

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
UNIVERZITY PALACKÉHO V OLOMOUCI

Katedra experimentální fyziky



**Určení faktorů zesílení signálu Ramanova
rozptylu modelových sloučenin ve vodném
roztoku vlivem přítomnosti stříbrných
nanočástic různých rozměrů**

Diplomová práce

Autor:

Ondřej Bečička

Vedoucí práce:

RNDr. Karolína Šišková, Ph.D.

Studijní obor:

Nanotechnologie

Forma studia:

Prezenční

Rok:

2012

Bibliografická identifikace

Autor: Ondřej Bečička

Název práce: Určení faktorů zesílení signálu Ramanova rozptylu modelových sloučenin ve vodném roztoku vlivem přítomnosti stříbrných nanočástic různých rozměrů

Typ práce: magisterská

Pracoviště: Katedra experimentální fyziky

Vedoucí práce: RNDr. Karolína Šišková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2012

Počet stran: 64

Počet příloh: 1

Jazyk: český

Abstrakt:

Cílem této diplomové práce je proměřit Ramanova spektra dvou modelových sloučenin ve vodném roztoku s nanočásticemi tří různých rozměrů, otestovat vliv účinku HCl na signál Ramanova rozptylu jednotlivých adsorbátů v přítomnosti Ag nanočástic. Dále se práce zabývá samotným způsobem zesílení Ramanova signálu vlivem Ag nanočástic a určením nejnižší detekovatelné koncentrace modelových sloučenin v jejich přítomnosti. Byla zjištěna nevhodnost použití Ag nanočástic vytvořených za pomoci redukčních účinků maltosy k účelům zesílení Ramanova rozptylu pro excitační vlnovou délku 532 nm. Oproti tomu se ukázaly Ag nanočástice připravené redukcí glukosou velmi vhodné pro detekci velmi nízkých koncentrací nativní formy porfyriu TMPyP. Ag nanočástice vytvořené borohydridovou syntézou jsou také velmi vhodné pro zesilování Ramanova signálu. U dvou posledních druhů nanočástic byla zjištěna mez detekce.

Klíčová slova: Porfyrin, 2,2'-Bipyridin, SERS, SERRS, nanočástice, detekce

Bibliographical identification

Author: Ondřej Bečička

Title: Determining factors amplification of Raman scattering of model compounds in aqueous solution due to the presence of silver nanoparticles of different sizes

Type of thesis: master

Department: Department of Experimental Physics

Supervisor: RNDr. Karolína Šišková, Ph.D.

Year of presentation: 2012

Number of pages: 64

Number of appendices: 1

Language: czech

Abstract:

The aim of these diploma thesis is to measure Raman spectra of two model compounds in aqueous solution with three different sizes nanoparticles and test the influence of the effect of HCl on the Raman signal of each adsorbate in the presence of Ag nanoparticles. The thesis also deals with the a manner alone enhanced of Raman signal due to Ag nanoparticles and determining the lowest detectable concentration of model compounds in their presence. The work was found to inappropriate use of Ag nanoparticles produced through reducing effects of maltose for the purpose of enhanced Raman scattering for the 532 nm excitation wavelength. Against this is showed, that Ag nanoparticles prepared by reduction of glucose very suitable for detecting very low concentration free base form of porphyrin TMPyP. Ag nanoparticles formed Sodium borohydrid synthesis are also very suitable for enhanced of Raman scattering. The two most recent types of nanoparticles was observed detection limit.

Keywords: Porfyrin, 2,2'-Bipyridin, SERS, SERRS, nanoparticles, detection

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením *RNDr. Karolíny Šiškové, Ph.D.*, a že jsem uvedl všechny zdroje literatury v seznamu použitých zdrojů.

V Olomouci dne

.....

podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat především RNDr Karolíně Šiškové, Ph.D. za příkladné vedení diplomové práce, za trpělivost a ochotu. Dále pak děkuji Mgr.Vlastimilu Maškovy, Ph.D.a Mgr. Kláře Šafářové, Ph.D. za spolupráci při měřeních. Také děkuji svým rodičům za podporu při studiích.

Obsah

Úvod.....	7
1. Teoretická část.....	8
1.1. Velikostní závislost plasmonové extinkce.....	8
1.2. Vlnový model Reyleigho a Ramanova rozptylu.....	10
1.3. Elektromagnetický mechanismus SERS.....	11
1.4. Chemické zesílení.....	15
2. Experimentální část.....	17
2.1. Příprava Ag nanočástic.....	17
2.1.1. Příprava Ag nanočástic pomocí redukce stříbrné soli borohydridem sodným.....	17
2.1.2. Příprava redukcí amino-komplexu Ag+ pomocí cukru.....	17
2.2. Modelové sloučeniny kationtový porfyrin TMPyP a 2,2'-bipyridin	18
2.3. Přístrojové vybavení a použité techniky.....	20
2.4. Charakterizace nanočástic	23
2.4.1. Vlastnosti AgB nanočástic.....	23
2.4.2 Vlastnosti AgG a AgM nanočástic.....	24
3. Výsledky a diskuse.....	26
3.1. Vliv HCl na UV-vis spektra Ag nanočástic.....	26
3.2. Vliv adsorbátu nebo adsorbátu a HCl na UV-vis spektra Ag nanočástic.....	27
3.3. SERS/SERRS bipyridinu na Ag nanočásticích.....	33
3.4. SERRS porfyrinu TMPyP na Ag nanočásticích.....	39
Závěr.....	49
Seznam použitých zdrojů.....	50
Přílohy.....	52

Úvod

Stříbrné nanočástice jsou v poslední době velmi dobře známé široké veřejnosti pro své antibakteriální účinky, neboť jsou používány v náplastích, zubních pastách apod. Na rozdíl od této jejich vlastnosti mají ještě další unikátní vlastnost, o které však ví již málokdo. Jsou totiž schopné fungovat jako zesilovače optických jevů, jakými jsou absorpce, emise, rozptyl. A právě tím posledně zmiňovaným jevem se zabývá tato práce. Konkrétně jde o zesílení Ramanova rozptylu molekul, které jsou umístěné v blízkosti stříbrných nanočástic.

Ramanův rozptyl je neelastický rozptyl fotonů molekulou při její interakci s monochromatickým zářením. Pomocí spektroskopie Ramanova rozptylu se zkoumají vibrační hladiny sloučenin. Jedná se však o metodu málo citlivou, je potřeba relativně vysoké koncentrace vzorku v roztoku a dlouhé akumulací časy pro nasbírání dostatečného signálu. A právě díky stříbrným nanočásticím dispergovaným v roztoku je možno podstatně zkrátit akumulací časy a měřit v nižších koncentracích vzorku při získání stejného poměru signálu k šumu [1]. Při použití nanočástic stříbra coby zesilovačů Ramanova rozptylu hovoříme o povrchem zesíleném Ramanově rozptylu (z anglického Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS)

Cílem této experimentální diplomové práce je proměřit Ramanova spektra dvou modelových sloučenin (adsorbátů) ve vodném roztoku s nanočásticemi tří různých rozměrů. Dále je cílem otestovat vliv účinku HCl na signál Ramanova rozptylu jednotlivých adsorbátů v přítomnosti Ag nanočástic. Po vyhodnocení Ramanových spekter modelových sloučenin a jejich porovnání s časopiseckou literaturou bude zjištěno, jakým způsobem dochází k zesílení Ramanova signálu vlivem Ag nanočástic tří různých rozměrů bez přítomnosti a za přítomnosti HCl. Bude rovněž určena nejnižší detekovatelná koncentrace modelových sloučenin, tzv. mez detekce, umožněná díky Ag nanočásticím tří různých rozměrů.

1. Teoretická část

Kovové nanočástice fascinovaly vědce svým pestrobarevným chováním v koloidních roztocích již dlouho před polovodiči a jejich aplikacemi jako nedílnou součástí moderních technologií. Zlaté nanočástice byly použity jako pigmenty v rubínově-červeně zabarvených sklech již v 17. století[2]. Faraday rozpoznal, že je červené zabarvení způsobeno kovovými částicemi zlata v koloidní formě. Mie byl prvním, kdo v roce 1908 vysvětlil tento jev teoreticky pomocí řešení Maxwellových rovnic pro absorpci a rozptyl elektromagnetického záření sférickými částicemi. Jeho teorie měla od začátku široké využití, protože dovoľovala výpočty částicových extinkčních (tj. absorpčních a rozptylových) spekter za předpokladů: (a) znalosti materiálové dielektrické funkce a (b) velikosti částic menších, než je vlnová délka světla.

Fyzikální zdůvodnění extinkce kovových nanočástic spočívá v koherentní oscilaci elektronů ve vodivostním pásu indukované interakcí s elektromagnetickým polem. Tyto resonance jsou označovány jako povrchové plasmony (kvanta plasmonové oscilace) a jsou ve skutečnosti efektem malých částic. Resonance totiž vznikají z důvodů nepřítomnosti individuálních atomů kovu oproti situaci v objemovém materiálu[3].

1.1. Velikostní závislost plasmonové extinkce

Celkový extinkční koeficient malých kovových částic udává Mieho teorie jako součet přes všechny elektrické a magnetické multipolové oscilace absorpčních a rozptylových interakcí s elektromagnetickým polem. Pro nanočástice o hodně menších rozměrech než je vlnová délka absorbovaného světla (typicky se uvádí menších než $1/20 \lambda$) přispívá k extinkci pouze dipolový člen Mieho teorie tzv. dipolová aproximace.

V kvazi-statickém režimu je extinkční koeficient κ pro N částic v objemu

V dán následující rovnicí
$$\kappa = \frac{18\pi N V \varepsilon_m^{3/2}}{\lambda} \frac{\varepsilon_2}{[\varepsilon_1 + 2\varepsilon_m]^2 + \varepsilon_2^2} .$$

V předešlé rovnici je λ vlnová délka absorbovaného záření a ε_m je dielektrická konstanta okolního prostředí (předpokladem je frekvenční nezávislost ε_m). Reálnou a imaginární část materiálové dielektrické funkce reprezentuje ε_1 a ε_2 , což lze zapsat jako $\varepsilon(\omega) = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega)$, kde ω je uhlová frekvence světla. Absorbance A koloidního roztoku obsahující N částic v optické dráze o délce L je $A = (\kappa / \ln 10) L$.

Resonanční podmínka pro plasmonovou extinkci je přibližně splněna pro $\varepsilon_1(\omega) = -2\varepsilon_m$, pokud je ε_2 malé, nebo slabě závislé na ω . Šířka plasmonového pásu především závisí na $\varepsilon_2(\omega)$. Na základě předchozí rovnice pro extinkční koeficient κ je plasmonová extinkce v rámci dipolové aproximace velikostně nezávislá. Ovšem experimentálně je velikostní efekt povrchové plasmonové extinkce pozorován jako zvětšující se šířka pásu povrchového plasmonu se snižující se velikostí částic. Tedy ve skutečnosti je dobře prokázáno, že je šířka pásu plasmonové resonance nepřímo uměrná poloměru r částic pro velikosti menší než přibližně 20 nm.

Mieho teorie našla široké uplatnění a byla úspěšná v objasnění optických extinkčních spekter kovových nanočástic. Velikostní závislost pro kvazi-statický režim může být popsána předešlou rovnicí pro extinkční koeficient κ při zavedení velikostně závislé materiálové dielektrické funkce $\varepsilon(\omega, R)$. Dielektrická funkce může být zapsána jako kombinace mezipásového členu $\varepsilon_{IB}(\omega)$, zodpovědného za odezvu D elektronů a část známá též jako Drudeův člen $\varepsilon_D(\omega)$. S ohledem na vodivost elektronového plynu se dá zapsat vztah $\varepsilon(\omega) = \varepsilon_{IB}(\omega) + \varepsilon_D(\omega)$.

Poslední člen se v rámci tohoto modelu dá zapsat jako následující

výraz
$$\varepsilon_D(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} ,$$

kde $\omega_p = [ne^2/\epsilon_0 m_{eff}]$ je objemová plasmonová frekvence vyjádřená v rovnici pomocí elektronového vodivostního plynu n , elektrického náboje e , permitivity vakua ϵ_0 a efektivní elektronové hmotnosti m_{eff} . Fenomenologická relaxační (utlumová) konstanta γ má stejný význam jako šířka pásu plasmonové resonance pro případ ideálního elektronového plynu za předpokladu $\gamma \ll \omega$. Relaxační konstanta γ souvisí s dobou života všech elektronů v rozptylovém procesu v objemovém materiálu, především však souvisí s elektron-elektron, elektron-phonon a elektron-defektním srážkami a tedy rozptylem. Pro malé částice se stává elektron-povrchový rozptyl zajímavějším, což je dáno volným pohybem vodivostních elektronů, (typicky u vzácných kovů v řádech desítek nanometrů), ovšem je limitován hranicemi částic. Z tohoto důvodu se relaxační konstanta γ stává funkcí poloměru částice

$$r \text{ a můžeme psát } \gamma(r) = \gamma_0 + \frac{A v_F}{r} ,$$

kde γ_0 je objemová relaxační konstanta, v_F je Fermiho rychlost (rychlost elektronů na Fermiho hladině). Dalším členem je A , což je teoreticky závislý parametr, který obsahuje rozptylové procesy (isotropní nebo difusní rozptyl) a je také velmi závislý na použitém mediu[3][4][5][6].

1.2. Vlnový model Reyleigho a Ramanova rozptylu

Z Vlnového modelu je krásně vidět rozdíl mezi oběma druhy rozptylu. Základem je popis elektrického pole, které dopadá na analyt a má frekvenci ν_{ex} . Toto pole se dá zapsat jako $E = E_0 \cos(2\pi\nu_{ex} \cdot t)$, kde E_0 je amplituda záření. Především vztah je základem k odvození dipolového momentu \mathbf{p} celé soustavy a lze ho nalézt v literatuře[7].

Výsledkem celého odvození je následující výraz

$$p = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_{ex} t) + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos[2\pi(\nu_{ex} - \nu_v) t] + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos[2\pi(\nu_{ex} + \nu_v) t] ,$$

kde α_0 je polarizovatelnost molekuly, E_0 je vektor intenzity elektrického pole dopadajícího záření, ν_{ex} je frekvence budícího(excitačního) záření, ν_v frekvence vibrační a nakonec r_m , jakožto vnitřní souřadnice molekuly.

První člen z výrazů v předešlé rovnici reprezentuje Rayleighův rozptyl, v kterém se vyskytuje frekvence budícího záření ν_{ex} . Druhý a třetí výraz se souhrně nazývá Ramanův rozptyl a odpovídá Stokesovu, respektive Anti-Stokesovu rozptylovému členu s vlastními frekvencemi $(\nu_{ex} - \nu_v)$ a $(\nu_{ex} + \nu_v)$. Jak je vidět, je v těchto dvou případech excitační frekvence modulována vibrační frekvencí vazby. [7][[8].

Výraz $(\partial\alpha/\partial r)\neq 0$ vyjadřuje změnu polarizovatelnosti vazeb molekuly v závislosti na změně mezijaderné vzdálenosti. Z tohoto výrazu dále vyplývá nutná změna polarizovatelnosti molekul pro vznik Ramanova rozptylu. Předešlá rovnice je označována za základní výběrové pravidlo pro Ramanovu spektrometrii.

1.3. Elektromagnetický mechanismus SERS

Hlavní složkou povrchově zesíleného Ramanova rozptylu je zesílení elektromagnetického pole v blízkosti povrchu kovu. K tomuto zesílení dochází, pokud excitační anebo Ramanovým rozptylem rozptýlené frekvence spadají do extinkčního pásu (a) povrchu s nano-nerovnostmi nebo (b) malých částic. Tato podmínka SERS je splněna především pro některé ušlechtilé kovy, jmenovitě Cu, Ag, Au a alkalické kovy, které mají nano-zdrsňený povrch anebo jsou ve formě nanočástic vykazujících zřetelné extinkční pásy ve viditelné oblasti spektra. S ohledem na běžně dostupné lasery emitující ve viditelné oblasti může tak být využito excitace rezonančního povrchového plasmonu.

Pro kovové částice modelované jako kulové s poloměrem a , který je menší než vlnová délka světelného svazku laseru, např. pro $\lambda \gg 20 \cdot a$ je teoretický základ pro elektromagnetický zesilovací činitel aproximován v rámci elektrostatického přiblížení, protože nám tento předpoklad ($\lambda \gg 20 \cdot a$) dovoluje zanedbat zpoždění probíhajícího děje (elektrostatická aproximace). Proto můžeme použít Laplaceových rovnic a ulehčit si tak práci s řešením rovnic Maxwellových. Předpoklad

$\lambda \gg 20 \cdot a$ společně s uvažováním jedné částice v interakci s elektromagnetickým zářením a rovnoměrně rozděleným elektrickým polem budícího světelného svazku přicházejícím z nekonečna je ve světelné rozptylové teorii nazývána jako dlouhovlnná, neboli Rayleighova aproximace.

Problém v popisu elektrického pole v určité vzdálenosti od povrchu kovové částice r je řešen použitím Laplaceho rovnice $\nabla \Phi = 0$, kde Φ je elektrostatický potenciál s odpovídajícími hraničními podmínkami:

a) Potenciál elektrostatického pole v nekonečnu: $\Phi = E_0 r \cos \theta$, kde je E_0 časově závislá složka intenzity elektrického pole budícího laserového záření, r je vzdálenost od středu kovové nanočástice (střed částice je identický s počátkem zvoleného souřadného systému, kde je světelný zdroj umístěn na ose Z) a θ je úhel mezi osou Y a polohovým vektorem \mathbf{r} v rovině dané těmito osami.

b) pro rovnost elektrické intenzity v tangenciální rovině ve vzdálenosti $r = a$ (a je poloměr kovové částice, r je vzdálenost od středu kovové částice):

$$-\varepsilon_i \left| \frac{\partial \Phi_{in}}{\partial \theta} \right|_{r=a} = -\varepsilon_0 \left| \frac{\partial \Phi_{out}}{\partial \theta} \right|_{r=a}$$

c) pro rovnost elektrické indukce ve vzdálenosti $r = a$ (a je poloměr kovové částice, r je vzdálenost od středu kovové částice):

$$-\frac{1}{a} \left| \frac{\partial \Phi_{in}}{\partial \theta} \right|_{r=a} = -\frac{1}{a} \left| \frac{\partial \Phi_{out}}{\partial \theta} \right|_{r=a}$$

kde Φ_{in} a Φ_{out} jsou potenciály uvnitř a vně dielektrické koule.

Potenciál vně sféry částice můžeme vypočítat z následující

rovnice: $\Phi = -E_0 r \cos \theta + g \left(\frac{a^3}{r^2} \right) E_0 \cos \theta$, kde $g = \frac{\varepsilon_i(\lambda_l) - \varepsilon_0}{\varepsilon_i(\lambda_l) + 2\varepsilon_0}$.

Člen $\varepsilon_i(\lambda_l)$ je dielektrická funkce kovových částic, $\varepsilon_i(\lambda_l)$ a ε_0 je dielektrická funkce homogenního média v okolí částic. První člen

v potenciálové rovnici je příspěvek budícího pole, zatímco druhý člen je příspěvek pole elektrických dipólů lokalizovaných v centrech sfér s polarizabilitou $g \cdot a^3$ orientovaných ve směru budícího elektromagnetického pole.

Průměrná hodnota pole v radiálním směru $\langle E_n^2 \rangle^{1/2}$, ve směru \mathbf{r} je nalezen potenciál Φ , který je dán parciální derivací podle r , tedy

$$E_n = -\partial\Phi/\partial r$$

Střední kvadratická hodnota vyplývá z integrace přes element prostorového úhlu $d\Omega = \sin\theta d\theta d\varphi$ s omezením na interval pro $\theta \in \langle 0, \pi \rangle$, $\varphi \in \langle 0, 2\pi \rangle$ a lze zapsat následující rovnici:

$$\langle E_n^2 \rangle^{1/2} = (1/3)^{1/2} * E_0 * [1 + 2g(a/r)^3]$$

Důvodem, proč je indukovaný molekulární dipolový moment \mathbf{p} orientovaný kolmo na sféru zesilován, je přítomnost dalšího členu (kromě elektromagnetické komponenty) v předešlé rovnici. Toto elektromagnetické zesílení je pak dáno vztahem

$$L_n^2(\lambda_l) = \langle E_n^2 \rangle / E_0^2 \approx [1 + 2g(a/r)^3]^2$$

Za účelem výpočtů tangenciálních komponent elektrického pole je rovnice pro potenciál Φ diferencovatelná podle vztahu

$$E_t = -(1/r) * (\partial\Phi/\partial\theta)$$

a integrací přes všechny elementy prostorového úhlu dostáváme

$$\langle E_t^2 \rangle^{1/2} = (2/3)^{1/2} * E_0 * [1 - g(a/r)^3] .$$

Pro vibrační módy orientované paralelně s tangenciální složkou pole je elektromagnetické zesílení dáno

$$L_t^2(\lambda_l) = \langle E_t^2 \rangle / E_0^2 \approx [1 - g(a/r)^3]^2 .$$

Kovové sférické částice fungují na podobném principu jako antény, které vysílají oscilující pole molekulárních dipólů. Emitují již Ramansky posunuté elektromagnetické frekvence ν_s (lze zapsat v podobě vlnových délek λ_s), které jsou právě zesíleny přítomností kovových částic.

Dipólový moment celého systému, emisní dipól molekuly plus kovový částicový systém jako takový, zahrnuje efekt elektromagne-

tického zesílení pole laseru a principu anténního dipólu.

