

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra fyzikální chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Olomouc 2014

Bc. Pavlína Andrýsková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra fyzikální chemie

**SERRS DETEKCE VODOROZPUSTNÝCH
PORFYRINŮ VYUŽITÍM NANOČÁSTIC
VZÁCNÝCH KOVŮ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Pavlína Andrýsková

Studijní obor:

Materiálová chemie

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D.

Olomouc 2014

PALACKÝ UNIVERSITY IN OLMOUC

Faculty of Science

Department of Physical Chemistry

**SERRS DETECTION OF WATER-SOLUBLE
PORPHYRINS BY EXPLOITING NOBLE
METAL NANOPARTICLES**

MASTER THESIS

Author:

Bc. Pavlína Andrýsková

Specialization:

Material chemistry

Supervisor:

RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D.

Olomouc 2014

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Vlastnoruční podpis

*Děkuji své vedoucí diplomové práce RNDr. Karolíně Machalové Šiškové, Ph.D.
a Mgr. Arianě Fargašové za pomoc, cenné rady a čas, který věnovaly mé práci.*

|

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Pavlína Andrásková
Název práce:	SERRS detekce vodorozpustných porfyrinů využitím nanočástic vzácných kovů
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2014
Klíčová slova:	porfyrin, PPIX, Ag nanočástice, Ag koloid, povrchem zesílená rezonanční Ramanova spektroskopie
Počet stran:	61
Počet příloh:	1 CD ROM
Jazyk:	čeština

Abstrakt:

Diplomová práce je zaměřena na detekci vybraných porfyrinů v přítomnosti nanočástic vzácných kovů, tedy využitím povrchem zesílené rezonanční Ramanovy spektroskopie (SERRS). Konkrétně se jedná jak o detekci porfyrinů vyskytujících se v lidské krvi v raných stádiích rakoviny (protoporfyrin IX), tak i porfyrinů uměle syntetizovaných, které mohou být lidskému zdraví škodlivé (př. kationtové a aniontové porfyriny). Hlavním cílem je otestovat několik druhů roztoků nanočástic v interakci s příslušnými porfyriny.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Pavlína Andrásková

Title: SERRS detection of water-soluble porphyrins by exploiting noble metal nanoparticles

Department: Department of Physical Chemistry

Type of thesis: Master

Supervisor: RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D.

The year of presentation: 2014

Keywords: SERRS, porphyrin, PPIX, Ag nanoparticle, Ag colloid, surface-enhanced resonance Raman spectroscopy

Number of pages: 61

Number of appendices: 1 CD ROM

Language: Czech

Abstract:

This thesis is focused on the detection of selected porphyrins in the presence of noble metal nanoparticles, therefore the exploitation of surface-enhanced resonance Raman spectroscopy (SERRS). Specifically, it deals with the detection of a porphyrin occurring in human blood in the early stages of cancer (protoporphyrin IX) as well as of artificially synthesized porphyrins that may be harmful to human health (e.g. cationic and anionic porphyrins). The main aim is to test several types of nanoparticles solutions in the interaction with particular porphyrins.

OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Povrchem zesílená rezonanční Ramanova spektroskopie	10
2.1.1 Vývoj.....	10
2.1.2 Mechanismy	10
2.1.3 Instrumentace	13
2.2 Ag nanočástice	15
2.2.1 Optické vlastnosti	15
2.2.2 Příprava nanočástic.....	16
2.2.3 Metody charakterizace nanočástic stříbra	16
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1 Chemikálie	22
3.2 Příprava nanočástic	23
3.2.1 Borohydridový koloid - Agbh1	23
3.2.3 Citrátový koloid AgCit	23
3.2.4 Glukózový koloid AgG	23
3.3 Porfyriny	24
3.4 Přístrojové vybavení a použité techniky	24
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	25
4.1 Charakterizace připravených nanočástic	25
4.2 Porfyriny	27
4.2.1 TMPyP	27
4.2.2 TTMAPP	32
4.2.3 TCPP	36
4.2.4 TSPP	40
4.2.5 PPIX	44
5. ZÁVĚR	48
6. SUMMARY	49
7. POUŽITÉ ZKRATKY	50
8. LITERATURA.....	51
9. PŘÍLOHA 1 - poster z konference Nanocon 2013	54
10. PŘÍLOHA 2 – článek ve sborníku z konference nanocon 2013	55

1. ÚVOD

Povrchem zesílená rezonační Ramanova spektroskopie (SERRS) vešla ve známost během posledních desetiletí. Jak název napovídá, jedná se o zesílení Ramanova rozptylu, a to na, nebo v blízkosti povrchu kovové nanočástice.

Pro potřebu SERRS měření se většinou využívá stříbrných nanočástic, které jsou nejčastěji připravovány chemickou redukcí stříbrných solí ve vodném roztoku. Redukce může být řízena například borohydridem sodným, citrátem sodným či glukózou, uvedeme-li ty nejznámější a nejpoužívanější. Použitím rozdílných redukčních činidel lze připravit, jak již bylo dokázáno mnoha výzkumnými týmy, nanočástice s velmi podobnými vlastnostmi (př. záporný zeta potenciál, velikost) avšak různými povrchovými obaly, které při SERRS měření hrají podstatnou roli v interakci se zkoumanými látkami. Tento vliv na SERRS spektra zkoumaných látek byl však studován pouze okrajově.

Studium porfyrinů využitím SERRS za použití Ag koloidu je vzhledem k rostoucímu využití porfyrinových derivátů významnou oblastí výzkumu. Porfyriny vyskytující se v přírodě v hojné míře jsou v dnešní době i synteticky upravovány pro dosažení zlepšení jejich vlastností pro použití v oblasti solárních článků či detekci kovů.

V diplomové práci jsem se zaměřila na detekci pěti porfyrinů (dva kationtové, dva aniontové, protoporfyrin IX). Pro potřebu SERRS měření jsou v této diplomové práci použity čtyři koloidní roztoky: dva byly připraveny redukcí borohydridem sodným, u dalších dvou byly stříbrné soli redukovány buď citrátem, nebo glukózou.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Povrchem zesílená rezonanční Ramanova spektroskopie

Povrchem zesílená rezonanční Ramanova spektroskopie (SERRS – surface-enhanced resonance Raman scattering) je velmi citlivá metoda se schopností detekce látek na úrovni jedné molekuly. Vysoká citlivost metody je zajímavá pro její použití pro stanovení analytu v nízkých koncentracích v biologických vzorcích.¹⁻⁴

2.1.1 Vývoj

Objev Ramanova rozptylu (spektroskopie-RS) se datuje k roku 1928, kdy sir Chandrasekhra Venkata Raman za použití slunečního světla, dalekohledu a vlastních očí tento jev pozoroval. Další významný pokrok v RS, mimo instrumentálního vývoje, byl popsán v roce 1974. Fleischmann et al. pozoroval (avšak nevysvětlil správně) intenzivní zesílení Ramanova spektra pyridinu na zdrsňeném povrchu stříbrné elektrody ve vodném roztoku, dnes známé jako povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS). Kombinací SERS s jevem rezonančního zesílení (vlivem blízkosti energií excitačních fotonů a energetických hladin v molekule, či nově vytvořeném povrchovém komplexu) vzniká povrchově zesílená rezonanční Ramanova spektroskopie (SERRS).^{2,5-8}

2.1.2 Mechanismy

Od rozvoje SERRS probíhá debata o mechanismech zesílení Ramanova rozptylu. Z literatury vychází, že princip zesílení lze rozdělit na dva hlavní mechanismy: elektromagnetický a molekulárních rezonancí (často také zvaný chemický). Oba mechanismy nejsou v některých případech zcela jednoznačně odlišitelné, avšak jejich působení je navzájem multiplikativní.^{5,6}

Elektromagnetický mechanismus

Základem elektromagnetického mechanismu zesílení Ramanova rozptylu molekul je jejich adsorpce na povrch nanočástic ušlechtilých kovů (Au, Ag,...), nebo alespoň jejich výskyt v těsné blízkosti nanočástic. (Pozn.: Tento mechanismus zesílení RS se rovněž uplatňuje na elektrodách z uvedených kovů, které mají nerovnosti ve stupnici nanometrů. V této práci se však zaměříme pouze na nanočástice.) Zesílení se pohybuje řádově v hodnotách 10^5 - 10^6 a funguje nezávisle na povaze cílové molekuly. Velmi však záleží např. na tvaru nanočástic, jejich agregačním stavu apod.⁵⁻⁸

Pro základní přiblížení je nejjednodušší aproximovat Ag nanočástice jako částice kulovitěho tvaru, jejichž velikost je mnohem menší než vlnová délka dopadajícího záření (Rayleighova aproximace pro popis rozptylu světla částicemi). Je-li elektrické pole rovnoměrně rozprostřeno po celém povrchu částice, je možné na jejich povrchu laserem vybudit indukované pole, které zesiluje Ramanův rozptyl molekul. Výběr laseru je vymezen vhodností použité vlnové délky, neboť vlnová délka musí splňovat podmínku rezonance s povrchovým plasmonem. Na základě TEM snímků je známo, že ve skutečnosti se Ag nanočástice nejčastěji vyskytují jako polyedrické útvary. Ačkoliv již jsou známy i výpočty zesílení pro různé tvary částic.⁵⁻⁸

Z předchozího textu vyplývá, že, je-li Ag nanočástice osvětlena zářením o vhodné vlnové délce, jsou vodivé elektrony na povrchu kovu oscilovány se stejnou frekvencí, jakou má dopadající záření, a vytvářejí oscilující dipól. Rezonanční excitace tohoto dipólu je také známa jako dipolární buzení povrchového plasmonu. Oscilující dipól vyzařuje záření, jehož intenzita je úměrná druhé mocnině absolutní hodnoty dipólového momentu. Z toho vyplývá, že jsou-li Ag nanočástice v roztoku rozptýleny daleko od sebe, fungují jako „lehké“ zesilovače Ramanova rozptylu. V praxi se však často jednotlivé nanočástice vyskytují blízko u sebe, díky tomu vznikají dipól-dipól interakce, které způsobují rozšíření a posunutí rezonanční oblasti. Toto souvisí také s místy známými jako „hot spots“. Jsou to místa, která vykazují silné elektromagnetické pole indukované dopadajícím laserovým zářením.^{6,9}

Mechanismus molekulárních rezonancí

Působení tohoto mechanismu zesílení je nezávislé na elektromagnetickém mechanismu zesílení. V systémech kde je možno pozorovat oba mechanismy, působí multiplikativně a je možno dosáhnout zesílení až na úrovni jedné molekuly, nebo-li 10^{14} - 10^{15} pro nechromoforní molekuly. Impulsem pro vznik teorie o existenci zesílení RS vlivem molekulárních rezonancí bylo experimentální pozorování. Při působení pouze elektromagnetického zesílení RS se totiž předpokládá, že zesílení je neselektivní, působí na všechny molekuly stejnou měrou. Z experimentálních pozorování však vyplývá, že pro určité molekuly je zesílení RS větší než pro jiné. Toto vysvětluje právě existence mechanismu zesílení RS vlivem molekulárních rezonancí.⁶⁻⁸

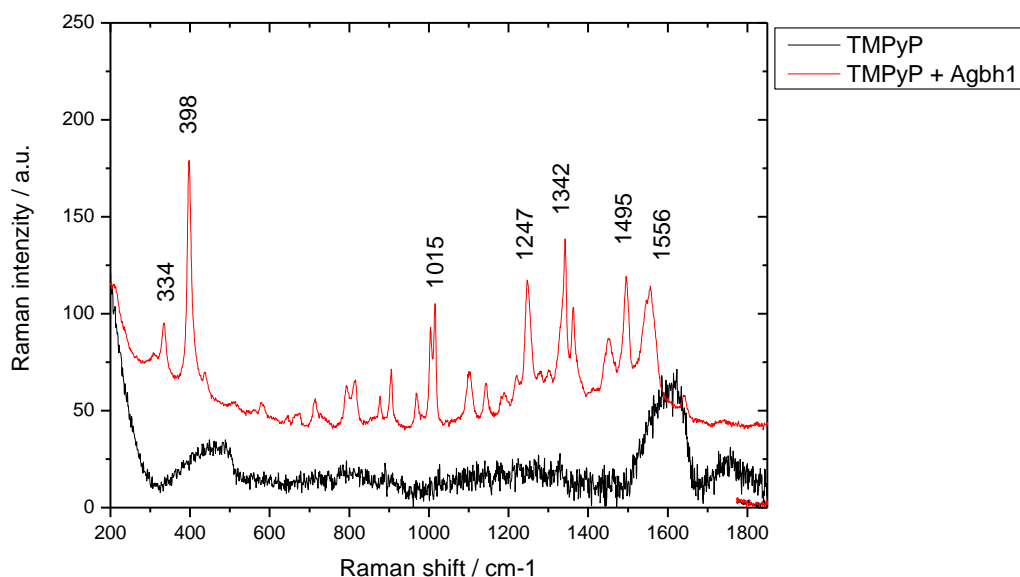
Obecně je mechanismus zesílení RS vlivem molekulárních rezonancí založen právě na vzniku rezonance, avšak rezonance molekuly adsorbované na nanočásticích. Při interakci molekul s povrchem nanočástic lze sledovat:

- a) Posunutí a rozšíření elektronových stavů adsorbovaných molekul.
- b) Nové elektronové stavy molekuly, které vznikají chemisorpcí a slouží jako rezonanční stavy.

SERRS zahrnuje jak elektromagnetický mechanismus zesílení RS, tak i mechanismus molekulárních rezonancí. Obecně řečeno SERRS nastává, když vlnová délka dopadajícího záření odpovídá vlnové délce povolených elektronových přechodů v molekule a současně je v rezonanci s příslušným povrchovým plasmonem. Na základě struktury molekul lze sledovat dva případy molekulárních příspěvků.

První jednodušší případ rezonance nastává, pokud molekula obsahuje chromoforní skupinu. Je důležité zachování chromoforní skupiny v případě spojení molekuly a nanočástice kovu, vytvoření SERRS aktivního systému. Příkladem můžeme uvést spojení porfyriu a Ag nanočástice, za vzniku metalokomplexu, viz obr. 1.

V druhém případě molekula sama o sobě neobsahuje chromoforní strukturu, ale na povrchu kovu dochází k vytvoření chromoforního komplexu. Příkladem může být uveden 2,2'-bipyridin v interakci s Ag nanočásticemi.⁶⁻⁹



Obr. 1: Zesílení Ramanova rozptylu porfyrinu TMPyP po přidání Ag nanočástic do měřeného systému.

2.1.3 Instrumentace

První Ramanův spektrometr, sestavený v roce 1928, využíval slunečního záření, dalekohledu a lidského oka jako detektoru, tato jednoduchá konstrukce od té doby prošla značným vývojem.

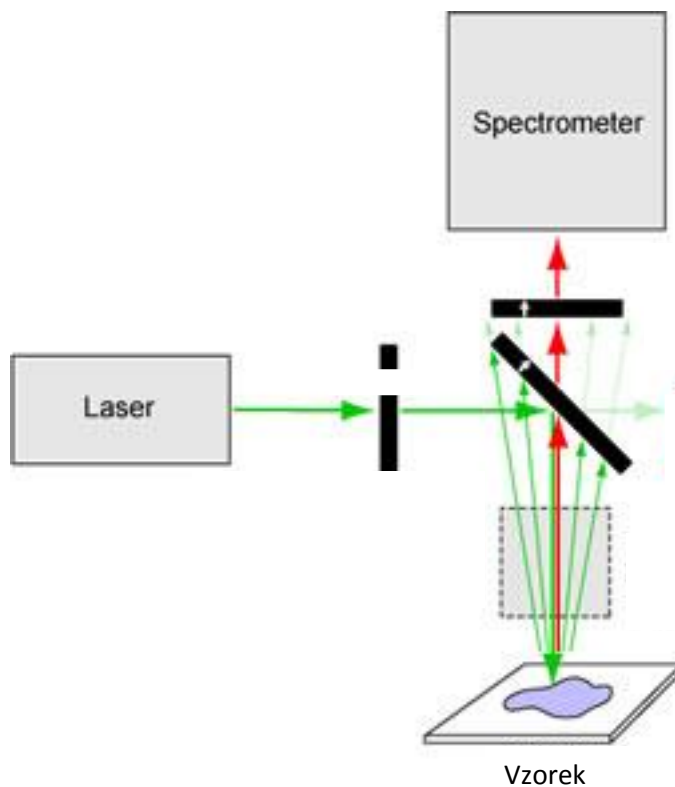
Zdroje záření

K excitaci Ramanova rozptylu je potřeba monochromatické záření, jehož zdrojem jsou dnes výhradně lasery. Pro viditelnou oblast se nejčastěji používají He-Ne laser (633 nm), Ar iontový laser (457, 488 a 514,5 nm), Kr iontový laser (647 a 568 nm) či polovodičový diodový laser (532 nm). V blízké infračervené oblasti (NIR) je typicky používán Nd-YAG laser (1064 nm – neodymem dotovaný yttriohlinitý granát, $Y_3Al_5O_{12}$).^{2,7}

Optická dráha

Jako optickou dráhu Ramanova spektrometru nazýváme prostor mezi zdrojem záření a detektorem. V tomto prostoru se nachází umístění vzorku a optické prvky, nejčastěji monochromátor, mřížky či filtry, pro filtraci, fokusaci a směřování paprsku. Monochromátor zde také slouží k odstranění Rayleighova rozptylu, který svou intenzitou může zastínit Ramanův rozptyl.

Existuje několik možností uspořádání optických komponent pro měření RS, a tedy i vnitřního uspořádání spektrometru. Mezi základní patří geometrické uspořádání 90° či 180° . Uspořádání v geometrii 180° je znázorněno na obr. 2 a bylo využito v této diplomové práci.^{2,7}



Obr. 2: Uspořádání Ramanova spektrometru v geometrii 180° .²⁶

Detektor

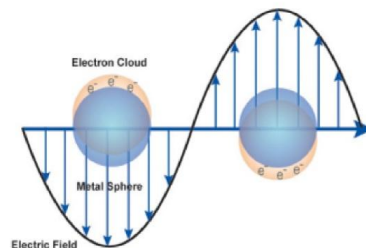
V současné době se pro zpracování a detekci Ramanova rozptylu ve viditelné oblasti používá disperzní detektor s mřížkovým spektrografem a víceprvkovým (mnohokanálovým) CCD detektorem (z angl. charge coupled device). CCD detektor je světlocitlivá součástka využívající fotoefektu k převodu fotonů na elektrický signál. Další možností zpracování dat je interferometr využívající Fourierovou transformaci (FT) pro převedení interferogramu na vlastní spektra. FT Ramanův spektrometr se používá při měření v blízké infračervené oblasti (NIR).^{2,7}

2.2 Ag nanočástice

Nanočástice stříbra jsou široké veřejnosti známé pro své antibakteriální vlastnosti, ale mají i mnohé další zajímavé vlastnosti, příkladem jsou jejich optické vlastnosti zaznamenané již ve středověku a používané pro barvení skla.

2.2.1 Optické vlastnosti

Stříbrné nanočástice vykazují mimořádné vlastnosti jak v oblasti absorpce, tak i odrazu elektromagnetického záření. Při interakci nanočástic a elektromagnetického záření dochází k interakci delokalizovaných elektronů s elektrickou složkou elektromagnetického záření o určité vlnové délce. Díky repulzi mezi elektrickou složkou záření a elektronovým obalem atomů dochází k oscilaci delokalizovaných elektronů, tento jev je známý jako rezonance povrchových plasmonů. Interakce povrchového plasmonu s elektrickou složkou záření je znázorněna na obr. 3.¹³



Obr. 3: Znázornění interakce částice s delokalizovanými elektrony a elektrickou složkou elektromagnetického záření.¹³

2.2.2 Příprava nanočástic

Metody příprav nanočástic lze rozdělit podle principu do dvou skupin: metody dispergační a kondenzační.

Dispergační metody jsou založeny na mechanickém rozměňování látek makroskopických rozměrů. Příkladem lze uvést mletí, ultrazvuk, laserovou ablací,...

