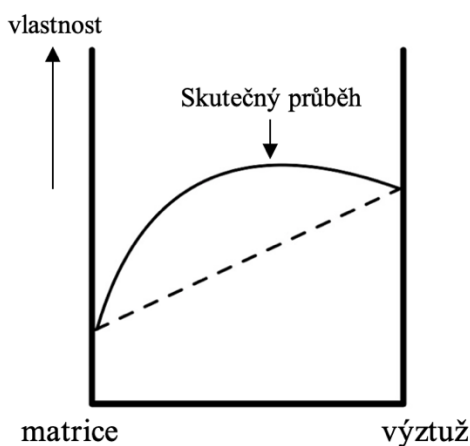
$$\frac{I}{I_0} = \frac{8\pi^4}{\lambda^4 R^2} \left(\frac{\alpha}{4\pi\epsilon_0} \right)^2 (1 + \cos^2\theta) \quad (26)$$

zde značí I rozptýlenou intenzitu světla.¹⁴

2.7 Kompozit

Kompozit je označení pro materiál složený alespoň ze dvou různých složek, které společně získávají nové fyzikální, chemické a mechanické vlastnosti. Uměle vytvořený

kompozit se na rozdíl od například slitin liší postupem výroby. U slitin dochází ke vzniku pomocí fázových přeměn. Kompozit na druhou stranu vzniká mísením nebo spojováním jednotlivých složek, ty se pak nazývají výztuž a matrice. Typickým jevem pro kompozitní materiál je tzv. synergismus, což je označení pro průběh vlastností oproti běžným látkám. Vlastnosti daného kompozitu jsou vylepšeny oproti pouhému sečtení vlastností složek (viz obr. 2).¹⁵ V této práci bylo vyzkoušeno několik kompozitů, přičemž největší důraz se kladl na magnetický kompozit.



Obrázek 2: Znárodnění synergie u kompozitu (převzato z ¹⁶)

2.7.1 Nanokompozity

Magnetické polymerní nanokompozity se díky svým unikátním fyzikálně chemickým vlastnostem dostaly do pozornosti. Tyto kompozity mají i potenciální užití v zařízeních pro úchovu energie, magnetických senzorech, zpomalovačích hoření a absorbérech mikrovlnného záření.¹⁷ Magnetických vlastností v polymerním kompozitu lze dosáhnout pomocí železa, kobaltu, niklu a jejich slitin. Přidáním kovů se nedocílí pouze magnetických vlastností, ale například i lepší termální stability, mechanických a optických vlastností.¹⁷

Konkrétním využitím magnetických polystyrenových nanokompozitů je i v adsorpci antibiotik ze zdrojů vody. Hlavním přístupovým bodem kudy se antibiotika dostávají do vodních zdrojů jsou čistírny odpadních vod, které nedokážou odstranit všechno množství. Takovéto antibiotika je snaha naadsorbovat na polystyrenový nanokompozit s akrylovou kyselinou a Fe_3O_4 a odstranit je tak z vodního prostředí.¹⁸

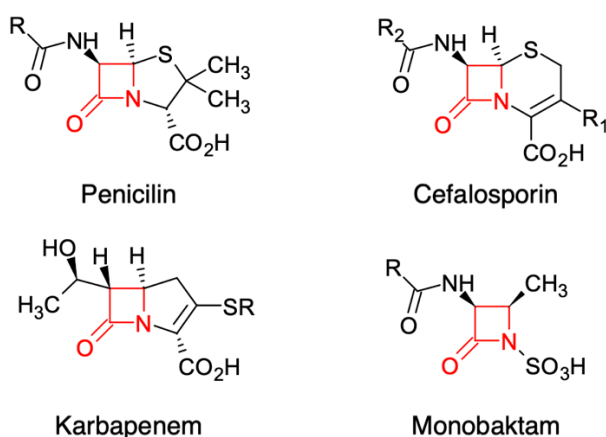
Poslední dobou se stále více řeší otázka bio-rozložitelnosti a není tomu jinak ani v případě nanokompozitů, kdy je snaha vytvářet takové kompozity, které jsou z přírodních materiálů, jsou rozložitelné a zároveň mají své unikátní vlastnosti. Příkladem přírodních materiálů použitých pro přípravu nanokompozitů jsou celulóza, škrob, chitin, chitosan, pektin, rostlinné oleje a proteiny. Takovéto přírodní nanokompozity lze využívat například ve zdravotnictví pro cílené doručování léčiv. Příkladem přírodního nanokompozitu je hydroxyapatit/kolagen alginát jehož pomocí se docílilo cíleného uvolnění vitamínu.¹⁹

2.8 Antibiotika

Antibiotika jsou látky patřící do skupiny antimikrobiálních. Využívají se zejména ve zdravotnictví, kvůli jejich schopnosti ničit bakterie. První objev antibiotika se datuje do roku 1928, který učinil britský lékař Sir Alexander Fleming.²⁰ Svůj objev pojmenoval jako penicilin a dodnes je to jedno z nejvíce užívaných antibiotik na světě.²¹ Penicilin se svojí strukturou spadá do kategorie β -laktamových antibiotik.

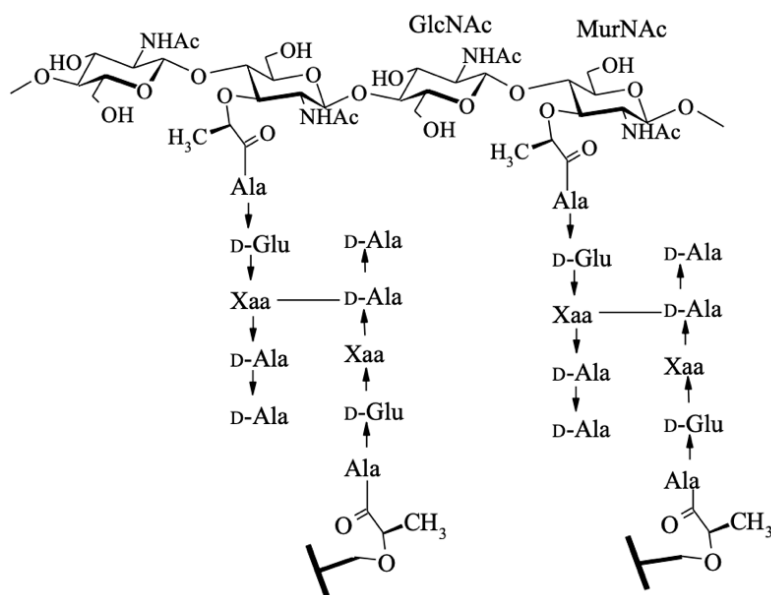
2.8.1 β -laktamové antibiotika

β -laktamové antibiotika jsou skupinou antibiotik, která obsahují ve své struktuře β -laktamový kruh. Jedná se o jedny z nejvíce užívaných antibiotik na světě. Udává se, že tyto antibiotika zabírají až 55-65% celkového světového trhu.^{22,23} Tato skupina antibiotik se dále dělí na antibiotika z řady penicilinů, cefalosporinů, karbapenemů a monobaktamů.²² Všechny zmíněné druhy antibiotik obsahují vysoce reaktivní β -laktamový kruh (viz obr. č. 3). Tento β -laktamový kruh je hlavní příčinou, že tyto látky mají svoje antibakteriální vlastnosti.



Obrázek 3: Obecné struktury β -laktamových antibiotik s červeně vyznačeným β -laktamovým kruhem

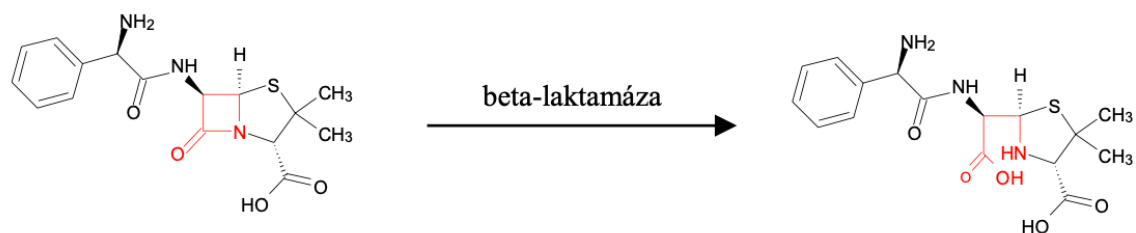
β -laktamové antibiotika fungují díky kovalentnímu navázání na enzym s názvem proteiny vázající penicilin (z angl. Penicillin Binding Proteins – PBP)²⁴. Inhibice enzymu vede k narušení struktury peptidoglykanu v buněčných stěnách bakterií, díky přerušení výstavby peptidových a glycinových můstků.²⁵ Následkem je zamezení růstu bakterií anebo jejich úplný zánik vlivem osmózy. Peptidoglykan je polymer, který je důležitou součástí buněčné stěny (viz obr. 4). Skládá se z polysacharidu, který obsahuje dvě jednotky aminosacharidů a to N-acetylglukosamin (GlcNAc) a kyseliny N-acetylmuramové (MurNAc) a peptidových řetězců spojených peptidovou vazbou. Struktura peptidoglykanu se liší v závislosti na tom, jestli se jedná o gram-negativní nebo gram-pozitivní bakterie. U gram-negativních bakterií je značeno pomocí „Xaa“ meso-diaminopimelová kyselina a u gram-pozitivních bakterií lysin.²⁶



Obrázek 4: Struktura peptidoglykanu u gram-negativních a -pozitivních bakterií (převzato z²⁶)

2.8.2 Ampicilin

Do β -laktamové rodiny antibiotik patří i ampicilin, který se konkrétněji řadí mezi peniciliny. Jedná se o semi-syntetické antibiotikum, které je jedno z nejvíce využívaných, s odhadovaným množstvím na trhu ve výši 20 000 tun ročně.²⁷ Využívá se proti gram-negativním i -pozitivním bakteriím.²⁸ Ampicilin má strukturu nejvíce podobnou penicilinu. Jeho interakce s bakterií, která vykazuje rezistenci, vede k hydrolýze β -laktamového kruhu a vzniku penicilinové kyseliny (viz obr. 5).



Obrázek 5: Hydrolýza ampicilinu na penicilinovou kyselinu

2.8.3 Bakteriální rezistence

Bakterie jsou si schopny vyvinout rezistenci na daný druh antibiotik, což může mít fatální následky v medicíně, kdy nejsme schopni léčit bakteriální infekce. Můžeme je dělit na dva druhy z pohledu mechanismů rezistence proti β -laktamovým antibiotikům. Jedná se o gram-negativní a gram-pozitivní bakterie. Existují i další druhy bakterií jako například mykoplasmata, ale tento druh nemá peptidoglykan a tím pádem ani buněčnou stěnu a β -laktamová antibiotika, jako například penicilin, nemají žádný efekt, neboť jejich hlavním cílem je narušování buněčných stěn.²⁹ Gram-negativní bakterie mají oproti pozitivním i vnější buněčnou stěnu.

2.8.4 Detekce β -laktamáz

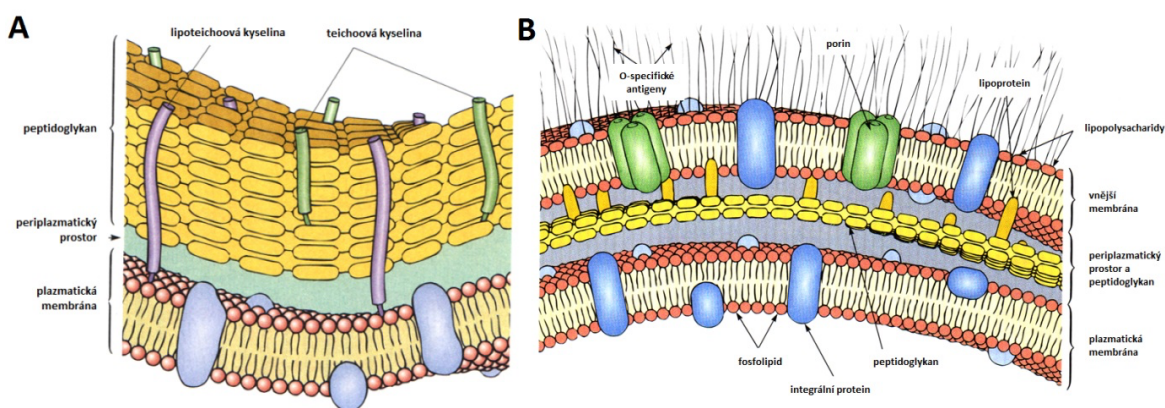
Detekce enzymu momentálně probíhá pomocí například kolorimetrických reakcí, kdy se pozoruje produkt hydrolýzy a změna barvy. Jedná se o chromogenní cefalosporinovou, acidimetrickou, jodometrickou. Dalšími metodami detekce jsou inhibiční a reverzně pasivní hemaglutinační.^{30,31} Velmi rozšířené metody detekce rezistence jsou na základě testování citlivosti bakterií na léčivo pomocí difúzních metod. Tyto testy, jako například disková difúzní Kirby-Bauer metoda, probíhají v Petriho miskách, kde je v Mueller-Hintonově agaru zkoumán vliv bakterií na antibiotikum. Jedná se o časově náročné testy kdy se udává časový interval od odběru do výsledku 2 až 7 dní.³² Tato zdoluhavá metoda vyžaduje kultivaci bakterií a následné přidání antibiotika a další vyčkání na reakci. Dalším nedostatkem takového testování může být i množství potřebného materiálu, jednotlivých kroků a zachování sterilního pracovního prostředí. Nové způsoby testování se soustředí například na testování jednotlivých bakteriálních buněk, místo toho, aby se čekalo na kultivaci většího počtu. Jedním z takovýchto způsobů sledování jednotlivých buněk je i pomocí mikrofluidního čipu, kdy se bakterie zapouzdří v agaru a je

k nim přidáváno antibiotikum. Změna morfologie se zaznamenává v čase a v důsledku této změny lze říct, zda je bakterie rezistentní.³²

2.8.4.1 Gram-negativní bakterie

Gram-negativní bakterie mají zvýšenou rezistenci na antibiotika kvůli přítomné vnější membráně, protože PBP se nachází v periplazmatickém prostoru za vnější membránou (viz obr. 6). Vyvinuly si několik mechanismů rezistence proti β -laktamovým antibiotikům.^{33,34} Těmito mechanismy jsou: omezení přístupu k PBP, pozměnění PBP a produkce β -laktamáz.