Anténový efekt má v dobrém přiblížení stejnou formu jako $L^2(\lambda)$. Protože se však frekvence rozptýleného světla změnila (Stokes-shifted), dostáváme faktor zesílení $L^2(\lambda_s)$. Tato změna vlnové délky se projeví i na dielektrické funkci g_0 , která je zapsána níže

$$g_0 = \frac{\epsilon_i(\lambda_s) - \epsilon_0}{\epsilon_i(\lambda_s) + 2\epsilon_0} .$$

Nakonec můžeme zapsat obecnou rovnici intenzity rozptýleného světelného záření z jedné izolované stacionární molekuly

$$I \approx L^2(\lambda_l) L^2(\lambda_s) I_l ,$$

kde I_l je intenzita budícího lineárně polarizovaného laserového záření ($I_l \approx E_0^4$). Při speciálních případech se může molekula adsorbovat na povrch kovových částic tak, že se její hlavní osa rotace bude orientovat kolmo k povrchu částice, což vyvolá tři tzv. vibrační módy, které jsou vyjádřeny jako složky tensoru polarizovatelnosti a jsou společně s příslušným faktorem zesílení zapsány v následující tabulce:

Tab. 1 prvky tensoru polarizovatelnosti

α_{zz}	$L_n^2(\lambda_l) L_n^2(\lambda_s)$
α_{xz}, α_{yz}	$1/2 [L_n^2(\lambda_l) L_t^2(\lambda_s) + L_t^2(\lambda_l) L_n^2(\lambda_s)]$
$\alpha_{xx}, \alpha_{yy}, \alpha_{xy}$	$L_t^2(\lambda_l) L_t^2(\lambda_s)$

Pro maximální elektromagnetické zesílení je potřeba splnit rezonanční podmínku (viz. výše, kde je uvedena jako povrchová plasmonová rezonanční podmínka). Tato podmínka je splněna pro maximální možnou hodnotu dielektrické funkce g (respektive g_0), můžeme tedy zapsat:

$$\epsilon_i(\lambda) \rightarrow -2\epsilon_0 \Rightarrow \epsilon_l(\lambda) = -2\epsilon_0, \epsilon_s(\lambda) \rightarrow 0$$

Z uvedeného je zřejmé, že k maximálnímu zesílení dochází u takových kovů, u kterých je imaginární část dielektrické funkce

(útlumový rezonanční faktor) blízký nule a reálná část dielektrické funkce je rovna dielektrické konstantě obklopujícího média násobené faktorem -2 . Na závěr a v zájmu zobecnění, je nutno zmínit, že rezonanční podmínka může být splněna pro každý kov v interakci s vhodnou vlnovou délkou použitého záření.[9]

1.4. Chemické zesílení

Relativní příspěvek, anebo vůbec chemické zesílení je již roky předmětem mnoha diskusí a dodnes se nevyřešilo. Tento fakt platí jen částečně, protože mnoho chemikálních efektů může mít vliv na intenzitu SERS, např. molekulová adsorbce, vliv orientace molekul atd. Tyto jevy nejsou exaktně považovány za zesilovací faktor SERS.

Chemické zesílení je jen těžko měřitelné experimentálně, ale určité závislosti existují. Velikost tohoto zesílení jen zřídka přesáhne faktor zesílení 10 . Chemické zesílení lze chápat jako modifikaci polarizačního tensoru adsorbátu vyplývajícího z tvorby komplexu mezi adsorbátem a kovem. Spíše než zesilovací mechanismus je chemický účinek považován za změnu v povaze adsorbátu. Změna tohoto tenzoru polarizovatelnosti může vést k resonanci s dopadajícím excitačním zářením, což právě vede k zesilování SERS.

Nejvíce studovaným mechanismem chemického zesílení je tzv. mechanismus přenosu náboje (charge-transfer mechanism).

Tento mechanismus má několik variant:

a) První varianta se vyskytuje, pokud není adsorbát kovalentně vázán s kovem. V tomto případě ovlivňuje přítomnost kovu odchylku v elektronové struktuře analytu způsobující mírné změny v elektronové distribuci. To může mít za následek odpovídající změnu polarizovatelnosti a tím i změnu relativního Ramanova zesílení. Tento případ byl registrován např. pro pásy 1008 cm^{-1} a 1035 cm^{-1} pyridinu.

b) Druhá varianta vyžaduje kovalentní vazbu povrchového komplexu s kovem, nebo nepřímou vazbu za pomoci volných iontů

elektrolytu. Tyto vazby mohou způsobovat podstatné změny vlastní polarizovatelnosti molekuly. Velikost polarizovatelnosti explicitně závisí na dostupném optickém přechodu mezi energetickými hladinami. Takto vzniklý elektronový přechod se musí překrývat s molekulárními energetickými hladinami, čímž poskytuje možný přenos náboje a tím i změnu polarizovatelnosti. Povrchový komplex může vytvořit nové elektronové hladiny, které budou v rezonanci, nebo blízko resonance s incidenčním laserovým zářením, což opět poskytuje příspěvek k zesílení rezonančního typu SERS

c) Třetí varianta je sofistikovanější verzí druhé (obtížněji postřehnutelná). Zahrnuje fotoindukovaný přenos náboje mezi analytem a kovem. Tato situace může nastat jen v případech, kdy jsou rozdíly mezi Fermiho hladinami (E_f) kovu a HOMO a LUMO energiemi danými laserem. Mechanismus fotoindukovaného přenosu náboje může být vyvolán mezi HOMO a neobsazenými hladinami nad E_f , popř. mezi LUMO a nejvyšší obsazenou hladinou pod E_f . Tento proces byl pozorován během experimentu s galvanickým článkem, kde byla možná změna rozdílu energetických hladin mezi adsorbovaným analytem a kovovou elektrodou. Tento experiment je pravděpodobně jeden z nejjasnějších důkazů mechanismu přenosu náboje mezi molekulami a substráty.

Tyto mechanismy hrají nezanedbatelnou roli v SERS zesílení a považují se za SERRS (Surface Enhanced Resonant Raman Scattering), neboli povrchově zesílený rezonanční Ramanův rozptyl[1,10].

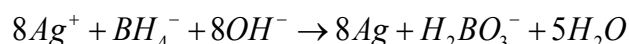
2. Experimentální část

2.1. Příprava Ag nanočástic

2.1.1. Příprava Ag nanočástic pomocí redukce stříbrné soli borohydridem sodným

Redukce stříbrné soli Ag^+ borohydridem sodným ($NaBH_4$) patří do skupiny kondenzačních metod, které umožňují tvorbu vysoce dispergovaných a poměrně monodisperzních soustav nanočástic (dále je v textu označována jako Agb)[11]. V tomto případě se jedná o chemickou kondenzační metodu. Tato redukce byla navržena Creightonem, Blatchfordem a Albrechtem a je právě založena na redukci $AgNO_3$ silným redukčním činidlem ($NaBH_4$). Tato metoda přípravy je uvedena v literatuře např. [12].

Iontový zápis této reakce lze zapsat:

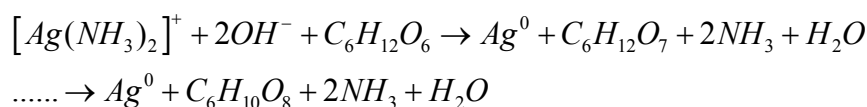


Podstata spočívá ve vmíchání dusičnanu stříbrného do intenzivně míchaného a v ledové lázni chlazeného roztoku borohydridu sodného. Tímto postupem jsme vytvořili stříbrné nanočástice o průměrné velikostech kolem 12 nm .

2.1.2. Příprava redukcí amino-komplexu Ag^+ pomocí cukru

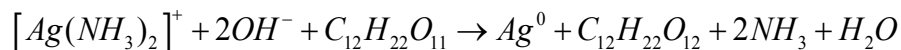
Příprava stříbrných nanočástic pomocí cukru je známa jako Tollensova reakce, kdy se amoniakální komplexní kation stříbrné soli $[Ag(NH_3)_2]^+$ redukuje pomocí cukru. V této práci byla použita jako zástupce monosacharidů glukóza (dále označované koloidy jako AgG) a jako zástupce disacharidů maltóza (dále označované koloidy jako AgM) [13].

Iontový zápis první z reakcí lze zapsat ve tvaru:



Experimentální detaily přípravy Ag nanočástic pomocí modifikované Tollensovy metody [14]: 0,085 g AgNO₃ je rozpuštěno ve 100 mL destilované vody (všechna použitá voda je demineralizovaná). Potom je za stálého míchání přidán 1 mL NH₃ rozpuštěný v 100 mL vody. Následně je za silného míchání přidáno 0,1920 g NaOH rozpuštěného v 100 mL vody, čímž vznikne reakční směs. Nakonec se 0,9008 g glukosy rozpuštěné v 100 mL vody rychle smíchá s reakční směsí. Celá reakční směs je zředěna 100 mL vody do finálního objemu 500 mL [15]. Tímto postupem jsme získali stříbrné nanočástice o velikosti kolem 80 nm.

Pro přípravu dalších nanočástic Ag bylo použito redukce pomocí maltozy, jakožto zástupce disacharidů. Iontový zápis této reakce lze zapsat ve tvaru:



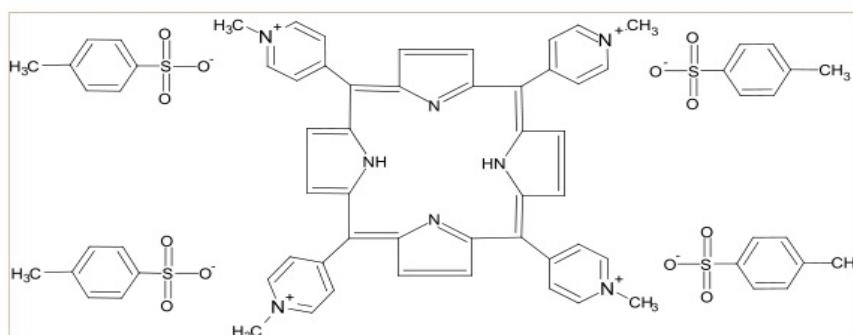
Takto vytvořené nanočástice měli průměrné velikosti okolo 28 nm.

2.2. Modelové sloučeniny kationtový porfyrin TMPyP a 2,2'-bipyridin

Porfyrin (TMPyP) je zajímavý pro jeho potenciální použití ve fotodynamické terapii (PDT) v boji proti rakovině (obr.1a). Poslední dobou jsou syntetizovány porfyriny s různými vhodnými a neobvyklými substituenty jakožto kandidáti pro použití v PDT. Jejich struktury též zajišťují použití v různých typech spektroskopických metod. Mezi nimi, Ramanova spektroskopie senzitivně zkoumá porfyrinovou strukturu a vazebné interakce s ostatními molekulami. Ovšem tato metoda není vhodná k měření velmi nízkých koncentrací používaných v PDT.

2,2'-bipyridin (bpy) patří do skupiny tzv. heterocyklických sloučenin a je dobře známý jako ligand v komplexní (koordinační) chemii (obr. 1b). Tato bezbarvá pevná látka je důležitým isomerem ve skupině

dusíkatých bazí a tvoří komplexy s mnoha přechodnými kovy. Povrchové komplexy tvořené dusíkatými zásadami na nanostrukturách či nanopovrchích Ag byly předmětem četných SERS spektrálních studií [9]. Mimo jiné tyto studie pomohly objasnit relativní příspěvky elektromagnetického a chemického zesílení na celkový SERS signál. Oproti předchozí sloučenině (TMPyP) má bpy o hodně menší účinný průřez pro interakci se zářením, proto je těžké získat dostatečný Ramanův signál. Obzvláště v těchto případech jsme použili kyselinu chlorovodíkovou, která nám povrch Ag nanočástic „vyčistila“ a vytvořila tak podmínky pro adsorbování bpy na povrch částic. Současně při osvětlení vhodnou vlnovou délkou, konkrétně v oblasti ~540 nm u povrchového komplexu Ag-bpy, dochází k fotoindukovanému přenosu náboje, tzv. charge-transfer [16], který lze přiřadit k chemickým systémům zesílení signálu [1]. Tímto způsobem lze docílit detekci nízkých koncentrací bpy.



a) Scheme II – structure of H_2TMPyP -tetratosylate salt



b) Scheme I – two conformations of the 2,2'-bipyridine structure.

Obr.1 schema TMPyP (a) a 2,2'-bipyridin(b), obrázek převzat z [9]

Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS) a povrchem zesílená rezonanční Ramanova spektroskopie (SERRS) překonává problém detekce nízkých koncentrací, což platí pro obě modelové sloučeniny. Ramanův signál z molekul adsorbovaných na zdrsňeném

povrchu kovů nebo na nanočásticích je zesílen výše zmíněnou plasmonovou oscilací elektronového plynu, případně zmíněným přenosem náboje (charge-transfer). Tím dochází k zesílení signálu molekul modelových sloučenin v řádech $10^4 - 10^6$. Vhodnými kovy jsou především Ag, Au, a Cu, které mají extinkční křivku povrchového plasmonu umístěnu ve vhodné části spektra [17].

2.3. Přístrojové vybavení a použité techniky

K charakterizaci vzniklých nanočástic bylo použito několik experimentálních technik. Některé z nich jsou vhodné pro základní představy o vzniklých nanočástic, některé jsou zásadní pro vyhodnocování interakcí nanočástic v roztoku a interakcí nanočástic s modelovými sloučeninami.

Do první kategorie můžeme zařadit dynamický rozptyl světla, neboli DLS (Dynamic light scattering). Tato metoda slouží k určení distribuce velikosti nanočástic. Principem je měření Brownova pohybu částic ve vodném roztoku. Používá se laserového svazku, který se rozptyluje na částicích a následně se analyzují fluktuace intenzit rozptýleného světla. To je prováděno v různých časových okamžicích a pomocí korelační funkce lze dopočítat difusní koeficient pomocí Einsteinova-Smoluchowského rovnice [18,19]. Primárně naměřené distribuce jsou vážené podle intenzity z důvodů očekávané širší distribuce nanočástic.

Další pomocnou metodou určující vlastnosti nanočástic je měření ζ (Zeta) potenciálu. Ten je parametrem charakterizujícím elektrické vlastnosti na rozhraní nanočástice s elektrickou dvojvrstvou a příslušného rozpouštědla. Mezi těmito dvěma soustavami je určitý elektrokinetický potenciál, tzv. ζ potenciál, který vyjadřuje míru elektrické stability nanočástic [20].

DLS i ζ potenciál byly naměřeny pomocí přístroje Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments).

Dále jsme použili transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) pro hrubý odhad velikostí částic a jejich tvarů. TEM je bezesporu nejpoužívanější metodou pro mikroskopii malých rozměrů pod optickým difrakčním limitem. Použití elektronového mikroskopu pod tímto limitem je dáno nositeli informace, které jsou v tomto případě elektrony, které mají oproti fotonům o hodně kratší vlnovou délku, a tím i větší rozlišovací schopnost [21].

K měření byl použit mikroskop JEOL JEM-2010 s LaB_6 katodou (urychlující napětí 160 kV s bodovým rozlišením 0,194 nm). Vzorek pro transmisní elektronovou mikroskopii byl získán nanesením a vysušením 4 μL příslušného systému na kruhovou Cu síťku o průměru 3 mm.

Výše zmiňované metody jsou dobré pro vytvoření základní představy o připravovaných nanočásticích.

Přímou metodou pro měření extinkčních spekter je UV-vis spektroskopie. Tato metoda se používá především v chemii. V principu jde o absorpci záření molekul v UV-vis oboru vlnových délek, tedy od 200 - 800 nm. V této oblasti dochází u molekul k elektronovým přechodům mezi energetickými hladinami. Při těchto přechodech dochází rovněž k excitaci vibračních a rotačních hladin molekuly. Z toho také vyplývá výsledné absorpční spektrum, které je pásové. Podle polohy absorpčních maxim lze určit vzdálenosti elektronových orbitalů, které jsou charakteristické pro každý materiál [22,23]. UV-vis spektra jsou doplňková k Ramanovým spektrům a jako taková nám dávají informace o dějích v systému nanočástic Ag, modelových adsorbátech či HCl.

SERS/SEERS, neboli povrchem zesílená Ramanova spektroskopie nese informaci o vibračním pohybu molekuly, kterou je možno využít při strukturních analýzách organických či anorganických sloučenin. Je vhodná především k měření velmi nízkých koncentrací sloučenin

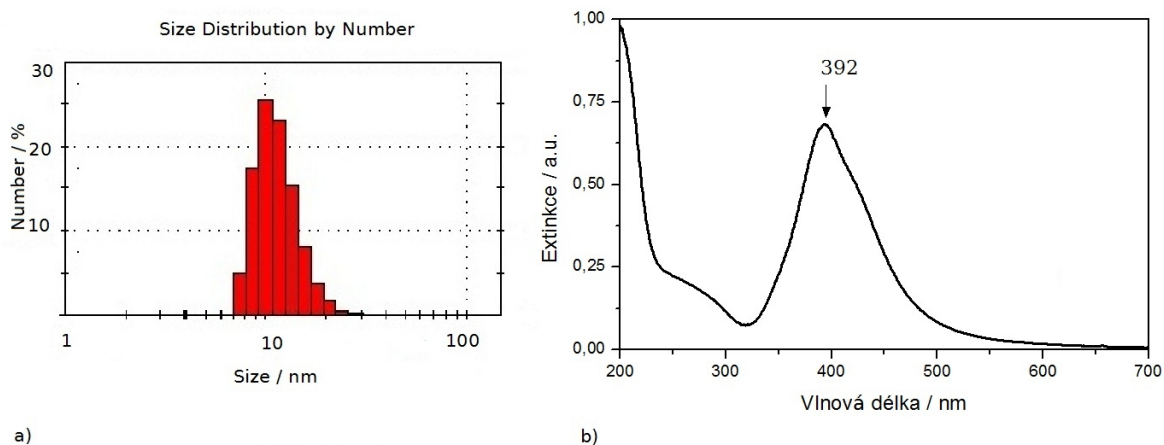
v přítomnosti některého z vhodných plasmonických kovů v nanorozměrech.

Měření SERS a SERRS spekter jsme prováděli v teplotně stabilizované místnosti za použití Ramanova spektrometru s excitační vlnovou délkou 532 nm za použití laseru Verdi V5 laser (DPSS technology, Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA, výkon ~100 mW v kontinuálním režimu). Rozptýlené záření bylo soustředěno objektivem pod úhlem 90° a detekováno dusíkem chlazeným CCD detektorem Symphony (Horiba Jobin Yvon S.a.S., Longjumeau, France) s rozlišením 2048 x 512 pixelu. Dalším článkem v řetězu je iHR320 obrazový spektrometr (Horiba Jobin Yvon S.a.S., Longjumeau, France) s difrakční mřížkou s 1200 vrypy/mm. Celý měřicí systém byl kontrolován softwarem LabSpec 5 (Horiba Jobin Yvon S.a.S., Longjumeau, France). Expoziční čas byl nastaven na 90x 1s a velikost štěrby byla nastavena na 110 μm. Přesná kalibrace spekter Ramanova posunu byla prováděna pomocí měření signálu toluenu. Každý připravený systém obsahující nanočástice Ag a modelový adsorbát či HCl byl testován v pětiokénkové kyvetě (5 x 5 x 30 mm³).

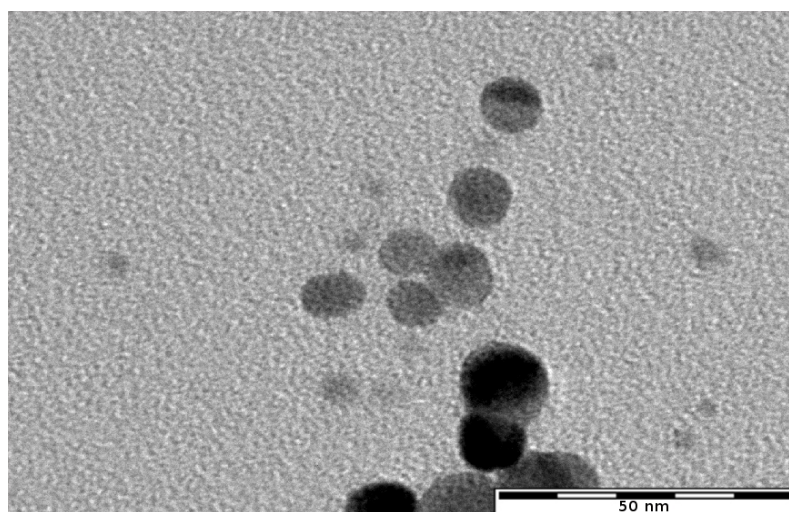
Ačkoliv ke kompletní charakterizaci systémů obsahujících nanočástice Ag a modelové adsorbáty či HCl by měly být využity všechny výše zmíněné techniky (TEM, DLS, zeta potenciál, UV-vis), my se v kapitolách výsledků a diskusí zaměříme především na sledování změn v UV-vis spektrech a budeme diskutovat přímé souvislosti pozorované v SERS/SERRS spektrech. Důvodem je fakt, že v obou případech sledujeme roztokové systémy (kde nic neodsychá na rozdíl od případu přípravy vzorků na TEM), které interagují pouze s viditelným zářením (tzn. není vkládáno napětí jako v případě měření ζ potenciálu). Navíc jsme při volbě excitační vlnové délky pro měření Ramanova rozptylu limitováni dostupným laserem (532 nm), takže je důležité sledovat průběh plasmonové extinkce systémů obsahujících Ag nanočástice tří různých druhů v okolí této vlnové délky.

