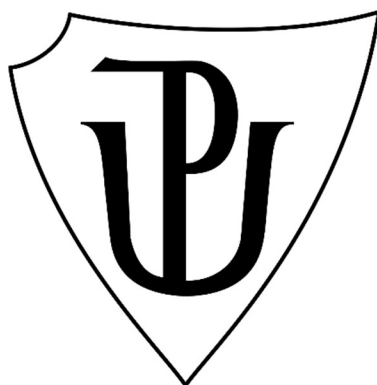


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální chemie



**Příprava vrstev nanočástic stříbra na celulosových
substrátech pro detekci látek pomocí povrchem zesílené
Ramanovy spektroskopie**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jakub Kořenek
Studijní obor:	Nanomateriálová chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Barbora Štefková
Rok:	2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Barbory Štefkové a dále prohlašuji, že jsem veškeré použité zdroje a literaturu uvedl v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

Jakub Kořenek

Poděkování

Zde bych rád poděkoval zejména RNDr. Barboře Štefkové za odborné vedení, přínosné konzultace, cenné rady a čas, který mi věnovala. Dále bych rád poděkoval Mgr. Michalu Kořenkovi za pořízení SEM snímků připravených substrátů.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Jakub Kořenek
Název práce:	Příprava vrstev nanočástic stříbra na celulosových substrátech pro detekci látek pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Barbora Štefková
Rok obhajoby:	2024
Abstrakt:	<p>Tato bakalářská práce je zaměřena na studium přípravy vrstev nanočástic stříbra na nosných celulosových substrátech s jejich následným využitím v oblasti povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. Podkladem byl čistý chromatografický papír (CEL) a chromatografický papír impregnovaný polyethyleneiminem (CEL-PEI). Příprava vrstev probíhala ponořením nosného substrátu do zvoleného objemu disperze nanočástic stříbra a po definovanou dobu byla promíchávána. Samotná příprava nanočástic stříbra spočívala v redukci dusičnanu stříbrného tetrahydridoboritanem sodným. Vznikající nanočástice byly stabilizovány a modifikovány pomocí dihydrátu citronanu sodného a peroxidu vodíku. Celkově bylo připraveno deset různých substrátů, na kterých byla testována SERS aktivita při měření vodného roztoku adeninu o koncentraci $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ jako modelového analytu. Měření SERS spekter probíhalo na laserech o vlnových délkách 455 nm, 532 nm, 633 nm a 780 nm. SERS aktivita jednotlivých substrátů byla vyhodnocena na základě výpočtů faktorů zesílení Ramanova signálu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo v kombinaci substrátů s laserem o vlnové délce 780 nm, kde se faktory zesílení pohybovaly řádově v rozmezí $10^6 - 10^7$. Substrát celPEI100 byl následně zvolen pro měření malachitové zeleně, kterou bylo možné detekovat v minimální koncentraci $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.</p>
Klíčová slova:	Nanočástice, vrstvy stříbra, SERS, Ramanova spektroskopie, SERS substrát, adenin, malachitová zeleň
Počet stran:	93
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Jakub Kořenek
Title:	Preparation of silver nanoparticle layers on cellulose-based substrates for compound detection by surface-enhanced Raman spectroscopy
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of physical chemistry
Supervisor:	RNDr. Barbora Štefková
The year of presentation:	2024
Abstract:	<p>This bachelor thesis is focused on the study of the preparation of silver nanoparticle layers on cellulose substrates with their subsequent application in the field of surface-enhanced Raman spectroscopy. Base substrates are pure chromatographic paper (CEL) and chromatographic paper impregnated with polyethyleneimine (CEL-PEI). The preparation of the layers was carried out by immersing the carrier substrate in a selected volume of silver nanoparticle dispersion and stirred for a defined period of time. The actual preparation of the silver nanoparticles consisted of the reduction of silver nitrate by sodium borohydride. The resulting silver nanoparticles were stabilized and modified by sodium citrate dihydrate and hydrogen peroxide. A total of ten different substrates were prepared and tested for SERS activity by measuring an aqueous solution of adenine at a concentration of 10^{-5} M as a model analyte. The SERS spectra were measured on lasers with wavelengths of 455 nm, 532 nm, 633 nm a 780 nm. The SERS activity of each substrate was evaluated by calculating Raman signal enhancement factors. The best results were achieved in the combination of substrates with 780 nm laser, where the enhancement factors were in the order of $10^6 - 10^7$. The substrate celPEI100 was then chosen for measurement of malachite green, which could be detected on this substrate at a minimum concentration of 10^{-4} M.</p>
Keywords:	Nanoparticles, silver layers, SERS, Ramanova spectroscopy, SERS substrate, adenine, malachite green
Number of pages:	93
Language:	Czech

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	9
2.1	Ramanova spektroskopie.....	9
2.1.1	Historie.....	10
2.1.2	Základní princip Ramanovy spektroskopie.....	12
2.2	Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS).....	14
2.2.1	Mechanismy zesílení Ramanova signálu.....	16
2.2.2	Elektromagnetický a chemický jev.....	18
2.2.3	Další možnosti zesílení Ramanova signálu.....	20
2.3	Obecná příprava koloidních materiálů a nanomateriálů.....	21
2.3.1	Příprava nanočástic stříbra.....	23
2.4	Stabilizace koloidů.....	24
2.5	Vlastnosti nanočástic stříbra.....	25
2.6	Typy substrátů pro aplikace SERS.....	26
2.7	Příprava vrstev nanočástic stříbra na celulóze.....	28
3	Experimentální část.....	30
3.1	Chemikálie.....	30
3.2	Experimentální vybavení.....	31
3.3	Příprava nanočástic stříbra.....	32
3.4	Příprava vrstev nanočástic stříbra.....	33
3.5	Měření SERS.....	34
4	Výsledky a diskuze.....	37
4.1	Charakterizace nanočástic stříbra pomocí UV-VIS spektroskopie.....	37
4.2	Charakterizace nanočástic pomocí dynamického rozptylu světla.....	38
4.3	Transmisní elektronová mikroskopie.....	39
4.4	Modifikace celulosy.....	45
4.5	Charakterizace vrstev stříbra pomocí UV-VIS spektroskopie.....	48
4.6	Množství stříbra na vrstvách.....	50
4.7	Skenovací elektronová mikroskopie a energiově disperzní spektroskopie.....	51
4.8	Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie.....	58
4.8.1	Měření adeninu na nosných substrátech bez stříbra.....	59
4.8.2	Měření připravených substrátů pro SERS.....	61
4.8.3	Faktory zesílení připravených substrátů.....	76
4.8.4	SERS měření malachitové zeleně.....	82
5	Závěr.....	86
6	Summary.....	88

1 Úvod

Teoreticky předpovězený Ramanův jev byl prvně experimentálně dokázán v roce 1928 výzkumnou skupinou C. V. Ramana. Ramanova spektroskopie je metoda založená na Ramanově jevu, která souvisí s rozdílem vlnové délky dopadajícího záření z excitačního laserového zdroje a vlnovou délkou rozptýleného záření po interakci se zkoumaným vzorkem.¹ Jedná se o nedestruktivní metodu sloužící k charakterizaci materiálů a identifikaci molekul, která nevyžaduje složitou úpravu vzorků před měřením a umožňuje také měření vodných roztoků, což z ní dělá velice rychlou a účinnou metodu. Její vývoj je úzce spjatý s infračervenou spektroskopií a často s ní bývá spojována jakožto doplňková metoda. Nástup Ramanovy spektroskopie přichází zejména s vývojem prvních laserů a monochromátorů, kdy byl v roce 1953 sestaven první komerční Ramanův spektrometr. Následným rozvojem citlivějších detektorů byla rozšířena celá škála jejich aplikací a vznikají metody umožňující měření analytů i o velmi nízkých koncentracích. Mezi tyto metody patří povrchem zesílená Ramanova spektroskopie objevená v roce 1974 M. Fleischmannem.² Jedná se o metodu využívající zesílení intenzity Ramanova signálu prostřednictvím povrchové plazmonové rezonance plazmonických kovů. Tento efekt vykazují nejčastěji kovy jako je stříbro, zlato nebo měď. Tato metoda může také existovat v kombinaci s rastrovací sondovou mikroskopií, kdy se jedná o hrotem zesílenou Ramanovu spektroskopii.^{3,4,5,6,7,8,9}

Při měření povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS) je důležité připravit vhodný substrát, který zprostředkuje výrazné zesílení Ramanova signálu. Přípravou ideálního substrátu lze vyladit citlivost SERS až na úroveň jedné molekuly adsorbované na jedné nanočástici. K takovému substrátu se lze přiblížit například vyladěním velikostí, tvarů částic a vzdálenostmi mezi nimi na povrchu substrátu. V porovnání sférických a anizotropních nanočástic budou právě anizotropní nanočástice jako jsou trojúhelníky, nanohvězdy nebo krychličky zesilovat Ramanův signál mnohem více, a to z důvodu tvorby aktivních míst neboli tzv. „hot „spots“ na jejich povrchu. Důležitá je také stabilita a reprodukovatelnost daného substrátu, případně jeho rovnoměrnost, aby vykazoval nízkou odchylku v zesílení signálu.^{10,11,12,13}

Tato práce je založena na studiu přípravy celulosových substrátů, které jsou snadno připravitelné a ekologické. Nanočástice stříbra použité k nanesení na nosné substráty byly

připraveny redukcí dusičnanu stříbrného tetrahydridoboritanem sodným, stabilizovány dihydrátem citronanu sodného a modifikovány různými přísadkami peroxidu vodíku. Testování SERS aktivity připravených substrátů bylo následně provedeno na modelovém analytu – adeninu o koncentraci $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Při měření byly využity lasery o vlnových délkách 455; 532; 633 a 780 nm. Na základě výsledků měření byl vybrán nejefektivnější substrát, který byl použit pro detekci různých koncentrací malachitové zeleně.

2 Teoretická část

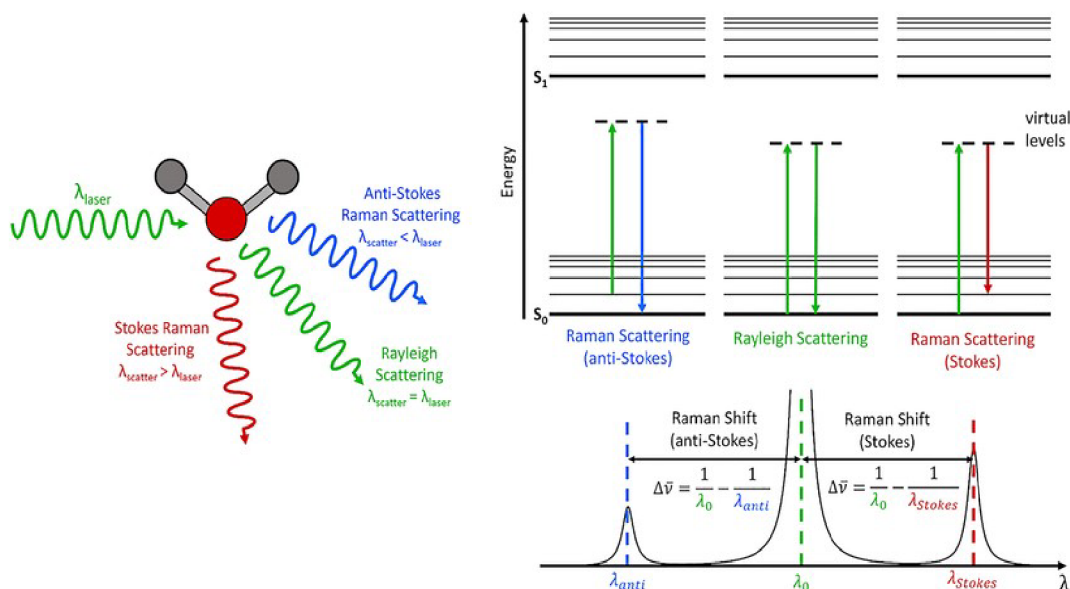
2.1 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je nedestruktivní rotačně–vibrační metoda sloužící pro charakterizaci materiálů a identifikaci molekul, které mají svá specifická spektra. Je založena na neelastickém rozptylu elektromagnetického záření při interakci s molekulami měřeného vzorku, který nazýváme jako Ramanův rozptyl. Během interakce světelného záření s molekulou může docházet buď k absorpci nebo rozptylu světla, ale taktéž však daná molekula nemusí s dopadajícím zářením vůbec interagovat. Jednotlivé energetické hladiny jsou popsány pomocí zjednodušeného Jablonskiho diagramu (viz *Obr. 1*).⁷

Pokud má foton dopadajícího záření dostatečnou energii odpovídající energetickým rozdílům mezi dílčími molekulovými stavy, může dojít k jeho absorpci. Při tomto procesu molekula přechází ze základního nebo nižšího excitovaného stavu do vyššího excitovaného stavu. Po uplynutí určité doby dochází k emisi fotonu molekulou v závislosti na životnosti daného vybuzeného stavu. Emise fotonu potom odpovídá rozdílu energií, kdy se molekula vrací do svého základního stavu nebo do nižší energetické hladiny. Při procesu rozptylu světla může docházet k Rayleighovu nebo Ramanovu rozptylu. Rayleighův rozptyl světla je způsobený elastickými srážkami fotonů s molekulami, což znamená, že po proběhnutí procesu rozptýlení záření je energie molekulárního systému stejná jako na začátku. Po dopadu fotonu tedy dochází k excitaci molekuly do virtuální energetické hladiny a při následné deexcitaci molekula přechází zpět do základního vibračního stavu a vyzáří foton o stejné energii jakou měl foton, který byl molekulou původně absorbován. Rayleighův rozptyl proto nenese žádnou analytickou informaci o zkoumané molekule a je nutné ho odfiltrovat před dopadem na detektor, jelikož jeho intenzita je mnohonásobně vyšší než intenzita neelastického rozptylu záření, který by tak mohl být zastíněn.^{7,14,15}

V Ramanově spektru lze taktéž pozorovat dva typy symetricky rozložených linií kolem Rayleighova rozptylu. Mezi tyto dvě linie patří Stokesův a anti-Stokesův rozptyl, které jsou pro Ramanovu spektroskopii stěžejní a vždy nesou analytickou informaci o zkoumané molekule. Během Stokesova rozptylu dochází nejprve k excitaci molekuly ze základního vibračního stavu po interakci s dopadajícím zářením do vyššího

energetického stavu a následně molekula emituje foton o nižší energii, než měl foton budícího záření. Molekula se nevrací zpět do základního vibračního stavu, ale zůstává na vyšší energetické hladině. Zároveň se malá část molekul podle Boltzmannova rozdělení i za laboratorních teplot již vyskytuje ve vyšších vibračních energetických hladinách a po interakci s elektromagnetickým zářením emitují foton s vyšší energií. Po relaxaci se molekula opět vrací zpět na základní vibrační hladinu. Tento proces nazýváme anti-Stokesův rozptyl, který má proto z rozptylových procesů nejnižší intenzitu. Jelikož tyto efekty většinou zahrnují přechody mezi hladinami vibrační energie stejného elektronového stavu, patří Ramanova spektroskopie mezi vibrační a poskytuje tak informace o vibračních a rotačních stavech molekul díky detekci neelastického Ramanova rozptylu.^{7,14,15}



Obr. 1: Zjednodušený Jablonskiho diagram popisující rozptylové procesy Ramana a Rayleigha¹⁶

2.1.1 Historie

Vývoj Ramanovy spektroskopie je úzce spjatý s počátky infračervené spektroskopie, avšak její vzestup za ní výrazně zaostával hlavně v důsledku technických obtíží. Nejdůležitější událostí pro Ramanovu spektroskopii byl nástup a rozvoj laseru, díky čemuž bylo možné rozšířit její využití i mimo laboratoře do průmyslu.³

Obecně se má za to, že teoretickou předpověď Ramanova rozptylu učinil rakouský teoretický fyzik A. Smekal v roce 1923. Experimentálně dokázali tuto předpověď jevu,

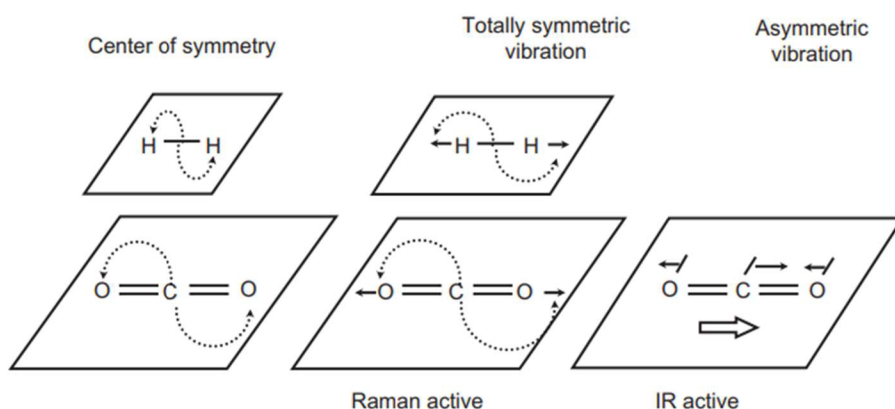
který spočívá ve změně vlnové délky rozptýleného monochromatického světla, potvrdit v roce 1928 C. V. Raman a jeho student K. S. Krishnan při hledání obdoby Comptonova jevu. C. V. Raman ve své první zprávě uvedl, že pozoroval depolarizaci vody v závislosti na vlnové délce, která se měnila o 13,2; 10,2; 11,5; 15,3 a 21,7 % pro červené, žluté, zelené, modré a fialové světlo. O pár let později pozoroval K. S. Krishnan slabou fluorescenci při průchodu světla různými kapalinami (vodou, étherem, acetaldehydem nebo jednosytnými alkoholy). Pokusy o prokázání této slabé fluorescence nebyly úspěšné pro její nízkou intenzitu, avšak s použitím laseru bylo dokázáno, že u pouze velmi malého zlomku světla (1 mocnina ze 108) dochází při rozptylu ke změně frekvence. Rovněž nezávisle na výzkumné skupině C. V. Ramana experimentálně prokázali Ramanův jev také vědci z Ruska G. S. Landsberg a L. I. Mandelstam. Za jeho objev byla však oceněna pouze první výzkumná skupina, když byla C. V. Ramanovi v roce 1930 udělena Nobelova cena za fyziku jako uznání tohoto úspěchu a stal se tak druhým Indem, který získal toto ocenění. Tento objev byl také jako počest pojmenován po C. V. Ramanovi.^{1,4,5}

První komerční Ramanův spektrometr byl však sestaven až v roce 1953 po vývoji prvního monochromátoru. Jako zdroj záření byla použita rtuť s vlnovou délkou 435,8 nm. Díky tomuto spektrometru bylo možné již v této době identifikovat více než 40 000 sloučenin. Použitý zdroj však ztěžoval aplikaci hlavně pro barevné roztoky, které intenzivně absorbovaly toto světelné záření, proto vynález laseru v roce 1960 a jeho použití jako zdroj záření v Ramanových spektrometrech znamenal velký pokrok v tomto směru výzkumu a umožnil rychlejší a reprodukovatelnější použití Ramanovy spektroskopie. Následně bylo v roce 1974 vyvinuto zařízení využívající propojení mikroskopu s Ramanovým spektrometrem, což umožnilo rozšíření využitelnosti Ramanovy spektroskopie pro mapování povrchů. Důležitým krokem bylo taktéž použití CCD (Charged Coupled device) detektorů z důvodu slabé intenzity Ramanova signálu. Použitím CCD detektorů byla rozšířena celá škála aplikací a byly vyvinuty další varianty Ramanovy spektroskopie. Jednou z nich je právě povrchem zesílená Ramanova spektroskopie, která našla své využití při měření velmi nízkých koncentrací analytů s možností detekce až na úrovni jednotek molekul.⁴

2.1.2 Základní princip Ramanovy spektroskopie

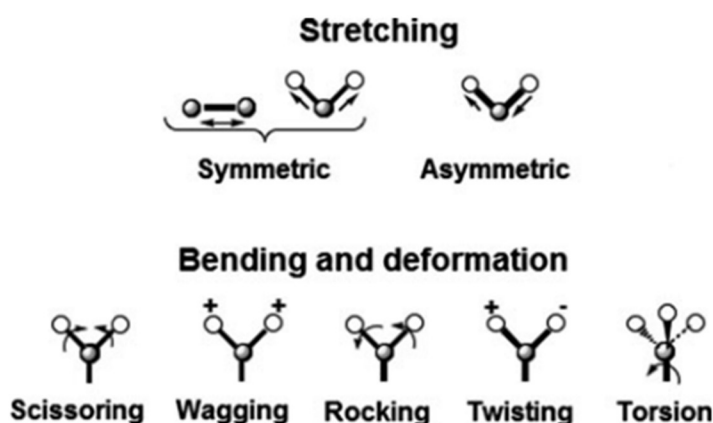
Jak již bylo uvedeno výše, Ramanova spektroskopie se označuje jako vibrační spektroskopická technika a často bývá spojována s infračervenou spektroskopií, jakožto doplňková metoda. Tyto dvě techniky se rozlišují na základě fyzikálního původu. Zatímco IR absorpce si zakládá na přímé absorpci fotonu v infračervené oblasti za účelem excitace vibračního kvanta, tedy procesu absorpce jednoho fotonu, v Ramanově spektroskopii probíhá vibrační excitace prostřednictvím procesu dvoufotonového rozptylu.⁶

Důležitým prvkem je také symetrie molekuly, která určuje, zda budou vibrace aktivní v Ramanově nebo infračervené spektroskopii. Jestliže má molekula střed symetrie, vibrace bude aktivní buď v infračervené nebo Ramanově spektroskopii. Schémata popisující aktivní vibrace v IR a Ramanově spektru jsou znázorněny (viz *Obr. 2*). Pokud je tedy vibrace aktivní v Ramanově spektru, nebude aktivní v IR spektru a naopak. Za laboratorní teploty se téměř všechny molekuly vyskytují v nejnižší vibrační energetické hladině charakterizované vibračním kvantovým číslem ($\nu = 0$). Mezi nejpravděpodobnější přechody pak patří přechod ze základní vibrační hladiny do první excitované vibrační hladiny ($\nu = \pm 1$). Tyto přechody jsou označovány jako fundamentální, jímž odpovídá hodnota fundamentální frekvence. Přechody spojené s excitací do vyšších vibračních hladin jsou méně pravděpodobné a jsou přibližně násobky fundamentální frekvence (ve skutečnosti jsou částečně nižší, jelikož s vyššími hodnotami vibračního kvantového čísla dochází ke zhušťování energetických hladin). Tyto vibrační hladiny nazýváme overtony neboli vyšší harmonické frekvence.^{7,17}



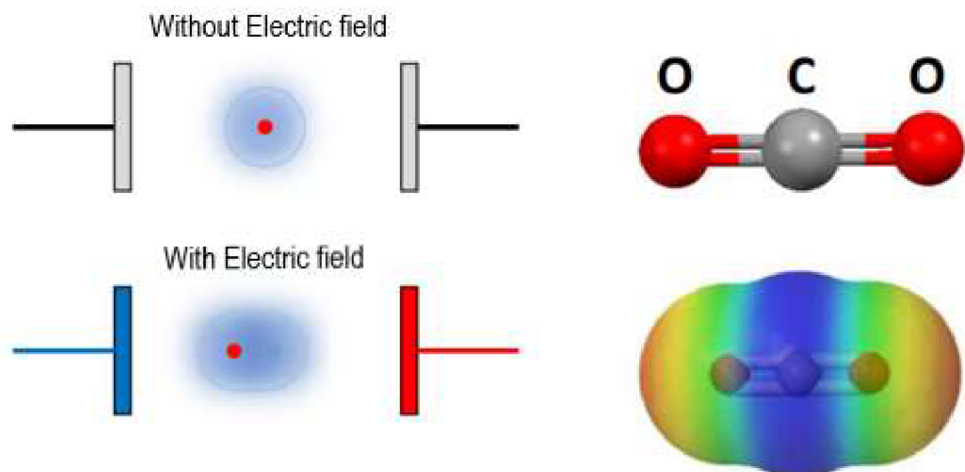
Obr. 2: Aktivní vibrace v IR a Ramanově spektru a středy symetrie molekuly H₂ a CO₂¹⁷

Fundamentální vibrace jsou v Ramanově spektroskopii silné, zatímco overtóny bývají mnohem slabší, avšak ne všechny fundamentální vibrace mohou být zaznamenatelné v Ramanově spektru. Intenzita konkrétního vibračního pásma totiž závisí na stupni polarizovatelnosti na rozdíl od infračervené spektroskopie, kde je nutná změna dipólového momentu molekuly během vibrace. Pokud tedy vibrace výrazně nezmění polarizovatelnost, potom bude intenzita Ramanova rozptylu velmi nízká a naopak. Zpravidla u symetrických valenčních vibrací nedochází ke změně dipólového momentu a tato vibrace nebude aktivní v IR spektru, ale bude aktivní v Ramanově spektru. Základní vibrační pohyby molekul jsou znázorněny na obrázku (viz *Obr. 3*).^{6,7,16,17}



Obr. 3: Základní vibrační pohyby molekul⁷

Polarizovatelnost molekuly je míra deformovatelnosti elektronového obalu vlivem vnějšího elektrického pole, kdy v důsledku interakce světla s hmotou dochází k indukci elektrického dipólu v molekule, jelikož se polarizují atomy. Během interakce s elektromagnetickým polem se totiž přemístí centrum záporného náboje z atomových jader (viz *Obr. 4*). V případě Rayleighova elastického rozptylu lze polarizovatelnost považovat za statickou, která se nemění s časem, v důsledku čehož je frekvence rozptýleného elektromagnetického záření totožná s frekvencí vnějšího elektromagnetického pole. U vibrujících molekulárních systémů však dochází ke změně polarizovatelnosti v průběhu vibrace. To znamená, že se elektronová hustota rychle upravuje v závislosti na pohybu jader.^{6,17}



Obr. 4: Deformace elektronového obalu molekuly ve vnějším elektrickém poli¹⁸

Jelikož jsou dané vibrace charakteristické pro každou molekulu, můžeme proto vibrační spektra považovat za „molekulární otisk“ zkoumané anorganické, organické nebo biologické molekuly, případně složitějších systémů, jako jsou např. biologické buňky nebo tkáně. Typickými vazbami, které lze v Ramanově spektru spolehlivě zachytit jsou vazby s π -elektrony (např. C = C). Naopak vysoce polární vazby (např. -OH) bývají slabé.^{6,7}

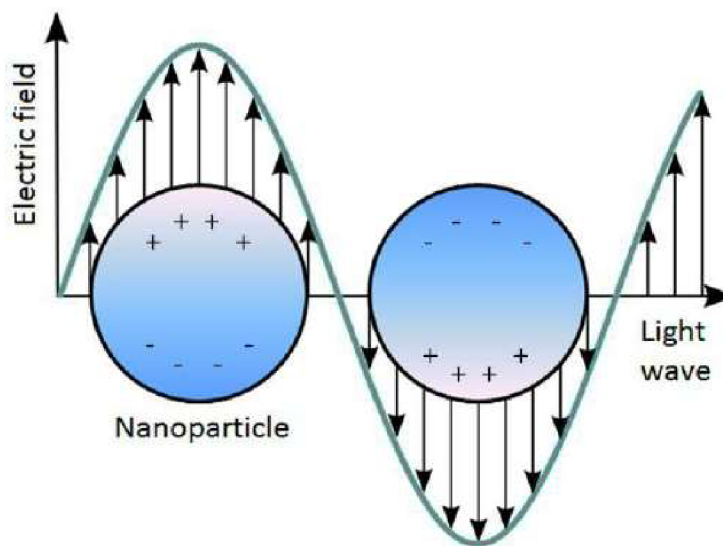
2.2 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS)

Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie je velice účinná nedestruktivní vibrační spektroskopická metoda, která má schopnost rozšířit citlivost Ramanovy spektroskopie na úroveň jedné molekuly díky zesílení Ramanova signálu až o několik řádů pomocí adsorpce molekul na zdrsňené povrchy některých kovů. Tento efekt byl poprvé pozorován v roce 1974 M. Fleischmannem, P. J. Hendrou a A. J. McQuillanem při studiu adsorpce pyridinu na elektrochemicky zdrsňené stříbrné elektrodě.² Zpočátku se tento jev spojoval s nárůstem plochy povrchu kovu během redoxních reakcí, ale později bylo zjištěno, že takto silný růst Ramanova signálu nezávisí pouze na změnách na povrchu kovu.^{2,8}

Celkové zesílení Ramanova signálu v SERS je dáno především prostřednictvím interakce elektromagnetického záření s kovy, během které dochází k zesílení elektromagnetického pole skrze excitace známé jako povrchová plazmonová rezonance. Jedná se o vychýlení elektronového mraku, který se chová jako oscilátor a kmitá

tak s určitou frekvencí vlivem působení elektrické složky elektromagnetického záření (viz *Obr. 5*). Tato vlastnost nastává pouze u plasmonických nanočástic kovů díky omezení prostoru pro pohyb elektronů. Termín povrchově zesílená Ramanova spektroskopie lze velmi dobře popsat třemi základními prvky tohoto jevu:

1. Povrch: SERS je metoda povrchové spektroskopie a je potřeba zaručit, aby se zkoumané molekuly navázaly na povrch kovového substrátu nebo musí být alespoň v jeho těsné blízkosti.
2. Zesílení: Jak již bylo řečeno výše, zesílení signálu je dáno povrchovou plazmonovou rezonancí v kovovém substrátu, a proto je pro SERS aplikace důležité využití kovových nanostruktur. Uplatňují se zde substráty od kovových koloidů v roztoku až po různé substráty připravené např. nanolitografií.
3. Raman: Technika spočívající v měření Ramanových signálů molekul, která se zabývá studiem neelastického rozptylu světla. Poskytuje základní informace o rotačních a vibračních stavech molekul.^{19,20}



Obr. 5: Schéma popisující efekt povrchové plazmonové rezonance¹⁹

Výhodami povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie jsou ostré píky ve spektru o vysokém rozlišení, které mohou napomáhat simultánní multikomponentní analýze, dále neinvazivní povaha metody, jednoduchost přípravy vzorku s možností měření vodných roztoků díky nízké intenzitě Ramanova rozptylu pro vodu a taktéž manipulace se vzorkem, rychlost analýzy, identifikace měřených vzorků a přenositelnost zařízení. Velkou výhodou je také měření tenkých povrchových filmů, pevných vzorků a krystalů i ve velmi malém množství měřené látky. Hlavními omezeními SERS jsou požadavky na blízký kontakt substrátu s měřeným analytem, možná degradace substrátů, problémy se selektivitou, homogenita substrátu nebo opětovné použití. Celková všestrannost a jednoduchost SERS tak může být využita v široké škále oblastí. Například spektra zaznamenaná při měření různých koncentrací analytů mohou být využity pro analýzu potravinářských výrobků. Může také poskytovat detailní strukturní charakterizaci různých materiálů jako jsou uhlíkové nanotrubičky nebo polymery. S využitím zlatých a stříbrných nanočástic byla tato metoda uplatněna také jako analytický nástroj pro detekci bakterií. Své využití našla i v oblastech elektrochemie, biochemie a medicíny, například při detekci a stanovení biomarkerů, které souvisejí s Alzheimerovou chorobou.^{14,16,21,22}

2.2.1 Mechanismy zesílení Ramanova signálu

Metoda povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie kombinuje výhody plazmoniky i Ramanova rozptylu. Využívá vysoce lokalizované povrchové plazmonové rezonanční pole (LSPR), které může za správných podmínek existovat na površích kovových substrátů, ke zvýšení signálu Ramanova rozptylu molekul, jež se vyskytují na povrchu kovových substrátů nebo v jejich těsné blízkosti (řádově jednotky nanometrů). Mezi nejdůležitější aspekty této metody patří určení o kolik může být tento signál zesílen. Jinými slovy to znamená, že je potřeba vědět jaká je hodnota zesilovacího faktoru a jaký je jeho fyzikální původ. Zesilovací faktor je velmi důležitým prvkem jak pro výzkum, tak pro různé SERS aplikace. Při porovnávání teoretických předpovědí s experimentálně naměřenými hodnotami se ale objevuje řada problémů, které se promítají do širokého rozptylu hodnot uváděných v literatuře od ~ 10 do $\sim 10^{15}$ v závislosti na rozdílech mezi různými substráty. Proto je důležité přesně definovat zesilovací faktor SERS.²⁰

Existují dvě různé definice, respektive dva různé pohledy na vysvětlení zesilovacího faktoru:

1. Analytický pohled: Tento přístup je nejjednodušší a nejvíce intuitivní. Říká nám, že pro koncentraci analytu c_{RS} je Ramanův signál I_{RS} . Za identických experimentálních podmínek, jako je vlnová délka laseru, výkon laseru atp. a za stejných podmínek přípravy poskytuje nyní stejný analyt na SERS substrátu (případně o jiné koncentraci c_{SERS}) signál I_{SERS} . Zesilovací faktor potom definujeme jako:

$$AEF = \frac{I_{SERS}/c_{SERS}}{I_{RS}/c_{RS}} \quad (1)$$

Tato definice předpokládá, že I_{RS} a I_{SERS} se lineárně mění s hustotou dopadajícího záření a koncentrací molekul c_{RS} . U barviv je poté potřeba zajistit, aby nedocházelo k molekulární agregaci nebo absorpci, čemuž případně může zabránit snížení koncentrace analytu a také zvolení vhodných podmínek (např. zvolení vhodné vlnové délky laseru), tak aby nedocházelo k intenzivní fluorescenci. Těmto nežádoucím efektům lze také zpravidla předcházet snížením koncentrace analytu. Analytický zesilovací faktor je velmi závislý na adsorpčních vlastnostech sondy (typický SERS analyt, např. benzotriazol), koncentraci analytu c_{SERS} , respektive na pokrytí povrchu substrátu a na přípravě vzorku. AEF je spíše vhodné pro případ SERS aktivních kapalin, tedy koloidních roztoků, na rozdíl od planárních SERS substrátů.

