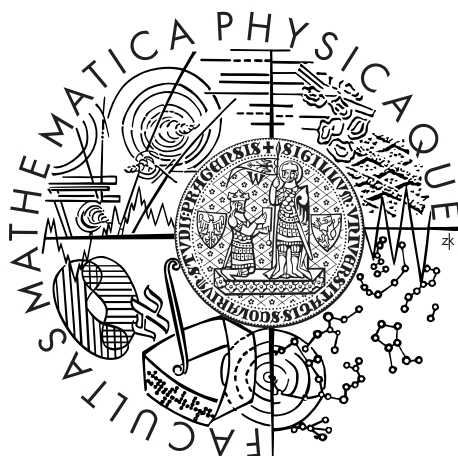


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Václav Alt

Zesílená emise na kovových nanostrukturách

Fyzikální ústav Univerzity Karlovy - oddělení biofyziky

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Petr Heřman, CSc.

Studijní program: Fyzika, Obecná fyzika

Praha 2014

Chtěl bych poděkovat doc. RNDr. Petru Heřmanovi, CSc. za cenné rady, odborné vedení, výpomoc při měření a vstřícnost při konzultacích a vypracování bakalářské práce.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou 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 15. května 2014

Václav Alt

Název práce: Zesílená emise na kovových nanostrukturách.

Autor: Václav Alt

Katedra: Fyzikální ústav Univerzity Karlovy - oddělení biofyziky

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Petr Heřman, CSc., Fyzikální ústav Univerzity Karlovy - oddělení biofyziky

Abstrakt: Fluorescence je v dnešní době široce využívaným jevem. Ukazuje se, že v blízkosti kovových nanostruktur může docházet k výraznému zesílení fluorescence, což může mnohá praktická využití. V této práci se zabýváme přípravou těchto kovových nanostruktur, konkrétně v podobě tenkého filmu tvořeného mnoha stříbrnými ostrůvky, a následným měřením zesílení. K vyhodnocení zesílení fluorescence zkusíme různé metody, z nichž dvě vedou k použitelným výsledkům. Součástí práce je popis přípravy nanostruktur, výklad použitých metod a naměřené emisní a excitační spektra použitých fluoroforů.

Klíčová slova: fluorescence, radiative decay engineering, kovové nanostruktury

Title: Enhanced emission on metal nanostructures

Author: Václav Alt

Department: Institute of Physics of the Charles University - Biophysics Division

Supervisor: doc. RNDr. Petr Heřman, CSc., Institute of Physics of the Charles University - Biophysics Division

Abstract: Today, fluorescence is a broadly used phenomenon. It is known, that in presence of metal nanostructures the fluorescence emission rate can be extensively enhanced. In this thesis we study the preparation of such nanostructures, specifically in the form of a thin film made of many silver islands, followed by measuring the expected enhancement. We try several methods for enhancement evaluation, two of which lead to usable results. Thesis contains description of nanostructures preparation, explanation of used methods and measured emission and excitation spectra of used fluorophores.

Keywords: fluorescence, radiative decay engineering, metal nanostructures

Obsah

Úvod	2
1 Fluorescence	3
1.1 Základní informace	3
1.2 Popis fluorescence	4
2 Radiative Decay Engineering	6
2.1 Kovem zesílená fluorescence	6
2.2 Určení zesílení	6
3 Příprava a měření	8
3.1 Metoda přípravy SIF	8
3.2 Vlastní příprava	8
3.3 Hledání zesílení	10
3.4 Porovnání fluoroforů s vysokým a nízkým kvantovým výtěžkem	14
3.4.1 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ a Fluorescein	16
3.4.2 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ a Rhodamin 560	17
3.4.3 Erythrosin B a DCM	18
3.4.4 ANS	20
3.5 Časově rozlišená měření	21
Diskuze	22
Závěr	23
Seznam použité literatury	24
Příloha 1 - Použité fluorofory	25
ANS	25
Erythrosin B	26
DCM	27
Fluorescein	28
Rhodamin 560	29
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	30

Úvod

Fluorescence má v dnešní době velmi široké využití. Nachází uplatnění v optoelektronice, medicíně, biologii či analytické chemii. Pomocí fluorescence lze například stanovit koncentrace plynů rozpuštěných v kapalinách, fluorofory lze použít jako indikátory pH, existuje celá řada fluorescenčních sond, které fluoreskují pouze v přítomnosti specifických molekul. Některé látky se dokonce stávají fluorofory, až když se naváží například na buněčnou membránu. Díky tomu lze snáze sledovat některé buněčné procesy, neboť buněčné membrány pak pod mikroskopem zřetelně svítí.

Při určování koncentrací látek bývá často, zejména v medicíně, rozhodující nízký detekční limit koncentrace hledané látky. Z tohoto hlediska je zajímavé zabývat se možnostmi zesílení emise těchto fluorescenčních sond. Ukazuje se, že k výraznému zesílení emise může dojít, je-li v blízkosti fluoroforu přítomen kov v podobě malých částic nebo nanostruktur. V této práci se zabývám chemickou přípravou těchto nanostruktur a provádím testovací měření zesílení fluorescence na několika vybraných fluoroforech různými metodami.

1. Fluorescence

1.1 Základní informace

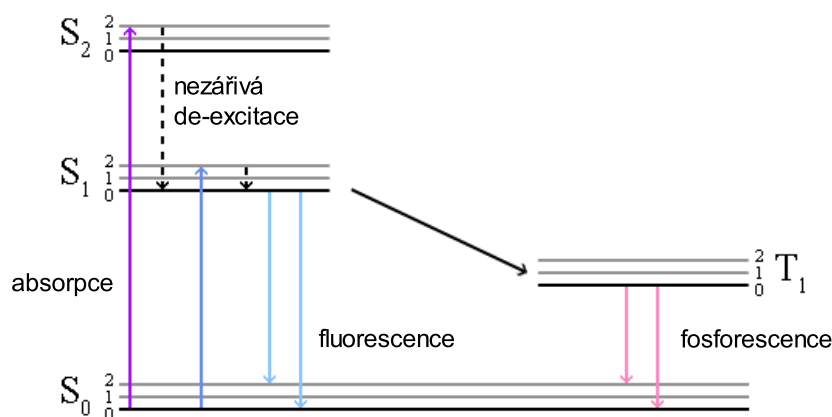
Princip fluorescence je podrobně popsán např. v [1]. Fluorescence je speciálním případem jevu obecnějšího - luminiscence. Luminiscencí nazýváme pohlcení energie látkou a její následné vyzáření v podobě světla. Látka schopná luminiscence se nazývá *luminofo*r, přičemž tímto luminoforem může být samostatný atom, molekula či směs různých molekul. K samotné absorpci a následné emisi však dochází v rámci jednoho atomu. Mechanismus luminiscence je ve své podstatě jednoduchý. Přijme-li daný atom určité množství energie, přejde jeden z jeho elektronů do vyššího energetického stavu. Atom je excitován. Tento excitovaný stav však není stabilní a elektron opět klesne do nižšího stavu. Odpovídající rozdíl energií může být vyrovnán vyzářením fotonu příslušné vlnové délky.

V závislosti na povaze excitovaného stavu dělíme luminiscenci do dvou kategorií — fluorescence a fosforescence. Fluorescence je emise fotonu při přechodu z singletního excitovaného stavu, fosforescence ze stavu tripletního. Pojmenování stavů singletní a tripletní souvisí s degenerací příslušné energetické hladiny: uvažujme soustavu dvou částic se spinem $1/2$, například elektron a proton. Celkovému spinu 0 odpovídá pouze jeden stav, kdežto celkovému spinu 1 odpovídají 3 stavy. Odtud tedy názvy singlet a triplet. Podrobně je problematika popsána např. v [2].

Elektron v singletním excitovaném stavu je navíc doplněn elektronem v základním stavu, který má však opačný spin, a návrat vybuzeného elektronu do základního stavu je povolen. Oproti tomu elektrony v tripletním stavu mají stejnou orientaci spinu jako elektron v základním stavu a jejich návrat je tedy zakázán. Zásadní rozdíl mezi fluorescencí a fosforescencí je tedy v době života příslušných excitovaných stavů, která v případě fluorescence činí řádově 10 ns, kdežto u fosforescence se pohybuje v rozmezí milisekund až sekund, občas i minut.

Z popsaného mechanismu by plynulo, že energie vyzářeného fotonu bude přesně odpovídat rozdílu energií mezi jednotlivými hladinami, u skutečných fluoroforů však bývá nižší. To je dáno tím, že běžný fluorofor obvykle bývá větší molekula a jednotlivé energetické hladiny elektronů jsou dále štěpeny na několik vibračních podhladin. Elektrony v excitovaném atomu zpravidla zaujmou místo na nějaké z vyšších vibračních hladin a následně v řádu 10^{-12} s nebo rychleji přechází do nižších vibračních hladin. Tento přechod nebývá spojen s vyzářením fotonu. Z nejnižších vibračních hladin pak přecházejí do základního stavu, za vyzáření fotonu o energii, která je tedy menší, než energie fotonu absorbovaného. Tomuto jevu se říká Stokesův posun. To se projeví i na příslušných emisních a absorpčních spektrech. Jelikož je energie emitovaného fotonu nižší, je celé emisní spektrum oproti absorpčnímu posunuto k nižším energiím, potažmo větším vlnovým délkám.

Tyto procesy lze schématicky zakreslit v takzvaném Jablonského diagramu, který je na obrázku 1.1.



Obrázek 1.1: Jablonského diagram

1.2 Popis fluorescence

Nejdůležitějšími veličinami sloužícími k popisu fluorescence jsou *kvantový výtěžek* a *doba života*. Kvantový výtěžek Q se zavádí jako poměr mezi počtem emitovaných a absorbovaných fotonů za jednotku času. Označíme-li četnost přechodů z excitovaného stavu do základního spojených s emisí fotonu Γ a četnost přechodů bez emise fotonu k_{nr} , lze kvantový výtěžek vyjádřit

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}. \quad (1.1)$$

Četnost k_{nr} (nr = non-radiative) zahrnuje obecně nezářivé přechody do základního stavu bez ohledu na jejich mechanismus či příčinu. Zatímco četnosti Γ a k_{nr} se mohou v principu pohybovat od nuly do nekonečna, kvantový výtěžek může nabývat pouze hodnot v rozmezí od 0 do 1. Jednotkový kvantový výtěžek má tedy zřejmě ten fluorofor, jehož každý excitovaný elektron při návratu do základního stavu vyzáří foton.

Doba života se obvykle definuje jako průměrná doba, kterou luminofor (molekula, atom, ...) setrvává v excitovaném stavu. Ze zavedení výtěžku Q je zřejmé, že doba života τ je dána vztahem

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}}. \quad (1.2)$$

Jedním z procesů, který stojí za nezářivým vyprazdňováním excitovaných stavů je takzvané *zhášení fluorescence* (fluorescence quenching). Zhášení fluorescence je však velmi široký pojem a zahrnuje řadu mechanismů, které snižují výsledný kvantový výtěžek. K tomu může docházet například tak, že je přítomna látka, která dohromady s fluoroforem tvoří nefluorescenční komplex. Za zvyšováním četnosti nezářivých přechodů může stát dynamické (kolizní) zhášení. Při něm je excitovaný elektron sražen do základního stavu jinou molekulou. Tedy fluorofor, který by osamocen dosahoval kvantového výtěžku blízkému 1, nemusí v roztoku fluoreskovat vůbec, neboť může být kompletně zhášen.

