

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Martin Šubr

SERS spektroskopie modelových biomolekul pro SERS biosenzinng

Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Marek Procházka, Dr.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2014

Rád bych poděkoval zejména vedoucímu své diplomové práce, doc. Procházkovi, za odborné vedení práce, veškerou pomoc při provádění experimentů a řadu cenných připomínek během sepsování této práce. Děkuji také Mgr. Martinu Petrovi z Katedry makromolekulární fyziky MFF UK a Mgr. Haně Šípové z Ústavu fotoniky a elektroniky za přípravu povrchů, na kterých byla prováděna měření. Práce byla vypracována za finanční podpory Grantové agentury ČR (grant č. P205/13/20110S).

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 v Praze má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V Praze dne.....

Martin Šubr

Název práce: SERS spektroskopie modelových biomolekul pro SERS biosenzig

Autor: Martin Šubr

Ústav: Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Marek Procházka, Dr., Fyzikální ústav UK

Abstrakt: Hlavním požadavkem biomolekulárního senzingu, založeného na spektroskopii povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS), je vysoká citlivost a spektrální reprodukovatelnost. K tomuto účelu byly v rámci práce testovány pravidelné pevné stříbrné a zlaté nanostruktury, připravované magnetronovým naprašováním a litografickými metodami na spolupracujících pracovištích. Reprodukovatelná SERS spektra použitých modelových biomolekul (aminokyselin, lysozymu a albuminu) byla na pravidelných pevných stříbrných površích získána v koncentracích 10^{-4} až 10^{-6} M, v případě porfyrinů až $\approx 10^{-7}$ M. SERS spektra některých biomolekul byla také srovnávána se spektry naměřenými na stříbrném koloidu. Stříbrný hydroxylaminový koloid při použití KCl jako agregačního činidla poskytuje podstatně nižší limit detekce vybraných látek (např. pro cystein řádově 10^{-8} M), ale s nižší spektrální reprodukovatelností. Hlavním problémem měření SERS spekter ze stříbrných povrchů byl výskyt anomálních pásů, pocházejících z procesu přípravy. V případě pevných stříbrných naprašovaných povrchů bylo zjištěno, že ponechání substrátu několik hodin ve vakuu tento jev výrazně omezilo. Zlaté povrchy připravené litografickými metodami vykazovaly obecně menší zesílení, než stříbro, ale podařilo se získat reprodukovatelná SERS spektra monomolekulární vrstvy oligonukleotidů obsahujících 20 thyminových jednotek, ukotvené na zlatý povrch pomocí thiolových skupin.

Klíčová slova: SERS, biosenzig, biomolekuly, pravidelné kovové nanostruktury, GLAD

Title: SERS spectroscopy of model biomolecules for SERS biosensing

Author: Martin Šubr

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: doc. RNDr. Marek Procházka, Dr., Institute of Physics of Charles University

Abstract: The main requirement for surface enhanced Raman scattering (SERS)-based biomolecular sensing is high sensitivity and spectral reproducibility. For this purpose, ordered silver and gold nanostructures fabricated by magnetron sputtering and lithography methods at cooperating institutes were tested in this work. Reproducible SERS spectra of employed model biomolecules (amino acids, lysozyme and albumin) were obtained on ordered silver surfaces at concentrations 10^{-4} M – 10^{-6} M and as low as $\approx 10^{-7}$ M in the case of porphyrins. SERS spectra of certain biomolecules were also compared to spectra measured on silver colloid. The limit of detection provided by hydroxylamine-reduced silver colloid, using KCl as an aggregating agent, is substantially lower (on the order of 10^{-8} M for cysteine), but with lower spectral reproducibility. The main drawback of SERS spectra measured on silver surfaces was the occurrence of spurious bands resulting from the preparation procedure. In the case of sputter-deposited silver surfaces, it was found that keeping the substrates several hours in vacuum significantly reduced this effect. Lithographically produced gold substrates exhibited generally lower enhancement, than silver, but reproducible SERS spectra of a monomolecular layer of oligonucleotides comprising 20 thymine units, attached to the gold surface via thiol groups, were obtained.

Keywords: SERS, biosensing, biomolecules, ordered metal nanostructures, GLAD

Obsah

Úvod	5
1. Teoretický úvod k Ramanovu rozptylu	6
2. Povrchem zesílený Ramanův rozptyl	11
2.1. Elektromagnetický mechanismus zesílení	12
2.2. Molekulární mechanismus zesílení.....	19
3. SERS-aktivní povrchy	22
3.1. Kovové koloidy	24
3.2. Povrchy připravené magnetronovým naprašováním	26
3.3. Litograficky připravené pravidelné nanostruktury	27
4. Aplikace SERS spektroskopie pro studium biomolekul, SERS biosenzng	29
5. Experimentální metody a použité vzorky	33
5.1. Ramanův spektrometr	33
5.2. Konfokální Ramanův mikrospektrometr.....	34
5.3. Poměr signál/šum v Ramanově spektroskopii.....	36
5.4. Měření absorpčních spekter	36
5.5. Použité vzorky	37
6. Výsledky a diskuse	40
6.1. Měření na hydroxylaminovém koloidu	40
6.1.1. Příprava hydroxylaminového koloidu	40
6.1.2. Charakterizace hydroxylaminového koloidu.....	40
6.1.3. Analýza anomálních pásů.....	44
6.1.4. Měření na cysteinu	47
6.1.5. Měření na histidinu	60
6.2. Měření na stříbrných GLADech	66
6.2.1. Příprava a charakterizace stříbrných GLADů.....	66
6.2.2. Mapování stříbrných GLADů	67
6.2.3. Měření na tryptofanu.....	71
6.2.4. Měření na histidinu	74
6.2.5. Měření na cysteinu	76
6.2.6. Měření na proteinech	80
6.2.7. Měření na porfyrinech	83
6.2.8. Kontaminace stříbrných GLADů	85
6.3. Měření na zlatých površích	89
Závěr	93
Seznam použité literatury	96
Seznam zkratk	105

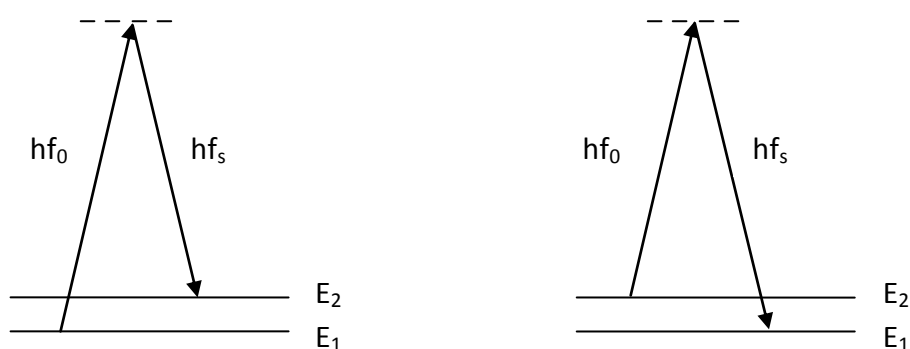
Úvod

Metody optické spektroskopie představují v současnosti širokou škálu metod, využívajících interakce optického záření o přesně definovaných vlastnostech s látkou. Výhoda těchto metod spočívá především v jejich nedestruktivnosti, rychlé časové škále získaných dat a v případě vibrační spektroskopie (absorpční nebo Ramanova rozptylu) snadné charakterizaci měřené látky díky jejímu specifickému „otisku prstu“ ve spektrech (fingerprintu), který je pro každou měřenou molekulu jedinečný. Snaha využít potenciál těchto metod naplno je však omezena tím, že Ramanův rozptyl je principiálně velice slabý jev, proto jsou pro získání kvalitních spekter vyžadovány poměrně vysoké koncentrace měřeného vzorku (a přiměřeně dlouhé akumulace dat). Jeden ze způsobů, jak tento problém překonat, představuje povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS), při kterém dochází k zesílení intenzity Ramanova rozptylu z molekul adsorbovaných na kovových nanostrukturách, čímž je alespoň v principu možno získat signál ze vzorků s koncentracemi o několik řádů nižších, než bez použití kovové nanostruktury. Ačkoliv byl povrchem zesílený Ramanův rozptyl objeven již v roce 1974, jeho použití pro rutinní analytické účely zůstává v praxi stále dosti omezené.

Předložená práce si klade za cíl především optimalizovat podmínky pro získání SERS spekter modelových biomolekul a otestovat sensitivitu některých použitých povrchů a následnou reprodukovatelnost získaných dat. Jako modelové biomolekuly byly vybrány aminokyseliny cystein, tryptofan a histidin, proteiny albumin a lysozym, porfyriny H_2TMAP , H_2TMPyP , H_2TSPP a oligonukleotid obsahující 20 thyminových jednotek. Byly testovány různé druhy pevných pravidelných stříbrných a zlatých nanostruktur, připravených magnetronovým naprašováním a litografickými metodami na spolupracujících pracovištích: Katedře makromolekulární fyziky MFF UK a Oddělení optických senzorů Ústavu fotoniky a elektroniky (ÚFE) AV ČR. Získaná spektra některých látek byla srovnávána se spektry naměřenými na stříbrném koloidu. Tato pilotní studie by v budoucnu měla vést k dalšímu rozvoji SERS aplikací včetně biomolekulárního senzingu, tedy velice citlivé a reprodukovatelné detekci biomolekul na kovových substrátech.

1. Teoretický úvod k Ramanovu rozptylu

Jev, kdy při ozáření vzorku látky silným monochromatickým světlem pozorujeme ve spektru rozptýleného záření kromě budící čáry i symetricky rozložené slabší linie, poprvé pozoroval indický fyzik Chandrasekhara Venkata Raman již v roce 1928. Tento jev byl na jeho počest nazván Ramanovým rozptylem. Jedná se o neelastický rozptyl světla, při kterém se část energie dopadajícího záření přenáší na vnitromolekulární vibrace, a tudíž se mění i vnitřní energie rozptylujícího objektu. Ramanův rozptyl je příkladem tzv. dvoufotonového procesu, jehož energetické schéma lze vyjádřit obrázkem 1:



Obrázek 1: Energetické schéma Ramanova rozptylu. Příklad vlevo odpovídá Stokesově rozptylu, případ vpravo odpovídá antistokesově rozptylu. Plnou čarou jsou znázorněny energetické hladiny stacionárních stavů molekuly, čárkovaně jsou znázorněny virtuální stavy.

Dle schématu na obr. 1 si lze Ramanův rozptyl představit jako děj, při kterém se molekula po absorpci fotonu dostane ze stacionárního stavu $|1\rangle$ do jistého virtuálního stavu, který je okamžitě následován emisí sekundárního fotonu, čímž se molekula dostane do stacionárního stavu $|2\rangle$, který je odlišný od stavu $|1\rangle$ ¹ [1]. Má-li ve stavu $|1\rangle$ jistý vibrační mód molekuly energii E_1 a ve stavu $|2\rangle$ má tentýž vibrační mód energii E_2 , přičemž $E_2 > E_1$, dochází ke zmenšení energie fotonu vycházejícího z látky na úkor rozdílu energetických hladin $\Delta E = E_2 - E_1$. Tento přechod se nazývá Stokesův přechod (Ramanův-Stokesův rozptyl). Má-li naopak ve stavu $|1\rangle$ určitý vibrační mód molekuly energii E_2 a ve stavu $|2\rangle$ má tentýž vibrační mód energii E_1 , přičemž opět $E_2 > E_1$, dochází k navýšení energie fotonu vycházejícího z látky

¹ Představa o existenci virtuálních stavů a absorpci a následné emisí fotonu je spíše názornou pomůckou. Ve skutečnosti dochází k absorpci fotonu ve smyslu jednofotonové absorpce pouze při rezonančním Ramanově rozptylu (viz dále).

odpovídající energetickému rozdílu ΔE . Tento přechod se nazývá antistokesův. Dle zákona zachování energie tedy můžeme psát pro Stokesův rozptyl

$$hf_0 = hf_s + \Delta E, \quad (1.1)$$

a analogicky pro antistokesův rozptyl

$$hf_0 = hf_s - \Delta E, \quad (1.2)$$

kde f_0 v obou případech značí frekvenci dopadajícího záření, f_s frekvenci rozptýleného záření a h Planckovu konstantu.

Jelikož má N -atomová nelineární molekula $3N - 6$ vnitřních (vibračních) stupňů volnosti, lze ve spektru Ramanova rozptylu pozorovat až $3N - 6$ Stokesových čar a $3N - 6$ antistokesových čar. Vzdálenosti těchto linií od centrální čáry vyjádřené ve stupnici vlnočtů nezávisí na frekvenci budícího záření f_0 a jsou charakteristické pro danou rozptylující látku, neboť poskytují informace o vibrační struktuře této látky.

Hodnota $|f_0 - f_s| = \frac{\Delta E}{h}$ vyjádřená v jednotkách vlnočtu se nazývá Ramanovým posuvem; výsledná spektra Ramanova rozptylu jsou tedy znázorněna jako závislost intenzity rozptýleného záření na Ramanově posuvu. Pro Ramanův-Stokesův rozptyl je hodnota $f_0 - f_s$ kladná a pro Ramanův-antistokesův rozptyl je tato hodnota záporná. Virtuální stav na obr. 1 se obecně nemusí shodovat s žádným jiným stacionárním stavem této molekuly. Ramanův rozptyl je zpravidla buzen frekvencí, která je podstatně větší, než odpovídá energetickému rozdílu $E_2 - E_1$, ale zároveň podstatně menší, než odpovídá energetickému rozdílu mezi základním a prvním excitovaným elektronovým stavem. Takovýto Ramanův rozptyl se označuje jako nerezonanční. Pokud frekvence budícího záření odpovídá energetickému rozdílu mezi základním a vyšším excitovaným elektronovým stavem, mluvíme o rezonančním Ramanově rozptylu. Pásky ve spektru rezonančního Ramanova rozptylu mají zpravidla mnohem větší intenzitu, než při nerezonančním Ramanovu rozptylu, a také platí jiná výběrová pravidla. Rezonančním Ramanovým rozptylem se dále v této kapitole zabývat nebudeme (podrobněji viz např. [2]).

Ramanův rozptyl je velmi slabý jev, což je dáno tím, že je jakožto dvoufotonový proces povolen až v druhém řádu poruchové teorie.² Důležitou molekulární charakteristikou, popisující pravděpodobnost přechodu mezi stavy $|1\rangle$ a $|2\rangle$ mechanismem Ramanova rozptylu, je tzv. Ramanův tenzor $\overleftrightarrow{\alpha}^{12}$. Jedná se o matici typu 3×3 , pro kterou budeme používat obvyklé označení

$$\overleftrightarrow{\alpha}^{12} = (\alpha_{ij}^{12})_{i,j=1}^3 = \begin{pmatrix} \alpha_{11}^{12} & \alpha_{12}^{12} & \alpha_{13}^{12} \\ \alpha_{21}^{12} & \alpha_{22}^{12} & \alpha_{23}^{12} \\ \alpha_{31}^{12} & \alpha_{32}^{12} & \alpha_{33}^{12} \end{pmatrix}. \quad (1.3)$$

Pro Ramanův tenzor dostáváme v druhém řádu poruchové teorie při aproximaci dlouhých vln vztah [1]

$$\alpha_{ij}^{12} = \sum_{s \neq 1,2} \left[\frac{\langle 2 | \hat{d}_i | s \rangle \langle s | \hat{d}_j | 1 \rangle}{E_1 - E_s + hf_0} + \frac{\langle 2 | \hat{d}_j | s \rangle \langle s | \hat{d}_i | 1 \rangle}{E_2 - E_s - hf_0} \right], \quad (1.4)$$

kde \hat{d} je operátor elektrického dipólového momentu a \hat{d}_k jeho libovolná složka ($k = 1,2,3$). Sčítání ve vzorci (1.4) probíhá přes všechny stacionární stavy molekuly vyjma stavů $|1\rangle$ a $|2\rangle$. Pravděpodobnost přechodu molekuly ze stavu $|1\rangle$ do stavu $|2\rangle$ mechanismem Ramanova rozptylu, spojená s emisí fotonu o polarizaci určené jednotkovým vektorem \vec{e}^R do prostorového úhlu $d\Omega$ (je-li tento přechod indukován fotonem o polarizaci určené jednotkovým vektorem \vec{e}^0), je úměrná výrazu

$$\frac{dP}{d\Omega} \sim e_i^R \alpha_{ij}^{12} e_j^0. \quad (1.5)$$

V souladu s Einsteinovou sumační konvencí vysčítáváme ve výrazu (1.5) přes dva indexy $i, j \in \{1,2,3\}$. Úpravou Ramanova tenzoru při nerezonančním přiblížení lze získat důležitý závěr, že intenzita dané vibrační linie je úměrná změně polarizovatelnosti molekuly při uvažovaném vibračním pohybu. V nerezonančním přiblížení je zároveň tenzor Ramanova rozptylu symetrický a nemění se při záměně stavů $|1\rangle$ a $|2\rangle$. Intenzita čar ve Stokesově větvi je však mnohem větší, než v antistokesově větvi, neboť nižší energetická hladina molekuly má ve stavu termodynamické rovnováhy větší pravděpodobnost obsazení. Při stavu

² Ramanův rozptyl však může být částečně vysvětlen i pomocí klasické teorie – viz např. [2], [3].

termodynamické rovnováhy je totiž poměr obsazovacích čísel N_1, N_2 nedegenerovaných energetických hladin E_1, E_2 podle Boltzmannova rozdělení

$$\frac{N_1}{N_2} = e^{\frac{E_2 - E_1}{k_B T}}, \quad (1.6)$$

kde k_B značí Boltzmannovu konstantu a T termodynamickou teplotu. Například pro energetický rozdíl odpovídající vlnočtu 1000 cm^{-1} a teplotu $T = 300 \text{ K}$ vychází tento poměr jako $\frac{N_1}{N_2} \approx 120$. Jelikož výběrová pravidla povolují v prvním přiblížení za nerezonanční aproximace existenci pouze tzv. fundamentálních přechodů, jsou ve spektru nejčastěji pozorovány přechody mezi základním a prvním excitovaným stavem daného vibračního módu, tedy mezi stavy s kvantovými čísly $n_1 = 0$ a $n_2 = 1$. Protože je spektrální hustota zářivosti Ramanova rozptylu uvažovaného souboru molekul přímo úměrná čtvrté mocnině frekvence rozptýleného záření, lze poměr intenzit mezi Stokesovou linií (I_{Stokes}) a antistokesovou linií ($I_{antistokes}$) daného pásu ve spektru odhadnutý vzorcem (1.6) zpřesnit do výsledného tvaru

$$\frac{I_{Stokes}}{I_{antistokes}} = \left[\frac{hf_0 - (E_2 - E_1)}{hf_0 + E_2 - E_1} \right]^4 e^{\frac{E_2 - E_1}{k_B T}}. \quad (1.7)$$

Pro získání celkové zářivosti Ramanova rozptylu vzorku je nutné vystředovat výraz $e_i^R \alpha_{ij}^{12} e_j^0$ přes orientace všech rozptylujících molekul. V rozptylových experimentech dále zavádíme veličinu účinný průřez rozptylu σ , který je roven poměru celkového rozptýleného světelného výkonu Φ a plošné hustoty zářivého toku dopadajícího záření $\langle |\vec{S}| \rangle$

$$\sigma = \frac{\Phi}{\langle |\vec{S}| \rangle}. \quad (1.8)$$

Účinný průřez Ramanova rozptylu, který je funkcí frekvence rozptýleného záření f_s , lze tak chápat jako míru pravděpodobnosti, s jakou se foton dopadající na vzorek látky rozptýlí mechanismem Ramanova rozptylu.³

³ Takto je definován tzv. totální účinný průřez. Míru pravděpodobnosti rozptylu do jednotlivých směrů v prostoru (prostorového úhlu Ω) udává tzv. diferenciální účinný průřez $\frac{d\sigma}{d\Omega}$. Analogicky lze definovat diferenciální účinný průřez vztahovaný na jednotkový interval frekvencí ω : $\frac{d\sigma}{d\omega}$, resp. kombinaci obou předchozích veličin: $\frac{d^2\sigma}{d\omega d\Omega}$.

Pro nerezonanční Ramanův rozptyl je udávána velikost účinného průřezu řádově mezi $10^{-29} - 10^{-31} \text{ cm}^2$ [3 – 5], což je zhruba 10^3 až 10^6 krát méně, než účinný průřez pro elasticky rozptýlené záření, a zároveň mnohem méně, než účinný průřez většiny dalších optických procesů, jako např. absorpce či fluorescence [3]. Velký rozvoj Ramanovy spektroskopie tedy mohl nastat až s objevem výkonných laserů a CCD detektorů.

2. Povrchem zesílený Ramanův rozptyl

V 70. letech minulého století bylo zjištěno, že při adsorpci molekul na nerovný kovový povrch může dojít k zesílení intenzity Ramanova rozptylu i o několik řádů [6]. Tento jev dnes označujeme jako povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS, z angl. surface enhanced Raman scattering). Výhodou této metody je schopnost detekce některých molekul již za velmi nízkých koncentrací – obvyklá zesílení účinného průřezu oproti klasickému Ramanovu rozptylu se pohybují v řádu $10^5 - 10^7$ [5, 7 – 9], ale udává se, že tento faktor může u některých molekul dosáhnout až hodnoty okolo 10^{12} , což by mohlo vést k detekci jednotlivých molekul [10, 11]. Původ tohoto zesílení naznačíme v následujících odstavcích.

V klasickém modelu interakce elektromagnetického záření s látkou předpokládáme, že elektrická složka proměnného elektromagnetického pole působí na nabitě částice v látce Lorentzovou silou a rozkmitává je. Vynucené kmity nábojů lze popsat pomocí multipólového rozvoje, jehož dominantním členem je indukovaný elektrický dipólový moment \vec{d} . V aproximaci lineární odezvy (slabého elektrického pole \vec{E}) lze indukovaný elektrický dipólový moment vyjádřit jako

$$\vec{d} = \vec{\beta}\vec{E}, \quad (2.1)$$

kde $\vec{\beta}$ je tenzor polarizovatelnosti molekuly, což je obecně komplexní veličina závislá na frekvenci pole. Jedná se o matici typu 3×3 ; vektorová rovnice (2.1) je tedy ekvivalentní třem skalárními rovnicím, které můžeme napsat také ve tvaru

$$d_i = \beta_{ij} E_j, \quad (2.2)$$

kde v souladu s Einsteinovou sumační konvencí sčítáme přes index j ; $i, j \in \{1, 2, 3\}$. Vektor indukovaného elektrického dipólového momentu tedy obecně nemusí mít stejný směr, jako pole \vec{E} .

Jelikož je podle klasické teorie intenzita rozptýleného záření úměrná druhé mocnině indukovaného dipólového momentu [12], lze v principu vysvětlit zesílení Ramanova rozptylu povrchem buďto zesílením polarizovatelnosti $\vec{\beta}$ (tzv. molekulární mechanismus), nebo zesílením lokální intenzity elektrického pole \vec{E} (tzv.

elektromagnetický mechanismus). V dalším textu se těmto dvěma mechanismům budeme věnovat podrobněji.

2.1. Elektromagnetický mechanismus zesílení

Elektromagnetický mechanismus zesílení je založen na zesílení lokálního elektromagnetického pole v důsledku rezonanční excitace povrchových plazmonů v kovu. Povrchové plazmony jsou kvazičástice reprezentující kvantum oscilací vodivostních elektronů v kovu (vázaný stav elektromagnetického pole a kmitů vodivostních elektronů). K vybuzení těchto povrchových plazmonů dojde, pokud bude frekvence excitačního záření spadat do oblasti plazmonové rezonance kovu. Molekula adsorbovaná na povrch kovu pak může být vystavena mnohem silnějším elektrickému poli \vec{E} ; stejným mechanismem však může být zesíleno i rozptýlené záření, což se ve spektru může projevit mnohem intenzivnějšími pásy, než bez přítomnosti kovu. Udává se, že za hlavní příspěvek na celkovém zesílení ve většině experimentů SERS odpovídá právě elektromagnetický mechanismus [7, 8, 13, 14].

Interakci světla s látkou lze v rámci klasické teorie popsat pomocí modelu, který navrhl již na konci 19. století H. A. Lorentz. Tento model předpokládá, že elektrony atomů v látce jsou k jádru vázány silou, která je přímo úměrná výchylce elektronu z rovnovážné polohy (společnému těžišti kladného a záporného náboje) – na soustavu jádra a elektronu tedy nahlížíme jako na harmonický oscilátor. Ačkoliv je Lorentzův model značně zjednodušený, pomáhá vysvětlit nejen rezonanční charakter přenosu energie z elektromagnetické vlny na atomy v látce, ale umožňuje v jistém přiblížení odvodit i explicitní vztah pro závislost relativní permitivity kovu na frekvenci. Protože tato závislost hraje klíčovou roli při vysvětlení elektromagnetického mechanismu zesílení, její odvození zde naznačíme.⁴

Pohybová rovnice tlumeného harmonického oscilátoru pro elektron, který se pohybuje na pružině o tuhosti k ve směru osy x v elektrickém poli $\vec{E} = E\vec{e}_x$, má tvar:

⁴ Zde uvedené odvození lze najít např. v knihách [3] nebo [15]. Některé další tvary pro závislost relativní permitivity kovu na frekvenci lze najít v [7].

$$m\ddot{x} + m\gamma\dot{x} + kx = -eE, \quad (2.3)$$

kde m značí hmotnost elektronu, e elementární náboj a γ konstantu tlumení. Na pravé straně rovnice (2.3) vystupuje Lorentzova síla, která způsobuje nucené oscilace elektronu. Zavedením vlastní úhlové frekvence oscilátoru ω_0 : $\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{m}}$, lze rovnici (2.3) přepsat do tvaru

$$\ddot{x} + \gamma\dot{x} + \omega_0^2 x = -\frac{e}{m} E. \quad (2.4)$$

Velikost časově proměnného vektoru elektrické intenzity v místě kmitajícího dipólu předpokládáme ve tvaru

$$E = E_0 e^{-i\omega t}. \quad (2.5)$$

Řešení rovnice (2.4) budeme hledat ve tvaru

$$x = x_0 e^{-i\omega t}, \quad (2.6)$$

kde E_0 a x_0 jsou konstanty nezávislé na čase (zajímáme se pouze o partikulární řešení rovnice (2.4), neboť homogenní řešení se díky nenulovému členu γ po dostatečně dlouhé době utlumí). Dvojnásobným derivováním rovnice (2.6) a dosazením do rovnice (2.4) dostáváme amplitudu výchylky x_0 ve tvaru

$$x_0 = -\frac{eE_0}{m} \frac{1}{\omega_0^2 - \omega^2 - i\gamma\omega}. \quad (2.7)$$

Výchylka x je obecně komplexní, neboť mezi touto výchylkou a kmitajícím elektrickým polem může existovat jistý fázový posuv. Elektrický dipólový moment soustavy d spojený s výchylkou elektronu x_0 a polarizace látky P jsou rovny

$$d = -ex_0, \quad P = Nd = \frac{Ne^2 E_0}{m} \frac{1}{\omega_0^2 - \omega^2 - i\gamma\omega}, \quad (2.8)$$

kde N značí počet dipólových momentů \vec{d} v jednotkovém objemu. Srovnáním se známým vztahem mezi intenzitou elektrického pole a polarizací dostaneme frekvenčně závislou hodnotu relativní permitivity látky $\varepsilon(\omega)$ ve tvaru

$$\varepsilon(\omega) = 1 + \frac{Ne^2}{\varepsilon_0 m} \frac{1}{\omega_0^2 - \omega^2 - i\gamma\omega}, \quad (2.9)$$

kde ε_0 značí permitivitu vakua. Frekvenčně závislou hodnotu relativní permitivity pro kovy lze určit v přiblížení volných elektronů, jak navrhl na samém konci 19.

století P. Drude. Podle Drudeho modelu je pro kovy v určitém přiblížení silová konstanta k nulová ($\omega_0^2 = 0$; zanedbáváme zde příspěvek vázaných elektronů). Potom ovšem dostáváme hodnotu relativní permitivity pro kovy ve tvaru

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{Ne^2}{\varepsilon_0 m} \frac{1}{\omega^2 + i\gamma\omega} = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega}, \quad (2.10)$$

kde jsme zavedli tzv. plazmovou frekvenci ve tvaru

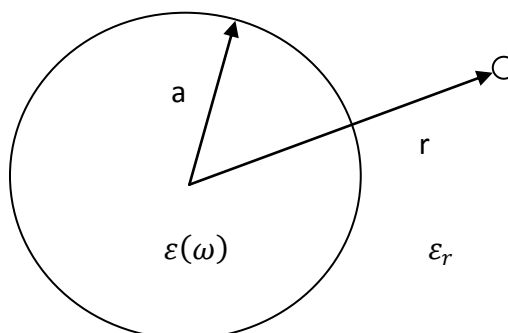
$$\omega_p^2 = \frac{Ne^2}{\varepsilon_0 m}. \quad (2.11)$$

Velikost plazmové frekvence pro daný kov lze odhadnout na základě jeho známé hustoty, molární hmotnosti a počtu valenčních elektronů. Vztah (2.10) pomáhá vysvětlit také např. silnou odrazivost kovů ve světle s nižší frekvencí, než plazmová, a tudíž i jejich lesk (viz např. [14, 15]).

Pro elektromagnetický mechanismus zesílení je nutná přítomnost kovových nanostruktur vhodné velikosti. Nachází-li se molekula v blízkosti kovové nanostruktury, může dojít k mnohonásobnému zvýšení intenzity elektromagnetického pole, kterému je vystavena, oproti poli, kterému by byla molekula vystavena bez přítomnosti kovové nanostruktury. Obecně je pro výpočet zesíleného pole nutno řešit Maxwellovy rovnice s příslušnými okrajovými podmínkami [7]; explicitně lze toto spočítat například pro malou kovovou kuličku v tzv. elektrostatické aproximaci. Tato aproximace vyžaduje, aby velikost této kuličky byla alespoň více než 20× menší, než vlnová délka dopadajícího záření (což odpovídá ve viditelné oblasti poloměru kuličky menšímu, než zhruba 20 nm). Intenzita elektrického pole spojená s dopadajícím zářením je pak sice stále časově proměnná, ovšem fáze tohoto pole se v pevně zvoleném čase v těsné blízkosti kuličky příliš nemění.

Uvažujme tedy kovovou kuličku o poloměru a a relativní permitivitou $\varepsilon(\omega)$ danou vzorcem (2.10), obklopenou neabsorbujícím homogenním prostředím s relativní permitivitou ε_r (viz obr. 2). Ve vzdálenosti r od středu kuličky nechť se nachází zkoumaná molekula. Poměr intenzity elektrického pole v místě molekuly bez přítomnosti kovové kuličky (E_1) a za přítomnosti kovové kuličky (E_2) lze vyjádřit jako (viz např. [3, 9, 16])

$$\frac{E_2}{E_1} = \left| \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_r}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_r} \right| \frac{a^3}{r^3} \quad (2.12)$$



Obrázek 2: Molekula v přítomnosti kovové částice.

Intenzita záření je však přímo úměrná druhé mocnině s ní spojeného elektrického pole. Umocníme-li tedy obě strany rovnice (2.12) a uvážíme, že může dojít k zesílení jak dopadajícího záření, tak záření rozptýleného, dostáváme pro celkový zesilovací faktor (EF, z angl. enhancement factor) pro molekulu v blízkosti kovového povrchu za výše uvedeného přiblížení vztah

$$EF = L(\omega_0)^2 \cdot L(\omega_s)^2 \cdot \frac{a^{12}}{r^{12}} = \left| \frac{\varepsilon(\omega_0) - \varepsilon_r}{\varepsilon(\omega_0) + 2\varepsilon_r} \right|^2 \left| \frac{\varepsilon(\omega_s) - \varepsilon_r}{\varepsilon(\omega_s) + 2\varepsilon_r} \right|^2 \frac{a^{12}}{r^{12}}, \quad (2.13)$$

kde index 0 nadále značí excitační záření a index s záření rozptýlené.

Vzhledem k tomu, že permitivita kovu $\varepsilon(\omega)$ je obecně komplexní veličina, lze očekávat maximální zesílení v případě, kdy budou její reálná část $\varepsilon'(\omega)$ a imaginární část $\varepsilon''(\omega)$ splňovat podmínky

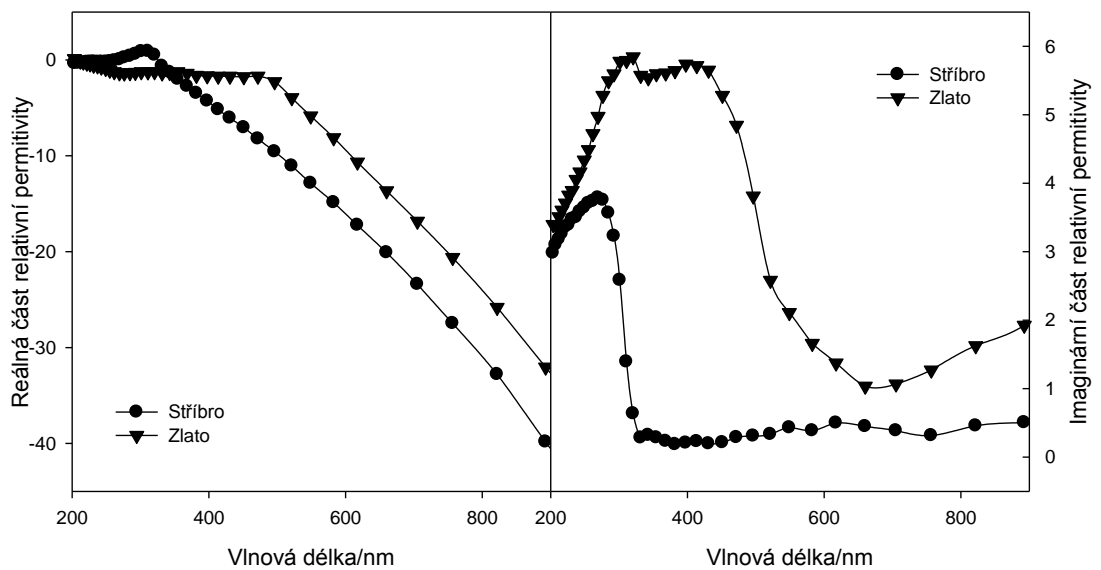
$$\varepsilon'(\omega) \approx -2\varepsilon_r, \quad \varepsilon''(\omega) \approx 0, \quad (2.14)$$

jak lze snadno ověřit diskusí výrazu (2.13). Aby ovšem byly jmenovatele prvních dvou zlomků na pravé straně rovnice (2.13) zároveň blízko nuly, je třeba, aby se permitivity kovu příslušející frekvencím ω_0 a ω_s příliš nelišily. Za výše uvedeného přiblížení jsou tedy ve spektru Ramanova rozptylu nejvíc zesíleny vibrační pásy s malým Ramanovým posuvem a toto zesílení klesá s rostoucí energií vibračních módů. Zesílení také prudce klesá s rostoucí vzdáleností molekuly od kovové kuličky, ačkoliv přímý kontakt molekuly s kovovou nanočásticí není nutný – hovoříme proto o adsorpci, někdy také o physisorpci molekuly na kovový povrch. Podle [3] se physisorpcí míní interakce kovu s molekulou prostřednictvím Van der Waalsových

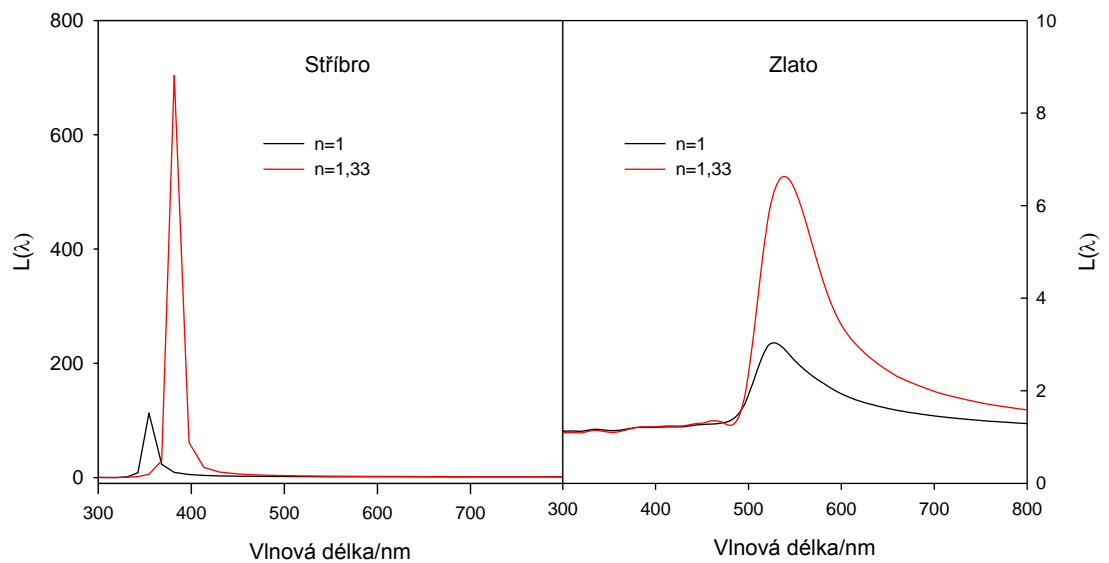
sil, přičemž nedochází ke změně struktury energetických hladin molekuly (frekvence vibrací zůstávají neposunuté vůči hodnotám získaným při měření bez přítomnosti kovového povrchu). Hodnota adsorpční energie této interakce je menší, než energie chemické vazby.

