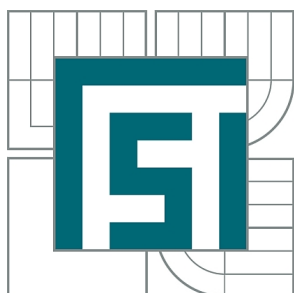


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

POUŽITÍ KOVOVÝCH A POLOVODIČOVÝCH NANOSTRUKTUR PRO BIODETEKCI

APPLICATION OF METAL AND SEMICONDUCTOR NANOSTRUCTURES FOR BIODETECTION

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. LUKÁŠ KEJÍK

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. MIROSLAV KOLÍBAL, Ph.D.

BRNO 2015

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Ústav fyzikálního inženýrství

Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

student(ka): Bc. Lukáš Kejík

který/která studuje v **magisterském navazujícím studijním programu**

obor: **Fyzikální inženýrství a nanotechnologie (3901T043)**

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

Použití kovových a polovodičových nanostruktur pro biodetekci

v anglickém jazyce:

Application of metal and semiconductor nanostructures for biodetection

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Kovové a polovodičové nanostrukтуры jsou užívané pro detekci biomolekul zejména pro své plazmonické, případně luminiscenční vlastnosti. Nanostrukтуры jsou také atraktivní kvůli velkému poměru počtu atomů na povrchu ku počtu atomů v objemu materiálu. Úkolem studenta bude použít předpřipravené nanostrukтуры k rozličným způsobům detekce biomolekul.

Cíle diplomové práce:

1. Navrhněte a realizujte experiment pro měření změny fáze na plazmonických anténách.
2. Navrhněte a realizujte experiment pro současné měření cyklické voltametrie a plazmonové rezonance, příp. luminiscence.

Seznam odborné literatury:

- [1] Dahlin A. B. et al., Analytical and Bioanalytical Chemistry 402 (2012) 1773.
- [2] Pallarola D. et al., Chemical Communications 49 (2013) 8326.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Miroslav Kolíbal, Ph.D.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2014/2015.

V Brně, dne 21.11.2014

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.
Ředitel ústavu

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá dvěma způsoby aplikace zlatých diskových nanostruktur vykazujících plazmonové rezonance pro biodetekci. První část se týká detekce změny fáze na plazmonických anténách pomocí koherencí řízeného holografického mikroskopu. Bylo zjištěno, že změna fáze se zvýrazňuje s rostoucí vlnovou délkou osvitu, kdy je buzena plazmonová rezonance na anténách větších rozměrů. Dále byla prokázána citlivost fáze na změnu indexu lomu okolního prostředí, přičemž největší fázová změna nastala pro antény v rezonanci s vlnovou délkou osvitu. Druhá část práce se týká kombinace optické spektroskopie detekující plazmonové rezonance a voltametrie charakterizující elektrochemickou aktivitu. V této části byl pozorován postupný posuv rezonanční vlnové délky v přítomnosti SSC pufru, avšak tento vliv je s časem stále menší. Provedené experimenty také ukázaly nevhodnost užití kyslíkového plazmatu k čištění povrchu vzorku, protože způsobuje oxidaci kovů včetně zlata.

KLÍČOVÁ SLOVA

plazmonika, elektrochemie, biosenzor, plazmatické čištění, SSC pufr

ABSTRACT

The master's thesis deals with two applications of gold discoidal nanostructures exhibiting plasmon resonance for biodetection. The first approach considers the detection of changes in the phase on plasmonic antennas using coherence-controlled holography microscope. It was found that the steepness of the phase is increasing with the illumination wavelength when plasmon resonance is excited in larger antennas. The sensitivity of the phase to refractive-index changes of the surrounding media was observed when the largest response was given by antennas in resonance with wavelength of illumination. Next part deals with plasmon resonance detection by means of optical spectroscopy combined with voltametry which characterizes the electrochemical activity. Changes in resonance wavelength induced by the presence of SSC buffer were observed, although this influence seems to diminish in time. Conducted experiments have also shown that oxygen-plasma cleaning is not suitable for sample surface cleaning because of oxidation of metals including gold as well.

KEYWORDS

plasmonics, electrochemistry, biosensor, plasma cleaning, SSC buffer

KEJÍK, Lukáš *Použití kovových a polovodičových nanostruktur pro biodetekci*: diplomová práce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Ústav fyzikálního inženýrství, 2015. 67 s. Vedoucí práce Ing. Miroslav Kolíbal, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma „Použití kovových a polovodičových nanostruktur pro biodetekci“ jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

Brno

.....

(podpis autora)

Poděkování

Převelice děkuji Ing. Miroslavu Kolíbalovi, Ph.D. za příkladné vedení, ochotu, trpělivost a za veškeré cenné rady a předané zkušenosti. Další díky náleží doc. Radku Kalouskovi, Ph.D. za důkladné přečtení textu a mnoho užitečných poznámek, Ing. Filipu Ligmajerovi a Ing. Petru Dvořákovi za pomoc při spektroskopických měřeních, a spolu s nimi i Ing. Jiřímu Babockému a Ing. Anetě Křížové za spolupráci na měření fázové odezvy. Dále děkuji také všem dalším kolegům z Ústavu fyzikálního inženýrství za vytváření příjemné atmosféry na pracovišti.

Tato práce vznikla s podporou projektu CEITEC - open access, kterému děkuji za poskytnutý přístrojový čas na použitém zařízení.

Zároveň chci poděkovat rodičům a sestrám za důvěru a podporu v průběhu celého studia, s níž se vždy pracuje výrazně lépe.

Bc. Lukáš Kejík

OBSAH

Úvod	2
1 Biosenzory	4
1.1 Elektrochemické biosenzory	4
Základní principy elektrochemie	4
Voltametrie	6
1.2 Plazmonické biosenzory	7
LSP biosenzory	7
Změna rezonanční vlnové délky	8
Změna fáze	10
1.3 Elektrochemické plazmonické biosenzory	14
Provázanost optické a elektrické odezvy senzoru	14
Elektrochemie a LSP	16
2 Změna fáze plazmonových rezonancí	20
2.1 Koherencí řízený holografický mikroskop	20
2.2 Provedené experimenty	21
Měření fáze s interferenčními filtry	24
Měření fáze s laditelným laserem	29
Měření fáze ve vodném prostředí	33
3 Voltametrie a plazmonové rezonance	36
3.1 Optická spektroskopie	36
3.2 Analýza spekter	37
3.3 Optimalizace spektroskopických měření	39
3.4 Provedené experimenty	42
Měření ve vodném prostředí	43
Měření v SSC pufru	44
Návrh elektrochemické cely	53
4 Závěr	55
Literatura	59

ÚVOD

Lidé se odjakživa zajímali o procesy uvnitř svého těla odehrávající se jak na makroskopické úrovni orgánů, tak s vývojem techniky i na mikroskopické úrovni. Optická pozorování biologických procesů na buněčné úrovni o mikrometrových rozměrech byla umožněna postupným vylepšováním optického mikroskopu. K pozorování menších biologických útvarů jako jsou proteiny, lipidy či nukleové kyseliny o rozměrech v řádu jednotek a desítek nanometrů je již kvůli difrakčnímu limitu třeba používat speciální optické techniky. Významnou roli v zobrazování biomolekul mají techniky, jež těží z označování určitou aktivní látkou, jejíž výskyt jsme schopni detekovat. Dříve používané značení radioaktivními izotopy fosforu bývá nyní nahrazeno fluorescenčními barvivy, které při osvitu vyzařují intenzivní světlo charakteristické vlnové délky, jež je možné poměrně snadno detekovat. Existují však i techniky, které značení biomolekul pro jejich detekci nevyžadují. Jedná se například o techniky na bázi plazmonových rezonancí, jež dokáží detekovat přítomnost biomolekuly skrze pozorování změn v indexu lomu svého okolí, případně elektrochemické metody, jež detekují přesun elektronů mezi elektrodou a analyzovanou látkou, a mnoho dalších.

Získaný signál bývá výsledkem interakce velkého počtu biomolekul. Avšak pro lepší porozumění interakcí a transportu biomolekul by bylo výhodnější detekovat jednotlivé biomolekuly, v reálném čase je sledovat a to přímo v jejich nativním prostředí. Toto je cíl, jehož naplnění by mělo nezměrný dopad na rozvoj poznání nejen v oblasti biologie.

Biosenzory na bázi plazmonových rezonancí nebo jejich kombinace s dalšími metodami se pomalu tomuto limitu přibližují a jsou na dobré cestě k jeho dosažení. V rámci této práce jsou představeny dva koncepty využití plazmonických nanostruktur, které by v budoucnu mohly vést k aplikacím právě v detekci biomolekul.

V první kapitole jsou nastíněny základní principy elektrochemie a elektrochemických biosenzorů. Dále je zde pojednáno o biosenzorech využívajících plazmonových rezonancí k detekci změn indexu lomu prostředí způsobených přítomností biomolekul. Tyto změny lze detekovat na základě měření některého ze dvou parametrů, které charakterizují plazmonové rezonance - rezonanční vlnová délka a fáze. Zároveň je shrnut dosavadní vývoj s důrazem na detekci fáze, jejímuž měření je věnován obsah kap. 2. Dále je zde také pojednáno o kombinaci plazmonových rezonancí a elektrochemických metod, na něž částečně navazují experimenty v kap. 3. Ve druhé kapitole je nejdříve stručně popsán princip koherencí řízeného holografického mikroskopu, s nímž probíhala veškerá fázová měření. Při zde popsaných experimentech bylo využito různého druhu osvitu - jak pomocí interferenčních filtrů,

tak i pomocí laditelného superkontinuálního laseru, který poskytuje výrazně vyšší intenzitu osvitů. Třetí kapitola je zaměřena na optimalizaci a analýzu spekter propustnosti získaných za využití aparatury Nanonics, s níž měření probíhala. Jsou tu uvedeny experimenty pozorující vliv SSC pufru na rezonanční vlnovou délku. Dále je předveden návrh elektrochemické cely, která v budoucnu umožní spojit optická a elektrochemická měření v jednom čase.

1 BIOSENZORY

Biosenzor představuje analytický prvek, který měří fyzikálně-chemické změny v biologické rozpoznávací vrstvě, jež je v kontaktu s převodníkem signálu. Fyzikálně-chemické změny v rozpoznávací vrstvě jsou zapříčiněny její interakcí s detekovanými molekulami a přímo souvisejí s jejich množstvím. Dle typu signálu měřeného na povrchu převodníku lze biosenzory dělit do tří hlavních kategorií – na elektrické, optické a mechanické [1]. S měřením optického signálu jsou spojeny např. techniky využívající plazmonových rezonancí, jež jsou spolu s elektrochemickými metodami, které poskytují elektrický signál, diskutovány v následující kapitole.

1.1 Elektrochemické biosenzory

Elektrochemie, jak název napovídá, je oblastí chemie zabývající se propojením elektrických a chemických efektů. Zkoumá tedy souvislost přenosu elektrického náboje s chemickou aktivitou látky.

Přenos elektronů z jedné látky do druhé je jedním z fundamentálních dějů ovládajících biologické procesy v živých organizmech, fotosyntézu, palivové články a získávání čistých kovových materiálů. Porozumění elektronovým přenosům nám pomáhá nalézat způsoby, jak užít chemické reakce k produkci elektřiny a jak naopak použít elektřinu k vyvolání chemické reakce. Elektrochemická měření mohou být použita k analýze chemických systémů, kdy poskytují informaci o termodynamice reakcí, výskytu kovů a organických látek [2].

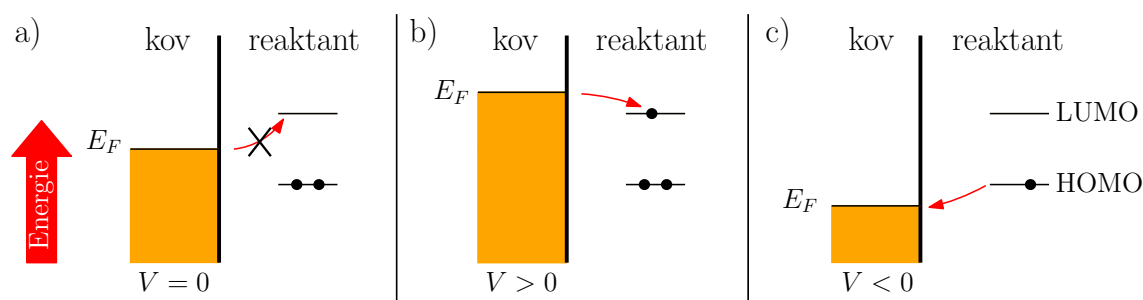
Základní principy elektrochemie

Základní charakteristikou atomu, která vyjadřuje, jak silně bude přitahovat elektron, je jeho elektronegativita. Ta zároveň určuje charakter vazby, kterou spolu atomy vytvoří. Jedná-li se o atomy téhož prvku, vytvoří kovalentní vazbu, kde budou elektrony sdíleny rovnoměrně a jejich rozložení bude symetrické podle osy vazby. V případě atomů s rozdílnou elektronegativitou bývají elektrony sdíleny nerovnoměrně. Elektronegovnější atom přitáhne elektrony blíže k sobě, což vyústí v parciální záporný náboj (δ^-) na straně tohoto atomu a v parciální kladný náboj (δ^+) na straně opačné. Vzniklá molekula je tedy polarizována, přičemž je-li rozdíl elektronegativit větší než 2, elektronegovnější atom získá elektron z druhého atomu a vytvoří se tak záporný a kladný iont. Tyto ionty se vzájemně přitahují a vzniká tak iontová vazba [3].

Reakce, při nichž dochází k elektronovému přenosu bývají označovány jako redoxní (oxidačně-redukční) reakce. Redoxní reakce bývá vždy výsledkem současně

probíhajícími poloreakcí – oxidace a redukce. Při nich dochází ke změnám oxidačního stavu atomů, který je vyjádřen tzv. oxidačním číslem. Toto číslo, jež může nabývat kladné, záporné i nulové hodnoty, vyjadřuje hypotetický náboj, který by měl daný atom, pokud by všechny jeho vazby byly iontové. Oxidační číslo atomu se zvyšuje, resp. snižuje, pokud elektrony odevzdává, resp. přijímá, přičemž říkáme, že se atom oxiduje, resp. redukuje.

V elektrochemických systémech jsou v centru pozornosti procesy a faktory, které ovlivňují přenos náboje mezi chemickými fázemi, například mezi elektrickým vodičem (elektroda) a iontovým vodičem (elektrolyt). Chování elektronů v kovu lze částečně pochopit uvážením jeho Fermiho hladiny, která odpovídá nejvyšší zaplněné elektronové hladině. Její poloha není pevná a může se měnit například aplikací elektrického potenciálu na kovovou elektrodu, tedy dodáním elektrické energie. Elektrický potenciál, který posuvem Fermiho energie mění chemickou aktivitu reaktantu, můžeme nazývat elektrochemickým potenciálem.

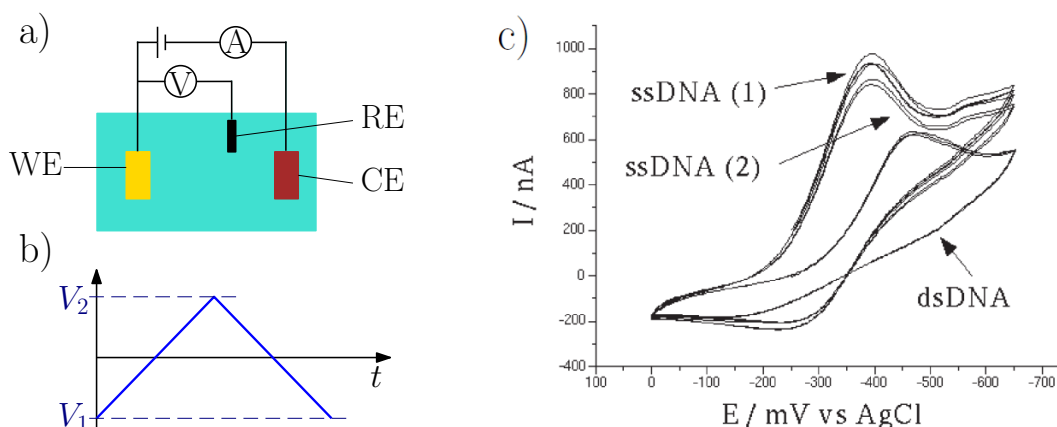


Obr. 1.1: a) Hladina Fermiho energie E_F v kovové elektrodě a její posuv při aplikaci b) kladného a c) záporného elektrického potenciálu. LUMO zde značí nejnižší neobsazený molekulový orbital reaktantu, HOMO nejvyšší obsazený molekulový orbital reaktantu, přičemž černé tečky znázorňují elektrony na příslušných elektronových hladinách.

Obr. 1.1 ukazuje Fermiho hladinu spolu s orbitálními energiovými hladinami molekuly reaktantu. LUMO zde značí nejnižší neobsazený molekulový orbital, HOMO nejvyšší obsazený molekulový orbital. Aplikací dostatečně vysokého kladného potenciálu na elektrodu může být Fermiho hladina posunuta nad úroveň LUMO reaktantu a elektrony blízko Fermiho hladiny mohou přejít do reaktantu. Naopak při aplikaci záporného potenciálu se sníží Fermiho hladina pod úroveň HOMO reaktantu, z níž mohou elektrony přejít do elektrody. Proud elektronů, jež v závislosti na aplikovaném potenciálu přecházejí mezi elektrodou a reaktantem v roztoku, je možné měřit. Měření a analýza této volt-ampérové závislosti je předmětem voltametrie [4].

Voltametrie

Většina voltametrických měření probíhá v roztoku, jež je uzavřen v elektrochemické cele. Do analyzovaného roztoku jsou ponořeny zpravidla tři elektrody. Pracovní elektroda (WE) je elektrodou, na níž probíhá samotná reakce. Nejvyužívanějším druhem pracovní elektrody je rtuťová kapka, jejíž interakční povrch je dobře definovaný a snadno reprodukovatelný. Metoda využívající rtuťové pracovní elektrody bývá označována jako polarografie [5]. Dále lze využít pracovní elektrody z platiny, zlata, stříbra uhlíku atd., přičemž základním požadavkem je chemická odolnost materiálu a snadné čištění povrchu. Referenční elektroda (RE) poskytuje stabilní potenciál, se kterým je porovnáván potenciál na pracovní elektrodě. Nejčastěji používaná referenční elektroda je satureovaná kalomelová elektroda (SCE) a Ag / AgCl elektroda. Pomocnou elektrodou (CE) bývá zpravidla platinový drát. Proud roztokem je měřen mezi pomocnou a pracovní elektrodou [6]. Obecný tříelektroodový systém je znázorněn na obrázku 1.2a).



Obr. 1.2: a) Tříelektroodové uspořádání pro voltametrická měření, kde WE značí pracovní, RE referenční a CE pomocnou elektrodu. b) Časový průběh potenciálu v rámci jednoho cyklu a c) volt-ampérová charakteristika získaná cyklickou voltametrií jednovláknové DNA (ssDNA) a dvouvláknové DNA (dsDNA) – převzato a upraveno z [7].

Základem roztoku, do něhož jsou elektrody ponořeny, je rozpouštědlo (např. H_2O), v němž je rozpouštěn elektrolyt (např. NaCl). Elektrolyt o vysoké koncentraci zajišťuje dostatečnou elektrickou vodivost roztoku. K vytvoření prostředí o stabilních podmínkách, zejména o stálém pH, je do roztoku přidáno pufovací činidlo. Do takto stabilizovaného prostředí lze poté přidat samotný reaktant [8].

Obrázek 1.2b) ukazuje časový průběh potenciálu aplikovaný na pracovní elektrodu v rámci jednoho cyklu cyklické voltametrie, která je používána [9] na Biofyzikálním ústavu Akademie věd v Brně, s nímž je navázána spolupráce. Příklad

voltamogramu odlišujícího signál od jednovláknové DNA (ssDNA) od dvouvláknové DNA (dsDNA) je na obrázku 1.2c) [7]. Aplikací voltametrie je nespočet, například detekce karcinogenů, pesticidů, barviv, farmaceutik, těžkých kovů atd [10].

1.2 Plazmonické biosenzory

Materiály mající zápornou reálnou část dielektrické funkce mohou podporovat vznik rezonance povrchových plazmonových polaritonů (surface plasmon polariton – SPP). Jedná se kolektivní oscilace povrchových vodivostních elektronů, jež mohou být za využití vazebného členu (skleněný hranol, mřížka) vybuzeny dopadem elektromagnetické vlny. Tyto oscilace se šíří na rozhraní vrstvy kovu a dielektrika, přičemž intenzita elektrického pole je v blízkosti rozhraní zesílena a klesá exponenciálně s rostoucí vzdáleností od rozhraní. Oblast průniku této tzv. evanescentní vlny do dielektrického prostředí vymezuje objem, na jehož index lomu jsou oscilace citlivé [11]. Právě poměrně velká lokalizace elektromagnetického pole v blízkosti rozhraní umožňuje detekovat děje, jež se zde odehrávají. Jedná se například o adsorpci molekul na rozhraní, případně jejich navázání na již dříve funkcionalizovaný povrch. K detekci přítomnosti biomolekul bylo povrchových plazmonů využito poprvé už kolem roku 1983 Liedbergem et al. [12]. Od té doby našly techniky využívající SPP aplikace v různých oblastech včetně lékařské diagnostiky, kontroly životního prostředí, nezávadnosti potravin atd., jež jsou shrnuty např. v [13].

LSP biosenzory

Povrchové plazmonové polaritony nelze vybudit přímým dopadem elektromagnetického záření. Je třeba využít vazebný člen ve formě hranolu či mřížky, čímž se komplikuje zařízení určené k jejich buzení a detekci. Zároveň SPP konfigurace neumožňuje příliš dobře lokalizovat případnou vazebnou interakci biomolekuly, protože vzdálenost, po níž se SPP šíří, je v řádu μm a oblast průniku těchto vln do zkoumaného prostředí je v řádu stovek nm [14]. Tento problém lze minimalizovat, pokud je místo spojitě kovové vrstvy využito diskrétních kovových struktur rozměrově menších než vlnová délka dopadající elektromagnetické vlny. Dopad světla vybudí kolektivní oscilace vodivostních elektronů v rámci objemu nanostruktury. Tuto rezonanci označujeme jako lokalizovaný povrchový plazmon (localized surface plasmon – LSP), přičemž oblast průniku zesíleného elektromagnetického pole je v řádu desítek nm. Rezonanční vlnová délka LSP závisí na velikosti nanočástice, kdy zpravidla narůstá s jejím rozměrem [15]. Dále závisí na materiálu nanočástice, kde platí, že využití stříbra umožňuje rezonanci v oblasti menších vlnových délek než zlato [16].

Vliv mají také lokální dielektrické vlastnosti okolí nanočástice, přičemž nárůst indexu lomu prostředí je spojen s posuvem k větším vlnovým délkám [17], a v ne- poslední řadě tvar nanočástice [18]. Současné techniky výroby těchto nanočástic umožňují vytvoření tvaru, který je vhodný pro požadovanou aplikaci. Jedná se například o antény ve tvaru disků [19], kvádrů [20], trojbokých hranolů [21], srpků [22], hvězdic [23], prstenců [24], pórů [25] a dalších. Využití více částic umožňuje vznik míst se zesíleným polem v oblasti mezi částicemi, tedy ještě větší lokalizaci elektromagnetického pole. Jedná se o tzv. dimery (využití blízkosti dvou částic) [26], trimery [27], případně klastry obsahující více částic [28].

Změnu indexu lomu okolního prostředí lze detekovat pomocí plazmonických nanočástic na základě změny rezonanční vlnové délky plazmonové rezonance nebo změny její fáze.

Změna rezonanční vlnové délky

Při pozorování nanočástic vykazujících LSP rezonance bývají použity zejména optické spektroskopické metody. Ty umožňují měřením spektrálních závislostí odrazivosti či propustnosti charakterizovat interakci světla s nanočásticemi. Spektrální závislost odrazivosti podává informaci o rozptylu světla na nanočásticích, přičemž světlo může být i absorbováno. Vliv obou efektů dohromady lze vyjádřit pomocí extinkce, kterou je možné určit měřením spektrální závislosti propustnosti. Extinkci lze charakterizovat pomocí účinného průřezu C_{ext} , který lze z Mieho teorie definovat jako [29]

$$C_{\text{ext}} = \frac{4\pi}{k^2} \operatorname{Re} \left\{ i \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} \right\}, \quad (1.1)$$

kde ϵ značí dielektrickou funkci materiálu částice, ϵ_m dielektrickou konstantu okolního prostředí, $k = 2\pi n_m/\lambda$ je vlnové číslo odpovídající vlnové délce λ v prostředí o indexu lomu n_m , který souvisí s dielektrickou konstantou dle $\epsilon_m = n_m^2$.

Účinný průřez extinkce dle rce. (1.1) nabývá maximální hodnoty v případě, že platí rezonanční podmínka

$$\operatorname{Re}\{\epsilon + 2\epsilon_m\} \rightarrow 0. \quad (1.2)$$

Je-li ve vyjádření dielektrické funkce materiálu nanočástice použit Drudeho model pro oblast viditelného a ultrafialového světla ve tvaru

$$\operatorname{Re}\{\epsilon\} = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2}, \quad (1.3)$$

přičemž ω_p je plazmová frekvence materiálu, lze dospět k závislosti rezonanční vlnové

délky λ na indexu lomu n_m ve tvaru

$$\lambda = \lambda_p \sqrt{2\epsilon_m + 1} \simeq \sqrt{2} \lambda_p n_m, \quad (1.4)$$

kde λ_p značí vlnovou délku příslušející plazmové frekvenci materiálu ω_p . Rovnice (1.4) tedy pro dostatečně úzký rozsah n_m ukazuje lineární závislost rezonanční vlnové délky LSP sférických nanočástic na indexu lomu okolí.

Svedendahl et al. [30] porovnávali posuv rezonanční vlnové délky LSP a SPP odpovídající jednotkové změně indexu lomu (RIU – refractive index unit). Pro 50 nm zlatou vrstvu (SPP) dospěl k posuvu rezonanční vlnové délky o 3300 nm/RIU a pro pole zlatých nanodisků (LSP) dospěl k hodnotě 178 nm/RIU, což by mohlo vést k závěru, že detekce pomocí SPP je mnohem citlivější. Pokud jsou však měřeny změny indexu lomu v blízkosti povrchu způsobené adsorpcí vrstvy molekul, odezva těchto dvou technik se stává srovnatelnou [31, 32].

