

## TECHNIKY A APLIKACE POVRCHOVĚ ZESÍLENÉ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE SE ZAMĚŘENÍM NA UMĚLECKÁ DÍLA

ŠTĚPÁNKA KUČKOVÁ<sup>a,b,c,d</sup>, EZAT HAMIDI-ASL<sup>a</sup>,  
IRENA MATULKOVÁ<sup>e</sup>, RADOVAN HYNEK<sup>c</sup>,  
KAROLIEN DE WAELE<sup>a</sup>, JANA SANYOVA<sup>b</sup>  
a KOEN JANSSENS<sup>a</sup>

<sup>a</sup> AXES Research Group, Department of Chemistry, University of Antwerp, Groenenborgerlaan 171, 2020 Antwerpen, Belgie, <sup>b</sup> Polychrome artefacts laboratory, Royal Institute for Cultural Heritage, Parc du Cinquantenaire 1, B-1000 Brusel, Belgie, <sup>c</sup> Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 3, 166 28 Praha 6, <sup>d</sup> Univerzita Karlova, Pedagogická fakulta, Katedra chemie a didaktiky chemie, M. D. Rettigové 4, 116 39 Praha 1, <sup>e</sup> Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra anorganické chemie, Hlavova 2030/8, 128 43 Praha 2  
kuckovas@vscht.cz

Došlo 1.2.17, přepracováno 11.9.17, přijato 6.10.17.

Klíčová slova: spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERSS), biosenzory, umělecká díla

### Obsah

1. Úvod
2. Princip metody
  - 2.1. Spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu s využitím protilátek (imuno-SERS)
  - 2.2. Hrotem zesílený Ramanův rozptyl (TERS)
3. Příklady využití metody SERS
4. Závěr

### 1. Úvod

Základy metody SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) neboli spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu byly položeny už v roce 1974, kdy bylo experimentálně zjištěno zesílení Ramanova signálu pyridinu při jeho adsorpci na zdrsňený (oxidačně-redukčním dějem) povrch stříbrné elektrody<sup>1</sup>. Avšak teprve od přelomu tisíciletí zažívá SERS ten pravý rozkvět. Její použití je velmi široké a sahá od chemie, mikrobiologie, potravinářství, toxikologie, forenzních věd až po lékařské obory. V medicíně se s ní můžeme setkat například v biosenzorech používaných pro detekci biologických molekul spojených s výskytem rakoviny<sup>2</sup>, Alzheimerovy či

Parkinsonovy nemoci<sup>3–5</sup>. V současné době se např. vyvíjejí osobní biosenzory založené na technice SERS ke sledování okamžité hladiny glukosy v krvi u diabetiků bez nutnosti odběru krve<sup>6</sup>. Takový přístroj bude v budoucnu buď implantován do těla pacienta, nebo bude dokonce provádět neinvazivní měření přímo přes pacientovu kůži. Než se ale dostaneme k aplikacím této metody, popíšeme si, na jakých principech SERS funguje.

### 2. Princip metody

Technika SERS využívá přítomnosti kovových (nejčastěji zlatých, stříbrných nebo měděných nanostruktur (nanočástic, nanostrukturálních filmů, agregátů apod.) na povrchu vzorků, které zesilují Ramanův signál, a to  $10^8$  až  $10^{12}$  krát<sup>7</sup>. Nejvyššího zesílení je dosaženo pro fraktálové struktury či „hot-spoty“<sup>8,9</sup>. Ovšem v případě biologických vzorků se uvádí zesílení jen 10–100 násobně<sup>10</sup>. Na druhou stranu je pro měření těchto vzorků výhodou zhášení fluorescence, která jinak může překrývat signál Ramanova rozptylu. Princip zesílení není jednoduchý a jeho vysvětlením se zabývá několik monografií<sup>11,12</sup>. V následujících odstavcích se jej pokusíme přiblížit bez použití složitých matematických výrazů.