Pro přípravu SERS substrátů se nejčastěji používá stříbro a zlato, neboť podmínka plazmonové rezonance pro excitační záření je u těchto kovů splněna ve viditelné části spektra [7, 14]. Zatímco průběh reálné i imaginární části relativní permitivity stříbra lze alespoň ve viditelné oblasti velmi dobře vystihnout pomocí Drudeho modelu, zlato má ve viditelné oblasti v intervalu vlnových délek zhruba do 600 nm značně vyšší imaginární složku relativní permitivity, než jaká by odpovídala pouze Drudeho modelu. U zlata je totiž potřeba vzít v úvahu i optickou odezvu vázaných elektronů a elektronové přechody probíhající na frekvencích na hranici UV a viditelné oblasti spektra [17]. Právě imaginární složka relativní permitivity přitom souvisí s absorpcí světla v materiálu a energetickými ztrátami.⁵ Jelikož podmínky (2.14) až na výjimky nelze splnit současně a reálné části permitivity zlata i stříbra se v celé viditelné oblasti prakticky shodují, poskytuje stříbro v oblasti vlnových délek zhruba do 600 nm obvykle větší zesílení, než zlato. Ke srovnatelnému zesílení obou těchto kovů dochází až v červenější oblasti viditelné části spektra a blízké infračervené oblasti. Pro ilustraci jsou hodnoty reálné i imaginární části relativní permitivity zlata a stříbra v závislosti na vlnové délce uspořádány v grafu na obr. 3. V grafu na obr. 4 je zakreslena závislost zesilovacího faktoru L (tak, jak byl zaveden v rovnici (2.13)) na vlnové délce pro stříbro, zlato a relativní permitivity okolního prostředí odpovídající vzduchu a vodě.

⁵ Ze vztahu $n^2 = \varepsilon$, kde $\varepsilon = \varepsilon' + i\varepsilon''$ je permitivita prostředí a $n = n' + in''$ index lomu (n' a n'' je reálná a imaginární část indexu lomu), lze získat $n'' = \sqrt{\frac{1}{2}(\sqrt{\varepsilon'^2 + \varepsilon''^2} - \varepsilon')}$. Obecně komplexní je pak i vlnový vektor $k = k' + ik''$ (k' a k'' je reálná a imaginární část vlnového vektoru). Intenzita světla v kovu je pak tlumena exponenciálně s absorpčním koeficientem $2k''$. Podrobnější diskusi lze nalézt např. v [15].



Obrázek 3: Reálná a imaginární část relativní permittivity stříbra a zlata v závislosti na vlnové délce v rozšířené viditelné oblasti. Jedná se o interpolaci experimentálně naměřených hodnot z [18].



Obrázek 4: Závislost faktoru zesílení L na vlnové délce. Faktor L je definován rovnicí (2.13). Výpočet byl proveden pro experimentálně naměřená data z grafu na obr. 3 a dvě různé hodnoty relativní permittivity okolí odpovídající indexům lomu vzduchu ($n = 1$) a vody ($n = 1,33$). Při zvýšení indexu lomu se rezonanční křivka posouvá do červenější oblasti. Rezonance nastává pro takovou vlnovou délku, pro kterou je záporně vzata hodnota relativní permittivity kovu blízká dvojnásobku relativní permittivity prostředí. Výška rezonanční křivky je pak nepřímo úměrná příslušné imaginární části relativní permittivity kovu. S rostoucí imaginární částí relativní permittivity kovu současně dochází k rozšíření pásu rezonančních frekvencí. Z toho důvodu je maximální zesílení poskytované stříbrem řádově 10^2 krát větší, než zesílení poskytované zlatem; v oblasti, kde $\lambda > 600$ nm, jsou schopnosti zesílení těchto dvou kovů srovnatelné.

Při jiných tvarech nerovností, než kulových, může být rezonanční podmínka (maximum rezonanční křivky v grafu na obr. 4) posunuta do jiné vlnové délky, neboť musí být při řešení takového problému v elektrostatické aproximaci splněny jiné okrajové podmínky, než v případě kuličky. Stále ale platí, že reálná část relativní permitivity kovu musí být záporná. Většina ostatních kovů (např. měď, hliník, platina atd.) poskytuje řádově menší zesílení kvůli vysoké hodnotě imaginární složky relativní permitivity, k jejímuž snížení (a větší potenciální schopnosti zesílení) dochází obvykle až v UV oblasti. Podrobnější přehled o experimentálně naměřených hodnotách konstant charakterizujících optické vlastnosti kovů lze najít v [19].

Aby mohlo dojít k dostatečnému zesílení, je nutná velikost nerovností přibližně v řádu 5 – 100 nm [4, 8, 14, 16]. Příliš malé částice nejsou schopné vytvořit plazmony, zatímco při vyšších rozměrech již selhává výše uvedená elektrostatická aproximace. Zatímco v elektrostatické aproximaci lze v situaci znázorněné na obr. 2 vyjádřit elektrickou intenzitu jako součet původního elektrického pole a pole dipólu, umístěného ve středu koule, rovnoběžného s polarizací dopadajícího záření, pro větší rozměry částic se začnou uplatňovat i další členy multipólového rozvoje, zejména elektrický kvadrupól. S rostoucí velikostí kovových částic se rezonanční podmínka posouvá do červené oblasti spektra a zesílení, které u větších kovových částic v důsledku radiačních ztrát klesá, již nelze vyjádřit vzorcem (2.13).

Jak již bylo zmíněno, na výslednou schopnost zesílení daného systému má vliv i tvar jednotlivých nanonerovností a také jejich vzájemná interakce. Nahradíme-li v našem modelu kovovou kuličku protáhlým elipsoidem, dojde k posunu rezonanční podmínky k červené oblasti spektra a rozšíření pásu příslušných rezonančních frekvencí [20]. Maximální zesílení lze očekávat na pólech elipsoidu a jeho pokles směrem k rovníku, což lze považovat za speciální případ jevu, že na nabitém kovovém tělese je nejsilnější elektrické pole právě v oblasti hrotů a zakřivení ("lightning rod effect").

Přiblížíme-li k sobě 2 nanočástice na vzdálenost menší, než zhruba 1 nm, může zesílení mezi nimi dosáhnout hodnoty až 10^{11} , což je až 10^6 krát víc, než zesílení pro izolovanou kuličku [7, 8, 13]. Takovýmito objektům říkáme dimery a místa s takto velkým zesílením nazýváme „hot-spoty“. Právě hot-spoty jsou přítom v SERSu

zdrojem obrovského zesílení, které by mohlo vést až k detekci jednotlivých molekul. Zesílení je v tomto případě, stejně jako např. při excitaci nanočástic ve tvaru elipsoidů, obecně závislé i na polarizaci dopadajícího záření [8, 14, 20].

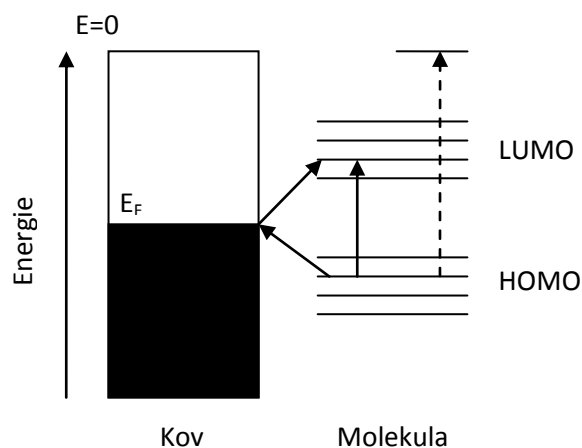
Interakcí ještě většího počtu nanočástic vznikají klastry, takže zatímco u izolované nanočástice odpovídá podmínce plazmonové rezonance pouze úzký pás kolem určité frekvence, pro soubor agregovaných nanočástic je typický mnohem širší pás plazmonové rezonance [4]. K takovému nehomogennímu rozšíření rezonanční křivky dochází obecně u substrátů s určitou distribucí velikostí a tvarů jednotlivých nanočástic. V mnoha případech vytvářejí SERS-aktivní substráty fraktální struktury (soběpodobné útvary, tedy útvary, které vypadají stále stejně při změně měřítko), kterým může příslušet pás plazmonové rezonance pokrývající často celou viditelnou oblast spektra [16, 21]. Počet hot-spotů v obvyklém vzorku je ovšem zpravidla velmi malý; některé odhady naznačují, že pouze asi 3 % adsorbovaných molekul se nachází poblíž hot-spotů a zbylých 97 % molekul poblíž mnohem méně zesilujících míst, čímž obvykle dojde ke zprůměrování signálu na výslednou typickou hodnotu zesílení $10^5 - 10^6$ [13].

2.2. Molekulární mechanismus zesílení

Molekulární neboli chemický mechanismus zesílení je založen na zesílení polarizovatelnosti molekuly $\vec{\beta}$ v důsledku její interakce s kovovým povrchem. Molekulární mechanismus zesílení vyžaduje, aby byla molekula v přímém kontaktu s kovovým povrchem, na druhé straně však nanometrické nerovnosti v kovu nejsou nutnou podmínkou. Jelikož je v tomto případě energie interakce molekuly s kovem srovnatelná s energií chemické vazby, hovoříme o chemisorpci molekuly na kovový povrch za vzniku komplexu molekuly s kovem (podle [3] se chemisorpcí míní interakce, jejíž energie je v absolutní hodnotě větší, než 40 kJ/mol, což většinou odpovídá kovalentní vazbě mezi molekulou a kovem; naopak interakce s energií v absolutní hodnotě menší, než 25 kJ/mol, je nazývána adsorpce). Udává se, že molekulární mechanismus zesílení přispívá k celkovému SERS zesílení zhruba faktorem $10^1 - 10^2$ [16], ačkoliv podle [5] hodnota zesílení daná molekulárním

mechanismem jen zřídka přesáhne faktor 10. Právě interakce molekuly s kovem však může podstatným způsobem ovlivnit tvar výsledného spektra, které se tak může značně lišit od spektra volné molekuly. Vznik komplexu molekuly s kovem často zapříčiní změnu bodové grupy molekuly i změnu struktury jejích elektronových hladin, čímž může docházet k posuvu některých spektrálních čar či změně jejich šířky, ale mohou se objevovat i pásy nové, příslušející vazbě molekuly s kovem apod.

Zesílení dané molekulárním mechanismem se nejčastěji vysvětluje mechanismem přenosu náboje mezi molekulou a kovem (CT, z angl. charge transfer, viz obr. 5, [22]). To, zda se zesílení dané molekulárním mechanismem projeví na celkovém zesílení, záleží na vlnové délce excitačního záření a na rozložení energetických hladin molekuly vzhledem k Fermiho hladině kovu. Jsou-li hodnoty energií příslušející nejvyššímu obsazenému molekulovému orbitalu (HOMO, z angl. highest occupied molecular orbital) a nejnižšímu neobsazenému molekulovému orbitalu (LUMO, z angl. lowest unoccupied molecular orbital) rozloženy symetricky kolem Fermiho hladiny kovu, může dojít vlivem excitačního záření k přenosu elektronu z kovu na molekulu či naopak. Tím může dojít ke změně polarizovatelnosti molekuly a k výslednému zesílení pak dochází mechanismem analogickým, jako u rezonančního Ramanova rozptylu. Zvýšením excitační vlnové délky lze docílit toho, že energie dopadajícího fotonu nemusí být k přenosu náboje dostatečná, a zesílení dané molekulárním mechanismem tudíž není přítomno.



Obrázek 5: Schéma mechanismu přenosu náboje. V levé části obrázku jsou energetické hladiny kovu, v pravé části energetické hladiny molekuly. E_F značí hodnotu Fermiho energie kovu. Při dostatečně nízkých teplotách obsazují elektrony v kovu výhradně energetické hladiny ležící pod hodnotou Fermiho energie (začerněná oblast v obrázku). V obrázku jsou znázorněny možné přechody elektronu z hladiny HOMO do Fermiho hladiny kovu, resp. přechod elektronu z Fermiho hladiny kovu do hladiny LUMO. Takovýto přechod je doprovázen změnou struktury elektronového obalu molekuly a může vést ke zvýšení polarizovatelnosti molekuly. Excitace molekuly zářením o frekvenci potřebné k přímému přechodu z hladiny HOMO do hladiny LUMO odpovídá rezonančnímu (povrchem zesílenému) Ramanovu rozptylu, toto je na obrázku znázorněno svislou plnou šipkou. V měřítku na tomto schématu je k přechodu mezi uvažovanými molekulovými orbitaly a Fermiho hladinou zapotřebí přibližně 2× menší energie, než k excitaci samotné molekuly do vyššího elektronového stavu. Přerušovanou čarou je znázorněna energie potřebná k ionizaci elektronu. Zpracováno podle [22].

3. SERS-aktivní povrchy

Jako SERS-aktivní povrchy neboli SERS substráty se v SERS spektroskopii nazývají všechny kovové struktury, které poskytují zesílení svým povrchem. Dostatečně velké zesílení je v SERS spektroskopii nejdůležitějším předpokladem pro to, aby bylo možno získat signál i při velmi nízkých koncentracích měřeného vzorku. Pro kvantitativní analýzu je však téměř stejně důležitá i dostatečná homogenita a časová stabilita použitého povrchu, která je klíčová pro reprodukovatelnost získaných dat. Maximální přípustná odchylka mezi intenzitou signálu v rámci různých míst povrchu i v rámci různých povrchů, připravených toutéž metodou, je optimálně udávána okolo 20 % [23]. Zároveň musí být takový povrch dostatečně odolný vůči kontaminaci jinými nežádoucími látkami, které by mohly překrývat signál měřené molekuly a znehodnotit tak celá měření. Snahou současné SERS spektroskopie je vyrobit takový povrch, který by všechny výše uvedené předpoklady splňoval. V neposlední řadě je třeba volit kompromis mezi jednoduchostí přípravy, dostupností a cenou takového povrchu.

Mezi tradiční SERS-aktivní povrchy, používané v SERS spektroskopii již od přelomu 70. a 80. let, patří zdrsňelé kovové elektrody, kovové ostrůvkové filmy a kovové koloidy. Kvůli vysokým nárokům na dostatečně citlivou a reprodukovatelnou detekci molekul se zhruba v posledních 15 letech začaly objevovat další typy pravidelných pevných nanosubstrátů se snahou mít pod kontrolou velikost, tvar i uspořádání nanočástic na povrchu. Z těchto metod zmiňme např. litograficky připravené pravidelné nanostruktury využívající jako templát dielektrické kuličky (metoda tzv. nanosphere lithography [24, 25] nebo její varianta hole-mask colloidal lithography [26]), povrchy připravené elektronovou litografií [27] nebo magnetronovým naprašováním pod velkým úhlem [28]. Podrobnější informace o některých z těchto metod lze přehledně najít např. v [7, 29]. Na Oddělení fyziky biomolekul MFF UK je v posledních letech věnována značná pozornost imobilizaci kovových nanočástic na pevné substráty, čímž je možno získat stabilní povrch s relativně úzkou distribucí velikostí částic. Kovové nanočástice je možno na podložním skle buď nechat zaschnout [30], nebo je imobilizovat na povrch sklíčka pomocí silanu [31, 32]. Takovéto povrchy byly použity v pracích [33, 34] především ke studiu porfyrinů.

Pro určité druhy molekul a některé substráty je díky přítomnosti hot-spotů možno získat signál přesahující i standardně udávaný faktor zesílení 10^5 až 10^7 , ovšem zpravidla s vysokou mírou nereprodukovatelnosti. Právě častá nepřímá úměrnost mezi reprodukovatelností daného substrátu, vyžadovanou pro rutinní analytické účely, a citlivostí, tedy schopností detekovat dané molekuly za velmi nízkých koncentrací, byla v SERS spektroskopii nazvána principem neurčitosti [23].

Z teoretických úvah, vycházejících z tvaru frekvenční závislosti relativní permitivity kovů, diskutovaných v předchozí kapitole, plyne, že stříbro by mělo poskytovat ve viditelné oblasti ze všech kovů největší SERS zesílení. Ve skutečnosti existuje několik důvodů, proč je v některých situacích vhodné dát přednost spíše povrchům vyrobeným ze zlata. Zlato, ačkoliv v principu poskytuje o něco menší zesílení, než stříbro, totiž vykazuje lepší stabilitu, je méně náchylné k oxidaci, než stříbro, a také je biokompatibilní, což je důležitá vlastnost pro studium biologických objektů. Úspěšnost SERS experimentu však závisí nejen na vlastnostech kovové struktury, ale i na vlastnostech molekuly a její schopnosti se na daný povrch adsorbovat. Tato schopnost je primárně určena elektrostatickými interakcemi mezi zkoumanými molekulami a kovovým substrátem, ale i vzájemnou chemickou afinitou. Jelikož výsledný náboj adsorbovaných molekul závisí na pH, lze očekávat značnou změnu intenzity jejich pásů ve spektru s měnícím se pH (viz např. [35, 36]). Ve speciálních případech lze kovový povrch vhodnou metodou funkcionalizovat tak, aby se na něj cíleně vázaly pouze určité skupiny molekul. O některých metodách takovéto funkcionalizace se zmíníme v kapitole 4. Vzhledem k tomu, že dominantním mechanismem zesílení je v SERSu elektromagnetický mechanismus, je nutno pečlivě volit i vlnovou délku excitačního záření, neboť i při výborné zesilovací schopnosti daného substrátu může být při použití nevhodné vlnové délky výsledný signál (v lepším případě) jen o málo větší, než signál získaný bez přítomnosti zesilujícího kovového povrchu (viz obr. 4).⁶

⁶ U klasického Ramanova rozptylu je účinný průřez Ramanova rozptylu úměrný čtvrté mocnině frekvence rozptýleného záření, tedy zvýšení excitační vlnové délky řekněme z 500 nm na 600 nm vede k přibližně dvojnásobnému poklesu intenzity pásů ve spektru. V případě povrchem zesíleného Ramanova rozptylu ovšem takovéto zvýšení excitační vlnové délky může vést naopak k tomu, že výsledná intenzita pásů ve spektru bude naopak mnohem větší (viz obr. 4).

V následujících odstavcích si všimneme blíže některých z výše uvedených SERS-aktivních povrchů, které byly používány během vlastních měření této práce.

3.1. Kovové koloidy

Kovový koloid je suspenze kovových nanočástic o velikosti zhruba 1 – 100 nm rozptýlených v roztoku – jedná se tedy o heterogenní systém [3]. Zmíníme se zde o jejich nejčastějším způsobu přípravy, který byl v průběhu této práce také použit, a to o přípravě koloidů pomocí chemické redukce.

Při chemické redukci se anorganická sůl, obsahující nejčastěji kationt stříbra nebo zlata, redukuje vhodným redukčním činidlem. V literatuře bylo dosud popsáno několik takových způsobů příprav, a to využívající redukci AgNO_3 či HAuCl_4 pomocí borohydridu sodného [37], citrátu sodného [38], popř. redukci AgNO_3 pomocí hydroxylamin-hydrochloridu [39]. Velikost vzniklých nanočástic a jejich tvar závisí na podmínkách přípravy, mezi které patří zejména množství výchozích látek, teplota, pH, ale i rychlost míchání vznikající směsi. Výhodou takto připravených koloidů je nízká cena a relativní jednoduchost přípravy, která není náročná na použité experimentální zařízení – např. hydroxylaminový koloid [39] může být oproti ostatním připraven již za pokojové teploty a lze jej použít jako SERS-aktivní substrát okamžitě po jeho přípravě. Nevýhodou je ovšem špatná reprodukovatelnost takovýchto povrchů plynoucí z toho, že i velice malá změna ve způsobu přípravy koloidu může vést ke značným rozdílům v jeho výsledných vlastnostech i v jeho výsledné schopnosti fungovat jako SERS-aktivní substrát. Již v článku [39] bylo ukázáno, že k rozdílné distribuci velikostí vzniklých nanočástic hydroxylaminového koloidu může vést i pořadí mísení dvou dílčích roztoků, ze kterých výsledný koloid vzniká, či rychlost tohoto mísení. Pro úspěšnou přípravu kovového koloidu je v neposlední řadě nezbytná také čistota použitého nádobí.

Další výhodou kovových koloidů je to, že lze snadno charakterizovat pomocí extinkčního spektra (SPE, z angl. surface plasmon extinction), které zahrnuje extinkci záření v takto připraveném koloidu, tedy pokles intenzity světla v důsledku absorpce a elastického rozptylu. Optimální vlnová délka použitelná k rezonanční excitaci

povrchových plazmonů by měla odpovídat poloze maxima extinkčního pásu. Z šířky tohoto pásu lze následně usuzovat na distribuci velikostí nanočástic. Extinkční spektrum lze snadno změřit pomocí UV-VIS absorpčního spektrometru. Zatímco pro monodisperzní systémy, tedy systémy obsahující částice pouze prakticky jedné velikosti, je charakteristický velice úzký extinkční pás, při širší distribuci velikosti částic a vzniku větších agregátů dochází k nehomogennímu rozšíření pásu, který ve výsledku může pokrývat i celou viditelnou oblast [4]. Další možností, jak charakterizovat kovový koloid, je využití elektronové mikroskopie (SEM, z angl. scanning electron microscopy, nebo TEM, z angl. transmission electron microscopy), pomocí nichž lze získat podrobnější informace o rozměrech kovových nanočástic, jejich tvaru a celkové distribuci.

Čerstvě připravený koloid je tvořený kladně nabitými kovovými nanočásticemi, okolo kterých se vytvoří záporně nabitá obálka iontů redukčního činidla. Velikost tohoto náboje a jeho rozložení v okolí kovového povrchu rozhoduje o schopnosti koloidu adsorbovat daný analyt a také o jeho stabilitě, tj. odolnosti vůči agregaci. Pokud bude odpudivá síla mezi okolními částicemi koloidu menší, než určitá mezní hodnota, tak začnou koloidní částice agregovat, precipitují z roztoku a usadí se na dně nádoby – takovýto koloid pak neposkytuje potřebné zesílení. Míru agregace lze ovšem ovlivnit přidáním vhodného agregačního činidla – nejčastěji anorganické soli obsahující kationty sodíku, draslíku, vápníku či hořčíku a chloridové, síranové nebo dusičnanové anionty [40]. Přidáním určitého množství soli do koloidu lze snížit elektrostatickou repulsní bariéru mezi okolními částicemi koloidu, které se pak k sobě mohou více přiblížit a vytvořit struktury, které ve výsledku poskytují větší zesílení, než izolované částice [40]. V SPE spektru se agregace mezi částicemi koloidu projeví rozšířením pásu a posuvem do červenější oblasti [4, 9] – změnu barvy koloidu tak lze někdy pozorovat i pouhým okem. Stejně jako samotná příprava koloidu, i efekt agregace závisí na mnoha různých parametrech, jako je teplota, pH, pořadí mísení dílčích vzorků (koloid, agregační činidlo a měřený vzorek), rychlost míchání i čas, což je dalším důvodem, proč je měření na koloidech stále zatíženo vysokou mírou nereprodukovatelnosti.

U SERS spekter získaných měření na koloidech je třeba dbát opatrnosti při jejich interpretaci; obzvláště je třeba rozlišit pásy příslušející měřené molekule od parazitních (anomálních) pásů pocházejících ze samotného koloidu, popř. ze směsi koloidu a agregačního činidla (v horším případě i z jiných neznámých kontaminantů). Ještě složitější situace nastává tehdy, pokud se pás příslušející měřené molekule a nějaký z pásů pocházejících od koloidu překrývají, a nelze je tudíž bezpečně odlišit. V praxi to znamená, že ačkoliv na první pohled můžeme v SERS spektru zkoumané molekuly rozlišit poměrně značné množství pásů, ve skutečnosti jen málo z nich může příslušet samotné zkoumané molekule. Obecně je tak pro daný koloid nutno změřit nejen spektrum zkoumané molekuly (tedy směsi koloidu, agregačního činidla a dané molekuly), ale i spektrum samotného koloidu a spektrum koloidu spolu s agregačním činidlem. Výskyt těchto anomálních pásů byl v odborné literatuře zatím zkoumán spíše okrajově (viz např. [41, 42]), jejich detailnější studie a vysvětlení jejich přesného původu však dosud chybí.

3.2. Povrchy připravené magnetronovým naprašováním

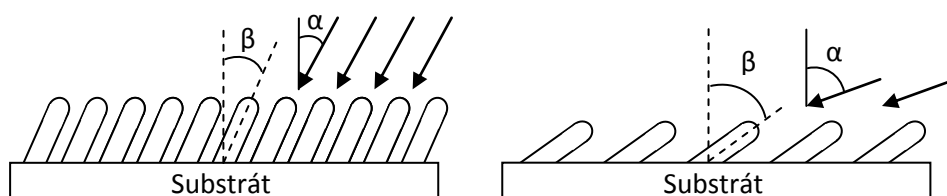
Při metodě označované zkratkou OAD (z angl. oblique angle deposition) dochází k naprašování atomů stříbra na čisté podložní sklíčko nebo křemíkovou destičku pod šikmým úhlem [43, 44]. K depozici obvykle dochází při tlaku $\ll 1$ Pa. Svazek atomů dopadající na substrát na něm v první fázi vytváří ostrůvkovité filmy; po určité době se však díky efektu stínění dopadající částice nemohou dostat do všech míst substrátu a rostou preferenčně jen v určitých oblastech, čímž dochází ke vzniku sloupcovitých struktur (angl. nanorods, nanopillars). Probíhá-li depozice pod úhlem α vůči normále použitého substrátu (obr. 6), budou vzniklé sloupce růst převážně pod úhlem β , který souvisí s úhlem α přibližným vztahem [45]

$$\beta = \alpha - \arcsin\left(\frac{1 - \cos \alpha}{2}\right); \quad (3.1)$$

úhel β je tedy vždy menší, než úhel α (viz obr. 6). Vlastnosti vzniklého substrátu je možno modifikovat změnou úhlu α , teplotou substrátu nebo dobou depozice, která souvisí s tloušťkou vzniklé kovové vrstvy. Úhel α je často volen větší, než 80° , takže depozice pak probíhá téměř rovnoběžně s povrchem substrátu [43, 46]. Tímto

postupem lze připravit struktury mající rozměry několika desítek nanometrů a lze je snadno charakterizovat např. pomocí SEM.

Úhlem α je při metodě OAD určen nejen úhel β , ale i vzdálenost jednotlivých sloupců od sebe neboli pórovitost vznikajícího povrchu. Při modifikaci metody OAD, metodě GLAD (z angl. glancing angle deposition), je substrátem při depozici zároveň otáčeno okolo jeho normály, čímž je možno při daném depozičním úhlu α dosáhnout menšího úhlu β , než jaký by odpovídal vzorci (3.1), ale se zachováním velikosti mezer mezi jednotlivými sloupci (podrobněji viz např. [28]). Poznamenejme však, že v odborné literatuře nemusí být takto zavedené názvosloví jednoznačné, a někdy se zkratka GLAD používá i pro způsob přípravy zde popsany zkratkou OAD [47].

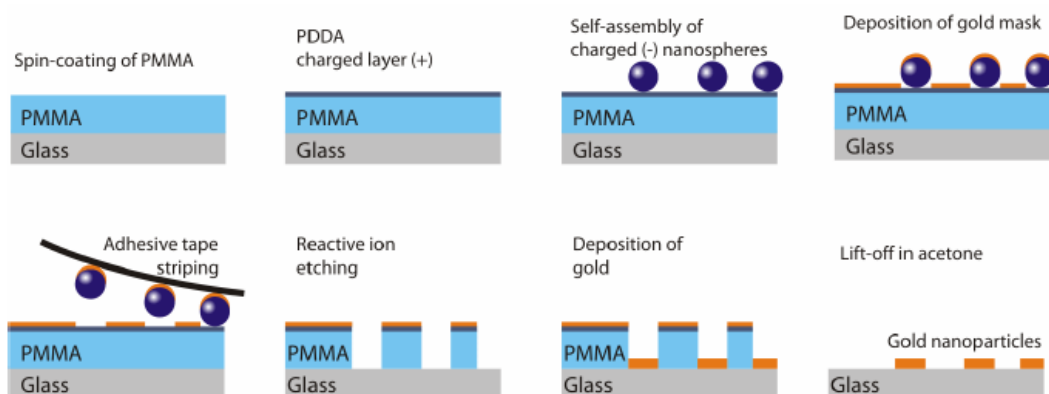


Obrázek 6: Příprava naprašovaných povrchů. Na obrázku vlevo je úhel depozice $\alpha = 30^\circ$, čemuž podle vzorce (3.1) odpovídá úhel růstu částic $\beta \approx 26^\circ$. Na obrázku vpravo je úhel depozice $\alpha = 80^\circ$, čemuž podle vzorce (3.1) odpovídá úhel růstu částic $\beta \approx 56^\circ$. Při metodě OAD (stacionární poloze substrátu vůči směru naprašování) je pro daný substrát při dané teplotě úhlem α jednoznačně určen i úhel β a mezery mezi jednotlivými vznikajícími sloupci. Otáčením substrátu okolo jeho normály během depozice je možno připravit povrch s jen nepatrnou odchylkou směru růstu částic vůči normále substrátu, ale s větší pórovitostí (menší hustotě částic na povrchu substrátu). Zpracováno podle [28].

3.3. Litograficky připravené pravidelné nanostruktury

V metodě nanosphere lithography (NSL) je na čistou skleněnou nebo křemíkovou podložku nanosená vrstva nanokuliček z dielektrického materiálu (nejčastěji polystyrenu) s typickými rozměry několika desítek až stovek nanometrů, které po zaschnutí vytvářejí na povrchu samouspořádané vrstvy. Po napaření kovu na takovou strukturu vzniká povrch s nerovnostmi, jejichž velikosti jsou dány rozměry použitých kuliček a jejich vzájemnou vzdáleností. To dává vzniku útvarům podobným obráceným mističkám, které jsou v literatuře označovány zkratkou FON (z angl. film over nanospheres), [25]. Následným chemickým odstraněním

polystyrenových kuliček lze dosáhnout toho, že zbylé struktury (úseky napařené kovu, které se vytvořily v mezerách mezi kuličkami) budou mít spíše trojúhelníkový tvar. Modifikací této metody, postupem tzv. hole-mask colloidal lithography, je vytvořena samouspořádaná vrstva polymerních kuliček na sklíčku předem pokrytém vrstvou polymeru. Po depozici zlatého filmu a mechanickém odtržení polystyrenových kuliček zůstanou na povrchu střídavě místa pokrytá zlatem a místa bez zlata, kde byly polystyrenové kuličky odstraněny. Chemickým odstraněním polymeru v místech, kde byly odstraněny polystyrenové kuličky, dalším napařením zlatého filmu a dalším chemickým odstraněním přebytečného polymeru lze získat struktury označované jako nanodírky nebo nanodisky (viz obr. 7). Změnou úhlu napařování mohou vznikat např. útvary podobné měsíčkům nebo kužlům. Takovou změnou tvaru vzniklých nanočástic, resp. změnou jejich velikosti, lze ladit rozložení elektromagnetického pole v blízkosti povrchu, a tedy i rezonanční vlnovou délku. Uvedeným postupem lze připravovat substráty o povrchu až několik cm^2 [26]. Morfologii takto připravených povrchů lze zkoumat např. pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM, z angl. atomic force microscopy).



Obrázek 7: Schéma přípravy pravidelných zlatých nanostruktur. Převzato z materiálů ÚFE.

4. Aplikace SERS spektroskopie pro studium biomolekul, SERS biosenzing

Jak jsme se snažili naznačit už v předcházející kapitole, metoda povrchem zesíleného Ramanova rozptylu představuje extrémně citlivou metodu vibrační spektroskopie, použitelnou ke studiu biomolekul za velice nízkých koncentrací. Zatímco ke studiu spekter klasického Ramanova rozptylu biomolekul je třeba používat poměrně velké koncentrace molekul (řádově 10^{-3} až 10^{-1} M, přičemž horní limit této koncentrace je často daný rozpustností zkoumané látky v použitém rozpouštědle), povrchem zesílený Ramanův rozptyl umožňuje tyto studované koncentrace i o několik řádů snížit, čímž je možno studovat spektra biomolekul i za fyziologických koncentrací. Chování mnohých biomolekul ve velmi zředěných roztocích přitom může být odlišné, než za vyšších koncentrací, při kterých můžou některé molekuly agregovat. Horní hranice účinného průřezu povrchem zesíleného Ramanova rozptylu může být dokonce ještě větší, než u fluorescence; předností Ramanova rozptylu před fluorescencí je navíc unikátní “otisk prstu” (fingerprint) měřené molekuly ve spektrech, který zajišťuje mnohem větší specifitu a pomáhá spolehlivěji určit přítomnost molekuly i v přítomnosti pozadí a případných parazitních pásů. Efekt zesílení s sebou přináší i menší experimentální náročnost a možné zkrácení akumulační doby z obvyklých minut až desítek minut na sekundy až zlomky sekund, čímž je možno sledovat některé fyzikálně-chemické procesy v reálném čase. Při měření v mikro-modu (na Ramanově spektrometru kombinovaném s mikroskopem – viz kapitola 5.2) lze získat signál z oblasti o rozměru odpovídající řádově vlnové délce použitého světla. Při tzv. metodě TERS (z angl. tip enhanced Raman spectroscopy) je možno dostat dokonce lepší prostorové rozlišení, než je difrakční limit viditelného světla [48].

Nevýhodou povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie je přílišné zahřívání molekul na kovových površích v důsledku přítomnosti silného elektromagnetického pole, což může vést k dekompozici adsorbovaných molekul. Ve spektru biomolekul je pak možno pozorovat řadu ostrých čar, které však obvykle nepocházejí ze samotné molekuly, ale z uhlíkatých produktů vzniklých jejím tepelným rozkladem. Poloha i intenzita těchto čar může v čase značně fluktuovat a při delších

akumulačních dobách se středuje do pásů, vytvářejících ve spektru široké pozadí [49 – 51]. Ačkoliv byly navrženy metody k eliminaci tohoto nežádoucího jevu [52], možnosti jejich použití jsou v praxi stále ještě poměrně omezené.

Jak již bylo zmíněno, jedním z největších problémů SERS spektroskopie je špatná reprodukovatelnost naměřených dat související s nehomogenitou a nestabilitou použitých substrátů. Přímočará však nemusí být ani interpretace naměřených dat. Interakce molekuly s kovem může zapříčinit změnu poloh některých pásů ve spektru, změnu poměrů jejich relativních intenzit oproti spektru klasického Ramanova rozptylu, změnu jejich pološířek, popř. vznik zcela nových pásů (viz kapitola 2.2). Známý je např. případ inkorporace atomu stříbra do porfyrinového cyklu [53 – 55]. Při kontaktu biomolekuly s kovovým povrchem také může docházet k denaturaci a změně její vyšší úrovně struktury (např. [56, 57]).

