VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ZLATÉ NANOSYSTÉMY PRO DETEKCI MOLEKUL POMOCÍ POVRCHOVĚ ZESÍLENÉHO RAMANOVA ROZPTYLU (SERS)

GOLD NANO SYSTEMS FOR THE DETECTION OF MOLECULES USING SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING (SERS)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE — Bc. Markéta Benešová

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — Ing. Petra Skoumalová, Ph.D.

SUPERVISOR

BRNO 2022

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání diplomové práce

Číslo práce:	FCH-DIP1635/2021	Akademický rok: 2021/22
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Studentka:	**Bc. Markéta Benešová**	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace	
Vedoucí práce:	**Ing. Petra Skoumalová, Ph.D.**	

Název diplomové práce:

Zlaté nanosystémy pro detekci molekul pomocí povrchově zesíleného Ramanova rozptylu (SERS)

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Výroba zlatých nanosystémů pro SERS a kontrola jejich funkce
3. Měření zesílených Ramanových spekter molekul pomocí zlatých nanosystémů
4. Vyhodnocení a interpretace výsledků detekce molekul prostřednictvím SERS

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Markéta Benešová studentka	Ing. Petra Skoumalová, Ph.D. vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Tato diplomová práce byla zaměřena na výrobu a využití zlatých nanosystémů k zesílení Ramanova rozptylu. Kovové nanočástice při interakci s elektromagnetickým zářením vytváří tzv. lokalizované plazmony, které mají schopnost zesílit Ramanův rozptyl.

SERS (povrchem zesílený Ramanův rozptyl) je nedestruktivní analytická technika, která byla v této práci použita k měření koncentrace a chemických změn v molekule rhodaminu B. Rhodamin B byl před měřením podroben fotokatalytické degradaci za pomoci dvou typů fotokatalyzátorů: TiO_2-(H) a TiO_2-(H)-Ag. Byla hledána kvantitativní závislost fotodegradace rhodaminu B na přítomnosti fotokatalyzátorů ve stanoveném časovém úseku, pomocí fotodegradačních procesů. Výsledky z měření pomocí metody SERS byly porovnány s výsledky získanými UV-VIS spektroskopií.

Z naměřených dat bylo zjištěno, že fotokatalyzátory výrazně urychlují fotodegradační procesy, protože Ramanův signál rhodaminu B klesal, přičemž pokles signálu byl nejvýraznější pro katalyzátor s přídavkem TiO_2-(H)-Ag, méně výrazný, ale stále statisticky významný pokles signálu byl pozorován pro katalyzátor bez přídavku TiO_2-(H), zatímco v kontrolním vzorku bez fotokatalyzátoru nebyl pokles signálu pozorován.

V další fázi diplomové práce byl navržen sendvičový imunotest, který využívá SERS k detekci bakterie *E. coli*, nebo jiných specifických mikroorganismů ve vzorku. První složkou sendvičového imunotestu jsou zlaté nanočástice, které nesou tzv. Ramanův reportér, který má zřetelnou Ramanovskou odezvu ve spektru a zlaté nanočástice tento signál zesilují, a protilátky, díky nimž se částice specificky váže na mikroorganismus. Další složkou jsou buď pozlacená sklíčka nebo magnetické nanočástice, které jsou modifikovány protilátkami a slouží imobilizaci mikroorganismů. Tento systém může být rychlou a velmi přesnou cestou, jak identifikovat daný mikroorganismus ve vzorku.

Klíčová slova

SERS, zlaté nanočástice, zlaté nanostrukturované povrchy, lokalizované plazmony, rhodamin B, detekce bakterií

Abstract

This diploma thesis was focused on the production and use of gold nanosystems to enhance Raman scattering. Metal nanoparticles, when interacting with electromagnetic radiation, form so-called localized plasmons, which can enhance Raman scattering.

SERS (surface-enhanced Raman scattering) is a non-destructive analytical technique used in this work to measure the concentration and chemical changes in the rhodamine B molecule. Rhodamine B was subjected to photocatalytic degradation using two types of photocatalysts before measurement: TiO_2-(H) and TiO_2-(H)-Ag. The quantitative dependence of rhodamine B photodegradation on the presence of photocatalysts in a given period time was sought using photodegradation processes. The results of measurements using the SERS method were compared with the results obtained by UV-VIS spectroscopy.

From the measured data, it was found that the photocatalysts significantly accelerate the photodegradation processes, because the Raman signal of rhodamine B decreased, while the signal decrease was most pronounced for the catalyst with added TiO_2-(H)-Ag, less prominent but still statistically significant signal decrease was observed for the TiO_2-(H) catalyst. In the control sample without the addition of photocatalyst, no decrease in signal was observed.

In the next phase of the thesis, a sandwich immunoassay was designed that uses SERS to detect *E. coli* bacteria or other specific microorganisms in the sample. The first component of the sandwich immunoassay is gold nanoparticles, which carry a so-called Raman reporter, which has a clear Raman response in the spectrum, and gold nanoparticles amplify this signal, and antibodies, thanks to which the particles specifically bind to the microorganism. Another component is either gold layered slides or magnetic nanoparticles, which are modified with antibodies and serve to immobilize microorganisms. This system can be a fast and very accurate way to identify a given microorganism in a sample.

Keywords

SERS, gold nanoparticles, gold nanostructured surfaces, localized plasmons, rhodamine B, bacterial detection

BENEŠOVÁ, Markéta. *Zlaté nanosystémy pro detekci molekul pomocí povrchově zesíleného Ramanova rozptylu (SERS)* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-05]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138754. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petra Skoumalová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT

.....

podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych zde poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Petře Skoumalové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a vstřícnost, kterou mi věnovala při zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala svému odbornému konzultantovi Mgr. Zdeňku Pilátovi, Ph.D. za možnost konzultace výsledků, odborné vedení v laboratoři a veškerý čas, který mi věnoval. V neposlední řadě patří mé velké poděkování mé rodině, přátelům a kolegům v laboratoři i mimo ni, kteří mě podporovali během celého mého studia. Zvlášť chci poděkovat také kolegovi Mgr. Martinu Kizovskému za obrázky do mé diplomové práce a pomoc v laboratoři.

OBSAH:

1 ÚVOD 9

2 CÍLE PRÁCE 10

3 TEORETICKÁ ČÁST 11

3.1 Elektromagnetické záření 11

3.1.1 Kvantová povaha elektromagnetického záření 12

3.1.2 Interakce látek s elektromagnetickým zářením 13

3.2 Optické instrumentální metody 15

3.2.1 Spektrometrická měření 15

3.2.2 Absorpční spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra 16

3.2.3 Absorpční spektra 17

3.2.4 Emise záření 19

3.2.5 Vlivy na vzhled spekter 21

3.2.6 Instrumentace v optické spektroskopii 21

3.2.7 Selektory vlnových délek 24

3.2.8 Detekce a měření záření 25

3.3 Absorpční UV/VIS spektrometry 26

3.4 Molekulová absorpční spektroskopie 27

3.5 Ramanovská spektroskopie 27

3.5.1 Ramanův rozptyl/Ramanův jev 27

3.5.2 Rezonanční Ramanova spektroskopie (RRS) 28

3.5.1 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS) 29

3.5.2 Zlaté nanočástice 31

3.6 Detekce bakterií pomocí SERSu 34

3.7 Naprašování tenkých vrstev 36

3.8 AFM 37

3.9 Elektronová mikroskopie 38

3.9.1 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) 38

3.9.2 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) 39

3.10 Rhodamin B 41

3.10.1 Fotokatalytická degradace rhodaminu B 42

3.11 Bakterie 43

3.11.1 Bakterie *Escherichia coli* 43

3.11.2 Bakterie *Serratia marcescens* ... 43
3.11.3 Bakterie *Staphylococcus aureus* ... 44
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ... 45
4.1 Seznam chemikálií ... 45
4.1.1 Příprava SERS substrátu ... 45
4.1.2 Recyklace SERS substrátu ... 45
4.1.3 Výroba zlatých nanočástic ... 45
4.1.4 Modifikace nanočástic a ověření funkce protilátky ... 45
4.1.5 Výroba magnetických nanočástic ... 45
4.2 Seznam přístrojů a pomůcek ... 46
4.3 Využité počítačové programy ... 46
4.4 Použité bakterie ... 46
4.5 Příprava SERS substrátu ... 47
4.6 Měření fotokatalytické degradace rhodaminu B ... 47
4.6.1 Jednotkové úpravy a měření rhodaminu B ... 48
4.7 Recyklace SERS substrátu ... 49
4.8 Příprava nanočástic, tvorba sendvičového imunotestu ... 50
4.8.1 Chemická syntéza zlatých nanotyček ... 50
4.8.2 Modifikace povrchu zlatých nanotyček ... 51
4.8.3 Výroba magnetických nanočástic ... 53
4.9 Ověření funkce protilátky ... 54
4.9.1 Modifikace povrchu podložních sklíček ... 54
4.9.2 Adhezní vrstvy ... 56
4.9.3 Charakterizace povrchu pomocí AFM ... 57
4.9.4 Test protilátky ... 57
5 VÝSLEDKY A DIZKUZE ... 59
5.1 Příprava SERS substrátu ... 59
5.2 Výsledky z měření rhodaminu B ... 59
5.2.1 Porovnání klasické Ramanovy spektroskopie a metody SERS ... 59
5.2.2 Vyhodnocení získaných spekter rhodaminu B z metody SERS ... 61
5.2.3 UV-VIS spektroskopie a porovnání UV-VIS spektroskopie ... 68
5.3 Recyklace SERS substrátu ... 71
5.4 Charakterizace připravených nanočástic ... 72

5.4.1 Pozorování zlatých nanočástic na elektronovém mikroskopu 72
5.4.2 Modifikace povrchu zlatých nanotyček 75
5.4.3 Magnetické nanočástice 77
5.5 Ověření funkce protilátky 77
5.5.1 Test adheze 77
5.5.2 Pozorování vrstev na AFM 79
5.5.3 Inkubační test 81
6 ZÁVĚR 83
7 ZDROJE 85
8 SEZNAM ZKRATEK 92
9 PŘÍLOHY 93

1 ÚVOD

Jedním z nejdiskutovanějších problémů dnešní doby je boj s patogeny, jejich určení a jejich eliminace. Jedna z komplikací je rezistence mikroorganismů na antibiotické látky. Právě díky neustále se rozšiřující rezistenci mikroorganismů na antibiotika je omezena efektivní délka života každého antibiotika. Jedním z řešení je neustálý přísun nových antibiotik, avšak tato možnost je velice limitována. Lze se pokusit efektivní délku života antibiotika prodloužit tím, že se v klinické praxi omezí využití širokospektrálních antibiotik a že se rozšíří možnosti specifičtěji cílit léčbu. Ke zefektivnění léčby je tedy nutno vylepšit diagnostiku klinicky relevantních patogenů. K tomuto mohou přispět zlaté diagnostické nanočástice s protilátkami a ramanovsky aktivními molekulami na povrchu.

Ramanova spektroskopie je nedestruktivní analytická technika založena na Ramanově rozptylu molekul. Ramanův rozptyl je nepružný rozptyl fotonů při interakci s elektrony v chemických vazbách. Každá Ramanovsky aktivní molekula má své typické spektrum, které je pro ni jedinečné. Díky tomu lze identifikovat molekuly ve vzorku. Problém je, že při klasické Ramanově spektroskopii poskytuje molekula velmi slabou odezvu, která je často překryta intenzivní fluorescencí.

SERS (povrchem zesílená Ramanova spektroskopie) využívá kovové nanostruktury k zesílení Ramanova rozptylu. Kovové nanočástice vykazují tzv. plazmonovou rezonanci, což je koherentní oscilace vodivostních elektronů, která vzniká interakcí viditelného záření s kovovými nanostrukturami. K zesílení Ramanova rozptylu je analyt nejčastěji adsorbován na povrchu zlatých nebo stříbrných nanočástic. K zesílení intenzity Ramanova rozptylu přispívají dva mechanismy, a to elektromagnetický, kdy dochází k rezonančnímu vybuzení plazmonů v kovové struktuře, a chemický, kdy dochází k přenosu náboje mezi adsorbátem a povrchem kovu. Celkově lze dosáhnout zesílení Ramanova rozptylu o několik řádů, běžně 10^3, ale v určitých případech až 10^6.

Díky metodě SERS jsme schopni rychle identifikovat a rozlišit širokou škálu chemických i biologických vzorků včetně bakterií. Typické bakteriální spektrum obsahuje informace o buněčném obsahu, jako jsou nukleové kyseliny, purinové báze, proteiny, sacharidy a lipidy. Rozdíly v chemickém složení však mohou být příliš malé pro spolehlivé rozlišení příbuzných druhů bakterií. Aby byla identifikace specifická pro konkrétní druh bakterie, je možné použít diagnostické zlaté nanočástice. Tyto nanočástice mají povrch modifikovaný tzv. Ramanovým reportérem, který poskytuje specifickou a velmi silou odezvu, která je zesílená díky zlatým nanočásticím. Spolu s Ramanovým reportérem je povrch nanočástice modifikován protilátkou, která se bude na základě afinity antigen-protilátka vázat na povrch konkrétního druhu bakterie. Když je ve vzorku pozorovatelná odezva Ramanova reportéru, je zřejmé, jaký druh bakterie je ve vzorku přítomen. Tyto diagnostické nanočástice mohou být využity ke značení libovolného druhu bakterií, stačí pouze modifikovat povrch pro ni typickou protilátkou.

Tyto nanočástice představují velmi účinný prostředek k rychlejší a přesnější diagnostice, a tedy i boji proti mikroorganismům.

2 CÍLE PRÁCE

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Výroba zlatých nanosystémů pro SERS a kontrola jejich funkce
3. Měření Ramanových spekter molekul zesílených pomocí zlatých nanosystémů
4. Vyhodnocení a interpretace výsledků detekce molekul prostřednictvím SERS

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Elektromagnetické záření

O sjednocení poznatků o elektromagnetickém záření se zasloužil v roce 1861 a 1862 James Clerk Maxwell, geniální skotský fyzik, který publikoval ranou formu rovnic zahrnující Lorentzův silový zákon. Svými čtyřmi parciálními diferenciálními rovnicemi popsal elektromagnetické záření, včetně jeho chování v makrosvětě. Maxwellovy rovnice také dokazují, že se světlo šíří konečnou rychlostí. Tímto Maxwell sjednotil dříve samostatně popsané jevy magnetismu, elektřiny, světla a záření [1,2].

Maxwellovy rovnice mají celkem dvě varianty, a to mikroskopické a makroskopické rovnice. Mikroskopické rovnice se vztahují na elektrická a magnetická pole k celkovému náboji a celkovému proudu, zahrnujíc náboje a proudy v materiálu v atomovém měřítku. Makroskopické rovnice definují dvě nová pomocná pole popisující chování hmoty ve velkém měřítku, nezahrnují ale náboje atomového měřítka a kvantové jevy [2,3].

První z nich je zákon celkového proudu neboli Ampérův zákon, jehož diferenciální tvar je zapsán v rovnici (1), kde $\boldsymbol{H}$ značí rotaci vektoru intenzity magnetického pole, $\boldsymbol{J}$ (v literatuře často i $\boldsymbol{j}$) je hustota vodivého proudu, zatímco člen $\partial \boldsymbol{D}/\partial t$ značí hustotu posuvného proudu [1,3].

$$\nabla \times \boldsymbol{H} = \boldsymbol{J} + \frac{\partial \boldsymbol{D}}{\partial t} \tag{1}$$

Druhá rovnice se nazývá Faradayův indukční zákon, či zákon o elektromagnetické indukci, v diferenciálním tvaru dává do rovnosti rotaci vektoru intenzity elektrického pole a zápornou derivaci magnetické indukce, viz (2) [2,3].

$$\nabla \times \boldsymbol{E} = -\frac{\partial \boldsymbol{B}}{\partial t} \tag{2}$$

Třetí rovnicí je Gaussův elektrostatický zákon, z rovnice (3) vyplývá, že v rovnosti je divergence vektoru elektrické indukce $\boldsymbol{D}$ a objemová hustota volného náboje ρ [2–4].

$$\nabla \cdot \boldsymbol{D} = \rho \tag{3}$$

Poslední rovnice v diferenciálním tvaru nám říká, že divergence vektoru magnetické indukce $\boldsymbol{B}$ se rovná nule, viz rovnice (4) [2,3].

$$\nabla \cdot \boldsymbol{B} = 0 \tag{4}$$

Elektromagnetické záření je při popisu určitých typů jevů, jako jsou např. odraz, lom, difrakce a interference, považováno za vlnění skládající se z periodicky oscilujícího magnetického a elektrického pole, jejichž vektory jsou na sebe kolmé. Celý průběh lze popsat sinusovou funkcí, která má vždy určitou amplitudu a vlnovou délku (λ). Amplitudou rozumíme vektor, který odpovídá maximu vlny magnetické nebo elektrické složky, zatímco vlnová délka

nám udává vzdálenost dvou za sebou jdoucích maxim vlny a perioda (p) je doba potřebná k dosažení průchodu dvou maxim určitým bodem. Důležitou veličinou je frekvence neboli kmitočet (v, nebo také f) s jednotkou Hz (s^{-1}), která nám udává počet oscilací za jednotku času [5,6].

Mezi další veličiny, kterými popisujeme elektromagnetické záření, řadíme rychlost elektromagnetického záření v prostředí. Rychlost šíření elektromagnetického záření je závislá nejen na prostředí, jímž záření prochází, ale i na jeho samotné frekvenci. Ve fyzice jsou dva typy rychlostí šíření vln, a to rychlost grupová a rychlost fázová. Rychlost grupová označuje přenos energie vlněním a rychlost přenosu této energie. Rychlost šíření světla ve vakuu (c) je vždy vyšší než ve hmotném prostředí, pokud se jedná o rychlost grupovou. Při šíření záření v prostředí obsahujícím částice dochází k interakcím elektromagnetického pole s elektrony v atomech. Frekvence není, jak již bylo zmíněno výše, závislá na prostředí, proto dochází k ovlivnění rychlosti a vlnové délky. Při přestupu záření z opticky řidšího do opticky hustšího prostředí (např. ze vzduchu do skla) rychlost a vlnová délka klesají. V opačném případě, při přechodu z opticky hustšího prostředí do opticky řidšího, rychlost i vlnová délka rostou. Fázová rychlost popisuje fázi vlnění, která se pohybuje prostorem určitou rychlostí, která může překročit grupovou rychlost světla ve vakuu [5,6].

Používanou veličinou zejména v infračervené oblasti je vlnočet ($\tilde{v}$) představující počet vln za jednotku délky, který udáváme v jednotkách cm^{-1}, je přímo úměrný frekvenci a energii elektromagnetického záření. Vztah mezi vlnočtem ($\tilde{v}$) a vlnovou délkou (λ) je poté definován rovnicí (5). Další veličinou je index lomu (η), který je roven poměru rychlosti záření o dané vlnové délce ve vakuu (c_0) ku rychlosti daného záření v rozdílném prostředí, proto je index lomu vždy větší než 1 [5,6].

$$\tilde{v} = \frac{1}{\lambda} \tag{5}$$

K vyjádření množství energie, která byla přenesena svazkem záření na určitou plochu za jednotku času, využíváme veličinu zářivý tok (P) s jednotkou watt (W). Když zářivý tok přepočítáme na jednotkový prostorový úhel, tak získáme zářivost (I_e) s jednotkou $W \cdot sr^{-1}$. Jak zářivý tok, tak i zářivost jsou úměrné druhé mocnině amplitudy elektrického pole [5,6].

3.1.1 Kvantová povaha elektromagnetického záření

Při interakci s hmotou elektromagnetické záření předává svou energii nespojitě, ale po určitých kvantech. Toto kvantum nazýváme foton, kterému rozumíme jako částici elektromagnetického záření s nulovou hmotností, ale energií dle rovnice [5–7]:

$$E = \boldsymbol{h}v = {}^{\boldsymbol{hc}_0}/_{\boldsymbol{\lambda}} = \boldsymbol{hc}_0\tilde{v} \tag{6}$$

která je vyjádřena pomocí vlnové délky (λ), frekvence (v) či vlnočtu ($\tilde{v}$), kde $\boldsymbol{h}$ je Planckova konstanta ($\boldsymbol{h}$=6,62607015·10^{-23} J·s) [5]. Z rovnice jasně vyplývá, že energie fotonu je přímo úměrná frekvenci a vlnočtu a zároveň nepřímo úměrná vlnové délce. Zářivý tok svazku záření roste přímo s počtem fotonů za sekundu [5,8,9].

Kvantové chování elektromagnetického záření bylo poprvé popsáno v roce 1905 Albertem Einsteinem. Zasloužil se o popsání fotoelektrického jevu, při němž se dopadem elektromagnetického záření z hmoty uvolňují elektrony atomového obalu a emitují se do okolí (vnější fotoelektrický jev) nebo zůstanou uvnitř látky (vnitřní fotoelektrický jev). Nejprve musí být dodáno určité množství energie, tzv. ionizační energie. Hodnota ionizační energie se označuje jako fotoelektrická bariéra. Pokud je energie dodaného záření větší, než je minimální potřebná energie k opuštění atomové slupky, tak je uchována v kinetické energii elektronu. Na tomto základě byla definována Einsteinem rovnice fotoelektrického jevu (7), kde $\boldsymbol{h}v$ je energie dopadajícího fotonu, $\boldsymbol{h}v_0$ definuje minimální energii k vypuzení elektronu a $\boldsymbol{E}_{\max}$ značí maximální energii vypuzeného elektronu [8–10].

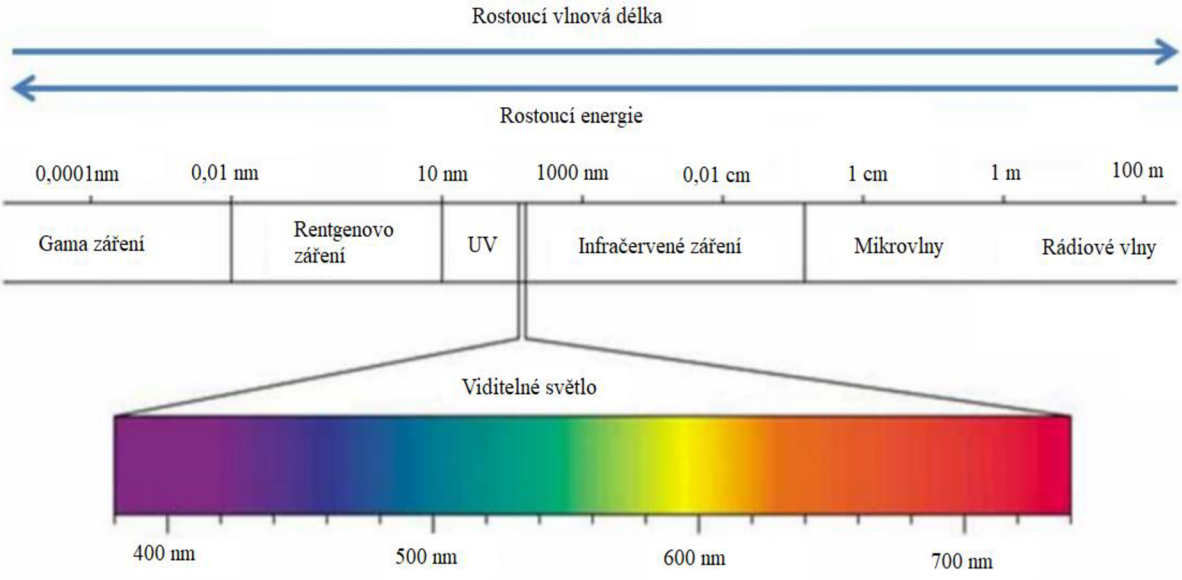
$$\boldsymbol{h}v = \boldsymbol{h}v_0 + \boldsymbol{E}_{\max} \tag{7}$$

Při dopadu elektronů na povrch látky, které vyvolají vyzáření fotonu, tak hovoříme o inverzním fotoelektrickém jevu. Tímto způsobem lze při dostatečné počáteční energii získat rentgenové záření [8,9].

3.1.2 Interakce látek s elektromagnetickým zářením

Různé frekvenční oblasti elektromagnetického záření způsobují rozdílné typy interakcí s hmotou [6]. V atomech a molekulách dochází interakcí s fotonem k přechodům elektronů mezi odlišnými energetickými hladinami. V molekulách také může docházet k deformaci vazeb čili k vibračním přechodům mezi virtuálními kvantovými stavy vazeb. Při interakci záření s hmotou nemusí docházet pouze k energetickým přechodům, částice v analytu mohou způsobit také lom, odraz, elastický rozptyl (Rayleighův a Mieho rozptyl), stáčení roviny polarizovaného záření, interferenci či difrakci elektromagnetického záření [5,10].

Dle typu interakce záření s hmotou dělíme spektrometrické metody na nespektrální spektrální. Nespektrální jsou založeny na faktu, že látka ovlivňuje vlastnosti procházejícího záření a zároveň nedochází k výměně energie, jsou závislé na změně rychlosti, směru, rozptylu nebo pootočení roviny polarizovaného záření apod. Do této skupiny řadíme např. refraktometrii, interferometrii, polarimetrii, rentgenovou refraktometrii, turbidimetrii a nefelometrii. Při metodách spektrálních pak dochází k výměně energie mezi zářením a hmotou. Sem jsou řazeny především metody absorpční a emisní, podrobněji viz kapitola 3.2.1 [5].



Obrázek 1: Elektromagnetické spektrum (upraveno ze zdroje [11]).

Na **obrázku 1** je schématicky zobrazeno elektromagnetické spektrum, z něhož lze vyčíst, že nejvyšší energie náleží gama záření, tedy záření o nejkratší vlnové délce. V opačném extrému dojdeme až k rádiovým vlnám, záření o nejnižší energii, ale nejdelší vlnové délce [5,6].

Nízkoenergetická záření mohou být využita např. při nukleární magnetické rezonanci (NMR) nebo elektronové spinové rezonanci (ESR), kdy v molekulách dochází pouze ke změně spinu. Při interakci mikrovln s hmotou může dojít ke změně rotace molekulárních vazeb, a v případě infračerveného (IR) záření dochází k deformaci vazeb v molekulách. Fotony ve viditelné oblasti, která se nachází v rozmezí vlnových délek 400 nm (hranice UV) až 760 nm (hranice IR), způsobují přeskoky mezi kvantovými hladinami, stejně jako v ultrafialové (UV) oblasti. Při interakci hmoty a vysokoenergetického záření, jako je záření gama, již dochází k interakcím s vnitřními elektronovými orbitaly, či atomovými jádry analytu [5].

3.1.2.1 Absorpce energie

Metody spektroskopie lze dělit dle toho, zda ke změně energetického stavu dochází v molekule nebo atomu, nebo dle frekvence použitých záření nebo vlnových délek emitovaného záření [5,12].

V případě, že se jedná o molekulu, tak každý elektronový obal molekul má definovány čtyři základní energetické příspěvky, které nám dávají v součtu celkovou energii molekuly. Největší energetický příspěvek je tzv. elektronický. V elektronovém obalu se konají přechody mezi jednotlivými elektronovými stavy (elektronové excitace) a využíváme je k vytvoření elektronových spekter. Emise energie při deexcitaci do nižších energetických stavů je charakteristická pro daný atom či molekulu, je rovna rozdílu energií jednotlivých hladin, tím nese charakteristickou vlnovou délku. Z emise poté můžeme získat informace o analytu [5,12].

Vibrační příspěvek se nachází ve vazbách molekuly. Přechody mezi vibračními stavy vyžadují menší množství energie než přechody elektronové, výstupem jsou vibrační spektra. Rotační energie je příspěvek energie v molekule, kdy molekuly v plynném stavu mění rotaci (rotační stavy) za vzniku rotačních spekter. Translační, nejmenší příspěvek, je poté roven kinetické energii molekuly [5,12].

3.2 Optické instrumentální metody

Spektroskopie je souhrnný název pro vědní obor zabývající se interakcí elektromagnetického záření s hmotou [6]. Analytické spektroskopické metody jsou založeny na měření emitovaného (vysílané záření při přechodu z excitovaného do základního stavu) nebo absorbovaného záření částicemi analytu. Tyto metody se dále klasifikují dle úseku elektromagnetického spektra, které je emitováno či absorbováno [5,12].

Elektromagnetické záření má tzv. vlnově-částicový charakter. Tato vlastnost popisuje typické jevy, jako je ohyb nebo interference, jež souvisí s vlnovým charakterem záření, ale také jevy jako je absorpce a emise záření po kvantech, proto se dá považovat záření za proud částic nazývaných fotony [6]. Vlnový charakter lze popsat parametry jako je vlnová délka, frekvence, rychlost, amplituda vlny, vlnočet a mnoha dalšími [5,12].

Příkladem optických instrumentálních metod může být atomová absorpční spektroskopie. Principem atomové absorpční spektroskopie je, že absorpci provádí valenční elektrony atomů, které jsou excitovány do vyšších energetických hladin. UV-VIS spektrofotometrie se liší tím, že měříme absorpci energie záření vazebnými i nevazebnými valenční elektrony v molekulách analytu [5,12].

IR spektroskopie je založena na změně vibračních a rotačních stavů v molekulách. Dále může být energie absorbována jádrem atomů nebo nepárovými elektrony, čehož využívá např. NMR nebo elektronová spinová rezonance [5,12].

3.2.1 Spektrometrická měření

Při specifické interakci záření s analytem, můžeme získat informaci o jeho složení či koncentraci analytů ve vzorku [5,12].

Za samotného měření může dojít k excitaci elektronů do vyšší energetické hladiny dodáním energie. Před dodáním samotné energie, předpokládáme, že se molekula nachází v základním stavu, tedy energeticky nejvýhodnějším stavu. Po dodání energie přechází částice do excitovaného stavu, kdy excitovaný stav odpovídá vyšší energetické hladině E_1, kdy energetický rozdíl ΔE mezi základní energetickou hladinou E_0 a excitovaným stavem musí být roven přijaté energii (např. ve formě záření), dle rovnice (8) [5,12].

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h \cdot v \qquad (8)$$

Při absorpci toho záření molekulou, dojde v molekule ke změně rozložení náboje oproti stavu základnímu, tedy ke změně tzv. dipólového momentu molekuly [13], což je doprovázeno i změnou stavů vibračních a rotačních ve virtuálních hladinách. Měření emitovaného záření je základem emisních a luminiscenčních technik. Při měření absorbovaného záření mluvíme o metodách absorpčních stavů [5,12].

Při emisní a chemiluminiscenční spektroskopii je analyt excitován dodáním energie, přičemž informaci o analytu můžeme získat měřením zářivého toku emitovaného při návratu částic do základního stavu ze stavu excitovaného. Zdrojem energie může být dodané teplo, elektrická energie nebo chemická reakce. Samotná emise probíhá ve všech směrech. Na základě spektrálního měření je možné analyt identifikovat i kvantifikovat. Výstupem z měření je spektrum, jedná se o grafické vyjádření závislosti zářivého toku na frekvenci nebo vlnové délce [5,12].

Z vnějšího zdroje může být vysláno záření na analyt, ten pohltí záření a dojde k excitaci částic analytu. Absorpční techniky tohoto využívají, přičemž je měřeno množství absorbovaného záření o dané vlnové délce. Pouze část původního záření ze zdroje projde vzorkem, načež je měření provedeno ve stejné ose, jako je vstup. K absorpci může dojít, pokud frekvence elektromagnetického záření odpovídá rozdílu energie mezi kvantovými hladinami, viz rovnice (8). Výstupem je spektrum absorbovaných vlnových délek (závislost absorbance na vlnové délce). Ze spektra lze opět získat informace o identitě a koncentraci analytu [5,12].

Je-li sledována emise fotonů po absorpci záření, mluvíme o fotoluminiscenční spektroskopii. Sleduje se jev fluorescence a fosforescence, dle nich dostaly název i dané techniky, a to fluorescenční a fosforescenční spektroskopie. Deexcitace je prováděna zářivými přechody, ale také nezářivými přechody. Při fluorescenci dochází k téměř okamžité emisi (10^{-5} s od excitace), zatímco fosforescence se označuje jako emise zpožděná, řádově o minuty až hodiny od excitace. Zpoždění je způsobeno spinově zakázanými přechody mezi excitovanými tripletovými stavy a základními singletovými stavy [5,12].

3.2.2 Absorpční spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra

Metoda spektroskopie využívající absorpci v UV a VIS oblasti je hojně využívána v oblasti chemie, biologie, forenzní a klinické biochemii, zemědělské nebo potravinářské analýze, ale také v mnoha jiných oborech stavu [5,12].

Jak již bylo výše popsáno v kapitole 3.2.1, jsou částice analytu schopny absorbovat záření o určité frekvenci, a tím dojde k zeslabení toku záření, které je vysíláno ze zdroje. Tento pokles je závislý nejen na druhu analytu, ale také na jeho koncentraci. Závislost poklesu intenzity záření zdroje v závislosti na koncentraci je popsána pomocí Lambert-Beerova zákona [5,12].

Bouguerův-Lambertův-Beerův zákon je v literatuře uváděn různě jako Lambertův-Beerův nebo také jako Beerův zákon. Zákon vyjadřuje, že útlum zdrojového záření závisí na koncentraci absorbující látky a tloušťce absorbujícího prostředí. Čím je větší tloušťka absorbujícího prostředí nebo vyšší koncentrace absorbující látky, tím větší je zeslabení zdrojového záření [5,12,14].

Základem je zdroj monochromatického záření, tedy záření o jedné vlnové délce (polychromatické záření obsahuje více vlnových délek). Monochromatické záření o určitém zářivém toku P_0 projde absorbujícím prostředím o tloušťce l (v praxi se jedná o tloušťku kyvety, která je v řádu cm) s absorbující látkou o koncentraci c. Při průchodu paprsku dojde k interakci záření s analytem, analyt absorbuje záření, proto zářivý tok poklesne z hodnoty P_0 na hodnotu P [5,12,14].

Pokles zářivého toku je možné vyjádřit pomocí absorbance A, která je vyjádřena dle rovnice (9) [5,12,14].

$$A = -\log\left({}^{P}/_{P_0}\right) = \log\left({}^{P_0}/_{P}\right) \qquad (9)$$

Tato rovnice nelze využít přímo za měření, jelikož při měření v kyvetě dochází k významným ztrátám zářivého toku, při průchodu zdrojového záření dochází k odrazům na různých rozhraních a také k rozptylu. Ke kompenzaci využíváme tzv. referenční měření [15], kdy je porovnán zářivý tok, který prošel kyvetou se vzorkem se zářivým tokem, který prošel slepým

vzorkem, který neobsahoval analyt (tzv. *blank*). Slepý vzorek obsahuje většinou rozpouštědlo nebo matrici vzorku, vše je tedy měřeno za stejných podmínek jako analyt [5,12,16].

Samotný Lambertův-Beerův zákon zapisujeme pomocí absorbance, která je přímo závislá na koncentraci absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy l dle rovnice [5,12,14]:

$$A = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c \qquad (10)$$

kde ε_λ je konstanta zvanou molární absorpční koeficient s jednotkou $mol^{-1} \cdot cm^{-1} \cdot dm^3$, pokud c je látková koncentrace o jednotce $mol \cdot dm^{-3}$. Molární absorpční koeficient je jednou z charakteristických vlastností látky, je zjišťován v maximu absorpčního pásu a pro velké množství látek tabelován [5,12,14].

3.2.2.1 Využití Lambertova-Beerova zákona

Lambertův-Beerův zákon využíváme k výpočtu molárního absorpčního koeficientu nebo k výpočtu neznámé koncentrace analytu ve vzorku, ale pouze v případě, že známe zbytek proměnných v rovnici (10). Není vhodné využívat tabelovanou hodnotu molárního absorpčního koeficientu, je závislý na teplotě, použitém rozpouštědle, vlnové délce i celkovém složení roztoku. V praxi se nejprve změří roztok analytu o známé koncentraci v rozpouštědle, které bylo použito i na vzorek při stejné teplotě. Nejčastěji stanovujeme koncentraci metodou konstrukce kalibrační závislosti, kdy je měřena koncentrační řada roztoků o známé koncentraci analytu, neznámou koncentraci pak vypočítáme z regresní rovnice kalibrační přímky [15]. Roztoky jsou připraveny ve stejném rozpouštědle (matrici) jako je vzorek analytu. Jsou případy, kdy ani tato možnost není možná, proto využíváme metodu přídavku standardu. Zákon lze uplatnit i v roztocích, které obsahují větší množství neinteragujících složek, které absorbují záření při dané vlnové délce. Pak je celková absorbance výsledkem jednotlivých příspěvků složek [5,16].

Lambertův-Beerův zákon patří mezi tzv. limitní zákony [15]. První z problémů nastává za příliš nízké, ale i vysoké koncentrace absorbující složky. Při vysokých koncentracích se zmenšuje prostor mezi molekulami, a to ovlivňuje rozložení nábojů sousedních částic a jejich schopnost absorpce. Při nízkých koncentracích podobný problém nastává, jsou-li v roztoku přítomny i jiné chemické látky ve vysokých koncentracích (např. elektrolyty) za vzniku elektrostatických interakcí. Velké odchylky v zákoně způsobuje i disociace, asociace nebo reakce s rozpouštědlem. Další odchylky mohou být způsobeny instrumentací, při nevyhovujícím zdroji monochromatického záření, vnikem bludného záření do měřícího systému nebo měření v nestejných kyvetách [5].

3.2.3 Absorpční spektra

Jedná se o grafické vyjádření absorbance v závislosti na vlnové délce (či frekvenci nebo vlnočtu). Absorpční spektrum nám může poskytnout informaci o identitě látky [5].

Absorpční spektrum volných atomů v plynném stavu zpravidla obsahuje pouze omezené množství velmi úzkých čar. Ke snížení zářivého toku dochází pouze na několika vlnových délkách zdrojového záření, jak již bylo výše popsáno, dle energetického rozdílu mezi základním a excitovaným stavem elektronů v atomovém obalu [6]. Atomy a ionty převedeny do plynného stavu nevykazují žádné vibrační nebo rotační přechody. Jediný způsob přechodů v atomech a

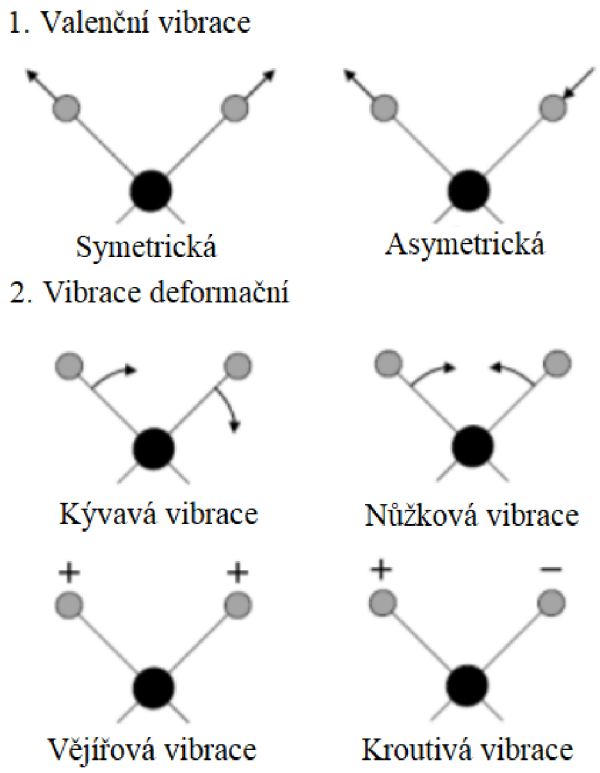
iontech jsou přechody mezi jednotlivými elektronovými stavy. Informace o elektronových přechodech atomů a excitačních vlnových délkách jsou tabelovány. Atomová absorpční spektroskopie je využívána zpravidla pouze ke kvantitativní analýze, kdy se využívá zdroje monochromatického záření, vykazuje velmi úzké rozmezí vysílaných vlnových délek [5,12].

Při excitaci molekuly ultrafialovým, viditelným nebo infračerveným zářením může dojít k elektronovým, vibračním i rotačním přechodům. U elektronových přechodů dochází k excitaci elektronů do orbitalů o vyšší energii, stejně jako v případě atomů. Energie fotonů musí být shodná s rozdílem energií molekulových orbitalů [5,12].

Vazba mezi atomy může být deformována, tento fakt je v přímé souvislosti s existencí kvantových hladin molekuly a vibračními přechody mezi nimi. Oproti tomu rotační přechody, které jsou také kvantovány, jsou vázány na těžiště molekuly a její rotací okolo něj. Samotná energie potřebná k vibračním a rotačním kvantovým přechodům je mnohem menší než energie potřebná k elektronovým přechodům, typicky až o jeden řád [5,12,17].

Ke snazšímu pochopení, co jsou kvantově vibrační přechody, můžeme si představit vazbu mezi atomy jako hypotetickou pružinu. Pružina, tak stejně i vazba, se může do jisté míry natahovat, smršťovat nebo ohýbat. Míra rozsahu deformace molekuly udává pak potenciální energii systému. Zásadním rozdílem oproti hypotetickému systému je, že vibrační hladiny molekul nabývají pouze diskrétních energetických hodnot [5,12,17].

Na **obrázku 2** v první části (1. Valenční vibrace) jsou znázorněny symetrické a asymetrické neboli antisymetrické vibrace. Tyto vibrace ovlivňují délku vazby, kdy se vazba zkracuje a prodlužuje. V druhé části obrázku (2. Deformační vibrace) jsou další čtyři typy vibrací, kdy dochází ke změně vazebných úhlů. Označujeme je jako deformační, které rozdělujeme podle toho, zda probíhají v ploše (nůžková a kývavá vibrace), nebo v prostoru (vějířová a kroutivá vibrace) [5,12].



Obrázek 2: Typy molekulových vibrací (inspirováno z [18]).

