

MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV FYZIKY KONDENZOVANÝCH LÁTEK

Bakalářská práce

BRNO 2017

ŠÁRKA NOVOTNÁ



MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV FYZIKY KONDENZOVANÝCH LÁTEK



Studium luminiscence v ramanských spektrech aminokyselin

Bakalářská práce

Šárka Novotná

Vedoucí práce: Mgr. Dušan Hemzal, Ph.D. Brno 2017

Bibliografický záznam

Autor:	Šárka Novotná Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav fyziky kondenzovaných látek
Název práce:	Studium luminiscence v ramanských spektrech aminokyselin
Studijní program:	Fyzika
Studijní obor:	Biofyzika
Vedoucí práce:	Mgr. Dušan Hemzal, Ph.D.
Akademický rok:	2016/2017
Počet stran:	vii + 36
Klíčová slova:	Luminiscence; Ramanská spektroskopie; Aminokyseliny

Bibliographic Entry

Author: Šárka Novotná
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Condensed Matter Physics

Title of Thesis: Study of luminescence in Raman spectra of amino acids

Degree Programme: Physics

Field of Study: Biophysics

Supervisor: Mgr. Dušan Hemzal, Ph.D.

Academic Year: 2016/2017

Number of Pages: vii + 36

Keywords: Luminescence; Raman spectroscopy; Amino acids

Abstrakt

V této bakalářské práci se věnujeme potlačení luminiscenčního pozadí v ramanských spektrech, které často ramanský signál překrývá. Z experimentálních metod potlačení luminiscence byla použita změna vlnové délky laseru, vysvěcování luminiscence včetně změny intenzity excitace a rozdíl v depolarizovanosti ramanského signálu a luminiscence. Z matematických metod potlačení luminiscence se věnujeme metodě klouzavého průměru. K měření byly použity vodné roztoky aminokyselin.

Abstract

In this thesis we study reduction of luminescent background in Raman spectra which often overwhelms Raman signal. From experimental methods change of excitation wavelength, photobleaching including change of the excitation intensity and different depolarization of Raman signal and luminescence were used. From mathematical methods we discuss the method of moving average. The measurements were carried out on aqueous solutions of amino acids.



MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Akademický rok: 2016/2017

Ústav: Ústav fyziky kondenzovaných látek

Studentka: Šárka Novotná

Program: Fyzika

Obor: Biofyzika

Ředitel Ústavu fyziky kondenzovaných látek PŘF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s názvem:

Název práce: Studium luminiscence v ramanských spektrech aminokyselin

Název práce anglicky: Study of luminescence in Raman spectra of amino acids

Oficiální zadání:

Ramanská spektroskopie aminokyselin představuje základní stavební kámen vibrační charakterizace peptidů. Ramanská spektra aminokyselin jsou však často zatížena luminiscencí, která jejich další využití při studiu vibrací peptidů silně komplikuje až znemožňuje.

Cílem teoretické části práce je seznámit se s technikami vibrační spektroskopie a problematikou luminiscence. Cílem experimentální části práce je pořídit ramanská spektra biogenních aminokyselin a využít postupy vedoucí k odstranění luminiscence z těchto spekter, prezentované v teoretické části práce.

Práce bude napsána v českém nebo anglickém jazyce.

Literatura:

GARDINGER, D.J. a P.R. GRAVES. *Practical Raman Spectroscopy*. 1989. vyd. : Springer, 1989. ISBN 0387502548.

Jazyk závěrečné práce: čeština

Vedoucí práce: Mgr. Dušan Hemzal, Ph.D.

Datum zadání práce: 1. 12. 2016

V Brně dne: 5. 12. 2016

Souhlasím se zadáním (podpis, datum): 14. 12. 2016



Šárka Novotná
studentka



Mgr. Dušan Hemzal, Ph.D.
vedoucí práce



doc. Mgr. Dominik Munzar, Dr.
ředitel Ústavu fyziky
kondenzovaných látek

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Dušanu Hemzalovi, PhD. za jeho čas, trpělivost, pomoc a podporu při vedení bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat Bc. Jánmu Tunglimu za jeho ochotu a pomoc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 18. května 2017

.....
Šárka Novotná

Ramanská spektra aminokyselin

Úvod	1
1. Teoretická část	2
1.1 Aminokyseliny	2
1.2 Ramanská spektroskopie	5
1.3 Luminiscence	8
1.3.1 Absorpční spektrum	10
1.4 Metody potlačování luminiscence	12
1.4.1 Experimentální metody	12
1.4.2 Matematické metody	13
2. Praktická část	15
2.1 Voda	16
2.2 Koncentrační studie	18
2.3 Luminiscence a její potlačení	20
2.3.1 Změna vlnové délky	20
2.3.2 Vysvěcování luminiscence	21
2.3.3 Změna intenzity excitace	22
2.3.4 Rozdíl v depolarizovanosti	23
2.3.5 Klouzavý průměr	24
2.4 Stárnutí vzorků	25
2.5 Spektra aminokyselin	27
2.6 Laboratorní deník	31
3. Závěr	33
Seznam použité literatury	34

Úvod

Ramanská spektroskopie je nedestruktivní analytickou metodou, která využívá rozdílných vibračních stavů molekul k získání informací o jejich struktuře. Protože každá molekula má charakteristické vibrační otisky, není problém pomocí ramanské spektroskopie od sebe rozeznat i velmi podobné molekuly.

Při měření se ovšem potýkáme s několika komplikacemi. Kromě slabé intenzity ramanského rozptylu a možného zahřívání studovaného vzorku je častým problémem luminiscence, jejíž intenzita může být řádově vyšší než samotný ramanský signál. Abychom tedy mohli ze spekter vyčíst informace o struktuře molekul, musíme nejprve luminiscenci potlačit.

Metody potlačení luminiscence dělíme na experimentální a matematické, přičemž experimentální metody využívají k potlačení luminiscence jejích fyzikálních vlastností a fyzikálních vlastností ramanského rozptylu, kdežto matematické metody se snaží luminiscenci potlačit pomocí počítačového algoritmu. Protože se od sebe jednotlivé molekuly liší množstvím luminiscence, časovým vývojem jejich ramanského spektra a dalšími vlastnostmi, používáme různé metody odstranění jejich luminiscenčního pozadí. Pokud je to možné, upřednostňujeme experimentální metody před matematickými.

V této bakalářské práci jsou v teoretické části popsány vybrané vlastnosti aminokyselin, fyzikální vlastnosti luminiscence a ramansky rozptýleného světla a principy některých experimentálních a matematických metod potlačení luminiscence. V praktické části jsou potom zobrazeny výsledky použití těchto metod. K měření bylo použito 20 biogenních aminokyselin, které jsou základními stavebními podjednotkami proteinů. Jejich měření vždy probíhalo ve vodném roztoku ve skleněné kapiláře.

1. Teoretická část

1.1 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou základními stavebními jednotkami proteinů. Skládají se z aminoskupiny NH_2 a karboxylové skupiny COOH , které jsou navázané na společný atom uhlíku, který se označuje C_α . Na tento uhlík se dále váže atom vodíku a postranní řetězec, který je charakteristický pro danou aminokyselinu. Podle uhlíku C_α jsou tyto aminokyseliny označovány jako α -aminokyseliny. Existují také β -, γ -, δ -aminokyseliny, které mají mezi těmito charakteristickými skupinami více uhlíků. (β -aminokyseliny dva, γ -aminokyseliny tři, atd.). Z tohoto hlediska můžeme kyselinu asparagovou označit jako α -aminokyselinu i β -aminokyselinu a kyselinu glutamovou jako α - nebo γ -aminokyselinu. Každá aminokyselina kromě glycinu se vyskytuje ve dvou izomerech, kde jeden izomer je zrcadlovým obrazem druhého. Označují se jako D- a L-enantiomery. D-aminokyseliny mají postranní řetězec ve Fisherově projekci orientován vpravo, zatímco L-aminokyseliny naopak vlevo. Navzájem se od sebe neliší fyzikálními ani chemickými vlastnostmi, odlišují se ale chemickými reakcemi s jinými enantiomery. Mají schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla, každý z enantiomerů ji ovšem stáčí v opačném směru. V přírodě se D-aminokyseliny vyskytují jen vzácně.

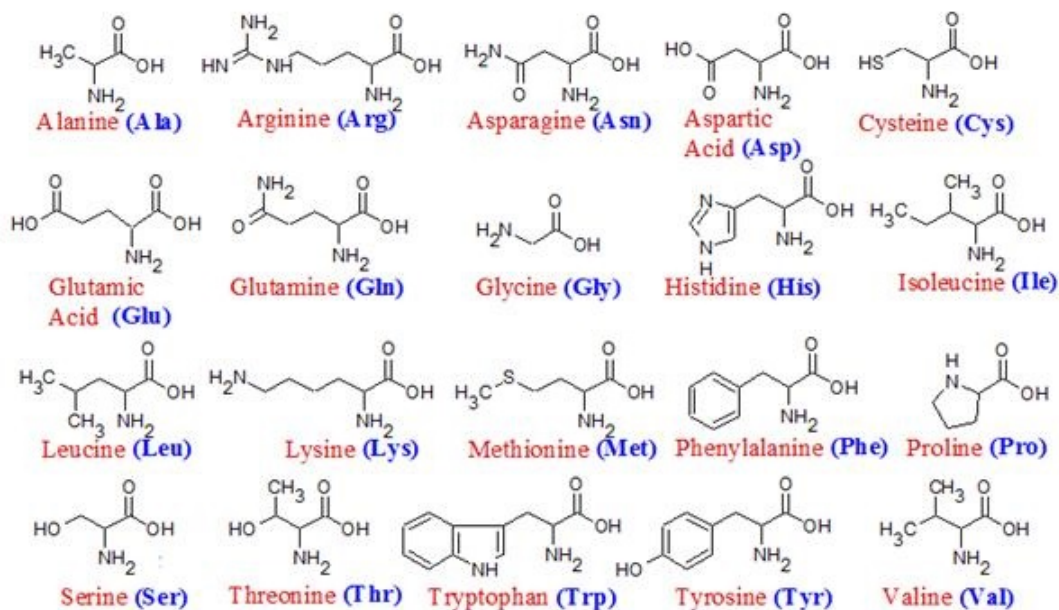
Protože aminokyseliny obsahují kladně nabitou NH_3^+ skupinu a zároveň záporně nabitou COO^- skupinu, tvoří tzv. *zwitterion*. Zwitterion je molekula obsahující kladný i záporný náboj tak, že je celkově neutrální. Díky tomu má každá aminokyselina charakteristickou hodnotu pH, při které je celkově neutrální. Tato hodnota pH se nazývá izoelektrický bod a značí se pI. Při této hodnotě pH se molekula v elektrickém poli nepohybuje. Pokud se daná aminokyselina nachází v prostředí, které je kyselější, získává kladný náboj a naopak v prostředí s vyšším pH získává náboj záporný. Hodnoty pI jednotlivých aminokyselin jsou uvedeny v praktické části v tabulce 2. [1]

Existuje 20 biogenních L- α -aminokyselin, jejichž strukturní vzorce jsou znázorněny na obrázku 1.1. Každou aminokyselinu označujeme trojpísmennou nebo jednopísmennou zkratkou, jejichž seznam je uveden v tabulce 1. Podle postranního řetězce aminokyseliny dělíme do několika skupin:

Aminokyseliny s alifatickým postranním řetězcem. Postranní řetězec těchto aminokyselin se skládá pouze z atomů uhlíku a vodíku a zároveň není cyklický. Kvůli tomuto atomovému složení je nepolární a tím pádem neinteraguje dobře s vodou – je hydrofobní. Zároveň je chemicky neaktivní. Do této skupiny patří *glycin*, *alanin*, *valin*, *leucin* a *izoleucin*.

Aminokyseliny s hydroxylovou skupinou. Kvůli přítomnosti OH skupiny patří *serin*

a **threonin** mezi polární aminokyseliny. Jednou z jejich významných vlastností je schopnost reagovat s fosfátovou skupinou, přičemž vzniká fosfoserin nebo fosfthreonin. Další aminokyselinou s hydroxylovou skupinou je **tyrosin**, který se od předchozích dvou aminokyselin liší svými vlastnostmi (např. je hydrofobní).



Obrázek 1.1: Strukturní vzorce aminokyselin. Převzato z [2].

Aminokyseliny obsahující atom síry. Atomem síry se vyznačují aminokyseliny **cystein** a **methionin**. U methioninu tento atom reaguje především s komplexy těžkých kovů, obzvláště pokud obsahují rtuť nebo platinu. Také může být oxidován na sulfoxid nebo na sulfon. Na rozdíl od methioninu cystein obsahuje thiolovou skupinu SH, díky čemuž je velmi reaktivní. Jednotlivé molekuly cysteinu tvoří mezi sebou disulfidické můstky.

Kyselé aminokyseliny. Do této skupiny se řadí **kyselina asparagová** a **kyselina glutamová**, protože obsahují v postranním řetězci karboxylovou skupinu COOH. Její vodík je ve fyziologickém prostředí disociován, takže skupina COO^- nese záporný náboj. Probíhá u nich reakce typické pro organické kyseliny, např. esterifikace s alkoholy nebo neutralizace.

Amidy kyseliny asparagové a kyseliny glutamové – asparagin a glutamin. Vyznačují se nereaktivní polární skupinou CONH_2 , která je labilní v zásaditém prostředí a při vysokých teplotách. Zároveň je schopna tvořit vodíkové můstky.

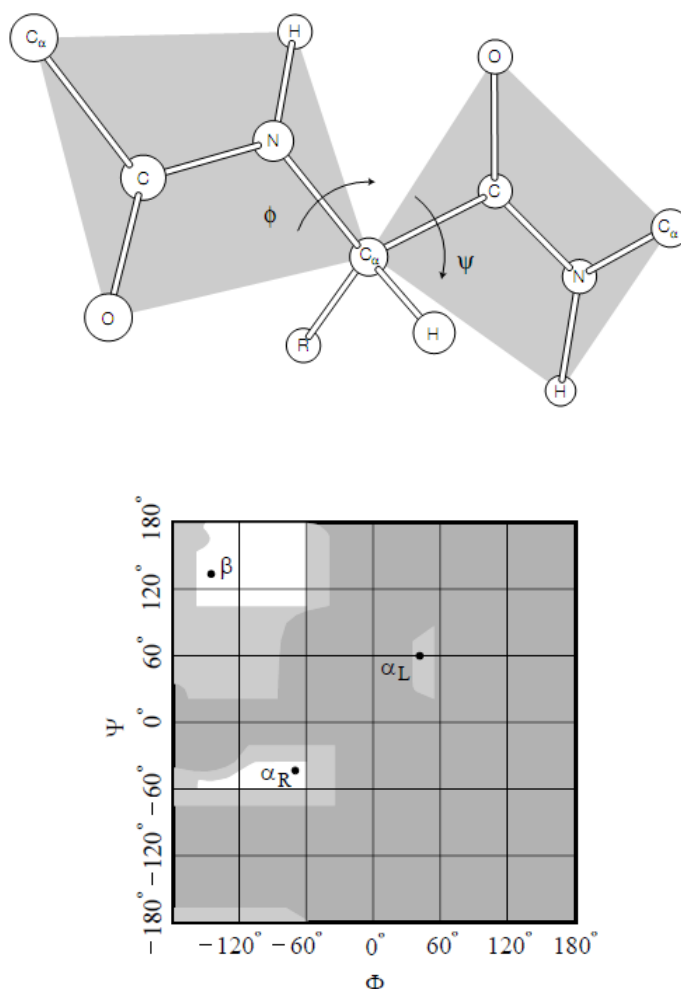
Bazické aminokyseliny. Mezi bazické aminokyseliny se řadí **arginin**, **lysin** a v některých případech i **histidin**. Nejbazičtější z nich je arginin, který obsahuje ve svém postranním řetězci guaninovou skupinu. Po argininu následuje lysin, který se vyznačuje bazickou NH_2 skupinou, zatímco histidin nabývá kladný náboj pouze v kyselejším prostředí. Histidin je charakteristický svou imidazolovou skupinou. Arginin má kladný náboj rozložen po celé guanidinové skupině.