Zamezení přístupu antibiotika k PBP provádí bakterie pomocí ztráty porinů, což je protein umístěný ve vnější membráně, přes který mohou prostupovat molekuly. Tím, že se ho bakterie zbaví ztěžuje antibiotiku dostupnost k potřebným PBP, kde by se mohlo ireverzibilně vázat a narušovat syntézu buněčné stěny. Určitým druhem zamezení přístupu k PBP je i přítomnost efluxní pumpy, která má za úkol odstraňovat pro bakterii nežádoucí látky z jejího periplazmatického prostoru.^{33–35} Dalším mechanismem je změna struktury vazebného místa PBP. Jakmile dojde k této změně, výrazně se snižuje afinita antibiotika, ale protein je stále schopný syntézy buněčné stěny. Posledním a nejefektivnějším mechanismem je produkce β -laktamáz. Tento enzym produkovaný bakterií hydrolyticky rozkládá β -laktamový kruh antibiotika a tím pádem mu zamezuje se vázat na PBP a ztrácí tak své antibakteriální účinky.³⁴



Obrázek 6: Struktura buněčné stěny gram-pozitivních (A) a gram-negativních (B) bakterií (převzato z ³⁶)

2.8.4.2 Gram-pozitivní bakterie

Gram-pozitivní bakterie mají primární mechanismus ve změně PBP kde opět stejně jako u gram-negativních bakterií dochází ke změně struktury. Druhým případem, kdy může mít gram-pozitivní bakterie rezistenci, je vytváření β -laktamázy. Tento proces je ale méně častý, než zmíněný primární mechanismus.³³

2.9 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie

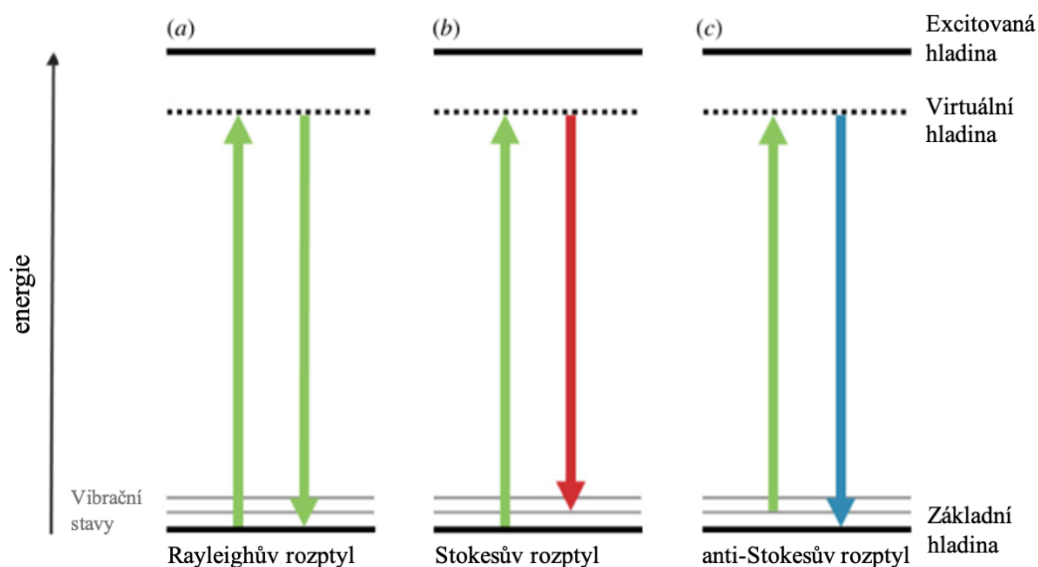
Jedná se o vibrační spektroskopickou techniku, která umožňuje vysoce citlivou detekci i velmi malých množství analytu. Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie je rozšířením základní Ramanovy spektroskopie a umožňuje tak měřit množství analytu nedosažitelné základní metodou. Udává se, že faktor zesílení pro SERS je 10^{10} a je možné detekovat i jednotlivé molekuly.³⁷⁻⁴⁰

Ramanova spektroskopie funguje na principu rozptylu světelného paprsku. Zdrojem světelného záření je v tomto případě laser, který má monochromatické záření. Dochází ke třem rozptylům. Největším z nich je elastický neboli Rayleighův rozptyl. U tohoto rozptylu dochází k excitaci elektronu pomocí světla na virtuální hladinu a následné de-excitaci na stejnou, původní hladinu. Při de-excitaci se vyzařuje foton o stejné vlnové délce.

Druhým největším rozptylem je Stokesův, označován také jako neelastický rozptyl. Tento rozptyl nastává, pokud se excitovaný elektron po de-excitaci vrací na vyšší hladinu. Záření má po de-excitaci vyšší vlnovou délku než původní zdroj a tím pádem nižší energii. Naopak anti-Stokesův rozptyl, který má nejmenší intenzitu ze všech zmíněných, má zase nižší vlnovou délku a větší energii, protože dochází k excitaci elektronu z vyšší základní hladiny a následné de-excitaci na nižší hladinu, než byla původní (viz obr. 7).

Rayleighův rozptyl nenese žádnou analytickou informaci a je ho potřeba odstranit při měření pomocí filtrů záření. Odfiltrování Rayleighova rozptylu je důležité, protože je tak intenzivní, že by poškodil detektor v přístroji a neelastický rozptyl by byl zastíněn. Stokesův rozptyl nastává asi jen u jednoho z 10^7 fotonů.⁴¹ Anti-stokesův nastává ještě méně, protože se původní stav, kdy se molekula nachází v základní nebo vyšší vibrační hladině, řídí Boltzmannovým rozdělením, a tedy počet molekul nacházejících se ve vyšším vibračním stavu je menší a tudíž musí být i menší intenzita daného rozptylu. Při rotačních hladinách je

rozdíl intenzit daleko menší, protože energetický rozdíl hladin je menší. Podle Boltzmannova rozdělení tedy může být ve vyšší hladině i více molekul.⁴²

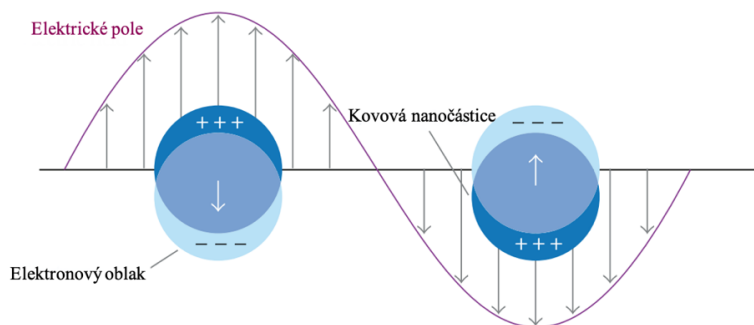


Obrázek 7: Znárodnění (a) Rayleighova, (b) Stokesova a (c) anti-Stokesova rozptylu (převzato z⁴³)

Metoda SERS funguje na základně využití nanočástic, převážně zlata a stříbra. Lepší výsledky oproti základní metodě jsou dosaženy díky dvěma efektům. První je elektromagnetický a druhým je chemický efekt. V této oblasti SERS se vedou debaty, ale již se obecně připouští, že právě zmíněné efekty jsou zodpovědné za vynikající zlepšení citlivosti detekce analytu.

2.9.1 Elektromagnetický efekt

Tento efekt je hlavním přispěvatelem k SERS procesům. Elektromagnetický efekt je důsledkem dopadajícího záření o správné frekvenci, které excituje oblak elektronů a vybudí tak jejich oscilaci. Elektronové pole záření interaguje s nanočásticemi za vzniku polarizace elektronů a tím dochází ke vzniku náboje, který způsobuje oscilaci povrchových elektronů. Síla elektromagnetického efektu klesá se třetí mocninou vzdálenosti od povrchu. Zvláště silný elektromagnetický efekt je v mezerách mezi jednotlivými nanočásticemi kovu. Tato oblast se nazývá „hot spot“.⁴⁴ Frekvence oscilujících elektronů se nazývají lokalizovaná povrchová plasmonová rezonance (z angl. localized surfaced plasmon resonance – LSPR).^{45,46}



Obrázek 8: Lokalizovaný povrchový plasmon vzniklý oscilací delokalizovaných elektronů v důsledku vlivu vnějšího elektrického pole (převzato z ⁴⁷)

2.9.2 Chemický efekt

Chemický efekt zahrnuje formování vazby mezi analytem a povrchem nanočástice, díky tomu je možné mezi nimi přenášet náboj. Elektron se přesouvá z Fermiho hladiny do hladiny LUMO (z angl. Lowest Unoccupied Molecular Orbital) a naopak. Následkem tohoto přesunu dochází ke zvýšení polarizovatelnosti a to vede ke zvýšení Ramanova signálu.⁴⁶ Chemický efekt má značně menší dosah než elektromagnetický, a proto i menší faktor zesílení.

2.10 Nanočástice stříbra a zlata v SERS

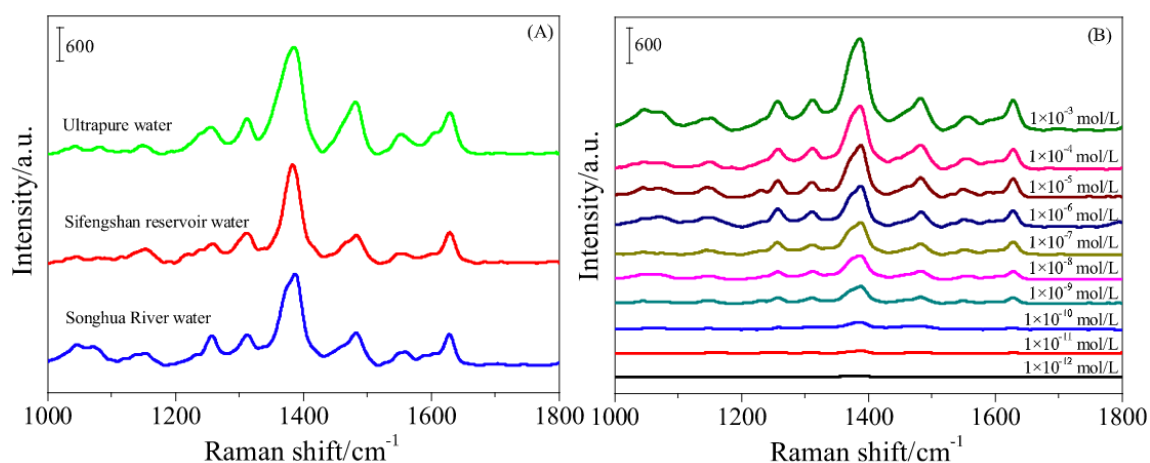
Stříbrné a zlaté nanočástice jsou jedny z nejvíce využívaných u SERS měření. Existuje několik druhů příprav nanočástic, mezi které patří například příprava se stabilizací pomocí citronanu sodného (citrát). Postup přípravy spočívá v rozpuštění dusičnanu stříbrného ve vodě a přivedení k varu s následným přidáním malého množství citrátu za stálého míchání a varu. Takto připravené nanočástice se dále využili pro měření iontů uranu, které se stále častěji a ve větším množství dostávají do okolí a rychlá a účinná detekce pomocí SERS je důležitá například pro pracovníky v jaderném odvětví.⁴⁸