Jak již bylo výše popsáno, tak rotační kvantové stavy jsou vztahovány k rotaci okolo molekulového těžiště. Rotační hladiny se nachází mezi hladinami vibračními. Energetický rozdíl rotačních hladin je o řád nižší než energetický rozdíl mezi hladinami vibračními, proto dochází při vibračních přechodech také k rotačním kvantovým přechodům [5,12].

Za absorpce infračerveného záření zpravidla není přeneseno dostatek energie k excitaci elektronů, ale dost na to, aby došlo k vibračním či rotačním přechodům v základním elektronovém stavu molekuly [6]. Ovšem, energie (frekvence) bude odpovídat rozdílu mezi vibračními hladinami [5,12].

Viditelná oblast záření a oblast ultrafialového přenáší již dostatečné množství energie k elektronové excitaci [19]. Proto výsledné absorpční spektrum nese velké množství absorpčních pásů jak z UV, tak i viditelné oblasti spektra. Absorpční pásy jsou složeny z mnoha velmi blízko u sebe ležících čar, navíc molekula může obsazovat velké množství elektronových, vibračních i rotačních stavů [5,12].

Velký vliv na absorpční spektra má rozpouštědlo. Když je vzorek v plynném stavu, je možné pozorovat i jednotlivé absorpční čáry ve spektrech [15]. Ale když se vzorek nachází v roztoku, může dojít ke kolizím mezi molekulami rozpouštědla a analytu, a tím dojde k výměně energie, která se ve spektrech projeví rozostřením absorpčních pásů a mohou zaniknout až do hladké obalové křivky [5,12].

3.2.4 Emise záření

Dodáním tepla, bombardováním elektrony, vystavením vysokoteplotnímu plazmatu, plamenu nebo elektrickému výboji, případně ozářením elektromagnetickým zářením můžeme excitovat atomy, molekuly i ionty do vyšších energetických hladin. V energeticky vybuzeném

stavu zůstávají v průměru 10^{-9} až 10^{-6} s, přičemž záhy dojde k relaxaci buď zářivým přechodem (za vyzáření fotonu), nezářivým (tepelným) přechodem nebo jejich kombinací [5,12].

Atomová emisní a fluorescenční spektra lze získat po excitaci všemi výše popsanými způsoby. K excitaci molekul se využívá pouze elektromagnetické záření za vzniku molekulových luminiscenčních (fluorescenčních a fosforescenčních) spekter [5,12].

Emisní spektra zobrazujeme jako závislost zářivého toku na vlnové délce či frekvenci. Spektra se mohou skládat z tří typů signálů, a to ze spekter čárových, pásových a z kontinua. Čárová spektra náleží jednotlivým prvkům, jedná se o jasně definované ostré spektrální přechody. Spektra pásová se skládají z několika čar ležících v těsné blízkosti, které nelze jasně rozlišit. Zdrojem pásových spekter jsou většinou elektronové a vibrační přechody malých molekul, radikálů vznikajících v plameni či plazmatu nebo adukty malých molekul složených z prvků vzorku. Kontinuum odpovídá narůstajícímu pozadí (drift základní linie) a je způsobeno jevem tzv. vyzařování tmavého tělesa [6]. Jedná se o důsledek oscilací atomů v pevné fázi, když látku zahříváme na vysoké teploty. Avšak na vysoké teploty ohřáté materiály jsou důležitými zdroji infračerveného, viditelného a blízkého ultrafialového záření [5,12].

Emise a její zářivý tok při pásovém nebo čárovém přechodu je přímo úměrná koncentraci (počtu částic) [5,12].

Velmi důležitými fyzikálními procesy jsou fluorescence a fosforescence, kdy po dodání energie dochází k excitaci a následné relaxaci za vyzáření fotonu. Tyto dva typy vyzáření fotonu se liší svými mechanismy, taktéž časovým intervalem k excitaci i emisi záření. [5,12].

K excitaci atomů v plynné fázi se využívá vlnová délka jejich rezonančních přechodů, tzn. přechod elektronů ze základního do nejbližšího excitovaného stavu, nebo vlnová délka jiné intenzivní spektrální čáry. Po excitaci následuje atomová fluorescence. Vlnová délka excitace může být totožná s vlnovou délkou emitovanou, tuto fluorescenci označujeme jako fluorescenci rezonanční. Sledujeme ve většině případů u jednoduchých dvouatomových molekul v plynném stavu [20]. V jiném případě je část energie vydána nezářivými přechody, jako jsou srážky s jinými částicemi (tzv. vnější konverze), a vlnová délka nerezonanční fluorescence je delší než excitační [5,12].

V případě molekul dochází k excitaci i emisi podobným způsobem jako u prvků s tím rozdílem, že molekuly mají tendenci se zbavovat nadbytečné energie interakcí s rozpouštědlem, ale také mají mnohem více typů energetických přechodů, zejména vibrační a rotační stavy [19]. Excitační stavy mají velmi krátké doby života a fluorescenční spektra dané látky jsou závislá na poměru rychlostí zářivých a nezářivých procesů, proto nejsou všechny molekuly schopny fluorescence [5,12].

K nezářivé relaxaci může dojít ve formě vibrační relaxace, kdy dojde k přechodům mezi vibračními hladinami jednoho elektronového stavu, kdy je malé množství energie předáno rozpouštědlu při srážkách s jeho molekulami, což se projeví i v mírném zvýšení teploty. Účinnost vibrační relaxace je velmi vysoká a rychlá, proto doba života vibrační excitace čítá pouze cca 10^{-15} s [19]. Vnitřní konverze označuje děj, kdy dojde k nezářivému přechodu mezi nejnižší vibrační hladinou vyššího elektronového stavu a nejvyšší vibrační hladinou nižšího elektronového stavu. Mechanismus vnitřní konverze nedosahuje takové rychlosti jako předchozí mechanismus, proto elektronové excitované stavy mají dobu životnosti 10^{-9} až 10^{-6} s. Po vnitřní konverzi může dojít k emisi fotonu nejvyšší hladiny některého nižšího excitovaného elektronového stavu [5,12].

Fluoreskující molekuly emitují záření z nejnižší hladiny excitovaného vyššího elektronového stavu do jedné z vibračních hladin stavu základního. Fluorescenční molekulová spektra sestávají z širokých pásů skládajících se z blízko položených linií, přičemž výsledné spektrum je obalová křivka. Tato spektra sestávají převážně z delších vlnových délek, než byly excitační vlnové délky, tento posun emisních pásů vůči pásům excitačním nazýváme Stokesův posun [6]. Proto emisní molekulové spektrum vypadá jako osově převrácený a posunutý obraz excitačního spektra (např. excitační pás z UV oblasti má emisní pás ve viditelné oblasti spektra) [5,12].

3.2.5 Vlivy na vzhled spekter

V praxi není žádná spektrální čára dokonale úzká, má nenulovou šířku s rozšířením o určitém profilu. Přirozené rozšíření spektrálních čar je dáno Heisenbergovým principem neurčitosti, efekt je malý, ale minimální hodnota rozšíření odpovídá $\Delta\lambda=10^{-5}$ nm. Spektrální čára si uchovává Lorentzův tvar, kdy je sice ostřejší vrchol, ale širší křídla než při profilu Gaussovském [5,6,12].

K rozšíření spektrálních čar může dojít několika mechanismy. První homogenní, kdy může dojít např. k rozšíření sycením (zvyšování intenzity dopadajícího světla), kdy si čára ponechá Lorentzův tvar, ale dochází ke snižování výšky a rozšiřuje se, jelikož méně molekul zůstává v základním stavu. Zadruhé nehomogenně, kdy může dojít k teplotnímu rozšíření. Za narůstající teploty dochází k Dopplerovu jevu, jedná se o neuspořádaný termický pohyb atomů, tudíž šířka čar roste s teplotou a klesá s hmotností pohybujících se částic. Nebo může dojít také k tlakovému rozšíření srážkami, čím je plyn hustší, tím je větší pravděpodobnost srážek, přičemž srážka může být pružná či nepružná [5,6,12].

Skutečný profil čar je tedy kombinace hned několika faktorů. Prvním je Heisenbergův princip neurčitosti (přirozená šíře čáry). Dalším je Dopplerovo rozšíření, které vytváří Gaussovský profil vlivem teploty, pohybem částic. Posledním je Lorentzovo rozšíření, které vytváří Lorentzův profil vlivem kolizí. Velký vliv na Lorentzovo rozšíření má koncentrace a interakce emitovaných částic s ostatními. Samotný výsledný profil je určen dominantním rozšiřujícím mechanismem [5,6,12].

3.2.6 Instrumentace v optické spektroskopii

Každý z přístrojů pro absorpční, emisní a luminiscenční spektroskopická měření ať už v ultrafialové, viditelné nebo infračervené oblasti má jisté základní součásti, které jsou si velmi podobné [19]. Zároveň je nutné, aby se dle aplikace a použité oblasti spektra zvolila příhodná instrumentace, jelikož se přístroje se liší převážně v uspořádání základních částí [5,12].

Většina spektroskopických přístrojů, které jsou využívány pro měření v UV, viditelné nebo IR oblasti, je poskládána několika základních komponent. Základ je zdroj stabilního záření, na nějž navazuje selektor vlnových délek, který ze spektra izoluje úzký rozsah vlnových délek. Poté jednu či více kyvet, za nimiž je detektor záření, který konvertuje zářivý tok na měřitelný elektrický signál, jenž dále zpracovává počítač, kde pak data i uchováváme [5,12,19].

Absorpční a fluorescenční spektroskopie disponují externím zdrojem energie, ale v absorpční spektroskopii je měřeno zeslabení zářivého toku na zvolené vlnové délce, proto je detektor hned za kyvetou se vzorkem. V některých typech měření absorbance je pořadí selektoru vlnových délek a vzorku prohozeno. U fluorescenční spektroskopie excitujeme analyt

zvolenou vlnovou délkou, při relaxaci dojde k vyzáření záření, které detekujeme v pravém úhlu k vyzařování zdroje. K výběru emitované vlnové délky se používá ještě jeden selektor vlnových délek. Uspořádání v emisní spektroskopii je jiné, protože zdrojem záření je samotný analyt excitovaný tepelnou energií (plamen nebo plazma). Vzorek je ve zdroji tepla atomizován (atomizér) a zároveň excitován. Za atomizérem se nachází selektor vlnových délek a detektor, odkud se již dále zpracovává signál [5,12].

Spektroskopy obsahují komponenty jako optická okénka, zrcadla, čočky a prvky selektorů vlnových délek, přičemž žádná z komponent nesmí absorbovat vlnové délky, které jsou určeny k měření námi vybraným přístrojem. Např. klasické křemičité sklo je vhodné pro měření ve viditelné oblasti, ale absorbuje v UV i IR, proto se využívá např. křemenné sklo propouštějící UV, viditelné vlnové délky a část IR (do délky cca 2,5 μm). V IR oblasti se hojně využívají halogenidy alkalických kovů (LiF, NaCl, KBr), případně polymerní materiály nebo také AgCl a TlBr-TlI [5,19].

3.2.6.1 Zdroje záření

Nejzásadnější podmínky pro zdroj jsou, že musí produkovat požadované rozmezí vlnových délek o velkém zářivém toku a musí vykazovat dostatečnou stabilitu v čase. Pokud je zářivý tok rovnoměrně rozprostřen v širokém spektrálním intervalu, tzv. spektrální kontinuum, jedná se o zdroj spojitého záření. Oproti tomu, pokud zdroj vyzařuje jen v rámci určitých emisních pásů (spektrálních čar), tak hovoříme o čárovém zdroji záření. Dále lze zdroje rozdělit na ty, které emitují záření spojitě v čase, a na pulzní zdroje emitující záření v časových intervalech [5,12].

Mezi zdroje spojitého ultrafialového a viditelného záření řadíme např. obyčejné wolframové žárovky, které se využívají jako zdroj vlnových délek 350-2 500 nm. Dalším je halogenová žárovka, která spolu se žhaveným wolframovým vláknem obsahuje sloučeniny jodu uvnitř baňky z křemenného skla [6]. Halogenová žárovka dosahuje vyšších zářivých toků (využívá intenzivnějšího žhavení vlákna než wolframová), a má delší životnost díky jodu, který napomáhá obnově struktury wolframového vlákna [5,12].

Mezi další spojité zdroje UV a viditelného záření patří kombinované deuteriové (a vodíkové) výbojky využívané jako zdroj celého rozsahu viditelného záření a UV. Výbojky sestávají z válcové trubice, která je evakuovaná a naplněná deuteriem (příp. vodíkem) o nízkém tlaku, kdy se pomocí elektrického výboje mezi žhaveným oxidem pokrytým vláknem a kovovou elektrodou excitují molekuly deuteria, dojde k homolytickému štěpení deuteria a vyzáření záření, které pak vystupuje křemenným okénkem. Mimo klasické kombinace halogenové a deuteriové výbojky se také využívají výbojky xenonové pokrývající celý rozsah vlnových délek viditelného a ultrafialového záření [5,12].

Mezi čárové zdroje záření můžeme zařadit rtuťové výbojky využívané např. u detektorů v kapalinové chromatografii. Její dominantní emitovaná čára má vlnovou délku 253,7 nm. V atomové absorpční spektroskopii se využívá například dutá katoda emitující čárové spektrum prvku, který chceme stanovit. V současnosti jsou jako zdroj rozšířeny lasery, viz 3.2.6.2 [5,12].

Jako zdroje spojitého záření pro infračervenou oblast využívány inertní pevné látky žhavené na vysokou teplotu, např. Globar je označení tyče z karbidu křemíku žhavené elektrickým proudem na teplotu 1 500°C. Tzv. Nernstův zdroj pracuje na podobném principu, kde je

žhavený váleček vyroben z oxidů zirkonia a yttria. Další levný zdroj je elektricky vyhřívaná spirála niklchromového drátku [5,12,19].

3.2.6.2 Lasery jako zdroje záření

Lasery (z anglického *Light Amplification by Stimulated Emissiom of Radiation)* jsou využívány jako speciální zdroje záření, které produkují monochromatický, koherentní a zároveň velmi intenzivní paprsek záření [5,12].

Laser funguje na principu tzv. populační inverze v tzv. aktivním prostředí. Při dodání energie dochází k zesílení záření a celkový zářivý tok vzrůstá při stimulované emisi. K populační inverzi dochází procesem buzení, kdy je využita elektrická energie, elektromagnetické záření nebo chemická reakce [21]. Jsou typy laserů fingující kontinuálně se stabilně udržovanou populační inverzí, nebo v tzv. v pulzním módu, kdy jsou vysílané krátké pulzy záření. Ke generování pulzů se nejčastěji používá tzv. Q-spínání (*Q-switch*), kdy je periodicky modulován parametr zvaný míra kvality rezonátoru [5].

Celý excitační proces probíhá v rezonanční dutině laseru, která obklopuje aktivní prostředí. Aktivní prostředí leží mezi dvěma zrcadly, přičemž výstupní je polopropustné, aby část světla mohla opustit rezonanční dutinu, ale zároveň laserový paprsek osciloval v dutině. Během oscilace je paprsek zesilován, ale jsou zesíleny pouze vlnové délky, které splňují podmínky daného rezonátoru a nazýváme je rezonanční módy laseru. K laserovým přechodům dochází většinou mezi excitovaným singletovým stavem a základním stavem [5,21].

Různé typy laseru se liší složením a fází aktivního media. Mezi nejstarší typy patří pevnolátkové lasery, kam patří např. rubínový laser, kde aktivní médium je krystal korundu, který ve své krystalické mřížce obsahuje atomy Cr^{+3}. Dalším je laser Nd:YAG (krystal syntetického yttrium-hlinitého granátu dopovaného atomy Nd^{3+}), kde je populační inverze dosáhnuta buzením xenonovou výbojkou. Laser Nd:YAG je konstruován tak, aby vysílal vlnovou délku IR spektra 1,06 µm. K výrobě laserů na bázi krystalů YAG můžou být využity i prvky vzácných zemin jako ytterbium, holmium nebo erbium. Minerál korund je také základem titan-safírového laseru laditelného v infračervené oblasti [5].

Mezi plynové lasery patří např. laser He-Ne, který pracuje v kontinuálním módu a své využití nalézá zdroj záření a jako pomůcka pro optické seřizování. K buzení je využíván elektrický výboj a emitované záření se nachází v červené oblasti viditelného světla (vlnová délka 638,8 nm) [21]. Další typ je dusíkový laser (N_2-laser) generující záření v ultrafialové oblasti (vlnová délka 337,1 nm). Do této skupiny patří také excimerové lasery obsahující směs vzácných plynů a halogenů, přičemž za pomoci elektrického výboje vzniká excitovaná molekula s krátkou dobou života (tzv. excimetr, jedná se o excitovaný dimer značený jako AA^*) a po vyzáření se rozpadá. Mezi excimerové lasery patří $XeCl^*$-excimerový laser, který generuje vlnovou délku 308 nm, nebo ArF^*-laser, z něhož získáváme vlnovou délku 193 nm ze vzdáleného UV spektra. Excimerové lasery jsou důležité především ve fluorescenční spektroskopii a jako zdroje pro laditelné barvivové lasery [5].

Barvivové lasery, které se využívají ve spektroskopii laserem buzeného plazmatu, mají aktivní prostředí v kapalné fázi, jako je roztok fluorescenčního organického barviva (rhodamin, kumarin, fluorescein) v polárním organickém rozpouštědle. Získáme široké pásy fluorescenčního spektra, z nichž pak vybíráme úzký pás vlnových délek pomocí mřížky,

hranolu nebo interferometru, viz 3.2.7. K buzení tohoto typu laseru se pak využívají zdroje spojitého záření (např. xenonová výbojka) nebo jiný druh laseru [5].

Poslední skupinou jsou polovodičové lasery neboli laserové diody, u nichž populační inverze vzniká na pomezí vodivostního a valenčního pásu na rozhraní p-n přechodu polovodičové diody. Emitovaná vlnová délka pak závisí na použitém polovodičovém materiálu a je laditelná v úzkém rozmezí. Tato skupina laserů nalézá uplatnění i v běžných zařízeních jako jsou laserové tiskárny, případně k přenosu dat optickými vlákny, ale v analytické chemii nalézá své uplatnění v Ramanově spektroskopii [5].

3.2.7 Selektory vlnových délek

Optické elementy, které vymezují úzký pás vlnových délek, jsou nezbytnou součástí spektrometru jak pro ultrafialovou, tak i pro viditelnou oblast. Nejčastějšími selektory jsou monochromátory nebo filtry. Součástí spektrografu je vstupní štěrbina, difrakční mřížka a velký otvor na výstupu (místo výstupní štěrbiny), aby velký rozsah vlnových délek mohl dopadnout na plošný detektor [5,12].

Monochromátory jsou vybaveny difrakční mřížkou (dříve hranol), která rozkládá záření na jednotlivé vlnové délky a její rotací pak na výstupní štěrbinu dopadají námi vybrané vlnové délky. Mimo disperzního prvku (difrakční mřížka, hranol) jsou nutné i vstupní a výstupní štěrbiny, přičemž úzký pás vlnových délek je izolován i právě výstupní štěrbinou. Rozmezí délek na výstupu z monochromátoru se nazývá efektivní šířka pásu. Monochromátory se používají ke snímání spekter nebo k měření při konstantní vlnové délce. Polychromátory jsou velmi oblíbené selektory vlnových délek, které se liší vyšším počtem výstupních štěrbin a detektorů [5,12,19].

Klasický monochromátor typu Czerny-Turner se skládá obdélníkové vstupní štěrbiny, na níž dopadá zdrojové záření, které pak dopadá na konkávní zrcadlo. Konkávní zrcadlo kolimuje světelné záření do rovnoběžných paprsků, ty dopadají na difrakční mřížku. Při dopadu na odrazivý povrch difrakční mřížky dojde k úhlové disperzi záření, tzn. čím menší je vlnová délka, tím ostřejší je úhel odrazu, a jednotlivé vlnové délky se od sebe oddělí. Odražené paprsky dopadají na druhé konkávní zrcadlo. Zrcadlo poté jednotlivé vlnové délky zaostří do jejich ohniskových rovin. Poté následuje výstupní štěrbina, kterou vybíráme konkrétní vlnovou délku. Většina monochromátorů má výstupní štěrbinu nastavitelnou, a tím umožňuje nám měnit vybraný interval vlnových délek [5,12].

Difrakční mřížky jsou pryskyřicové odlitky matricových mřížek. Matricové mřížky mají tvrdý leštěný povrch, do nějž jsou diamantovým nástrojem vyryty husté souběžné vrypy, vzdálenost vrypů je připravena dle vlnových délek, které chceme od sebe oddělit. Odlitá pryskyřice je poté pokryta vrstvičkou hliníku, případně platinou nebo zlatem.

Dalším difrakčním prvkem může být mřížka typu eschellete, s velkou odrazivou plochou, nebo konkávní difrakční mřížky, kdy dochází zároveň i k zaostření směrem na výstupní štěrbinu.

Filtry odráží nebo absorbují některé vlnové délky záření a propouští námi vybraný pás. Jsou využívány dva typy, a to interferenční a absorpční filtry. Interferenční filtry, které jsou založeny na destruktivní či konstruktivní interferenci záření. Využívají se častěji, protože propouštějí vyšší zářivý tok a šíře propuštěného pásu je užší. Absorpční filtry jsou levnější a robustnější,

ale jsou omezeny pouze na viditelnou oblast záření. Jedná se o obarvená skla, která propouštějí pouze požadované barvy, ostatní jsou absorbovány [5,12].

Na měření v infračervené oblasti se využívá Michelsonův interferometr. Informace o spektru jsou získány pomocí konstruktivních a destruktivních interferencí elektromagnetických vln v kombinaci s Fourierovou transformací [5,12].

3.2.8 Detekce a měření záření

Detektor musí snímat propuštěné nebo emitované záření a následně ho převést na měřitelnou veličinu. Ve spektroskopii může být detektorem fotografická deska, lidské oko či dnes běžně používané detektory, které převádí dopadající zářivý tok na elektrický proud nebo napětí. Moderní detaktory jsou velmi citlivé a ideálně vykazují nízkou míru elektrického šumu, kdy nejčastější zdroje šumu jsou mechanické vibrace, změny teploty a fluktuace frekvence nebo napětí elektrické sítě [5,12].

Detektory rozdělujeme do dvou hlavních skupin, na detektory snímající fotony a detektory reagující na tepelnou energii. Detektory snímající fotony jsou z fotocitlivých materiálů (polovodiče), které v důsledku dopadu fotonu emitují elektrony nebo excitují elektrony do vyšších energetických stavů, to pak zapříčiní vodivost materiálu (sníží jeho odpor). Fotovodivostní detektory se využívají při detekci UV, viditelného a blízkého infračerveného záření, přičemž infračervenou oblast můžeme detekovat i pomocí detekce tepelné energie. Mezi detektory fotonů řadíme fotonásobiče, fotonky, křemíkové diody a polovodičové detektory s diodovým polem, CCD (z angl. *charge-coupled device*) nebo CID (z anglického *charge-injection device*) [5,12].

Fotonky a fotonásobiče fungují na bázi vnějšího fotoelektrického jevu. Fotonka je složena z fotokatody, jejíž povrch je pokryt materiálem schopným fotoemise elektronů, a anody uzavřené v evakuované skleněné nebo křemenné obálce. Když na povrch fotokatody dopadne záření o vhodné vlnové délce vstupním okénkem, budou z jejího povrchu vyraženy fotoelektrony (primární elektrony). Primární elektrony jsou vloženým napětím mezi katodu a anodu urychleny ke kladně nabité anodě, tím vniká v obvodu tzv. fotoproud. Vyhodnocení vychází z faktu, že počet vyražených fotoelektronů za jednotku času je přímo úměrný dopadajícímu zářivému toku [5,12].

Fotonásobiče jsou konstrukčně podobné fotonkám s rozdílem, že současně signál zesílí. Navíc mimo katody a anody obsahují také tzv. dynody, z nichž jsou po dopadu primárních elektronů vyraženy sekundární elektrony. Vyhodnocují se průměrné hodnoty proudu po dopadu elektronů na anodu, nebo se detekují proudové pulzy (tzv. počítání fotonů) [5,12].

Vnitřní fotoelektrický jev využívají křemíkové polovodičové detektory. Tohoto pak využívají plošné detektory s diodovým polem a CCD (z angl. *charge-coupled device*, zařízení s nábojově vázanými prvky) [19]. Vnitřní fotoelektrický jev se projevuje tak, že jsou valenční elektrony vybuzeny do vrstev o vyšší energii, a tím zapříčiní vodivost materiálu [7]. Elektrony jsou schopny se pohybovat po materiálu a vést elektrický proud, přitom vznikne v elektronovém obalu tzv. vakance neboli díra. Křemíková fotodioda se využívá k měření zářivého toku, kdy dostatečnou energii k vyvolání vnějšího fotoelektrického jevu poskytuje UV a viditelná část spektra. V porovnání s fotonásobiči vykazují mnohem nižší citlivost [5,12].

Detektory s diodovým polem jsou složeny z křemíkových destiček se stovkami křemíkových fotodiod v těsné blízkosti. Tento typ detektorů se umisťuje v ohniskové vzdálenosti

monochromátoru tak, aby mohl snímat celé spektrum. Tohoto se využívá nejen ve spektrometrech, ale i ve skenerech či čtečkách čárových kódů [5,12].

Zařízení s přenosem náboje (CTD, z anglického *charge-transfer device*) dokáží snímat velkou část spektra, a zároveň minimalizují šum, který je problémem u většiny křemíkových polovodičových detektorů. Dvoudimenzionální detekční prvky (pixely) jsou organizovány do struktury sloupců a řad po celé ploše detektoru. Materiál pixelů je z dopovaného křemíku (s příměsí jiných prvků). Každý pixel je složen ze dvou elektrod, izolující vrstvy a polovodivého dopovaného křemíku jako substrátu. Na dvě sousední elektrody jsou vloženy různě velké potenciály, což způsobuje kumulaci vygenerovaného náboje pod elektrodou o větším záporném potenciálu. Měří se potenciál mezi elektrodami, vyvolaný elektromagnetickým zářením, a to dvěma různými způsoby [5,12].

První způsob se využívá u detektoru CID, kde je měřena změna napětí, která vzniká při přestupu náboje od elektrody o nižším potenciálu k druhé o vyšším potenciálu. Druhý způsob využívá CCD detektor, kde se hromadí náboj na konci čipu v tzv. čtecím řádku, kde je zároveň zesílen. Tyto detektory nalézají uplatnění ve spektroskopii, v digitálních kamerách, v mikroskopii i astronomii (např. v Hubbleově teleskopu) [5,12,19].

Poslední skupinou detektorů jsou detektory tepelného záření. Nejčastější uplatnění je k měření fotonů v infračervené oblasti. Ve spektroskopii FTIR (infračervený spektrometr s Fourierovou transformací) jsou užívány MCT (z anglického *Mercury-Cadmium-Telluride*), fotovodivostní nebo pyroelektrické detektory. Ke snímání tepelného záření detektory používají malý začerněný povrch, který absorbuje IR záření, a tak zvyšuje svou teplotu [19]. Poté je změna teploty převedena na elektrický signál, jenž je zesílen a změřen. Celá detekce je provedena za vakua, i přesto je přesnost nižší než u klasických UV/VIS detektorů [5,12].

Dalšími detektory tepelného záření jsou termočlánky, které generují elektrický proud. Příkladem jsou bolometry z vodivého materiálu, jejichž odpor závisí na teplotě, nebo plynové (pneumatické) detektory obsahující vzácný plyn v komoře a membránu, která se deformuje v důsledku změny objemu plynu spolu s teplotou. Poslední jsou pyroelektrické detektory z materiálu jako je $BaiTiO_3$, nebo z deuterovaného triglycinumsulfátu. Skládají se z pyroelektrického krystalu, který je zasazen mezi dvě elektrody po ozáření produkuje napětí závislé na teplotě [5,12].

3.2.8.1 Čtení a zpracování signálu

Po detekování je nutné signál znásobit, protože odezva na měřenou veličinu je většinou příliš malá. Dále se musí odfiltrovat rušivé komponenty jako je šum, konvertovat mezi střídavým se stejnosměrným signálem, případně změnit fázi signálu. Všechny tyto kroky probíhají v procesoru signálu, který může signál matematicky zpracovat (derivovat, integrovat, logaritmovat). Poté můžeme výsledky vyobrazit v závislostech nebo číselných hodnotách na displeji přístroje či monitoru počítače, případně je můžeme déle upravovat, porovnávat i ukládat. Spektra můžeme porovnat s databázemi daných analytických metod nebo je sdílet [5,12].

3.3 Absorpční UV/VIS spektrometry

Klasická UV-VIS spektroskopie je absorpční spektroskopickou metodou, kdy rozmezí použitých vlnových délek začíná v UV oblasti (200-400 nm), až do oblasti viditelného záření,

které obsahuje vlnové délky 400-700 nm. Metoda je založena na výše rozepsaném Lambertově-Beerově zákoně (viz 3.2.2), kdy dle zákona je absorbance závislá na koncentraci obsažené složky. Při analýze mohou energii absorbovat vazebné i nevazebné elektrony v molekule [5,12,16].

Rozdělit tyto přístroje je lze dle použitého disperzního prvku nebo dle vnitřního uspořádání. První skupinou jsou disperzní spektrometry, které jsou vybaveny monochromátorem nebo polychromátorem, načež nesmí chybět senzor záření převádějící zářivý tok na elektrický signál. Dokážou pokrýt měření v UV, viditelné i blízké infračervené oblasti. Nedisperzní spektrometry využívají místo monochromátorů interferenční nebo absorpční filtry, případně interferometr. Jsou levnější a robustnější variantou pro měření ve viditelné oblasti. Oba typy jsou realizovány v jednopaprskovém nebo dvoupaprskovém uspořádání [5,12,16].

Jednopaprskové uspořádání je nevhodné k měření molekul, ale zato má nižší pořizovací cenu, jsou jednodušší a mají snadnější údržbu. Dvoupaprskové uspořádání disponuje svazkem, který prochází kyvetou se vzorkem, a druhým, který prochází referenční kyvetou. Díky tomu se kompenzují fluktuace zářivého toku produkované zdrojem záření. Dobré jsou i ke kontinuálnímu měření absorpce vzorku [5,12,16].

Metoda lze využít samostatně jako analytická metoda, např. ve forenzní chemii, ale také v kombinaci např. jako detektor při separaci v kapalinové chromatografii, elektroforéze, imunochemických stanoveních a kontinuální průtokové analýze [12].

3.4 Molekulová absorpční spektroskopie

Metody molekulové absorpční spektroskopie v ultrafialové, viditelné i infračervené oblasti spektra jsou široce využívané k identifikaci a stanovení struktury anorganických i organických látek, včetně biochemicky aktivních. V chemických a klinických laboratořích jsou nedílnou součástí procesů. Slouží ke kvalitativní, tak i kvantitativní analýze zejména v oblasti znečistění životního prostředí, kde se ve velké míře uplatňuje infračervená spektroskopie [5,12,16].

Dle projevu typu energetické změny ve spektru se molekulová spektroskopie dělí na mikrovlnnou (rotační přechody), infračervenou a Ramanovu (rotačně vibrační přechody) a viditelnou až ultrafialovou (elektronové přechody) [5,12].

3.5 Ramanovská spektroskopie

Ramanova spektroskopie je instrumentální analytická metoda, kterou lze rychle, bezkontaktně a nedestruktivně analyzovat chemické sloučeniny a jejich směsi [22].

Ramanova spektroskopie je založena na tzv. Ramanově jevu, nebo také Ramanově rozptylu. Jedná se o neelastický rozptyl, který byl objeven Ramanem a Krishnanem, jejich objev byl publikován v roce 1928 [23]. Později v roce 1930 byl Chandrasekhar Venkata Raman oceněn Nobelovou cenou. Samotný jev byl předpovězen již v roce 1923 Adolfem G. S. Smekalem [24,25].

3.5.1 Ramanův rozptyl/Ramanův jev

Fyzikální podstatou Ramanova rozptylu jsou neelastické srážky molekul s fotony z viditelné až blízké infračervené oblasti elektromagnetického záření. Podstatou je zářivý přechod mezi dvěma vibračními hladinami ve vazbě molekuly [19,26].

Převážná část fotonů se rozptýlí elasticky tzv. Rayleighovým rozptylem. Pokud se energie rozptýlených fotonů liší od energie dopadajících fotonů, tak mluvíme o neelastickém

Ramanově rozptylu. Pouze jeden z 10^7 fotonů rozptýlených ze vzorku pochází z Ramanova rozptylu [23,27]. Mohou nastat dvě možnosti, v prvním případě má rozptýlené záření nižší energii, než mělo záření dopadající, v tomto případě hovoříme o Stokesově rozptylu. V případě druhém, vzácnějším, má rozptýlené záření vyšší energii, než mělo záření dopadající, to znamená, že se molekula nacházela již v excitovaném vibračním stavu. Při pokojové teplotě se ale většina molekul nachází ve stavu základním, nikoliv excitovaném [19,26].

Ne všechny vazby v molekulách jsou Ramanovsky aktivní, je nutné, aby při vybuzení vibračního stavu docházelo ke změně polarizovatelnosti. Polarizovatelností rozumíme schopnost posunu záporných nábojů v molekule vlivem vnějšího elektromagnetického pole, tj. do jaké míry je elektronový mrak deformován. Polarizovatelnost je proměnná v čase v závislosti na frekvenci vibrace molekuly [19,26].

Výstupem Ramanovy spektroskopie jsou Ramanova spektra, která vyjadřují závislost intenzity rozptýleného světla na Ramanově posuvu (značíme relativním vlnočtem v cm^{-1}, vztaženém k vlnové délce budícího laseru), které poskytuje informaci o vibračních stavech molekul. Frekvence vibračních stavů jsou závislé na základních charakteristikách dané molekuly, jako je jejich molekulová hmotnost, počet vazeb, počet násobných vazeb, síla vazeb, funkční skupiny apod., ale také jejich prostorové uspořádání. V Ramanových spektrech jsou vibrace reprezentovány jako spektrální pásy (čáry), a jejich intenzita je úměrná druhé mocnině změny polarizovatelnosti při vibraci vazby. Ve spektru se mohou objevit i tzv. overtony, které jsou násobky základních spektrálních čar, případně jejich lineární kombinace [19,28].

Mezi molekuly, které jsou schopny efektivně měnit polarizovatelnost vazeb, patří takové, které obsahují symetrické nepolární vazby jako je dvojná vazba mezi uhlíky nebo atomy dusíku, trojná vazba mezi uhlíky apod. Tzn., že v Ramanovských spektrech se nejvíce projevují vazby, u nichž probíhají symetrické vibrace a vibrace ve fázi [19].

Ramanova spektroskopie se dá využít jak ke kvantitativní, tak i kvalitativní analýze. Tím, že výsledné Ramanovské spektrum poskytuje velké množství informací o struktuře zkoumané částice, tak je výborným prostředkem pro identifikaci dané molekuly a slouží jako „otisk prstu“ mnohých struktur. I v případě, kdy nelze využít dostupné databáze, lze ze spektra posoudit molekulární strukturu. Z intenzity jednotlivých píků spektra lze poté sestavit i kvantitativní analýzu. Kvantitativní analýza skýtá jistá úskalí, neboť měření může ovlivnit mnoho faktorů, ať už instrumentálních, nebo chemických či fyzikálních. Proto se nejčastěji využívá metoda kalibrační závislosti [19,26].

Výhodou je, že je možné analyzovat látky v pevném skupenství, jako jsou látky krystalické, amorfní, polovodičové, kovy, polymerní, v kapalném skupenství, kdy se může jednat o čisté kapaliny, vodné nebo jiné roztoky [19,26].

3.5.2 Rezonanční Ramanova spektroskopie (RRS)

Jednou z velkých nevýhod Ramanovy spektroskopie je její poměrně nízká citlivost. Protože je Ramanova spektroskopie limitována na citlivosti, není možné detekovat stopová množství analytů [27].

Jedna z metod, jak zajistit vyšší citlivost této techniky je rezonanční Ramanova spektroskopie. Technika je postavena na tzv. rezonančním Ramanově rozptylu, který nastává, když vlnová délka excitačního laseru odpovídá energii potřebné k elektronovému přechodu v molekule, tím se dostanou elektrony do elektronového excitovaného stavu. Rezonance

zesiluje pouze Ramanův rozptyl ze specifického vibračního módu a každý z přechodů musí být povolen, také musí být vybrán silný pás, aby k rezonanci došlo [29].

Ramanův rezonanční rozptyl se využívá při zkoumání barvených látek, ale problémem může být silná doprovodná fluorescence u vzorků a jejich fotodegradace. Výhodou je, že zesílení dosahuje 10^3-10^6 [19,29].

3.5.1 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS)

Intenzita Ramanova signálu závisí do značné míry na Ramanově průřezu rozptylu molekuly („*Raman cross-section*“), který je úměrný jeho polarizaci, dané chemickou strukturou. Objev povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie [30] nám umožňuje zesílení Ramanova signálu o několik řádů tím, že vzorek je v kontaktu s nanostrukturovanými kovovými povrchy. V určitých případech lze pozorovat signál i z jednotlivých molekul [31].

První zmínky o SERS („*Surface-Enhanced Raman Scattering*“) efektu byly zaznamenány v roce 1974 Fleischmannem a kol., kdy byl pozorován na molekule pyridinu. Zesílený ramanovský signál byl zaznamenán z povrchu stříbrné elektrody, na jejímž povrchu byl pyridin adsorbován [32].

Zesílení je způsobeno interakcí lokalizované oscilace plazmonu s elektrony v molekulových orbitalech námi studované molekuly. Vznik povrchového zesílení má dva základní principy, a to elektromagnetické a chemické zesílení [19,33,34].

3.5.1.1 Elektromagnetické zesílení

Na kovových nanočásticích nebo na drsném kovovém povrchu může vznikat tzv. povrchový lokalizovaný plazmon, který vyvolá elektromagnetické zesílení. Povrchový plazmon označuje koherentní oscilaci vodivostních elektronů kovové nanočástice. Oscilaci je možné vyvolat světelným (tzv. budícím) zářením s vlnovou délkou, jež je větší, než je průměr nanočástice. Můžeme říci, že se jedná o hromadné excitace vodivostních elektronů, vybuzení je pomocí elektromagnetického vlnění viditelné oblasti spektra. Proto je nutné, aby nanočástice byla mnohonásobně menší v porovnání s vlnovou délkou elektromagnetického záření [19,33,34].

Vybuzení povrchového plazmonu budícím zářením způsobí zesílení elektromagnetického pole v těsné blízkosti nanočástice, jelikož plazmonové pole dosahuje pouze několik nanometrů daleko od kovového povrchu. Nachází-li se v tomto blízkém poli stanovovaná molekula, tak na ní dochází k elastickému i neelastickému rozptylu [19,35]. Nejintenzivnější plazmony jsou lokalizovány v oblastech zvaných „hot-spoty“ (v literatuře jiných zdrojů také aktivní místa), které se vytváří, když jsou kovové částice blízko u sebe, případně ve strukturovaném povrchu se nachází v nanometrových mezerách povrchu [36,37].

K zesílení Ramanova rozptylu se využívají především ušlechtilé kovy jako je zlato, stříbro, v některých případech i měď, nebo také kovy alkalické jako lithium, sodík či draslík [19,35].

Elektromagnetické zesílení je převážně závislé na vlastnostech nanočástic, méně pak na druhu analytu. Zesílení elektromagnetického signálu se pro různé molekuly liší, některé zdroje uvádí 10^8-10^{12} [35], ale průměrně dochází k zesílení v řádech 10^4-10^6 [38]. Jiné zdroje uvádí teoretický limit zvýšení elektromagnetického signálu až v řádu 10^{11} [39].

3.5.1.2 Chemické zesílení

Chemické zesílení je o několik řádů nižší a těžce detekovatelné, protože je překryto silnějším elektromagnetickým zesílením. Předpokládá se, že v důsledku chemisorpce studované látky

na povrchu nanočástic kovu, a stejně jako v případě elektromagnetického zesílení, dochází k interakcím mezi valenčními elektrony studované molekuly a vodivostních elektronů kovu, ale dochází k ovlivnění náboje neboli změně polarizace molekuly [40].

Přes těžkou detekovatelnost se povedlo vědcům změřit chemické zlepšení Ramanova signálu řádově 10^2-10^4 [41,42].

Celkové průměrné zesílení Ramanova rozptylu je tedy řádově mezi 10^{11}-10^{12}, tyto hodnoty jsou ale závislé na druhu kovu, jeho struktuře a mnohých dalších faktorech [43].

3.5.1.3 Aplikace SERS v praxi

Operace je poměrně jednoduchá, ale pokud se jedná o roztok, v některých případech je nutné před měřením vzorek vysušit, protože jak již bylo výše zmíněno, molekuly musí být ve velmi těsném kontaktu se substrátem, aby došlo k zesílení signálu. Vysušením se zabrání difúzi molekul z povrchu kovových nanostruktur do roztoku, ale i přes aplikační potíže a zeslabení signálu v důsledku difúze v roztoku bylo zjištěno, že při lokálním zahřátí substrátu může dojít k opětovnému zesílení Ramanovského signálu [44].

Při měření těkavých složek je sušení nemožné, došlo by k závažným chybám v měření, v takových případech je možné vzorek uzavřít do neprodyšného prostředí, kde budou molekuly v přímém kontaktu s nanostrukturami kovu. Jednou z možnosti může být i v monitoringu životního prostředí, kdy vědci navrhli optofluidní zařízení, které se skládá z mikrofluidního čipu, v němž byl uzavřen citlivý SERS substrát. Mikrofluidní čip se zhotovuje například lisováním hmoty do formy, dle npožadovaného reliéfu. Výsledný optofluidní systém byl v experimentu využit ke kvantitativní detekci 1,2,3-trichlorpropanu, který znečišťuje životní prostředí, ve vodě již v submilimolárních koncentracích. Tím navrhli účinný prostředek k velmi rychlé a jednoduché kvantifikaci těkavých halogenovaných látek [27]. Takto navržený systém je možné uplatnit také k detekci léčiv, toxinů, polutantů nebo dalších biologicky důležitých molekul [22,27,45].