2.4. Charakterizace nanočástic

2.4.1. Vlastnosti AgB nanočástic



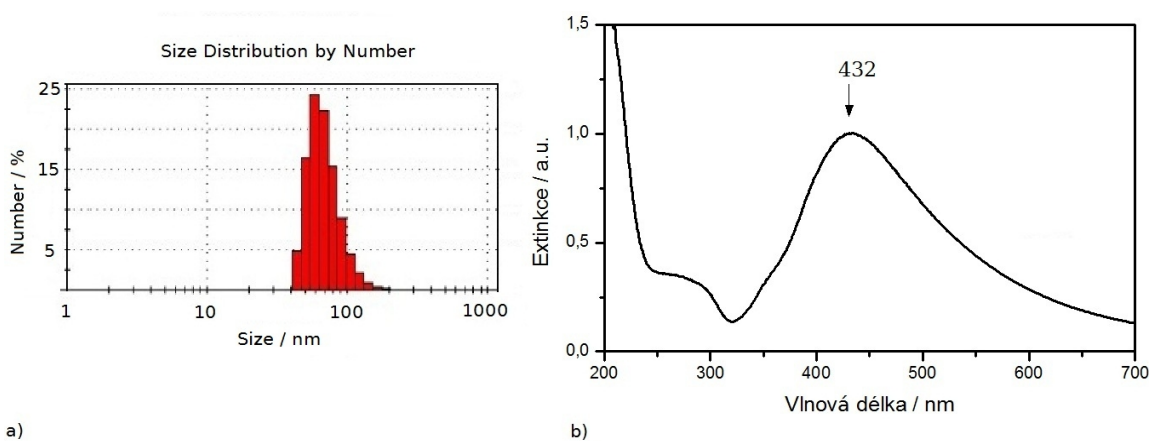
Obr.2 Velikostní distribuce (a), UV-vis spektrum (b) AgB nanočástic vytvořených redukcí stříbrných solí pomocí NaBH_4 . Vzorek byl pro měření UV-vis zředěn v poměru 1:1 s destilovanou vodou.



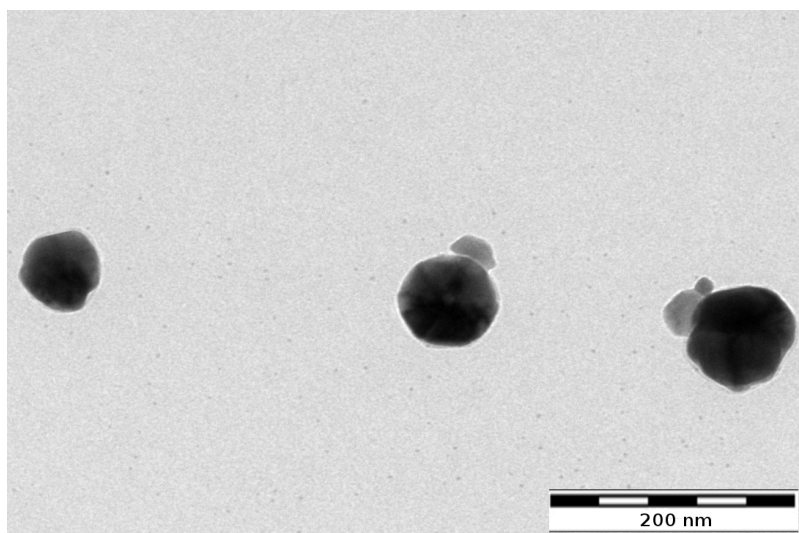
Obr. 3 TEM snímek AgB nanočástic.

ζ (Zeta) potenciál je v tomto případě $\zeta_B = -31,6 \pm 0,1 \text{ mV}$

2.4.2 Vlastnosti AgG a AgM nanočástic

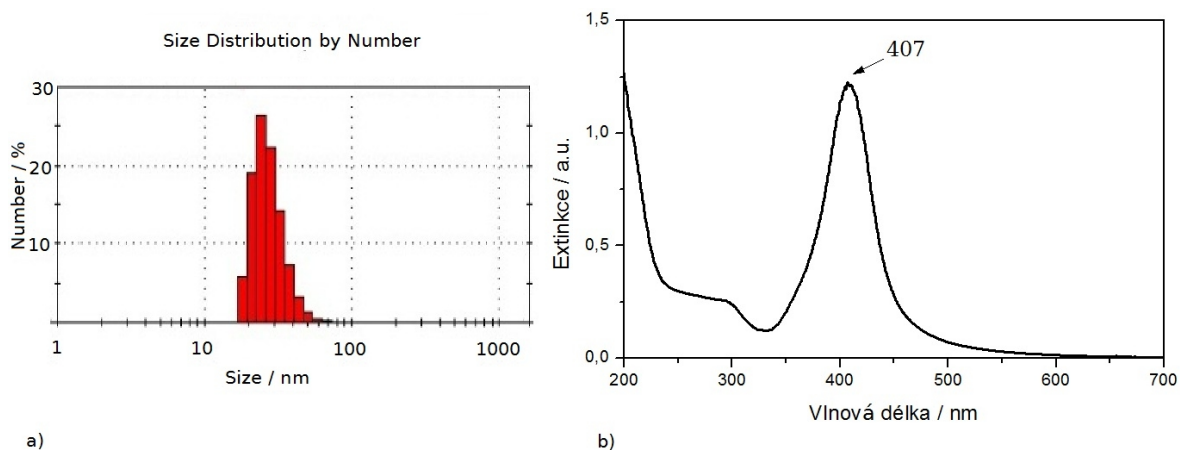


Obr.4 Velikostní distribuce (a), UV-vis spektrum (b) AgG nanočástic vytvořených redukcí amino-komplexu Ag^+ pomocí glukosy. Vzorek byl pro měření UV-vis zředěn v poměru 1:2 s destilovanou vodou.

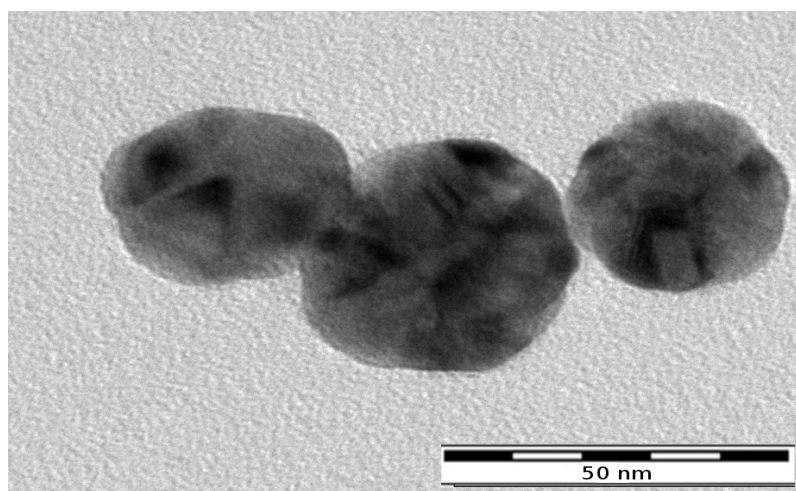


Obr. 5 TEM snímek AgG nanočástic.

ζ (Zeta) potenciál je v tomto případě $\zeta_G = -48,3 \pm 0,1 \text{ mV}$



Obr. 6 Velikostní distribuce (a), UV-vis spektrum (b) AgM nanočástic vytvořených redukcí amino komplexu Ag^+ pomocí maltosy. Vzorek byl pro měření UV-vis zředěn v poměru 1:2 s destilovanou vodou.



Obr. 7 TEM snímek AgM nanočástic.

ζ (Zeta) potenciál je v tomto případě $\zeta_m = -38,1 \pm 0,1 \text{ mV}$

Následující tabulka přehledně shrnuje všechny naměřené fyzikální vlastnosti jednotlivých druhů nanočástic.

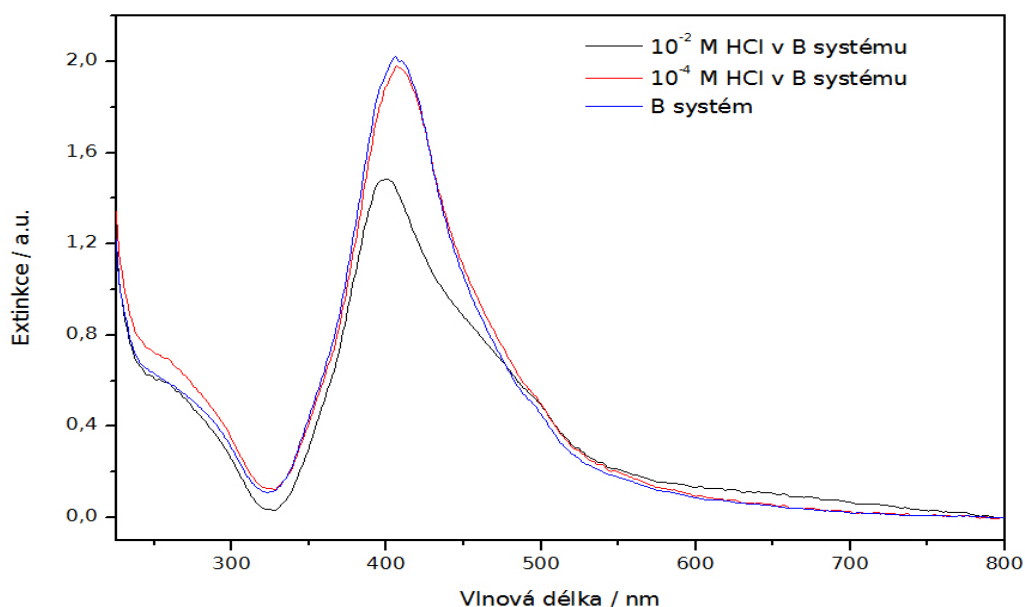
Tab. 2 Souhrn charakteristických veličin připravených nanočástic.

	AgB	AgG	AgM
Průměrná velikost [nm]	$11,6 \pm 0,2$	$69,4 \pm 1,4$	$27,6 \pm 0,6$
ζ potenciál [mV]	$-31,6 \pm 0,1$	$-48,3 \pm 0,1$	$-38,1 \pm 0,1$
Vlnová délka λ extinkčního maxima [nm]	392 ± 1	432 ± 1	407 ± 1

3. Výsledky a diskuse

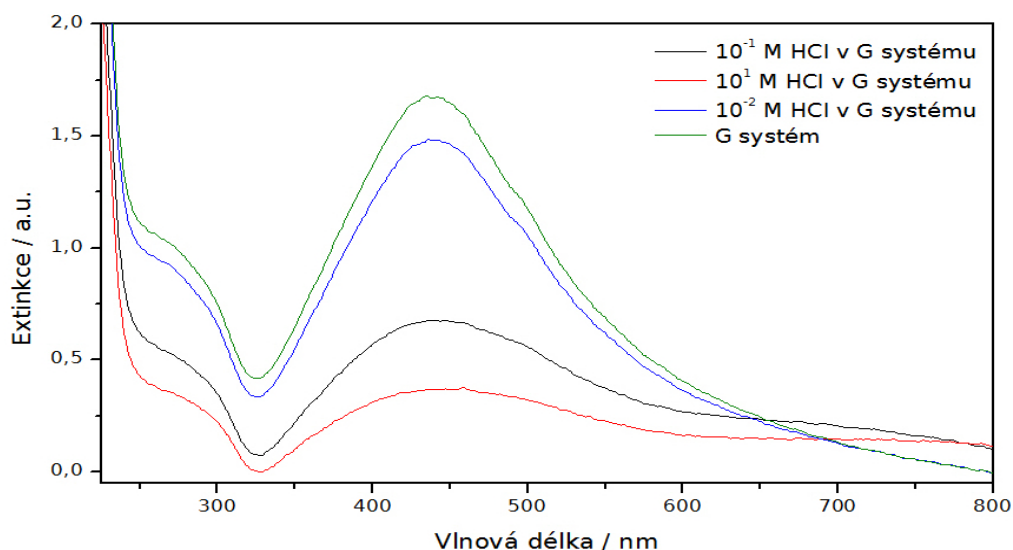
3.1. Vliv HCl na UV-vis spektra Ag nanočástic

V grafu na obrázku 8 je vidět pokles maxima rezonance povrchového plasmonu v AgB systému bez přítomnosti modelových sloučenin. Pokles je tím větší, čím více je v koloidním roztoku HCl. Při koncentraci 10^{-4} M HCl v systému je pokles nepatrný. Pokles maxima plasmonové rezonance souvisí s agregací či změnou velikostí a tvaru nanočástic, jak bylo již dříve pozorováno [24].



Obr. 8 UV-vis spektrum AgB systému s různou koncentrací HCl.

Stejně jako v předchozím případě je vidět v grafu na obrázku 9 pokles maxima rezonance povrchového plasmonu v AgG systému, což je způsobeno vlivem účinku HCl.

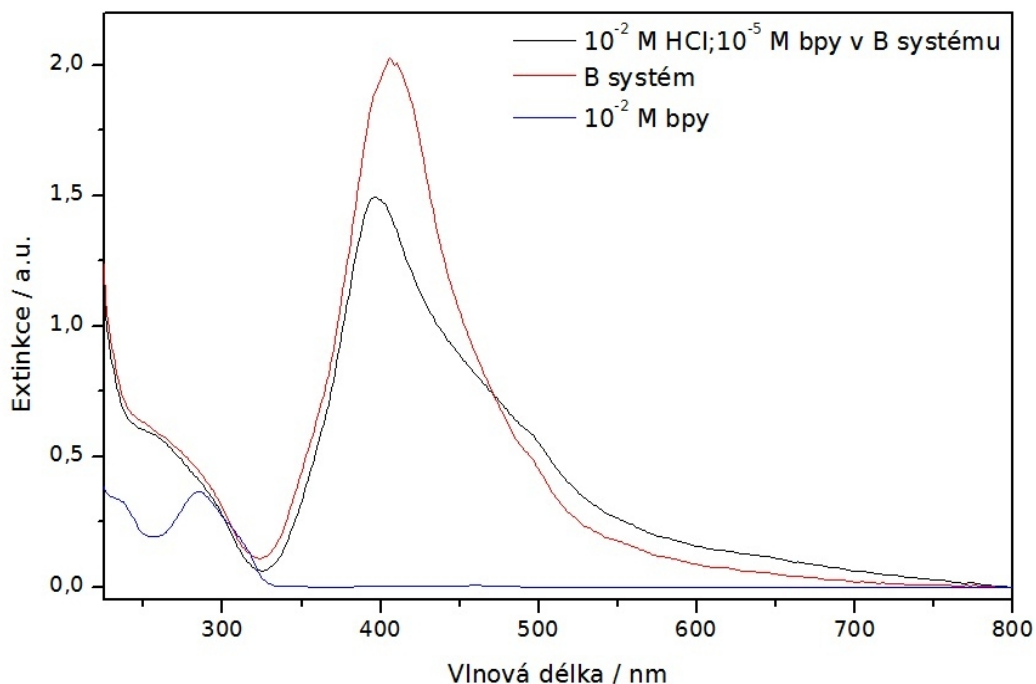


Obr. 9 UV-vis spektrum AgG systému s různou koncentrací HCl.

U maltosového Ag koloidu jsme nepozorovali žádnou změnu v UV-vis spektrech, proto není uvedeno.

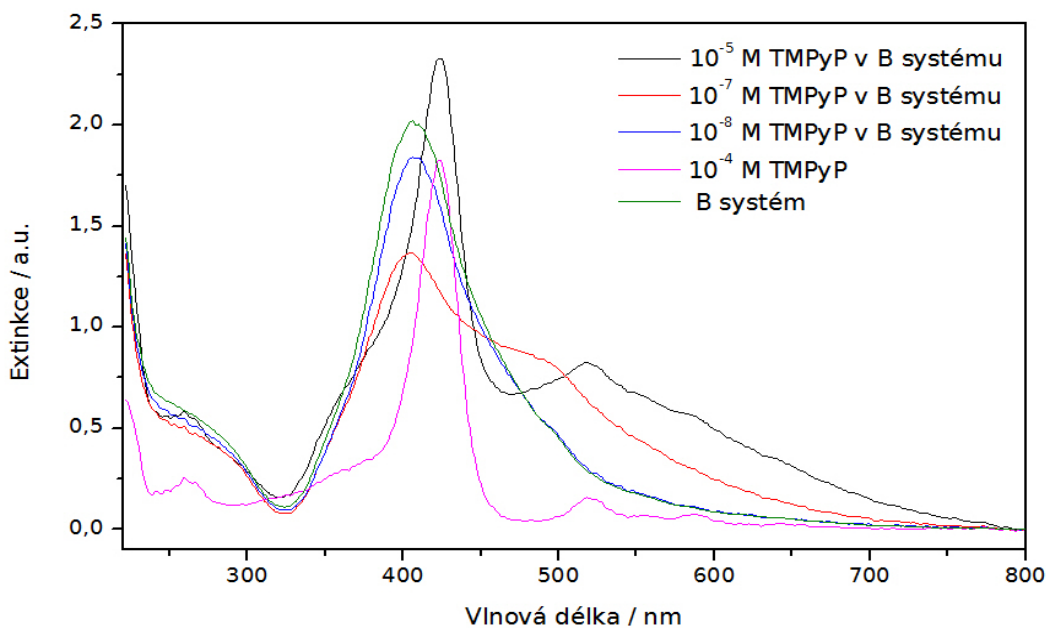
3.2. Vliv adsorbátu nebo adsorbátu a HCl na UV-vis spektra Ag nanočástic

Zvolenými adsorbáty přidávanými k Ag nanočásticím jsou 2,2'-bipyridin (bpy) a kationtový porfyrin TMPyP. V případě bpy jde o látku, která absorbuje v UV a neabsorbuje ve viditelné části spektra (obr. 10), zatímco TMPyP díky prokonjugovanému porfyrinovému kruhu absorbuje ve viditelné části spektra (obr. 11). Bpy způsobuje agregaci Ag nanočástic v roztoku pouze při vyšší koncentraci [9], proto jsme s ohledem na použitou excitační vlnovou délku světla zvolili preagregaci účinkem HCl, a tím se dostali do lepší rezonance při 532 nm, jak je vidět na obr. 10.



Obr.10 UV-vis spektrum AgB systému s HCl s vysokou koncentrací bpy.

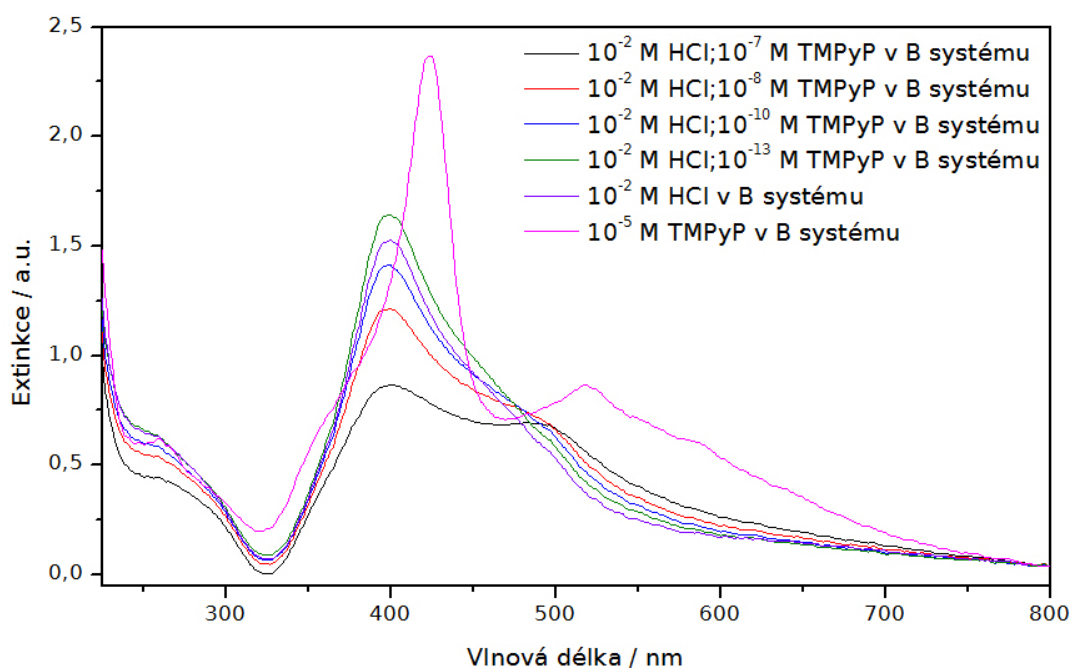
Do borohydridového Ag systému bylo přidáno 1×10^{-8} M koncentrace TMPyP, což vedlo ke snížení maxima plasmonové resonance (modré spektrum v obr. 11). Při dalším zvýšení koncentrace TMPyP v systému opět dochází ke snížení maxima plasmonové resonance, ale také dochází k požadovanému nárůstu extinkce v oblasti



Obr. 11 UV-vis spektrum AgB systému s různou koncentrací TMPyP.

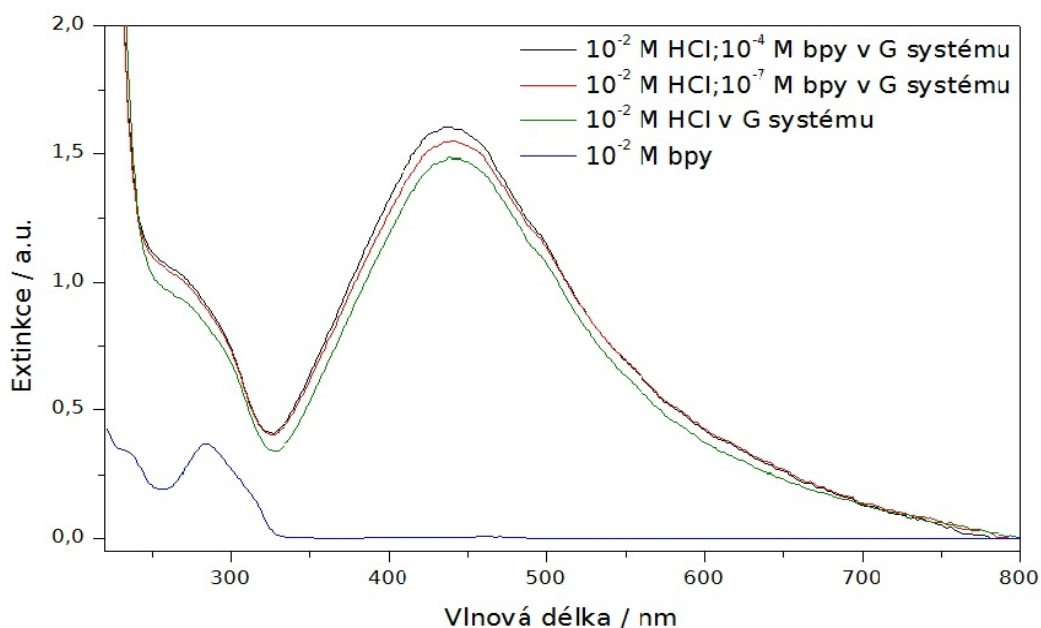
od cca 450 nm výše (viz obr. 11, černé a červené spektrum). Černé spektrum na obr. 11, odpovídající koncentraci 1×10^{-5} M TMPyP v sobě již zahrnuje překrytou absorpci TMPyP (růžové spektrum v obr. 11 pro přímé srovnání) a plasmonovou rezonanci AgB koloidu (zelené spektrum v obr. 11 pro srovnání).

