

UNIVERZITA KARLOVA V PRAHE

Matematicko-fyzikálna fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCA

2006

Peter Molnár

UNIVERZITA KARLOVA V PRAHE

Matematicko-fyzikálna fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCA



Peter Molnár

Príprava a testovanie strieborných imobilizovaných nanočastíc k SERS spektroskopii biomolekúl

Fyzikálny Ústav UK

Vedúci diplomovej práce: RNDr. Marek Procházka, Ph.D..

Študijný program: Fyzika

Študijný obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2006

V prvom rade by som sa chcel poďakovať svojmu školiteľovi RNDr. Markovi Procházkovi Ph.D. Moja vďaka mu patrí nielen za nesmiernu pomoc vo všetkých fázach práce – pri experimentoch, interpretovaní výsledkov a pri samotnom spisovaní práce, ale hlavne za jeho ľudský a chápaný prístup a ochotu vždy pomôcť.

Moje poďakovanie patrí ďalej Mgr. Tomášovi Špringerovi za pomoc pri experimentoch a spracovaní dát, Mgr. Natálii Hajdukovej za pomoc pri experimentoch a Mgr. Martinovi Křížovi a Mgr. Vítovi Marekovi za pomoc pri spracovaní dát. Všetkým im samozrejme ďakujem aj za ich veľkú ochotu.

V neposlednom rade patrí moje poďakovanie aj všetkým ľuďom, ktorí sa na tejto diplomovej práci podieľali len nepriamo – tým, že mi poskytli zázemie a oporu v čase jej písania. Za toto ako aj za podporu behom celého môjho štúdia ďakujem svojej rodine a priateľom.

Táto práca bola vypracovaná s finančnou pomocou MŠMT, číslo grantu 1P05ME809.

Prehlasujem, že som svoju diplomovú prácu napísal samostatne a výhradne s použitím citovaných prameňov. Súhlasím so zapožičiavaním práce.

V Prahe, dňa 11.7. 2006

Peter Molnár

ABSTRAKT	5
I TEORETICKÁ ČASŤ	6
ÚVOD.....	6
1 RAMANOV ROZPTYL	7
2 POVRCHOM ZOSILNENÝ RAMANOV ROZPTYL (SERS)	10
2.1 <i>Elektromagnetický mechanizmus</i>	12
2.1.1 Elektromagnetické zosilnenie pre zložitejšie systémy	17
2.2 <i>Chemický mechanizmus</i>	23
2.3 <i>SERS aktívne povrchy</i>	26
2.3.1 Kovové elektródy	26
2.3.2 Kovové ostrovčekovité filmy	27
2.3.3 Kovové koloidy	28
2.3.4 Kovové častice imobilizované na sklenom povrchu.....	29
3 PORFYRÍNY	31
3.1 <i>Význam porfyrínov</i>	31
3.2 <i>Fotodynamická terapia (PDT)</i>	33
3.3 <i>Porfyríny ako fotosenzibilizátory</i>	35
3.4 <i>SERS štúdium porfyrínov</i>	38
II CIELE PRÁCE.....	39
III EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	41
4 POSTUP PRÍPRAVY VZORIEK	41
4.1 <i>Použité chemikálie</i>	41
4.2 <i>Umývanie sklenených nádob</i>	42
4.3 <i>Príprava koloidov</i>	42
4.4 <i>Príprava SERS-aktívnych povrchov</i>	43
5 POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNE ZARIADENIA	44
5.1 <i>UV-VIS absorbná spektroskopia</i>	44
5.2 <i>Meranie Ramanovho rozptylu</i>	45
5.3 <i>Elektrónová mikroskopia</i>	46
IV VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	47
6 PRÍPRAVA A CHARAKTERIZÁCIA SERS-AKTÍVNYCH POVRCHOV	47
6.1 <i>Vplyv použitého koloidu</i>	48
6.2 <i>Vplyv použitého silanu</i>	48
6.3 <i>Vplyv dĺžky času jednotlivých krokov prípravy</i>	49
6.4 <i>Vplyv koncentrácie použitého silanu</i>	54
6.5 <i>Charakterizácia SERS povrchov pomocou elektrónovej mikroskopie</i>	57
6.6 <i>Zhrnutie výsledkov</i>	61
7 MERANIA SERS SPEKTIER Z POVRCHOV	62
7.1 <i>Merania na povrchoch pripravených z citrátového koloidu</i>	62
7.2 <i>Merania na povrchoch pripravených z borohydridového koloidu</i>	63
7.2.1 TMPyP	64
7.2.2 TSPP	75
7.2.3 TPP.....	78
7.3 <i>Zhrnutie výsledkov</i>	83
8 MERANIA SERS SPEKTIER PRIAMO Z KOLOIDU	84
8.1 <i>Postup pri spracovaní SERS spektier</i>	84
8.1.1 Zbavenie spektier pozadia	85
8.1.2 Faktorová analýza	87
8.1.3 Získanie spektier metalovanej a nemetalovanej formy TMPyP	91
8.1.4 Stanovenie pomeru metalovanej a nemetalovanej formy TMPyP.....	92
8.2 <i>Výsledky</i>	93
8.2.1 Merkaptosilan.....	94
8.2.2 Aminosilan	96
8.3 <i>Zhrnutie výsledkov</i>	97
V ZÁVER.....	99
VI LITERATÚRA	101