Aminokyseliny s aromatickými kruhy. Jejich vlastností je schopnost absorbovat světlo v UV oblasti – mezi 250 a 350 nm. Patří mezi ně **tryptofan**, **tyrosin** a **fenylala-**

nin.

Iminokyselina. Tak bývá označován *prolin*, jehož postranní řetězec je cyklicky navázán na NH_2 skupinu, která kvůli této vazbě ztratila jeden vodík. [3]

Aminokyseliny se k sobě vážou peptidovou vazbou, která vzniká mezi aminoskupinou jedné aminokyseliny a karboxylovou skupinou druhé aminokyseliny za vyloučení jedné molekuly vody. Tímto způsobem vzniká peptid. Peptidová vazba (CONH) je planární a peptidová páteř se skládá z atomu dusíků z aminoskupin, α -uhlíků a uhlíků karboxylových skupin jednotlivých aminokyselin. Proteinová páteř se může protáčet kolem vazeb $\text{N}-\text{C}_\alpha$ a $\text{C}_\alpha-\text{C}$, což můžeme popsat pomocí dihedrálních (torzních) úhlů Φ a Ψ mezi rovinami $\text{C}, \text{N}, \text{C}_\alpha$ a $\text{N}, \text{C}_\alpha, \text{C}$ (úhel Φ) a rovinami $\text{N}, \text{C}_\alpha, \text{C}$ a $\text{C}_\alpha, \text{C}, \text{N}$ (úhel Ψ). Hodnoty, kterých tyto dihedrální úhly v biomolekulách nabývají, jsou znázorněny v Ramachandranově diagramu na obrázku 1.2. Podle těchto hodnot nabývá protein některé ze dvou sekundárních struktur – α -šroubovice, která může být pravotočivá i levotočivá, nebo β -skládaného listu. [4]



Obrázek 1.2: Proteinová páteř z vyznačenými úhly Φ a Ψ (nahore) a Ramachandranův diagram – závislost úhlů Φ a Ψ , které určují sekundární strukturu proteinů (dole). [4, 5]

Tabulka 1: Trojpísmenné a jednopísmenné zkratky aminokyselin.

Alanin	Ala	A	Kyselina glutamová	Glu	E
Arginin	Arg	R	Leucin	Leu	L
Asparagin	Asn	N	Lysin	Lys	K
Cystein	Cys	C	Methionin	Met	M
Fenylalanin	Phe	F	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glycin	Gly	G	Trheonin	Thr	T
Histidin	His	H	Tryptofan	Trp	W
Isoleucin	Ile	I	Tyrosin	Tyr	Y
Kyselina asparagová	Asp	D	Valin	Val	V

1.2 Ramanská spektroskopie

Když dopadá monochromatická vlna o úhlové frekvenci ω_1 na měřený vzorek, většina nepohlceného světla vzorkem projde nebo se od něj odrazí beze změny frekvence. Část záření ovšem získá nové frekvence $\omega_1 \pm \omega_2$ s diskrétními hodnotami ω_2 . Ukazuje se, že frekvence ω_2 odpovídají energiím přechodu mezi jednotlivými vibračními nebo rotačními stavy molekul ve vzorku.

Když vložíme molekulu do elektrického pole (světelné vlny), vytvoří se v lineárním přiblížení *indukovaný* elektrický dipólový moment $\vec{P}$ přímo úměrný vektoru elektrického pole $\vec{E}$

$$\vec{P} = \alpha \vec{E}, \quad (1.1)$$

kde α je polarizovatelnost molekuly. Ta se ovšem může měnit v důsledku kmitání molekuly. Hodnota polarizovatelnosti pro malé výchylky vychází z Taylorova rozvoje do prvního řádu:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q, \quad (1.2)$$

přičemž α_0 je polarizovatelnost molekuly v rovnovážné poloze a q je zobecněná výchylka atomů z rovnovážné polohy vyvolaná vibrací molekuly v čase t s amplitudou q_A a úhlovou frekvencí ω_2 ,

$$q = q_A \cos(\omega_2 t). \quad (1.3)$$

Po dosazení rovnice (1.3) do rovnice (1.2), získáme

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_A \cos(\omega_2 t). \quad (1.4)$$

Zároveň elektrická složka dopadajícího světla E kmitá s úhlovou frekvencí ω_1 a amplitudou E_A ,

$$E = E_A \cos(\omega_1 t). \quad (1.5)$$

Když tedy dosadíme rovnice (1.4) a (1.5) do vztahu (1.1), dostaneme následující vztah

$$P = \alpha_0 E_A \cos(\omega_1 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_A \cos(\omega_2 t) E_A \cos(\omega_1 t),$$

který můžeme dále upravit do tvaru

$$P = \alpha_0 E_A \cos(\omega_1 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 \frac{q_A E_A}{2} \left[\cos[(\omega_1 - \omega_2)t] + \cos[(\omega_1 + \omega_2)t] \right]. \quad (1.6)$$

První člen rovnice (s úhlovou frekvencí ω_1) popisuje Rayleighův rozptyl, další dva členy patří Ramanovu rozptylu: člen s frekvencí $\omega_1 - \omega_2$ popisuje Stokesův posun a zbývající člen o frekvenci $\omega_1 + \omega_2$ popisuje anti-Stokesův posun.

Rayleighův rozptyl vzniká elastickou srážkou fotonu s molekulou, takže při něm nedochází k výměně energie. Naopak jevu, který vzniká při neelastické srážce fotonu s molekulou, při níž dochází ke změně frekvence, se říká Ramanův rozptyl. Oba rozptyly jsou všesměrové.

Z rovnice (1.6) také vyplývá, že aby se světlo rozptylovalo neelasticky, musí se měnit polarizovatelnost molekuly s výchylkou vibrace:

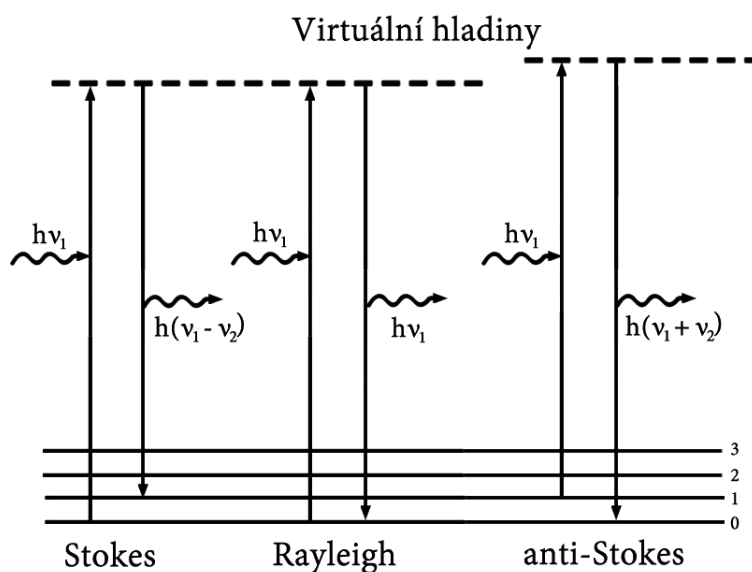
$$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 \neq 0. \quad (1.7)$$

Ramanská spektroskopie je nedestruktivní analytická metoda založená na nepružném rozptylu světla, který byl předpovězen Smekalem v roce 1923. Poprvé byl pozorován Ramanem v roce 1928, po kterém je tento jev pojmenován. Fotony s nižší frekvencí $\omega_1 - \omega_2$ předaly část své energie molekule vzorku, s níž se neelasticky srazily a tím ji vybudily do vyššího vibračního nebo rotačního stavu. Pokud se ale foton srazí neelasticky s molekulou ve vyšším vibračním stavu, může dojít k přenosu energie z molekuly na foton. Vibrace se tímto způsobem deexcituje a foton získá frekvenci $\omega_1 + \omega_2$. Protože tato změna frekvence probíhá proti Stokesovu posunu, nazývá se anti-Stokesovým posunem. Vzhledem k tomu, že za *normálních* podmínek je většina molekul v základním stavu, dochází ke Stokesovu posunu častěji než k anti-Stokesovu. Poměr počtu molekul N_1 nacházejících se v excitovaném stavu o energii E_1 a počtu molekul N_0 v základním stavu o energii E_0 je za dané teploty dán vztahem:

$$\frac{N_1}{N_0} = e^{(E_0 - E_1)/kT}, \quad (1.8)$$

kde T je termodynamická teplota a k je Boltzmannova konstanta. [6]

Kvantová teorie vysvětluje Ramanův rozptyl podobně s tím rozdílem, že energie fotonů i vibračních stavů je kvantována. Molekula si proto nemůže vzít pouze část energie fotonu, ale pohltí všechnu jeho energii, přičemž se excituje na virtuální elektronovou hladinu. Krátce poté může přejít do nového vibračního stavu, a následně se zbaví přebytečné energie formou vyzáření fotonu při deexcitaci elektronového stavu. Pokud energie vyzářeného fotonu je stejná jako energie původního fotonu (tedy nedošlo ke změně vibračního stavu), jedná se Rayleighův rozptyl. Pokud má vyzářený foton jinou energii, než foton pohlcený, jedná se o Ramanův rozptyl, při kterém molekula přejde do nového



Obrázek 1.3: Schéma přechodů mezi vibračními stavy (znázorněny plnými čarami) Rayleighova rozptylu a obou případů Ramanova rozptylu. Virtuální elektronové hladiny jsou zobrazeny přerušovanou čarou. [7]

vibračního stavu. V případě Ramanova rozptylu podle Stokesova principu, kdy vyzářený foton má energii nižší než původní foton, molekula skončí ve vyšším vibračním stavu a naopak v případě Ramanova rozptylu podle anti-Stokesova principu se vyzáří foton s vyšší energií, než byla energie absorbovaného fotonu a molekula se na konci procesu nachází v nižším vibračním stavu, než byla na začátku. Schéma těchto přechodů je znázorněno na obrázku 1.3. [7]

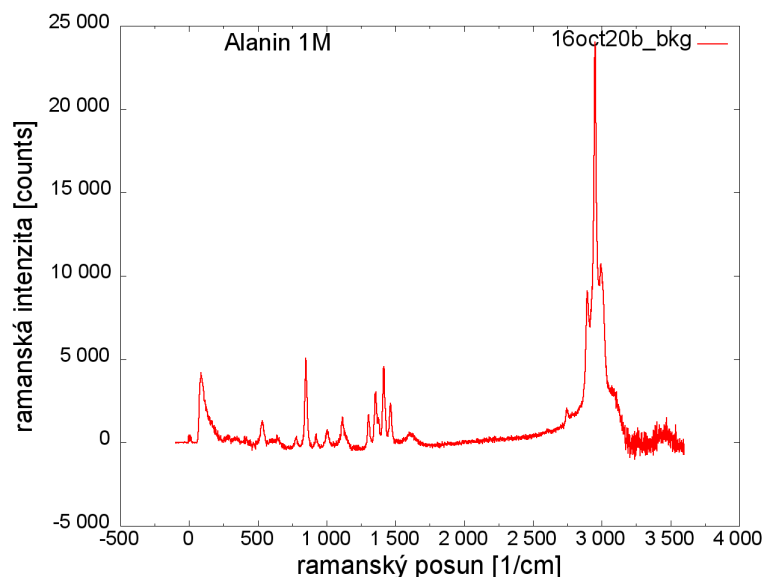
Ramanská spektroskopie má řadu výhod i nevýhod. Mezi výhody patří, že se jedná o nedestruktivní metodu, že zkoumaný vzorek může být v pevném, kapalném i plynném skupenství, dále že k získání spektra stačí pouze malý objem vzorku. Nevýhodou této spektroskopie je, že Ramanův rozptyl je velmi slabý, rozptýlí se přibližně jeden foton z milionu. Další stinnou stránkou této metody je, že místo na vzorku, kam laserový paprsek dopadá, je jím zahříváno. Poslední nevýhodou je luminiscence, která u některých vzorků překrývá ramanský signál.

V ramanském spektru se na vodorovnou osu vynáší ramanský posun v cm^{-1} . Tento posun přímo odpovídá vibračním frekvencím měřené molekuly a v případě potřeby z něj můžeme poměrně jednoduše vypočítat vlnovou délku rozptýleného fotonu. Nejprve je třeba převést vlnovou délku použitého laseru z nm do cm^{-1} . Například pro zelený laser o vlnové délce 514 nm tato hodnota vychází přibližně $19\,455\text{ cm}^{-1}$. Od této hodnoty odečteme hodnotu ramanského posunu daného píku, protože měříme v oblasti Stokesova posunu. Aminokyseliny mají charakteristické vibrační otisky (tzv. *fingerprint*) kolem hodnoty $1\,400\text{ cm}^{-1}$, proto jako příklad uvedu tuto hodnotu. Po odečtení od vlnočtu zeleného laseru získáme hodnotu $18\,055\text{ cm}^{-1}$, tedy po převedení zpět 553,86 nm. Ramanský posun 0 cm^{-1} vždy odpovídá vlnové délce laseru. Jinak řečeno, vlnočť ramanského posunu $\Delta\nu$ se vypočítá ze vztahu

$$\Delta\nu = \frac{1}{\lambda_i} - \frac{1}{\lambda}, \quad (1.9)$$

kde λ_l je vlnová délka laseru a λ je vlnová délka rozptýleného světla.

Na svislou osu ramanského spektra se vynáší ramanská intenzita, zpravidla v počtech fotonů zachycených detektorem. Na obrázku 1.4 je příklad ramanského spektra alaninu.



Obrázek 1.4: Ilustrační ramanské spektrum alaninu (Ar-ion laser 514 nm, 11,43 mW, 1×10 s, objektiv 20×), po odečtení ramanského spektra kapiláry s vodou.

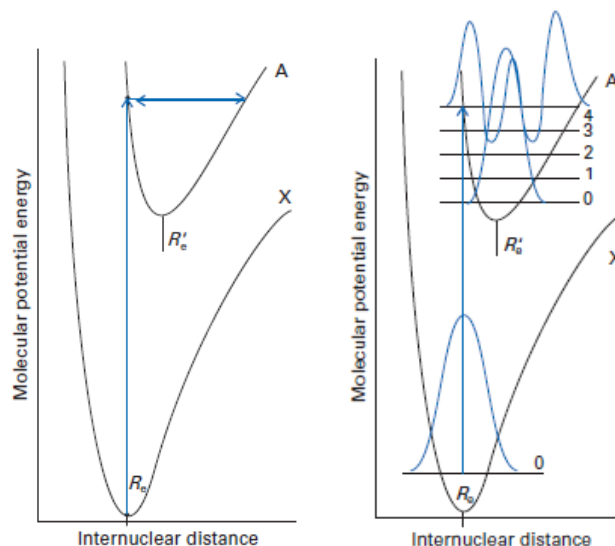
1.3 Luminiscence

Luminiscencí se látka zbavuje přebytečné energie vyzářením fotonu nejčastěji v oblasti viditelného světla, infračerveného nebo UV záření. Elektron v dané látce nejprve absorbuje kvantum energie, čímž se excituje do vyššího energetického stavu. Poté se zpravidla zbaví části energie kaskádou nezářivých přechodů, než se dostane na hladinu, ze které vrátí zpět do základního stavu. Přitom se vyzáří přebytečná energie ve formě fotonu, který má podle Stokesova zákona menší energii než foton absorbovaný. Luminiscence je stejně jako ramanský rozptyl všesměrová.