První pokusy o změření SERS spekter některých biomolekul byly provedeny už na začátku 80. let, kdy byla získána první SERS spektra aminokyselin i některých proteinů [57 – 59]. I po více než 30 letech se však SERS spektra těchto biomolekul stále intenzívně studují ve snaze optimalizovat experimentální podmínky, snižovat hranice detekčních limitů a spolu s vývojem nových pravidelných pevných nanosubstrátů zajišťovat větší reprodukovatelnost naměřených dat. Navzdory tomu se však SERS spektra např. některých aminokyselin, publikovaná v posledních několika letech [30, 35, 36, 40, 42, 60 – 69], často značně liší, a to nejen při měření na různých typech substrátů, ale i v rámci stejného substrátu. Přitom neoptimističtější odhady limitu detekce se např. pro tryptofan pohybují v řádu koncentrace 10^{-8} M [62], a to i při měření na běžně dostupných koloidech. Typické koncentrace některých proteinů nebo oligopeptidů, použitelné k měření SERS spekter, se v literatuře pohybují přibližně v řádu 10^{-3} M až 10^{-5} M [70 – 73], ojediněle však až 10^{-7} M [74]. Takto nízké koncentrace by zřejmě mohly předčit i metodu kapkově nanášených povlaků (DCDR, z angl. drop coating deposition Raman), kde se díky zahuštění vzorku na okraji kapky nakápnuté na hydrofobním povrchu typické měřitelné koncentrace některých proteinů pohybují v řádu 10^{-6} M [75]. Další skupinou často zkoumaných biomolekul v SERS spektroskopii jsou nukleové kyseliny a jejich součásti. Ze tří základních složek nukleových kyselin

(sacharid, fosfát a dusíkaté báze) poskytuje obvykle největší SERS signál dusíkatá báze, často výrazně převyšující signál ostatních částí molekuly. Pozice nejintenzivnějšího pásu dusíkatých bází ve spektru může, podobně jako ve spektru klasického Ramanova rozptylu, sloužit k jednoznačné identifikaci daného mononukleotidu [76 – 78]. Přesto se však SERS spektra nukleových kyselin mohou značně lišit od spekter nativní DNA, zjištěných pomocí klasického Ramanova rozptylu. Tvar získaných spekter je ovlivněn především uspořádáním vláken DNA (jednovláknová/dvouvláknová), pH, které rozhoduje o způsobu vázání molekuly na kovový povrch a v případě koloidů i použitým agregačním činidlem [78]. Koncentrace některých nukleotidů při měření na borohydridovém koloidu se přitom v článku [78] pohybuje v řádu 10^{-5} až 10^{-8} M. Citlivá a reprodukovatelná detekce biomolekul v takto nízkých koncentracích by mohla otevřít nové možnosti bioanalytických aplikací včetně SERS biosenzingu. Metoda povrchem zesíleného Ramanova rozptylu má proto rozsáhlé potenciální aplikace v oblastech od analytické chemie přes medicínské diagnostiky, analýzy znečištění ovzduší či potravy a kriminalistiku až po analýzu uměleckých děl a lze ji bez nadsázky označit za silně multidisciplinární obor na hranici mezi fyzikou, chemií, biologií a inženýrstvím. Podrobnější informace o současném stavu poznání SERS spektroskopie a některé konkrétní aplikace lze najít souhrnně např. v [4, 9, 79].

Potenciální aplikace povrchem zesíleného Ramanova rozptylu v biosenzingu vyžadují jednak schopnost specifického navázání molekuly na povrch substrátu a její specifický SERS signál, který by měl značně převyšovat signál dalších molekul přítomných v měřeném vzorku, nebo by od nich měl být alespoň dostatečně odlišný. Takové zařízení, pomocí něhož lze zjišťovat přítomnost určitých biomolekul v měřeném vzorku, se obecně nazývá biosenzor. Vhodnou funkcionalizací zlatých nebo stříbrných povrchů je skutečně možno docílit přípravy i vysoce selektivního senzoru, který bude mít afinitu pouze ke specifickým látkám. Při takové proceduře je na povrch kovu přichycena vrstva molekul (nejčastěji prostřednictvím thiolových skupin vytvořených vhodnou chemickou modifikací) tak, že postranní skupiny těchto molekul slouží jako bio-rozpoznávací elementy pro jiné terčové molekuly, jejichž přítomnost, popř. množství chceme stanovit. Při inkubaci takového povrchu

v roztoku dojde k vysoce specifickému navázání terčových molekul na povrch senzoru, čímž se molekula dostane do blízkosti kovového povrchu, a následně je možno z ní měřit SERS. Žádoucí je v takovém případě potlačení jakýchkoliv nespecifických vazeb, které by při měření mohly poskytovat parazitní signál. Mezi skupiny nejčastěji používaných látek s vysokou vzájemnou afinitou patří receptorové proteiny s vysokou afinitou k některým ligandům (např. disociační konstanta dvojice avidin/biotin je v řádu 10^{-15} [80]), protilátky s vysokou afinitou k příslušným antigenům nebo vzájemně komplementární řetězce oligonukleotidů.⁷ Terčová molekula navázaná na povrch biosenzoru, není-li její SERS účinný průřez dostatečný k přímé detekci, může být dále inkubována v roztoku obsahujícím molekuly, které jsou chemicky označeny jistou molekulou s vysokým SERS účinným průřezem a které jsou schopné se na terčovou molekulu selektivně navázat. Navázání terčové molekuly na povrch biosenzoru je následně indikováno SERS signálem této chemické značky (viz např. [81]).

⁷ Poznamenejme, že výše uvedená metoda navazování biomolekul na povrch senzoru prostřednictvím vysoké afinity k jejich specifickým biochemickým partnerům je v současnosti využívána i u skupiny senzorů založených na rezonanci povrchových plazmonů (SPR), jejichž použití a další vývoj jsou do budoucna považovány za velice perspektivní [82].

5. Experimentální metody a použité vzorky

5.1. Ramanův spektrometr

Pro měření spekter Ramanova rozptylu byl použit mnohokanálový Ramanův spektrometr, umístěný v laboratoři Oddělení fyziky biomolekul MFF UK. Jako excitační zdroj byl použit Nd: YVO₂ laser Verdi V-2 s vlnovou délkou 532,027 nm. Výkon na výstupu laseru byl pro měření SERS spekter nastaven na 0,2 W, což odpovídalo výkonu 0,12 W paprsku vstupujícího do kyvety. Paprsek z tohoto laseru byl vedený pomocí soustavy zrcadel a čoček do vzorkové komory na kyvetu s měřeným vzorkem, přičemž ke sběru rozptýleného záření byl použit sběrný objektiv ve směru svírajícím úhel 90° oproti původnímu směru chodu laserového paprsku (tzv. pravouhlé uspořádání). Tato část aparatury byla ze všech stran chráněna černými závěsy proti nežádoucímu záření vstupujícímu zvnějšku, navíc okna laboratoře byla trvale zatemněná. Detekční systém aparatury byl tvořen CCD detektorem, chlazeným tekutým dusíkem na teplotu okolo 150 K. Separace rozptýleného záření v závislosti na vlnočtu byla provedena pomocí spektrografu Jobin Yvon – SPEX 270M s ohniskovou vzdáleností 270 mm, obsahujícího mřížku s 1800 vrypy/mm. Jelikož signál měřených vzorků bylo třeba získávat ze spektrální oblasti odpovídající Ramanovým posuvům přibližně od 400 cm⁻¹ do 1800 cm⁻¹, nastavili jsme polohu mřížky pro střed měřené oblasti odpovídající vlnové délce 574 nm (v pravé části spekter vodných roztoků bylo možno pozorovat Ramanův pás deformačních vibrací vody). Nastavení polohy mřížky, včetně možnosti přepnutí mezi dvěma dostupnými mřížkami (mřížka označená jako grating 1 s 1200 vrypy/mm a mřížka označená jako grating 2 s 1800 vrypy/mm), bylo možno provést pomocí ovládací konzole spektrometru HandScan. Šířka vstupní štěrby byla na displeji nastavena na 60 μm, což podle kalibrační tabulky spektrografu odpovídalo reálné šířce 43,4 μm. Tato šířka dovozovala ve výše uvedeném uspořádání měřit spektra Ramanova rozptylu s rozlišením okolo 3 cm⁻¹. K dosažení optimálního signálu Ramanova rozptylu daného vzorku bylo také možno jemně pohybovat držákem kyvety ve třech vzájemně kolmých směrech. Tato poloha byla během měření průběžně korigována pomocí spektra toluenu, obsahujícího velmi silné

spektrální čáry. Sběr dat, tedy údaje o závislosti intenzity rozptýleného záření na vlnočtu, byl realizován řídicím počítačovým programem spektrometru WinSpec.

Ihned po změření každého spektra bylo třeba změřit spektrum kalibrační neonové výbojky, což se řešilo zastíněním dráhy laserového paprsku poblíž jeho výstupu z laseru a nastavením hranolu poblíž sběrné části spektrometru do příslušné polohy tak, že došlo ke sběru světelného signálu pouze od výbojky. Spektrum neonové výbojky obsahuje ve viditelné oblasti řadu čar, jejichž vlnové délky jsou tabelovány, tudíž přiřazení těchto známých hodnot jednotlivým čarám vedlo k vytvoření přesné vlnočtové stupnice na vodorovné ose pro každé ze změřených spekter. Tato kalibrace byla prováděna pomocí programu NeokalSpex2, který vytvořil doc. Bok z FÚUK. Pomocí programu spc2asc byla spektra následně převedena do tabulek ve formě textových souborů, které již mohly být snadno použity pro další zpracování naměřených dat.

5.2. Konfokální Ramanův mikrospektrometr

Pro měření Ramanových spekter z pevných vzorků byl v rámci této práce použit Ramanův mikrospektrometr LabRAM HR 800 Horiba Jobin-Yvon s mikroskopem BX40 od firmy Olympus, umístěný ve stejné laboratoři, jako Ramanův spektrometr popsáný v kapitole 5.1. Hlavní rozdíl oproti Ramanovu spektrometru popsáném v kapitole 5.1 spočívá v tom, že Ramanův mikrospektrometr používá uspořádání pro měření zpětného rozptylu. Jako excitační zdroj byl využíván He-Ne laser s vlnovou délkou 632,816 nm, jehož stopa byla pomocí optické soustavy vedena směrem k pohyblivému stolku mikroskopu a posléze pomocí objektivu fokusována na vzorek.⁸ Tentýž objektiv sbíral i veškeré odražené a rozptýlené záření, popř. fluorescenční záření, přičemž záření s nezměněnou vlnovou délkou bylo filtrováno pomocí hranového edge filtru. Výkon na výstupu laseru byl 10 mW, což odpovídalo výkonu 6,4 mW paprsku fokusovaného na vzorek. Tento výkon byl však během experimentů často regulován pomocí šedých filtrů, označených jako D1 až D4.

⁸ Při současném uspořádání aparatury je možno použít i další laserové zdroje s vlnovými délkami přibližně 488 nm, 514 nm a 785 nm. Tyto vlnové délky však byly během měření v rámci této práce používány jen výjimečně.

Přesné výkony laserového paprsku fokusovaného na vzorek odpovídající jednotlivým filtrům jsou uspořádány v tabulce 1.

Separace rozptýleného záření v závislosti na vlnočtu byla realizována pomocí spektrografu HR 800 s ohniskovou vzdáleností 800 mm, obsahujícího mřížku s 300 vrypů/mm. Detekční systém aparatury byl tvořen CCD detektorem, chlazeným tekutým dusíkem na teplotu okolo 150 K. V cestě svazku bylo dále zařazeno optické vlákno, pomocí něhož bylo možno osvětlit vzorek bílým světlem. Pomocí barevné kamery tak bylo možno sledovat povrch vzorku na obrazovce počítače a tím i velice jemně nastavovat správnou fokusaci svazku. Poblíž sběrné části spektrometru bylo umístěno otáčivé zrcadlo, jehož pootočením bylo možno docílit toho, že svazek rozptýleného záření byl veden buďto do kamery, nebo do spektrografu.

Tabulka 1: Výkon He-Ne laseru na vzorku v závislosti na použitém filtru

Filtr	–	D1	D2	D3	D4
Výkon laseru na vzorku/mW	6,4	0,5	0,065	0,02	0,002

Výhodou Ramanova spektrometru kombinovaného s mikroskopem je možnost fokusace stopy laseru do oblasti, jejíž průměr je řádově srovnatelný s vlnovou délkou použitého světla. Při použití objektivu s vysokou numerickou aperturou (NA) je mnohem vyšší efektivita sběru rozptýleného záření, než při měření na aparatuře popsané v kapitole 5.1, kde sběr signálu probíhá pouze v jednom konkrétním úhlu (objektivem používaným pro měření SERS spekter byl v této práci vždy objektiv 100×, NA = 0,9, přičemž objektivy s nižší numerickou aperturou byly využívány pouze při počátečním hrubém nastavování polohy měřeného vzorku). Při maximálním uzavření konfokální štěrbině spektrometru je možno získat vysoké rozlišení nejen ve vodorovné (xy) rovině, ale i hloubkové rozlišení ve svislém (z) směru. Konfokalita však pro naše měření nebyla příliš podstatná; naopak uzavření konfokální štěrbině vedlo ke snížení získaného signálu, proto byla během měření SERS spekter konfokální štěrbině otevřená na maximální hodnotu 1100 μm . Šířka štěrbině spektrografu byla 100 μm , spektrální rozlišení odhadujeme okolo 3 cm^{-1} .

Sběr dat, tedy údaje o závislosti intenzity rozptýleného záření na vlnočtu, byl realizován řídicím počítačovým programem spektrometru LabSpec. Pomocí téhož

programu bylo rovněž možno určovat šířku otevření konfokální štěrbinu nebo pootáčet mřížku a volit střed měřené oblasti. Příslušný software navíc dovoľoval naprogramovat na měřeném vzorku síť bodů, ze kterých bylo třeba měřit signál, a provádět tak Ramanovo mapování. Posun vzorku v rovině xy byl realizován joystickem s nejmenším krokem 0,1 μm , čímž byl zajištěn velice přesný výběr měřeného místa.

5.3. Poměr signál/šum v Ramanově spektroskopii

Přesnost měření spekter Ramanova rozptylu byla na obou výše popsaných aparaturách negativně ovlivněna zejména přítomností šumu. K eliminaci tohoto nežádoucího jevu jsme proto využili akumulaci spekter. Pomocí počítačových programů bylo možno u každého měření nastavit dobu trvání expozice i počet akumulací. Při zvyšování počtu akumulací, postupně zaznamenávaných pomocí počítače, docházelo k opakovanému průměrování změřených spekter, čímž se zároveň celková hodnota šumu střeďovala na co nejmenší hodnotu. Přitom platí, že při N opakovaných měřeních se úroveň náhodného šumu sníží \sqrt{N} krát [1]. Délka jedné expozice byla při měření spekter klasického Ramanova rozptylu nastavena na 5 s a při měření SERS spekter na 1 s; celková doba akumulace dat se v případě spekter klasického Ramanova rozptylu pohybovala v řádu několika desítek minut a v případě SERS spekter nejčastěji okolo jedné minuty.

5.4. Měření absorpčních spekter

K měření absorpčních spekter koloidu byl použit absorpční UV-VIS spektrometr Lambda 12 od firmy Perkin Elmer, umístěný na Oddělení fyziky biomolekul MFF UK. Tento spektrometr obsahuje deuteriovou výbojku a halogenovou lampu, které slouží jako zdroje záření ve viditelné a blízké UV oblasti spektra. Disperzním prvkem je v případě spektrometru optická mřížka, která separuje světlo z lampy v závislosti na vlnové délce. Záření konkrétní vlnové délky je posléze přivedeno na dělič svazku a pomocí detektoru je snímána intenzita svazku po průchodu jak měřeným vzorkem, tak referencí. Informace o absorpanci, tedy dekadickém logaritmu podílu

intenzity světla dopadajícího na vzorek a intenzity propuštěné, je pro každou vlnovou délku spektra zapsána do počítače prostřednictvím řídicího programu WinAspect. Výsledné absorpční spektrum je znázorněno jako závislost absorpance vzorku na vlnové délce záření. Poznamenejme, že pokud dochází ke snižování intenzity světla po průchodu vzorkem vlivem absorpce i elastického rozptylu, mluvíme obvykle o extinkčních spektrech a místo termínu absorpance používáme spíše termín extinkce.

Veškerá měření extinkčních spekter koloidů probíhala v intervalu vlnových délek od 300 do 800 nm s krokem 1 nm a integračním časem 0,1 s. Spektra byla měřena v křemenné kyvetě s optickou drahou 2 mm, pro jednoduchost vždy bez reference.

5.5. Použité vzorky

Pro přípravu vzorků byla během diplomové práce použita deionizovaná voda, připravovaná v zařízení umístěném v laboratoři Oddělení fyziky biomolekul MFF UK. Na vymývání kyvet byla dále použita destilovaná voda a 65% HNO₃ od firmy Lachema. Pro přípravu hydroxylaminového koloidu byly použity následující chemikálie:

- Dusičnan stříbrný (AgNO₃) – od firmy Lachema.
- Hydroxylamin-hydrochlorid (NH₂OH·HCl) – od firmy Sigma-Aldrich.
- Hydroxid sodný (NaOH) – od firmy Fluka.

Jako agregační činidlo byl použit chlorid draselný (KCl) od firmy PENTA. Jako modelové (bio)molekuly byly použity následující látky:

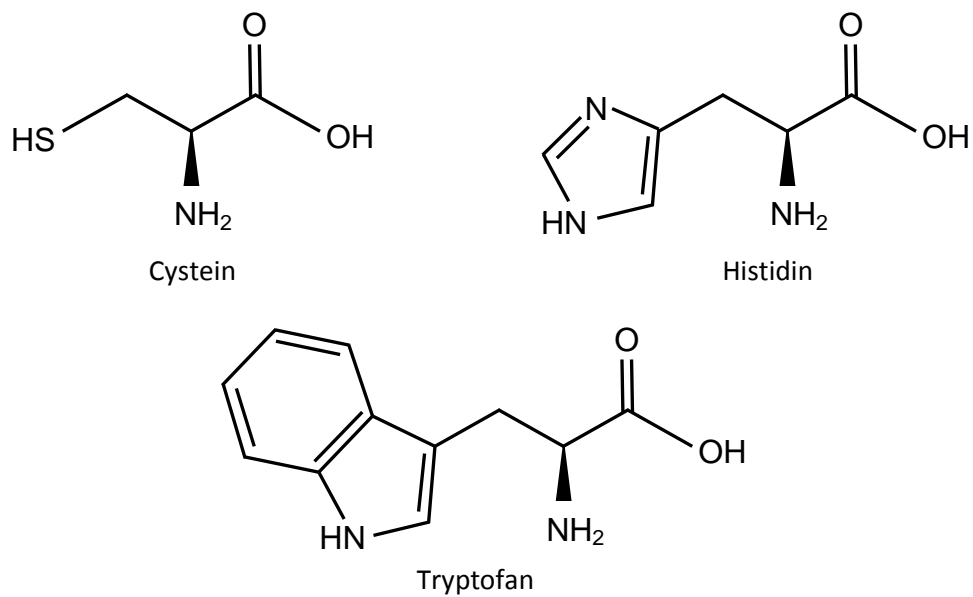
- Aminokyseliny: Cystein, tryptofan, histidin (vše řady L-) od firmy Sigma-Aldrich.
- Proteiny: Albumin (BSA, 66400 g/mol, od firmy Sigma-Aldrich), kuřecí lysozym (14600 g/mol, od firmy Fluka).
- Methylenová modř – od firmy Sigma-Aldrich.
- Free-base porfyriny: 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-porfin (H₂TMPyP), 5,10,15,20-tetrakis(4-trimethylammoniofenyl)-21H,23H-porfin

(H₂TMAP) a 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl)-21H,23H-porfin (H₂TSP), vše od firmy Sigma-Aldrich.

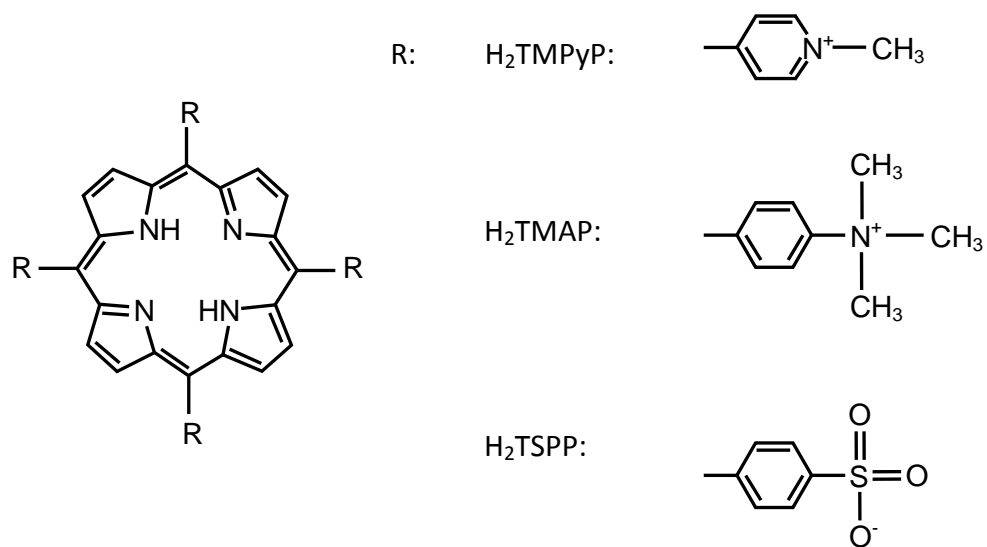
- 36% HCl na okyselování zásobních roztoků – od firmy Lachema.

Vážení pevných vzorků probíhalo na analytických vahách s přesností okolo jedné desetiny miligramu. Při přípravě zásobních roztoků i při jejich ředění byly použity pipety s plastovými nástavci s přesností lepší, než jeden mikrolitr. Všechny zásobní roztoky byly uchovávány v průhledných eppendorfkách v lednici při teplotě okolo 2 °C. Zásobní roztoky proteinů byly uchovávány v mrazáku při teplotě okolo -18 °C.

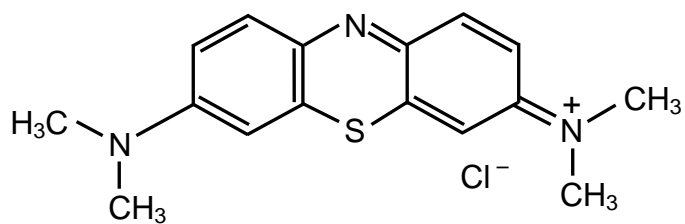
Zásobní roztoky aminokyselin byly připraveny s molárními koncentracemi 0,05 M (cystein), 0,03 M (tryptofan) a 0,25 M (histidin). Z těchto zásobních roztoků byla v rámci práce pro porovnání změřena rovněž spektra klasického Ramanova rozptylu (viz obr. 15, 21 a 27). Pro účely měření spekter povrchem zesíleného Ramanova rozptylu těchto látek za ještě nižších koncentrací byly tyto roztoky dále zředěny; konkrétně z původního zásobního roztoku cysteinu byly připraveny další 4 zásobní roztoky o molárních koncentracích cysteinu $5 \cdot 10^{-3}$ M, 10^{-4} M, $5 \cdot 10^{-5}$ M a $5 \cdot 10^{-7}$ M. Z původního zásobního roztoku tryptofanu byly připraveny roztoky o molárních koncentracích tryptofanu 10^{-4} M a 10^{-5} M a z původního zásobního roztoku histidinu byl připraven ještě roztok o molární koncentraci 10^{-4} M. Jako agregační činidlo byl během měření na hydroxylaminovém koloidu použit KCl, jehož molární koncentrace v zásobním roztoku byla zvolena jako 1,0 M. Zásobní roztoky albuminu, resp. lysozymu o molárních koncentracích $4 \cdot 10^{-5}$ M, resp. $7 \cdot 10^{-5}$ M, byly dále zředěny na koncentrace 10^{-5} M a 10^{-6} M. Vzorky porfyrinů a methylenové modři, používané během měření především v druhé části práce, byly připraveny ředěním jejich zásobních roztoků, připravených na Oddělení fyziky biomolekul již v minulosti.



Obrázek 8: Molekuly cysteinu, histidinu a tryptofanu.



Obrázek 9: Molekuly porfyrinů H₂TMPyP, H₂TMAP a H₂TSPP.



Obrázek 10: Molekula methylenové modři.

6. Výsledky a diskuse

6.1. Měření na hydroxylaminovém koloidu

6.1.1. Příprava hydroxylaminového koloidu

Prvním SERS-aktivním substrátem, který byl použit pro měření SERS spekter některých modelových biomolekul v první fázi této práce, byl hydroxylaminový koloid. Veškeré chemické nádoby, které bylo pro přípravu koloidu použito, bylo vymyto pomocí kyseliny dusičné (původně 65% HNO₃, pro účely vymývání zředěná destilovanou vodou v poměru přibližně 1:1), následně několikrát propláchnuté horkou vodou, destilovanou vodou a deionizovanou vodou a usušeno v sušičce.

Samotná příprava hydroxylaminového koloidu proběhla podle návodu uvedeného v [39]: 0,017 g AgNO₃ bylo rozpuštěno v 90 ml deionizované vody, čímž vznikl první dílčí roztok o molární koncentraci AgNO₃ $1,1 \cdot 10^{-3}$ M. Dále bylo naváženo 0,043 g NH₂OH·HCl, který byl rozpuštěn v 10 ml deionizované vody. Do tohoto roztoku bylo následně přidáno 9 ml 0,1 M roztoku NaOH, protože redukce musí probíhat v zásaditém prostředí. Tímto postupem vznikl druhý dílčí roztok o finální molární koncentraci NH₂OH·HCl $3,3 \cdot 10^{-2}$ M. Kádinka s prvním dílčím roztokem byla posléze umístěna na magnetickou míchačku a za stálého míchání do ní byl pomocí pipety pomalu přikapáván druhý dílčí roztok, čímž vznikla šedo-hnědá suspenze. Pro přípravu koloidu bylo celkově použito veškeré připravené množství prvního roztoku (obsahující AgNO₃) a 9,5 ml druhého roztoku (obsahující NH₂OH·HCl). pH takto připraveného koloidu bylo ihned po jeho přípravě změřeno pomocí univerzálního indikátorového papírku jako pH ≈ 5 . Po celou dobu práce byl koloid skladován v uzavřené nádobě v zatemnělé skříni o pokojové teplotě; při delší manipulaci s koloidem během přípravy vzorků byla jeho nádoba zakrývána alobalem.

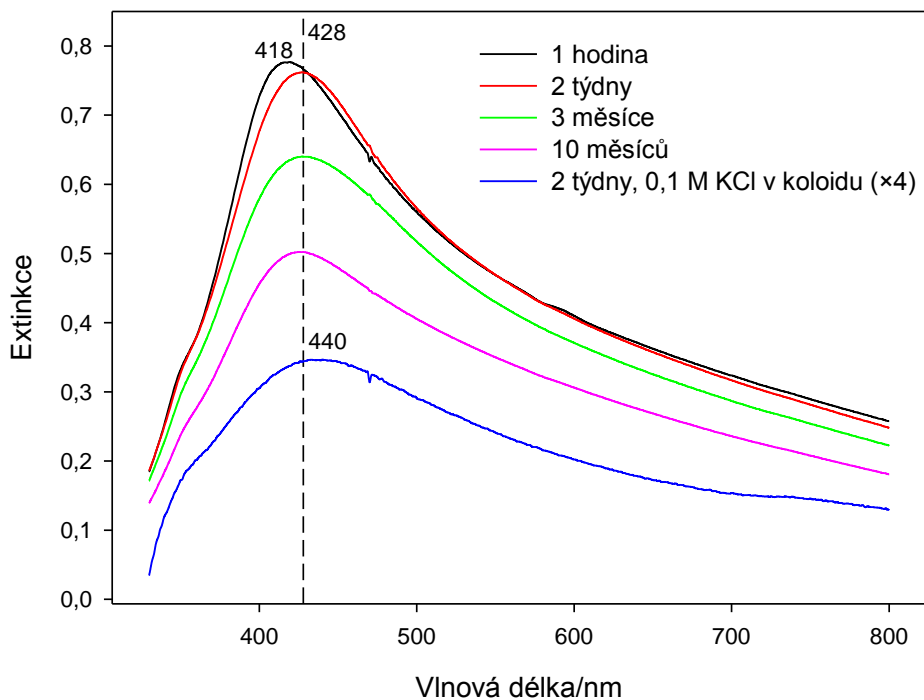
6.1.2. Charakterizace hydroxylaminového koloidu

Pro charakterizaci připraveného hydroxylaminového koloidu byla změřena jeho extinkční spektra, která jsou zobrazena v grafu na obr. 11. Čerstvě připravený koloid vykazuje maximum extinkce na vlnové délce (418 ± 2) nm. Zhruba po dvou týdnech se toto maximum posunulo na vlnovou délku (428 ± 2) nm, přičemž tato poloha

zůstala v časové škále zhruba 10 dalších měsíců (až do spotřebování téměř veškerého objemu) prakticky nezměněná. Tvar spektra se však v rámci několika měsíců mírně změnil zejména v oblasti náběhu extinkčního pásu směrem k vyšším hodnotám vlnových délek. Posun maxima extinkčního spektra o zhruba 10 nm k oblasti vyšších vlnových délek souvisí s jistou agregací koloidních částic, která zřejmě probíhala ještě několik hodin až dní po přípravě koloidu.

Jelikož bylo později při měření SERS spekter aminokyselin použito jako agregační činidlo KCl, změřili jsme dále extinkční spektrum směsi koloidu a KCl (obr. 11). Přidání agregačního činidla do koloidu je doprovázeno posunem maxima extinkce do vyšších vlnových délek (viz kapitola 3.1), ale také snížením absorbance, neboť při agregaci dochází k sedimentaci větších částic na dno nádoby, a dochází tedy k odbarvování směsi, což lze někdy pozorovat i pouhým okem. Pro extinkční spektrum takto zagregovaného koloidu je dále typické plošší maximum extinkce a pozvolnější klesání extinkce směrem k vyšším vlnovým délkám, což svědčí o větší distribuci velikostí přítomných nanočástic. Naproti tomu přidání aminokyseliny do samotného koloidu (bez agregačního činidla) v množstvích, která byla použita pro získání jejich SERS spekter (nejvýše 10^{-3} M), tento efekt nemělo (extinkční spektra směsí koloidu a aminokyseliny byla prakticky totožná s extinkčními spektry samotného koloidu). Stejně tak nebyla pozorovaná ani další agregace po přidání aminokyseliny do směsi koloidu s agregačním činidlem (extinkční spektrum směsi koloidu, agregačního činidla a aminokyseliny bylo prakticky totožné s extinkčním spektrem samotného koloidu a agregačního činidla).

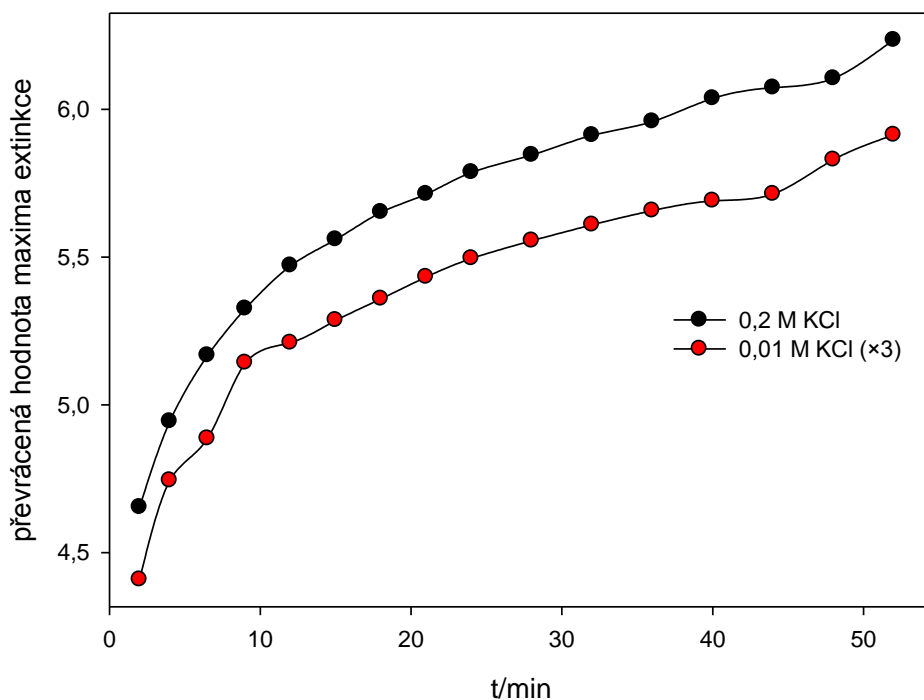
Výsledky extinkčních měření ukázaly, že zatímco pro finální molární koncentraci 0,01 M KCl ve vzorku se extinkční spektrum takového vzorku příliš neliší od spektra samotného koloidu (maximum extinkce zůstalo neposunuté), tak pro molární koncentraci 0,1 M KCl již došlo k posunu maxima extinkce ze 428 nm zhruba na 440 nm a hodnota extinkce v maximu extinkčního pásu se snížila přibližně 4×. Odtud plyne, že větší zesílení v SERS experimentech lze očekávat s koncentracemi agregačního činidla KCl spíše v řádu 0,1 M, než 0,01 M. Toto je v souladu i s nedávno publikovaným článkem [40], kde byla optimalizována množství agregačních činidel při studiu povrchem zesíleného Ramanova rozptylu některých biomolekul.



Obrázek 11: Extinkční spektra hydroxylaminového koloidu. Časy v legendě udávají, jak dlouho po přípravě koloidu bylo dané extinkční spektrum změřeno. U čerstvě připraveného koloidu bylo získáno maximum extinkce na vlnové délce (418 ± 2) nm. Během měření po dvou týdnech od přípravy koloidu došlo k posunu tohoto maxima na vlnovou délku (428 ± 2) nm. Tato poloha již zůstala v časové škále několika dalších měsíců nezměněná. Tvar spektra se v rámci několika měsíců mírně lišil zejména v oblasti náběhu extinkčního pásu směrem k vyšším hodnotám vlnových délek. Modře je vyznačeno spektrum po přidání příslušného množství KCl, jehož maximum leží na vlnové délce (440 ± 3) nm (měřeno 2 týdny po přípravě koloidu; toto spektrum je pro lepší přehlednost vynásobeno čtyřmi a vertikálně posunuto).

Časová závislost extinkce směsi koloidu a KCl byla změřena pro molární koncentrace KCl 0,01 M a 0,2 M v průběhu přibližně 50 minut od přípravy vzniklé směsi. S rostoucím časem dochází podle předpokladu ke snižování extinkce, neboť vznikající agregáty postupně sedimentují na dno nádoby. Během 50 minut došlo u vzorku s 0,2 M KCl k poklesu maximální extinkce z hodnoty 0,215 na hodnotu 0,160 a podobně u vzorku s 0,01 M KCl poklesla maximální extinkce z hodnoty 0,681 na hodnotu 0,501. Zajímavé je, že ačkoliv měly oba měřené vzorky různou molární koncentraci KCl a tedy i trochu jiný tvar extinkčních spekter a lišící se polohu maxima extinkce, u obou z nich došlo za dobu 50 minut k poklesu hodnoty extinkčního maxima o (26 ± 1) %. Toto je zobrazeno v grafu na obr. 12, kde je pro oba měřené vzorky znázorněna převrácená hodnota maxima extinkce v závislosti na

čase. Pro lepší přehlednost jsou převrácené hodnoty maxima extinkce pro vzorek s 0,01 M KCl vynásobené třemi.