2. Experimentální pohled: Nevýhodou analytického přístupu je, že ignoruje SERS jako povrchovou spektroskopii, což znamená, že pouze adsorbované molekuly přispívají k zesílení Ramanova signálu. Tuto nevýhodu lze eliminovat použitím následující definice pro faktor zesílení substrátu SERS:

$$SSEF = \frac{I_{SERS}/N_{Surf}}{I_{RS}/N_{Vol}}, \quad (2)$$

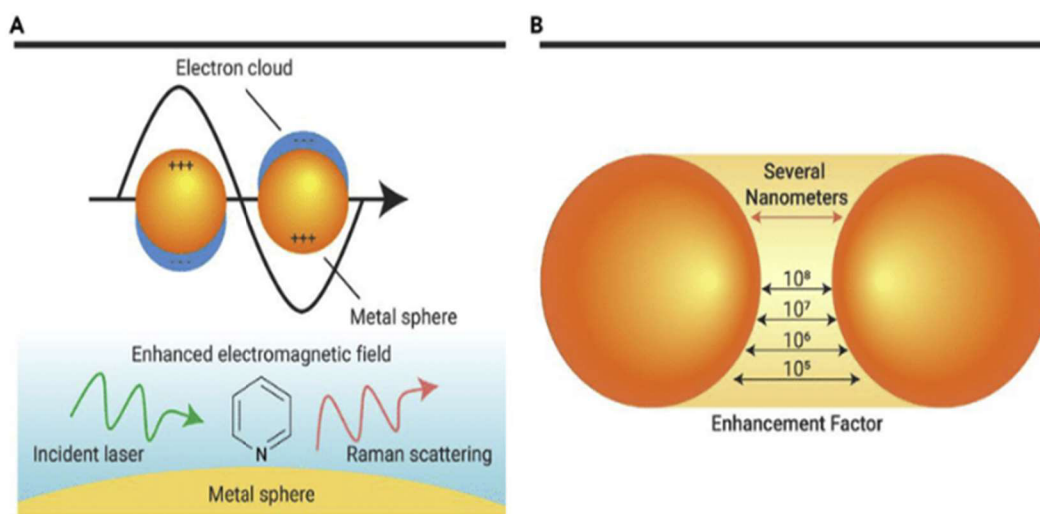
kde $N_{Vol} = c_{RS} \times V$ je průměrný počet molekul v rozptylovém objemu V pro Ramanovo měření (bez SERS) a N_{Surf} je průměrný počet adsorbovaných molekul ve stejném rozptylovém objemu pro měření SERS. Tento výpočet se obvykle považuje jako nejlepší odhad průměrného faktoru zesílení pro daný SERS substrát. Tato definice pracuje s omezením použití rovnice, kdy je pokrytí povrchu menší než jedna monovrstva, protože SERS efekt je závislý na vzdálenosti, a proto jsou obvykle Ramanovy signály druhé a dalších monovrstev sníženy. Toto omezení tak zajišťuje, že průměrná intenzita SERS je úměrná průměrnému počtu adsorbovaných molekul a je nezávislá na N_{Surf} , což by neplatilo na delší vzdálenost, než je tloušťka jedné monovrstvy. To ale nemusí být omezením, protože v mnoha aplikacích je zájem velmi nízká koncentrace zkoumané látky.²⁰

2.2.2 Elektromagnetický a chemický jev

Zesílení Ramanova signálu výrazně závisí na vlastnostech budícího laseru (např. vlnová délka laseru, polarizace a směr dopadu) a také na vlastnostech okolního prostředí a optických vlastnostech SERS substrátů. Mezi nejčastěji používané substráty patří stříbrné a zlaté nanočástice o velikosti desítek nanometrů, hroty o velikosti nanometrů, hrany a strukturované povrchy s otvory, dutinami, hrbolky, drážkami nebo výběžky o rozměrech nanometrů, protože nejlépe podporují povrchovou plazmonovou rezonanci. Základním popisem celkového zesílení Ramanova signálu zodpovědného za vynikající citlivost povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie, je kombinace dvou mechanismů.^{10,11,12}

Prvním je elektromagnetický jev, který je zodpovědný za velmi vysoké zesílení Ramanova signálu. Dominantním mechanismem je vlastnost lokalizovaných povrchových plazmonů v plazmonických nanomateriálech, které mohou být excitovány dopadajícím elektromagnetickým zářením, jehož energie může být následně soustředěna v nanoměřítku, tedy na hranách, hrotech nebo štěrbinách, což má za následek zvýšení intenzity elektromagnetického pole až o několik řádů (může dosáhnout faktoru zesílení až 10^8). Podmínkou pro získání zesíleného signálu je frekvence laseru odpovídající frekvenci povrchové plazmonové rezonance. Maximální zesílení lze dosáhnout při vzniku tzv. „hot spots“, které nejčastěji vznikají, pokud se nanočástice dostanou do velmi

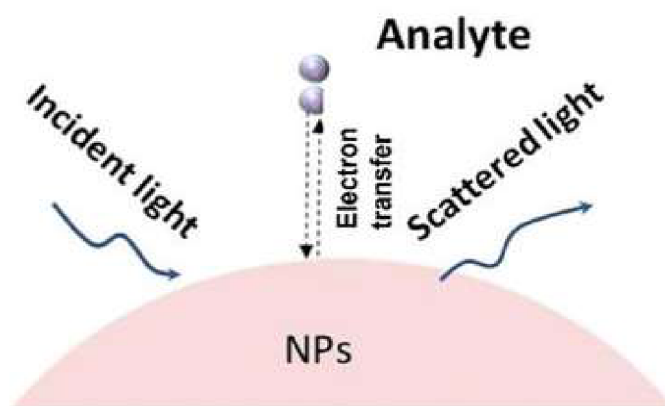
blízkého kontaktu, tedy do vzdálenosti v řádu maximálně několika jednotek nanometrů (viz Obr. 6). Ve srovnání s povrchem sférické nanočástice je intenzita elektromagnetického pole v „hot spots“ několikanásobně vyšší. Tyto místa tedy nevznikají pouze při blízkém kontaktu nanočástic, ale právě také na hranách, hrotech nebo štěrbinách anizotropních nanočástic jako jsou trojúhelníky, nanohvězdy nebo krychličky.^{10,11,12}



Obr. 6: (A) Zesílení elektromagnetického pole prostřednictvím povrchového plazmonu, (B) Ilustrace vzniku „hot spots“¹⁰

Teorie elektromagnetického jevu nedokáže vysvětlit různé velikosti zesílení Ramanova rozptylu mezi různými vibračními módy, proto byla navržena také teorie chemického jevu (viz Obr. 7). Tento mechanismus je spojený s přenosem elektrického náboje, kdy v zásadě existují tři různé mechanismy přenosu náboje jako je rezonanční přenos elektronů, přenos elektronů z molekuly do kovu a přenos elektronů z kovu do molekuly. Dále je spojený s hybridizací nebo s jinými interakcemi mezi molekulárním adsorbátem a povrchem nanočástice kovu, což vede k větší polarizovatelnosti a tím tak ke zvýšení Ramanova rozptylu. Zesílení signálu může dosahovat hodnoty zesilovacího faktoru až 10^3 pro modelový kovový molekulární systém. Obecně mohou k chemickému zesílení signálu přispívat dva mechanismy. Prvním je nerezonanční příspěvek, který je charakterizovaný chemisorpčními interakcemi mezi molekulou a substrátem v základním stavu bez vytvoření nového elektronového stavu, tedy bez excitace. Nicméně taková interakce může vyvolat znatelnou geometrickou a elektronovou změnu ve struktuře molekuly. Druhý příspěvek je efekt přenosu rezonančního náboje, který závisí na vlnové

délce budícího záření a přináší vytvoření stavu přenosu náboje ve směru kov–molekula nebo molekula–kov na základě polohy Fermiho hladiny v kovu a HOMO/LUMO (nejvyšší obsazený/nejnižší neobsazený molekulový orbital) orbitalů molekuly. K přenosu náboje dochází, pokud jednotlivé energetické rozdíly mezi orbitaly a Fermiho hladinou odpovídají energii použitého laseru. Největšího efektu se pak dostává při přenosu náboje do/z hladin v blízkosti Fermiho hladiny kovu. Chemický jev obecně způsobuje změny v Ramanově spektru spojené s polohou a tvarem spektrálních čar v důsledku modifikace molekulární struktury například při vzniku nových chemických vazeb na povrchu adsorbentu.^{10,12}



Obr. 7: Chemické zesílení signálu prostřednictvím přenosu elektronů²³

2.2.3 Další možnosti zesílení Ramanova signálu

I přes veškeré výhody oproti infračervené spektroskopii je spontánní Ramanův rozptyl velmi slabý, a proto se vyvinulo mnoho dalších technik rozšiřujících Ramanovu spektroskopii. Mezi tyto techniky patří již výše diskutovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS), dále hrotem zesílená Ramanova spektroskopie (TERS), stimulovaný Ramanův rozptyl (SRS) a koherentní anti-Stokesův rozptyl (CARS).²⁴

SRS zkoumá stejné vibrační módy molekul, které mohou být pozorovány při spontánním Ramanově rozptylu, protože se ale jedná o koherentní proces, umožňuje

získat výrazně silnější signály. Zároveň umožňuje časově rozlišit jednotlivé vibrační pohyby. Koherentní rozptyl světla zahrnuje více dopadajících fotonů, které mohou současně interagovat s rozptylujícím materiálem. Historie této techniky je paralelní s vývojem laserových zdrojů a využívá se v celé řadě oblastí výzkumu, jako je například fyzika plazmatu, zobrazování biomolekul v potravinách nebo chemie uvnitř živých buněk.^{24,25}

CARS je proces, který zahrnuje čtyři fotony a opět dokáže poskytovat mnohem větší množství signálu. Tato technika se stala dominantním nástrojem převážně pro zobrazování vibračních módů v molekulární medicíně, protože anti-Stokesovy fotony jsou modře posunuty oproti Stokesovým frekvencím, a proto je lze snadněji detekovat v přítomnosti jednofotonové fluorescence molekul.²⁴

TERS kombinuje chemickou citlivost povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie a vysoké rozlišení rastrovací sondové mikroskopie s hrotem z plazmonického materiálu, díky čemuž umožňuje chemické zobrazování povrchů na úrovni nanometrů. Na rozdíl od elektronové spektroskopie a mikroskopických technik (XPS, SEM, TEM), které vyžadují využití vakua, lze TERS používat v okolním prostředí a taktéž je vhodná pro měření vzorků ve vodném roztoku. TERS rozšiřuje prostorové rozlišení Ramanovy spektroskopie na nanometrové měřítko a využívá se pro zkoumání nanostrukturálních materiálů a biologických vzorků, kde může poskytovat informace o struktuře a chemii těchto systémů, které nelze získat běžnými analytickými metodami.⁹

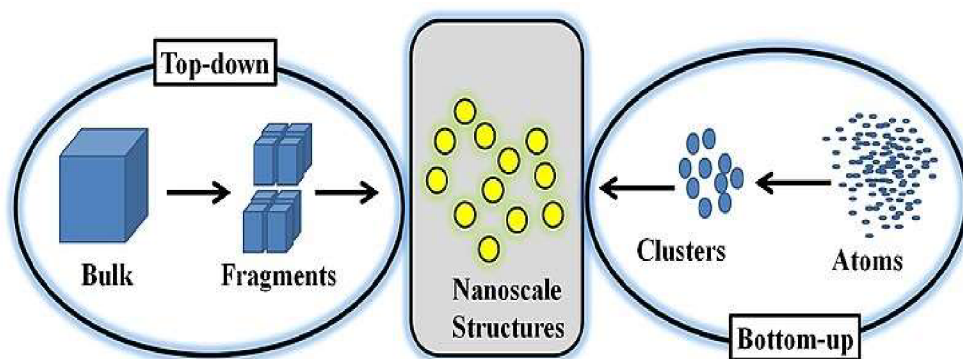
2.3 Obecná příprava koloidních materiálů a nanomateriálů

Příprava koloidních roztoků kovových nanočástic je jedna z nejdůležitějších oblastí moderní vědy. V současnosti jsou koloidní částice sledovány především pro své jedinečné fyzikální, chemické a biologické vlastnosti, díky kterým se odlišují od „bulk“ materiálů. Ojedinelé vlastnosti takových částic jsou dány zejména jejich velikostí ale také tvarem. Metody přípravy koloidů a nanomateriálů lze rozdělit na dva přístupy, a to na top-down (dispergační) a bottom-up (kondenzační) metody.²⁶

Dispergační techniky jsou založeny na rozbíjení objemnějšího materiálu, tzv. „bulk“ materiálu na malé částice o velikosti nanometrů. Jedná se převážně o jednoduché metody přípravy, přičemž nejsou účinné pro výrobu anizotropních nanočástic a částic

o velikosti jednotek nanometrů. Nejjednodušším a nejučinnějším top-down způsobem je mechanické mletí, které využívá tření a nárazy kuliček se sypkým materiálem a stěnou nádoby. Další možností přípravy spadající mezi dispergační techniky, je laserová ablace využívající vysoce energetický laser, jež slouží k odstraňování materiálu z pevné látky, ale může být aplikována také na kapaliny a je zajímavou možností k přípravě monodisperzních koloidních nanočástic bez použití povrchově aktivních látek nebo ligandů. Tato metoda je účinná zejména pro přípravu nanočástic kovů. Do této skupiny technik patří také vakuové naprašování, litografie, tepelné odpařování, leptání nebo využití ultrazvuku. Hlavní nevýhodou top-down metod jsou obtíže při přípravě požadované velikosti a tvaru nanočástic.²⁷

Kondenzační metody jsou opačným způsobem metod dispergačních a zakládají si na spojování atomů a molekul jako stavebních bloků za vzniku větších částic. Často se označují jako „mokrě“ metody, protože využívají přídavky rozpouštědel a dalších chemických látek. Velkou výhodou této skupiny technik je možnost přípravy nanočástic o kýžených tvarech a velikostech, kdy je možné získat téměř monodisperzní soustavy. Částice je však nutné často stabilizovat, aby nedocházelo k jejich agregaci, tedy růstu za hranice nanoměřítka. Nejběžnějším způsobem je chemická redukce, která je dokonale říditelná, nenákladná a poměrně rychlá. Dalšími možnostmi jsou sol-gel, elektrochemické, templátové nebo sonochemické metody. Oba zmíněné přístupy jsou znázorněny na schématu (viz Obr. 8).^{27,28}



Obr. 8: Ilustrace top-down a bottom-up přístupů²⁸

2.3.1 Příprava nanočástic stříbra

Nejčastěji používanou metodou přípravy nanočástic stříbra (AgNPs) ve formě stabilních koloidních disperzí ve vodě je chemická redukce. Reakce běžně probíhá v přítomnosti stabilizátoru, který brání agregaci nanočástic, redukční látky a případně chemické látky starající se o modifikaci vznikajících tvarů částic. Mezi obvykle používané redukční látky patří tetrahydridoboritan sodný, citrát sodný, kyselina askorbová, elementární vodík nebo redukující sacharidy jako je maltóza, fruktóza, případně glukóza.²⁹

Výsledkem redukce iontů stříbra, nejběžněji se jako výchozí látka používá dusičnan stříbrný, je získ koloidního stříbra o velikosti částic několika nanometrů v závislosti na použité redukční látce. Podle studií totiž při použití tetrahydridoboritanu sodného, jakožto silného redukčního činidla, vznikají AgNPs o malých velikostech a s nízkou polydisperzitou v porovnání se slabou redukční látkou, citrátem sodným, kde redukce probíhá výrazně pomaleji a distribuce velikostí AgNPs není zdaleka tak nízká.²⁹

Hojně využívanou metodou pro přípravu nanočástic stříbra je tzv. Tollensův proces. Jedná se o relativně rychlý a jednoduchý jedнокrokový způsob přípravy. Jak již z názvu napovídá, tato metoda spočívá v redukci Tollensova činidla, tedy komplexu $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$, pomocí aldehydu. V rámci modifikovaného Tollensova postupu se využívá redukce dusičnanu stříbrného v přítomnosti amoniaku pomocí redukujících sacharidů (maltóza, glukóza, galaktóza, laktóza). Následné řízení velikosti a morfologie vznikajících nanočástic stříbra je možné při změnách koncentrace amoniaku a v závislosti na povaze použitého redukčního činidla. Průměrná velikost nanočástic roste s rostoucí koncentrací amoniaku a nejvyšších velikostí je dosahováno při koncentraci amoniaku $0,035 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v kombinaci s redukujícími disacharidy a při koncentraci $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s monosacharidy. Připravené nanočástice stříbra lze stabilizovat pomocí látek jako je Tween 80 nebo polyvinylpyrrolidon (PVP).³⁰

Jednou z dalších mnoha možností je také využití dvoustupňové redukce při přípravě AgNPs. Tento přístup popisuje například článek, ve kterém je vysvětlena metodika založená na redukci dusičnanu stříbrného ($c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) tetrahydridoboritanem sodným ($c = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a kyselinou askorbovou ($c = 0,005 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) jako sekundární

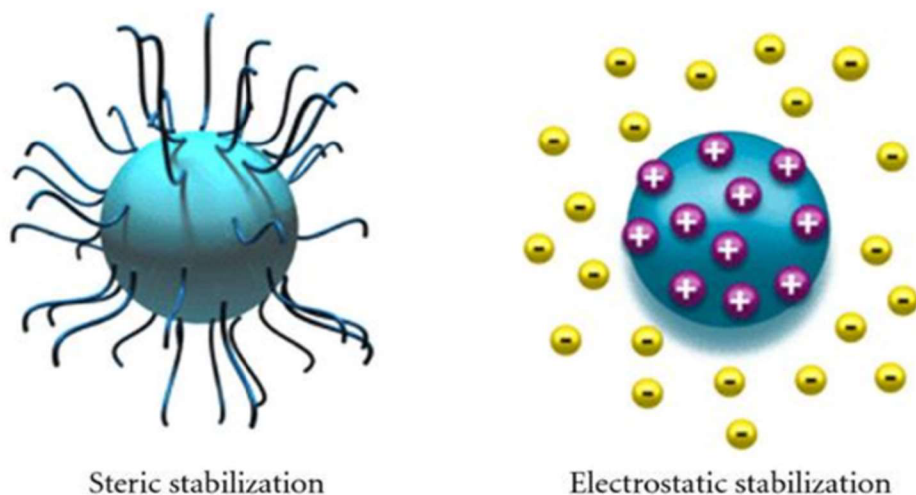
redukční látkou. Byla sledována kritická závislost kyseliny askorbové na stabilitu a reprodukovatelnost nanočástic, dále koncentrace citrátu sodného ($c = 0,075 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) jako stabilizátoru a také účinky peroxidu vodíku (1%), který sloužil jako modifikátor vznikajících tvarů AgNPs. Větší AgNPs byly také získávány ředěním základní disperze před přidáním kyseliny askorbové a rychlostí, popř. množstvím dodatečně přidaného dusičnanu stříbrného po přidavku kyseliny askorbové. Výsledkem byly AgNPs v rozsahu absorpčních maxim od 400 do 800 nm, které by mohly být dále využity např. pro aplikace povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie.³¹

2.4 Stabilizace koloidů

Jak již bylo řečeno výše, příprava kovových koloidních roztoků probíhá v přítomnosti stabilizující látky, která dokáže zabránit agregaci vznikajících nanočástic. Nejčastější strategií, jak chránit nanočástice je přidavek ochranné látky, která se adsorbuje na povrch nanočástice, čímž zabrání jejich shlukování. Druhým prostředkem, jak toho dosáhnout, je stabilizace náboje, přičemž stabilitu můžeme ovlivnit změnou chemického prostředí, jako je koncentrace solí, typ iontů nebo pH.^{29,32}

V prvním případě se jedná o tzv. sférickou stabilizaci a lze využít makromolekulární látky, které se adsorbují na povrch a vytvoří mechanickou bariéru (*viz Obr: 9*). Účinnost stabilizace závisí na fyzikálně–chemických vlastnostech navázaného polymeru, jeho koncentraci v roztoku, schopnosti adsorbovat se na povrch nanočástice, případně na rozpustnosti v kapalném prostředí. Nadbytek stabilizátoru může naopak způsobovat propojení polymerů a snížení stability systému. Nejběžněji používané polymery jsou polyvinylpyrrolidon (PVP), polyethylenglykol (PEG), polymethakrylová kyselina (PMAA) nebo polyakryláty (PAA).^{26,29}

Ve druhém případě je důležité dodatečně zvýšit odpudivé interakce mezi jednotlivými částicemi, protože bez těchto doplňkových sil je energetická bariéra mezi přechodem na destabilizovanou soustavu tak malá, že může dojít k agregaci částic již vlivem kinetické energie související s Brownovým pohybem. Dodatečné odpudivé interakce jsou nejčastěji dány elektrickým nábojem na povrchu částice, což vede k vytvoření elektrické dvojvrstvy (*viz Obr: 9*). K vytvoření elektrostatické repulze lze využít iontové sloučeniny, jako jsou karboxyláty (např. běžně používaný citrát sodný) nebo polyoxoanionty.³³



Obr. 9: Možnosti stabilizace koloidů³⁴

2.5 Vlastnosti nanočástic stříbra

Kovové nanočástice mají obrovský specifický povrch a vysoký podíl atomů na povrchu nanočástice, které jsou schopny interagovat s okolím, což je hlavní podstatou jejich výjimečných fyzikálně–chemických vlastností včetně katalytické aktivity, optických, elektrochemických, magnetických vlastností a antimikrobiální aktivity zejména u stříbrných nebo zlatých nanočástic.³⁵

Nanočástice stříbra jsou nejvíce účinné zejména při absorpci a rozptylu světla. Na rozdíl od většiny barviv nebo pigmentů mají své zbarvení závislé na velikosti a tvaru částice. K tak účinné interakci elektromagnetického záření s nanočásticí stříbra dochází v důsledku povrchové plazmonové rezonance, která byla již diskutována výše. Tento efekt má za následek neobvykle silné absorpční a rozptylové vlastnosti stříbrných nanočástic. Zároveň je zodpovědný za jejich žluté zbarvení v roztoku pro sférické částice o velikosti 1-50 nm. Jakákoli viditelná změna v roztoku potom obvykle znamená agregaci nanočástic. Jedinečnou vlastností sférických nanočástic stříbra je také vrcholová vlnová délka povrchové plazmonové rezonance, kterou lze ladit změnou velikosti nanočástic nebo indexu lomu od 400 nm (fialová) do 530 nm (zelená). Většího posunu až do infračervené oblasti elektromagnetického záření lze získat přípravou nanočástic stříbra ve tvaru tyčinek nebo destiček.^{35,36,37}

Sloučeniny stříbra jsou taktéž velmi účinné v boji proti bakteriím, tím že srážejí buněčné proteiny a blokují systém mikrobiálního dýchacího řetězce. Díky své velikosti

mohou navázat lepší kontakt s mikroorganismem a zároveň poskytují velkou plochu pro kontakt s bakteriemi, případně mohou pronikat skrz buněčnou membránu. Po vstupu do bakteriálních buněk způsobují trvalé uvolňování Ag^+ , což může vytvářet volné radikály a vyvolat oxidativní stres, díky čemuž se dále zvyšuje jejich antibakteriální aktivita.³⁵

2.6 Typy substrátů pro aplikace SERS

Jak již bylo řečeno, zesílení Ramanova signálu je dáno dvěma mechanismy, tedy elektromagnetickým a chemickým, z nichž první zmíněný je dominantní. Elektromagnetické zesílení je dáno efektem povrchové plazmonové rezonance a vyladěním složení, tvaru, velikostí a vzdáleností mezi nanočásticemi plazmonického kovu, lze získat optimalizovaný substrát pro povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii při dané vlnové délce.¹³

Pomocí čtyř vlastností substrátů lze nastínit ideální substrát pro aplikace SERS. Tento substrát by měl mít vysokou SERS aktivitu a poskytovat vysokou citlivost. Vyladěním velikostí a vzdáleností (méně než 10 nm) mezi nanočásticemi lze získat stejnou frekvenci lokalizované povrchové plazmonové rezonance, jako je frekvence dopadajícího budícího záření, čímž dochází k zesílení intenzity signálu. Povrch substrátu by měl být rovnoměrný, aby odchylka zesílení na celém povrchu byla menší než 20 %. Takový povrch vyžaduje uspořádané nanočástice na substrátu. Dokonalý substrát by měl být také dlouhodobě stabilní a reprodukovatelný, čímž by efekt zesílení signálu mohl být zachován i na dlouhou dobu. V poslední řadě by měl vykazovat dostatečnou čistotu a neměl by vykazovat signálové interference substrátu nebo látek, které byly použité pro jeho přípravu (např. stabilizátory), tak aby bylo možno měřit nejen silné adsorbáty, ale také některé slabé adsorbáty a neznámé vzorky.¹³

Obvykle bývá problém připravit dokonalý substrát, který by splňoval všechny výše zmíněné vlastnosti současně. Na základě daného využití substrátu je potřeba se zaměřit na jeho nejdůležitější vlastnosti. Například při kvantitativní analýze je velmi důležitý rovnoměrný a reprodukovatelný substrát, ale naopak při analýze stopového množství látky je za potřebí dosažení maximálního zesílení signálu.¹³

Z hlediska efektu zesílení signálu byla studována celá řada kovů, jako jsou Li, Na, K, Rb, Cs, Pt, In, Ga, Rh, Al, Cu, Ag a Au. Nejlepších výsledků je dosahováno u stříbra, zlata a popřípadě mědi, protože vytvářejí vysoce zesílené a spolehlivé signály SERS pro širokou škálu studovaných molekul a zároveň snadnou laditelnost plazmonu ve viditelné oblasti, případně pro blízkou infračervenou oblast elektromagnetického spektra s využitím pro biomolekuly, které v této oblasti obvykle nefluoreskují. Výsledný design substrátu může mít různou podobu. Často bývají potaženy na různých pevných nosičích, kterými může být sklo, křemíkové destičky, lepící pásy, polymery (např. nylon, PET, PE, PAA), grafen, uhlíkové nanotrubičky nebo na hojně využívané celulóze. Imobilizace kovových nanočástic na pevném nosiči je funkční metoda, jak udržet nanočástice v těsném kontaktu. Jiným způsobem může být také forma koloidního roztoku, pokud je možnost jejich stabilizace pomocí různých činidel.^{16,38}

Tato práce využívá pro přípravu SERS substrátů celulózu jako pevný nosič stříbrných nanočástic. Obecně ji lze ale využít v několika různých formách, jako je stabilizační činidlo, které může zabraňovat agregaci plazmonických nanočástic i během syntézy v přítomnosti redukčního činidla. Za vhodných reakčních podmínek může hrát také roli redukční pro plazmonické nanočástice. S ohledem na tyto vlastnosti se jedná o velký přínos při navrhování substrátů pro aplikace SERS. Výhledově tedy bude teoreticky možné připravovat udržitelné, flexibilní a ekologické substráty. V další kapitole jsou popsány některé metody, kterými lze připravovat vrstvy plazmonických nanočástic na celulóze.³⁸

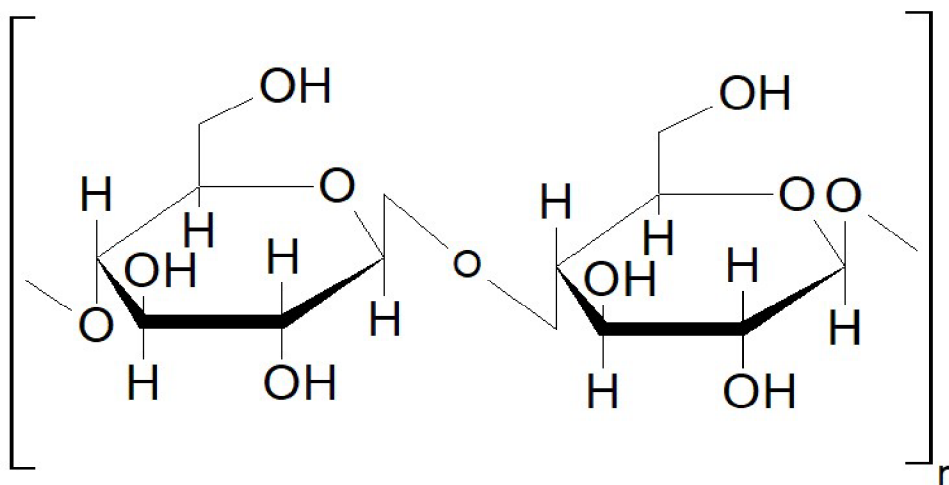
Substráty ve formě koloidního roztoku jsou taktéž výhodné pro aplikace v SERS, protože agregace kovových nanočástic vede k tvorbě agregátů s drsností a morfologií důležitou pro zesílení Ramanova signálu.³⁹ Výhodou je také poměrně jednoduchá příprava těchto roztoků a jejich reprodukovatelnost. Svoji roli mohou hrát také relativně nízké náklady na jejich přípravu. Díky těmto výhodám lze připravovat pro každou analýzu čerstvý koloidní roztok, což umožňuje spolehlivé měření. Nejčastěji využívané koloidní roztoky jsou na bázi stříbra nebo zlata. Metody přípravy stříbrných nanočástic byly popsány v kapitole 2.3.1.⁴⁰ Experimentálně bylo zjištěno, že intenzita signálu roste s velikostí nanočástice stříbra (průměrná velikost 50 nm), avšak při dalším zvětšování (100–130 nm) vede ke snížení intenzity.⁴¹ Pokud je molekula zodpovídající za efekt SERS příliš malá, snižuje se efektivní vodivost kovových nanočástic a dochází

ke snížení efektu povrchové plazmonové rezonance, což vede ke zhoršení kvality zesílení signálu.⁴⁰

2.7 Příprava vrstev nanočástic stříbra na celulóze

Jedinečné vlastnosti celulózy v jejích různých formách jsou hlavním důvodem, díky kterým se široce uplatňuje především pro navrhování substrátů při aplikacích v SERS. Jelikož se jedná o flexibilní substrát s minimálními interferencemi signálu, jsou substráty na bázi celulózy v papíru nejvíce zkoumanou formou. Samotná celulóza však nemůže poskytnout i ve svých různých formách povrchovou plazmonovou rezonanci, avšak napomáhá agregaci a stabilizaci plazmonických nanočástic, díky čemu vznikají „hot spots“ pro zesílení signálu SERS. Přípravy substrátů na bázi celulózy v papíru s obsahem plazmonických nanočástic jsou většinou inovativní, jednoduché a ekonomické oproti obvyklým metodám. Existuje velké množství metod, avšak nejběžnější jsou techniky založené na namáčení, nakápnutí nebo *in situ* redukci.^{38,42}

Celulóza je jedním z nejrozšířenějších biopolymerů na světě, která se sestavuje z jednotek β -D-glukopyranózy ($C_6H_{10}O_5$) spojených β -1,4-glykosidickou vazbou (viz Obr. 10). Základní jednotkou je celobióza, která má přítomno šest hydroxylových funkčních skupin. Morfologicky se poté celulóza skládá z tuhých a uspořádaných krystalických částí, které jsou spojené méně uspořádanými amorfními oblastmi. Ty mohou být náchylné k hydrolýze za účinků koncentrovaných kyselin nebo mohou být snadno oxidovány.³⁸



Obr. 10: Strukturní vzorec celulózy

První substráty na celulózovém papíře byly připraveny nakapáním AgNPs na filtrační a tiskařský papír, které poskytly stabilizaci pro nanočástice stříbra. SERS spektra byla získávána za mokra bez sušení, aby bylo využito dielektrického prostředí, které zprostředkovává voda (dochází k vytvoření lepšího zesílení ve srovnání se vzduchem). U tiskařského papíru s obsahem AgNPs bylo pozorováno vyšší zesílení v porovnání s filtračním papírem. Tyto rozdíly jsou dány několika faktory, přičemž některé z nich jsou vlastní morfologie, složení, pórovitost papíru, ale také techniky nanášení, případně doba sušení substrátu. Taktéž koncentrace plazmonických nanočástic nanesených na celulózový papír kapkováním silně ovlivňuje intenzitu SERS signálu. Ten se postupně zvyšuje s rostoucím objemem nanočástic, až do dosažení bodu nasycení, při kterém dochází k shlukování nanočástic a poklesu intenzity. Problémem této jednoduché techniky zůstává nerovnoměrné nanášení plazmonických nanočástic na povrch celulózového papíru.^{38,43,44}

Další jednoduchou technikou nanesení plazmonických nanočástic na celulózový papír je jeho ponoření do předem připravené disperze nanočástic. Pokrytí papíru opět závisí na koncentraci koloidního roztoku. Čím je koncentrace vyšší, tím je často hustší a rovnoměrnější pokrytí povrchu papíru, což vede k zesílení SERS signálu v porovnání s nižšími koncentracemi. Důležitým poznatkem je, že povrchový náboj nanočástice výrazně ovlivňuje afinitu k povrchu celulózového substrátu a přispívá tak k homogenitě nanesené vrstvy více než velikost nanočástic. Aby byl snížen počet cyklů nanášení pro dosažení homogenity vrstvy, lze v případě AgNPs vyvolat samouspořádání pomocí dusičnanu tetrabutylamonného na rozhraní voda/dichlormethan, což vede k vytvoření rovnoměrného pokrytí AgNPs v jedné vrstvě.³⁸

V neposlední řadě lze připravit vrstvy nanočástic na celulózových substrátech pomocí *in situ* redukce. Tato technika je založena na adsorpci stříbrné soli na povrch celulózy, po níž následuje redukce na kovové AgNPs. Zajímavou alternativou je také nanesení AgNPs rozprašováním z tlakové nádoby. V porovnání s kapkováním je touto technikou dosažena vyšší přesnost a reprodukovatelnost vrstvy, tedy rozložení AgNPs na povrchu papíru je rovnoměrnější. Metoda však obvykle zahrnuje k optimálnímu zesílení signálu velké množství cyklů, což znamená delší dobu přípravy a větší množství činidla.^{38,42}

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

Tabulka 1: Použité chemikálie

Název chemikálie	Výrobce
Dusičnan stříbrný (p.a.)	Fagron
Peroxid vodíku (29 – 32%)	Penta
Citronan sodný dihydrát (p.a.)	Lach-Ner
Tetrahydridoboritan sodný (p.a.)	Sigma-Aldrich
Adenin (>99%)	Sigma-Aldrich
Větvený polyethylenimin ($M_r \sim 800$)	Sigma-Aldrich
Malachitová zeleň ($\geq 90\%$)	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH
Kyselina chlorovodíková (35%)	Lach-Ner
Kyselina dusičná (65%)	Lach-Ner

Při přípravě roztoků všech výše zmíněných chemikálií byla použita demineralizovaná voda s čistotou $<0,1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Jako nosný substrát pro přípravu vrstev stříbra byl využit chromatografický papír (CEL) Grade 1 značky Whatman využívaný pro papírovou chromatografii a chromatografický papír impregnovaný polyethyleniminem (CEL-PEI).

3.2 Experimentální vybavení

UV-VIS spektroskopie

Pro záznam UV-VIS absorpčních spekter byl využit absorpční spektrofotometr Specord S600 (Analytik Jena AG, Germany) a spektrofotometr s integrační sférou Specord 250 Plus (Analytik Jena AG, Germany), ze kterých byly získány informace o absorpčních maximech připravených disperzí a vrstev stříbra.

Dynamický rozptyl světla (DLS)

Metodou DLS byla zjištěna velikostní distribuce a průměrná velikost připravených nanočástic stříbra. Jako přístroj byl využit Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK).

Elektronový mikroskop (SEM a TEM)

Pomocí skenovacího elektronového mikroskopu byly pořízeny snímky struktury u vybraných vrstev nanočástic stříbra na chromatografickém papíře (CEL) a chromatografickém papíře impregnovaném pomocí polyethyleniminu (CEL-PEI) a zároveň byly pořízeny snímky z energiově disperzní spektroskopie. Měření probíhalo ve spolupráci s Katedrou experimentální fyziky s Mgr. Michalem Kořenkem na přístroji Tescan VEGA3. Během měření byly pořízeny snímky jak v režimu detekce sekundárních elektronů (SE), tak zpětně odražených elektronů (BSE). Z transmisního elektronového mikroskopu byly pořízeny snímky připravených disperzí stříbra ve spolupráci s Českým institutem výzkumu a pokročilých technologií (CATRIN) s Mgr. Janou Stráskou na přístroji JEOL 2100.

Termická analýza

U nosných substrátů (CEL a CEL-PEI) byly pořízeny TG a DTG křivky simultánním termálním analyzátozem SDT650 (TA Instruments) Mgr. Zuzanou Kovářovou. Zahřívání probíhalo pod teplotním programem rychlostí 20 °C/min do 500 °C. Na základě výsledků z termické analýzy bylo potvrzeno navázání polyethyleniminu na chromatografický papír.

Atomová absorpční spektrometrie (AAS)

U připravených vrstev nanočástic stříbra na nosných substrátech CEL a CEL-PEI bylo zjištěno množství navázaného stříbra pomocí přístroje ContrAA 300 (Analytik Jena AG, Germany) s plamennou atomizací.

Infračervená spektroskopie

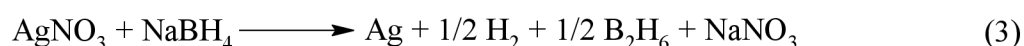
Pro záznam infračervených spekter čistých nosných substrátů CEL a CEL-PEI byl využit FTIR spektrometr Nicolet iS50. Měření probíhalo metodou zeslabeného úplného odrazu záření na rozhraní měřicího krystalu (diamant) a měřeného vzorku, tedy metodou ATR krystalu.

Ramanova spektroskopie a povrchem zesílená Ramanova spektroskopie

K získání Ramanových spekter nosných substrátů CEL a CEL-PEI byl využit Ramanův spektrometr iRamanTMPlus dodávaný firmou B&W Tek, Inc. Během měření byl na přístroji použit laser s vlnovou délkou 785 nm o maximálním výkonu 340 mW. K dalšímu měření Ramanových spekter již připravených vrstev byl využit Ramanův mikroskop DXRTM dodávaný firmou Thermo Fisher Scientific Inc, který umožňuje měření při různých vlnových délkách. Vlnové délky použitých laserů byly: 455 nm s maximálním výkonem 6 mW, 532 nm s maximálním výkonem 9 mW, 633 nm s maximálním výkonem 7 mW a 780 nm s maximálním výkonem 24 mW. Všechny lasery byly používány v kombinaci s full-range mřížkami.

3.3 Příprava nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra byly připraveny pomocí metody chemické redukce. Jako výchozí látka byla při přípravě použita stříbrná sůl – dusičnan stříbrný (AgNO_3). Hlavním krokem této syntézy je redukce dusičnanu stříbrného s využitím tetrahydridoboritanu sodného (NaBH_4), který umožňuje přípravu nanočástic až o velikosti jednotek nanometrů. Redukce probíhala podle následující rovnice:



Při přípravě nanočástic je taktéž velmi důležitá jejich následná stabilizace. V tomto případě byl jako stabilizátor využit dihydrát citronanu sodného ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).

Vzhledem k následné aplikaci připravených nanočástic pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie byl navíc využit peroxid vodíku (H_2O_2) sloužící jako modifikátor výsledných tvarů nanočástic, kdy jeho různé přídavky podporují vznik anizotropních částic. Všechny disperze byly připravovány s výsledným objemem 25 ml a výslednou koncentrací stříbra $0,0003 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Celkově bylo připraveno osm disperzí s přídavky peroxidu vodíku 0; 20; 40; 50; 60; 80; 100 a 120 μl . Veškeré navážky, koncentrace a objemy použitých chemikálií k přípravě nanočástic stříbra jsou uvedeny v následující tabulce (*Tabulka 2*).

Tabulka 2: Koncentrace, navážky a objemy použitých chemikálií

Chemikálie	c [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	V [μl]		Navážka do 50 ml [g]
H_2O	-	od 24200	do 24080	-
AgNO_3	0,05	150	150	0,4246
TSC	0,075	450	450	1,102
H_2O_2	15%	od 0	do 120	-
NaBH_4	0,1	200	200	0,1892

Během přípravy byly všechny chemikálie smíchány v kádince umístěné na magnetické míchače s magnetickým míchadlem v pořadí, ve kterém jsou uvedeny v tabulce (*Tabulka 2*). Před přídavkem redukčního činidla bylo vyčkáno cca 1 minutu a následně byl za stálého míchání pozvolna napipetován požadovaný objem NaBH_4 . Samotná redukce proběhla během několika desítek vteřin. Připravené disperze byly charakterizovány pomocí UV-VIS, DLS a TEM.

3.4 Příprava vrstev nanočástic stříbra

Pro přípravu vrstev byly využity 2 typy nosných substrátů, a to čistý chromatografický papír využívaný pro papírovou chromatografii (CEL) a chromatografický papír impregnovaný větveným polyethyleniminem (CEL-PEI). Impregnace probíhala ponořením papíru do předem připraveného roztoku polyethyleniminu o koncentraci 10 g/l. Doba impregnace byla zvolena na délku 2 hodin. U nižších koncentrací a nižší doby impregnace nedocházelo k tak efektivnímu navázání polyethyleniminu na chromatografický papír. K samotné přípravě jednotlivých vzorků byl vždy vystříhnut obdélník o velikosti 25 x 5 mm.

Takto nachystané substráty byly následně namočeny do předem připravených disperzí stříbra, které byly vybrány na základě jejich optických vlastností. Pro vrstvy obsahující nosný substrát ve formě čistého chromatografického papíru byly využity 2 ml disperze, kdy byl substrát ponořen do zkumavky Eppendorf o objemu 2 ml. Stříbro bylo následně otáčením rotátoru (25 rpm) navazováno po dobu 20 hodin. Po uplynutí této doby byly vzorky vysušeny za laboratorní teploty na vzduchu. U vrstev obsahujících nosný substrát s polyethyleniminem byly provedeny tři cykly nanášení po dobu 20 minut a čtvrtý cyklus opět po dobu 20 hodin. Pro přípravu těchto vrstev tedy byla spotřeba disperzí 8 ml. Úvodní tři cykly byly zvoleny kvůli téměř okamžité destabilizaci. Čas nástupu destabilizace se s každým cyklem prodlužoval.

Výsledkem byly barevné vrstvy stříbra v závislosti na použité disperzi od žluté až do modré na čistém chromatografickém papíře a tmavě zbarvené vrstvy stříbra na chromatografickém papíře impregnovaném polyethyleniminem, které naznačují vznik agregátů. Všechny vrstvy byly charakterizovány pomocí UV-VIS, AAS a SEM.

3.5 Měření SERS

Pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie byly vybrány nanočástice stříbra, které nejlépe absorbovaly viditelné elektromagnetické záření v oblastech odpovídajících použitým laserům o vlnových délkách 455; 532; 633 a 780 nm. Zvolené byly tedy disperze s přísadkou peroxidu vodíku 20; 50; 60; 80 a 100 μl na základě jejich absorpčních maxim zjištěných pomocí UV-VIS spektroskopie.