Příkladem využití zlatých nanočástic v SERS může být detekce *S. aureus* a *E. coli*. Detekce mikro organismů touto metodou může vést k lepším a rychlejším diagnostikám v lékařství. Nanočástice zlata byly pro tento typ měření připraveny třemi způsoby. Prvním postupem byla chemická syntéza kdy se použil škrob s kyselinou chlorozlatitou a hydrazinem. Dalším postupem byla syntéza pomocí mikrovlnného záření. Opět s využitím kyseliny chlorozlatité, škrobu a hydrazinu s rozdílem, že se směs zahřívala pomocí

mikrovlnného záření. Poslední byla elektrochemická syntéza. Do roztoku kyseliny chlorozlatité se ponořily stříbrné elektrody. Zlaté nanočástice se z katody odstranily pomocí sonikace.⁴⁹

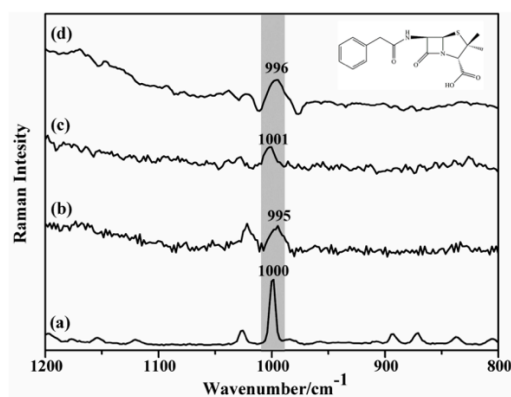
2.11 Příklady využití SERS pro detekci antibiotik

V několika článcích^{50–52} vědci využívají SERS pro detekci zbytkových antibiotik, například ve zdrojích pitné vody. Jeden z článků detekuje antibiotika pomocí Ag-TiO₂ a koloidního stříbra. Kompozit připravily pomocí sol-hydrotermální metody kdy se využila směs butoxidu titaničitého a ethanolu se směsí dusičnanu stříbrného, vody, ethanolu a 70% kyseliny dusičné. Následovalo několik kroků zahřívání a sušení. Podobně byl připraven i čistý oxid titaničitý. Stříbrné nanočástice připravily redukcí dusičnanu stříbrného s citrátem sodným.⁵⁰ V jejich práci se podařilo detekovat antibiotika difloxacin ze vzorků vody (viz obr. 10).^{50–52}



Obrázek 9: SERS spektra antibiotika difloxacinu ze Songhua řeky pomocí Ag-TiO₂. A) různé vzorky vody, B) různé koncentrace vody

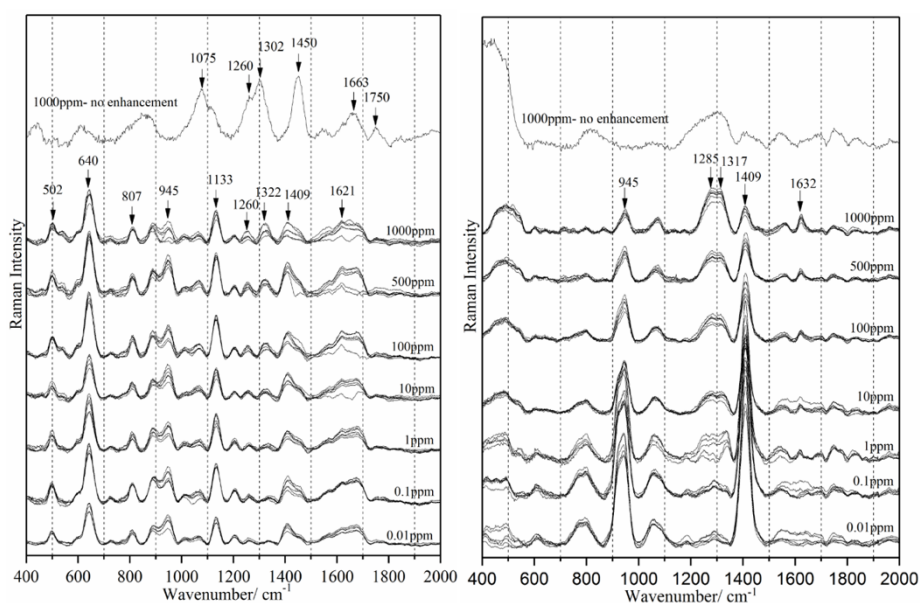
V další práci zaměřující se na detekci antibiotika penicilinu G (PG) ve vodě, využily magnetitové nanočástice s koloidním zlatem (MNP-Au).⁵¹ Na obrázku 11. lze vidět naměřené hodnoty antibiotika pomocí kompozitu s různou velikostí zlatých nanočástic, tedy 37,71 a 102 nm.



Obrázek 10: SERS spektra analytu o koncentraci $10^{-4}M$. A) pevná forma PG, B) MNP-Au(37), C) MNP-Au(71), D) MNP-Au(102)

Dalším příkladem využití SERS ve spojení s antibiotikem je snaha kontroly mléčných produktů, popřípadě dalších potravin.^{53–55} Zaměření na mléčné produkty není náhodné, protože dobytek dostává značné dávky antibiotika tetracyklinu, jak kvůli léčení chorob, tak i pro nutriční důvody. Antibiotikum se pak dostává i do mléčných produktů. To může mít za následek peněžní ztráty pro mlékárenský průmysl.

Větší problém je ale ve zdravotní stránce věci, kdy náchylnější jedinci mohou mít zdravotní potíže a například produkty z dobytku, krmených přísadkou tetracyklinu zvyšují šanci na infekci rezistentní na antibiotika.^{53,54} Pro měření antibiotika byly využity stříbrné nanočástice obalené cyklodextrinem. Nanočástice byly připraveny pomocí β -cyklodextrinu s upraveným pH pomocí NaOH. Roztok se ohřál a za míchání se přidal dusičnan stříbrný.⁵⁴



Obrázek 11: SERS spektra tetracyklinu zleva: roztok tetracyklinu v mléku při různých koncentracích, vodný roztok tetracyklinu při různých koncentracích.

Na obr. 12 lze vidět naměřené výsledky tetracyklinu v roztocích vody a mléka při sedmi různých koncentracích. Antibiotikum je detekovatelné podle píku 1322 respektive 1317 cm^{-1} i pro nejnižší koncentraci 0,01 ppm, které je nižší než povolené množství.⁵⁴

3 Praktická část

3.1 Chemikálie

Dusičnan stříbrný (AgNO_3 , Fagron), amoniak (NH_3 , Sigma-Aldrich, vodný roztok, 28-30%), trihydrát chloridu zlatitého ($\text{AuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, $\geq 99,9\%$), tetrahydroboritan sodný (NaBH_4 , Sigma-Aldrich, $\geq 98,0\%$), dihydrogencitran draselný dihydrát ($\text{KC}_6\text{H}_7\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Lachema n.p.Brno), hydrazin (N_2H_4 , Sigma-Aldrich, 64-65%), dopamin hydrochlorid (Sigma-Aldrich), kyselina L-askorbová (Sigma-Aldrich), poly(dialyldimethylammonium chlorid) (Sigma-Aldrich), polyakrylová kyselina (PAA, Sigma-Aldrich), hydroxid sodný (NaOH , Lach-Ner), kyanografen (GCN), grafen oxid (GO), grafenová kyselina (GA), polystyrenové mikročástice s magnetickým jádrem (Sigma-Aldrich, velikost částic $1 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$), kyselina chlorovodíková (HCl , Penta, 35%) destilovaná voda

3.2 Experimentální vybavení

Pro experimentální část bylo použito následující technické vybavení: pro měření zeta potenciálu byl použit přístroj Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK), pomocí spektrofotometru Specord S600 byla proměřena UV-VIS absorpční spektra (Analytic Jena AG, Německo) kdy se měřilo v rozsahu 350 až 800 nm, pH metr (Eutech Instruments pH 700), elektromagnetická míchačka (Heidolph MR Hei-Mix S), transmisní elektronový mikroskop JEM 2010 (Jeol, Japan), Ramanův spektrometr DXR (Thermo Scientific, USA), vakuová sušárna (Mettler), třepačka (Heidolph Promax 1020), analytické váhy (Kern 770).



Obrázek 12: Přístroje zleva: Zetasizer Nano ZS, Specord S600, DXR Raman.⁵⁶⁻⁵⁸

3.3 Příprava vzorků

3.3.1 Příprava anizometrických nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra (AgNPs) byly připraveny pomocí dvojstupňové redukce amoniakálního komplexu stříbra. Tento komplex byl připraven reakcí dusičnanu stříbrného a amoniaku. Dalším krokem byla dvoustupňová redukce tetrahydridoboritanem sodným a hydrazinem. Do reakční směsi byl přidán i dihydrogencitran draselný dihydrát (citrán). Zásobní roztoky pro přípravu nanočástic stříbra byly připraveny následovně:

- 50 ml roztoku AgNO_3 o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 50 ml roztoku NH_3 o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 50 ml 1% (w/w) roztoku $\text{KC}_6\text{H}_7\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 50 ml roztoku NaBH_4 o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 50 ml roztoku N_2H_4 o koncentraci $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Reakce probíhala za stálého míchání, kdy komponenty byly pipetovány do kádinky podle pořadí v tabulce č. 2. Celkový objem reakční směsi činil 25 ml a výsledná koncentrace stříbra v disperzi byla 108 mg/l.

Tabulka 2: Pořadí a pipetované objemy reaktantů

1	2	3	4	5	6
AgNO_3	NH_3	$\text{KC}_6\text{H}_7\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	H_2O	NaBH_4	N_2H_4
5 ml	1,25 ml	3 ml	11,645 ml	75 μl	4 ml

U takto připravené disperze bylo následně změřeno pH a zeta potenciál. Před měřením pomocí UV-VIS spektroskopu byla disperze 10x naředěna a rozpětí vlnových délek bylo v rozmezí 350 až 800 nm. Hodnota pH koloidního stříbra po přípravě byla 8,14. Z důvodu zamezení deprotonace karboxylové kyseliny ampicilinu byla hodnota pH upravena na 7,07; 6,08; 5,06 a 4,08 pomocí HCl. Takto připravené koloidní stříbro bylo použito pro měření SERS spektra ampicilinu.

3.3.2 Příprava kompozitu na bázi grafenu s mezivrstvou polymeru

Pro měření SERS spekter byl připraven kompozit s mezivrstvou polymeru poly(diallyldimethylammonium chlorid) (PDDA). Prvně se připravil 0,01% zásobní roztok PDDA, kterého se odměřilo 2x25 ml do Erlenmayerových baněk. Do každé baňky byl přidán 1ml disperze kyanografenu (GCN) o koncentraci $15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a směsi byly protřepávány na třepačce po dobu 80 minut. Takto připravené směsi byly 3x centrifugovány po dobu 10 minut při 6000 rpm a pomocí destilované vody se pročistily. Grafen byl následně smíchán s 3x25 ml připravených disperzí anizometrických částic stříbra a směsi byly třepány po dobu 60 minut. Následovalo znovu 3x přečištění pomocí centrifugy. Výsledný kompozit se nechal vysušit při 65°C a tlaku 90 mb.

Další kompozit byl připraven pomocí grafen oxidu (GO). Postup přípravy byl stejný, jako v případě kyanografenu, s tím rozdílem, že se použilo 0,792 ml disperze grafen oxidu o koncentraci $18,94 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Opět následovalo přeměření UV-VIS spekter a kompozit jsem následně sušil při 50°C a tlaku 90 mb.

Prakticky stejný postup byl využit i pro přípravu kompozitu pomocí grafenové kyseliny (GA). Pro přípravu se využilo 0,888 ml disperze grafenové kyseliny s koncentrací $16,9 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Sušení probíhalo při 65°C a tlaku 90 mb.

3.3.3 Příprava magnetického kompozitu se zlatými nanočásticemi

Byl připraven kompozit s magnetickými polystyrenovými mikročásticemi (@mPS-AuNPs). Pro přípravu se použily následující zásobní roztoky:

- 50 ml hydrátu chloridu zlatitého o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 25 ml dopaminu o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 25 ml kyseliny askorbové o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Na přípravu kompozitu se využilo 0,5 ml 5% magnetických polystyrenových mikročástic (mPS), které se smíchaly s 8,0 ml destilované vody. Následně se přidalo 0,5 ml $\text{AuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a reakční směs byla míchána na magnetické míchačce po dobu 3 minut při 500 rpm. Nakonec byla přidána redukční látka - 1 ml roztoku dopaminu, popřípadě kyseliny askorbové a další 3 minuty při 500 rpm byla směs promíchávána. Následně se proměřilo pH a výsledný kompozit byl 3x promyt. Dále se také pořídily snímky z transmisního elektronového mikroskopu (TEM).