Jiným efektem, který může ovlivnit intenzitu fluorescence je *FRET* - Fluorescence Resonance Energy Transfer. K tomuto jevu dochází, když se emisní spektrum fluoroforu (donoru) překrývá s absorpčním spektrem jiné látky (akceptoru). Dochází pak k dipól-dipólové interakci mezi donorem a akceptorem, která má za následek deexcitaci donoru. Akceptor přitom vůbec nemusí být fluoroforem, ale pokud je, stává se pro něho FRET dalším zdrojem excitace.

Po jednorázové excitaci (například pulsem, zpravidla mnohem kratším než je doba života fluorescence) se elektrony začnou vracet do základních stavů a počet excitovaných molekul se postupně snižuje a klesá tak i intenzita fluorescence. Průběh poklesu intenzity má tvar rozpadového zákona:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau}, \quad (1.3)$$

kde τ je právě doba života fluorescence.

2. Radiative Decay Engineering

Zde vycházím z [1], [3] a [4]. Pojmem *Radioactive Decay Engineering* (RDE) rozumíme obecně změnu podmínek, ve kterých sledujeme fluorescenci daného fluoroforu, za účelem změn v četnosti přechodů spojených s emisí záření (ideálně jejího zvýšení).

2.1 Kovem zesílená fluorescence

Ukazuje se, že v blízkosti kovových povrchů nebo částic může dojít k výrazným změnám v charakteru emise. Fluorescenční spektroskopické experimenty se obvykle provádějí na vzorcích, jejichž celkový rozměr je mnohonásobně větší než průměrné rozměry jednotlivých fluoroforů (zpravidla molekul). Fluorescence, kterou takto pozorujeme, je tedy proces, který vlastně probíhá ve volném prostoru (v dobrém přiblížení). Právě přítomnost kovu, ať už v podobě filmu nebo jednotlivých částic, tuto situaci výrazně mění.

Z teoretického hlediska by bylo třeba vyřešit Maxwellovy rovnice pro danou situaci. V krátkosti lze říci, že změny v četnosti přechodů jsou důsledkem interakcí excitovaných fluoroforů s volnými elektrony v kovu, který je následně polarizován a svým polem tak působí na fluorofor.

Dle [3] předpokládáme, že přítomnost kovové vrstvy navýší četnost zářivých přechodů o Γ_m . Kvantový výtěžek pak je

$$Q_m = \frac{\Gamma + \Gamma_m}{\Gamma + \Gamma_m + k_{nr}} \quad (2.1)$$

a odpovídající doba života

$$\tau_m = \frac{1}{\Gamma + \Gamma_m + k_{nr}} \quad (2.2)$$

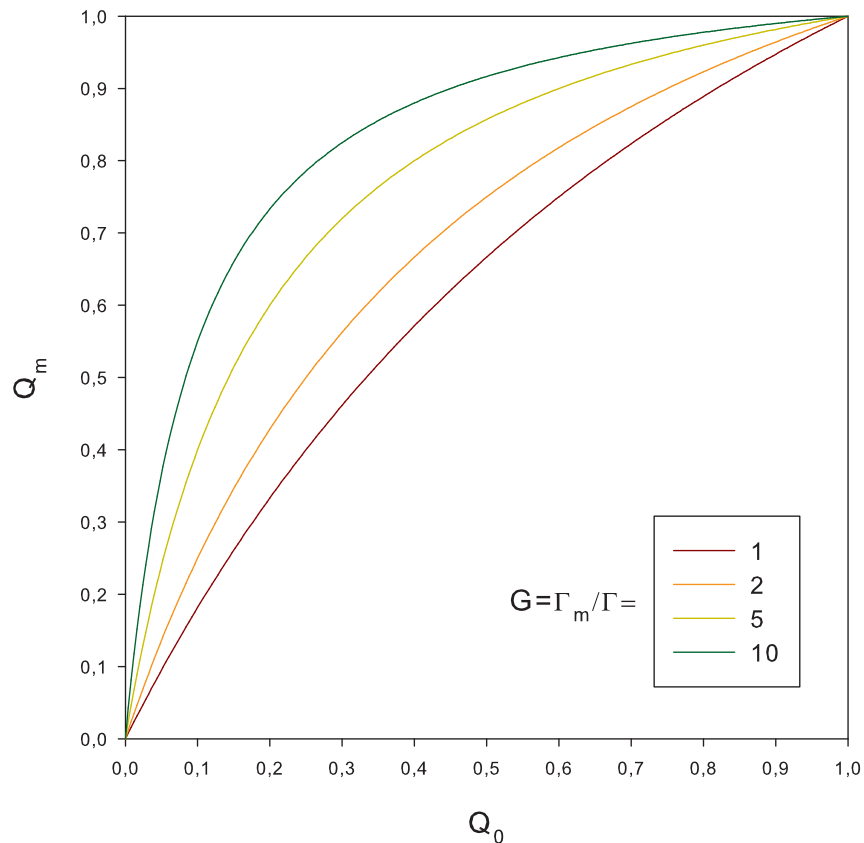
Vidíme tedy, že doba života se v přítomnosti kovových struktur zkracuje. Bližší pozornost si však zaslouží otázka, do jaké míry se změní kvantový výtěžek. V grafu na obrázku 2.1 je vynesena závislost zesíleného kvantového výtěžku Q_m na nezesíleném Q_0 pro různé hodnoty Γ_m . Rovnici křivek v grafu lze získat z rovnic 1.1 a 2.1:

$$Q_m(Q_0) = \frac{Q_0(G + 1)}{Q_0G + 1}, \quad (2.3)$$

kde $G = \Gamma_m/\Gamma$. Zajímavé je, že zesílení nezávisí na hodnotě k_{nr} . Je zřejmé, že u fluoroforů s kvantovým výtěžkem blízko jedné nelze očekávat výrazné zvětšení, zatímco u fluoroforů, které příliš nezáří, může v blízkosti kovových struktur dojít k silnému zesílení.

2.2 Určení zesílení

Nabízí se dva experimentální přístupy k určení zesílení. Prvním z nich je sledování absolutní intenzity fluorescence. Teoreticky by mělo stačit změřit intenzitu



Obrázek 2.1: Kovem zesílený kvantový výtěžek Q_m v závislosti na nezesíleném Q_0 při různých poměrech zářivých přechodů v přítomnosti kovu a bez kovu

samostatného fluoroforu a poté v přítomnosti kovu a intenzity porovnat. Tento přístup však naráží na jisté překážky, o kterých píše v části 3.3.

Jinou možností je časově rozlišené měření. Při tomto postupu je fluorofor excitován řadou krátkých světelných pulsů, jejichž časové rozestupy jsou podstatně delší než doba života fluorescence (aby fluorofor stihl dohasnout) a měří se průběh intenzity v čase. Proložení naměřeného průběhu křivkou 1.3 lze stanovit dobu života fluorescence. Dojde-li v blízkosti kovu k zesílení, naměříme tedy kratší dobu života než u samostatného fluoroforu.

3. Příprava a měření

3.1 Metoda přípravy SIF

Při přípravě laboratorních sklíček s kovovou vrstvou jsem následoval postup popsaný v [3], jedná se tedy o přípravu stříbrného filmu (SIF - Silver Islands Film). Příprava je ryze chemická. Před samotným nanesením stříbrné vrstvy je nutno sklíčka důkladně vyčistit. Vhodným způsobem se zdá být ponoření sklíček do směsi 95–98% H_2SO_4 a 30% H_2O_2 alespoň přes noc. Samotné nanesení kovu pak probíhá v 30 ml kádince s magnetickým míchátkem. Do rychle míchaného roztoku AgNO_3 (0,22 g v 26 ml destilované vody) se přidá 8 kapek čerstvého 5% roztoku NaOH , který způsobí tvorbu tmavě hnědých sraženin. Poté se přidá necelý 1 ml NH_3OH , který vzniklé sraženiny znovu rozpustí.

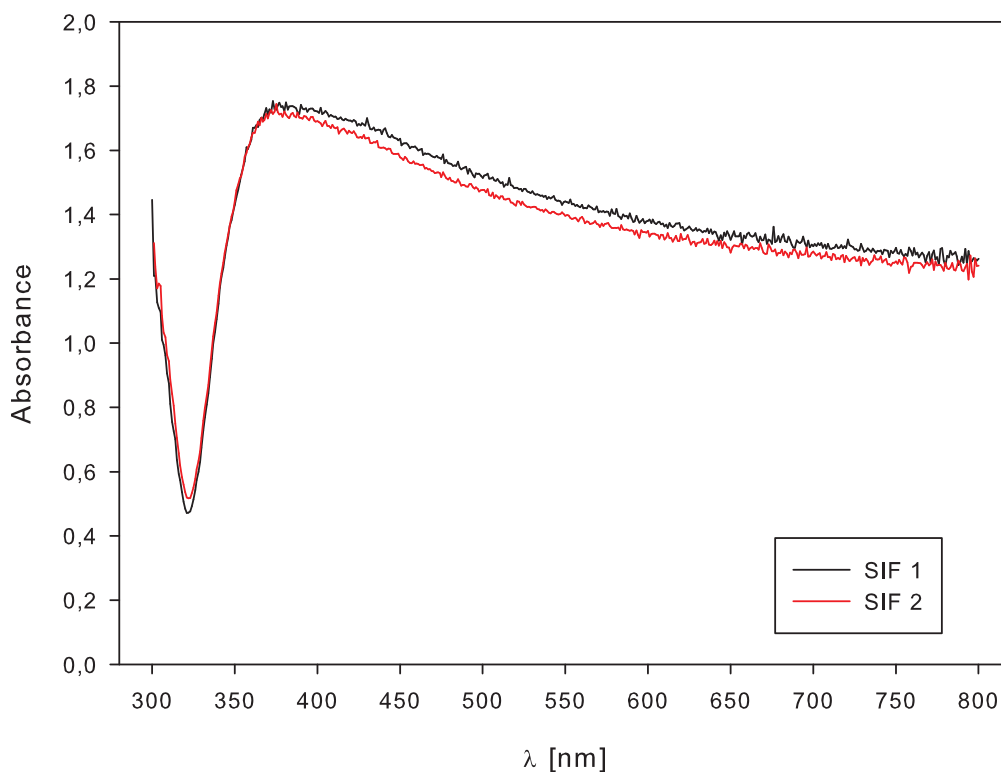
Za teploty 5°C a stálého míchání se do směsi vloží destilovanou vodou opláchnuté a očištěné destičky a přidá se čerstvý roztok D-glukózy (0,35 g v 4 ml destilované vody) a směs se nechá 2 minuty míchat. Následně se směs nechá zvolna zahřát na 30°C , přičemž se počne zakalovat a barva postupně přechází od žlutozelené po žlutohnědou. Nakonec se sklíčka vyjmou, opláchnou destilovanou vodou a vloží na minutu do sonikátoru, který je zbaví špatně uchycených částic stříbra. Výsledkem by měla být stříbrná vrstva tvořená rovnoměrně rozmístěnými ostrůvky o velikosti 300–400 nm .