Kondenzační metody využívají chemické či fyzikální metody pro přípravu. Typickým příkladem chemického postupu je vytvoření nerozpustné látky v daném prostředí z původně rozpustné látky. Fyzikální metodou může být změna rozpouštědla, ve kterém má daná látka nízkou rozpustnost, tím je vyvolaná kondenzace látky a vznik nanočástic.

Roztoky nanočástic se vzhledem k definici koloidního roztoku (rozměry 1-100 nm) nazývají koloidy. Podle typu rozpouštědla lze rozlišovat hydrosoly (rozpuštědlem je voda) a organosoly (organická rozpouštědla). V této diplomové práci bude využito pouze hydrosolů obsahujících Ag nanočástice vzniklé různými kondenzačními metodami.^{11,12}

2.2.3 Metody charakterizace nanočástic stříbra

Pro určení charakteristických fyzikálních vlastností nanočástic, např. velikost a zeta potenciál, lze využít několika experimentálních technik postavených na odlišných fyzikálních principech.

DLS

Dynamický rozptyl světla (Dynamic Light Scattering) se používá k určení distribuce velikostí částic. Takto jsou získána rozdělení dle velikosti, objemu a intenzitního zastoupení částic v koloidu.

Při klasickém rozptylu se světlo, rozptýlené od různých částic, nachází v náhodné fázi, proto nedochází k jeho interferenci. Použitím laseru jako zdroje koherentního záření dochází při jeho interakci s nanočásticemi k interferenci. Brownův pohyb malých částic v kapalině zajišťuje neustálou změnu vzdálenosti mezi částicemi a detektorem. Díky této změně vzdáleností může rozptýlené záření interferovat a vznikají fluktuace intenzity rozptýleného záření kolem průměrné hodnoty. Korelační funkce,

získána z fluktuací intenzit, vyjadřuje závislost mezi průměrem intenzity v čase $(t+\tau)$ a průměrem intenzity v čase t . Závislost mezi $I(t)$ a $I(t+\tau)$ je snadno přirovnatelná k velikosti zpoždění τ , je-li zpoždění veliké jsou $I(t)$ a $I(t+\tau)$ na sobě nezávislé, při krátkém zpoždění na sobě závislé jsou. Předpokládáme-li systém kulovitých částic o stejné velikosti, vypadá korelační funkce následovně:

$$g(\tau) = \exp(-\tau/\tau_c)$$

kde:

$$\tau_c = \frac{1}{2} DQ^2$$

D vyjadřuje difúzní koeficient, Q je vlnový vektor.

Pro získání hydrodynamického poloměru částic R , se používá Stokes-Einsteinovy rovnice pro difúzní koeficient ($D = kT/6\pi\eta a$).

$$R = (kT/6\pi\eta)Q^2 \tau_c$$

Pro praktické použití předcházejících vztahů se pod různými úhly rozptylu (různé hodnoty Q) proměřují hodnoty τ_c . Vynesením $1/\tau_c$ proti Q^2 získáme D a z něj následující R .^{11,12}

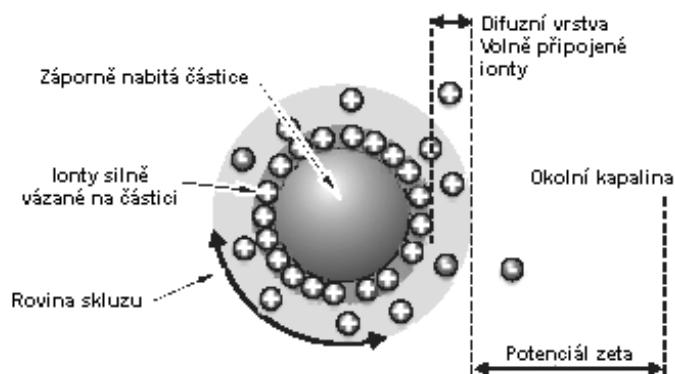
Zeta potenciál

Zeta potenciál (ζ potenciál, elektrokinetický potenciál) je jedním ze dvou druhů potenciálových rozdílů, které vznikají díky existenci elektrické dvojvrstvy kolem nabitě částice v kapalině. Výskyt nabitě nanočástice v kapalině doprovází seskupování opačně nabitých iontů v jejím okolí. Na povrchu této částice vzniká elektrická dvojvrstva skládající se ze dvou základních částí. Kompaktní vrstva u povrchu částice je vystavena adsorpčním silám, od povrchu vzdálenější část, kde adsorpční síly zanedbáváme, nazýváme difúzní vrstvou.

První z potenciálů je elektrochemický potenciál je dán potenciálovým rozdílem mezi povrchem částice a okolní kapalinou.

Druhý elektrokinetický (zeta) potenciál znázorněný na obr. 4, popisuje potenciál mezi tenkou vrstvou proti-iontů upoutanou k povrchu částice a okolní kapalinou (potenciálový rozdíl mezi kompaktní a difúzní částí). Zeta potenciál, odpovídá náboji difúzní části, který je mírou elektrického náboje dvojvrstvy, ten charakterizuje a

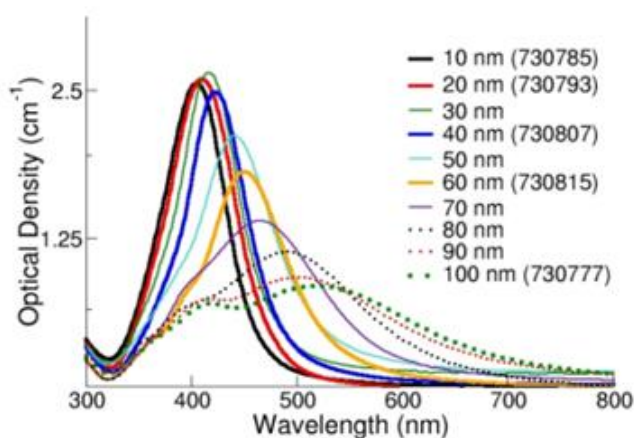
ovlivňuje stabilitu koloidních soustav. Obecně jsou považovány koloidy za stabilní, pokud je hodnota zeta potenciálu menší než -30 mV nebo naopak větší než $+30$ mV.^{11,12}



Obr. 4: Znázornění povrchově nabitě částice v roztoku a popis vrstev včetně zeta potenciálu.¹⁴

UV/Vis spektra

Molekulová absorpční spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/Vis spektroskopie) poskytuje elektronová spektra látek, které absorbují elektromagnetické záření v oblasti 200 až 800 nm. Při absorpci záření dochází k přechodu ze základního do excitovaného stavu molekuly a následné deexcitaci záření, čímž je udržována rovnováha.

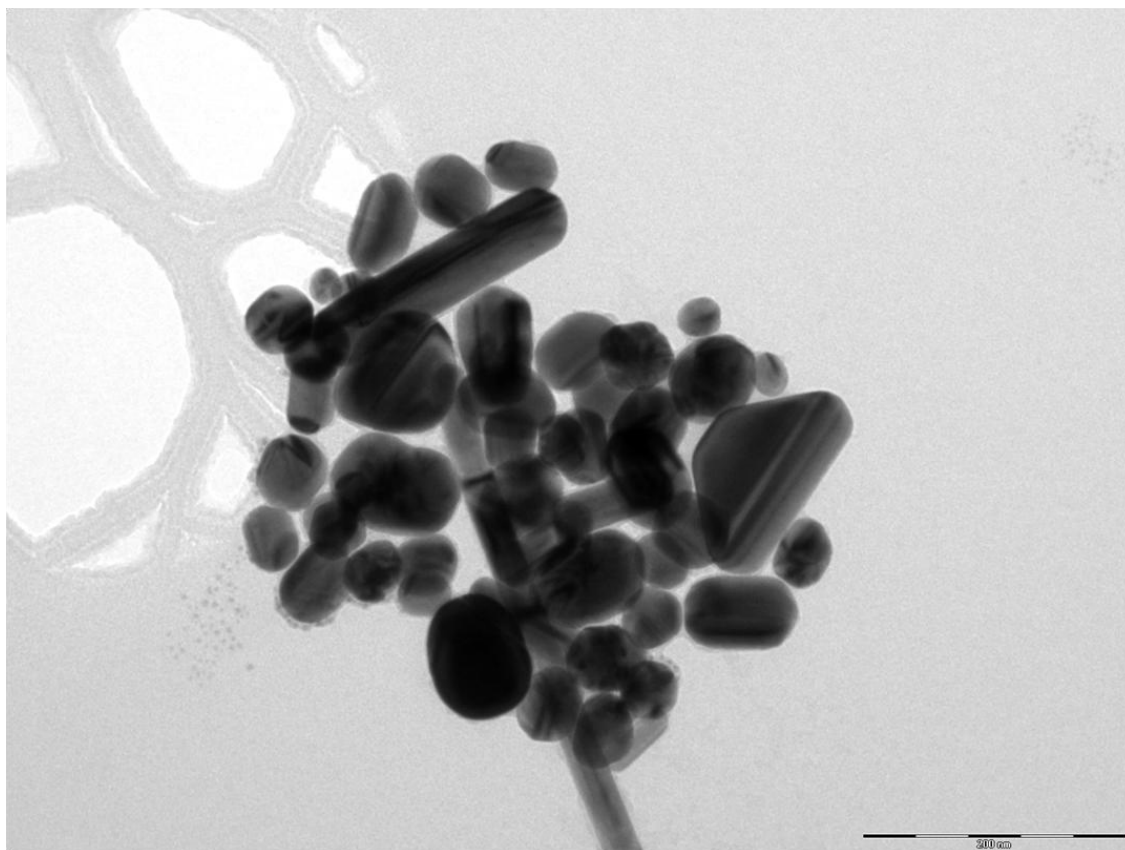


Obr. 5: Posun plasmonického píku v závislosti na velikosti nanočástic.¹³

UV/Vis spektra stříbrných nanočástic poskytují intenzitu extinkce (součet příspěvků absorpce a rozptylu) povrchového plasmonu, přítomnost plasmonického píku. Typicky se extinkční maximum stříbrných nanočástic nalézá v oblasti 390 – 530 nm. Plasmonický pás, jeho poloha a šířka, vyjadřuje závislost na velikosti (obr. 5), tvaru a bezprostředním prostředí nanočástice. Například posun plasmonové extinkce nastává při agregaci koloidu např. přidáním kationtového porfyriu.¹³

TEM

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) je významný nástroj pro zobrazování nanočástic, jejich velikostí a morfologií. V praxi se jedná o analogii světelného mikroskopu, s rozdílem použití elektronového paprsku pro zobrazování částic. Vznikající elektrony jsou urychlovány a přes soustavu čoček zaměřeny na vzorek. Následnou fokusací je daný obraz digitálně zaznamenán pomocí CCD kamery.



Obr. 6: Zobrazení stříbrných nanočástic pomocí TEMu.

Na obr. 6 je snímek z transmisního elektronového mikroskopu stříbrných nanočástic připravených redukcí pomocí citrátu. Byl vybrán snímek, z něhož je patrná rozdílná velikost a morfologie vzniklých částic.¹⁵

2.3 Porfyriny

Porfyriny je souhrnný název pro skupinu makrocyclických sloučenin skládajících se ze čtyř pyrrolových cyklů. Převážně se jedná o přirozeně se vyskytující látky, ale existuje i velká skupina synteticky vyráběných porfyrinů.¹⁸ Jejich charakteristickou vlastností je tvorba metalokomplexů – komplexů s kovovými ionty vázanými k dusíkovému atomu pyrrolových kruhů.

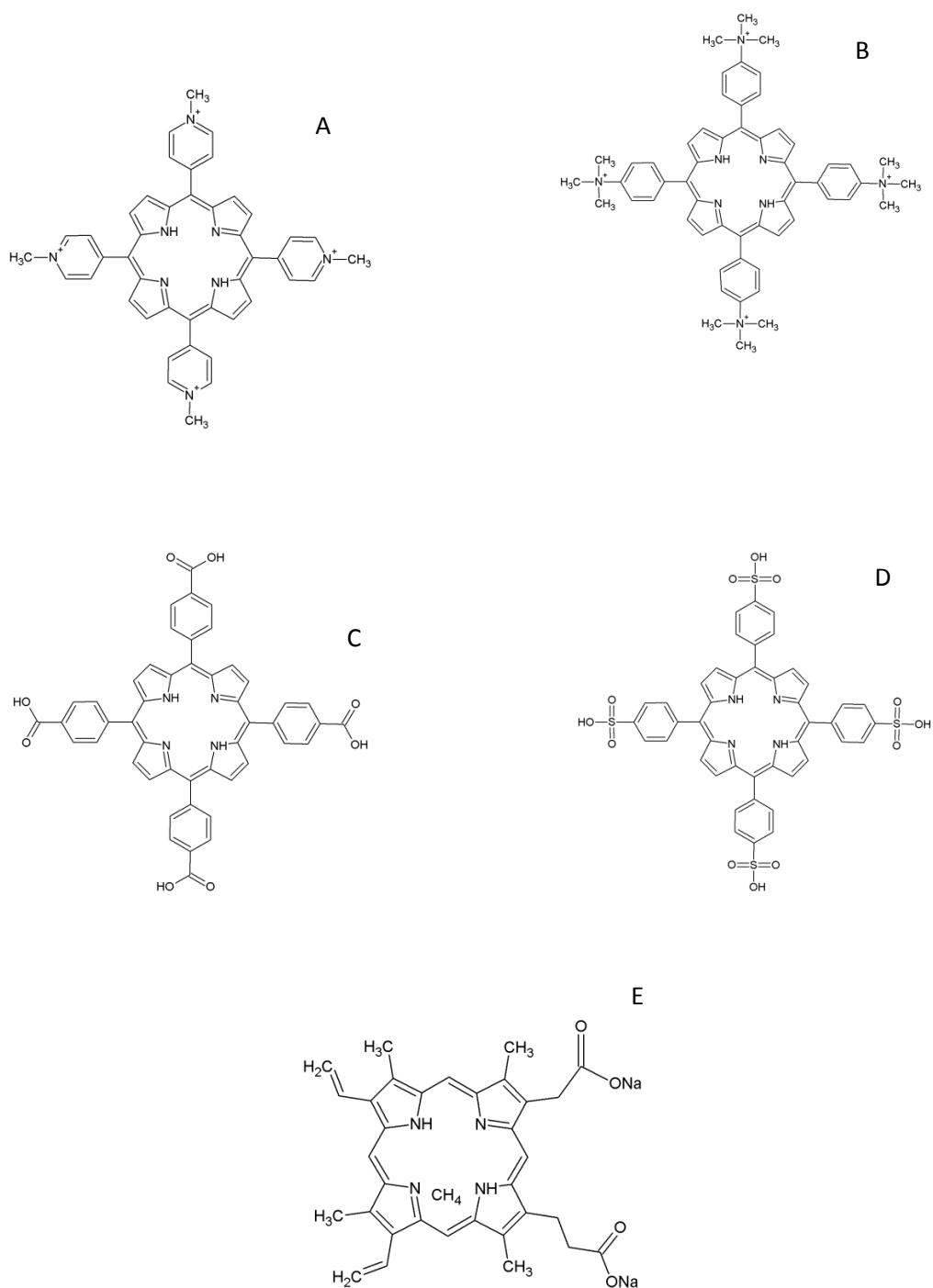
Nejznámějším příkladem přirozeně se vyskytujících porfyrinů je komplex s atomem železa známý jako hem (součást hemoglobinu) či komplex s hořčíkem – chlorofyl. V práci se zaměříme na jejich přirozeně se vyskytující prekurzor Protoporfyrin IX (PPIX).

V oblasti zájmů je nyní využití syntetických porfyrinů jako barviva do solárních článků nebo jejich uplatnění v senzorech. Jako každá synteticky vytvořená látka, jsou cizorodými v životním prostředí a mohly by být nebezpečné, pokud by došlo k jejich uvolňování. Proto je prozkoumání možností a mezi detekce i syntetických porfyrinů důležitá.¹⁸⁻²⁰

Tab. 1: Systematické názvosloví použitých porfyrinů:

Zkratka	Systematické názvosloví
TMPyP	5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-porfin, tetratosylátová sůl
TTMAPP	5,10,15,20-tetrakis(4-trimethyl-ammoniophenyl)porfyrin, tetra(p-toluenesulfonát)
TCPP	4,4',4'',4'''-(21H,23H-porfin-5,10,15,20-tetrayl)tetrakis(benzoová kyselina)
TSPP	4,4',4'',4'''-(21H,23H-porfin-5,10,15,20-tetrayl)tetrakis(benzensulfonová kyselina)
PPIX	Protoporfyrin IX

Na obrázku 7 jsou znázorněny struktury vybraných porfyrinů, které byly použity pro měření SERRS spekter v přítomnosti stříbrných nanočástic v rámci této diplomové práce. Konkrétně se jedná o dva kationtové porfyriny TMPyP a TTMAPP, dva aniontové porfyriny TCPP, TSPP a již zmíněný PPIX.



Obr. 7: Strukturní vzorce vybraných porfyrinů A - TMPyP, B - TTMAPP, C - TCPP, D - TSPP, E - PPIX

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Seznam použitých chemikálií pro přípravu

- Ag nanočástic.: AgNO₃ – p.a., Tamba
- NH₃ – vodný roztok 25%, p.a. Lachema
- NaOH – p.a., Lachema
- C₆H₁₂O₆ – p.a., Riedel-de Haen
- Citronan sodný - p.a., Lachema
- NaBH₄ - p.a., Lachema

Chemikálie použité na přípravu porfyrinových roztoků:

- TMPyP – 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-porfin, tetratosylátová sůl – p.a., Sigma-Aldrich
- TTMAPP - 5,10,15,20-tetrakis(4-trimethyl-ammoniofenyl)porfyrin, tetra(p-toluenesulfonát) – p.a., Sigma-Aldrich
- TCPP - 4,4',4'',4'''-(21H,23H-porfin-5,10,15,20-tetrayl)tetrakis (benzoová kyselina) – p.a., Sigma-Aldrich
- TSPP - 4,4',4'',4'''-(21H,23H-porfin-5,10,15,20-tetrayl)tetrakis (benzensulfonová kyselina) – p.a., Sigma-Aldrich
- PPIX - Protoporfyrin IX – p.a., Sigma-Aldrich

Veškeré chemikálie byly použity bez dalšího čištění. Pro přípravu všech roztoků a na čištění skla byla použita deionizovaná voda. Čištění používaného laboratorního skla a křemenných kyvet mezi jednotlivými měřeními bylo zajišťováno kyselinou dusičnou v poměru 1:1 s destilovanou vodou. Pro důkladnější zachování čistoty prostředí bylo laboratorní sklo a kyvety čištěny směsí kyseliny sírové s peroxidem vodíku (1:1).

3.2 Příprava nanočástic

Pro přípravu stříbrných nanočástic byla zvolena chemická redukce stříbrných solí rozdílnými činidly na základě literatury věnující se SERS.

3.2.1 Borohydridový koloid - Agbh1

Borohydridový koloid označován jako Agbh1 byl připraven v předem vychlazené lázni o 4°C. Ve vychlazené deionizované vodě (75 ml) bylo rozpuštěno 3,5 mg NaBH₄. Za stálého míchání (100 otáček za minutu) bylo k roztoku NaBH₄ po kapkách přidáno 7,5 ml roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci 2,2 x 10⁻³ M. V míchání se pokračovalo po dobu 45 minut za pokojové teploty.²²

3.2.2 Borohydridový koloid Agbh2

Příprava Agbh2 byla analogická k přípravě Agbh1, akorát bylo přidáno 9 ml (místo 7,5 ml) roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci 2,2 x 10⁻³ M. V míchání se opět pokračovalo po dobu 45 minut za pokojové teploty.²²

3.2.3 Citrátový koloid AgCit

Redukce dusičnanu stříbrného při přípravě AgCit probíhala dle následujícího postupu: Roztok 45 mg AgNO₃ ve 250 ml deionizované vody byl přiveden k varu a za stálého míchání bylo přidáno 10 ml 1% citrátu. Poté byl systém udržován ve varu po dobu jedné hodiny. Získaný koloid byl odstředěn v centrifuze po dobu 15 minut při 4000 otáčkách za minutu.²³

3.2.4 Glukózový koloid AgG

Pro přípravu AgG byla použita upravená Tollensova metoda. V kádince bylo smíseno 20 ml vodného roztoku AgNO₃ o koncentraci 5 x 10⁻³M, 20 ml vodného roztoku NH₃ (0,025 M), 4 ml roztoku 0,24 M NaOH a bylo přidáno 36 ml vody. Po spuštění míchání bylo přidáno 20 ml 0,05 M vodného roztoku glukózy. Po 10 minutách stálého míchání je koloid šedé barvy hotový.²⁴

3.3 Porfyriny

Rozpuštěním příslušných porfyrinů jsme připravili zásobní roztoky o koncentraci 1×10^{-4} M. Pro měření Ramanovou spektroskopií byly kyvety naplněny 1,5 ml daného koloidu, ke kterému bylo přidáno 15 μ l porfyriu, výsledná koncentrace porfyriu v systému s koloidem je 1×10^{-6} M. Systémy, které byly určeny pro měření v delším časovém období, byly uloženy v uzavíratelných nádobách v temnu za laboratorní teploty.