3.3.4 Příprava magnetického kompozitu se stříbrnými nanočásticemi

Další kompozit měl totožné magnetické polystyrenové mikročástice s tím rozdílem, že se použily stříbrné nanočástice. Postup přípravy kompozitu je obdobný jako v předchozím případě a byly použity následující zásobní roztoky:

- 50 ml AgNO_3 o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 50 ml roztoku NH_3 o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 25 ml roztoku NaOH o koncentraci $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 25 ml dopaminu o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 25 ml kyseliny askorbové o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

K 0,5 ml mPS se přidalo 8,0 ml destilované vody. Poté se přidalo 0,5 ml AgNO_3 a 0,125 ml roztoku amoniaku. Reakční směs byla promíchávána na magnetické míchače po dobu 3 minut při 500 rpm. Pomocí 0,2 ml NaOH se upravilo pH. Nakonec se přidala 1 ml roztoku kyseliny askorbové, popřípadě dopaminu, jako redukčního činidla. Reakční směs byla míchána další 3 minuty při 500 rpm. Opět se proměřilo pH a 3x promyl kompozit. Rovněž byly pořízeny TEM snímky.

3.3.5 Příprava magnetického kompozitu s polyakrylovou kyselinou

Dalším připraveným typem kompozitu je již výše zmíněný magnetický kompozit se zlatými, popřípadě stříbrnými nanočásticemi s přidavkem polyakrylové kyseliny (PAA) s molární hmotností $15\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ a $w = 35 \%$. K přípravě byly využity následující zásobní roztoky:

- 100 ml 1% (v/v) PAA
- 25 ml $\text{AuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 50 ml AgNO_3 o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 50 ml roztoku NH_3 o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 25 ml dopaminu o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 25 ml kyseliny askorbové o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 25 ml roztoku NaOH o koncentraci $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Do Erlenmayerovy baňky jsem odměřil 50 ml připraveného zásobního roztoku PAA a přidal 2 ml disperze magnetických polystyrenových částic. Tuto směs jsem nechal 1 hodinu protřepávat. Po protřepání jsem směs 3x promyl. Mezi každým promytím byla směs protřepávána alespoň 3 minuty. Směs jsem rozdělil na čtyři stejné části s tím, že dva vzorky určené pro přípravu kompozitu se zlatými nanočásticemi jsem doplnil destilovanou vodou na 8,5 ml a přidal 0,5 ml roztoku $\text{AuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Zbylé dva vzorky pro přípravu kompozitu se stříbrnými nanočásticemi jsem doplnil destilovanou vodou na objem 8,175 ml a přidal 0,5 ml AgNO_3 společně s 0,125 ml roztoku amoniaku. Všechny směsi jsem nechal protřepávat po dobu 30 minut. Dalším krokem bylo přidání redukční látky. V případě zlatých nanočástic jsem přidal 1 ml dopaminu anebo kyseliny askorbové a pro stříbrné nanočástice jsem přidal shodně 1 ml dopaminu nebo kyseliny askorbové a dále 0,2 ml NaOH. Všechny vzorky jsem nechal míchat alespoň 3 minuty při 500 rpm a 3x promyl.

3.3.6 Příprava magnetického kompozitu s PDDA

Kvůli zápornému zeta potenciálu kompozitů byla připravena verze s PDDA polymerem, který značně snižuje jejich zápornou hodnotu. Příprava probíhala podle postupu pro přípravu magnetických kompozitů (viz kapitola 3.3.3 a 3.3.4). Po jejich přípravě se kompozit nechal protřepávat společně s roztokem 0,02% PDDA v poměru 1:1 po dobu 60 minut. Byl proměřen zeta potenciál a pH.

3.3.7 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie

Kompozity a disperze AgNPs byly přeměřeny pomocí SERS. Pro měření byl použit laser 633 nm s výkonem 0,5 až 2 mW, počet skenů 32 s časem 1 s. Nejprve se přeměřila odezva samotného kompozitu, popřípadě disperze AgNPs. Následně bylo měřeno SERS spektrum ampicilinu. K měření se odpipetovalo 50 μl kompozitu polystyrenových mikročástic s naadsorbovanými zlatými nanočásticemi redukovanými kys. askorbovou (mPS-AuNPs) a přidalo se 50 μl ampicilinu o koncentraci $40 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Takto připravený kompozit se nechal 30 minut inkubovat a poté se proměřilo spektrum. Pro měření AgNPs bylo použito 92,6 μl připravených anizometrických nanočástic stříbra o různé hodnotě pH (8,14; 7,07; 6,08; 5,06; 4,08). Dále se přidalo 100 μl ampicilinu o koncentraci $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$

a nakonec 307,4 μl destilované vody. Konečná koncentrace stříbra a ampicilinu byla 20 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Dalším krokem bylo přidání enzymu β -laktamázy. Ke vzorku kompozitu nebo koloidu s ampicilinem se přidalo 5 μl enzymu. Následovalo opět SERS měření, které se uskutečnilo 10 minut po přidavku enzymu a pak se každých 10 minut opakovalo po dobu 90 minut.

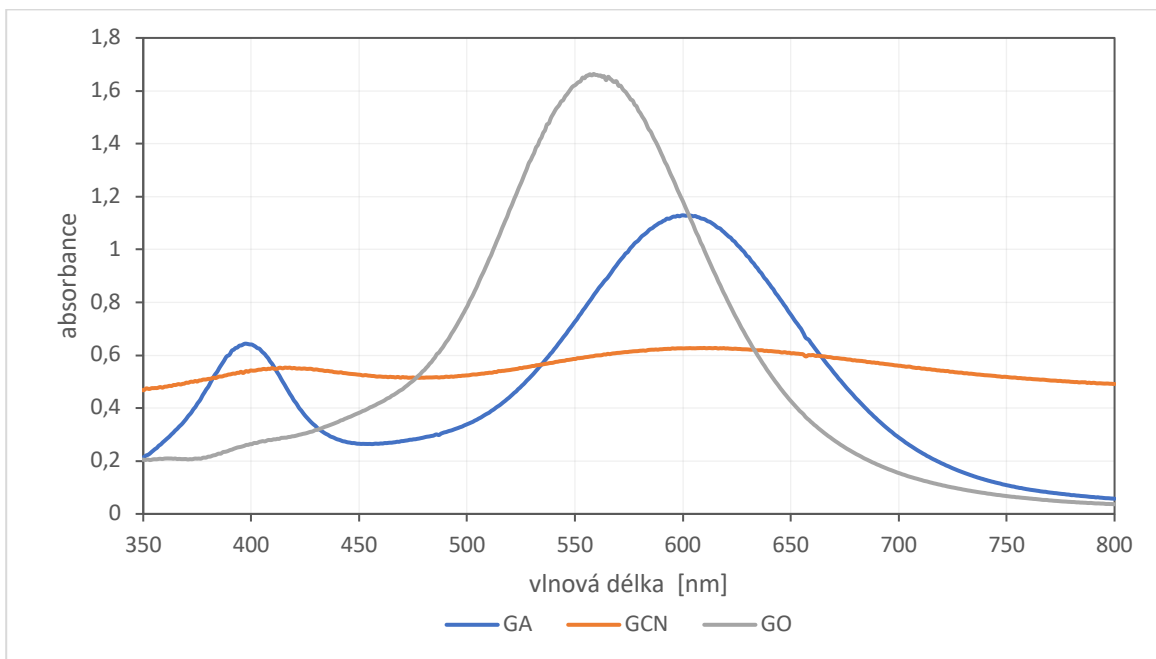
4 Výsledky a diskuze

Pro měření pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie byly připraveny vzorky koloidního stříbra dvoustupňovou redukcí při přidavku 3 ml citranu s různými výslednými hodnotami pH. Jako další byly připraveny kompozity at' už na bázi grafenu, přesněji se jednalo o kompozity s mezivrstvou PDDA s kyanografenem, grafen oxidem a grafenovou kyselinou.

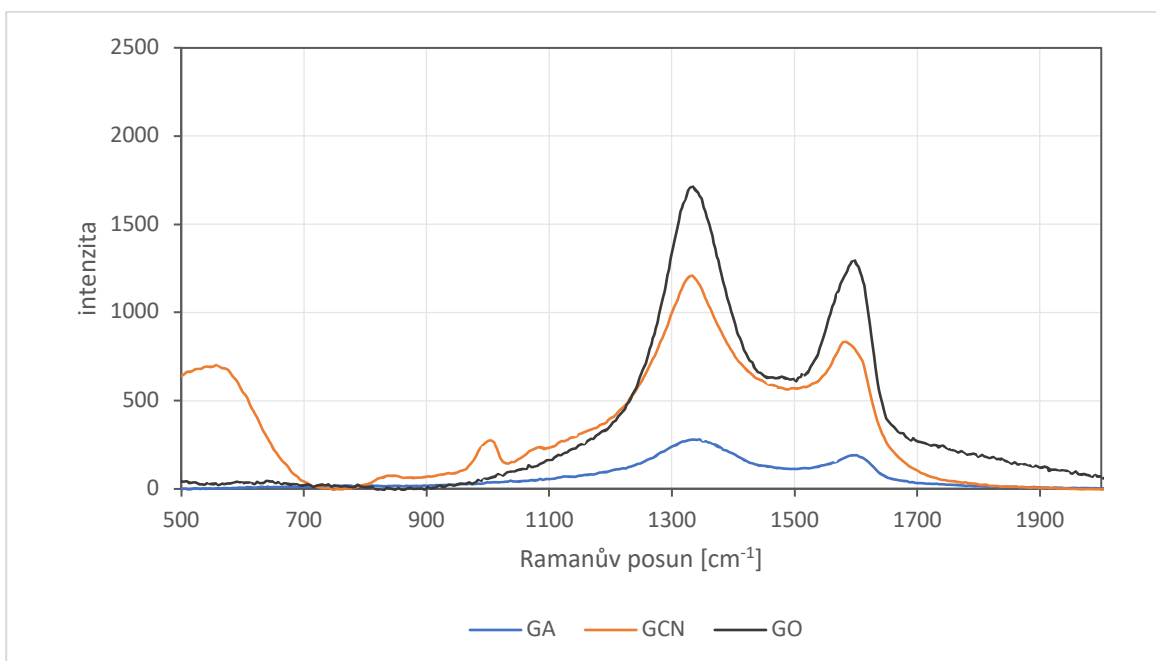
Posledním druhem připravených kompozitů byly na bázi polystyrenových mikročástic s magnetickým jádrem. Tento poslední kompozit byl připraven v několika provedeních, přičemž základní, z kterého se dále vycházelo byl kompozit se zlatými, popřípadě stříbrnými nanočásticemi redukovaných dvěma různými redukčními činidly. Další provedení spočívala v modifikaci postupu pomocí PAA nebo PDDA. K modifikaci pomocí PAA se přistoupilo, kvůli zvýšení počtu nanočástic na polystyrenových mikročásticích. Modifikace pomocí PDDA měla zase za účel snížit hodnotu záporného zeta potenciálu kompozitu a tím pádem docílit lepší adsorpce antibiotika do blízkosti nanočástic, za účelem lepšího zesílení Ramanova signálu. Všechna SERS spektra byla zbavena fluorescence.

4.1 Grafenové kompozity

Nejprve byly připraveny kompozity na bázi grafenu a proměřeny jejich UV-VIS a SERS spektra (viz obr. 14 a 15). Tyto kompozity se ukázaly jako nevhodné pro další kroky charakterizace pomocí měření zeta potenciálů, pH, popřípadě TEM snímků a k naplnění cíle diplomové práce. Jejich nevhodnost byla především v širokém Ramanově spektru, které zakrývá píky β -laktamových antibiotik, a to specificky kolem vlnočtu 1000 a 1600 cm^{-1} . Tyto dva píky jsou charakteristické pro penicilinové antibiotika. Pík při hodnotě vlnočtu 1000 cm^{-1} přísluší vibraci vazby C-C v β -laktamovém kruhu, který je přítomný ve zmíněných antibiotikách. Pík při hodnotě vlnočtu 1600 cm^{-1} zase odpovídá vibraci fenylu. Z těchto důvodů se přešlo k přípravě magnetických polystyrenových kompozitů.