Podle způsobu excitace elektronů v látce rozdělujeme luminiscenci do několika skupin. Pokud získaná energie pochází z absorbovaného světla, mluvíme o fotoluminiscenci, po urychlení elektronů vzniká katodoluminiscence, při ozařování materiálu rentgenovým zářením, gamma zářením nebo proudem α nebo β částic vzniká radioluminiscence. Elektroluminiscence vzniká při dodání energie látce pomocí elektrického pole, triboluminiscence získává energii pomocí mechanických sil, kdy látka pomocí tření získá elektrický náboj. U chemoluminiscence se využívá energie získaná z chemických reakcí, u bioluminiscence potřebná energie pochází z biologických procesů. [8]

Většina organických molekul v základním stavu má sudý počet elektronů, které leží v nejnižších molekulových orbitalech. Podle Pauliho vylučovacího principu se v každém stavu mohou nacházet pouze dva elektrony s opačným spinem. Protože každý elektron se snaží zaujmout stav s nejnižší energií, jsou všechny elektrony spárovány. Díky tomu je

výsledný spin molekuly roven nule. Takový stav, který nemá žádné nespárované elektrony, se nazývá singlet. Naopak molekula, která má dva nespárované elektrony, má výsledný spin roven 1, což znamená, že spinové momenty hybnosti nabývají hodnot $-1, 0, 1$. Takový stav se nazývá triplet. [9]



Obrázek 1.5: Franckův–Condonův princip. Převzato z [10].

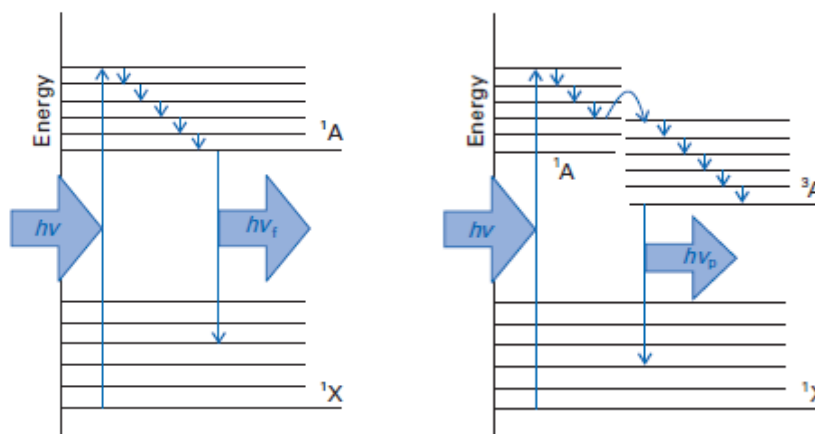
Když elektron přejde do vyššího elektronového stavu, jádro atomu na tento pohyb reaguje, protože jádro a elektrony na sebe navzájem působí Coulombickou silou. Franckův–Condonův princip říká, že protože je hmotnost elektronu výrazně menší než hmotnost jádra a protože je tento přechod velmi rychlý (přibližně 10^{-15} s), jádro reaguje až po excitaci elektronu, a to v podobě vibrací (vibrace probíhají pomaleji než 10^{-14} s). Proto téměř při každé excitaci elektronu se molekula také excituje do vyššího vibračního stavu. Přesněji tento princip popisuje obrázek 1.5, na kterém je zobrazena potenciální energie dvou elektronových stavů u dvouatomové molekuly. Protože se elektron před excitací nacházel v místě s nejnižší potenciální energií R_e (v základním vibračním stavu) a protože při přechodu elektronu do vyššího stavu jsou jádra v klidu, získá elektron potenciální energii, která je v grafu přímo nad bodem R_e , kde se před excitací nacházel. Tento bod na horní křivce odpovídá příslušnému vibračnímu stavu, který elektron přechodem získá. Podle kvantové mechaniky molekula přejde ze základního vibračního stavu do takového vibračního stavu, který má nejpodobnější vlnovou funkci jako základní vibrační stav.

Excitované elektrony se mohou zbavit přebytečné energie více způsoby, často se tato energie přemění na teplo, ale může se také vyzářit např. v podobě fotonu viditelného světla. Jedná se o fotoluminiscenci, která se dělí na fluorescence a fosforescenci. Tyto dva jevy se od sebe liší více způsoby. První rozdíl je v době, po kterou látka vyzáří. Fluorescence probíhá jen dokud osvěcujeme danou látku, když vypneme zdroj, zhasne i daná látka. Naopak u fosforescence po odstranění zdroje látka ještě nějakou dobu září.

Dalším rozdílem je mechanismus těchto jevů, který je znázorněn na obrázku 1.6. Při fluorescence probíhá elektronový přechod mezi excitovaným a základním singletem. Po absorpci fotonu přejde elektron do vyššího stavu, přičemž se excituje molekula do vyššího vibračního stavu. Při srážkách s ostatními molekulami dojde k deexcitaci vibrační-

ho stavu. Po určité době molekula přejde do základního elektronového stavu, přičemž se vyzáří foton. Vyzářený foton má nižší energii než foton absorbovaný, protože část energie předala molekula okolí v při srážkách s ostatními molekulami. Jedná se o Stokesův posun, protože emitovaný foton má větší vlnovou délku než foton absorbovaný.

Mechanismus fosforescence začíná stejně jako u fluorescence absorpcí fotonu, přičemž dojde k excitaci molekuly do vyššího elektronového (singletu) i vibračního stavu. Poté dojde k deexcitaci vibračního stavu a pokud tento přechod neproběhne příliš rychle, přejde elektron nezářivě do blízkého tripletu. Přechod mezi singletem a tripletem je málo pravděpodobný. Větší pravděpodobnost, že k takovému přechodu dojde, mají molekuly, které obsahují těžký atom. Potom pokračuje deexcitace vibračního stavu v tripletu srážkami. Když se molekula dostane až do základního vibračního stavu, může elektron znovu přejít do základního singletu, přičemž se vyzáří foton. Protože se znovu jedná o přechod, který je málo pravděpodobný, trvá celý mechanismus fosforescence poněkud déle než u fluorescence. [10]



Obrázek 1.6: Mechanismus fluorescence (vlevo) a fosforescence (vpravo).
Převzato z [10].

1.3.1 Absorpční spektrum

Absorpční spektrum molekul je zajímavé z hlediska jeho souvislosti s luminiscencí. Látka, která se excituje absorbováním fotonu o určité vlnové délce do vyššího elektronového stavu, se později zbaví přebytečné energie vyzářením nového fotonu o stejné nebo podobné vlnové délce, jako měl původní foton. Proto v okolí místa píku v absorpčním spektru můžeme očekávat větší množství luminiscence.

Metoda měřící absorpci světla látkou při různých vlnových délkách se nazývá spektrofotometrie. Absorbovanou energii fotonů látka využije na excitaci elektronů, vibračních a rotačních stavů. Proto se absorbují takové fotony, jejichž energie odpovídá elektronovým, vibračním a rotačním přechodům v dané molekule. Můžeme měřit buď čárové absorpční spektrum, na kterém je znázorněno celé spektrum vlnových délek v rozsahu měření, je

ovšem přerušeno několika černými proužky, které odpovídají vlnovým délkám absorbovaných fotonů. Druhou možností je absorpční křivka, která vyznačuje, jakou část světelné intenzity při průchodu látka pohltila v závislosti na vlnové délce.

Místo v molekule, kde dochází k elektronovým přechodům mezi dvěma stavy, jejichž energiový rozdíl odpovídá energii fotonu viditelného světla, se nazývá chromofor. Nejčastějšími chromofory jsou karbonylové ($C=O$) a nitroskupiny (NO_2) a dvojné vazby mezi uhlíky.

Když dopadá paprsek světla o intenzitě I_0 na látku, jeho část o intenzitě I_A je absorbována, další část o intenzitě I_R se odrazí a zbytek světla o intenzitě I_T projde skrz danou látku. Můžeme tedy napsat

$$I_0 = I_A + I_R + I_T. \quad (1.10)$$

Proto poměry intenzit

$$\frac{I_A}{I_0} = A, \quad \frac{I_R}{I_0} = R, \quad \frac{I_T}{I_0} = T \quad (1.11)$$

nazýváme popořadě pohltivost, odrazivost a propustnost. Po vydělení rovnice (1.10) počáteční intenzitou I_0 tedy získáme vztah [11]

$$1 = A + R + T. \quad (1.12)$$

Základním vztahem spektrofotometrie je Lambertův-Beerův zákon. Lambertův zákon říká, že část světla absorbovaná průhlednou látkou je nezávislá na počáteční intenzitě světla, ale lineárně závisí na tloušťce materiálu. Bohužel Lambertova absorbance není to samé jako pohltivost z předchozího vztahu, ale je definovaná jako $A' = -\log_{10} T$. Tedy

$$A' = \log_{10} \frac{I_0}{I_T} = kl, \quad (1.13)$$

kde l je délka dráhy paprsku světla v kyvetě s měřenou látkou a k je konstanta specifická pro danou látku, kterou popisuje Beerův zákon. Beerův zákon říká, že absorbované množství světla je přímo úměrné koncentraci c chromoforu, přes který prošlo. Tedy $k = \varepsilon c$, kde ε je molární absorpční koeficient a je roven absorbanci roztoku o koncentraci 1 mol dm^{-3} při šířce kyvety 1 cm. Kombinací těchto dvou zákonů tedy dostáváme Lambertův-Beerův zákon:

$$\log_{10} \frac{I_0}{I_T} = \varepsilon cl. \quad (1.14)$$

Podle tohoto zákona by měla být závislost absorbance na koncentraci lineární, prakticky to ale platí pouze pro nižší koncentrace. Při vyšších koncentracích jsou molekuly blíže u sebe, takže spolu více interagují a mění tím propustnost měřené látky. Odchylka od Lambertova-Beerova zákona také nastává, pokud dochází k rozptylu světla, protože detektor měří prošlé světlo (propustnost) a zanedbává tím odrazivost a rozptyl světla. Odrazivost bývá u roztoků zanedbatelná, ale rozptyl světla sílí s jejich rostoucí koncentrací, proto u některých látek zvláště při vyšších koncentracích není zanedbatelný a způsobuje odchylku od Lambertova-Beerova zákona. [12]

1.4 Metody potlačování luminiscence

Jedním z problémů ramanské spektroskopie je luminiscence, která ve větší či menší míře vzniká v každém měřeném vzorku v důsledku ozáření látky laserem. V některých případech dosahuje luminiscence vyšších intenzit než ramanský signál, takže jej zcela překryje. Abychom tedy získali ramanské spektrum, musíme luminiscenci potlačit. Metody, jimiž se toho dá dosáhnout, můžeme rozdělit do dvou skupin – na experimentální a matematické. Experimentální metody využívají fyzikálních vlastností luminiscence a ramanský rozptýleného světla, proto je preferujeme před matematickými, které se snaží potlačit luminiscenci pomocí počítačového algoritmu.

1.4.1 Experimentální metody

Mezi experimentální metody potlačování luminiscence patří změna vlnové délky, vysvěcování luminiscence a změna intenzity excitace, rozdíl v depolarizovanosti oproti ramanskému signálu. Dále do této skupiny patří využití lock-inu, SERS a další pokročilé metody, kterými se nebudeme v této práci zabývat.

Změna vlnové délky

Se změnou vlnové délky směrem k červenému konci spektra množství luminiscence klesá, protože fotony o delší vlnové délce mají méně energie, a tím pádem klesá pravděpodobnost, že se elektron ve vzorku excituje do vyššího stavu. Protože se mezi sériemi elektronových stavů nachází zakázané pásy, které neobsahují žádné elektronové hladiny, při snížení energie excitace klesá luminiscence skokově. Jedinou nevýhodou této metody je, že i intenzita ramanského signálu I klesá se čtvrtou mocninou vlnové délky λ podle vztahu

$$I = I_0 \frac{8\pi N \alpha^2}{\lambda^4 R^2} (1 + \cos^2 \theta), \quad (1.15)$$

kde I_0 je intenzita laseru, N je počet rozptylových center, α je polarizovatelnost molekuly vzorku, R je vzdálenost detektoru od vzorku, a θ je úhel, pod kterým je rozptýlené světlo sledováno.

Vysvěcování luminiscence a změna intenzity

Pokud déle svítíme laserem na měřený vzorek, excitované elektrony postupně zaplňují vyšší elektronové stavy v molekulách vzorku, proto množství emitované luminiscence pomalu klesá. Po zaplnění všech vyšších elektronových stavů se elektrony již nemohou dále excitovat a množství luminiscence dosáhlo svého minima. Pokud použijeme laser o větší intenzitě, dojde k výraznějšímu a rychlejšímu potlačení luminiscence.

Rozdíl v depolarizovanosti

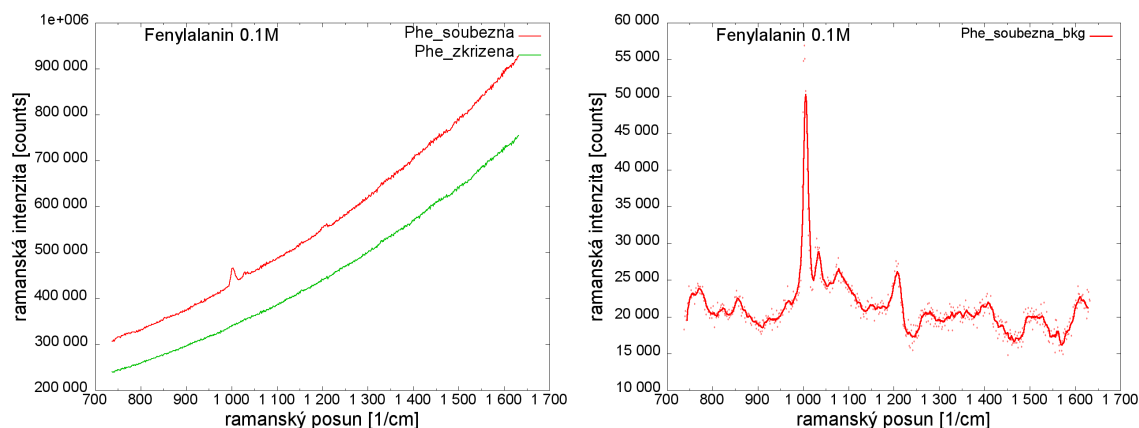
Světlo je elektromagnetické vlnění, kde vektor elektrické intenzity $\vec{E}$ spolu s vektorem magnetické indukce $\vec{B}$ kmitají kolmo na sebe. V nepolarizovaném světle kmitají vektory elektrické intenzity (a tudíž i vektory magnetické indukce) jednotlivých světelných vln

různými směry. Když vložíme takovému světelnému paprsku do cesty polarizátor, projdou skrz něj pouze ty světelné vlny, u kterých kmitá vektor $\vec{E}$ jen ve směru, pro který je polarizační filtr propustný. Prošlé světlo je tedy lineárně polarizované. Jednou z vlastností laseru je, že jeho světlo je polarizované. Když dojde k Ramanovu rozptylu, světlo se částečně depolarizuje. Jak moc je rozptýlené světlo depolarizováno udává *depolarizační poměr* ρ_R . Depolarizační poměr se vypočítá jako intenzita rozptýleného světla polarizovaného kolmo na původní směr vektoru $\vec{E}$ (označuje se jako *zkřížená polarizace*) ku intenzitě rozptýleného světla polarizovaného rovnoběžně s původním vektorem $\vec{E}$ (*souběžná polarizace*), [13]

$$\rho_R = \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}}. \quad (1.16)$$

Světlo vzniklé luminiscencí je více depolarizované než světlo rozptýlené, proto pokud chceme s využitím tohoto jevu luminiscenci potlačit, stačí změřit spektrum v souběžné polarizaci a spektrum v polarizaci zkřížené, a potom od sebe obě spektra odečíst. Spektrum získané rovnoběžnou polarizací totiž obsahuje značně víc ramanského signálu než spektrum naměřené polarizací kolmou, přičemž obě spektra obsahují přibližně stejné množství luminiscence. Po optimalizovaném odečtení tedy získáme v ideálním případě pouze ramanský signál. [14]

Na obrázku 1.7 vlevo je znázorněno spektrum fenylalaninu v souběžné (červeně) a zkřížené (zeleně) polarizaci. Vpravo je zobrazené spektrum v souběžné polarizaci po optimalizovaném odečtení polarizace zkřížené. Ramanský signál je zde mnohem lépe pozorovatelný než v původních spektrech.



