

Vliv hydrofobního povrchu na zasychání vzorku pro Ramanovu spektroskopii kapkově nanášených povlaků

Alžběta Oplištilová

19.9.2017

Obsah

1	Teorie	2
1.1	Vypaření kapky - vznik kávového kroužku	2
1.1.1	Marangoniho efekt	3
1.1.2	Tvar molekul suspendovaných látek	3
1.1.3	Využití jevu kávového kroužku	3
1.2	Ramanův jev	4
1.2.1	Princip experimentu	5
1.2.2	Základní veličiny a jednotky	6
1.2.3	Fyzikální podstata jevu	7
1.2.4	Historie	7
1.2.5	Využití Ramanovy spektroskopie	8
1.3	Ramanova spektroskopii kapkově nanášených povlaků	9
2	Pomůcky	9
3	Postup	10
3.1	Příprava vzorků	10
3.1.1	Riboflavin (vitamin B2)	10
3.1.2	Kyselina pikolinová (2-Picolinic acid)	11
3.1.3	Kyselina dipikolinová (2,6-Pyridinedicarboxylic acid)	12
3.2	Měření spekter	13
4	Výsledky měření	14
4.1	Spektra podložních materiálů	14
4.1.1	Podložní sklíčko	14
4.1.2	Fluorid vápenatý CaF_2	15
4.2	Riboflavin	15
4.2.1	Riboflavin ve formě prášku	15
4.2.2	Kapka roztoku riboflavinu na podložním sklíčku	16
4.2.3	Riboflavin na skle	17
4.2.4	Riboflavin na skle	20
4.2.5	Riboflavin na CaF_2 - koncentrace c	22
4.2.6	Riboflavin na CaF_2 - koncentrace 0,1c	24
4.2.7	Riboflavin na ocelové destičce s teflonovou vrstvou SpectRIM	27
4.2.8	Riboflavin na ocelové destičce s teflonovou vrstvou - 0,1c	30
4.2.9	Riboflavin na ocelové destičce s teflonovou vrstvou - 0,02c	32
4.2.10	Riboflavin - porovnání spekter různých koncentrací	35
4.3	Kyselina pikolinová (PA)	36
4.3.1	Kyselina pikolinová na leštěném nerez s 50 nm teflonu	36
4.3.2	Kyselina pikolinová na CaF_2	44
4.4	Kyselina dipikolinová (DPA)	48
4.4.1	Kyselina dipikolinová na leštěném nerez s 50 nm teflonu	48
4.4.2	Kyselina dipikolinová na CaF_2	52
5	Závěr	58
6	Seznam literatury	59

1 Teorie

1.1 Vypaření kapky - vznik kávového kroužku

Děj vysychání kapky probíhá ve dvou fázích – v první se sníží kontaktní úhel mezi kapkou a její podložkou, v druhé fázi se zmenšuje poloměr kapky r , dokud se celá nevypaří.

Díky povrchovému napětí si kapka udržuje na hydrofobním povrchu konstantní poloměr. Kapalina v kapce se vypařuje tím více, čím větší je zakřivení volné hladiny. Nejvýrazněji se tedy vypařuje na okraji kapky. Vypařovací tok $J(r)$ proto musí snižovat výšku kapky $h(r)$ a ta se tak stává plošší. Narůstající odpařování kapaliny směrem k perimetru kapky vede k deficitu kapaliny v okrajových částech, což vede ke vzniku proudění (obr. 1) směrem od středu kapky. Proudění kompenzuje ztrátu kapaliny na okraji kapky a unáší částičky v kapalině směrem k okrajovým částem. Pokud by proudění nevzniklo, snížila by se výška v každém bodě a kapka by zmenšila svůj poloměr r . Za infinitezimální čas se tak odpaří tenká vrstvička, která se směrem k okraji zmenšuje. Rychlost proudění je dána vypařovacím tokem. V první fázi tedy dochází ke snižování kontaktního úhlu.

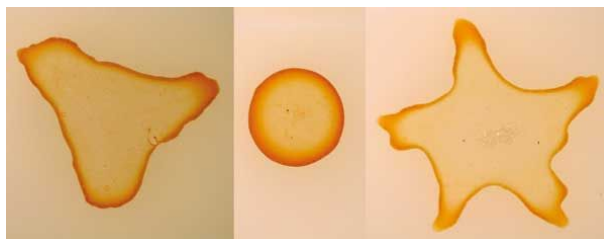


Obrázek 1: Proudění vzniklé při vysychání kapky [1]

V druhé fázi je kontaktní úhel již příliš malý. Těsně před úplným odpařením vysychají kapky tak, že se postupně odpařuje voda z okrajů a kapka zmenšuje svůj poloměr r , tedy i perimetr o . Po odpaření kapky zůstane na povrchu kroužek z částic, které na její původní perimetr odneslo vzniklé proudění. Tento jev můžeme pozorovat po odpaření kapky kávy, čaje či deště s prachovými částicemi. K jevu kávového kroužku (obr. 2) tedy dojde, pokud jsou splněny následující požadavky:

1. Kapka roztoku musí být na hydrofobním povrchu - kontaktní úhel kapky a povrchu je nenulový.
2. Perimetr kapky zůstává při vypařování stejný.
3. Rozpuštědlo se odpařuje.

Kroužek kolem kapky závisí na koncentraci rozpuštěné látky, nevzniká při vysoké koncentraci rozpuštěné látky v roztoku. Existuje i několik fyzikálních jevů, které rozvrací vznik kávového kroužku i při nízké koncentraci: Marangoniho efekt a eliptický tvar rozptýlených částic.

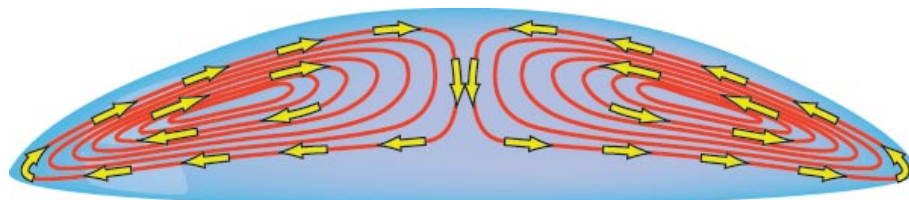


Obrázek 2: Kávový kroužek po odpaření kávových kapek [1]

1.1.1 Marangoniho efekt

Marangoniho efekt pojmenovaný podle italského fyzika Carla Marangoni spočívá ve vzniku proudění podél rozhraní dvou kapalin vlivem gradientu povrchového napětí. Kapalina s větším povrchovým napětím má tendenci nasávat kapalinu s menším povrchovým napětím. Pokud tedy gradient existuje, bude kapalina proudit pryč z oblasti s nižším povrchovým napětím do oblasti s vyšším povrchovým napětím.

Tento jev se může projevit i v kapce kapaliny, protože tím, jak se kapalina na povrchu kapky odpařuje, dochází k jejímu ochlazení. Povrchové vrstvy jsou tedy chladnější - mají vyšší povrchové napětí. Nejchladnější část kapaliny (s největším povrchovým napětím) se nachází na okraji kapky, kde dochází k největšímu vypařování, a proto vznikne proudění na rozhraní kapalin s jiným povrchovým napětím podle šipek na obrázku 3, aby zůstal zachován poloměr kapky r . Kapalina s největší teplotou (s nejmenším povrchovým napětím) se nachází ve středu kapky u povrchu. Kapalina tedy proudí z tohoto místa k okraji kapky. Při proudění některé částice adsorbují k povrchu a ostatní recirkulují. Mají tendenci shromáždit se uprostřed kapičky, nevytvoří kroužek. Většinou se ale oba jevy promísí a částice se nenahromadí ve středu. Tento jev můžeme pozorovat u organických rozpouštědel.



Obrázek 3: Marangoniho efekt [1]

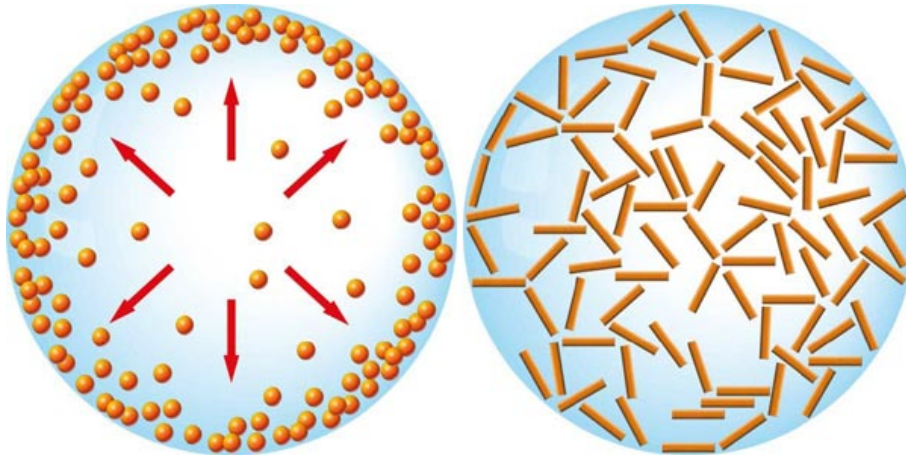
1.1.2 Tvar molekul suspendovaných látek

Další případ, kdy jev kávového kroužku nenastane, byl objeven v roce 2011 [1] a spočívá ve změně tvaru suspendovaných částic, například na elipsoidní tvar. To, že významnou roli hraje i tvar částic, vyjde najevo, pokud se uměle zvýší povrchové napětí a co nejvíce se zamezí pohybu částic v kapce. Elipsoidní částice se během vysychání kapky přimknou k rozhraní voda-vzduch, příčné kapilární síly je budou tlačit k sobě a částice vytvoří agregované struktury na povrchu vysychající kapky. Elipsoidní částice podléhají díky působícím kapilárním silám křupinkovému efektu a uplatňují se zde jejich tvar.

Dochází totiž k tomu, že kapalina smáčející jejich povrch deformuje rozhraní voda-vzduch, hladina se zvedá uprostřed velké poloosy a je tlačena dolů u pólů elipsoidu. Výsledná deformace vede k silným příčným kapilárním silám, které přitahují elipsoidní částice k sobě a utváří tak jejich volné seskupení nebo větší kvazistatické agregáty. Pokud je poloměr os elipsoidu větší než 2,5, vzniklé agregáty homogenně pokrývají hladinu kapaliny a rozvrátí tak efekt kávového kroužku viz obr. 4.

1.1.3 Využití jevu kávového kroužku

Jev kávového kroužku v některých oborech představuje nepříjemnost, například se s ním musí vypořádat výrobci bublinkových tiskáren. Nicméně v některých oborech je tento jev vítaný, jako při vytváření nových optických materiálů nebo filmů. Zde je hromadění částic v určitém místě vítané. Cíleného zkoncentrování biomolekul, jako jsou např. proteiny, lipidy, myoglobin atd., se využívá při Ramanově spektroskopii kapkově nanášených povlaků.



Obrázek 4: Uspořádání suspendovaných částic podle tvaru molekul [1]

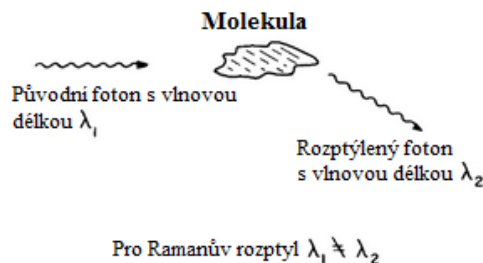
1.2 Ramanův jev

Ramanův jev je nepružný (neelastický) rozptyl (obr. 5). Je pozorován při interakci mezi fotony dopadajícího světla s vibračními stavy atomů nebo molekul, kdy rozptýlené záření má jinou vlnovou délku (resp. energii fotonů) než dopadající záření (obr. 6). Dopadající světlo (laser) interaguje se vzorkem následovně:

1. Většina záření projde
2. Část fotonů se absorbuje
3. 10^{-4} fotonů se rozptýlí elasticky (Rayleighův rozptyl)

Nejčastěji laserový paprsek excituje molekulu v základním stavu do virtuálního stavu, a při návratu z virtuálního stavu zpět se vyzáří foton se stejnou vlnovou délkou (stejnou energií), jakou měl původní foton. Zde není přenášena žádná analytická informace a nemění se energie molekuly.

4. 10^{-6} až 10^{-8} fotonů se rozptýlí neelasticky (Stokesovy a antistokesovy linie) - dojde ke změně energie fotonů a tudíž i ke změně jejich vlnové délky. Navíc platí zákon zachování energie, takže se musí nabytá a ztracená energie rovnat změně energie celé molekuly - proběhne změna energetické hladiny molekuly.

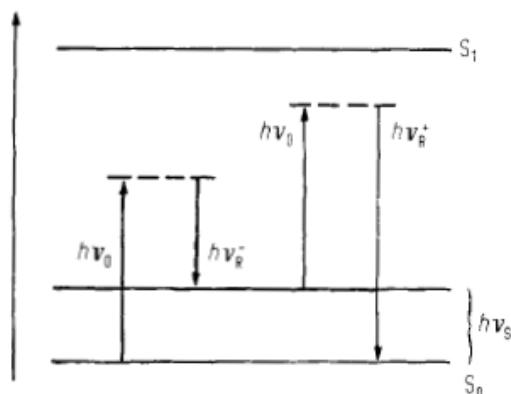


Obrázek 5: Princip Ramanova rozptylu [2]

Pokud se molekula po excitaci do virtuálního stavu vrátí do vyšší kvantové hladiny, než ve které byla, vyzáří se foton s větší vlnovou délkou (s menší energií) - tzv. Stokesův foton. Energie molekuly tedy vzroste, aby byl splněn zákon zachování energie.

Naopak, pokud se molekula původně nenacházela v základním stavu, ale na vyšší kvantové hladině a vrací se na základní hladinu, vyzáří se foton s menší vlnovou délkou (s větší

energií) – tzv. Anti-Stokesův foton. Energie molekuly se tudíž zmenší, aby byl splněn zákon zachování energie.

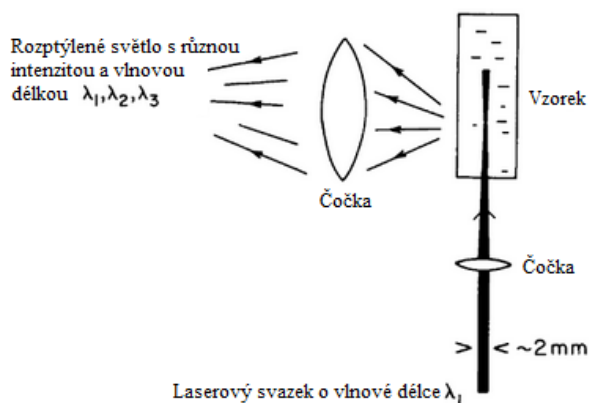


Obrázek 6: Ramanův rozptyl [3]

Ramanova spektroskopie (RS) sleduje neelastický rozptyl fotonů. Navzdory tomu, že je Ramanův rozptyl slabý, nachází široké uplatnění v mnoha vědách. Byly totiž vyvinuty techniky, které signál zesilují, a to například povrchem zesílený Ramanův rozptyl. Tyto techniky jsou použitelné pro silně zředěné roztoky biomolekul.

1.2.1 Princip experimentu

Jako světelný zdroj monochromatického světla se používá laser o vlnové délce λ . Laserový svazek je namířen do vzorku, takže vznikají fotony, u kterých je analyzována jejich vlnová délka a intenzita. Schéma Ramanova pokusu je znázorněno na obrázku 7. Na obrázku 8 je zobrazeno Ramanovo spektrum vody.



Obrázek 7: Princip Ramanova experimentu [2]

Na grafu vidíme dva pásy s vyšší intenzitou. První znázorňuje deformační vibrace - změnu úhlu mezi vodíky v molekule vody. Druhý pás jsou valenční vibrace vzniklé měnicí se délkou vazby vodíku na kyslík. Obě maxima tedy vzniknou výměnou energie mezi přicházejícími fotony a vibračním pohybem měnicí se buď délkou vazby O-H nebo úhlem v molekule vody.

Ramanův posun představuje změny energie. Nula odpovídá Rayleighovu posunu, napravo na kladné x-ové ose najdeme Stokesovu větev a nalevo na záporné x-ové ose Anti-Stokesovu větev.

1.2.3 Fyzikální podstata jevu

Fyzikální podstatu Ramanova rozptylu můžeme vysvětlit dvěma způsoby. Podle klasického přístupu, pokud ozáříme molekuly světlem o frekvenci ν_0 , dojde k rozkmitání jejího elektronového obalu, čímž vznikne dipólový moment. Molekula se stane zdrojem sekundárního světelného záření o frekvenci kmitů tohoto dipólu o velikosti p , která bude úměrná elektrické intenzitě E

$$p = \alpha E = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t). \quad (5)$$

Konstantou úměrnosti bude polarizovatelnost α , která říká, jak snadno se vychylují elektrony v molekule, pokud působí elektrické pole. Tím jak molekula vibruje, mění svoji geometrii, a tedy i polarizovatelnost. Molekula tedy bude vysílat záření nestálé frekvence. Pokud budeme mít molekulu, která kmitá frekvencí f bude se její polarizovatelnost měnit s časem t jako

$$\alpha = \alpha_0 + \Delta\alpha \cos(2\pi f t). \quad (6)$$

Časovou změnu dipólu dostaneme dosazením α do vztahu (5)

$$p = [\alpha_0 + \Delta\alpha \cos(2\pi f t)] E_0 \cos(2\pi\nu_0 t). \quad (7)$$

Po roznásobení a úpravě dostaneme vztah

$$p = \alpha_0 E_0 \cos[2\pi(\nu_0 + f)t] + \frac{1}{2} \Delta\alpha E_0 \cos[2\pi(\nu_0 + f)t] + \frac{1}{2} \Delta\alpha E_0 \cos[2\pi(\nu_0 - f)t]. \quad (8)$$

Spektrum Ramanova rozptylu se tedy skládá z dvojic čar symetricky rozložených kolem čary elasticky rozptýleného Rayleighova záření o frekvenci ν_0 . Polohy čar Ramanova rozptylu se určují posunem vůči budící frekvenci ν_0 . Oblast nižších frekvencí se nazývá *Stokesova* a oblast vyšších frekvencí *anti-Stokesova* větev Ramanova spektra.

Z pohledu kvantové fyziky popisujeme Ramanův rozptyl jako výsledek zářivého přechodu mezi dvěma vibračními stavy o energiích E_1 a E_2 . Foton budícího záření o frekvenci ν_0 zaniká a současně je emitován foton s odlišnou frekvencí ν_R . Z podmínky zachování energie pak musí frekvence ν_R splňovat

$$h\nu_R = h\nu_0 \pm (E_1 - E_2) \quad (9)$$

Jelikož za běžných podmínek je nejvíce molekul v základním vibračním stavu, ze kterého nemůže dojít k anti-Stokesovu přechodu ($\nu_R > \nu_0$), je záření anti-Stokesovy větve podstatně slabší než záření větve Stokesovy. Nicméně Ramanův rozptyl je i ve Stokesově větvi vůči Rayleighovu rozptylu velmi slabý, protože jen asi jeden z milionu fotonů je rozptýlen neelasticky.

1.2.4 Historie

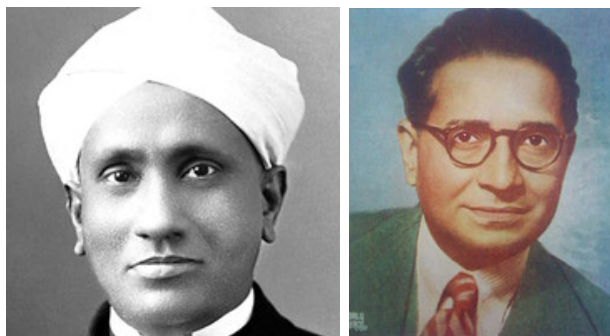
Jev neelastického (nepružného) rozptylu objevil roku 1928 indický fyzik Chandrasekhara Venkata Raman (1888 – 1970) viz obr. 9. V září 1921 se vrátil do Bombaje z první zahraniční cesty do Evropy. Fascinovala ho modř Středozemního moře a začal se tak věnovat studiu otázky „Proč je moře modré?“. Nesouhlasil s tvrzením lorda Rayleigha, který vysvětlil otázku „Proč je nebe modré?“ – pomocí Rayleighova jevu, že modř moře je pouhým odrazem barvy nebe.

V Kalkatě hledal Raman se svým studentem K. S. Krishnanem (1898 – 1961) viz obr. 9 analogii Comptonova jevu. Pro výzkum neelastického rozptylu v kapalinách sestavili aparaturu, kde sluneční světlo z heliostatu bylo fokusováno sedmipalcovým objektivem dalekohledu a krátkoohniskovou čočkou přes modrofialový filtr do baňky s kapalinou. Do dráhy rozptýleného

světla pak umístili druhý, zelený filtr. Sledovali něco jako fluorescenci. Jev však byl příliš slabý na to, aby zaznamenali jeho spektrum. Po sérii polarizačních pokusů si uvědomili, že nejde o fluorescenci – záření bylo více polarizované, než poskytuje fluorescenci. 28. 10. 1928 poprvé zaznamenali spektrum nového „typu záření“. Poprvé pozorovali Ramanův jev - světlo, které prošlo kapalinou mělo jinou vlnovou délku. Raman dostal 10. 12. 1930 Nobelovu cenu za „práci na rozptylu světla a za objev efektu pojmenovaném po něm“.

Objev Ramanova jevu byl velmi brzy potvrzen v řadě článků francouzských vědců. Až do 40. let se Ramanova spektra zaznamenávala pouze na fotografický film. Ramanův spektrometr se poprvé objevil během druhé světové války a po válce existovaly i komerčně dostupné. V 60. letech nastal významný rozvoj s příchodem laseru, který představoval ideální zdroj intenzivního monochromatického světla. V 70. letech se lasery staly standardní součástí Ramanových spektrometrů. Zatím posledním významným krokem ve vývoji techniky RS byly v 80. letech diodové řádky a v 90. letech CCD detektory umožňující získávat velmi slabá spektra.

Vyvinuly se i další techniky Ramanovy spektroskopie, například Ramanova mikroskopie, rezonanční Ramanova spektroskopie (RRS), Stimulovaný Ramanův rozptyl, Koherentní anti-Stokesova Ramanova spektroskopie (CARS), Hyper-Ramanova spektroskopie, Povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS), Ramanova optická aktivita (ROA) ...



Obrázek 9: C. V. Raman (nalevo) a K. S. Krishnan (napravo) [4], [5]

1.2.5 Využití Ramanovy spektroskopie

Ramanova spektroskopie je univerzální typ spektroskopie, který nachází využití ve většině přírodních věd, technice i průmyslu. Užitečnost Ramanovy spektroskopie spočívá v faktu, že vibrační spektrum molekuly poskytuje velmi přesné informace o chemických vlastnostech látky. Vibrační spektra odhalují uspořádání atomových jader a chemických pászů uvnitř molekul a jejich bezprostřední okolí.

Používá se v materiálovém výzkumu na studium čistoty a tloušťky připravených polovodičových a polymerních vrstev jako test kvality. Ve forenzních vědách se pomocí RS analyzují nepatrné vzorky a nedojde k jejich poškození – analýza drog, tkanin a vláknin, identifikace výbušnin, a to i na velké vzdálenosti (několik stovek metrů). V archeologii a kunsthistorii se užívá RS především při studiu složení pigmentů. Nenahraditelná je při identifikaci původu drahých kamenů, na základě spektra lze určit přesnou lokalitu. RS také dokáže odhalit dokonalé padělky starověkých skleněných nádob. V oblasti ochrany životního prostředí pomáhá při analýze a identifikaci polutantů v životním prostředí. Lze analyzovat půdy, odpadní vody i plyny. Ve farmacii lze díky RS sledovat obsah účinných látek v tabletě i rovnoměrnost distribuce léčiva v jednotlivých tabletách. V molekulární biologii lze RS zkoumat procesy jinak nedostupné jiným technikám (fibrilace proteinů vedoucí k Alzheimerově nemoci) nebo lze nahlédnout na strukturu nukleové kyseliny uvnitř virové kapsidy. Ramanova mikroskopie společně s pokrokem

v počítačové technice umožnil v posledních 20 letech využívání RS v biomedicíně. Otevřela se tam možnost studovat jednotlivé buňky, tkáně či biologické tekutiny.

Ramanova spektroskopie figuruje i ve výzkumu vesmíru. Za posledních dvacet let se podařilo překonat překážky spojené s fungováním techniky v mimozemských podmínkách – přístroj musel být malý, ale zároveň robustní, aby vydržel dopad sondy na povrch, musel spotřebovávat málo energie, ale přesto být dostatečně citlivý a výkonný. Byla také vytvořena nová koncepce – „zkoumání na dálku“. Ramanův spektrometr se tak stal součástí Evropského robotického vozítka pro průzkum Marsu ExoMars. Ramanův spektrometr váží 2 kg a při měření má spotřebu jen 30 W. Přístroj bude určen pro identifikaci hornin a organických látek v nichž přítomných, které by mohly svědčit o přítomnosti života na Marsu. Další vhodný cíl pro využití Ramanovy spektroskopie je na planetě Venuše, kde by se uplatnil hlavně Ramanův spektrometr pro vzdálený výzkum. V budoucnu můžeme očekávat, že se bude provádět výzkum pomocí Ramanovy spektroskopie i z orbitální dráhy.

1.3 Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků

Pokud chceme Ramanův signál zesílit, je třeba zvýšit koncentraci vzorku. To lze zajistit odstraněním rozpouštědla při vysychání kapky. Například pokud vyschne kapka o objemu 2 μl s průměrem 1,56 mm na objem 10 μl , pak signál vzroste více než $3 \cdot 10^6$ x. Zvýšení koncentrace vzorku využívá technika kapkově nanášených povlaků (Drop Coating Deposition Raman - DCDR) objevená v roce 2003. Roztok se nanese na hydrofobní povrch a po vyschnutí kapky zbude buď "kávový kroužek"- kapalina se koncentruje podél kontaktní linie, nebo nehomogenně do různých skvrn. DCDR umožňuje měření i roztoků s koncentrací molekul menší než 1 μM ($\text{M} = 1 \text{ mol/l}$) a zkoumané vzorky nepoškodí.

Při Ramanově spektroskopii kapkově nanášených povlaků je třeba Ramanův spektrometr (spektrometr spojený s mikroskopem), protože prstenec po vyschlé kapce je velmi úzký (po kapce o objemu 2 μl s průměrem 1,5 mm zanechá prstenec šířky pouhých několik mikrometrů).

Vhodná podložka musí být hydrofobní a musí mít slabý Ramanův signál, aby nepřekrýval signál zkoumané látky. Mezi méně nevhodné podložky patří sklo a pravděpodobně nejlepší výsledky lze dosáhnout s leštěnou ocelovou destičkou s napařenou 50 nm vrstvou teflonu - jedná se o komerční destičku od firmy SpectRIMTM (dříve Tienta Sciences, Inc.). Ocelový povrch funguje jako zrcátko a do objektivu mikroskopu jsou odraženy i fotony rozptýlené původně směrem do podložky, což dále zvyšuje intenzitu Ramanova signálu. Kontaktní úhel této destičky s kapkou vody je 122°. Vhodným povrchem je také leštěná destička z fluoridu vápenatého. Nami použitá destička byla připravena v optické dílně MFF v Tróji. Kontaktní úhel mezi destičkou a kapkou vody je 89°.

Metoda DCDR umožňuje měřit v krátkých časových intervalech ve velmi nízkých koncentracích, zhruba o tři řady menší než standardní Ramanova spektroskopie.

2 Pomůcky

- Zkumavky eppendorf 5 ml a 2 ml
- Pipetmany (1000 μl , 5000 μl , 200 μl , 100 μl , 10 μl)
- Látky na přípravu vzorků: deionizovaná voda, kyselina pikolinová, kyselina dipikolinová, riboflavin (zakoupeno od firmy Sigma-Aldrich)
- Stříčky s destilovanou vodou a ethanolem (čištění nástrojů)

- Kádinka
- Míchačka roztoků
- Naběrací nástroj
- Stroj na deionizaci vody
- Plášť, rukavice
- Ramanův mikrospektrometr (mikroskop spojený se spektrometrem) HR800 Horiba Jobin-Yvon
- Podložní sklíčka
- Vzorek křemíku na ověření kalibrace
- Destička z leštěného nerezů s 50 nm vrstvou teflonu od firmy TIENTA SpectRIM™
- Destička z leštěného fluoridu vápenatého (CaF_2)

3 Postup

3.1 Příprava vzorků

Nejprve si připravíme roztoky o objemu 5 ml z tří látek: kyseliny pikolinové (2-Picolinic acid), kyseliny dipikolinové (2,6-Pyridinedicarboxylic acid) a Riboflavinu (vitamin B2), všechny látky pochází od firmy Sigma-Aldrich. Jako rozpouštědlo použijeme deionizovanou vodu.