Obrázek 13: Závislost absorbance na vlnové délce pro kompozity GA, GCN a GO



Obrázek 14: SERS spektra kompozitů GA, GCN a GO

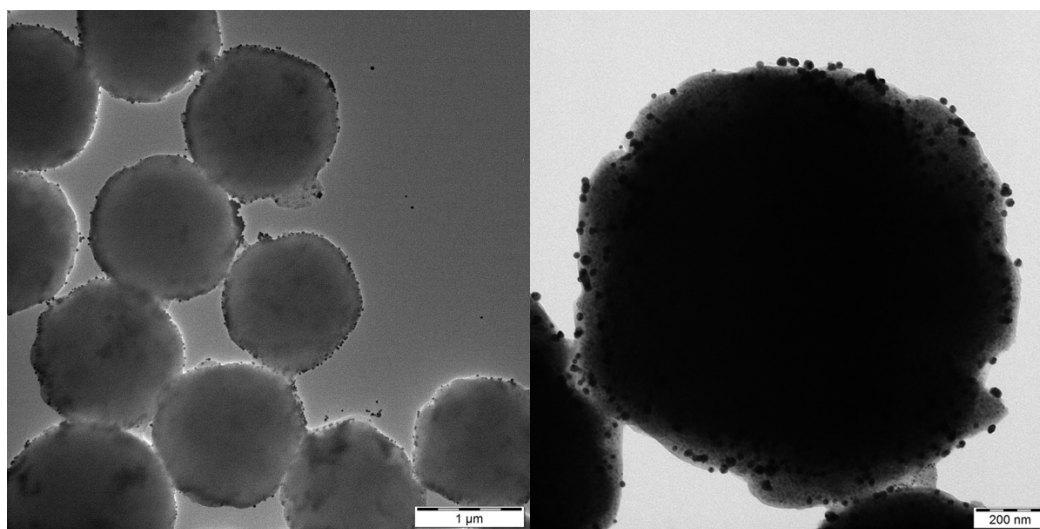
4.2 Magnetické polystyrenové kompozity

Kompozity s magnetickým jádrem se pro použití při detekci v systémech blízcí se skutečné praxi hodí daleko více. Je to hlavně dáno jejich lehkou separací pomocí magnetu. V následující tabulce lze vidět hodnoty pH a zeta potenciálů připravených kompozitů.

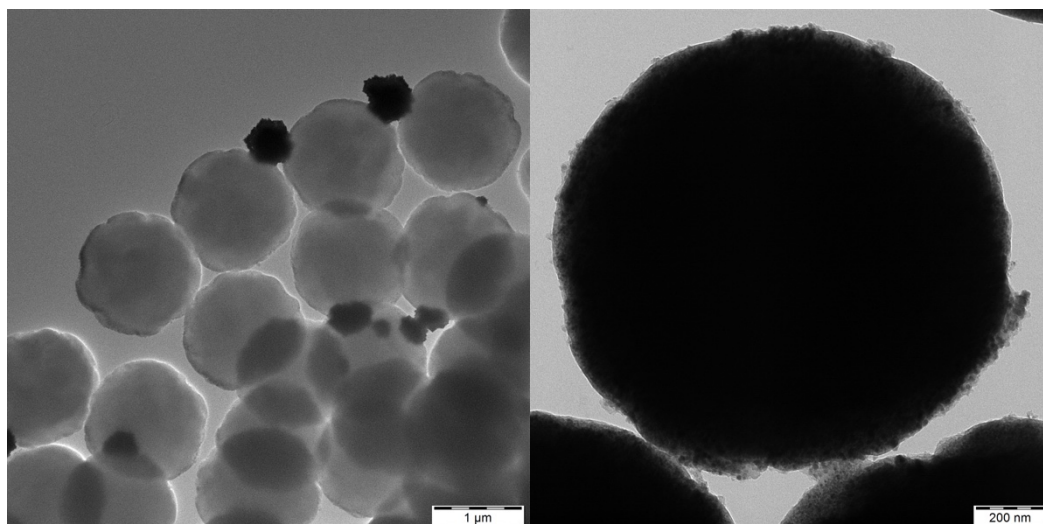
Tabulka 3: Přehled naměřených hodnot pH a zeta potenciálu pro kompozity

redukční činidlo	kompozit	po pročištění	
		pH	Zeta potenciál ζ [mV]
kyselina askorbová	mPS-AuNPs	8,38	-36,4
	mPS-AgNPs	8,08	-44,1
dopamin	mPS-AuNPs	8,40	-54
	mPS-AgNPs	8,08	-39,3

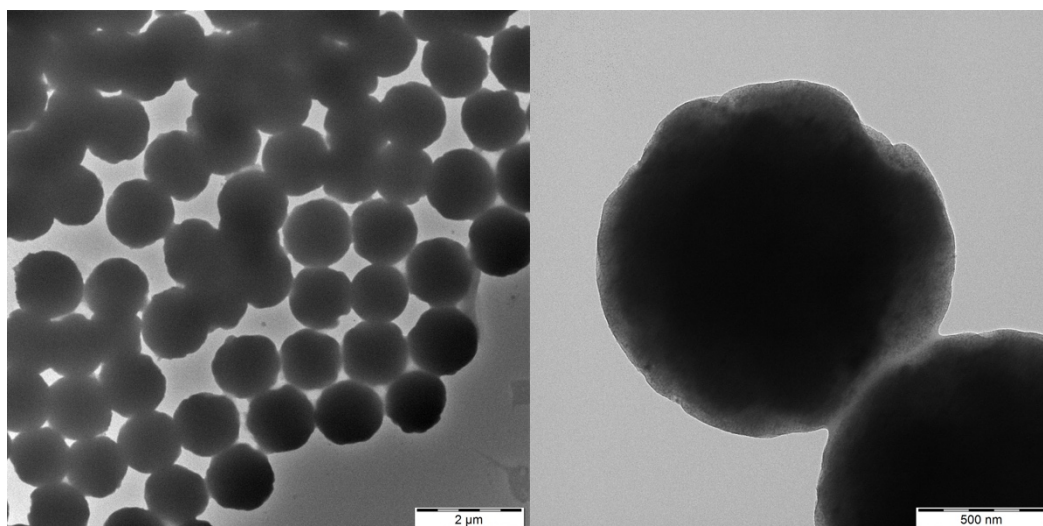
Před měřením SERS spektra antibiotik byly připravené kompozity charakterizovány pomocí TEM. Z těchto snímků se nejlépe jeví kompozit mPS-AuNPs redukováný pomocí kys. askorbové. Důvodem je úspěšné vyredukování částic zlata na povrchu magnetické částice ve větší míře než u ostatních kompozitů.



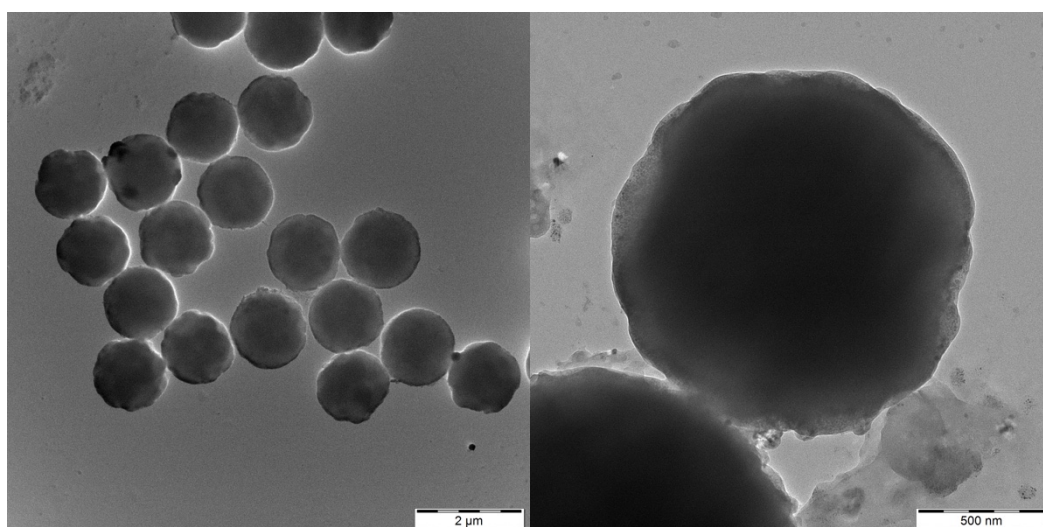
Obrázek 15: TEM snímky mPS-AuNPs redukováné pomocí kys. askorbové



Obrázek 16: TEM snímky mPS-AuNPs redukované pomocí dopaminu



Obrázek 17: TEM snímky mPS-AgNPs redukované pomocí kys. askorbové

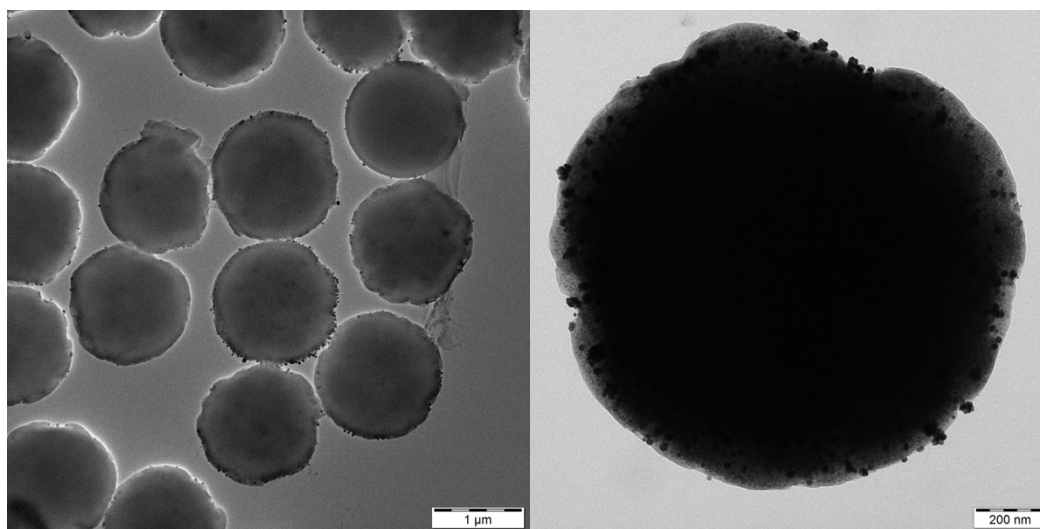


Obrázek 18: TEM snímky mPS-AgNPs redukované pomocí dopaminu

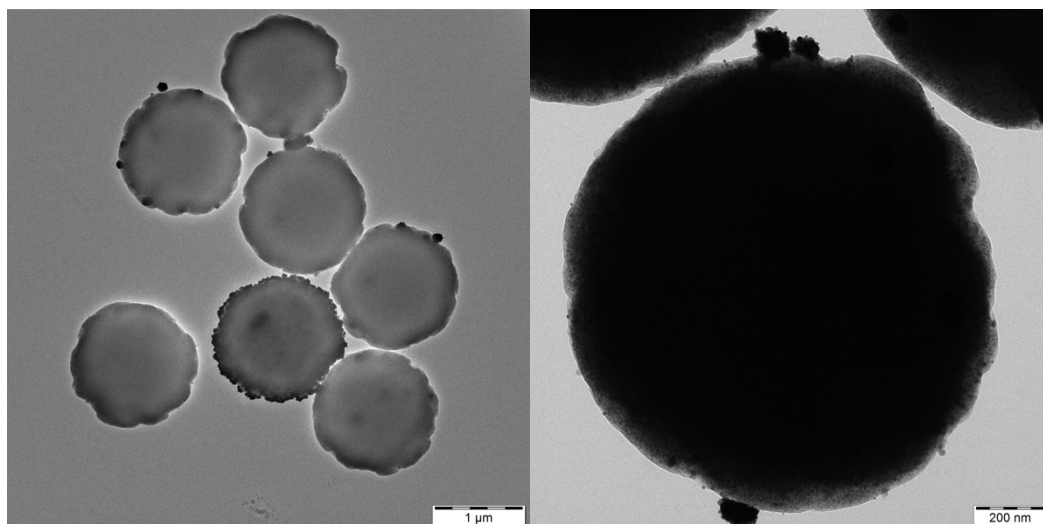
V případě kompozitů stříbra se nepodařilo připravit částice kompozitu s dostatečně pokrytým povrchem nanočásticemi stříbra. Proto se přistoupilo k modifikaci pomocí PAA, která se adsorbuje na povrch magnetické částice a díky zápornému náboji na karboxylu váže stříbrné kationty. Tato modifikace by měla zefektivnit redukci stříbra na povrchu magnetické nanočástice. Na obr. č. 20-23 lze vidět kompozity modifikované pomocí PAA, kde však nelze pozorovat výrazný nárůst počtu nanočástic. Tabulka č. 4 shrnuje naměřené hodnoty pH a zeta potenciálů pro kompozity s PAA.

Tabulka 4: Přehled naměřených hodnot pH a zeta potenciálu pro kompozity s PAA.