Abstrakt

Názov práce: Príprava a testovanie strieborných imobilizovaných nanočastíc k SERS spektroskopii biomolekúl
Autor: Peter Molnár
Ústav: Fyzikálny ústav UK
Vedúci diplomovej práce: RNDr. Marek Procházka Ph.D.
E-mail vedúceho: prochaz@karlov.mff.cuni.cz
Abstrakt:

Táto práca mala dva hlavné ciele: vyvinutie metodiky imobilizácie strieborných nanočastíc na silanizovaný sklenený substrát a použitie týchto substrátov k štúdiu vybraných biomolekúl pomocou povrchom zosilneného Ramanovho rozptylu (SERS). Pre SERS spektroskopiu sa ukázali byť vhodné povrchy pripravené imobilizáciou borohydridom-redukovaných koloidných nanočastíc pomocou merkapto- i aminosilanu. Z týchto povrchov sa nám podarilo získať kvalitné SERS spektrá kladne nabitého TMPyP porfyrínu ako aj vo vode nerozpustného TPP porfyrínu, pre ktorý sme získali spektrá bez vplyvu rozpúšťadla. Naše výsledky jasne ukazujú, že takto pripravené povrchy poskytujú unikátnu možnosť, ako merať SERS spektrá v ich natívnej free-base forme, čo nie je možné priamo z koloidu. Ďalšie experimenty potvrdili, že metalácii porfyrínov zabraňuje prítomnosť silanu použitého k imobilizácii strieborných častíc.

Kľúčové slová: SERS, strieborné imobilizované nanočastice, porfyríny, metalácia

Abstract

Title: Preparation and testing of attached silver nanoparticles for purpose of SERS spectroscopy of biomolecules
Author: Peter Molnár
Department: Institute of Physics, Charles University
Supervisor: RNDr. Marek Procházka Ph.D.
Supervisors E-mail address: prochaz@karlov.mff.cuni.cz
Abstract:

Main goal of this work was to develop methodology of immobilization of silver nanoparticles to silanized glass plates and employment of these substrates in biomolecular study using surface-enhanced Raman scattering (SERS). The suitable substrates for SERS spectroscopy, borohydride-reduced colloidal nanoparticles immobilized by mercapto- or aminosilane, have been found. Good SERS spectra of positively charged TMPyP porphyrin as well as of water insoluble TPP porphyrin (without interference of the solvent) have been obtained. Our results clearly show, that our substrates provide unique possibility how to measure SERS spectra of the porphyrins in his native free-base form (what is impossible directly from the colloid). Further experiments confirm that the porphyrins are protected against metalation due to the presence of the silane employed for the silver particles immobilization.

