

MOŽNOSTI VYUŽITÍ TECHNIK POVRCHEM ZESÍLENÉ VIBRAČNÍ SPEKTROSKOPIE PŘI ANALÝZE PŘÍPRAVKU *Chamomilla vulgaris*

DANUŠE VAVŘINOVÁ^{a*} a PAVEL MATĚJKA^b

^a Ústav analytické chemie, ^b Ústav fyzikální chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
vavrinod@vscht.cz

Došlo 10.12.12, přijato 21.1.13.

Klíčová slova: povrchem zesílená vibrační spektroskopie, homeopatikum, Ramanův rozptyl, infračervená absorpce, *Chamomilla vulgaris*

Úvod

Spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (Surface Enhanced Raman Scattering spectroscopy – SERS Spectroscopy) a povrchem zesílená infračervená absorpční spektroskopie (Surface Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy – SEIRA spectroscopy) jsou metodami povrchem zesílené vibrační spektroskopie¹. Největší výhodou těchto metod je, že právě díky povrchovému zesílení spektrální odezvy lze detegovat i velmi malé koncentrace analytu, případně několika analytů. Intenzita signálů v zesílených spektrech je oproti nezesíleným spektrům o několik řádů vyšší, v případě SEIRA se jedná o zesílení cca stonásobné až tisícinásobné, zatímco v případě SERS je běžné zesílení o více než 6 řádů, v tzv. „hot spot“ i o více než 10 řádů.

Aby mohlo docházet k uvedeným jevům, musí být molekuly adsorbovány na povrchu některých kovů s vhodnou nanostrukturální morfologií. K tomuto účelu se používají především zlato, stříbro či měď.

Efekt povrchového zesílení je výsledkem kombinace elektromagnetického a chemického mechanismu. Elektromagnetický mechanismus je založen na interakci záření s lokalizovanými povrchovými plasmony v nanostrukturálních motivech na povrchu kovu. Plasmony můžeme chápat jako kvantované hromadné oscilace valenčních elektronů. Chemický mechanismus zesílení zvyšuje polarizovatelnost (důležitá pro případ Ramanova rozptylu), resp. dipolový moment (klíčový pro infračervenou spektroskopii) adsor-

bované molekuly v důsledku interakce s kovovým substrátem.

Cílem předkládané práce byla možnost využití technik SERS a SEIRA pro analýzu homeopatického přípravku *Chamomilla vulgaris*. Výrobce udané složení je následující: účinná látka – *Chamomilla recutita* (heřmánek lékařský, synonymní český název heřmánek pravý); pomocné látky – sacharosa, monohydrát laktosy.

Experimentální část

Pro přípravu platinových terčičků byly použity následující chemikálie: oxid hlinitý, p.a. (Sigma Aldrich), uhličitán vápenatý, p.a. (Penta), peroxid vodíku (30%), p.a. (Lach-Ner), kyselina sírová (97%), p.a. (Penta). K přípravě zlatem pokovených terčičků byly využity: peroxidisíran amonný, p.a. (Lach-Ner), platinové terčičky (Safina), dikyanozlatnan draselný, p.a. (Safina), citronová kyselina, monohydrát, p.a. (Merck), citrát sodný, dihydrát, p.a. (Merck), hydroxid sodný (Lach-Ner), redestilovaná voda. K extrakci homeopatického přípravku a heřmánkového čaje sloužil methanol, p.a. (Penta). Vzorkem homeopatického přípravku byl preparát *Chamomilla vulgaris* 9CH od výrobce Boiron CZ, s.r.o. Heřmánkový čaj byl od výrobce Megafyt-R s.r.o.

Jako podkladový materiál, na němž byl vytvářen nanostrukturovaný kovový (konkrétně zlatý) povrch, byly použity masivní platinové terčičky o průměru cca 10 mm a tloušťce cca 2 mm. Terčičky byly nejprve mechanicky upraveny dříve popsány postupem^{2,3}.

Elektrochemické pokovování terčičků bylo prováděno katodickou redukcí podle dříve používaného postupu². Platinový terčiček byl zapojen jako katoda, jako anoda sloužila zlatá spirála. Obě elektrody byly ponořeny do elektrochemické lázně připravené rozpuštěním dikyanozlatnanu draselného. Na Pt terčičku docházelo k vylučování zlata ve formě nanostrukturované vrstvy dříve charakterizované mikroskopickými technikami³. Na některé terčičky byly poté aplikovány oxidačně-redukční cykly pro lepší morfologii povrchu a vyšší hodnotu povrchového zesílení³. Oxidačně-redukční cykly byly prováděny v uzavřené elektrochemické cele s třielektrodovým zapojením. Na pracovní elektrodě (pozlacený terčiček) se postupně měnil potenciál od jedné mezní hodnoty (610 mV) k druhé (340 mV) a zase zpět.