V rámci samotného měření SERS spekter byla modelovou molekulou zvolena molekula adeninu ve formě vodného roztoku obsahující atomy dusíku, prostřednictvím kterých je schopna navázat se na vrstvách stříbra. Na naměřených SERS spektrech je viditelný úzký pík adeninu v oblasti $725 - 738 \text{ cm}^{-1}$ Ramanova posunu. Měření modelového analytu probíhalo nakápnutím 5 μl vodného roztoku o koncentraci $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pomocí automatické mikropipety na vystřižený čtvereček nosných substrátů CEL a CEL-PEI pokrytých vrstvami stříbra. Parametry měření SERS jsou uvedeny v tabulce (*Tabulka 3*). Pro každý vzorek bylo měření provedeno jednou bez přítomnosti adeninu a třikrát po nakápnutí adeninu na jednotlivé vrstvy. Celkově bylo tedy provedeno 40 záznamů SERS spekter postupně na všech čtyřech použitých laserech. Zároveň bylo změřeno Ramanovo spektrum pro roztok adeninu o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, který byl

připraven rozpuštěním adeninu v okyselené destilované vodě několika kapkami koncentrované kyseliny chlorovodíkové do odměrné baňky o objemu 25 ml a Ramanova spektra pro oba použité nosné substráty (CEL a CEL-PEI) bez přítomnosti stříbra. Okyselení destilované vody při rozpouštění adeninu bylo provedeno z důvodu dosažení větší rozpustnosti adeninu ve vodě. Parametry pro měření Ramanových spekter jsou uvedeny v tabulce (*Tabulka 4*).

Tabulka 3: Parametry měření SERS spekter adeninu o koncentraci $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ na nosných substrátech CEL a CEL-PEI s vrstvami stříbra

Vlnová délka laseru [nm]	Výkon laseru [mW]	Počet expozič vzorku	Počet expozič pozadí	Doba jedné expozič [s]
455	6	15	5	2
532	9	15	5	2
633	7	15	5	2
780	24	15	5	2

Tabulka 4: Parametry měření Ramanových spekter $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ adeninu a nosných substrátů CEL a CEL-PEI

Vlnová délka laseru [nm]	Výkon laseru [mW]	Počet expozič vzorku	Počet expozič pozadí	Doba jedné expozič [s]
785	340	6	6	30

Po vyhodnocení SERS spekter naměřených na všech připravených vrstvách byl vybrán substrát celPEI100, který dosahoval nejlepších výsledků v rámci zesílení Ramanova signálu pro modelový analyt (adenin) v kombinaci s laserem o vlnové délce 780 nm. Na tomto zmíněném substrátu bylo následně provedeno měření vodných roztoků malachitové zeleně o koncentracích $10^{-2} - 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ s charakteristickými píky v oblastech 1172 cm^{-1} , 1377 cm^{-1} a 1612 cm^{-1} . Malachitová zeleň se váže na vrstvy stříbra prostřednictvím atomů dusíku navázaných na benzenová jádra. Navážka pro nejvyšší koncentraci byla 1,2875 g/250 ml a dalších méně koncentrovaných roztoků bylo dosaženo postupným ředěním. Měření probíhalo obdobně nakápnutím 5 μl vodného roztoku dané látky na vystřížený čtvereček nosného substrátu potaženého vrstvou stříbra. Parametry měření jsou uvedeny v tabulce (*Tabulka 5*).

Tabulka 5: Parametry měření SERS spekter malachitové zeleně na substrátu celPEI100

Vlnová délka laseru [nm]	Výkon laseru [mW]	Počet expozič vzorku	Počet expozič pozadí	Doba jedné expozič [s]
780	24	15	5	2

4 Výsledky a diskuze

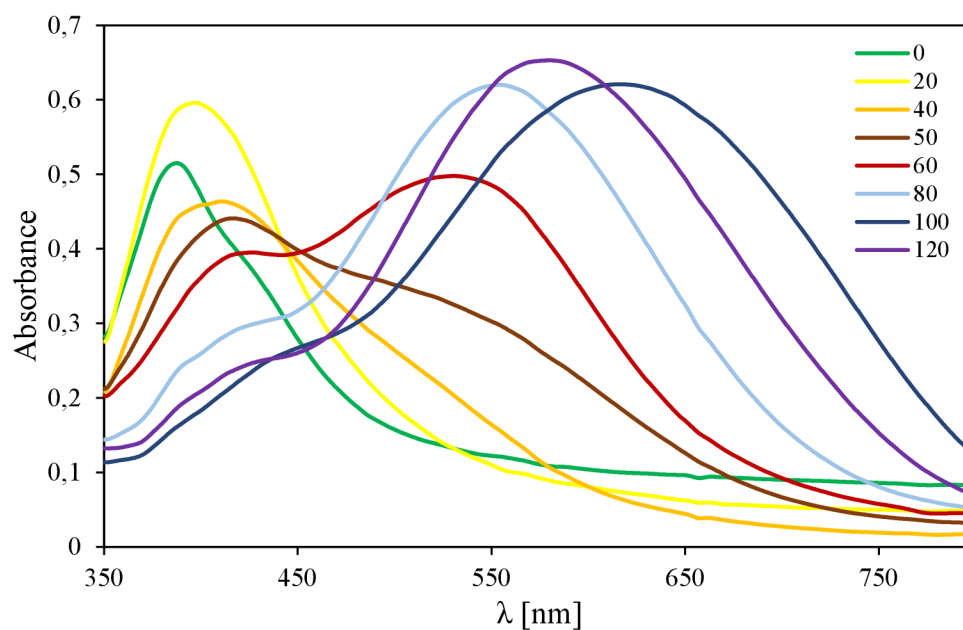
4.1 Charakterizace nanočástic stříbra pomocí UV-VIS spektroskopie

Disperze připravené výše zmíněnou redukcí dusičnanu stříbrného pomocí tetrahydridoboritanu sodného s využitím citrátu sodného jako stabilizačního činidla a peroxidu vodíku sloužícího k modifikaci nanočástic jsou uvedeny na obrázku (viz Obr. 11)



Obr. 11: Připravené disperze nanočástic stříbra

Všechny připravené disperze nanočástic stříbra byly charakterizovány pomocí UV-VIS spektroskopie. Jejich absorpční spektra jsou znázorněna na následujícím obrázku (viz Obr. 12).



Obr. 12: Absorpční spektra disperzí nanočástic stříbra

Z hodnocení získaného absorpčního spektra vyplývá, že čím vyšší je přídavek peroxidu vodíku, tím se absorpční maximum jednotlivých disperzí nanočástic stříbra posouvá do vyšších vlnových délek (přidavky peroxidu vodíku jsou uvedeny v legendě grafu). Hranicí tohoto tvrzení je poté disperze s přídavkem peroxidu vodíku 120 μ l, při které se absorpční maximum již vrací zpět k nižším vlnovým délkám pravděpodobně z důvodu rozpouštění hran anizotropních částic přebytkem peroxidu vodíku.⁴⁵ Hodnoty absorpčních maxim odpovídající daným disperzím jsou uvedeny do tabulky (*Tabulka 6*). Uvedené spektrum nám také může napovídat o vlastnostech připravených nanočástic jako je jejich polydisperzita, případně zda se jedná o sférické či anizotropní nanočástice. Čím větší je šířka absorpčního píku, dá se předpokládat, že dané nanočástice budou zaujímat různé velikosti a tím vyšší tedy bude jejich polydisperzita. Absorpční maxima v oblasti ~ 400 nm odpovídají spíše sférickým nanočásticím stříbra a následný posun těchto absorpčních maxim do vyšších vlnových délek napovídá o výskytu anizotropních tvarů nanočástic, které vznikají na základě teorie blokování hran, kdy se krycí činidlo přichytí na určitou krystalovou hranu rostoucí částice a zpomalí tak růst této hrany ve srovnání s ostatními.^{46,57}

Tabulka 6: Hodnoty absorpčních maxim

Disperze	Absorpční maximum	
	Absorbance	Vlnová délka [nm]
0	0,5152	387,5
20	0,5961	396,9
40	0,4639	411,0
50	0,4411	416,2
60	0,4980	530,4
80	0,6203	554,5
100	0,6211	616,6
120	0,6531	579,4

4.2 Charakterizace nanočástic pomocí dynamického rozptylu světla

Orientačně bylo provedeno měření DLS, na základě kterého bylo zjištěno, že připravené nanočástice stříbra jsou poměrně polydisperzní, což odpovídá předpokladu z měření UV-VIS spektroskopie a dále byla získána informace o průměrné velikosti nanočástic. Také bylo změřeno pH jednotlivých disperzí, které se pohybuje v rozmezí 8 – 9 a s přidavky peroxidu vodíku klesá. Všechny zmíněné naměřené hodnoty jsou uvedeny do tabulky (*Tabulka 7*). Přesnější informace o velikosti připravených nanočástic

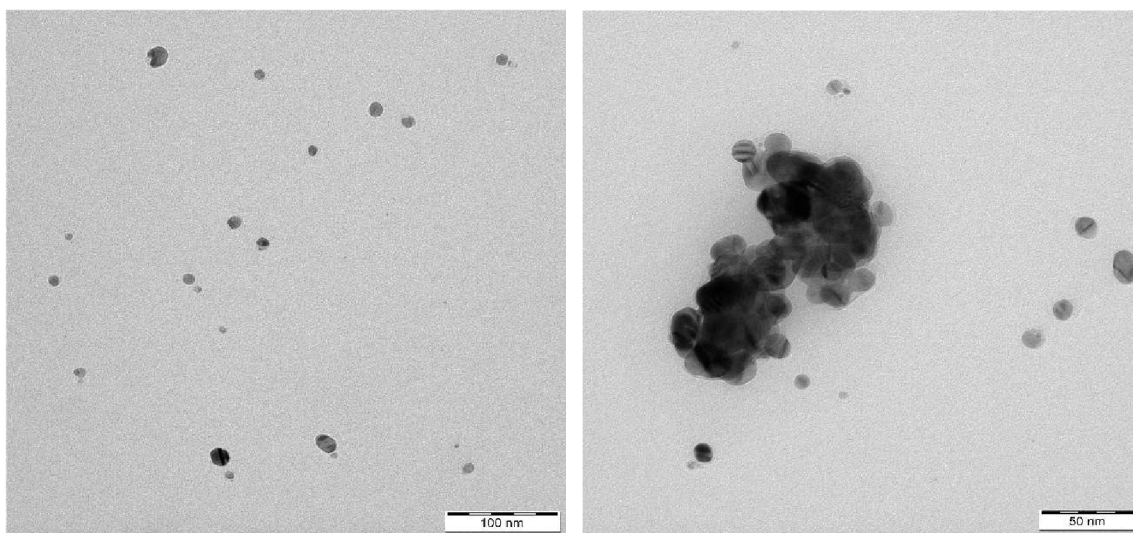
byly získány ze snímků z transmisního elektronového mikroskopu a jsou uvedeny níže v kapitole 4.3.

Tabulka 7: Naměřené hodnoty z DLS a pH disperzí

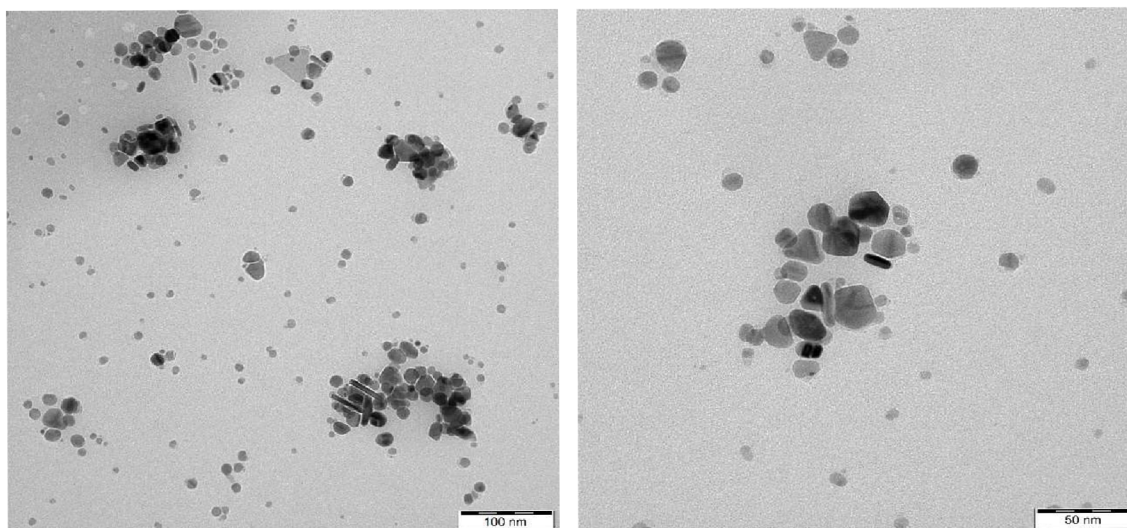
Disperze	Průměrná velikost částic [nm]	PDI	pH
0	13,08	0,559	8,18
20	30,52	0,566	8,79
40	26,42	0,714	8,67
50	33,49	0,434	8,48
60	32,96	0,255	8,43
80	29,73	0,462	8,34
100	19,29	0,584	8,27
120	18,99	0,607	8,25

4.3 Transmisní elektronová mikroskopie

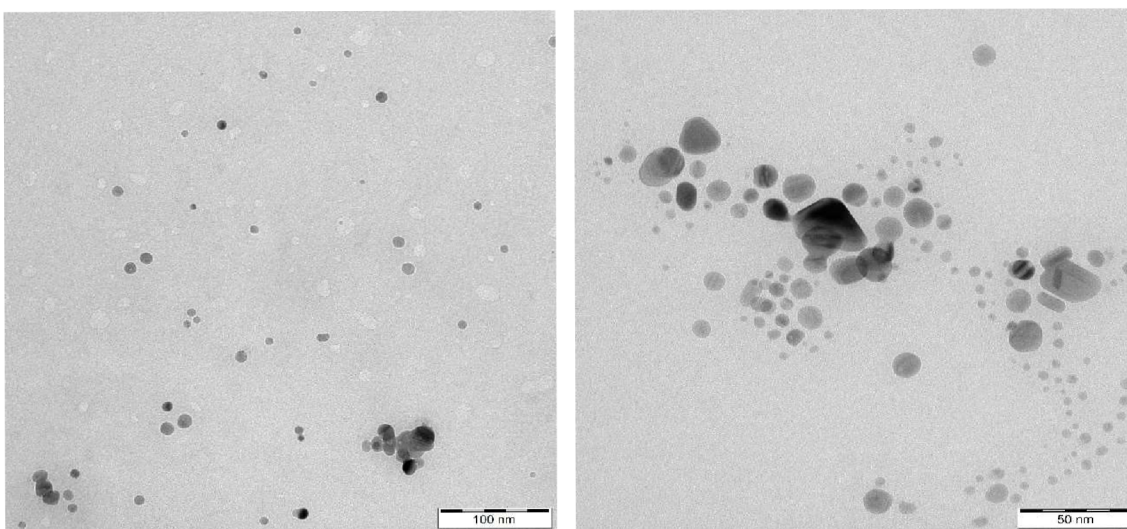
V následující kapitole jsou uvedeny snímky nanočástic stříbra pořízené pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Na základě nejvyšší kvality snímků zde byly uvedeny snímky s měřítkem 100, 50 a případně 20 nm. Snímky byly pořízeny ke zjištění tvarů a velikostí připravených nanočástic. U disperzí s přidavky peroxidu vodíku 0, 20 a 40 μ l převládají čistě sférické částice a u disperzí s vyššími přidavky se již vyskytují částice anizotropní jako jsou trojúhelníky, tyčinky nebo různé mnohoúhelníky.



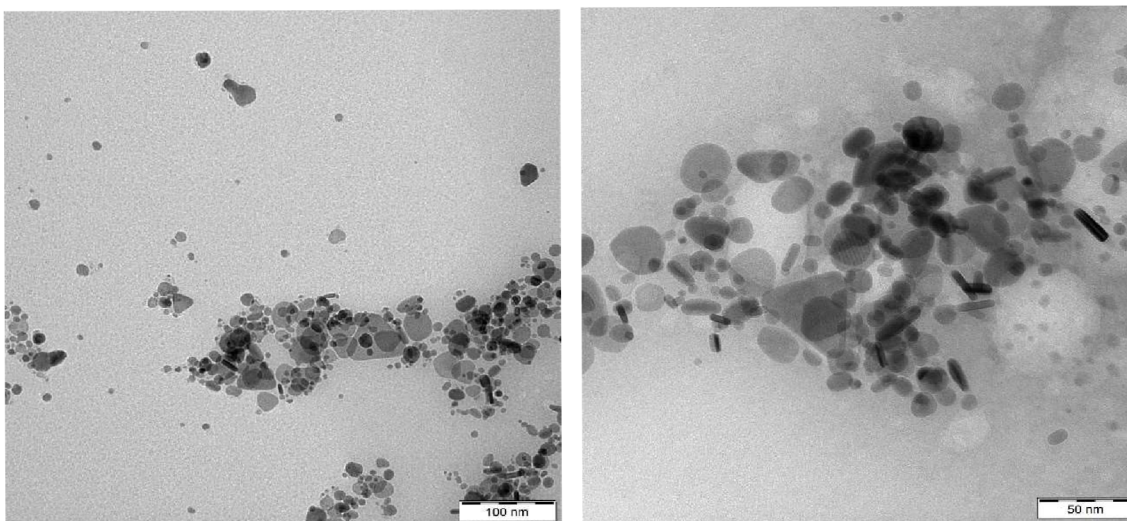
Obr. 13: TEM snímky disperze nanočástic stříbra s přidavkem peroxidu vodíku 0 μ l, měřítko 100 a 50 nm



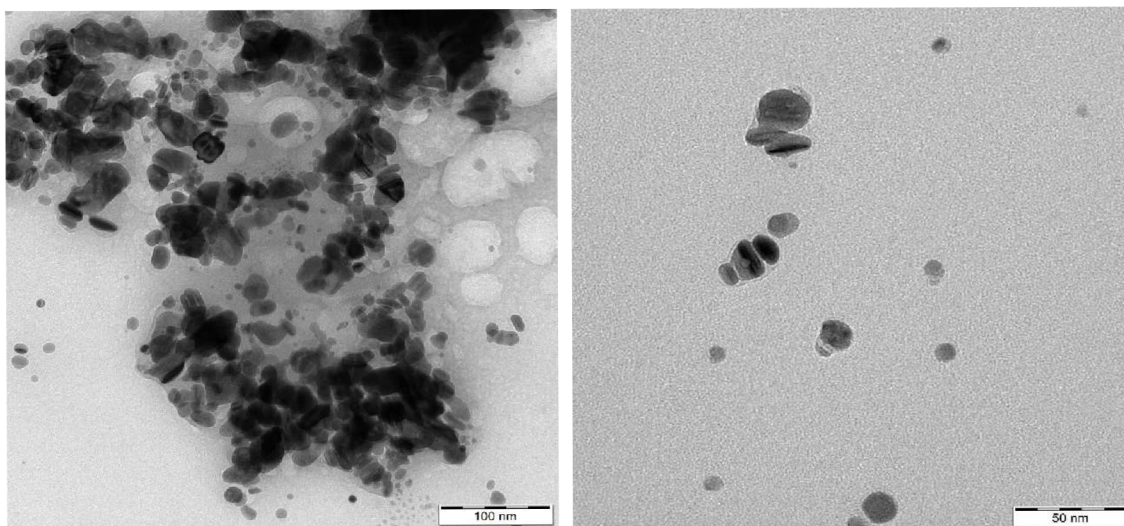
Obr. 14: TEM snímky disperze nanočástic stříbra s přidavkem peroxidu vodíku 20 µl, měřítko 100 a 50 nm



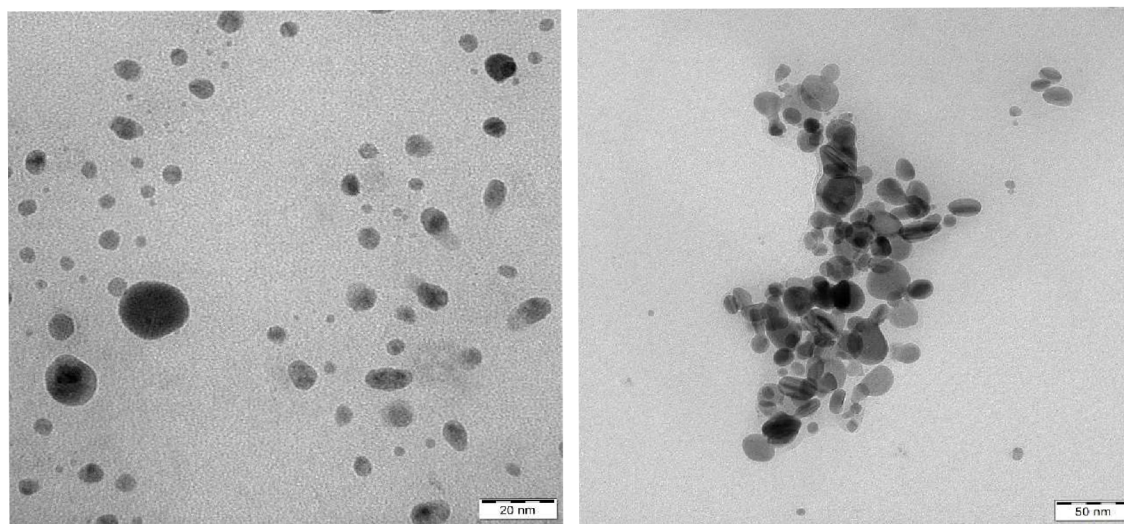
Obr. 15: TEM snímky disperze nanočástic stříbra s přidavkem peroxidu vodíku 40 µl, měřítko 100 a 50 nm



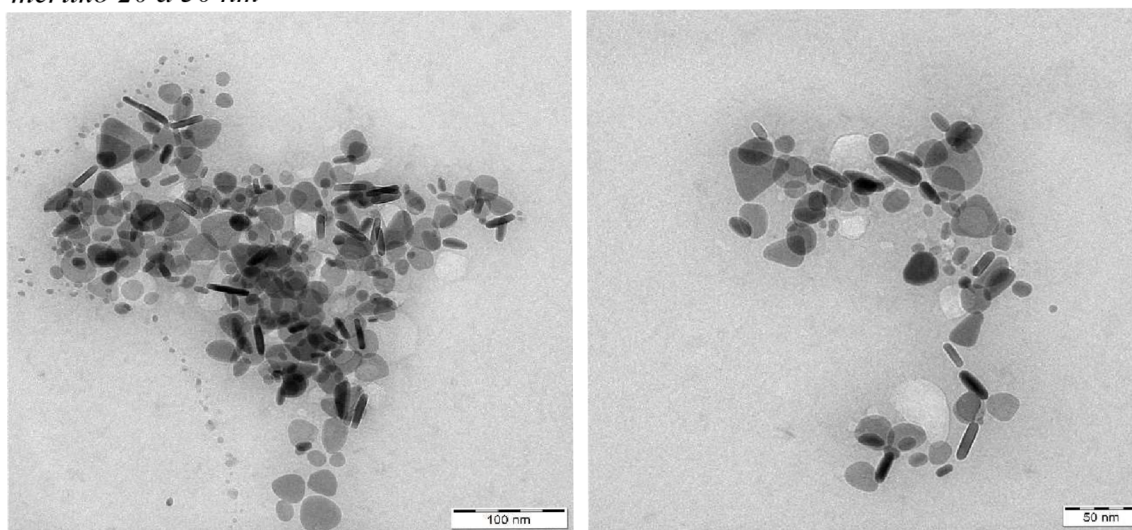
Obr. 16: TEM snímky disperze nanočástic stříbra s přidavkem peroxidu vodíku 50 µl, měřítko 100 a 50 nm



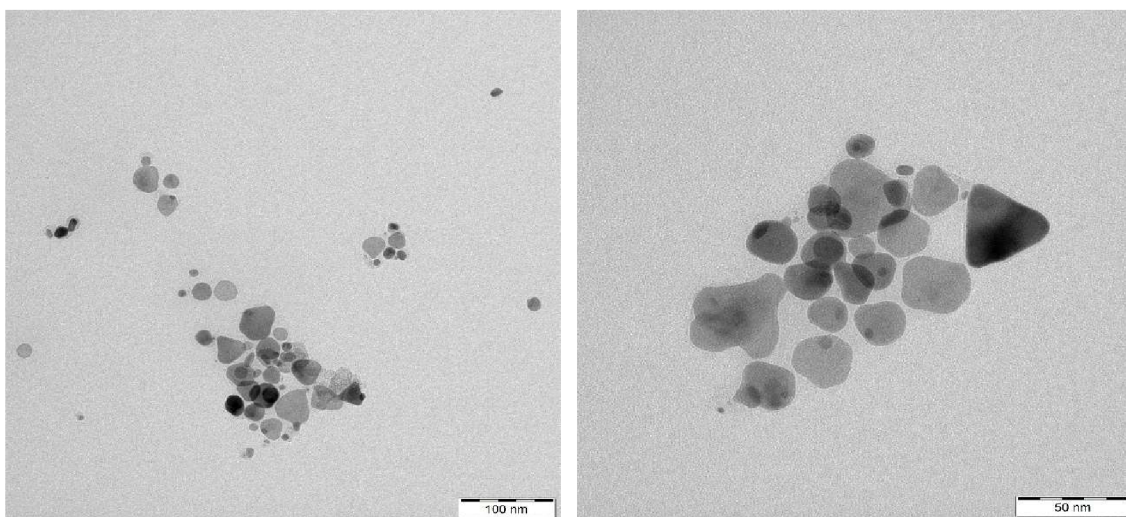
Obr. 17: TEM snímky disperze nanočástic stříbra s přidavkem peroxidu vodíku 60 µl, měřítko 100 a 50 nm



Obr. 18: TEM snímky disperze nanočástic stříbra s přidavkem peroxidu vodíku 80 µl, měřítko 20 a 50 nm



Obr. 19: TEM snímky disperze nanočástic stříbra s přidavkem peroxidu vodíku 100 µl, měřítko 100 a 50 nm

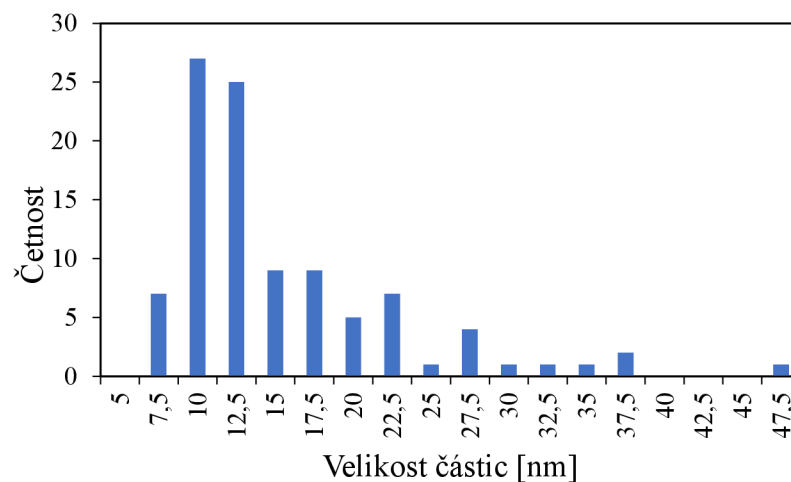


Obr. 20: TEM snímky disperze nanočástic stříbra s přidavkem peroxidu vodíku 120 μ l, měřítko 100 a 50 nm

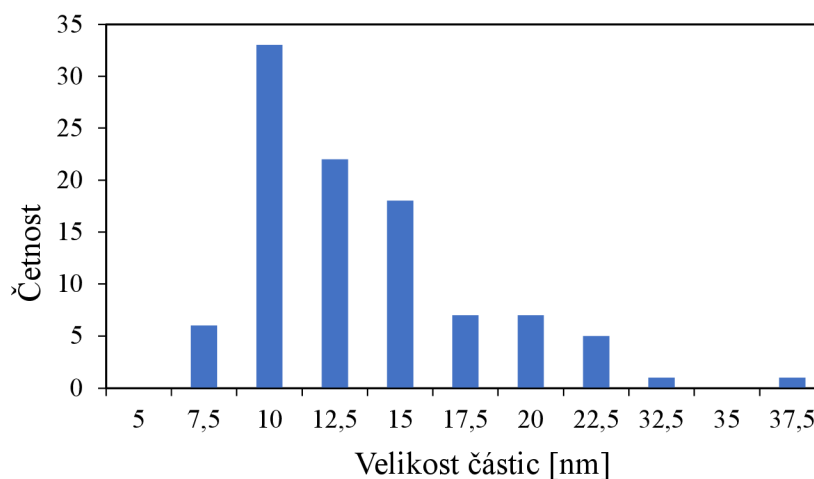
Z TEM snímků byla následně zjištěna velikost nanočástic za pomoci softwaru Digimizer. Měření velikosti bylo provedeno pro každou disperzi ze 100 částic v jednom směru. Výsledné velikosti jednotlivých disperzí a směrodatné odchylky byly uvedeny do tabulky (Tabulka 8). Pro každou disperzi byl sestaven histogram znázorňující závislost velikosti částic na četnosti. Průměrná velikost připravených nanočástic se pohybuje kolem 13 nm. Jelikož jsou nanočástice značně polydisperzní, disperze obsahují velké množství částic o velikostech menších než 10 nm, ale i některé částice dosahující velikostí až okolo 50 nm. Za tvorbou nanočástic o velikostech v jednotkách nanometrů stojí využití silného redukčního činidla během syntézy, kterým je tetrahydridoboritan sodný. Variace přidavků peroxidu vodíku nijak výrazně nepřispívá k ovlivnění velikosti vznikajících nanočástic, ale rozdíly jsou znatelné v jejich výsledných tvarech.

Tabulka 8: Vyhodnocení TEM snímků

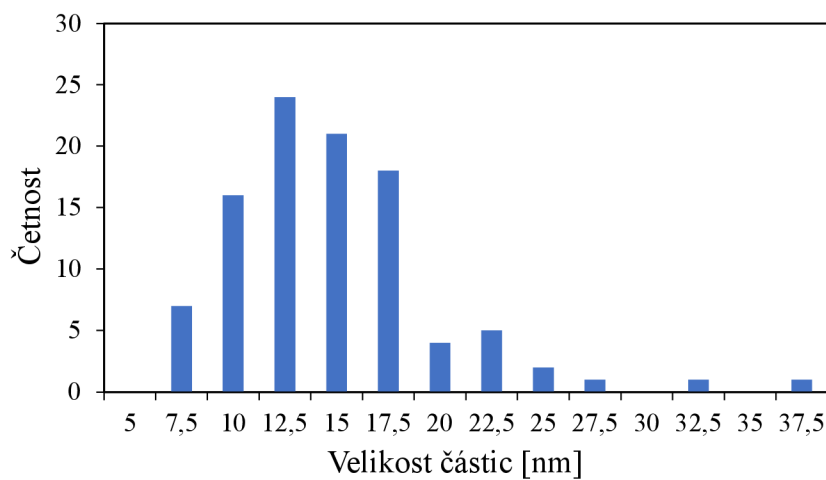
Disperze	Průměrná velikost částic [nm]	Směrodatná odchylka [nm]
0	14,09	7,44
20	12,49	4,99
40	13,69	5,21
50	12,57	6,94
60	12,92	8,00
80	9,50	5,70
100	9,61	7,26
120	15,99	9,02



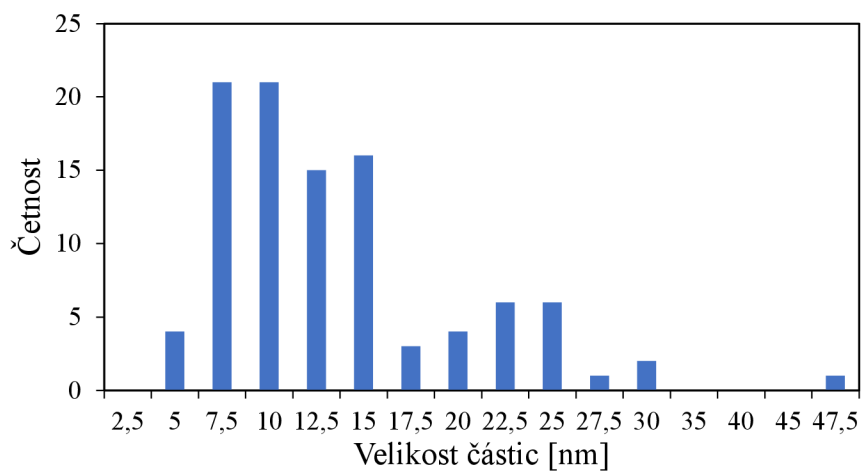
Obr. 21: Velikostní distribuce částic disperze s přidavkem 0 µl peroxidu vodíku



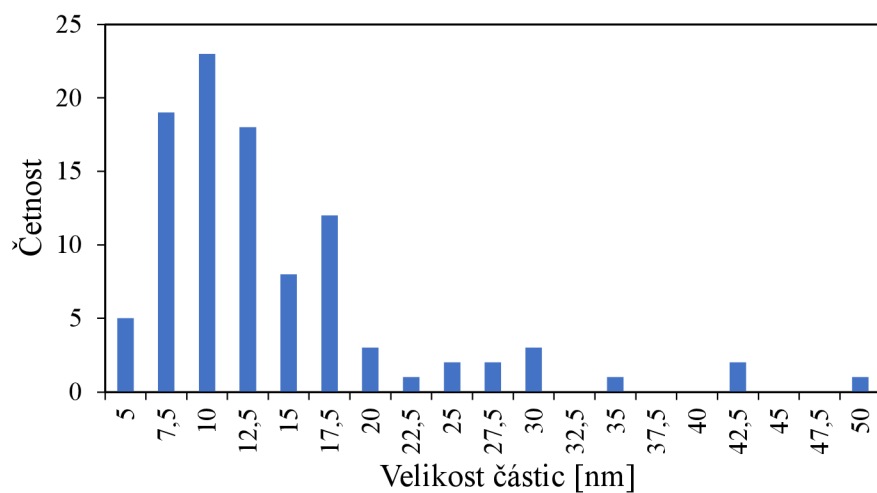
Obr. 22: Velikostní distribuce nanočástic s přidavkem 20 µl peroxidu vodíku



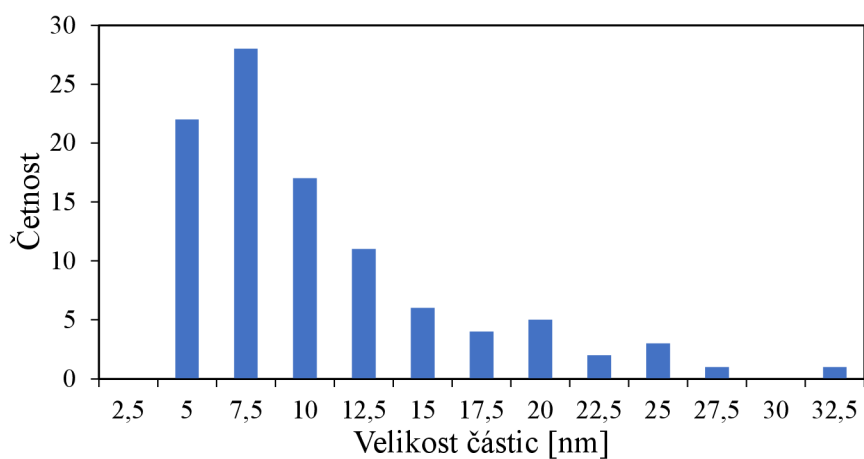
Obr. 23: Velikostní distribuce nanočástic s přidavkem 40 µl peroxidu vodíku



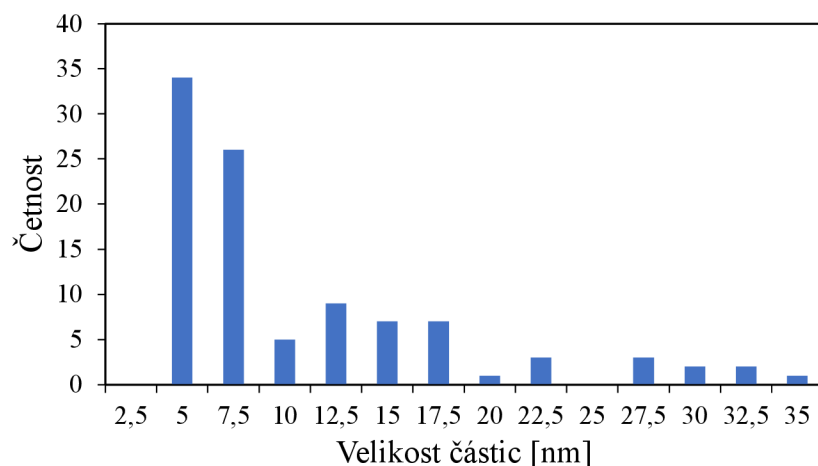
Obr. 24: Velikostní distribuce nanočástic s přidavkem 50 µl peroxidu vodíku



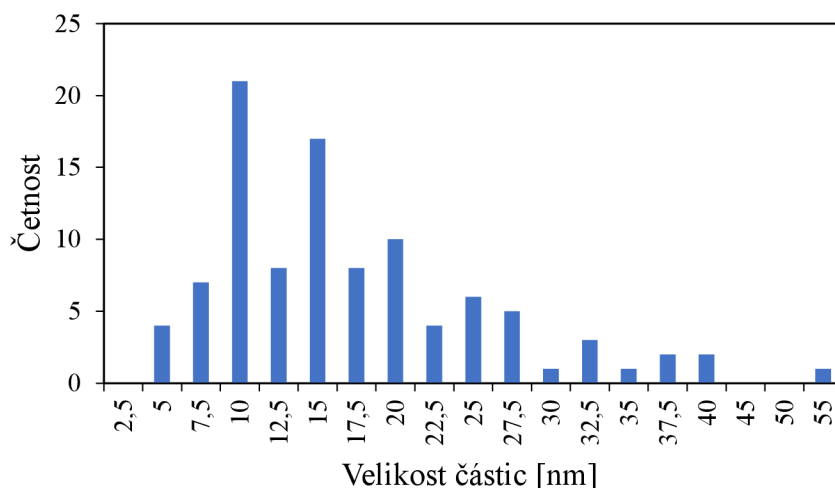
Obr. 25: Velikostní distribuce nanočástic s přidavkem 60 µl peroxidu vodíku



Obr. 26: Velikostní distribuce nanočástic s přidavkem 80 µl peroxidu vodíku



Obr. 27: Velikostní distribuce nanočástic s přidavkem 100 µl peroxidu vodíku



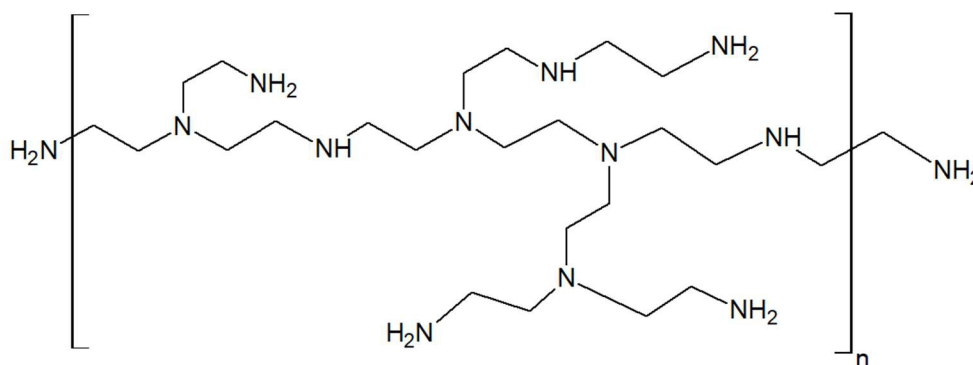
Obr. 28: Velikostní distribuce nanočástic s přidavkem 120 µl peroxidu vodíku

Z grafů velikostních distribucí poté vyplývá, že nejvíce zastoupenou skupinou jsou nanočástice v rozmezí velikostí 10 – 17,5 nm.