Koloidní zlaté a stříbrné nanočástice vykazují intenzivní barvy v důsledku jevu známého jako povrchová plasmonová rezonance. Tento jev vzniká, když dopadající záření vybudí oscilace oblaku elektronů vodivostního pásu. Interakce mezi elektrickým polem dopadajícího světla a nanočástic s rozměrem menším, než je vlnová délka dopadajícího záření, způsobuje polarizaci elektronů. V důsledku polarizace dojde ke vzniku náboje, který vyvolá kolektivní oscilaci dipolárních povrchových elektronů. Tento efekt je ale omezen na povrch nanočástice nebo její bezprostřední blízkost (klesá se čtvrtou mocninou vzdálenosti analytu od povrchu nanočástice). Frekvence, při kterých tyto povrchové plasmony oscilují, jsou známy jako LSPR (*lokalizovaná povrchová plasmonová rezonance; Localized Surface Plasmon Resonance*). LSPR pásma pro zlato a stříbro jsou ve viditelné části elektromagnetického spektra. Například LSPR sférických 50 nm velkých zlatých nanočástic je přibližně 530 nm a spadá tedy do zelené oblasti viditelného spektra (495–570 nm). Jelikož je zelené světlo pohlcováno a komplementární červené je odráženo, jeví se tyto nanočástice jako červené. Stejně tak LSPR sférických 50 nm stříbrných nanočástic je asi 430 nm, spadá tedy do oblasti fialového světla, a proto jsou částice zelené. Na LSPR má velký vliv typ, velikost, tvar a agregace nanočástic a chemické složení roztoku, ve kterém jsou obsaženy. Změny v LSPR mohou vyvolat kvantifikovatelné barevné proměny. Například po agregaci zmí-

něných červených 50 nm zlatých nanočástic dochází k posunu LSPR do červené oblasti až k asi 700 nm. Protože se červené světlo absorbuje, zatímco modré je rozptýleno, dojde ke změně zabarvení na modrou. Vzhledem k tomu, že je změna barvy tak výrazná, využívá se tento děj ke kolorimetrické detekci nejrůznějších látek<sup>13</sup>. SERS spektroskopie nevyužívá jen již zmíněných povrchů kovových elektrod nebo koloidních roztoků, ale také ostrůvkových filmů, které mohou být tvořeny malými izolovanými sférickými kovovými částicemi o rozměrech 5–20 nm, nanesených na skelné či křemenné podložce, dále kovových solů/hydrosolů, připravovaných redukcí příslušné kovové soli, nebo shlukování nanočástic do malých agregátů<sup>14</sup> až po fraktály<sup>9</sup>. Podobně lze využít i různých tvarů nanočástic či bimetalických nanočástic<sup>15</sup>.

Povrchově zesílený Ramanův rozptyl (SERS) je jeden z jevů, který vzniká v důsledku LSPR. Samotný Ramanův rozptyl je nepružný rozptyl fotonů na chemických vazbách v molekule. Ramanovo spektrum vzniká tím, že dopadající světlo indukuje v molekule dipólový moment (nesymetrické rozložení elektrického náboje, tj. molekuly musí být schopné polarizace). Ramanův rozptyl představuje nejvýše  $10^{-7}$  z celkového rozptylu záření, a proto je jeho využití při detekci nízkých koncentrací látek velmi obtížné. Pokud je ale molekula hledané látky adsorbována na povrchu nanočástice (např. na zlaté, stříbrné, měděné, či alkalických kovů nebo hliníku), pak může být Ramanův rozptyl zesílen o mnoho řádů, což je základem techniky SERS.

Za SERS jsou zodpovědné dva základní mechanismy: elektromagnetický a chemický.