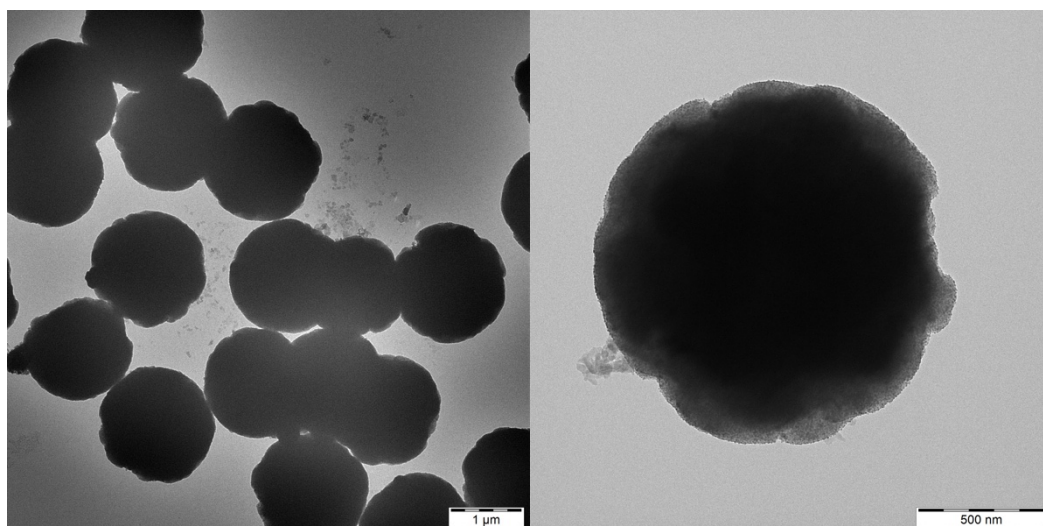
redukční činidlo	kompozity modifikované PAA	po pročištění	
		pH	Zeta potenciál ζ [mV]
kyselina askorbová	mPS-AuNPs	7,84	-54,3
	mPS-AgNPs	7,86	-40,3
dopamin	mPS-AuNPs	7,55	-48,1
	mPS-AgNPs	8,06	-34,9



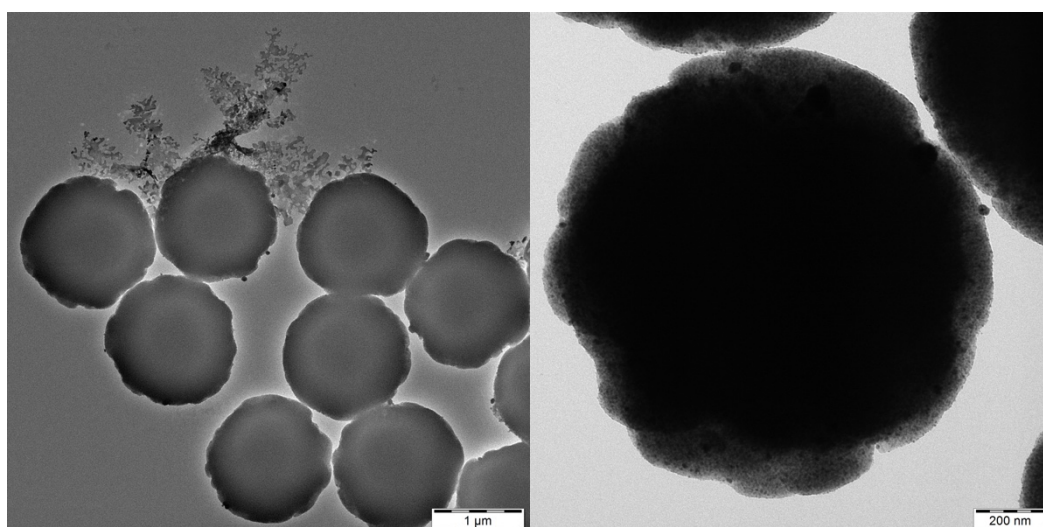
Obrázek 19: TEM snímky mPS-AuNPs redukováné pomocí kys. askorbové a promyté PAA



Obrázek 20: TEM snímky mPS-AuNPs redukované pomocí dopaminem a promyté PAA

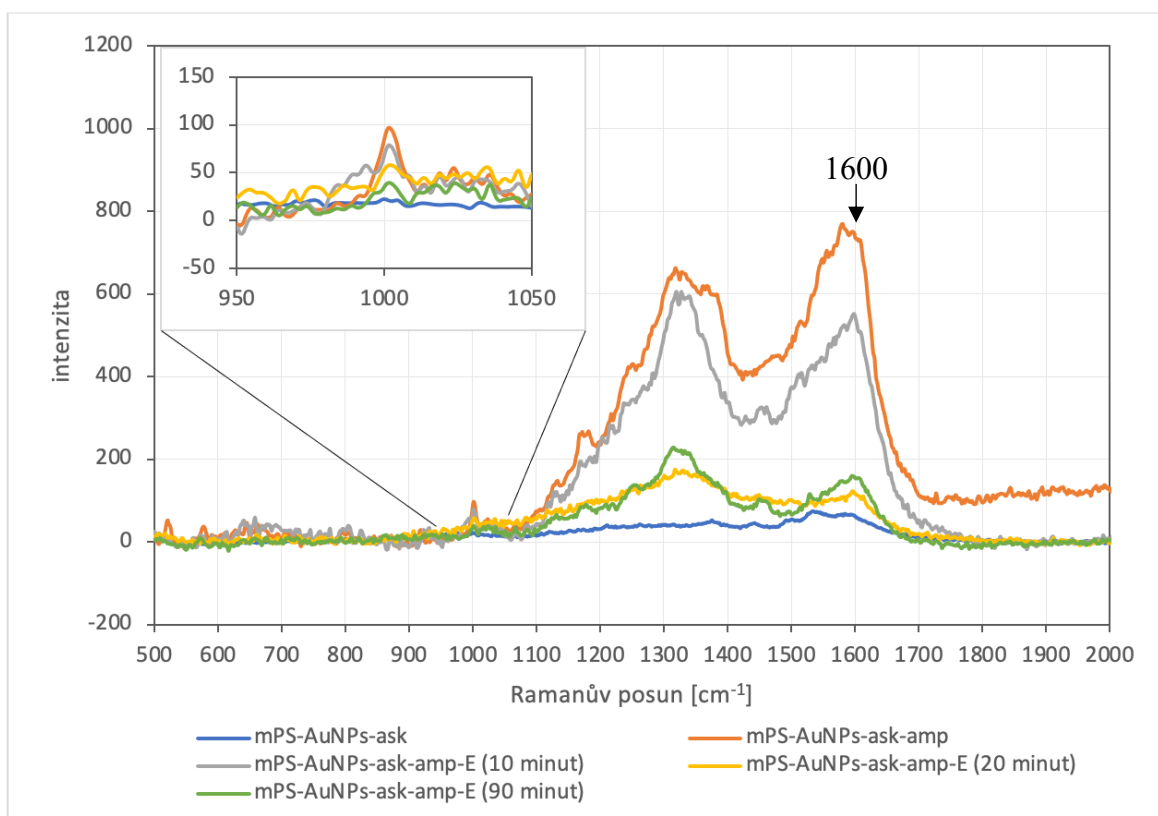


Obrázek 21: TEM snímky mPS-AgNPs redukované pomocí kys. askorbovou a promyté PAA



Obrázek 22: TEM snímky mPS-AgNPs redukované pomocí dopaminu a promyté PAA

Odezva v SERS spektrech samotných kompozitů již byla minimální a na základě pořízených TEM snímků bylo dále pracováno s kompozitem mPS-AuNPs redukováným pomocí kys. askorbové, protože tento kompozit měl největší počet naadsorbovaných nanočástic zlata. K tomuto kompozitu byl přidán ampicilin s dobou inkubace 30 minut před prvním měřením. Získaná spektra lze vidět na obr. 24 kde je záznam spektra samotného antibiotika. Další spektra jsou antibiotikum s přídávkem enzymu. Tyto spektra byly proměřena v 10minutových intervalech. Spektra antibiotika od 20 minut po přidání enzymu se nelišila a nebyla zařazena z důvodu přehlednosti.



Obrázek 23: SERS spektra samotného ampicilinu a po přidavku enzymu na mPS-AuNPs redukované kys. askorbovou

Na základě naměřených spekter bylo možné opakovaně pozorovat přítomnost ampicilinu na základě přítomnosti jeho charakteristického píku při hodnotě vlnočtu 1000 a 1600 cm⁻¹. Po přidání enzymu došlo k poklesu intenzity spektra a ke zmenšení charakteristických píků pro β-laktamová antibiotika, ale nevznikaly žádné nové. Pokles intenzity Ramanova spektra ampicilinu při vlnočtu 1000 cm⁻¹ lze vysvětlit tím, že enzym rozkládal β-laktamový kruh. Očekával se vznik penicilinové kyseliny jakožto produkt hydrolyzy ampicilinu vlivem enzymu, ale žádný nový pík ve spektrech nebyl zaznamenán.

Produkty degradace antibiotika se nepodařilo detekovat. První snaha o změnu tohoto výsledku byla v podobě promytí kompozitu pomocí PDDA, který změnil hodnotu a znaménko zeta potenciál kompozitu.

Tabulka 5: Přehled naměřených hodnot pH a zeta potenciálu pro kompozity s PDDA

redukční činidlo	kompozity modifikované PDDA	po pročištění	
		pH	Zeta potenciál ζ [mV]
kyselina askorbová	mPS-AuNPs	7,89	31,8
	mPS-AgNPs	7,97	41
dopamin	mPS-AuNPs	7,76	29,3
	mPS-AgNPs	7,93	38,7

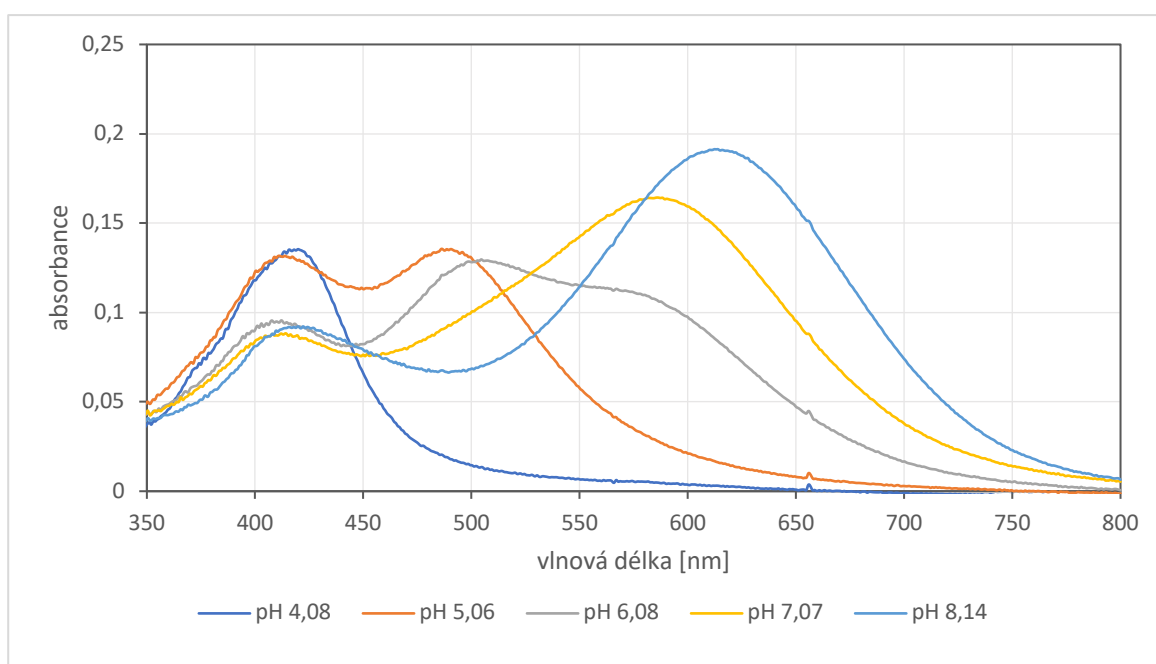
V tabulce č. 5 lze vidět změnu zeta potenciálu. Tato úprava nevedla ke kladným výsledkům, protože i přes to nebylo zaznamenáno žádné spektrum produktu hydrolyzy antibiotika. Další úpravou bylo okyselení kompozitu případně i ampicilinu na pH 4-5 pomocí HCl, kvůli zamezení deprotonace karboxylové kyseliny na ampicilinu, popřípadě penicilinové kyselině, ale opět se nevyskytlo žádné spektrum produktu. Tyto modifikace se prováděly pro zlepšení Ramanského spektra ampicilinu

4.3 Koloidní stříbro

U připravených disperzí koloidního stříbra se proměřilo pH, zeta potenciál a UV-VIS spektrum (viz tabulka č. 6). Takto připravené disperze, se měřily při koncentraci stříbra $20 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pro měření pomocí UV-VIS spekter byly vzorky ještě 10x zředěny do křemenných kyvet. Tyto spektra disperze stříbra lze vidět na obr. č. 25. Naměřená maxima se posouvala k nižším vlnovým délkám se snižujícím se pH, kdy přítomnost částic různých tvarů naznačuje změnu velikostí částic. Hodnota pH koloidního stříbra byla upravena kvůli zamezení deprotonace karboxylové kyseliny ampicilinu. Změna hodnoty pH měla vliv na měření Ramanovských spekter ampicilinu, kdy nejintenzivnější pík při hodnotě vlnočtu 1000 cm^{-1} byl za použití koloidního stříbra s pH 4,08.