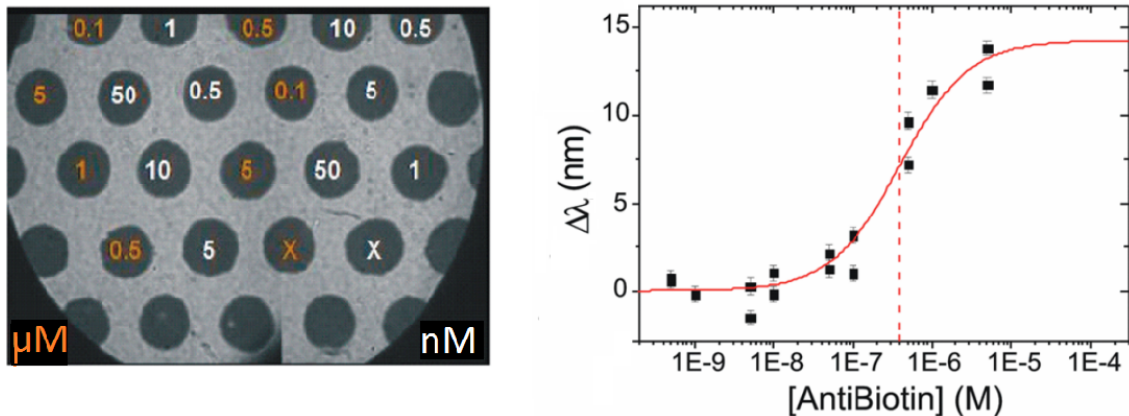
Vliv adsorpce vrstvy molekul o tloušťce d a indexu lomu n_a na změnu rezonanční vlnové délky $\Delta\lambda$ lze vyjádřit dle vztahu [33]

$$\Delta\lambda = m(n_a - n_m)[1 - \exp(-2d/l_d)], \quad (1.5)$$

kde m je faktor citlivosti (nm/RIU), n_m objemový index lomu okolního prostředí a l_d udává vzdálenost od rozhraní, v níž dojde k poklesu intenzity elektromagnetického pole na 1/e násobek původní hodnoty. Rovnice (1.5) ukazuje, že výsledný posuv rezonanční vlnové délky je velmi závislý na parametru l_d , pro SPP nabývá hodnoty 200-300 nm a LSP i méně než 10 nm, kdy LSP přinejmenším vyrovnává citlivost SPP [14].

Posuvu rezonanční vlnové délky pro detekci biomolekul využili např. Ruemmele et. al [34]. Krycí sklíčko ($\phi = 25$ mm) pokryli oddělenými zhruba milimetrovými kruhovými oblastmi tvořenými zlatými diskovými anténami o průměru 190 nm. Každá z oblastí je individuálně přístupná a umožňuje tak každou z nich vystavit jiným podmínkám a výsledný vliv na plazmonové rezonance v jednotlivých oblastech měřit pomocí extinkční spektroskopie. Takové uspořádání využili po funkcionalizaci veškerých oblastí antén biotinem k detekci anti-biotinu. Na jednotlivé oblasti byly aplikovány roztoky o různých koncentracích anti-biotinu. Extinkční spektra z těchto oblastí získaná vykazovala odezvu na jednotlivé koncentrace v podobě posuvu rezonanční vlnové délky (obr. 1.3).

V rámci první části se zaměřím především na využití změny fáze, jejíž měření je poté obsahem kap. 2.

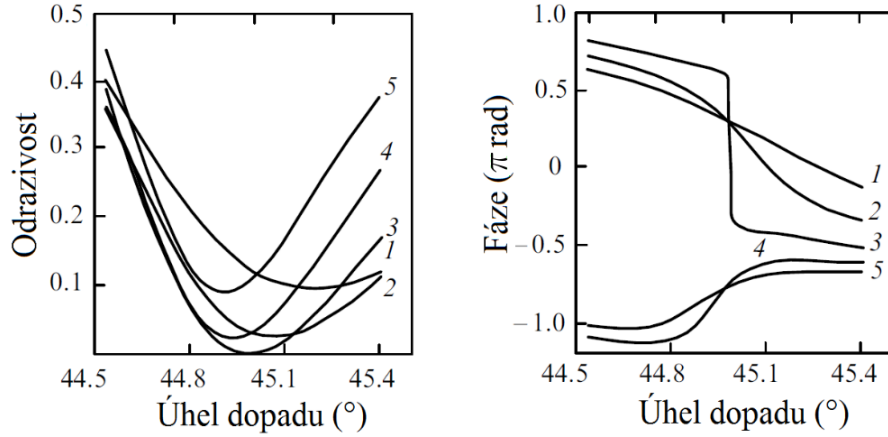


Obr. 1.3: Vlevo: skleněný vzorek ($\phi = 25$ mm), s oblastmi antén (tmavé kruhové plochy) s vyznačenými aplikovanými koncentracemi anti-biotinu – oranžově μM a bíle nM koncentrace. Vpravo: výsledná odezva rezonanční vlnové délky na koncentraci anti-biotinu. Převzato a upraveno z [34].

Změna fáze

Fáze světla vykazuje netriviální chování – je to periodická proměnná, která není definována v místech s nulovou intenzitou světla. Z toho plyne, že se objevuje extrémně strmý fázový přechod mezi oblastí s nulovou a nenulovou intenzitou. Obecně platí, že pokud amplituda systému projde nulou, potom celková fáze systému prodělá téměř skokovou změnu o π . Stejně tak k přeskoku dojde při minimální změně vnějších parametrů [35]. Tyto úvahy lze přímo aplikovat na SPP, kde se objevuje rezonanční pokles v závislosti na vlnové délce p -polarizovaného světla odraženého od kovové vrstvy. Tento pokles je spojen se vznikem SPP, přičemž v této oblasti je opravdu možné detekovat strmou změnu fáze, jak prvně ukázali Abeles et al. užitím elipsometrie [36]. Dále je možné detekovat prostorové rozložení fáze využitím interferometrických [37] nebo holografických metod. Kombinací rastrovací optické mikroskopie v blízkém poli rozptylového typu (s-SNOM) s interferometrickou detekcí, lze dosáhnout získu informací o amplitudě i fázi až s 10 nm prostorovým rozlišením [38, 39].

První, kdo využil změny fáze jakožto senzoru změny indexu lomu okolního prostředí, byli Kabashin et al. [40]. Sledovali také, mimo jiné, hodnoty fáze v závislosti na přítomnosti dvou různých plynů (Ar a N_2), pro něž je rozdíl indexu lomu (RI) $\Delta n = 1,5 \cdot 10^{-5}$. Odpovídající fázový rozdíl $\Delta\varphi \approx 0,7\pi$ při schopnosti detekovat změny fáze až do $2 \cdot 10^{-3}$ rad udává citlivost SPR interferometru na změny RI až $\Delta n = 4 \cdot 10^{-8}$.



Obr. 1.4: Výsledky simulace odrazivosti (vlevo) a fáze (vpravo) v závislosti na úhlu dopadu svazku o vlnové délce 633 nm na zlatou vrstvu o různých tloušťkách: (1) 40 nm, (2) 45 nm, (3) 50 nm, (4) 55 nm a (5) 60 nm. Převzato a upraveno z [41].

Kochergin et al. [41] simulovali vliv různých parametrů SPP (vlnová délka osvitu, úhel dopadu, tloušťka vrstvy) na průběh odrazivosti měřené elipsometricky, zejména na polohu jejího minima. Zároveň počítali průběh fáze pro dané parametry, přičemž její strmost byla největší v případě, kdy se odrazivost blížila nule. Výpočty a experimenty mimo jiné prokázaly, že volbou vhodné tloušťky zlaté vrstvy pro příslušnou vlnovou délku osvitu, lze dosáhnout úplného potlačení odrazivosti, jak ukazuje obr. 1.4. K podobným výsledkům se propracovali také Zhang et al. [42], kteří však pro získání fáze využili interference radiálně a azimutálně polarizovaných svazků. Citlivost této metody byla určena jako $\Delta n = 7,4 \cdot 10^{-7}$ při měření fáze s vodnými roztoky NaCl o různých koncentracích.

K detekci přítomnosti biomolekul byla měření změny fáze provedena poprvé pomocí Machova-Zenderova interferometru [43]. Na povrch kovu byl nanesen roztok fosfátového pufru (PBS), jenž obsahoval hovězí sérový albumin (BSA), což vyvolalo výraznou fázovou odezvu. Přidání BSA protilátek způsobilo další nárůst fáze odpovídající jejímu navázání na BSA. Detekční limit takového senzoru byl vyčíslen na 7,4 ng/ml. Ho et al. [44] dále ukázali, že využití Michelsonova či Fabryho-Perotova interferometru přináší alespoň dvojnásobné zvýšení citlivosti oproti využití výše uvedeného Machova-Zenderova interferometru.

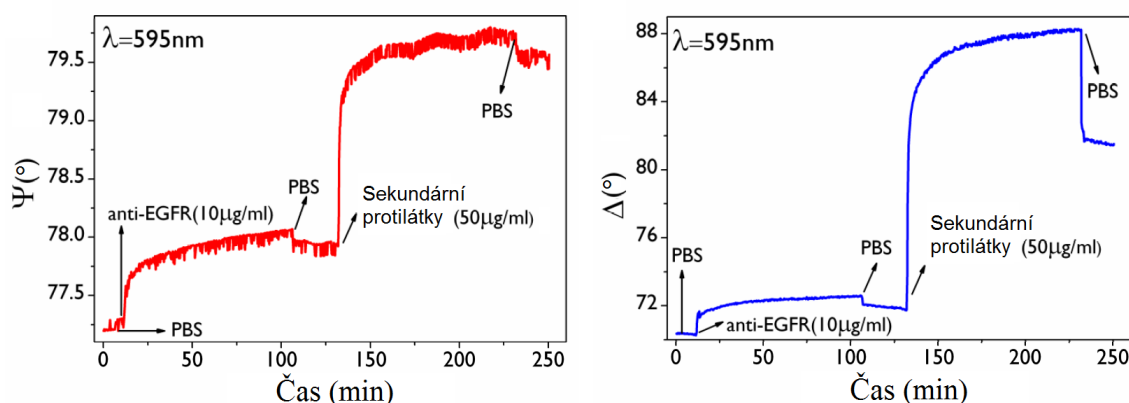
Z jediného interferenčního obrazce (hologram) je možné zrekonstruovat kompletní 3D informaci o amplitudě a fázi rezonancí. Suck et al. [45] využili holografie k mapování rozptylu intenzity na dimeru zlatých nanodisků v různých rovinách, přičemž průběh fáze pro různé druhy osvitu pouze simulovali. Citlivostí rekonstruované amplitudy a fáze pomocí digitální holografie v závislosti na změnách indexu lomu prostřednictvím vysychání roztoku NaCl se zabývali v [46]. Zjistili přitom,

že citlivosti jsou takřka komplementární – při malé citlivosti fáze je možné využít amplitudy a naopak.

Také uspořádaných polí nanostruktur lze využít k minimalizaci odrazivosti. Při volbě vhodných parametrů je možné dosáhnout potlačení odrazivosti vzorku a fáze se strmě změní o π . Při difrakci svazku na strukturách může za určitých podmínek dojít k vymizení některého difrakčního řádu při přechodu mezi vzduchem a substrátem při tzv. Rayleighově mezní vlnové délce [47].

Osvit Rayleighovou mezní vlnovou délkou využili např. Kravets et al. [48], kteří k elipsometrickým měřením použili nanostruktury v podobě pole zlatých nanodisků. Při takovém uspořádání autoři uvádějí citlivost fáze na změnu RI až $\Delta n = 2 \cdot 10^{-9}$, což je o řád lepší citlivost než při využití detekce fáze v klasické SPP [49]. Kromě jednotlivých antén použili také jejich dvojice, přičemž tato geometrie vykazovala výrazné zmenšení spektrální šířky rezonance zachycené v extinkčních spektrech. Změny polohy rezonance a její spektrální šířku v závislosti na vzájemné vzdálenosti nanočástic jsou podrobněji popsány v [50].

Li et al. [51] pozorovali reakci optické fáze a extinkčních spekter na změnu indexu lomu prostředí a porovnávali jejich citlivost. Fáze byla detekována po excitaci longitudinálního módu zlatých nanotyčinek jak blízkým polem (evanescentní vlnou při totálním vnitřním odrazu), tak polem dalekým (rovinnou vlnou). Detekce fáze v obou případech umožnila větší citlivost na změny indexu lomu než při měření extinkce - při buzení blízkým polem (84-krát) a dalekým polem (8-krát).



Obr. 1.5: Dynamická odezva elipsometrických parametrů na navázání antigenu (anti-EGFR) a následné interakci se sekundárními protilátkami. Vlevo: parametr Ψ , vpravo: parametr Δ . Převzato a upraveno z [52].

Moirangthem et al. [52] vytvořili pole částečně v substrátu zanořených zlatých nanostrůvků k fázové detekci vazby antigenu anti-EGFR a sekundárních protilátek IgG. Časový vývoj elipsometrických parametrů v rámci jednotlivých kroků analýzy

je znázorněn na obr. 1.5. Výchozím stavem je roztok PBS pufru, následuje přidání antigenu, odstranění nezachyceného antigenu pomocí PBS pufru, načež jsou přidány samotné protilátky.

Detekční limit biosenzoru založeného na měření fáze se blíží až k jednomolekulovému rozlišení, jak je ukázáno v [53], kde je popsána detekce streptavidinu na strukturách funkcionalizovaných biotinem.

Zajímavým se jeví také získání informace o fázi rezonancí v nanostrukturách buzených femtosekundovými pulzy, jejichž spektrální závislost průběhu amplitudy je známa a fáze je řízeně tvarována [54]. V naměřené fázové závislosti je poté obsažena jak původní řízeně tvarovaná fáze, tak intrinsická fáze způsobená rezonancí antén, kterou lze pak výpočtem určit. Accanto et al. [55] dokázali získat amplitudu a fázi rezonancí přímo využitím dvoufotonové excitace (takřka současná interakce dvou fotonů o stejné energii s nanostrukturou, jež se projeví jako interakce jednoho fotonu o dvojnásobné energii). Signál generovaný dvoufotonovou excitací přímo podává informaci o vlastní amplitudě a fázi plazmonových rezonancí.

1.3 Elektrochemické plazmonické biosenzory

Plazmonické biosenzory – ať už ty využívající již poměrně osvojené techniky povrchových plazmonových rezonancí [13, 56, 57] či ty těžící z lokalizovaných povrchových plazmonových rezonancí [58–60], přitahují stále více pozornosti. Avšak nejjednodušší a nejúspěšnější senzory, jako například glukózový biosenzor [61], jsou založeny na detekci elektrického signálu. Nabízí se tedy varianta spojení obou metod a vytvoření tzv. elektrochemického plazmonického biosenzoru. Hlavní výhodou této kombinace je možnost z elektrického proudu kvantifikovat množství látky, u níž při reakci dochází k elektronovému přenosu, a z plazmonových rezonancí získat informaci o indexu lomu adsorbované vrstvy, případně i její tloušťku [62].

Provázanost optické a elektrické odezvy senzoru

Optické a elektrické jevy spolu úzce souvisí a navzájem se ovlivňují. Při dopadu světla na polovodič může za jistých podmínek v atomu dojít k excitaci elektronu a jeho přechodu z valenčního do vodivostního pásu. Je-li tento elektron vnějším elektrickým polem oddělen od kladně nabitého atomu, jenž se chová jako díra, může takto generovaný proud sloužit k napájení elektrických zařízení. Jedná se o základní princip fotovoltaiických článků [63].

Sheldon et al. [64] ukázali, že přeměny světelné energie na elektrickou je možné dosáhnout i využitím plazmonových rezonancí v kovových nanostrukturách. Zlaté nanočástice na substrátu cínem dopovaného oxidu indium (ITO) a díry o průměru 100 nm ve 20 nm tlusté vrstvě zlata na skleněném substrátu sloužily jako testovací plazmonické nanostruktury. Pro oba druhy nanostruktur autoři potvrdili vznik elektrického napětí o různé polaritě, když struktury osvětlovali monochromatickým světlem s vlnovými délkami většími resp. menšími než jejich rezonanční vlnová délka.

Jevy opačného rázu, tedy změna optické odezvy v závislosti na aplikaci potenciálu na nanostruktury a tím vyvolané změny v hustotě elektronů, jsou mnohem lépe prozkoumány. Vliv elektrického pole na plazmonovou rezonanci využili Abeles et al. [36] k pozorování rozhraní zlata a elektrolytu. Tadjeddine et al. [65] experimentálně získali vztah určující závislost plazmonových rezonancí na aplikovaném potenciálu pro stříbro [Ag(111) v NaClO₄]. Foley et al. [66] tuto závislost diskutovali z hlediska změny plazmové frekvence v rámci Drudeho modelu volných elektronů. Jak ukazuje tabulka 1.1, posuvy rezonančních vlnových délek nemusí být způsobeny pouze změnou elektronové hustoty, ale i vlivem dalších efektů. Tyto efekty jsou sto způsobit posuvy rezonanční vlnové délky jak k menším, tak větším vlnovým délkám, přičemž tyto změny nemusí být vždy vratné.

Tab. 1.1: Shrnutí efektů, které mohou ovlivnit optickou odezvu plazmonových rezonancí, když je na kov aplikován elektrochemický potenciál. „Modrý“ posuv zde značí zmenšení rezonanční vlnové délky, „červený“ naopak zvětšení. Tab. převzata a upravena z [67].

<i>Efekt</i>	<i>Spektrální změna</i>	<i>Reverzibilita</i>	<i>Poznámka</i>
Změna elektronové hustoty	Modrý posuv s rostoucí elektronovou hustotou	Ano	Vyšší elektronová hustota zvýší plazmovou frekvenci kovu, viz [66, 81].
Zachycení hydratovaných iontů	Možný velice malý červený posuv	Ano	Elektrická dvojvrstva zvýší lokální index lomu, avšak výsledný efekt je malý, viz [96].
Chemicky vázané ionty	Většinou červený posuv a rozšířený pík	Dle interakce	Formování opticky tlumících vrstev s vysokým indexem lomu, viz [96]. Reverzibilní, pokud je reakce reverzibilní.
Redoxní reakce	Červený i modrý posuv	Ano	Při redoxních reakcích bude signál pocházet z rozdílného indexu lomu reaktantu a produktu, viz [68, 69].
Elektrochemická krystalizace	Modrý posuv a zúžený pík	Ne	Nevyžíhané kovové vrstvy mohou prodělat krystalizaci [70], což silně ovlivňuje plazmony, viz [65].
Změny tvaru a rozměrů	Záleží na struktuře	Ne	Rozpouštění kovu za vysokých kladných potenciálů [71] nebo ovlivněných halidovými ionty, viz [72]. Jemné strukturální změny, viz [73, 74].
Změny teploty	Záleží na struktuře	Ano	Elektrochemická aktivita by potenciálně mohla kov ohřát, což činí změny v dielektrické funkci, viz [75].

Elektrochemie a LSP

Většina článků o spojení elektrochemie a LSP se zabývá nanočásticemi. Zlaté (obdobně i stříbrné) nanočástice jsou obvykle získávány redukcí iontů zlata v roztoku, jak je shrnuto v [76]. Podobně lze získat kovové nanočástice řízenou redukcí iontů v roztoku na platinové elektrodě [77]. Dále je možné využít např. anodického rozpouštění zlaté elektrody [78] (podobně i stříbrné [79]), přičemž uvolněné ionty se na chemicky stabilní platinové katodě redukují za tvorby nanočástic, jejichž velikost lze regulovat změnou proudové hustoty mezi elektrodami.

Při detekci elektrického a optického signálu za využití plazmonických nanočástic je velmi důležité pochopit, jak elektrochemický potenciál ovlivňuje jejich optické vlastnosti. Mulvaney et al. [80] byli první, kdo shrnuli spojení plazmonických nanočástic s elektrochemií. Uvažovali o přesunu elektronů z elektrody do částice jako o ději, jenž změní hustotu volných elektronů v Drudeho modelu, což má za následek zvýšení plazmové frekvence. Jak ukazuje rovnice (1.6), výsledný poměr koncentrace elektronů před a po aplikaci potenciálu odpovídá druhé mocnině poměru příslušných rezonanční vlnových délek [81].

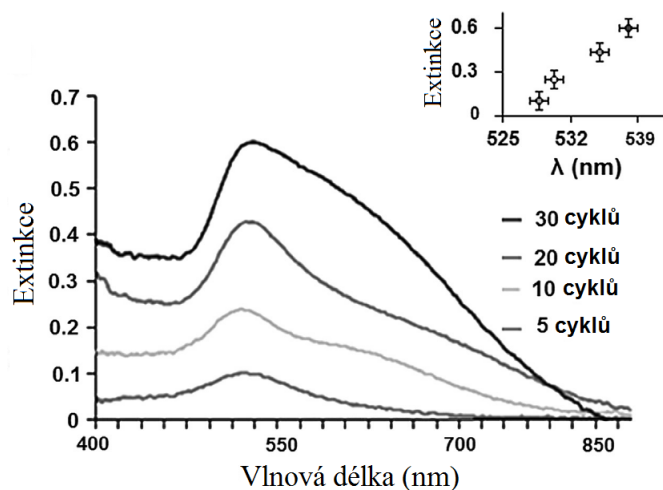
$$\lambda_f^2 / \lambda_i^2 = N_i / N_f, \quad (1.6)$$

kde λ značí vlnovou délku rezonance, N koncentraci vodivostních elektronů a indexy i a f označují počáteční a konečný stav.

Jsou-li nanočástice navázány na vodivý povrch, je s nimi možné snadněji manipulovat a také rychleji kontrolovat přívod elektrochemických potenciálů. Je tedy třeba nalézt vodivý, přesto transparentní podkladový materiál. Tímto materiálem je například cínem dopovaný oxid indium (ITO) [82, 83]. Tento n-dopovaný polovodič dosahuje poměrně nízkého měrného elektrického odporu ($\rho \sim 10^{-5} \Omega \cdot \text{cm}$ [84]). Šířka pásu zakázaných energií je okolo 4 eV, což jej činí propustným pro viditelné a blízké infračervené světlo [85].

ITO je při katodických potenciálech okolo -1,3 eV (vůči saturované kalomelové elektrodě - SCE) výrazně narušován oxidací [86]. Při kladných anodických potenciálech je ITO elektrochemicky stabilní. Cheng et al. [87] tuto stabilitu zúžitkovali pro depozici zlatých nanočástic pomocí cyklické voltametrie. Využili tříelektrodové uspořádání se stočeným Pt vláknem jako pomocnou elektrodou, Ag/AgCl referenční elektrodou a ITO substrátu jako pracovní elektrody. Elektrody byly poté ponořeny do roztoku HAuCl_4 v roztoku fosfátového pufru s rozdílnou koncentrací KCl. Na pracovní elektrodu byl poté periodicky přiváděn potenciál jdoucí od -1,00 do 1,15 V vůči Ag/AgCl. S narůstajícím počtem cyklů se zvětšovaly rozměry nanočástic, což

kromě analýzy pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu potvrdila i narůstající extinkce a posuv rezonanční vlnové délky k větším vlnovým délkám, jak ukazuje obr. 1.6.



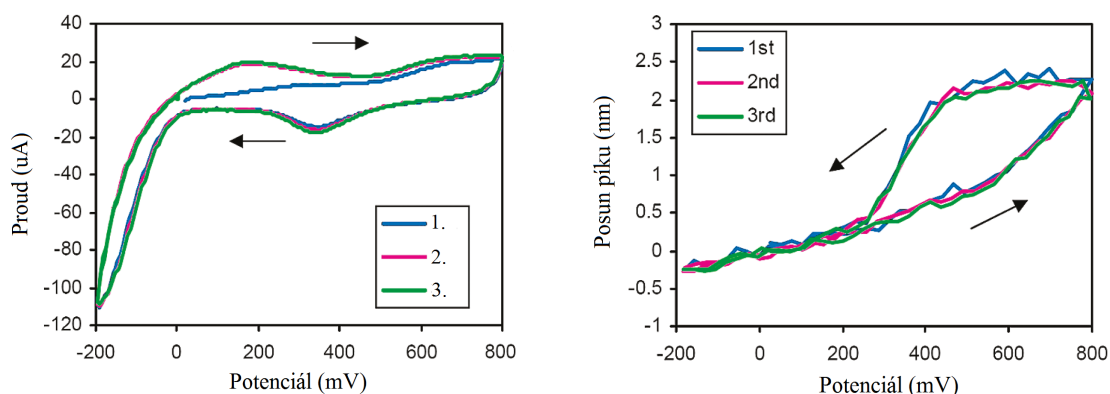
Obr. 1.6: Odezva lokalizovaných plazmonových rezonancí v závislosti na rostoucím počtu voltametrických cyklů. Vložený graf ukazuje odečtené rezonanční vlnové délky a extinkci odpovídající jednotlivým spektrům. Převzato a upraveno z [87].

Hill et al. [88] využili mikroskopii v temném poli k detekci depozice individuálních stříbrných nanočástic případně jejich shluků s 350 nm prostorovým a milisekundovým časovým rozlišením. Tato metoda umožňuje detekci několika set až tisíc nanočástic zároveň a zrekonstruovat voltametrickou závislost každé z nich. Nanočástice stříbra byly deponovány z roztoku $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Ag}$ a LiClO_4 v MeCN rozpouštědle na ITO elektrodě pomocí lineární voltametrie. S časovým krokem 5 ms byla zaznamenávána mapa intenzity rozptylu, k jejímuž nárůstu při dostatečném katodickém potenciálu začne v oblastech výskytu nanočástice docházet. Průběh závislosti intenzity rozptylu na aplikovaném potenciálu jednotlivých nanočástic je funkcí její velikosti, což po kalibraci pomocí SEM umožnilo opticky detekovat velikost nanočástic. Znalost závislosti velikosti nanočástice na aplikovaném potenciálu umožnila vypočítat proud způsobený redukcí Ag^+ iontů. Autoři tak získali voltametrickou závislost pro jednotlivé nanočástice.

Jsou-li na elektrodu s kovovými nanočásticemi aplikovány kladné elektrochemické potenciály, může docházet k jejich oxidaci a následnému rozpouštění. Tento oxidační potenciál je závislý na velikosti nanočástice, jak ukázali Ivanova et al. [89] pro stříbrné nanočástice. Po adsorbci na ITO substrát s NH_2 skupinou na povrchu byla provedena lineární voltametrie roztoku H_2SO_4 . Různé velikosti nanočástic vykazovaly různou polohu anodického píku, přičemž oxidace menších nanočástic vedla k nižším anodickým potenciálům. Obdobná závislost byla prokázána také

pro zlaté nanočástice [90]. Oxidy zlata, jež se vyskytují zejména ve formě Au_2O_3 (oxidační stav Au^{III}), případně jako AuO (Au^{II}) či Au_2O (Au^{I}), jsou značně nestabilní [91], přičemž je možné je rozlišit využitím rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS). Při stálých nebo cyklicky se měnících potenciálech pod úrovní 1,5 V se vyskytuje převážně AuO , vyšší potenciály způsobí nárůst podílu Au_2O_3 . Potenciály vyšší než 2 V znamenají výskyt hydratovaných oxidů zlata ($\text{Au}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) [92]. Oxidační stav zlata má vliv na jeho reaktivitu, proto je velmi výhodné řídit tvorbu takového oxidu, jež je pro danou aplikaci požadován. Na zlatých nanočásticích této řízené syntézy oxidů zlata dosáhli Tchapyguine et al. [93]. Zlato vyskytující se v oxidačním stavu Au^{II} může například katalyzovat oxidaci jedovatého oxidu uhelného (CO) na méně nebezpečný oxid uhličitý (CO_2) [94]. O oxidu zlata bude dále pojednáno v rámci kap. 3.4.

Spektrální odezvu na oxidaci zlatých nanočástic adsorbovaných na ITO elektrodě popsali Miyazaki et al. [95]. Zaznamenali spektrální posuv rezonanční vlnové délky o velikosti 68 nm k delším vlnovým délkám po aplikaci 5 V potenciálu na elektrodu, přičemž po vynulování potenciálu se rezonance posouvala zpátky. Tyto posuvy přisoudil nárůstu indexu lomu v okolí nanočástic způsobené vrstvou oxidu.



Obr. 1.7: Vlevo: voltametrická závislost, vpravo: posuv rezonanční vlnové délky měřené pro zlaté kuličky na ITO elektrodě v rámci tří voltametrických cyklů v rozmezí potenciálů od -200 mV do 800 mV v roztoku NaCl [96].