Obrázek 12: Časová závislost převrácené hodnoty maxima extinkce směsi hydroxylaminového koloidu a KCl. Hodnoty příslušející 0,01 M koncentraci KCl jsou pro lepší přehlednost vynásobené třemi. Časy na vodorovné ose značí zpoždění začátku jednotlivých měření vůči době, kdy bylo do koloidu přidáno příslušné množství KCl.

Příprava všech vzorků pro měření SERS spekter na hydroxylaminovém koloidu probíhala tak, že do 500 μ l koloidu, aplikovaného do kyvety pomocí pipety, bylo přidáno příslušné množství zásobního roztoku aminokyseliny, čímž byla získána směs s požadovanou finální molární koncentrací měřené látky. Objem takto přidaného zásobního roztoku měřené látky byl přitom ve všech případech zhruba 50 \times až 500 \times menší, než objem samotného koloidu, což odpovídá řádově 1 až 10 μ l zásobního roztoku přidaného do kyvety obsahující 500 μ l koloidu. Do takto vzniklé směsi bylo často přidáváno navíc jako agregační činidlo ještě určité množství zásobního roztoku KCl o molární koncentraci 1,0 M. Při finální molární koncentraci 0,2 M KCl ve výsledné směsi to odpovídá až 25% zředění koloidu a tedy i molární koncentrace měřené látky, které je nutno ve výpočtech množství měřené látky (aminokyseliny) uvažovat, aby nedošlo ke zkreslení její výsledné koncentrace v konečném vzorku. Ve všech následujících prezentovaných údajích o koncentracích

měřené látky je tato korekce uvažována. Obrácený způsob přípravy (nejdříve přidání roztoku KCl a až pak roztoku aminokyseliny) vedl k podstatnému zhoršení signálu, což patrně souvisí s tím, že zagregovaný koloid (po přidání KCl) již nedovoluje molekulám aminokyseliny dostat se do blízkosti nejvíce zesilujících míst.

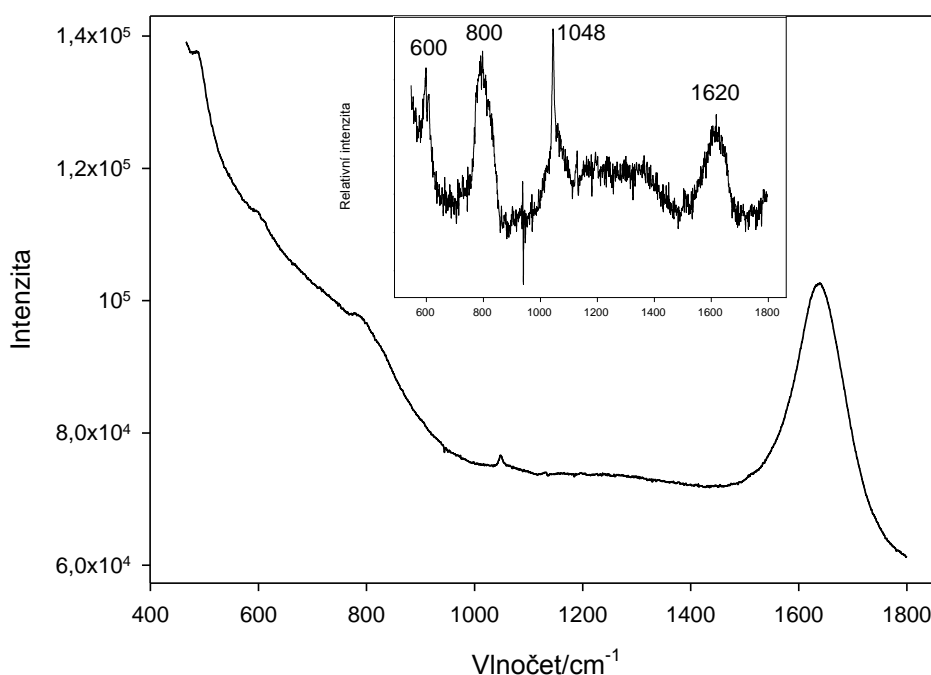
6.1.3. Analýza anomálních pásů

Účelem prvních měření SERS spekter bylo mimo seznámení se s měřicí aparaturou orientačně otestovat zesilující schopnosti čerstvě připraveného koloidu na známých látkách s vysokým SERS účinným průřezem – methylenové modři a porfyrinu H_2TMPyP . Jelikož se ukázalo, že průběžné vymývání kyvet pouze destilovanou vodou nestačí (ve spektru čistého koloidu byly občas pozorovány pásy látky přítomné v kyvetě během některého z předchozích měření), musela být kyveta pokaždé, kdy se v ní měřila jiná látka (nebo tatáž látka, ale s menší koncentrací), vypláchnuta kyselinou dusičnou, následně horkou vodou, destilovanou vodou a deionizovanou vodou a usušena v sušičce. Možné kontaminace kyvety nežádoucími látkami (které se díky efektu zesílení mohou projevit již ve velmi nízkých koncentracích) byly po každém takovémto vymytí průběžně kontrolovány tak, že ještě před vlastním měřením bylo orientačně změřeno i spektrum samotného koloidu.

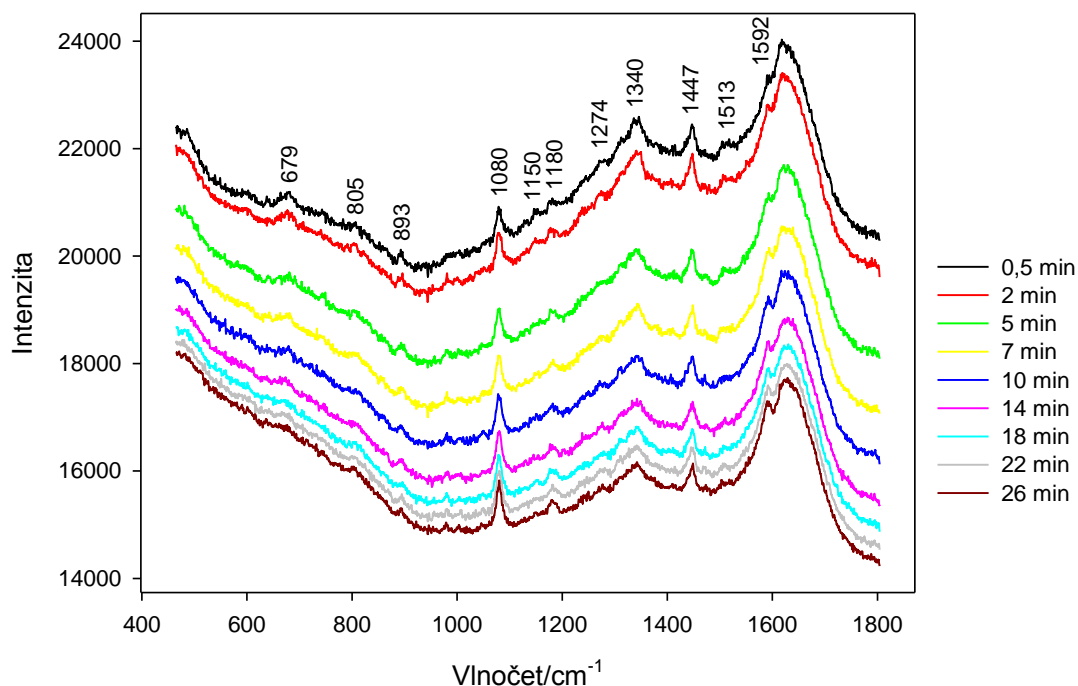
Spektrum Ramanova rozptylu samotného hydroxylaminového koloidu je zobrazeno v grafu na obr. 13. V tomto spektru je dominantní pás deformačních vibrací vody na vlnočtu kolem 1635 cm^{-1} . Prakticky celý zbytek spektra je tvořen pozadím, jehož hodnota prudce roste zhruba od vlnočtu 1000 cm^{-1} směrem k nižším hodnotám vlnočtu. Po odečtu spektra vody zjistíme, že ve spektru hydroxylaminového koloidu jsou ve skutečnosti přítomné 3 pásy, a to na vlnočtech okolo 600 cm^{-1} , 800 cm^{-1} a 1048 cm^{-1} (pás na vlnočtu okolo 1620 cm^{-1} vznikl pravděpodobně nedokonalým odečtením pozadí, navíc má tento pás oproti ostatním třem značně větší pološířku). Vhodný koeficient pro odečet těchto dvou spekter byl nalezen s využitím programu Spectra Calc. Reprodukovatelnost spektra samotného koloidu byla ověřena minimálně během 3 měření v průběhu 6 měsíců od přípravy koloidu. Celková doba akumulace spektra samotného koloidu byla 15 minut ve srovnání s 1 minutou, po kterou byla akumulována většina naměřených SERS spekter.

Spektrum samotného koloidu bylo dále změřeno ještě pro jiný hydroxylaminový koloid, připravený na Oddělení fyziky biomolekul již v minulosti. Po podobné analýze, jako u námi připraveného koloidu, se ukázalo, že pás na vlnočtu 1048 cm^{-1} zůstává ve spektru neposunutý, avšak došlo k posunu pásu ze 600 cm^{-1} na 612 cm^{-1} a k posunu pásu z 800 cm^{-1} na 785 cm^{-1} (zde nezobrazeno). Tyto posuny souvisí pravděpodobně s nepatrně odlišným způsobem přípravy obou koloidů, který lze i ve snaze přesného dodržení postupu přípravy jen velmi těžko reprodukovat.

Dále byla změřena spektra $0,2\text{ M KCl}$ v hydroxylaminovém koloidu, tedy o stejné molární koncentraci, která se ukázala jako optimální při měření spekter některých aminokyselin (viz následující kapitola). Přehled naměřených spekter spolu s určením vlnočtů jednotlivých pásů je v grafu na obr. 14.



Obrázek 13: Spektrum Ramanova rozptylu hydroxylaminového koloidu. Ve spektru je dominantní pás deformačních vibrací vody na vlnočtu kolem 1635 cm^{-1} . Prakticky celý zbytek spektra je tvořen pozadím, jehož hodnota prudce roste zhruba od vlnočtu 1000 cm^{-1} směrem k nižším hodnotám vlnočtu. Celková doba akumulace je 15 minut. Ve výřezu je zobrazeno spektrum vzniklé odečtem vody od spektra hydroxylaminového koloidu. Při odečtu vynikly 3 pásy pocházející od koloidu na vlnočtech $600, 800$ a 1048 cm^{-1} . Pás na 1620 cm^{-1} vznikl zřejmě nedokonalým odečtením pozadí.



Obrázek 14: Časový vývoj Ramanových spekter 0,2 M KCl v hydroxylaminovém koloidu. Časy v legendě značí zpoždění začátků jednotlivých měření vůči době, kdy bylo do koloidu přidáno příslušné množství zásobního roztoku KCl. S rostoucím časem hodnota celkové intenzity rozptýleného záření monotónně klesala. Celková doba akumulace všech spekter je 1 minuta, zde prezentované spektrum je bez jakýchkoliv dalších úprav i odečtu pozadí.

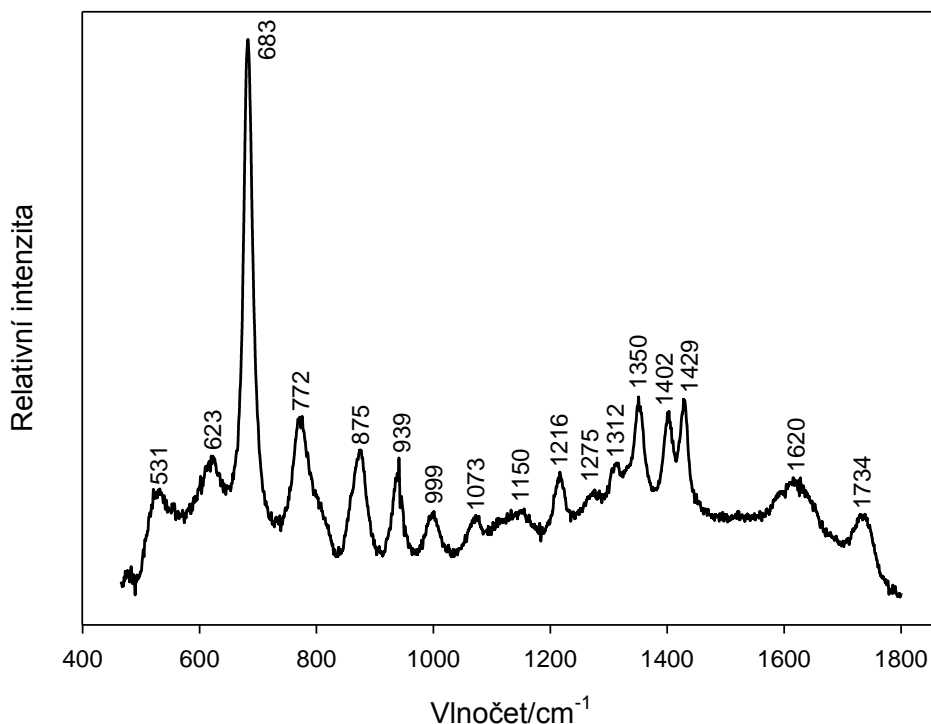
Grafy na obr. 13 a 14 demonstrují, jak je důležité charakterizovat spektra samotného koloidu, resp. spektra směsi koloidu a agregačního činidla, ještě před měřením SERS spekter samotného vzorku. Spektra na těchto obrázcích obsahují řadu anomálních pásů, jejichž poloha se může překrývat právě s pásy měřené molekuly a ztěžovat interpretaci naměřených dat. V neposlední řadě může přítomnost těchto anomálních pásů vést ke zcela chybně určenému detekčnímu limitu měřené látky. Přesný původ těchto anomálních pásů není dosud znám, avšak jedná se zřejmě o nějakou kombinaci mezimolekulárních interakcí mezi hydroxylaminovými ionty, ionty agregačního činidla a koloidními částicemi. Vliv různých agregačních činidel na výskyt anomálních pásů byl částečně studován v článku [42], ze starších článků zmiňme např. [41]. Některé polohy anomálních pásů publikované v [42] pro hydroxylaminový koloid v rámci uvedeného spektrálního rozlišení souhlasí, nebo se nejvýše o několik cm^{-1} liší od poloh pásů v námi změřených spektrech na obr. 14. Přesnému srovnání s [42] ovšem brání fakt, že ve zmíněném článku se jedná o anomální pásy pocházející ze souhrnu několika

různých agregačních činidel a jejich použitá molární koncentrace byla 10× menší, než v případě našeho měření. Jak již bylo zmíněno, svoji roli zde mohla rovněž sehrát i nepatrně odlišná příprava hydroxylaminového koloidu.

Účelem počátečních měření v laboratoři bylo vytipovat některé biomolekuly, u kterých bylo při předběžných měřeních jejich SERS spekter dosaženo dostatečného zesílení, a dále se pokusit optimalizovat použité experimentální podmínky, jako koncentraci vzorku, agregačního činidla nebo dobu akumulace s ohledem na časovou závislost naměřených spekter. V této první fázi práce jsme se soustředili zejména na měření SERS spekter aminokyselin – základních stavebních kamenů proteinů, neboť porozumění interakce aminokyselin s kovovými povrchy může být důležitá pro pochopení interakce kovových povrchů i se složitějšími proteiny a dalšími biomolekulami. V následujících dvou kapitolách budeme prezentovat výsledky našich měření získaných na aminokyselinách cysteinu a histidinu.

6.1.4. Měření na cysteinu

Cystein je jedna z 21 základních aminokyselin a jedna ze dvou aminokyselin obsahující atom síry. Naměřená SERS spektra cysteinu můžeme porovnávat s Ramanovým spektrem jeho vodného roztoku, které je zobrazeno v grafu na obr. 15. Toto spektrum bylo změřeno s molární koncentrací cysteinu 0,05 M a s celkovou dobou akumulace 15 minut. Zde prezentované spektrum je výsledkem odečtu spektra vody s vhodným koeficientem (nalezeným pomocí programu Spectra Calc) a lineární korekce tvaru spektra vzhledem k pozadí, provedenou pomocí programu SigmaPlot.



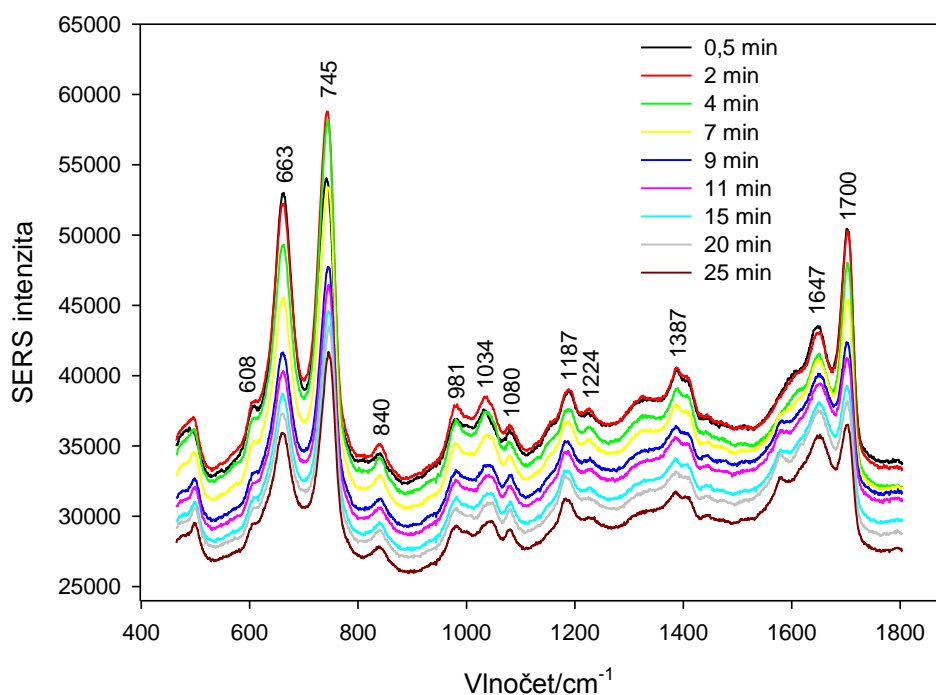
Obrázek 15: Ramanovo spektrum cysteinu. Molární koncentrace cysteinu je 0,05 M, celková doba akumulace 15 minut, výkon laseru 0,3 W. Zde prezentovaný graf je výsledkem odečtu spektra vody a lineární korekce tvaru spektra vzhledem k pozadí.

Nejintenzivnějším pásem Ramanova spektra cysteinu je pás na 683 cm^{-1} , který se připisuje valenční vibraci atomů C–S [42]. Rovněž původ některých dalších páسů v naměřeném spektru lze přehledně najít v [42]. Zatím však není zcela jasné, jestli pás na 1620 cm^{-1} přísluší skutečně nějaké vnitromolekulární vibraci cysteinu, nebo jestli vznikl pouze nedokonalým odečtem pozadí vody (na vlnočtu okolo 1635 cm^{-1} se nachází pás deformačních vibrací vody). Podle [42] by se s pásem deformačních vibrací vody měla překrývat deformační vibrace skupiny NH_3^+ , jejíž energie by měla odpovídat vlnočtu okolo 1636 cm^{-1} .

Zvolený koncentrační rozsah aminokyseliny i agregačního činidla, používaných při SERS měřeních, byl zvolen na základě podobných měření publikovaných v odborné literatuře [40, 42, 60 – 74]. Během všech měření na koloidech byl použit KCl jako agregační činidlo, který byl shledán optimálním agregačním činidlem pro cystein v článku [40], a také z důvodu relativně málo intenzivních anomálních páسů (ve srovnání s jinými agregačními činidly, [42]). Finální molární koncentrace KCl ve výsledném vzorku byla při předběžných měřeních SERS spekter cysteinu

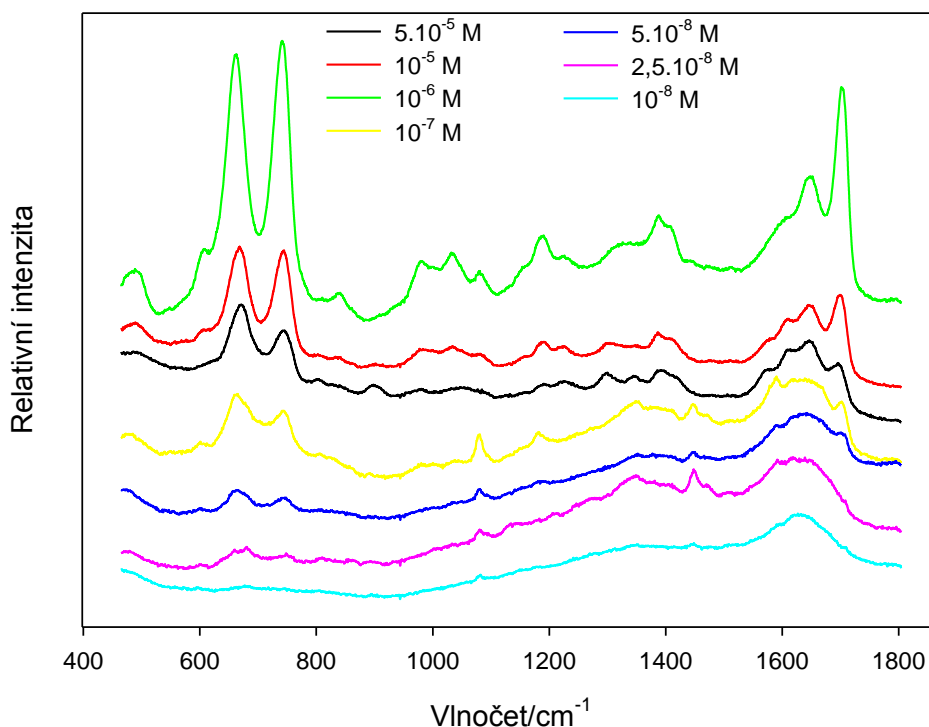
optimalizována na 0,2 M (měřeno pro molární koncentrace cysteinu 10^{-7} M a $5 \cdot 10^{-5}$ M). Zvýšení molární koncentrace KCl na 0,3 M, resp. snížení na 0,1 M, resp. 0,01 M, již při měření SERS spekter nevedlo k dalšímu zvyšování signálu. Toto je rovněž v souladu s článkem [40], kde byla po pečlivější analýze shledána optimální molární koncentrace KCl jako 0,26 M, a částečně i v souladu s absorpčními měřeními (viz kapitola 6.1.2).

Koncentrační závislost SERS spekter cysteinu byla změřena pro 7 vzorků s molárními koncentracemi cysteinu pokrývající interval od 10^{-8} M až po $5 \cdot 10^{-5}$ M a pevnou molární koncentrací KCl 0,2 M. Spektrum každého z připravených vzorků přitom bylo změřeno v různých časech, počínaje časem cca 0,5 minuty od přípravy vzorku, až po dobu cca 25 minut po jeho přípravě. Většina spekter o dané koncentraci byla změřena alespoň 2× v průběhu několika dní, přičemž k dalšímu zpracování bylo vybíráno vždy nejlepší naměřené spektrum. Časová závislost SERS spekter cysteinu o molární koncentraci 10^{-6} M je zobrazena na obr. 16. Pro všechny měřené koncentrace byl nejvyšší signál pozorován v čase zhruba 3 až 5 minut po přípravě vzorku; dále již s rostoucím časem velikost signálu monotónně klesala. S rostoucím časem dochází k poklesu maximální intenzity SERS spekter, ale i k poklesu pozadí. Tato závislost dobře koreluje s poklesem extinkce směsi koloidu s KCl, změřeným na absorpčním spektrometru (obr. 12).



Obrázek 16: SERS spektra cysteinu na hydroxylaminovém koloidu – časová závislost. Molární koncentrace cysteinu je 10^{-6} M, finální molární koncentrace KCl je 0,2 M, celková doba akumulace všech spekter je 1 minuta. Časy v legendě značí zpoždění začátků jednotlivých měření vůči době, kdy bylo do směsi koloidu a aminokyseliny přidáno příslušné množství KCl. Nejvyšší signál byl pozorován v čase zhruba 3 až 5 minut po přidání KCl do směsi, dále již s rostoucím časem velikost signálu monotónně klesala. Podobná časová závislost byla zjištěna i u dalších koncentrací cysteinu.

Koncentrační závislost SERS spekter cysteinu je zobrazena v grafu na obr. 17. Pro danou molární koncentraci je v grafu vykresleno vždy nejlepší spektrum s ohledem na časovou závislost. Koncentrace KCl je ve všech případech 0,2 M.



Obrázek 17: Koncentrační závislost SERS spekter cysteinu na hydroxylaminovém koloidu. Pro danou koncentraci je v grafu zobrazeno nejlepší naměřené spektrum s ohledem na časovou závislost. Finální koncentrace KCl je ve všech případech 0,2 M. Pro větší přehlednost jsou vůči sobě spektra v grafu vertikálně posunuta. Doba akumulace všech spekter je 1 minuta.

Zkoumejme nejprve, zda se v některém ze SERS spekter cysteinu vyskytují i anomální pásy, jejichž poloha ve spektru je naznačená v grafu na obr. 14. Pro většinu anomálních pásů platí, že s rostoucí koncentrací cysteinu začaly tyto pásy ze spekter mizet, což je i v souladu s článkem [42] (tam však byla použita ještě větší koncentrace cysteinu, a to 0,01 M, a zároveň nižší koncentrace KCl, a to 0,02 M).

Anomální pás, vyskytující se ve spektru 0,2 M KCl v koloidu na 679 cm^{-1} , je v SERS spektrech cysteinu zřetelný pouze pro dvě nejnižší koncentrace cysteinu (do koncentrace $2,5 \cdot 10^{-8}\text{ M}$); u vyšších koncentrací již začíná být tento pás překrytý mnohem intenzivnějším pásem samotného cysteinu, který leží na vlnočtu přibližně 663 cm^{-1} .

Anomální pásy na 1447 , 1513 , 1592 cm^{-1} a velice slabý pás na 893 cm^{-1} byly v SERS spektrech cysteinu pozorovány v jeho čtyřech nejnižších koncentracích; pro koncentrace cysteinu vyšší, než 10^{-7} M , již tyto pásy v SERS spektrech cysteinu

nebyly přítomny. Podobně i další velice slabé anomální pásy na 1150 a 1274 cm^{-1} byly v SERS spektrech cysteinu pozorovány pouze ve dvou nejnižších koncentracích; pro koncentrace cysteinu vyšší, než $2,5 \cdot 10^{-8}$ M, již tyto pásy v SERS spektrech cysteinu rovněž nebyly přítomny.

Pás na 1180 cm^{-1} lze v SERS spektru cysteinu pozorovat pouze pro čtyři nejnižší koncentrace; s rostoucí koncentrací se však ve spektru začíná objevovat nový pás přibližně na 1187 cm^{-1} . Z provedených měření není zcela jasné, zda se skutečně jedná pouze o mírně posunutý anomální pás, avšak vzhledem ke značnému zvýšení intenzity tohoto pásu ve spektrech s vyššími koncentracemi cysteinu je pravděpodobné, že by se mohlo jednat spíše o pás příslušející vibracím cysteinu. Neobjasněná zůstává i interpretace anomálního pásu na 1347 cm^{-1} , který je v SERS spektru cysteinu pozorovatelný pro koncentrace nižší, než 10^{-6} M, a následně až při nejvyšší koncentraci $5 \cdot 10^{-5}$ M. Změna tvaru tohoto pásu při různých koncentracích cysteinu sice koresponduje s odlišným průběhem spektrálního pozadí, avšak ani zde nelze zcela vyloučit možnost, že by se při nejvyšší koncentraci mohlo jednat o pás příslušející rovněž vibracím cysteinu. V SERS spektrech cysteinu měřených na hydroxylaminovém koloidu v článku [42] byl navíc pozorován pás se středem na stejné pozici, který zde byl připsán valenčním vibracím skupiny atomů C–NH₂.

Jedním z nejintenzivnějších anomálních pásů ve spektru je pás na vlnótu 1080 cm^{-1} . Tento pás se vyskytuje ve všech SERS spektrech cysteinu mimo spektra s nejvyšší koncentrací, tedy $5 \cdot 10^{-5}$ M. Podobně se anomální pás na vlnótu 805 cm^{-1} , ačkoliv patří k nejslabším ve spektru, vyskytuje ve všech naměřených spektrech cysteinu, mimo spektra měřeného při koncentraci 10^{-6} M. I přesto, že se v našich měřeních tento pás vyskytoval již ve spektru samotného koloidu s KCl, byl v článku [42] tento pás připsán deformačním vibracím karboxylové skupiny molekuly cysteinu.

Z ostatních pásů v SERS spektrech cysteinu, které by již mohly příslušet vibracím samotné aminokyseliny, měly nejvyšší intenzitu ve spektrech pásy na 663 cm^{-1} a 745 cm^{-1} . Tyto dva pásy by ve spektrech klasického Ramanova rozptylu cysteinu mohly odpovídat pásům na 683 cm^{-1} , resp. 772 cm^{-1} . První ze zmiňovaných se připisuje valenční vibraci atomů C–S [42], což by mohlo naznačovat, že právě atom síry obsažený v cysteinu interaguje se stříbrným povrchem nejsilněji. Původ pásu na 745

cm^{-1} je dosud nejasný; překvapující je především jeho velká intenzita, která při koncentraci cysteinu 10^{-6} M dokonce převyšuje intenzitu pásu na 683 cm^{-1} , což dosud pravděpodobně v žádném článku věnovaném SERS spektru cysteinu [40, 42] nebylo publikováno. Oba tyto pásy lze v SERS spektrech cysteinu rozeznat již při koncentraci $2,5 \cdot 10^{-8}$ M, přitom střed pásu nacházející se na vlnočtu 663 cm^{-1} je při vyšších koncentracích cysteinu (10^{-5} M a $5 \cdot 10^{-5}$ M) posunutý asi o 7 cm^{-1} směrem do oblasti vyšších vlnočtů. Přibližně $2 \times$ větší pološířka pásu okolo $663/683 \text{ cm}^{-1}$ v SERS spektru oproti spektru klasického Ramanova rozptylu je dána zřejmě určitou distribucí orientací molekul aminokyseliny v blízkosti stříbrného povrchu (nehomogenní rozšíření spektrální čáry).

Se zvyšující se koncentrací cysteinu se v jeho SERS spektrech začínají objevovat některé další pásy, zejména pás okolo 1700 cm^{-1} , detekovatelný pro koncentrace cysteinu $5 \cdot 10^{-8}$ M a vyšší, pásy na 981 a 1034 cm^{-1} , detekovatelné pro koncentrace cysteinu 10^{-7} M a vyšší, pásy na 1224 , 1387 , 1575 a 1647 cm^{-1} , detekovatelné pro koncentrace cysteinu 10^{-6} M a vyšší, a pásy na 900 , 1298 a 1610 cm^{-1} , detekovatelné pouze pro dvě nejvyšší koncentrace cysteinu (10^{-5} M a $5 \cdot 10^{-5}$ M). Naproti tomu pás na 608 cm^{-1} byl při nižších koncentracích cysteinu (od $2,5 \cdot 10^{-8}$ M do 10^{-7} M) pozorovatelný posunutý asi o 8 cm^{-1} směrem k oblasti nižších vlnočtů a pro nejvyšší koncentraci ($5 \cdot 10^{-5}$ M) nebyl ve spektru pozorován vůbec. Stejně tak pás na 840 cm^{-1} , ačkoliv byl pozorovaný ve spektrech cysteinu o koncentracích 10^{-6} M a 10^{-5} M, ve spektru s koncentrací $5 \cdot 10^{-5}$ M pozorovaný nebyl. Tyto kvalitativní rozdíly ve spektrech by mohly odpovídat různým způsobům vázání molekul cysteinu na kovový povrch v závislosti na koncentraci molekul v roztoku.

Pás na 1575 cm^{-1} byl pro koncentraci cysteinu 10^{-6} M detekovatelný až po čase přibližně 10 minut po přípravě daného vzorku. Toto byl jediný zaznamenaný případ, kdy byl ve spektru pozorován pás až po určité době od přidání KCl, a nikoliv hned během první minuty po přípravě vzorku. Vzhledem k tomu, že k tomuto pásu lze těžko najít korespondující pás ve spektru klasického Ramanova rozptylu, lze předpokládat, že by se mohlo jednat o vibraci amorfního uhlíku vzniklého dekompozicí uhlíkatých látek v blízkosti kovového povrchu (což by odpovídalo i zmíněnému časovému vývoji tohoto pásu).

Tabulka 2: Výskyt pásů v naměřených SERS spektrech cysteinu na hydroxylaminovém koloidu

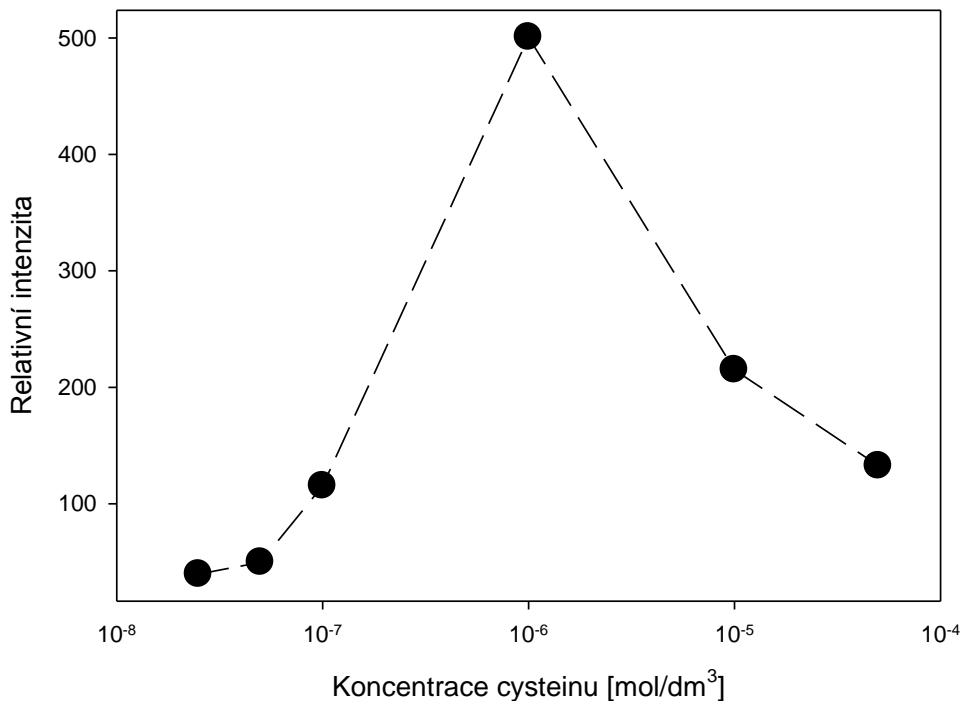
SERS	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	Raman	Anom.	[42]
608	x	600	600	600	✓	✓	x	623		623
663	x	✓	✓	✓	✓	670	670	683		663
679	✓	✓	x	x	x	x	x		679	
745	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	772		729
805	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓		805	802
840	x	x	x	x	✓	✓	x	875		
893	✓	✓	✓	✓	x	x	x		893	
900	x	x	x	x	x	✓	✓	939		896
981	x	x	x	✓	✓	✓	✓	999		978
1034	x	x	x	✓	✓	✓	1050	1073		1061
1080	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x		1080	
1150	✓	✓	x	x	x	x	x		1150	
1180	✓	✓	✓	✓	1187	1187	1187	1150	1180	1140
1224	x	x	x	x	✓	✓	✓	1216		1251
1274	✓	✓	x	x	x	x	x		1274	
1298	x	x	x	x	x	✓	✓	1275/1312		1298
1347	✓	✓	✓	✓	x	x	✓	1350	1340	1347
1387	x	x	x	x	✓	✓	✓	1402/1429		1400
1447	✓	✓	✓	✓	x	x	x		1447	
1513	✓	✓	✓	✓	x	x	x		1513	
1575	x	x	x	x	✓	✓	✓		Amorf. C	
1592	✓	✓	✓	✓	x	x	x		1592	
1610	x	x	x	x	x	✓	✓	1620		1622
1647	x	x	x	x	✓	✓	✓			1645 (anom.)
1700	x	x	✓	✓	✓	✓	✓	1734		

V tabulce je symbolicky znázorněno, které pásy byly při které měřené koncentraci cysteinu pozorovatelné a které ne. Koncentrace cysteinu jsou $c_1 = 10^{-8}$ M, $c_2 = 2,5 \cdot 10^{-8}$ M, $c_3 = 5 \cdot 10^{-8}$ M, $c_4 = 10^{-7}$ M, $c_5 = 10^{-6}$ M, $c_6 = 10^{-5}$ M, $c_7 = 5 \cdot 10^{-5}$ M. První sloupec značí polohu daného pásu v SERS spektru cysteinu [cm^{-1}]; čísla v jednotlivých sloupcích c_1 až c_7 značí případný posun daného pásu oproti pozici dané v prvním sloupci tabulky. V posledních 3 sloupcích je zaznamenána poloha možných korespondujících pásů ve spektru klasického Ramanova rozptylu cysteinu (obr. 15), poloha anomálních pásů směsi KCl v koloidu (obr. 14) a pro srovnání i polohy pásů SERS spektra cysteinu měřeného na hydroxylaminovém koloidu z článku [42]. Tučně jsou vyznačeny pásy, které lze na základě provedených měření považovat za důkaz přítomnosti cysteinu v měřeném vzorku.

