

U n i v e r z i t a P a l a c k é h o v O l o m o u c i

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**Studium aplikačního potenciálu povrchem zesílené Ramanovy  
spektroskopie pro cílenou analýzu fyziologicky aktivních látek**

Bakalářská práce

Autor:

David Lang

Školitel:

RNDr. Václav Ranc, Ph.D.

Studijní program:

B 1407 Chemie

Studijní obor:

Aplikovaná chemie

Forma studia:

Prezenční

Olomouc 2014

P a l a c k y U n i v e r s i t y O l o m o u c

Faculty of Science

Department of Physical Chemistry



**The study of potential applications of selective detection of  
physiological important markers by surface enhanced Raman  
spectroscopy**

Bachelor thesis

Author:	David Lang
Supervisor:	RNDr. Václav Ranc, Ph.D.
Study programme:	B 1407 Chemistry
Major:	Applied chemistry
Study form:	Daily

Olomouc 2014

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a veškeré literální prameny použité v této práci jsme uvedl v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne:

David Lang

***Poděkování:***

*Rád bych poděkoval RNDr. Václavu Rancovi Ph.D. za umožnění vypracování této práce, její odborné vedení, za čas, který mi věnoval a rady, které mi poskytl. Také bych chtěl poděkovat Katedře fyzikální chemie, kde mi bylo umožněno pracovat se SERS spektrometrem.*

## **Bibliografická identifikace:**

Autor:	David Lang
Název práce:	Studium aplikačního potenciálu povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie pro cílenou analýzu fyziologicky aktivních látek
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie, UP Olomouc
Vedoucí práce:	RNDr. Václav Ranc, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2014
Abstrakt:	<p>Předmětem této bakalářské práce je studium aplikačního potenciálu povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie pro cílenou analýzu fyziologicky aktivních látek. Byla hledána optimální koncentrace avidinu k pokrytí stříbrné vrstvy na skleněném substrátu. Za tímto účelem byla proměřena sada různých koncentrací avidinu imobilizovaného na stříbrné vrstvě. Na základě Ramanových spekter byl avidin o koncentraci 1 mM určen jako nejvhodnější. Poskytoval jednoznačně nejlepší signál při použití tří různých laserů.</p>
Klíčová slova:	SERS, avidin, stříbrná vrstva, nanočástice
Počet stran:	49
Jazyk:	čeština

## **Bibliographic identification:**

Author:	David Lang
Title:	The study of potential applications of selective detection of physiological important markers by surface enhanced Raman spectroscopy
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of physical chemistry, UP Olomouc
Supervisor:	RNDr. Václav Ranc, Ph.D.
The Year of presentation:	2014
Abstract:	<p>The bachelor thesis is concerned with the applicable potential of surface-enhanced Raman spectroscopy for the purpose of targeted analysis of physiologically active substances. Its aim was to arrive at the optimal concentration of avidin to cover the silver film on a glass substrate. A set of various concentrations of avidin, immobilised on the silver film, were measured for this purpose. By examining the different results of Raman spectrum it was discovered that an avidin concentration of 1mM is the most suitable one. This concentration provided the best signal with each of the three different lasers used.</p>
Keywords:	SERS, avidin, silver layer, nanoparticles
Number of Pages:	49
Language:	Czech

# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Teoretická část.....</b>	<b>10</b>
2.1 Molekulová spektroskopie.....	10
2.1.1 Spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra (UV/VIS) .....	10
2.1.2 Infračervená spektroskopie (IR).....	12
2.2 Ramanova spektroskopie .....	13
2.2.1 Historie Ramanovy spektroskopie .....	13
2.2.2 Princip Ramanovy spektroskopie.....	14
2.3 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS) .....	18
2.3.1 Elektromagnetický mechanismus .....	19
2.3.2 Chemický mechanismus.....	21
2.3.3 SERS aktivní povrchy .....	21
2.3.3.1 Zdrsňené kovové elektrody .....	21
2.3.3.2 Kovové filmy .....	22
2.3.3.3 Kovové koloidy.....	22
2.3.3.4 Kovové koloidní částice imobilizované na skleněném substrátu .....	23
2.3.4 Aplikace SERS.....	23
2.4 Disperzní soustavy .....	24
2.4.1 Koloidní disperze.....	26
2.4.2 Klasifikace a charakteristika koloidních disperzí.....	26
2.4.3 Kinetické vlastnosti koloidních soustav.....	27
2.4.4 Optické vlastnosti koloidních soustav .....	27
2.4.5 Elektrické vlastnosti koloidních soustav.....	28
<b>3. Experimentální část.....</b>	<b>29</b>
3.1 Instrumentace .....	29
3.1.1 Ramanův spektrometr .....	29
3.1.2 Elektronový mikroskop (SEM) .....	30

3.2	Příprava stříbrné vrstvy .....	30
3.3	Zpracování spekter .....	31
3.4	Výsledky a diskuze .....	32
<b>4.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>44</b>
<b>5.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>46</b>



# 1. Úvod

Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie, běžně známá pod zkratkou SERS, je analytická technika, kterou lze považovat za jakési rozšíření běžné Ramanovy spektroskopie. Jedná se o velmi selektivní a zároveň citlivou metodu. Vysoká citlivost je dána pomocí zesílení Ramanova rozptylu molekul, které jsou adsorbovány nebo se nacházejí v blízkosti plasmonického kovu, kterým může být například zlato nebo stříbro. Díky této metodě je možné detegovat jedinou molekulu. Stává se tak v místech s velmi silným zesílením signálu, která se nazývají „hot spots”. Tato vibrační spektroskopie se využívá hlavně při chemické analýze a při studiu biomolekul.

Je několik způsobů, jakými se dají vzorky zkoumat. V této práci byla analýza prováděna pomocí stříbrné vrstvy na skleněném substrátu, která zaručovala dostatečné zesílení signálu. Připravené stříbrné vrstvy byly postupně modifikovány. Během posledního kroku modifikace byl imobilizován avidin, který byl také předmětem zkoumání v předložené práci. Důležitost avidinu spočívá v jeho interakci s modifikovaným biotinem, čímž vzniká možnost aplikace takto připravených vrstev například při detekci diagnosticky významných proteinů.

Teoretickou část otevírá kapitola věnována obecnému úvodu do molekulové spektroskopie, pozornost je pak zaměřena na Ramanovu spektroskopii. Hlavní část práce se zabývá povrchem zesílenou Ramanovou spektroskopií, kde jsou popsány mechanismy, na kterých tato spektroskopie pracuje, SERS aktivní povrchy a aplikace samotné spektroskopie. V experimentální části jsou popsány přístroje, které byly během práce využity a jsou zde popsány výsledky, ke kterým se došlo. Hodnoty jsou reprezentovány převážně pomocí grafů a spekter, díky čemuž jsou výsledky přehledné.

## **2. Teoretická část**

### **2.1 Molekulová spektroskopie**

Molekulovou spektroskopií se dá nazvat soubor metod, které sledují interakci elektromagnetického záření s analyzovanou molekulou. Podstatou je studování nastalých jevů za účelem identifikace nebo určení struktury látek. [1]

Mezi techniky molekulové spektroskopie se řadí metody, které využívají měření absorpce či emise elektromagnetického záření v ultrafialové až mikrovlnné oblasti. Tyto metody lze dále členit podle:

- a) Změn, ke kterým dochází při interakci molekul s elektromagnetickým zářením
- b) Spektrální oblasti záření použitého k analýze
- c) Toho, zda k měření využíváme záření absorbovaného molekulami nebo záření emitovaného

#### **2.1.1 Spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra (UV/VIS)**

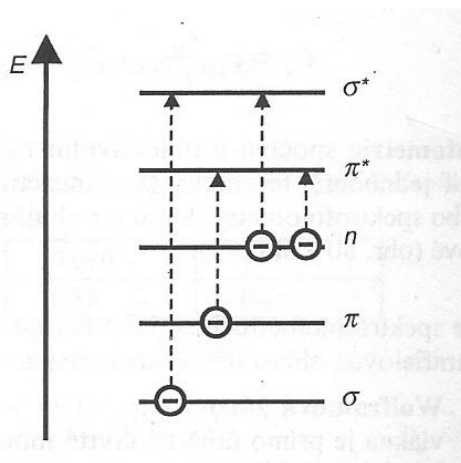
UV/VIS spektroskopie je založena na absorpci ultrafialového a viditelného záření ze spektra 200 – 800 nm. Při absorpci nastane excitace valenčních elektronů. Látky pohlcující ultrafialové záření (pod 400 nm) se jeví jako bezbarvé, zatímco látky pohlcující světlo viditelné se jeví jako barevné. Barevné látky umožňují vidět doplňkovou barvu k barvě absorbované. [2] Vlnové délky a barvy absorbovaného záření uvedeny v tabulce č. 1.

Absorbované záření (nm)	Barva absorbovaného záření	Barva doplňková
400-435	Fialová	Žlutozelená
435-480	Modrá	Žlutá
480-490	Zelenomodrá	Oranžová
490-500	Modrozelená	Červenooranžová
500-560	Zelená	Purpurová
560-580	Zelenožlutá	Fialová
580-595	Žlutooranžová	Modrá
595-610	Červenooranžová	Zelenomodrá
610-760	Červená	Modrozelená

**Tabulka 1:** Soubor doplňkových barev a příslušných vlnových délek.

Při excitaci elektronu může dojít k několika přechodům:

- a)  $\pi \rightarrow \pi^*$  přechod, který je možný v molekulách s násobnými vazbami. Látky, které jej umožňují, se nazývají chromofory. Jedná se o přechod antivazebného elektronu.
- b)  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  přechod u sloučenin obsahující jen jednoduché vazby, které jsou velice pevné a je tedy potřeba největšího množství energie.
- c)  $\eta \rightarrow \pi^*$  značí přechod elektronu (navázaného na atomu násobnou vazbou) nevazebného elektronového páru do antivazebného orbitalu.
- d)  $\eta \rightarrow \sigma^*$  přechod, který se vyskytuje u nasycených sloučenin s volným elektronovým párem.
- e) **Přechod přenosu náboje** nastane, jestliže dochází k přenosu elektronu z donoru na akceptor. Tento přechod se vyskytuje u anorganických látek.



**Obr. 1:** Zobrazení elektronových přechodů v molekule. Převzato z [2].

### 2.1.2 Infračervená spektroskopie (IR)

Principem infračervené spektroskopie je absorpce záření molekulami z infračervené oblasti spektra. Využívané spektrum se nachází v intervalu  $0,78 - 1000 \mu\text{m}$  (odpovídá vlnočtu v rozmezí  $12800 - 10 \text{ cm}^{-1}$ ) a je rozděleno do tří oblastí: [2]

- 1) Blízká infračervená oblast ( $0,78 - 2,50 \mu\text{m}$ , tj.  $12800 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ )
- 2) Střední infračervená oblast ( $2,50 - 50 \mu\text{m}$ , tj.  $4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$ )
- 3) Vzdálená infračervená oblast ( $50 - 1000 \mu\text{m}$ , tj.  $200 - 10 \text{ cm}^{-1}$ )

Infračervené záření má větší vlnovou délku a nižší energii než záření z oblasti UV/VIS, způsobuje pouze změny vibračně rotační.

Pro absorpci IR záření je nutná změna dipólového momentu molekuly. S Ramanovou spektroskopií (popsána v kapitole 2.2), u které je nutná změna polarizovatelnosti, tak tvoří doplňkové metody.

## **2.2 Ramanova spektroskopie**

Ramanova spektroskopie je spektroskopická technika založená na neelastickém rozptylu monochromatického světla, které je obvykle z laserového zdroje.

