



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Mikuláš Přikryl

**Nové přístupy v Ramanově spektroskopii kapkově
nanášených povlaků pro citlivou molekulární detekci**

Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Eva Kočišová, Ph.D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Učitelství fyziky pro střední školy se sdruženým studiem
Učitelství matematiky pro střední školy

Praha 2022

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V dne.....

podpis

Chtěl bych poděkovat RNDr. Evě Kočišové, Ph.D. za její ochotu, trpělivost a podporu při vedení této diplomové práce. Dále chci poděkovat Prof. RNDr. Markovi Procházkovi, Dr. a Mgr. Alžbetě Kuižové za pomoc a podporu.

Název práce: *Nové přístupy v Ramanově spektroskopii kapkově nanášených povlaků pro citlivou molekulární detekci*

Autor: *Mikuláš Příkryl*

Katedra / Ústav: *Fyzikální ústav UK*

Vedoucí diplomové práce: *RNDr. Eva Kočišová, Ph.D., Fyzikální ústav UK*

Abstrakt: Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků je vibrační spektroskopickou metodou založenou na Ramanově jevu. Nakápnutím malého objemu roztoku (μl) o nízké koncentraci (μM) na vhodný hydrofobní substrát získáme po vyschnutí depozit, z něhož je možné získat kvalitní Ramanova spektra při koncentracích nižších než při použití klasické Ramanovy spektroskopie. V rámci této práce byly při studiu čtyř kontaminantů (melamin, picloram, thiram, bentazon) porovnány vlastnosti nových nekomerčních substrátů na bázi nanočástic připravených na MFF UK se substrátem komerčním. Ukázalo se, že nové substráty s vyšší hydrofobicitou jsou vhodné pro další vývoj a měření. V další části práce byly uměle připraveny směsi dvojic ze čtyř kontaminantů a studovány na komerčním substrátu. Jednotlivé kontaminanty bylo možné ve směsích detekovat a rozlišit pomocí faktorové analýzy při relativně nízkých koncentracích, v některých depozitech docházelo i k jejich oddělení. Byla ovšem naměřena i neznámá spektra, pravděpodobně v důsledku chemických interakcí kontaminantů, možnost dodatečné kontaminace nebo interakce se substrátem byla vyloučena. V poslední části práce byl studován reálný vzorek kojenecké výživy, do kterého byl uměle přidán melamin. Kontaminant byl v roztoku detekován při koncentracích odpovídajícím reálným případům kontaminace. Metoda kapkově nanášených povlaků ukázala svůj potenciál pro kontrolu potravinových výrobků.

Klíčová slova: *Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků, hydrofobní povrch, nanočástice, molekulární detekce*

Title: New approaches in drop coating deposition Raman spectroscopy for sensitive molecular detection

Author: Mikuláš Přikryl

Department: *Institute of Physics UK*

Supervisor: *RNDr. Eva Kočíšová, Ph.D., Institute of Physics UK*

Abstract: Drop coating deposition Raman spectroscopy is a vibrational spectroscopic method based on the principle of Raman scattering. Deposition of a small volume of solution (μl) of a low concentration (μM) on a special hydrophobic substrate and subsequent drying leads to a formation of a deposit from which we can accumulate a higher quality Raman spectrum than in the case of classical Raman spectroscopy. In this thesis, four contaminants (melamine, picloram, thiram, bentazone) were studied on new nanoparticle-based substrates prepared at our faculty. These hydrophobic substrates were compared to commercial substrates and proven to be suitable for further development. Next, artificially prepared mixtures of pairs of contaminants were studied using the commercial substrate. Every contaminant was detected and differentiated in each of these mixtures using factor analysis at relatively low concentrations. Furthermore, the contaminants were separated in some deposits. However, unknown spectra were detected, probably due to chemical reactions between the contaminants. Possibilities of contaminations or interactions with the substrate were eliminated. Finally, a real sample of infant formula artificially contaminated by melamine was studied. The contaminant was detected at concentrations equal to those detected in real cases. Drop coating deposition Raman spectroscopy showed its potential for detecting food contaminations.

Keywords: Drop coating deposition Raman spectroscopy, hydrophobic surface, nanoparticles, molecular detection

Obsah

Úvod.....	1
1 Teoretická část	3
1.1 Ramanova spektroskopie.....	3
1.1.1 Klasický model Ramanova rozptylu	3
1.1.2 Kvantově-mechanický model Ramanova rozptylu	5
1.2 Vibrace molekul	7
1.3 Metoda kapkově nanášených povlaků (DCDR).....	8
1.3.1 Vysychání kapek	10
1.3.2 Typy depozitů.....	11
1.3.3 Porovnání DCDR a klasické Ramanovy spektroskopie	13
1.4 Využití DCDR	14
2 Experimentální část	18
2.1 Spektrometr	18
2.2 Použité substráty.....	19
2.2.1 μ -RIM TM	19
2.2.2 SpectRIM TM	19
2.2.3 Au a Cr substráty	20
2.2.4 CaF ₂ substrát.....	20
2.2.5 Nanodrsné substráty – substráty s nanočásticemi (Nps - nanoparticles)	21
2.3 Použité kontaminanty	22
2.3.1 Melamin.....	22
2.3.2 Picloram.....	23
2.3.3 Thiram	23
2.3.4 Bentazon	24
2.4 Příprava vzorků	25
2.5 Zpracování spekter	26
2.5.1 Faktorová analýza.....	26
3 Výsledky měření.....	28
3.1 Nanodrsné substráty	32
3.1.1 Melamin.....	32
3.1.2 Picloram.....	34
3.1.3 Thiram	35
3.1.4 Bentazon	36
3.1.5 Shrnutí	37
3.2 Směsi kontaminantů	38
3.2.1 Směsi dvou kontaminantů	38

3.2.2	Měření roztoků směsí kontaminantů na různých substrátech.....	60
3.3	Detekce melaminu v kojenecké výživě	70
Závěr	78

Úvod

Ramanova spektroskopie je metodou vibrační spektroskopie používanou k detekci a studiu širokého spektra organických i anorganických látek. Tato metoda je nekontaktní, spolehlivá a jednoduchá na přípravu, a proto je využívána v mnoha odvětvích fyziky, chemie a biologie. Má ovšem několik nevýhod, mezi něž patří například malá intenzita signálu získaných spekter.

Jednou z novějších specializovaných technik Ramanovy spektroskopie, která řeší tento problém, je metoda kapkově nanášených povlaků neboli DCDR(S) (drop-coating deposition Raman spectroscopy), která rozšířila možnosti využití Ramanovy spektroskopie, od měření spekter proteinů ve vodných roztocích, až po detekci procesů anorganické chemie nebo diagnostiky různých onemocnění v oblasti medicíny. Princip metody spočívá v nakápnutí malého objemu roztoku na vhodný povrch – substrát. Vysycháním roztoku se na substrátu vytvoří povlak (depozit), ze kterého je následně možné získat Ramanovské spektrum. Hlavními výhodami je už zmíněné zesílení intenzity signálu oproti klasické Ramanově spektroskopii a navíc, získaná spektra pochází z měření depozitů vytvořených z malých objemů roztoků o nízkých koncentracích.

Tato práce volně navazuje na bakalářskou práci „Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků vybraných kontaminantů“, jejímž výsledkem bylo určení detekčních limitů pro tuto metodu (nejnižších výchozích koncentrací, které je možné detekovat) v případě čtyř různých kontaminantů, a to; melaminu – organické sloučeniny, která bývá používána jako bílkovinová náhražka, thiramu – fungicidu a dvou pesticidů; bentazonu a picloramu. Tyto kontaminanty byly studovány na dvou komerčně vyráběných substrátech – μ -RIMTM a SpectRIMTM, a jednom nekomerčním připraveném na Katedře makromolekulární fyziky MFF UK.

Tato práce se zabývá stejnými látkami a porovnává data získaná z předešlých měření na komerčních substrátech s daty získanými měřeními na nových nanodrsných substrátech vyvíjených na Katedře makromolekulární fyziky MFF UK. Cílem je hledání optimálního substrátu, který by vedl k citlivější detekci studovaných látek. Problematika hledání vhodného substrátu je stále důležitá pro další vývoj metody DCDR, jelikož výrobce komerčního substrátu, který byl dosud úspěšně používán ve výzkumu, ukončil jeho výrobu.

Dalším cílem této práce je zaměřit se na studium směsí dvojic kontaminantů, jejich chování při vysychání smíšených roztoků, a zda bude možné spolehlivě rozlišit (oddělit) látky z jednoho roztoku za pomoci metody DCDR, tedy prozkoumat, jestli se při vysychání kapky roztoku jeho jednotlivé komponenty rozdělí a budou i opticky rozlišitelné ve vzniklém depozitu. Některé z kontaminantů jsou používány v zemědělském průmyslu a mohou být přítomny v podzemních vodách. Již bylo ukázáno, že za pomoci DCDR jsme schopni detekovat tyto kontaminanty v relevantních koncentracích, ovšem studovány byly pouze jednotlivě.

Tato práce se také zaměří na studium melaminu. Tato látka byla v minulosti detekována v konzumních produktech, kam byla nezákonně přidávána jako bílkovinná náhražka, což vedlo k několika úmrtím. Nejznámější případ je z roku 2008, kdy se v Číně otrávil melaminem až 300 000 lidí. V této práci budou zkoumána spektra z depozitů roztoku vybrané kojenecké výživy před a po přidání melaminu a bude určeno, zda je možné za pomoci DCDR detekovat tuto kontaminaci.

1 Teoretická část

1.1 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je jednou z metod optické spektroskopie, jejíž pomocí je možné získat informace o struktuře a vlastnostech látky. Stojí na principu Ramanova jevu, tedy neelastickém rozptylu monochromatického záření na částicích studované látky. Historie Ramanova jevu sahá až do roku 1928, kdy jej pozoroval C. V. Raman [Raman, 1982]. Teoreticky předpovězen byl již dříve, aplikováním zákonů kvantové mechaniky na molekuly [Lewis, Edwards, 2001].

Jelikož je intenzita Ramanovského záření velmi slabá, k jeho detekci jsou potřeba relativně vysoce výkonné lasery a sofistikované elektrické a optické vybavení laboratoře. Kvůli těmto překážkám začala být Ramanova spektroskopie využívána až v šedesátých letech dvacátého století, tedy po vynálezu laseru, který mohl být využit jako zdroj záření. Po dalším vývoji technologií v osmdesátých letech se stala Ramanova spektroskopie rutinní metodou v mnoha oblastech. [Procházka, 2016]

1.1.1 Klasický model Ramanova rozptylu

Ramanův jev spočívá ve změně frekvence rozptýleného monochromatického světla dopadajícího na studovanou látku. Při interakci s látkou dochází k přenosu energie, změnu frekvence pak způsobuje elektrická složka záření, která v molekule způsobí rozkmitání elektronového obalu molekuly. To zapříčiní vznik indukovaného dipólového momentu $\vec{\pi}$, který je úměrný celkové elektrické intenzitě pole, tedy:

$$\vec{\pi} = \vec{\alpha}\vec{E} \quad (1.1.1)$$

Veličina $\vec{\alpha}$ se nazývá polarizovatelnost a jde o tenzor druhého řádu. Obecně má tedy vektor dipólového momentu $\vec{\pi}$ jiný směr, než vektor elektrické intenzity \vec{E} . Vztahy mezi $\vec{\pi}$ a složkami \vec{E} mají následující tvar:

$$\begin{aligned} \pi_x &= \alpha_{xx}E_x + \alpha_{xy}E_y + \alpha_{xz}E_z \\ \pi_y &= \alpha_{yx}E_x + \alpha_{yy}E_y + \alpha_{yz}E_z \\ \pi_z &= \alpha_{zx}E_x + \alpha_{zy}E_y + \alpha_{zz}E_z \end{aligned} \quad (1.1.2)$$

Z těchto vztahů je vidět, že každá ze tří složek \vec{E} má vliv na každou ze složek $\vec{\pi}$. Mějme dvouatomovou molekulu ozářenou plošně polarizovaným světlem ve směru z s frekvencí ν_0 . Elektrická intenzita daná jako funkce času t bude mít tvar:

$$E_z = E_{max} \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (1.1.3)$$

Kde E_{max} je amplituda vlnění. Složka indukovaného dipólového momentu π_z pak bude mít tvar:

$$\pi_z(t) = \alpha_{zz} E_{max} \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (1.1.4)$$

Kde α_{zz} je složka tenzoru polarizovatelnosti. Ta má pro model dvouatomové molekuly vibrující o frekvenci ν_{vib} tvar:

$$\alpha_{zz} = \alpha_{zz}^{eq} + \left(\frac{d\alpha_{zz}}{dr} \right) \Delta r_{max} \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (1.1.5)$$

Kde α_{zz}^{eq} je polarizovatelnost statické molekuly a $\left(\frac{d\alpha_{zz}}{dr} \right)$ charakterizuje změnu polarizovatelnosti při změně r . Člen Δr_{max} vyjadřuje maximální výchylku dvou atomů, které tvoří molekulu. Po dosazení do vztahu (1.1.4) a několika úpravách dostaneme vztah pro časovou závislost z -tové složky indukovaného dipólového momentu π_z pro dvouatomovou molekulu:

$$\begin{aligned} \pi_z(t) = & \alpha_{zz}^{eq} E_{max} + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha_{zz}}{dr} \right) \Delta r_{max} \cos(2\pi(\nu_0 + \nu_{vib})t) E_{max} \\ & + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha_{zz}}{dr} \right) \Delta r_{max} \cos(2\pi(\nu_0 - \nu_{vib})t) E_{max} \end{aligned} \quad (1.1.6)$$

Vztah (1.1.6) ukazuje, že když světelná vlna interaguje s vibrující dvouatomovou molekulou, má pak indukovaný dipólový moment tři složky ovlivňující závislost této veličiny na čase. Z klasické teorie elektromagnetismu víme, že elektrický dipól vyzařuje energii v podobě rozptýleného záření. První ze tří složek na pravé straně rovnice popisuje část rozptýleného záření se stejnou frekvencí, jakou mělo dopadající světlo šířící se všemi směry. Jde o elastický Rayleighův rozptyl.

Druhá složka popisuje tu část rozptýleného záření s frekvencí rovnou součtu frekvence dopadajícího záření a frekvence vibrační molekuly, tento druh rozptylu se nazývá anti-Stokesův Ramanův rozptyl. Třetí složka popisuje část rozptýleného záření s frekvencí rovnou rozdílu frekvence dopadajícího záření a frekvence vibrační molekuly. Tento druh rozptylu záření se nazývá Stokesův Ramanův rozptyl. [Carey, 1982]

Tyto dva poslední členy rovnice závisí na frekvencích vibrační molekuly, a tedy i na její struktuře. Právě tento fakt nám umožňuje pomocí získaných spekter získávat informace o molekulách a pomáhá nám s jejich studiem.

1.1.2 Kvantově-mechanický model Ramanova rozptylu

Oproti klasickému přístupu je ten kvantově-mechanický velmi rozdílný, protože vlnově-korpuskulární dualita světelného paprsku je brána v úvahu. Paprsek se skládá z kvant světelných částic – fotonů. Navíc, kvantovány jsou i energetické hladiny molekuly. Pokud studujeme Ramanův jev, zajímají nás konkrétně vibrační energetické hladiny molekul, které jsou přidruženy k hladinám elektronovým. Dobrou aproximací vibrační energie dvouatomové molekuly můžeme vyjádřit vztahem:

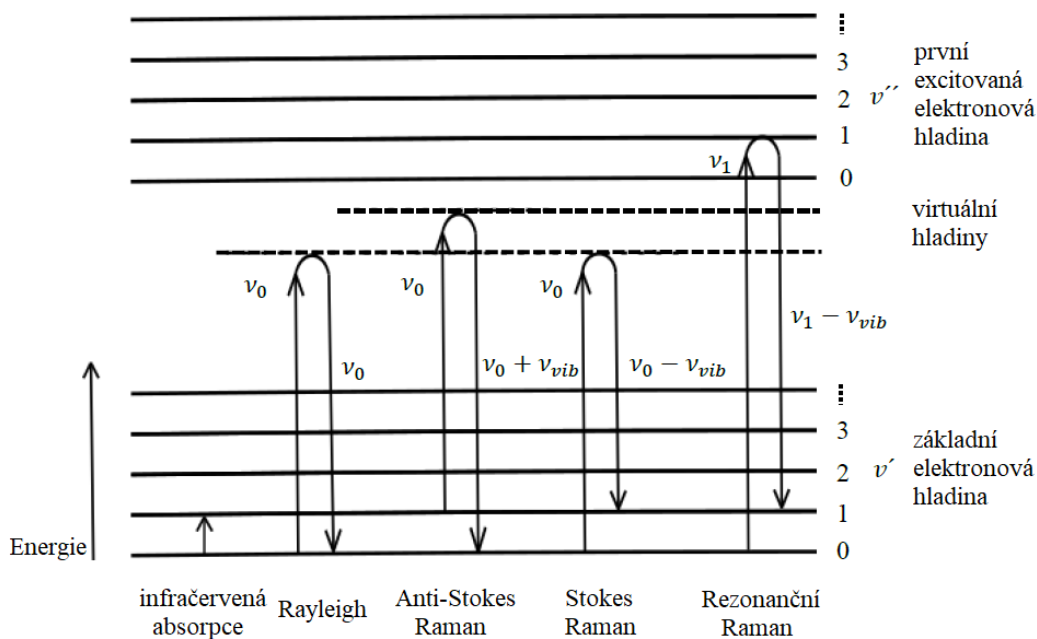
$$E_{vib} = \left(v + \frac{1}{2} \right) v_{vib} \quad v = 0, 1, 2, \dots \quad (1.1.7)$$

Kde v je vibrační kvantové číslo nabývající hodnot nezáporných celých čísel. V kvantově-mechanickém modelu je rozptyl světla brán jako dvoufotonový proces. Prvním krokem je sloučení fotonu s molekulou, které vede ke skoku molekuly na vyšší energetickou hladinu s krátkou životností. [Carey, 1982]

Druhý krok spočívá ve vyzáření fotonu a skoku molekuly na nižší energetickou hladinu. Pokud se jedná o Rayleighův rozptyl, molekula se navrací na stejnou energetickou hladinu, jakou měla před absorpcí fotonu. Energie vyzářeného fotonu je tedy stejná, jako energie absorbovaného fotonu.

K Ramanovu rozptylu dochází, pokud se molekula po vyzáření fotonu ustálí na nižší, či vyšší energetické hladině, než jakou měla před absorpcí fotonu. V případě, že se molekula navrátila na vyšší hladinu a vyzářila tedy foton s menší energií (s delší vlnovou délkou), dochází ke Stokesově Ramanovu rozptylu. Pokud se molekula navrátila na nižší energetickou hladinu a vyzářila foton s vyšší energií

(kratší vlnovou délkou), dochází k anti-Stokesově Ramanovu rozptylu. Pro oba tyto typy rozptylu platí výběrové pravidlo, že se vibrační kvantové číslo změní pouze o jedna. Stokesův Ramanův rozptyl, anti-Stokesův Ramanův rozptyl a další druhy rozptylu jsou schematicky znázorněny na obrázku 1.1.1.



Obrázek 1.1.1: Energetický diagram pro Rayleighův a Ramanův rozptyl

Kvantově-mechanický model ilustruje velmi důležité zobecnění Ramanových spekter, a to že pozice pásů je vlastností pouze základního elektronového stavu. Navíc, oproti klasickému modelu, který předpovídá stejnou intenzitu Stokesova i anti-Stokesova rozptylu, kvantově-mechanický model ukazuje, že očekávaná intenzita těchto dvou druhů rozptylu bude rozdílná. Na obrázku 1.1.1 vidíme, že jde o přechody ze dvou různých hladin, které jsou dle Boltzmanova rozdělení jinak obsazené. Poměr obsazení základní vibrační hladiny N_0 a první vibrační hladiny N_1 je dán vztahem:

$$\frac{N_1}{N_0} = \exp\left(\frac{-h\nu_{vib}}{kT}\right) \quad (1.1.8)$$

Kde h je Planckova konstanta, k je Boltzmanova konstanta a T udává absolutní teplotu. Pro teplotu $T = 300$ K a vibrační frekvenci $\nu_{vib} = 480$ cm^{-1} vychází intenzita

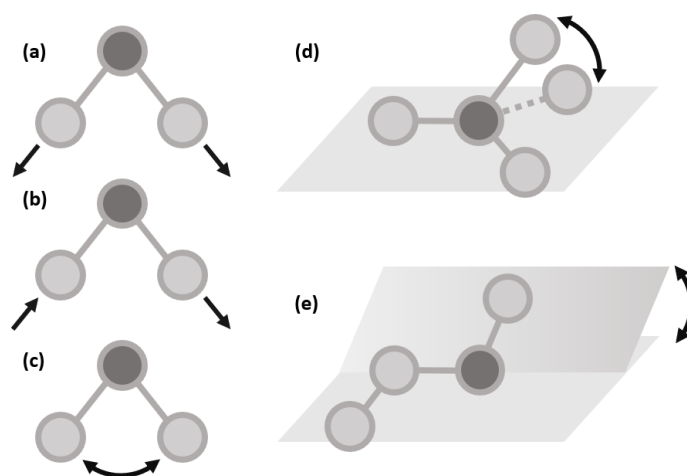
Stokesova rozptylu $1000\times$ silnější, než intenzita rozptylu anti-Stokesova. V praxi to znamená, že slabý anti-Stokesův rozptyl není využit a zaznamenává se pouze Stokesův. [Carey, 1982]

1.2 Vibrace molekul

Každý atom má sám o sobě tři stupně volnosti, tedy může se volně pohybovat ve směrech odpovídajícím osám kartézských souřadnic. Molekulu si představujeme jako soubor atomů spojených pružnými vazbami. Pokud se takováto molekula skládá z n atomů, má tedy $3n$ stupňů volnosti. Pokud vynecháme takové pohyby atomů, kdy mezi sebou nemění vzdálenosti, dostáváme $3n - 6$ stupňů volnosti. Jelikož jsou vazby mezi atomy pružné, dochází k periodickým pohybům.

Relativní pohyby atomů v molekule vůči sobě jsou superpozicí *normálních vibrací*, kdy atomy vibrují se stejnou *fází* a *normální frekvencí*, kde jejich amplitudy jsou dány *normálními souřadnicemi*. Výsledné vibrační spektrum ovlivňuje symetričnost molekuly, uspořádání atomů v molekule, jejich hmotnost a síla vazeb mezi nimi. Určité skupiny atomů v molekulách mají své *charakteristické vibrace*, které odpovídají charakteristickým spektrálním pásům. [Schrader, 1995]

Mezi základní dva vibrační pohyby molekul patří změna délky vazby a změna úhlu mezi vazbami. Změna délky vazby se nazývá valenční vibrace – stretching, při změně úhlu pak může jít o deformační vibrace (bending), či torzní vibrace (torsional). Valenční vibrace bývají obvykle až o tři řády silnější než ty deformační a torzní [Carey, 1982]. Základní druhy vibrací jsou zobrazeny na obrázku 1.2.1.



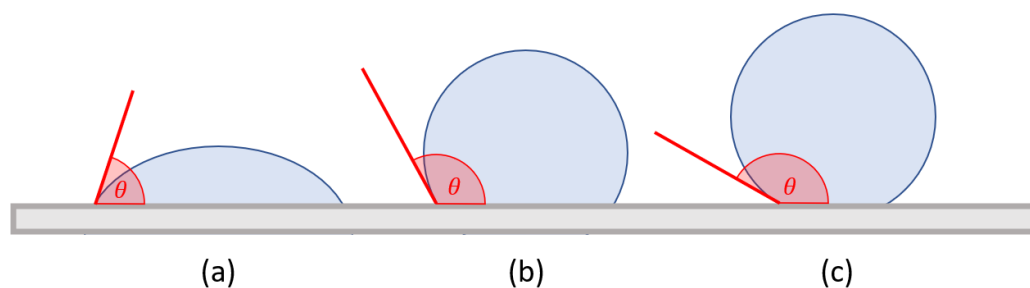
Obrázek 1.2.1: Základní druhy vibrací: (a) symetrické valenční vibrace, (b) antisymetrické valenční vibrace, (c) rovinné deformační vibrace, (d) mimorovinné deformační vibrace a (e) torzní vibrace

1.3 Metoda kapkově nanášených povlaků (DCDR)

DCDR neboli Drop Coating Deposition Raman je metoda zvyšující intenzitu signálu Ramanovy spektroskopie zakoncentrováním látky v důsledku procesu vysychání kapky studovaného roztoku. Měření metodou DCDR začíná nakápnutím malé kapky roztoku (přibližně 1 μl) na hydrofobní povrch – substrát. Roztok následně vysychá a v ideálním případě dochází ke vzniku koncentrovaných oblastí látky na substrátu, mezi možné formy takto vzniklého depozitu patří tzv. „kávový kroužek“, kdy je látka zakoncentrována na okraji kapky ve formě tenkého prstence nebo flíček kdy je látka koncentrována na jednom místě – ve středu kapky. Možný je také vznik krystalů a dalších útvarů, ovšem procesy schnutí jsou natolik komplikované, že předem nelze určit, jak bude daný roztok vysychat. Tato problematika je popsána v další kapitole.

Jedním z hlavních faktorů ovlivňujících vysychání kapky je samotný substrát a jeho vlastnosti. Pro maximální efektivitu metody DCDR je třeba substrát, který je málo smáčivý pro nanesenou kapku a je charakterizovaný kontaktním úhlem (vyznačeno na obrázku 1.3.1) větším než 90° . Takovýto substrát se nazývá *hydrofobní*, kapka se tohoto substrátu dotýká pouze velmi malou plochou. Pokud je kontaktní úhel dokonce větší než 150° , nazýváme tento substrát *superhydrofobní*, pokud je naopak kontaktní úhel menší než 90° , jde o *hydrofilní* substrát a kapka se dotýká substrátu velkou plochou.

Kromě toho, že by měl být substrát použitý pro DCDR hydrofobní (či superhydrofobní), neměl by také vykazovat žádné silné vlastní Ramanovo spektrum. Pokud substrát vykazuje silné spektrum, dochází při měření ke sčítání spektra měřeného a spektra substrátu. Z takového spektra je pak nutné nežádoucí pásy substrátu odečíst, což ovlivňuje výsledky měření a navíc, takovýto proces může být do určité míry neobjektivní.



Obrázek 1.3.1: Kontaktní úhel kapaliny vůči substrátu: (a) hydrofilní substrát ($\theta < 90^\circ$), (b) hydrofobní substrát ($90^\circ < \theta < 150^\circ$), superhydrofobní substrát ($\theta > 150^\circ$)

Substrát by také měl mít nízkou optickou absorbanci a vysokou optickou odrazivost, být chemicky a teplotně odolný. V první publikované práci, která testovala možnosti DCDR, byly použity čtyři různé substráty, první z nich tvořený plochou zlatou fólií, druhý deponovanou vrstvou zlata na laboratorním sklíčku (s a bez přidané organické monovrstvy) a plátek oceli pokrytý tenkou vrstvou teflonu, právě tento substrát se osvědčil v prvních experimentech s DCDR a stal se základem pro komerční výrobek s názvem SpectRIMTM. Jeho výrobcem byla firma Tienta Sciences. S rozvojem DCDR přišly i nové druhy substrátů, například v publikacích zaměřujících se na proteiny přítomné v lidských slzách autoři J. Filik a N. Stone používali substrát z leštěného fluoridu vápenatého. Vlastnosti tohoto substrátu byly pro studované látky porovnatelné s již tehdy dostupným substrátem SpectRIMTM [Filik, Stone, 2008a]. Substráty tvořené polytetrafluorethylenovými (PTFE) páskami vyrobené z komerčně dostupné těsnicí pásky byly testovány v práci Smitha a kolegů [Smith et al., 2018]. Na Oddělení fyziky biomolekul MFF UK je nejvíce využíván dnes již nevyroběný substrát SpectRIMTM [Kopecký, Baumruk, 2006] [Kočišová, Procházka, 2011] [Klener et al., 2014], který je v dnešní době nahrazován novým komerčně vyráběným substrátem μ -RIMTM, který je tvořen ocelovou destičkou s deponovanou uhlovodíkovou vrstvou s hydrofobními vlastnostmi. V současné době jsou ve vývoji nové typy substrátů především na bázi nanočástic na Katedře makromolekulární fyziky MFF UK.

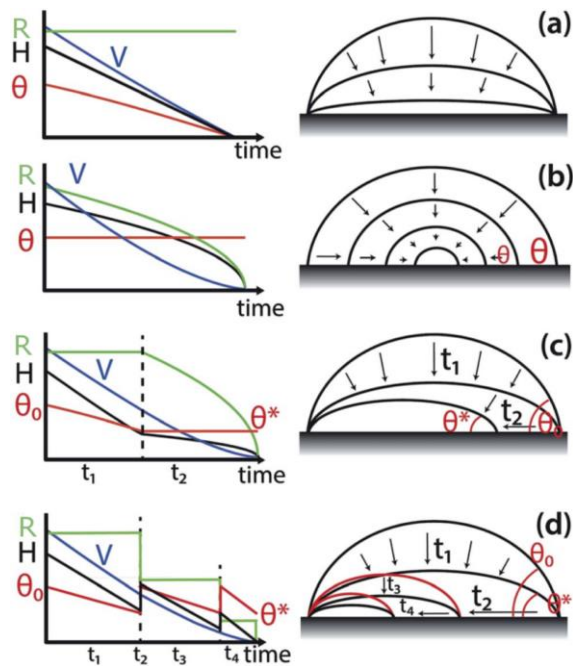
1.3.1 Vysychání kapek

Vysychání kapek je komplexním procesem, který je zkoumán už téměř sto let. Nejstarší výzkum týkající se vysychání mikrometrových kapek provedl Gudris a Kulikowa v roce 1924 [Gudris, Kulikowa, 1924]. Zkoumáno bylo množství faktorů ovlivňující vysychání kapek na pevném povrchu, například parametry okolního prostředí, vlastnosti substrátu a jeho drsnost. Tyto parametry neovlivňují jen rychlost vysychání, ale také profil kapky, dynamiku stykové plochy a vnitřní proudění tekutiny kapky [Parsa, et al., 2018].

Tématem důležitým pro tuto práci je vysychání kapek obsahujících rozpuštěné částice pevné látky. Práce Deegana a kolektivu [Deegan, et al., 1997] ukázala, že částice rozpuštěné látky se mohou při vysychání hromadit na okraji stykové plochy kapky a vytvořit tak tzv. „kávový kroužek“. Další výzkum se pak zaměřil na další způsoby ovlivňování vysychání kapky „vhodným“ způsobem a využití těchto efektů.

