



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ  
FAKULTA**  
Univerzita Karlova

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Mikuláš Přikryl

### **Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků vybraných kontaminantů**

Fyzikální ústav UK

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

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Obecná Fyzika

Praha 2020

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

V ..... dne.....

podpis

Chtěl bych poděkovat RNDr. Evě Kočišové, Ph.D za její ochotu, trpělivost a podporu při vedení této bakalářské práce. Dále chci poděkovat Mgr. Alžbětě Kuižové za pomoc a radu při řešení konkrétních problémů.

Název práce: *Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků vybraných kontaminantů*

Autor: *Mikuláš Příkryl*

Katedra / Ústav: *Fyzikální ústav UK*

Vedoucí bakalářské práce: *RNDr. Eva Kočišová, Ph.D.*

Abstrakt: *Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků představuje speciální metodu Ramanovy spektroskopie, která je založena na nakápnutí malého objemu roztoku nebo suspenze na speciální hydrofobní substrát. Kapka na tomto povrchu uschne, a ze vzniklého depozitu je možné získat kvalitní Ramanovo spektrum. Toho je možné dosáhnout z malého objemu kapky (několik  $\mu\text{l}$ ) z výchozího roztoku o nízké koncentraci ( $\mu\text{M}$ ). Hlavní náplní této práce je nalezení detekčních limitů pro tuto metodu v případě několika kontaminantů (melamin, picloram, thiram, bentazon), a to na dvou komerčních substrátech (SpectRIM<sup>TM</sup>,  $\mu$ -RIM<sup>TM</sup>), na kterých byly studovány vodní roztoky, a jednom nekomerčním, na kterém byly studovány roztoky etanolu. Spektra získaná ze substrátů komerčních byla obecně kvalitnější a detekční limity tedy nižší. Mezi dvěma komerčními substráty se SpectRIM<sup>TM</sup> ukázal jako vhodnější volba díky tomu, že se látka na tomto substrátu lépe koncentrovala. Naměřené detekční limity byly porovnány s těmi naměřenými metodou povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie. Ač nebylo dosaženo stejných limitů, všechny substráty ukázaly velký potenciál pro detekci nízkých koncentrací látek.*

Klíčová slova: *Ramanova spektroskopie, metoda kapkově nanášených povlaků, hydrofobní povrch, kontaminant, detekční limit*

Title: *Drop coating deposition Raman spectroscopy of selected contaminants*

Author: *Mikuláš Přikryl*

Department: *Institute of Physics UK*

Supervisor: *RNDr. Eva Kočíšová, Ph.D.*

*Abstract: Drop coating deposition Raman spectroscopy is a special method of Raman spectroscopy based on a deposition of a small volume of solution or suspension on a special substrate with hydrophobic properties. The drop dries on this substrate and forms a deposit from which a Raman spectrum of good quality can be accumulated. This is possible in case of the small volume of deposited drop (several  $\mu\text{l}$ ) and low initial concentration ( $\mu\text{M}$ ) as well. The main goal of this thesis is to find the limits of this method for detection of several contaminants (melamine, picloram, thiram, bentazone) using two commercial substrates (SpectRIM<sup>TM</sup>,  $\mu$ -RIM<sup>TM</sup>) for study of aqueous solutions, and one non-commercial for study of ethanol solutions. Spectra accumulated on commercial substrates were generally of higher quality and therefore the detection limits were lower. Between the two commercial substrates, SpectRIM<sup>TM</sup> proved to be a more suitable choice due to the fact that contaminants were better concentrated on this substrate. The obtained detection limits were compared with the limits of these substances for surface enhanced Raman spectroscopy. Although the same limits were not reached, all substrates showed great potential for the detection of substances at very low concentrations.*

Keywords: Raman spectroscopy, drop coating deposition method, hydrophobic surface, contaminant, limit detection

# Obsah

Úvod.....	1
<b>1. Teoretická část.....</b>	<b>3</b>
1.1. Ramanova spektroskopie .....	3
1.2 Vibrace molekul .....	5
1.3 Metoda kapkově nanášených povlaků (DCDR).....	6
1.3.1 Využití DCDR.....	9
<b>2 Experimentální část .....</b>	<b>11</b>
2.1 Spektrometr .....	11
2.1.1 Nastavení aparatury.....	12
2.2 Použité substráty .....	12
2.2.1 SpectRIM <sup>TM</sup> .....	12
2.2.2 $\mu$ -RIM <sup>TM</sup> .....	13
2.2.3 Nekomerční substrát.....	13
2.3 Použité kontaminanty .....	14
2.3.1 Melamin .....	14
2.3.2 Picloram .....	14
2.3.3 Thiram .....	15
2.3.4 Bentazon.....	16
2.3.5 Příprava roztoků a měření spekter kontaminantů.....	17
<b>3 Výsledky měření .....</b>	<b>20</b>
3.1 Melamin .....	20
3.1.1 Melamin na substrátu SpectRIM <sup>TM</sup> .....	20
3.1.2 Melamin na substrátu $\mu$ -RIM <sup>TM</sup> .....	22
3.1.3 Melamin na nekomerčním substrátu .....	24
3.2 Picloram .....	24
3.2.1 Picloram na substrátu SpectRIM <sup>TM</sup> .....	24

3.2.2 Picloram na substrátu $\mu$ -RIM <sup>TM</sup> .....	26
3.2.3 Picloram na nekomerčním substrátu .....	28
3.3 Thiram .....	28
3.3.1 Thiram na substrátu SpectRIM <sup>TM</sup> .....	28
3.3.2 Thiram na substrátu $\mu$ -RIM <sup>TM</sup> .....	30
3.3.3 Thiram na nekomerčním substrátu .....	31
3.4 Bentazon .....	33
3.4.1 Bentazon na substrátu SpectRIM <sup>TM</sup> .....	33
3.4.2 Bentazon na substrátu $\mu$ -RIM <sup>TM</sup> .....	35
3.4.3 Bentazon na nekomerčním substrátu .....	37
3.5 Přehled výsledků a porovnání s metodou SERS .....	39
<b>Závěr .....</b>	<b>42</b>
<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>44</b>
<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>47</b>
<b>Seznam tabulek .....</b>	<b>50</b>
<b>Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>51</b>

## Úvod

Hledání jednoduché a spolehlivé detekční metody kontaminantů v okolním prostředí – znečišťujících látek, které jsou často škodlivé nebo toxické – je důležitým problémem, ať už jde o monitorování kvality zdrojů pitné vody, či kontrolu nezávadnosti konzumních produktů. Mnoho dnes používaných metod vyžaduje zkušené laboratorní pracovníky v dobře vybavených laboratořích, což se odráží na cenách potřebných k jejich použití a transportu vzorků na místo zpracování. Tyto faktory mohou znamenat zpoždění reakce na případné zjištění nebezpečné kontaminace. V tomto ohledu se jeví metody vibrační spektroskopie jako ideální řešení. Zvláště díky nekontaktní povaze těchto metod, jejich jednoduché přípravě a velmi rychlé a spolehlivé detekci přítomnosti nežádoucích kontaminantů chemické a mikrobiální povahy.

Tato práce se zabývá detekcí nízkých koncentrací několika kontaminantů rozpuštěných ve vodě a etanolu. K tomuto úkolu je využívána Ramanova spektroskopie, která umožňuje identifikovat zkoumané látky s velkou přesností. Získané spektrum se často přirovnává k "otisku prstu" dané látky. Ovšem klasická Ramanova spektroskopie má i své nevýhody, jednou z nich je nízká intenzita získaného spektra.

Tento problém se dá eliminovat použitím různých přístupů, mezi které patří například povrchem zesílená Ramanova spektroskopie – SERS (surface enhanced Raman spectroscopy), rezonanční Ramanova spektroskopie, či v této práci využívaná metoda kapkově nanášených povlaků – DCDR (drop coating deposition Raman spectroscopy). Je to metoda spočívající v nakápnutí malého objemu studovaného roztoku nebo suspenze na speciální hydrofobní substrát. Kapka na tomto povrchu uschne, a ze vzniklého depozitu je možné získat kvalitní (alespoň ve většině případů) Ramanovo spektrum.

Cílem této práce je detekovat vybrané kontaminanty a nalézt jejich detekční limity pro metodu DCDR. Výsledky budou porovnány především s metodou SERS, která již byla ke studiu těchto látek použita.

Měřenými kontaminanty jsou melamin, picloram, thiram a bentazon. Melamin je organická sloučenina, která slouží jako bílkovinová náhražka, zdánlivě zvyšující obsah bílkovin v potravě. Bývá do ní přidávána nezákonně. Thiram je



fungicid a picloram s bentazonem patří mezi pesticidy. Kontaminanty budou studovány na třech typech hydrofobních substrátů, na dvou komerčních a jednom nekomerčním, připraveném na Katedře makromolekulární fyziky MFF UK. Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků je díky svým výhodám rychlou a efektivní metodou k detekci těchto látek ve vodě, či jiných rozpouštědlech.

# 1. Teoretická část

## 1.1. Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je jednou ze základních metod molekulární optické spektroskopie. Jejím využitím lze získat informace jak o struktuře, tak i o vlastnostech látky. V této práci byla využita pro detekci malých množství kontaminantů rozpuštěných ve vodě a etanolu.

Ramanův jev byl poprvé pozorován roku 1928 C. V. Ramanem [Raman, 1928]. Již před tímto pozorováním byl Ramanův efekt předpovězen teoretickými fyziky (Kramers, Heisenberg, Dirac, Schroedinger, Smekal), kteří aplikovali kvantovou mechaniku na molekuly [Lewis, Edwards, 2001].

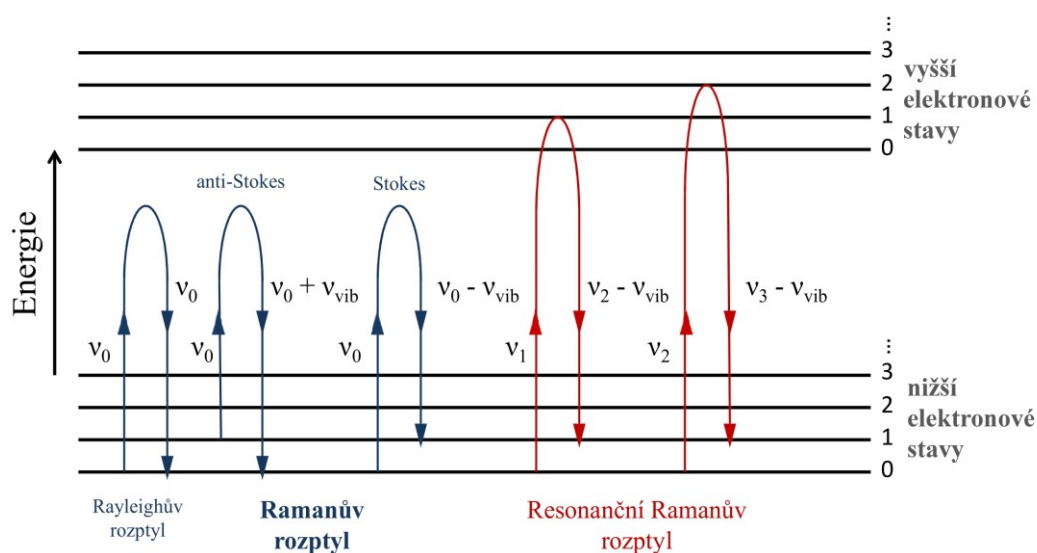
Ramanova spektroskopie je vibrační spektroskopickou technikou. Po dopadu záření na studovanou látku se část fotonů absorbuje a část rozptýlí. Elastický rozptyl elektronů se nazývá Rayleighovým rozptylem. Jen malá část fotonů se rozptýlí neelasticky (přibližně jeden z  $10^6$ ), tento jev je označován jako Ramanův rozptyl. Neelastický rozptyl znamená, že dochází k výměně energie mezi dopadajícím fotonem a molekulou, a to odpovídá změně energie (a tedy vlnové délky) fotonu, který je rozptýlen. Jelikož celková energie je zachována během procesu rozptylu, energie, kterou ztratí, či získá foton, je rovna změně energie v molekule. Tyto změny energií odpovídají přechodům mezi energetickými hladinami molekuly.

V případě, že se vyzáří foton s delší vlnovou délkou, dochází ke Stokesovu rozptylu, což znamená, že molekula byla vybuzena na virtuální energetickou hladinu fotonem o energii  $E_0 = h\nu_0$ , a poté se vrátila do vibračního stavu s vyšší energií ( $E_{\text{vib}} = h\nu_{\text{vib}}$ ), než na jaké byla původně. Vyzáří se foton s energií  $E = h(\nu_0 - \nu_{\text{vib}})$ . V druhém případě, kdy se vyzáří foton s menší vlnovou délkou, je molekula z vyššího vibračního stavu vybuzena do virtuálního stavu, a poté přechází zpět na základní energetickou hladinu. Je vyzářen foton s energií  $E = h(\nu_0 + \nu_{\text{vib}})$ . Tento druh rozptylu nazýváme anti-Stokesův. Tyto druhy rozptylu a další jsou schematicky vyobrazeny na obrázku 1.1.1.

V obou případech musí být splněn zákon zachování energie:

$$h\nu_{\text{vib}} = h\nu_0 \pm (E - E_0) \quad (1.1.1)$$

Ramanův rozptyl závisí i na vlnové délce budícího fotonu. Pokud se vlnová délka excitačního laseru rovná energii přechodu molekuly na vyšší excitační hladiny odpovídající vyššímu elektronovému stavu, dochází k rezonančnímu zesílení a mluvíme o rezonančním Ramanově rozptylu.



Obr. 1.1.1 Energetický diagram pro Rayleighův a Ramanův rozptyl

Pomocí Ramanovy spektroskopie můžeme zkoumat molekulární vibrace, které jsou demonstrovány v Ramanově spektru. Toto vibrační spektrum obsahuje informace související s chemickými vlastnostmi látek a s konfigurací jejich atomů a jejich chemických vazeb. Spektrum se obvykle vyobrazuje jako závislost intenzity signálu Ramanova rozptylu na Ramanově posunu, který je zaveden pomocí vlnočtu  $\tilde{\nu}$  s jednotkami  $\text{cm}^{-1}$ , což je absolutní hodnota rozdílu vlnočtu dopadajícího a rozptýleného záření.

$$\tilde{\nu} = 1/\lambda \quad (1.1.2)$$

K potlačení šumu při měření Ramanova spektra se využívá metody akumulace spekter, kdy se spektra získaná ze stejného bodu postupně průměrují. Po  $N$  opakováních se úroveň šumu snižuje  $\sqrt{N}$ -krát [Prosser et al., 1989].

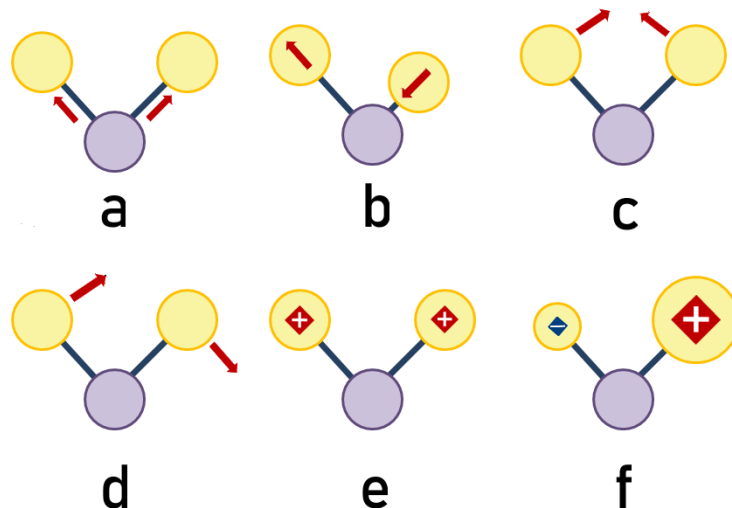
## 1.2 Vibrace molekul

Molekulu si můžeme představit jako soubor atomů pospojovaných pomocí pružných vazeb. Tento systém umožňuje vznik vibračního pohybu, tedy vzájemného pohybu jader atomů tvořících molekulu. Výsledné relativní pohyby atomů v molekule jsou superpozicí normálních vibrací (módů), kdy všechny atomy vibrují se stejnou fází a normální frekvencí. Jejich amplitudy jsou dány normálními souřadnicemi.