Zajímavá aplikace je také monitorování léčiv, kdy bylo například v slzách pacienta monitorována koncentrace či přítomnost léčiv [46]. Další možná aplikace je suspendovaných nanočástic kovu, které mohou být vyrobeny přímo *in situ* v roztoku vzorku, ale poté může nastat problém v reprodukovatelnosti měření [47].

Velké výhody Ramanovy spektroskopie mohou spočívat i v nedestruktivní povaze analýzy, tudíž můžeme testovat i biologickou aktivitu vzorku po konci analýzy. Analýza se dá aplikovat na vzorky libovolné morfologie, vzorky mohou být roztoky vodné, bezvodé, suspenze, precipitáty, gely, vrstvy, vlákna, prášky, monokrystaly a mnoho dalších. Díky tomu můžeme i porovnat nakolik se liší struktura biomolekuly v roztoku či v krystalické formě. Metoda je nenáročná na množství vzorku a na čas. Velkou výhodou je existence databází spekter [48].

Metoda je výhodná k analýze biologických systémů, ať už velmi citlivých biomolekul, tak i mikroorganismů, přičemž je zachována jejich původní struktura i biologická aktivita [19,29].

Uplatnění je široké, od analýzy v životním prostředí [49], v medicíně [50], farmaceutickém průmyslu, potravinářství [37,51], kriminalistice až ke geologii [29,52].

V případě experimentů provedených v této diplomové práci byly použity dva různé substráty k vytvoření SERS efektu, prvním je substrát SERS pojmenovaný SK307 a zlaté modifikované nanočástice. Oba případy jsou popsány níže, viz kapitoly 4.5 a 4.8.

Obrázek 3: Ramanův spektrometr InVia (Renishaw, Wotton-under-Edge, Velká Británie) použitý k měření rhodaminu B [53].

3.5.2 Zlaté nanočástice

V poslední době anorganické jsou nanočástice, jako jsou kvantové tečky (QD), široce používány jako fluorescenční značení pro biologické buňky a tkáně [54]. Přes jejich potenciální úspěch jako bio-zobrazovací činidla, cytotoxicita spolu se špatnou rozpustností QD ve vodě se staly překážkou a problémem k jejich biomedicínské aplikaci *in vivo*. Fluorescenční techniky často postrádají citlivost a selektivitu v biologických podmínkách. Proto jsou využívány zlaté nanočástice jako alternativa z důvodu jejich nízké cytotoxicity, rozpustnosti ve vodě, vysoké elektronové hustotě, dlouhodobé stabilitě a biokompatibilitě. Navíc, tyto zlaté nanočástice prokázaly zesílení při použití techniky Ramanovy spektroskopie, a principem SERS zvyšují citlivost této techniky při použití v biologických vzorcích [55].

Již před několika lety byly představeny zlaté nanotyčky jako velmi účinné zobrazovací sondy v biomedicínských a biologických aplikacích [56]. Zlaté nanotyčky mají dva pásy povrchového plasmonu, první s krátkou vlnovou délkou a druhý s delší vlnovou délkou, v blízké infračervené oblasti [57]. Pásmo dlouhých vlnových délek má mnohem větší intenzitu absorpce díky podélnému kmitání elektronů vodivého pásu, díky čemuž zlaté nanotyčky absorbují a rozptylují elektromagnetické záření s mnohem větší účinností než sférické nanočástice. Vyšší účinnost je způsobena plošnějším povrchovým zesílením elektrického pole při excitaci povrchového plazmonu, které využíváme i v metodě SERS. Agregáty zlatých nanotyček zesilují Ramanuv rozptyl vyšší mírou než agregáty nanosfér [49,58].

Zlaté částice se stávají čím dál více atraktivní, jakožto materiály pro biosenzory, už jen díky jejich rozměrům, které jsou velmi podobné s makromolekulárními látkami, ale také pro jejich optické a elektrické vlastnosti závislé na jejich velikosti, tvaru, vzdálenosti mezi ostatními částicemi, a biokompatibilitě i stabilitě [37,59].

Na plazmonovou rezonanci zlatých nanočástic má velký vliv jejich funkcionalizace, velikost, rozpouštědlo, ale také intenzita a vlnová délka budícího záření. Zlaté nanočástice vykazují vysokou afinitu k thiolům a thiolem modifikovaným molekulám [60], které jsou silně nukleofilní a mají vysokou afinitu ke kovovým iontům [60].

Nanorozměry částic nám dávají jednu z možných cest k detekci a regulaci rozmanitých biomedicínských procesů, které samy o sobě probíhají v nanoměřítku. Nanočástice jsou definovány jako útvary v rozměrech 1 až 1 000 nm, díky své velikosti mají charakteristické

vlastnosti povrchové chemie, a také tvarově závislé elektrické a optické vlastnosti. Tyto vlastnosti umožňují široké množství aplikací jako je dodávání léčiv a genů [61], zobrazování [62–64], vývoj vakcín nebo v biosenzorice a terapii [48,50,61,62].

3.5.2.1 SERS substrát

V praxi je již zavedeno mnoho různých typů SERS substrátů. Jedním z nich je námi použitý SERS substrát SK307 [27]. Jak již bylo výše zmíněno (viz 3.5.1) geometrii nanostrukturovaného zlatého povrchu mohou vznikat lokalizované oscilace plazmonu, které dávají za vznik SERS efektu, při němž jsou zesíleny Ramanovy spektrální čáry zesíleny. Zesílení je způsobeno interakcí plazmonického pole s elektrony v molekulových vazbách [36].

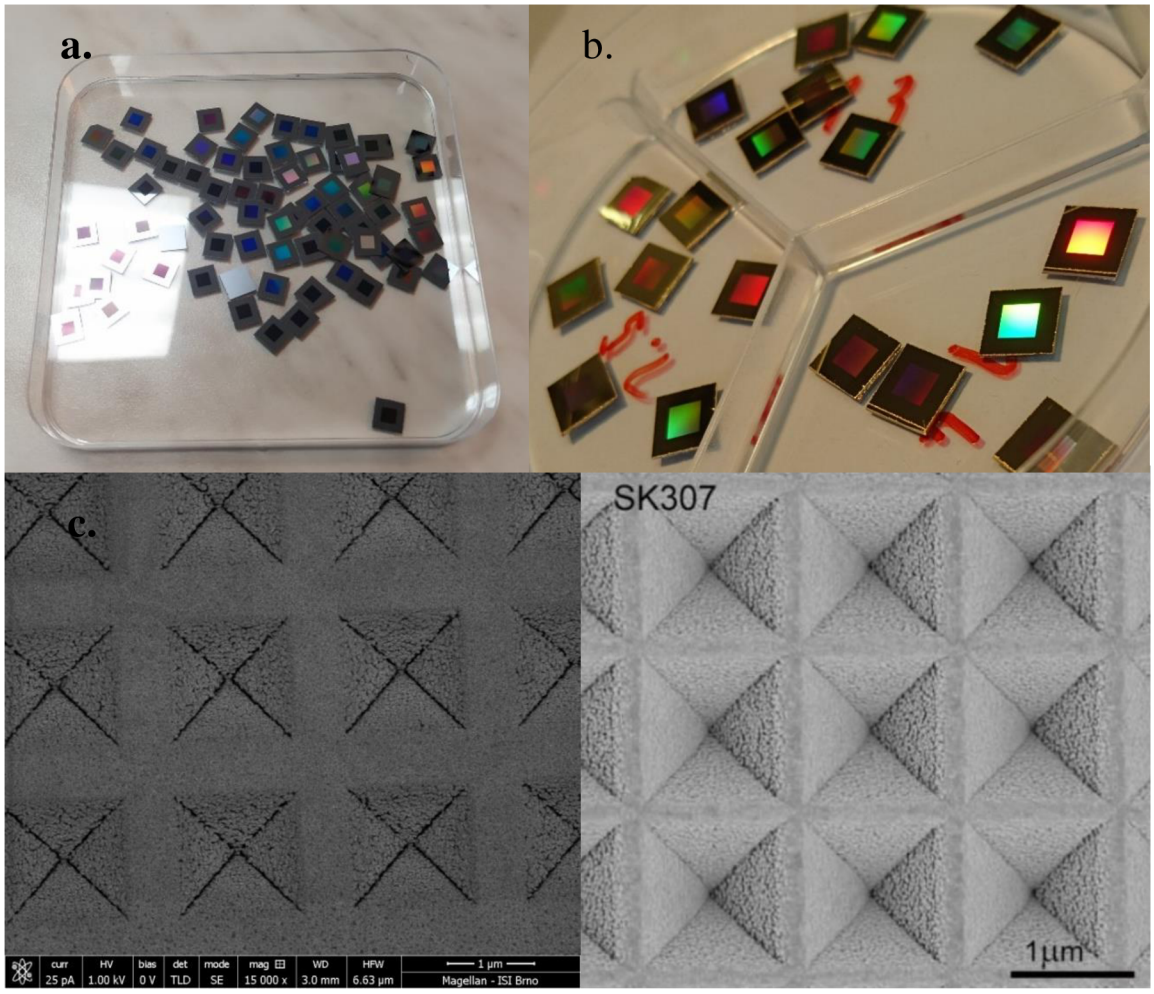
Použitý substrát SK307 má základ na křemíkovém čipu, na němž byly vyrobeny struktury metodou litografie elektronovým paprskem a mokrého leptání, čímž bylo dosaženo vzoru převrácené pyramidy na povrchu. Povrch je poté dodatečně pokryt vrstvou zlata o definované tloušťce a drsnosti. Díky těmto periodickým povrchovým strukturám jsou možné opakovatelné výsledky [27].

Litografická maska z oxidu křemičitého o tloušťce 100 nm byla připravena tepelnou oxidací. Oxidovaný substrát byl následně rotačně pokryt vrstvou polymethylmetakrylátu o tloušťce 80 nm, která plní funkci rezistu, což je makromolekulární látka citlivá na elektromagnetické záření. Tím, že na ní působíme energií elektronového svazku, tak dochází k síťovacím nebo degradačním procesům [27,60].

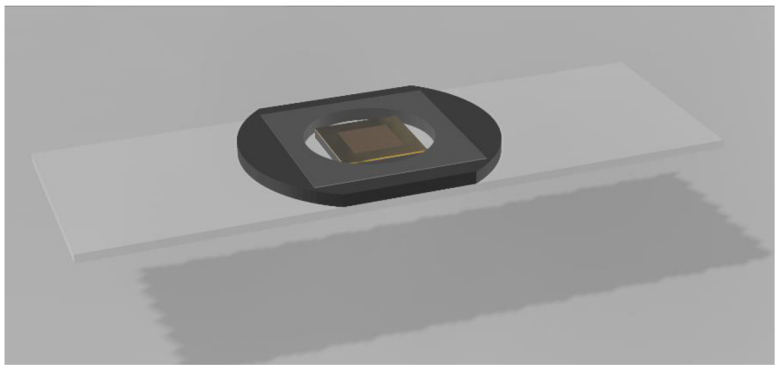
Systémem E-beam Raith (Vistec, Jena, Německo) EBPG5000+ ES pak provedl expozici požadovaného vzoru, který se skládal z jednoduché čtvercové mřížky s roztečí délky 1325 nm, kde byl vzorem nejprve čtverec o délce strany 900 nm. Vzor pokrývá plochu o velikosti 4 na 4 mm^2. Po kroku vyvolání byla na celý substrát po krátkou dobu aplikována kyslíková plazma, aby byla odstraněna část rezistu z masky oxidu křemičitého. Poté k leptání masky oxidu křemičitého bylo použito pufrované oxidové leptadlo (BOE), které bylo složeno z fluoridu amonného a kyseliny fluorovodíkové. Po nanesení vzoru do litografické masky byl rezist kompletně odstraněn kyslíkovou plazmou, následně byl vzor reverzních pyramid vyleptán do povrchu křemíkového substrátu vodným roztokem s 40 hm% hydroxidu draselného při 60 °C. Zbytek masky oxidu křemičitého byl odstraněn po leptaní křemíku leptadlem z fluoridu amonného a kyseliny fluorovodíkové. Poté byl substrát nakrájen na malé čipy o velikosti 10 na 10 mm^2, viz **obrázek 4 a.**, které byly posledním krokem podrobeny magnetronovému naprášení 300 nm zlata (Au). Výsledný produkt byl křemíkový pozlacený čip se vzorem reverzních pyramid se čtvercovou základnou (viz **obrázek 4 b. a SK307**) [27].

Koncept tohoto substrátu byl inspirován komerčním substrátem SERS Klarite 312 (Renishaw Diagnostics, Glasgow, Spojené království), jehož výroba byla ukončena. Substrát Klarite 312 obsahoval vzor převrácených pyramid se čtvercovou základnou o délce rozteče 2000 nm s hloubkou jamky 1000 nm, který byl vyráběn na křemíkovém substrátu [65]. Na **obrázku 4 c.** je snímek z elektronového mikroskopu, kde je vyobrazen substrát Klarite 312 v porovnání s SK307, kde SK307 má cca dvojnásobné množství pyramidek na jednotku plochy oproti Klarite 312. SK307 má nejen menší pyramidy, ale také menší mezery mezi nimi. Zrnitý zlatý povrch substrátu je nezbytný pro maximalizaci Ramanova signálu [27].

Se substrátem je nutno pracovat v prostředí laminárních boxů a musí se dbát na dokonalou čistotu substrátu. Substráty je možné recyklovat, po důkladném očištění se a opětovném naprášení zlata [27].



Obrázek 4: SERS substrát. **a.** Nakrájené čisté čipy před naprášením zlata. **b.** Čipy s naprášeným zlatem. **c.** SEM snímek Klarite 312 a SK307 získán z rastrového elektronového mikroskopu Magellan 400 (FEI, Hillsboro, OR, USA; detektor TLD; 1–2 kV; 6,3–25 pA; 2,6–3,0 mm pracovní vzdálenosti; 15 000–20 000x zvětšení) [27].



Obrázek 5: Hotový SERS substrát na měření [66].

Jednou z náplní závěrečné práce bylo naprašovat zlato na výše popsané křemíkové čipy a použít je následně k měření. Podrobný popis naprašování zlata viz 4.5.

3.6 Detekce bakterií pomocí SERSu

Detekce patogenu v této diplomové práci je založena na metodě SERS. V tomto případě je jako substrát použita zlatá sendvičová nanostruktura, která slouží k zesílení Ramanovského signálu [49].

Aby soustava byla ještě specifičtější, tak se celý systém vybaví tzv. Ramanovskou značkou. Jedná se o látku, která má silnou a specifickou odezvu na použitou vlnovou délku a ve výsledném spektru ji jsme schopni nalézt na konkrétním vlnočtu spektra. Díky značení není potřeba rozlišovat jednotlivé obsahy buněk. V konkrétním příkladě, který je blíže popsán níže, byla jako Ramanovská značka použita 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina) (DTNB), která má odezvu na 1,333 cm^{-1}[49].

Tzv. Ellmanovo činidlo (DTNB) se váže pomocí nekovalentních interakcí na povrch zlaté nanočástice [63]. Tato látka se často využívá ke kvantifikaci thiolových látek a biothilů v biologických vzorcích a léčivech [49]. Obsahuje-li roztok volné sulfhydrylové (thiolové) skupiny v roztoku, tak se místo DTNB naváže právě skupina thiolová a DTNB se uvolní do roztoku za současné změny barvy zlutě zbarveným 5-thio-2-nitrobenzoátového aniontu (TNB_2^-), ale také absorbance roztoku při 410 nm [67].

Základem celé sendvičové struktury jsou zlaté nanočástice, ve článku využili jak sférické, tak i tyčovité nanočástice, přičemž odezva tyčovitých je silnější, už jen z důvodu toho, že díky dvěma rozměrům mají dva typy plazmonové rezonance [49].

Samotné nanočástice lze jednoduše syntetizovat za pomocí $HAuCl_4$ (kyselina chlorozlatitá), která je v roztoku CTABu (tenzid hexydecyltrimethylammonium bromid) za přídavku redukčního činidla $NaBH_4$, tak vzniknou tzv. semínka, která se budou dále zvětšovat. Semínka se přidávají do roztoku CTABu s $HAuCl_4$ a dusičnanu stříbrného stabilizovaného kyselinou askorbovou [49].

Takto vzniklé nanotyčky se posléze nechají v roztoku DTNB za vytvoření monovrstvy Ramanovy značky, poté povrch modifikován 3-merkaptopropionovou kyselinou, pro aktivaci karboxylových skupin jsou nanočástice naloženy do roztoku sodné soli hydroxysulfosukciimidu (NHS), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylkarbiimid hydrochloridu (EDC), to celé v pufru založeném na kyselině 2-morfolinethansulfonové (MES). Po aktivaci karboxylových skupin byl navázán avidin v MES pufru, na nějž byla pomocí specifické vazby avidin-biotin navázána biotinylovaná protilátka [49].

V tomto pokuse byla použita protilátka k *Escherichia coli* K-12, která byla původně detekována ve vzorku vody z životního prostředí [49].

V druhé části pokusu je potřeba vyrobit imobilizující složku systému, která bude bakterii držet na místě, aby mohla být změřena. V tomto případě je možné zaujmout dva přístupy. Buď mohou být syntetizovány pozlacené magnetické nanočástice (viz **obrázek 6**), které se modifikují dle výše uvedeného postupu, s tím rozdílem, že není použito DTNB [63]. Nebo jsou vyrobena pozlacená sklíčka (viz **obrázek 7**), která jsou modifikována stejným způsobem jako pozlacené magnetické nanočástice [49].

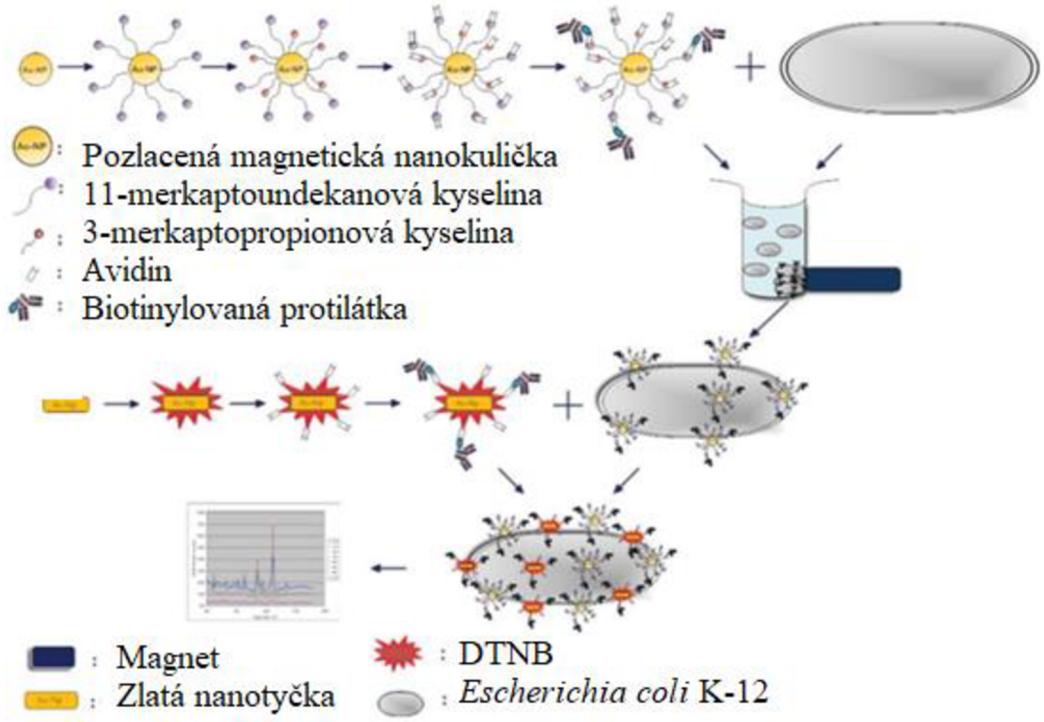
K samotné analýze byly použity podobným způsobem připravené zlaté nanočástice, ale nejen ve studii výše uvedeného pokusu [49], ale i např. v pokusu, kdy byly analyzovány vzorky potravin, kdy se vědci snažili určit znečištění potravin [68].

Na analýzu byly použity i různé typy pomocných materiálů, protože další problém byl soustředit analyzované bakterie v jednom místě, aby mohly být podrobeny analýze. Proto byla použita např. protilátkou modifikovaná pozlacená sklíčka [49], případně magnetické pozlacené nanočástice, opět modifikované protilátkou [63,68,69].

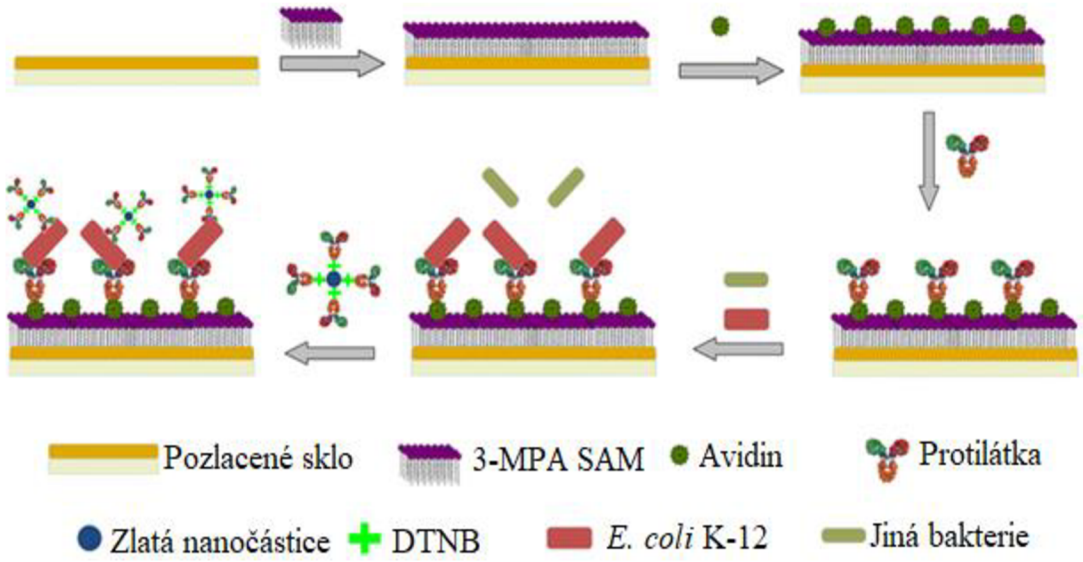
Díky takto připraveným nanočásticím jsme schopni analyzovat velké množství druhů bakterií, je nutné pouze při výrobě vyměnit typ protilátky [63,68,69]. Díky vysoké specifitě vazby protilátka-bakterie má analýza vysokou citlivost. Analyzovat lze vzorky nejen z životního prostředí [49], ale i vzorky potravin [68], případné využití je i v lékařské diagnostice [48,50]. Právě identifikace mikroorganismu rychle a spolehlivě je velmi zásadní v boji proti mikrobiálním infekcím. Diagnostika patogenu není závislá na tom, zda se ve vzorku nachází jiné typy bakterií, případně, zda se jedná o vzorek s vysokou heterogenitou (mozkomíšní mok, krev, moč, stolice, nátěry z ran, sputum, výtěry apod.) [63,68,69].

Díky tomuto objevu by tedy bylo možné provést rychlou a vysoce spolehlivou analýzu patogenů, což by mohl znamenat velký pokrok zejména v medicíně. Tradiční metody určování infekce jsou náročné a velmi zdlouhavé, jedná se o metody založené na kultivaci a počítání kolonií, které vyžadují několik manipulačních kroků. Objev diagnostických nanočástic by mohl být jedním možných nástrojů boje proti rezistenci mikroorganismů k antibiotikům [63,68,69]. Při spolehlivé diagnostice by byla lépe zacílena léčba, tudíž bychom se mohli vyhnout aplikaci širokospektrých antibiotik, antibiotika byla by aplikována dříve a takto optimalizovaná léčba se poté promítne do zkrácení délky léčby pacienta [50].

Podrobný pracovní popis syntézy a modifikace nanočástic viz kapitola 4.8.



Obrázek 6: Schéma analýzy vzorku pomocí sendvičových nanosystémů – SERS analýza *E. coli*, upraveno z [58]



Obrázek 7: Schéma analýzy pomocí pozlacených sklíček a zlatých nanotyček – SERS analýza *E. coli*, upraveno z [49]

3.7 Naprašování tenkých vrstev

Tenká vrstva je definována jako film o tloušťce několik desítek nanometrů až několika mikrometrů, který tvoříme na základní struktuře, kterou se snažíme modifikovat [70–72].

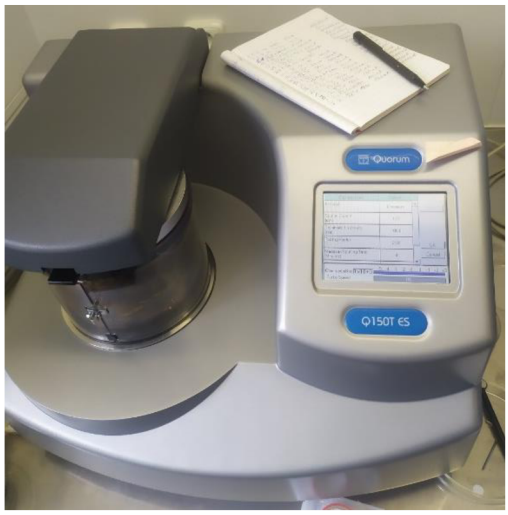
Naprašování tenkých vrstev řadíme do skupiny fyzikální depozice z plynné fáze (PVD, z anglického „*physical vapour deposition*“). Q150T ES systém, který byl použit v této diplomové práci, využívá metody tzv. magnetronového naprašování [70,72].

Naprašování jako takové je plazmový proces probíhající za nízkých tlaků v prostředí vzácného plynu, v našem případě argon, který je zároveň nejčastější. Přístroj je vybaven katodou, k níž je připojen terč ve tvaru disku nanášeného kovu (tzv. target) a anodou, mezi nimiž probíhá doutnavý výboj. Na katodu je přiváděno stejnosměrné nebo vysokofrekvenční napětí, v těsné blízkosti je anoda, na níž je struktura, u níž chceme modifikovat povrch naprášením kovové vrstvy. Pokud je potenciálový rozdíl mezi katodou a anodou dostatečně vysoký, začne katoda (terč) emitovat elektrony, které ionizují argonový plyn. Katoda se záporným nábojem přitahuje kladně nabité ionty plazmy, ty vysokou rychlostí dopadají na katodu. Z takto bombardovaného terče kladnými ionty jsou vyráženy atomy materiálu terče spolu se sekundárními elektrony. Sekundární elektrony bombardují atomy argonu, a tím udržují v pracovní komoře plazmový oblak [70,72].

Magnetronové naprašování využívá nízké napětí k tzv. chladnému naprašování a poskytuje povrchy o jemné zrnitosti. V těsné blízkosti elektrod se nachází poměrně silné magnety, jejichž magnetické pole je kolmé na generované pole elektrické. Toto uspořádání napomáhá usměrnit tok elektronů do oblasti v blízkosti terče, to zvýší stupeň ionizace plazmy a nárůst iontových proudů v komoře. Díky tomu je možné využít nízkého napětí za vysoké účinnosti naprášení povrchu [70,71,73].

Q150T ES systém je vybaven otočným stolem na vzorky, který zajišťuje rovnoměrné nanášení tenkých vrstev. Používá standardní terče, takže není nutné používat speciální terče s velkým profilem. A je vybaven sestavou uzávěrů, která umožňuje čištění pasivovaných terčů před procesem naprašování, což je výhodné např. u chrómu.

Takto připravené tenké vrstvy mají široké využití, v našem případě jsou využity k výrobě SERS substrátu, ale také se využívají v rastrovací elektronové mikroskopii k vytvoření elektricky vodivého tenkého filmu na povrchu zkoumaného vzorku, takové filmy brání „nabíjení“ vzorku, snižují tepelné poškození a zvyšují emisi sekundárních elektronů [74]. Také se využívají ve výrobě elektroniky, jako je výroba tranzistorů a jiných elektrických součástek, k vytvoření vrstev odolných vůči oděru, optických vrstev apod. [70–73].



Obrázek 8: Q150T ES systém (Quorum, Laughton, Východní Sussex, Anglie), který byl použit k naprašování tenkých vrstev.

3.8 AFM

AFM (z anglického „*atomic force microscopy*“) neboli mikroskopie atomárních sil je technikou sloužící k trojrozměrnému zobrazování mikro až nanoobjektů. Obraz je sestaven bod po bodu s dosahujeme velmi vysokého rozlišení [75].

K detekci a vyobrazení je využita vzájemná meziatomová přitažlivost, především pomocí van der Waalsových sil, kapilární síly apod. Základem k měření je malý hrot, který se pohybuje nad povrchem nebo po povrchu vzorku. Detekuje se pohyb hrotu, místo jeho ohybu a velikost amplitudy kmitu [75].

Velmi ostrý hrot je upevněn na ohebném nosníku, přičemž se hrot mírně dotýká povrchu vzorku a během toho se systém ohýbá dle hrubosti povrchu. Hrot se pohybuje po vzorku během pravidelného a opakovaného skenu. Díky tomuto uspořádání jsme schopni zobrazit struktury až s atomárním rozlišením, zároveň také nezáleží na vodivosti materiálu, což je výhodu oproti elektronové mikroskopii [75].

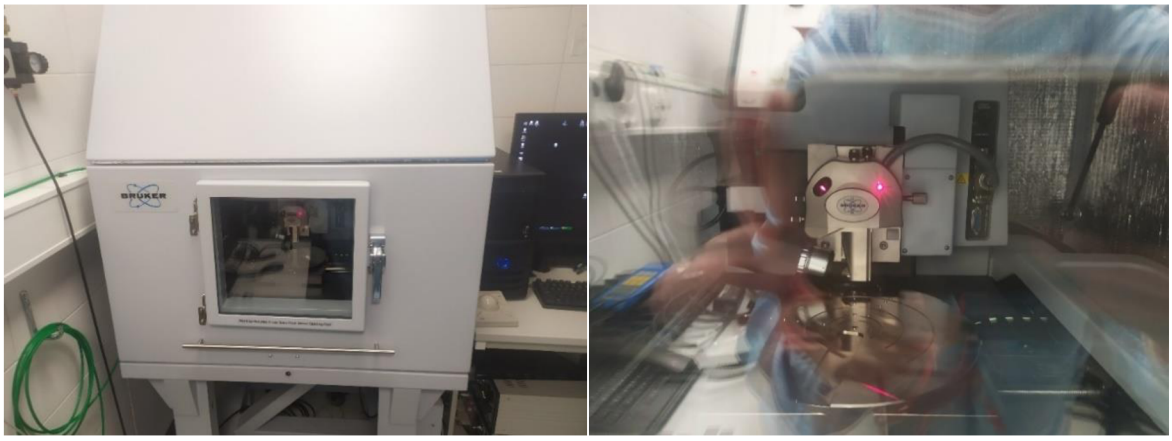
K zobrazení povrchu se využívají tři základní módy. Prvním je bezkontaktní, kdy soustava hrotu a nosníku osciluje nad vzorkem v dané výšce. Přičemž v těsné blízkosti povrchu vzorku značně soustava oscilovat v jiné frekvenci či amplitudě [75,76].

Druhý mód je kontaktní, kdy se hrot přímo pohybuje po povrchu vzorku, ale v tomto případě může dojít k poškození nejen hrotu, ale i vzorku, pokud má vzorek velké nerovnosti [75,76].

Třetím je poklepový mód, kdy se jedná o kombinaci obou předchozích. Hrot se pohybuje nad vzorkem, ale při poklepu se ho dotkne[75,76].

AFM metoda není schopna zobrazit objemové struktury, ale pouze povrch, vzorek musí být pevně usazen, ale nemusí být nijak zvláště připraven a nepracuje se vakuu, proto nemusí být vzorky vysušeny. Jsou různé aplikace, můžeme sledovat i mikroorganismy, ale na tuto aplikaci

je potřeba speciálního vybavení (speciální hroty a usazení), proto se nejčastěji sledují povrchy pevných látek, případně pomocí AFM můžeme manipulovat s nanoobjekty a vytvářet různé nano a mikrostruktury na površích [75,76]. V našem případě byl zvolen poklepový režim.



Obrázek 9: Mikroskop atomárních sil (BRUKER, Massachusetts, USA) využitý k pozorování sklíček.

3.9 Elektronová mikroskopie

Do první poloviny 20. století byly malé objekty zobrazovány za pomocí optického mikroskopu, kde bylo možné dosáhnout až tisícinásobného zvětšení drobných objektů. Rozlišovací schopnost optického mikroskopu je okolo 0,2 μm mezi dvěma objekty pozorování. Samotné rozlišení bylo limitováno vlnovou délkou světla. Tento limitující faktor byl odstraněn využitím elektronového svazku o mnohem nižší vlnové délce, tudíž byli vědci schopni zobrazit mnohem menší objekty. Elektronová mikroskopie dokáže zobrazit objekty velikosti i 1 nm, což vedlo k průlomovým informacím nejen o buněčné struktuře, ale i o virech a DNA [77,78].

Uplatnění této inovativní technologie je široké, můžeme ji nalézt v medicíně, biologii, ve výzkumu materiálů nebo ve forenzních i vědeckých laboratořích. Díky elektronové mikroskopii jsme získali kupříkladu obraz buněčných organel a pojem o jejich fyzikálních i chemických vlastnostech. Zároveň ale můžeme zobrazovat i anorganické materiály, získat ponětí o tvaru a složení nanočástic různých kovů, jako jsou různé oxidy železa, titanu, různé povrchy tenkých filmů a mnoho dalších [79].

3.9.1 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Skenovací elektronová mikroskopie nám poskytuje informace o povrchu vzorku [77]. Zpětně odražené elektrony od povrchu vzorku nám pomáhají získat jistý kontrast obrazu povrchu vzorku, který nám udává i informace o prvkovém složení vzorku. Světlá místa ve vyobrazení poukazují na těžké prvky. Důvodem je množství elektronů, které se dostalo na detektor z povrchu vzorku, těžší prvky vysílají větší množství elektronů. Zatímco místa tmavá označují místa s lehkými prvky. Za využití standardů jsme schopni nejen kvalitativní analýzy, ale i analýzy kvantitativní [80,81].

SEM poskytuje až 10 000krát zvětšený obraz pozorovaného objektu s hloubkou ostrosti několikanásobně vyšší než u optického mikroskopu. Tento typ elektronové mikroskopie používáme ke sledování povrchových struktur vzorku. K vyobrazení využívá primární elektrony, které předají energii elektronům vzorku, z nějž jsou poté vyráženy elektrony

sekundární. Sekundární elektrony jsou poté detekovány detektorem sekundárních elektronů, což nám poskytuje informace o povaze skenovaného povrchu. Skenovací mód využívá primární elektrony o malém průměru stopy, která postupuje po celém po celém povrchu za pomoci elektrostatického nebo magnetického pole udávajícího směr elektronového paprsku. Sken probíhá ve dvou navzájem kolmých drahách, to nám umožňuje snímat jak ve čtvercových, tak v obdélníkových plochách. K analýze atomového složení se k SEM připojuje rentgenový spektrometr, takto upravený mikroskop nám poté pomáhá k prvkové analýze vzorků. Snímáním charakteristického spektra RTG záření z povrchu vzorku dokážeme určit atomové složení daného vzorku a posléze i vytvořit prvkovou mapu analytu [80,81].

Každý skenovací elektronový mikroskop se skládá ze zdroje elektronů, jako je například wolframové vlákno, osově symetrických magnetických čoček a objektivu, který určuje prostorové rozlišení SEM. Skenování probíhá ve dvou na sobě kolmých osách x a y. Dalšími součástmi SEM jsou skenovací generátory a cívky, které napomáhají skenování vzorků. Výstupy z generátorů nám poskytují obraz vzorku jako SEM obraz na displeji počítače. Samotné signály jsou generovány digitálně, což umožnuje rozdělení obrazu na jednotlivé pixely, změna jasu je realizována elektricky dle signálu detektoru a převodu na konkrétní pixel. Mezi zvětšením a rychlostí skenování je nepřímá úměra, při větším zvětšení sice dostaneme kvalitnější snímek obsahující méně elektrického šumu, ale o to je skenování pomalejší [80].

Častým problémem je nedostatečná vodivost materiálu, na obraze se projeví bílé řádky nebo posuv obrazu v důsledku nahromadění prostorového náboje. Další problém nastává u vzorků s horší tepelnou odolností, vzorek může být spálen právě soustředěným proudem elektronů. Ideální vzorek pro SEM je tepelně stabilní a také odolný proti vákuu využívanému při měření v komoře. Případně vzorek může být upraven tak, aby vyhovoval měření na SEM, např. kryogenní skenovací elektronová mikroskopie, která nám napomáhá získat trojrozměrnou strukturu zmražených vzorků, kdy se ve vzorku zadržuje značná část přirozené vody a ponechává si svoji strukturu (nutné uchovávat při -196 °C) [82,83]. Další problém je osový astigmatismus, který se vyrovnává pomocí magnetického pole stigmátoru, kdy při průchodu čočkou mají elektrony různé ohnisko, nebo sférická vada, kdy se široký svazek elektronů za čočkou rozděluje na středové a okrajové elektrony. Sférická vada se řeší pomocí clony. Existuje také chromatická vada, kdy za kolísání urychlovacího napětí elektrony nenabývají stejné energie [80,84,85].

3.9.2 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Druhý velmi významný typ elektronové mikroskopie je transmisní elektronová mikroskopie, jež pracuje na principu transmisního elektronového rozptylu. Při pozorování krystalického vzorku pevného skupenství dochází k transmisnímu elektronovému rozptylu, který způsobují elektrony odražené od atomů v materiálu. Za požití vhodných magnetických čoček můžeme tyto elektrony snímat a poté díky nim získat obraz. V moderní době se využívá k dosáhnutí co nejlepšího rozlišení vertikální uspořádání čoček, tedy ve směru optické osy. Paralelně s optickou osou působí gravitační síla, což umožňuje dobré uspořádání po delší časový interval a menší rušivé mechanické zkreslení [80].

Aplikace v biologii a medicíně umožnilo zobrazit buněčné struktury, makromolekuly nebo viry. Aplikace TEM v anorganické chemii umožňuje zobrazit struktury v řádech mikrometrů

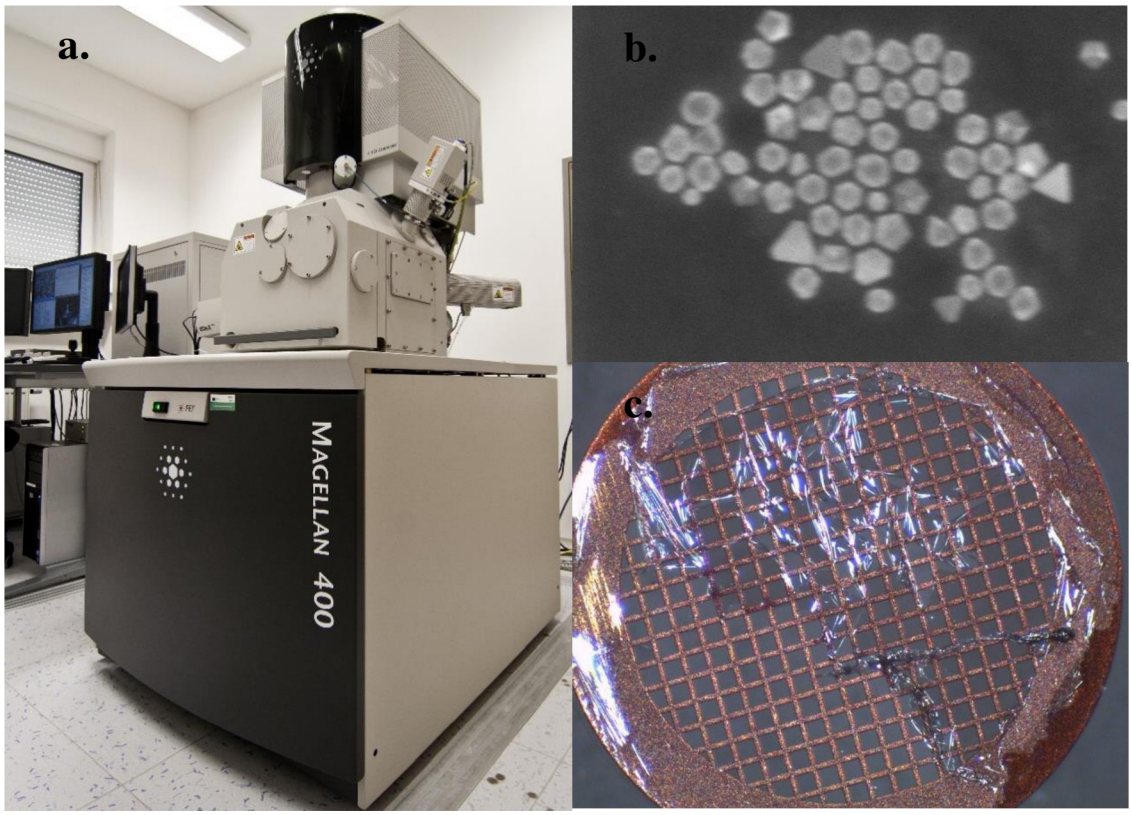
až téměř k atomárnímu rozlišení. Za pomoci elektronových spektrometrů je možné poté provést kvantitativní analýzu prvků s rozlišením až cca 1 nm [78,79].