Pro depozici látek z homeopatického přípravku resp. z heřmánkového čaje bylo v každém jednotlivém pokusu extrahováno zvlášť 0,5 g heřmánkového čaje a 0,5 g homeopatického přípravku. Připravené pozlacené terčičky byly předem vloženy do vialek a teprve poté byl přidán extrakt, tak aby se molekuly extrahované látky sorbovaly především na vrchní stranu terčičku. Terčičky byly takto

* Danuše Vavřinová tuto práci úspěšně prezentovala na soutěži o cenu firmy Merck 2012 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie.

ponechány bez třepání a bez přístupu světla cca 20 hodin, poté byly opatrně vyndány pinzetou a methanol se nechal volně odpařit. Tímto způsobem zůstaly na povrchu terčíku sorbované látky extrahované z příslušného výchozího materiálu.

Nejprve bylo prováděno několik typů referenčních resp. pomocných měření. Proměřovány byly oba methanolicke extrakty, a to infračervenou (IČ) a UV-viditelnou (UV-vis) spektrometrií. Samotné tablety homeopatického přípravku pak byly analyzovány buď v podobě celých kuliček Ramanovou spektrometrií, nebo byly před měřením rozdrceny (pro IČ a Ramanovu spektrometrii).

Ramanova spektra celých i rozdrcených kuliček homeopatika byla měřena pomocí FT-IR/NIR spektrometru Equinox 55 firmy Bruker Optik opatřeném Ramanovým modulem FRA 106/S a germaniovým detektorem chlazeným kapalným dusíkem. Zdrojem budícího záření byl Nd-YAG laser (Coherent, USA) s výstupním paprskem o vlnové délce 1064 nm (blízká infračervená oblast) a s nastaveným výkonem na laserové hlavici 280 mW. Spektrometr byl dále vybaven TLC nástavcem, který sloužil k polohování vzorku ve směrech x-y-z.

Pro měření Ramanových spekter byla kulička homeopatika vložena do skleněné vialky, která byla umístěna do kyvetového prostoru spektrometru. Po nastavení vhodné polohy kuličky vůči excitujícímu paprsku a sběrné optice byla snímána Ramanova spektra s rozlišením 4 cm^{-1} a akumulací 512 skenů na jedno spektrum. V třecí misce připravená drť z kuliček byla nasypána do kovového kalíšku a zhutněna ocelovou tyčinkou. V případě rozdrcených kuliček byly parametry samotného měření Ramanových spekter shodné s předchozím měřením celých tablet.

Infračervená spektra obou typů extraktů a drti z kuliček homeopatika byla měřena na FTIR spektrometru Nicolet 6700 (Thermo, USA). Jako zdroj záření sloužila keramická globarová tyčinka a k detekci byl použit DTGS detektor. Měření probíhalo technikou zeslabeného úplného odrazu (Attenuated Total Reflectance – ATR) za použití jednodrazového nástavce opatřeného horizontálním ZnSe krystalem. Při měření technikou ATR byl vzorek (extrakt či drť z kuliček homeopatického přípravku) nanesen přímo na krystal. Vždy bylo měřeno nejprve jednopaprskové spektrum pozadí, poté jednopaprskové spektrum vzorku. Ukládaná spektra byla zaznamenávána jako průměr ze 128 po sobě následujících skenů s rozlišením 4 cm^{-1} .

Extrakty z heřmánkového čaje a z homeopatického přípravku byly měřeny také elektronovou absorpční spektrometrií v UV-vis oblasti za použití dvoupraprskového disperzního spektrometru Varian Cary 300 SCAN. Extrakty homeopatického přípravku byly měřeny ve skleněné kyvetě s vnitřní tloušťkou 1 cm, zatímco extrakt čaje byl měřen v kyvetě o tloušťce 0,5 cm. UV-vis spektra byla porovnána v rozsahu 300–600 nm.