V dalším kroku jsme využili HCl opět pro preagregaci Ag nanočástic a následně přidávali TMPyP (viz obr. 12).



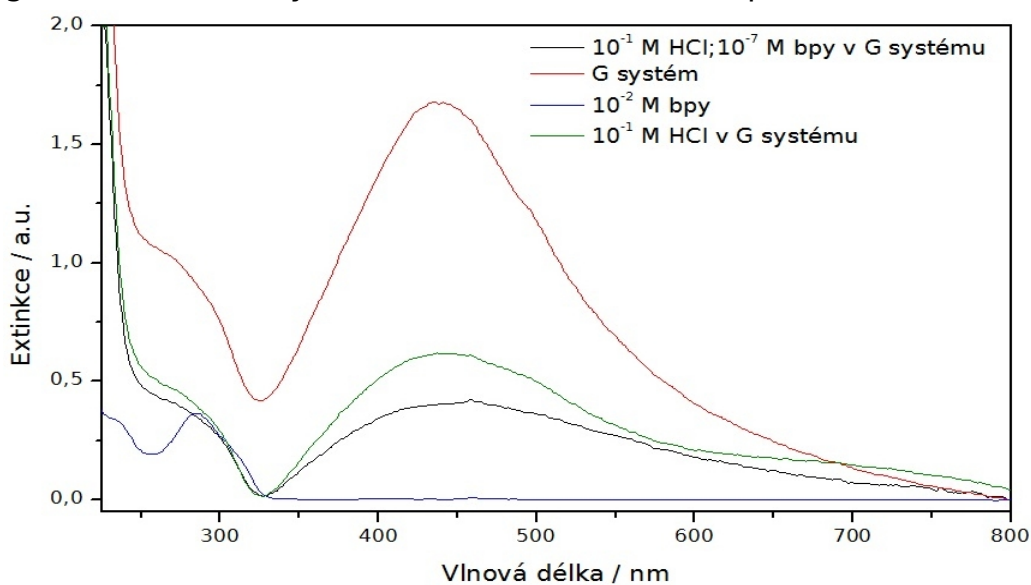
Obr.12 UV-vis spektrum AgB systému s 10^{-2} M koncentrací HCl a různou koncentrací TMPyP.

Obdobný postup jako u AgB jsme aplikovali rovněž na systémy obsahující nanočástice redukované glukózou, tj. přidávali preagregační činidlo HCl. Jak je vidět na obrázku 13, AgG koloid není zdaleka tak citlivý na přidavek HCl v koncentracích do 1×10^{-2} M a včetně jako tomu bylo u AgB systému. v rezonanci s 532 nm-excitační vlnovou délkou laseru.



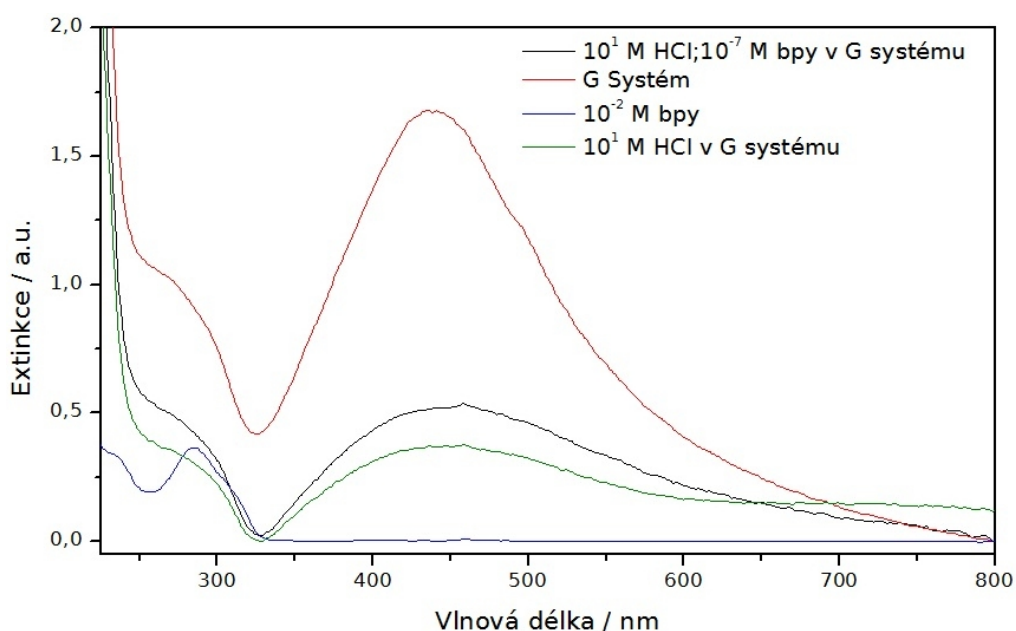
Obr.13 UV-vis spektrum AgG systému s 10^{-2} M koncentrací HCl a různou koncentrací bpy.

Při zvýšení koncentrace HCl o jeden řád, tzn. na 1×10^{-1} M, a výše již dochází ke značné agregaci či přerůstání Ag nanočástic, jak je patrné z obr. 14 a 15, ze zelených křivek. Čím vyšší je koncentrace HCl, tím nižší je původní hodnota extinkce u ca 420 nm a zároveň je patrnější zvýšená extinkce v oblastech nad 600 nm odpovídající právě buď agregátům, či zvětšeným rozměrům nanočástic (z původních desítek



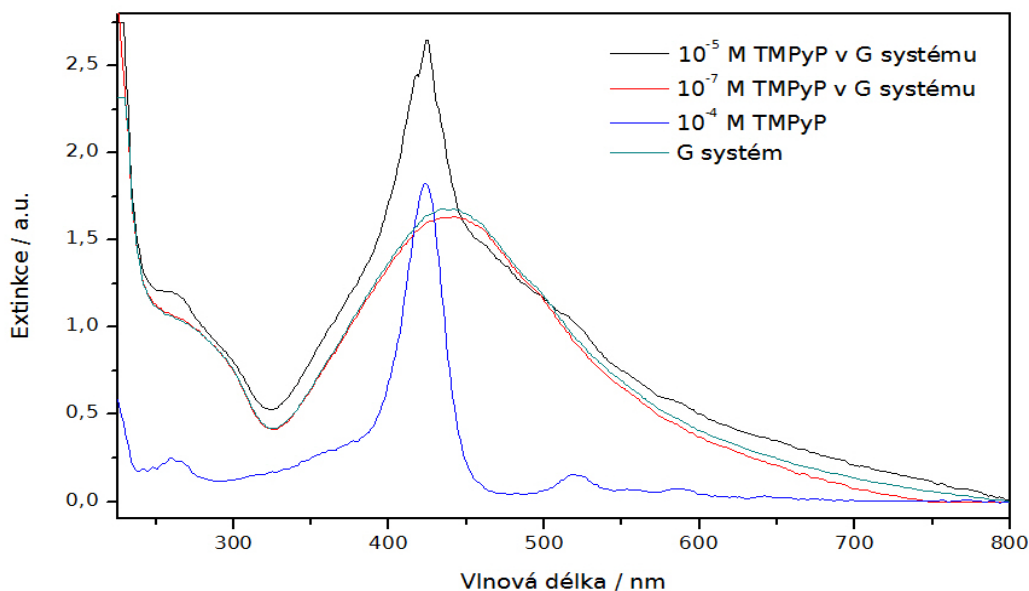
Obr.14 UV-vis spektrum AgG systému s 1×10^{-1} M koncentrací HCl a 1×10^{-7} M koncentrací bpy.

nanometrů na stovky nanometrů).



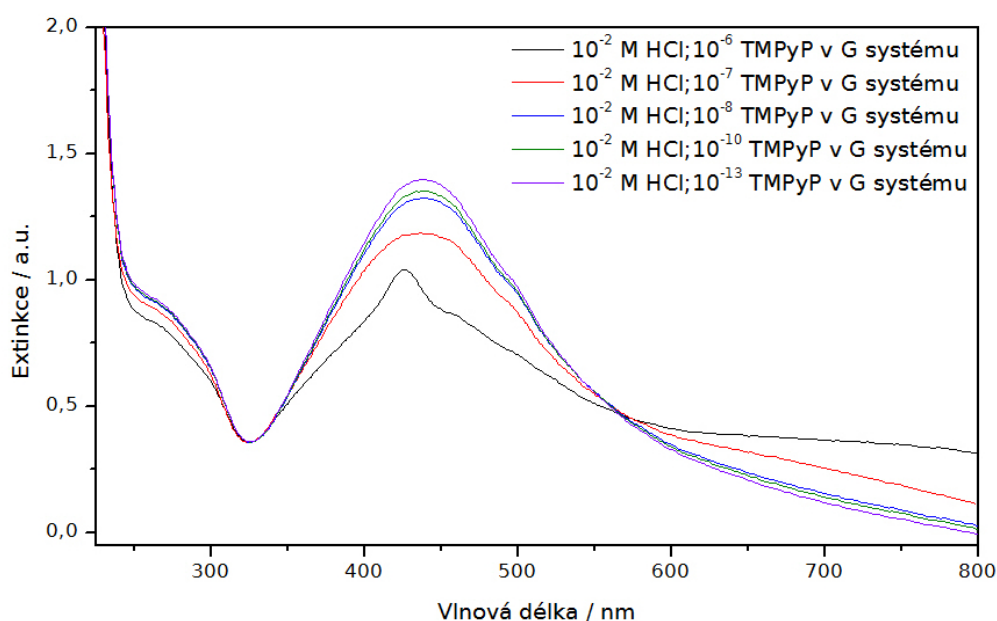
Obr. 15 UV-vis spektrum AgG systému s 1×10^1 M koncentrací HCl a 1×10^{-7} M koncentrací bpy.

Kromě bpy jsme k otestování SERS/SERRS aktivity povrchu nanočástic v AgG koloidu používali TMPyP. UV-vis spektra z těchto systémů jsou uvedeny na obr. 16 a účinek HCl na obr. 17.



Obr. 16 UV-vis spektrum AgG systému s různou koncentrací TMPyP.

Na obrázku 16 je vidět nepatrné snížení plasmonové extinkce pro koncentraci TMPyP 1×10^{-7} M. Oproti tomu, při vyšších koncentracích TMPyP v AgG koloidu dochází ke zvýšení extinkce nejen v oblasti plasmonové resonance (okolí ~ 440 nm), ale i v UV oblasti spektra (pás u cca 260 nm) – černé spektrum v obr. 16. Pozorované zvýšení extinkce odpovídá překryvu absorpce TMPyP (modré spektrum v obr. 16) a plasmonové resonance AgG koloidu (zelené spektrum v obr. 16).



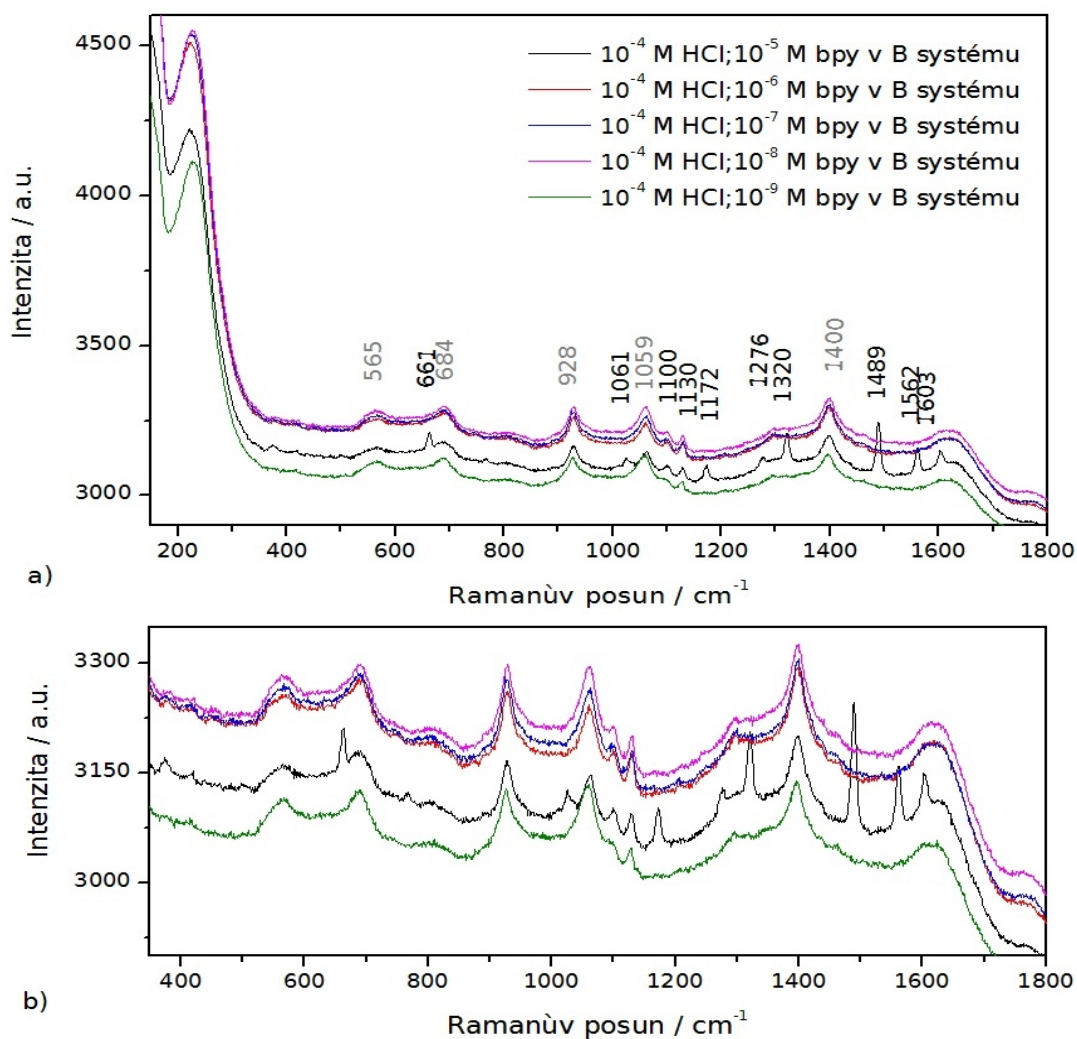
Obr. 17 UV-vis spektrum AgG systému s 1×10^{-2} HCl a TMPyP s různou koncentrací.

Na obrázku 17 je vidět vliv zvyšující se koncentrace TMPyP na UV-vis spektra. Dochází k postupnému snižování plasmonové resonance. Při koncentraci 1×10^{-6} M TMPyP v systému se nám projeví absorpční pás samotného TMPyP, jak bylo diskutováno výše.

3.3. SERS/SERES bipyridinu na Ag nanočásticích

Pro interpretaci Ramanových spekter bpy jsme využili literaturu [24], kde jsou publikovány dva nejznámější SERS/SERES spektrální projevy interakce bpy s povrchem Ag nanočástic: Ag^+ -bpy a Ag^0 -bpy forma. Zatímco Ag^0 -bpy forma, generovaná přítomností zvýšené koncentrace chloridů, vykazuje fotoindukovaný přenos náboje u ca 540 nm [16], Ag^+ -bpy forma tuto vlastnost nemá. S ohledem na fakt, že používáme excitační vlnovou délku 532 nm, budeme buď pozorovat SERES spektra v případě Ag^0 -bpy formy, nebo SERS spektra v případě Ag^+ -bpy formy.

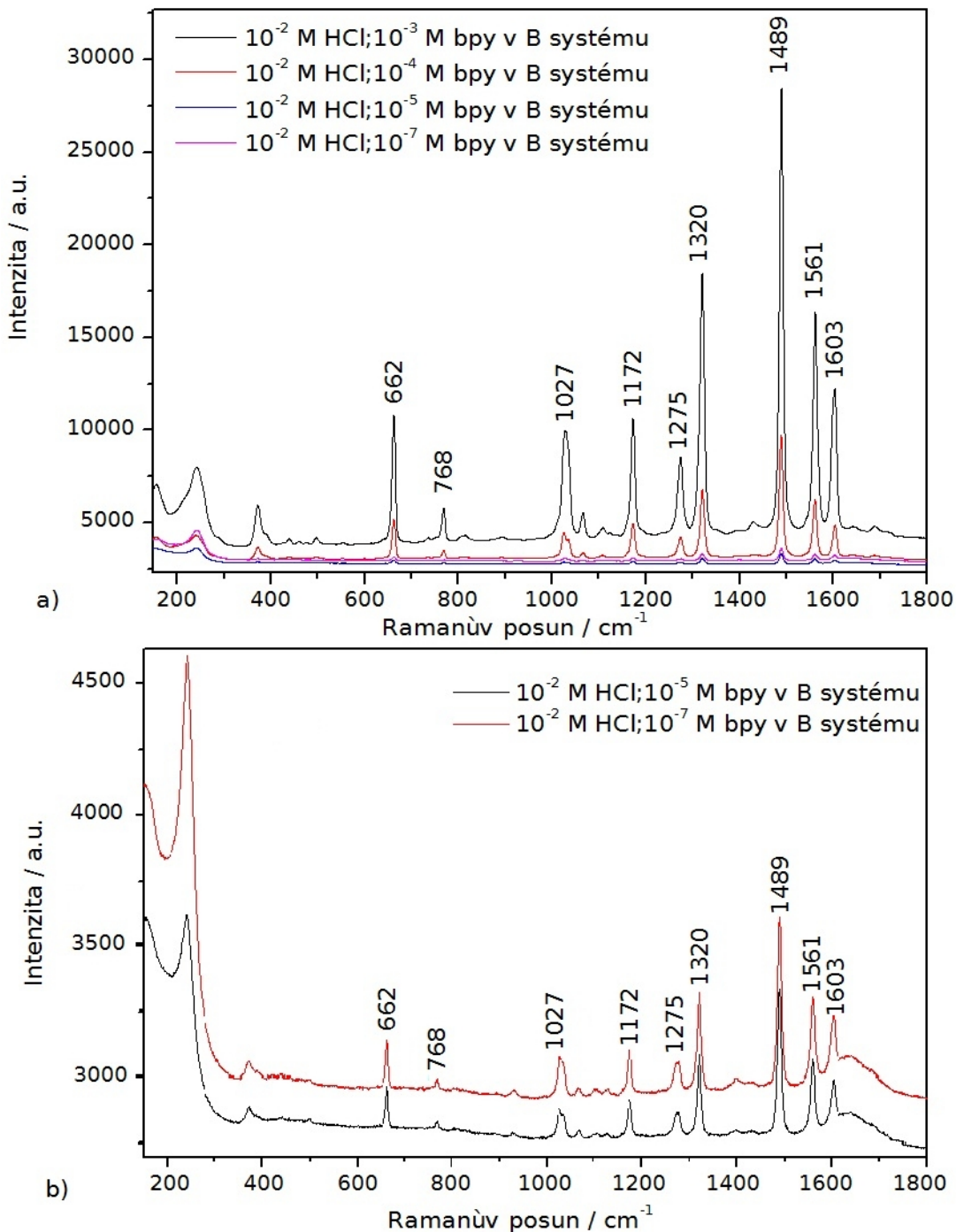
Na obrázku 18a jsou vidět spektra prvního ze systémů tvořeného AgB nanočásticemi, bpy a HCl. V tomto spektru je u $\sim 240 \text{ cm}^{-1}$ patrný AgCl pás, který má oproti zbylému spektru o hodně větší intenzitu. Při této koncentraci HCl, $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, která je v porovnání s koncentrací adsorbátu bpy o několik řádů vyšší, jsou Ramanovy linie samotného bpy neznatelné a nedochází k zásadnímu zesilování SERS/SERES signálu až do koncentrace $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ bpy. Při koncentraci $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ bpy v systému se objevují pásy, které lze přiřadit Ag^0 -bpy [22], což je však s ohledem na použitou koncentraci HCl neobvyklé. Proto toto spektrum přikládám špatně vymyté kyvetě a zbytkům bpy v systému.



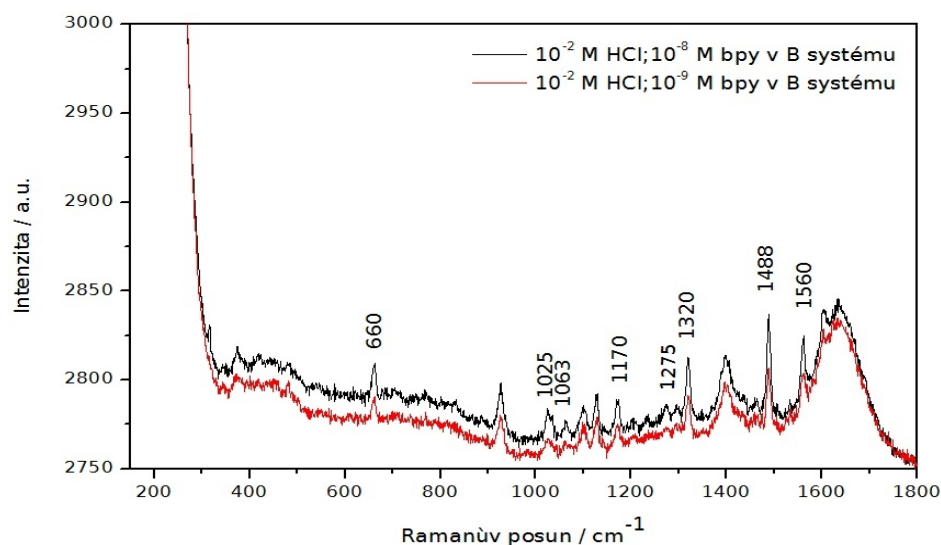
Obr.18 Ramanovo spektrum AgB koloidu s nízkou koncentrací HCl a různou koncentrací bpy (a) a detail téhož spektra (b).

