

1. Úvod

Při analýze potravin jsou nejčastěji používanými metodami GC-MS a HPLC-MS, které mohou být drahé a mohou konzumovat příliš mnoho času. Proto je důležité vyvíjet rychlé, jednoduché a spolehlivé techniky pro detekci nežádoucích látek v potravinách. Jednou z rozvíjejících se metod pro hodnocení nezávadnosti a kvality potravin je metoda SERS, která může být rychlejší, jednodušší než ostatní tradiční metody a může dosahovat velmi nízkých detekčních limitů.

V této diplomové práci byly nejprve studovány podmínky, díky nimž lze dosáhnout maximálního zesílení SERS signálu, a to na modelových látkách (adenin, xantin, hypoxantin). Byl studován zejména vliv pH, velikosti nanočástic a použitého redukčního činidla na intenzitu SERS signálu.

V další části práce byla vypracována metoda, díky níž je možné detekovat vybraná antibiotika v medu s využitím FT-SERS.

V EU je používání antibiotik ve včelařství zakázáno.

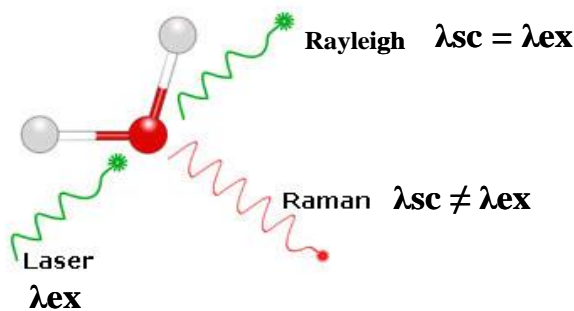
Autor

2. Teoretická část

2.1 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je metodou vibrační molekulové spektroskopie. Rozvinula se v první čtvrtině 20. století, kdy byl neelastický rozptyl monochromatického záření teoreticky předpovězen rakouským fyzikem A. Smekalem¹. První pozorování neelastického rozptylu bylo popsáno v Kalkatě C. V. Ramanem, a to v roce 1928. Raman objevil, že při ozáření vzorku intenzivním monochromatickým světlem můžeme ve spektru, kromě budící čáry, zaznamenat i symetricky rozložené slabší linie. Vzdálenost těchto linií od centrální čáry, vyjádřená ve stupnici vlnočtů, je charakteristická pro rozptylující látku a nezávisí na vlnové délce budícího záření. V roce 1930 obdržel Raman za svoji práci Nobelovu cenu a tento obor spektrometrie byl pojmenován po něm.

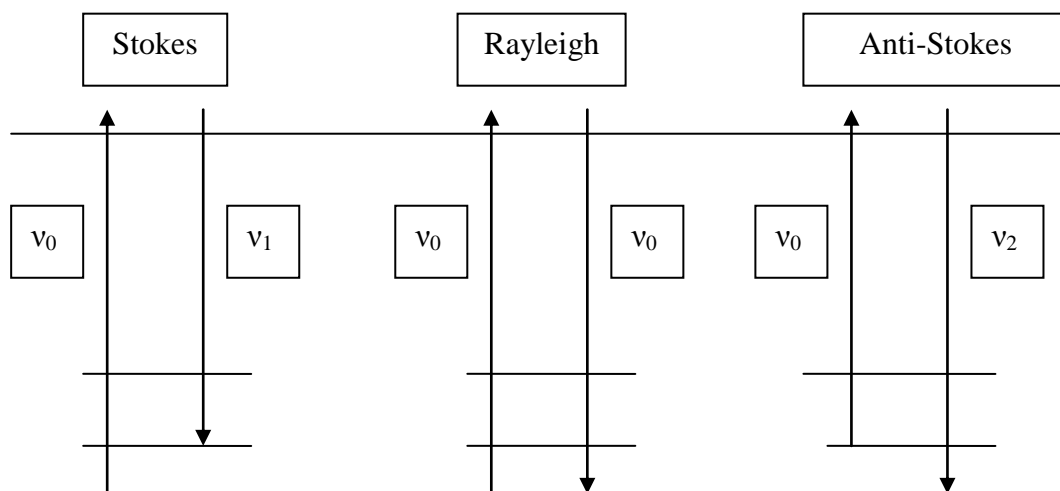
Při Ramanově jevu prochází monochromatický světelný paprsek zkoumaným prostředím. V tomto prostředí je světelný paprsek zčásti absorbován, zčásti rozptýlen a zbylá část paprsku projde prostředím beze změny. Pro Ramanovu spektroskopii je podstatný právě neelastický rozptyl světelného paprsku, ke kterému dochází interakcí monochromatického záření s molekulami vzorku za současné změny jejich rotačních a vibračních stavů. Schéma vzniku Ramanova rozptylu je uvedeno na obr. 1.



Obr.1 Schéma vzniku Ramanova rozptylu²

Jednou z možností, popisujících Ramanův rozptyl, je kvantově mechanický model, který zahrnuje vlnově-částicovou povahu kvant záření, fotonů a kvantování energetických hladin molekuly. Na obr. 2. jsou znázorněny některé varianty celého procesu. Při **Rayleighově rozptylu** nedochází ke změně energie fotonu. Výchozí a koncová vibrační energetická hladina tohoto procesu je stejná a vyzářený foton má tudíž stejnou vlnovou délku, jako excitační záření. Rayleighův rozptyl řadíme mezi elastické rozptyly. Stokesovy linie

v Ramanově spektru vznikají, je-li koncová vibrační energetická hladina přechodu vyšší, než počáteční. Pak má vyzářený foton nižší energii a tedy větší vlnovou délku λ , než excitační záření. **Anti-Stokesovy linie** v Ramanově spektru vznikají tehdy, když je koncová vibrační energetická hladina celého děje nižší, než počáteční. Vyzářený foton má vyšší energii a menší vlnovou délku λ , než excitační záření. Abychom mohli vidět anti-Stokesovy linie, musí být splněna jedna podmínka. Molekula se již na počátku celého procesu musí nacházet v některém z vyšších vibračních energetických stavů v rámci základního elektronického stavu.



Obr. 2 Schematické znázornění některých interakcí foton-molekula

Populace těchto vyšších vibračních stavů se řídí Boltzmanovým rozdělením (rovnice II. 1. 1.). Vzhledem k výše uvedené podmínce pro vznik anti-Stokesových linií je procento molekul, nacházejících se v takovém stavu malé. Díky tomu mají anti-Stokesovy linie nižší intenzitu než Stokesovy linie. Z tohoto důvodu se **v běžné praxi Ramanova spektroskopie zabývá pouze studiem Stokesových linií.**

$$\frac{N_1}{N_0} = \frac{g_1}{g_0} e^{-\frac{\Delta E_v}{kT}} \quad (\text{II.1.1})$$

- N_0 počet atomů v nižším vibračním stavu
- N_1 počet atomů ve vyšším vibračním stavu
- g_0 degenerace nižšího vibračního stavu
- g_1 degenerace vyššího vibračního stavu
- ΔE_v energetický rozdíl mezi dvěma vibračními stavy
- k Boltzmanova konstanta

Klasická Ramanova spektroskopie trpí podstatnou nevýhodou, kterou je nízká účinnost Ramanova rozptylu³. Ze svazku fotonů je neelasticky rozptýlen přibližně jeden z 10^{-7} fotonů. Abychom získali spektrum, je tedy nutný velký soubor molekul.

Intenzita "I" Ramanova rozptylu je pak dána vztahem (II.1.2)

$$I \approx |P|^2 \quad (\text{II.1.2})$$

Ve studované molekule je zářením indukována polarizace P, která je vyjádřena rovnicí (II.1.3)

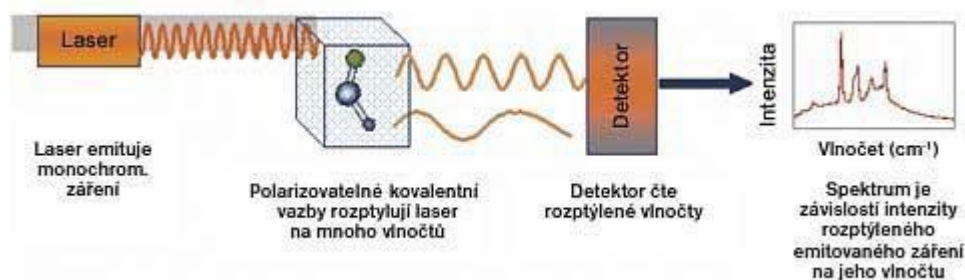
$$P = \alpha \cdot E_0 \quad (\text{II.1.3})$$

α polarizovatelnost molekuly

E_0 intenzita elektrického pole záření dopadajícího na molekulu

Podmínkou aktivity vibrace v Ramanově spektru je změna polarizovatelnosti molekuly během vibrace. **Polarizovatelnost** je mírou snadnosti změny rozložení nábojů v molekule a vypovídá tedy o účinnosti, s níž střídavé elektrické pole indukuje v molekule dipólový moment. Úzce souvisí s vlastnostmi molekuly (se strukturou molekuly, s povahou a směrem chemických vazeb v molekule). Intenzivní pásy v Ramanově spektru poskytují skupiny $-C=C-$, $-S-S-$, $-N=N-$. Středově symetrické vibrace jsou v Ramanově spektru aktivní.

Na obr. 3 už je uvedeno **základní uspořádání Ramanova spektrometru**.



Obr. 3 Základní uspořádání Ramanova spektrometru⁴

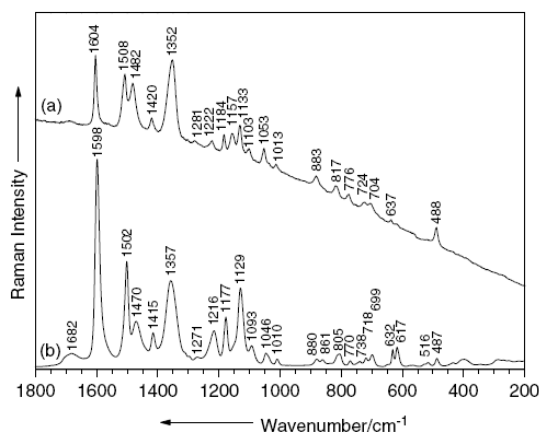
Výběr **budícího laseru** je dán vlastnostmi měřené substance. Rozptýlené záření se měří kolmo na směr dopadajícího paprsku. Intenzita Ramanových linií je úměrná čtvrté mocnině frekvence budícího záření⁵. Lze použít excitační lasery různých vlnových délek.

Na trhu je k dispozici např. laser o vlnové délce 532 nm, 633 nm, 1064 nm a mnoho dalších. Předností laseru Nd: YAG 1064 nm je omezená fluorescence studované látky.

Ramanovou spektroskopií lze měřit vzorky plynné, kapalné i pevné. Můžeme pracovat s relativně malým objemem vzorku. Na rozdíl od IČ spektroskopie lze relativně snadno měřit i ve vodném rozpouštědle.

Při měření Ramanova rozptylu musíme dbát na **čistotu vzorku**. Fluorescenční příměsi způsobují překrytí spektra relativně silnější luminiscencí, takže se Ramanovy pásy ztrácí v šumu intenzivního pozadí. V případě tekutých vzorků jsou překážkou měření i rozptylující makroskopické částice, vznášející se v tekutině. Tyto částice se nahodile dostávají do budícího svazku a způsobují náhlý vzrůst intenzity elasticky rozptýleného záření o několik řádů. Nahodilost a relativně velká časová konstanta fluktuací znemožňuje jejich ofiltrování v elektrickém signálu detektoru. Luminiscenci vzorku, která je nežádoucí, lze snížit (již dříve zmíněnou) volbou optimální vlnové délky buzení. Někdy je možné ke vzorku přidat látku, která luminiscenci zhasí. Musíme ovšem vzít v úvahu její možný vliv na měřený vzorek. Mezi moderní metody patří modulace vlnové délky budícího záření nebo měření s vysokým časovým rozlišením, umožňující časově oddělit Ramanův rozptyl od pomalejší luminiscence. Ve srovnání s fluorescencí ($\sim 10^{-9}$ s) probíhá Ramanův rozptyl ve velmi krátké časové škále ($\sim 10^{-15}$ s).

Na obr. 4 je uveden příklad záznamu, který dostaneme na výstupu.



Obr. 4 Ukázka záznamu Ramanovy spektroskopie (a) Ramanovo spektrum E 102, laser 514,5 nm (b) FT-Raman spektrum E 102, laser 1064 nm⁶

Je-li při porovnání změřených a databázových dat dodržena podmínka, že Ramanova spektra byla získána pro stejný fyzikální stav látky, slouží vibrační spektrum molekuly jako tzv. “fingerprint”.

2.2 Nanočástice

Nanočástice mají unikátní adsorpční, katalytické, optické i biologické vlastnosti⁷. Jsou charakterizovány velikostí od cca 1 nm - 100 nm. Můžeme u nich pozorovat obrovský nárůst poměru plochy povrchu k objemu částic nanomateriálu (počet atomů, vytvářející povrch nanočástice, je nepoměrně vyšší, než počet atomů uvnitř částice).

Před vlastní přípravou nanočástic, je nutné dobře uvážit jejich další aplikaci⁸. Nanočástice mohou být připraveny různými metodami. Lze dosáhnout požadovaných velikostí, tvarů a tím i požadovaných chemických a fyzikálních vlastností.

Kovové nanočástice lze připravit dvěma hlavními metodami⁹, založenými za poprvé na **kondenzačních metodách**, při kterých dochází ke spojování jednotlivých atomů či molekul v homogenních soustavách do větších agregátů. Druhou možností jsou **dispergační metody**, kdy naopak velké částice hrubě disperzních soustav jsou rozptylovány za tvorby menších nanočástic.

Dispergační metody, mezi které patří např. **laserová ablace**, nejsou při přípravě nanočástic kovů příliš používány. Laserová ablace pro přípravu nanočástic má však některé výhody. Nanočástice, připravené touto metodou, jsou velmi čisté a proto je lze s výhodou využít k základním studiím v oblasti povrchově zesílené Ramanovi spektroskopie (SERS)¹⁰. Čistota nanočástic je důležitá pro stabilitu koloidních částic a reprodukovatelnost SERS měření. Další výhodou laserové ablace je, že nezanechává v systému zbytková chemická činidla. Protože při této práci nebyly nanočástice připravovány výše popsaným postupem, nebude tato metoda v této práci podrobněji popisována.

Při přípravě nanočástic kovů hrají podstatně významnější roli **Kondenzační metody**, které lze, vzhledem k použitým principům, rozdělit na dvě skupiny – metody fyzikální a chemické. V experimentální části teze byly připravovány nanočástice metodou **chemické redukce**.

Při **chemické redukci** dochází k redukci rozpustné stříbrné soli vhodným redukčním činidlem. Atomy Ag, které vznikají, se při jejich dostatečném přesycení v roztoku začleňují do zárodků nové pevné fáze. Ty, po dosažení kritické velikosti, mohou dále růst za vzniku stabilních nanočástic (či koloidních částic) stříbra.

Nevýhodou chemických koloidů je **nestabilita jejich povrchových vlastností** (typ a koncentrace reziduálních iontů, povrchový potenciál). Systém není stálý, dochází

k agregaci, což vede ke vzniku agregátů. Následkem je ztráta vlastností spojovaných s koloidním stavem těchto nanočástic, které je tedy nutné stabilizovat.

Imobilizovat lze částici na vhodném substrátu – uplatnění našly polymerní substráty s vhodnými funkčními skupinami (kyano, amino, resp. thiolové). Nebo lze vytvořit ochrannou adsorpční vrstvy přímo na povrchu kovové nanočástice.

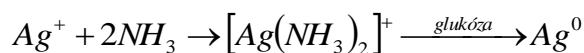
S objevem SERS v 70. letech 20. století došlo k rozvoji tzv. „wet“ (**roztokových metod přípravy koloidů roztoku stříbra**). Redukce solí přechodných kovů (v daném případě AgNO_3) v roztoku, je nejvíce rozšířená metoda pro přípravu koloidních suspenzí kovů a je velmi jednoduše proveditelná. Umožňuje, aby byly v gramových množstvích připraveny koloidní nanočástice požadované velikosti s nízkou disperzí. Je využíván široký rozsah redukčních činidel, např. NaBH_4 , citrát sodný a další.

Jednou z možností, jak připravit nanočástice stříbra metodou chemické redukce, je redukce AgNO_3 silným redukčním činidlem, a to NaBH_4 ve vodném prostředí. Variací poměru $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$ mohou být ovlivněny vlastnosti vznikajících nanočástic Ag (hlavně velikost a povrchový náboj). Nevýhodou těchto nanočástic je přítomnost borátového anionu, adsorbovaném na jejich povrchu (např. při SERS studiu cytochromu P-450, který na borohydridovém solu podléhá denaturaci).

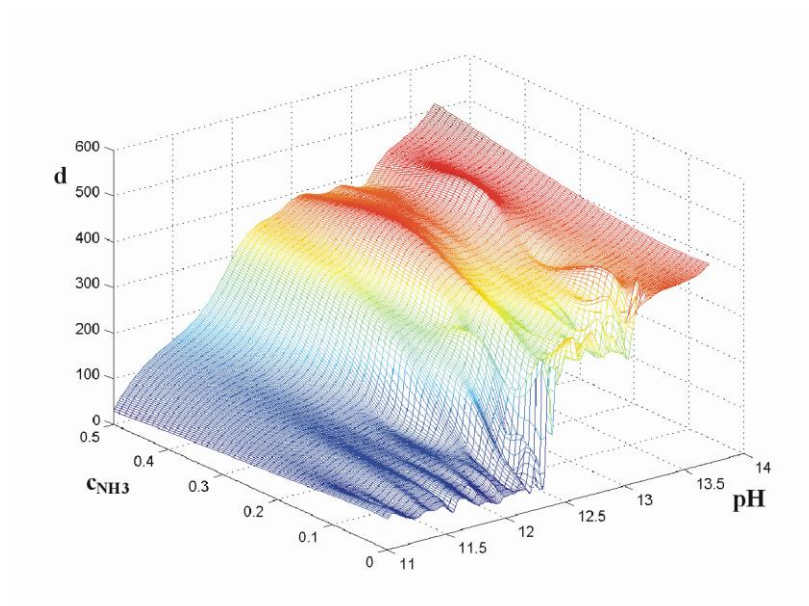
V uvedených a podobných případech je lepší použít druhý z klasických redukčních postupů. Vyznačuje se použitím mírnějšího redukčního činidla. Tím je citrátový anion, který zároveň stabilizuje vznikající nanočástice stříbra. Vzniklé nanočástice jsou výrazně větší a polydisperznější, než u borohydridové redukce. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 30-120 nm. Citrátové nanočástice nejsou tak stabilní.

NaBH_4 nebo citrát sodný nejsou jediné používané redukční látky při přípravě nanočástic stříbra. Další možností je využití redukčních účinků jednoduchých cukrů. Z hlediska této práce jsou pak zajímavé nanočástice stříbra připravené metodou, vycházející z historického **Tollensova postupu** přípravy stříbrného zrcátka, kdy dochází k redukci amoniakálního komplexního kationtu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ redukujícími cukry, např. glukózou, což je znázorněno v reakci II.2 1.

Modifikovaný Tollensův proces (II.2 1)



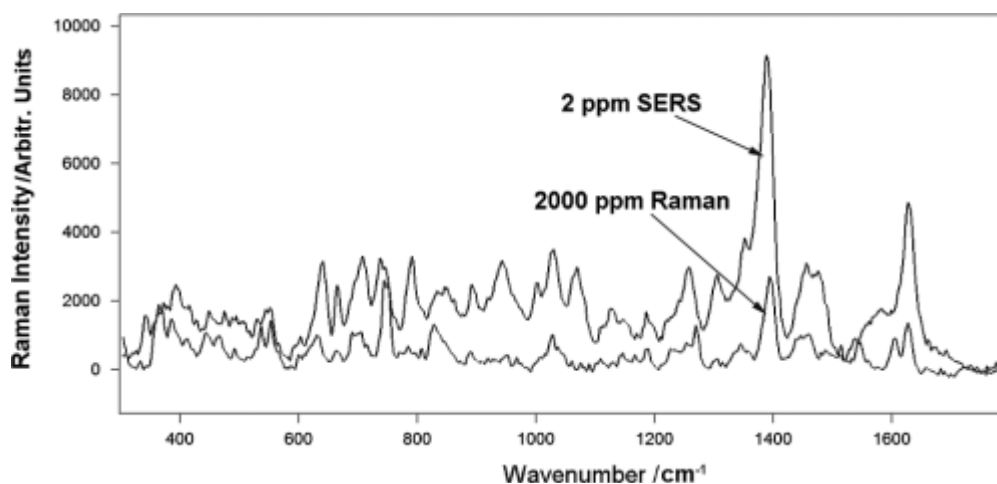
Na obr. 5 je znázorněn vliv pH a koncentrace amoniaku na velikosti částic stříbra, připravených výše uvedeným modifikovaným Tollensovým postupem.



Obr. 5 Trojrozměrný konturovaný graf, znázorňující vliv koncentrace amoniaku a pH na velikosti částic stříbra, vznikajících redukcí Ag^+ v amoniakálním prostředí glukózou¹⁰.

2.3 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS)

SERS je analytická metoda, využívající zvýšení intenzity signálů při Ramanově rozptylu¹¹. K tomuto ději dochází působením elektromagnetického záření na povrch nanostruktury (velikosti 5-100 nm) některých kovů. Molekuly se musí nacházet v blízkosti těchto nanočástic a navíc musí být detekovatelné Ramanovou spektroskopií. Díky externímu povrchovému zesilování lze pracovat s koncentracemi, které byly pro Ramanovu spektroskopii dříve nedostupné. Porovnání klasického Ramanova spektra a SERS spektra je uvedeno na obr. 6.



Obr. 6 Porovnání klasického Ramanova spektra a SERS spektra ciprofloxacinu¹²

V roce 1974 bylo Fleischmannem poprvé pozorováno Ramanovo spektrum pyridinu absorbovaného na stříbrné elektrodě¹³. Původní interpretace zesílených Ramanových signálů však nebyla správná. K poznání jevu došlo až v roce 1977 a efekt byl nazván povrchem zesílený Ramanův rozptyl. V roce 1999 už byly uskutečněny detekce na úrovni jedné molekuly.

