



Univerzita Palackého
v Olomouci

Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální chemie

Detekce grafen oxidu v buňkách HeLa pomocí Ramanovy
spektroskopie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:	Tereza Závodná
Studijní obor:	Aplikovaná chemie
Vedoucí práce:	Mgr. Zuzana Chaloupková, Ph.D.

Bibliografická identifikace

Autor:	Tereza Závodná
Název práce:	Detekce grafen oxidu v buňkách HeLa pomocí Ramanovy spektroskopie
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	Mgr. Zuzana Chaloupková, Ph.D.
Konzultant:	Doc. RNDr. Václav Ranc, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2020

Abstrakt:

Cílem této práce je studium průniku grafen oxidu do nádorových buněk rakoviny děložního čípku pomocí Ramanovy spektroskopie. Použita byla metoda Ramanovy mikroskopie a mapování na vzorcích buněk inkubovaných s různými koncentracemi grafen oxidu. Stejnou metodou byla také sledována stabilita vybraného vzorku buněk s grafen oxidem v průběhu několika měsíců. V buňkách byly úspěšně detekovány částice grafen oxidu při všech měřených koncentracích.

Klíčová slova:	Ramanova spektroskopie; grafen oxid; HeLa buňky; mapování
Počet stran:	55
Počet příloh:	6
Jazyk:	Český

Bibliographic identification

Author:	Tereza Závodná
Title:	Detection of graphene oxide in HeLa cells using Raman spectroscopy
Thesis type:	Bachelor's thesis
Department:	Department of Physical Chemistry
Supervisor:	Mgr. Zuzana Chaloupková, Ph.D.
Consultant:	Doc. RNDr. Václav Ranc, Ph.D.
Year of presentation:	2020

Abstract:

The focus of this thesis is the study of cellular uptake of graphene oxide into cervical cancer cells using Raman spectroscopy. Tumor cells incubated with different concentrations of graphene oxide were investigated by Raman microscopy and imaging. The same method was used to observe sample stability over a period of six months. Graphene oxide has been successfully detected in all observed samples.

Keywords:	Raman spectroscopy; graphene oxide; HeLa cells; imaging
Number of pages:	55
Number of appendices:	6
Language:	Czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci dne

.....

Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Mgr. Zuzaně Chaloupkové, Ph.D. za její pomoc, ochotu a čas při vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Václavu Rancovi, Ph.D. za cenné rady při konzultaci, Mgr. Janu Belzovi za přípravu buněk a Mgr. Arianě Opletalové, Ph.D. za přípravu grafen oxidu.

Obsah

Úvod.....	12
1 Teoretická část.....	13
1.1 Vibrační spektroskopie.....	13
1.2 Ramanova spektroskopie.....	18
1.2.1 Princip Ramanovy spektroskopie.....	18
1.2.2 Základní instrumentace a rozvržení Ramanova spektroskopu.....	20
1.2.3 Příprava vzorku.....	23
1.2.4 Interpretace Ramanových spekter.....	25
1.2.5 Typy Ramanovy spektroskopie.....	26
1.2.6 Biologické aplikace Ramanovy spektroskopie.....	28
1.3 Grafen oxid.....	29
1.3.1 Příprava grafen oxidu.....	30
1.3.2 Struktura a vlastnosti grafen oxidu.....	31
1.3.3 Biologické aplikace grafen oxidu.....	32
2 Experimentální část.....	34
2.1 Materiály a vybavení.....	34
2.1.1 Chemikálie.....	34
2.1.2 Materiál.....	34
2.1.3 Přístroje.....	34
2.2 Metody.....	35
2.2.1 Příprava grafen oxidu.....	35
2.2.2 Příprava buněk.....	35
2.2.3 Měření.....	36
2.3 Výsledky a diskuze.....	37
2.3.1 Charakterizace grafen oxidu.....	37

2.3.2	Kontrolní buňky	39
2.3.3	Detekce grafen oxidu v buňkách.....	40
2.3.4	Stabilita vzorku buněk s grafen oxidem	44
	Závěr.....	48
	Summary	49
	Přílohy	50
	Seznam použité literatury	52

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma natahování a prodlužování vazeb při valenčních vibracích. Symetrické vibrace vznikají deformací ve stejném směru, antisymetrické vibrace vznikají deformacemi vazeb v opačných směrech.....	13
Obrázek 2: Znázornění typů deformačních vibrací. Nůžková a kyvadlová vibrace se vyznačují změnou vazebného úhlu ve stejné rovině, krouživá a vějířová vibrace vznikají kmitáním atomů za a před rovinu.....	14
Obrázek 3: Porovnání spekter methylesteru kyseliny olejové z FT-infračervené spektroskopie a Ramanovy spektroskopie. U jednotlivých funkčních skupin lze vidět rozdílné pásy pro rozdílně aktivní vibrace. Převzato z literatury ⁵	15
Obrázek 4: Porovnání energetických hladin modelu harmonického a anharmonického oscilátoru. Na ose x je uvedena mezijaderná vzdálenost a na ose y energie. Převzato z literatury. ⁴	17
Obrázek 5: Znázornění přestupů molekul mezi vibračními hladinami m, n a virtuálními stavy při Stokesově, Rayleigho i anti-Stokesově rozptylu. Převzato z literatury ³	19
Obrázek 6: Porovnání signálů Stokesova a anti-Stokesova rozptylu u Ramanova spektra CCl ₄ . Stokesovy i anti-Stokesovy linie jsou od excitačního záření posunuty se stejným rozdílem ve frekvenci, ale každá opačným směrem. Viditelný je i rozdíl v síle signálu. Převzato z literatury ¹	19
Obrázek 7: Blokové schéma uspořádání 90° a 180° geometrie pro Ramanovu spektroskopii. Převzato z literatury ⁵	21
Obrázek 8: Porovnání Ramanova spektra aspirinu uvnitř barevné skleněné ampule a spektra samotného prášku. Převzato z literatury. ⁵	24
Obrázek 9: Znázornění typických vibrací aktivních v Ramanových spektrech. Délka čar představuje vlnočtový rozsah vibrace v cm ⁻¹ a tloušťka čar reprezentuje intenzitu Ramanova signálu. Převzato z literatury. ³	26
Obrázek 10: Struktura GO podle Lerf-Klinowského. Převzato z literatury. ³²	31

Obrázek 11: AFM snímek o velikosti 5x5 μm použitého grafen oxidu s výškovými profily vypočítanými pro vyznačené částice.	37
Obrázek 12: Snímek měřené částice grafen oxidu z Ramanova mikroskopu, 50x zvětšení.	37
Obrázek 13: Ramanovo spektrum grafen oxidu použitého pro inkubaci s buňkami.	38
Obrázek 14: Ramanovo spektrum kontrolní HeLa buňky.	39
Obrázek 15: Ramanova spektra všech vzorků buněk s GO, (a) 5 $\mu\text{g/ml}$, (b) 18,75 $\mu\text{g/ml}$, (c) 20 $\mu\text{g/ml}$, (d) 25 $\mu\text{g/ml}$, (e) 37,5 $\mu\text{g/ml}$ a (f) 57,6 $\mu\text{g/ml}$	41
Obrázek 16: Mapa HeLa buněk s GO o koncentraci 18,75 $\mu\text{g/ml}$. Vlevo nahoře je vidět snímek z mikroskopu s vyznačenou oblastí mapování, vpravo nahoře získaná RGB mapa a dole jsou spektra nalezených komponent. Červená barva reprezentuje substrát, modrá HeLa buňky a zelená částice GO.	42
Obrázek 17: Mapa HeLa buněk s GO o koncentraci 25 $\mu\text{g/ml}$. Vlevo nahoře je vidět snímek z mikroskopu s vyznačenou oblastí mapování, vpravo nahoře získaná RGB mapa a dole jsou spektra nalezených komponent. Červená barva reprezentuje substrát, modrá HeLa buňky a zelená částice GO.	43
Obrázek 18: Mapa HeLa buněk s GO o koncentraci 37,5 $\mu\text{g/ml}$. Vlevo nahoře je vidět snímek z mikroskopu s vyznačenou oblastí mapování, vpravo nahoře získaná RGB mapa a dole jsou spektra nalezených komponent. Červená barva reprezentuje substrát, modrá HeLa buňky a zelená částice GO.	43
Obrázek 19: Mapa HeLa buněk s GO o koncentraci 57,6 $\mu\text{g/ml}$. Vlevo nahoře je vidět snímek z mikroskopu s vyznačenou oblastí mapování, vpravo nahoře získaná RGB mapa a dole jsou spektra nalezených komponent. Červená barva reprezentuje substrát, modrá HeLa buňky a zelená částice GO.	44
Obrázek 20: Přehled Ramanových spekter získaných pro vyhodnocení stability vzorku o koncentraci 37,5 $\mu\text{g/ml}$ během šesti měsíců. Jednotlivé měsíce jsou označeny následovně: (a) září, (b) říjen, (c) listopad, (d) prosinec, (e) leden, (f) únor.	45
Obrázek 21: Graf znázorňující změnu poměrů intenzit D a G pásů během šesti měsíců.	47

Seznam tabulek

Tabulka 1: Hodnoty intenzit D a G pásů a jejich poměry I_D/I_G pro jednotlivá měření v průběhu šesti měsíců.....	45
--	----

Seznam příloh

Příloha 1: Spektra HeLa buněk o koncentrace GO 37,5 µg/ml měřených během září.	50
Příloha 2: Spektra HeLa buněk o koncentrace GO 37,5 µg/ml měřených během října.	50
Příloha 3: Spektra HeLa buněk o koncentrace GO 37,5 µg/ml měřených během listopadu.	50
Příloha 4: Spektra HeLa buněk o koncentrace GO 37,5 µg/ml měřených během prosince. ..	51
Příloha 5: Spektra HeLa buněk o koncentrace GO 37,5 µg/ml měřených během ledna.	51
Příloha 6: Spektra HeLa buněk o koncentrace GO 37,5 µg/ml měřených během února.	51

Úvod

Grafen oxid je nanomateriál, který je v posledních letech zkoumán pro praktické využití v řadě oblastí, například v elektronice, chemickém průmyslu nebo v lékařství. Díky svým vlastnostem jako jsou hydrofilita, pevnost a velký specifický povrch s možností funkcionalizace, je grafen oxid obzvláště atraktivním materiálem pro využití v cílené dopravě léčiv. Dvourozměrné nanomateriály jako grafen oxid jsou totiž schopné nést molekuly léčiv a s vhodnou úpravou je cíleně transportovat na místo účinku. Takováto cílená léčba je důležitá například v oblasti léčby rakoviny, kde léčiva fungují na principu usmrcení buňky a je proto velmi důležité, aby působila cíleně v nádorových buňkách a nepoškodila buňky zdravé.

Pro vývoj metody, která by používala grafen oxid jako nosič léčiva pro cílenou léčbu, je v první řadě potřeba určit, zda grafen oxid proniká do žádaných buněk a jestli jsme schopni jej v těchto buňkách detekovat a sledovat. A právě to je hlavním zaměřením a cílem této práce.

V této práci je prezentován průnik oxidu grafenu do nádorových buněk rakoviny děložního čípku (HeLa) pomocí Ramanovy spektroskopie, která je zaběhnutým nástrojem ve výzkumu léčby rakoviny i při studiu cílené dopravy léčiv. Za použití Ramanova mikroskopu je prováděna detekce grafen oxidu ve vzorcích a mapování buněk pro určení rozložení jeho částic. Kromě detekce průniku grafen oxidu do buněk je také zkoumána jeho chemická stabilita uvnitř buňky v průběhu šesti měsíců.

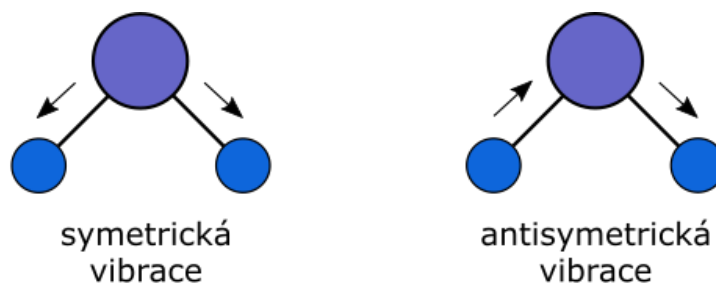
1 Teoretická část

Ramanova spektroskopie patří do rozsáhlé skupiny spektroskopických metod, které využívají interakci mezi elektromagnetickým zářením a vzorkem pro získání informací o jeho složení, struktuře a dalších vlastnostech. Při použití záření o vlnových délkách z různých oblastí spektra dochází k různým jevům, jako je absorpce, excitace nebo rozptyl. Všechny z těchto jevů jsou způsobeny interakcí záření s energetickými hladinami molekul ve vzorku, a protože jsou tyto hladiny unikátní pro každý prvek nebo sloučeninu, je možné je využít pro identifikaci neznámých sloučenin a jejich bližší analýzu.

1.1 Vibrační spektroskopie

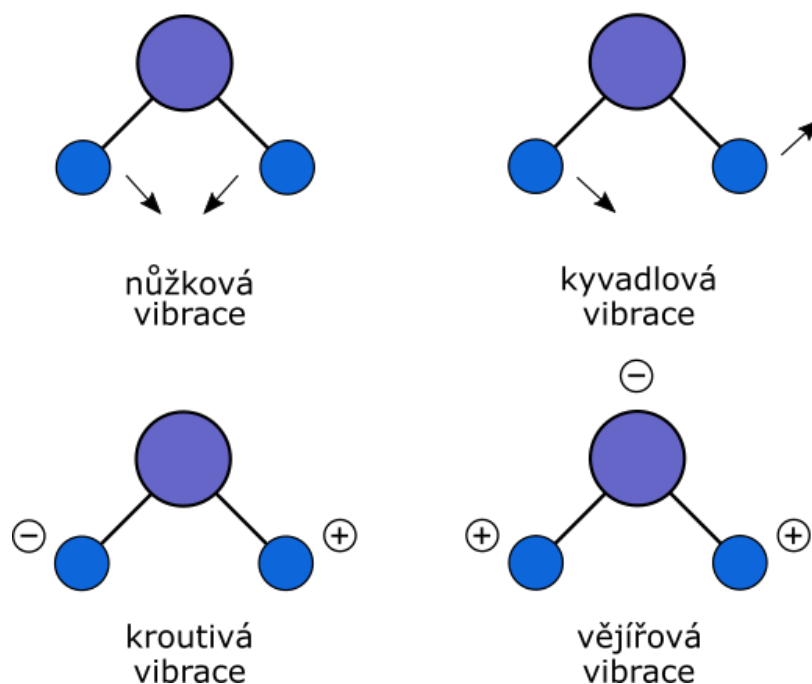
Vibrační spektroskopie, mezi které patří i Ramanova, využívají k analýze vzorků vibrační energii molekul. Vibrace molekul vznikají pohybem vázaných atomů kolem jejich rovnovážných poloh a projevují se tedy na vazbách v molekule. Základní vibrace molekul dělíme na dvě hlavní skupiny: valenční a deformační, a to podle toho, k jakým změnám vazeb u nich dochází.

Valenční vibrace se vyznačují natahováním a stlačováním vazby, následkem toho dochází ke změně její délky. Podle toho, v jakém směru k této změně dochází, je dále můžeme rozlišit na symetrické a antisymetrické vibrace (viz Obrázek 1).



Obrázek 1: Schéma natahování a prodlužování vazeb při valenčních vibracích. Symetrické vibrace vznikají deformací ve stejném směru, antisymetrické vibrace vznikají deformacemi vazeb v opačných směrech.

V případě deformačních vibrací dochází ke změně vazebného úhlu mezi atomy. Podle orientace této deformace je dělíme na rovinné deformační vibrace – mezi které patří nůžkové (scissoring) a kyvadlové (rocking) vibrace; a mimorovinné deformační – zde patří kroutivé (twisting) a vějířové (wagging) vibrace (viz Obrázek 2).¹

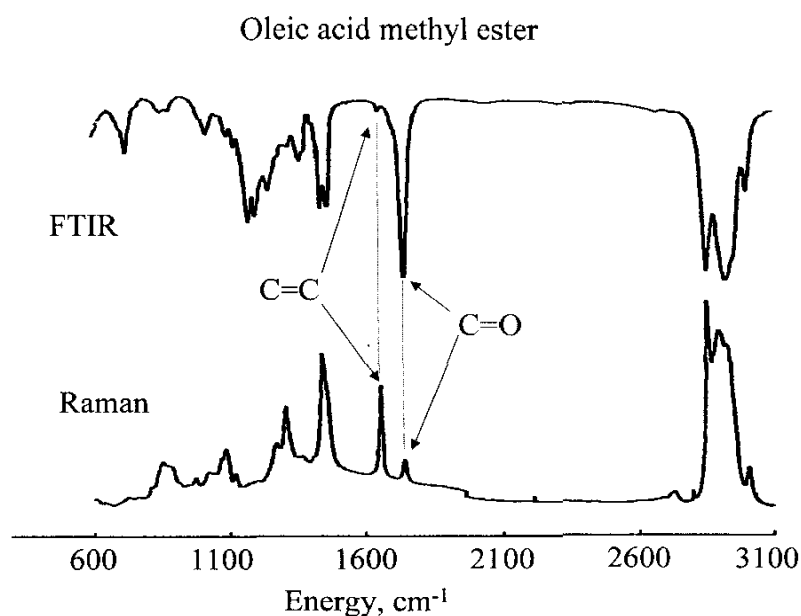


Obrázek 2: Znáznornění typů deformačních vibrací. Nůžková a kyvadlová vibrace se vyznačují změnou vazebného úhlu ve stejné rovině, kroutivá a vějířová vibrace vznikají kmitáním atomů za a před rovinu.