3.2 Vlastní příprava

Přípravu stříbrné vrstvy jsem nejprve testoval na obyčejných sklíčkách do mikroskopu, protože křemenné destičky jsou drahé. Řídil jsem se postupem popsaným výše, ale byl jsem nucen se ve dvou krocích trochu odchýlit. Nepodařilo se mi připravit ledovou lázeň, neboť ledovač vypověděl službu. Přípravu jsem tedy provedl bez přesné kontroly teploty, jenom na míchačce jsem nechal roztok chvíli zahřívát. Změny teploty v rámci postupu zřejmě slouží pouze k regulaci hustoty stříbrných ostrůvků, za pokus to tedy stálo.

Takto jsem tedy připravil první dvě sklíčka. Výsledkem byla souvislá, stříbřitě lesklá vrstva, která se pozvolna vytrácela v místě, kam dosahovala hladina roztoku. Obě sklíčka jsem poté ponořil do destilované vody a uložil do lednice. Do laboratoře jsem se dostal až po dvou týdnech od přípravy, ale navzdory předpovědi v [3] jsem na sklíčkách neshledal žádné degradující změny. Obě jsem osušil fénem a proměřil jejich absorbanci. Spektra jsou vidět na obrázku 3.1. Měřil jsem na spektrometru Varian a spektrum je korigováno na pozadí proměřením absorbance čistého sklíčka, které výrazně absorbuje v UV pásmu.

Při dalším pokusu jsem již reguloval teplotu. Měl jsem k dispozici ledovou lázeň, v níž se mi teplotu podařilo snížit na 6°C . Následný ohřev jsem realizoval přímo na magnetické míchačce, která je k tomu vybavena. Nechal jsem tak směs se sklíčky ohřát na 30°C , poté jsem sklíčka opláchl destilovanou vodou a umístil do sonikátoru. Z jednoho sklíčka však skoro celá vrstva odpadla. Domnívám se, že je to nedostatečným očištěním, které jsem z časových důvodů realizoval pouze po dobu cca půl hodiny, namísto celonoční lázně.

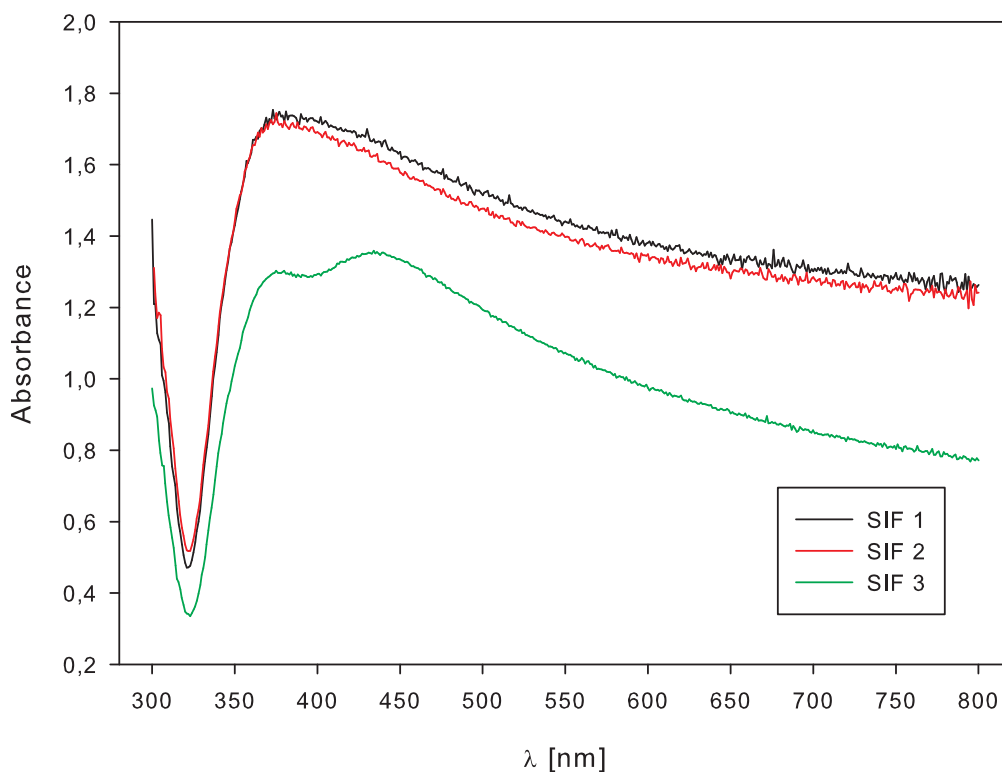


Obrázek 3.1: Spektrum absorpance sklíček 1 a 2

Proměřil jsem též absorpaci třetího sklíčka a výsledné spektrum je vyneseno v grafu na obrázku 3.2, společně se spektry prvních dvou sklíček. Absorbance třetího sklíčka je o poznání nižší než u prvních dvou, což nasvědčuje tomu, že stříbrné ostrůvky jsou rozmístěny řidčeji.

V dalších pokusech jsem kontroloval čas, který sklíčka strávila v lázni. Ukázalo se, že rychlost tvorby vrstvy závisí na dalších, jemnějších faktorech, které jsem blíže neidentifikoval. Při jednom pokusu jsem dobu ohřevu volil 3,5 minuty a poté nechal míchat dalších 5 minut. Výsledkem byla uspokojivě pokrytá skla. Při dalším pokusu se však ještě po 10 minutách od počátku ohřevu nezačal tvořit ani zákal v roztoku. Po celkových 18 minutách jsem skla vyjmul (na vnitřní stěně kádinky se již utvořila lesklá, stříbrná vrstva). Vrstva na sklech z této várky však byla značně nekvalitní - při manipulaci (např. osušení přiložením k buničině) se vrstva na rozdíl od předchozích velmi snadno stírala.

Jedno sklíčko se SIF bylo zobrazeno elektronovým mikroskopem TM-1000 firmy Hitachi. Ze snímků na obrázku 3.3 je patrné, že velikost stříbrných ostrůvků se pohybuje v rozmezí od 100 do 400 nm. Výsledné vrstvy jsou tedy uspokojivé. Na pozorovaném sklíčku byl SIF místy poškozen, čehož jsem využil ke srovnání. Na snímcích v levém sloupci je neporušená oblast, na snímcích vpravo je oblast s pozůstalými stříbrnými ostrůvky po setření SIF. Je vidět značně rozdílnou hustotu ostrůvků.

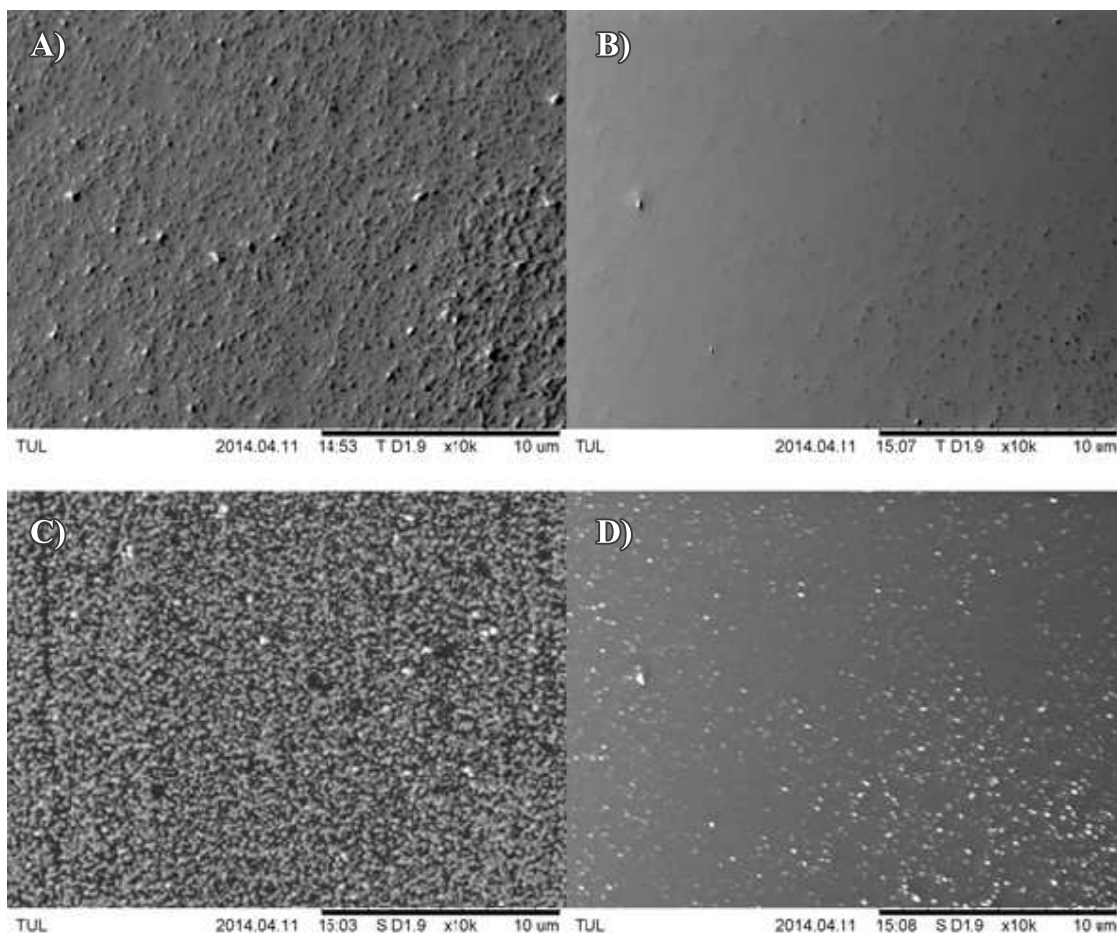


Obrázek 3.2: Spektrum absorpce sklíček 1, 2 a 3

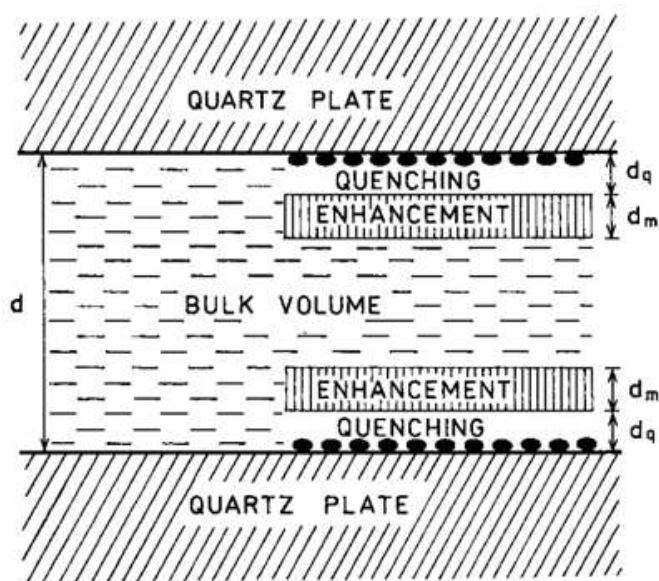
3.3 Hledání zesílení

K zesílení fluorescence má dojít v přítomnosti stříbrné vrstvy. Když jsem však fluorofor ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$) nanesl na sklíčko, nebylo patrné zda k nějakému zesílení vůbec dochází nebo ne, protože dopadající excitující světlo se zároveň odrazí od stříbrné vrstvy, což znesnadňuje spolehlivé porovnání zesílení. Navíc dle [3] má vliv kovu pouze omezený dosah - přibližně do 50 Å je fluorescence zhasena a k zesílení dochází pouze do vzdálenosti řádově 100 Å. Takže zesílená fluorescence má jen malý podíl na celkovém pozorované intenzitě - zastřena velkým množstvím nezesílené fluorescence z objemu vzorku. Situace je ilustrována na obrázku 3.4. V obrázku je vyznačena oblast o tloušťce d_q , ve které je fluorescence zhasena, oblast tloušťky d_m , ve které je emise zesílena (černá kolečka znázorňují SIF). Obrázek je převzat z [3], proto jsou v něm zakreslena křemenná sklíčka a SIF je na obou stranách vzorku.