Nejintenzivnějšího zesílení je dosaženo, když je frekvence oscilací elektronů v povrchu kovu blízká frekvenci excitačního laserového záření. Pro excitační záření ve viditelné a blízké infračervené oblasti je tato podmínka nejlépe splněna u substrátů (Ag, Au, Cu). Přípravují se nejčastěji chemickou redukcí dusičnanu stříbrného, především díky levné a snadné přípravě a relativně úzké distribuci velikosti částic.

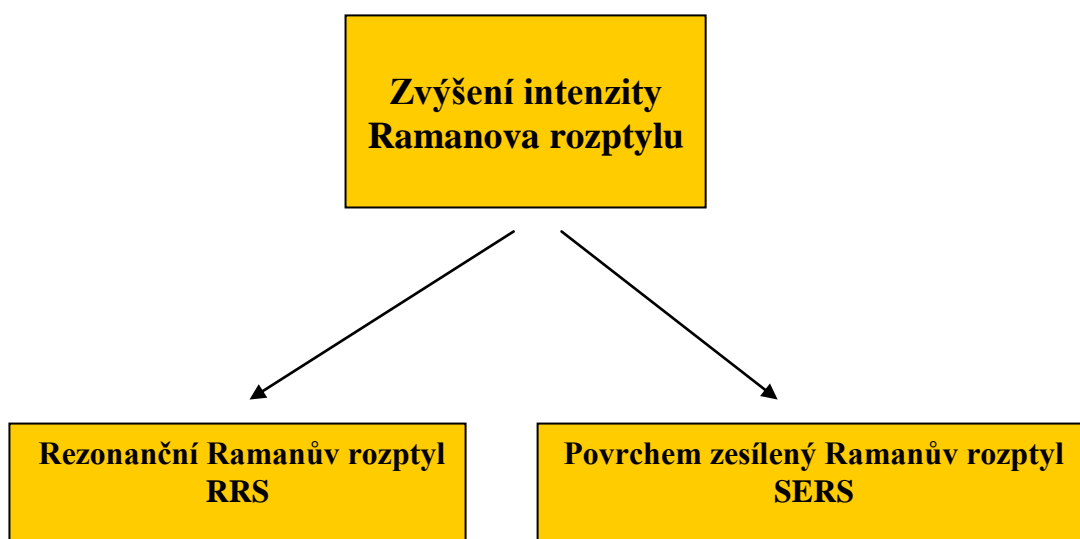
SERS závisí na velikosti nanočástic (podle použitého excitačního zdroje), jejich tvaru, dielektrické konstantě okolí a interakcemi mezi částicemi. Tyto vlastnosti nanočástic můžeme ovlivnit již při jejich přípravě.

Intenzitu Ramanova rozptylu je možné zvýšit v podstatě **dvěma možnými způsoby**³:

První případ je založen na zesílení zvýšením polarizovatelnosti molekuly α . Jevu lze dosáhnout vhodným výběrem vlnové délky excitujícího záření λ_{exc} . Je možné využít takovou λ_{exc} , která odpovídá excitaci elektronového přechodu v molekule. V tomto případě dochází k **rezonančnímu Ramanovu rozptylu (RRS)**, při němž je intenzita Ramanova rozptylu zvýšena faktorem zesílení 10^2 - 10^4 .

Druhou možností je využití již dříve zmíněných „zesilovačů“ (Au,Ag,Cu nanočástic). Na povrchu těchto kovových nanomateriálů dochází po dopadu záření k rezonanci lokalizovaných povrchových plasmonů a tím ke vzniku silného elektromagnetického pole. Jestliže je analyt emitující Ramanovo rozptýlené záření v dosahu tohoto elektromagnetického pole, zvýší se indukovaný dipól analytu o několik řádů, a tím i intenzita jím emitovaného rozptýleného záření. Tento jev se nazývá **povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS)**. Faktor zesílení Ramanova rozptylu při tomto procesu dosahuje hodnot 10^3 - 10^{14} . V případě SERSu mohou k celkovému zesílení přispívat dvěma mechanismy.

Na obr. 7 jsou uvedeny možné způsoby zesílení Ramanova signálu.

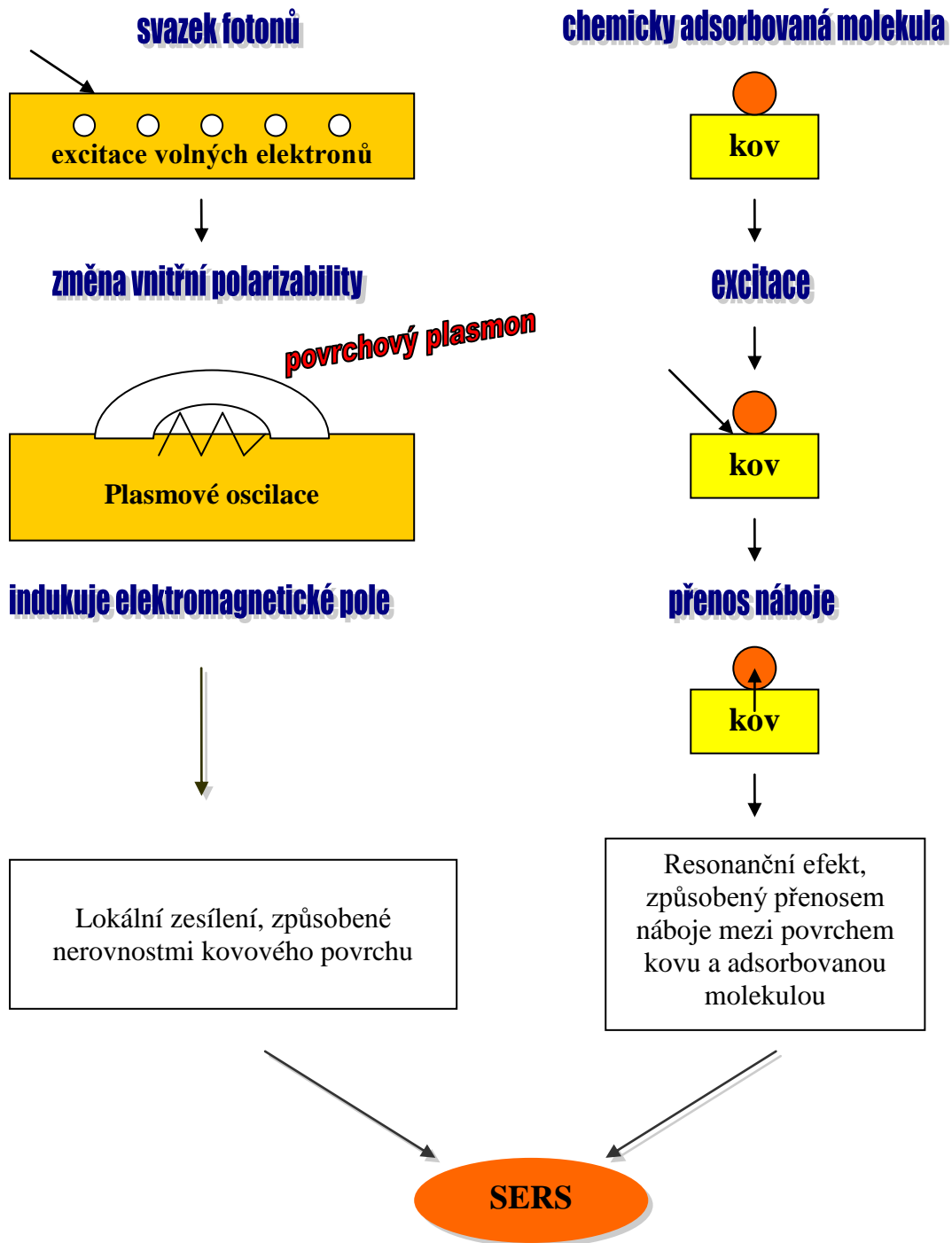


Obr. 7 Možnosti zesílení Ramanova signálu

Následující část práce se bude zabývat SERS efektem. Oba mechanismy SERSu jsou názorně ukázány na obr. 8.

Elektromagnetický mechanismus

chemický mechanismus



Obr. 8 Znázornění mechanismů, podléjících se na SERS efektu

1. **Elektrochemický mechanismus** je spojen s existencí povrchového plasmonu¹⁴. V těsném okolí kovové nanočástice je vybuzeno elektrické pole s intenzitou o několik řádů vyšší, než bylo původní elektromagnetické pole budícího záření, což je znázorněno na obr. 9. Musí být splněna rezonanční podmínka, která je uvedena v rovnici (II.3.1)

$$\varepsilon_1 = -2\varepsilon_2 \quad (\text{II.3.1})$$

ε_1 dielektrická konstanta kovové částice

ε_2 dielektrická konstanta okolního prostředí

Rovnice (II.3.2) vyjadřuje intenzitu rozptýleného světla

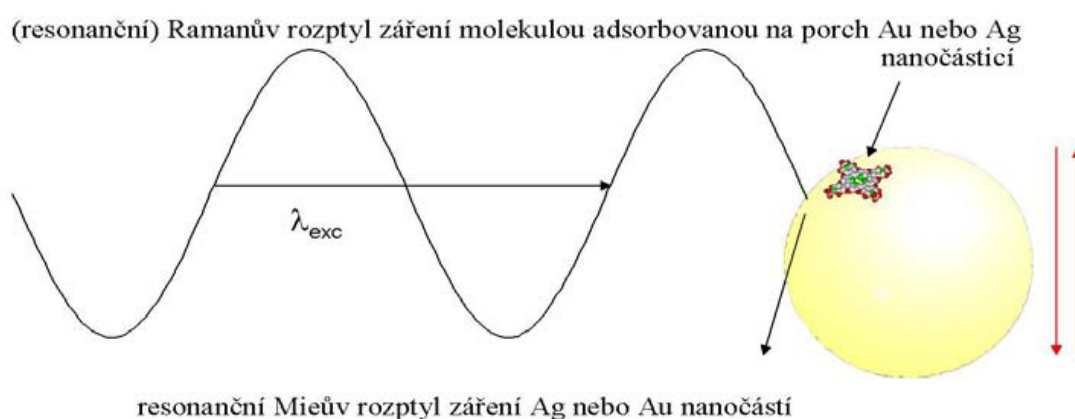
$$E_{local} = \frac{1}{\varepsilon(\omega) + 2} \cdot E_0 \quad (\text{II.3.2})^{(\text{cit.15})}$$

$\varepsilon(\omega)$ reálná část dielektrické funkce kovu

E_0 elektrické pole

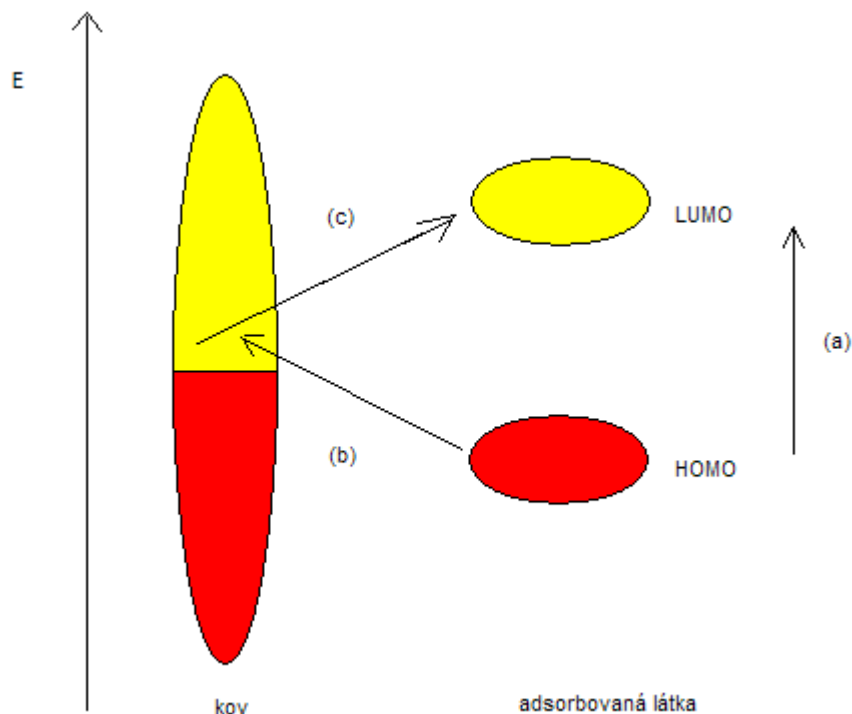
E_{local} lokální elektrické pole

Děj, odehrávající se při elektromagnetickém mechanismu, vystihuje obr.9.



Obr.9 Excitace povrchového plasmonu³

2. **Chemický mechanismus** je spojen s přenosem náboje mezi absorbovanou molekulou a kovovým povrchem, což je znázorněno na obr. 10^(cit. 14).



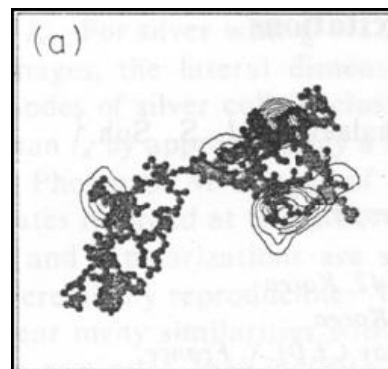
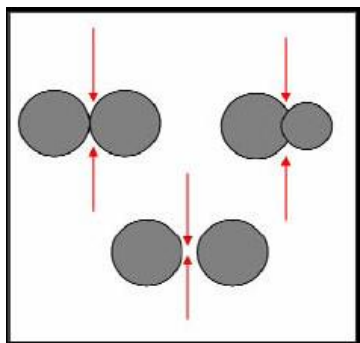
Obr. 10 Diagram úrovně energie pro molekuly, adsorbované na kovovém povrchu. Na obrázku jsou znázorněny neobsazené molekulové orbitály LUMO a obsazené molekulové orbitály HOMO.

Optická rezonance energetických hladin mezi orbitály absorbované molekuly a elektrony v kovu, mohou vyústit v rezonanční přenos náboje, který je příčinou dodatečného, tzv. rezonančního či charge transfer zesílení Ramanova jevu.

Součným působením obou mechanismů lze v některých případech dosáhnout celkového faktoru zesílení až 10^{14} .

Nejúčinnějšími zesilovači záření jsou soubory interagujících Ag nanočástic nebo Au nanočástic³. V těchto souborech jsou plasmonové excitace lokalizovány do tzv. „**hot spotů**“, které lze vidět na obr. 11. a 12. Jsou to místa nejvyššího zesílení elektromagnetickým

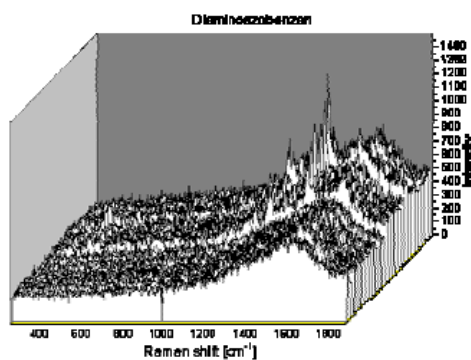
mechanismem. Pro maximalizaci zesílení jsou kromě „hot spotů“ vhodné rovněž dimery nanočástic. V praxi se tohoto jevu dosahuje tzv. cílenou agregací přidávkem chloridu sodného, čímž se zvýší iontová síla a začnou se tak tvořit klastry nanočástic.



Obr. 11 „Hot spoty“ v dimerech Ag nanočástic Obr. 12 „Hot spoty“ ve fraktálních agregátech

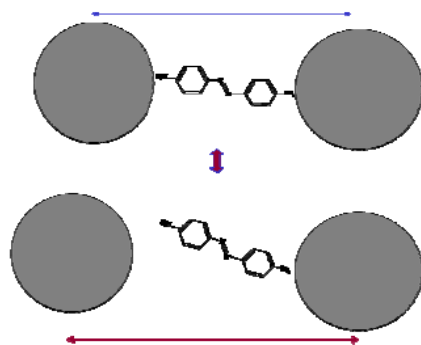
M. Sládková a B. Vlčková se ve svém experimentu zabývaly uspořádáním nanočástic pomocí molekul jako spojek³. Výsledků svého výzkumu využili k realizaci nejjednoduššího a zároveň účinnějšího zesilovače záření, tj. dimeru Ag nanočástic, spojených zkoumanou molekulou.

Během svého experimentu pozorovaly změny signálu v čase. Kolísání signálu během jejich experimentu můžeme vidět na obr. 13.



Obr. 13 Fluktuace SERS signálu v čase

Fluktuace signálů nám naznačují, že pravděpodobně dochází k rozpojování a opětovnému spojování částic molekulární spojkou, což znázorňuje obr. 14.



Obr. 14 Pravděpodobný mechanismus fluktuace SERS signálu

Důležitou roli hraje **stabilizace nanočástic**¹⁰. Jednou z možností stabilizace koloidních disperzí, díky níž lze zabránit těsnému přiblížení koloidních částic, je tzv. **sterická stabilizace**. Do disperze přidáváme látky, které se specificky adsorbují na povrchu částice. Vytvářejí na jejím povrchu vrstvu. Používány jsou především látky s vhodným heteroatomem (N,S). Ty zabezpečují dostatečně pevnou vazbu mezi povrchem částice a polymerním řetězcem. Z dostupné literatury vyplývá, že nanočástice připravené redukcí citrátem, se jeví jako nevhodné pro imobilizaci látek vázaných přes atom dusíku¹⁶. Naopak studie ukázaly, že citrát se vyznačuje poměrně vysokou afinitou vůči stříbrnému povrchu a vytěsnit jej dovedou pouze trioly.

2.3.1 Použití SERSu v potravinářství

Následující kapitola má za cíl zmonitorovat SERS experimenty, které už byly dělány s látkami, vyskytující se v potravinářství. Tyto látky jsou v rámci kapitoly rozděleny na dvě podskupiny, a to na kontaminanty a aditiva.

2.3.1.1 Kontaminanty

2.3.1.1.1 Melamin

Bin Liu, Mengshu Lin a Hao Li prošetřili ve svém experimentu proveditelnost metody SERS na zlatých nanočásticích pro rychlou detekci stopového množství melaminu v mléce¹⁷.

Melamin je látka bohatá na dusík a byla nezákonně přidávána do potravin, aby maskovala nedostatečný obsah bílkovin (kontrola Kjeldahlovou metodou). V roce 2007 došlo v USA k řadě úmrtí psů a koček. Příčinou této události bylo krmivo pro psy a kočky dovážené z Číny, které obsahovalo melamin. Daleko větší škody však nadělal melamin v samotné Číně, kde byl dokonce identifikován v sušeném mléce. Obrovská aféra propukla v roce 2008, během níž mělo 94 000 dětí zdravotní potíže a 4 děti dokonce zemřely. Strukturální vzorec melaminu je uveden na schématu I.

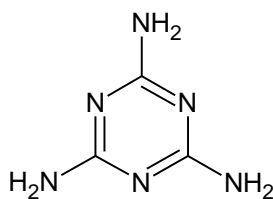
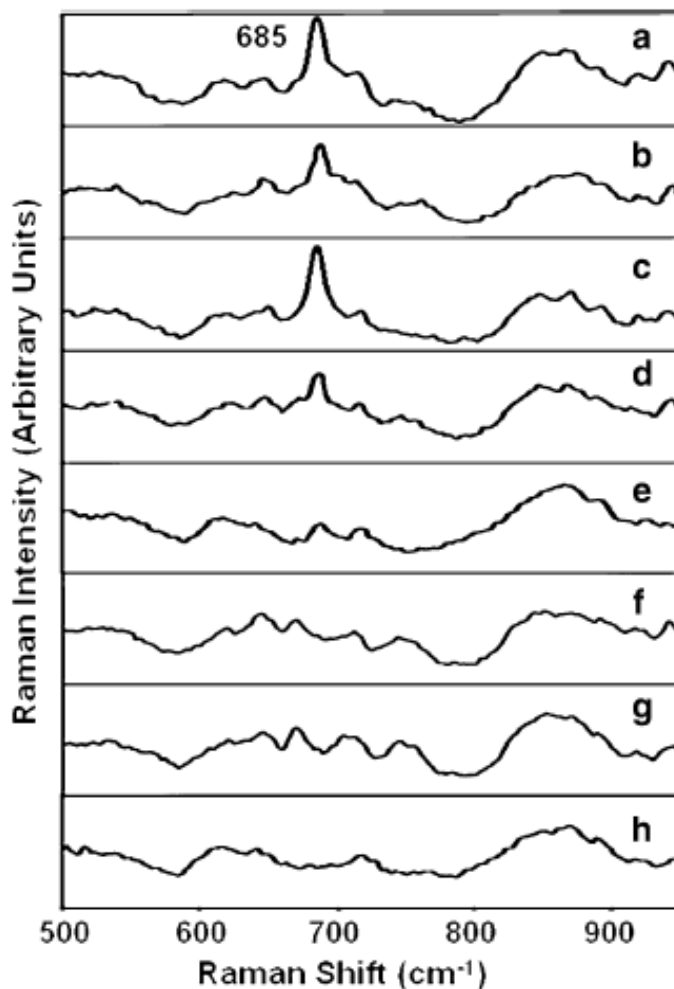


Schéma I melamin

Při tomto experimentu byl melamin naspajkován do mléka (2 % tuku), a to v rozmezí 100 – 0 ppm. K extrakci melaminu byl použit acetonitril. Po krátkém třepání byla použita centrifugace (7 minut a 3800 otáček/min). Různé koncentrace melaminu v mléce byly potom analyzovány pomocí SERS. Ramanův signál testovaného vzorku byl pomocí SERS významně zvýšen. Mez detekce melaminu v mléce na zlatých nanočásticích dosáhl v tomto

experimentu 20 ppm. Prominentní pík, sloužící k detekci melaminu v mléce, se nachází kolem 685 cm^{-1} . SERS spektrum melaminu, získané z extraktu mléka, je na obr. 15.