Sannomyia et al. [96] ukázali příklad elektrochemické chloridace zlatých nanočástic zachycených na ITO elektrodě v roztoku NaCl se synchronizovanou spektroskopií. Na obr. 1.7 je vlevo zakreslena voltametrická závislost pro první tři cykly, zatímco obr. 1.7 vpravo ukazuje příslušnou spektrální odezvu. Je patrná hysterezní závislost posuvu píku na aplikovaném potenciálu. Posuv rezonanční vlnové délky a současné rozšiřování příslušných píků autoři přisoudili vzniku ztrátové dvojvrstvy, jež je

kombinací tenké o elektrony ochuzené vrstvy zlatých atomů a vrstvy chloridových iontů.

Velmi zajímavou kombinací LSP rezonancí a cyklické voltametrie pro detekci polypeptidu melitin o koncentraci 10 ng/ml předvedli Hiep et al. [97]. Melitin je toxin vyskytující se v jedu včely, který narušuje buněčné membrány. Křemenné nanočástice (průměr 50, 100, 150 nm) navázané na funkcionalizovanou vrstvu zlata byly následně pokryty další vrstvou zlata (30 nm), na níž byla poté vytvořena lipidová dvojvrstva. V průběhu tvorby lipidové dvojvrstvy docházelo k postupnému nárůstu extinkce a posuvu rezonanční vlnové délky k delším vlnovým délkám. Voltametrický signál byl tvorbou dvojvrstvy takřka utlumen. Aplikací melitinu na membrány docházelo k jejímu narušování a k opětovnému nárůstu voltametrického signálu.

Kromě sférických nanočástic lze také například využívat zlaté nanodráty, které umožňují šíření povrchových plazmonů po jeho délce a lokalizované transverzální plazmony ve směru kolmém na osu nanodrátu [98]. Nanodráty jsou výhodné pro elektrická měření kvůli své vodivosti v délce nanodrátu, která je však nižší než vodivost objemu zlata. Tato snížená vodivost bývá spojována zejména s rozptylem elektronů na povrchu nanodrátů [99] a na hranicích zrn [100]. MacKenzie et al. [101] sledovali adsorpci iontů z roztoku NaCl při aplikaci různých potenciálů (± 500 mV) na zlaté nanodráty za současného měření extinkce. Pallarola et al. [102] využili vertikálně orientovaných zlatých nanodrátů syntetizovaných elektrochemicky. Tento plazmonický senzor reaguje posuvem rezonance na elektrochemicky řízenou adsorpci proteinů. Princip byl ověřen pro kladně nabitý (hovězí sérový albumin – BSA) i záporně nabitý (lysozym – LZM) protein.

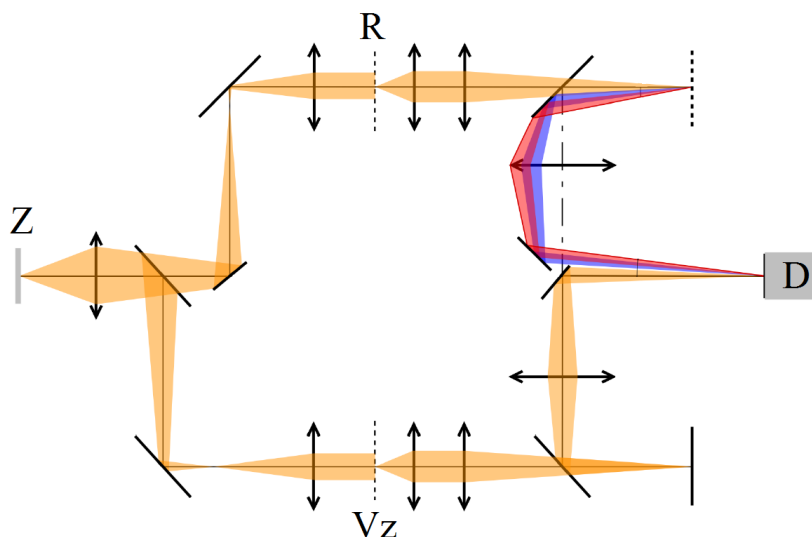
Zhang et al. [103] využili „nanopohárků“ vytvořených ve zlaté vrstvě, na jejichž stěny byly přichyceny zlaté nanočástice. Nanopohárky sloužily jako pracovní elektroda pro cyklickou voltametrii ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ jako redoxní pár), během níž byla měřena transmisní spektra. Toto uspořádání bylo využito pro detekci různých koncentrací proteinu BSA. Synchronní spektrální měření spolu s cyklickou voltametrií vykazovalo výraznější posuv, tedy větší citlivost na výskyt BSA, než samotné spektrální měření. Selektivita takového senzoru byla dále zvýšena užitím protilátky anti-BSA.

Článků zabývajících se spojením elektrochemie s plazmonovými rezonancemi pro biodetekci byl nalezen omezený počet, avšak všechny ukazují, že je kombinace LSP s elektrochemickými metodami přínosná a umožňuje získat větší množství informací o analyzované látce než jednotlivé metody samotné.

2 ZMĚNA FÁZE PLAZMONOVÝCH REZONANCÍ

2.1 Koherencí řízený holografický mikroskop

Principem holografie, s níž poprvé přišel Denis Gabor v roce 1948 [104], je interference dvou světelných svazků – objektového, který je ovlivněn rozptylem na předmětu, a referenčního. Mikroskop použitý v rámci práce je koherencí řízeným holografickým mikroskopem (CCHM) druhé generace, a oproti svému předchůdci (viz [105]) umožňuje pozorování nejen v prošlém světle, ale po připojení potřebných modulů i v odraženém světle, přičemž je možná i kombinace s fluorescencí [106]. Při využití osvětlení s nízkou koherencí je zabráněno vzniku koherenčního šumu a lze dosáhnout velmi tenkých optických řezů vzorkem. Mikroskop je schematicky znázorněn na obr. 2.1.



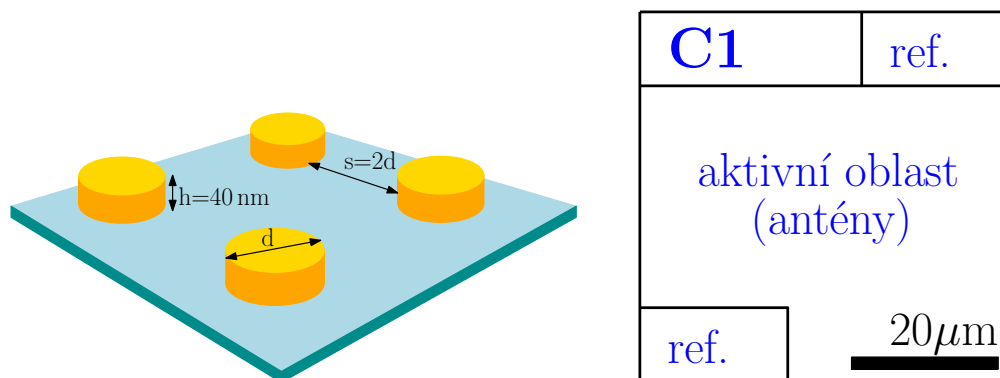
Obr. 2.1: Schematické znázornění funkce koherencí řízeného holografického mikroskopu, kde Z značí zdroj světla (halogenová výbojka + interferenceční filtr nebo superkontinuální laser), R referenci, Vz vzorek a D detektor. Převzato a upraveno z [106].

Nekoherentní světlo z halogenové výbojky prochází barevným filtrem a je děličem rozděleno do dvou větví - objektové, jež prochází vzorkem, a referenční, která prochází vhodnou referencí. Z objektového svazku je difrakcí vybrán jeden difrakční řád ($m = -1$) a tento svazek poté pod úhlem interferuje se svazkem referenčním. Vzniklý interferenční obrazec je zaznamenán v detektoru, přičemž je v něm obsažena kompletní informace o předmětu. Pomocí počítačových algoritmů je možné ze zaznamenaného interferenčního obrazce takřka ihned získat obraz předmětu jak amplitudový (intenzitní), tak fázový [107]. Právě kvantitativní informace o fázi, která udává rozdíl

v optických drahách svazků, je stěžejní například pro pozorování buněčných procesů [108], topologie vzorku [109] a umožňuje i pozorování plazmonických efektů [45], čehož bude využito v následující kapitole popisující experimenty týkající se měření změny fáze plazmonových rezonancí.

2.2 Provedené experimenty

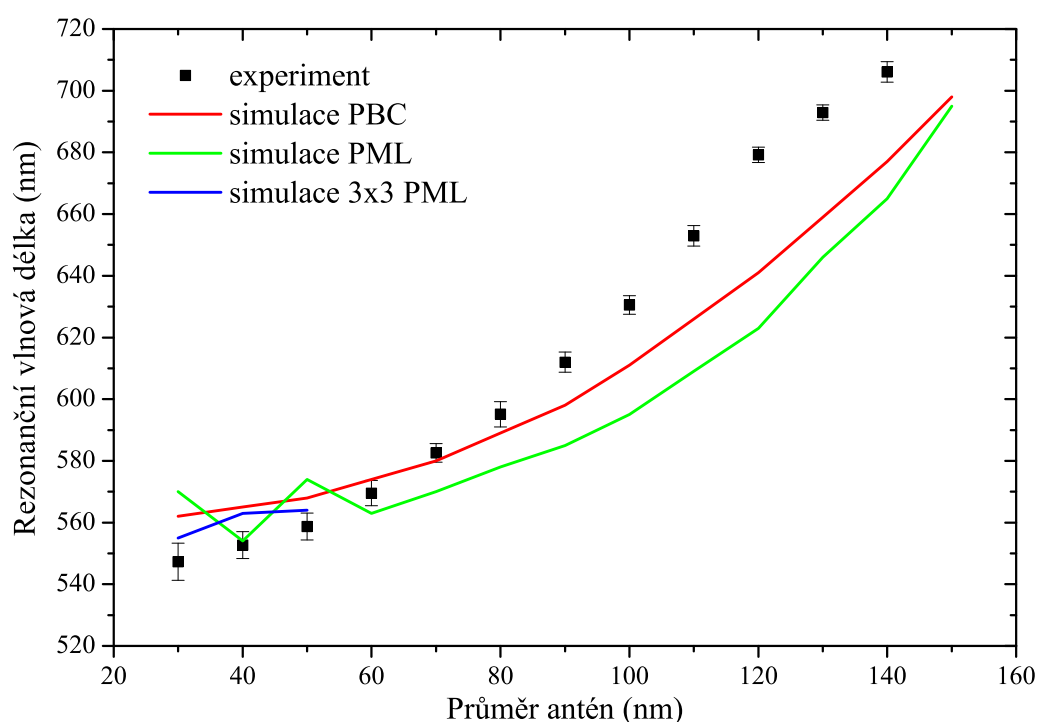
K měření změny fáze byla použita pole zlatých diskových antén vykazujících plazmonové rezonance. Tato pole antén s průměry 30–150 nm umístěných na skleněném substrátu byly vyrobeny Ing. Jiřím Babockým pomocí elektronové litografie. Skleněný substrát byl nejdříve zbaven nečistot pomocí acetonu a následně isopropyl alkoholu (IPA). Pomocí rotačního lakování (spin coating) byla dále nanesena (100 nm) vrstva polymethylemtakrylát (PMMA) rezistu. Strukturace proběhla osvitom elektronovým svazkem, přičemž oblasti vystavené elektronovému svazku byly poté odstraněny ve vývojce. Na takto strukturovaný vzorek byla naprášena 3 nm tlustá vrstva titanu pro zlepšení přilnavosti povrchu a následně následně samotná vrstva zlata o tloušťce 40 nm. Následný proces lift-off probíhal v acetonu za přispění ultrazvukových vln, načež byl vzorek opláchnut v IPA, demineralizované vodě a ofouknut dusíkem.



Obr. 2.2: Znázornění geometrie vzorku s diskovými anténami. Vlevo: geometrie a rozložení antén, vpravo: struktura pozorovaného pole, kde C1 je označení vzorku a ref. značí oblast referenčních struktur.

Obrázek 2.2 ukazuje geometrii antén, jejich uspořádání a umístění v rámci pozorovaného pole o rozměrech $50 \times 50 \mu\text{m}^2$. Aktivní oblast je celá pokryta jednou velikostí antén. Samotné antény jsou od sebe vzdáleny dvojnásobek jejich průměru, což lze také vyjádřit pomocí faktoru zaplnění (plocha pokrytá anténami/celková plocha pole), který má hodnotu asi 8 %, přičemž byla vytvořena pole i se zaplněním

dvojnásobným (16 %). Značení vzorku (vlevo nahoře) charakterizuje faktor zaplnění povrchu anténami (C – 8 %, B – 16 %) a velikost antén v aktivní oblasti (1 – 30 nm, ... 9, a, ... d – 150 nm). V rozích každého pole byly vytvořeny dvě oblasti s výrazně většími čtvercovými strukturami o faktoru zaplnění shodném s aktivní oblastí, které posloužily jako reference. Rezonanční vlnová délka těchto struktur spadá do blízké infračervené oblasti spektra a nezasahuje tak do oblasti viditelného světla, v níž samotná měření fáze probíhala. Tato reference umožnila mezi sebou porovnávat fázi v rámci polí s různými velikostmi antén a zároveň by měla eliminovat případné fázové změny vlivem topografie vzorku.

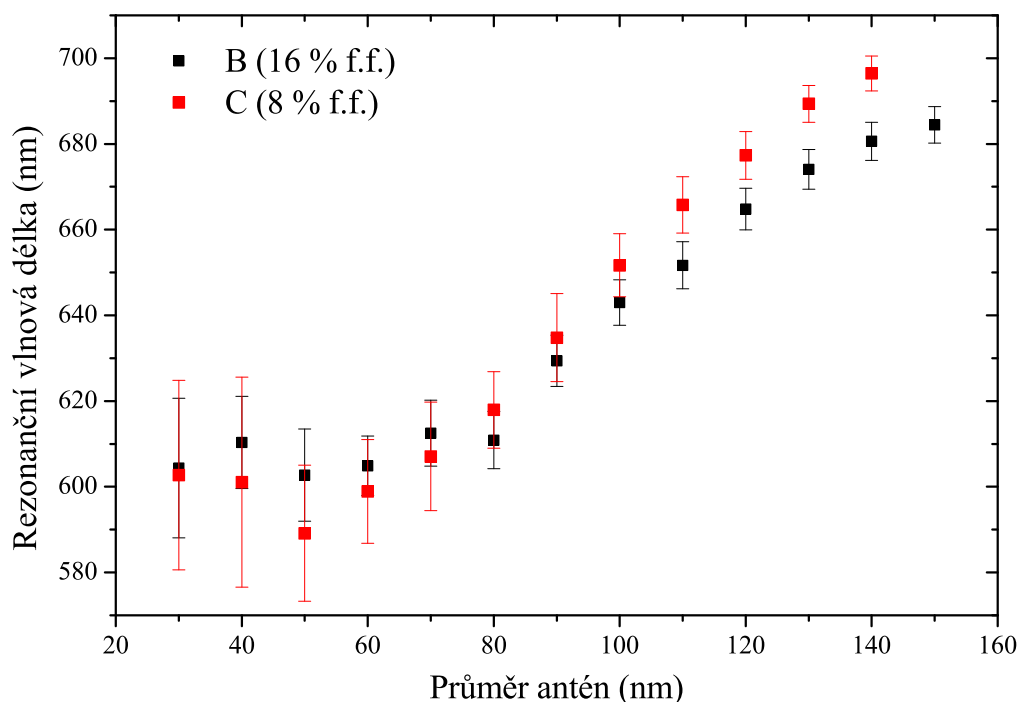


Obr. 2.3: Rezonanční vlnové délky pro pole s různými průměry antén při 8 % zaplnění získaná měřením spektrální závislosti propustnosti pro vzorek č. 1. Naměřené hodnoty (černá) jsou porovnány se simulacemi: s využitím periodických okrajových podmínek PCB (červená), s využitím absorbujičích PML okrajových podmínek pro jednu anténu (zelená) a pro pole antén 3 x 3 (modrá).

Pro získání představ o rezonanční vlnové délce antén v jednotlivých polích bylo provedeno měření spektrální propustnosti na zařízení Nanonics (obr. 3.1). Polohu rezonance je vhodné znát, protože určuje oblast strmého fázového přechodu, jak bylo popsáno v [48]. Hodnoty rezonančních vlnových délek znázorněných na obr. 2.3 byly získány postupem popsaným v kapitole 3.2. Tyto experimentálně získané hodnoty jsou zde zároveň porovnány s výsledky simulací provedených v pro-

gramu Lumerical. Při první simulaci byly na použitou geometrii antén v rovině povrchu aplikovány periodické okrajové podmínky PBC (periodic boundary condition). Ty obecně umožňují vypočítat odezvu celého periodického systému simulací jediné buňky, přičemž poté pouze zkopíruje elektromagnetické pole z vnitřní hranice buňky na vnější hranici. Dále byla provedena simulace s využitím PML (perfectly matched layer) okrajových podmínek. Užití těchto okrajových podmínek, kdy jsou pohlceny veškeré elektromagnetické vlny, které na hranice buňky dopadají, a zabráňují tak ovlivnění výsledku simulace odraženými vlnami. Poté byly pro srovnání simulovány pole antén 3 x 3 s užitím PML podmínek, avšak pouze pro rozměry 30, 40 a 50 nm. Výsledky simulací jsou na obr. 2.3 znázorněny jako čáry vzniklé spojením bodů (velikostí), pro něž byly simulace provedeny.

Stejně byla provedena spektroskopická transmisní měření i pro pole antén na vzorku č. 3, jehož geometrie je uvedena na obr. 2.9), který obsahoval jak struktury B (16 %) tak i C (8 %) viz tab. 2.1. Rezonanční vlnové délky pro obě zaplnění jsou znázorněny na obr. 2.4.



Obr. 2.4: Rezonanční vlnové délky pro pole s různými průměry antén při zaplnění 8 a 16 % získaná měření spektrální závislosti propustnosti pro vzorek č. 3.

Určení polohy rezonancí menších nanodisků obsahuje větší nejistotu, protože pokles v propustnosti vlivem rezonancí je pro ně poměrně malý. S velikostí disků však pokles narůstá a umožňuje odečet polohy rezonance přesněji. Geometrie vzorku

č. 3 činí tento rozdíl v nejistotách ještě výraznějším. Kromě políčka s anténami je totiž světlo sbíráno i z blízkého okolí, které je úplně propustné, a pokles propustnosti vlivem rezonancí je tak poněkud „utopen“ ve světle, které prošlo mimo struktury.

Pro experimenty s měřením fázové odezvy antén byly vyrobeny celkem čtyři vzorky, jejichž parametry jsou shrnuty v tab. 2.1

Tab. 2.1: Porovnání vzorků, jež byly využity v experimentech týkajících se měření fázové odezvy antén. C značí výskyt polí s 8 % zaplněním, B pole s 16 % zaplněním a Cr / Br označuje, zda se na vzorku nachází pole obsahující všechny průměry antén.

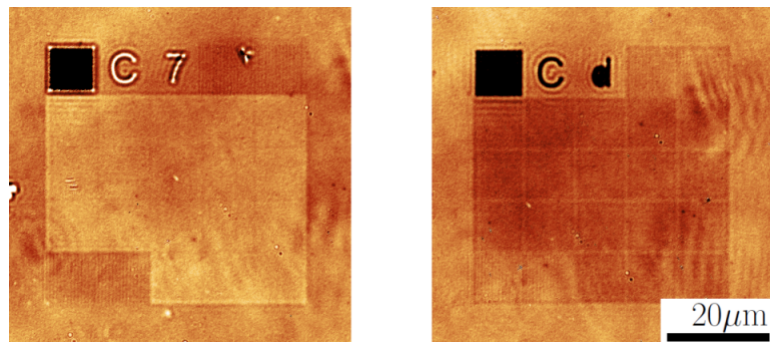
Vzorek	Průměr antén (nm)	Geometrie	C (8 %)	B (16 %)	Cr/Br (obr. 2.11)
1	30 – 150	obr. 2.2	X	–	–
2	30 – 150	obr. 2.2	X	X	X
3	30 – 150	obr. 2.9	X	X	–
4	30 – 200	obr. 2.9	X	X	X

Měření fáze s interferenčními filtry

Samotná měření s CCHM prováděla zpravidla Ing. Aneta Křížová, případně Ing. Jana Čolláková. Při prvním měření koherencí řízeným holografickým mikroskopem byl v rámci transmisního módu pouze kvalitativně zjištěn fázový kontrast mezi dvěma poli s různými velikostmi antén (30 nm a 130 nm). Interferenční filtr zajistil osvit nekoherentním světlem o vlnové délce $\lambda = 650$ nm, jehož pološířka byla 10 nm. Při zkoušce reflexní konfigurace však nebyl osvit dostatečně intenzivní na to, aby mohla být fáze zobrazena a to ani při použití filtru s pološířkou 80 nm, poskytujícím intenzivnější svazek. Abychom zvýšili odrazivost pole antén, byl vzorek č. 2 (viz tab. 2.1) navržen tak, že kromě polí se zaplněním 8 % obsahoval i dvojnásobné zaplnění 16 %.

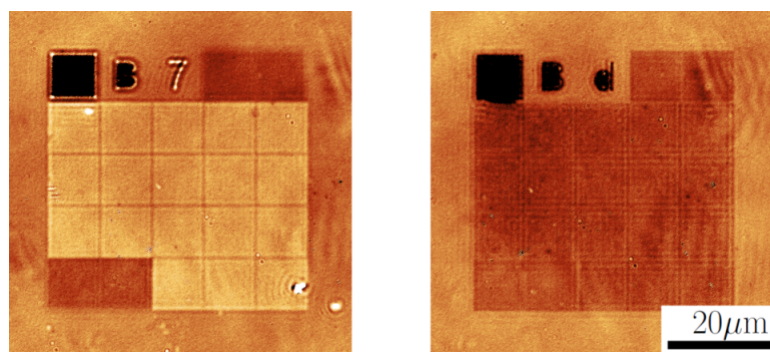
Jak se však při dalším měření se vzorkem č. 2 ukázalo, že ani zvýšené zaplnění plochy pole anténami nebylo dostatečné na získ signálu v reflexní konfiguraci mikroskopu. Další zvýšení zaplnění už je poměrně problematické z hlediska technologie výroby. Možností, jak dosáhnout dostatečného signálu k reflexnímu měření, by mohlo být zvýšení intenzity osvětlení, což je náplní následující podkapitoly na str. 29.

Měření v transmisním uspořádání CCHM umožnilo bezproblémové zobrazení fáze, jak ukazuje obr. 2.5. Je patrný opačný kontrast aktivních oblastí pole C7 (90 nm) a Cd (150 nm). C7 se vůči referenci jeví jako světlejší, kdežto Cd je naopak tmavší. Tato měření proběhla s interferenčním filtrem o vlnové délce 650 nm (10 nm).



Obr. 2.5: Kvalitativní porovnání fáze vůči referenci pro pole antén s průměrem: 90 nm (vlevo) a 150 nm (vpravo) při 8 % zaplnění.

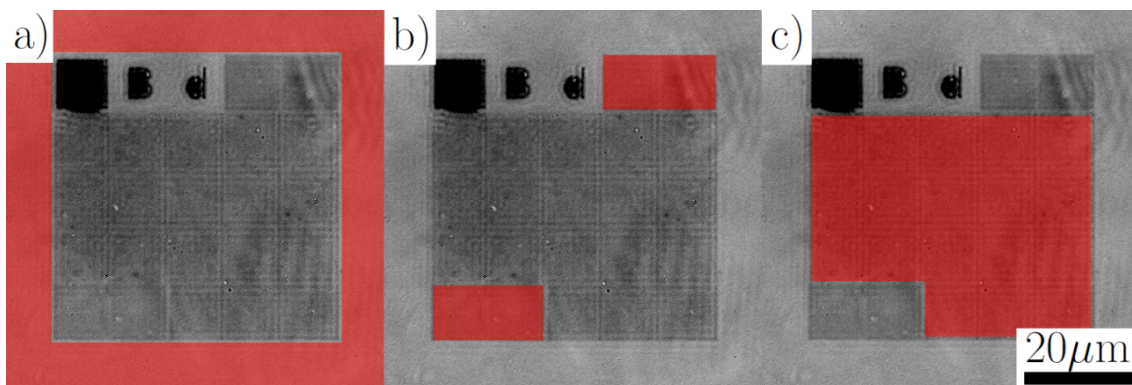
Pole s dvojnásobným zaplněním vykazují podobný kontrast, viz obr. 2.6. Data získaná z CCHM poskytují hodnotu fáze pro každý pixel bitmapy, proto je možné dodatečnou analýzou získat také číselnou fázovou informaci.



Obr. 2.6: Kvalitativní porovnání fáze vůči pozadí pro pole antén s průměrem: 90 nm (vlevo), 150 nm (vpravo) při 16 % zaplnění.

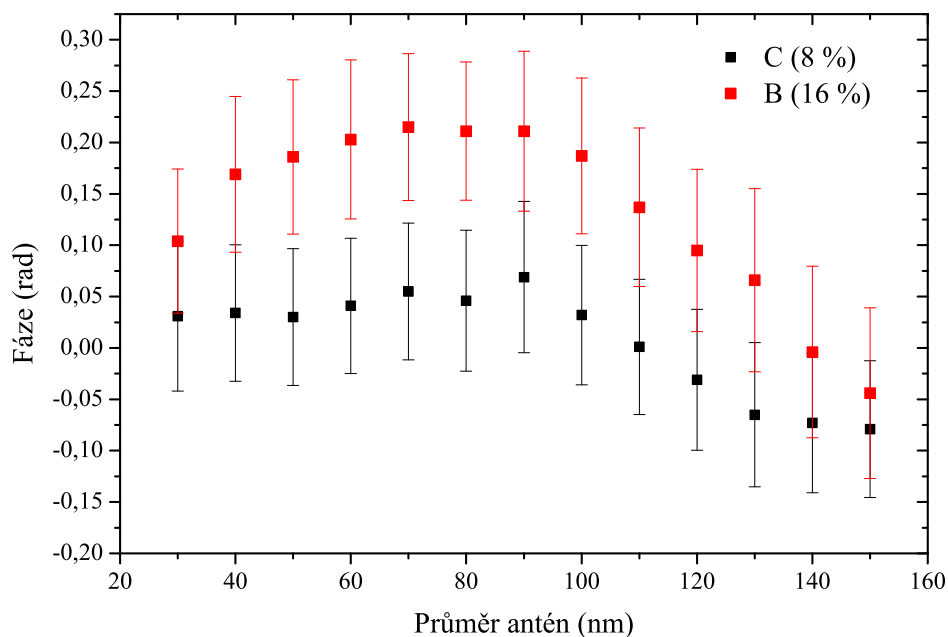
Kvantitativní analýza dat probíhala v prostředí programu Gwyddion, který byl vytvořen zejména pro potřeby sondové mikroskopie. Umožňuje mimo jiné odstraňovat defekty v obrázcích způsobených nečistotami, vyrovnávat pozadí, tvořit průřezy, extrahovat číselné hodnoty a statisticky je zpracovávat.

Na obr. 2.7 jsou vyznačené oblasti potřebné pro analýzu dat získaných z CCHM. Z vyznačených oblastí, případně z jejich okolí lze získat jak průměrnou hodnotu fáze, tak i odpovídající směrodatnou odchylku. Celkem byly pro každé pole získány tři hodnoty fáze – charakterizující pozadí (ϕ_{poz}), referenci (ϕ_{ref}) a samotnou aktivní oblast antén (ϕ_{ant}).



