

STUDIUM VYUŽITELNOSTI KOLOIDNÍCH ROZTOKŮ ZLATÝCH A STŘÍBRNÝCH NANOČÁSTIC PRO POVRCHEM ZESÍLENOU RAMANOVU SPEKTROSKOPII KREVŇÍ PLAZMY

JAKUB HARVALÍK, KATEŘINA HRUBEŠOVÁ,
ONDŘEJ VRTĚLKA a VLADIMÍR SETNIČKA

Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice
harvalia@vscht.cz

Klíčová slova: povrchem zesílený Ramanův rozptyl, krevní plazma, medicínální diagnostika, koloidní substrát, riboflavin

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20220327>

Úvod

Krevní plazma je tekutá složka krve, která je z největší části tvořena vodou (91 %), dále pak organickými látkami (8 %) a anorganickými solemi (1 %). Složení krevní plazmy může být ovlivněno patobiochemickými procesy probíhajícími v organismu při rozvoji onemocnění a sledování těchto změn může být využito ke stanovení klinické diagnózy. Na vývoj nových postupů analýzy krevní plazmy využitelných v diagnostice závažných onemocnění se v současnosti zaměřuje řada výzkumných skupin^{1–5}. Jednou z metod často uplatňovaných v těchto studiích je Ramanova spektroskopie^{4,6}, a to především díky nízké intenzitě Ramanova rozptylu vody či možnosti rychlé a nedeštruktivní analýzy vzorku bez jeho předchozí složité přípravy. Její nevýhodou je ale obtížná detekce analytů o nízkých koncentracích⁷.

Přínosem by tak mohla být spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS), která využívá kovových substrátů vykazujících lokální povrchovou plazmonovou rezonanci^{7,8} za účelem několikanásobného zesílení Ramanova rozptylu analytu navázaného na vhodný substrát. Díky tomu mohou být detegovány i látky o velice nízkých koncentracích. V této práci byly optimalizovány experimentální parametry pro spektroskopii SERS krevní plazmy využívající koloidních roztoků zlatých (AuNP) a stříbrných nanočástic (AgNP). Získané poznatky rozvíjí současnou metodiku analýzy krevní plazmy využívanou v Laboratoři medicínální diagnostiky na Ústavu analytické chemie VŠCHT Praha a mohly by posunout hranice možností klinické diagnostiky obecně.

Experimentální část

Koloidní roztoky nanočástic byly připraveny citrátovou redukcí $K[AuCl_4]$, resp. $AgNO_3$ (cit.⁹). Roztoky modelového analytu riboflavinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, použité pro ověření zesilujících schopností připravených nanočástic, byly získány naředěním zásobního roztoku riboflavinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ odpovídajícím objemem demineralizované vody, resp. suspenze AuNP či AgNP. Analyzované vzorky krevní plazmy byly získány v souladu s etickými pravidly v rámci spolupráce s Oddělením gastrointestinální endoskopie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Ústřední vojenské nemocnice v Praze. Vzorky byly skladovány při teplotě $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Před analýzou byly rozmrazeny při laboratorní teplotě a 10 min odstředovány při přetížení $13\,000 \times g$ za použití filtru s polyvinylidendifluoridovou membránou s póry o velikosti $0,45 \text{ } \mu\text{m}$. Poměry mísení krevní plazmy s nanočásticemi byly 1:1, 1:5, resp. 1:9 (v:v). V případě všech experimentů s AuNP byl jako agregační činidlo dále přidán roztok NaCl o koncentraci $1,0 \text{ mol l}^{-1}$ v poměru 15–150 μl NaCl na 1 ml suspenze nanočástic.