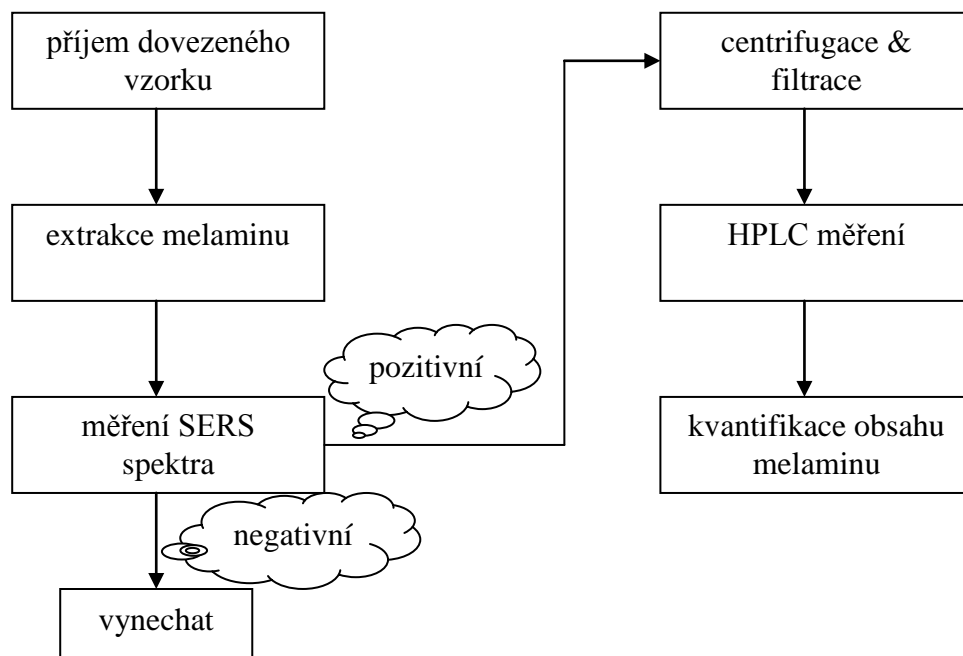


Obr. 15 SERS spektra získaná z extraktu mléka, obsahující různé koncentrace melaminu:

- (a) 100 ppm, (b) 80 ppm, (c) 60 ppm, (d) 40 ppm, (d) 20 ppm, (e) 10 ppm, (f) 2 ppm, (h) 0 ppm¹⁷

Celkový čas analýzy jednoho vzorku u metody SERS je kratší než 30 minut, zatímco analýza vzorku pomocí LC/MS trvá delší dobu. HPLC je analytická metoda, používaná FDA (Food and Drug Administration) pro detekci a kvantifikaci melaminu v potravinách, přičemž limit detekce je 10 ppb.

Kombinace těchto dvou metod (SERS a HPLC) může poskytovat rychlé a cenově výhodné způsoby monitoringu melaminu ve stále větším množství importovaných potravin. Na obr. 16 je znázorněn návrh postupu analýzy.



Obr. 16 Navržený postup pro monitoring melaminu v kontaminovaných potravinách

2.3.1.1.2 Malachitová zeleň a krystalová violet'

Pánové Lili He, Hao Li a jejich kolegové se zabývali ve svém experimentu uskutečnitelností SERS techniky k detekci stopového množství malachitové zeleně, krystalové violeti a jejich směsi v roztoku¹⁸. Struktury těchto látek jsou uvedeny na schématu II a III.

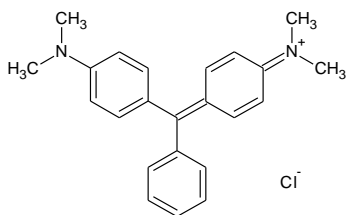


Schéma II malachitová zeleň

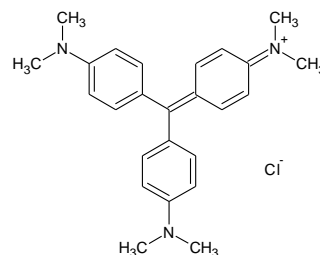
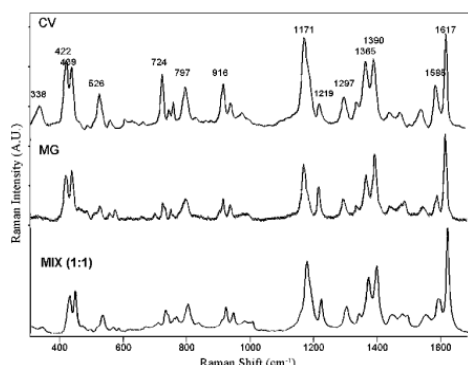


Schéma III krystalová violet'

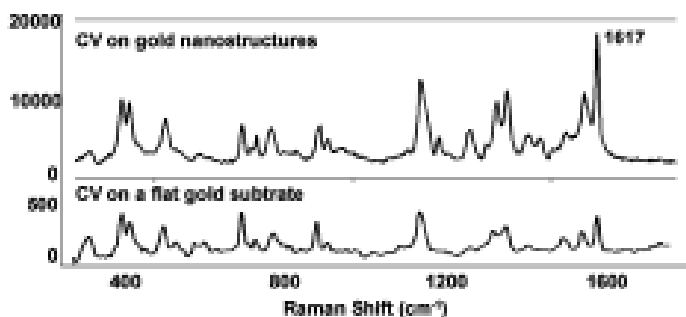
Tyto kontaminanty obsahují hlavně mořské potraviny dovážené do USA, a to z JV Asie, Číny, Mexika a Venezuely. Malachitová zeleň je účinná proti kožním parazitům. Vzhledem k tomu, že přetrvává dlouhou dobu ve vodním prostředí a odtud se může potravním řetězcem dostat i do neošetřených ryb určených ke konzumaci, musí být této látce věnována zvýšená pozornost. Kvůli jejich teratogenním a mutagenním účinkům zavedla pro tyto látky FDA nulovou toleranci. Hlavní metodu, kterou FDA používá pro detekci těchto látek v mořském jídle je LC/MS a limit detekce je 0,25 ppb.

V experimentu byly použity zlaté nanočástice, které měly velikost mezi 30-50 nm. Jako redukční činidlo byl použit citrát sodný. Standardní roztoky malachitové zeleně a krystalové violeti, byly zředěny 50 %ním etanolem. SERS spektra byla proměřena v rozsahu 2000 ppb-0,2 ppb. Na obr. 17 můžeme vidět SERS spektra jednotlivých látek a dole pak jejich směsi.



Obr. 17 SERS spektra 200 ppb malachitové zeleně, krystalové violeti a jejich směsi¹⁸

V další části experimentu bylo porovnáno naměřené SERS spektrum krystalové violeti a normální Ramanovo spektrum krystalové violeti, což znázorňuje obr. 18.



Obr. 18 SERS spektrum 2 ppb krystalové violeti na Au nanočásticích a normální Ramanovo spektrum 2000 ppb krystalové violeti¹⁸

2.3.1.1.3 Sudan-1

V roce 2010 se na univerzitě v Manchesteru zabývala skupina kolem Williama Cheunga možností stanovení Sudanu-1 v čili¹⁹. Struktura této látky je na schématu IV.

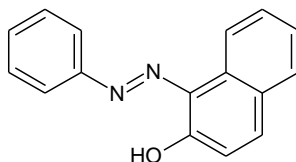
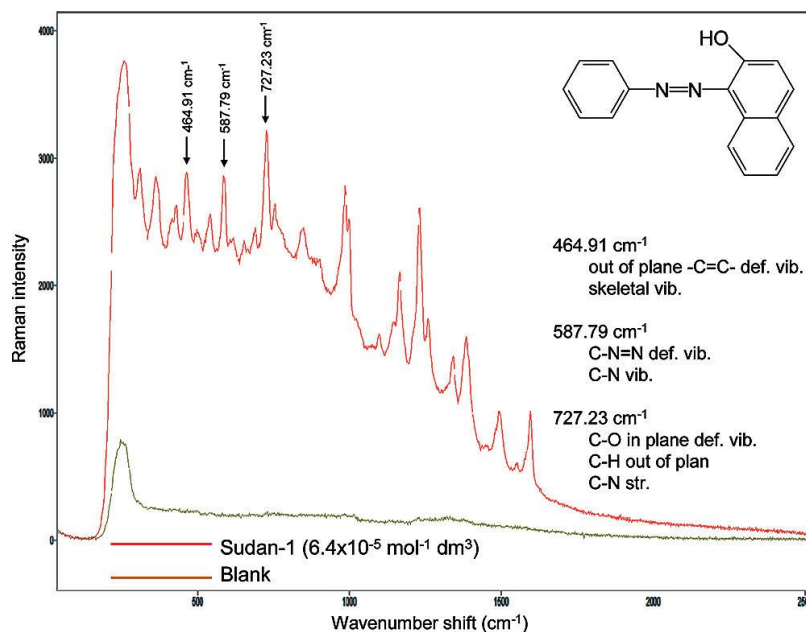


Schéma IV sudan-I

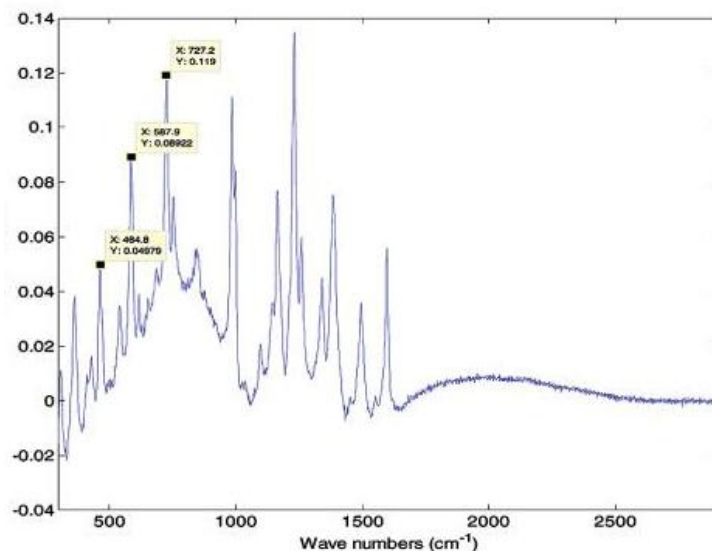
Sudan-1 je oranžově červená azosloučenina. Používá se k barvení potravin. Azobarviva mohou být ovšem karcinogenní a mutagenní. V roce 2003 byla tato látka identifikována v Indii, a to v čili. O dva roky později byl v Číně sudan-1 identifikován v obchodech s rychlým občerstvením. Běžnou metodou pro stanovení je HPLC/MS.

Koloid byl připraven redukcí HAuCl_4 citrátem sodným. Celkové složení roztoku pro SERS měření bylo následující: 1 ml nanočástic zlata, 1 ml deionizované vody, 150 μl roztoku poly (L)-lysinu (0,01%) a 150 μl vzorku. Na Obr. 19 můžeme vidět SERS spektrum sudanu-1.



Obr. 19 SERS spektrum sudanu-1 ($6,4 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$)¹⁹

Následně bylo proměřeno SERS spektrum čili, ve kterém byl sudan-1 naspajkován. Záznam SERS spektra tohoto měření je uveden na obr. 20.



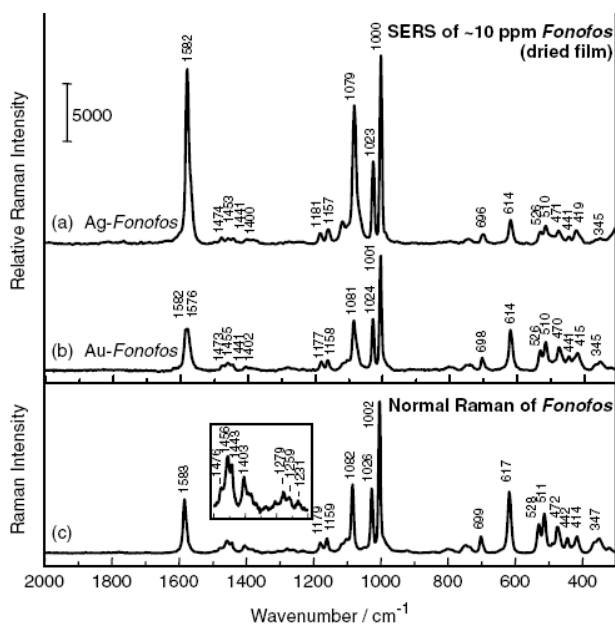
Obr. 20 SERS spektrum získané z naspajkovaného sudanu-1 do čili¹⁹

2.3.1.1.4 Pesticidy

Skupina kolem Jitraporna Vongsvivuta se zabývala metodou SERS ve spojení s pesticidy²⁰. Experiment porovnal míru zesílení SERS spektra na zlatých, stříbrných nanočásticích a Ramanovou spektroskopií.

Organofosfáty inhibují enzym acetylcholinesterázu v nervovém systému. Proto je důležité umět dokázat stopová množství pesticidů v zemědělských produktech. Standardní analytická metoda pro stanovení pesticidů je GC s detekcí pomocí FPD.

Nanočástice stříbra byly připraveny redukcí dusičnanu stříbrného citrátem sodným. Zlaté nanočástice byly připraveny redukcí HAuCl_4 citrátem sodným. Pesticidy byly rozpuštěny v roztoku metanolu. Při experimentu byl použit HeNe laser o vlnové délce 633 nm. Na obr. 21 jsou vidět výsledky experimentu.



Obr. 21 SERS spektra 10 ppm pesticidů, adsorbovaných na Ag, Au nanočásticích v porovnání s normální Ramanovou spektroskopií²⁰

2.3.1.1.5 Ciprofloxacin

Ciprofloxacin je širokospektrální antibiotikum. Proměřit jeho SERS spektrum bylo úkolem Lili He a jeho skupiny spolupracovníků¹². Struktura ciprofloxacinu je uvedena na schématu V.

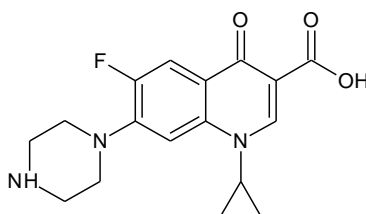
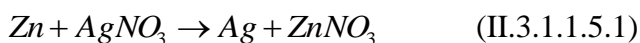
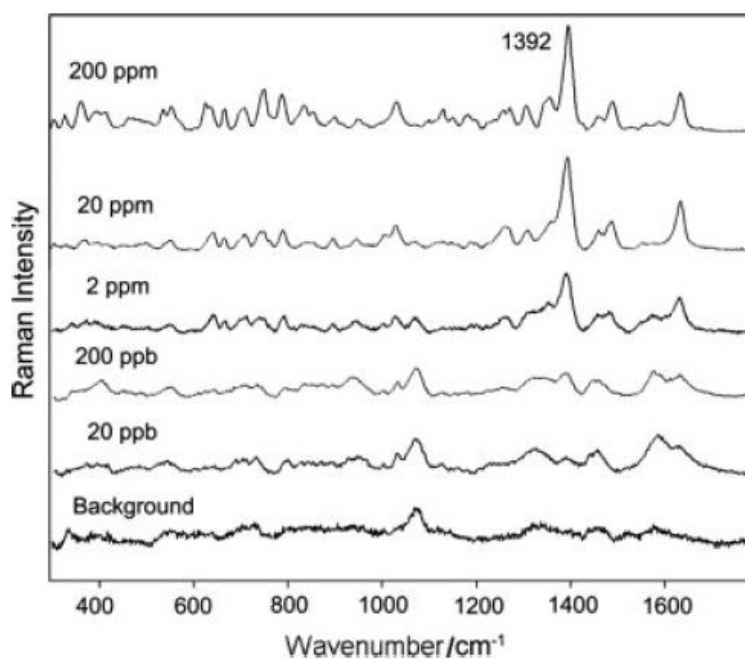


Schéma V ciprofloxacin

Nanostruktury byly připraveny reakcí (II.3.1.1.5.1)



Po promytí 0,02 mol/l HCl bylo vše promyto deionizovanou vodou. Byl připraven zásobní roztok ciprofloxacinu (HCl pH=5) v rozmezí 20 ppb-200 ppm a bylo proměřeno SERS spektrum ciprofloxacinu, což je zobrazeno na obr. 22.

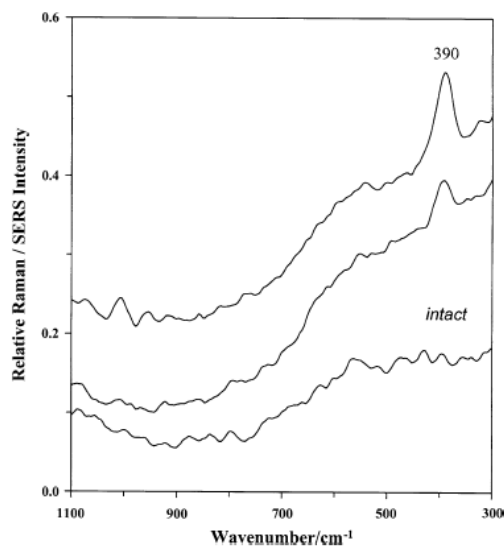


Obr. 22 SERS spektra ciprofloxacinu (20 ppb - 200 ppm)¹²

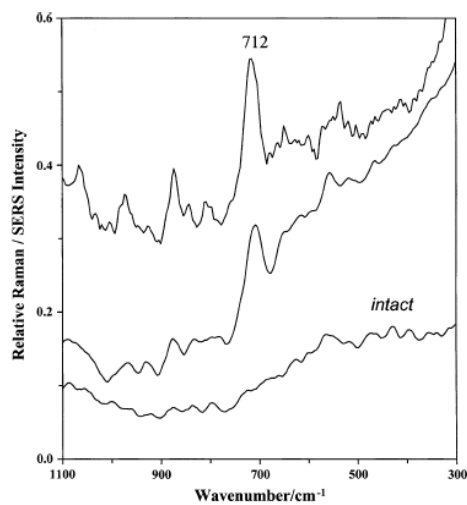
2.3.1.1.6 Bakterie

Několik skupin vědců se snažilo ve svých experimentech získat SERS spektra vybraných bakterií. Jednou z těchto skupin byla i skupina kolem Yonglianga Liu. Výsledky jejich experimentu jsou uvedeny v následujících řádcích²¹.

Stříbrné nanočástice byly připraveny redukcí dusičnanu stříbrného citrátem sodným. Byl použit Nd:YAG laser o vlnové délce 1064 nm. SERS spektrum bylo měřeno po deseti minutách po přidání všech složek do kyvety. Byla proměřena SERS spektra *Listerie* a *Salmonelly* (navíc porovnána s normálními Ramanovými spektry), což zobrazují obr. 23 a 24.



Obr. 23 FT-Raman spektrum a SERS spektrum *Listerie*²¹



Obr. 24 FT-Raman spektrum a SERS spektrum *Salmonelly*²¹

2.3.1.2 Aditiva

Skupina polských vědců kolem Edyty Podstawské se ve svém experimentu zabývala použitím metody SERS pro některé doplňky stravy. Ve svém článku se zaměřili konkrétně na tři látky, a to HMB, kreatin a karnitin²².

2.3.1.2.1 HMB

HMB (hydroxymethylbutyrát) je látka užívaná sportovci k lepší stavbě svalové tkáně (zabránění odbourávání proteinů při fyzické zátěži). Je nezbytná pro syntézu cholesterolu a steroidních hormonů. Nachází se např. v rybím mase, v grepech. Její struktura je uvedena na schématu VI.

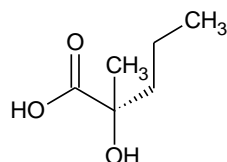
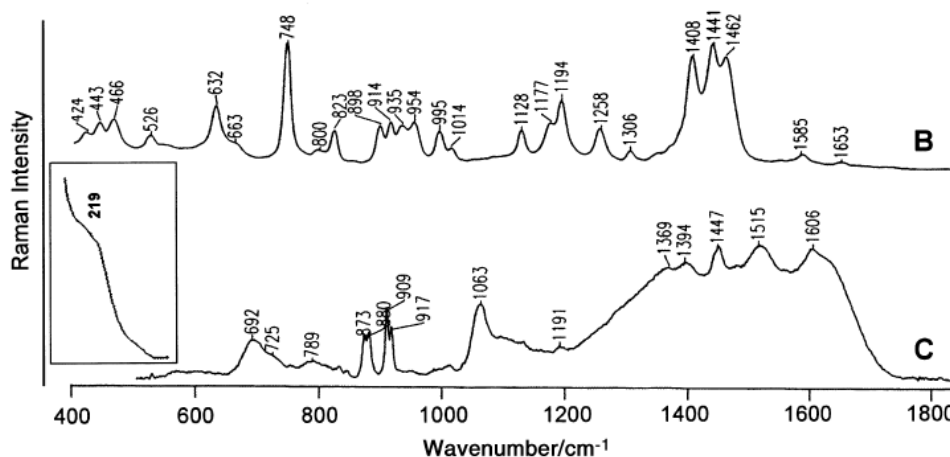


Schéma VI HMB

K výrobě nanočástic byl použit dusičnan stříbrný, který byl redukován NaBH_4 . Pro zesílení SERS signálu byl přidán KCl (10^{-5} M). Výsledek měření můžeme vidět na obr. 25.



Obr. 25 Porovnání normálního Ramanova spektra (b) a SERS spektra HMB (c)²²

2.3.1.2.2 Kreatin

Kreatin se nachází u všech obratlovců. Najdeme ho např. ve svalové tkáni. Jeho zdrojem jsou tedy různé druhy masa. V rostlinách obsažen není²². Začal poutat pozornost sportovní medicíny. Struktura kreatinu je uvedena na schématu VII.

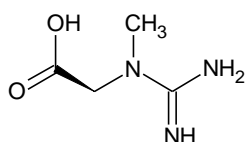
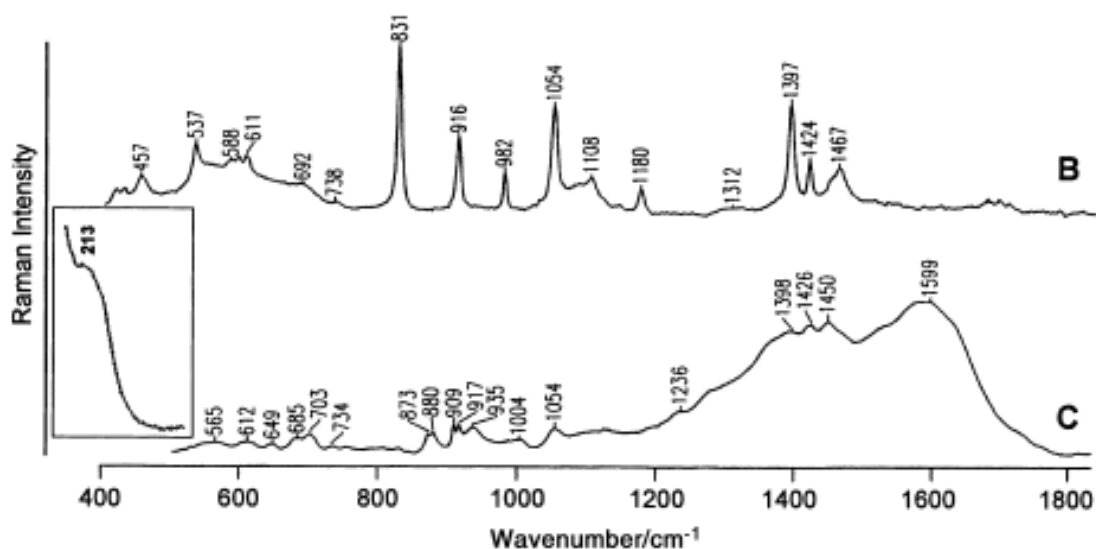


Schéma VII kreatin

K výrobě nanočástic byl použit dusičnan stříbrný, který byl redukován NaBH₄. Pro zesílení SERS signálu byl přidán KCl (10⁻⁵ M). Výsledek měření můžeme vidět na obr. 26.