Počet normálních vibrací je daný počtem atomů v molekule. Pro  $n$  atomů má molekula  $3n$  stupňů volnosti; 3 reprezentují translační pohyb a další 3 zase pohyb rotační. Pro pohyb vibrační zůstává  $3n - 6$  vibračních stupňů volnosti, což je i počet normálních módů molekuly [Schrader, Bougeard, 1995].

Tvar výsledných vibračních spekter ovlivňuje několik faktorů, například hmotnosti vibrujících atomů, síly chemických vazeb mezi nimi, geometrické uspořádání atomů v molekule a její symetrie. Při analýze těchto spekter je nejdůležitější přítomnost vibračních pásů, které jsou charakteristické pro každou molekulu. Tyto pásy odpovídají vibračním pohybům určitých skupin atomů v molekule [Schrader, Bougeard, 1995].

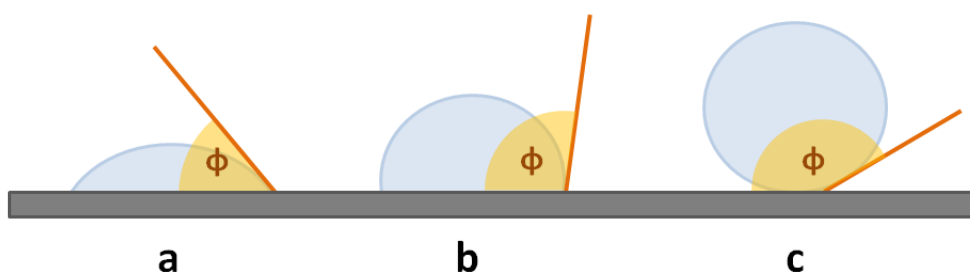
Vibrace v molekulách se dají rozdělit na dvě základní skupiny pohybů. První skupinou jsou ty pohyby, při kterých se mění úhel mezi vazbami atomů (deformační, torzní), druhou skupinou jsou pohyby, kdy se mění délka těchto vazeb (valenční). Vibrace valenční bývají až o tři řády silnější než vibrace deformační. Příklady některých pohybů jsou vidět na obrázku 1.2.1.



Obr. 1.2.1 Příklady vibrací tříatomové lomené molekuly, **a**) valenční symetrická (symmetric stretch), **b**) valenční antisymetrická (anti-symmetric stretch), **c**) deformační nůžková (scissoring bend), **d**) deformační kývavá (rocking bend), **e**) deformační vějířová (wagging bend), **f**) deformační kroutivá (twisting bend)

### 1.3 Metoda kapkově nanášených povlaků (DCDR)

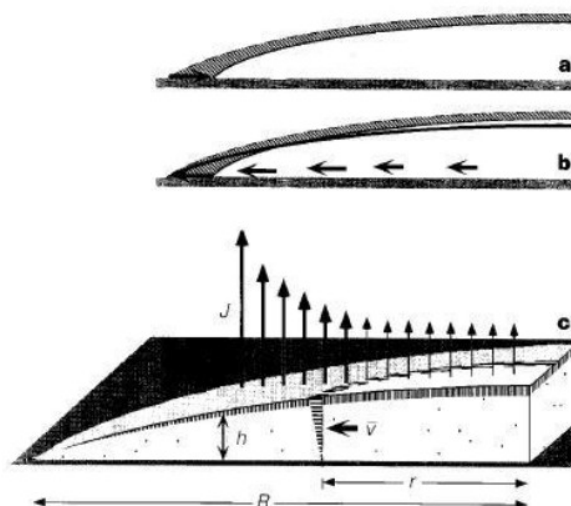
Podstata metody DCDR spočívá v nanášení kapek roztoku nebo suspenze (obvykle o objemu několik mikrolitrů) na hydrofobní povrch – substrát. Ten se vyznačuje malou smáčivostí pro nanesenou kapku a je charakterizován kontaktním úhlem (schematicky zobrazen na obrázku 1.3.1) větším než  $90^\circ$ . Povrchy s kontaktním úhlem větším než  $150^\circ$  jsou označovány jako superhydrofobní a kontakt kapky s povrchem je v tomto případě minimální. Naopak substráty s kontaktním úhlem menším než  $90^\circ$  se vyznačují velkou smáčivostí a kapka se substrátu dotýká velkou plochou.



Obr. 1.3.1 Různé kontaktní úhly: **a**) hydrofilní substrát ( $<90^\circ$ ), **b**) hydrofobní substrát ( $>90^\circ$ ), **c**) superhydrofobní substrát ( $>150^\circ$ )

Pro metodu DCDR je potřeba hydrofobní nebo superhydrofobní substrát. Ten by neměl vykazovat silné Ramanovo spektrum, měl by být silně opticky odrazivý s nízkou optickou absorbancí a být chemicky a teplotně odolný. Pokud jsou tyto podmínky splněny, je možné po nanesení kapky a jejím následném vyschnutí získat koncentrovaný vzorek, buď vyschlý s efektem "kávového kroužku" (princip zobrazen na obrázku 1.3.2), který je popsán dále, nebo v obecném tvaru malého flíčku, a z něj lze naměřit kvalitní Ramanovo spektrum. Toho všeho je možné dosáhnout z malého objemu kapky, tedy často i z velmi zředěného roztoku [Zhang et al., 2003].

Vypařování kapky probíhá nejdříve tak, že se mění její kontaktní úhel s podložkou, nemění se však její styčná plocha. Teprve po dosažení kritické hodnoty kontaktního úhlu se styčná plocha začne zmenšovat [Hu, Larson, 2002].



Obr. 1.3.2 Princip vysychání s efektem „kávového kroužku“, převzato z [Deegan et al., 1997]

Vysychání kapky ovlivňuje i tzv. Marangoniho proud, což je vnitřní cirkulační proud na povrchu kapky. Jde o pohyb kapaliny podél rozhraní mezi místy s různým mezifázovým napětím. Tento efekt je způsoben nerovnoměrnou teplotou kapky. Jelikož se kapalina na vrcholu kapky vypařuje rychleji než na okrajích, je zde teplota nižší, tedy je zde i vyšší povrchové napětí. Vzniká tedy proudění kapaliny od okrajů kapky (s nižším povrchovým napětím) do jejího vrcholu, kde je povrchové napětí vyšší. Jelikož je ale styčná plocha kapky stále stejná, musí probíhat i proudění

opačným směrem, takto vniká v kapce cirkulační Marangoniho proud [Hu, Larson, 2006].

V roztocích vody je tento efekt potlačen, neboť voda je snadno kontaminována povrchově aktivními látkami, které Marangoniho proud oslabí. Protože se styčná plocha kapky vodného roztoku nezmenšuje, proudí do jejích okrajových částí kapalina z vnitřku kapky. Tento proud s sebou nese i rozptýlené částice rozpuštěné látky, které se pak na okrajích kapky usazují. Tomuto se říká efekt "kávového kroužku" [Deegan et al., 1997].

Proudění v kapce při procesu vysychání lze podle základní práce skupiny R. D. Deegana [Deegan et al., 1997] vysvětlit v souvislosti s nasycením okolí dané vodní kapky vodní párou. Je možné předpokládat, že v nejbližším okolí kapky bude nasycenost popsána pomocí funkce  $\Phi(r)$ , která splňuje  $\nabla^2 \Phi(r) = 0$ . V nekonečnu pak předpokládejme koncentraci  $\Phi_\infty$  a na povrchu kapky koncentraci  $\Phi_s$ . Tok vypařování kapaliny v kapce je pak daný vztahem:

$$J(r) = -D\nabla\Phi \quad (1.3.1)$$

Kde  $D$  je difuzivita vodní páry ve vzduchu. Tento problém se dá řešit s využitím elektrostatiky. Kapka představuje vodič a funkce  $\Phi(r)$  elektrostatický potenciál. Protože je kontaktní úhel kapky s podložkou  $\theta_c$  malý, vychází tok divergentně.

$$J(r) = (R - r)^{-\frac{(\pi - 2\theta_c)}{(2\pi - 2\theta_c)}} \quad (1.3.2)$$

V tomto vztahu  $R$  značí poloměr kapky a  $r$  vzdálenost od jejího středu. Výraz v exponentu se pro zmenšující kontaktní úhel přibližuje k  $1/2$ . Tok vypařování tekutiny je tedy úměrný:

$$J(r) = (R - r)^{-\frac{1}{2}} \quad (1.3.3)$$

Kapalina, která se vypaří, je tedy nahrazována kapalinou ze středu kapky rychlostí přímo úměrnou toku  $J(r)$  a na okraji pak vzniká kroužek usazeného vzorku, který sem tento proud kapaliny odnese.

Za daných podmínek je tedy možný vznik koncentrované vrstvy rozpuštěného kontaminantu na okraji vyschlé kapky. Pokud je substrát silně

hydrofobní, tedy kontaktní úhel s kapalinou je mnohem vyšší než  $90^\circ$ , je také možné, že se rozpuštěná látka bude koncentrovat přímo ve středu kapky.

### 1.3.1 Využití DCDR

K prvním, kteří DCDR metodu aplikovali, především na biomolekuly a biologicky významné molekuly, patří skupina D. Ben-Amotze [Zhang et al., 2000; Zhang et al., 2003]. Autoři zkoumali hlavně základní vlastnosti a limity této metody. Spektra glukózy, fruktózy a lysozymu získaná pomocí DCDR porovnávali se spektry získanými jinými metodami (např. metodou rezonanční Ramanovy spektroskopie).

Y. Xie a kol. [Xie et al., 2004] demonstrovali pomocí DCDR spektroskopické změny indukované fosforylací tyrosinu v peptidech. Zhang a kol. [Zhang et al., 2005] dále zkoumali fosforylaci na peptidu, jehož sekvence je odvozena ze sekvence proteinu tyrosin kináza. P. Cipriani a D. Ben-Amotz [Cipriani, Ben-Amotz, 2005] změřili různé koncentrace (1 mM – 1  $\mu$ M) roztoků tří molekul skupiny taxanů. Srovnali tato spektra se spektry pevných látek a interpretovali jednotlivé spektrální pásy. Spektra také porovnali s kvantově-mechanickým výpočtem energetických hladin daných molekul. Vypočtená spektra velmi dobře odpovídala těm naměřeným.

C. Ortiz a kol. [Ortiz et al., 2006] zkoumali změnu, respektive stálost vzorku lysozymu při dlouhodobém osvětlení laserovým svazkem. Žádné výrazné změny po hodinovém měření spektrum vzorku ovšem nevykazovalo.

Zajímavým využitím DCDR je například analýza lidských slz, kterou provedli J. Filik a N. Stone [Filik, Stone, 2008]. Od tří dobrovolníků odebrali vzorky slz produkovaných za různých podmínek. Ač signály byly slabé, byla detekována přítomnost proteinů a močoviny ve všech vzorcích.

N. C. Dingari a kol. [Dingari et al., 2012] ve své práci využili metodu DCDR k detekci glykace albuminu. Glykovaný albumin je důležitým markerem pro zjištění hrozby onemocnění diabetes v lidském organismu.

Metodou DCDR použitou ke studiu biomolekul a biologicky významných molekul se zabývají i členové Oddělení fyziky biomolekul, MFF UK. V. Kopecký Jr. a V. Baumruk se ve své práci [Kopecký, Baumruk, 2006] zaměřili na zkoumání struktur vytvořených po vyschnutí roztoku albuminu.

Účinnost DCDR při zkoumání liposomů, kulových lipidových struktur, ukázali E. Kočišová a M. Procházka [Kočišová, Procházka, 2011]. V jejich práci byli schopni detekovat Ramanova spektra liposomů při koncentracích o dva řády nižších,



než bylo možné s využitím konvenční Ramanovy spektroskopie. Navíc, při vysychání nanesené kapky docházelo k separaci lipidů a fosfátového pufru.

V práci J. Klenera a kol. [Klener et al., 2014] se autoři zaměřili na analýzu mozkomíšního moku pomocí DCDR spektroskopie. Cílem práce bylo zjistit, jak dlouho zůstává vzorek mozkomíšního moku stabilní, a jak ho ovlivní opakované zmražení.

E. Kočišová a M. Procházka byli ve své práci [Kočišová, Procházka, 2015] schopni detekovat porfyriny (organické cyklické sloučeniny) při koncentracích srovnatelných či nižších, než bylo možné s použitím metody povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS).

T. Pazderka a V. Kopecký Jr. ve své práci [Pazderka, Kopecký Jr., 2015] studovali rozdíly ve spektrech proteinogenních aminokyselin v případech, kdy byly tyto látky ve své krystalové formě, ve skelné fázi, či rozpuštěné ve vodném roztoku.

E. Kočišová a M. Procházka v roce 2018 ve své práci zkoumali detekční limity dipikolinové kyseliny, což je biologický marker pro bakterii *Bacillus anthracis*, původce onemocnění antrax [Kočišová, Procházka, 2018].

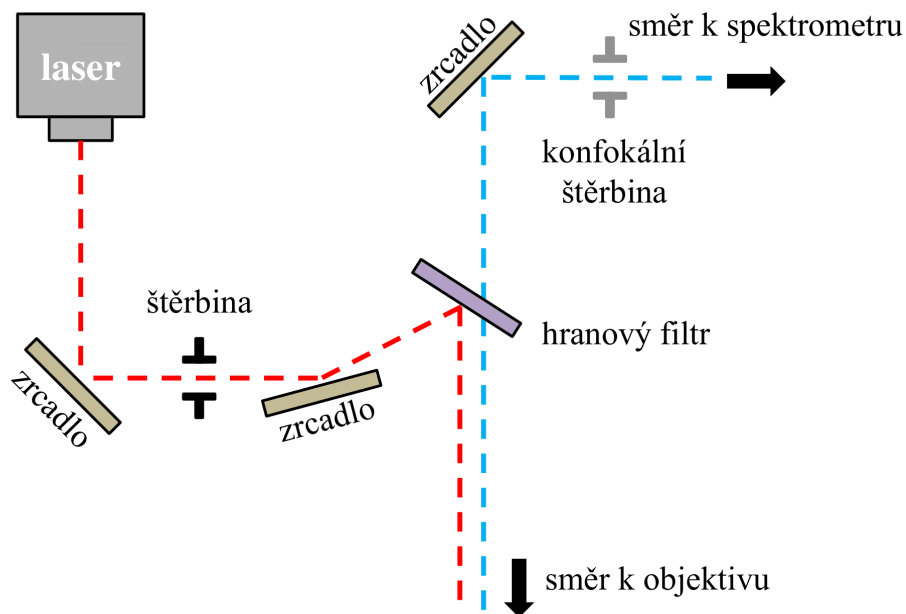
Limity metody DCDR při detekci kyseliny acetylsalicylové (aspirin), riboflavinu (vitamín B2) a methylenové modři zkoumali E. Kočišová, S. Sayedová a M. Procházka v roce 2020 [Kočišová, Sayedová a Procházka, 2020].

## 2 Experimentální část

### 2.1 Spektrometr

K měření byl využíván integrovaný Ramanův systém HR800 od společnosti Horiba Jobin Yvon. Mikroskop je zde konfokálně spojený se spektrografem, což umožňuje potlačení signálů mimo rovinu zaostření. Tímto se maximalizuje kvalita získaných dat.

K excitaci byl použit helium-neonový laser o vlnové délce 632,917 nm a výkonu 20 mW. K úpravě intenzity svazku lze využít neutrální filtry o optické hustotě 0,3, 0,6, 1, 2, 3 a 4. Ramanův signál sbírá objektiv a vrací se stejnou dráhou jako příchozí paprsek. Záření vzniklé Rayleighovým rozptylem je odraženo hranovým filtrem. Dráha laserového svazku je znázorněna na obrázku 2.1.1 .



Obr. 2.1.1 Schéma integrovaného Ramanova systému HR800

### 2.1.1 Nastavení aparatury

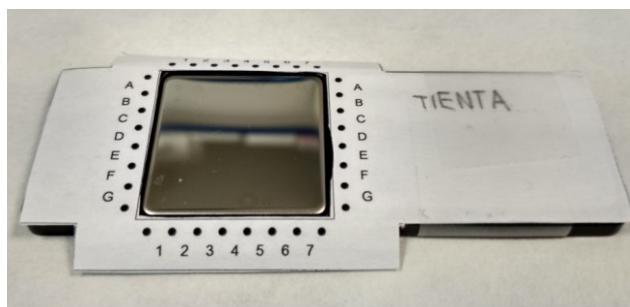
K pozorování vyschlých kapek roztoků byly využity objektivy zvětšující 5×, 10× a 50×. Spektra byla sbírána pomocí objektivu 50× ULWD (ultra long working distance – objektiv s prodlouženou pracovní vzdáleností, tedy s prodlouženou ohniskovou vzdáleností). Konfokální štěrbinu byla otevřena na průměr 400 μm, akumulace spekter byla pro každé měření nastavena na 1×60 s. Filtr optické hustoty byl nastaven na 0,3, což odpovídá konečnému výkonu 3 mW.