3.4 Přístrojové vybavení a použité techniky

Základní charakteristiky nanočástic, velikost částic, sledována dynamickým rozptylem světla (DLS), a zeta potenciál, byly měřeny na přístroji Zetasizer Nano Series (Malvern Instrument). UV/Vis spektra byla měřena pomocí Specord S600 (Analytic Jena). Spektrometr Specord S600 poskytuje opakující se pík v oblasti 650 nm, jedná se o chybu detektoru. Snímky z transmisního elektronového mikroskopu (TEM) byly pořízeny na přístroji JEM 2010 (Jeol, Japonsko) s rozlišovací schopností 0,1 nm, měření prováděla Mgr. Klára Šafářová, Ph.D.

Měření povrchem zesílených rezonančních Ramanových spekter probíhalo na přístroji DXR Raman Microscope (THERMO SCIENTIFIC). Spektrometr pracuje ve 180° uspořádání a byl použit polovodičový diodový laseru s vlnovou délkou 532 nm. Spektrometr obsahuje filtr sloužící k eliminaci Stokesových linií a termoelektricky chlazený (-50°C , 223,15K) detektor. Při měřeních byl nastaven maximální výkon laseru, tzn. 10 mW. Spektra byla načítána v nastavení 2 s expozice 64x.

Veškerá SERRS měření byla opakována minimálně třikrát z důvodu ověření reprodukovatelnosti získaných dat.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Charakterizace připravených nanočástic

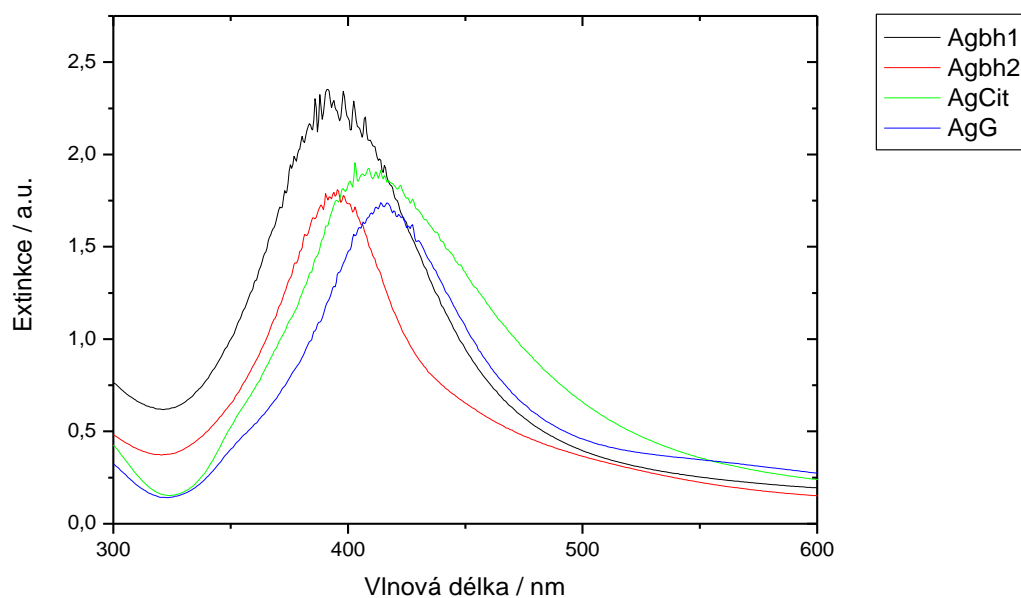
Byly připraveny čtyři druhy nanočástic. Agbh1 a Agbh2 jsou koloidy připravené redukcí borohydridem sodným, které se však liší rozdílnou koncentrací stříbra použitou při přípravě a mírně odlišnými velikosti vzniklých částic. Redukcí stříbrných solí pomocí citrátu sodného byl připraven AgCit. Při redukci koloidu označeného AgG byla jako redukční činidlo použita glukóza.

Základní charakteristiky připravených nanočástic, jako je absorpční maximum UV/Vis spektra, průměrná velikost získána na základě DLS a zeta potenciál jsou shrnuty v tabulce 2. Další vlastností, kterou se připravené koloidy liší, avšak není v tabulce 2 zmíněna, je chemického složení iontů/látek jsoucích na povrchu nanočástic. Na povrchu Agbh1 a Agbh2 se ustálí elektrostatická dvojvrstva tvořená anorganickými ionty (boráty a polyboráty), zatímco další dva koloidy (AgCit a AgG) jsou obklopeny organickými molekulami (karboxylové a polykarboxylové anionty).^{27,28}

Tab. 2: Základní charakteristiky připravených nanočástic.

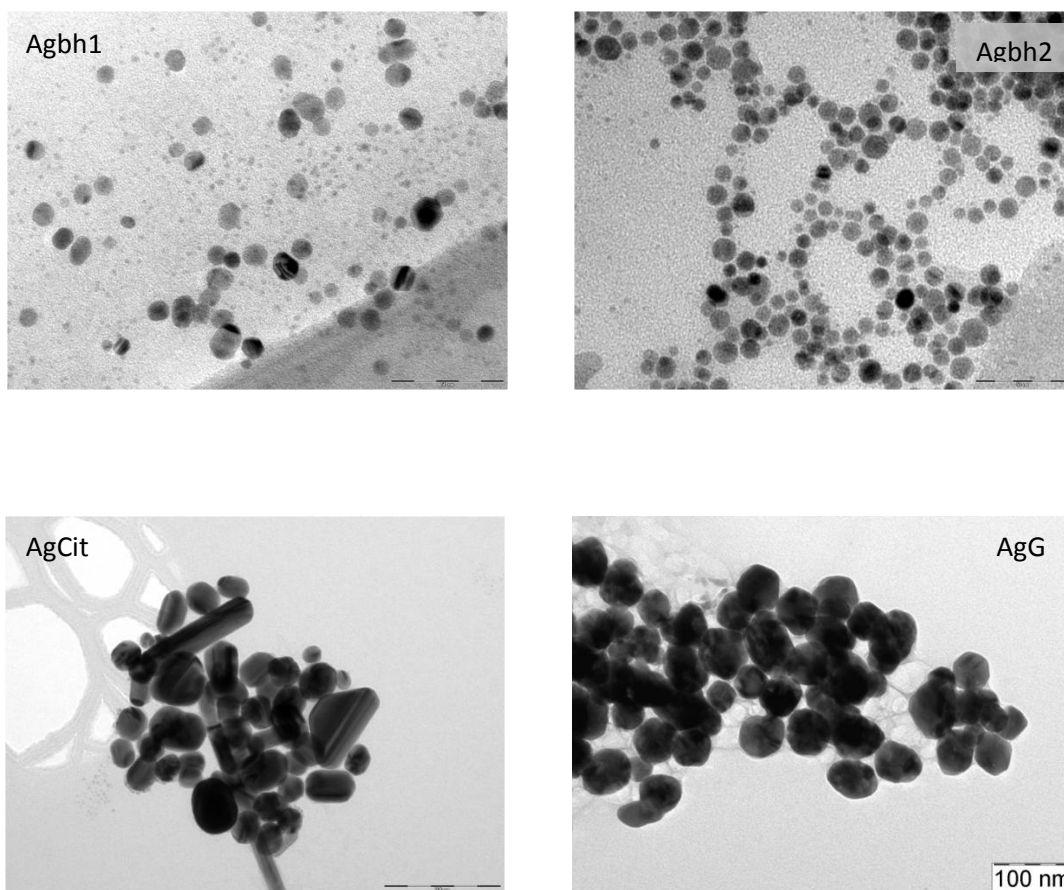
Koloid	UV/Vis (nm)	Průměrná velikost dle DLS (nm)	Zeta potenciál (mV)
Agbh1	395	13 ± 2	-41 ± 9
Agbh2	394	9 ± 3	-42 ± 8
AgCit	410	52 ± 10	-37 ± 15
AgG	415	75 ± 15	-32 ± 19

UV/Vis spektra samotných koloidů jsou uvedena na obr. 8. Pro naměření UV/Vis spektra AgG bylo nutno koloid naředit v poměru 1:5.



Obr. 8: UV/Vis spektra Agbh1, Agbh2, AgCit a AgG.

Na snímcích TEM (obr. 9) je patrné, že připravené nanočástice se liší nejen velikostí, ale také tvarem částic, což je nejvíce patrné u AgCit.



Obr. 9: TEM snímky Agbh1, Agbh2, AgCit a AgG

4.2 Porfyriny

Hlavním cílem této diplomové práce je detekovat vybrané porfyriny pomocí čtyř druhů nanočástic připravených redukcí stříbrných solí, dva borohydridem sodným s rozdílnou koncentrací stříbra v roztoku, jeden citrátem sodným a poslední glukózou. Stříbrné nanočástice se liší povrchovým uspořádáním iontů. Na povrchu Agbh1 a Agbh2 se ustaluje elektrostatická dvojvrstva tvořená anorganickými ionty (boráty a polyboráty), zatímco další dva koloidy (AgCit a AgG) jsou obklopeny organickými molekulami (karboxylové a polykarboxylové anionty).

V následujících sekcích jsou podrobně popsány jednotlivé systémy (míněno příslušný porfyrin s danými koloidy), vývoje kinetiky metalace porfyrinu od 1. do 43. minuty u kationtových porfyrinů a podle možností do 4 týdnů pro aniontové porfyriny. Porfyriny byly měřeny při excitační vlnové délce 532 nm. Výsledná koncentrace porfyrinů v systému je 1×10^{-6} M. Pro všechny systémy byla sledována nejen Ramanova spektra, ale i UV/Vis spektra pro posouzení splnění rezonanční podmínky.

4.2.1 TMPyP

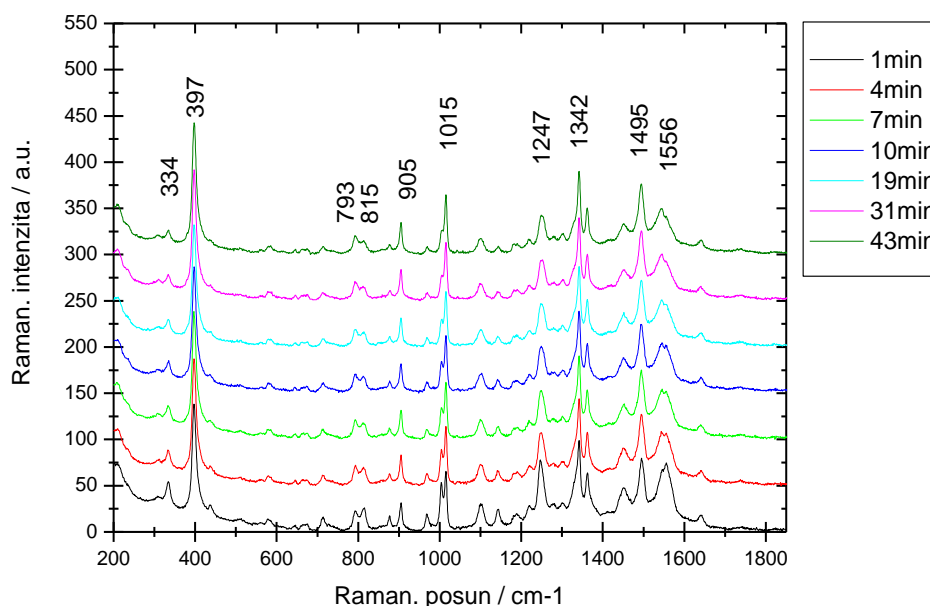
Kationtový porfyrin TMPyP poskytuje spektrální odezvu ve dvou formách: metalované (díky Ag^+ přítomnému na povrchu Ag nanočástic) a nemetalované („volná báze“, zesílení je možno pozorovat díky přiblížení porfyrinu k povrchu nanočástice). Tyto formy se od sebe liší polohami několika pásů, tzv. metalačními markery, v oblastech okolo 390, 1015 a 1340 cm^{-1} pro metalovanou formu a 340, 1004 a 1360 cm^{-1} pro nemetalovanou formu.²¹ Spektrální zesílení je pozorováno již od první minuty po přípravě systému. Spektra byla pozorována po dobu 43 minut; delší časové období (týden a více) nebylo měřeno z důvodu rychlé agregace systémů a jejich sedimentace.

SERRS spektra koloidních systémů Agbh1, Agbh2, AgCit, AgG s TMPyP jsou zaznamenány na obrázcích 10 až 13.

Agbh1

Porfyrin TMPyP v prostředí Agbh1 je možno pozorovat v metalované formě, což potvrzují pásy v oblasti 397, 1015 a 1342 cm^{-1} (obr. 10).

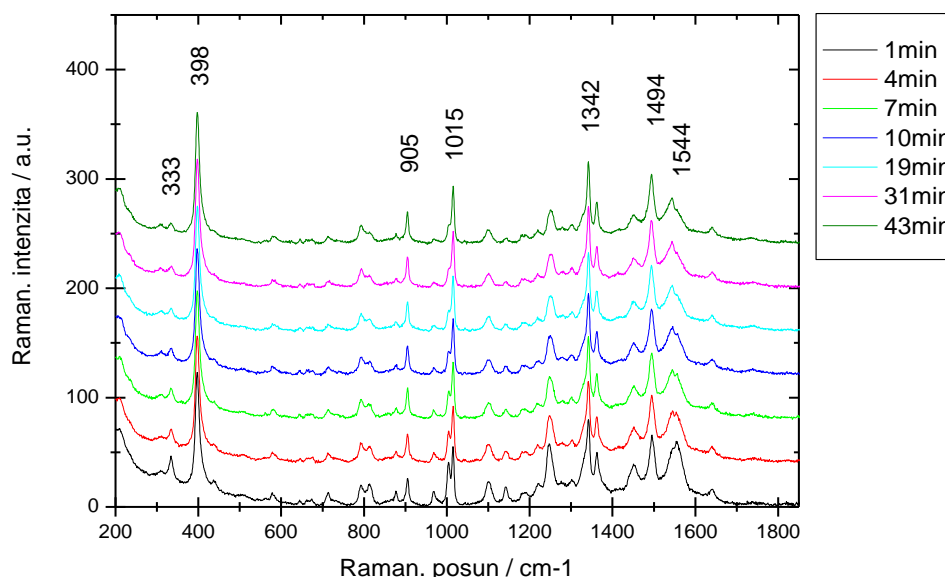
Z kinetického hlediska lze pozorovat metalaci porfyriu, a to porovnáním relativních intenzit pásů 334:397 a 1004:1015 cm^{-1} . Metalaci porfyriu lze tak potvrdit díky nárůstu pásů 397 a 1015 cm^{-1} a zmenšujícími se píky 334 a 1004 cm^{-1} (obr. 10). Průběh metalace kationtového porfyriu na částicích koloidu Agbh1 souvisí s postupným ustalováním nové elektrické dvojvrstvy tvořené kationtovým porfyriem, boráty a polyboráty na povrchu těchto nanočástic.



Obr. 10: Spektrum interakce Agbh1 a TMPyP v excitaci 532 nm.

Agbh2

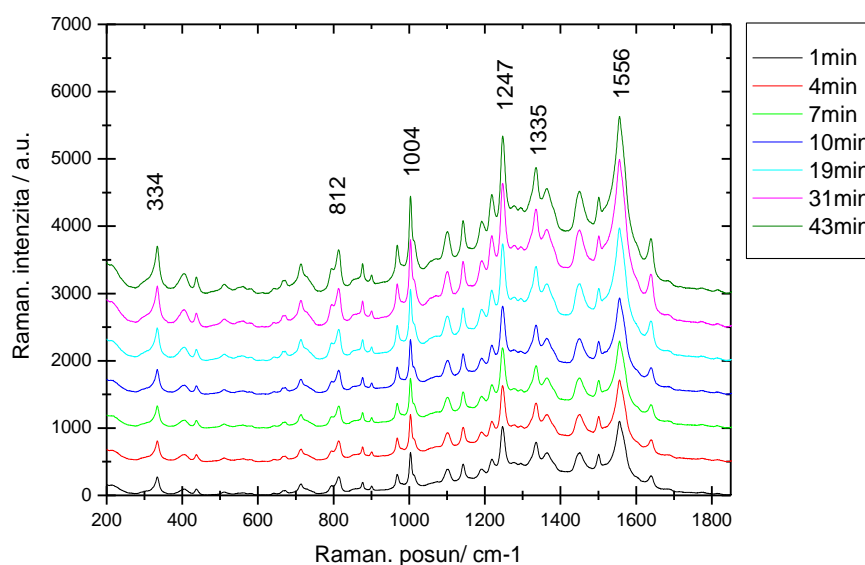
V systému tvořeném Agbh2 a TMPyP (obr. 11) jsou pozorovány stejné trendy jako v systému TMPyP a Agbh1. Porfyrin TMPyP je možno pozorovat v metalované formě, což potvrzují pásy v oblasti 398, 1015 a 1342 cm^{-1} .



Obr. 11: Spektrum interakce Agbh2 a TMPyP v excitaci 532 nm.

AgCit

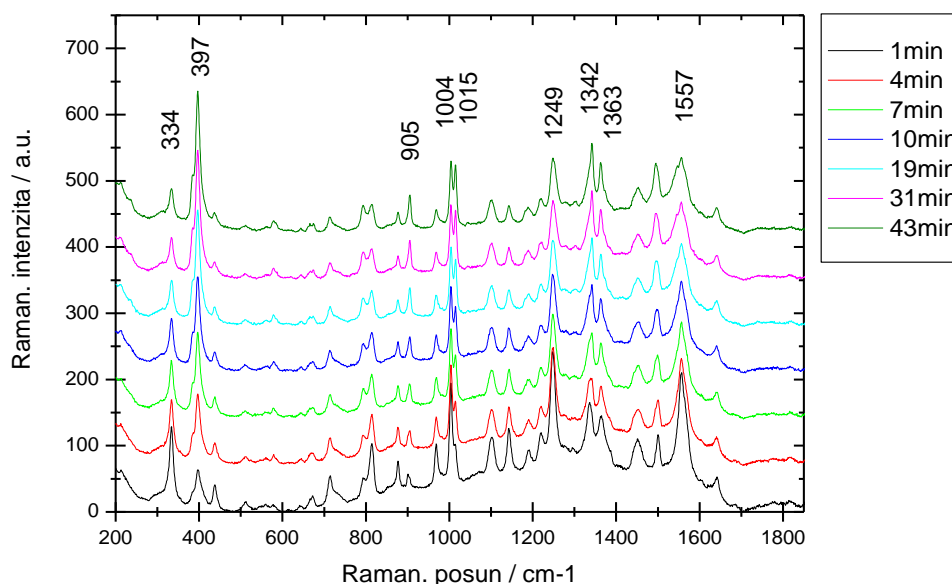
Nemetalovanou formu TMPyP můžeme pozorovat v přítomnosti citrátového koloidu. Projevem této nemetalované formy jsou pásy 334, 1004 a 1335 cm^{-1} , jak je zřejmé z obrázku 12. K zabránění metalace nejpravděpodobněji dochází z důvodu přítomnosti organických látek pocházejících z oxidace citrátů (v průběhu syntézy tohoto Ag koloidu) na povrchu nanočástice.