Celkový počet základních vibrací možných pro určitou molekulu se odvozuje pomocí stavů volnosti molekuly. Každý atom, který je vázáný v molekule, se může pohybovat ve třech směrech (ve směru os x , y a z), molekula o N atomech má tedy celkem $3N$ stupňů volnosti. Tři z toho se projevují jako translační pohyby a další tři stupně volnosti se projevují v rotačním pohybu, zbylých $3N - 6$ stupňů volnosti pak vyjadřuje počet základních (normálních) vibrací. U lineárních molekul je těchto vibrací $3N - 5$, protože lineární molekuly mají o jeden rotační stupeň volnosti méně.² Každá z těchto základních vibrací má svou jedinečnou vibrační energii, počet normálních vibrací tedy odpovídá počtu základních energetických přechodů, které se mohou při vibrační spektroskopii projevit.³

Je třeba však brát v úvahu, že ne všechny vibrace budou v dané vibrační spektroskopické metodě aktivní. Například molekula H_2 má pouze jednu vibraci, která se v infračervené spektroskopii nezobrazí, ale v Ramanově spektroskopii bude poskytovat signál. Rozdíl v aktivitě vibrací lze také vidět na Obrázku 3, na příkladu methylesteru kyseliny olejové. V infračervené spektroskopii jsou zpravidla aktivní takové molekuly, které nejsou symetrické a během jejich vibrací dochází ke změně dipólového momentu.⁴ Pokud má totiž molekula nesymetricky rozdělený náboj, vlivem jedné nebo více vibrací se jeho rozdělení mění, touto změnou vzniká elektrické pole, které může interagovat s infračerveným zářením při infračervené spektroskopii. Oproti tomu jsou v Ramanově spektroskopii aktivní ty vibrace, u kterých se mění polarizovatelnost molekuly.

To znamená, že během vibrací dochází k deformaci molekulového orbitalu (elektronového oblaku okolo molekuly).² V případě molekuly H_2 vlivem valenčních vibrací dochází k deformaci molekulového orbitalu, mění se tím její polarizovatelnost a je proto aktivní v Ramanově spektroskopii. Opačný případ je příklad molekuly vody, u které se vibracemi mění především dipólové rozdělení jejího náboje a projeví se tedy v infračervené spektroskopii. Pro molekuly s centrem symetrie je možné tohle chování shrnout v tzv. pravidle alternujícího zákazu. Toto pravidlo říká, že pokud má molekula střed symetrie, potom vibrace, které jsou aktivní v infračervené spektroskopii, nejsou aktivní v Ramanově spektroskopii a naopak.³ Za použití obou metod tak lze zkoumat vibrační stavy skoro všech molekul v základním stavu a proto jsou obě metody považovány za vzájemně komplementární a často se používají společně pro získání kompletních informací.⁴



Obrázek 3: Porovnání spekter methylesteru kyseliny olejové z FT-infračervené spektroskopie a Ramanovy spektroskopie. U jednotlivých funkčních skupin lze vidět rozdílné pásy pro rozdílně aktivní vibrace. Převzato z literatury⁵

Pro detailnější popis vibračních pohybů a jejich energetických hladin se používají dva fyzikální modely – harmonický a anharmonický oscilátor. Tyto modely popisují, s jakou frekvencí molekuly vibrují a zabývají se přesnou velikostí jednotlivých energetických hladin.

V modelu harmonického oscilátoru se atomy zjednodušeně uvažují jako hmotné body a na chemickou vazbu se pohlíží jako na pružinu. Vibrace molekuly se pak dají chápat jako stlačování

této pružiny. Pro dvouatomové molekuly se tedy frekvence vibrace se dá vyjádřit pomocí následující rovnice (1) pro frekvenci kmitání harmonického oscilátoru. Tato rovnice je odvozená od Hookova zákona, který popisuje chování pružiny.¹

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}} \quad (1)$$

K v této rovnici vyjadřuje silovou konstantu, která definuje vazbu a její sílu, μ představuje redukovanou hmotnost systému a vyjadřuje se následujícím vztahem (2),

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (2)$$

kde m_1 a m_2 jsou hmotnosti jednotlivých jader vázaných v molekule.

Z těchto dvou vzorců vyplývá, že molekuly různých prvků a sloučenin tedy budou kmitat s různou frekvencí. Konstanta K v rovnici (1) závisí na typu vazby, proto se také vibrace různých vazeb liší. Čím silnější vazba bude, tím vyšší bude frekvence její vibrace. Zpravidla také platí, že násobné vazby jsou silnější než jednoduché vazby stejných prvků, a proto také vibrují s vyšší frekvencí. Například pro vibrace mezi atomy uhlíku platí, že ve trojné vazbě $C \equiv C$ se vibrace ve spektru objeví v oblasti 2150 cm^{-1} , u dvojné vazby $C = C$ v oblasti 1650 cm^{-1} a u jednoduché vazby $C - C$ v okolí 1200 cm^{-1} .⁴ Z rovnice číslo (2) vyplývá, že molekuly s lehčími atomy budou kmitat poměrně vysokou frekvencí a molekuly s těžšími atomy budou vibrovat s frekvencí nižší.

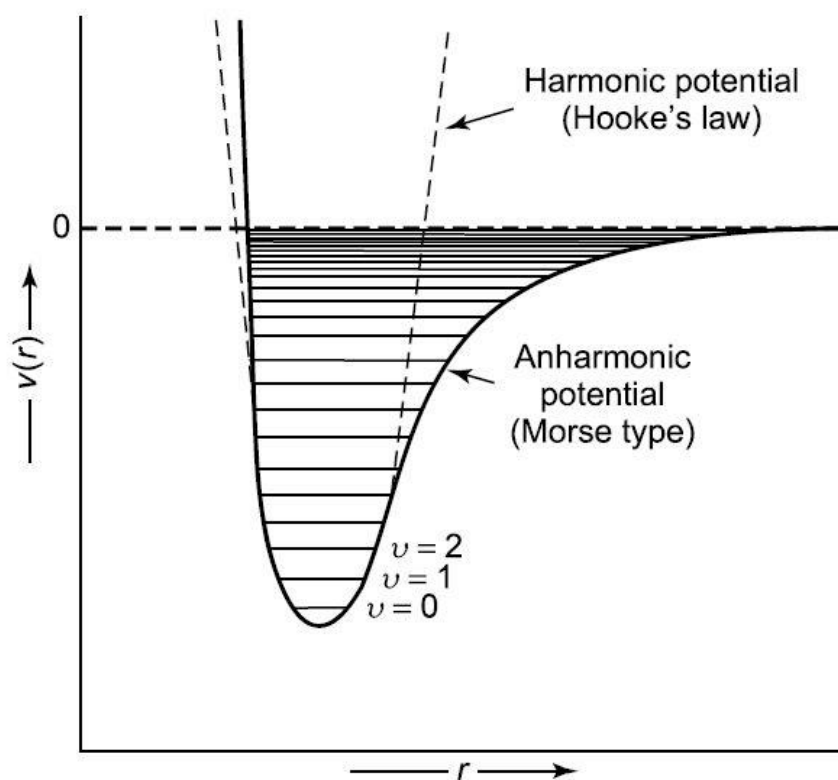
Energie vibrační a vibračních hladin je kvantována, což znamená, že nabývá pouze určitých hodnot. V modelu harmonického oscilátoru se energie jednotlivých vibračních hladin vypočítají podle následující rovnice (3).

$$E = hf \left(v + \frac{1}{2} \right) \quad (3)$$

V tomto vztahu v představuje vibrační kvantové číslo, h je Planckova konstanta a f je frekvence dané vibrace.

Model harmonického oscilátoru je zjednodušený a neodpovídá plně skutečnému chování molekul. Například jsou v něm povolené pouze fundamentální přechody o jednu hladinu $\Delta v = \pm 1$. Vibrace skutečných molekul však nejsou dokonale harmonické a s velmi malou pravděpodobností dochází i k větším přechodům $\Delta v > 1$. Proto se zavádí model anharmonického oscilátoru,⁶ který je sice složitější, ale odpovídá věrněji skutečnosti. V modelu anharmonického oscilátoru jsou povoleny přechody na vyšší vibrační stavy, tzv. overtony, tedy přechody pro které platí $\Delta v = 2, 3, 4, \dots$ ¹ Kromě toho se v modelu anharmonického oscilátoru liší i velikosti

jednotlivých hladin. Ve skutečných molekulách se totiž vzdálenosti vibračních hladin s rostoucím kvantovým číslem postupně zmenšují.⁶ To znamená, že výše uvedená rovnice pro výpočet vibrační energie (3) platí pouze pro nízká vibrační čísla v . Overtony pak budou mít energii, která je jen přibližným násobkem energie fundamentálních vibrací² (viz Obrázek 4).



Obrázek 4: Porovnání energetických hladin modelu harmonického a anharmonického oscilátoru. Na ose x je uvedena mezijaderná vzdálenost a na ose y energie. Převzato z literatury.⁴

V praxi také platí, že hladiny valenčních vibrací jsou energeticky vzdálenější než u deformačních vibrací. To je dáno tím, že natahování a stlačování vazby vyžaduje více energie než ohýbání molekuly. Ve vibračním infračerveném spektru se tedy symetrické vibrace mezi atomy C–H budou nacházet okolo 3000 cm^{-1} , ale valenční vibrace se budou nacházet okolo 1340 cm^{-1} .²

Vibrační hladiny lze zkoumat pomocí vibrační spektroskopie, ve kterých se zkoumá interakce elektromagnetického záření s vibračními hladinami vzorku. Většinou využívají záření z oblasti infračerveného spektra, protože je energeticky blízké vibračním hladinám v molekulách. Přejít mezi vibračními hladinami při spektroskopii může vyvolat i přechod mezi hladinami rotačními, i když jsou rotační hladiny podstatně méně energeticky vzdálené. Rotace molekul se projevují ve vibračních spektrech tím, že jim dodávají jemnou strukturu, která je nejvýraznější v plynné fázi. V kapalně a pevné fázi se potom tato jemná struktura ztrácí, v těchto skupenstvích

jsou totiž molekuly omezeny a k rotaci skoro nedochází. Blíže zkoumat rotační hladiny lze pomocí mikrovlnné spektroskopie, která využívá záření s nižšími energiemi blízké jednotlivým rotačním hladinám.^{2,6}

1.2 Ramanova spektroskopie

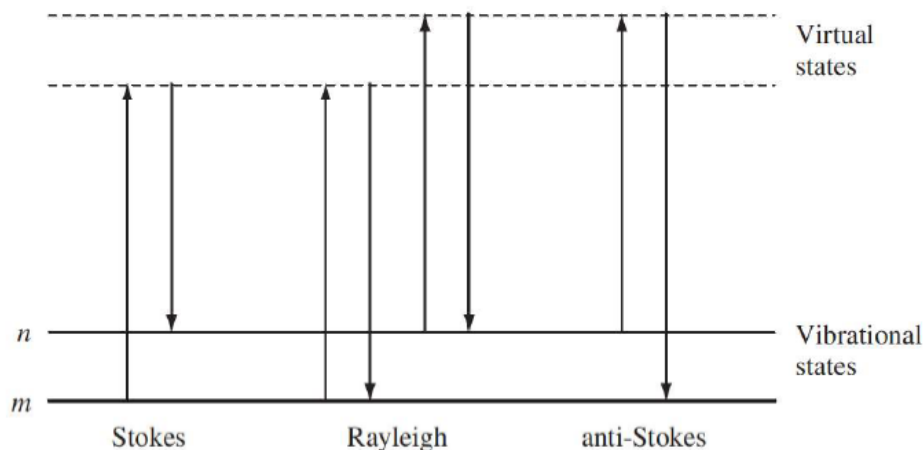
1.2.1 Princip Ramanovy spektroskopie

Ramanova spektroskopie je metoda vibrační spektroskopie založená na detekci neelastického rozptylu záření. Rozptyl záření je jev, při kterém fotony excitačního záření kolidují s molekulami zkoumaného vzorku a interagují s nimi na vibračních energetických hladinách, během toho dojde k anihilaci fotonů excitovaného záření a nově vzniklé fotony se odrážejí od vzorku pryč.

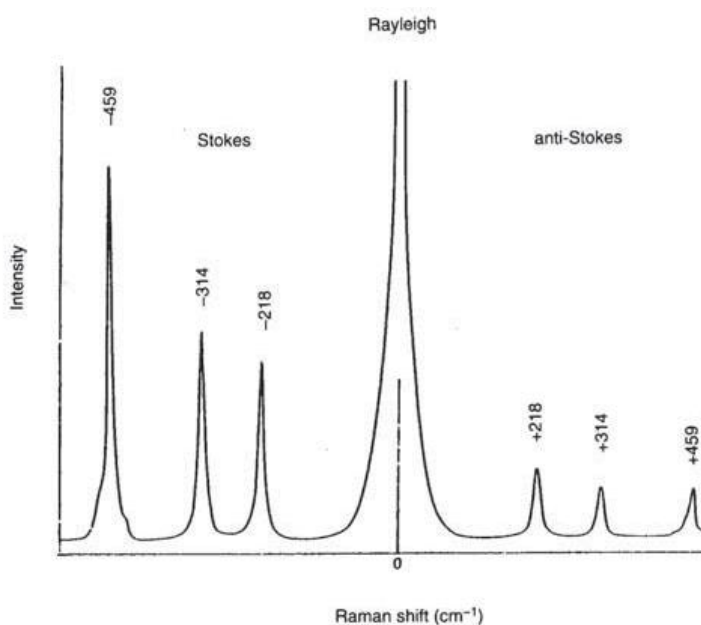
Většina fotonů se od vzorku rozptyluje beze změny frekvence. Tento typ rozptylu nazýváme elastický nebo také Rayleighův rozptyl a neposkytuje žádné informace o zkoumaném vzorku. Malé množství fotonů se však po excitaci vzorku rozptyluje se změnou frekvence, ke které dojde interakcí záření s vibračními hladinami molekul vzorku. Tento rozptyl nazýváme neelastický a je označován jako Ramanův efekt nebo také Ramanův rozptyl. Ramanův rozptyl je v porovnání s Rayleighovým rozptylem velmi slabý. Uvádí se, že se neelasticky rozptýlí jeden foton z 10^6 až 10^8 rozptýlených fotonů.³ Zmíněná změna ve frekvenci u Ramanova rozptylu vypovídá o velikosti vibrační hladiny v dané molekule, která je pro každou molekulu výjimečná a tedy je použitelná k její identifikaci.^{3,7} Neelasticky rozptýlené záření se tedy snímá a z něj se vytváří Ramanovo spektrum jako posun od frekvence použitého záření.

Při neelastické srážce fotonu s molekulami dochází ke dvěma případům – pokud mají rozptýlené fotony nižší frekvenci než původní záření, můžeme na spektru pozorovat Stokesovy linie; pokud však rozptýlené fotony mají vyšší frekvenci než původní záření, mluvíme o anti-Stokesových liniích.⁷ Při Stokesově rozptylu dochází k interakci mezi fotony excitačního záření a molekulami v základním vibračním stavu. Na okamžik dojde k přestupu molekuly do virtuálního vibračního stavu a poté molekula spadne na vyšší vibrační hladinu, dojde tedy k absorpci energie záření a od molekuly se rozptýlí foton s nižší frekvencí.³ U anti-Stokesova rozptylu interagují fotony s molekulami, které už jsou ve vyšším vibračním stavu. Molekuly na vyšších vibračních hladinách jsou při Ramanově rozptylu také excitovány do vyššího virtuálního stavu, ale poté přejdou na svůj základní stav a odevzdají tak část své energie. Výsledkem je rozptýlení fotonu s vyšší frekvencí než použité záření. Oba případy znázorňuje jednoduchý diagram na Obrázku 5 a výsledné posuny frekvencí jsou pro ukázkou demonstrovány na Obrázku 6.³ Stokesovy a anti-Stokesovy linie nesou stejnou analytickou informaci, ale Stokesovy linie mají zpravidla vyšší inten-

zitu. To je dáno tím, že většina molekul vzorku se při standardní teplotě a tlaku vyskytuje v základním vibračním stavu.³ Pro tvorbu výsledných spekter se proto většinou využívají pouze Stokesovy linie a anti-Stokesovy linie se odfiltrují. Anti-Stokesův rozptyl lze využít v případech, kdy Stokesovy linie jsou překryty fluorescencí vzorku, ale anti-Stokesovy linie zůstávají nedotčeny.⁸



Obrázek 5: Znáznornění přestupů molekul mezi vibračními hladinami m , n a virtuálními stavy při Stokesově, Rayleighově i anti-Stokesově rozptylu. Převzato z literatury³



Obrázek 6: Porovnání signálů Stokesova a anti-Stokesova rozptylu u Ramanova spektra CCl_4 . Stokesovy i anti-Stokesovy linie jsou od excitačního záření posunuty se stejným rozdílem ve frekvenci, ale každá opačným směrem. Viditelný je i rozdíl v síle signálu. Převzato z literatury¹.

Intenzita Ramanova jevu závisí na tom, jak velká je změna polarizovatelnosti při vibraci v dané molekule. Vztah mezi intenzitou Ramanova rozptylu a změnou v polarizovatelnosti se dá vyjádřit pomocí následující rovnice (4).²

$$I_{Raman} = KI_L(\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_i)^4 \left(\frac{d\alpha}{dQ} \right)^2 \quad (4)$$

V této rovnici K je konstanta přímé úměry, která závisí na instrumentaci a z ní vyplývající efektivitě snímání Ramanova rozptylu, I_L je intenzita excitačního laseru, $(\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_i)$ představuje frekvenci rozptylu a člen $\frac{d\alpha}{dQ}$ vyjadřuje změnu v polarizovatelnosti při vibraci. Z tohoto vztahu vyplývá, že intenzita Ramanova rozptylu roste se čtvrtou mocninou frekvence použitého laseru.