Kapka nakápnutá na pevný povrch s neměnicí se kontaktní linií je charakterizována svou výškou h , poloměrem R a kontaktním úhlem θ . Pokud není okolí nasyceno párou tekutiny kapky, pak se kapka může vypařovat čtyřmi hlavními způsoby, a to vypařování s konstantním poloměrem, vypařování s konstantním kontaktním úhlem, vypařování s proměnlivou velikostí kontaktního úhlu a poloměru a nakonec „stick-slip“ vypařování, kdy se kapka vypařuje s konstantním poloměrem (stick fáze), dokud nedojde k jeho náhlé změně (slip fáze), poté vypařování opět pokračuje (viz. obr. 1.3.2). [Parsa, et al., 2018]

Při vypařování v kapce dochází ke vzniku proudů, mezi dva nejvýznamnější patří kapilární proud a tzv. Marangoniho proud. Jakmile je kapka nakápnuta, kapalina začne radiálně proudit k okraji kapky, kde dochází k rychlejšímu vypařování. Tento proud, jež „doplňuje“ ubývající kapalinu, se nazývá kapilární. Pokud je tento proud v kapce dominantní, kapka se vypařuje se stálým průměrem. [Parsa, et al., 2018]



Obrázek 1.3.2: Schematické zobrazení čtyř možností při vysychání kapky: (a) s konstantním poloměrem, (b) s konstantním kontaktním úhlem, (c) s proměnlivými parametry a (d) „stick-slip“ vypařování [Zhang, et al., 2015]

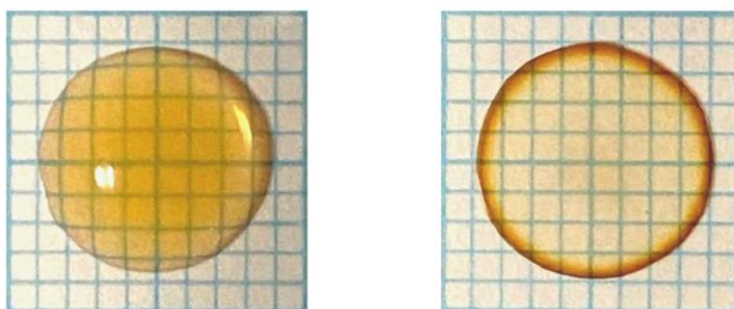
Marangoniho proud je způsobený gradientem povrchového napětí v kapce, který je způsobený nerovnoměrným rozložením teploty na povrchu kapky a/nebo koncentrací podél fázového přechodu mezi kapalinou a plynem. V případě teplotního gradientu je tento proud nazýván termokapilární, v druhém případě se proud nazývá solutální Marangoniho proud. Ve vysychající kapce se kapalina přemísťuje z míst s menším povrchovým napětím do míst s větším povrchovým napětím, což vytváří Marangoniho proud. Tudiž, směr Marangoniho proudu se může během vypařování měnit. [Parsa, et al., 2018]

Tyto dva proudy mohou v kapce koexistovat, pokud její vypařování způsobuje termodynamickou, či hydrodynamickou nerovnováhu. Bylo zjištěno, že kapilární proud je silnější, pokud je roztok zahřátý. Naopak Marangoniho proud je silnější v chlazených roztocích. [Parsa, et al., 2018]

1.3.2 Typy depozitů

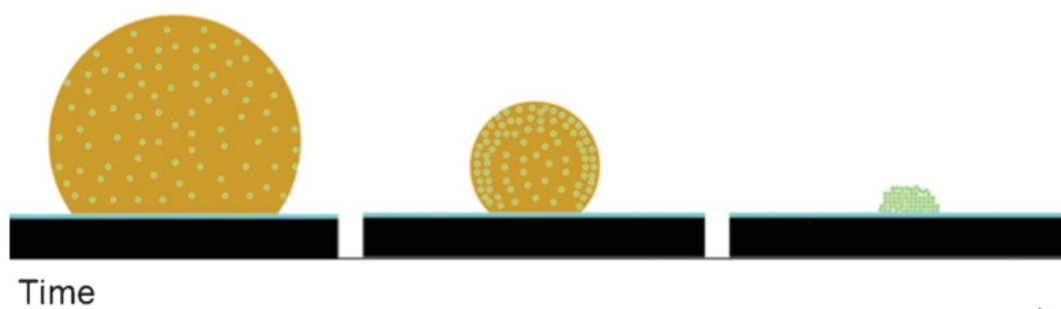
Když se kapka kávy zcela vypaří na pevném povrchu, často za sebou zanechá usazeninu ve tvaru kroužku (viz. obr. 1.3.3), takovému jevu se proto říká efekt kávového kroužku (coffee-ring effect). Tento jev je způsoben kapilárním proudem, kdy při vypařování kapky s konstantním poloměrem je rozpuštěná látka unášena

proudy ze středu kapky na okraj, kde se pak usazuje v silnější vrstvě oproti zbytku kapky. Pro vznik „kávového kroužku“ je tedy nutné, aby poloměr kapky r byl při vypařování konstantní, aby se kapalina na okraji kapky vypařovala rychleji, tudíž aby vznikl kapilární proud, a také aby kapilární proud překonal Marangoniho proud. Tyto podmínky jsou ovlivňovány mnoha parametry, a to například velikostí kapky, rychlostí vypařování, koncentrací látky v kapce a druhem rozpuštěné látky. [Parsa, et al., 2018]



Obrázek 1.3.3: Kapka kávy před a po vyschnutí [Kim et al., 2022]

Další možná forma depozitu vzniklého po vyschnutí kapky roztoku na pevném substrátu je malý flíček, kdy také dochází ke koncentraci látky, ovšem ne na okraji vyschlé kapky, ale v jejím středu. K takovému zakoncentrování dojde, pokud se kapka vypařuje s konstantním kontaktním úhlem θ . Zmenšování styčné plochy kapky zabraňuje látce usadit se na substrátu, což vede k nahromadění částic ve středu kapky. Thokchom a kolegové [Thokchom, et al., 2017] přisoudili tento jev na hydrofobních substrátech Marangoniho proud, který díky konstantnímu úhlu zůstává dostatečně prominentní k tomu, aby zanášel látku ke středu kapky (viz. obr. 1.3.4)



Obrázek 1.3.4: Vysychání kapky za konstantního kontaktního úhlu [Wu et al., 2013]

Oba tyto uvedené typy vzniklých depozitů jsou ideální pro získání Ramanových spekter, ovšem jak už bylo řečeno, proces vysychání kapek je komplexní a nelze počítat s tím, že se každý roztok bude chovat stejně, závisí na jeho koncentraci, velikosti molekul a typu studované látky. Navíc tu existuje ještě další, již uvedená, proměnná, a to zvolený substrát. Vzniklý depozit může mít několik dalších podob, například být rovnoměrně rozprostřený v místě vyschlé kapky, mohou vznikat shluky krystalů, látka může také tvořit útvary vycházející z jejích vlastností a samozřejmě, může vznikat také jakákoliv kombinace těchto případů.

1.3.3 Porovnání DCDR a klasické Ramanovy spektroskopie

DCDR sdílí mnoho výhod klasické Ramanovy spektroskopie, mezi ty hlavní patří bezkontaktní povaha obou metod a jejich rychlost, obě metody nám ve formě spektra nabízí okamžitý „snímek“ zkoumaných molekul. Navíc, při měření oběma metodami nedochází k žádným relaxačním jevům, které by měnily spektrum, jako například u metody nukleární magnetické rezonance. Klasická Ramanova spektroskopie umožňuje zkoumat vzorky relativně malé velikosti a experimentální podmínky pro provedení měření nejsou náročné, jde tedy o velmi flexibilní metodu. Je možné stejně kvalitně zkoumat kapaliny, plyny, roztoky, povrchy vlákna i krystaly. [Carey, 1982]

Za pomoci DCDR můžeme zkoumat roztoky a suspenze, ovšem potřebné objemy těchto roztoků jsou menší. Klasická Ramanova spektroskopie také vyžaduje relativně vysoké koncentrace roztoků (0,1 – 0,01 M), jelikož intenzita signálu je kvůli nepravděpodobnosti procesu Ramanovského rozptylu poměrně slabá. Navíc, signál může být překryt silnějšími procesy, jako je například fluorescence [Carey, 1982], na druhé straně za pomoci DCDR jsme schopni zkoumat roztoky o mnohonásobně nižších koncentracích (až 1 μ M).

Nevýhodou obou metod je nutnost omezení výkonu laseru. Pokud je dopadající paprsek laseru příliš intenzivní, může docházet k fotochemickým efektům ovlivňujícím vzorek [Carey, 1982], v případě DCDR může dokonce docházet k pálení vzorku, což vede k degradaci, či úplné ztrátě získaných spekter.

1.4 Využití DCDR

DCDR spektroskopii se jako první zabývala výzkumná skupina okolo D. Ben-Amotze. Jejich cílem bylo nalézt vhodnou a nenáročnou metodu pro detekci roztoků o malých koncentracích, což se jim podařilo. V první z jejich publikací týkajících se DCDR tak autoři položili základy této metody při zkoumání spekter glukózy, fruktózy a různých proteinů. V textu práce jsou popsány základní podmínky pro úspěšnost DCDR, zejména pak vlastnosti substrátu; jeho nízká optická absorbance a vysoká optická reflektivita, malý nebo žádný Ramanovský signál substrátu a hlavně, jeho nesmáčivost vůči použitému rozpouštědлу v roztoku. Autoři také pozorovali vznik depozitu ve formě „kávového kroužku“, což zvyšovalo účinnost metody. Jako substráty byly použity teflonem pokryté ocelové destičky, zlaté fólie a zlatem pokrytá sklíčka. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na destičce z oceli pokryté tenkou (<50 nm) vrstvou teflonu [Zhang et al., 2003]. Další prací této skupiny bylo využití DCDR k rozlišení tří přírodních variant insulinu – lidského, hovězího a vepřového, tentokrát byl použit pouze substrát s tenkou vrstvou teflonu, jelikož se osvědčil v minulé práci. Díky DCDR bylo možné získat kvalitní spektra, která pak algoritmus roztrídil podle druhu detekovaného insulinu. [Ortiz et al., 2004]

Dalším důležitým milníkem v rozvoji DCDR vedeném skupinou D. Ben-Amotze byla práce Zhanga a kolegů, kteří demonstrovali, že při použití DCDR je možné omezit ovlivňování měřeného spektra fluorescencí a nechtěným signálem použitých pufrů. Pozorovali řádový pokles intenzit těchto nežádoucích záření při použití DCDR oproti konvenční Ramanově spektroskopii při studiu fosfoserinu (aminokyselina) a myoglobinu (protein). V této práci byly použity dva druhy substrátů; zlatá fólie a teflonem pokrytá ocelová destička, nyní vyráběna komerčně jako substrát SpectRIMTM, který byl vyvinut ve spolupráci s výzkumnou skupinou D. Ben-Amotze [Zhang et al., 2004]. Substrát SpectRIMTM byl dále využit v práci Y. Xie a kol. [Xie et. al, 2004], kteří detekovali spektrální změny při fosforylaci tyrosinu v peptidech. O rok později Zhang a kol. [Zhang et al., 2005] vydali práci, která se hlouběji zaměřila na změny spektra při fosforylaci na konkrétním peptidu.

V práci P. Ciprianiho a D. Ben-Amotze [Cipriani, Ben-Amotz, 2005] se autoři zaměřili na interpretaci naměřených spekter. Ze tří vybraných molekul z rodiny taxanů vytvořili několik roztoků o koncentracích 1 μM až 1 mM. Získaná

spektra porovnali se spektry získanými z pevných forem těchto látek a interpretovali hlavní spektrální pásy. K porovnání využili i teoretické kvantově-mechanické výpočty energetických hladin daných molekul. Teoretická spektra velmi dobře odpovídala těm naměřeným. DCDR bylo dále použito ke zkoumání aminokyselin, konkrétně šlo o proces protonace, tedy navázání protonu. Zkoumané kyseliny navázáním protonu měnili své pH a za pomoci DCDR bylo možné spolehlivě určit, že k tomuto procesu došlo v roztoku o koncentraci 100 μM . Vyšší pH znamenalo zesílení intenzity určitých Ramanovských pásů v naměřených spektrech [Xie et al., 2005]. Odolnost vzorku při dlouhodobém působení laseru zkoumali ve své práci C. Ortiz a kol. [Ortiz et al., 2006]. Laserový svazek o výkonu 8 mW osvětloval v tomto experimentu vzorky lysozomu, ovalbuminu, β -laktoglobulinu, kraviho insulinu a dalších biologicky významných látek po dobu až jedné hodiny, žádné významné změny ve spektru však nebyly zaznamenány, vyzdvížena byla také vysoká reprodukovatelnost měření spekter a jednoduchost přípravy vzorků.

Významnou dvojicí pro vývoj DCDR jsou také J. Filik a N. Stone. Ve své práci nejdříve ověřili citlivost a spolehlivost metody DCDR při zkoumání roztoků několika bílkovin, a to albuminu, lysozymu a laktoferinu, a jejich mixů. Na substrátu z fluoridu vápenatého byli schopni připravit stabilní vzorky a rozlišit relativně malé změny v koncentracích jednotlivých složek mixu. A to hlavně díky tomu, že roztok po vyschnutí vytvářel depozit v podobě kávového kroužku a rozložení jednotlivých látek v prstenci kroužku bylo nehomogenní. Na vnitřním okraji byla detekována spektra lysozymu, zatímco na vnějším okraji spektra odpovídala zbylým látkám [Filik, Stone, 2007]. Navazující práce této dvojice se zaměřila na zkoumání spekter lidských slz, bylo pozorováno vysychání kapek slz na laboratorních sklíčkách a následně byly analyzovány vzniklé depository. Ty pak byly zmapovány pomocí DCDR. Z výsledků vyplynulo, že DCDR by mohla být vhodnou metodou k diagnostice očních infekcí, ale autoři uvedli, že je nutný další výzkum [Filik, Stone, 2008a]. V navazující práci byla zkoumána spektra slzných roztoků získaných od tří dobrovolníků, jeden vzorek slz byl získán za přirozených podmínek a druhý po spuštění reflexu zívání. Jako substrát byla opět použita destička fluoridu vápenatého. Měření proběhlo i na substrátu SpectRIMTM, ovšem autoři nenašli žádné výhody tohoto substrátu oproti CaF_2 destičkám [Filik, Stone, 2008b]. Výzkum pak pokračoval dále, tentokrát s použitím centrifugálního filtru na oddělení

proteinových složek slzného roztoku. Podle autorů se DCDR ukázalo jako vhodný nástroj pro diagnostiku infekčních onemocnění oka [Filik, Stone 2009].

Využitím DCDR v oblasti medicíny se také zabýval tým Ishana Barmana [Dingari et al., 2012]. Pomocí metody DCDR detekovali na křemenných sklíčkách glykaci albuminu, jenž je důležitým markerem při onemocnění diabetes. Výsledkem bylo, že pomocí DCDR lze spolehlivě rozlišit albumin od glykovaného albuminu, a jde tedy o vhodnou metodu ke sledování a monitorování průběhu nemoci diabetes.

DCDR bylo používáno zejména ke studiu organických látek, ovšem to neznamená, že tuto metodu nebylo možné použít i v oblasti anorganické chemie. Abdolazadeh a kolegové studovali katalyzovanou oxidaci alkenů, DCDR se ukázala být vhodnou metodou v porovnání s klasickými metodami používanými v této oblasti. Jako substrát byla použita křemenná sklíčka. [Abdolazadeh et al., 2013]

Metodou DCDR se také zabývají na MFF UK, konkrétně na Oddělení fyziky biomolekul. Hlavním využitím je zde zkoumání biomolekul a biologicky významných látek. V. Kopecký Jr. a V. Baumruk se ve své práci [Kopecký, Baumruk, 2006] zajímali o albumin, konkrétněji o struktury, které po vyschnutí kapky vytváří. Účinnost metody při zkoumání roztoků liposomů ověřili E. Kočišová a M. Procházka [Kočišová, Procházka, 2011]. V jejich práci byli nejen schopni detekovat liposomy v koncentracích o dva řády nižších než při konvenčním použití Ramanovy spektroskopie, ale navíc, při vysychání vzorku docházelo i k praktické separaci lipidů a fosfátového pufru. J. Klener a kolegové [Klener et al., 2014] se zabývali studiem mozkomíšního mozku za pomoci metody DCDR. Jejich cílem bylo zjistit dobu stability mozkomíšního mozku při opakovaném zmrazování a rozmrazování. Další práce zaměřená na detekční limity se zabývala porfyriny (cyklické organické sloučeniny), výsledky tentokrát byly porovnány s Ramanovskou metodou SERS (povrchově zesílená Ramanova spektroskopie). Získané limitní detekční koncentrace byly porovnatelné, či dokonce nižší [Kočišová, Procházka, 2015]. T. Pazderka a V. Kopecký Jr. studovali rozdíly ve spektru proteinogenních aminokyselin, které se mohou vyskytovat ve své krystalické, či skelné fázi [Pazderka, Kopecký, 2017]. E. Kočišová a M. Procházka se opět zaměřili na detekční limity, tentokrát roztoku dipikolinové kyseliny. Dipikolinová kyselina je mimo jiné důležitým markerem pro výskyt bakterie *Bacillus anthracis*, která způsobuje onemocnění antrax [Kočišová, Procházka, 2018]. Kyselinou acetylsalicylovou (aspirin), riboflavinem (vitamin B2) a methylenovou modří se tým

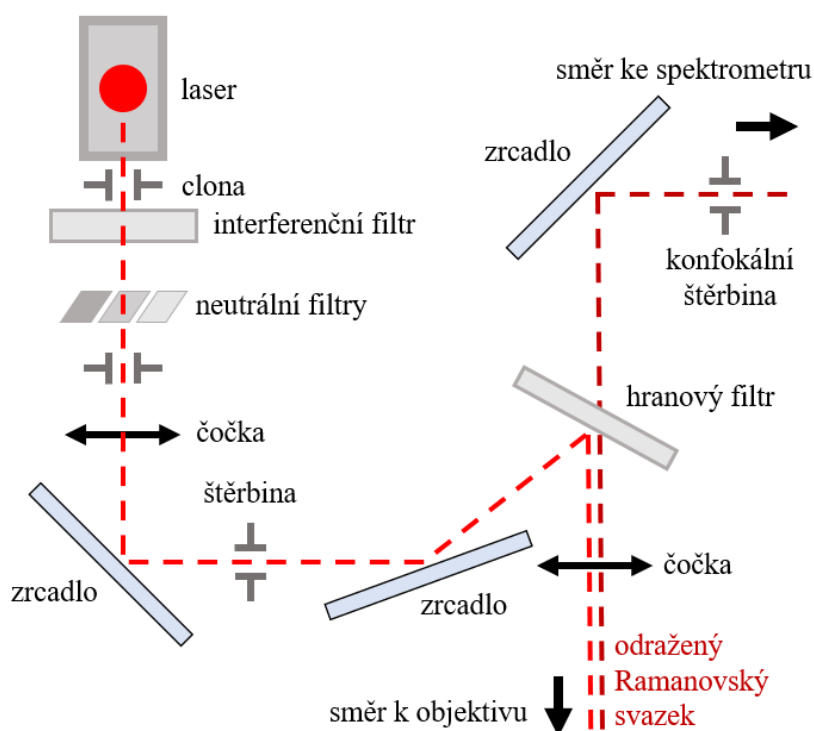
E. Kočišové zabýval o dva roky později [Kočišová, Sayedová a Procházka, 2020]. Jako substrát jsou na Oddělení fyziky biomolekul používány zejména destičky SpectRIM™, ovšem jelikož již v současné době nejsou ve výrobě, v blízké budoucnosti bude nutné přejít na jiný druh substrátu. Jednou z dostupných možností je například komerčně vyráběný substrát μ -RIM™, který se ovšem nejví jako rovnocenná náhrada.

2 Experimentální část

2.1 Spektrometr

Pro měření Ramanových spekter byl používán integrovaný Ramanův systém HR800 (Ramanův mikrospektrometr – mikroskop konfokálně spojen se spektrografem) od společnosti Horiba Jobin Yvon. Laserový paprsek vstupuje do systému skrz clonu do interferenčního filtru. Ten odstraňuje vedlejší plazmové linie laseru. Následují šedé filtry používané na snížení intenzity laseru v případě, že laser poškozuje měřený vzorek. Následuje další clona a čočka zaostřující paprsek do štěrbinu prostorového filtru.

Pomocí zrcadel je paprsek nasměrován k hranovému filtru, který je tvořen vrstvami dielektrického materiálu vytvářejícími gradient indexu lomu. Tento filtr určuje práh propuštěných vlnových délek. Paprsek pak prochází čočkou do objektivu mikroskopu a dopadá na vzorek. Odražené Rayleighovo a Ramanovo záření se následně vrací stejnou cestou do hranového filtru. Záření s původní vlnovou délkou se vrací zpět, ale neelasticky odražené záření, tedy záření s posunutou vlnovou délkou, prochází dál ke spektrometru (viz. obr. 2.1.1).



Obrázek 2.1.1: Schéma integrovaného Ramanova systému HR800

Byl použit helium-neonový laser o vlnové délce 632,817 nm a výkonu 20 mW. Dostupné byly šedé filtry o optické hustotě 0,3, 0,6, 1, 2 a 3, které odpovídají výkonům 3 mW, 1,6 mW, 0,48 mW, 0,065 mW a 0,016 mW na vzorku. Vzorky byly pozorovány za pomoci objektivů se zvětšením $5\times$, $10\times$ a $50\times$. Spektra byla sbírána pomocí objektivu $50\times$ ULWD (ultra long working distance – objektiv s prodlouženou pracovní vzdáleností, tedy s prodlouženou ohniskovou vzdáleností). Konfokální štěrbinu byla otevřena na průměr 400 μm , akumulace spekter byla pro každé měření nastavena na 60×1 s.

2.2 Použité substráty

2.2.1 μ -RIMTM

Substrát firmy BioTools. Substrát tvoří plátek nerezové oceli pokrytý tenkou uhlovodíkovou vrstvou, uložený do plastové destičky pro lepší manipulaci (viz. obr. 2.2.1) [μ -RIM user manual]. Kontaktní úhel s vodou je 96° , což odpovídá hydrofobnímu substrátu. Substrát nevykazuje žádné nežádoucí spektrální pozadí [BioTools, 2015].



Obrázek 2.2.1: Substrát μ -RIMTM [BioTools, 2015]

2.2.2 SpectRIMTM

Substrát firmy Tienta Sciences. Substrát tvoří plátek nerezové oceli s tenkou (<50 nm) vrstvou teflonu, uložený do plastové destičky (viz. obr. 2.2.2). Kontaktní úhel s vodou je 122° [Tienta Sciences, 2003]. Substrát nevykazuje žádné nežádoucí spektrální pozadí. V současnosti se tento substrát již nevyrábí.



Obrázek 2.2.2: Substrát SpectRIMTM [SigmaAldrich]

2.2.3 Au a Cr substráty

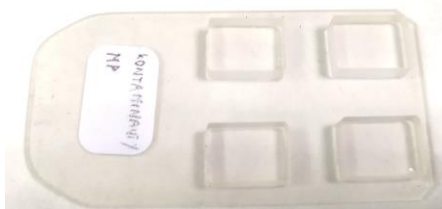
Tyto substráty byly připravovány metodou vakuového napařování na sklo (podložní sklíčko) v komoře Leybold-Heraeus UNIVEX 450. Na evakuování komory se používá rotační vakuová pumpa a turbomolekulární pumpa s výsledným tlakem 3×10^{-6} mbar. Použité zlato a chrom pochází od firmy Kurt J. Lesker Company (čistota materiálu 5N). Vrstva chromu je napařována z wolframové tyčinky pokryté chromem při 30% výkonu (z maximálního výkonu 200 A) po dobu 20 s. Výsledná tloušťka chromové vrstvy je přibližně 50 nm. Zlato je ve formě nepravidelných peletek umístěno ve wolframovém výparníku tvaru lodičky a je napařováno při 38 % výkonu po dobu 50 s. Tloušťka vzniklé vrstvy je v tomto případě více než 100 nm. Au substrát je na obrázku 2.2.3. Poděkování za přípravu těchto substrátů patří Dr. Mykolovi Brynzovi z Fyzikálního ústavu MFF UK.



Obrázek 2.2.3: Sklíčko s vrstvou zlata

2.2.4 CaF₂ substrát

Substrát z fluoridu vápenatého pochází z optických dílen MFF UK Jana Ulricha. Destičky byly vyleštěny a umístěny na plastovou podložku (viz. obr. 2.2.4). Kontaktní úhel s vodou je 90° , což představuje rozhraní mezi hydrofobním a hydrofilním povrchem. Substrát má intenzivní Ramanovský pás na pozici 321 cm^{-1} .

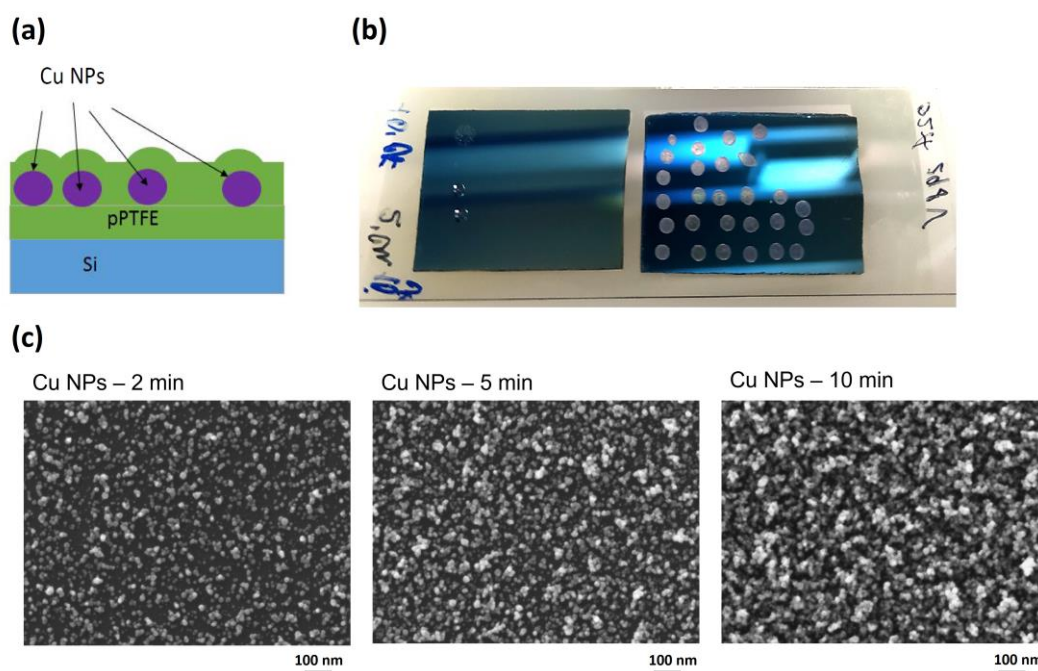


Obrázek 2.2.4: Destičky fluoridu vápenatého

2.2.5 Nanodrsné substráty – substráty s nanočásticemi

(Nps - nanoparticles)

Základem těchto substrátů je křemíková destička pokrytá tenkou vrstvou polymeru pPTFE (polytetrafluoretylen). Na ni byly následně nanoseny měděné nanočástice (průměr 16 ± 5 nm, tlak v agregační komoře 40 Pa, magnetronový proud 200 mA), které způsobily změnu drsnosti povrchu, z povrchu hladkého se stal povrch nanodrsný. Důsledkem této změny je i změna hydrofobicity, s nárůstem drsnosti hydrofobicita roste. Doba depozice nanočástic byla 2, 5 a 10 minut, a takto byly vytvořeny tři substráty, dále označovány jako NpsCu2, NpsCu5 a NpsCu10. Vyšší doba depozice je spojena s větším počtem nanosených nanočástic a následně i s vyšší drsností. Na nanočástice byla v posledním kroku ještě nadeponována vrstva pPTFE. Výsledná struktura substrátů byla Si destička – pPTFE (20 nm) – CuNPs – pPTFE (20 nm), viz. Obr. 2.2.5. Tyto substráty byly připraveny na Oddělení fyziky vrstev a povrchů na Katedře makromolekulární fyziky MFF UK pod vedením doc. Ondřeje Kyliána.



Obrázek 2.2.5: Nanodrsné substráty; (a) schéma substrátu, (b) fotografie substrátu NpsCu10, (c) snímky povrchů nanodrsných substrátů pořízené za pomoci skenovacího elektronového mikroskopu

2.3 Použité kontaminanty

2.3.1 Melamin

Melamin (1,3,5-triazin-2,4,6-triamin – $C_3H_6N_6$, viz. obr. 2.3.1) je bezbarvá až bílá látka ve formě krystalků, či prášku. Při kombinaci s formaldehydem vytváří umělou pryskyřici, která je využívána ke tvorbě plastů. Velký podíl melaminu (67 % na jednotku hmotnosti) tvoří dusík, díky tomuto byly pokusy ho nezákonně přidávat do jídla. Zdánlivě totiž zvyšuje podíl proteinové složky v daném potravinářském produktu.

Melamin má dráždivý efekt při kontaktu s pokožkou, po požití se akumuluje v ledvinách a vede ke tvorbě ledvinových kamenů a při dlouhodobější konzumaci až k selhání ledvin [Skinner, 2010]. Melamin může také způsobovat různá poškození nervového systému při kritických fázích jeho vývoje, tedy hlavně u dětí [Wei, Liu, 2012].

V roce 2007 došlo k odhalení, že melamin byl přidáván do krmiva pro domácí zvířata od kanadské firmy Menu Foods, stalo se tak poté, co náhle prudce stoupla počty úmrtí domácích zvířat, která vykazovala stejné symptomy, a to zvracení, časté močení a nechuť k jídlu. Dle různých online databází na otravu zemřeli až tisíce domácích zvířat [Puschner et al., 2007].

Nejznámějším případem otravy melaminem patří aféra hromadných otrav mlékem v Čínské lidové republice v roce 2008. Otráveno bylo odhadem 300 000 lidí, z toho 6 dětí zemřelo z důvodu poškození ledvin a 54 000 jich bylo hospitalizováno. Do skandálu bylo zapojeno minimálně 22 různých výrobců mléčných produktů [Mu, 2008].

Hodnota LD_{50} (smrtelná dávka pro 50 % testovaných jedinců) při orálním podání byla pro testovanou skupinu potkanů rovna 3161 mg/kg tělesné hmotnosti [World Health Organization]. Detekční limit metodou DCDR byl v bakalářské práci určen na 6,34 μ M pro substrát SpectRIMTM a 0,16 mM pro substrát μ -RIMTM.

2.3.2 Picloram

Picloram (4-amino-3,5,6-trichlorpyridin-2-karboxylová kyselina –

$C_6H_3Cl_3N_2O_2$, viz obr. 2.3.1) je bílá až béžová látka ve formě prášku, či malých krystalků. Zapáchá mírně po chlóru. Jde o systemický herbicid používaný proti travinám a dřevinám. Používá se na pastvinách, lesích i na obilných polích. [Howard, Michalenko, 1991]

Picloram je velmi slabě toxický až netoxický při pozření, LD_{50} při orálním podání se pro testovanou skupinu potkanů pohybovala kolem 5000–8200 mg/kg. Nežádoucí efekty při kontaktu s touto látkou jsou jinak minimální. [Exttoxnet, 1993b]

Vyhláškač.232/2004 Sb. a World Health Organization udává maximální přijatelnou denní dávku thiramu pro dospělého člověka 0,2 mg/kg tělesné hmotnosti [ČHMÚ]. V České republice je podle vyhlášek MŽP, MZE a vlády České republiky limitní koncentrace picloramu v podzemních vodách 0,1 $\mu\text{g/l}$. Detekční limit metodou DCDR byl v bakalářské práci určen na 41,40 μM pro oba substráty (SpectRIMTM a μ -RIMTM).

2.3.3 Thiram

Thiram (tetramethylthiuramdisulfid – $C_6H_{12}N_2S_4$, viz. obr. 2.3.1) je bílá, až žlutá krystalická látka. Jde o organický disulfid, běžně používaný jako fungicid, mimo to má antiseptické a antibakteriální účinky [Cameo Chemicals]. Díky tomuto byl používán také jako součást léčiv proti svrabu, antibakteriálních krémů a mýdel.

Thiram je středně toxický při požití a silně toxický při vdechnutí. Může u lidí způsobovat malátnost, zvracení a žaludeční potíže [Hayes, Laws, 1991].

Hodnota LD_{50} při orálním podání se pro testovanou skupinu potkanů pohybovala kolem 560–1000 mg/kg tělesné hmotnosti, u králíků byla tato hodnota pouze 210 mg/kg [World Health Organization]. Koncentrace ve vzduchu či vodě přesahující 1500 mg/cm³ je považována za bezprostřední ohrožení veškerého života v daném médiu [Exttoxnet, 1993a].

Vyhláška č.232/2004 Sb. a World Health Organization udává maximální přijatelnou denní dávku thiramu pro dospělého člověka 0,01 mg/kg tělesné hmotnosti [ČHMÚ]. Detekční limit metodou DCDR byl v bakalářské práci určen na 2,50 μM pro oba substráty (SpectRIMTM a μ -RIMTM).