Obr. 2.7: Definice oblastí sběru dat (vyznačeno červeně) pro analýzu fázového obrazu z CCHM: a) pozadí, b) reference, c) aktivní oblast s anténami.

Hodnota fáze reference vůči pozadí byla určena jejich rozdílem ($\phi_{\text{ref}} - \phi_{\text{poz}}$), stejně tak signál odpovídající aktivní oblasti vůči pozadí ($\phi_{\text{ant}} - \phi_{\text{poz}}$). Porovnání těchto hodnot mezi poli s různými velikostmi disků ukázalo, že signál z oblasti antén vykazuje výraznou závislost na velikosti antén, kdežto fáze reference se mění pouze mírně. Vliv fáze připadající na topografii vzorku je odstraněn z původní fáze odečtením reference, kterou považujeme za stálou napříč všemi poli. Hodnoty fázového rozdílu mezi oblastí antén a referencí ($\phi = \phi_{\text{ant}} - \phi_{\text{ref}}$) v závislosti na průměru antén jsou vyneseny na obr. 2.8 a to pro obě zaplnění. Výsledná fáze odpovídá $\phi \pm \sigma$, kde $\sigma = \sqrt{\sigma_{\text{ant}}^2 + \sigma_{\text{ref}}^2}$ je kombinace směrodatných odchylek fáze antén, resp. reference.

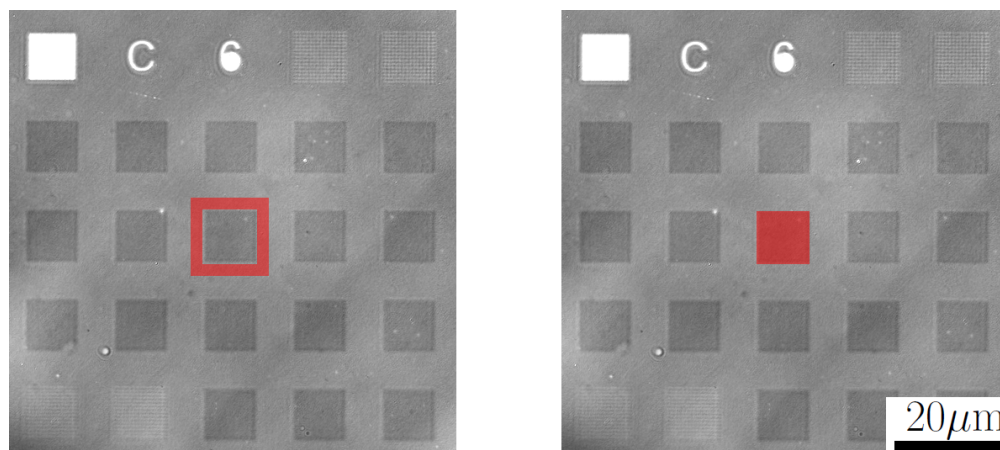


Obr. 2.8: Hodnoty fázového rozdílu mezi anténami a referencí v závislosti na velikosti antén pro dvě různá zaplnění – 8 a 16 % na vzorku č. 2.

Obě závislosti (obr. 2.8) jsou tvarově podobné a je na nich vidět oblast (90 – 130 nm), kde fáze rovnoměrně klesá o 3 mrad/nm s rostoucím průměrem nanodisků. Oblast největší změny fáze by měla korespondovat s rezonanční vlnovou délkou, což pro 8 % zaplnění nejspíše odpovídá velikosti antén 110 nm, které vykazují rezonanci pro (652 ± 3) nm (obr. 3.6), což je ve shodě s osvitem 650 nm při měření na CCHM.

Pro struktury se zaplněním 16 % se zdá, že se fázová závislost ještě nedostala v rámci zobrazených dat do nejnížší polohy. I přesto je změna fáze mnohem výraznější než u struktur s 8 % zaplněním. Pokles (90 – 150 nm) se zdá být pro větší zaplnění strmější (4 mrad/nm). Celá závislost se navíc jeví posunutá k větším rozměrům antén. To by naznačovalo, že je u vyššího zaplnění posunutá rezonance směrem k menším vlnovým délkám, tedy že při osvitu 650 nm bude rezonovat struktura s rozměry většími než 110 nm. Tento jev, alespoň pro větší struktury, podporují experimentálně zjištěné polohy rezonancí uvedené na obr. 2.4, což je také v soulasu s [110], kde tuto závislost pro přibližující se 200 nm zlaté disky potvrzují.

Měření na obr. 2.8 vykazuje velkou nejistotu, která charakterizuje rozdíly fáze v rámci celého pole. Z důvodu lepší definice oblasti sběru dat a kvůli možnosti odečtu okolního pozadí byl vytvořen vzorek (č. 3 – viz tab. 2.1) s novou geometrií, jež je znázorněna na obrázku 2.9. Každé pole je rozloženo do menších políček antén oddělených od sebe oblastmi čistého skla, přičemž v pravo nahoře a vlevo dole jsou vždy políčka odpovídající referenci. Vzorek opět obsahoval struktury jak struktury B (16 %), tak i C (8 %).

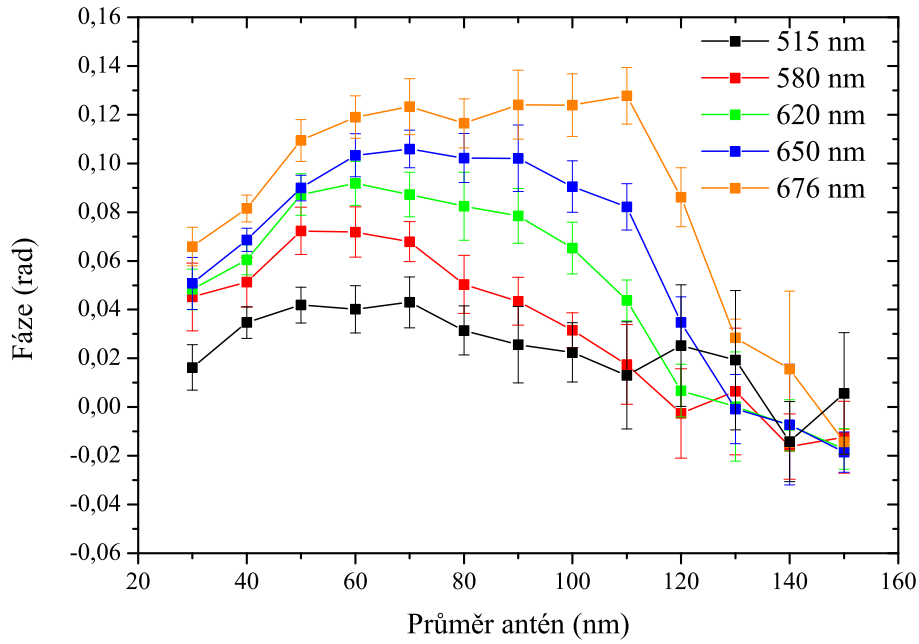


Obr. 2.9: Nová geometrie polí na vzorku č. 3 umožňující přesnější odečet pozadí s vyznačenými oblastmi (červeně) sběru dat. Vlevo: vyznačena oblast sběru fáze odpovídající pozadí jednoho políčka, vpravo: vyznačena sběru fáze z jednoho políčka s anténami. Obdobně pro referenční struktury (pravý horní a levý dolní roh).

Od průměrné hodnoty fáze z jednoho políčka s anténami bylo odečteno pozadí definované rámečkem těsně okolo hranice aktivní plochy, přičemž tímto způsobem

byla z i -tého políčka získána fáze $\phi_{\text{ant},i}$. Stejný postup byl aplikován na referenční struktury za dosažení referenční fáze $\phi_{\text{ref},i}$. Tímto způsobem byla získána fáze z pěti políček antén a také ze čtyř referenčních. Z nich byly vypočteny střední hodnoty fáze pro antény ($\bar{\phi}_{\text{ant}}$) a pro referenci ($\bar{\phi}_{\text{ref}}$). Výsledná střední hodnota rozdílu fáze je určena odečtením reference: $\bar{\phi} = \bar{\phi}_{\text{ant}} - \bar{\phi}_{\text{ref}}$. Konečná podoba fáze pro pole s určitou velikostí antén odpovídá $\phi = \bar{\phi} \pm \sigma$, kde $\sigma = \sqrt{\sigma_{\text{ant}}^2 + \sigma_{\text{ref}}^2}$ je kombinace vypočtených směrodatných odchylek fáze antén, resp. reference.

Pro zjištění chování fázové odezvy v závislosti na vlnové délce osvitu bylo pro osvit tentokrát využito několika různých filtrů (515, 580, 620, 650 a 676 nm) všechny o pološírce 10 nm. Výsledky těchto měření pro 8 % zaplnění jsou uvedeny na obr. 2.10. Je třeba poznamenat, že data z pole s anténami o průměru 140 nm (Cc) byla značně zašuměná, nejspíše kvůli chvilkovému rozladění mikroskopu.



Obr. 2.10: Hodnoty fáze získané analýzou dat změřených využitím pěti různých interferenčních filtrů (515, 580, 620, 650, 676 nm).

V grafu na obr. 2.10 lze vidět odlišné průběhy závislosti fáze na velikosti antén. Fázová závislost pro filtr 515 nm nevykazuje takřka žádné výrazné fázové změny s velikostí antén. Je patrný výraznější pokles pouze pro velikost 140 nm (Cc), kde byl však obraz zašuměný. Zisk dat z měření s filtrem 515 nm byl značně problematický kvůli malé rozlišitelnosti polohy jednotlivých políček. Ta byla totiž takřka nerozeznatelná od pozadí.

Data získaná s dalšími filtry vykazovala již větší fázový kontrast, který roste s vlnovou délkou osvitu. Je navíc stále více patrný klesající trend fáze s rostoucím průměrem nanoantén a posun této nejstrmější oblasti se zvyšováním vlnové délky osvitu (tedy buzení rezonance antén o větších rozměrech). Pokles fáze se jeví nejvýraznější pro filtr 650 a 676 nm. Podíváme-li se na rezonanční vlnové délky antén na vzorku č. 3 (obr. 2.4), můžeme přibližně určit velikost disků, které byly při osvitu užitím daného filtru vybudeny k rezonanci. Absence strmého poklesu fáze pro filtry 515 a 580 nm je pochopitelná, neboť tyto oblasti jsou mimo rezonanční vlnové délky připravených struktur (viz. obr. 2.4). Pro ostatní filtry nastává strmější fázový přechod, přičemž poloha jeho nejstrmější části se však příliš neshoduje se změřenými rezonančními vlnovými délkami, vyjma filtru 676 nm.

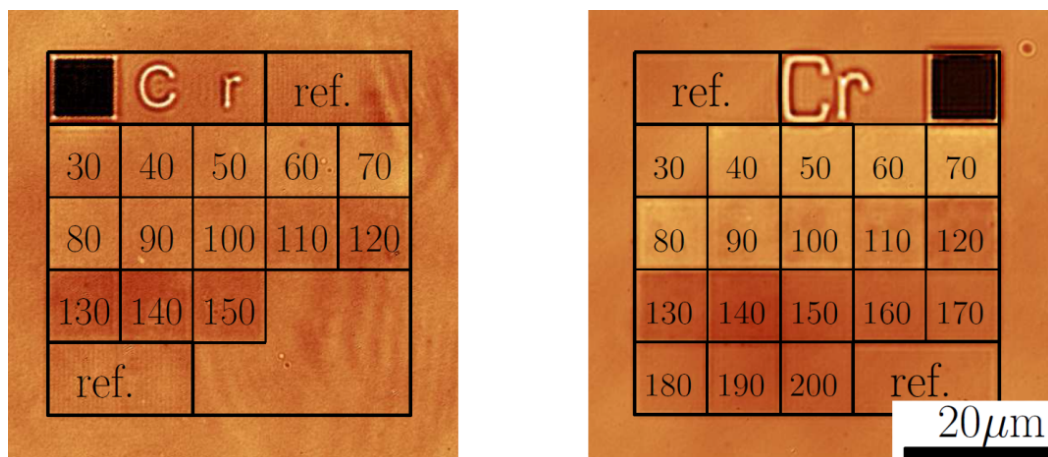
Ukázalo se tedy, že průběh fáze pro nanoantény různých velikostí je velmi citlivý na vlnovou délku osvitu. Větší vlnová délka osvitu budící rezonance větších struktur má za následek strmější fázovou změnu. Pro získání dalších informací o průběhu fáze v závislosti na vlnové délce osvitu bylo využito laditelného superkontinuálního laseru. Ten umožňuje variaci vlnových délek osvitu s intenzitou násobně vyšší, než která je dosažena při využití halogenové výbojky a interferenčního filtru.

Měření fáze s laditelným laserem

Superkontinuální (SC) laser WhiteLase SC480 od společnosti Fianium spolu s akustooptickým laditelným filtrem nahradil klasické osvětlení halogenovou výbojkou s interferenčním filtrem (obr. 2.1). Superkontinuum lze vytvořit průchodem laserového svazku (zdroje) fotonickým krystalovým vláknem, kde dojde k výraznému spektrálnímu rozšíření svazku nelineárními optickými procesy. Z takto vzniklého spektra jsou poté akustoopticky vybírány vlnové délky. Kombinace SC laseru a akustooptického filtru dokáže pokrýt spektrální oblast jdoucí od 480 nm až do 2000 nm.

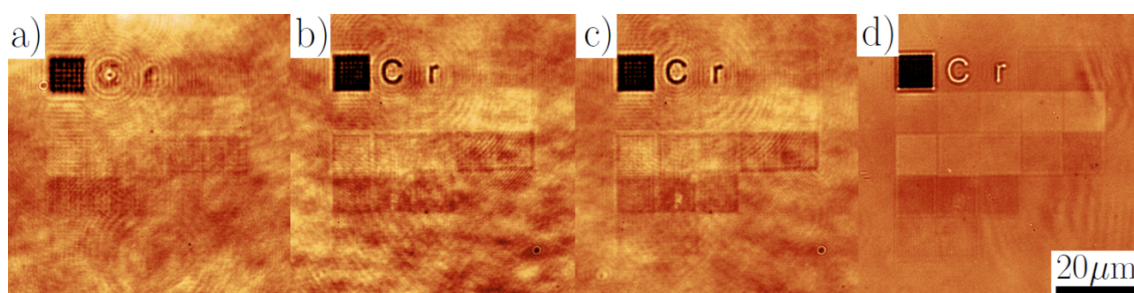
Pro počáteční měření se jevilo vhodným mít v rámci jednoho pozorovaného pole struktur zastoupeny veškeré velikosti nanodisků (30 – 150 nm). Tak bylo možné přímo porovnávat vliv osvětlení na fázi pro různé velikosti nanodisků v rámci jednoho pole. Takové pole (označené Cr – obr. 2.11 vlevo) bylo vytvořeno v rámci vzorku č. 2.

Obrázky získané při prvním měření (obr. 2.12a)) s SC laserem byly výrazně poznamenány interferencí na nečistotách v optickém systému a koherenční zrnitostí. Hlavním viníkem je „přílišná“ koherence světla z SC laseru, která znemožňuje mikroskopu tvorbu tenkých optických řezů a do signálu se promítá i rozptýlené světlo z nezaostřených oblastí vzorku. Bylo by tedy vhodné snížit koherenci osvitu a minimalizovat tak výše uvedené negativní projevy.



Obr. 2.11: Geometrie pole obsahujícího políčka s průměry antén (znázorněno čísla) od 30 do 150 nm na vzorku č. 2 (vlevo), od 30 do 200 nm na vzorku č. 4 (vpravo), při zaplnění 8 %, přičemž ref. značí oblast referenčních struktur.

Nejjednodušší možností, jak snížit koherenci, je využití rozptylujícího prostředí (difuzoru), které naruší prostorovou koherenci svazku. Při měření byly testovány tři diskové difuzory o různé matnosti, kterými bylo rotováno v cestě svazku. Nejvíce rozptylující matnice, která by měla dosáhnout nejvýraznějšího narušení koherence, propouštěla pouze velmi malou část původní intenzity svazku. Tato intenzita nebyla dostatečná na získání fázového obrazu na CCHM. Při měřeních byl proto také použit SC laser s vyšším výkonem (obr.2.12b) a c)), který však využití nejvíce rozptylující matnice také neumožnil. Porovnáním kvality obrazu dvou SC laserů (obr. 2.12a) a b)) ukazuje, že výkonnější SC laser zvýšil ostrost obrazu, ale lze vidět větší vliv koherenční zrnitosti.

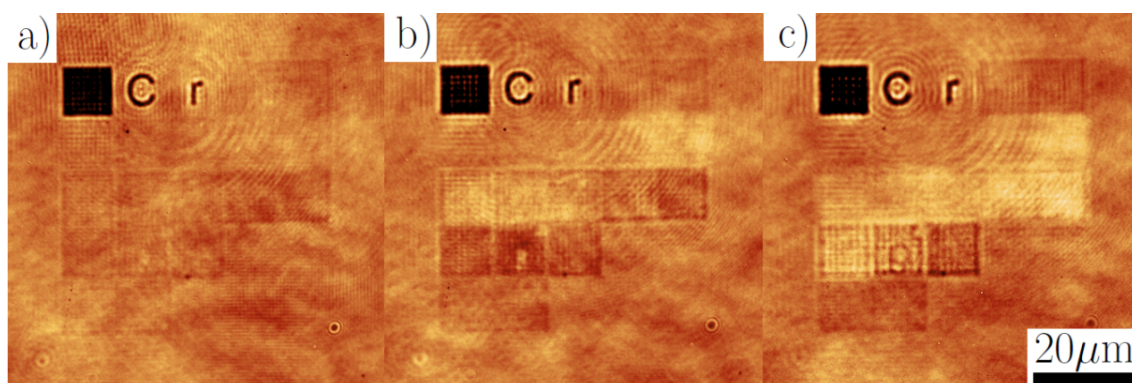


Obr. 2.12: Porovnání kvality obrazu při užití: a) původního modelu SC laseru, b) výkonnějšího bez difuzoru, c) výkonnějšího s difuzorem, d) interferenčního filtru, vše při osvětlení světlem o vlnové délce 650 nm.

Nejméně rozptylující matnice propustila dostatek intenzity, ale její vliv na zlepšení kvality obrazu byl neznatelný. Nejvhodnější matnicí se ukázala být středně rozptylující matnice, jejímž použitím bylo při osvětlení výkonnějším SC laserem dosaženo

nejlepší kvality obrazu (obr. 2.12c)). Porovnáme-li nejlepší obraz získaný osvitom SC laserem s obrazem pořízeným osvitom interferenčním filtrem (obr.2.12d)) je patrný markantní rozdíl. Bylo by tedy vhodné nalézt způsob, jak svazek učinit ještě méně koherentním.

Vliv vlnové délky osvitu na změnu fáze je patrný při pohledu na obr. 2.13. Ukazuje se, že kladná hodnota fáze (světlé políčko) se posunuje s rostoucí vlnovou délkou osvitu směrem k větším rozměrům antén.



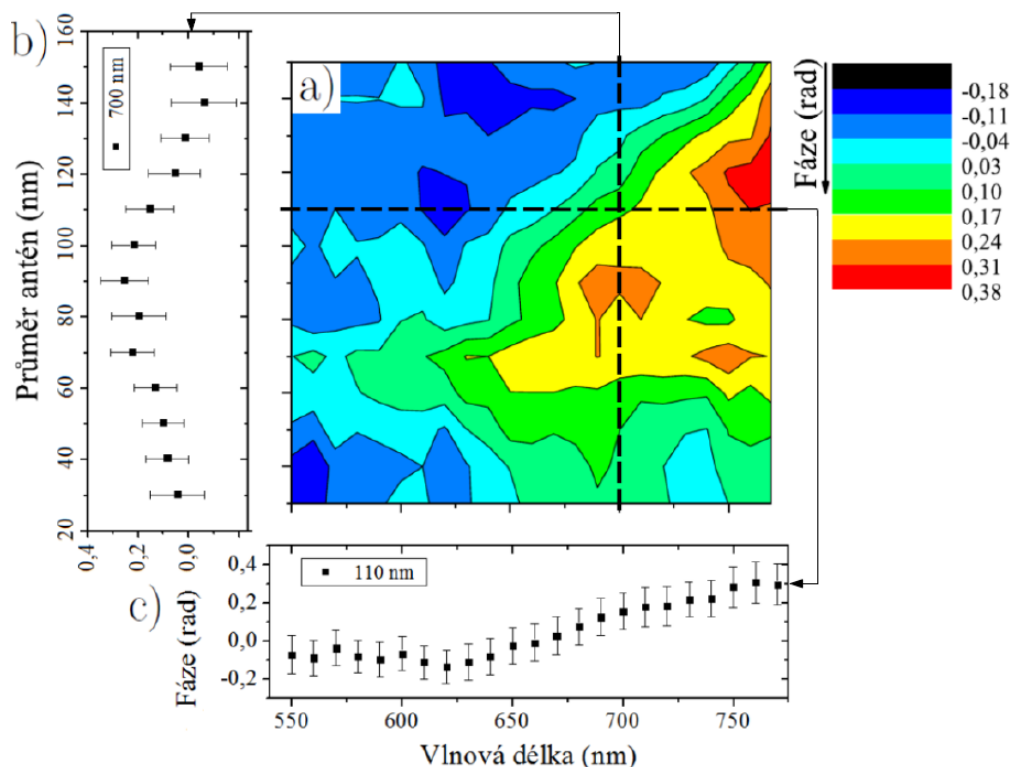
Obr. 2.13: Porovnání fáze na polích s různými průměry disků pro tři různé vlnové délky: a) 590 nm, b) 670 nm, c) 750 nm při osvitu výkonnějším SC laserem s rotující matnicí.

Číselná informace o fázi jednotlivých políček s různými velikostmi byla získána jako průměrná hodnota fáze v oblasti antén jedné velikosti ($\phi_{ant i}$). Tyto hodnoty byly vztaženy k referenci, která představovala nulovou hodnotu fáze, způsobem popsáným na str. 27. Stejný postup analýzy byl aplikován na data získaná při dalších vlnových délkách.

Měření probíhalo v rozmezí od 550 nm do 770 nm s krokem 10 nm, pološířka svazku byla 10 nm. Vlnové délky menší než 550 nm poskytovaly velmi málo fázového kontrastu, podobně jako u měření s filtry (2.10). Pro vlnové délky větší než 770 nm byla data silně ovlivněna absorpcí světla optickým systémem a nebudou zde uvedena.

Výsledky měření za osvitu SC laserem jsou shrnuty v grafu na obr. 2.14 je na ose x vynesena vlnová délka osvitu, na ose y průměr disků a fáze jakožto třetí rozměr je dána barevnou škálou. Jedná se o střední hodnotu fáze pro každý bod sítě vlnové délky a rozměru. Pro získání představy o velikosti chybových úsečků jsou zde také vyvedeny dva řezy tímto konturovým grafem. Jeden pro 110 nm antény a druhý pro 700 nm osvit. Data potvrzují dřívější závěry vyvozené z obr. 2.10, kdy je patrné, že změna fáze narůstá s velikostí nanodisků, resp. vlnovou délkou osvitu, která rezonance těchto větších nanodisků budí. Tato závislost na průměru nanodisků může souviset s narůstajícím vlivem rozptylu světla na anténách a tedy

i celé extinkce [111]. S rostoucí extinkcí klesá propustnost a stále větší část detekovaného světla je rozptýlena anténami, přičemž v limitním případě je to jediný příspěvek k signálu. V takovém případě bychom získali nejvýraznější signál odpovídající plazmonovým rezonancím, přičemž změna fázového signálu by měla být nejvýraznější.

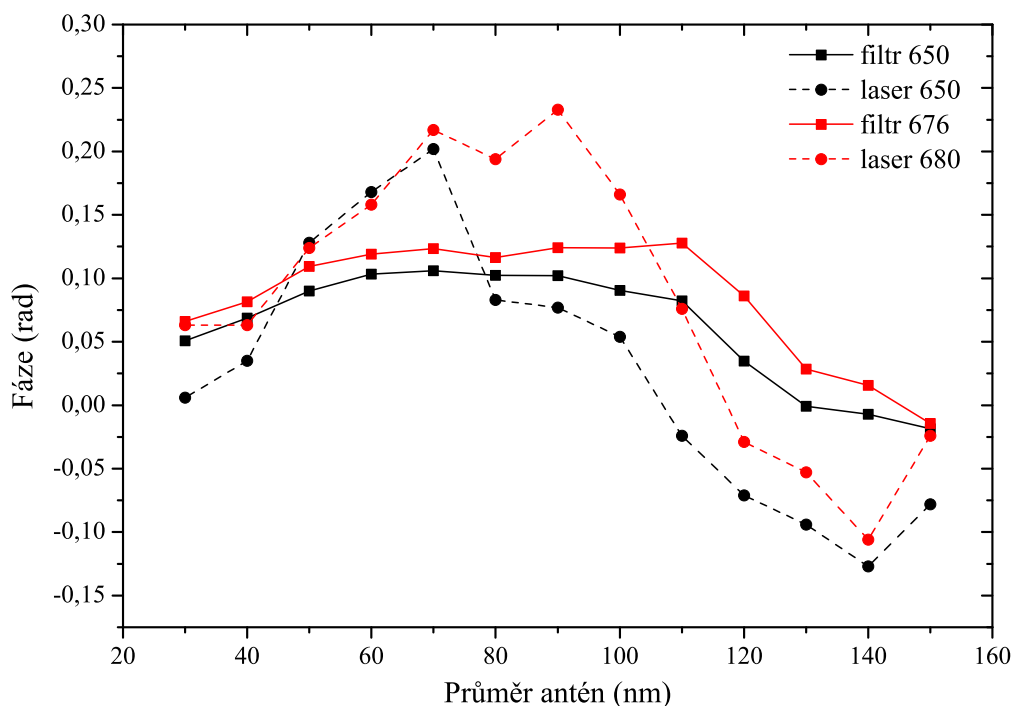


Obr. 2.14: Znázornění závislosti a) fáze na vlnové délce osvitu a na průměru nanodisků s vyznačenými řezy: b) pro vlnovou délku 700 nm, c) pro průměr 110 nm.

Graf na obr.2.14 opravdu vykazuje znaky takového chování. S růstem rozměrů disků narůstá i strmost fázové změny. Vhodné by bylo použít osvit delšími vlnovými délkami, což je však kvůli absorpci v optické soustavě v současnosti nemožné. Přidáním nanodisků s ještě většími rozměry by také bylo možné získat informaci o tom, zda se strmost fázové změny ještě zvýší. Nicméně kvůli problémům s elektronovým litografem nebyl nový vzorek pro důkladnou analýzu včas vyroben.

Porovnání hodnot fáze získaných užitím filtrů na vzorku č.3 a hodnot příslušných vlnových délek při užití bílého laseru na vzorku č.2 je znázorněno na obrázku 2.15. Ukazuje se, že polohy nejstrmějších fázových změn získaných osvitom s filtry a bílým laserem se poněkud liší. Data z SC laseru jsou vůči těm z filtrů horizontálně posunuta směrem k nižším rozměrům disků. To je možné vysvětlit případným rozdílem ve velikostech struktur na vzorku č. 2 a 3. Na první pohled je také zřejmé, že při užití bílého laseru je fázová změna větší a strmější. Tyto závislosti jsou ale oproti filtru

mnohem méně hladké, což lze přičíst horší kvalitě obrazu. Velikost nejistoty měření není u těchto závislostí možné přímo porovnávat, protože se k nim dospělo jiným způsobem analýzy. Pro získání alespoň přibližné představy lze porovnat nejistoty měření při 650 nm osvitu SC laserem a 650 nm filtrem (zaplnění C na obr. 2.8). Směrodatná odchylka fáze při využití laseru přes všechny velikosti poskytuje hodnoty $\sigma_{\text{las}} = (97 \pm 6)$ mrad a pro filtr $\sigma_{\text{fil}} = (68 \pm 2)$ mrad.



