

# Reforma a rozvoj výuky Biofyziky pro potřeby 21. století

Číslo výzvy: **IPo - Oblast 2.2 (výzva 15)**

Reg. č. projektu: **CZ.1.07/2.2.00/15.0215**



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# **Spektroskopická elipsometrie s využitím plazmonové rezonance**

**Dušan Hemzal**

Ústav fyziky kondenzovaných látek

## **Obsah**

### **plazmové oscilace**

volné plazma elektronů  
objemové a povrchové vlny

### **modelování optické odezvy**

vrstevnatý systém  
reflektivita

motivace: biacore

dynamika rovnovážných reakcí

### **korejská aparatura TIRE**

vlastní měření  
citlivost TIRE

## Plazma volných elektronů

Uvažujme pohyb elektronů v plazmatu,

$$m(\ddot{\vec{x}} + \Gamma \dot{\vec{x}} + \Omega^2 \vec{x}) = q\vec{E}.$$

Předpokládejme  $\vec{E}, \vec{x} \approx \exp(i\omega t)$ . Potom

$$m(-\omega^2 - i\omega\Gamma + \Omega^2)\tilde{x} = q\tilde{E},$$

odkud

$$\tilde{x}(\omega) = \frac{q}{m} \frac{\tilde{E}(\omega)}{\Omega^2 - \omega^2 - i\omega\Gamma}.$$

Polarizace  $\tilde{P} = \varepsilon_0 \chi \tilde{E}$ , definovaná jako dipólový moment objemové jednotky, je v našem případě vyjádřena jako  $\tilde{P} = nq\tilde{x}$ , kde  $n$  je koncentrace elektronů v plazmatu, tedy

$$\chi = \frac{\omega_p^2}{\Omega^2 - \omega^2 - i\omega\Gamma}$$

kde jsme prozatím označili  $\omega_p^2 = nq^2/(\varepsilon_0 m)$ . Vztah mezi susceptibilitou a permitivitou určuje  $\vec{D} = \varepsilon_0 \vec{E} + \vec{P} = \varepsilon \varepsilon_0 \vec{E}$ , odkud dostáváme

$$\varepsilon = 1 + \chi = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \Gamma^2} + i \frac{\omega_p^2 \Gamma}{\omega(\omega^2 + \Gamma^2)}$$

pro  $\Omega = 0$ , což je případ volných částic plazmatu.

## Disperzní relace

V ideálním (bezsrážkovém) plazmatu dále platí  $\Gamma = 0$ , což pro permitivitu dává

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2},$$

kde  $\varepsilon_\infty$  zahrnuje příspěvek iontů k polarizaci. Dosadíme-li do vlnové rovnice

$$\mu_0 \frac{\partial^2 \vec{D}}{\partial t^2} = \nabla^2 \vec{E},$$

dostáváme

$$\mu_0 \varepsilon_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} \left[ \left( \varepsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \right) \vec{E} \right] - \nabla^2 \vec{E} = 0,$$

přičemž  $\mu_0 \varepsilon_0 = 1/c^2$ . Předpoklad

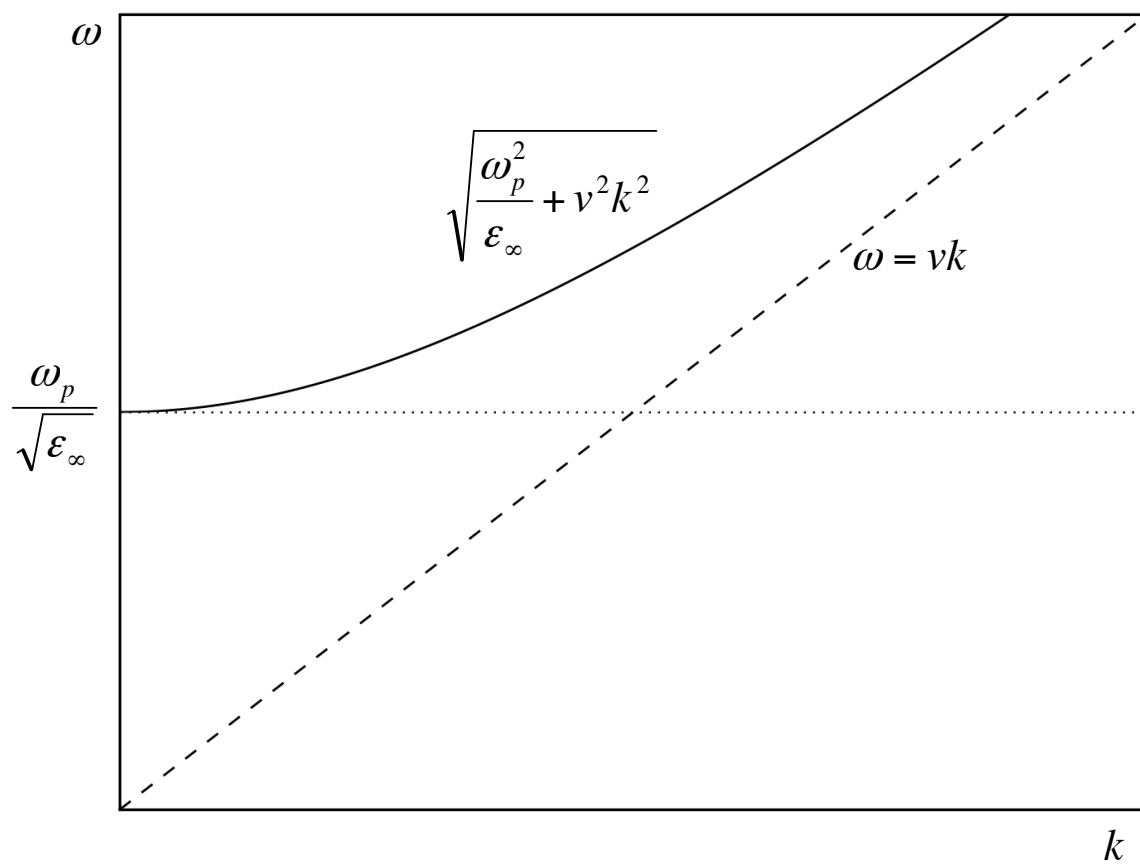
$$\vec{E} \approx \exp(i[\vec{k}\vec{r} - \omega t])$$