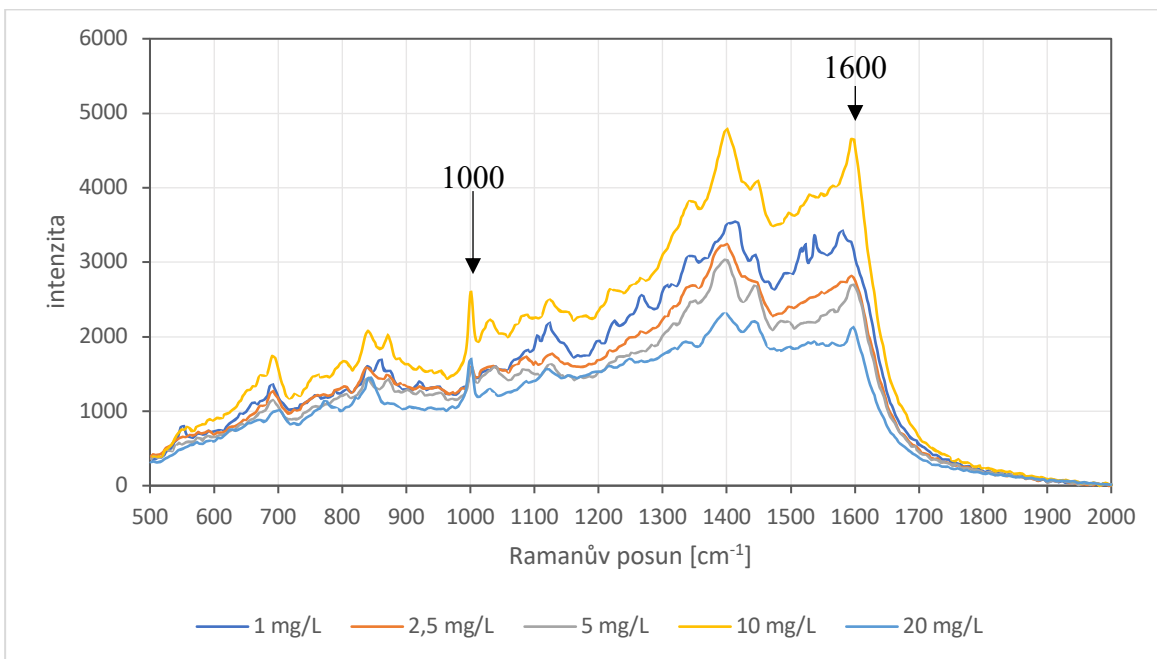
Tabulka 6: Naměřené hodnoty pro připravenou disperzi stříbrných nanočástic s přidavkem 3 ml citranu

pH	Zeta potenciál ζ [mV]	λ [nm]
8,14	-31,5	612,5
7,07	-28,6	586
6,08	-25,7	504,5
5,06	-25,0	486,5
4,08	-22,5	420



Obrázek 24: Závislost absorbance na vlnové délce pro koloidní stříbro s přidavkem 3 ml citranu o různém pH

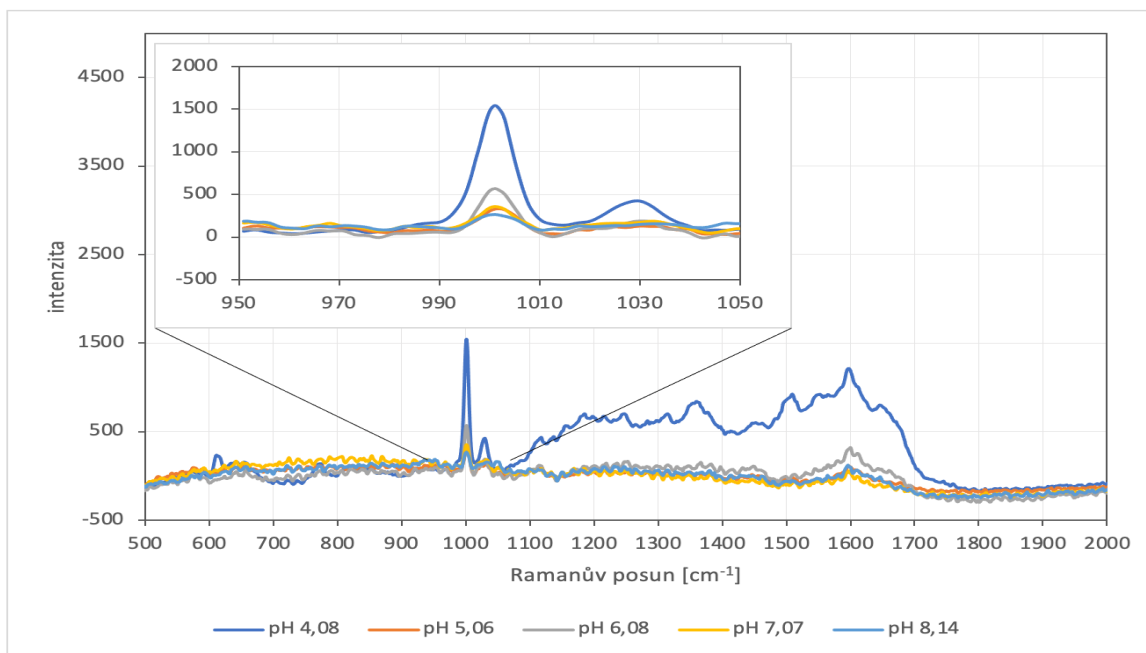
Pro vyzkoušení schopnosti detekce ampicilinu byla připravena řada o různých koncentracích, kdy nejvyšší byla $20 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ a nejnižší $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Takto připravený ampicilin byl přidán ke koloidnímu stříbru a proměřila se SERS spektra (viz obr. 26). Ampicilin byl detekován při všech koncentracích na základě přítomnosti píků u 1000 a 1600 cm^{-1} .



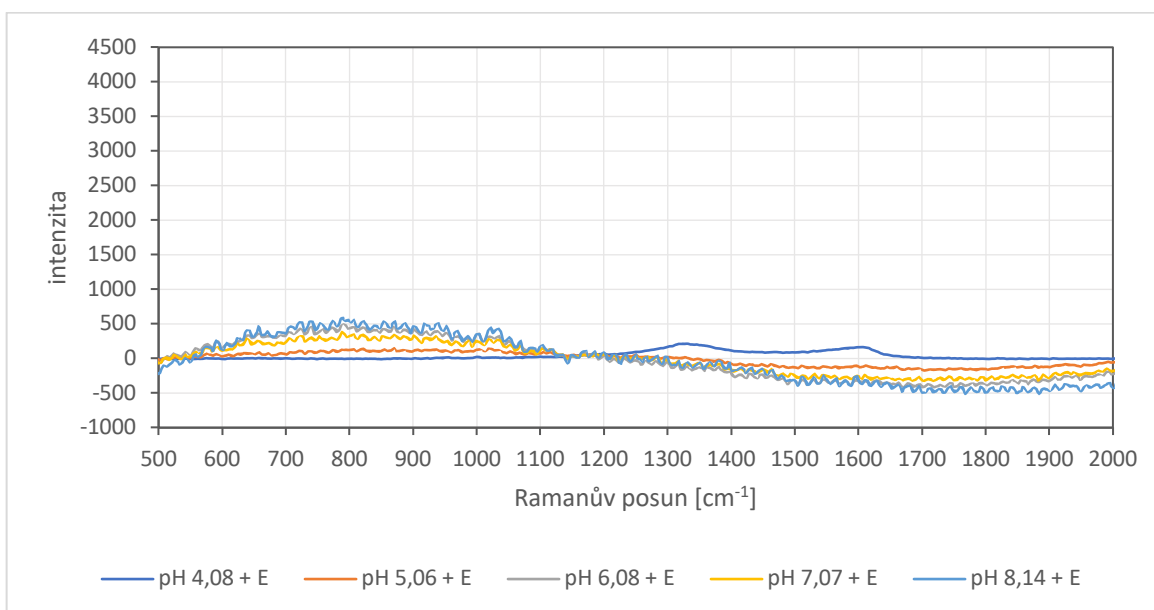
Obrázek 25: SERS spektra ampicilinu o různé koncentraci pomocí koloidního stříbra

4.3.1 Přídavek enzymu ke koloidnímu stříbru

K disperzi koloidního stříbra bylo přidáno 5 μl enzymu a následně bylo změřeno SERS spektrum. I když byl okamžitě viditelný pokles hodnoty intenzity píku antibiotika při 1000 cm^{-1} , ani v tomto případě nebyly detekovány produkty rozkladu antibiotika. Pro zvrácení tohoto jevu u koloidního stříbra byla připravena řada s ampicilinem o různé hodnotě pH disperze stříbra a byla zaznamenána SERS spektra (viz obr. 27). Tato úprava měla vliv při měření samotného ampicilinu, ale neodrazila se při měření produktu rozkladu. U vzorku s hodnotou pH 4,08 byla naměřena nejvyšší intenzita antibiotika, která je pozorovatelná při 1000 cm^{-1} . Žádné produkty rozkladu nebyly detekovány (viz obr. 28).



Obrázek 26: SERS spektra ampicilinu o různém pH



Obrázek 27: SERS spektra ampicilinu o různém pH po přidavku enzymu

Podle spekter lze pozorovat, že se povedlo zachytit a změřit přítomnost ampicilinu, což bylo několikrát v průběhu měření zopakováno s disperzemi stříbra o různém pH tak i s různou koncentrací antibiotika. Přítomnost a účinek β -laktamázy lze dokázat pouze nepřímou, zánikem charakteristických píků antibiotika, což bylo také opakovaně změřeno. Na základně článku od *Fargašové, A.*⁵⁹ bylo vyzkoušeno i přidání chloridových iontů pro agregaci nanočástic stříbra a jejich aktivaci. Žádný krok neměl vliv na měření a spektrum produktu nebylo zaznamenáno.

5 Závěr

Cílem práce bylo detekovat β -laktamázu, tedy enzym produkovaný bakteriemi, které jsou rezistentní na β -laktamová antibiotika. Tento enzym má za následek hydrolyzu β -laktamového kruhu ve struktuře antibiotik a jeho rozpad vyúsťuje ve ztrátu antibakteriálních vlastností antibiotik. V práci bylo zkoumáno β -laktamové antibiotikum ampicilin, které je jedno z nejpoužívanějších antibiotik vůbec.

Pro detekci bylo připraveno několik kompozitů jakožto substrátů pro povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii. První byly kompozity na bázi grafenu, tedy grafen oxid, grafenová kyselina a kyanografen s obsahem nanočástic stříbra. Tyto kompozity se prokázaly jako nevhodné pro další měření a detekci kvůli své odezvě na SERS spektrech, kdy částečně zakrývaly píky samotného antibiotika, a mohly by zakrývat případně jiné vznikající píky produktů. Další kompozity byly připraveny pomocí polystyrenových mikročástic s magnetickým jádrem a zlatými, respektive stříbrnými nanočásticemi redukovanými kyselinou askorbovou nebo dopaminem.

Takto připravené kompozity byly modifikovány pomocí PAA pro získání většího množství vyredukovaných nanočástic na povrchu polystyrenové mikročástice. Tato modifikace neměla podle TEM snímků velký vliv na počet navázaných nanočástic. Pro měření SERS spekter antibiotika se dále používal jen kompozit polystyrenových magnetických mikročástic se zlatými nanočásticemi redukovanými kys. askorbovou. Tento kompozit byl vybrán, protože měl největší množství vyredukovaných nanočástic na povrchu. Po přidání ampicilinu ke kompozitu byly naměřeny píky v SERS spektru u 1000 a 1600 cm^{-1} , což jsou píky odpovídající přítomnosti β -laktamového antibiotika. Následné přidání enzymu se odrazilo na snížení intenzity nebo zcela vymizení těchto píků. Tento jev je důsledkem hydrolyzy β -laktamového kruhu pomocí enzymu. Žádné spektrum produktu rozpadu antibiotika nebylo zaznamenáno.

Byla také vyzkoušena modifikace pomocí polymeru PDPA, který snižoval hodnotu záporného zeta potenciálu kompozitu, ovšem opět bez prokazatelných spekter produktu. Okyselení kompozitu mělo za cíl zamezit deprotonaci karboxylové kyseliny ampicilinu, popřípadě penicilinové kyseliny a dopomoci tak produktu, aby se udržel v blízkosti nanočástic. Tento postup se také ukázal jako nepříliš efektivní.

Ampicilin se detekoval i v přítomnosti anizometrických stříbrných nanočástic, které byly připraveny dvoustupňovou redukcí s přídavkem 3 ml citranu. Koloidní stříbro se podobně jako kompozity prokázalo jako vhodné pouze pro měření spekter antibiotika. Po přidání enzymu opět nebyly detekovány žádné jiné píky. U koloidního stříbra se měnila hodnota pH opět z důvodu zamezení deprotonace. Tato změna měla vliv pouze na měření ampicilinu, přičemž nejintenzivnější pík byl u hodnoty pH 4,08. Pro pokračování v detekci β -laktamázy je zapotřebí se soustředit na podmínky měření jako je například pH, kdy se ukázalo, že právě změna pH má vliv na Ramanovská spektra ampicilinu.