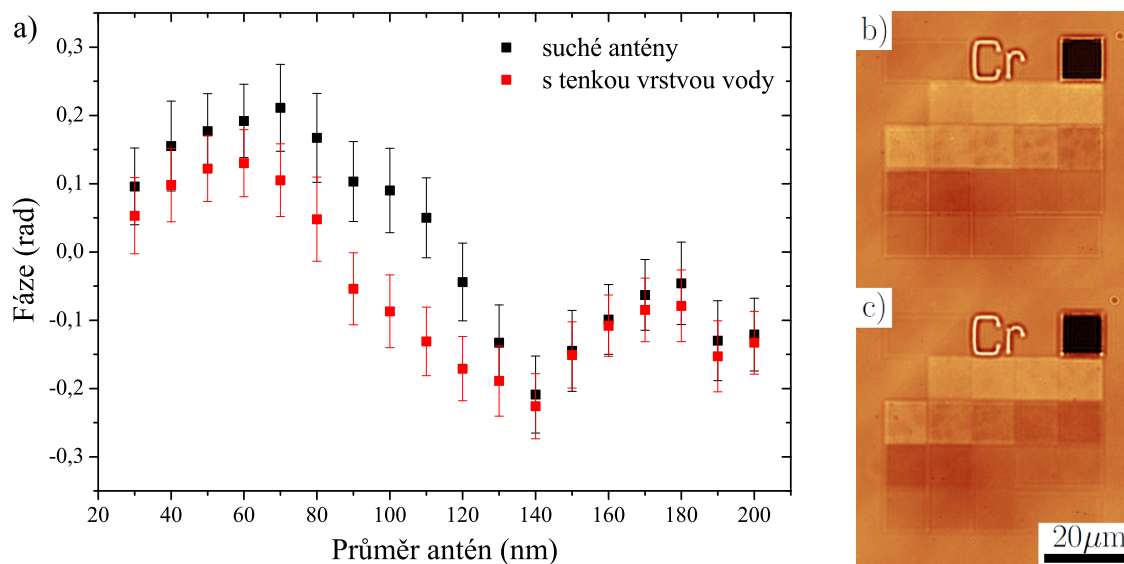
Obr. 2.15: Porovnání hodnot fáze získaných užitím filtrů na vzorku č.3 a hodnot příslušných vlnových délek při užití SC laseru na vzorku č.2.

Ačkoliv užití SC laseru přinášelo takřka úplnou volnost v nastavení vlnové délky osvitu, výrazně zhoršená kvalita zobrazení oproti filtru (porovnání na obr. 2.12) vnáší do odečtu fáze větší nejistotu. Pro případné aplikace se tedy zdá být využití interferenčních filtrů výhodnější, přičemž variabilita osvitu bude umožněna nákupem dalších filtrů.

Měření fáze ve vodném prostředí

Finální experiment proběhl s využitím 650 nm filtru a měl ověřit reakci změny fáze na změnu okolního prostředí, konkrétně na vodu. K experimentu bylo využito nového vzorku (č. 4 – viz tab. 2.1), který obsahoval i pole s anténami o různých rozměrech se zaplněním 8 % (podobně jako na vzorku č. 2 – obr. 2.11 vpravo) a také se zaplněním 16 %. Tentokrát byla navíc ještě přidána políčka s velikostmi antén 150 – 200 nm.

Nejprve byla změřena fáze na anténách vystavených vzduchu, poté byla mezi vzorek a krycí sklíčko aplikována tenká vrstva vody. Získaný fázový obraz pro případ antén se zaplněním 8 % (ozn. Cr) na vzduchu resp. ve vodě je znázorněn na obr. 2.16 b) resp. c), kde je patrný posuv rozměru antén, kdy dochází ke změně znaménka fáze daného políčka.

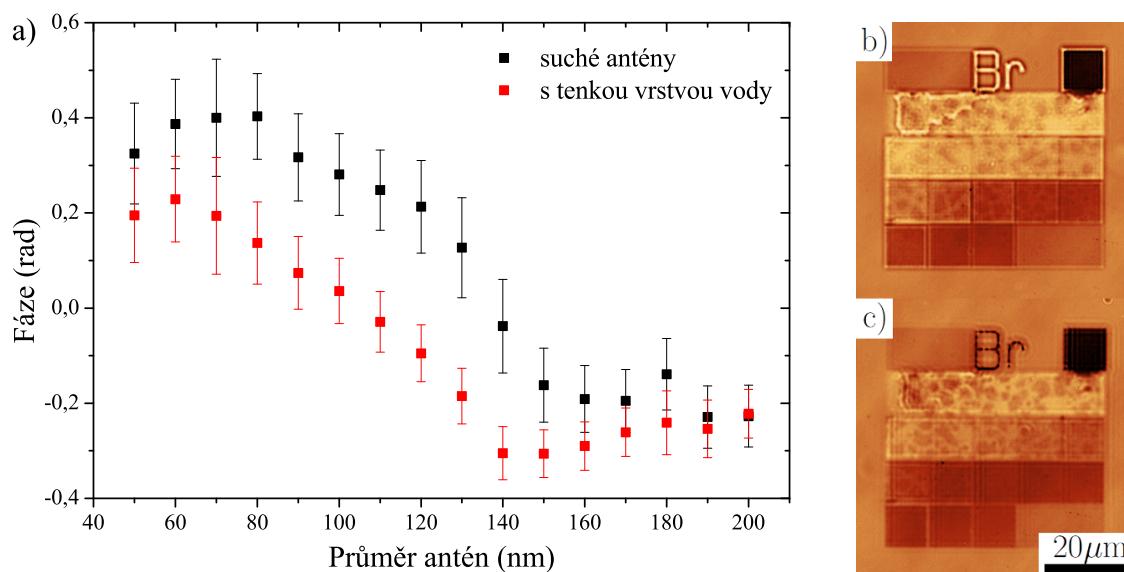


Obr. 2.16: Fázová odezva antén se zaplněním 16 % na změnu prostředí. a) Číselné hodnoty fáze v závislosti na průměru antén pro dvě různá prostředí. Příslušné obrazy získané při měření antén b) na vzduchu a c) ve vodě.

Hodnoty fáze příslušející jednotlivým políčkům s velikostmi antén od 30 nm do 200 nm byly získány stejným postupem jako data na obr. 2.14. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v grafu na obr. 2.16a), přičemž graf závislosti fáze na velikosti je pro případ s vodou posunut směrem k menším rozměrům antén. Tento vzájemný posuv lze vysvětlit na základě posuvu rezonančních vlnových délek antén. Při osvětlení 650 nm světlem jsou v případě antén na vzduchu nejsilněji buzeny rezonance v anténách s rozměrem 110 nm. Jejich rezonanční vlnová délka, alespoň na vzorku č. 1 (obr. 2.3), odpovídá právě hodnotám okolo 650 nm. Přidáním vody se rezonanční vlnové délky antén posunou směrem k větší vlnové délce přibližně o 40 nm (z dat získaných v další kapitole - rozdíl mezi krokem 2 a 3 na obr. 3.11). Jsou-li tedy antény obklopeny vodou, osvětlení o vlnové délce 650 nm nejsilněji vybudí rezonance v anténách o průměru 90 nm. Fázový rozdíl způsobený přidáním vody je největší pro antény s průměrem 110 nm, a to $0,18 \pm 0,08$ rad.

Stejným postupem bylo analyzováno i pole s anténami o dvojnásobném zaplnění 16 % (ozn. Br). Výsledky jsou shrnuty na obr. 2.17, přičemž chybí hodnota z prvních

dvou políček, na nichž došlo k poškození struktur při odplavování rezistu.



Obr. 2.17: Fázová odezva antén se zaplněním 16 % na změnu prostředí. a) Číselné hodnoty fáze v závislosti na průměru antén pro dvě různá prostředí. Příslušné obrazy získané při měření antén b) na vzduchu a c) ve vodě.

Výsledky vypadají podobně jako u nižšího zaplnění, jen fázové rozdíly jsou výrazně větší. Největší fázový rozdíl způsobený přidáním vody nastal pro antény s rozměrem 120 nm, a to $0,31 \pm 0,11$ rad.

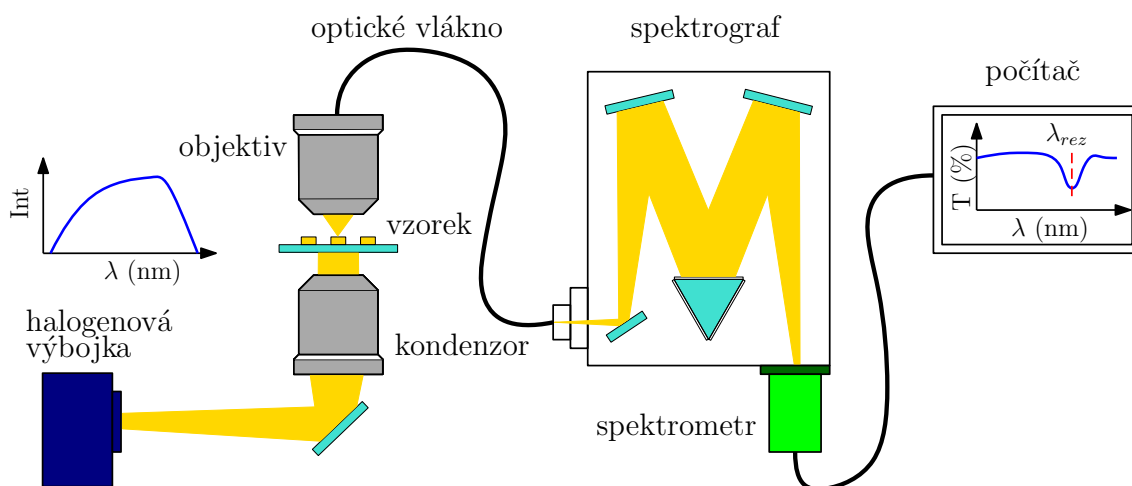
Tyto experimenty tedy prokázaly, že je možné pomocí fázového kontrastu při pozorování koherencí řízeným holografickým mikroskopem registrovat změny v indexu lomu v okolí plazmonických antén. Další kroky budou směřovat k využití fázové odezvy na detekci menších rozdílů v indexu lomu, které mohou být způsobeny například adsorpcí biomolekul.

3 VOLTAMETRIE A PLAZMONOVÉ REZONANCE

3.1 Optická spektroskopie

Optická spektroskopie je analytickou metodou, která umožňuje studium vlastností fyzických objektů na základě jejich interakce se světlem. Světlo je následně analyzováno spektrometrem, který poskytne spektrální závislost intenzity světla na vlnové délce. Právě tvar této závislosti v sobě ukrývá informaci o interakci světla s látkou jako je například absorpce, rozptyl, emise, difrakce atd.

Spektroskopická měření v oblasti viditelného světla probíhala na aparatuře Nanonics Multiview 400 (CEITEC MU), jejíž mikroskopová část je v uzavíratelné skříni. Proces získu transmisních (extinkčních) spekter je schematicky naznačen na obr. 3.1. Bílé světlo vychází z halogenové výbojky a vstupuje do kondenzoru (zvětšení 100 x), prochází vzorkem a je sbíráno objektivem (50 x / 100 x). Odtud je optickým vláknem vedeno do spektrografu Andor Shamrock 303i (typ Czerny-Turner), v němž je světlo spektrálně rozloženo, a následně je analyzováno na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ chlazeným spektrometrem Andor iDus 420 (CCD s rozlišením $1024\text{ pixelů} \times 255\text{ pixelů}$). Data ze spektrometru jsou poté v PC softwarově zpracována, přičemž výsledkem je spektrální závislost propustnosti (případně jiné veličiny). Tato část práce je zaměřena na vývoj a implementaci elektrochemické cely do prostoru vzorku. V následujícím textu jsou popsány experimenty ukazující postup od tenké vrstvy roztoku, přes využití gumového kroužku až k samotné elektrochemické cele.



Obr. 3.1: Schematické znázornění aparatury Nanonics pro spektroskopická měření. Bílé světlo z halogenové výbojky prochází optickou soustavou se vzorkem, prošlý signál je spektrálně rozložen a detekován spektrometrem, z něhož jsou data zpracována v počítači. Měření v reflexním módu lze provést díky další lampě, která umožňuje osvit shora.

K získání spektrální závislosti je vždy třeba pořídit alespoň tři spektra - jedno odpovídající světelnému pozadí od okolí (*poz*), druhé charakterizující neaktivní oblast vzorku (čisté sklo), jež poslouží jako reference (*ref*), vůči níž je vztahováno třetí spektrum z oblasti zájmu (*ant*). Při spektroskopických měřeních LSP byl využit vzorek polí zlatých nanodisků (obr. 2.2) na skleněném substrátu, kdy jako reference posloužila oblast čistého skla a signál byl získáván z oblastí s plazmonickými anténami, podobně jako v případě měření fáze. Jak propustnost T , tak i odrazivost R v závislosti na konfiguraci jsou poté získány následovně

$$\frac{ant - poz}{ref}.$$

Pozadí bylo měřeno pouze na začátku, reference byla měřena před každým jednotlivým měřením. Spektra získaná v transmisním módu mikroskopu vykazují v oblasti rezonance náhlý pokles propustnosti, který je důsledkem absorpce a rozptylu (dohromady extinkce) světla na diskových anténách. Ve spektrech získaných z mikroskopu v reflexním módu se naopak oblast rezonance vyznačuje nárůstem odrazivosti, která je důsledkem rozptylu světla na diskových anténách. Vlnová délka odpovídající minimu resp. maximu propustnosti resp. odrazivosti pak udává informaci o rezonanční vlnové délce nanostruktur, která může podávat kvalitativní informaci o případných posuvech rezonanční vlnové délky vlivem např. adsorpce molekul.

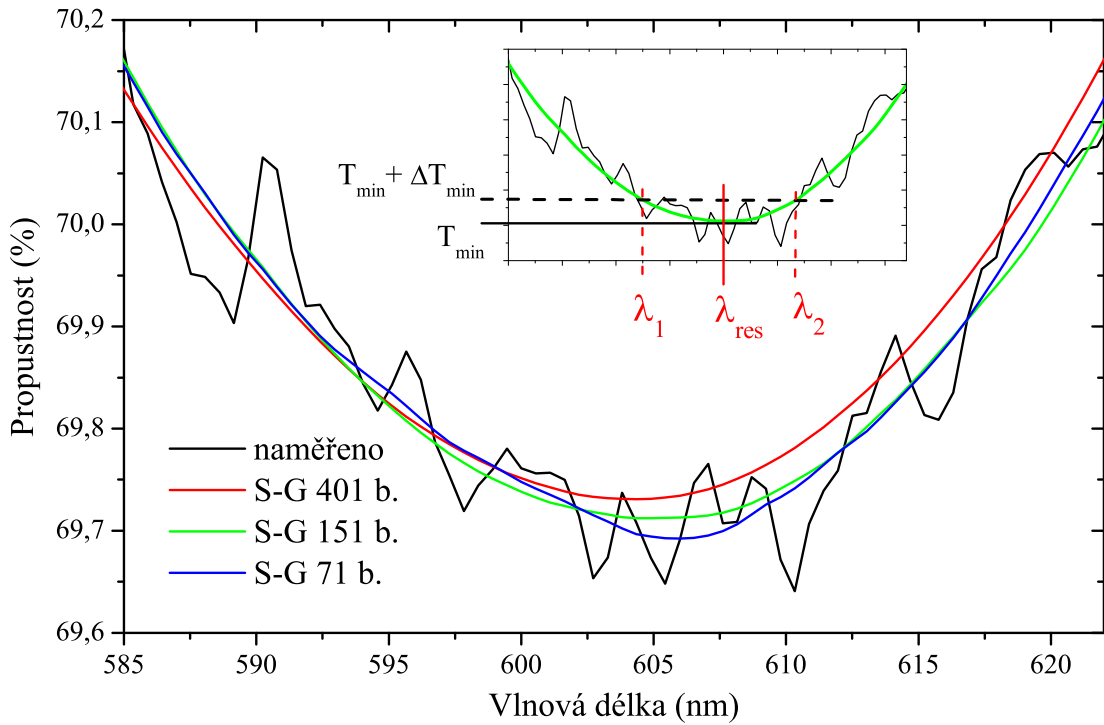
Pro získání přesnější informace o poloze rezonance je vhodné spektra podrobit dodatečné analýze.

3.2 Analýza spekter

Při analýze spekter propustnosti měřených na strukturách vykazujících plazmonové rezonance je hlavním úkolem nalézt minimum, neboť poloze minima odpovídá vlnová délka, kterou lze považovat za rezonanční vlnovou délku LSP. Podobným způsobem lze určit polohu rezonance ze spekter odrazivosti, kde však hledáme polohu maxima.

Naměřená spektra propustnosti nejsou vlivem šumu, případně vnějších vlivů, příliš hladká, a to ani při využití optimálních parametrů experimentu, jež jsou komentovány v následující kapitole 3.3. Tento šum znesnadňuje nalezení skutečné polohy rezonance zejména s přihlédnutím k pološířce rezonančního píku. Naměřená spektra byla vyhlazena pomocí techniky Savitzki-Golay, která vyžaduje zadání dvou řídicích parametrů. První je řád polynomu (m), jímž je proložen interval hodnot o lichém počtu bodů (n). Koeficienty polynomu $\varphi(x)$ jsou spočítány pomocí metody nejmenších čtverců, přičemž do takto získaného tvaru polynomu je dosazena

centrální hodnota x použitého intervalu. Následně se interval o jeden bod posune a proces se zopakuje. Řád polynomu byl zvolen $m = 4$ a šířka intervalu hodnot byla přizpůsobena konkrétním spektrům. Šířka intervalu byla specifická pro každé spektrum a ležela v intervalu $n \in \langle 71, 401 \rangle$. Prakticky tedy platí, že s rostoucím n roste vyhlazení spektra, přičemž bylo třeba nalézt kompromis mezi hladkostí a schopností zachytit trend změřeného spektra, jak ukazuje obr. 3.2.



Obr. 3.2: Hledání optimální šířky intervalu při vyhlazování spektra metodou S-G a její vliv na tvar vyhlazeného spektra. Srovnání vyhlazení je demonstrováno pro tři různé šířky intervalu (401, 151 a 71 bodů) při S-G vyhlazování. Vsazený graf znázorňuje odečet rezonanční vlnové délky λ_{rez} pro optimální vyhlazení (S-G 151 bodů) a určení odpovídajícího intervalu nejistoty.

Po nalezení vhodného parametru n je možné získat vlnovou délku ($\bar{\lambda}_{\text{rez}}$), které odpovídá minimální propustnost ($\bar{T}_{\text{min}}$). Z celého spektra je poté vybrána v okolí minima oblast o spektrální šířce 110 nm (N bodů), která pokrývá velkou část poklesu propustnosti, a je z ní dále určena nejistota vyhlazení. Hodnoty propustnosti změřené ($T_{Z,i}$) a vyhlazené ($T_{V,i}$) jsou porovnány a dle vztahu

$$\Delta T_{\text{min}} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (T_{Z,i} - T_{V,i})^2} \quad (3.1)$$

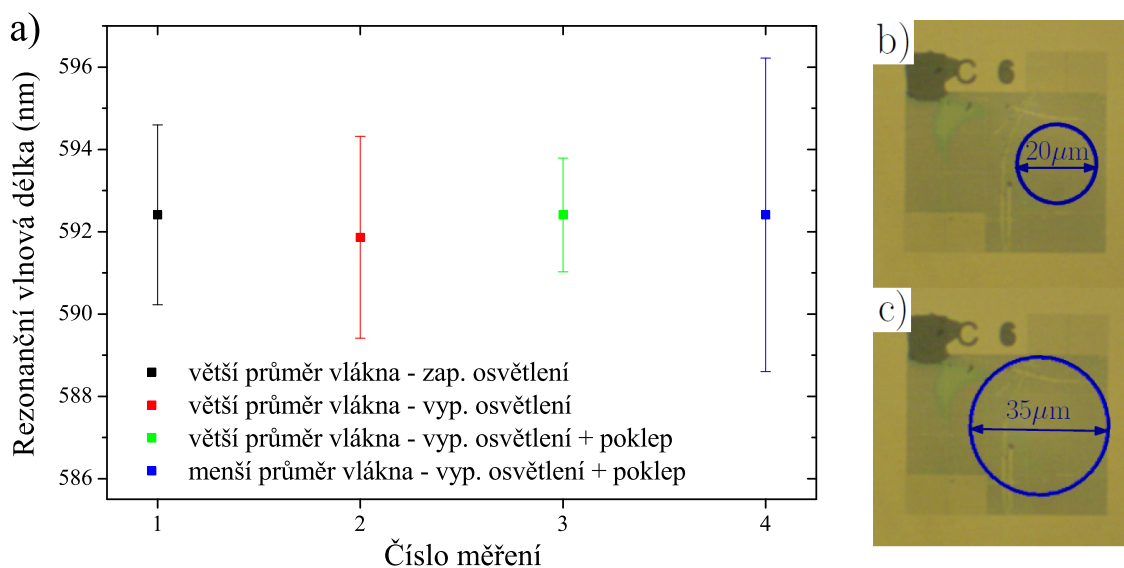
je určena nejistota nalezení minima propustnosti vlivem vyhlazení. S nejistotou určení minima propustnosti je spojena i nejistota v určení rezonanční vlnové délky. Průsečíky propustnosti $T_{\min} + \Delta T_{\min}$ s vyhlazenou závislostí (λ_1 a λ_2) představují hranice intervalu nejistoty určení λ_{rez} . Výsledek je poté tvaru

$$\lambda_{\text{rez}} = \bar{\lambda}_{\text{rez}} \pm \frac{\lambda_2 - \lambda_1}{2}. \quad (3.2)$$

V literatuře zabývající se problematikou zpracování spektroskopických dat jako například v [112] využívají k popsání naměřeného píku extinkce fit polynomem vyššího řádu, jehož koeficienty jsou spočteny pomocí metody nejmenších čtverců. Při úvaze nad citlivostí a přesností se neberou v potaz odchylky fitu od naměřených dat a dosahují tak citlivosti na 0,1 nm posuv rezonance. Vysoká citlivost je ale také dána použitým experimentálním uspořádáním, kdy je možné během jediného měření zároveň měřit spektrum i pozadí, což v našem experimentálním uspořádání nebylo možné. Pozadí se určovalo zvlášť, což přispívalo ke snížení citlivosti.

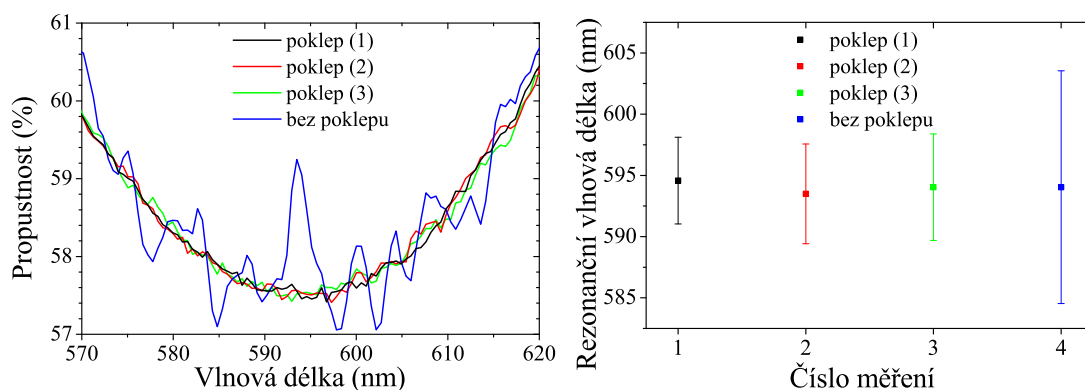
3.3 Optimalizace spektroskopických měření

Podoba spektra je závislá na mnoha faktorech, a to jak na typu vzorku, na vnějších podmínkách v jeho okolí, tak i na vnitřních parametrech samotného měření. Vliv vzorku, tedy typ plazmonických struktur, jejich rozložení, přesnost výroby atd., zde rozebírány nebudou, protože prozatím veškerá měření byla provedena na stejném vzorku (vzorek č. 1 pro fázová měření – obr. 2.2). Jedním z parametrů soustavy, jež mají velký vliv na výslednou podobu spektra je volba optického vlákna. Vlákem je sbírána část světla prošlá vzorkem a je jím vedena ke spektrometru. Bylo možné použít jedno ze dvou optických vláken o různém průměru jádra. Vláknem s větším průměrem sbírá světlo z větší plochy vzorku a poskytuje tak více signálu, což se projevuje na menším vlivu šumu na spektra. Pokud je však třeba brát signál z menší oblasti, je vhodnější použít vlákno s menším vnitřním průměrem, které sbírá méně světla a je náchylnější na změny vnějšího osvětlení v místnosti. Obr. 3.3 ukazuje reakci spektra získaného vlákem o větším průměru na zapnuté osvětlení v místnosti a na mechanický poklep vlákna rychle se opakujícími nárazy prstů, přičemž míra jejich vlivu je charakterizována zejména velikostí nejistoty určení rezonance. Tyto vlivy jsou porovnány s vlákem o menším průměru s „ideálními“ podmínkami (poklep vlákem + vypnuté osvětlení v místnosti).



Obr. 3.3: a) Porovnání vlivu vlákna a vnějších podmínek (osvětlení místnosti a poklep vláknem) na velikost nejistoty určení rezonanční vlnové délky. Vpravo jsou vyznačené oblasti sběru světla při použití vlákna b) o menším a c) o větším průměru.

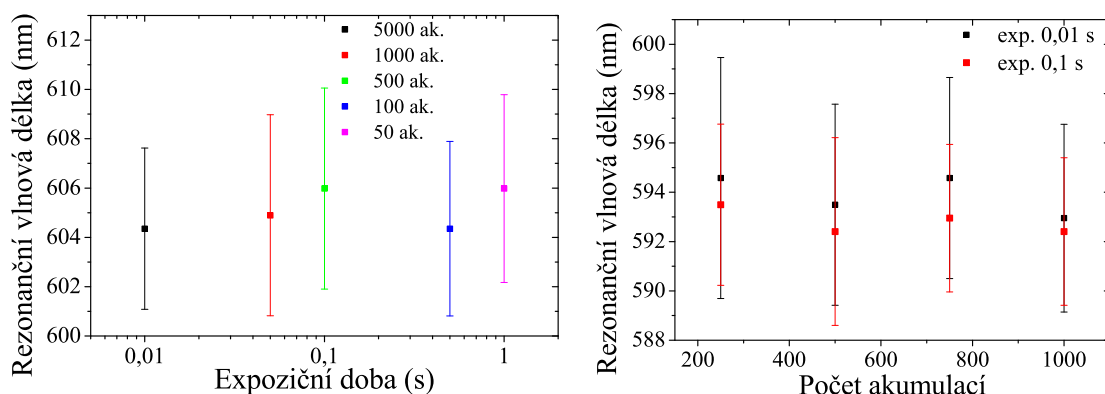
Z obr. 3.3 je patrné, že spektra získaná s vláknem o větším průměru vykazují mnohem menší nejistotu při určování polohy rezonance. Zapnuté osvětlení v místnosti na spektrum vliv spíše nemá, ale poklep vlákna umožnil získání nejhladšího spektra. Při použití vlákna o menším průměru je vliv poklepu mnohem výraznější, což naznačuje zvýšenou průchodnost vlákna při poklepu.