Bylo tedy třeba, aby se excitované světlo odráželo stejně jak v místě, kde je fluorofor ve styku se SIF, tak i v místě, kde není. Jelikož se při přípravě sklíčka pokryjí SIF z obou stran, zkusil jsem jich připravit několik tak, že na každé straně jsem odstranil půlku vrstvy (obrázek 3.5). Toho jsem docílil tak, že jsem sklíčka polepil lepicí páskou před nanášením SIF. Hranice SIF jsou pak ostré. Příprava je však velmi nespolehlivá a pracná. Polepení vyžaduje mnoho času a při zahřívání roztoku se pomalu rozpouští lepidlo a páska se odlepí. Vyzkoušel jsem postup i s páskou určenou k použití v náročnějším prostředí - měla být odolná vůči vlhkosti a vydržet na slunci. Výsledek byl však stejný. Navíc bych těžko odhadoval vliv



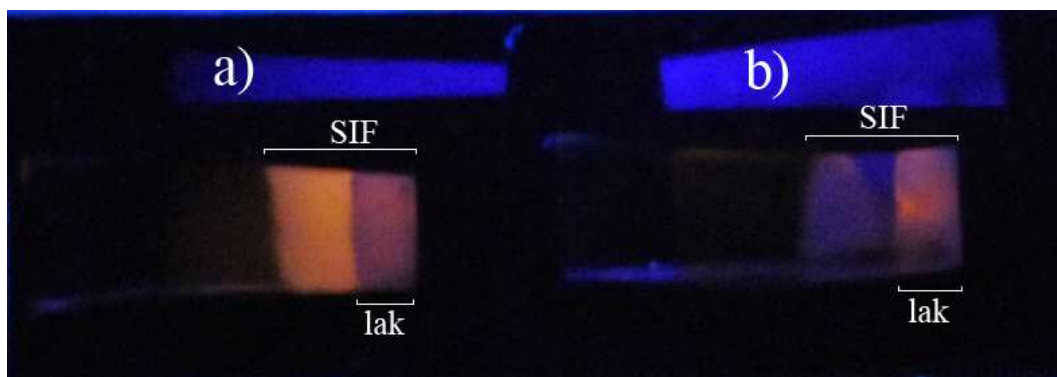
Obrázek 3.3: Snímky SIF z elektronového mikroskopu: A) Oblast s dobrým krytím SIF; B) Oblast se setřeným SIF, pozůstalé ostrůvky; C) a D) stejné oblasti snímáné v režimu s větším kontrastem



Obrázek 3.4: Fluorofor mezi dvěma křemennými sklíčky, z [3]



Obrázek 3.5: Sklíčko s kontrolovaným pokrytím SIF



Obrázek 3.6: a) Rhodamin 610/glycerol; b) Rhodamin 610/voda

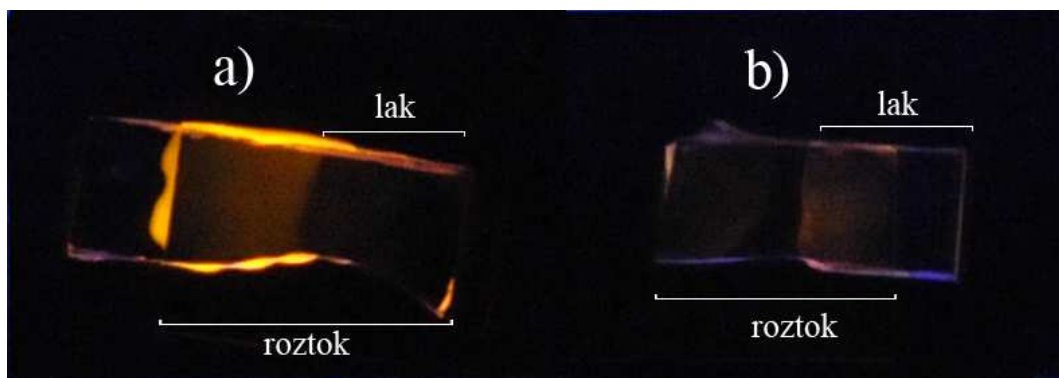
lepidla na fluorescenci. Tento postup se tedy ukázal být nevhodný.

Jako alternativu jsem zvolil lak na nehty. Pořídil jsem obyčejný bezbarvý lak na nehty, kterým jsem následně přetřel část SIF. Vrstvou laku, o které s jistotou předpokládám, že je silnější než 100 Å, jsem tak oddělil fluorofor od SIF. Pro prvotní testování jsem zvolil Rhodamin B. Malé množství (řádově 5 μl) jsem umístil na sklíčko se SIF a lakem a překryl krycím sklíčkem. Následně jsem vzorek pozoroval pod obyčejnou UV lampou (UV stačí k excitaci Rhodaminu B). Vodný roztok však velice rychle vysychá a v řádu minut již není schop fluorescence, zkusil jsem proto rozpustit trochu Rhodaminu v glycerolu.

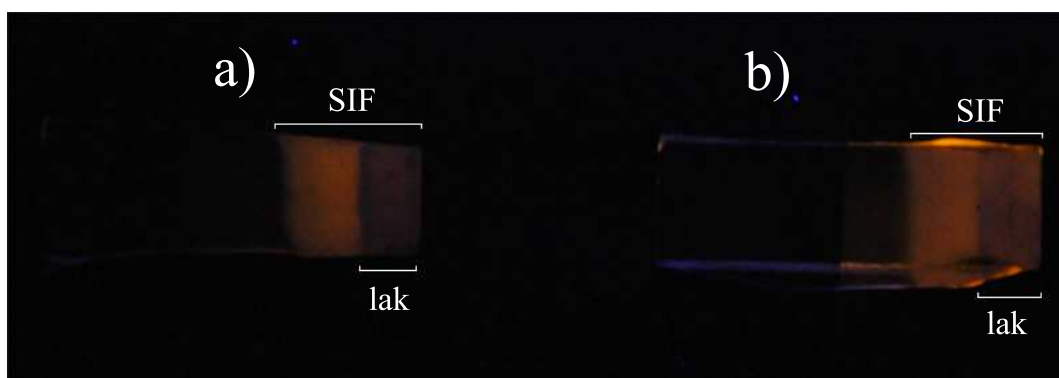
Vzorokly s Rhodaminem v glycerolu a ve vodě jsou na obrázku 3.6. Na první pohled je vidět, že jsem dosáhl dvou různých výsledků. Vyzkoušel jsem proto ještě jak ovlivní fluorescenci vrstva laku na jinak čistém skle (tj. bez SIF), výsledek je na obrázku 3.7. Chování je zde stejné jako v prvním případě: roztok v glycerolu fluoreskuje silněji mimo lak, u vodného roztoku je to naopak. Příčinou je zřejmě odlišné chování glycerolu na lakové vrstvě - glycerol má tendenci z laku stéct (což jsem pozoroval při nanášení), v důsledku čehož se mimo lak tvoří silnější vrstva. Ta ve výsledku i silněji svítí. Kromě toho je vrstva laku sama o sobě dosti silná, neboť lak je velmi hustý. Pro další pokusy jsem tedy zkusil lak naředit acetonem.

Zředěným lakem bylo možné vytvořit zřetelně tenčí vrstvu. Opět jsem nanas Rhodamin B v glycerolu. Ředění laku přineslo očekávaný výsledek - tloušťka vrstvy nanášeného roztoku poklesla, pozorované intenzity se poněkud vyrovnaly (viz obrázek 3.8).

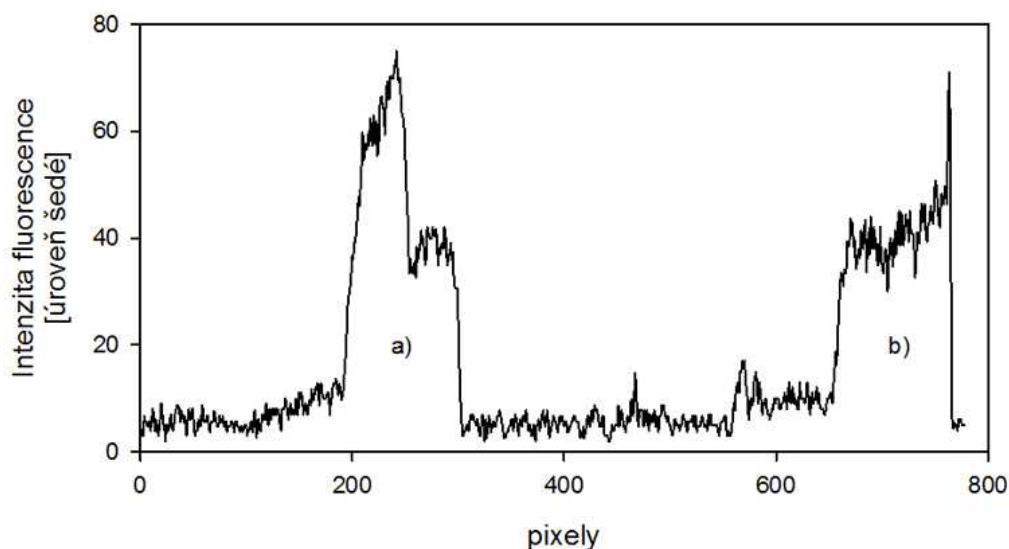
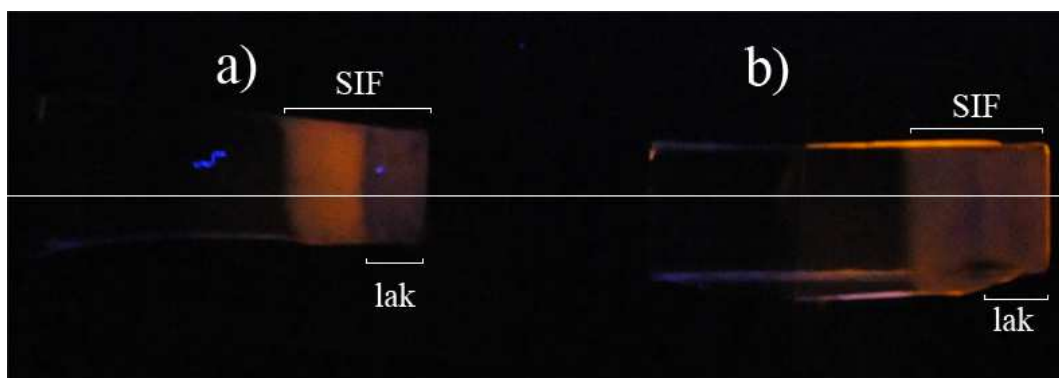
Při nanášení roztoku jsem zkusil ještě krycí sklíčko poněkud přitlačit, abych minimalizoval rozdíly mezi vrstvami roztoku na laku a na SIF, tím se však veškerý okem pozorovatelný rozdíl v intenzitách prakticky vyrušil (obrázek 3.9). To je ostatně vidět i na přiloženém intenzitním řezu. Ukázalo se, že pozorovaná intenzita značně závisí na tloušťce vrstvy laku a na přitlačení krycího sklíčka. Není tedy možné takto zesílení fluorescence pozorovat, metodu jsem proto opustil.