Za důkaz přítomnosti cysteinu při měření jeho SERS spekter na hydroxylaminovém koloidu lze na základě provedených měření považovat existenci pásů na 663, 745, 840, 900, 981, 1034, 1224, 1298, 1387, 1610 a 1700 cm^{-1} , neboť poloha těchto pásů je dostatečně vzdálená od polohy anomálních pásů pocházejících ze směsi samotného koloidu a KCl, k těmto pásům lze snadno najít pravděpodobné

korespondující pásy ve spektru klasického Ramanova rozptylu cysteinu a mnohé z těchto pásů byly při měření SERS spekter cysteinu pozorovány už dříve [42], přitom k některým z nich byl přiřazen i příslušný vibrační pohyb jader [42]. Podrobnější přehled výskytu všech pásů ve všech naměřených spektrech cysteinu je zaznamenán v tabulce 2.

Jak plyne z grafu na obr. 17, intenzita některých pásů v SERS spektru cysteinu může s jeho rostoucí koncentrací růst, ale může i klesat. Všimneme si zde závislosti integrální intenzity pásu se středem okolo 663 cm^{-1} . Graf závislosti integrální intenzity tohoto pásu (vypočtené pomocí programu Spectra Calc) je na obr. 18. Z grafu plyne, že největší intenzitu má tento pás při koncentraci cysteinu 10^{-6} M a s dalším zvyšováním i snižováním koncentrace tato intenzita klesá. Dalšímu růstu signálu při zvýšení koncentrace měřené látky pak může bránit to, že při vyšší koncentraci měřené látky se už ne všechny její molekuly mohou dostat k povrchu stříbrných nanočástic, a ne všechny tak přispívají do výsledného signálu. Nejvyšším intenzitám ve spektru by pak měla odpovídat jistá nasycená hodnota koncentrace měřeného vzorku, při které dochází k optimálnímu pokrytí koloidních nanočástic molekulami měřené látky. Jak plyne z grafů na obr. 17 a 18, pro cystein byla nalezena tato optimální koncentrace jako $\approx 10^{-6}\text{ M}$. Při vyšších koncentracích může docházet k agregaci měřené látky, ke změně jejího způsobu vázání na kovový povrch a také k nižší účinnosti obsazování hot-spotů, proto může při dalším zvyšování koncentrace signál dokonce klesat. Ke snižování počtu rozptylujících center pak dochází samozřejmě i při snižování koncentrace měřené látky, a tím pádem k dalšímu poklesu signálu. Poznamenejme, že podobná závislost signálu na koncentraci je pro SERS poměrně charakteristická, viz např. [40, 62, 83].



Obrázek 18: Závislost relativní intenzity pásu cysteinu na 663 cm^{-1} na koncentraci cysteinu. Integrální intenzita tohoto pásu byla vypočtena pomocí programu Spectra Calc v oblasti od 620 cm^{-1} do 700 cm^{-1} .

Faktor zesílení lze v SERS experimentu definovat jako poměr integrálních intenzit nejsilnějšího pásu v SERS spektru a spektru klasického Ramanova rozptylu, měřených za stejných experimentálních podmínek a normovaných v obou případech na počet rozptylujících center [7]. Jelikož lze ale počet rozptylujících center často jen stěží odhadnout, zavádíme dále tzv. analytický faktor zesílení, kde jsou příslušné intenzity v SERS spektru a spektru klasického Ramanova rozptylu normovány na koncentrace použitého vzorku [7]. I zde je ovšem důležité, aby byla obě spektra měřena za stejného experimentálního uspořádání. Jelikož jsme v našich měřeních používali při měření SERS spekter a spekter klasického Ramanova rozptylu různý výkon laseru a různé doby expozice, nelze faktor zesílení stanovit zcela přesně, ale spíše jen řádově odhadnout. Faktor zesílení takto odhadneme pro koncentraci cysteinu 10^{-6} M pro pás ze spektra na 663 cm^{-1} , jehož integrální intenzitu porovnáme s integrální intenzitou pásu ve spektru klasického Ramanova rozptylu $0,05\text{ M}$ cysteinu na 683 cm^{-1} . Tyto integrální intenzity, získané pomocí programu Spectra Calc, normujeme na koncentraci vzorku, výkon laseru ($0,3\text{ W}$ v případě Ramanova rozptylu a $0,12\text{ W}$ v případě povrchem zesíleného Ramanova

rozptylu) a dobu expozice (5 s v případě spektra Ramanova rozptylu a 1 s v případě povrchem zesíleného Ramanova rozptylu). Údaje, ze kterých je faktor zesílení vypočten, jsou shrnuty v tabulce 3. Tímto způsobem byl faktor zesílení určen pro pásy na 663/683 cm^{-1} a nejlepší změřené spektrum (při koncentraci 10^{-6} M) jako $EF \approx 8 \cdot 10^5$.

Jinou možností, jak v SERS experimentu odhadnout faktor zesílení, je provést normování na intenzitu jiného pásu, vyskytujícího se ve spektru jak Ramanova rozptylu, tak povrchem zesíleného Ramanova rozptylu, přičemž jeho intenzita se v přítomnosti koloidu příliš nemění. V našem případě je prakticky jedinou možností, jak toto provést, zvolit jako normalizační faktor intenzitu pásu deformačních vibrací vody. Tento způsob částečně pomáhá odstranit nepřesnost v předchozím výpočtu danou nelineárním růstem intenzity signálu Ramanova rozptylu s rostoucím výkonem laseru, resp. dobou expozice. Touto metodou vypočtený faktor zesílení vychází pro pásy na 663/683 cm^{-1} a nejlepší naměřené spektrum jako $EF \approx 10^6$. Ačkoliv se tyto dva faktory zesílení, vypočtené různými metodami, liší zhruba o 25 %, je tento faktor zesílení přibližně 6× až 9× větší, než faktor zesílení publikovaný v [40] pro SERS spektrum cysteinu, měřené na stejném typu koloidu.

Tabulka 3: Údaje pro výpočet faktoru zesílení cysteinu

	Integrální intenzita pásu cysteinu	Integrální intenzita pásu vody	Koncentrace cysteinu	Výkon laseru	Doba expozice
SERS	$5,1 \cdot 10^5$	$7,5 \cdot 10^5$	10^{-6} M	0,12 W	1 s
Raman	$4 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^7$	0,05 M	0,3 W	5 s

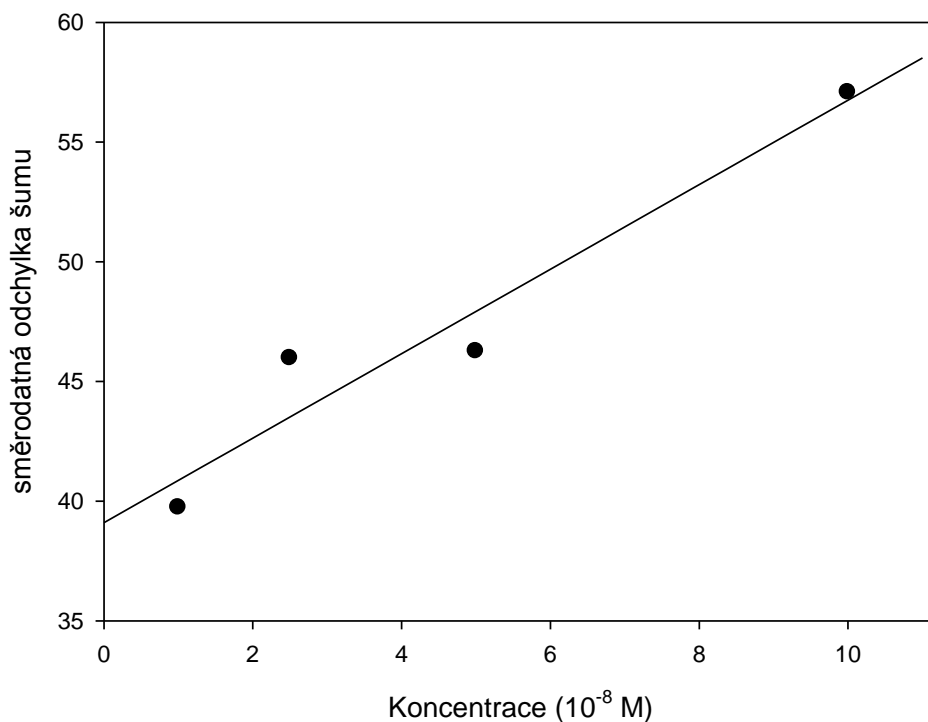
Integrální intenzita pásu cysteinu byla vypočtena pomocí programu Spectra Calc v oblasti od 620 cm^{-1} do 700 cm^{-1} ; podobně byla vypočtena i integrální intenzita pásu cysteinu bez přítomnosti koloidu (se středem okolo 683 cm^{-1}) a integrální intenzity pásu deformačních vibrací vody se středem okolo 1635 cm^{-1} . Při normování na dobu expozice a výkon laseru vychází faktor zesílení jako $EF \approx 8 \cdot 10^5$, při normování na intenzitu deformačních vibrací vody vychází faktor zesílení jako $EF \approx 10^6$. Při výpočtu integrální intenzity pásu deformačních vibrací vody v SERS spektru cysteinu byl brán do úvahy i odečet integrálních intenzit pásů cysteinu, které se s pásem vody překrývají.

Podmínkou detekce látky o dané koncentraci pomocí klasického nebo povrchem zesíleného Ramanova rozptylu je rozlišení dostatečného množství pásů v jejím spektru s dostatečným poměrem signál/šum a dostatečným odstupem od pozadí. Odpověď na otázku, jaké podmínky musí být splněny, aby již bylo možno danou látku ve spektru uspokojivě identifikovat, však není zcela jednoznačná. V článku [84]

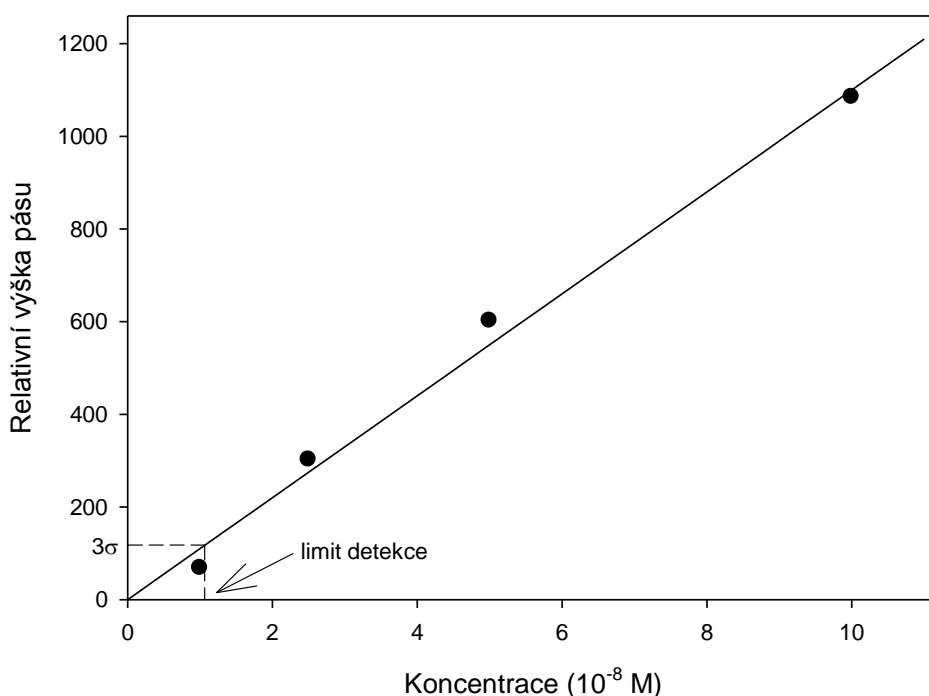
se zavádí tzv. limit detekce (LOD, z angl. limit of detection), což je nejnižší koncentrace vzorku, u které lze z provedených měření rozhodnout, zda naměřený signál skutečně pochází z měřeného vzorku, nebo zda se jedná pouze o šum pozadí. Podle definice v [84] lze limit detekce vyjádřený jako koncentrace vypočítat jako trojnásobek standardní odchylky σ tzv. prázdného vzorku, vynásobený citlivostí S (sklonem kalibrační křivky neboli převrácenou hodnotou směrnice přímky vyjadřující závislost standardní odchylky šumu na koncentraci, je-li tato závislost lineární). Standardní odchylku prázdného vzorku σ lze přitom získat extrapolací funkční závislosti standardní odchylky šumu (měřené v místě signálu) na koncentraci vzorku směrem k nulové hodnotě koncentrace. Standardní odchylku šumu získáme z diferenčního spektra dvou spekter měřených za stejného experimentálního uspořádání, popř. z diferenčního spektra originálně naměřeného spektra a téhož spektra vyhlazeného pomocí vhodné počítačové procedury. Z kalibrační křivky (závislosti intenzity signálu na koncentraci vzorku) lze poté snadno určit hodnotu koncentrace, které přísluší hodnota signálu 3σ – tato hodnota koncentrace pak určuje právě hledaný limit detekce.⁹ Výhodou takového postupu je, že takto definovanou hodnotu limitu detekce lze určit zcela objektivně, a navíc aniž bychom vzorek s touto koncentrací vůbec měřili. Tímto postupem nyní určíme limit detekce pro pás cysteinu se středem okolo 745 cm^{-1} . Tomuto pásu jsme dali přednost před pásem se středem okolo 663 cm^{-1} , protože v blízkosti pásu na 663 cm^{-1} se nachází anomální pás, jehož přítomnost by mohla vést k chybně určenému limitu detekce. K fitování byla použita spektra o 4 nejnižších naměřených koncentracích, pro která lze pokles intenzity i směrodatné odchylky šumu s klesající koncentrací vzorku považovat s dostatečnou přesností za lineární. Směrodatná odchylka šumu byla určena pro interval od 710 cm^{-1} do 790 cm^{-1} , neboť při výpočtu směrodatné odchylky šumu z celého spektra by byla kvůli vysokému pozadí v oblasti vyšších vlnočtů tato hodnota přibližně o 10 % nadhodnocena. Tato hodnota byla vypočtena pomocí rozdílu originálně naměřeného spektra a spektra vyhlazeného Savitzkeho-Golayovým filtrem (stupně 25) pomocí programu Spectra Calc. Relativní výška pásu

⁹ To, že se jedná právě o trojnásobek standardní odchylky šumu, je spíše subjektivní volbou. Mimo limitu detekce se někdy uvádí i tzv. limit kvantifikace, který lze určit podobným způsobem, jako limit detekce, pouze místo trojnásobku standardní odchylky šumu se bere její desetinásobek.

byla určena jako rozdíl intenzit v maximu daného pásu (okolo 745 cm^{-1}) a v jeho minimu (okolo 715 cm^{-1}). Závislosti směrodatné odchytky šumu a relativní výšky pásu na koncentraci jsou zobrazeny v grafech na obr. 19 a 20. Tímto způsobem byl naitován limit detekce jako koncentrace cysteinu $c \approx 1,1 \cdot 10^{-8}\text{ M}$.



Obrázek 19: Závislost směrodatné odchytky šumu SERS spekter cysteinu na koncentraci. Směrodatná odchytky šumu byla získána z rozdílu originálně naměřeného spektra a spektra vyhlazeného Savitzkeho-Golayovým filtrem pomocí programu Spectra Calc a spočtena pro interval vlnočtů $710\text{ až }790\text{ cm}^{-1}$. Finální molární koncentrace KCl ve vzorcích byla $0,2\text{ M}$, celková doba akumulace spekter byla 1 minuta . Směrodatná odchytky prázdného vzorku byla naitována jako $\sigma = 39 \pm 2$.



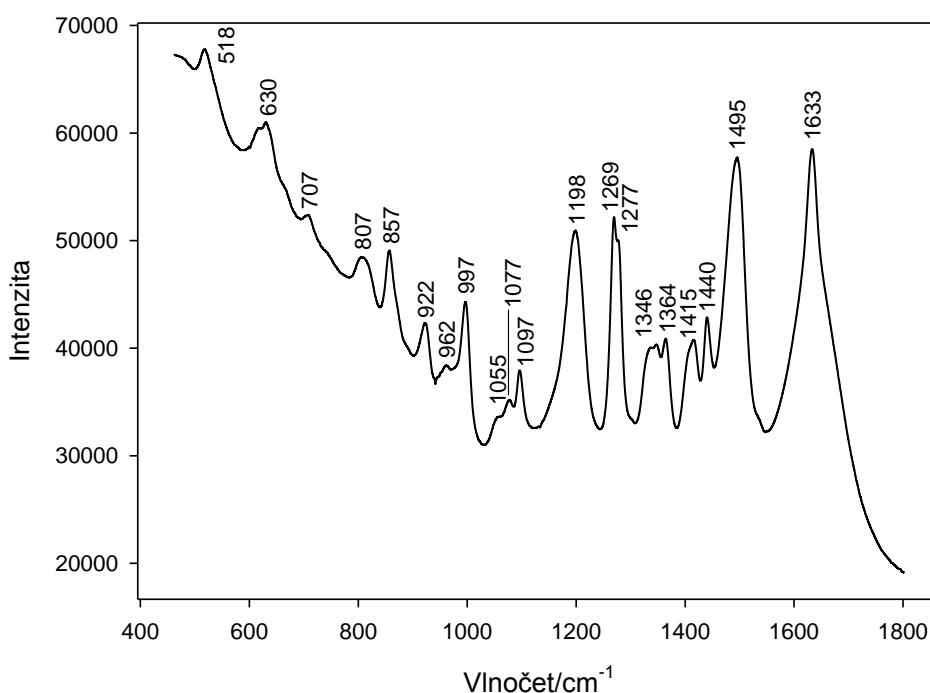
Obrázek 20: Závislost relativní výšky pásu okolo 745 cm^{-1} na koncentraci cysteinu. Relativní výška pásu byla určena jako rozdíl mezi maximální hodnotou intenzity okolo 745 cm^{-1} a minimální hodnotou intenzity v oblasti $(715 \pm 5)\text{ cm}^{-1}$. Převrácená hodnota směrnice lineární funkce vyjadřující závislost relativní výšky pásu na koncentraci určuje citlivost S (sklon kalibrační křivky). Číselná hodnota této směrnice byla naitována metodou lineární regrese jako 110 ± 4 . Odtud určíme koncentraci, které přísluší relativní výška pásu $3\sigma = 117$, jako $c \approx 1,1 \cdot 10^{-8}\text{ M}$.

Protože přítomnost jediného pásu měřené molekuly ještě nemusí zcela prokazatelně svědčit o přítomnosti dané molekuly v roztoku, je v mnoha případech praktičtější uvádět tzv. spektrální limit detekce, podle kterého je třeba k identifikaci měřené látky ve spektru rozlišit zhruba 3 až 5 jejích pásů. Takto stanovený detekční limit lze odhadnout spíše jen řádově a jeho určení je do značné míry subjektivní. Podle údajů v tabulce 2 lze spektrální limit detekce pro cystein stanovit okolo koncentrace $\approx 5 \cdot 10^{-8}\text{ M}$, neboť při této koncentraci již ve spektru cysteinu můžeme rozeznat alespoň tři pásy měřené molekuly (které nepatří mezi pásy označené v tabulce 2 jako anomální).

6.1.5. Měření na histidinu

Další aminokyselinou, u které jsme se pokusili optimalizovat podmínky pro získání SERS spekter, byl histidin. Pro porovnání bylo nejprve naměřeno spektrum

klasického Ramanova rozptylu vodného roztoku histidinu, které je zobrazeno v grafu na obr. 21. Toto spektrum bylo změřeno s molární koncentrací histidinu 0,25 M a s celkovou dobou akumulace 30 minut. Zde prezentované spektrum je bez jakýchkoliv dalších úprav i odečtu pozadí. Přiřazení některých pásů ve spektru jednotlivým molekulárním vibracím histidinu lze najít např. v [64]. Pás na 1633 cm^{-1} zřejmě pochází od histidinu, ale ve spektru se překrývá s pásem deformačních vibrací vody.

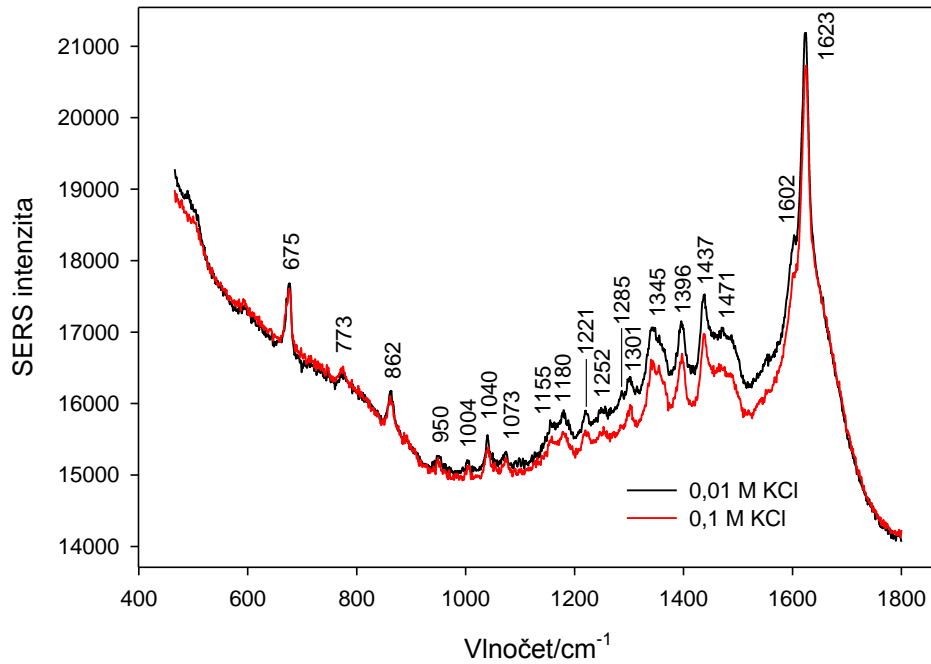


Obrázek 21: Ramanovo spektrum histidinu. Molární koncentrace histidinu je 0,25 M, celková doba akumulace 30 minut, výkon laseru 0,3 W. Zde prezentované spektrum je bez jakýchkoliv dalších úprav i odečtu pozadí.

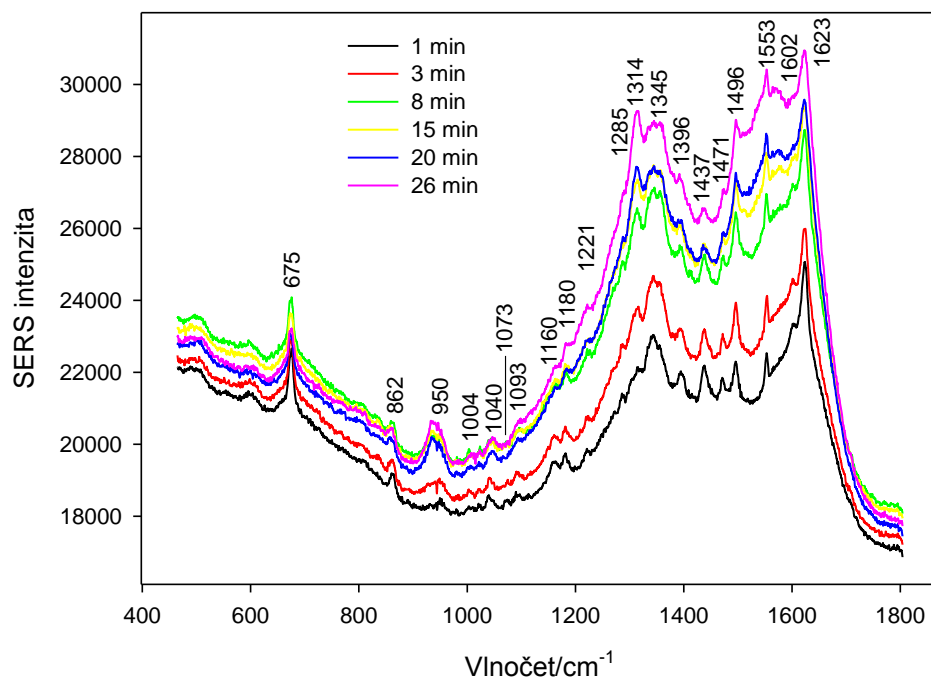
SERS spektra histidinu byla zkoumána již před několika lety v článku [64] měřením na citrátovém koloidu s koncentrací histidinu $\approx 10^{-3}$ M. V našem případě jsme pro měření použili hydroxylaminový koloid, stejně jako v případě měření na cysteinu, a pokusili jsme se optimalizovat podmínky, za kterých by bylo možno snížit detekovatelnou koncentraci histidinu oproti koncentraci měřené v článku [64]. Jako agregační činidlo byl použit KCl, stejně jako v případě cysteinu. Optimální finální molární koncentrace KCl ve výsledné směsi byla při předběžných měřeních SERS spekter histidinu (s koncentrací histidinu $5 \cdot 10^{-4}$ M) shledána jako 0,01 M, neboť další

zvyšování koncentrace KCl již nevedlo k dalšímu zvyšování signálu. Na rozdíl od spekter cysteinu jsme však v případě histidinu sledali značnou nereprodukovatelnost ve spektrech vzorků s prakticky stejnou molární koncentrací histidinu, ovšem měřených různou dobu po přípravě hydroxylaminového koloidu (obr. 22 a 23). Spektrum histidinu měřené přibližně 3 měsíce od přípravy koloidu vykazovalo strmý nárůst intenzity pozadí v oblasti zhruba od 1000 cm^{-1} směrem k vyšším hodnotám vlnočtu. Takto vzniklé široké pásy se v literatuře [49 – 51] připisují amorfnímu uhlíku, který vzniká tepelným rozkladem a fotodekompozicí uhlíkatých sloučenin obsažených ve vzorku vlivem intenzivního laserového záření. Přítomnosti pásů grafitického uhlíku jsme se nezbavili ani po přidání malého magnetického míchadla do kyvety s měřeným vzorkem. Účelem míchadla mělo být docílení větší homogenity měřeného vzorku, částečná eliminace rozkladu uhlíkatých sloučenin a snaha zajistit větší reprodukovatelnost naměřených dat. Ani při systematickém používání míchadla však nedocházelo k systematickému zlepšování signálu; naopak použití míchadla i při jeho pečlivém omývání několikrát vedlo k výskytu dalších, velice silných anomálních pásů v naměřených spektrech, které se opakovaně objevovaly i při měření odlišných aminokyselin. Z tohoto důvodu jsme nadále magnetické míchadlo při měření SERS spekter přestali používat.

Časová závislost SERS spekter histidinu o molární koncentraci $2,5 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ a s $0,01\text{ M}$ KCl je zobrazena v grafu na obr. 23. Na rozdíl od časově závislých SERS spekter cysteinu dochází v případě histidinu s rostoucím časem k nárůstu celkové intenzity signálu, což je dáno zejména postupnou dekompozicí uhlíkatých sloučenin přítomných ve vzorku a vysokou intenzitou pásů grafitického uhlíku v oblasti od zhruba 1000 cm^{-1} směrem k oblasti vyšších vlnočtů, která s časem dále roste.



Obrázek 22: SERS spektra histidinu na hydroxylaminovém koloidu. Molární koncentrace histidinu je $5 \cdot 10^{-4}$ M, finální molární koncentrace KCl je 0,01 M, resp. 0,1 M, celková doba akumulace je 1 minuta. Spektrum bylo změřeno 1 týden po přípravě hydroxylaminového koloidu.



Obrázek 23: Časová závislost SERS spekter histidinu na hydroxylaminovém koloidu. Molární koncentrace histidinu je $2,5 \cdot 10^{-4}$ M, finální molární koncentrace KCl je 0,01 M, celková doba akumulace všech spekter je 1 minuta. Spektra byla změřena 3 měsíce po přípravě hydroxylaminového koloidu. Časy v legendě značí zpoždění začátků jednotlivých měření vůči době, kdy bylo do směsi koloidu a aminokyseliny přidáno příslušné množství KCl. S rostoucím časem se zvětšuje intenzita pásů grafitického uhlíku.

S anomálními pásy, jejichž poloha je zaznamenána v grafu na obr. 14, se ve spektru histidinu překrývají pásy na 675, 1073, 1155/1160, 1180 a 1345 cm^{-1} . Další anomální pásy, pocházející ze směsi koloidu + KCl, ve spektrech histidinu přítomné nejsou, což je obdoba výsledku získaného při měření SERS spekter cysteinu, při kterém s rostoucí koncentrací cysteinu začaly mnohé anomální pásy ze spekter mizet. Molární koncentrace histidinu při měření SERS spekter přítomná byla téměř o 1 řád větší, než nejvyšší měřená koncentrace cysteinu, a navíc finální molární koncentrace KCl byla v případě histidinu 20× menší, než v případě cysteinu. Přesto je však pás na 675 cm^{-1} ve spektrech histidinu přibližně 5× intenzivnější, než tentýž pás ve spektru samotné směsi koloidu + KCl, což připouští možnost, že by se mohlo jednat o pás příslušející histidinu (odpovídající ve spektru klasického Ramanova rozptylu histidinu pásu na 630 nebo 707 cm^{-1}). Anomální pásy na 1080, 1150 a 1180 cm^{-1} sice v SERS spektrech cysteinu s rostoucí koncentrací aminokyseliny mizely, ovšem na základě toho nelze uspokojivě stanovit, zda pásy na 1073, 1155/1160 a 1180 cm^{-1} ve spektrech histidinu skutečně svědčí o přítomnosti měřené molekuly, nebo zda se jedná pouze o pozůstatek anomálních pásů. Širší pás se středem okolo 1345 cm^{-1} je možno připsat buďto vibracím histidinu (ve spektrech klasického Ramanova rozptylu byl přítomný pás, který by tomu velice dobře odpovídal), nebo vibracím uhlíkatých produktů, vyskytujících se v blízkosti kovového povrchu; v literatuře je tento pás nazýván pás D [50].

Mezi nejintenzivnější pásy SERS spektra histidinu patří pásy na 862, 1040, 1396, 1437, 1471 a 1623 cm^{-1} , které byly pozorovány ve všech získaných SERS spektrech histidinu. Poloha některých dalších pásů je vyznačena v grafech na obr. 22 a 23 a v tabulce 4, tyto pásy jsou však velice slabé, často téměř na hranici limitu detekce, z nichž většina je překryta strmým spektrálním pozadím, které znesnadňuje jejich další interpretaci.

Výrazný rozdíl, kterým se spektra histidinu v grafu na obr. 23 liší od spekter z grafu na obr. 22, je mimo přítomnosti silného pozadí, příslušejícího amorfnímu uhlíku, také přítomnost dalších pásů na vlnočtech okolo 1496 a 1553 cm^{-1} . Původ těchto pásů není zcela jasný, ale zřejmě se nejedná o pásy příslušející histidinu, neboť tyto dva pásy se opakovaně vyskytovaly i ve spektrech jiných aminokyselin (mimo

cysteinu). Jedno z možných vysvětlení je, že se jedná o pásy uhlíkových kontaminantů vzniklých tepelným rozkladem nebo fotodekompozicí organických molekul v blízkosti kovového povrchu. Navíc lze těžko najít korespondující pásy se spektrem klasického Ramanova rozptylu histidinu a pásy na 1496 a zároveň 1553 cm^{-1} .

Tabulka 4: Výskyt pásů v naměřených SERS spektrech histidinu na hydroxylaminovém koloidu

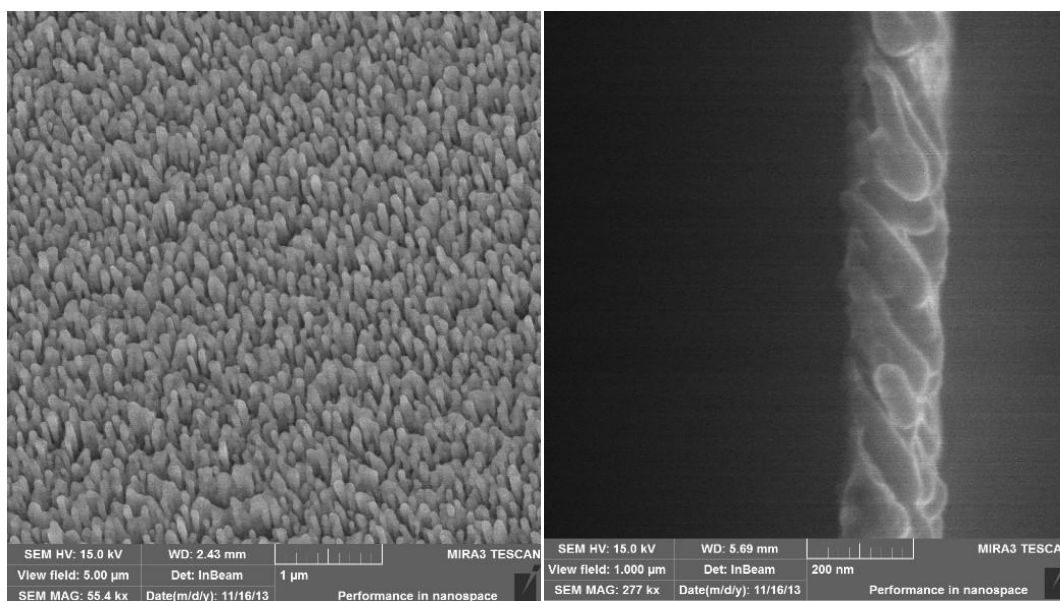
SERS	$5 \cdot 10^{-4}$ M	$2,5 \cdot 10^{-4}$ M	Raman	Anom.	[64]
675	✓	✓	630/707	679	
773	✓	×	807		
862	✓	✓	857		856
950	✓	✓	922/962		919/961
1004	✓	✓	997		
1040	✓	✓	1055		1057
1073	✓	✓	1077	1080	
1093	×	✓	1097		
1155	✓	1160		1150	
1180	✓	✓		1180	1182
1221	✓	✓	1198		
1252	✓	×	1269		1267
1285	✓	✓	1277		
1301	✓	1314			
1345	✓	✓	1346	1340	1353
1396	✓	✓	1415		1412
1437	✓	✓	1440		
1471	✓	✓	1495		1477
1496	×	✓		Amorf. C	
1553	×	✓		Amorf. C	
1602	✓	✓			
1623	✓	✓	1633		1623

V tabulce je symbolicky znázorněno, které pásy byly při jednotlivých měřeních spekter histidinu pozorovatelné, a které ne. Spektrum s koncentrací $5 \cdot 10^{-4}$ M bylo získáno týden po přípravě koloidu a spektrum s koncentrací $2,5 \cdot 10^{-4}$ M tři měsíce po přípravě koloidu. První sloupec značí polohu daného pásu v SERS spektru histidinu [cm^{-1}]; čísla v dalších dvou sloupcích značí případný posun daného pásu oproti pozici dané v prvním sloupci tabulky. V posledních 3 sloupcích je zaznamenána poloha možných korespondujících pásů ve spektru klasického Ramanova rozptylu histidinu (obr. 21), poloha anomálních pásů (obr. 14) a pro srovnání i některé polohy pásů SERS spektra histidinu z článku [64], byť měřeného na citrátovém koloidu. Tučně jsou vyznačeny pásy, které lze na základě provedených měření považovat za důkaz přítomnosti histidinu v měřeném vzorku.

