

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **236148**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **412548**

(22) Data zgłoszenia: **02.06.2015**

(51) Int.Cl.
G01N 27/26 (2006.01)
G01N 21/62 (2006.01)
G01N 21/65 (2006.01)
G01J 3/44 (2006.01)

(54) **Sposób nakładania analitu w polu elektrycznym z roztworu na podłoże
do powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
05.12.2016 BUP 25/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
14.12.2020 WUP 20/20

(73) Uprawniony z patentu:
**INSTYTUT CHEMII FIZYCZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:
ŁUKASZ RICHTER, Ełk, PL
JAN PACZESNY, Żary, PL
**MONIKA KSIĘŻOPOLSKA-GOCALSKA,
Siedlce, PL**
ROBERT HOŁYST, Warszawa, PL

(74) Pełnomocnik:
rzec. pat. Krystian Żygadło

PL 236148 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób nakładania analitu na podłoża (substraty) do powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii („surface enhanced spectroscopy” SES) wykorzystujący pole elektryczne. Wynalazek zostanie opisany na przykładzie powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii Ramana („surface enhanced Raman spectroscopy” SERS), należy jednak rozumieć, że może zostać zastosowany w połączeniu z innymi technikami pomiarowymi; nieograniczająca ich lista zawiera pomiary powierzchniowo wzmocnionej luminescencji, powierzchniowo wzmocnionej fluorescencji, powierzchniowo wzmocnionej absorpcji zarówno w zakresie UV-Vis, jak i IR, techniki SPR („surface plasmon resonance”) i LSPR („localized surface plasmon resonance”). Dzięki zastosowaniu metody według wynalazku jakość analizy SES jest znacznie lepsza w porównaniu z metodami klasycznymi, ponieważ analit wysyca większość lub nawet wszystkie lokacje na powierzchni substratu, które wzmacniają sygnał. Dzięki temu uzyskiwane wyniki charakteryzują się znacznie lepszą powtarzalnością, a rejestrowane widma są bardziej intensywne. Dodatkowo procedura nakładania analitu może ulec skróceniu z kilkudziesięciu godzin do nawet kilku sekund. Sposób według wynalazku wykorzystuje pole elektryczne, którego optymalne parametry można wyznaczyć z wykorzystaniem teorii Debye'a.

Spektroskopia Ramana to technika, która umożliwia badanie przejść energetycznych związanych z drganiami wiązań i grup funkcyjnych w cząsteczkach. Światło padając na cząsteczkę może oddziaływać z nią w sposób elastyczny (bez zmiany energii – tzw. pasma Rayleigha) lub nieelastyczny (ze zmianą energii – pasma stokesowskie i antystokesowskie, kiedy fotony rozproszone mają energię odpowiednio mniejszą i większą niż fotony wzbudzające). Jedynie około jeden foton na milion rozpraszany jest w sposób nieelastyczny, a tylko te fotony niosą informację o strukturze molekularnej i są mierzone w spektroskopii Ramana. Rejestrowane widma dają „odcisk palca” badanych substancji – są na tyle specyficzne, że nie ma konieczności znakowania badanych molekuł.

Powierzchniowo wzmocniona spektroskopia Ramana (SERS) to technika analityczna, która w założeniach pozwala osiągnąć najwyższą możliwą czułość – wykrycie pojedynczej cząsteczki poszukiwanego związku w analizie. Jest ona jedną z najsilniej rozwijających się technik spektroskopowych w ostatniej dekadzie, umożliwia bowiem wzmocnienie intensywności widm Ramana o kilka rzędów wielkości (10^2 – 10^6 , a dla pewnych systemów nawet 10^8 – 10^{15} z możliwością detekcji pojedynczych molekuł [Phys. Rev. Lett., 76 (1996) 2444; Phys. Rev. Lett., 78 (1997) 1667; Science, 275 (1997) 1102]).

SERS wykorzystuje rezonans plazmonów na powierzchni nanostruktur metali (najczęściej złota lub srebra) do wzmocnienia sygnału ramanowskiego. Plazmony to kolektywne drgania elektronów powierzchniowych, których oddziaływania z falą elektromagnetyczną rozpraszanej wiązki zwiększają czułość techniki nawet o kilka rzędów wielkości. Do działania SERS wymaga najczęściej stałego nośnika, na który nanoszony jest analit. Nośnik taki nazywa się platformą, podłożem lub substratem SERS.

Dzisiaj SERS jest wykorzystywany do detekcji bakterii (Anal. Chem. 2004, 76, 40–47, US2008/0096005 A1, data 24 kwietnia 2008 r.) i wirusów, poziomu glukozy (Anal. Chem. 2007, 79, 6927–6932), antygeny raka prostaty (Analyst, 2009, 134, 842–844), modyfikacji protein po translacji w komórce (Anal. Chem. 2006, 78, 3543–3550), detekcji DNA (JACS 2007, 129, 6378–6379) i mutacji DNA (Anal. Chem. 2005, 77, 7810–7815). Technika ta używana jest również w badaniach nad inhibitorami korozji, polimerami, do detekcji i charakteryzacji barwników w obiektach archeologicznych i dziełach sztuki, w analizie śladowej np. do określania zanieczyszczeń wody, w medycynie sądowej czy w detekcji zagrożeń bioterrorystycznych.

Nadal jednak pozostaje problematyczne tworzenie powierzchni tanich, czułych, stabilnych w czasie i dających powtarzalne sygnały ramanowskie. Brak takich podłoży czyni tę technikę bezużyteczną w zastosowaniach praktycznych.

Największym problemem jest niejednorodność i niepowtarzalność uzyskiwanych wyników. Widma zebrane z jednego podłoża SERS, ale z oddalonych jego części, często różnią się znacznie od siebie. Wyniki uzyskiwane na różnych substratach (podłożach) charakteryzują się bardzo niską precyzją, uniemożliwiając wyciąganie wiążących wniosków z przeprowadzonych analiz. Dotychczas nie było wiadomo co jest powodem tak znacznych różnic. Badane próbki analizowano bardzo dokładnie z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej i technik spektralnych (np. XPS), ale nie znaleziono zależności między jakością uzyskiwanych widm SERS, a parametrami substratów SERS. Dwa identycznie wyglądające substraty SERS, przygotowane według tego samego procesu technologicznego, często dają różne widma SERS tych samych próbek.

Rozwiązaniem istniejącego problemu może być usprawnienie i optymalizacja procesu osadzania analitu na podłożach SERS. Zazwyczaj element sensoryczny zanurza się w badanym roztworze na kilka do kilkudziesięciu godzin. Proces nie prowadzi do jednorodnego pokrycia powierzchni w mikro i nano-skali. Wynika to przede wszystkim z faktu, że większość sygnału SERS pochodzi z niewielkich obszarów zwanych „hot spotami”. Liczba „hot spotów” przypadająca na jednostkę powierzchni jest statystycznie jednakowa na całej powierzchni próbki i w kolejnych próbkach przygotowanych z wykorzystaniem tego samego procesu technologicznego. Wysycenie „hot spotów” gwarantuje maksymalny i stały sygnał w granicach błędu pomiarowego. Obserwowane różnice w intensywności sygnału SERS wynikają z faktu, że w rzeczywistości niektóre „hot spoty” pozostają nieobsadzone. Parametr opisujący to niedokładne wysycenie powierzchni jest dla eksperymentatora nieznany i może być różny w obrębie jednej próbki oraz na kolejnych podłożach.