2.3.4 Bentazon

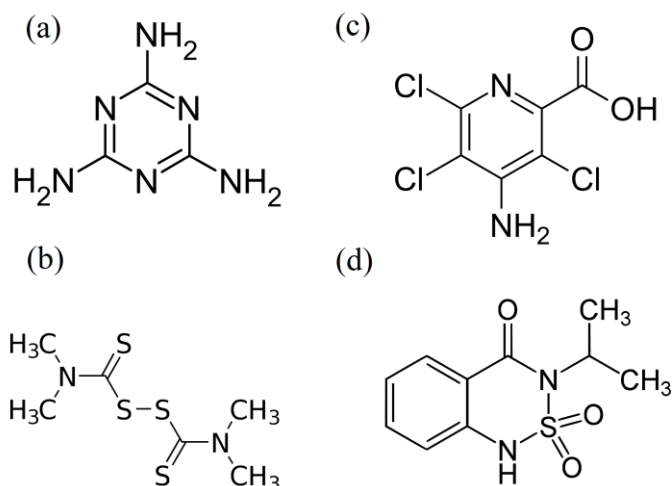
Bentazon (3-isopropyl-1H-2,1,3- benzothiadiazin-4(3H)-on- 2,2-dioxid –

$C_{10}H_{12}N_2O_3S$, viz. obr. 2.3.1) je bílá až nahnědlá látka ve formě prášku nebo krystalu. Je používán jako selektivní herbicid, ničí tedy jen takové rostliny, jež nejsou schopny bentazon metabolizovat. Mezi takovéto rostliny patří zejména trávy a příbuzné druhy [Exttoxnet, 1993c].

Bentazon je mírně toxický při požití a kontaktu s pokožkou. Může způsobit zvracení, pocit slabosti, třasy a potíže s dýcháním. Celkově je ale bentazon vůči necílovým organismům toxický velmi slabě a prochází trávicími trakty rychle bez reakce [Exttoxnet, 1993c].

Hodnota LD_{50} při orálním podání se pro testovanou skupinu potkanů pohybovala kolem 100–2063 mg/kg tělesné hmotnosti, u králíků byla tato hodnota 750 mg/kg [Exttoxnet, 1993c].

Vyhláškač.232/2004 Sb. a World Health Organization udává maximální přijatelnou denní dávku thiramu pro dospělého člověka 0,1 mg/kg tělesné hmotnosti [ČHMÚ]. V České republice je podle vyhlášek MŽP, MZE a vlády České republiky limitní koncentrace bentazonu v podzemních vodách 0,1 $\mu\text{g/l}$ a v povrchové vodě 4,5 $\mu\text{g/l}$ [ČHMÚ]. Detekční limit metodou DCDR byl v bakalářské práci určen na 41,60 μM pro substrát SpectRIMTM a 2,08 mM pro substrát μ -RIMTM.



Obrázek 2.3.1: Strukturální vzorce zkoumaných látek: (a) melamin, (b) thiram, (c) picloram, (d) bentazon

2.4 Příprava vzorků

Studované látky byly zakoupeny ve formě prášku a s největší dostupnou čistotou. Prášek byl nanesen na skleněnou destičku a poté z něj byla vždy změřena minimálně tři spektra. Tato spektra byla dále použita jako reference k dalšímu měření. Rozpustnosti látek byly převzaty z literatury [Yalkowski et al., 2003] a z předchozích zkušeností s těmito látkami získanými při měření do bakalářské práce. Pro roztoky byla použita deionizovaná voda (Millipore-Q, 18 M Ω). Konkrétní informace o látkách a základních roztocích jsou uvedeny v následující tabulce:

Tabulka 2.4.1: Přehled kontaminantů, jejich čistoty, rozpustnosti a koncentrací v použitých roztocích

látka	firma	čistota	Rozpustnost ve vodě dle lit. [Yalkowski et al., 2003]		Koncentrace základního roztoku	
			mg/ml	mM	mg/ml	mM
melamin (<i>kat. č. M2659</i>)	Sigma-Aldrich Chemistry	99,0 %	2,69	21,35	2,00	15,86
picloram (<i>kat. č. 36774</i>)	FLUKA	99,6 %	0,55	2,28	0,50	2,07
thiram (<i>kat. č. 43966</i>)	Sigma-Aldrich Chemistry	99,0 %	0,03	0,13	0,03	0,13
bentazon (<i>kat. č. 32052</i>)	FLUKA	99,9 %	0,50	2,08	0,50	2,09

Tyto základní roztoky sloužili jak k přímému měření či dalšímu ředění, tak k vytváření roztoků směsí kontaminantů. Každá vytvořená kombinace kontaminantů, ať už s jakýmkoliv koncentracemi, byla vytvořena přímo z těchto základních roztoků.

Objem nakápnuté kapky byl vždy 2 μ l. Po nakápnutí na substrát byl vzorek zakryt Petriho miskou, aby se zabránilo kontaminaci prachem po čas vysychání. Kapka vysychala za pokojové teploty po dobu 30–120 minut. Po úplném vyschnutí byl vzorek přenesen do laboratoře s mikrospektrometrem ke studiu.

2.5 Zpracování spekter

Spektra se vykreslují do grafů, kde osa y odpovídá relativní intenzitě signálu a osa x Ramanově posunu, který se vyjadřuje jako absolutní hodnota z rozdílu vlnočtu ($\tilde{\nu} = 1/\lambda$, kde λ je vlnová délka) dopadajícího záření a rozptýleného záření. Zpracování naměřených spekter byl použit program OriginPro, ve kterém byla s pomocí modulu Peak Analyzer odečítána ze získaných spekter případná nežádoucí pozadí nebo spektrální pásy substrátu. Na datech získaných z několika depozitů byla také provedena faktorová analýza, tento proces je popsán v následující podkapitole.

2.5.1 Faktorová analýza

Faktorová analýza je statistickou metodou používanou ke zpracování vyššího množství dat. Tato multivariační technika využívá redukce matic, jejichž složkami jsou naměřená data, na nejmenší možnou dimenzi. Dimenze matic je pak rovna faktorům, které popisují zkoumaný systém. Existuje více postupů pro tento proces, všechny s ekvivalentními výsledky. Mezi nejpoužívanější z nich patří metoda singulárního rozkladu neboli SVD (Singular Value Decomposition) [Malinowski, 2002].

Nechť A je matice $m \times n$ tvořená daty. Bez újmy na obecnosti předpokládejme, že $m \geq n$. SVD spočívá v rozkladu této matice na součin:

$$A = UWV^T \quad (2.5.1)$$

Kde matice U má rozměry $m \times n$ a je ortogonální, V je ortogonální matice o rozměrech $n \times n$ a W je diagonální matice se stejnými rozměry, jejíž členy jsou nezáporné. Prvky W se nazývají singulární hodnoty a jsou uspořádány sestupně. V našem případě bude matice A tvořena n spektry s m spektrálními body. Z předchozího vztahu pro prvky této matice platí vztah:

$$A_{kl} = \sum_{i=1}^n U_{ki} W_{ii} V_{li} \quad (2.5.2)$$

V tomto rozkladu je každé l -té naměřené spektrum lineární kombinací n subspekter, která odpovídají sloupcům ortogonální matice U . Prvky matice V jsou koeficienty těchto lineárních kombinací. Prvky diagonální matice W vyjadřují váhový faktor. Faktorová analýza nám dává jedná tato subspektra, ale také jejich statistickou váhu (singulární čísla) a normalizované koeficienty udávající zastoupení subspekter v našich naměřených spektrech uložených ve sloupcích matice V .

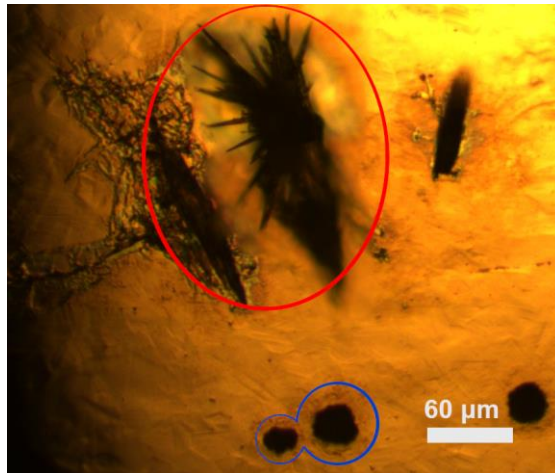
V této práci budeme pracovat pouze s prvním subspektrům, které popisuje nejdůležitější společné rysy všech naměřených spekter. Aproximuje tedy celou studovanou sadu dat. Další subspektra pak popisují spektrální změny mezi naměřenými spektry, každé z nich obsahuje vlastní, na ostatních subspektech nezávislé informace o naměřených datech, od určitého subspektra pak jde jen o šumovou složku.

K hromadnému zpracování dat získaných z mapování, tedy ze spekter získaných z bodů sítě pokrývající vybranou část depozitu, byl využit program vytvořený J. Palackým a kolegy [Palacký et al., 2011]. Pokud naměříme sadu dat (spekter) z vybrané oblasti depozitu, pak za pomoci koeficientů pro první subspektrum můžeme danou oblast „zmapovat“. Vytvořená gradientní mapa v tomto případě ukazuje rozložení intenzity signálu v dané oblasti, tedy místa, kde je přítomna látka odpovídající naměřeným spektrům. Pokud se v depozitu nachází více různých látek – spekter, můžeme se při zpracování omezit jen na části prvního subspektra obsahující význačné pásy nebo spektrální oblasti pouze jedné z látek, uvidíme pak její rozložení v tomto depozitu.

3 Výsledky měření

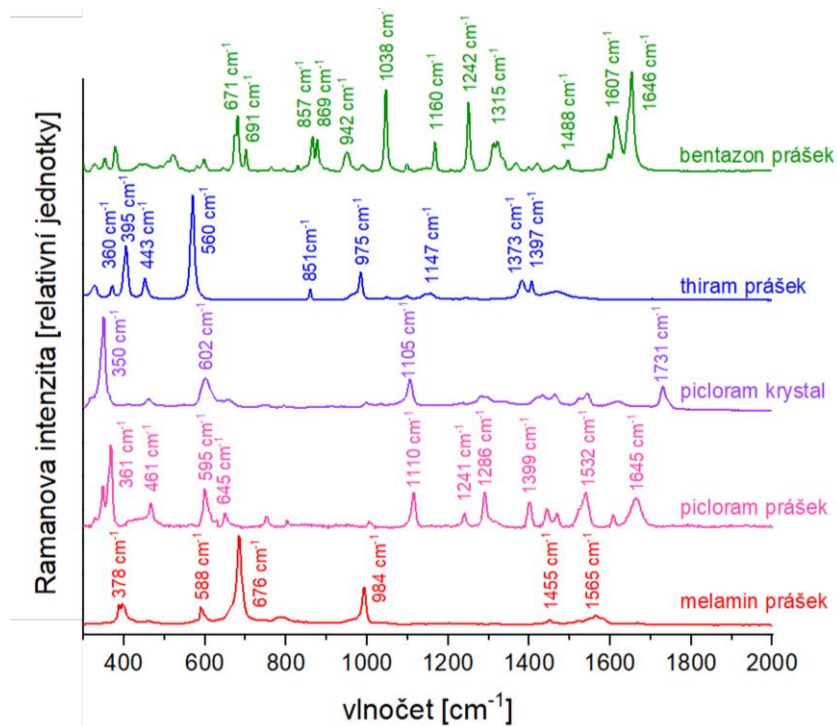
Bakalářská práce „Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků vybraných kontaminantů“, na kterou tato práce volně navazuje, se zabývala studiem čtyř kontaminantů, a to melaminu – bílkovinové náhražky, pesticidů picloramu a bentazonu a fungicidu thiramu. V jejím rámci byly roztoky těchto látek nakápnuty na 3 různé substráty: SpectRIM™; již nevyráběný komerční substrát, μ -RIM™; relativně nový komerční substrát považovaný za náhradu za SpectRIM™ a nekomerční „jamkový“ substrát připravený na Katedře makromolekulární fyziky MFF UK. V této budeme pracovat se stejnými čtyřmi kontaminanty. Výsledková část je rozdělena do tří hlavních částí, v první budou porovnány výsledky měření bakalářské práce na komerčním substrátu s výsledky na nových nanodrsných substrátech vyvíjených na Katedře makromolekulární fyziky MFF UK. Druhá část se pak zabývá uměle připravenými směsmi roztoků kontaminantů na substrátu μ -RIM™. Třetí a poslední část se zaměří na reálný vzorek, a to kojeneckou směs Sunar Complex 1, do které bude přidán melamin. Melamin byl v minulosti nezákonně přidáván do podobných kojeneckých směsí. Cílem této části je pokusit se detekovat melamin v Sunaru při relevantních koncentracích, které odpovídají koncentracím detekovaným při melaminovém skandálu v Číně z roku 2008.

Aby bylo možné porovnávat získaná spektra v průběhu měření, byla nejdříve změřena spektra zakoupených práškových forem všech použitých kontaminantů, a to nejen obvyklá spektra z „fingerprint“ oblasti Ramanova posunu (vlnočtu) $300\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$, ale i spektra v oblasti valenčních vibrací $2000\text{--}3800\text{ cm}^{-1}$. Kromě práškových spekter čtyř použitých kontaminantů je také nutné zmínit spektrum krystalické formy picloramu. Toto spektrum již pozorovala Kuižová a kolegové [Kuižová et al., 2021a]. Spektrum picloramu se mění v závislosti na tom, jaká forma při vysychání vzniká. Spektru prášku odpovídají spektra získaná z amorfních shluků vzniklých v depozitu po vyschnutí roztoku látky, picloram je ale také schopný tvořit podlouhlé tenké krystaly, které poté vykazují rozdílné spektrum. Je dokonce možné vidět obě formy picloramu (tedy i obě spektra) v jednom depozitu (viz. obr. 3.1.1).

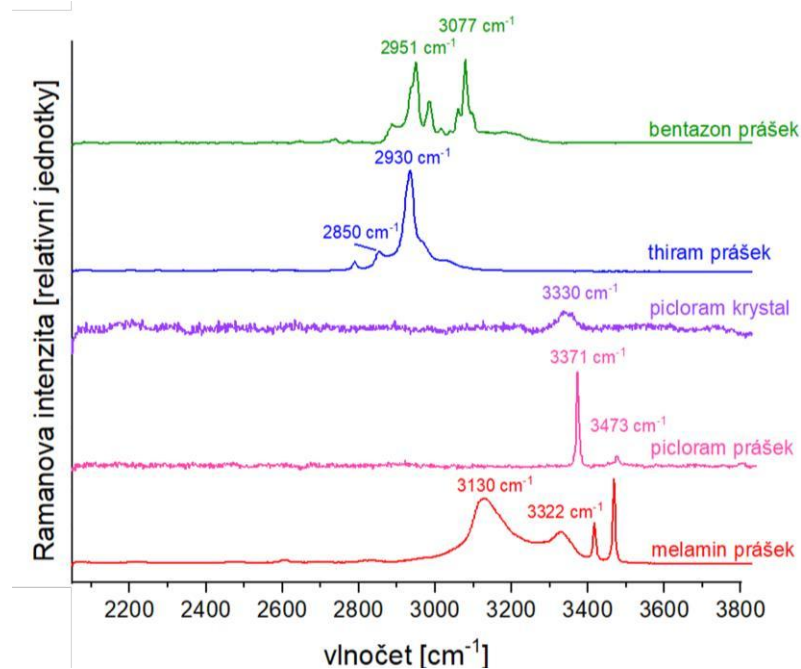


Obrázek 3.1.1: Dvě formy picloramu ve stejném depozitu z roztoku o koncentraci 1 mM; nahoře (červeně) – krystalická forma, dole (modře) „prášková“ forma (kompozitní obrázek dvou zaostření)

Různá spektra pro různé formy jedné látky nejsou úplně neobvyklá, například ve spektru melaminu, který je také jedním z použitých kontaminantů, dochází k rozdělení jednoho z méně intenzivních pásů při změnách v rozložení náboje molekuly. Intenzity pásů se také mohou u všech látek měnit v důsledku různých natočení krystalů v depozitu. Změna ve spektru picloramu je ovšem natolik výrazná, že je nutné ji zdůraznit. Spektra získaná z prášků použitých kontaminantů a DCDR spektrum krystalické formy picloramu získané z depozitu na obrázku 3.1.1 je zobrazeno na obrázku 3.1.2 a 3.1.3.



Obrázek 3.1.2: Referenční spektra čtyř kontaminantů ve spektrální oblasti 300–2000 cm^{-1} ; práškové spektrum melaminu, práškové spektrum picloramu a krystalové DCDR spektrum picloramu získané z deponátu roztoku, práškové spektrum thiramu a práškové spektrum bentazonu



Obrázek 3.1.3: Referenční spektra čtyř kontaminantů ve spektrální oblasti 2000–3800 cm^{-1} ; práškové spektrum melaminu, práškové spektrum picloramu a krystalové DCDR spektrum picloramu získané z deponátu roztoku, práškové spektrum thiramu a práškové spektrum bentazonu

Výrazné pásy melaminu na pozicích 676 cm^{-1} a 984 cm^{-1} bývají přisuzovány vibračním triazinového kruhu (heterocyklický kruh tvořený třemi atomy uhlíku a třemi atomy dusíku) zvaným dýchací vibrace, při kterých se kruh periodicky roztahuje a stahuje. Zvláště tyto dva pásy byly využívány k identifikaci přítomnosti melaminu v depozitech. Pásy 1455 cm^{-1} a 1565 cm^{-1} jsou způsobeny složitějšími kombinovanými vibračními pohyby molekuly. Dva široké pásy v oblasti valenčních vibrací ($2000\text{--}3800\text{ cm}^{-1}$) jsou způsobeny interagujícími -NH_2 skupinami v molekule, ostré pásy v oblasti za 3400 cm^{-1} jsou naopak způsobeny volnými -NH_2 skupinami [Meier et al., 1995]. K identifikaci picloramu byl používán hlavně vysoce intenzivní pás 350 cm^{-1} resp. 361 cm^{-1} (u práškové formy) [Dias, 2019], při nižších koncentracích totiž ostatní pásy rychle zanikají. Co se týče spektra thiramu, pásy na pozicích 360 cm^{-1} , 390 cm^{-1} a 443 cm^{-1} odpovídají molekulovým vibračním, které kombinují deformační a torzní pohyby. Vysoce intenzivní pás na pozici 560 cm^{-1} odpovídá kombinaci deformačních vibrací v oblasti (CH_3NCH_3) a valenčních (stretching) vibrací ve zbytku molekuly. Právě tyto pásy byly používány pro identifikaci thiramu v depozitech. Zbylé pásy v oblasti pod 2000 cm^{-1} jsou výsledkem komplexních vibračních pohybů molekuly. Skupina pásů ve spektrální oblasti $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ je pak zejména tvořena deformačními (bending) vibracemi -CH_3 skupin v molekule, i tyto pásy sloužily jako identifikátor thiramu v depozitu [Hieu et al., 2021]. Pro identifikaci bentazonu pak byly použity hlavně vysoce intenzivní pásy na pozicích 1038 cm^{-1} , 1607 cm^{-1} a 1646 cm^{-1} [Dias, 2019].

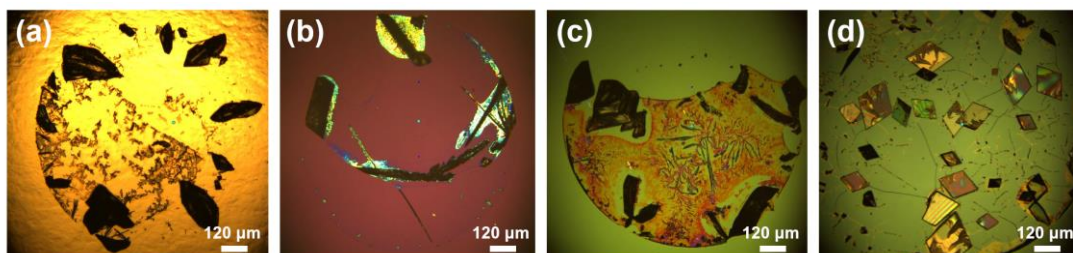
3.1 Nanodrsné substráty

Základní roztoky kontaminantů melaminu, picloramu, thiramu a bentazonu s koncentracemi 15,86 mM, 2,07 mM, 0,13 mM a 2,09 mM byly nakápnuty na tři nanodrsné substráty připravené na Katedře makromolekulární fyziky MFF UK. Tyto tři substráty se lišily dobou, po kterou na ně byly naprašovány měděné nanočástice. Pro první z těchto substrátů byla tato doba 2 minuty (NpsCu2), šlo tedy o substrát s nejméně drsným (v kontextu nanodrsnosti) povrchem, druhý ze substrátů (NpsCu5) byl naprašován 5 minut a poslední (NpsCu10) 10 minut, tudíž drsnost jeho povrchu byla největší. Vyschlé depozity byly následně porovnány s depozity vzniklými na komerčním substrátu SpectRIM™, na kterém byly tyto roztoky při stejných koncentracích studovány v rámci bakalářské práce. Důležitými parametry pro porovnání bylo rozložení depozitu, tedy zda vlastnosti substrátu umožňují při vysychání vznik oblastí s dostatečně vysokou koncentrací daného kontaminantu, a kvalita získaných spekter. Podobný typ substrátu již ve své práci testovala Kuižová a kolegové [Kuižová et al., 2021b], při studiu lipidů se ukázalo, že čím je takovýto povrch drsnější, tím je pro DCDR vhodnější – vytvořené depozity měli tvar kávového kroužku, látka byla lépe koncentrována v prstenci kroužku a spektra byla více intenzivní. Autoři ale pracovali s lipozomy – kulovitými strukturami tvořenými lipidovou dvouvrstvou, tyto útvary jsou mnohonásobně větší (průměr lipozomů v suspenzi byl 100 nm) než molekuly v roztoku studované v této práci, a proto naše pozorování nemuselo odpovídat očekávanému výsledku.

3.1.1 Melamin

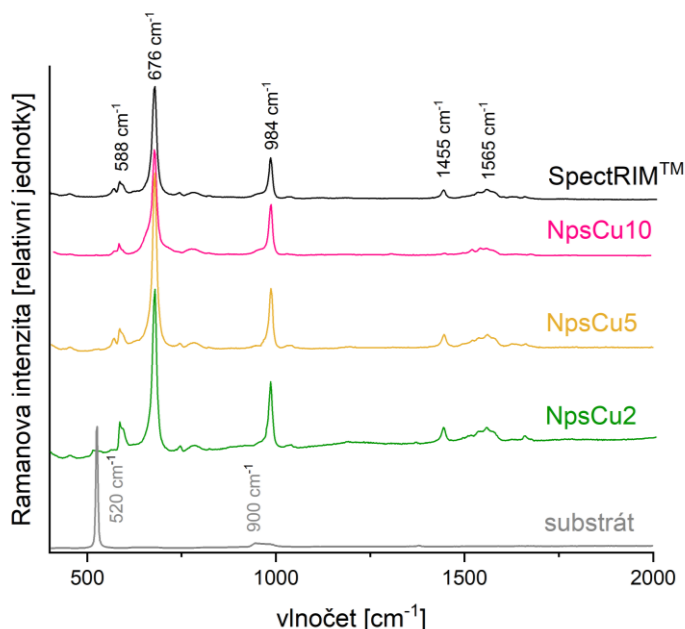
Melamin má oproti ostatním kontaminantům, kterými se tato práce zabývá, lepší rozpustnost ve vodě. Detekce melaminu v základním roztoku tedy byla s použitím substrátu SpectRIM™ relativně snadná. Melamin při vyschnutí nevytváří na komerčním substrátu kroužek ani flíček, místo toho tvoří velké (až 300 μm dlouhé) krystaly, ze kterých je možné získat velmi kvalitní spektra, která jsou svojí intenzitou porovnatelná, či dokonce vyšší než spektra získaná přímo z práškové formy melaminu. Na nanodrsných substrátech se melamin choval stejně jako na substrátu komerčním, na obrázku 3.1.4 je vidět porovnání depozitů na všech čtyřech substrátech. Tmavé oblasti na depozitech označených (a), (b) a (c) jsou krystaly, ze kterých byla získána spektra, krystaly se zdají tmavé díky jejich mohutnosti,

v některých depozitech bylo možné určit přítomnost krystalů pouhým okem. V depozitu s označením (d) jsou vidět krystaly menší (kolem 150 μm).



Obrázek 3.1.4: Depozit melaminu na různých substrátech: (a) SpectRIMTM, (b) NpsCu10, (c) NpsCu5, (d) NpsCu2

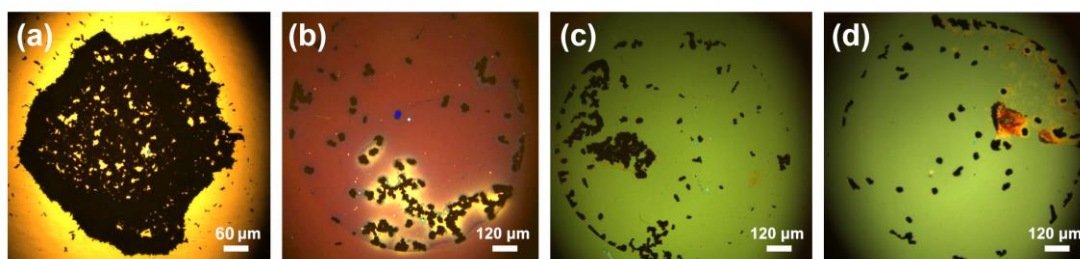
Z obrázku 3.1.4 vidíme, že depozity (b) a (c) jsou depozitu na komerčním povrchu nejvíce podobné. S ubývající drsností povrchu substrátu se podobně jako v práci Kuižové a kolegů [Kuižová et al., 2021b] vlastnosti substrátu zhoršují. Na obrázku 3.1.5 vidíme porovnání intenzit spekter získaných z těchto substrátů, je zde také zobrazeno samostatné spektrum substrátu, ve kterém jsou pozorovatelné pásy křemíku. Jediná spektra nezatížená nežádoucím spektrem substrátu byla získána z vrcholů největších krystalů z depozitů na substrátu NpsCu10 a NpsCu5, v ostatních případech muselo být spektrum substrátu odečteno pomocí programu OriginPro.



Obrázek 3.1.5: Porovnání intenzit DCDR spekter melaminu o koncentraci 15,86 mM na různých substrátech (spektrum substrátu pokaždé odečteno)

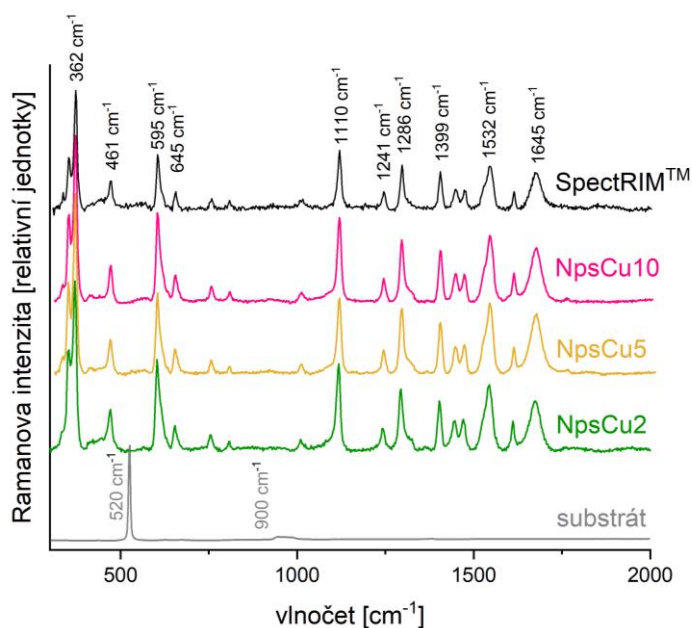
3.1.2 Picloram

Picloram při koncentraci roztoku 2,07 mM na komerčním substrátu také nevysychal jednoznačným způsobem, vzhled depozitu nejvíce připomínal vysychání ve formě flíčku, ačkoliv tento flíček byl relativně velký, a to přibližně 0,5 mm v průměru. I přesto bylo možné získat kvalitní spektra. Na nekomerčním povrchu látka vytvořila shluky po celé kontaktní ploše kapky. Porovnání je zobrazeno na obrázku 3.1.6, je vidět, že mezi nekomerčními substráty v tomto případě téměř není možné pozorovat rozdíl.



Obrázek 3.1.6: Depozit picloramu na různých substrátech: (a) SpectRIM™, (b) NpsCu10, (c) NpsCu5, (d) NpsCu2

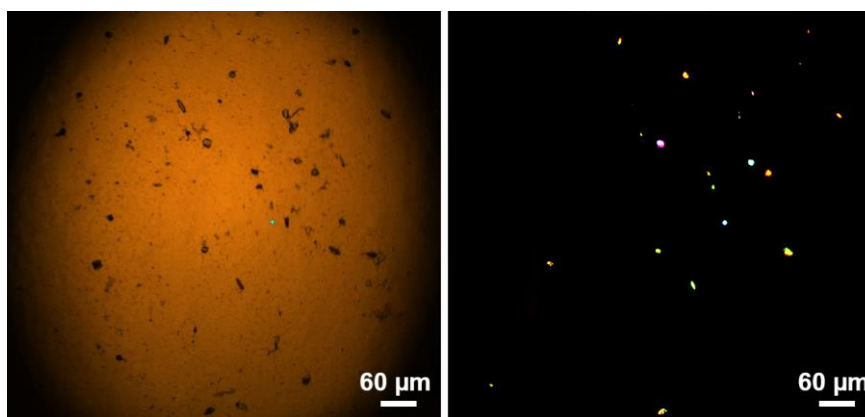
Ze shluků látky bylo možné získat kvalitní spektra (viz. obr. 3.3.7), která ale byla ovlivněna nežádoucím signálem substrátu a fluorescencí látky, obojí bylo ze spekter odstraněno pomocí programu OriginPro.



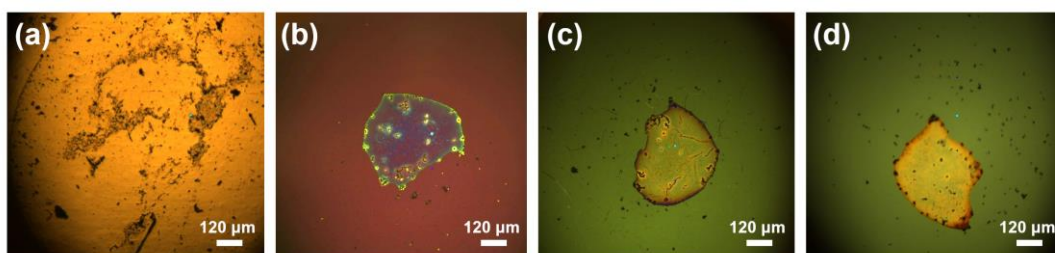
Obrázek 3.1.7: Porovnání DCDR spekter picloramu o koncentraci 2,07 mM na různých substrátech (spektrum substrátu pokaždé odečteno)

3.1.3 Thiram

Thiram má z vybraných kontaminantů nejhorší rozpustnost ve vodě (0,13 mM), jeho detekce tak byla složitá už na komerčním substrátu SpectRIM™, na kterém se po vyschnutí látka rozprostřela po velké ploše (až 1,5 mm v průměru). K detekci thiramu bylo nutné v depozitu najít malé krystalky, které thiram po vyschnutí vytváří, což bylo možné díky pozorování pomocí polarizačních filtrů mikroskopu. Porovnání pohledu na depozit bez polarizačního filtru a se zkříženými polarizačními filtry je na obrázku 3.3.8. Na nanodrsných substrátech depozity vypadaly podobně, látka vytvářela malé shluky (viditelné jako černé tečky), krystalky (průsvitné hranoly) a tenké vrstvičky (světlé oblasti). Mezi nekomerčními substráty opět nebyl výrazný rozdíl, viz. obr. 3.1.9.