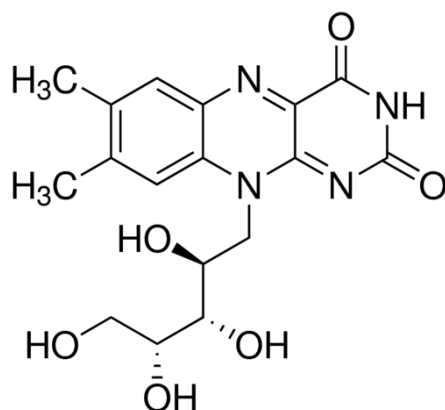
3.1.1 Riboflavin (vitamin B2)

Riboflavin řadíme chemicky mezi flaviny. Jedná se o žluté až oranžové barvivo přírodního původu, které jemně fluoreskuje. Samotný vitamin B2 si dokáží rostliny a mikroorganismy sami syntetizovat, člověk a živočichové obecně si jej však syntetizovat sami neumí a musí ho přijímat potravou. Vzhledem k faktu, že vitamin B2 je rozpustný ve vodě, organismus si jej neukládá a nevyužitý vitamin B2 odchází z organismu pryč močí. Je tepelně stálý, ale rozkládá se působením světla, vydrží tedy vysoké teploty. To je velmi výhodné při zpracování potravin obsahující tento vitamin, které můžeme bez obav tepelně upravovat. Výborným zdrojem vitaminu B2 je řada rozmanitých potravin jako jsou vnitřnosti (játra, ledvinky), vejce, vepřové a hovězí maso. Děti mohou tento vitamin přijímat i prostřednictvím tvarohu, mléka a kakaa. Vitamin B2 obsahují i veškeré potraviny obsahující ve svém složení složku označenou E 101.

Vitamin B2 patří k jednomu z univerzálních vitaminů, je důležitý pro tvorbu nových buněk - pokožky, vlasů nebo nehtů, obstarává správnou funkci očí převáděním krátkovlnných modrých paprsků na žlutozelené, čímž obdobně jako retinol ovlivňuje vidění za šera. Dále posiluje srdeční aparát a ovlivňuje mnoho dalších orgánů. Svůj nepostradatelný vliv má i na celkový metabolismus organismu, kde ve formě koenzymů FMN (flavinmononukleotid) a FAD-(flavindinukleotid) zasahuje do metabolismu cukrů, aminokyselin a tuků, čímž přímo ovlivňuje energetické přeměny v organismu. Riboflavin také ovlivňuje nervovou soustavu, mozek a při vyšší fyzické námaze napomáhá v přenosu kyslíku svalovým buňkám.

- Katalogové číslo firmy Sigma-Aldrich: R4500-5G

- Sumární vzorec $C_7H_{20}N_4O_6$
- Strukturní vzorec viz obrázek 10
- Molekulární váha: 376,36 g/mol
- Maximální rozpustnost ve vodě: 84,7 g/l
- Čistota látky: $\geq 98\%$



Obrázek 10: Strukturní vzorec ryboflavinu

Výpočet koncentrace roztoku riboflavinu

Výpočet koncentrace roztoku c , do kterého bylo rozpuštěno 0,0847 mg riboflavinu:

$$1 \text{ M} \dots 376,367 \text{ mg} \dots 1 \text{ ml}$$

$$c \text{ M} \dots 0,0847 \text{ mg} \dots 1 \text{ ml}$$

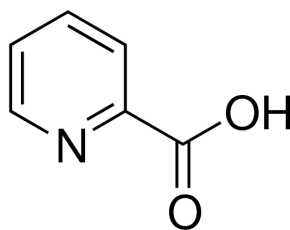
$$c = \frac{0,0847}{376,367} = 2,25 \cdot 10^{-4} \text{ M} = 0,225 \text{ mM}$$

Koncentrace námi připraveného roztoku riboflavinu je $c = 0,225 \text{ mM}$.

3.1.2 Kyselina pikolinová (2-Picolinic acid)

Pikolinová kyselina je produkt rozkladu L-tryptofanu v lidském těle. Váže kovové ionty. Vykazuje vysokou antimikrobiální aktivitu při pH = 5,0 a 7,0. Kyselina pikolinová a její soli představují nový potenciální konzervační prostředek pro potraviny a kosmetické prostředky.

- Katalogové číslo firmy Sigma-Aldrich: P42800-5G
- Sumární vzorec: $C_6H_5NO_2$
- Strukturní vzorec viz obrázek 11
- Molekulární váha: 123,11 g/mol
- Maximální rozpustnost ve vodě: 5 g/l
- Čistota látky: 99 %



Obrázek 11: Strukturální vzorec kyseliny pikolinové

Výpočet koncentrace roztoku kyseliny pikolinové

Maximální koncentrace roztoku c :

1 M 123,11 mg 1 ml

c M 887,00 mg 1 ml

$$c = \frac{887}{123,11} = 7,2 \text{ M}$$

Maximální koncentrace roztoku kyseliny pikolinové je $c = 7,2 \text{ M}$.

Výpočet koncentrace roztoku c , do kterého se rozpustilo 85 mg kyseliny pikolinové:

1 M 615,55 mg 5 ml

c M 85 mg 5 ml

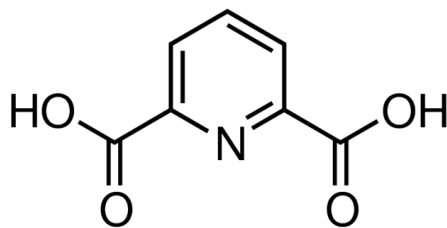
$$c = \frac{85}{615,55} = 138 \text{ mM}$$

Koncentrace námi připraveného roztoku kyseliny pikolinové je $c_1 = 138 \text{ mM} \doteq 14 \text{ mM}$. Tento roztok jsme rozředili na koncentrace $c_2 = 14 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ a $c_3 = 14 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Dále jsme připravili roztok o koncentraci $c = 10^{-3} \text{ mM}$ a rozředili jsme jej na koncentrace $c_4 = 10^{-4} \text{ M}$, $c_5 = 10^{-5} \text{ M}$ a $c_6 = 10^{-6} \text{ M}$.

3.1.3 Kyselina dipikolinová (2,6-Pyridinedicarboxylic acid)

Dipikolinová kyselina (DPA) společně s vápníkem je součástí endosporu bakterií (např. *Bacillus Anthrax*), jenž pravděpodobně chrání spory před extrémními podmínkami. Syntetizuje ji mateřská buňka. V přírodě je přítomna jako degradační produkt vitaminů, koenzimů a alkaloidů. Patří mezi silné organické kyseliny.

- Katalogové číslo firmy Sigma-Aldrich: P63808-25G
- Sumární vzorec $\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_4$
- Strukturální vzorec viz obrázek 12
- Molekulární váha: 167,12 g/mol
- Maximální rozpustnost ve vodě: 887 g/l
- Čistota látky: 99 %



Obrázek 12: Strukturální vzorec kyseliny dipikolinové

Výpočet koncentrace roztoku kyseliny dipikolinové

Maximální koncentrace roztoku c :

1 M 167,12 mg 1 ml

c M 5 mg 1 ml

$$c = \frac{5}{167,12} = 30 \text{ mM}$$

Maximální koncentrace roztoku kyseliny dipikolinové je $c = 30 \text{ mM}$.

Výpočet koncentrace roztoku c , do kterého se rozpustilo 24,45 mg kyseliny dipikolinové:

30 mM 25 mg 5 ml

c M 24,45 mg ... 5 ml

$$c = \frac{24,45}{25} \cdot 30 = 29,34 \text{ mM}$$

Koncentrace námi připraveného roztoku kyseliny dipikolinové je $c = 29,34 \text{ mM} \doteq 30 \text{ mM}$.
Roztok jsme rozředili na koncentrace $c_1 = 3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $c_2 = 3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ a $c_3 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

3.2 Měření spekter

Měření spekter budeme provádět pomocí Ramanova mikrospektrometru HR800 Horiba Jobin-Yvon a programu LabSpec. Před každým měřením ověřujeme kalibraci pomocí vzorku křemíku, jehož ostrý pás je $520,7 \text{ cm}^{-1}$. K ověření kalibrace používáme objektiv x10, excitační vlnová délka laseru je $\lambda = 632,816 \text{ nm}$, poloha mřížky spektrometru 600 cm^{-1} .

Každý vzorek připravíme na podložní sklíčko a umístíme pod Ramanův mikrospektrometr. Nejprve provedeme fokusaci. Zapneme na program kameru, máme zasunuté zrcátko a na vzorek si posvítíme. Pomocí šroubů zaostříme na bod, jehož spektrum chceme měřit. Někdy nám může fokusaci usnadnit laser, pomocí nějž se snadněji zorientujeme, v jakém materiálu se nacházíme. Zda se nacházíme na povrchu zkoumaného vzorku poznáme tak, že se po něm můžeme pohybovat joystickem. Pomocí něj také namíříme na požadované místo, ve kterém chceme měřit spektrum. Následně zastavíme kameru, vysuneme zrcátko, vypneme podsvícení vzorku, zapneme laser (červený laser $632,816 \text{ nm}$), zkontrolujeme nastavení měření - objektiv, filtr, vstupní štěrbinu monochromátoru, spektrální rozsah měření, akumulaci spektra, mřížku (počet vrypů na mm), vlnovou délku, můžeme nastavit i název dat... Nakonec spustíme měření (za teploty -129°C) a na obrazovce vidíme vznikající graf závislosti intenzity na Ramanova posunu. Mřížka se natáčí a snímají se fotony s různou vlnovou délkou. Data můžeme uložit v několika formátech. Formát pro program LabSpec je .ngs. Tímto postupem měříme všechny vzorky.

4 Výsledky měření

Pomocí Ramanova mikrospektrometru HR800 Horiba Jobin-Yvon změříme Stokesovu větev připravených vzorků na různých površích. Červená tečka na obrázcích značí místo, odkud byl signál akumulován.

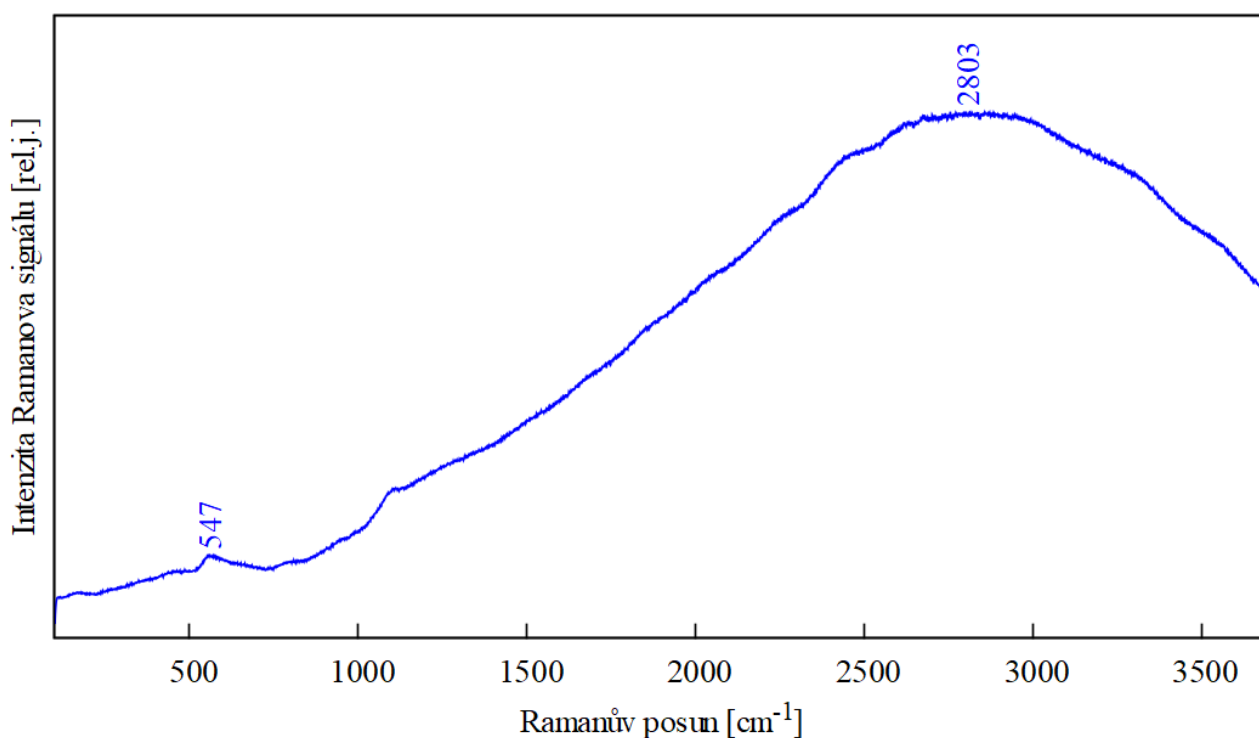
4.1 Spektra podložních materiálů

4.1.1 Podložní sklíčko

Změřili jsme spektrum podložního sklíčka (graf 13) a zjistili jsme, že sklo není ideálním povrchem pro Ramanovu spektroskopii, jelikož má své vlastní spektrum a to se může promítnout do každého měření vzorku, který je na něj nanesen. Ověření kalibrace křemínku: $520,1 \text{ cm}^{-1}$.

Nastavení Ramanova mikrospektrometru

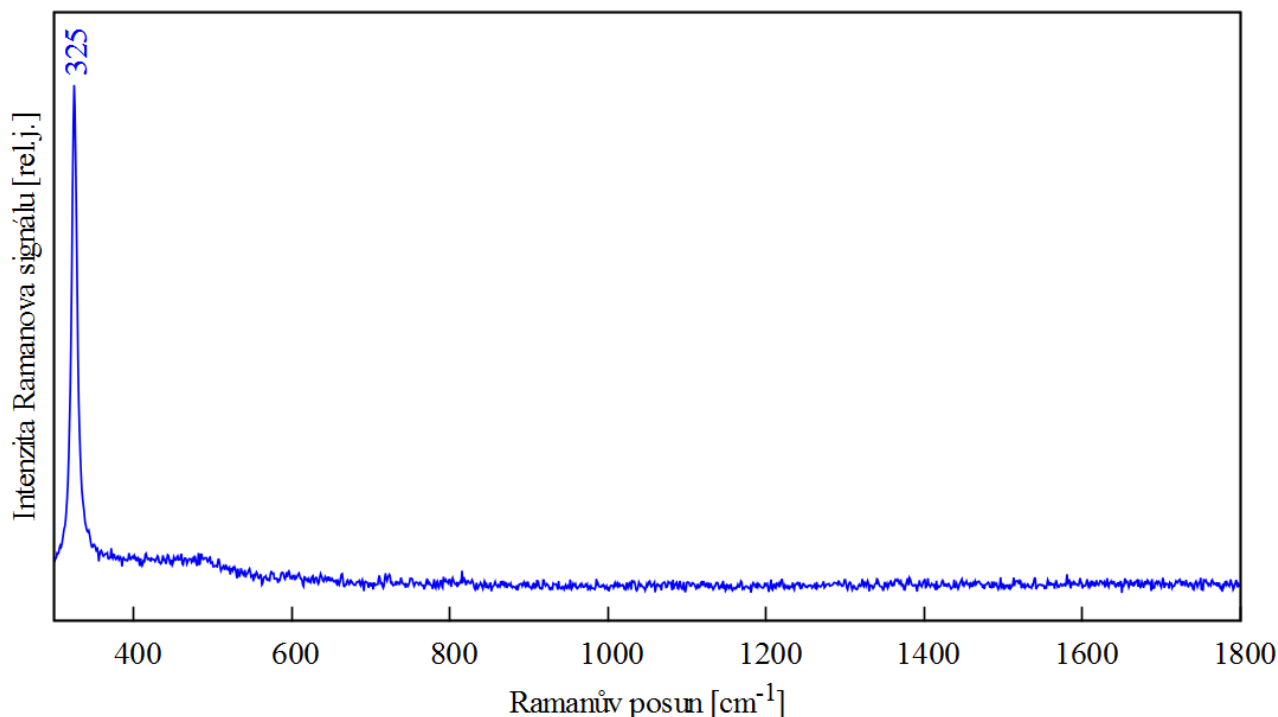
Parametry	Nastavené hodnoty
Vlnová délka	632,8 nm
Šedý filtr	D 0.6
Vstupní štěrbin	100 μm
Mřížka	600 vrypů/mm
Objektiv	x50 ULWD
Akumulace spektra	90 x 1 s
Konfokální clona	1000 μm



Graf 13: Spektrum podložního sklíčka

4.1.2 Fluorid vápenatý CaF_2

Změřili jsme spektrum fluoridu vápenatého (graf 14) a zjistili jsme, že je vhodnějším povrchem pro DCDR, jelikož kromě pásu 325 cm^{-1} nemá spektrum, které by se promítalo do měření vzorků. Ověření kalibrace křemíku: $520,1 \text{ cm}^{-1}$.



Graf 14: Spektrum fluoridu vápenatého

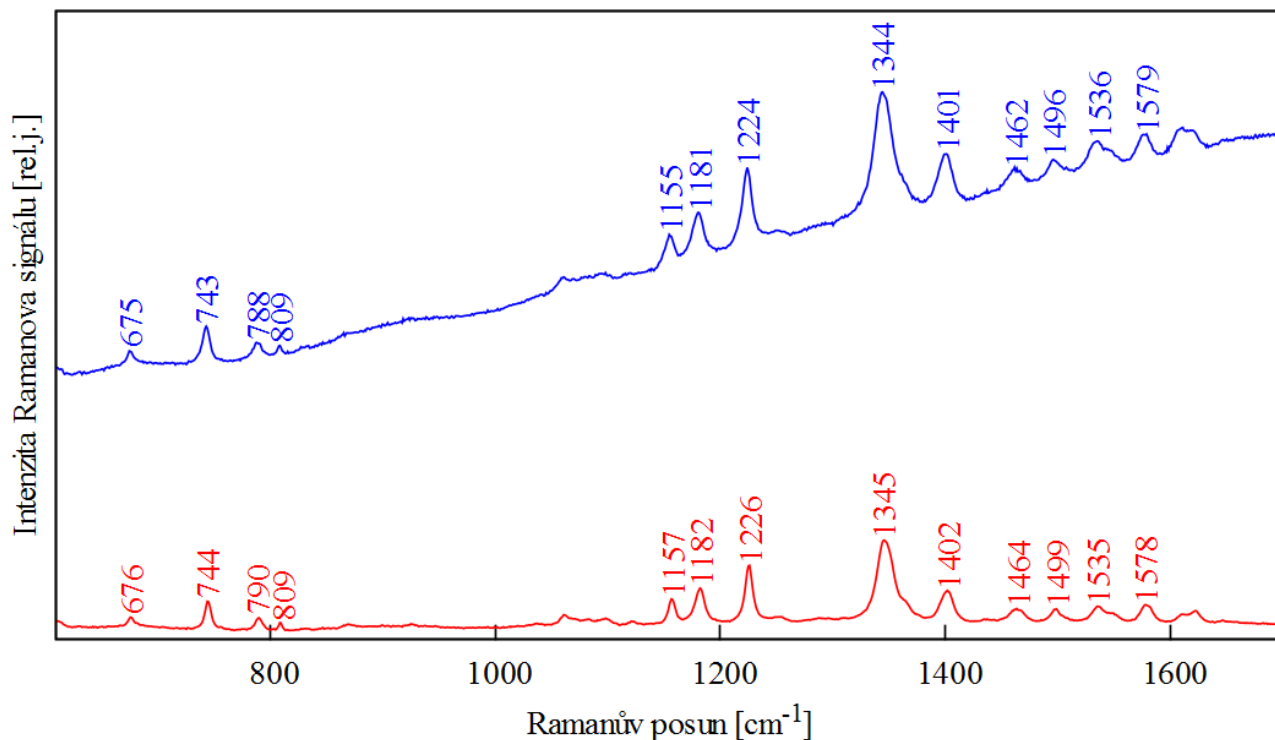
4.2 Riboflavin

4.2.1 Riboflavin ve formě prášku

Změříme spektrum riboflavinu (graf 15) o čistotě $> 98 \%$ ve formě prášku, který nanese na podložní sklíčko. Ověření kalibrace křemíku: $522,88 \text{ cm}^{-1}$.

Nastavení Ramanova mikrospektrometru

Parametry	Hodnoty
Vlnová délka	632,8 nm
Šedý filtr	D 0.3
Vstupní štěrba	100 μm
Mřížka	600 vrypů/mm
Objektiv	x50 ULWD
Akumulace spektra	90 x 1 s
Konfokální clona	400 μm



Graf 15: Příklady spekter riboflavínu v formě prášku

4.2.2 Kapka roztoku riboflavínu na podložním sklíčku

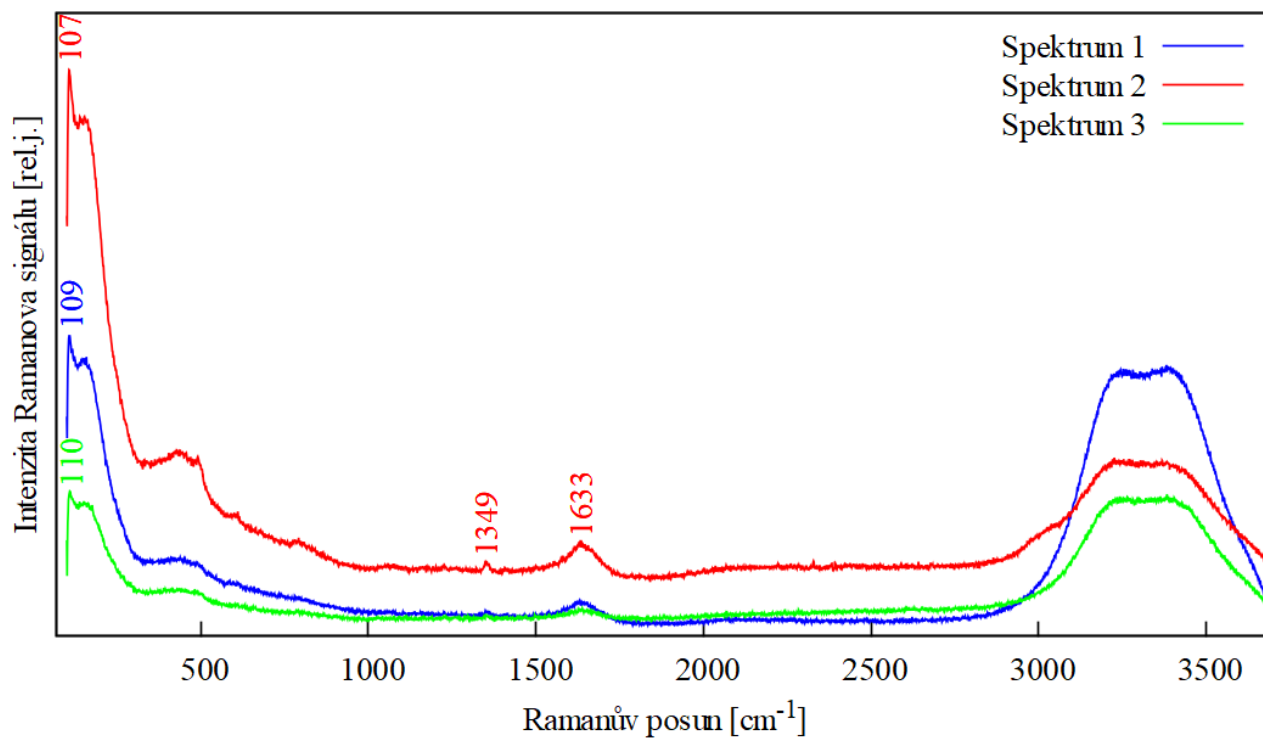
Na podložní sklíčko bylo nakapáno 50 μl roztoku riboflavínu o koncentraci $c = 2,25 \cdot 10^{-4}$ M a změřili jsme spektrum (graf 16). Ověření kalibrace křemítku: 520,1 cm^{-1} .

Nastavení Ramanova mikrospektrometru

Parametry	Spektrum 1	Spektrum 2	Spektrum 3
Vlnová délka	632,8 nm	632,8 nm	632,8 nm
Šedý filtr	žádný	žádný	D 0.6
Vstupní štěrba	100 μm	100 μm	100 μm
Mřížka	600 vrypů/mm	600 vrypů/mm	600 vrypů/mm
Objektiv	x50 ULWD ²	x50 ULWD	x50 ULWD
Akumulace spektra	90 x 1 s	90 x 1 s	90 x 1 s
Konfokální clona ¹	400 μm	1000 μm	1000 μm

¹Pinhole

²Ultra long work distance



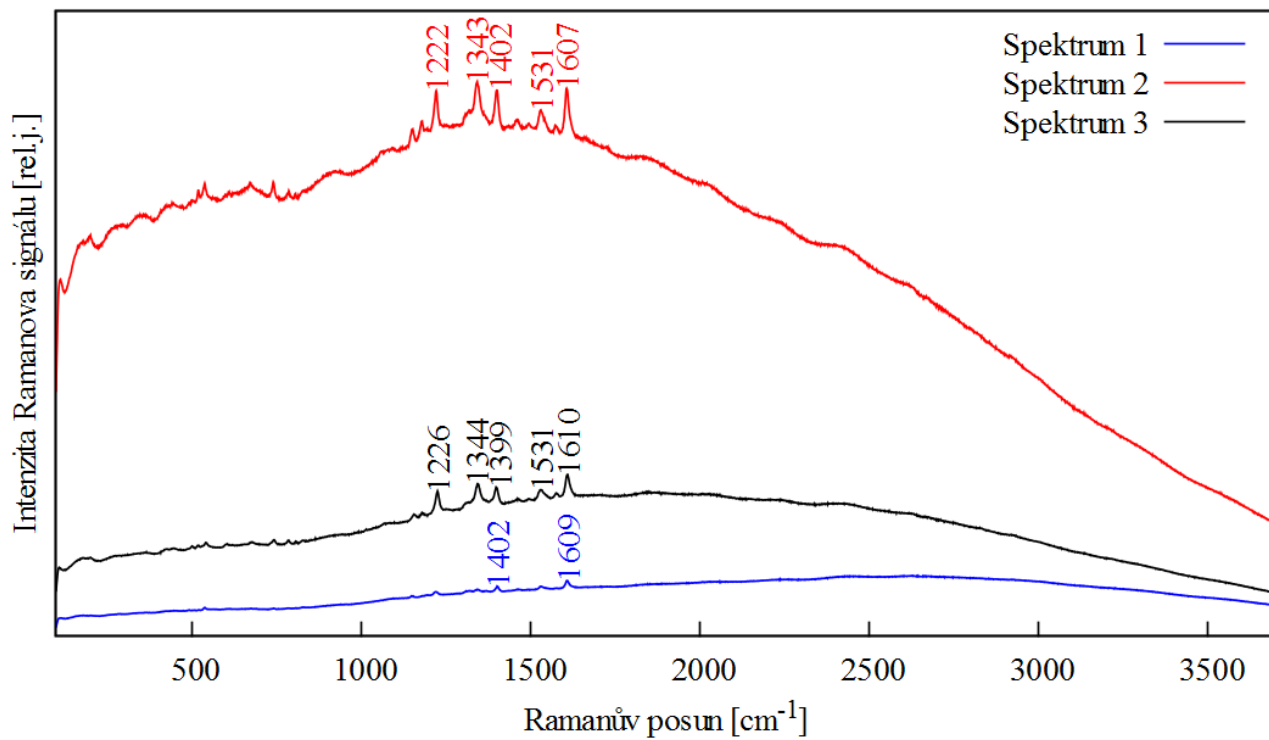
Graf 16: Příklady spekter kapky riboflavínu na podložním sklíčku, $c = 2,25 \cdot 10^{-4}$ M

4.2.3 Riboflavin na skle

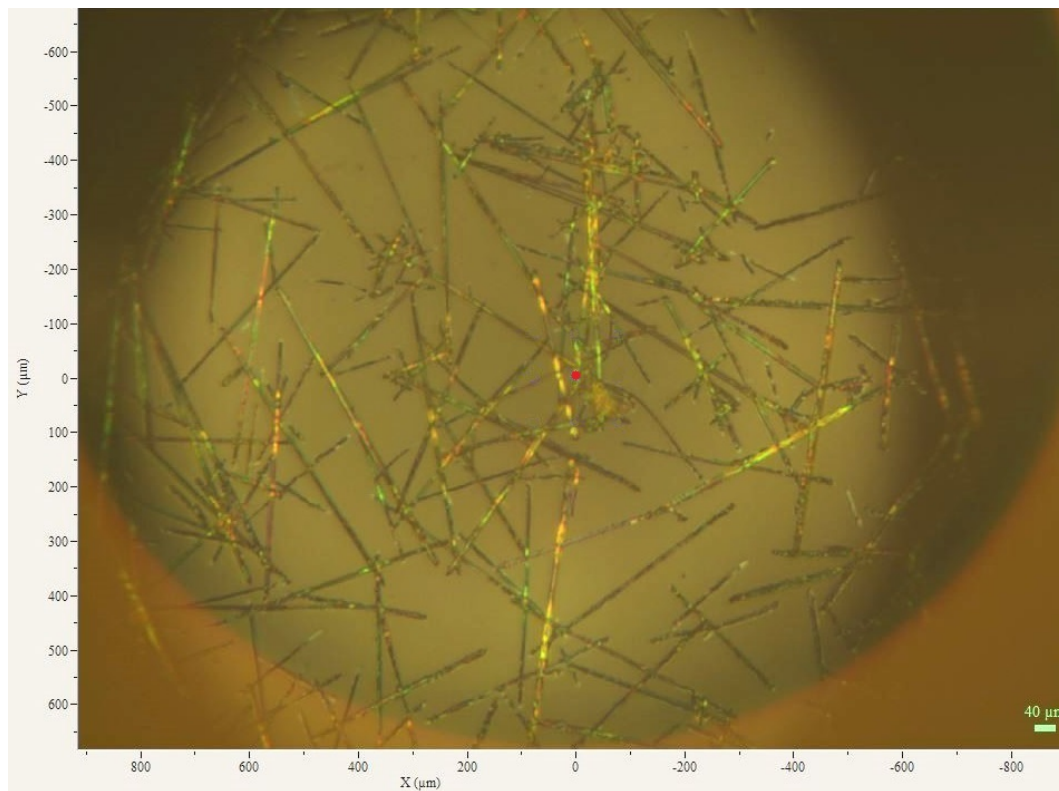
Kapka riboflavínu o koncentraci $c = 2,25 \cdot 10^{-4}$ M vyschla (viz obrázky 18, 19, 20) do formy jehlicovitých krystalků a někde se nachází větší agregáty. Změřili jsme spektrum (graf 17). Ověření kalibrace křemíku: $520,46 \text{ cm}^{-1}$.