Keywords: SERS, silver immobilized nanoparticles, porphyrines, metalation

I Teoretická časť

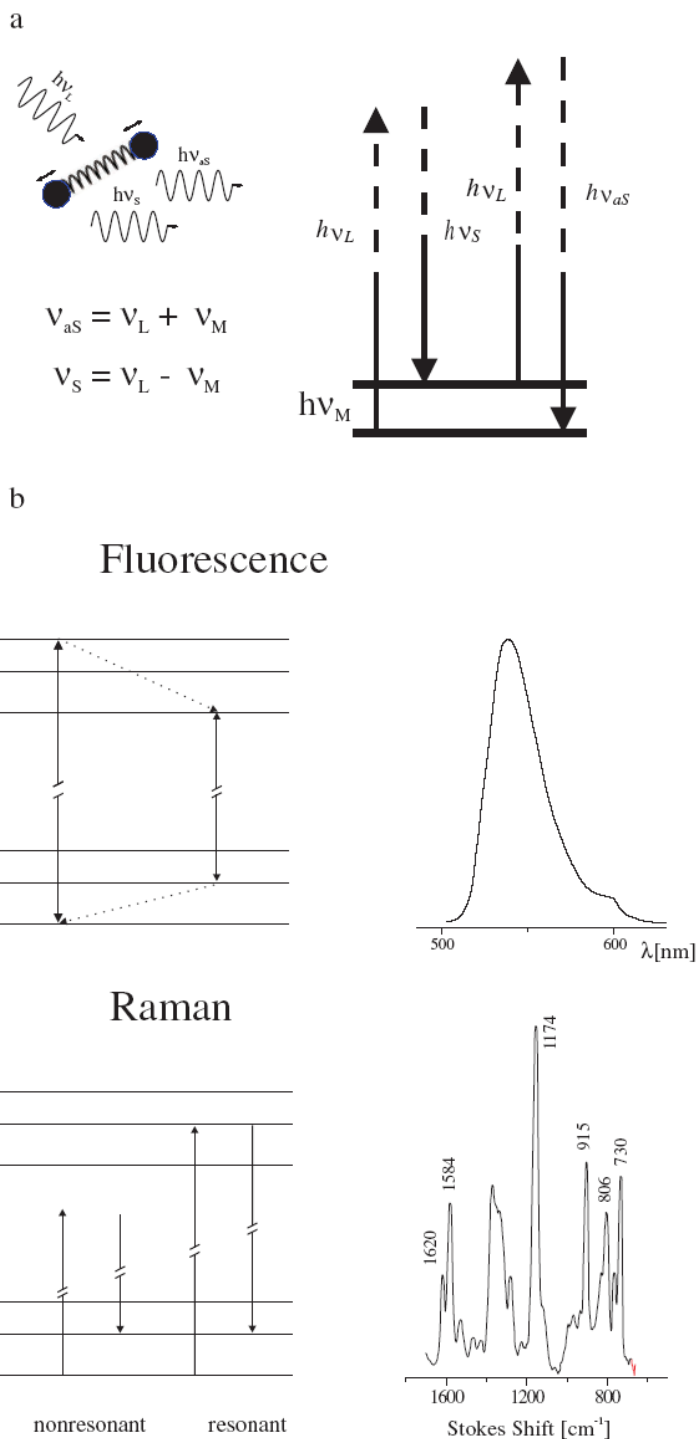
Úvod

Ľudia sa od nepamäti snažili čo najlepšie spoznať svet okolo seba. Takto sa vyvinuli rôzne vedecké disciplíny. Spektroskopia je dobrým príkladom tohto snaženia. Zaradili by sme ju pod prírodné vedy, pravdepodobne pod fyziku, čiastočne asi aj pod chémiu. Dôležité nie zaradenie kam patrí, ale to, čím sa zaoberá. Ako názov napovedá, spektroskopia sa zaoberá získavaním a vyhodnocovaním spektier. Vyhodnocovanie spektier znamená v podstate to, že porovnávame spektrum skúmanej látky so spektrami známych látok. Tento proces samozrejme nie je náhodný, ale veľmi ho uľahčujú mnohé pravidlá. Získanie spektra sa odlišuje podľa toho, o akú spektroskopiu sa jedná. V prípade optickej spektroskopie získame spektrum tak, že na skúmanú látku zasvietime a detekujeme žiarenie, ktoré z tejto látky vyjde. Podľa toho, aké žiarenie detekujeme, rozlišujeme rôzne typy optickej spektroskopie – napríklad absorpčnú (pri ktorej skúmame, aké žiarenie bolo vzorkou pohltené a aké prešlo) alebo luminiscenciu (pri ktorej skúmame žiarenie, ktoré vo vzorke vzniklo kvôli tomu, že sme naňho zasvietili). Ďalším príkladom je spektroskopia Ramanovho rozptylu (pri ktorej skúmame svetlo vzorkou rozptýlené) a jej špeciálny prípad spektroskopia povrchom zosilneného Ramanovho rozptylu. Obe tieto metódy patria do vibračnej spektroskopie.