1.2.2 Základní instrumentace a rozvržení Ramanova spektroskopu

Ramanův spektroskop se skládá z několika hlavních částí – zdroje monochromatického záření, soustavy čoček a zrcadel, které přivádějí záření do vzorku a následně také zachycující rozptýlené světlo, z monochromátorů a filtrů pro potlačení Rayleigha rozptylu a anti-Stokesova posunu a z detektoru.

Pro Ramanovu spektroskopii je potřeba monochromatický zdroj světla. Před rozvojem laserů se pro excitaci vzorku při Ramanově spektroskopii používaly rtuťové výbojky, které se kombinovaly do různých sestav pro získání určité vlnové délky. Tyto sestavy vyžadovaly neúměrné množství času na přípravu (hlavně na jejich zahřátí a rozsvícení) v porovnání s výslednou délkou osvětlení vzorku.¹ Dnes se jako excitační zdroj používají téměř výhradně lasery. Kromě jejich malé náročnosti na použití jsou ideálním zdrojem pro Ramanovu spektroskopii i z několika dalších důvodů. Lasery jsou velmi výkonné a mohou poskytovat výkon v řádech wattů i megawattů. Jsou také vysoce monochromatické a jejich případné nepřesnosti lze jednoduše odstranit filtrem. Většina laserů má navíc velmi malý průměr světelného svazku, který lze ještě podle potřeby ztenčit, což umožňuje laser na vzorek namířit s velkou přesností,¹ a to i na tak malé vzorky jako jednotlivé mikročástice.³

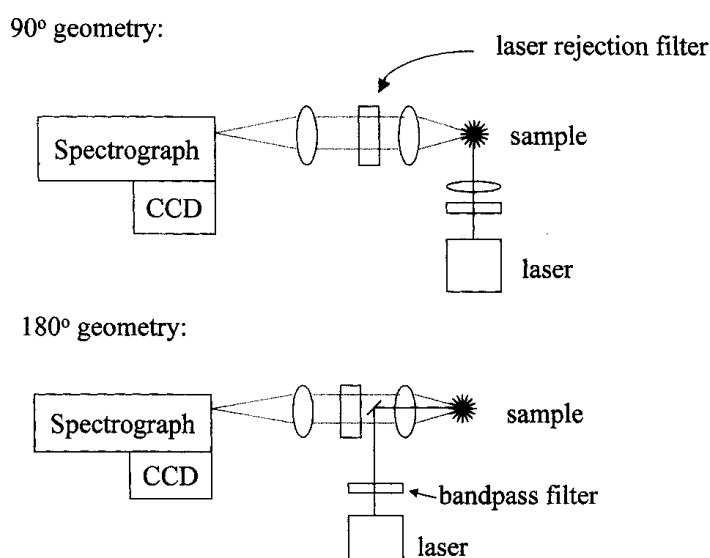
Vlnová délka excitačního zdroje významně ovlivňuje měření, protože intenzita Ramanova rozptylu se zvyšuje se čtvrtou mocninou frekvence (viz Rovnice (4)). S vyšší frekvencí a menší vlnovou délkou se zvyšuje množství neelasticky rozptýlených fotonů, což by v teorii vedlo k používání laseru z ultrafialové oblasti. To má však hned několik nevýhod – je třeba se vyhnout absorpci na elektronové hladině, snadněji dochází k poškození vzorku a takové lasery jsou cenově velmi náročné a vyžadují speciální optiku.⁷ Proto se používají lasery převážně z oblasti

viditelného a infračerveného spektra, i když ultrafialové zdroje se s pokrokem technologií v poslední době využívají stále více.³

Z oblasti viditelného spektra se nejvíce používají argonový iontový laser (488,0 nm), kryptonový iontový laser (530,9 nm nebo 647,1 nm) a helium-neonový laser (632,8 nm).¹ Z pohledu intenzity Ramanova jevu se jedná o nejvýhodnější lasery. Velmi často se také používají diodové lasery (o vlnových délkách 785 nm a 830 nm) a Nd:YAG laser (1064 nm) z blízké infračervené oblasti. Tyto lasery produkují Ramanův jev méně efektivně, ale lze je používat s velkým výkonem bez velkých problémů s degradací díky nízké energii produkovaného záření.⁸

Před průchodem laserového paprsku samotným vzorkem, prochází paprsek band-pass filtrem (pásmovou propustí).^{1,8} Filtr eliminuje případné nepřesnosti laseru tím, že propouští pouze jednu žádanou vlnovou délku. Někdy se také zároveň s band-pass filtrem používá i polarizační filtr, který zajistí polarizaci excitačního paprsku, což je důležité například pro analýzu optických antipodů.⁹

Při průchodu laseru vzorkem dochází k Ramanově rozptylu, a protože se rozptýlené světlo od vzorku šíří všemi směry, lze jej snímat v různých místech vzorkového prostoru pomocí různých geometrií. Typicky se používají dvě hlavní rozvržení – 90° a 180°, a to právě podle toho, kde se rozptýlené světlo snímá.³ Geometrie rozvržení může mít vliv na poměr signál-šum a ovlivňuje detailnější složení daného spektroskopu.⁵



Obrázek 7: Blokové schéma uspořádání 90° a 180° geometrie pro Ramanovu spektroskopii. Převzato z literatury⁵

Z těchto dvou geometrií je 90° rozvržení považováno za klasičtější a historicky nejvíce využívané,⁵ rozptýlené záření se v něm snímá kolmo ke vzorku. Snímací zrcadlo je tedy umístěno pod úhlem 90° vzhledem k excitačnímu paprsku, který se vzorkem nechá bez dodatečného odražení projít. Oproti 180° geometrii je toto uspořádání o něco náročnější na umístění vzorku – pokud vzorkem pohneme, kužel rozptýleného záření dopadne na snímací čočku pod jiným úhlem, což by mohlo znehodnotit výsledky.^{1,5} Pro toto uspořádání se používají velké čočky s malou ohniskovou vzdáleností pro zachycení co největšího kuželu světla, což také znamená, že vzdálenost od snímané vzorku nemůže být příliš velká.³

U zpětné 180° geometrie se snímá odražené záření ve stejné přímce, ve které putuje excitační laser. Ten prochází přímo snímací čočkou, která následně snímá rozptýlené záření.³ Tato geometrie má oproti klasickému 90° rozvržení řadu výhod a dodatečných možností. Díky rovnoběžnosti paprsku a snímací čočky je 180° sestava méně choulostivá na přesné umístění vzorku, což umožňuje snadnější výměnu vzorku, možnost rotování vzorku při měření a lepší možnosti zaostření. Také vzdálenost mezi vzorkem a snímací optikou může být větší než u 90° uspořádání, čehož se využívá u speciálních instrumentací, jako například u Ramanových sond, kde se odražené světlo přivádí na spektrometr pomocí optických vláken.⁵ Zpětný typ geometrie se poslední dobou využívá stále častěji, velký význam má hlavně u Ramanovy mikroskopie a Ramanových sond.³

Bez ohledu na použitou geometrii, je třeba ze snímaného rozptýleného záření následně oddělit nežádoucí Rayleigh a anti-Stokesovo záření. To se provádí pomocí band-stop filtrů (pásmová zádrž) nebo pomocí monochromátorů.^{1,3} Volba mezi band-stop filtrem nebo monochromátory záleží na více faktorech, ale ve většině případů jde o rozhodnutí na základě poměru výkonu a ceny. Moderní filtry jsou na většinu měření dostatečné a jsou zpravidla méně nákladné než monochromátory, ale při měření rozptylu blízkého vlnové délce excitačního paprsku jsou vhodnější variantou monochromátory.³

Získané Ramanovo záření se musí před konečnou detekcí ještě jednou upravit, je totiž potřeba od sebe oddělit jednotlivé frekvence pro získání jednotlivých spektrálních pásů. To se provádí pomocí monochromátoru.³ Monochromátory mají velký vliv na výsledné rozlišení měření. Jejich základním parametrem je počet vrypů, které udávají jejich citlivost. Při větším počtu vrypů je separován větší počet vlnových délek, ale s rostoucím počtem vrypů dochází ke ztrátám na intenzitě výsledného signálu. Proto je třeba při výběru vhodného monochromátoru brát v úvahu sílu daného Ramanova jevu.¹

Před detektorem se také nachází štěrbin, která při konfokální analýze zajišťuje, do jaké hloubky laser šel a z jaké hloubky se rozptýlené záření dostane na detektor. Šířka této štěrbiny také ovlivňuje rozlišení výsledného spektra, jejím rozšířením se do jisté míry dá kompenzovat ztráta signálu.¹

Posledním krokem při měření je detekce. Světlo z monochromátoru dopadá na detektor, který ho převede na elektrický signál pro následné vytvoření výsledného spektra. V porovnání s původním zdrojem záření má rozptýlené světlo velmi malou intenzitu, a proto je třeba použít k detekci citlivé detektory jako například fotodiodové pole, CCD detektory nebo čítače fotonů.³ Volba detektoru závisí především na vlnové délce použitého laseru, síle Ramanova jevu u daného vzorku a vlnové délce získaných signálů. Pokud například používáme záření o vlnové délce blízké hranici detekce detektoru, fotony po posunu vlnové délky už nemusí být detektorem zaznamenatelné.³ Fotodiodové pole s PN přechody se používají pro snímání infračerveného záření, PIN diody umožňují měření i ve viditelné oblasti.¹⁰ Přesný rozsah citlivosti detektoru závisí hlavně na materiálu fotodiod.⁵ CCD detektory se používají pro měření v rozsahu vlnové délky 120-1000 nm.¹ Výhodami CCD detektorů jsou malé rušení, vysoká efektivita a velký rozsah vlnových délek, pro které může daný detektor být citlivý. Pro velmi slabé jevy se používají čítače fotonů, které patří mezi jedny z nejcitlivějších detektorů a nejsou omezeny rozsahem.¹⁰ Jejich citlivost se však může stát i jejich nevýhodou – pokud je počet dopadajících fotonů příliš vysoký, dojde k přesycení detektoru a jednotlivé napět'ové pulzy nelze rozlišit. Proto se čítače fotonů nehodí na silné Ramanovy jevy.¹

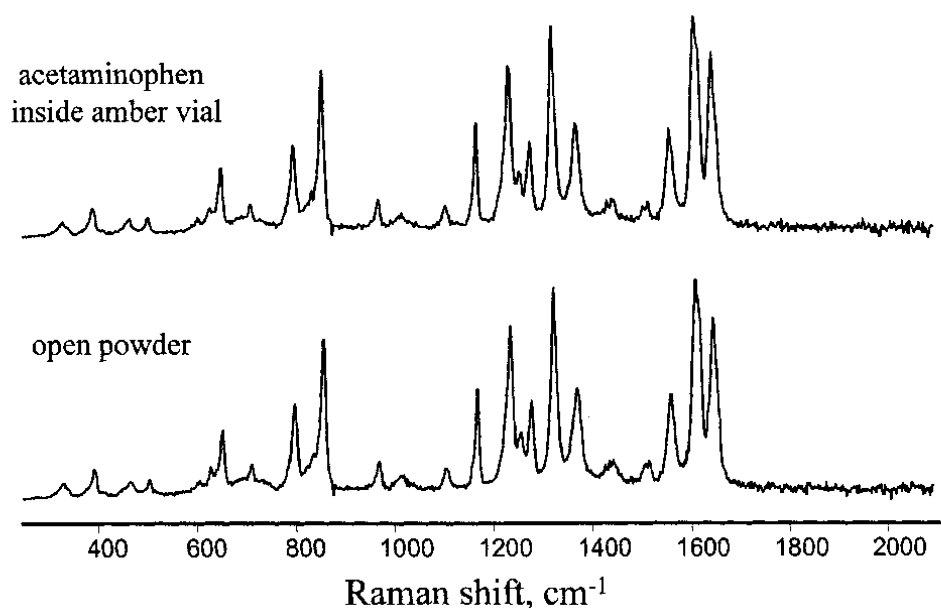
1.2.3 Příprava vzorku

Pomocí Ramanovy spektroskopie lze zkoumat většinu vzorků bez omezení a s minimální přípravou. Kromě odstranění nežádoucích nečistot ze vzorku, není ve většině případů třeba vzorek dále upravovat.^{2,3}

Je možné měřit vzorky ve všech skupenstvích a v různých formách, jako například roztoky, prášky, filmy, nebo také gely a biologický materiál. Velkou výhodou Ramanovy spektroskopie je malá interakce s vodou. Vibrace v molekule vody jsou totiž při Ramanově spektroskopii velmi málo aktivní a neruší výsledné spektrum. Vzorky se proto nemusí před měřením vysušovat a bez problémů lze takto analyzovat vodné roztoky, hydrofobické látky a jiné vzorky, které obsahují vodu, jako například živé tkáně a buňky. Další výhodou je, že pro analýzu v Ramanově spektroskopii stačí pouze malé množství vzorku, což umožňuje zkoumat vzorky v řádech miligramů, povrchové vrstvy,³ jednotlivé buňky,¹¹ krystaly¹ a někdy i jednotlivé molekuly.¹² V případě živých tkání a buněk je obrovskou výhodou také to, že pro provedení Ramanovy analýzy není třeba

vzorek barvit, což by vzorek nebo podmínky měření mohlo znehodnotit, jako například při zkoumání kinetiky a metabolismu léčiv.¹¹ Problémy při analýze vzorků v Ramanově spektroskopii představují hlavně fluorescence vzorku a zahřátí a následná degradace vzorku vlivem silného laseru. Fluorescenci lze minimalizovat správným výběrem laseru a jeho vlnové délky. Riziko degradace vzorku lze snížit více způsoby. Jedním z nich je zmenšení výkonu laseru na úkor síly Ramanova efektu, dále je možné vzorek při měření rotovat nebo jej umístit do média, které není v Ramanově spektroskopii aktivní, jako například bromid draselný nebo chlorid sodný.³

Analyzované látky lze teoreticky zkoumat bez vnějšího obalu, ale většinou se musí do přístroje nějakým způsobem vložit a upevnit. Nádoby a kyvety, které se při Ramanově spektroskopii používají většinou nemusí splňovat žádné zvláštní požadavky. Barva a tvar nádoby nehrají ve většině případů velkou roli,³ a materiál je nutné volit podle použité vlnové délky excitačního zdroje. Pro měření v oblasti viditelného nebo blízkého infračerveného spektra, je možno používat skleněné nebo plastové kyvety. V ultrafialové oblasti se z důvodů absorpce používají křemenné kyvety. Kromě umístění vzorků do nádob je také možností měření na podložních sklíčkách, většinou vyrobených z fluoridu vápenatého nebo hořečnatého. Vzorky lze také často analyzovat přímo skrz plastové obaly, jak je vidět na porovnání spekter Obrázku 8. Toho se využívá zejména v oblasti kontrol léčiv¹³ a jiných komerčních výrobků, kde se používají přenosné ruční Ramanovy analyzátoři. Je tak možné provést neinvazivní a nedestruktivní kontrolu výrobku bez potřeby jeho rozbalení. V případech, kdy vzorek nelze umístit do přístroje, ale je potřeba použít sofistikovanější přístroj, je alternativní možností použití Ramanovy mikrosondy.¹



Obrázek 8: Porovnání Ramanova spektra aspirinu uvnitř barevné skleněné ampule a spektra samotného prášku. Přeřazeno z literatury.⁵

Plynné vzorky se pro měření uzavírají do válců nebo do kapilár.¹ Při měření kapalných vzorků se analyzované kapaliny umísťují do kyvet nebo kapilár. Kapiláry mohou být poměrně malé, s vnitřním poloměrem až v oblasti 0,5 – 1 mm. Kapalně vzorky lze také umístit do tenké vrstvy mezi dvě sklíčka, většinou vyrobené z bromidu draselného. Díky vysoké výkonosti dnešních laserů lze používat roztoky i o velmi malých koncentracích. Pevné látky je možné zkoumat ve formě jemného prášku, který se umístí do dutinky nebo kapiláry. Někdy se pevné vzorky smíchají s bromidem draselným nebo chloridem draselným a slisují se do tenkých tablet, jako u infračervené spektroskopie. Tento postup snižuje riziko přehřátí a degradace vzorku laserem.³ Většinu polymerů lze snímat bez předchozí úpravy.⁸ U krystalických vzorků lze však pozorovat vliv orientace krystalu na výsledné spektrum, což lze omezit rotováním vzorku.³

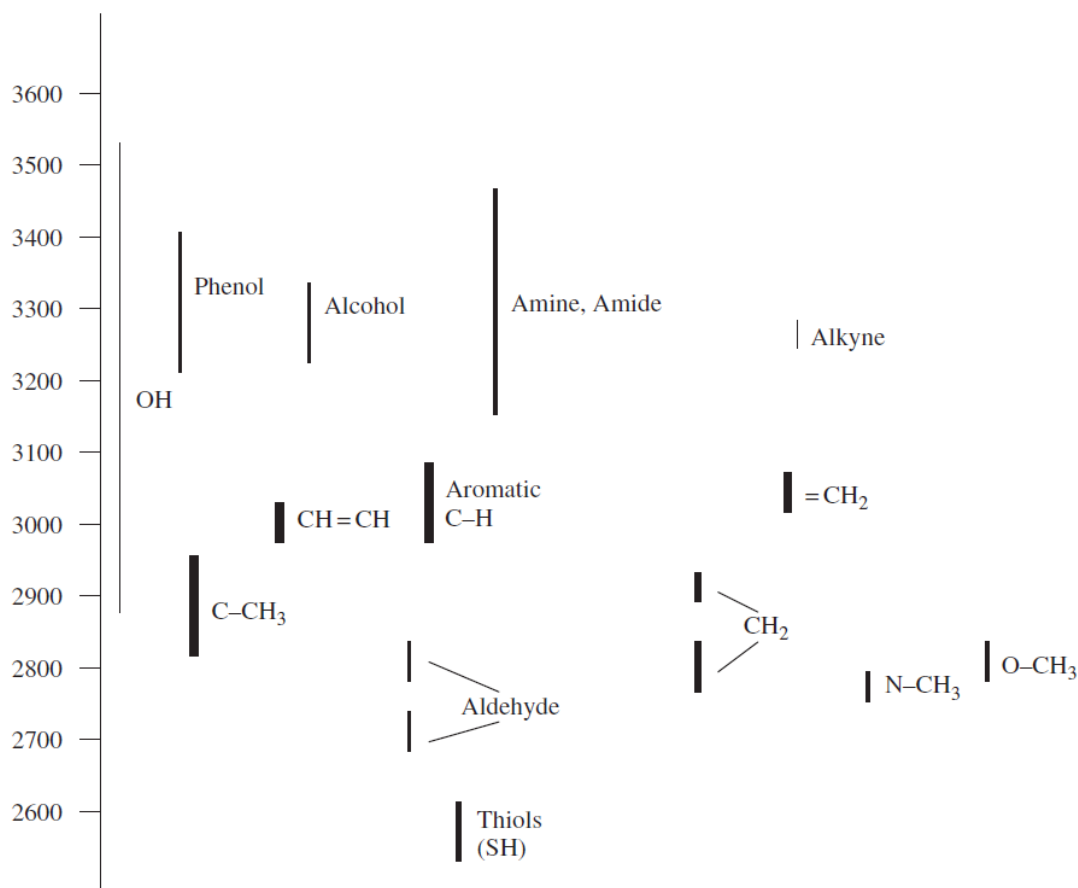
1.2.4 Interpretace Ramanových spekter

Grafickým znázorněním výsledků Ramanovy spektroskopie je spektrum, ve kterém je na ose y vynesena intenzita rozptýleného záření v závislosti na Ramanově posunu na ose x. Ramanův posun představuje vlnovou délku (případně vlnočety) rozptýlených elektronů a je důležitým údajem pro interpretaci spekter.