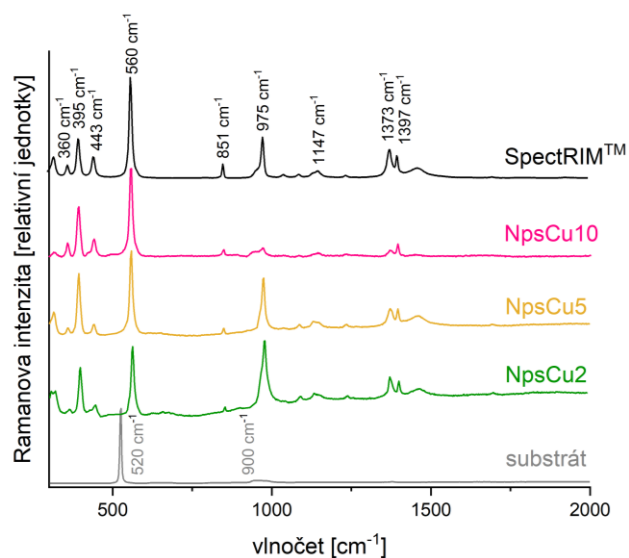


Obrázek 3.1.8: Krystaly v depozitu roztoku thiramu na substrátu SpectRIM™, snímek bez použití polarizačních filtrů (vlevo) a snímek stejného místa při použití polarizačních filtrů (vpravo)



Obrázek 3.1.9: Depozit thiramu na různých substrátech: (a) SpectRIM™, (b) NpsCu10, (c) NpsCu5, (d) NpsCu2

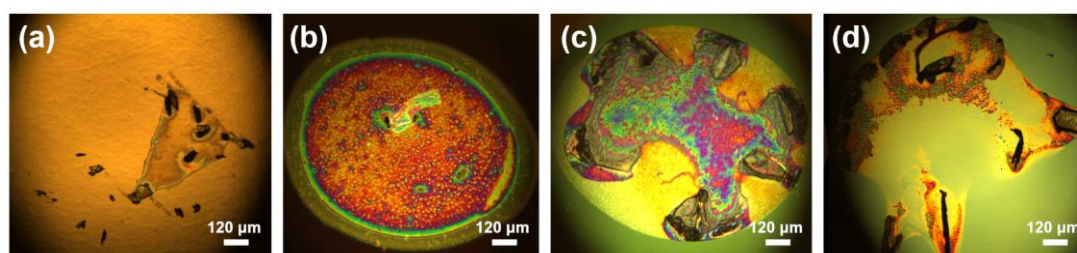
Až na přítomnost nežádoucího signálu křemíku byly opět vlastnosti nekomerčních substrátů porovnatelné se substrátem komerčním. Získaná spektra jsou vidět na obrázku 3.3.10.



Obrázek 3.1.10: Porovnání DCDR spekter thiramu o koncentraci 0,13 mM na různých substrátech (spektrum substrátu pokaždé odečteno)

3.1.4 Bentazon

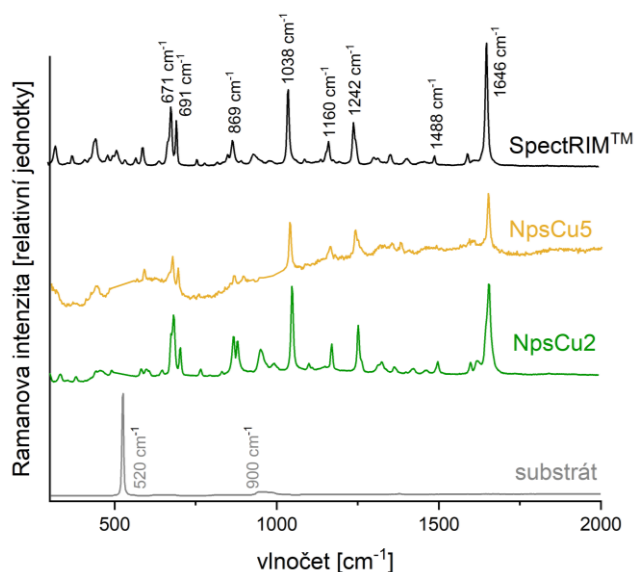
Podobně jako melamin, bentazon (v roztoku o koncentraci 2,09 mM) vytváří na substrátu SpectRIM™ velké krystalky, ze kterých lze následovně získat kvalitní Ramanovské spektrum. Na substrátech NpsCu10 a NpsCu5 látka naopak vytvořila tenký film ohraničený původní kontaktní linií vysychající kapky. Na substrátu NpsCu2 se pak látka rozprostřela nerovnoměrně po ploše s průměrem 1 mm a vzniklo několik krystalů. Porovnání depositů je na obrázku 3.1.11.



Obrázek 3.1.11.: Deposit bentazonu na různých substrátech: (a) SpectRIM™, (b) NpsCu10, (c) NpsCu5, (d) NpsCu2

Z vrstvy vzniklé na substrátu NpsCu10 nebylo možné získat prokazatelné spektrum bentazonu. Měření bylo obtížné také na substrátu NpsCu5, ale nakonec byla nalezena dvě vhodná místa a z nich změřena dvě spektra. Díky vzniku krystalů bylo možné získat mnoho kvalitních spekter ze substrátu NpsCu2, díky mohutnosti (tloušťce) krystalů dokonce tato spektra nebyla tolik zatížena signálem křemíku.

NpsCu2 se tedy v tomto případě překvapivě ukázal jako nejvhodnější ze tří nekomerčních substrátů pro detekci bentazonu. Porovnání získaných spekter je na obrázku 3.1.12.



Obrázek 3.1.12: Porovnání DCDR spekter bentazonu o koncentraci 2,09 mM na různých substrátech

3.1.5 Shrnutí

Doba úplného vyschnutí nanosené kapky na nanodrsných substrátech se pohybovala okolo 40–60 minut při nakápnutí čtyř kapek zároveň, což odpovídá době vysychání na substrátu komerčním. Až na bentazon se kontaminanty na nanodrsných substrátech chovají podobně jako na komerčním substrátu a kvalita získaných spekter byla porovnatelná mezi všemi substráty. Jak se ukázalo, při vysychání dochází především ke tvorbě krystalků a tenkých vrstviček a vyšší drsnost substrátu nezpůsobuje podobný efekt zkoncentrování, jako při schnutí jiných typů látek, ve formě kávového kroužku. Substrát NpsCu10 se jevil jako nejvhodnější pro metodu DCDR pro tři ze čtyř kontaminantů. Největší nevýhodou všech variant substrátu je jeho vlastní Ramanovské spektrum (spektrum křemíku, který tvoří základ substrátu). Při použitých relativně vysokých koncentracích roztoků nešlo o výraznou nevýhodu, ovšem při koncentracích nižších by mohl zejména intenzivní pás na pozici 520 cm^{-1} velmi negativně ovlivnit získaná data. I přesto má tento nový typ DCDR substrátu velký potenciál nejen pro studium lipidů, jak ukázala Kuižová a kolegové [Kuižová et al., 2021b], ale i pro menší molekuly, jak bylo prezentováno v této práci.

3.2 Směsi kontaminantů

Cílem bakalářské práce „Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků vybraných kontaminantů“ bylo určit detekční limity DCDR čtyř vybraných kontaminantů. V rámci této práce byly látky melamin, picloram, thiram a bentazon studovány na třech různých substrátech. V literatuře již bylo ukázáno, že pomocí DCDR je možné studovat komplexní roztoky a suspenze (např. v práci Filik, Stone, 2008a). Dalším cílem této je tedy pokračovat ve studiu zmíněných kontaminantů v jejich vzájemných směsích, zjistit, při jakých koncentracích bude možné v daných směsích látky stále detekovat, a zda se látky (i spektrálně) oddělí. Jako vodítko budou sloužit data získaná z bakalářské práce.

Kontaminanty při nejnižších koncentracích bylo možné v rámci bakalářské práce detekovat na dříve zmíněném substrátu SpectRIM™, který již není ve výrobě. Druhým použitým komerčním substrátem byl μ -RIM™, na kterém nebylo dosaženo stejných výsledků, ale na rozdíl od prvního substrátu, tento je stále ve výrobě. μ -RIM™ byl proto zvolen jako primární substrát ke studiu směsí vybraných kontaminantů.

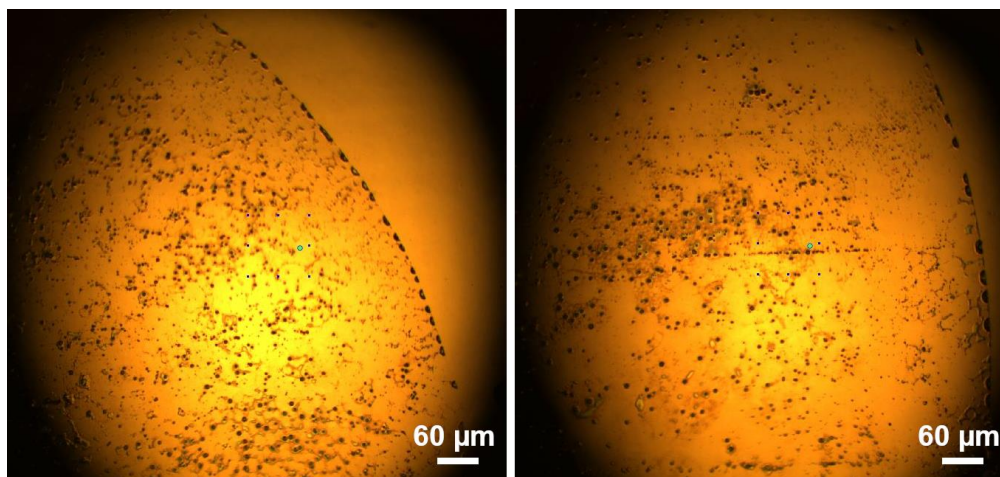
3.2.1 Směsi dvou kontaminantů

K vytvoření prvních šesti testovacích směsí kontaminantů byly základní roztoky zředěny tak, aby po smíchání byly obě látky v dané směsi v řádově podobné molární koncentraci. Pro picloram byla zvolena koncentrace nižší, než bylo nutné, z důvodu omezení vzniku depozitu s dvěma různými spektry picloramu, pokud je totiž koncentrace roztoku picloramu nižší nežli 0,2 mM nemělo by se již objevovat práškové spektrum [Kuižová et al., 2021a]. Z každého roztoku byly nakápnuty dvě kapky o objemu 2 μ l na substrát μ -RIM™. Z depozitu každé kapky bylo akumulováno minimálně 5 spekter na ověření přítomnosti obou látek. V dalším textu bude u vytvářených směsí v závorkách uváděna výsledná koncentrace příslušné látky v roztoku této směsi.

melamin (80 μ M) a bentazon (100 μ M)

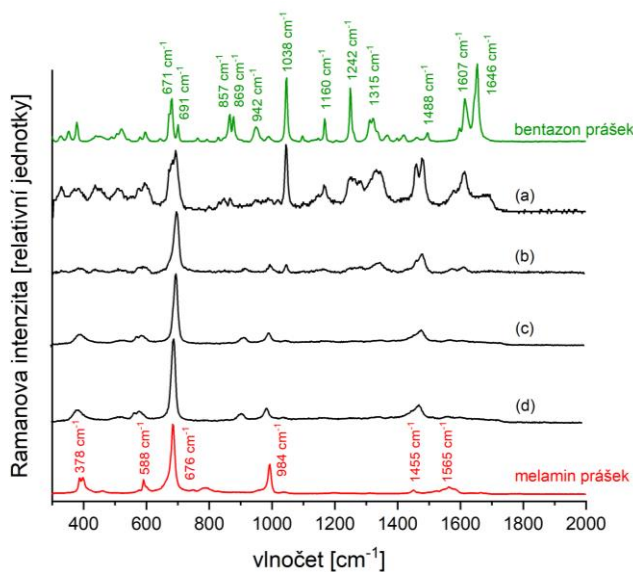
Látka se po vyschnutí obou kapek rozprostřela na poměrně velké ploše o průměru přibližně 2 mm (viz. obr. 3.2.1.), přesto bylo možné získat z obou depozitů kvalitní spektra melaminu i bentazonu, detekována byla také spektra s pásy odpovídajícími oběma látkám. Na kameře mikroskopu bylo náročné určit, zda se

v místě měření nachází bentazon, či melamin, v některých místech však melamin tvořil kulové útvary, zatímco bentazon byl detekován spíše v útvarech připomínajících kvádrčky. Zvláštností jednoho depositu (na obr. 3.2.1 vpravo) byl vznik rovnoběžek ze shluků látky, tyto útvary byly přisouzeny nerovnoměrnostem na povrchu substrátu.



Obrázek 3.2.1: Deposity vzniklé po vyschnutí kapky roztoku melaminu ($80 \mu\text{M}$) a bentazonu ($100 \mu\text{M}$) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$

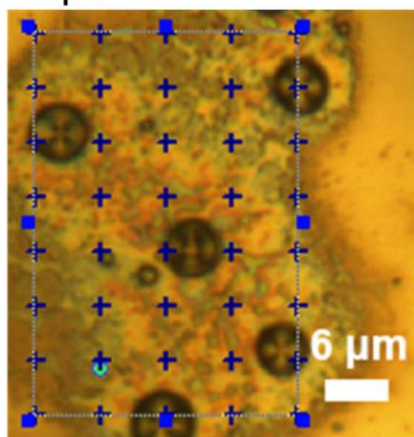
V naměřených spektrech převažovala ta odpovídající melaminu. Jemu odpovídající pás na pozici 676 cm^{-1} se nejspíše sčítal s pásy bentazonu na blízkých pozicích. Na obrázku 3.2.2 vidíme výběr naměřených spekter, ve spektrech označených (a) a (b) je zřejmé míchání spekter obou látek, pásy na pozici 1038 cm^{-1} odpovídající bentazonu a pásy na pozici 676 cm^{-1} odpovídající melaminu jsou přítomny současně v obou těchto spektrech. Ze spektra (a) muselo být odečteno nežádoucí pozadí pomocí programu OriginPro.



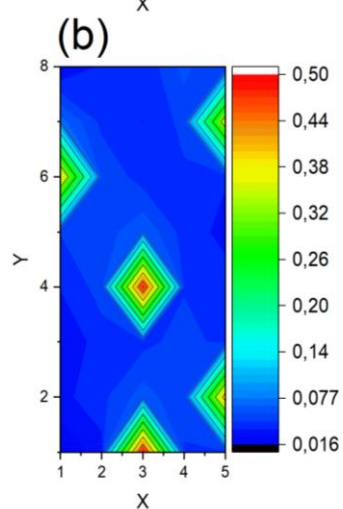
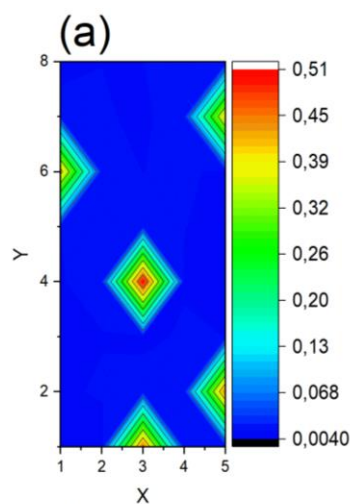
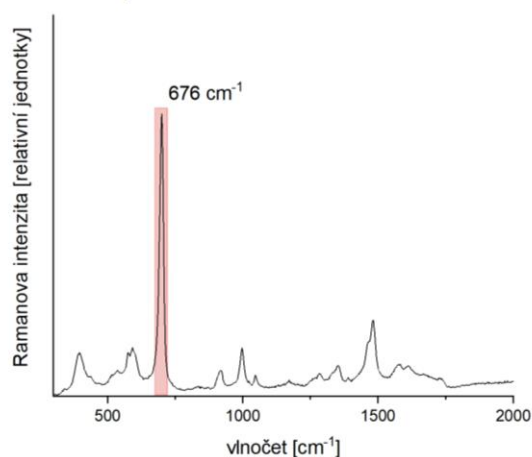
Obrázek 3.2.2: Vybraná DCDR spektra (a) až (d) (v rozsahu 300–2000 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku melaminu (80 μM) a bentazonu (100 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$

Po nakápnutí další kapky na stejný substrát byly vybrány dvě vhodné oblasti pro mapování a z dat z nich získaných byla provedena faktorová analýza. Obrázek 3.2.3 zobrazuje mapy zpracované z dat z první oblasti. Na obrázku je fotografie vybrané oblasti depozitu s vyznačenými místy (modré křížky), ze kterých byla měřena Ramanova spektra, první subspektrum a mapy (a) a (b). Mapa (a) je mapou koeficientů prvního subspektra, zobrazuje tedy výskyt veškeré detekovatelné látky, mapa (b) vznikla omezením se na oblast prvního subspektra ($660\text{--}700\text{ cm}^{-1}$) obsahující charakteristický pás melaminu na pozici 676 cm^{-1} (v prvním subspektru vyznačeno červeně), zobrazuje tedy místa, kde se ve vybrané oblasti nachází melamin. Škála vedle map popisuje relativní zastoupení subspektra v celkovém spektru. Mapy jsou téměř identické, v této oblasti se tedy nacházel pouze melamin, který vytvářel kruhové útvary, jak je vidět na fotografii depozitu.

depozit

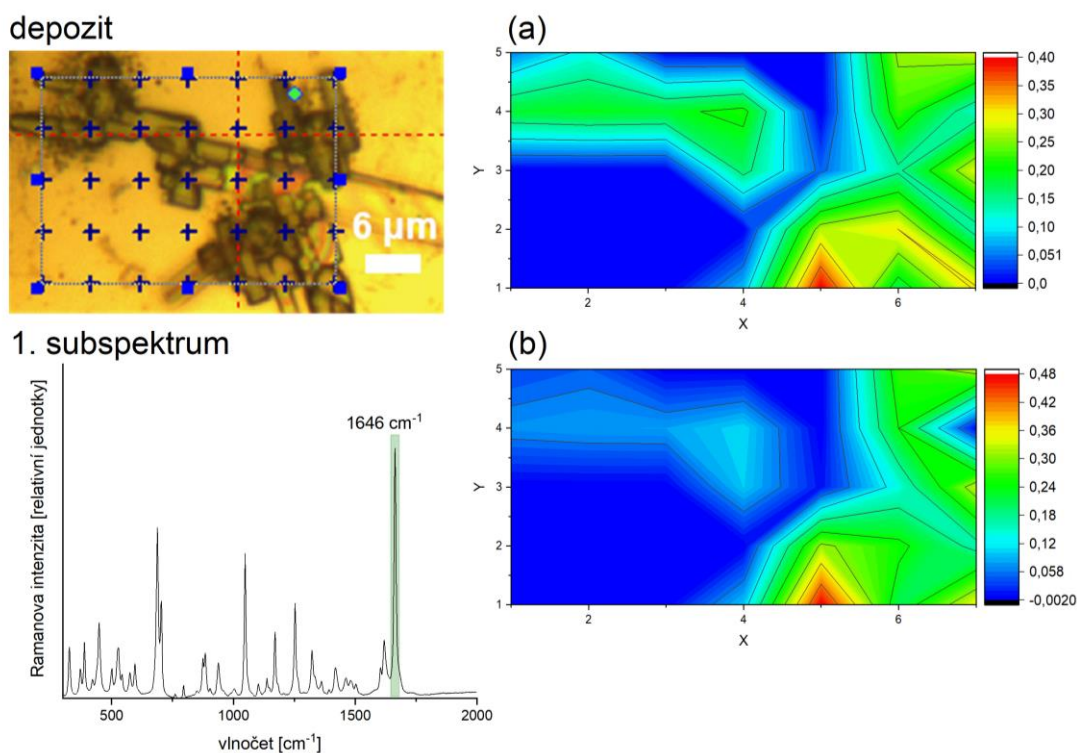


1. subspektrum



Obrázek 3.2.3: Mapování první oblasti z depozitu roztoku melaminu ($80 \mu\text{M}$) a bentazonu ($100 \mu\text{M}$) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$; (a) gradientní mapa koeficientů prvního subspektra pro spektrální oblast $300\text{--}2000 \text{ cm}^{-1}$, (b) gradientní mapa odpovídající výskytu melaminu ($660\text{--}700 \text{ cm}^{-1}$)

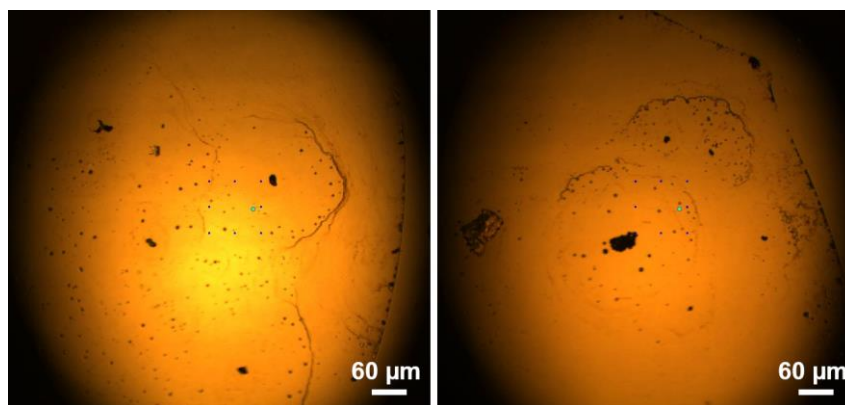
Další oblast vybraná pro mapování byla naopak bez melaminu. Depozit, první subspektrum a mapy jsou zobrazeny na obrázku 3.2.4. Mapa (a) byla vytvořena z koeficientů prvního subspektra. Mapa (b) odpovídající výskytu bentazonu byla vytvořena omezením se na spektrální oblast 1630–1660 cm^{-1} , která obsahuje význačný pás bentazonu na pozici 1646 cm^{-1} (v prvním subspektru vyznačeno zeleně).



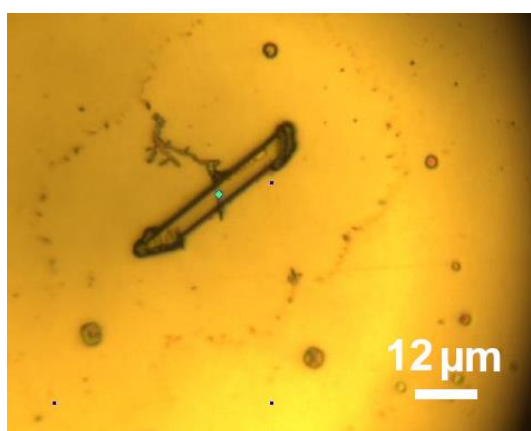
Obrázek 3.2.4: Mapování druhé oblasti z depozitu roztoku melaminu (80 μM) a bentazonu (100 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$; (a) gradientní mapa koeficientů prvního subspektra pro spektrální oblast 300–2000 cm^{-1} , (b) gradientní mapa odpovídající výskytu bentazonu (1630–1660 cm^{-1})

melamin (80 μM) a thiram (65 μM)

Látka se opět rozprostřela po velké ploše (2 mm v průměru), ovšem tentokrát na substrátu vzniklo několik větších shluků, oproti velkému množství malých shluků v předchozích depozitech (viz. obr. 3.2.5). Thiram bylo v některých případech možné již na kameře mikroskopu rozeznat od melaminu, jelikož tvořil malé krystalky (viz. obr. 3.2.6).

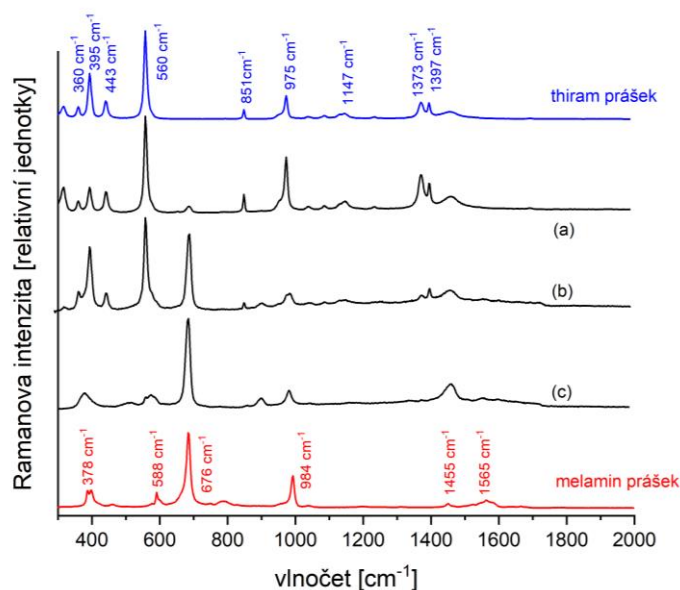


Obrázek 3.2.5: Depozity vzniklé po vyschnutí kapky roztoku melaminu ($80 \mu\text{M}$) a thiramu ($65 \mu\text{M}$) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$



Obrázek 3.2.6: Krystal thiramu v depozitu vzniklém po vyschnutí kapky roztoku melaminu ($80 \mu\text{M}$) a thiramu ($65 \mu\text{M}$) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$

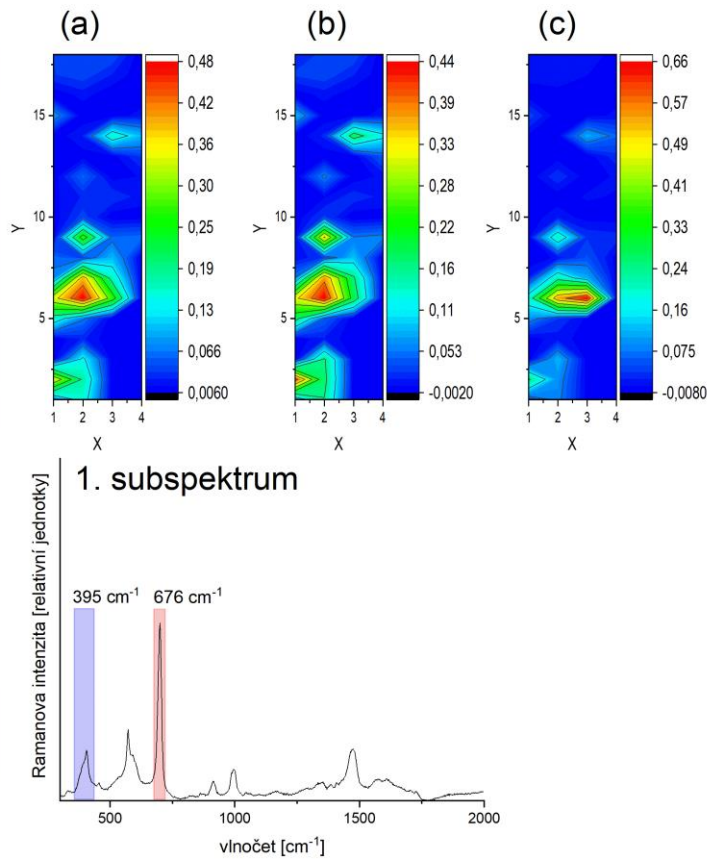
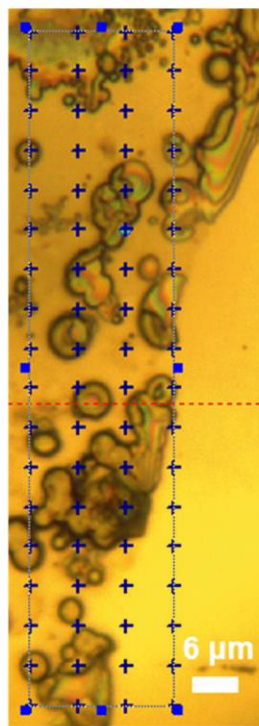
V naměřených spektrech převažovala spektra odpovídající thiramu. Opět byly vidět i kombinace spekter obou látek (viz. obr. 3.2.7). Spektrum (b), které bylo naměřeno na okraji depozitu, obsahuje význačné pásy obou kontaminantů.



Obrázek 3.2.7: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu $300\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$) získaná z depozitu roztoku melaminu ($80\text{ }\mu\text{M}$) a thiramu ($65\text{ }\mu\text{M}$) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$

Následně byla nakápnuta další kapka a vybrána jedna oblast pro mapování a zpracování faktorovou analýzou (viz. obr. 3.2.8). Šlo o oblast okraje kapky, kde byla v předchozím měření získána spektra kombinace melaminu a thiramu. Ze snímku depozitu lze vidět, že v tomto případě nelze thiram a melamin dobře opticky rozlišit. Ve shlucích u okraje depozitu jsou smíchány dohromady, což již ukazovala jednotlivě naměřená spektra. Mapa (a) je vytvořena pomocí koeficientů prvního subspektra, které je vidět pod mapami. Mapa (b) vznikla omezením se na spektrální oblast $660\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ obsahující charakteristický pás melaminu na pozici 676 cm^{-1} v prvním subspektru (vyznačeno červeně), mapa (c) vznikla omezením se na spektrální oblast $340\text{--}420\text{ cm}^{-1}$ obsahující charakteristický pás thiramu na pozici 385 cm^{-1} (v prvním subspektru vyznačeno modře). Pro thiram nemohl být použit nejintenzivnější pás na pozici 560 cm^{-1} jelikož se v prvním subspektru sčítá s pásem melaminu na pozici 588 cm^{-1} (na obrázku 3.2.8 je tento pás vidět jako rameno pásu na pozici 560 cm^{-1}). Pás na pozici 395 cm^{-1} se také spojuje s pásky melaminu (378 cm^{-1}), i přesto byl tento pás nejlepší možnou volbou při zpracování. Z map je vidět, že většina thiramu se ve vybrané oblasti nachází ve spodní polovině, kde je depozit tmavší než okolí. Rozložení melaminu pak poměrně dobře odpovídá rozložení látky na snímku depozitu.

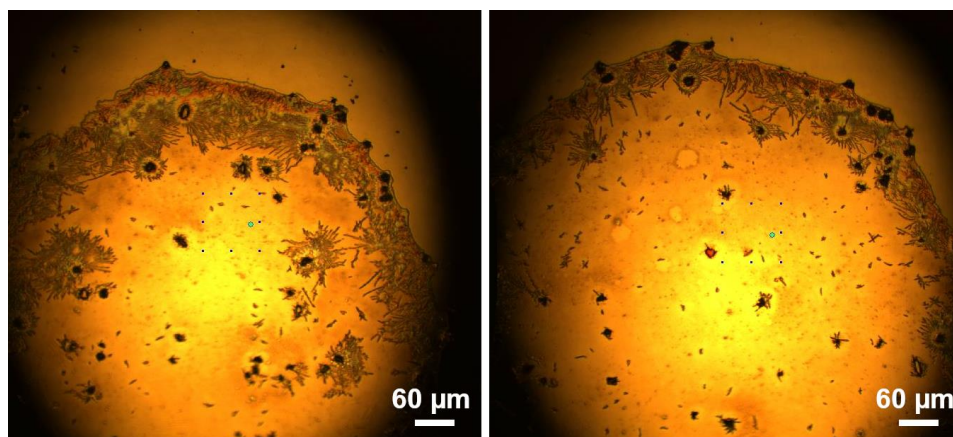
depozit



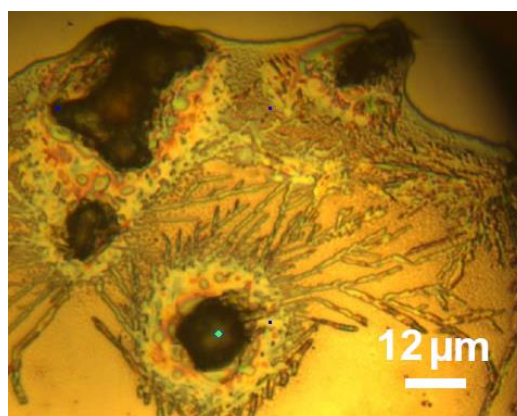
Obrázek 3.2.8: Mapování vybrané oblasti z depozitu roztoku melaminu (80 μM) a thiramu (65 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$; (a) gradientní mapa koeficientů prvního subspektra pro spektrální oblast 300–2000 cm^{-1} , (b) gradientní mapa odpovídající výskytu melaminu (660–700 cm^{-1}), (c) gradientní mapa odpovídající výskytu thiramu (340–420 cm^{-1})

thiram (65 μM) a bentazon (100 μM)

Roztok po vyschnutí vytvořil prstenec o přibližné šířce 50 μm skládající se ze shluků thiramu (tmavé flíčky) a tenkých krystalků bentazonu (průhledná vrstva) (viz. obr. 3.2.9 a 3.2.10). Jednotlivé kontaminanty šlo tedy v depozitu rozlišit poměrně dobře.