4.4 Modifikace celulosy

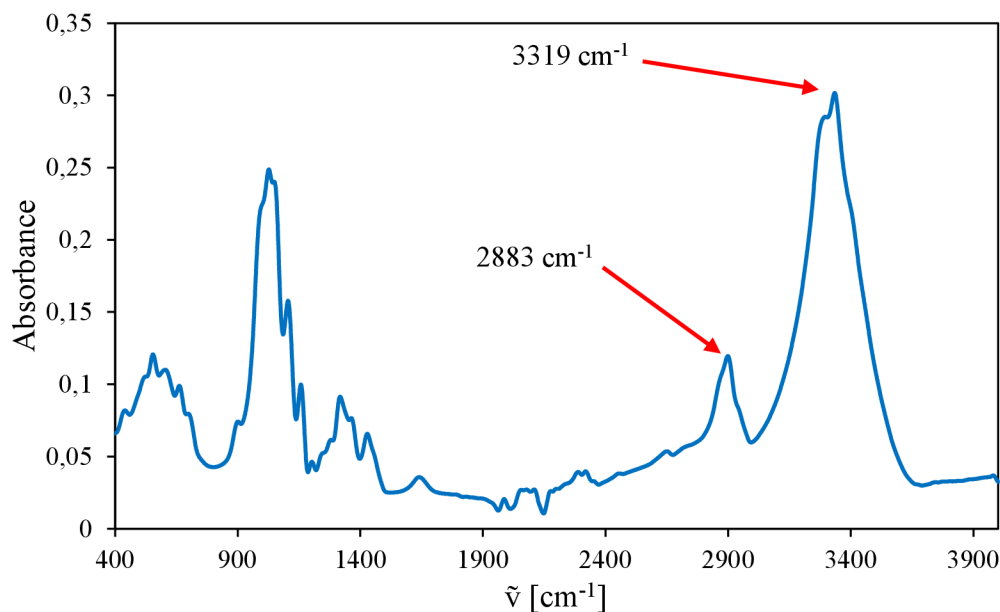
Pro následnou přípravu vrstev stříbra jsou využívány dva nosné substráty – čistá celulosa (CEL) a celulosa impregnovaná větveným polyethyleminem (CEL-PEI). Čistá celulosa se již nijak nemusí upravovat a je rovnou vhodná pro přípravu vrstev. K přípravě CEL-PEI se často využívá různých linkerů jako například glutaraldehydu, kde dochází k zavedení mezimolekulárních můstků prostřednictvím struktury Schiffovy báze mezi celulosou a PEI.⁴⁸ V této práci byla zvolena zjednodušená příprava formou impregnace, při které se PEI navazuje na celulosu pomocí elektrostatických sil

a vodíkových vazeb.⁴⁹ Příprava probíhala namočením čisté celulosy do vodného roztoku PEI o koncentraci 10 g l^{-1} na dobu dvou hodin. Již impregnovaná celulosa se po vyjmutí z roztoku nechala sušit v Petriho misce na vzduchu. Struktura řetězce PEI obsahuje velké množství $-\text{NH}_2$ skupin (viz Obr. 29), na které jsou nanočástice stříbra schopny se navázat. Impregnovaná celulosa tak na sobě dokáže zachytit větší množství stříbra, které je následně využito pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie.

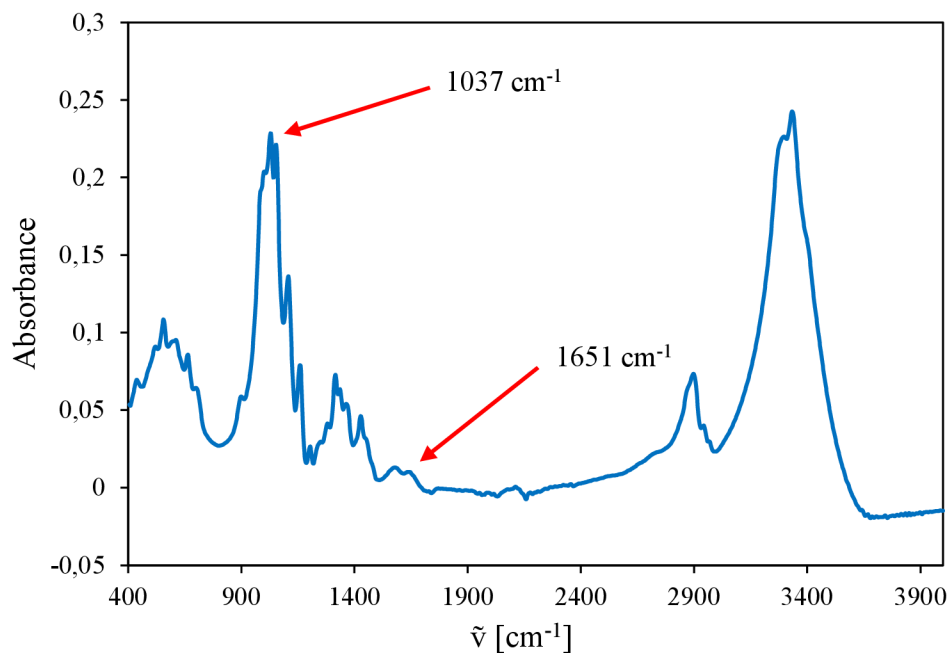


Obr. 29: Struktura větveného polyethyleneiminu

Pro potvrzení, zda se polyethyleneimin navázal na povrch celulosy byla provedena analýza funkčních skupin pomocí infračervené spektroskopie. Oba nosné substráty mají stejné primární funkční skupiny. Jedná se o pík v oblasti 3319 cm^{-1} , který je způsobený vibrací $-\text{OH}$ vazby a pík v oblasti 2883 cm^{-1} , který odpovídá vibraci C-H vazby (viz Obr. 30). Ve spektru pořízeném při měření modifikované celulosy se navíc vyskytují píky v oblasti 1651 cm^{-1} , kterému odpovídá vibrace $\text{C}\equiv\text{N}$ vazby a pík v oblasti 1037 cm^{-1} , který je způsobený vibrací C-C v modifikované celuloze (viz Obr. 31).⁵⁰

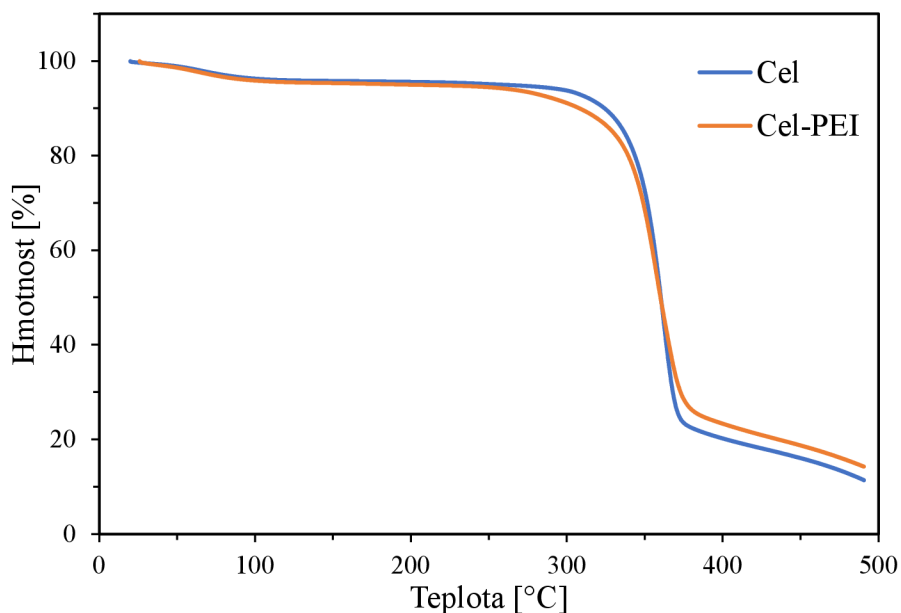


Obr. 30: Infračervené spektrum čisté celulosy

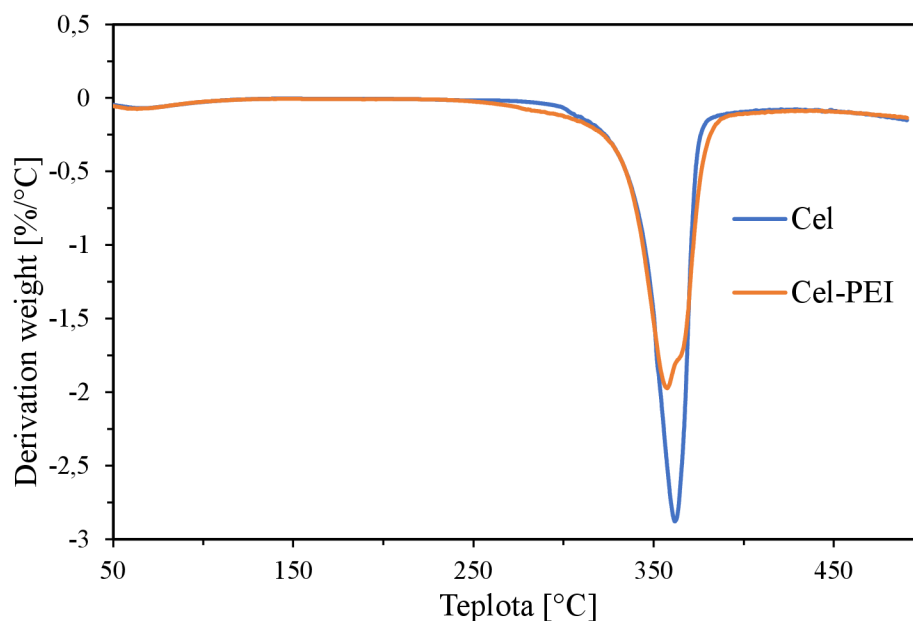


Obr. 31: Infračervené spektrum impregnované celulosy pomocí PEI

Oba nosné substráty byly rovněž podrobeny termogravimetrické analýze. Vyhodnocením termogravimetrických (viz Obr. 32) a derivačních termogravimetrických křivek (viz Obr. 33) byl zjištěn nulový úbytek hmotnosti termickým rozkladem u nosného substrátu CEL-PEI při nižších teplotách v porovnání s čistou celulosou, což je způsobeno rozkladem PEI.⁵¹



Obr. 32: Termogravimetrické křivky nosných substrátů CEL a CEL-PEI

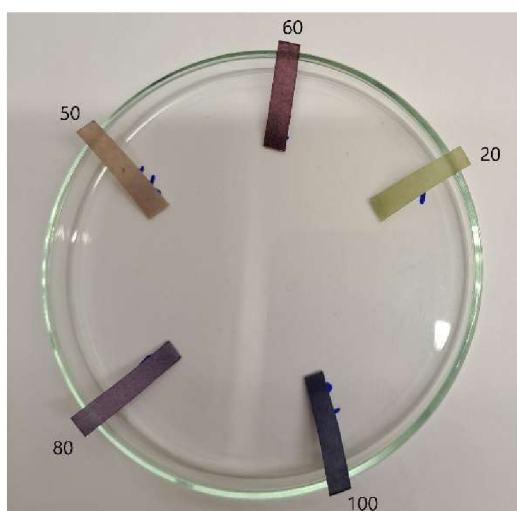


Obr. 33: Derivační termogravimetrické křivky nosných substrátů CEL a CEL-PEI

4.5 Charakterizace vrstev stříbra pomocí UV-VIS spektroskopie

Na základě absorpčních spekter zmíněných v kapitole 4.1 byly pro přípravu vrstev stříbra a pro následné účely v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii vybrány disperze nanočástic stříbra s přísady peroxidu vodíku 20; 50; 60; 80 a 100 μl , jelikož jejich absorpční maxima nejlépe odpovídaly použitým laserům, které byly dostupné při měření SERS spekter.

Oba nosné substráty CEL a CEL-PEI pokryté vrstvami stříbra jsou uvedeny na následujících obrázcích (viz Obr. 34 a 35).

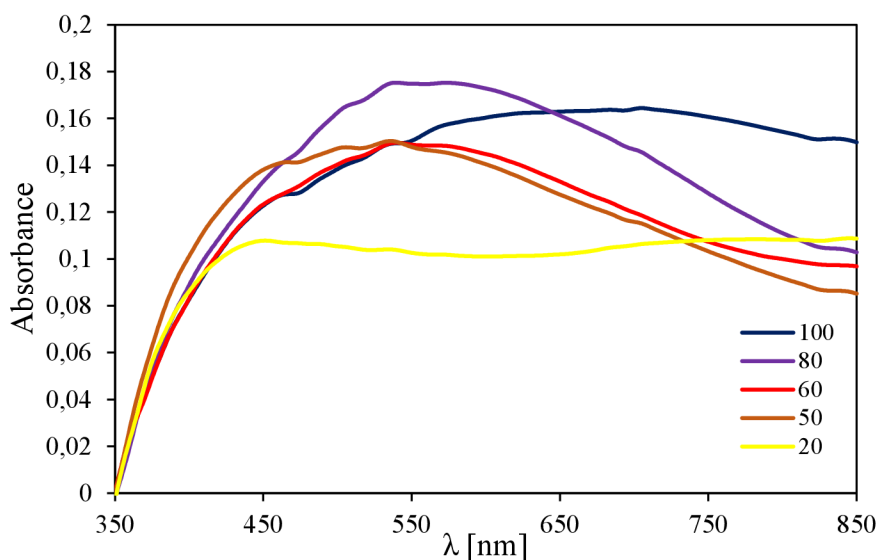


Obr. 34: Substráty cel20 – cel100

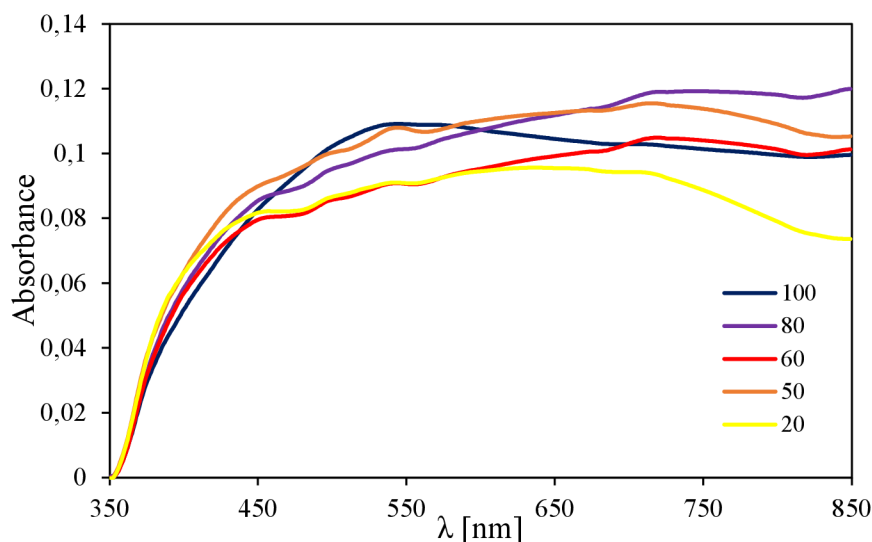


Obr. 35: Substráty celPEI20 – celPEI100

Na základě vizuálního porovnání obou nosných substrátů CEL a CEL-PEI lze říci, že k efektivnějšímu navázání stříbra na povrch obou nosičů došlo v případě substrátů CEL-PEI. Celkové množství stříbra, které se navázalo na substrátech CEL a CEL-PEI je uvedeno v kapitole 4.6. Během přípravy však bylo v případě CEL-PEI využité čtyřnásobné množství disperzí nanočástic stříbra z důvodu destabilizace způsobené uvolněním přebytečného PEI z povrchu celulosy a částečným vysrážením a sedimentací stříbra na dno zkumavky. Tmavé zbarvení CEL-PEI substrátů rovněž napovídá ke vzniku agregátů na povrchu, zatímco CEL substráty dosáhly výsledného zbarvení na základě použitých nanočástic stříbra. Pro všechny připravené vzorky byly následně naměřeny UV-VIS spektra pomocí integrační sféry (viz Obr. 36 a 37).



Obr. 36: UV-VIS spektra substrátů cel20 – cel100



Obr. 37: UV-VIS spektra substrátů celPEI20 – celPEI100

UV-VIS spektra byla měřena ve viditelné oblasti v rozsahu 350 – 850 nm oproti oxidu hořečnatému (MgO). Ve spektrech (viz Obr. 36) lze rozpoznat jednotlivá absorpční maxima CEL substrátů, které se v závislosti na použitých nanočásticích stříbra pro přípravu vrstev postupně posouvají do vyšších vlnových délek, zatímco na spektrech (viz Obr. 37) je vidět, že substráty CEL-PEI absorbovaly přibližně stejně v rámci celé oblasti viditelného spektra záření, což víceméně odpovídá předchozímu pozorování, kdy CEL-PEI substráty jsou výrazně tmavě zbarveny oproti substrátům CEL.

4.6 Množství stříbra na vrstvách

Ke stanovení obsahu stříbra navázaného na povrchu nosných substrátů CEL a CEL-PEI bylo využito měření atomové absorpční spektrometrie. Měření probíhalo rozpuštěním jednotlivých vzorků o rozměrech 25×5 mm v 30% roztoku kyseliny dusičné v kádince a následným převedením obsahu do 25 případně 50 ml odměrných baněk podle měřeného substrátu CEL nebo CEL-PEI. Ze zjištěných koncentrací bylo pro každý substrát dopočítáno množství navázaného stříbra v mikrogramech. Množství stříbra bylo také vztaženo na jednotku plochy, a nakonec bylo dopočítáno procentuální navázání stříbra z celkového množství, které bylo obsaženo v použitých disperzích pro přípravu vrstev. Všechny zmíněné hodnoty jsou uvedeny v tabulkách (Tabulka 9 a 10).

Tabulka 9: Vyhodnocení AAS pro substráty CEL20 – CEL100

cel-Ag					
Substrát	c_{Ag} [mg·l ⁻¹]	m_{Ag} [μg]	x_{Ag} [μg·cm ⁻²]	$m_{Ag} - \text{max.}$ [μg]	Procentuální navázání [%]
cel20	0,8754	21,86	17,51	64,72	33,78
cel50	0,5806	14,52	11,61		22,44
cel60	0,4931	12,33	9,86		19,05
cel80	0,6045	15,11	12,09		23,35
cel100	0,5977	14,94	11,95		23,08

Tabulka 10: Vyhodnocení AAS pro substráty CEL-PEI20 – CEL-PEI100

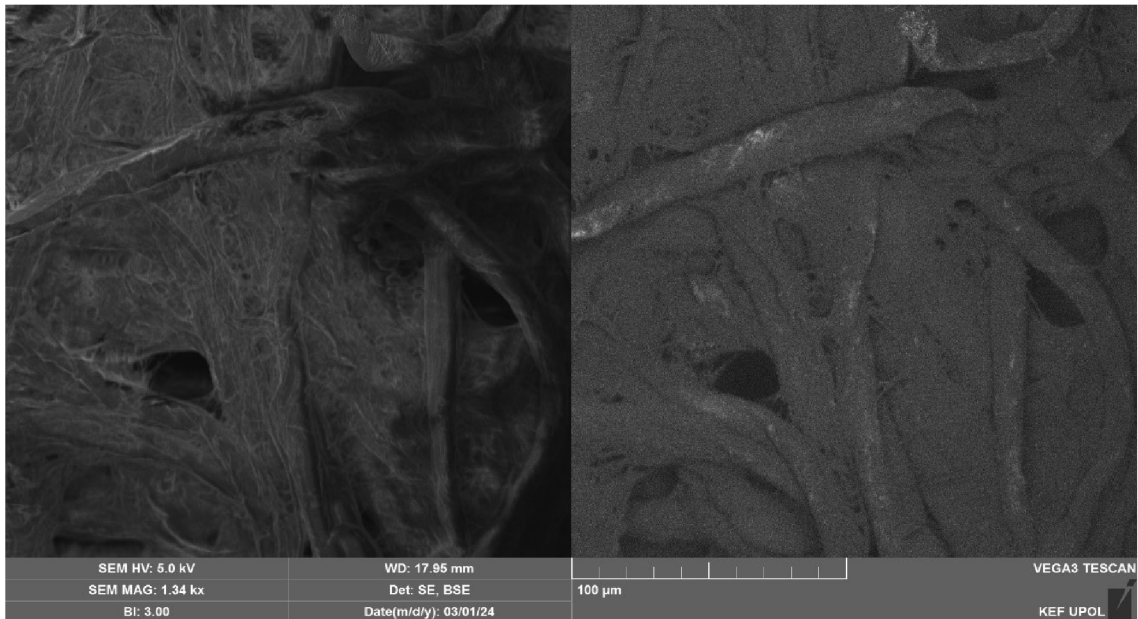
celPEI-Ag					
Substrát	c_{Ag} [mg·l ⁻¹]	m_{Ag} [μg]	x_{Ag} [μg·cm ⁻²]	$m_{Ag} - \text{max.}$ [μg]	Procentuální navázání [%]
celPEI20	0,5412	27,06	21,65	258,88	10,45
celPEI50	0,4268	21,34	17,07		8,24
celPEI60	0,6229	31,14	24,92		12,03
celPEI80	0,6176	30,88	24,70		11,93
celPEI100	0,448	22,40	17,92		8,65

Z hodnocení tabulek vyplývá, že množství stříbra, které se navázalo na nosný substrát CEL-PEI je vyšší, což odpovídá také vzhledu připravených vrstev. K přípravě každé CEL-PEI-Ag vrstvy však bylo využito 8 ml disperze nanočástic stříbra s maximálním množstvím 258,88 μg, tedy čtyřnásobné množství než pro CEL-Ag vrstvy. Při porovnání procentuálního navázání stříbra se tedy dá říci, že efektivněji došlo k navázání stříbra na nosný substrát CEL.

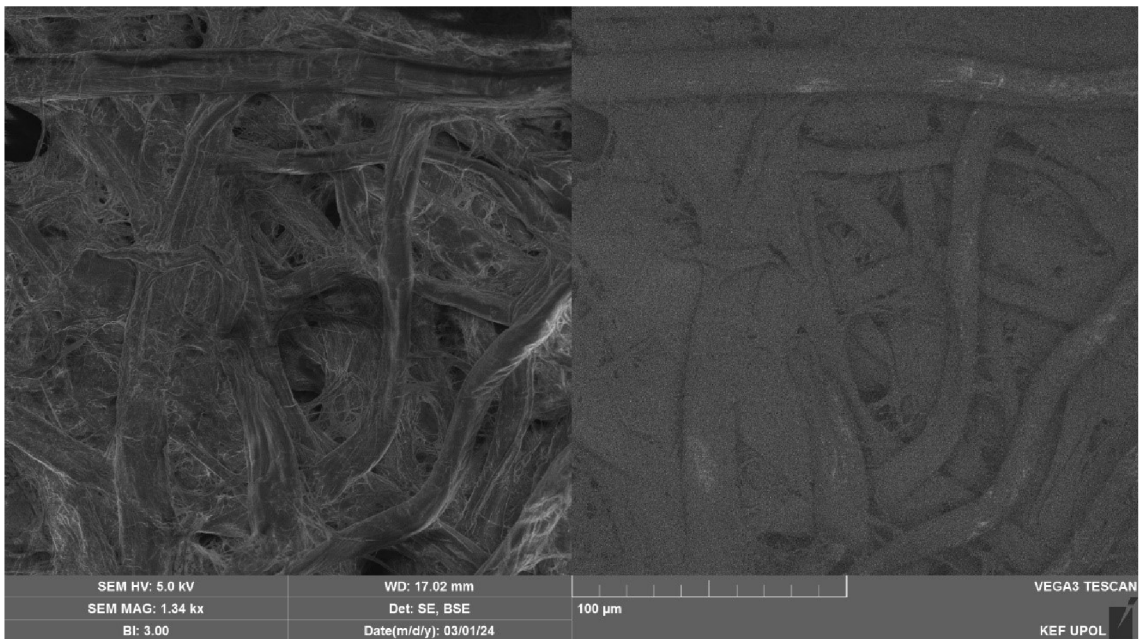
4.7 Skenovací elektronová mikroskopie a energiově disperzní spektroskopie

V následující kapitole jsou uvedeny snímky všech připravených vrstev stříbra na substrátech CEL a CEL-PEI, které byly pořízeny pomocí skenovacího elektronového mikroskopu a záznamy z energiově disperzní spektroskopie sloužící pro mapování prvkového složení povrchu vzorku. Měření probíhalo ve dvou režimech, a to v režimu detekce sekundárních elektronů (SE) a zpětně odražených elektronů (BSE). Snímky pořízené pomocí BSE mají větší kvalitu obrazu, avšak pro porovnání zde byly uvedeny i snímky naměřené pomocí detekce sekundárních elektronů. Během měření bylo využito

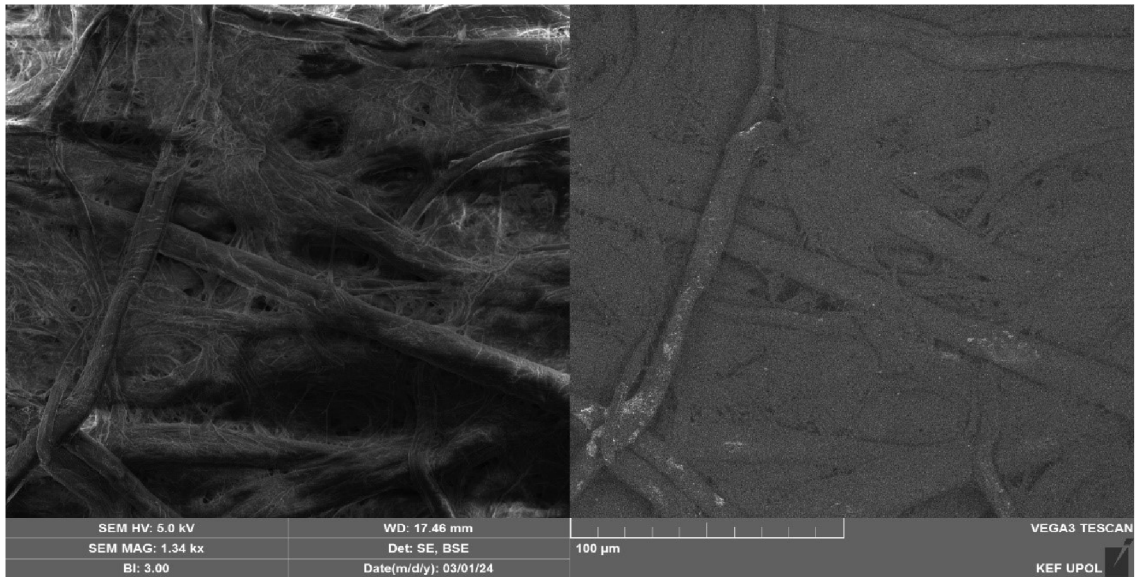
urychlovací napětí od 3 do 5 kV s intenzitou dopadajícího svazku elektronů 3. Měření EDS snímků poté vyžadovalo vyšší urychlovací napětí – 15 kV.



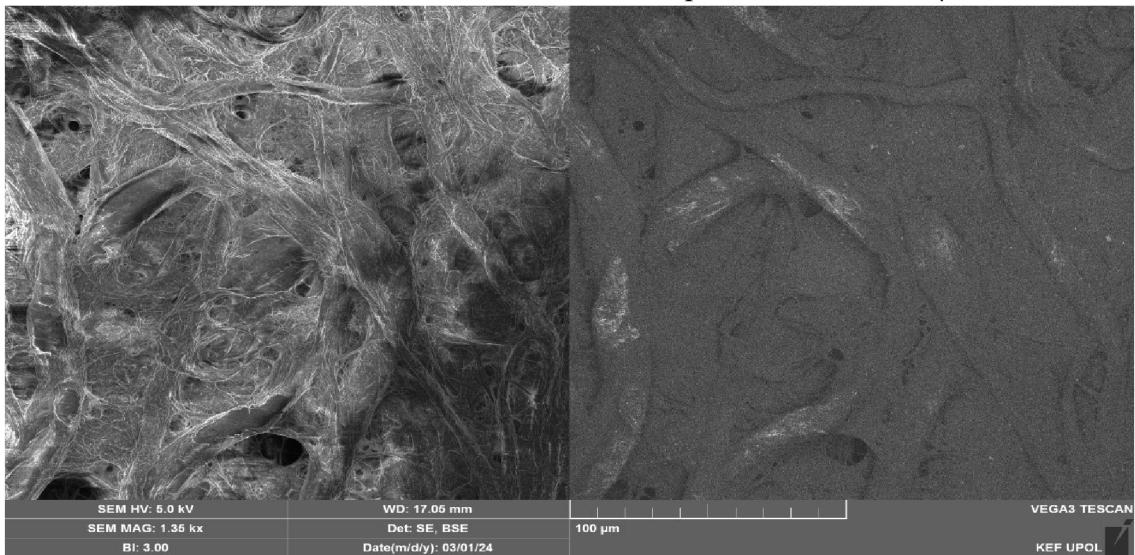
Obr. 38: SEM snímek substrátu CEL20, BSE snímek vpravo, měřítko 100 μm



Obr. 39: SEM snímek substrátu CEL50, BSE snímek vpravo, měřítko 100 μm



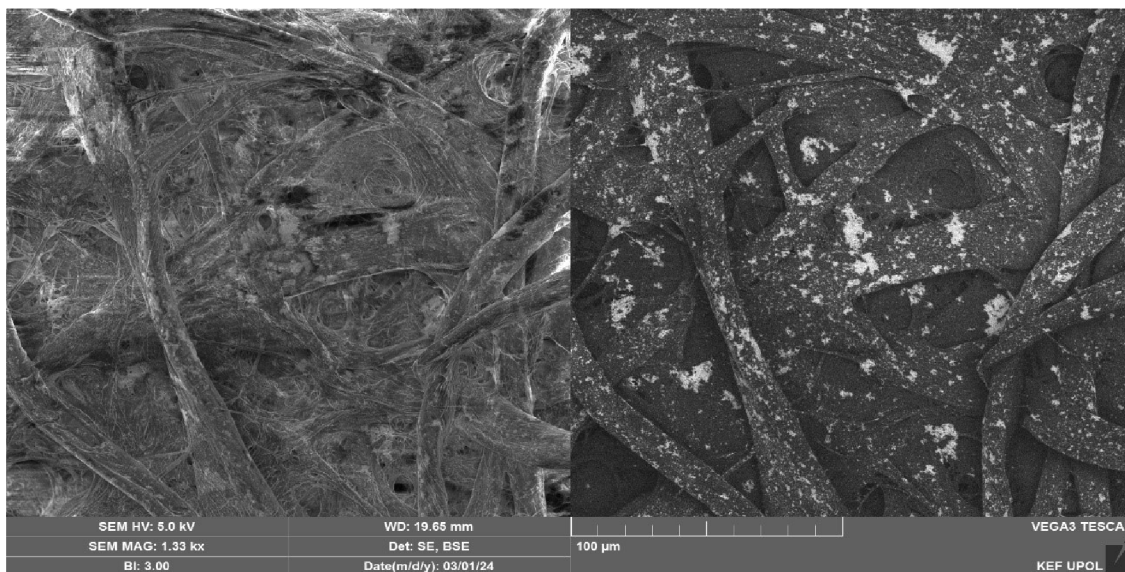
Obr. 40: SEM snímek substrátu CEL60, BSE snímek vpravo, měřítko 100 μm



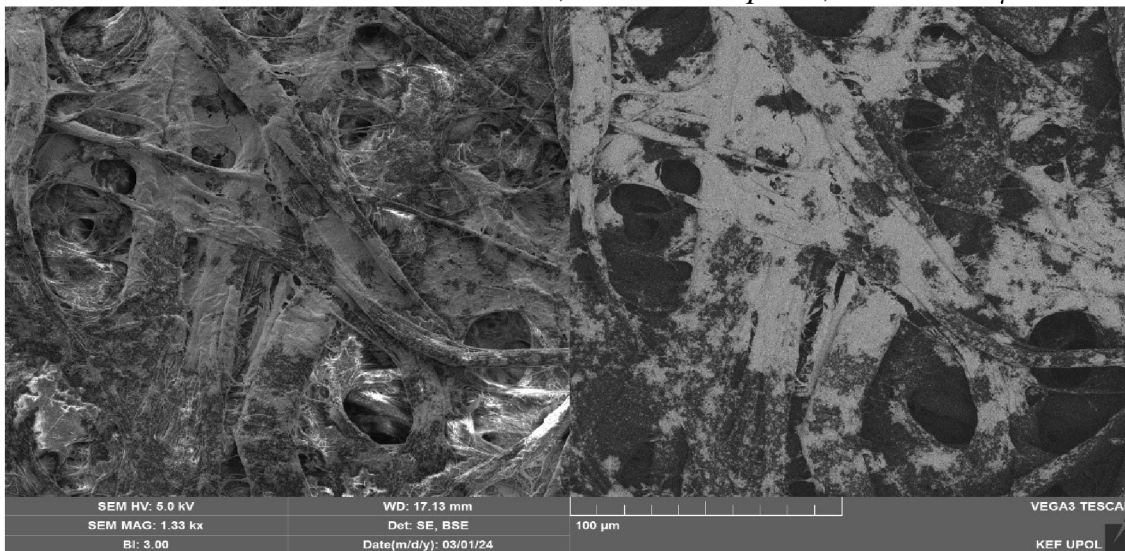
Obr. 41: SEM snímek substrátu CEL80, BSE snímek vpravo, měřítko 100 μm



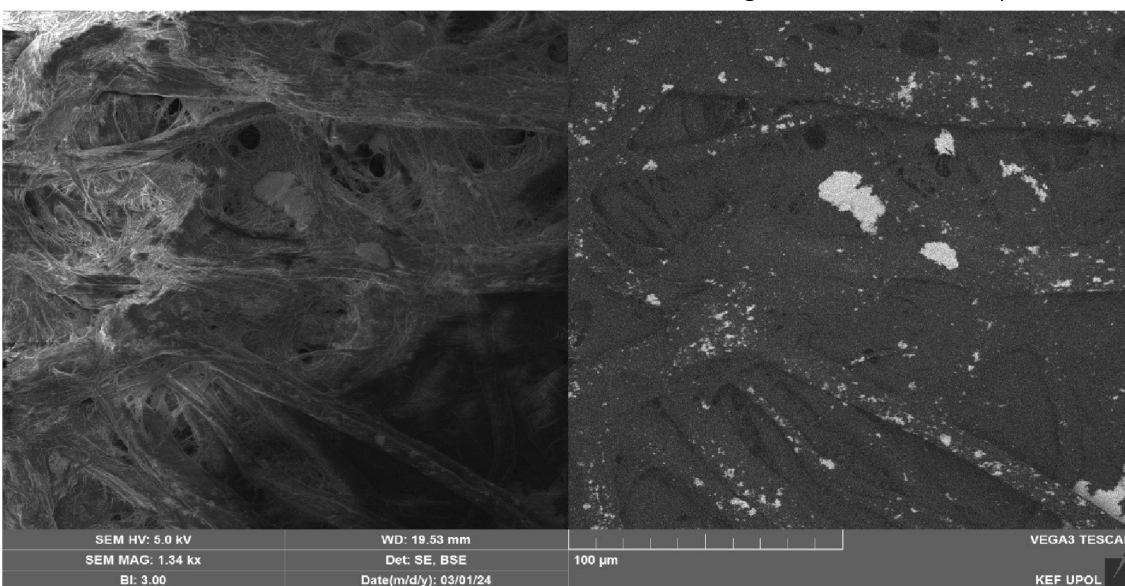
Obr. 42: SEM snímek substrátu CEL100, BSE snímek vpravo, měřítko 100 μm



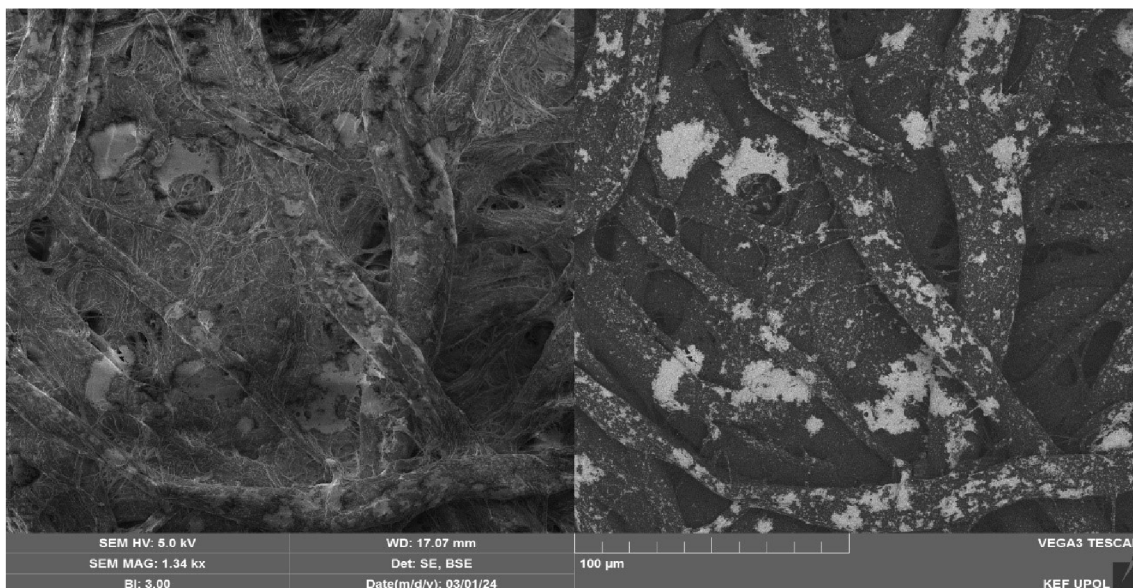
Obr. 43: SEM snímek substrátu CEL-PEI20, BSE snímek vpravo, měřítko 100 μm