Ramanova spektra je možné interpretovat pomocí přiřazování pásů ve spektru funkčním skupinám dle jejich typických vlnových délek. Vazby, které jsou v molekule blízko sebe, se mohou ovlivňovat a pokud jsou si zároveň blízké energeticky, poskytnout dohromady jeden výsledný signál ve spektru. Pokud jsou obě vazby energeticky vzdálené, na spektru se zobrazí jako dva samostatné pásy.³ Přehled typických vibrací pro několik funkčních skupin je vidět na Obrázku 9.

Interpretace spekter jen na základě typických vlnočtů vibrací funkčních skupin může být u složitějších sloučenin velmi obtížná. Ramanova spektroskopie je však vhodná i pro „fingerprint“ analýzu. Oblast Ramanova spektra pod vlnočtem 1500 cm^{-1} se označuje jako oblast otisku prstu, kde se často vyskytují spektrální pásy tvořené většími skupinami vazeb, které se navzájem ovlivňují a spojují se do složitějších útvarů.³ Popisují tak tvar a uspořádání zkoumané molekuly a jsou tedy unikátní pro každou sloučeninu. Interpretaci pak lze nejlépe provádět porovnáním naměřených spekter s databázemi a s knihovnami.

Intenzita Ramanova rozptylu se uvádí v arbitrárních jednotkách a je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku, což umožňuje i kvantitativní analýzu. Je však třeba brát v úvahu, že záleží i na aktivitě dané vibrace v Ramanově spektroskopii. Například symetrické vibrace poskytují silnější signály než vibrace asymetrické. Aromatické a nenasycené vazby zpravidla také poskytují signály o vysokých intenzitách. Spolu se šířkou pásu, může být intenzita také ukazatelem čistoty a krystalinity vzorku.



Obrázek 9: Znáznornění typických vibrací aktivních v Ramanových spektrech. Délka čar představuje vlnočtový rozsah vibrace v cm^{-1} a tloušťka čar reprezentuje intenzitu Ramanova signálu. Převezato z literatury.³

1.2.5 Typy Ramanovy spektroskopie

V dnešní době existuje velké množství speciálních instrumentací Ramanovy spektroskopie kombinující různé uspořádání, speciální přípravy vzorku a další jiné techniky. Mezi jedny z nejvíce využívaných patří povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS), rezonanční Ramanova spektroskopie a Ramanova mikroskopie.

Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (v angličtině Surface Enhanced Raman Spectroscopy, zkráceně tedy SERS) je technika, u které je Ramanovo spektrum vytvářeno obvyklým způsobem bez speciální instrumentace, ale vzorek je speciálně upraven pro zesílení Ramanova jevu.⁸ V literatuře se uvádí, že běžně je u SERS dosahováno zesílení intenzity Ramanova jevu o 6 řádů,^{1,3,8} i když některé experimenty uvádějí, že dosahují i větších zesílení, a to až o 10-15 řádů.^{12,14} SERS využívá k zesílení intenzity Ramanova efektu zdrsňený povrch. Toho lze dosáhnout dvěma hlavními způsoby, nejpoužívanějším z nich je použití koloidních roztoků, které obsahují nanočástice inertních kovů jako například stříbra nebo zlata.³ Tyto koloidní roztoky mohou být suspendovány přímo do měřených roztoků, nebo nanášeny na povrch vzorku.⁸ Při SERS buněk a tkání se nanočástice inkorporují přímo do buněk, čehož se dosáhne inkubací

buněk přímo s nanočásticemi a následným termálním šokem (snížení teploty na 0°C) pro otevření pórů buněk a přijmutí nanočástic dovnitř buňky.¹⁴ Další možností jak dosáhnout zesílení Ramanova jevu, je použití hrubého povrchu elektrody. Vzorek se na takovou elektrodu přímo nanáší,⁸ nebo se elektroda vkládá přímo do nádoby se vzorkem.³ SERS technika není příliš vhodná pro analýzu sloučenin, u kterých je Ramanův efekt velmi silný, protože může dojít k zasycení detektoru.

Rezonanční Ramanova spektroskopie představuje zajímavou možnost pro analýzu chromoforů. Chromofory pohlcují záření, které může způsobit fluorescenci a vyzáření elektronů. Při rezonanční Ramanově spektroskopii se jako excitační zdroj používá laser s vlnovou délkou, která je velmi blízko absorbované frekvenci, což má za důsledek zesílení Ramanova jevu o dva až šest řádů.³ To umožňuje analýzu vzorků o velmi malé koncentraci – obvykle se pomocí Ramanovy spektroskopie měří koncentrace do 0,1 mol/dm³, ale tato metoda umožňuje detekovat analyty o koncentraci až 10⁻¹⁸ mol/dm³.⁸ To je obzvláště výhodné pro biologické uplatnění, kde vzorky často neobsahují velké koncentrace zkoumaných analytů. Velkou výhodou této metody je vysoká potenciální specificita, kdy zesilovací efekt bude uplatněn jen pro ty chromofory, které splňují rezonanční podmínku, a zesílí tak jejich signál nad ostatní složky vzorku. Toho se využívá například při analýze chromatoforů v buňkách, kde při použití určité frekvence dojde pouze k zesílení signálu chromatoforů nad signály proteinů a ostatních složek. Nevýhodou je, že tato metoda je z očividných důvodů náchylná k fluorescenci, což může způsobit dodatečné problémy. U rezonanční spektroskopie lze také zmínit metodu SERRS, která spojuje rezonanční Ramanovu spektroskopii a povrchem zesílenou spektroskopii.

Ramanova mikroskopie spojuje metodu Ramanovy spektroskopie s optickým mikroskopem. Zkoumaný vzorek se na sklíčku vkládá pod mikroskop, který je skrze objektiv propojen s excitačním laserem. Pomocí objektivu uživatel namíří laser pod vhodným zvětšením na vzorek nebo určité místo v něm. Zvětšení objektivu umožňuje provést zaměření laseru s velkou přesností. Uvádí se, že při Ramanově mikroskopie je možné laser zaměřovat s přesností až na 2 μm.¹ V případě použití konfokálního mikroskopu je navíc možné zaměřit laser i do hloubky vzorku, a to pomocí změny zaostření mikroskopu. Následně se vzorek ozáří excitačním laserem, rozptýlené světlo se objektivem zachytí a následně pomocí soustavy čoček, zrcadel, filtrů a monochromátorů dále upravuje a přivádí na detektor. Ramanova mikroskopie se může kombinovat i s jinými metodami jako například s použitím nanočástic pro povrchově zesílenou Ramanovou spektroskopii (SERS) nebo výběrem vlnové délky laseru pro rezonanční Ramanovou spektroskopii pro zesílení získaných signálů.¹⁵ Kromě získávání spekter z určitého místa vzorku

je možné využít Ramanovu mikroskopii také pro mapování rozsáhlejších oblastí vzorku a zkoumání chemického rozvržení vzorku. Při mapování je příprava vzorku stejná jako u jednotlivého měření, ale místo získání spektra pouze z určitých míst vzorku, je provedeno více měření v rozsáhlejší oblasti. Vzorkem se pohybuje v pravidelných rozestupech tak, aby byla postupně změněná celá žádaná oblast. Takovéto mapování je sice časově náročné (trvá v řádech hodin), ale umožňuje získání detailních spektrálních informací pro velkou oblast vzorku, což je obzvláště výhodné pro nehomogenní vzorky. Provedením mapování získáme obrovské množství spektrálních dat, které je potřeba dále zpracovat a interpretovat. Pro jejich zpracování se používají různé statistické a matematické algoritmy, které získaná spektra zpracují, vzájemně porovnají a vytvoří mapu četnosti jednotlivých komponentů.¹⁶

1.2.6 Biologické aplikace Ramanovy spektroskopie

Ramanova spektroskopie může být využita pro identifikaci neznámých vzorků (čistých prvků i sloučenin) a jejich čistoty, proto má široké uplatnění v řadě oblastí, jako například ve farmacii a kontrole podezřelých látek. Kromě uplatnění v analytických oblastech má však i řadu biologických aplikací. Malé požadavky na úpravu vzorků a relativně nedestruktivní povaha Ramanovy spektroskopie umožňují její využití pro analýzu tkání, a ve spojení s mikroskopem i analýzu jednotlivých buněk a organel. Absence potřeby barvení vzorku navíc umožňuje využití v oblasti dopravy léčiv a zkoumání jejich metabolismu.

U biologických aplikací má časté využití hlavně Ramanova mikroskopie, která je dostatečně citlivá na sledování změn v buňkách na molekulární úrovni. To ji činí vhodnou pro použití v oblasti výzkumu rakoviny. Nádorové buňky se od zdravých buněk liší právě na úrovni molekul, dochází v nich ke změnám množství a konformace jednotlivých buněčných složek jako například DNA, bílkoviny a tuky. Přesné změny v buňce závisí na daném typu rakoviny, ale obecně platí, že nádorové buňky obsahují velké množství DNA, a tedy signál z nukleových kyselin bývá u nádorových buněk silnější než u zdravých.¹⁷ Nádorové buňky se oproti zdravým buňkám také rozmnožují rychlejším tempem a obsahují proto velké množství bílkovin, které plní funkci růstových faktorů pro stimulaci dalšího růstu buňky.¹¹ Při porovnávání Ramanových spekter s histologickými vyšetřeními řada studií dokázala, že lze Ramanovu spektroskopii použít pro rozzeznání nádorových buněk od buněk zdravých s přesností 90 až 99%.^{18–20} Časem by tedy Ramanovy sondy v některých případech mohly nahradit biopsii a náročná histologická vyšetření, a tím urychlit a usnadnit detekci rakoviny u pacientů.²⁰

Kromě detekce nádorových buněk má Ramanova spektroskopie uplatnění také ve výzkumu možností léčby rakoviny a cíleném transportu léčiv. Pomocí Ramanovy mikroskopie lze totiž

zkoumat transport léčiv do buňky a jejich následný metabolismus uvnitř buňky.¹⁵ V porovnání s jinými technikami používanými pro tyto účely, jako například fluorescenční mikroskopie, má Ramanova mikroskopie výhodu v podobě absence potřeby používání barviv. Barviva mohou totiž při zkoumání transportu a metabolismu léčiv významně ovlivnit interakci použitých léčiv s buňkou.^{11,15,21} Při použití Ramanovy spektroskopie proto není třeba hledat vhodná barviva pro sledování daného léčiva a znát jejich vzájemnou interakci.¹¹ Pokud použité léčivo poskytuje silný Ramanův signál, sledování jeho transportu do buňky a uvnitř buňky lze provádět bez dalších úprav vzorku. Pokud však dané léčivo nelze takto detekovat, je možné transport léčiv provést ve spojení s použitím nanočástic,¹⁵ které umožní sledování léčiv bez silných Ramanových signálů a zároveň můžou danou léčivou látku transportovat cíleně do nádorové buňky pomocí cílení určité bílkoviny nebo růstového receptoru.¹¹ Použití nanočástic jako nosičů tak zabraňuje předčasné degradaci léčiva a minimalizuje jeho nespecifickou toxicitu. Kromě cíleného zaměření nádorových buněk je důležité také následné působení léčiva uvnitř buňky. Žádaná je afinita k určitým organelám, především mitochondriím, jádru a lysozomům. Pokud je totiž léčivo transportováno přímo do místa, kde má působit, je menší šance, že léčivo bude buňkou zničeno a maximalizuje se tak jeho účinnost.²² Nanočástice použité pro transport léčiv do buněk musí splňovat několik kritérií, hlavními z nich jsou biokompatibilita s lidským organizmem, biodegradovatelnost a nízká toxicita. V současné době se zkoumá použití několika typů nanočástic, mezi ně patří kationické lipozomy,²² biodegradovatelné polymerní nanočástice – z nich se hodně využívá například PLGA (Poly lactide-co-glycolide)^{11,15} a v poslední době se začíná zkoumat pro toto použití i oxid grafenu (GO).^{21,23}

1.3 Grafen oxid

Grafen oxid je planární uhlíkový derivát odvozený od grafenu. Podobně jako grafen, se vyznačuje velkým specifickým povrchem, vysokou mechanickou pevností a průhledností.²⁴ Oproti grafenu však obsahuje kyslíkové skupiny, které mu propůjčují dodatečné vlastnosti, jako například hydrofilitu a lepší možnosti funkcionalizace. V závislosti na stupni oxidace GO je možné měnit jeho elektrické a optické vlastnosti, GO tak může být vodivým i polovodičovým materiálem.²⁵ Díky možnosti snadné úpravy velikosti částic a vlastností pomocí funkcionalizace, GO představuje zajímavý materiál pro řadu využití, od baterií a solárních článků,²⁶ přes membrány a biosenzory²⁷ až po využití v řízené dopravě léčiv.²¹

1.3.1 Příprava grafen oxidu

Existuje velké množství metod a postupů, které se dnes používají pro výrobu grafen oxidu, všechny zahrnují oxidaci grafitu různými oxidačními činidly a silnými kyselinami a jeho následnou exfoliaci. Jako klasické metody se uvádějí Brodieho, Staudenmaierova a Hummersova, ze kterých postupem času vznikaly efektivnější, bezpečnější a časově méně náročné metody. Například Hummersova metoda je díky své bezpečnosti a časové nenáročnosti dodnes s drobnými modifikacemi často využívána. Efektivita oxidace při přípravě se specifikuje pomocí poměru uhlíkových a kyslíkových atomů ve výsledném GO. U dobře zreagovaných vzorků GO by se tento poměr měl pohybovat mezi hodnotou 2,1 a 2,9.²⁸

Brodieho metoda je považována historicky za nejstarší metodu přípravy GO, i když vznikla v podstatě náhodou. Brodie se zabýval studiem atomové hmotnosti grafitu a při jeho míchání se silnými oxidačními činidly zaznamenal zvýšení hmotnosti výsledného produktu. Oxidačními činidly, která Brodie používal byla koncentrovaná kyselina dusičná a chlorečnan draselný. Nechával s nimi grafit opakovaně reagovat, dokud po promytí produktu nedocházelo ke změně hmotnosti. Produktem dle Brodieho byly velmi tenké, průhledné krystaly, které se skládaly z uhlíku, kyslíku a vodíku. Výsledný produkt Brodie nazval kyselina grafitová.²⁹ Během této reakce dochází k uvolňování toxických oxidu dusíku a rozkladem chlorečnanu vzniká potenciálně explozivní oxid chloričitý. Brodieho metoda dosahuje poměru uhlíku a kyslíku o hodnotě 2,6, ale je časově náročná, kdy reakční doba se uvádí jako tři až čtyři dny.³⁰

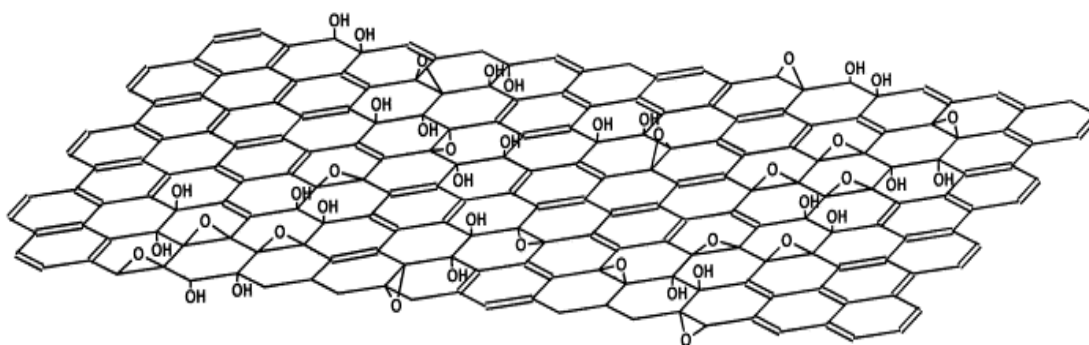
Staudenmaierova metoda vychází z Brodieho metody, stále je časově velmi náročná, ale je upravena pro lepší výtěžek produktu.³⁰ Součástí reakční směsi je kromě koncentrované kyseliny dusičné také koncentrovaná kyselina sírová. Směs těchto dvou kyselin je při přidávání grafitu chlazená a je do ní postupně přidáván chlorečnan draselný, oproti jeho okamžitému přimíchání při Brodieho metodě.³¹ Během této reakce se opět uvolňují toxické plyny, po jejich uvolnění se reakční směs nechává reagovat za pokojové teploty po dobu čtyř dnů. Reakce je ukončena přidáním destilované vody. Pro výsledný produkt se uvádí poměr uhlíku a kyslíku o hodnotě 2,89.^{28,31}

Hummersova metoda je vznikla ve snaze vytvořit časově méně náročnou a bezpečnější metodu pro přípravu GO. Výsledná metoda zkracuje reakční dobu z řádu dnů na dvě hodiny.²⁸ Hummersova metoda je založena na použití prakticky bezvodé směsi, která se kromě grafenu skládá z dusičnanu sodného a kyseliny sírové. Do této směsi je přidáván manganistan draselný, který se směsí exotermně reaguje. Proto je reakční směs umístována do chladících lázní, tak aby teplota nepřekračovala 20 °C. Směs se následně ohřívá a nechává reagovat při 35 °C, poté je do

reakční směsi přidávána voda za průběhu další exotermní reakce. U takto získaného GO je poměr uhlíku a kyslíku uváděn jako 2,25²⁸ a nedochází ke vzniku výbušných plynů.