Zesílená Ramanova spektra terčíků s deponovanými vzorky byla měřena při různých excitačních vlnových délkách (633 nm, 1064 nm). Infračervená spektra byla zaznamenávána v reflexním módu s využitím nástavce pro difusní reflexi. Ramanova spektra při excitační vlnové délce

633 nm byla naměřena pomocí disperzního spektrometrického systému Labram 5/98 IM firmy Dilor-Jobin-Yvon (Horiba Group, Francie) vybaveném integrovaným optickým mikroskopem Olympus BX40 se sadou objektivů se zvětšením 10×, 50× a 100× a termoelektricky chlazeným CCD detektorem Spectrum One 3000. Jako zdroj excitačního záření sloužil interní He-Ne laser s emisní vlnovou délkou 633 nm. K ovládní spektrometru slouží osobní počítač se softwarem LabSpec (Dilor, Francie). Pod objektiv mikroskopu byl umístěn referenční křemíkový plátek a ve vizuálním režimu byl laser zaostřen. Poté byl pod objektiv umístěn terčík a přístroj byl přepnut do režimu měření, které bylo prováděno se středním rozlišením cca 4 cm^{-1} .

Deponované vrstvy na terčících byly stejně jako samotné tablety homeopatického přípravku měřeny na FT-IR/NIR spektrometru Equinox 55 při excitační vlnové délce 1064 cm^{-1} . K mapování byl využit TLC nástavec s držákem terčíků. Pomocí počítače vybaveného softwarem OPUS (Bruker) byla řízena poloha nástavce s terčíkem, tak aby mohla být zaznamenána spektrální mapa. Na každém z terčíků bylo vždy proměřeno dohromady 9 bodů (čtverec 3×3 body) při výkonu laseru (u hlavice) 280 mW s rozlišením 4 cm^{-1} a akumulací 512 skenů na jednotlivé spektrum.

Zesílená infračervená spektra terčíků byla měřena difusně-reflexní technikou na FTIR spektrometru Nicolet 6700 (Thermo, USA). K tomuto účelu byl použit difusně-reflexní nástavec Smart DRIFT (Thermo). Všechna spektra byla stejně jako v případě měření extraktů a drti z tablet homeopatika snímána s rozlišením 4 cm^{-1} s akumulací 128 skenů na jednotlivé spektrum. Nejprve bylo vždy změněno pozadí na referenčním zlatém zrcátku, poté byly měřeny terčíky z jedné i druhé strany.

Výsledky a diskuse

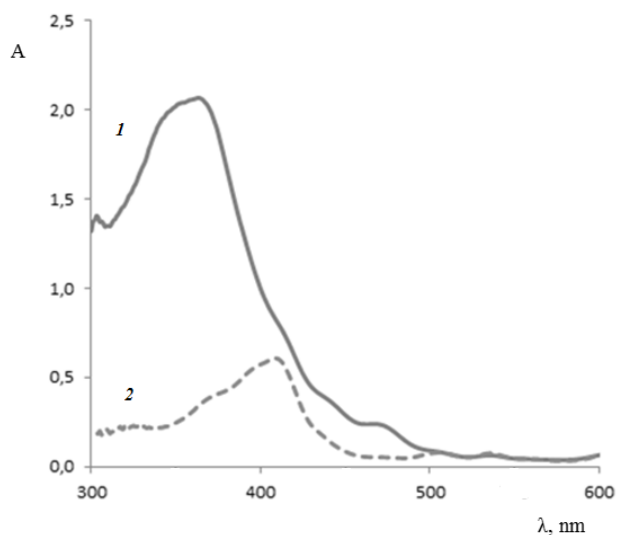
Při zpracování zesílených infračervených spekter získaných pomocí difusně reflexní techniky od sebe byly vždy odečteny spektra naměřená z horní strany terčíku (strana s deponovaným vzorkem) a ze spodní strany terčíku (strana s minimální depozicí vzorku). Takto byla získána diferenční spektra, od nichž bylo odečteno korekční spektrum (korekce vodní páry a vzdušného CO_2 , případně byla upravena základní linie).

Extrakty z heřmánkového čaje i z homeopatického přípravku byly měřeny pomocí elektronové absorpční spektroskopie. Ze spektra (obr. 1) je patrné, že homeopatický preparát *Chamomilla vulgaris* obsahuje kromě sacharosy i jiné látky způsobující absorpční pás v oblasti okolo 400 nm. Nicméně extrakt z heřmánkového čaje poskytuje významně intenzivnější spektrum s intenzivním pásem okolo 350 nm a několika raménky okolo 400, 440 a 470 nm.