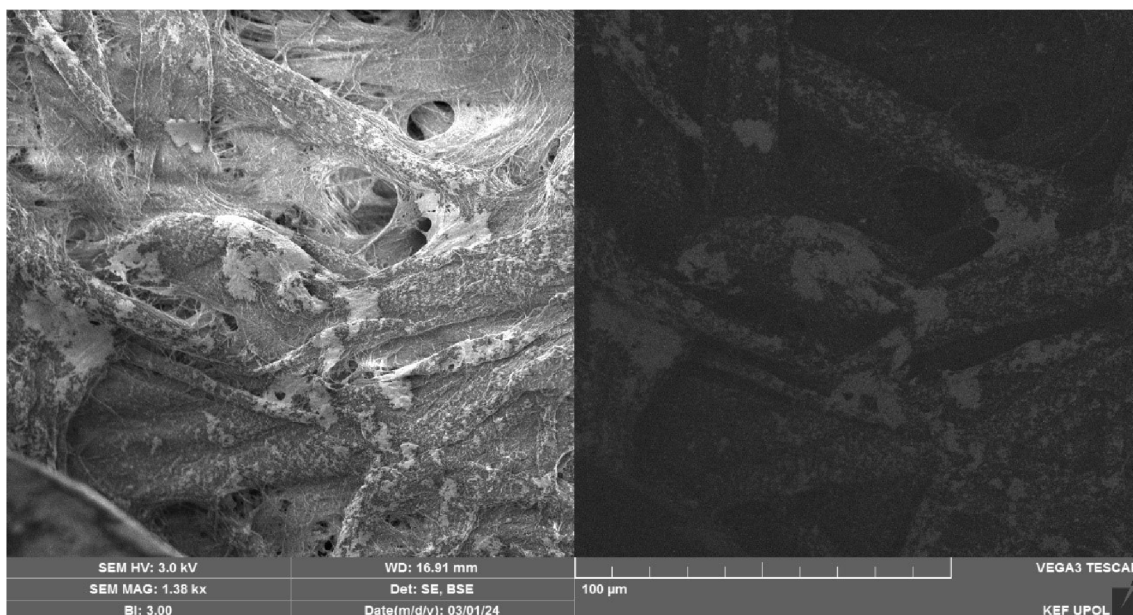
Obr. 44: SEM snímek substrátu CEL-PEI50, BSE snímek vpravo, měřítko 100 μm



Obr. 45: SEM snímek substrátu CEL-PEI60, BSE snímek vpravo, měřítko 100 μm



Obr. 46: SEM snímek substrátu CEL-PEI80, BSE snímek vpravo, měřítko 100 μm



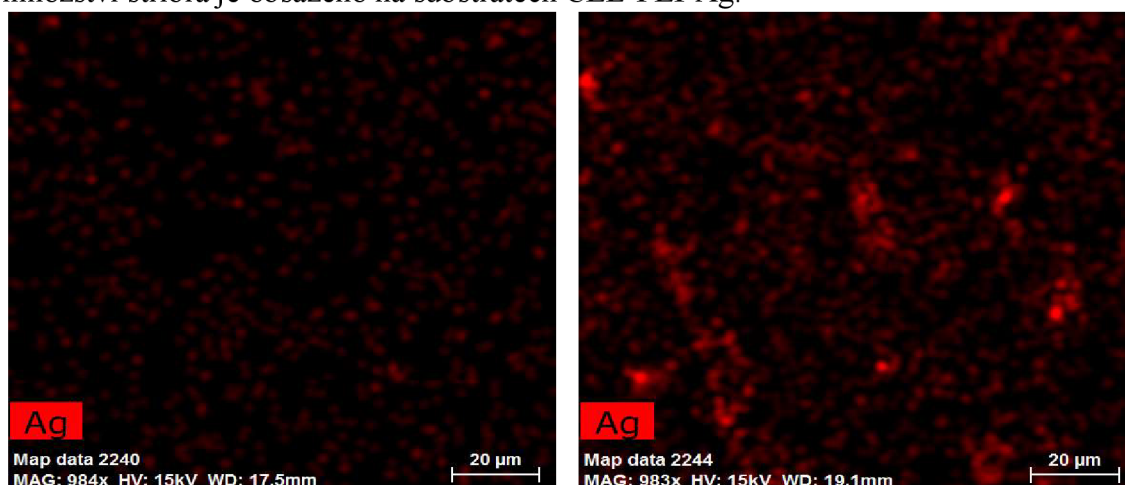
Obr. 47: SEM snímek substrátu CEL-PEI100, BSE snímek vpravo, měřítko 100 μm

I když se substráty CEL-Ag jeví z výsledků atomové absorpční spektrometrie jako podklady, které jsou efektivnější pro navázání stříbra na jejich povrch, na snímcích těchto substrátů nelze pozorovat tvorbu shluků většího množství částic. Částice o velikostním průměru 13 nm na povrchu celulosy nebylo možné na použitém skenovacím elektronovém mikroskopu zachytit. Faktu, že nedochází ke tvorbě agregátů na povrchu odpovídá také zbarvení těchto substrátů od žluté až po modrou (viz Obr. 34) v závislosti na použitých disperzích nanočástic stříbra. U světlých oblastí vyskytujících se na BSE snímcích CEL-Ag substrátů se pravděpodobně nebude jednat o výskyt shluků částic stříbra, ale spíše o hrany ve struktuře celulosy. Naopak na BSE snímcích substrátů CEL-

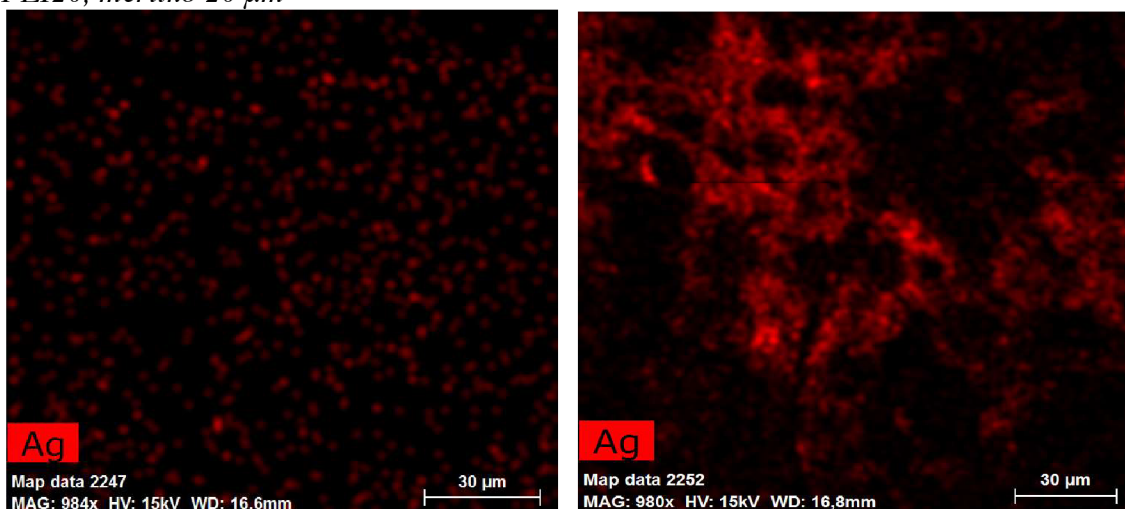
PEI-Ag lze poměrně hezky pozorovat světlejší oblasti, které odpovídají místům, kde během přípravy docházelo k vytvoření shluků většího množství částic. Tyto shluky částic jsou taktéž pozorovatelné na snímcích pořízených pomocí SE, které u substrátů CEL-Ag pozorovatelné nejsou.

Na některých snímcích (viz Obr. 41, 44 a 47) je také patrné, že během měření docházelo k výraznému nabíjení povrchu vzorku z důvodu nedostatečného odvodu náboje, a tedy nízké vodivosti těchto materiálů. Z tohoto důvodu byly všechny vzorky měřeny pod poměrně malým urychlovacím napětím elektronů. Při měření EDS snímků pod urychlovacím napětím 15 kV místy také docházelo ke spálení měřených vzorků.

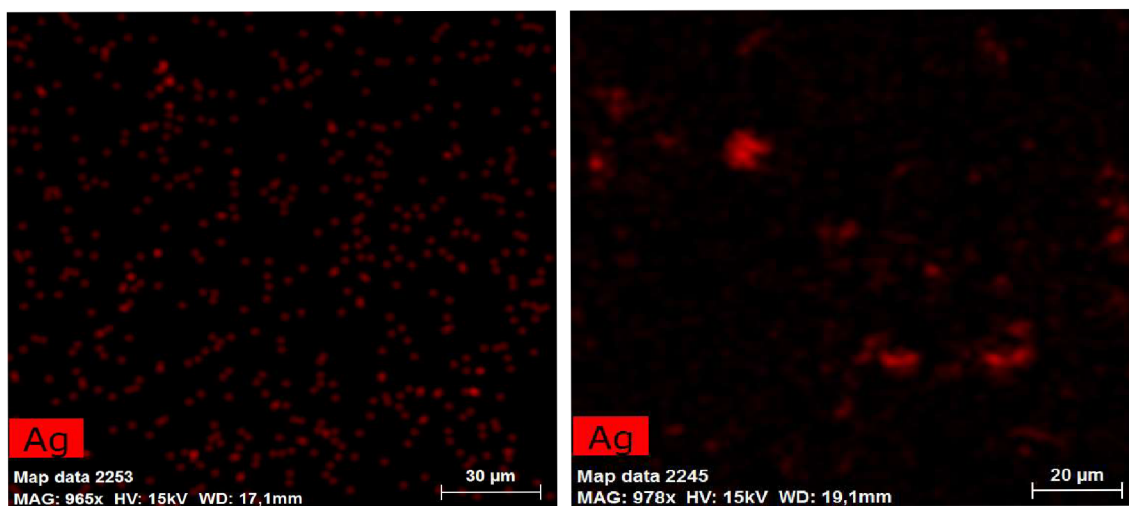
Níže jsou poté uvedeny snímky z mapování povrchu jednotlivých substrátů pomocí energiově disperzní spektroskopie (viz Obr. 48 – 52). Z těchto snímků je patrné, že větší množství stříbra je obsaženo na substrátech CEL-PEI-Ag.



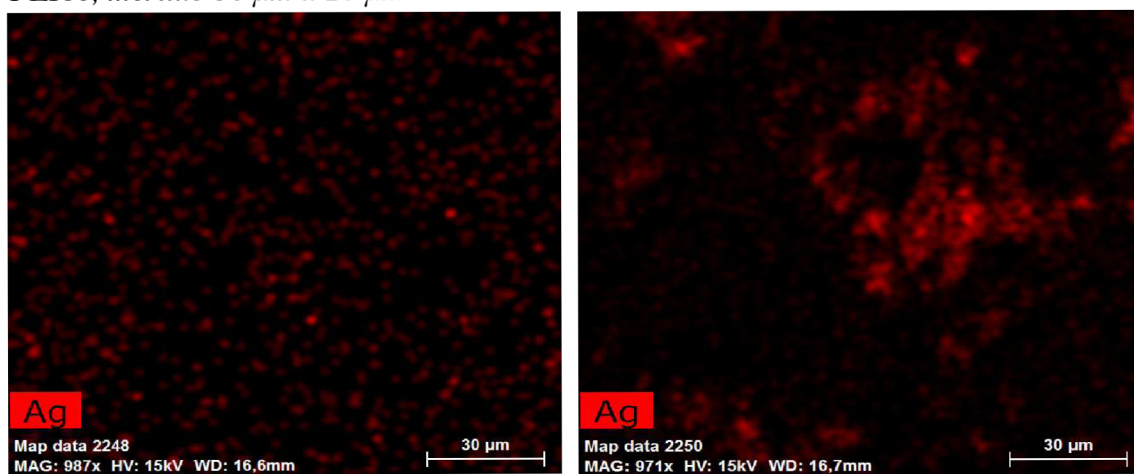
Obr. 48: Porovnání mapování stříbra na povrchu pro substráty CEL20 (vlevo) a CEL-PEI20, měřítko 20 µm



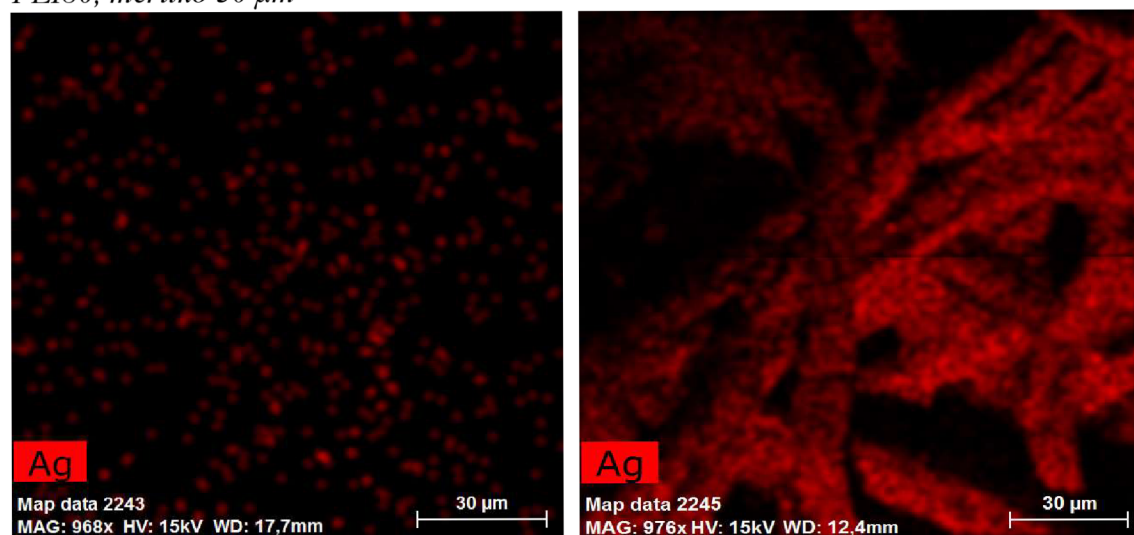
Obr. 49: Porovnání mapování stříbra na povrchu pro substráty CEL50 (vlevo) a CEL-PEI50, měřítko 30 µm



Obr. 50: Porovnání mapování stříbra na povrchu pro substráty CEL60 (vlevo) a CEL-PEI60, měřítko 30 µm a 20 µm



Obr. 51: Porovnání mapování stříbra na povrchu pro substráty CEL80 (vlevo) a CEL-PEI80, měřítko 30 µm

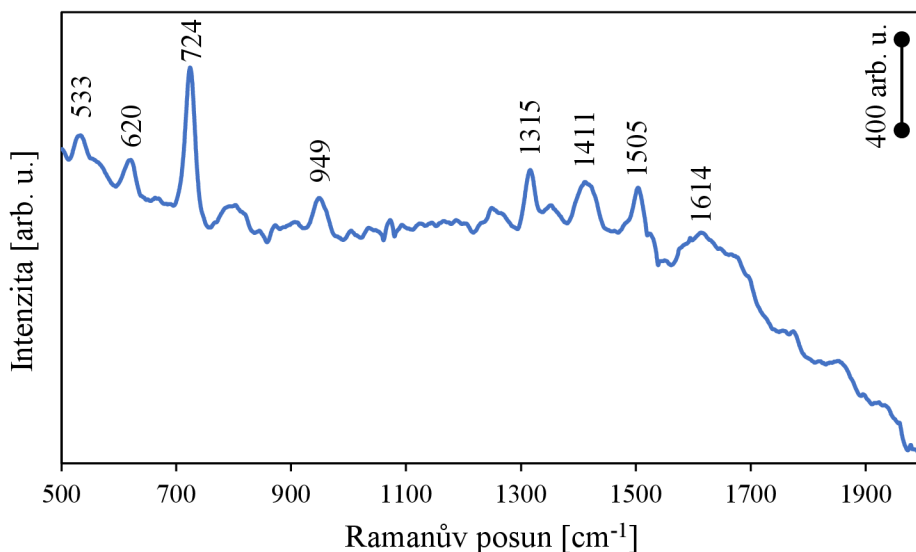


Obr. 52: Porovnání mapování stříbra na povrchu pro substráty CEL100 (vlevo) a CEL-PEI100, měřítko 30 µm

4.8 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie

Všechna spektra měřených vzorků pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie byla zaznamenána v rozmezí Ramanova posunu od 51 cm^{-1} do 3400 cm^{-1} pro lasery všech použitých vlnových délek (455; 532; 633 a 780 nm). Při měření byly využívány maximální možné výkony všech laserů (*Tabulka 3*). Naměřená spektra byla upravována pomocí programu *SpectraGryph v1.2.16 – spectroscopy software*. Provedených změn se týká úprava rozsahu vlnočtů jednotlivých spekter na hodnoty od 500 cm^{-1} do 2000 cm^{-1} . Všechna spektra byla dále vyhlazena pomocí příkazu *Advanced smoothing*, tak aby nedošlo ke ztrátě nebo snížení intenzity jednotlivých píků obsažených v daném spektru a zarovnána pomocí příkazů *Simple baseline* a *Advanced baseline* pro snadnější odečet intenzit charakteristických píků měřených analytů. Pro každý substrát bylo měření provedeno jednou bez přítomnosti zkoumané látky a třikrát po nakápnutí analytu na jednotlivé substráty. Z těchto tří měření byla následně pomocí příkazu *Average spectra* zhotovena jedna křivka odpovídající průměru daných tří měření.

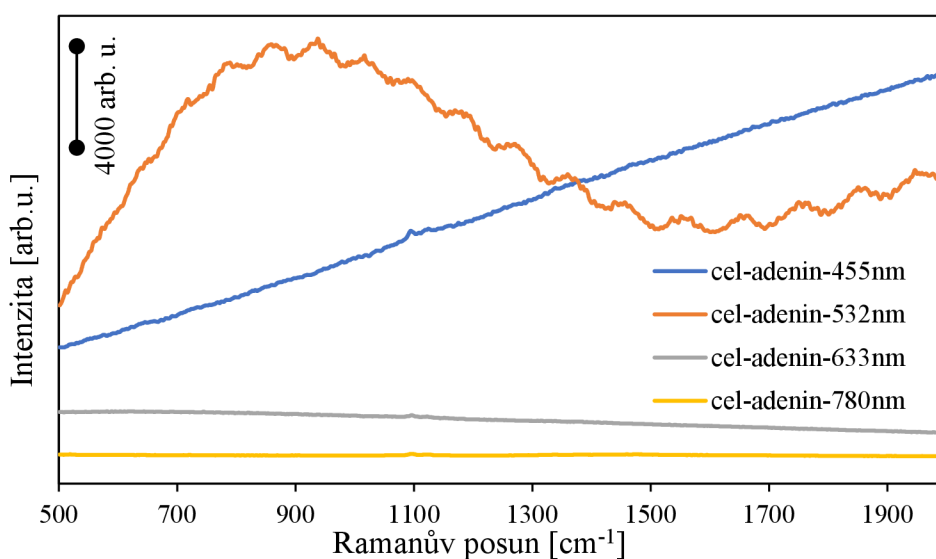
V následujícím grafu (*viz Obr. 53*) je uvedeno Ramanovo spektrum vodného roztoku $0,1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ adeninu, které bylo naměřeno v kyvetě za použití laseru o vlnové délce 785 nm a výkonu laseru 340 mW. Nejvýraznějším píkem adeninu je pík v oblasti 724 cm^{-1} , který odpovídá symetrickému módu „dýchání“ prstence purinu. Píky v oblasti 533 cm^{-1} a 620 cm^{-1} odpovídají vibracím C-C=C a N-C-C. Maximum v oblasti 949 cm^{-1} odpovídá deformační vibraci pětičlenného kruhu, 1315 cm^{-1} pak valenční vibraci C-N a 1411 cm^{-1} deformační vibraci N=CH. Poslední výraznější píky v oblasti 1505 cm^{-1} a 1614 cm^{-1} odpovídají deformační vibraci C-N-9-H a valenční vibraci C=N.⁵²



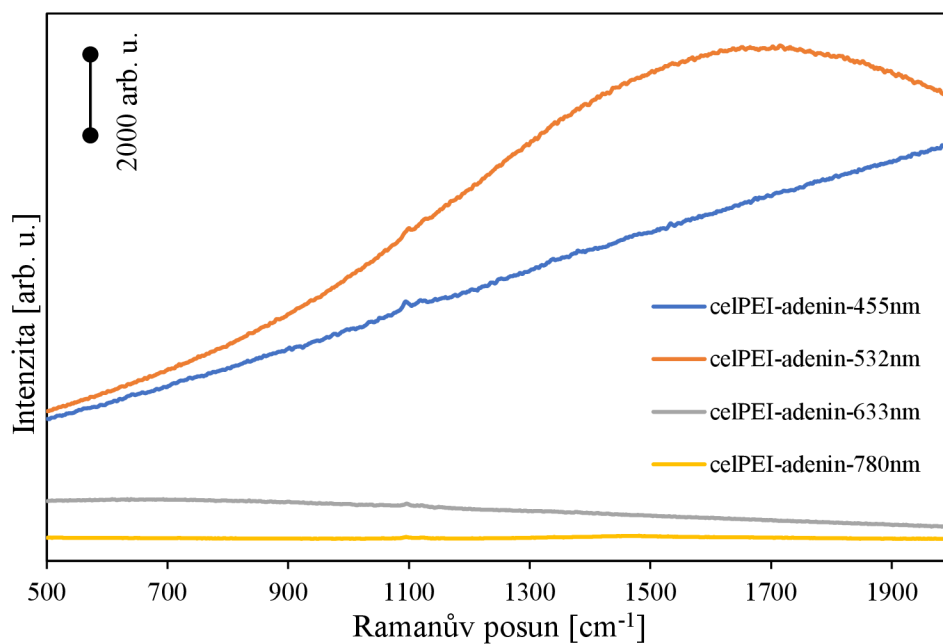
Obr. 53: Ramanovo spektrum $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ adeninu s výkonem laseru 340 mW , $\lambda = 785 \text{ nm}$

4.8.1 Měření adeninu na nosných substrátech bez stříbra

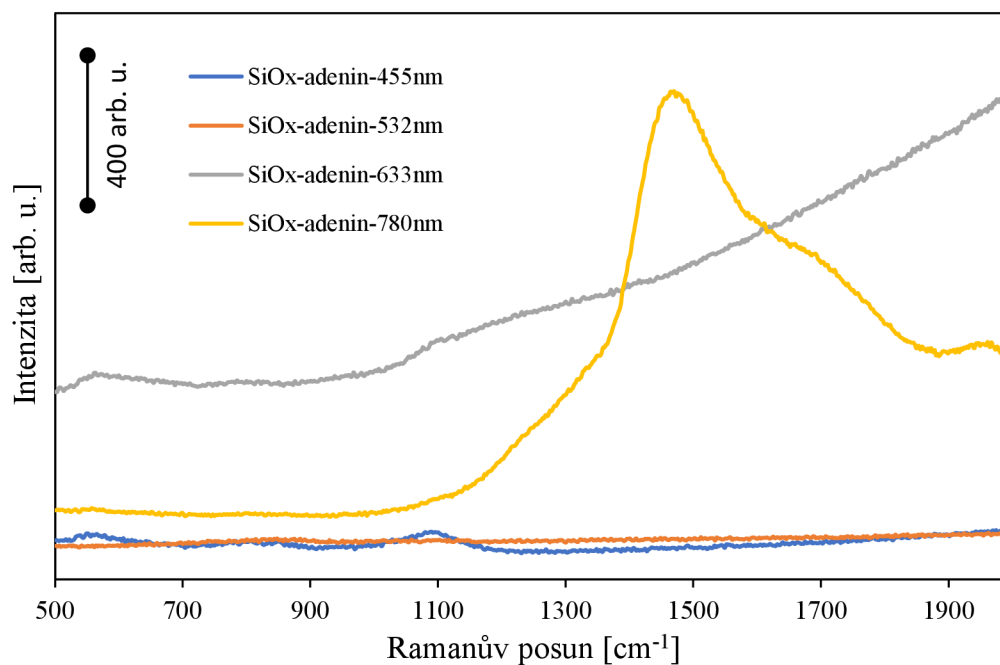
V následující kapitole jsou nejprve uvedeny grafy (viz Obr. 54 – 56) obsahující spektra z měření adeninu o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ na obou nosných substrátech CEL a CEL-PEI bez navázaného stříbra a taktéž záznam z měření kapky vodného roztoku adeninu na mikroskopickém sklíčku. Pro měření bylo vždy na nosný substrát, případně mikroskopické sklíčko nakápnuto pomocí automatické mikropipety $5 \mu\text{l}$ vodného roztoku adeninu. Měření bylo provedeno pro všechny výše zmíněné vlnové délky laserů.



Obr. 54: SERS spektra $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na nosném substrátu CEL bez přítomnosti stříbra



Obr. 55: SERS spektra $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na nosném substrátu CEL-PEI bez přítomnosti stříbra

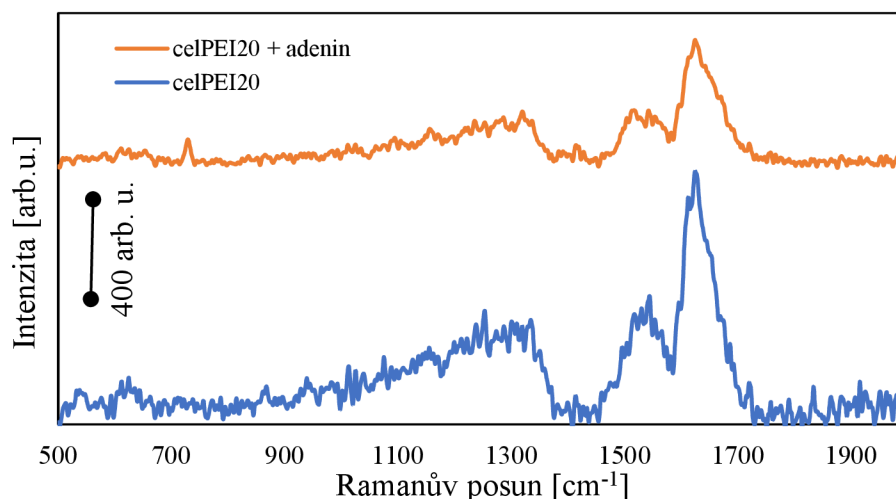


Obr. 56: SERS spektra $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ adeninu měřeného ve formě kapky na mikroskopickém sklíčku

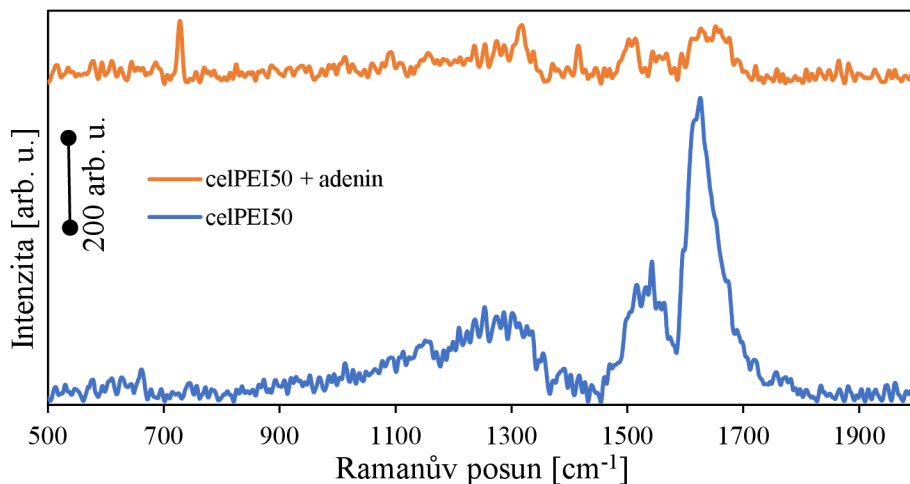
Měření adeninu o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na nosných substrátech bez přítomnosti stříbra bylo provedeno z důvodu výpočtu faktorů zesílení, které vykazovaly substráty s vrstvami stříbra. Spektra adeninu byla také doměřena na mikroskopickém sklíčku (viz Obr. 56) z důvodu výskytu silné fluorescence ve spektrech adeninu měřených na obou nosných substrátech CEL a CEL-PEI způsobené celulosou.⁵³

4.8.2 Měření připravených substrátů pro SERS

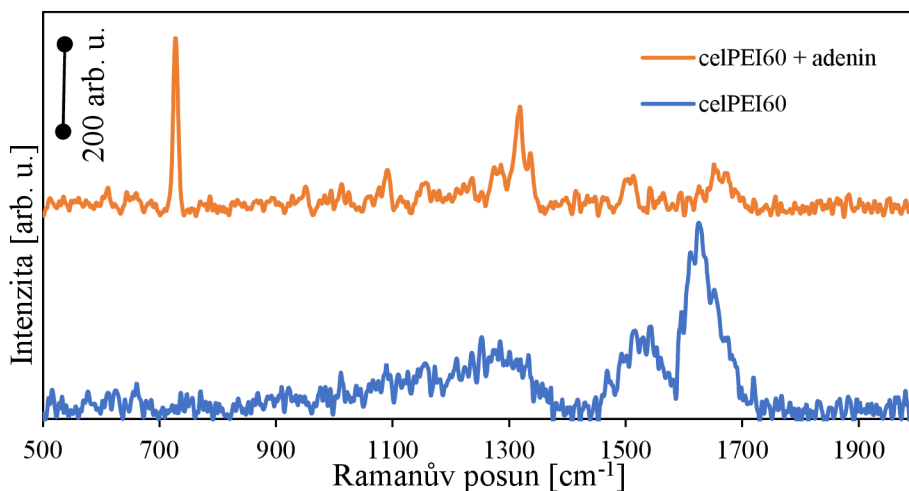
Testování aktivity substrátů v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii probíhalo na modelovém analytu, jímž byl zvolen vodný roztok adeninu o koncentraci $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro účely měření bylo připraveno celkem deset vzorků. Jedná se o substráty celPEI100, celPEI80, celPEI60, celPEI50, celPEI20, cel100, cel80, cel60, cel50 a cel20, které byly postupně proměřeny pomocí všech typů laserů. Parametry měření jsou uvedeny výše v tabulce (Tabulka 3). Výsledky měření vzorků s impregnovanou celulosou jako nosným substrátem jsou uvedeny v následujících grafech (viz Obr. 57 – 76). Pokud se v některém z měření vyskytovala fluorescence, nebylo takové spektrum zahrnuto v průměrování, protože by došlo k přílišnému zkreslení píku adeninu. Pro výpočet níže uvedených faktorů zesílení však byla využita všechna naměřená data.



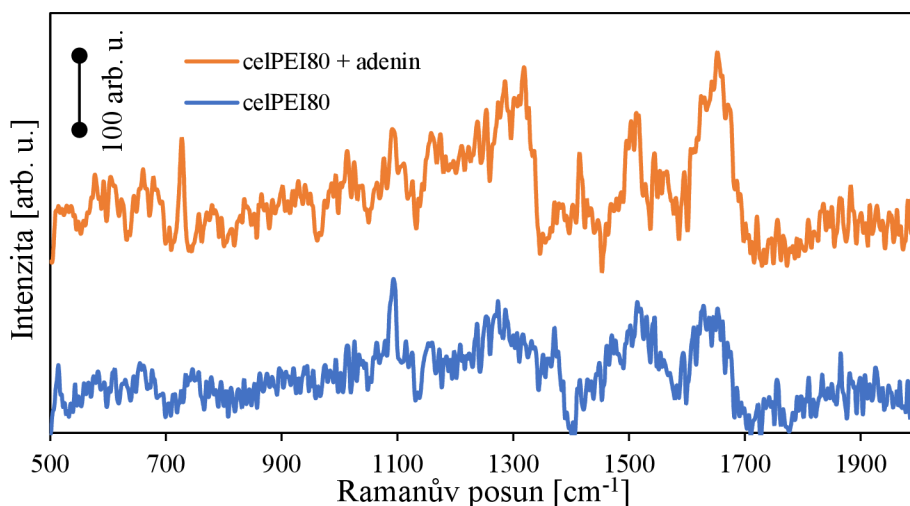
Obr. 57: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI20 a čistého substrátu celPEI20, $\lambda = 455 \text{ nm}$



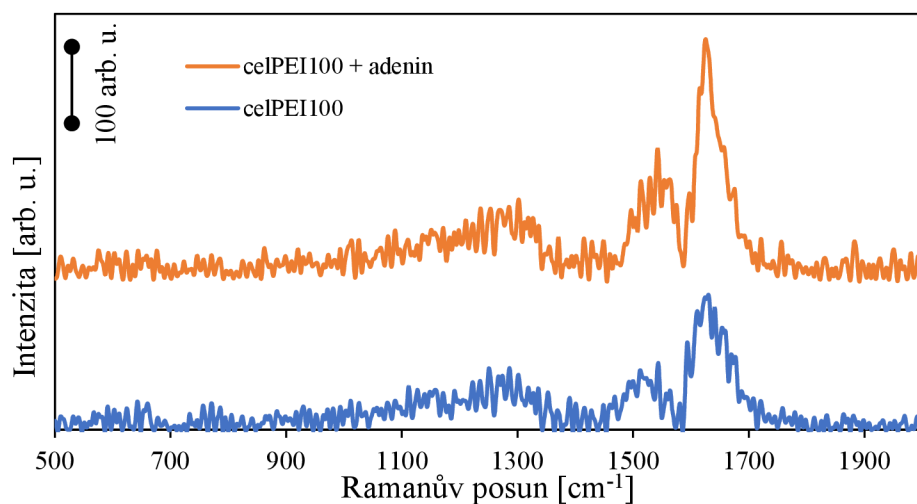
Obr. 58: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI50 a čistého substrátu celPEI50, $\lambda = 455 \text{ nm}$



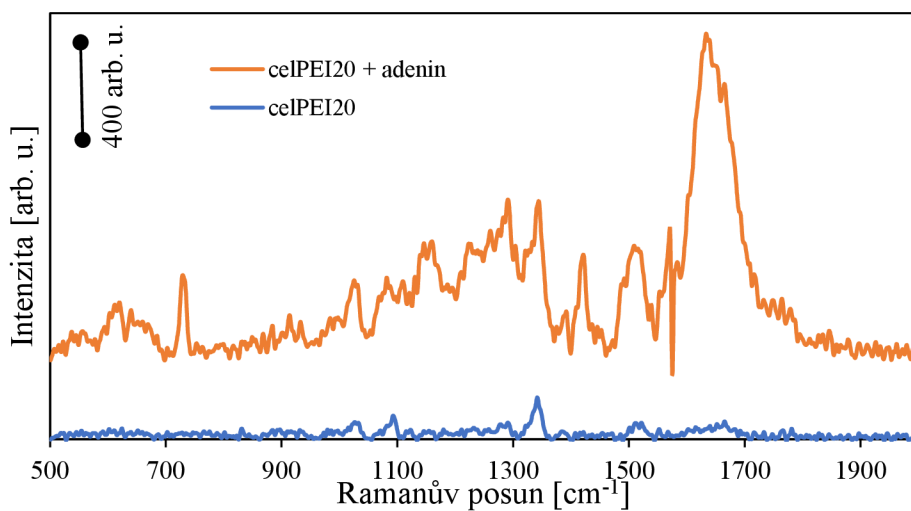
Obr. 59: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI60 a čistého substrátu celPEI60, $\lambda = 455 \text{ nm}$



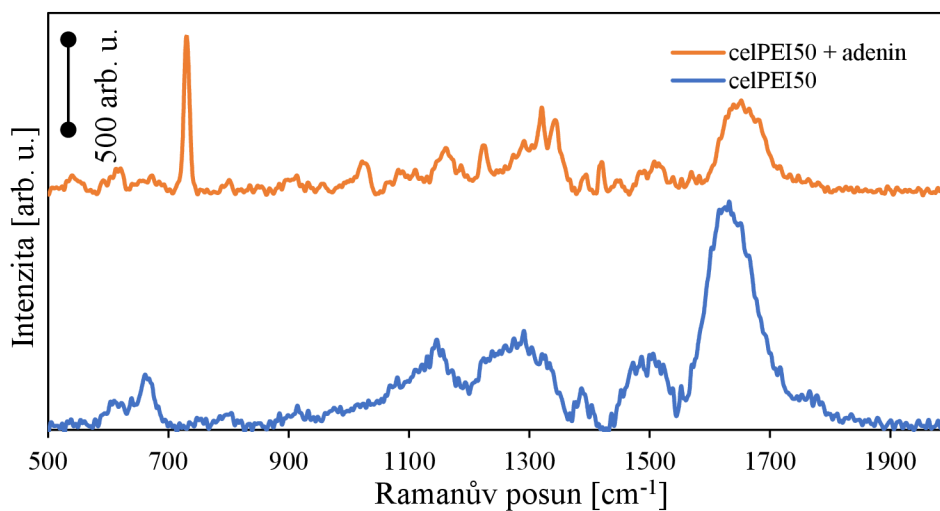
Obr. 60: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI80 a čistého substrátu celPEI80, $\lambda = 455 \text{ nm}$



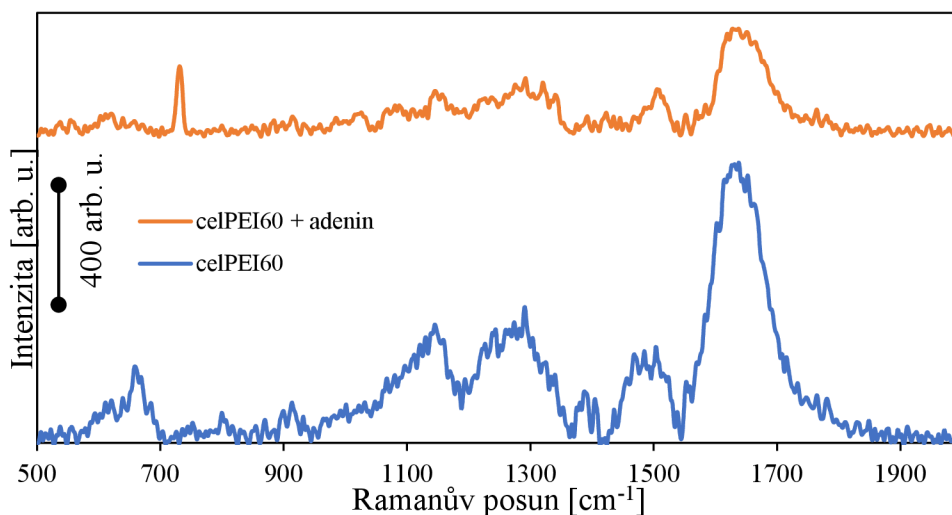
Obr. 61: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI100 a čistého substrátu celPEI100, $\lambda = 455 \text{ nm}$