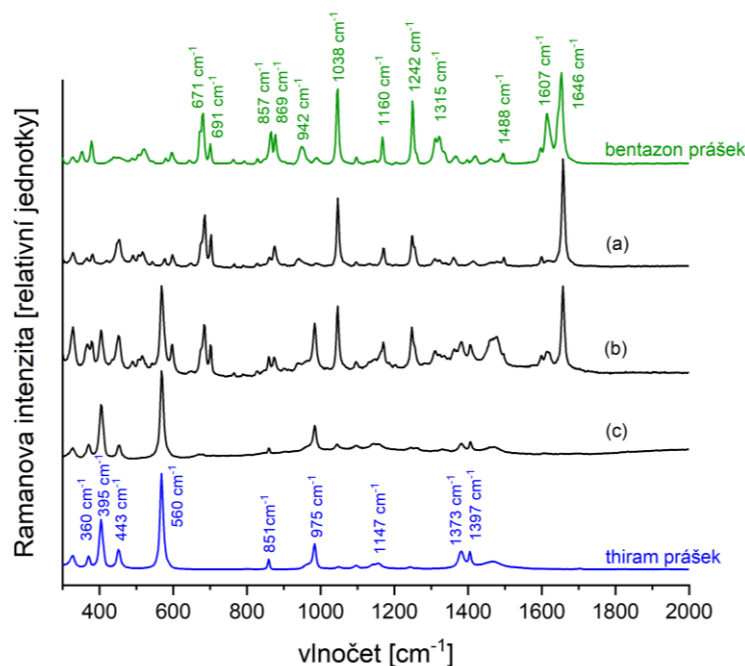


Obrázek 3.2.9: Depozity vzniklé po vyschnutí kapky roztoku thiramu (65 μM) a bentazonu (70 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$



Obrázek 3.2.10: Detail depozitu vzniklého po vyschnutí kapky roztoku thiramu (65 μM) a bentazonu (70 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$

Z tenkých vrstev bentazonu bylo možné získat kvalitní spektra a ze shluků (na obr. 3.2.10 tmavé flíčky) zase kvalitní spektra thiramu. Z rozhraní těchto útvarů pak bylo naměřeno spektrum s pásy odpovídajícími oběma látkám. Vybraná spektra jsou vidět na obrázku 3.2.11. Spektrum (a) velmi dobře odpovídá referenčnímu spektru bentazonu, spektrum (c) zase referenčnímu spektru thiramu, spektrum (b) je spektrem směsi obou látek získaném z rozhraní obou látek v depozitu.

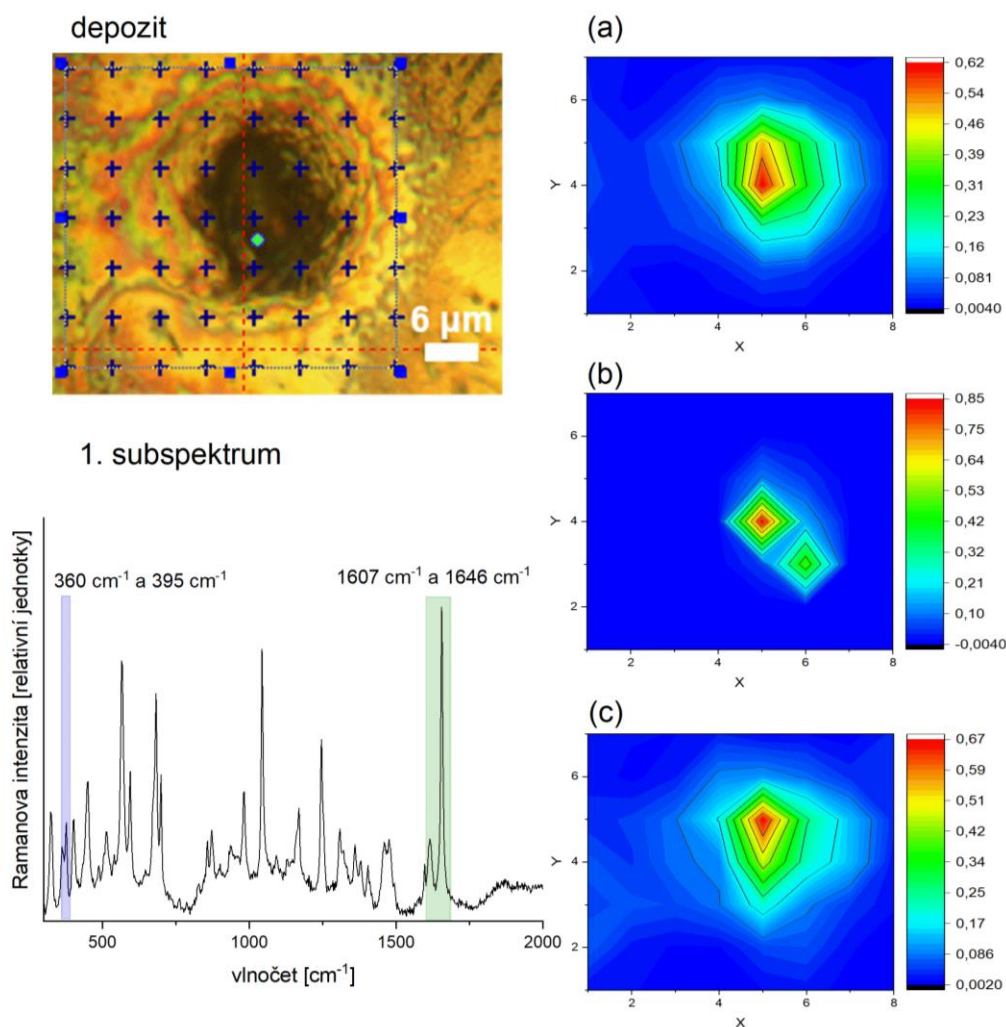


Obrázek 3.2.11: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu 300–2000 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku thiramu (65 μM) a bentazonu (70 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$

Dále byla nakápnuta další kapka a vzniklý depozit byl využit k mapování. Vybrány byly dvě oblasti v depozitu. Mapy z první oblasti jsou zobrazeny na obrázku 3.2.12, depozit je podobný tomu na obrázku 3.2.10. Mapa (a) vznikla z koeficientů prvního subspektra, mapa (b) pak omezením se na spektrální oblast 350–430 cm^{-1} obsahující pásy thiramu na pozicích 360 cm^{-1} a 395 cm^{-1} (v prvním subspektru vyznačeno modře). Z mapy (b) je zřejmé, že thiram se nachází pouze v tmavé části depozitu. Mapa (c) pak vznikla omezením se na spektrální oblast 1540–1690 cm^{-1} obsahující pásy 1607 cm^{-1} a 1646 cm^{-1} charakteristické pro bentazon (v prvním subspektru vyznačeno zeleně). Mapy odpovídají předchozím měřením, thiram vytváří malé shluky v depozitu viditelné jako tmavší flíčky, zatímco bentazon se v depozitu nachází jako tenká vrstva.

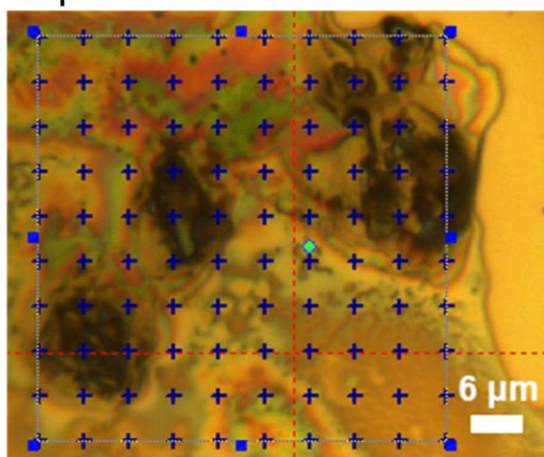
Mapy z druhé oblasti jsou na obrázku 3.2.13. Depozit se jeví podobně a měření odpovídá předpokladu, že tmavší místa v depozitu odpovídají thiramu a světlejší vrstva kolem odpovídá bentazonu. Mapa (a) je vytvořena z koeficientů prvního subspektra, mapa (b) vznikla omezením se na spektrální oblast 540–580 cm^{-1} obsahující pás thiramu na pozici 560 cm^{-1} (v prvním subspektru vyznačeno modře) a mapa (c) omezením se na spektrální oblast 1640–1670 cm^{-1}

obsahující pás bentazonu na pozici 1646 cm^{-1} (v prvním subspektru vyznačeno zeleně). Z prvního subspektra je vidět, že na rozdíl od první oblasti, v této převažoval výskyt thiramu.

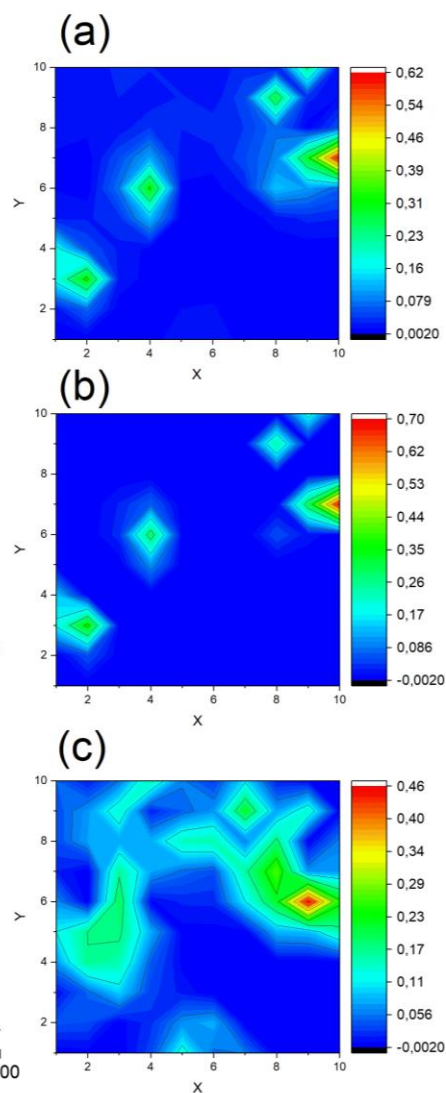
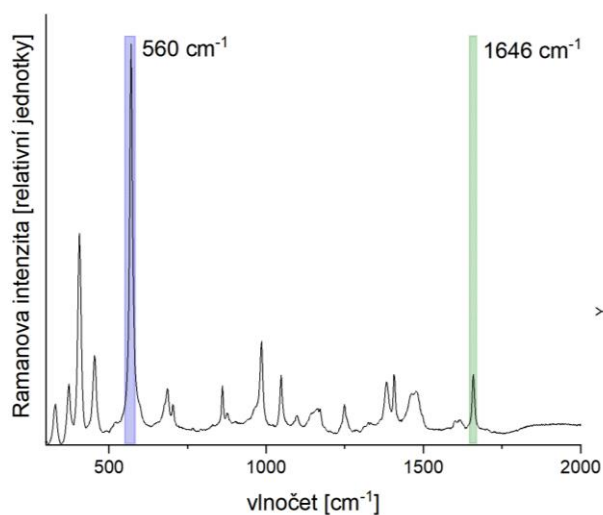


Obrázek 3.2.12: Mapování první oblasti z deponátu roztoku thiramu ($65\ \mu\text{M}$) a bentazonu ($70\ \mu\text{M}$) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$; (a) gradientní mapa koeficientů prvního subspektra pro spektrální oblast $300\text{--}2000\ \text{cm}^{-1}$, (b) gradientní mapa odpovídající výskytu thiramu ($350\text{--}430\ \text{cm}^{-1}$), (c) gradientní mapa odpovídající výskytu bentazonu ($1540\text{--}1690\ \text{cm}^{-1}$)

depozit



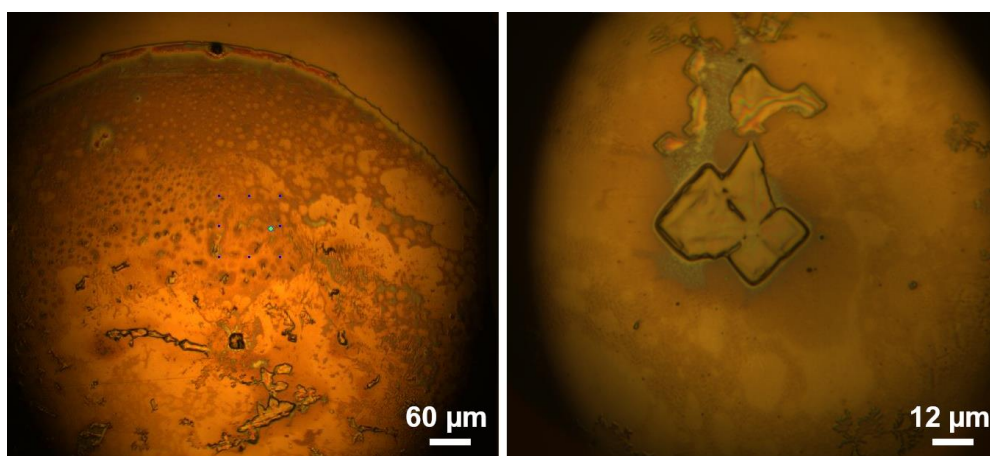
1. subspektrum



Obrázek 3.2.13: Mapování druhé oblasti z deponátu roztoku thiramu (65 μM) a bentazonu (70 μM) na substrátu μ-RIMTM; (a) gradientní mapa koeficientů prvního subspektra pro spektrální oblast 300–2000 cm⁻¹, (b) gradientní mapa odpovídající výskytu thiramu (540–580 cm⁻¹), (c) gradientní mapa odpovídající výskytu bentazonu (1640–1670 cm⁻¹)

picloram (50 μM) a bentazon (50 μM)

Po celé ploše depozitu bylo možné vidět tenký povlak, mimo to v depozitu vznikly zvláštní krystalicky vypadající struktury (viz. obr. 3.2.14).

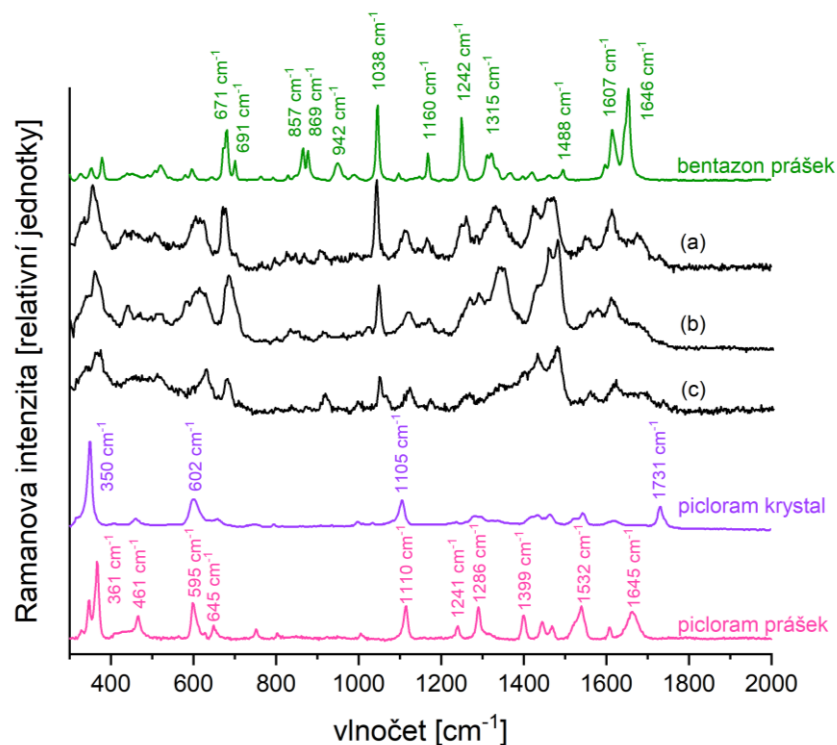


Obrázek 3.2.14: Depozit vzniklý po vyschnutí kapky roztoku picloramu (50 μM) a bentazonu (50 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$ (vlevo) a detail struktury vznikající v depozitu (vpravo)

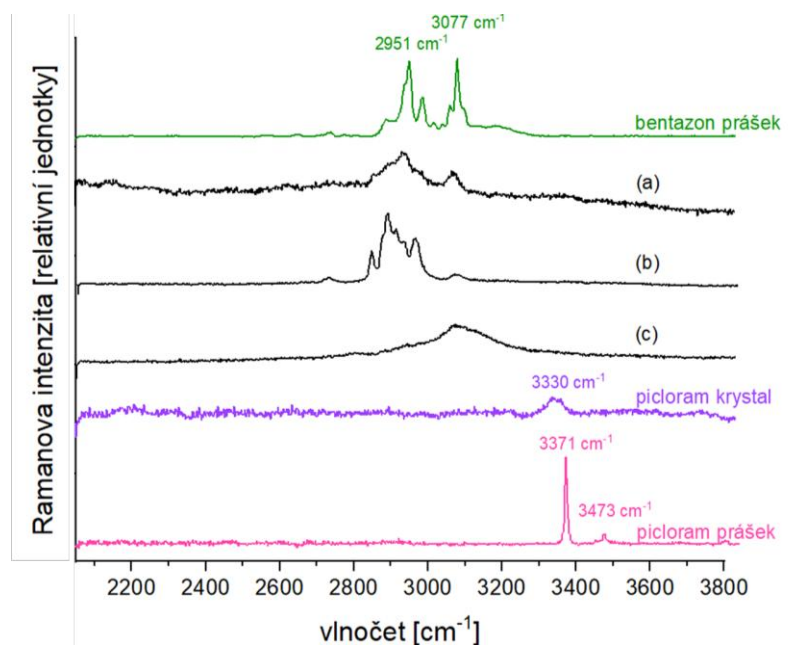
V případě této směsi se ukázalo, že depozit je zvláštní, jelikož z něj bylo získáno několik spekter, která neodpovídala jednoznačně ani jednomu ze dvou přítomných kontaminantů. Toto neznámé spektrum mělo intenzivní pás v oblasti 1400–1500 cm^{-1} , a také několik vysoce intenzivních pásů v oblasti valenčních vibrací (2800–3000 cm^{-1}). Výběr těchto spekter je na obrázku 3.2.15 a 3.2.16 (pozn. spektra označená stejným písmenem byla vždy získána ze stejného místa, toto platí i pro další případy, kde jsou uvedeny grafy ve dvou různých rozsazích).

Spektrum (a) nejvíce odpovídá referenčnímu spektru bentazonu, což je vidět i ve spektru v rozsahu odpovídajícím valenčním vibracím. Všechna spektra mají relativně intenzivní pás v oblasti okolo 350 cm^{-1} , zda tento pás opravdu odpovídá pásu picloramu je však diskutabilní. Spektrum (b), vyznačující se charakteristickou skupinou pásů v oblasti 2800–3000 cm^{-1} bylo nazváno *XI*.

Tato směs se tedy ukázala jako problematická, v obou depozitech byla detekována neznámá spektra. První teorií o výskytu neznámých spekter bylo, že základní roztoky, ze kterých byla směs připravena, byly kontaminovány neznámou látkou. Roztok bentazonu a roztok picloramu byly samostatně prověřeny, ale žádná zvláštní spektra v depozitech detekována nebyla.

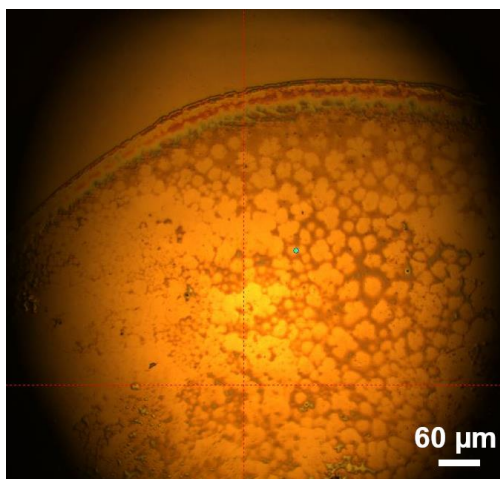


Obrázek 3.2.15: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu 300–2000 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku picloramu (50 μM) a bentazonu (50 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$



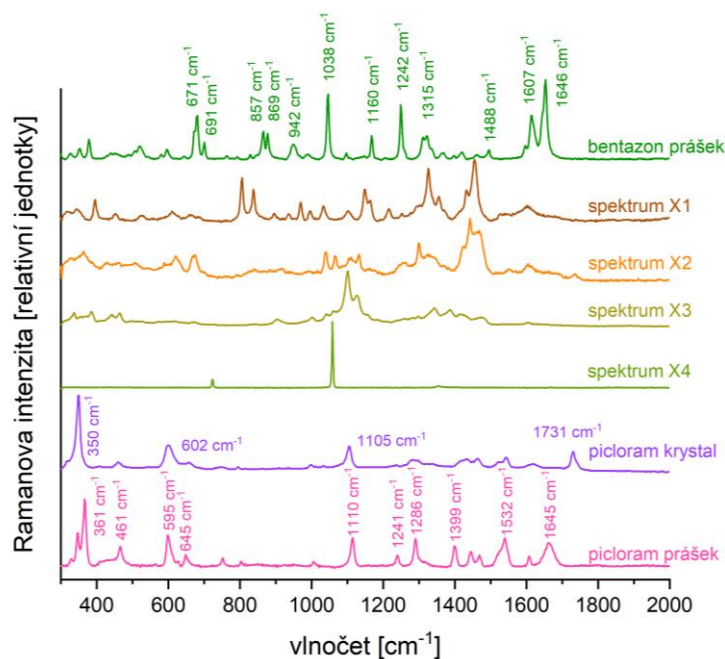
Obrázek 3.2.16: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu 2000–3800 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku picloramu (50 μM) a bentazonu (50 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$

Základní roztoky tedy kontaminovány nebyly. Další možností byla kontaminace již namíchané směsi, byla tedy namíchána nová směs se stejnými koncentracemi a na substrát μ -RIMTM nakápnuty další dvě kapky. Depozit vypadal podobně (viz. obr. 3.2.17), opět se na substrátu vytvořila tenká vrstva látky, ovšem ani v jedné z obou nakápnutých kapek nebyly vidět žádné krystalické struktury.

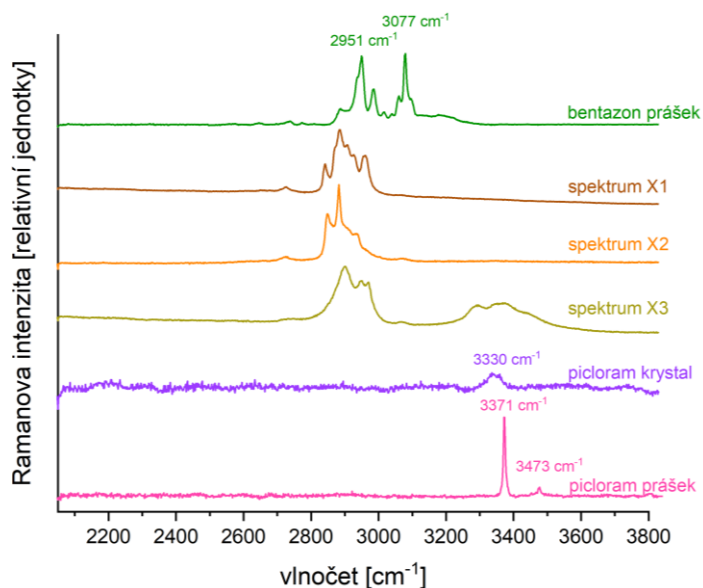


Obrázek 3.2.17: Depozit vzniklý po vyschnutí kapky nového roztoku picloramu (50 μ M) a bentazonu (50 μ M) na substrátu μ -RIMTM

V obou depozitech bylo opět detekováno spektrum *X1*. Navíc, byla několikrát detekována ještě 3 další nová spektra, postupně označena jako *X2*, *X3* a *X4*. Přehled těchto spekter je na obrázku 3.2.18 a 3.2.19. Spektrum *X2* se podobá spektru *X1*, opět se zde nachází široký intenzivní pás v oblasti 1400–1500 cm^{-1} , ale skupina pásů v oblasti valenčních vibrací má jiný profil. Spektrum *X3* má vysoce intenzivní pás na pozici 1500 cm^{-1} , v oblasti valenčních vibrací pak pásy na pozicích 2900–3000 cm^{-1} a 3250–3450 cm^{-1} . Spektrum *X4*, získané z krystalků přítomných v jednom z depozitů, se nepochybně podobá žádnému z ostatních nových spekter. Zdá se, že jde o velmi symetrickou molekulu, jelikož spektrum má pouze několik úzkých pásů, tři nejintenzivnější se nachází na pozicích 722 cm^{-1} , 1057 cm^{-1} (velmi vysoká intenzita) a 1354 cm^{-1} , v oblasti valenčních vibrací nebyly detekovány žádné pásy.



Obrázek 3.2.18: Neznámá spektra (v rozsahu 300–2000 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku picloramu (50 μM) a bentazonu (50 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$

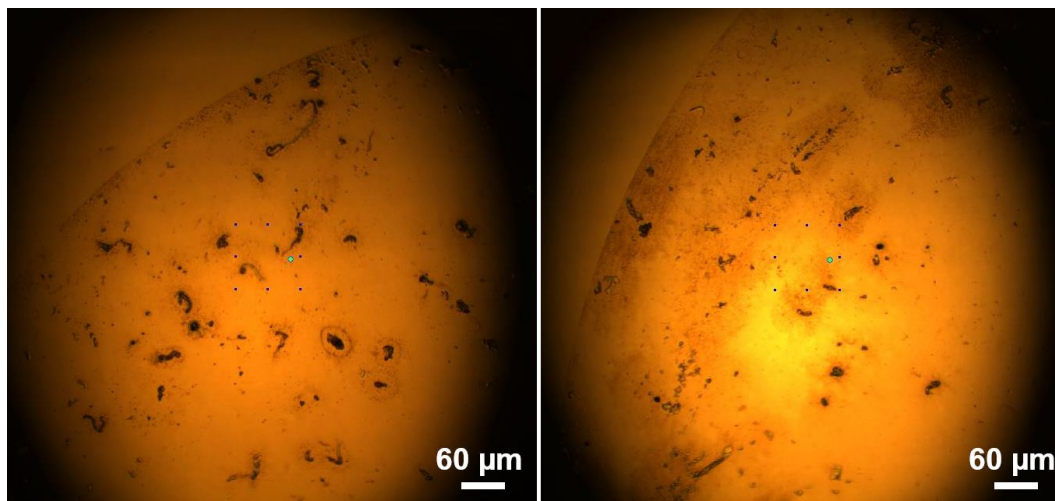


Obrázek 3.2.19: Neznámá spektra (v rozsahu 2000–3800 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku picloramu (50 μM) a bentazonu (50 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$

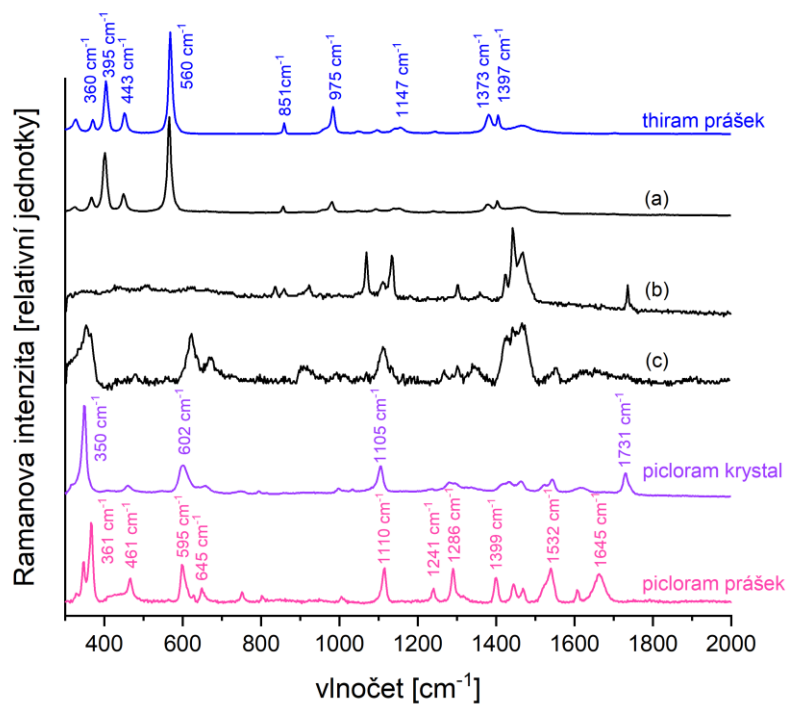
Neznámá spektra jsou pravděpodobně důsledkem interakce bentazonu a picloramu. Nemohlo jít o časovou degradaci vzorku, jelikož měření proběhlo ihned po přípravě směsi. Vzhled depozitů a profily spekter se neměnily ani po měsíci po prvním měření. Vzhledem k výskytu neznámých spekter, nebylo na depozitu provedeno mapování.

picloram (50 μM) a thiram (65 μM)

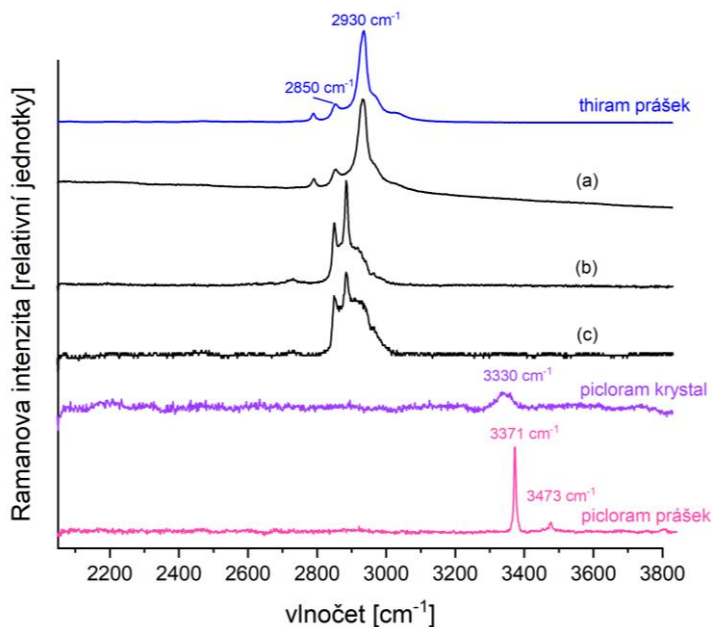
Vyschlé depozity této směsi si byly vzájemně podobné (viz. obr. 3.2.20.), látka byla rozprostřena po velké ploše (až 2 mm v průměru) a vytvářela pouze malé shluky. Thiram vytvářel malé krystalky o rozměrech v řádu jednotek mikrometrů, picloram nebylo možné detekovat. Navíc, několik měření vykazovalo známky ještě jiného spektra, které se velmi blízce podobalo spektru X2 naměřenému v předchozím vzorku. Výběr spekter jse vidět v obrázku 3.2.21 a 3.2.22. Spektrum (a) získané z krystalku odpovídá velice dobře referenčnímu spektru thiramu, spektra (b) a (c) sdílí mnoho znaků se spektrem X2, zejména pak v oblasti valenčních vibrací. Z důvodu přítomnosti neznámých spekter, neúspěšné detekce picloramu a přílišného rozprostření látky nebyly depozity tohoto roztoku mapovány.