Nastavení Ramanova mikrospektrometru

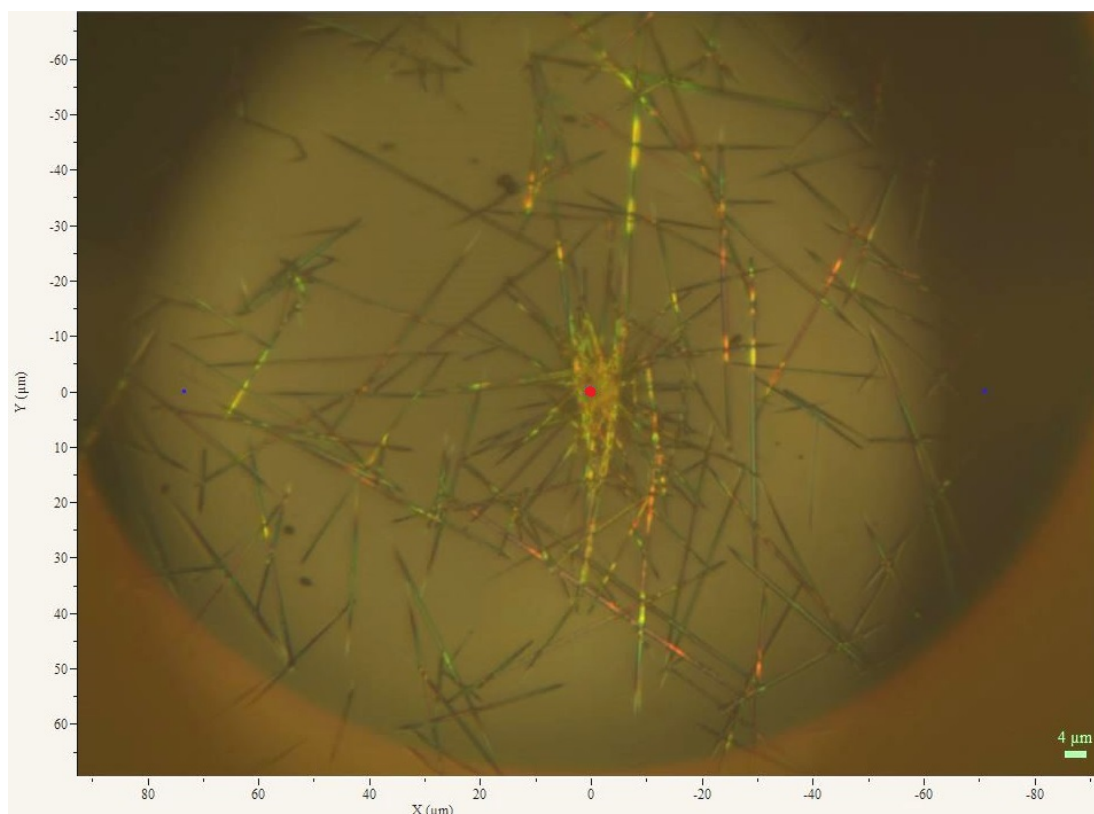
Parametry	Hodnoty
Vlnová délka	632,8 nm
Šedý filtr	žádný
Vstupní štěrba	100 μm
Mřížka	600 vrypů/mm
Objektiv	x50 ULWD
Akumulace spektra	90 x 1 s
Konfokální clona	1000 μm



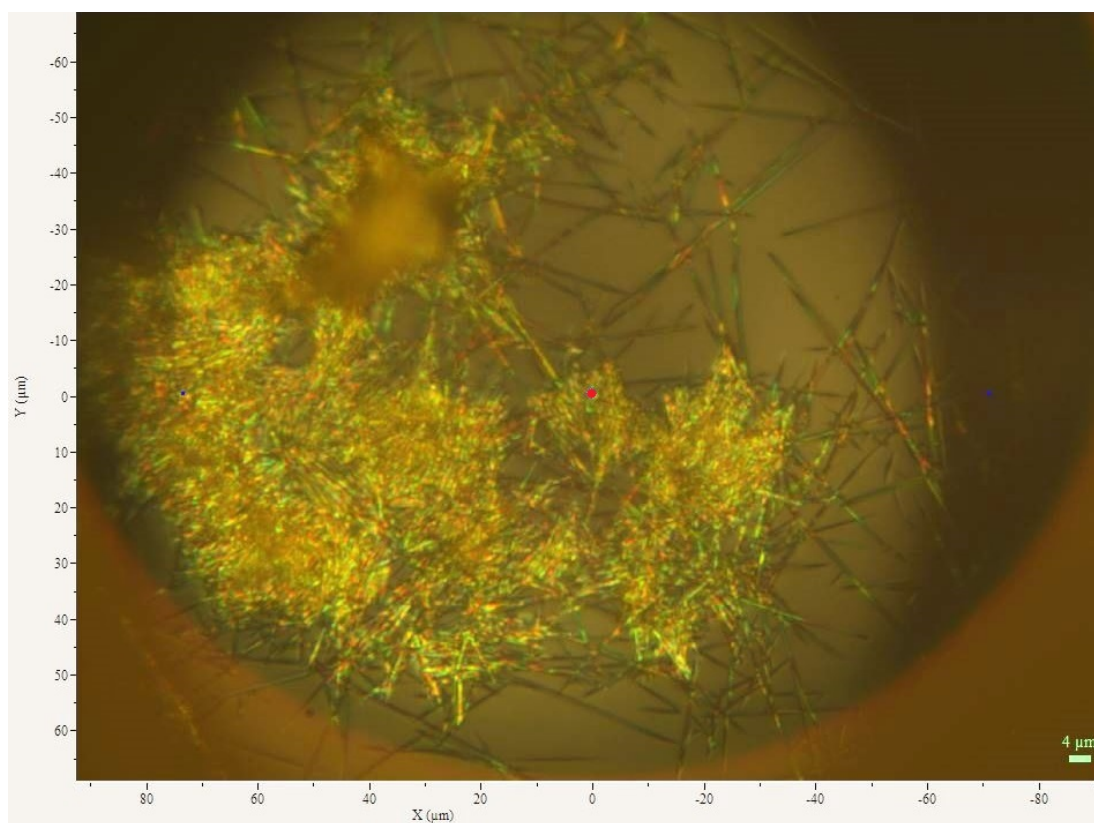
Graf 17: Příklady spekter riboflavinu na skle, $c = 2,25 \cdot 10^{-4}$ M



Obrázek 18: Zkoumané místo - spektrum 1



Obrázek 19: Zkoumané místo - spektrum 2



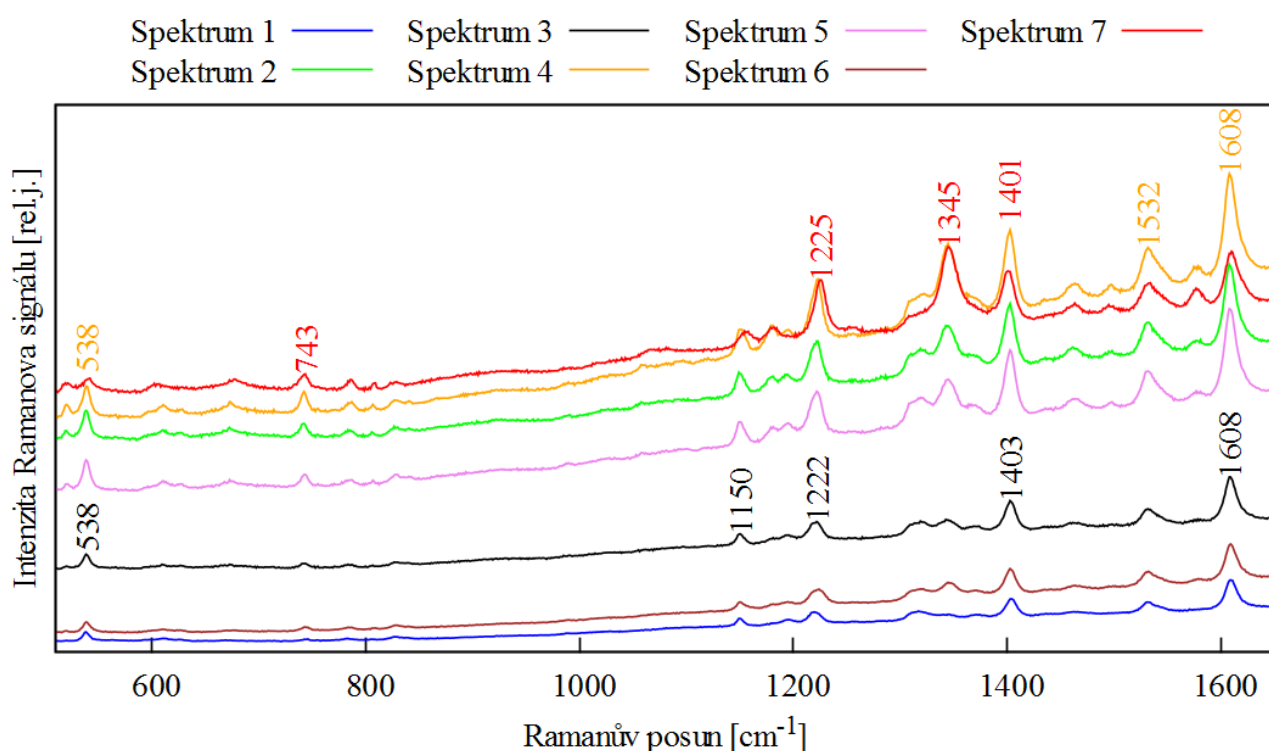
Obrázek 20: Zkoumané místo - spektrum 3

4.2.4 Riboflavin na skle

Další měření provádíme se zaměřením na oblast, kde se vyskytují pásy. Nastavíme také filtr, jelikož u předchozích měření pravděpodobně docházelo k pálení vzorku - signál při měření rostl. Dostaneme tak graf 21 z míst na obrázcích 22 a 23. Ověření kalibrace křemíku: $520,46 \text{ cm}^{-1}$.

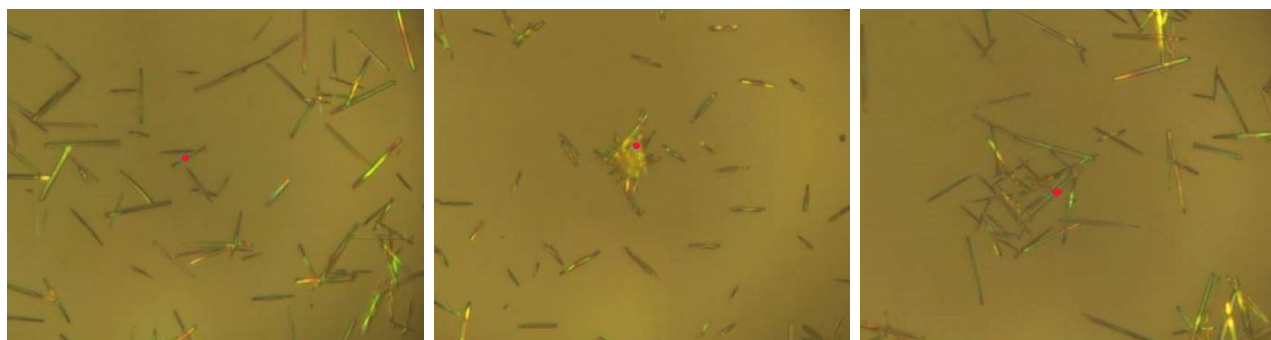
Nastavení Ramanova mikrospektrometru

Parametry	Hodnoty
Vlnová délka	632,8 nm
Šedý filtr	D 0.3
Vstupní štěrbin	100 μm
Mřížka	600 vrypů/mm
Objektiv	x50 ULWD
Akumulace spektra	90 x 1 s
Konfokální clona	1000 μm

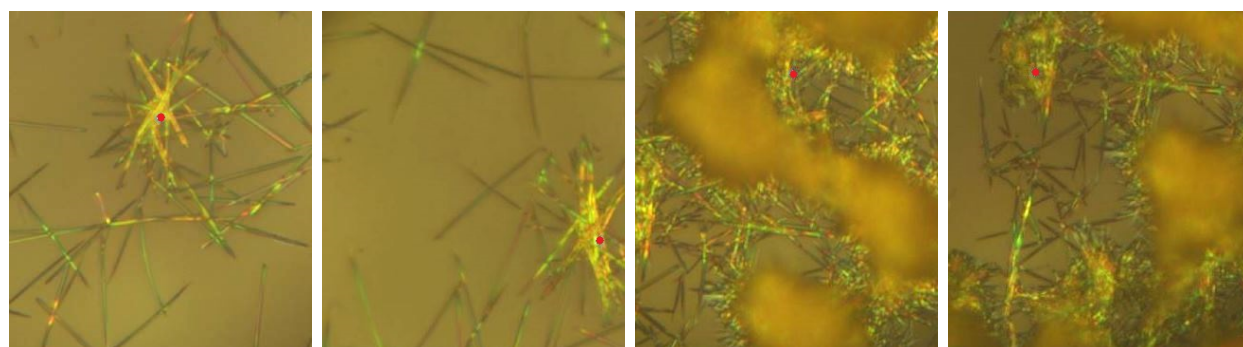


Graf 21: Příklady spekter riboflavínu na skle, $c = 2,25 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

Kontrola kalibrace křemíku po skončení měření: $522,88 \text{ cm}^{-1}$. Kalibrace se mírně posunula vlivem změny teploty.



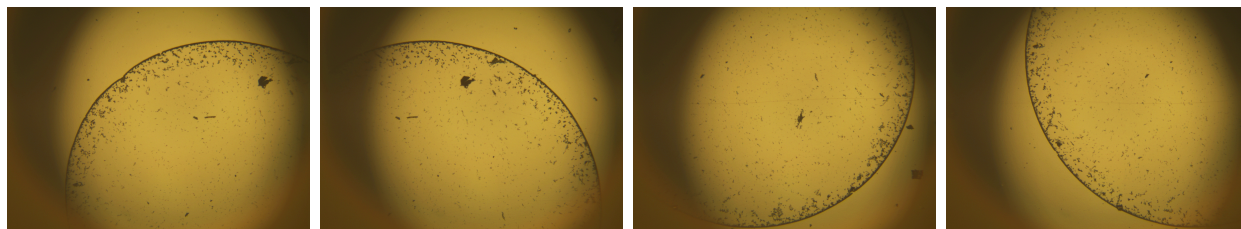
Obrázek 22: Zkoumaná místa - spektrum 1,2,3



Obrázek 23: Zkoumaná místa - spektrum 4,5,6,7

4.2.5 Riboflavin na CaF_2 - koncentrace c

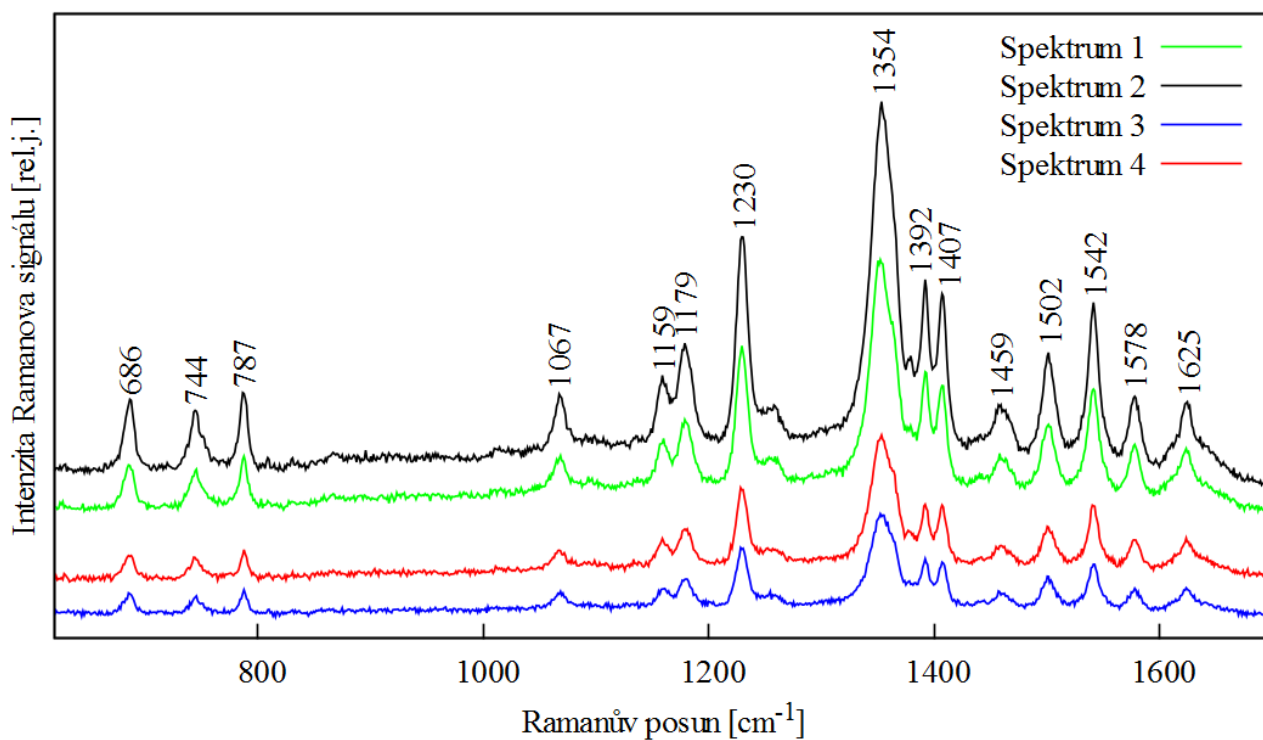
Kapka roztoku riboflavinu o koncentraci $c = 2,25 \cdot 10^{-4}$ M vytvořila při vysychání na destičce z CaF_2 kroužek (obr. 24). Získali jsme graf 25 po změření míst na obrázku 29. Ověření kalibrace křemíku: $522,88 \text{ cm}^{-1}$.



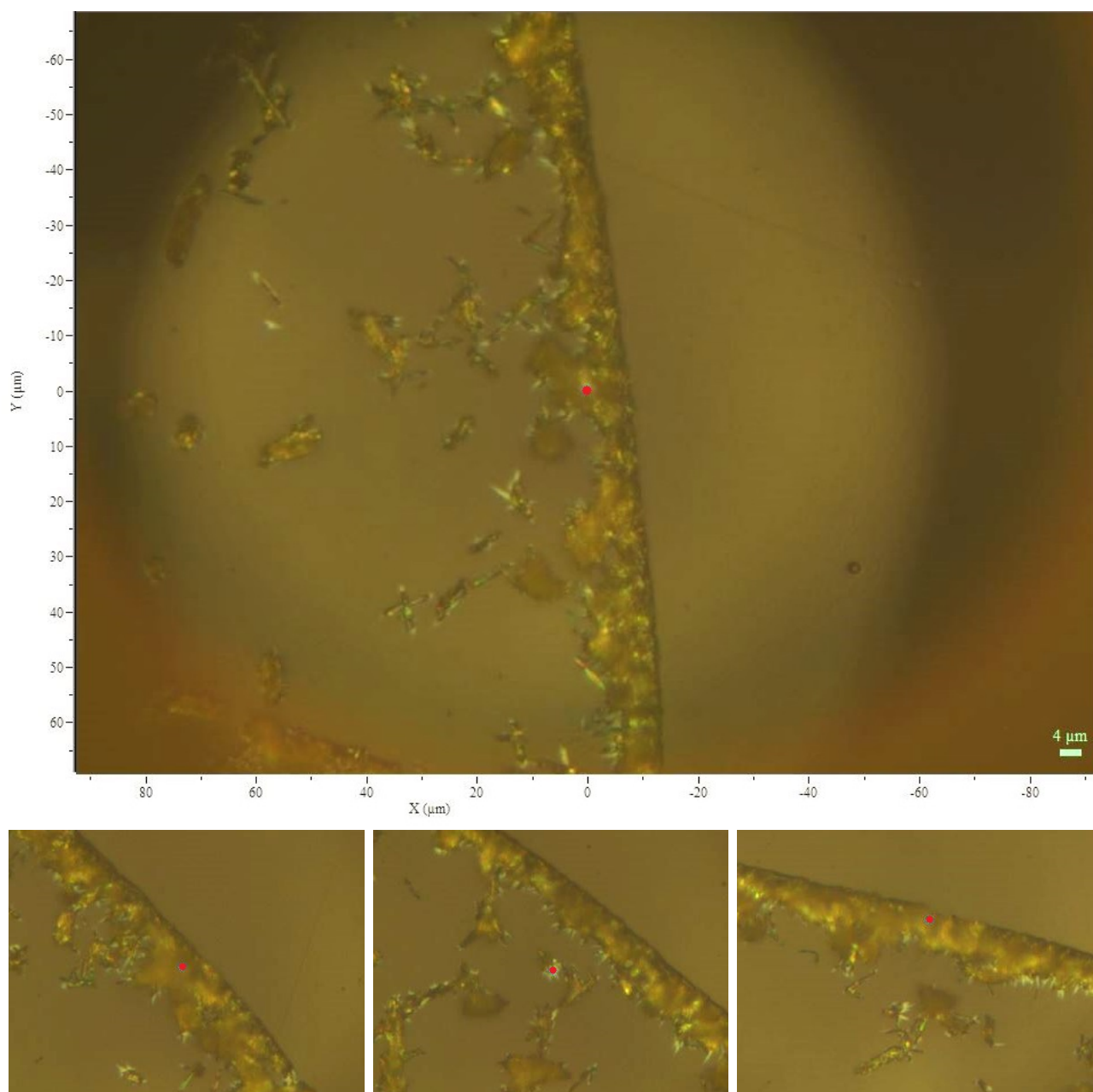
Obrázek 24: Riboflavin na destičce z fluoridu vápenatého - objektiv x10

Nastavení Ramanova mikrospektrometru

Parametry	Hodnoty
Vlnová délka	632,8 nm
Šedý filtr	D 0.3
Vstupní štěrba	100 μm
Mřížka	600 vrypů/mm
Objektiv	x50 ULWD
Akumulace spektra	90 x 1 s
Konfokální clona	400 μm



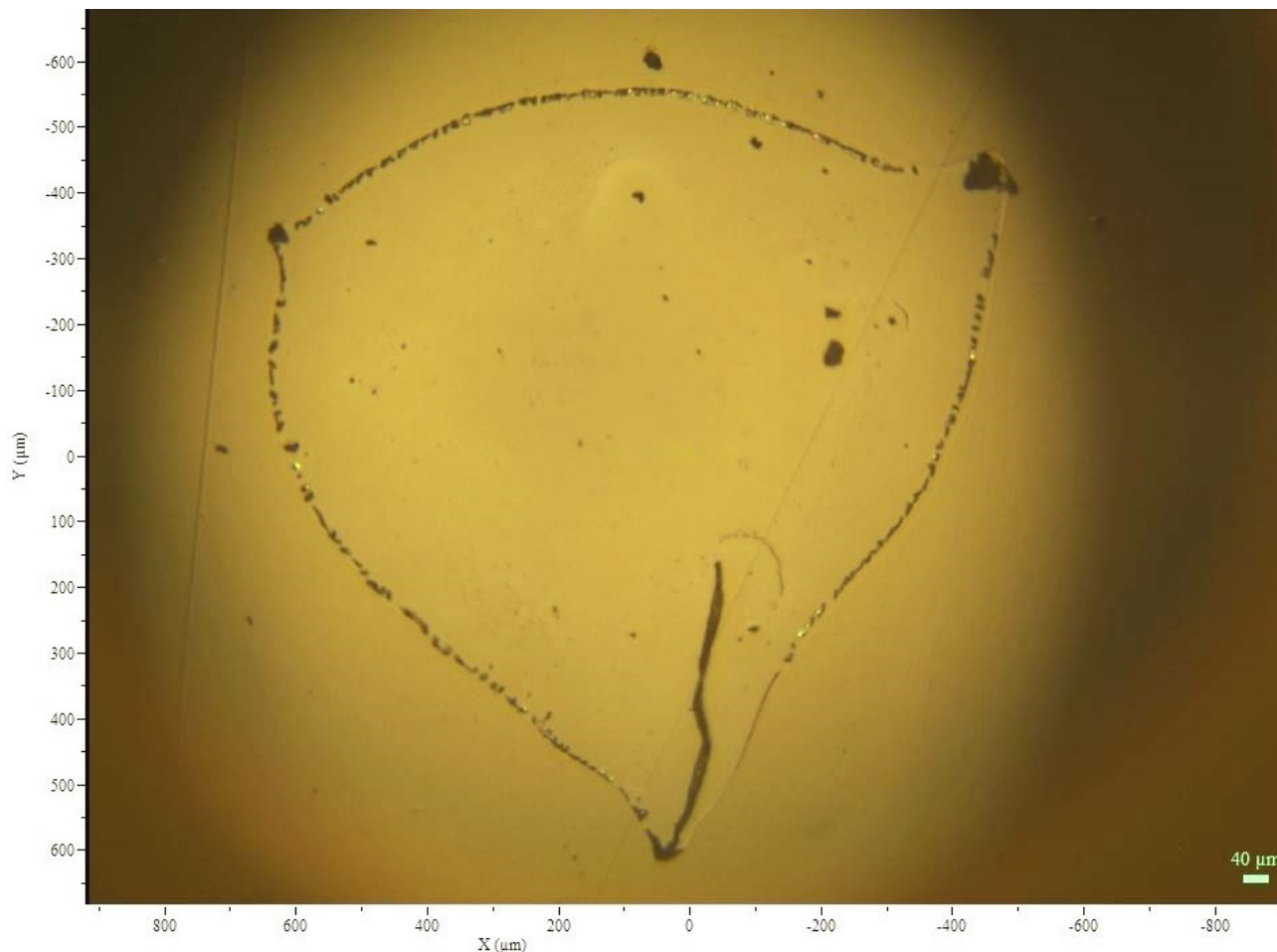
Graf 25: Příklad spekter riboflavinu na fluoridu vápenatém s koncentrací $c = 2,25 \cdot 10^{-4}$ M



Obrázek 26: Změřená místa - spektrum 1,2,3,4

4.2.6 Riboflavin na CaF_2 - koncentrace 0,1c

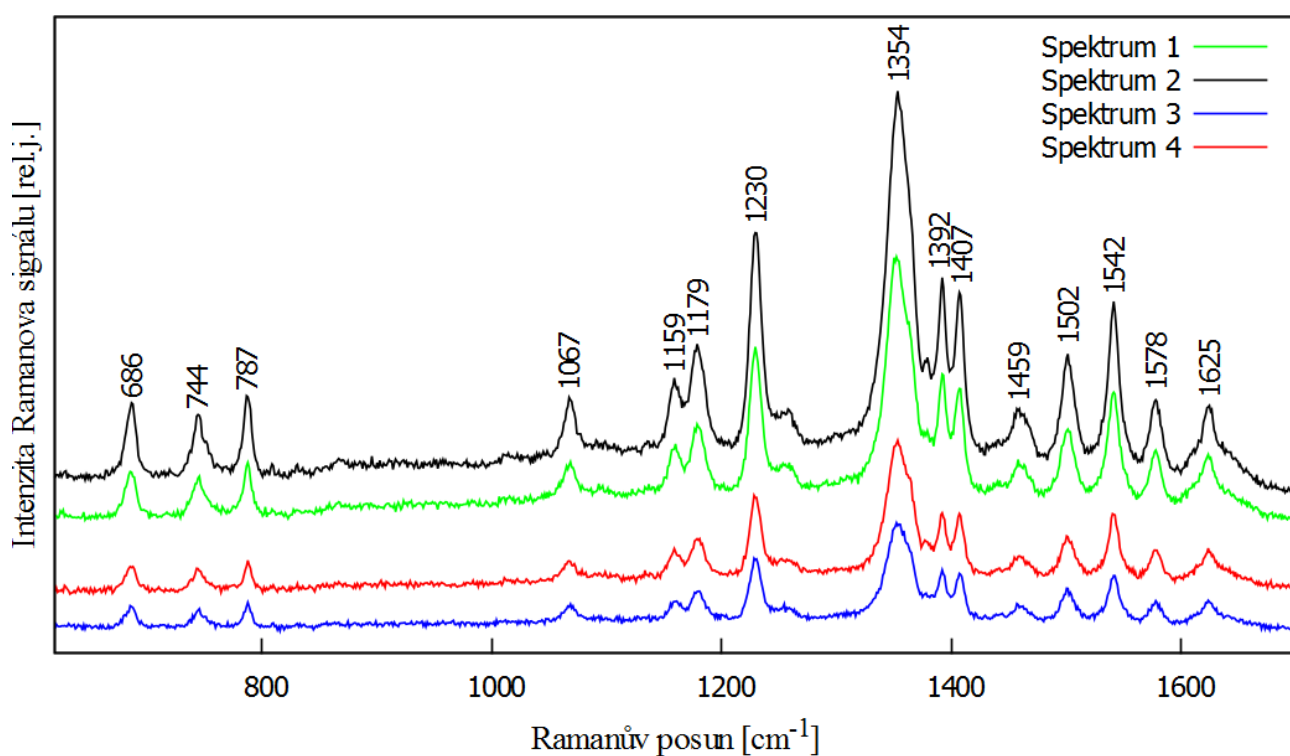
Roztok riboflavínu 10x zředíme a necháme tak uschnout na fluoridu vápenatém roztok riboflavínu o koncentraci $c = 2,25 \cdot 10^{-5}$ M. Částice po vyschnutí byly u okraje, ale kroužek tvořily jen v horní části, jinde se kontaktní linie zhroutila (obr. 27). Na měření spekter byl třeba silnější filtr - D 1, protože při filtru D 0.3 docházelo k vypalování vzorku. Získali jsme tam graf 28 měření z míst na obrázcích 26. Ověření kalibrace křemíku: $522,88 \text{ cm}^{-1}$.