Obr. 26 Porovnání normálního Ramanova spektra (b) a SERS spektra kreatinu (c)²²

2.3.1.2.3 Karnitin

Karnitin se vyskytuje ve dvou optických izomerech, a to D-karnitin a L-karnitin. L-karnitin se používá jako potravinový doplněk²². Je přirozenou součástí organismu. Důležitá látka při spalování tuků. Struktura karnitinu je uvedena na schématu VIII.

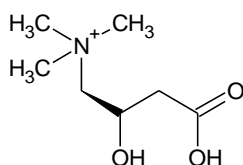
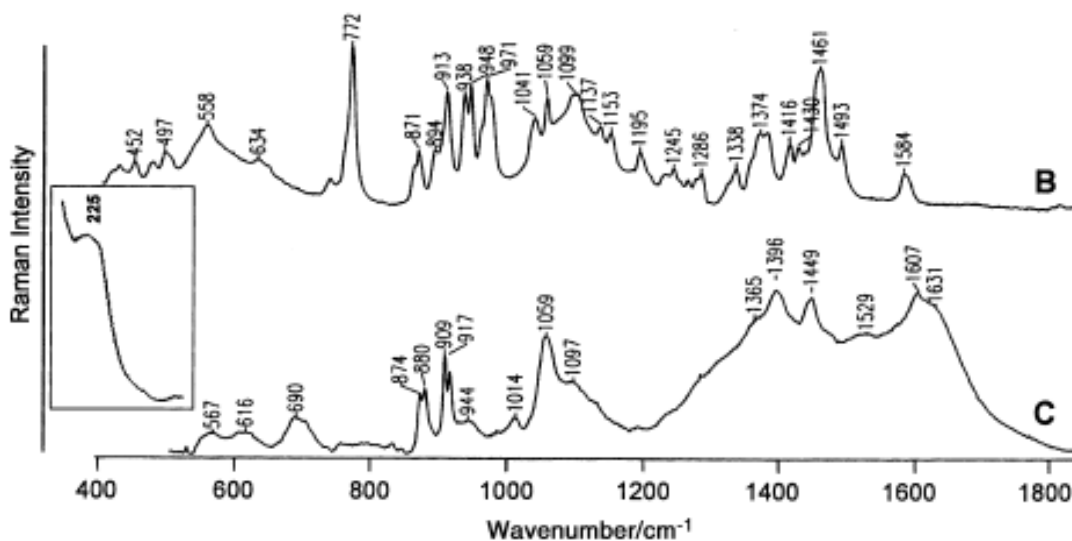


Schéma VIII karnitin

K výrobě nanočástic byl použit dusičnan stříbrný, který byl redukován NaBH_4 . Pro zesílení SERS signálu byl přidán KCl (10^{-5} M). Výsledek měření můžeme vidět na obr. 27.



Obr. 27 Porovnání normálního Ramanova spektra (b) a SERS spektra karnitinu (c)²²

2.3.1.2.4 Tartrazin

V roce 2005 uskutečnila skupina kolem I. Pavla experiment o využití SERSu pro tartrazin (E 102)⁶.

Tartrazin je dalším barvivem, patřícím mezi azobarviva. Nedávné studie ukázaly, že E 102 je zodpovědný za alergické reakce, včetně migrén. Není vhodný pro děti, protože se navíc může podílet na hyperaktivitě. Struktura tartrazinu je uvedena na schématu IX.

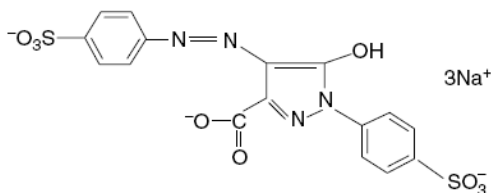
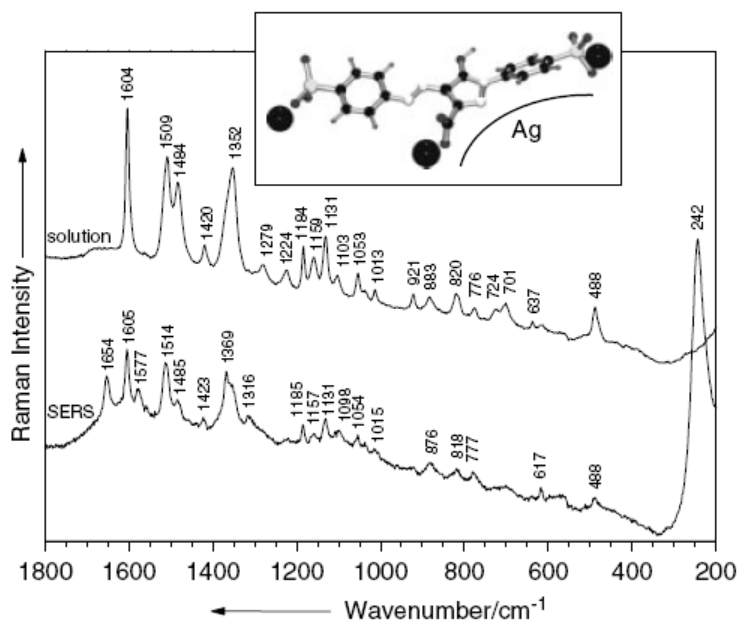


Schéma IX tartrazin

Ve vlastním experimentu bylo proměřeno pouze SERS spektrum E 102 ve vodném roztoku. Byly použity stříbrné nanočástice (po redukci citrátem sodným). Ke zvýšení iontové síly byl před měřením k roztoku přidán chlorid sodný. Při měření byl použit laser Nd:YAG o vlnové délce 1064 nm. Na obr. 28 už je vidět záznam SERS spektra tartrazinu v porovnání se záznamem z běžné Ramanovy spektroskopie.

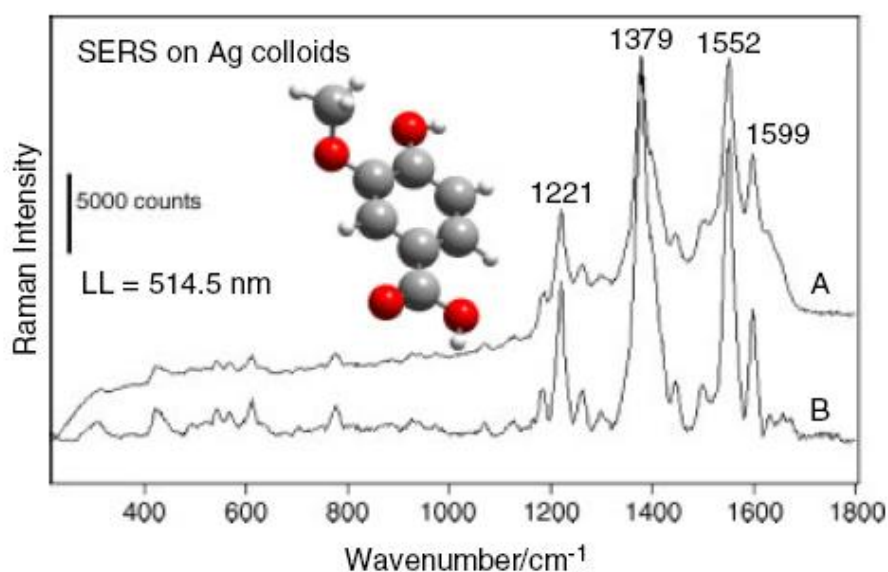


Obr. 28 Porovnání Ramanova a SERS spektra tartrazinu (10^{-6} mo/l)⁶

2.3.1.2.5 Kyselina vanilová

Kyselina vanilová je přírodní kyselina, nacházející se např. v rýži. Patří mezi fenolické kyseliny. V experimentu E. Clavija a jeho skupiny, bylo proměřeno SERS spektrum čisté kyseliny vanilové²³.

Stříbrné nanočástice byly připraveny redukcí dusičnanu stříbrného citrátem sodným. Vlnová délka laseru použitého k excitaci byla 514,5 nm. Na obr. 29 je SERS spektrum kyseliny vanilové.



Obr. 29 SERS spektrum kyseliny vanilové na Ag nanočásticích (A) spektrum bez úprav (B) po korekci základní linie²³

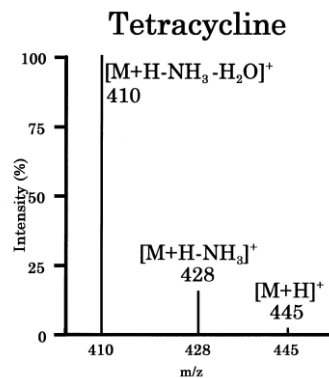
2.4 Stanovení antibiotik v medu

O stanovení antibiotik (tetracyklinu, streptomycinu a chloramfenikolu) v medu bylo publikováno mnoho článků. Separace je založena hlavně na HPLC a liší se detektorem. Využití našla i kapilární elektroforéza.

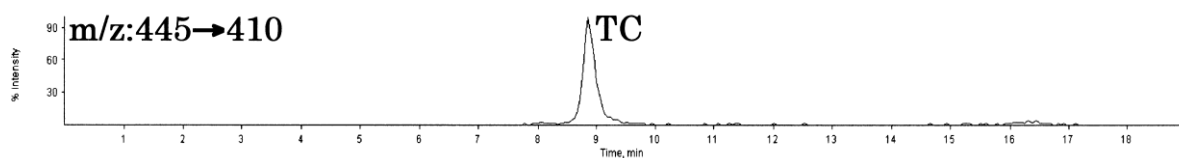
2.4.1 Stanovení tetracyklinu

Hiroyuki Nakazava a jeho kolegové se ve své práci zabývali možností stanovení **tetracyklinových** (TC) antibiotik ve stravě pomocí **HPLC-MS/MS s využitím APCI** (chemická ionizace za atmosférického tlaku)²⁴.

5 g vzorku bylo extrahováno 20 ml 0,1 M Na₂EDTA v mírně kyselém prostředí (pH=4). Jako mobilní fáze byla použita směs metanol - acetonitril - 5 mM, roztok kyseliny šřavelové (18:27:55,v/v/v). Separace probíhala na koloně C8. Vnitřním standardem byl demeclocyklin.. Recovery tetracyklinu v medu dosahuje podle autorů přes 70%. Na obr. 30 je uvedeno MS spektrum standardu tetracyklinu. Na obr. 31 můžeme vidět výsledek separace standardu tetracyklinu za daných podmínek, kde byl sledován SIM (selected ion monitoring) přechod, charakteristický pro TC.

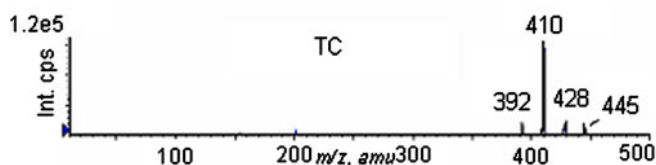


Obr. 30 APCI tandemová hmotnostní spektrometrie standardu tetracyklinu²⁴

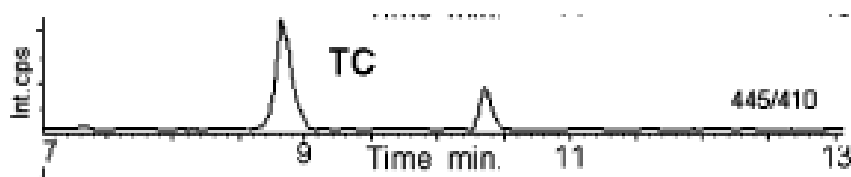


Obr. 31 standard tetracyklinu, APCI LC-MS/MS²⁴

L. Giannetti a jeho kolegové se zabývali stanovením tetracyklinu v medu metodou **LC-MS/MS s využitím ionizace elektrosprejem**²⁵. Tetracyklin z medu byl extrahován octanem amonným. Separace byla provedena na fenylové koloně. Mobilní fáze byla složena z cetonitrilu, metanolu, vody a kyseliny mravenčí. Recovery tohoto postupu uvádějí autoři ve svém článku přes 80%. Na obr.32 můžeme vidět MS spektrum tetracyklinu po ionizaci elektrosprejem a na obr. 33 je uvedena separace tetracyklinu v medu za výše uvedených podmínek.

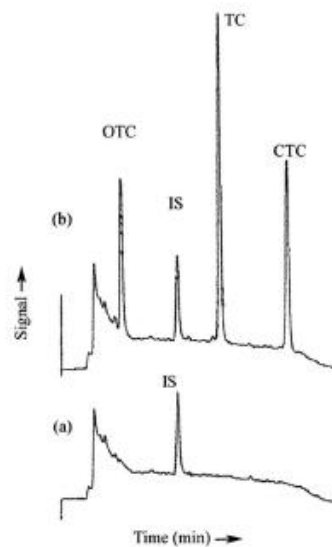


Obr.32 MS spektrum tetracyklinu, ionizace elektrosprejem (pozitivní mód)²⁵



Obr.33 Tetracyklin v medu²⁵

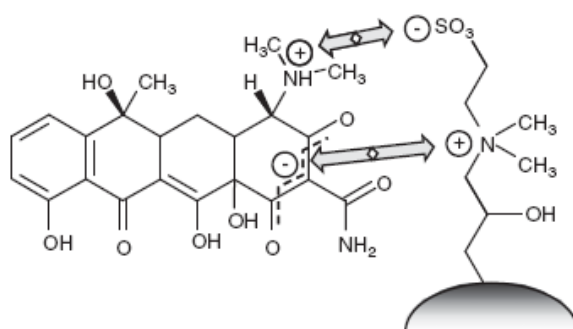
Gustavo Tayar Peres a kolegové se zabývali stanovením tetracyklinu v medu s využitím **HPLC s fluorescenční detekcí**²⁶. Separace byla provedena na koloně C8. Mobilní fáze byla připravena z vodného roztoku A a organické fáze B. Mobilní fáze A, obsahovala vodný roztok acetátu sodného dihydrátu, chloridu vápenatého dihydrátu a Na₂EDTA. Hodnota pH byla upravena na 6,5, a to hydroxidem sodným. Mobilní fáze B byla složena ze směsi metanol : voda (95:5 v/v). Limit detekce se pohyboval v $\mu\text{g/kg}$. Na obr. 34 už můžeme vidět výsledný záznam po separaci.



Obr.34

- a) blank vzorku medu, obsahující 200 μg /kg deoxycyklinu (IS) vnitřní standard
 b) vzorek medu, naspajkovaný 200 μg /kg antibiotiky²⁶

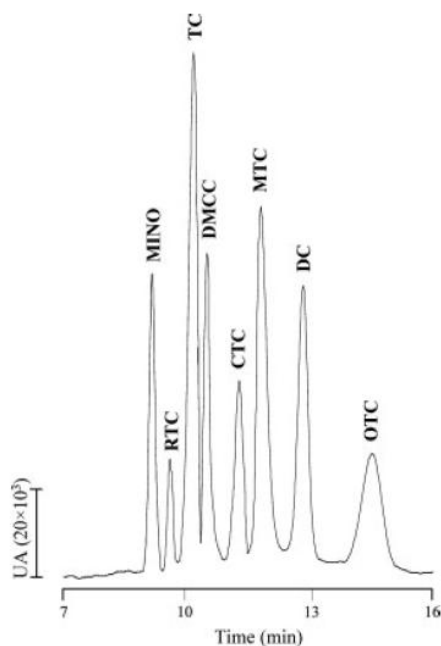
Tomoyasu Tsukamoto a jeho kolegové se zabývali použitím nového polymeru **jako SPE sorbentu**, a to konkrétně sulfobetainu²⁷. Studovali selektivní interakci Sulfobetainu s tetracyklinem. Z jejich závěrů vyplývá, že sulfobetain lze použít jako SPE sorbent pro stanovení tetracyklinu, protože recovery se pohybovalo přes 70%. Na obr. 35 je znázorněna interakce mezi sulfobetainem a tetracyklinem.



Obr.35 Intermolekulární interakce funkčních skupin tetracyklinu a sulfobetainu²⁷

Silvia Fasádo-Terrones a kolegové se zabývali stanovením **tetracyklinových** antibiotik v medu za použití **kapilární elektroforézy** s UV detekcí²⁸.

Vzorek medu (20 g) byl rozpuštěn v 30 ml 0,1 M Na₂EDTA v mírně kyselém prostředí (pH 4). Byl přečištěn na kolonce SPE C18. Bylo pracováno v prostředí 150 mM boritanu sodného (pH 9,8), 2,5% 2-propanolu a napětí bylo 25 kV. Výsledek separace můžeme vidět na obr. 36.

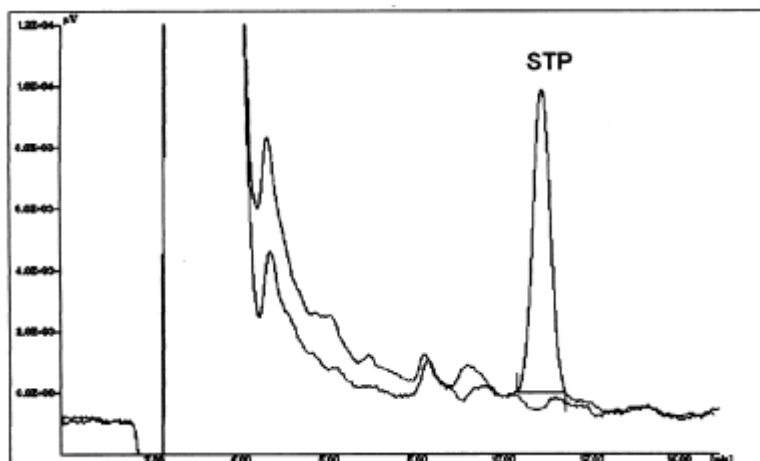


Obr.36 CZE směsi osmi tetracyklinových antibiotik (100 mg/l), UV při 360 nm.²⁸

2.4.2 Stanovení streptomycinu

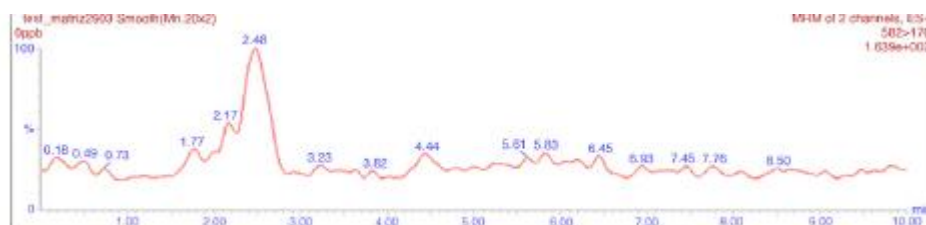
P. Edder a jeho kolegové vypracovali metodu na stanovení streptomycinu v medu s využitím **HPLC s deprivatizací za kolonou a fluorometrickou detekcí**²⁹.

Med byl extrahován kyselinou chloristou. Extrakt byl čištěn pomocí SPE. V prvním kroku s kationtově výměnnou patronou (kyselina sulfonová) a ve druhém kroku s oktadecylovou patronou. Autoři uvádějí recovery kolem 80%. LOD pro streptomycin v medu touto metodou dosahuje hodnoty 0,005 (mg/kg) a LOQ 0,01 (mg/kg). Na obr. 37 můžeme vidět výsledek.

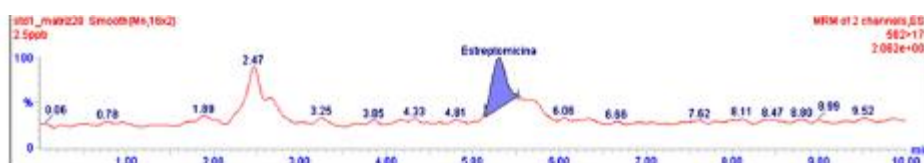


Obr.37 Do medu naspajkováno 100 mikrogramů/kg.²⁹

Rodrigo H.M.M. Granja a jeho kolegové se ve své práci zabývali stanovením streptomycinu v medu metodou **LC-MS/MS**³⁰. Separace byla prováděna na koloně C18. Mobilní fáze byla složena ze směsi 5mM heptafluormáselné kyselina - acetonitrilu (85:15). K ionizaci byl použit **elektrosprej**. Autoři uvádějí recovery kolem 90 %. Detekční limit této metody se pohybuje v jednotkách $\mu\text{g}/\text{kg}$. Na obr. 38 můžeme vidět chromatogram medu (blank) a na obr. 39 je ukázán chromatogram streptomycinu v medu.



Obr.38 Chromatogram vzorku medu (blank).³⁰



Obr.39 Chromatogram streptomycinu 2,5 mikrogram/kg.³⁰

2.4.3 Stanovení chloramfenikolu

Brian Boyd a jeho kolegové se zabývali stanovením **chloramfenikolu** pomocí molekulárně vtištěného polymeru (MIP) s využitím LC-MS/MS³¹.

Do kádinky bylo k 1 g medu přidáno 1 ml vody. Tento roztok medu byl zahříván na vodní lázni při teplotě 45 °C, a to po dobu 5-ti minut. Potom bylo do rozpuštěného medu přidáno 5 ml acetonitrilu. Následovala centrifugace. Supernatant byl smíchán s 5 ml chloroformu. Organická fáze byla odpařena. Nakonec bylo přidáno 100 µl 30% acetonitrilu v 10 mM octanu amonném (pH=6,7). Na kolonu byl dávkován objem 20 µl.