## 2.2 Použité substráty

K měření DCDR spekter je potřeba vhodný hydrofobní substrát. Takovýto substrát podporuje zakoncentrování rozpuštěné látky. Také je potřeba, aby neměl výrazné pozadí v měřených spektrech. K měření výše uvedených vzorků byly použity tři různé substráty, dva komerční a jeden nekomerční. Pro měření kontaminantů rozpuštěných ve vodě byly použity substráty SpectRIM™ od firmy Tienta Sciences (firma již v současnosti neexistuje) a μ-RIM™ od firmy BioTools [BioTools]. Pro měření kontaminantů rozpuštěných v etanolu byl použit nekomerční substrát připravený na Katedře makromolekulární fyziky MFF UK. Každá látka byla měřena na všech třech substrátech.

### 2.2.1 SpectRIM™

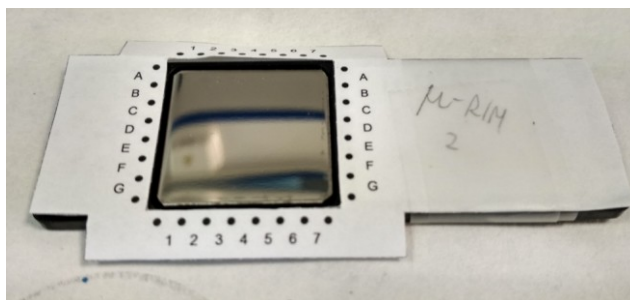
Tento substrát od firmy Tienta Sciences se skládá z plastové podložky, na které je připevněný plát z leštěné nerezové ocele, obojí je vidět na obrázku 2.2.1. Plát je pokryt tenkou vrstvou teflonu (<50 nm). Kontaktní úhel pro vodu byl určen na 122° [Tienta Sciences, 2003]. Substrát neprodukuje žádné nežádoucí viditelné pozadí. V roce 2020 už ovšem není ve výrobě.



Obr. 2.2.1 Substrát SpectRIM™

### 2.2.2 $\mu$ -RIM<sup>TM</sup>

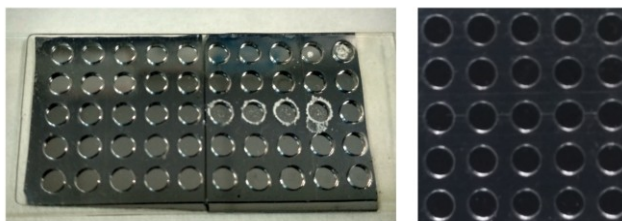
Tento substrát od firmy BioTools se skládá z plastové podložky, na níž je připevněný plátek z leštěné nerezové ocele s hydrofobními vlastnostmi, které bohužel nejsou v příloženém manuálu blíže specifikovány [ $\mu$ -RIM user manual]. Kontaktní úhel pro vodu je  $96^\circ$  [BioTools, 2015]. Substrát neprodukuje žádné nežádoucí viditelné spektrální pozadí. Celá destička je na obrázku 2.2.2.



Obr. 2.2.2 Substrát  $\mu$ -RIM<sup>TM</sup>

### 2.2.3 Nekomerční substrát

Tento substrát byl připraven na Katedře makromolekulární fyziky MFF UK (doc. RNDr. O. Kylián Ph.D.). Jeho povrch tvoří tenká deponovaná vrstva polytetrafluóretylénu (40 nm) nanesená pomocí RF magnetronového naprašování z teflonového terče v argonové atmosféře na křemíkovém plátku. Kontaktní úhel pro vodu je  $110^\circ$ , pro etanol  $36^\circ$ . Na tomto substrátu je připevněná ještě plastová maska s "jamkami" – Grace Bio-Labs CultureWell<sup>TM</sup> chambered coverglass pořízena od firmy Grace Bio-Labs. Tyto jamky tvoří hranice pro nakápnutí vzorku smáčivých kapalin, například vzorků etanolových roztoků. Právě ke studiu kontaminantů rozpuštěných v etanolu byl substrát v této práci použit. Nevýhodou tohoto substrátu je pozadí v podobě silného Ramanova signálu křemíku. Substrát s maskou je vidět na obrázku 2.2.3.



Obr. 2.2.3 Nekomerční substrát připraven na Katedře makromolekulární fyziky MFF UK

## 2.3 Použité kontaminanty

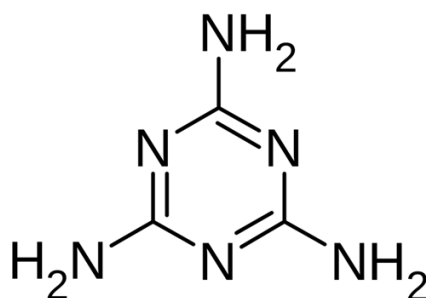
### 2.3.1 Melamin

Melamin (1,3,5-triazin-2,4,6-triamin –  $C_3H_6N_6$ , viz obr. 2.3.1) je organická látka s velkým podílem dusíku (67% na jednotku hmotnosti), využívaná jako součást lepidel a plastů. Mimo toto využití je známá jako ilegální přídavek do potravinářských produktů za účelem zdánlivého zvýšení množství proteinové složky, neboť přítomnost proteinů se obvykle detekuje analyzováním dusičné složky.

Při kontaktu s kůží má melamin dráždivý účinek. Při konzumaci zatěžuje ledviny a je spojen s tvorbou ledvinových kamenů. Dlouhodobá konzumace melaminu může vést k poruše reprodukčního systému, močových cest, či dokonce k rakovině močového měchýře [Skinner, 2010].

V roce 2008 došlo v Čínské lidové republice k jedné z nejmasovějších dětských otrav v historii lidstva, a to právě kvůli melaminu, který čínští producenti přidávali do zředěného mléka. Z přibližně 300 000 obětí otravy bylo téměř 53 000 dětí hospitalizováno a 6 zemřelo [McDonald, 2008].

Při testování na krysách byla hodnota  $LD_{50}$  (smrtná dávka pro 50% testovaných zvířat) při orálním podání rovna 3161 mg/kg tělesné hmotnosti [World Health Organization].



Obr. 2.3.1 Strukturní vzorec melaminu

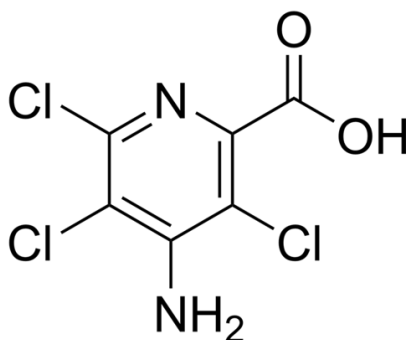
### 2.3.2 Picloram

Picloram (4-amino-3,5,6-trichlorpyridin-2-karboxylová kyselina –  $C_6H_3Cl_3N_2O_2$ , viz obr. 2.3.2) je herbicid využívaný proti dřevinám a některým travinám. Picloram je středně toxický při kontaktu s očima a mírně toxický v případě

kontaktu s kůží. Ačkoliv nemá tendence se akumulovat ve vodním prostředí, byl již detekován v podzemních vodách.

Případů intoxikace picloramem u člověka je velice málo. Při testování na krysách byla hodnota LD<sub>50</sub> rovna 8900 mg/kg tělesné hmotnosti, u králíků to bylo mezi 2,000 – 3,500 mg/kg, v obou případech se data měřila při přímém orálním podání. Při měření toxicity picloramu v případě vdechnutí nebyly ve zkoumané skupině krys pozorovány žádné nežádoucí efekty [Extoxnet, 1993a].

Dle vyhlášky č.232/2004 Sb. a World Health Organization je pro člověka přijatelná denní dávka picloramu 0,2 mg/kg tělesné hmotnosti a dle vyhlášky MŽP (Ministerstvo životního prostředí) a MZE (Ministerstvo zemědělství) České republiky 5/2011 je v České republice limitní koncentrace picloramu v podzemní vodě 0,1 µg/l [ČHMÚ].



Obr. 2.3.2 Strukturní vzorec picloramu

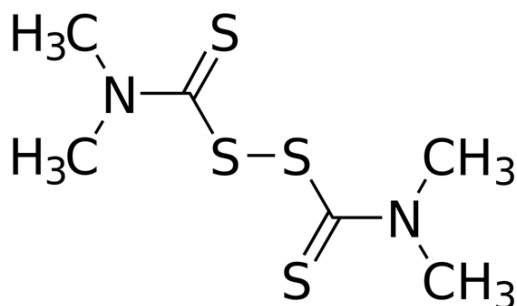
### 2.3.3 Thiram

Thiram (tetramethylthiuramdisulfid – C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>S<sub>4</sub>, viz obr. 2.3.3) je fungicid, který je zároveň používán jako zvířecí repelent k ochraně ovocných stromů. Byl využíván také pro léčbu svrabu nebo v opalovacích krémech. Není předpokládáno, že by thiram měl schopnost kontaminovat podzemní vodu [Howard, Michalenko, 1991]. Thiram je středně toxický v případě požití, ale vysoce toxický v případě vdechnutí. Může způsobovat bolesti hlavy, únavu, malátnost a žaludeční potíže [Hayes, Laws, 1991].

Při orálním podání thiramu krysám je hodnota LD<sub>50</sub> mezi 560 – 1000 mg/kg tělesné hmotnosti, u králíků dokonce jen 210 mg/kg. Tento kontaminant je tedy mnohem více toxický než předchozí dva. Při měření toxicity thiramu v případě vdechnutí byla hodnota LC<sub>50</sub> (smrtná koncentrace chemikálie ve vzduchu/vodě pro

50% testovaných zvířat) po 4 hodinách 500 mg/cm<sup>3</sup>, koncentrace 1500 mg/cm<sup>3</sup> nebo vyšší je bezprostředním ohrožením života pro přítomné organismy [Extoxnet, 1993b].

Dle vyhlášky č.232/2004 Sb. a World Health Organization je pro člověka přijatelná denní dávka thiramu 0,01 mg/kg tělesné hmotnosti [ČHMÚ].



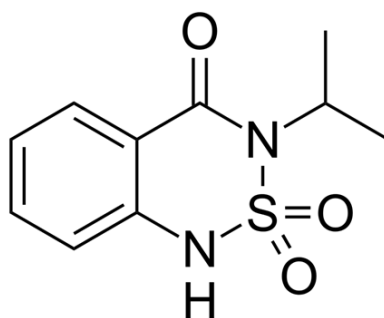
Obr. 2.3.3 Strukturní vzorec thiramu

#### 2.3.4 Bentazon

Bentazon (3-isopropyl-1H-2,1,3- benzothiadiazin-4(3H)-on- 2,2-dioxid – C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S, viz obr. 2.3.4) je selektivní herbicid využívaný jako postřik na kukuřici, hrách, rýži a mnoho dalších plodin. Je relativně nebezpečným kontaminantem podzemních vod [California EPA, 1999]. Při přímém kontaktu bentazon dráždí oči a dýchací ústrojí, požití může způsobit průjemy, malátnost, zvracení a ztížené dýchání.

Při testování na krysách se hodnota LD<sub>50</sub> při orálním podání pohybovala mezi 1100 – 2063 mg/kg tělesné hmotnosti. Maximální denní dávka podle EPA (United States Environmental Protection Agency) je 20 µg/l [Extoxnet, 1993c].

Dle vyhlášky č.232/2004 Sb. a World Health Organization je pro člověka přijatelná denní dávka bentazonu 0,1 mg/kg tělesné hmotnosti a dle vyhlášky MŽP a MZE 5/2011 v České republice je limitní koncentrace bentazonu v podzemní vodě 0,1 µg/l a dle nařízení vlády České republiky 401/2016 je limitní koncentrace bentazonu v povrchové vodě 4,5 µg/l [ČHMÚ].



Obr. 2.3.4 Strukturní vzorec bentazonu

### 2.3.5 Příprava roztoků a měření spekter kontaminantů

Studované látky ve formě prášku byly zakoupeny s nejvyšší dostupnou čistotou. Melamin (kat. č. M2659) a thiram (kat. č. 43966) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich Chemistry s čistotou 99%. Picloram (kat. č. 36774) s čistotou 99,6% a bentazon (kat. č. 32052) s čistotou 99,9% pochází od firmy FLUKA.

Pro všechny studované kontaminanty byla změřena Ramanova spektra z prášku. Tato spektra sloužila jako reference. Prášek byl nanesen na skleněnou destičku, a poté z něj byla změřena dvě spektra.

Při přípravě základních vodných roztoků se vycházelo z informací z literatury [Yalkowski et al., 2003]. Cílem bylo, aby se základní roztok koncentrací co nejvíce blížil maximální rozpustnosti látky v daném rozpouštědle.

Hodnoty maximální rozpustnosti látek ve vodě získané z práce Yalkowského a kol. [Yalkowski et al., 2003] jsou následující; melamin (při 20°C) 2,69 mg/ml (21,35 mM), picloram (při 20°C) 0,55 mg/ml (2,28 mM), thiram (při pokojové teplotě) 0,03 mg/ml (0,12 mM) a bentazon (při 20°C) 0,5 mg/ml (2,08 mM). Látky byly rozpouštěny v neionizované vodě (Millipore-Q, 18 MΩ).

Připravené vodní roztoky byly studovány, a to tak, že na každý ze dvou komerčních substrátů byly nakápnuty dvě kapky o objemu 2 μl. Následně byl substrát s kapkami zakryt Petriho miskou, aby se zamezilo kontaminaci vzorků prachem. Po vyschnutí, které trvalo mezi 40 – 60 minutami, byly substráty odkryty a přeneseny do laboratoře ke studiu, tedy pozorování tvaru a formy vyschlé kapky a akumulaci Ramanových spekter. Na každé vyschlé kapce byla provedena minimálně tři měření.

Po změření byla odebrána část základního roztoku. Tato část byla následně zředěna. Opět následovalo nakapání kapky, a po jejím vysušení pozorování a měření



Ramanova spektra. Tento postup byl opakován až po koncentraci, kdy už látku nebylo možné detekovat. Na základě toho byla určena limitní koncentrace, jako nejnižší koncentrace detekovatelná metodou DCDR.

Základní roztok melaminu byl namíchán s koncentrací 2 mg/ml (15,86 mM) a dále ředěn 10×, 100×, 500× a 2500×.

Základní roztok picloramu byl namíchán s koncentrací 0,5 mg/ml (2,07 mM). Dále byl ředěn 50× a 100×.

Thiram má ve vodě velmi nízkou rozpustnost a navázat jeho přesné množství k přípravě základního roztoku nebylo v laboratoři možné. Byl tedy vytvořen roztok s vyšší koncentrací (0,06 mg/ml), který byl následně odstředěn. Po odstředění byla odebrána horní část roztoku bez sedimentu, kde se nacházel plně rozpuštěný thiram. Tato část roztoku byla odebrána pipetou a považována za roztok základní s koncentrací 0,03 mg/ml, která dle literatury odpovídala maximální možné rozpustnosti. Dále byl pak ředěn 50× a 100×.

Základní roztok bentazonu byl namíchán s koncentrací 0,5 mg/ml (2,08 mM) a dále ředěn 50× a 100×.

Podobně se postupovalo i při měření kontaminantů rozpuštěných v etanolu (etanol pro spektroskopické účely – absolutní pro UV zakoupen od firmy Penta s kat. č. 71250-11001), informace o maximálních rozpustnostech byly čerpány z několika různých zdrojů a cílem bylo opět přiblížit se při přípravě roztoku maximální možné koncentraci. Hodnoty maximální rozpustnosti látek v etanolu jsou následující; melamin 0,6 mg/ml (4,76 mM) [European chemicals agency], picloram 10,5 mg/ml (43,49 mM) [O'Malley, 2010], thiram <10mg/ml (<41,58 mM) [Tomlin, 2003] a bentazon 0,68g/ml (2,8 M) [Exttoxnet, 1993c].

Etanolvé roztoky studovaných látek byly nakapávány do "jamek" nekomerčního povrchu. Nanesena byla vždy jen jedna kapka dané koncentrace roztoku o objemu 1μl, který odpovídal objemu jamky. Schnutí kapky obvykle trvalo 10 – 15 minut.