Obraz v TEM nám vytváří interakce elektronového svazku se vzorkem, kdy dochází k elastickému či neelastickému rozptylu. Elastický rozptyl nastává při průletu urychleného elektronu elektronovým oblakem atomu a následně se vychýlí z původní trajektorie pod určitým úhlem, který může být až 180 stupňů, nebo může nastat případ, že elektron je zpětně odražený, ale jeho energie se nemění. Rozptýlené elektrony nám pomáhají k dotváření kontrastu obrazu. Když hovoříme o neelastickém rozptylu, tak se primární elektrony sráží s elektrony v atomových orbitalech vzorku. Primární elektrony mohou ztratit vysoké procento své energie z důvodu srážky dvou částic o stejné hmotnosti, mění se jejich vlnová délka, ale nedochází k vychýlení od trajektorie letu. Neelastické srážky nám udávají ostrost obrazu [80].

Zdrojem elektronů může být žhavená wolframová katoda, žhavená LaB_6 (borid lanthanový) katoda či autoemisní tryska. K vizualizaci se využívá stínidlo často s vrstvou ZnS umístěného u dna tubusu, k němuž je ze stejného materiálu malé stínidlo sloužící k zaostření obrazu. Elektrony poskytují informaci, která je převedena do oblasti viditelného světla. Obraz je zaznamenán CCD kamerou nebo na speciální fotografický materiál. Vše probíhá za vakua, které vytváří vakuový systém s výkonnými vývěvami [80].

K pozorování biologických preparátů je nutná chemická nebo fyzikální fixace, a také jejich dehydratace. Voda je nahrazena postupně ethanolem nebo acetonem, fungujícími jako dehydratační činidla, která jsou mísitelná se zalévacím činidlem (voda nikoliv). Zalévání slouží k vytváření ultratenkých řezů (60-70 nm), přičemž se využívají živice, ale musí být pevné a ve velmi tenkých vrstvách s rovnoměrnou polymerizací, a nesmí způsobit rozptyl primárních elektronů. Těmto kritériím vyhovují živice epoxidové, akrylové nebo polyesterové, zároveň mají velmi podobné prvkové složení a podobné rozptylové vlastnosti jako preparát. K lepšímu rozlišení a zvýšení kontrastu se využívají také těžké kovy jako je osmium. Tzv. infiltrace je proces, kdy se při zalévání živicí plní vzorek až do přesycení, kdy se plní do silikonových forem či kapslí. Poté se dle typu živice spustí polymerizace, pro epoxidové se využívá zvýšená teplota do 60 °C, u akrylátových UV záření nebo chemický katalyzátor, či kombinace několika iniciačních postupů. Obecně platí, čím tenčí řezy, tím lepší rozlišení. Řezy jsou vytvořeny pomocí skleněného nebo diamantového nože [78,80].

Vzorky jsou k pozorování umístěny na kovové síťky z mědi, niklu nebo zlata, a poté může být vzorek pozorován metodou TEM. Jsou-li vzorky v práškovém stavu, je nutný nosič, jímž jsou právě kovové síťky nebo speciální fólie z polyvinyl formaldehydové pryskyřice (tzv. *formvaru*). Jindy se využívá i vrstva uhlíku místo polyvinyl formaldehydové pryskyřice, nebo i kombinace. Díky tomu je pak příprava vzorku jednoduchá, vzorek se rozpustí ve vhodném rozpouštědle, pak se kápne roztok na vybraný nosič a nechá se zaschnout. Takto připravená soustava vzorek-nosič je vhodná k pozorování [78,80,86].



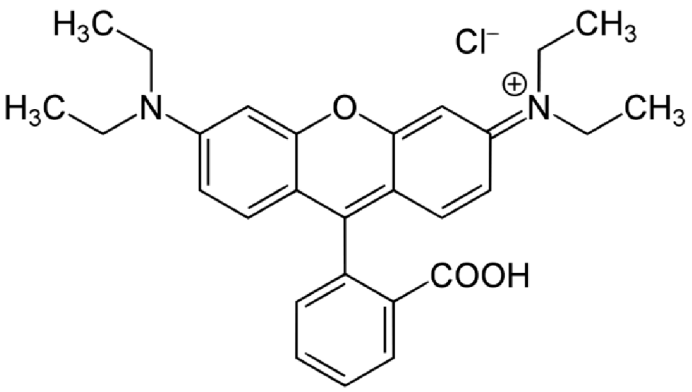
Obrázek 10: a. Rastrový elektronový mikroskop Magellan 400 (FEI, Hillsboro, OR, USA) [87]. **b.** Snímek z Magellan 400 (FEI, Hillsboro, OR, USA detektor STEM III; mód DF2; 30 kV; 50 pA; 4,8 mm pracovní vzdálenosti; 200 000x zvětšení). **c.** Měděná síťka s vrstvou formvaru [88].

3.10 Rhodamin B

Mezi základní průmyslová barviva patři rhodamin B. Využívá se k barvení a glazování textilu, kožených a dřevěných výrobků apod. Má velmi intenzivní barvu, silné barvící schopnosti a nízkou pořizovací cenu. Díky svým velmi výhodným vlastnostem je problémem v posledních letech jeho zneužití v potravinářském průmyslu při zpracování čili koření, kukuřice[51] a vařených masných produktů [37], aby se zvýraznila barva, a tím se zatraktivnily méně kvalitní potravinářské výrobky. Tímto krokem výrobci ohrožují zdraví spotřebitelů, rhodamin B je chronicky toxický nejen pro lidi, ale také pro zvířata [89].

Již před lety byl zakázán v potravinářském průmyslu Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) [90] kvůli jeho karcinogenním vlastnostem, reprodukční a vývojové toxicitě, také neurotoxicitě [51].

Ke stanovení rhodaminu B se využívá několik analytických metod, jako je HPLC (vysoce účinná kapalinová chromatografie) a hmotnostní spektrometrie, pro něž je ale bohužel typická delikátní příprava vzorku a vysoká cena, různé tandemové techniky, UV-VIS spektrofotometrie a SERS (povrchově zesílená Ramanova spektroskopie). SERS nám může poskytnout nejvíce informací o molekulární chemické struktuře, metoda je vysoce citlivá a selektivní, jednoduchá a rychlá, také má menší interference s molekulami vody a fluorescenčním signálem [51,91].



Obrázek 11: Molekula rhodaminu B [92].

3.10.1 Fotokatalytická degradace rhodaminu B

Jednou z náplní této závěrečné práce je měření výše popsaného rhodaminu B po úpravách v jiné laboratoři. Mým úkolem bylo zjistit, zdali při fotokatalytické degradaci došlo k nějaké spektroskopicky zachytitelné významné změně fotocitlivého rhodaminu B. Byly porovnány tři analytické spektrální metody, a to UV-VIS spektroskopie, Ramanova spektroskopie a povrchem zesílená Ramanova spektroskopie. Podrobné pracovní postupy a výsledky v kapitolách 4 a 5.

Před samotným měřením rhodamin B prošel následujícím protokolem. Na začátku je vždy 20 µM roztok rhodaminu B. Byly připraveny tři typy fotodegradace rhodaminu B, jedna bez katalyzátoru, kde byl čistý roztok rhodaminu B vystaven zdroji světla a bude fungovat jako referenční vzorek, druhý byl s katalyzátorem TiO_2-(H) a třetí pokus byl s katalyzátorem TiO_2-(H)-Ag.

Roztoky s katalyzátory byly připraveny tak, že 20 mg katalyzátoru bylo smícháno s 50 ml 20µM roztokem rhodaminu B. Výsledná směs byla ponechána na 30 minut ve tmě, aby se roztok s katalyzátorem dostali do rovnováhy adsorpce-desorpce. Před zapnutím světelného zdroje fotoreaktoru je odebráno 2 ml suspenze z každého ze tří roztoků a uchováno ve zkumavce Eppendorf pro pozdější měření. Po zapnutí světelného zdroje byla suspenze odebírána v pravidelných intervalech, vždy v objemu 2 ml ze všech tří roztoků, jejichž supernatant byl podroben spektroskopické analýze.

Rychlost fotodegradace je závislá na množství katalyzátoru, koncentraci barviva a intenzitě světelného zdroje fotoreaktoru. Je očekávání ze strany provozovatele pokusu, že TiO_2-(H)-Ag bude nejlepším katalyzátorem.

Roztoky ve zkumavce Eppendorf byly centrifugovány a supernatant byl poté měřen spektroskopickými metodami. Podrobný pracovní postup je v kapitole 4.6.

Oxid titaničitý se v přírodě vyskytuje v několika formách, ale uměle vyrobený se označuje jako „titanová běloba“, která se využívá jako pigment do nátěrových hmot, jako barvivo v potravinářství nebo i jako účinná složka v určitých typech opalovacích krémů. Má velmi specifické vlastnosti, jako pigment má velmi vysoký jas a vysoký index lomu, v práškové formě rozptyluje světlo, k tomu také UV rezistentní vlastnosti, kdy pohlcuje UV záření, které je následně přeměněno na teplo. Díky svým vlastnostem se využívá v optice při výrově dielektrických zrcadel [93,94].

Oxid titaničitý v přítomnosti UV záření se chová jako fotokatalyzátor, ale pokud je nadopován ještě jinými atomy, jako je například dusík, nebo stříbro, tak může fungovat jako fotokatalyzátor již v přítomnosti viditelného záření. Díky svému vysokému redoxnímu potenciálu je schopen oxidovat vodu ve svém excitovaném stavu za vzniku hydroxylových radikálů, nebo přímo oxidovat organické látky [95]. Proto jej přidáváme jako složku materiálů k povrchovým úpravám, které jsou pak samočistící a s dezinfekční funkcí. Neustále se snažíme využívat více obnovitelných zdrojů energie, jako jsou právě solární články, jichž je oxid titaničitý nedílnou součástí [93].

Fotokatalytické vlastnosti oxidu titaničitého jsou závislé na jeho fázi a také na druhu dopingu, většinou se jedná o dusík nebo vodík [93]. V posledních letech se také začaly využívat vzácné kovy k vylepšení fotokatalytických účinků látek při ozařování světlem, mezi něž patří i výše zmíněné stříbro [95].

3.11 Bakterie

Jedná se o velmi druhově a morfologicky rozmanité prokaryotické mikroorganismy, které zpravidla dosahují velkostí několika mikrometrů. Rozlišujeme dle způsobu výživy a získávání energie, charakteru rozmnožování, atd. [96].

Vnitřní strukturou se příliš neliší, ale pro nás jsou zásadní struktury buněčné stěny. Obecně vzato, buněčná stěna slouží k ohraničení obsahu buňky, ochraně před chemickým, mechanickým poškozením nebo vysušením, udržuje buněčný tvar. Může se lišit chemickým složením, které je pro každou bakteriální buňku specifické. Základem buněčné stěny bakterií je peptidoglykan (murein), mezi jeho řetězci jsou vmezeřeny lipidy, bílkoviny, polysacharidy a jiné molekuly [96].

Bakterie produkují antigeny, látky bílkovinné nebo polysacharidové povahy na buněčném povrchu, které poté pobízí imunitní systém organismů k produkci protilátek. Každá protilátka se váže na specifický antigen [96].

Níže jsou ve zkratce popsány tři kmeny bakterií, použitých k testování připravených diagnostických struktur k identifikaci *Escherichia coli* K-12 v experimentální části práce.

3.11.1 Bakterie *Escherichia coli*

Jedná se o tyčinkovou gramnegativní fakultativně anaerobní bakterii. Pohybuje se pomocí bičíků, netvoří spory. Patří do vnitřní mikroflóry mnohých živočichů, včetně člověka. Proto její přítomnost v pitné vodě je indikace fekálního znečištění [97].

Problémem jsou různé patogenní kmeny *E. coli*, které způsobují mnoho nepříjemných onemocnění, jako je onemocnění močových cest, způsobuje infekci ran a jejich hnisání, při jejím vniku do intestinálního traktu člověka způsobuje průjmy apod. [97].

3.11.2 Bakterie *Serratia marcescens*

Serratia marcescens je opět tyčinková bakterie, která je fakultativně anaerobní, chemotrofní a netvoří spory. Bakterie je to gramnegativní a při určité teplotě produkují červený pigment [98].

Patogenní je jen pro lidi s oslabenou imunitou, kterým může způsobit onemocnění dýchacích cest, infekci ran, případně urogenitálního traktu, sepsi, meningitidu nebo endokarditidu [98].

3.11.3 Bakterie *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus neboli zlatý stafylokok je grampozitivní bakterie, často tvořící žlutý pigment. Přirozeně se vyskytuje na kůži nebo sliznicích [97].

Způsobuje různé infekce, od drobných zánětů na kůži nebo měkkých tkání až po těžké sepse, syndrom toxického šoku a nekrotizující pneumonie a mnoho dalších [97].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Seznam chemikálií

Veškerý deionizovaná H2O byla připravena ve standardním komerčním purifikačním systému s měrným odporem asi 5 MΩ/cm2.

4.1.1 Příprava SERS substrátu

NICOLOID (Nicolet CZ s.r.o., Praha, Česká republika)
Aceton (čistý, PENTA, Chrudim, Česká republika)
Isopropanol (čistý, PENTA, Chrudim, Česká republika)

4.1.2 Recyklace SERS substrátu

Ethanol (96 %, PENTA, Chrudim, Česká republika)
Chloroform (PENTA, Chrudim, Česká republika)
Leptadlo zlata, standard (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)

4.1.3 Výroba zlatých nanočástic

CTAB (hexadecyltrimethylamonium bromid) (čistý, Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)
$HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ (trihydrát kyseliny chlorozlatité) (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)
$NaBH_4$ (borohydrid sodný) (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)
$AgNO_3$ (dusičnan sodný) (čistý, PENTA, Chrudim, Česká republika)
Kyselina askorbová (čistá, PENTA, Chrudim, Česká republika)

4.1.4 Modifikace nanočástic a ověření funkce protilátky

DTNB (kyselina 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoová) (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)
Absolutní ethanol (PENTA, Chrudim, Česká republika)
3-MPA (3-merkaptopropionová kyselina) (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)
11-MUA (kyselina 11-merkaptoundekanová) (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)
NHS (sodná sůl N-hydroxysulfosukcinimidu) (Fluka Analytical, Mnichov, Německo)
EDC (N-(3-dimethylaminopropyl)-NO-ethylkarodiimid hydrochlorid) (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)
Avidin (čistý, Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)
Ethanolamin (čistý, PENTA, Chrudim, Česká republika)
Protilátka Biotin Anti-E. coli antibody (ab20640) (Abcam, Cambridge, Velká Británie)
PBS pufr (fyziologický roztok pufrovaný fosfátem) (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)
Tween20 (Carl Roth, Karlsruhe, Německo)
MES pufr (monohydrát kyseliny 2-morfolinoethansulfonové) (Carl Roth, Karlsruhe, Německo)
1H,1H,2H,2H-perfluorooctyltriethoxysilan (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)
Medium Mueller Hinton Broth (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)

4.1.5 Výroba magnetických nanočástic

$FeCl_3$ (chlorid železitý) (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)
$FeSO_4$ (síran železnatý) (PENTA, Chrudim, Česká republika)

NaOH (PENTA, Chrudim, Česká republika)
HCl (kyselna chlorovodíková) (35 %, PENTA, Chrudim, Česká republika)
Urotropin (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)
PEG (polyethylenglykol) (Carl Roth, Karlsruhe, Německo)

4.2 Seznam přístrojů a pomůcek

Ramanův InVia spektrometr (Renishaw, Wotton-under-Edge, Velká Británie)
Rozprašovací nanášeč uhlíku/kovu Q150T ES (Quorum, Laughton, Východní Sussex, Anglie)
Rastrový elektronový mikroskop Magellan 400 (FEI, Hillsboro, OR, USA)
Čistička ultrazvuková KLN, programovatelná s elektronickým časovačem, typ K-12LE (K-12L (Verkon, Praha, Česká republika)
Analytické váhy ABT 120-4M (Verkon, Praha, Česká republika)
Generátor plazmy (Diener electronic GmbH & Co. KG, Ebhausen, Německo)
Centrifuga Eppendorf Minispin (Eppendorf, Hamburk, Německo)
Centrifuga EBA 20 (HETTICH | Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Německo)
Terč chróm 99,95 % pr. 53 x 1 mm (SAFINA, a.s., Vestec, Česká republika)
Terč zlato 99,99 % pr. 53 x 1,2 mm (SAFINA, a.s., Vestec, Česká republika)
Měděná síťky s formvarem (Micro to Nano, Nizozemí)
Boxy s horizontálním laminárním prouděním, Heraguard (Thermo Fisher Scientific, Brno, Česká republika)
Rastrový elektronový mikroskop Magellan 400 (FEI, Hillsboro, OR, USA)
Rastrový elektronový mikroskop Helios 5 Hydra UX DualBeam (Thermo Fisher Scientific, Brno, Česká republika)
AFM (BRUKER, Massachusetts, USA)
DEN-1B McFarlandův denzitometr (Biosan Ltd. – Unimed Praha, s.r.o., Česká republika)
RTS-1C Personal Bioreactor (Biosan Ltd. – Unimed Praha, s.r.o., Česká republika)
Spektrofotometr – Helios γ, Unicam (Thermo Fisher Scientific, Brno, Česká republika)
Přesné váhy KERN EMB 600-2 (Unimetra, spol. s r.o., Ostrava, Česká republika)
Vortex Reax top (Heidolph Instruments, Schwabach, Německo)
Digitální magnetická míchačka s ohřevem MS-H280-Pro (LABtechnik,s.r.o., Brno, Česká republika)
Ultrazvukový homogenizátor model 150 v/t (Heat Biologics, Inc., Severní Karolína, USA)
Sander Certizon C 50 ozonizátor (Profiplants s.r.o., Praha, Česká republika)
Automatické pipety v různém rozsahu objemu

4.3 Využité počítačové programy

Microsoft Excel 365 (Microsoft, Albuquerque, Nové Mexiko, USA)
RTS-1 (Biosan SIA, Riga, Lotyšsko)
WiRE 3.4 (Renishaw, Wotton-under-Edge, Velká Británie)
NanoScope Analysis 1.9 (BRUKER, Massachusetts, USA)

4.4 Použité bakterie

Escherichia coli K-12 (prof. Ute Neugebauer, Univerzitní klinika v Jeně)
Staphylococcus aureus (prof. Filip Růžička, Fakultní nemocnice u Svaté Anny)

Serratia marcescens CCM 8587, z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně

4.5 Příprava SERS substrátu

Příprava k naprašování křemíkových čipů probíhala v čistých prostorách laboratoří ve speciálním oděvu a v rukavicích. Při manipulaci je nutné dbát na čistotu použitých nástrojů i samotného substrátu. K manipulaci je vždy využívána pinzeta a přečištěné sklo.

Nejprve jsou křemíkové čipy odmaštěny v čistém acetonu v ultrazvukové lázni po dobu pěti minut, na maximální výkon a s nastavenou teplotou nižší, než je teplota v místnosti. Poté jsou pinzetou čipy převedeny do čistého isopropanolu, poté jím lehce opláchnuty a vysušeny pomocí proudu dusíku. Poté jsou vloženy na 20 min. do kyslíkové plazmy při 99% výkonu generátoru plazmy od firmy Diener electronic. Po ukončení dvacetiminutového vystavení plazmě byl tlak v komoře obnoven pomocí čistého dusíkového plynu, aby se zamezilo znečištění.

Po ukončení čistících procedur následuje pokovení v naprašovacím systému s výměnnými vložkami na naprašování kovu Q150T ES od firmy Quorum. Do naprašovačky byl vložen zlatý terč, z něhož byl naprášen zlatý povrch. Čipy byly uloženy na otočný vyměnitelný naprašovací stolek, který byl před procedurou důkladně očištěn a vydezinfikován. Poté byly nastaveny parametry k naprašování, viz **tabulka 1**, a spuštěno naprašování. Po naprášení zlaté vrstvy byl substrát hotový a připravený k dalším úpravám a měření.

Tabulka 1: Nastavení systému naprašování

Paramer	Hodnota
Materiál:	Zlato
Naprašovací proud [mA]:	50
Naprašovací čas [s]:	400
Nástrojový faktor:	2,7
Předčištění terče:	Ne

4.6 Měření fotokatalytické degradace rhodaminu B

Před samotným měřením rhodaminu B, prošel roztok o 20µM koncentraci fotodegradací. Do rukou se mi dostaly tři řady Eppendorf zkumavek, které jsou vyobrazeny na **obrázku 12**. Po celou dobu manipulace byly uchovávány v temnu, aby nedocházelo k žádným dalším fotokatalytickým procesům mimo měření. První řada (na **obrázku 12** označeno jako „1. line“) obsahuje čistý roztok rhodaminu B, který byl vystaven světlu ve fototreaktoru bez jakéhokoliv typu fotokatalyzátoru a sloužil jako referenční vzorek. Druhá řada (na **obrázku 12** označeno jako „2. line“) obsahuje rhodamin B, který byl v fotoreaktoru vystaven i působení fotokatalyzátoru TiO_2-(H). Třetí řada (na **obrázku 12** označeno jako „2. line“) obsahovala navíc v roztoku rhodaminu B katalyzátor TiO_2-(H)-Ag.

Vzorky před měřením prošly protokolem fotokatalytické degradace dle protokolu viz kapitola 3.10.1. V každé řadě jsou vzorky, které byly z roztoku odebrány v časech 0, před začátkem fotodegradace, poté po časech 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 a 360 minut, poté v řadě bez katalyzátoru po 96 hodinách a ostatní pak po několika hodinách v suspenzi. Celkem bylo k měření 48 vzorků.

Tyto vzorky byly měřeny třemi typy spektroskopických metod, a to UV-VIS spektroskopií, Ramanovou spektroskopií a metodou SERS.

Obrázek 12: Vzorky rhodaminu B. 1. line obsahuje vzorky, které byly vystaveny světlu bez fotokatalyzátoru. 2. line obsahuje vzorky s fotokatalyzátorem TiO_2-(H). 3. line obsahuje vzorky s fotokatalyzátorem TiO_2-(H)-Ag.

4.6.1 Jednotkové úpravy a měření rhodaminu B

Před každým měřením byly vzorky rhodaminu B centrifugovány na 11 000 rpm po dobu 7 minut v centrifuze Eppendorf Minispin. Poté byl supernatant změřen, případně naředěn a změřen. Výstup byl poté graficky vyhodnocen, viz kapitola 5.2.

4.6.1.1 Měření Ramanovým spektroskopem

Experimentální uspořádání je vyobrazeno na **obrázku 14**. Pro všechna Ramanova spektroskopická měření byl použit spektrometr InVia (Renishaw, Wotton-under-Edge, UK). Výkon laseru byl nastaven na 15,5 mW a bylo měřeno při vlnové délce 785 nm, doba integrace byla 1 s a celkem 10 akumulací, tak byla celková akvizice 10 s. K měření byl použit objektiv mikroskopu s celkovým zvětšením 20x, 0,4 NA (Leica, Wetzlar, Německo). Při měření konvenčního Ramanova signálu bylo zaostření paprsku upraveno na maximální signál uvnitř kapky čistého analytu na podložním sklíčku. Vše bylo řízeno v uživatelském rozhraní WiRE 3.4. Celkem z každého vzorku bylo sejmuto 10 spekter a zpracováno v programu MS Excel.

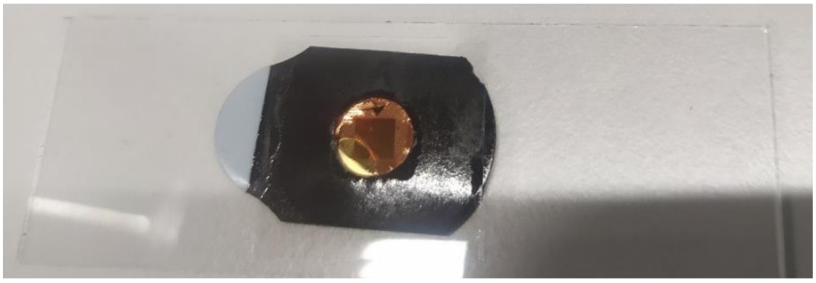
Nejdříve byl vzorek změřen klasickou Ramanovou spektroskopií, ale ramanovský signál byl překryt fluorescencí, výsledky viz 5.2.

4.6.1.2 Měření SERS

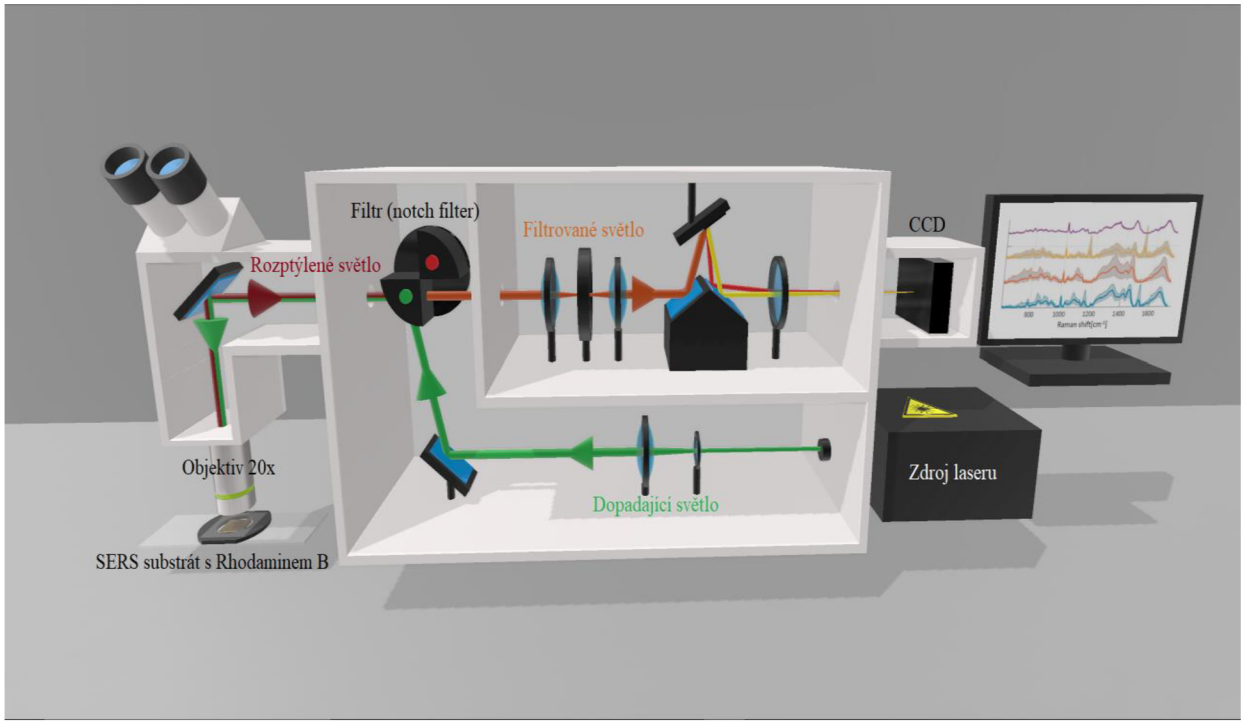
Experimentální uspořádání je vyobrazeno na **obrázku 14**. Byl použit spektrometr InVia (Renishaw, Wotton-under-Edge, UK) pro všechna SERS měření. Výkon laseru byl nastaven na 10 % a bylo měřeno při vlnové délce 785 nm, doba integrace byla 1 s a celkem 10 akumulací, tak byla celková akvizice 10 s. K měření byl požit objektiv mikroskopu s celkovým zvětšením 20x, 0,4 NA (Leica, Wetzlar, Německo). Pro SERS byl excitační laser zaostřen na povrch substrátu. Vše bylo řízeno v uživatelském rozhraní WiRE 3.4. Celkem z každého vzorku bylo sejmuto 10 spekter a zpracováno v programu MS Excel.

Všechny vzorky byly měřeny na zlatých substrátech, jejichž výroba je popsána v kapitolách 3.5.2.1 a 4.5. Tento SERS substrát jako jediný zvýšil Ramanovský signál natolik, aby nebyl překryt fluorescencí rhodaminu B. Byl však vyzkoušen také SERS se stříbrnými nanočásticemi, které se syntetizují přímo v roztoku vzorku NICOLOID od firmy (Nicolet CZ s.r.o., Praha, Česká republika).

Zlatý substrát byl položen na podložní sklíčko, které bylo přelepeno oboustrannou samolepkou (tzv. „spacerem“) s dírou na vzorek, do něhož bylo napipetováno 37 µl supernatantu vzorku a přikryto krycím sklíčkem a měřeno, jak je názorně ukázáno na **obrázku 13**. Celkem z každého vzorku bylo sejmuto 10 spekter a zpracováno v programu MS Excel. Výsledky jsou zpracovány v kapitole 5.2.



Obrázek 13: SERS substrát s rhodaminem B, připraven na měření.



Obrázek 14: Ramanův spektrometr – schéma, použitý k měření rhodaminu B [66].

4.6.1.3 Měření na UV-VIS spektroskopu

Jako kontrolní metoda byla použita UV-VIS spektroskopie, jako jedna z metod kontroly koncentrace rhodaminu B. Nejprve, před měřením, byly vzorky centrifugovány, poté byla měřena absorbance supernatantu, který ale musel být 10x naředěn.

Absorbance byla změřena u každého vzorku 3x, tyto výsledky byly zprůměrovány a zpracovány pomocí programu MS Excel. Vyhodnocení je v kapitole 5.2.

4.7 Recyklace SERS substrátu

Z měření rhodaminu B zbylo okolo 50-ti kusů použitého SERS substrátu. Jelikož se jedná pouze o vrstvu naprášeného zlata na křemíkovém čipu, lze ho relativně snadno očistit a znovu naprášit zlatem, a tak recyklovat k dalšímu použití.

Nejprve byly čipy odlepeny od podložního sklíčka, poté byly ve vhodné nádobě s deionizovanou vodou vloženy do ultrazvukové lázně, která byla nastavena na nejvyšší výkon po dobu 8 minut. Poté byly čipy převedeny do 96% ethanolu a opět vloženy do ultrazvukové lázně na 8 minut na nejvyšší výkon. Poté byly čipy přeneseny do chloroformu a naposledy uloženy do ultrazvukové lázně na 8 minut na maximální výkon.

Po tomto důkladném přečištění byly na dobu několika sekund převedeny pinzetou do leptadla zlata, které z čipů odstranilo zbytky zlata, které nebyly odstraněny během ultrazvukového čištění, zlato má velmi špatné adhezní vlastnosti na hladkém povrchu. Poté byly zbytky leptadla očištěny v acetonu a následné v isopropanolu. Čipy byly poté vysušeny a mohly projít opět protokolem naprašování zlaté vrstvy o tloušťce 300 nm.

4.8 Příprava nanočástic, tvorba sendvičového imunotestu

Cílem této experimentální části diplomové práce bylo navrhnout a vyzkoušet imunotest na detekci bakterie *Escherichia coli* K-12. Imunostest se skládá ze dvou hlavních části, ze zlatého SERS substrátu s Ramanovým reportérem a imobilizující složky, která se skládá buď ze specificky vázající se magnetické částice, nebo sklíčka, na nějž se specificky vážou bakterie. Vše je na bázi vazby antigen-protilátka, proto by imunotest měl dosahovat vysoké specifity i účinnosti.

4.8.1 Chemická syntéza zlatých nanotyček

Dle literatury mají nanotyčky vyšší (až několikanásobně větší) zesílení Ramanova signálu [37,69], z tohoto důvodu bylo vyzkoušeno několik typů syntéz nanotyček. Bylo vyzkoušeno několik typů protokolů. Na syntézu nanotyček se osvědčily celkem dva protokoly, přičemž z hlediska snadné přípravy byl vybrán níže popsaný.

Zlaté nanotyčky byly vyrobeny technikou, kdy nejprve byl připraven roztok tzv. semínek, které poté byly naočkovány do roztoku kyseliny chlorozlatité. Roztok na semínka byl připraven ze 7,5 ml 0,1M roztoku CTABu (hexadecyltrimethylamonium bromid) spolu s 250 µl 0,01M $HAuCl_4$ (kyselina chlorozlatitá) za vzniku jasně oranžovo-žlutého roztoku. Po zamíchání byl přidán roztok ledově chladného $NaBH_4$ (borohydrid sodný) o objemu 600 µl, roztok se zbarvil dohněda, a nechalo se stát po dobu 5 minut k vytvoření očkovacího roztoku. Roztok k syntéze nanotyčenek vznikl smícháním 4,75 ml 0,1M roztoku CTABu, 1 ml $HAuCl_4$ a 60 µl $AgNO_3$ (dusičnan stříbrný) do vzniku tmavě oranžové barvy, k takto vzniklému roztoku bylo po kapkách přidáno 250 µl 0,1M kyseliny L-askorbové, po přidání kyseliny L-askorbové vznikl bezbarvý roztok (funguje jako slabé redukční činidlo). Do bezbarvého roztoku bylo přidáno 5 µl očkovacího roztoku. Směs byla míchána po dobu několika vteřin, barva se začala postupně měnit v tmavě modrou až fialovou, a nechala se stát po dobu nejméně 3 hodin k získání nanotyček [69].

Obrázek 15: Syntetizované zlaté nanočástice.

Poté, co byla syntetizována řada nanočástic, tak byl vzorek vysušen na měděné síťce s vrstvou formvaru a byly pozorovány pod elektronovým mikroskopem. Snímky z elektronového mikroskopu jsou v kapitole 5.4.1.

4.8.1.1 Pozorování elektronovým mikroskopem

Připravené nanočástice byly koncentrovány centrifugováním po dobu 2 minut na 7 000 rpm v centrifuze Eppendorf Minispin (Eppendorf, Hamburk, Německo). Poté byly 3 µl roztoku nanočástic nastříknuty na měděnou síťku s vrstvou formvaru (Micro to Nano, Nizozemí), ta byla držena ve zkřížené pinzetě v boxu s laminárním prouděním do vypaření rozpouštědla.

U všech připravených nanočástic, včetně těch, u nichž nebylo docíleno tvaru tyčinek, byl udělán snímek. Ukázky těchto snímků a parametry měření jsou poté zpracovány v kapitole 5.4.1.

4.8.2 Modifikace povrchu zlatých nanotyček

Syntetizované zlaté nanočástice byly poté modifikovány metodou vrstva po vrstvě. Nejprve byl navázán Ramanovský reportér, v našem případě DTNB (kyselina 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoová), kdy se podle protokolu ze článku mělo vzít 1 mg nanočástic, které se přes noc (dle literatury 18 hodin [63]) nechají v roztoku 1 ml 50mM DTNB v absolutním ethanolu při pokojové teplotě k vytvoření SAM (z anglického „self-assembled monolayer“, samouspořádaná monovrstva) [49]. V tomto bodě nastal problém, jelikož nanočástice se začaly srážet a po navazování dalších vrstev byl velmi nízký výtěžek. Proto byl mezi modifikací nanočástic souběžně spuštěn test výtěžnosti, viz kapitola 4.8.2.1.

Agregace zlatých nanotyček začala již během promývání, kdy nanočástice ztrácely vrstvu detergentu CTAB. Ale při namáčení do absolutního ethanolu mohlo dojít ke ztrátě možného solvatačního obalu z molekul vody na povrchu nanočástic. Absence těchto vrstev a poté vysoká koncentrace Ramanova reportéru DTNB vedla k různé míře agregace, zdroje uvádí velkou van der Waalsovu přitažlivost Au–Au [37]. Z tohoto důvodu byl udělán i test rozpustnosti DTNB (viz 4.8.2.2), aby se našla vhodná koncentrace k promývání nanotyček, a tím nedocházelo k tak velkým ztrátám spojené s agregací nanotyček, aby mohlo dojít k obnově teoretického solvatačního obalu nanočástic.

Poté, co byla vytvořena SAM Ramanova reportéru DTNB, byl vzorek přečištěn pomocí centrifugy dvakrát v 70% ethanolu na 4000 rpm po dobu 20-ti minut, dle výsledku testu rozpustnosti. Poté jsou přes noc modifikovány v roztoku 150 nM 11-MUA (kyselina 11-

merkaptoundekanová) a 150mM 3-MPA (3-merkaptopropionová kyselina) v absolutním ethanolu, ještě je možné dodat i 1-dekanthiol, ale modifikace funguje i bez něj. Obě látky obsahují potřebnou thiolovou skupinu. Použitý objem byl 1,5 ml [49].

Po vytvoření vrstvy s karboxylovými zbytky následovalo promytí nejprve 70% ethanolem a centrifugace na 4000 rpm po dobu 20-ti minut a promytí 0,1M MES (monohydrát kyseliny 2-morfolinoethansulfonové, pH 6,5) pufrem na 4000 rpm po dobu 20-ti minut. K aktivaci karboxylových skupin byl použit roztok 0,05M NHS (sodná sůl N-hydroxysulfosukcinimidu) a 0,2M EDC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimid hydrochlorid) v 0,1M MES pufru, celkový použitý objem byl 1 ml. Pro aktivaci karboxylových skupin stačí pouze 30-40 minut. Poté byly za pomocí centrifugy nanotyčky dvakrát přečištěny MES pufrem, byly centrifugovány na 4000 rpm po dobu 20-ti minut [49].

Po povrchové aktivaci byly částice zality roztokem avidinu o koncentraci 0,5 mg/ml, přičemž avidin byl rozpuštěn v 0,1M MES pufru a bylo použito celkem 200 µl. Částice byly namáčeny po dobu 30-40 minut, aby se mezi aktivovanou karboxylovou skupinou a avidinem vytvořila kovalentní vazba, poté dvakrát promyty 0,1M MES pufrem. Aby se zabránilo nespecifickým interakcím, byl použit 1% ethanolamin v objemu 3 ml, který zablokuje aktivní skupiny nebo jakékoliv otevřené prostory, které vznikly vazbou avidinu. Působení ethanolaminu bylo po dobu 1 hodiny. Poté byly částice promyty dvakrát roztokem PBS pufru (fyziologický roztok pufrovaný fosfátem) [49].

Posledním krokem bylo navázání biotinem modifikované protilátky, biotin se specificky váže na avidin. Protilátky byly nejprve naředěny v roztoku PBS na koncentraci 0,1 mg/ml, bylo použito celkem 150 µl. Roztok byl ponechán po dobu 2 hodin v laboratorní teplotě, a poté byl dvakrát promyt PBS, aby se odstranily nekonjugované nebo volně konjugované protilátky [49].

Takto připravené modifikované nanotyčky jsou uchovávány v roztoku PBS v lednici do jejich navázání na cílenou bakterii [49].

4.8.2.1 Test výtěžnosti

Zprvu byla modifikace zlatých nanotyček prováděna v plastových centrifugačních zkumavkách, z důvodu snadného přečišťování a celkové manipulace. Problém se začal objevovat již při první vrstvě, navázání Ramanova reportéru DTNB. Nanočástice se začaly nekontrolovaně lepit nejen mezi sebou, ale také na povrch centrifugačních zkumavek. Proto byly vyrobeny centrifugační zkumavky se superhydrofobním povrchem.

Nejprve byly zkumavky ozonizovány po 10 minut s koncentrací ozónu 35 mg/h (maximální výkon 50 mg/h) a poté modifikovány pomocí 1% 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyltriethoxysilanu v toluenu. Poté byly vypláchnuty čistým toluenem a methanolem. Jako další alternativní nádoby na modifikaci zlatých nanotyček byly zvoleny skleněné 4ml vialky.

Byly tedy použity 3 typy reakčních nádob, klasické centrifugační zkumavky, modifikované centrifugační zkumavky a skleněné vialky. Do těchto nádob byl k roztoku nanočástic napipetován 1 ml DTNB o různé koncentraci, byly zvoleny koncentrace 50 mM, 10 mM, 1 mM, 0,1 mM, 0,01mM a 0,001 mM [67]. Šlo tedy o koncentraci z původního zvoleného protokolu, a poté o koncentrace dle jiné literatury. Celkem bylo vytvořeno 24 variant, u nichž byla v průběhu modifikací a jejich promývání měřena optická hustota (OD) pomocí McFarlandova denzitometru (vlnová délka 565 ± 15 nm).

Výsledky testu výtěžnosti viz kapitola 5.4.2.1.

4.8.2.2 Test rozpustnosti DTNB

Test rozpustnosti DTNB byl proveden z důvodu nalezení vhodného promývacího roztoku mezi kroky navázání Ramanovského reportéru a vrstvy složené z 3-MPA a 11-MUA (s 1-dekanthiolem), které byly syntetizovány v absolutním ethanolu. Ztráty nanočástic byly vysoké, proto byly hodnoceny různé možnosti, jak ztráty snížit. Jedna idea byla zvýšit viskozitu rozpouštědla a také případné obnovení teoretického solvatačního obalu.

Základem tohoto testu bylo vytvoření koncentrační řady množství přidané vody. Základem bylo 15 zkumavek Eppendorf, do nichž bylo napipetováno vypočítané množství 50mM DTNB (byla zvolena nejvyšší koncentrace DTNB, která byla použita k vytvoření samouspořádané mnovrstvy na povrchu zlatých nanotyček), které bylo rozpuštěno v absolutním ethanolu. Do takto připravených roztoků bylo přidáno vypočítané množství vody, poté byly vzorky promíchány pomocí vortexu a ponechány po dobu 10-ti minut při laboratorní teplotě. Poté byly vzorky centrifugovány na 13 000 rpm po 2 minuty. Poté byly hodnoceny, zda se objevila viditelná sraženina. Vzorky byly ponechány i po dobu až dvou dní, z důvodu ověření dlouhodobé stability.

Pozorování bylo zpracováno do přehledné tabulky v kapitole 5.4.2.2.

4.8.3 Výroba magnetických nanočástic

Sendvičový imunostest se skládá ze dvou hlavních částí, a to ze specificky vázajicí se značky, kterou je zlatá nanočástice značená DTNB, a poté bakterii imobilizující složkou, a tou mohou být buď magnetická nanočástice s navázanými protilátkami, nebo podložní sklíčko s navázanými protilátkami. Byly vyzkoušeny obě varianty [49,69].

Byly zhotoveny magnetické nanočástice typu jádro-skořápka, jádro bylo tvořeno z oxidu železitého (Fe_2O_3), které bylo stabilizováno pomocí polyethylenglykolu (PEG 4000 [99]). Byla použita kombinace dvou různých protokolů [69,99].