6.2. Měření na stříbrných GLADech

6.2.1. Příprava a charakterizace stříbrných GLADů

Povrchy, na kterých byla testována možnost získání SERS spekter některých biomolekul v druhé části práce, byly stříbrné GLADy.¹⁰ Jednalo se o substráty, jejichž přípravu zajišťoval na Katedře makromolekulární fyziky MFF UK kolega Mgr. Martin Petr. Princip přípravy těchto povrchů je popsán v kapitole 3.2. Sloupcovité struktury stříbra vznikaly na povrchu křemíkové destičky metodou magnetronového napařování stříbrného terče s konstantním proudem 0,3 A procházejícím magnetronem. Depozice probíhala ve vakuové komoře za tlaku 0,18 Pa, zabezpečované pomocí rotační a difúzní vývěvy. Vzdálenost mezi magnetronem a substrátem byla 10 cm a úhel napařování vůči normále substrátu činil 85°. Jako pracovní plyn byl použit argon, přičemž celková doba depozice byla nastavena na 15 minut. Snímky připravených povrchů byly pořízeny pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Tescan Mira III v lomu i v pohledu zeshora, oboje při použitím urychlovacím napětí 15 kV (obr. 24).



Obrázek 24: SEM snímky stříbrných GLADů. V levém obrázku při pohledu zeshora, v pravém obrázku při pohledu v lomu.

¹⁰ V dalším textu budeme pro uvedené povrchy používat zkratku GLAD namísto OAD, i když při jejich přípravě nedocházelo k rotaci substrátu podél jeho normály. Držíme se zde názvu zavedeného na Katedře makromolekulární fyziky MFF UK, kde byly uvedené kovové povrchy připravovány, ačkoliv to neodpovídá názvosloví používanému např. v [28] a [44], viz kapitola 3.2. Zdá se, že uvedená terminologie není v odborné literatuře dosud zcela jednoznačná.

6.2.2. Mapování stříbrných GLADů

Jelikož se SERS intenzita zkoumané molekuly měřená v přítomnosti pevného kovového povrchu může díky přítomnosti hot-spotů v jednotlivých místech vzorku značně lišit, rozhodli jsme se pro charakterizaci homogenity příslušného povrchu z hlediska velikosti jeho SERS zesílení provést Ramanovo mapování. Ovládací software Ramanova mikrospektrometru dovoluje naprogramovat na měřeném vzorku síť bodů, ze kterých lze měřit signál, a celý proces měření tak zautomatizovat. K mapování stříbrných GLADů byla použita methylenová modř, což je v SERS spektroskopii často používaná modelová molekula z důvodu jejího vysokého SERS účinného průřezu. Pevné vzorky o velikosti přibližně $0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$ byly pro účely mapování na 1 hodinu ponořeny do 10^{-6} M roztoku methylenové modři, poté volně položeny na podložní sklíčko a opatrně osušeny sprejem obsahujícím netečný plyn. Všechna SERS spektra měřená na stříbrných GLADech byla získána s excitací He-Ne laserem o vlnové délce 632,8 nm, neboť měření s touto vlnovou délkou dávalo vždy větší intenzitu pásů, než měření s dalšími dostupnými lasery s vlnovými délkami 514 a 785 nm.

Série spekter byly zpracovány v programu Cell Viewer, vytvořeném v prostředí Matlab dr. Janem Palackým. Tento program zpracovává mapu naměřených spekter pomocí faktorové analýzy, konkrétně metodou Singular Value Decomposition (SVD, [85]). Z hlediska faktorové analýzy je vhodné nahlížet na každé originálně naměřené spektrum¹¹ jako na vektor o velmi vysoké dimenzi n (v našem případě $n = 1024$, což je počet pixelů detektoru). Při algoritmu SVD je série originálně naměřených spekter $Y_i(t)$ ($i = 1, \dots, N$, kde N je počet naměřených spekter) rozložena na lineární kombinaci subspekter $U_j(t)$ ($j = 1, \dots, N$), která tvoří ortonormální bázi vektorového prostoru generovaného originálně naměřenými spektry. Formálně tedy pro všechna $j, k \in \{1, \dots, N\}$ platí:

$$\langle U_j(t), U_k(t) \rangle = \sum_{t=1}^n U_j(t) \cdot U_k(t) = \delta_{jk}, \quad (6.1)$$

¹¹ Může se jednat buďto přímo o originálně naměřená spektra, nebo o spektra vzniklá vhodnou úpravou originálně naměřených spekter, např. spektra, od kterých již bylo odečteno pozadí, nebo o vyčlenění originálně naměřených spekter pouze na určitém spektrálním intervalu.

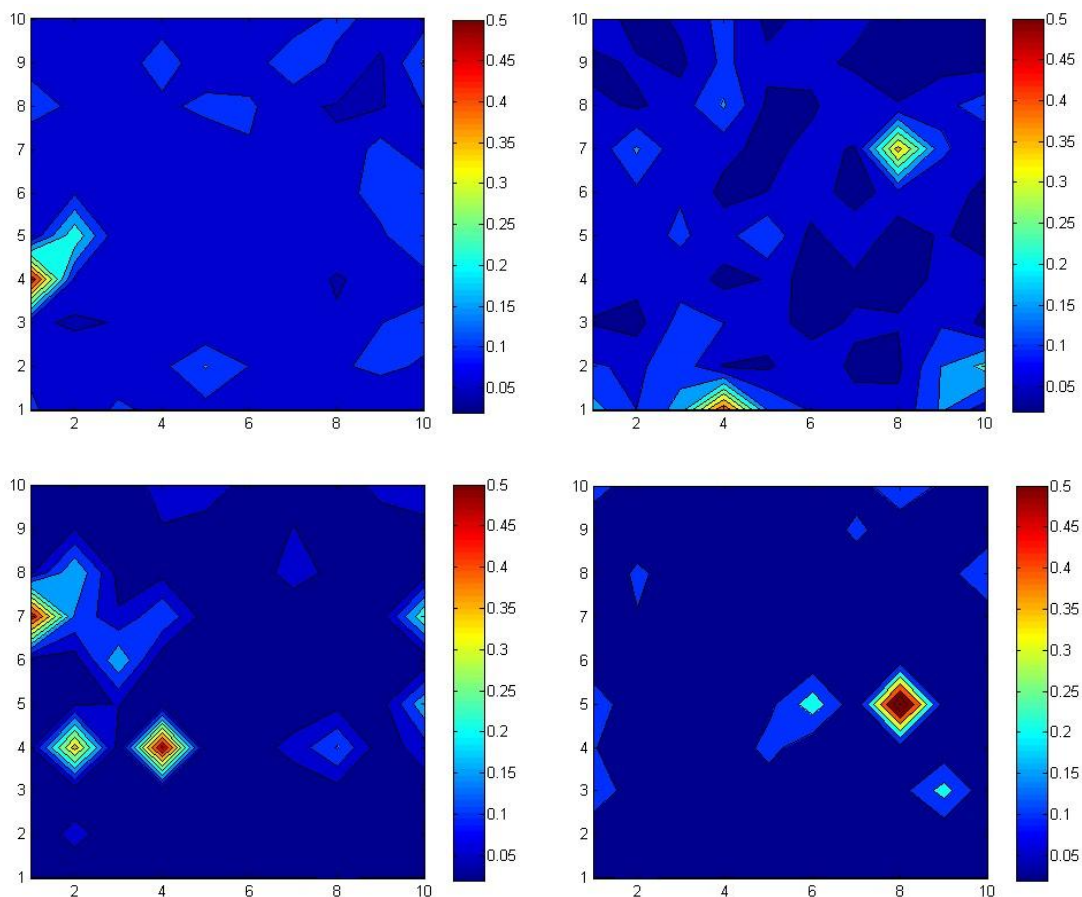
kde symbolem $\langle \cdot, \cdot \rangle$ značíme skalární součin definovaný rovněž předchozím vztahem (6.1), tedy standardně po složkách. Jednotlivá počáteční spektra Y_i pak lze zpětně vyjádřit jako lineární kombinaci subspekter U_j s určitými parametry jisté unitární matice V a vektoru W . Formálně platí:

$$Y_i(t) = \sum_{j=1}^N W_j V_{ij} U_j(t), \quad (6.2)$$

kde W_j , resp. V_{ij} , kde $i, j = 1, \dots, N$, je vektor, resp. matice, obojí vypočtené podle daného algoritmu. Čísla W_j se nazývají singulární čísla, která udávají relativní statistickou váhu jednotlivých subspekter. Jelikož se v našem případě nejednalo o soubor naměřených spekter s jistým systematicky se měnícím parametrem, ale v jednotlivých spektrech (získaných z různých míst vzorku) docházelo víceméně pouze ke kolísání intenzity, můžeme vzít za referenční spektrum, ke kterému budeme vztahovat intenzity všech originálně naměřených spekter v různých místech vzorku, přímo první subspektrum. První subspektrum totiž v našem případě odpovídá jakémusi „průměru“ všech spekter změřených v různých místech vzorku, ačkoliv přímý fyzikální význam (stejně jako subspektra s dalšími pořadovými čísly) samo o sobě nemá.¹²

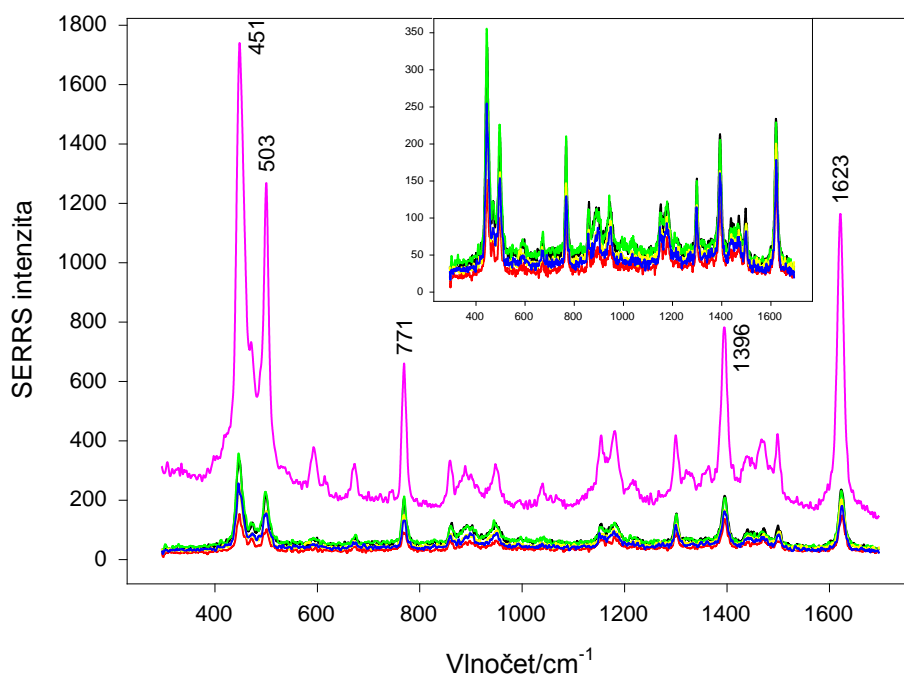
Pomocí programu Cell Viewer byla relativní intenzita spekter v jednotlivých místech vzorku (definovaná pro každé z i naměřených spekter jako velikost čísla V_{i1}) vyhodnocena graficky pomocí barevné škály, ve které tmavě modrá barva značí relativně nejnižší intenzitu spekter a červená barva svědčí o nejvyšších intenzitách spekter naměřených v daném bodě, tj. o přítomnosti hot-spotů. Z takového grafického vyjádření lze snadno usoudit na homogenitu povrchu z hlediska SERS zesílení (viz obr. 25).

¹² Jelikož byla doba akumulace spekter pouze 1 s, může být intenzita některých spekter zkreslena i vznikem náhodného signálu na detektoru, např. přítomností kosmického záření (při delších akumulacích počítačový program tyto jevy sám automaticky eliminuje). Toto zkreslení se ale nejčastěji projevuje až u subspekter s vyšším pořadovým číslem.



Obrázek 25: Mapy methylenové modři na stříbrných GLADech. Vzorky byly na 1 hodinu ponořeny do roztoku 10^{-6} M methylenové modři. Dvě spodní mapy byly získány na odlišné várce stříbrných GLADů, než dvě svrchní mapy. Stupnice barevné škály udává relativní statistickou váhu, s jakou do originálně naměřeného spektra v daném bodě přispívá první subspektrum. Spektra byla zpracována na spektrálním intervalu od 300 do 1700 cm^{-1} a bez jakýchkoliv dalších úprav pozadí. Vzdálenost dvou sousedních bodů, ze kterých byla získána spektra, je $5\text{ }\mu\text{m}$; celková velikost každé mapy je tedy $50 \times 50\text{ }\mu\text{m}^2$.

Výsledky mapování ukázaly, že i na opakovaně připravených várkách stříbrných GLADů vykazuje přibližně 2 až 5 % plochy vzorku vlastnosti hot-spotů. V těchto místech byla intenzita získaných spekter přibližně o 1 řád větší, než intenzita na ostatních místech vzorku (viz obr. 26).



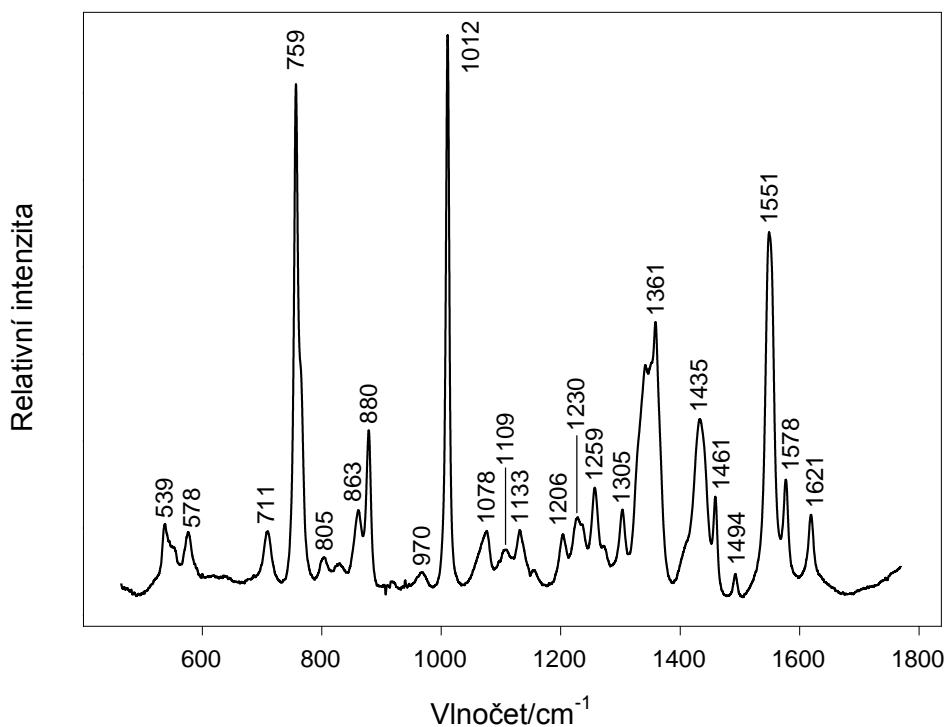
Obrázek 26: Ukázka SERS spekter methylenové modři na stříbrných GLADech – originálně naměřená spektra bez jakýchkoliv úprav pozadí. Vzorky byly na 1 hodinu ponořeny do roztoku methylenové modři o molární koncentraci 10^{-6} M. V grafu je prezentováno prvních 5 spekter získaných z levé horní mapy na obr. 25 a spektrum odpovídající hot-spotu téže mapy v poloze odpovídající souřadnicím [1,4]. Polohy nejintenzivnějších pásů ve spektru jsou vyznačeny. Doba akumulace 1 spektra byla 1 s, při měření byl použit filtr D2.

Jako modelové biomolekuly pro testování stříbrných GLADů byly, podobně jako u hydroxylaminového koloidu, vybrány aminokyseliny cystein, histidin a tryptofan, dále proteiny albumin a lysozym a některé porfyriny. Jelikož ponořování stříbrných substrátů do zásobních roztoků měřených látek nevedlo (mimo porfyrinů) ani po hodinovém ponoření k dostatečně silnému signálu, rozhodli jsme se nadále připravovat vzorky nakápnutím cca 2 μ l kapky zásobního roztoku měřené látky na substrát, přičemž kapka byla následně ponechána přibližně 20 až 30 minut k zaschnutí. Nízký SERS signál při ponořování a následném sušení může být vysvětlen tím, že při této proceduře se molekuly měřené látky nedokážou dostatečně pevně navázat na povrch substrátu, zatímco při nakápnutí a následném zaschnutí dochází v určitých místech zaschlé kapky k zahušťování koncentrace měřených molekul, které již mohou poskytovat dostatečně silný SERS signál. Nevýhodou tohoto způsobu přípravy vzorků je však menší homogenita SERS signálu, získaného v různých místech vzorku, než jaká by odpovídala mapám na obr. 25.

Metoda měření povrchem zesíleného Ramanova rozptylu ze zaschlých kapek je dosti analogická metodě DCDR, při které během vysychání kapky na hydrofobním povrchu dochází k zahušťování vzorku na jejím okraji (tzv. coffee ring effect), což podobně jako metoda SERS umožňuje měření spekter Ramanova rozptylu některých látek i při jejich nízkých koncentracích ($\approx 10^{-6}$ M, [75]). Při měření spekter ze zaschlých kapek je proto třeba dbát zvýšené pozornosti i při interpretaci naměřených dat, zejména správně rozlišit, zda se v naměřených spektrech projevil efekt zesílení povrchem (SERS), nebo pouze efekt zahuštění vzorku na okraji zaschlé kapky (DCDR). Další nevýhodou měření SERS spekter z pevných substrátů je častý tepelný rozklad a fotodekompozice uhlíkatých sloučenin, nacházejících se v blízkosti kovového povrchu. Intenzita spektrálních pásů těchto uhlíkatých nečistot je kvůli špatnému odvodu tepla z povrchu substrátu často ještě větší, než při měření v roztocích (i při srovnatelných výkonech excitačního záření); navíc poloha i intenzita těchto parazitních čar může během jednotlivých skenů značně fluktuovat a překrývat tak pásy měřené molekuly [49 – 51]. Pro získání kvalitních SERS spekter s optimálním poměrem signál/šum je tak třeba volit kompromis především mezi výkonem laseru (tj. použitým filtrem) a dobou akumulace.

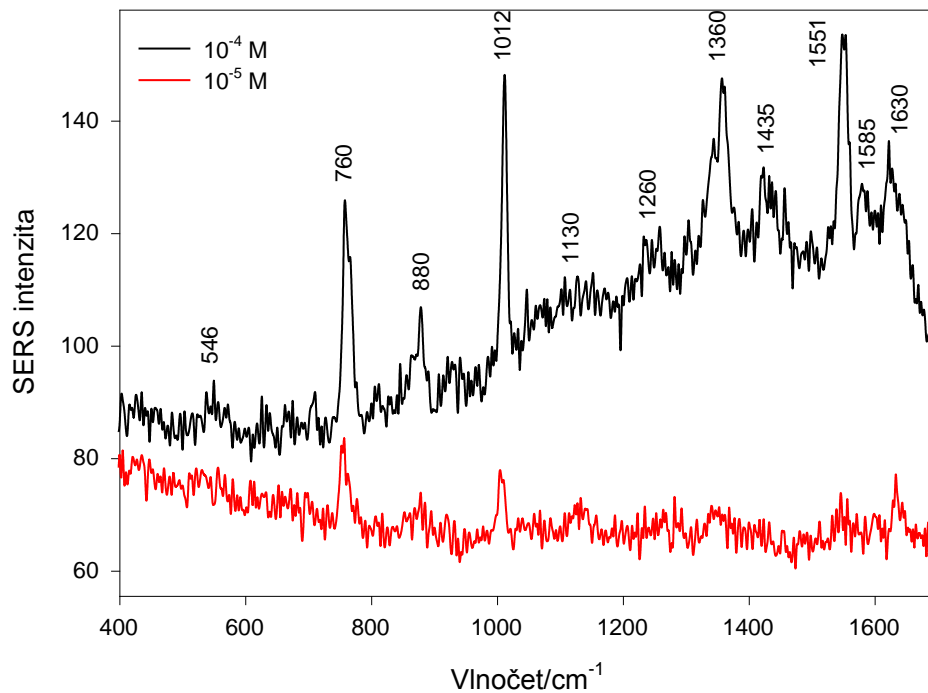
6.2.3. Měření na tryptofanu

Tryptofan je v odborné literatuře zřejmě jedna z nejčastěji studovaných aminokyselin metodou povrchem zesíleného Ramanova rozptylu [30, 36, 60 – 63]. Naměřená SERS spektra tryptofanu můžeme srovnat s Ramanovým spektrem jeho vodného roztoku, které je zobrazeno v grafu na obr. 27. Toto spektrum bylo změřeno s koncentrací tryptofanu 0,03 M a s celkovou dobou akumulace 40 minut. Zde prezentované spektrum je výsledkem odečtu spektra vody s vhodným koeficientem (nalezeným pomocí programu Spectra Calc) a následné korekce na pozadí pomocí polynomu 5. stupně. Ve spektru dominují především pásy na 759 a 1012 cm^{-1} , které se připisují dýchacím vibracím, kterých se zúčastní indolový kruh molekuly [60, 62, 63]. Přiřazení dalších pásů jednotlivým molekulárním pohybům lze najít přehledně např. v [60].



Obrázek 27: Ramanovo spektrum tryptofanu. Molární koncentrace tryptofanu je 0,03 M, celková doba akumulace je 40 minut, výkon laseru 0,3 W. Zde prezentované spektrum je výsledkem odečtu spektra vody a korekce na pozadí pomocí polynomu 5. stupně.

Počáteční koncentrace tryptofanu pro měření na stříbrných GLADech byla zvolena jako 10^{-4} M. I při měření s filtrem D2 však docházelo k silné tepelné dekompozici vzorku, která se podobně jako v případě histidinu (obr. 23) projevovala nárůstem pozadí v oblasti přibližně od 1000 cm^{-1} směrem k vyšším hodnotám vlnočtu a také výskytem velice úzkých spektrálních čar v této oblasti, jejichž poloha v čase během jednotlivých skenů značně fluktovala, a to prakticky bez ohledu na konkrétní místo sběru signálu na vzorku. Z toho důvodu byla všechna další spektra tryptofanu měřena s filtrem D3. Výsledky nejlepších získaných SERS spekter tryptofanu jsou zobrazeny v grafu na obr. 28.



Obrázek 28: SERS spektra tryptofanu na stříbrných GLADech – přehled nejlepších naměřených spekter. Jedná se o originální spektra naměřená ze zaschlých kapek, bez jakýchkoliv dalších úprav. Doba akumulace 1 spektra byla 10 s, při měření byl použit filtr D3.

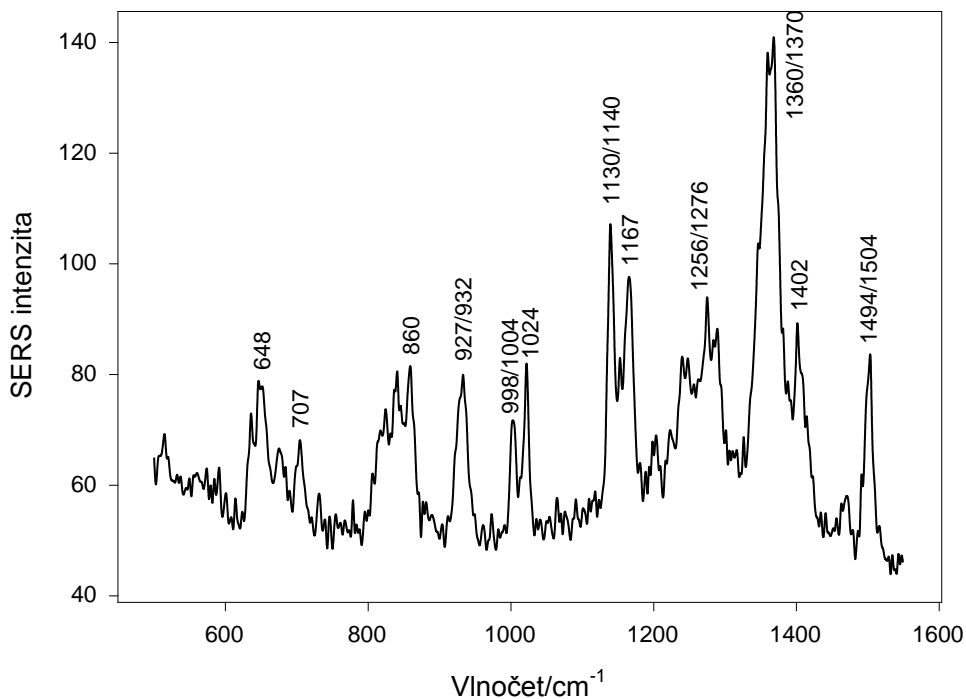
Z porovnání spekter na obr. 27 a 28 plyne, že SERS spektra tryptofanu naměřená z povrchu stříbrných GLADů se velice dobře shodují i se spektrem klasického Ramanova rozptylu vodného roztoku tryptofanu, přičemž orientačně zůstává zachován i poměr intenzit jednotlivých pásů. Námi získaná spektra se zároveň poměrně dobře shodují se spektry tryptofanu publikovanými v článkách [30, 60] a částečně i v [62, 63], ačkoliv v uvedených pracích se vesměs jednalo o měření na koloidech, převážně borohydridovém. Na druhou stranu, takto zjištěná spektra tryptofanu se výrazně liší od spekter publikovaných v práci [61], měřených na hydroxylaminovém koloidu. Předpokládáme, že nesoulad mezi jednotlivými pracemi je dán právě výskytem parazitních pásů – ať už pocházejících z koloidu, nebo z grafitického uhlíku, které mohou vést k chybně přiřazeným pásům pocházejícím od tryptofanu i k nesprávně určeným limitům detekce.

Spektrum tryptofanu bylo pro ověření reprodukovatelnosti změřeno alespoň z 20 různých bodů na povrchu vzorku a zároveň alespoň ze tří různých várek připravených GLADů. Ačkoliv úroveň pozadí v rámci různých míst vzorku fluktovala

až pětinasobně, polohy pásů vyznačené v grafu na obr. 28 i jejich orientačně určená intenzita (po odečtení pozadí) zůstaly pro danou koncentraci tryptofanu zachovány. Během měření nebyl shledán statisticky významný rozdíl mezi měřením uprostřed kapky a na jejím okraji, což znamená, že efekt zesílení a možnost získání spekter tryptofanu v takto nízkých koncentracích nelze připsat efektu DCDR. Poměrně nízký poměr signál/šum v získaných spektrech je dán tím, že akumulace spektra trvala pouze 10 s; nicméně při prodloužených dobách akumulace docházelo i s filtrem D3 ke vzniku teplem/světlem indukované dekompozici uhlíkatých sloučenin poblíž kovového povrchu a vzniku dalších anomálních pásů ve spektru, které degradovaly původně akumulované spektrum. K výraznému nárůstu pozadí často docházelo zhruba okolo 10 s po začátku měření, o čemž vypovídá i spektrum 10^{-4} M tryptofanu z grafu na obr. 28, ze kterého je náznak rostoucího pozadí u vyšších hodnot vlnočtu patrný. Navíc, tepelná dekompozice vzorku svědčí o vysokých hodnotách elektromagnetického pole v těsné blízkosti kovového povrchu, což by mohlo naznačovat, že získaná spektra tryptofanu jsou zesílena především díky elektromagnetickému mechanismu, neboť spektra téže látky v takto nízkých koncentracích nebyla na dalších površích, které neobsahovaly kovové nanonerovnosti, byť byly srovnatelně hydrofobní, pozorována vůbec.

6.2.4. Měření na histidinu

Dále jsme se pokusili, podobně jako na hydroxylaminovém koloidu, získat spektra histidinu i na stříbrných GLADech. SERS spektrum histidinu o molární koncentraci zásobního roztoku 10^{-4} M, nakápnutého na pevný povrch, je zobrazeno v grafu na obr. 29.

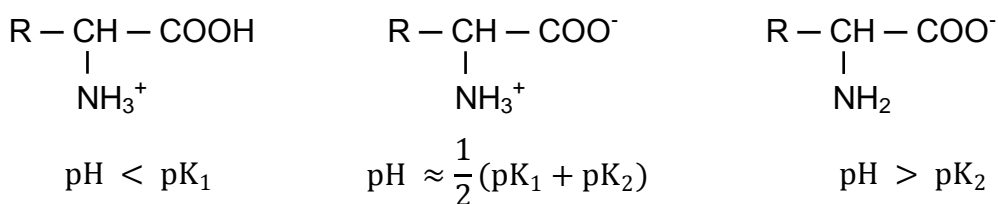


Obrázek 29: SERS spektrum histidinu na stříbrných GLADech – nejlepší originálně naměřené spektrum bez jakýchkoliv dalších úprav pozadí. Molární koncentrace histidinu je 10^{-4} M, měření probíhala ze zaschlých kapek. V grafu jsou označeny pásy, jejichž poloha se při měření z různých míst vzorku i z různých várek GLADů neměnila, údaje s lomítkem značí mírnou změnu polohy jednotlivých pásů v rámci různých získaných spekter. Doba akumulace 1 spektra byla 1 minuta, při měření byl použit filtr D3.

V SERS spektru histidinu na stříbrných GLADech se pásy, vyskytující se na vlnočtech okolo 707, 860, 998/1004, 1256/1276, 1360/1370 a 1494/1504 cm^{-1} , velice dobře shodují s polohou pásů zjištěnou pomocí klasického Ramanova rozptylu (viz obr. 21). Pásu, jehož poloha byla při SERS měřeních určena jako 648 cm^{-1} , by přitom ve spektru klasického Ramanova rozptylu histidinu mohl odpovídat pás okolo 630 cm^{-1} , pásu na 927/932 cm^{-1} by mohl odpovídat pás na 922 cm^{-1} , jednomu z pásů na 1130/1140 a 1167 cm^{-1} pravděpodobně ve spektru klasického Ramanova rozptylu histidinu přísluší pás na 1198 cm^{-1} a pásu na 1402 cm^{-1} by mohl příslušet pás na 1415 cm^{-1} . Mírné kolísání poloh některých pásů, vyznačených v grafu na obr. 29, může být důsledkem různých orientací molekuly histidinu adsorbované na pevný kovový povrch. Spektra histidinu byla pro ověření reprodukovatelnosti změřena alespoň z 10 různých bodů na povrchu vzorku a zároveň alespoň ze dvou různých várek připravených GLADů. Ze stejného důvodu, jako v případě tryptofanu, nelze ani v případě histidinu získat spektra v takto nízkých koncentracích přisoudit efektu DCDR.

6.2.5. Měření na cysteinu

Poslední modelovou aminokyselinou, jejíž SERS spektra byla získána na stříbrných GLADech, byl cystein. Jelikož předběžná měření této aminokyseliny, nakápnuté na pevný stříbrný povrch, nevedla k tak velkému signálu, jako v případě hydroxylaminového koloidu, rozhodli jsme se dále zkusit použít takové zásobní roztoky, jejichž pH bylo upraveno přidáním malého množství HCl nebo NaOH. Se změnou pH zásobního roztoku se totiž mění výsledný náboj molekul aminokyseliny v roztoku, jak je znázorněno na obr. 30.



Obrázek 30: Převažující formy aminokyselin v roztoku v závislosti na pH. pK konstanty jsou definovány jako hodnoty pH, kdy jsou obě „sousední“ formy dané aminokyseliny zastoupeny v roztoku stejnou měrou. Pro aminokyselinu je $\text{pK}_1 \approx 2$ a $\text{pK}_2 \approx 9$, takže při kyselých hodnotách pH převažuje u většiny molekul v roztoku kladný náboj (dochází k protonaci aminoskupiny i karboxylové skupiny) a při zásaditých hodnotách pH záporný náboj (dochází k deprotonaci karboxylové skupiny). Při hodnotách pH okolo průměru obou konstant pK_1 a pK_2 (v izoelektrickém bodě) se nachází aminokyselina v roztoku převážně s nábojem 0. Může-li se v určitém rozsahu pH protonovat/deprotonovat i uhlovodíkový zbytek R-, lze u dané aminokyseliny definovat ještě další konstantu pK_R takovou, že pro $\text{pH} < \text{pK}_R$ se uhlovodíkový zbytek R- vyskytuje převážně v protonované formě a při $\text{pH} > \text{pK}_R$ převážně v deprotonované formě. Zpracováno podle [80].

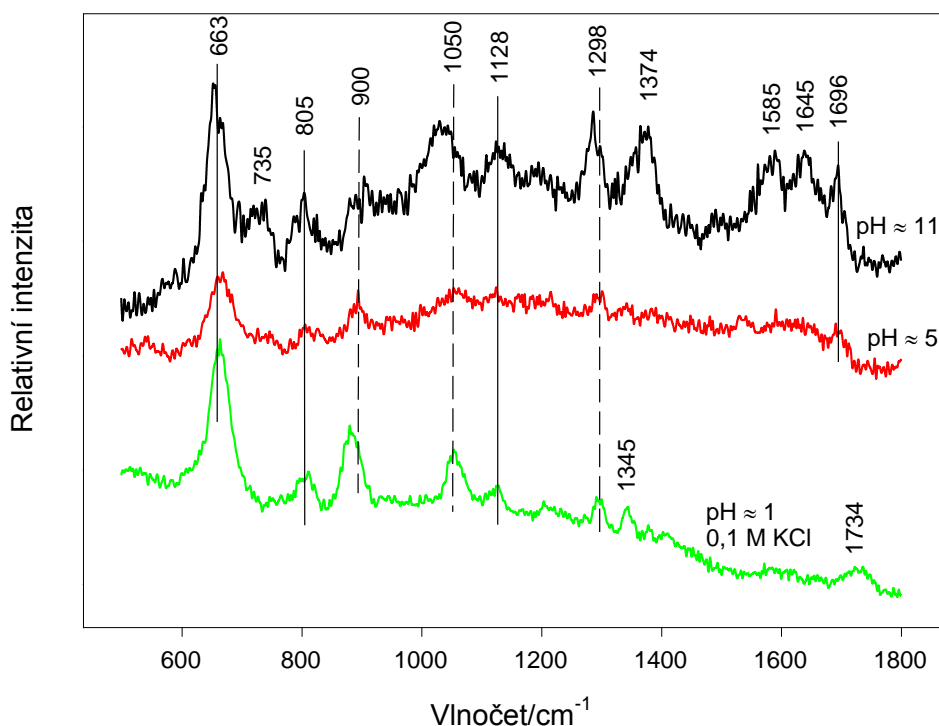
Pro odhad podílu jednotlivých různě protonovaných forem téže látky v roztoku lze využít Henderson-Hasselbalchovu rovnici (6.3). Je-li při $\text{pH} = \text{pK}_A$ v roztoku stejný podíl dvou různých forem téže látky (lišících se pouze protonací na jisté skupině atomů; symbolicky tyto látky značíme HA a A^-), pak při jiném pH bude podíl jejich koncentrací v roztoku takový, aby platilo

$$\text{pH} = \text{pK}_A + \log \frac{[A^-]}{[HA]}, \quad (6.3)$$

tj. např. při zvýšení hodnoty pH o 1 už je v roztoku deprotonovaná forma v desetinásobném nadbytku oproti protonované formě.

pK konstanty cysteinu jsou $\text{pK}_1 = 1,96$, $\text{pK}_2 = 10,28$ a $\text{pK}_{SH} = 8,18$ [80], přičemž u původně připraveného zásobního roztoku cysteinu bylo orientačně změřeno pH jako $\text{pH} \approx 5$, tj. lze předpokládat, že v takovém roztoku má většina molekul cysteinu

výsledný náboj nulový. Dále proto byly připraveny zásobní roztoky 10^{-4} M cysteinu, do kterých bylo přidáno malé množství HCl, resp. NaOH, čímž bylo dosaženo orientační pH roztoku okolo 1, resp. okolo 11. Dále byly připraveny zásobní roztoky, které mimo toho, že bylo takto upraveno jejich pH, obsahovaly ještě KCl o finální molární koncentraci 0,1 M ve výsledném vzorku. Nejlepší naměřená spektra z některých z těchto zásobních roztoků, nakápnutých na stříbrné GLADy, jsou zobrazena v grafu na obr. 31.