Wysycenie powierzchni analitem można uzyskać przez zwiększenie jego stężenia. Jednak takie podejście niweluje zalety SERS jako techniki analitycznej. Dlatego należy opracować sposób zwiększenia pokrycia powierzchni analitem, co spowoduje także lepsze wysycenie „hot spotów” lub kierowania niewielkiej liczby cząsteczek (niski limit detekcji) w odpowiednie miejsca („hot spoty”) na podłożu SERS. W tym celu można wykorzystać pole elektryczne.

Znane jest rozwiązanie US 2009/0166222 A1, w którym dwie nanoelektrody zbliżono do siebie tak, że pozostała pomiędzy nimi nanoprzerwa. Do nanoelektrod przyłożono zmienne pole elektryczne, które powodowało zatężenie analitu w obszarze nanoprzerwy. Pozwoliło to na zmniejszenie limitu detekcji SERS do badania DNA.

Rozwinięciem zaprezentowanego wyżej wynalazku jest opis US 2014/0211196 A1, według którego obiekty wzmacniające sygnał w powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii SES umieszczone są pomiędzy (w jednej płaszczyźnie) układem zawierającym od dwóch do pięciu elektrod. Do elektrod przyłożony może być potencjał stały lub zmienny, który powoduje przepływ prądu i wytworzenie pola elektrycznego pomiędzy elektrodami. Mnogość elementów SES może według opisu rozciągać się na odległość do 1 mm.

Znane jest rozwiązanie US 8,559,002 B2, w którym autorzy opisują możliwość zwiększenia ilości cząsteczek analitu w obszarach na powierzchni o największym promieniu krzywizny. Autorzy w zastrzeżeniu pierwszym wymagają by substrat SERS stworzony był z wielu wypukłości (w skali nano i mikrometrowej) o kształcie stożka, których czubek jest właśnie miejscem o największym promieniu krzywizny. Wypukłości te pokryte są materiałem SERS aktywnym. Opis wynalazku jasno wskazuje, że substrat SERS musi pozostawać w kontakcie elektrycznym z elektrodą, bądź sam stanowić elektrodę. Najważniejsze jednak, że do tej elektrody przykładany jest potencjał 0 V, a różnica potencjałów budowana jest poprzez przyłożenie zadanego potencjału do elektrody przeciwnej. Z opisu jasno wynika, że w trakcie procesu osadzania analitu przez cały układ przepływa prąd oraz zachodzą reakcje elektrochemiczne. Jedyna uwaga dotycząca warstwy ochronnej nawiązuje do zabezpieczenia przed korozją i adsorpcją jonów na elektrodzie. Zastrzeżenia określają również, by wspomniana elektroda przeciwna była przepuszczalna dla fotonów w zakresie światła wzbudzającego oraz fotonów rozproszonych w wyniku zjawiska Ramana. Autorzy nie podają ani jednego przykładu wykorzystania wynalazku do rejestracji widm Ramana, ani żadnych danych eksperymentalnych dotyczących opisywanego procesu, np. przyłożonej różnicy potencjałów.

Znany jest również opis US 2013/0196449 A1, będący rozszerzeniem zaprezentowanego powyżej rozwiązania US 8,559,002 B2. Główną nowością w zaprezentowanym rozszerzeniu jest wskazanie możliwości wykorzystania selektywnych receptorów, które wiążą cząsteczki analitu na powierzchni. Zaprezentowano przykład wiązania jonów CrO_4^{2-} przez 4-merkaptopirydynę osadzoną na strukturach wzmacniających sygnał Ramana. Autorzy wykorzystali napięcie 1,2 V. Zmiana znaku przyłożonego potencjału powoduje uwolnienie analitu. Autorzy wymagają, by wspomniane struktury wzmacniające sygnał Ramana charakteryzowały się dużym współczynnikiem proporcji (długie i cienkie struktury), które mogą się wyginać tworząc „hot spoty” na szczycie, gdzie wierzchołki się dotykają. Jak w bazowym wynalazku (US 8,559,002 B2) autorzy wymagają, by substrat SERS był w kontakcie elektrycznym z elektrodą lub sam stanowił elektrodę. Elektroda przeciwna według opisu musi być przepuszczalna dla światła w zakresie użytkowym (tj. dla światła wzbudzającego i rozproszonego).

Znane jest również rozwiązanie wykorzystujące zjawisko dielektroforezy poruszającej się fali TWDEP („travelling wave dielectrophoresis”) opisane w zgłoszeniu US 2014/0209463 A1. Wynalazek jest rozwinięciem opisanego powyżej rozwiązania US 2013/0196449 A1. Główne różnice to wskazanie

możliwości wykorzystania TWDEP nie tylko w SERS, ale również w kalorymetrii, reflektometrii, spektrometrii, mikroskopii optycznej i luminescencji. Autorzy ograniczają wykorzystanie wynalazku jedynie do skomplikowanego układu TWDEP, który wymaga przyłożenia potencjału zmiennego i jednocześnie będącego poza fazą. W opisie wskazują na preferencyjne wykorzystanie struktur o dużym współczynniku proporcji (długie i cienkie struktury). Wskazana została możliwość kontroli odległości między ich wierzchołkami, co pozwala na tworzenie „hot spotów”. Podkreślona została również rola modyfikacji powierzchni, która zapewnia selektywność opracowanej technice.

Znane są również opisy pomiarów SERS bezpośrednio w zewnętrznym polu elektrycznym. Badania takie prowadzone są jednak w celu pełniejszej charakterystyki układu, a nie jako etap osadzania analitu. Po przyłożeniu pola elektrycznego możliwe jest bądź to inne ustawienie cząsteczki na podłożu, zmiana jej przekroju czynnego na rozpraszanie lub wręcz zmiany związane z energią poziomów wibracyjno-rotacyjnych. Dlatego widma SERS zawierają inne informacje niż te rejestrowane w nieobecności pola elektrycznego (Electrochim. Acta, 2007, 52, 18, 5669–5676).

Znany jest opis wynalazku US 7,569,188 B2, który wskazuje możliwość wykorzystania energii elektrycznej do wytworzenia wysoko zlokalizowanego pola optycznego. Energia elektryczna może zostać zamieniona na energię wykorzystaną do wzbudzenia plazmonów na powierzchni.