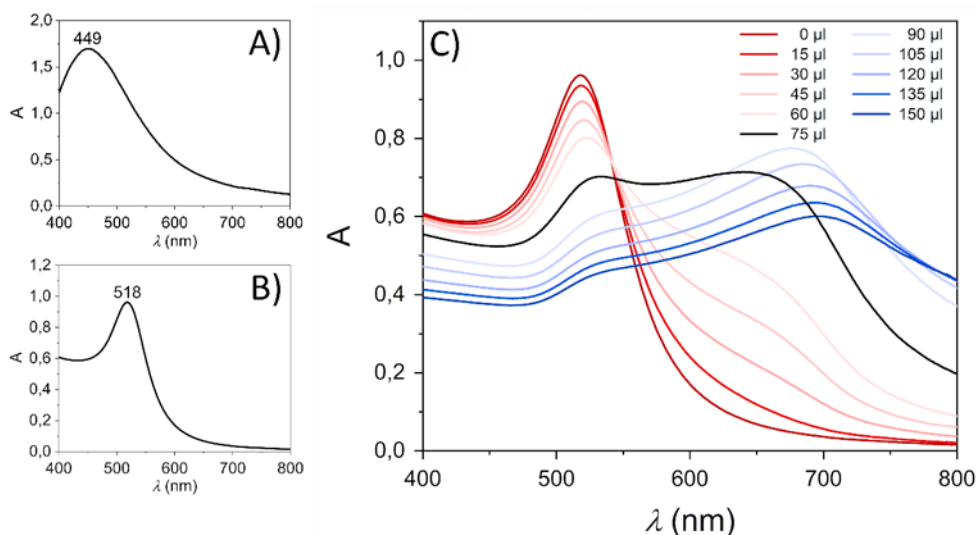
Akvizice spekter SERS proběhla na přístroji i-Raman[®] Plus (B&W Tek, USA) s excitační vlnovou délkou 785 nm. Optimální podmínky pro měření byly zvoleny na základě jejich testování takto: 5 akumulací po 60 s, 50% výkon laseru (max. výkon 340 mW). Byla zaznamenávána spektra v rozsahu $200\text{--}2000 \text{ cm}^{-1}$ s rozlišením lepším než $4,5 \text{ cm}^{-1}$. Pro analýzu krevní plazmy bylo využito spojení Ramanova spektrometru s mikroskopem BAC151 (B&W Tek, USA) s objektivem se $100\times$ zvětšením a numerickou aperturou 0,80. Krevní plazma byla analyzována ve formě zaschlé kapky (20 μl ; na vzduchu za laboratorní teploty). Roztoky riboflavinu byly měřeny ve skleněných vialkách za využití sondy s vláknovou optikou BAC102 (B&W Tek, USA). Zpracování spekter probíhalo v programu OMNIC (verze 9.2.98, Thermo Scientific, USA). Byla provedena manuální korekce základní linie spektra a vyhlazení pomocí Savitzkého Golayova algoritmu s oknem 15 bodů.

Absorpční UV-Vis spektra připravených nanočástic byla získána na přístroji Cary 60 (Agilent, USA) v rozsahu 400–800 nm při rychlosti skenování 600 nm min^{-1} . Analýza probíhala v kyvetách z optického polystyrenu s délkou optické dráhy 1 cm. Při měření AgNP byl roztok naředěn demineralizovanou vodou v poměru 1:3 (v/v), aby absorbance nedosahovala hodnot vyšších než 2. Byl prováděn odečet pozadí, které bylo získáno změřením absorpčního spektra demineralizované vody.

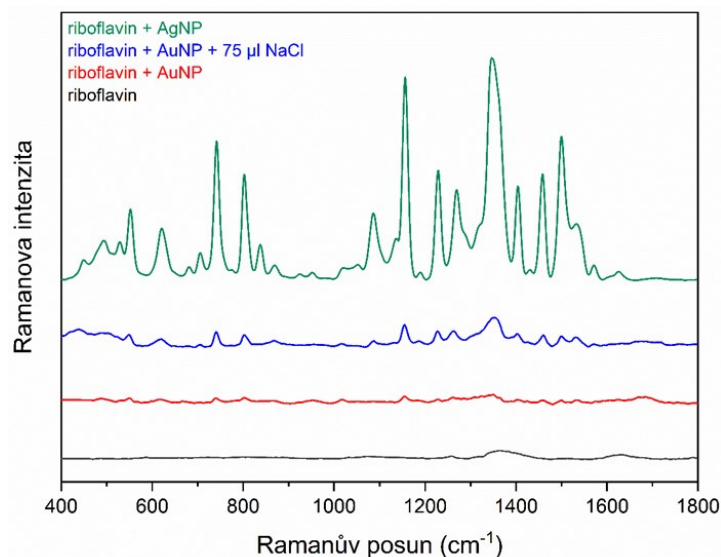
Výsledky a diskuse

Připravené roztoky nanočástic byly nejprve charakterizovány pomocí absorpční UV-Vis spektroskopie (obr. 1) za účelem nalezení maxima plazmonové rezonance. Maximum plazmonové rezonance pro AuNP se nacházelo při 518 nm, zatímco pro AgNP nastalo již při 449 nm. Nalezená maxima jsou ve shodě s literaturou⁷, což potvrzuje úspěšnost přípravy substrátů.