pak konečně přináší

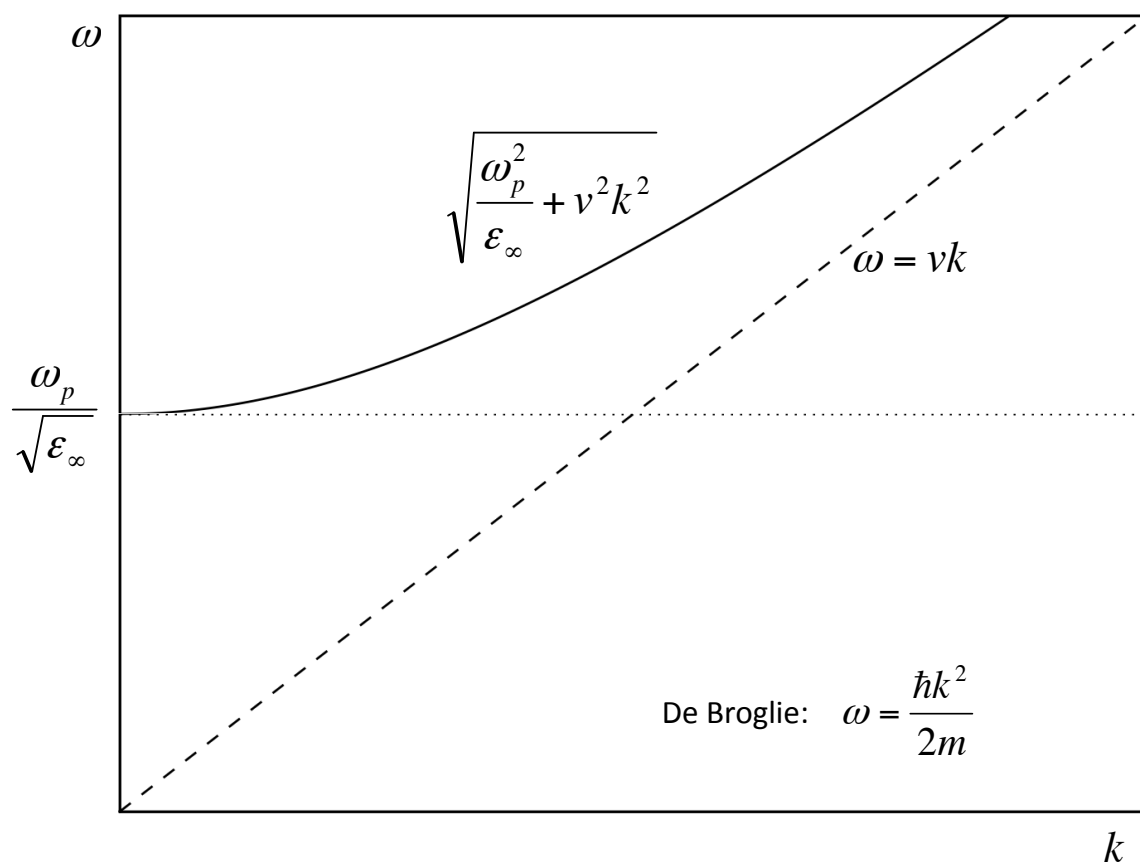
$$\omega = \sqrt{\frac{\omega_p^2}{\varepsilon_\infty} + v^2 k^2},$$

kde  $k^2 = \vec{k} \cdot \vec{k}$  a  $v^2 = c^2 / \sqrt{\varepsilon_\infty}$  je rychlost šíření elmag vlny ve zvoleném prostředí.

disperze objemového plazmonu



disperze objemového plazmonu



## Objemové vlny

Disperzní relaci lze přepsat do tvaru

$$\omega^2 - \frac{\omega_p^2}{\sqrt{\varepsilon_\infty}} = v^2 k^2.$$

$\omega < \omega_p / \sqrt{\varepsilon_\infty}$ :

$k$  je ryze imaginární

vlny v plazmatu nepostupují

při vnějším dopadu na rozhraní materiálu dochází k totálnímu odrazu.

(V reálných materiálech vlna postupuje, ale je tlumena.)

$\omega > \omega_p / \sqrt{\varepsilon_\infty}$ : v plazmatu se šíří postupné příčné vlny.

Vraťme se k permitivitě

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2},$$

Vlastní kmity látky se dějí v místech, kde má  $\varepsilon$  póly;

vzhledem k použitému zjednodušení  $\Omega = 0$  dostáváme pouze kořen  $\omega = 0$ .

Podélné módy jsou definovány podmínkou  $\varepsilon(\omega_l) = 0$ . V našem případě

$$\omega_l = \omega_p / \sqrt{\varepsilon_\infty},$$

čili ve volném ideálním plazmatu se může šířit podélný mód o plazmové frekvenci.

## Povrchové vlny

Kromě objemových vln předchozího odstavce mají makroskopické Maxwellovy rovnice

$$\nabla \times \vec{H} = \varepsilon \varepsilon_0 \dot{\vec{E}} \quad \nabla \cdot \vec{H} = 0$$

$$\nabla \times \vec{E} = -\mu_0 \dot{\vec{H}} \quad \nabla \cdot (\varepsilon \varepsilon_0 \vec{E}) = 0$$

v nepřítomnosti volných nábojů a proudů ještě jedno řešení, úzce spjaté s rozhraním plazmového prostředí. Toto řešení odpovídá objemové p-polarizované vlně ( $\vec{H} \parallel$  s rozhraním)

$$\vec{E} = (E_x, 0, E_z) e^{-\kappa|z|} e^{i(kx - \omega t)} \quad \vec{H} = (0, H_y, 0) e^{-\kappa|z|} e^{i(kx - \omega t)},$$

přičemž okrajovým podmínkám (spojité  $E_x$ ,  $\varepsilon E_z$ ,  $H_y$  na rozhraní) vyhoví pouze disperzní relace a útlumy

$$k = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}} \quad \kappa^2 = \varepsilon \frac{\omega^2}{c^2} - k^2$$

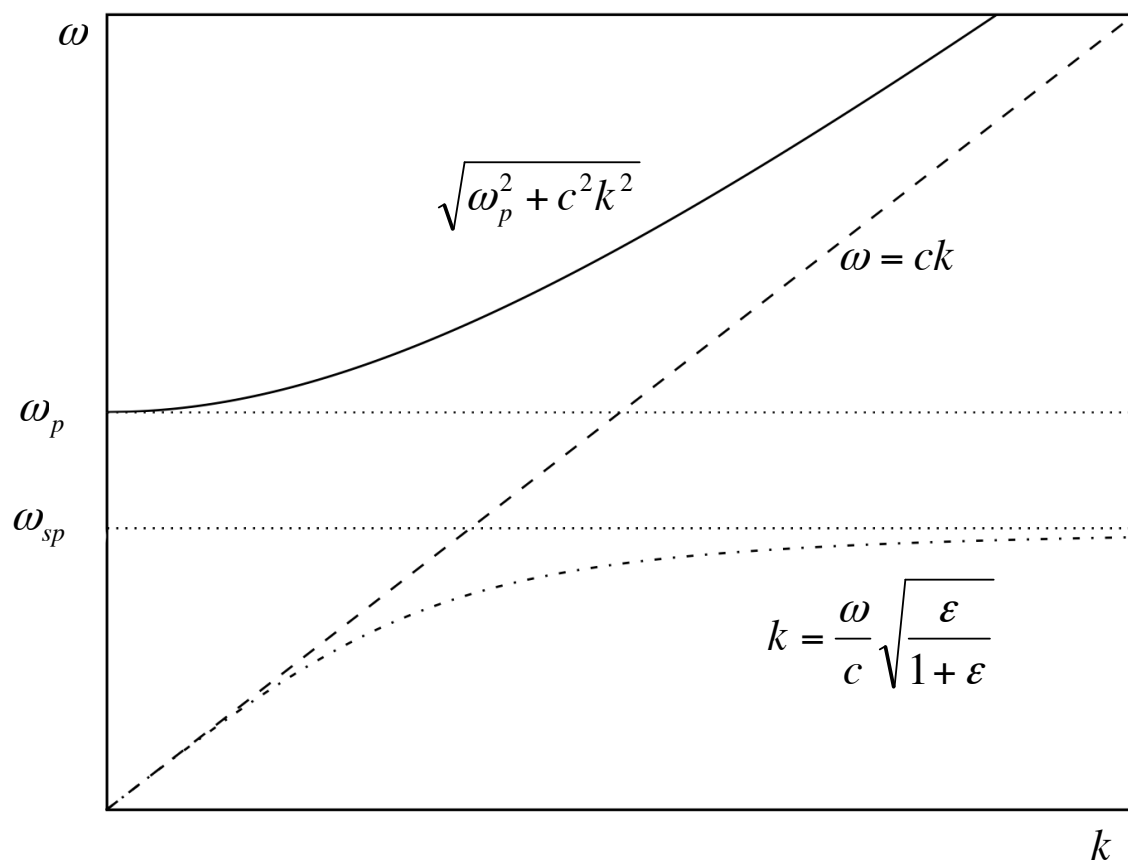
V krátkovlnné limitě (při  $\varepsilon_\infty \approx 1$ ) dostáváme