Nejprve byly použity roztoky dvou solí železa o dvou různých oxidačních stavech v poměru $2Fe^{3+}$:$1Fe^{2+}$, tím byly $FeCl_3$ (chlorid železitý) a $FeSO_4$ (síran železnatý [69]), z nichž byl udělán roztok v destilované vodě. Celkem bylo použito 0,508 g $FeCl_3$ a 0,261 g $FeSO_4$, tyto látky byly rozpuštěny v 2,95 ml deionizované vody. Roztok solí byl poté vmíchán do předehřátého 1M NaOH (0,3g ve 7,515 ml deionizované vody), roztok byl udržován pod bodem varu po dobu 1 hodiny a míchán na magnetické míchače s ohřevem. Roztok změnil barvu ze žluté na černou vznikajícím oxidem železitým ve formě sraženiny. Tato sraženina byla oddělena od zbytku roztoku magnetem a promyta deionizovanou vodou, takto bylo opakováno dvakrát [69,99].

Vzniklé částice oxidu železitého byly pomocí ultrazvuku rozptýleny v 50-ti ml deionizované vody, vzniklá disperze byla zahřáta na teplotu 80 °C, a bylo přidáno 295 mg PEG4000. Směs byla míchána po 30 minut na magnetické míchačce. Částice byly shromážděny magnetem, promyty nejprve vodou, poté ethanolem, aby byl odstraněny zbytky PEG a solí. Poté je černá sraženina volně vysušena na vzduchu do vzniku černého prášku [69,99].

K vytvoření zlaté skořápky bylo použito 5 mg připravených částic bylo rozptýleno v 50 ml deionizované vody, kde byly rozptýleny ultrazvukem. Roztok byl okyselen 0,1M HCl na pH 5 až 6, aby byl povrch částic protonizován, poté bylo přidáno 6 mg urotropinu. Směs byla míchána po 30 minut. Poté bylo přidáno 2,42 ml 0,01M kyseliny chlorozlatité, ke směsi bylo po 30-ti minutách míchání přidáno 10 ml čerstvě připraveného ledového 0,15M $NaBH_4$. Tím

bylo yvredukováno zlato na povrchu částic oxidu železitého. Roztok byl míchán ještě po dobu jedné hodiny. Částice byly shromážděny pomocí magnetu a několikrát promyty vodou [69,99].

K modifikaci jejich povrchu byl použit stejný protokol, jako v případě zlatých modifikovaných částic s výjimkou toho, že nebyl použit ramanovský reportér DTNB, dále byl protokol totožný, viz kapitola 4.8.2.

4.9 Ověření funkce protilátky

Jelikož byl velmi nízký výtěžek částic použitých ke značení bakterií, tak byl hledán způsob, jak ověřit jeho funkčnost. Pokud by protokol k navázání protilátek fungoval, je možné poté hledat východisko, jak jednotlivé kroky poupravit a zvýšit tím výstup z celé procedury. Výtěžek z magnetických částic též nebyl ideální, proto bylo rozhodnuto, že bude lepší se soustředit na výrobu imobilizačních podložních sklíček, jejichž výroba a manipulace s nimi je mnohem snazší.

4.9.1 Modifikace povrchu podložních sklíček

Modifikace podložních sklíček započala tím, že byly nejprve pozlacena. Sklíčka byla pozlacována dle stejného protokolu jako substráty na SERS, viz kapitola 4.5, s drobnými rozdíly. Sklíčka byla také očištěna v acetonu v ultrazvukové lázni, ale na poloviční intenzitu, poté byly převedeny do isopropanolu a po vysušení dusíkem vloženy do kyslíkové plazmy. Parametry i generátor plazmy byl totožný.

Poté sklíčka byla naprášena ve stejné naprašovačce, ale byla naprašována po kratší čas, tak aby vrstva měla 100 nm. Dle parametrů v **tabulce 2**.

Tabulka 2: Parametry naprašování sklíček

Parametr	Hodnota
Materiál:	Zlato
Naprašovací proud [mA]:	50
Naprašovací čas [s]:	134
Nástrojový faktor:	2,7
Předčištění terče:	Ne

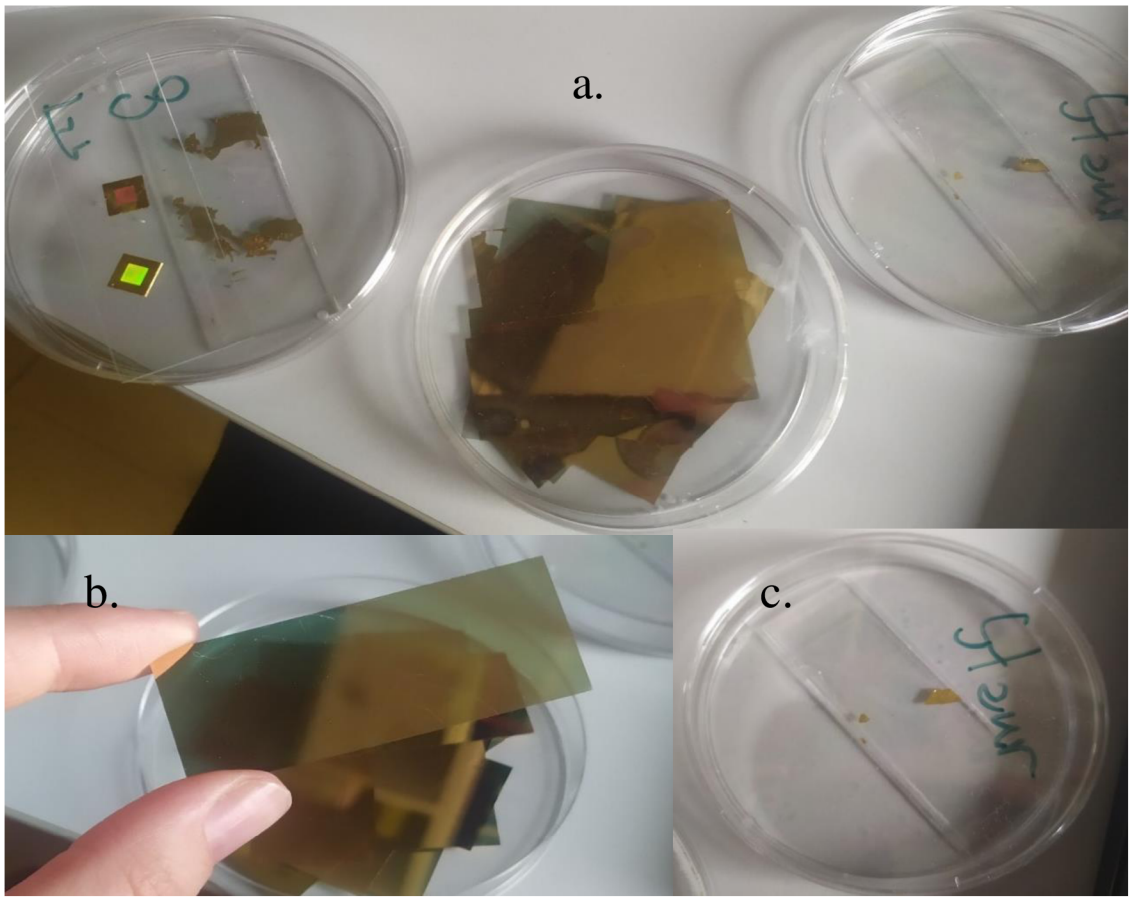
Hotová naprášená podložní sklíčka byla modifikována podobným způsobem jako zlaté nanotyčky s několika rozdíly. Prvním rozdílem bylo, že nebyl použit Ramanovský reportér. Prvním krokem tedy byla modifikace modifikovány v roztoku 150nm 11-MUA (kyselina 11-merkaptoundekanová) a 150mM 3-MPA (3-merkaptopropionová kyselina) v absolutním ethanolu přes noc, případně také v 1-dekanthiolu [49]. Použitý objem byl 5 ml.

Po vytvoření vrstvy s karboxylovými zbytky byla sklíčka nejprve opláchnuta nejprve 96% ethanolem, poté 0,1M MES (monohydrát kyseliny 2-morfolinoethansulfonové, pH 6,5) pufrem, k aktivaci karboxylových skupin byl použit roztok 0,05M NHS (sodná sůl N-hydroxysulfosukcinimidu) a 0,2M EDC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimid hydrochlorid) v 0,1M MES pufru, celkový použitý objem byl 2 ml, roztok byl nakapán do středu sklíčka a krouživými pohyby rozprostřen po povrchu, proti vysušení byla soustava vždy uzavřena v Petriho misce. Pro aktivaci karboxylových skupin stačí pouze 30-40 minut. Poté byla opláchnuta MES pufrem [49].

Po povrchové aktivaci byl na sklíčka kápnut roztok avidinu o koncentraci 0,5 mg/ml, přičemž avidin byl rozpuštěn v 0,1M MES pufru a bylo použito celkem 200 µl. Sklíčka byla namáčena po dobu 30-40 minut, aby se mezi karboxylovou skupinou vytvořila kovalentní vazba, poté dvakrát opláchnuta 0,1M MES pufrem. Aby se zabránilo nespecifickým interakcím, tak byl použit 1% ethanolamin, který zablokuje aktivní skupiny nebo jakékoliv otevřené prostory, které vznikly vazbou avidinu. Působení ethanolaminu bylo podobu 1 hodiny v objemu 5 ml. Poté byly částice promyty dvakrát roztokem PBS pufru (fyziologický roztok pufrovaný fosfátem) [49].

Posledním krokem poté bylo navázání biotinem modifikovanou protilátku, biotin se poté specificky váže na avidin. Protilátky byly nejprve naředěny v roztoku PBS na koncentraci 0,1 mg/ml, bylo použito celkem 150 µl, roztok byl opět nakápnut do středu sklíček. Roztok byl ponechán po dobu 2 hodin v laboratorní teplotě, a poté byl dvakrát promyt PBS, aby se odstranily nekonjugované nebo bolně konjugované protilátky [49].

Takto připravená modifikovaná sklíčka jsou uchovávána v roztoku PBS v lednici. Poté na ně budou vázat cílené bakterie [49].



Obrázek 16: Podložní sklíčka k imobilizaci bakterií. **a.** Vlevo modifikované podložní sklo na zachytávání *E.Coli*, střed pozlacená sklíčka k povrchové modifikaci, vpravo kontrolní modifikované sklíčko, které bylo vystaveno kultuře *Staphylococcus aureus*. **b.** Čistá podložní pozlacená skla k modifikaci v detailu. **c.** Detail kontrolního modifikovaného sklíčka, které bylo vystaveno kultuře *Staphylococcus aureus*.

4.9.2 Adhezní vrstvy

Problémem podložních sklíček s naprášeným čistým zlatem je, že zlato má na nich velmi malou adhezi a při procesu modifikace se začíná zlatá vrstva postupně odlupovat do téměř kompletního nebo až úplného odstranění zlaté vrstvy, viz **obrázek 16 a.** a **c.**, kde na podložních sklíčkách nezůstala prakticky žádná zlatá vrstva. Proto byla přidána vrstva adhezní, byl zvolen chróm a byl proveden test adheze, viz kapitola 4.9.2.1. Vybrané sklíčko s naprášeným chromem a zlatem bylo poté modifikováno dle protokolu výše v kapitole 4.9.1.

Naprašovací systém je standardně osazen sestavou s kovovým štítem, která umožňuje čištění terčů od oxidů před naprašováním kovu. Po očištění terče se štít odklopí a standardně se začne naprašovat. Chróm se pasivuje oxidem chromitým (Cr_2O_3).

4.9.2.1 Test adheze

Bylo celkem zvoleno 15 variant různých typů naprášených podložních sklíček. Byla připravena 3 sklíčka s vrstvou chromu o tloušťce 2 nm, 3 sklíčka s vrstvou chromu o tloušťce 5 nm, 3 sklíčka s vrstvou chromu o tloušťce 10 nm a poté 3 sklíčka s vrstvou chromu o tloušťce 100 nm. Pokaždé na jedno z chromovaných sklíček bylo poté naprášeno 50 nm zlata, na druhé 100 nm zlata, na třetí 150 nm zlata. Parametry naprašování obou kovů viz **tabulka 3**.

Po naprášení byla sklíčka vložena do deionizované vody a vložena na půl hodiny do ultrazvukové lázně na poloviční výkon. Každé sklíčko bylo v samostatné kádince, která obsahovala 30 ml deionizované vody. Poté bylo vybráno sklíčko s nejmenší mírou poškození, a to bylo zvoleno k modifikaci protilátkami.

Tabulka 3: Parametry naprašování tenkých vrstev na podložní sklíčka

Výstupní tloušťka [nm]:	100	10	5	2
Parametr	Hodnota	Hodnota	Hodnota	Hodnota
Materiál:	Chróm	Chróm	Chróm	Chróm
Naprašovací proud [mA]:	120	120	120	120
Maximální naprašovací čas [s]:	240	24	12	5
Nástrojový faktor:	2,3	2,3	2,3	2,3
Předčištění terče:	Ano	Ano	Ano	Ano
Výstupní tloušťka [nm]:	150	100	50	
Parametr	Hodnota	Hodnota	Hodnota	
Materiál:	Zlato	Zlato	Zlato	
Naprašovací proud [mA]:	50	50	50	
Naprašovací čas [s]:	200	134	67	
Nástrojový faktor:	2,7	2,7	2,7	
Předčištění terče:	Ne	Po	Út	

4.9.3 Charakterizace povrchu pomocí AFM

Mimo SERS experimentů bylo provedeno měření mikroskopií atomárních sil (AFM), aby byla prokázána povrchová úprava sklíček. Byl použit AFM (BRUKER, Massachusetts, USA) s hrotem TESPA-V2 (BRUKER, Massachusetts, USA), který byl řízen na uživatelském rozhraní NanoScope Analysis 1.9 a stejně tak i analyzováno. Parametry měření viz **tabulka 4**.

Tabulka 4: Parametry měření modifikovaných sklíček na AFM

Parmetr	Hodnota
Mód	Tapping
Hrot	TESPA-V2
Velikost skenu [µm]	4-10
Poměr stran	1
X posun [nm]	0
Y posun [nm]	0
Skenovací úhel	90°
Rychlost skenování [Hz]	0,4
Rozlišení	256

4.9.4 Test protilátky

Dokončení testu protilátky bylo provedeno pomocí testu inkubačního

4.9.4.1 Inkubační test

K provedení testu byly inkubovány tři typy bakterií, a to cílová *E. Coli, Staphylococcus aureus* a *Serratia marcescens*. Byly inkubovány v tekutém médiu v bioreaktorech

do exponenciální fáze růstu (OD 0,5). Bioreaktory byly ovládány uživatelským rozhraním RTS-1 (Biosan). Pipetou byl odebrán 1 ml bakterií, které byly vloženy do zkumavky eppendorf a promyty roztokem PBS a centrifugovány na 2 000 rpm po dobu 1 minuty. Supernatanty obsahující médium byl odebrán a znova resuspendován v roztoku PBS za použití vortexu. Poté byl odebrán objem 1 ml pipetou a nastříknuto na povrch modifikovaného sklíčka s protilátkami. Uvedený postup přípravy vzorku byl shodný pro všechny tři použité druhy bakterií. Poté byly mikroorganismy na povrchu sklíček inkubovány po dobu 30 minut.

Kvalitativní test proběhl tak, že z agarových ploten byl odebrán stěr o délce cca 1 cm z bakteriálních kolonií. Ten byl suspendován pomocí vortexu a centrifugován na 2 000 rpm po dobu 1 minuty. Poté byl supernatant odebrán a bakterie byly resuspendovány v roztoku PBS, z něhož byl odebrán 1 ml pipetou a nastříknut na povrch modifikovaného sklíčka s protilátkami. Takto bylo provedeno v případě všech tří druhů bakterií. Poté byly mikroorganismy na povrchu sklíček inkubovány po dobu 30 minut.

Mezitím byla nařezána podložní sklíčka na obdélníky přibližné velikosti jako bylo modifikované sklíčko. Ta byla pomocí oboustranné izolepy přilepena na povrch podložního čistého skla, aby mezi nimi vznikl prostor pro sklíčka modifikovaná, s navázanými bakteriemi.

Modifikovaná sklíčka s bakteriemi byla opláchnuta sedmkrát 2 ml PBS a přilepena pomocí oboustranné lepící pásky k podložnímu sklu mezi již přilepená skla nařezaná. Poté celý systém byl překryt krycím sklíčkem, které bylo také přilepeno oboustrannou lepící páskou. Do mezery mezi krycím sklíčkem a sklíčkem modifikovaným byl doplněn PBS pufr.

Takto připravená sklíčka byla pozorována optických mikroskopem u Ramanova spektrometru a pořízeny snímky, které jsou ukázány v kapitole 5.5.3.

Obrázek 17: Modifikovaná podložní sklíčka s navázanými bakteriemi

5 VÝSLEDKY A DIZKUZE

5.1 Příprava SERS substrátu

Naprašovačka využívá magnetronové rozprašovací elektrody, přičemž využívá nízké napětí (tzv. chladné rozprašování) a poskytuje jemnozrnný povrch, který je nezbytný k SERS efektu.

5.2 Výsledky z měření rhodaminu B

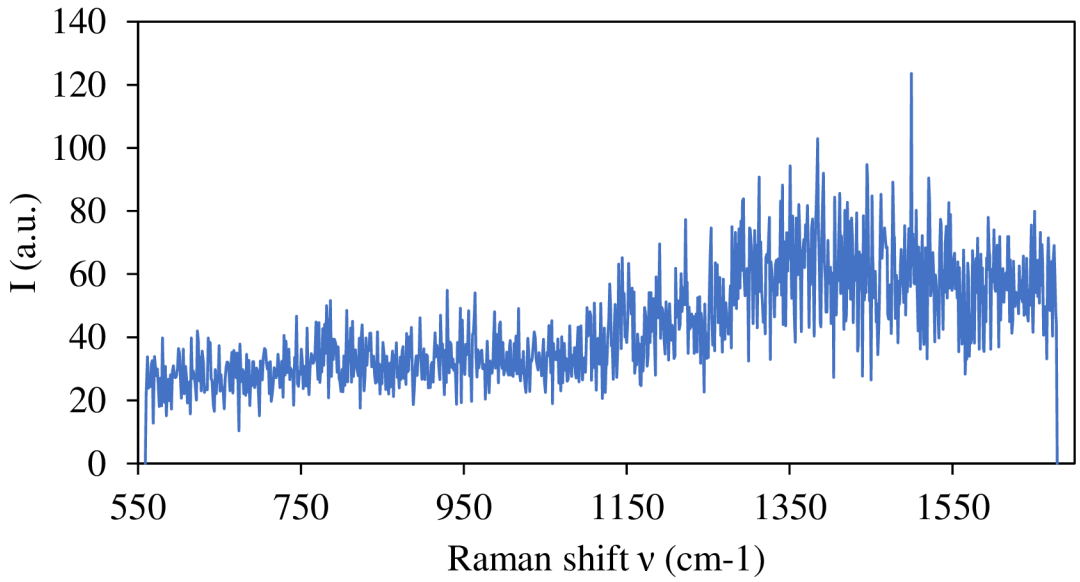
5.2.1 Porovnání klasické Ramanovy spektroskopie a metody SERS

Bylo změřeno všech 48 vzorků, z každého bylo odečteno 10 spekter dle experimentálního uspořádání viz kapitola 4.6.1.1 a 4.6.1.2. Tato spektra byla poté zpracována v programu MS Excel a vyhodnocena.

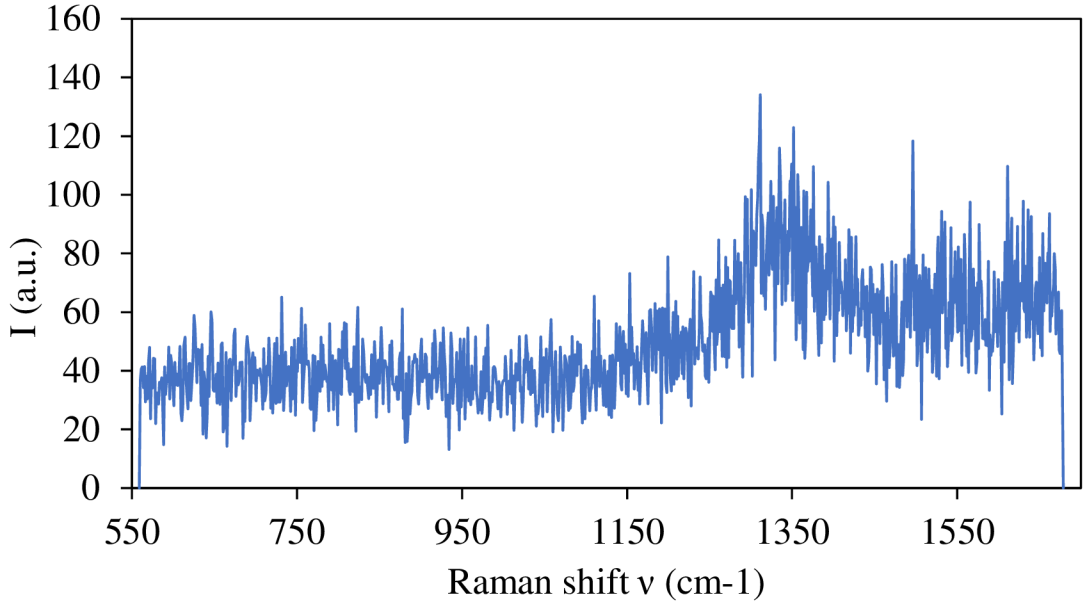
Z **obrázku 18** a **obrázku 19** je patrné, že se nepovedlo zachytit žádný Ramanův signál rhodaminu B. Jakýkoliv signál byl překryt fluorescencí a nemohla být provedena žádná kvalitativní a ani kvantitativní analýza.

Z tohoto důvodu bylo dále provedeno měření na zlatém SERS substrátu.

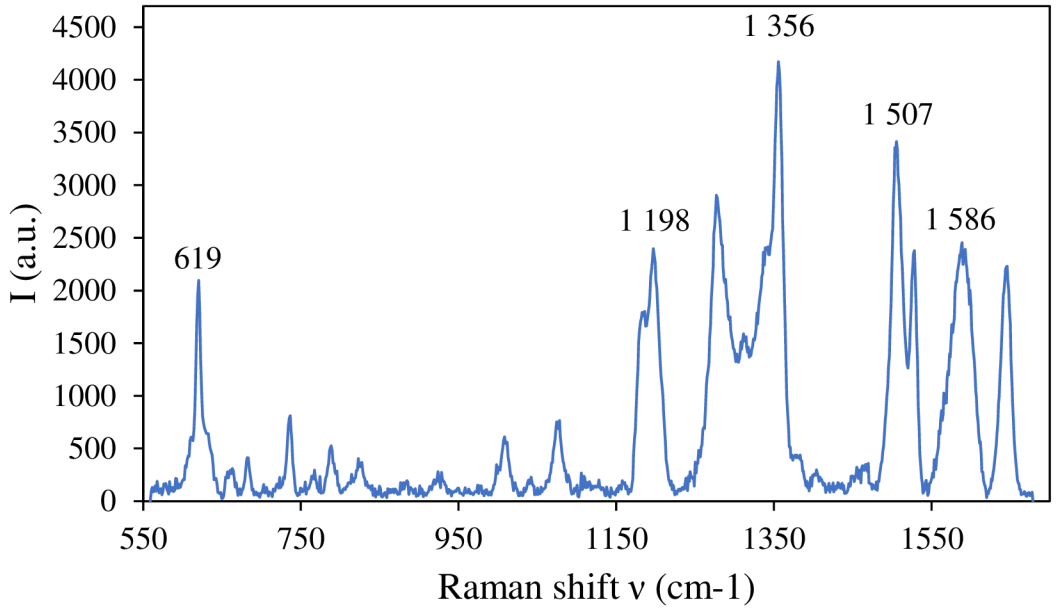
Dle uvedených spekter níže, viz **obrázek 18**, **obrázek 19**, **obrázek 20** a **obrázek 21**, lze usoudit, že není možné získat rozeznatelnou odezvu rhodaminu B metodou klasické Ramanovy spektroskopie, zatímco SERS detekuje rhodamin B velmi efektivně Proto bylo nutné přejít k měření metodou SERS.



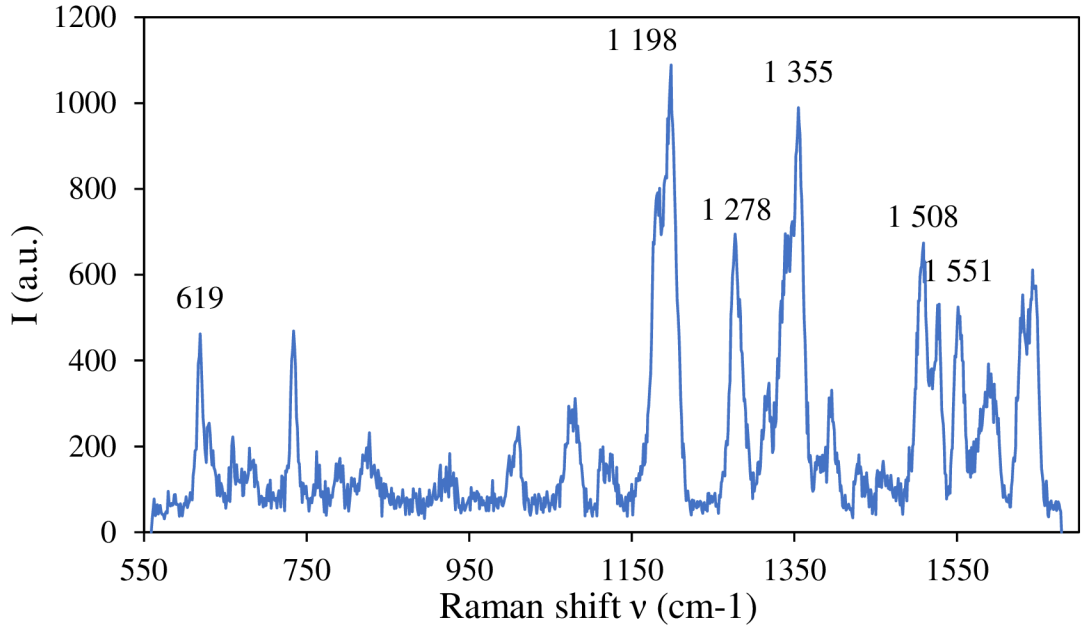
Obrázek 18: Ramanovo spektrum rhodaminu B, rhodamin B první řada 96 hodin.



Obrázek 19: Ramanovo spektrum rhodaminu B, rhodamin B první řada 150 min.



Obrázek 20: Ramanovo spektrum rhodaminu B, získané metodou SERS, rhodamin B první řada 96 hodin.



Obrázek 21: Ramanovo spektrum rhodaminu B, získané metodou SERS, rhodamin B první řada 150 min.

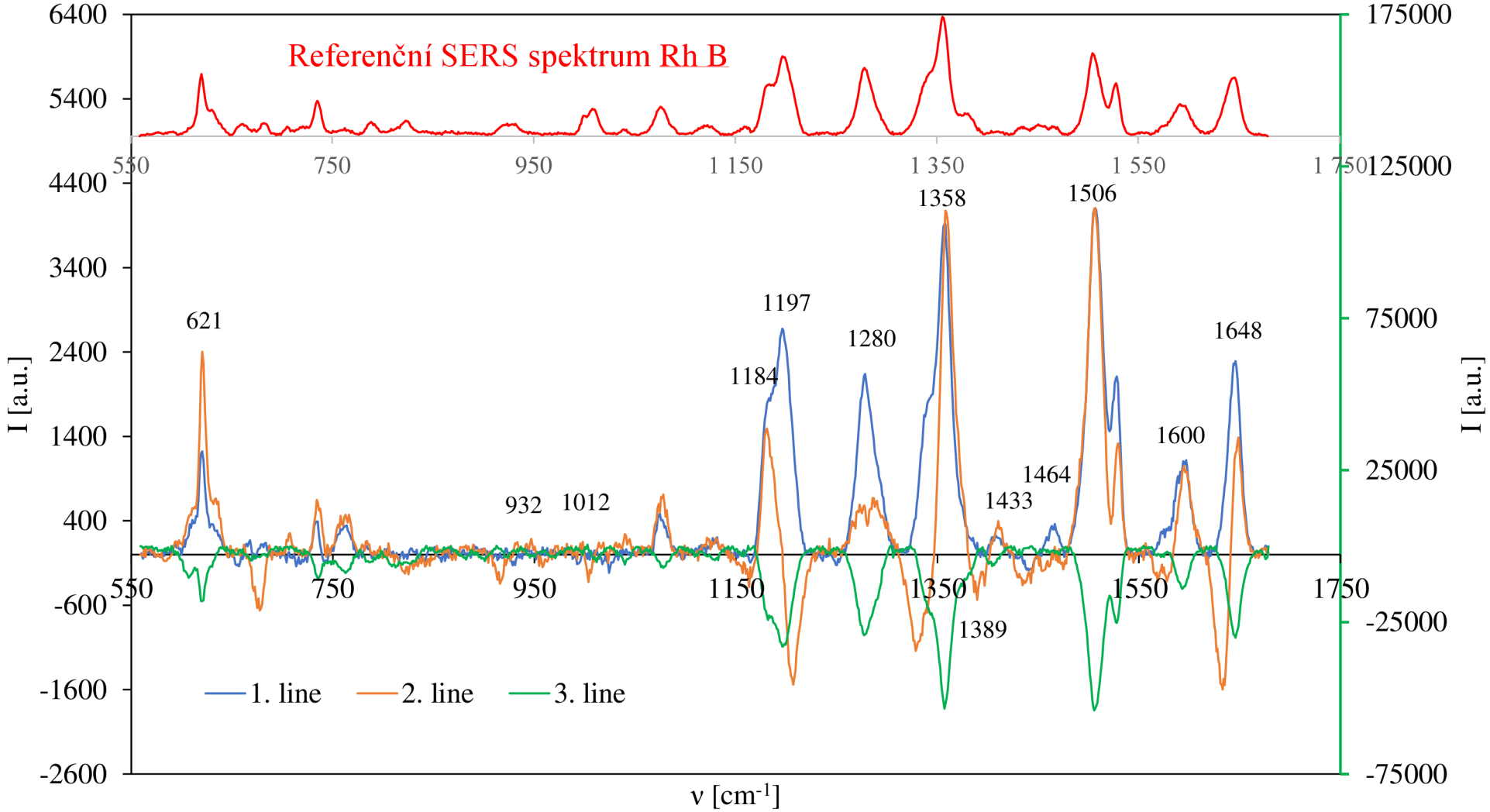
5.2.2 Vyhodnocení získaných spekter rhodaminu B z metody SERS

Bylo změřeno všech 48 vzorků rhodaminu B pomocí metody SERS, ze všech bylo celkem sejmuto 10 spekter a posléze vyhodnoceny v uživatelském rozhraní MS Excel. Byly vyzkoušeny dva typy SERS substrátů, komerční NICOLOID (Nicolet CZ s.r.o., Praha, Česká republika), kde byl signál opět, stejně jako v případě konvenční Ramanovy spektroskopie, překryt velmi silnou fluorescencí, a poté zlaté čipy, které byly vyrobeny před samotným experimentem, příprava viz 4.5. Tedy, jediný substrát, který dostatečně zesiloval signál rhodaminu B byl substrát se strukturou reverzních pyramid s 300 nm naprášeného zlata, které mělo lehce zrnitou strukturu.

Nejprve byly spektra vyhodnoceny tak, že se z každého vzorku a jeho celkem deseti spekter udělala spektra průměrná a jejich směrodatné odchylky. Dále byla vytvořena jejich diferenciální spektra tak, že z každé řady udělalo průměrné spektrum, od něhož se pak odečetlo spektrum z bodu nula. Tento bod byl proveden, aby se zjistilo, zda nedošlo k poklesu či vzestupu intenzity některého píku. Poté, pokud se projevila některá ze změn, tak byl každý z nich vyhodnocen zvláště, zdali by nebyla zjištěna nějaká lineární či jiná závislost v poklesu intenzity některého píku. Takto byla hodnocena každá řada zvlášť i všechny dohromady. Diferenciální spektra na následujícím **obrázku 22** byla vytvořena tak, že od průměru z deseti vzorků t_0 byl odečten průměr úplně všech fotodegradovaných vzorků, vždy v rámci jedné experimentální varianty. Spektra 1. line (fotodegradace bez fotokatalyzátoru), vykazují jen minimální rozdíly poměru píků vůči referenčnímu spektru rhodaminu B, zatímco spektra 2. line (fotodegradace s TiO_2-(H) fotokatalyzátorem) má intenzity některých píků snížené a spektra 3. line (fotodegradace s TiO_2-(H)-Ag fotokatalyzátorem) má snížené píky všechny. To by znamenalo, že efektivita fotodegradace v rámci celého časového intervalu byla nulová či zanedbatelná pro vzorky bez katalyzátoru, zatímco v přítomnosti fotokatalyzátoru TiO_2-H vykazovalo menší efektivitu fotodegradace než TiO_2-(H)-Ag. To, že některá z diferenciálních

spekter obsahují pozitivní hodnoty, tedy relativní nárůst signálu během experimentu, lze snadno vysvětlit například odparem vody při manipulaci se vzorkem.

Nicméně, ze začátku nebyla nalezena žádná lineární ani jiná závislost v poklesu intenzity na čase, proto došlo ke třídění spekter. Pokud se některé ze spekter, která byla změřena u jednotlivých vzorků příliš lišilo, (tzv. outlier, odlehlé měření) bylo z hodnocení vyřazeno.



Obrázek 22: Diferenciální spektra (průměrná změna intenzity píků během experimentu). 1. line obsahuje vzorky roztoků Rhodaminu B, které byly vystaveny světlu bez fotokatalyzátoru. 2. line obsahuje vzorky s fotokatalyzátorem TiO_2-(H). 3. line obsahuje vzorky s fotokatalyzátorem TiO_2-(H)-Ag.

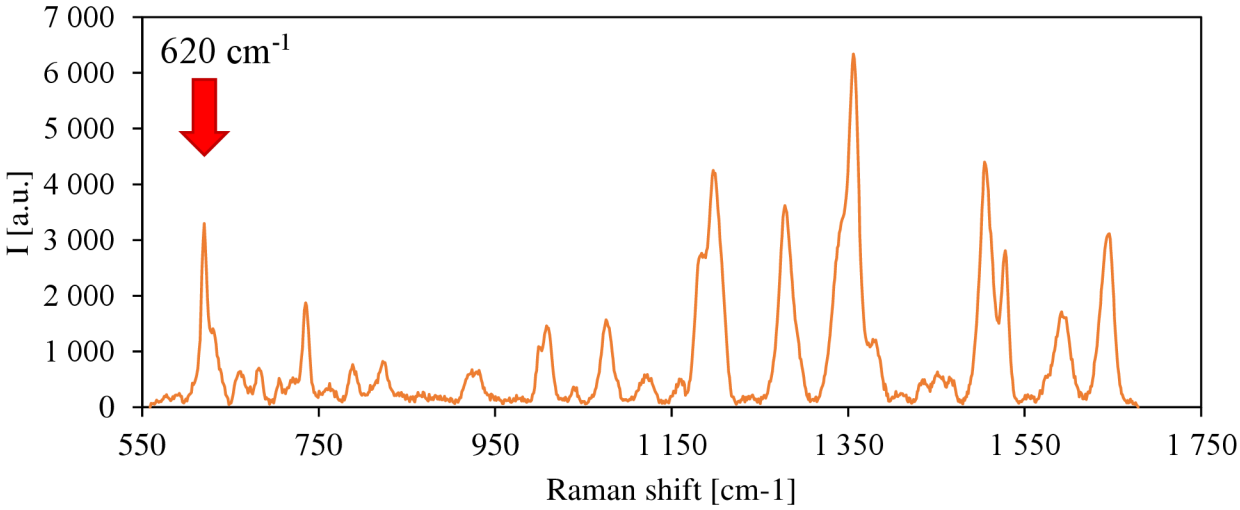
Jako první změna byla zkoumána na píku 621 a 1506 cm^{-1}, která byla nejvíce patrná na vzorcích s katalyzátorem TiO_2-(H)-Ag. Jedná se o charakteristické píky rhodaminu B, stejně tak 1356-1358 cm^{-1}, 1646-1649 cm^{-1} která souvisí s deformací xantenového prstence (jádra rhodaminu B), tzv. dýchání, natahování nebo ohybu v rovině. Jedná se tedy o deformaci C-C-C vazeb. Na právě těchto signálech byla pozorována největší změna, především ve vzorcích s katalyzátorem, co může poukazovat na změnu ve struktuře xantenového jádra (otevírání aromatického kruhu apod.). Další píky, které nejsou tak dominantní, ale také náleží k signálům C-C-C vazeb jsou 932 cm^{-1} nebo 1600 cm^{-1}, na nichž nebyly pozorovány extrémní změny, již z důvodu nízké intenzity signálu [37,100,101].

Velká změna byla pozorována na 1197 cm^{-1} odpovídající natahování jednoduché vazbě mezi uhlíky [100,101], zejména v případě katalyzovaných vzorků, kdy se mohlo jednat o ethylové skupiny navázány přes dusík ke xantanovému jádru. V případě katalyzovaného vzorku pomocí TiO_2-(H)-Ag signál má velký propad, paradoxně v případě katalyzátoru TiO_2-(H) naopak roste. Stejná odezva byla zachycena i při 1280 cm^{-1}, kdy by se mělo jednat o vibrace vazby C-H [100,101], kdy v případě vzorku katalyzovaného pomocí TiO_2-(H)-Ag signál má velký propad a v případě katalyzátoru TiO_2-(H) naopak opět roste.

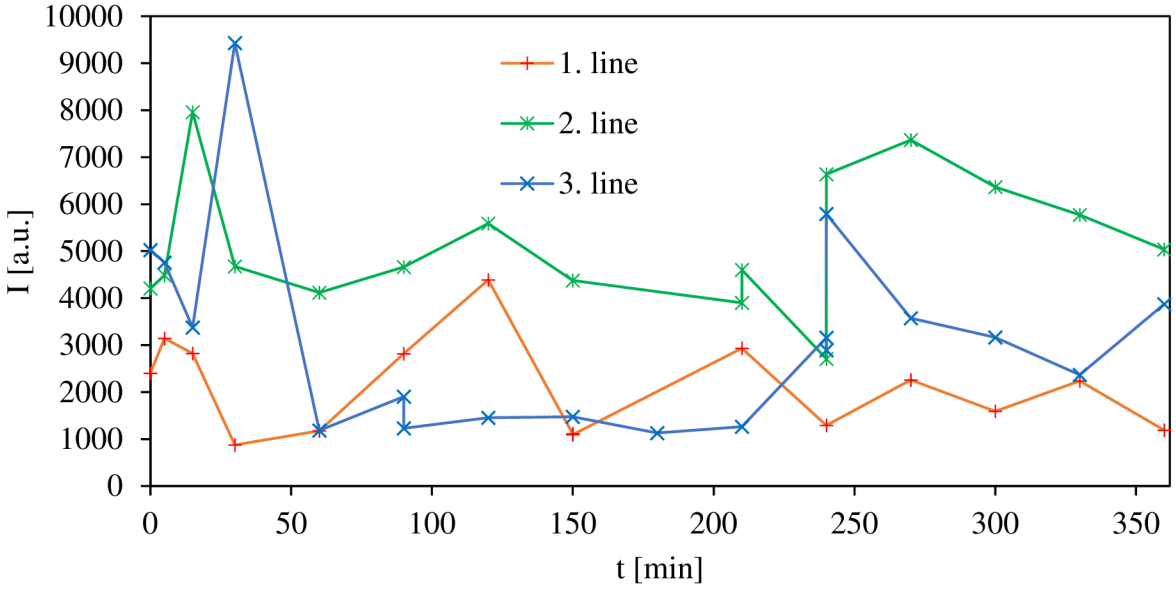
Menší změna byla také pozorována na 1388-1392 cm^{-1}, kdy by se mělo jednat o natažení vazby uhlík-dusík, případně dvojitých vazeb mezi uhlíky [100]. Poté vazba uhlík-dusík natahující se na benzenovém kruhu na 1433 cm^{-1} [37,100] a slabý pás 1464 cm^{-1}, kde vidíme C-H nůžkovou vibraci připojené na C-N [37,101], prakticky beze změny.

Na 1184 cm^{-1} je vidět vibrace C–H dvou benzenových kruhů v molekule [100], kdy dochází k poklesu signálu u vzorků s katalyzátorem TiO_2-(H)-Ag, ale v případě dvou ostatních řad signál roste. Malý signál, který byl zachycen na 1012 cm^{-1} odpovídající natažení C-N [37,101], byl téměř beze změny.