Neelastický rozptyl znamená, že rozptýlené záření má jinou vlnovou délku než záření dopadající. Fotony ze zdroje záření jsou absorbovány a následně reemitovány. Frekvence reemitovaných fotonů je posunuta nahoru nebo dolů vzhledem k původní frekvenci monochromatického záření. Tento jev se nazývá Ramanův rozptyl. Změna frekvence a tedy i vlnové délky poskytuje informace o vibračním i rotačním stavu v molekulách. [3]

### **2.2.1 Historie Ramanovy spektroskopie**

Ramanův rozptyl byl předpovězen poprvé v roce 1923 fyzikem Adolfem Smekalem, ale poprvé pozorován až v roce 1928 Sirem Chandrasekrou Venkatou Ramanem. Za tento jev, který byl pojmenován po jeho objeviteli, obdržel v roce 1930 Raman Nobelovu cenu. [4]

Při původním pokusu bylo sluneční světlo – tehdy použito jako zdroj záření, zaměřeno na vzorek pomocí teleskopu. Další čočka umístěná u vzorku zachytávala rozptýlené záření a pomocí optických filtrů bylo dokázáno záření s rozdílnou frekvencí oproti dopadajícímu slunečnímu světlu. [5]

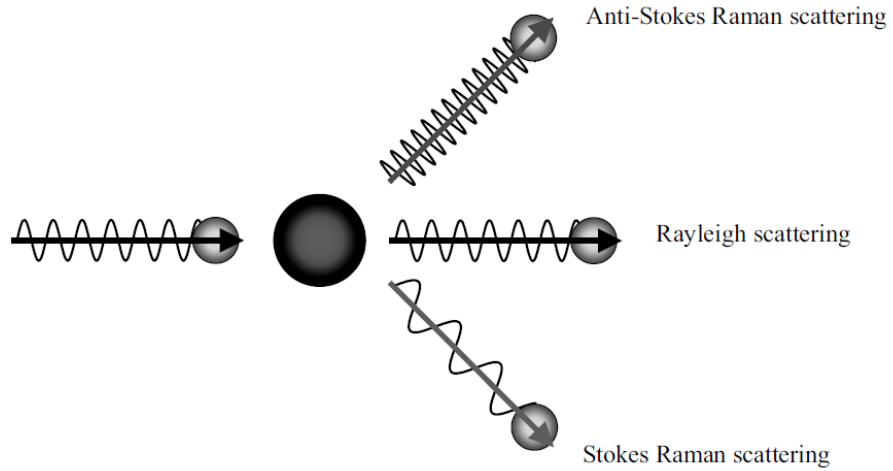
První výzkum instrumentace zaměřený na Ramanovu spektroskopii se zabýval problémem nevyhovujícího excitačního zdroje. Vhodnější lampy (rtuťnaté) se podařilo sestavit až ve třicátých letech minulého století. Zásadní rozmach této techniky nastal v šedesátých letech díky objevu laseru.

## 2.2.2 Princip Ramanovy spektroskopie

Tato metoda je založena na rozptylu záření, které nastane při kolizi fotonu ze zdroje záření a molekuly vzorku. Současně musí docházet i ke změně rotačních a vibračních stavů této molekuly. [3]

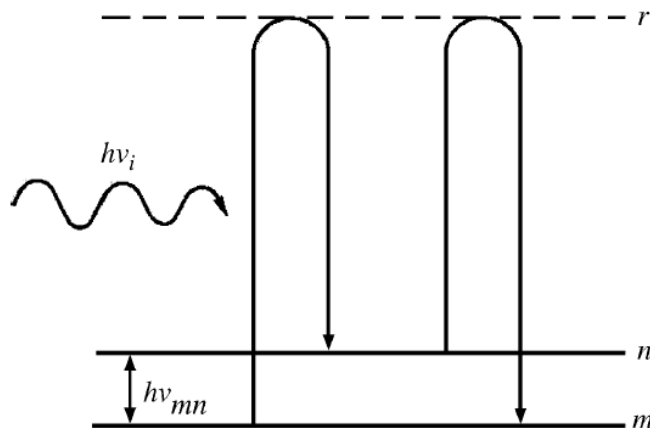
Většina fotonů kolidujících s molekulou svou energii vůbec nezmění – jedná se o elastickou kolizi, která se nazývá Rayleighův rozptyl. Molekula absorbuje záření o frekvenci  $\nu_0$  a excitovaná molekula vyzáří při návratu na základní hladinu záření o stejné frekvenci  $\nu_0$  jako měl excitační zdroj. [6]

Pouze velmi malé množství fotonů změní svou energii v závislosti na interakci s molekulou zkoumaného vzorku. V tomto případě se jedná o neelastický rozptyl. Pokud foton předá  $h\nu$  kvantum energie molekule vzorku, energie rozptýleného fotonu se zmenší na  $h(\nu_0-\nu)$  a frekvence rozptýleného fotonu se zmenší na  $\nu_0-\nu$ . Jestliže foton obdrží energii  $h\nu$  z molekuly vzorku, energie rozptýleného fotonu vzroste na  $h(\nu_0+\nu)$  a frekvence bude  $\nu_0+\nu$ . Rozptyl, během kterého si foton vymění energii s molekulou, se nazývá Ramanův rozptyl. Podmínkou tohoto rozptylu je, aby se při vibraci analyzované molekuly měnila její polarizovatelnost (schopnost posouvat náboj v molekule pomocí elektrického pole a vytvářet tak indukovaný dipól). Jev, kdy rozptýlené fotony mají frekvenci  $\nu_0-\nu$  se nazývá Stokesův rozptyl. V druhém případě, kdy rozptýlené fotony mají frekvenci  $\nu_0+\nu$  se jedná o anti-Stokesův rozptyl. [3,6,7]



**Obr. 2:** Znázornění Ramannova a Rayleighova rozptylu záření. Převzato z [9].

Stokesův rozptyl vzniká interakcí mezi fotonem a molekulou, která je v základním stavu, zatímco anti-Stokesův rozptyl vzniká interakcí mezi fotonem a molekulou, která je v excitovaném stavu. Protože jsou molekuly v zásadě v základním vibračním stavu, je právě Stokesův rozptyl mnohem častěji pozorován a měřen, než rozptyl anti-Stokesův. [8]



**Obr. 3:** Znázornění Stokesova a anti-Stokesova Ramannova rozptylu. Převzato z [9].

Jak již bylo řečeno, podmínkou Ramanova rozptylu je polarizovatelnost molekul. Tato schopnost se vyskytuje u nepolárních částí molekuly. V Ramanově spektru je tedy možné pozorovat intenzivní pásy vibrací nepolárních vazeb, protože při vibracích se jejich polarizovatelnost výrazně mění.

K lepšímu porozumění Ramanova jevu slouží tzv. klasická teorie. Tato teorie je založena na indukci dipólového momentu v molekule za působení oscilujícího pole excitovaného záření. [9]

Tento indukovaný dipól vyzáří rozptýlené světlo, které si vyměnilo nebo nevyměnilo určitou část energie se zkoumanou molekulou. Indukovaný dipólový moment  $\mathbf{P}$  je přímo úměrný intenzitě elektrického pole  $\mathbf{E}$  a je vyjádřen jako:

$$\mathbf{P} = \alpha \mathbf{E} \quad (1)$$

Koeficient  $\alpha$  značí elektrickou polarizovatelnost – ta určuje, jak snadno se mění rozložení náboje. Intenzita elektrické složky excitačního záření je dána vztahem  $E = E_0 \cos 2\pi\nu_0 t$ , kde  $E_0$  odpovídá amplitudě a  $\nu_0$  je frekvence laseru. Z toho vyplývá že:

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

Polarizovatelnost  $\alpha$  je možné rozdělit na polarizovatelnost  $\alpha_0$ , která se nezměnila navzdory molekulovým vibracím a na polarizovatelnost, která se změnila skrz molekulové vibrace. Zavedením okamžité výchylky harmonického oscilátoru  $q = Q \cos 2\pi\nu t$ , kde  $q$  je amplituda dané vibrace o frekvenci  $\nu$ , získáme rovnici

$$\alpha = \alpha_0 + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 Q \cos 2\pi\nu t \quad (3)$$

Substitucí rovnice (3) do rovnice (2) obdržíme rovnici pro indukovaný dipólový moment:

$$P = \alpha_0 \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)_0 Q \mathbf{E}_0 \{ \cos 2\pi(\nu_0 + \nu)t + \cos 2\pi(\nu_0 - \nu)t \} \quad (4)$$



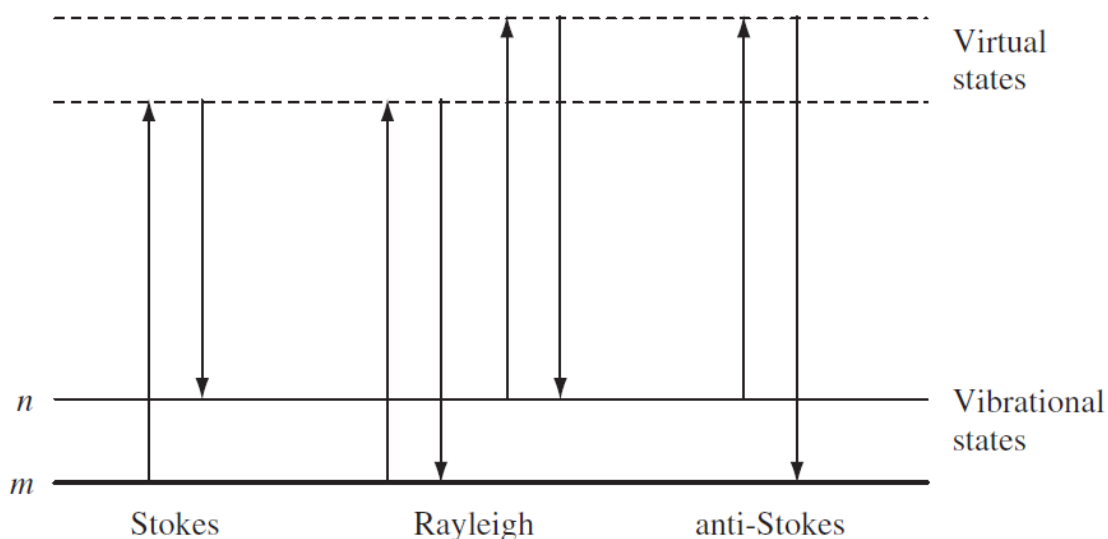
Rovnice (4) obsahuje tři části, které přispívají k indukci dipólového momentu v molekule interagující se zářením. Z rovnice lze vyčíst tři různé frekvence, které dipól vyzařuje. Emitované záření s nezměněnou frekvencí  $\alpha_0 \mathbf{E}_0 \cos(2\nu_0 t)$  odpovídá Rayleighovu rozptylu. Tato frekvence je shodná s frekvencí excitačního záření  $\nu_0$ . Zbylé dvě složky odpovídají Ramanovu rozptylu. Záření o nižší frekvenci  $(\nu_0 - \nu)$  odpovídá tedy Stokesovu rozptylu a záření o frekvenci vyšší  $(\nu_0 + \nu)$  odpovídá rozptylu anti-Stokesovu.

Z rovnice (4) též vyplývá, že pokud má dojít ke vzniku Ramanovy linie, musí při vibračním pohybu nastat změna polarizovatelnosti. To znamená, že musí platit:

$$\frac{\partial \alpha}{\partial q} \neq 0 \quad (5)$$

Rovnici (5) označujeme za základní výběrové pravidlo pro Ramanovu spektroskopii.

Ramanův jev je možné popsat také pomocí kvantové teorie. Zde je Ramanův rozptyl popsán jako dvoufotonový proces. Nejprve foton z excitačního zdroje interaguje s molekulou, která je excitována do virtuálního stavu. V dalším kroku dochází k přechodu molekuly na nižší energetickou hladinu za současného vyzáření fotonu o energii, která odpovídá tomuto přechodu. Mohou nastat tři možnosti. Pokud se foton z virtuální energetické hladiny vrátí na stejnou počáteční energetickou hladinu, jedná se o Rayleighův rozptyl. Jestliže se foton navrátí na vyšší hladinu, než byla hladina počáteční, hovoří se o Stokesovu rozptylu. Je-li koncová hladina nižší, než počáteční, tak nastal anti-Stokesův rozptyl. [9]



**Obr. 4:** Diagram energetických hladin znázorňující interakci foton – molekula. Převzato z [6].

### 2.3 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS)

Ve srovnání s jiným spektroskopickými ději v molekule je Ramanův rozptyl relativně slabý a získat Ramanovo spektrum látek při nízkých koncentracích je poměrně obtížné. Velice výrazného zesílení intenzity lze dosáhnout adsorpcí molekuly na povrch nanočástice kovů. Mezi nejběžněji používané patří zlato a stříbro, lze však použít i jiné kovy (Cu, Pt, Pd). Na tomto principu pracuje SERS spektroskopie. [10] Zkratka SERS se dá vysvětlit dvěma způsoby. Jedním je Surface enhanced Raman Scattering a druhým je Surface enhanced Raman Spectroscopy.

Povrchově zesílený Ramanův rozptyl byl poprvé pozorován roku 1974 Fleischmanem, kdy byl sledován pyridin adsorbovaný povrchu zdrsňené stříbrné elektrody. [11] Získaný intenzivní signál Fleischman přičítal zvětšenému povrchu elektrody, což roku 1977 vyvrátily dvě na sobě nezávisle vypracované práce. Práce Jeanmarieho a Van Duyneho vysvětlovala nezvykle zesílený signál pomocí elektromagnetického mechanismu a práce Albrechta a Craightona přičítala toto zesílení efektu přenosu náboje mezi kovem a

na něm adsorbovanou molekulou. [12, 13] Až o několik dalších let později se přišlo na to, že na zesílení Ramanova rozptylu se podílejí oba tyto mechanismy.