Zmienne pole elektryczne zostało również wykorzystane w wynalazku US 8,243,270 B2 do wzbudzenia drgań ostro zakończonych końcówki nanoigły, co poprawia jakość analizy SERS (zwiększa stosunek sygnału do szumu). Opis jest rozwinięciem techniki „tip enhanced Raman spectroscopy” (TERS).

Nieoczekiwanie okazało się, że osadzanie analitu na podłożu SERS z wykorzystaniem pola elektrycznego może być prowadzone bez przepływu prądów faradajowskich przez układ, a potencjał nie musi być przyłożony do podłoża SERS. Dodatkowo sposób taki skraca czas procesu osadzania analitu, a uzyskane wyniki charakteryzują się znacznie lepszą powtarzalnością zarówno w zakresie pojedynczego substratu SERS, jak i pomiędzy substratami SERS.

Dlatego celem niniejszego wynalazku jest ujawnienie sposobu osadzania analitu na podłożu SERS, który wykorzystuje zmienne pole elektryczne, którego parametry można wyznaczyć korzystając z teorii Debye’a. W przeciwieństwie do wynalazków US 8,559,002 B2 i US 2013/0196449 A1 sposób według wynalazku nie wymaga konkretnego typu podłoża SERS, czyli może być zastosowany do wszystkich substratów SERS, zarówno wytworzonych w laboratorium, jak i komercyjnie dostępnych. Nie wymaga również, by jedna z elektrod była przepuszczalna dla światła o odpowiedniej długości fali. W odróżnieniu od wynalazku US 2014/0209463 A1 prezentowany sposób nie opiera się na zjawisku TWDEP i nie wymaga stosowania impulsów pozostających poza fazą. W odróżnieniu od rozwiązań US 8,559,002 B2, US 2013/0196449 A1, US 2014/0209463 A1, US 2009/0166222 A1 prezentowany sposób nie wymaga kontaktu elektrycznego między elektrodą a strukturami wzmacniającymi sygnał SERS. W odróżnieniu od wszystkich wspomnianych rozwiązań w sposobie według wynalazku nie ma bezpośredniej wymiany ładunków na granicy elektroda-roztwór, zatem nie występują prądy faradajowskie, mogące wpływać na morfologię powierzchni SERS-aktywnej lub powodować modyfikacje osadzanego analitu.

Schemat prezentujący wykorzystanie metody do osadzania kwasu p-merkaptobenzoesowego (PMBA) pokazano na fig. 1A. PMBA w wodzie może dysocjować i istnieć w postaci anionu (ujemnie naładowany jon). Dlatego substrat SES znajduje się bezpośrednio nad elektrodą, do której przykładany jest potencjał dodatni. Przebieg tego potencjału pokazany jest na fig. 1B. Część okresu, w którym wartość potencjału przybiera maksymalną wartość to czas, w którym cząsteczki i jony poruszają się w stronę przeciwnie naładowanych elektrod. Kiedy potencjał wynosi 0 V lub jest bliski tej wartości następuje rozmycie podwójnej warstwy elektrycznej (zgodnie z teorią Guya-Chapmana), która silnie ekranuje pole elektryczne. Ponieważ jony poruszają się szybciej niż cząsteczki analitu, to wypadkowo PMBA zostaje osadzony na substracie SES.

Zgodnie z wynalazkiem sposób nanoszenia analitu z roztworu na podłoże (substrat) SES obejmujący proces osadzania w polu elektrycznym, charakteryzuje się tym, że obejmuje następujące etapy:

- a) podłoże (substrat) SES umieszcza się pomiędzy elektrodami, będącymi okładkami kondensatora, przy czym co najmniej jedna z nich jest zaizolowana tak, by poprzez objętość znajdującą się pomiędzy elektrodami nie płynął prąd faradajowski,
- b) na podłoże (substrat) SES nanosi się roztwór analitu,
- c) do elektrod przykładają się napięcie, przy czym polaryzacja elektrod, wartość oraz przebieg przyłożonego do nich napięcia zależy od budowy molekularnej cząsteczek badanej substancji,

a korzystnie parametry wykorzystanego pola elektrycznego wyznacza się z wykorzystaniem teorii Debye'a,

- d) w tych warunkach, przy braku przepływu prądów faradajowskich przez objętość znajdującą się między elektrodami, prowadzi się osadzanie analitu z roztworu na podłożu (substracie) SES, przez czas od 0,1 sekundy do 24 godzin, korzystnie od 3 sekund do 30 min.

Korzystnie, po wykonaniu kroku d) podłoże (substrat) SES z osadzonym analitem usuwa się spośród elektrod, będących okładkami kondensatora.

Korzystnie, następnie mierzy sygnał SES z wykorzystaniem zewnętrznego spektrometru lub innego aparatu pomiarowego.

Korzystnie, w etapie a) odległość między okładkami wynosi od 10 μm do 10 cm, korzystnie od 100 μm do 3 mm, a najkorzystnie od 100 μm do 1,5 mm.

Korzystnie, w etapie b) objętość nakładanego roztworu analitu wynosi od 5 μl do 10 ml, korzystnie od 50 μl do 400 μl .

Korzystnie, w etapie c) różnica potencjałów wynosi od 10 mV do 1000 V, korzystnie od 0,1 V do 100 V, najkorzystnie 10 V.

Korzystnie, w etapie c) i d) przykładą się napięcie zmienne, korzystnie o profilu prostokątnym, a najkorzystnie w drugiej połowie okresu zmiennego napięcia wartość przyłożonego potencjału wynosi 0 V.

Korzystnie, w etapie c) i d) częstotliwość zmian napięcia wynosi od 1 mHz do 5 MHz, korzystnie od 500 Hz do 100 kHz, a najkorzystnie od 1 kHz do 20 kHz.

Korzystnie, roztwór analitu obejmuje analit i rozpuszczalnik, przy czym stosuje się taki rozpuszczalnik, a zwłaszcza rozpuszczalnik o takim pH, że analit w rozpuszczalniku jest w formie posiadającej ładunek elektryczny.

Wynalazek zostanie teraz bliżej przedstawiony w korzystnym przykładzie wykonania, z odniesieniem do załączonych figur, na których:

fig. 1A przedstawia schemat metody do osadzania analitu w polu elektrycznym;

fig. 1B przedstawia profil potencjału przyłożonego do elektrod kondensatora, w którym umieszczono substrat SERS i osadzano analit. Pokazano przykładowy układ do osadzania kwasu p-merkaptobenzoowego (PMBA). Należy rozumieć, że polaryzacja elektrod oraz potencjał do nich przyłożony zależą od budowy molekularnej badanej substancji i mogą mieć zarówno inny znak, jak i inną wartość;

fig. 2 przedstawia projekt (A) oraz zdjęcie (B) celki pomiarowej wykorzystanej do osadzania analitu na substraty SERS;

fig. 3 przedstawia wyniki pomiarów SERS po osadzeniu kwasu p-merkaptobenzoowego (PMBA) o stężeniu 10^{-6} mol/l na substraty SERS w zależności od częstotliwości przyłożonego pola zmiennego. Na każdym wykresie przedstawiono widma zebrane z różnych miejsc jednego podłoża;

fig. 4 przedstawia porównanie wyników analizy SERS kwasu p-merkaptobenzoowego (PMBA) o stężeniu 10^{-6} mol/l osadzanego na substratach SERS różnymi metodami. Moc lasera wynosiła 9 mW. Wstawiony wykres umożliwia porównanie intensywności zebranych widm.