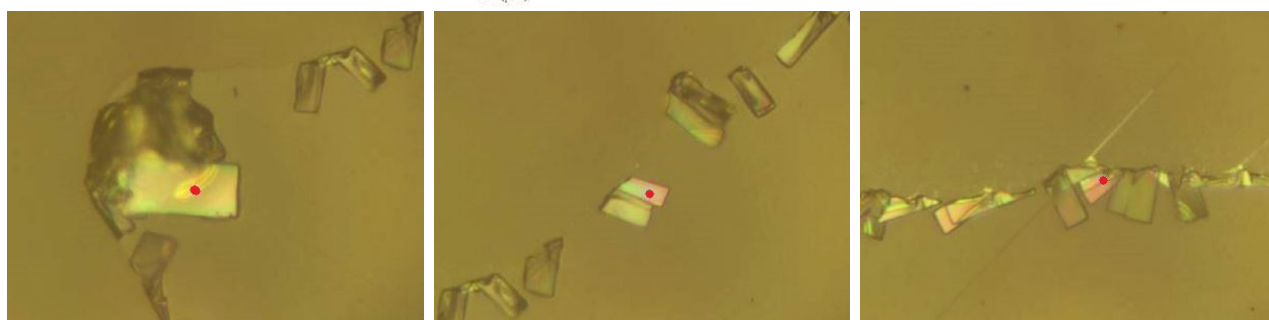
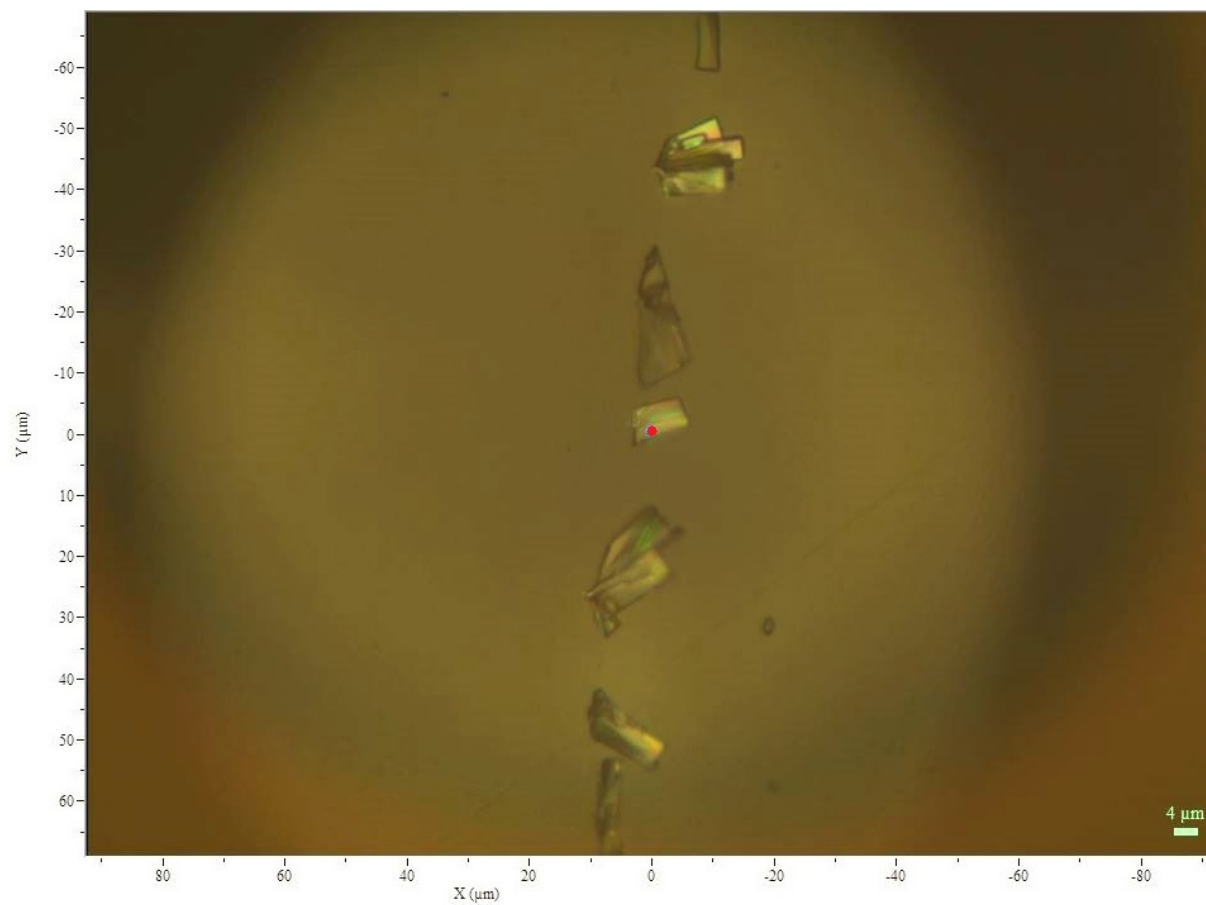
Obrázek 27: Riboflavin na destičce z fluoridu vápenatého - objektiv x10, $c = 2,25 \cdot 10^{-5}$ M

Nastavení Ramanova mikrospektrometru

Parametry	Hodnoty
Vlnová délka	632,8 nm
Šedý filtr	D 1
Vstupní štěrbin	100 μm
Mřížka	600 vrypů/mm
Objektiv	x50 ULWD
Akumulace spektra	90 x 2 s
Konfokální clona	400 μm



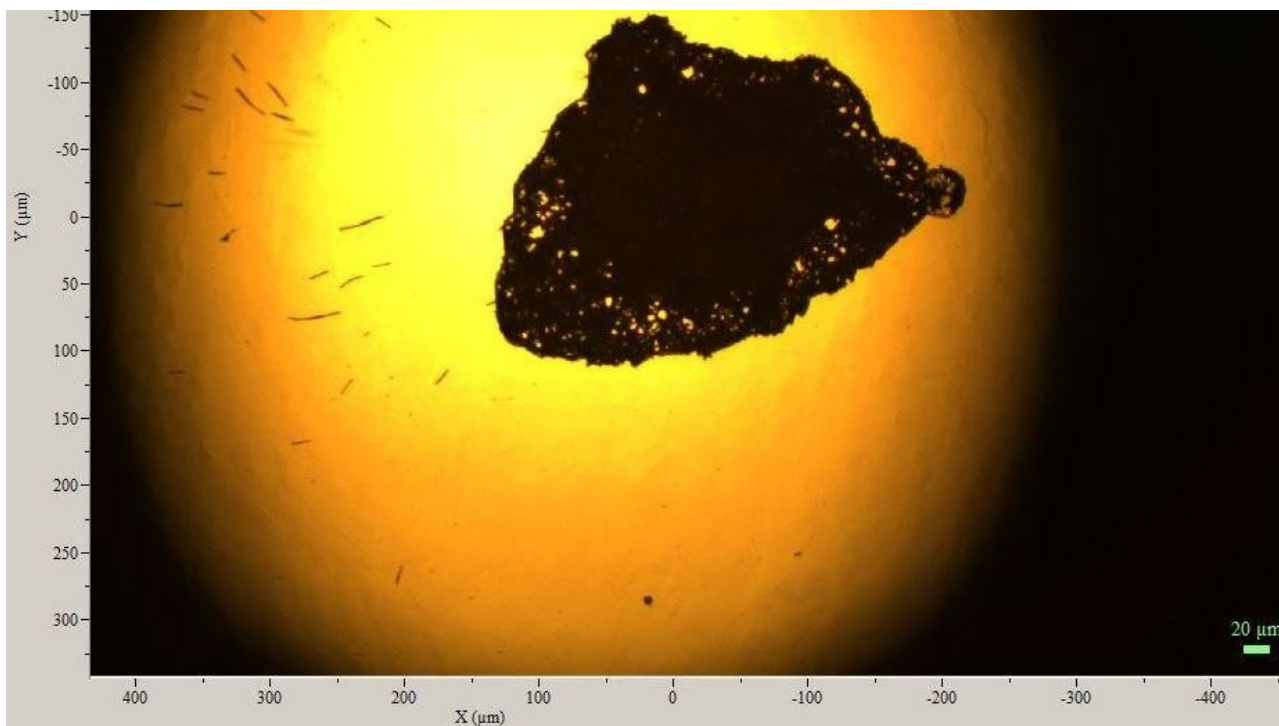
Graf 28: Příklady spekter riboflavínu na fluoridu vápenatém, $c = 2,25 \cdot 10^{-5}$ M



Obrázek 29: Změřená místa - spektrum 1,2,3,4

4.2.7 Riboflavin na ocelové destičce s teflonovou vrstvou SpectRIM

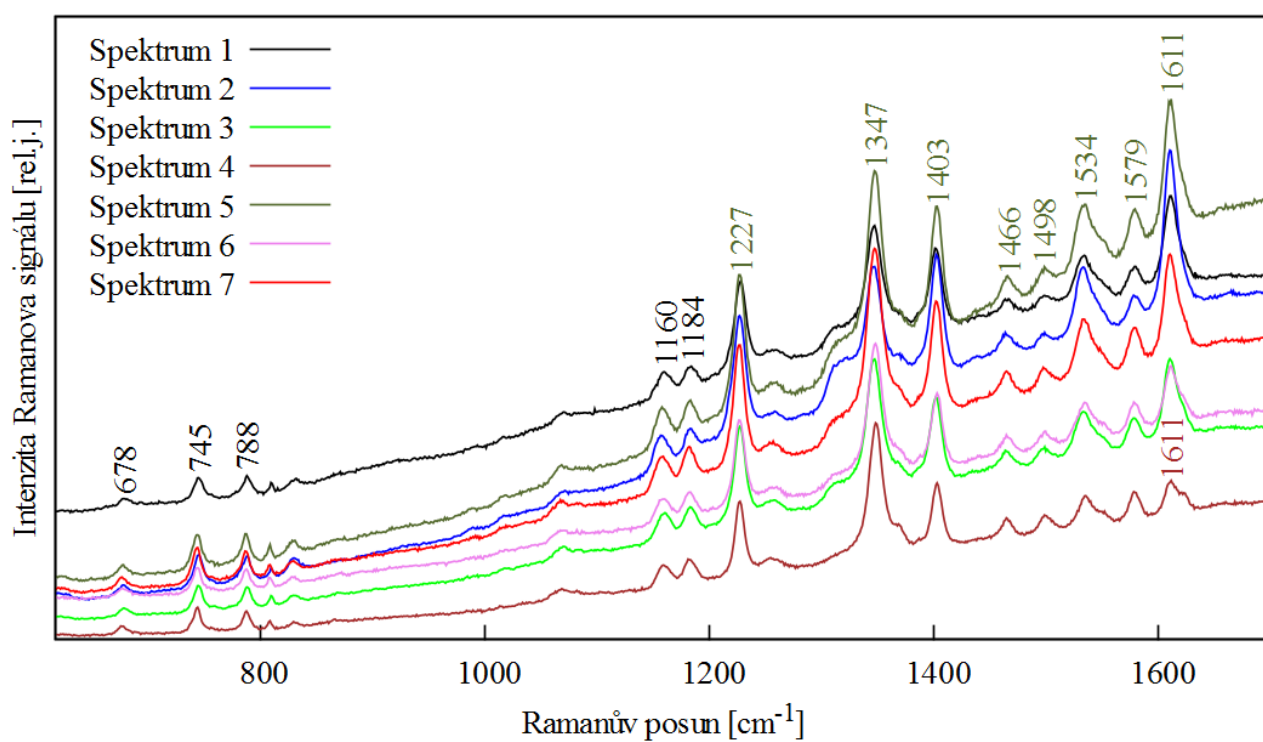
Ocelová destička s teflonovou vrstvou je nejlepší povrch pro Ramanovu spektroskopii - signál je nejsilnější. Částice po odpaření kapky riboflavinu o koncentraci $c = 2,25 \cdot 10^{-4}$ M neutvořily kroužek (obr. 30). Získali jsme graf 31 měření z míst na obrázcích 32. Ověření kalibrace křemíku $522,88 \text{ cm}^{-1}$.



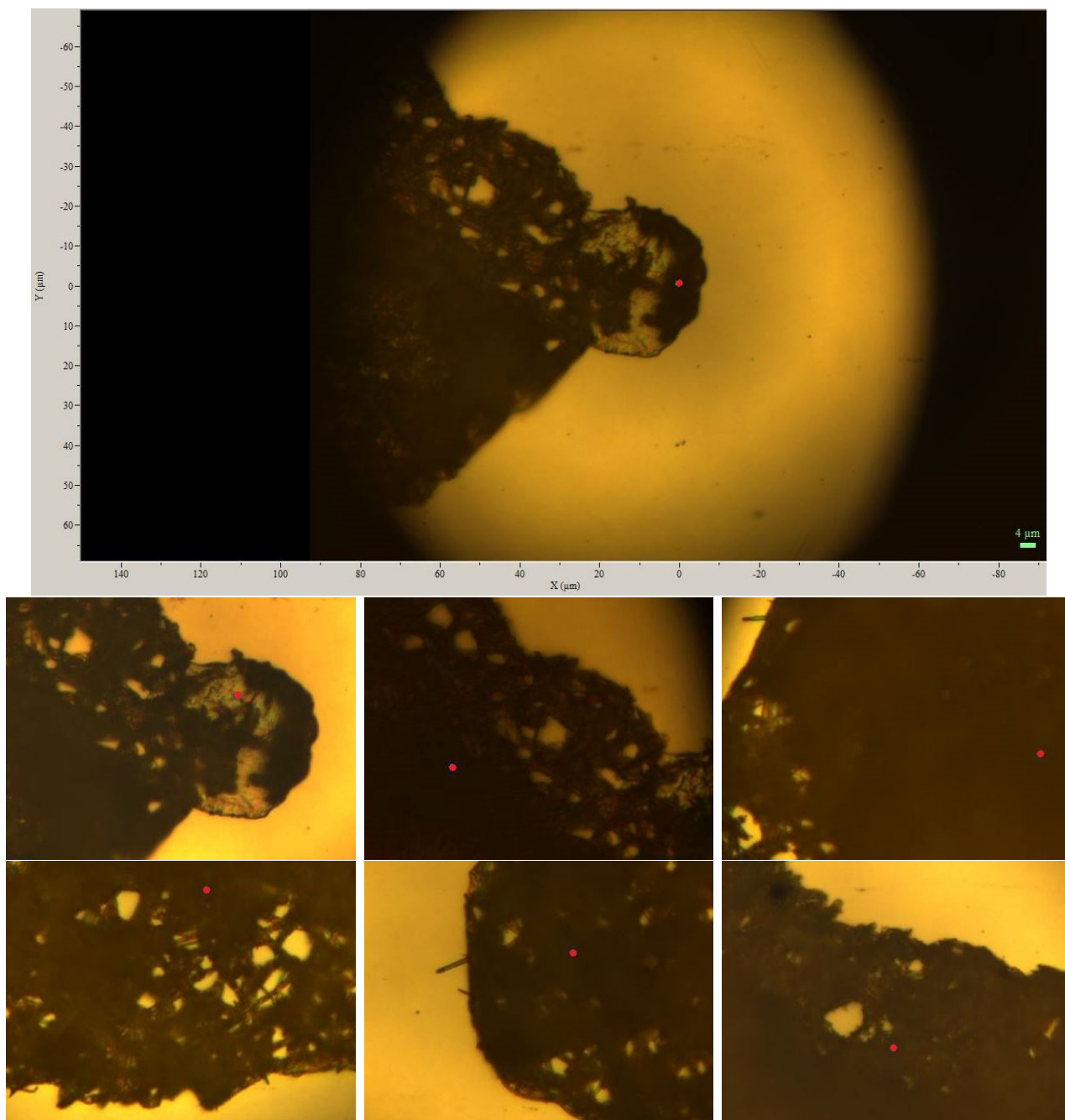
Obrázek 30: Riboflavin na leštěné ocelové destičce s teflonovou vrstvou (50 nm) - objektiv x10

Nastavení Ramanova mikrospektrometru

Parametry	Hodnoty
Vlnová délka	632,8 nm
Šedý filtr	D 1
Vstupní štěrbin	100 μm
Mřížka	600 vrypů/mm
Objektiv	x50 ULWD
Akumulace spektra	90 x 1 s
Konfokální clona	400 μm



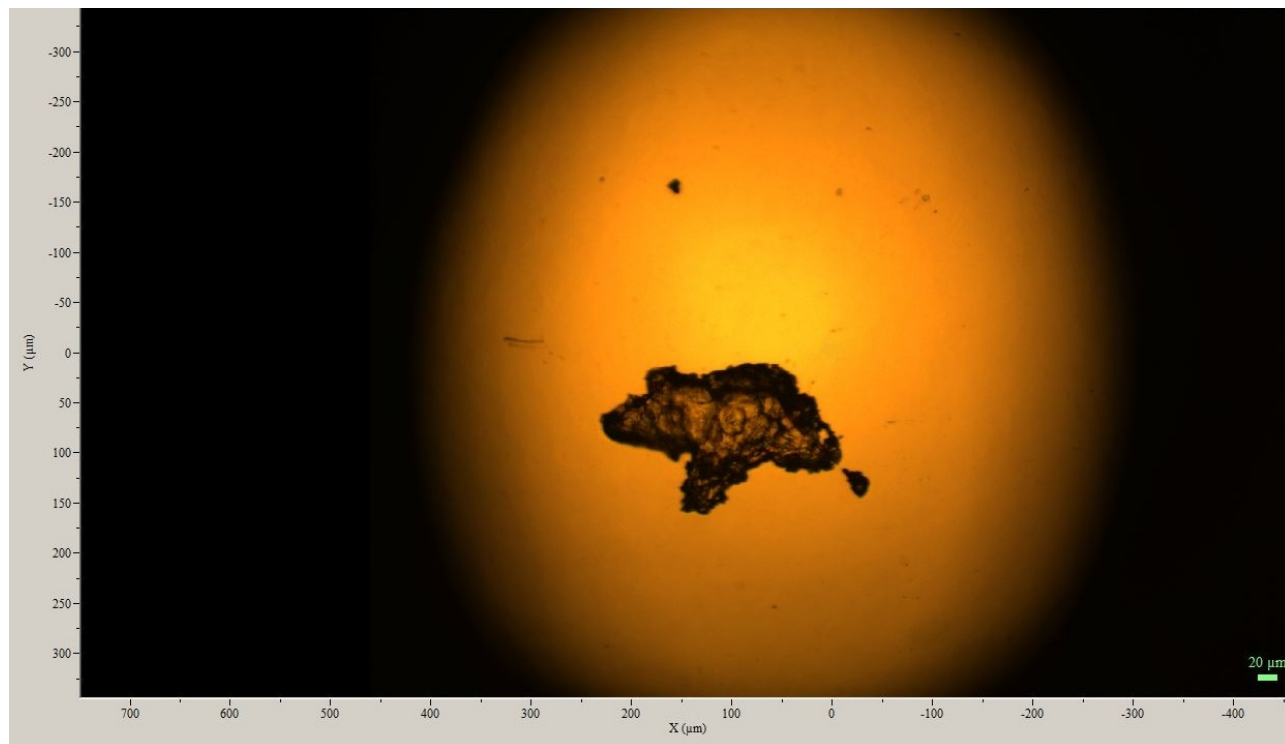
Graf 31: Spektrum riboflavinu na leštěné ocelové destičce s teflonovou vrstvou, $c = 2,25 \cdot 10^{-4}$ M



Obrázek 32: Změřená místa - spektrum 1-7 riboflavinu na leštěné ocelové destičce s teflonovou vrstvou

4.2.8 Riboflavin na ocelové destičce s teflonovou vrstvou - 0,1c

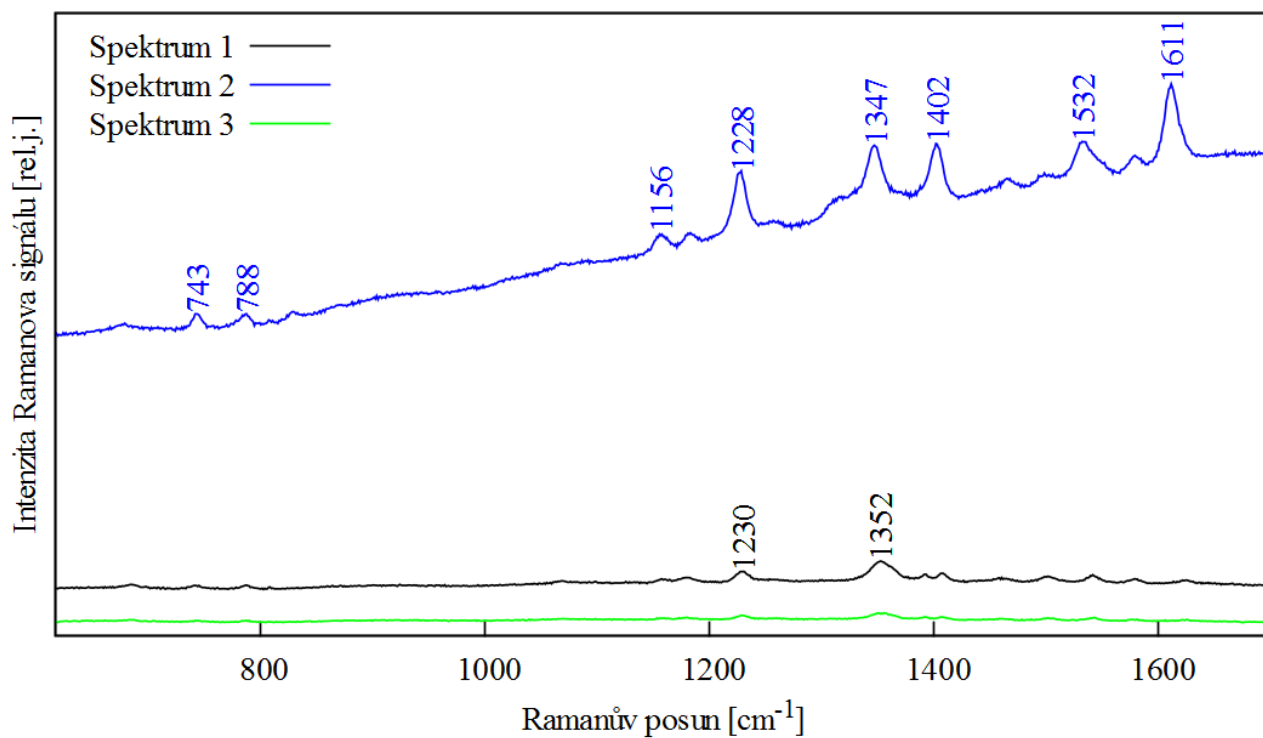
Na destičce necháme zaschnout kapku roztoku riboflavinu o koncentraci $c = 2,25 \cdot 10^{-5}$ M. Částice po odpaření kapky neutvořily kroužek (obr. 33). Získáme graf 34 z měřených míst na obrázcích 35. Ověření kalibrace křemíku $522,88 \text{ cm}^{-1}$.