Obrázek 3.7: a) Rhodamin 610/glycerol; b) Rhodamin 610/voda



Obrázek 3.8: Rhodamin 610/glycerol - a) neředěný lak; b) ředěný lak



Obrázek 3.9: **Nahoře:** Rhodamin 610/glycerol - a) neředěný lak; b) ředěný lak, důkladně přitlačené krycí sklíčko; **Dole:** intenzitní řez podél bílé čáry v horním obrázku

3.4 Porovnání fluoroforů s vysokým a nízkým kvantovým výtěžkem

Vzhledem k artefaktům při prostých intenzitních měřeních bylo přistoupeno k měření poměrovou metodou s vnitřní referencí. Bylo pozorováno zesílení fluorescence na směsi dvou fluoroforů, z nichž jeden má vysoký kvantový výtěžek (nemůže tedy dojít k většímu zesílení fluorescence), druhý, referenční, má nízký kvantový výtěžek. Každý má maximum emise na jiné vlnové délce. Smícháme-li takové fluorofory ve vhodném poměru a umístíme-li je na čisté sklo, pozorujeme v emisním spektru dvě stejně vysoká maxima (důsledek volby koncentrací). Umístíme-li však tutéž směs na sklo se SIF, měl by být vrchol odpovídající fluoroforu s nízkým kvantovým výtěžkem výrazně větší oproti emisnímu vrcholu reference.

Tato metoda byla vyzkoušena pro $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ se dvěma různými referencemi (Fluorescein a Rhodamin 560) a pro Erythrosin B s DCM jako referencí. Porovnáním absolutních intenzit emisních maxim u jednotlivých fluoroforů byl stanoven poměr, ve kterém je třeba je mísit, aby ve výsledné směsi zářily se stejnou intenzitou. Poté byla proměřena emisní spektra směsi každé dvojice na skle a na SIF.

Jelikož není v mých možnostech umístit oba vzorky do spektrometru naprosto stejně, bylo výsledné zesílení vypočteno z poměru naměřených emisních maxim. Intenzitu ve všech případech normuji na maximum emise reference. Výsledky pro fluorescein a $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ilustruje tabulka 3.1. Své výsledky jsem poté porovnal s výsledky skupiny profesora Lakowicze [3]. Ten ale měřil v trochu jiném experimentálním uspořádání: roztok s fluoroforem umístit mezi dvě křemenná sklíčka, která byla obě pokryta SIF. Z mého měření lze tedy očekávat výsledky rámcově poloviční. Je vidět, že v rámci hrubého odhadu výsledky odpovídají.

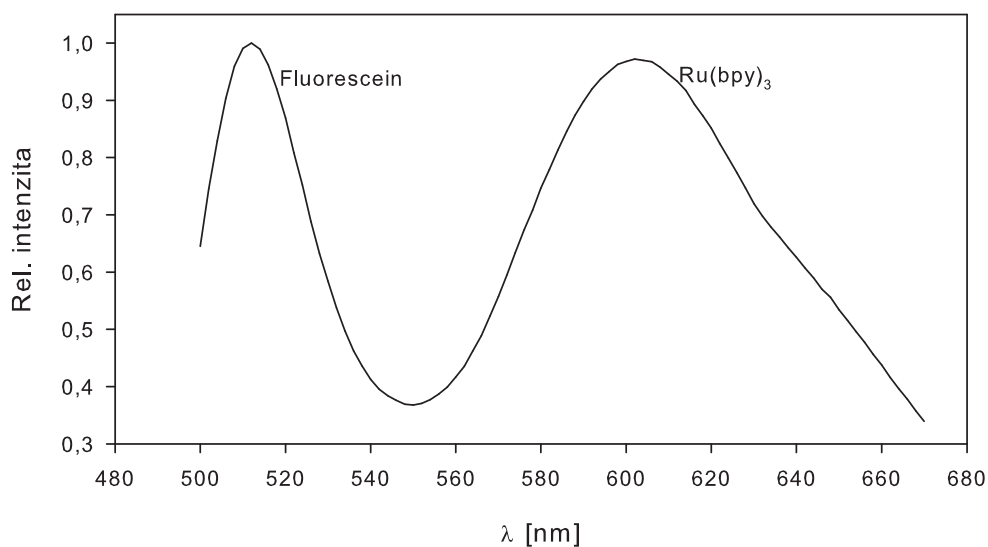
Výsledky měření pro uvedené dvojice jsou na následujících stranách, dodatečné informace k použitým fluoroforům jsou v Příloze 1

3.4.1 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ a Fluorescein

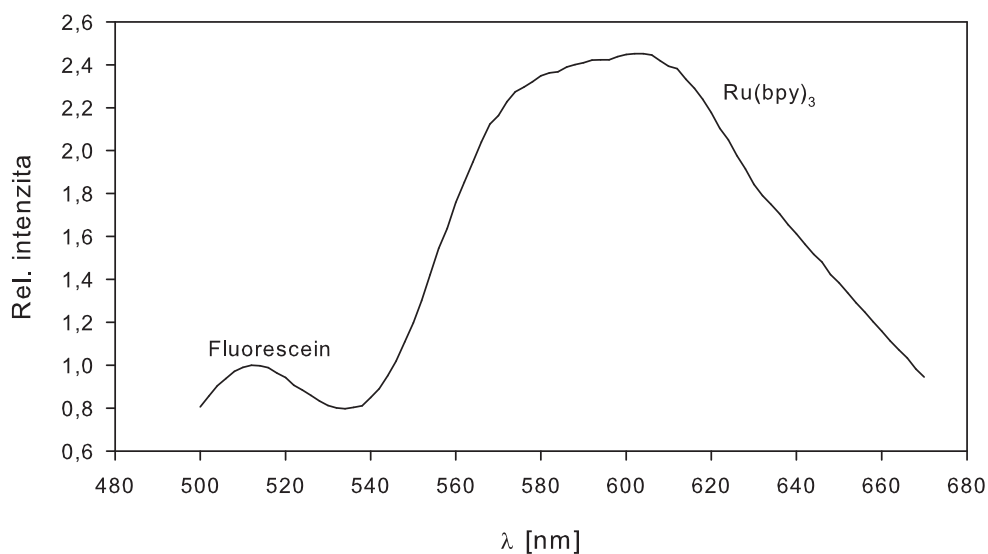
Tabulka 3.1: Zesílení fluorescence $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, s Fluoresceinem jako referencí

rel. intenzita na skle	rel. intenzita na SIF	zesílení	výsledek z [3]
0,97	2,45	2,53	4,7

Excitační vlnová délka: 450 nm



Obrázek 3.10: Emisní spektrum směsi Fluoresceinu a $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ve vodě na skle



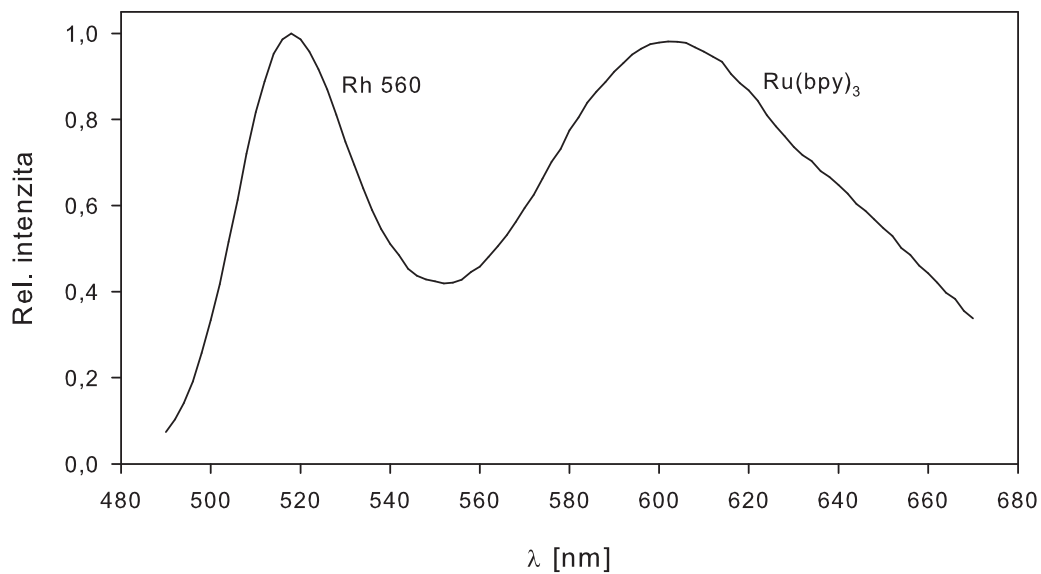
Obrázek 3.11: Emisní spektrum směsi Fluoresceinu a $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ve vodě na SIF

3.4.2 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ a Rhodamin 560

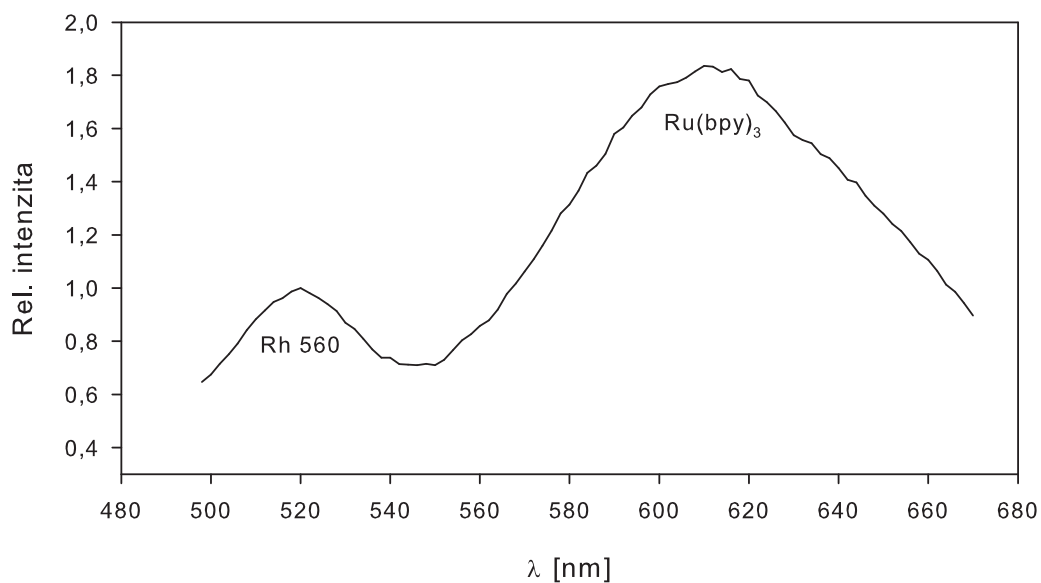
Tabulka 3.2: Zesílení fluorescence $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, s Rhodaminem 560 jako referencí

rel. intenzita na skle	rel. intenzita na SIF	zesílení	výsledek z [3]
0,98	1,84	1,87	4,7