$$\omega_{sp} = \sqrt{\frac{\omega_{p1}^2 + \omega_{p2}^2}{2}}.$$

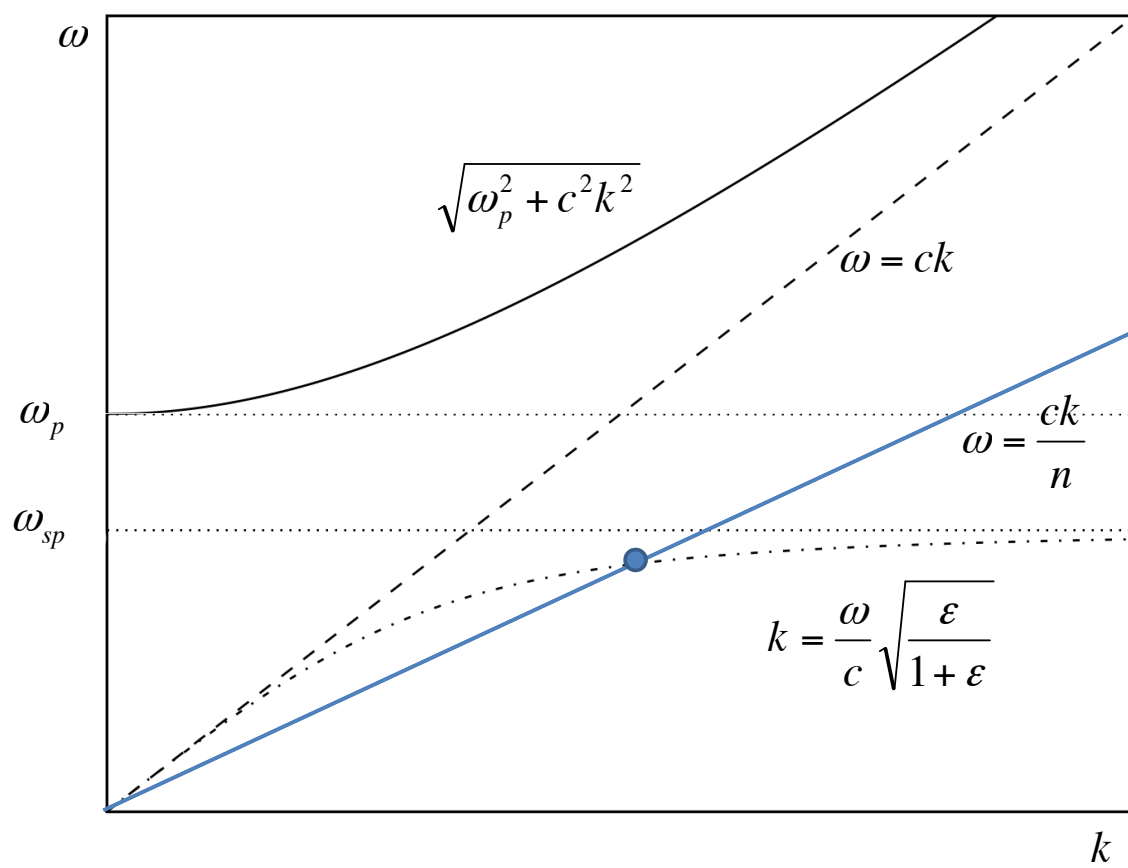
Ve vakuu (vzduchu) se mohou šířit vlny všech frekvencí, a klademe v něm tedy  $\omega_p = 0$ , což na rozhraní s kovem přináší

$$\omega_{sp} = \frac{\omega_p^2}{\sqrt{2}}.$$

disperze povrchového plazmonu na rozhraní se vzduchem



disperze povrchového plazmonu na rozhraní se vzduchem

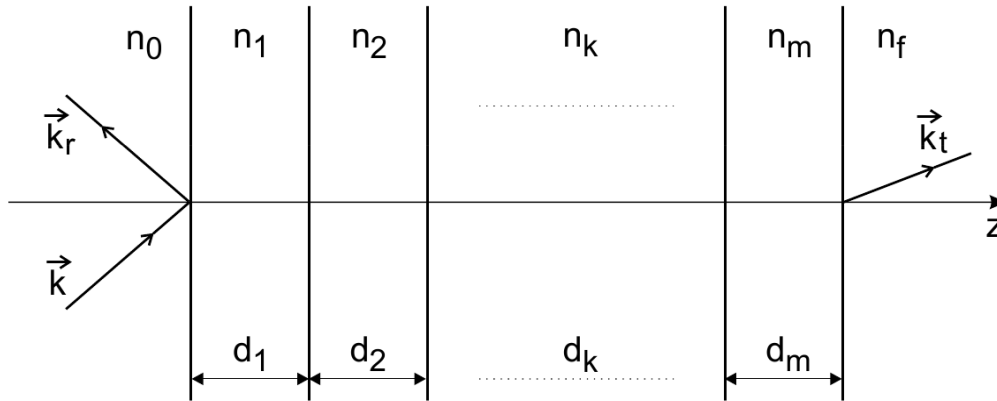


## Optická odezva multivrstev

úhel dopadu na  $j$ -topu vrstvu:  $\cos \varphi_j = \sqrt{1 - \left( \frac{n_a \sin \varphi}{n_j} \right)^2}$

optická dráha v  $j$ -té vrstvě:

$$\theta_j = 2\pi \frac{d_j}{\lambda} n_j \cos \phi_j$$



$$\begin{bmatrix} E_i \\ E_r \end{bmatrix} = (V_0)^{-1} (R_1)^{-1} \dots (R_m)^{-1} V_f \begin{bmatrix} E_t \\ 0 \end{bmatrix}$$