Na figurach użyto następujących oznaczeń: 1 – podstawa; 2 – element w kształcie grzebienia („grzebień”); 3 – pokrywa; 4 – belka zabezpieczająca kołki ze sprężynami, dostarczające napięcie do powierzchni płytek; 5 – przekładka teflonowa, zapobiegająca przepływowi prądów faradajowskich; 6 – kołki zapewniające odpowiednie ułożenie i docisk pokrywy do podstawy; 7 – nakrętki do kołków; 8 – kołki dostarczające napięcie do płytki; 9 – kołki doprowadzające napięcie do miedzianych elektrod; 10 – sprężyny dociskające kołki do dolnej elektrody lub powierzchni płytki; 11 – miedziane elektrody; 12 – substraty SES. Na rysunku nie zaznaczono dolnych elektrod, które spoczywają na dnie komór (pod substratami SES) i mogą być łatwo usunięte.

Korzystny przykład wykonania wynalazku

Materiały i sprzęt

Podczas eksperymentów wykorzystywane były rozpuszczalniki organiczne wysokiej czystości dostarczone przez firmę Chempur. Pozostałe niezbędne, dostępne komercyjnie odczynniki dostarczyła firma Sigma-Aldrich. Wykorzystano wodę o jakości MiliQ ($18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$).

Wszystkie eksperymenty przeprowadzono z wykorzystaniem substratów SERS przygotowanych według wynalazku P-408785. Wynalazek ten przedstawia sposób otrzymywania metodą elektrochemiczną powierzchni pokrytej jednorodnie nanocząstkami metalu oraz zastosowanie powstałej platformy do pomiarów powierzchniowo wzmocnionego efektu Ramana (SERS). W obecnym wynalazku wykorzystywane były podłoża z warstwą nanocząstek srebra osadzoną na płytkach szklanych z przewodzącym tlenkiem, które zostały pocięte na fragmenty o wymiarach 8 mm na 25 mm.

Do osadzania analitu w polu elektrycznym na podłożu SES przygotowany został nowy układ eksperymentalny. Zestaw składa się z dwóch części. Pierwszą jest specjalnie zaprojektowana celka, umożliwiająca szybkie i proste osadzanie. Jej głównym zadaniem jest zapewnienie powtarzalności warunków procesu osadzania. Schemat urządzenia przedstawiony został na fig. 1A, jego dokładny projekt na fig. 2A, a zdjęcie na fig. 2B. Schemat przedstawiony na fig. 1A przedstawia sytuację, w której cząsteczki analitu mają ładunek ujemny (tak jak PMBA). Należy rozumieć, że polaryzacja elektrod oraz potencjał do nich przyłożony zależą od budowy molekularnej badanej substancji i mogą mieć zarówno inny znak, jak i inną wartość niż na fig. 1. Celka ma budowę kondensatora, którego okładki stanowią miedziane elektrody nad i pod podłożem SES. Projekt celki umożliwia również przyłożenie potencjału bezpośrednio do podłoża SES. Celka składa się z dwóch elementów – podstawy oraz pokrywy. W podstawie znajdują się trzy komory, w których umieszcza się substraty SES. Powyżej komór umieszczony jest element w kształcie grzebienia. Ma on dwie główne funkcje: 1) unieruchamia podłoża SES i 2) jego grubość określa objętość, jaką można wprowadzić do komory. Element ten można łatwo wymieniać. Dwie śruby na obu końcach podstawy zapewniają poprawne wzajemne ułożenie podstawy i pokrywy. W pokrywie zamontowano elektrodę górną wraz z wyprowadzeniem elektrycznym oraz kontakty do podłączenia dolnej elektrody, umieszczonej w podstawie. Kontakty te dociskane są do dolnej elektrody przez sprężyny. Górne elektrody zaizolowane zostały 200 μm warstwą teflonu. Dzięki temu w układzie nie płynie prąd faradajowski (pomiaru dokonano z dokładnością do nanoamperów) i dzięki temu wykluczono możliwość zajścia procesów elektrochemicznych.

Celka połączona jest z układem do generowania napięcia, w skład którego wchodzi generator funkcyjny (DG1022, Rigol, China) oraz wzmacniacz napięcia (2210, Trek, USA). Sygnał dostarczany przez generator jest wzmacniany 100 razy. Równolegle podłączono oscyloskop (DS1052E Rigol, China) wyposażony w sondy (niskonapięciową do 250 V i wysokonapięciową do 1000 V). Dzięki temu precyzyjnie kontrolowano sygnał wyjściowy.

Celka i system do generowania napięcia połączone są przez skrzynkę rozdzielczą, która zapewnia kontrolę nad całym zestawem, tj. polaryzacją elektrod lub nawet odłączenie niektórych kanałów w celu przeprowadzenia eksperymentów kontrolnych bez użycia pola.

Do rejestracji widm SERS wykorzystano przenośny spektrometr ramanowski firmy BWTEK Inc.

P r z y k ł a d 1: Sposób obliczenia korzystnej częstotliwości zmiennego pola elektrycznego

Wykorzystanie pola elektrycznego do osadzania analitu na podłożach SERS wymaga dostosowania parametrów do konkretnego układu. Zaprezentowany przykład przybliża sposób szacowania parametrów pola elektrycznego do osadzania kwasu p-merkaptobenzoowego (PMBA) z wykorzystaniem teorii Debye'a. Schemat przedstawiony na fig. 1A przedstawia sytuację, w której cząsteczki analitu mają ładunek ujemny (tak jak PMBA). Należy rozumieć, że polaryzacja elektrod oraz potencjał (jego wartość i przebieg) do nich przyłożony zależą od budowy molekularnej badanej substancji i mogą mieć zarówno inny znak, jak i inną wartość niż na fig. 1.

Znakomita większość badań prowadzonych z wykorzystaniem techniki SERS dotyczy roztworów wodnych. Jako takie zawsze zawierają one jony (pochodzące z rozpuszczania dwutlenku węgla z powietrza oraz autodysocjacji wody). Jony ekranują pole elektryczne poprzez wytworzenie podwójnej warstwy elektrycznej w sąsiedztwie elektrod. Ekranowanie to powoduje, że wewnątrz roztworu natężenie pola bliskie jest 0 V/m. Problem ten można rozwiązać pozwalając na przepływ prądu przez cały układ (jak w znanych opisach US 2013/0196449 A1, US 8,559,002 B2, US 2014/0209463 A1). Rozwiązanie takie w większości przypadków wydaje się niekorzystne, ponieważ umożliwia przebieg reakcji redoks w układzie. Przepływ prądu może prowadzić również do zmian morfologicznych w strukturze podłoża SERS, co negatywnie wpływa na jego zdolności do wzmocnienia sygnału ramanowskiego.