První z nich zvyšuje intenzitu dopadajícího i rozptýleného záření díky rezonanční excitaci povrchových plasmonů s faktorem zesílení cca  $10^4$ – $10^6$  ( $10^6$ – $10^{11}$  při lokalizaci molekuly v „hot-spotech“<sup>16</sup>). Elektromagnetický mechanismus souvisí se změnami elektrického pole na povrchu i v blízkosti povrchu nanočástice kovu, není tedy závislý na povaze studované molekuly. Jedná se o spřažení oscilující složky elektrického pole  $E$  excitačního záření a rozptýleného Ramanova záření s oscilacemi povrchového plasmonu na nanočásticích kovu. Tento mechanismus zesílí mnohem více vibrační módy kolmé k povrchu než vibrační módy rovnoběžné s povrchem. Druhý mechanismus (molekulární rezonance) mění polarizovatelnost molekuly v důsledku její silné interakce s kovovým povrchem nanočástice (tedy tvorbou povrchového (adsorpčního) komplexu mezi molekulou a nanočásticí kovu), ale jeho příspěvek k zesílení signálu je v porovnání s elektromagnetickým mechanismem mnohonásobně nižší, řádově  $10$ – $10^2$  (cit.<sup>4,13</sup>). U mechanismu molekulární rezonance můžeme podle síly interakce molekuly s povrchem nanočástice, tedy komplexem mezi molekulou analytu a kovovými nanočásticemi, rozlišit dva typy – fyzisorpci (pro slabé interakce na úrovni energií van der Waalsových sil) a chemisorpci (adsorpční energie je srovnatelná s energiemi chemických vazeb). Dalším důležitým faktorem pro posouzení a odhad pravděpodobného mechanismu SERS je fakt, že dopadající foton budícího záření může

indukovat v substrátu excitací typu elektron-díra, povrchový plasmon či povrchový fonon. Získáme tedy novou možnost excitace – přenos náboje mezi Fermiho hladinou nanočástice a LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) studované molekuly. Pokud je přechod mezi Fermiho hladinou kovu a LUMO molekuly v rezonanci s elektronovým přechodem tohoto komplexu (molekulopovrch kovu), mluvíme o chemisorpci. Pokud je v rezonanci elektronový přechod samotné molekuly s přechodem mezi Fermiho hladinou kovu a LUMO molekuly, může dokonce nastat další zesílení Ramanova signálu. Dochází zároveň k molekulární a plasmonové rezonanci – mluvíme o povrchově zesíleném rezonančním Ramanově rozptylu (SERRS – Surface Enhanced Resonance Raman Scattering). Detailnější a podrobnější popis mechanismů a teoretických modelů SERS je uveden např. v monografiích<sup>12,16</sup>.

V současné době se můžeme setkat s modifikací metody SERS, např. s tzv. imuno-SERS (povrchově zesílený Ramanův rozptyl využívající protilátky) anebo technikou TERS (hrotem zesílený Ramanův rozptyl; Tip-Enhanced Raman Scattering), kterým budou patřit následující řádky.

## 2.1. Spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu s využitím protilátek (imuno-SERS)

Detekce organických molekul pomocí SERS je poměrně jednoduchá, protože malé molekuly mohou být snadno adsorbovány na povrch nanočástice a zůstat v její dostatečně blízkosti, kdy se zesilující efekt může projevit. Nicméně větší objekty, jako jsou bakterie či viry, jsou příliš velké na to, aby došlo k účinnému zesílení signálu. Chceme-li tento problém řešit, můžeme na povrch nanočástic navázat tzv. SERS značku (reportérovou skupinu), která poskytne své zesílené Ramanovo spektrum. Dále se na nanočástice naváže rozpoznávací skupina, která se bude specificky vázat na hledané látky. Touto skupinou mohou být např. odpovídající protilátky (imunoglobuliny), a pak se v tomto případě název metody upřesňuje na tzv. imuno-SERS.