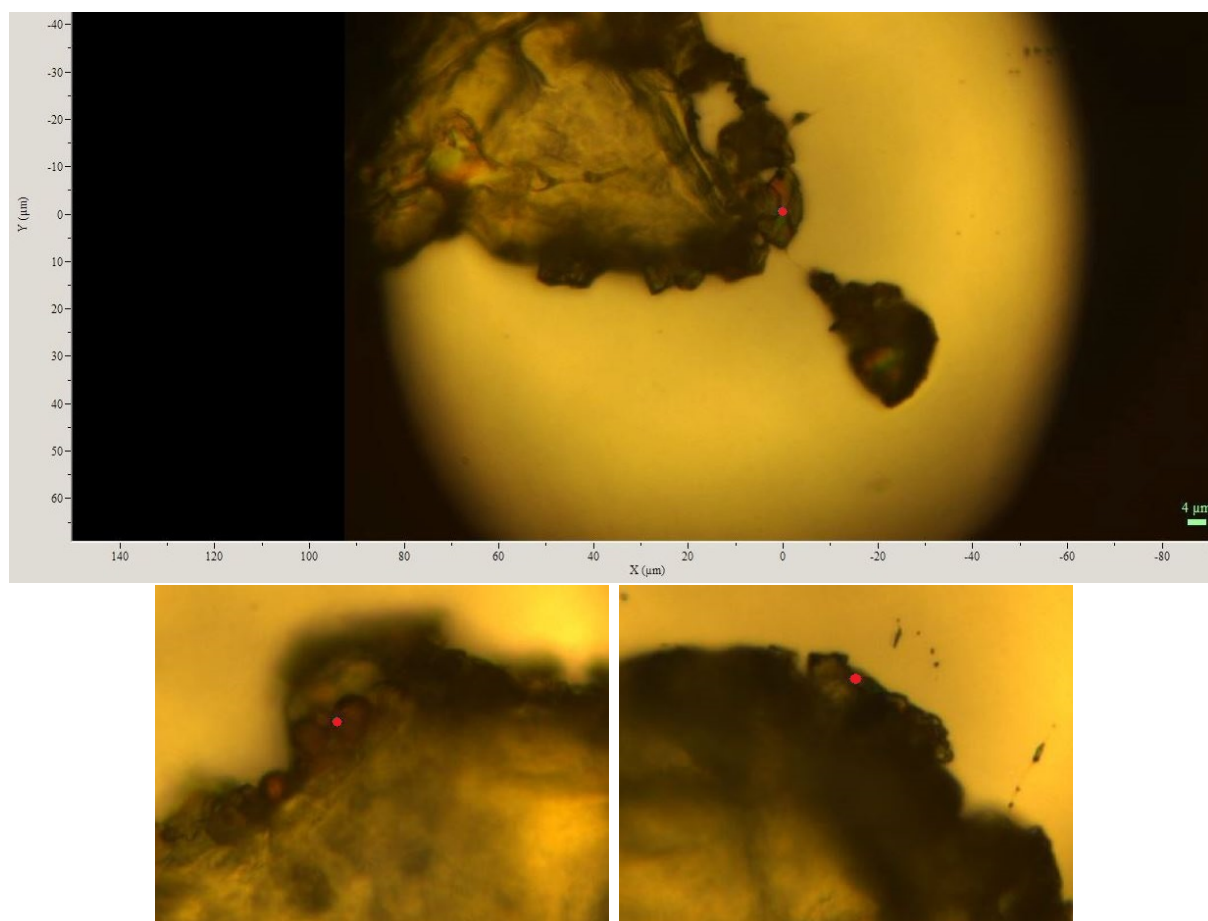
Obrázek 33: Riboflavin na ocelové destičce s teflonovou vrstvou, objektiv x10, $c = 2,25 \cdot 10^{-5}$ M

Nastavení Ramanova mikrospektrometru

Parametry	Hodnoty
Vlnová délka	632,8 nm
Šedý filtr	D 1
Vstupní štěrbin	100 μm
Mřížka	600 vrypů/mm
Objektiv	x50 ULWD
Akumulace spektra	90 x 1 s
Konfokální clona	400 μm



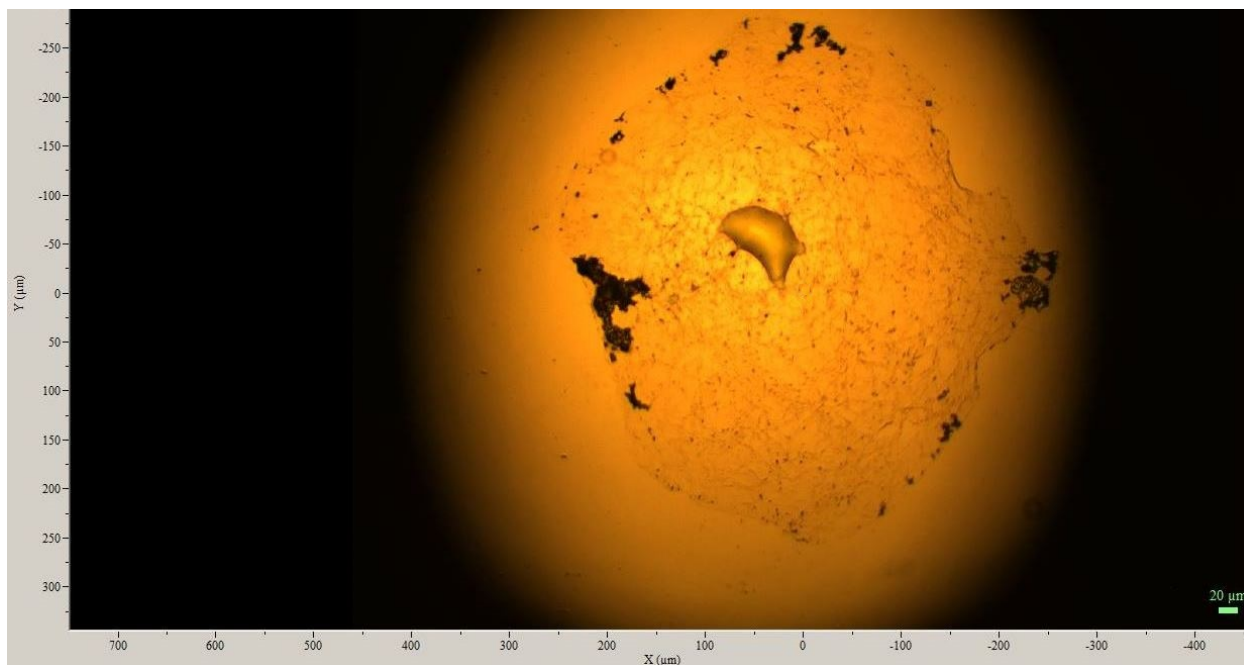
Graf 34: Spektrum riboflavínu na leštěné ocelové destičce s teflonovou vrstvou, $c = 2,25 \cdot 10^{-5}$ M



Obrázek 35: Změřená místa - spektrum 1,2,3

4.2.9 Riboflavin na ocelové destičce s teflonovou vrstvou - 0,02c

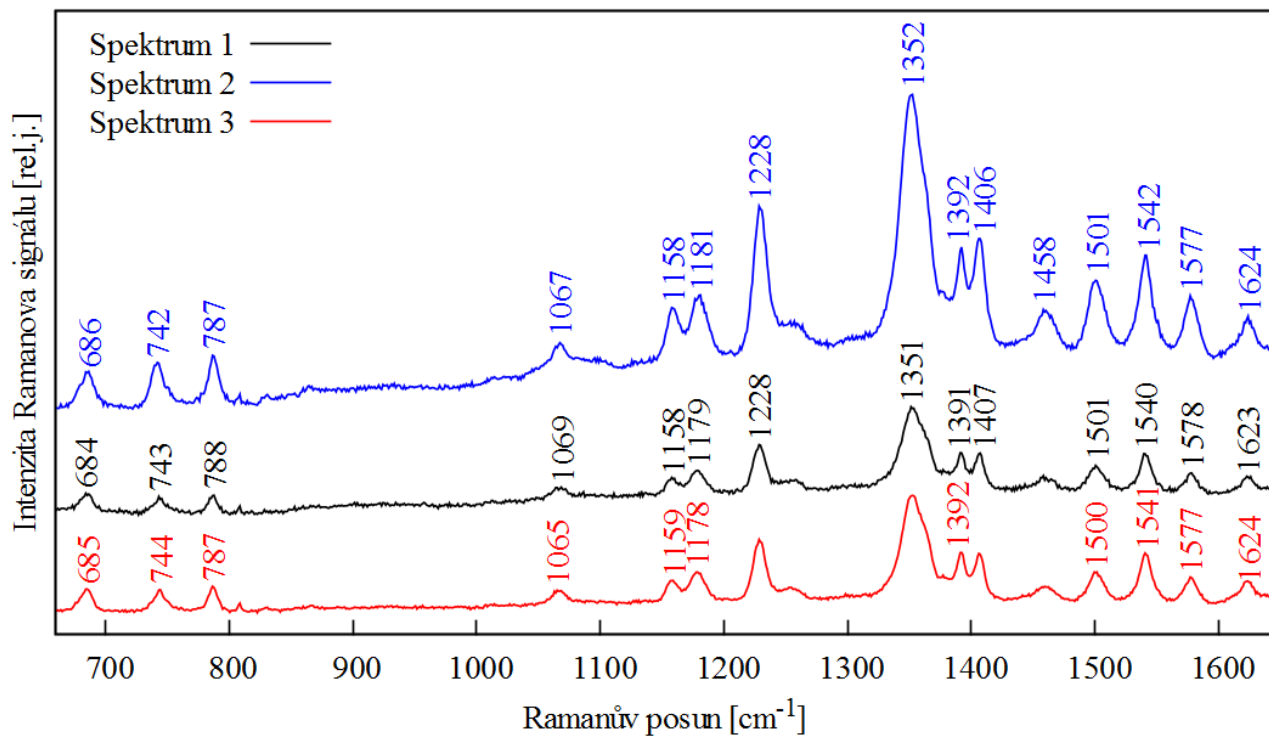
Na destičku pod mikroskopem nakápneme 50x zředěný roztok riboflavinu o koncentraci $c = 4,5 \cdot 10^{-6}$ M a pozorujeme, jak se kapka vypařuje. Při menších koncentracích je tento způsob jednodušší než fokusovat částice, které zůstanou po odpaření roztoku (obr. 36). Získáme graf 37 měření z míst na obrázcích 38.



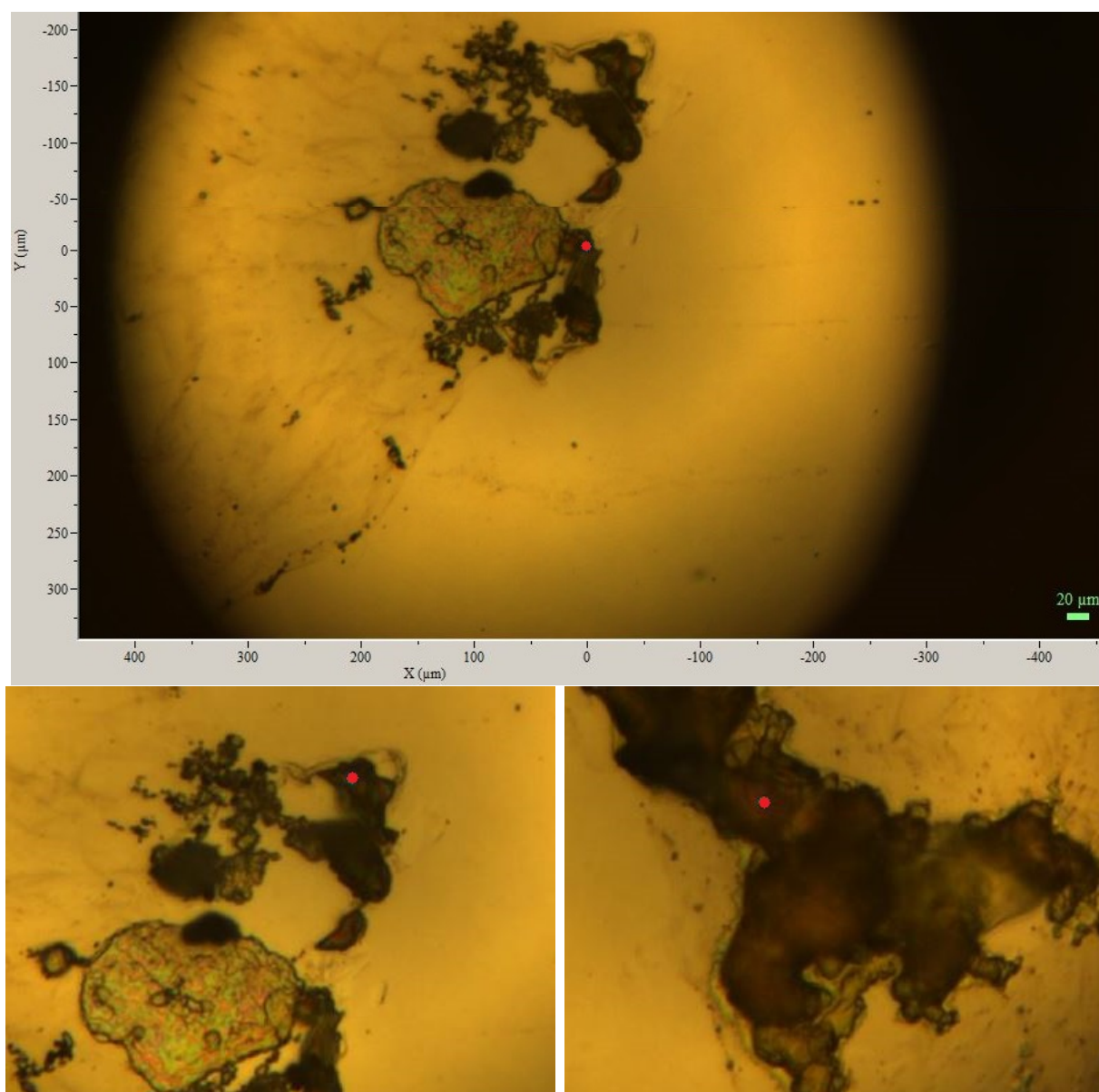
Obrázek 36: Riboflavin na ocelové destičce s teflonovou vrstvou, objektiv x10, $c = 4,5 \cdot 10^{-6}$ M

Nastavení Ramanova mikrospektrometru

Parametry	Hodnoty
Vlnová délka	632,8 nm
Šedý filtr	D 1
Vstupní štěrbin	100 μm
Mřížka	600 vrypů/mm
Objektiv	x50 ULWD
Akumulace spektra	90 x 1 s
Konfokální clona	400 μm



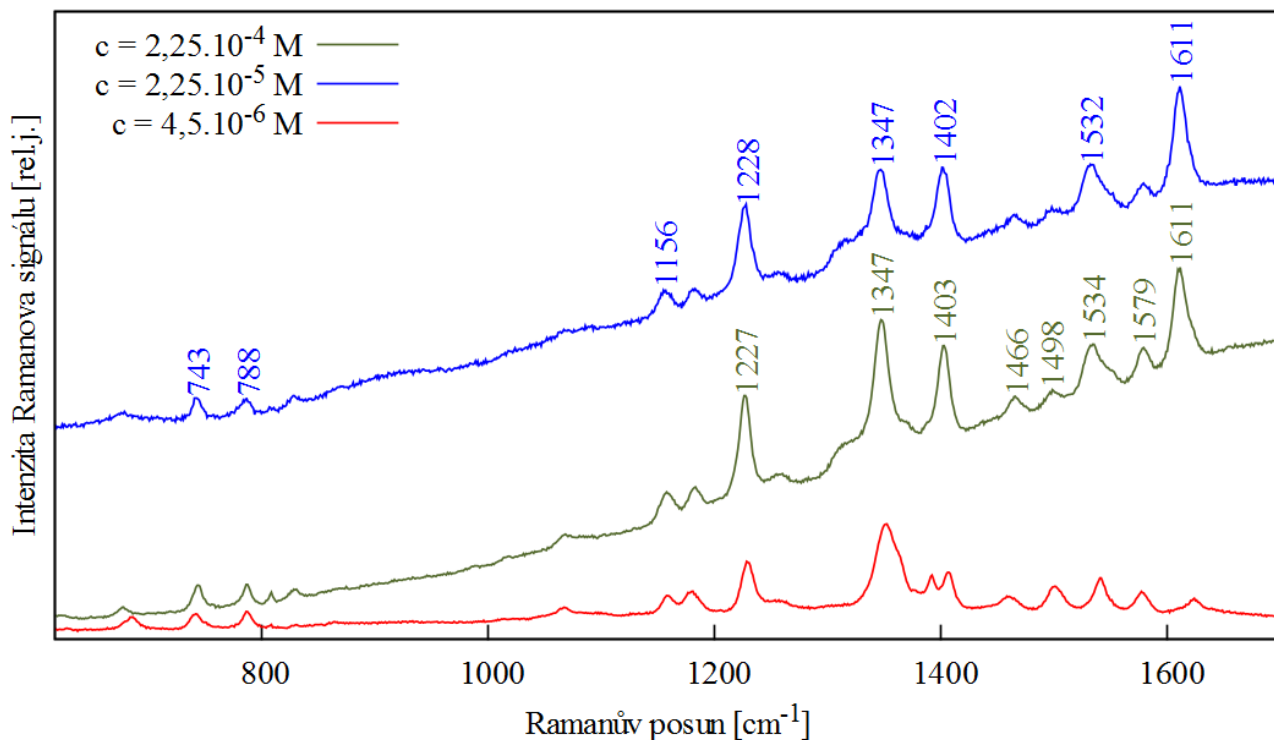
Graf 37: Spektrum riboflavinu na leštěné ocelové destičce s teflonovou vrstvou, $c = 4,5 \cdot 10^{-6}$ M



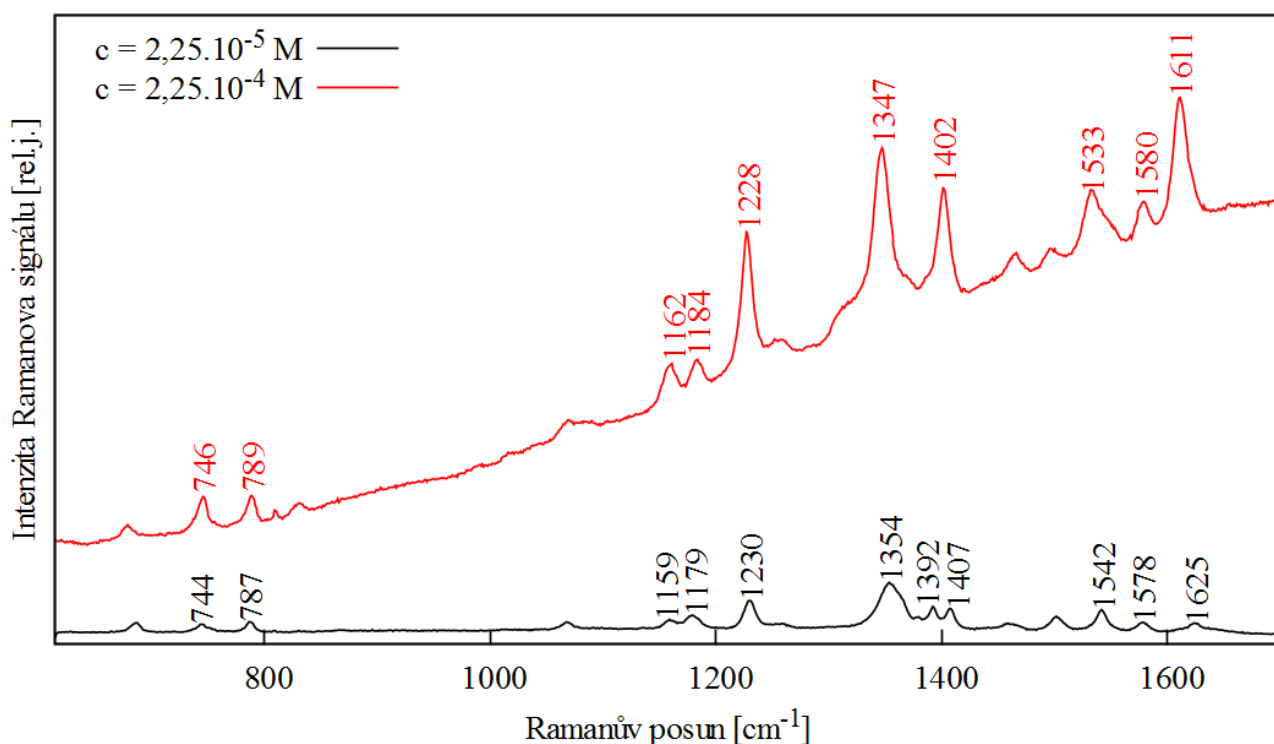
Obrázek 38: Změřená místa - spektrum 1,2,3

4.2.10 Riboflavin - porovnání spekter různých koncentrací

Na grafech 39 a 40 vidíme porovnání spekter měřených z různých koncentrací.



Graf 39: Spektrum riboflavínu leštěném nerezů s 50 nm vrstvou teflonu - různé koncentrace



Graf 40: Spektrum riboflavínu na fluoridu vápenatém - různé koncentrace

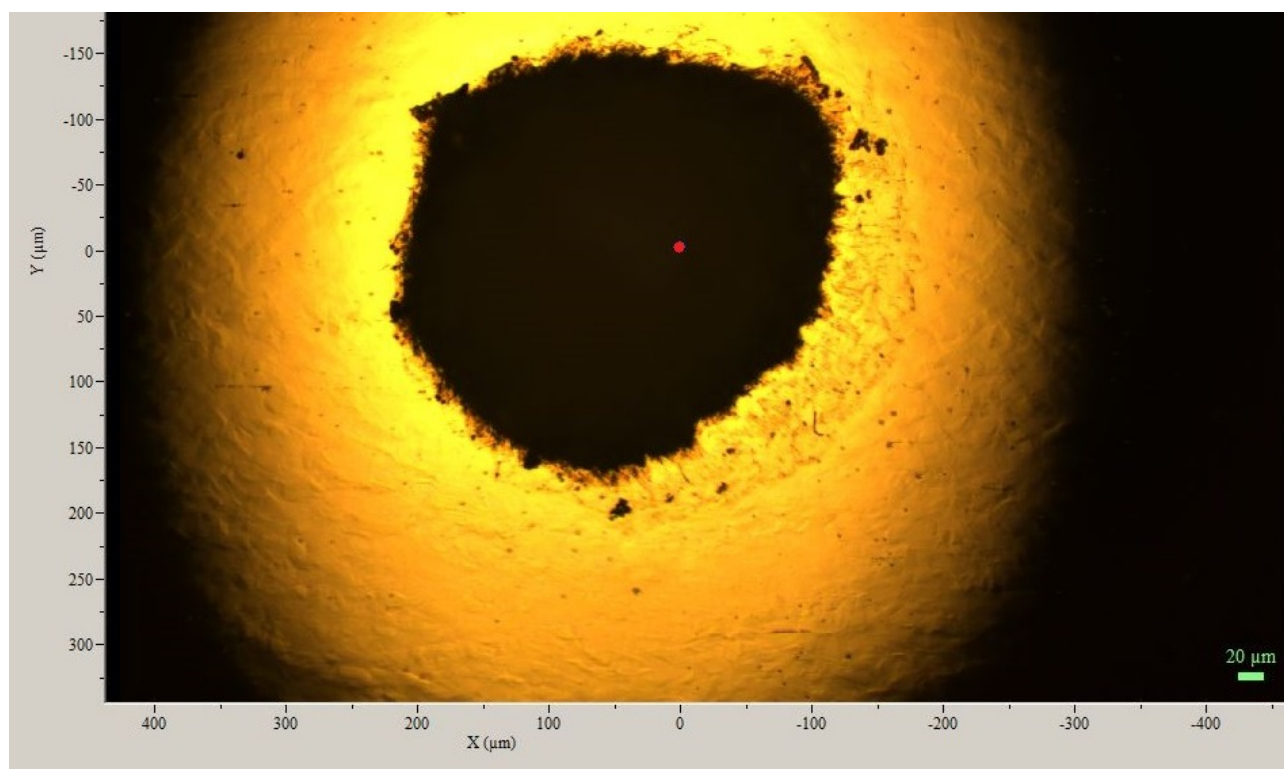
4.3 Kyselina pikolinová (PA)

Na destičce z leštěného nerezů s 50 nm teflonu a na destičce z fluoridu vápenatého necháme zaschnout kapky o objemu $2 \mu\text{l}$ roztoku kyseliny pikolinové o koncentracích $c_1 = 14 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $c_2 = 14 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $c_3 = 14 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $c_4 = 10^{-4} \text{ M}$ a $c_5 = 10^{-5} \text{ M}$, $c_6 = 10^{-6} \text{ M}$.

4.3.1 Kyselina pikolinová na leštěném nerezů s 50 nm teflonu

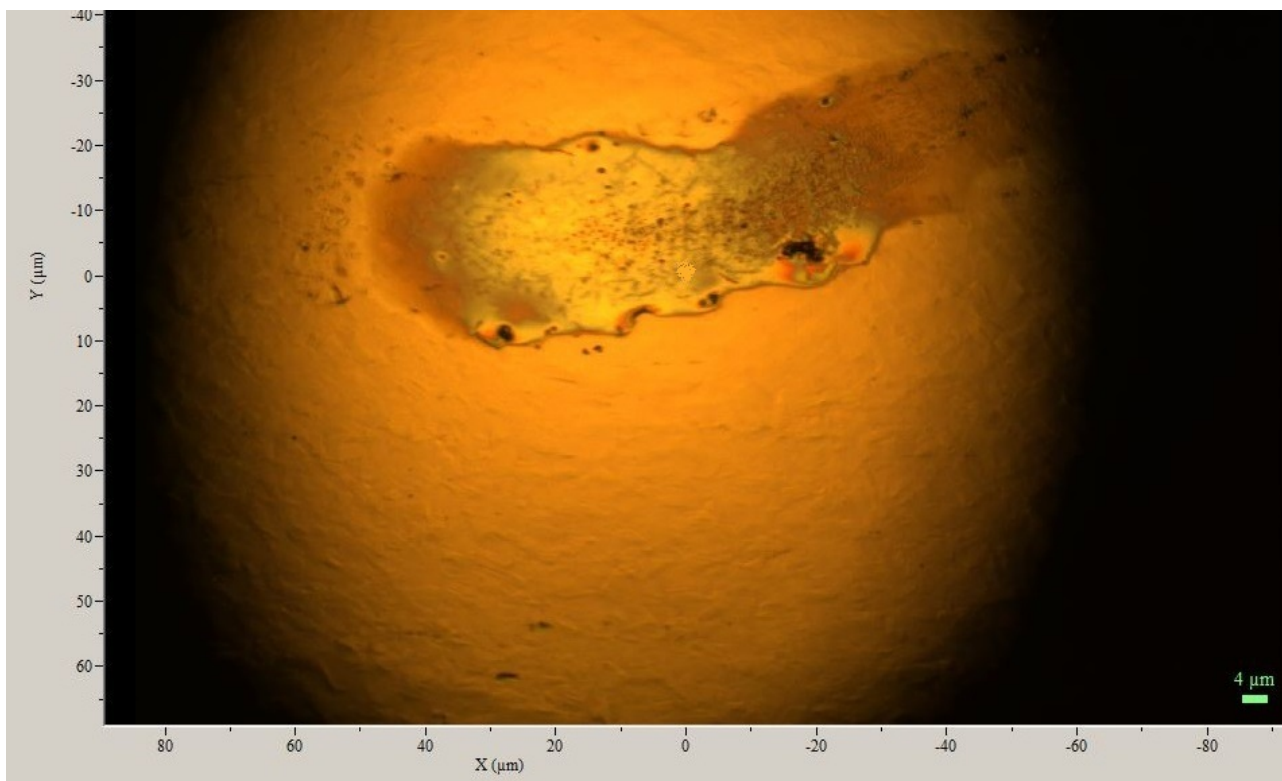
Ověření kalibrace: $521,67 \text{ cm}^{-1}$.

Vysycháním kapky o $2 \mu\text{l}$ roztoku kyseliny pikolinové (koncentrace $c_1 = 14 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) se vytvořil nános agregátů (obr. 41).



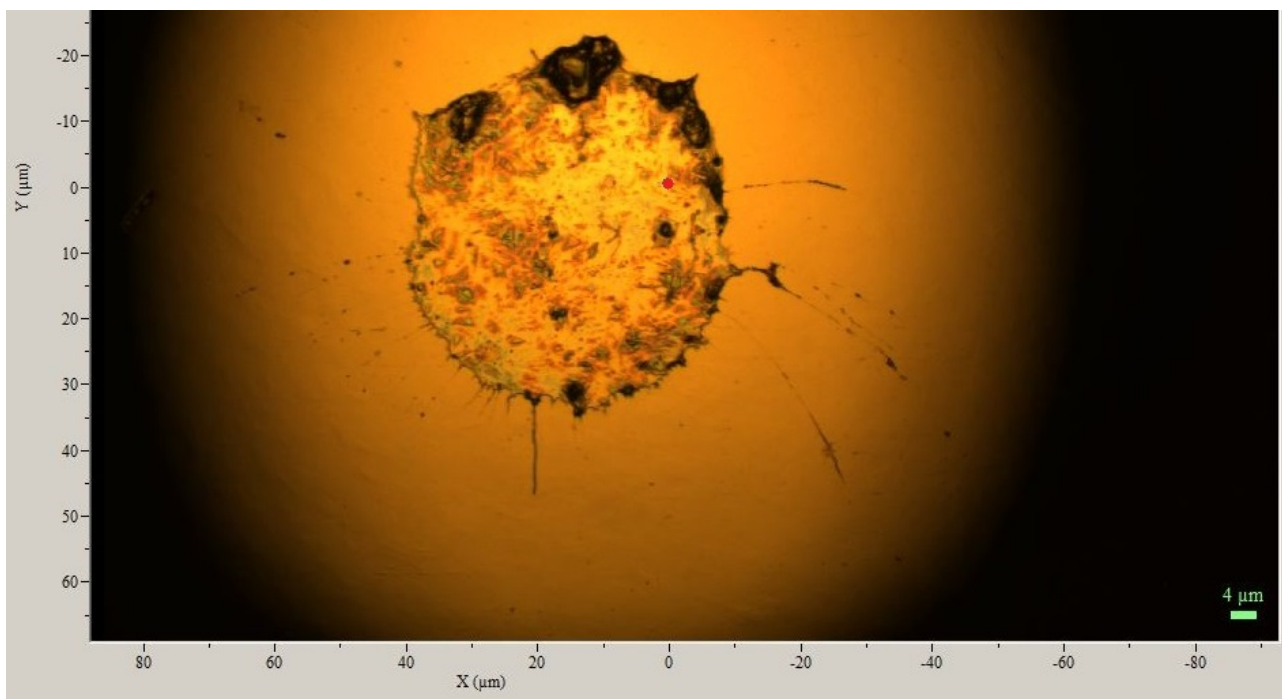
Obrázek 41: PA o koncentraci $c = 14 \text{ mM}$, objektiv x10

Vysycháním kapky o $2 \mu\text{l}$ roztoku kyseliny pikolinové (koncentrace $c_1 = 14 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) se vytvořila skvrna, látka tvoří místy krystalky (42).