3. Experimentální část

3.1 Aparatura

Experimenty byly prováděny na **FT-Raman Nicolet 6700** (Thermo Electron; U.S.A.), který je zobrazen na obr. 40. Přístroj je vybaven **germaniovým detektorem**, který musí být chlazen kapalným dusíkem. Dalším **detektorem** je **InGaAs**, který nemusí být chlazen.

Nd:YAG laser pracuje s vlnovou délkou 1064 nm. Při vlastním experimentu byla nastavena síla laseru na 300 mW (šířka štěrbin 150, počet scanů 256). Ke kalibraci přístroje byl použit polystyren.



Obr. 40 FT-Raman Nicolet 6700

3.2 Chemikálie

Adenin p.a., xantin p.a., hypoxantin p.a., citrát sodný p.a., glukóza p.a., galaktóza p.a. a maltóza p.a. byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich. Dusičnan stříbrný p.a., kyselina chlorovodíková (36%), hydroxid amonný p.a., triethylamin p.a., byly zakoupeny ve firmě Fluka. Použitá voda byla získána z deionizátoru Mili-Q s konduktivitou menší než 18 μS . Tetracyklin, streptomycin, chloramfenikol byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich. Vzorkem byl med luční od společnosti PaMaP s.r.o.

3.3 Příprava standardních roztoků

Byly připraveny standardní roztoky xantinu, hypoxantinu a adeninu. Pro všechny tři standardní látky byly připraveny zásobní roztoky (100 ml baňka, $c = 1 \cdot 10^{-4}$), z nichž byly metodou postupného zředování (deionizovanou vodou) připraveny standardní roztoky v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-14}$ mol/l, a to do eppendorfek (1ml). Stejným způsobem byly připraveny standardní roztoky streptomycinu, tetracyklinu a chloramfenikolu.

3.4 Příprava nanočástic

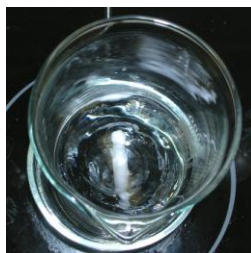
Nanočástice stříbra byly připraveny použitím modifikované metody, popsané Panáčkem, Soukupovou a dalšími³². Tato metoda je založena na redukci stříbrné soli (dusičnan stříbrný) vybraným redukčním činidlem (citrát sodný, redukující cukry) v bazickém prostředí.

3.4.1 Redukcí citrátem sodným

Bylo pracováno na vodní lázni a pod zpětným chladičem. Do aparatury bylo nejprve odměřeno 100 ml deionizované vody a následně byl přidán roztok dusičnanu stříbrného (150 mg/50 ml). Bylo spuštěno magnetické míchadlo a roztok byl vytemperován na teplotu 80 °C. Až byl roztok vytemperován na požadovanou teplotu, bylo přidáno 500 µl vodného roztoku amoniaku a 500 µl triethylaminu. Vše bylo vařeno na vodní lázni po dobu 45 minut. Po této době byl po kapkách přidáván roztok citrátu sodného (400 mg/50 ml). Vlivem vznikajících nanočástic stříbra docházelo k zakalování roztoku.

3.4.2 Redukcí glukózou

Při přípravě těchto nanočástic bylo rovněž pracováno na vodní lázni. Do kádinky bylo nalito 100 ml deionizované vody. Dále byl přidán roztok dusičnanu stříbrného (80 mg/50 ml) a bylo zapnuto magnetické míchadlo, což můžeme vidět na obr. 41.



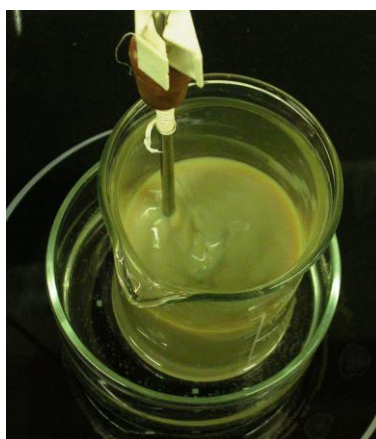
Obr. 41 Roztok deionizované vody a dusičnanu stříbrného

Roztok byl vytemperován na teplotu 35°C. Potom bylo přidáno 200 μ l vodného roztoku amoniaku, 400 μ l triethylaminu a vše bylo ponecháno při daných podmínkách 10 minut. Díky vznikajícímu komplexu byla změněna barva roztoku dohněda, což lze vidět na obr. 42.



Obr. 42 Roztok deionizované vody a dusičnanu stříbrného po přidání 200 μ l vodného roztoku amoniaku a 400 μ l triethylaminu

Po deseti minutách byl do soustavy přidáván roztok glukózy (1 g/50 ml), čímž začaly být v roztoku tvořeny nanočástice. Vznikající nanočástice lze vidět obr. 43.

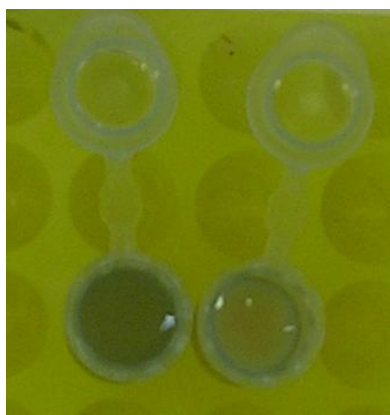


Obr. 43 Vznikající nanočástice po přidávání roztoku glukózy do soustavy

Stejným způsobem byly připraveny maltózové nanočástice. K vyredukování stříbra byl použit roztok maltózy (1 g/50 ml).

3.5 Příprava pracovního roztoku

Při přípravě pracovního roztoku bylo pipetováno do eppendorfky (1,5 ml) nejdříve 200 μl stříbrných nanočástic (celková koncentrace dosáhla 60 ppm). Potom bylo přidáno 690 μl deionizované vody, což lze vidět na Obr. 44 vpravo. Následně bylo přidáno 100 μl roztoku chloridu sodného (3 mol/l), čímž byla zvýšena iontová síla a došlo k relkrystalizaci koloidu. Následkem byla změna barvy roztoku, obr. 44 vlevo. Nakonec bylo přidáno 10 μl analytu požadované koncentrace. Potom byla eppendorfka uzavřena. Nebylo s ní třepáno, nýbrž byla 5krát převrácena a dána do stojanu na eppendorfky. Měření bylo prováděno hned po přípravě pracovního roztoku.



Obr.44 Roztok 200 μl stříbrných nanočástic a 690 μl deionizované vody (vpravo), po přidání 100 μl roztoku chloridu sodného (vlevo)

3.6 Příprava vzorku medu k měření

postup E₁

Vzorek medu 5 g byl rozpuštěn v kádince na vodní lázni. Do eppendorfky (1,5 ml) bylo nejprve pipetováno 200 μ l stříbrných nanočástic. Dále bylo přidáno 690 μ l deionizované vody a 100 μ l roztoku chloridu sodného (3 mol/l). Nakonec bylo pipetou přidáno 10 μ l vzorku medu, který byl mezitím rozpuštěn na vodní lázni. SERS spektrum medu můžeme vidět na obr. 57 A.

3.7 Příprava vybraných antibiotik k měření

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky těchto antibiotik. Tetracyklin se v bazickém prostředí po určité době rozkládá (ze žluté barvy přejde do oranžové), proto byl tetracyklin rozpuštěn v mírně kyselém prostředí kyseliny mravenčí (0,2 %). Oproti tomu byl streptomycin dobře rozpustný v mírně bazickém prostředí vodného roztoku amoniaku (0,2 %). Chloramfenikol byl rozpuštěn v metanolu. Rozpouštění všech látek bylo prováděno v ultrazvukové lázni.

postup E₂

Do eppendorfky (1,5 ml) bylo nejprve pipetováno 200 μ l stříbrných nanočástic (celková koncentrace 60 ppm). Dále bylo přidáno 690 μ l deionizované vody a 100 μ l roztoku chloridu sodného (3 mol/l). Nakonec bylo pipetou přidáno 10 μ l zásobního roztoku streptomycinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l a bylo proměřeno SERS spektrum této látky, jehož SERS spektrum lze vidět na obr. 58 A.

Stejným způsobem byl připraven pracovní roztok pro změření SERS spektra tetracyklinu, které můžeme vidět na obr. 58 B.

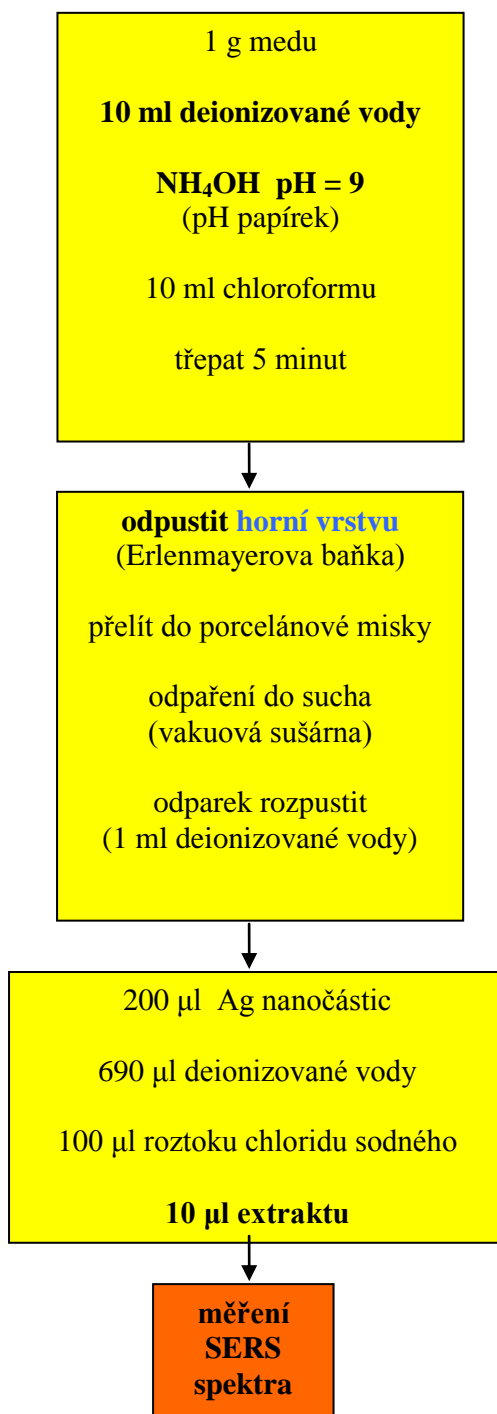
3.8 Extrakční postupy

3.8.1 Extrakce z bazického prostředí - horní vrstva

Extrakt med – horní vodná vrstva
(bazické prostředí)

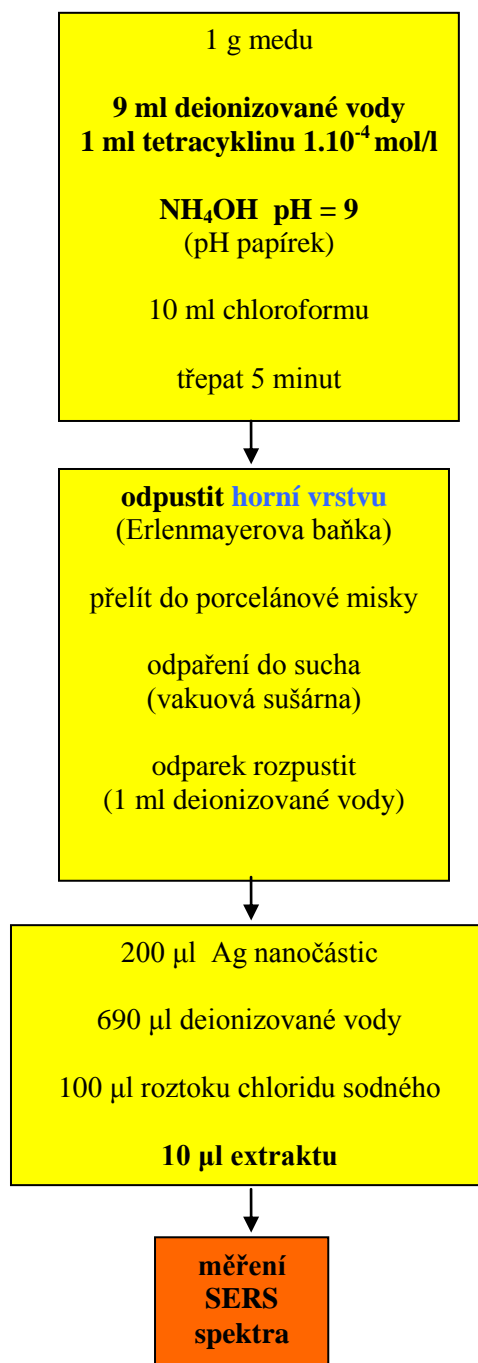
Obr. 59 a

postup E₃



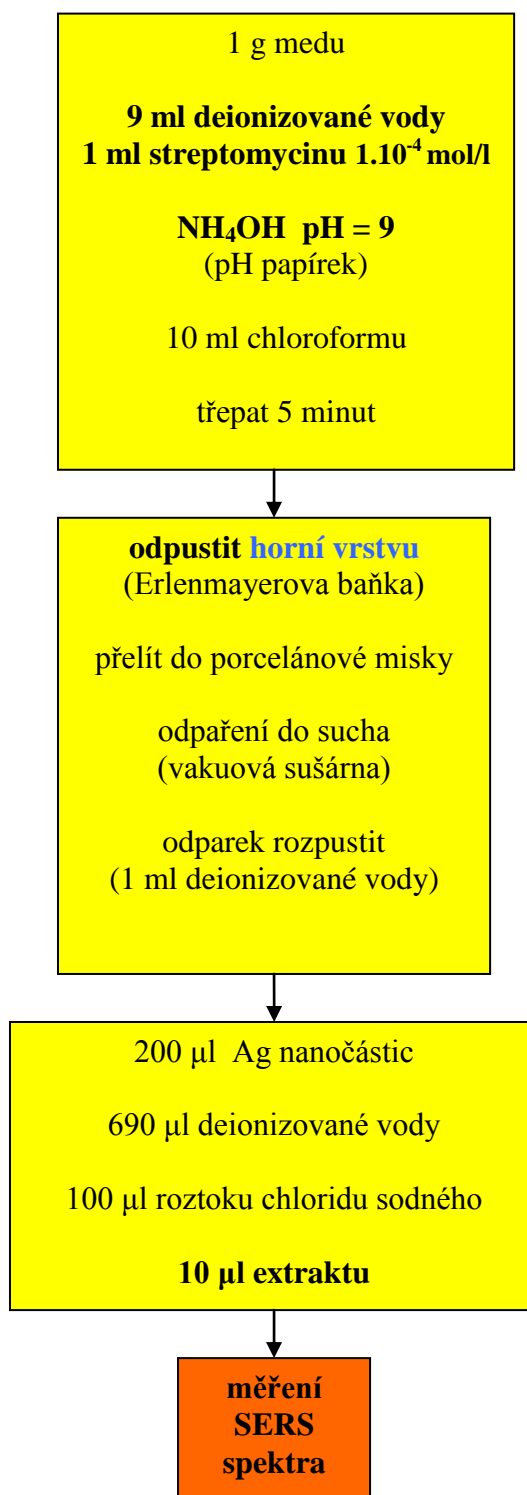
Extrakt med + tetracyklin – horní vodná vrstva
(bazické prostředí) **Obr. 59 b**

postup E₄



Extrakt med + streptomycin – horní vodná vrstva
(bazické prostředí) **Obr. 59 c**

postup E₅

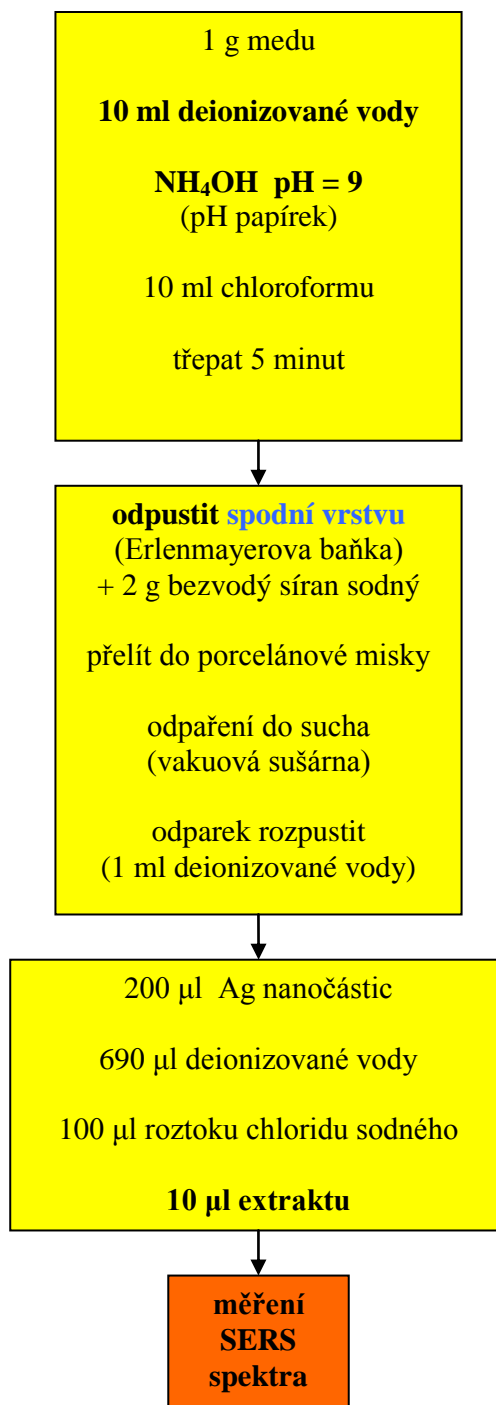


3.8.2 Extrakce z bazického prostředí - spodní vrstva

Extrakt med – spodní chloroformová vrstva
(bazické prostředí)

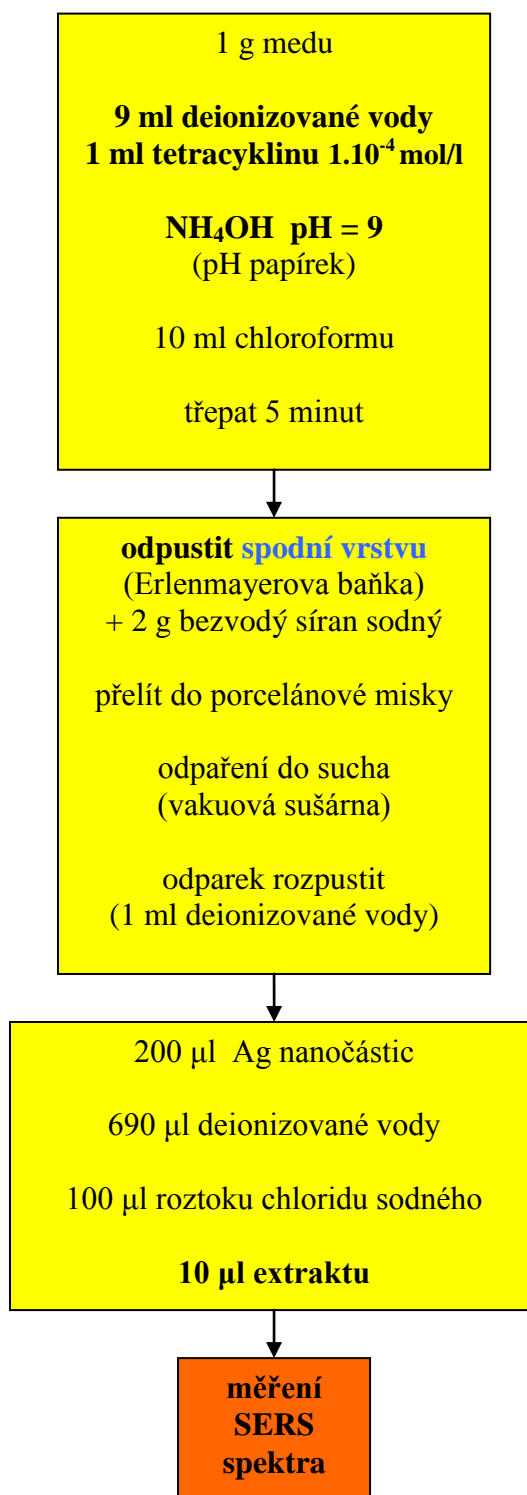
Obr. 60 a

postup E₆



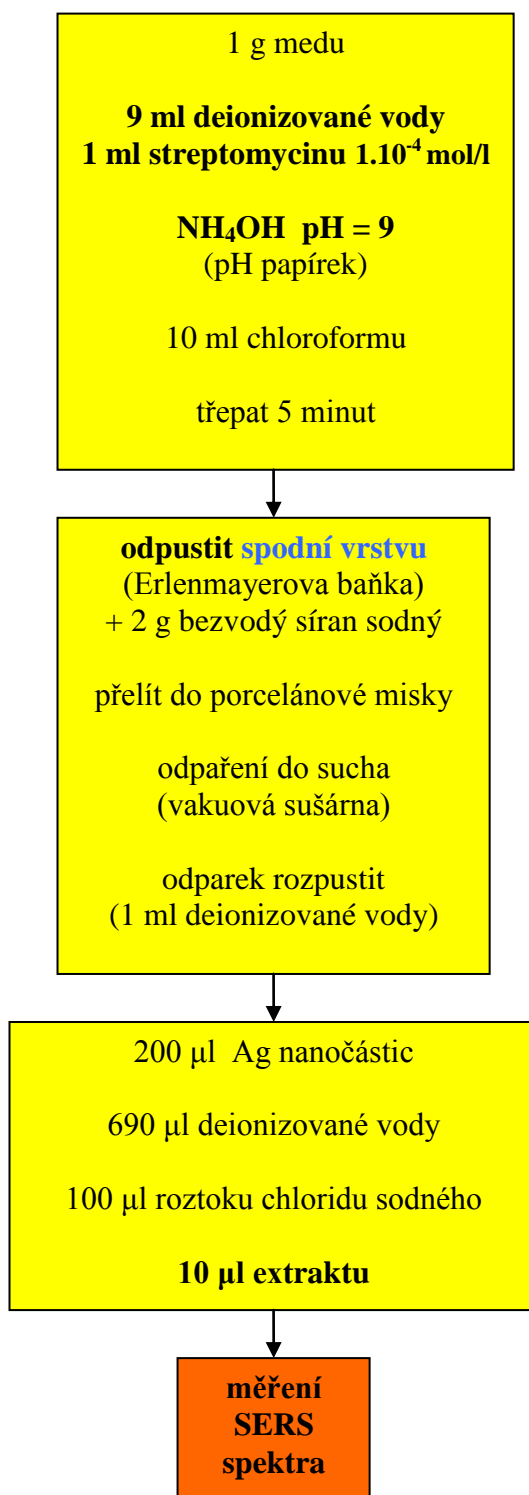
Extrakt med + tetracyklin – spodní chloroformová vrstva
(bazické prostředí) **Obr. 60 b**

postup E₇



Extrakt med + streptomycin – spodní chloroformová vrstva
(bazické prostředí) **Obr. 60 c**