Obrázek 3.2.20: Depozity vzniklé po vyschnutí kapky roztoku picloramu (50 μM) a thiramu (65 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$



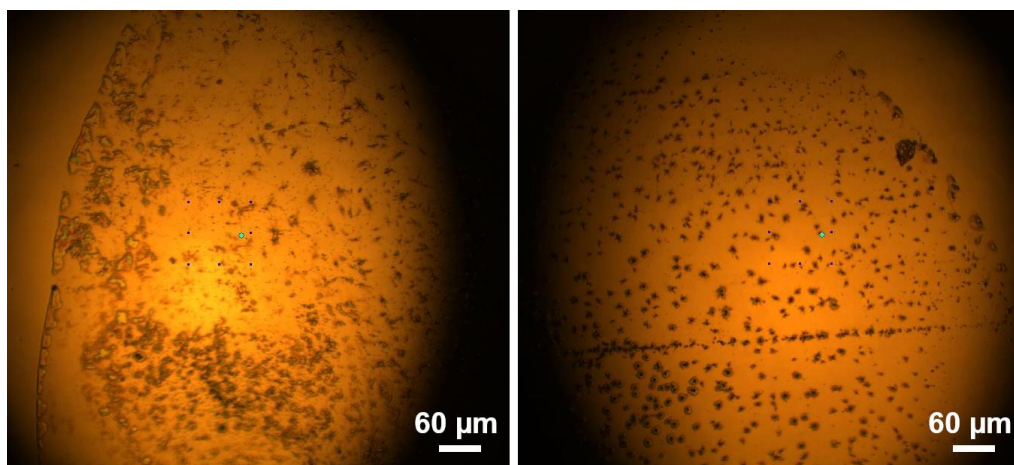
Obrázek 3.2.21: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu 300–2000 cm⁻¹) získaná z depozitu roztoku picloramu (50 μM) a thiramu (65 μM) na substrátu μ-RIMTM



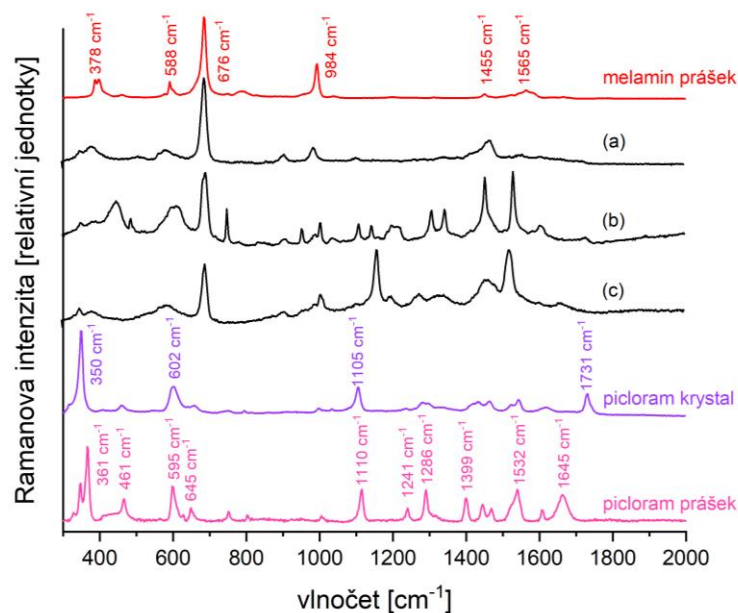
Obrázek 3.2.22: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu 2000–3800 cm⁻¹) získaná z depozitu roztoku picloramu (50 μM) a thiramu (65 μM) na substrátu μ-RIMTM

picloram (50 μM) a melamin (80 μM)

Látka depozitu vytvořila malé shluky ($\sim 1 \mu\text{m}$), zajímavostí bylo opětovné pozorování usazenin formujících „přímky“ vedoucí přes celou plochu depozitu (viz. obr. 3.2.23 (vpravo)). Z obou depozitů bylo možné získat pouze několik spekter odpovídajících referenčnímu spektru melaminu bez pásů neznámých spekter. Picloram nebyl detekován. Přehled spekter je na obrázku 3.2.24, spektrum (a) je jediné získané spektrum odpovídající melaminu, spektra (b) a (c) obsahují pás na pozici 676 cm^{-1} charakteristický pro melamin, ovšem ve spektrech jsou také pásy nepříslušející žádnému z dvou kontaminantů. Na depozitu nebylo provedeno mapování.



Obrázek 3.2.23: Depozity vzniklé po vyschnutí kapky roztoku picloramu (50 μM) a melaminu (80 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$



Obrázek 3.2.24: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu 300–2000 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku picloramu (50 μM) a melaminu (80 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$

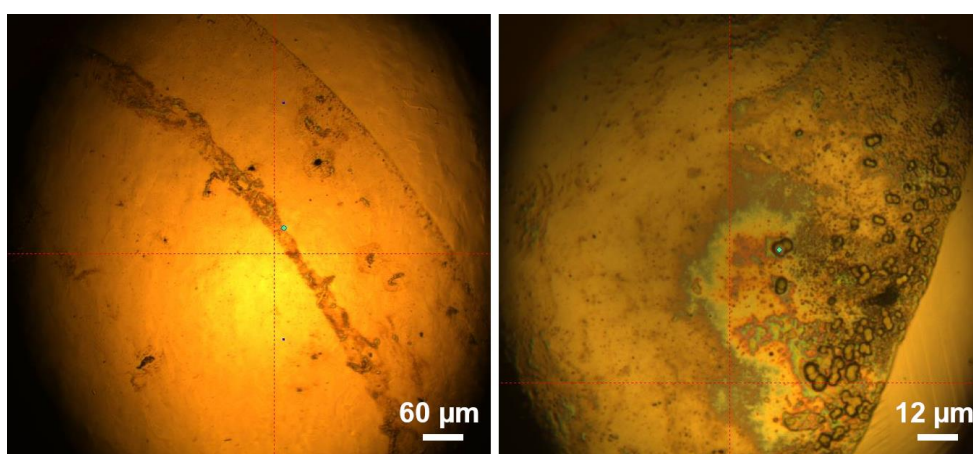
Ve všech depozitech směsí obsahujících picloram byla detekována neznámá spektra. Všechny základní roztoky byly samostatně prověřeny za pomoci DCDR, ale žádné známky případné další kontaminace neznámou látkou nebyly nalezeny. Neznámá spektra byla tedy v době měření přisouzena interakcím kontaminantů s picloramem a jejich studium bylo dočasně pozastaveno. Na druhou stranu ve směších bez picloramu byly bez problému detekovány oba přítomné kontaminanty a někdy bylo dokonce možné je v depozitu odlišit pouze pozorováním. Dalším krokem bylo postupně ředit směsi kontaminantů a studovat limitní koncentrace, při kterých jsme schopni oba kontaminanty rozeznat a detekovat samostatně. Jako nejvhodnější roztok pro další měření se jevila směs melaminu a thiramu, proces postupného ředění tedy začal právě touto směsí.

melamin (8 μM) a thiram (6,5 μM)

V depozitu byly jasně viditelné dvě linie vzniklé při vysychání kapky, podobně jako při vysychání způsobem „stick-slip“. Při takovémto vysychání kapka drží po určitou dobu konstantní průměr, poté se průměr skokem zmenší a opět zůstává po určitou dobu konstantní, v depozitu tak vzniká série prstenců, které postupně odpovídají průměrům, při kterých se vysychání kapky ustálilo. Ve vnitřním

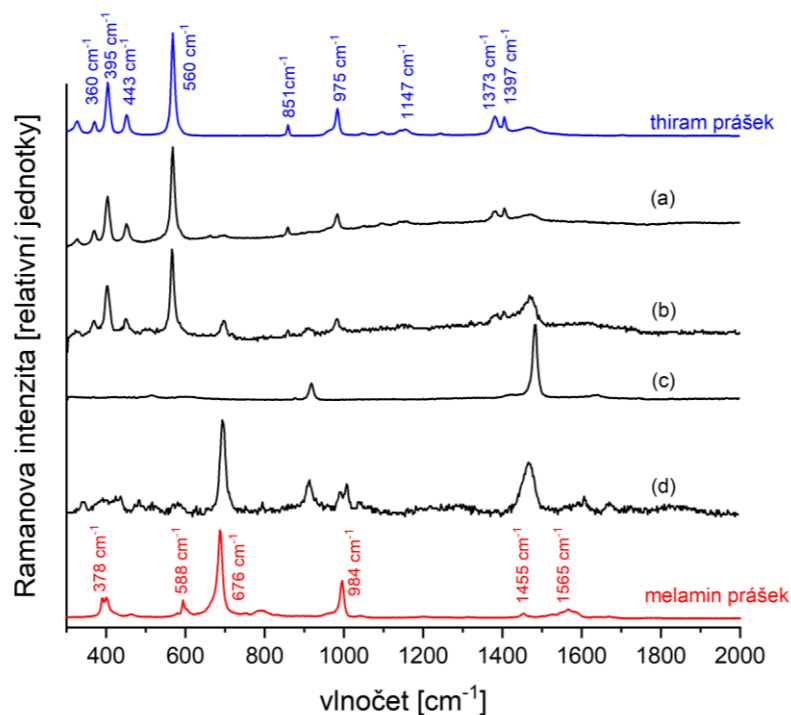
(širším) prstenci tohoto depozitu látka tvořila velmi malé shluky. Na obrázku 3.3.25 je zobrazen jeden z depozitů, vpravo při větším přiblížení je vidět shluk thiramu (černý flíček na okraji) a kolem něj útvary připomínající bubliny. Z flíčků byla získána kvalitní spektra thiramu – spektrum (a) na obrázcích 3.2.26 a 3.2.27.

Z krystalku, co byl nalezen v druhém depozitu bylo pak získáno spektrum (b), také odpovídající thiramu. Z „bublin“ bylo získáno spektrum (c), které neodpovídá doposud žádnému měřenému spektru. Spektrum (d), také získané blízko okraje kapky, pak připomíná melamin, v oblasti valenčních vibrací se však liší, jde tedy o další neznámé spektrum.

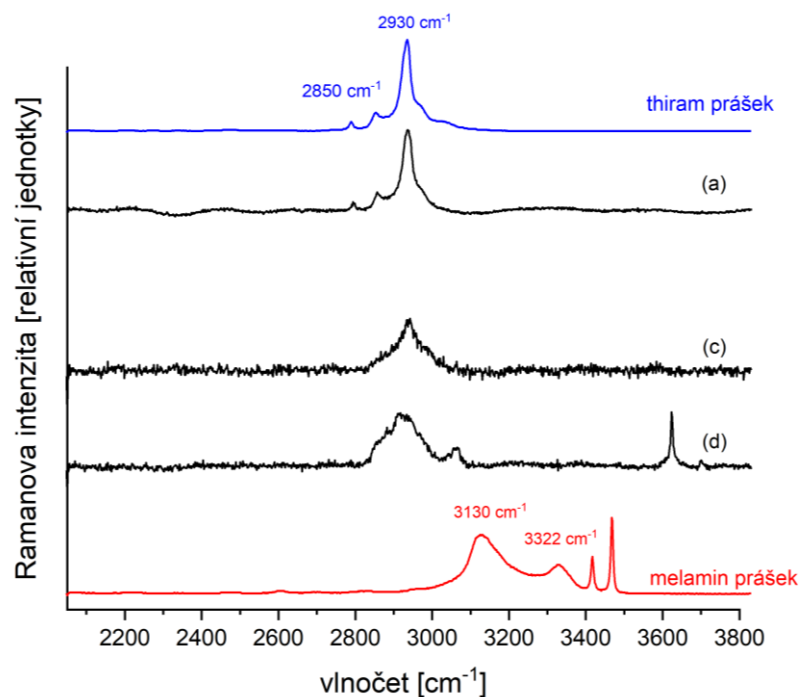


Obrázek 3.2.25: Depozit vzniklý po vyschnutí kapky roztoku melaminu (8 μM) a thiramu (6,5 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$

Vzhledem k tomu, že neznámá spektra byla pozorována i v depozitu roztoku, který picloram neobsahoval, možným vysvětlením bylo, že látka interaguje s použitým substrátem. V některých případech byly navíc pozorovány mikropraskliny vzniklé degradací substrátu, kdy došlo k zatékání kapky pod deponovanou uhlovodíkovou vrstvou.



Obrázek 3.2.26: Vybraná DCDR spektra (a) až (d) (v rozsahu 300–2000 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku melaminu (8 μM) a thiramu (6,5 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$



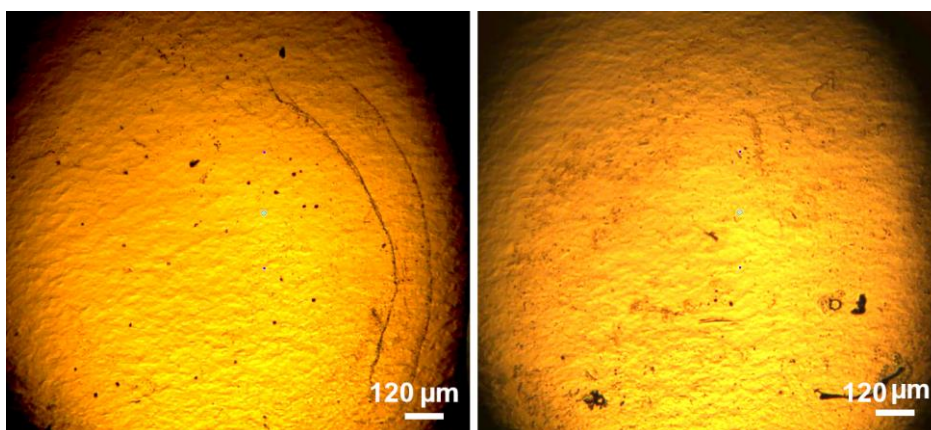
Obrázek 3.2.27: Vybraná DCDR spektra (a), (b), (d) (v rozsahu 2000–3800 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku melaminu (8 μM) a thiramu (6,5 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$

3.2.2 Měření roztoků směsí kontaminantů na různých substrátech

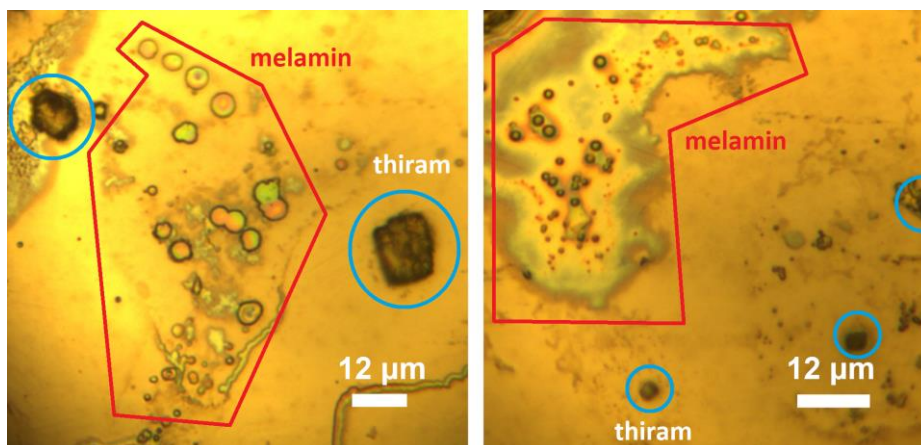
Aby byla ověřena nebo vyloučena teorie o interakci kapky roztoku s povrchem, bylo potřeba otestovat vzorky na jiných substrátech. Roztoky směsí melaminu a thiramu byly nakápnuty na komerční substrát SpectRIM™, který byl již použit a prověřen u mnoha předchozích měření.

melamin a thiram

Roztoky směsí melaminu a thiramu (pro dvě různé koncentrace) vysychaly na tomto substrátu podobně jako na předchozím použitém, látka se rozprostřela po velké ploše (~ 2 mm průměr) a vytvářela pouze malé shluky (viz. obr. 3.2.28), ovšem thiram a melamin byly v obou kapkách poměrně dobře rozeznatelné, jak je vyznačeno na obrázku 3.2.29. Zatímco thiram tvořil krystalky ve tvaru čtyřúhelníku, melamin vytvářel spíše kruhové sktruktury.



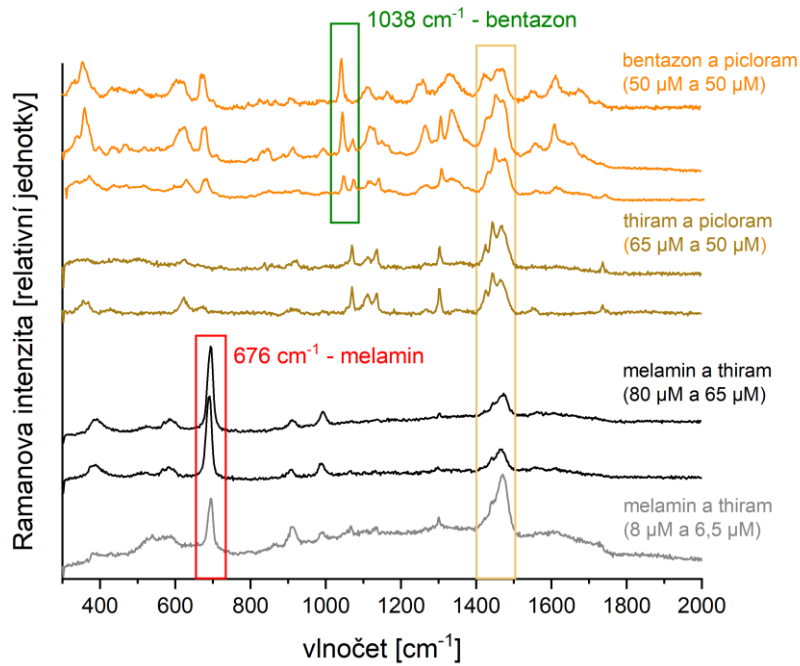
Obrázek 3.2.28: Depozit vzniklý po vyschnutí kapky roztoku melaminu a thiramu na substrátu SpectRIM™; vlevo s koncentracemi 80 μM a 65 μM resp., vpravo s koncentracemi 8 μM a 6,5 μM



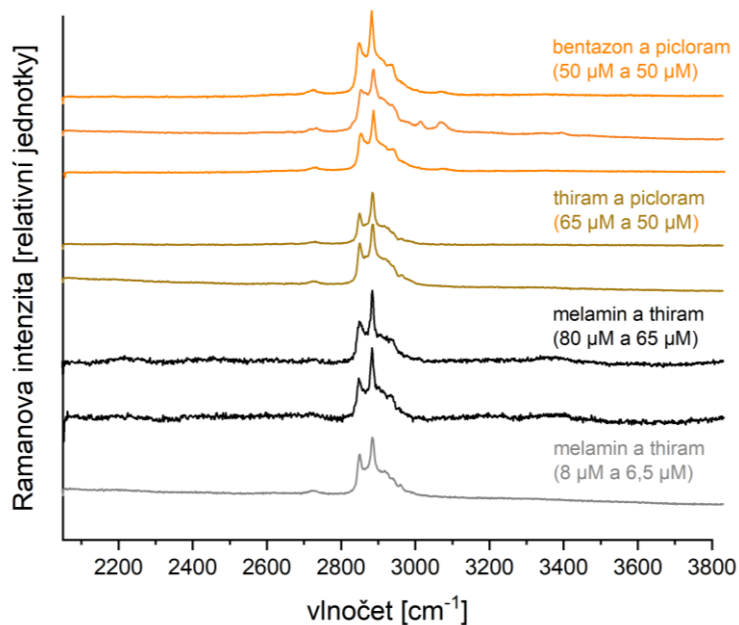
Obrázek 3.2.29: Detail depozitu vzniklého po vyschnutí kapky roztoku melaminu a thiramu na substrátu SpectRIM™; vlevo s koncentracemi 80 μM a 65 μM, vpravo s koncentracemi 8 μM a 6,5 μM

Tentokrát bylo cílem měření nalézt spektra, která neodpovídají spektrům dvou použitých kontaminantů. V depozitu tedy byly hledány struktury lišící se od krystalků thiramů a útvarů tvořených melaminem. Toto hledání bylo úspěšné. Překvapivě byla v obou kapkách nalezena spektra, která silně připomínala spektrum X2, jež bylo předtím detekováno ve dvou roztocích směsí obsahujících picloram. Porovnání spekter získaných v tomto depozitu se spektry X2 získanými z depozitů na substrátu μ-RIM™ je na obrázku 3.2.30 a 3.2.31.

Jelikož nejvíce neznámých spekter bylo detekováno v roztoku bentazonu a picloramu, další měření bylo zaměřeno na něj. Aby byla opravdu vyloučena možnost, že roztok interaguje s povrchem substrátu, byly vybrány tři další substráty, a to CaF₂ substrát, sklíčko s napařenou vrstvou zlata (dále jen Au substrát) a sklíčko s napařenou vrstvou chromu (dále jen Cr substrát).



Obrázek 3.2.30: Výběr neznámých DCDR spekter (v rozsahu 300–2000 cm⁻¹) získaných z depozitů roztoků melaminu a thiramu na substrátu SpectRIMTM (černá a šedá) v porovnání s neznámými spektry získanými na substrátu μ-RIMTM



Obrázek 3.2.31: Výběr neznámých DCDR spekter (v rozsahu 2000–3800 cm⁻¹) získaných z depozitů roztoků melaminu a thiramu na substrátu SpectRIMTM (černá a šedá) v porovnání s neznámými spektry získanými na substrátu μ-RIMTM

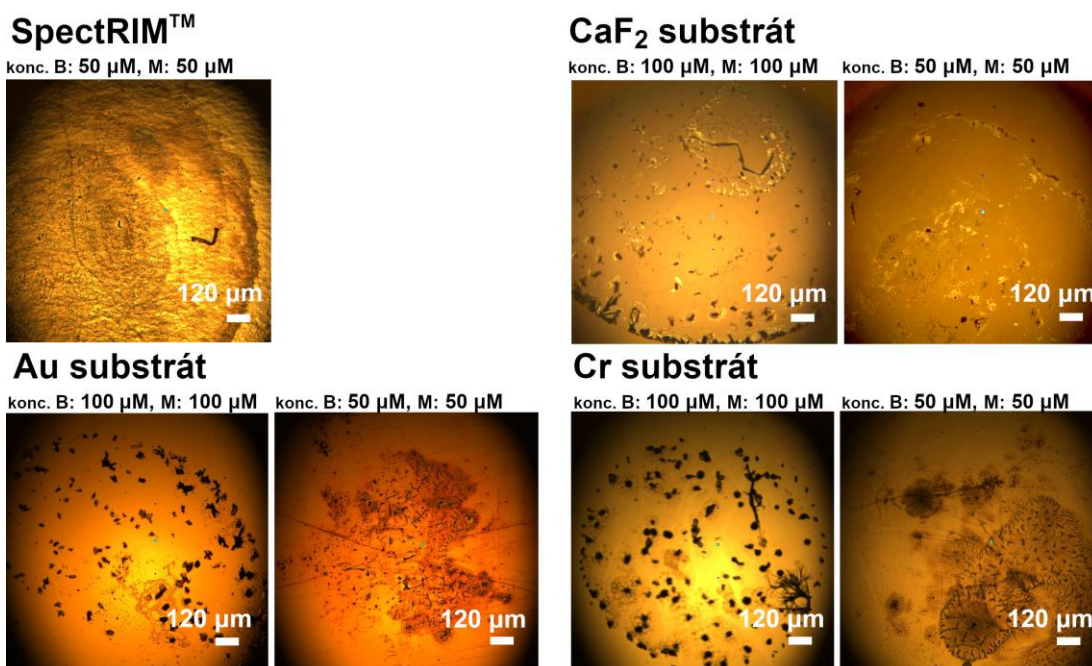
bentazon a picloram

Vzhledem k tomu, že na některých substrátech bylo náročné získat z depozitu spektra (popsáno dále), byl vytvořen nový roztok směsi bentazonu s koncentrací 100 μM a picloramu s koncentrací 100 μM (v původním roztoku měli oba kontaminanty koncentrace 50 μM z důvodu výskytu dvou různých spekter picloramu ve vyšších koncentracích), ovšem i původní roztok byl v tomto měření použit. Přehled připravených vzorků a z nich získaných spekter je v tabulce 3.2.1, snímky depozitů jsou na obrázku 3.2.32.

Na substrátu SpectRIMTM roztok vysychal podobně jako na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$, látka byla opět velmi rozprostřena (až 2 mm v průměru), vznikly pouze malé shluky. Detekován byl bentazon i picloram, ale většina spekter se podobala spektrům typu X2, hlavně v oblasti valenčních vibrací. Na substrátu CaF_2 bylo náročnější získat kvalitní spektra. Kvůli menší odrazivosti substrátu byla intenzita signálu velmi slabá, fluorid vápenatý má navíc vlastní Ramanovské spektrum, a to jeden vysoce intenzivní pás na pozici 321 cm^{-1} , který zasahoval do získaných spekter a musel být odečítán v programu OriginPro. V roztoku s vyššími koncentracemi byla naměřena spektra obou kontaminantů i spektrum X2. V roztoku s nižšími koncentracemi bylo získáno mimo spektra kontaminantů jedno neznámé spektrum.

Tabulka 3.2.1: Přehled vytvořených roztoků a z nich získaných spekter

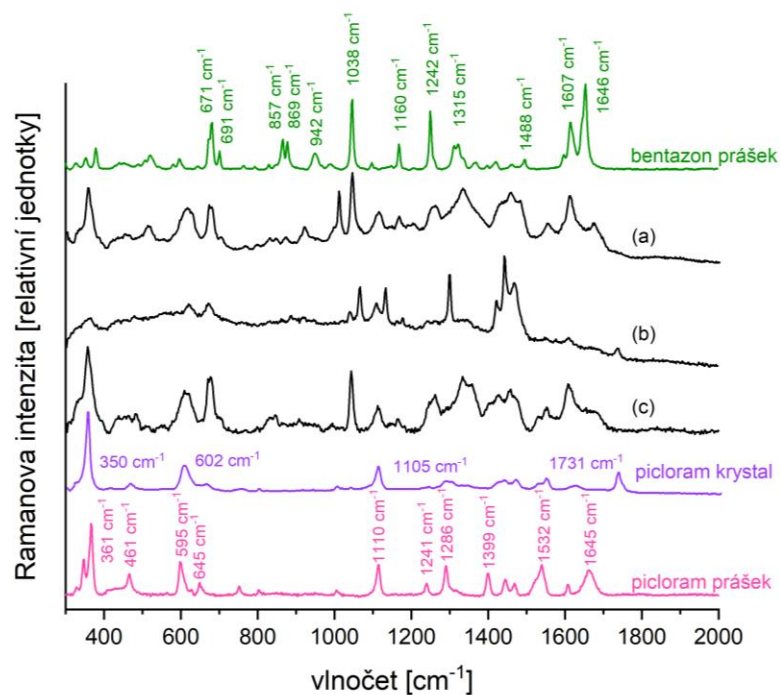
substrát	koncentrace bentazonu (μM)	koncentrace picloramu (μM)	získaná spektra
SpectRIMTM	50	50	<i>bentazon picloram X2</i>
CaF₂ substrát	100	100	<i>bentazon picloram X2</i>
	50	50	<i>bentazon picloram neznámé spektrum</i>
Au substrát	100	100	<i>bentazon picloram X2</i>
	50	50	<i>bentazon X1 X2</i>
Cr substrát	100	100	<i>bentazon picloram</i>
	50	50	nebylo možné získat žádné spektrum



Obrázek 3.2.32: Přehled depozitů vzniklých po vyschnutí roztoků směsi bentazonu a picloramu na vybraných substrátech (nad snímky uvedeny koncentrace pro oba kontaminanty ve směsi)

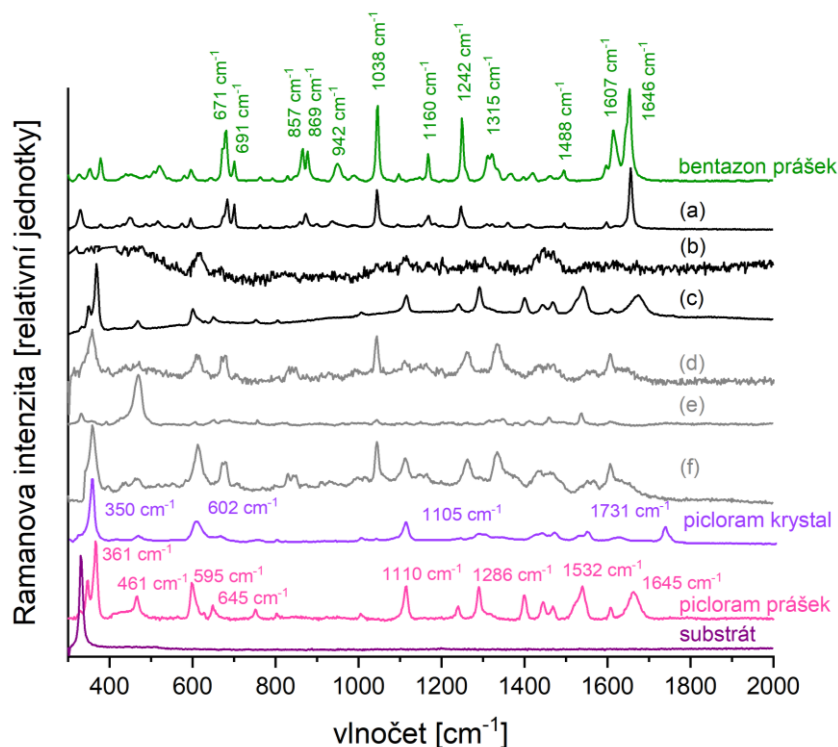
Pro měření na zlatem a chromem pokrytých sklíčkách bylo nutné využít šedé filtry pro snížení výkonu laseru, protože bez nich se vzorek velmi rychle pářil. Filtrem nastavené výstupní výkony laseru byly 3 mW a 1,6 mW. Při vyšších koncentracích byla na obou substrátech změřena spektra bentazonu i picloramu, na Au substrátu pak i spektrum *X2*. Při nižších koncentracích látka v depozitu tvořila pouze tenké vrstvičky, což za prvé znamenalo, že bylo velmi snadné vzorek působením laseru zničit, a za druhé, že intenzita signálu byla velmi slabá i bez použití šedých filtrů. Měření tak bylo velmi náročné. Na Au substrátu bylo získáno pouze několik spekter, mezi nimiž jedno odpovídalo spektru *X1* a zbylé bentazonu nebo *X2*. Na Cr substrátu nebylo možné získat žádné spektrum.

Na obrázku 3.2.33 je výběr získaných spekter z depozitu na substrátu SpectRIM™. Spektrum (a) se podobá spektru bentazonu, i přesto, že jsou vidět i další pásy. Spektrum (b) odpovídá velice přesně spektru *X2* a spektrum (c), které se nejvíce podobá referenčnímu spektru krystalické formy picloramu (zejména kvůli přítomnosti pásu na pozici 350 cm^{-1}). Žádné ze spekter nepochází jednoznačně od jedné látky, v každém jsou vidět pásy, které nenáleží k žádnému z referenčních spekter.



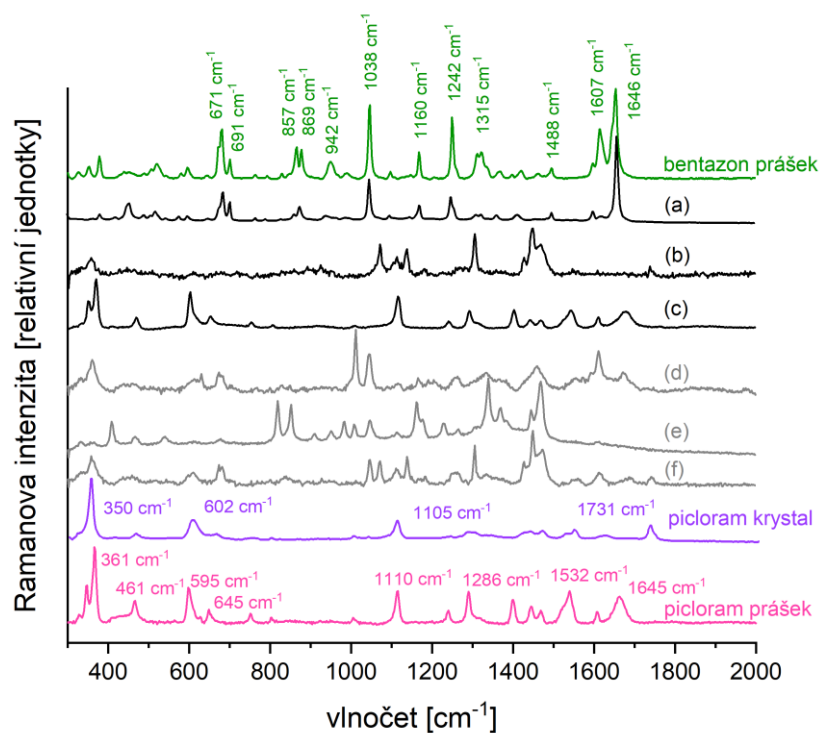
Obrázek 3.2.33: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu 300–2000 cm⁻¹) získaná z depozitu roztoku picloramu (50 μM) a bentazonu (50 μM) na substrátu SpectRIM™

Výběr spekter získaných na CaF₂ substrátu je na obrázku 3.2.34. Spektra (a) až (c) jsou získána z depozitu roztoku o koncentraci 100 μM pro oba kontaminanty, spektra (d) až (f) pak pro koncentraci 50 μM pro oba kontaminanty. Spektra (a), (d) a (f) obsahují pás 1038 cm⁻¹, který je charakteristický pro bentazon. Spektra (d) a (f) navíc obsahují velmi intenzivní pás na pozici 350 cm⁻¹, který je typický pro picloram. Spektrum (b) odpovídá spektru X2. Spektrum (c) velmi dobře odpovídá referenčnímu spektru práškové formy picloramu. Spektrum (e) neodpovídá žádnému doposud naměřenému spektru.