## Počtení přístup

polarizačně závislé definice:

$$s : \tilde{n}_j = n_j \cos \varphi_j \quad p : \tilde{n}_j = \frac{n_j}{\cos \varphi_j}$$

polarizačně nezávislé vztahy

$$(R_j)^{-1} = \begin{pmatrix} \cos \theta_j & -\frac{i \sin \theta_j}{\tilde{n}_j} \\ -i \tilde{n}_j \sin \theta_j & \cos \theta_j \end{pmatrix}$$

$$\tilde{V}_f = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \tilde{n}_f & -\tilde{n}_f \end{pmatrix} \quad (\tilde{V}_0)^{-1} = \begin{pmatrix} -\tilde{n}_0 & -1 \\ -\tilde{n}_0 & 1 \end{pmatrix}$$

celkem:

$$\begin{bmatrix} a \\ b \end{bmatrix} = (\tilde{V}_0)^{-1} (R_1)^{-1} \dots (R_m)^{-1} \tilde{V}_f \begin{bmatrix} E_t \\ 0 \end{bmatrix}$$

Pro s- i p- polarizace jsou definovány koeficienty odrazivosti jako

$$r = \frac{E_r}{E_i} = \frac{b}{a}$$

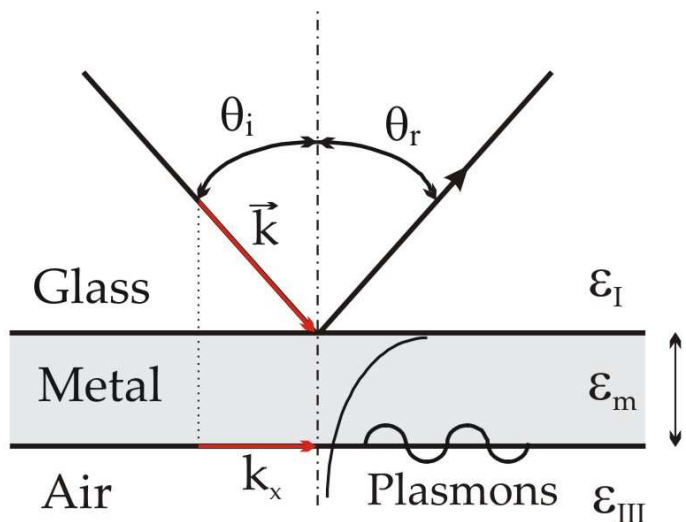
takže je možno modelovat elipsometrické veličiny:

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \tan \Psi \exp(i\Delta)$$

*Pozn: matice  $\tilde{V}_0^{-1}$  ve skutečnosti není inverze  $\tilde{V}_0$ ; pro jednoduchost (koeficienty odrazivosti vznikají podílem), byl vytknut společný faktor, takže vztah k elektrickému poli je celkem*

$$s : \begin{bmatrix} E_i \\ E_r \end{bmatrix} = -\frac{1}{2\tilde{n}_0} \begin{bmatrix} a \\ b \end{bmatrix} \quad p : \begin{bmatrix} E_i \\ E_r \end{bmatrix} = -\frac{1}{2\tilde{n}_0 \cos \varphi_0} \begin{bmatrix} a \\ b \end{bmatrix}.$$

## reflektivita vrstevnatého systému



### Kretschamnnova konfigurace:

správný průmět vlnového vektoru zajišťuje skleněný hranol

na jeho povrchu je napařena vrstvička Au (50 – 100 nm)

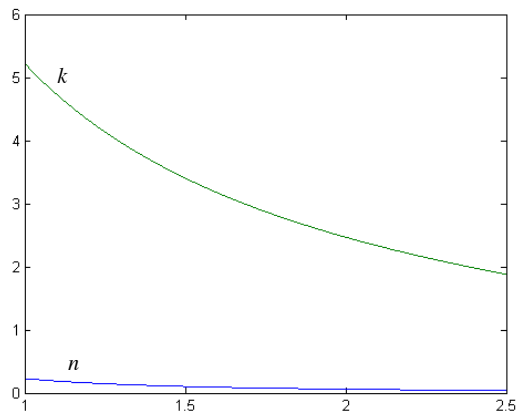
plazmony vznikají na vnějším rozhraní zlata (zpravidla s vodným roztokem)

$$R_p = \left| \frac{r_{gm}^p + r_{ga}^p \exp(2ikd)}{1 + r_{gm}^p r_{ga}^p \exp(2ikd)} \right|^2$$

odrazivost p-složky vykazuje ostrý pokles v místě rezonance dopadajícího záření s povrchovou plazmonovou frekvencí

jiné konfigurace: Ottova, difrakční mřížka

## optická odezva zlata

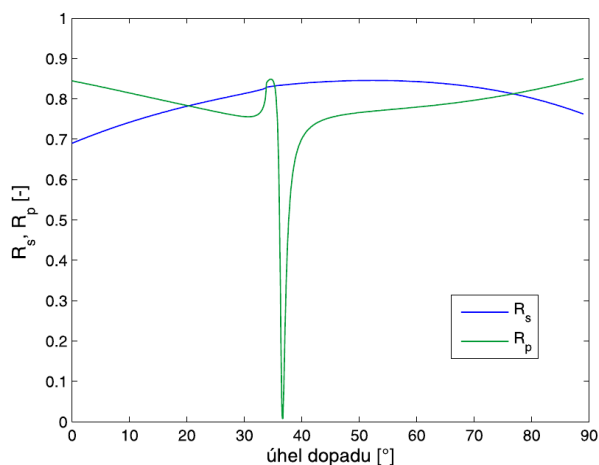


v souladu s Drudeho modelem,

$$n = \sqrt{1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \Gamma^2} + i \frac{\omega_p^2 \Gamma}{\omega(\omega^2 + \Gamma^2)}}$$

$$\omega_p = 33,45 \text{ eV} \quad \Gamma = 0.53 \text{ eV}$$

$$\text{Zeman 1987} \quad \omega_p = 8,89 \text{ eV} \quad \Gamma = 0.07 \text{ eV}$$



1.62/ 50 nm Au/ 1  
700 nm

**GE Healthcare: BIACORE 4000**

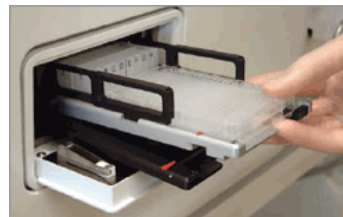
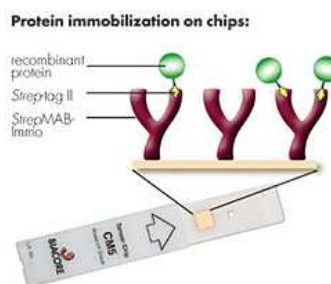
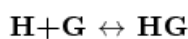
plně autoamtizovaný

cena: cca 10 mil. Kč

citlivost: ?

měření rezonanční reflektivity,  
na průmyslové úrovni:

- až 20 paralelních reakcí
- až 4800 vzorků denně

čipy: cca 50 nm Au na skle + například  
matrice 100 nm carboxymethyl-dextranvazba biomolekul na záporně nabitě carboxylové skupiny  
případně přímo na povrch čipuRychlost slučování komponent  $H$  a  $G$  je úměrná jejich koncentracím,

$$\frac{d[C]}{dt} = [H][G]k_{\text{on}},$$

kde hranaté závorky značí koncentraci,  $C$  je vznikající produkt a  $k_{\text{on}}$  ja konstanta úměrnosti. Produkt se zároveň rozpadá s rychlostí

$$\frac{d[C]}{dt} = [C]k_{\text{off}},$$

kde  $k_{\text{on}}$  je konstanta úměrnosti tohoto procesu. Celková změna v koncentraci produktu se tak skládá z obou předchozích příspěvků jako

$$\frac{d[C]}{dt} = [H][G]k_{\text{on}} - [C]k_{\text{off}}.$$

V rovnováze bude platit,  $d[C]/dt = 0$ , což přináší

$$\frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} = \frac{[C]}{[H][G]}.$$

Vystupující tři koncentrace nejsou nezávislé; pokud označíme indexem  $^0$  počáteční hodnoty, platí (v případě vazby 1:1)

$$[C] + [H] = [H]^0$$

neboť vznik produktu vyčerpává zásobu zdrojových látek.