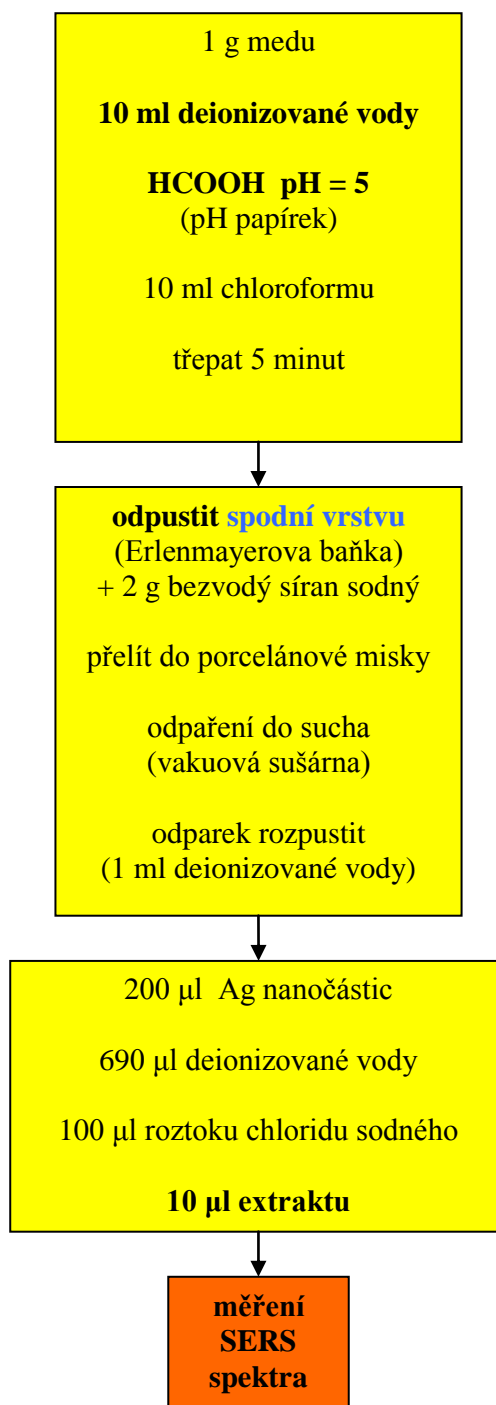
postup E₈



3.8.3 Extrakce z kyselého prostředí - spodní vrstva

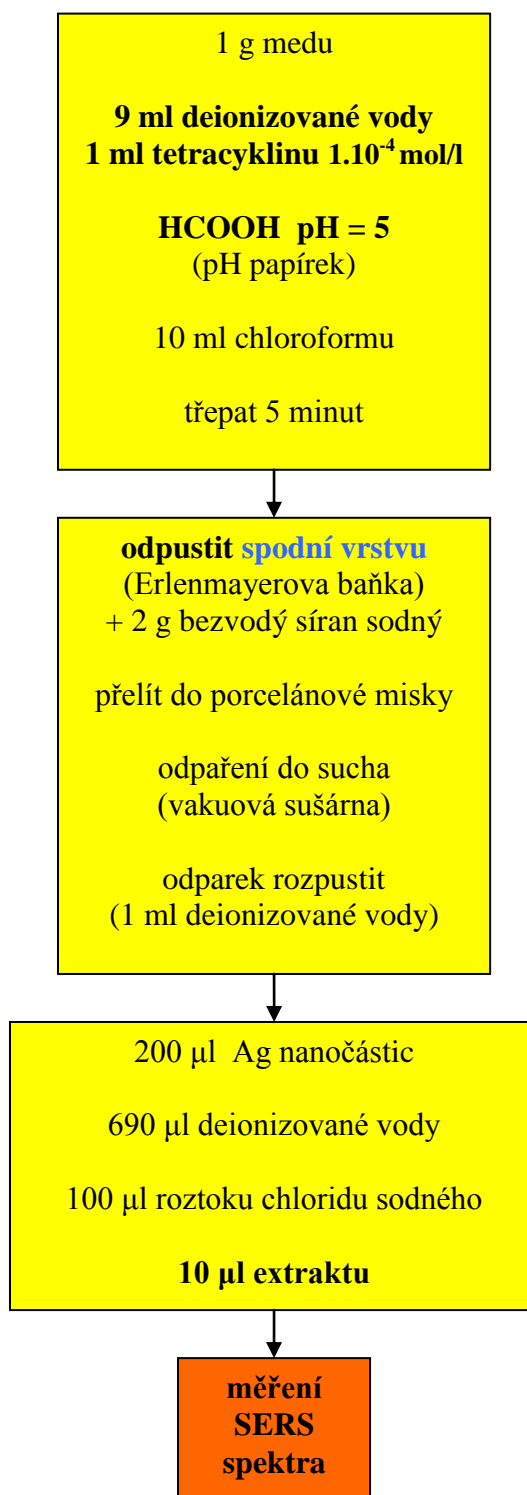
Extrakt med – spodní chloroformová vrstva
(kyselé prostředí) **Obr. 61 a**

postup E₉



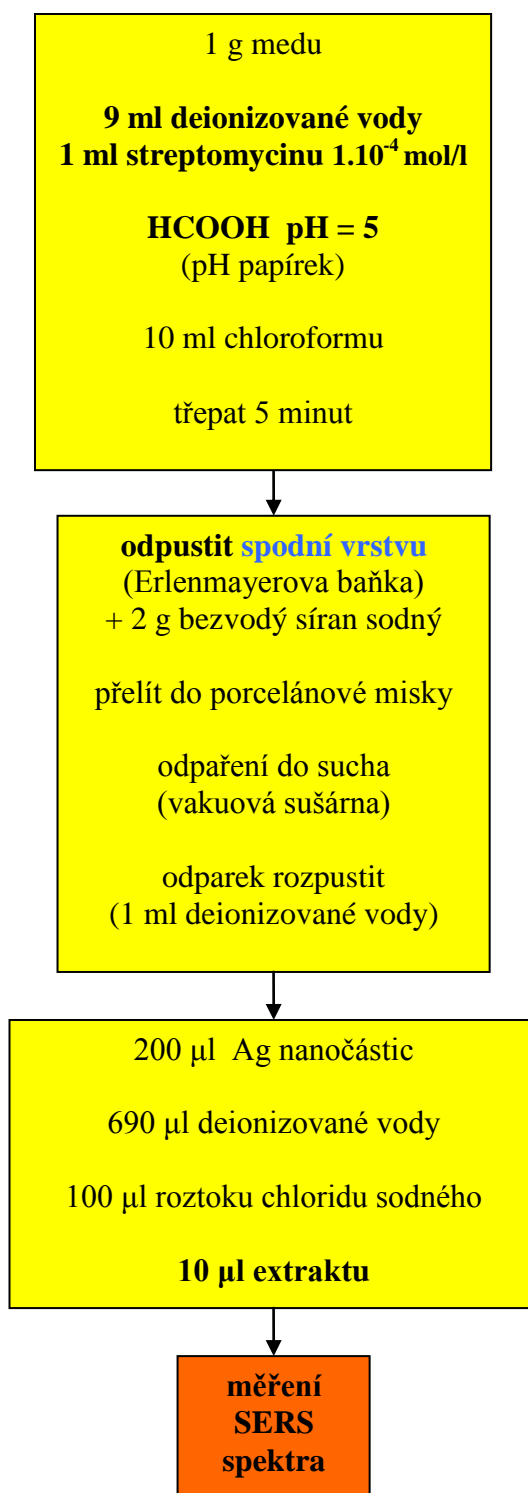
Extrakt med + tetracyklin – spodní chloroformová vrstva
(kyselé prostředí) **Obr. 61 b**

postup E₁₀



Extrakt med + streptomycin – spodní chloroformová vrstva
(kyselé prostředí) **Obr. 61 C**

postup E₁₁

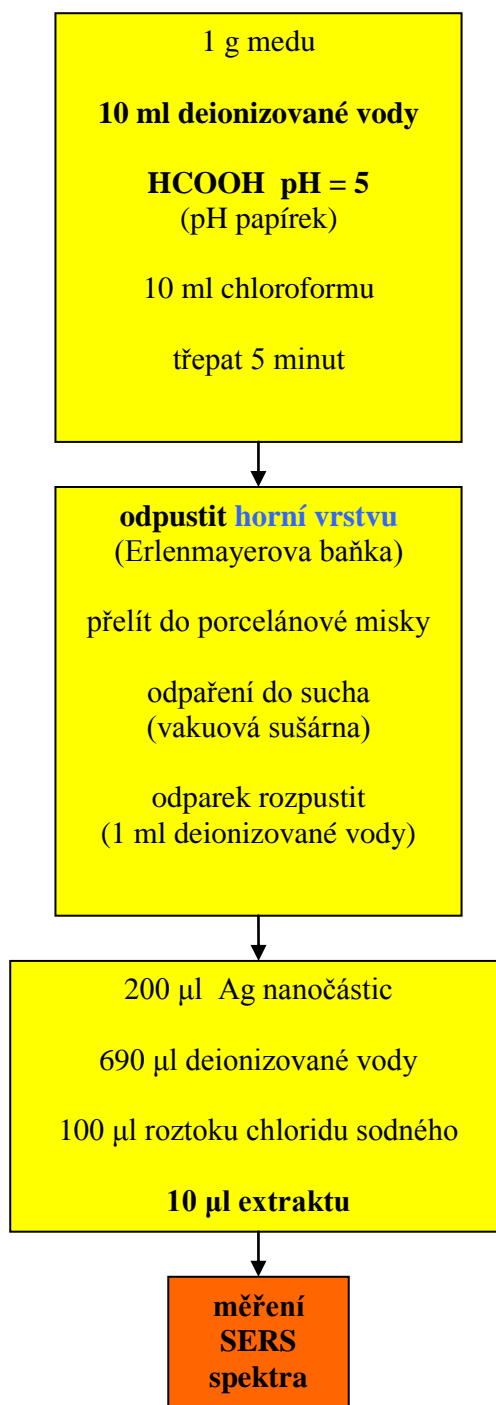


3.8.4 Extrakce z kyselého prostředí - horní vrstva

Extrakt med – horní vodná vrstva
(kyselé prostředí)

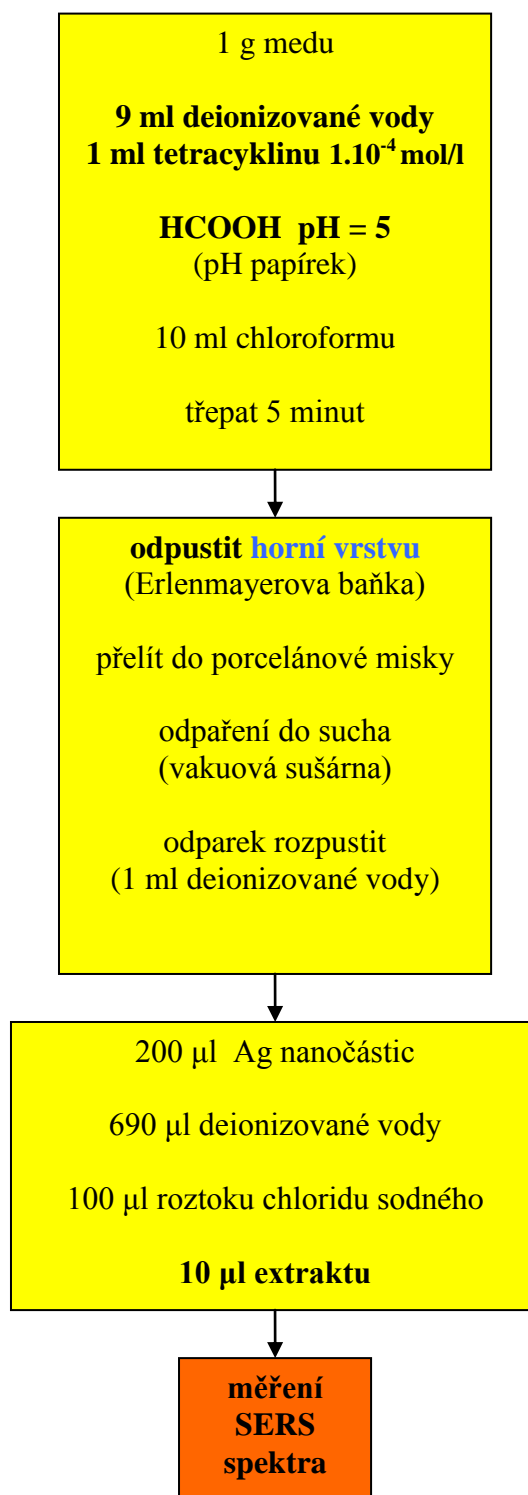
Obr. 62 a

postup E₁₂



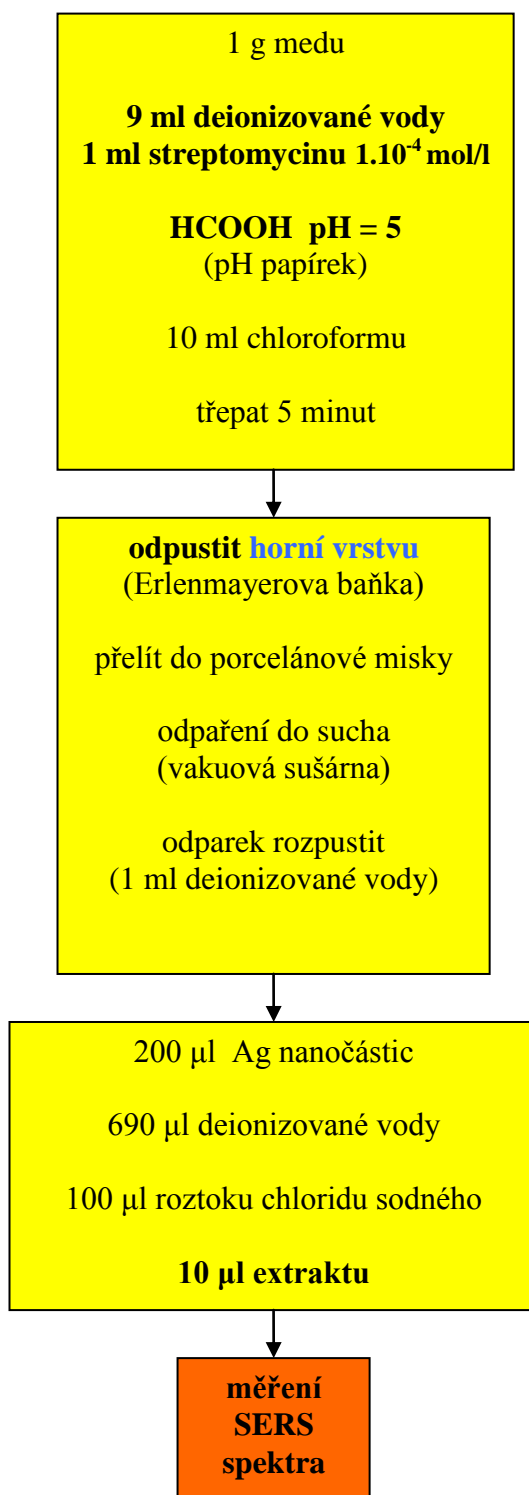
Extrakt med + tetracyklin – horní vodná vrstva
(kyselé prostředí) **Obr. 62 b**

postup E₁₃



Extrakt med + streptomycin – horní vodná vrstva
(kyselé prostředí) **Obr. 62 c**

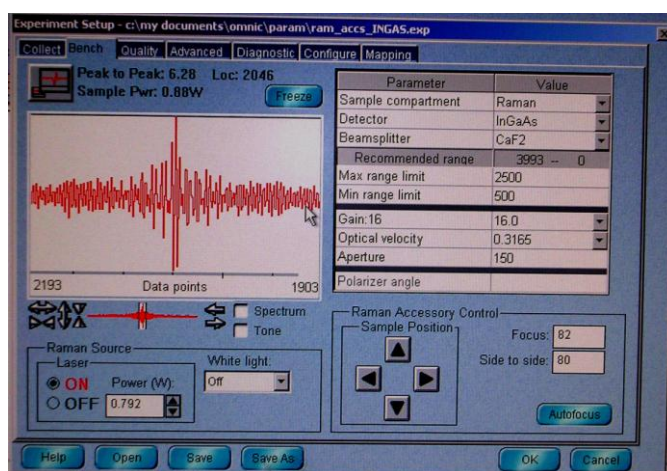
postup E₁₄



3.9 Měření a možné komplikace

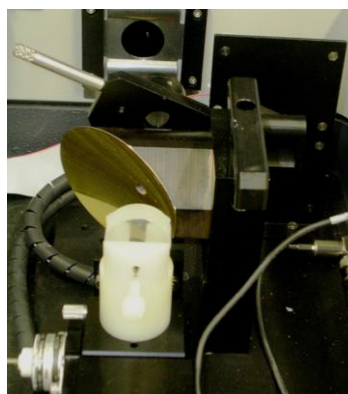
3.9.1 Nastavení přístroje před měřením

Při experimentu bylo pracováno s programem OMNIC. V ikoně **Exp Set** byly upravovány podmínky měření. Po otevření ikony Exp Set byly parametry nastavovány v její části **Collect**. Byl nastaven počet scanů (256). V ikoně **Exp Set** bylo dále kliknuto na ikonu Bench. Parametry, které mohou být měněny v této ikoně můžeme vidět na obr. 45.



Obr. 45 Okno Bench

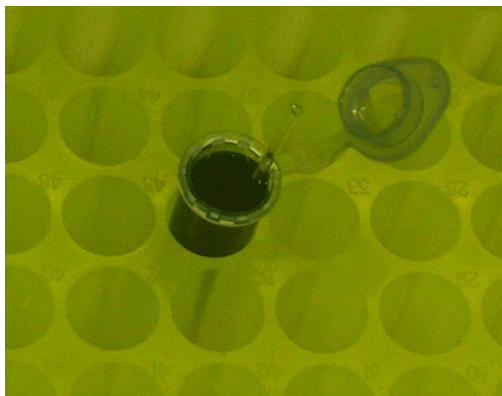
V tomto okně byl zapnut laser. Dále byla provedena kalibrace signálu (na polystyren). Polystyren vložený do přístroje je ukázán na obr.46. Správný záznam signálu, který by měl přístroj při kalibraci ukazovat, lze vidět na obr. 45 vlevo nahoře.



Obr. 46 Polystyren, upevněný v nástavci a připraven ke kalibraci přístroje

3.9.2 Měření

Jestliže byl přístroj nakalibrován. Byl-li zafokusován laserový paprsek a připraven pracovní roztok, pak mohlo být zahájeno měření. Na obr. 47 je zobrazen odběr pracovního vzorku do kapiláry.



Obr. 47 Odběr vzorku do kapiláry

Na obr. 48 je ukázána kapilára se vzorkem, která byla strčena do nástavce a připravena k měření. Po zavření víka přístroje bylo zahájeno měření.



Obr. 48 Kapilára se vzorkem v kovovém nástavci

Prvním měřením, které bylo prováděno, mělo být zjištěno, zda v pracovním roztoku není přítomen kontaminant. Nejprve byl tedy připraven pracovní roztok (bez analytu) a byl dán k měření. Jestliže byl záznam čistý (pouze šum), byla vyloučena kontaminace. Po vyloučení kontaminace, byl k měření připraven pracovní roztok s analytem.

3.9.3 Kontaminace

SERS dosahuje vyjimečných detekčních limitů, což je výhodou této metody. Tato vlastnost sebou však nese jednu obrovskou nevýhodu, a to problém s kontaminacemi. Je-li v měřeném vzorku přítomný kontaminant, který má větší afinitu k nanočásticím, než hledaný analyt, pak SERS spektrum bude obsahovat i vibrace, které odpovídají příslušnému kontaminantu. V extrémní situaci může interferent spektrum analytu zcela zastínit. Vypořádání se s kontaminacemi je tedy základní předpoklad pro měření SERS spekter.

Zdrojů kontaminací může být mnoho:

1. **čistota nádobí**
2. **typ kyvety**

Problémy byly způsobovány zejména paměťovými efekty. Ty pak rušily stanovení analytu. Řešením bylo měření v kapiláře, jež můžeme vidět na obr.49 a na obr. 50. Kapiláry jsou na jedno použití.