Excitační vlnová délka: 450 nm



Obrázek 3.12: Emisní spektrum směsi Rhodaminu 560 a $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ve vodě na skle



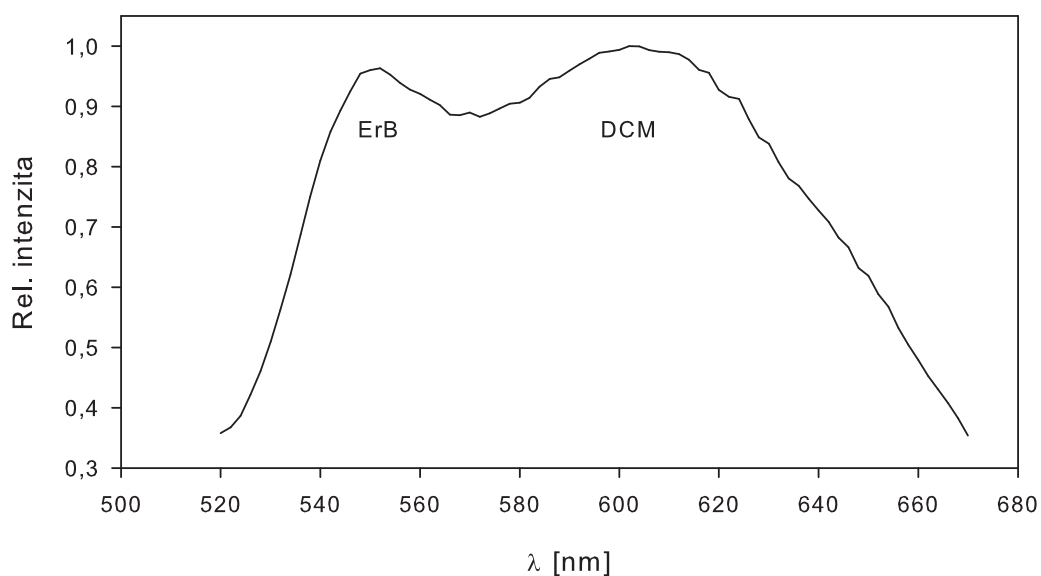
Obrázek 3.13: Emisní spektrum směsi Rhodaminu 560 a $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ve vodě na SIF

3.4.3 Erythrosin B a DCM

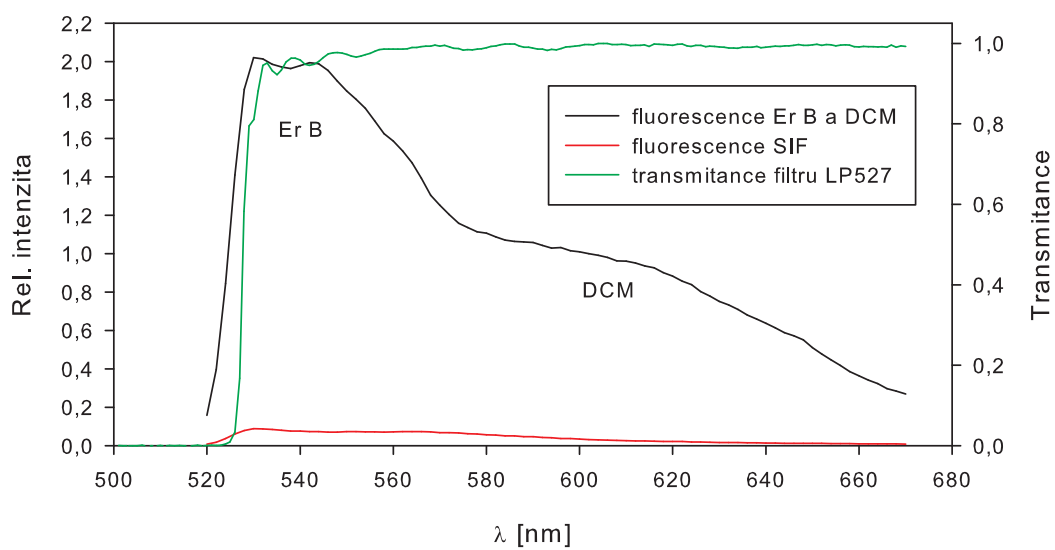
Tabulka 3.3: Zesílení fluorescence Erythrosinu B, s DCM jako referencí

rel. intenzita na skle	rel. intenzita na SIF	zesílení	výsledek z [3]
0,96	1,97	2,04	2,95

Excitační vlnová délka: 500 nm



Obrázek 3.14: Emisní spektrum směsi Erythrosinu B a DCM ve vodě na skle



Obrázek 3.15: Emisní spektrum směsi Erythrosinu B a DCM ve vodě na SIF

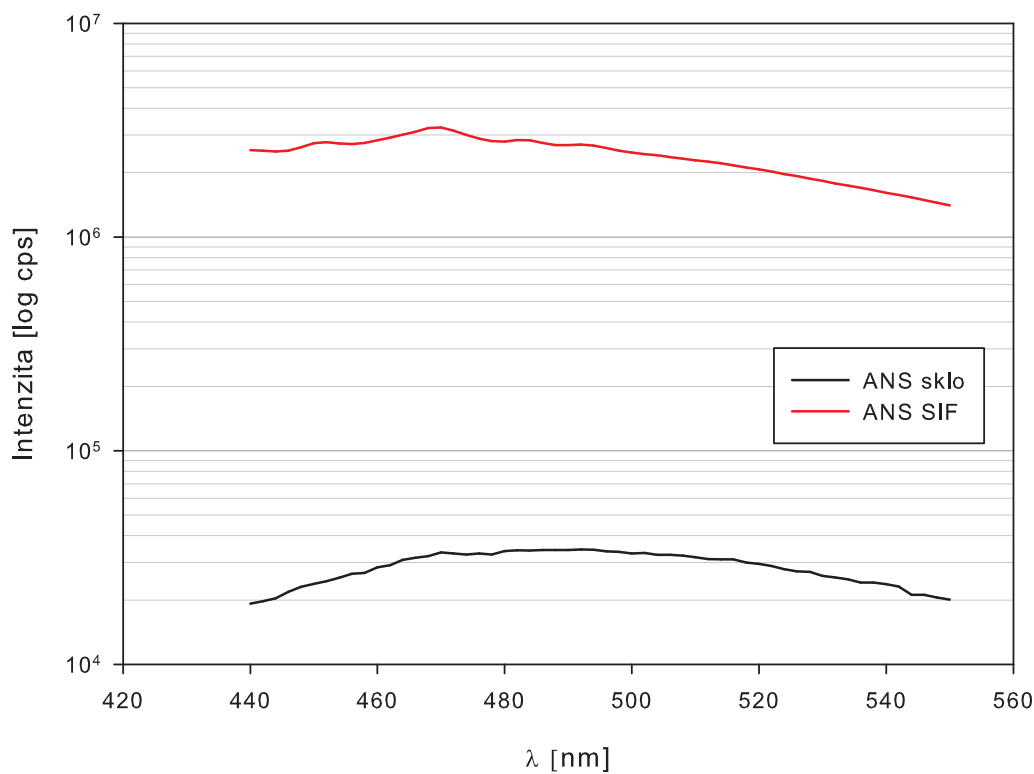
Vyhodnocení zesílení pro dvojici Erythrosin B a DCM je velmi přibližné. DCM má totiž poměrně široké emisní spektrum, což vede k tomu, že se vrcholy DCM a Erythrosinu B slévají. Navíc se v blízkosti vrcholu Erythrosinu objevil další vrchol, pocházející zřejmě z rozptylu. Bylo tedy nutné použít hranový filtr, v našem případě LP 527, jehož transmitance je v grafu 3.15 vynesena zelenou barvou. Kromě toho se v okolí maxima Erythrosinu objevila dodatečná struktura, která svým tvarem připomíná emisi čistého SIF bez fluoroforu. Spektrum v grafu 3.15 je již na tuto nežádoucí dodatečnou emisí korigováno. Korekce ale výsledky změnila pouze nevýznamně a rámcovému vyhodnocení zesílení fluorescence tato struktura nepřekáží.

3.4.4 ANS

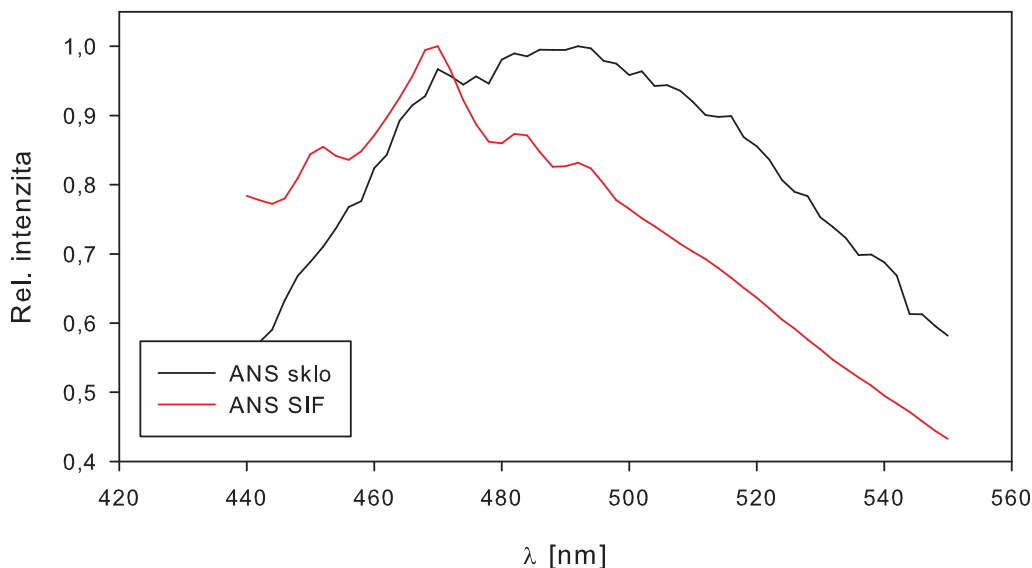
Pro ANS nebyla k dispozici vhodná reference, proto byla proměřena absolutní intenzita fluorescence, nejprve ve vodném roztoku na čistém skle a poté na SIF. V grafu 3.16 je vidět, že signál na SIF je řádově 100 krát větší. Je však třeba uvážit, že excitující světlo se odráží od SIF, takže k excitaci může dojít reálně dvakrát. Lze tedy očekávat, že zesílení je 50-100 násobné. Vzhledem k absenci reference je měření pouze orientační.

Na obrázku 3.17 vidíme vynesené relativní intenzity fluorescence na skle a na SIF. Emisní spektrum na SIF vykazuje dodatečnou strukturu a navíc se zřetelně posunulo ke kratším vlnovým délkám. Dle [3] je však modrý posuv u fluoroforů citlivých na prostředí běžný, z čeho usuzují, že se jedná vskutku o fluorescenci ANS na SIF a struktura je pravděpodobně pouze nevýznamným vedlejším artefaktem.