Při přípravě základního roztoku melaminu nebylo možné při koncentraci odpovídající dle literatury hodnotě maximální rozpustnosti melamin úspěšně rozpustit. Po přidávání většího množství etanolu bylo dosaženo zdánlivého rozpuštění melaminu při koncentraci 0,3 mg/ml (2,38 mM).

Základní roztok picloramu byl namíchán s koncentrací odpovídající maximální rozpustnosti, tedy 10,5 mg/ml (43,49 mM).

Při vytváření základního roztoku thiramu byl nejdříve namíchán roztok s koncentrací 9 mg/ml (37,4 mM), který byl dále ředěn dokud se látka nejevila jako rozpuštěná. To nastalo při koncentraci 1,5 mg/ml (resp. 6,24 mM). Tento roztok byl dále ředěn 50× a 100×.

Základní roztok bentazonu byl namíchán s koncentrací odpovídající maximální rozpustnosti, tedy 0,68 g/ml (2,8 M). Tento roztok byl nadále ředěn 50×, 100×, 500× a 1000×.

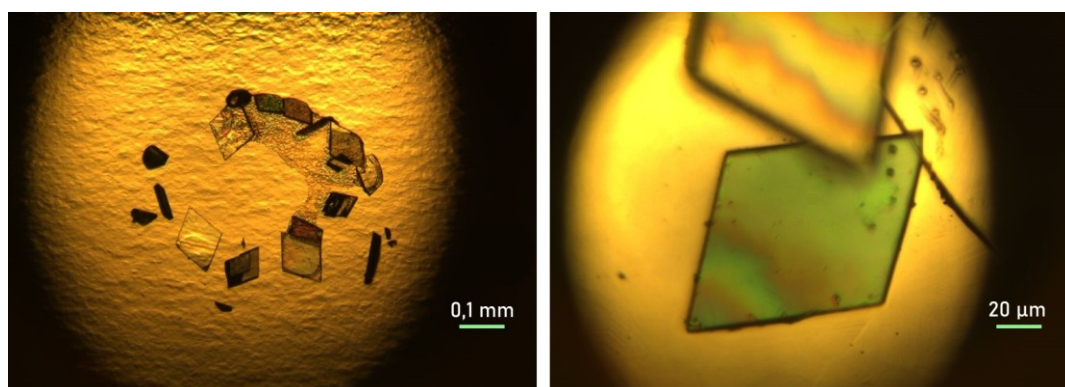
## 3 Výsledky měření

### 3.1 Melamin

Rozpustnost melaminu ve vodě (2,69 mg/ml) je ve srovnání s rozpustností v etanolu (0,6 mg/ml) vyšší. Navíc, rozpustit tuto látku v etanolu nebylo možné pro koncentraci literaturou uváděnou. Proto byl při studiu důraz kladen na pozorování vyschlých kapek z vodného roztoku a měření na substrátech SpectRIM™ a  $\mu$ -RIM™.

#### 3.1.1 Melamin na substrátu SpectRIM™

Pozorování vyschlých kapek vycházelo ze základní koncentrace 2 mg/ml (15,86 mM). Melamin na substrátu tvořil krystalky, které jsou vidět na následujícím obrázku 3.1.1.

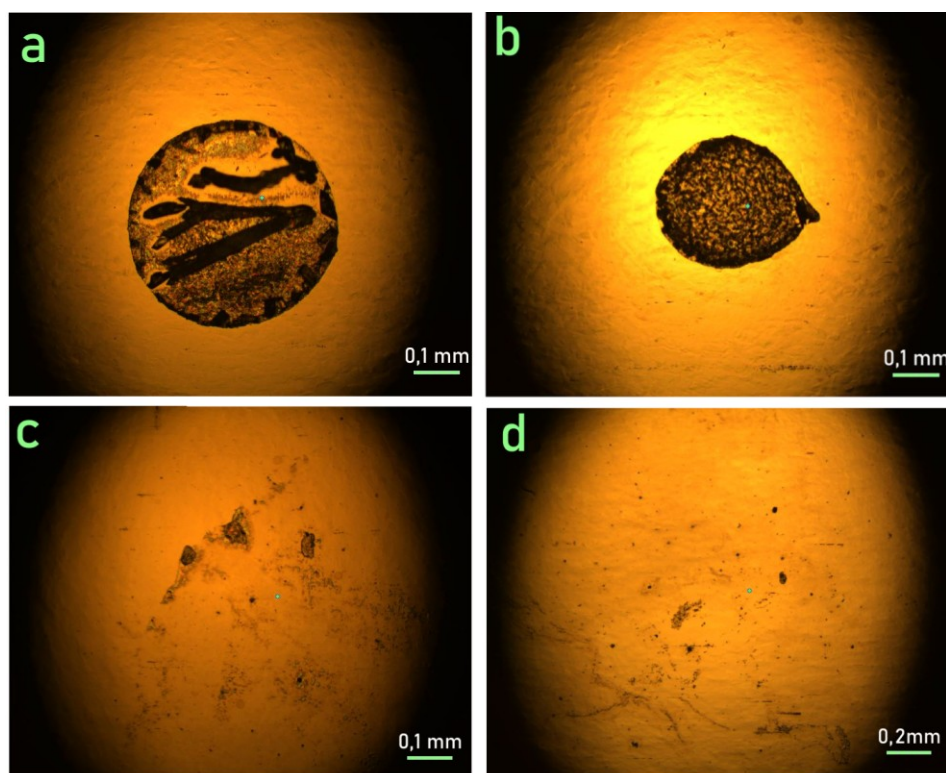


Obr. 3.1.1 Vyschlá kapka melaminu o koncentraci 15,86 mM na substrátu SpectRIM™ (vlevo), detail krystalu (vpravo)

Téměř všechna látka tedy byla koncentrována na ploše o průměru přibližně 0,6 mm v krystalcích o délkách 50  $\mu$ m – 100  $\mu$ m. Při ředění na koncentraci 1,59 mM se při schnutí stále tvořily krystaly, tentokrát však byl jejich tvar odlišný. Krystaly byly podlouhlé a všechna látka se nacházela v kruhu o průměru přibližně 0,5 mm (viz obr. 3.1.2 a).

Stejně to bylo i při dalším naředění na 0,16 mM (viz obr. 3.1.2 b), ovšem vzniklé krystaly byly mnohem menší. Menší byl i průměr kruhu, ve kterém se látka nacházela, ten byl téměř poloviční. Při následujících ředění se již netvořily ani krystalky, ani "kávový kroužek", látka se rozprostřela po velké ploše a její shluky

vznikaly spíše náhodně. To, jak se se snižováním koncentrace měnil vyschlý vzorek je vidět na obrázku 3.1.2.



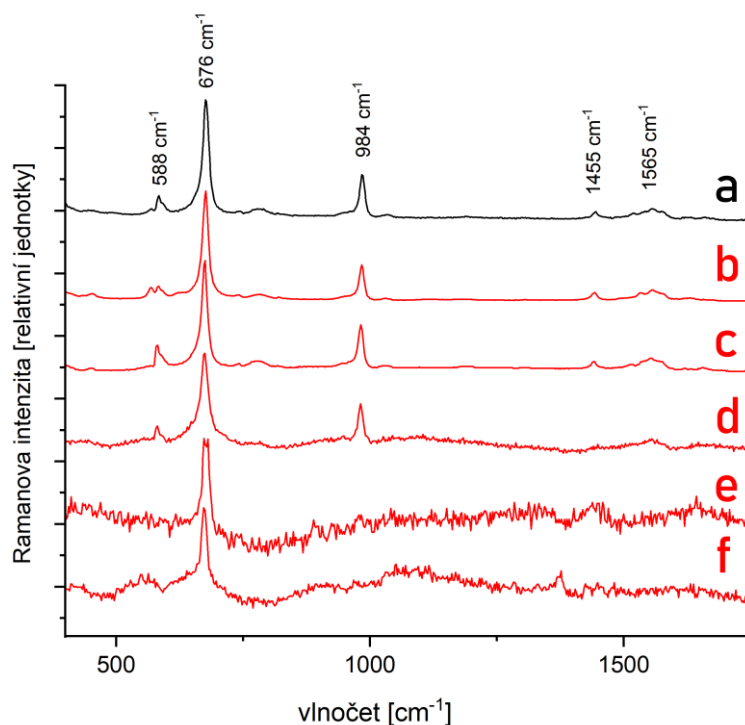
Obr. 3.1.2 Vyschlé kapky melaminu na substrátu SpectRIM<sup>TM</sup> **a)** koncentrace 1,59 mM; **b)** koncentrace 0,16 mM; **c)** koncentrace 31,7  $\mu\text{M}$ ; **d)** koncentrace 6,34  $\mu\text{M}$

Co se týče spektra, látka byla identifikována zejména díky charakteristickému pásu na pozici  $676\text{ cm}^{-1}$  (ring breathing vibration) a také díky menšímu pásu na pozici  $984\text{ cm}^{-1}$  (skeletal vibraton) [Sawodny et al., 1966]. Tyto, ale i další pásy, byly velmi dobře vidět již ve spektru získaném z prášku melaminu.

Spektrum získané z velkých krystalů vzniklých ve vyschlé kapce základního roztoku bylo téměř nerozeznatelné od spektra práškového. Při zředění na koncentraci 1,59 mM byly pásy na pozicích  $676\text{ cm}^{-1}$  a  $984\text{ cm}^{-1}$  stále velmi dobře pozorovatelné. Stejně kvalitní spektrum bylo získáno i z vyschlé kapky z roztoku o koncentraci 0,16 mM.

I přes to, že po dalším ředění bylo již složitější nalézt místo vhodné pro sběr spektra, po změření jednoho z viditelných shluků materiálu bylo získáno spektrum s charakteristickým pásem na pozici  $676\text{ cm}^{-1}$ , které potvrzovalo, že jde o melamin. Z vyschlé kapky roztoku s koncentrací 6,34  $\mu\text{M}$  bylo možné získat jen jedno relativně

kvalitní spektrum poukazující na přítomnost melaminu, poté bylo měření na tomto substrátu ukončeno. Porovnání spekter je na obrázku 3.1.3.



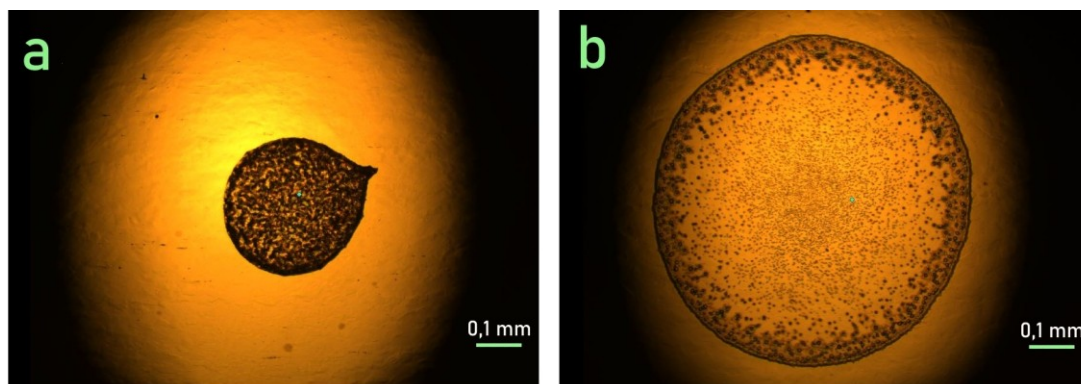
Obr. 3.1.3 Porovnání spekter z vyschlých kapek melaminu na substrátu SpectRIM™ : **a)** prášek, výchozí vodní roztoky o koncentraci **b)** 15,86 mM, **c)** 1,59 mM, **d)** 0,16 mM, **e)** 31,7 μM, **f)** 6,34 μM

### 3.1.2 Melamin na substrátu μ-RIM™

Na substrátu μ-RIM™ se melamin choval podobně. Při vyschnutí kapky základního roztoku vznikly podobné krystaly, ovšem byly rozprostřeny na ploše s průměrem přibližně 1 mm, což je mnohokrát větší plocha než na prvním substrátu.

Při ředění na 1,59 mM byla vidět linie tvaru kroužku, a v ní se nacházelo několik podlouhlých krystalů, které dosahovaly délky až 0,6 mm.

Při koncentraci 0,16 mM bylo velmi složité nalézt bod vhodný na sběr kvalitního spektra, ačkoliv vyschlá kapka vykazovala usazování látky na okrajích nakápnuté kapky (efekt „kávového kroužku“). Je tedy zřejmé, že i přes to, že oba substráty jsou prezentovány téměř identicky, jejich vlastnosti se relativně dost liší, což je názorně vidět na obrázku 3.14.

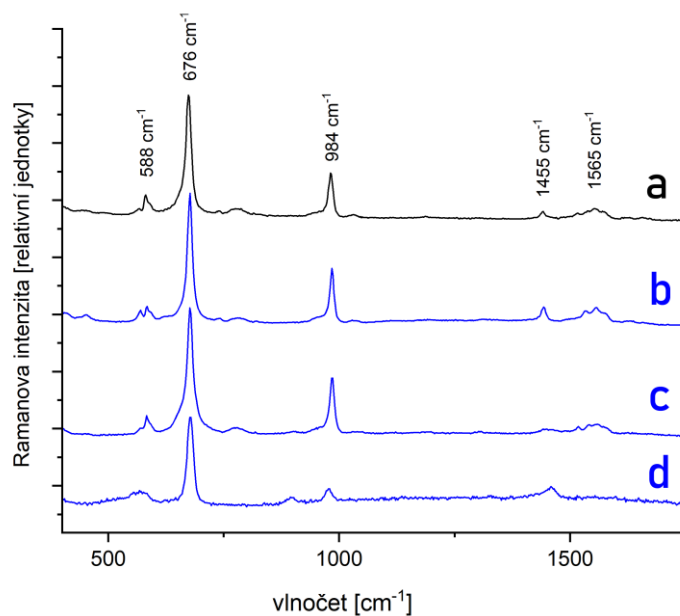


Obr. 3.1.4 Porovnání plochy vyschlé kapky melaminu o koncentraci 0,16 mM na substrátech SpectRIM™ (a) a μ-RIM™ (b)

Z krystalů vzniklých po vyschnutí základního roztoku o koncentraci 15,86 mM bylo možné změřit velmi kvalitní spektrum, ale již při prvním zředění na koncentraci 1,59 mM byl zřejmý rozdíl mezi dvěma komerčními substráty, vyschlá kapka totiž nabízela kvůli své velikosti méně bodů (míst) vhodných na změření spektra.

Situace byla při dalším zředění ještě horší, ale v jednom bodě nakonec bylo možné získat spektrum s výraznými pásy na pozicích  $676\text{ cm}^{-1}$  a  $984\text{ cm}^{-1}$ .

Při dalším ředění už žádné kvalitní spektrum nebylo možné změřit. Na substrátu SpectRIM™ se látka mnohem snadněji koncentrovala a bylo tedy možné měřit kvalitní spektra i při koncentraci několikanásobně menší než na substrátu μ-RIM™. Naměřená spektra jsou vidět v přehledu na obrázku 3.1.5.



Obr. 3.1.5 Porovnání spekter melaminu z vyschlých kapek na substrátu  $\mu$ -RIM<sup>TM</sup>: **a)** prášek, výchozí vodní roztoky o koncentraci **b)** 15,86 mM, **c)** 1,59 mM, **d)** 0,16 mM

### 3.1.3 Melamin na nekomerčním substrátu

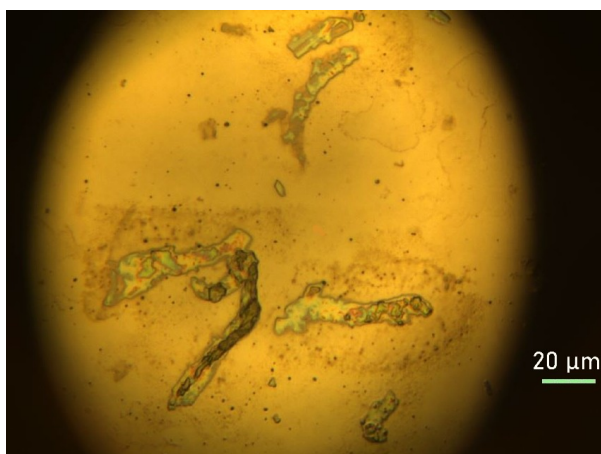
Vyschlá kapka základního roztoku melaminu na nekomerčním substrátu nevykazovala žádné známky koncentrace látky v jakémkoliv místě. Pokusy o akumulaci spektra z několika malých shluků látky na substrátu byly neúspěšné. Měření bylo tedy ukončeno bez zisku jediného spektra vykazujícího přítomnost melaminu v roztoku.