1.3.2 Struktura a vlastnosti grafen oxidu

Detailní popis struktury GO zatím není kompletní a existuje řada modelů, které se GO snaží popsat. Jedním z důvodů, proč je obtížné vytvořit jednoznačný model GO, je závislost jeho vlastností na stupni oxidace. V literatuře je často zmiňován Lerf-Klinowského model založený na ¹³C NMR spektroskopii GO,³² který není sice úplně kompletní, ale nejlépe vysvětluje dosud popsané vlastnosti GO.³⁰ Podle tohoto modelu je základem struktury GO uhlíková kostra, ve které jsou atomy uhlíku umístěné do ploché, hexagonální mřížky obsahující sp² hybridizované vazby. Na tuto kostru jsou dále navázány atomy kyslíku v podobě různých funkčních skupin, přesněji jde o hydroxylové a epoxidové skupiny s karbonylovými a karboxylovými skupinami na okraji částic.³³ Tyto skupiny způsobují nepravidelnosti a deformace mřížky, jako například díry nebo nepravidelnou distribuci sp² hybridizovaných vazeb.



Obrázek 10: Struktura GO podle Lerf-Klinowského. Převzato z literatury.³²

Jedním z vhodných nástrojů pro popis GO je transmisní elektronová mikroskopie (TEM).³⁰ Pomocí TEM byla struktura GO více přiblížena a získané poznatky z velké části podporují Lerf-Klinowského model. Z měření pomocí TEM vyplývají následující vlastnosti struktury GO:³⁴ rovnoměrně oxidovaný GO obsahuje oblasti o velikostech až do 8 nm², které mají pravidelnou strukturu grafenu, oxidované oblasti GO jsou amorfní, bez pravidelné struktury s minimálním počtem sp² vazeb a dominantními kyslíkovými funkčními skupinami by měly být hydroxylové a epoxidové skupiny.

V GO jsou zachovány některé vlastnosti grafenu. Stále jde o poměrně chemicky inertní sloučeninu, která je mechanicky pevná a opticky průhledná. Struktura obsahující polární skupiny navíc poskytuje GO hydrofilní vlastnosti, což umožňuje získání lepší disperze ve vodním prostředí a snadnější využití GO v biomedicínských aplikacích.³⁵ Kromě toho struktura GO poskytuje

nekovalentní interakce s řadou biomolekul, což umožňuje využití GO pro sensory nebo jako nosič pro léčiva. GO interaguje s biomolekulami, které obsahují například diolové, fenylové a aminové funkční skupiny. Nekovalentní reakce, které se zde uplatňují, jsou nejen vodíkové můstky a elektrostatické působení, ale také π - π patrová interakce s aromatickými molekulami.²⁷ GO je také SERS aktivní, což ho činí ideální pro Ramanovu spektroskopii.

1.3.3 Biologické aplikace grafen oxidu

GO je díky svým fyzickým i chemickým vlastnostem zajímavým materiálem pro řadu využití. Mimo jiné je velmi atraktivní materiálem i pro biologické aplikace jako například v řízené dopravě léčiv, jako součást biosensorů nebo materiálů s antibakteriální aktivitou.

GO se může nekovalentně vázat s řadou biomolekul, což umožňuje jeho aplikaci jako nosiče léčiv pro jejich cílenou dopravu. Toho se dá využít při léčbě řady onemocnění, ale obrovskou výhodou to představuje především pro léčbu rakoviny, kde je specifita léčiv vzhledem k jejich povaze nesmírně důležitá. Jedním z často používaných chemoterapeutik v kombinaci s GO je aromatický doxorubin. Ten je možné na povrch částic GO aplikovat pomocí fyziosorpce, protože mezi GO a aromatickými kruhy doxorubinu dochází k patrovým interakcím.³⁶ GO má hydrofilní charakter, proto je v organismu poměrně biokompatibilní. Vyšší biokompatibilitu se dá u něj dosáhnout pomocí tzv. PEGylace, což je metoda, ve které se navazuje polyethylenglykolový polymer přímo na GO³⁶ nebo na adsorbované léčivo.³⁷ Tím se dosáhne vhodnějších vlastností systému a dojde k jeho „zamaskování“ před imunitním systémem.

Kromě cílené dopravy léčiv, poskytují nekovalentní interakce GO možnost využití pro výrobu biosensorů. Biosensory jsou zařízení, které umožňují detekci určitých analytů a převedení jejich detekce do podoby měřitelného signálu. GO je často využíván ve FRET (Förster resonance energy transfer) biosensorech, které fungují na principu přenosu energie mezi molekulami dvou chromoforů. Donor je při tomto jevu v excitovaném stavu a pomocí nezářivého přenosu přenáší svou energii molekule akceptoru, který následně energii uvolní ve formě fluorescence. Efektivita tohoto jevu je závislá na vzájemné vzdálenosti molekul donoru a akceptoru. Tato závislost je natolik citlivá, že je možné této závislosti využít pro výrobu biosensorů. GO v takovémto sensoru může v závislosti na jeho stupni oxidace sloužit jako donor nebo i jako akceptor. Demonstrován byl například při detekce patogenů³⁸ nebo glukosy.³⁹

GO také prokazuje značnou antibakteriální aktivitu. Při porovnání jeho antibakteriální aktivity s ostatními materiály založenými na grafenu vykazuje vyšší efektivitu, a to především díky vysokému obsahu kyslíkových skupin, které dobře interagují s polárními membránami bakterií.⁴⁰ Mechanismus antibakteriální aktivity GO je připisován jeho fyzikálním i chemickým vlastnostem.

Často se uvádí, že grafen oxid má ostré hrany, které mechanicky porušují buněčné membrány bakterií a způsobují tak jejich smrt.⁴¹ Dle novějších studií by však antibakteriální aktivita měla být převážně způsobena chemickou povahou GO. GO adheruje na povrch buňky a díky jeho vlastnostem dochází k elektronovému transferu mezi buněčnou membránou a GO,⁴² což vede k oxidativnímu stresu a následnému úmrtí buňky.

2 Experimentální část

2.1 Materiály a vybavení

2.1.1 Chemikálie

Grafitový prášek (katalogové číslo #282863, velikost částic pod 20 μm) pro přípravu GO, stejně jako manganistan draselný (KMnO_4), dusičnan draselný (NaNO_3), kyselina sírová (H_2SO_4) a peroxid (H_2O_2), byl pořízen od společnosti Sigma-Aldrich.

Při přípravě vzorků buněk byl použit fosfátový pufr připravený z chloridu sodného (NaCl), chloridu draselného (KCl) a dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4) od společnosti Penta a dihydrátu hydrogenofosforečnanu sodného (Na_2HPO_4) od výrobce Sigma-Aldrich. Fixace buněk byla prováděna roztokem paraformaldehydu od společnosti Penta.

Ultračistá voda byla připravena v laboratoři pomocí systému Puris water, od výrobce MiraESt, model Esse-UP Analysis.

2.1.2 Materiál

Buněčnou kulturou použitou pro experiment byly lidské nádorové epitelální buňky nádoru děložního čípku Hela od společnosti ATCC, USA. Buňky byly kultivované v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium) s nízkou koncentrací glukosy od společnosti Life Technologies při 37 °C a 5% CO_2 atmosféře.

2.1.3 Přístroje

Snímky pro charakterizaci GO pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) byly získány na systému NTEGRA Spectra (NT-MDT, Rusko) se softwarem Nova Px. 3.4.0 rev. 19040.

Ramanova spektra a mapy byly získány pomocí disperzního Ramanova mikroskopu DXR Nicolet (Thermo Scientific, U.S.A.). Přístroj je vybaven optickým mikroskopem s objektivy o zvětšení 4x, 10x a 50x a termoelektricky chlazeným CCD detektorem (chlazen na teplotu 50 °C). Excitačním zdrojem byl diodový laser o vlnové délce 455 nm s maximálním výkonem 10 mW.

2.2 Metody

2.2.1 Příprava grafen oxidu

Použitý GO byl připraven oxidací grafitového prášku pomocí Hummersovy metody. Do směsi 1 g grafitového prášku a 0,5 g dusičnanu sodného bylo po kapkách přidáno 23 ml kyseliny sírové. Získaná reakční směs byla schlazena na 0 °C a za dalšího chlazení do ní byly následně postupně přidávány 3 g manganistanu draselného, teplota během této exotermní reakce byla udržována pod 20 °C. Po přidání manganistanu byla reakční směs zahřáta na teplotu 35 °C a míchána po dobu 30 minut. Následně bylo pomalu přidáváno 46 ml destilované vody a reakční směs byla dále míchána při teplotě 98 °C po dobu 15 minut. Po 15 minutách byla směs ochlazena na pokojovou teplotu, byl přidán 1 ml 30% peroxid vodíku a 140 ml destilované vody. Výsledný materiál byl centrifugován při 6000 rpm po dobu 7 minut a promyt destilovanou vodou. Tento proces byl několikrát opakován za účelem odstranění zbytkových nečistot. Získaný materiál byl přes noc vysušen ve vakuové peci a z něj pak byl získán prášek GO.

Pro získání koloidně stabilních částic z takto získaného GO byla provedena účinná velikostní selekce GO prášku dispergovaného ve vodě jednoduchou sonikací a následnou centrifugací. 10 mg GO prášku bylo dispergováno ve 20 ml destilované vody a byla provedena jeho sonikace po dobu 1 hodiny. Poté byla disperze míchaná přes noc na magnetickém míchadle. Následovala centrifugace při 13500 rpm po dobu 20 minut, a nakonec byla provedena dekantace supernatantu, který obsahoval GO částice požadované velikosti.

2.2.2 Příprava buněk

Do jamky v kultivační destičce bylo vloženo sklíčko z fluoridu vápenatého (substrát pro Ramanovu analýzu). Byla provedena standardní trypsinizace buněk a do jamky se substrátem bylo vyseto dostatečné množství buněk (cca 60 % konfluence). Buňky se takto nechaly přes noc adherovat na povrch substrátu. Další den bylo provedeno značení buněk pomocí suspenze GO tak, aby byla dosažena žádaná koncentrace GO v použitém objemu média. Buňky s GO byly následně inkubovány po dobu dalších 24 hodin. Kontrolní buňky byly kultivovány po dobu 24 hodin bez značení suspenzí GO.

Po inkubaci bylo kultivační médium odstraněno a buňky byly opatrně propláchnuty fosfátovým pufrům (PBS). Následně byl k buňkám přidán 1 ml 4% roztoku paraformaldehydu v PBS pro jejich fixaci. Buňky byly pro fixaci ponechány v lednici po dobu 10 minut, poté bylo fixační činidlo odsáto a následoval průplach fosfátovým pufrům a ultračistou vodou. Před měřením byl vzorek buněk ponechán vyschnout.

2.2.3 Měření

Povrchová morfologie GO pomocí mikroskopie atomárních sil byla měřena v pokleповém módu za použití ACTA-SS (AppNano, USA) hrotu s frekvencí 200-400 kHz a silovou konstantou 13-77 N/m. Měření probíhalo za pokojové teploty s vlhkostí v rozmezí 45-55 %. Výškové profily byly vypočítány za pomoci softwaru Gwyddion 2.51.

Analýza vzorků buněk byla prováděna pomocí Ramanových spekter a mapování. Nastavení Ramanova spektrometru bylo zvoleno tak, aby vzorek poskytoval signál o přijatelné intenzitě, ale nedošlo k jeho tepelné degradaci. Excitační laser o vlnové délce 455 nm byl tedy omezený na výkon 4 mW a spektra byla vytvořena z 32 snímků s dobou expozice 2 s. Zvolen byl objektiv s 50x zvětšením. Před CCD detektorem byla zvolena sestava 50 μm pinhole s mřížkou s 1200 vrypy/mm. Zapnuta také byla korekce na fluorescenci pro kompenzaci vzniku nežádoucí fluorescence z buněk. Získaná spektra byla následně upravena na baseline pomocí softwaru OMNIC 8.2.0.403, vyexportována a zpracována pomocí skriptů v programu gnuplot pro prezentaci výsledků.

Pro detekci přítomnosti GO v buňkách byly měřeny vzorky o následujících koncentracích GO v inkubačním médiu: 5 $\mu\text{g/ml}$, 18,75 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 37,5 $\mu\text{g/ml}$ a 57,6 $\mu\text{g/ml}$. V jednotlivých vzorcích bylo vybráno minimálně deset buněk a z každé byly z různých míst vždy získány tři spektra. Pro prezentaci a vyhodnocení výsledků byly vždy z těchto tří spekter vybrány spektra s co nejmenším šumem a nejmenším výskytem kosmického záření.

Přítomnost GO v buňkách byla také potvrzována pomocí mapování, a to ve vzorcích o koncentracích GO 18,75 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 37,5 $\mu\text{g/ml}$ a 57,6 $\mu\text{g/ml}$. Mapovány byly oblasti o velikosti 2-4 buněk, což odpovídá oblasti o rozměrech v řádech desítek až stovek μm . Změřené mapy byly zpracovávány v softwaru OMNIC pro úpravu pozadí a další zpracování. Získaná multispektrální data upravená na pozadí byla dále analyzována pomocí Multivariate Curve Resolution (MCR) algoritmu pro zjištění jednotlivých komponent ve vzorku. Pro výpočet byly zadány dva regiony očekávaných složek (GO a buňka) a čtyři komponenty (pro kontrolní buňky bez GO pouze jeden region a tři komponenty). Z algoritmicky nalezených komponent byly následně vybrány komponenty odpovídající HeLa buňkám, GO a substrátu. Z nich byly vytvořeny RGB mapy, které ukazují prostorové rozložení jednotlivých komponent pomocí přiřazených barev.

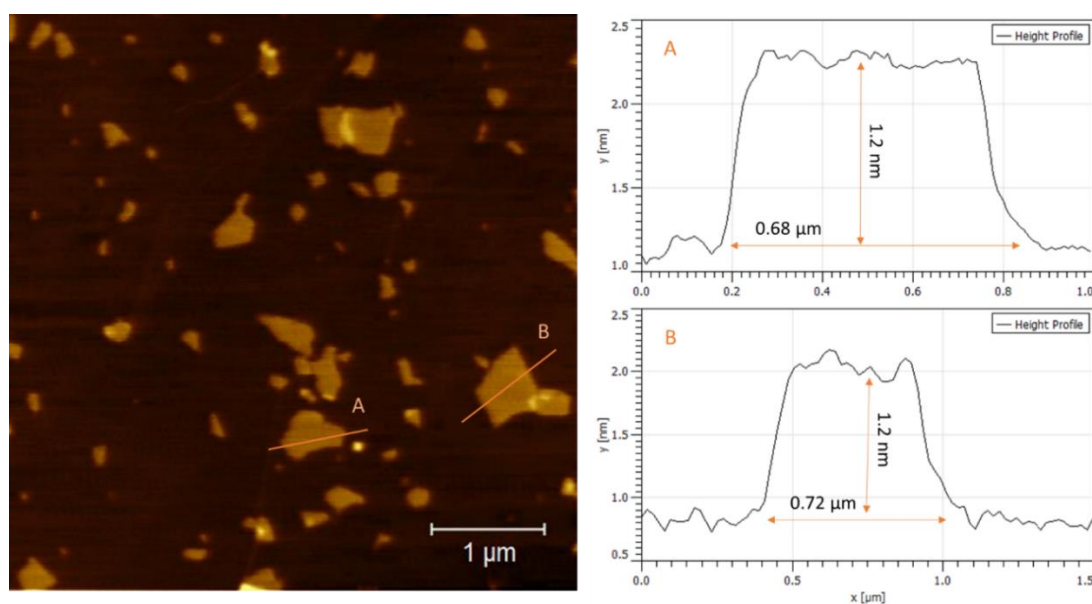
Pro měření stability vzorku v čase byl vybrán vzorek o koncentraci GO 37,5 $\mu\text{g/ml}$. Měření vzorku bylo pravidelně opakováno po dobu 6 měsíců. Měření byly vždy minimálně čtyři buňky,

z každé byly získány tři spektra a z nich vybráno spektrum s nízkým šumem a nízkým výskytem kosmického záření. Mezi jednotlivými měření byl vzorek skladován v lednici.