W prezentowanym wynalazku zabezpieczono jedną z elektrod (przeciwną) 200 μm warstwą teflonu, dzięki czemu w układzie nie płynął prąd faradajowski oraz brak było reakcji elektrochemicznych. By odczuwalne pole elektryczne nie było ekranowane już w sąsiedztwie substratu SERS, konieczne było wykorzystanie zmiennego pola elektrycznego. Pole takie powinno oscylować między wartością maksymalną (dodatnią lub ujemną w zależności od struktury cząsteczkowej analitu) a zerem. Kiedy wartość przyłożonego potencjału jest niezerowa przez krótki czas cząsteczki analitu odczuwają obecność pola elektrycznego. Etap ten może trwać od pikosekund do milisekund w zależności od badanego układu – główny wpływ ma siła jonowa. Po tym czasie tworzy się podwójna warstwa elektryczna i odczuwalne pole zbliża się do zera. Wtedy należy zmienić wartość przyłożonego potencjału z wartości maksymalnej do

zera tak, by podwójna warstwa elektryczna rozmyła się w wyniku dyfuzji. Ponieważ jony dyfundują znacznie szybciej niż nawet najmniejsze cząsteczki organiczne, to przypadkowy obserwowany efekt powoduje zbliżanie się, a w konsekwencji osadzanie analitu na podłożu SERS.

Aby wyznaczyć optymalną częstotliwość zmian przyłożonego potencjału należy obliczyć jak długo trwa proces tworzenia podwójnej warstwy elektrycznej w danym układzie. Można założyć, że czas ten równy jest czasowi, w którym jon o największej ruchliwości i znaku przeciwnym do potencjału przyłożonego do elektrody przebędzie długość Debye'a w zewnętrznym polu elektrycznym o znanym natężeniu. Przebieg przykładanego potencjału składa się z równej długości pulsów i czasów między pulsami. W przypadku optymalnej częstotliwości czas trwania jednego pulsu jest równy wyznaczonemu czasowi tworzenia podwójnej warstwy elektrycznej.

Wszystkie niezbędne do obliczeń dane oraz stałe tablicowe zebrano w Tabeli 1.

Tabela 1

Dane i stałe tablicowe niezbędne do wyznaczenia parametrów procesu osadzania kwasu p-merkaptobenzoowego (PMBA) w polu elektrycznym. Szybkość elektroforetyczna PMBA została zmierzona za pomocą elektroforezy kapilarnej

STAŁA	OPIS	wartość	jednostka
ϵ_0	przenikalność dielektryczna próżni	$8,8542 \times 10^{-12}$	F/m
k_B	stała Boltzmanna	$1,3806 \times 10^{-23}$	J/K
N_A	stała Avogadra	$6,0221 \times 10^{23}$	1/mol
e	ładunek elementarny	$1,6022 \times 10^{-19}$	C
$\epsilon_{r(H_2O)}$	względna przenikalność dielektryczna wody w 20 °C	80	-
$\mu_{(H^+)}$	ruchliwość jonów H^+	$3,63 \times 10^{-7}$	$m^2/(Vs)$
$\mu_{(OH^-)}$	ruchliwość jonów OH^-	$2,05 \times 10^{-7}$	$m^2/(Vs)$
$\mu_{(PMBA)}$	ruchliwość PMBA	$3,11 \times 10^{-8}$	$m^2/(Vs)$
T	temperatura	293	K
C_{PMBA}	stężenie PMBA	10^{-3}	mol/m ³
C_{H^+}	stężenie jonów wodorowych	$10^{-2,5}$	mol/m ³
C_{OH^-}	stężenie jonów wodorotlenkowych	$10^{-5,5}$	mol/m ³
V	napięcie	10	V
d	odległość między elektrodami	2,2	mm

Pierwszym etapem jest zatem obliczenie długości Debye [m] wg wzoru:

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 k_B T}{2 N_A e^2 I}} \quad (1)$$

gdzie ε_r to względna przenikalność elektryczna roztworu [-], ε_0 to przenikalność elektryczna próżni [F/m], k_B to stała Boltzmanna [J/K], T to temperatura [K], N_A to stała Avogadra [l/mol], e to elektryczny ładunek elementarny [C], a I to siła jonowa [mol/m³].

Siła jonowa [mol/l], potrzebna do obliczenia długości Debye, wyliczana jest ze wzoru:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (2)$$

gdzie c_i to stężenie danego jonu w roztworze [mol/m³], a z_i to jego ładunek [-].

Zmierzone pH wodnego roztworu PMBA o stężeniu 10⁻⁶ mol/l (czyli 10⁻³ mol/m³) po 24 godzinach wynosiło około 5,5. Wartość ta nieznacznie odbiega od teoretycznej przede wszystkim ze względu na zakwaszenie wody w wyniku rozpuszczania dwutlenku węgla z powietrza. Stała pKa cząsteczki PMBA wynoszą odpowiednio: 4,14 (dla grupy -COO-H) oraz 6,62 (dla grupy -S-H). Zatem, w pH 5,5 tylko grupa karboksylowa uległa dysocjacji, a więc cząsteczka PMBA posiadała wyłącznie jeden ładunek. Dodatkowo, w pH 5,5 stężenie jonów wodorowych H⁺ wynosiło 10^{-5,5} mol/l, a stężenie jonów wodorotlenkowych OH⁻ wynosiło 10^{-8,5} mola/l.

Dla zastosowanego układu siła jonowa obliczona według wzoru (2) wynosi:

$$I = 2,08 \times 10^{-3} \text{ mol/m}^3.$$

Zatem, długość Debye obliczona wg wzoru (1) to:

$$\kappa^{-1} = 210,9 \text{ nm}.$$

Następnie należy określić, jakie jest pole elektryczne w celce. Można to policzyć znając odległości między elektrodami oraz przykładane napięcie:

$$E = \frac{V}{d} \quad (3)$$

gdzie V to przykładane napięcie [V], a d to odległość między elektrodami [m].

W zastosowanym układzie eksperymentalnym natężenie pola elektrycznego wynosi 4545,45 V/m. W prezentowanym przykładzie przyłożono różnicę potencjałów równą 10 V, a odległość d między elektrodami to 2,2 mm. Tym samym pole elektryczne, obliczone wg wzoru (3), wynosi:

$$E = 4545,5 \text{ V/m}.$$

Kolejnym etapem jest określenie, jak szybko najszybszy jon przebędzie obliczoną długość Debye. Określenie czasu jest oparte o ruchliwość elektroforetyczną najszybszego jonu o znaku przeciwnym do potencjału przyłożonego do elektrody:

$$t = \frac{\kappa^{-1}}{E \times \mu_i} \quad (4)$$

gdzie μ_i to ruchliwość elektroforetyczna najszybszego jonu o znaku przeciwnym do potencjału przyłożonego do elektrody, κ^{-1} to długość Debye, a E to pole elektryczne w celce.