Obrázek 31: SERS spektra cysteinu na stříbrných GLADech – přehled nejlepších naměřených spekter v závislosti na pH. Molární koncentrace cysteinu je ve všech vzorcích 10^{-4} M, měření probíhala ze zaschlých kapek. Spektra jsou pro lepší přehlednost vertikálně posunuta. pH původně připraveného zásobního roztoku (pH \approx 5) bylo upraveno na hodnoty pH \approx 1 a pH \approx 11 přidáním malého množství HCl nebo NaOH. Zásobní roztok cysteinu o hodnotě pH \approx 1 obsahoval navíc 0,1 M KCl; přidání KCl do zásobních roztoků o hodnotách pH \approx 5 a pH \approx 11 nevedlo k výraznému zlepšení signálu. Polohy pásů, které se u naměřených spekter nemění, jsou vyznačeny plnou čarou. Pásky, jejichž poloha v závislosti na pH kolísá, jsou vyznačeny čerchovanou čarou. Doba akumulace 1 spektra byla 1 minuta, při měření byl použit filtr D3.

Reprodukovatelnost naměřených spekter byla podobně jako u předchozích aminokyselin ověřena během několika dní během přibližně 20 měření z různých bodů na povrchu vzorku. Během měření nebyl shledán statisticky významný rozdíl

mezi měření uprostřed kapky a na jejím okraji, což znamená, že efekt zesílení nelze ani v případě cysteinu připsat efektu DCDR.

Výsledky z grafu na obr. 31 naznačují, že ve spektrech cysteinu začíná růst intenzita některých pásů jak se zvyšujícím se pH, tak se snižujícím se pH (oproti hodnotě pH blízké neutrálnímu pH). Vůbec nejlepší spektrum bylo získáno při zásaditém pH (pH ≈ 11), při kterém se molekuly cysteinu v roztoku vyskytují převážně s nábojem -2 (dochází k deprotonaci karboxylové i thiolové skupiny). Interakce deprotonované thiolové skupiny s kladně nabitým kovovým povrchem by přitom mohla být důležitá pro správnou adsorpci molekuly cysteinu na kovový povrch, což lze dokumentovat i vysokou intenzitou pásu se středem okolo 663 cm^{-1} , který byl již při měřeních na hydroxylaminovém koloidu připsán vibracím, kterých se zúčastní atom síry. Intenzita pásu na 663 cm^{-1} byla v případě zásaditého vzorku zhruba 2× až 3× větší, než intenzita v případě vzorku, jehož pH bylo blízké neutrální hodnotě pH. Pro neutrální a zásadité zásobní roztoky cysteinu dále platilo, že intenzita pásů ve spektrech nebyla nijak výrazně ovlivněna přítomností KCl v zásobním roztoku. V kyselém prostředí bez přidaného KCl byla intenzita pásů ve spektru zhruba srovnatelná se spektry změřenými v neutrálním prostředí, avšak intenzita některých pásů vzrostla po přidání KCl do zásobního roztoku cysteinu s kyselým pH. Z toho lze usuzovat, že molekuly cysteinu, mající v kyselém prostředí převážně náboj +1, se mohou na pevný kovový povrch vázat proto, že kladný náboj kovového povrchu je odstíněn přítomnými chloridovými anionty. Poznamenejme však, že přesnější analýze vlivu pH na adsorpci cysteinu na kovový povrch brání nehomogenita použitého povrchu, která způsobuje, že intenzity pásů ve spektrech, měřených z téhož zásobního roztoku, se v různých místech zaschlé kapky mohou lišit téměř srovnatelně, jako intenzity pásů cysteinu z různých zásobních roztoků. Stejně tak je do budoucna nutno podrobněji prozkoumat i kolísání intenzity pásů ve spektrech při používání povrchů z různých připravených várek, což vyžaduje ještě další studie, které by mohly předchozí úvahy o adsorpci cysteinu na kovový povrch potvrdit.

Nejintenzivnějším pásem v SERS spektrech cysteinu, měřených na stříbrných GLADech, je stejně jako v případě měření na hydroxylaminovém koloidu pás na 663 cm^{-1} , který jsme již dříve přisoudili valenční vibraci atomů C–S. Dále se ve všech

naměřených SERS spektrech vyskytuje pás na 805 cm^{-1} , což je pás, který byl v [42] připsán deformačním vibračním skupiny karboxylové skupiny molekuly cysteinu. Oba tyto pásy byly pozorovatelné i ve spektru cysteinu změřeném na hydroxylaminovém koloidu (viz tabulka 2). Pás na 1128 cm^{-1} byl pozorován ve všech SERS spektrech cysteinu na stříbrných GLADech, ovšem ne na hydroxylaminovém koloidu, což může vnášet jisté pochybnosti, zda se jedná skutečně o pás příslušející cysteinu, nebo o nějaký anomální pás. Ve spektru cysteinu byly dále pozorovány pásy, jejichž poloha mírně kolísala s měnícím se pH roztoku: Jedná se o pásy, které byly ve spektru neutrálního cysteinu pozorovány na 900 , 1050 a 1298 cm^{-1} (což je opět v souladu s údaji v tabulce 2). Pás na 900 cm^{-1} je však v případě vzorku s kyselou hodnotou pH posunut asi o 15 cm^{-1} směrem k oblasti nižších vlnočtů a v případě vzorku se zásaditou hodnotou pH asi o 10 cm^{-1} směrem k oblasti vyšších vlnočtů. Poloha pásů okolo 1050 , resp. 1298 cm^{-1} , zůstává i v kyselém prostředí prakticky nezměněná, avšak v zásaditém prostředí se oba dva pásy posouvají asi o 15 , resp. o 10 cm^{-1} směrem k oblasti nižších vlnočtů.

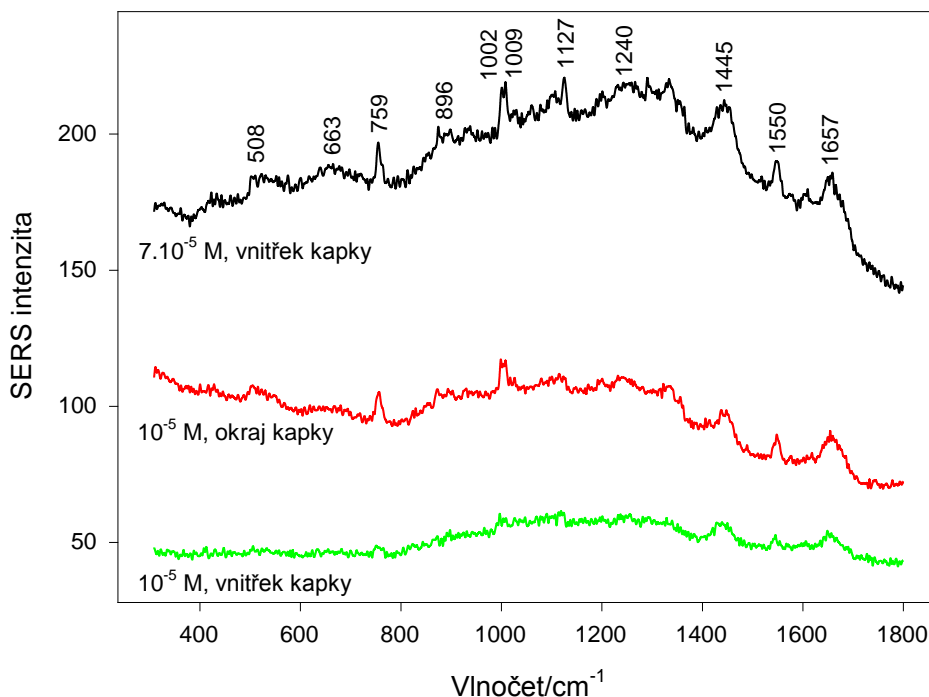
Pásy, které se v SERS spektrech cysteinu vyskytují pouze při zásaditém pH, jsou pásy na 735 , 1374 , 1585 a 1645 cm^{-1} . Těmto pásům by mohly odpovídat pásy na 745 , 1387 , 1575 a 1647 cm^{-1} , změřené na hydroxylaminovém koloidu.

Pás na 1696 cm^{-1} (odpovídající poloze třetího nejintenzivnějšího pásu cysteinu, změřeného na hydroxylaminovém koloidu) byl pozorován u vzorku s neutrálním i zásaditým pH. U vzorků s kyselým pH tento pás pozorován nebyl, naproti tomu se však u vzorků s kyselým pH objevily pásy na 1345 a 1734 cm^{-1} , což naopak velice dobře souhlasí s polohami pásů zjištěnými ve spektru klasického Ramanova rozptylu.

Závěrem shrňme, že pásy získané při měření SERS spekter na stříbrných GLADech, které svědčí o přítomnosti cysteinu, jsou pásy na 663 , 735 , 900 , $1035/1050$, $1288/1298$, 1374 a 1696 cm^{-1} , neboť k těmto pásům lze snadno najít korespondující pásy ve spektru klasického Ramanova rozptylu i v SERS spektrech získaných na hydroxylaminovém koloidu.

6.2.6. Měření na proteinech

Pro testování stříbrných GLADů byly dále vybrány modelové proteiny albumin a lysozym. Podobně jako při měření SERS spekter aminokyselin byly zásobní roztoky těchto proteinů nakápnuty na stříbrných povrch a ponechány k zaschnutí. Z takto zaschlých kapek byla získána spektra obou proteinů. Výsledky jsou zobrazeny v grafech na obr. 32 a 33.

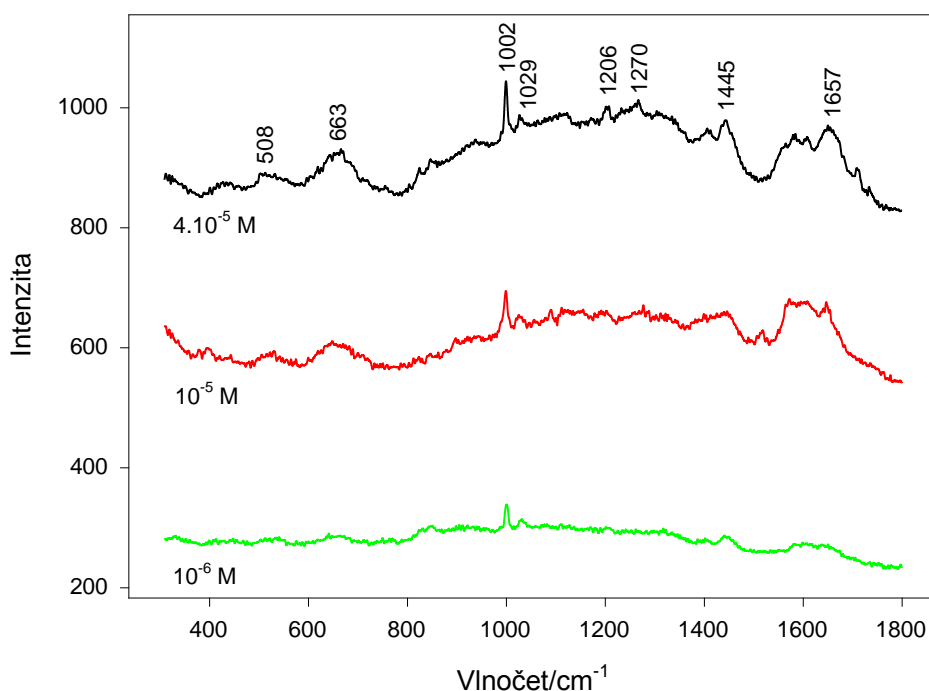


Obrázek 32: SERS spektra lysozymu na stříbrných GLADech – přehled nejlepších naměřených spekter. Jedná se o originálně naměřená spektra bez jakýchkoliv dalších úprav. Doba akumulace 1 spektra byla 1 minuta, při měření byl použit filtr D2.

Spektra lysozymu se podařilo získat v molárních koncentracích $7 \cdot 10^{-5}$ M a 10^{-5} M. Reprokovatelnost měření byla (stejně, jako v případě albuminu) ověřena měření alespoň z 20 různých bodů na povrchu vzorku během několika dní. Při měření s koncentrací $7 \cdot 10^{-5}$ M nebyl shledán statisticky významný rozdíl mezi intenzitou spekter získaných z okraje zaschlé kapky a z jejího vnitřku; při koncentraci lysozymu 10^{-5} M však již měření z okraje kapky dávala poněkud lepší výsledky, než měření z vnitřku kapky (viz obr. 32). To by mohlo naznačovat, že na efektu zesílení a možnosti získání spekter lysozymu v takto nízké koncentraci nemá podíl pouze zesílení dané kovovým povrchem, ale jistou roli zde hraje i efekt zahuštění vzorku na

okraji zaschlé kapky (DCDR). Na druhou stranu, nepřímým projevem existence elektromagnetického mechanismu zesílení je tepelná a světelná dekompozice vzorku při použití vyšších výkonů laseru, která ve spektrech lysozymu opakovaně vedla k výskytu pásů příslušejících amorfnímu uhlíku.

Ve spektrech lysozymu dominují pásy na 759, 1002, 1009 a 1550 cm^{-1} , které se v literatuře připisují vibracím aromatických reziduí tryptofanu (759, 1009 a 1550 cm^{-1}) a fenylalaninu (1002 cm^{-1}). Dále je možno ve spektrech rozeznat silný pás na 1445 cm^{-1} , připisovaný deformačním vibracím $-\text{CH}_2-$ skupin, a pásy označované v literatuře jako Amid I (1657 cm^{-1}) a Amid III (okolo 1240 cm^{-1}), které se připisují vibracím peptidických vazeb. Poloha všech výše uvedených pásů se velice dobře shoduje s měřeními publikovanými na stříbrných koloidech: borohydridovém [70] i citrátovém [74]. Přehledné přiřazení pásů pozorovaných v SERS spektrech lysozymu jednotlivým molekulárním vibracím lze najít např. v [70].



Obrázek 33: Spektra albuminu na stříbrných GLADech – přehled nejlepších naměřených spekter. Všechna spektra byla změřena z okraje zaschlé kapky. Jedná se o originálně naměřená spektra bez jakýchkoliv dalších úprav. Doba akumulace 1 spektra byla 1 minuta, při měření byl použit filtr D2.

Spektra albuminu se podařilo naměřit v koncentracích 4.10⁻⁵ M, 10⁻⁵ M a 10⁻⁶ M. Všechna tato spektra byla změřena z okraje zaschlé kapky, neboť sběr rozptýleného

záření z vnitřku kapky nedával prakticky žádný užitečný signál. Naproti tomu, signál získaný z okraje kapky vedl i při opakovaných pokusech k získání dobře reprodukovatelných spekter, což naznačuje, že v případě albuminu jsou získaná spektra v takto nízkých koncentracích především projevem zahuštění molekul proteinu na okraji zaschlé kapky (DCDR). K výrazné tepelné dekompozici molekul albuminu přitom nedocházelo ani při použití filtru D1, což (ve srovnání se silnou dekompozicí molekul lysozymu i aminokyselin při použití odpovídajícího výkonu laseru) by mohlo svědčit o nižší schopnosti molekul albuminu adsorbovat se do těsné blízkosti kovového povrchu (ve srovnání s molekulami lysozymu a aminokyselin). I přesto se podařilo naměřit spektra 10^{-6} M albuminu z okraje zaschlé kapky již s použitím filtru D3, což odpovídá 500× menšímu výkonu excitačního záření, než jaký byl použit při DCDR měřeních v článku [75] na komerčních teflonových substrátech.

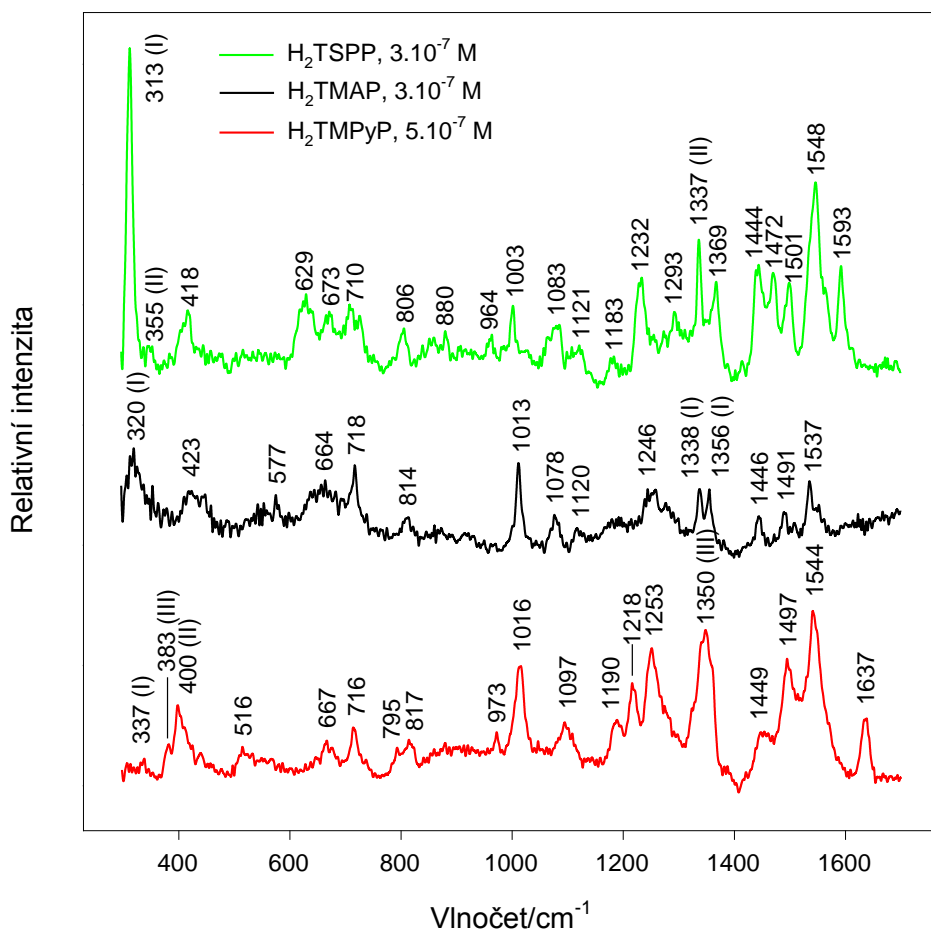
Ve spektrech albuminu, podobně jako ve spektrech lysozymu, dominují pásy reziduí aromatických aminokyselin na vlnočtech okolo 1002 a 1029 cm^{-1} (fenylalanin) a dále pásy deformačních vibrací $-\text{CH}_2-$ skupin (1445 cm^{-1}) a amidu I (1657 cm^{-1}). Námi naměřená spektra se dobře shodují se spektry publikovanými v člancích [75] (DCDR měření albuminu) a [72] (SERS spektra albuminu získaná na pravidelných zlatých substrátech). Výraznější rozdíl mezi námi naměřenými spektry a spektry publikovanými v [75] je dán v případě většiny spekter získaných na stříbrných GLADech absencí pásu okolo 759 cm^{-1} , příslušejícího vibracím tryptofanu; naopak ve spektrech v [75] chybí širší pás se středem okolo 663 cm^{-1} . Tento pás byl přitom v našich měřeních pozorovaný ve spektrech albuminu i lysozymu. Navrhujeme, že tento pás by mohl příslušet vibracím, kterých se účastní atom síry obsažený v cysteinových reziduích obou proteinů, neboť stejný pás byl pozorován i ve spektru samotného cysteinu (viz obr. 31). To by zároveň mohlo vysvětlovat, proč v $\approx 10^{-6}$ M DCDR spektrech albuminu [75] na teflonových substrátech tento pás pozorovaný nebyl, neboť k zesílení jeho intenzity je zřejmě potřeba mimo efektu DCDR i interakce thiolové skupiny obsažené v cysteinu s kovovým povrchem. Poznamenejme, že pásy v SERS spektrech některých dalších proteinů, vyskytující se na vlnočtech ≈ 670 až 690 cm^{-1} , byly připsány vibracím, kterých se účastní atomy

síry, i v článku [70]. V témže článku byly zároveň pásy přítomné u proteinů na vlnočtech okolo 500 až 550 cm^{-1} připsány vibracím disulfidických vazeb, což by zároveň mohlo vysvětlovat původ pásu na 508 cm^{-1} , pozorovatelného jak ve spektru albuminu, tak ve spektru lysozymu.

Rozdíl mezi námi získanými spektry lysozymu a albuminu je dán především nepřítomností pásů příslušejících tryptofanu ve spektru albuminu, tj. pásů na 759, 1009 a 1550 cm^{-1} , které jsou naopak velice výrazné v SERS spektrech lysozymu. To dokládá, že na stříbrných GLADech jsme schopni získat spektra těchto dvou proteinů s dostatečnou specificitou, a to až do koncentrace 10^{-5} M (v případě albuminu až do koncentrace 10^{-6} M).

6.2.7. Měření na porfyrinech

Poslední použité modelové molekuly byly porfyriny. Jelikož se díky konjugovanému systému dvojných vazeb porfyrinového jádra jedná prakticky o rovinné molekuly s vysokou polarizovatelností, které navíc absorbují světlo ve viditelné oblasti spektra, lze u těchto molekul očekávat vysokou intenzitu SER(R)Su i klasického (rezonančního) Ramanova rozptylu. Z tohoto důvodu byly koncentrace pro měření SER(R)S spekter porfyrinů zvoleny přibližně o 2 až 3 řády menší, než u předchozích biomolekul, což odpovídá i standardně používaným koncentracím porfyrinů v literatuře [30, 32, 53 – 55]. Vzhledem k silné tepelné dekompozici porfyrinů na povrchu stříbrných GLADů i při použití filtru D3 byl v případě měření SERS spekter porfyrinů použit dokonce filtr D4, se kterým byl při měření ostatních biomolekul získán prakticky vždy téměř nulový signál. Nejlepší získaná spektra porfyrinů H_2TMAP , H_2TMPyP a H_2TSPp , naměřená ze zaschlých kapek, jsou zobrazena v grafu na obr. 34.



Obrázek 34: SER(R)S spektra porfyrinů na stříbrných GLADech – přehled nejlepších naměřených spekter. Měřeno ze zaschlých kapek. U všech zde prezentovaných spekter byla provedena korekce na pozadí pomocí polynomů vhodného stupně; pro přehlednost jsou spektra vůči sobě vertikálně posunuta. Poloha nejintenzivnějších pásů ve spektrech je vyznačena. Pásky, které lze jednoznačně připsat jednotlivým porfyrinovým formám I až III (viz text), jsou vyznačeny pomocí příslušných symbolů. Doba akumulace 1 spektra byla 1 minuta, při měření byl použit filtr D4.

V SERS spektrech porfyrinů je možno rozlišit pásy, z nichž některé přísluší free-base formě (I) a některé přísluší metalované formě (II), kdy je do porfyrinového jádra inkorporován stříbrný kationt Ag^+ [54]. Ve spektru porfyrinu H_2TMPyP byly však navíc pozorovány ještě další pásy, které byly v literatuře přiřazeny ještě třetí formě porfyrinu (III), kdy dochází k metalaci neutrálním atomem stříbra Ag^0 [55]. Relevantní markery jednotlivých metalovaných forem molekuly se nacházejí především ve spektrální oblasti $\approx 310 - 400 \text{ cm}^{-1}$ a $\approx 1330 - 1360 \text{ cm}^{-1}$ [54, 55] a v grafech na obr. 34 jsou vyznačeny příslušným symbolem I až III. U porfyrinu H_2TMAP byla ze spekter získána především jeho nemetalovaná forma, což lze

zřejmě vysvětlit tím, že kvůli jeho prostorově velkým postranním skupinám nemůže v této koncentraci porfyrin H_2TMAP zaujmout takovou orientaci na povrchu, aby docházelo k jeho metalaci. Nemetaloaná forma se projevuje především přítomností pásů okolo 320 cm^{-1} , dubletem okolo $1338/1356\text{ cm}^{-1}$ a absencí silného pásu v oblasti $\approx 370 - 400\text{ cm}^{-1}$. Naproti tomu přechod z dubletu $1338/1356\text{ cm}^{-1}$ na jediný úzký pás okolo 1337 cm^{-1} v případě porfyriu H_2TSPP značí, že tento porfyrin se na stříbrných GLADech částečně metaluje, o čemž by mohl svědčit i menší pás okolo 355 cm^{-1} [86, 87]. Předpokládáme, že adsorpce porfyriu H_2TSPP na kovový povrch je usnadněna tím, že se jedná o porfyrin, jehož každá postranní skupina nese v rámci fyziologického pH záporný náboj. V případě porfyriu H_2TMPyP byla detekovaná i třetí metalovaná forma, což je indikováno dalším štěpením pásu na $383/400\text{ cm}^{-1}$ a širším pásem na 1350 cm^{-1} , jehož netriviální struktura však po podrobnějším prozkoumání naznačuje, že zde dochází k překryvu více pásů příslušejících různým formám. Podrobnější studie, týkající se podílu jednotlivých forem molekuly přítomných na kovovém povrchu či zkoumání kinetiky metalace, však přesahuje rámec této práce.

6.2.8. Kontaminace stříbrných GLADů

Vedle výskytu anomálních pásů, pocházejících z grafitického uhlíku, byla další překážkou v získání SERS spekter biomolekul na stříbrných GLADech kontaminace samotných substrátů. Kontaminace se projevovala výskytem dalších parazitních pásů i při měření z prázdného vzorku, tj. z míst, na která měřená látka vůbec nebyla nakápnuta. Intenzita těchto parazitních pásů a jejich „reprodukovatelnost“ v rámci různých míst téhož substrátu se přitom lišila v rámci různých várek povrchů, připravených na Katedře makromolekulární fyziky. Z přibližně 8 opakovaných pokusů o přípravu substrátů bez povrchových kontaminantů v průběhu zhruba 5 měsíců se podařilo připravit pouze 2 várky substrátů, které tyto kontaminace prakticky nevykazovaly (na těchto várkách byla změřena všechna spektra prezentovaná v této kapitole). Opakované pokusy o přípravu substrátů s optimálními vlastnostmi vedly k následujícím závěrům:

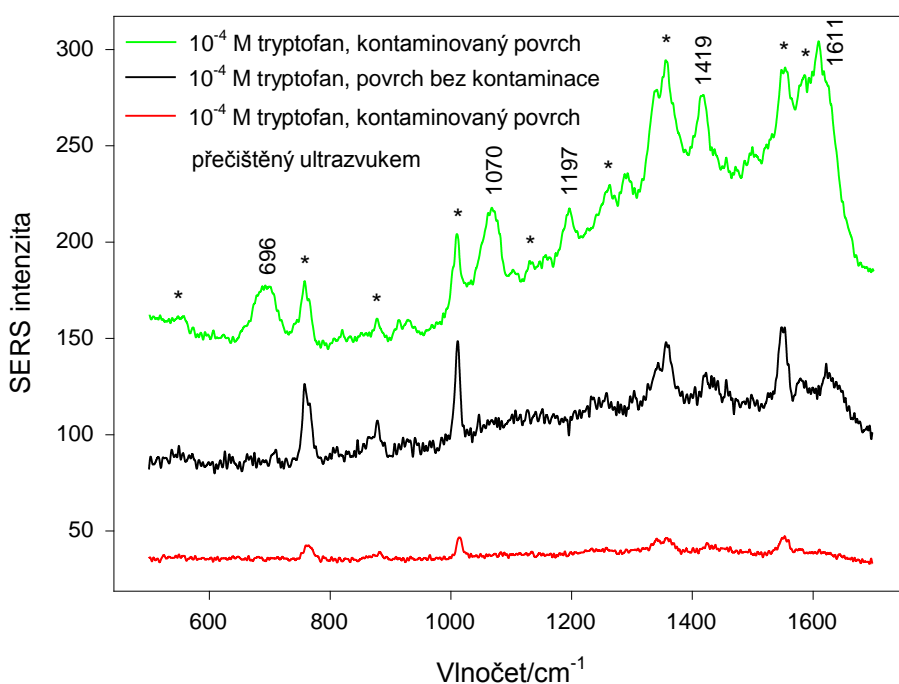
- U várek nově připravených GLADů, které při prvním měření žádnou kontaminaci nevykazovaly, nedocházelo k výraznému zhoršování jejich zesilovacích schopností ani po přibližně měsíčním skladování. Krátkodobá vystavení těchto povrchů okolní atmosféře ani opakovaná manipulace se vzorky při normálním tlaku vzduchu již nevedly k žádnému dodatečnému navazování kontaminantů ze vzduchu na povrch vzorku ani k následnému výskytu parazitních pásů ve spektrech. To naznačovalo, že kontaminace vzorků pochází pravděpodobně již ze samotného procesu jejich přípravy.
- Ultrazvukové čištění kontaminovaných substrátů v deionizované vodě občas vedlo k desorpci kontaminantů z povrchu vzorku a k mizení parazitních pásů ze spekter. Tím se však zároveň zesilovací schopnosti daného povrchu pro nakápnutý vzorek biomolekuly zhoršily přibližně 2× až 4× (viz obr. 35). Úspěšnost tohoto procesu však silně závisela na intenzitě parazitních pásů: V optimálním případě stačilo 5minutové ultrazvukové čištění k výrazné eliminaci parazitních pásů ze spekter, u některých silněji kontaminovaných várek stříbrných GLADů však tento proces nevedl k cíli vůbec.
- Při pokusech získat SERS spektra biomolekul nakápnutých na kovový povrch i z takto kontaminovaných povrchů docházelo občas do určité míry k přebití signálu kontaminantů signálem z nakápnuté biomolekuly (viz obr. 35), a to i v případě, že signál kontaminantů z prázdného vzorku byl větší, než signál samotné biomolekuly. Toto lze vysvětlit zřejmě jistou kompeticí mezi navazováním molekul měřené látky a molekul kontaminantů na kovový povrch, resp. schopností některých biomolekul vytlačit molekuly kontaminantů ze zesilujících míst na povrchu vzorku. Na obr. 35 je toto ilustrováno pro tryptofan o molární koncentraci 10^{-4} M, přičemž pro nižší koncentrace tryptofanu již signál aminokyseliny nebyl schopný převýšit signál parazitních pásů kontaminantů. Podobný výsledek byl získán i pro lysozym (až do koncentrace 10^{-5} M), ovšem nikoliv pro albumin, což potvrzuje naši domněnku, že spektra albuminu nakápnutého na stříbrné GLADy jsou namísto SERS efektu zesílena spíše efektem DCDR (viz kapitola 6.2.6; i při nejvyšší koncentraci albuminu $4 \cdot 10^{-5}$ M byly ve spektru

pozorovány pouze parazitní pásy kontaminantů, a to i na okraji zaschlé kapky).

- Na základě opakovaných problémů s kontaminací vzorků došlo během února 2014 na Katedře makromolekulární fyziky MFF UK k přestavbě aparatury, na které byly prováděny depozice stříbrných GLADů. Původní motivace stavby nové aparatury spočívala v používání lepšího systému vývěv, které by měly zcela vyloučit možnost kontaminace vzorků pracovními oleji. Přesto se však ukázalo, že nejcitlivější na adsorpci nečistot na čerstvě připravený substrát (a následný výskyt parazitních pásů v SERS spektrech) je manipulace se vzorkem těsně po jeho přípravě. Se zvyšováním časového odstupu mezi ukončením depozice daného vzorku a jeho vystavením okolní atmosféře docházelo systematicky ke snižování intenzity parazitních pásů ve spektru. To lze vysvětlit pravděpodobně vysokou chemickou reaktivitou stříbrného povrchu těsně po ukončení depozice, která je však utlumena s postupným chladnutím substrátu, kdy dochází k deaktivaci stříbrné vrstvy a ke snižování její schopnosti chemicky vázat látky obsažené v okolní atmosféře. Vyzkoušením různých časových odstupů byl získán závěr, že k optimální deaktivaci povrchů je nutno použít časový odstup mezi depozicí a další manipulací se vzorkem při normálním tlaku vzduchu v řádu alespoň několika hodin; v našem případě byly proto nadále vzorky po depozici před další manipulací ponechávány ve vakuové aparatuře přes noc (cca 16 hodin).
- Při několika pokusech o přípravu substrátů bez navázaných kontaminantů byl ještě před depozicí k očištění křemíkových destiček použit aceton nebo ethanol. Ukázalo se však, že samotné čištění navázání kontaminantů na vzniklý stříbrný povrch nezabrání; naopak v několika případech vedl tento postup ještě k vyšší intenzitě parazitních pásů ve spektru, než při přípravě bez chemického čištění.

Metodu, při které je z důvodu eliminace kontaminantů na povrchu substrátu vzorek po depozici nechán ještě několik hodin ve vakuu, považujeme za optimální především díky tomu, že při ní není nutno do procesu depozice vnášet další parametry, jako je chemické čištění povrchu před začátkem samotné depozice,

neboť vliv použitých chemikálií na parametry vzniklých substrátů, včetně jejich afinity k případným kontaminantům, je i nadále diskutabilní. Tímto postupem je navíc možno vyhnout se i relativně nešetrnému přečišťování již kontaminovaných substrátů ultrazvukem nebo např. nedávno publikovanými metodami čištění pomocí argonového plazmatu [88, 89], popř. chemickou cestou, které mohou změnit morfologii připraveného povrchu, resp. vést k oxidativnímu poškození připraveného povrchu, a tím zhoršit jeho schopnost fungovat jako SERS-aktivní substrát.

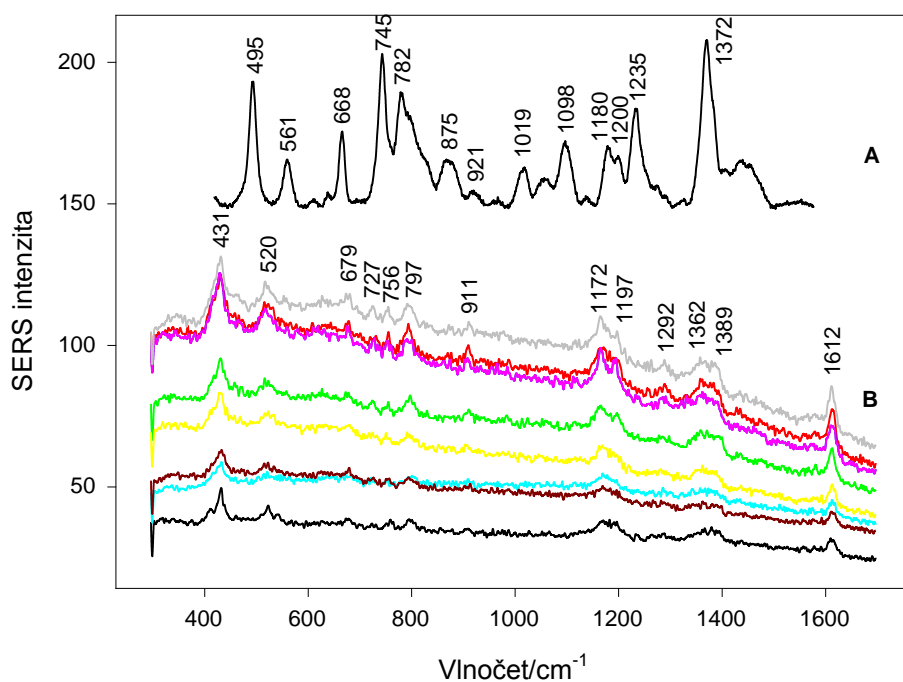


Obrázek 35: SERS spektra tryptofanu na stříbrných GLADech. Molární koncentrace tryptofanu je ve všech případech 10^{-4} M. Jedná se o originálně naměřená spektra bez jakýchkoliv úprav pozadí. Pásky příslušející tryptofanu jsou označeny hvězdičkou. Parazitní pásky pocházející od povrchových kontaminantů jsou vyznačeny číselným symbolem, ačkoliv jejich poloha v rámci různých substrátů a i z důvodu teplem/světlem indukované dekompozice na povrchu vzorku často fluktovala. Doba akumulace každého spektra byla 10 s, při měření byl použit filtr D3.