Byla srovnávána infračervená spektra drti z tablet homeopatika (1) a samotné sacharosy (2), aby se zjistilo, ve kterých pásech spektra se tablety homeopatického pří-

pravku liší od obyčejného cukru. Ačkoli se na první pohled zdají spektra téměř stejná, po jejich odečtení (3) je patrný rozdíl. Diferenční spektrum bylo dále porovnáváno se zesíleným infračerveným spektrem extraktu *Chamomilla vulgaris* (4) deponovaném na pozlaceném terčíku (předtím upraveném pomocí ORC). Spektra jsou znázorněna na obr. 2.

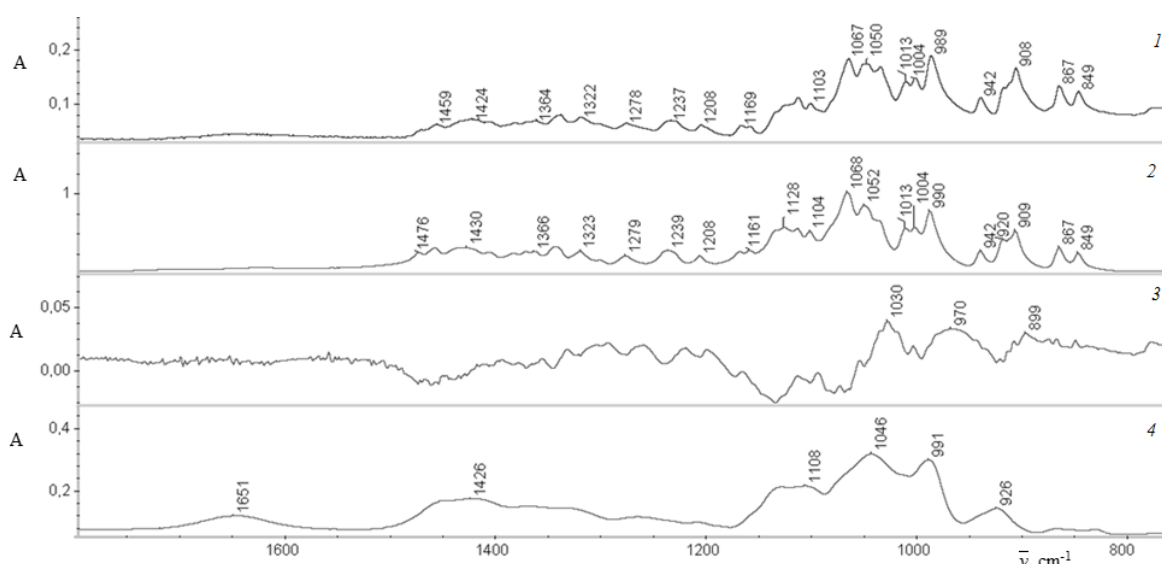
V diferenčním spektru tablety a sacharosy pozorujeme pásy nenáležící sacharose, a to především pásy okolo



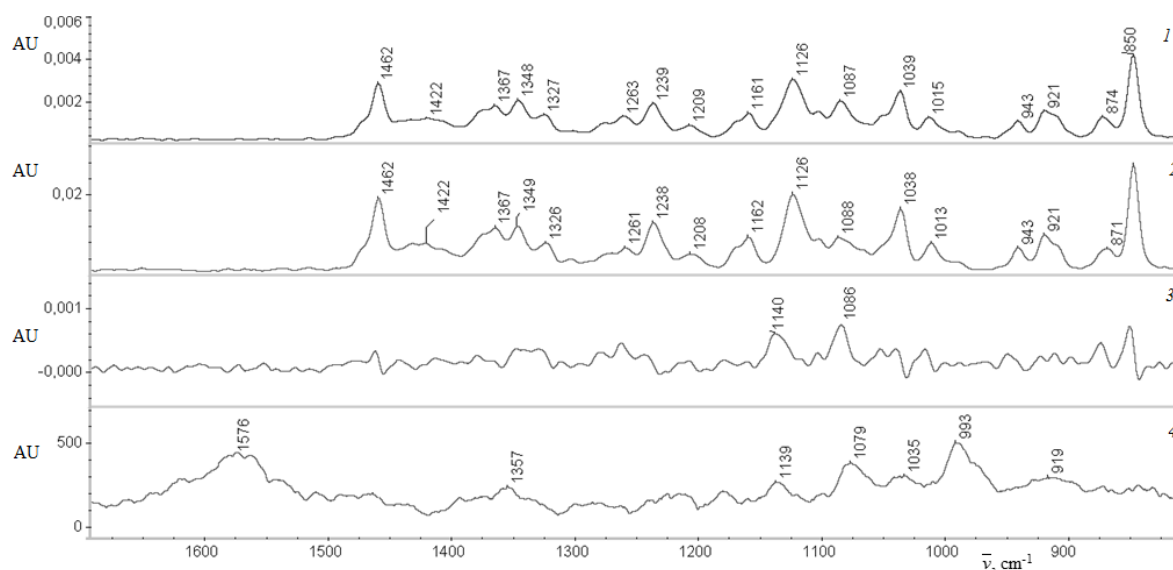
Obr. 1. UV spektra methanolicých extraktů z čaje (1) a homeopatického přípravku (2)