## Časový průběh reakce

Dosazením předchozích definic vzniká diferenciální rovnice

$$\frac{d[C]}{dt} + ([G]k_{\text{on}} + k_{\text{off}})[C] = [H]^0[G]k_{\text{on}}.$$

Pokud udržíme  $[G]$  konstantní (například s pomocí průtokové cely), předchozí rovnice má konstantní koeficienty ( $\dot{C} + a[C] = b$ ) a tedy řešení

$$Y = \frac{b}{a} + bC \exp(-at),$$

kde  $C$  je integrační konstanta. Zafixujeme-li  $Y(0) = Y^0$ , získáváme konečně

$$[C] = \frac{[H]^0[G]k_{\text{on}}}{[G]k_{\text{on}} + k_{\text{off}}} + \left( [C]^0 - \frac{[H]^0[G]k_{\text{on}}}{[G]k_{\text{on}} + k_{\text{off}}} \right) \exp(-at).$$

*speciální případ:*  $[C]^0 = 0$

$$[C] = [C]^\infty [1 - \exp(-at)]$$

kde

$$[C]^\infty = \frac{[H]^0[G]k_{\text{on}}}{[G]k_{\text{on}} + k_{\text{off}}}$$

*v souladu s dříve odvozenou rovnovážnou hodnotou.*

*speciální případ:*  $[G] = 0$

$$[C] = [C]^0 \exp(-at)$$

## Vazebná konstanta reakce

Vrátíme se k rovnovážnímu stavu reakce  $H + G \leftrightarrow C$  a definujeme

$$K_a = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} = \frac{[C]}{[H][G]}.$$

Předpokládáme i nadále reakci s vazbou 1:1, a nechť je navíc opět  $[G]$  konstantní. Potom

$$K_a = \frac{[C]}{([H]^0 - [C])[G]} \quad [C] = \frac{[G]}{\frac{1}{K_a} + [G]} [H]^0$$

Všimněme si vlastností posledního vztahu:

$$[G] = 0 \Rightarrow [C] = 0$$

$$k_{\text{on}} \gg k_{\text{off}} \Rightarrow K_a \rightarrow \infty \Rightarrow [C] = [H]^0$$

$$k_{\text{on}} \ll k_{\text{off}} \Rightarrow K_a \rightarrow 0 \Rightarrow [C] = 0.$$

Měření průběhu reakce postupuju poměrně jednoduchým způsobem: zkoumaná veličina  $\delta$  má hodnotu  $\delta_0$  pro  $[C] = 0$  a hodnotu  $\delta_f$  for  $[C] = [H]^0$  pro zcela spotřebované reagenty. Aproximujeme-li například průběh  $\delta$  lineárně,

$$\delta = \delta_0 + \frac{[C]}{[G]^0} (\delta_f - \delta_0)$$

můžeme po dosazení do hořejšího vztahu pro  $[C]$  získat hodnotu  $K_a$  prokládáním naměřené závislosti.