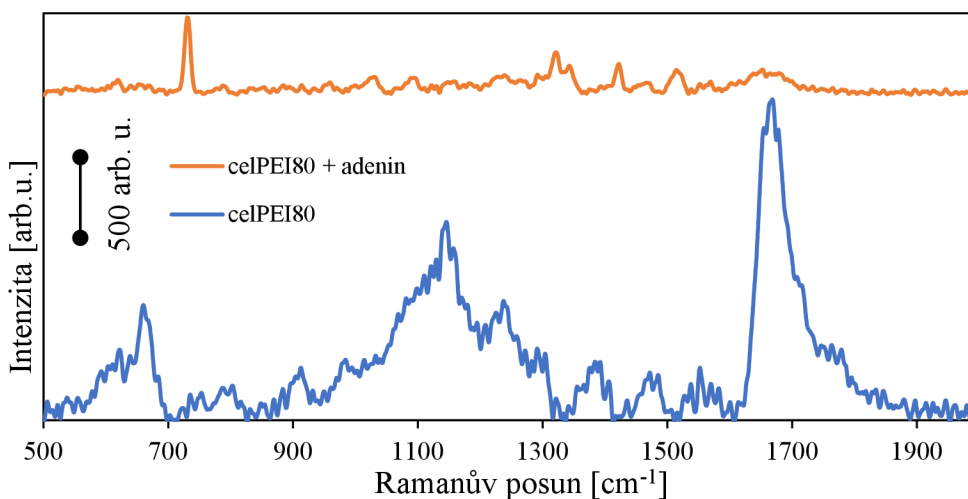
Obr. 62: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI20 a čistého substrátu celPEI20, $\lambda = 532 \text{ nm}$



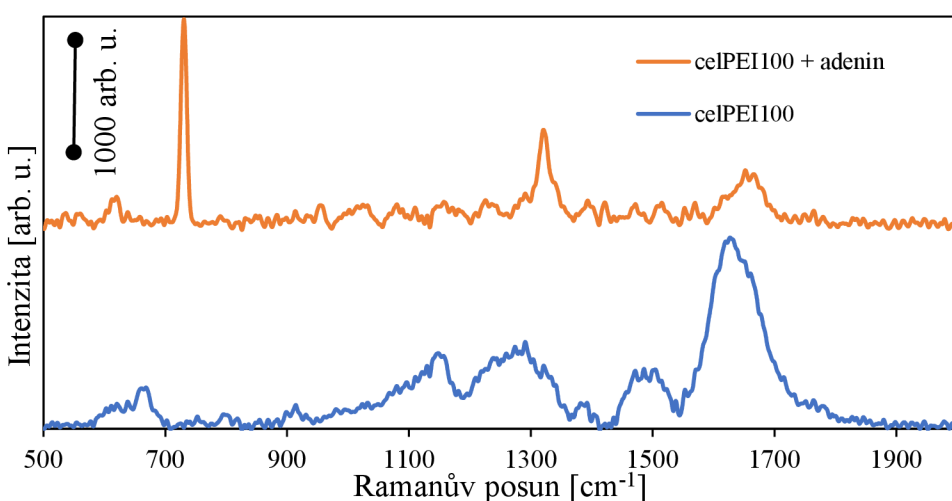
Obr. 63: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI50 a čistého substrátu celPEI50, $\lambda = 532 \text{ nm}$



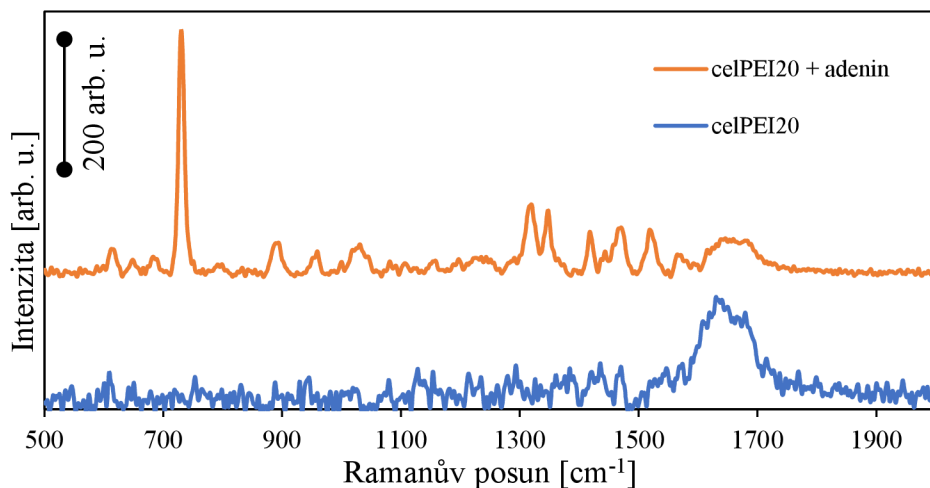
Obr. 64: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI60 a čistého substrátu celPEI60, $\lambda = 532 \text{ nm}$



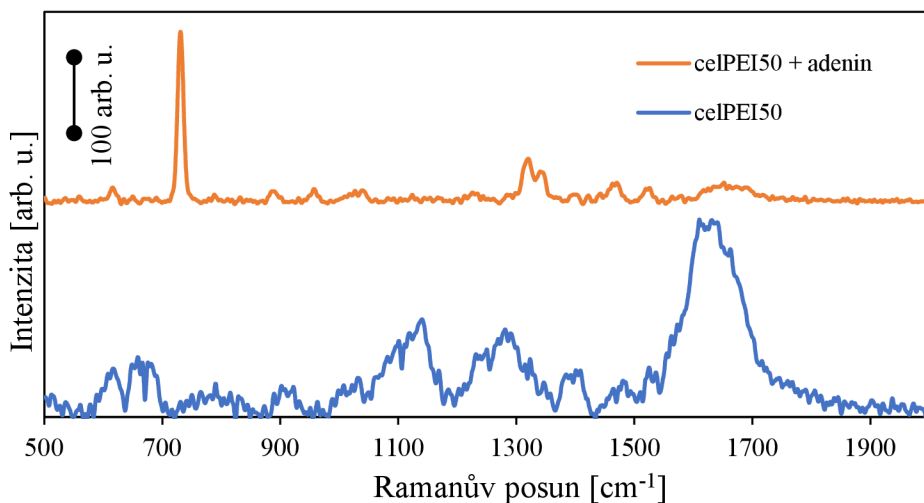
Obr. 65: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI80 a čistého substrátu celPEI80, $\lambda = 532 \text{ nm}$



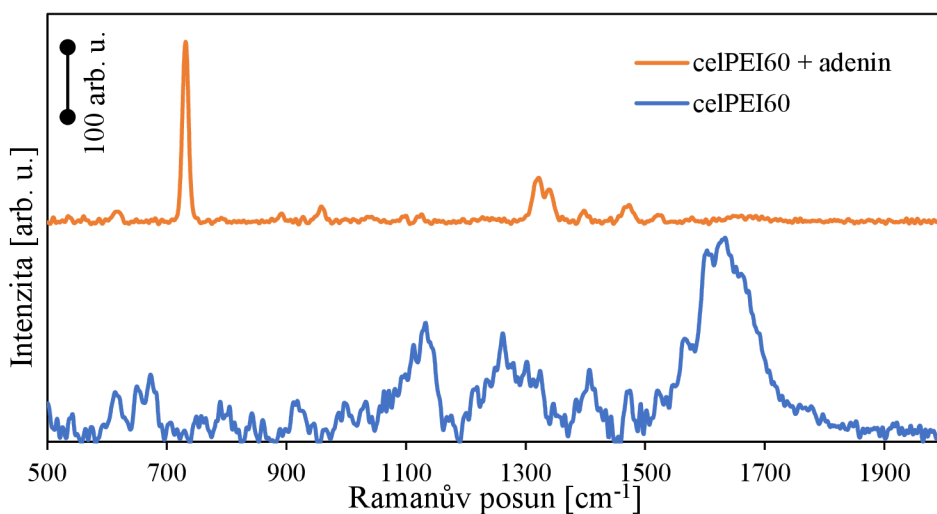
Obr. 66: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI100 a čistého substrátu celPEI100, $\lambda = 532 \text{ nm}$



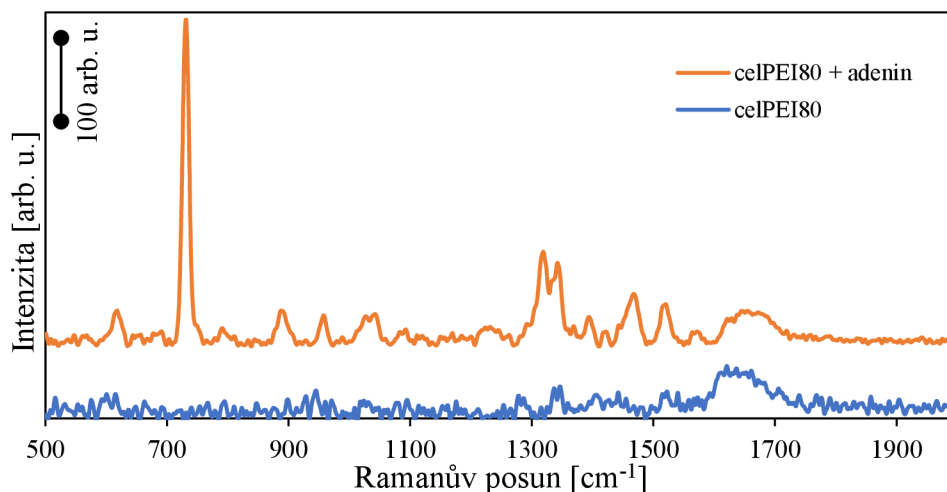
Obr. 67: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI20 a čistého substrátu celPEI20, $\lambda = 633 \text{ nm}$



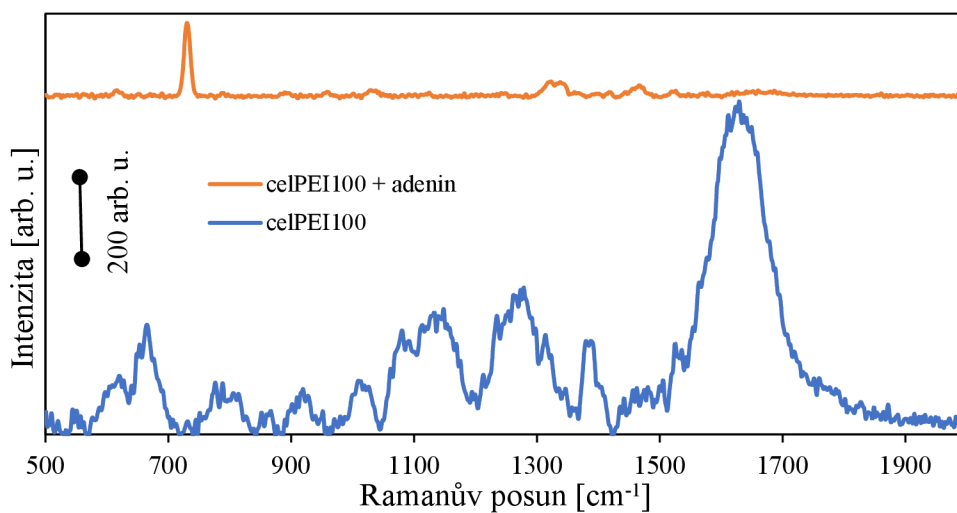
Obr. 68: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI50 a čistého substrátu celPEI50, $\lambda = 633 \text{ nm}$



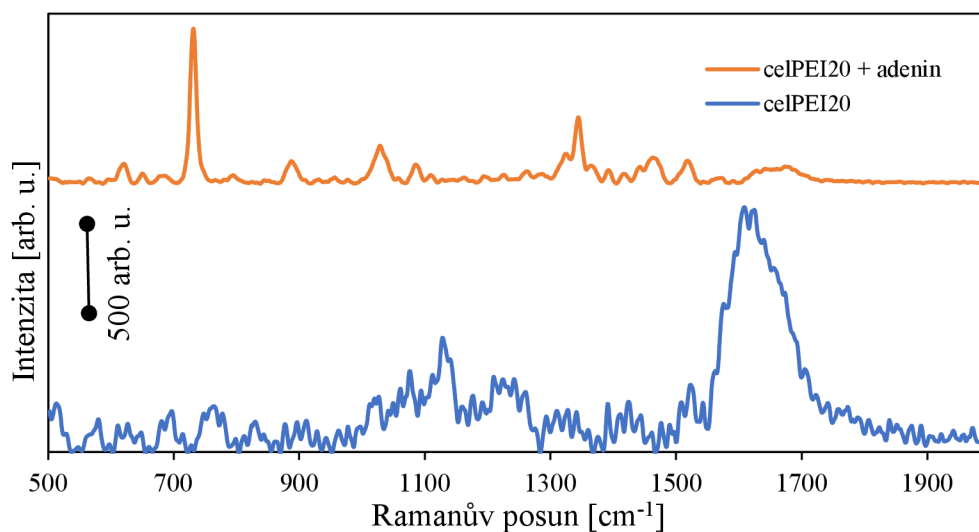
Obr. 69: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI60 a čistého substrátu celPEI60, $\lambda = 633 \text{ nm}$



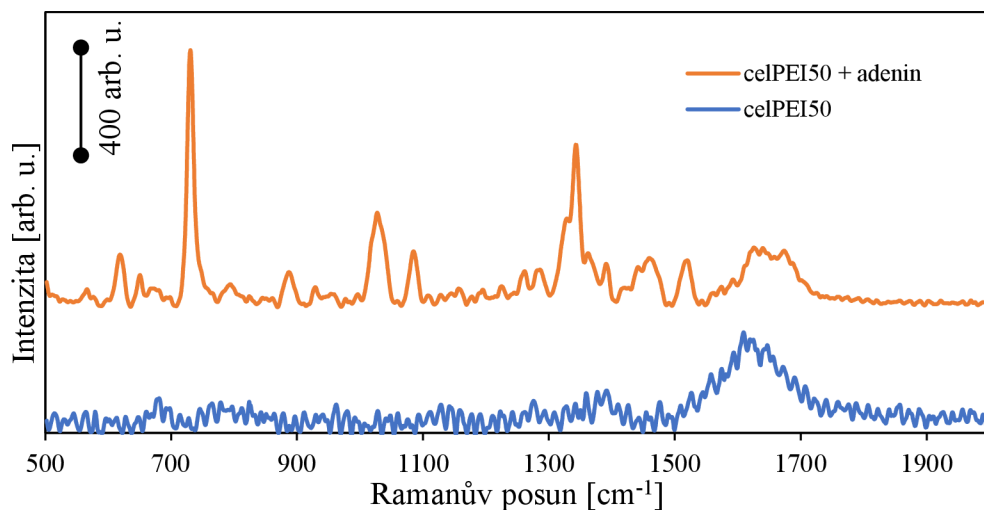
Obr. 70: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI80 a čistého substrátu celPEI80, $\lambda = 633 \text{ nm}$



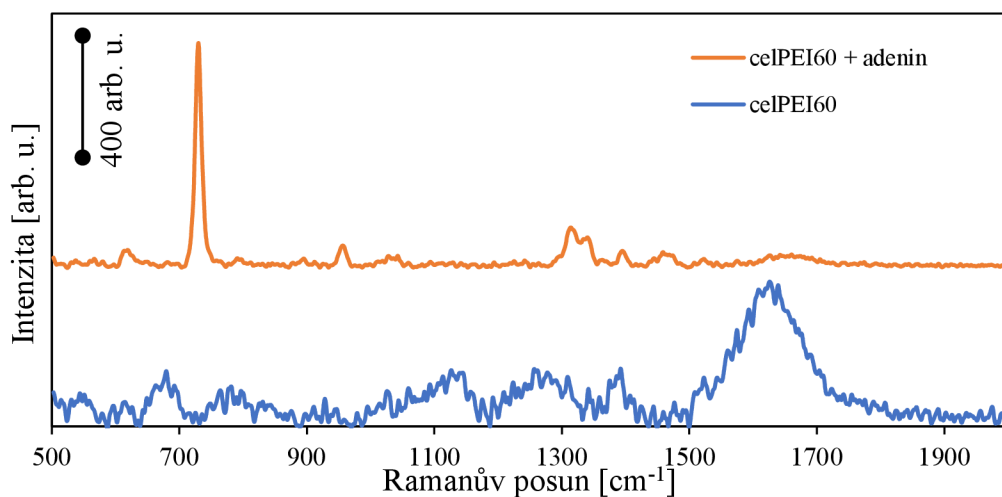
Obr. 71: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI100 a čistého substrátu celPEI100, $\lambda = 633 \text{ nm}$



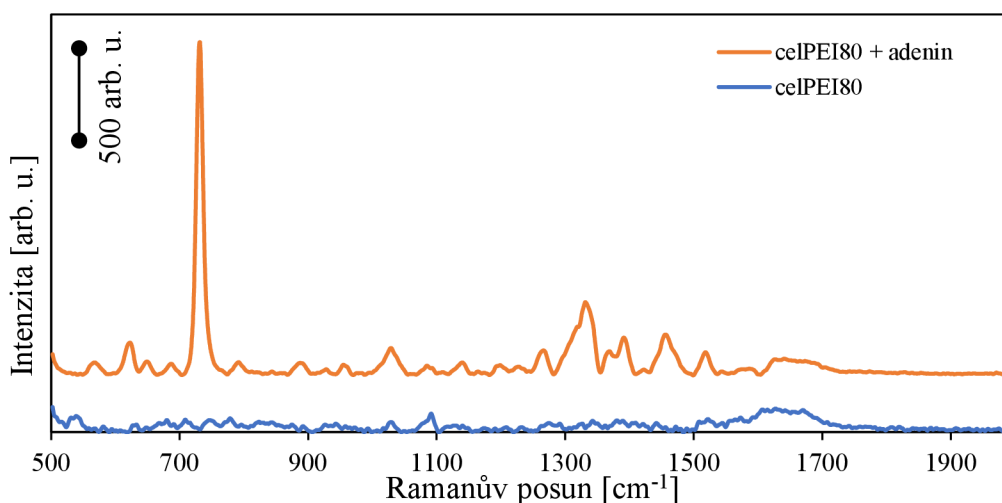
Obr. 72: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI20 a čistého substrátu celPEI20, $\lambda = 780 \text{ nm}$



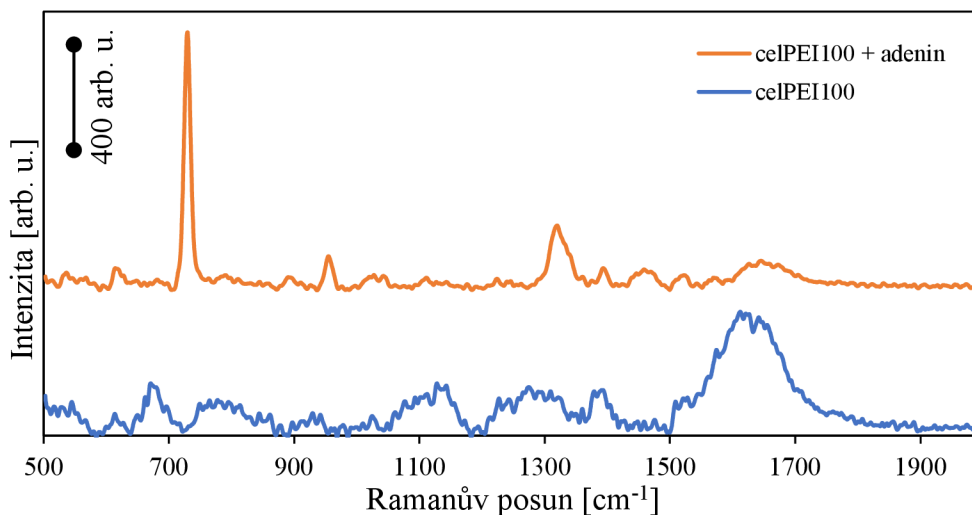
Obr. 73: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI50 a čistého substrátu celPEI50, $\lambda = 780 \text{ nm}$



Obr. 74: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI60 a čistého substrátu celPEI60, $\lambda = 780 \text{ nm}$



Obr. 75: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI80 a čistého substrátu celPEI80, $\lambda = 780 \text{ nm}$

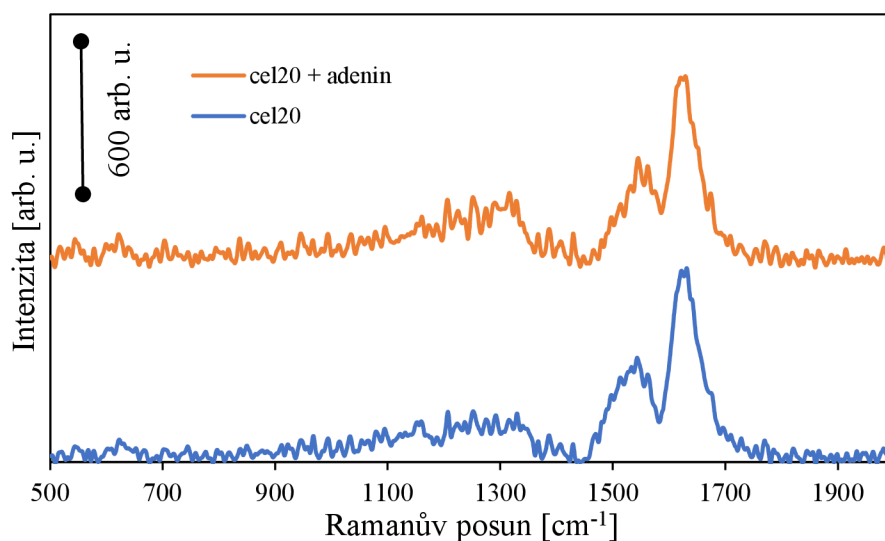


Obr. 76: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu celPEI100 a čistého substrátu celPEI100, $\lambda = 780 \text{ nm}$

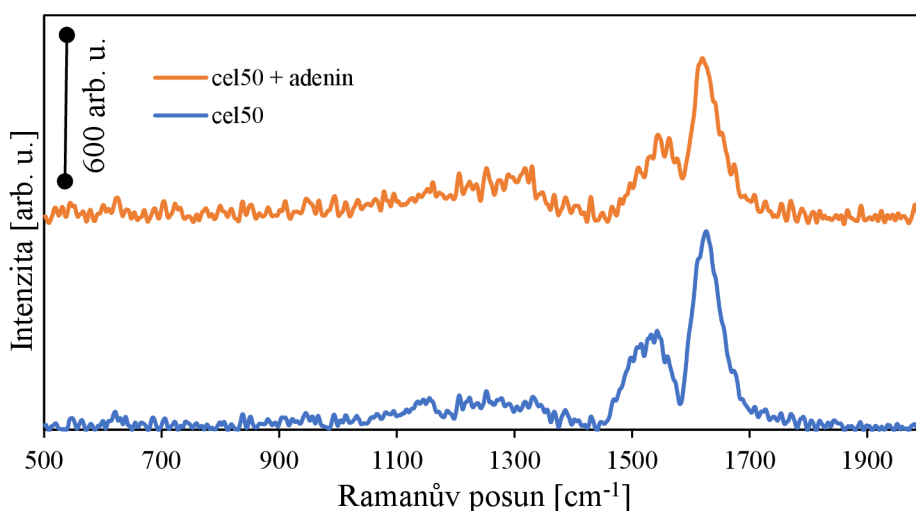
Pro vzorky připravené na impregnované celuloze pomocí polyethyleneiminu bylo docíleno největšího zesílení Ramanova signálu pro molekulu adeninu v kombinaci s lasery o vlnových délkách 780 nm a 633 nm. Naopak nejnižší SERS aktivitu substráty vykazovaly v kombinaci s laserem o vlnové délce 455 nm s výjimkou substrátu celPEI60, který dosahoval poměrně vysokého zesílení. V těchto spektrech se také navíc vyskytuje fluorescence celulosy o dosti vysoké intenzitě, která částečně zakrývá viditelnost charakteristického píku adeninu v oblasti $\sim 735 \text{ cm}^{-1}$ (viz Obr. 60). Fluorescence impregnované celulosy se také vyskytuje ve spektrech, která byla získána při měření s excitačním laserem o vlnové délce 532 nm (viz Obr. 62), kde je ale naopak intenzita Ramanova signálu adeninu dostatečně vysoká. Ve spektrech naměřených s lasery o vlnových délkách 633 nm a 780 nm se fluorescence v takovém rozsahu jako v případě laserů o vlnových délkách 455 nm a popř. 532 nm nevyskytuje. Jediný substrát, který nevykazoval žádnou SERS aktivitu byl substrát celPEI100 v kombinaci s laserem o vlnové délce 455 nm, kde se nepodařilo detekovat žádný signál odpovídající molekule adeninu a opět je ve spektru přítomna silná fluorescence celulosy (viz Obr. 61). Ve všech ostatních případech byly substráty SERS aktivní a molekula adeninu byla detekována s poměrně vysokou intenzitou. Nejlepšími z této řady substrátů s využitím impregnované celulosy se poté konkrétně jeví substráty celPEI80 a celPEI100. K nejvyššímu zesílení došlo při kombinaci substrátu celPEI80 s laserem o vlnové délce 780 nm a 633 nm. Nejvyšší zesílení Ramanova signálu pro laser o vlnové délce 532 nm bylo poté dosaženo se substrátem celPEI100, který obecně vykazoval poměrně konzistentní výsledky v rámci jednotlivých měření kromě zmíněného selhání tohoto substrátu při měření s laserem

o vlnové délce 455 nm. Díky různé adsorpci molekul adeninu na povrch substrátů, které vykazovaly zesílení Ramanova signálu, byl často jeho charakteristický pík posunutý v rozmezí 726 cm^{-1} až 734 cm^{-1} Ramanova posunu. Tato adsorpce také může částečně ovlivňovat míru zesílení intenzity Ramanova signálu měřeného analytu. Vypočítané faktory zesílení a průměrné intenzity jsou uvedeny níže v kapitole 4.8.3.

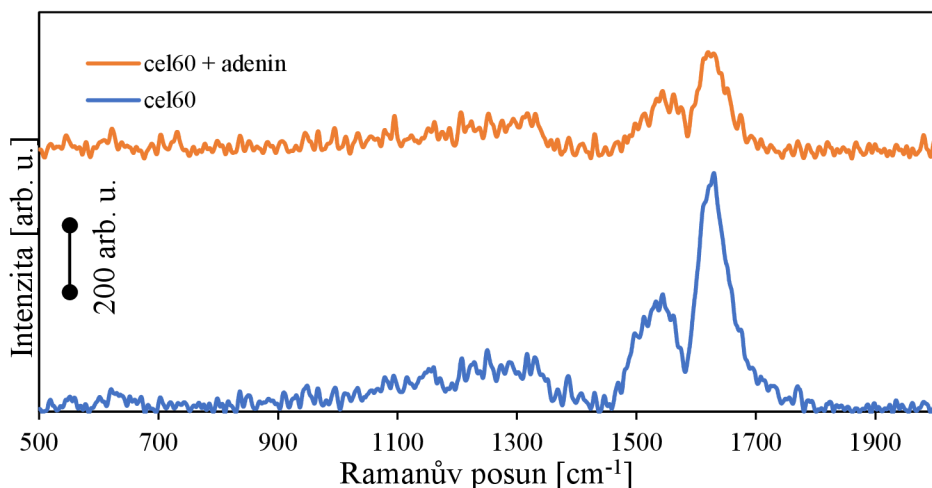
Na následujících grafech jsou zobrazeny SERS spektra adeninu měřeného na vzorcích s čistou celulosou jako nosným substrátem pro vrstvy stříbra (viz Obr. 77 – 96).



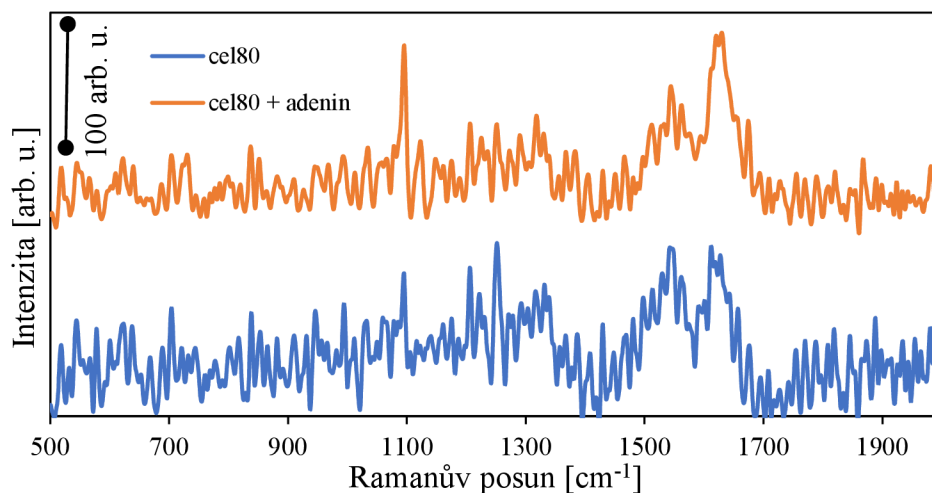
Obr. 77: SERS spektrum $10^{-5}\text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel20 a čistého substrátu cel20, $\lambda = 455\text{ nm}$



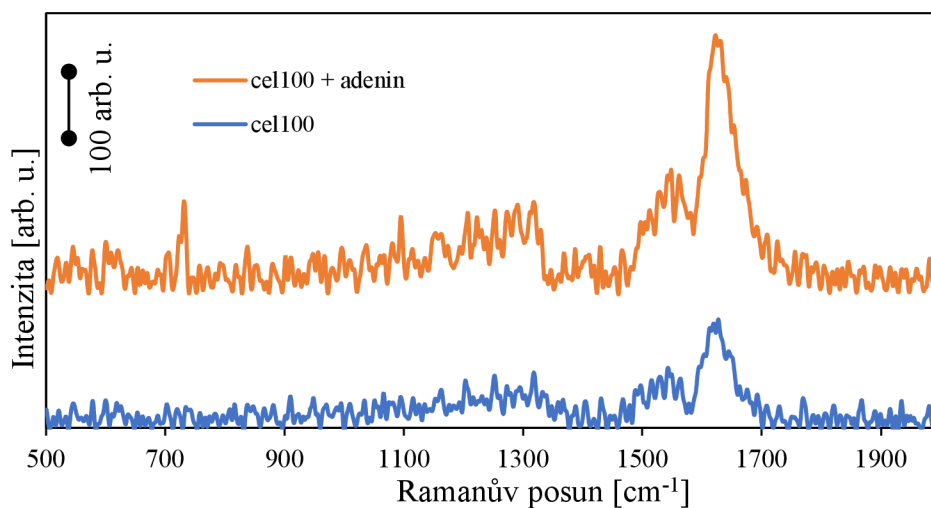
Obr. 78: SERS spektrum $10^{-5}\text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel50 a čistého substrátu cel50, $\lambda = 455\text{ nm}$



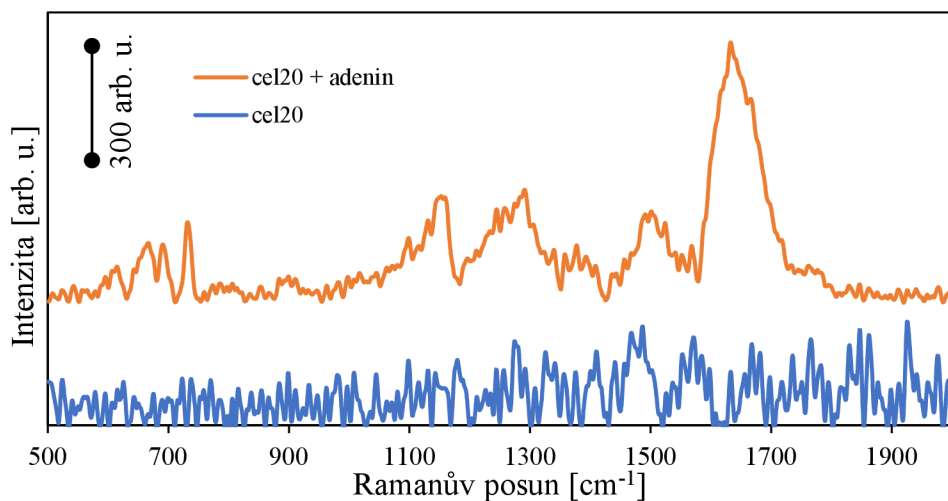
Obr. 79: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel60 a čistého substrátu cel60, $\lambda = 455 \text{ nm}$



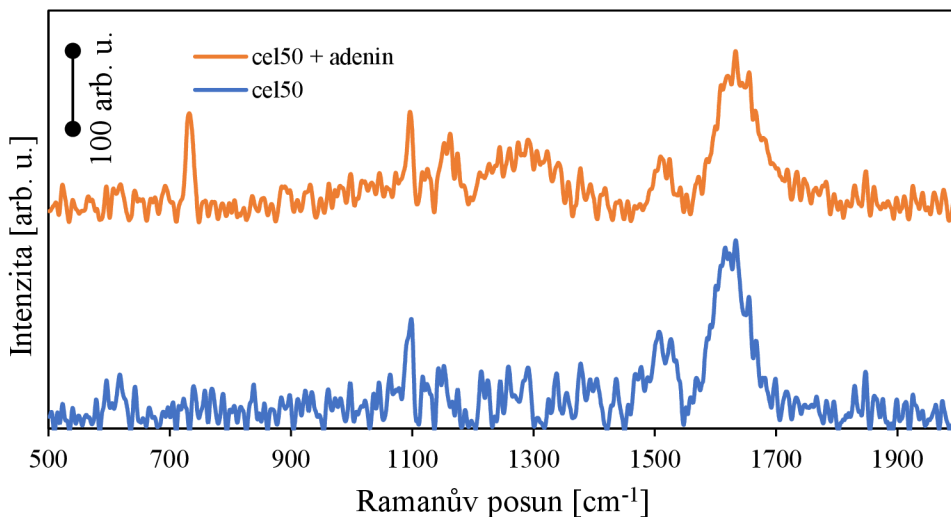
Obr. 80: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel80 a čistého substrátu cel80, $\lambda = 455 \text{ nm}$



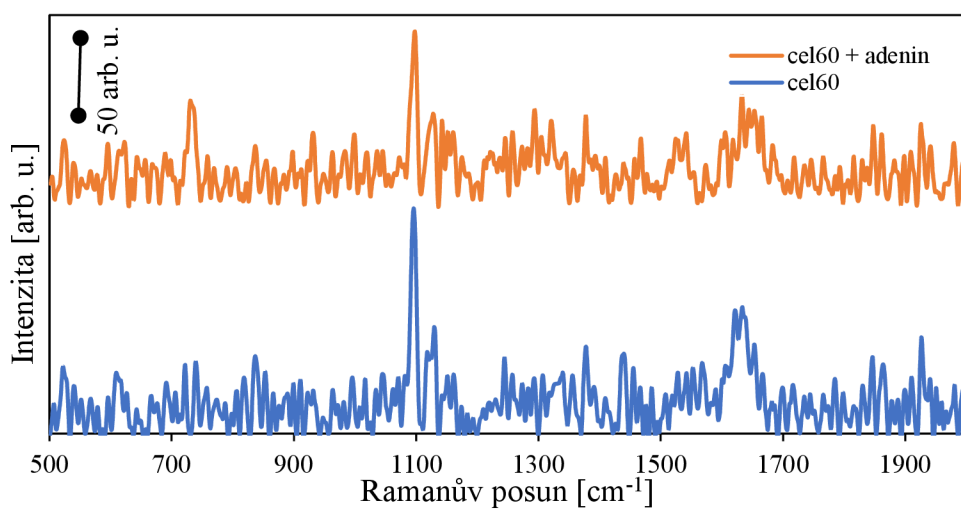
Obr. 81: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel100 a čistého substrátu cel100, $\lambda = 455 \text{ nm}$



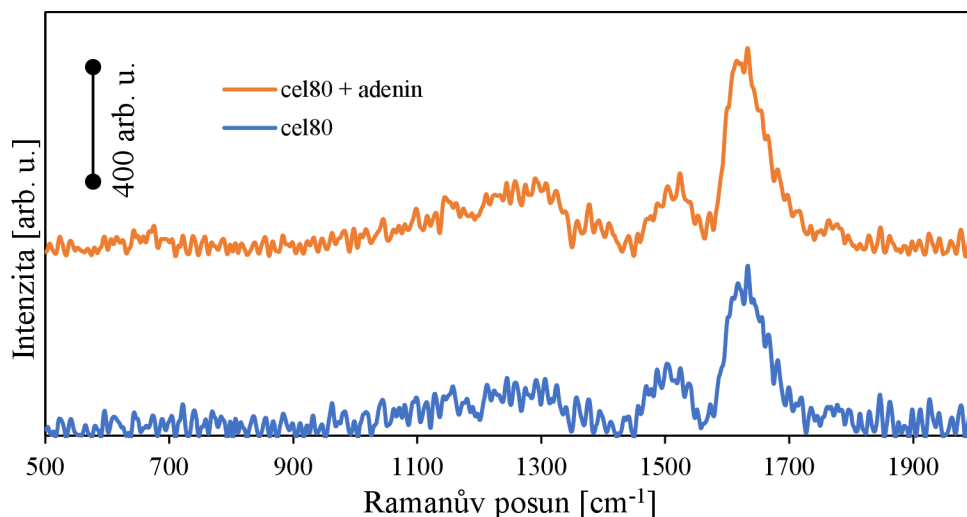
Obr. 82: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel20 a čistého substrátu cel20, $\lambda = 532 \text{ nm}$



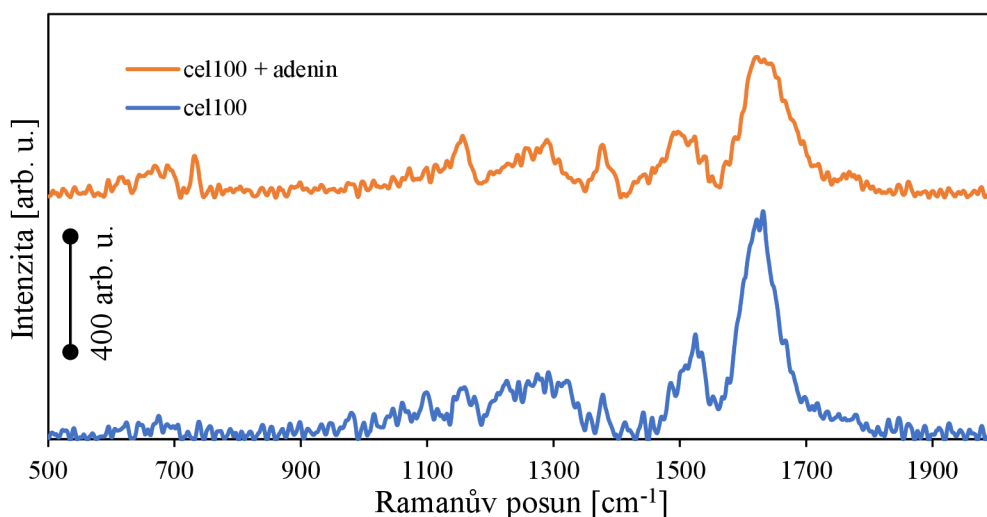
Obr. 83: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel50 a čistého substrátu cel50, $\lambda = 532 \text{ nm}$