Víme, že intenzita rozptýleného Ramanova záření je úměrná druhé mocnině indukovaného dipólového momentu:

$$I \sim P^2 \quad (6)$$

Z kapitoly 2.2.2. je známo, že pro indukovaný dipólový moment platí vztah  $P = \alpha E$ . Z toho vyplývá, že intenzita záření, které je rozptýleno molekulou, může být zesíleno dvěma způsoby:

1. Pomocí zvýšení intenzity elektromagnetického pole  $E$ , což odpovídá elektromagnetickému mechanismu.
2. Zvýšením polarizovatelnosti  $\alpha$ , což bývá označováno jako chemický mechanismus

### 2.3.1 Elektromagnetický mechanismus

Elektromagnetický mechanismus je považován za základní mechanismus SERS spektroskopie. Faktor zesílení Ramanova rozptylu tímto mechanismem je v rozmezí od  $10^4$  až do  $10^{11}$ .

Při interakci elektromagnetického záření s nanočásticí kovu a splnění rezonanční podmínky  $\lambda_{\text{exc}} \sim \lambda_{\text{res}}$  dojde k tomu, že elektrony kovu začnou kmitat se stejnou frekvencí, jakou má dopadající záření a tím vznikne oscilující dipól. V důsledku nastalé rezonanční excitace povrchových plazmonů dojde k zesílení lokálního elektromagnetického pole, což je podstatou elektromagnetického mechanismu.

Velikost oscilujícího dipólu určuje dipólový moment vztahem:

$$P = r^3 \cdot g \cdot E \quad (7)$$

Přičemž  $r$  je poloměr kovové nanočástice,  $E$  je intenzita elektrického pole excitačního záření a  $g$  je faktor zesílení excitačního záření, které je dáno vztahem:

$$g = \frac{\varepsilon(\lambda) - \varepsilon_m}{\varepsilon(\lambda) + 2\varepsilon_m} \quad (8)$$

Kde  $\varepsilon(\lambda)$  představuje relativní komplexní permitivitu kovu nanočástice a  $\varepsilon_m$  je relativní permitivita prostředí.

Vzniklý oscilující dipól emituje záření, jehož intenzita je dána vztahem:

$$I = P^2 \quad (9)$$

Největší zesílení intenzity záření nastává při splnění rezonanční podmínky, kdy je faktor zesílení  $g$  nejvyšší. Tedy když pro reálnou složku komplexní permitivity kovu nanočástice platí:

$$\varepsilon(\lambda) = -2\varepsilon_m$$

a pro imaginární složku, která odpovídá míře tlumení rezonance, platí:

$$\varepsilon(\lambda) \rightarrow 0$$

Z těchto podmínek vyplývá, že velikost zesílení závisí na typu kovu a že ke splnění rezonanční podmínky pro různé kovy je potřeba rozdílná vlnová délka excitačního záření. Výhodou nejběžněji používaných kovů zlata a stříbra (z hlediska dostupnosti laserů) je to, že splňují rezonanční podmínku vlnových délek ve viditelné oblasti. Další výhodou je nízká hodnota  $\varepsilon(\lambda)$ , která je nutná k většímu zesílení intenzity signálu. [14]

K zesílení signálu není nutná přímá adsorpce molekuly na kovové nanočástici, ale s rostoucí vzdáleností intenzita záření výrazně klesá. Pomocí SERS spektroskopie lze pozorovat Ramanův rozptyl i z jednotlivých molekul. Aby to bylo možné, musí být molekula v kontaktu se dvěma nanočásticemi kovu. Jedná se o takzvaný dimer. Tato místa s extrémně velkým zesílením se označují jako „hot spots”. Další zesílení elektromagnetického pole se vyskytuje v místech nerovností kovového povrchu nanočástic. [15]

## 2.3.2 Chemický mechanismus

Pomocí chemického mechanismu lze vysvětlit některé děje v SERS spektroskopii, které nedokáže vysvětlit elektromagnetický mechanismus. V tomto mechanismu dochází k ději, při kterém se zvýší polarizovatelnou molekuly  $\alpha$  a podle vztahu  $P=\alpha E$  tedy nastane zesílení signálu.

Na rozdíl od elektromagnetického mechanismu je nutné, aby byla molekula v přímém kontaktu s nanočásticí kovu. Jedná se o druh adsorpce, kdy mezi adsorbátem a adsorbentem vzniká chemická vazba. Tento jev se nazývá chemisorbce. Kvůli silné interakci molekuly s elektrony kovu se mění vlastnosti molekuly a velice často dochází i k přenosu náboje. Ve vzniklém komplexu tedy osciluje elektron mezi molekulou a kovem. Aby došlo k rezonančnímu růstu amplitudy oscilací, musí na komplex působit vnější elektromagnetické záření o frekvenci blízké frekvenci těchto oscilací. Díky tomu dochází ke zvětšení polarizovatelnosti molekuly. Tento mechanismus přispívá k růstu faktoru zesílení v rozmezí  $10 - 10^2$ . [10]

## 2.3.3 SERS aktivní povrchy

Díky plnění podmínky plazmonové rezonance pro excitační záření ve viditelné oblasti, patří zlato, stříbro a měď mezi nejběžněji používané kovy na přípravu SERS aktivních povrchů. Snahou při přípravě těchto povrchů je připravit povrch o známé velikosti, tvaru a uspořádání nanočástic. Povrchy pro chemickou analýzu musí být homogenní a reprodukovatelné. Mezi nejběžněji používané SERS aktivní povrchy patří zdrsňené kovové elektrody, kovové filmy a kovové koloidy. [14]

### 2.3.3.1 Zdrsňené kovové elektrody

Tento povrch je znám od samého začátku SERS spektroskopie. [11] Nejprve je povrch elektrody vyhlazen kvůli reprodukovatelnosti a následně je zdrsňen během několika oxidačně-redukčních cyklů elektrolýzy. Na povrchu vznikají nerovnosti o velikosti v rozmezí 25 – 500 nm. Tato velikost je závislá na několika faktorech, jako je počet cyklů elektrolýzy, přeneseném náboji, na vlastnostech elektrolytu atd. Velikou výhodou elektrod je možnost nastavení elektrodového potenciálu, čímž lze ovlivnit adsorpci analytu.

### **2.3.3.2 Kovové filmy**

Kovové filmy se připravují napařováním kovu substrát, kterým bývá nejběžněji sklo. Velikost nerovností se pohybuje kolem 100 – 600 nm a odvíjí se v závislosti na různých parametrech, jako je rychlost napařování, teplota substrátu během přípravy vrstvy a tloušťka filmu. Další způsob, jak získat nanonerovnosti na filmu je nanášet kov na substrát s nerovnostmi na povrchu.

### **2.3.3.3 Kovové koloidy**

Kovové koloidy jsou nanočástice rozptýlené ve vodě. Jedná se o suspenzi, kde se velikost kovových nanočástic pohybuje v řádu desítek nm. Připravují se chemickou redukcí kovových solí, pomocí laseru ablací nebo fotoredukcí. [16,17,18]

Chemický způsob přípravy za použití vhodného redukčního činidla je nejběžnější metodou přípravy kovových koloidů. Vznikají částice s výrazně užší distribucí velikostí, než je distribuce nerovností u předchozích způsobů přípravy. Velikost nanočástic závisí na použitém kovu, redukčním činidle, teplotě a koncentraci kovových iontů. Z extinkčního spektra, které se zjišťuje pomocí UV-VIS spektroskopie se dá zjistit, které excitační vlnové délky jsou vhodné pro SERS.

V případě znečištění některých použitých látek může začít koloid agregovat. Vzniklé agregáty sice mohou poskytovat větší zesílení signálu, ale nejsou vhodné pro reprodukovatelnost SERS měření. Čistému koloidu brání v agregaci anionty redukčního činidla, kterým je obalena kladně nabitá kovová nanočástice.

Při přípravě kovového koloidu laserovou ablací se ozařuje kovová folie ve vodě pomocí pulzního laseru. Kvůli působení laseru se z folie odpařují nanočástice kovu a vzniká tak velice čistý koloid. Díky nepřítomnosti žádných činidel nehrozí, že se v SERS spektru objeví nežádoucí pásy. Na velikost částic má vliv vlnová délka použitého laseru, počet a intenzita pulzů a doba jeho působení.

Principem fotoredukce je ozařování reakční směsi UV záření, kdy se z organické látky uvolní radikály a ty pak fungují jako redukční činidlo kovových iontů. Jedná se o metodu spíše ojedinělou.

#### **2.3.3.4 Kovové koloidní částice imobilizované na skleněném substrátu**

Problém s agregací koloidů a tedy i s reprodukovatelností měření řeší kovové koloidní částice imobilizované na pevném substrátu. Jsou zde spojeny výhody kovových koloidů a pevných povrchů. Přípravou těchto povrchů se zabývá například článek Hajdukové a kol. [19]

Vzhledem k velkému významu aplikace koloidních disperzí v SERS spektroskopii, jsou rozebrány jejich vlastnosti v dalších kapitolách.

#### **2.3.4 Aplikace SERS**

O SERS spektroskopii se dá jednoznačně mluvit jako o multidisciplinární analytické metodě. Své uplatnění nachází zejména v přírodních vědách od analytické chemie, fyzikální chemie, biochemie až po mineralogii, geochemii a biofyziku. Veliký význam má rovněž ve farmacii a lékařství. Další, neméně důležité využití lze najít v průmyslu a v analýze znečištěného prostředí. [14]

Široká škála využívání je dána tím, že SERS spektroskopie poskytuje vysokou specifitu kombinovanou s vysokou citlivostí. Ramanovo spektrum poskytuje informace z oblasti otisku palce molekuly, což může být použito pro analytické účely v široké oblasti využití. „Otisk palce“ je velice cenný prvek SERS spektroskopie díky kterému tak poskytuje více specifické informace než běžně používané metody.

Velice specifickou aplikací SERS spektroskopie je detekce jednotlivých molekul (SM-SERS). Největší výzkum a pokrok v SM-SERS oblasti provedli Nie, Kneipp a kol., kteří dosáhli faktoru zesílení až  $10^{14}$ . [20] Detekce jednotlivých je stále objektem intenzivního výzkumu. K tomuto mimořádnému zesílení je klíčový vznik „hot spots“. [21] Vznik těchto míst je spojen a agregací nanočástic. Tímto problémem se zabýval také

Schenk a kol. v jeho práci bylo dokázáno, že přidáním adeninu po skončení tvorby nanočástic dojde k agregaci těchto nanočástic a po 25 minutách nastane maximální zesílení Ramanova signálu. [22] Slibným rozvojem SERS spektroskopie je hrotem zesílená Ramanova spektroskopie (TERS), která se snaží vytvářet „hot spots“ na kontrolovaných místech. [15]

Využití SERS spektroskopie jako biosenzorů je v dnešní době již velice dobře prozkoumáno. Díky této metodě je možné detegovat a identifikovat biomolekuly, u některých z nich lze určit i strukturní uspořádání.

Mezi analýzami životního prostředí se při kontrolách znečištění vody využívá mobilní SERS spektroskopie, pomocí které je možné detegovat i stopové množství nebezpečných látek látek *in situ*. Další možnost využití v tomto odvětví při analýze vod je detekce  $\text{NO}_2^-$  iontů, které svědčí o rozsahu znečištění.

V průmyslu tato metoda hraje důležitou roli například při studiu elektrochemických systémů. Tato technika poskytuje informace o molekulách na rozhraní pevná látka – kapalina a je tak vhodná pro studium koroze. Studují se kovy jako Pb, Ag, Fe, Ni, Co, Cu, Cr, Au a Sn.

Zajímavou úlohu SERS spektroskopie lze nalézt při forenzních analýzách. Díky nedestruktivnosti této metody ji lze použít i při zkoumání uměleckých děl nebo archeologických nálezů. Existuje mnoho dalších možných aplikací SERS spektroskopie, které nemohou být pokryty pomocí klasické Ramanovy spektroskopie. Patří mezi ně ty aplikace, které jsou spojeny s přítomností kovového povrchu. [5, 6, 8, 14, 15]

## 2.4 Disperzní soustavy

Disperzní soustavou označujeme systém, který obsahuje minimálně dvě složky, přičemž je jedna rozptýlená ve druhé ve formě částic. Rozptýlenou složku tvořenou částicemi označujeme jako disperzní podíl a spojitou část disperze soustavy nazýváme disperzní prostředí.



Heterogenní disperzní soustava se vyznačuje dvěma fázemi, kdy je jedna tvořena disperzní fází a druhá fáze je tvořena disperzním prostředím. Lze tak pozorovat fázové rozhraní. Pokud je disperzní soustava tvořena pouze jednou fází, jedná se o homogenní soustavu. Jednofázový systém je na pohled stejnorodý a nelze pozorovat žádné rozhraní. [17, 23]

Jednou z možností, jak dělit disperzní systém, je dělení na základě velikosti částic disperzního podílu. Velikost částic charakterizuje stupeň disperzity, což odpovídá převrácené hodnotě průměrné velikosti částic. Podle rostoucí velikosti dispergovaných částic to jsou analytické disperze, koloidní disperze a hrubé disperze.