## 3.2 Picloram

Rozpustnost picloramu je mnohonásobně vyšší v etanolu (10,5 mg/ml), nežli ve vodě (0,55 mg/ml). Nekomerční substrát se tedy zde jevil jako vhodný konkurent substrátů komerčních.

### 3.2.1 Picloram na substrátu SpectRIM<sup>TM</sup>

Při vyschnutí kapky základního roztoku o koncentraci 2,07 mM se většina látky koncentrovala ve velkém shluku o průměru 0,8 mm, oproti melaminu zde nevznikaly žádné krystaly. Při zředění se struktura látky na substrátu nijak nezměnila, byla jen rozprostřena na větší ploše o průměru až 2 mm. Detail shluku látky je vidět na obrázku 3.2.1. Tento trend pokračoval dále i při dalším zředění.

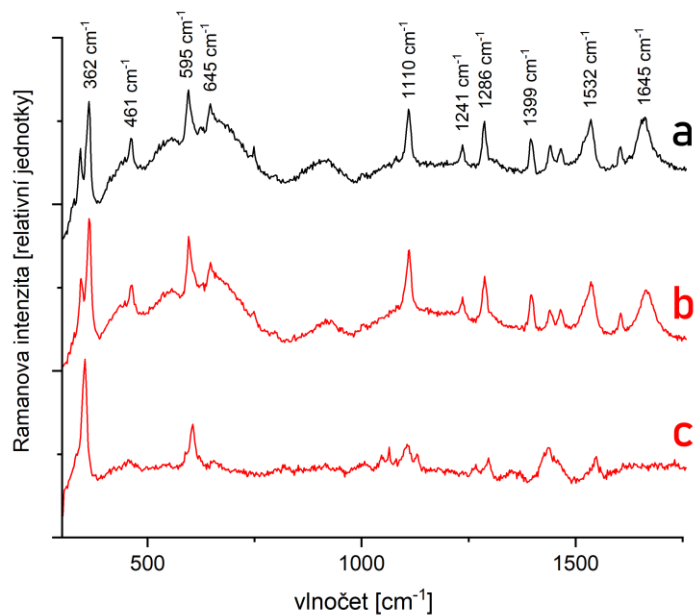


Obr. 3.2.1 Shluk látky vytvořený po vyschnutí kapky picloramu o koncentraci 41,4  $\mu\text{M}$  na substrátu SpectRIM<sup>TM</sup>

Ke spektrální detekci tohoto kontaminantu byly využívány hlavně pásy na pozicích 362  $\text{cm}^{-1}$ , 595  $\text{cm}^{-1}$  a 1110  $\text{cm}^{-1}$  [Dias, 2019], spektrum prášku mělo ale výrazných pásů mnohem více, tyto další pásy ovšem ve spektrech z vyschlých kapek získaných ze zředěných roztoků nebyly tolik výrazné. Spektrum získané z vyschlé kapky základního roztoku navíc vykazovalo přítomnost silného fluorescenčního pozadí, které značně snižovalo kvalitu spektra.

Z několika shluků vzniklých po vyschnutí kapky s koncentrací 41,40  $\mu\text{M}$  bylo ještě získáno relativně kvalitní spektrum, které opět bylo ovlivněno fluorescenčním pozadím. Při dalším zředění již nebylo možné změřit spektrum odpovídající přítomnosti picloramu. Naměřená spektra jsou vidět na obrázku 3.2.2, fluorescenční pozadí bylo odečteno pomocí nástroje Peak Analyzer, který je součástí programu OriginPro. V programu byla automaticky vypočítána polynomiální funkce, která odpovídala fluorescenčnímu pozadí, ta byla následně od spektra odečtena.



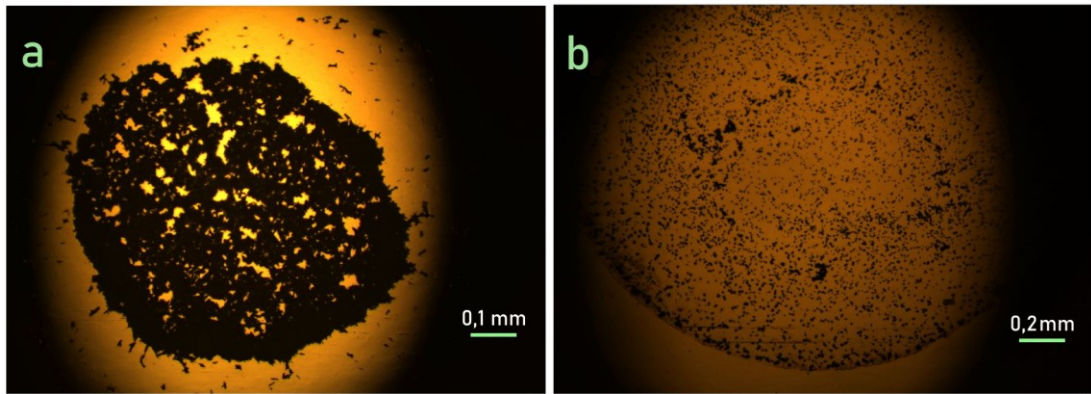


Obr. 3.2.2 Porovnání spekter z vyschlých kapek picloramu na substrátu SpectRIM<sup>TM</sup>: a) prášek, výchozí vodní roztoky o koncentraci b) 2,07 mM, c) 41,40  $\mu$ M

### 3.2.2 Picloram na substrátu $\mu$ -RIM<sup>TM</sup>

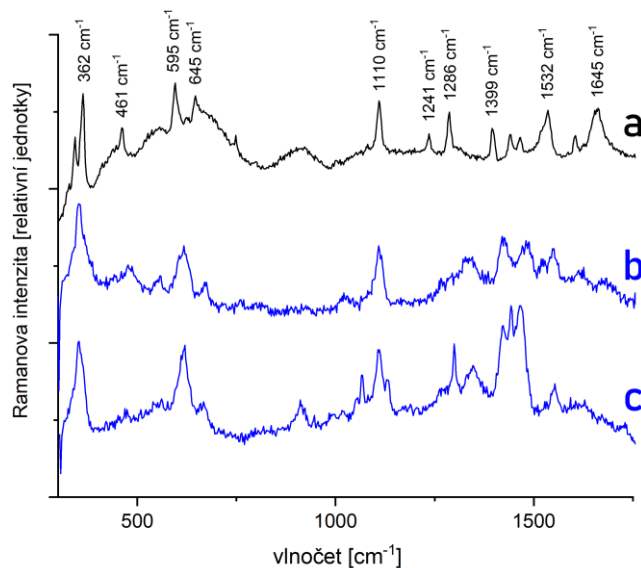
Na tomto substrátu byl efekt koncentrování látky slabší, již při maximální koncentraci 2,07 mM byla látka rozprostřena na ploše o průměru 2 mm. Struktura usazené látky byla ale identická jako na substrátu SpectRIM<sup>TM</sup>. Velikost shluků byla na okrajích vyschlé kapky o něco větší.

Při zředění na 41,4  $\mu$ M již byla látka rozprostřena po substrátu bez jakéhokoliv náznaku koncentrace vlivem proudů při vysychání kapky a shluky látky byly velice malé. Rozdíly ve vysychání mezi substráty byly téměř identické, jako při měření melaminu. Látka na substrátu  $\mu$ -RIM<sup>TM</sup> se opět nekonzcentruje tak, jako na substrátu SpectRIM<sup>TM</sup>. Porovnání je vidět na obrázku 3.2.3.



Obr. 3.2.3 Porovnání vyschlé kapky picloramu na substrátu SpectRIM™ (a) a substrátu  $\mu$ -RIM™ (b) při koncentraci 2,07 mM

Ve spektru získaném z okraje vyschlé kapky byly dobře vidět výrazné pásy na pozicích  $362\text{ cm}^{-1}$  a  $1110\text{ cm}^{-1}$ . Všechna spektra naměřená na tomto substrátu byla ovšem také ovlivněna přítomností silného fluorescenčního pozadí. Po zředění bylo v několika náhodných shlucích látky naměřeno spektrum s charakteristickým pásem na pozici  $362\text{ cm}^{-1}$ , ale při dalším ředění již ani tento pás nebyl rozeznatelný od pozadí. Naměřená spektra s odečteným fluorescenčním pozadím (opět pomocí programu OriginPro) jsou vidět na obrázku 3.2.4.



Obr. 3.2.4 Porovnání spekter z vyschlých kapek picloramu na substrátu  $\mu$ -RIM™: a) prášek, výchozí vodní roztoky o koncentraci b) 2,07 mM, c)  $41,40\text{ }\mu\text{M}$

### 3.2.3 Picloram na nekomerčním substrátu

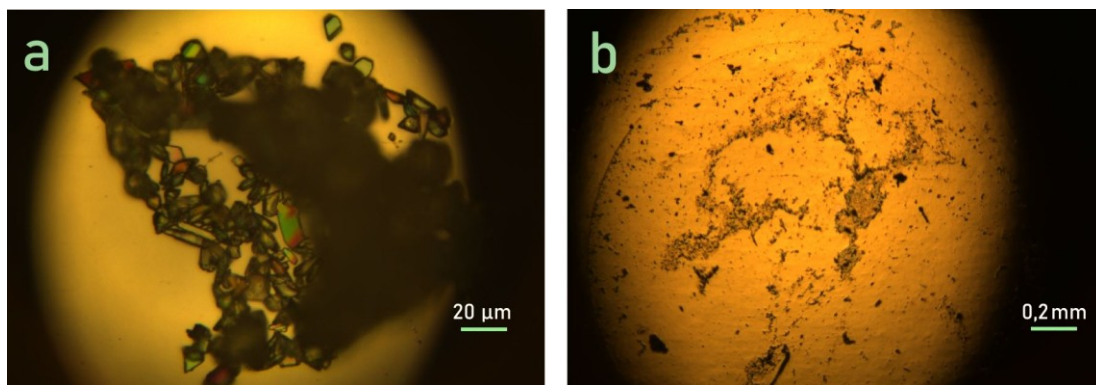
Při vysychání kapky základního roztoku docházelo ke vzlínání po stěnách jamky. Na povrchu substrátu se tedy neudržela žádná část kontaminantu a nemohlo být změřeno žádné spektrum.

## 3.3 Thiram

Ačkoliv byl thiram rozpuštěn v etanolu s mnohem menší koncentrací než uváděla literatura ( $<10\text{mg/ml}$ ), byla to stále několikanásobně lepší rozpustnost, než jakou má thiram ve vodě ( $0,03\text{ mg/ml}$ ).

### 3.3.1 Thiram na substrátu SpectRIM<sup>TM</sup>

Původní neodstředěný roztok vytvořil po vyschnutí shluk látky o rozměrech  $120\text{ }\mu\text{m} \times 160\text{ }\mu\text{m}$ . Tento shluk se skládal převážně z malých krystalů o délce kolem  $5\text{ }\mu\text{m}$ . Po vyschnutí odstředěného roztoku se na substrátu vytvořilo několik oblastí s koncentrovaným thiramem, ovšem ty neodpovídali ani vysychání s efektem „kávového kroužku“, ani koncentraci na středu kapky, jak je vidět na obr. 3.3.1. Ve vyschlé kapce bylo také možné najít několik krystalů o velikostech  $4 - 8\text{ }\mu\text{m}$ .



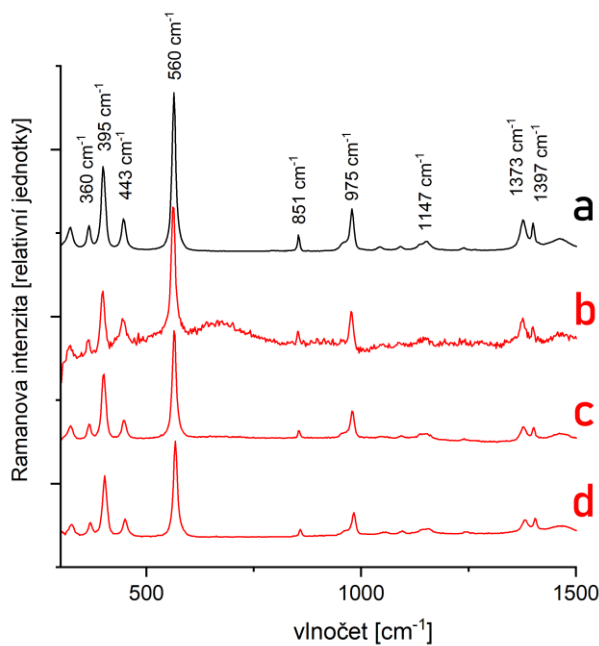
Obr. 3.3.1 Porovnání vyschlé kapky neodstředěného roztoku thiramu (a) a odstředěného roztoku thiramu (b) na substrátu SpectRIM<sup>TM</sup>

Při koncentraci  $2,50\text{ }\mu\text{M}$  již ve vyschlých kapkách nebyla pozorovatelná žádná místa s vyšší koncentrací thiramu, ovšem v jedné z nich byl nalezen malý krystal, podobný těm, které šli pozorovat i při vyšších koncentracích. Při dalším zředění již byla látka rozprostřena jen v tenkých vrstvách po velké ploše.

K identifikaci tohoto kontaminantu byl využíván hlavně velmi intenzivní pás na pozici  $560\text{ cm}^{-1}$  a další silné pásy na pozici  $395\text{ cm}^{-1}$  a  $975\text{ cm}^{-1}$  [Sánchez-Cortés, 1998]. Ve spektru získaném z prášku thiramu bylo možné vidět i několik slabších pásů.

Ze shluků i z krystalů vzniklých po vyschnutí neodstředěného roztoku s koncentrací  $0,25\text{ mM}$  bylo možné získat kvalitní spektrum odpovídající předtím naměřenému prášku. I ve vyschlé kapce odstředěného roztoku ( $0,12\text{ mM}$ ) bylo možné najít několik míst, ze kterých bylo získáno kvalitní spektrum.

Z malého krystalu vzniklého po zředění na  $2,50\text{ }\mu\text{M}$  bylo získáno velice kvalitní spektrum, ovšem z žádného dalšího místa na vyschlé kapce se nedala určit přítomnost thiramu. Měření bylo ukončeno potom, co nebylo možné akumulovat žádné kvalitní spektrum ve vyschlé kapce  $100\times$  zředěného roztoku ( $1,25\text{ }\mu\text{M}$ ). Spektra thiramu jsou vidět na obrázku 3.3.2.

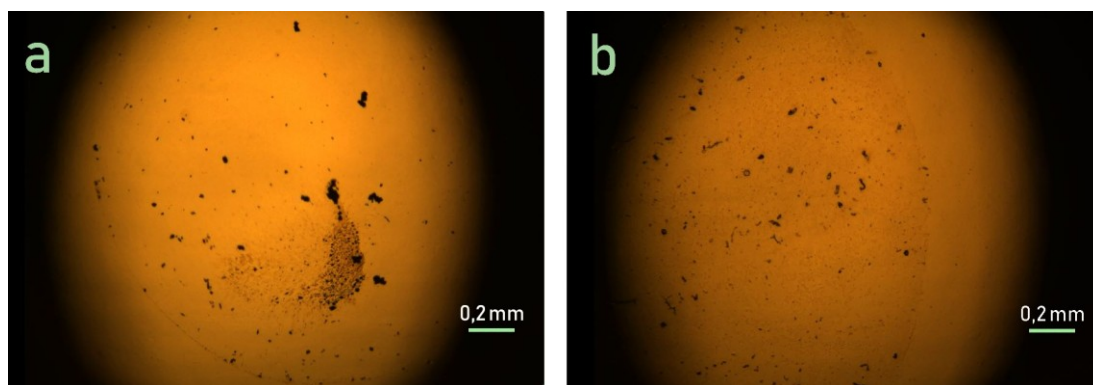


Obr. 3.3.2 Porovnání spekter thiramu z vyschlých kapek na substrátu SpectRIM<sup>TM</sup>: **a)** prášek, výchozí vodní roztoky o koncentraci **b)**  $0,25\text{ mM}$ , **c)**  $0,12\text{ mM}$ , **d)**  $2,50\text{ }\mu\text{M}$

### 3.3.2 Thiram na substrátu $\mu$ -RIM<sup>TM</sup>

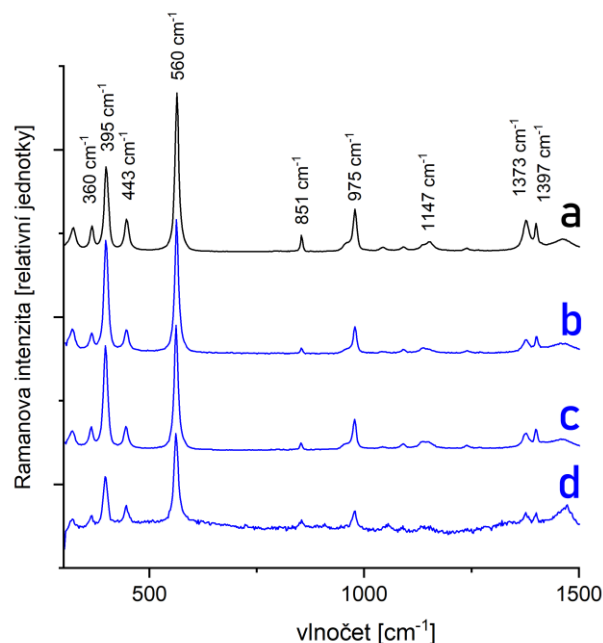
Na rozdíl od situace na substrátu SpectRIM<sup>TM</sup>, kde neodstředěný roztok vyschnul a látka se koncentrovala na relativně malé ploše, zde se látka rozprostřela na ploše o průměru přibližně 2 mm.