Na obrázku 19 je jako v předešlém případě vidět Ramanovo spektrum AgB systému s bpy, ale tentokrát jsme zvýšili koncentraci HCl na 1×10^{-2} M, což vedlo k „vyčištění“ povrchu částic, adsorpci molekul bpy a tvorbě Ag^0 -bpy formy. Při této HCl koncentraci již dochází k zesilování SERS signálu, i když se s excitační vlnovou délkou laseru (532 nm) trefujeme do sestupné hrany UV-vis spektra (obr. 10). Důvodem je fakt, že navíc k elektromagnetickému mechanismu SERSu využíváme také fotoindukovaného přenosu náboje při dané excitační vlnové délce laseru [16], čímž dostáváme i příspěvek chemického

zesílení a jedná se tak o SERRS. Jak je vidět, SERRS signál samotného bpy se vyrovnává v intenzitě s pásem od Ag-Cl, ačkoliv je koncentrace bpy v systému stále o několik řádů nižší než HCl, např. červené spektrum na obr. 19a anebo černé spektrum na obr. 19b.

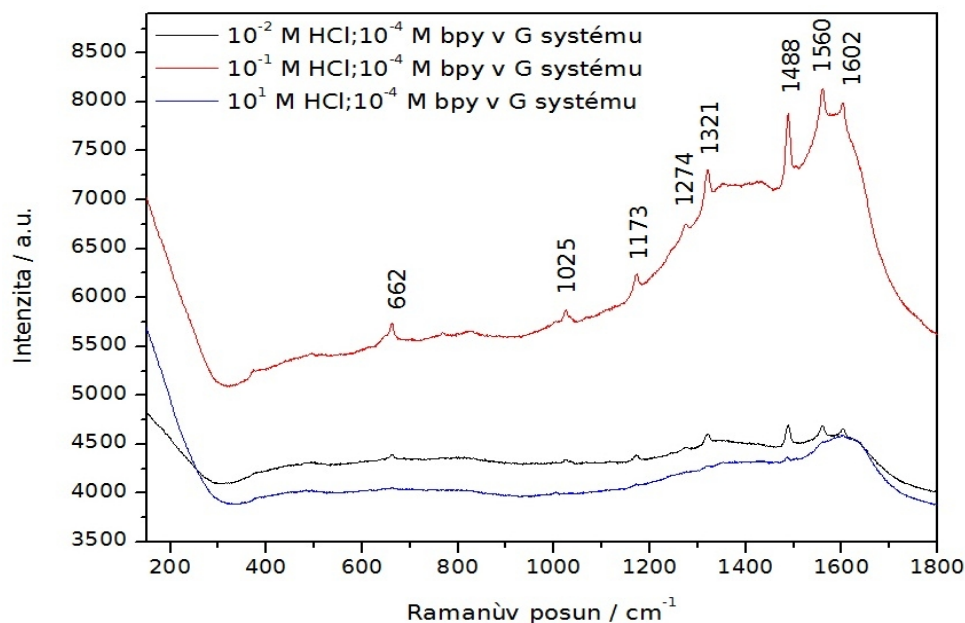


Obr.19 Ramanovo spektrum AgB koloidu s vyšší koncentrací HCl a různou koncentrací bpy (a) a detail spektra (b) pro koncentrace bpy 1 x 10⁻⁵ a 1 x 10⁻⁷ M.



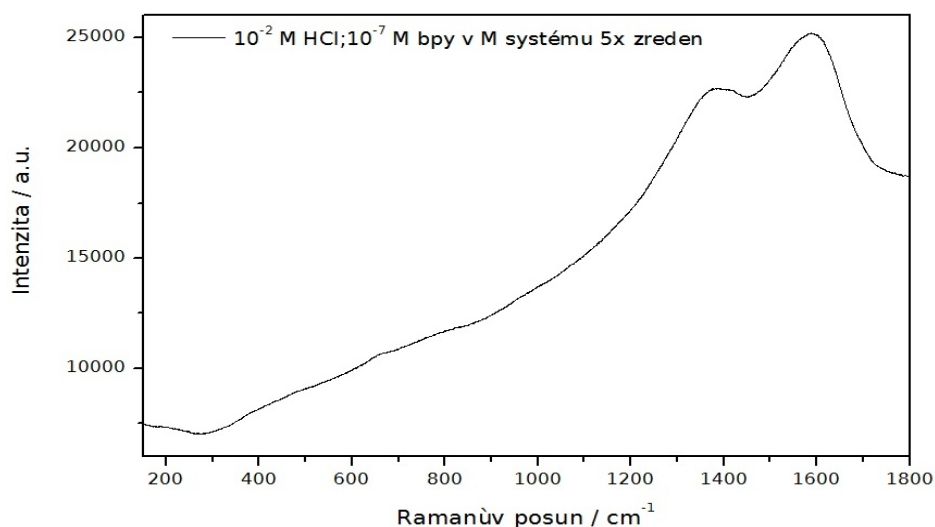
Obr. 20 Ramanovo spektrum AgB koloidu s vyšší koncentrací HCl a koncentracemi 10^{-8} a 10^{-9} M bipyridinu.

Na obrázku 20 je vidět SERRS signál z velmi nízké koncentrace bpy v AgB systému. Z grafu je patrná velká hladina šumu, i přesto jsou znatelné pásy bpy. Opět zde figuruje vysoká koncentrace HCl v systému (1×10^{-2} M), která umožňuje tvorbu Ag^0 -bpy, tedy formu s možností fotoindukovaného přenosu náboje [16], čímž se použitím excitace 532 nm dostáváme opět do rezonančního Ramanova rozptylu, neboli SERRS. Koncentraci 1×10^{-9} M považujeme za detekční mez tohoto systému.



Obr. 21 Ramanovo spektrum bipyridinu v AgG koloidu při různé koncentraci HCl.

Na obrázku 21 je vidět vliv HCl na Ramanovo spektrum AgG systému a bpy. Ramanovy linie od Ag⁰-bpy povrchového komplexu jsou zřejmé teprve u 1×10^{-4} M koncentrace bpy s 1×10^{-2} M koncentrace HCl (černá křivka), což považujeme za detekční mez tohoto systému. Vyšší koncentrace HCl způsobují agregaci či přerůstání nanočástic takového rozsahu, že se dostáváme mimo rezonanci s excitační vlnovou délkou 532 nm, jak bylo pozorováno na extinkčních spektrech v UV-vis oblasti (zelená křivka na obr. 14).



Obr. 22 Ramanovo spektrum AgM koloidu s bpy.

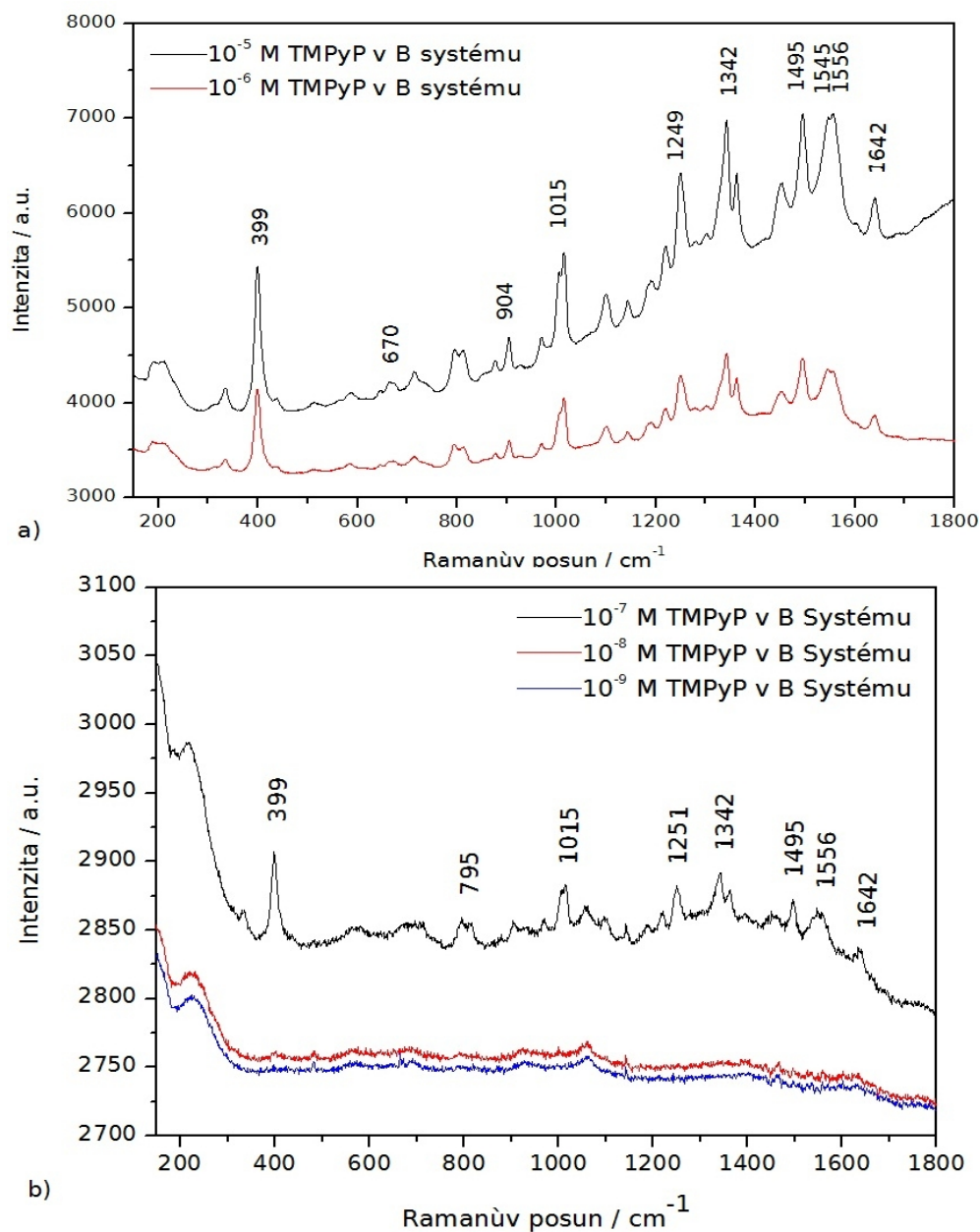
Na obrázku 22 je vidět spektrum AgM koloidu s bipirydinem. U maltosového koloidu jsme po přidání bpy nebo HCl a bpy nezaznamenali jakoukoliv změnu v UV-vis spektrech, jak už bylo uvedeno v kapitole 3.3, což v kombinaci s malými částicemi a z toho vyplývajícím úzkým absorpčním pásem nenaznačovalo SERS/SEERS aktivitu při použití excitace 532 nm. Tento fakt je dokumentován obrázkem 22, kde jsou vidět pouze pásy grafitického uhlíku (~1400 a ~1600 cm^{-1}). Grafitický uhlík je zpravidla pozorován ve spektrech Ramanova rozptylu, pokud dochází k pálení organických látek vlivem silného elektromagnetického pole v blízkosti nanočástic Ag. S ohledem na fakt, že AgM koloid vznikl redukcí disacharidem maltosou, je dost pravděpodobné, že vysoká koncentrace uhlíkatých látek (pocházejících ze syntézy) v blízkosti nanočástic vede k pozorování těchto dvou charakteristických pásů. Usoudili jsme tudíž, že nanočástice vytvořené touto metodou jsou pro zesílení Ramanova rozptylu při použití excitační vlnové délky 532 nm naprosto nevhodné.

3.4. SERRS porfyrinu TMPyP na Ag nanočásticích

V této kapitole se budeme věnovat SERRS spektrům porfyrinu TMPyP na Ag nanočásticích. Podstata SERRS, jak již bylo zmiňováno v teoretické části a připomenuto v předchozí kapitole, spočívá ve využití nejen elektromagnetického, ale i chemického mechanismu zesílení Ramanova signálu molekul adsorbátu. Budeme tak využívat nejen plasmonové resonance Ag nanočástic, ale i absorpce modelové sloučeniny TMPyP v oblasti excitační vlnové délky laseru 532 nm.

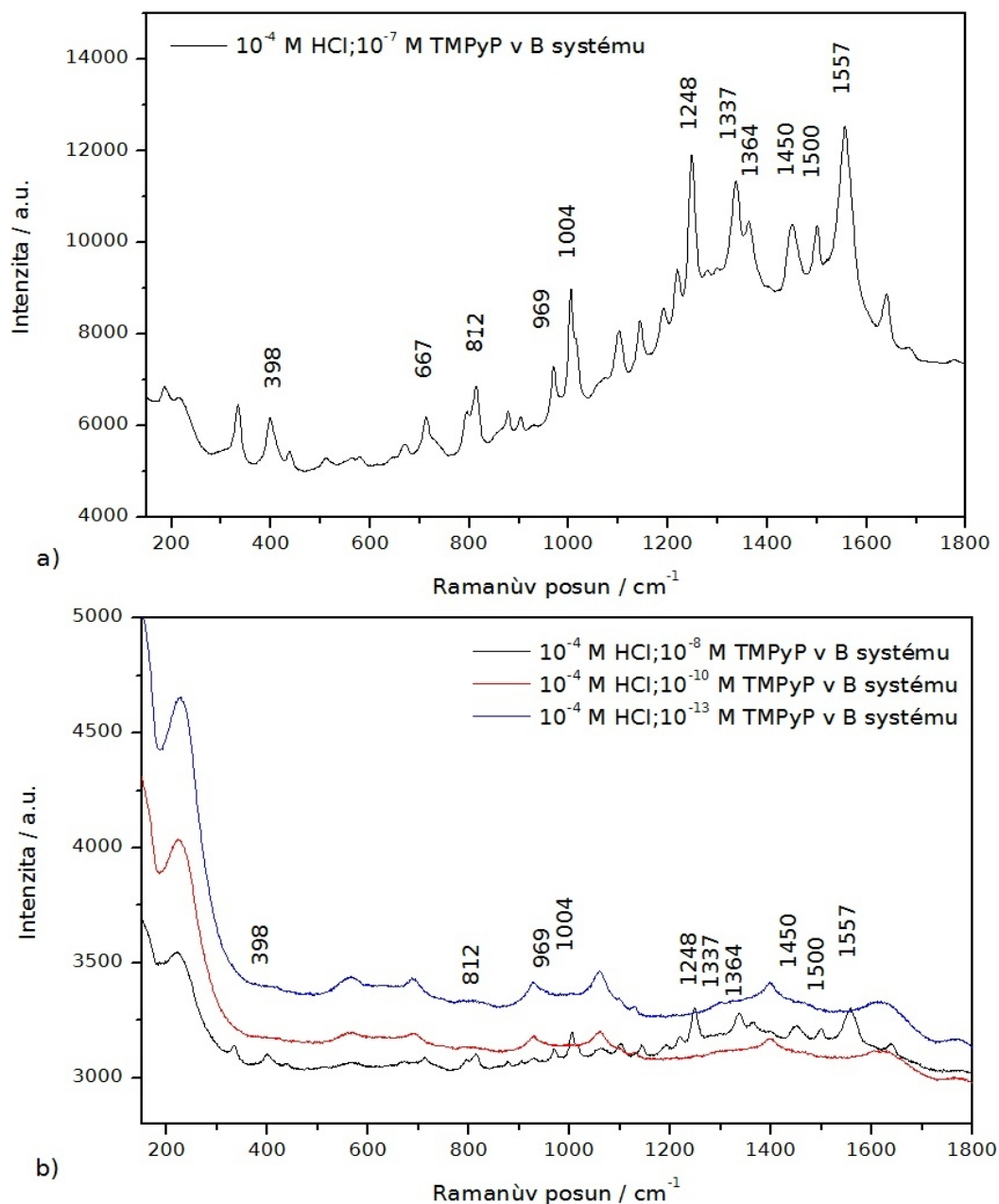
Z časopisecké literatury jsou známy celkem tři formy TMPyP [25]: dvě metalované ($\text{Ag}^0\text{-TMPyP}$ a $\text{Ag}^+\text{-TMPyP}$) a jedna nemetalovaná, tzv. volná báze (anglicky „free-base“). Liší se navzájem SERRS spektry; u metalovaných forem se projevují metalární markery [25], které se ve spektrech objevují vlivem interakce pyrolových cyklů porfyrinového jádra s Ag atomy. Oproti tomu nemetalovaná forma TMPyP odpovídá spektru samotného porfyrinu v jeho neporušené nativní podobě. Detekce této nativní formy je obzvláště cenná. O její detekci se pokoušely mnohé výzkumné skupiny [26,27,28,29,30,31].

Na obrázku 23a je vidět SERRS spektrum TMPyP v AgB systému při relativně vyšších koncentracích TMPyP. Na obrázku 23b jsou nižší koncentrace stejného systému. 1×10^{-7} M koncentrace TMPyP lze považovat za detekční mez. Ve všech těchto koncentracích TMPyP jsme pozorovali metalovanou formu $\text{Ag}^+\text{-TMPyP}$, jak víme ze srovnání našich SERRS spekter s literaturou [25].



Obr. 23 Ramanovo spektrum AgB systému pro různé koncentrace TMPyP bez přídavků HCl.

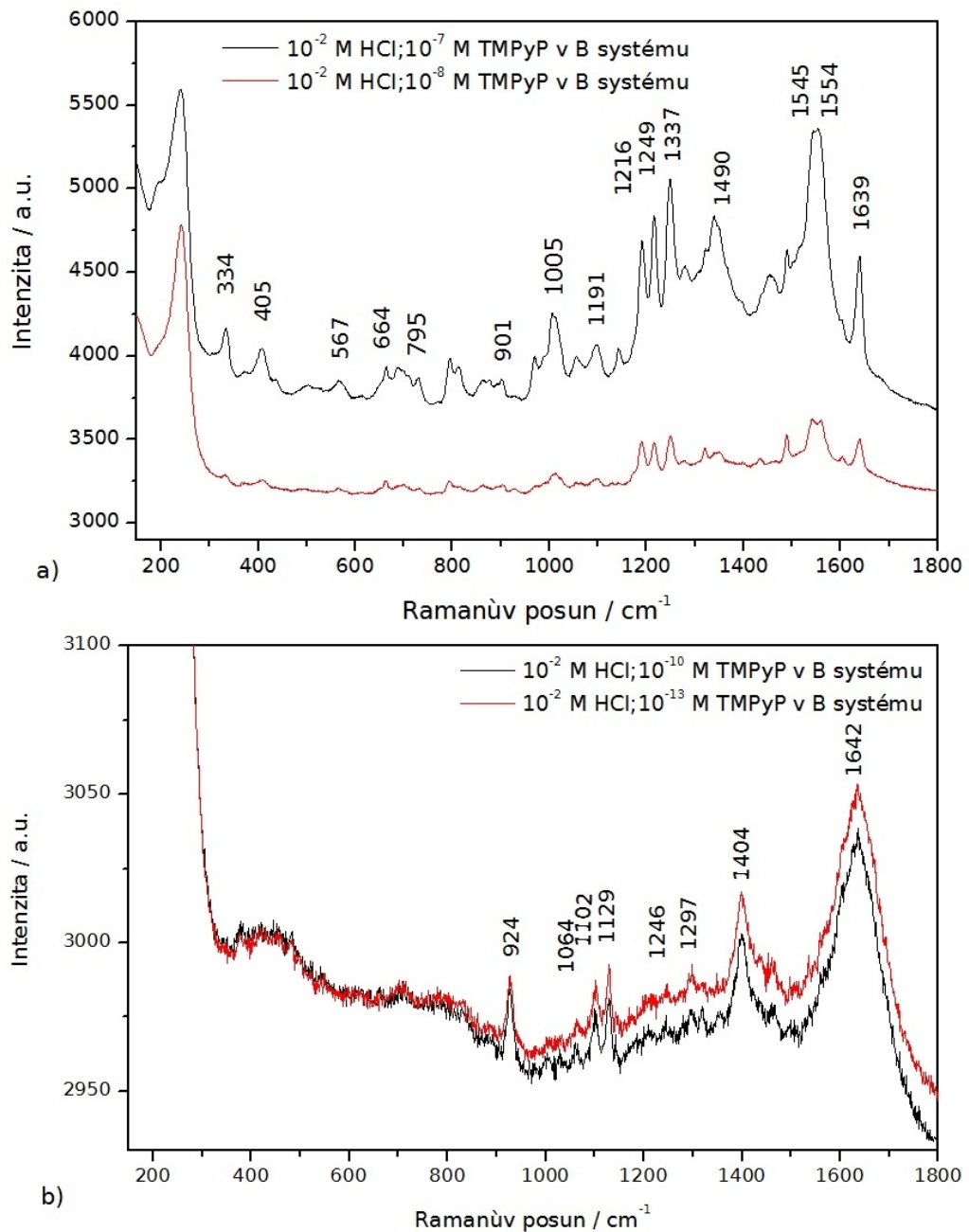
V dalším kroku bylo přidáno malé množství HCl (ve výsledné koncentraci 1×10^{-4} M) a pozorováno, jak se změní Ramanovo spektrum – obrázky 24a a 24b. Z obrázku 24b je patrné, že díky tomuto přídavku HCl se mez detekce porfyrinu posunula o jeden řád níže. Je tedy možné tímto způsobem bezpečně detekovat koncentrace 1×10^{-8} M TMPyP, opět v jeho metalované, ale už i částečně nemetalované podobě (což víme zejména podle pásů umístěných u 334, 1004 a 1557 cm^{-1}).