2.3 Výsledky a diskuze

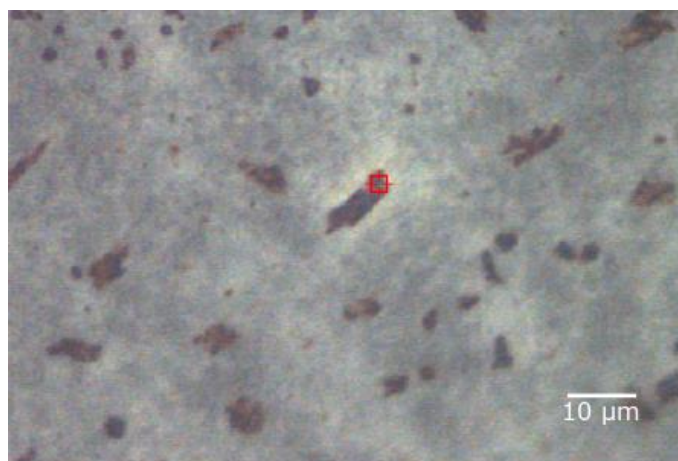
2.3.1 Charakterizace grafenu oxidu

Pro charakterizaci velikosti a profilu částic GO byla provedena mikroskopie atomárních sil (AFM). Výsledný snímek spolu se zjištěnými výškovými profily vyznačených částic je znázorněn na Obrázku 11.



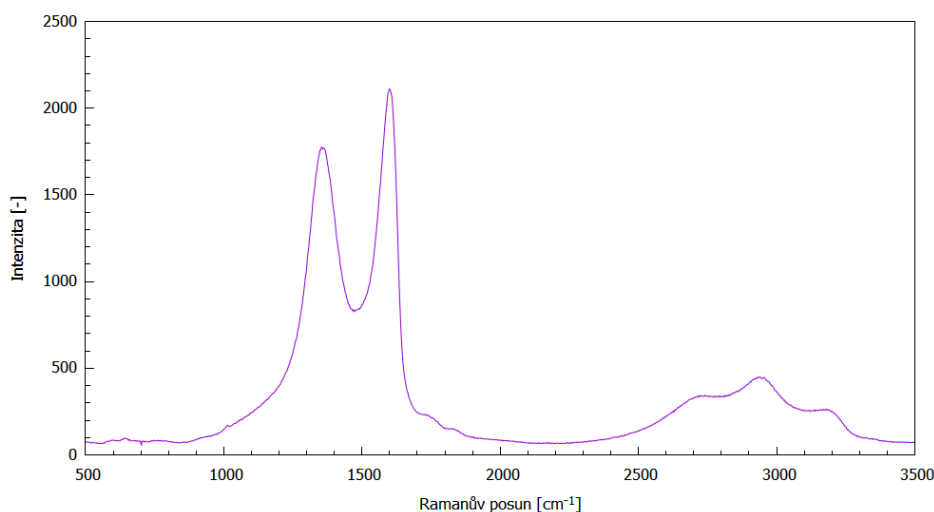
Obrázek 11: AFM snímek o velikosti $5 \times 5 \mu\text{m}$ použitého grafenu oxidu s výškovými profily vypočítanými pro vyznačené částice.

Pomocí Ramanovy spektroskopie bylo získáno spektrum použitého GO. Snímek měřené částice z mikroskopu je vidět na Obrázku 12.



Obrázek 12: Snímek měřené částice grafenu oxidu z Ramanova mikroskopu, 50x zvětšení.

Grafen oxid při Ramanově spektroskopii poskytoval spektrum typické pro GO, které znázorňuje Obrázek 13. Byly v něm viditelné dva výrazné signály při 1600 cm^{-1} a 1350 cm^{-1} , a skupina tří, méně intenzivních pásů v oblasti $2715\text{--}3180\text{ cm}^{-1}$.



Obrázek 13: Ramanovo spektrum grafen oxidu použitého pro inkubaci s buňkami.

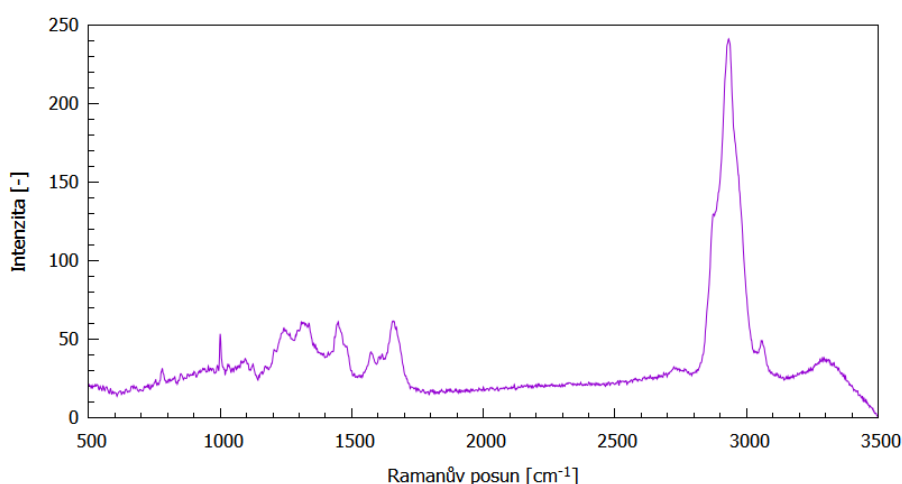
Pás s největší intenzitou při vlnočtu 1600 cm^{-1} odpovídal G pásu, který je typický jak pro Ramanova spektra grafenu, tak pro spektra jeho ostatních forem. G pás vzniká z vibrací uhlíkových vazeb v hexagonální mřížce, π elektrony v této sp^2 vazbě navíc způsobují rezonanci a výsledný pás je proto často velmi intenzivní.⁴³ Druhý výrazný, ale méně intenzivní pás vlnočtu 1350 cm^{-1} příslušel D pásu. Ve spektrech GO se typicky vyskytuje v oblasti $1342\text{--}1356\text{ cm}^{-1}$.⁴⁴ Oproti G pásu se ve spektrech grafenu neprojevuje příliš intenzivně, ale po oxidaci grafenu na GO dochází k jeho výraznému zesílení. Jeho původ spočívá v distorzích a deformacích hexagonální sp^2 mřížky.⁴⁵

Kromě intenzivních D a G pásů byly v oblasti $2500\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ ve spektru přítomné tři široké, méně intenzivní pásy při vlnočtech 2715 cm^{-1} , 2940 cm^{-1} a 3180 cm^{-1} . Ty odpovídají overtonům D a G pásů. Nejvýraznější z nich (2940 cm^{-1}) se označuje jako D+D' pás. Ten se podle literatury projevuje v oblasti $2920\text{--}2940\text{ cm}^{-1}$,⁴⁵ tento široký pás je typickým znakem spekter GO a redukovaného GO (rGO). Pás při vlnočtu 2715 cm^{-1} se označuje jako 2D pás (někdy také G') a přesněji se jedná o overtony vibrací D pásu.^{46,47} Tento pás je citlivý na tloušťku měřeného materiálu, velmi ostrý 2D pás je považován za ukazatel jednovrstevného grafenu,⁴⁷ jeho intenzita po oxidaci na GO klesá.⁴⁵ Poslední pás při vlnočtu 3180 cm^{-1} se označuje jako 2D' pás a odpovídá druhému řádu vibrací D a 2D pásu.⁴⁴

Jako ukazatel struktury se při Ramanově spektroskopii grafenu a jeho derivátů využívá poměru intenzit D a G pásu – I_D/I_G . Čím vyšší tento poměr je, tím více defektů a nerovnoměrností je ve struktuře měřeného grafenu obsaženo. Díky narušení sp^2 vazeb ve struktuře grafenu během jeho oxidace na GO, je pak D pás GO intenzivní. Poměr I_D/I_G je pro GO tedy vyšší než pro grafen a je možné jej využít jako ukazatel stupně jeho oxidace. Vzorek čistého GO při charakterizaci měl I_D/I_G poměr roven 1,19.

2.3.2 Kontrolní buňky

Všechny měřené kontrolní buňky poskytovaly spektrum typické pro linii rakoviny děložního čípku. Jedno reprezentativní spektrum je uvedeno na Obrázku 14.



Obrázek 14: Ramanovo spektrum kontrolní HeLa buňky

V oblasti vlnočtu $800-1800\text{ cm}^{-1}$, která se v buňkách považuje za oblast otisku palce, byla přítomná skupina menších pásů, které převážně odpovídají signálům z nukleových kyselin a proteinů.⁴⁸ Při vlnočtu 780 cm^{-1} byly přítomny signály z valenčních vibrací heterocyklu cytosinu a uracilu. Dále byl v této oblasti pozorován výrazný úzký pás aminokyseliny fenylalaninu při vlnočtu 1000 cm^{-1} . Okolo vlnočtu 1100 cm^{-1} se nacházel pás symetrické vibrace vazeb O-P-O fosfátové kostry nukleových kyselin. Kromě vibrací z proteinů a nukleových kyselin byl v této oblasti rozeznatelný i pás vibrací pocházející z C–C vazeb v lipidech, a to při vlnočtu 1130 cm^{-1} . V rozsahu vlnočtů $1180-1400\text{ cm}^{-1}$ byla viditelná skupina signálů odpovídající dalším nukleotidům. Zde se také nalézal pás při vlnočtu 1310 cm^{-1} pocházející z vibrací amid III, tedy z deformačních vibrací peptidové vazby proteinů. Výrazný pás byl detekován i při 1450 cm^{-1} , který odpovídá deformačním vibracím CH_2 a CH_3 vazeb v proteinech. Při vlnočtu 1650 cm^{-1} byl pozorován signál vibrací amid I, který má původ ve valenčních vibracích peptidových vazeb v proteinech.

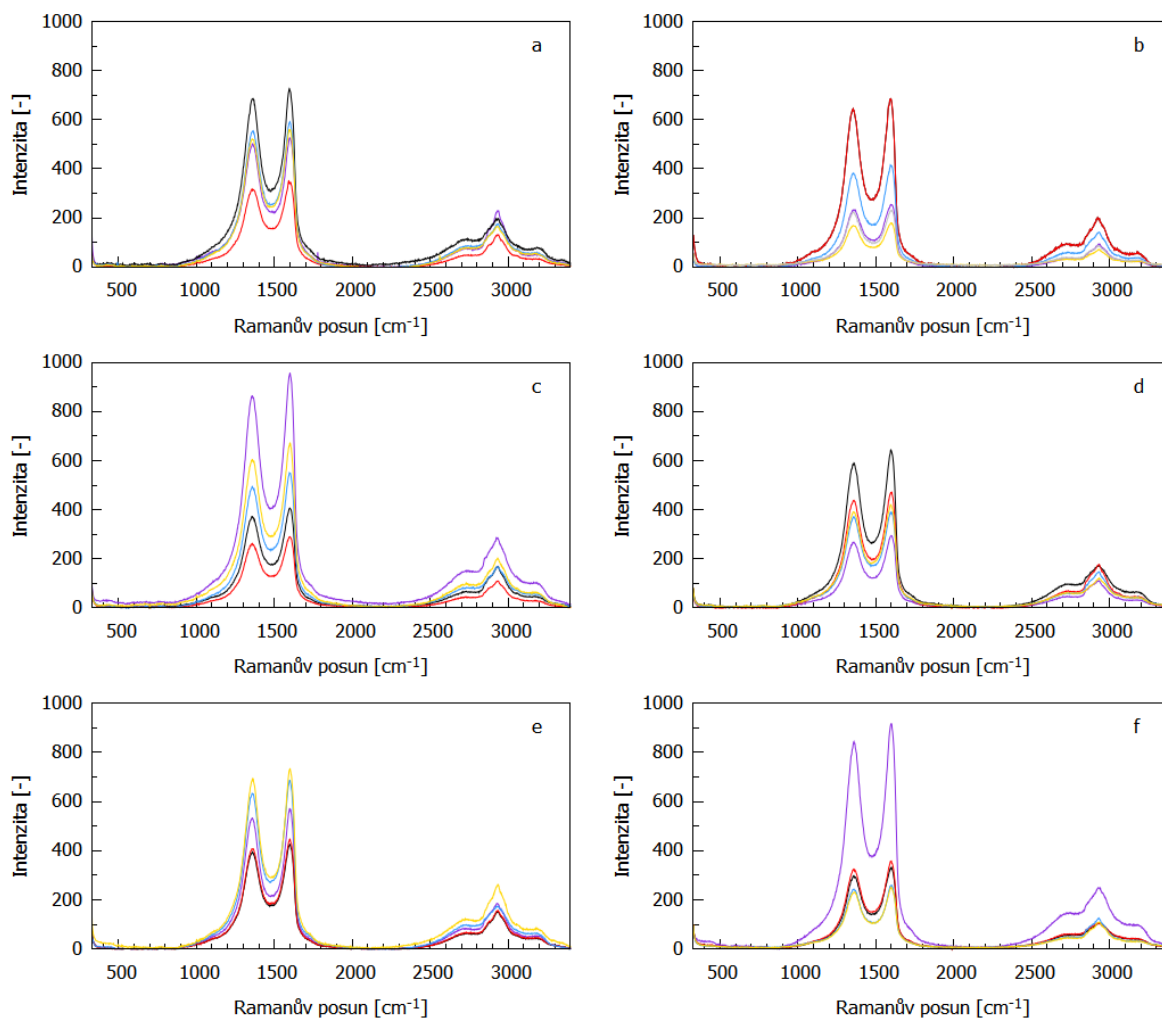
V rozsahu vlnočtů 1800-2700 cm^{-1} se nacházela oblast bez výrazných signálů. Ta je pro spektra buněk typickým znakem a označuje se jako tichý region (silent region).

Dominantou celého spektra byl pak pás s vysokou intenzitou o vlnočtu 2930 cm^{-1} , který odpovídal symetrické valenční vibraci CH_3 fosfolipidové membrány. V oblasti 2854-2900 cm^{-1} , v blízkosti pásu fosfolipidové membrány, byl patrný signál o menší intenzitě, který odpovídal asymetrickým valenčním vibracím CH_2 vazeb v lipidech a mastných kyselinách. Při vlnočtu 3060 cm^{-1} se nacházel signál pocházející z vibrací aromatických jader a dvojných $\text{CH}=\text{CH}$ vazeb. V oblasti 3170-3500 cm^{-1} se pak nacházel signál původem z málo aktivních vibrací vody obsažené v buňce.

2.3.3 Detekce grafenu v buňkách

Pomocí měření jednotlivých spekter byla přítomnost GO zaznamenána ve všech měřených koncentracích, přehled vybraných spekter je znázorněn na Obrázku 15. Všechna získaná spektra obsahovala D a G pásy GO při stejných vlnočtech jako ve spektrech čistého GO, tedy při 1600 cm^{-1} a 1350 cm^{-1} . V oblasti 2500-3300 cm^{-1} byly viditelné pásy overtonů D pásu (tedy 2D a 2D' pás), G' pás byl zakryt signálem z vibrací proteinů v buňce při vlnočtu 2930 cm^{-1} .

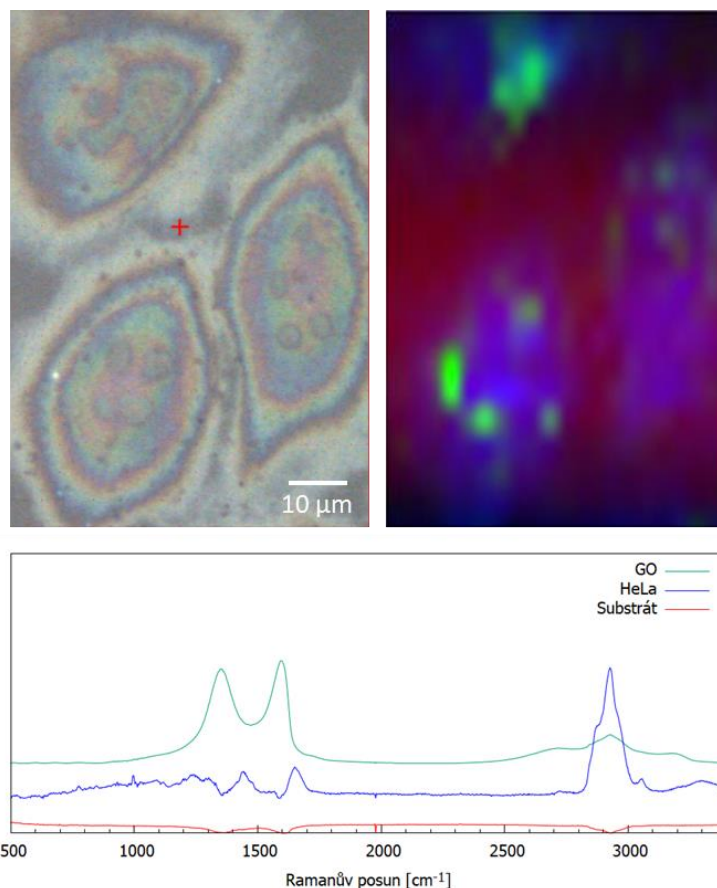
Intenzity Ramanova rozptylu mezi buňkami i mezi jednotlivými měřeními v jedné buňce, se značně lišily. Intenzita v případě buněk je kromě přesného složení daného místa, které se liší organelou od organely, také závislá na profilu buňky. V místech, kde je buňka vyšší, jsou její komponenty více zastoupeny než v místech s nízkým profilem. Ramanova mikroskopie je konfokální metoda, která umožňuje zaostření do různé hloubky vzorku, což u vzorků s vysokým profilem může způsobovat značné odlišnosti v intenzitě rozptýleného záření. Intenzita pásů pocházejících ze samotného GO také závisí na přesné poloze jeho částic uvnitř buňky. Pokud je daná částice GO obsažena v organelu, dochází k utlumení jejího signálu oproti částici GO umístěné volně v cytoplasmě.



Obrázek 15: Ramanova spektra všech vzorků buněk s GO, (a) 5 $\mu\text{g/ml}$, (b) 18,75 $\mu\text{g/ml}$, (c) 20 $\mu\text{g/ml}$, (d) 25 $\mu\text{g/ml}$, (e) 37,5 $\mu\text{g/ml}$ a (f) 57,6 $\mu\text{g/ml}$.