Obr. 12: Spektrum interakce AgCit a TMPyP v excitaci 532 nm. Porfyrin TMPyP v nemetalované formě, pásy v oblasti 334, 1004 a 1335 cm^{-1} .

AgG

V přítomnosti AgG je v průběhu 43 minut možno sledovat postupnou metalaci porfyrinu (obr. 13), stejně jako v interakci s borohydridovými koloidy. Rozdílem je zde pomalejší postup metalace (díky organickým iontům na povrchu nanočástic), který je pozorovatelný hlavně v relativních intenzitách pásů 1004 a 1015 cm^{-1} .



Obr. 13: Spektrum interakce AgG a TMPyP v excitaci 532 nm.

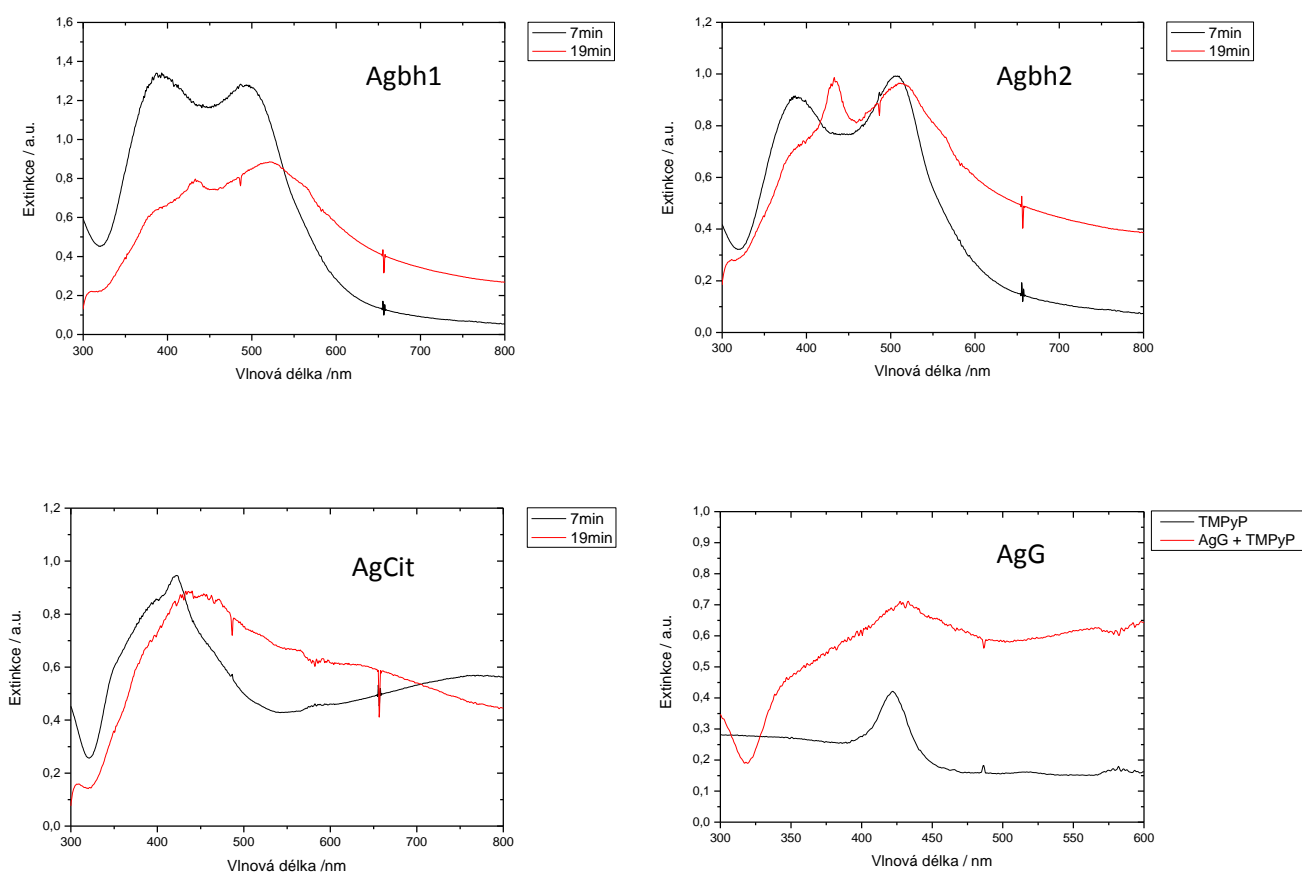
Z uvedeného lze uzavřít, že SERRS aktivní systémy Agbh1, Agbh2 a AgG poskytují s TMPyP spektra metalované formy. V Agbh1 a Agbh2 dochází k metalaci rychleji než s AgG. AgCit neposkytuje v celém rozmezí 43 minut žádné metalační pásy. Tyto rozdíly ve spektrech a kinetice metalace porfyrinu TMPyP jsou přiřazovány rozdílným iontům na povrchu nanočástic. Na povrchu Agbh1 a Agbh2 se ustaluje elektrostatická dvojvrstva tvořená anorganickými ionty (boráty a polyboráty), zatímco další dva koloidy (AgCit a AgG) jsou obklopeny organickými molekulami (karboxylové a polykarboxylové anionty).

UV/Vis spektra

Změny v systémech koloid – porfyrin se pochopitelně projeví nejen v Ramanově rozptylu, ale také v UV/Vis spektrech. UV/Vis spektra jsou sice jednodušší na interpretaci z hlediska jasně pozorovatelného posunu pásu příslušejícího povrchovému plasmonu nanočástic, avšak nejsou natolik detailní, aby zachytila metalaci porfyrinu. Uvádíme je zde především pro ověření splnění podmínek rezonance pro SERRS

v případě jednotlivých systémů. Také se v nich projeví agregace nanočástic (způsobená přidávkem zkoumaného porfyriu), a to posunem maxima povrchového plasmonu k vyšším vlnovým délkám.

V systémech Agbh1 a Agbh2 pozorujeme v UV/Vis spektrech pás se dvěma maximy, jež se v průběhu času posunují směrem k větším vlnovým délkám (obr. 14). Ve spektrech AgCit a AgG pozorujeme pouze jedno maximum (obr. 14), které se však v obou případech v průběhu času lehce posunuje k vyšším vlnovým délkám, a navíc se šířka pásu povrchového plasmonu zvětšuje. UV/Vis spektra byla pořízena v 7. a 19. minutě po vzniku jednotlivých systémů.



Obr. 14: UV/Vis spektra koloidních systémů s TMPyP. Legenda označuje, v které minutě byla spektra naměřena: 7 min (černá spektra) vs. 9 min po přípravě systému (červená spektra).

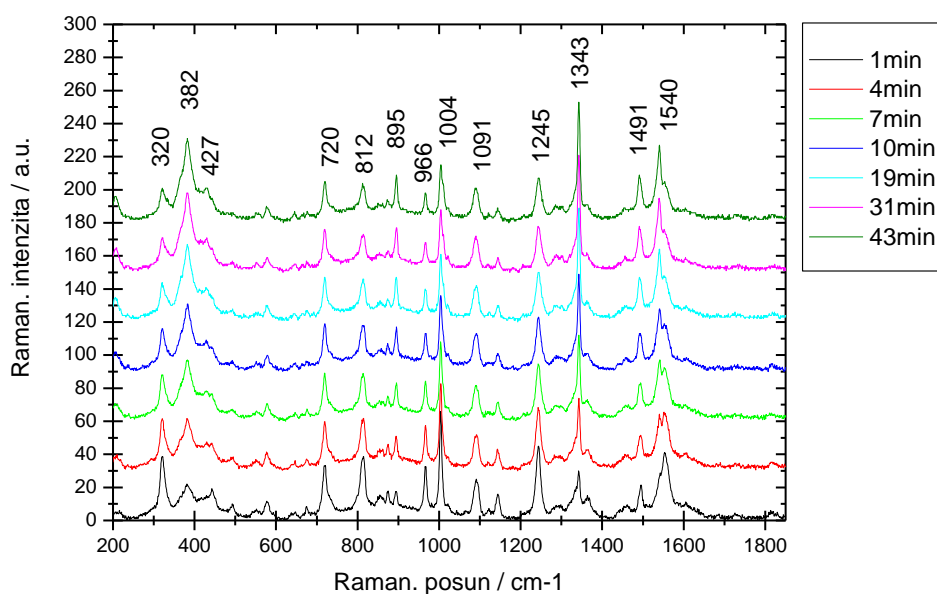
4.2.2 TTMAPP

Metalační pásy porfyriu TTMAPP leží převážně v oblasti 380 a 1340 cm^{-1} . Pás v oblasti 320 cm^{-1} a absence zřetelnějších pásů kolem $1330 - 1360\text{ cm}^{-1}$ jsou projevy přítomnosti nemetalované formy.

Stejně jako tomu byly porfyriu TMPyP jsou u porfyriu TTMAPP pozorována spektra v průběhu prvních 43 minut po vzniku systémů.

Agbh1

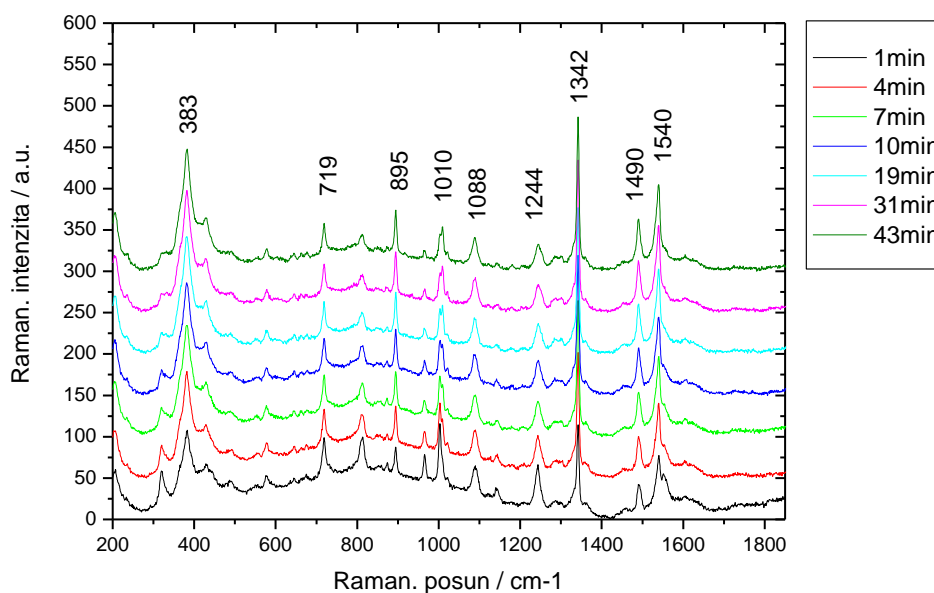
Pro systém Agbh1 a TTMAPP (obr. 15) lze pozorovat postupnou metalaci porfyriu vyznačující se změnou relativních intenzit pásů nemetalované a metalované formy v průběhu sledovaného časového období. Sledujeme tudíž změnu relativních intenzit pásů nemetalované formy 320 a 1360 cm^{-1} a pásů metalované formy 382 a 1343 cm^{-1} .



Obr. 15: Spektrum interakce Agbh1 a TTMAPP v excitaci 532 nm.

Agbh2

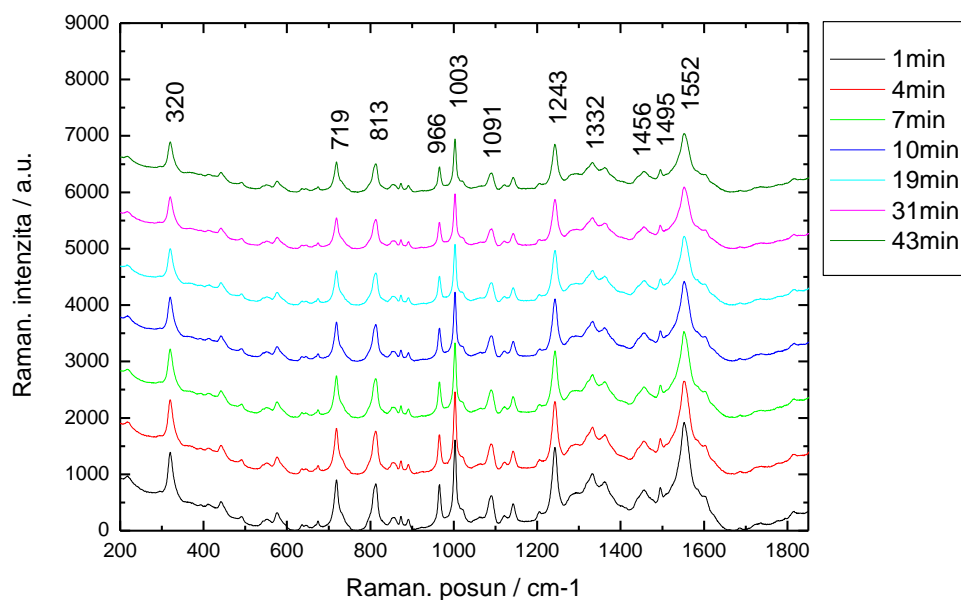
V systému TTMAPP s Agbh2 (obr. 16) sledujeme trend postupné metalace, která je rychlejší než v přítomnosti Agbh1. Pás při 320 cm^{-1} , který je na počátku relativně zřetelný, postupem vymizí, znamená metalace přítomných porfyrinů. Rychlejší metalace je pravděpodobně způsobena větší koncentrací stříbra při přípravě koloidu.



Obr. 16: Spektrum interakce Agbh2 a TTMAPP v excitaci 532 nm.

AgCit

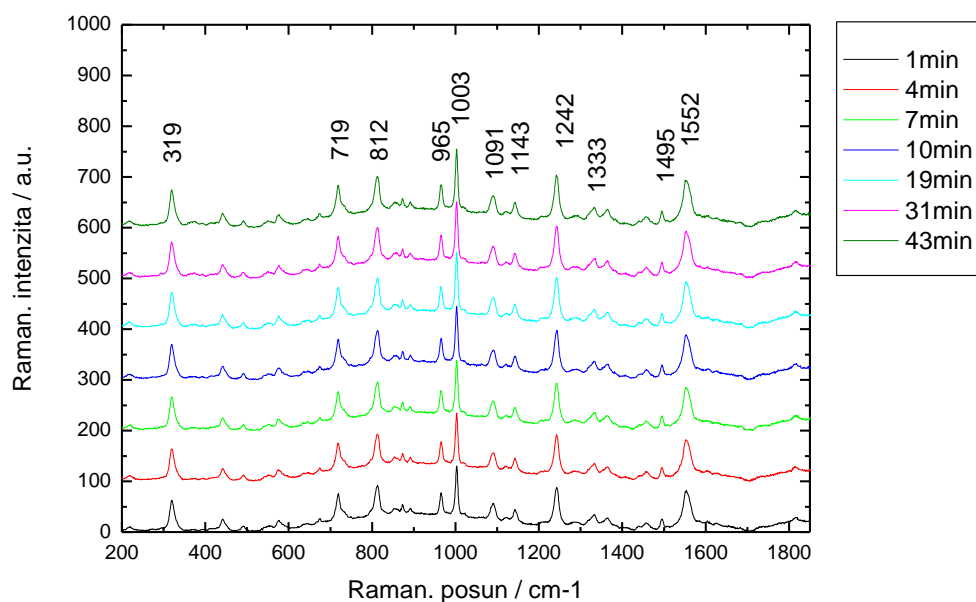
Na obr. 17 je zřetelné spektrum nemetalované formy TTMAPP, které se po dobu 43 minut nemění, s výjimkou klesající celkové intenzity spektra. Tento postupný pokles intenzity může souviset s agregací a sedimentací nanočástic vlivem přidavku kationtového porfyriu.



Obr. 17: Spektrum interakce AgCit a TTMAPP v excitaci 532 nm.

AgG

Zajímavým rozdílem oproti systému AgG-TMPyP, diskutovaným v předchozí části, je interakce AgG s TTMAPP (obr. 18), kde jsou spektra pouze nemetalované formy porfyriu. Ani po 43 minutách není pozorován náznak metalovaného porfyriu.

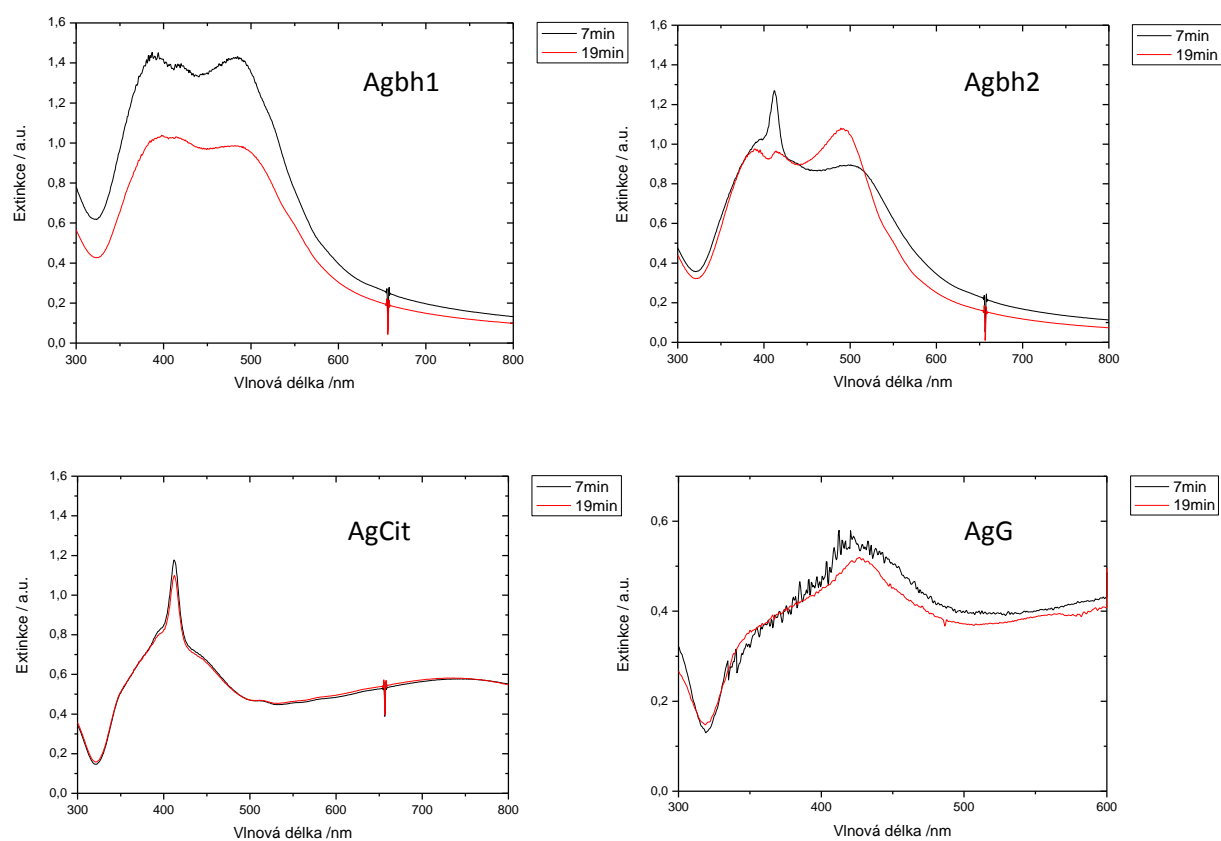


Obr. 18: Spektrum interakce AgG a TTMAPP v excitaci 532 nm.

Obecně lze tudíž konstatovat, že jsou v systémech s TTMAPP pozorovány podobné trendy jako u porfyriu TMPyP, a to nejspíše díky faktu, že jde opět o kationtový porfyrin a musíme uvažovat přeuspořádání elektrické dvojvrstvy okolo nanočástic při proniknutí porfyriu k povrchu Ag a jeho metalaci. Jediný významnější rozdíl se projevuje u AgG koloidu, což může být způsobeno odlišnou interakcí mezi TTMAPP a karboxylovými kyselinami přítomnými na povrchu AgG oproti případu AgG s TMPyP.