Excitační vlnová délka: 380 nm



Obrázek 3.16: Emisní spektrum ANS ve vodě na skle a na SIF



Obrázek 3.17: Emisní spektrum ANS ve vodě na skle a na SIF

3.5 Časově rozlišená měření

Zda k zesílení dochází, bylo ověřeno ještě pomocí časově rozlišených měření na vybraných fluoroforech (ANS, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$). Změřené dohasínání intenzity fluorescence bylo proloženo multiexponenciálou:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i},$$

kde α_i jsou amplitudy jednotlivých exponenciál a τ_i příslušné doby života. V obou případech s dobrou přesností vystačily dvě exponenciály, výsledky jsou shrnuty v tabulce 3.4. Uvádím i výpočet střední doby života

$$\bar{\tau} = \sum_i f_i \tau_i, \text{ kde } f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum_i \alpha_i \tau_i}.$$

U obou látek je vidět, že se střední doby života v přítomnosti SIF zkracují, takže k zesílení skutečně dochází. Excitační vlnové délky byly 318 nm v případě ANS, 475 nm u $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.

Tabulka 3.4: Naměřené doby života

	$\bar{\tau}$ [ns]	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]	α_1	α_2	f_1	f_2	zesílení
ANS	21,59	0,85	25,25	0,832	0,159	0,150	0,850	4,15
ANS SIF	5,19	0,75	9,06	0,964	0,091	0,466	0,534	
$\text{Ru}(\text{bpy})_3$	368,82	6,39	370,37	0,189	0,762	0,004	0,996	1,36
$\text{Ru}(\text{bpy})_3$ SIF	271,40	5,57	277,78	0,493	0,412	0,023	0,977	

Diskuze

Jako použitelné metody pro určení zesílení se tedy jeví poměrové měření s vnitřní referencí (část 3.4) a časově rozlišené měření (3.5).

Výsledky první poměrové metody jsou v porovnání s výsledky z [3] uspokojivé. Jistá nepřesnost zde vzniká při vkládání vzorku do spektrometru, neboť je v podstatě nemožné dva různé vzorky umístit stejně. Přesnější měření by vyžadovalo držák na vzorky, který by umožňoval jemnou a kontrolovanou manipulaci. V našem případě byl vzorek (sklíčko) vsunuto do naříznutého gumové špuntu a takto vložen do držáku na kyvety ve spektrometru. Šance na přesnou reprodukovatelnost polohy je tak mizivá.

Možnou komplikací použité referenční metody je projev FRET (část 1.2). V případě mých měření se však tento efekt neprojevil. Srovnáním emisních a excitačních spekter (Příloha 1) je vidět, že u dvojic Fluorescein s $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ a Rhodamin 560 s $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ k překryvu spekter nedochází. U dvojice DCM s Erythrosinem B se emisní spektrum Erythrosinu částečně překrývá s absorpčním spektrem DCM, ale vzhledem k tomu, že DCM posloužilo jako reference, může FRET pozorované zesílení pouze zmenšit.

Metoda sama je veskrze nenáročná a poměrně rychlá. Je vhodná pro rámcové určení zesílení emise daného fluoroforu poblíž kovových nanostruktur, jsou-li k dispozici vhodné referenční fluorofory.

Časově rozlišené měření laserovými pulsy je metody v principu mnohem přesnější, je ale třeba si uvědomit, že naměřené zesílení je slabší než ve skutečnosti. Je to tím, že k zesílení dochází pouze v malém objemu poblíž SIF, kdežto ve většině objemu vzorku je charakter emise nepozměněn (viz část 3.3 a obrázek 3.4). Proložení dohasínání fluorescence multiexponenciálou je pak samozřejmě ovlivněno dohasínáním neovlivněné emise. Vypočtená střední doba života fluorescence je pak nutně větší, než doba života zesíleného fluoroforu. To je ostatně vidět na výsledcích měření - měření doby života u ANS ukázalo přibližně čtyřnásobné zesílení, kdežto odhad získaný poměrovou metodou naznačuje 50-100 násobné zesílení. U $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ je situace obdobná. K získání přesnějších výsledků by bylo třeba důkladnějšího rozboru situace a přípravy vzorku, jak je popsáno v [3].

Závěr

Metoda chemické přípravy SIF (Silver Islands Film) byla úspěšně reprodukována. Výsledkem byla souvislá vrstva tvořená stříbrnými ostrůvky o velikosti v rozmezí 100 až 400 nm. Jeden vzorek SIF byl nasnímán elektronovým mikroskopem (obrázek 3.3).

Bylo vyzkoušeno několik metod hledání a určení zesílení fluorescence, z nichž se dvě ukázaly být použitelné. První z nich byla poměrová metoda s vnitřní referencí, která je snadná na provedení a nenáročná na vybavení. Tato metoda dává dobré orientační výsledky, které jsou pro vybrané fluorofory shrnuty v tabulce 3.5.

Druhou metodou byla časově rozlišená měření, jejichž smyslem bylo stanovit změnu doby života fluorescence daných fluoroforů po přiložení k SIF a tím i výsledně zesílení fluorescence. K získání relevantních výsledků by však bylo třeba metodu ještě poupravit (viz Diskuze a [3]).

Bylo tedy ověřeno, že kovové nanostruktury skutečně mohou zesilovat emisi fluorescence a v průběhu práce byla proměřena emisní a excitační spektra vybraných fluoroforů, která jsou uvedena v příloze.

Tabulka 3.5: Naměřené doby života

fluorofor	reference	zesílení
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	Fluorescein	2,53
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	Rhodamin 560	1,87
Erythrosin B	DCM	2,04
ANS	×	50-100

Seznam použité literatury

- [1] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, xxvi, 954 p. ISBN 03-873-1278-1.
- [2] GRIFFITHS, David Jeffrey. *Introduction to Quantum Mechanics*. New Jersey: Prentice Hall, 1994. ISBN 01-312-4405-1.
- [3] LAKOWICZ, Joseph R., Yibing SHEN, Sabato D'AURIA, Joanna MALICKA, Jiyu FANG, Zygmunt GRYCZYNSKI a Ignacy GRYCZYNSKI. *Radiative Decay Engineering*. *Analytical Biochemistry*. 2002, vol. 301, issue 2, s. 261-277. DOI: 10.1006/abio.2001.5503.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269701955034>
- [4] LAKOWICZ, Joseph R. *Radiative Decay Engineering: Biophysical and Biomedical Applications*. *Analytical Biochemistry*. 2001, vol. 298, issue 1, s. 1-24. DOI: 10.1006/abio.2001.5377.

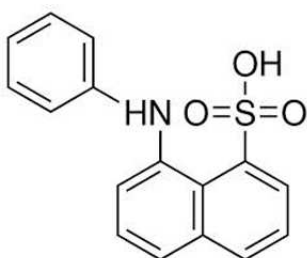
Příloha 1 - Použité fluorofory

V této příloze uvádím základní informace o použitých fluoroforech. U vybraných fluoroforů přikládám i naměřená emisní a excitační spektra. Spektra byla měřena na spektrometru Fluoromax 2 (ISA, Jovin Yvon - SPEX).

ANS

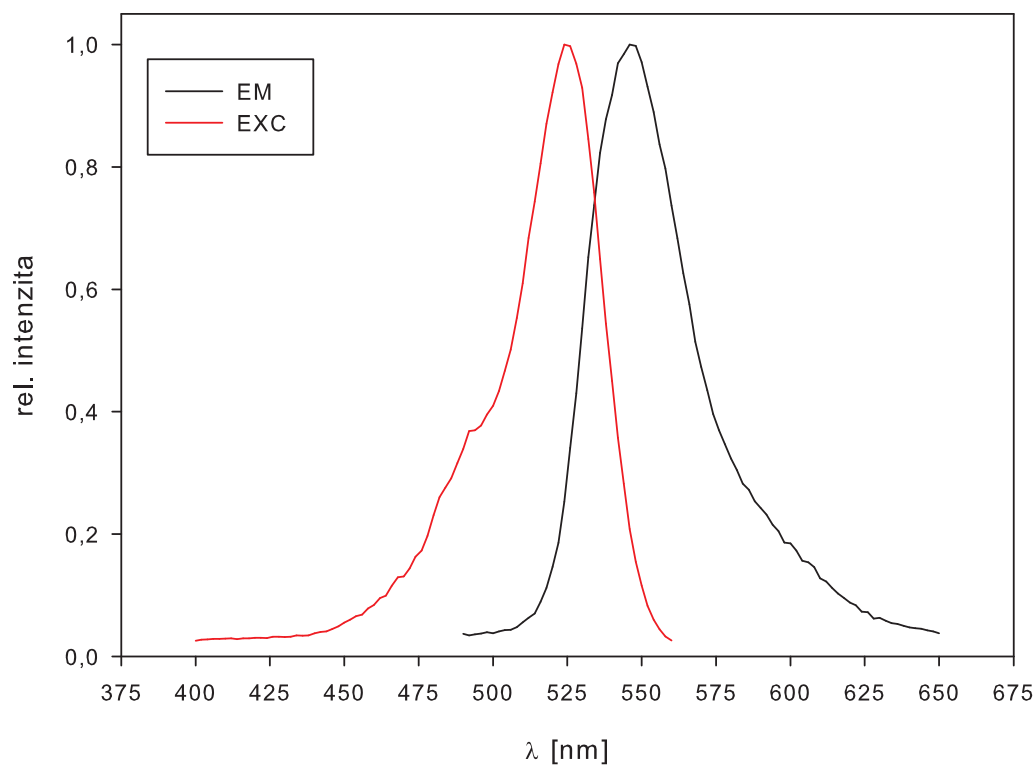
8-anilinaftalen-1-sulfonová kyselina; 1,8-ANS

ANS se používá jako fluorescenční molekulární sonda, která se váže na proteiny. ANS se ve vodném prostředí vyznačuje velmi nízkým kvantovým výtěžkem, ale vázaná do hydrofobních oblastí proteinů dosahuje výtěžku většího.