Ponieważ PMBA jest anionem (jon o ładunku ujemnym) to w obliczeniach należy uwzględnić czas tworzenia podwójnej warstwy elektrycznej przez jony OH⁻. Czas w którym jon OH⁻ przebędzie długość Debye'a w zewnętrznym polu elektrycznym to 4,57 × 10⁻⁴ s (wzór 4). Czas ten przekłada się bezpośrednio na częstotliwość równą około 2 kHz.

Dla badanego układu wartość ta, obliczona wg wzoru (4), wynosi:

$$t = 226,3 \text{ } \mu\text{s}.$$

Ostatnim krokiem jest wyznaczenie częstotliwości. Obliczony czas t równa się czasowi optymalnego pulsu. Cały przebieg składa się z pulsów oraz przerw między pulsami. Zatem, aby uzyskać pełny okres, należy podwoić uzyskany czas t (odpowiada to uwzględnieniu pulsu i przerwy między pulsami). Zatem, optymalna częstotliwość wynosi:

$$f = \frac{1}{2t} \quad (5)$$

gdzie f to optymalna częstotliwość [Hz], a t to obliczony czas przelotu najszybszego jonu przez długość Debye (czyli czas tworzenia podwójnej warstwy elektrycznej) [s].

W badanym układzie optymalna częstotliwość, obliczona wg (5), wynosi zatem:

$$f = 4,42 \text{ kHz.}$$

P r z y k ł a d 2: Osadzanie PMBA na substratach SERS w polu elektrycznym o różnej częstotliwości.

Zmierzono widma SERS z substratów, na których osadzano PMBA z roztworu wodnego o stężeniu 10^{-6} mol/l przez 5 minut w zmiennym polu elektrycznym o przebiegu zaprezentowanym na fig. 1B.

Procedura każdego osadzania przebiegała następująco:

- a) podłoże (substrat) SES umieszczono w celce pomiędzy elektrodami, będącymi okładkami kondensatora, przy czym co najmniej jedna z nich była zaizolowana tak, by poprzez objętość znajdującą się pomiędzy elektrodami nie płynął prąd faradajowski,
- b) na podłoże (substrat) SES naniesiono 50 μ l wodnego roztworu PMBA o stężeniu 10^{-6} mol/l,
- c) do elektrod przyłożone zostało napięcie o przebiegu prostokątnym, oscylujące pomiędzy 0 V oraz +10 V. Wykonano osiem procesów osadzania, w których użyto ośmiu różnych częstotliwości przykładanego napięcia: 1 MHz, 750 kHz, 500 kHz, 200 kHz, 10 kHz, 1 kHz, 500 Hz, 50 Hz. Proces osadzania trwał 5 minut,
- d) po 5 minutach podłoże zostało wyjęte z celki, a następnie wysuszone na powietrzu,
- e) ostatnim etapem było zmierzenie sygnału SERS w standardowym pomiarze z wykorzystaniem spektrometru ramanowskiego firmy BWTEK Inc.

Wyniki uzyskane dla różnych częstotliwości (1 MHz, 750 kHz, 500 kHz, 200 kHz, 10 kHz, 1 kHz, 500 Hz, 50 Hz) pola zmiennego zebrano na fig. 3. Najlepsze wyniki (zarówno ze względu na intensywność, jak i powtarzalność rejestrowanych widm) uzyskano dla częstotliwości pomiędzy 1 kHz a 10 kHz, co pozostaje w dobrej zgodności z przewidywaniami teoretycznymi (uzyskano zgodność na poziomie pół rzędu wielkości, co jest wystarczającym przybliżeniem do szacowania odpowiedniego zakresu częstotliwości stosowanego pola).

P r z y k ł a d 3: Porównanie wyników analizy SERS po osadzeniu PMBA różnymi sposobami

Porównano efekt osadzania kwasu p-merkaptobenzoowego (PMBA) trzema różnymi metodami:

- a) Pierwsze było podejście opisane w niniejszym zgłoszeniu patentowym. Analit został osadzony w ciągu 5 minut w polu elektrycznym pod wpływem przyłożonego napięcia (10 V, 10 kHz). Dokładny przebieg procedury został opisany w „Przykładzie 2”.
- b) Druga metoda była identyczna z pierwszą, jednak nie zostało przyłożone napięcie. Przeprowadzone osadzanie miało na celu sprawdzenie, czy napięcie jest czynnikiem wywołującym efektywne osadzanie.
- c) Ostatnie podejście było standardową procedurą wykorzystywaną do osadzania analitów w technice SERS. Substrat SERS-aktywny został zanurzony w 2 ml roztworu analitu na 20 godzin.

Na fig. 4 zaprezentowano porównanie wyników analizy SERS kwasu p-merkaptobenzoowego (PMBA) osadzanego na substratach SERS różnymi metodami. Osadzanie PMBA w polu elektrycznym w czasie 5 minut daje widmo o największej intensywności. Jakość analizy jest lepsza niż w przypadku standardowej procedury, która trwa od kilku do kilkudziesięciu godzin.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób nanoszenia analitu z roztworu na podłoże (substrat) SES obejmujący proces osadzania w polu elektrycznym, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy:

- a) podłoże (substrat) SES umieszcza się pomiędzy elektrodami, będącymi okładkami kondensatora, przy czym co najmniej jedna z nich jest zaizolowana tak, by poprzez objętość znajdującą się pomiędzy elektrodami nie płynął prąd faradajowski,
- b) na podłoże (substrat) SES nanosi się roztwór analitu,
- c) do elektrod przykładają się napięcie, przy czym polaryzacja elektrod, wartość oraz przebieg przyłożonego do nich napięcia zależy od budowy molekularnej cząsteczek badanej substancji, a korzystnie parametry wykorzystanego pola elektrycznego wyznacza się z wykorzystaniem teorii Debye'a,
- d) w tych warunkach, przy braku przepływu prądów faradajowskich przez objętość znajdującą się między elektrodami, prowadzi się osadzanie analitu z roztworu na podłożu (substracie) SES, przez czas od 0,1 sekundy do 24 godzin, korzystnie od 3 sekund do 30 min.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że po wykonaniu kroku d) podłoże (substrat) SES z osadzonym analitem usuwa się spomiędzy elektrod, będących okładkami kondensatora.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że następnie mierzy sygnał SES z wykorzystaniem zewnętrznego spektrometru lub innego aparatu pomiarowego.
4. Sposób według zastrz. 1, 2 albo 3, **znamienny tym**, że w etapie a) odległość między okładkami wynosi od 10 μm do 10 cm, korzystniej od 100 μm do 3 mm, a najkorzystniej od 100 μm do 1,5 mm.
5. Sposób według dowolnego z poprzedzających zastrz. od 1 do 4, **znamienny tym**, że w etapie b) objętość nakładanego roztworu analitu wynosi od 5 μl do 10 ml, korzystniej od 50 μl do 400 μl .
6. Sposób według dowolnego z poprzedzających zastrz. od 1 do 5, **znamienny tym**, że w etapie c) różnica potencjałów wynosi od 10 mV do 1000 V, korzystniej od 0,1 V do 100 V, najkorzystniej 10 V.
7. Sposób według dowolnego z poprzedzających zastrz. od 1 do 6, **znamienny tym**, że w etapie c) i d) przykładą się napięcie zmienne, korzystniej o profilu prostokątnym, a najkorzystniej w drugiej połowie okresu zmiennego napięcia wartość przyłożonego potencjału wynosi 0 V.
8. Sposób według zastrz. 7, **znamienny tym**, że w etapie c) i d) częstotliwość zmian napięcia wynosi od 1 mHz do 5 MHz, korzystniej od 500 Hz do 100 kHz, a najkorzystniej od 1 kHz do 20 kHz.
9. Sposób według dowolnego z poprzedzających zastrz. od 1 do 8, **znamienny tym**, że roztwór analitu obejmuje analit i rozpuszczalnik, przy czym stosuje się taki rozpuszczalnik, a zwłaszcza rozpuszczalnik o takim pH, że analit w rozpuszczalniku jest w formie posiadającej ładunek elektryczny.