Obrázek 1.7: Spektrum fenylalaninu v souběžné a zkřížené polarizaci (vlevo) a rozdíl těchto spekter (vpravo). Výrazný pík na $1\,000\text{ cm}^{-1}$ patří vibraci benzenového jádra.

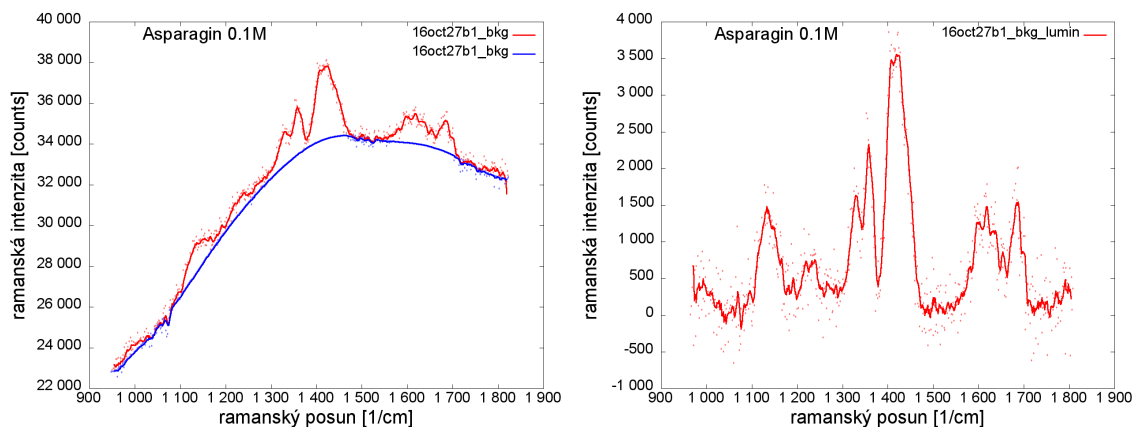
1.4.2 Matematické metody

Existuje velké množství matematických metod potlačování luminiscence jako například odečítání polynomiálního pozadí, technika valící se koule nebo využití klouzavého průměru. V této práci se zaměříme pouze na metodu klouzavého průměru.

Klouzavý průměr

Jednou z možností potlačení luminiscence je metoda klouzavého průměru. Při této metodě se nejprve zvolí šířka okolí bodu, které se má průměrovat. Pro každý bod tedy získáme novou zprůměrovanou hodnotu, kterou program porovná s hodnotou původního spektra a vybere z nich tu nižší. Tento proces se může několikrát opakovat, čímž se spektrum postupně vyhlazuje a zůstávají na něm pouze větší a užší píky. Metoda má tedy dva parametry: šířku okna průměrovaných bodů a počet opakování. Oblasti spektra, která obsahují pouze šum, se ovšem v rámci tohoto algoritmu vyhladí úplně, což vypadá nepřírozně. Proto se do spektra vrátí šum tak, že se odečítá průměr okolí i -tého bodu od $i+1$ bodu.

Čím širší oblast průměrovaných hodnot použijeme, tím více klesnou široké pásy luminiscence, ale i širší pásy ramanského signálu. Proto se musí zvolit šířka oblasti průměrovaných hodnot tak, aby luminiscence klesla co nejvíc, ale zároveň se příliš neodečetly i pásy ramanského signálu. Správně upravené spektrum by mělo být vyrovnané s ostrými ramanskými píky a ležet blízko nulové hladiny intenzity. Příklad spektra upraveného klouzavým průměrem je zobrazen na obrázku 1.8. [15, 16]



Obrázek 1.8: Spektrum asparaginu před (nahore) a po (dole) použití klouzavého průměru.

2. Praktická část

Všechny aminokyseliny byly měřeny ve vodném roztoku v kapiláře. Vlastnosti skleněných kapilár a jejich použití je popsáno v dřívější bakalářské práci [17]. K měření byl použit spektrometr Renishaw in Via, který má objektivy 5×, 20× a 50×, He-Ne laser o vlnové délce 633 nm a výkonu 6,9 mW a Ar laser o vlnové délce 514 nm a výkonu 11,4 mW. Dále byl použit spektrometr NT-MDT s He-Cd laserem o vlnové délce 442 nm a výkonu 25,5 mW a zeleným diodovým laserem o vlnové délce 532 nm s měnitelným výkonem do 1 W.

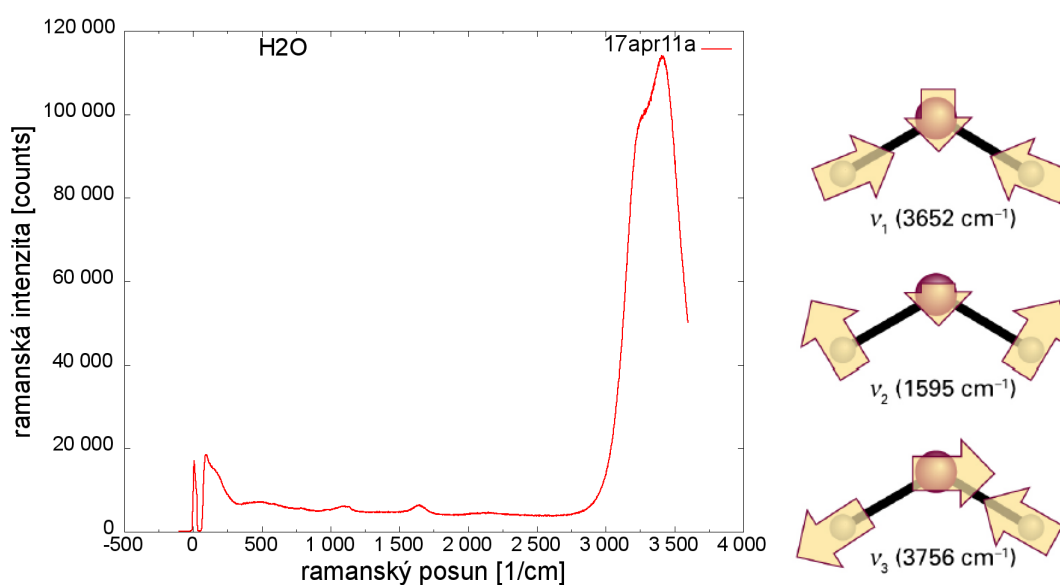


Obrázek 2.1: Spektrometr Renishaw in Via (nahore vlevo) a NT-MDT TERS (nahore vpravo) a technika měření v kapilárách (dole).

Ve spektrech jsou uvedeny názvy měření, jejichž seznam je umístěn v kapitole Laboratorní deník.

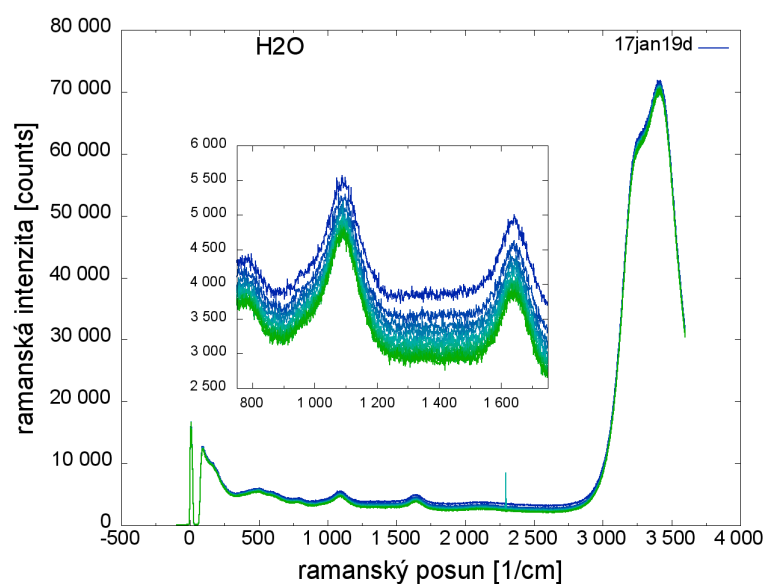
2.1 Voda

Na obrázku 2.2 je znázorněno ramanské spektrum vody v kapiláře. Její největší dvojitý pík, který odpovídá symetrickému natahování molekuly vody, se nachází na $3\,400\text{ cm}^{-1}$, další poněkud menší pík můžeme vidět na $1\,600\text{ cm}^{-1}$, jenž odpovídá symetrickému ohýbání molekuly vody. Protože voda i všechny aminokyseliny byly měřeny ve skleněné kapiláře, na většině spektru je patrný ramanský signál amorfního skla na $1\,100\text{ cm}^{-1}$ a také kolem 500 cm^{-1} . Intenzitu ramanského signálu skla můžeme snížit až téměř na nulu, měříme-li v dostatečné hloubce kapiláry.



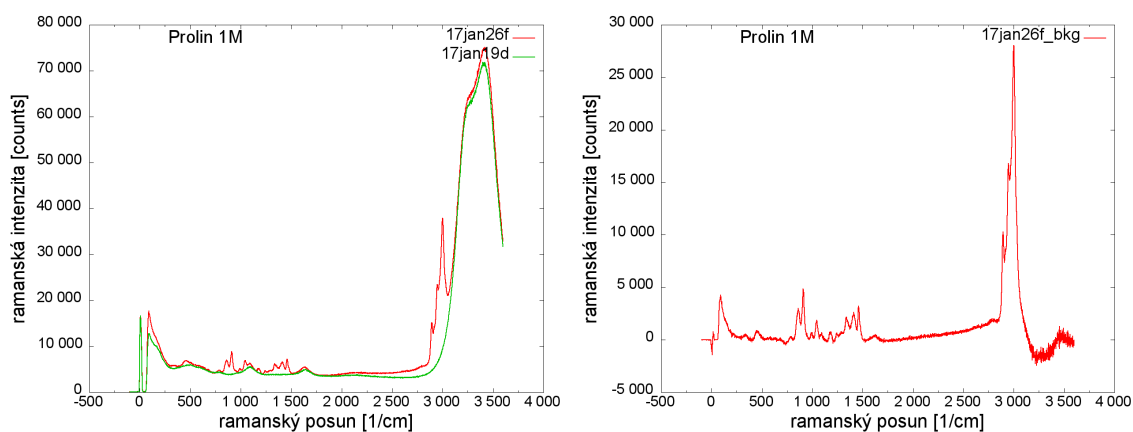
Obrázek 2.2: Ramanské spektrum vody s jejími typickými píky na $3\,400\text{ cm}^{-1}$ a $1\,600\text{ cm}^{-1}$ (vlevo) a vibrace molekuly vody v plynném stavu (vpravo) [18]. V kapalném stavu se frekvence symetrického natahování sníží z $3\,652\text{ cm}^{-1}$ na $3\,400\text{ cm}^{-1}$ kvůli vodíkovým můstkům.

Luminiscenci můžeme v malé míře pozorovat i u vody. Na obrázku 2.2 můžeme vidět, že celé spektrum je posunuto nahoru ve směru svislé osy, takže má nenulovou intenzitu i v místech, kde není žádný ramanský signál. Tuto luminiscenci můžeme snížit jako v případě aminokyselin například vysvícením, které je znázorněno na obrázku 2.3.



Obrázek 2.3: Vysvěcování luminiscence vody.

Protože všechny aminokyseliny byly měřeny ve vodném roztoku v kapiláře, bylo potřeba z jejich spekter toto celkové pozadí odečíst. Odečítání pozadí je zobrazeno na obrázku 2.4. Vlevo vidíme spektrum prolinu ve vodném roztoku (červeně) a spektrum vody (zeleně). Přestože je odečítání optimalizované, často není dokonalé kvůli různým poměrům intenzit jednotlivých píků vody a skla. Proto na obrázku 2.4 vpravo vidíme, že po odečtení v okolí 3400 cm^{-1} není zcela rovné pozadí a na 1600 cm^{-1} zůstal malý zbytek pásu vody.



Obrázek 2.4: Prolin před odečtením vody a voda (vlevo) a prolin po odečtení vody (vpravo).

Všechna spektra v této kapitole jsou měřena Ar laserem o vlnové délce 514 nm a výkonu $11,4\text{ mW}$, při akumulaci $1 \times 10\text{ s}$ a s objektivem $20\times$.