Odstředěný roztok s koncentrací 0,12 mM vyschnul tak, že látka byla rozprostřena na ještě větší ploše (viz obr. 3.3.3). I zde se však nacházely malé krystalky, ovšem v menším množství. Při dalším ředění se už na substrátu žádné krystalky nenacházely a látka byla usazena v podobě tenkého povlaku. Opět se zde ukázaly rozdíly mezi oběma komerčními substráty, nejvíce zřejmé byly však při nakápnutí neodstředěného roztoku.



Obr. 3.3.3 Porovnání vyschlé kapky neodstředěného roztoku thiramu (a) a odstředěného roztoku thiramu (b) na substrátu  $\mu$ -RIM<sup>TM</sup>

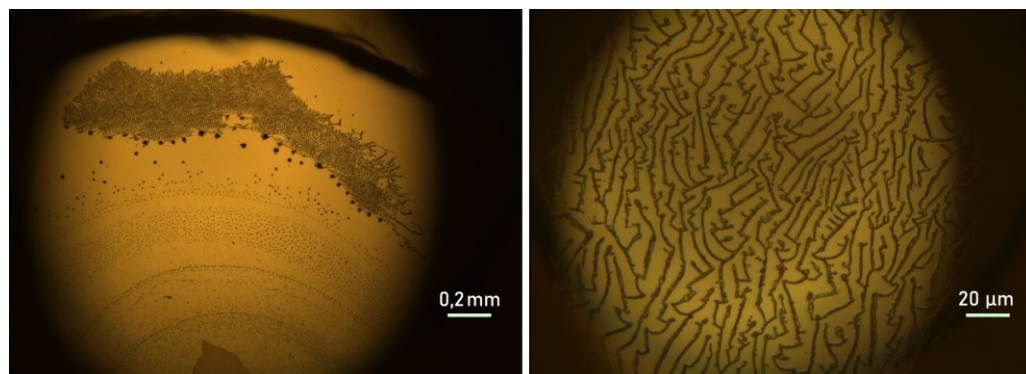
Z viditelných shluků thiramu a několika malých krystalů vzniklých po vyschnutí neodstředěného roztoku (0,25 mM) bylo možné změřit kvalitní spektrum. Krystalky vzniklé při vyschnutí odstředěného roztoku (0,12 mM) se také ukázaly jako vhodné místo pro sběr spektra. Při dalším ředění již však žádný krystal, či jiné vhodné místo na měření nebylo možné nalézt. Získaná spektra jsou vidět na obrázku 3.3.4.



Obr. 3.3.4 Porovnání spekter thiramu z vyschlých kapek na substrátu  $\mu$ -RIM<sup>TM</sup>: **a)** prášek, výchozí vodní roztoky o koncentraci **b)** 0,25 mM, **c)** 0,12 mM, **d)** 2,50  $\mu$ M

### 3.3.3 Thiram na nekomerčním substrátu

Při výchozí koncentraci 6,24 mM vytvářel roztok thiramu v etanolu po vyschnutí na substrátu velice zajímavé struktury, připomínající svým vzhledem labyrint. Velice tenké stěny (menší než 1  $\mu$ m) tvořili chodby útvarů o rozměrech až 2,3 mm  $\times$  0,4 mm. Tyto útvary se nacházely hlavně na okrajích vymezených jamkou, kam byl nakapán roztok. Na krajích útvarů byly "chodby" často zakončeny shluky malých krystalků o průměrech kolem 5  $\mu$ m. Blíže ke středu jamky vznikaly soustředné kružnice z "teček" usazeného thiramu, které nejspíše vznikaly postupným vysycháním kapky (viz obr. 3.3.5). Tento tečkovaný vzor byl jemnější blíže středu, tam látka vytvořila tenký nepravidelný povlak.

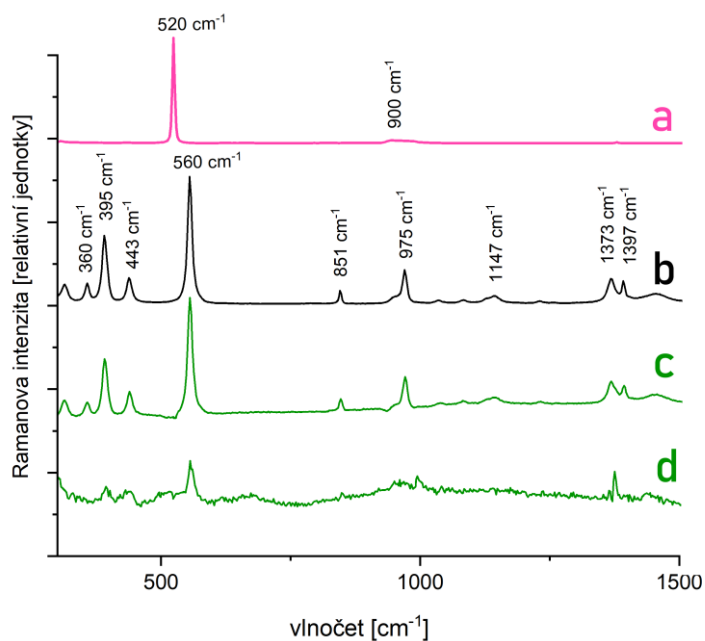


Obr. 3.3.5 Vyschlá kapka thiramu o koncentraci 6,24 mM na nekomerčním substrátu (vlevo), detail vzniklé struktury (vpravo)

Po zředění na 0,125 mM již vyschlá kapka netvořila žádné velké struktury, ovšem zárodky útvarů viditelných při vyšší koncentraci byly zřetelně vidět. Při dalším zředění již nebyla pozorována žádná struktura.

Spektrum odpovídající spektru thiramu bylo možné naměřit jak z usazených částecek blíže ke středu jamky, tak ze shluků krystalů a "stěn", které thiram tvořil po vyschnutí základního roztoku. Identifikace thiramu byla ztížena faktem, že jeho charakteristický velmi intenzivní pás na pozici  $560\text{ cm}^{-1}$  a další intenzivní pás na pozici  $975\text{ cm}^{-1}$  byly částečně či celkově zakryty signálem křemíku ze substrátu (mnohonásobně intenzivnější pás na pozici  $520\text{ cm}^{-1}$  a široký pás  $900 - 1000\text{ cm}^{-1}$ ).

Po zředění na 0,13 mM bylo také možné změřit spektrum, které bylo stále identifikovatelné jako thiram podle pásu na pozici  $560\text{ cm}^{-1}$ , při dalším zředění byl v získaných spektrech rozpoznatelný jen signál křemíku, který do měření vnášel samotný substrát. Naměřená spektra jsou vidět na obrázku 3.3.6, ze spekter thiramu byl odečten signál substrátu pomocí programu OriginPro. Již zmíněný Peak Analyzer dokáže nejen odečítat fluorescenční pozadí, ale i uživatelem zadaná spektra. Při měření bylo tedy naakumulováno i spektrum samotného substrátu, které se následně odečítalo od každého naměřeného spektra látky. Díky jemnému ladění, které umožňoval program, bylo možné získat čistá spektra beze stopy rušivého signálu substrátu.



Obr. 3.3.6 Porovnání spekter thiramu z vyschlých kapek na nekomerčním substrátu: **a)** signál substrátu, **b)** prášek, výchozí etanolové roztoky o koncentraci **c)** 6,24 mM, **d)** 0,13 mM

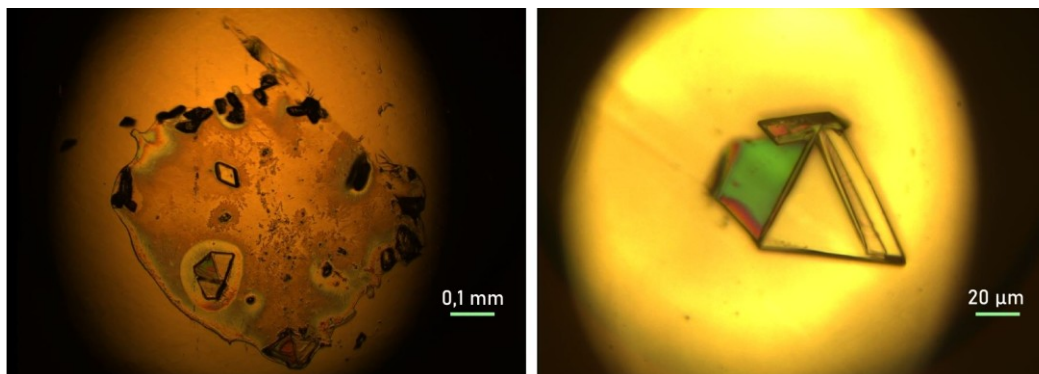
### 3.4 Bentazon

Bentazon je ve vodě velmi málo rozpustný (0,5 mg/ml). Ze zkoumaných látek má však nejlepší rozpustnost v etanolu (0,68 g/ml).

#### 3.4.1 Bentazon na substrátu SpectRIM<sup>TM</sup>

Při vysychání základního roztoku o koncentraci 2,08 mM vznikaly na tomto substrátu poměrně velké krystaly (až o délce 60  $\mu\text{m}$ ). Tyto krystaly byly společně s tenkou vrstvou látky koncentrovány na ploše o průměru přibližně 0,7 mm (viz obr. 3.4.1).



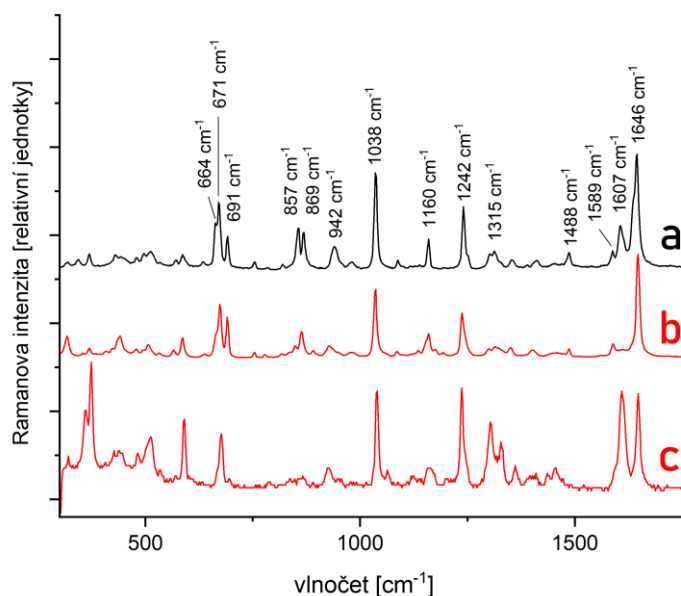


Obr. 3.4.1 Vyschlá kapka bentazonu o koncentraci 2,08 mM na substrátu SpectRIM™ (vlevo), detail krystalu (vpravo)

Při zředění na 41,6  $\mu\text{M}$  již ovšem žádné krystaly nevznikaly a látka nebyla nikde koncentrována. Podobně jako předtím při měření thiramu, malé shluky látky byly rozprostřeny přes velkou plochu. Po dalším zředění látka na substrátu vytvořila jen jemné vrstvičky.

Ve spektru získaném z prášku bentazonu byly nejvýraznější pásy na pozicích  $672\text{ cm}^{-1}$ ,  $1038\text{ cm}^{-1}$  a  $1646\text{ cm}^{-1}$  [Dias, 2019], několik dalších středně silných a slabších pásů bylo zřetelně vidět také. Klíčovou roli při identifikaci bentazonu ve vyschlých kapkách zředěných roztoků však hrály hlavně pásy na pozicích  $672\text{ cm}^{-1}$  a  $1646\text{ cm}^{-1}$ . Po vyschnutí základního roztoku nebylo z tenké vrstvičky, která na substrátu vznikla, možné změřit kvalitní spektrum, ovšem z malých i velkých krystalů byla změřena spektra, která velice dobře odpovídala spektru práškové formy bentazonu.

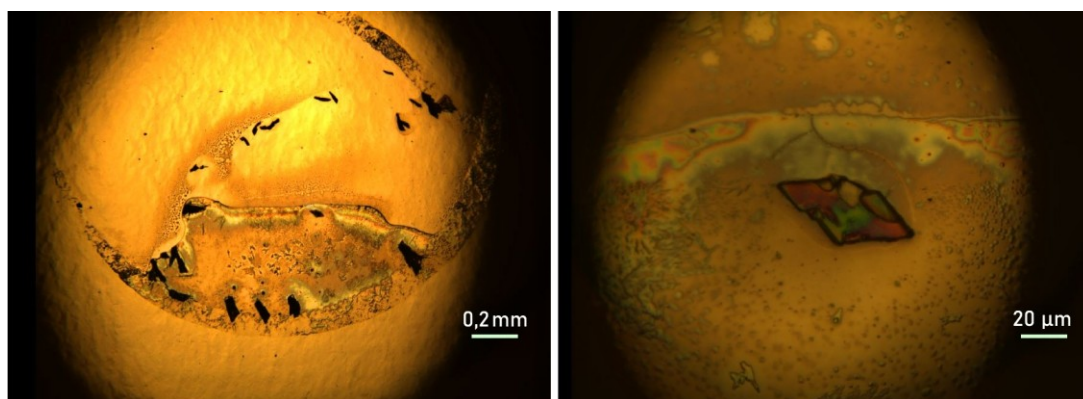
Z několika shluků vzniklých na substrátu po vyschnutí kapky s koncentrací 41,60 mM se podařilo získat rozpoznatelné spektrum bentazonu, které ovšem obsahovalo i několik výrazných pásů, které bentazonu neodpovídaly. Další ředění jen zhoršilo podmínky pro nalezení vhodného místa na sběr spektra, látka nebyla nikde koncentrována a z jemných vrstviček usazeniny nebylo možné získat ani jedno kvalitní spektrum. Výsledná spektra jsou vidět na obrázku 3.4.2.



Obr. 3.4.2 Porovnání spekter bentazonu z vyschlých kapek na substrátu SpectRIM<sup>TM</sup>: **a)** prášek, výchozí vodní roztoky o koncentraci **b)** 2,08 mM, **c)** 41,60 mM

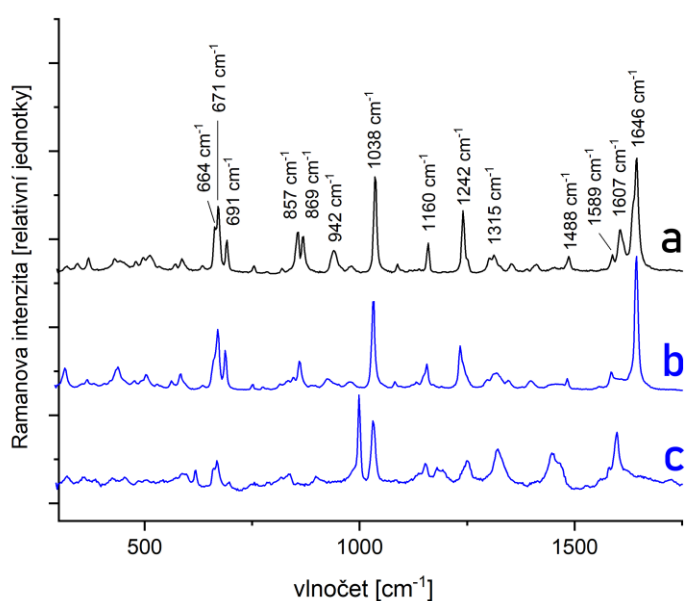
### 3.4.2 Bentazon na substrátu $\mu$ -RIM<sup>TM</sup>

Základní roztok vysychal částečně v podobě kávového kroužku. Na obrázku 3.4.3 jsou vidět části okraje vysychající kapky, kde se látka nejvíce koncentrovala. V této oblasti vzniklo i několik velkých krystalů. Vyschlá kapka ovšem zabírala téměř dvojnásobnou plochu oproti kapce na minulém substrátu. Rozdíl v nich se tedy projevil i zde. Po zředění na 41,6  $\mu$ M se látka rozprostřela přes velkou plochu, a na ní vznikly velice tenké kruhové útvary.