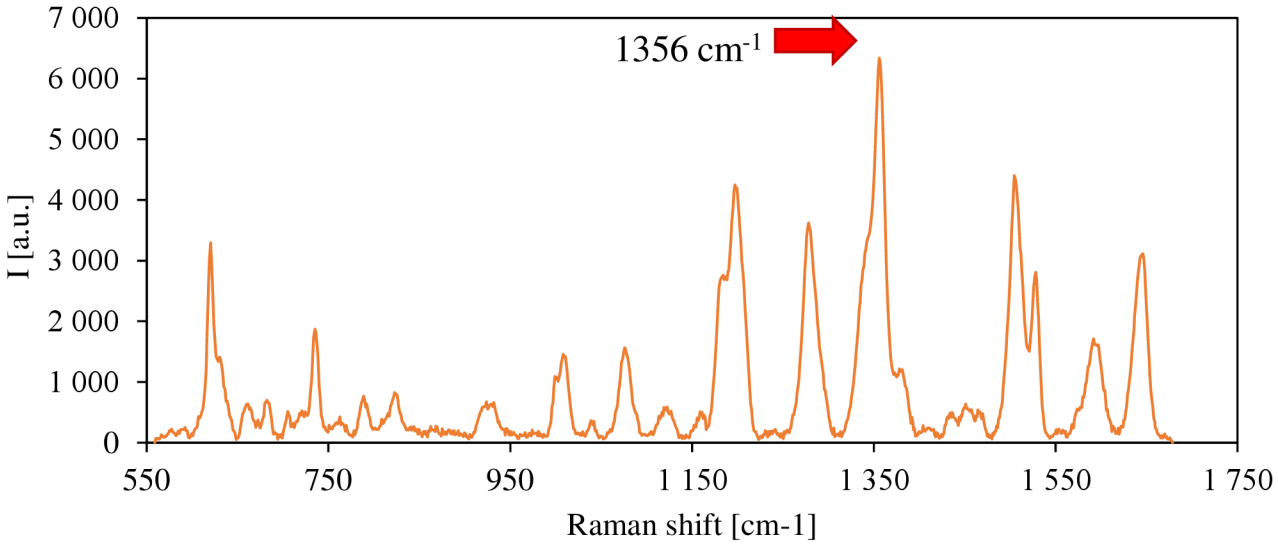
Všechny tyto změny byly zpracovány v programu MS Excel. Pro každý pík byla poté sestavena vlastní závislost intenzity na čase a graficky zpracována do grafů. Níže na obrázcích můžete vidět ukázky těchto grafických zpracování, viz **obrázek 23**, **obrázek 24**, **obrázek 25**, **obrázek 26**, **obrázek 27** a **obrázek 28**. Byly vybrány nejdominantnější změny a zároveň charakteristické píky pro rhodamin B.



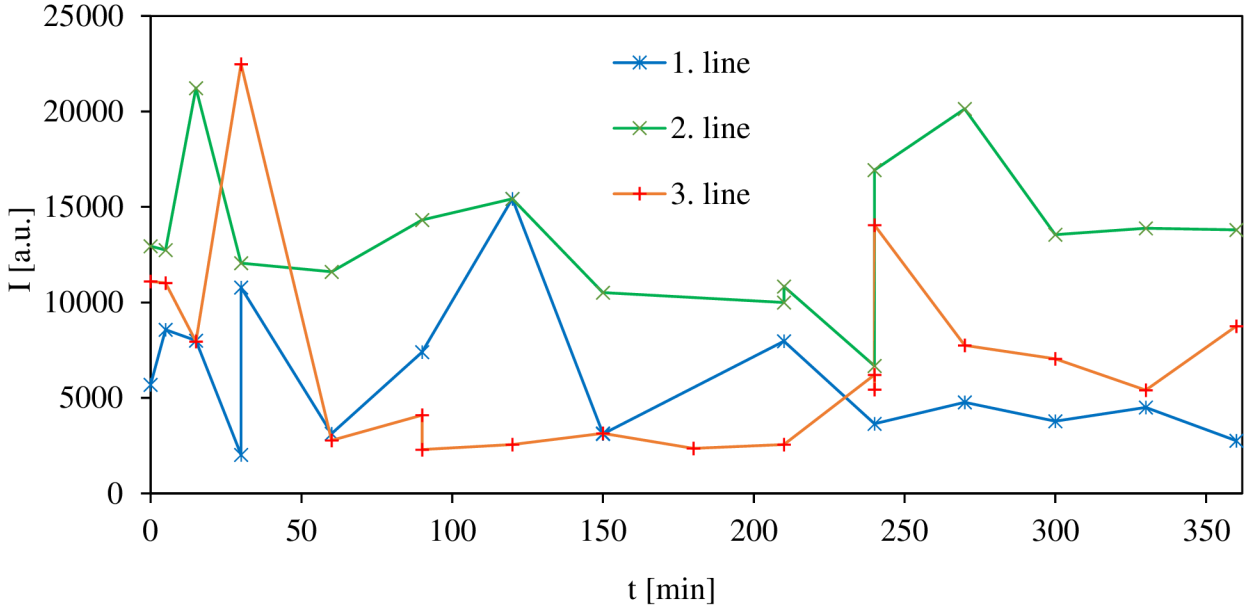
Obrázek 23: Závislost intenzity Ramanova signálu na vlnočtu získané metodou SERS, ukázka vybraného píku ze spektra rhodamin B.



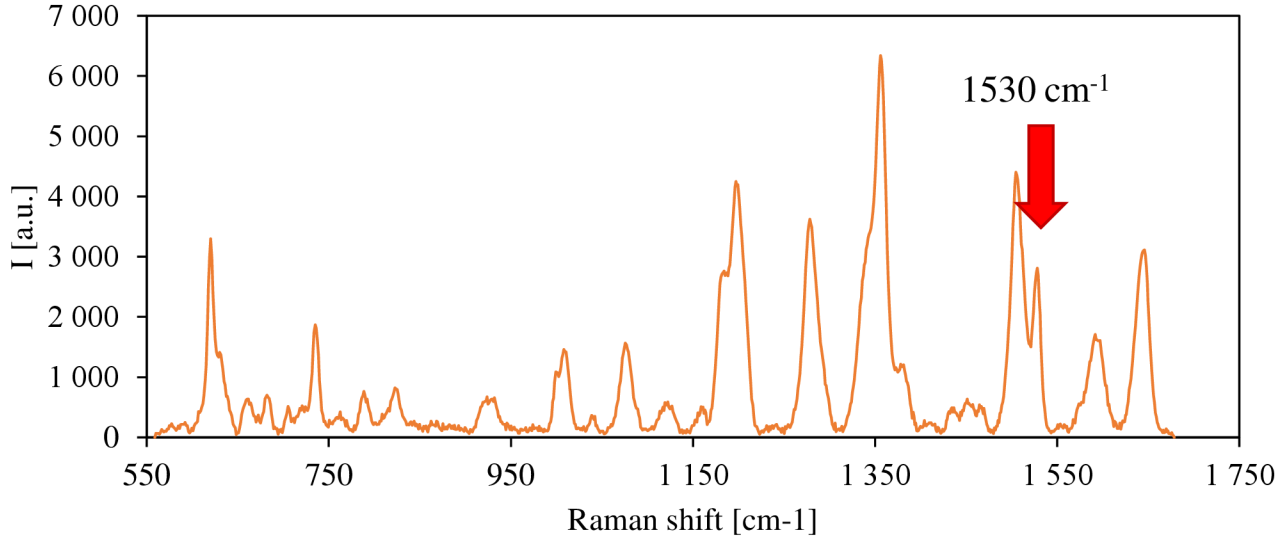
Obrázek 24: Závislost intenzity signálu na čase pro pík 620 cm^{-1}.



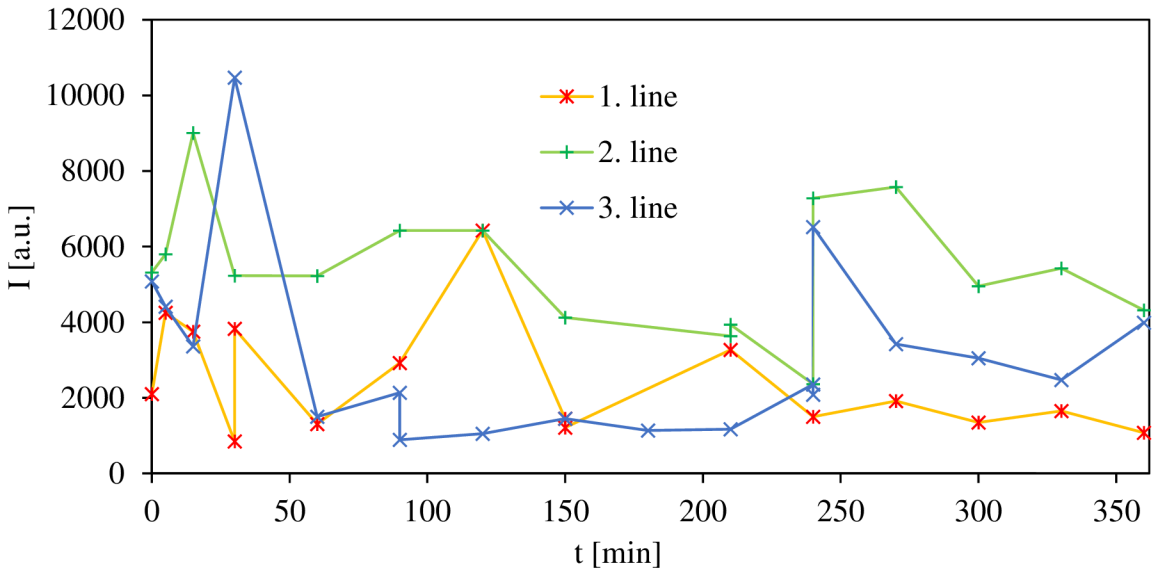
Obrázek 25: Závislost intenzity Ramanova signálu na vlnočtu získané metodou SERS, ukázka vybraného píku ze spektra rhodamin B.



Obrázek 26: Závislost intenzity signálu na čase pro pík 1356 cm^{-1}.



Obrázek 27: Závislost intenzity Ramanova signálu na vlnočtu získané metodou SERS, ukázka vybraného píku ze spektra rhodamin B.



Obrázek 28: Závislost intenzity signálu na čase pro pík 1530 cm-1.

Z **obrázku 23**, **obrázku 24**, **obrázku 25**, **obrázku 26**, **obrázku 27** a **obrázku 28** lze vyčíst, že v intenzitách jednotlivých signálů v průběhu času není žádná konkrétní závislost. Zpracování dat probíhalo uniformě pro všechny píky, u nichž byla zaznamenána změna, ale nebylo možné z nich vyčíst jakoukoliv závislost. Proto byla data zpracována ve třech úsecích do sloupcových grafů, zdali nebude změna v čase tím výraznější. Konkrétně se jednalo o intervaly 0-120 minut, 150-240 minut a 270-360 minut. Byla do sloupcového grafu vynesena závislost intenzity Ramanova signálu na čase u píků, u nichž byla stejně jako v předchozím zpracování zaznamenána změna. Takto bylo provedeno pro každou řadu zvlášť. Tyto grafy můžete vidět v přílohách, viz **obrázek 48**, **obrázek 49** a **obrázek 50**. V případě první řady, kde nebyl použit žádný katalyzátor se zdál úbytek signálu konstantní. V případě vzorků druhé řady, kde byl použit fotokatalyzátor TiO_2-(H) byl vidět nekonstantní úbytek signálu, kde v případě některých píků byl úbytek lineární, ale v jiných začal signál stoupat. Vzorky třetí řady, ke byl použit fotokatalyzátor TiO_2-(H)-Ag byl ke konci reakce naopak zaznamenán vysoký nárůst signálu, nikoliv však nad iniciální intenzitu.

Z měření nebylo možné vyvodit žádnou kvantitativní závislost fotodegradace rhodaminu B. Důvody mohou být různé, jedním z nich je špatná reprodukovatelnost kvality SERS substrátu. Jelikož substrát se naprašuje v sadách po 10-ti kusech, může se v průběhu přípravy jiné sady stát nějaká anomálie, která ovlivní kvalitu substrátu (např. rozdílná zrnitost povrchu), a tím pak i signál jím produkovaný, tato skutečnost je graficky znázorněna v kapitole 5.3. Další důvod může být, že v průběhu reakce dochází k posuvu píků, to může vést ke ztížené identifikaci a kvantifikaci.

Dalším důvodem, proč došlo k silnému zesílení signálu v případě vzorků třetí řady je, že v průběhu degradační reakce mohlo dojít k vylučování stříbra z katalyzátoru, stříbro je jeden z typů kovů, které se také používají k zesílení Ramanova signálu, blíže popsáno v kapitole 3.5.1.

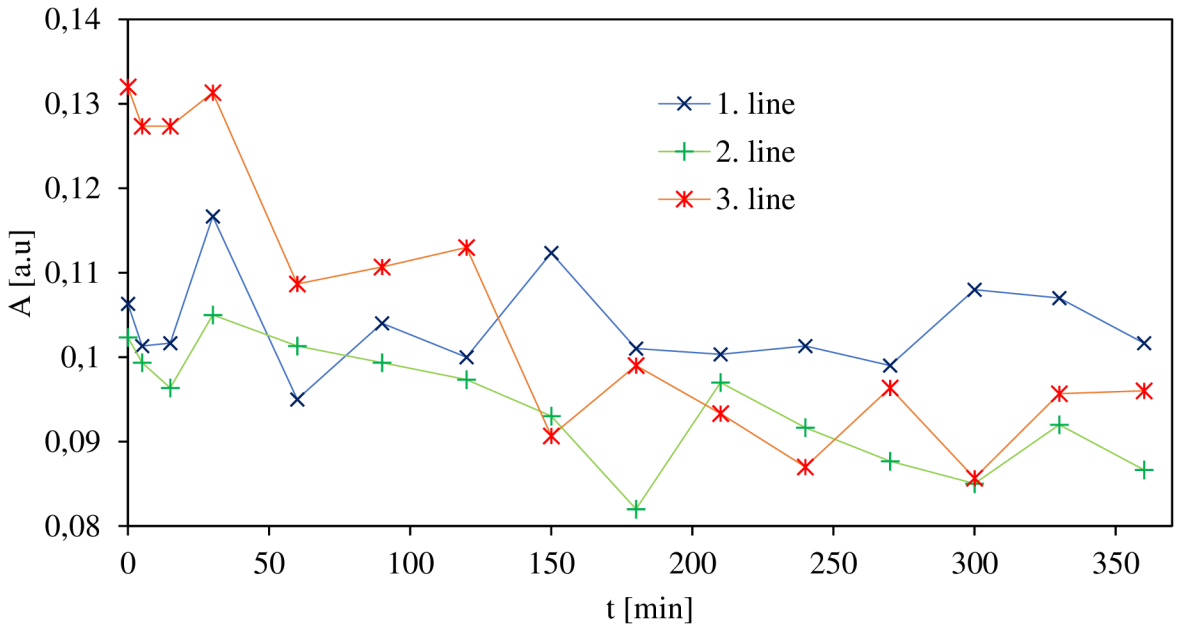
Jedním z návrhů, jak tety problémy vyřešit je, že se využije jiná analytická metoda, jako je UV-VIS spektroskopie, případně MALDI-TOF a jiné. Další možností je využití mikrofluidního

čipu s implantovaným SERS substrátem, blíže viz kapitola 3.5.1.3. Ačkoliv pravděpodobně není snadné změřit všech 48 vzorků na jednom substrátu, protože zlato má na SERS substrátu velmi špatné adhezivní vlastnosti, časem dojde k abrazi zlaté vrstvy protékajícím vzorkem, a tím substrát ztrácí na účinnosti.

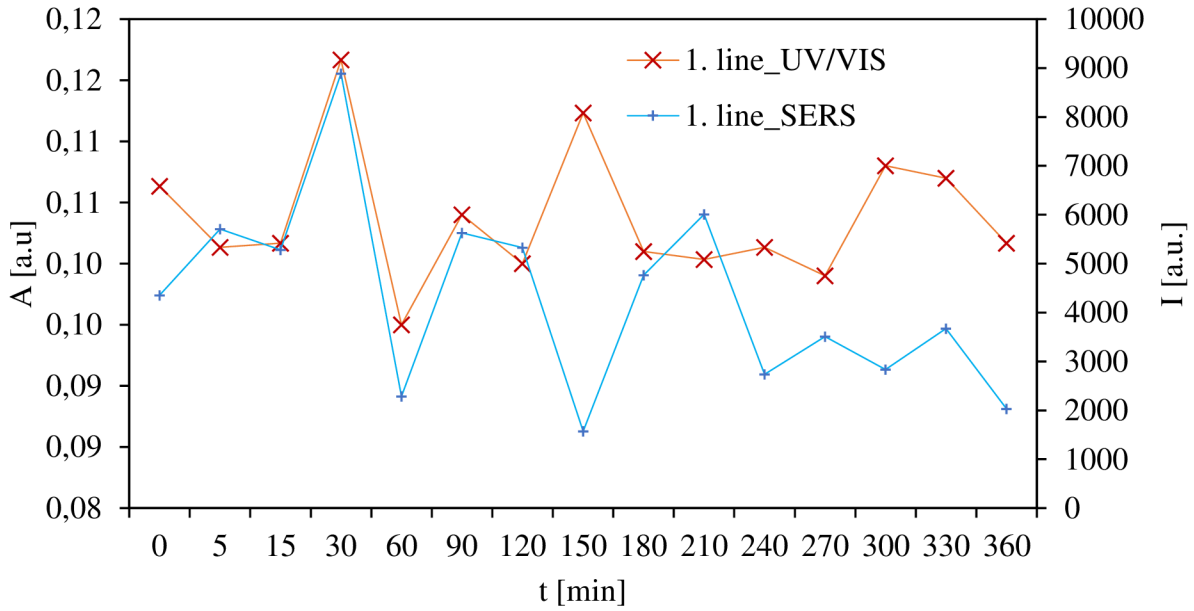
Pro porovnání byly vzorky rhodaminu B změřeny ještě pomocí UV-VIS spektroskopie.

5.2.3 UV-VIS spektroskopie a porovnání UV-VIS spektroskopie

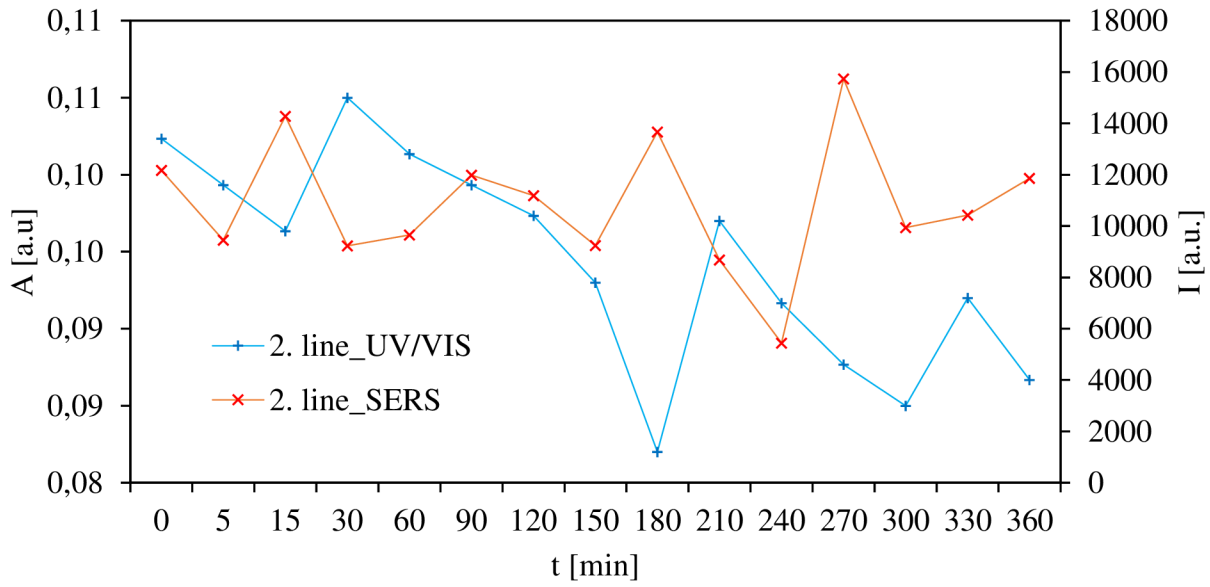
Jako kontrolní měření byla zvolena právě UV-VIS spektroskopie. Rhodamin B je silně barvící fluoreskující látka, proto se jeví tato metoda jako ideální pro jeho charakterizování. Z literatury má rhodamin B maximum absorbance mezi vlnovými délkami 554-556 nm, proto byl měřen při 556 nm a následně vyhodnocen v uživatelském rozhraní MS Excel. Před vlastním měření musel být roztok rhodaminu B 10x zředěn a poté měřen proti vodě. Dle grafu na **obrázku 29** není opět zřejmá lineární ani exponenciální závislost, nicméně pokles signálu u vzorků s fotokatalyzátory je patrný. Dále byly porovnány jednotlivá měření z každé řady, jak metodou UV-VIS, tak i metodou SERS.



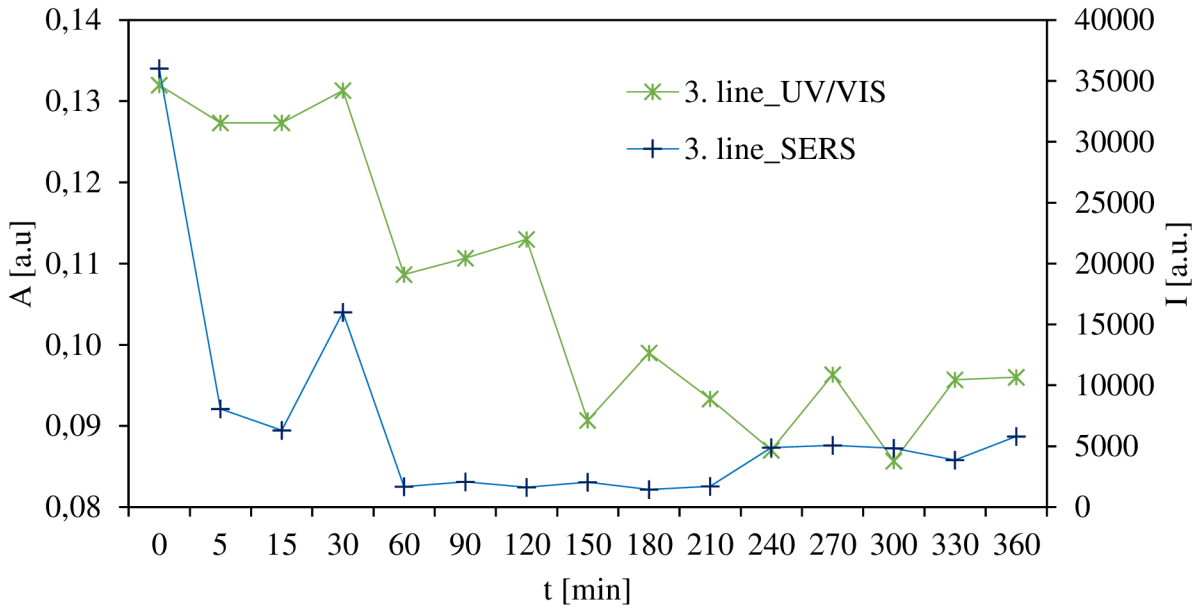
Obrázek 29: Závislost absorbance na čase, kde 1. line obsahuje vzorky, které byly vystaveny světlu bez fotokatalyzátoru. 2. line obsahuje vzorky s fotokatalyzátorem TiO_2-(H). 3. line obsahuje vzorky s fotokatalyzátorem TiO_2-(H)-Ag



Obrázek 30: Porovnání závislostí metod SERS píku 1350 cm^{-1} a UV-VIS spektroskopie na čase pro vzorky z 1. řady (bez katalyzátoru).

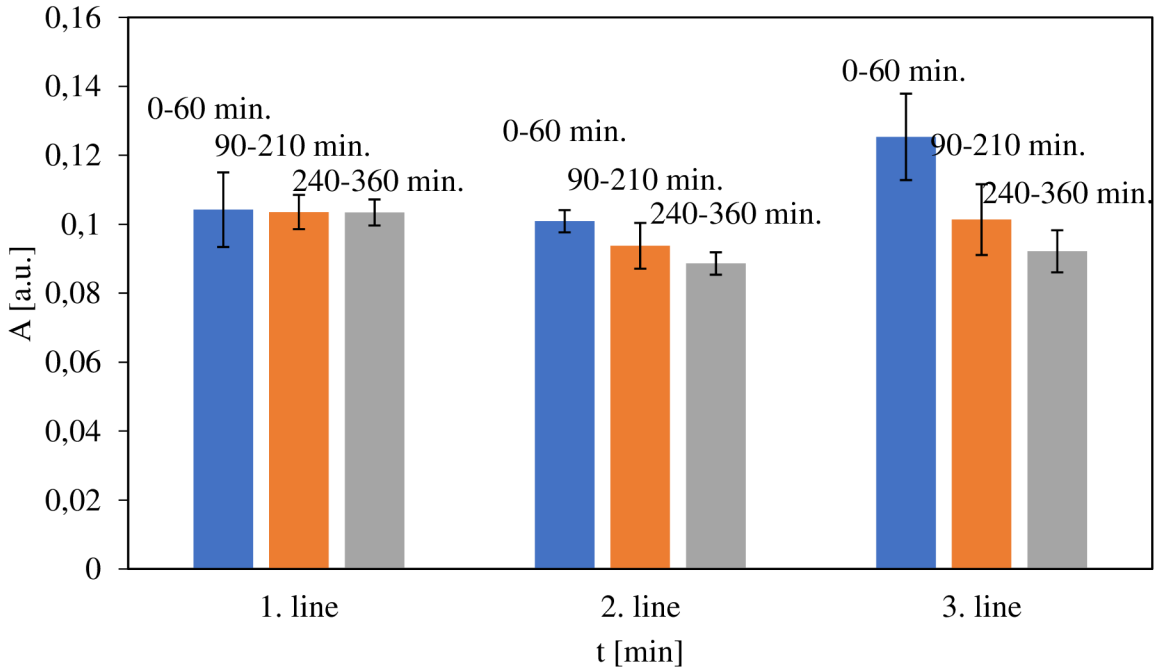


Obrázek 31: Porovnání závislostí metod SERS píku 1350 cm^{-1} a UV-VIS spektroskopie na čase pro vzorky z 2. řady (katalyzátor TiO_2-(H)).

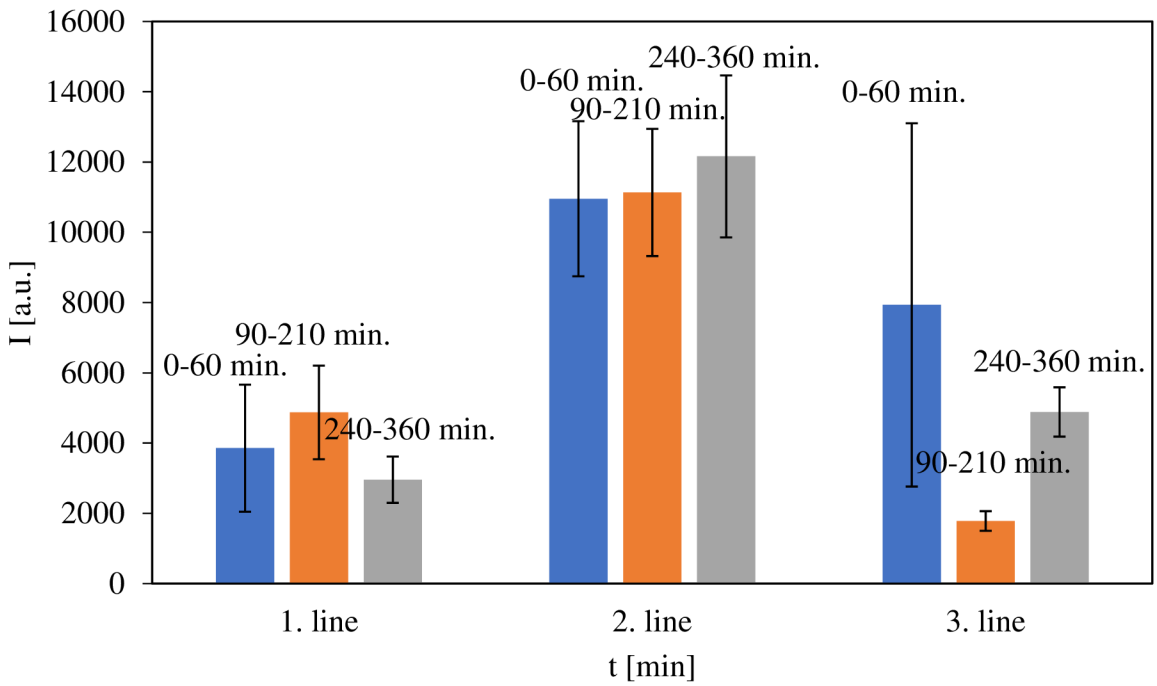


Obrázek 32: Porovnání závislostí metod SERS píku 1350 cm^{-1} a UV-VIS spektroskopie na čase pro vzorky z 3. řady (katalyzátor TiO_2-(H)-Ag).

Mezi metodami SERS a UV-VIS spektroskopie byla zaznamenána podobnost pouze v některých úsecích 1. a 2. řady a dále do jisté míry u 3. řady... Proto byla data zpracována ještě do grafů na třetinové časové úseky, zdali nebude lépe viditelná závislost fotokatalytické degradace pomocí větší aproximace dat.



Obrázek 33: Intenzita absorbance v závislosti na třetinovém časovém úseku.



Obrázek 34: Závislost intenzity SERS píku 1350 cm^{-1} signálu třetinovém časovém úseku.

Lze říci, že mezi metodami SERS a UV-VIS spektroskopie byla zaznamenána jen velmi malá podobnost. Metodou UV-VIS spektroskopie nebyla zaznamenána zřetelná závislost až do bodu, kdy byla udělána aproximace dat na třetiny, vyobrazeno na **obrázku 33**, kde v první řadě vzorků bez katalyzátoru (slepý vzorek) není prakticky žádná změna v absorbanci rhodaminu B, u řad vzorků, které byly podrobeny fotokatalytické degradaci je již zaznamenána klesající závislost absorbance rhodaminu B, zejména v řadě, kde byl použit katalyzátor TiO_2-(H)-Ag, u jehož reakce se předpokládala větší míra degradačních procesů. Jelikož se jedná o aproximaci dat z pěti různých vzorků, jsou data zatížena určitou chybou, přesto nižší než v případě SERS metody.

Také je možné, že metoda UV-VIS spektroskopie postrádá dostatečnou citlivost k tomu, aby byla zaznamenána fotokatalytická změna absorbance. Jelikož pouze u třetí řady byl zaznamenán přesný lineární pokles absorbance rhodaminu B.

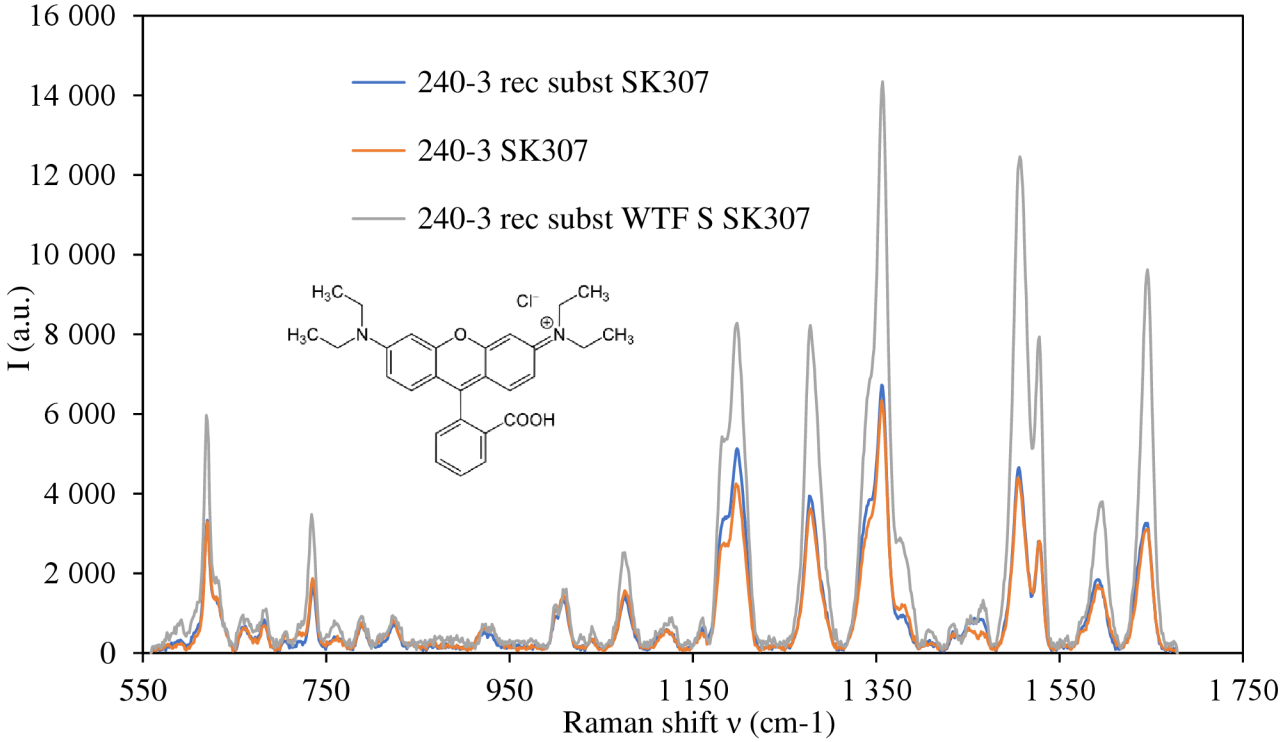
Jak lze vidět na **obrázku 34**, nelze u vzorků s katalyzátorem TiO_2-(H) nalézt fotodegradační závislost rhodaminu B, která byla měřena metodou SERS, přičemž data jsou také zatíženy velkou chybou. Pouze u vzorků s katalyzátorem TiO_2-(H)-Ag byl pozorován markantní úbytek v intenzitách odezvy rhodaminu B, ale s následným nárustem, který mohly způsobit částice uvolněného stříbra z katalyzátoru, které způsobily větší intenzitu SERS efektu.

Pro srovnání výsledků a doplnění informací, viz kapitola 5.2.2.

5.3 Recyklace SERS substrátu

Jak již bylo výše popsáno, je možné SERS substráty recyklovat. Po důkladném přečištění byly křemíkové čipy opět poprášeny 300nm vrstvou zlata a jejich účinnost byla změna na vzorcích výše vyhodnoceného rhodaminu B, aby byla zjištěna míra odchylky v efektivitě substrátu. Byly změřeny spektra stejného vzorku rhodaminu B na třech různých substrátech, z nichž dva byly substráty recyklované. Z každého vzorku bylo sejmuto 10 spekter, které byly

zprůměrovány a vloženy do níže vyobrazeného grafu na **obrázku 35**. Experimentální uspořádání bylo stejné jako při měření všech ostatních vzorků rhodaminu B, které je popsáno v kapitole 4.6.1.2. Měření proběhlo na vzorku z 3. řady odebrán po 240 minutách působení fotoreaktoru spolu s katalyzátorem TiO_2-(H)-Ag.



Obrázek 35: Závislost intenzity Rmanova signálu na vlnočtu

Z grafu na **obrázku 35** lze pozorovat, že nové a recyklované SERS substráty mohou mít rozdílnou kvalitu a vykazovat tak různé zesílení. To kompromituje reprodukovatelnost kvantitativní analýzy na různých výrobních sériích SERS substrátů. Tento nedostatek lze obejít použitím jednoho SERS substrátu na celou sérii vzorků v mikrofluidním čipu, avšak pouze na omezené množství vzorku kvůli povrchové abrazi zlatého povrchu.

Přes tyto nevýhody SERS nabízí velmi citlivou a jednoduchou techniku k detekci molekul, také díky recyklovatelným křemíkovým čipům se strukturou reverzních pyramid.

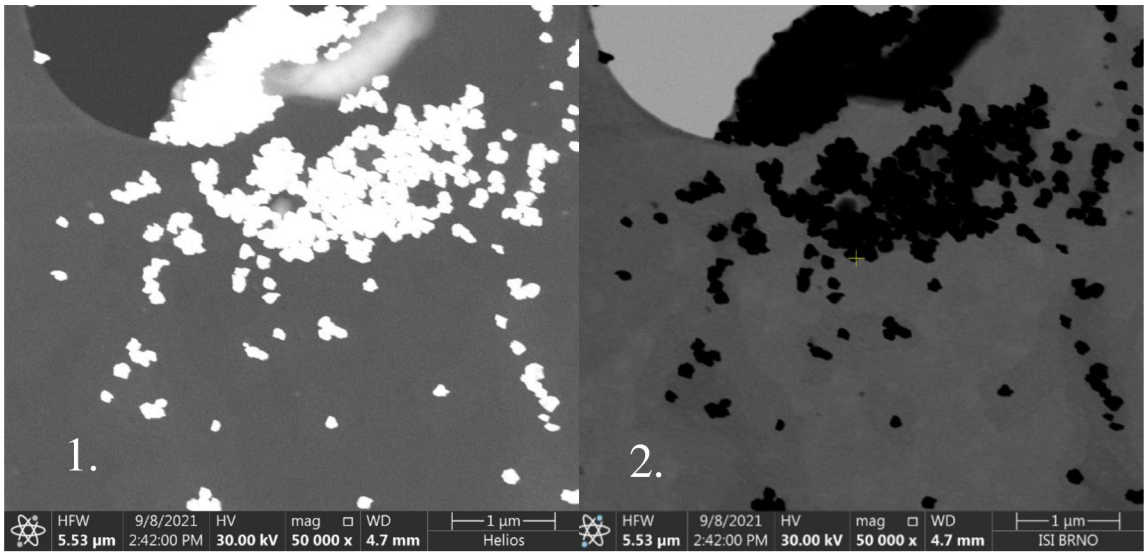
5.4 Charakterizace připravených nanočástic

Bylo vyrobeno několik sad zlatých nanočástic, které poté byly různými způsoby charakterizovány.

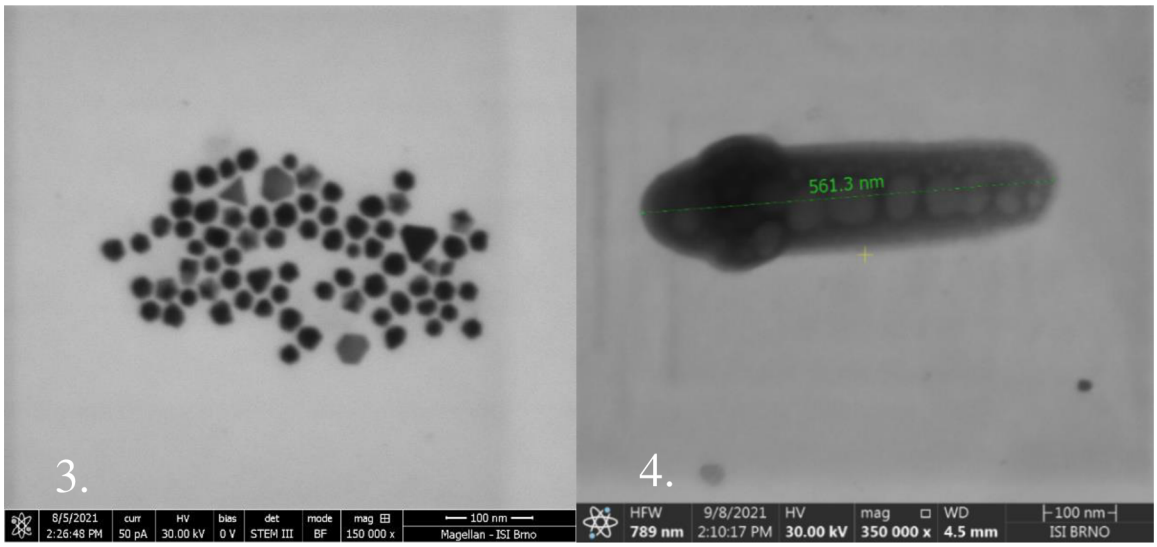
5.4.1 Pozorování zlatých nanočástic na elektronovém mikroskopu

První charakterizací je pomocí elektronového mikroskopu, kdy byl roztok s nanočásticemi vysušen na měděné mřížce s formvarem. Tato mřížka byla vložena do držáku sítěk na pozorování v elektronovém mikroskopu, a poté pozorovány. Níže na **obrázku 36**, **obrázku 37**, **obrázku 38** a **obrázku 39** můžete vidět ukázky připravených nanočástic, z důvodu velkého množství nebyly vkládány všechny. Bylo vyzkoušeno množství protokolů na jejich výrobu, ale pouze dva byly vyhovující a byly syntetizovány nanotyčky o vyhovujících rozměrech. Z mnoha protokolů byly vytvořeny sférické nanočástice o různých velikostech, bipyramidy a

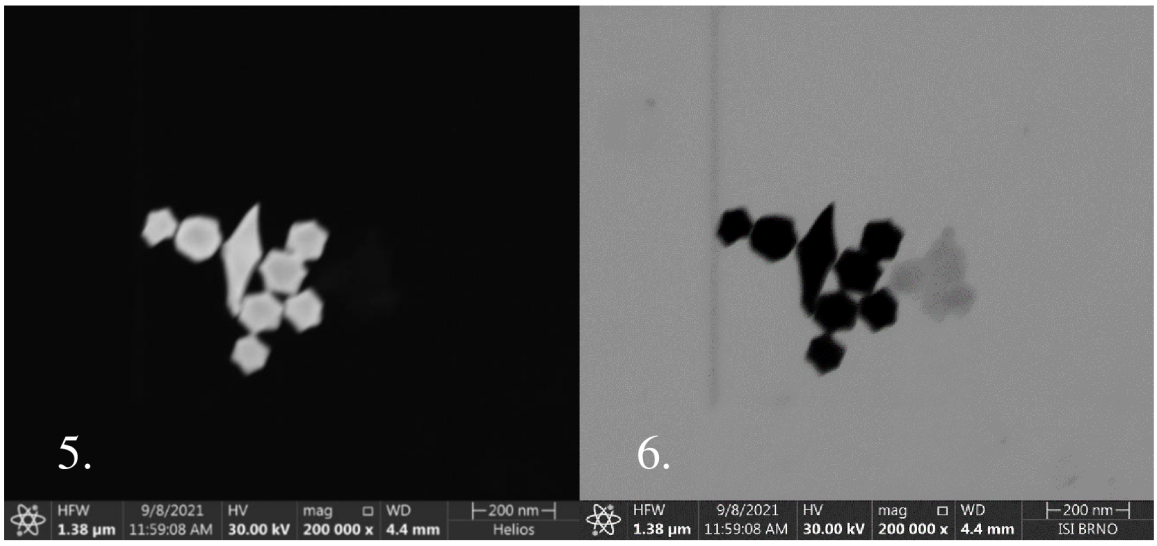
mnoho jiných tvarů, jejichž ukázku můžete vidět níže. Parametry měření jsou poté v **tabulce 5** níže.