Rysunki

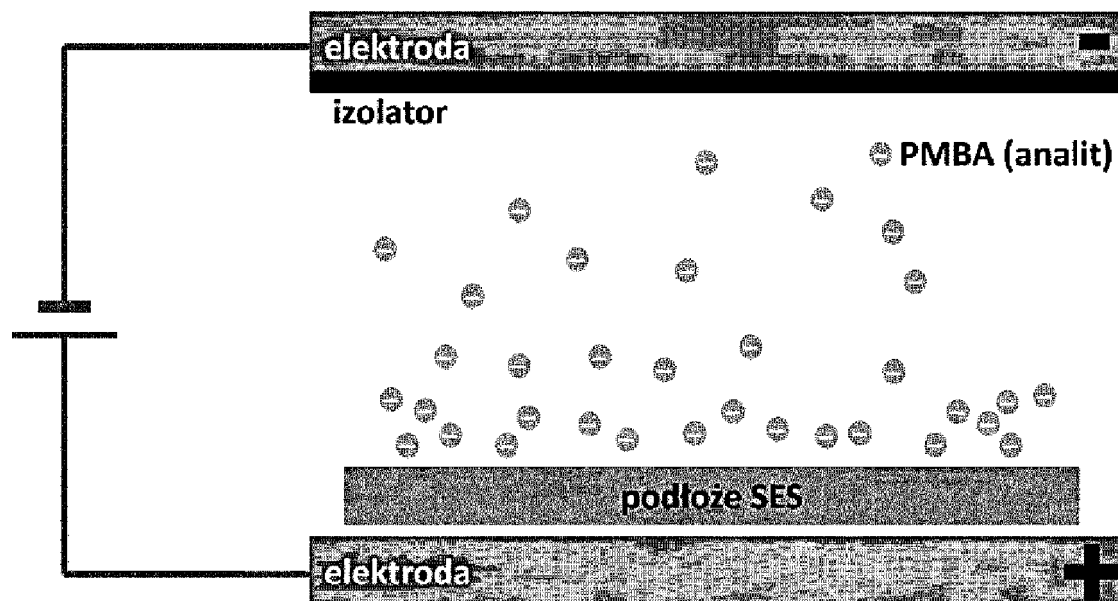


Fig. 1A

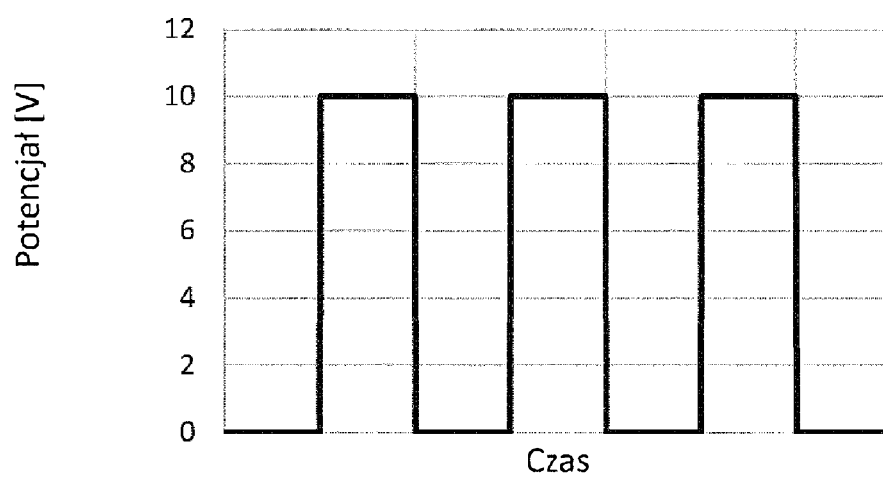


Fig. 1B