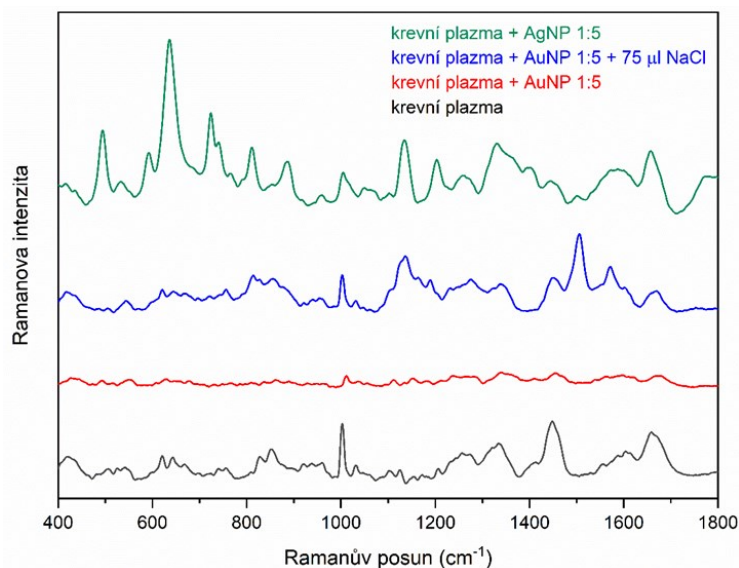
Zesilující schopnosti připravených substrátů byly následně ověřeny analýzou roztoku riboflavinu, jako modelového analytu (obr. 2). Zatímco AgNP spektra SERS riboflavinu efektivně zesilovaly, AuNP nevykazovaly zesílení téměř žádné. Z toho důvodu bylo přistoupeno k experimentům, kdy byl do roztoku AuNP přidáván různý objem roztoku NaCl ($c = 1 \text{ mol l}^{-1}$), který způsobuje agregaci nanočástic a napomáhá tak tvorbě tzv. hot-spotů a zesílení signálu. Přídavek roztoku NaCl způsobil zesílení



Obr. 1. Absorpční UV-Vis spektra koloidních roztoků nanočástic; A) AgNP; B) AuNP; C) AuNP s přidavky roztoku NaCl. Koncentrace roztoku NaCl je 1 mol l^{-1} a jeho přídavek je vyjádřen v μl na 1 ml nanočástic



Obr. 2. Srovnání Ramanových spekter roztoku riboflavinu a směsi riboflavinu s AgNP, AuNP, resp. AuNP s přidavkem NaCl. Koncentrace riboflavinu je ve všech vzorcích $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Koncentrace přidávaného roztoku NaCl je 1 mol l^{-1} a jeho přídavek je vyjádřen v μl na 1 ml nanočástic. Spektra jsou pro lepší názornost posunuta



Obr. 3. Srovnání Ramanových spekter krevní plazmy, krevní plazmy s AgNP, AuNP, resp. AuNP s přidavkem NaCl. Koncentrace roztoku NaCl je 1 mol l^{-1} a jeho přidavek je vyjádřen v μl na 1 ml nanočástic. Spektra jsou pro lepší názornost posunuta

signálu riboflavinu, nicméně při srovnání obou typů nanočástic je patrné, že k výrazně vyššímu zesílení dochází v případě použití AgNP. Intenzita pozorovaných pásů se pro jednotlivé výše přidavku NaCl nijak výrazně nelišila.

Efekt přidavku roztoku NaCl k AuNP byl sledován také pomocí absorpční UV-Vis spektroskopie. S rostoucím objemem přidaného agregačního činidla byl pozorován posun maxima plazmonové rezonance k vyšším vlnovým délkám (obr. 1C), přičemž největší skokový posun způsobil přidavek $75 \mu\text{l}$ NaCl na 1 ml nanočástic, kdy došlo k vytvoření výraznějšího maxima u 640 nm .

Pro experimenty s krevní plazmou byl s ohledem na výsledky UV-Vis spektroskopie a spekter SERS riboflavinu zvolen přidavek roztoku NaCl v poměru $75 \mu\text{l}$ NaCl na 1 ml AuNP. Z porovnání získaných spekter krevní plazmy a spekter SERS krevní plazmy s AgNP, resp. AuNP v různých poměrech, včetně přidavku roztoku NaCl v případě AuNP, vyplývají následující skutečnosti (obr. 3): (a) k zesílení intenzity signálu při použití AuNP musí být v roztoku přítomno agregační činidlo; (b) AgNP dosahují vyššího zesílení signálu než AuNP; (c) AgNP poskytují zesílení signálu při všech poměrech, zatímco v případě AuNP bylo úspěšně naměřeno pouze jedno dobře rozlišené spektrum SERS krevní plazmy; (d) při využití AgNP jsou spektra více zesílena v oblasti nižších vlnočtů ($400\text{--}1000 \text{ cm}^{-1}$), AuNP dosahují lepšího zesílení při vyšších vlnočtech ($1100\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$).