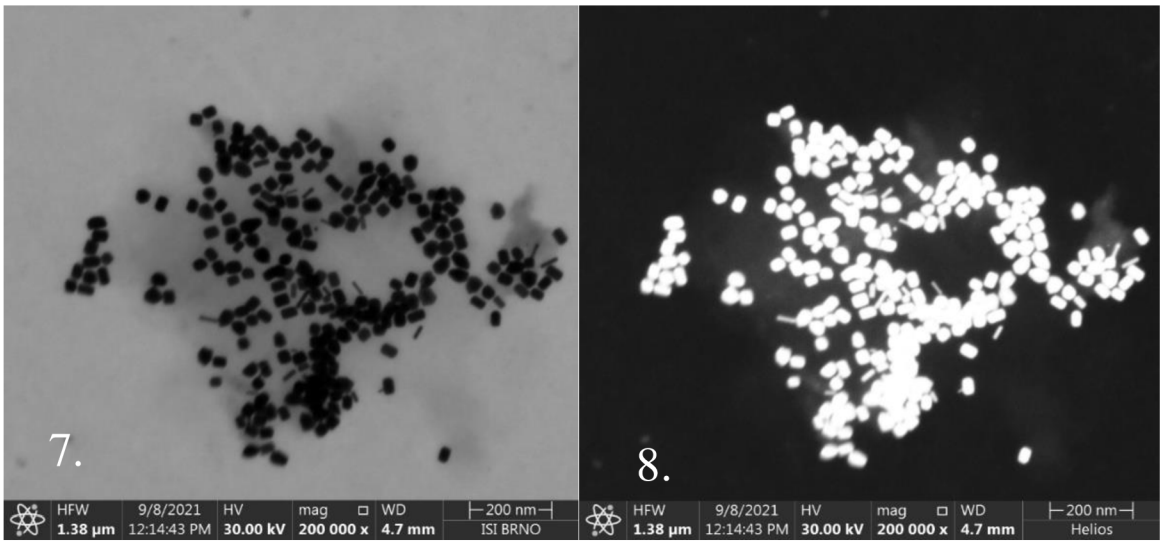
Obrázek 36: Ukázka syntetizovaných nanočástic parametry snímku 1. i 2. viz **tabulka 5**



Obrázek 37: Ukázka syntetizovaných nanočástic, parametry snímku 3. i 4. viz **tabulka 5**



Obrázek 38: Ukázka syntetizovaných nanočástic, parametry snímku 5. i 6. viz **tabulka 5**



Obrázek 39: Ukázka syntetizovaných nanočástic použitých k vytvoření sendvičového imunotestu, parametry snímku 7. i 8. viz **tabulka 5**

Tabulka 5: Parametry měření na elektronovém mikroskopu, zkratky v tabulce: P. V. (pracovní vzdálenost), P. P. (proud paprsku), U. N. (urychlovací napětí)

Obrázek	Mikroskop	Mód	P. V. [mm]	Detektor	Zvětšení	P. P [pA]	U. N. [kV]
Obrázek 28, 1.	Helios	HAADF	4,7	STEM 3+	50 000x	50	30 000
Obrázek 28, 2.	Helios	BF	4,7	STEM 3+	50 000x	50	30 000
Obrázek 29, 3.	Magelan	BF	4,5	STEM III	150 000x	50	30 000
Obrázek 29, 4.	Helios	BF	4,5	STEM 3+	350 000x	50	30 000
Obrázek 30, 5.	Helios	BF	4,4	STEM 3+	200 000x	50	30 000
Obrázek 30, 6.	Helios	HAADF	4,4	STEM 3+	200 000x	50	30 000
Obrázek 31, 7.	Helios	BF	4,7	STEM 3+	200 000x	50	30 000
Obrázek 31, 8.	Helios	HAADF	4,7	STEM 3+	200 000x	50	30 000

Byly syntetizovány nanotyčky potřebné k vytvoření sendvičového imunotestu, jejichž ukázka je na **obrázku 39**. Paramtetry pozorovnání zlatych nanočástic jsou zapsány v **tabulce 5**. Tyto nanočástice byly poté modifikovány způsobem vázání vrstvy na vrstvu.

5.4.2 Modifikace povrchu zlatých nanotyček

Byly vyrobeny modifikované nanočástice ke značení bakterie *Escherichia coli* K-12, problém ale byl v nízkém výtěžku modifikovaných nanočástic, proto muselo dojít k modifikaci protokolu, který byl podroben podrobnému přezkoumání.

5.4.2.1 Test výtěžnosti

Jedním z bodů přezkoumání byla nádoba, v níž byla modifikace prováděna. Zprvu byla modifikace zlatých nanotyček prováděna v plastových centrifugačních zkumavkách, manipulace byla snadná, kroky pročištění byly prováděny v centrifuze, a i z hlediska aplikace v praxi je plast na jedno použití praktičtější. Problém se začal objevovat již při první vrstvě, navázání Ramanova reportéru DTNB. Nanočástice se začali nekontrolovaně agregovat a adherovat na povrch centrifugačních zkumavek. Proto byly vyrobeny nejprve centrifugační zkumavky superhydrofobní a jako další byly zvoleny klasické skleněné vialky.

Byly tedy použity 3 typy reakčních nádob, klasické centrifugační zkumavky, modifikované centrifugační zkumavky a skleněné vialky. Do těchto nádob bylo k roztoku nanočástic napipetován 1 ml DTNB o různé koncentraci, byly zvoleny koncentrace 50 mM, 10 mM, 1 mM, 0,1 mM, 0,01mM a 0,001 mM [67]. Celkem bylo vytvořeno 24 variant, u nichž bylo v průběhu modifikací a jejich promývání měřena optická hustota (OD).

Obrázek 40: Skleněné vialky obsahující zlaté nanotyčky a klesající koncentraci DTNB.

Tabulka 6: Procentuální výtěžky z modifikace nanotyček

Normální centrifugační zkumavky			
Koncentrace DTNB [mM]	Začátek [%]	Po čištění [%]	Po DTNB [%]
50	100	113,39	14,56
10	100	108,41	19,26
1	100	93,80	23,38
0,1	100	124,65	26,05
0,01	100	105,73	13,42
0,001	100	123,14	15,07
Modifikované centrifugační zkumavky			
Koncentrace DTNB [mM]	Začátek [%]	Po čištění [%]	Po DTNB [%]
50	100	136,36	4,06
10	100	117,34	9,79
1	100	115,42	11,53
0,1	100	129,52	12,20
0,1	100	113,31	21,01
0,01	100	91,48	10,92
0,001	100	140,55	8,24
Vialky			
Koncentrace DTNB [mM]	Začátek [%]	Po čištění [%]	Po DTNB [%]
50	100	114,68	26,22
10	100	110,16	28,52
1	100	95,81	18,50
0,1	100	115,15	16,39
0,01	100	104,09	29,31
0,001	100	116,05	27,16

Dle výše uvedených výstupů nejvyšší výtěžek byl z modifikace ve skleněných vialkách při koncentraci DTNB 10 mM a 0,01 mM, tyto koncentrace jsou použity k dalšímu přezkoumání a modifikaci.

5.4.2.2 Test rozpustnosti DTNB v různé koncentraci vody

Byla vytvořena koncentrační řada o různém obsahu vody v ethanolu s rozpuštěným DTNB. Přidané objemy vody a roztoku 50mM DTNB v absolutním ethanolu jsou v **tabulce 7**. Tyto roztoky byly ponechány nejprve po dobu deseti minut a poté centrifugovány a sledovány, zda není viditelná usazená sraženina. Vzorky byly testovány i na dlouhodobou stabilitu po dva dny.

Tabulka 7: Výsledky testu rozpustnosti DTNB v roztoku ethanolu a vody

Množství vody [%]	V (H2O) [ml]	V (DTNB) [ml]	sraženina
5	0,013	0,25	bez sraženiny
10	0,028	0,25	bez sraženiny
25	0,125	0,25	bez sraženiny
30	0,107	0,25	bez sraženiny
35	0,135	0,25	po jednom dni stání s objevila sraženina
40	0,166	0,25	po dvou hodinách se objevila sraženina
45	0,205	0,25	po stání a centrifugaci viditelná sraženina
50	0,25	0,25	viditelná po centrifugaci
60	0,375	0,25	viditelná po promíchání a chvíli stání
70	0,583	0,25	viditelná po promíchání a chvíli stání
75	0,75	0,25	viditelná okamžitě po promíchání
80	1	0,25	viditelná okamžitě po promíchání
85	1,133	0,2	viditelná okamžitě po promíchání
90	0,9	0,1	viditelná po centrifugaci
95	1,33	0,07	nízká koncentrace, viditelná po centrifugaci

Výsledkem testu je, že je možné na promývání částic použít 70% ethanol, v němž je DTNB ještě stabilní i po delší dobu.

5.4.3 Magnetické nanočástice

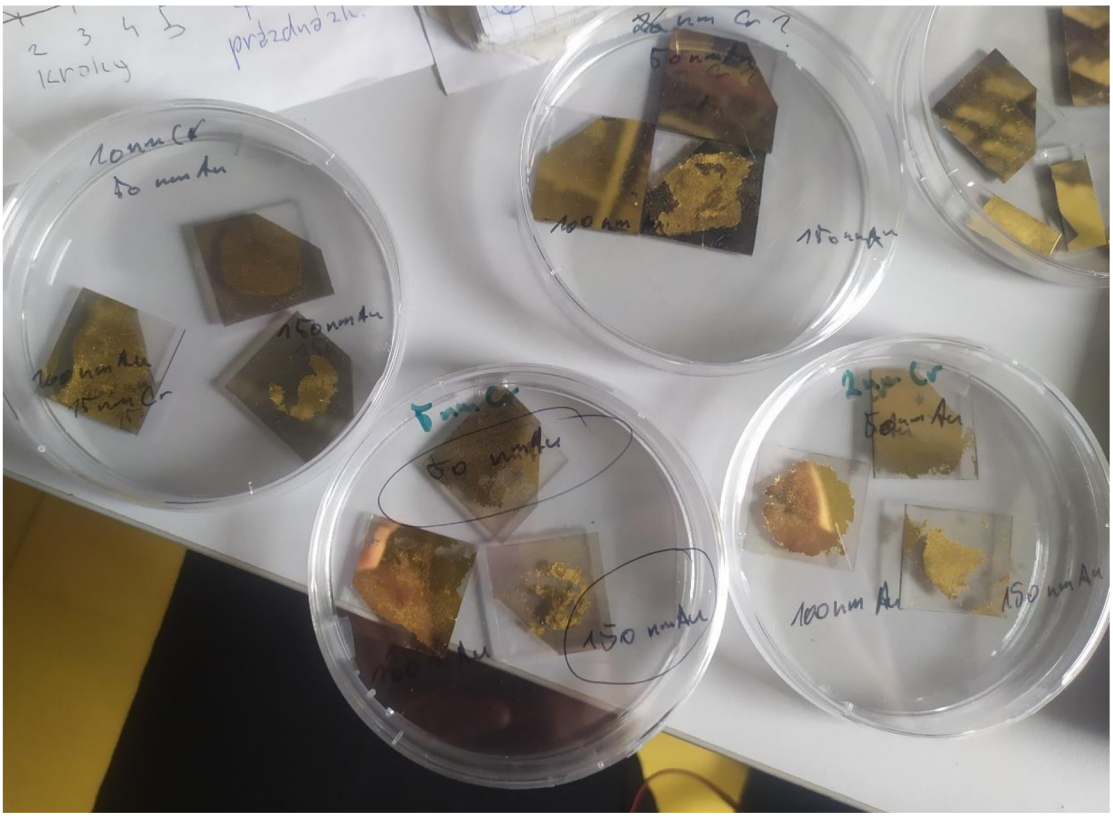
Výhodou magnetických nanočástic je jejich vyšší míra specifity, mají menší množství nespecifických interakcí oproti podložním sklíčkům. Pro změnu je s nimi ale složitější manipulace, obzvláště pokud nedisponujete dostatečně silným magnetem. Příprava je relativně složitá a zdlouhavá, proto bylo rozhodnuto více se zaměřit na modifikovaná podložní sklíčka.

5.5 Ověření funkce protilátky

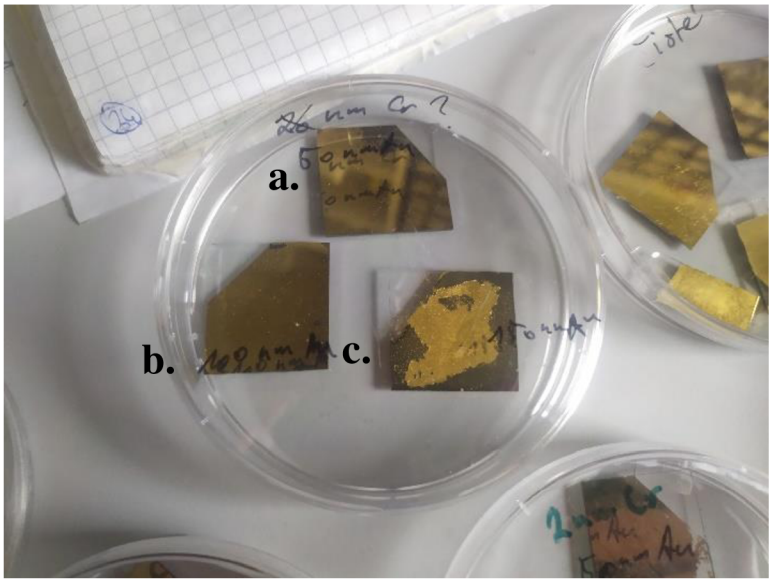
K ověření protilátky bylo nejprve potřeba nejít vhodný nosič, který bude modifikován. Poté, co byl modifikován, tak byl pozorován pomocí AFM (mikroskopu atomárních sil), kde byly jednotlivé vrstvy pozorovány, výsledky viz kapitola 5.5.2. A následně mohly být navázány bakterie, výsledky viz 5.5.3.

5.5.1 Test adheze

K testu adheze bylo připraveno 12 typů sklíček s různě silnou vrstvou chrómu i zlata. Tato sklíčka byla poté vložena do ultrazvuku a pozorována. Dle obrázků níže, viz **obrázek 41** a **obrázek 42**, bylo vybráno k dalším modifikacím typ sklíček se 100nm vrstvou chrómu a 100nm vrstvou zlata, jejichž povrch byl téměř bez jakýkoliv známek poškození.



Obrázek 41: Podložní sklíčka s naprášeným chromem a zlatem, nahoře vlevo je varianta 10 nm chrómu, nahoře vpravo je varianta se 100 nm chrómu, dole vlevo varianta s 5 nm chrómu a dole vpravo je varianta 2 nm chrómu. Každá z variant má na své adhezní vrstvě 50, 100 a 150 nm zlata.



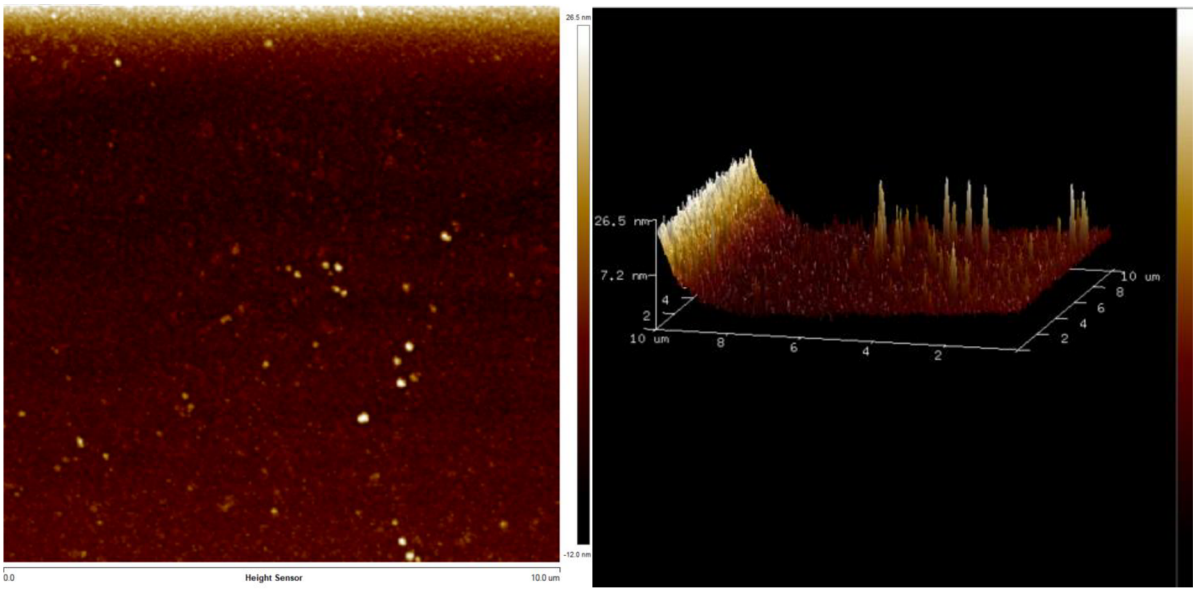
Obrázek 42: Podložní sklíčka se 100 nm vrstvou chrómu. **a.** Podložní sklíčko s 50 nm zlata. **b.** podložní sklíčko s 100 nm zlata. **c.** Podložní sklíčko se 150 nm zlata.

5.5.2 Pozorování vrstev na AFM

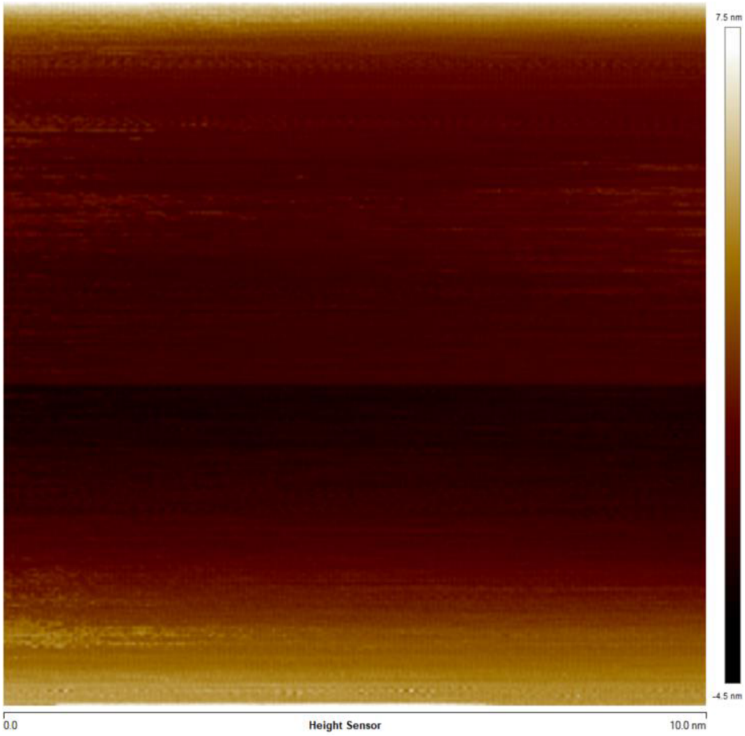
Byly pozorovány vzorky modifikovaných sklíček. Nejprve bylo změřeno sklíčko pouze s naprášeným chrómem a zlatem. Poté modifikované 3-MPA a 11-MUA, následně modifikované avidinem a protilátkou. Již sklíčka před modifikací měla jistou zrnitost, což je u naprášených kovů časté a běžné, při využití v SERSu i nezbytné. Zrnitost nebyla viditelná při měření sklíček modifikované pomocí 3-MPA a 11-MUA. Nebyla zřejmá zrnitost zlatého povrchu a molekuly nebyly pozorovatelné kvůli nízkému rozlišení, zároveň mohl být problém v pořízení příliš velkého skenu, který snižuje rozlišení AFM.

Při pořízení snímku povrchu modifikovaného avidinem již byla zřejmá větší zrnitost, kdy byly pozorovatelné jisté shluky, které dle literatury by měly odpovídat avidinu [49], na **obrázku 45** je avidin označen červeně. Podobně pak v případě sklíček modifikovaných protilátkami, kde se místy začínají objevovat delší provazce a vzrůstající drsnost zrnitost povrchu [49], na **obrázku 46** opět červeně zaznačeno.

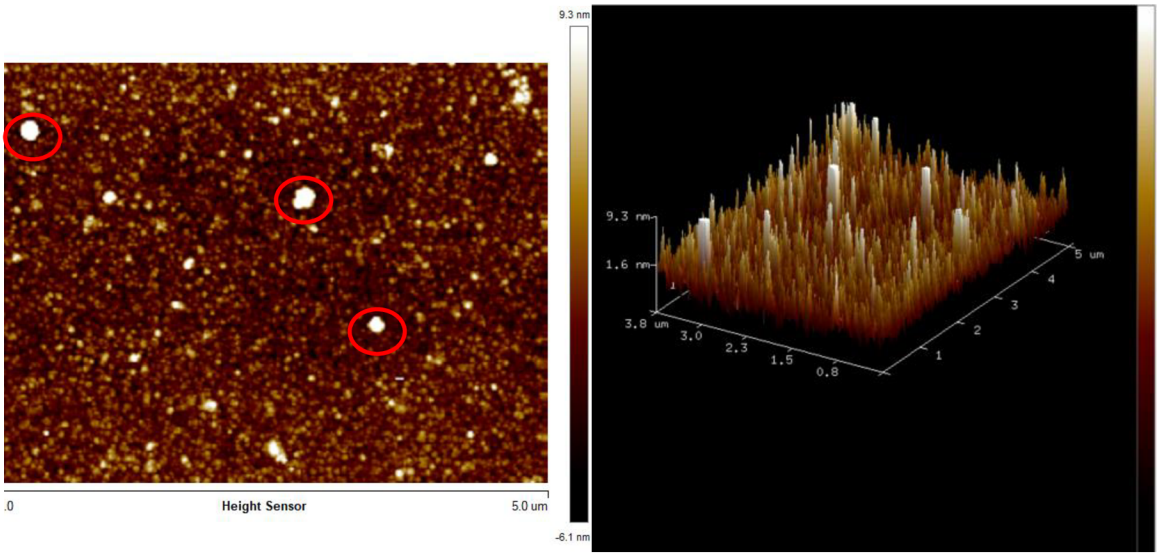
Ze vzrůstající drsnosti povrchu lze usoudit, že modifikace sklíček proběhla úspěšně.



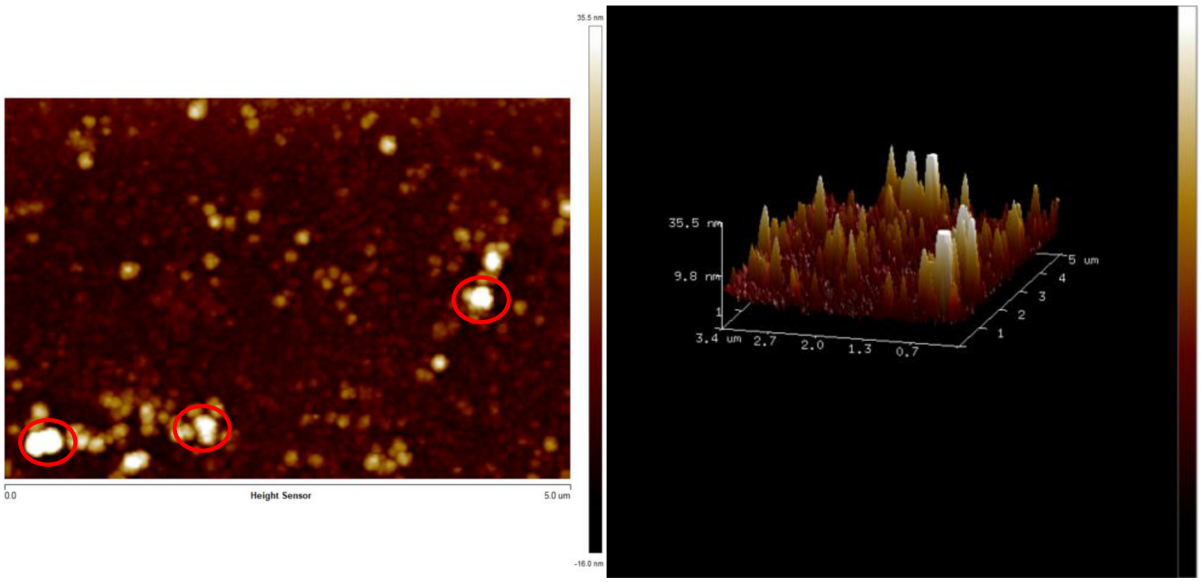
Obrázek 43: Sklíčka s naprášeným chrómem a zlatem pozorováno metodou AFM, vlevo je 2D snímek povrchu sklíčka, vpravo je 3D snímek povrchu sklíček. Škála udává výšku reliéfu, minimum v -12 nm a maximum ve 26,5 nm.



Obrázek 44: 2D snímímek sklíčka modifikovaného 3-MPA a 11-MUA pozorováno metodou AFM, vlevo je 2D snímek povrchu sklíčka, vpravo je 3D snímek povrchu sklíček. Škála udává výšku reliéfu, minimum v -4,5 nm a maximum ve 7,5 nm.



Obrázek 45:Podložní sklíčko modifikované avidinem pozorováno metodou AFM, vlevo je 2D snímek povrchu sklíček, vpravo je 3D snímek povrchu sklíček. Škála udává výšku reliéfu, minimum v -6,1 nm a maximum ve 9,3 nm.



Obrázek 46: Podložní sklíčko modifikované protilátkami pozorováno metodou AFM, vlevo je 2D snímek povrchu sklíček, vpravo je 3D snímek povrchu sklíček. Škála udává výšku reliéfu, minimum v -16 nm a maximum ve 35,5 nm.

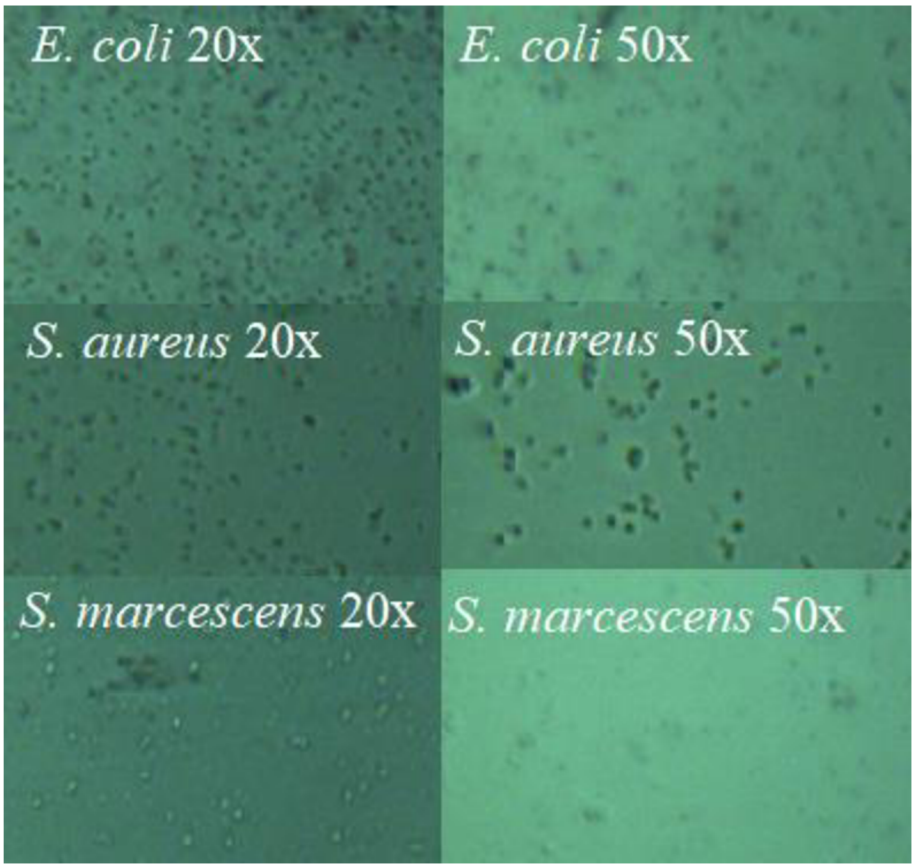
5.5.3 Inkubační test

Byl proveden inkubační test se třemi druhy bakterií na modifikovaných sklíčkách s protilátkou k zachytávání bakterie *Escheriechia Coli* K-12. Jako kontrolní bakterie, které by neměly být zachyceny na povrchu modifikovaných sklíček byly zvoleny *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*. Pozorování bylo provedeno pomocí mikroskopu Ramanova InVia spektrometru (Renishaw, Wotton-under-Edge, Velká Británie), s objektivy se zvětšením 20x a 50x.

Při testu protilátek nebyly použity nanotyčky značené DTNB a protilátkami, pouze modifikovaný zlatý povrch. Dle obrázku níže, viz **obrázek 47**, lze usoudit, že protilátka dělá specifické vazby s bakteriemi. Sklíčka, která byla inkubována s bakterií *E. Coli* má na svém povrchu mnohem větší počet navázaných bakterií než sklíčka, která byla inkubována se *S. marcescens* a *S. aureus*. Ačkoliv je na povrchu kontrolních sklíček stále poměrně vysoký počet bakterií, tak bylo pozorováno, že vykonávají poměrně velký pohyb po povrchu. Proto lze usoudit, že spíše, než o nespecifické vazby se jedná o přilnutí k povrchu a málo důkladné vypláchnutí. Povrch, kde byla použita *S. marcescens*, obsahoval poměrně malé množství bakterií. Problém ale nastal v případě *S. aureus*, která má velmi přilnavý bakteriální slizový obal a dochází tím k vysokému procentu záchytu na povrchu modifikovaného sklíčka. Je možné zvýšit solvatační schopnosti PBS přidáním Tweenu20, a tím docílit lepšího proplachu.

Problém sklíček je větší množství nespecifických vazeb, ale manipulace s nimi manipulace i s bakteriemi je poměrně jednoduchá. A s navázáním Ramanovských značek bude možné i přesto velmi přesně určit druh bakterie.

Originální celé snímky jsou přiloženy v přílohách, viz kapitola 9.



Obrázek 47: *E. Coli* K-12, *S. aureus*, *S. marcescens* na povrchu modifikovaných sklíček. Snímek z optického mikroskopu v uživatelském rozhraní WiRE 3.4. Mikroskop Ramanova InVia spektrometru (Renishaw, Wotton-under-Edge, Velká Británie), objektiv se zvětšením 20x a 50x.

.

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá zlatými nanosystémy využitými na povrchově zesílený Ramanův rozptyl. Během této práce byly řešeny dílčí úkoly, k nimž byla literární rešerše řešené problematiky, výroba zlatých nanosystémů pro SERS a kontrola jejich funkce, měření zesílených Ramanových spekter molekul pomocí zlatých nanosystémů a vyhondocení a interpretace výsledků naměřených dat prostřednistvým SERS.

Nejprve byla sepsána literární rešerše na řešenou problematiku. Poté byly vyráběny zlaté nanosystémy k měření pomocí metody SERS. Byly vyrobeny křemíkové čipy s povrchovou strukturou reverzních pyramid s vrstvou zlata o tloušťce 300 nm. Povrch měl lehkou zrnitost, právě tato zrnitost a struktura vytváří tzv. lokalizované plazmony, které zesilují Ramanův rozptyl molekul. Takto připravenými zlatými substráty byly měřeny vzorky rhodaminu B.

Před měřením rhodaminu B byly vzorky upraveny a podrobeny fotokatalytická degradaci. Celkem byly tři sady vzorků, první sada obsahovala rhodamin B, na který bylo působeno pouze světlem bez fotokatalyzátoru, v druhé sadě vzorků byl rhodamin B s příměsí fotokatalyzátoru TiO_2-(H), který by měl urychlovat jeho fotodegradaci, ve třetí sadě byl rhodamin B s fotokatalyzátorem TiO_2-(H)-Ag, u něhož se předpokládal největší vliv fotokatalytický rozklad.

Nejprve byl rhodamin B měřen bez SERS substrátu, přičemž signál byl překryt velmi silnou fluorescencí, poté byl měřen SERS substrátem NIKOLOID, komerčně dostupný SERS substrát, který vytváří přímo ve vzorku koloidní stříbro, ale signál byl opět překryt velmi silnou fluorescencí. Rhodamin B vykazoval jasný Ramanův signál teprve na vyrobeném SERS substrátu se strukturou reverzních pyramid a vrstvou zlata o tloušťce 300 nm. Byla vytvořena diferenciální spektra, na nichž byly pozorovány změny po fotodegradaci rhodaminu B. Ke každému píku, u něhož byla pozorována změna byl vytvořen graf a bylo zkoumáno, zdali není u některé ze sady vzorků rhodaminu B viditelná závislost degradace na čase.

Žádaná přímá závislost degradace rhodaminu B s časem nebyla pozorována, ale degradace rhodaminu B za použití obou typů fotokatalyzátorů byla pomocí metody SERS prokázána. U diferenciálních spekter jednotlivých sad vzorků byly pozorovány změny v intenzitách píků Ramanových spekter. V případě první řady, kde nebyl použit k žádný katalyzátor spektra vykazují jen minimální rozdíly poměru píků vůči referenčnímu spektru rhodaminu B, zatímco spektra druhé řady (fotodegradace s TiO_2-(H) fotokatalyzátorem) má intenzity některých píků snížené a spektra 3. line (fotodegradace s TiO_2-(H)-Ag fotokatalyzátorem) má snížené píky všechny. To by znamenalo, že efektivita fotodegradace v rámci celého časového intervalu byla nulová či zanedbatelná pro vzorky bez katalyzátoru, zatímco v přítomnosti fotokatalyzátoru TiO_2-H vykazovalo menší efektivitu fotodegradace než TiO_2-(H)-Ag.

Po aproximaci dat byl pozorován markantní úbytek Ramanova signálu u vzorků, jejichž rozklad byl katalyzován TiO_2-(H)-Ag, který ke konci reakce opět vzrostl. Nárůst signálu mohl být způsoben vznikem stříbrných nanočástic, které byly uvolněny z katalyzátoru. Dále byly změřeny tři SERS substráty, které byly připraveny v různých sadách, dva z nich byly recyklovány z předchozích měření. Recyklované substráty byly před měřením očištěny a znova pokryty zlatem. Bylo zjištěno, že každý substrát poskytuje různě velkou intenzitu zesílení

Ramanova rozptylu. Výstupem z měření je, že byly úspěšně recyklovány SERS substráty, ale kvůli různé kvalitě nebyly vhodné ke kvantitativní analýze.

Jako kontrolní měření byla zvolena metoda UV-VIS spektroskopie, vzorky byly 10x zředěny a změřeny pomocí UV-VIS spektroskopie. A Byla opět hledána kvantitativní závislost fotodegradačních procesů na čase, byla nalezena klesající absorbance v závislosti na čase, která byla nejvýraznější při použití katalyzátoru TiO_2-(H)-Ag, zatímco u kontrolní řady vzorků nebyl pozorován téměř žádný pokles absorbance.

V další části experimentální práce byl řešen sendvičový imunotest k indikaci bakterie *Escherichia coli* K-12 ve vzorku. Sendvičový imunostest se skládá ze dvou částí, ze zlaté nanočástice, která nese molekuly Ramanovského reportéru (molekuly s jasnou Ramanovskou odezvou), a složky imobilizující bakterie, tou mohou být buď modifikovaná pozlacená sklíčka nebo magnetické pozlacené modifikované nanočástice. Obě složky se specificky vážou na bakterii přes afinitu antigen-protilátka.

Prvním krokem bylo najít vhodný postup k syntéze zlatých nanočástic ve tvaru tyčinek, které vykazují dle literatury vyšší míru zesílení Ramanova rozptylu. Bylo vyzkoušeno mnoho pracovních postupů k jejich chemické syntéze. Všechny syntetizované zlaté nanočástice pozorovány pomocí elektronového mikroskopu.

Byly syntetizovány zlaté nanočástice ve tvaru tyčinek a modifikovány protilátkami, ale kvůli nízkému výtěžku z reakcí, nemohla být potvrzena jejich funkce. Proto byly vytvořena pozlacená sklíčka, která byla také modifikována protilátkou, a tím byla ověřena funkce protilátky. Sklíčka tvořila množství i nespecifických reakcí, přesto ale byla potvrzena velmi silná specifická vazba *E. coli* na povrch modifikovaných sklíček. Množství *E. coli* K-12 bylo mnohem větší, než u kontrolních bakterií *Serratia marcesncems* a *Staphylococcus aureus*.

Problém modifikace sklíček se samostatnou vrstvou zlata bylo, že zlato nedrželo na povrchu sklíček a v průběhu modifikace se se prakticky celý zlatý povrch oddělil. Zlato má velmi špatné adhezní vlastnosti, a proto musela být přidána vrstva adhezní. Jako adhezní vrstva byla přidána na povrch sklíček vrstva chrómu.

Modifikovaná sklíčka byla také pozorována pomocí mikroskopu atomárních sil, přičemž bylo zjištěno, že povrch byl úspěšně modifikován protilátkami.

Jelikož byl velmi nízký výtěžek zlatých nanotyček modifikace protilátkami, musela být výroba optimalizována. Jedná se o modifikaci zlatých nanotyček v šesti krocích. Největší ztráty byly pozorovány hned na začátku, kdy byl vázán Ramanův reportér a v krocích promývání. Právě tyto kroky byly optimalizovány.

V této části experimentu byla ověřena funkčnost protokolu k modifikaci složek sendvičového imunotestu k indikaci bakterie *Escherichia coli* K-12 ve vzorku, a tím byl navržen nástroj k rychlé a přené charakterizaci vzorků.

7 ZDROJE

[1] Larsson J. Electromagnetics from a quasistatic perspective. Am J Phys 2007;75:230–9. https://doi.org/10.1119/1.2397095.

[2] Siegel DM. Completeness as a Goal in Maxwell's Electromagnetic Theory. Isis 1975;66:361–8. https://doi.org/10.1086/351474.

[3] Lax M, Nelson DF. Maxwell equations in material form. Phys Rev B 1976;13:1777–84. https://doi.org/10.1103/PhysRevB.13.1777.

[4] Russakoff G. Derivation of the Macroscopic Maxwell Equations. Am J Phys n.d.;1970:1188–95. https://doi.org/10.1119/1.1976000.

[5] Skoog Douglas A., West Donald M., Holler F. James, Crouch SR. Analytická chemie. vol. 2019. 1. vydání. Praha: VŠCHT Praha; n.d.

[6] KONG JA. ELECTROMAGNETIC WAVE THEORY. vol. 2008. Cambridge, Massachusetts, USA: EMW Publishing; n.d.

[7] Pais A. Einstein and the quantum theory. Rev Mod Phys 1979;51:863–914. https://doi.org/10.1103/RevModPhys.51.863.

[8] Klassen S. The Photoelectric Effect: Reconstructing the Story for the Physics Classroom. Sci Educ 2011;20:719–31. https://doi.org/10.1007/s11191-009-9214-6.

[9] Niaz M, Klassen S, McMillan B, Metz D. Reconstruction of the history of the photoelectric effect and its implications for general physics textbooks. Sci Educ 2010;94:903–31. https://doi.org/10.1002/sce.20389.

[10] Kemp BA. Resolution of the Abraham-Minkowski debate: Implications for the electromagnetic wave theory of light in matter. J Appl Phys 2011;109:111101. https://doi.org/10.1063/1.3582151.

[11] https://www.gymkren.cz/wp-content/uploads/24.-Elektromagnetick%C3%A9-kmit%C3%A1n%C3%AD-a-vln%C4%9Bn%C3%AD.pdf n.d.

[12] KLOUDA P. Moderní analytické metod. 2. upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda; n.d.

[13] Regan BC, Commins ED, Schmidt CJ, DeMille D. New Limit on the Electron Electric Dipole Moment. Phys Rev Lett 2002;88:071805. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.88.071805.

[14] Swinehart DF. The Beer-Lambert Law n.d.:3.

[15] Swinehart DF. The Beer-Lambert Law. J Chem Educ n.d.;1962:3. https://doi.org/10.1021/ed039p333.

[16] Mäntele W, Deniz E. UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2017;173:965–8. https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.09.037.

[17] Hoffmann FM. Infrared reflection-absorption spectroscopy of adsorbed molecules. Surf Sci Rep n.d.;1983. https://doi.org/10.1016/0167-5729(83)90001-8.

[18] Prešerová, Jana. Infračervená a Ramanova spektroskopie v analýze biologicky aktivních látek v potravinách. Olomouc, 2014, 105 s. Dostupné také z:

https://theses.cz/id/wq1asy/DisP_Preerov.pdf. Disertační práce. Universita Palackého v Olomouci. Vedoucí práce Doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D n.d.

[19] Smith E, Dent G. Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach. vol. 2005. Chichester: John Wiley & Sons; n.d.

[20] Kimble HJ, Mandel L. Theory of resonance fluorescence. Phys Rev A 1976;13:2123–44. https://doi.org/10.1103/PhysRevA.13.2123.

[21] Joly NY, Nold J, Chang W, Hölzer P, Nazarkin A, Wong GKL, et al. Bright Spatially Coherent Wavelength-Tunable Deep-UV Laser Source Using an Ar-Filled Photonic Crystal Fiber. Phys Rev Lett 2011;106:203901. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.106.203901.

[22] Wen N, Zhao Z, Fan B, Chen D, Men D, Wang J, et al. Development of Droplet Microfluidics Enabling High-Throughput Single-Cell Analysis. Molecules 2016;21:881. https://doi.org/10.3390/molecules21070881.

[23] C. V. RAMAN, KRISHNAN KS. A New Type of Secondary Radiation. Nature n.d.;1928:501–2. https://doi.org/10.1038/121501c0.

[24] Perspectives on the History of the Raman Effect and its Implementation. Elements 2020;16:82–3. https://doi.org/10.2138/gselements.16.2.82.

[25] Smekal A. Zur Quantentheorie der Dispersion. NATURWISSENSCHAFTEN n.d.;1923:873–5.