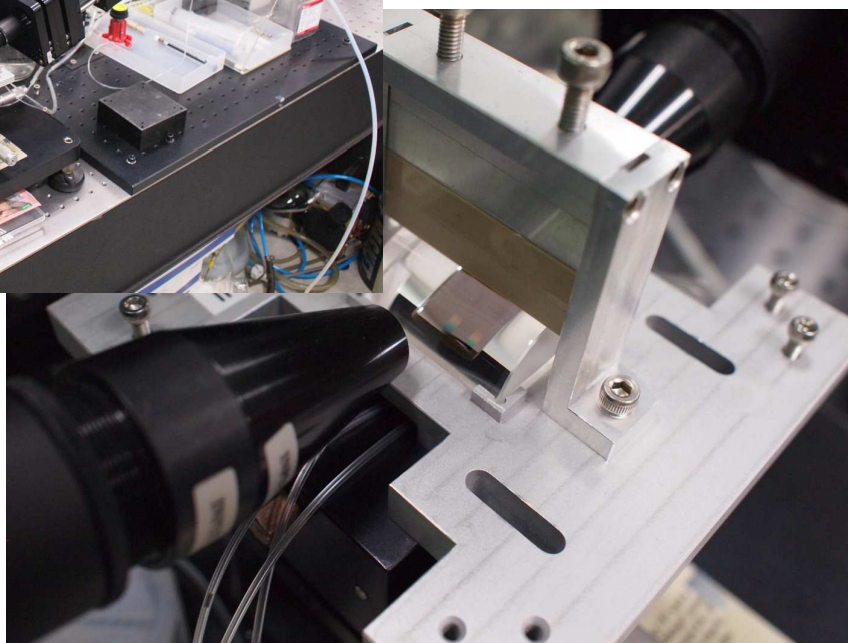
**Soul, 2011**



Woollam M-2000FI

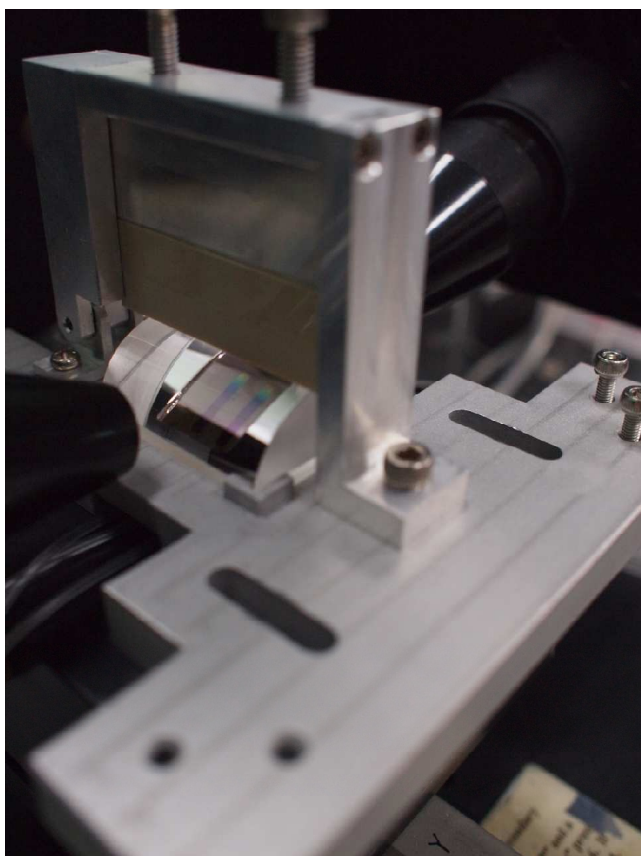
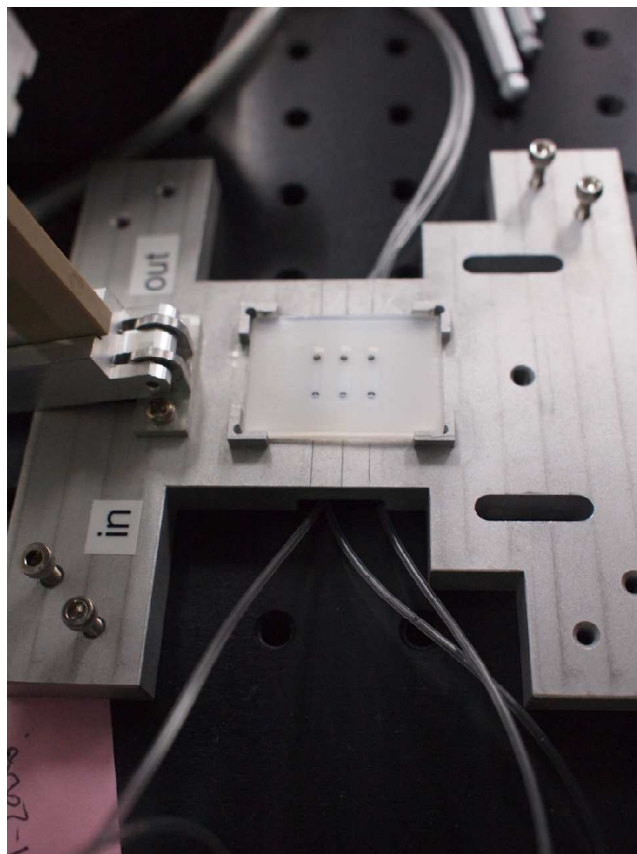
**TIRE, Soul**

fokusovaný svazek,  
stopa 40  $\mu\text{m}$



TIRE, Soul

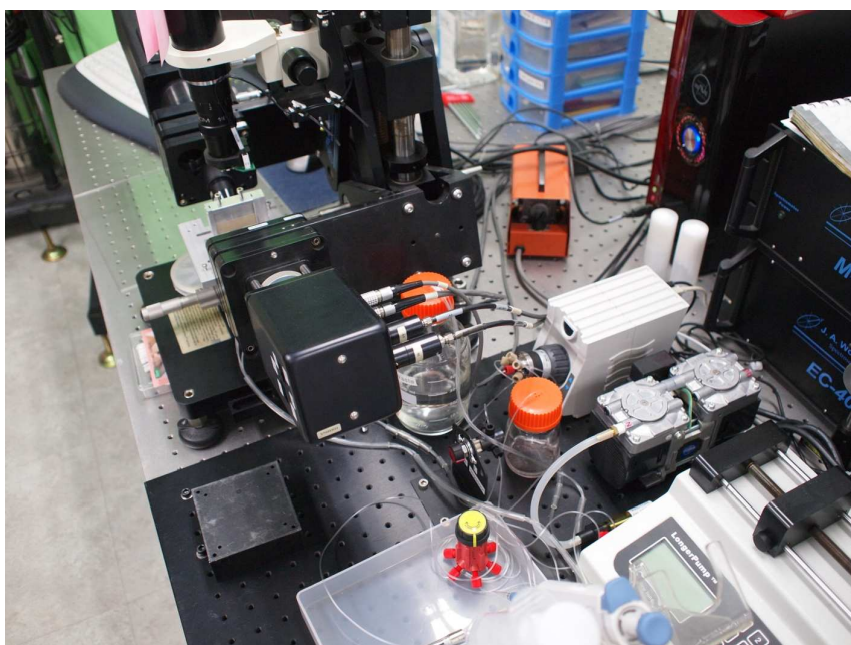
tři komůrky na čipu



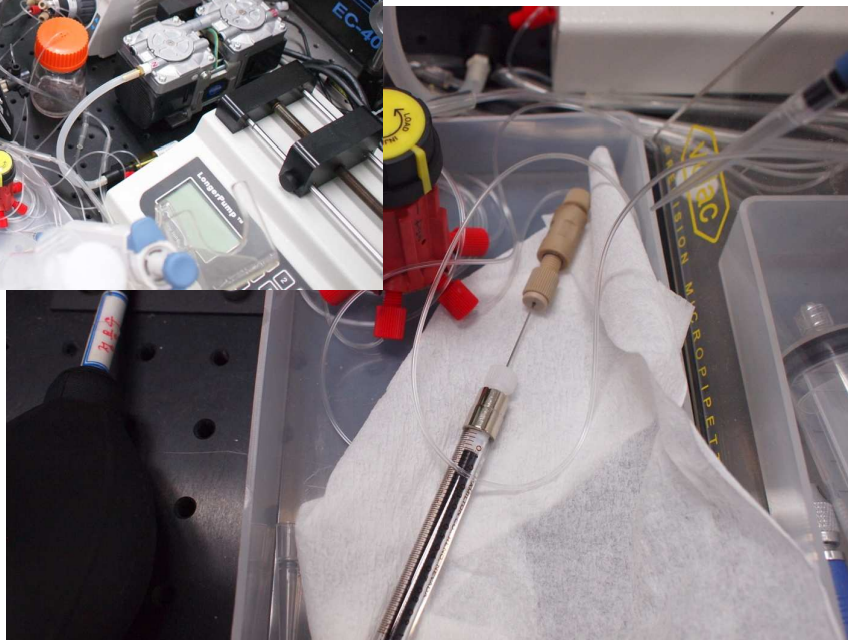
cylindrická čočka v roli vazby  
výměnná pozlacená destička

TIRE, Soul

injekce vzorku



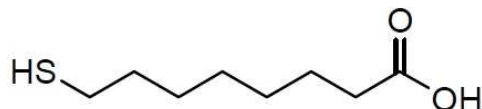
biofyzikální část aparatury



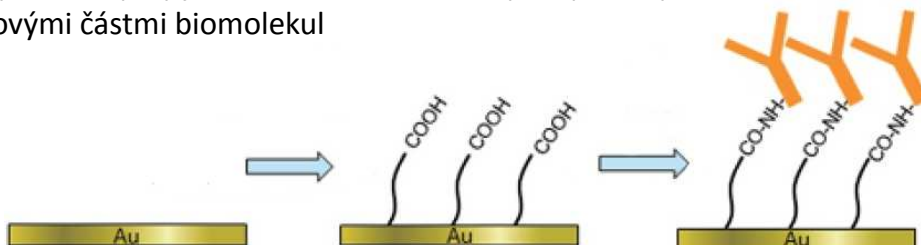
## specifická a nespecifická vazba

### specifická vazba:

karboxylové kyseliny mají tendence vytvářet samouspořádané (mono)vrstvy na zlatý povrch nasedají prostřednictvím sírových zakončení