Analytickou disperzí se nazývají částice, které jsou menší než  $10^{-9}$  m. Tyto částice jsou tak malé, že je nemůžeme pozorovat ani v elektronovém mikroskopu. Procházejí filtračním papírem i membránami. Disperze obsahující částice větší, než je  $10^{-9}$  m, ale zároveň menší než  $10^{-6}$  m se nazývají koloidní. Lze je pozorovat pomocí ultramikroskopu. Na rozdíl od analytické disperze začínají koloidní částice pomalu sedimentovat a procházejí pouze některými membránami. Soustavy hrubých disperzí obsahují částice větší, než je  $10^{-6}$  m. Pokud jsou dostatečně velké, tak jsou pozorovatelné pouhým lidským okem, jinak lze využít optický mikroskop. Částice hrubé disperze zachytává filtrační papír a velice rychle sedimentují. [23, 24]

Dalším způsobem dělení disperzních systémů je dělení na základě distribuce velikosti částic. Většina disperzních soustav obsahuje částice různé velikosti, jedná se tedy o polydisperzní systém. Opakem jsou monodisperzní systémy, kdy mají částice stejnou velikost nebo pouze velice malé rozmezí jejich velikostí. Korpuskulárně, laminárně a fibrilárně disperzní systémy jsou děleny podle tvaru částic. Korpuskulárně disperzní částice se vyznačují tím, že jsou ve všech směrech přibližně stejně velké. Částice tvaru destiček obsahují laminárně disperzní systémy. Tvary tyčinek nebo vláken se vyskytují ve fibrilárně disperzních systémech. [25]

## 2.4.1 Koloidní disperze

Koloidně disperzní soustava obsahuje částice, které se svou velikostí pohybují v rozmezí  $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  m. Koloidní disperze mají velký význam díky svým fyzikálně chemickým vlastnostem. Čím je částice menší, tím je podíl povrchových molekul ku počtu molekul uvnitř větší. Zde se tedy uplatňují povrchové jevy, jako je adsorpce. [23]

## 2.4.2 Klasifikace a charakteristika koloidních disperzí

Podle skupenství disperzního prostředí a disperzního podílu lze koloidní disperze rozdělit dle tabulky č. 2.

Disperzní prostředí	Disperzní podíl	Koloidní soustavy
plynné	plynný	netvoří koloidy
	kapalný	aerosoly
	pevný	aerosoly
kapalné	plynný	pěny
	kapalný	emulze
	pevný	lyosoly
pevné	plynný	Tuhé pěny
	kapalný	Tuhé emulze
	pevný	Tuhé lyosoly

**Tabulka 2:** Druhy koloidních disperzí.

Podrobnější dělení koloidních systémů je u lyosolů – tedy disperze, kde jsou v kapalném prostředí rozptýleny pevné částice. Lyosoly se dělí do tří skupin:

- 1) Lyofobní disperze jsou nestálé systémy, které mají tendenci shlukovat se a následně sedimentovat. Pokud je disperzní prostředí tvořeno vodou, označují se tyto systémy jako hydrosoly. Disperzní prostředí tvořená organickou látkou se nazývají organosoly.
- 2) Lyofilní systémy jsou stálé roztoky, kde není nutná stabilizace. Nazývají se také koloidní roztoky.
- 3) Asociativní koloidní soustavy vznikají spojováním rozptýlených povrchově aktivních částic. Takto vzniklé útvary se nazývají micely. [18, 24]

### **2.4.3 Kinetické vlastnosti koloidních soustav**

Díky studiu kinetických vlastností koloidních systémů lze určit stupeň disperzity částic. Tyto vlastnosti jsou dány tepelným pohybem

Vlivem tepelného pohybu dochází k nepravidelným nárazům mezi částicemi disperzního podílu a disperzního prostředí. Vzniká tak neuspořádaný pohyb částic, který se nazývá Brownův pohyb. Je tím intenzivnější, čím větší teplota je soustavě dodávána a čím menší jsou částice disperzního podílu.

Projevem Brownova pohybu je difuze. Je to schopnost systému vyrovnávat rozdílné koncentrace dotýkajících se roztoků. K difuzi dochází ve směru z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí o nižší koncentraci. [17, 23]

Vlastnost, při které dochází k vyrovnávání tlaků přes polopropustnou membránu, se nazývá osmóza. Přes membránu mohou proniknout pouze molekuly rozpouštědla. Rozpouštědlo přechází směrem do koncentrovanějšího roztoku, jedná se tedy opačný směr než u difuze. [24]

Koloidní částice o určité hmotnosti se vlivem působení gravitačních sil usazují – nastává sedimentace. K urychlení tohoto děje se využívá centrifug a ultracentrifug. [17]

### **2.4.4 Optické vlastnosti koloidních soustav**

Při kontaktu elektromagnetického záření s koloidním systémem dochází současně k absorpci a rozptylu záření. Díky těmto vlastnostem lze určit přítomnost, velikost a koncentraci dispergovaných částic.

Absorpce záření je spojena s pohlcením kvanta energie elektromagnetického záření o vhodné vlnové délce a následného zvýšení vnitřní energie molekul soustavy. Aby došlo k rozptylu světla (jev, při kterém je přijatá energie vyzářena do všech směrů beze změny vlnové délky), je nutné, aby vlnová délka dopadajícího elektromagnetického záření byla větší, než velikost dispergovaných částic soustavy. [17, 23]

### **2.4.5 Elektrické vlastnosti koloidních soustav**

Kvůli elektrickému náboji na povrchu koloidních částic nastane při vložení elektrického pole na koloidní soustavu v tomto systému pohyb. Pokud je na elektrody ponořené v koloidním roztoku přiveden elektrický proud, nastane jev, který se nazývá elektroforéza. Jde o pohyb nabitých částic. Obdobným jevem je elektroosmóza, zde se však jedná o pohyb disperzního prostředí. Souhrnně tyto jevy nazýváme elektrokinetické. Své uplatnění nacházejí v analytické chemii nebo například při odvodňování pórovitých materiálů. [17, 26]

### 3. Experimentální část

#### 3.1 Instrumentace

##### 3.1.1 Ramanův spektrometr

K analýze vzorků byl použit Thermo Scientific DXR Raman microscope. Tento spektrometr využívá excitační lasery o vlnových délkách 532 nm, 633 nm a 780 nm. Rozsah možného měření je od  $3500\text{ cm}^{-1}$  do  $50\text{ cm}^{-1}$  pro lasery o vlnových délkách 532 a 633 nm. Pro laser o vlnové délce 780 nm je rozsah od  $3300 - 50\text{ cm}^{-1}$ . Poměr signál šum je pro laser 532 nm 3000:1, pro laser 633 nm je poměr 900:1 a pro laser 780 nm 750:1. Maximální výkony jsou pro jednotlivé lasery 10 mW, 8mW a 24 mW. Pomocí tohoto spektroskopu lze měřit pevné i kapalně vzorky.

Expozice byly nastaveny na 32 snímků, přičemž se jedna expozice načítala jednu vteřinu. U laserů o vlnových délkách 532 nm a 633 nm byl výkon snížen na 2 mW z důvodu ztráty signálu. U laseru s vlnovou délkou 780 nm byl ponechán maximální výkon, tedy 24 mW. Veškeré nastavení a kalibrace se provádělo pomocí softwaru OMNIC verze 8 (Nicolet, U.S.A.).



**Obr. 5:** Thermo Scientific DXR Raman Microscope. Převzato z [27].

### 3.1.2 Elektronový mikroskop (SEM)

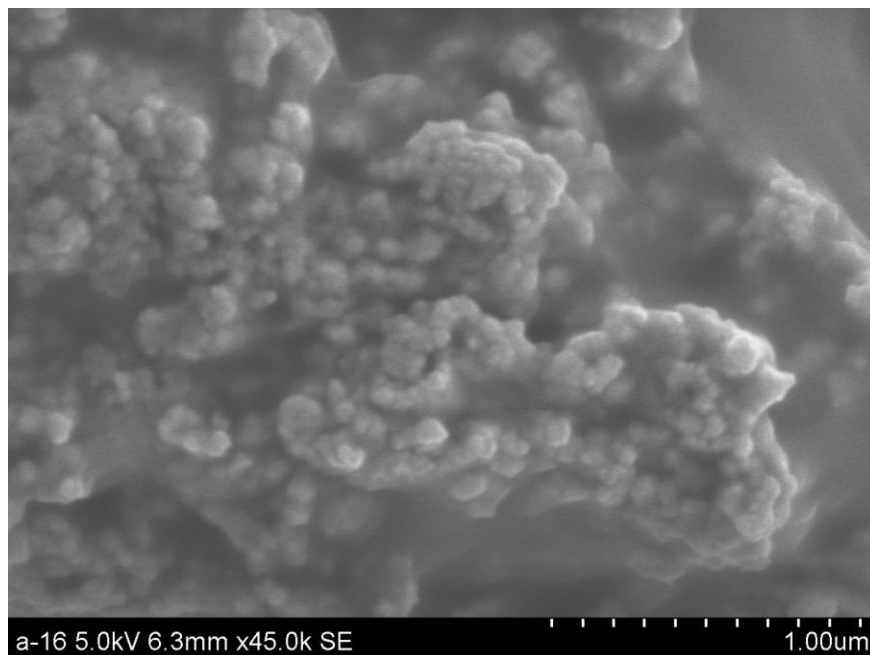
Ke kontrole připravených vrstev byl použit elektronový mikroskop Hitachi SU 6600. Jako zdroje elektronů využívá „ZrO/W Schottky emission electron source“. Tento mikroskop dosahuje rozlišení 1,2 nm při napětí 30 kV a 3 nm při 1 kV. Zvětšení dosahuje  $10\times - 600\,000\times$ .

### 3.2 Příprava stříbrné vrstvy

Přípravy stříbrných vrstev probíhaly podle způsobu, který zavedl Gedanken. [28]

1. Sklíčko bylo vloženo do ultrazvukové baňky s 0,05 molárním roztokem  $\text{AgNO}_3$  rozpuštěného v roztoku voda – etylenglykol.
2. Reakční směs byla půl hodiny přečišťována pomocí argonu, aby se odstranily stopy vzduchu. Následně byla baňka hodinu ozařována ultrazvukem.
3. Během prvních třech minut ozařování byl do reakční směsi přidán vodný roztok 24%  $\text{NH}_3$  ( $\text{NH}_3:\text{AgNO}_3 = 2:1$ ). Množství amoniaku bylo vypočteno pro plné utvoření komplexu  $[\text{AgNO}(\text{NH}_3)_2]^+$ .
4. Obdržený produkt byl promyt vodou, aby se odstranily stopy amoniaku a následně byl promyt etanolem.
5. Kvůli stabilizaci nanostříbra v disperzním stavu byl ke směsi přidán polyvinylpyrrolidon o koncentraci  $3\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Metoda byla následně modifikována přidáním  $1\cdot 10^{-2}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  8-aminooktanové kyseliny a hexylaminu v poměru 1:3. Po promytí byla směs aktivována pomocí  $5\cdot 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NHS a EDC. Nakonec bylo přidáno  $1\cdot 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  avidinu. Jednotlivé kroky modifikace probíhaly v hodinových intervalech.



**Obr 6:** SEM snímek stříbrné vrstvy.

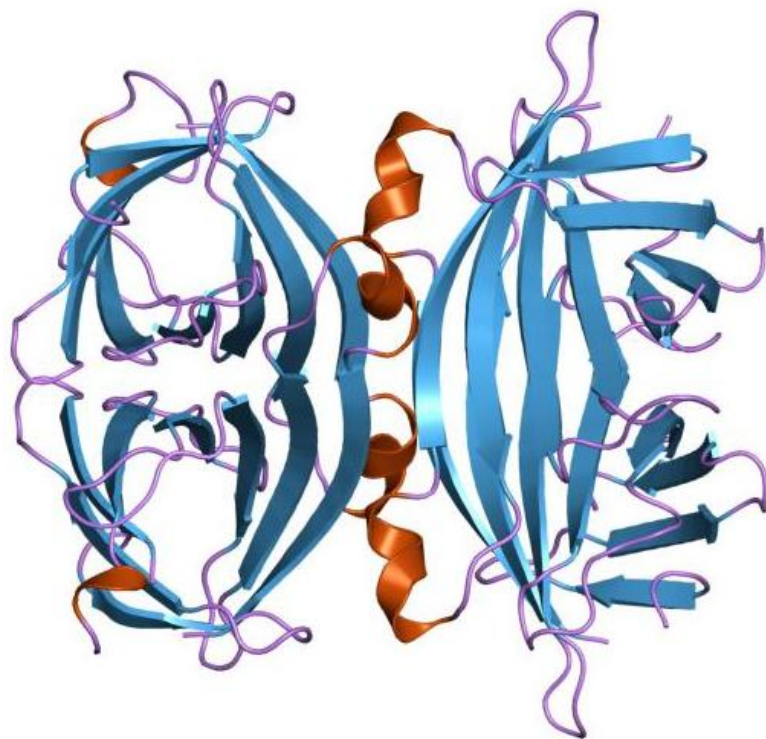
### 3.3 Zpracování spekter

Zpracování spekter bylo určeno dvěma způsoby: normalizací spekter a zavedením referenčního píku.