2.2 Koncentrační studie

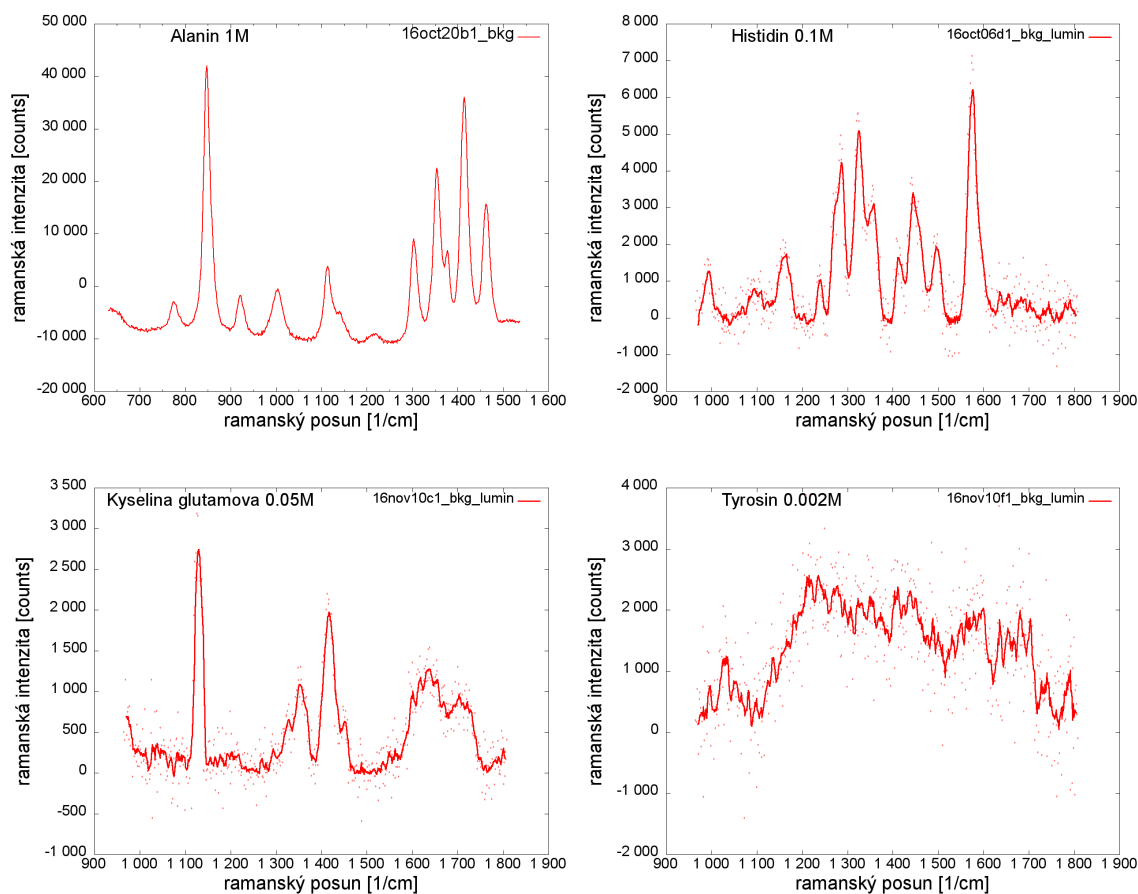
Protože intenzita ramanského signálu je úměrná koncentraci studované látky, k měření byly většinou použity nejvyšší možné koncentrace, maximálně však 1 M. Přestože se uvádí, že aminokyseliny jsou dobře rozpustné ve vodě, u většiny z nich 1 M roztok nelze připravit. V tabulce 2 jsou převzaty maximální koncentrace, které lze za dané teploty připravit. Některé hodnoty se však mohou od skutečnosti lišit, například kyselina asparagová byla připravena o koncentraci 0,05 M. Dále je v tabulce 2 uvedeno, že maximální koncentrace serinu při 25 °C je 3 M, zatímco v tabulce z jiného zdroje, podle které byl tento roztok připraven, byla uvedena koncentrace pouze 0,5 M.

Tabulka 2: Základní vlastnosti aminokyselin. [19, 20]

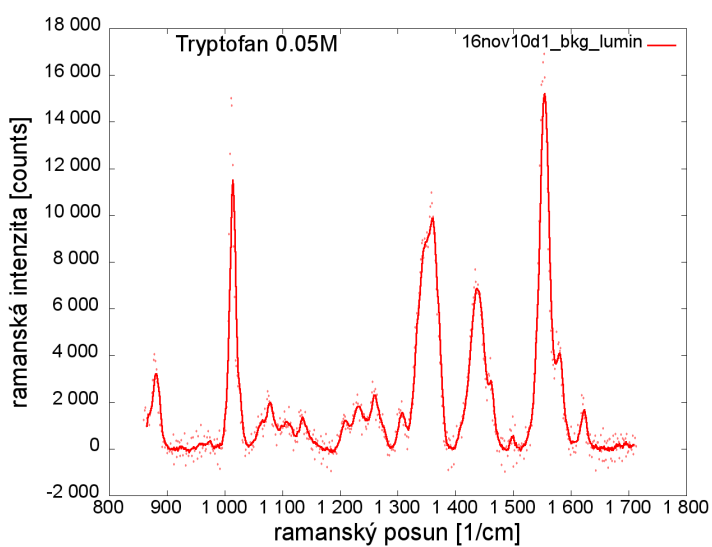
Aminokyselina	Molární hmotnost [g/mol]	Rozpustnost při 25 °C [g/100 ml H ₂ O]	Maximální koncentrace [M]	pI
Alanin	89,09	16,63	1,867	6,01
Arginin	174,20	19,59	1,125	10,76
Asparagin	132,12	2,51	0,190	5,41
Cystein	121,15	2,56	0,211	5,07
Fenylalanin	165,19	2,80	0,170	5,48
Glutamin	146,15	4,25	0,291	5,65
Glycin	75,07	25,23	3,361	5,97
Histidin	155,16	4,36	0,281	7,59
Isoleucin	131,17	3,17	0,242	6,02
Kyselina asparagová	133,10	0,51	0,038	2,77
Kyselina glutamová	147,13	0,88	0,060	3,22
Leucin	131,17	2,19	0,167	5,98
Lysin	146,19	24,66	1,687	9,74
Methionin	149,21	5,59	0,375	5,74
Prolin	115,13	130,07	11,298	6,48
Serin	105,09	36,57	3,480	5,68
Trheonin	119,12	9,79	0,822	5,87
Tryptofan	204,23	1,32	0,065	5,88
Tyrosin	181,19	0,05	0,003	5,66
Valin	117,15	5,87	0,501	5,97

Na následujících obrázcích můžeme vidět, jak s klesající koncentrací klesá intenzita píků, a tím i jejich zřetelnost vůči pozadí. Zvýšení ramanského signálu oproti pozadí můžeme dosáhnout delší dobou akumulace. Celková akumulace následujících obrázků je vždy 100 s. K měření byl použit Ar laser o vlnové délce 514 nm a výkonu 11,4 mW, a s objektivem 20×.

Z tohoto hlediska je zajímavou aminokyselinou tryptofan. Přestože má velmi nízkou koncentraci (pouze 0,05 M), intenzita jeho signálu přesahuje intenzitu většiny aminokyselin o koncentraci 0,1 M (obrázek 2.6).



Obrázek 2.5: Alanin 1 M, histidin 0,1 M, kyselina glutamová 0,05 M a tyrosin 0,002 M.



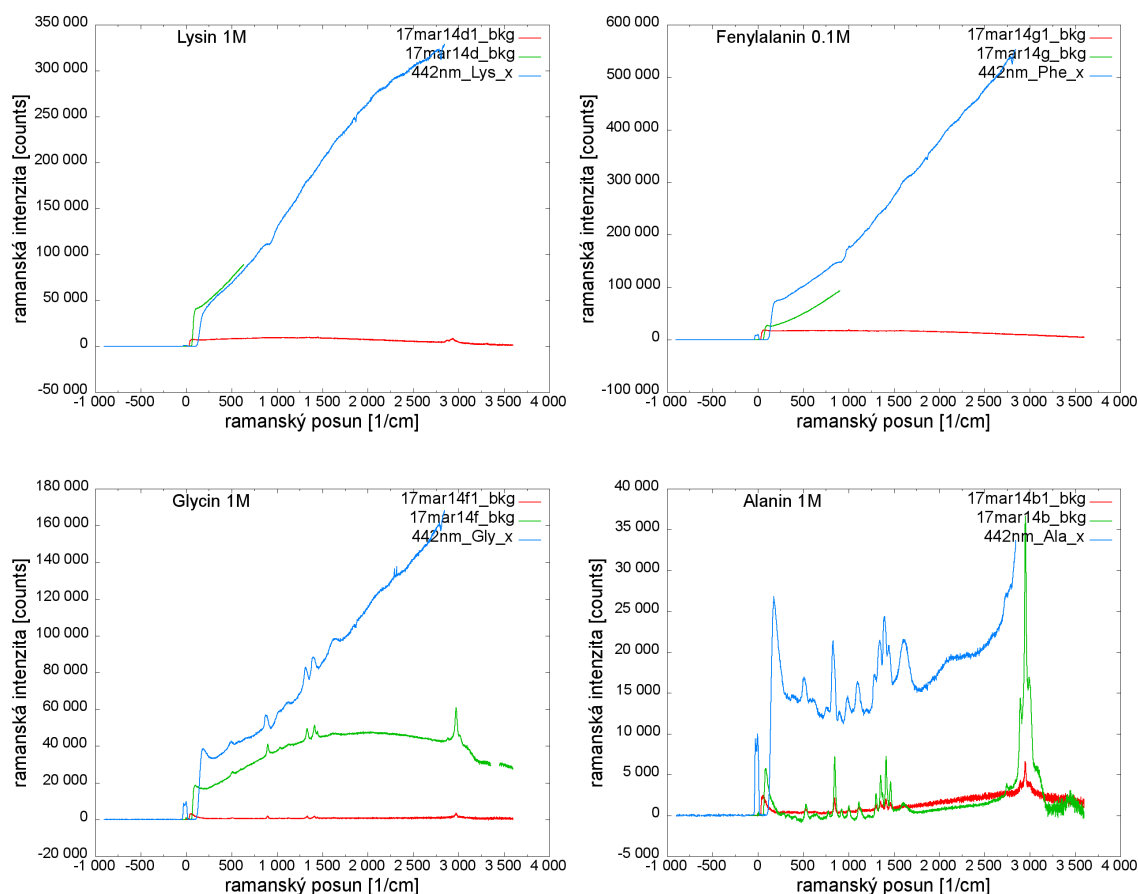
Obrázek 2.6: Tryptofan 0,05 M.

2.3 Luminiscence a její potlačení

2.3.1 Změna vlnové délky

Při změně vlnové délky byl použit kromě základního zeleného argonového laseru o vlnové délce 514 nm a výkonu 11,4 mW také červený He-Ne laser o vlnové délce 633 nm a výkonu 6,9 mW a modrý He-Cd laser o vlnové délce 442 nm a výkonu 25,5 mW.

Podle očekávání spektra naměřená červeným laserem obsahují více šumu než spektra naměřená zeleným laserem. Nicméně zatímco při měření se zeleným laserem u některých aminokyselin detektor nedokázal kvůli velkému množství luminiscence spektrum zaznamenat, při použití červeného laseru se spektrum naměřit podařilo. Naopak při měření modrým laserem se intenzita ramanského signálu mnohonásobně zvýšila, přibýlo však i množství luminiscence (obrázek 2.7). Spektra modrého laseru byla naměřena jiným spektrometrem, proto byla normována s využitím referenčních spekter vody (celkem faktorem 26× intenzita původního spektra, viz také kapitola Laboratorní deník).

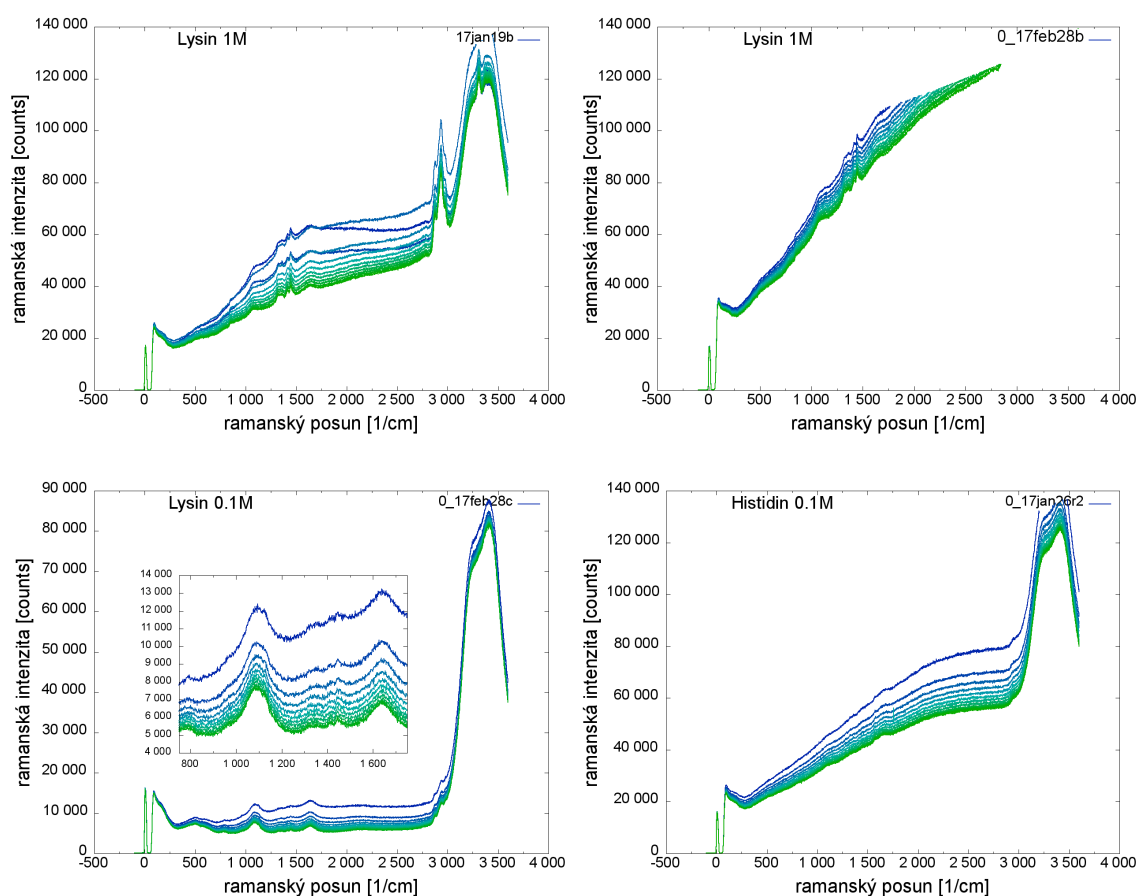


Obrázek 2.7: Lysin 1 M, fenylalanin 0,1 M, glycin 1 M a alanin 1 M, lasery o vlnových délkách 514 nm (zeleně), 633 nm (červeně) a 442 nm (modře – intenzita byla vydělena padesáti), vše normováno na 1×10 s spektrometru Renishaw s výkonem 10 mW a vlnovou délkou 514 nm.

2.3.2 Vysvěcování luminiscence

Při vysvěcování luminiscence byl laser přiveden na vzorek se začátkem měření, jednotlivá spektra byla měřena ihned po dokončení měření předchozího spektra. (Délka měření jednoho spektra je přibližně 1 minuta.) Spekter bylo získáno 10 – 20 v závislosti na tom, zda luminiscence stále ubývala.