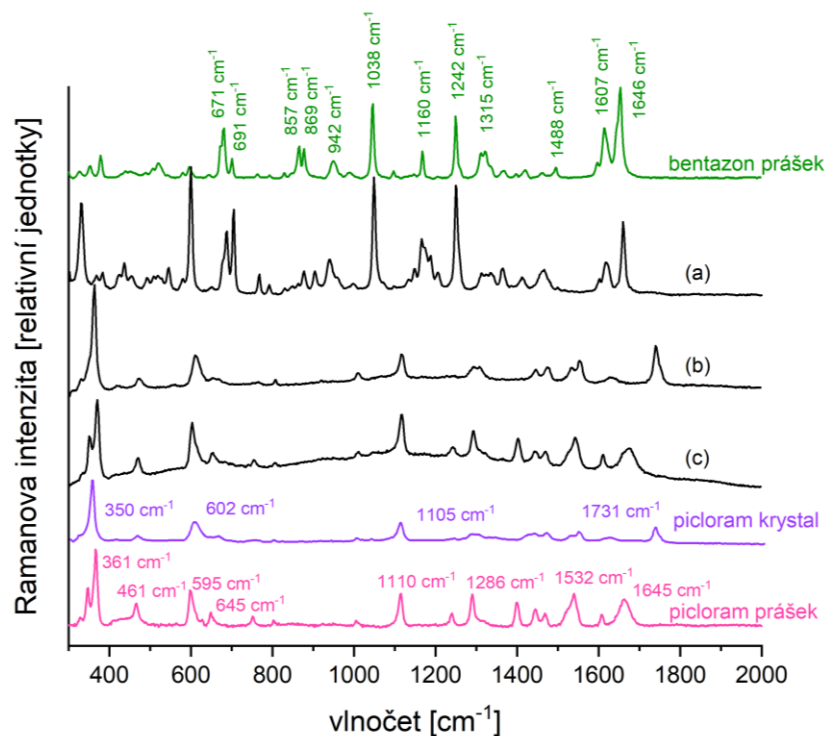
Obrázek 3.2.34: Vybraná DCDR spektra (a) až (f) (v rozsahu 300–2000 cm^{-1}) získaná z depozitů roztoků picloramu a bentazonu při dvou různých koncentracích na CaF_2 substrátu

Na obrázku 3.2.35 je přehled vybraných spekter získaných z depozitů na substrátu tvořeném napařenou vrstvou zlata na sklíčku. Stejně jako v předchozím obrázku, spektra (a) až (c) jsou získána z depozitu roztoku o koncentraci 100 μM pro oba kontaminanty, spektra (d) až (f) pro koncentraci 50 μM pro oba kontaminanty. Spektra (a) a (d) odpovídají referenčnímu spektru bentazonu, spektrum (d) obsahuje navíc pásy neznámého původu. Spektra (b) a (f) se velmi podobají a obě odpovídají spektru typu *X2*. Spektrum (c) přesně odpovídá referenčnímu spektru práškové formy picloramu a spektrum (e) odpovídá neznámému spektru typu *X1*, které bylo naměřeno už na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$.



Obrázek 3.2.35: Vybraná DCDR spektra (a) až (f) (v rozsahu 300–2000 cm^{-1}) získaná z depositů roztoků picloramu a bentazonu při dvou různých koncentracích na Au substrátu

Obrázek 3.2.36 obsahuje výběr spekter získaných z depositu na substrátu tvořeném napařenou vrstvou chromu na sklíčku. Všechna zobrazená spektra byla získána při koncentraci 100 μM pro oba kontaminanty. Spektrum (a) velmi dobře odpovídá spektru bentazonu, rozdílné poměry intenzit jednotlivých pásů jsou způsobeny tím, že spektrum bylo detekováno z krystalu, zatímco referenční spektrum pochází z prášku. Spektrum (b) velmi dobře odpovídá referenčnímu spektru krystalické formy picloramu a spektrum (c) práškové formě.



Obrázek 3.2.36: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu $300\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$) získaná z deponátu roztoku picloramu a bentazonu na Cr substrátu

Jelikož spektrum *X2* bylo detekováno na třech ze čtyř použitých substrátů a v obou směsích, je nutné teorii o interakci látky se substrátem zavrhnout. Dalším vysvětlením neznámých spekter by mohla být interakce mezi kontaminanty samotnými. I přesto, že zdroje neuvádějí žádné pozorované interakce těchto látek, je možné že při vyschnutí dochází k vzájemnému ovlivňování, které vede ke vzniku spektra *X2* a dalších neobjasněných spekter.

Ukázalo se, že oddělování látek v deponátu roztoku směsí není vždy jednoznačné, jen v jednom případě (bentazon a thiram) bylo možné spolehlivě oba kontaminanty rozlišit na snímcích v mikroskopu. K oddělení látek ovšem může docházet, což potvrdila faktorová analýza dat získaných z vybraných oblastí deponitů. Nejnižší koncentrace, při kterých byly jednotlivé kontaminanty detekovány v deponitech roztoků jejich směsí na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$ jsou uvedeny v tabulce 3.2.2.

Tabulka 3.2.2: Nejnižší detekované koncentrace jednotlivých kontaminantů v roztocích jejich směsí

Roztok směsi dvojice:			
	koncentrace [μM]		koncentrace [μM]
melamin	80	bentazon	100
melamin	80	thiram	6,5
bentazon	100	thiram	65
picloram	50	bentazon	50
picloram	-	thiram	65
picloram	-	melamin	80

3.3 Detekce melaminu v kojenecké výživě

Nelegální manipulace s mléčnými výrobky je vážným problémem po celém světě. Mezi důvody patří vysoká poptávka po mléčných produktech, jejich nízká trvanlivost a šetření na jinak dražších ingrediencích. Problémem je také nedostatek metod pro detekci takovýchto alterací [Kamthania, M., 2014]. Některé přísady nepředstavují pro lidský organismus riziko, mezi tyto patří například různé proteiny a rostlinné oleje. Do mléčných výrobků se ovšem přidávají i škodlivé látky, jako je močovina, formalin, peroxid vodíku a melamin. Melamin se přidává do mléka ke zdánlivému zvýšení proteinového podílu za nižší náklady. Jde o látku bohatou na dusík, používanou k výrobě plastů, lepidel, barev a hnojiv. Melamin byl detekován v kojenecké výživě ve větším množství poprvé v září 2008, kdy v Číně minimálně šest dětí zemřelo na otravu. Stopová množství melaminu byla v mléčných výrobcích detekována již dříve, dostal se tam nepřímo díky jeho přítomnosti ve zvířecím krmivu v podobě pesticidů a hnojiv [Jalili, 2017].

Podíl proteinové složky v mléčných výrobcích je určován detekcí dusíku Kjeldahlovou a Dumovou metodou [Snyder, 2007], které ovšem nedokážou rozeznat proteiny od melaminu. Výrobci pak mohou mléko s melaminem ředit a stejně dosáhnout standardních hodnot podílu proteinu. Nejohroženější skupinou jsou pak kojenci, kteří jsou na přísunu mléka závislí a jejichž plně nevyvinutá trávicí ústrojí jsou velmi zranitelná. Codex Alimentarius (mezinárodní sbírka potravinových standardů a směrnic) určuje maximální limit pro kojeneckou výživu jako 1 mg melaminu na 1 kg produktu [Codex alimentarius, 2020]. Dle výzkumu provedeného v Číně v roce 2008 (po zjištění kontaminace) se koncentrace melaminu v testovaných kojeneckých výživách pohybovala od 0,05 mg do 4700 mg na kilogram produktu. U 51 z 87 zkoumaných vzorků přesahovala koncentrace 1000 mg/kg [Jalili, 2017]. Cílem této části práce je přidat melamin do vybrané kojenecké výživy Sunar Complex 1 v relevantní koncentraci a detekovat jej za pomoci DCDRS. Obal produktu je na obrázku 3.3.1.

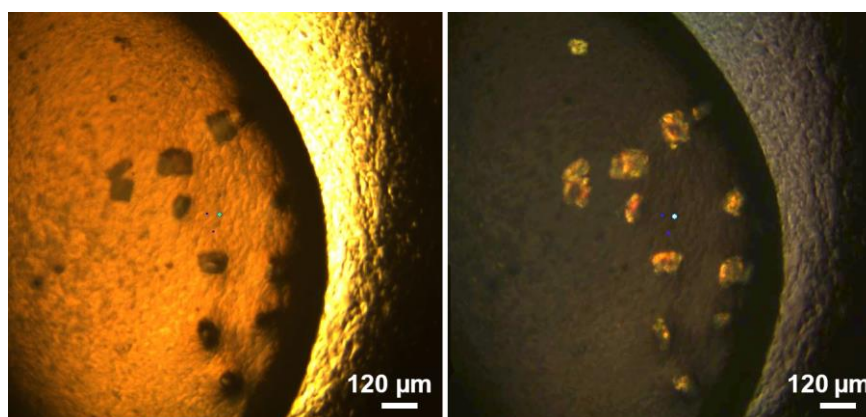


Obrázek 3.3.1: Obal kojenecké výživy Sunar Complex 1 [Sunar]

Složení produktu:

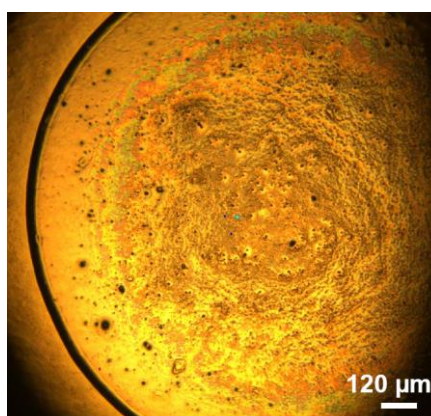
Odtučněné mléko, laktóza (z mléka), smetana (obsahuje mléčný tuk), slunečnicový olej, koncentrát syrovátkové bílkoviny (z mléka), galaktooligosacharidy (GOS) (z mléka), řepkový olej, kokosový olej, citronan draselný, rybí olej, vápenaté soli kyseliny fosforečné, chlorid hořečnatý, chlorid sodný, cholin chlorid, emulgátor (sójový lecitin), L-askorbát sodný, citronan sodný, olej z *Mortierella alpina*, uhličitan vápenatý, taurin, L-askorbyl-6-palmitát, inositol, síran železnatý, L-karnitin, síran zinečnatý, nikotinamid, cytidin 5'-monofosforečnan, D- α -tokoferol, D-pantothenát vápenatý, uridin 5'-monofosforečnan, síran měďnatý, adenosin 5'-monofosforečnan, retinyl palmitát, guanosin 5'-monofosforečnan, inosin 5'-monofosforečnan, thiamin-hydrochlorid, riboflavin, pyridoxin-hydrochlorid, jodid draselný, kyselina listová, seleničitan sodný, síran manganatý, fytomenadion, cholekalciferol, D-biotin, kyanokobalamin. [Sunar]

Jelikož jde o komplexní směs mnoha látek, bylo nejdříve nutné zjistit, jak budou vypadat spektra získaná z nekontaminovaného vzorku této kojenecké výživy a zda se pásy těchto spekter nebudou překrývat s pásy melaminu. Nejdříve byl prášek nasypán na sklíčko a přímo z něj získána Ramanova spektra, jako referenční spektra. Následně, dle návodu na obalu, byl připraven první základní roztok nekontaminované kojenecké výživy. Byla použita deionizovaná voda o teplotě přibližně 40 °C. Základní roztok byl připraven s koncentrací 156,7 mg/ml a před nakápnutím přibližně 20 minut míchán za stálé teploty 40 °C. Jako substrát byla použita destička μ -RIMTM, na kterou byly nakápnuty dvě kapky o objemu 2 μ l. Látka po vyschnutí vytvořila povlak po celé kontaktní ploše kapky s vyšší koncentrací látky na okraji. V depozitu se také vytvořili objekty připomínající krystaly. Snímek depozitu vzniklého po vyschnutí kapky tohoto roztoku s použitím zkřížených polarizačních filtrů a bez něj je na obrázku 3.3.2.



Obrázek 3.3.2: Depozit základního roztoku kojenecké výživy Sunar Complex 1 (156,7 mg/ml) na substrátu μ -RIMTM, snímek bez použití zkřížených polarizačních filtrů (vlevo) a snímek stejného místa při použití zkřížených polarizačních filtrů (vpravo)

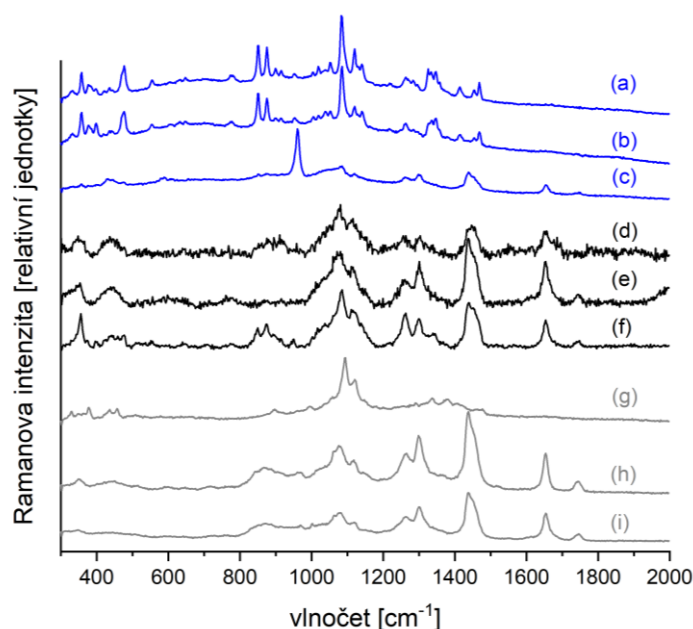
Jelikož bylo odebrání vzorku pipetou kvůli vysoké hustotě a přesycenosti roztoku i po řádném promíchání obtížné, byl připraven ještě jeden roztok s koncentrací 1,57 mg/ml, tedy 100× zředěný. Opět byly nakápnuty dvě kapky. Na substrátu vytvořila látka depozit v podobě kávového kroužku, většina látky tak byla koncentrována na okraji kontaktní plochy vyschlé kapky, což je vidět na obrázku 3.3.3.



Obrázek 3.3.3: Depozit roztoku kojenecké výživy (1,57 mg/ml) Sunar Complex 1 na substrátu μ -RIMTM

Přehled naměřených DCDR spekter je na obrázku 3.3.4. V prášku byly detekovány dva typy spekter, a to první typ – spektra (a) a (b), a druhý typ – spektrum (c). Spektra (d), (e) a (f) byla získána z vyschlého depozitu ze základního

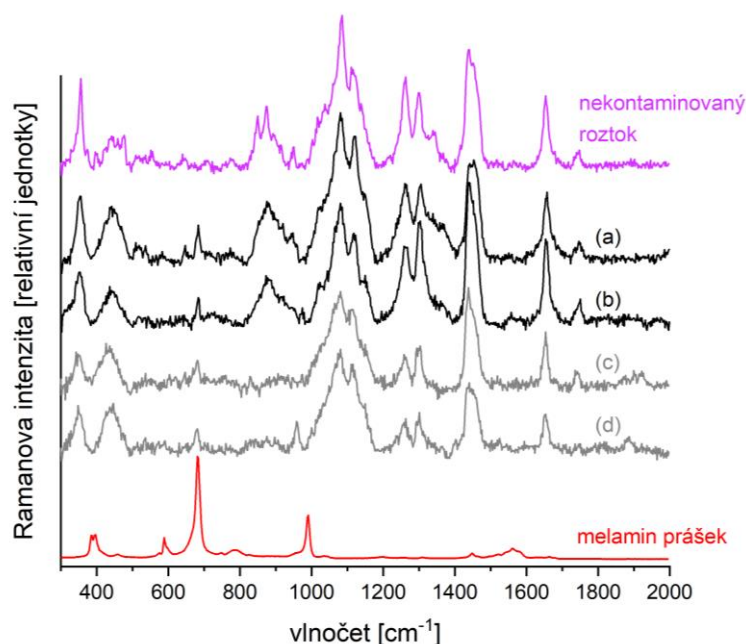
roztoku. Tato spektra byla ovlivněna silným fluorescenčním pozadím, které bylo odečteno pomocí programu OriginPro. Spektrum (f) bylo naměřeno z krystalického objektu (viz. obr. 3.3.2) a vyznačuje se silnějším pásem v oblasti 1100 cm^{-1} . Z depozitu ze zředěného roztoku bylo také změřeno toto mírně odlišné spektrum – spektrum (g). Ostatní naměřená spektra z depozitu (h) a (i) se velmi podobají spektrům (e) a (f). Spektra získaná z depozitu ze zředěného roztoku byla kvalitnější, a dokonce nebyla zatížena fluorescenčním pozadím. Nejdůležitějším výsledkem ale bylo, že jednotlivá spektra si víceméně odpovídala a navíc, v oblasti $600\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ se nenacházely žádné výrazné pásy, které by ovlivňovaly případnou detekci melaminu (charakteristický pás na pozici 676 cm^{-1}).



Obrázek 3.3.4: Vybraná DCDR spektra (v rozsahu $300\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$): (a) – (c) prášek Sunar Complex 1, (d) – (f) základní roztok Sunar Complex 1 ($156,7\text{ mg/ml}$), (g) – (i) zředěný základní roztok Sunar Complex 1 ($1,57\text{ mg/ml}$) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$

Získaná DCDR spektra z depozitu nekontaminovaného roztoku byla dále používána jako reference. První testovací kontaminovaný roztok byl připraven následovně. Bylo naváženo $2,7\text{ mg}$ melaminu, zvlášť bylo naváženo $211,4\text{ mg}$ Sunaru, aby po smíchání a přidání $1,35\text{ ml}$ vody vznikl roztok s koncentrací 2 mg melaminu na 1 ml roztoku kojenecké výživy se stejnou koncentrací jako měl základní roztok ($156,7\text{ mg/ml}$). Koncentrace melaminu 2 mg/ml byla vybrána, jelikož představuje maximální rozpustnost melaminu ve vodě. Při zaokrouhlení jde o koncentraci $12\,763\text{ mg}$ melaminu na 1 kg kojenecké výživy, což je téměř třikrát více

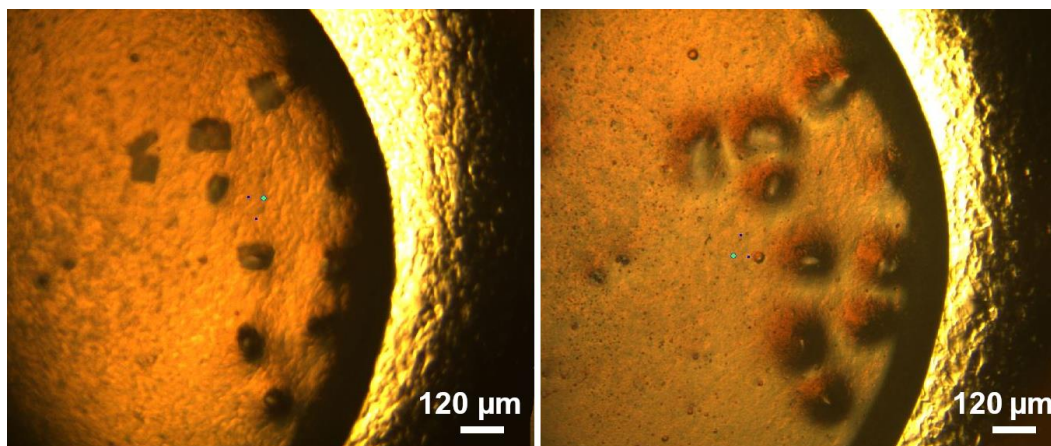
než relevantní koncentrace 4700 mg/kg. Měření na depozitech tohoto roztoku mělo za cíl nalézt případné rozdíly v depozitu oproti nekontaminovanému roztoku, nalézt místa pro detekci melaminu a zjistit, zda bude melamin vůbec detekovatelný. Byly nakápnuty dvě kapky na substrát μ -RIMTM a provedeny dvě série měření, jedna ihned po vyschnutí kapky a druhá po pěti dnech. Výběr spekter z tohoto měření porovnaných se spektrem z roztoku sunaru bez melaminu a s referenčním spektrem melaminu je na obrázku 3.3.5.



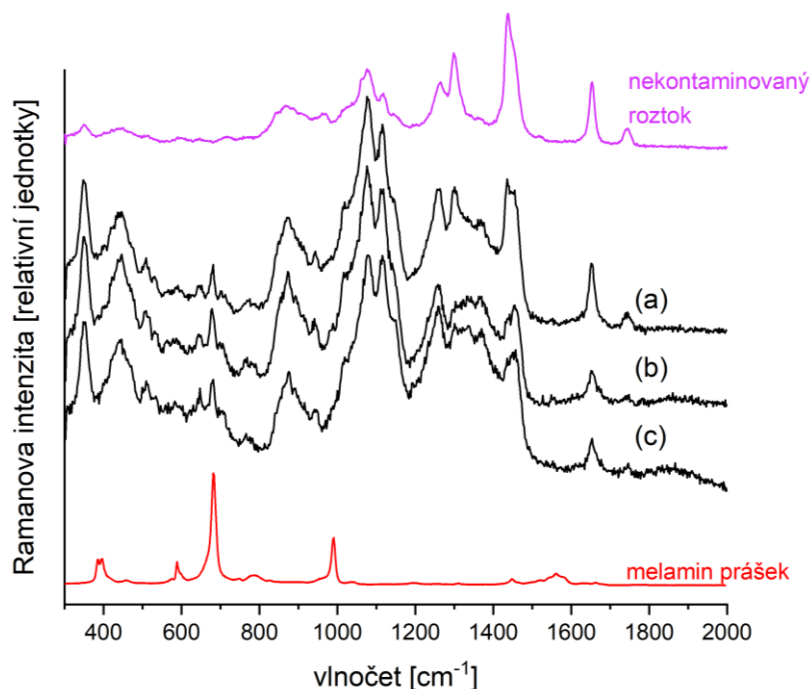
Obrázek 3.3.5: DCDR spektra (a) až (d) (v rozsahu 300–2000 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku kojenecké výživy Sunar Complex 1 (156,7 mg/ml) kontaminovaného melaminem (12 763 mg/kg) na substrátu μ -RIMTM

Ze všech spekter muselo být v programu OriginPro odečítáno fluorescenční pozadí. Spektra (a) a (b) byla získána z depozitu ihned po vyschnutí, oproti DCDR spektrům získaným z nekontaminovaného roztoku se zde objevuje pás na pozici 676 cm^{-1} . Jde o pás odpovídající charakteristickému pásu melaminu, a proto byla detekce považována za úspěšnou. Tento pás je méně intenzivní ve spektrech (c) a (d), která byla získána o pět dní později, zdá se tedy, že vzorek se i po vyschnutí dále mění (viz obr. 3.3.6) a schopnost detekovat melamin se snižuje. Další měření proto probíhala vždy ihned po vyschnutí kapky. V depozitu nebylo nalezeno žádné konkrétní místo „pro detekci melaminu“, spektra s intenzivnějším melaminovým pásem byla ale většinou získána z míst blíže středu depozitu.

Vzhledem k úspěšnosti měření byl základní kontaminovaný roztok ještě $100\times$ zředěn za účelem zjištění, zda nebude detekce melaminu snazší, pokud celý roztok nebude saturován. Výběr naměřených spekter a porovnání s DCDR spektrem získaným ze $100\times$ zředěného nekontaminovaného roztoku je na obrázku 3.3.7.



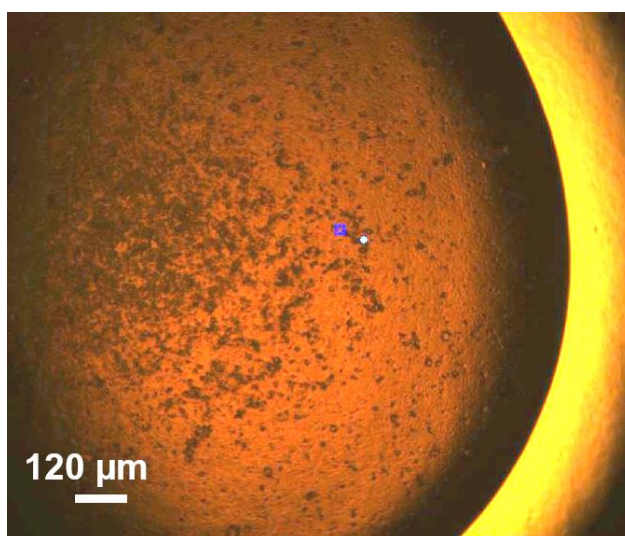
Obrázek 3.3.6: Depozit základního roztoku kojenecké výživy Sunar Complex 1 (156,7 mg/ml) na substrátu μ -RIMTM ihned po vyschnutí kapky (vlevo) a o pět dní později (vpravo)



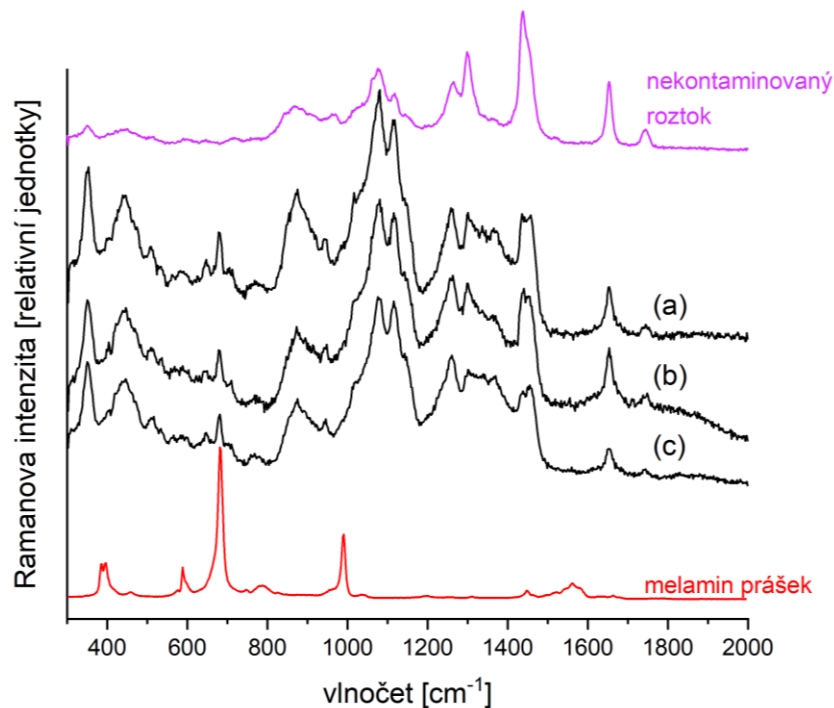
Obrázek 3.3.7: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu $300\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$) získaná z deponátu roztoku kojenecké výživy Sunar Complex 1 (1,57 mg/ml) kontaminovaného melaminem (12 763 mg/kg) na substrátu μ -RIMTM

Ve spektrech získaných z deponátu tohoto roztoku bylo výhodou, že nebylo nutné odečítat pozadí. Charakteristický pás melaminu na pozici 676 cm^{-1} byl ihned při měření mnohem viditelnější. Z obrázku se možná zdá, že se tu objevuje i nový pás nalevo od pásu melaminu (zejména ve spektru (c)), přibližně na pozici 660 cm^{-1} , ovšem tento pás je již v referenčním spektru nekontaminovaného Sunaru, jen není na obrázku vidět, kvůli své nízké intenzitě vůči ostatním pásům ve spektru.

Jelikož byla detekce melaminu v testovacích roztocích úspěšná, byl připraven stejným způsobem roztok nový, a to s koncentrací 4700 mg melaminu na 1 kg kojenecké výživy. Tato koncentrace odpovídá nejvyšší hodnotě detekované v kojenecké výživě v rámci výzkumu po melaminovém skandálu v Čínské lidové republice [Jalili, 2017]. Proces přípravy roztoku byl stejný, opět byla použita deionizovaná voda o teplotě 40 °C a před nakápnutím byl roztok 20 minut promícháván za stálé teploty 40 °C . Následně byly nanесeny dvě kapky na substrát $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$. V tomto roztoku nebylo možné melamin detekovat. Roztok byl poté $100\times$ zředěn, dvě kapky byly nakápnuty na stejný substrát a měření proběhlo znova, tentokrát úspěšně. Depozit je na obrázku 3.3.8 a výběr naměřených spekter na obrázku 3.3.9.



Obrázek 3.3.8: Depozit roztoku kojenecké výživy Sunar Complex 1 ($1,57\text{ mg/ml}$) kontaminovaného melaminem (4700 mg/kg) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$



Obrázek 3.3.9: Vybraná spektra (a) až (c) (v rozsahu 300–2000 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku kojenecké výživy Sunar Complex 1 (1,57 mg/ml) kontaminovaného melaminem (4700 mg/kg) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$

Melamin byl tedy detekován v této kojenecké výživě i při relevantní koncentraci 4700 mg/kg. Ukázalo se, že je vhodné kontaminovaný roztok minimálně 100× zředit a provádět měření ihned po vyschnutí kapky na substrátu.

Závěr

V rámci této práce byly porovnány tři nekomerční nanodrsné DCDR substráty vyrobené na Katedře makromolekulární fyziky MFF UK s komerčním hladkým substrátem SpectRIMTM. Substráty s nanočásticemi představují nový typ hydrofobního substrátu pro studium látek metodou DCDR, který by umožnil efektivnější zakoncentrování studované látky a následně její citlivější detekci. Na substrátech byly studovány roztoky čtyř kontaminantů; melaminu, picloramu, thiram a bentazonu. Pro melamin se nejvíce osvědčil substrát NpsCu10, tedy nejdrsnější z nich s nejdelší dobou naprašování měděných nanočástic. Pro picloram a thiram byly výsledky na všech substrátech podobné. Pro detekci bentazonu se naopak jako nejvhodnější jevil substrát NpsCu2, tedy z těchto tří nejméně drsný substrát s nejkratší dobou naprašování měděných nanočástic. Vlastnosti nekomerčních substrátů byly porovnatelné se substrátem komerčním, největší nevýhodou byl nežádoucí signál křemíku, pocházející ze základní vrstvy substrátu, ovlivňující měřená spektra.