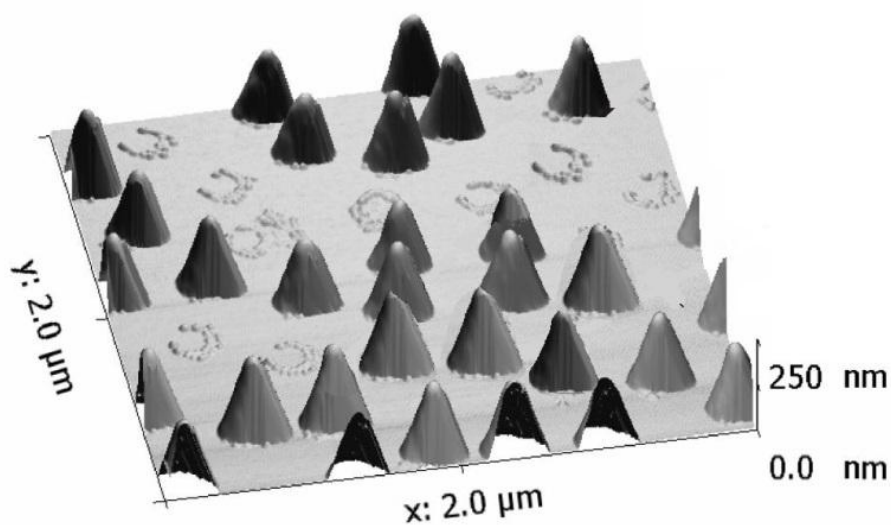
6.3. Měření na zlatých površích

Posledním druhem substrátů, na kterých jsme se v rámci práce pokusili získat spektra některých modelových biomolekul, byly litograficky připravené zlaté nanostruktury. Příprava těchto substrátů probíhala na spolupracujícím pracovišti ÚFE. Princip přípravy uvedených povrchů je popsán v kapitole 3.3. Mírnou modifikací zde popsaného procesu přípravy vznikaly struktury označené jako disky, kužílky nebo měsíčky, které byly následně testovány z hlediska SERS zesílení. Optimalizace podmínek pro získání SERS spekter některých jednodušších biomolekul na těchto površích a testování reprodukovatelnosti příslušných substrátů bylo úkolem paralelně probíhající disertační práce kolegy Mgr. Vlastimila Peksy. Stav v březnu 2014 je zatím takový, že se dosud nepodařilo připravit vhodné zlaté nanostruktury tak, aby byl z námi používaných modelových molekul adsorbovaných na jejich povrch získán takový SERS signál, jehož zesílení by bylo alespoň srovnatelné se signálem získaným v případě stříbrných povrchů.

Možný problém s adsorpcí biomolekul na zlatý povrch jsme se pokusili překonat tím, že jsme se rozhodli vyzkoušet získat SERS spektra z chemicky modifikovaných modelových biomolekul, které by byly na stříbrný povrch cíleně ukotveny. Jako modelové biomolekuly byly použity chemicky modifikované úseky jednovláknové DNA, konkrétně oligonukleotid složený z 20× opakující se jednotky dTMP (2'-deoxythymidinmonofosfát), modifikovaný thiolovou skupinou na 5' konci (schematicky HS-5'-(dT)₂₀-3'). Depozice takto modifikovaných oligonukleotidů na pevný zlatý substrát, spočívající v inkubaci zlatých povrchů v médiu obsahující thiolované molekuly DNA a jejich následném navázání na pevný povrch prostřednictvím thiolových skupin, vedla k vytvoření uspořádané monomolekulární vrstvy na povrchu, ze kterého jsme se pokusili získat SERS signál. Povrchová koncentrace molekul byla odhadnuta okolo $4 \cdot 10^{12}$ molekul/cm² na základě SPR měření, provedených na pracovišti ÚFE. Tam bylo také pro porovnání změřeno spektrum klasického Ramanova rozptylu oligonukleotidu (dT)₂₀ (bez přítomnosti kovového povrchu). Naměřená spektra jsou zobrazena v grafu na obr. 36, na obr. 37 je AFM snímek typického zlatého substrátu (kužílky), pořízený rovněž na pracovišti ÚFE.



Obrázek 36: Ramanovo spektrum oligonukleotidu $(dT)_{20}$ (A) a sada SERS spekter oligonukleotidů HS-5'-(dT)₂₀-3', ukotvených na zlatý povrch prostřednictvím thiolových skupin (B). Spektrum (A) bylo naměřeno metodou DCDR bez přítomnosti zlatého povrchu na pracovišti ÚFE, toto spektrum není v grafu zobrazeno v odpovídajícím měřítku. Substrátem pro sadu spekter (B) byly kužilky H497 na podložním skle, připravené na pracovišti ÚFE. SERS spektra jsou originálně naměřená a bez jakýchkoliv úprav pozadí, poloha nejintenzivnějších pásů ve spektru je vyznačena. Doba akumulace každého SERS spektra byla 1 minuta, při měření byl použit filtr D3.



Obrázek 37: Typický snímek litograficky připravených zlatých povrchů (kužilky H497) pořízený pomocí AFM. Převzato z materiálů ÚFE.

Z grafu na obr. 36 plyne, že SERS spektra oligonukleotidů, naměřená z různých míst na povrchu vzorku, jsou velice dobře reprodukovatelná, přičemž podíl integrálních intenzit odpovídajících pásů u nejintenzivnějšího a nejméně intenzivního naměřeného spektra (ze sady spekter získaných měřeními přibližně v 15 různých bodech měřeného vzorku) nepřesáhne faktor 5. Zároveň je však nutno dodat, že všechna zde prezentovaná spektra byla získána ve velice malé oblasti vzorku o ploše menší, než 1 mm^2 . Odhadujeme, že méně než 1 % plochy vzorku poskytuje dostatečné zesílení na to, aby na něm bylo možno měřit spektra oligonukleotidů v takto nízké koncentraci, ačkoliv v rámci této plochy byla získána spektra velice dobře reprodukovatelná. Toto pravděpodobně souvisí s jistou nedokonalostí přípravy zlatých povrchů, v jejíž některé fázi dochází zřejmě k poškození vzniklých nanostruktur, čímž je vznik vhodných nanonerovností omezen pouze na dosti malý zlomek původní připravené plochy. Předpokládáme, že do budoucna se budou parametry ovlivňující přípravu těchto povrchů dále intenzivně studovat se snahou odhalit pravou příčinu tohoto jevu a tím zvýšit úspěšnost přípravy zmiňovaných povrchů.

V SERS spektrech oligonukleotidu HS-5'-(dT)₂₀-3' přísluší pás na 797 cm^{-1} dýchací vibraci thyminu, což dokládají v literatuře četné studie týkající se Ramanových i SERS spekter jednak samotného thyminu, jednak složek nukleových kyselin, jejichž součástí je thymin (v případě SERS spekter však nejčastěji na stříbrných substrátech; [76 – 78, 90]). Pás na 1612 cm^{-1} lze zřejmě přisoudit vibracím ketoskupiny, ačkoliv v literatuře je poloha tohoto pásu vesměs stanovena až zhruba v oblasti okolo 1650 cm^{-1} . Dalšími charakteristickými pásy příslušejícími thyminu jsou pásy na 1172 , 1197 , 1362 a 1389 cm^{-1} (poslední dva zmiňované jsou zřejmě dubletem vzniklým štěpením pásu okolo 1372 cm^{-1} ve spektru klasického Ramanova rozptylu), ačkoliv jejich přesná poloha v SERS spektrech se napříč různými publikovanými výsledky v literatuře může v krajních případech lišit až o 20 cm^{-1} [76, 90]. Předpokládáme, že tento posun může být dán jednak druhem použitého substrátu (zlato/stříbro, pevný povrch/koloid) a jednak spřažením vibrací molekuly thyminu s vibracemi sacharidové části, což v člancích [76, 90] studováno nebylo. Poloha pásů na 679 a 756 cm^{-1} naopak dobře souhlasí se spektry klasického Ramanova rozptylu

polynukleotidů obsahující thymin [91], avšak v jiných člancích, věnujících se SERSu, tyto pásy nenacházíme. Existuje však i možnost, že se s některým z pásů v této oblasti překrývá pás valenčních vibrací atomů C–S, jehož polohu ve spektru jsme při měření cysteinu na stříbrných površích stanovili na 663/679 cm^{-1} . Stejně tak přísluší vibraci thyminu i nejsilnější pásy v SERS spektrech na vlnočtech okolo 431 a 520 cm^{-1} , ačkoliv v odborných člancích věnujících se thyminu jsou pásy o takto nízkých vlnočtech studovány poměrně málo (viz např. [90]).

Spektra nukleotidů ukotvená podobným způsobem na zlatý povrch byla zkoumána již v článku [92], kde však byly použity polynukleotidy obsahující různé druhy bází, což brání přesnému srovnání s našimi měřeními. Jak v našich, tak ve spektrech publikovaných v [92], však oproti spektru klasického Ramanova rozptylu chyběl pás okolo 1098 cm^{-1} , který se připisuje vibracím fosfátové skupiny. Naproti tomu se v námi změřených spektrech vyskytuje pás na 911 cm^{-1} , který byl v [77] připsán vibracím cukr-fosfátové páteře.

Závěr

V rámci předložené diplomové práce byly zkoumány kovové povrchy se snahou otestovat na nich možnost zisku spekter povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS) některých modelových biomolekul. Jako modelové biomolekuly byly studovány aminokyseliny cystein, tryptofan a histidin, proteiny albumin a lysozym a porfyriny H₂TMAP, H₂TMPyP a H₂TSPP. Hlavním cílem práce byla optimalizace experimentálních podmínek, za kterých lze získat SERS spektra těchto biomolekul, testování sensitivity použitých povrchů a reprodukovatelnosti získaných dat. Tato pilotní studie by v budoucnu měla vést k dalšímu rozvoji SERS aplikací včetně biomolekulárního senzingu, tedy velice citlivé a reprodukovatelné detekci biomolekul na kovových substrátech.

V první části práce jsme se zabývali měřením SERS spekter biomolekul na hydroxylaminovém koloidu. Podařilo se změřit koncentrační závislost SERS spekter cysteinu a ukázalo se, že limit detekce této aminokyseliny se při použití KCl jako agregačního činidla a excitační vlnové délky 532 nm pohybuje v řádu molární koncentrace $\approx 10^{-8}$ M. Faktor zesílení byl stanoven v řádu $\approx 8 \cdot 10^5$ až 10^6 , tedy zhruba 6× až 9× větší, než dosud nejvyšší faktor zesílení publikovaný pro SERS spektrum cysteinu v koloidních systémech [40]. Schopnost hydroxylaminového koloidu fungovat jako SERS-aktivní povrch pro cystein přisuzujeme zejména thiolové skupině obsažené v cysteinu, díky které se cystein může adsorbovat na kovový povrch, což dovoluje získat jeho SERS spektra i v takto poměrně nízkých koncentracích. V rámci práce byla také provedena analýza anomálních pásů, vyskytujících se i ve spektrech prázdného vzorku (tj. obsahujícího pouze koloid + KCl), a bylo prokázáno, že přítomnost ani poloha těchto anomálních pásů ve spektru se při používání téhož koloidu a téhož agregačního činidla nemění, avšak s rostoucí koncentrací aminokyseliny může docházet k jejich mizení. Zisku kvalitních spekter některých dalších aminokyselin však často bránil tepelný rozklad a fotodekompozice organických molekul v blízkosti kovového povrchu, což také zapříčinilo nedostatečnou spektrální reprodukovatelnost naměřených dat.

V druhé části práce byly pro měření SERS spekter modelových biomolekul použity pravidelné pevné kovové povrchy, zejména stříbrné GLADy, připravené ve

spolupráci s Katedrou makromolekulární fyziky MFF UK. Častým problémem při měření SERS spekter z tohoto druhu povrchů byl výskyt anomálních pásů pocházejících jednak z procesu přípravy, jednak z produktů dekompozice organických látek v blízkosti kovového povrchu při vyšších výkonech laseru. Opakované pokusy o přípravu substrátů s optimálními vlastnostmi odhalily, že nejcitlivější na adsorpci nečistot na čerstvě připravený substrát (a následně výskyt parazitních pásů ve spektru) je manipulace se substrátem těsně po jeho přípravě, proto bylo nutné po skončení depozice ponechat vzorek ještě několik hodin ve vakuu. Při měření na stříbrných GLADech se podařilo získat reprodukovatelná spektra tryptofanu o koncentracích 10^{-4} a 10^{-5} M a spektra histidinu a cysteinu o koncentraci 10^{-4} M. V případě cysteinu byla navržena možnost, jak více zesílit interakci aminokyseliny s kovovým povrchem, a tím zesílit i intenzitu pásů ve spektrech, a to změnou pH zásobního roztoku cysteinu. Z proteinů se podařilo naměřit spektra albuminu a lysozymu s dostatečnou specificitou a srovnatelnou koncentrací, jaká se pohybuje při DCDR měřeních. Nakonec byla na stříbrných GLADech získána spektra porfyrinů o koncentracích $\approx 10^{-7}$ M. Zlaté povrchy připravené litografickými metodami poskytovaly menší zesílení, než stříbro, ale podařilo se získat dobře reprodukovatelná SERS spektra monomolekulární vrstvy oligonukleotidů obsahujících 20 thyminových jednotek (v množství odpovídající pokrytí povrchu zhruba $4 \cdot 10^{12}$ molekul/cm²), ukotvených na zlatý povrch pomocí thiolových skupin. Další rozšíření okruhu takto studovaných oligonukleotidů by v budoucnu mohlo být základem pro plánovanou studii SERSu DNA, zejména, pokud by se ve spolupráci s ÚFE podařilo zvýšit úspěšnost přípravy zlatých povrchů, popř. pokud by se podařilo připravovat uvedené struktury i na křemíkové podložce, jejíž pás by v Ramanových spektrech mohl sloužit jako interní standard pro normování získaných SERS spekter.

Základní cíle diplomové práce byly splněny – vybrané zlaté a stříbrné pravidelné nanostruktury se jeví jako vhodné pro SERS biosenzing testovaných biomolekul. Zdá se však, že v případě stříbrných GLADů stále ještě existuje prostor i pro další zdokonalení procesu jejich přípravy, např. použitím lepšího systému chlazení vzorku během depozice nebo současným umožněním rotace vzorku, čímž by bylo možno

dále ladit parametry vzniklých povrchů, a tím i velikost SERS zesílení při experimentech s biomolekulami. Do budoucna se předpokládá pokračování spolupráce s Katedrou makromolekulární fyziky i Ústavem fotoniky a elektroniky na vývoji a testování dalších stříbrných a zlatých pevných pravidelných SERS substrátů (zlaté GLADy, povrchy připravované nanolitografickými metodami a elektronovou litografií), vhodnými pro SERS biosenzink. Na druhé straně je zřejmé, že detekce určitých typů biomolekul bude vyžadovat vhodně funkcionalizované SERS-aktivní substráty, a to především s ohledem na specifickou citlivost a reprodukovatelnost.

Seznam použité literatury

- [1] V. Prosser a kol.: Experimentální metody biofyziky. Academia Praha, 1989, ISBN: 80-200-0059-3.
- [2] J. R. Ferraro, K. Nakamoto, C. W. Brown: Introductory Raman spectroscopy. Elsevier, 2003 (second edition), ISBN: 978-0-12-254105-6.
- [3] R. Aroca: Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy. J. Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2006, ISBN: 0-471-60731-2.
- [4] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld: Surface-enhanced Raman scattering and biophysics, *J. Phys.: Condens. Matter* **14** (2002), R597 – R624.
- [5] M. Moskovits: Surface-enhanced spectroscopy, *Rev. Mod. Phys.* **57** (1985), 783 – 826.
- [6] M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan: Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chem. Phys. Lett.* **26** (1974), 163 – 166.
- [7] E. C. Le Ru, P. G. Etchegoin: Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects. Elsevier, Amsterdam, 2009, ISBN: 978-0-444-52779-0.
- [8] M. Moskovits: Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective, *J. Raman Spectrosc.* **36** (2005), 485 – 496.
- [9] M. Procházka, J. Štěpánek: Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) and its Application to Biomolecular and Cellular Investigation, *Applications of Raman Spectroscopy to Biology – From Basic Studies to Disease Diagnosis* (M. Ghomi ed.), 1 – 30, IOS Press, Amsterdam, 2012, ISBN: 978-1-60750-999-8.
- [10] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld: Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), *Phys. Rev. Lett.* **78** (1997), 1667 – 1670.
- [11] S. Nie, S. R. Emory: Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering, *Science* **275** (1997), 1102 – 1106.

- [12] B. Sedlák, I. Štoll: *Elektřina a magnetismus*. Academia Praha, 2002, ISBN: 80-200-1004-1.
- [13] J. M. McMahon, A.-I. Henry, K. L. Wustholz, M. J. Natan, R. G. Freeman, R. P. Van Duyne, G. Schatz: Gold nanoparticle dimer plasmonics: finite element method calculations of the electromagnetic enhancement to surface-enhanced Raman spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.* **394** (2009), 1819 – 1825.
- [14] P. G. Etchegoin, E. C. Le Ru: Basic Electromagnetic Theory of SERS, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications* (S. Schlücker ed.), 1 – 38, Wiley-WCH, Weinheim, 2011, ISBN: 978-3-527-32567-2.
- [15] P. Malý: *Optika*. Karolinum, Praha, 2008, ISBN: 978-80-246-1342-0.
- [16] A. Campion, P. Kambhampati: Surface-enhanced Raman scattering, *Chem. Soc. Rev.* **27** (1998), 241 – 250.
- [17] P. G. Etchegoin, E. C. Le Ru, M. Meyer: An analytic model for the optical properties of gold, *J. Chem. Phys.* **125** (2006), 164705-1-3.
- [18] P. B. Johnson, R. W. Christy: Optical Constants of the Noble Metals, *Phys. Rev. B* **6** (1972), 4370 – 4379.
- [19] E. D. Palik: *Handbook of Optical Constants of Solids III*. Academic Press, New York, 1998, ISBN: 0-12-544423-0.
- [20] P. W. Barber, R. K. Chang, H. Massoudi: Surface-Enhanced Electric Intensities on Large Silver Spheroids, *Phys. Rev. Lett.* **50** (1983), 997 – 1000.
- [21] V. A. Podolskiy, V. M. Shalaev: Giant Optical Responses in Microcavity-Fractal Composites, *Laser Phys.* **11** (2001), 26 – 30.
- [22] A. G. Brolo, D. E. Irish, B. D. Smith: Applications of surface enhanced Raman scattering to the study of metal-adsorbate interactions, *J. Mol. Struct.* **405** (1997), 29 – 44.
- [23] M. J. Natan: Concluding Remarks – Surface enhanced Raman scattering, *Farad. Discuss.* **132** (2006), 321 – 328.

- [24] J. C. Hulteen, R. P. Van Duyne: Nanosphere lithography: a materials general fabrication process for periodic particle array surfaces, *J. Vac. Sci. & Techn. A* **13** (1995), 1553 – 1558.
- [25] K. A. Willets, R. P. Van Duyne: Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58** (2007), 267 – 297.
- [26] H. Fredriksson, Y. Alaverdyan, A. Dmitriev, C. Langhammer, D. S. Sutherland, M. Zäch, B. Kasemo: Hole-Mask Colloidal Lithography, *Adv. Mater.* **19** (2007), 4297 – 4302.
- [27] M. Kahl, E. Voges, S. Kostrewa, C. Viets, W. Hill: Periodically structured metallic substrates for SERS, *Sensors and Actuators B* **51** (1998), 285 – 291.
- [28] K. Robbie, J. C. Sit, M. J. Brett: Advanced techniques for glancing angle deposition, *J. Vac. Sci. & Techn. B* **16** (1998), 1115 – 1122.
- [29] X.-M. Lin, Y. Cui, Y.-H. Xu, B. Ren, Z.-Q. Tian: Surface-enhanced Raman spectroscopy: substrate-related issues, *Anal. Bioanal. Chem.* **394** (2009), 1729 – 1745.
- [30] P. Šimáková, M. Procházka, E. Kočíšová: SERS Microspectroscopy of Biomolecules on Dried Ag Colloidal Drops, *Spectrosc. Int. J.* **27** (2012), 449 – 453.
- [31] R. G. Freeman, K. C. Grabar, K. J. Allison, R. M. Bright, J. A. Davis, A. P. Guthrie, M. B. Hommer, M. A. Jackson, P. C. Smith, D. G. Walter, M. J. Natan: Self-Assembled Metal Colloid Monolayers: An Approach to SERS Substrates, *Science* **267** (1995), 1629 – 1632.
- [32] P. Šimáková, M. Procházka: SERRS microspectroscopy of porphyrins on Ag immobilized nanoparticles, *J. Mol. Struct.* **993** (2011), 425 – 427.
- [33] P. Šimáková: Diplomová práce: Studium biomolekul pomocí povrchem zesílené Ramanovy mikrospektroskopie, MFF UK, Praha, 2010.
- [34] N. Hajduková: Diplomová práce: Kovové částice imobilizované na skleněné podložky a jejich využití jako SERS-aktivních povrchů při studiu biomolekul, MFF UK, Praha, 2005.

- [35] H. Zhao, B. Yuan, X. Dou: The effects of electrostatic interaction between biological molecules and nano-metal colloid on near-infrared surface-enhanced Raman scattering, *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* **6** (2004), 900 – 905.
- [36] S. Bhattacharya, N. Vyas, A. K. Ojha, S. Dasgupta, A. Roy: Surface-enhanced Raman measurements and DFT calculations for L-tryptophan of varying pH in silver sol, *J. Raman Spectrosc.* **43** (2012), 718 – 723.
- [37] J. A. Creighton, C. G. Blatchford, M. G. Albrecht: Plasma Resonance Enhancement of Raman Scattering by Pyridine Adsorbed on Silver or Gold Sol Particles of Size Comparable to the Excitation Wavelength, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, **75** (1979), 790 – 798.
- [38] P. C Lee, D. Meisel: Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols, *J. Phys. Chem.* **86** (1982), 3391 – 3395.
- [39] N. Leopold, B. Lendl: A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride, *J. Phys. Chem. B* **107** (2003), 5723 – 5727.
- [40] N. R. Yaffe, A. Ingram, D. Graham, E. W. Blanch: A multi-component optimisation of experimental parameters for maximising SERS enhancements: *J. Raman Spectrosc.* **41** (2010), 618 – 623.
- [41] S. Sánchez-Cortés, J. V. García-Ramos: Anomalous Raman Bands Appearing in Surface-Enhanced Raman Spectra, *J. Raman Spectrosc.* **29** (1998), 365 – 371.
- [42] N. R. Yaffe, E. W. Blanch: Effects and anomalies that can occur in SERS spectra of biological molecules when using a wide range of aggregating agents for hydroxylamine-reduced and citrate-reduced silver colloids, *Vib. Spectrosc.* **48** (2008), 196 – 201.
- [43] S. B. Chaney, S. Shanmukh, R. A. Dluhy, Y.-P. Zhao: Aligned silver nanorod arrays produce high sensitivity surface-enhanced Raman spectroscopy substrates, *Appl. Phys. Lett.* **87** (2005), 031908-1-3.

- [44] J. Fu, Z. Cao, L. Yobas: Localized oblique-angle deposition: Ag nanorods on microstructured surfaces and their SERS characteristics, *Nanotechnology* **22** (2011), 1 – 7.
- [45] R. N. Tait, T. Smy, M. J. Brett: Modelling and characterization of columnar growth in evaporated films, *Thin Solid Films* **226** (1993), 196 – 201.
- [46] Q. Zhou, Z. Li, Y. Yang, Z. Zhang: Arrays of aligned, single crystalline silver nanorods for trace amount detection, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **41** (2008), 1 – 4.
- [47] A. Choukourov, P. Solar, O. Polonskyi, J. Hanus, M. Drabik, O. Kylian, E. Pavlova, D. Slavinska, H. Biederman: Structured Ti/Hydrocarbon Plasma Polymer Nanocomposites Produced By Magnetron Sputtering with Glancing Angle Deposition, *Plasma Process. Polym.* **7** (2010), 25 – 32.
- [48] R. M. Stöckle, Y. D. Suh, V. Deckert, R. Zenobi: Nanoscale chemical analysis by tip-enhanced Raman spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.* **318** (2000), 131 – 136.
- [49] A. Kudelski, B. Pettinger: SERS on carbon chain segments: monitoring locally surface chemistry, *Chem. Phys. Lett.* **321** (2000), 356 – 362.
- [50] A. Kudelski: Fluctuations of Raman spectra of hydrogenated amorphous carbon deposited on electrochemically-roughened silver, *Chem. Phys. Lett.* **427** (2006), 206 – 209.
- [51] A. Kudelski: Some aspects of SERS temporal fluctuations: analysis of the most intense spectra of hydrogenated amorphous carbon deposited on silver, *J. Raman Spectrosc.* **38** (2007), 1494 – 1499.
- [52] B.-S. Yeo, T. Schmid, W. Zhang, R. Zenobi: A Strategy to Prevent Signal Losses, Analyte Decomposition, and Fluctuating Carbon Contamination Bands in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* **62** (2008), 708 – 713.
- [53] M. Procházka, J. Hanzliková, J. Štěpánek, V. Baumruk: Metalation of positively charged water soluble mesoporphyrins studied via time-resolved SERRS spectroscopy, *J. Mol. Struct.* **410 – 411** (1997), 77 – 79.

- [54] M. Procházka, J. Štěpánek, P.-Y. Turpin, J. Bok: Drastically Different Porphyrin Adsorption and Metalation Processes in Chemically Prepared and Laser-Ablated SERS-Active Silver Colloidal Substrates, *J. Phys. Chem. B* **106** (2002), 1543 – 1549.
- [55] M. Procházka, B. Vlčková, J. Štěpánek, P.-Y. Turpin: Probing of Porphyrin Surface Chemistry in Systems with Laser-Ablated Ag Nanoparticle Hydrosol: Role of Thiosulfate Anions, *Langmuir* **21** (2005), 2956 – 2962.
- [56] A. M. Ahern, R. L. Garrell: Protein-Metal Interactions in Protein-Colloid Conjugates Probed by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Langmuir* **7** (1991), 254 – 261.
- [57] G. Smulevich, T. G. Spiro: Surface Enhanced Raman Spectroscopic Evidence That Adsorption on Silver Particles Can Denature Heme Proteins, *J. Phys. Chem.* **89** (1985), 5168 – 5173.
- [58] I. R. Nabiev, V. A. Savchenko, E. S. Efremov: Surface-enhanced Raman Spectra of Aromatic Amino Acids and Proteins Adsorbed by Silver Hydrosols, *J. Raman Spectrosc.* **14** (1983), 375 – 379.
- [59] T. M. Cotton, S. G. Schultz, R. P. Van Duyne: Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering from Cytochrome *c* and Myoglobin Adsorbed on a Silver Electrode, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980), 7960 – 7962.
- [60] C.-H. Chuang, Y.-T. Chen: Raman scattering of L-tryptophan enhanced by surface plasmon of silver nanoparticles: vibrational assignment and structural determination, *J. Raman Spectrosc.* **40** (2009), 150 – 156.
- [61] A. E. Aliaga, I. Osorio-Román, P. Leyton, C. Garrido, J. Cárcamo, C. Caniulef, F. Célis, G. Díaz F., E. Clavijo, J. S. Gómez-Jeria, M. M. Campos-Vallette: Surface-enhanced Raman scattering study of L-tryptophan, *J. Raman Spectrosc.* **40** (2009), 164 – 169.
- [62] A. Kandakkathara, I. Utkin, R. Fedosejevs: Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Detection of Low Concentrations of Tryptophan Amino Acid in Silver Colloid, *Appl. Spectrosc.* **65** (2011), 507 – 513.

- [63] N. Maiti, S. Thomas, J. A. Jacob, R. Chadha, T. Mukherjee, S. Kapoor: DFT and surface-enhanced Raman scattering study of tryptophan-silver complex, *J. Colloid Interface Sci.* **380** (2012), 141 – 149.
- [64] J. K. Lim, Y. Kim, S. Y. Lee, S.-W. Joo: Spectroscopic analysis of L-histidine adsorbed on gold and silver nanoparticle surfaces investigated by surface-enhanced Raman scattering, *Spectrochim. Acta A* **69** (2008), 286 – 289.
- [65] Y. Zhao, M. Shao, R. Que, Z. Zhang: The surface-enhanced Raman scattering for monitoring histidine and tyrosine using silver vanadate nanoribbons as substrates, *J. Phys. Chem. Solids* **74** (2013), 255 – 258.
- [66] M.-L. Cheng, B.-C. Tsai, J. Yang: Silver nanoparticle-treated filter paper as a highly sensitive surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrate for detection of tyrosine in aqueous solution, *Anal. Chim. Acta* **708** (2011), 89 – 96.
- [67] A. K. Ojha, P. Donfack, A. Materny: Complex concentration dependence of SERS and UV-Vis absorption of glycine/Ag-substrates because of glycine-mediated Ag-nanostructure modifications, *J. Raman Spectrosc.* **43** (2012), 1183 – 1190.
- [68] J. J. Cárcamo, A. E. Aliaga, E. Clavijo, C. Garrido, J. S. Gómez-Jeria, M. M. Campos-Vallette: Proline and hydroxyproline deposited on silver nanoparticles. A Raman, SERS and theoretical study, *J. Raman Spectrosc.* **43** (2012), 750 – 755.
- [69] A. E. Aliaga, C. Garrido, P. Leyton, G. Diaz F., J. S. Gomez-Jeria, T. Aguayo, E. Clavijo, M. M. Campos-Vallette, S. Sanchez-Cortes: SERS and theoretical studies of arginine, *Spectrochim. Acta A* **76** (2010), 458 – 463.
- [70] E. Podstawka, Y. Ozaki, L. N. Proniewicz: Adsorption of S-S Containing Proteins on a Colloidal Silver Surface Studied by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* **58** (2004), 1147 – 1156.
- [71] F. Wei, D. Zhang, N. J. Halas, J. D. Hartgerink: Aromatic Amino Acids Providing Characteristic Motifs in the Raman and SERS Spectroscopy of Peptides, *J. Phys. Chem. B* **112** (2008), 9158 – 9164.

- [72] C. David, N. Guillot, H. Shen, T. Toury, M. L. Chapelle: SERS detection of biomolecules using lithographed nanoparticles towards a reproducible SERS biosensor, *Nanotechnology* **21** (2010), 1 – 6.
- [73] E. Podstawka-Proniewicz, Y. Ozaki, Y. Kim, Y. Xu, L. M. Proniewicz: Surface-enhanced Raman scattering studies on bombesin, its selected fragments and related peptides adsorbed at the silver colloidal surface, *Appl. Surf. Sci.* **257** (2011), 8246 – 8252.
- [74] X. X. Han, G. G. Huang, B. Zhao, Y. Ozaki: Label-Free Highly Sensitive Detection of Proteins in Aqueous Solutions Using Surface-Enhanced Raman Scattering, *Anal. Chem.* **81** (2009), 3329 – 3333.
- [75] V. Kopecký Jr., V. Baumruk: Structure of the ring in drop coating deposited proteins and its implication for Raman spectroscopy of biomolecules, *Vib. Spectrosc.* **42** (2006), 184 – 187.
- [76] C. Otto, T. J. J. van den Tweel, F. F. M. de Mul, J. Greve: Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of DNA Bases, *J. Raman Spectrosc.* **17** (1986), 289 – 298.
- [77] E. Koglin, J.-M. Séquaris: Surface Enhanced Raman Scattering of Biomolecules, *Top. Curr. Chem.* **134** (1986), 1 – 57.
- [78] L. Grajcar, M.-H. Baron: A SERS probe of adenyl residues available for intermolecular interactions. Part I – adenyl ‘fingerprint’, *J. Raman Spectrosc.* **32** (2001), 912 – 918.
- [79] K. C. Bantz, A. F. Meyer, N. J. Wittenberg, H. Im, Ö. Kurtulus, S. H. Lee, N. C. Lindquist, S.-H. Oh, C. L. Haynes: Recent progress in SERS biosensing, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13** (2011), 11551 – 11567.
- [80] D. L. Nelson, M. M. Cox: *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York, 2008 (fifth edition), ISBN: 978-0-7167-7108-1.
- [81] T. E. Rohr, T. Cotton, N. Fan, P. J. Tarcha: Immunoassay employing surface-enhanced Raman spectroscopy, *Anal. Biochem.* **182** (1989), 388 – 398.

- [82] J. Homola: Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species, *Chem. Rev.* **108** (2008), 462 – 493.
- [83] Z. Wang, L. J. Rothberg: Silver nanoparticle coverage dependence of surface-enhanced Raman scattering, *Appl. Phys. B* **84** (2006), 289 – 293.
- [84] V. Thomsen, D. Schatzlein, D. Mercurio: Limits of Detection in Spectroscopy, *Spectroscopy* **18** (2003), 112 – 114.
- [85] E. R. Malinowski: Factor Analysis in Chemistry. J. Wiley & Sons, New York, 2002 (third edition), ISBN: 0-471-13479-1.
- [86] Ch. Mou, D. Chen, X. Wang, B. Zhang, T. He, H. Xin, F. Liu: Surface-enhanced Raman scattering of TSPP, Ag(II)TSPP, and Pb(II)TSPP adsorbed on AgI and AgCl colloids, *Spectrochim. Acta A* **47** (1991), 1575 – 1581.
- [87] Ch. Mou, D. Chen, X. Wang, B. Zhang, T. He, H. Xin, F. Liu: SERS and UV spectra of meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl)-porphine adsorbed on Ag₂O colloids, *Chem. Phys. Lett.* **179** (1991), 237 – 242.
- [88] P. Negri, N. E. Marotta, L. A. Bottomley, R. A. Dluhy: Removal of Surface Contamination and Self-Assembled Monolayers (SAMs) from Silver (Ag) Nanorod Substrates by Plasma Cleaning with Argon, *Appl. Spectrosc.* **65** (2011), 66 – 74.
- [89] N. Nuntawong, P. Eiamchai, B. Wong-ek, M. Horprathum, K. Limwichean, V. Patthanasettakul, P. Chindaudom: Shelf time effect on SERS effectiveness of silver nanorod prepared by OAD technique, *Vacuum* **88** (2013), 23 – 27.
- [90] Z.-G. Shang, D. N. Ting, Y. T. Wong, Y. C. Tan, B. Ying, Y.-J. Mo: A study of DFT and surface enhanced Raman scattering in silver colloids for thymine, *J. Mol. Struct.* **826** (2007), 64 – 67.
- [91] J. Stepanek, M. Vincent, P.-Y. Turpin, D. Paulin, S. Femandjian, B. Alpert, C. Zentz: C → G base mutations in the CARG box of *c-fos* serum response element alter its bending flexibility, *FEBS J.* **274** (2007), 2333 – 2348.
- [92] A. Barhoumi, D. Zhang, F. Tam, N. J. Halas: Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of DNA, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008), 5523 – 5529.

Seznam zkratek

AFM – atomic force microscopy

CT – charge transfer

DCDR – drop coating deposition Raman

EF – enhancement factor

FON – film over nanospheres

GLAD – glancing angle deposition

HOMO – highest occupied molecular orbital

LOD – limit of detection

LUMO – lowest unoccupied molecular orbital

NSL – nanosphere lithography

OAD – oblique angle deposition

SEM – scanning electron microscopy

SERRS – surface enhanced resonant Raman scattering

SERS – surface enhanced Raman scattering

SPE – surface plasmon extinction

SPR – surface plasmon resonance

SVD – singular value decomposition

TEM – transmission electron microscopy

TERS – tip enhanced Raman scattering

ÚFE – Ústav fotoniky a elektroniky