Obr. 24 Ramanovo spektrum AgB systému pro různé koncentrace TMPyP s nízkou koncentrací HCl.

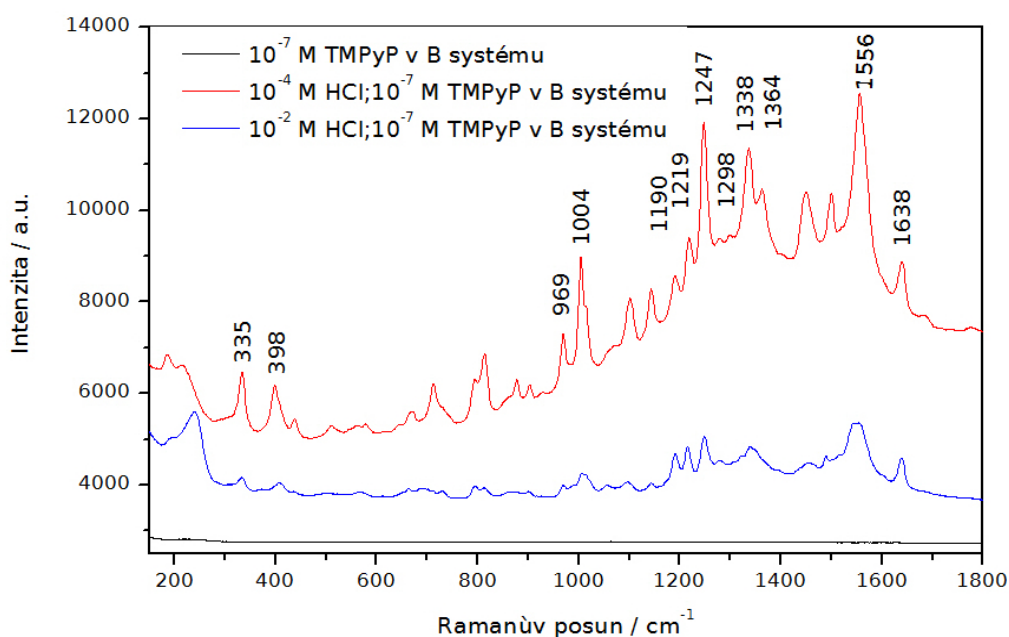
Při zvýšení koncentrace HCl v systému na 1×10^{-2} M došlo k výraznému snížení meze detekce TMPyP, a to až na 1×10^{-13} M TMPyP – obrázky 25a a 25b. Nutno však podotknout, že v tomto případě, při nízkých pH (vysoké koncentraci HCl), je detekována tzv. diacidická forma tohoto porfyrinu, jejíž vibrační pásy jsou opět známy z literatury

[32]. Jednou z hlavních indicií, že se nejedná o klasickou metalovanou formu TMPyP, je absence metalačních markerů u 398, 1015, 1342 cm^{-1} a poněkud jiný charakter relativních intenzit pásů. Ve spekterch se objevuje rovněž pás Ag-Cl, který jsme již diskutovali dříve.



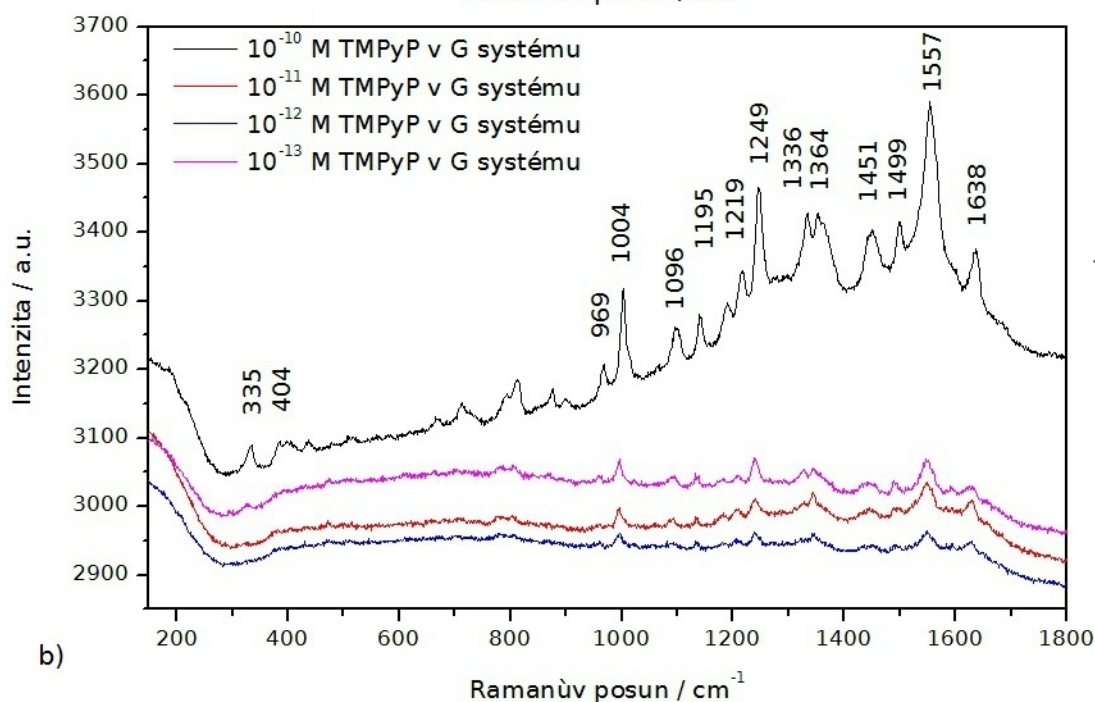
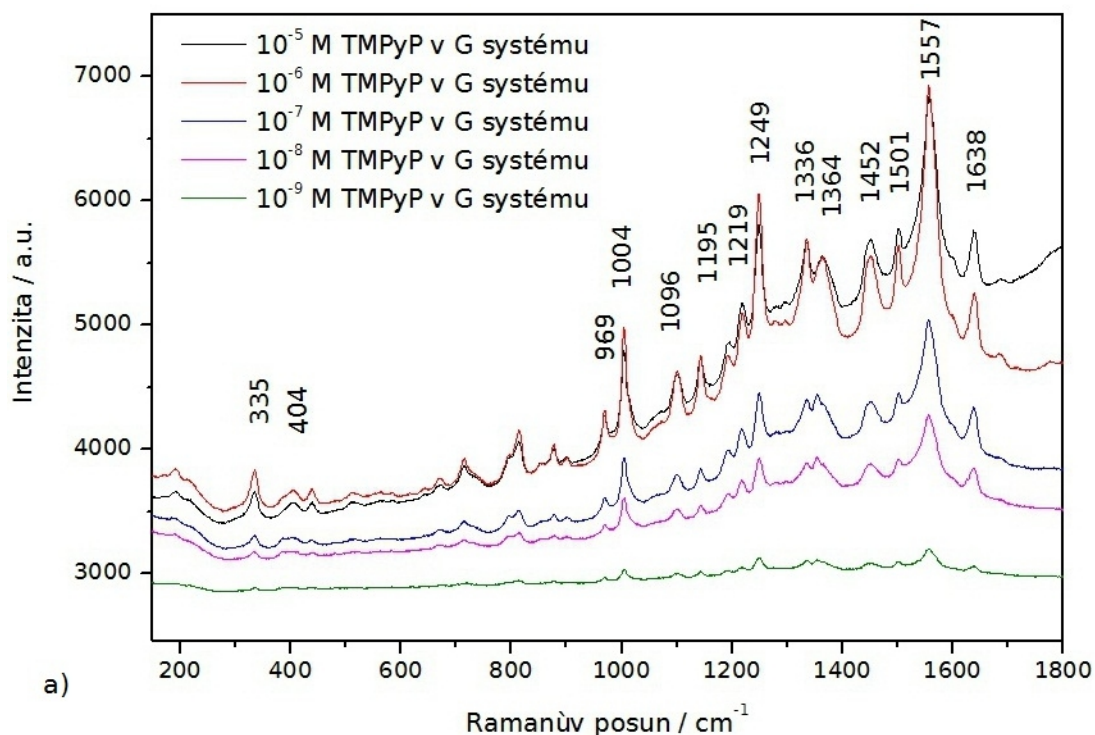
Obr.25 Ramanovo spektrum AgB systému s vyšší koncentrací HCl a koncentracemi 10^{-10} a 10^{-13} M TMPyP

Obrázek 26 shrnuje přehledně v jednom grafu vliv nepřítomnosti a přítomnosti dvou různých koncentrací HCl na tutéž koncentraci TMPyP (1×10^{-7} M) ve výsledném systému obsahujícím AgB koloid. Vzrůst SERRS signálu TMPyP v přítomnosti HCl oproti nepřítomnosti HCl souvisí se zlepšením resonance povrchového plasmonu s použitou excitační vlnovou délkou laseru (532 nm) v systémech s HCl. Jinými slovy vzrůst SERRS signálu TMPyP je výrazně ovlivněn preagregací nanočástic, jak bylo diskutováno u UV-vis spekter v kapitole 3.2.



Obr. 26 Ramanovo spektrum AgB systému pro různé koncentrace TMPyP s různými koncentracemi HCl.

Nanočástice AgG koloidu byly rovněž testovány pomocí modelové sloučeniny TMPyP na SERRS-aktivitu. Nejprve jsme testovali samotné nanočástice AgG koloidu, tj. bez přídavku HCl - obrázky 27a a 27b.



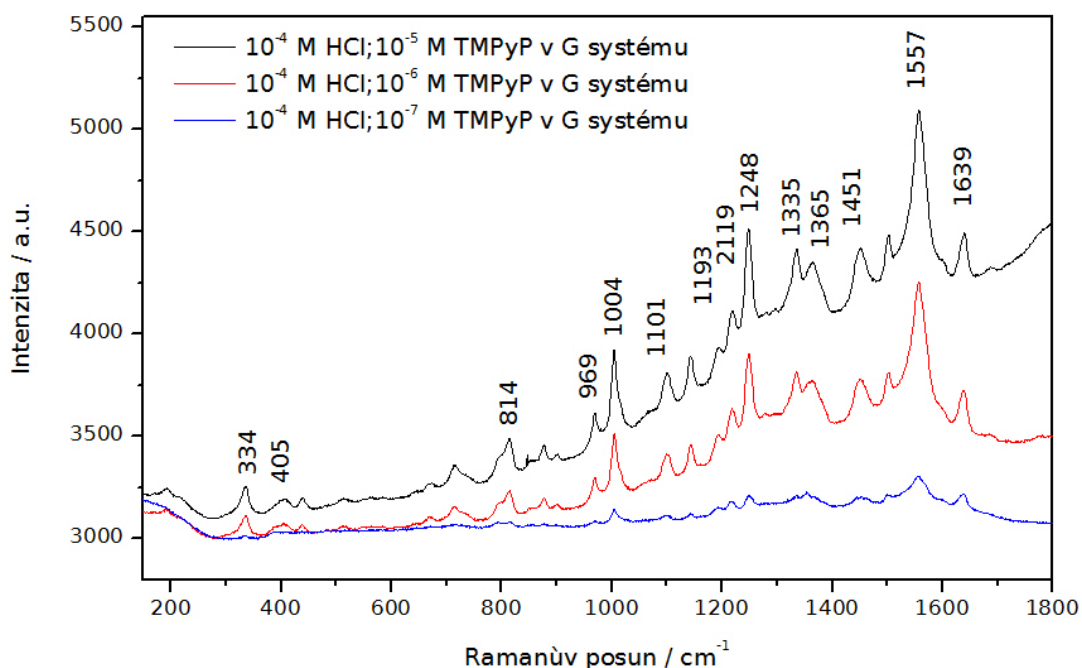
Obr. 27 Ramanovo spektrum AgG koloidu s různou koncentrací TMPyP (a) a detail spektra (b) pro koncentrace TMPyP 1×10^{-10} až 1×10^{-13} M.

U obr. 27a si lze všimnout celkového poklesu Ramanova signálu se snižující se koncentrací TMPyP v rozmezí 1×10^{-6} – 1×10^{-9} M koncentrace 1×10^{-5} M tomuto trendu nepodléhá, protože je již natolik

vysoká, že se uplatňuje absorpce volných, tj. neadsorbovaných molekul TMPyP v roztoku, které tak působí jako vnitřní filtr jak pro záření dopadající, tak pro Ramansky rozptýlené. Proto se nám jeví Ramanův signál ze systému obsahujícího 1×10^{-5} M TMPyP srovnatelný či dokonce nižší než ze systému obsahujícího o řád nižší koncentraci TMPyP. Navíc je patrný rozdíl v pozadí Ramanova signálu: zatímco u 1×10^{-5} M koncentrace TMPyP se uplatňuje fluorescenční prohnutí spektra, vliv tohoto typu pozadí je méně a méně patrný při snižování koncentrace TMPyP (obr. 27a).

Z obrázku 27b je zřejmé, že za mez detekce TMPyP v koloidu AgG je možno považovat koncentraci 1×10^{-13} M.

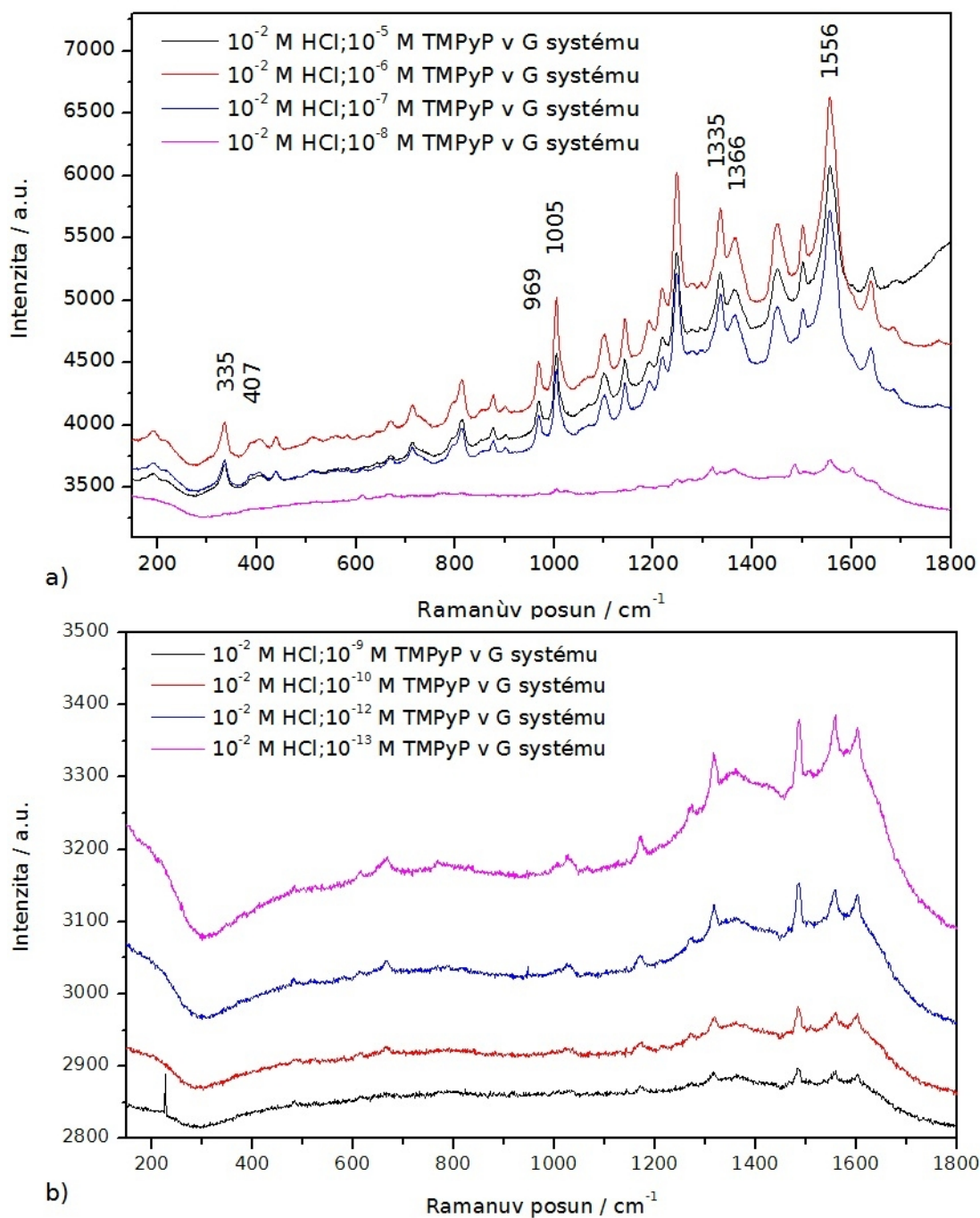
Studován byl rovněž vliv přítomnosti HCl o nižší (obrázek 28) a vyšší (obrázky 29a a 29b) koncentraci ve finálním systému obsahujícím TMPyP a AgG koloid. Přehledně je pak vidět rozdíl vlivu HCl na SERRS signál TMPyP při koncentraci 1×10^{-7} M v obrázku 30.



Obr. 28 Ramanovo spektrum AgG koloidu s nižší koncentrací HCl a různou koncentrací TMPyP.

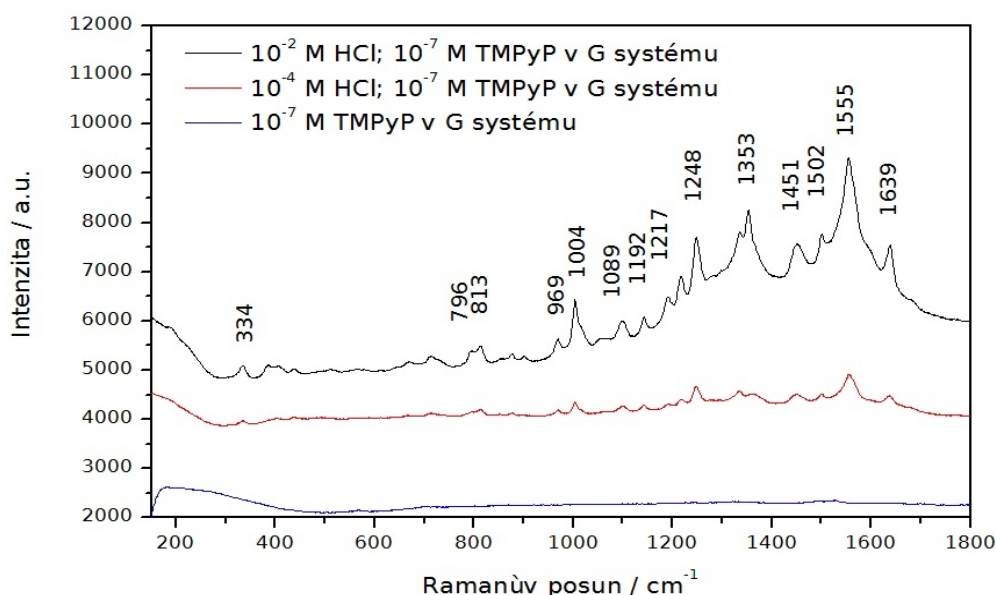
U obrázku 28 je pozoruhodné, že Ramanovo spektrum 1×10^{-5} M koncentrace TMPyP sice leží na fluorescenčním pozadí, ale celková intenzita je přece jen vyšší než u 1×10^{-6} M koncentrace TMPyP v přítomnosti 1×10^{-4} M HCl v AgG koloidu. Tento výsledek je v protikladu k pozorování signálu Ramanova rozptylu 1×10^{-5} M a 1×10^{-6} M koncentrace TMPyP v AgG koloidu (obr. 27a). Domníváme se, že tento rozdíl v chování TMPyP je způsoben právě přítomností HCl v koncentraci 1×10^{-4} M. Podle poloh pásů a jejich relativních intenzit je rovněž z obr. 28 patrné, že se jedná o nemetalovanou SERRS spektrální formu TMPyP.

Na obrázcích 29a a 29b je vidět vliv přítomnosti HCl v koncentraci 1×10^{-2} M na systém obsahující AgG koloid a TMPyP v různých koncentracích. V charakteru SERRS spekter ze systémů obsahujících koncentrace TMPyP vyšší než 1×10^{-8} M rozeznáváme jednoznačně nemetalovanou SERRS spektrální formu. Je pozoruhodné, že ani v takto vysoké koncentraci HCl nepozorujeme diacidickou formu TMPyP, kterou jsme detekovali v AgB koloidech za jinak stejných podmínek měření. Rovněž nepozorujeme charakteristický pás Ag-Cl, což však bylo již konstatováno u systémů obsahujících bpy, HCl a AgG koloid.



Obr.29 Ramanovo spektrum AgG koloidu s vyšší koncentrací HCl a vyšší koncentrací TMPyP (a) a nižší koncentrací TMPyP .

Dále je zajímavé, že počínaje koncentrací 1×10^{-8} M TMPyP se charakter spektra mění a čím dál tím více se polohami a relativními intenzitami pásů podobá SERRS spektru bipyridinu, formě $\text{Ag}^0\text{-bpy}$. Podoba není úplně náhodná, protože TMPyP obsahuje čtyři kladně nabitě metyl-pyridylové kruhy, které se mohou flexibilně natáčet od povrchu, či k povrchu nanočástic Ag. Domníváme se, že vysoká koncentrace HCl, která protonuje pyrolová jádra v porfyrinovém makrocyklu způsobí prostorovou deformaci TMPyP molekuly. Dále z charakterizace AgG koloidu prostřednictvím zeta potenciálu víme, že pracujeme s nanočásticemi značně záporně nabitými. Tyto jsou schopné daleko snáze interagovat s kladně nabitými metyl-pyridylovými kruhy. Vysvětluje se tak pozorovaná nízká mez detekce: 1×10^{-13} M TMPyP.