Obr. 3.4: Porovnání tří spekter získaných za stejných podmínek při poklepu a jednoho spektra získaného bez poklepu – vše za využití vlákna o menším průměru. Vlevo: tvar změřených spekter, vpravo: odečtené příslušné polohy rezonance a nejistoty získané při jejich určení.

Při naprosté většině případů bylo použito vlákno o menším průměru z důvodu snadnějšího nalezení oblasti bez nečistot, za zhasnutého osvětlení v místnosti a za stálého manuálního poklepu, jehož vliv na spektrum za využití vlákna o menším průměru je zřejmý z obr. 3.4. K porovnání jsou zde také spektra, jež byla změřena s poklepem, přičemž se jedná o měření stejného místa se stejnými parametry, abychom získali náhled na stabilitu měření. Poloha rezonance je takřka stálá, mírně se mění velikost nejistoty. Tyto drobné odchylky jsou pravděpodobně způsobeny šumem pozadí, které je změřeno pouze na začátku experimentu.

Další důležitou oblastí optimalizace byly parametry samotného zisku dat. Jedná se zejména o expoziční čas a počet akumulací. Expoziční čas udává dobu, po kterou bude sbírán signál potřebný na pořízení jednoho spektra, přičemž počet akumulací udává, kolik jich bude celkem pořízeno a zprůměrováno k zisku výsledného spektra. Zvýšení jednoho či druhého parametru by mělo přispět ke snížení šumu ve spektrech. Součin těchto parametrů charakterizuje celkovou dobu měření. Porovnání měření trvajících 50 s pro různé parametry sběru dat je na obr. 3.5 vlevo.



Obr. 3.5: Vlevo: porovnání 50 s měření pro různé doby expozice a počty akumulací, vpravo: porovnání vlivu počtu akumulací pro dva různé časy expozice.

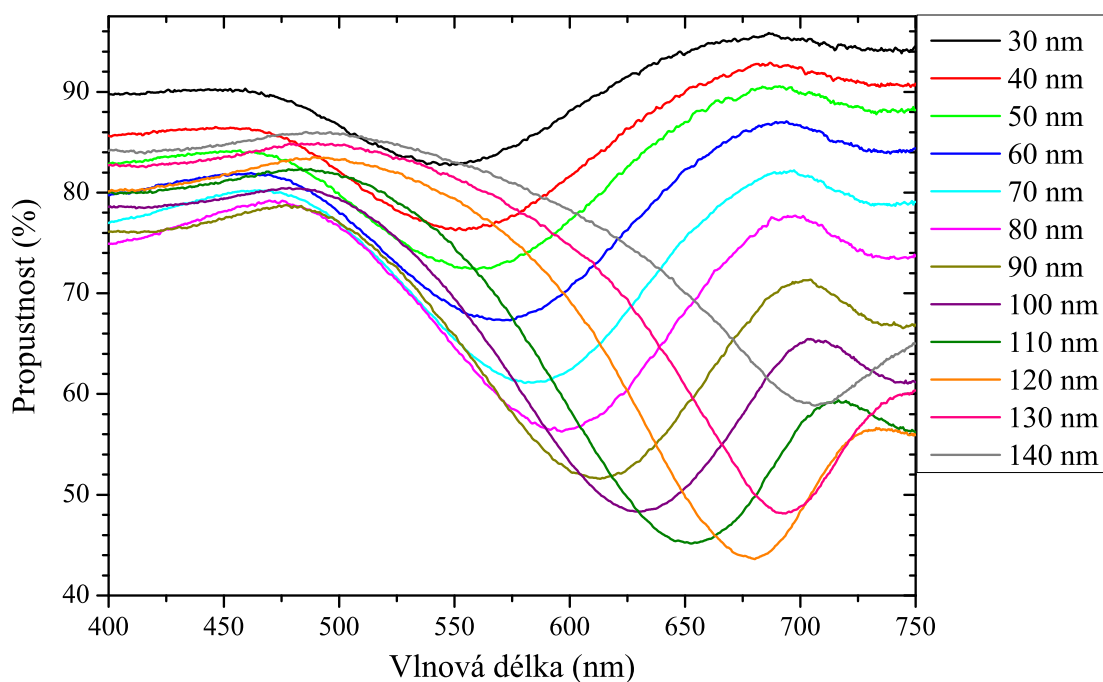
Zadaná hodnota expoziční doby se v případě časů 0,01 s a 0,05 s se však neshodovala s reálným časem měření, který měl hodnotu 0,023 s, resp. 0,063 s, takže měření reálně trvala déle. To se podepsalo zejména na datech získaných pro nastavený expoziční čas 0,01 s, kde měření probíhala více než dvakrát déle a výsledná nejistota je tak menší. Dále expoziční časy 0,5 s a 1 s dávají menší nejistotu než časy 0,05 s a 0,1 s, avšak nejedná se o výrazný rozdíl.

Obr. 3.5 vpravo ukazuje vliv počtu akumulací na přesnost odečtu polohy rezonance pro dva různé expoziční časy (0,01 s a 0,1 s) přičemž se dle očekávání ukazuje, že delší časy měření poskytují menší nejistotu v určování rezonanční vlnové délky.

Na základě výše uvedených testů a dalších měření byl pro následující experimenty nastaven expoziční čas 1 s a 50 akumulací.

3.4 Provedené experimenty

Jelikož tato práce směřuje k uplatnění v biodetekci, bylo třeba nejdříve ověřit, zda lze na zařízení Nanonics naměřit absorpční spektra v jiném prostředí než na vzduchu, např. ve vodě, která je základní složkou naprosté většiny fyziologických roztoků biomolekul. Pro samotná měření byl využit první vzorek fázových antén (obr. 2.2 s parametry shrnutými v tab. 2.1) – zlaté diskové antény o výšce 40 nm a průměrech od 30 do 150 nm na skleněném substrátu. Plazmonová rezonance polí o různých velikostech antén byla ověřena optickou spektroskopií, jak ukazuje obrázek 3.6, přičemž odpovídající rezonanční vlnové délky jsou vyneseny v grafu na obr. 2.3.



Obr. 3.6: Spektrální závislost propustnosti vzorku č. 1 se zlatými anténami o průměrech 30 – 140 nm.

Z grafu na obr. 2.3 je patrné, že poloha minima propustnosti se s rostoucím rozměrem disků posouvá k vyšším vlnovým délkám a zároveň dochází k prohlubování poklesu propustnosti. Tento trend je alespoň u posledních dvou spekter narušen, což lze přičítat počínající absorpci světla optickými prvky mikroskopu (od 700 nm), kvůli

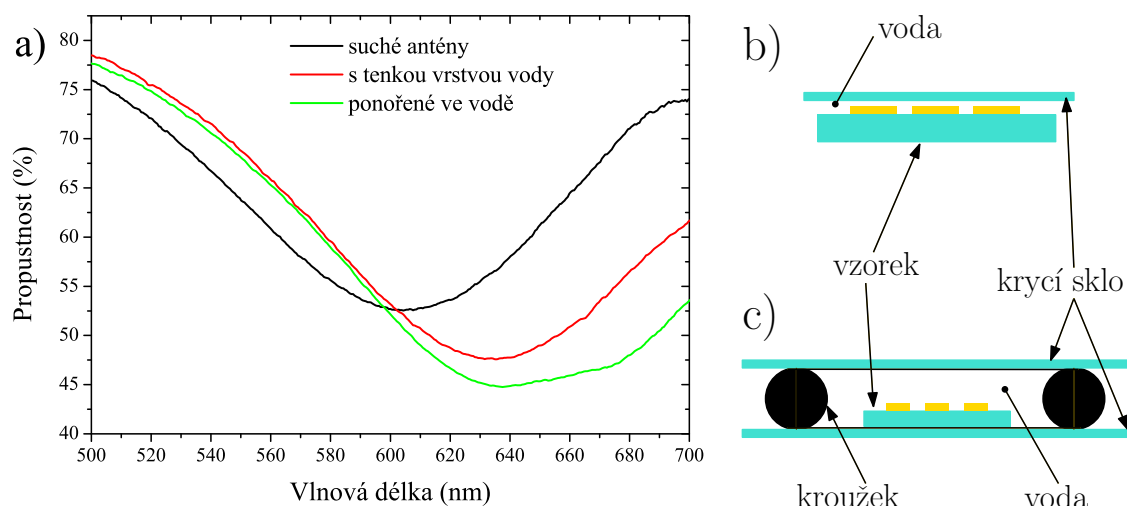
níž nebylo změřeno spektrum odpovídající největším anténám. Je proto třeba brát i jim odpovídající rezonanční vlnovou délku poněkud s rezervou.

K dále uvedeným měřením bylo použito pole C6, jež označuje pole antén s průměrem 80 nm, jejichž rezonanční vlnová délka byla určena jako (595 ± 4) nm. Výběr pole, potažmo průměru disků, byl kompromisem mezi co nejvýraznější rezonancí a její polohou tak, aby nezasahovala do oblasti absorpce optickými prvky.

Měření ve vodném prostředí

Vliv vodného prostředí na polohu rezonance byl testován na tenké vrstvě, která byla na vzorku vytvořena přiklopením kapky vody krycím sklem. Obraz z mikroskopu kromě jemného rozostření nebyl přítomností vody poznamenán a stále umožňoval přesnou lokalizaci pole antén ke sběru signálu. Dalším krokem bylo vložení vzorku do vody o větším objemu vymezeného gumovým kroužkem (materiál - viton) a dvěma krycími skly. K zaostření na povrch vzorku bylo třeba namísto objektivu 100 x (WD 1 mm), používaného pro běžná spektrální měření spekter, použít objektiv s delší pracovní vzdáleností 50 x (WD 17,5 mm), s nímž byla měřena veškerá spektra týkající se této části práce.

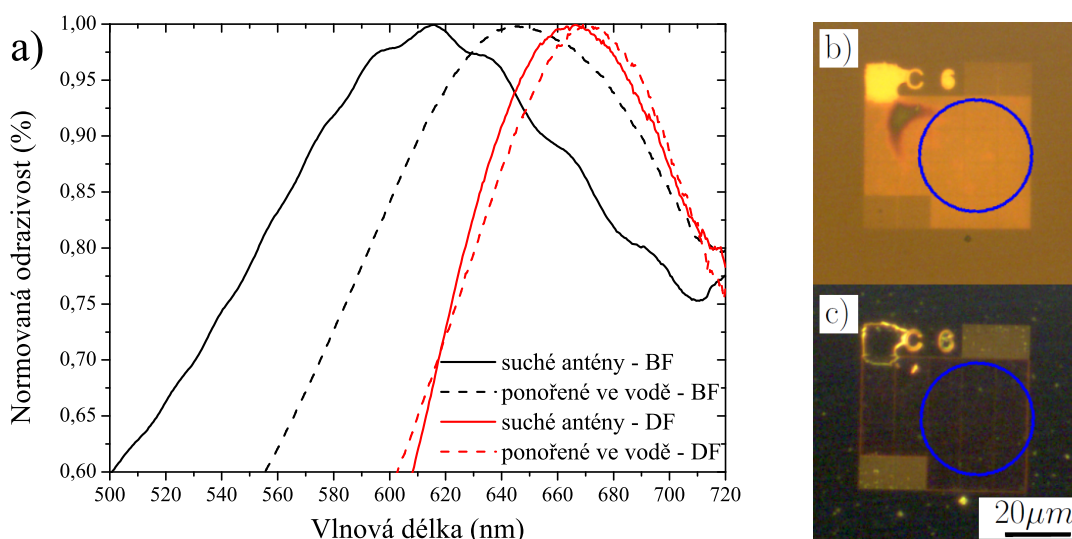
Výsledky těchto měření jsou uvedeny na obr.3.7, kde je patrný výrazný posuv k delším vlnovým délkám asi o 30 nm a to jak pro antény s tenkou vrstvou vody, tak i pro antény ponořené do vody vymezené gumovým kroužkem.



Obr. 3.7: a) Spektra propustnosti suchých antén o průměru 80 nm a po následné aplikaci tenké vrstvy vody, případně jejich ponoření do vody. Příslušná uspořádání pro měření antén: b) s tenkou vrstvou vody, c) ponořených do vody.

Z grafu na obr. 3.7 se zdá, že na rezonanční vlnovou délku tloušťka vrstvy vliv nemá. Větší pokles propustnosti při užití kroužku byl pravděpodobně způsoben přítomností více optických rozhraní, na nichž se světlo mohlo odrazit, případně rozptylem světla v kapalině. Tento experiment však zejména ověřil schopnost mikroskopu pomocí objektivu s delší pracovní vzdáleností zaostřit na povrch vzorku obklopeného silnou vrstvou slabě rozptylujícího prostředí a následně pak detekovat plazmonové rezonance.

Mimo měření propustnosti (transmisní mód), proběhla i měření odrazivosti (reflexní mód ve světlém BF i temném poli DF), jak ukazuje obr. 3.8. Lze vidět, že ve světlém poli nastal po aplikaci vody výrazný posuv rezonanční vlnové délky směrem k delším vlnovým délkám, přibližně stejný jako u transmisního uspořádání. Naproti tomu při detekci v temném poli se posuv rezonanční vlnové délky ukázal být výrazně menší. Citlivost rezonanční vlnové délky na změny indexu lomu prostředí je v případě využití temného pole velmi malá.



Obr. 3.8: a) Normovaná odrazivost měřená ve světlém (BF) i temném (DF) poli antén na vzduchu a ponořených vody. Obrázek pole suchých antén pořízený mikroskopem v reflexním módu v: b) světlém c) temném poli.

I suchý vzorek byl při měření podložen krycím sklem, proto je odpovídající BF spektrum vlivem interference na vzduchové vrstvě zvlněné.

Měření v SSC pufru

Další postup spočíval v pozorování vlivu přítomnosti pufru v roztoku na polohu rezonance. Pufr bývá používán ve fyziologických roztocích biomolekul ke stabili-

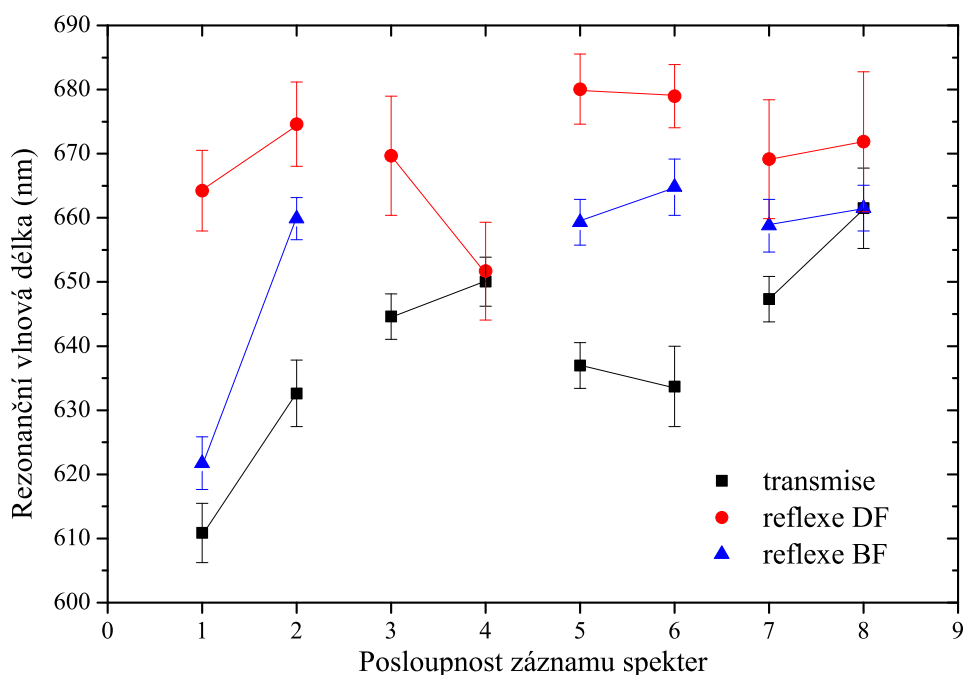
zaci pH, přičemž vliv samotného pufru je také třeba sledovat. Index lomu roztoku s pufrem se liší od vody pouze minimálně, jelikož voda bývá nejčastěji jeho základem. Pro experimenty byl zvolen SSC (saline sodium citrate) pufr, který je směsí NaCl a citrátu sodného (10:1) a jenž udržuje rovnováhu okolo neutrálního pH 7. Experimentů s pufrů proběhlo celkem sedm, přičemž jejich stručný popis je shrnut v tab. 3.1.

Tab. 3.1: Porovnání provedených spektroskopických měření při aplikaci SSC pufru s ohledem na použitou koncentraci, čištění plazmatem a použité uspořádání.

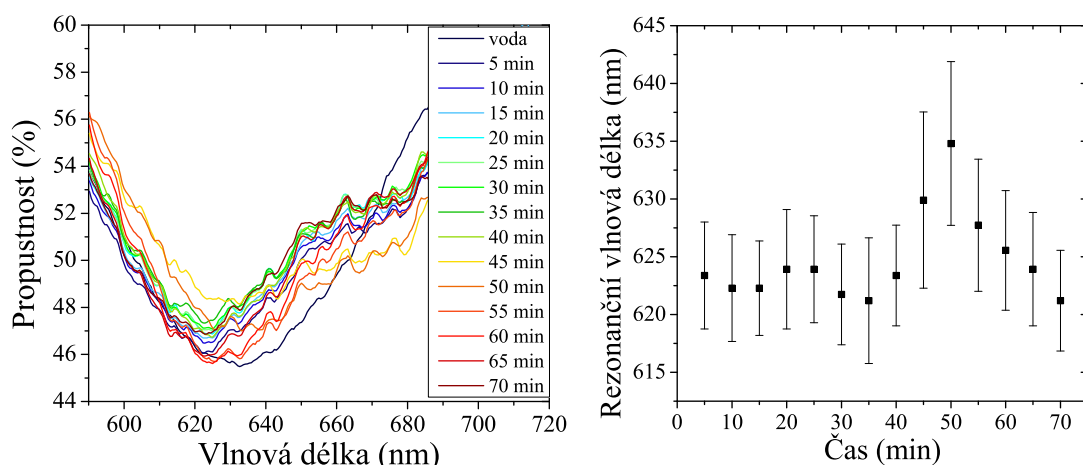
Měření č.	10 mM	100 mM	1 M	Plazma	Uspořádání
1	X	X	X	–	obr. 3.7b)
2	–	X	–	X	obr. 3.7b)
3	X	X	X	X	obr. 3.7c)
4	X	–	–	X	obr. 3.7c)
5	–	–	X	X	obr. 3.7c)
6	X	–	–	X	obr. 3.7c)
7	–	–	X	X	obr. 3.17

V rámci experimentu byly nařaděny tři různé koncentrace SSC pufru – 10, 100 a 1000 mM, jež byly poté aplikovány na vzorek s anténami. První měření bylo provedeno kápnutím malé kapky roztoku na vzorek, na který bylo poté přiloženo krycí sklíčko. Před kápnutím roztoku byla změřena kontrolní spektra odpovídající suchému vzorku a poté vzorku s tenkou vrstvou vody. Po osušení se přešlo k aplikaci pufru o nejnižší koncentraci (10 mM), s níž byla zaznamenána dvě spektra s časovým rozestupem 20 min, abychom odhalili případný časový vývoj. Vzorek i sklíčko byly poté opláchnuty deionizovanou vodou a ofouknuty dusíkem. Stejný postup použit i při zbývajících koncentracích. V rámci tohoto experimentu byla v každém kroku zaznamenána spektra jak propustnosti, tak odrazivosti (BF i DF) a polohy rezonance získané z příslušných spekter jsou uvedeny v grafu na obr. 3.9.

Hodnota rezonanční vlnové délky v kroku 3 (po aplikaci 10 mM SSC) při měření odrazivosti ve světlém poli chybí kvůli chybě při ukládání. Hodnoty v kroku 4 (10 mM SSC po 20 min) byly ovlivněny vysycháním roztoku, k němuž postupně docházelo a které zkreslovalo výsledky. Odrazivost ve světlém poli byla v tomto kroku úplně vyřazena, protože výsledné spektrum bylo zdeformované interferencí a nebylo tak možné správně určit polohu rezonance. Výsledky měření odrazivosti v temném poli vykazují největší nejistoty a zároveň nejmenší citlivost rezonanční vlnové délky na změny v indexu lomu okolního prostředí, a proto již tato konfigurace nebyla dále používána. Při měření s dalšími koncentracemi už k úplnému vyschnutí nedošlo, avšak nelze s jistotou říci, že alespoň částečně neovlivňovalo i další měření.



Obr. 3.9: Experiment č. 1: Rezonanční vlnové délky 80 nm nanodisků v různých koncentracích SSC pufru získané analýzou spekter pořízených v transmisním a reflexním (BF i DF) módu. Posloupnost záznamu: suché antény (1), s vodou (2), s 10 mM (3 a 4), s 100 mM (5 a 6), s 1 M (7 a 8) SSC pufru.



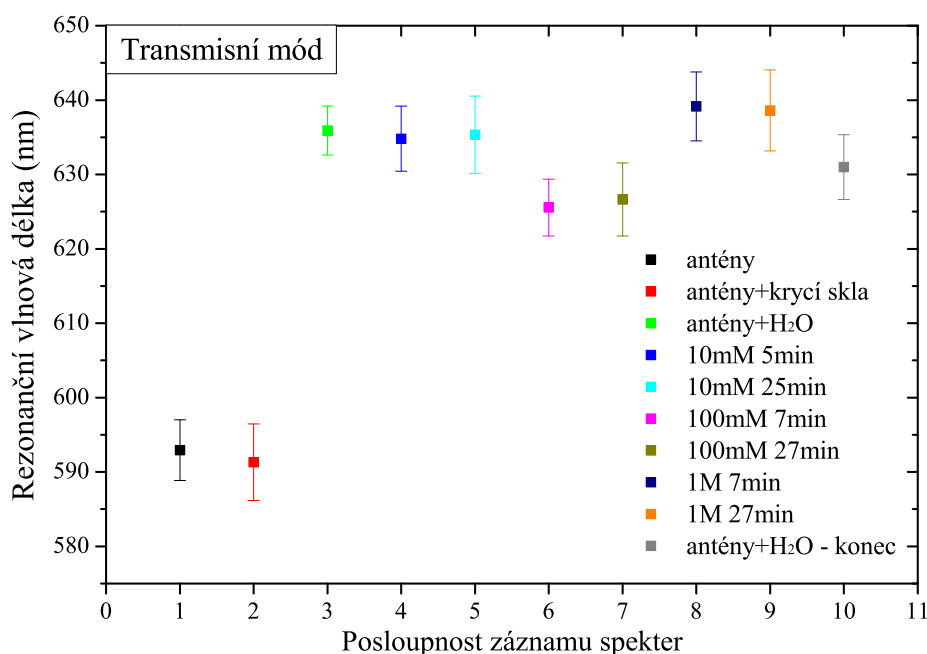
Obr. 3.10: Experiment č. 2: Časová závislost polohy rezonance na délce časového intervalu, po něž byl vzorek vystaven roztoku 100 mM SSC pufru. Vlevo: výřez oblasti rezonance ze spekter propustnosti pro různé časy od aplikace SSC pufru. Vpravo: Příslušné rezonanční vlnové délky.

Z výsledků na obr. 3.9 není možné určit, zda po první aplikaci pufru na povrchu vzorku nezůstaly i po oplachu adsorbované zbytky SSC pufru a neovlivnily tak

výsledek dalších měření. Proto všem následujícím sériím měření předcházelo čištění vzorku, konkrétně v kyslíkovém plazmatu, které bývá běžně používáno např. na odstraňování zbytků fotorezistu a organických nečistot obecně [113].

Z časové změny vlivu pufru na rezonanční vlnovou délku (obr. 3.9) nebylo možné ze dvou měření v časovém rozestupu 20 min činit spolehlivé závěry. Následující experiment byl proto navržen k mapování časového vývoje rezonanční vlnové délky pro jednu koncentraci SSC pufru a to 100 mM. Při měření samotné časové závislosti byla zaznamenávána spektra propustnosti tak, že reference byla změřena pouze jednou hned po aplikaci roztoku. Poté už byl signál získáván pouze z oblasti antén. Případné posuvy by pak měly být důsledkem změn prostředí v okolí antén. Naměřená data jsou zobrazena na obr. 3.10 a ukazují, že rezonanční vlnová délka se nijak systematicky neposouvá, a časový vývoj se zdá být spíše náhodným.

Další experimenty s SSC pufrům probíhaly se vzorkem uvnitř objemu ohraničeného gumovým kroužkem a krycími skly (obr. 3.7c) – tedy geometrie blízká elektrochemické cele, která navíc zabráňovala vypařování roztoku a umožnila tak udržování stabilnějších podmínek.



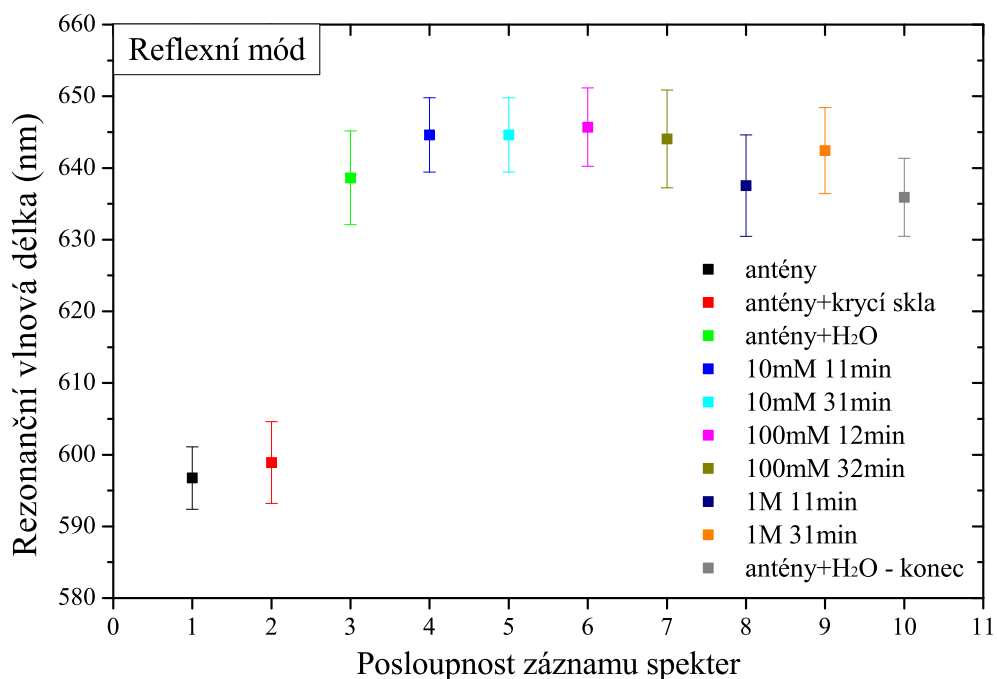
Obr. 3.11: Experiment č. 3: Rezonanční vlnové délky ze spekter propustnosti pro antény v různých koncentracích SSC pufru měřených v objemu za využití gumového kroužku. Hodnoty jsou seřazeny dle časové souslednosti a popsány v legendě grafu.