V spektroskopii povrchom zosilneného Ramanovho rozptylu (SERS, Surface-Enhanced Raman Scattering) sú spojené dve pozitívne charakteristiky – je to metóda veľmi selektívna (ako sú metódy vibračnej spektroskopie vo všeobecnosti) a veľmi citlivá (to je spôsobené práve zosilnením signálu na povrchu kovových nanočastíc). Napriek tomu, že táto metóda je stará len 25 rokov, našla už široké uplatnenie. Používa sa hlavne na chemickú analýzu a obzvlášť na štúdium biomolekúl. Dopredu prezradím, že s použitím tejto metódy sú spojené niektoré praktické problémy. Napriek tomu som sa rozhodol v svojej diplomovej práci zaoberať práve ňou. Táto metóda je potenciálne veľmi užitočná – umožňuje detekovať niektoré látky vo veľmi nízkych koncentráciách, niekedy sa jedná dokonca o detekciu jednotlivých molekúl. To je veľmi dôležité aj z toho dôvodu, že mnohé látky sa v živých organizmoch nachádzajú práve v takýchto nízkych koncentráciách. V nasledujúcom texte vás s touto metódou zoznámim podrobnejšie.

1 Ramanov rozptyl

Ešte predtým, ako vysvetlím SERS, stručne pripomeniem podstatu Ramanovho rozptylu. Tento jav bol objavený v roku 1928 Chandrasekhara Venkata Raman-om a o dôležitosti tohto objavu značí fakt, že už v roku 1930 zaňho dostal Nobelovu cenu. Jeho podstatu znázorňuje obrázok 1.1. Jedná sa o neelastický rozptyl svetla na molekulách.



Obrázok 1-1: Schematické znázornenie Ramanovho rozptylu a fluorescence. Prevzaté z [1]

Na začiatok sa pozrime na tento dej z pohľadu fotónov. Pre dopadajúci fotón je molekula rozptylové centrum. Fotón sa na nej môže rozptýliť elasticky alebo neelasticky. Pri elastickom rozptyle má vyžiarený fotón rovnakú vlnovú dĺžku ako dopadajúci fotón, pri neelastickom rozptyle má vyžiarený fotón inú energiu (a teda aj inú frekvenciu). Ramanov rozptyl patrí medzi neelastické rozptyly. Keďže len veľmi malá časť svetla je rozptýlená neelasticky, je pomer intenzít Rayleighovho a Ramanovho rozptylu $10^9 - 10^{12}$. Pri tomto rozptyle sa energia dopadajúceho fotónu $h\nu_L^1$ zmení o energiu charakteristickej molekulovej vibrácie $h\nu_M$. Jeho energia sa môže zvýšiť aj znížiť – to závisí na tom, či molekula, s ktorou fotón interagoval, je v základnom vibračnom stave alebo v vyššom vibračnom stave. Preto vo vibračnom spektre molekuly pozorujeme dve Ramanove čiary symetricky rozložené od Rayleighovej čiary. V prípade, že fotón interaguje s molekulou v základnom vibračnom stave, sa molekula vracia do vyššieho vibračného stavu a rozptýlený fotón má menšiu energiu (a teda aj frekvenciu ν_S):