Obr. 30 Ramanovo spektrum AgG systému s různými koncentracemi HCl a 1×10^{-7} M TMPyP.

S ohledem na výše uvedené výsledky, srovnáváme záměrně v obrázku 30 stejnou SERRS spektrální formu TMPyP v koncentraci 1×10^{-7} M v AgG koloidu za nepřítomnosti či přítomnosti HCl ve dvou různých koncentracích. Je patrné, že stejná koncentrace TMPyP se velice liší v celkové intenzitě spekter z jednotlivých systémů.

Závěr

V diplomové práci byly použity dva modelové adsorbáty, bipyridin a porfyrin TMPyP. Jejich spektra Ramanova rozptylu byla zesílena v přítomnosti Ag nanočástic o velikostech cca 12 a 70 nm v průměru (určeno dynamickým rozptylem světla, DLS). Třetí druh Ag nanočástic o průměru cca 28 nm (určeno pomocí DLS), pocházející ze syntézy využívající redukčních účinků maltosy, bohužel nebyl vhodný pro zesílení Ramanova rozptylu ani jedné z modelových sloučenin, a to především z důvodu přítomnosti vysoké koncentrace uhlíkatých zbytků po syntéze, které se vlivem intenzivního laserového svazku pálily na grafitický uhlík a znemožňovaly tak detekci modelových sloučenin.

Oproti tomu nanočástice připravené redukcí glukosou (cca 70 nm v průměru, určeno díky DLS) se ukázaly být velice perspektivní pro detekci velmi nízkých koncentrací porfyrinu TMPyP, 1×10^{-13} M TMPyP koncentrací, a to dokonce nativní formy tohoto porfyrinu, což je obzvláště cenné pro případnou aplikaci povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie v diagnostice nízkých koncentrací porfyrinů.

Studovaný vliv přítomnosti HCl, způsobující agregaci nanočástic Ag, vedl v případě nanočástic připravených borohydridovou syntézou (velikosti cca 12 nm v průměru, určeno pomocí DLS) ke snížení koncentrace nutné pro detekci každého z modelových adsorbátů. Pro bipyridin byla určena mez detekce v přítomnosti těchto Ag nanočástic v koncentraci 1×10^{-9} M, zatímco pro porfyrin TMPyP 1×10^{-13} M.

Seznam použitých zdrojů


- [1] Le Ru, C. Erik; Etchegoin, G. Pablo; *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects*, Wellington, NZ
- [2] <http://www.agh2o.cz/z-historie.html>, ze dne 4.5.2012
- [3] Link. S.; Mostafa, A.; *J. Phys. Chem. B* **1999**. 103. 8410-8426.
- [4] George, C.; Schatz and Richard P. Van Duyne, *Electromagnetic Mechanism of Surface-enhanced Spectroscopy. Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Chichester, **2002**
- [5] U, Kreibig.; L, Genzel.; *Surface Science*, **1985**, 156, 678-700,
- [6] Rotello, V. M.; *Nanoparticles, Building Blocks for Nanotechnology*, **2004**
- [7] Skoog, A. D.; Holler, James. F.; Nieman, A. T.; *Principles of Instrumental Analysis, 5th Edition*, **1997**
- [8] Ferraro, R. J.; Nakamoto, K.; Brown, W. Chris. *Introductory Raman Spectroscopy, 2nd Edition*, **2003**
- [9] Šišková, K.; *Diplomová práce, Karlova univerzita,, Praha*, **2003**
- [10] Camption, A; Kambhampati, P; *Surface-enhanced Raman scattering*, Department of Chemistry and Biochemistry, The University of Texas at Austin, Austin, TX 78712, USA, **1998**
- [11] Svobodník, T.; *Příprava a stabilizace nanočástic stříbra v systému voda-alkohol*, Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, **2010**
- [12] Sally D. Solomon, Mozghan Bahadory, Aravindan V. Jeyarajasingam, Susan A. Rutkowsky, Charles Boritz, *Synthesis and Study of Silver particles*, Department of Chemistry, Drexel University, Philadelphia, PA 19104, **2007**
- [13] Libor Kvítek, *Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra*, Habilitační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, **2008**
- [14] Kvítek et al., *J. Mater. Chem.*, 15, 1099, **2005**

- [15] Siskova, K.; Becicka, O.; Macek, V.; Safarova, K.; Zboril, R. *Spacer-free SERRS spectra of unperturbed porphyrin detected at 100 fM concentration in Ag hydrosols prepared by modified Tollens method*, **2012**
- [16] Srnová-Šloufová, I., Vlčková, B., T.L. Snoeck, T.L., Stufkens, D.J., P. Matějka, P, *Inorganic Chemistry*, 39, 3551, **2000**
- [17] Hanzlíková, J.; Procházka, M.; Štěpánek, J.; Bok, J.; Baumruk, V.; Anzenbacher, P, Jr.; *J. Raman Spectrosc.* 29, 575-584, **1998**
- [18] Lindon, J, Holmes, J, Tranter, G, *Encyclopedia of Spectroscopy and spectrometry*, Academia Press London, UK, **2000**
- [19] Tscharnuter, W., *Photon Correlation Spectroscopy in Particle Sizing*, Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, USA, **2000**
- [20] Kvítek, L. *Metody studia koloidních soustav*, prozatímní učební text, **2006**
- [21] Kubínek, R, *Elektronová mikroskopie-přednášky*, **2003**
- [22] <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/uvvisab1.htm>
- [23] Tranter, G.; Holmes, J.; Lindon, J. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Three-Volume set, Part 1, Academic Press, **2000**
- [24] Šloufová et al., *Phys.Chem. Chem.Phys.* **2008**
- [25] Procházka, M., et al., *Journal of Raman Spectroscopy*, **2002**, 33, 758
- [26] Vlčková, B. et al., *Journal of Physical Chemistry*, **1993**, 97, 9719;
- [27] Šmejkal, P. et al., *Vibrational Spectroscopy* **1999**, 19, 243;
- [28] Šmejkal, P. et al., *Journal of Molecular Structure*, **1999**, 482-483, 225;
- [29] Molnár, P. et al., *Journal of Raman Spectroscopy*, **2007**, 38, 799;
- [30] Hajduková, N. et al., *Vibrational Spectroscopy* **2008**, 48, 142;
- [31] Jia, G. et al., *Journal of Raman Spectroscopy* **2010**, 41, 1325
- [33] Blom, N., J. Odo, N., Nakamoto, Strommen, K. D.P.J. *Phys. Chem.* **1986**, 90, 2847

Přílohy

Spacer-free SERRS spectra of unperturbed porphyrin detected at 100 fM concentration in Ag hydrosols prepared by modified Tollens method

Karolína Šišková,^{a*} Ondřej Bečička,^a Vlastimil Mašek,^b Klára Šafářová^a and Radek Zbořil^a

 Surface-enhanced resonance Raman scattering (SERRS) spectroscopy is a powerful tool for the selective and sensitive detection of porphyrins. We report a repeatable detection of unperturbed free base 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl) 21H,23H-porphine in concentrations as low as 1×10^{-13} M in the final system when Ag nanoparticles prepared by modified Tollens method are employed as Raman scattering amplifiers, i.e. without any further post-modifications of their surface. Most probably the residues of sugar oxidation present on Ag nanoparticle surface are responsible for the effective protection of 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)21H,23H-porphine molecules against the metalation by silver. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: porphyrin; TMPyP; detection

Porphyrins and their derivatives are of particular interest because of their biological and medical importance.^[1,2] In particular, the detection of their native forms at very low concentrations has attracted a lot of attention during the past two decades and is still an actual direction of research nowadays.^[1–7] Indeed, porphyrins should be investigated at extremely low concentrations to mimic their physiological conditions and to prevent their self-aggregation. Thus, a sensitive method has to be used. For the sake of an unambiguous determination of a porphyrin type in an investigated system, a selective method has to be chosen. Surface-enhanced resonance Raman scattering (SERRS) spectroscopy is an efficient tool for fulfilling both requirements at once as it has been clearly demonstrated in the literature already.^[3–12] The metalation of a free base porphyrin molecule, i.e. the incorporation of a metal ion into a porphyrin core,^[3] can be an undesirable effect from the viewpoint of the unperturbed free base porphyrin SERRS detection in bioanalytical applications.^[4,5] Only a few researchers have detected SERRS signal of unperturbed free base porphyrins on Ag nanoparticles so far.^[4–9] They had to either employ molecular spacers, i.e. surface modifiers of Ag nanoparticles that prevent porphyrins against the metalation,^[5–7] or immobilize Ag nanoparticles through amino-silane molecules on glass substrates.^[8,9] Another approach has been applied by Jia *et al.* who observed a photo-induced demetalation of a porphyrin to its free base form when introducing human serum albumin.^[4]

In this communication, we report a novel and easy way how to repeatedly detect the SERRS signal of the unperturbed free base 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)21H,23H-porphine (TMPyP) at very low concentrations. Modified Tollens method of Ag

nanoparticles generation^[13] has been used and the as-prepared Ag nanoparticles employed in SERRS testing by TMPyP. To the best of our knowledge, nobody has yet probed the surface of Ag nanoparticles prepared by Tollens method^[14] and/or modified Tollens method^[13] using porphyrins. There are two reasons for using Tollens-method-prepared nanoparticles: (i) almost monodispersed hydrosols can be easily formed^[13,15] (supporting information); (ii) the surface of nanoparticles is very negatively charged (as known from zeta-potential measurements presented in the supporting information and in^[15]) resulting in high stability of hydrosols.

Figures 1(A) and (B) show that free base TMPyP SERRS signal (as determined on the basis of band assignments in^[11]) has been detected in concentrations varying from 1×10^{-6} to 1×10^{-13} M in the final system (for experimental details see supporting information). Such a broad range of TMPyP concentrations is intentionally presented because it is well-known that TMPyP metalation is easier and faster below its concentration of monolayer coverage.^[12] The monolayer coverage TMPyP concentration in a

* Correspondence to: Karolína Šišková, Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, 77146 Olomouc, Czech Republic. E-mail: karolina.siskova@upol.cz

a Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, 77146, Olomouc, Czech Republic

b Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, 77147 Olomouc, Czech Republic

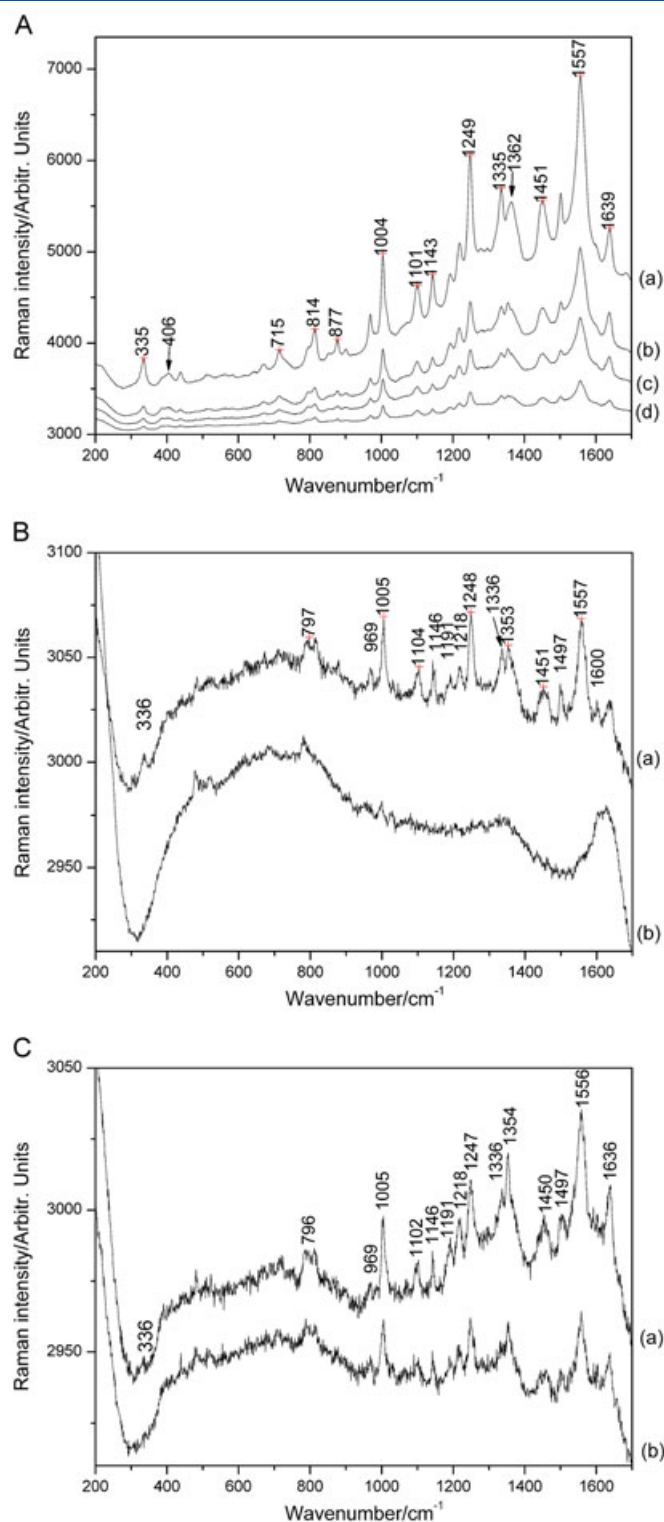


Figure 1. SERRS spectra of TMPyP (532 nm excitation line, acquisition: 90× 1 s, power ~100 mW at the sample): (A) porphyrin concentrations of (a) 1 μM, (b) 0.1 μM, (c) 10 nM, and (d) 0.1 nM in the final system; (B) porphyrin concentrations of (a) 0.1 pM and (b) 10 fM in the final system; (C) 0.1 pM TMPyP in the final system recorded after (a) 30 min and (b) 150 min elapsed from the system preparation.

particular system strongly depends on the size and type of Ag nanoparticles.^[12] We roughly quantified the theoretical monolayer coverage to be at around 2×10^{-6} M value of TMPyP concentration in our case (for calculation details see supporting information). Thus, Figures 1(A) and (B) clearly demonstrate that even well below the monolayer coverage TMPyP concentration,

no metalation proceeds on Tollens-method-prepared Ag nanoparticles. It should be noted that the metalation markers appear at 398, 1015, 1342, and 1545 cm⁻¹.^[3,11] The TMPyP detection limit was determined to be as low as 1×10^{-13} M (Figure 1(B)). A further decrease of TMPyP concentration revealed only bands attributable either to water, or to the residues of glucose oxidation

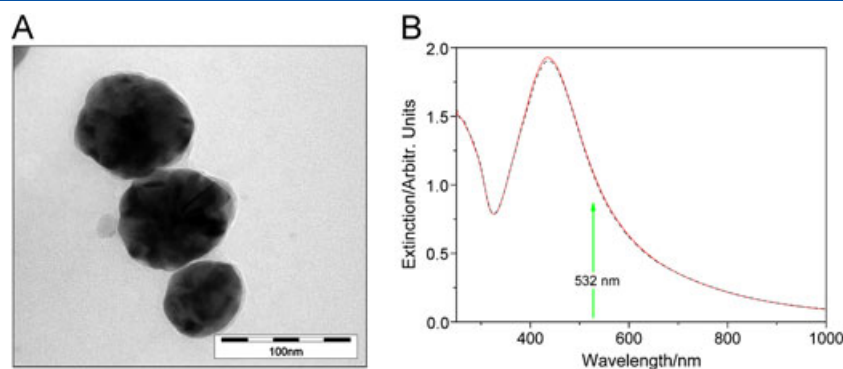


Figure 2. (A) Characteristic TEM image of Ag nanoparticles surrounded by a thin shell. (B) UV-Vis extinction spectra of Ag nanoparticle hydrosol (solid curve) and of hydrosol with 0.1 μM TMPyP in the final system (dashed curve).

(Figure 1(B), curve b). Last, but not least, the SERRS spectra plotted in Figure 1(C) give evidence that the system containing 1×10^{-13} M TMPyP concentration resists to the metalation for 2.5 h elapsed from the system preparation.

Taking into account the results of Procházka *et al.*^[12] the TMPyP metalation process can be controlled by the presence of ions at the Ag nanoparticle surface. Therefore, in our case, the residues of sugar oxidation (which takes place during the Tollens method generation of Ag nanoparticles) can be considered to be responsible for the effective prevention of TMPyP metalation. This conclusion is further supported by transmission electron microscopy (TEM) images, which repeatedly show polyhedrons of sizes mostly ~ 80 nm (see supporting information for a representative TEM image and particle size distribution derived from TEM images and dynamic light scattering measurements) surrounded by a thin more/less visible shell (Figure 2(A)).

The low value of TMPyP SERRS signal detection can be most probably induced by several positive influencing factors. First, cationic TMPyP can be driven toward a negatively charged nanoparticles surface resulting thus in a close vicinity of TMPyP molecule to the Ag surface. As a consequence, a high enhancement of Raman signal is achieved because of electromagnetic mechanism. Second, the excitation laser line falls within the surface plasmon band of even non-aggregated Ag nanoparticles (Figure 2(B)). Finally, the resonance enhancement mechanism contributes as well because the excitation wavelength is in resonance with one of TMPyP Q-bands.^[10]

It can be envisaged that the easy way of free base TMPyP detection at very low concentrations because of SERRS employing Ag nanoparticles prepared by modified Tollens method could be particularly exploited in medical science.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the support by the Operational Program Research and Development for Innovations - European Regional Development Fund (project CZ.1.05/2.1.00/03.0058 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic).

Dr Siskova also acknowledges the financial support by GAČR P108/11/P657. Assoc. Prof. Jiří Bok is kindly thanked for the software enabling the precise calibration of Raman shift axis.

Supporting information

Supporting information may be found in the online version of this article.

References

- [1] K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard, *The Porphyrin Handbook, Vol. 6 - Applications: Past, present and future; Vol. 14 - Medical aspects of porphyrins*, Academic Press, Amsterdam, **2003**.
- [2] E. Izbicka, R. T. Wheelmouse, E. Raymond, K. K. Davidson, R. A. Lawrence, D. Sun, B. E. Windle, L. H. Hurley, D. D. von Hoff, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 639.
- [3] T. M. Cotton, S. G. Schulz, R. P. Van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6528.
- [4] G. Jia, Z. Feng, C. Wei, C. Li, *J. Raman. Spectrosc.* **2010**, *41*, 1325.
- [5] B. Vlčková, P. Matějka, J. Šimonová, K. Čermáková, P. Pančoška, V. Baumruk, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 9719.
- [6] P. Šmejkal, B. Vlčková, M. Procházka, P. Mojžeš, J. Pflieger, *J. Molecul. Struct.* **1999**, *482–483*, 225.
- [7] P. Šmejkal, B. Vlčková, M. Procházka, P. Mojžeš, J. Pflieger, *Vibrat. Spectrosc.* **1999**, *19*, 243.
- [8] P. Molnár, M. Procházka, *J. Raman. Spectrosc.* **2007**, *38*, 799.
- [9] N. Hajduková, M. Procházka, P. Molnár, J. Štěpánek, *Vibrat. Spectrosc.* **2008**, *48*, 142.
- [10] J. Hanzlíková, M. Procházka, J. Štěpánek, V. Baumruk, J. Bok, P. Anzenbacher Jr., *J. Raman. Spectrosc.* **1998**, *29*, 575.
- [11] M. Procházka, P. Y. Turpin, J. Štěpánek, B. Vlčková, *J. Raman. Spectrosc.* **2002**, *33*, 758.
- [12] M. Procházka, J. Štěpánek, P. Y. Turpin, J. Bok, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 1543.
- [13] L. Kvítek, R. Prucek, A. Panáček, R. Novotný, J. Hrbáč, R. Zbořil, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 1099.
- [14] Y. Yin, Z.-Y. Li, Z. Zhong, B. Gates, Y. Xia, S. Venkateswaran, *J. Mater. Chem.* **2002**, *12*, 522.
- [15] K. Šišková, K. Šafářová, J. H. Seo, R. Zbořil, M. Mashlan, *Nanotechnology* **2011**, *22*, 275601.

Supporting Information

Spacer-free SERRS spectra of unperturbed porphyrin detected at 100 fM concentration in Ag hydrosols prepared by modified Tollens method

Karolína Šišková, Ondřej Bečička, Vlastimil Mašek, Klára Šafářová, Radek Zbořil

Experimental details:

Preparation of Ag nanoparticles by the modified Tollens method [Kvitek et al., J.Mater. Chem. 2005, 15, 1099]: 0.085 g of AgNO₃ is dissolved in 100 mL of deionized water. Then, 1 mL of NH₃ in 100 mL of deionized water is added under stirring. Subsequently, 0.1920 g of NaOH dissolved in 100 mL of deionized water is introduced into the reaction mixture under vigorous stirring. Finally, 0.9008 g of glucose dissolved in 100 mL of deionized water is rapidly added into the reaction mixture. The whole reaction mixture is diluted by another 100 mL of deionized water to the final volume of 500 mL.

SERRS spectra were recorded at room temperature with a Raman spectrometer using the 532 nm excitation line of a Verdi V5 laser (DPSS technology, Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA, power ~100 mW at the sample). Scattered radiation was collected at 90° relative to the excitation beam and detected with a nitrogen cooled CCD detector Symphony (Horiba Jobin Yvon S.a.S., Longjumeau, France) with 2048x512 pixels, coupled to a iHR320 imaging spectrometer (Horiba Jobin Yvon S.A.S., Longjumeau, France) with a 1200 grooves/mm grating. System was controlled by LabSpec 5 software (Horiba Jobin Yvon S.A.S., Longjumeau, France). Accumulation time was set to 90x 1s and slit to 110 μm. Precise calibration of Raman shift axis was done due to toluene signal acquisition. A typical system tested by SERRS measurements in a five-window cuvette (5 x 5 x 30 mm³) comprised 0.5 mL of Ag hydrosol and 0.5 μL of the appropriate concentration of TMPyP solution so that the final TMPyP concentration in the system varied from 1 x 10⁻⁶ to 1 x 10⁻¹⁴ M. UV-visible spectra were measured using Specord S600 (Analytic Jena). Transmission electron microscopic (TEM) images were recorded on a JEOL JEM-2010 microscope equipped with a LaB₆ cathode (accelerating voltage of 160 kV; a point-to-point resolution of 0.194 nm). A drop of the Ag hydrosol was placed onto a holey-carbon film supported by a copper TEM grid and allowed to dry at room temperature. FT-IR spectra were measured on FT-IR spectrometer iS5 Thermo Nicolet employing ATR mode and ZnSe crystal. DLS and zeta potential were recorded on Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments).