Obr. 3.4.3 Vyschlá kapka bentazonu o koncentraci 2,08 mM na substrátu  $\mu$ -RIM<sup>TM</sup> (vlevo), detail krystalu (vpravo)

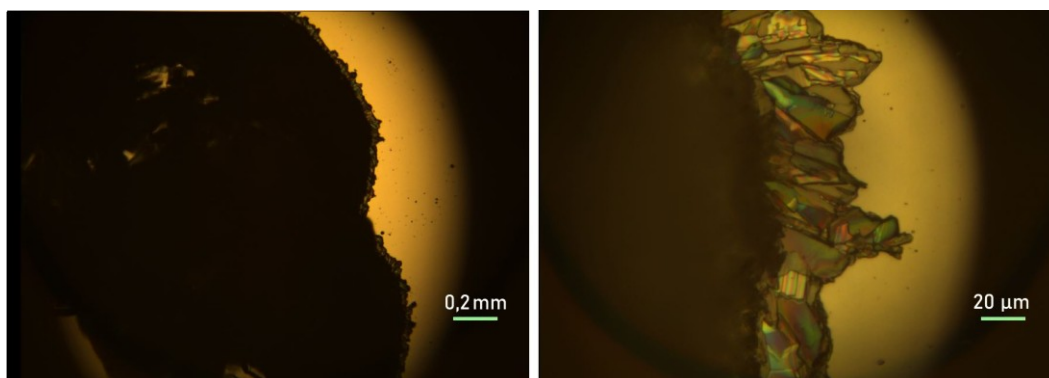
Podobně jako na prvním substrátu, velké krystaly vzniklé po vyschnutí kapky základního roztoku (2,08 mM) byly dobrým místem na sběr kvalitního spektra. Po zředění na 41,6  $\mu\text{M}$  nebylo možné najít místo pro sběr kvalitního spektra. Jedno jediné spektrum ukazuje podobnost s referenčním spektrem, ovšem vzhledem k přítomnosti pásů, které spektru bentazonu neodpovídají, je jeho identifikace v tomto případě problematická, toto spektrum a další naměřené na tomto substrátu jsou vidět na obrázku 3.4.4.



Obr. 3.4.4 Porovnání spekter bentazonu z vyschlých kapek na substrátu  $\mu\text{-RIM}^{\text{TM}}$ : **a)** prášek, výchozí vodní roztoky o koncentraci **b)** 2,08 mM, **c)** 41,60 mM

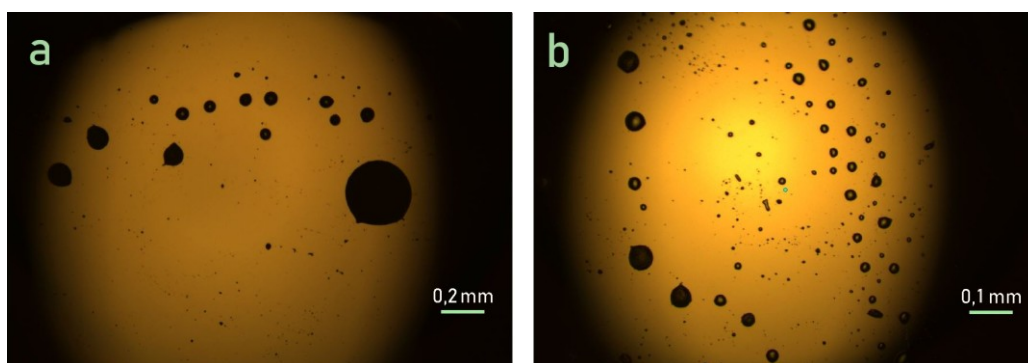
### 3.4.3 Bentazon na nekomerčním substrátu

Základní roztok bentazonu v etanolu (2,8 M) po vyschnutí vytvořil velký shluk látky, na jejímž okraji se vytvořila krystalová struktura. Některé krystaly dosahovaly délky až 40  $\mu\text{m}$ , jak je vidět na obrázku 3.4.5.



Obr. 3.4.5 Vyschlá kapka bentazonu o koncentraci 2,8 M na nekomerčním substrátu (vlevo), detail krystalu (vpravo)

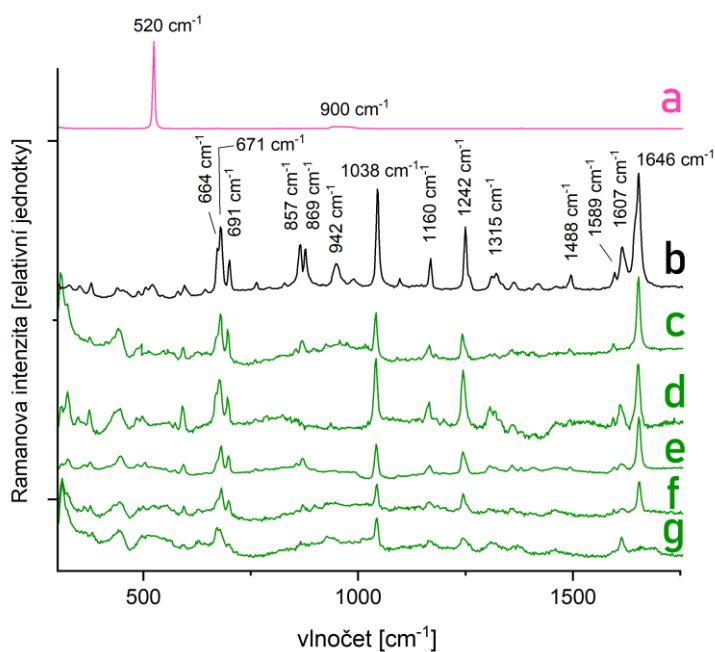
Při zředění na 56,6 mM se struktura vyschlé kapky změnila. Látka na substrátu vytvořila shluky v podobě kapek. Tyto téměř dokonale kulaté kapky měly průměry od několika mikrometrů až po 240  $\mu\text{m}$ . Tento jev pokračoval až do koncentrace 28,3 mM, kapky však byly stále četnější a menší, což je vidět na obrázku 3.4.6. Při nižších koncentracích, začala vyschlá kapka připomínat obrazec soustředných kružnic, který byl vidět již při měření thiramu.



Obr. 3.4.6 Vyschlé kapky bentazonu o koncentraci 56,6 mM (a) a 28,3 mM (b) na nekomerčním substrátu

Z velkých krystalů i ze shluku látky, který vznikl po vyschnutí základního roztoku (2,8 M), bylo možné měřit kvalitní rozpoznatelné spektrum. Pozadí nekomerčního substrátu tentokrát nepřekrývalo nejvýraznější pás spektra, jako tomu bylo u thiramu.

Kapky vzniklé při vysychání dále ředěných roztoků byly velmi dobrým místem na měření Ramanova spektra až do koncentrace 5,66 mM, kdy už byly kapky natolik malé, že hledání místa pro akumulaci kvalitního spektra začalo být obtížné. I tak bylo ještě při koncentraci 2,79 mM možné změřit spektrum odpovídající referenci. Spektra získaná na tomto substrátu jsou vidět na obrázku 3.4.7, nežádoucí signál substrátu byl odstraněn pomocí programu OriginPro.



Obr. 3.4.7 Porovnání spekter bentazonu z vyschlých kapek na nekomerčním substrátu: **a)** signál substrátu, **b)** prášek, výchozí etanolové roztoky o koncentraci **c)** 2,83 M, **d)** 56,60 mM, **e)** 28,30 mM, **f)** 5,66 mM, **g)** 2,79 mM

### 3.5 Přehled výsledků a porovnání s metodou SERS

V tabulce 3.5.1 je předložen stručný přehled studovaných látek a koncentrací, které bylo možné detekovat ve vodných roztocích. Substrát SpectRIM™, i když bohužel již nevyroběn, byl pro detekci těchto látek ve všech případech buď stejně dobrou, či lepší volbou než druhý (v současnosti dostupný) komerční substrát  $\mu$ -RIM™. Z této tabulky můžeme určit detekční limity pro výchozí vodní roztoky v případě použité metody DCDR následovně: melamin 6,34  $\mu$ M, picloram 41,40  $\mu$ M, thiram 2,50  $\mu$ M a bentazon 41,60  $\mu$ M.

Tabulka 3.5.1 Přehled detekovaných koncentrací a detekčních limitů pro vybrané kontaminanty z výchozích vodných roztoků při použití metody DCDR na komerčních substrátech

látko	koncentrace	SpectRIM™	$\mu$ -RIM™
Melamin	15,86 mM	ANO	ANO
Melamin	1,59 mM	ANO	ANO
Melamin	0,16 mM	ANO	ANO
Melamin	31,70 $\mu$ M	ANO	NE
Melamin	6,34 $\mu$ M	ANO	NE
Picloram	2,07 mM	ANO	ANO
Picloram	41,40 $\mu$ M	ANO	ANO
Thiram	0,25 mM	ANO	ANO
Thiram	0,12 mM	ANO	ANO
Thiram	2,50 $\mu$ M	ANO	ANO
Bentazon	2,08 mM	ANO	ANO
Bentazon	41,60 $\mu$ M	ANO	NE

V tabulce 3.5.2 je podobně znázorněno, při jakých koncentracích bylo možné detekovat studované kontaminanty v roztocích etanolu. Vzhledem k chování melaminu a picloramu bylo možné studovat na tomto substrátu pouze thiram a bentazon. Při žádném měření však nebylo dosaženo detekce kontaminantu při koncentraci nižší, než na substrátech komerčních.

Tabulka 3.5.2 Přehled detekovaných koncentrací a detekčních limitů pro vybrané kontaminanty z výchozích etanolových roztoků při použití metody DCDR na nekomerčním substrátu

látka	koncentrace	nekomerční substrát
Melamin	2,38 mM	NE
Picloram	43,49 mM	NE
Thiram	6,24 mM	ANO
Thiram	0,13 mM	ANO
Thiram	62,40 $\mu$ M	NE
Bentazon	2,83 M	ANO
Bentazon	56,60 mM	ANO
Bentazon	28,30 mM	ANO
Bentazon	5,66 mM	ANO
Bentazon	2,79 mM	ANO

Metoda SERS byla v detekování melaminu používána již dříve, přehledová kapitola v knížce Surface-Enhanced Raman Spectroscopy [Procházka, 2016] se zmiňuje o několika publikacích v rozmezí let 2008 –2015. Detekce nízkých koncentrací melaminu byla velmi úspěšná, ať už na substrátech se zlatými, či stříbrnými nanočásticemi nebo na komerčním substrátu Klarite<sup>®</sup>. Z novějších publikací je možné zmínit práci Zhang a kol. [Zhang et al., 2019], kteří vyvinuli platformu na bázi hydrofobního filtračního papírku s nanočásticemi a úspěšně ji použili k detekci melaminu v mléku. Melamin je možné detekovat při koncentracích  $10^{-7}$ – $10^{-8}$  M [Zheng, He, 2014], což jsou o jeden až dva řády menší koncentrace než ty, při kterých bylo možné detekovat melamin pomocí metody DCDR na substrátu SpectRIM<sup>TM</sup>. Lin a spol. určili limitní detekovatelnou koncentraci melaminu v kuřecím masu a jiných potravinářských produktech při použití metody SERS a komerčního substrátu Klarite<sup>®</sup> na 50 – 100  $\mu$ g/g [Lin et al., 2008].

V laboratořích Oddělení fyziky biomolekul MFF UK detekoval picloram pomocí metody SERS ve své disertační práci V. Peksa [Peksa, 2017] při limitní koncentraci 5  $\mu$ M (o řád nižší koncentrace, než při měření s využitím DCDR).

Spektra byla zatížena fluorescenčním pozadím, podobně jako při studiu látky v této práci.

Knih Surface-Enhanced Raman Spectroscopy [Procházka, 2016] uvádí informace k detekci thiramu. Tang a spol. ve své práci detekovali thiram nanášený na slupku jablek pomocí přenosného Ramanova spektrometru. SERS spektra thiramu byli schopni získat při koncentracích  $10^{-7}$  M [Tang et al., 2015]. Tento detekční limit metody SERS je o řád nižší, než limit pro DCDR metodu naměřený na komerčních substrátech v této práci.

Bentazon zatím nebyl pomocí metody SERS studován, žádná data o detekčních limitech nejsou dostupná. DCDR je tedy první Ramanovskou metodou, která byla použita pro zkoumání detekčních limitů bentazonu.



## Závěr

V této práci byla studována spektra čtyř vybraných kontaminantů – melaminu, picloramu, thiramu a bentazonu – metodou DCDR. Tato měření byla provedena na třech různých substrátech, a to dvou komerčních – SpectRIM<sup>TM</sup> a  $\mu$ -RIM<sup>TM</sup> a jednom nekomerčním, který byl připraven na Katedře makromolekulární fyziky MFF UK.

Díky vlastnostem, které umožnily dobrou koncentraci látky na jeho povrchu, byl substrát SpectRIM<sup>TM</sup> pro získání spekter z vyschlých kapek vodných roztoků nejvhodnější. Druhý komerční substrát vykazoval vhodné chování, co se týče vysychání kapky naneseného roztoku, avšak ne v takové míře jako substrát první. To následně neumožnilo v každém případě detekci výrazně nižších koncentrací.

Detekce studovaných látek na nekomerčním substrátu, kde se pracovalo s etanolovými roztoky, byla obtížnější. Nebylo zde možné dosáhnout detekce podobně nízkých koncentrací jako na substrátech komerčních. Důvodem byl jednak nežádoucí signál substrátu, který byl často silnější než žádoucí signál kontaminantu a také fakt, že substrát jednoduše nepodporoval děje vedoucí ke zkoncentrování látky v jednom místě či oblasti.

Limitní koncentrace pro detekci melaminu byla určena na 6,34  $\mu$ M na substrátu SpectRIM<sup>TM</sup>, na substrátu  $\mu$ -RIM<sup>TM</sup> byla rovna 0,16 mM. Na nekomerčním substrátu nebylo možné melamin detekovat.

Limitní koncentrace pro detekci picloramu byla určena na 41,40  $\mu$ M pro oba komerční substráty. Na nekomerčním substrátu nebylo kvůli vzlínavé povaze roztoku možné tuto látku studovat.

Thiram byl identifikován na obou komerčních substrátech při minimální koncentraci 2,50  $\mu$ M a na substrátu nekomerčním při koncentraci 0,13 mM.

Bentazon byl detekován na substrátu SpectRIM<sup>TM</sup> při minimální koncentraci 41,60  $\mu$ M. Na substrátu  $\mu$ -RIM<sup>TM</sup> byla minimální detekovatelná koncentrace látky rovna 2,08 mM. Pro nekomerční substrát byla limitní koncentrace 2,79 mM.

Získané detekční limity metody DCDR byly porovnány s dostupnými informacemi o limitech metody SERS. Výsledné hodnoty se lišily o jeden až dva řády ve prospěch metody SERS. Měření pomocí metody DCDR na komerčních substrátech ovšem nabízí zajímavou volbu při zkoumání vodných roztoků, které

nejdou metodou SERS studované, a také pro látky, jejichž SERS spektrum nelze jednoduše získat.

I přes to, že metoda DCDR nedosahuje pro každou studovanou látku detekčních limitů SERS, blíží se jim. Další vývoj této metody, zejména pak vývoj nových superhydrofobních substrátů s lepšími vlastnostmi, může přinést velký pokrok a posun v detekčních limitech. DCDR pak může být ideálním nástrojem pro detekci velmi nízkých koncentrací kontaminantů například v podzemních vodách.