1030 cm^{-1} a 970 cm^{-1} , jejichž analogy posunutě o cca 15 až 20 cm^{-1} k vyšším vlnočtům (tj. při 1046 cm^{-1} , 991 cm^{-1}) se objevují i v SEIRA spektru terčíku s deponovaným extraktem z homeopatika. Tyto pásy přísluší valenčním vibracím C-O vazeb zatím neidentifikovaných složek homeopatického přípravku. SEIRA spektrum bylo naměřeno s minimální úrovní šumu. I tak je ale problémem obtížná identifikace látek z tohoto spektra, protože všechny zde pozorované pásy jsou široké pravděpodobně kvůli neuspořádanému systému molekul na povrchu terčíku. Navíc v důsledku adsorpce látek na povrch kovu obecně dochází v SEIRA spektrech k určitému posunu pásů. Přesto se ale můžeme domnívat, že i pásy sacharosy byt' v nižší intenzitě a posunutě se objevují i v SEIRA spektru (například pásy okolo 1279 cm^{-1} , 1239 cm^{-1} a 1208 cm^{-1}).

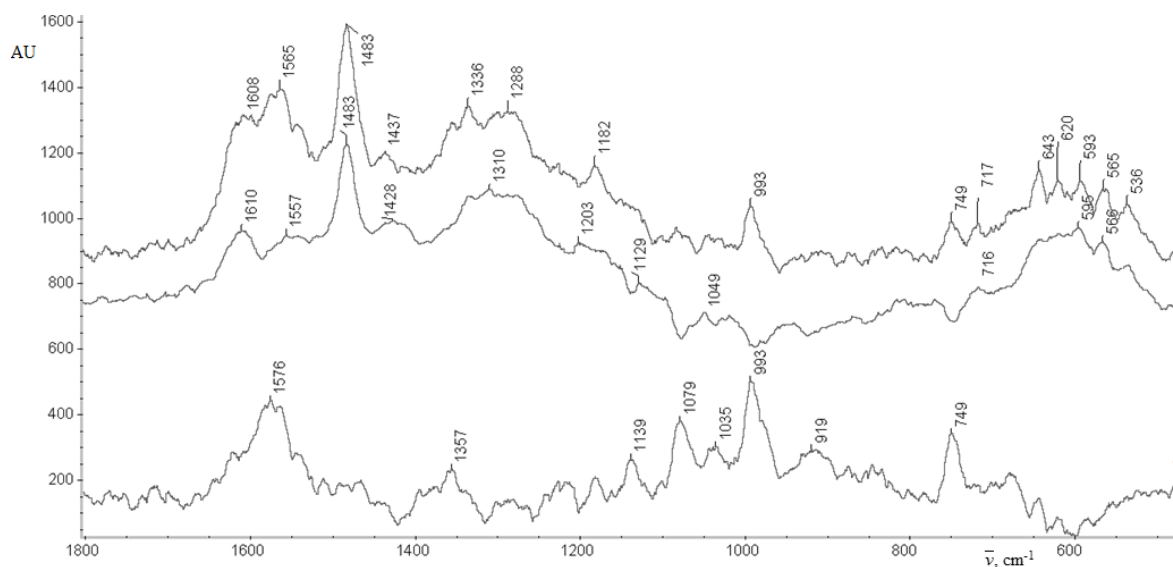
Analogické srovnání bylo provedeno i v případě sady Ramanových spekter (obr. 3). I v tomto případě je spektrum samotné tablety na první pohled téměř shodné se spektrem sacharosy. V diferenčním spektru je opět vidět malý rozdíl, především v případě pásů v oblasti 1140 cm^{-1} a 1086 cm^{-1} . Téměř shodné pásy se objevují i v SERS spektru extraktu homeopatika na terčíku (1139 cm^{-1} a 1079 cm^{-1}), které tedy poukazují, že v extraktu je obsažena jiná látka resp. jiné látky než sacharosa. Intenzivní pás sacharosy v oblasti 1462 cm^{-1} , za nějž je zodpovědná deformační vibrace CH_2 skupin, se již prakticky neobjevuje (nad úrovní šumu) v SERS spektru přípravku *Chamomilla vulgaris*. Naproti tomu se ve spektru depozitu na terčíku objevují pásy (1576 cm^{-1} , 1357 cm^{-1} , 993 cm^{-1}), které se neshodují s pásy ve spektrech sacharosy a tablety. Můžeme proto usuzovat, že do methanolického extraktu přešly především ostatní organické látky obsažené v homeopatickém přípravku.