UV/Vis spektra

Podobně jako u TMPyP byla i u TTMAPP změřena UV/Vis spektra pro jednotlivé systémy (obr. 19). I zde jsou pozorovatelné rozdíly mezi spektry koloidů Agbh1, Agbh2 a AgCit, AgG. Borohydridové koloidy mají ve svém spektru dvě maxima, jejichž intenzita se s metalací přelévá k vyšším vlnovým délkám. Tento jev souvisí s agregací nanočástic vlivem narušení jejich elektrické dvojvrstvy při interakci s kationtovým porfyriem. Koloidy s organickými ionty na povrchu (AgCit, AgG) mají pouze jedno maximum, které se výrazně nemění (a současně víme ze SERRS spekter, že nedochází k metalaci – obr. 17 a 18). UV/Vis spektra jsou měřena v 7. a 19. minutě po vzniku systémů.



Obr. 19: UV/Vis spektra koloidů Agbh1, Agbh2, AgCit a AgG s porfyrinem TTMAPP.

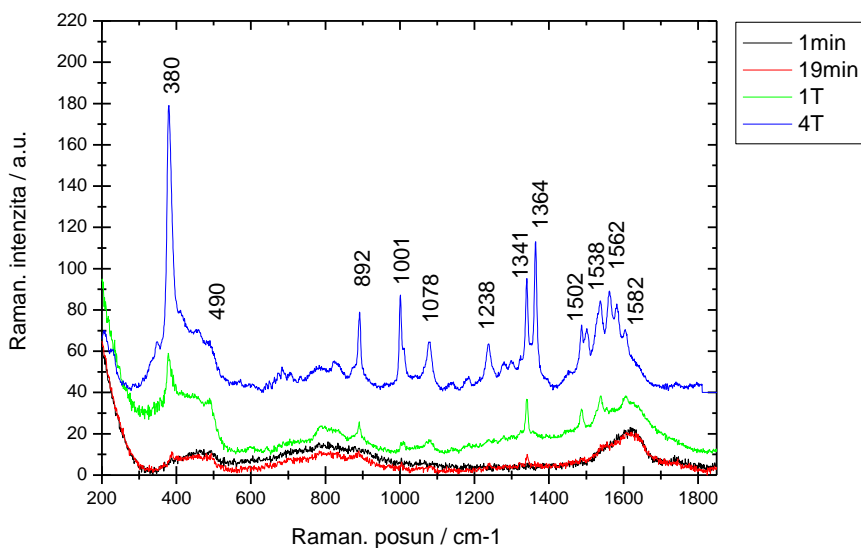
Legenda označuje, v jaké minutě byla spektra naměřena: 7 min (černá spektra) vs. 9 min po přípravě systému (červená spektra).

4.2.3 TCPP

TCPP uvádíme jako první ze studovaných aniontových porfyrinů. Jeho SERRS spektra jsou měřena v 1. a 19. minutě a následně po 1 a 4 týdnech (respektive 2 týdnech). Jako u předešlých porfyrinů lze detekovat dvě SERRS spektrální formy TCPP: metalovanou a nemetalovanou (volnou bázi). Metalovanou formu lze ve spektru jasně odlišit pomocí charakteristických pásů, které se nacházejí v oblasti 390, 1340 a 1540 cm^{-1} . Známkou nemetalované formy jsou pásy posunuté do oblastí 380, 1360 a 1560 cm^{-1} .¹⁶

Agbh1

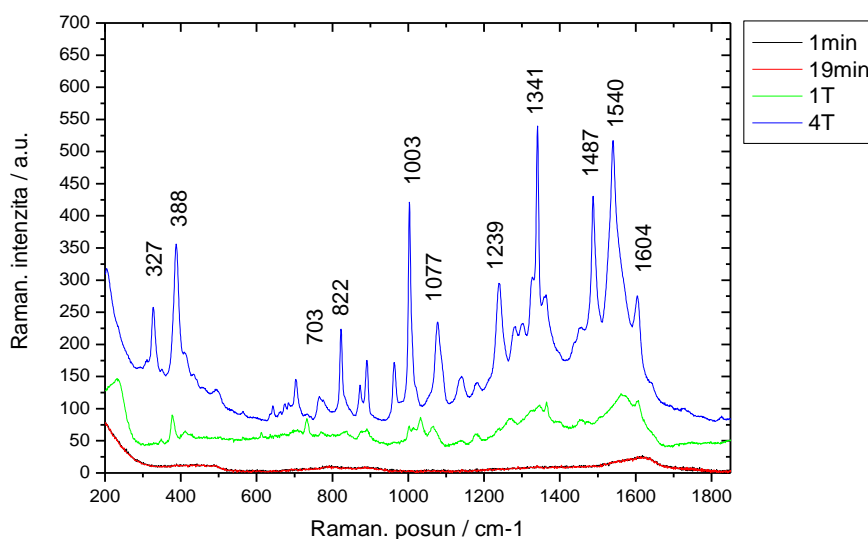
Pásky 1341, 1538 cm^{-1} jsou charakteristické pro metalovanou formu TCPP, mírně intenzivnější pásky 1364 a 1562 cm^{-1} jsou známkou přítomnosti i nemetalovaného TCPP (obr. 20).



Obr. 20: Spektrum interakce Agbh1 a TCPP v excitaci 532 nm.

Agbh2

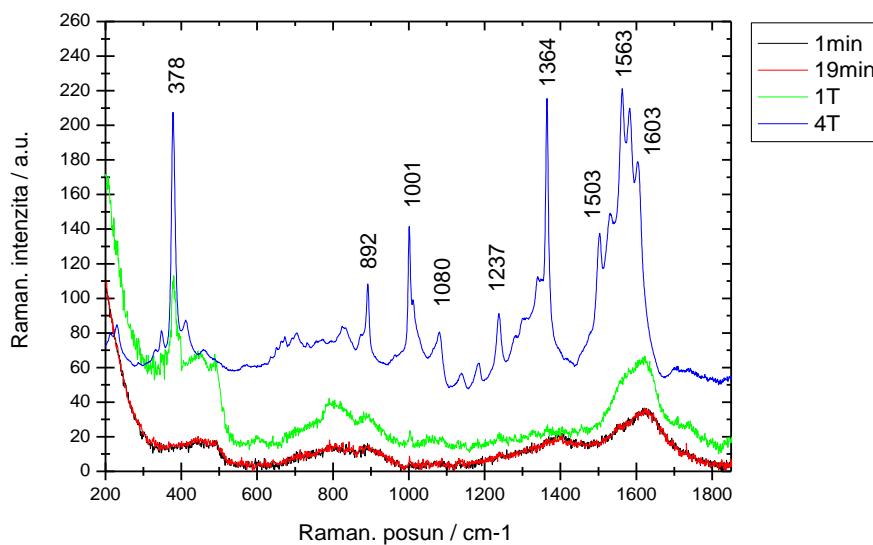
Charakteristické pásky metalovaného TCPP v oblastech 388, 1341 a 1540 cm^{-1} byly změřeny v SERRS aktivním systému s Agbh2 po časovém období 4 týdnů (obr. 21).



Obr. 21: Spektrum interakce Agbh2 a TCPP v excitaci 532 nm.

AgCit

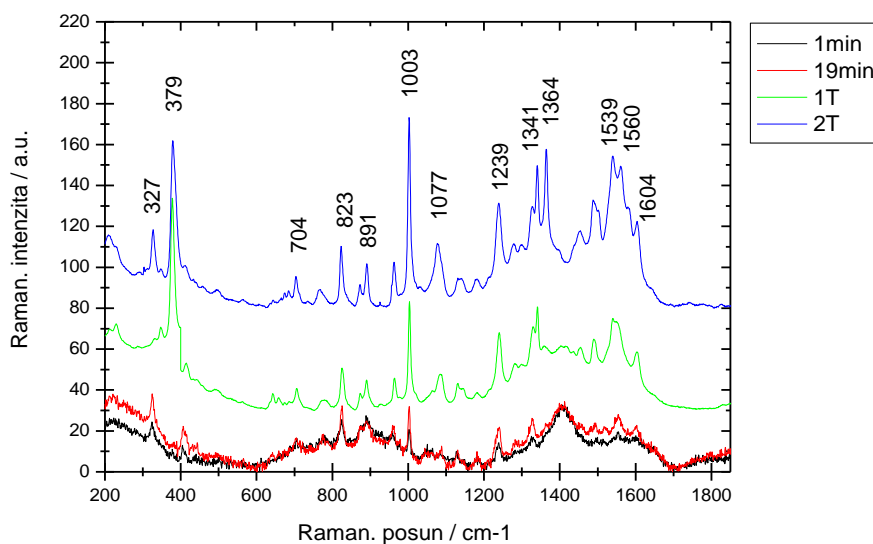
Charakteristické pásy nemetalovaného TCPP v oblastech 378, 1364 a 1563 cm^{-1} byly změřeny v SERRS aktivním systému s Agbh2 po časovém období 4 týdnů (obr. 22).



Obr. 22: Spektrum interakce AgCit a TCPP v excitaci 532 nm.

AgG

Pásy 1341, 1538 cm^{-1} jsou charakteristické pro metalovanou formu TCPP, mírně intenzivnější pásy 378 a 1364 cm^{-1} jsou známou přítomnosti i nemetalovaného TCPP (obr. 23).

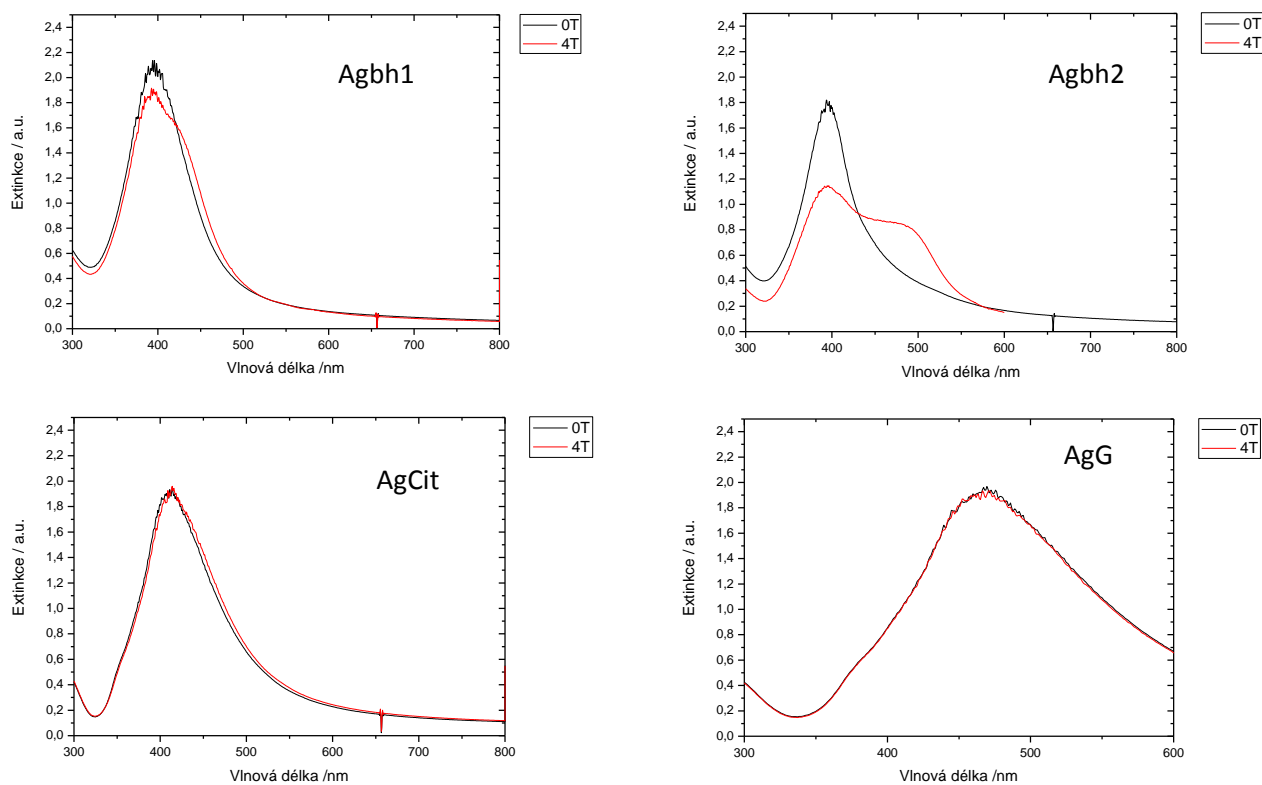


Obr. 23: Spektrum interakce AgG a TCPP v excitaci 532 nm.

Lze tedy shrnout, že v 1. a 19. minutě jsou viditelná SERRS spektra od TCPP pouze při použití koloidu AgG. Zřetelnější SERRS spektra dostáváme již po 1 týdnu a to převážně u Agbh1 a AgG. Po uplynutí 4 týdnů pozorujeme u všech koloidů výrazná spektra: metalované formy – u systému s Agbh2, nemetalované formy – u systému s AgCit, pásy obou forem – pro systémy s Agbh1 a AgG. To souvisí, stejně jako v předchozích případech, s ionty na povrchu nanočástic.

UV/Vis spektra

Průběh UV/Vis spekter koloidních systémů s aniontovým porfyrinem TCPP je na obrázku 24. UV/Vis spektra, měřena v několika minutách po vzniku příslušného systému, mají podobnost se spektry samotných koloidů, viz obr. 8. UV/Vis spektrum TCPP s Agbh1 se ani po několika týdnech příliš nemění, dochází však k náznaku vytvoření raménka u 450 nm. U systému TCPP s Agbh2 je v období čtyř týdnů značně rozvinuta metalace, což souvisí s agregací nanočástic projevující se v UV/Vis spektru vznikem druhého maxima při 500 nm. UV/Vis spektra AgCit a AgG se ani po několika týdnech nemění. Za povšimnutí stojí, že na rozdíl od ostatních systémů, kde leží maxima v oblastech okolo 400 nm je maximum u AgG u 480 nm. To vypovídá o agregaci nanočástic. Je pozoruhodné, že se agregace nanočástic v systému AgG s TCPP nemění v průběhu čtyř týdnů (obr. 24).



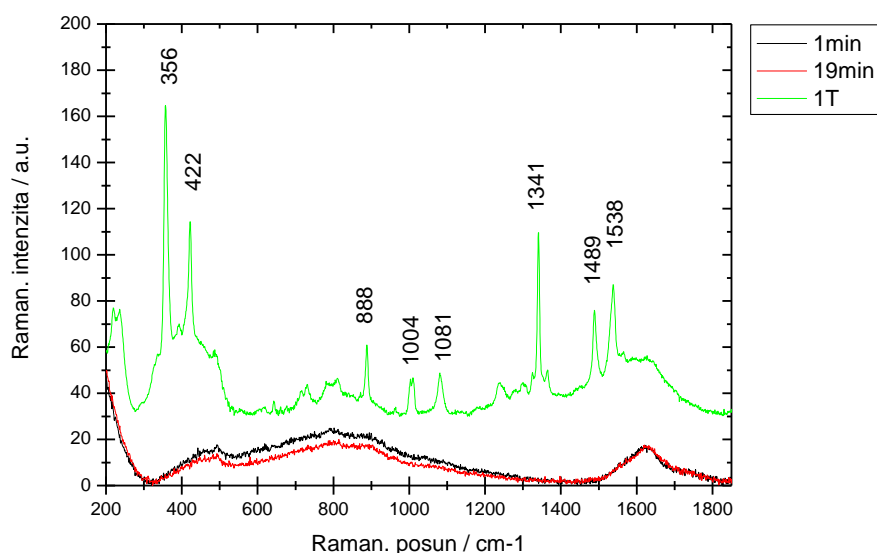
Obr. 24: UV/Vis spektra koloidů Agbh1, Agbh2, AgCit a AgG s porfyrinem TCPP. Legenda označuje, v jakém týdnu byla spektra naměřena: v den přípravy systému (černá spektra) vs. 4 týdny po přípravě (červená spektra).

4.2.4 TSPP

Porfyrin TSPP byl zkoumán, obdobně jako předchozí tři porfyryny, v interakci s Agbh1, Agbh2, AgCit a AgG. TSPP se také vyskytuje ve dvou spektrálních formách: metalované (projevující se 355, 422, 1341, 1541 cm^{-1}) a nemetalované (350, 412, 1364 a 1563 cm^{-1}).¹⁶

Agbh1

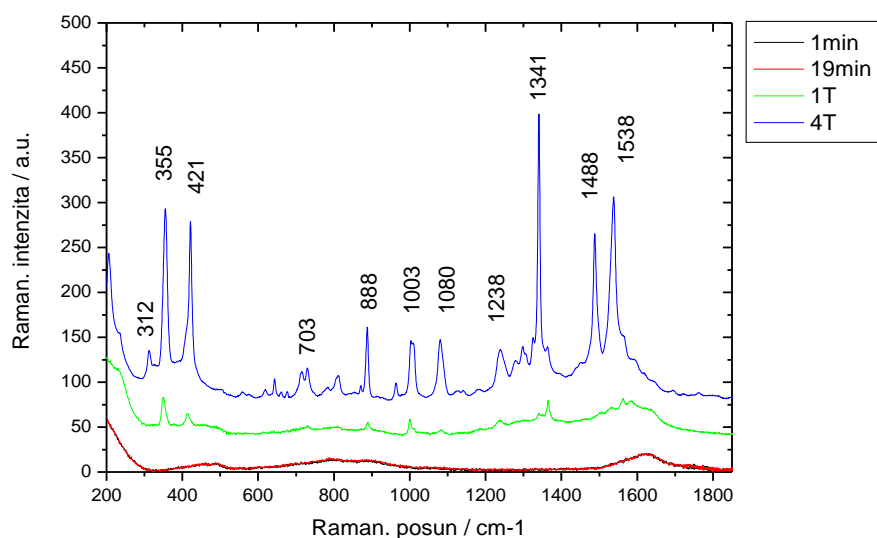
Pásky 356, 422, 1341 a 1538 cm^{-1} , signály metalované formy TSPP, jsou pozorovatelné již po 1 týdnu v systému TSPP s Agbh1 (obr. 25).



Obr. 25: Spektrum interakce Agbh1 a TSPP v excitaci 532 nm.

Agbh2

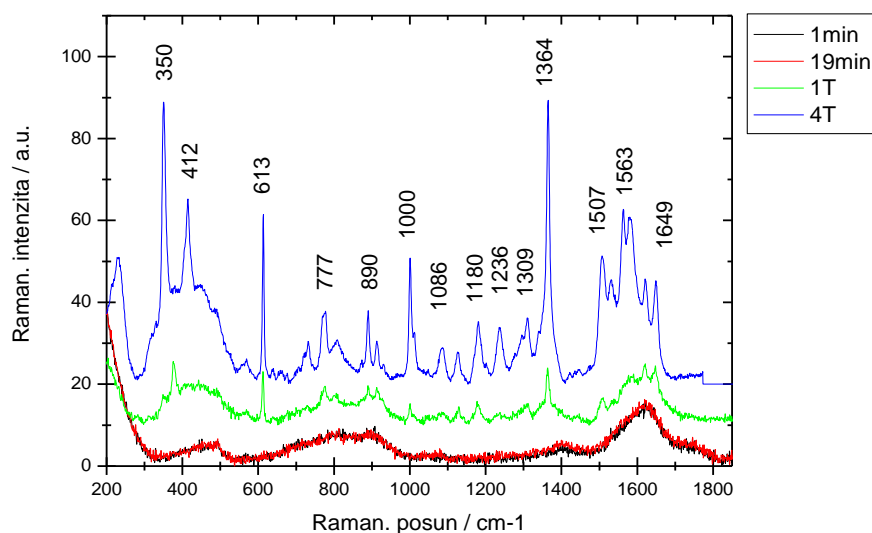
Pro systém TSPP s Agbh2 se vyskytují v SERRS spektru měřeném po 1 týdnu pouze slabě intenzivní pásy (obr. 26) ležící v polohách metalacních pásů 355, 421, 1341 a 1538 cm^{-1} . Po 4 týdnech je SERRS spektrum tohoto systému mnohem intenzivnější a pro interpretaci dat vhodnější; dominuje metalovaná forma TSPP.



Obr. 26: Spektrum interakce Agbh2 a TSPP v excitaci 532 nm.