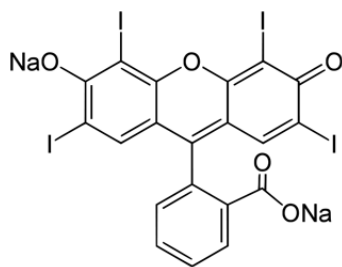


Obrázek P1: Struktura 1,8-ANS

Erythrosin B



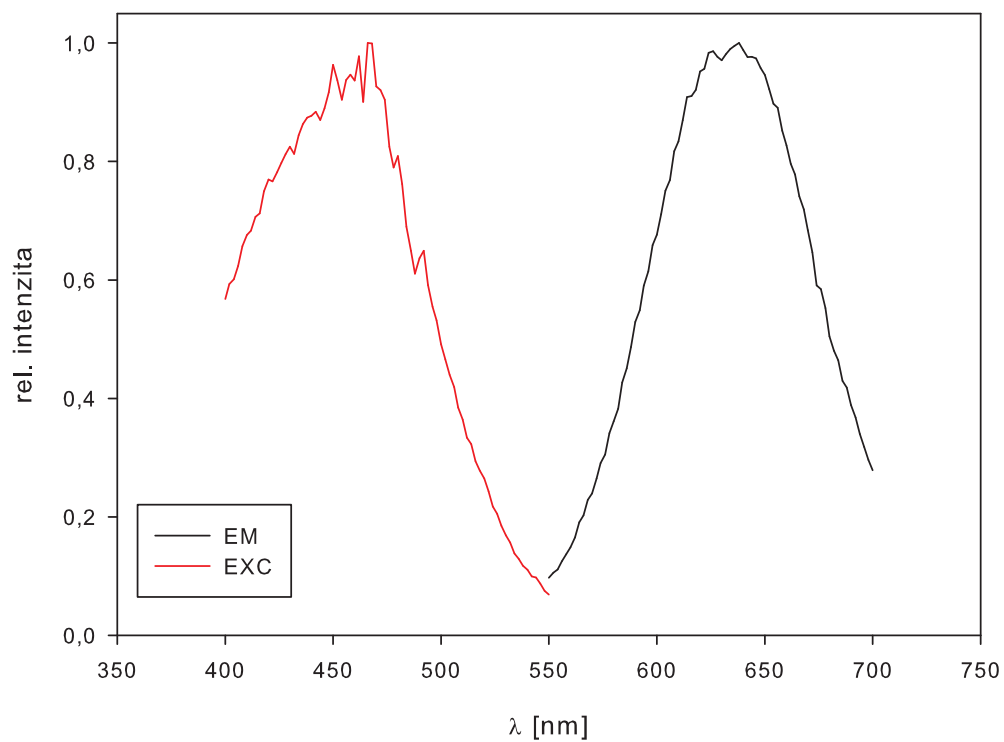
Obrázek P2: Emisní a excitační spektrum Erythrosinu B ve vodě



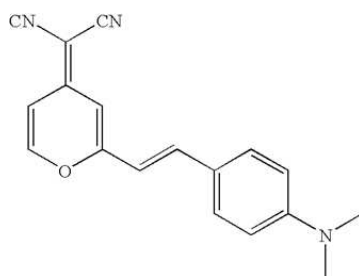
Obrázek P3: Struktura Erythrosinu B

DCM

4-(dicyanomethylene)-2-methyl-6-(p-dimethylaminostyryl)-4H-pyran
DCM se používá jako laserové barvivo

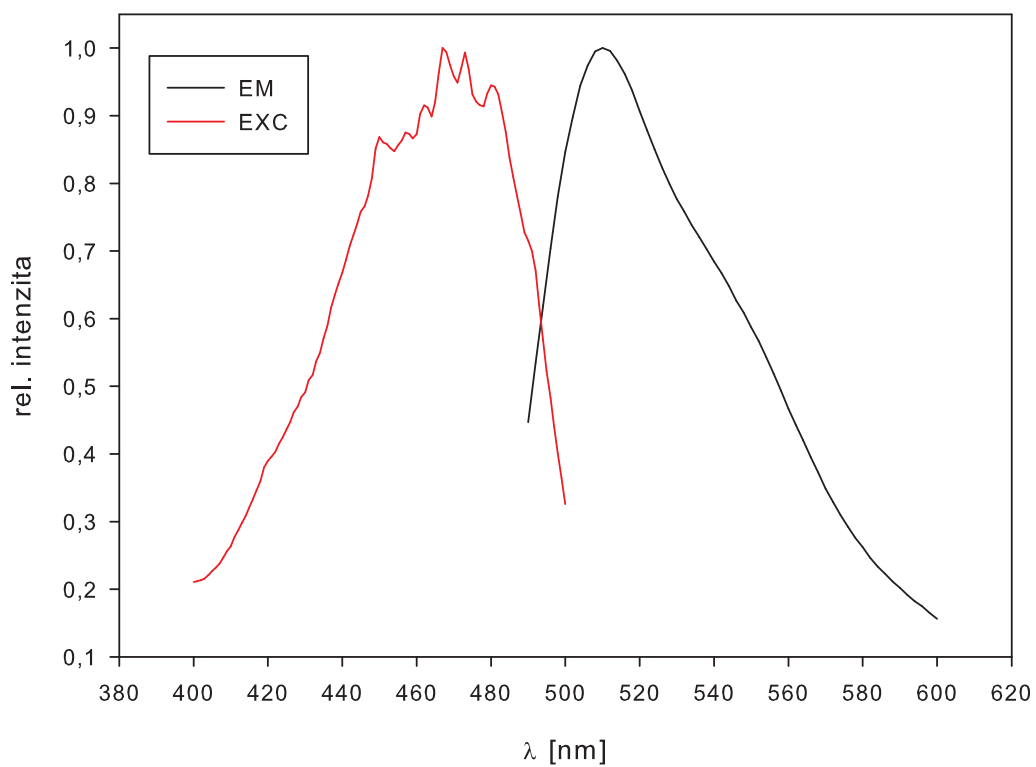


Obrázek P4: Emisní a excitační spektrum DCM ve vodě

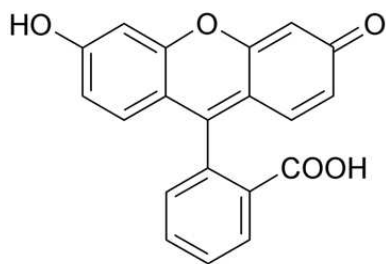


Obrázek P5: Struktura DCM

Fluorescein



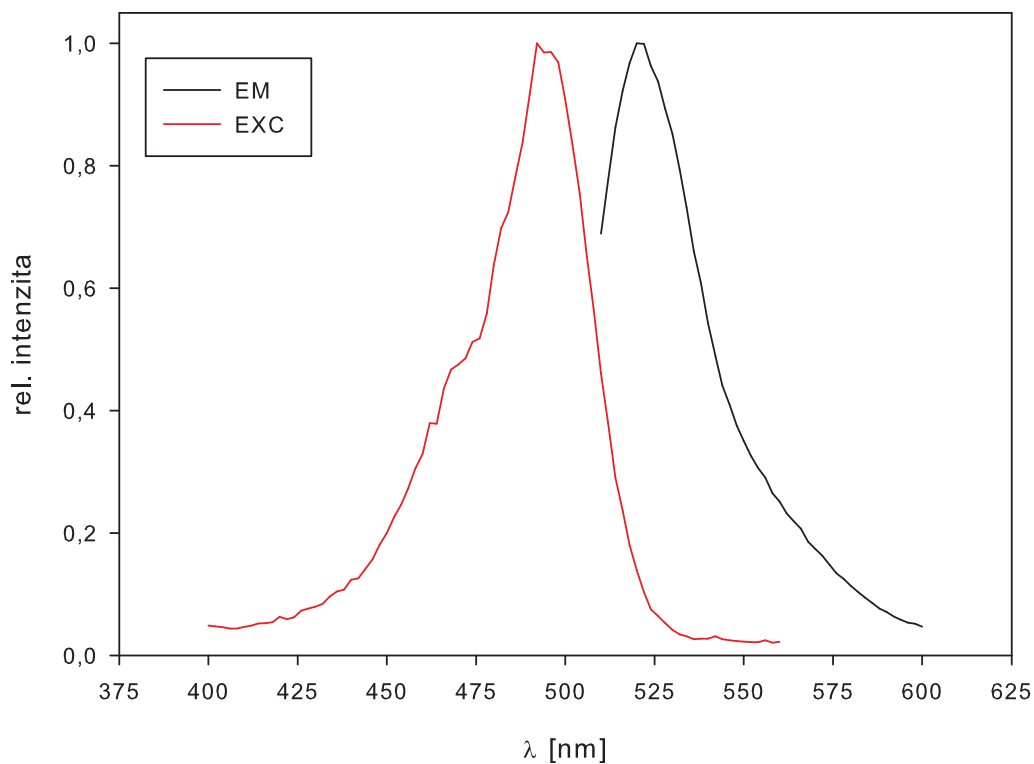
Obrázek P6: Emisní a excitační spektrum fluoresceinu ve vodě



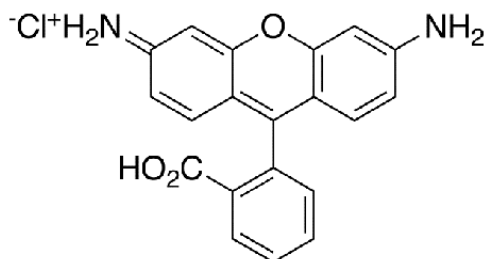
Obrázek P7: Struktura fluoresceinu

Rhodamin 560

Rhodamin 560 se používá jako laserové barvivo.



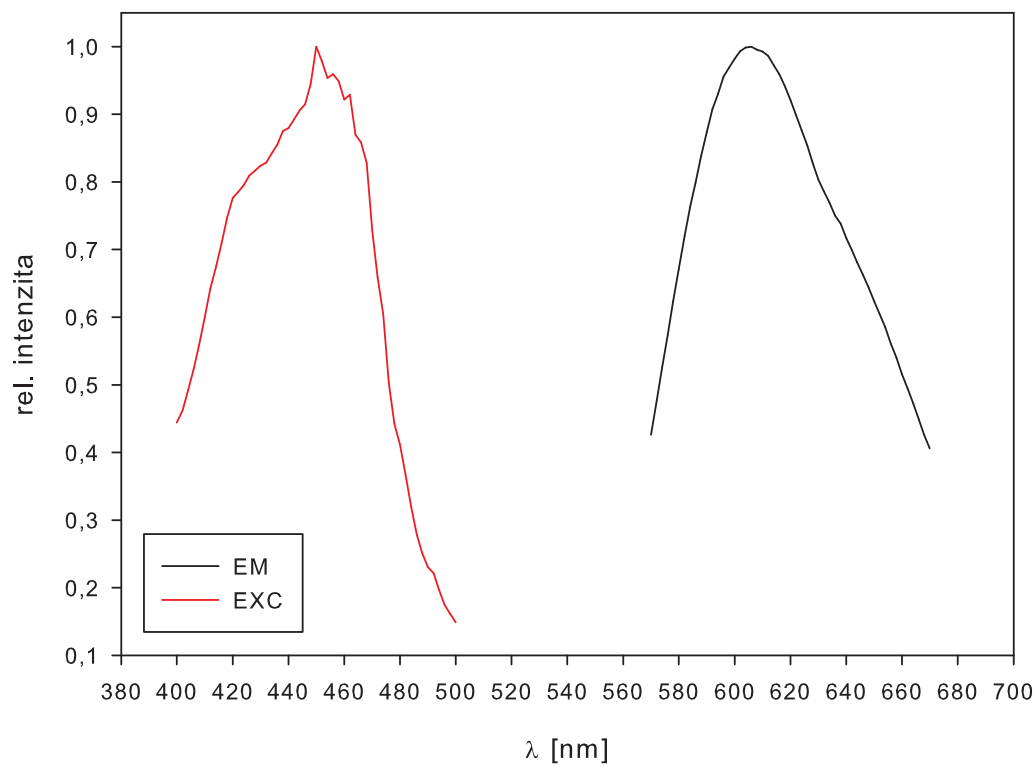
Obrázek P8: Emisní a excitační spektrum Rhodaminu 560 ve vodě



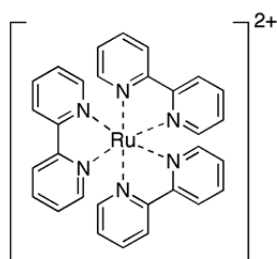
Obrázek P9: Struktura Rhodaminu 560



Tris(bipyridine)ruthenium(II)



Obrázek P10: Emisní a excitační spektrum $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$



Obrázek P11: Struktura $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$