## 2.2. Hrotem zesílený Ramanův rozptyl (TERS)

Koncept metody navrhl J. Wessel již v roce 1985 (cit.<sup>17</sup>), ale experimentálně byla realizována různými skupinami až v roce 2000 (cit.<sup>18–21</sup>). Metoda kombinuje chemickou citlivost povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS) s vysokým prostorovým rozlišením mikroskopie skenovací sondou (SPM – Scanning Probe Microscopy) a umožňuje chemické mapování povrchů v řádech nanometrů. Na rozdíl od rastrovací elektronové mikroskopie nebo transmisní elektronové mikroskopie (TEM – Transmission Electron Microscopy) a rentgenové fotoelektronové spektroskopie, které vyžadují pro svůj provoz vakuum, TERS (Tip-Enhanced Raman Spectroscopy) může být použita za normálního tlaku, a proto je vhodná i pro zkoumání vzorků ve vodném prostředí, zejména pro studii

um molekulární dynamiky v biologických vzorcích<sup>22</sup>, ke studiu rakoviny<sup>23</sup>, reakčních intermediátů nebo katalytických procesů<sup>24</sup>.

V technice TERS se uplatňuje kovový nebo pokovený SPM hrot, který je umístěn ve středu laserového záření buď dopadajícího na povrch, nebo procházejícího studovaným materiálem. Elektromagnetické záření vybudí na špičce hrotu povrchovou plasmonovou rezonanci, a ta následně zvýší intenzitu elektromagnetického pole, což vede k zesílení Ramanova signálu pocházejícího z molekul analytu nacházejícího se v těsné blízkosti špičky hrotu.

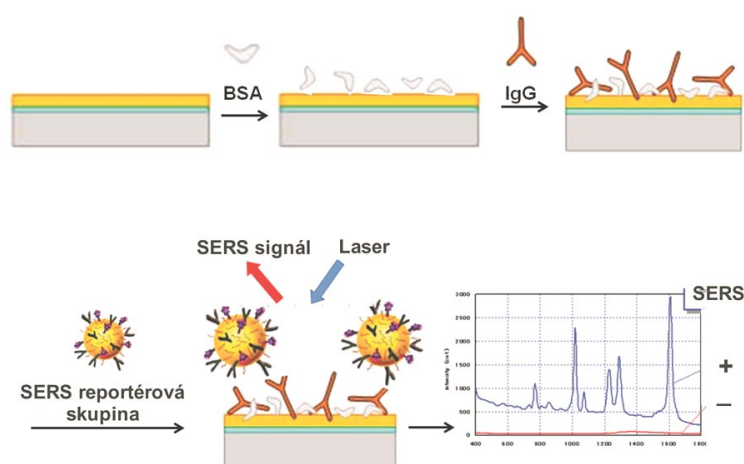
### 3. Příklady využití metody SERS

Jak již bylo zmíněno, technika SERS má v současné době široké využití a my se nyní můžeme podívat blíže na některá z nich. Kromě její hojné aplikace v medicíně, farmacii<sup>25</sup>, biochemii, biologii, životním prostředí<sup>26</sup>, materiálové chemii, historii a archeologii se například poměrně nedávno v potravinářství objevily tisknutelné testovací proužky (tzv. stripy), podobné rychlým jednorázovým těhotenským testům. Tyto proužky mají na povrchu papíru zlaté nanočástice umožňující testování pomocí SERS a používají se pro „screening“ bio-toxinů v potravinách<sup>27</sup>. Proužek reaguje na přítomnost toxinů změnou zabarvení (dochází k agregaci či disociaci nanočástic) a pro zjištění jejich koncentrace se následně z testovací zóny měří intenzita SERS signálu. V některých případech bylo dosaženo i několikanásobně vyšší citlivosti než v případě klasicky používaných imunochemických metod, mezi které patří např. imunoelektroforetické nebo imunoprecipitační metody.

SERS spektroskopie se rozvíjí i v oborech zabývajících se analýzou uměleckých děl. Zkoumají se její možnosti při identifikaci organických materiálů, jakými jsou organická barviva ať již syntetického nebo přírodního pů-