Obrázek 42: PA o koncentraci $c = 1,4 \text{ mM}$, objektiv x10

Vysycháním kapky o $2 \mu\text{l}$ roztoku kyseliny pikolinové (koncentrace $c_1 = 14 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) se vytvořil nepřesný kruh s větší koncentrací látky na okraji (obr. 43).

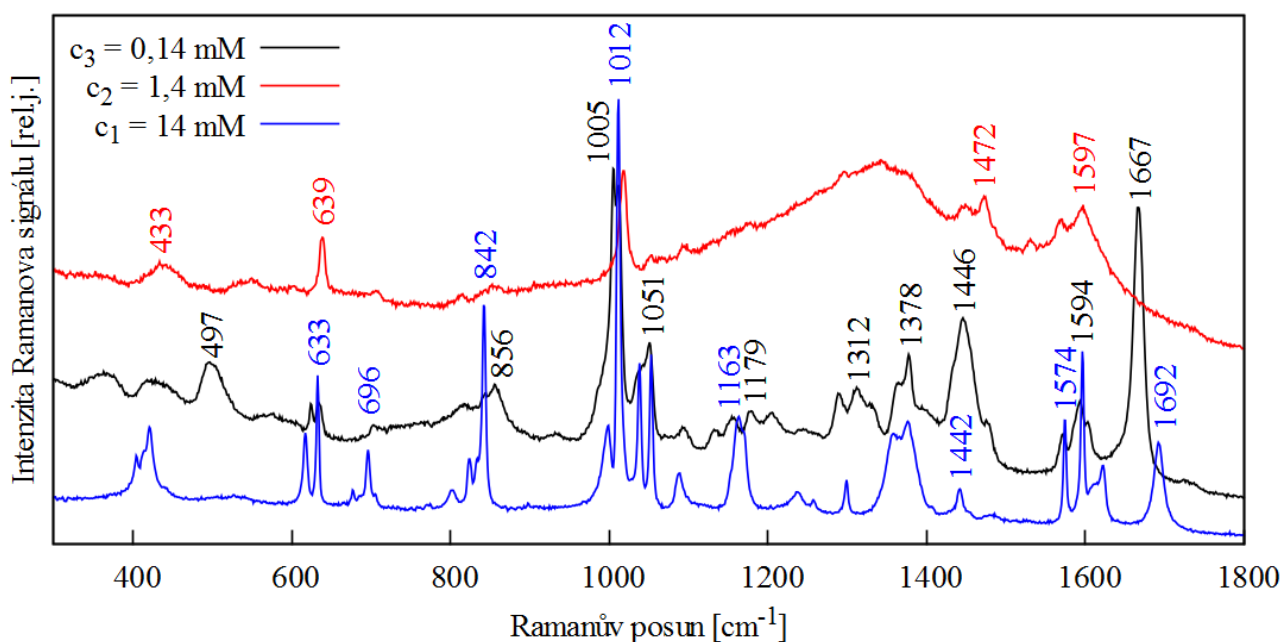


Obrázek 43: PA o koncentraci $c = 0,14 \text{ mM}$, objektiv x10

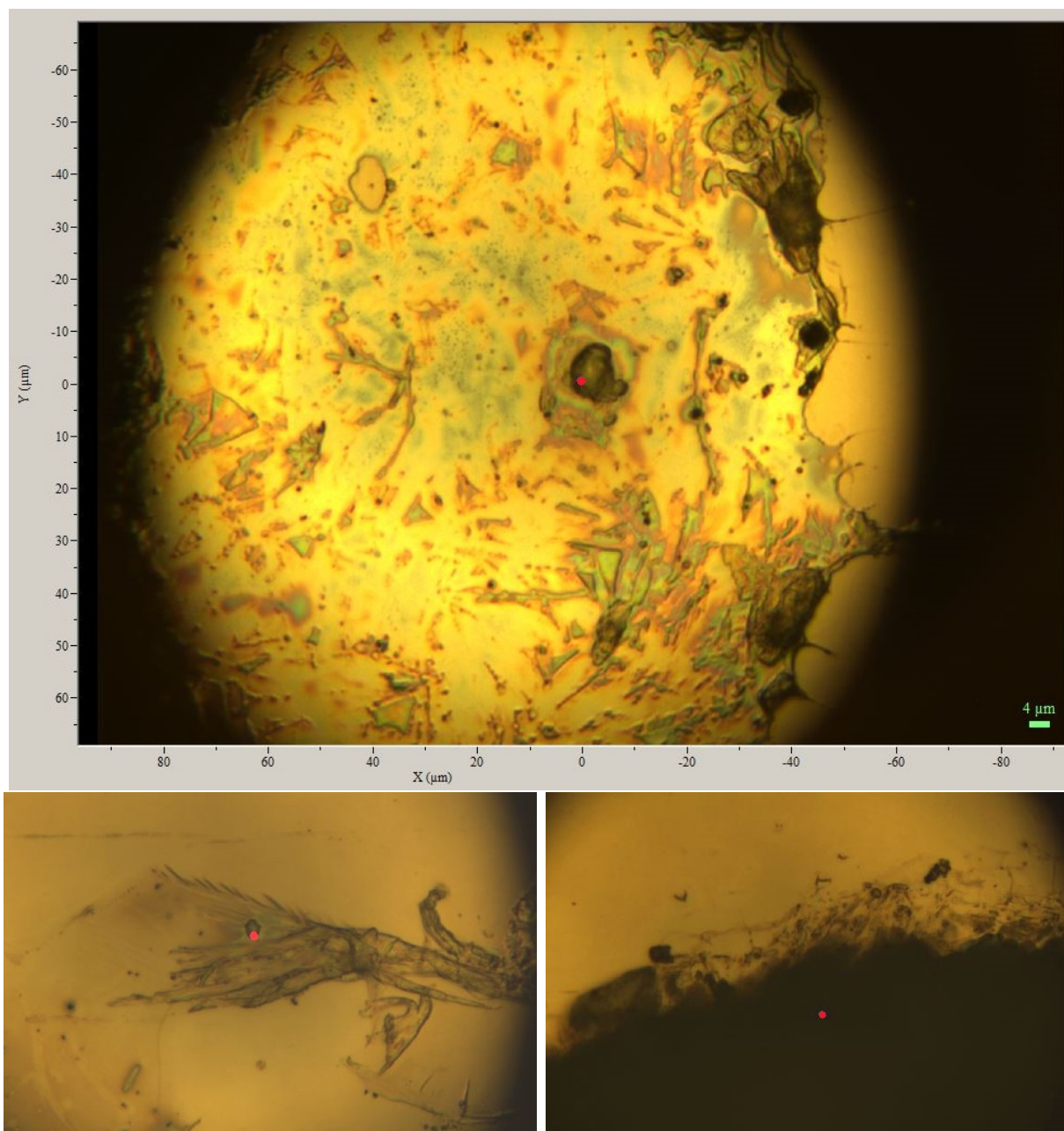
Nastavení Ramanova mikrospektrometru

Parametry	Nastavené hodnoty
Vlnová délka	632,8 nm
Šedý filtr	žádný
Vstupní štěrba	100 μm
Mřížka	600 vrypů/mm
Objektiv	x50 ULWD
Akumulace spektra	90 x 1 s
Konfokální clona	1000 μm

Získali jsme graf 44 změřením míst na obrázcích 45.

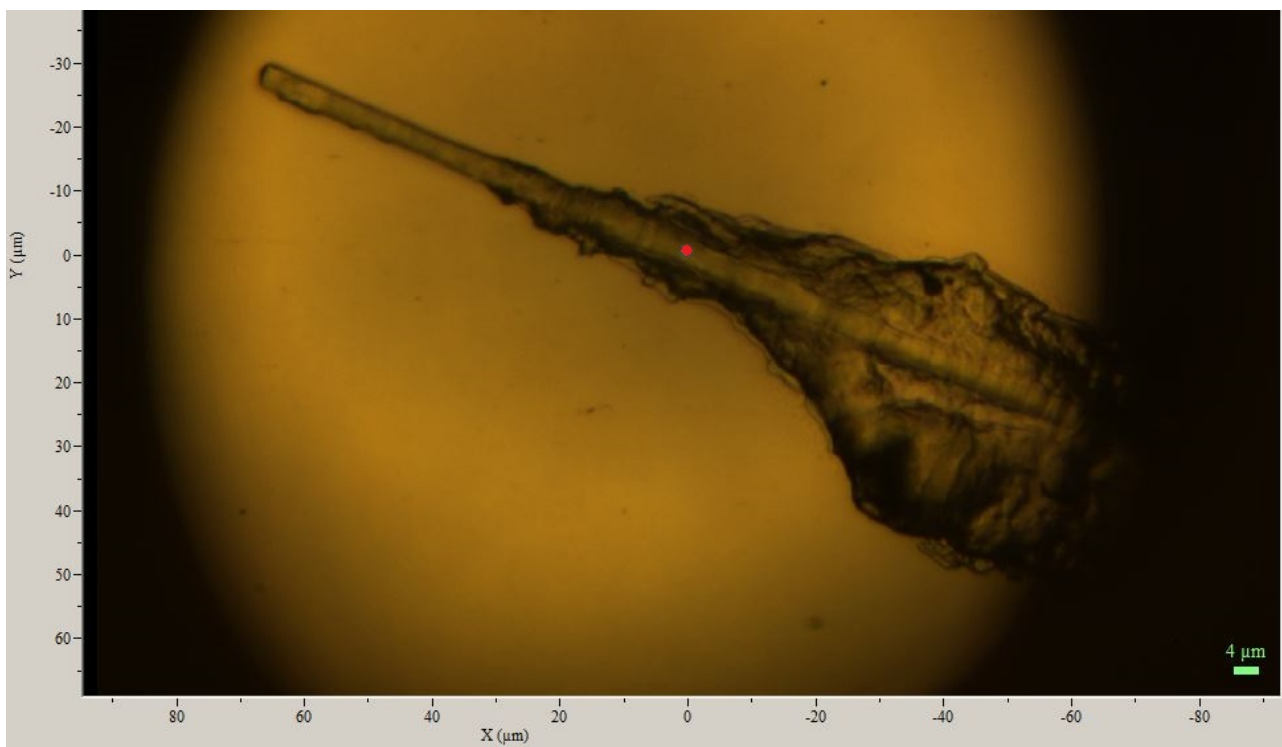


Graf 44: Spektrum kyseliny pikolinové o koncentracích c_1, c_2, c_3



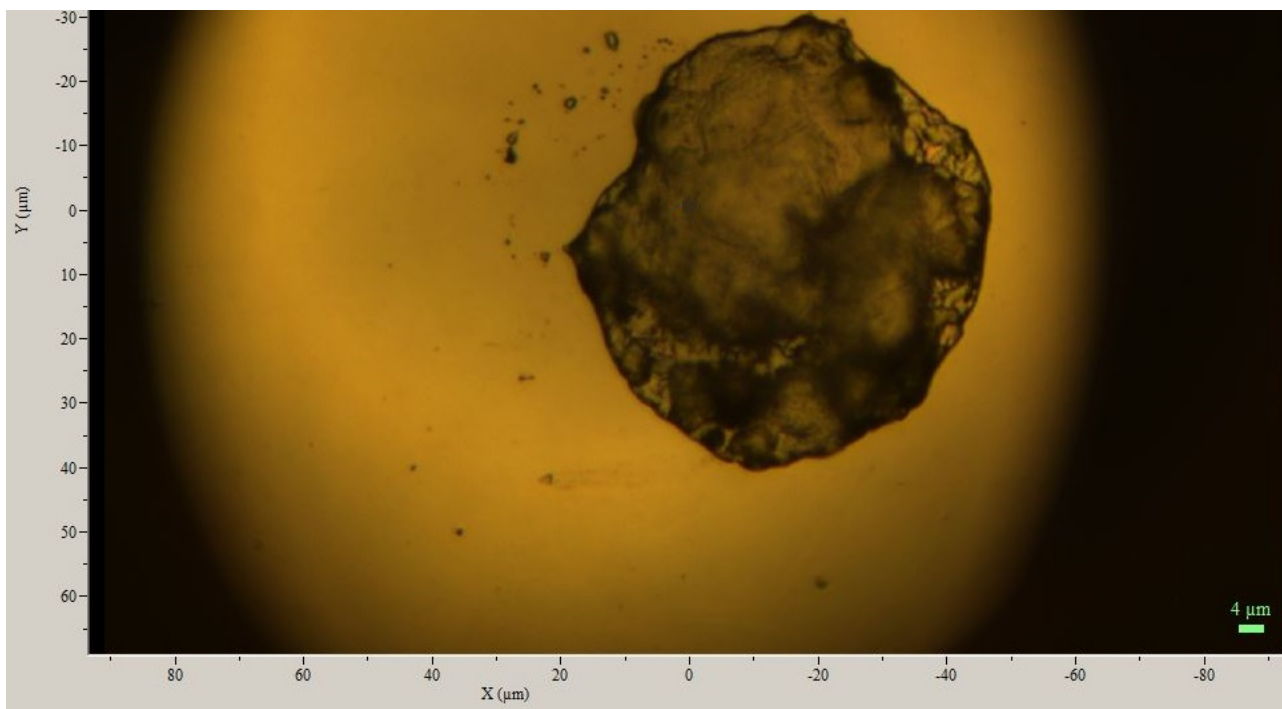
Obrázek 45: Změřená místa: $c_3 = 14 \cdot 10^{-5}$ M, $c_2 = 14 \cdot 10^{-4}$ M, $c_1 = 14 \cdot 10^{-3}$ M

Vysycháním kapky o $2 \mu\text{l}$ roztoku kyseliny pikolinové (koncentrace $c_4 = 10^{-4} \text{ M}$) se vytvořil krystal obklopený amorfni látkou (obr. 46).



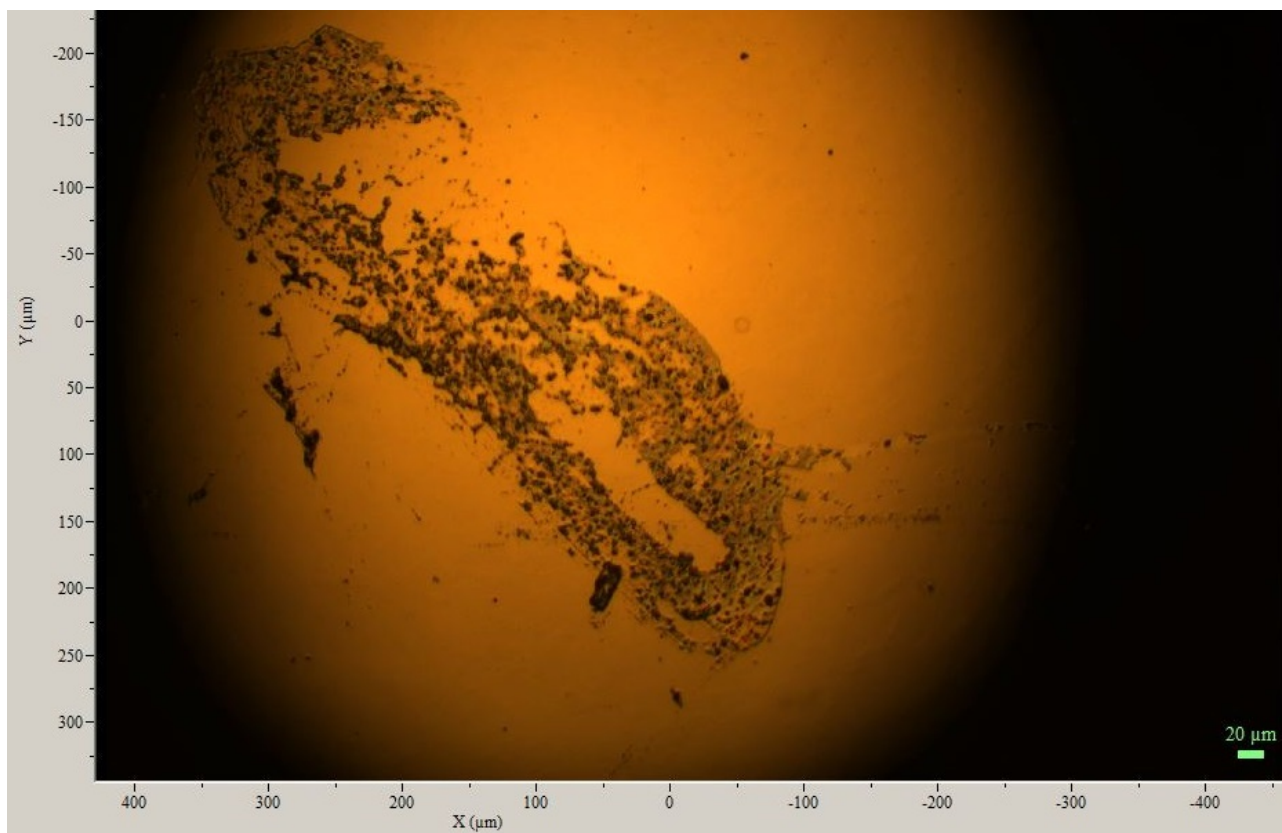
Obrázek 46: PA, koncentrace $c_4 = 10^{-4} \text{ M}$

Vysycháním kapky o $2 \mu\text{l}$ roztoku kyseliny pikolinové (koncentrace $c_5 = 10^{-5} \text{ M}$) se utvořila skvrna tvořená krystalky a amorfni látkou (obr. 47).



Obrázek 47: PA, koncentrace $c_5 = 10^{-5} \text{ M}$

Vysycháním kapky o 2 μl roztoku kyseliny pikolinové (koncentrace $c_6 = 10^{-6}$ M) se vytvořila skvrna s nehomogenně rozloženou látkou (obr. 48).

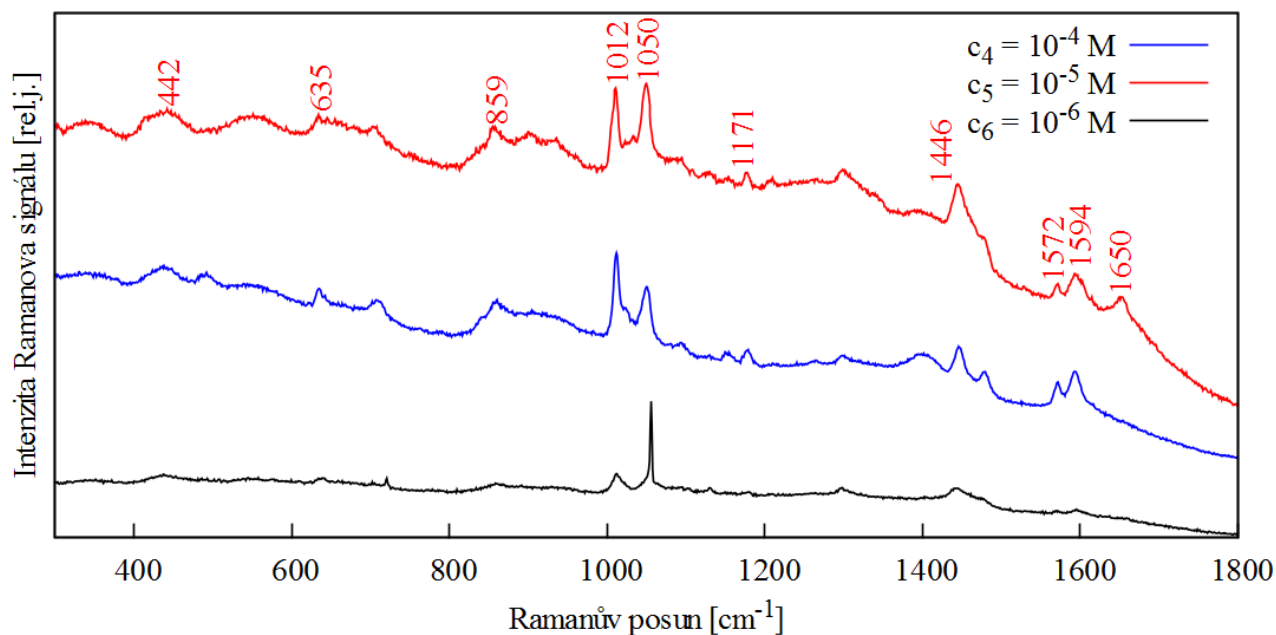


Obrázek 48: PA, koncentrace $c_6 = 10^{-6}$ M

Nastavení Ramanova mikrospektrometru

Parametry	Nastavené hodnoty
Vlnová délka	632,8 nm
Šedý filtr	žádný
Vstupní štěrbin	100 μm
Mřížka	600 vrypů/mm
Objektiv	x50 ULWD
Akumulace spektra	90 x 2 s 1000 μm
Konfokální clona	

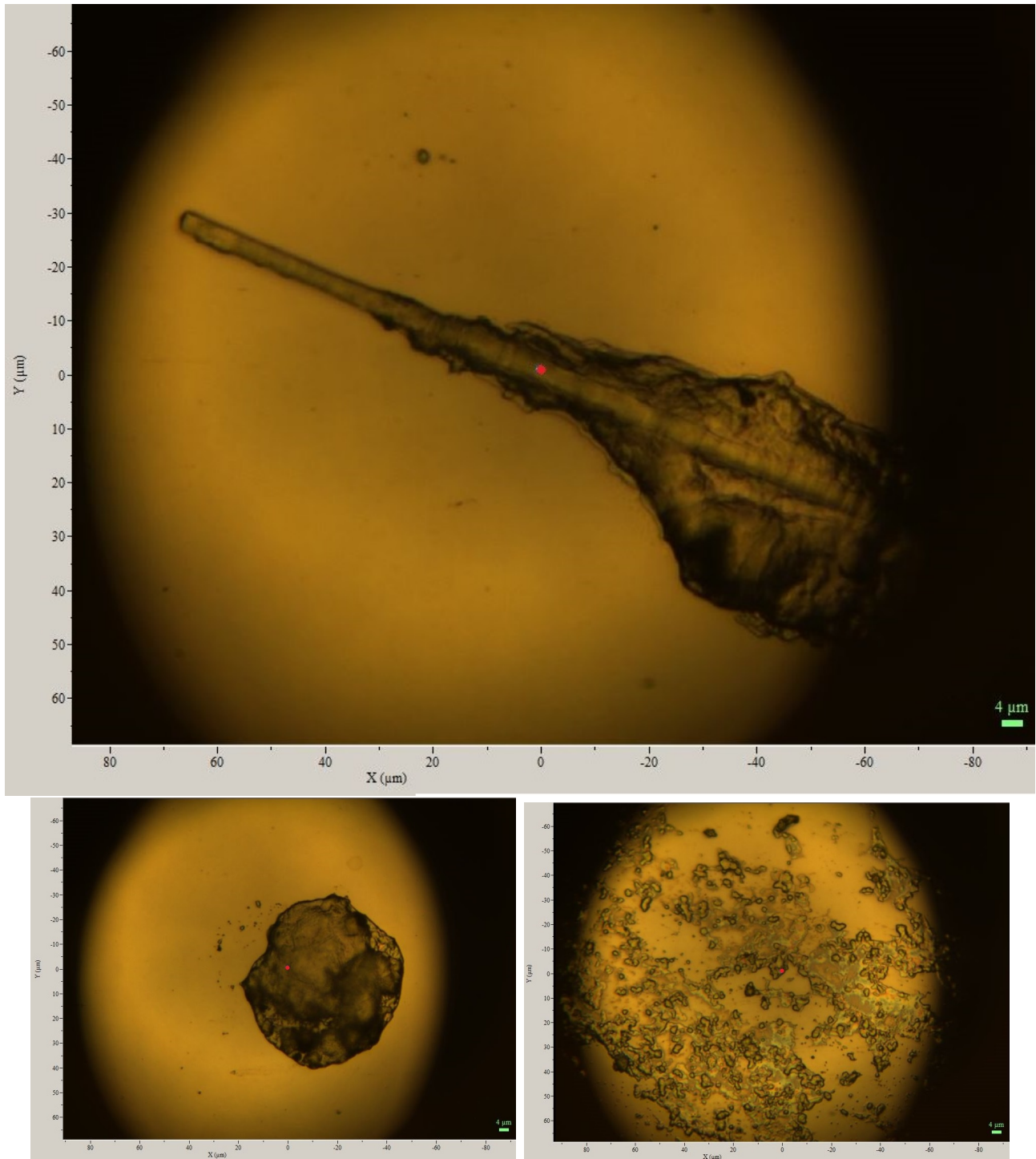
Získáme graf 49 měření z míst na obrázcích 50.



Graf 49: Spektrum kyseliny pikolinové o koncentracích c_4, c_5, c_6

INTERPRETACE

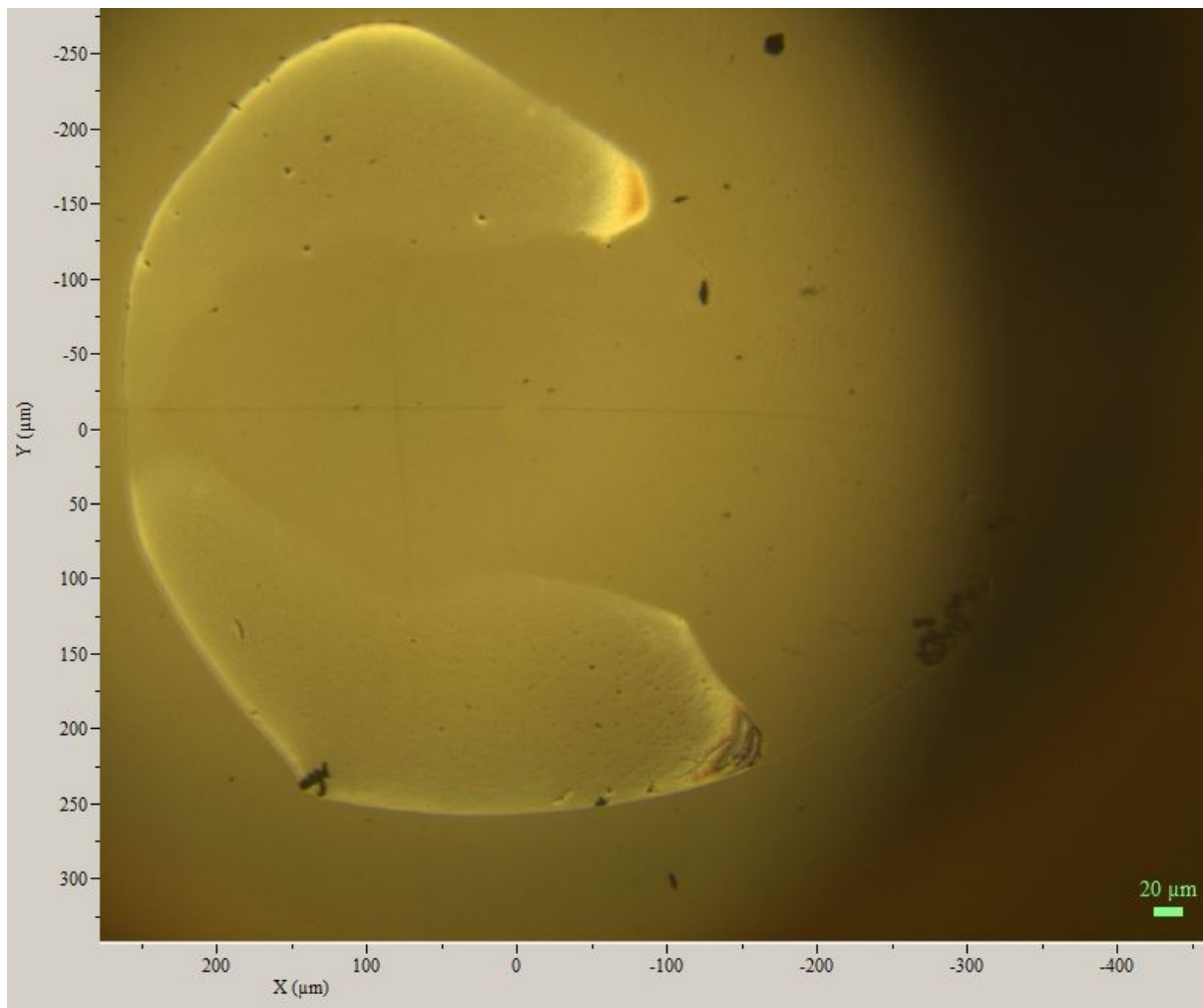
Z grafů je výrazná změna intenzity pásů 1012 a 1050 cm^{-1} . Při měření spektra kapky o největší koncentraci c_4 vyšel pás 1012 cm^{-1} jako nejintenzivnější. Po snížení koncentrace 10 krát byla intenzita obou pásů téměř stejná a při nejmenší koncentraci c_6 se stal nejintenzivnějším pás 1050 cm^{-1} .