1. Normalizace – odečtením spektra čisté vrstvy od spektra avidinu došlo k odstranění spektrálního šumu.
2. Zavedení reference – byl vybrán spektrální pás  $373\text{ cm}^{-1}$ , který slouží jako srovnávací bod pro porovnání intenzit cílených spektrálních pásů, zejména Amidu I, II a III. Tento pás značí vazbu mezi linkerem a stříbrnou vrstvou. Z principu by tedy neměla jeho intenzita záviset na koncentraci přidaného avidinu.

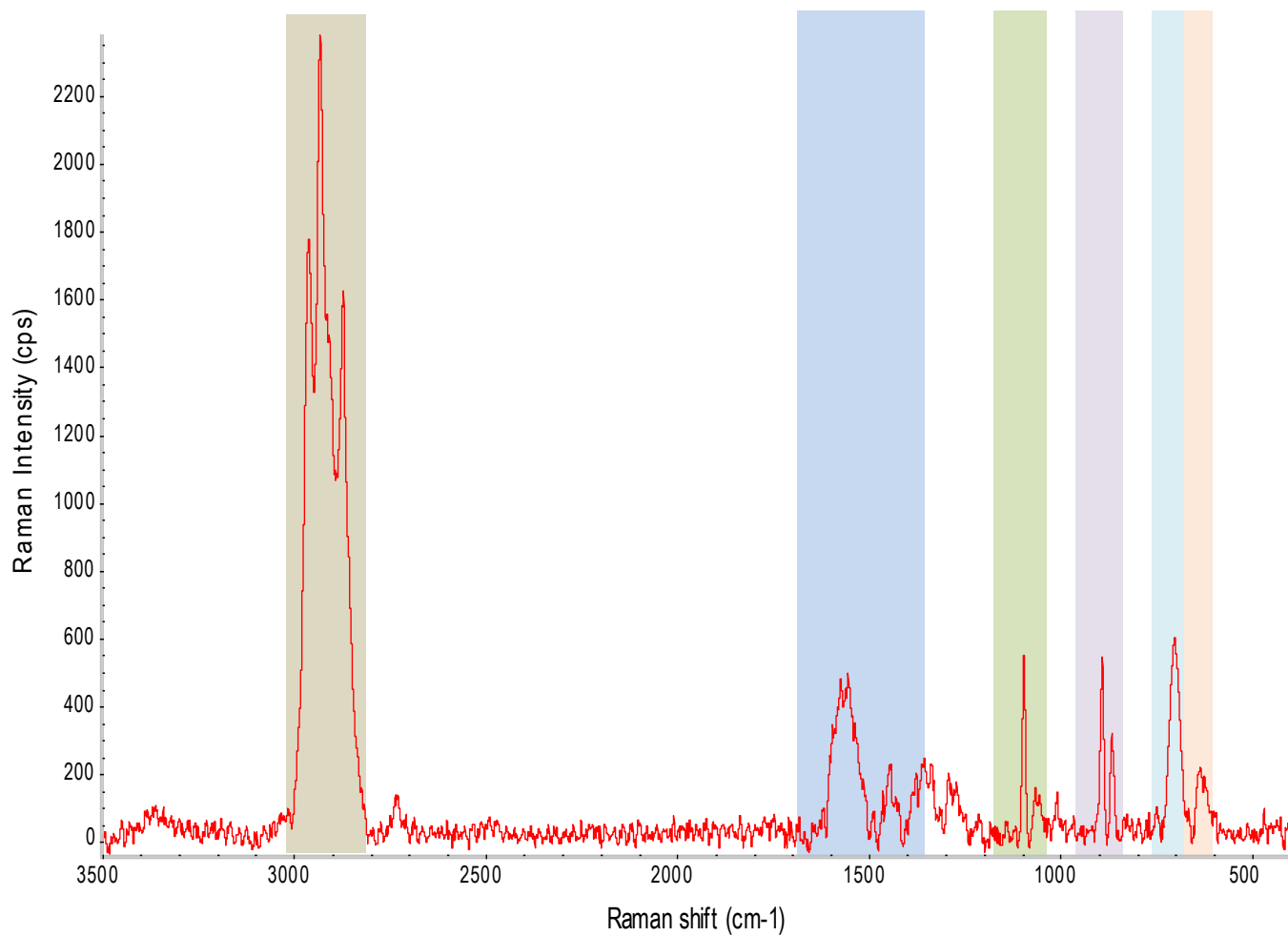
### 3.4 Výsledky a diskuze

Pomocí metody SERS byly zkoumány připravené stříbrné vrstvy s navázaným avidinem o různých koncentracích za účelem připravení vrstvy s co možná nejlepšími vlastnostmi pro následné vázání dalších klíčových proteinů.



**Obr 7:** Znáznornění struktury avidinu. Převzato z [29].





**Obr. 8:** Zobrazení Ramanského spektra stříbrné vrstvy s navázaným avidinem a barevně vyznačenými spektrálními pásy za účelem jejich popisu.

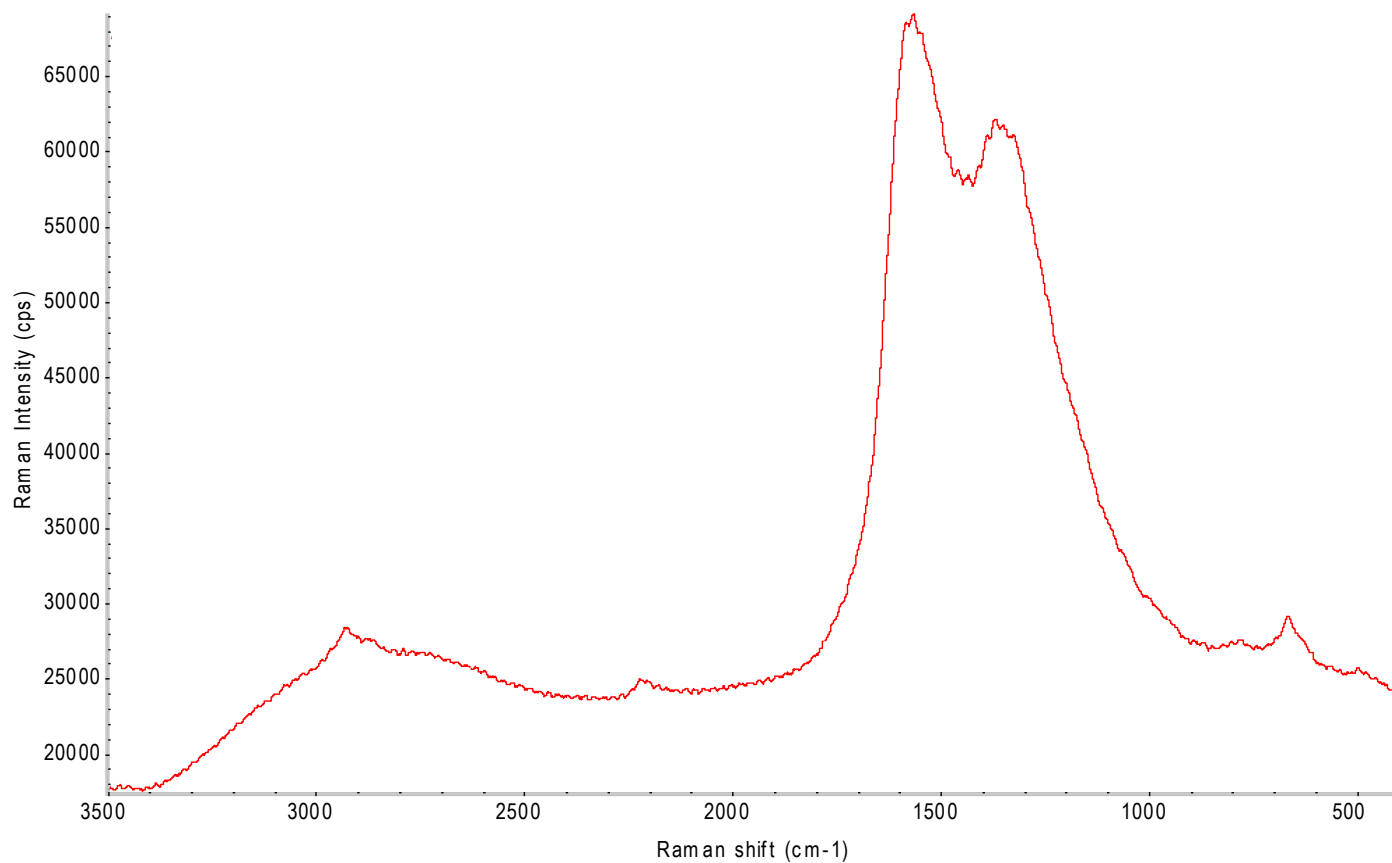
	Funkční skupina	Udávaný vlnoččet	Skutečný vlnoččet
1	-CH <sub>2</sub> - -CH <sub>3</sub> skupina pásů značí navázání linkerů	2955 – 2915 2995 – 2940 2880 – 2830	2931 2962 2872
2	Proteinové pásy Amidu I, II, III, značí úspěšné navázání avidinu	1650 – 1350	1555 1447 1354
3	-COOH	1190 – 1075	1097
4	R-OH	900 – 800	893 865
5	-NH-	750 – 700	704
6	-NH-CO-	770 – 620	640

**Tabulka 3:** Tabulka popisující píky spektra z obrázku č. 8. Jsou zde uvedeny funkční skupiny, které píky zobrazují a jim odpovídající vlnočty jak běžně udávané, tak skutečně naměřené.

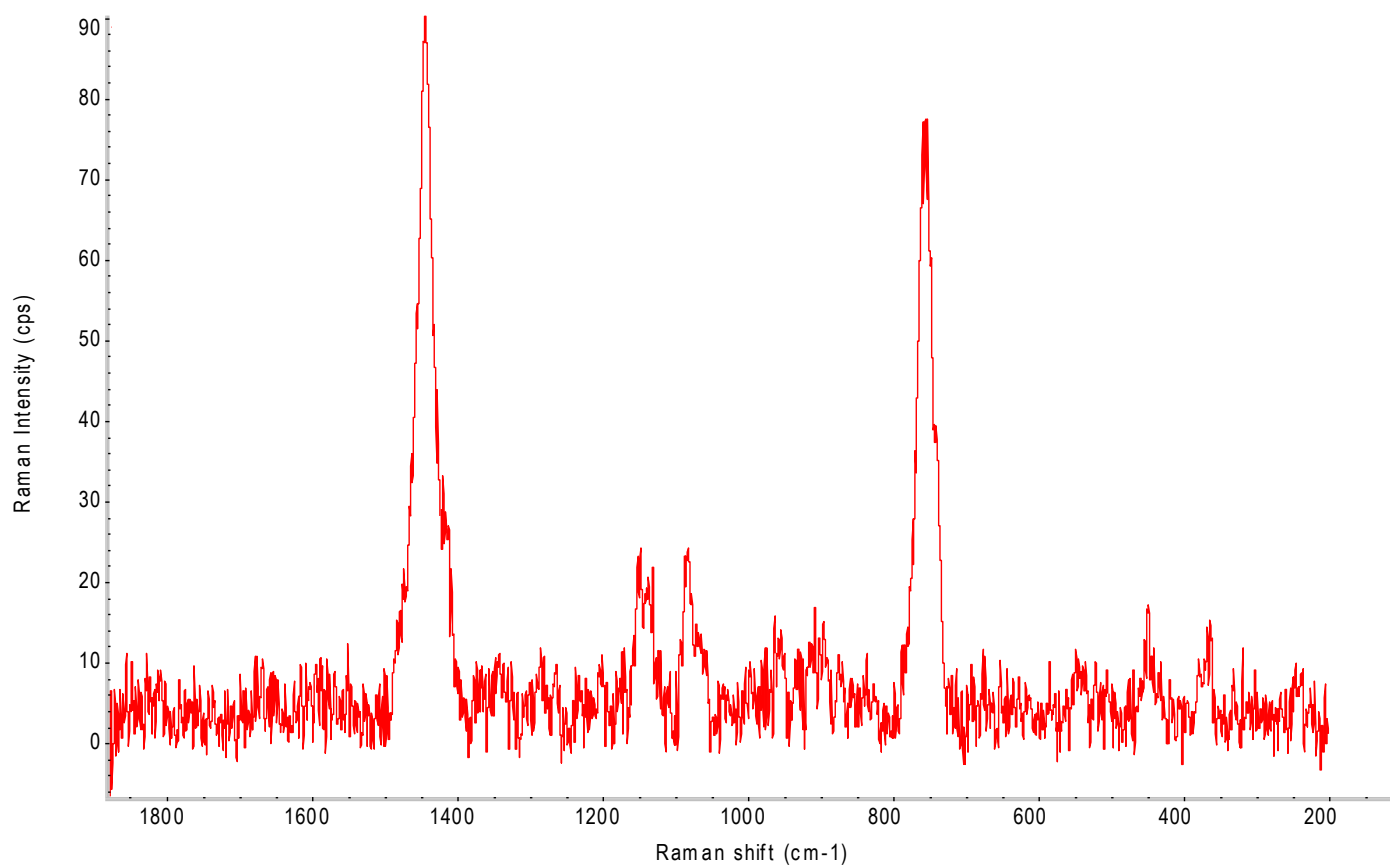
K analýze stříbrných vrstev byly použity lasery o třech různých vlnových délkách. Laser s vlnovou délkou 532 nm dokáže poskytnout největší výkon zaměřený na vzorek, ale v důsledku toho se u biologických vzorků může vyskytnout nežádoucí fluorescence. Naopak u laseru s vlnovou délkou 780 nm je efekt fluorescence minimalizován, ovšem za cenu nejnižšího výkonu. Laser o vlnové délce 633 nm je možné považovat za střední cestu mezi výkonem a výskytem fluorescence.