Karboxylové skupiny jsou následně aktivovány do podoby, ve které snadno reagují s amidovými částmi biomolekul



tyto biomolekuly jsou vybírány tak, aby poskytovaly specifickou vazbu zkoumaným vzorkům

**nespecifická vazba:** vzorky se vážou přímo na povrch čipu, bez využití jeho aktivace

## měřené vzorky

fosfátový pufr PBS: pufrovaný fyziologický roztok

10  $\mu$ M HSA (human serum albumin), 67 kDa, 585 aminokyselin  
v krvi 0.5 – 0.8 mM

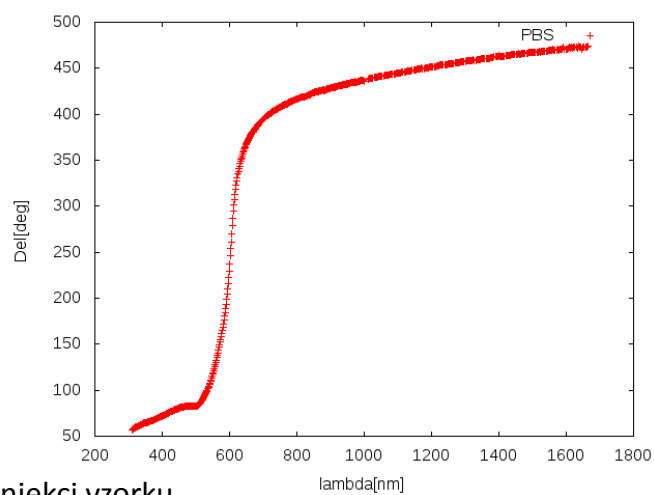
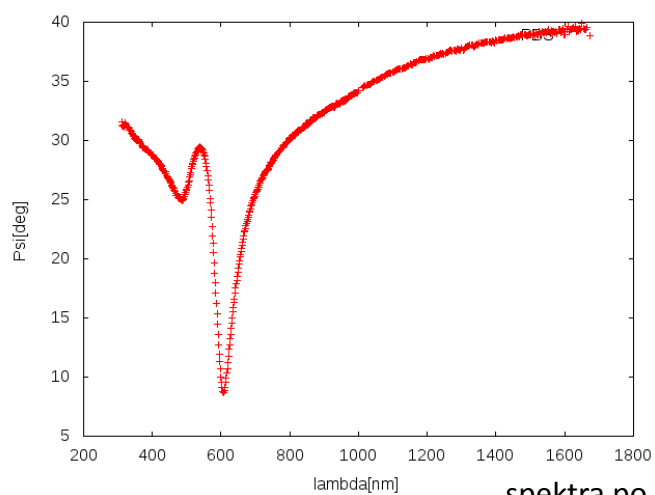
1 mM oligonukleotid, single strand tetramer , 1174 Da, 5'-AGCT-3'

úhel dopadu: 75°

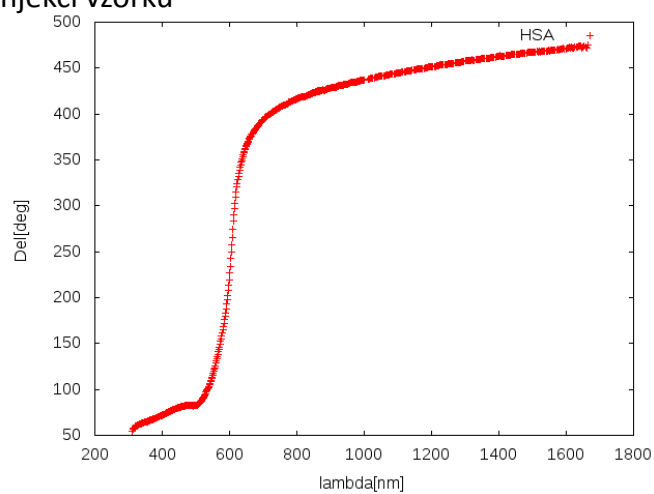
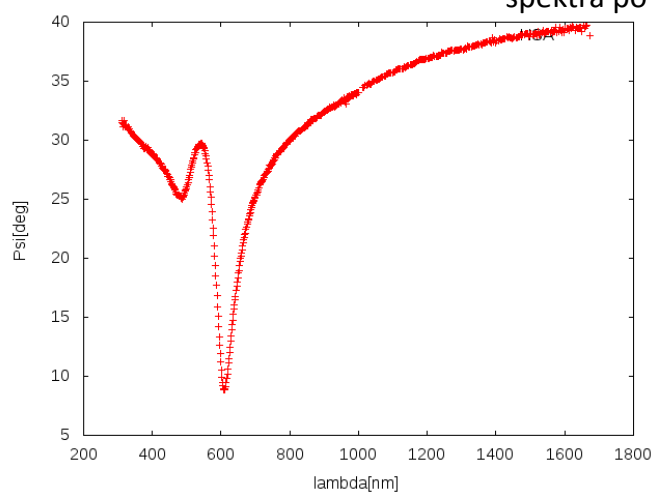
komora: BK7-Cr-Au

nespecifická vazba

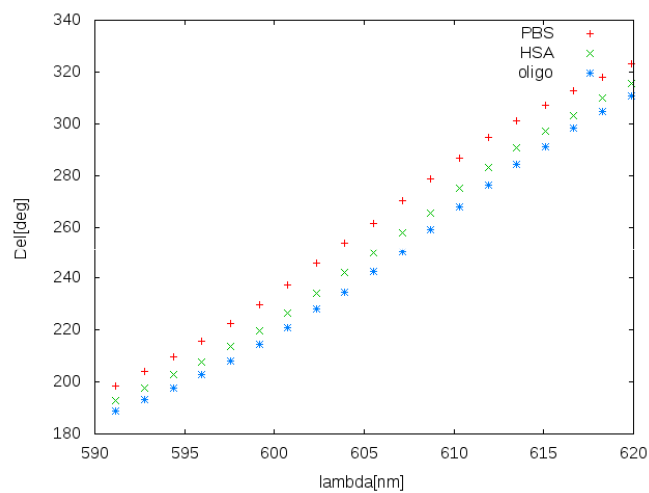
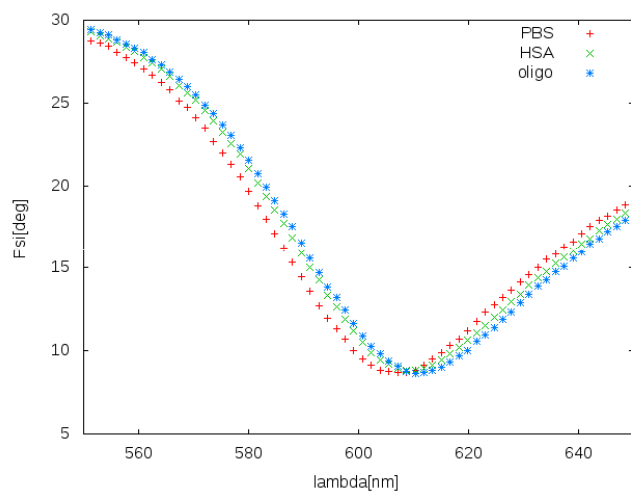
injekce: 4x 80  $\mu$ l, 250  $\mu$ l/min (oligo), 500  $\mu$ l/min HSA, start po 1 min