vodu<sup>28</sup> anebo se jí zkoumají proteinová pojiva (vaječné tempery, klišová nebo kaseinová pojiva atd.)<sup>29</sup>. Použití techniky SERS pro identifikaci přírodních organických pigmentů v komplexní studii obrazů Maneta, Pissarra, Renoira, Moneta a Gauguina bylo jedinečnou příležitostí ke studiu impresionistické palety klíčových umělců 19. století<sup>30</sup>. Tato metoda umožnila zmenšit velikost vzorků potřebných pro analýzu (až na 20×20 μm), což je u testování uměleckých objektů zásadní, a přitom provést systematické studium celé malířské sbírky. Bylo zjištěno, že na zkoumaných obrazech byly hojně používané červené pigmenty rostlinného původu, jako jsou mořenový lak a košenilové laky, které jsou živočišného původu. Tyto výsledky potvrdily předchozí analýzy provedené na jiných kolekcích a publikované v literatuře, ale nové analýzy navíc umožnily detekci barviv i na vybledlých místech, kde došlo k jejich většinovému rozložení.

V oblasti analýzy uměleckých děl se SERS (resp. její obdoba imuno-SERS) začala nedávno využívat také k současné identifikaci a lokalizaci proteinů pocházejících z proteinových poživ. Proteiny jsou v uměleckých dílech obsaženy v malém množství v barevných vrstvách, kam jsou přidávány jako pojiva ve formě směsí např. oleje s celým vajíčkem, žloutkem, kaseinem (mléčnými proteiny) nebo klišem (kolagenními proteiny) atd. Většinou komponentou barevných vrstev však bývají anorganické pigmenty jako nositelé barevné informace. V odebraných vzorcích navíc obvykle není zastoupena jen jedna vrstva, ale jedná se o soubor jejich většího počtu. Pro restaurátory a kunsthistoriky je považována současná identifikace a lokalizace proteinových poživ v těchto vícevrstvých vzorcích za velmi klíčovou, protože jejich přesné umístění a jednoznačná identifikace jsou nezbytné nejen pro výběr správného restaurátorského postupu, ale také pro získání více informací o autorovi, provenienci díla, historii díla či o rozvoji malířských technik v minulosti. Dosud byla mož-



Obr. 1. Jednotlivé kroky přípravy vzorku pro imuno-SERS

ná buď jen konkrétní identifikace proteinového pojiva (např. plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí nebo metodami MALDI-TOF (matricí asistovaná laserová desorpce-ionizace s detektorem doby letu; Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization – Time of Flight) či LC-MS/MS (kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí; Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) nebo jen jeho lokalizace bez jeho určení (histochemické testy)<sup>31–33</sup>.

Rozlišení jednotlivých typů proteinů není samotnou Ramanovou spektroskopií obecně možné: to lze realizovat jen v případě použití specifických protilátek (imuno) a nanočástic (SERS). Technika imuno-SERS nalézá své využití např. při identifikaci proteinů zejména u biologických či biomedicinských vzorků. Na rozdíl od biologických vzorků jsou však umělecké vzorky suché, pevné a obsahují velké množství anorganických látek, které mohou analýzu komplikovat. Přesto se podařilo vyvinout poměrně jednoduchou metodu jejich analýzy metodou SERS, která je ale při samotném experimentování poněkud obtížnější vzhledem k částečné rozpustnosti barevných vrstev (obr. 1) ve vodných roztocích nanočástic. Nejprve je nutné na povrchu vzorku zablockovat místa, kam by se mohly nespecificky – tedy náhodně – navázat protilátky. Tímto blokačním činidlem bývá hovězí sérový albumin (BSA) rozpuštěný v sójovém mléce. Dále se přidávají specifické protilátky proti konkrétnímu proteinu z hledaného pojiva, které se označují jako primární. Po jejich navázání na vrstvu, která takové proteiny obsahuje, se ke vzorku přidávají nanočástice, které na svém povrchu nesou reportérovou skupinu (např. rhodamin B, krystalovou violet, nilskou modř, bifenylyl-4,4'-dithiol, 1,4-benzendithiol) zodpovědnou za signál v Ramanově spektru a také sekundární protilátky, tj. protilátky reagující výhradně s primárními protilátkami navázanými na hledaných proteinech. Po odmytí nenavázaných částic přichází na řadu Ramanova spektroskopie a mapování jednotlivých vrstev vzorku. Ta vrstva, která obsahuje hledané pojivo, pak poskytuje spektrum odpovídající reportérové skupině. Nalezený signál reportérové skupiny na určitém místě vzorku nám nepřimo zviditelní distribuci hledaného proteinu. Výše popsáným způsobem se např. v Metropolitním muzeu umění v New Yorku podařilo zjistit přítomnost klišu v podkladové vrstvě a vaječných proteinů v barevné vrstvě u italské polychromované plastiky ze 13. století<sup>34</sup>.