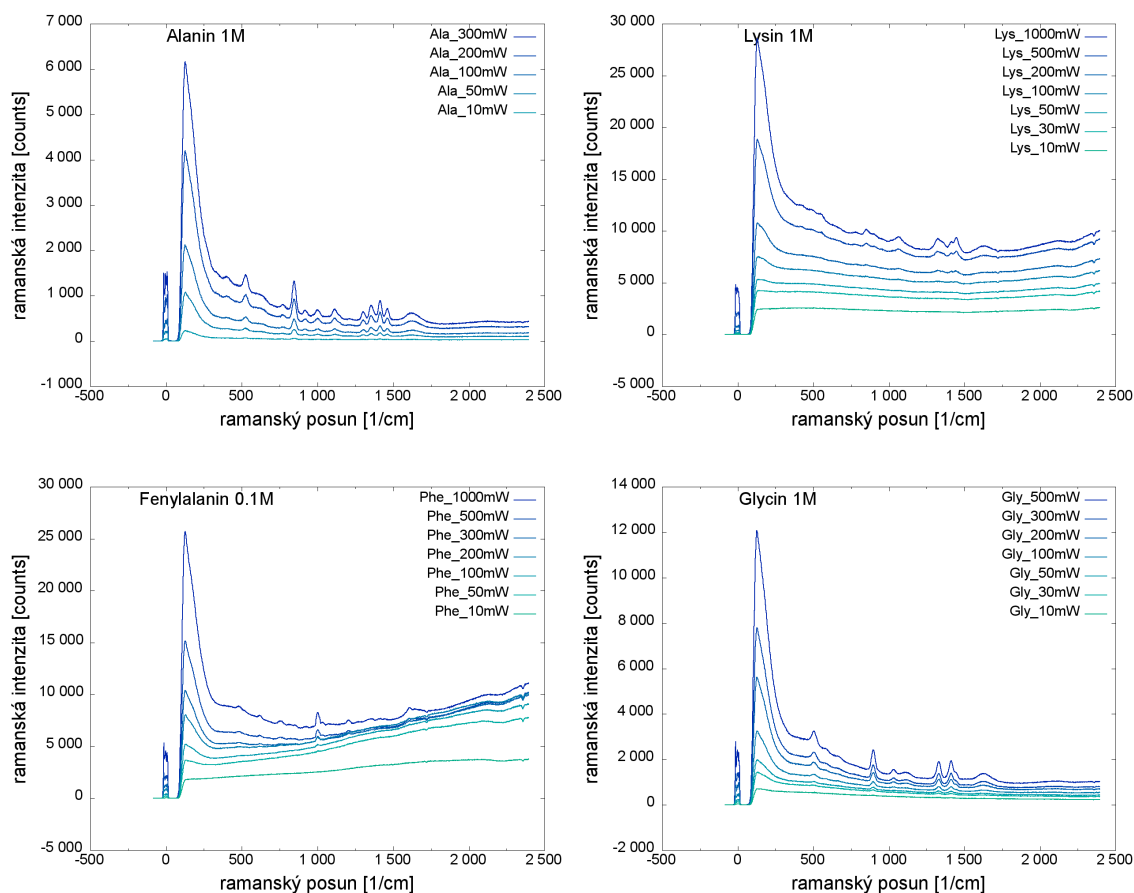
Přestože první spektrum lysinu 1 M na obrázku 2.8 bylo z poloviny saturované kvůli velkému množství luminiscence, díky vysvěcování luminiscence se jej povedlo získat téměř celé. Oproti tomu na druhém spektru lysinu 1 M je mnohem méně luminiscence, i když jde o stejný vzorek, protože jednotlivé série spekter nebyly měřeny ve stejný den, ale projevil se zde vliv stárnutí.



Obrázek 2.8: Vysvěcování luminiscence u lysinu 1 M (2× v různém stáří), lysinu 0,1 M a u histidinu 0,1 M (shora dolů), (Ar laser 514 nm, 11,4 mW, 1×10 s, objektiv 20×)

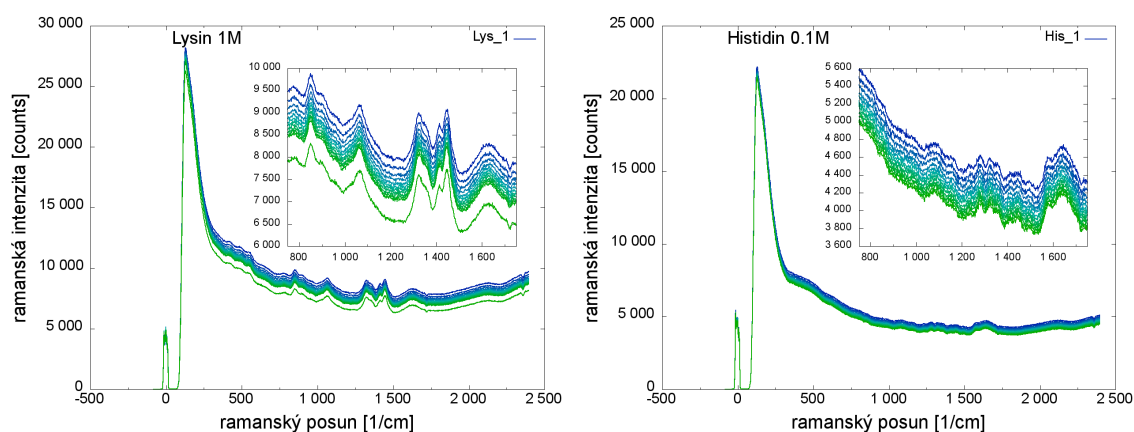
2.3.3 Změna intenzity excitace

Při zvýšení intenzity excitace získáváme silnější ramanský signál. Zároveň se rychleji a výrazněji vysvěcuje luminiscenční pozadí. Na obrázku 2.9 jsou znázorněny spektra aminokyselin při různých nominálních výkonech laseru. Touto metodou se například podařilo získat spektrum lysinu, který měl v důsledku stárnutí velmi mnoho luminiscence. K měření byl použit zelený diodový laser o vlnové délce 532 nm, při akumulaci 1×10 s a objektivu 20 $\times$.



Obrázek 2.9: Alanin 1 M, lysin 1 M, fenylalanin 0,1 M a glycin 1 M při různé intenzitě laseru.

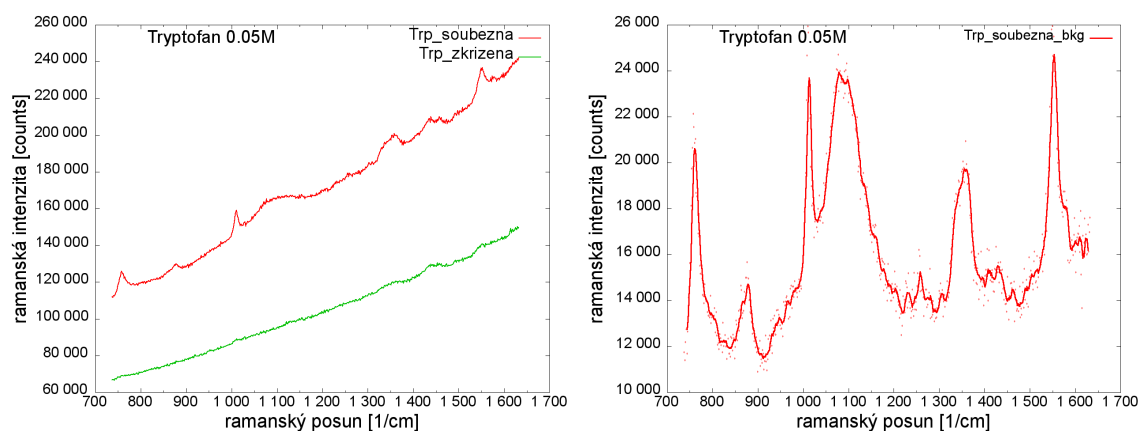
Při vysvěcování luminiscence laserem o vysoké intenzitě dochází k rychlejšímu a výraznějšímu poklesu luminiscenčního pozadí, jak je znázorněno na obrázku 2.10 na spektrech lysinu 1 M a histidinu 0,1 M.



Obrázek 2.10: Vysvěcování luminiscence lysinu 1 M (vlevo) a histidinu 0,1 M (vpravo) (shora dolů) při nominálním výkonu 1 W.

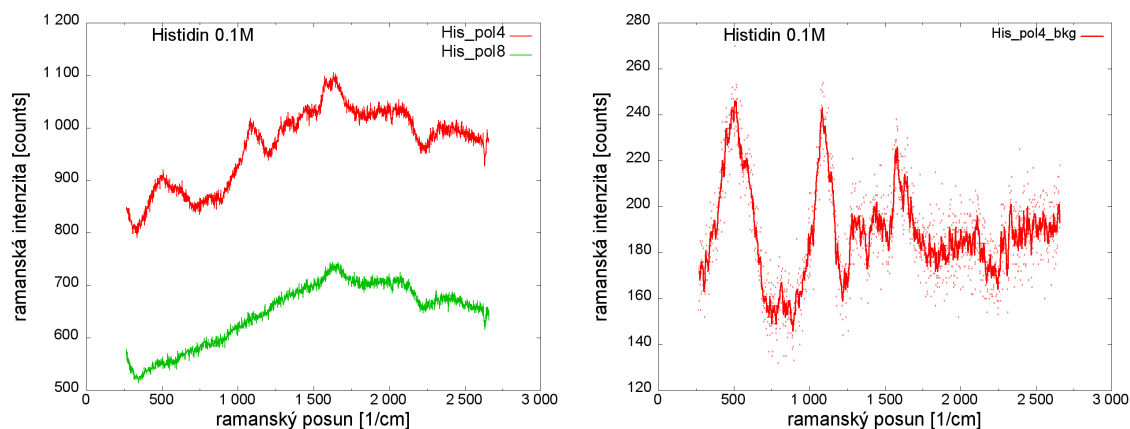
2.3.4 Rozdíl v depolarizovanosti

Jak bylo popsáno v teoretické části, ramanský signál je méně depolarizovaný než luminiscence. Proto optimálním odečtením spektra měřeného v kolmé polarizaci od spektra měřeného v souběžné polarizaci získáme v ideálním případě pouze ramanský signál. Na obrázku 2.11 je znázorněno použití této metody na spektru tryptofanu.



Obrázek 2.11: Spektrum tryptofanu ve souběžné (červeně) a zkřížené (zeleně) polarizaci (vlevo) a rozdíl těchto dvou spekter (vpravo). Na $1\,100\text{ cm}^{-1}$ se nachází ramanský signál skla. (Ar laser 514 nm, 11,4 mW, 10×10 s, objektiv 20×)

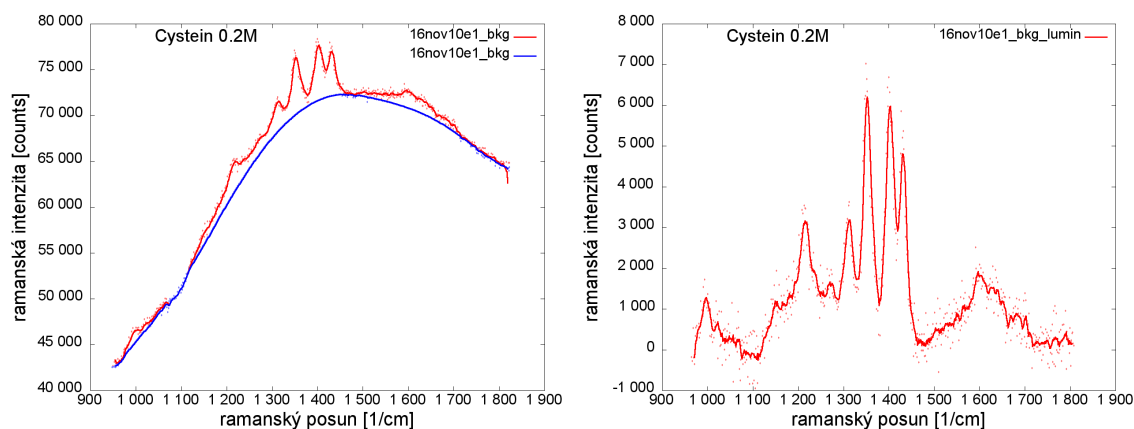
Na obrázku 2.12 byla použita tato metoda také při vyšší intenzitě laseru.



Obrázek 2.12: Spektrum histidinu v souběžné (červeně) a zkřížené (zeleně) polarizaci (vlevo) a rozdíl těchto dvou spekter (vpravo). Na 1100 cm^{-1} se nachází ramanský signál skla. (Diodový laser 532 nm, 1 W, 1×10 s, objektiv 20 $\times$)

2.3.5 Klouzavý průměr

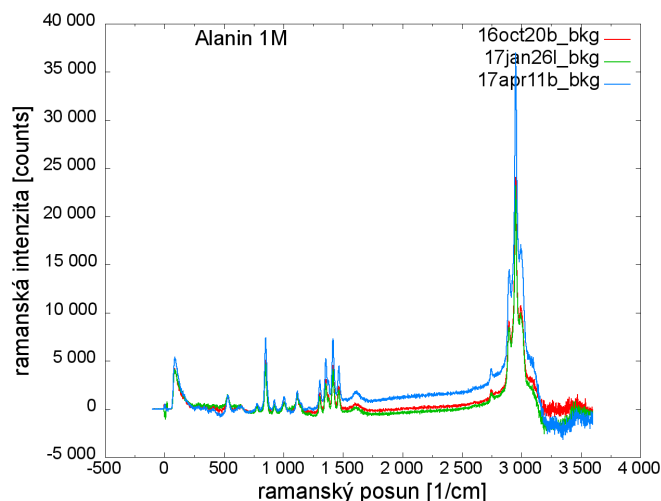
Na obrázku 2.13 je znázorněno ramanské spektrum cysteinu před a po jeho úpravě klouzavým průměrem při šířce okna 100 bodů a třech iteracích. Spektrum je poměrně vyrovnané a leží blízko nulové hladiny intenzity. Stejné nastavení bylo použito u všech spekter upravených touto metodou.



Obrázek 2.13: Spektrum cysteinu před (vlevo) a po (vpravo) použití klouzavého průměru.

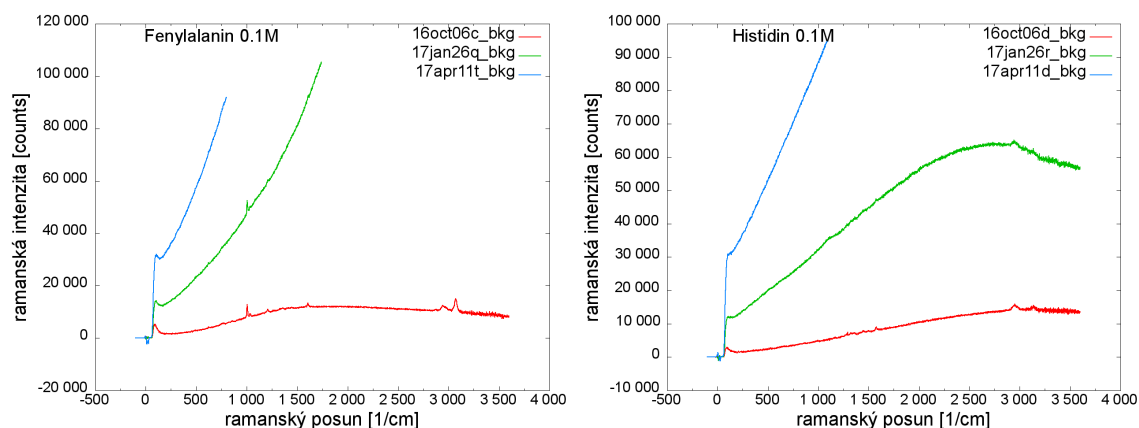
2.4 Stárnutí vzorků

Spektrum některých aminokyselin se v průběhu času nijak nemění, u jiných naopak sledujeme jejich vývoj v čase. U většiny aminokyselin, které se v čase mění, můžeme pozorovat nárůst luminiscence, u některých aminokyselin ale přechodně sledujeme i její pokles. Mezi aminokyselinami, jejichž spektrum se v čase nemění, patří alanin, glutamin, isoleucin, leucin, methionin, prolin a valin. Mírný přírůstek luminiscence je patrný ve spektrech argininu, asparaginu, kyseliny glutamové, serinu, threoninu a tyrosinu.



Obrázek 2.14: Stárnutí alaninu.