Při měření vrstev s využitím laseru s vlnovou délkou 532 nm byl výkon postupně snižován z 10 mW na 2 mW, kde byl získán stabilní signál. Ke ztrátám signálu docházelo z důvodu poškození připravené vrstvy vlivem laseru. Obdobný jev nastal při využívání laseru o vlnové délce 633 nm, kde se výkon musel snížit také na 2 mW. Při použití laseru s vlnovou délkou 780 nm bylo možné využít maximální výkon použitého laseru, tedy 24 mW.

Jako první laser k měření vrstev byl použit laser s vlnovou délkou 532 nm. Ramanovo spektrum čisté stříbrné vrstvy je zobrazeno na obrázku 9. Na následujícím obrázku číslo 10 je zobrazena totožná stříbrná vrstva s již navázaným avidinem.



**Obr. 9:** Spektrum čisté stříbrné vrstvy změřené pomocí laseru s excitační vlnovou délkou 532 nm.

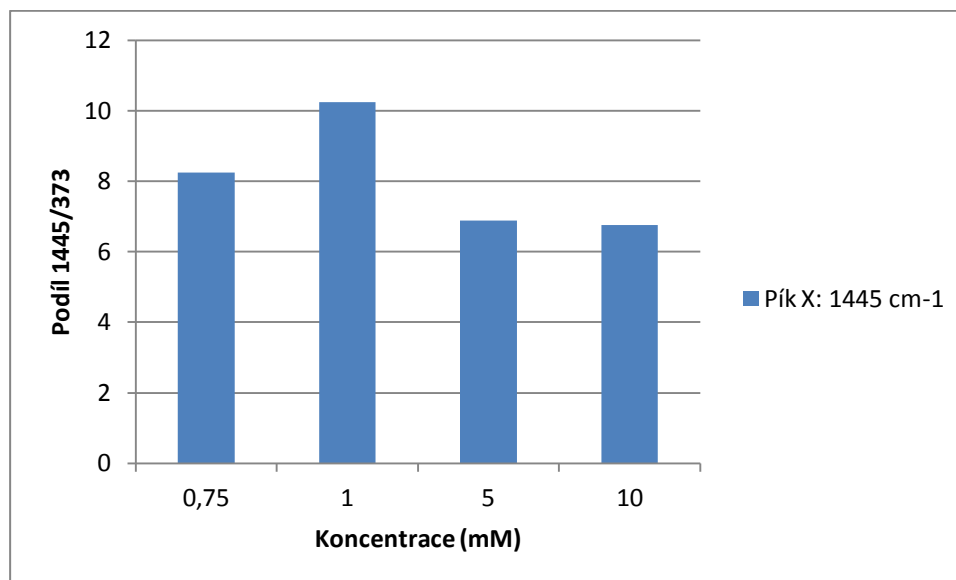


**Obr 10:** Spektrum stříbrné vrstvy s navázaným avidinem změřené pomocí laseru s excitační vlnovou délkou 532 nm.

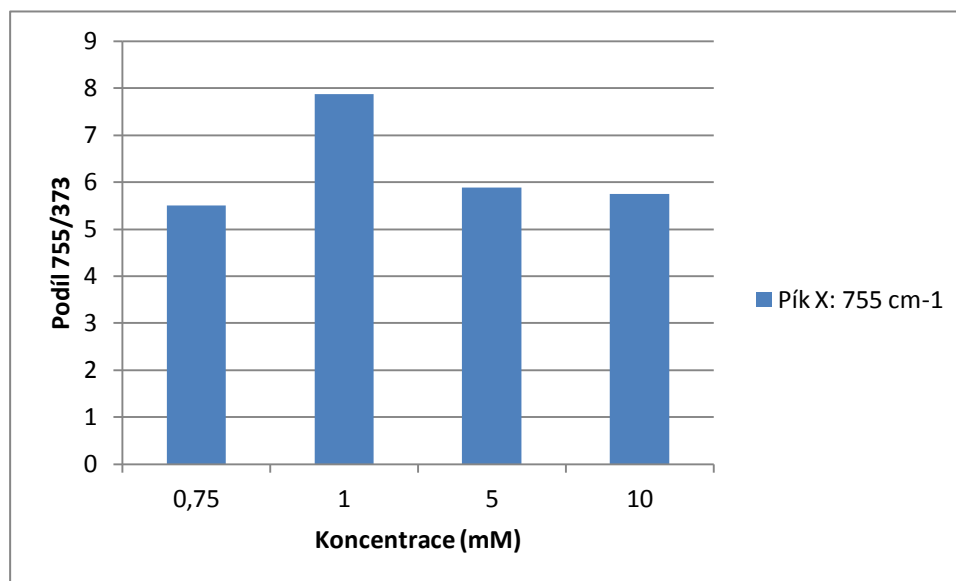
Na spektru s avidinem je nejintenzivnější pík s vlnočtem  $1445\text{ cm}^{-1}$  a intenzitou 91 cps. Pás značí úspěšné navázání proteinu na stříbrnou vrstvu. Druhý, velice intenzivní pík má vlnočet  $755\text{ cm}^{-1}$  a intenzitu 71 cps. Tento pás signalizuje sekundární amid. Další dobře pozorovatelné pásy kolem vlnočtu  $1100\text{ cm}^{-1}$  značí karboxylové skupiny. Pás z oblasti  $448\text{ cm}^{-1}$  vznikl díky přítomnosti aromatických uhlovodíků. Průměrná hodnota pěti nejintenzivnějších pásů ( $1445, 1150, 1085, 755$  a  $448\text{ cm}^{-1}$ ) je 44 cps.

K analýze byly připraveny čtyři různé koncentrace avidinu. Účelem bylo zjistit, která koncentrace bude poskytovat nejlepší signál. Navázání avidinu o koncentraci  $0,75\text{ mM}$  na stříbrnou vrstvu nebylo dostatečné. Při zvýšení koncentrace na  $1\text{ mM}$  došlo

k nárůstu signálu navázaného proteinu. Během dalšího zvyšování koncentrace avidinu již k žádnému růstu signálu nedošlo.



**Graf 1:** Graf znázorňující podíl píku ( $1445\text{ cm}^{-1}$ ) avidinu o různých koncentracích a referenčního píku s vlnočtem  $373\text{ cm}^{-1}$  za použití laseru s excitační vlnovou délkou  $532\text{ nm}$ .

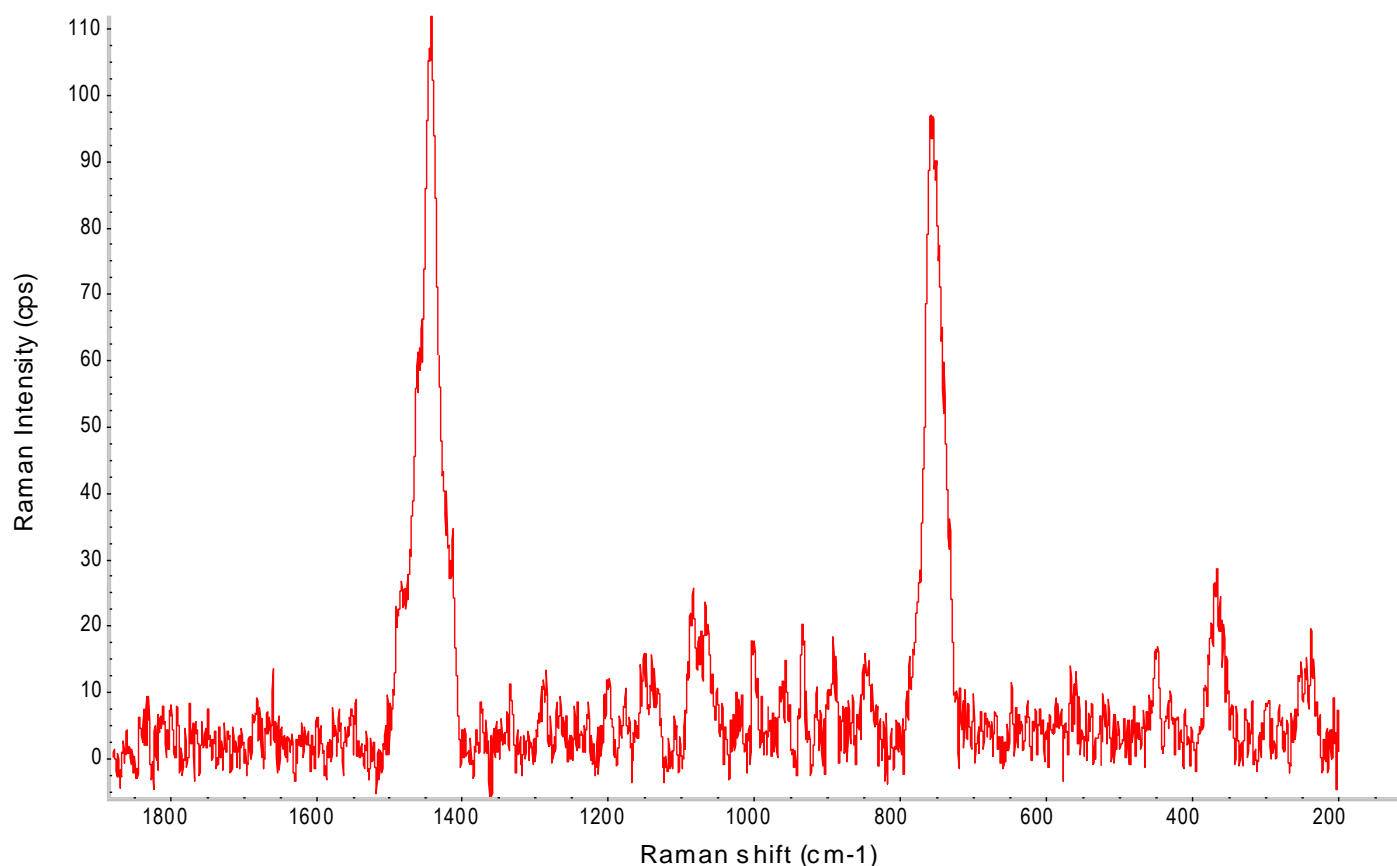


**Graf 2:** Graf znázorňující podíl píku ( $755\text{ cm}^{-1}$ ) avidinu o různých koncentracích a referenčního píku s vlnočtem  $373\text{ cm}^{-1}$  za použití laseru s excitační vlnovou délkou  $532\text{ nm}$ .

Pásky z grafů o vlnočtech  $1445\text{ cm}^{-1}$  a  $755\text{ cm}^{-1}$  byly vybrány k proměření z důvodu, že signalizují navázání avidinu. Dalším důvodem je, že jsou velice intenzivní při použití všech tří laserů, se kterými se pracovalo.