Calculation of the monolayer coverage TMPyP concentration on the surface of Ag nanoparticles prepared by modified Tollens method

The rough calculation is subsequently done in several steps according to these points:

- 1) Mol of Ag contained in a spherical nanoparticle of 80 nm in diameter:

$$\rho(\text{Ag}) = 10.49 \text{ g.cm}^{-3}$$

$$\text{Ar}(\text{Ag}) = 107.87$$

$$R = 40 \text{ nm} = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}$$

$$V_{\text{sphere}} = 4/3 \times \Pi \times R^3$$

Mass of one spherical Ag nanoparticle with 80 nm in diameter: $m(1 \text{ NP})$

$$m(1 \text{ NP}) = \rho(\text{Ag}) \times V_{\text{sphere}} = 10.49 \times 4/3 \times 4^3 \times 10^{-18} \text{ g} = 8.95 \times 10^{-16} \text{ g}$$

$$n(\text{Ag v 1 NP}) = m(1 \text{ NP}) / \text{Ar}(\text{Ag}) = 8.95 \times 10^{-16} / 107.87 \text{ mol} = 8.3 \times 10^{-18} \text{ mol}$$

- 2) Mol of Ag^+ ions present in the reaction mixture of 500 mL and in 0.5 mL of the final system:

$m(\text{AgNO}_3) = 0.085 \text{ g}$ in 500 mL of the reaction mixture

$$\text{Mr}(\text{AgNO}_3) = 169.9$$

$$w(\text{Ag}^+ \text{ in AgNO}_3) = \text{Ar}(\text{Ag}) / \text{Mr}(\text{AgNO}_3) = 107.87 / 169.9 = 0.635$$

Mass of Ag^+ in the reaction mixture: $m(\text{Ag}^+ \text{ in 500 mL})$

$$m(\text{Ag}^+ \text{ in 500 mL}) = 0.085 \times 0.635 \text{ g} = 0.05397 \text{ g}$$

$$n(\text{Ag}^+ \text{ in 500 mL}) = m(\text{Ag}^+ \text{ in 500 mL}) / \text{Ar}(\text{Ag}) = 0.05397 / 107.89 \text{ mol} = 5 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

$$n(\text{Ag}^+ \text{ in 0.5 mL}) = 5 \times 10^{-7} \text{ mol}$$

- 3) Theoretical number of spherical Ag nanoparticles of 80 nm in diameter encountered in 0.5 mL of Ag hydrosol: $N(\text{Ag NPs})$

$$N(\text{Ag NPs}) = 5 \times 10^{-7} / 8.3 \times 10^{-18} = 60.24 \times 10^9 \text{ pieces}$$

- 4) The surface area of a spherical Ag nanoparticle of 80 nm in diameter:

$$S(\text{Ag NP}) = 4 \times \Pi \times R^2$$

$$R = 40 \text{ nm}$$

$$S(\text{Ag NP}) = 4 \times \Pi \times 40^2 \text{ nm}^2 = 20\,106 \text{ nm}^2$$

- 5) Available surface area of all Ag nanoparticles present in 0.5 mL of Ag hydrosol. This calculation is based on the assumption that all Ag nanoparticles are spherical, their diameter is 80 nm and they do not create aggregates:

$$S(\text{Ag NPs}) = S(\text{Ag NP}) \times N(\text{Ag NPs})$$

$$S(\text{Ag NPs}) = 20\,106 \times 60.25 \times 10^9 \text{ nm}^2 = 1.211 \times 10^{15} \text{ nm}^2$$

6) The surface area of a porphyrin molecule:

Based on the assumption made in [Sloufova-Srnova I., Vlckova B., NanoLett 2002, 2, 121-125], the porphyrin diagonal dimension is ~2 nm. Therefore, the size of a porphyrin site (labeled as a) can be calculated according to Pythagorean theorem: $a = (1^2 + 1^2)^{1/2}$

Then, the surface area of a porphyrin molecule can be estimated:

$$S(\text{porphyrin}) = a^2 = (2^{1/2})^2 \text{ nm}^2 = 2 \text{ nm}^2$$

7) Number of porphyrin molecules adsorbed on the available surface area of all Ag nanoparticles in 0.5 mL of Ag hydrosol. This calculation is based on the assumption that porphyrins are adsorbed next to each other creating thus a monolayer on Ag nanoparticles:

$$N(\text{porphyrins in 0.5 mL}) = S(\text{Ag NPs}) / S(\text{porphyrin}) = 1.211 \times 10^{15} / 2 = 6.05 \times 10^{14}$$

8) The porphyrin concentration corresponding to the monolayer coverage:

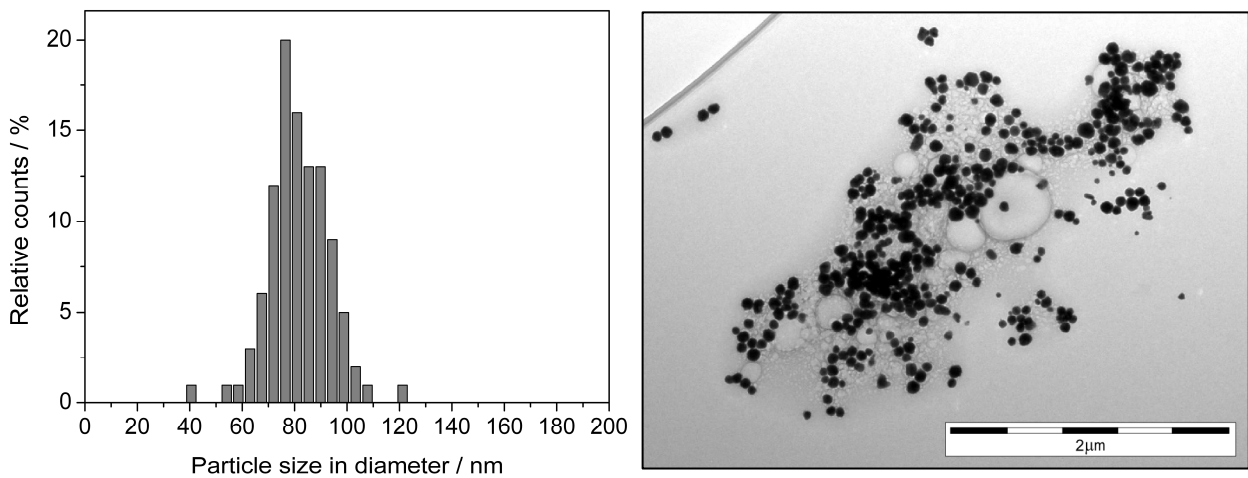
$$n(\text{porphyrins in 0.5 mL}) = N(\text{porphyrins in 0.5 mL}) / N_{\text{Avog}}$$

$$n(\text{porphyrins in 0.5 mL}) = 1 \times 10^{-9} \text{ mol}$$

$$c(\text{porphyrin monolayer coverage}) = n(\text{porphyrins in 0.5 mL}) / V$$

$$c(\text{porphyrin monolayer coverage}) = 1 \times 10^{-9} / 0.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L} = 2 \times 10^{-6} \text{ M}$$

Particle size distribution of the modified-Tollens-method prepared Ag nanoparticles derived from TEM and a characteristic TEM image:

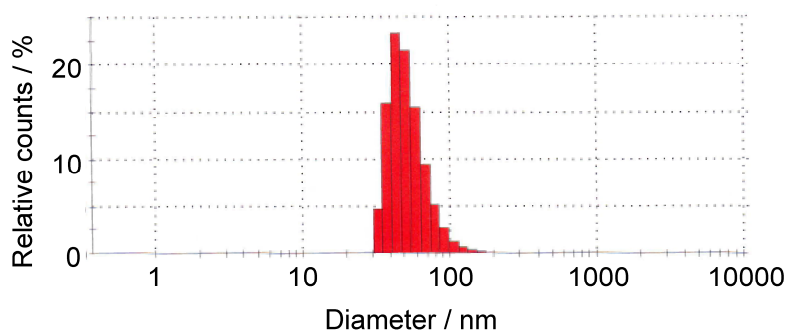


Average particle size (in diameter) is 80.8 ± 7.5 nm

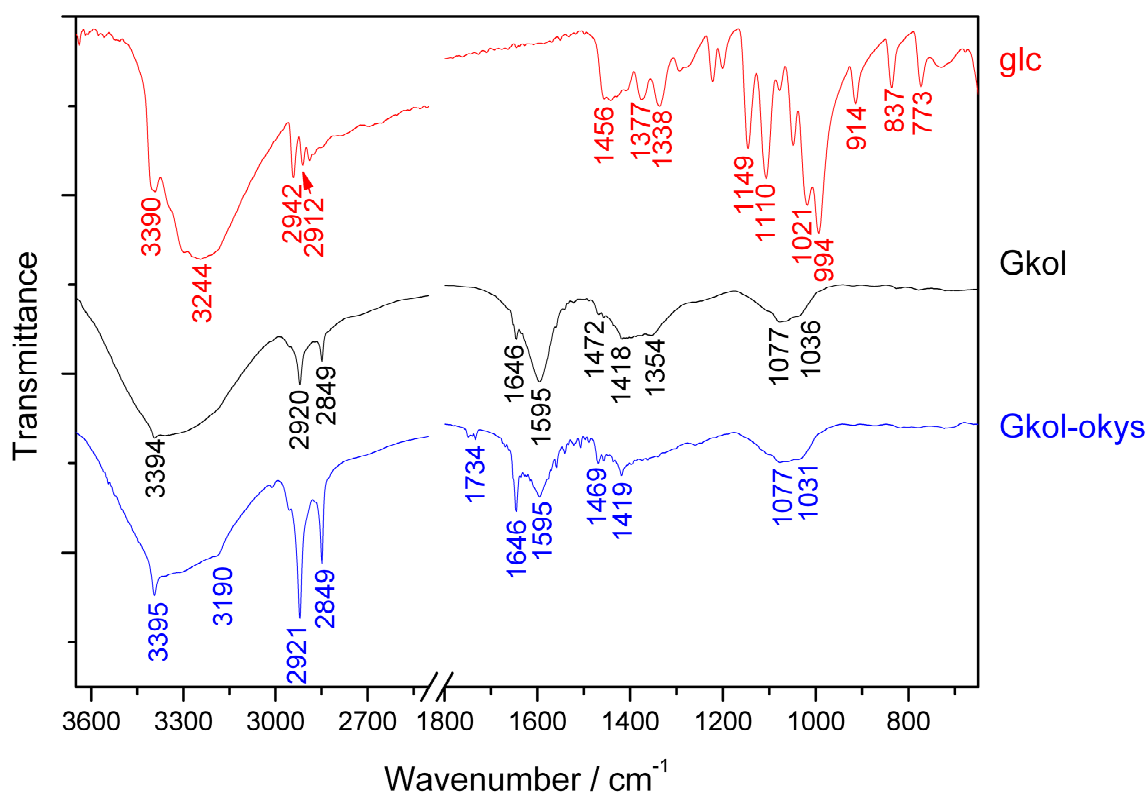
Average particle size has been determined on the basis of several TEM images recorded on different places of the TEM grid.

Particle size distribution determined on the basis of dynamic light scattering (DLS) measurements:

Average particle size (in diameter) is 85.7 ± 15 nm



FT-IR spectra of glucose, Ag nanoparticle hydrosol and acidified Ag nanoparticle hydrosol

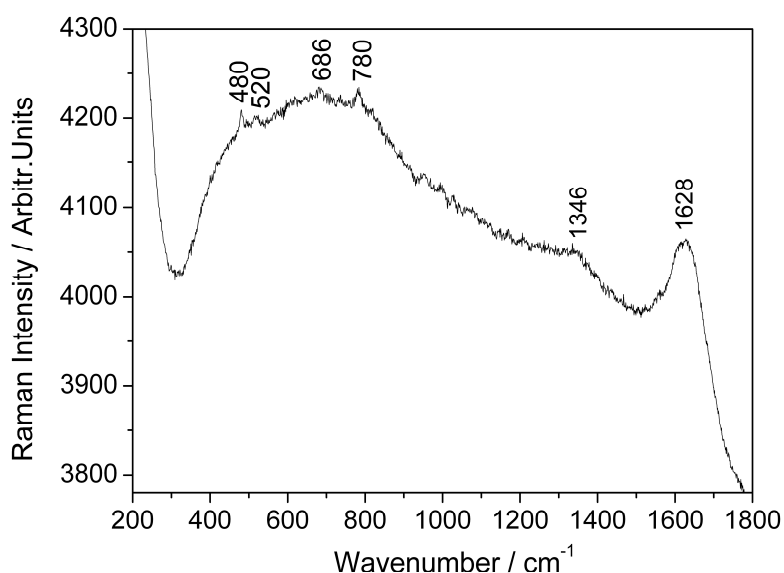


The FT-IR absorption spectrum of air-dried as-prepared glucose-reduced Ag nanoparticle hydrosol (black curve, labeled as Gkol in the above presented Figure) demonstrates the presence of organic species in this hydrosol. Namely, the presence of bands between 2800 and 2900 cm^{-1} , together with 1595, 1418 and 1077 cm^{-1} bands can be attributed to the stretching and/or deformation vibrations of -CH, -C-C- and $-\text{COO}^-$ bonds [Nakamoto K., *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part A: Theory and applications in inorganic chemistry*, Wiley: Hoboken, New Jersey, USA, 2009, pp 82-85; Nakamoto K., *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B: Applications in coordination, organometallic, and bioinorganic chemistry*, Wiley: Hoboken, New Jersey, USA, 2009, pp 64-71]. Moreover, the FT-IR absorption spectrum of an air-dried acidified glucose-reduced Ag nanoparticle hydrosol has been measured and is presented as blue curve (labeled as Gkol-okys) in the above shown Figure. There are clearly seen the changes in relative intensities of 1646 and 1595 cm^{-1} bands as well as a new broad peak positioned at around 1734 cm^{-1} . The latter is usually assigned to uncharged (i.e. protonated) carboxylic group -COOH [Nakamoto K., *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B: Applications in coordination, organometallic, and*

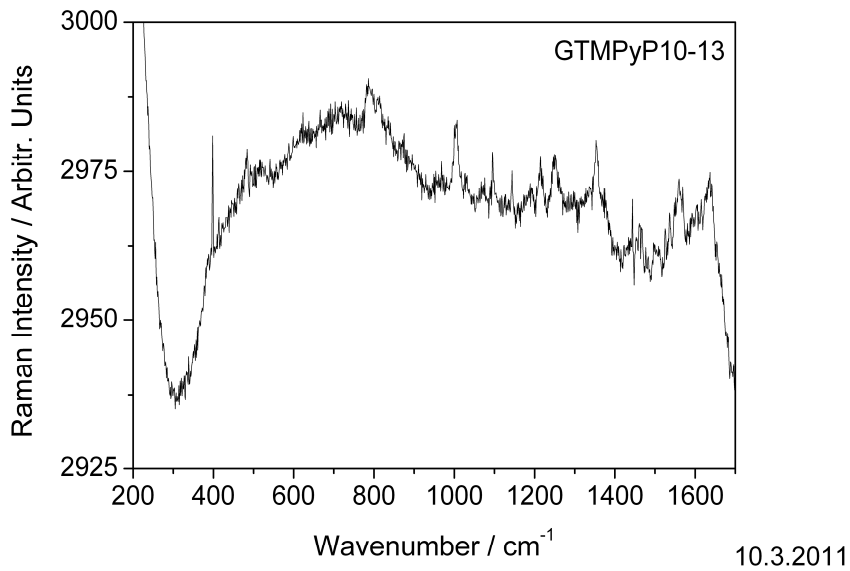
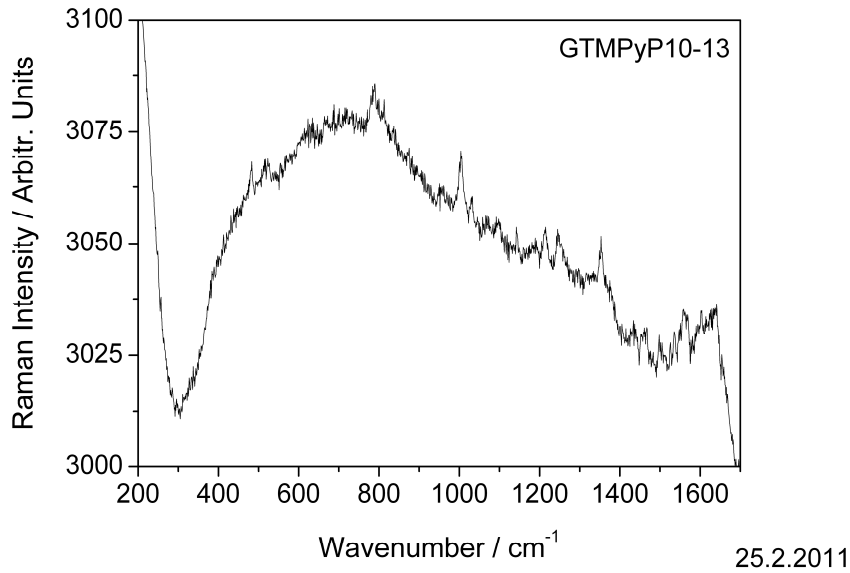
bioinorganic chemistry, Wiley: Hoboken, New Jersey, USA, 2009, pp 71-73]. For the sake of a direct comparison, the FT-IR absorption spectrum of glucose is shown as well (red curve, labeled as glc in the above presented Figure). From all three FT-IR absorption spectra it is obvious that glucose has been oxidized during the reduction of silver-ammonia complex. Taking into account the generally known reaction taking place during aldehydes oxidation and simultaneous silver cations reduction, we assume that gluconic and glucuronic acids are formed during the Ag nanoparticle hydrosol preparation using modified Tollens method. Most probably gluconic and/or glucuronic acids are attached to the surface of Ag nanoparticles creating thus a carbonaceous layer around each Ag nanoparticle.

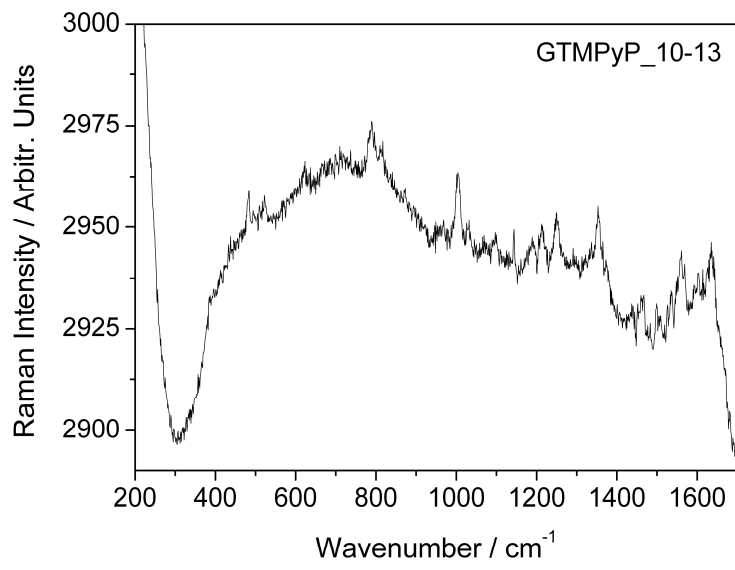
Furthermore, the presence of carboxylates on Ag nanoparticle surface can be independently, however, indirectly derived from *zeta potential measurements*. Hydrosols repeatedly manifested themselves by the value of $-62.5 \pm 11 \text{ mV}$.

Raman spectrum of Ag nanoparticle hydrosol prepared by modified Tollens method

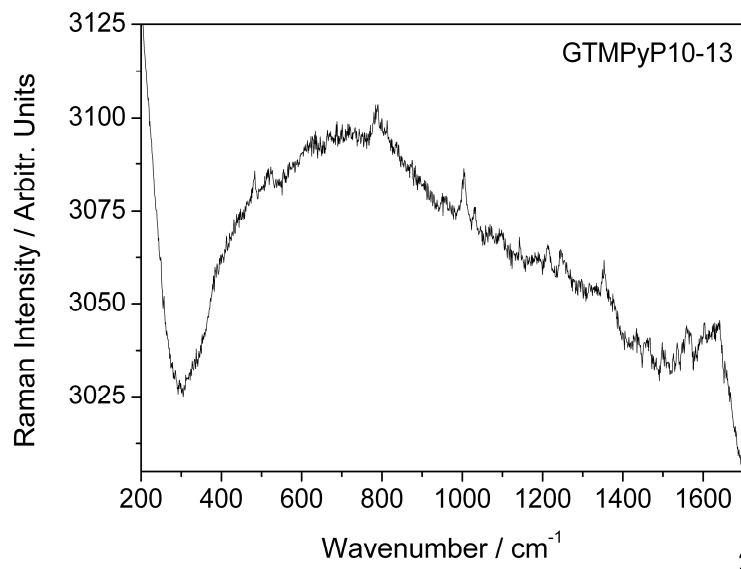


Reproducibility of 100 fM TMPyP signal recorded in different days under the same experimental conditions (532 nm excitation line of a Verdi V5 laser, power ~100 mW at the sample, accumulation time 90x 1s, slit 110 μm) using Ag nanoparticle hydrosol prepared by modified Tollens method and TMPyP solution





8.4.2011



26.5.2011