GO byl ve vzorcích detekován i pomocí mapování. Ve všech mapovaných vzorcích, tedy o koncentracích 18,75 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 37,5 $\mu\text{g/ml}$ a 57,6 $\mu\text{g/ml}$ byl GO ve výsledných mapách přítomen. S rostoucí koncentrací GO použitého při inkubaci vzorku přibývalo detekovaných částic ve vzorku.

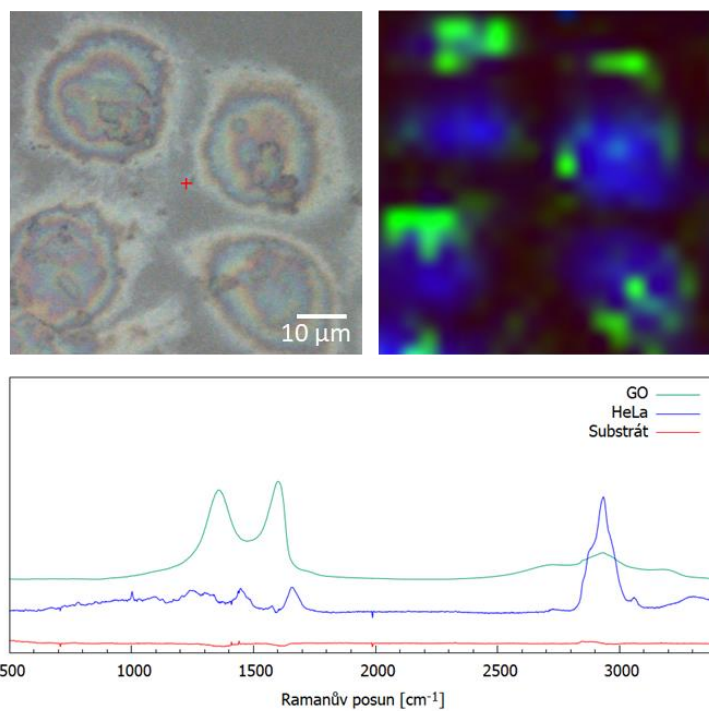
Z Obrázku 16 je patrné, že na mapě vzorku o nejnižší mapované koncentraci (18,75 $\mu\text{g/ml}$) bylo viditelné malé množství částic rozptýlených po celém průřezu buňky. Nedošlo k jejich shlukování ani k hromadění na určitých místech v buňce.



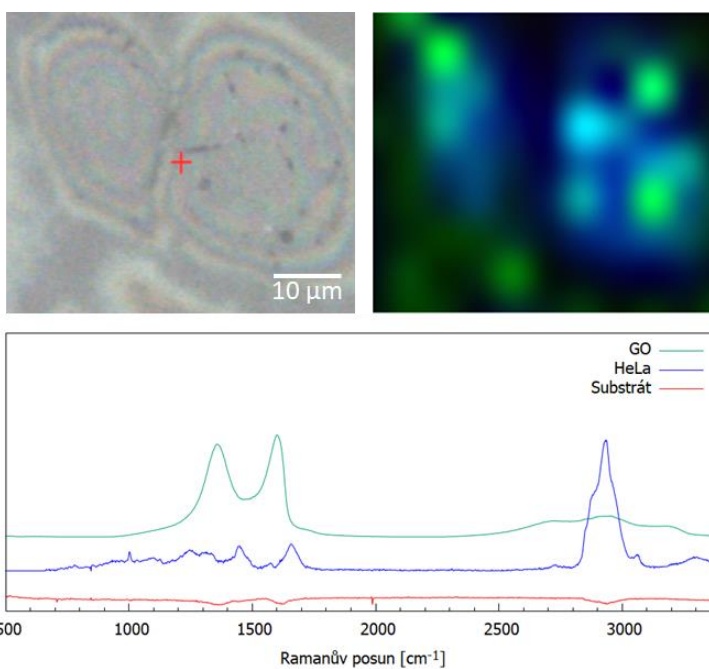
Obrázek 16: Mapa HeLa buněk s GO o koncentraci 18,75 $\mu\text{g/ml}$. Vlevo nahoře je vidět snímek z mikroskopu s vyznačenou oblastí mapování, vpravo nahoře získaná RGB mapa a dole jsou spektra nalezených komponent. Červená barva reprezentuje substrát, modrá HeLa buňky a zelená částice GO.

Na Obrázcích 17 a 18 vyššími koncentracemi (25 $\mu\text{g/ml}$ a 37,5 $\mu\text{g/ml}$) je na mapách znatelný nárůst počtů částic GO v buňkách. Na obou mapách je znatelné shlukování většího počtu částic.

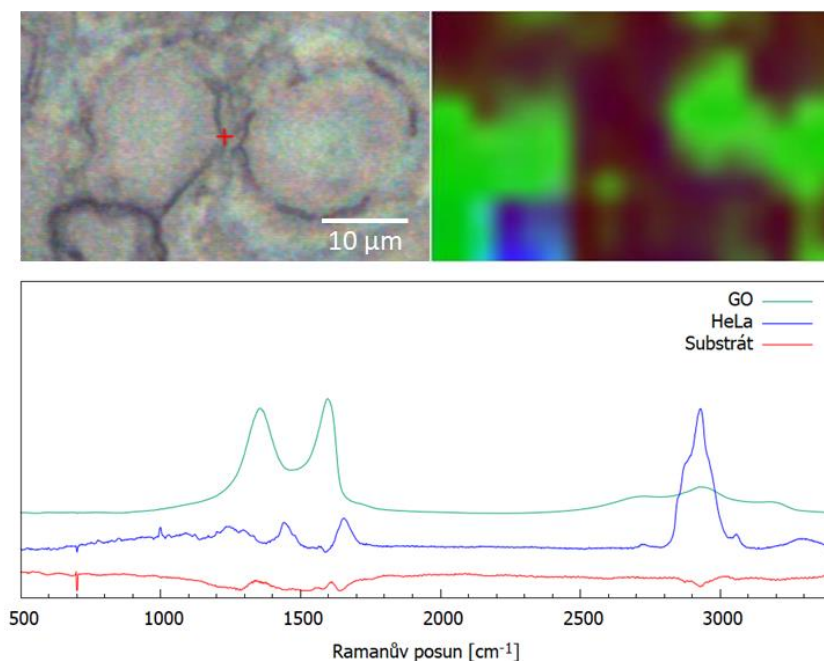
Jak je vidět na Obrázku 19, na mapě vzorku o nejvyšší koncentraci GO (57,6 $\mu\text{g/ml}$) značně dominoval GO. HeLa buňka jím byla zcela zahlcena a obsahovala GO téměř po celém průřezu. Buňky pod mikroskopem vypadaly odlišně od vzorků o nízkých koncentracích již při prvním pohledu. Byly na povrchu značně zašedlé a ve vzorku byla viditelná místa, kde se GO očividně shlukoval.



Obrázek 17: Mapa HeLa buněk s GO o koncentraci 25 µg/ml. Vlevo nahoře je vidět snímek z mikroskopu s vyznačenou oblastí mapování, vpravo nahoře získaná RGB mapa a dole jsou spektra nalezených komponent. Červená barva reprezentuje substrát, modrá HeLa buňky a zelená částice GO.



Obrázek 18: Mapa HeLa buněk s GO o koncentraci 37,5 µg/ml. Vlevo nahoře je vidět snímek z mikroskopu s vyznačenou oblastí mapování, vpravo nahoře získaná RGB mapa a dole jsou spektra nalezených komponent. Červená barva reprezentuje substrát, modrá HeLa buňky a zelená částice GO.



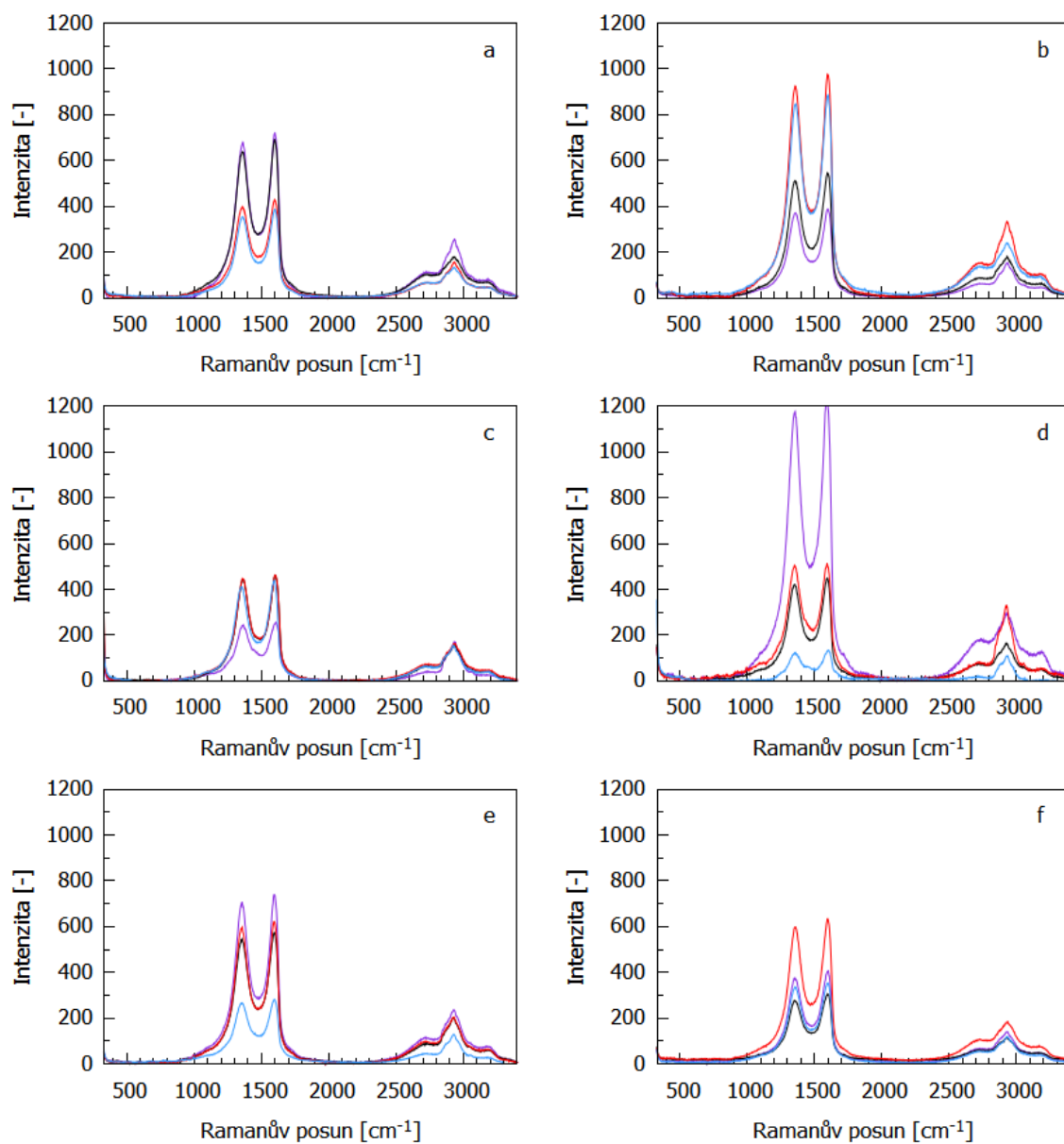
Obrázek 19: Mapa HeLa buněk s GO o koncentraci 57,6 µg/ml. Vlevo nahoře je vidět snímek z mikroskopu s vyznačenou oblastí mapování, vpravo nahoře získaná RGB mapa a dole jsou spektra nalezených komponent. Červená barva reprezentuje substrát, modrá HeLa buňky a zelená částice GO.

2.3.4 Stabilita vzorku buněk s grafen oxidem

Během měření stability vzorku byly ve změřených spektrech přítomny signály GO i signály HeLa buněk po celou dobu měření. Vzorky byly však během posledních měření náchylnější ka na některých místech o něco snadněji docházelo jejich k spálení, nebyl však problém měření provést se získáním dostatečného počtu spekter. Přehled vybraných spekter ze všech měsíců znázorňuje Obrázek 20, výsledky z jednotlivých měsíců jsou pak pro lepší čitelnost uvedeny i jednotlivě v příloze.

Během jednotlivých měření byly opět pozorovány změny v intenzitách signálu, které byly způsobeny kombinací rozdílných profilů jednotlivých buněk, přesného umístění GO v buňce a zaostření samotného mikroskopu. Pro vyhodnocení změn, ke kterým mohlo v průběhu času ve vzorku dojít, byly použity hodnoty poměrů intenzit D a G pásů (I_D/I_G). Sledovány byly změny těchto hodnot po jednotlivých měsících.

Pro analýzu naměřených dat byly tedy v získaných spektrech zjištěny intenzity obou pásů a byly zaznamenány do Tabulky 1. Z odečtených intenzit byly následně vypočítány poměry I_D/I_G a výsledné hodnoty byly zaznamenány do stejné tabulky. Pro lepší vizualizaci výsledků, byly poměry I_D/I_G také zpracovány do krabicového grafu na Obrázku 21.

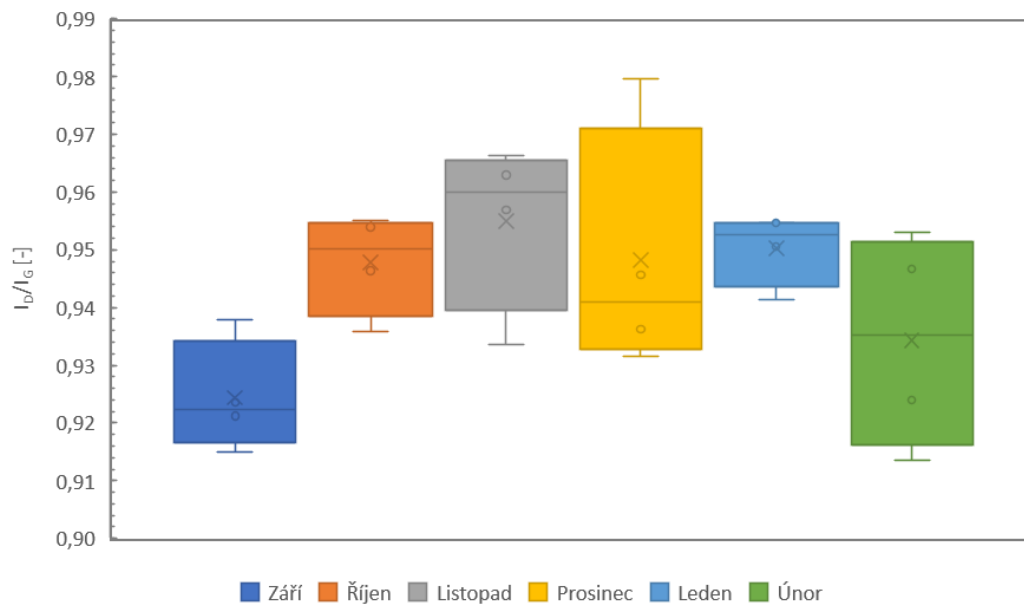


Obrázek 20: Přehled Ramanových spekter získaných pro vyhodnocení stability vzorku o koncentraci $37,5 \mu\text{g/ml}$ během šesti měsíců. Jednotlivé měsíce jsou označeny následovně: (a) září, (b) říjen, (c) listopad, (d) prosinec, (e) leden, (f) únor.

V krabicovém grafu je vidět, že docházelo k výrazným změnám poměru D a G pásů. Změna těchto hodnot ukazuje na to, že v GO uvnitř buněk postupem času docházelo k chemickým změnám. Přesný charakter těchto změn nebylo možné v rámci této práce určit, je však zajímavým předmětem pro budoucí výzkum.

Tabulka 1: Hodnoty intenzit D a G pásů a jejich poměry I_D/I_G pro jednotlivá měření v průběhu šesti měsíců.

Měsíc	Měření	Intenzita D	Intenzita G	I_D/I_G
Září	1	677	722	0,938
	2	638	693	0,921
	3	397	430	0,923
	4	355	388	0,915
Říjen	1	372	389	0,955
	2	925	977	0,946
	3	511	546	0,936
	4	847	888	0,954
Listopad	1	247	256	0,966
	2	442	459	0,963
	3	445	465	0,957
	4	411	440	0,934
Prosinec	1	1176	1243	0,946
	2	420	449	0,936
	3	504	515	0,980
	4	127	136	0,932
Leden	1	706	739	0,955
	2	545	573	0,951
	3	266	283	0,941
	4	595	623	0,955
Únor	1	376	407	0,924
	2	278	304	0,914
	3	600	633	0,947
	4	337	353	0,953



Obrázek 21: Graf znázorňující změnu poměrů intenzit D a G pásů během šesti měsíců.

Závěr

Tématem této bakalářské práce bylo využití Ramanovy spektroskopie pro studium průniku grafen oxidu do nádorových buněk rakoviny děložního čípku.

Ramanova spektroskopie se potvrdila jako metoda vhodná k detekci grafen oxidu v buňkách HeLa. Ve všech vzorcích inkubovaných s grafen oxidem (5 $\mu\text{g/ml}$, 18,75 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 37,5 $\mu\text{g/ml}$ a 57,6 $\mu\text{g/ml}$) byla jeho přítomnost uvnitř buněk potvrzena pomocí měření jednotlivých spekter. Na základě mapování byl grafen oxid v buňkách potvrzen ve všech mapovaných vzorcích při koncentracích 18,75 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 37,5 $\mu\text{g/ml}$ a 57,6 $\mu\text{g/ml}$. Na získaných mapách bylo znatelné, že s rostoucí koncentrací GO použitého při inkubaci buněk se zvyšoval počet částic, které pronikly dovnitř buněk. U vyšších koncentrací bylo pod mikroskopem pozorováno shlukování částic GO a na mapách bylo vidět, že docházelo k zahlcení buněk GO po celém průřezu.