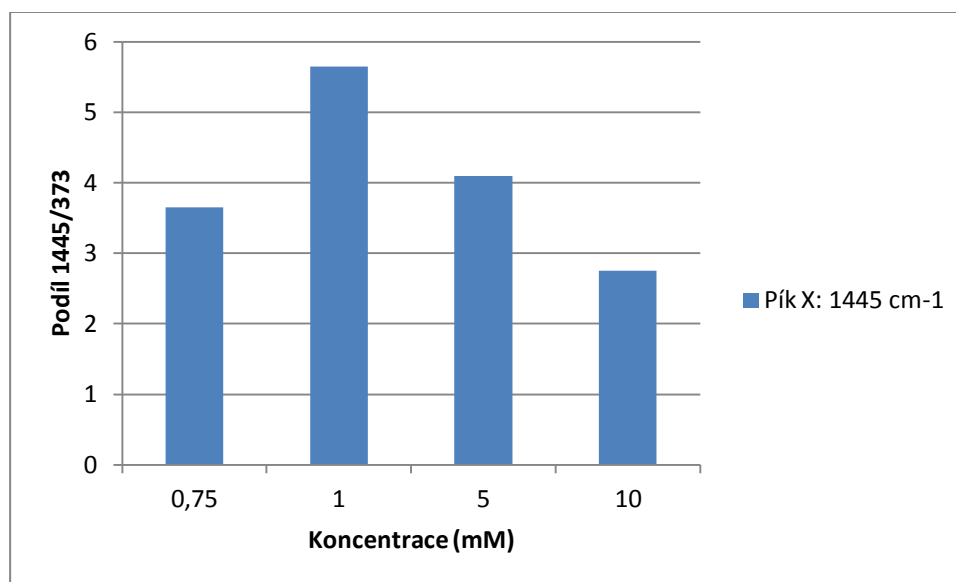
Z podílů pásků  $1445\text{ cm}^{-1}$  a  $755\text{ cm}^{-1}$  s referenčním pásem o vlnočtu  $373\text{ cm}^{-1}$  byla odvozena volba koncentrace  $1\text{ mM}$  avidinu jako nejvhodnějšího. Podíl pásků avidinu o koncentraci  $1\text{ mM}$  s referenčním pásem je nejvyšší, tím pádem lze říci, že intenzita pásků s vlnočtem  $1445\text{ cm}^{-1}$  a  $755\text{ cm}^{-1}$  je také nejvyšší.

Další laser použitý k proměření stříbrných vrstev byl laser s excitační vlnovou délkou  $633\text{ nm}$ .

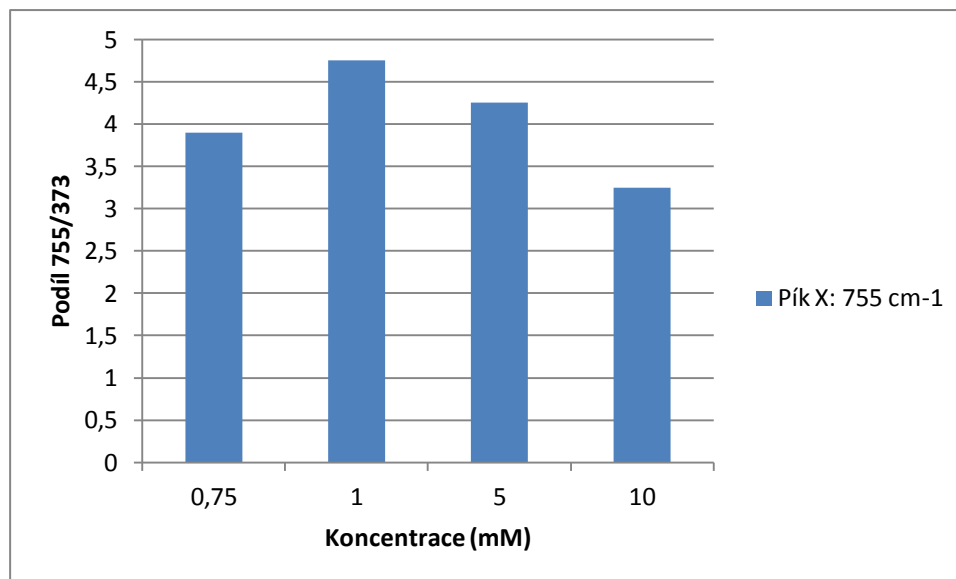


**Obr 11:** Spektrum stříbrné vrstvy s navázaným avidinem změřené pomocí laseru s excitační vlnovou délkou  $633\text{ nm}$ .

Ramanovské spektrum na obrázku 11 zobrazuje stříbrnou vrstvu s navázaným avidinem o koncentraci 1 mM. Lze pozorovat nárůst intenzity nejintenzivnějšího píku oproti spektru změřeném laserem s vlnovou délkou 532 nm. Pás má shodný vlnčet (1445  $\text{cm}^{-1}$ ) ale intenzita stoupla z 91 cps na 105 cps. U pásu značící sekundární amid s vlnčetem 755  $\text{cm}^{-1}$  je také možné pozorovat nárůst intenzity signálu na 95 cps. Další intenzivnější pásy pozorovatelné na pásu signalizují karboxylovou skupinu a aromatické uhlovodíky. Průměrná hodnota pěti nejintenzivnějších pásů (1445, 1084, 1067, 755 a 373  $\text{cm}^{-1}$ ) vzrostla na 54 cps.



**Graf 3:** Graf znázorňující podíl píku ( $1445 \text{ cm}^{-1}$ ) avidinu o různých koncentracích a referenčního píku s vlnčetem  $373 \text{ cm}^{-1}$  za použití laseru s excitační vlnovou délkou 633 nm.

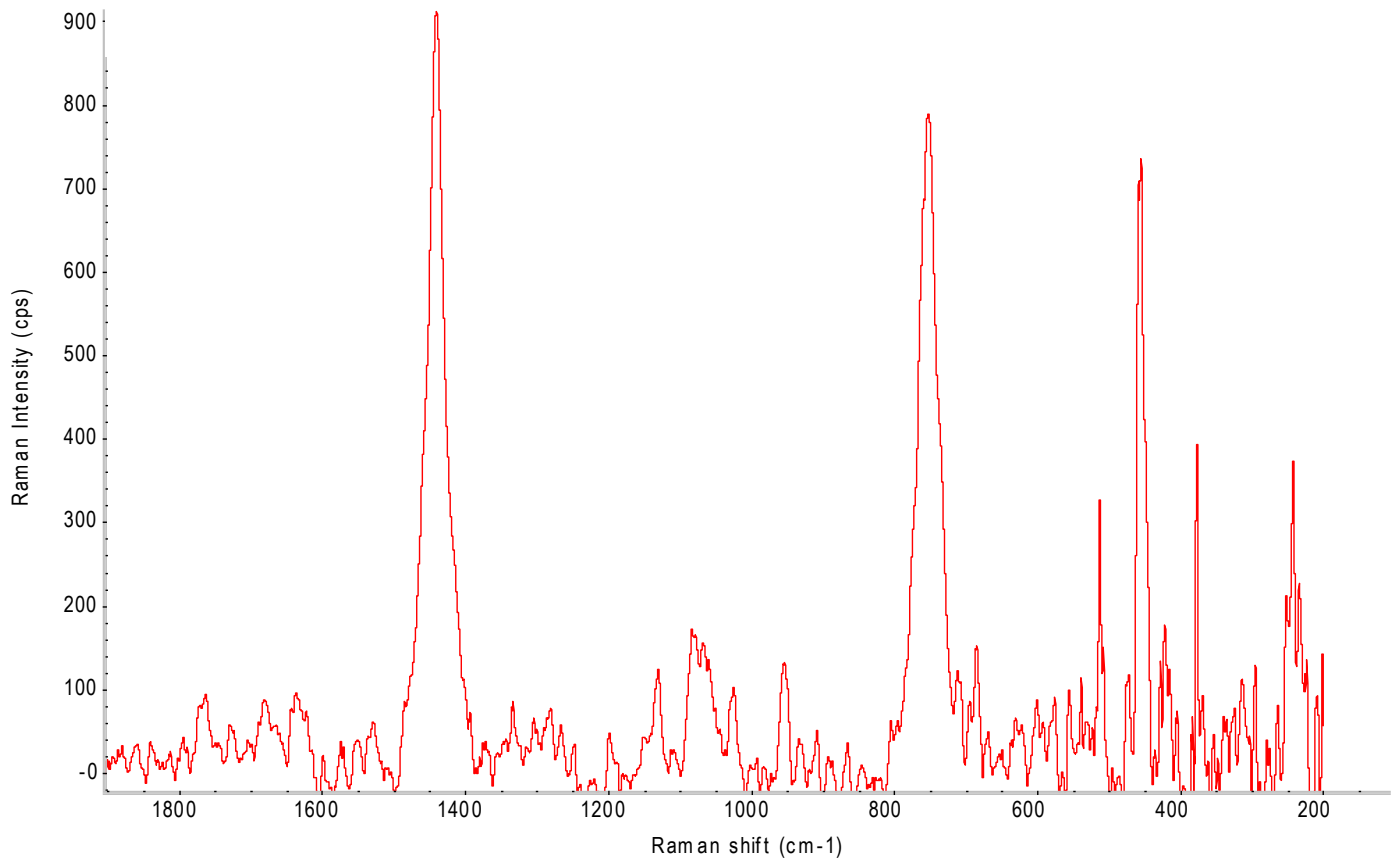


**Graf 4:** Graf znázorňující podíl píku ( $755\text{ cm}^{-1}$ ) avidinu o různých koncentracích a referenčního píku s vlnočtem  $373\text{ cm}^{-1}$  za použití laseru s excitační vlnovou délkou 633 nm.

Při použití laseru s vlnovou délkou 633 nm došlo opět při zvýšení koncentrace avidinu ze 0,75 mM na 1 mM k růstu intenzity signálu. Při dalším zvýšení koncentrace proteinu nedošlo k jeho většímu navázání na stříbrnou vrstvu. Volba 1mM avidinu jako nejvhodnější koncentrace byla tedy potvrzena i pro tento laser.

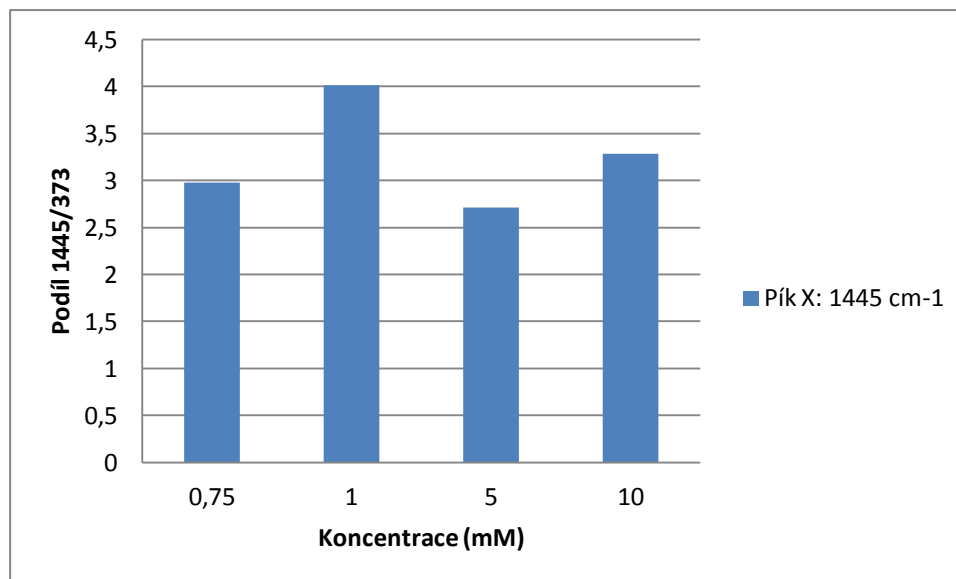
Jako poslední byl k analýze vrstev použit laser s excitační vlnovou délkou 780 nm.



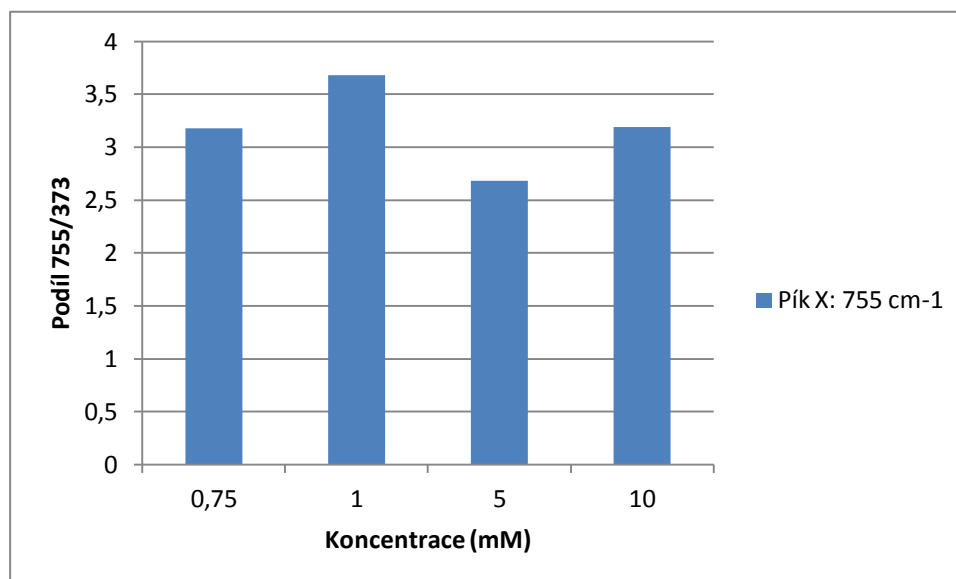


**Obr 12:** Spektrum stříbrné vrstvy s navázaným avidinem změřené pomocí laseru s excitační vlnovou délkou 780 nm.

Spektrum na obrázku 12 změřené pomocí laseru s vlnovou délkou 780 nm vykazuje několikanásobné zvětšení intenzity signálu. Intenzita nejintenzivnějšího pásu opět s vlnočtem 1445 cm<sup>-1</sup> vzrostla na 912 cps, přitom u laseru s vlnovou délkou 532 nm byla intenzita 91 cps. Intenzita druhého nejintenzivnějšího píku s vlnočtem shodným pro všechny tři pásy (755 cm<sup>-1</sup>) vzrostla na 787 cps. Třetí nejintenzivnější pás signalizující přítomnost aromatických uhlovodíků odpovídá vlnočtu 453 cm<sup>-1</sup> a má intenzitu 708 cps. Průměrná hodnota pěti nejintenzivnějších pásů (1443,754, 453, 373 a 244 cm<sup>-1</sup>) je 653 cps.