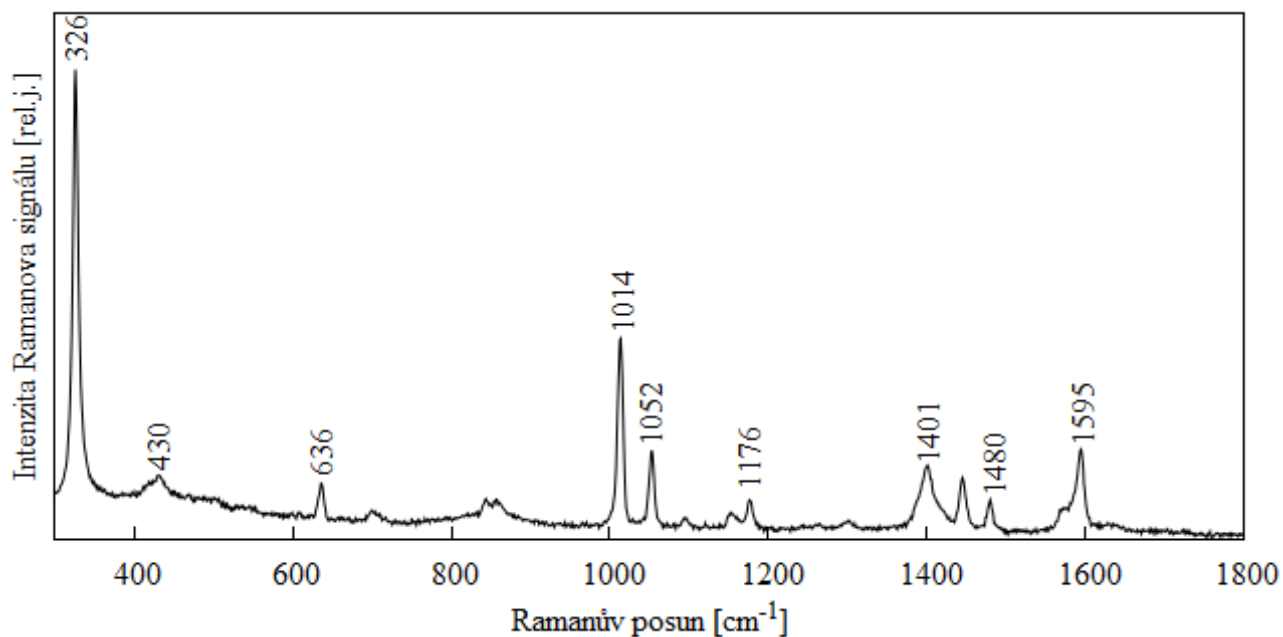
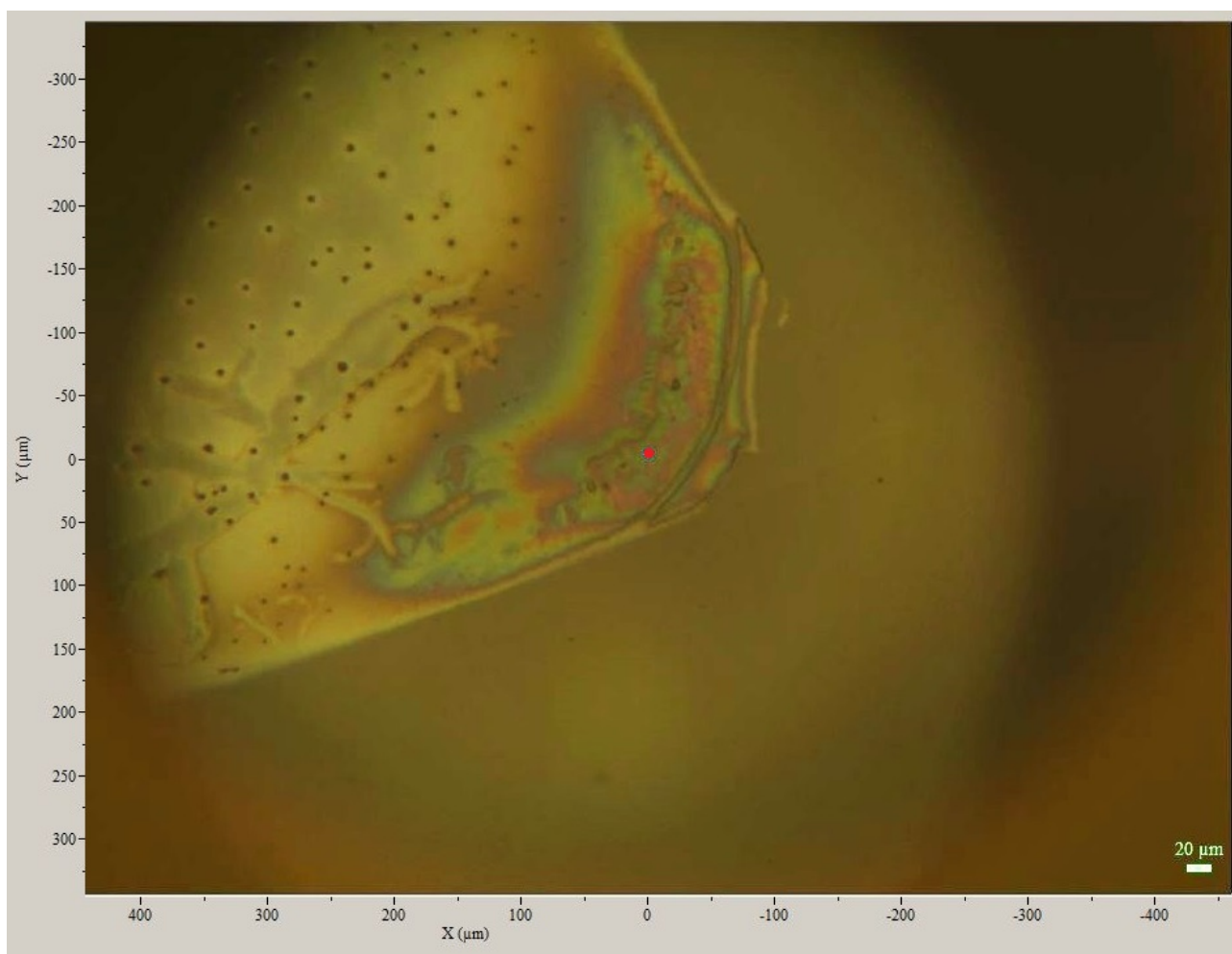
Obrázek 50: Změřená místa: $c_3 = 14 \cdot 10^{-5}$ M, $c_2 = 14 \cdot 10^{-4}$ M, $c_1 = 14 \cdot 10^{-3}$ M

4.3.2 Kyselina pikolinová na CaF_2

Po vyschnutí kapky roztoku kyseliny pikolinové o objemu $V = 2 \mu\text{l}$ (koncentrace $c = 0,14 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) je vidět na levé straně část kontaktní linie (část "kávového kroužku"), která se nezachovala po celém obvodu (obr. 51).

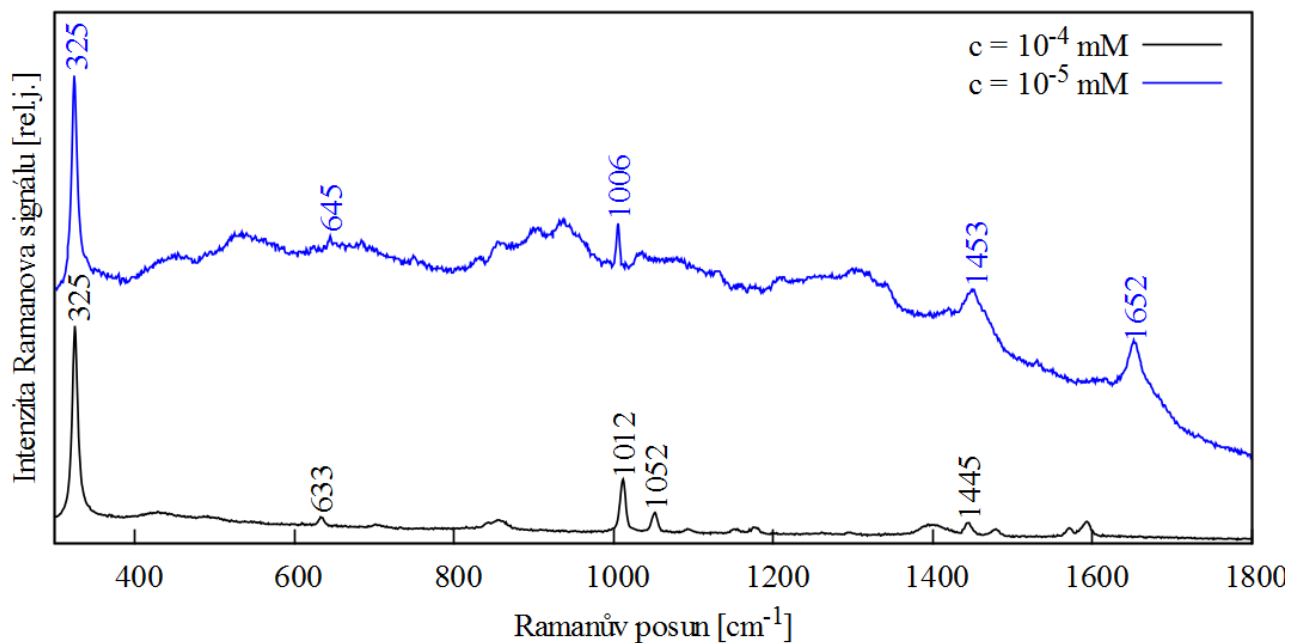


Obrázek 51: PA na CaF_2 , $c = 14 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, objektiv x10

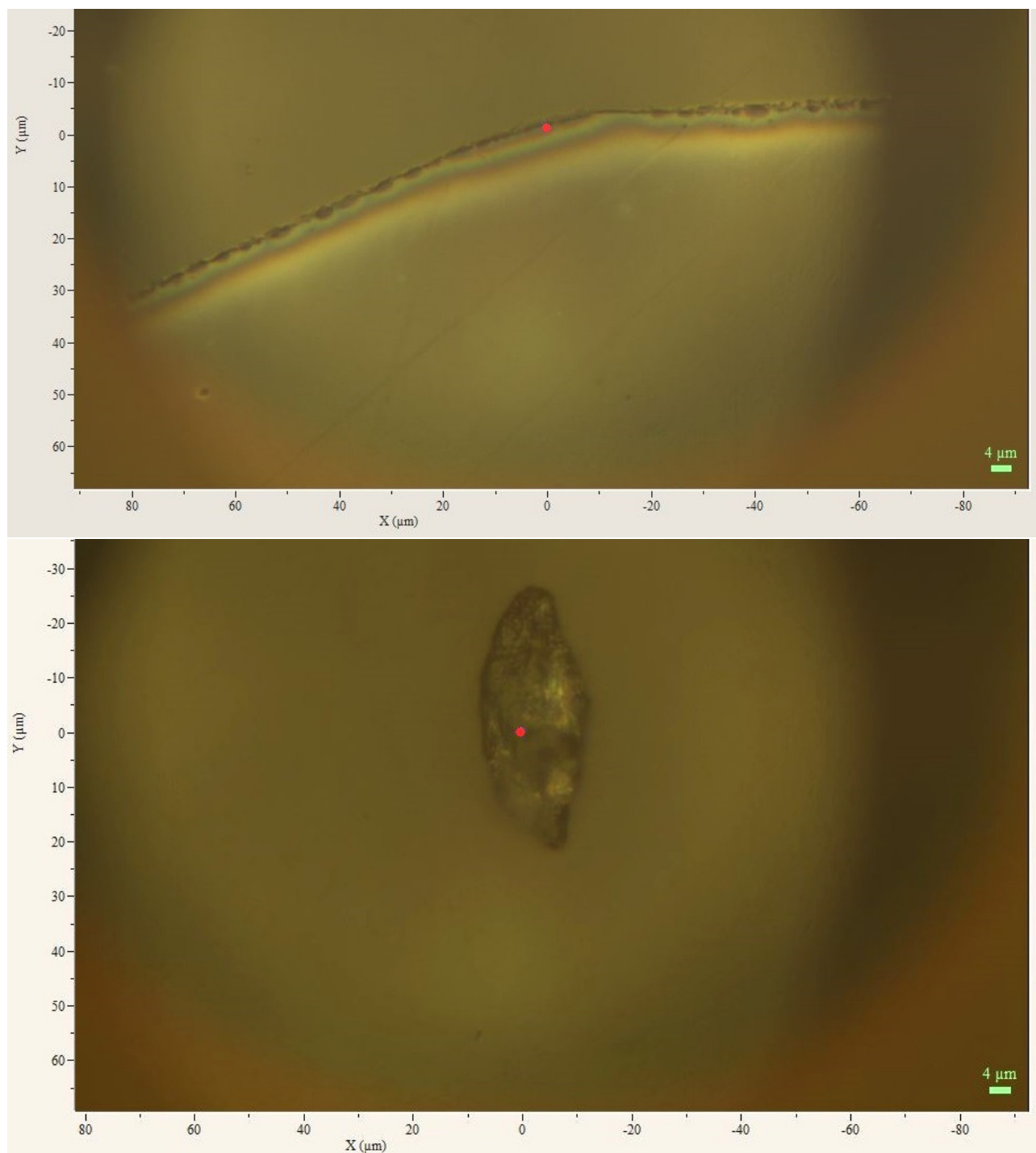
Graf 52: Spektrum kyseliny pikolinové na fluoridu vápenatém - koncentrace $c = 14 \cdot 10^{-5}$ M

Obrázek 53: Změřené místo

Po vyschnutí kapky roztoku kyseliny pikolinové o objemu $V = 2 \mu\text{l}$ s koncentrací $c_4 = 10^{-4} \text{ M}$ se vytvořil "kávový kroužek", ale po vyschnutí kapky o koncentraci $c_5 = 10^{-5} \text{ M}$ zůstaly agregáty ve skvrně. Z koncentrace $c_6 = 10^{-6} \text{ M}$ se na tomto povrchu signál získat nepodařilo. Získali jsme graf 54 měřením z míst na obrázcích 55.



Graf 54: Spektrum kyseliny pikolinové na fluoridu vápenatém - různé koncentrace

Obrázek 55: Změřená místa: $c_4 = 10^{-4}$ M, $c_5 = 10^{-5}$ M

INTERPRETACE

Při porovnání grafů např. 44 a 54 vidíme, že na fluoridu vápenatém je homogennější pozadí než na destičce z leštěného nerez.

Nejdůležitější pásy [6]:

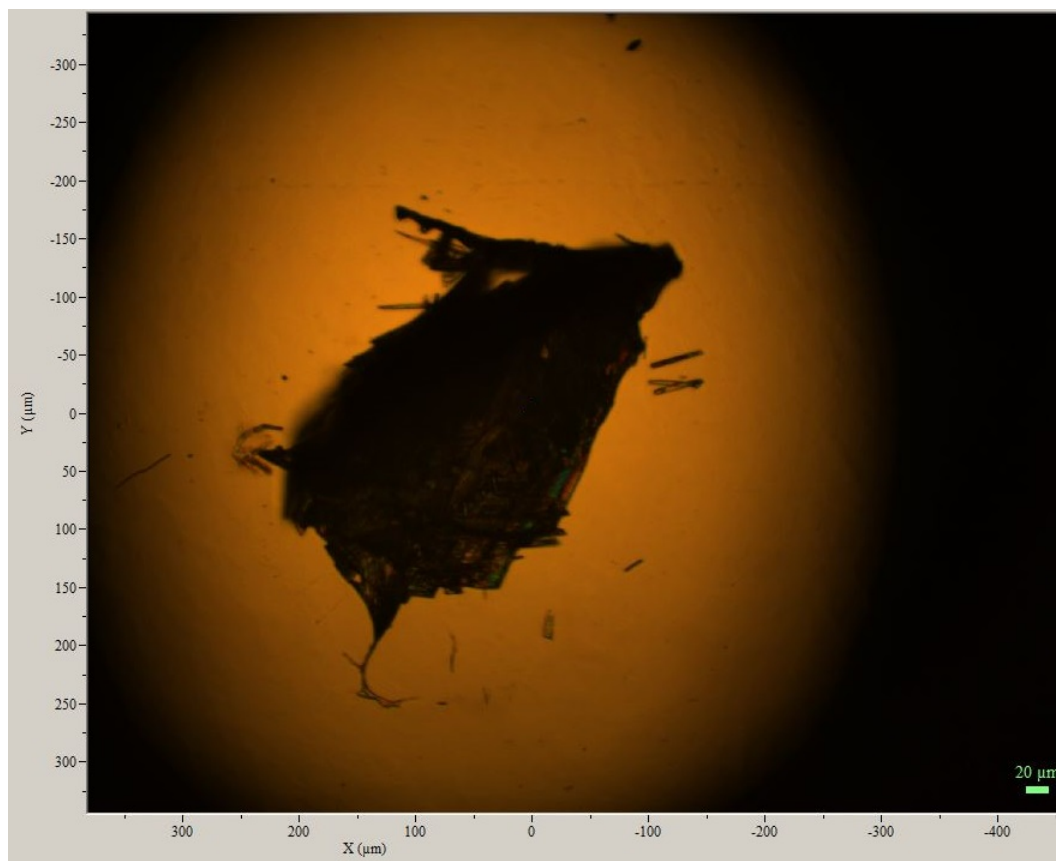
- 620 cm^{-1} - deformační vibrace kruhu
- $1015(1012)\text{ cm}^{-1}$ - dýchací vibrace kruhu (ring vibration) - zkracování a prodlužování vazeb
- 1370 cm^{-1} - valenční vibrace (stretching) COO
- 1440 cm^{-1} - deformace dvojně vazby C=C
- 1598 cm^{-1} - valenční vibrace (stretching) C=C, deformace dvojně vazby

4.4 Kyselina dipikolinová (DPA)

Na destičce z leštěného nerez s 50 nm teflonu a na destičce z fluoridu vápenatého necháme zaschnout kapky o objemu $2\ \mu\text{l}$ roztoku kyseliny dipikolinové o koncentracích $c_1 = 3 \cdot 10^{-3}\text{ M}$, $c_2 = 3 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ a $c_3 = 3 \cdot 10^{-5}\text{ M}$.

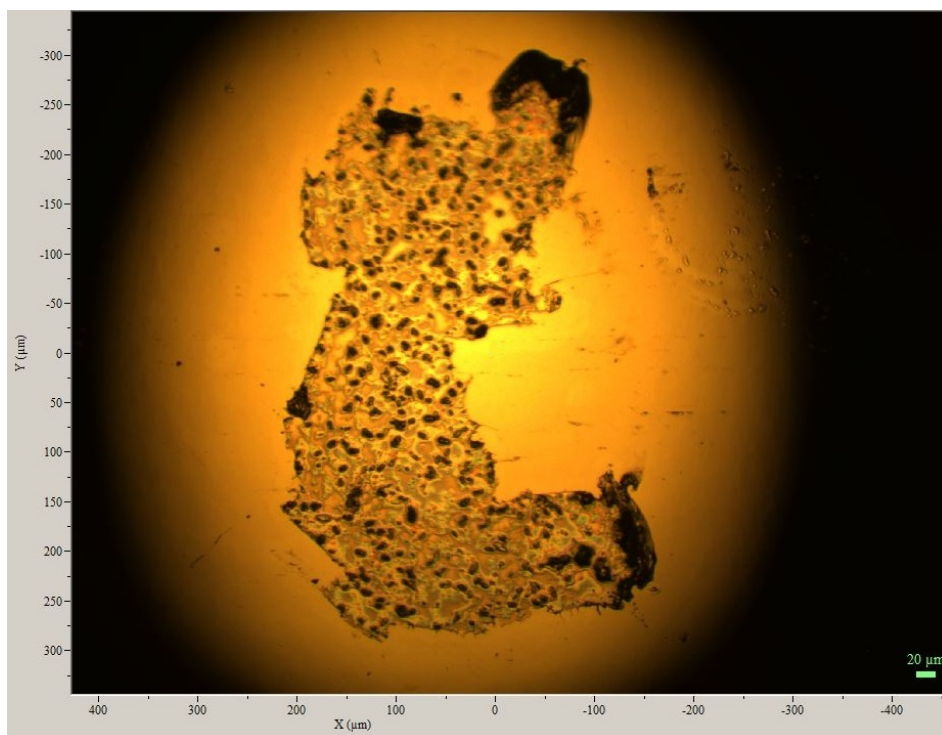
4.4.1 Kyselina dipikolinová na leštěném nerez s 50 nm teflonu

Po vyschnutí kapky roztoku kyseliny dipikolinové $2\ \mu\text{l}$ o koncentraci $c_1 = 3 \cdot 10^{-3}\text{ M}$ se vytvořil nános koncentrované látky s krystalky na okraji (obr. 56).



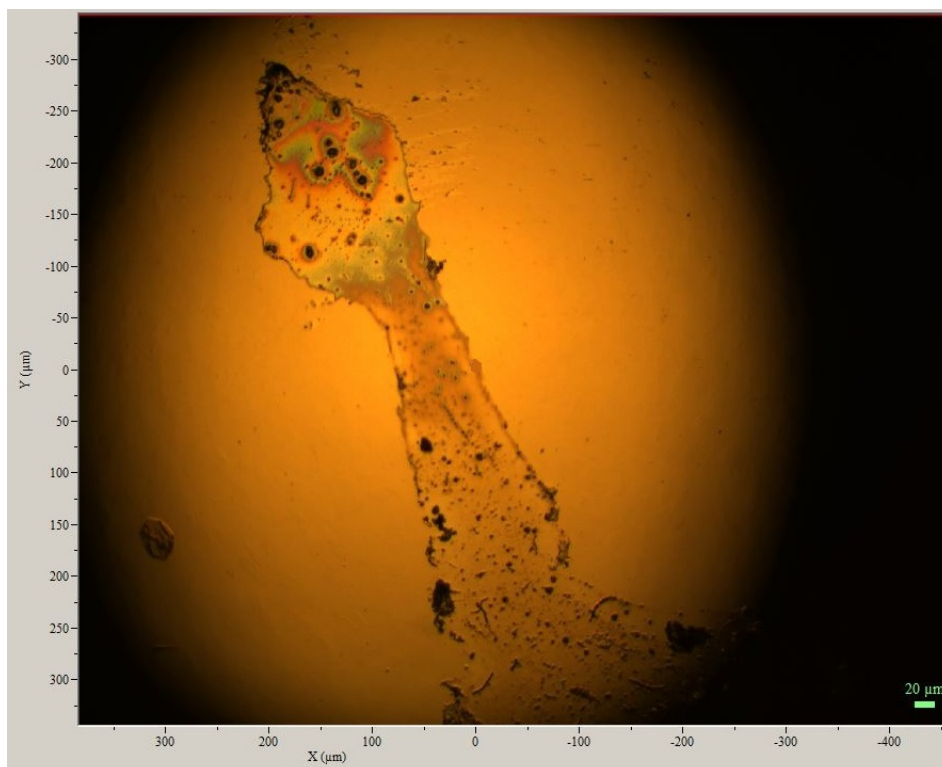
Obrázek 56: DPA o koncentraci $c_1 = 3 \cdot 10^{-3}\text{ M}$

Po vyschnutí kapky roztoku kyseliny dipikolinové $2 \mu\text{l}$ o koncentraci $c_2 = 3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ zbyla skvrna s nehomogenně rozloženou látkou (obr. 57).



Obrázek 57: DPA o koncentraci $c_2 = 3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

Po vyschnutí kapky roztoku kyseliny dipikolinové $2 \mu\text{l}$ o koncentraci $c_3 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ zbyla skvrna s nehomogenně rozloženou látkou (obr. 58), ale s menší hustotou než u předchozí, desetkrát větší koncentrace.