S využitím kroužku byla zopakována měření propustnosti (obr. 3.11) a odrazivosti (tentokrát pouze BF – obr. 3.12) pro všechny tři koncentrace SSC pufru. Byla

získána spektra odpovídající suchým anténám, přikrytých a podložených sklíčky, ponořených ve vodě a následně v samotných SSC pufrů, podobně jako v případě měření na obr. 3.9. Jakmile byla pořízena spektra pro nejvyšší koncentraci pufru, vzorek byl opláchnut, následně znovu vložen do čisté vody a bylo opětovně změřeno kontrolní spektrum.

Porovnání spektra s vodou před a po aplikaci SSC pufru by mělo odhalit, zda nedošlo na anténách k nějakým povrchovým změnám způsobených například jejich znečištěním zbytky pufru, případně některým z dalších jevů, které mohou změnit rezonanční vlnovou délku antén.

Výsledky analýzy spekter propustnosti za využití gumového kroužku jsou vyneseny na obr. 3.11. Kroky 1 a 2 odpovídají takřka stejným rezonančním vlnovým délkám, vložením do vody nastal výrazný posuv asi o 45 nm (krok 3). Aplikace 10 mM SSC (krok 4) nezpůsobila v podstatě žádný posuv, stejně tak ani po 20 minutách působení (krok 5). Oplach a vložení do SSC s 100 mM koncentrací (krok 6) vyvolalo posuv k nižším vlnovým délkám asi o 10 nm. Intervaly nejistoty kroků 5 a 6 se neprotínají a nejedná se tedy o odchylku v rámci určování rezonanční vlnové délky, což potvrzuje i měření o 20 min později (krok 7), které je na podobné úrovni.

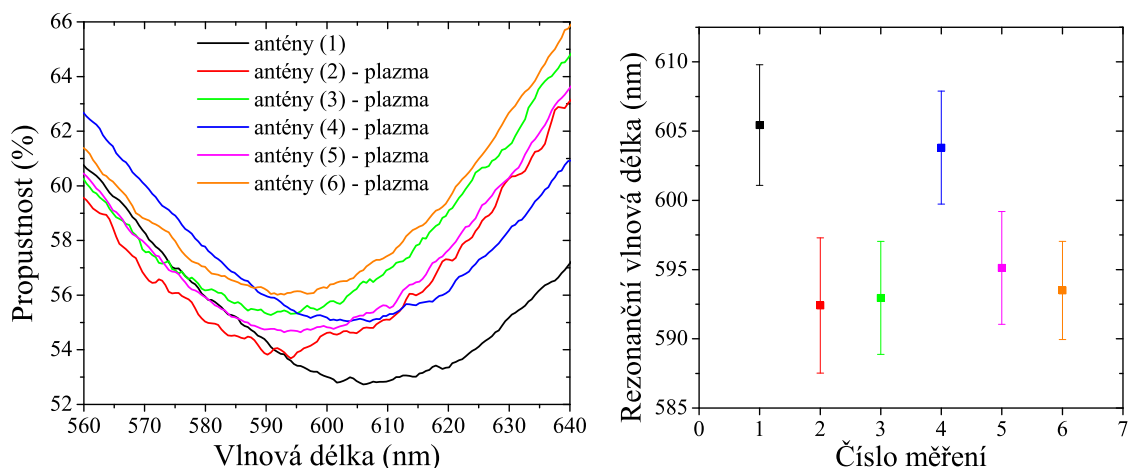


Obr. 3.12: Experiment č. 3: Rezonanční vlnové délky pro antény v různých koncentracích SSC pufru za využití gumového kroužku získaných měřením odrazivosti ve světlem poli. Hodnoty jsou seřazeny dle časové souslednosti a popsány v legendě grafu.

Tento posuv se nepodařilo uspokojivě vysvětlit, mimo jiné proto, že v současně měřených spektrech odrazivosti (obr. 3.12) se žádný takový posuv neobjevil. Při využití nejvyšší koncentrace došlo k opětovnému návratu rezonanční vlnové délky směrem k delším vlnovým délkám mírně nad úroveň vody. Posuv vůči vodě ($n_{\text{H}_2\text{O}} \doteq 1,33$) je v rámci nejistoty určení polohy rezonance, ale byl by vysvětlitelný na základě mírně vyššího indexu lomu 1 M SSC pufru ($n_{\text{SSC}} \doteq 1,34$ [114]). Rezonanční vlnová délka antén ve vodě na konci (krok 10) je oproti té na začátku (krok 3) posunuta asi o 5 nm k menším vlnovým délkám.

Rezonanční vlnové délky odpovídající jednotlivým krokům experimentu obdržené ze souběžného měření odrazivosti ve světlém poli jsou uvedeny v grafu na obr. 3.12. Posuv rezonance mezi suchými anténami (krok 1 a 2) a anténami ve vodě (krok 3) odpovídá asi 40 nm. Další změny rezonančních vlnových délek poměrně korelují s těmi odečtenými ze spekter propustnosti (obr. 3.11). Posuv rezonančních vlnových délek mezi kroky 3 a 10 je asi 3 nm je ve směru ke kratším vlnovým délkám. Takové posuvy se vyskytovaly i u dalších měření (obr. 3.14).

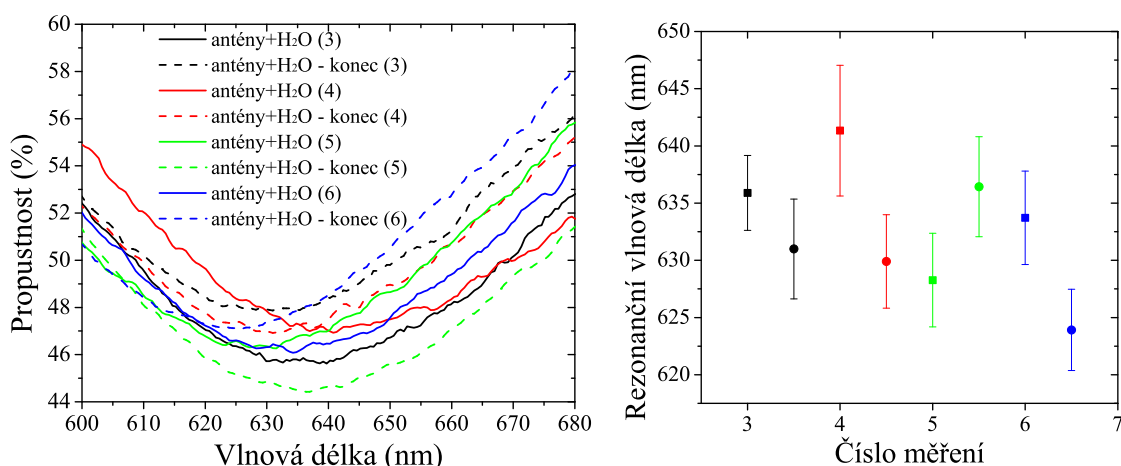
Postupně proběhly další měření propustnosti, jež měly ukázat, zda poněkud nahodilé posuvy rezonance při aplikaci tenké vrstvy pufru (obr. 3.10), jsou v objemu roztoku s využitím gumového kroužku odstraněny. Systematický posuv rezonanční vlnové délky se však při měřeních neobjevil, stejně tak ani ustálení její polohy. Pozornost byla tedy věnována důkladnější analýze již změřených spekter a jejich vzájemnému porovnávání.



Obr. 3.13: Propustnost suchých antén měřená před každým ze šesti experimentů s SSC pufrům – kromě měření č. 1 byl vzorek vždy čištěn v kyslíkovém plazmatu. Vlevo: výřez oblasti rezonance ze spekter propustnosti odpovídajících šesti experimentům. Vpravo: Příslušné rezonanční vlnové délky.

Obr. 3.13 vlevo ukazuje porovnání spekter propustnosti získané měření na suchých anténách, která předcházela každému experimentu. Vpravo jsou vyznačeny příslušné rezonanční vlnové délky.

Celkem bylo porovnáváno 6 experimentů, jež v sobě zahrnovaly zahrnovaly měření propustnosti antén vystavených SSC pufru o různých koncentracích. Obr. 3.13 ukazuje, že při prvním experimentu byla rezonanční vlnová délka antén posunuta k větším vlnovým délkám. Důvodem byly nejspíše nečistoty na povrchu, protože vzorek nebyl před měřením nijak čištěn. Při dalších experimentech provedených po čištění v plazmatu se rezonanční vlnová délka držela okolo původní hodnoty (595 ± 4) nm (změřeno na obr. 3.6). Výjimkou bylo měření č. 4, kdy byla rezonance posunuta směrem k větším vlnovým délkám.



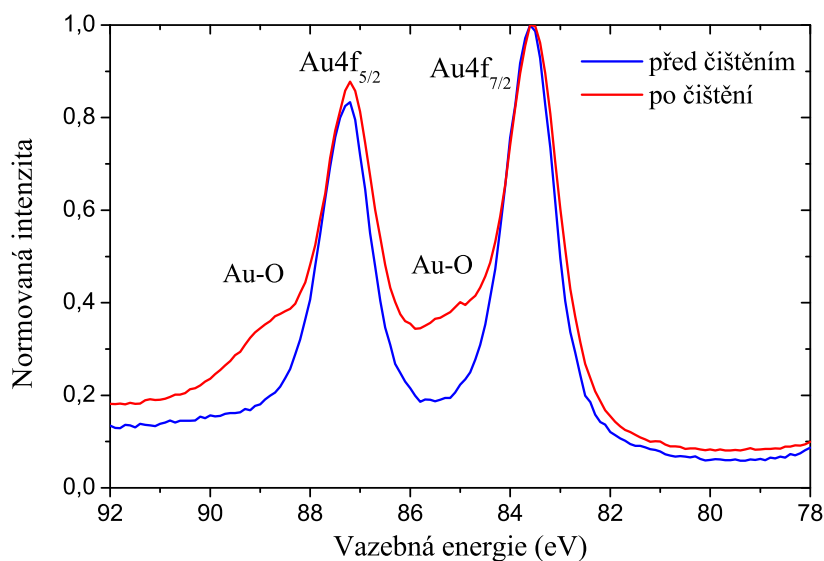
Obr. 3.14: Propustnost antén na vzorku ponořeném do vody měřená před a po experimentech 3 – 6. Vlevo: výřez oblasti rezonance ze spekter propustnosti odpovídající experimentům 3 – 6. Vpravo: Příslušné rezonanční vlnové délky.

Zvláště zajímavá byla porovnání rezonanční vlnové délky antén ve vodě před a po měřeních s pufru. Malý posuv rezonančních vlnových délek je patrný už z experimentu č. 3 (obr. 3.11 a 3.12). Jak ukazuje obr. 3.14, při dalších experimentech spektra vykazovala i mnohem výraznější posuv ke menším vlnovým délkám (měření č. 4 a 6 – časový vývoj 10 mM SSC pufru). Naproti tomu při měření č. 5 (časový vývoj 1 M SSC) vykazovalo poměrně výrazný posuv k větším vlnovým délkám. Tento rozptyl v posuvech rezonančních vlnových délek a zejména posuvy k menším vlnovým délkám naznačují, že na vině nebude pouhá změna koncentrace SSC pufru, ale nějaký výraznější efekt. Tímto efektem nebude při nepřítomnosti vnějšího napětí ani žádný z povrchových jevů, jež jsou shrnuty v tabulce 1.1.

V odborné literatuře byla nalezena informace, že čištění v kyslíkovém plazmatu po dobu 60 s může způsobit růst vrstvy oxidů zlata – nejčastěji oxidu zlatitého (Au_2O_3) o tloušťce do 4 nm [115].

Pro ověření oxidace zlata působením kyslíkového plazmatu byla provedena analýza rentgenovou fotoelektronovou spektroskopií (XPS). Na křemík Si(111) byla iontovým naprašováním nanесena 40 nm vrstva zlata odpovídající výšce zlatých antén, s nimiž probíhala měření. Výsledky XPS analýzy vzorku před a po čištění v kyslíkovém plazmatu jsou znázorněny na obr. 3.15. Jedná se o část spektra odpovídající elektronům ze 4f orbitalu zlata ($\text{Au}4f$).

Spektrum získané po čištění v plazmatu po dobu 60 s vykazuje oproti čistému zlatu zvýšenou intenzitu v oblastech vedle dvou hlavních píků ve směru k vyšším vazebným energiím. Tento nárůst je způsoben přítomností dalšího píku s menší intenzitou, který odpovídá vazbě zlata na jiný prvek, nejspíše na kyslík, kdy vazbě Au-O odpovídá posuv vůči čistému zlatu přibližně o 1,9 eV [116] k vyšším vazebným energiím.



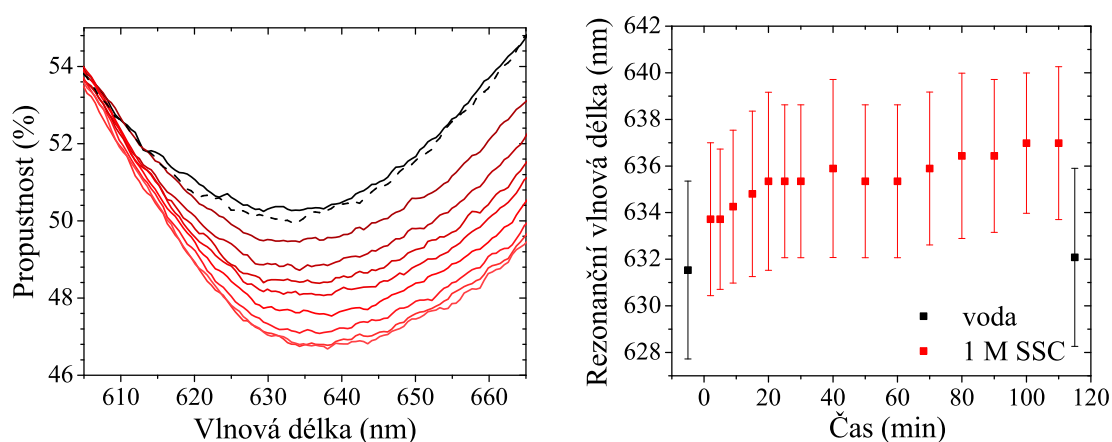
Obr. 3.15: Výsledky XPS analýzy vzorku Si(111) se 40 nm vrstvou zlata před a po čištění v kyslíkovém plazmatu.

Tvar píků se shoduje s těmi, které byly naměřeny v [91] a potvrzují tak růst oxidu zlatitého vlivem kyslíkového plazmatu. Vzniklý oxid je však nestálý a postupně se redukuje zpět na zlato, přičemž po čtyřech dnech v atmosferických podmínkách ho lze považovat za úplně zredukovaný [91].

Vliv oxidace zlata na spektra propustnosti je tedy velmi závislý na časovém rozestupu mezi čištěním a samotným měřením. Tento rozestup nebyl vždy stejný,

v důsledku čehož mohou být vysvětleny rozdíly v rezonančních vlnových délkách holých antén (obr. 3.13). Měření č. 4 zde pravděpodobně vybočuje proto, že měření propustnosti probíhalo pouze několik hodin po čištění a vrstva oxidu zlata, jakožto dielektrika o vysokém indexu lomu ($n_{\text{oxid}} = 3,3$), zřejmě způsobila posuv rezonance k delším vlnovým délkám.

Vzájemné posuvy v rezonančních vlnových délkách antén vložených do vody (obr. 3.14) by mohly být vysvětleny postupnou tvorbou hydratovaného oxidu zlatitého s různým počtem x molekul H_2O , tedy $\text{Au}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, jak ukázali Xia et al. [92]. Index lomu hydratovaného oxidu zlatitého ($n_{\text{hydrát}} \in (1,65; 1,80)$) se liší dle typu hydrátu. Na základě přechodu z Au_2O_3 do jeho hydratované formy při vystavení vodnému prostředí je možné vysvětlit posuv ke kratším vlnovým délkám z obr. 3.14 u experimentů č. 3, 4 a 6. Možným vysvětlením posuvu opačným směrem u experimentu č. 5 by byla absence oxidu zlatitého, tedy v případě prodlevy mezi čištěním a měřením alespoň 4 dny, kdy na se poté na povrch zlata adsorbovaly molekuly z SSC pufru. Jelikož jsme nevěděli, jaká byla časová prodleva mezi čištěním a samotným měřením v rámci experimentu č. 5 (časový vývoj antén v 1 M SSC pufru), byl tento experiment zopakován, tentokrát více než týden po posledním čištění, přičemž výsledky jsou na obr. 3.16.



Obr. 3.16: Rezonanční vlnové délky pro antény v různých časech působení 1 M SSC pufru a pro vodu před a po aplikaci pufru. Vlevo: výběr ze spekter propustnosti – černá plná (pouze voda na začátku), černá čárkovaná (pouze voda na konci), červená (1 M SSC pufr) – s přibývajícím časem v roztoku světlejší červená. Vpravo: rezonanční vlnové délky – černá (voda na začátku / na konci), červená (časový vývoj v 1 M SSC pufru).

Při měření bylo navíc využito vyrobené elektrochemické cely (obr.3.17), v níž byl uzavřen vzorek, načež do ní byl vpraven samotný roztok. Tento postup je praktičtější

a umožnil začít měření rychleji než při využití kroužku (obr. 3.7c)). Měření tentokrát probíhala se širším vláknem, aby byl získán co nejlepší optický signál, a zároveň byla snížena doba měření jednoho spektra asi na 10 s, aby mohl být lépe zachycen časový vývoj.

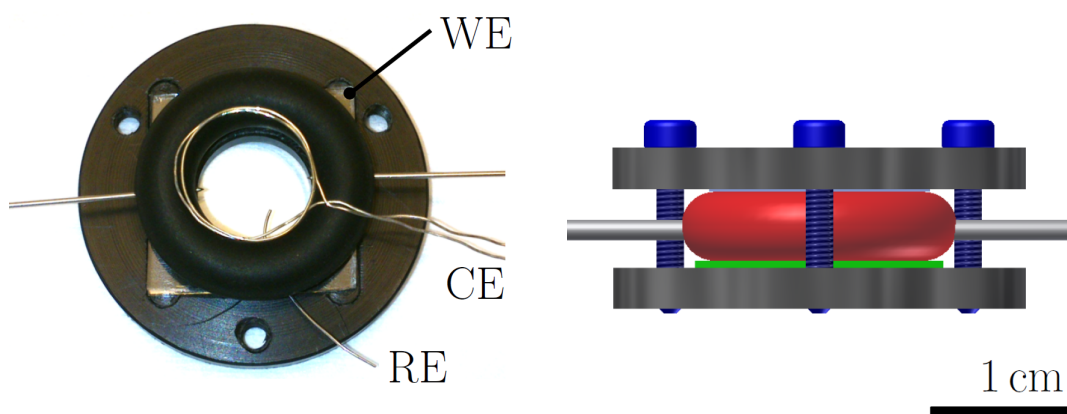
Z obr. 3.16 je patrné, že se rezonanční vlnová délka postupně posouvá k větším vlnovým délkám a zároveň dochází k poklesu propustnosti. Ze získaných spekter se zdálo, že už k posuvu nedochází, a proto bylo měření po 110 min zastaveno. Následné určení rezonanční vlnové délky ukázalo, že k ustálení polohy rezonance ještě úplně nedošlo. Přesto je však patrné, že se nárůst zpomaluje a zdá se, spěje k ustálené hodnotě. Vzhledem k tomu, že dochází k postupnému nárůstu odečtené rezonanční vlnové délky bez výrazných náhodných změn, se zdá, že získaná nejistota odečtu polohy rezonance je pravděpodobně vyšší než její reálná nejistota.

Rezonanční vlnová délka antén ve vodě na konci experimentu je takřka stejná, jako byla na začátku. Zdá se tedy, že oxid zlatitý tentokrát přítomný nebyl a experiment neovlivňoval. Zároveň se ukázalo, že ač za přítomnosti pufru na anténách dochází k postupnému nárůstu rezonanční vlnové délky nejspíše vlivem adsorpce molekul pufru, po oplachu je tento vliv odstraněn.

Experiment, jehož výsledky jsou na obr. 3.16, tedy ukázal, že přítomnost pufru postupně posouvá rezonanční vlnovou délku. Pokud však bude ponechána dostatečně dlouhá doba na ustálení podmínek v roztoku, pak přítomnost pufru nemusí na polohu rezonance mít žádný vliv. Při biodetekci tak bude umožněno sledovat pouze změny rezonanční vlnové délky vyvolané reakcí na přítomnost biomolekul.

Návrh elektrochemické cely

Původní podoba cely vycházela z designu, který vytvořili MacKenzie et al. [101]. Při experimentech s těsnicím kroužkem (obr. 3.7) se ukázala jeho praktičnost, protože jednak vymezuje objem cely a zároveň poskytuje dostatečné těsnění v kontaktu s hladkými plochami skla. Gumový kroužek (z EPDM gumy) tedy tvoří základ i samotné elektrochemické cely (obr. 3.17). Gumový kroužek je podložen ITO sklem, které bude sloužit jako průhledná pracovní elektroda, a přikryt krycím sklem. Kroužek a sklíčka jsou k sobě tisknuty dvěma plastovými deskami, přičemž jedna z nich obsahuje závitové otvory pro stažení kroužku třemi šrouby. Plastové desky mají v sobě vyvrtané kruhové otvory umožňující průchod světla. Z vnitřní strany každé desky jsou vyfrézovány čtvercové drážky pro zafixování sklíček.



Obr. 3.17: Vlevo: fotografie vnitřku elektrochemické cely s vloženým platinovým kroužkem (CE), platinovým drátem (RE) a s ITO sklíčkem (WE) zahloubeným v plastové podstavě cely, zprava a zleva plnicí injekční jehly. Vpravo: model sestavené cely, kde je kroužek stahován mezi dvěma plastovými deskami.

Vedle pracovní elektrody jsou na obr. 3.17 vlevo zobrazeny i zbývající elektrody a to pomocná elektroda v podobě svinutého platinového drátu, a referenční elektroda tvořená krátkým platinovým drátem. Celu je možné plnit injekční stříkačkou.

Dalším krokem v designu elektrochemické cely by mohlo být využití mikrofluidních kanálků, při jejichž využití je možné analyzovat velmi malé objemy roztoků a z něj získat elektrochemický [117] či optický [118] signál odpovídající jediné biomolekule.

4 ZÁVĚR

Náplní předložené diplomové práce bylo navržení a realizace experimentu pro měření změny fáze na plazmonických anténách pomocí koherencí řízeného holografického mikroskopu. Cílem druhé části diplomové práce bylo navržení a realizace experimentu pro současné měření cyklické voltametrie a plazmonových rezonancí. Obě dvě části byly přitom směřovány k využití v biodetekci.

V první kapitole jsou popsány dva možné přístupy k získání informace o analyzované látce, a to pomocí elektrochemických a plazmonických senzorů. Nejdříve je zde nastíněn princip elektrochemie, která je založena na analýze přenosu elektronů mezi elektrodou a analyzovanou látkou. Dále jsou zde představeny plazmonové rezonance jakožto účinný nástroj k detekci změn v indexu lomu způsobených přítomností biomolekul, ať už na základě změny plazmonové rezonanční vlnové délky nebo změny fáze. Zároveň jsou zde diskutovány již použité přístupy k detekci změny fáze a jejich aplikace v biodetekci. V neposlední řadě jsou zde také shrnuty dosavadní přístupy ve využití kombinace elektrochemických metod spolu s měřením plazmonových rezonancí.

Ve druhé kapitole jsou popsány výsledky týkající se měření fáze na plazmonických anténách využitím koherencí řízeného holografického mikroskopu. Měření probíhala na poli zlatých diskových antén s průměrem jdoucím zpravidla od 30 do 150 nm, jejichž plazmonické vlastnosti potvrdila spektroskopická měření propustnosti (obr. 3.6). Už první měření ukázala, že není možné pro fázové zobrazení využít reflexního módu mikroskopu kvůli nedostatečnému signálu, což se nepodařilo změnit větším zaplněním plochy anténami ani zvýšením intenzity osvitu při využití SC laseru. Transmisní mód však umožnil bezproblémové zobrazení fáze, přičemž se ukázalo, že její hodnota je závislá na velikosti antén.

Byl pozorován a vysvětlen posuv oblasti nejstrmější změny fáze směrem k větším rozměrům antén (obr. 2.8) při použití většího zaplnění. Tento posuv nastal nejspíše v důsledku zmenšení rezonanční vlnové délky antén vlivem jejich vzájemného přiblížení, což bylo také potvrzeno spektroskopicky (obr. 2.4). Užití filtrů o různých vlnových délkách ukázalo, že strmost poklesu fáze narůstá s rozměrem antén (obr. 2.10). Tento posuv fázové závislosti spolu se zvyšováním její strmosti byl potvrzen využitím osvitu pomocí laditelného SC laseru (obr. 2.14), který umožnil osvit světlem z celé viditelné oblasti spektra. Tento jev lze vysvětlit tím, že se zvětšujícím se průměrem antén roste fázový signál vlivem rostoucího rozptylu světla na anténách.

Využití SC laseru však výrazně zhoršilo kvalitu fázového obrazu (porovnání na obr. 2.12), i když byla jeho koherence narušována difuzorem. Vhodnější se proto

jeví využití interferenčních filtrů, přičemž filtru s propustností okolo 650 nm bylo na závěr využito pro určení vlivu změny indexu lomu na průběh fáze při aplikaci vody na antény. Oblast s největší strmostí se posunula ke kratším vlnovým délkám, přičemž největší citlivost fáze na změnu indexu lomu prokázalo pole s anténami o průměru 110 nm (obr. 2.16), jejichž rezonanční vlnová délka je blízko 650 nm osvitu. Reakce antén o vyšším zaplnění na aplikaci vody byla ještě výraznější (obr. 2.17).

Třetí kapitola je zaměřena na spektroskopická optická měření, která budou v nejbližších týdnech spojena s elektrochemickými měřeními. Úvod kapitoly je zaměřen na analýzu a optimalizaci zisku spekter propustnosti. Byla ověřena schopnost využití aparatury (obr. 3.1) zachytit optický signál z antén ponořených do vody a zároveň posuv rezonanční vlnové délky k menším vlnovým délkám (obr. 3.7). Poté byl pozorován vliv SSC pufru o různých koncentracích na rezonanční vlnovou délku antén, přičemž výsledky měření propustnosti ani odrazivosti neukazovaly žádný ustálený trend změny rezonanční vlnové délky (obr. 3.9). Před samotnými experimenty byl vzorek vždy čištěn v kyslíkovém plazmatu, což se ukázalo mít zásadní vliv na výsledky následně provedených experimentů. Porovnala-li se rezonanční vlnová délka antén v čisté vodě před aplikací pufru a v čisté vodě na konci experimentu, byly pro většinu měření patrné výrazné posuvy směrem k menším vlnovým délkám (obr. 3.14). Ty se podařilo vysvětlit až díky zjištění, že plazmové čištění způsobuje růst vrstvy oxidu zlatitého na povrchu antén, jehož existence byla také potvrzena XPS analýzou (obr. 3.15). Tento oxid poté při aplikaci vody přešel do hydratované formy o menším indexu lomu a způsobil tak výsledný posuv k nižším vlnovým délkám. K čištění vzorku je tedy vhodnější použít chemické metody případně využít čištění ve vodíkovém plazmatu, které oxidaci zlata nezpůsobuje.