Další měření bylo zaměřeno na roztoky směsí dvojic (ze stejných čtyř) kontaminantů. Pro toto měření byl použit komerční substrát μ -RIMTM. Nejdříve bylo připraveno všech šest možných kombinací dvou různých kontaminantů při vzájemně podobných molárních koncentracích. V téměř všech roztocích bylo možné detekovat obě látky a v některých je bylo možné na snímcích z mikroskopu odlišit. Pomocí zpracování faktorovou analýzou bylo možné vytvořit mapy, které zobrazují místa výskytu obou přítomných kontaminantů ve studovaném depozitu. Jak se ale ukázalo, toto rozdělení nebylo ve všech případech jednoznačné, ve směsích obsahujících picloram byla detekována neznámá spektra. Ředěním roztoků melaminu a thiram bylo také detekováno neznámé spektrum podobné spektrům předtím získaných z depozitů roztoků s picloramem. Po těchto zjištěních bylo vytvořeno několik teorií o vzniku neznámých spekter. První z nich – kontaminace neznámou látkou. Ta byla vyloučena po důkladném studiu roztoků jednotlivých látek. Další teorií bylo, že kontaminanty interagují s povrchem. Aby byla tato teorie potvrzena, či vyloučena byly vybrané roztoky studovány na několika různých substrátech (SpectRIMTM, napařená vrstva zlata na sklíčku, napařená vrstva chromu na sklíčku, CaF₂ substrát). Na tří ze čtyř substrátů byla detekována neznámá spektra odpovídající těm předchozím. Bylo usouzeno, že pravděpodobně dochází interakcím mezi

jednotlivými kontaminanty, buď přímo v roztoku nebo při vysychání kapky. V těchto procesech mohou hrát roli CH_3 a NH_2 skupiny přítomné ve zkoumaných kontaminantech. K potvrzení nebo vyvrácení této hypotézy je potřebná další chemická analýza, což bylo nad možnosti této práce. I přes tuto skutečnost bylo možné téměř všechny jednotlivé kontaminanty v depozitech roztoků jejich směsí na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$ detekovat při koncentracích řádově desítek mikromolů.

Poslední část práce byla zaměřena na studium reálného vzorku – kojenecké výživy Sunar Complex 1. Dle návodu na obalu produktu byl připraven vzorek, jehož spektrum bylo získáno z měření vyschlého depozitu na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$. Cílem této části bylo pokusit se detekovat melamin přidaný uměle do této kojenecké směsi v koncentracích odpovídajícím hodnotám detekovaných při odhalení nelegálních manipulací s kojeneckou výživou v roce 2008. Ukázalo se, že spektrum této konkrétní kojenecké výživy má vhodný profil k případné detekci melaminu za pomoci DCDR. Byly namíchány dva kontaminované roztoky, jeden testovací s vysokou koncentrací melaminu (12 763 mg melaminu na 1 kg produktu) a jeden při koncentraci relevantní, a to 4700 mg melaminu na 1 kg produktu. V prvním z roztoků byl melamin úspěšně detekován. Bylo navíc zjištěno, že vzorky poměrně rychle degradují a že měření je vhodné provádět na depozitech vzniklých vyschnutím kapky zředěného základního roztoku. Tyto zkušenosti pomohli k detekci melaminu při relevantní koncentraci, v tomto případě byl totiž melamin spolehlivě detekován pouze v depozitu 100× zředěného roztoku. Ukázalo se tedy, že DCDR by mohla být potenciálně vhodnou metodou pro detekci melaminu v kojenecké výživě, bylo by ale nutné provést další testování na různých typech kojenecké výživy při různých koncentracích.

Seznam použité literatury

- Abdolahzadeh, S., Boyle, N.M., Draksharapu, A., Dennis, A.C., Hage, R., de Boer, J.W., Browne, W.R. (2013). 'Off-line reaction monitoring of the oxidation of alkenes in water using drop coating deposition Raman (DCDR) spectroscopy', *The Analyst*, **138**(11), 3163.
- BioTools. (2015). μ -RIM™ SLIDE *User manual*. Jupiter, Florida 33458 USA.
- BioTools μ -RIM™ SLIDE [online]. Dostupné z: <<https://www.biotoools.us/u-rim.html>> (cit. únor 2022)
- Cameo Chemicals. *Thiram* [online]. Dostupný z: <<https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/1603>> (cit. únor 2022)
- Carey, P. R. (1982) *Biochemical applications of Raman and resonance Raman spectroscopies*. New York, Academic Press. Molecular biology series.
- Cipriani P., Ben-Amotz D. (2005) 'Characterization of select members of the taxane family using Raman spectroscopy', *J. Raman Spectrosc.*, **36**, 1052–1058.
- Codex alimentarius (1995) General standard for contaminants and toxins in food and feed (CODEX STAN 193-2020) [online]. Dostupné z: <<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/list-standards/en/>> (cit. duben 2022)
- ČHMÚ: Český Hydrometeorologický ústav. Pasportizace pesticidů [online]. Dostupný z: <<http://hydro.chmi.cz/pasporty/>> (cit. únor 2022)
- Deegan, R.D. (2000). 'Pattern formation in drying drops', *Physical Review E*, **61**(1), 475–485.
- Deegan R. D., Bakajin O., Dupont T. F., Huber G., Nagel S. R, Witten T. A. (1997) 'Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops', *Nature* **389**, 827
- Dias L. A. F., Jussiani E. I., Appoloni C. R. (2019) 'Reference Raman Spectral Database of Commercial Pesticides', *J. Appl. Spectrosc.*, **86**, 171–172 [online]. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1007/s10812-019-00798-1>> (cit. duben 2022)
- Dingari N. C., Horowitz G. L., Kang J. W., Dasari R. R., Barman I. (2012) 'Raman Spectroscopy Provides a Powerful Diagnostic Tool for Accurate Determination of Albumin Glycation', *PLoS ONE* **7**(2) [online]. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032406>> (cit. únor 2022)
- Exttoxnet: Extension Toxicology Network (1993a) *Pesticide Information Profile: Picloram* [online]. Dostupný z: <<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/exttoxnet/metiram-propoxur/picloram-ext.html>> (cit. březen 2022)

- Exttoxnet: Extension Toxicology Network (1993b) *Pesticide Information Profile: Thiram* [online]. Dostupný z: <<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/exttoxnet/pyrethrins-ziram/thiram-ext.html>> (cit. březem 2022)
- Exttoxnet: Extension Toxicology Network (1993c) *Pesticide Information Profile: Bentazon* [online]. Dostupný z: <<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/exttoxnet/24d-captan/bentazon-ext.html>> (cit. březem 2022)
- Filik, J., Stone, N. (2007). 'Drop coating deposition Raman spectroscopy of protein mixtures', *The Analyst*, **132**(6), 544.
- Filik, J., Stone, N. (2008a), 'Raman point mapping of tear ferning patterns', *Spectrochim. Acta A*, **64**(3), 681–692.
- Filik J., Stone N. (2008b) 'Analysis of human tear fluid by Raman spectroscopy', *Anal. Chim. Acta*, **616**, 177–184.
- Filik, J. and Stone, N. (2009), 'Investigation into the protein composition of human tear fluid using centrifugal filters and drop coating deposition Raman spectroscopy', *Journal of Raman Spectroscopy*, **40**(2), 218–224.
- Gudris, N. and Kulikowa, L. (1924). 'Die Verdampfung kleiner Wassertropfen', *Z. Physik*, **25**(1), 121–132 [online]. Dostupný z: <<https://doi.org/10.1007/BF01327514>> (cit. dubem 2022)
- Hayes W., Laws E. (1991) *Handbook Of Pesticide Toxicology*. Vol. 3. San Diego, Calif.: Academic Press.
- Hieu, T.D., Chinh, N.T., Nhung, N.T.A., Quang, D.T. and Quang, D.D. (2021), 'SERS chemical enhancement by copper - nanostructures: Theoretical study of Thiram pesticide adsorbed on Cu₂₀ cluster', *VJCH*, 159-166 [online]. Dostupný z: <<https://doi.org/10.1002/vjch.202000137>> (cit. dubem 2022)
- Howard P., Michalenko E. (1991) *Handbook Of Environmental Fate And Exposure Data For Organic Chemicals*. Chelsea, Mich.: Lewis.
- Jalili, M. (2017), 'A Review Paper on Melamine in Milk and Dairy Products'. *Journal of Dairy & Veterinary Sciences*, **1**(4) [online]. Dostupný z: <[10.19080/JDVS.2017.01.555566](https://doi.org/10.19080/JDVS.2017.01.555566)> (cit. dubem 2022)
- Kamthania, M., Saxena, J., Saxena, M., Sharma, D. K., (2014), 'Milk Adultration: Methods of Detection & Remedial Measures'. *International Journal of Engineering and Technical Research*. ISSN. 2321-869.
- Kim, H., Yang, J., Kim, S., Lee, C., Yoon, S., Kwak, S. and Kim, J. (2022), 'Numerical simulation of the coffee-ring effect inside containers with time-dependent evaporation rate'. *Theoretical and Computational Fluid Dynamics* [online]. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1007/s00162-021-00602-x>> (cit. dubem 2022)
- Klener J., Hofbauerová K., Bartoš A., Řičný J., Řípová D., Kopecký V. (2014) 'Instability of cerebrospinal fluid after delayed storage and repeated freezing: a holistic study by drop coating deposition Raman spectroscopy', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, **52**(5), 657–664.

- Kočišová E., Procházka M. (2011) 'Drop-coating deposition Raman spectroscopy of liposomes', *J. Raman Spectrosc.*, **42**, 1606–1610.
- Kočišová E., Procházka M. (2015) 'Drop-coating deposition Raman spectroscopy of porphyrins', *J. Raman Spectrosc.*, **46**, 280–282.
- Kočišová E., Procházka M. (2018) 'Drop coating deposition Raman spectroscopy of dipicolinic acid', *J. Raman Spectrosc.*, **49**, 2050–2052.
- Kočišová E., Sayedová S., Procházka M. (2020) 'Drop coating deposition Raman scattering of selected small molecules of biological importance', *J. Raman Spectrosc.*, **51**, 871–874.
- Kopecký V., Baumruk V. (2006) 'Structure of the ring in drop coating deposited proteins and its implication for Raman spectroscopy of biomolecules', *Vibrational Spectroscopy*, **42**(2), 184-187.
- Kuižová, A., Příkryl, M., Procházka, M. and Kočišová, E. (2021a), 'Drop coating deposition Raman (DCDR) spectroscopy of contaminants. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **262**, 120109.
- Kuižová, A., Kuzminova, A., Kylián, O. and Kočišová, E. (2021b), 'Nanostructured Plasma Polymerized Fluorocarbon Films for Drop Coating Deposition Raman Spectroscopy (DCDRS) of Liposomes'. *Polymers*, **13**(22), 4023.
- Lewis I. R., Edwards H. G. M. (2001) *Handbook of Raman spectroscopy*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Malinowski, E.R. (2002). *Factor analysis in chemistry*. New York: Wiley. Third edition. ISBN 0-471-13479-1
- Meier, R.J., Maple, J.R., Hwang, M.-J. . and Hagler, A.T. (1995), 'Molecular Modeling Urea- and Melamine-Formaldehyde Resins. 1. A Force Field for Urea and Melamine', *The Journal of Physical Chemistry*, **99**(15), 5445–5456 [online]. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1021/j100015a031>> (cit. duben 2022)
- Mu X., (2008) 'China seizes 22 companies with contaminated baby milk powder', *Xinhua* [online]. Dostupné z: <<https://www.mfa.gov.cn/ce/cenz//eng/xw/t513011.htm>> (cit. březen 2022)
- Ortiz, C., Zhang, D., Xie, Y., Davisson, V.J. Ben-Amotz, D. (2004). 'Identification of insulin variants using Raman spectroscopy', *Analytical Biochemistry*, **332**(2), 245–252.
- Ortiz C., Zhang D., Xie Y., Ribbe A. E., Ben-Amotz D. (2006). 'Validation of the drop coating deposition Raman method for protein analysis', *Anal. Biochem.*, **353**, 157–166.
- Palacký, J., Mojžeš, P. and Bok, J. (2011). 'SVD-based method for intensity normalization, background correction and solvent subtraction in Raman spectroscopy exploiting the properties of water stretching vibrations', *Journal of Raman Spectroscopy*, **42**(7), 1528–1539 [online]. Dostupné z: <<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jrs.2896>> (cit. duben 2022)

- Parsa, M., Harmand, S., Sefiane, K. (2018). 'Mechanisms of pattern formation from dried sessile drops', *Advances in Colloid and Interface Science*, **254**, 22–47.
- Pazderka T., Kopecký V. (2017) 'Drop coating deposition Raman spectroscopy of proteinogenic amino acids compared with their solution and crystalline state', *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **185**, 207–216.
- Procházka M. (2016) *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. Switzerland: Springer International Publishing.
- Puschner, B., Poppenga, R. H., Lowenstine, L. J., Filigenzi, M. S., Pesavento, P. A. (2007) 'Assessment of Melamine and Cyanuric Acid Toxicity in Cats', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **19**(6), 616–624 [online]. Dostupné z: <10.1177/104063870701900602> (cit. březem 2022)
- Raman C.V., (1928) 'A new radiation', *Indian J. Phys.*, **74**(4), 387–398 [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF03052651> (cit. březem 2022)
- Schrader B., Bougeard D. (1995) *Infrared and Raman spectroscopy: methods and applications*. New York: Wiley.
- Skinner C. G., Thomas J. D., Osterloh J.D. (2010) 'Melamine toxicity', *J. Med. Toxicol.*, **6**(1), 50–55 [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13181-010-0038-1> (cit. dubem 2022)
- Smith, J. and Arnolds, H. (2018), 'Polytetrafluoroethylene tape as a low-cost hydrophobic substrate for drop-coating deposition Raman spectroscopy of proteins', *Journal of Raman Spectroscopy*, **49**(7), 1236–1239 [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jrs.5371> (cit. dubem 2022)
- Snyder, A. (2007). Protein Pretense. *Scientific American*, **297**(2), 18–20 [online]. Dostupné z: <https://www.scientificamerican.com/article/protein-pretense/> (cit. dubem 2022)
- Sunar, *Sunar Complex 1* [online]. Dostupné z: <https://www.sunar.cz/produkt/sunar-Snyder, A. complex-1> (cit. dubem 2022)
- Thokchom, A.K., Medhi, B.J., Majumder, S.K., Singh, A. (2021). 'Analysis of Circulation Reversal and Particle Transport in Evaporating Drops', *Microgravity Science and Technology*, **33**(1) [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12217-020-09866-0> (cit. dubem 2022)
- Wei, Y., Liu, D. (2012) 'Review of melamine scandal: still a long way ahead', *Toxicology and Industrial Health*, **28**(7), 579–582 [online]. Dostupné z: <10.1177/0748233711416950> (cit. březem 2022)
- World Health Organization. *Food safety* [online]. Dostupný z: <https://www.who.int/foodsafety/areas_work/chemical-risks/melamine/en/> (cit. únor 2022)
- Wu, J., Xia, J., Lei, W., Wang, B. (2013), 'Generation of the smallest coffee-ring structures by solute crystallization reaction on a hydrophobic surface'. *RSC Advances*, **3**(16), 5328.

- Xie, Y., Jiang, Y., Ben-Amotz, D. (2005). 'Detection of amino acid and peptide phosphate protonation using Raman spectroscopy', *Analytical Biochemistry*, **343**(2), 223–230.
- Xie Y., Zhang D., Jarori G. K., Davisson V. J., Ben-Amotz D. (2004) 'The Raman detection of peptide tyrosine phosphorylation', *Anal. Biochem.*, **332**, 116–121.
- Yalkowsky S., He Y., Jain P. (2003) *Handbook Of Aqueous Solubility Data*. Second Edition. 61, 197, 680. USA: CRC Press.
- Zhang, D., Mrozek, M.F., Xie, Y., Ben-Amotz, D. (2004). 'Chemical Segregation and Reduction of Raman Background Interference Using Drop Coating Deposition', *Applied Spectroscopy*, **58**(8), 929–933.
- Zhang D., Ortiz C., Xie Y., Davisson V. J., Ben-Amotz D. (2005) 'Detection of the site of phosphorylation in a peptide using Raman spectroscopy and partial least squares discriminant analysis', *Spectrochim. Acta A*, **61**, 471–745.
- Zhang, X., Wang, J., Bao, L., Dietrich, E., van der Veen, R.C.A., Peng, S., Friend, J., Zandvliet, H.J.W., Yeo, L., Lohse, D. (2015). 'Mixed mode of dissolving immersed nanodroplets at a solid–water interface', *Soft Matter*, **11**(10), 1889–1900.
- Zhang D., Xie Y., Mrozek M. F., Ortiz C., Davisson J., Ben-Amotz D. (2003) 'Raman detection of proteomic analytes', *Anal. Chem.*, **75**, 5703–5709.

Seznam obrázků

Obrázek 1.1.1: Energetický diagram pro Rayleighův a Ramanův rozptyl	6
Obrázek 1.2.1: Základní druhy vibrací: (a) symetrické valenční vibrace, (b) antisymetrické valenční vibrace, (c) rovinné deformační vibrace, (d) mimorovinné deformační vibrace a (e) torzní vibrace	7
Obrázek 1.3.1: Kontaktní úhel kapaliny vůči substrátu: (a) hydrofilní substrát ($\theta < 90^\circ$), (b) hydrofobní substrát ($90^\circ < \theta < 150^\circ$), superhydrofobní substrát ($\theta > 150^\circ$).....	9
Obrázek 1.3.2: Schematické zobrazení čtyř možností při vysychání kapky: (a) s konstantním poloměrem, (b) s konstantním kontaktním úhlem, (c) s proměnlivými parametry a (d) „stick-slip“ vypařování [Zhang, et al., 2015]	11
Obrázek 1.3.3: Kapka kávy před a po vyschnutí [Kim et al., 2022]	12
Obrázek 2.1.1: Schéma integrovaného Ramanova systému HR800	18
Obrázek 2.2.1: Substrát μ -RIM TM [BioTools, 2015].....	19
Obrázek 2.2.2: Substrát SpectRIM TM [SigmaAldrich].....	19
Obrázek 2.2.3: Sklíčko s vrstvou zlata	20
Obrázek 2.2.4: Destičky fluoridu vápenatého	20
Obrázek 2.2.5: Nanodrsné substráty; (a) schéma substrátu, (b) fotografie substrátu NpsCu10, (c) snímky povrchů nanodrsných substrátů pořízené za pomoci skenovacího elektronového mikroskopu.....	21
Obrázek 2.3.1: Strukturní vzorce zkoumaných látek: (a) melamin, (b) thiram, (c) picloram, (d) bentazon	24
Obrázek 3.1.1: Dvě formy picloramu ve stejném depozitu z roztoku o koncentraci 1 mM; nahoře (červeně) – krystalická forma, dole (modře) „prášková“ forma (kompozitní obrázek dvou zaostření).....	29
Obrázek 3.1.2: Referenční spektra čtyř kontaminantů ve spektrální oblasti 300–2000 cm^{-1} ; práškové spektrum melaminu, práškové spektrum picloramu a krystalové DCDR spektrum picloramu získané z depozitu roztoku, práškové spektrum thiramu a práškové spektrum bentazonu	30
Obrázek 3.1.3: Referenční spektra čtyř kontaminantů ve spektrální oblasti 2000–3800 cm^{-1} ; práškové spektrum melaminu, práškové spektrum picloramu a krystalové DCDR spektrum picloramu získané z depozitu roztoku, práškové spektrum thiramu a práškové spektrum bentazonu	30
Obrázek 3.1.4: Depozit melaminu na různých substrátech: (a) SpectRIM TM , (b) NpsCu10, (c) NpsCu5, (d) NpsCu2.....	33
Obrázek 3.1.5: Porovnání intenzit DCDR spekter melaminu o koncentraci 15,86 mM na různých substrátech (spektrum substrátu pokaždé odečteno).....	33
Obrázek 3.1.6: Depozit picloramu na různých substrátech: (a) SpectRIM TM , (b) NpsCu10, (c) NpsCu5, (d) NpsCu2.....	34
Obrázek 3.1.7: Porovnání DCDR spekter picloramu o koncentraci 2,07 mM na různých substrátech (spektrum substrátu pokaždé odečteno)	34

Obrázek 3.1.8: Krystaly v depozitu roztoku thiramu na substrátu SpectRIM™, snímek bez použití polarizačních filtrů (vlevo) a snímek stejného místa při použití polarizačních filtrů (vpravo)	35
Obrázek 3.1.9: Depozit thiramu na různých substrátech: (a) SpectRIM™, (b) NpsCu10, (c) NpsCu5, (d) NpsCu2.....	35
Obrázek 3.1.10: Porovnání DCDR spekter thiramu o koncentraci 0,13 mM na různých substrátech (spektrum substrátu pokaždé odečteno)	36
Obrázek 3.1.11.: Depozit bentazonu na různých substrátech: (a) SpectRIM™, (b) NpsCu10, (c) NpsCu5, (d) NpsCu2.....	36
Obrázek 3.1.12: Porovnání DCDR spekter bentazonu o koncentraci 2,09 mM na různých substrátech.....	37
Obrázek 3.2.1: Depozity vzniklé po vyschnutí kapky roztoku melaminu (80 μM) a bentazonu (100 μM) na substrátu μ-RIM™	39
Obrázek 3.2.2: Vybraná DCDR spektra (a) až (d) (v rozsahu 300–2000 cm ⁻¹) získaná z depozitu roztoku melaminu (80 μM) a bentazonu (100 μM) na substrátu μ-RIM™	40
Obrázek 3.2.3: Mapování první oblasti z depozitu roztoku melaminu (80 μM) a bentazonu (100 μM) na substrátu μ-RIM™; (a) gradientní mapa koeficientů prvního subspektra pro spektrální oblast 300–2000 cm ⁻¹ , (b) gradientní mapa odpovídající výskytu melaminu (660–700 cm ⁻¹)	41
Obrázek 3.2.4: Mapování druhé oblasti z depozitu roztoku melaminu (80 μM) a bentazonu (100 μM) na substrátu μ-RIM™; (a) gradientní mapa koeficientů prvního subspektra pro spektrální oblast 300–2000 cm ⁻¹ , (b) gradientní mapa odpovídající výskytu bentazonu (1630–1660 cm ⁻¹).....	42
Obrázek 3.2.5: Depozity vzniklé po vyschnutí kapky roztoku melaminu (80 μM) a thiramu (65 μM) na substrátu μ-RIM™	43
Obrázek 3.2.6: Krystal thiramu v depozitu vzniklém po vyschnutí kapky roztoku melaminu (80 μM) a thiramu (65 μM) na substrátu μ-RIM™	43
Obrázek 3.2.7: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu 300–2000 cm ⁻¹) získaná z depozitu roztoku melaminu (80 μM) a thiramu (65 μM) na substrátu μ-RIM™	44
Obrázek 3.2.8: Mapování vybrané oblasti z depozitu roztoku melaminu (80 μM) a thiramu (65 μM) na substrátu μ-RIM™; (a) gradientní mapa koeficientů prvního subspektra pro spektrální oblast 300–2000 cm ⁻¹ , (b) gradientní mapa odpovídající výskytu melaminu (660–700 cm ⁻¹), (c) gradientní mapa odpovídající výskytu thiramu (340–420 cm ⁻¹).....	45
Obrázek 3.2.9: Depozity vzniklé po vyschnutí kapky roztoku thiramu (65 μM) a bentazonu (70 μM) na substrátu μ-RIM™	46
Obrázek 3.2.10: Detail depozitu vzniklého po vyschnutí kapky roztoku thiramu (65 μM) a bentazonu (70 μM) na substrátu μ-RIM™	46
Obrázek 3.2.11: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu 300–2000 cm ⁻¹) získaná z depozitu roztoku thiramu (65 μM) a bentazonu (70 μM) na substrátu μ-RIM™	47

Obrázek 3.2.12: Mapování první oblasti z depozitu roztoku thiramu (65 μM) a bentazonu (70 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$; (a) gradientní mapa koeficientů prvního subspektra pro spektrální oblast 300–2000 cm^{-1} , (b) gradientní mapa odpovídající výskytu thiramu (350–430 cm^{-1}), (c) gradientní mapa odpovídající výskytu bentazonu (1540–1690 cm^{-1})	48
Obrázek 3.2.13: Mapování druhé oblasti z depozitu roztoku thiramu (65 μM) a bentazonu (70 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$; (a) gradientní mapa koeficientů prvního subspektra pro spektrální oblast 300–2000 cm^{-1} , (b) gradientní mapa odpovídající výskytu thiramu (540–580 cm^{-1}), (c) gradientní mapa odpovídající výskytu bentazonu (1640–1670 cm^{-1})	49
Obrázek 3.2.14: Depozit vzniklý po vyschnutí kapky roztoku picloramu (50 μM) a bentazonu (50 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$ (vlevo) a detail struktury vznikající v depozitu (vpravo)	50
Obrázek 3.2.15: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu 300–2000 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku picloramu (50 μM) a bentazonu (50 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$	51
Obrázek 3.2.16: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu 2000–3800 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku picloramu (50 μM) a bentazonu (50 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$	51
Obrázek 3.2.17: Depozit vzniklý po vyschnutí kapky nového roztoku picloramu (50 μM) a bentazonu (50 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$	52
Obrázek 3.2.18: Neznámá spektra (v rozsahu 300–2000 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku picloramu (50 μM) a bentazonu (50 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$	53
Obrázek 3.2.19: Neznámá spektra (v rozsahu 2000–3800 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku picloramu (50 μM) a bentazonu (50 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$	53
Obrázek 3.2.20: Depozity vzniklé po vyschnutí kapky roztoku picloramu (50 μM) a thiramu (65 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$	54
Obrázek 3.2.21: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu 300–2000 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku picloramu (50 μM) a thiramu (65 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$	55
Obrázek 3.2.22: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu 2000–3800 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku picloramu (50 μM) a thiramu (65 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$	55
picloram (50 μM) a melamin (80 μM)	56
Obrázek 3.2.23: Depozity vzniklé po vyschnutí kapky roztoku picloramu (50 μM) a melaminu (80 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$	56
Obrázek 3.2.24: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu 300–2000 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku picloramu (50 μM) a melaminu (80 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$	57
Obrázek 3.2.25: Depozit vzniklý po vyschnutí kapky roztoku melaminu (8 μM) a thiramu (6,5 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$	58
Obrázek 3.2.26: Vybraná DCDR spektra (a) až (d) (v rozsahu 300–2000 cm^{-1}) získaná z depozitu roztoku melaminu (8 μM) a thiramu (6,5 μM) na substrátu $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$	59

Obrázek 3.2.27: Vybraná DCDR spektra (a), (b), (d) (v rozsahu 2000–3800 cm ⁻¹) získaná z deponátu roztoku melaminu (8 μM) a thiramu (6,5 μM) na substrátu μ-RIM TM	59
Obrázek 3.2.28: Depozit vzniklý po vyschnutí kapky roztoku melaminu a thiramu na substrátu SpectRIM TM ; vlevo s koncentracemi 80 μM a 65 μM resp., vpravo s koncentracemi 8 μM a 6,5 μM	60
Obrázek 3.2.29: Detail deponátu vzniklého po vyschnutí kapky roztoku melaminu a thiramu na substrátu SpectRIM TM ; vlevo s koncentracemi 80 μM a 65 μM, vpravo s koncentracemi 8 μM a 6,5 μM	61
Obrázek 3.2.30: Výběr neznámých DCDR spekter (v rozsahu 300–2000 cm ⁻¹) získaných z deponátů roztoků melaminu a thiramu na substrátu SpectRIM TM (černá a šedá) v porovnání s neznámými spektry získanými na substrátu μ-RIM TM	62
Obrázek 3.2.31: Výběr neznámých DCDR spekter (v rozsahu 2000–3800 cm ⁻¹) získaných z deponátů roztoků melaminu a thiramu na substrátu SpectRIM TM (černá a šedá) v porovnání s neznámými spektry získanými na substrátu μ-RIM TM	62
Obrázek 3.2.32: Přehled deponátů vzniklých po vyschnutí roztoků směsi bentazonu a picloramu na vybraných substrátech (nad snímky uvedeny koncentrace pro oba kontaminanty ve směsi).....	64
Obrázek 3.2.33: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu 300–2000 cm ⁻¹) získaná z deponátu roztoku picloramu (50 μM) a bentazonu (50 μM) na substrátu SpectRIM TM	65
Obrázek 3.2.34: Vybraná DCDR spektra (a) až (f) (v rozsahu 300–2000 cm ⁻¹) získaná z deponátů roztoků picloramu a bentazonu při dvou různých koncentracích na CaF ₂ substrátu	66
Obrázek 3.2.35: Vybraná DCDR spektra (a) až (f) (v rozsahu 300–2000 cm ⁻¹) získaná z deponátů roztoků picloramu a bentazonu při dvou různých koncentracích na Au substrátu	67
Obrázek 3.2.36: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu 300–2000 cm ⁻¹) získaná z deponátu roztoku picloramu a bentazonu na Cr substrátu	68
Obrázek 3.3.1: Obal kojenecké výživy Sunar Complex 1 [Sunar].....	71
Obrázek 3.3.2: Depozit základního roztoku kojenecké výživy Sunar Complex 1 (156,7 mg/ml) na substrátu μ-RIM TM , snímek bez použití zkřížených polarizačních filtrů (vlevo) a snímek stejného místa při použití zkřížených polarizačních filtrů (vpravo).....	72
Obrázek 3.3.3: Depozit roztoku kojenecké výživy (1,57 mg/ml) Sunar Complex 1 na substrátu μ-RIM TM	72
Obrázek 3.3.4: Vybraná DCDR spektra (v rozsahu 300–2000 cm ⁻¹): (a) – (c) prášek Sunar Complex 1, (d) – (f) základní roztok Sunar Complex 1 (156,7 mg/ml), (g) – (i) zředěný základní roztok Sunar Complex 1 (1,57 mg/ml) na substrátu μ-RIM TM	73
Obrázek 3.3.5: DCDR spektra (a) až (d) (v rozsahu 300–2000 cm ⁻¹) získaná z deponátu roztoku kojenecké výživy Sunar Complex 1 (156,7 mg/ml) kontaminovaného melaminem (12 763 mg/kg) na substrátu μ-RIM TM	74
Obrázek 3.3.6: Depozit základního roztoku kojenecké výživy Sunar Complex 1 (156,7 mg/ml) na substrátu μ-RIM TM ihned po vyschnutí kapky (vlevo) a o pět dní později (vpravo)	75

Obrázek 3.3.7: Vybraná DCDR spektra (a) až (c) (v rozsahu 300–2000 cm ⁻¹) získaná z depozitu roztoku kojenecké výživy Sunar Complex 1 (1,57 mg/ml) kontaminovaného melaminem (12 763 mg/kg) na substrátu μ-RIM TM	75
Obrázek 3.3.8: Depozit roztoku kojenecké výživy Sunar Complex 1 (1,57 mg/ml) kontaminovaného melaminem (4700 mg/kg) na substrátu μ-RIM TM	76
Obrázek 3.3.9: Vybraná spektra (a) až (c) (v rozsahu 300–2000 cm ⁻¹) získaná z depozitu roztoku kojenecké výživy Sunar Complex 1 (1,57 mg/ml) kontaminovaného melaminem (4700 mg/kg) na substrátu μ-RIM TM	77

Seznam tabulek

Tabulka 2.4.1: Přehled kontaminantů, jejich čistoty, rozpustnosti a koncentrací v použitých roztocích	25
Tabulka 3.2.1: Přehled vytvořených roztoků a z nich získaných spekter.....	63
Tabulka 3.2.2: Nejnižší detekované koncentrace jednotlivých kontaminantů v roztocích jejich směsí	69

Seznam použitých zkratk

- ČMHÚ – Český hydrometeorologický ústav
- DCDR(S) - Drop coating deposition Raman spectroscopy (Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povrchů)
- GOS – Galaktooligosacharidy
- Laser – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Zesilování světla stimulovanou emisí záření)
- MFF UK – Matematicko-fyzikální fakulta Univerzity Karlovy
- MZE – Ministerstvo zemědělství
- MŽP – Ministerstvo životního prostředí
- Nps – Nanoparticles (nanočástice)
- PTFE – Polytetrafluorethylen
- SERS – Surface enhanced Raman spectroscopy (Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie)
- SVD – Singular Value Decomposition (metoda singulárního rozkladu)
- TM – Trade Mark (Ochranná známka)
- ULWD – Ultra long working distance (Ultra dlouhá pracovní vzdálenost)