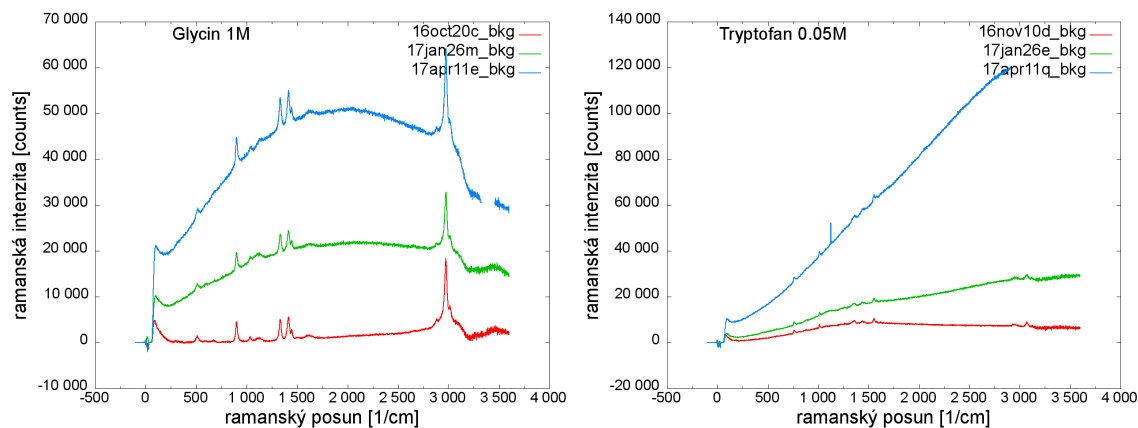
Největší nárůst luminiscence probíhá u lysinu, kde po krátké době je luminiscence tak silná, že saturuje detektor (po měsíci je již polovina spektra satureovaná při koncentraci 1 M). Jiná situace ovšem nastane, pokud použijeme lysin o nižší koncentraci. Na rozdíl od 1 M lysinu se vývoj v čase 0,1 M lysinu mění jen pozvolna. U této aminokyseliny můžeme zároveň sledovat žloutnutí jejího roztoku.



Obrázek 2.15: Stárnutí fenylalaninu (vlevo) a histidinu (vpravo).

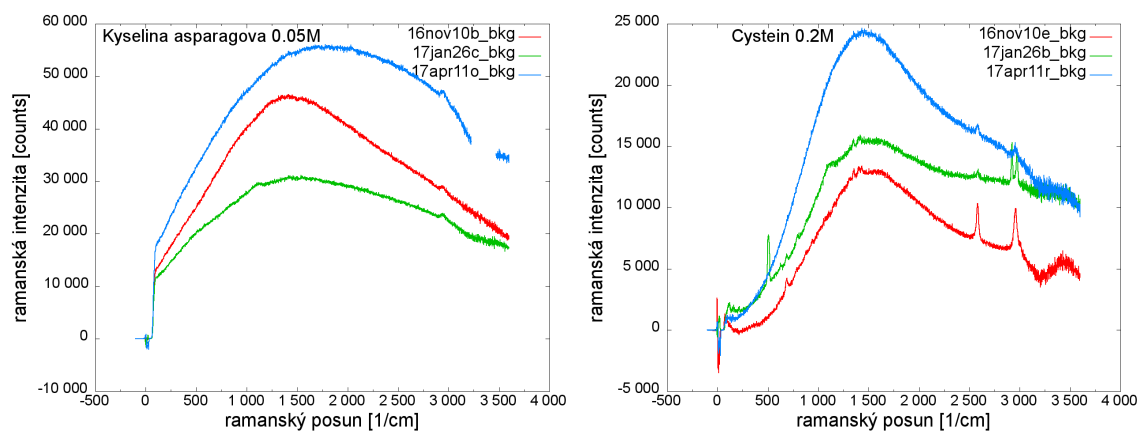
Druhou aminokyselinou, u které se luminiscence silně projevuje, je fenylalanin. Na obrázku 2.15 vlevo můžeme vidět, že po více než třech měsících má polovina spektra větší

luminiscenci, než je detektor při zvolené akumulaci schopen zachytit. O něco pomaleji stárne histidin, který je znázorněn na stejném obrázku vpravo. Dále v průběhu času luminiscence narostla u glycin a tryptofanu (obrázek 2.16).



Obrázek 2.16: Stárnutí glycinu (vlevo) a tryptofanu (vpravo).

Zvláštní aminokyselinou, která přechodně vykazuje pokles luminiscence je kyselina asparagová, kterou můžeme vidět na obrázku 2.17 vlevo. Vpravo je ramanské spektrum cysteinu, který kvůli disulfidickým můstkům vypadá z roztoku a krystalizuje na stěně kapiláry, takže klesá jeho koncentrace. Proto se v průběhu času mění jeho spektrum.

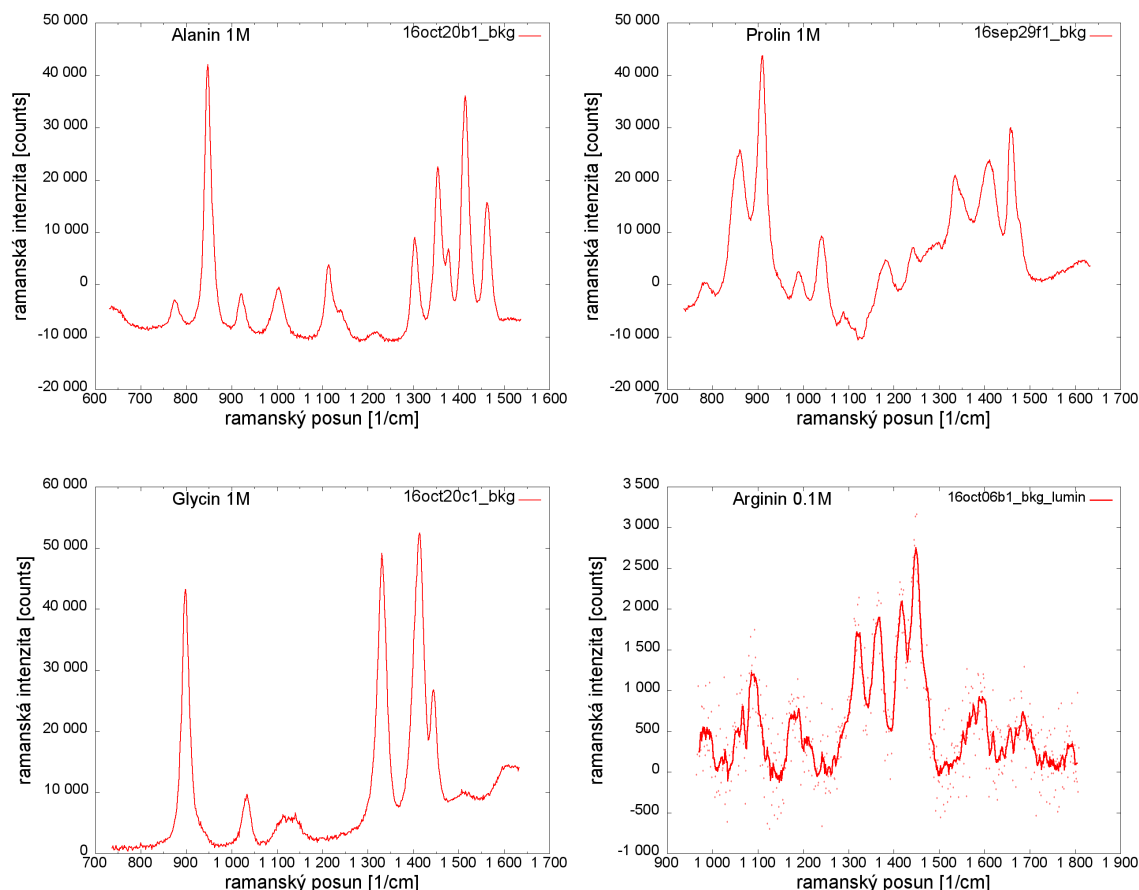


Obrázek 2.17: Stárnutí kyseliny asparagové (vlevo) a stárnutí cysteinu (vpravo).

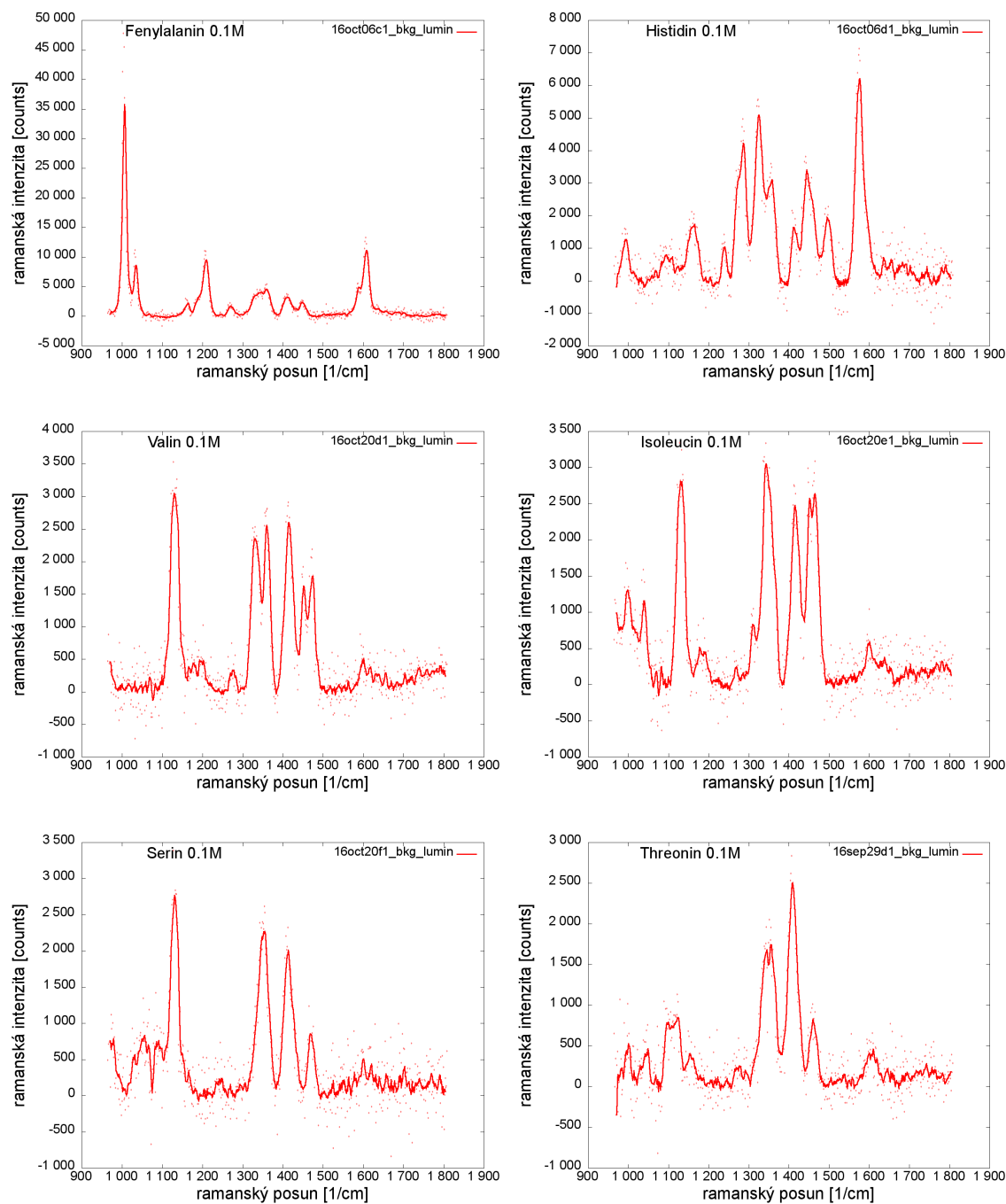
Všechna spektra byla měřena pomocí Ar laseru o vlnové délce 514 nm a výkonu 11,4 mW, při akumulaci 1×10 s, s objektivem 20 $\times$.

2.5 Spektra aminokyselin

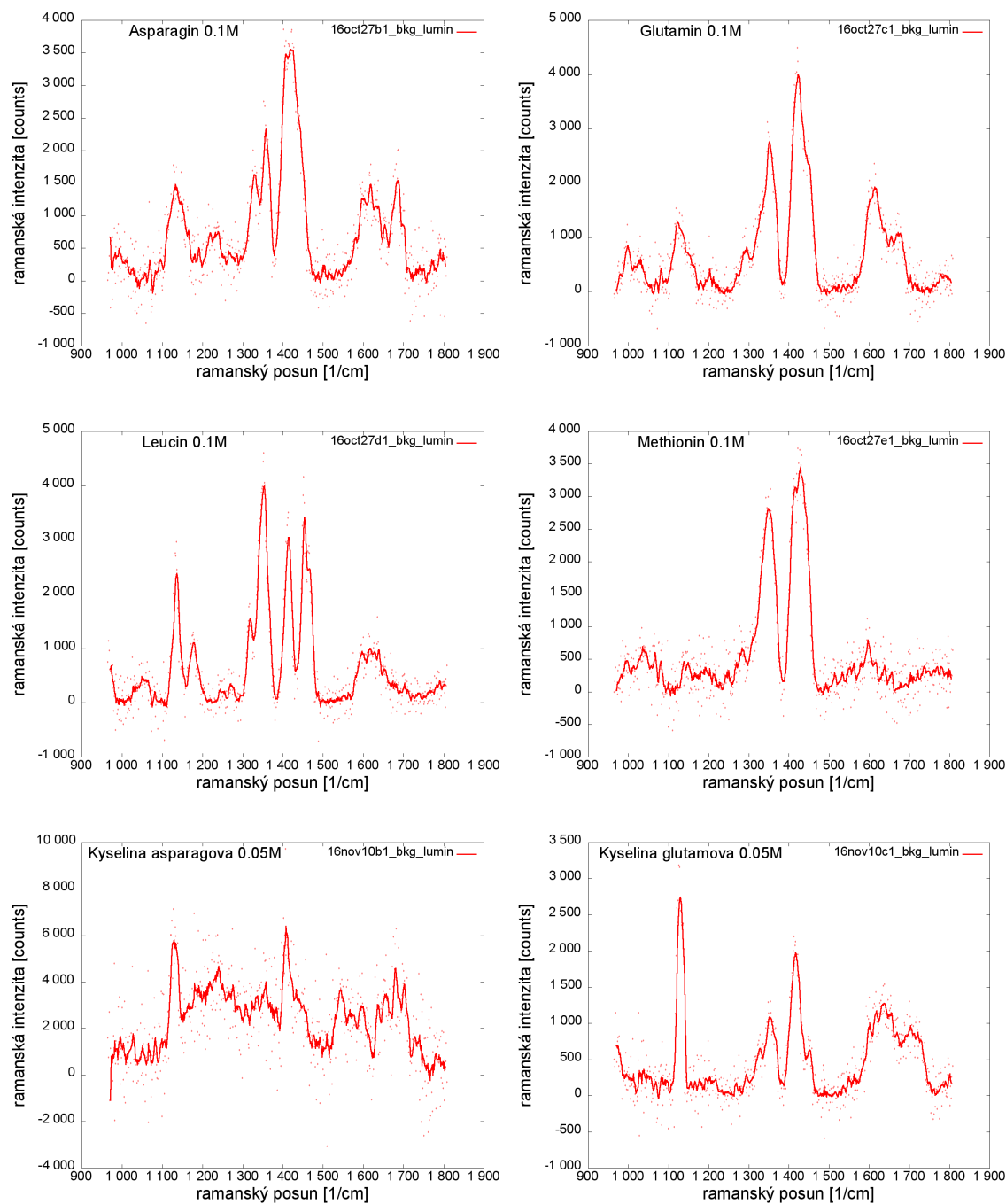
V této kapitole byla ve všech spektrech potlačena luminiscence. Všechny aminokyseliny byly měřeny ve vodném roztoku. K měření byl použit spektrometr Renishaw a zelený argonový laser o vlnové délce 514 nm a výkonu 11,4 mW na vzorku, při celkové akumulaci 100 s. Ze všech spekter bylo nejprve odečteno spektrum kapiláry s vodou, poté, pokud bylo potřeba, bylo spektrum upraveno metodou klouzavého průměru o šířce okna 100 bodů a třech opakováních.