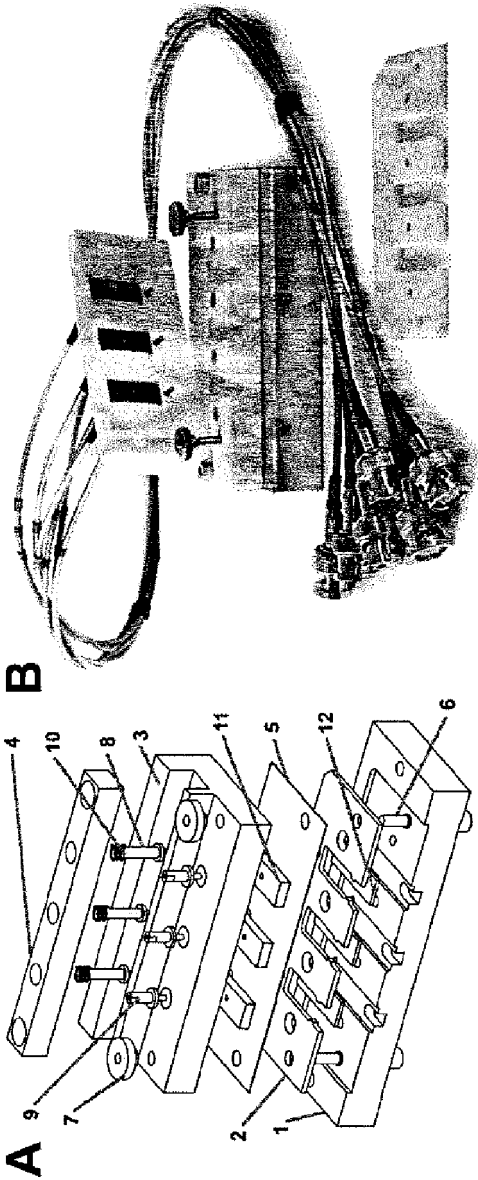
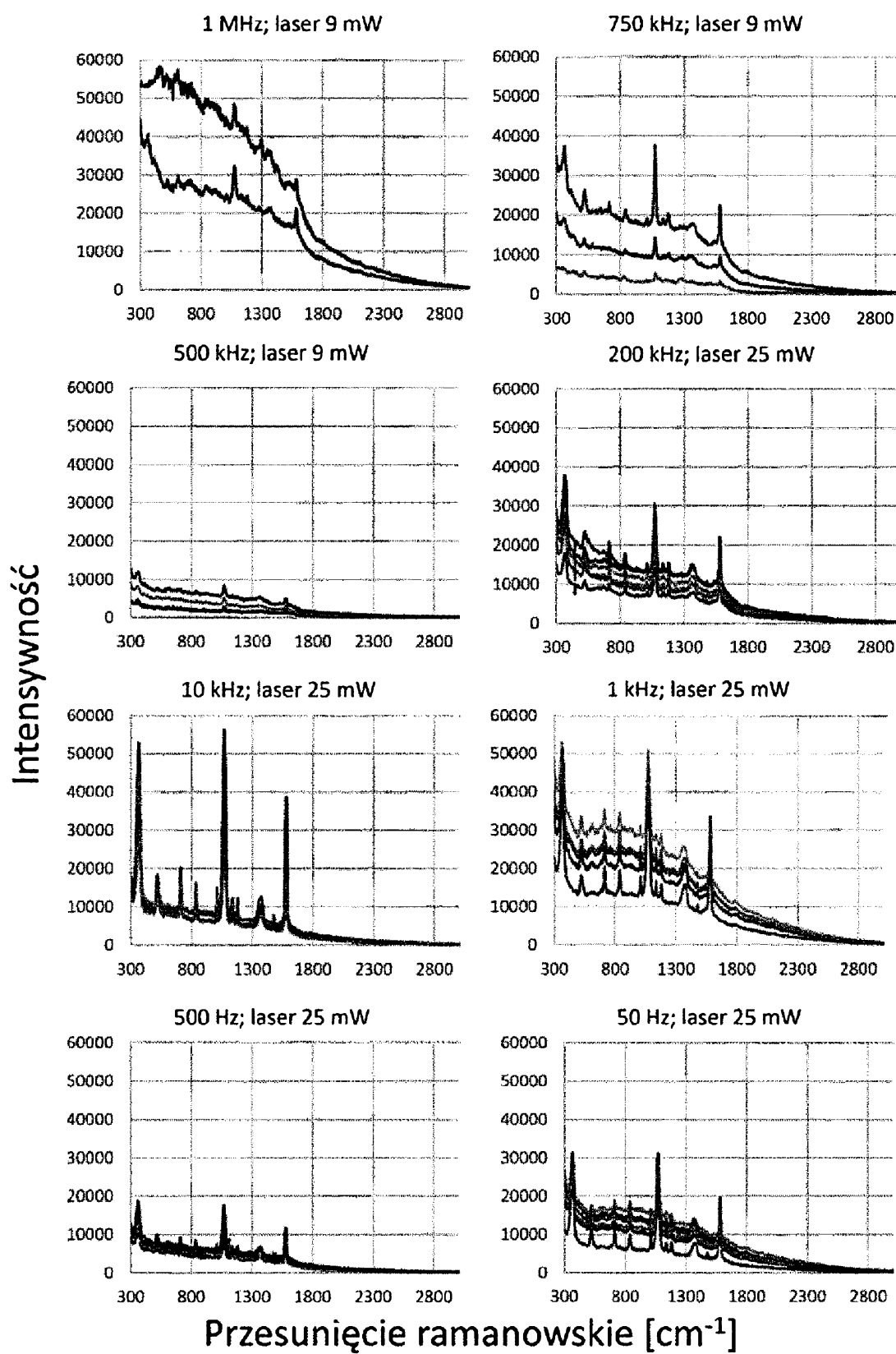


Fig. 2



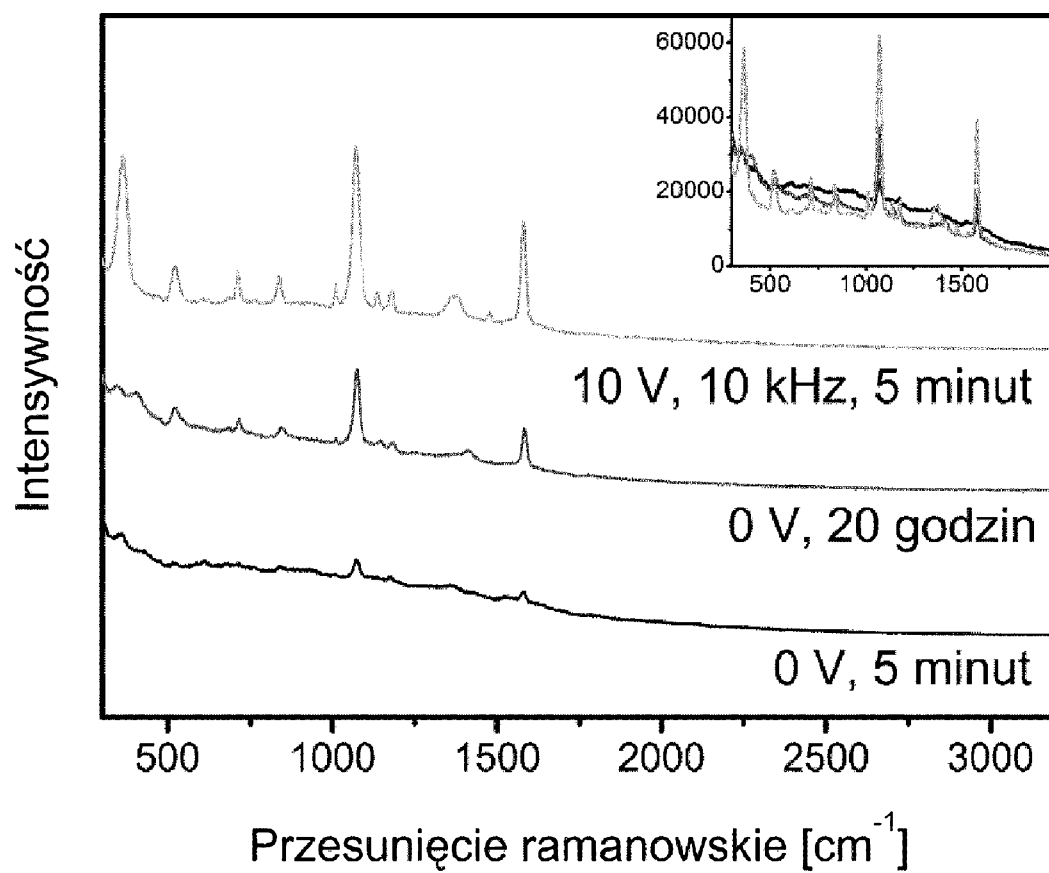


Fig. 4