Co se týče použitého nekomerčního substrátu, jeho potenciál dlí v tom, že mnoho látek má lepší rozpustnost v etanolu nežli ve vodě, což velmi usnadňuje měření. Je ale nutné substrát dále optimalizovat, aby umožňoval studovaným látkám lépe se koncentrovat. Důležitým faktorem je spektrální pozadí substrátu, které je potřeba eliminovat, protože velmi omezuje potenciál metody DCDR.

## Seznam použité literatury

- BioTools. (2015).  $\mu$ -RIM<sup>TM</sup> SLIDE *User manual*. Jupiter, Florida 33458 USA.
- BioTools  $\mu$ -RIM<sup>TM</sup> SLIDE [online]. Dostupné z: <<https://www.biotoools.us/urim.html>> (cit. květen 2020)
- California EPA (Office of Environmental Health Hazard Assessment). (1999). *Public Health Goal for Bentazon In Drinking Water* [online]. Dostupné z: <[https://oehha.ca.gov/media/downloads/water/chemicals/phg/bentazf\\_0.pdf](https://oehha.ca.gov/media/downloads/water/chemicals/phg/bentazf_0.pdf)> (cit. březen 2020)
- Cipriani P., Ben-Amotz D. (2005) 'Characterization of select members of the taxane family using Raman spectroscopy', *J. Raman Spectrosc.*, **36**, 1052–1058.
- ČHMÚ: Český Hydrometeorologický ústav. Pasportizace pesticidů [online]. Dostupný z: <<http://hydro.chmi.cz/pasporty/>> (cit. květen 2020)
- Dias L. A. F., Jussiani E. I., Appoloni C. R. (2019) 'Reference Raman Spectral Database of Commercial Pesticides', *J. Appl. Spectrosc.*, **86**, 171–172 [online]. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1007/s10812-019-00798-1>> (cit. květen 2020)
- Dingari N. C., Horowitz G. L., Kang J. W., Dasari R. R., Barman I. (2012) 'Raman Spectroscopy Provides a Powerful Diagnostic Tool for Accurate Determination of Albumin Glycation', *PLoS ONE* **7**(2) [online]. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032406>> (cit. květen 2020)
- European chemicals agency [online]. Dostupný z: <<https://echa.europa.eu/cs/registration-dossier/-/registered-dossier/15978/4/10/>> (cit. březen 2020)
- Exttoxnet: Extension Toxicology Network (1993a) *Pesticide Information Profile: Picloram* [online]. Dostupný z: <<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/exttoxnet/metiram-propoxur/picloram-ext.html>> (cit. březen 2020)
- Exttoxnet: Extension Toxicology Network (1993b) *Pesticide Information Profile: Thiram* [online]. Dostupný z: <<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/exttoxnet/pyrethrins-ziram/thiram-ext.html>> (cit. březen 2020)
- Exttoxnet: Extension Toxicology Network (1993c) *Pesticide Information Profile: Bentazon* [online]. Dostupný z: <<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/exttoxnet/24d-captan/bentazon-ext.html>> (cit. březen 2020)
- Filik J., Stone N. (2008) 'Analysis of human tear fluid by Raman spectroscopy', *Anal. Chim. Acta*, **616**, 177–184.
- Hayes W., Laws E. (1991) *Handbook Of Pesticide Toxicology*. Vol. 3. San Diego, Calif.: Academic Press.
- Howard P., Michalenko E. (1991) *Handbook Of Environmental Fate And Exposure Data For Organic Chemicals*. Chelsea, Mich.: Lewis.

- Hu H., Larson R.G. (2002) 'Evaporation of a sessile droplet on a substrate', *J. Phys. Chem. B*, **106**, 1334–1344.
- Klener J., Hofbauerová K., Bartoš A., Říčný J., Řípová D., Kopecký V. (2014) 'Instability of cerebrospinal fluid after delayed storage and repeated freezing: a holistic study by drop coating deposition Raman spectroscopy', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, **52**(5), 657–664.
- Kočišová E., Procházka M. (2018) 'Drop coating deposition Raman spectroscopy of dipicolinic acid', *J. Raman Spectrosc.*, **49**, 2050–2052.
- Kočišová E., Procházka M. (2011) 'Drop-coating deposition Raman spectroscopy of liposomes', *J. Raman Spectrosc.*, **42**, 1606–1610.
- Kočišová E., Procházka M. (2015) 'Drop-coating deposition Raman spectroscopy of porphyrins', *J. Raman Spectrosc.*, **46**, 280–282.
- Kočišová E., Sayedová S., Procházka M. (2020) 'Drop coating deposition Raman scattering of selected small molecules of biological importance', *J. Raman Spectrosc.*, **51**, 871–874.
- Kopecký V., Baumruk V. (2006) 'Structure of the ring in drop coating deposited proteins and its implication for Raman spectroscopy of biomolecules', *Vibrational Spectroscopy*, **42**(2), 184–187.
- Lewis I. R., Edwards H. G. M. (2001) *Handbook of Raman spectroscopy*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Lin M., He L., Awika J., Yang L., Ledoux D.R., Li H., Mustapha A. (2008) 'Detection of melamine in gluten, chicken feed, and processed foods using surface enhanced Raman spectroscopy and HPLC', *J. Food Sci.* **73**, 129.
- McDonald S. (2008) 'Nearly 53,000 Chinese children sick from milk', *NBC News*, 22. září [online]. Dostupné z: <<http://www.nbcnews.com/id/26827110/>> (cit. květen 2020)
- O'Malley M. (2010) 'The Regulatory Evaluation of the Skin Effects of Pesticides' v Krieger R. (ed.) *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. Third edition. University of Chicago: Elsevier, 701–787.
- Ortiz C., Zhang D., Xie Y., Ribbe A. E., Ben-Amotz D. (2006) 'Validation of the drop coating deposition Raman method for protein analysis', *Anal. Biochem.*, **353**, 157–166.
- Pazderka T., Kopecký V. (2017) 'Drop coating deposition Raman spectroscopy of proteinogenic amino acids compared with their solution and crystalline state', *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **185**, 207–216.
- Peksa V. (2017) 'Designing and testing of new metal nanosubstrates for biomolecular sensors based on surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy', *Disertační práce*, Univerzita Karlova, Praha.
- Procházka M. (2016) *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. Switzerland: Springer International Publishing.

- Prosser V. a kol. (1989) *Experimentální metody biofyziky*. Praha: Academia.
- Raman C.V., (1928) 'A new radiation', *Indian J. Phys.*, **74**(4), 387–398.
- Sánchez-Cortés S., Vasina M., Francioso O., García-Ramos J.V. (1998) 'Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy of dithiocarbamate fungicides', *Vibrational Spectroscopy*, **17**(2), 133-144.
- Sawodny W., Niedenzu K., Dawson J. (1966) 'Vibrational Spectrum and Assignment of Normal Vibrations of Melamine', *The Journal of Chemical Physics*, **45**, 3155.
- Schrader B., Bougeard D. (1995) *Infrared and Raman spectroscopy: methods and applications*. New York: Wiley.
- Skinner C. G., Thomas J. D., Osterloh J.D. (2010) 'Melamine toxicity', *J.Med. Toxicol.*, **6**(1), 50–55.
- Tang X., Dong R., Yang L., Liu J. (2015) 'Fabrication of Au nanorod-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> microspheres as SERS substrate for pesticide analysis by near-infrared excitation', *J. Raman Spectrosc.*, **46**, 470.
- Tienta Sciences. (2004). SpectRIM™ SLIDE *Product Information*. Indianapolis, Indiana 46202 USA.
- Tomlin C.D.S. (2003) *The e-Pesticide Manual*. 13th ed. UK, Surrey: British Crop Protection Council.
- World Health Organization. *Food safety* [online]. Dostupný z: [https://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/chemical-risks/melamine/en/](https://www.who.int/foodsafety/areas_work/chemical-risks/melamine/en/) (cit. květen 2020)
- Xie Y., Zhang D., Jarori G. K., Davisson V. J., Ben-Amotz D. (2004) 'The Raman detection of peptide tyrosine phosphorylation', *Anal. Biochem.*, **332**, 116–121.
- Yalkowsky S., He Y., Jain P. (2003) *Handbook Of Aqueous Solubility Data*. Second Edition. 61, 197, 680. USA: CRC Press.
- Zhang C., You T., Yang N., Gao Y., Jiang L., Yin P. (2019) 'Hydrophobic paper-based SERS platform for direct-droplet quantitative determination of melamine', *Food Chemistry*, **287**, 363–368.
- Zhang D., Ortiz C., Xie Y., Davisson V. J., Ben-Amotz D. (2005) 'Detection of the site of phosphorylation in a peptide using Raman spectroscopy and partial least squares discriminant analysis', *Spectrochim. Acta A*, **61**, 471–745.
- Zhang D., Xie Y., Mrozek M. F., Ortiz C., Davisson J., Ben-Amotz D. (2003) 'Raman detection of proteomic analytes', *Anal. Chem.*, **75**, 5703–5709.
- Zheng J., He L. (2014) 'Surface-enhanced Raman spectroscopy for the chemical analysis of food', *Compr. Rev. Food. Sci. Food Saf.*, **13**, 317.

## Seznam obrázků

Obr. 1.1.1 Energetický diagram pro Rayleighův a Ramanův rozptyl.....	4
Obr. 1.2.1 Příklady vibrační tříatomové lomené molekuly, a) valenční symetrická (symmetric stretch), b) valenční antisymetrická (anti-symmetric stretch), c) deformační nůžková (scissoring bend), d) deformační kývavá (rocking bend), e) deformační vějířová (wagging bend), f) deformační kroutivá (twisting bend) .....	6
Obr. 1.3.1 Různé kontaktní úhly: a) hydrofilní substrát ( $<90^\circ$ ), b) hydrofobní substrát ( $>90^\circ$ ), c) superhydrofobní substrát ( $>150^\circ$ ) .....	6
Obr. 1.3.2 Princip vysychání s efektem „kávového kroužku“, převzato z [Deegan at al., 1997] .....	7
Obr. 2.1.1 Schéma integrovaného Ramanova systému HR800 .....	11
Obr. 2.2.1 Substrát SpectRIM™ .....	12
Obr. 2.2.2 Substrát $\mu$ -RIM™ .....	13
Obr. 2.2.3 Nekomerční substrát připraven na Katedře makromolekulární fyziky MFF UK .	13
Obr. 2.3.1 Strukturální vzorec melaminu.....	14
Obr. 2.3.2 Strukturální vzorec picloramu .....	15
Obr. 2.3.3 Strukturální vzorec thirammu .....	16
Obr. 2.3.4 Strukturální vzorec bentazonu .....	17
Obr. 3.1.1 Vyschlá kapka melaminu o koncentraci 15,86 mM na substrátu SpectRIM™ (vlevo), detail krystalu (vpravo).....	20
Obr. 3.1.2 Vyschlé kapky melaminu na substrátu SpectRIM™ a) koncentrace 1,59 mM; b) koncentrace 0,16 mM; c) koncentrace 31,7 $\mu$ M; d) koncentrace 6,34 $\mu$ M .....	21
Obr. 3.1.3 Porovnání spekter z vyschlých kapek melaminu na substrátu SpectRIM™ : a) prášek, výchozí vodní roztoky o koncentraci b) 15,86 mM, c) 1,59 mM, d) 0,16 mM, e) 31,7 $\mu$ M, f) 6,34 $\mu$ M .....	22
Obr. 3.1.4 Porovnání plochy vyschlé kapky melaminu o koncentraci 0,16 mM na substrátech SpectRIM™ (a) a $\mu$ -RIM™ (b).....	23
Obr. 3.1.5 Porovnání spekter melaminu z vyschlých kapek na substrátu $\mu$ -RIM™: a) prášek, výchozí vodní roztoky o koncentraci b) 15,86 mM, c) 1,59 mM, d) 0,16 mM .....	24
Obr. 3.2.1 Shluk látky vytvořený po vyschnutí kapky picloramu o koncentraci 41,4 $\mu$ M na substrátu SpectRIM™ .....	25

Obr. 3.2.2 Porovnání spekter z vyschlých kapek picloramu na substrátu SpectRIM™: a) prášek, výchozí vodní roztoky o koncentraci b) 2,07 mM, c) 41,40 μM .....	26
Obr. 3.2.3 Porovnání vyschlé kapky picloramu na substrátu SpectRIM™ (a) a substrátu μ-RIM™ (b) při koncentraci 2,07 mM.....	27
Obr. 3.2.4 Porovnání spekter z vyschlých kapek picloramu na substrátu μ-RIM™: a) prášek, výchozí vodní roztoky o koncentraci b) 2,07 mM, c) 41,40 μM .....	27
Obr. 3.3.1 Porovnání vyschlé kapky neodstředěného roztoku thiramu (a) a odstředěného roztoku thiramu (b) na substrátu SpectRIM™ .....	28
Obr. 3.3.2 Porovnání spekter thiramu z vyschlých kapek na substrátu SpectRIM™: a) prášek, výchozí vodní roztoky o koncentraci b) 0,25 mM, c) 0,12 mM, d) 2,50 μM .....	29
Obr. 3.3.3 Porovnání vyschlé kapky neodstředěného roztoku thiramu (a) a odstředěného roztoku thiramu (b) na substrátu μ-RIM™ .....	30
Obr. 3.3.4 Porovnání spekter thiramu z vyschlých kapek na substrátu μ-RIM™: a) prášek, výchozí vodní roztoky o koncentraci b) 0,25 mM, c) 0,12 mM, d) 2,50 μM .....	31
Obr. 3.3.5 Vyschlá kapka thiramu o koncentraci 6,24 mM na nekomerčním substrátu (vlevo), detail vzniklé struktury (vpravo).....	32
Obr. 3.3.6 Porovnání spekter thiramu z vyschlých kapek na nekomerčním substrátu: a) signál substrátu, b) prášek, výchozí etanolové roztoky o koncentraci c) 6,24 mM, d) 0,13 mM .....	33
Obr. 3.4.1 Vyschlá kapka bentazonu o koncentraci 2,08 mM na substrátu SpectRIM™ (vlevo), detail krystalu (vpravo).....	34
Obr. 3.4.2 Porovnání spekter bentazonu z vyschlých kapek na substrátu SpectRIM™: a) prášek, výchozí vodní roztoky o koncentraci b) 2,08 mM, c) 41,60 mM .....	35
Obr. 3.4.3 Vyschlá kapka bentazonu o koncentraci 2,08 mM na substrátu μ-RIM™ (vlevo), detail krystalu (vpravo) .....	35
Obr. 3.4.4 Porovnání spekter bentazonu z vyschlých kapek na substrátu μ-RIM™: a) prášek, výchozí vodní roztoky o koncentraci b) 2,08 mM, c) 41,60 mM .....	36
Obr. 3.4.5 Vyschlá kapka bentazonu o koncentraci 2,8 M na nekomerčním substrátu (vlevo), detail krystalu (vpravo) .....	37
Obr. 3.4.6 Vyschlé kapky bentazonu o koncentraci 56,6 mM (a) a 28,3 mM (b) na nekomerčním substrátu .....	37

Obr. 3.4.7 Porovnání spekter bentazonu z vyschlých kapek na nekomerčním substrátu: a) signál substrátu, b) prášek, výchozí etanolové roztoky o koncentraci c) 2,83 M, d) 56,60 mM, e) 28,30 mM, f) 5,66 mM, g) 2,79 mM..... 38



## Seznam tabulek

Tabulka 3.5.1 Přehled detekovaných koncentrací a detekčních limitů pro vybrané kontaminanty z výchozích vodných roztoků při použití metody DCDR na komerčních substrátech .....	39
Tabulka 3.5.2 Přehled detekovaných koncentrací a detekčních limitů pro vybrané kontaminanty z výchozích etanolových roztoků při použití metody DCDR na nekomerčním substrátu .....	40

## Seznam použitých zkratk

- ČHMÚ – Český hydrometeorologický ústav
- DCDR (spectroscopy) – Drop coating deposition Raman spectroscopy (Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povrchů)
- EPA – United States Environmental Protection Agency (Agentura pro ochranu životního prostředí)
- Laser – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Zesilování světla stimulovanou emisí záření)
- MFF UK – Matematicko-fyzikální fakulta Univerzity Karlovy
- MZE – Ministerstvo zemědělství
- MŽP – Ministerstvo životního prostředí
- RF – Radio Frequency (Radiová frekvence)
- SERS – Surface enhanced Raman spectroscopy (Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie)
- TM – Trade Mark (Ochranná známka)
- ULWD – Ultra long working distance (Ultra dlouhá pracovní vzdálenost)
- UV – Ultraviolet (Ultrafialové záření)