Obr. 49 Kapilára, v níž bylo prováděno měření vzorku



Obr.50 Balení kapilár použitých k měření

3. **manipulace se vzorkem**
4. **čistota chemikálií**

3.10 Použitý software

Pro vyhodnocování byly použity následující programy:

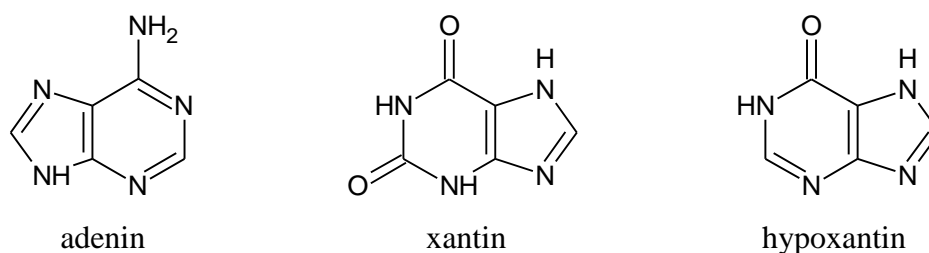
QtiPlot 0.981 (ProIndep Serv S.r.l., Romania)

OMNIC.8 (Thermo Electron; U.S.A)

4. Výsledky a diskuse

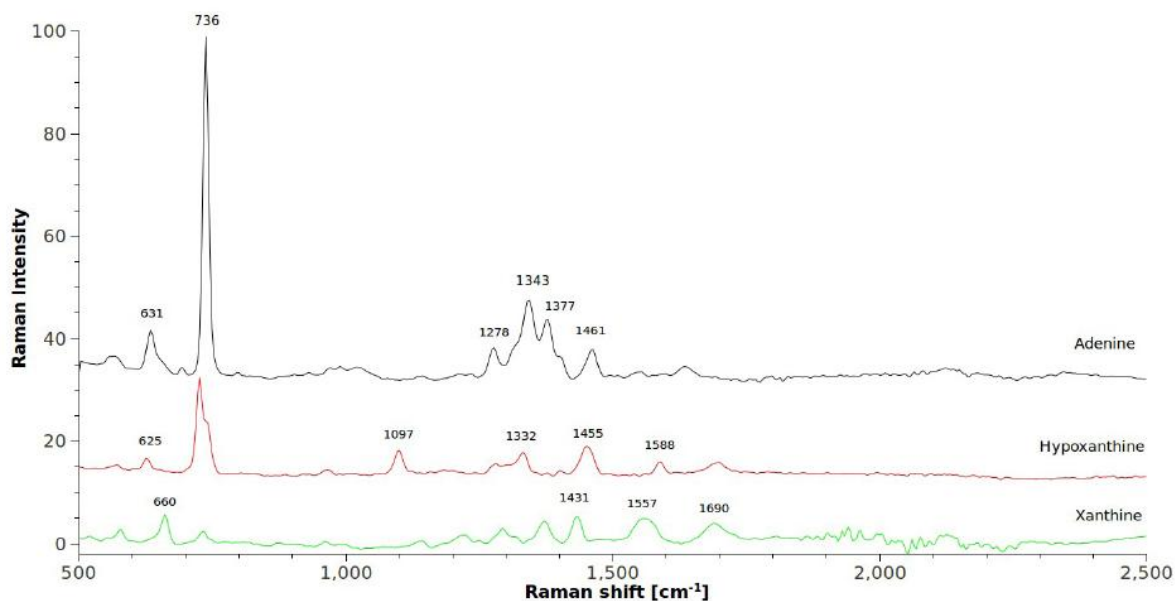
4.1 studium vybraných experimentálních parametrů

Pro zjištění vlivu redukčního činidla, pH a velikosti nanočástic na zesílení SERS signálu byly zvoleny tři modelové látky, a to **adenin**, **xantin** a **hypoxantin**, jejichž strukturní vzorce jsou uvedeny na obr. 51.



Obr. 51 Strukturní vzorec adeninu, xantinu a hypoxantinu

Nejprve byla proměřena SERS spektra všech tří modelových látek³³. Na obr. 52 můžeme vidět SERS spektrum adeninu, xantinu a hypoxantinu.



Obr. 52 SERS spektra adeninu, xantinu a hypoxantinu

Hlavní pík adeninu se nachází kolem hodnoty 736 cm⁻¹. Tento pík přísluší vibraci C=N v purinovém kruhu. U hypoxantinu je hlavní pík přisouzen stejné skupině. V případě xantinu, který má hlavní pík okolo hodnoty 660 cm⁻¹, je přisouzen vibraci C=N purinového kruhu.

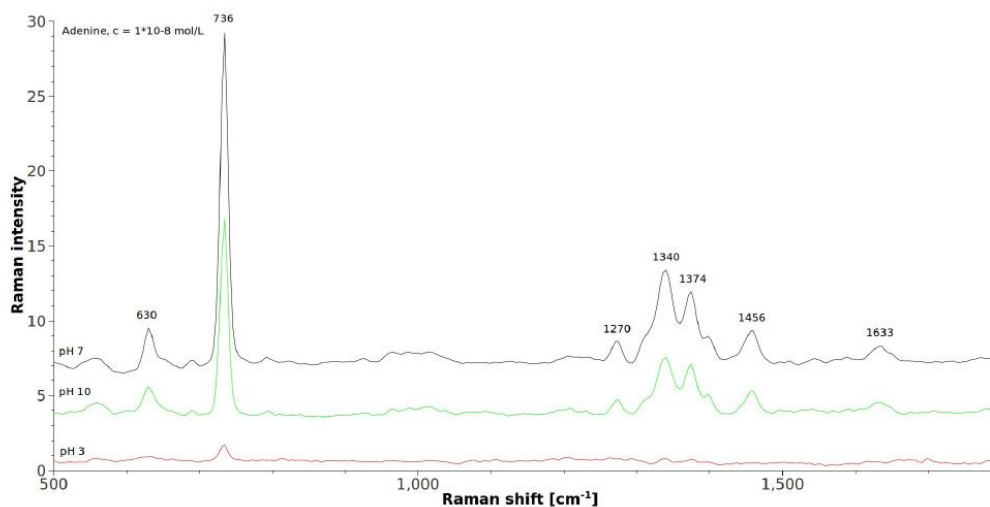
Jedním z parametrů, který má významný vliv na velikost nanočástic, je **použité redukční činidlo**. Získané výsledky jsou uvedeny v tab. I.

Tab. I Velikost nanočástic v závislosti na použitém redukčním činidlo

Velikost nanočástic v závislosti na použitém redukčním činidlo	
Redukční činidlo	Velikost nanočástic
Glukóza	44 nm
Citrát	58 nm
Maltóza	28 nm

Z tab. 1 můžeme vyčíst, že nanočástice stříbra připravené redukcí citrátem a glukózou, mají průměrnou velikost velmi podobnou. Naproti tomu nanočástice, připravené redukcí maltózou, vedou k nanočásticím, které mají mnohem menší velikost.

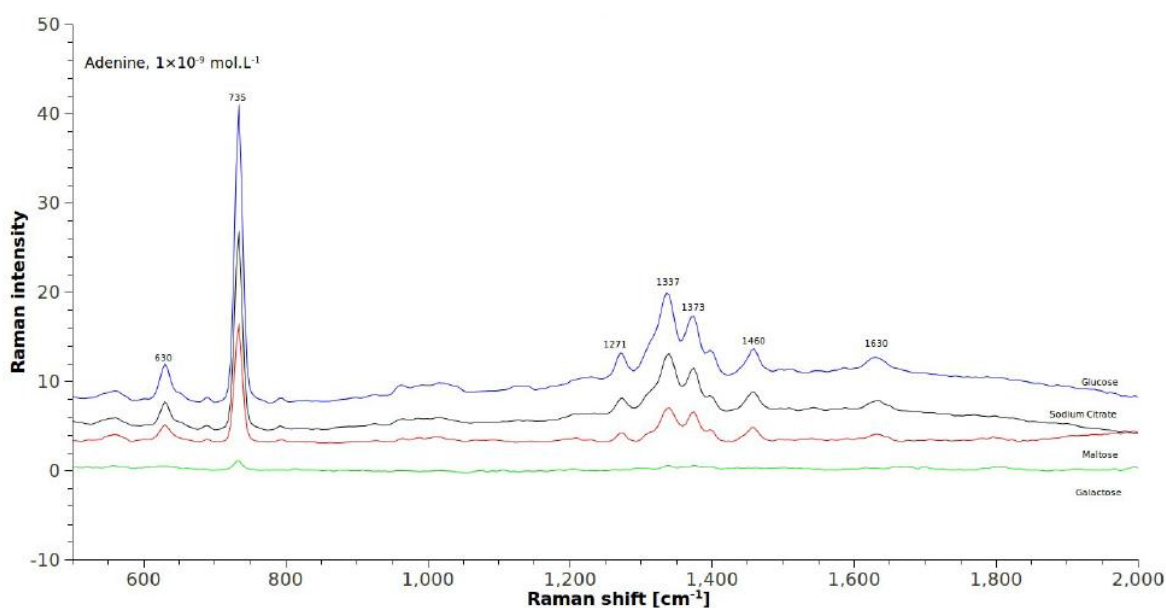
Dalším důležitým parametrem je **vliv hodnoty pH** měřeného vzorku. Studování vlivu pH bylo sledováno při třech různých hodnotách pH pracovního roztoku, a to 3, 7 a 10. Hodnoty pH=3 bylo dosaženo přidáním kyseliny chlorovodíkové ($c=50$ mmol/l). Hodnota pracovního roztoku pH=10 byla získána přidáním roztoku hydroxidu amonného ($c=20$ mmol/l). Na obr. 53 můžeme vidět SERS spektra adeninu ($c = 1 \cdot 10^{-8}$ mol/l), naměřená při různých hodnotách pH.



Obr. 53 SERS spektra adeninu ($c = 1 \cdot 10^{-8}$ mol/l) pro různé hodnoty pH

Na obr. 53 můžeme vidět, že v kyselém prostředí (pH=3) byl Ramanův signál potlačen. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo při pH=7.

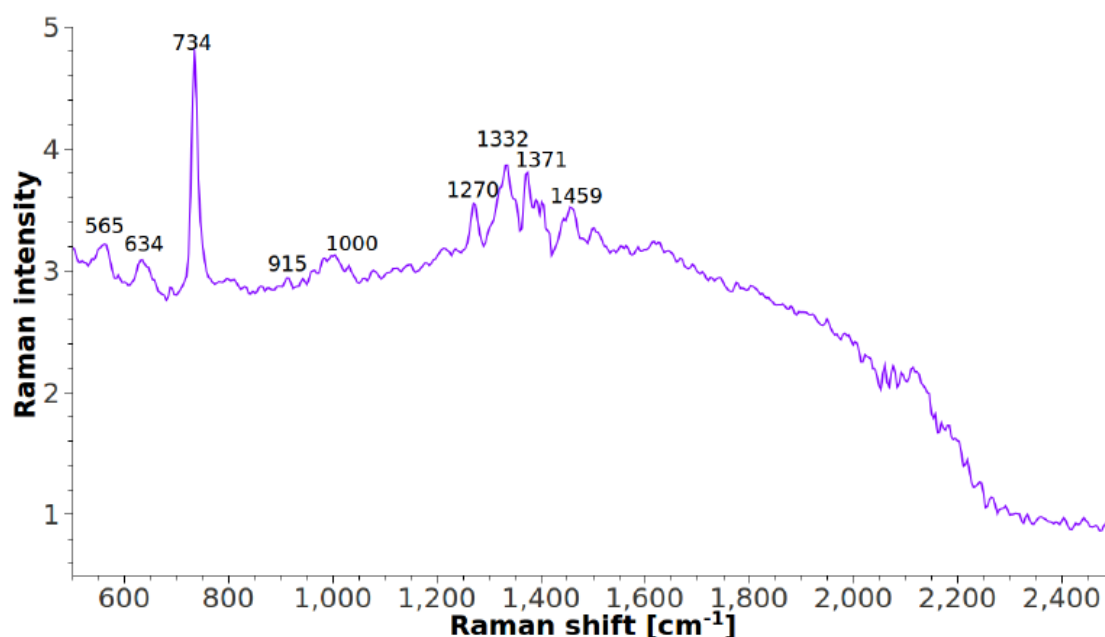
Vliv použité redukční látky k přípravě nanočástic stříbra ve vztahu k zesílení SERS signálu, byl dalším sledovaným parametrem. Byl připraven roztok adeninu $c = 1.10^{-9} \text{ mol/l}$ a postupně byly proměřeny SERS spektra po přidání nanočástic, které byly připraveny rozdílnými redukčními látkami. Výsledek je vidět na obr. 54.



Obr. 54 SERS spektra adeninu ($c = 1.10^{-9} \text{ mol/l}$) nanočástic, připravených různými redukčními látkami

Z obr. 54 lze vyčíst, že nanočástice, připravené redukcí galaktózou, SERS signál vůbec nezvyšují. Zesílení stoupá v řadě maltózové-citrátové nanočástice. Na základě experimentu lze vyvodit závěr, že pro zesílení SERS signálu se nejlépe jeví nanočástice, připravené redukcí glukózou. Příprava nanočástic redukcí glukózou je jednoduchá a velmi rychlá. Naproti tomu výroba citrátových nanočástic je časově mnohem náročnější.

V další části experimentu byly do měřeného roztoku přidány všechny tři modelové látky a bylo proměřeno SERS spektrum jejich směsi. Výsledek tohoto experimentu můžeme vidět na obr. 55.



Obr. 55 SERS spektrum směsi adeninu, xantinu a hypoxantinu

Díky píku 734cm^{-1} může být ve směsi identifikován adenin a pík kolem 1000cm^{-1} ukazuje na přítomnost hypoxantinu.

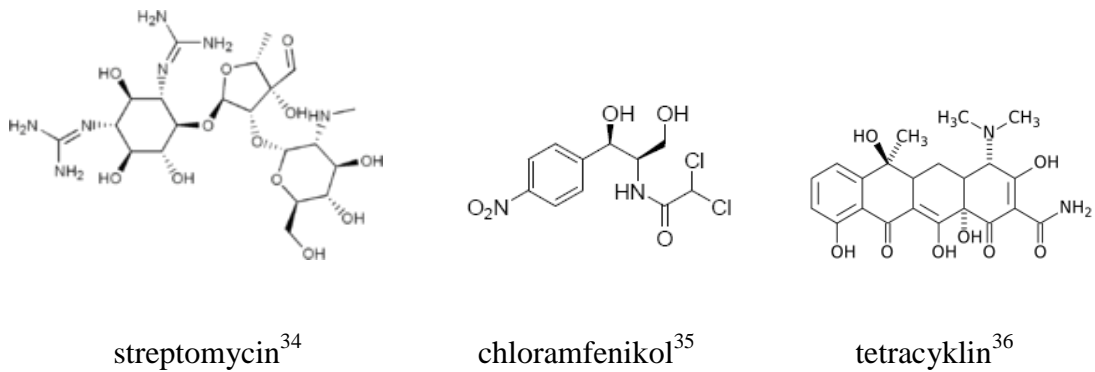
Součástí experimentu bylo proměření SERS spekter (adeninu, xantinu, hypoxantinu) v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-15} \text{ mol/l} - 1 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l}$. Závislost nebyla lineární, nýbrž byla podobná Langmuirově izotermě. K vyhodnocení byl brán pík s největší intenzitou. Limit detekce byl počítán z odstupů signál / šum pro daný pík. Na základě naměřených spekter a vyhodnocení pomocí softwaru, mohly být pro jednotlivé modelové látky určeny limity detekce, které jsou uvedeny v tab. II.

Tab. II Limity detekce dosažené metodou SERS pro adenin, xantin a hypoxantin

sloučenina	limit detekce (LOD) mol/l	korelační koeficient
adenin	$1 \cdot 10^{-15}$	0,99
xantin	$2 \cdot 10^{-15}$	0,99
hypoxantin	$1 \cdot 10^{-14}$	0,92

4.2 Analýza antibiotik v medu

Na obr. 56 jsou zobrazeny strukturní vzorce vybraných antibiotik (streptomycin, tetracyklin, chloramfenikol).



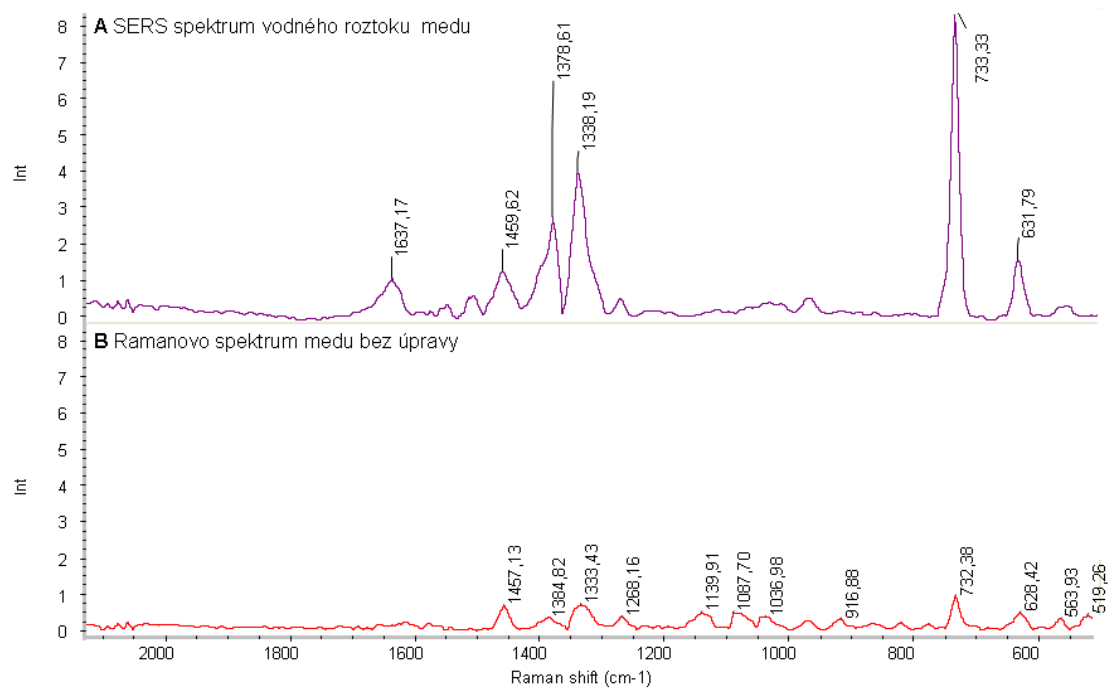
Obr.56 Strukturní vzorce streptomycinu, chloramfenikolu a tetracyklinu

4.2.1 SERS spektrum medu

Prvním úkolem bylo proměřit SERS spektrum vzorku medu. Vzorek medu byl připraven podle postupu E₁, uvedeném v experimentální části. **SERS spektrum medu** můžeme vidět na obr. 57 A.

Pro porovnání bylo změřeno **Ramanovo spektrum medu**. Kapilára, jenž byla používána k měření, byla v tomto případě naplněna tuhým medem přímo ze sklenice a bylo změřeno Ramanovo spektrum tohoto vzorku. Výsledné spektrum lze vidět na obr. 57 B.

Z obr. 57 je vidět jasný rozdíl ve spektrech. Obyčejné Ramanovo spektrum obr. 57 B je z praktického hlediska nepoužitelné. Díky SERS efektu je na obr. 57 A vidět zesílení signálu, čehož lze úspěšně využít.

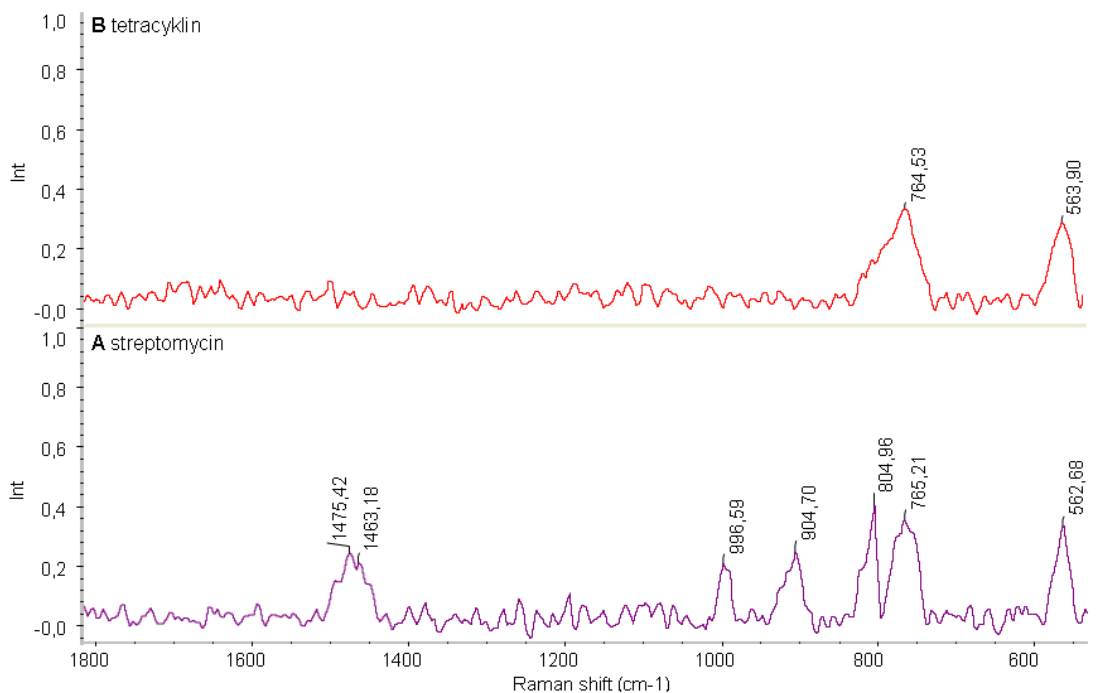


Obr. 57 A SERS spektrum vodného roztoku medu B Ramanovo spektrum medu

4.2.2 SERS spektra vybraných antibiotik

Dalším úkolem bylo proměření SERS spekter vybraných antibiotik (streptomycinu, tetracyklinu a chloramfenikolu). Vzorky vybraných antibiotik byly k měření připraveny podle postupu E₂, uvedeném v experimentální části. SERS spektrum streptomycinu lze vidět na obr. 58 A. SERS spektrum tetracyklinu můžeme vidět na obr. 58 B.

Spektrum chloramfenikolu chybí, protože na záznamu byl pouze šum. Po pečlivém zvážení molekulární struktury chloramfenikolu, která nemá ve své molekule dusík nebo síru, přes který by se mohl vázat na stříbrnou nanočástici, byl tento efekt vysvětlen. Z obr. 58 je zřejmé zesílení Ramanova signálu díky SERS efektu. Obě vybraná antibiotika mají své charakteristické SERS spektrum.