6 Summary

The main goal of my master's thesis was detection of β -lactamases. These enzymes produced by bacteria are resistant to β -lactam antibiotics. Enzyme causes hydrolysis of β -lactam ring in the structure of the named antibiotics. Degradation of this ring results in a loss of antibacterial properties. In this work the focus was on ampicillin as one of the most used antibiotics at all.

Few composites were prepared for detection as substrates for surface enhanced Raman spectroscopy. First of them were composites based on graphene, in particular graphene oxid, graphene acid and cyanographene with silver nanoparticles. All these composites proved to be not usable for further analysis and use in detection of antibiotics. This was mainly because of broad SERS spectrum of composites alone. These peaks would hide peaks of antibiotics and future possible products. Additional composites based on polystyrene microparticles containing magnetic core with silver or gold nanoparticles on surface reduced by ascorbic acid or dopamine were prepared.

Modification with PAA was used for further improvement of nanoparticles amount on surface of microparticles. This step did not have any significant impact according to TEM images. For measurement of SERS spectra of antibiotic was used composite of polystyrene microparticles with adsorbed gold nanoparticles reduced by ascorbic acid. This composite had the most adsorbed nanoparticles. With addition of ampicillin, I was able to measure SERS peaks at around 1000 and 1600 cm^{-1} . These are characteristic peaks of β -lactam antibiotic. The addition of enzyme resulted in diminishing of peaks intensities due to enzymatic hydrolysis of the ring. No products spectrum of antibiotic degradation was measured.

Modification with PDDA was used which caused to decrease negative value of zeta potential, but without any change in SERS. Acidification of composite was supposed to preclude deprotonation of carboxylic acid of ampicillin or penicilloic acid and keep the product in close distance of nanoparticles. This method proved to be not very effective.

Ampicillin was detected using anisometric silver nanoparticles which were prepared by two step reduction with addition of 3 ml of potassium citrate. Colloidal silver same as composites were suitable only for measurement of antibiotics. Addition of enzyme did result again in no observable peaks of product. In colloidal silver was also effort to change pH

because of deprotonation. This effort had impact only on detection of ampicillin where the highest intensity of antibiotic peaks was at pH 4,08. It is necessary for future work in detection of β -lactamases to focus on measurement conditions. The focus should be put for example on pH because the change in pH value have impact on Raman spectra of ampicillin.

7 Literatura

1. Bacteria Culture Test. (2020). Dostupné na: <https://medlineplus.gov/lab-tests/bacteria-culture-test/>. (Viděno: 3. Dubna 2021)
2. Han, Y. Y. *et al.* Rapid antibiotic susceptibility testing of bacteria from patients' blood via assaying bacterial metabolic response with surface-enhanced Raman spectroscopy. *Sci. Rep.* **10**, (2020).
3. Burnham, C.-A. D., Leeds, J., Nordmann, P. & Patel, J. *Diagnosing antimicrobial resistance*. (2017). doi:10.1038/nrmicro.2017.103
4. Kvítek, L. & Panáček, A. *Základy koloidní chemie*. (2007).
5. Kvítek, L. *Metody studia koloidních soustav*. (2006).
6. Khan, I., Saeed, K. & Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* **12**, 908–931 (2019).
7. Lidmila, B. & Marie, Š. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. (2005).
8. Lidmila, B. & Marie, Š. Modely elektrické dvojvrstvy. (2005). Dostupné na: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/modely_elektricke_dvojvrstvy.html. (Viděno: 24. Března 2021)
9. Holubová, R. *Základy reologie a reometrie kapalin*. (2014).
10. Kvítek, O., Slepíčka, P., Lyutakov, O. & Švorčík, V. Nanostruktury zlata: příprava, vlastnosti a vybrané aplikace. (2016).
11. Horikoshi, S. & Serpone, N. *Introduction to Nanoparticles*. (2013).
12. Ru, E. Le & Etchegoin, P. *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects*. (2009).
13. Lidmila, B. & Marie, Š. Rayleighova rovnice pro rozptyl světla. Dostupné na https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/rayleighova_rovnice_pro_rozptyl_svetla.html. (Viděno: 12. Května 2021)
14. Optické vlastnosti koloidních soustav. Dostupné na: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/texty-ulohy-uvod.pdf>. (Viděno: 12. Května 2021)
15. Vojtěch, D. *Kovové materiály*. (2006).

16. Pelánová, M. Vlastnosti biokompozitů na bázi lněných vláken. (2015).
17. Yan, X. *et al.* Magnetic Polystyrene Nanocomposites Reinforced with Magnetite Nanoparticles. (2014). doi:10.1002/mame.201300208
18. Mohammadi, L. *et al.* Polystyrene Magnetic Nanocomposites as Antibiotic Adsorbents. doi:10.3390/polym12061313
19. Ates, B., Koytepe, S., Ulu, A., Gurses, C. & Thakur, V. K. Chemistry, structures, and advanced applications of nanocomposites from biorenewable resources. *Chem. Rev.* (2020). doi:10.1021/acs.chemrev.9b00553
20. Sir Alexander Fleming - Biographical. Dostupné na: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/fleming/biographical/>. (Viděno: 27. Prosince 2020)
21. Antibiotic Resistance. Dostupné na: <https://www.bcm.edu/departments/molecular-virology-and-microbiology/emerging-infections-and-biodefense/antibiotic-resistance>. (Viděno: 27. Prosince 2020)
22. Neelanjana, P. & Cascella, M. Beta-lactam antibiotics. 79–117 (2021). Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/>. (Viděno: 1. Února 2021)
23. Fuda, C., Suvorov, M., Vakulenko, S. B. & Mobashery, S. The Basis for Resistance to β -lactam Antibiotics by Penicillin-binding Protein 2a of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* (2004). doi:10.1074/jbc.M403589200
24. Rice, L. B. Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to β -lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. in *Mayo Clinic Proceedings* 198–208 (2012). doi:10.1016/j.mayocp.2011.12.003
25. Sedláková, M. H. Klinický význam širokospektrých beta-laktamáz. (2015).
26. Moravcová, J. *Sacharidy a jejich konjugáty*.
27. Ferreira, A. L. O., Giordano, R. L. C. & Giordano, R. C. Improving Selectivity and Productivity of the Enzymatic Synthesis of Ampicillin with Immobilized Penicillin G Acylase. (2004).
28. Ampicillin. Dostupné na: <https://www.longdom.org/scholarly/ampicillin-journals-articles-ppts-list-1211.html>. (Viděno: 14. Února 2021)

29. Toršová, V. & Medková, Z. *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamydia pneumoniae*: původci respiračních infekcí a jejich vztah k některým chronickým onemocněním. *Interní medicína pro praxi* 13–18 (2001).
30. Garcia, L. Beta-Lactamase Tests. *Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd Edition* (2010). doi:10.1128/9781555817435.ch5.3
31. Llanes, R. *et al.* Evaluation of Four Methods for Detecting the Beta-lactamase Activity in *Neisseria gonorrhoeae* Isolated in Cuba. (2003).
32. Kelley, S. O. New Technologies for Rapid Bacterial Identification and Antibiotic Resistance Profiling.
33. Tang, S. S., Apisarnthanarak, A. & Hsu, L. Y. Mechanisms of β -lactam Antimicrobial Resistance and Epidemiology of Major Community- and Healthcare-associated Multidrug-resistant Bacteria. (2014). doi:10.1016/j.addr.2014.08.003
34. Zeng, X. & Lin, J. Beta-lactamase Induction and Cell Wall Metabolism in Gram-negative Bacteria. *Front. Microbiol.* (2013). doi:10.3389/fmicb.2013.00128
35. Soto, S. M. Role of Efflux Pumps in the Antibiotic Resistance of Bacteria Embedded in a Biofilm. *Virulence* 223–229 (2013). doi:10.4161/viru.23724
36. Gabriela Rotková & Kopecká, J. Makroskopické a mikroskopické pozorování mikroorganismů, Gramovo barvení. (2017). Dostupné na: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/pozorovani_mikroorganizmu.html. (Viděno: 2. Února 2021)
37. Guillot, N. & de la Chapelle, M. L. The Electromagnetic Effect in Surface Enhanced Raman Scattering: Enhancement Optimization using Precisely Controlled Nanostructures. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 2321–2333 (2012). doi:10.1016/j.jqsrt.2012.04.025
38. Blackie, E. J., Le Ru, E. C. & Etchegoin, P. G. Single-molecule surface-enhanced raman spectroscopy of nonresonant molecules. (2009). doi:10.1021/ja905319w
39. Coronado, E. A., Encina, E. R. & Stefani, F. D. Optical Properties of Metallic Nanoparticles: Manipulating Light, Heat and Forces at the Nanoscale. doi:10.1039/c1nr10788g

40. Wang, L., Hasanzadeh Kafshgari, M. & Meunier, M. Optical Properties and Applications of Plasmonic-Metal Nanoparticles. *Advanced Functional Materials* (2020). doi:10.1002/adfm.202005400
41. Raman scattering. Dostupné na: https://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/raman/raman_scattering.php. (Viděno: 26. Ledna 2021)
42. Stokes and anti-Stokes scattering Dostupné na: <https://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/raman/stokes.php>. (Viděno: 26. ledna 2021)
43. Moura, C. C., Tare, R. S., Oreffo, R. O. C. & Mahajan, S. Raman Spectroscopy and Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Imaging: Prospective Tools for Monitoring Skeletal Cells and Skeletal Regeneration. (2016). doi:10.1098/rsif.2016.0182
44. Wei, H. & Xu, H. Hot Spots in Different Metal Nanostructures for Plasmon-Enhanced Raman Spectroscopy. (2013). doi:10.1039/c3nr02924g
45. Kučková, Š. *et al.* Techniky a aplikace povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie se zaměřením na umělecká díla. *Chem. List.* 312–316 (2018).
46. Smith, E. & Dent, G. *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach.* (2005).
47. Hong, Y., Huh, Y. M., Yoon, D. S. & Yang, J. Nanobiosensors based on localized surface plasmon resonance for biomarker detection. *J. Nanomater.* (2012). doi:10.1155/2012/759830
48. Jiang, J. *et al.* Rapid and Sensitive Detection of Uranyl Ion with Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles by the Surface-Enhanced Raman Scattering Technique. *R. Soc. Open Sci.* (2018). doi:10.1098/rsos.181099
49. Ankamwar, B. & Gharpure, S. Gold and Silver Nanoparticles used for SERS Detection of *S. aureus* and *E. coli*. (2020). doi:10.1088/2632-959X/ab85b4
50. Wang, W. *et al.* Detection of Several Quinolone Antibiotic Residues in Water Based on Ag-TiO₂ SERS Strategy. (2019).
51. Pinheiro, P., Fateixa, S. & Trindade, T. SERS Detection of Penicillin G Using Magnetite Decorated with Gold Nanoparticles. *Magnetochemistry* (2017). doi:10.3390/magnetochemistry3040032

52. Yiin Hong, K., Diego Lima de Albuquerque, C., Poppi, R. J. & Brolo, A. G. Determination of Aqueous Antibiotic Solutions using SERS Nanogratings. (2017). doi:10.1016/j.aca.2017.05.025
53. Marques, A. *et al.* Paper-Based SERS Platform for One-Step Screening of Tetracycline in Milk. *Sci. Rep.* **9**, 1–8 (2019).
54. Dhakal, S. *et al.* A Simple Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Method for on-Site Screening of Tetracycline Residue in Whole Milk. (2018). doi:10.3390/s18020424
55. Andreou, C., Mirsafavi, R., Moskovits, M. & Meinhart, C. D. Detection of Low Concentrations of Ampicillin in Milk. *Analyst* (2015). doi:10.1039/c5an00864f
56. Zetasizer Nano – Laboratory of Food and Soft Materials. Available at: <https://fsm.ethz.ch/facilities/malvern-zetasizer-nano-zs.html>. (Accessed: 26th April 2021)
57. UV-Visible Spectrometer. Dostupné na: <https://www.medicalexpo.com/prod/analytik-jena/product-83550-547575.html>. (Viděno: 21. Dubna 2021)
58. DXR Raman Microscope. Dostupné na: <https://www.labcompare.com/555-Raman-Microscope-Confocal-Raman-Microscopes/3721373-DXR-Raman-Microscope/>. (Viděno: 1. Května 2021)
59. Fargašová, A. *et al.* Influence of Various Chloride Ion Concentrations on Silver Nanoparticle Transformations and Effectiveness in Surface Enhanced Raman Scattering for Different Excitation Wavelengths. (2015). doi:10.1039/c4ra13881c