AgCit

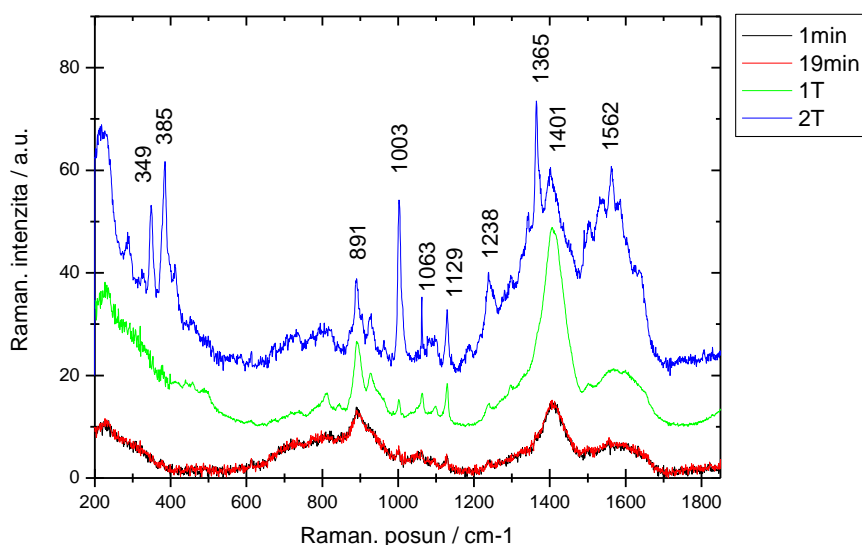
Podobně jako u předchozích porfyrinů poskytuje koloid AgCit s TSPP signál nemetalované formy porfyrinu, pásy 350, 412, 1364 a 1563 cm^{-1} (obr. 27).



Obr. 27: Spektrum interakce AgCit a TSPP v excitaci 532 nm.

AgG

Od přípravy systému TSPP s AgG se do 19. minuty objevuje pouze pár pásů příslušejících spíše organické vrstvě na povrchu AgG nanočástic (obr. 28). Po jednom týdnu je signál intenzivnější a objevují se již některé pásy porfyriu. K vývoji dalších SERRS spektrálních pásů nemetalovaného TSPP dochází teprve po dvou týdnech.



Obr. 28: Spektrum interakce AgG a TSPP v excitaci 532 nm.

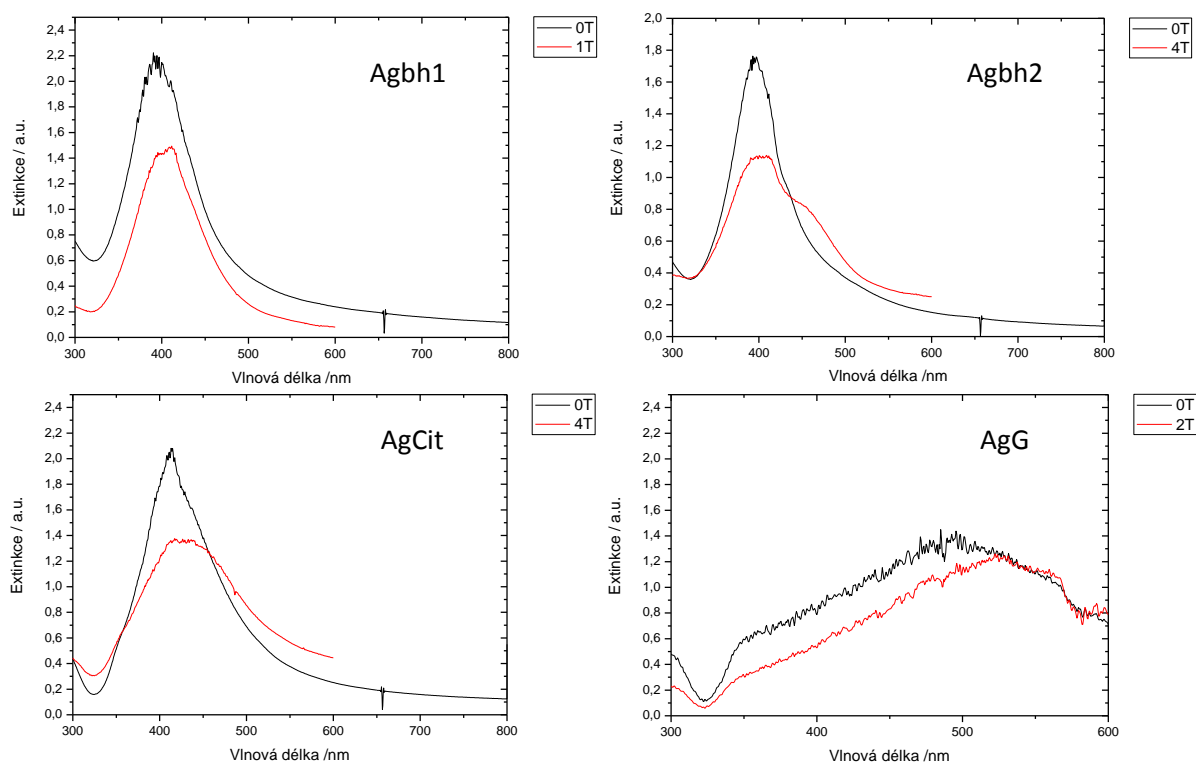
Shrneme-li pozorování týkající se SERRS spekter systémů čtyř různých koloidů s TSPP, tak v prvních minutách nejsou viditelná spektra v žádném systému. Již po jednom týdnu jsou zřetelná spektra u Agbh1. Pro systém s Agbh2 je potřeba až 4 týdnů

pro získání intenzivních pásů. Systémy s AgCit a AgG poskytují slabou spektrální odezvu po jednom týdnu, pro získání silnějšího signálu je potřeba rovněž až 4 týdnů.

Získaná data podporují teorii o vlivu charakteru povrchu nanočástic na SERRS signál porfyrinů. Tendence k metalaci TSPP stříbrem z jednotlivých koloidů je obdobná jako v případě TMPyP, tzn. metalovaná forma TSPP s Agbh1 a Agbh2, nemetalovaná forma s AgCit a AgG.

UV/Vis spektra

V UV/Vis spektrech TSPP s příslušnými koloidy (obr. 29) sledujeme podobné trendy jako v systémech s TCPP.



Obr. 29: UV/Vis spektra koloidů Agbh1, Agbh2, AgCit a AgG s porfyrinem TSPP.

Legenda označuje, v jakém týdnu byla spektra naměřena: v den přípravy systému (černá spektra) vs. vyznačený počet týdnů po přípravě (červená spektra).

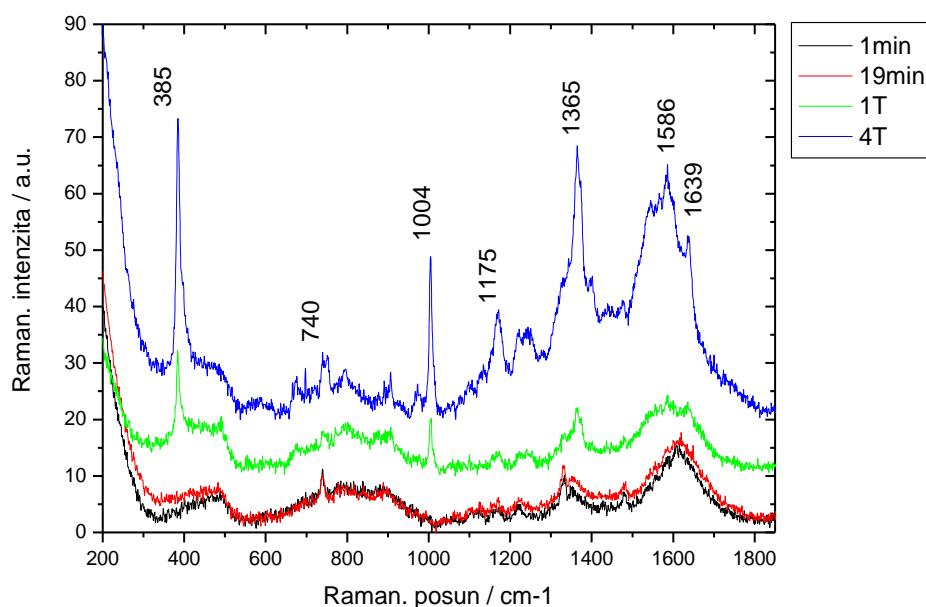
4.2.5 PPIX

Zástupce přirozeně se vyskytujících porfyrinů, PPIX, poskytuje SERRS spektrální odezvu prakticky ihned po přípravě systémů (obr. 30-33). Spektra porfyrinu PPIX jsou oproti ostatním zkoumaným porfyrinům specifická, neboť se PPIX od ostatních porfyrinů (které jsou strukturně velmi podobné) značně odlišuje svou strukturou, což se projevuje i v SERRS spektrech.

Z literatury²⁵ jsou u PPIX známy dvě spektrální formy, metalovaná a nemetalovaná (volná báze). Tyto formy poskytují velmi podobná spektra, které se odlišují pouze v několika pásech. Nejvíce patrné jsou pásy 1360 cm^{-1} pro metalovanou formu a pro nemetalovanou formu pásy 1353 a 1368 cm^{-1} .²⁵

Agbh1

V první a devatenácté minutě po přípravě systému PPIX s Agbh1 je pozorováno jen pár spektrálních pásů (obr. 30). Po jednom týdnu se situace příliš nezměnila. Větší změnu pozorujeme až po několika týdnech, kdy je spektrum intenzivnější.

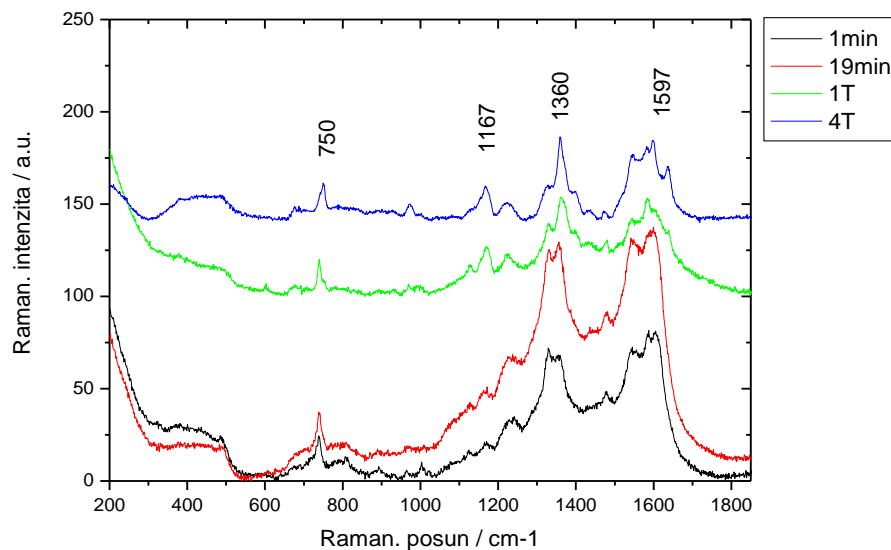


Obr. 30: Spektrum interakce Agbh1 a PPIX v excitaci 532 nm.

Agbh2

Rozdílem od Agbh1 je u systému PPIX s Agbh2 (obr. 31) intenzita signálu. Již v prvních minutách je signál lépe pozorovatelný. S postupem času, několika týdnů,

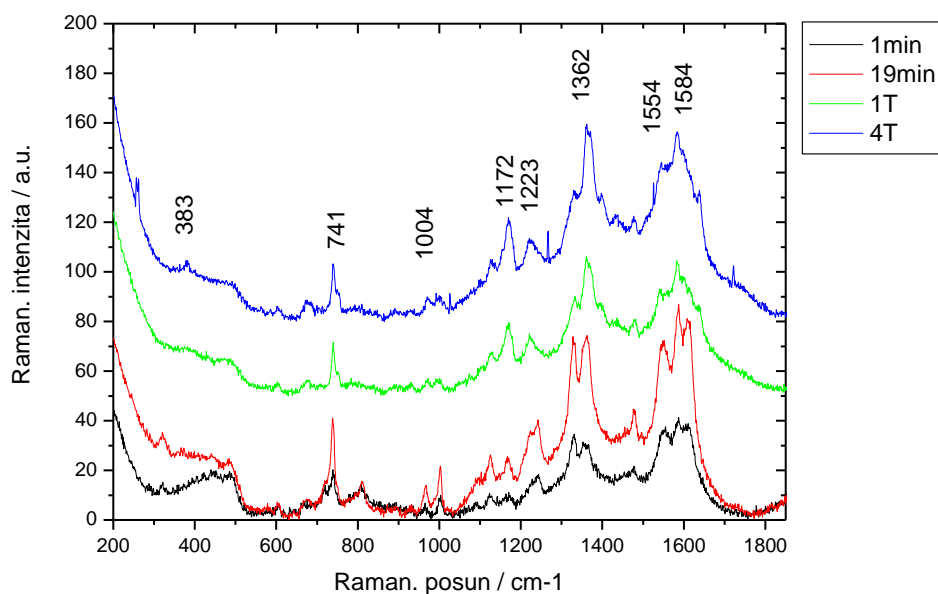
dochází ke změnám v relativních intenzitách v okolí pásů 1360 a 1597 cm^{-1} . U Agbh2 jsou pásy mírně posunuty do oblastí 750, 1167, 1360 a 1597 cm^{-1} .²⁵



Obr. 31: Spektrum interakce Agbh2 a PPIX v excitaci 532 nm.

AgCit

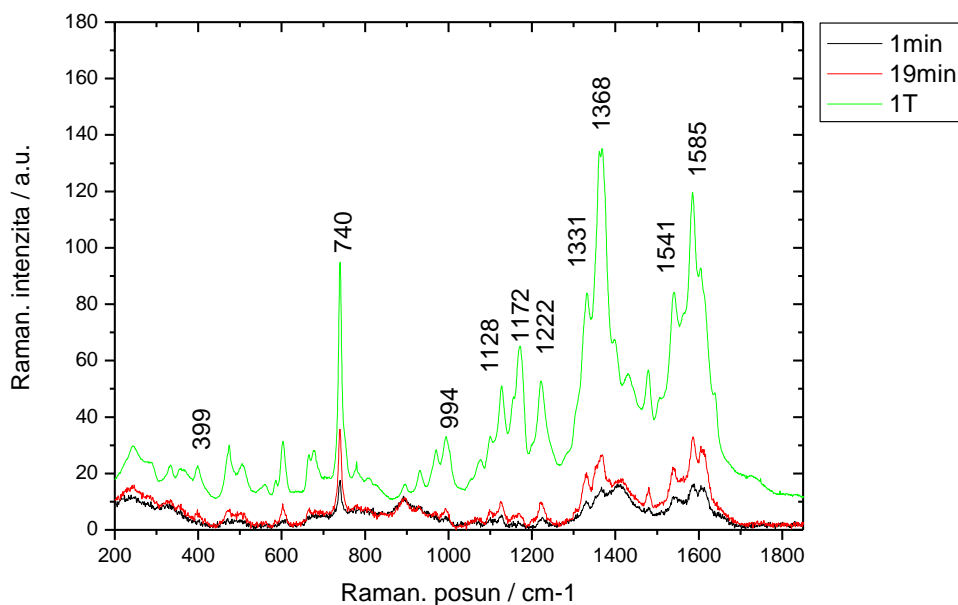
System AgCit – PPIX (obr. 32) poskytuje relativně největší odezvu v 19. minutě po jeho vzniku. Během několika týdnů se intenzita signálu příliš nemění, ale dochází ke změnám v relativních intenzitách pásů hlavně v oblastech kolem 1360 a 1560 cm^{-1} .



Obr. 32: Spektrum interakce AgCit a PPIX v excitaci 532 nm.

AgG

Relativně zřetelné spektrum naměřené v 19. minutě ze systému PPIX s AgG je celkově slabší oproti ještě intenzivnějšímu spektru z jednoho týdne (obr. 33).

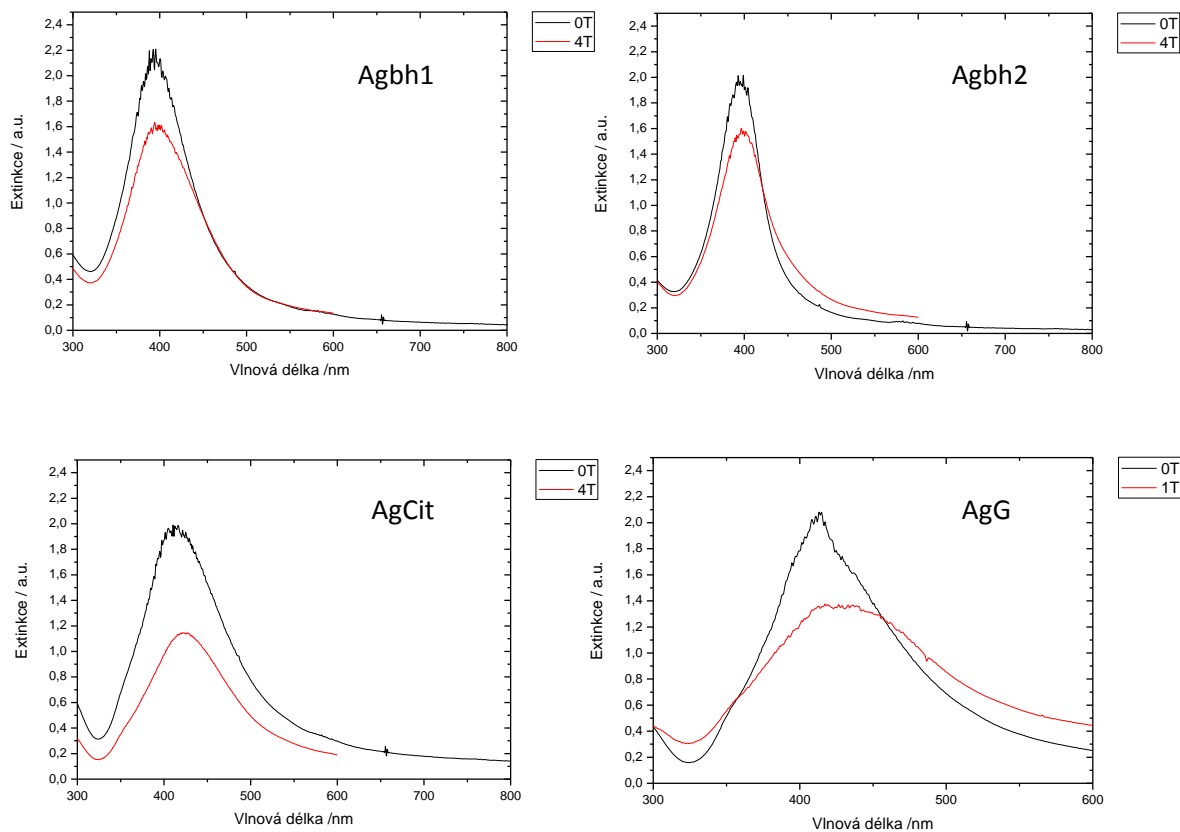


Obr. 33: Spektrum interakce AgG a PPIX v excitaci 532 nm.

Naše pozorování lze shrnout následovně: SERRS spektra změřená u systémů PPIX s Agbh2, AgCit a AgG se v průběhu času (od 1. minuty k 19 minutě) značně zintenzivní. V průběhu delšího časového období, jednoho až čtyřech týdnů, dochází ke změně intenzit pásů, což je s největší pravděpodobností způsobeno postupnou metalací porfyriu na povrchu nanočástic, popřípadě změnou orientace porfyriu na nanočásticích.

UV/Vis spektra

V UV/Vis spektrech systémů koloid – PPIX (obr. 34) nejsou pozorovatelné výrazné změny, převážně dochází pouze k poklesu intenzity signálu, který souvisí se sedimentací nanočástic. Tato je způsobena agregací nanočástic jednotlivých koloidů vlivem interakce PPIX s povrchem těchto nanočástic.



Obr. 34: UV/Vis spektra koloidů Agbh1, Agbh2, AgCit a AgG s porfyrinem PPIX. Legenda označuje, v jakém týdnu byla spektra naměřena: v den přípravy systému (černá spektra) vs. vyznačený počet týdnů po přípravě (červená spektra).

5. ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá detekcí a porovnáním SERRS spekter pěti různých porfyrinů (TMPyP, TTMAPP, TCPP, TSPP, PPIX) měřených v přítomnosti čtyřech různých druhů stříbrných nanočástic (Agbh1, Agbh2, AgCit, AgG). Připravené nanočástice byly charakterizovány a využity pro SERRS spektrální měření vybraných porfyrinů.

Teoretická část popisuje stručně podstatu, mechanismy zesílení a instrumentaci SERRS. K tomu neodmyslitelně patří příprava a metody charakterizace nanočástic. Základy obojího jsou v této práci rovněž zmíněny.

V experimentální části byly získána a diskutována SERRS a UV/Vis spektra všech vybraných porfyrinů s jednotlivými koloidy. Mezi jednotlivými porfyriny byly pozorovány podobnosti; konkrétně mezi TMPyP a TCPP, kdy u koloidů Agbh1, Agbh2 a AgG dochází k metalaci porfyrinu na povrchu nanočástic. V případě TTMAPP a TSPP dochází k metalaci pouze u Agbh1 a Agbh2. V případě AgCit nedochází k metalaci u žádného z měřených porfyrinů. Tyto podobné vlastnosti systémů jsou z velké míry pravděpodobně způsobeny přítomností iontů na povrchu příslušných nanočástic. Na povrchu Agbh1 a Agbh2 se ustaluje elektrostatická dvojvrstva tvořená anorganickými ionty (boráty a polyboráty), zatímco nanočástice dalších dvou koloidy (AgCit a AgG) jsou obklopeny organickými molekulami (karboxylové a polykarboxylové anionty). Co se týče strukturální podobnosti mezi jednotlivými porfyriny, tak kationtové porfyriny TMPyP a TTMAPP poskytují spektrální odezvu již v prvních minutách po vzniku systému, zatímco aniontové porfyriny TCPP a TSPP potřebují pro detekci SERRS signálu až několik týdnů. Z uvedeného lze usoudit, že náboje porfyrinů a elektrostatické síly působící mezi nanočásticemi a porfyriny tak hrají významnou roli při SERRS detekci těchto látek.

6. SUMMARY

This Diploma Thesis deals with the detection and comparison of SERRS spectra of five different porphyrins (TMPyP, TTMAPP, TCPP, TSPP, PPIX) which were measured in the presence of four different types of silver nanoparticles (Agbh1, Agbh2, AgCit, AgG). The as-prepared nanoparticles were characterized and exploited for SERRS spectral measurements of the selected porphyrins.

Theoretical part briefly describes basic principles, mechanisms of enhancement and instrumentation of SERRS. Preparation and characterization of nanoparticles is closely related and thus mentioned as well.

In experimental part, SERRS and UV/Vis spectra of all selected porphyrins with particular colloids were acquired and discussed. Similarities were observed among the selected porphyrins; namely between TMPyP and TCPP interacting with Agbh1, Agbh2 and AgG colloids where the metalation of porphyrins on nanoparticle surface proceeds. When TTMAPP and TSPP used, the metalation is observed only in the cases of Agbh1 and Agbh2. In the case of AgCit, metalation does not proceed in any of the porphyrins. The similarities in systems behavior are most probably induced by the presence of ions on the surface of particular nanoparticles. On the surface of Agbh1 and Agbh2 electrostatic bilayer is formed by inorganic ions (borates and polyborates); while nanoparticles of the other two colloids (AgCit and AgG) are surrounded by organic molecules (carboxylic and polycarboxylic anions). Concerning the structural similarities among selected porphyrins, cationic porphyrins TMPyP and TTMAPP provide spectral response from the very beginning of the particular system formation; while anionic porphyrins TCPP and TSPP need several weeks in order to detect any SERRS signal from their systems with nanoparticles. From the above mentioned, it can be concluded that porphyrins charges and electrostatic forces enabling the interaction among nanoparticles and porphyrins play a key role in SERRS detection of these species.

7. POUŽITÉ ZKRATKY

RS	Ramanova spektroskopie
SERS	povrchem zesílená Ramanova spektroskopie
SERRS	povrchem zesílená rezonanční Ramanova spektroskopie
DLS	dynamický rozptyl světla
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TMPyP	5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-porfin, tetratosylátová sůl
TTMAPP	5,10,15,20-tetrakis(4-trimethyl-ammoniophenyl)porfyrin, tetra(p- toluenesulfonát)
TCPP	4,4',4'',4'''-(21H,23H-porfin-5,10,15,20-tetrayl)tetrakis (benzoová kyselina)
TSPP	4,4',4'',4'''-(21H,23H-porfin-5,10,15,20-tetrayl)tetrakis (benzensulfonová kyselina)
PPIX	Protoporfyrin IX
Agbh1	stříbrné nanočástice připravené redukcí borohydridem sodným
Agbh2	stříbrné nanočástice připravené redukcí borohydridem sodným
AgCit	stříbrné nanočástice připravené redukcí citrátem sodným
AgG	stříbrné nanočástice připravené redukcí glukózou

8. LITERATURA

1. Kneipp K., Wang Y., Kneipp H., Perelman L. T., Itzkan I., Dasari R. R., Feld M. S., Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), The American Physical Society, vol. 78, p. 1667-1670, 1997
2. Ferraro J. R., Nakamoto K., Brown C. W., Introductory Raman Spectroscopy, Elsevier (book), 2003
3. Nie S., Emory S. R., Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering, Science, vol. 275, p. 1002-1106, 1997
4. Vlčková B., Moskovits M., Pavel I., Šišková K., Sládková M., Šlouf M., Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy from a molecularly-bridged silver nanoparticle dimer, Chemical Physics Letters, vol. 455, p. 131-134, 2008
5. Campion A., Kambhampati P., Surface-enhanced Raman scattering, Chemical Society Reviews, vol. 27, p. 241-250, 1998
6. Le Ru E. C., Etchegoin P. G., Principles of surface-enhanced Raman spectroscopy and related plasmonic effects, Elsevier (book), 2009
7. McNay G., Eustace D., Smith W. E., Faulds K., Graham D., Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications, Applied Spectroscopy, vol. 65, p. 825-837, 2011
8. Vlčková B., Pavel I., Sládková M., Šišková K., Šlouf M., Single molecule SERS: Perspectives of analytical applications, Journal of Molecular Structure, 834-836, p. 42-47, 2007
9. Johansson P., Xu H., Käll M., Surface-enhanced Raman Scattering and fluorescence near metal nanoparticles, Physical review B, vol. 72, p. 1-18, 2005
10. Srnová-Šloufová I., Vlčková B., Snoeck T. L., Stufkens D. J., Matějka P., Surface-Enhanced Raman Scattering and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering Excitation Profiles of Ag-2,2'-Bipyridine Surface Complexes and of $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ on Ag Colloidal Surfaces: Manifestations of the Charge-Transfer Resonance Contributions to the Overall Surface Enhancement of Raman Scattering, American Chemical Society, vol. 39, p. 3551-3559, 2000
11. Kvítek L., Panáček A., Základy koloidní chemie, skriptum Olomouc, 2007
12. Kvítek L., Metody studia koloidních soustav, prozatímní učební text Olomouc, 2006

13. <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html>, dne 23.2.2014
14. <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/pojmy.htm>, dne 20.1.2014
15. Kubínek R., Elektronová mikroskopie, přednáška Olomouc
16. Cotton T. M., Schultz S. G., Van Duyne R. P., Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering from Water-Soluble Porphyrins Adsorbed on a Silver Electrode, *Journal of American Chemical Society*, vol. 104, p. 6528-6532, 1982
17. Šišková K., Vlčková B., Turpin P.-Y., Thorel A., Grosjean A., Porphyrins as SERRS spectral probes of chemically functionalized Ag nanoparticles, *Vibrational Spectroscopy*, vol. 48, p. 44-52, 2008
18. Dror I., Schlautman M. A., Metalloporphyrin solubility: A trigger for catalyzing reductive dechlorination of tetrachloroethylene, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 23, p. 252-257, 2004
19. Ye S., Kathiravan A., Hayashi H., Tong Y., Infahsaeng Y., Chabera P., Pascher T., Yartsev A. P., Isoda S., Imahori H., Sundstrom V., Role of Adsorption Structures of Zn-Porphyrin on TiO₂ in Dye-Sensitized Solar Cells Studied by Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy and Ultrafast Spectroscopy, *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 117, p. 6066-6080, 2013
20. Frasco M. F., Vamvakaki V., Chaniotakis N., Porphyrin decorated CdSe quantum dots for direct fluorescent sensing of metal ions, *J Nanopart Res*, vol. 12, p. 1449-1458, 2010
21. Vlčková B., Šmejkal P., Michl M., Procházka M., Mojzeš P., Lednický F., Pflieger J., Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy of porphyrin and metalloporphyrin species in system with Ag nanoparticles and their assemblies, *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 79, p. 295-300, 2000
22. Vlčková B., Matějka P., Šimonová J., Čermáková K., Pančoška P., Baumruk V., Surface-enhanced resonance Raman spectra of free base 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin and Its silver complex in systems with silver colloid: Direct adsorption in comparison to adsorption via molecular spacer, *Journal of Physical Chemistry*, vol. 97, p. 9719-9729, 1993
23. Munro C. H., Smith W.E., Garner M., Clarkson J., White P. C., Characterization of the surface of a citrate-reduced colloid optimized for use as a substrate for surface enhanced resonance Raman scattering, *Langmuir*, vol. 11, p. 3712-3720, 1995

24. Kvítek L., Pucek R., Panáček A., Novotný R., Hrbáč J., Zbořil R., The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis, *Journal of Materials Chemistry*, vol. 15, p. 1099-1105, 2005
25. Sládková M., Vlčková B., Mojzeš P., Šlouf M., Naudin C., Le Bourdon G., Probing strong optical fields in compact aggregates of silver nanoparticles by SERRS of protoporphyrin IX, *Faraday Discussions*, vol. 132, p. 121-134, 2006
26. <http://www.semrock.com/high-performance-raman-spectroscopy.aspx>, dne 20.4.2014
27. Šišková K., Bečička O., Mašek V., Šafařova K., Zbořil R., Spacer-free SERRS spektr of unperturbed porphyrin detect at 100fM concentration in Ag hydrosols gepard by modiifed Tollens method, *Journal of Raman Spectroscopy* vol. 43, p. 689-691, 2012
28. Shamim N., Sharma V. K., Sustainable nanotechnology and the environment: advances and achievements (Book), vol. 1124, p. 151-163, 2013

9. PŘÍLOHA 1 - poster z konference Nanocon 2013



ANIONIC ORGANIC SPECIES DETECTION USING SILVER NANOPARTICLES?

Pavlna CIESLÁROVÁ, Karolína Machalová ŠÍŠKOVÁ, Ariana FARGAŠOVÁ, Radek ZBOŘIL

RCPTM, Dept. of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Štechtitelů 11, 78371 Olomouc, Czech Republic, pavlna.cieslarova@upol.cz

Abstract

Silver nanoparticles for spectroscopic applications, namely for surface-enhanced (resonance) Raman scattering (SER(R)S), are usually prepared by a chemical reduction in aqueous solutions. The as-prepared nanoparticles mostly reveal negative Zeta potential values among other important characteristic features. Therefore, it is really questionable if anionic organic species and/or pollutants dissolved in aqueous solutions can be directly and immediately detected by SER(R)S using the as-prepared silver nanoparticles. In this contribution, we are going to show our results concerning SERRS detection of two anionic TCPP, TSPP and, for a direct comparison, of cationic TTMAPP porphyrins serving as model compounds. Several different types of silver nanoparticles prepared by diverse chemical reduction processes are tested in this study.

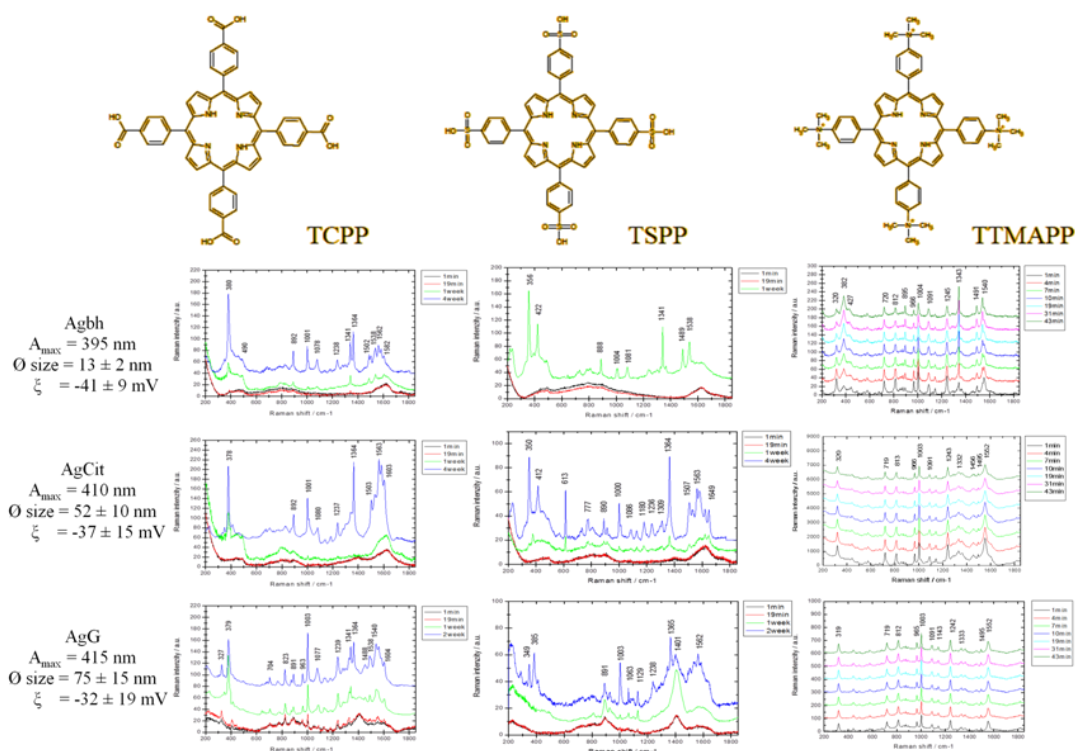


Fig. SERRS spectra of porphyrins (532 nm excitation) in silver colloids.

Conclusion

Two anionic and one cationic porphyrins were tested on silver nanoparticles prepared by chemical reduction driven by sodium borohydride, sodium citrate and glucose (in alkaline medium). Based on our data, SERRS spectral detection of the selected water-soluble porphyrins strongly depends on their charge in aqueous solutions and on the type of silver nanoparticles being exploited for SERRS measurement. While the SERRS signal of the cationic porphyrin can be immediately observed at low concentrations, the two anionic porphyrins in our study need an additional time in order to be detected. Moreover, their SERRS spectral forms differ on silver nanoparticles prepared by the three employed procedures due to the presence of significantly different ions which stabilize these silver nanoparticles in aqueous solutions.

ACKNOWLEDGEMENT

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) and the project of the Ministry of Industry and Business of the Czech Republic (project ID: FR-TI3/196). K.M.S. thanks for financial support to the Grant Agency of the Czech Republic (project no. P108-11-P657).

10. PŘÍLOHA 2 – článek ve sborníku z konference nanocon 2013

ANIONIC ORGANIC SPECIES DETECTION USING SILVER NANOPARTICLES?

Pavlna CIESLÁROVÁ, Karolína Machalová ŠIŠKOVÁ, Ariana FARGAŠOVÁ, Radek ZBOŘIL

Palacky University in Olomouc, Olomouc, Czech Republic, EU, pavlna.cieslarova@upol.cz

Abstract

Silver nanoparticles for spectroscopic applications, namely for surface-enhanced (resonance) Raman scattering (SE(R)RS), are usually prepared by a chemical reduction in aqueous solutions. The as-prepared nanoparticles mostly reveal negative zeta potential values among other important characteristic features. Therefore, it is really questionable if anionic organic species and/or pollutants dissolved in aqueous solutions can be directly and immediately detected by SE(R)RS using the as-prepared silver nanoparticles. In this contribution, we are going to show our results concerning SERRS detection of two anionic (4,4',4'',4'''-(21H,23H-porphine-5,10,15,20-tetrayl)tetrakis(benzenesulfonic acid, TSPP), 4,4',4'',4'''-(21H,23H-porphine-5,10,15,20-tetrayl)tetrakis(benzoic acid), TCPP) and, for a direct comparison, of cationic (5,10,15,20-tetrakis(4-trimethyl-ammoniophenyl)porphyrin tetra(p-toluenesulfonate), TTMAPP) porphyrins serving as model compounds. Several different types of silver nanoparticles prepared by diverse chemical reduction processes are tested in this study. Based on our data, SERRS spectral detection of selected water-soluble porphyrins strongly depends on their charge in aqueous solutions and on the type of silver nanoparticles being exploited for SERRS measurements. Furthermore, it can be claimed that the cationic porphyrin enables its immediate detection at low concentrations, while the anionic ones need an additional time in order to be detected.

Keywords: Ag nanoparticles, Ag colloid, porphyrins, surface-enhanced resonance Raman spectroscopy

1. INTRODUCTION

Exploitation of silver nanoparticles and/or electrodes for enhancement of Raman scattering of molecules being in a close vicinity of silver surface is known for many decades [1–3]. Silver nanoparticles can be prepared by several different ways: two most extensively used procedures include chemical reduction and/or laser ablation. Chemical reduction in aqueous solution of silver salt can be driven by e.g. sodium borohydride, sodium citrate, glucose (in alkaline pH values) etc. [2, 4, 5, 6]. The as-prepared nanoparticles differ in surface chemistry as it has been demonstrated in [7, 8] already. Generally, the as-prepared nanoparticles possess negative zeta potential values [7]. It can be thus presumed that the detection of anionic and cationic compounds will significantly differ.

Porphyrins serving in our study as model adsorbates are widely used in several different areas of research: for instance, in dye sensitized solar cells [9–11], for the detection of singlet oxygen [12], in conjunction with quantum dots as sensors of metal ions [13], as stabilizers of generated noble metal nanoparticles [14], for clinical diagnostics of early stages of cancer [15] etc.

Here, we focus our attention on the detection of two anionic (4,4',4'',4'''-(21H,23H-porphine-5,10,15,20-tetrayl)tetrakis(benzenesulfonic acid, TSPP), 4,4',4'',4'''-(21H,23H-porphine-5,10,15,20-tetrayl)tetrakis(benzoic acid), TCPP) and one cationic (5,10,15,20-tetrakis(4-trimethyl-ammoniophenyl)porphyrin tetra(p-toluenesulfonate), TTMAPP) porphyrins at the final concentrations of 1×10^{-6} M by means of SERRS (surface-enhanced resonance Raman scattering) spectroscopy. The final concentration has been chosen on the basis of previous studies made by us as well as by other research groups [2, 16].

2. EXPERIMENTAL

2.1 Materials

Analytical grade chemicals and distilled deionized water were used for all samples preparations. AgNO₃, NaBH₄, sodium citrate, aqueous solution of NH₃, NaOH, D-glucose, 4,4',4'',4'''-(21H,23H-porphine-5,10,15,20-tetrayl)tetrakis(benzenesulfonic acid, TSPP), 4,4',4'',4'''-(21H,23H-porphine-5,10,15,20-tetrayl)tetrakis(benzoic acid), TCPP, and (5,10,15,20-tetrakis(4-trimethyl-ammoniophenyl)porphyrin tetra(p-toluenesulfonate), TTMAPP) were used as received without any further purification. The glassware was cleaned by diluted nitric acid (1:1), extensively rinsed with distilled water and subsequently with deionized water. Alternatively, the mixture of sulphuric acid and hydrogen peroxide (1:1) was used, particularly when the glassware was polluted with porphyrin molecules.