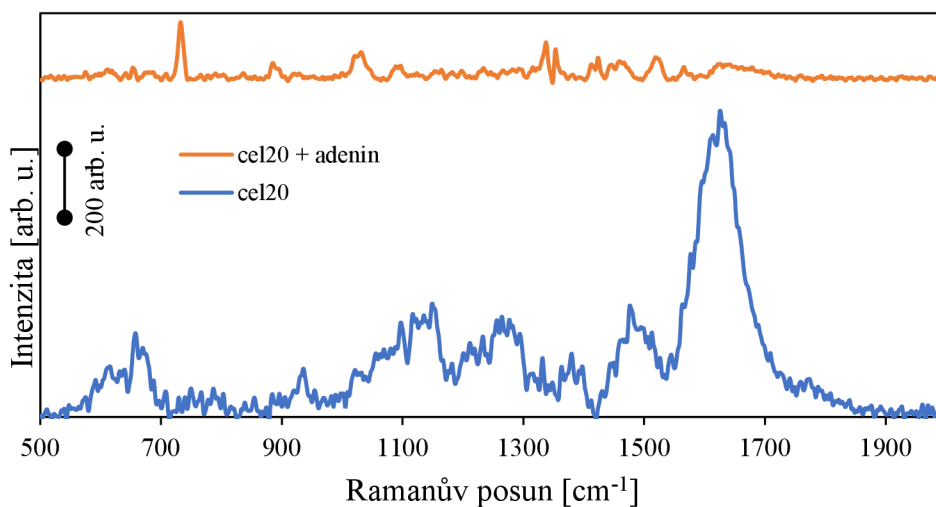
Obr. 84: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel60 a čistého substrátu cel60, $\lambda = 532 \text{ nm}$



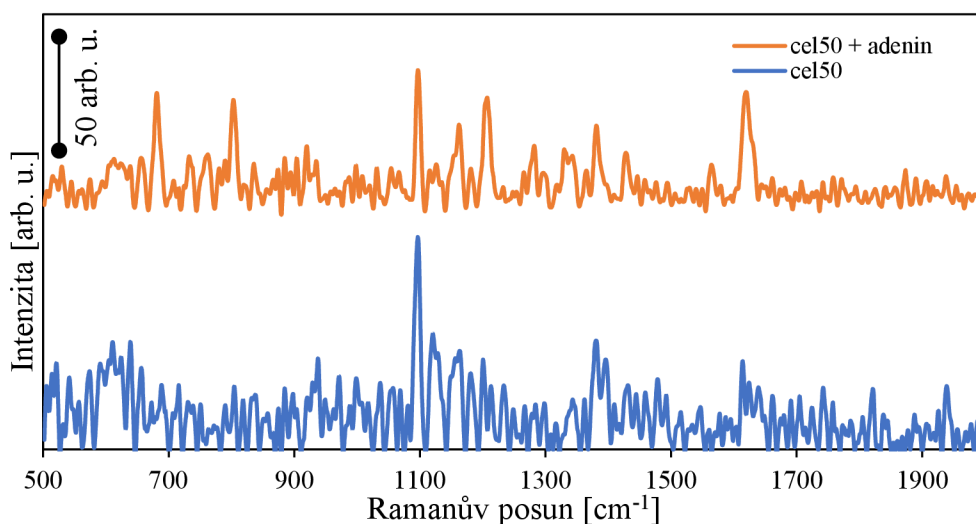
Obr. 85: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel80 a čistého substrátu cel80, $\lambda = 532 \text{ nm}$



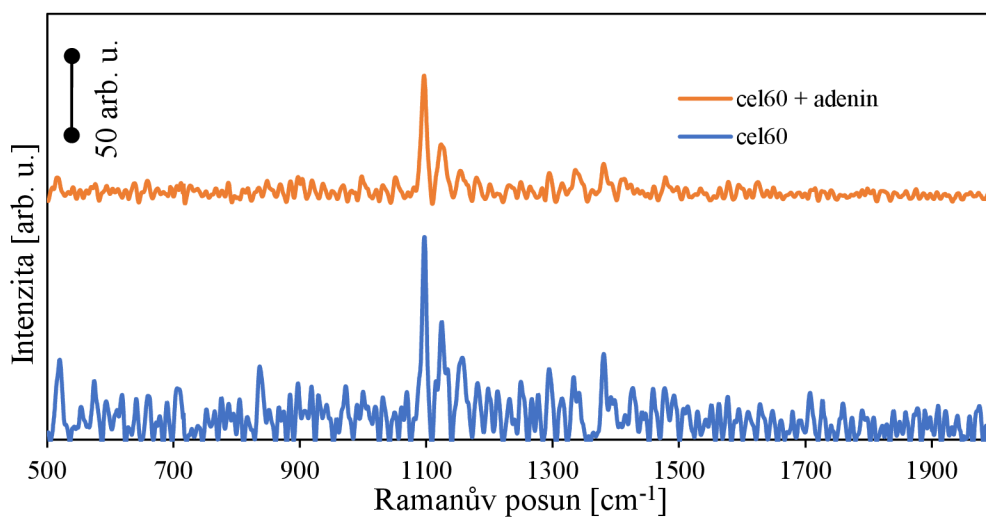
Obr. 86: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel100 a čistého substrátu cel100, $\lambda = 532 \text{ nm}$



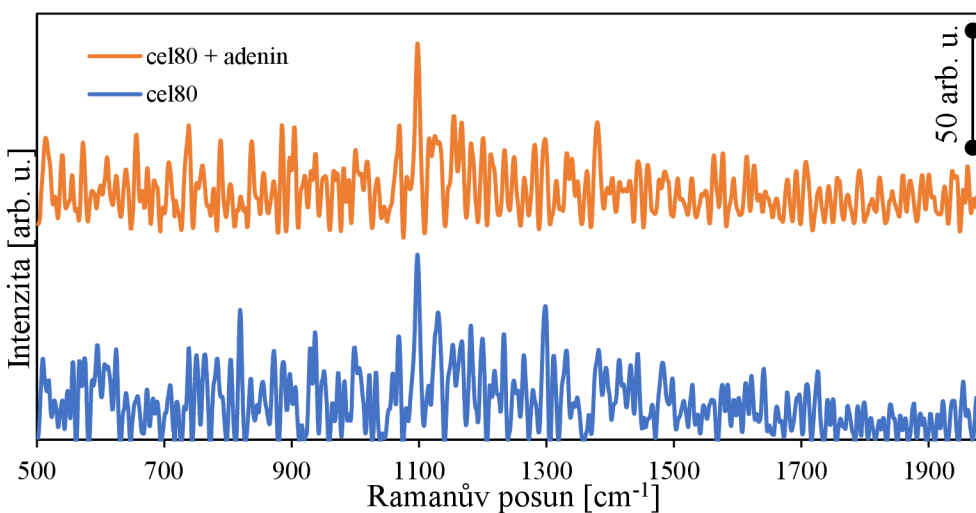
Obr. 87: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel20 a čistého substrátu cel20, $\lambda = 633 \text{ nm}$



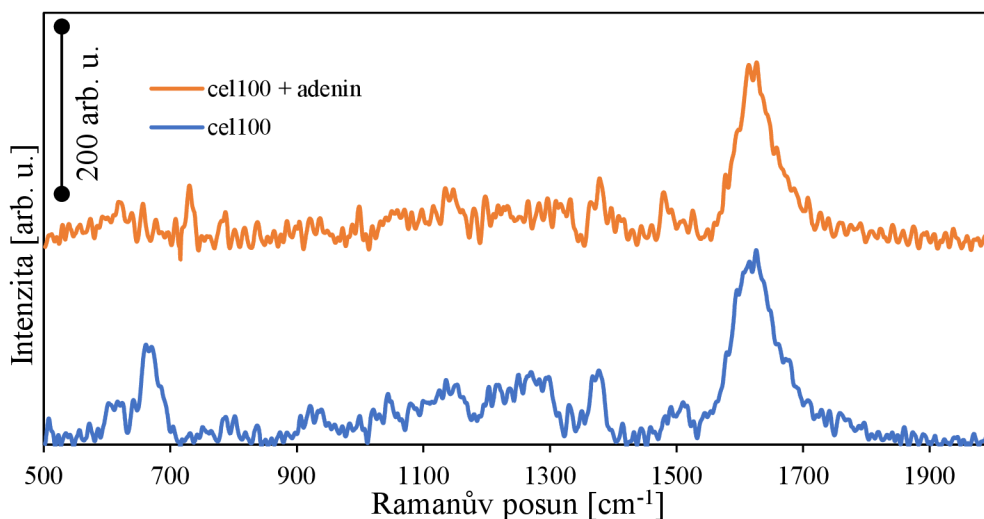
Obr. 88: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel50 a čistého substrátu cel50, $\lambda = 633 \text{ nm}$



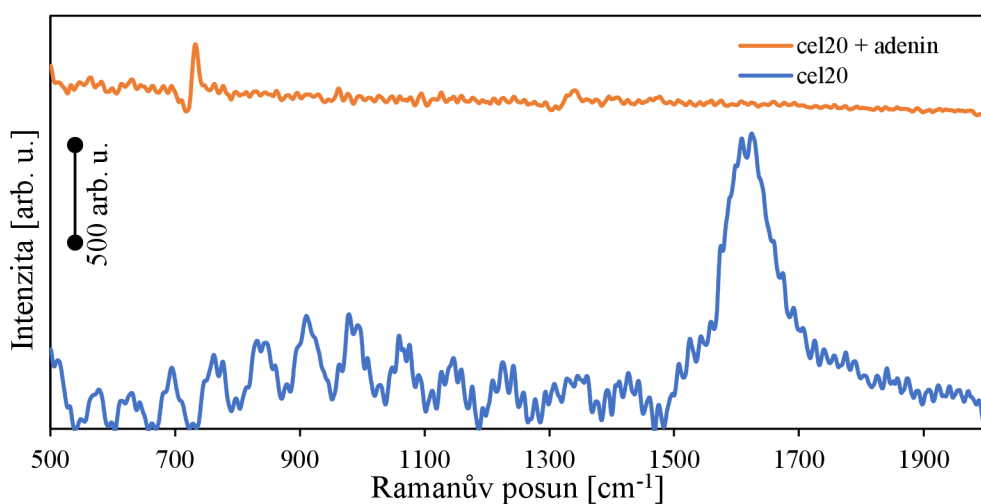
Obr. 89: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel60 a čistého substrátu cel60, $\lambda = 633 \text{ nm}$



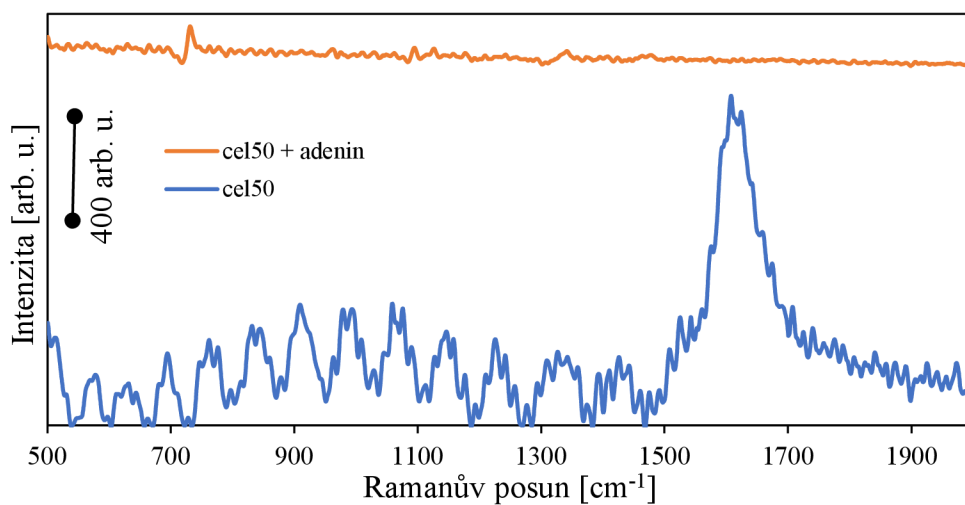
Obr. 90: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel80 a čistého substrátu cel80, $\lambda = 633 \text{ nm}$



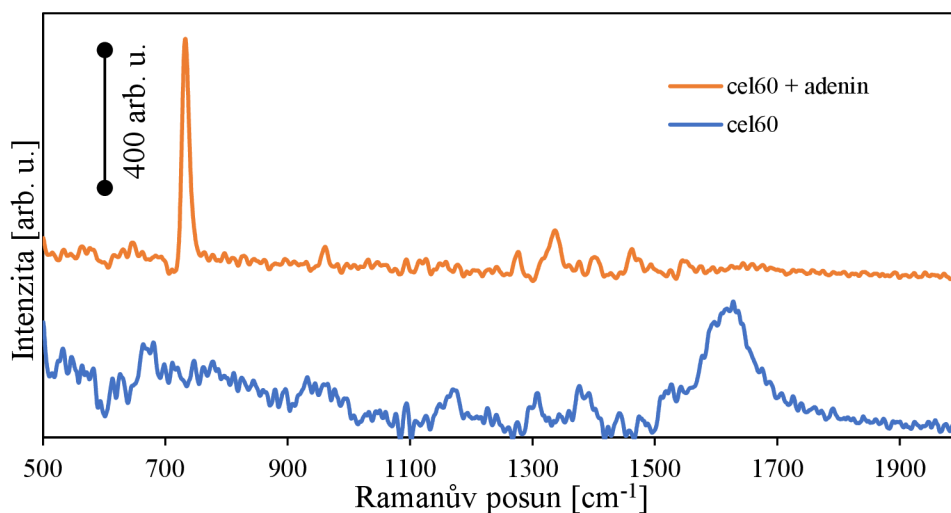
Obr. 91: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel100 a čistého substrátu cel100, $\lambda = 633 \text{ nm}$



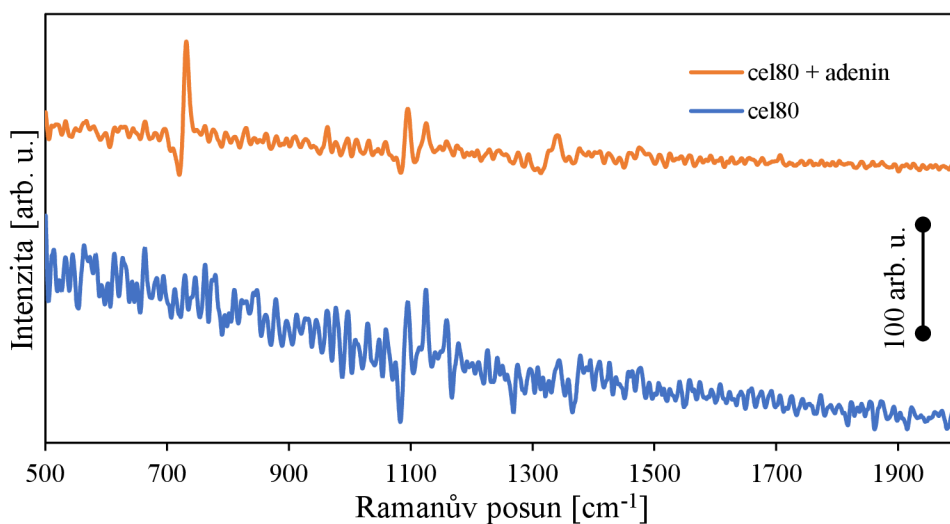
Obr. 92: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel20 a čistého substrátu cel20, $\lambda = 780 \text{ nm}$



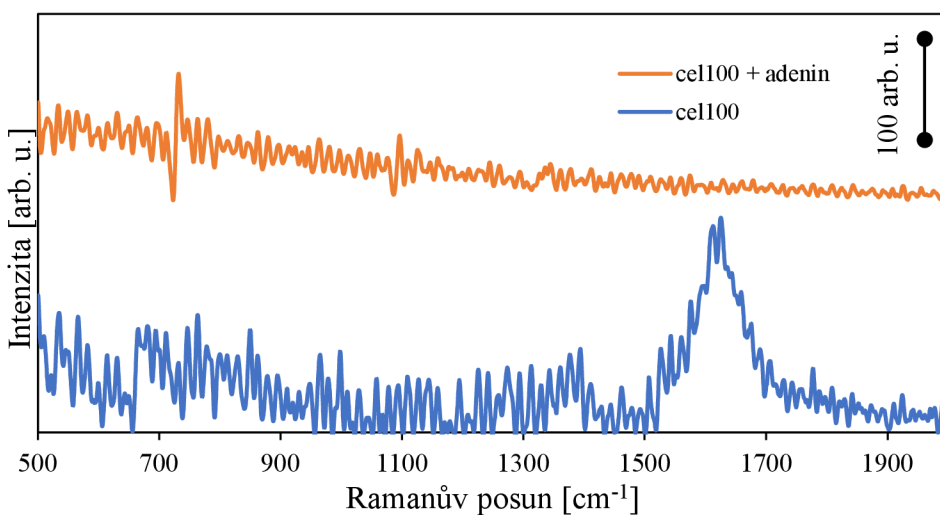
Obr. 93: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel50 a čistého substrátu cel50, $\lambda = 780 \text{ nm}$



Obr. 94: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel60 a čistého substrátu cel60, $\lambda = 780 \text{ nm}$



Obr. 95: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel80 a čistého substrátu cel80, $\lambda = 780 \text{ nm}$



Obr. 96: SERS spektrum $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ adeninu na substrátu cel100 a čistého substrátu cel100, $\lambda = 780 \text{ nm}$

Pro vzorky připravené na čisté celulóse nejlépe dopadly měření s excitačním laserem o vlnové délce 780 nm, kde všechny substráty dosahovaly poměrně vysokého zesílení Ramanova signálu a částečně také v kombinaci s laserem o vlnové délce 532 nm, kde zesilovaly všechny substráty s výjimkou substrátu cel80, u kterého se ve spektrech vyskytovala pouze fluorescence celulósy (viz Obr. 85). Výsledné intenzity charakteristického píku adeninu jsou však výrazně nižší než pro substráty celPEI-Ag. Obecně se tedy substráty připravené na čisté celulóse jeví jako méně vhodné v porovnání se substráty obsahující celulósu impregnovanou pomocí polyethyleniminu, což může být pravděpodobně způsobeno tvorbou shluků a agregátů většího množství částic na impregnované celulóse. U vrstev připravených na čisté celulóse lze i z vizuálního hlediska pozorovat, že ke tvorbě shluků částic během přípravy nedochází, což bylo rovněž potvrzeno na základě výsledků ze skenovacího elektronového mikroskopu. Oproti substrátům celPEI-Ag docházelo výrazně častěji k úplné neaktivitě cel-Ag substrátů při měření. Kromě substrátu cel80 v kombinaci s laserem o vlnové délce 532 nm se jedná také o substráty cel20 a cel50 při měření s excitačním laserem o vlnové délce 455 nm, kde je viditelná opět pouze fluorescence celulósy a také substráty cel60 a cel80 v kombinaci s laserem o vlnové délce 633 nm. Jak bylo výše zmíněno, některá spektra byla také průměrována pouze ze dvou měření, a to z důvodu silné fluorescence, která by svoji vysokou intenzitou přebila Ramanův signál adeninu. Jedná se o substráty cel50 s laserem o vlnové délce 633 nm, cel20 a cel50 s laserem o vlnové délce 532 nm a substrát cel100 s laserem o vlnové délce 633 nm, kde byla naměřena pouze dvě spektra. Ve třech případech byla fluorescence celulósy tak častá, že bylo spektrum adeninu zaznamenáno pouze z jednoho měření. Jedná se o měření na substrátech cel100 a cel60 s laserem o vlnové délce 532 nm a cel100 s laserem o vlnové délce 455 nm. Vlivem adsorpce adeninu na povrch substrátů opět docházelo k částečnému posunu charakteristického píku adeninu v rozsahu $729 \text{ cm}^{-1} - 732 \text{ cm}^{-1}$. V následující kapitole jsou uvedeny průměrné intenzity a faktory zesílení jednotlivých substrátů cel-Ag a celPEI-Ag.

4.8.3 Faktory zesílení připravených substrátů

K získání informací o efektivitě jednotlivých substrátů v rámci povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie je důležité stanovení zesilovacího faktoru těchto substrátů. Pro výpočet faktoru zesílení byl využit analytický pohled. Výpočet byl tedy proveden pomocí rovnice (1) uvedené v kapitole 2.2.1. Za hodnotu I_{SERS} byla při výpočtu dosazena intenzita

charakteristického píku adeninu, která byla získána z jeho měření na substrátech cel-Ag a celPEI-Ag. Hodnota I_{RAMAN} poté představuje intenzitu Ramanova signálu pro měření adeninu na nosných substrátech cel a celPEI bez vrstev stříbra. Za tuto hodnotu intenzity bylo dosazeno číslo 1, jelikož v měření adeninu na substrátech bez přítomnosti stříbra nebyl viditelný žádný pík (viz Obr. 55). Nakonec byly do rovnice dosazeny koncentrace c_{SERS} a c_{RAMAN} , které odpovídají koncentracím $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ využívanou při měření adeninu na substrátech celPEI-Ag a cel-Ag a $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ při měření adeninu na nosných substrátech bez pokrytí stříbrem. Vypočítané faktory zesílení pro všechny substráty při měření adeninu byly uvedeny do tabulky (Tabulka 11).

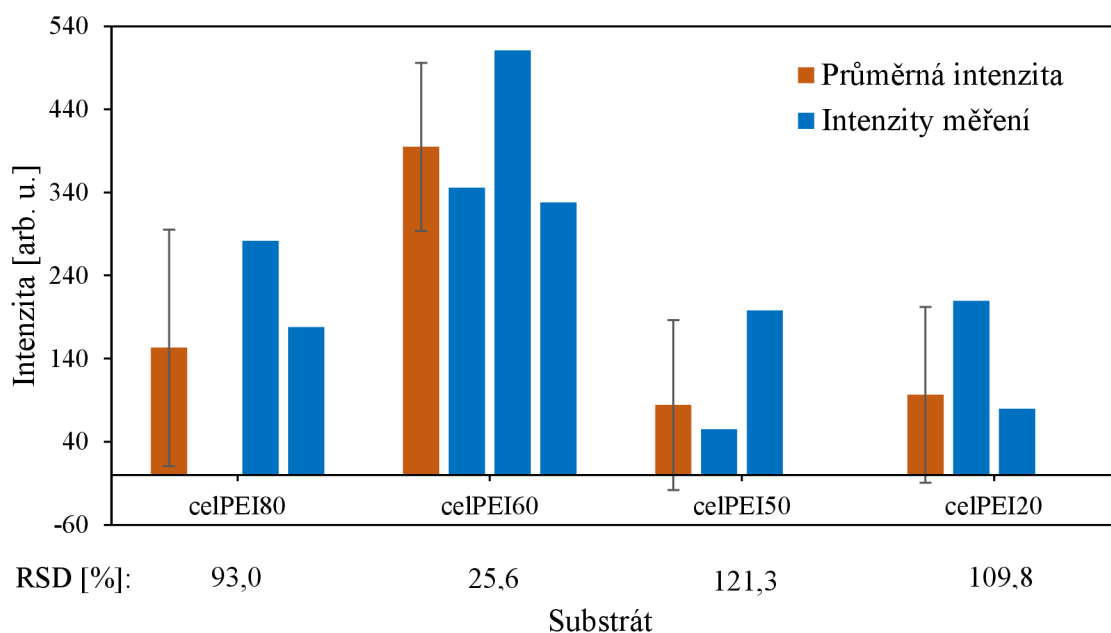
Tabulka 11: Faktory zesílení jednotlivých substrátů

Laser				
Substrát	455 nm	532 nm	633 nm	780 nm
celPEI100	-	$1,85 \cdot 10^7$	$1,81 \cdot 10^6$	$9,73 \cdot 10^6$
celPEI80	$1,53 \cdot 10^6$	$4,78 \cdot 10^6$	$3,65 \cdot 10^6$	$1,76 \cdot 10^7$
celPEI60	$3,94 \cdot 10^6$	$2,27 \cdot 10^6$	$2,37 \cdot 10^6$	$7,12 \cdot 10^6$
celPEI50	$8,42 \cdot 10^5$	$5,83 \cdot 10^6$	$2,44 \cdot 10^6$	$9,2 \cdot 10^6$
celPEI20	$9,63 \cdot 10^5$	$3,19 \cdot 10^6$	$3,77 \cdot 10^6$	$8,65 \cdot 10^6$
cel100	$4,27 \cdot 10^5$	$4,44 \cdot 10^5$	$5,50 \cdot 10^6$	$1,24 \cdot 10^6$
cel80	$4,37 \cdot 10^5$	-	-	$1,25 \cdot 10^6$
cel60	$7,10 \cdot 10^5$	$1,96 \cdot 10^5$	-	$6,36 \cdot 10^6$
cel50	-	$8,51 \cdot 10^5$	$1,53 \cdot 10^5$	$1,54 \cdot 10^6$
cel20	-	$1,41 \cdot 10^6$	$1,67 \cdot 10^6$	$3,62 \cdot 10^6$

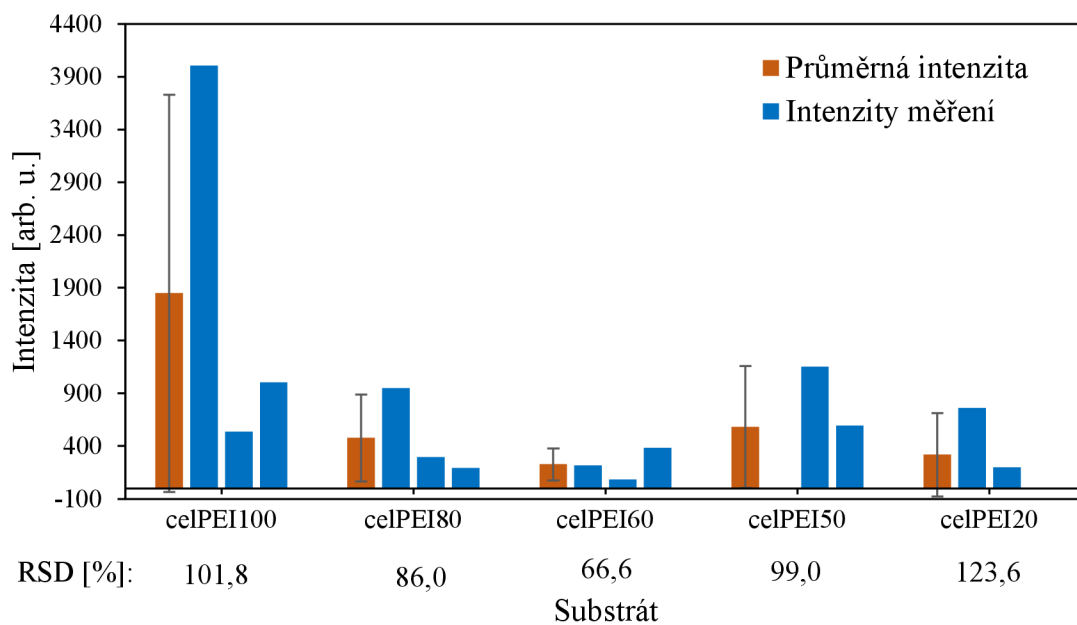
Nejllepších výsledků při zesílení Ramanova signálu adeninu bylo dosaženo použitím excitačního laseru o vlnové délce 780 nm, při kterém úspěšně zesilovaly všechny připravené substráty s faktorem zesílení řádově $10^6 - 10^7$. O podobných výsledcích se dá hovořit také u substrátů s impregnovanou celulosou v kombinaci s lasery o vlnových délkách 532 nm a 633 nm. Zhruba desetkrát méně potom tyto substráty zesilovaly Ramanův signál v kombinaci s laserem o vlnové délce 455 nm. Ze všech měření adeninu na substrátech s impregnovanou celulosou nebylo zesílení úspěšně však pouze jednou, a to u substrátu celPEI100 a laseru o vlnové délce 455 nm. Substráty s čistou celulosou zesilovaly s faktorem zesílení řádově v rozmezí $10^5 - 10^6$. Neúspěšnějším substrátem v této skupině byl substrát cel100, který zesiloval při použití laserů o všech vlnových délkách. Nejméně úspěšným byl poté substrát cel80, který až dvakrát Ramanův signál adeninu nezesiloval, a to pro lasery o vlnové délce 532 nm a 633 nm. Zbýlé tři cel-Ag substráty nebyly úspěšné vždy alespoň jednou. Substráty cel50

a cel20 v kombinaci s laserem o vlnové délce 455 nm a substrát cel60 v kombinaci s laserem o vlnové délce 633 nm. Celkově lepších výsledků tedy dosahovaly substráty připravené s impregnovanou celulosou oproti čisté celuloze, zejména z důvodu tvorby shluků a agregátů v případě substrátů celPEI-Ag a taktéž z důvodu častého výskytu silné fluorescence při měření na substrátech cel-Ag, která tak snížila efektivitu těchto vrstev. Při porovnání bylo podobných výsledků dosaženo v práci zabývající se přípravou celulosových substrátů z filtračního papíru. Nanočástice stříbra připravené Tollensovou metodou byly na tyto substráty nanесeny pomocí imerzní techniky. Substráty byly následně využity pro SERS měření léčiva acyklovir, kdy bylo dosaženo faktorů zesílení řádově 10^5 .⁵⁴ Obdobné SERS aktivní substráty na bázi filtračního papíru byly také využity například v dalších dvou pracích pro detekci léčiv flucytosin a amoxicillin, u kterých bylo dosaženo faktorů zesílení řádově 10^7 pro flucytosin a 10^4 pro amoxicillin.^{55,56}

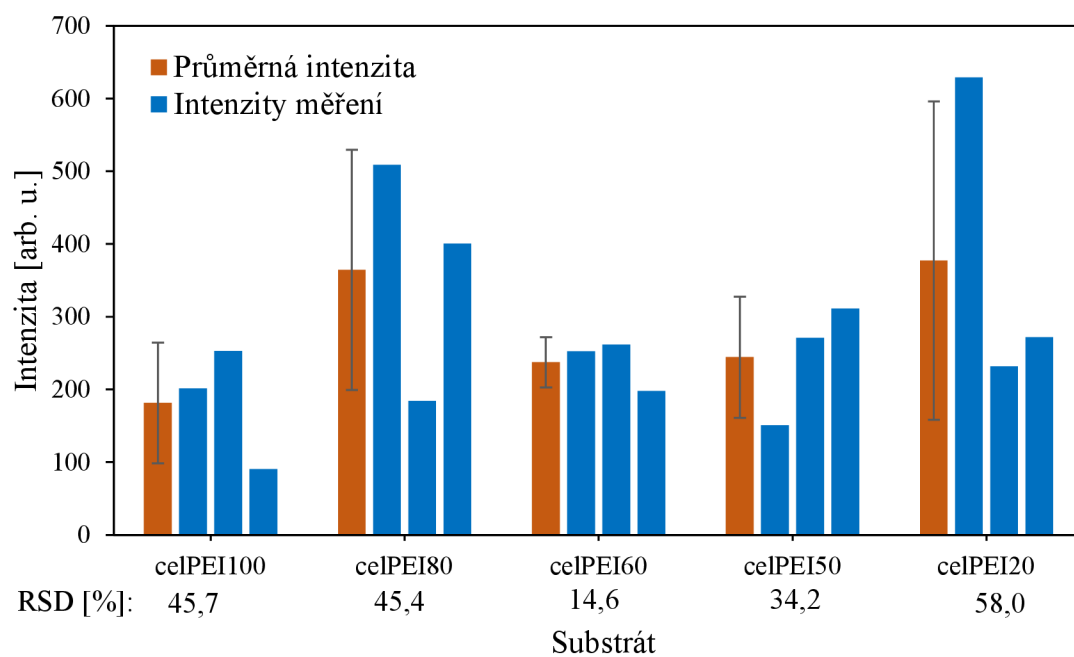
Na následujících grafech (viz Obr. 97 – 104) jsou uvedeny průměrné intenzity a relativní směrodatné odchylky jednotlivých měření všech substrátů celPEI-Ag a cel-Ag.



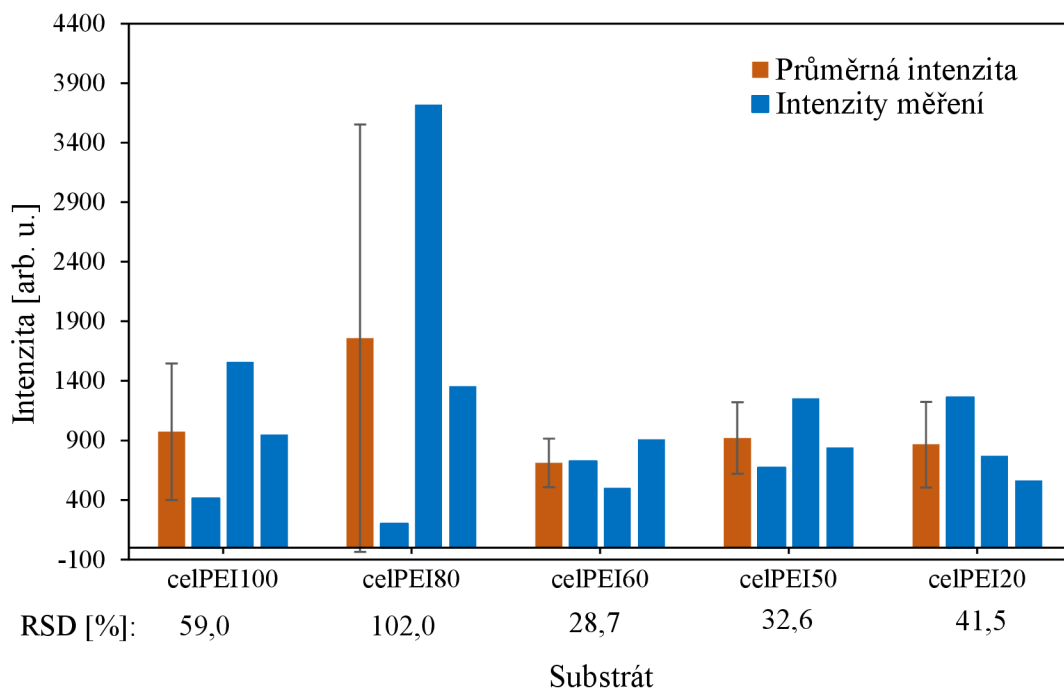
Obr. 97: Průměrné intenzity piků adeninu, RSD a směrodatné odchylky při měření na substrátech celPEI-Ag, $\lambda = 455 \text{ nm}$



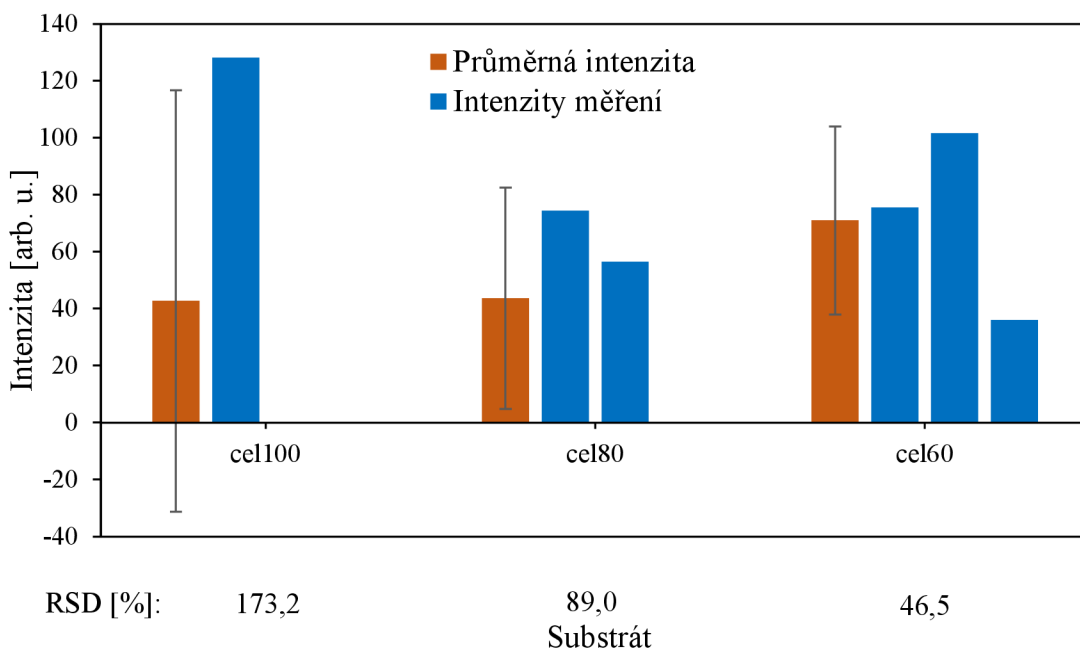
Obr. 98: Průměrné intenzity piků adeninu, RSD a směrodatné odchylky při měření na substrátech celPEI-Ag, $\lambda = 532 \text{ nm}$



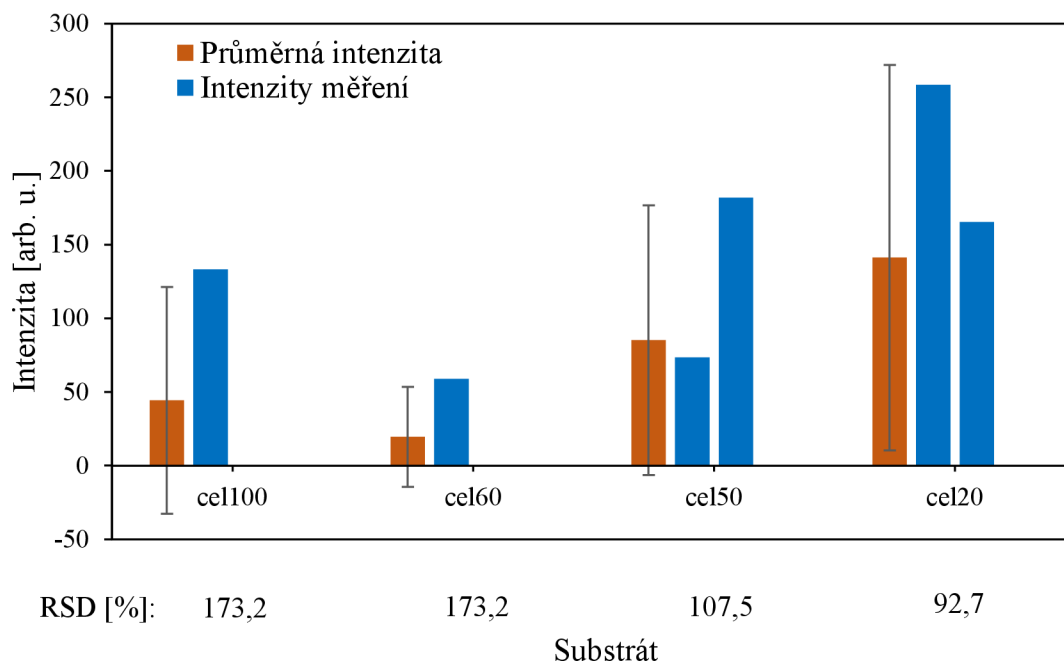
Obr. 99: Průměrné intenzity piků adeninu, RSD a směrodatné odchylky při měření na substrátech celPEI-Ag, $\lambda = 633 \text{ nm}$