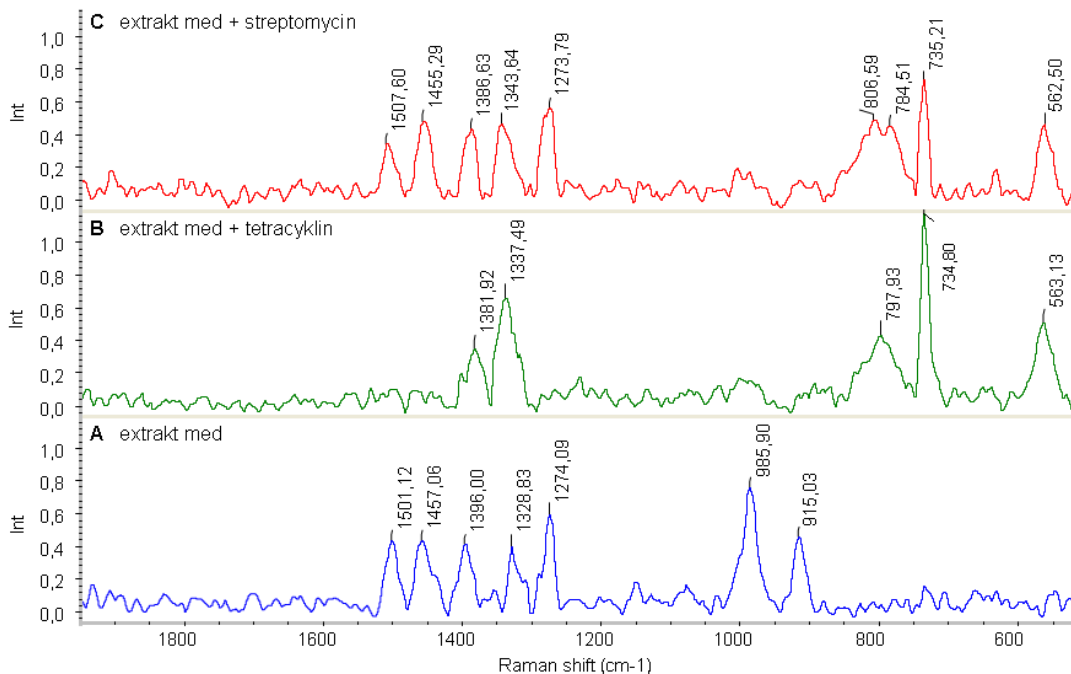
Obr. 58 A SERS spektrum streptomycinu $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l

B SERS spektrum tetracyklinu $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l

4.2.3 SERS spektra po extrakcích

K extrakci byl použit chloroform. Nejprve byla extrakce prováděna z bazického prostředí (postupy E₃ - E₈), uvedené v experimentální části, přičemž byla proměřena SERS spektra jak spodní, tak horní vrstvy. Následně byla extrakce prováděna z kyselého prostředí (postupy E₉ - E₁₄), uvedené v experimentální části a opět byla proměřena SERS spektra jak spodní, tak horní vrstvy.

Nejprve byla proměřena SERS spektra vzorků, které byly připraveny podle postupů E₃ - E₅. Výsledek měření lze vidět na obr. 59.

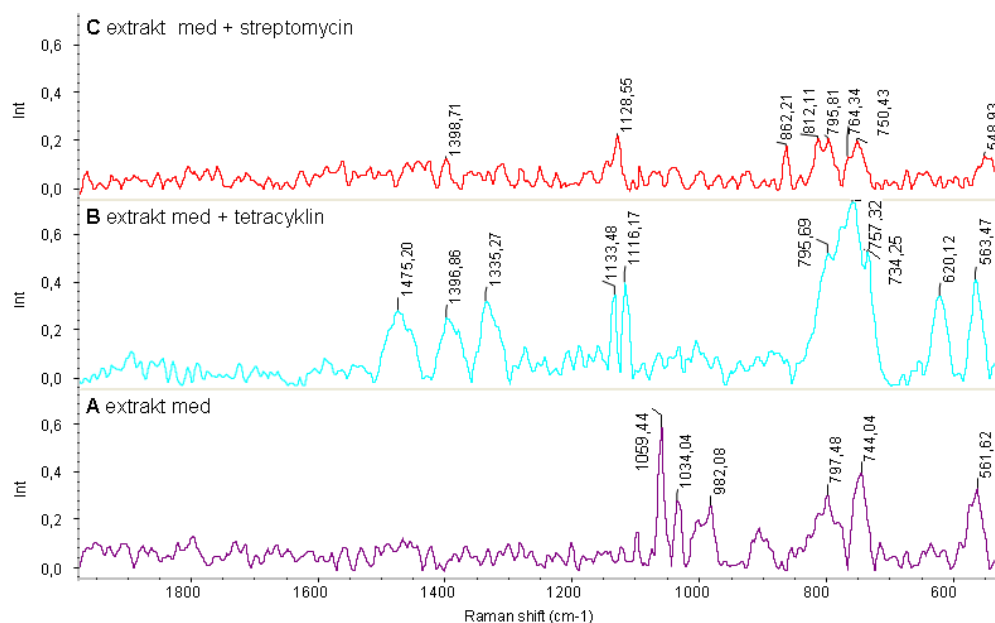


Obr.59 Extrakce chloroformem v bazickém prostředí, odebírána *horní vrstva* **A** extrakt medu **B** extrakt medu naspajkovaného tetracyklinem $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l **C** extrakt medu naspajkovaného streptomycinem $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l

Na obr. 59 lze vidět, že streptomycin i tetracyklin mohou být v předloženém vzorku medu dokázány. Píky kolem 560 cm^{-1} a píky v rozmezí 797 cm^{-1} - 735 cm^{-1} při měření SERS spektra extraktu medu (bez antibiotik) na záznamu nejsou. Bude-li dodržen daný

postup, lze s jistou pravděpodobností na základě těchto píků usoudit na přítomnost těchto dvou antibiotik v předloženém vzorku medu.

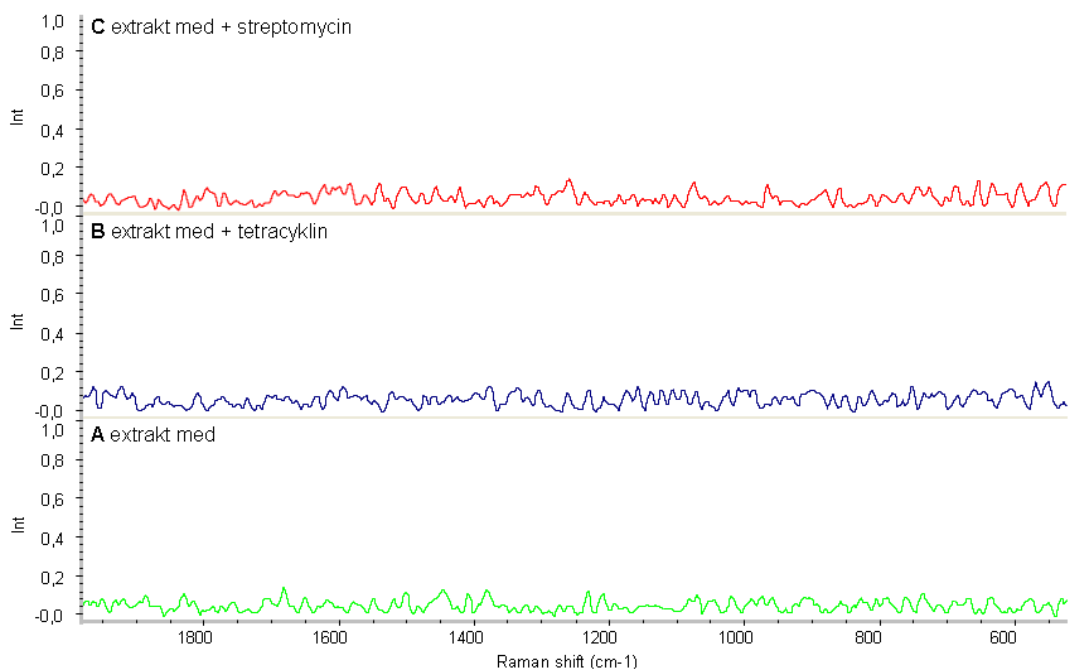
Potom byla proměřena SERS spektra vzorků, které byly připraveny podle postupů E₆ – E₈. Výsledek měření lze vidět na obr. 60.



Obr.60 Extrakce chloroformem v bazickém prostředí, odebrána *spodní vrstva* **A** extrakt medu **B** extrakt medu naspjovaného tetracyklinem $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l **C** extrakt medu naspjovaného streptomycinem $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l

Na rozdíl od předešlého extrakčního postupu byly v naměřeném SERS spektru extraktu medu zaznamenány píky v oblasti kolem 560 cm^{-1} a $597 \text{ cm}^{-1} - 744 \text{ cm}^{-1}$. Z daných spekter nelze vyčíst píky, které by jednoznačně sloužily ke screeningu daných antibiotik v předloženém vzorku medu.

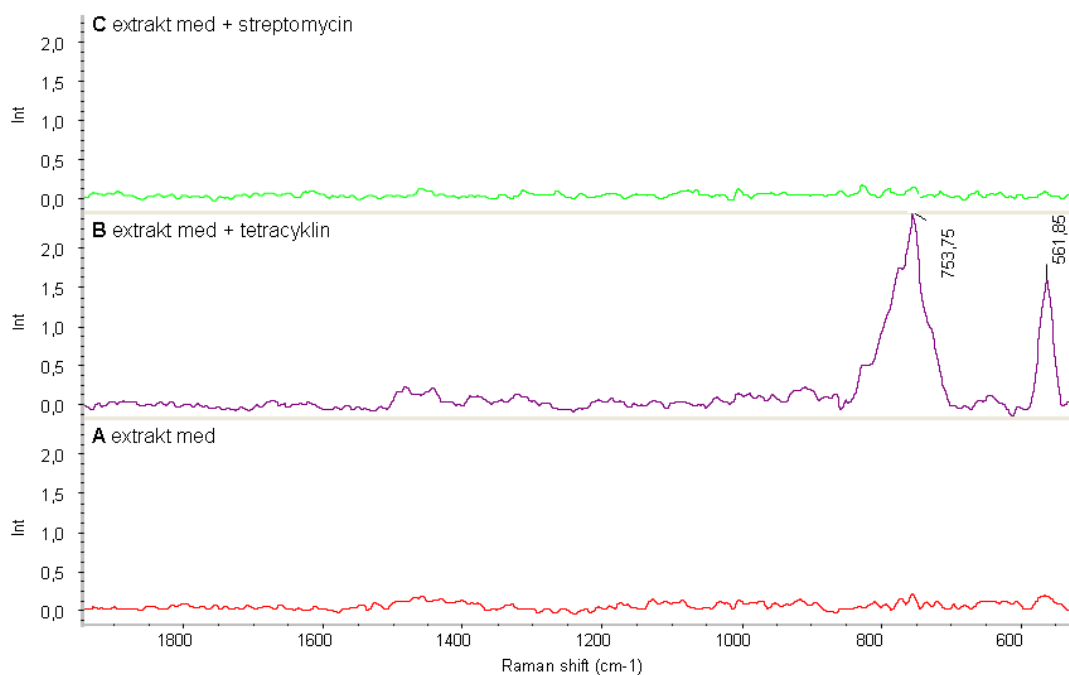
Dále byla proměřena SERS spektra vzorků, které byly připraveny podle postupů E₉ – E₁₁. Výsledek měření lze vidět na obr. 61.



Obr.61 Extrakce chloroformem v kyselém prostředí, odebírána *spodní vrstva* **A** extrakt medu **B** extrakt medu naspajkovaného tetracyklinem $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l **C** extrakt medu naspajkovaného streptomycinem $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l

Jak je vidět na obr. 61 tak měření spekter za daných podmínek vedlo pouze k naměření šumu. Žádný pík se na záznamu neobjevil, proto je tento postup při dokázání antibiotik zcela nevyhovující.

Nakonec byla proměřena SERS spektra vzorků, které byly připraveny podle postupů E₁₂ – E₁₄. Výsledek měření lze vidět na obr. 62.



Obr.62 Extrakce chloroformem v kyselém prostředí, odebírána *horní vrstva* **A** extrakt medu **B** extrakt medu naspajkovaného tetracyklinem $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l **C** extrakt medu naspajkovaného streptomycinem $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l

Při dodržení daných podmínek lze v předloženém vzorku medu usoudit na přítomnost tetracyklinu. Jak lze vidět na obr. 62, pro screening přítomnosti tetracyklinu v medu lze využít dva charakteristické píky o hodnotách $561,85 \text{ cm}^{-1}$ a $753,75 \text{ cm}^{-1}$.

5. Závěr

V první části vypracované studie byly zkoumány vlivy experimentálních podmínek (vliv pH, redukčního činidla a velikosti nanočástic) na zesílení SERS signálu. Byla proměřena SERS spektra adeninu, xantinu a hypoxantinu.

K prošetření **vlivu pH** na zesílení signálu byl připraven adenin $1 \cdot 10^{-8}$ mol/l. Měření bylo prováděno při třech různých hodnotách pH, a to 3, 5 a 10. V kyselém prostředí pH = 3 byl SERS signál potlačen. Největšího zesílení bylo dosaženo při pH = 7.

Vliv použité redukční látky k přípravě nanočástic stříbra ve vztahu k zesílení SERS signálu, byl dalším sledovaným parametrem. Byl připraven roztok adeninu $c = 1 \cdot 10^{-9}$ mol/l a postupně byly proměřeny SERS spektra po přidání nanočástic, jež byly připraveny rozdílnými redukčními látkami. Nanočástice, připravené redukcí galaktózou SERS, signál vůbec nezvyšují. Zesílení stoupá v řadě maltózové-citrátové nanočástice. Na základě experimentu lze vyvodit závěr, že pro zesílení SERS signálu se nejlépe jeví nanočástice, připravené redukcí glukózou.

Dále byl zkoumán vliv velikosti nanočástic stříbra v závislosti na použitém redukčním činidle. Velikost nanočástic byla proměřena metodou DLS. Z výsledků vyplývá, že nejmenší průměrnou velikost měly nanočástice, připravené redukcí maltosou. Jejich průměrná velikost byla 28 nm. Nanočástice, připravené redukcí glukosou (44 nm) a citrátem (58 nm), zesilují SERS signál mnohem více, než maltosové nanočástice.

Na základě změřených spekter a díky softwarovému vyhodnocení, mohly být pro jednotlivé modelové látky (adenin, xantin a hypoxantin) stanoveny limity detekce, které se pohybují na hladině fentomolů (adenin $1 \cdot 10^{-15}$ mol/l, xantin $2 \cdot 10^{-15}$ mol/l a hypoxantin $1 \cdot 10^{-14}$ mol/l).

Dále bylo proměřeno SERS spektrum směsi všech tří modelových látek (adenin, xantin a hypoxantin). Díky intenzivnímu píku kolem hodnoty 734 cm^{-1} lze ve směsi detekovat adenin. Pík kolem 1000 cm^{-1} ukazuje na přítomnost hypoxantinu.

Nakonec byla vypracována metoda pro screening antibiotik (streptomycin, tetracyklin) v medu. Nejprve bylo proměřeno SERS spektrum modelového vzorku medu. Následně byla proměřena SERS spektra antibiotik (streptomycin, tetracyklin, chloramfenikol). Zatímco SERS spektra streptomycinu a tetracyklinu byla naměřena bez problémů, SERS spektrum pro chloramfenikol se naměřit nepovedlo. Když se podíváme na strukturní vzorec

chloramfenikolu, nemá ve své molekule dusík nebo síru, přes které by se mohl vázat na stříbrnou nanočástici.

Dalším krokem bylo spajkování antibiotik do medu a použití extrakčního postupu k využití screeningu tetracyklinu a streptomycinu v medu. K extrakci byl použit chloroform. Extrakce byla prováděna jak z bazického, tak kyselého prostředí. Vždy byla proměřena SERS spektra obou vrstev. Streptomycin i tetracyklin bylo možné v předloženém vzorku medu detekovat, byla-li extrakce prováděna z bazického prostředí a jestliže bylo proměřeno SERS spektrum horní (vodné) vrstvy. Když byla antibiotika v medu přítomna, projevilo se to na SERS spektrech charakteristickými píky (píky kolem 560 cm^{-1} a píky v rozmezí 797 cm^{-1} - 735 cm^{-1}), které se v extraktu medu bez antibiotik nevyskytovaly.

K odlišení tetracyklinu od streptomycinu v medu lze využít extrakci z kyselého prostředí, kdy bylo proměřeno SERS spektrum horní (vodné) vrstvy. Tetracyklin, který byl naspajkován do medu, byl v SERS spektru identifikován díky dvěma charakteristickým píkům ($561,85\text{ cm}^{-1}$ a $753,75\text{ cm}^{-1}$)

Koncentrace antibiotik v medu, pro která byla tato screeningová metoda vypracována, byla $5 \cdot 10^{-8}\text{ mol/l}$.

6. Literatura

1. Kohoutová V.: Ramanova spektroskopie DNA modifikované protinádorově účinnými komplexy platiny, Rigorózní práce, Masarykova univerzita, Brno 2008, 30-34.
2. Mašek V.: Charakterizace aduktů platinových komplexů na DNA duplexech pomocí Ramanovy spektroskopie, Disertační práce, Masarykova univerzita, Brno 2007, 21-26.
3. <http://web.natur.cuni.cz/~kfmch/kompmolsys/conference-II.pdf>
(staženo dne 2.2.2011).
4. http://web.cvut.cz/ki/files/ramanuv_spektrometr_prirucka.pdf
(staženo dne 6.2.2011).
5. Jandera P.: Molekulová spektroskopie v organické analýze, Univerzita Pardubice, Pardubice 1999, 123-125.
6. Peica N., Pavel I., Rastogi V.K., Kiefer W.: Vibrational characterization of E102 food additive by Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy and theoretical studies, *Journal of Raman spectroscopy* 36, 659 (2005).
7. <http://fch.upol.cz/vyzkum/srozum/nanotechnologie.pdf>
(staženo dne 9.2.2011).
8. Řezanka P., Záruba K., Král V.: Potenciál modifikovaných nanočástic v analytické chemii, *Chemické listy* 101, 881-885 (2007).
9. <http://ksicht.natur.cuni.cz/serialy/nanocastice/1>
(staženo dne 9.2.2011).
10. Kvítek L.: Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra, Habilitační práce, Olomouc 2008, 9-49.
11. Le Ru E.C, Blackie E., Meyer M., Etchegoin P.G.: Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study, *J. Phys. Chem.* 111, 13794-13803 (2007).
12. He L., Lin M., Li H., Kim N.J.: Surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with dendritic silver nanosubstrate for detection of restricted antibiotics, *Journal of Raman Spectroscopy* 41 (7), 739-744 (2010).
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. Champion A, Kambhampati P.: Surface-enhanced Raman scattering, *Chemical Society Reviews* 27, 241-244 (1998).

15. Weißenbacher N., Göbel R, Kellner R. : Ag-layers on non-ferrous metals and alloys. A new substrate for Surface Enhanced Raman scattering (SERS), *Vibrational spectroscopy* 12, 189-195 (1996).
16. Žvátora P., Záruba K., Řezanka P., Král V.: Studium povrchové modifikace stříbrných nanočástic a jejich možné využití v analytické chemii, *Chemické listy* 103, 221-225 (2009).
17. Liu B., Lin M., Li H.: Potential of SERS for rapid detection of melanine and cyanuric acid extracted from milk, *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 4 (1), 13-19, (2010).
18. He L., Kim N.J., Li H.Hu Z., Lin M.: Use of a Fractal-like Gold Nanostructure in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Detection of Selected Food Contaminants, *J.Agric. Food Chem.* 56, 9843-9847 (2008).
19. Cheung W., Shadi T., Xu Y., Goodacre R.: Quantitative Analysis of the Banned Food Dye Sudan-I Using Surface Enhanced Raman Scattering with Multivariate Chemometrics, *J. Phys. Chem.*114, 7285-7290 (2010).
20. Vongsvivut J., Robertson E.G., McNaughton D. : Surface-enhanced Raman spectroscopic analysis of fonofos pesticide adsorbed on silver and gold nanoparticles, *Journal of Raman Spectroscopy* 41 (10), 1137-1148 (2010).
21. Liu Y., Chao K., Nou X., Chen Y.R.: Feasibility of colloidal silver SERS for rapid bacterial screening, *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 3 (2), 100-107 (2009).
22. Podstawka E., Borowiec E, Proniewicz L.M.: Food additives characterization by infrared,Raman and surface-enhanced Raman spectroscopies, *Journal of Raman spectroscopy* 38, 356-363 (2007).
23. Clavijo E., Menéndez J.R., Aroca R.: Vibrational and surface-enhanced Raman spektra of vanilic acid, *Journal of Raman spectroscopy* 39, 1178-1182 (2008).
24. Nakazawa H., Ino S., Kato K., Watanabe T., Ito Y., Oka H.: Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spektrometry 732, 55-64 (1999).
25. Giannetti L., Longo F., Buiarelli F., Russo M. V., Neri B.: Tetracycline residues in royal jelly and honey by liquid chromatography tandem mass

- spektrometry:validation study according to Commission Decision 2002/657/EC,Anal.Bioanal.Chem.398, 1017-1023 (2010).
26. Peres G.T., Rath S., Reyes F.G.: A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey 21, 620-625 (2010).
 27. Tsukamoto T., Yasuma M., Yamamoto A., Hirayama K., Kihou T., Kodama S., Inoue Y.: Evaluation of sulfobetaine-type polymer resin as an SPE adsorbent in the analysis of trace tetracycline antibiotics in honey,J. Sep. Sci. 32, 3591-3595 (2009).
 28. Terrones S.C., Carretero A.S., Busi S., Dinelli G., Gutiérrez A. F.: Determination of tetracycline residues in honey by CZE with ultraviolet absorbance detection, Electrophoresis 28, 2882-2887 (2007).
 29. Edder P., Cominoli A., Corvi C.: Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection, Journal of Chromatography A 830, 345-351 (1999).
 30. Granja R.H.M.M., Zucchetti R.A.M.,Patel R., Salerno A.g.: Determination of streptomycin residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectroscopy,Analytica Chimica Acta 637, 64-67 (2009).
 31. Boyd B., Björg H., Billing J., Shimelis O., Axelsson S., Leonora M., Yilmaz E.: Development of an improved method for trace analysis of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers, Journal of Chromatography A 1174, 63-71 (2007).
 32. <http://konference.tanger.cz/data/nanocon2009/sbornik/Lists/Papers/008.pdf>
(staženo dne 16.2.2011).
 33. Ranc V., Maitner K., Hruzíková J.,Prucek R.,Milde D.,Kvítek L.:Analysis of xanthine,hypoxanthine and adenine using FT-SERS spectroscopy on femtomolar concentration levels, Central european journal of chemistry, submitted.
 34. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Streptomycin>
(staženo dne 23.2.2011).
 35. Vyskočil V., Daňhel A., Fischer J., Novotný V.: Krása a užitečnost nových elektrodových materiálů, Chem. Listy 104, 1181-1195 (2010).
 36. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Tetracyklin>
(staženo dne 23.2.2011).