#### 4. Závěr

Metoda SERS či její modifikace imuno-SERS a TERS před námi otevírají nové pole možností při analýze komplexních systémů, mezi které patří na jedné straně biologické materiály a umělecká díla na straně druhé. Nesporné výhody těchto metod představuje zejména obrovská citlivost (jdoucí v některých případech téměř až do jednotek molekul – Single molecule SERS; identifikace jednoho zrna pigmentu) a relativní nenáročnost na vybavení pracoviště drahými přístroji. Pro imuno-SERS uměleckých děl, vzhledem k povaze jejich vzorků – mikrotomové

řezy či nábrusy, postačí běžný dispersní Ramanův přístroj s vyměnitelnými excitačními lasery ve viditelné oblasti spektra. To je důvod, proč jejich využití je již v současné době dosti rozsáhlé, a v budoucnu se s největší pravděpodobností ještě dále rozšíří. Můžeme se tedy již nyní těšit na jejich další pokroky a významné objevy, které budou její aplikací dosaženy.

*Děkujeme společnosti „Fund for Scientific Research–Flanders (FWO-Vlaanderen)“ za podporu působení hlavní autorky na pozici „Postdoctoral Fellow – Pegasus of the Research Foundation – Flanders“ v Belgii.*

#### LITERATURA

1. Fleischmann M., Hendra P. J., Mc Quillan A. J.: *Chem. Phys. Lett.* 26, 163 (1974).
2. Sládková M., Vlčková B., Mojžeš P., Šlouf M., Naudin C., Le Bourdon G.: *Faraday Discuss.* 132, 121 (2006).
3. El-Said W. A., Kim T. H., Yea C. H., Kim H., Choi J. W.: *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11, 768 (2011).
4. Trusso S., Zanchi C., Bombelli A., Lucotti A., Tommasini M., de Grazia U., Ciusani E., Romito L. M., Ossi P. M.: *J. Instrum.* 11, C05006 (2016).
5. Deckert-Gaudig T., Kurouski D., Hedegaard M. A. B., Singh P., Lednev I. K., Deckert V.: *Sci. Rep. - UK* 6, 33575 (2016).
6. Zhang A., Wheeler D., Ling Y. C., Wang G. M., Yang X., Vilozny B., Singaram B., Gu C., Li Y.: *Sci. Adv. Mater.* 4, 1047 (2012).
7. Fogarty S. W., Patel I. I., Martin F. L., Fullwood N. J.: *PLoS One* 9, 06283 (2014).
8. Stockman M. I., Shalaev V. M., Moskovits M., Botet R., George T. F.: *Phys. Rev. B* 46, 2821 (1992).
9. Zhang T. L. H., Douketis C., Moskovits M.: *Phys. Rev. B* 27, 513 (1998).
10. Jalani G., Cerruti M.: *Nanoscale* 7, 9990 (2015).
11. Kneipp K., Moskovits M., Kneipp H.: *Surface-Enhanced Raman Scattering. Physics and Applications, Topics in Applied Physics.* Springer-Verlag, Berlin 2006.
12. Schlücker S.: *Surface Enhanced Raman Spectroscopy. Analytical, Biophysical and Life Science Applications.* Wiley-VCH, Weinheim 2011.
13. Wei H., Abtahia M. H. S., Vikesland P. J.: *Environ. Sci. Nano* 2, 120 (2015).
14. Vlčková B., Moskovits M., Pavel I., Šišková K., Sládková M., Šlouf M.: *Chem. Phys. Lett.* 455, 131 (2008).
15. Philimonenko V. V., Philimonenko A. A., Šloufová I., Hrubý M., Novotný F., Halbhuber Z., Krivjanska M., Nebesařová J., Šlouf M., Hozák P.: *Histochem. Cell Biol.* 141, 229 (2014).
16. Aroca R.: *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy.* J. Wiley, Chichester 2006.
17. Wessel J.: *J. Opt. Soc. Am. B* 2, 1538 (1985).
18. Stockle R. M., Suh Y. D., Deckert V., Zenobi R.:

- Chem. Phys. Lett. 318, 131 (2000).
19. Hayazawa N., Inouye Y., Sekkat Z., Kawata S.: Opt. Commun. 183, 333 (2000).
  20. Anderson M. S.: Appl. Phys. Lett. 76, 3130 (2000).
  21. Pettinger B., Picardi G., Schuster R., Ertl G.: Electrochemistry 68, 942 (2000).
  22. Schmid T., Yeo B. S., Leong G., Stadler J., Zenobi R.: J. Raman Spectrosc. 40, 1392 (2009).
  23. Xiao L., Wang H., Schultz Z. D.: Anal. Chem. 88, 6547 (2016).
  24. Hartman T., Wondergem C. S., Kumar N., van den Berg A., Weckhuysen B. M.: J. Phys. Chem. Lett. 7, 1570 (2016).
  25. Vavřinová D., Matějka P.: Chem. Listy 107, 245 (2013).
  26. Cieslarová Z., Matějka P.: Chem. Listy 106, 224 (2012).
  27. Hwang J., Lee S., Choo J.: Nanoscale 8, 11418 (2016).
  28. Gabrieli F., Doherty B., Miliari C., Degano I., Modugno F., Uldank D., Kunzelman D., Buzzegoli E., Patti M., Rosi F.: J. Raman Spectrosc. 47, 1505 (2016).
  29. Kuckova S., Hamidi-Asl E., Sofer Z., Marvan P., de Wael K., Sanyova J., Janssens K.: Anal. Methods 10, 1054 (2018).
  30. Pozzi F., van den Berg K. J., Fiedler I., Casadio F.: J. Raman Spectrosc. 45, 1119 (2014).
  31. Kuckova S. H., Schultz J., Veiga R., Murta E., Sandu I. C. A.: Int. J. Conserv. Sci. 6, 507 (2015).
  32. Kuckova S., Sandu I. C. A., Crhova M., Hynek R., Fogas I., Schafer S.: J. Cult. Herit. 14, 31 (2013).
  33. Kuckova S. H., Sandu, I. C. A., Crhova M. K., Coufalova L., Krizova I., Hynek R., Muralha S. V., Schafer S., Fogas I.: Chem. Listy 109, 864 (2015).
  34. <http://www.metmuseum.org/about-the-met/conservation-and-scientific-research/projects/immuno-to-art>. Staženo dne 30. 1. 2017.
- Š. Kučková<sup>a,b,c,d</sup>, E. Hamidi-Asl<sup>a</sup>, I. Matulková<sup>e</sup>, R. Hynek<sup>c</sup>, K. de Wael<sup>a</sup>, J. Sanyova<sup>b</sup>, and K. Janssens<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>University of Antwerp, Belgium, <sup>b</sup>Royal Institute for Cultural Heritage, Brussels, Belgium, <sup>c</sup>Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague, <sup>d</sup>Charles University, Faculty of Education, Department of Chemistry and Chemistry Education, Prague, <sup>e</sup>Charles University, Faculty of Science, Department of Inorganic Chemistry, Prague): **Techniques and Applications of Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy (SERSS) Focused on Cultural Heritage**
- The review is devoted to a modern method of vibrational spectroscopy – surface enhanced Raman spectroscopy. Its principle and some of its special variants (immun-SERS and TERS (Tip-Enhanced Raman Spectroscopy)) are described in a simplified manner. Wide application possibilities are demonstrated on selected examples from its application in cultural heritage.
- Keywords: surface-enhanced Raman scattering spectroscopy (SERSS), biosensors, art works