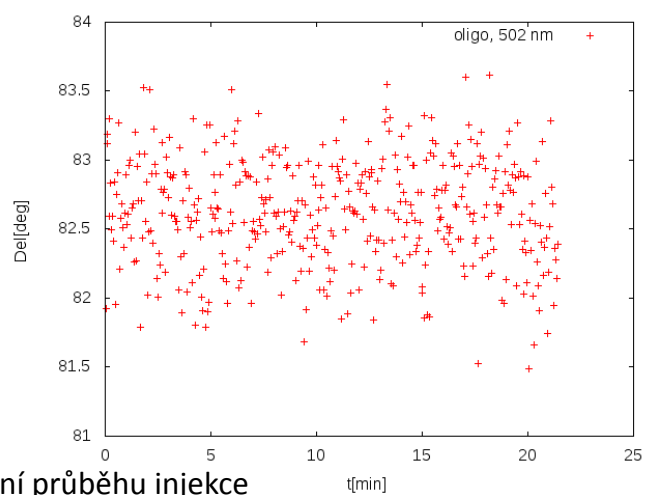
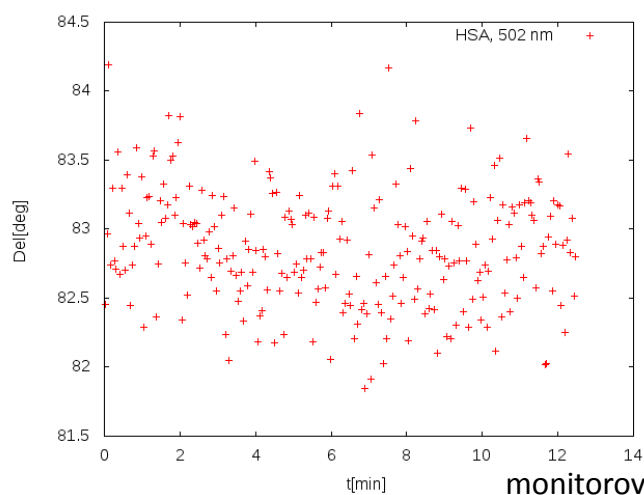


spektra po injekci vzorku

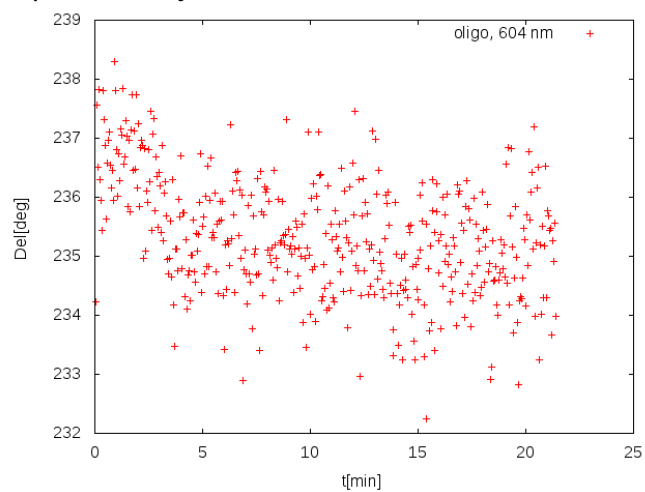
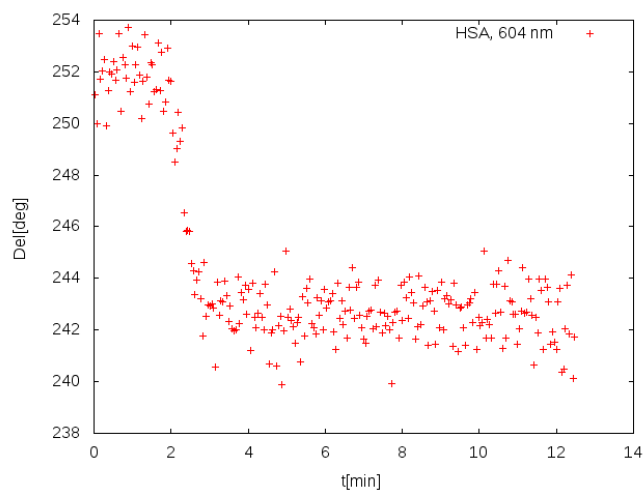


posun spektra po injekci vzorků

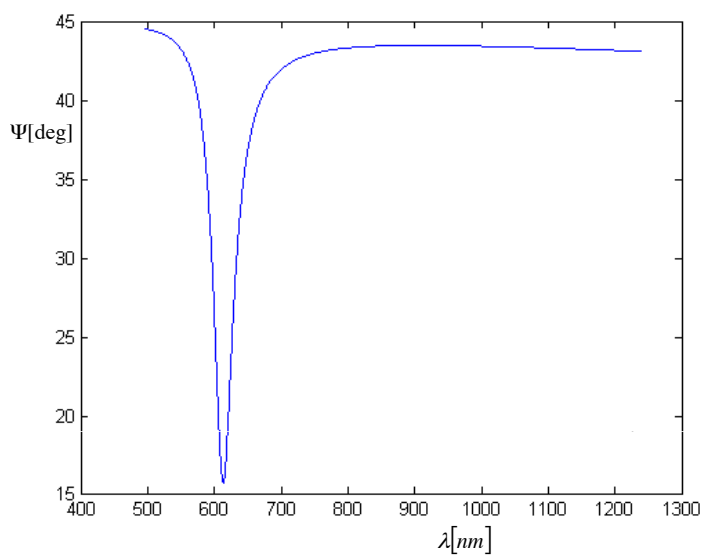




monitorování průběhu injekce

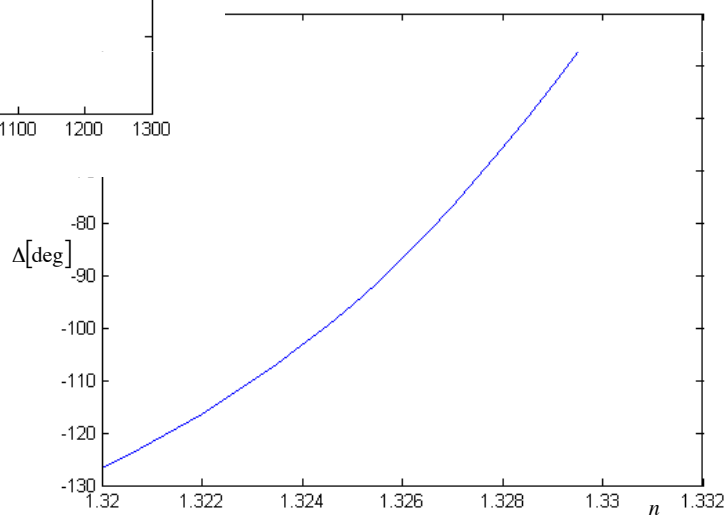


## modelování elipsometrické odezvy



1.55/ 80 nm Au/ 1.33

1.55/ 80 nm Au/ n  
600 nm



**díky za pozornost!**