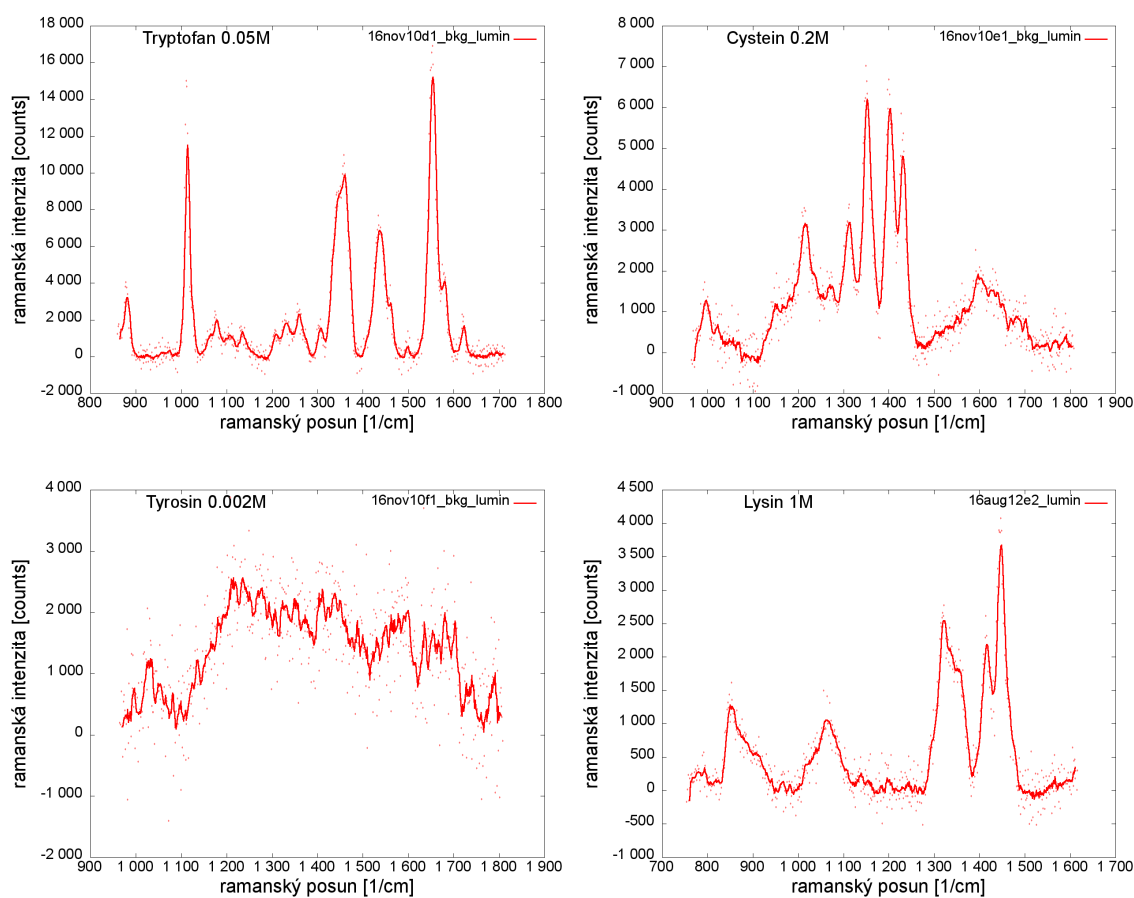
Obrázek 2.18: Ramanské spektrum alaninu 1 M, prolinu 1 M, glicinu 1 M a argininu 0,1 M.



Obrázek 2.19: Ramanské spektrum fenylalaninu 0,1 M, histidinu 0,1 M, valinu 0,1 M, isoleucinu 0,1 M, serinu 0,1 M a threoninu 0,1 M.



Obrázek 2.20: Ramanské spektrum asparaginu 0,1 M, glutaminu 0,1 M, leucinu 0,1 M, methioninu 0,1 M, kyseliny asparagové 0,05 M a kyseliny glutamové 0,05 M.



Obrázek 2.21: Ramanské spektrum tryptofanu 0,05 M, cysteinu 0,2 M, tyrosinu 0,002 M a lysinu 1 M.

2.6 Laboratorní deník

Celkem bylo naměřeno několik set spekter, přičemž celková doba všech akumulací přesáhla 1 000 minut. V tabulce je uvedeno označení a podmínky jednotlivých měření použitých v této práci.

NT-MDT:

442.Lys.x	Lys	1 M	1×10 s	He-Cd 441 nm, 25,5 mW
442.Phe.x	Phe	0,1 M	1×10 s	He-Cd 441 nm, 25,5 mW
442.Gly.x	Gly	1 M	1×10 s	He-Cd 441 nm, 25,5 mW
442.Ala.x	Ala	1 M	1×10 s	He-Cd 441 nm, 25,5 mW
H2O_10mW	H ₂ O	—	1×10 s	DPSL 532 nm, 10 mW
Ala_10mW	Ala	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 10 mW
Ala_50mW	Ala	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 50 mW
Ala_100mW	Ala	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 100 mW
Ala_200mW	Ala	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 200 mW
Ala_300mW	Ala	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 300 mW
Lys_10mW	Lys	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 10 mW
Lys_30mW	Lys	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 30 mW
Lys_50mW	Lys	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 50 mW
Lys_100mW	Lys	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 100 mW
Lys_200mW	Lys	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 200 mW
Lys_500mW	Lys	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 500 mW
Lys_1000mW	Lys	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 1000 mW
Phe_10mW	Phe	0,1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 10 mW
Phe_50mW	Phe	0,1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 50 mW
Phe_100mW	Phe	0,1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 100 mW
Phe_200mW	Phe	0,1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 200 mW
Phe_300mW	Phe	0,1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 300 mW
Phe_500mW	Phe	0,1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 500 mW
Phe_1000mW	Phe	0,1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 1000 mW
Gly_10mW	Gly	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 10 mW
Gly_30mW	Gly	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 30 mW
Gly_50mW	Gly	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 50 mW
Gly_100mW	Gly	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 100 mW
Gly_200mW	Gly	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 200 mW
Gly_300mW	Gly	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 300 mW
Gly_500mW	Gly	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 500 mW
Lys_1-22	Lys	1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 1000 mW
His_1-13	His	0,1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 1000 mW
His_pol4	His	0,1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 1000 mW
His_pol8	His	0,1 M	1×10 s	DPSL 532 nm, 1000 mW

U DPSL laseru je uváděn nominální výkon, na vzorku je kolem 20% této hodnoty. Abychom mohli porovnat spektra naměřená každé na jiném spektrometru, je potřeba přepočítat jejich intenzity. Pro přepočet bylo použito spektrum vody 17apr11a a H2O_10mW. K dosažení stejné intenzity je tedy potřeba intenzitu spekter ze spektrometru NT-MDT vynásobit 260×. Tento přepočet byl použit u spekter měřených He-Cd laserem o vlnové délce 442 nm, aby mohla být porovnána se spektry o jiných vlnových délkách měřených na přístroji Renishaw. Kvůli vysoké intenzitě byla spektra He-Cd laseru vydělena padesáti, tedy celkově vynásobena 26×.

Renishaw:

17apr11a	H ₂ O	—	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17jan19d	H ₂ O	—	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17jan19d1-12	H ₂ O	—	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
Phe_soubezna	Phe	0,1 M	50×2 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
Phe_zkrizena	Phe	0,1 M	50×2 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
Trp_soubezna	Trp	0,05 M	10×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
Trp_zkrizena	Trp	0,05 M	10×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
16oct20b	Ala	1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17jan26f	Pro	1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17mar14d	Lys	1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17mar14d1	Lys	1 M	1×10 s	He-Ne 633 nm, 6,91 mW
17mar14g	Phe	0,1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17mar14g1	Phe	0,1 M	1×10 s	He-Ne 633 nm, 6,91 mW
17mar14f	Gly	1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17mar14f1	Gly	1 M	1×10 s	He-Ne 633 nm, 6,91 mW
17mar14b	Ala	1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17mar14b1	Ala	1 M	1×10 s	He-Ne 633 nm, 6,91 mW
17jan19b	Lys	1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17jan19b1-14	Lys	1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17feb28b	Lys	1 M	20×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
17feb28c	Lys	0,1 M	20×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
17jan26r2	His	0,1 M	20×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16oct20b	Ala	1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17jan20l	Ala	1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17apr11b	Ala	1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
16oct6c	Phe	0,1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17jan26q	Phe	0,1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17apr11t	Phe	0,1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
16oct06d	His	0,1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17jan26r	His	0,1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17apr11d	His	0,1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
16oct20c	Gly	1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17jan26m	Gly	1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17apr11e	Gly	1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
16nov10b	Asp	0,05 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17jan26c	Asp	0,05 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17apr11o	Asp	0,05 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
16nov10e	Cys	0,2 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17jan26b	Cys	0,2 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
17apr11r	Cys	0,2 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
16oct20b1	Ala	1 M	10×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16sep29f1	Pro	1 M	10×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
16oct20c1	Gly	1 M	10×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16oct06b1	Arg	0,1 M	10×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16oct06c1	Phe	0,1 M	10×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16oct06d1	His	0,1 M	10×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16oct20d1	Val	0,1 M	10×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16oct20e1	Ile	0,1 M	10×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16oct20f1	Ser	0,1 M	10×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16sep29d1	Thr	0,1 M	10×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW
16oct27b1	Asn	0,1 M	10×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16oct27c1	Gln	0,1 M	10×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16oct27d1	Leu	0,1 M	10×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16oct27e1	Met	0,1 M	10×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16nov10b1	Asp	0,05 M	10×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16nov10c1	Glu	0,05 M	10×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16nov10d1	Trp	0,05 M	10×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16nov10e1	Cys	0,2 M	10×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16nov10f1	Tyr	0,002 M	10×(1×10 s)	Ar 514 nm, 11,43 mW
16aug12e2	Lys	1 M	1×10 s	Ar 514 nm, 11,43 mW

3. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo aplikovat různé metody potlačení luminiscence a s využitím těchto poznatků co nejlépe potlačit luminiscenční pozadí ve spektrech aminokyselin. Z experimentálních metod potlačení luminiscence byla použita změna vlnové délky laseru, vysvěcování luminiscence se změnou intenzity excitace a rozdíl v depolarizovanosti ramanského signálu a luminiscence. Z matematických metod byla použita metoda klouzavého průměru.

Ukázalo se, že velký vliv na luminiscenční pozadí má stárnutí vzorků, v jehož důsledku luminiscence u některých aminokyselin výrazně roste. Proto měření čerstvých vzorků velmi usnadní práci při potlačování luminiscence.

Za použití laseru o větší vlnové délce množství luminiscence výrazně kleslo, takže jsme byli schopni naměřit i spektra aminokyselin, která byla při použití laseru o kratší vlnové délce saturovaná. Klesla ale i intenzita ramanského signálu, takže klesla i kvalita spekter. Při použití laseru o kratší vlnové délce byl podle předpokladu ramanský signál silnější, nicméně vzrostlo i množství luminiscence. Při vysvěcování luminiscence se podařilo snížit luminiscenční pozadí, dokonce při použití této metody na vzorek, jehož spektrum bylo zpočátku z poloviny saturované, jsme získali téměř celé jeho spektrum. K výraznému snížení luminiscence došlo také při zvýšení intenzity excitace, čímž se podařilo získat i spektra starších vzorků a vzorků s nižší intenzitou ramanského signálu. Další použitou metodou potlačení luminiscence byl rozdíl v depolarizovanosti ramanského signálu a luminiscence, pomocí kterého se podařilo luminiscenční pozadí ze spektra odečíst. Osvědčila se i metoda klouzavého průměru, s jejíž pomocí byla ramanská spektra vyrovnána a posazena na nulovou hladinu intenzity. Nevýhodou této metody však je, že není založená na fyzikálním principu a s její pomocí je možné spektrum upravit téměř jakkoliv.

Celou situaci komplikovala nízká rozpustnost většiny aminokyselin, kvůli které byla intenzita ramanského signálu poměrně nízká. Přesto se podařilo získat spektra všech aminokyselin s potlačeným luminiscenčním pozadím.

Seznam použité literatury

- [1] G. C. Ibarrett, D. T. Elmore, *Amino Acids and Peptides*, Cambridge University Press, 2004. ISBN 0-511-03770-8.
- [2] <http://4.bp.blogspot.com/-ETKbT61-Zx0/TdENJ9rZReI/AAAAAAAAACw/KGc5c5BEgYE/s1600/Table1.jpg> (12. 3. 2017)
- [3] D. Whitford, *Proteins, Structure and Function*, John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, England, 2005. ISBN 0-471-49893-9.
- [4] R. M. J. Cotterill, *Biophysics, An Introduction*, John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, England, 2002. ISBN 0-471-48537-3.
- [5] <https://i.stack.imgur.com/3sqT7.png> (11. 5. 2017)
- [6] D. A. Long, *The Raman Effect A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*, John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, England, 2002. ISBN 0-471-49028-8.
- [7] D. J. Gardiner, P. R. Graves, *Practical Raman Spectroscopy*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1989. ISBN: 978-3-540-50254-8.
- [8] D. Curie, *Luminescence in Crystals*, Methuen and Co Ltd, Great Britain, 1963.
- [9] S. G. Schulman, *Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy: Physicochemical Principles and Practice*, Pergamon Press, ISBN 008-020499-6.
- [10] P. Atkins, R. Friedman, *Molecular Quantum Mechanics*, Oxford University Press Inc., New York, 2005. ISBN 0-19-927498-3.
- [11] L. Sommer, *Analytical Absorption Spectrophotometry in the Visible and Ultraviolet*, Elsevier Science Publishing Company, Inc., New York, 1989. ISBN 0-444-98882-3.
- [12] M. G. Gore, *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry*, Oxford University Press, 2000. ISBN 0-19-963813-6.
- [13] P. R. Carey, *Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies*, Academic Press, Inc., New York, 1982. ISBN 0-12-159650-8.
- [14] E. C. L. Ru, L. C. Schroeter, P. G. Etchegoin, *Direct Measurement of Resonance Raman Spectra and Cross Sections by Polarization Diffraction Technique*, Analytical Chemistry, 2012. DOI: 10.1021/ac300763q

- [15] H. G. Schulze, R. B. Foist, K. Okuda, A. Ivanov, R. F. B. Turner, *A Model-Free, Fully Automated Baseline-Removal Method for Raman Spectra*, Applied Spectroscopy, 2011. DOI: 10.1366/10-06010
- [16] H. G. Schulze, R. B. Foist, K. Okuda, A. Ivanov, R. F. B. Turner, *A Small-Window Moving Average-Based Fully Automated Baseline Estimation Method for Raman Spectra*, Applied Spectroscopy, 2012. DOI: 10.1366/11-06550
- [17] https://is.muni.cz/auth/th/379675/prif_b/Bakalarska_praca-Zuzana_Svobodova_ajptebuf.pdf
- [18] <http://mackenzie.chem.ox.ac.uk/teaching/Raman%20Scattering.pdf> (5. 5. 2017)
- [19] M. Fleck, A. M. Petrosyan, *Salts of Amino Acids: Crystallization, Structure and Properties*, Springer International Publishing, Switzerland, 2014. ISBN 978-3-319-06299-0.
- [20] F. A. Bettelheim, W. H. Brown, M. K. Campbell, S. O. Farrell, *Introduction to Organic and Biochemistry, Seventh Edition*, Brooks/Cole, Belmont, USA, 2010. ISBN-13: 978-0-495-39116-6.