2.2 Preparation of colloids

Ag colloids were prepared by different methods. Agbh were prepared by reduction of AgNO₃ by NaBH₄ [2]: 3.5 mg of NaBH₄ in 75 mL of distilled deionized water was cooled to 4 °C. To this solution, 7.5 mL of 2.2 x 10⁻³ M aqueous solution of AgNO₃ (precooled) was added dropwise with constant stirring (100 rpm). Stirring was continued without interruption for 45 min. The resulting silver colloid was bright yellow with maximum wavelength of surface plasmon absorption at 395 nm. This colloid has average zeta potential -41 ± 9 mV and size of nanoparticles by DLS was 13 ± 2 nm.

Second colloid (AgCit) was prepared by dissolving 45 mg AgNO₃ in 250 mL distilled deionized water and brought to boiling. A solution of 1 % sodium citrate (10 mL) was added. The solution was kept on boiling for ca. 1 h [4]. The resulting colloid was still centrifuged at 4000 rpm. AgCit has maximum wavelength of surface plasmon absorption at 410 nm. This average zeta potential was -37 ± 15 mV and size of nanoparticles by DLS was 52 ± 10 nm.

Next silver colloid AgG was prepared by the modified Tollens method [5]: 20 mL of 5 x 10⁻³ M aqueous solution of AgNO₃, 20 mL of 0.025 M aqueous solution of NH₃, 4 mL of 0.24 M aqueous solution of NaOH and 36 mL water was mixed. Under stirring was added 20 mL of 0.05 M aqueous solution of glucose. After 10 minutes stirring the gray colloid done. AgG has maximum wavelength of surface plasmon absorption at 415 nm. This average zeta potential was -32 ± 19 mV and size of nanoparticles by DLS was 75 ± 15 nm.

2.3 Preparation of SERRS-active systems

Were prepared stock solutions of the porphyrin concentration of 10⁻⁴ M that were used to prepare the SERRS active systems. To 1.5 mL Ag colloid was added 15 µL porphyrin. For TCPP were prepared systems with Agbh, AgCit and AgG. The same systems were prepared for TSPP and TTMAPP.

2.4 Instrumentation

DXR Raman microscope (Thermo Scientific, Nicolet CZ) equipped with a macro-sampling holder and thermoelectrically cooled CCD detector (-50 °C) was used for all SERRS spectra acquisition. The excitation wavelength of 532 nm of a diode-pumped solid state laser was used and set to the power of 10 mW at the sample. The samples were placed in a 1 cm quartz cuvette. Raman scattered light was collected in a 180° geometry, with the exposition time of 5 s, repeated 16 times.

UV-visible spectra were measured using Specord S600 (Analytic Jena). DLS and zeta potential were recorded on Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments).

3. RESULTS AND DISCUSSION

According to the literature [1, 2], two SERRS spectral forms of TCPP can be detected on silver surfaces: metallated (i.e. Ag atom incorporated in the center of porphine macrocycle) and/or non-metallated (free

base). The former can be clearly distinguished in SERRS spectrum by the appearance of characteristic bands (so called metallation markers) located at ~ 380 (390), 1340, and 1540 cm^{-1} . Our SERRS spectra of TCPP introduced into the Ag colloids, prepared by three different procedures, and recorded in given time intervals are shown in **Figs 1A–C**. While in the case of borohydride-reduced (Agbh) colloid (**Fig. 1A**), the metallation markers tend to appear in the 19th minute; there are no such bands detected in the cases of citrate-reduced (AgCit) and glucose-reduced (AgG) colloids in the same time interval elapsed from the SERRS-active systems preparation, **Figs 1B and 1C**, respectively. Moreover, no SERRS signal is seen on AgCit colloid in the 19th minute (**Fig. 1B**) and only Raman signal of free base TCPP is distinguished on AgG colloid in the 19th minute (**Fig. 1C**). It can be thus concluded that surfaces of Ag nanoparticles differ in their abilities to detect TCPP in one of its SERRS spectral forms. This behavior can stem from the fact that Agbh is stabilized by an electrostatic bilayer created by inorganic ions (borates), whereas the two others are surrounded by organic molecules (carboxylic and polycarboxylic anions).

Furthermore, the SERRS-active systems containing TCPP were measured in one week elapsed from their preparation and revealed all three metallation markers in Agbh (**Fig. 1A**) and AgG (**Fig. 1C**) colloids. On the contrary, only the 378 cm^{-1} band was detected in AgCit (**Fig. 1B**). This trend is maintained even after several weeks (**Figs. 1A–C**). It could be explained by a slightly different orientation of TCPP on AgCit which is most probably induced by the organic anions (citrates) being present on AgCit nanoparticles. Citrates can serve as an orientation matrix for TCPP molecules similarly as it has been observed for porphyrins tested on nanoparticles prepared by laser ablation in the presence of citrate and citric acid in ref. [17].

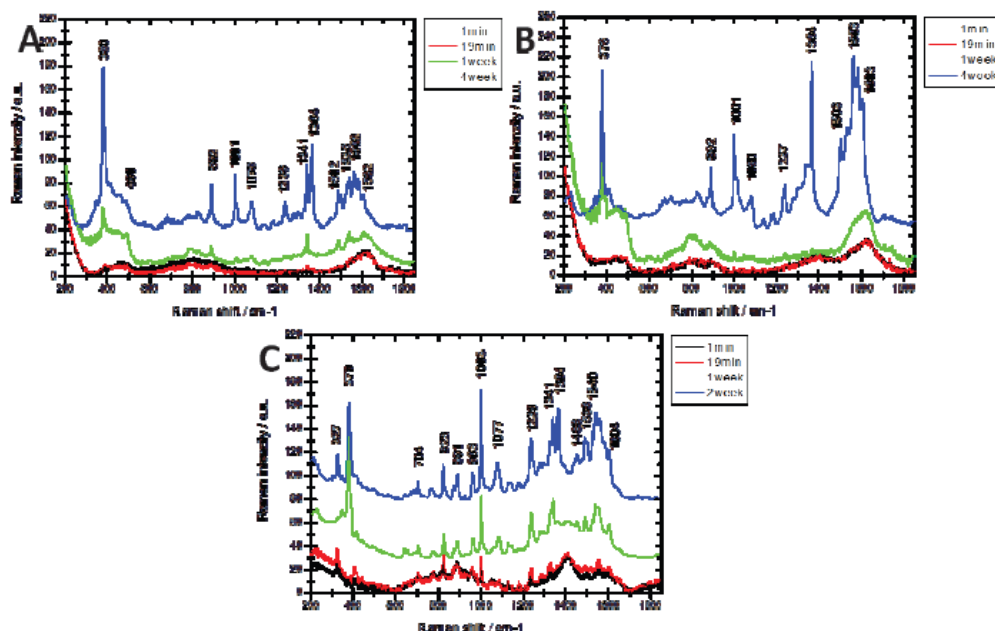


Fig. 1 SERRS spectra of TCPP (532 nm excitation) in (A) Agbh, (B) AgCit, (C) AgG colloids. Spectra of AgG and AgCit after 1 and 2 weeks were divided by 5 for the sake of clarity

In a very similar way, we investigated the possibilities of TSPP detection on the three types of Ag nanoparticles used in our study. This porphyrin can be again detected in two SERRS spectral forms as known from the literature [1]: metallated (manifesting itself by 355, 422, 1341 and 1541 cm^{-1}) and free base. Agbh (**Fig. 2A**) and AgCit (**Fig. 2B**) colloids revealed no signal of TSPP in the spectra recorded 19 minutes from the systems preparation. Just a few SERRS spectral peaks of TSPP were observed due to

nanoparticles of AgG colloid (**Fig. 2C**). The situation dramatically changed after one week: TSPP on Agbh nanoparticles was fully metallated and several bands of free base TSPP form appeared on AgCit and AgG nanoparticles. However, the observation of all metallation markers of TSPP was never achieved in AgCit and/or AgG colloids measured during several weeks (**Figs. 2B, C**). This is most probably caused by the presence of organic anions serving as an orientation matrix as it has been mentioned above already.

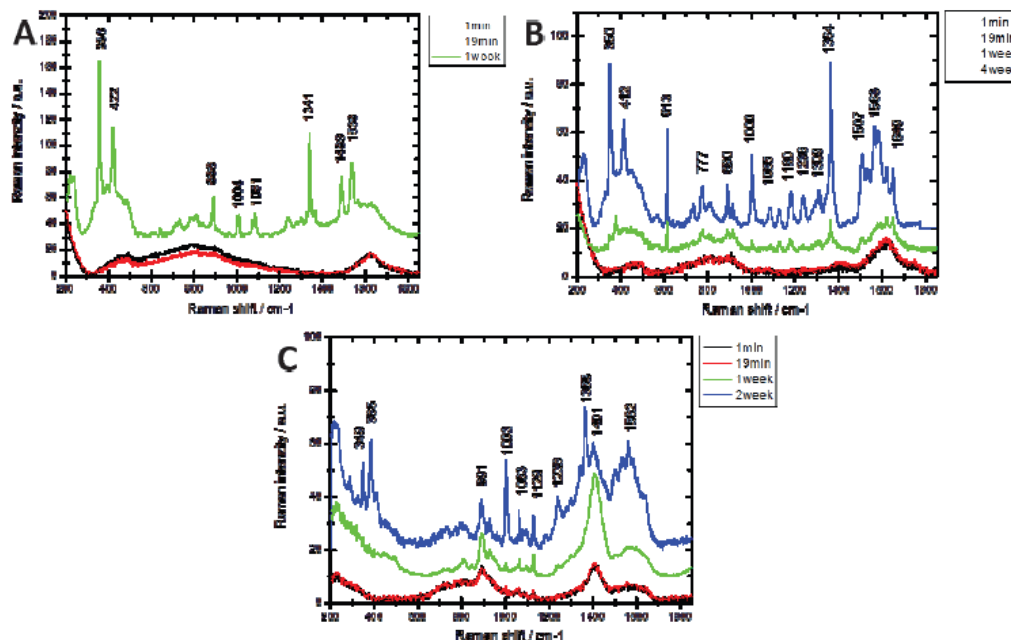


Fig. 2 SERRS spectra of TSPP (532 nm excitation) in (A) Agbh, (B) AgCit, (C) AgG colloids. Spectra of AgG and AgCit after 1 and 2 weeks were divided by 5 for the sake of clarity

Last, but not least, SERRS spectra of TTMAPP on nanoparticles of Agbh, AgCit and AgG colloids were recorded (**Figs. 3A–C**). Since in this case a cationic porphyrin is measured, it is not surprising that SERRS spectra are observed from the first minute after the systems preparation. Indeed, metallation markers of TTMAPP (382, 1343, 1540 cm^{-1}) were obvious in the SERRS spectrum of Agbh–TTMAPP system from the very beginning (**Fig. 3A**). The ratio of metallation vs. free base form in Agbh–TTMAPP increased during the time as it can be seen from the relative intensities of the bands located for instance at ~ 380 and 320 cm^{-1} , respectively (**Fig. 3A**). In the two other colloids (AgCit and AgG), no metallation markers appeared during the whole 43 min period elapsed from the SERRS–active systems preparation (**Figs. 3B, C**). It should be noted that due to a rather fast aggregation of the systems containing TTMAPP, they could not be measured after one and/or several weeks.

Taking into account the data from the literature [8, 16] concerning the extent and kinetics of metallation of another cationic porphyrin, TMPyP (5,10,15,20–tetrakis(1–methyl–4–pyridyl)21H,23H–porphine), it can be generalized that Ag nanoparticles being surrounded by a shell of loosely bounded anions (e.g. borates) are easily accessible to cationic porphyrins which are immediately metallated. On the other hand, Ag nanoparticles with organic molecules on their surfaces hinder the immediate metallation of cationic porphyrins and thus only free base forms are detected in short times after the SERRS–active systems preparation. The metallation can be enabled in longer times elapsed from the systems preparation [8] if lower concentrations of porphyrins used (otherwise the system collapses).

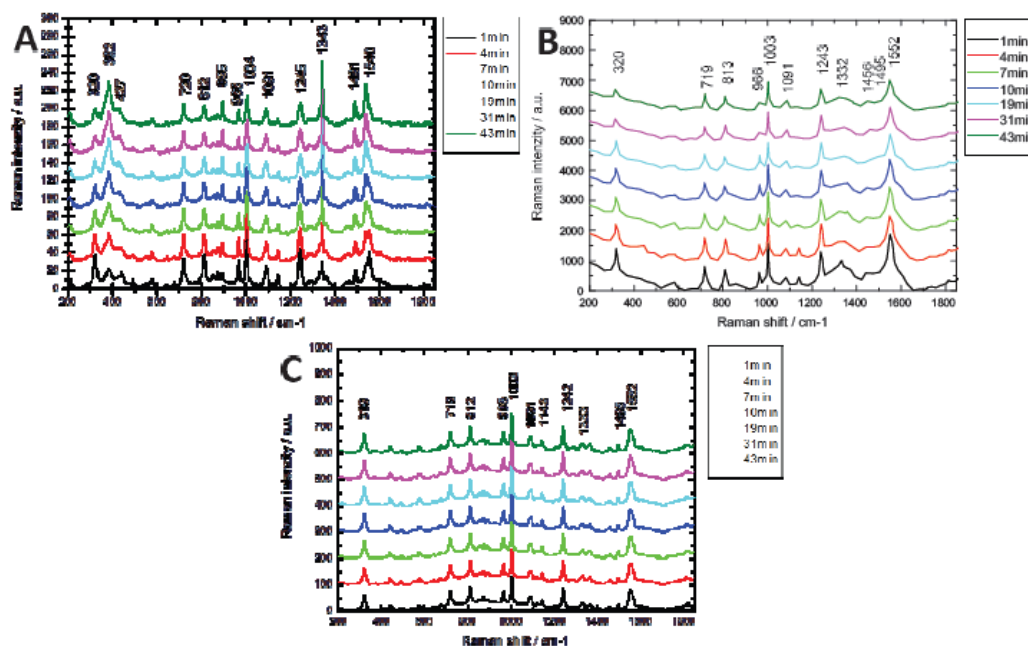


Fig. 3 SERRS spectra of TTMAPP (532 nm excitation) in (A) Agbh, (B) AgCit, (C) AgG colloids

4. CONCLUSIONS

Two anionic and one cationic porphyrins were tested on silver nanoparticles prepared by chemical reduction driven by sodium borohydride, sodium citrate and glucose (in alkaline medium). Based on our data, SERRS spectral detection of the selected water-soluble porphyrins strongly depends on their charge in aqueous solutions and on the type of silver nanoparticles being exploited for SERRS measurements. While the SERRS signal of the cationic porphyrin can be immediately observed at low concentrations, the two anionic porphyrins in our study need an additional time in order to be detected. Moreover, their SERRS spectral forms differ on Ag nanoparticles prepared by the three employed procedures due to the presence of significantly different ions which stabilize these Ag nanoparticles in aqueous solutions.

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) and the project of the Ministry of Industry and Business of the Czech Republic (project ID: FR-T13/196. K.M.S. thanks for financial support to GACR, project no. P108-11-P657.

LITERATURE

- [1] COTTON, T. M., SCHULTZ, S. G., VAN DUYN, R. P. Surface-enhanced resonance Raman scattering from water-soluble porphyrins adsorbed on a silver electrode. *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, vol. 104, p. 6528–6532.
- [2] VLCKOVA, B., MATEJKA, P., SIMONOVA, J., CERMAKOVA, K., PANCOSKA, P., BAUMRUK, V. Surface-enhanced resonance Raman spectra of free base 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin and its silver

- complex in systems with silver colloid: direct adsorption in comparison to adsorption via molecular spacer. *J Phys. Chem.*, 1993, vol. 97, p. 9719–9729.
- [3] SISKOVA, K., VLCKOVA, B., TURPIN, P.-Y., THOREL, A., PROCHAZKA, M. Laser ablation of silver in aqueous solutions of organic species: probing Ag nanoparticle –adsorbate systems evolution by surface-enhanced Raman and surface plasmon extinction spectra. *J.Phys. Chem. C*, 2011, vol. 115, p. 5404–5412.
- [4] LEE, P. C.; MEISEL, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *J. Phys. Chem.* 1982, vol. 86, p. 3391–3395
- [5] KVÍTEK, L., PRUCEK, R., PANÁČEK, A., NOVOTNY, R., HRBAC, J., ZBORIL, R. The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis. *J.Mater. Chem.*, 2005, vol. 15, p. 1099–1105
- [6] SISKOVA, K., VLČKOVÁ, B., TURPIN, P.-Y., FAYET, C. Ion-specific effects on laser ablation of silver in electrolyte aqueous solutions. *J.Phys.Chem. C*, 2008, vol. 112, p. 4435–4443.
- [7] SISKOVA, K., BECICKA, O., SAFAROVA, K., ZBORIL, R. HCl effect on two types of Ag nanoparticles utilizable in detection of low concentrations of organic species – chapter in the book: SUSTAINABLE NANOTECHNOLOGY AND THE ENVIRONMENT: ADVANCES AND ACHIEVEMENTS Book Series: ACS Symposium Series Editor(s): Shamim, N; Sharma, V. K., 2013, vol. 1124, p. 151–163
- [8] PROCHAZKA, M., STEPANEK, J., TURPIN, P.-Y., BOK, J. Drastically Different Porphyrin Adsorption and Metalation Processes in Chemically Prepared and Laser-Ablated SERS-Active Silver Colloidal Substrates. *J. Phys. Chem. B*, 2002, vol. 106, p. 1543–1549
- [9] LEE, C. Y., HUPP, J. T. Dye Sensitized Solar Cells: TiO₂ Sensitization with a Bodipy-Porphyrin Antenna System. *Langmuir*, 2009, vol. 26 (5), p. 3760–3765
- [10] WANG, Q., CAMPBELL, W. M., BONFANTANI, E. E., JOLLEY, K. W., OFFICER, D. L., WALSH, P. J., GORDON, K., HUMPHRY-BAKER, R., NAZEERUDDIN, M. K., GRATZEL, M. Efficient Light Harvesting by Using Green Zn-Porphyrin-Sensitized Nanocrystalline TiO₂ Films. *J. Phys. Chem. B*, 2005, vol. 109, p. 15397–153409
- [11] YE, S., KATHIRAVAN, A., HAYASHI, H., TONG, Y., INFANSAENG, Y., CHABERA, P., PASCHER, T., YARTSEV, A. P., ISODA, S., IMAHORI, H., SUNDSTROM, V. Role of Absorption Structures of Zn-Porphyrin on TiO₂ in Dye-Sensitized Solar Cells Studied by Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy and Ultrafast Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C*, 2013, vol. 117, p. 6066–6080
- [12] SNYDER, J. W., LAMBERT, J. D. C., OGILBY, P. R. 5, 10, 15, 20-Tetrakis(N-Methyl-4-Pyridyl)-21H,23H-Porphine (TMPyP) as a Sensitizer for Singlet Oxygen Imaging in Cells: Characterizing the Irradiation-dependent Behavior of TMPyP in a Single Cell. *Photochem.Photobio.*, 2006, vol. 82, p. 177–184
- [13] FRASCO, M. F., VAMVAKAKI, V., CHANIOTAKIS, N. Porphyrin decorated DcSe quantum dots for direct fluorescent sensing of metal ions. *J. Nanopart. Res.*, 2010, vol. 12, p. 1449–1458
- [14] SISKOVA, K., PFLEGER, J., PROCHÁZKA, M. Stabilization of Au nanoparticles prepared by laser ablation in chloroform with porphyrin molecules. *Applied Surface Science*, 2010, vol. 256, p. 2979–2987.
- [15] KREIG, R. C., FICKWEILER, S., WOLFBEIS, O. S., KNUECHEL, R. Cell-type Specific Protoporphyrin IX Metabolism in Human Bladder Cancer in vitro. *Photochem. Photobiol.*, 2000, vol. 72, p. 226–233
- [16] SISKOVA, K., BECICKA, O., MASEK, V., SAFAROVA, K., ZBORIL, R. Spacer-free SERRS spectra of unperturbed porphyrin detected at 100 fM concentration in Ag hydrosol prepared by modified Tollens method. *J. Raman Spectrosc.*, 2012, vol. 43, p. 689–961.
- [17] SISKOVA, K., VLČKOVÁ, B., TURPIN, P.-Y., THOREL, A., GROSJEAN, A. Porphyrins as SERRS spectral probes of chemically functionalized Ag nanoparticles. *Vibrat. Spectrosc.*, 2008, vol. 48, p. 44–52