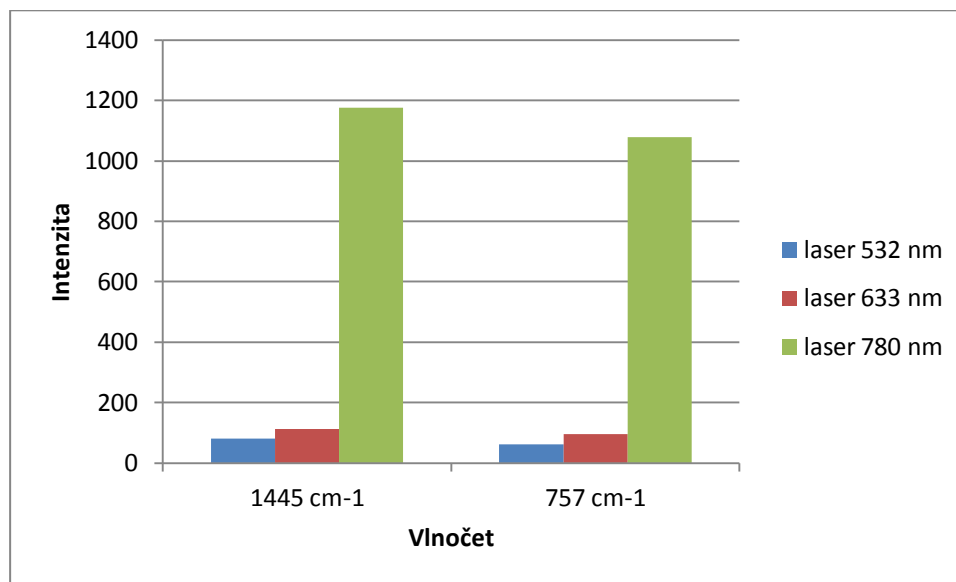
**Graf 5:** Graf znázorňující podíl píku ( $1445\text{ cm}^{-1}$ ) avidinu o různých koncentracích a referenčního píku s vlnočtem  $373\text{ cm}^{-1}$  za použití laseru s excitační vlnovou délkou  $780\text{ nm}$ .



**Graf 6:** Graf znázorňující podíl píku ( $755\text{ cm}^{-1}$ ) avidinu o různých koncentracích a referenčního píku s vlnočtem  $373\text{ cm}^{-1}$  za použití laseru s excitační vlnovou délkou  $780\text{ nm}$ .

Z grafů číslo 5 a 6 lze vyčíst, že k nejvyšší intenzitě signálu došlo opět za koncentrace avidinu  $1\text{ mM}$ . Nižší i vyšší koncentrace vykazovaly nižší signál. Lze tedy říci,

že avidin o koncentraci 1 mM se váže na stříbrnou vrstvu nejlépe. Tato skutečnost byla potvrzena třemi lasery s různými excitačními vlnovými délkami.



**Graf 7:** Graf znázorňující relativní intenzity signálů tří různých laserů.

Pro lepší přehlednost při porovnávání laserů byl utvořen graf číslo 7. Graf zobrazuje relativní intenzity signálů pásů s vlnověť 1445 cm<sup>-1</sup> a 757 cm<sup>-1</sup> při použití tří různých laserů. Je patrné, že volba laseru s excitační vlnovou délkou 780 nm je nejvýhodnější, neboť poskytovaný signál je zhruba desetkrát větší než za použití zbylých dvou laserů.

## 4. Závěr

Práce se zabývala studiem stříbrných vrstev na skleněném substrátu pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS) za účelem selektivní detekce fyziologicky aktivních látek. S tímto záměrem byly zkoumány stříbrné vrstvy s imobilizovaným avidinem. Cílem bylo zjistit nejvhodnější koncentraci navázaného proteinu, která bude poskytovat nejlepší signál. Dalším předmětem zkoumání bylo zajistit nejvhodnější parametry nastavení pro SERS spektroskop.

Hlavním zájmem bylo najít nejvhodnější koncentraci avidinu, která zajistí co největší jeho možné navázání. Aby bylo pokrytí vrstvy avidinem co nejefektivnější, bylo zajištěno několik předchozích modifikací vrstvy. Z připravených koncentrací avidinu (0,75; 1; 5 a 10 mM) byla jako nejvhodnější určena koncentrace 1 mM. S touto koncentrací bylo dosaženo maximálního Ramanova signálu. Při nižší i vyšší koncentraci avidinu nebylo dosaženo tak výrazného pokrytí stříbrné vrstvy.

Během snímání jednotlivých expozic bylo zjištěno, že dochází ke ztrátám signálu. Postupným snižováním výkonu laseru byl získán stabilní signál a zjištěno optimální nastavení SERS spektroskopu pro další měření, kterými se zabývala tato práce.

Experimentálně byla zjištěna nejvhodnější koncentrace avidinu k maximálnímu navázání na stříbrnou vrstvu. Takto imobilizovaný avidin má při dalších modifikacích vrstvy široké spektrum aplikací.

## 5. Summary

The aim of this thesis was to study silver films on glass substrate by the means of surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) in order to selectively detect physiologically active substances. Silver films with immobilised avidin were examined for this purpose. The goal was to find the optimal concentration of the protein that would provide the best signal possible. The secondary goal was to reach the optimal settings of an SERS spectroscope used for this purpose.

The primary goal was to find the optimal concentration of avidin at which it would bind with the silver film the most. Several modifications of the layer were made in order to make the avidin coverage as effective as possible. Of the prepared avidin solution concentrations (0.75; 1; 5 and 10 mM) the solution with concentration of 1mM has shown the best results. The Raman signal would reach its maximum at this concentration. Both lower and higher concentrations of avidin resulted in worse coverage of the silver film.

Signal losses were detected during the expositions. A stable signal was achieved by gradual lowering of the laser wattage. Also the optimal settings for the SERS spectroscope, necessary for further measurements, was reached.

The optimal concentration of avidin for the purpose of its maximal possible binding to the silver film was arrived at experimentally. This immobilised avidin has a wide range of applications if further modifications to its layer are made.

## 6. Literatura

- [1] MILATA, Viktor. *Aplikovaná molekulová spektroskopie*. Bratislava: Státní technická universita, 2008, 600 s. ISBN 978-802-2729-604.
- [2] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [3] NĚMCOVÁ, Irena. *Spektrometrické analytické metody I*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 166 s. ISBN 80-246-0776-X.
- [4] MCCREERY, Richard L. *Raman spectroscopy for chemical analysis*. 2. vyd. New York: John Wiley, c2000, xxiv, 420 p. ISBN 04-712-5287-5.
- [5] FERRARO, John R, Kazuo NAKAMOTO a Chris W BROWN. *Introductory Raman spectroscopy*. 2nd ed. Boston: Academic Press, c2003, xiii, 434 p. ISBN 01-225-4105-7.
- [6] SMITH, Ewen, Geoffrey DENT a Chris W BROWN. *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. 2nd ed. Hoboken, NJ: J. Wiley, c2005, x, 210 p. ISBN 04-714-9794-0.
- [7] MALOŇ, Petr a Jaroslav PODLAHA. *Fyzikálně-chemické metody*. Praha: Akademie věd České republiky, 1999. ISBN 80-902-1309-X.
- [8] LARKIN, Peter. *Infrared and raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. Boston: Elsevier, c2011, x, 288 s. ISBN 978-012-3869-845.
- [9] SASIC, Slobodan. *Pharmaceutical applications of Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2008, xiv, 264 p., [4] p. of plates. ISBN 08-138-1013-2.
- [10] LE RU, Eric C a Pablo G ETCHEGOIN. *Principles of surface-enhanced Raman spectroscopy and related plasmonic effects: principles and spectral interpretation*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2009, xxiii, 663 s. ISBN 978-0-444-52779-0.

- [11] FLEISCHMANN, M., P.J. HENDRA a A.J. MCQUILLAN. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*. 1974, vol. 26, issue 2, s. 163-166. DOI: 10.1016/0009-2614(74)85388-1.
- [12] JEANMAIRE, David L. a Richard P. VAN DUYNÉ. Surface raman spectroelectrochemistry. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1977, vol. 84, issue 1, s. 1-20. DOI: 10.1016/S0022-0728(77)80224-6.
- [13] ALBRECHT, M. Grant a J. Alan CREIGHTON. Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. *Journal of the American Chemical Society*. 1977, vol. 99, issue 15, s. 5215-5217. DOI: 10.1021/ja00457a071.
- [14] SCHLÜCKER, Sebastian, Martin MOSKOVITS a Harald KNEIPP. *Surface enhanced Raman spectroscopy: analytical, biophysical and life science applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, c2011, xxii, 331 p. ISBN 978-352-7633-067.
- [15] KNEIPP, Katrin, Martin MOSKOVITS a Harald KNEIPP. *Surface-enhanced raman scattering: physics and applications*. New York: Springer, c2006, xvii, 464 p. ISBN 978-354-0335-665.
- [16] LEOPOLD, Nicolae a Bernhard LENDL. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2003, vol. 107, issue 24, s. 5723-5727. DOI: 10.1021/jp027460u.
- [17] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007, 70 s. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [18] JIA, Huiying, Jiangbo ZENG, Wei SONG, Jing AN a Bing ZHAO. Preparation of silver nanoparticles by photo-reduction for surface-enhanced Raman scattering. *Thin Solid Films*. 2006, vol. 496, issue 2, s. 281-287. DOI: 10.1016/j.tsf.2005.08.359.

- [19] HAJDUKOVÁ, Natália, Marek PROCHÁZKA, Josef ŠTĚPÁNEK a Milena ŠPÍRKOVÁ. Chemically reduced and laser-ablated gold nanoparticles immobilized to silanized glass plates: Preparation, characterization and SERS spectral testing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2007, vol. 301, 1-3, s. 264-270. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2006.12.065.
- [20] KNEIPP, Katrin, Yang WANG, Harald KNEIPP, Lev PERELMAN, Irving ITZKAN, Ramachandra DASARI a Michael FELD. Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS): Preparation, characterization and SERS spectral testing. *Physical Review Letters*. 1997, vol. 78, issue 9, s. 1667-1670. DOI: 10.1103/PhysRevLett.78.1667.
- [21] KUMAR, Challa. *Raman spectroscopy for nanomaterials characterization*. New York: Springer, 2012, p. cm. ISBN 978-364-2206-207.
- [22] SCHENK, Jonas, Lisa TRÖBS, Franziska EMMERLING, Janina KNEIPP, Ulrich PANNE a Merwe ALBRECHT. *Analytical Methods*. 2012, vol. 4, issue 5, s. 1252-. DOI: 10.1039/c2ay05744a.
- [23] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, 244 s. ISBN 80-708-0579-X.
- [24] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, 205 s. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [25] KOMERS, Karel. *Základy koloidní chemie*. 1. vyd. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1996, 64 s. ISBN 80-719-4045-3.
- [26] VOJUCKUJ, Sergej S. *Kurs koloidní chemie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1984, 396 s.
- [27] <http://www.thermoscientific.com/content/tfs/en/product/dxr-raman-microscope.html>



[28] PERKAS, Nina, Galina AMIRIAN, Guy APPLEROT, Eldar EFENDIEV, Yuri KAGANOVSKII, Anil Vithal GHULE, Bo-Jung CHEN, Yong-Chien LING a Aharon GEDANKEN. Depositing silver nanoparticles on/in a glass slide by the sonochemical method. *Nanotechnology*. 2008-10-22, vol. 19, issue 43, s. 435604-. DOI: 10.1088/0957-4484/19/43/435604.

[29] <http://en.wikipedia.org/wiki/Avidin>