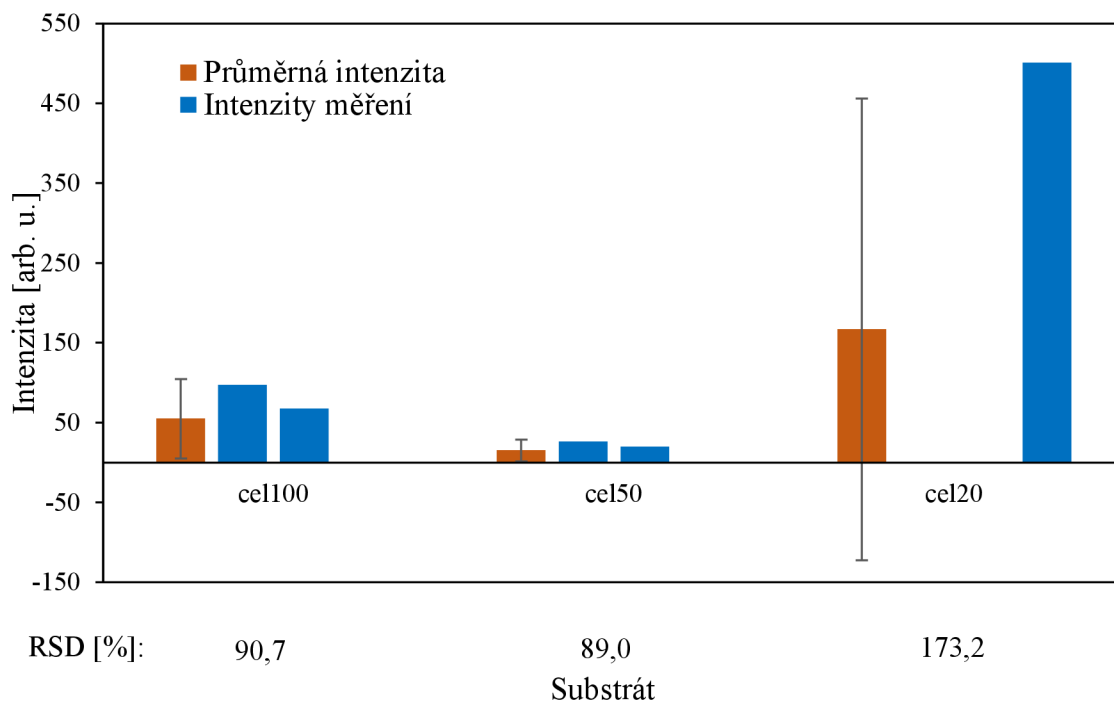
Obr. 100: Průměrné intenzity piků adeninu, RSD a směrodatné odchylky při měření na substrátech celPEI-Ag, $\lambda = 780 \text{ nm}$



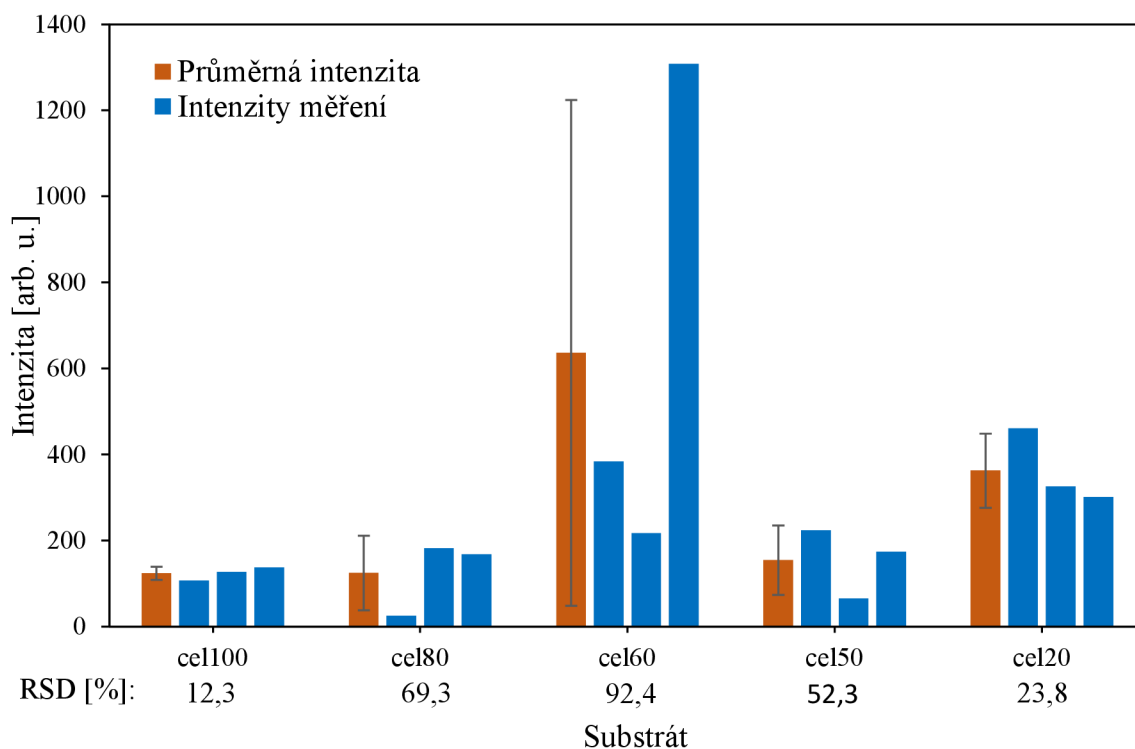
Obr. 101: Průměrné intenzity piků adeninu, RSD a směrodatné odchylky při měření na substrátech cel-Ag, $\lambda = 455 \text{ nm}$



Obr. 102: Průměrné intenzity piků adeninu, RSD a směrodatné odchytky při měření na substrátech cel-Ag, $\lambda = 532 \text{ nm}$



Obr. 103: Průměrné intenzity piků adeninu, RSD a směrodatné odchytky při měření na substrátech cel-Ag, $\lambda = 633 \text{ nm}$



Obr. 104: Průměrné intenzity piků adeninu a směrodatné odchylky při měření na substrátech cel-Ag, $\lambda = 780 \text{ nm}$

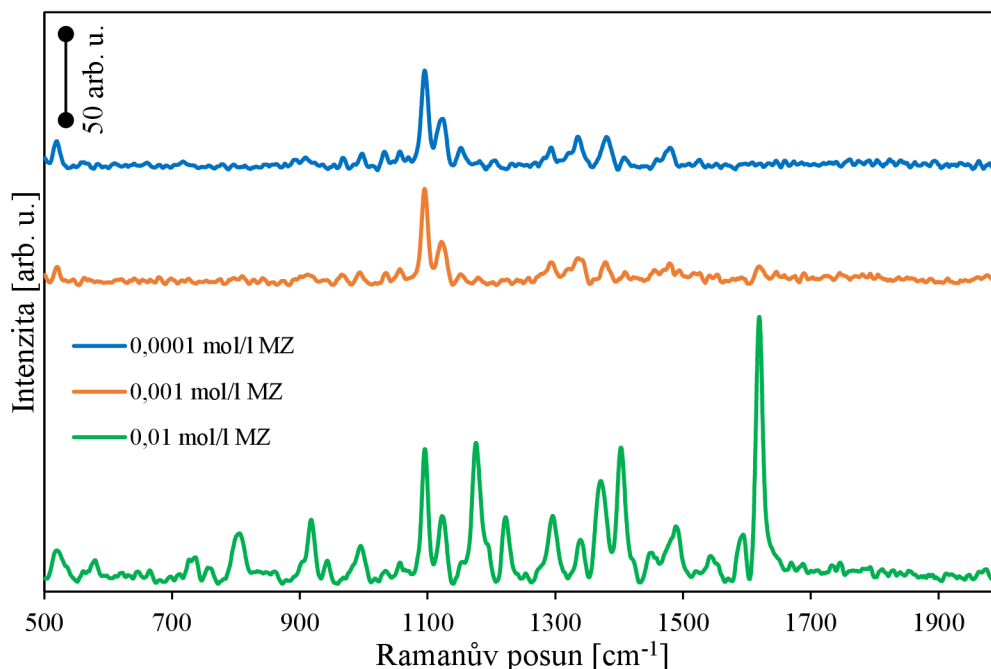
Do grafů byly uvedeny pouze substráty, které vykazovaly SERS aktivitu alespoň v rámci jednoho měření ze tří. V grafech se také vyskytují hodnoty naměřených intenzit, které odpovídají nule. Jedná se o chybějící sloupce v grafu odpovídající výskytu fluorescence při měření, která způsobila zakrytí charakteristického píku adeninu anebo daný substrát v daném měření nevykazoval SERS aktivitu.

4.8.4 SERS měření malachitové zeleně

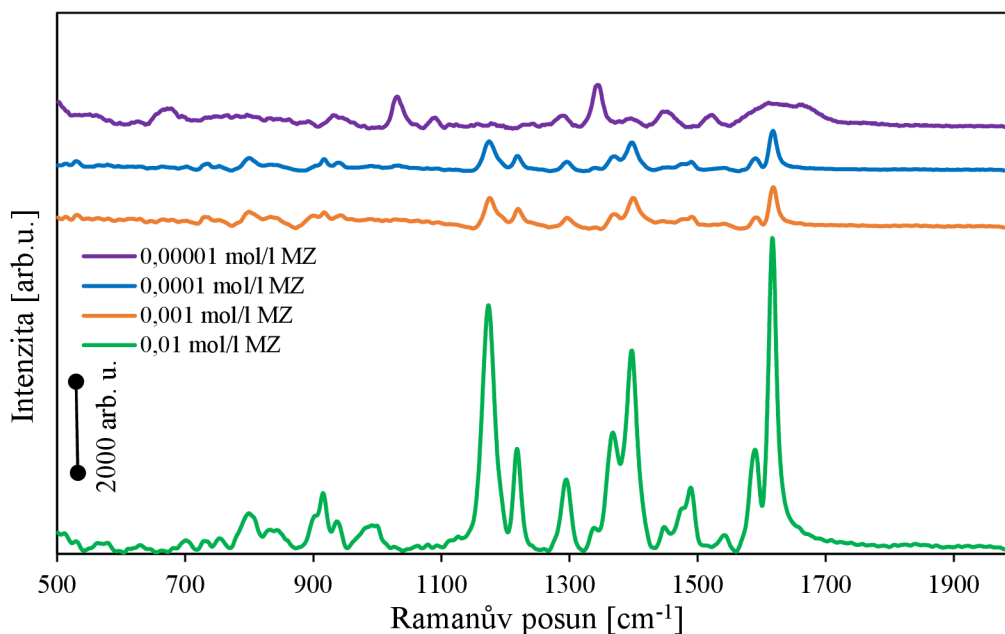
Malachitová zeleň je nejčastěji využívaná v barvířském průmyslu, ale na základě jejích vlastností se využívá také jako léčebný prostředek pro ryby. Jedná se o antimykotikum, které je považováno za nejúčinnější prostředek v boji proti plísňovým infekcím. Malachitová zeleň není přesně definovanou chemickou sloučeninou a většinou se vyskytuje ve formě chloridové nebo oxalátové soli jako zelená krystalická látka. Přestože existují také obavy o její karcinogenitě, je vzhledem k její snadné dostupnosti a vysoké účinnosti stále využívanou látkou.⁵⁷ Z tohoto důvodu byla zvolena malachitová zeleň jako analyt pro detekci na připravených SERS substrátech.

Na základě výše zmíněných výpočtů faktorů zesílení byl vybrán jeden substrát s nejlepšími výsledky při zesílení Ramanova signálu adeninu. Jedná se o substrát

celPEI100 v kombinaci s laserem o vlnové délce 780 nm, který vykazoval faktor zesílení řádově $>10^6$. Na následujících obrázcích (viz Obr. 105 a 106) je uvedeno porovnání SERS spekter pro měření různých koncentrací malachitové zeleně na nosném substrátu celPEI bez pokrytí stříbrem a substrátu celPEI100.



Obr. 105: SERS spektra malachitové zeleně o koncentracích 10^{-2} , 10^{-3} a 10^{-4} mol l^{-1} na nosném substrátu celPEI bez stříbra

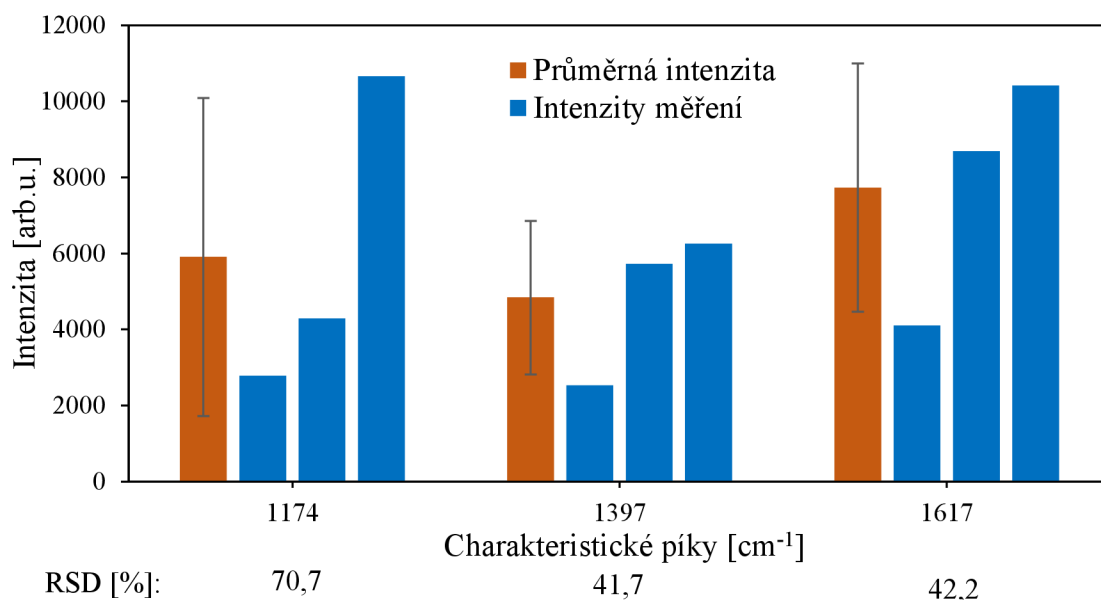


Obr. 106: SERS spektra malachitové zeleně o koncentracích 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} a 10^{-5} mol l^{-1} substrátu celPEI100

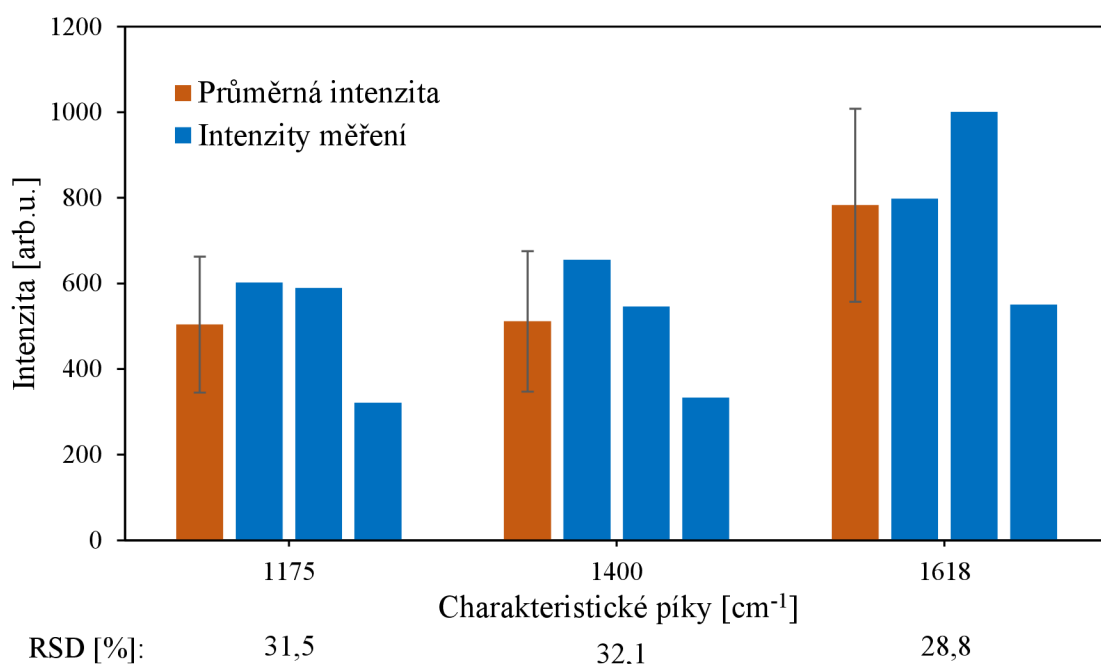
Na grafu (viz Obr. 105) lze vidět, že malachitová zeleň je při koncentraci 0,01 mol l^{-1} bez problému detekovatelná pomocí Ramanovy spektroskopie. Při zředění

základního roztoku na nižší koncentrace $0,001 \text{ mol l}^{-1}$ a $0,0001 \text{ mol l}^{-1}$ se již ztrácí některé její charakteristické píky, a to pík v oblasti 1377 cm^{-1} odpovídající vibraci C-H vazeb a 1612 cm^{-1} , který odpovídá vazbě N-C a natahování vazby C-C. Výrazný pík v oblasti 1172 cm^{-1} odpovídá ohybu aromatických C-H vazeb.⁵⁰ Při použití aktivního SERS substrátu celPEI100 bylo možné tyto píky detekovat až do koncentrace $10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, která se zdá být pro tento substrát hraniční. Přestože byla malachitová zeleň detekována na nosném substrátu bez pokrytí stříbrem, intenzita jednotlivých charakteristických píků této sloučeniny je zhruba čtyřicetkrát nižší než při použití substrátu celPEI100. Výpočet faktorů zesílení probíhal obdobně jako u modelového adeninu. Za hodnotu I_{RAMAN} byla dosazena intenzita charakteristických píků na nosném substrátu celPEI. V případě, že nebyl pík viditelný, bylo za tuto hodnotu dosazeno číslo jedna.

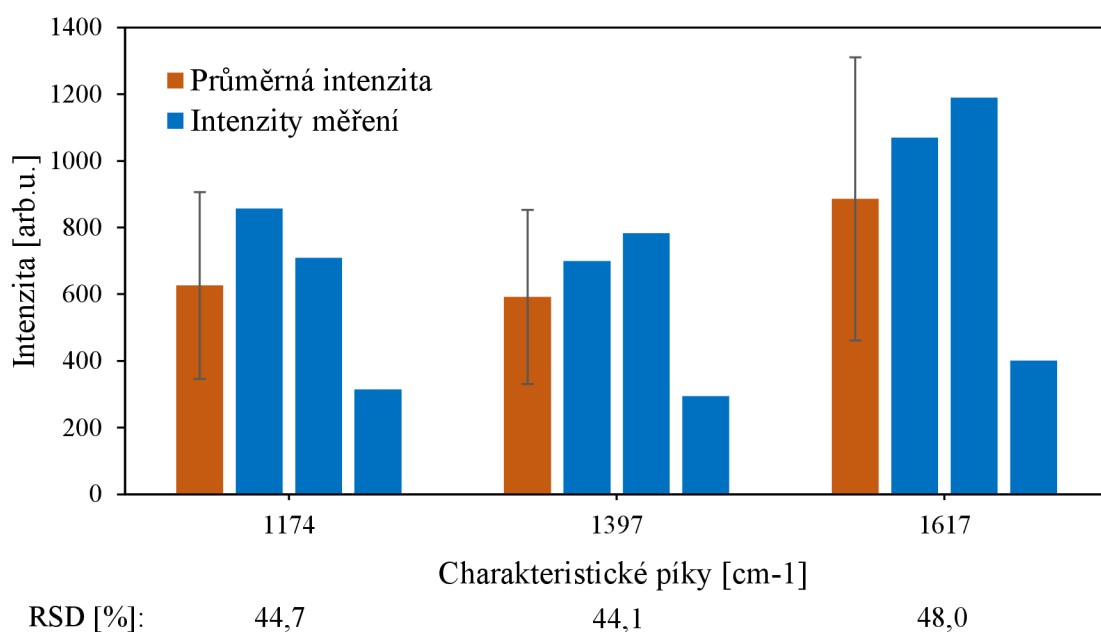
Substrát celPEI100 dosahoval faktorů zesílení pouze řádově $10^1 - 10^2$, což je v porovnání s měřením adeninu výrazně nižší zesílení. Tento fakt je pravděpodobně způsoben menší schopností adsorpce molekuly malachitové zeleně na povrch substrátu. Pro měření malachitové zeleně byly rovněž sestrojeny grafy s průměrnými intenzitami z jednotlivých měření a směrodatné odchylky (viz Obr. 107 – 109).



Obr. 107: Průměrné intenzity píků malachitové zeleně o koncentraci $0,01 \text{ mol l}^{-1}$, RSD a směrodatné odchylky při měření na substrátu celPEI100, $\lambda = 780 \text{ nm}$



Obr. 108: Průměrné intenzity píků malachitové zeleně o koncentraci $0,001 \text{ mol l}^{-1}$, RSD a směrodatné odchylky při měření na substrátu celPEI100, $\lambda = 780 \text{ nm}$



Obr. 109: Průměrné intenzity píků malachitové zeleně o koncentraci $0,0001 \text{ mol l}^{-1}$, RSD a směrodatné odchylky při měření na substrátu celPEI100, $\lambda = 780 \text{ nm}$

Při měření všech koncentrací malachitové zeleně bylo získáno značně více konzistentních hodnot intenzit jednotlivých charakteristických píků než při měření modelového adeninu. Zároveň bylo dosaženo poměrně vysokých intenzit Ramanova signálu, což je pravděpodobně způsobeno měřením vyšších koncentrací než v případě adeninu.

5 Závěr

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium přípravy vrstev nanočástic stříbra na nosných celulosových substrátech a jejich charakterizaci. Tyto substráty byly následně využívány pro účely v oblasti povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. Příprava vrstev probíhala ponořením nosného substrátu do předem zvoleného objemu disperze nanočástic stříbra a po definovanou dobu byla promíchávána. Jednalo se o dva odlišné typy podkladových substrátů, a to o čistý chromatografický papír využívaný pro papírovou chromatografii (CEL) a chromatografický papír impregnovaný větveným polyethyleneiminem (CEL-PEI). Příprava nanočástic stříbra probíhala pomocí metody chemické redukce. Jako výchozí látka byl použit dusičnan stříbrný, jehož ionty Ag^+ byly redukovány pomocí silného redukčního činidla tetrahydridoboritanu sodného. Takto vyredukované částice stříbra byly stabilizovány přidavkem dihydrátu citronanu sodného. K modifikaci vznikajících nanočástic byl využit přídavek peroxidu vodíku (15%), který se pohyboval v rozmezí 0 – 120 μl , za účelem přípravy anizotropních tvarů částic stříbra. Tímto způsobem připravené nanočástice stříbra byly charakterizovány pomocí UV-VIS a transmisního elektronové mikroskopu. Podle tohoto měření byla zjištěna velikost nanočástic a jejich velikostní distribuce. Na základě vlastností připravených disperzí bylo vybráno několik, které byly následně dále využity. Celkově bylo připraveno deset různých substrátů, na kterých byla testována SERS aktivita při měření modelového analytu – adeninu o koncentraci $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měření SERS probíhalo na čtyřech laserech o vlnových délkách 455 nm, 532 nm, 633 nm a 780 nm. Všechny připravené substráty byly také charakterizovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. SERS aktivita substrátů byla následně vyhodnocena pomocí výpočtu faktorů zesílení Ramanova signálu. Pro výpočet byly využity intenzity SERS signálu adeninu o koncentraci $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a intenzity Ramanova signálu adeninu o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Intenzity Ramanova signálu adeninu byly získány měřením na nosných substrátech bez přítomnosti stříbra. Substráty dosahovaly nejlepších výsledků při použití laseru o vlnové délce 780 nm, kde všechny substráty zesilovaly Ramanův signál řádově v rozmezí $10^6 - 10^7$. Při porovnání vypočtených faktorů zesílení, lepší zesílení Ramanova signálu vykazovaly substráty připravené na impregnované celulóse. Podobné substráty na bázi filtračního papíru pokrytého vrstvami stříbra byly také testovány pro detekci léčiv jako je acyklovir, flucytosin a amoxicillin, které dosahovaly faktorů zesílení Ramanova signálu řádově

$10^4 - 10^7$.^{54,55,56} Na základě nejvíce konzistentních výsledků při měření byl vybrán substrát celPEI100 v kombinaci s laserem o vlnové délce 780 nm pro měření malachitové zeleně o různých koncentracích. Nejmenší koncentrace, při které se malachitová zeleň podařila na zvoleném substrátu detekovat, byla $10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$.

6 Summary

This bachelor thesis is focused on the study of the preparation of silver nanoparticle layers on cellulose-based substrates and their characterization. These substrates were subsequently used for purposes in surface-enhanced Raman spectroscopy. The preparation of the layers was carried out by immersing the base substrate in a chosen volume of silver nanoparticle dispersion and stirred for a defined period of time. Two different types of base substrates were used – pure chromatographic paper, which is used for paper chromatography (CEL) and chromatographic paper impregnated with branched polyethyleneimine (CEL-PEI). The preparation of silver nanoparticles was carried out using a chemical reduction method. Silver nitrate was used as a starting substance and its Ag^+ ions were reduced using a strong reducing agent, sodium borohydride. So reduced silver particles were stabilized by the addition of sodium citrate dihydrate. To modify the resulting nanoparticles, the addition of hydrogen peroxide (15%), which ranged from 0 to 120 μl , was used to prepare anisotropic shapes of silver particles. The prepared silver nanoparticles in this way were characterized by UV-VIS and transmission electron microscopy. Based on this measurement, the size of the nanoparticles and their size distribution were determined. Based on the properties of the prepared dispersions, several were selected and subsequently further utilized. In total, ten different substrates were prepared and tested for SERS activity by measuring the model analyte – adenine at a concentration 10^{-5} M. The SERS measurement were performed on four lasers with wavelengths of 455 nm, 532 nm, 633 nm and 780 nm. All prepared substrates were also characterized by scanning electron microscopy. The SERS activity of the substrates was then evaluated by calculating Raman signal enhancement factors. The SERS signal intensities of adenine with concentration 10^{-5} M and the Raman signal intensities of adenine with concentration 0,1 M were used for calculation. The Raman signal intensities of adenine were obtained by measurements on substrates without silver. The substrates performed best when using a 780 nm laser, where all substrates amplified the Raman signal in the order of $10^6 - 10^7$. Comparing the calculated enhancement factors, the substrates prepared on impregnated cellulose showed better for Raman signal enhancement. Similar substrates based on filter paper coated with silver layers were also tested for the detection of drugs as acyclovir, flucytosine and amoxicillin, which achieved Raman signal enhancement factors of the order of $10^4 - 10^7$.^{54,55,56} Based on the most

consistent measurement results, the celPEI100 substrate was selected in combination with 780 nm laser to measure malachite green at various concentrations. The lowest concentration at which malachite green could be detected on the selected substrate was 10^{-4} M.

Literatura:

1. Raman, C. V. & Krishnan, K. S. A New Type of Secondary Radiation. *Nature* **121**, 501–502 (1928).
2. M. Fleischmann, P. J. Hendra & A. J. McQuillan, Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters* **26**, 163–166 (1974).
3. Gilbert, A. S. Vibrational, Rotational and Raman Spectroscopy, Historical Perspective. in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* 600–609 (Elsevier, 2017). doi:[10.1016/B978-0-12-803224-4.00308-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00308-3).
4. Mitsutake, H., Poppi, R. & Breitzkreitz, M. Raman Imaging Spectroscopy: History, Fundamentals and Current Scenario of the Technique. *J. Braz. Chem. Soc.* (2019) doi:[10.21577/0103-5053.20190116](https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190116).
5. Singh, R. C. V. Raman and the Discovery of the Raman Effect. *Phys. perspect.* **4**, 399–420 (2002).
6. Theoretical principles of Raman spectroscopy. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/psr-2017-0040/html>.
7. Prochazka, M. Basics of Raman Scattering (RS) Spectroscopy. *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy* 7–19 (2016) doi:[10.1007/978-3-319-23992-7_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23992-7_2).
8. Nascimento, G. M. D. Introductory Chapter: The Multiple Applications of Raman Spectroscopy. in *Raman Spectroscopy* (IntechOpen, 2018). doi:[10.5772/intechopen.75795](https://doi.org/10.5772/intechopen.75795).
9. Kumar, N., Mignuzzi, S., Su, W. & Roy, D. Tip-enhanced Raman spectroscopy: principles and applications. *EPJ Techn Instrum* **2**, 1–23 (2015).
10. Surface Enhanced Raman Scattering Revealed by Interfacial Charge-Transfer Transitions. *The Innovation* **1**, 100051 (2020).
11. Ding, S.-Y., You, E.-M., Tian, Z.-Q. & Moskovits, M. Electromagnetic theories of surface-enhanced Raman spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4042–4076 (2017).
12. Su, Y. *et al.* Quantification and coupling of the electromagnetic and chemical contributions in surface-enhanced Raman scattering. *Beilstein J. Nanotechnol.* **10**, 549–556 (2019).
13. Lin, X.-M., Cui, Y., Xu, Y.-H., Ren, B. & Tian, Z.-Q. Surface-enhanced Raman spectroscopy: substrate-related issues. *Anal Bioanal Chem* **394**, 1729–1745 (2009).
14. Zannotti, M., Rossi, A. & Giovannetti, R. SERS Activity of Silver Nanosphere, Triangular Nanoplates, Hexagonal Nanoplates and Quasi-Spherical Nanoparticles: Effect of Shape and Morphology. *Coatings* **10**, 288 (2020).
15. Okeil, S. & Schneider, J. J. Controlling surface morphology and sensitivity of granular and porous silver films for surface-enhanced Raman scattering, SERS. *Beilstein J. Nanotechnol.* **9**, 2813–2831 (2018).
16. Dey, T. Microplastic pollutant detection by Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): a mini-review. *Nanotechnology for Environmental Engineering* (2022) doi:[10.1007/s41204-022-00223-7](https://doi.org/10.1007/s41204-022-00223-7).
17. Larkin, P. Introduction. in *Infrared and Raman Spectroscopy* 1–5 (Elsevier, 2011). doi:[10.1016/B978-0-12-386984-5.10001-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386984-5.10001-1).

18. Molecule polarization, AVAILABLE: https://www.bellevuecollege.edu/wp-content/uploads/sites/140/2014/06/161lab_Molecular_models-updated-1-27-2014.pdf
19. Hammond, J. L., Bhalla, N., Rafiee, S. D. & Estrela, P. Localized Surface Plasmon Resonance as a Biosensing Platform for Developing Countries. *Biosensors* **4**, 172–188 (2014).
20. Eric Le Ru & Pablo Etchegoin. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: And Related Plasmonic Effects*. vol. 1st ed (Elsevier Science, 2009).
21. Dharmalingam, P., Venkatakrishnan, K. & Tan, B. An atomic-defect enhanced Raman scattering (DERS) quantum probe for molecular level detection – Breaking the SERS barrier. *Applied Materials Today* **16**, 28–41 (2019).
22. Tian, Z. Q. Surface-enhanced Raman spectroscopy: advancements and applications. *Journal of Raman Spectroscopy* **36**, 466–470 (2005).
23. Wang, K., Li, S., Petersen, M., Wang, S. & Lu, X. Detection and Characterization of Antibiotic-Resistant Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Nanomaterials* **8**, 762 (2018).
24. Jones, R. R., Hooper, D. C., Zhang, L., Wolverson, D. & Valev, V. K. Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers. *Nanoscale Res Lett* **14**, 1–34 (2019).
25. Rc, P., Rr, F. & Eo, P. Stimulated Raman Scattering: From Bulk to Nano. *Chemical reviews* **117**, (2017).
26. Slepíčka, P., Slepíčková Kasálková, N., Siegel, J., Kolská, Z. & Švorčík, V. Methods of Gold and Silver Nanoparticles Preparation. *Materials* **13**, 1 (2020).
27. Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* **300**, 102597 (2022).
28. Nanoparticle Synthesis | Nanoscience Instruments. <https://www.nanoscience.com/techniques/nanoparticle-synthesis/>.
29. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry* **3**, 135–140 (2010).
30. A, P. *et al.* Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *The journal of physical chemistry. B* **110**, (2006).
31. Haber, J. & Sokolov, K. Synthesis of Stable Citrate-Capped Silver Nanoprisms. *Langmuir* **33**, 10525–10530 (2017).
32. Cosgrove, T. *Colloid Science: Principles, Methods and Applications*. (John Wiley & Sons, 2010).
33. Kvítek, L. & Panáček, A. ZÁKLADY KOLOIDNÍ CHEMIE.
34. Yu, W. & Xie, H. A Review on Nanofluids: Preparation, Stability Mechanisms, and Applications. *Journal of Nanomaterials* **2012**, (2011).
35. Abbasi, E. *et al.* Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical Reviews in Microbiology* (2016).
36. Pandiarajan, J. & Krishnan, M. Properties, synthesis and toxicity of silver nanoparticles. *Environ Chem Lett* **15**, 387–397 (2017).

37. Syafiuddin, A. *et al.* A Review of Silver Nanoparticles: Research Trends, Global Consumption, Synthesis, Properties, and Future Challenges. *Journal of the Chinese Chemical Society* **64**, 732–756 (2017).
38. Ogundare, S. A. & van Zyl, W. E. A review of cellulose-based substrates for SERS: fundamentals, design principles, applications. *Cellulose* **26**, 6489–6528 (2019).
39. Prucek, R. *et al.* Re-crystallization of silver nanoparticles in a highly concentrated NaCl environment—a new substrate for surface enhanced IR-visible Raman spectroscopy. *CrystEngComm* **13**, 2242–2248 (2011).
40. Baia, M., Astilean, S. & Iliescu, T. Fundamentals of Infrared and Raman Spectroscopy, SERS, and Theoretical Simulations. in *Raman and SERS Investigations of Pharmaceuticals* 9–35 (Springer, Berlin, Heidelberg, 2008). doi:[10.1007/978-3-540-78283-4_2](https://doi.org/10.1007/978-3-540-78283-4_2).
41. L. Rivas, †, S. Sanchez-Cortes, *, J. V. García-Ramos, † and & Morcillo‡, G. Growth of Silver Colloidal Particles Obtained by Citrate Reduction To Increase the Raman Enhancement Factor.
42. Salama, A., Abouzeid, R. E., Owda, M. E., Cruz-Maya, I. & Guarino, V. Cellulose–Silver Composites Materials: Preparation and Applications. *Biomolecules* **11**, 1684 (2021).
43. He, S., Chua, J., Tan, E. K. M. & Kah, J. C. Y. Optimizing the SERS enhancement of a facile gold nanostar immobilized paper-based SERS substrate. *RSC Adv.* **7**, 16264–16272 (2017).
44. Oliveira, M. J. *et al.* Office paper decorated with silver nanostars - an alternative cost effective platform for trace analyte detection by SERS. *Sci Rep* **7**, 1–14 (2017).
45. Shape transformation of silver nanospheres to silver nanoplates induced by redox reaction of hydrogen peroxide. *Materials Chemistry and Physics* **153**, 127–134 (2015).
46. Zhang, Q., Li, N., Goebel, J., Lu, Z. & Yin, Y. A Systematic Study of the Synthesis of Silver Nanoplates: Is Citrate a “Magic” Reagent? *ACS Publications* <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ja2080345> (2011) doi:[10.1021/ja2080345](https://doi.org/10.1021/ja2080345).
47. Millstone, J. E., Hurst, S. J., Métraux, G. S., Cutler, J. I. & Mirkin, C. A. Colloidal Gold and Silver Triangular Nanoprisms. *Small* **5**, 646–664 (2009).
48. Surface functionalization of cellulose with polyethyleneimine and magnetic nanoparticles for efficient removal of anionic dye in wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **9**, 104639 (2021).
49. Fabrication of polyethyleneimine-paper composites with improved triboelectricity for triboelectric nanogenerators. *Nano Energy* **93**, 106859 (2022).
50. Chi, T. T. K., Le, N. T., Hien, B. T. T., Trung, D. Q. & Liem, N. Q. Preparation of SERS Substrates for the Detection of Organic Molecules at Low Concentration. *Comm. Phys.* **26**, 261–261 (2016).
51. Pattarith, K., Nugroho, D., Nanan, S. & Benchawattananon, R. Cellulose Modified with Polyethylenimine (PEI) Using Microwave Methodology for Adsorption of Chromium from Aqueous Solutions. *Molecules* **28**, 4514 (2023).
52. F.t.-i.r. and laser-Raman spectra of adenine and adenosine. *Carbohydrate Research* **131**, 1–15 (1984).

53. Zhang, S. *et al.* Dual-Excitation Nanocellulose Plasmonic Membranes for Molecular and Cellular SERS Detection. *ACS Applied Materials & Interfaces* (2018) doi:[10.1021/acsami.8b04817](https://doi.org/10.1021/acsami.8b04817).
54. Surface-Enhanced Raman scattering (SERS) filter paper substrates decorated with silver nanoparticles for the detection of molecular vibrations of Acyclovir drug. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **298**, 122762 (2023).
55. Karooby, E., Sahbafar, H., Heris, M. H., Hadi, A. & Eskandari, V. Identification of Low Concentrations of Flucytosine Drug Using a Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)-Active Filter Paper Substrate. *Plasmonics* **19**, 855–863 (2024).
56. Sahbafar, H. *et al.* Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Finite Difference Time Domain (FDTD) Investigations of Plasmonic and Flexible Filter Papers for the Detection of the Molecular Vibrations of Amoxicillin. *Plasmonics* 1–8 (2023) doi:[10.1007/s11468-023-02106-2](https://doi.org/10.1007/s11468-023-02106-2).
57. Culp, S. J. & Beland, F. A. Malachite Green: A Toxicological Review. *Journal of the American College of Toxicology* (1996) doi:[10.3109/10915819609008715](https://doi.org/10.3109/10915819609008715).