[26] Kudelski A. Analytical applications of Raman spectroscopy. Talanta 2008;76:1–8. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.02.042.

[27] Pilát Z, Kizovský M, Ježek J, Krátký S, Sobota J, Šiler M, et al. Detection of Chloroalkanes by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Microfluidic Chips. Sensors 2018;18:3212. https://doi.org/10.3390/s18103212.

[28] Efremov EV, Ariese F, Mank AJG, Gooijer C. Strong Overtones and Combination Bands in Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy. Anal Chem 2006;78:3152–7. https://doi.org/10.1021/ac052253m.

[29] Shipp DW, Sinjab F, Notingher I. Raman spectroscopy: techniques and applications in the life sciences. Adv Opt Photonics 2017;9:315. https://doi.org/10.1364/AOP.9.000315.

[30] Jeanmaire DL, Duyne RPV. SURFACE RAMAN SPECTROELECTROCHEMISTRY n.d.:20.

[31] Sharma B, Frontiera RR, Henry A-I, Ringe E, Van Duyne RP. SERS: Materials, applications, and the future. Mater Today 2012;15:16–25. https://doi.org/10.1016/S1369-7021(12)70017-2.

[32] Fleischmann M, Hendra PJ, McQUILLAN AJ. RAMAN SPECTRA OF PYRIDZNE ADSORBED AT A SILVER ELECTRODE. Chem Phys Lett n.d.;26:4.

[33] Moskovits M. Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective. J Raman Spectrosc 2005;36:485–96. https://doi.org/10.1002/jrs.1362.

[34] Tian ZQ. Surface-enhanced Raman spectroscopy: advancements and applications. J Raman Spectrosc 2005;36:466–70. https://doi.org/10.1002/jrs.1378.

[35] Campion A, Kambhampati P. Surface-enhanced Raman scattering. Chem Soc Rev 1998;27:241. https://doi.org/10.1039/a827241z.

[36] Lee SJ, Morrill AR, Moskovits M. Hot Spots in Silver Nanowire Bundles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. J Am Chem Soc 2006;128:2200–1. https://doi.org/10.1021/ja0578350.

[37] Sun Y, Li W, Zhao L, Li F, Xie Y, Yao W, et al. Simultaneous SERS detection of illegal food additives rhodamine B and basic orange II based on Au nanorod-incorporated melamine foam. Food Chem 2021;357:129741. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129741.

[38] Le Ru EC, Blackie E, Meyer M, Etchegoin PG. Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. J Phys Chem C 2007;111:13794–803. https://doi.org/10.1021/jp0687908.

[39] Xu H, Aizpurua J, Käll M, Apell P. Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering. Phys Rev E 2000;62:4318–24. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.62.4318.

[40] Otto A. The 'chemical' (electronic) contribution to surface-enhanced Raman scattering. J Raman Spectrosc 2005;36:497–509. https://doi.org/10.1002/jrs.1355.

[41] Kim N-J, Lin M, Hu Z, Li H. Evaporation-controlled chemical enhancement of SERS using a soft polymer substrate. Chem Commun 2009:6246. https://doi.org/10.1039/b907504f.

[42] Yu X, Cai H, Zhang W, Li X, Pan N, Luo Y, et al. Tuning Chemical Enhancement of SERS by Controlling the Chemical Reduction of Graphene Oxide Nanosheets. ACS Nano 2011;5:952–8. https://doi.org/10.1021/nn102291j.

[43] Hakonen A, Svedendahl M, Ogier R, Yang Z-J, Lodewijks K, Verre R, et al. Dimer-on-mirror SERS substrates with attogram sensitivity fabricated by colloidal lithography. Nanoscale 2015;7:9405–10. https://doi.org/10.1039/C5NR01654A.

[44] King MD, Khadka S, Craig GA, Mason MD. Effect of Local Heating on the SERS Efficiency of Optically Trapped Prismatic Nanoparticles. J Phys Chem C 2008;112:11751–7. https://doi.org/10.1021/jp803219x.

[45] Zhou Q, Meng G, Liu J, Huang Z, Han F, Zhu C, et al. A Hierarchical Nanostructure-Based Surface-Enhanced Raman Scattering Sensor for Preconcentration and Detection of Antibiotic Pollutants. Adv Mater Technol 2017;2:1700028. https://doi.org/10.1002/admt.201700028.

[46] Yamada K, Endo T, Imai H, Kido M, Jeong H, Ohno Y. Effectiveness of surface enhanced Raman spectroscopy of tear fluid with soft substrate for point-of-care therapeutic drug monitoring. In: Coté GL, editor., San Francisco, California, United States: 2016, p. 97150E. https://doi.org/10.1117/12.2214614.

[47] Parisi J, Su L, Lei Y. In situ synthesis of silver nanoparticle decorated vertical nanowalls in a microfluidic device for ultrasensitive in-channel SERS sensing. Lab Chip 2013;13:1501. https://doi.org/10.1039/c3lc41249k.

[48] Szaniawska A, Kudelski A. Applications of Surface-Enhanced Raman Scattering in Biochemical and Medical Analysis. Front Chem 2021;9:664134. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.664134.

[49] Temur E, Boyacı İH, Tamer U, Unsal H, Aydogan N. A highly sensitive detection platform based on surface-enhanced Raman scattering for Escherichia coli enumeration. Anal Bioanal Chem 2010;397:1595–604. https://doi.org/10.1007/s00216-010-3676-x.

[50] Samek O, Bernatová S, Dohnal F. The potential of SERS as an AST methodology in clinical settings. Nanophotonics 2021;10:2537–61. https://doi.org/10.1515/nanoph-2021-0095.

[51] Lin S, Hasi W-L-J, Lin X, Han S, Lou X-T, Yang F, et al. Rapid and sensitive SERS method for determination of Rhodamine B in chili powder with paper-based substrates. Anal Methods 2015;7:5289–94. https://doi.org/10.1039/C5AY00028A.

[52] Langer J, Jimenez de Aberasturi D, Aizpurua J, Alvarez-Puebla RA, Auguié B, Baumberg JJ, et al. Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering. ACS Nano 2020;14:28–117. https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04224.

[53] https://www.renishaw.cz/cs/renishaws-invia-is-used-at-the-university-of-duisburg-in-germany-to-study-two-dimensional-materials--37534 n.d.

[54] Chan WCW, Nie S. Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. Science 1998;281:2016–8. https://doi.org/10.1126/science.281.5385.2016.

[55] Jain PK, El-Sayed MA. Surface Plasmon Resonance Sensitivity of Metal Nanostructures: Physical Basis and Universal Scaling in Metal Nanoshells. J Phys Chem C 2007;111:17451–4. https://doi.org/10.1021/jp0773177.

[56] Biesso A, Qian W, Huang X, El-Sayed MA. Gold Nanoparticles Surface Plasmon Field Effects on the Proton Pump Process of the Bacteriorhodopsin Photosynthesis. J Am Chem Soc 2009;131:2442–3. https://doi.org/10.1021/ja8088873.

[57] Jia J-L, Xu H-H, Zhang G-R, Hu Z, Xu B-Q. High quality gold nanorods and nanospheres for surface-enhanced Raman scattering detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Nanotechnology 2012;23:495710. https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/49/495710.

[58] Yun S, Park Y-K, Kim SK, Park S. Linker-Molecule-Free Gold Nanorod Layer-by-Layer Films for Surface-Enhanced Raman Scattering. Anal Chem 2007;79:8584–9. https://doi.org/10.1021/ac071440c.

[59] Chen S-J, Chang H-T. Nile Red-Adsorbed Gold Nanoparticles for Selective Determination of Thiols Based on Energy Transfer and Aggregation. Anal Chem 2004;76:3727–34. https://doi.org/10.1021/ac049787s.

[60] Tseng AA, Kuan Chen, Chen CD, Ma KJ. Electron beam lithography in nanoscale fabrication: recent development. IEEE Trans Electron Packag Manuf 2003;26:141–9. https://doi.org/10.1109/TEPM.2003.817714.

[61] Guo S, Huang Y, Jiang Q, Sun Y, Deng L, Liang Z, et al. Enhanced Gene Delivery and siRNA Silencing by Gold Nanoparticles Coated with Charge-Reversal Polyelectrolyte. ACS Nano 2010;4:5505–11. https://doi.org/10.1021/nn101638u.

[62] Kim D, Jeong YY, Jon S. A Drug-Loaded Aptamer−Gold Nanoparticle Bioconjugate for Combined CT Imaging and Therapy of Prostate Cancer. ACS Nano 2010;4:3689–96. https://doi.org/10.1021/nn901877h.

[63] Guven B, Basaran-Akgul N, Temur E, Tamer U, Boyacı İH. SERS-based sandwich immunoassay using antibody coated magnetic nanoparticles for Escherichia coli enumeration. The Analyst 2011;136:740–8. https://doi.org/10.1039/C0AN00473A.

[64] Tiwari P, Vig K, Dennis V, Singh S. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. Nanomaterials 2011;1:31–63. https://doi.org/10.3390/nano1010031.

[65] Perney NMB, Baumberg JJ, Zoorob ME, Charlton MDB, Mahnkopf S, Netti CM. Tuning localized plasmons in nanostructured substrates for surface-enhanced Raman scattering. Opt Express 2006;14:847. https://doi.org/10.1364/OPEX.14.000847.

[66] Autor: Mgr. Martin Kizovský, UPT AV ČR n.d.

[67] Güçlü K, Özyürek M, Güngör N, Baki S, Apak R. Selective optical sensing of biothiols with Ellman's reagent: 5,5′-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)-modified gold nanoparticles. Anal Chim Acta 2013;794:90–8. https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.07.041.

[68] Li Y, Lu C, Zhou S, Fauconnier M-L, Gao F, Fan B, et al. Sensitive and simultaneous detection of different pathogens by surface-enhanced Raman scattering based on aptamer and Raman reporter co-mediated gold tags. Sens Actuators B Chem 2020;317:128182. https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128182.

[69] Tamer U, Boyacı İH, Temur E, Zengin A, Dincer İ, Elerman Y. Fabrication of magnetic gold nanorod particles for immunomagnetic separation and SERS application. J Nanoparticle Res 2011;13:3167–76. https://doi.org/10.1007/s11051-010-0213-y.

[70] Baptista A, Silva F, Porteiro J, Míguez J, Pinto G. Sputtering Physical Vapour Deposition (PVD) Coatings: A Critical Review on Process Improvement and Market Trend Demands. Coatings 2018;8:402. https://doi.org/10.3390/coatings8110402.

[71] Swann S. Magnetron sputtering. Phys Technol 1988;19:67–75. https://doi.org/10.1088/0305-4624/19/2/304.

[72] Reichelt K, Jiang X. The preparation of thin films by physical vapour deposition methods. Thin Solid Films 1990;191:91–126. https://doi.org/10.1016/0040-6090(90)90277-K.

[73] Kelly PJ, Arnell RD. Magnetron sputtering: a review of recent developments and applications. Vacuum 2000;56:159–72. https://doi.org/10.1016/S0042-207X(99)00189-X.

[74] Sun L, Yuan G, Gao L, Yang J, Chhowalla M, Gharahcheshmeh MH, et al. Chemical vapour deposition. Nat Rev Methods Primer 2021;1:5. https://doi.org/10.1038/s43586-020-00005-y.

[75] Steffens C, Leite FL, Bueno CC, Manzoli A, Herrmann PSDP. Atomic Force Microscopy as a Tool Applied to Nano/Biosensors. Sensors 2012;12:8278–300. https://doi.org/10.3390/s120608278.

[76] Basnar B, Friedbacher G, Brunner H, Vallant T, Mayer U, Hoffmann H. Analytical evaluation of tapping mode atomic force microscopy for chemical imaging of surfaces. Appl Surf Sci 2001;171:213–25. https://doi.org/10.1016/S0169-4332(00)00761-3.

[77] John J. BOZZOLA, RUSSELL LD. Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists. vol. 1992. 2nd ed. Sudbury, Massachusetts: Johnes and Bartlett Publishers; n.d.

[78] Winey M, Meehl JB, O'Toole ET, Giddings TH. Conventional transmission electron microscopy. Mol Biol Cell 2014;25:319–23. https://doi.org/10.1091/mbc.e12-12-0863.

[79] Karlík M. Úvod do transmisní elektronové mikroskopie. vol. 2011. Praha: České vysoké učení technické v Praze; n.d.

[80] Egerton RF. Physical Principles of Electron Microscopy. Cham: Springer International Publishing; 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39877-8.

[81] Zhou W, Apkarian RP, Wang ZL, Joy D. Fundamentals of Scanning Electron Microscopy n.d.:40.

[82] Aston R, Sewell K, Klein T, Lawrie G, Grøndahl L. Evaluation of the impact of freezing preparation techniques on the characterisation of alginate hydrogels by cryo-SEM. Eur Polym J 2016;82:1–15. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.06.025.

[83] Al-Amoudi A, Norlen LPO, Dubochet J. Cryo-electron microscopy of vitreous sections of native biological cells and tissues. J Struct Biol 2004;148:131–5. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2004.03.010.

[84] Lešer V, Drobne D, Pipan Ž, Milani M, Tatti F. Comparison of different preparation methods of biological samples for FIB milling and SEM investigation. J Microsc 2009;233:309–19. https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03121.x.

[85] Moran P, Coats B. Biological Sample Preparation for SEM Imaging of Porcine Retina. Microsc Today 2012;20:28–31. https://doi.org/10.1017/S1551929511001374.

[86] Davison E, Colquhoun W. Ultrathin formvar support films for transmission electron microscopy. J Electron Microsc Tech 1985;2:35–43. https://doi.org/10.1002/jemt.1060020105.

[87] Zdroj: společná databáze UPT AV ČR. n.d.

[88] https://techguru.sk/11779/elektronova-mikroskopie-cast-2-sem-a-tem/ n.d.

[89] Wang H, Guo X, Fu S, Yang T, Wen Y, Yang H. Optimized core–shell Au@Ag nanoparticles for label-free Raman determination of trace Rhodamine B with cancer risk in food product. Food Chem 2015;188:137–42. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.122.

[90] Qi P, Lin Z, Li J, Wang C, Meng W, Hong H, et al. Development of a rapid, simple and sensitive HPLC-FLD method for determination of rhodamine B in chili-containing products. Food Chem 2014;164:98–103. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.036.

[91] Aroca RF, Alvarez-Puebla RA, Pieczonka N, Sanchez-Cortez S, Garcia-Ramos JV. Surface-enhanced Raman scattering on colloidal nanostructures. Adv Colloid Interface Sci 2005;116:45–61. https://doi.org/10.1016/j.cis.2005.04.007.

[92] https://en.wikipedia.org/wiki/Rhodamine_B n.d.

[93] Pan H, Zhang Y-W, Shenoy VB, Gao H. Effects of H-, N-, and (H, N)-Doping on the Photocatalytic Activity of TiO_2. J Phys Chem C 2011;115:12224–31. https://doi.org/10.1021/jp202385q.

[94] Prabhudesai VS, Meshram AA, Vinu R, Sontakke SM. Superior photocatalytic removal of metamitron and its mixture with Rhodamine B dye using combustion synthesized TiO2 nanomaterial. Chem Eng J Adv 2021;5:100084. https://doi.org/10.1016/j.ceja.2020.100084.

[95] Chen Y, Wang Y, Li W, Yang Q, Hou Q, Wei L, et al. Enhancement of photocatalytic performance with the use of noble-metal-decorated TiO 2 nanocrystals as highly active catalysts for aerobic oxidation under visible-light irradiation. Appl Catal B Environ 2017;210:352–67. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.03.077.

[96] NĚMEC M, MATOULKOVÁ D. Základy obecné mikrobiologie. vol. 2015. Brno: Masarykova univerzita; n.d.

[97] HORÁČEK J. Základy lékařské mikrobiologie. 1. vydání. Praha: Karolinum; 2000.

[98] Rafii F. Serratia. Encycl. Food Microbiol., Elsevier; 2014, p. 371–5. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00304-9.

[99] Solovieva AYu, Ioni YuV, Baskakov AO, Starchikov SS, Avilov AS, Lyubutin IS, et al. Synthesis of Fe3O4@Au core–shell nanoparticles. Russ J Inorg Chem 2017;62:711–4. https://doi.org/10.1134/S0036023617060225.

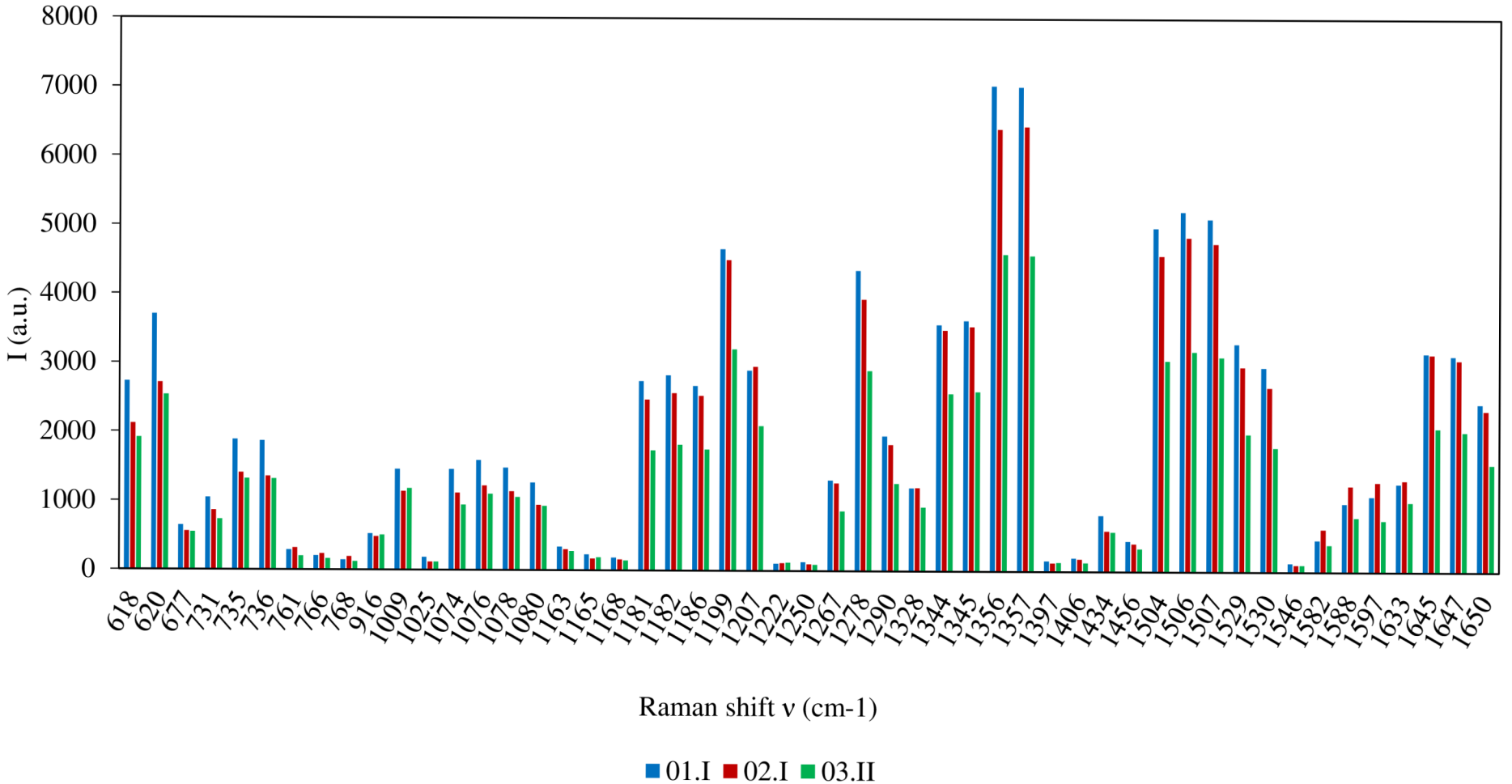
[100] Sun CH, Wang ML, Feng Q, Liu W, Xu CX. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study on Rhodamine B adsorbed on different substrates. Russ J Phys Chem A 2015;89:291–6. https://doi.org/10.1134/S0036024415020338.

[101] Hussain A, Pu H, Hu B, Sun D-W. Au@Ag-TGANPs based SERS for facile screening of thiabendazole and ferbam in liquid milk. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2021;245:118908. https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118908.

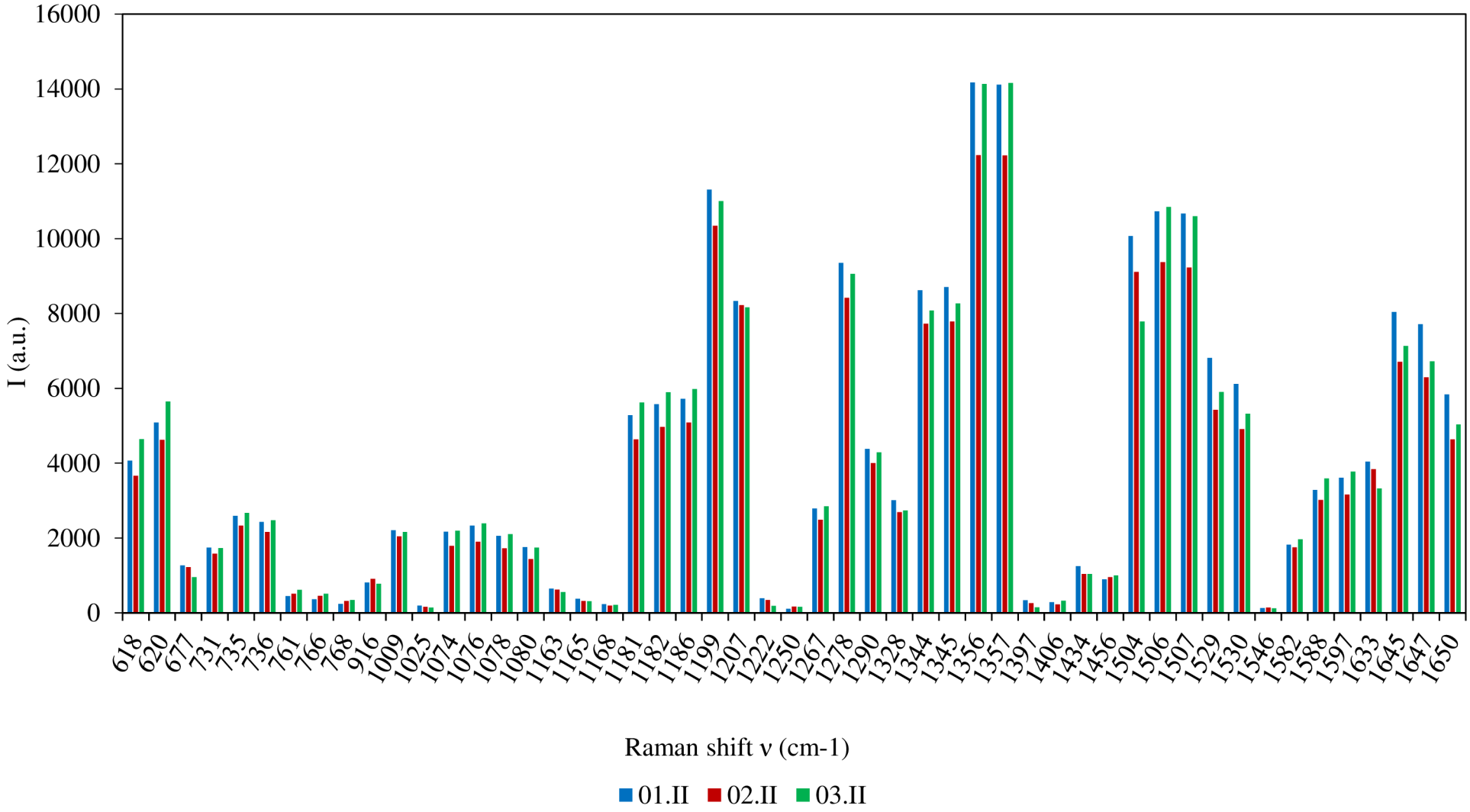
8 SEZNAM ZKRATEK

UV ultrafialové záření
VIS viditelná oblast záření
NMR nukleární magnetická rezonance
ESR elektronová spinová rezonance
IR infračervené záření
SEM skenovací elektronová mikroskopie
TEM transmisní elektronová mikroskopie
RTG rentgenovo záření
CCD kamera z angl. *charge-coupled device*
HPLC vysoce účinná kapalinová chromatografie
SERS povrchově zesílený Ramanův rozptyl
QD kvantové tečky
AFM mikroskopu atomárních sil
SAM samouspořádaná monovrstva
PVD fyzikální depozice z plynné fáze

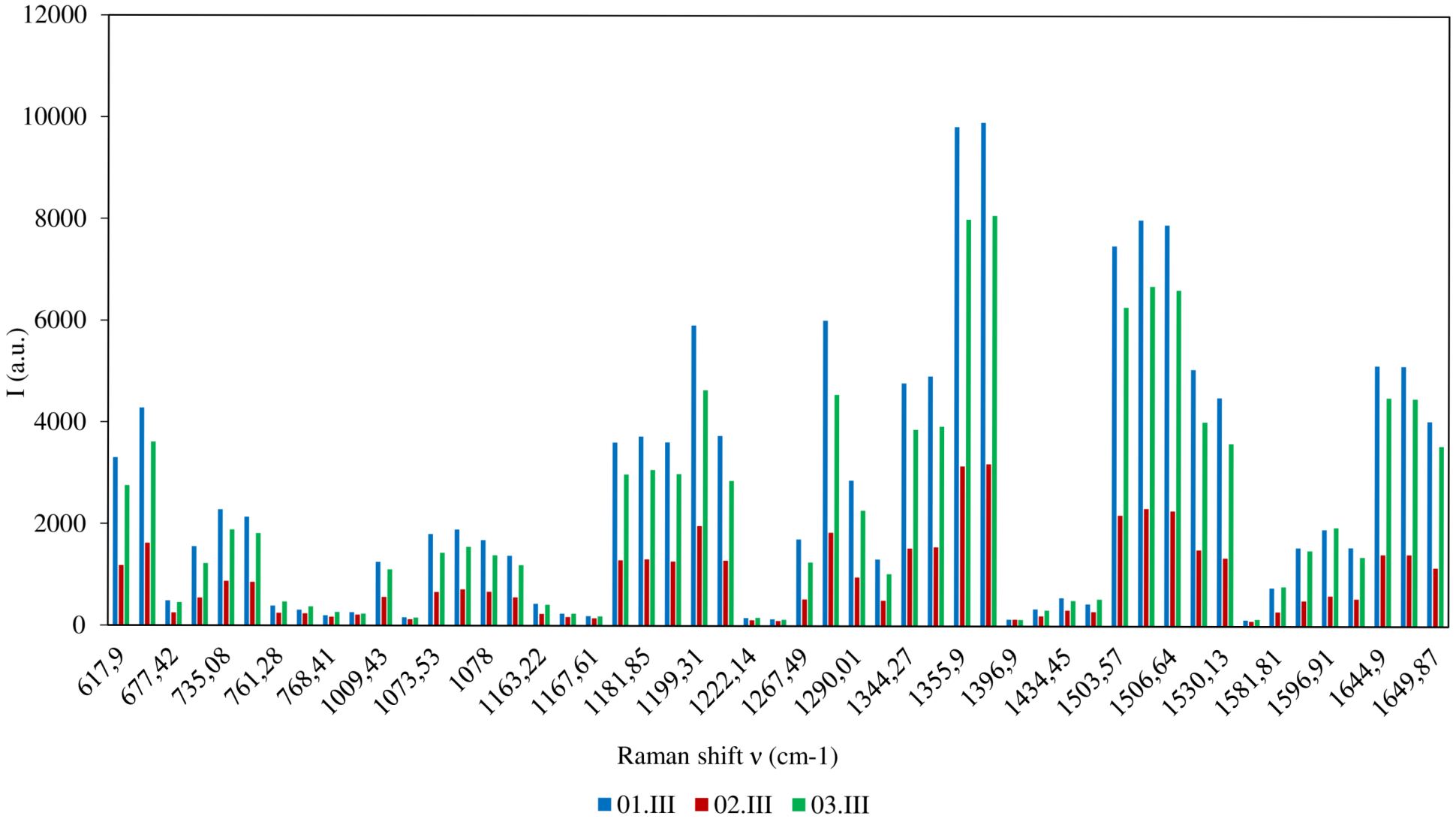
9 PŘÍLOHY



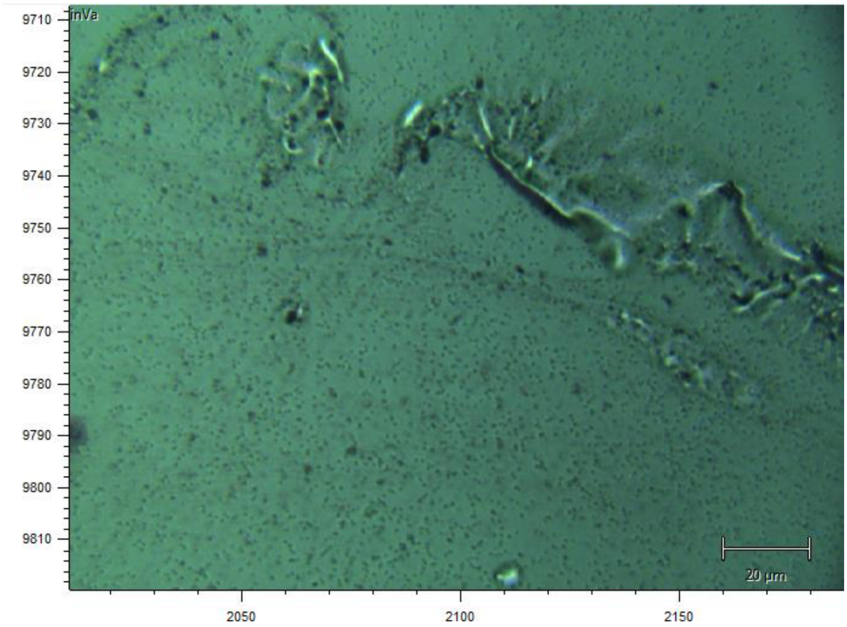
Obrázek 48: Intenzita vybraných píků v intervalech 0-120, 150-240 a 270-360 minut pro 1. řadu vzorků rhodaminu B (bez fotokatalyzátoru). Postupný pokles je znatelný téměř u všech píků.



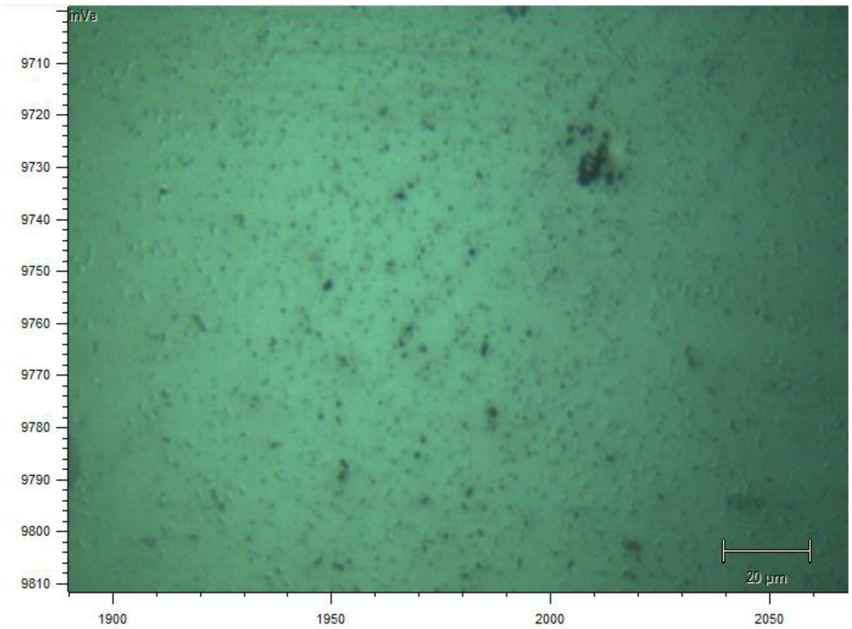
Obrázek 49: Intenzita vybraných píků v intervalech 0-120, 150-240 a 270-360 minut pro 2. řadu vzorků rhodaminu B (fotokatalyzátor TiO_2-(H)). Postupný pokles píků je vidět například na vlnočtu 1207 cm^{-1} a na 1633 cm^{-1}.



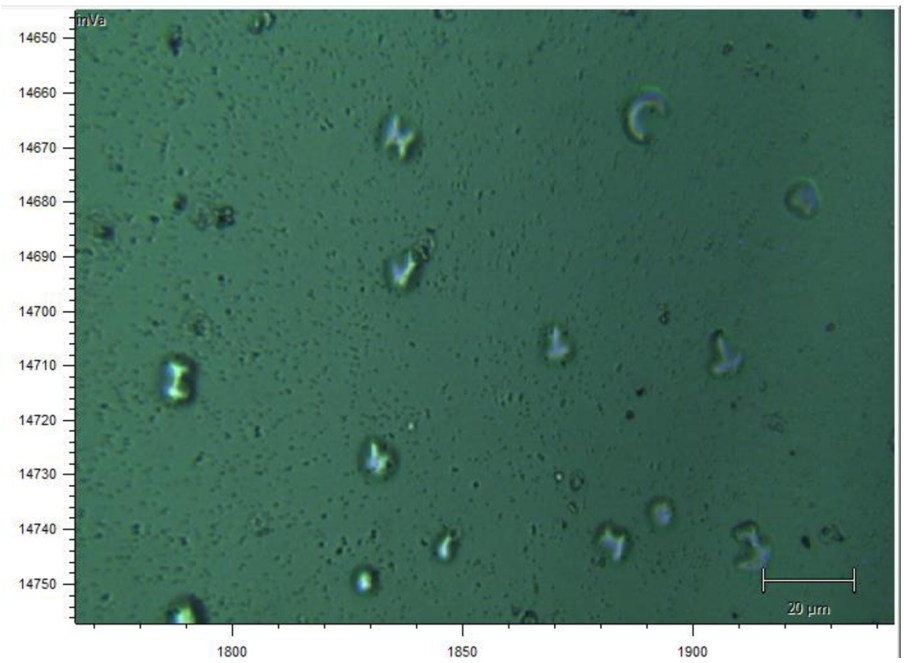
Obrázek 50: Intenzita vybraných píků v intervalech 0-120, 150-240 a 270-360 minut pro 3. řadu vzorků rhodaminu B (fotokatalyzátor TiO_2-(H)-Ag). Žádné píky nevykazují postupný pokles, ale průměrný pokles od první třetiny experimentu je znatelný.



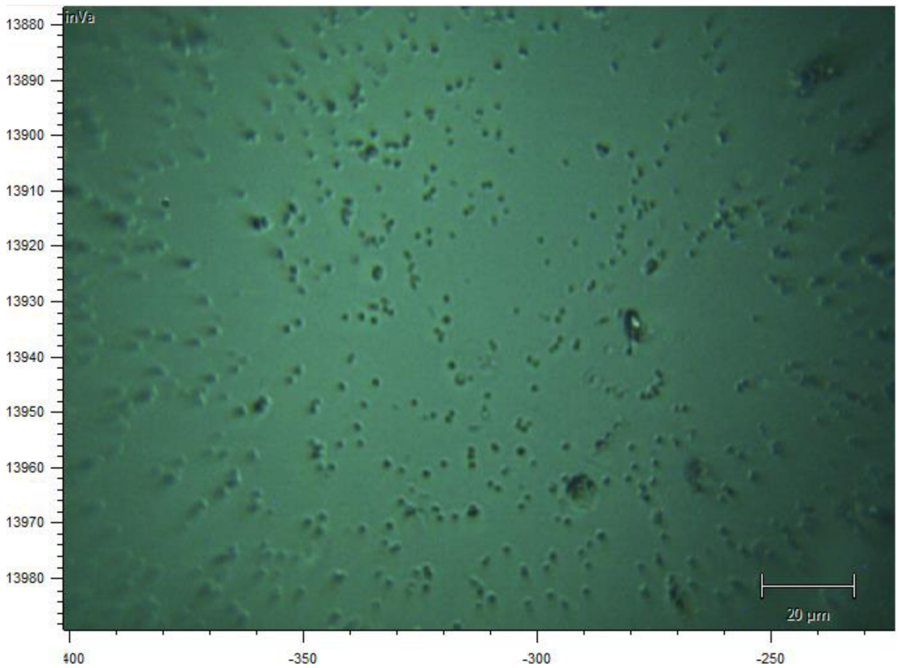
Obrázek 51: *E. Coli* K-12 na povrchu modifikovaných sklíček. Snímek z optického mikroskopu v uživatelském rozhraní WiRE 3.4. Mikroskop Ramanova InVia spektrometru (Renishaw, Wotton-under-Edge, Velká Británie), objektiv se zvětšením 20x.



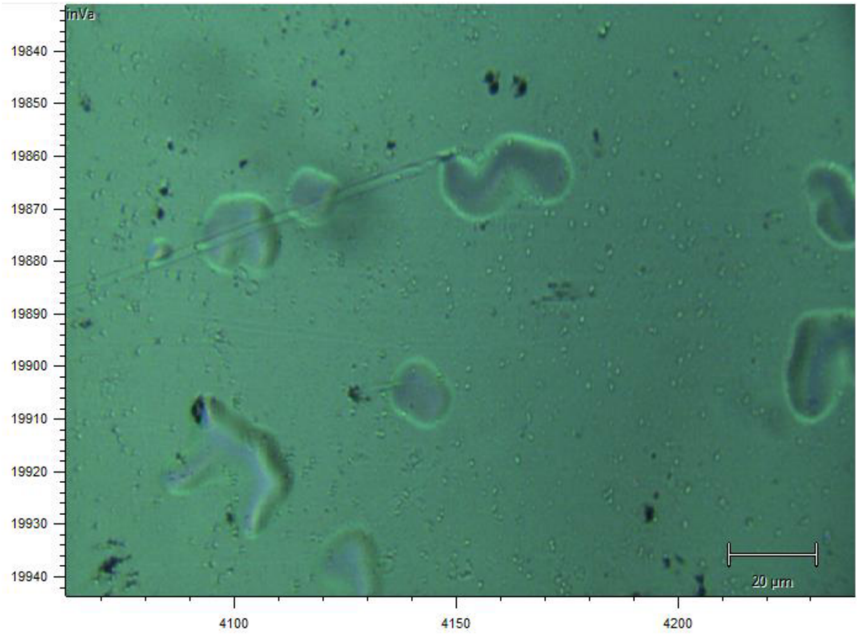
Obrázek 52: *E. Coli* K-12 na povrchu modifikovaných sklíček. Snímek z optického mikroskopu v uživatelském rozhraní WiRE 3.4. Mikroskop Ramanova InVia spektrometru (Renishaw, Wotton-under-Edge, Velká Británie), objektiv se zvětšením 50x.



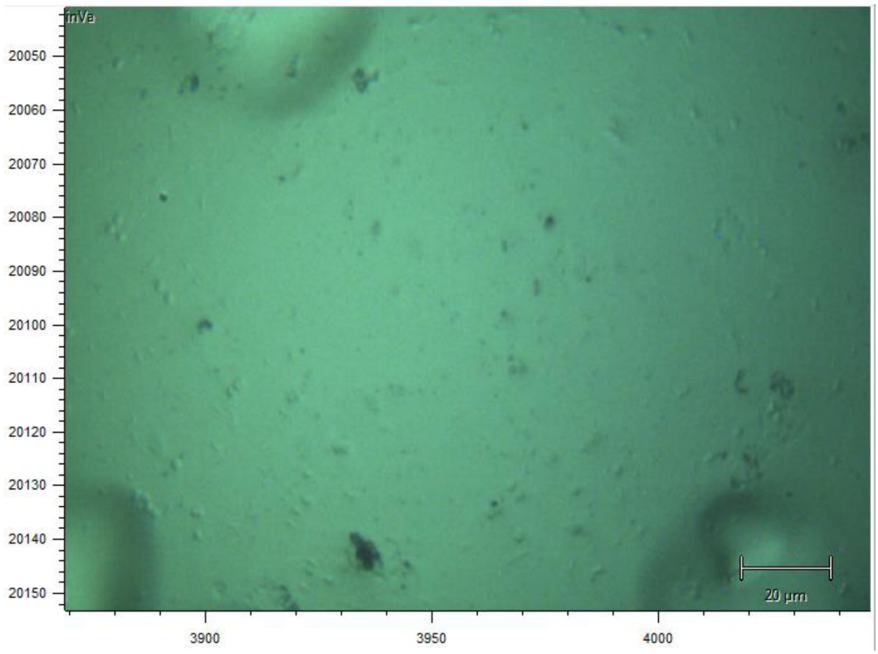
Obrázek 53: *S. aureus* na povrchu modifikovaných kontrolních sklíček. Snímek z optického mikroskopu v uživatelském rozhraní WiRE 3.4. Mikroskop Ramanova InVia spektrometru (Renishaw, Wotton-under-Edge, Velká Británie), objektiv se zvětšením 20x.



Obrázek 54: *S. aureus* na povrchu modifikovaných kontrolních sklíček. Snímek z optického mikroskopu v uživatelském rozhraní WiRE 3.4. Mikroskop Ramanova InVia spektrometru (Renishaw, Wotton-under-Edge, Velká Británie), objektiv se zvětšením 50x.



Obrázek 55: *S. marcescens* na povrchu modifikovaných kontrolních sklíček. Snímek z optického mikroskopu v uživatelském rozhraní WiRE 3.4. Mikroskop Ramanova InVia spektrometru (Renishaw, Wotton-under-Edge, Velká Británie), objektiv se zvětšením 20x.



Obrázek 56: *S. marcescens* na povrchu modifikovaných kontrolních sklíček. Snímek z optického mikroskopu v uživatelském rozhraní WiRE 3.4. Mikroskop Ramanova InVia spektrometru (Renishaw, Wotton-under-Edge, Velká Británie), objektiv se zvětšením 50x.