Závěrečné měření rezonanční vlnové délky proběhlo více než týden po posledním čištění, kdy by se měl všechn oxid zlatitý zredukovat zpět na zlato. Samotné měření bylo provedeno uvnitř elektrochemické cely, která byla v rámci práce navržena pro následné elektrochemické experimenty (obr. 3.17). Časová závislost rezonanční vlnové délky na době setrvání antén v SSC pufru už by tedy neměla být zkreslena přítomností oxidu. Dle obr. 3.16 je patrné, že skoro k žádnému posuvu rezonanční vlnové délky antén v čisté vodě před a v čisté vodě po experimentu nedochází. Samotný časový průběh rezonanční vlnové délky vykazuje její pozvolný nárůst, který však postupně zpomaluje a zdá se, že spěje do ustáleného stavu. Přítomnost pufru tedy má vliv na rezonanční vlnovou délku, avšak při ponechání dostatečně dlouhé doby na ustálení podmínek v roztoku může tento vliv úplně vymizet a umožnit tak detekovat změny v indexu lomu způsobené čistě přítomností biomolekul.

Tato práce vznikla s podporou projektu CEITEC – open access (LM2011020),

díky kterému byla umožněna práce na jednom z přístrojů Středoevropského technologického institutu CEITEC.

LITERATURA

- [1] TAMAYO, J. et al. Biosensors based on nanomechanical systems. *Chemical Society Reviews*. 2013, vol. 42(3), s. 1287-1311. DOI: 10.1039/C2CS35293A
- [2] ATKINS, P, Loretta JONES a Leroy LAVERMAN. *Chemical principles: the quest for insight*. 6th ed. New York: W H Freeman, 2013, 1 v., 856 str. ISBN 1464124663.
- [3] MURRAY, J.: *Organic chemistry*. 7e. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2008, 1224 str. ISBN 0-495-11258-5.
- [4] BARD, A. J. a L. R. FAULKNER. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2001, 833 str. ISBN 0-471-04372-9.
- [5] ZUMAN, P. Role of mercury electrodes in contemporary analytical chemistry. *Critical reviews in analytical chemistry*. 2000, vol. 12 (15), s. 1187-1194.
- [6] *Basics of Voltammetry and Polarography* [online]. Princeton Applied Research, [cit. 19.05.2015]. Dostupné z: www.princetonappliedresearch.com
- [7] LIE, L. H. et al. Immobilisation and synthesis of DNA on Si (111), nanocrystalline porous silicon and silicon nanoparticles. *Faraday discussions*. 2004, vol. 125, s. 235-249. DOI: 10.1039/b302845c.
- [8] *Buffer tutorials* [online]. ChemCollective - Online Resources for Teaching and Learning Chemistry, [cit. 20.05.2015]. Dostupné z: <http://chemcollective.org/>
- [9] PALEČEK, E. Past, present and future of nucleic acids electrochemistry. *Talanta*. 2002, vol. 56 (5), s. 809-819. DOI: 10.1016/S0039-9140(01)00649-X.
- [10] BAREK, J. et al. Polarography and voltammetry at mercury electrodes. *Critical reviews in analytical chemistry*. 2001, vol. 31 (4), s. 291-309. DOI: 10.1080/20014091076776.
- [11] MAIER, S. A. *Plasmonics: fundamentals and applications*. New York: Springer, 2007. 223 str., ISBN:0-387-33150-6.
- [12] LIEBERG, B., NYLANDER, C. a I. LUNSTRÖM. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing *Sensors and Actuators: Chemical*. 1983, vol. 4, s. 299-304, ISSN:0250-6874.
- [13] HOMOLA, J. Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. *Chemical Reviews*. 2008, vol. 108 (2), s. 462-493. DOI: 10.1021/cr068107d.
- [14] HAES, A. J. et al. Nanoscale Optical Biosensor: Short Range Distance Dependence of the Localized Surface Plasmon Resonance of Noble Metal Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004, vol. 108 (22), s. 6961-6968. DOI: 10.1021/jp036261n.

- [15] LINK, S. a M. A. EL-SAYED. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 1999, vol. 103 (21), s. 4212-4217. DOI: 10.1021/jp984796o.
- [16] SUN, Y. a Y. XIA. Gold and silver nanoparticles: A class of chromophores with colors tunable in the range from 400 to 750 nm. *The Analyst*. 2003, vol. 128 (6), s. 686-691. DOI: 10.1039/b212437h.
- [17] MILLER, M. M. a A. A. LAZARIDES. Sensitivity of Metal Nanoparticle Surface Plasmon Resonance to the Dielectric Environment. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2005, vol. 109 (46), s. 21556-21565. DOI: 10.1021/jp054227y.
- [18] KELLY, K. L. et al. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2003, vol. 107 (3), s. 668-677. DOI: 10.1021/jp026731y.
- [19] ZORIĆ, I. et al. Gold, Platinum, and Aluminum Nanodisk Plasmons: Material Independence, Subradiance, and Damping Mechanisms. *ACS Nano*. 2011, vol. 5, issue 4, s. 2535-2546. DOI: 10.1021/nn102166t.
- [20] OLMON, R. L. et al. Near-field imaging of optical antenna modes in the mid-infrared. *Optics Express*. 2008, vol. 16 (25), s. 20295-20305. DOI: 10.1364/oe.16.020295.
- [21] SHERRY, L. J. et al. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Single Silver Triangular Nanoprisms. *Nano Letters*. 2006, vol. 6 (9), s. 2060-2065. DOI: 10.1021/nl061286u.
- [22] SHUMAKER-PARRY, J. S., H. ROCHHOLZ a M. KREITER. Fabrication of Crescent-Shaped Optical Antennas. *Advanced Materials*. 2005, vol. 17 (17), s. 2131-2134. DOI: 10.1002/adma.200500063.
- [23] HAO, F. et al. Plasmon Resonances of a Gold Nanostar. *Nano Letters*. 2007, vol. 7 (3), s. 729-732. DOI: 10.1021/nl062969c.
- [24] LASRSON, E. M. et al. Sensing Characteristics of NIR Localized Surface Plasmon Resonances in Gold Nanorings for Application as Ultrasensitive Biosensors. *Nano Letters*. 2007, vol. 7 (5), s. 1256-1263. DOI: 10.1021/nl0701612.
- [25] ARTAR, A., YANIK, A. A. a H. ALTUG. Fabry–Perot nanocavities in multilayered plasmonic crystals for enhanced biosensing. *Applied Physics Letters* [online]. 2009, vol. 95 (5). DOI: 10.1063/1.3202391.
- [26] MUSKENS, O. L. at al. Optical scattering resonances of single and coupled dimer plasmonic nanoantennas. *Optics Express* [online]. 2007, vol. 15 (26), [cit. 2015-04-07]. DOI: 10.1364/oe.15.017736.
- [27] ALEGRET, J. at al. Plasmonic Properties of Silver Trimers with Trigonal Symmetry Fabricated by Electron-Beam Lithography. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2008, vol. 112 (37), s. 14313-14317. DOI: 10.1021/jp804505k.

- [28] FAN, J. A. et al. Self-Assembled Plasmonic Nanoparticle Clusters. *Science*. 2010, vol. 328 (5982), s. 1135-1138. DOI: 10.1126/science.1187949.
- [29] JENSEN, T. R. et al. Nanosphere lithography: effect of the external dielectric medium on the surface plasmon resonance spectrum of a periodic array of silver nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 1999, vol. 103 (45), s. 9846-9853. DOI: 10.1021/jp9926802.
- [30] SVEDENDAHL, M. et al. Refractometric sensing using propagating versus localized surface plasmons: a direct comparison. *Nano letters*. 2009, vol. 9 (12), s. 4428-4433. DOI: 10.1021/nl902721z.
- [31] WILLETS, K. A. a R. P. VAN DUYNE. Localised Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annual Review of Physical Chemistry*. 2007, vol. 58 (1), s. 267-297. DOI:10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607.
- [32] KAMINSKA, I. et al. Near-Field and Far-Field Sensitivities of LSPR Sensors. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2015, vol. 119 (17), s. 9470-9476. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b00566.
- [33] JUNG, L. S. et al. Quantitative Interpretation of the Response of Surface Plasmon Resonance Sensors to Adsorbed Films. *Langmuir*, 1998, vol. 14 (19), s. 5636-5648. DOI: 10.1021/la971228b.
- [34] RUEMMELE, J. A. et al. A localized surface plasmon resonance imaging instrument for multiplexed biosensing. *Analytical chemistry*, 2013, vol. 85(9), s. 4560-4566. DOI: 10.1021/ac400192f.
- [35] GRIGORENKO, A. N., NIKITIN, P. I. a A. V. KABASHIN. Phase jumps and interferometric surface plasmon resonance imaging *Applied Physics Letters*. 1999, vol. 75 (25), s. 3917-3919. DOI: 10.1063/1.125493.
- [36] ABELES, F. a T. LOPEZ-RIOS. Investigation of the metal-electrolyte interface using surface plasma waves with ellipsometric detection. *Solid State Communications*. 1975, vol. 16, s. 843-847.
- [37] KABASHIN, A. V. a P. I. NIKITIN. Surface plasmon resonance interferometer for bio-and chemical-sensors. *Optics Communications*. 1998, vol. 150 (1), s. 5-8. DOI: 10.1016/S0030-4018(97)00726-8
- [38] SCHNELL, M. et al. Amplitude- and Phase-Resolved Near-Field Mapping of Infrared Antenna Modes by Transmission-Mode Scattering-Type Near-Field Microscopy†. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2010, vol. 114 (16), s. 7341-7345. DOI: 10.1021/jp909252z.
- [39] SCHNELL, M., P. S. CARNEY a R. HILLENBRAND. Synthetic optical holography for rapid nanoimaging. *Nature Communications*. 2014, vol. 5, 3499. DOI: 10.1038/ncomms4499.

- [40] KABASHIN, A. V. a P. I. NIKITIN. Interferometer based on a surface-plasmon resonance for sensor applications. *Quantum Electronics*. 1997, vol. 27 (7), s. 653-654. DOI: 10.1070/QE1997v027n07ABEH001013
- [41] KOCHERGIN, V. E. et al. Phase properties of a surface-plasmon resonance from the viewpoint of sensor applications. *Quantum Electronics*. 1998, vol. 28 (5), s. 444-448. DOI: 10.1070/QE1998v028n05ABEH001245.
- [42] ZHANG, C. et al. Experimental approach to the microscopic phase-sensitive surface plasmon resonance biosensor. *Applied Physics Letters*. 2013, vol. 102 (1), 011114. DOI: 10.1063/1.4773997.
- [43] WU, S. Y. et al. Highly sensitive differential phase-sensitive surface plasmon resonance biosensor based on the Mach-Zehnder configuration. *Optics Letters*. 2004, vol. 29 (20), s. 2378-2380. DOI: 10.1364/OL.29.002378.
- [44] HO, H. P. et al. Sensitivity enhancement based on application of multi-pass interferometry in phase-sensitive surface plasmon resonance biosensor. *Optics Communications*. 2007, vol. 275 (2), s. 491-496. DOI: 10.1016/j.optcom.2007.03.067.
- [45] SUCK, S. Y. et al. Digital Heterodyne Holography Reveals the Non-Quasi-Static Scattering Behaviour of Transversally Coupled Nanodisk Pairs. *International Journal of Optics*. 2012, vol. 2012, s. 1-8. DOI: 10.1155/2012/532576.
- [46] LI, S. a J. ZHONG. Simultaneous amplitude-contrast and phase-contrast surface plasmon resonance imaging by use of digital holography. *Biomedical optics express*. 2012, vol. 3 (12), s. 3190-3202. DOI: 10.1364/BOE.3.003190.
- [47] RAYLEIGH, L. On the Dynamical Theory of Gratings. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 1907, vol. 79 (532), s. 399-416. DOI: 10.1098/rspa.1907.0051.
- [48] KRAVETS, V. G., F. SCHEDIN a A. N. GRIGORENKO. Extremely Narrow Plasmon Resonances Based on Diffraction Coupling of Localized Plasmons in Arrays of Metallic Nanoparticles. *Physical Review Letters*, 2008, vol. 101 (8), s. 087403 (4). DOI: 10.1103/physrevlett.101.087403.
- [49] KRAVETS, V. G. et al. Sensitivity of collective plasmon modes of gold nanoresonators to local environment. *Optics letters*, 2010, vol. 35 (7), s. 956-958. DOI: 10.1364/OL.35.000956.
- [50] ZOU, S., JANEL, N. a G. C. SCHATZ. Silver nanoparticle array structures that produce remarkably narrow plasmon lineshapes. *The Journal of chemical physics*, 2004, vol. 120 (23), s. 10871-10875. DOI: 10.1063/1.1760740.
- [51] LI, C. T. et al. Study of optical phase transduction on localized surface plasmon resonance for ultrasensitive detection. *Optics express*, 2012, vol. 20 (3), s. 3250-3260. DOI: 10.1364/OE.20.003250.

- [52] MOIRANGTHEM, R. S. et al. Enhanced localized plasmonic detections using partially-embedded gold nanoparticles and ellipsometric measurements. *Biomedical optics express*, 2012, vol. 3 (5), s. 899-910. DOI: 10.1364/BOE.3.000899.
- [53] KRAVETS, V. G. et al. Singular phase nano-optics in plasmonic metamaterials for label-free single-molecule detection. *Nature materials*, 2013, vol. 12 (4), s. 304-309. DOI: 10.1038/nmat3537.
- [54] BRINKS, D. et al. Plasmonic antennas as design elements for coherent ultrafast nanophotonics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, vol. 110 (46), s. 18386-18390. DOI: 10.1073/pnas.1308652110.
- [55] ACCANTO, N. et al. Capturing the optical phase response of nanoantennas by coherent second-harmonic microscopy. *Nano letters*, 2014, vol. 14 (7), s. 4078-4082. DOI: 10.1021/nl501588r.
- [56] HABAUZIT, D., CHOPINEAU, J. a B. ROIG. SPR-based biosensors: a tool for biodetection of hormonal compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2006, vol. 387 (4), s. 1215-1223. DOI: 10.1007/s00216-006-0958-4.
- [57] LI, Y., LIU, X. a Z. LIN. Recent developments and applications of surface plasmon resonance biosensors for the detection of mycotoxins in foodstuffs. *Food Chemistry*. 2012, vol. 132 (3), s. 1549-1554. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.10.109.
- [58] CAO, J., SUN, T. a K. T. V. GRATAN. Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014, vol. 195, s. 332-351. DOI: 10.1016/j.snb.2014.01.056.
- [59] DU, Y. et al. A surface plasmon resonance biosensor based on gold nanoparticle array. *Optics Communications*. 2013, 298-299, s. 232-236. DOI: 10.1016/j.optcom.2013.02.024.
- [60] ANKER, J. N. et al. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nature Materials*. 2008, s. 442-453. DOI: 10.1038/nmat2162.
- [61] WANG, J. Electrochemical Glucose Biosensors. *Chemical Reviews*. 2008, vol. 108 (2), s. 814-825. DOI: 10.1021/cr068123a.
- [62] BABA, A. et al. Electrochemical Surface Plasmon Resonance and Waveguide-Enhanced Glucose Biosensing with N-Alkylaminated Polypyrrole/Glucose Oxidase Multilayers. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2010, vol. 2 (8), s. 2347-2354. DOI: 10.1021/am100373v.
- [63] GREEN, M. A. Photovoltaic principles. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*. 2002, vol. 14 (1-2), s. 11-17. DOI: 10.1016/s1386-9477(02)00354-5.
- [64] SHELDON, M. T. et al. Plasmoelectric potentials in metal nanostructures. *Science* [online]. 2014, vol. 346 (6211), s. 828-831. DOI: 10.1126/science.1258405.

- [65] TADJEDDINE, A., KOLB, D. M. a R. KÖTZ. The study of single crystal electrode surfaces by surface plasmon excitation. *Surface Science*. 1980, vol. 101, s. 277285.
- [66] FOLEY, K. J., SHAN, X. a N. J. TAO. Surface Impedance Imaging Technique. *Analytical Chemistry*. 2008, vol. 80 (13), s. 5146-5151. DOI: 10.1021/ac800361p.
- [67] DAHLIN, A. B. et al. Electrochemical plasmonic sensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, vol. 402 (5), s. 1773-1784. DOI: 10.1007/s00216-011-5404-6.
- [68] SHAN, X. et al. Imaging Local Electrochemical Current via Surface Plasmon Resonance. *Science*. 2010, vol. 327 (5971), s. 1363-1366. DOI: 10.1126/science.1186476
- [69] WANG, S. et al. Electrochemical Surface Plasmon Resonance: Basic Formalism and Experimental Validation. *Analytical Chemistry*. 2010, vol. 82 (3), s. 935-941. DOI: 10.1021/ac902178f.
- [70] DAHLIN, A. B. et al. Electrochemical Crystallization of Plasmonic Nanostructures. *Nano Letters*. 2011, vol. 11 (3), s. 1337-1343. DOI: 10.1021/nl104424q.
- [71] CHEREVKO, S. et al. Electrochemical dissolution of gold in acidic medium. *Electrochemistry Communications*. 2013, vol. 28, s. 44-46. DOI: 10.1016/j.elecom.2012.11.040.
- [72] LOO, B. H. In situ identification of halide complexes on gold electrode by surface-enhanced Raman spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry*. 1982, vol. 86 (4), s. 433-437. DOI: 10.1021/j100393a002.
- [73] NOVO, C. a P. MULVANEY. Charge-Induced Rayleigh Instabilities In Small Gold Rods. *Nano Letters*. 2007, vol. 7 (2), s. 520-524. DOI: 10.1021/nl062649t.
- [74] ZHANG, X. et al. Electrochemical Tuning of Silver Nanoparticles Fabricated by Nanosphere Lithography. *Nano Letters*. 2005, vol. 5 (7), s. 1503-1507. DOI: 10.1021/nl050873x.
- [75] MOREIRA, C. S. et al. Temperature-dependent sensitivity of surface plasmon resonance sensors at the gold–water interface. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2008, vol. 134 (2), s. 854-862. DOI: 10.1016/j.snb.2008.06.045.
- [76] ZHAO, P., N. LI a D. ASTRUC. State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coordination Chemistry Reviews*. 2013, vol. 257, 3-4, s. 638-665. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.09.002.
- [77] MA, H. et al. Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles by a Novel Electrochemical Method. *ChemPhysChem*. 2004, vol. 5 (1), s. 68-75. DOI: 10.1002/cphc.200300900.

- [78] YU, Y. Y. et al. Gold Nanorods: Electrochemical Synthesis and Optical Properties. *Journal of Physical Chemistry B*. 1997, vol. 101 (34), s. 6661-6664. DOI: 10.1021/jp971656q.
- [79] RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, L., M. C. BLANCO a M. A. LÓPEZ-QUINTELA. Electrochemical Synthesis of Silver Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*. 2000, vol. 104 (41), s. 9683-9688. DOI: 10.1021/jp001761r.
- [80] MULVANEY, P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir*. 1996, 12 (3), s. 788-800. DOI: 10.1021/la9502711
- [81] UNG, T. et al. Spectroelectrochemistry of Colloidal Silver. *Langmuir*. 1997, vol. 13 (6), s. 1773-1782. DOI: 10.1021/la960863z.
- [82] MINAMI, T. Gold nanoparticle-attached ITO as a biocompatible matrix for myoglobin immobilization: direct electrochemistry and catalysis to hydrogen peroxide. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2005, vol. 577 (2), s. 273-279. DOI: 10.1016/j.jelechem.2004.12.005.
- [83] ZHANG, J. a M. OYAMA. Transparent conducting oxide semiconductors for transparent electrodes. *Semiconductor Science and Technology*, 2005, vol. 20 (4), s. 35-44. DOI: 10.1088/0268-1242/20/4/004.
- [84] TAHAR, R. B. H. et al. Tin doped indium oxide thin films: Electrical properties. *Journal of Applied Physics*, 1998, vol. 83 (5), s. 2631-2645. DOI: 10.1063/1.367025.
- [85] KIM, H. et al. Electrical, optical, and structural properties of indium–tin–oxide thin films for organic light-emitting devices. *Journal of Applied Physics*, 1999, vol. 86 (11), s. 6451-6461. DOI: 10.1063/1.371708.
- [86] HAO, W. et al. Electrochemical corrosion behaviors of ITO films at anodic and cathodic polarization in sodium hydroxide solution. In: *2008 International Conference on Electronic Packaging Technology & High Density Packaging*, IEEE, 2008. p. 1-4. DOI: 10.1109/icept.2008.4607097.
- [87] CHENG, X. R. et al. Au nanoparticle-modified DNA sensor based on simultaneous electrochemical impedance spectroscopy and localized surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, vol. 53, s. 513-518. DOI: 10.1016/j.bios.2013.10.003.
- [88] HILL, C. M. a S. PAN. A dark-field scattering spectroelectrochemical technique for tracking the electrodeposition of single silver nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, vol. 135 (46), s. 17250-17253. DOI: 10.1021/ja4075387.
- [89] IVANOVA, O. S. a F. P. ZAMBORINI. Size-dependent electrochemical oxidation of silver nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, vol. 132 (1), s. 70-72. DOI: 10.1021/ja908780g.

- [90] IVANOVA, O. S. a F. P. ZAMBORINI. Electrochemical size discrimination of gold nanoparticles attached to glass/Indium?Tin-Oxide electrodes by oxidation in bromide-containing electrolyte. *Analytical chemistry*, 2010, vol. 82 (13), s. 5844-5850. DOI: 10.1021/ac101021q.
- [91] TSAI, H. et al. Instability of gold oxide Au₂O₃. *Surface Science*, 2003, vol. 537 (1-3), s. 447-450. DOI: 10.1016/s0039-6028(03)00640-x.
- [92] XIA, S.J a V.I BIRSS. A multi-technique study of compact and hydrous Au oxide growth in 0.1 M sulfuric acid solutions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2001, vol. 500 (1-2), s. 562-573. DOI: 10.1016/s0022-0728(00)00415-0.
- [93] TCHAPLYGUINE, M. et. al. Gold Oxide Nanoparticles with Variable Gold Oxidation State. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2015, vol. 119 (16), s. 8937-8943. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b00811.
- [94] BOND, G. C. a D. T. THOMPSON. Gold-catalysed oxidation of carbon monoxide. *Gold Bulletin*, 2000, vol. 33 (2), s. 41-50. DOI: 10.1007/bf03216579.
- [95] MIYAZAKI, T. et al. Electrical Control of Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles Using Electrochemical Oxidation. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2009, vol. 113 (19), s. 8484-8490. DOI: 10.1021/jp901408w.
- [96] SANNOMIYA, T. et al. Electrochemistry on a localised surface plasmon resonance sensor. *Langmuir*. 2010, vol. 26 (10), s. 7619-7626. DOI: 10.1021/la9042342.
- [97] HIEP, H. M. et al. Label-Free Detection of Melittin Binding to a Membrane Using Electrochemical-Localized Surface Plasmon Resonance. *Analytical Chemistry*. 2008, vol. 80 (6), s. 1859-1864. DOI: 10.1021/ac800087u.
- [98] CHEN, H. A., H. Y. LIN a H. N. LIN. Localized Surface Plasmon Resonance in Lithographically Fabricated Single Gold Nanowires. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2010, vol. 114 (23), s. 10359-10364. DOI: 10.1021/jp1014725.
- [99] ZHANG, W. et al. Influence of the electron mean free path on the resistivity of thin metal films. *Microelectronic Engineering*. 2004, vol. 76 (1-4), s. 146-152. DOI: 10.1016/j.mee.2004.07.041.
- [100] DURKAN, C. a M. E. WELLAND. Size effects in the electrical resistivity of polycrystalline nanowires. *Physical Review B*. 2000, vol. 61 (20), s. 14215-14218. DOI: 10.1103/PhysRevB.61.14215.
- [101] MACKENZIE, R. et al. Simultaneous electrical and plasmonic monitoring of potential induced ion adsorption on metal nanowire arrays. *Nanoscale*. 2013, vol. 5 (11). DOI: 10.1039/c3nr34172k.
- [102] PALLAROLA, D. et al. Real-time monitoring of electrochemical controlled protein adsorption by a plasmonic nanowire based sensor. *Chemical Communications*. 2013, vol. 49 (75). DOI: 10.1039/c3cc44640a.

- [103] ZHANG, D. et al. Nanoplasmonic biosensor: Coupling electrochemistry to localized surface plasmon resonance spectroscopy on nanocup arrays. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, vol. 67, s. 237-242. DOI: 10.1016/j.bios.2014.08.022.
- [104] GABOR, D. A new microscope principle *Nature*. 1948, vol. 161, s. 777-778
- [105] KOLMAN P. a R. CHMELÍK. Coherence-controlled holographic microscope *Optics Express*. 2010, vol. 18 (21), s. 21990-22003. DOI: 10.1364/oe.18.021990
- [106] SLABÝ, T. et al. Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. *Optics Express*. 2013, vol. 21 (12), s. 14747-14762. DOI: 10.1364/oe.21.014747
- [107] KIM, M. K. Principles and techniques of digital holographic microscopy. *Journal of Photonics for Energy*. 2010. 50 s. ISBN: 1947-7988.
- [108] KEMPER, B. a G. von BALLY. Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection. *Applied Optics*. 2008, vol. 47 (4), s. A52-A61. DOI: 10.1364/AO.47.000A52.
- [109] KUHN, J. et al. Measurements of corner cubes microstructures by high-magnification digital holographic microscopy. *Proc. SPIE*. 2006, vol. 6188 (4), s. 618804-618815. DOI: 10.1117/12.662030.
- [110] HAYNES, C. L. et al. Nanoparticle optics: the importance of radiative dipole coupling in two-dimensional nanoparticle arrays. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2003, vol. 107 (30), s. 7337-7342. DOI: 10.1021/jp034234r.
- [111] JAIN, P. K. et al. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006, vol. 110 (14), s. 7238-7248. DOI: 10.1021/jp057170o.
- [112] DAHLIN, A. B., J. O. TEGENFELDT a F. HÖÖK. Improving the Instrumental Resolution of Sensors Based on Localized Surface Plasmon Resonance. *Analytical Chemistry*, 2006, vol. 78 (13), s. 4416-4423. DOI: 10.1021/ac0601967.
- [113] PETASCH, W. et al. Low-pressure plasma cleaning: a process for precision cleaning applications. *Surface and Coatings Technology*, 1997, vol. 97 (1), s. 176-181. DOI: 10.1016/S0257-8972(97)00143-6.
- [114] UNIVERSAL MEDICAL: SSC buffer concentrate colution [online], [cit. 26.05.2015]. Dostupné z: <http://www.universalmedicalinc.com/ibi-20x-ssc-buffer-concentrate-solution-1l.html>
- [115] KOSŁOWSKI, B. et al. Oxidation of preferentially (111)-oriented Au films in an oxygen plasma investigated by scanning tunneling microscopy and photoelectron spectroscopy. *Surface Science*, 2001, vol. 475 (1), s. 1-10. DOI: 10.1016/S0039-6028(00)00986-9.

- [116] NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY: NIST X-ray photoelectron spectroscopy database [online], [cit. 26.05.2015]. Dostupné z: <http://srdata.nist.gov/xps/Default.aspx>
- [117] HENRY, O. Y. et al. Design and testing of a packaged microfluidic cell for the multiplexed electrochemical detection of cancer markers. *Electrophoresis*, 2009, vol. 30 (19), s. 3398-3405. DOI: 10.1002/elps.200900368.
- [118] STREETS, A. M. a Y. HUANG. Microfluidics for biological measurements with single-molecule resolution. *Current opinion in biotechnology*, 2014, vol. 25, s. 69-77. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.08.013.