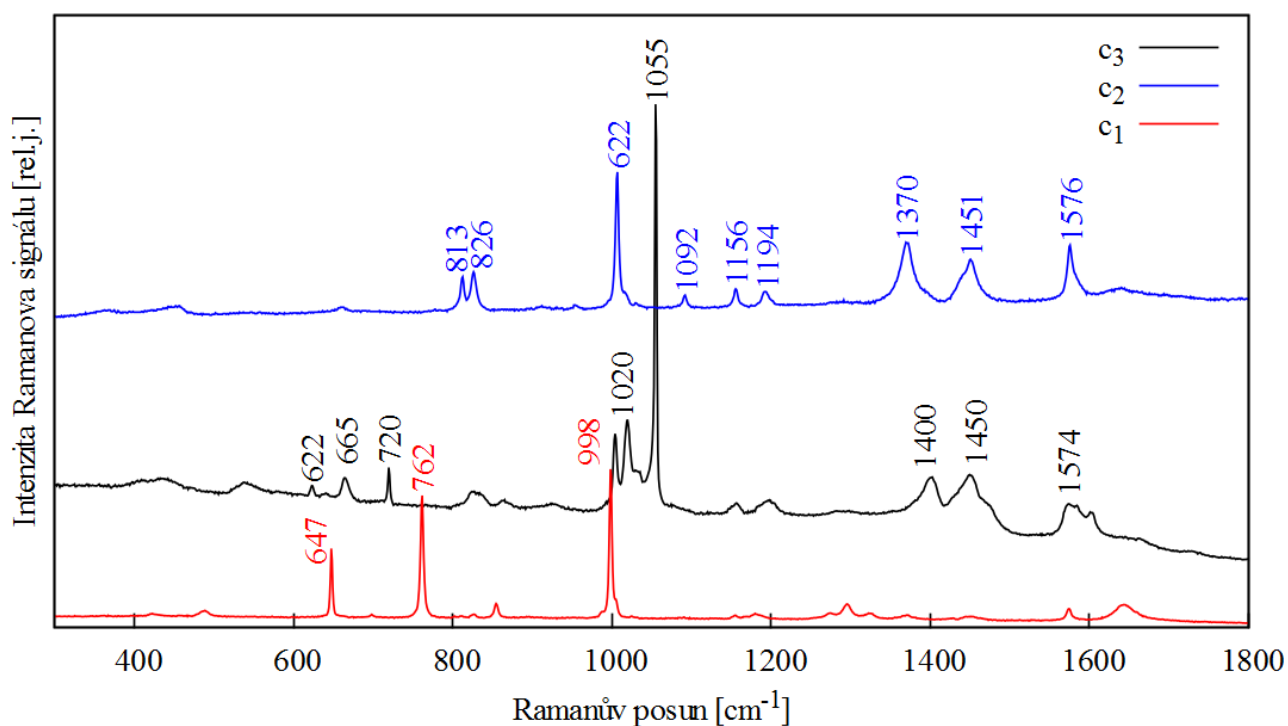


Obrázek 58: DPA o koncentraci $c_3 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

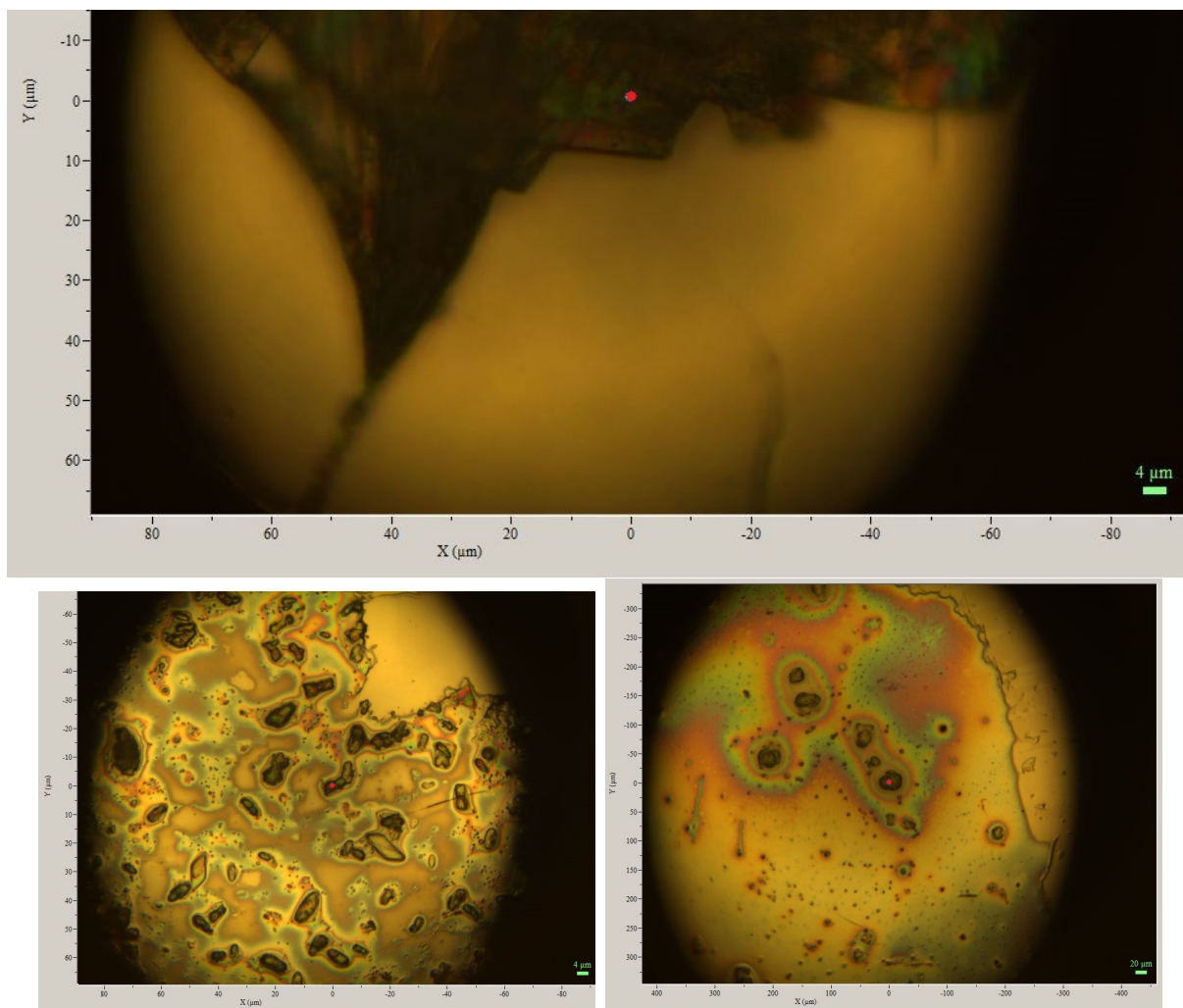
Nastavení Ramanova mikrospektrometru

Parametry	Nastavené hodnoty
Vlnová délka	632,8 nm
Šedý filtr	D 0.6 pro c_1 , D 0.3 pro c_2, c_3
Vstupní štěrba	100 μm
Mřížka	600 vrypů/mm
Objektiv	x50 ULWD
Akumulace spektra	90 x 1 s pro c_1, c_2 a 90 x 2 s pro c_3
Konfokální clona	1000 μm

Získali jsme graf 59 z naměřených míst na obrázku 60.



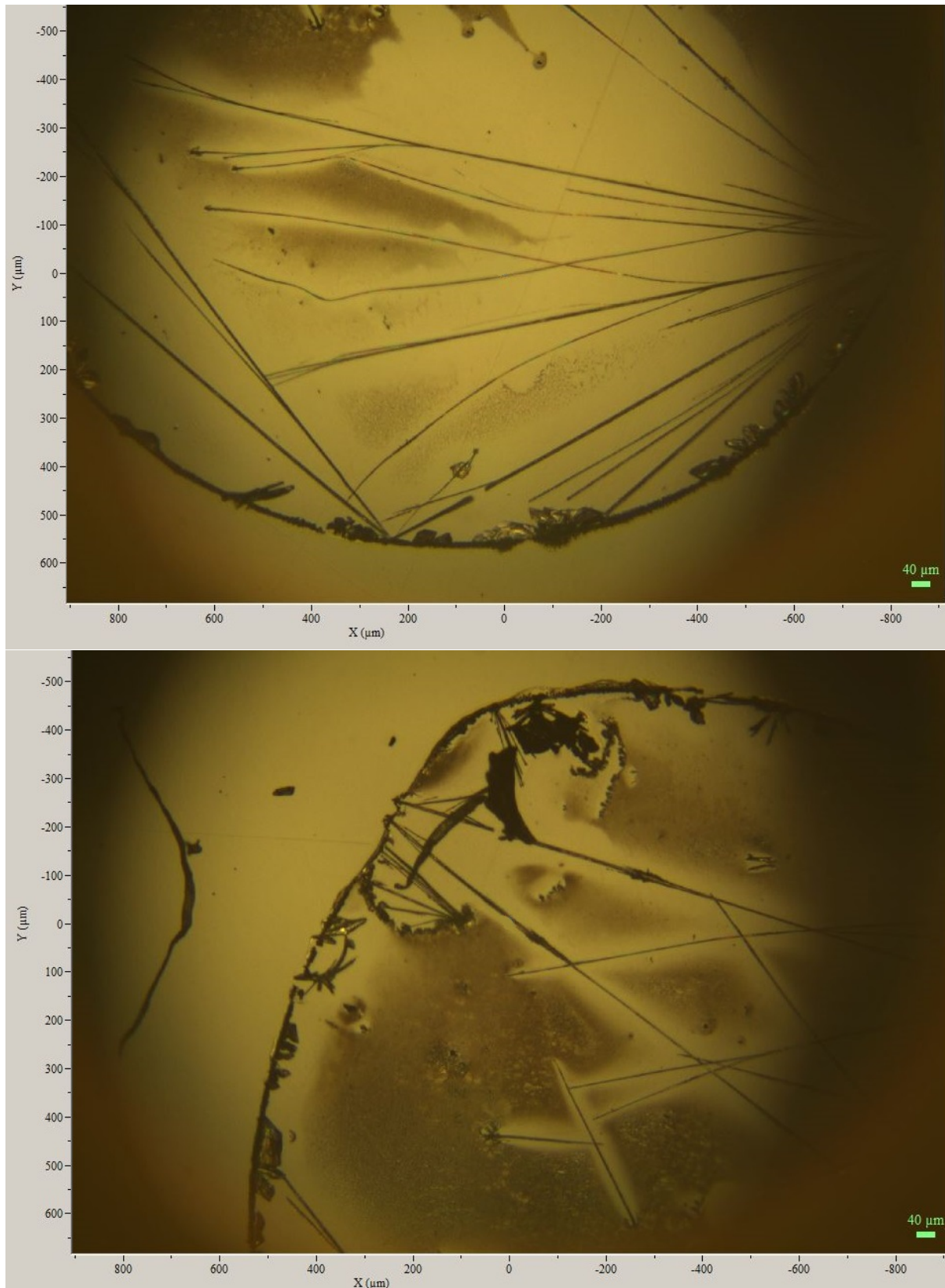
Graf 59: Kyselina dipikolinová na leštěném nerezovu s 50 nm vrstvou teflonu, $c_1 = 3 \cdot 10^{-3}$ M, $c_2 = 3 \cdot 10^{-4}$ M, $c_3 = 3 \cdot 10^{-5}$ M



Obrázek 60: Změřená místa: $c_1 = 3 \cdot 10^{-3}$ M, $c_2 = 3 \cdot 10^{-4}$ M, $c_3 = 3 \cdot 10^{-5}$ M

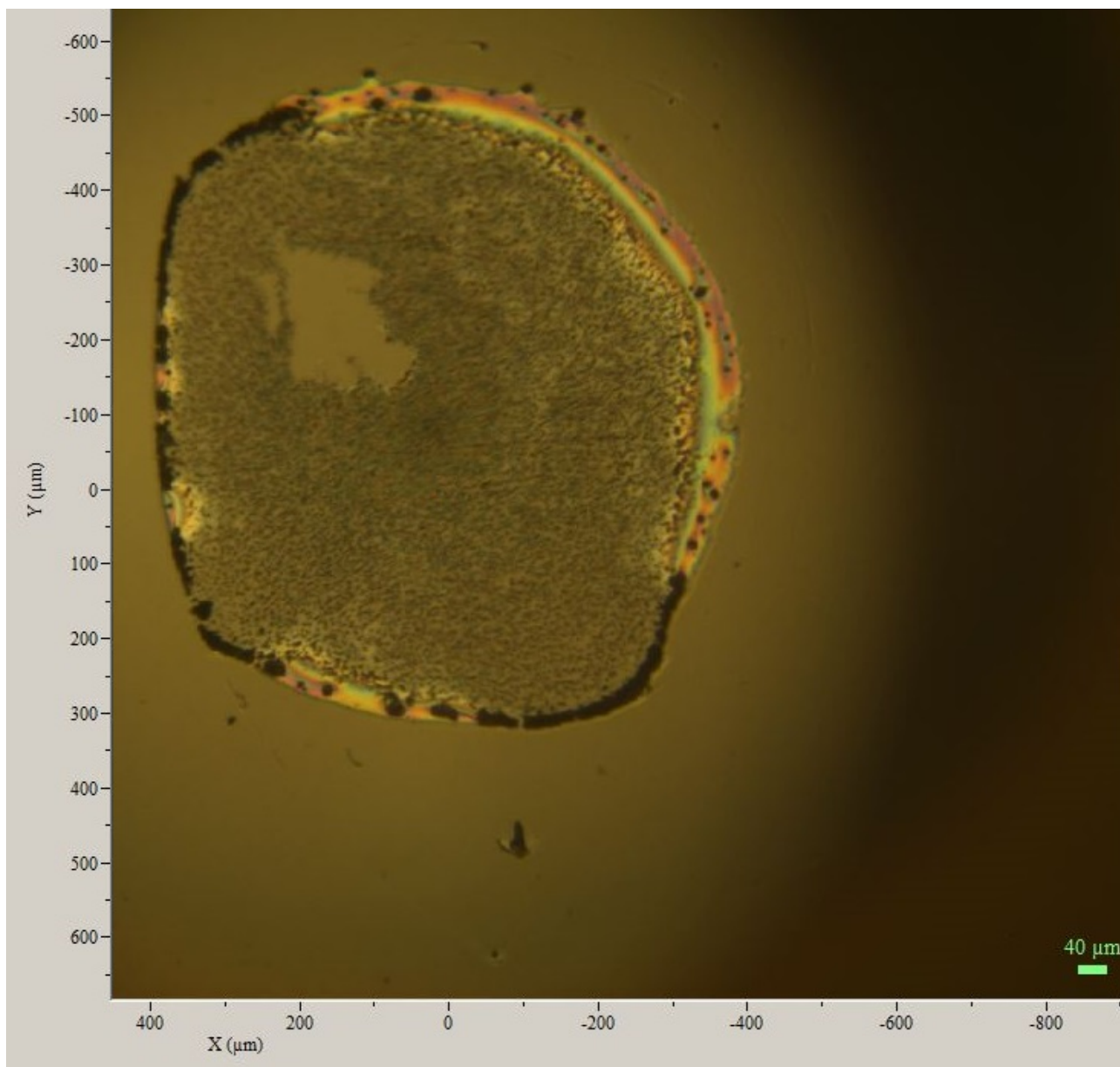
4.4.2 Kyselina dipikolinová na CaF_2

Po vyschnutí kapky roztoku kyseliny dipikolinové $2 \mu\text{l}$ o koncentraci $c_1 = 3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ se utvořil kávový kroužek s krystalky jehlicového tvaru uvnitř (obr. 61).



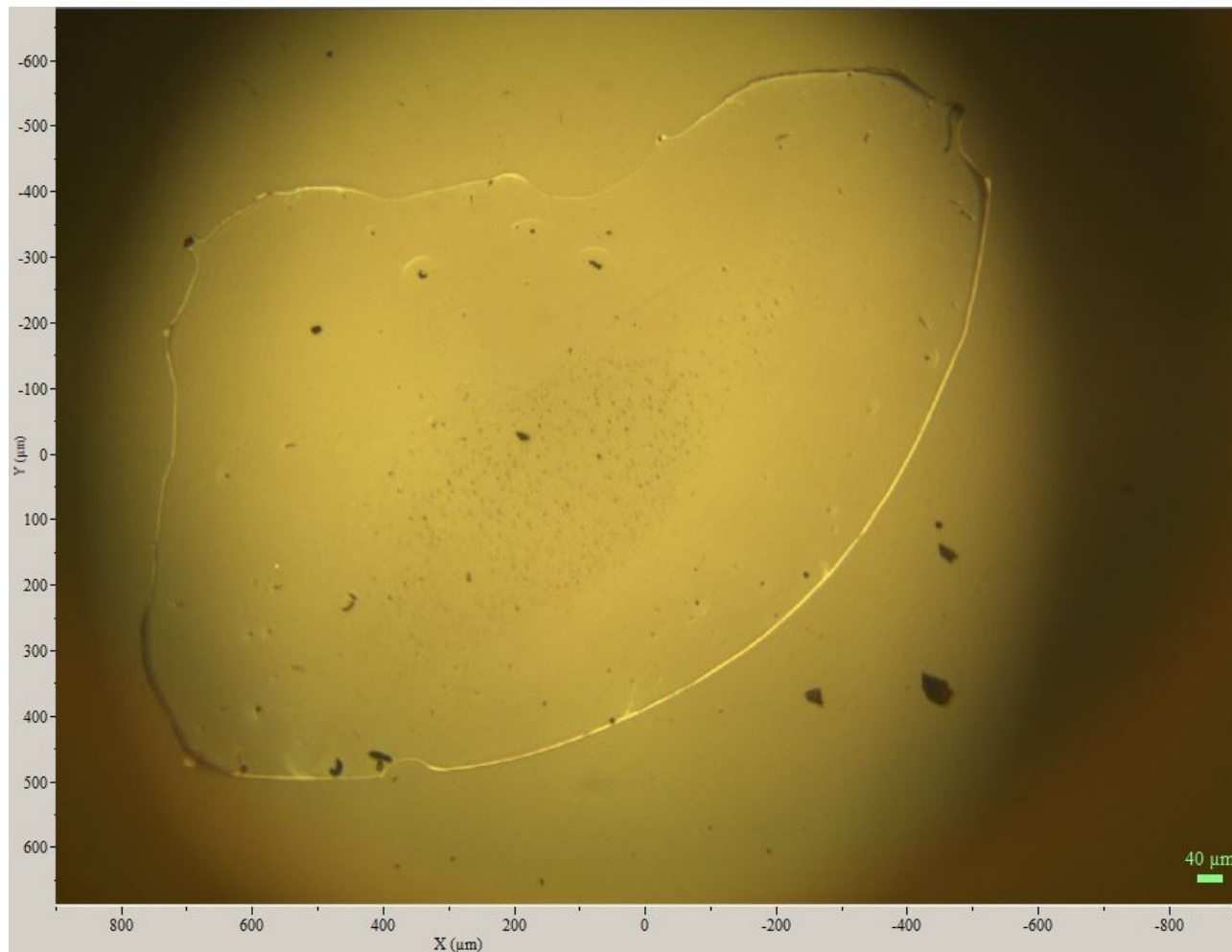
Obrázek 61: DPA, koncentrace $c_1 = 3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

Po vyschnutí kapky roztoku kyseliny dipikolinové 2 μl o koncentraci $c_2 = 3 \cdot 10^{-4}$ M) se látka koncentrovala na okraji 62.



Obrázek 62: Objektiv x5

Po vyschnutí kapky roztoku kyseliny dipikolinové $2 \mu\text{l}$ o koncentraci $c_3 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ zbyla látka koncentrovaná na okraji. Je zřejmá tendence o vytvoření kroužku - vpravo se zachovala část "kávového kroužku"(obr. 63). Z této koncentrace se však dostačující signál naměřit nepovedl.

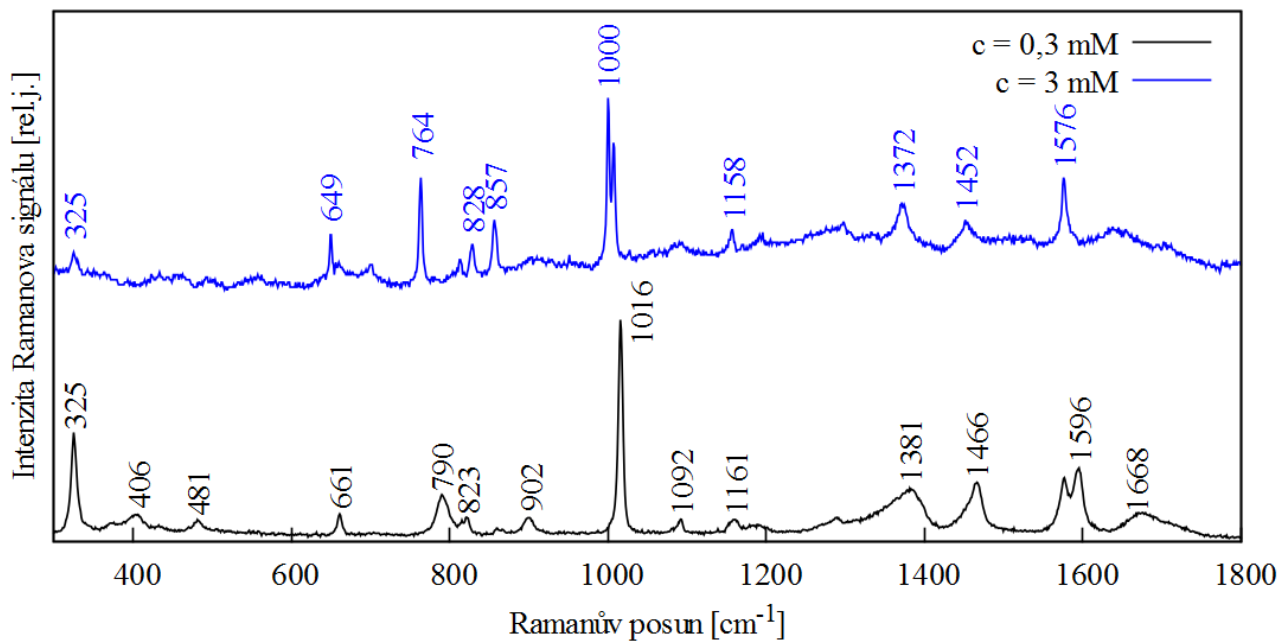


Obrázek 63: Objektiv x5

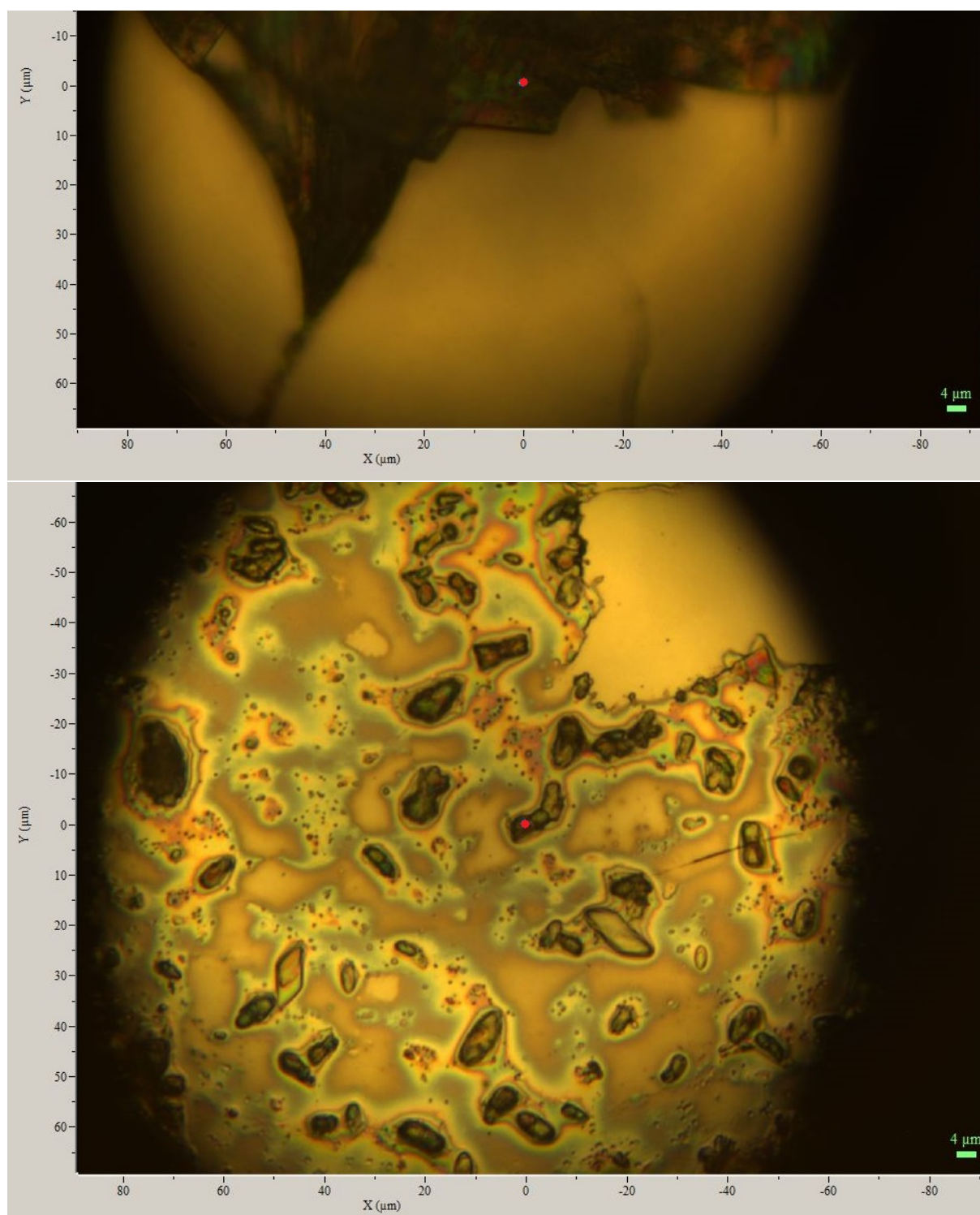
Nastavení Ramanova mikrospektrometru

Parametry	Nastavené hodnoty
Vlnová délka	632,8 nm
Šedý filtr	D 0.6 pro c_1 , D 0.3 pro c_2, c_3
Vstupní štěrbin	$100 \mu\text{m}$
Mřížka	600 vrypů/mm
Objektiv	x50 ULWD
Akumulace spektra	90 x 1 s pro c_1, c_2 a 90 x 2 s pro c_3
Konfokální clona	$1000 \mu\text{m}$

Získali jsme graf 64, který jsme dostali naměřením z míst na obrázcích 65.



Graf 64: Kyselina dipikolinová na fluoridu vápenatém - různé koncentrace



Obrázek 65: Změřená místa: $c_1 = 3 \cdot 10^{-3}$ M, $c_2 = 3 \cdot 10^{-4}$ M, $c_3 = 3 \cdot 10^{-5}$ M

INTERPRETACE

Z vyschlé kapky na fluoridu vápenatém jsme získali slabší signál, než když jsme použili jako povrch leštěný nerez. Důvodem je menší hydrofobicita CaF_2 - kapky mají větší tendenci vysychat do kroužku a tím pádem získáme méně koncentrovaného materiálu. U hydrofobního teflonu nevznikají obvykle "kávové kroužky" a částice jsou koncentrované v jednom místě.

Nejdůležitější pásy [6]:

- 639 až 648 cm^{-1} - deformační vibrace C-C (ring band)
- 765 až 759 cm^{-1} - OCO deformace v rovině
- 998 až 1000 cm^{-1} - dýchací vibrace (ring vibration) - stahování a roztahování kruhu
- 1642 cm^{-1} - valenční vibrace - stretching vazby C=O

5 Závěr

Pomocí techniky kapkově nanášených povlaků (Drop Coating Deposition Raman - DCDR) jsme zkoumali Ramanovo spektrum riboflavinu, kyseliny pikolinové a kyseliny dipikolinové. Tyto vzorky jsme nanášeli na destičku z leštěného nerezů s 50 nm vrstvou teflonu (SpectRIM) a na destičku z fluoridu vápenatého. Na povrchu SpectRIM byl kvůli kontaktnímu úhlu vždy průměr nánosu částic po vypaření kapky menší než na povrchu z fluoridu vápenatého, který má nižší hydrofobicitu. Spektra jsme získávali z roztoků různých koncentrací. Připravené vzorky jsme ředili tak, abychom naměřili spektrum z roztoku o co nejmenší koncentraci dané látky.

Spektrum riboflavinu z destičky SpectRIM se podařilo naměřit i z koncentrace $c = 4,5 \cdot 10^{-6}$ M, zatímco nejnižší koncentrace při použití povrchu z fluoridu vápenatého byla $c = 2,25 \cdot 10^{-5}$ M. U kyseliny pikolinové byla nejnižší koncentrace, ze které se dalo získat spektrum, na destičce SpectRIM $c = 10^{-6}$ M a na podložce z fluoridu vápenatého byla o řád nižší - $c = 10^{-5}$ M. Spektrum kyseliny dipikolinové na destičce SpectRIM jsme získali i z koncentrace $c = 3 \cdot 10^{-5}$ M a na povrchu z fluoridu vápenatého $c = 3 \cdot 10^{-4}$ M.

Z výsledků vyplývá, že Ramanovo spektrum naměříme pomocí povrchu z leštěného nerezů s 50 nm vrstvou teflonu (SpectRIM) z roztoku všech použitých vzorků (riboflavinu, kyseliny pikolinové, dipikolinové) o řád nižší koncentraci než pomocí povrchu z fluoridu vápenatého.

6 Seznam literatury

- [1] Vladimír Kopecký. Fyzika v kapce kávy. *Vesmír*, 92(3):156–158, 2013.
- [2] P. R. Carey. *Molecular Biology - Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies*. ACADEMIC PRESS, INC. (LONDON) LTD., 1982.
- [3] B. Schrader. *Infrared and Raman Spectroscopy*. ©VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1995.
- [4] C. V. Raman. https://en.wikipedia.org/wiki/C._V._Raman. citováno: 2017-07-20.
- [5] K. S. Krishnan. https://en.wikipedia.org/wiki/K._S._Krishnan. citováno: 2017-07-20.
- [6] A. Koczoń, P. Dobrowolski J. Lewandowski W. Mazurek. Experimental and theoretical ir and raman spectra of picolinic, nicotinic and isonicotinic acidsl. *Journal of MOLECULAR STRUCTURE*, 655(3):89–95, 2003.
- [7] Vladimír Kopecký. Tajemství kávových kapek aneb nová metoda pro ramanovu spektroskopii biomolekul. *Československý časopis pro fyziku*, 61(3-4):157–162, 2011.
- [8] Štěpánek Josef Kopecký, Vladimír. Ramanova spektroskopie - od nesmělých počátků až po odvážné kosmické zítřky. *Československý časopis pro fyziku*, 65(5):378–383, 2015.
- [9] Ramanova spektroskopie. https://cs.wikipedia.org/wiki/Ramanova_spektroskopie. citováno: 2017-07-20.
- [10] SIGMA-ALDRICH. <http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>. citováno: 2017-07-21.
- [11] Vitalion. <http://doplanky.vitalion.cz/vitamin-b2/1>. citováno: 2017-08-04.
- [12] Informační centrum bezpečnosti potravin. <http://www.bezpecnostpotravin.cz/antimikrobiani-aktivita-pikolinove-kyseliny-a-jejich-soli.aspx>. citováno: 2017-08-05.