Při sledování stability vybraného vzorku o koncentraci 37,5 $\mu\text{g/ml}$ byly signály GO i buňky ve vzorku přítomny po celou dobu šesti měsíců. Bylo zjištěno, že v GO docházelo k chemickým změnám, které se projeví změnou poměru intenzit D a G pásů. Bližší studium těchto chemických změn by mohlo být zajímavým předmětem dalšího výzkumu.

Grafen oxid se tedy ukázal jako materiál s potenciálem pro dopravu léčiv dovnitř nádorových buněk, který lze za pomoci Ramanovy spektroskopie dále zkoumat pro použití v praxi. Jako další kroky se v tomto procesu nabízí zkoumání průniku systému grafen oxidu nesoucího léčivo, studium biokompatibility takového systému a sledování dalšího osudu částic grafenu oxid, ať už přímo v léčeném organismu nebo v životním prostředí.

Summary

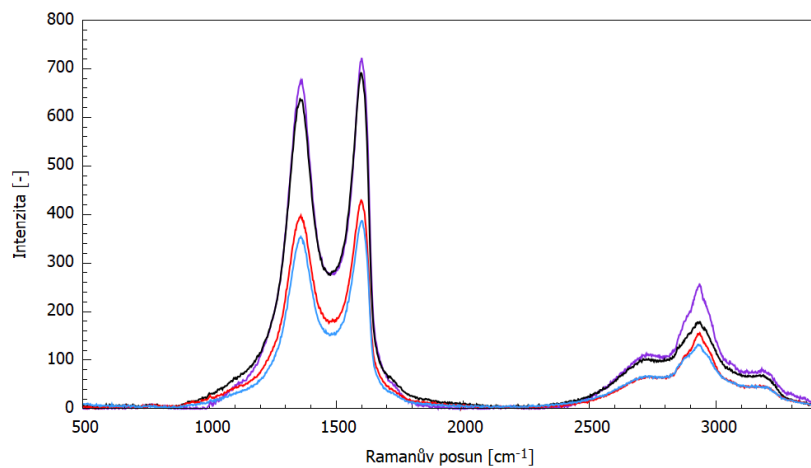
This thesis is focused on using Raman spectroscopy as a tool to study permeation of graphene oxide into cervical cancer HeLa cells.

Raman spectroscopy was a successful tool in detecting graphene oxide in HeLa cell samples. Graphene oxide was detected by single spectra measurements in all cell samples. All maps created using Raman imaging also showed graphene oxide particles inside the cells, although it was only possible to map samples with 18,75 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 37,5 $\mu\text{g/ml}$ and 57,6 $\mu\text{g/ml}$ concentrations due to time constraints. It was observed in the collected maps that with higher concentration of graphene oxide during cell incubation, more graphene particles permeated inside the cells. Maps of the most concentrated cells contained graphene oxide clusters, and the most concentrated sample was completely saturated with graphene oxide.

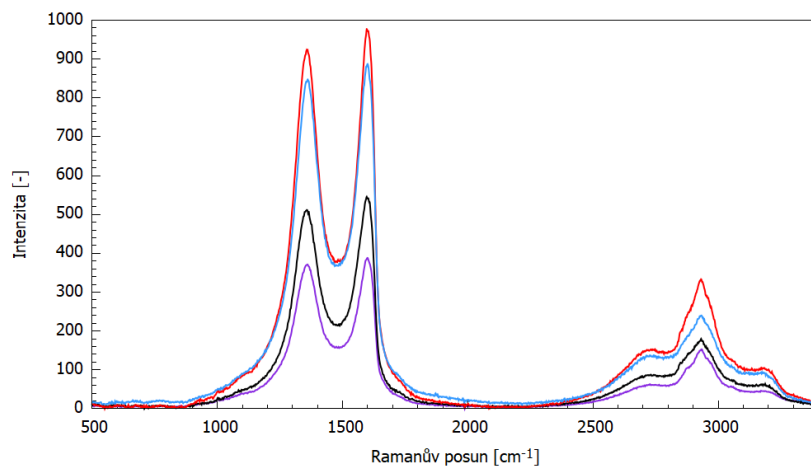
When observing the chemical stability of graphene oxide inside the cell, its signal and the cell signal were prevalent over the entire duration of six months. By comparing the ratios of D and G band intensities between measurements, it was found that chemical changes occurred inside the samples. The exact nature of these changes could be an interesting topic for further research.

Overall, graphene oxide demonstrated a potential for use in targeted drug delivery into cancer cells. With Raman spectroscopy as a powerful imaging tool, it could be possibly further developed for such use. The next steps in this journey will be observing graphene oxide permeation into cells when it is loaded with chemotherapeutic treatment, a closer look into biocompatibility of such delivery systems, and determining the exact pathways of graphene oxide not only inside the organism, but also in the environment.

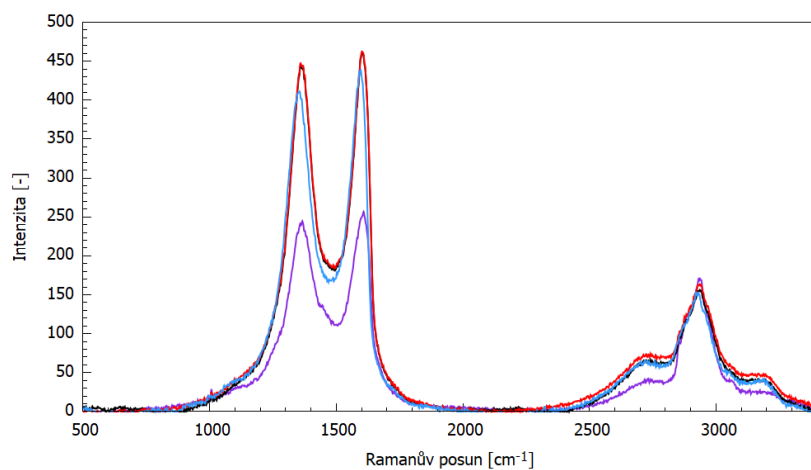
Přílohy



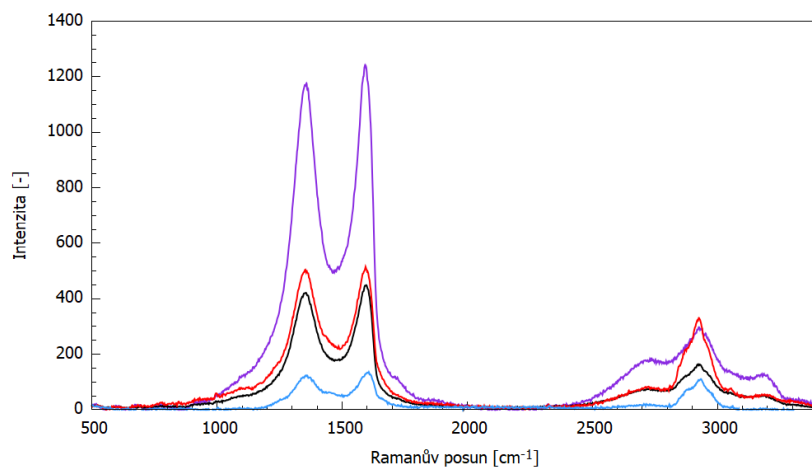
Příloha 1: Spektra HeLa buněk o koncentrace GO 37,5 µg/ml měřených během září.



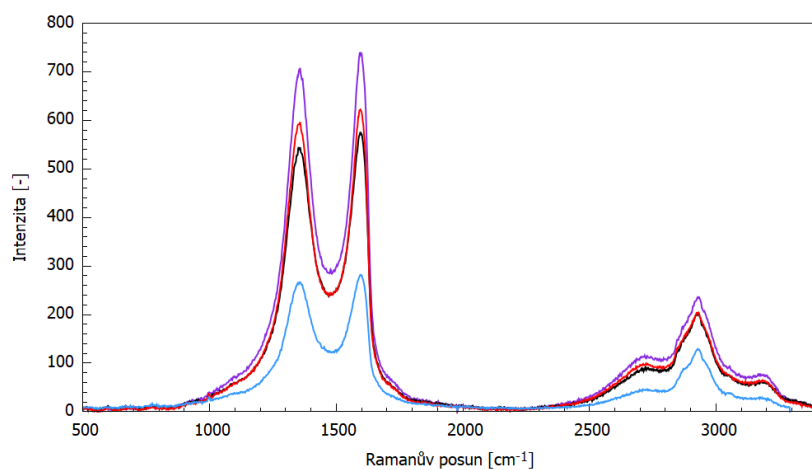
Příloha 2: Spektra HeLa buněk o koncentrace GO 37,5 µg/ml měřených během října.



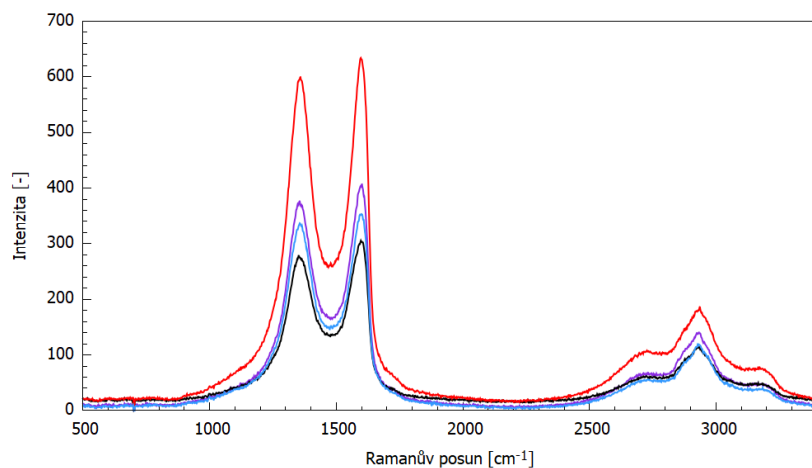
Příloha 3: Spektra HeLa buněk o koncentrace GO 37,5 µg/ml měřených během listopadu.



Příloha 4: Spektra HeLa buněk o koncentrace GO 37,5 µg/ml měřených během prosince.



Příloha 5: Spektra HeLa buněk o koncentrace GO 37,5 µg/ml měřených během ledna.



Příloha 6: Spektra HeLa buněk o koncentrace GO 37,5 µg/ml měřených během února.

Seznam použité literatury

1. Ferraro, J. R., Nakamoto, K. & Brown, C. W. *Introductory Raman Spectroscopy*. (Academic Press, 2008).
2. Chalmers, J. M. & Griffiths, P. R. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2002).
3. Smith, E. & Dent, G. *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2005).
4. Lampman, G. M., Pavia, D. L., Kriz, G. S. & Vyvyan, J. R. *Spectroscopy*. (Mary Finch, 2010).
5. McCreery, R. L. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2000).
6. Otyepka, M. *Struktura atomů a molekul*. (Univerzita Palackého v Olomouci, 2006).
7. Singh Bumbrah, G. & Mohan Sharma, R. Raman spectroscopy and Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* **6**, 209–215 (2016).
8. Skoog, D. A., Holler, J. F. & Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*. (Cengage Learning, 2018).
9. Lindon, J. C., Tranter, G. E. & Kopenaal, D. W. *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*. (Academic Press, 2010).
10. Hrbáč, J. *Aplikace počítačů v měřících systémech*. (Univerzita Palackého v Olomouci, 2013).
11. Chernenko, T. *et al.* Label-free Raman microspectral analysis for comparison of cellular uptake and distribution between nontargeted and EGFR-targeted biodegradable polymeric nanoparticles. *Drug Deliv. Transl. Res.* **3**, 575–586 (2013).
12. Xu, H., Bjerneld, E. J., Käll, M. & Börjesson, L. Spectroscopy of Single Hemoglobin Molecules by Surface Enhanced Raman Scattering. *Phys. Rev. Lett.* **83**, 4357–4360 (1999).
13. Dégardin, K., Guillemain, A. & Roggo, Y. Comprehensive Study of a Handheld Raman Spectrometer for the Analysis of Counterfeits of Solid-Dosage Form Medicines. *J. Spectrosc.* **2017**, 1–13 (2017).
14. González-Solís, J., Luévano-Colmenero, G. & Vargas-Mancilla, J. Surface enhanced Raman spectroscopy in breast cancer cells. *Laser Ther.* **22**, 37–42 (2013).

15. Smith, G. P. S., McGoverin, C. M., Fraser, S. J. & Gordon, K. C. Raman imaging of drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **89**, 21–41 (2015).
16. Hedegaard, M. *et al.* Spectral unmixing and clustering algorithms for assessment of single cells by Raman microscopic imaging. *Theor. Chem. Acc.* **130**, 1249–1260 (2011).
17. Kong, K., Kendall, C., Stone, N. & Notingher, I. Raman spectroscopy for medical diagnostics - From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **89**, 121–134 (2015).
18. Haka, A. S. *et al.* Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis. *J. Biomed. Opt.* **14**, 1–8 (2009).
19. Nijssen, A. *et al.* Discriminating Basal Cell Carcinoma from its Surrounding Tissue by Raman Spectroscopy. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 64–69 (2002).
20. Bakker Schut, T. C. *et al.* In vivo detection of dysplastic tissue by Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* **72**, 6010–6018 (2000).
21. Eliášová Sohová, M. *et al.* Label-free tracking of nanosized graphene oxide cellular uptake by confocal Raman microscopy. *Analyst* **143**, 3686–3692 (2018).
22. Chernenko, T. *et al.* Raman Microscopy for Non-Invasive Imaging of Pharmaceutical Nanocarriers: Intracellular Distribution of Cationic Liposomes of Different Compositioncess. *Mol Pharm.* **9**, 930–936 (2012).
23. Qu, Q. *et al.* Graphene oxide wrapped gold nanoparticles for intracellular Raman imaging and drug delivery. *J. Mater. Chem. B* **1**, 6495 (2013).
24. Novoselov, K. S. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *Science (80-.)*. **306**, 666–669 (2004).
25. Inagaki, M. & Kang, F. Engineering and Applications of Carbon Materials. in *Materials Science and Engineering of Carbon: Fundamentals* 219–525 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-800858-4.00003-6
26. Yin, Z. *et al.* Electrochemical Deposition of ZnO Nanorods on Transparent Reduced Graphene Oxide Electrodes for Hybrid Solar Cells. *Small* **6**, 307–312 (2010).
27. Morales-Narváez, E. & Merkoçi, A. Graphene Oxide as an Optical Biosensing Platform. *Adv. Mater.* **24**, 3298–3308 (2012).

28. Hummers, W. S. & Offeman, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1339–1339 (1958).
29. Brodie, B. C. XIII. On the atomic weight of graphite. *Philos. Trans. R. Soc. London* **149**, 249–259 (1859).
30. *Graphene Nanoelectronics*. (Springer US, 2012). doi:10.1007/978-1-4614-0548-1
31. Staudenmaier, L. Verfahren zur Darstellung der Graphitsäure. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **32**, 1394–1399 (1899).
32. He, H., Klinowski, J., Forster, M. & Lerf, A. A new structural model for graphite oxide. *Chem. Phys. Lett.* **287**, 53–56 (1998).
33. Zhu, Y. *et al.* Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. *Adv. Mater.* **22**, 3906–3924 (2010).
34. Erickson, K. *et al.* Determination of the Local Chemical Structure of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide. *Adv. Mater.* **22**, 4467–4472 (2010).
35. Liu, J., Cui, L. & Losic, D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomater.* **9**, 9243–9257 (2013).
36. Sun, X. *et al.* Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano Res.* **1**, 203–212 (2008).
37. Wang, L. *et al.* PEGylated doxorubicin cloaked nano-graphene oxide for dual-responsive photochemical therapy. *Int. J. Pharm.* **557**, 66–73 (2019).
38. Jung, J. H., Cheon, D. S., Liu, F., Lee, K. B. & Seo, T. S. A Graphene Oxide Based Immuno-biosensor for Pathogen Detection. *Angew. Chemie Int. Ed.* **49**, 5708–5711 (2010).
39. Liu, Y., Yu, D., Zeng, C., Miao, Z. & Dai, L. Biocompatible Graphene Oxide-Based Glucose Biosensors. *Langmuir* **26**, 6158–6160 (2010).
40. Liu, S. *et al.* Antibacterial Activity of Graphite, Graphite Oxide, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide: Membrane and Oxidative Stress. *ACS Nano* **5**, 6971–6980 (2011).
41. Akhavan, O. & Ghaderi, E. Toxicity of Graphene and Graphene Oxide Nanowalls Against Bacteria. *ACS Nano* **4**, 5731–5736 (2010).

42. Li, J. *et al.* Antibacterial activity of large-area monolayer graphene film manipulated by charge transfer. *Sci. Rep.* **4**, 4359 (2015).
43. Kudin, K. N. *et al.* Raman Spectra of Graphite Oxide and Functionalized Graphene Sheets. *Nano Lett.* **8**, 36–41 (2008).
44. Ferrari, A. C. Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron-phonon coupling, doping and nonadiabatic effects. *Solid State Communications* **143**, 47–57 (2007).
45. Aliyev, E. *et al.* Structural characterization of graphene oxide: Surface functional groups and fractionated oxidative debris. *Nanomaterials* **9**, (2019).
46. Krishnamoorthy, K., Veerapandian, M., Yun, K. & Kim, S.-J. The chemical and structural analysis of graphene oxide with different degrees of oxidation. *Carbon N. Y.* **53**, 38–49 (2013).
47. Kudin, K. N. *et al.* Raman Spectra of Graphite Oxide and Functionalized Graphene Sheets. *Nano Lett.* **8**, 36–41 (2008).
48. Kann, B., Offerhaus, H. L., Windbergs, M. & Otto, C. Raman microscopy for cellular investigations — From single cell imaging to drug carrier uptake visualization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **89**, 71–90 (2015).