Závěr

V této práci byla úspěšně testována schopnost zlatých a stříbrných koloidních substrátů zesilovat Ramanův signál krevní plazmy. Využitelnost obou typů nanočástic pro

spektroskopii SERS krevní plazmy byla zkoumána pro různé poměry mísení krevní plazmy s nanočásticemi a pro různé přidavky agregačního činidla (NaCl). Prvotní výsledky ukazují, že při využívané excitační vlnové délce (785 nm) je výrazně větších zesilujících účinků dosaženo při použití AgNP, které zvyšovaly intenzitu signálu pro všechny testované poměry, a to i bez přidavku NaCl. V případě AuNP bylo zesílení pozorováno pouze v jednom konkrétním případě a pro jejich následné použití při analýze krevní plazmy bude potřeba další optimalizace měřicího procesu. Výsledky získané v této práci naznačují, že koloidní roztoky plazmonických nanočástic poskytují účinné zesílení signálů v Ramanových spektrech krevní plazmy a získané poznatky tak budou dále rozvíjeny a v rámci dalšího výzkumu potenciálně využity pro analýzu krevní plazmy za účelem diagnostiky různých onemocnění.

LITERATURA

1. Lin D., Feng S. Y., Pan J. J., Chen Y. P., Lin J. Q., Chen G. N., Xie S. S., Zeng H. S., Chen R.: *Opt. Express* *19*, 13565 (2011).
2. Lin D., Pan J. J., Huang H., Chen G. N., Qiu S. F., Shi H., Chen W. W., Yu Y., Feng S. Y., Chen R.: *Sci. Rep.* *4*, 4751 (2014).
3. Ryzhikova E., Ralbovsky N. M., Halamkova L., Celmins D., Malone P., Molho E., Quinn J., Zimmerman E. A., Lednev I. K.: *Appl. Sci.* *9*, 3256 (2019).
4. Gurian E., Di Silvestre A., Mitri E., Pascut D., Tiri-belli C., Giuffre M., Croce L. S., Sergo V., Bonifacio A.: *Anal. Bioanal. Chem* *413*, 1303 (2021).
5. Premasiri W. R., Lee J. C., Ziegler L. D.: *J. Phys. Chem. B* *116*, 9376 (2012).
6. Bonifacio A., Dalla Marta S., Spizzo R., Cervo S.,

- Steffan A., Colombatti A., Sergio V.: *Anal. Bioanal. Chem* 406, 2355 (2014).
7. Procházka M.: *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. Springer, Cham 2016.
 8. Fujieda R., Yang M.: *Adv. Mat. Res.* 403, 4411 (2011).
 9. Lee P. C., Meisel D.: *J. Phys. Chem.* 86, 3391 (1982).

J. Harvalík, K. Hruběšová, O. Vrtělka, and V. Setnička (*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague, Prague*): **Study of the Applicability of Colloidal Solutions of Gold and Silver Nanoparticles for Surface-enhanced Raman Spectroscopy of Blood Plasma**

This work focuses on the preparation of colloidal solutions of Au and Ag nanoparticles and verification of their applicability for surface-enhanced Raman scattering spectroscopy of blood plasma. The composition of blood plasma may change due to pathobiochemical processes associated with disease development. Analysis of blood plasma might reveal these changes and thus help in the diagnostics process of various diseases. Raman spectroscopy appears to be an ideal method for rapid and non-destructive analysis of blood plasma. Moreover, surface-enhanced Raman scattering spectroscopy might allow the detection of very low levels of potential disease-specific markers. In this work, the prepared colloidal solutions of Au and Ag nanoparticles were first characterized by UV-VIS absorption spectroscopy and their enhancing capabilities were verified using riboflavin as a model analyte. Subsequently, optimization of the measurement conditions for surface-enhanced Raman spectroscopy of blood plasma was performed. The results show that at the excitation wavelength of 785 nm, significantly higher enhancement is achieved when using Ag nanoparticles. In the case of Au nanoparticles, the enhanced blood plasma spectrum was successfully detected only once, and the addition of an aggregating agent (NaCl) was required.

Keywords: surface-enhanced Raman scattering, blood plasma, medical diagnosis, colloid substrate, riboflavin

● <https://doi.org/10.54779/ccss20220327>