Obr. 2. Srovnání infračervených spekter výchozí homeopatické tablety (1), sacharosy (2), jejich diferenčního spektra (3) a zesíleného spektra (SEIRA) extraktu homeopatika na pozlaceném terčíku (4). Spektra byla měřena při excitační vlnové délce 1064 nm



Obr. 3. Srovnání Ramanových spekter homeopatické tablety (1), sacharosy (2), jejich diferenčního spektra (3) a zesíleného spektra (SERS) extraktu homeopatika na pozlaceném terčíku (4). Spektra byla měřena při excitační vlnové délce 1064 nm



Obr. 4. Srovnání zesílených Ramanových spekter homeopatické tablety (3), extraktu z heřmánkového čaje na pozlaceném terčíku (1) a jejich odečet (2), měřeno při excitační vlnové délce 633 nm

Aby bylo možné porovnat pásy SERS spektra extraktu homeopatika (3), které se neshodují se sacharosou, s pásy SERS spektra extraktu heřmánkového čaje (1), byla tato spektra od sebe odečtena (2). Porovnání spekter včetně odečtu je na následujícím obrázku (obr. 4).

SERS spektrum extraktu z tablety homeopatika je

poměrně slabé, ale jak se ukazuje, opravdu obsahuje některé pásy pozorované v extraktu z heřmánku (především pásy 1576 cm^{-1} , 993 cm^{-1}). Ve spektru extraktu heřmánkového čaje jsou však vidět další pásy, které jsou zřetelné v diferenčním spektru. Jsou to hlavně pásy okolo 1610 cm^{-1} , 1483 cm^{-1} , 1310 cm^{-1} a 1203 cm^{-1} , odpovídající fenolic-

kým látkám obsaženým v heřmánku⁴ (nejsou však nad úrovní šumu patrné ve spektru extraktu z homeopatika). SERS spektrum extraktu z tablety homeopatika je poměrně slabé, ale jak se ukazuje, opravdu obsahuje některé pásy pozorované v extraktu z heřmánku (především pásy 1576 cm⁻¹, 993 cm⁻¹).

Z uvedených SERS a SEIRA spekter a i dalších referenčních měření je patrné, že kromě „cukru“ obsahuje homeopatický přípravek i další látky. Jejich identifikace se zatím nepodařila, k tomu bude třeba analyzovat další referenční systémy a provést podrobnější interpretaci spekter s využitím dalších literárních zdrojů.

LITERATURA

1. Aroca R: *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*. J. Wiley, Londýn 2006.
2. Cieslarová Z., Matějka P.: Chem. Listy 106, 224 (2012).
3. Prokopec V.: *Disertační práce*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2010.
4. Harbourne N., Jacquier J. C., O’Riordan D.: Food Chem. 115, 15 (2009).

D. Vavřínová^a and P. Matějka^b (^a Department of Analytical Chemistry, ^b Department of Physical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague): **Potential Application of Surface-Enhanced Vibration Spectroscopy Techniques in Analysis of a *Chamomilla vulgaris* Preparation**

The extracts of a homeopathic *Chamomilla vulgaris* preparation and chamomile tea were analyzed by surface-enhanced Raman scattering and surface-enhanced IR spectroscopies. The aqueous or methanolic extracts were deposited on nanostructured, electrochemically prepared Au surfaces. Only saccharose was identified reliably in homeopathic sample. The presence of other component is evident but they could not be identified.