$$\nu_S = \nu_L - \nu_M \quad (1)$$

Index S je tam preto, že tento typ Ramanovho rozptylu sa nazýva Stokesov rozptyl. V prípade, že fotón interaguje s molekulou vo vyššom vibračnom stave, sa molekula vracia do základného vibračného stavu a rozptýlený fotón má väčšiu energiu a teda s vyššou frekvenciou ν_{aS} , v tomto prípade hovoríme o antiStokesovom rozptyle²:

$$\nu_{aS} = \nu_L + \nu_M \quad (2)$$

Molekula môže samozrejme prejsť zo základného vibračného stavu späť do základného stavu (rovnako aj z vyššieho do vyššieho). No to je práve elastický (Rayleigh) rozptyl. Intenzita Stokesovej vetvy Ramanovho rozptylu je väčšia ako intenzita Antistokesovej. To je spôsobené tým, že pri pokojovej teplote je vyššia pravdepodobnosť obsadenia základného vibračného stavu než stavu vyššieho (dané Boltzmannovým rozdelením). Práve kvôli silnejšiemu signálu vo väčšine prípadov detekujeme signál Stokesovej vetvy.

Keď je energia dopadajúceho žiarenia blízka energetickému rozdielu základného a excitovaného elektrónového stavu molekuly, je Ramanov rozptyl zosilnený faktorom $10^3 - 10^5$. Hovoríme o rezonančnom Ramanovom rozptyle.

¹ dolný index L je zo slova laser, pretože budiace žiarenie je vo väčšine prípadov práve laser

² Tieto názvy sa vzťahujú k Stokesovmu zákonu, ktorý hovorí, že vlnová dĺžka žiarenia emitovaného látkou môže byť rovnaká alebo vyššia ako je vlnová dĺžka budiaceho žiarenia [2]

Na obrázku 1.1 b je porovnaný Ramanov rozptyl s fluorescenciou. Zatiaľ čo fluorescencia poskytuje vo väčšine prípadov spektrá s málo a relatívne širokými pásmi, Ramanov rozptyl poskytuje skoro „odtlačok prstov“ molekuly, t.j. spektrá, v ktorých je mnoho úzkych pásov. To je spôsobené tým, že Ramanov rozptyl závisí na vibračných stavoch molekuly a tie zasa závisia priamo na druhu atómov, sile väzieb medzi nimi a ich usporiadaním v molekule.

Na obrázku 1.1 b je pekne vidieť aj rozdiel medzi nerezonančným a rezonančným Ramanovým rozptylom. Ramanov rozptyl sa značne zosilní v prípade, keď sa energia budiaceho žiarenia rovná energii nejakého elektrónového prechodu.

Ako vysvetlíme tento dej z klasického pohľadu? Svetlo je elektromagnetické žiarenie, vektor intenzity elektrického poľa si označme E . Toto elektromagnetické pole v molekule vyvolá dipólový moment P , pričom platí:

$$\vec{P} = \vec{\alpha} \cdot \vec{E} \quad (3)$$

kde α je polarizovateľnosť molekuly. Vzhľadom k tomu, že α je funkciou vibračných súradníc Q

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_k} \right)_0 \cdot Q_k \quad (4)$$

indukovaný dipólový moment osciluje nielen na frekvencii budiaceho žiarenia, ale aj na pri frekvenciách, ktoré sú rozdielom a súčtom frekvencií budiaceho žiarenia a molekulových vibrácií. Jedná sa práve o Stokesovu a Antistokesovu vetvu Ramanovho rozptylu.

2 Povrchom zosilnený Ramanov rozptyl (SERS)

Ako SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) rozumieme zosilnený Ramanov rozptyl, ktorý nastáva v prípade molekuly adsorbovanej na kovový povrch.

SERS bol objavený v roku 1974 Fleischmannom. [3] Študoval Ramanovské spektrá pyridínu adsorbovaného na striebornej elektróde. Rozhodol za zväčšiť povrch tejto elektródy, aby sa na ňu mohlo naadsorbovať viac molekúl pyridínu (čo by samozrejme znamenalo zosilnenie signálu).

Tento experiment sa mu podaril a naozaj pozoroval silné zosilnenie ramanovského signálu, dokonca až príliš silné. To si uvedomili až neskôr nezávisle na sebe dvaja ľudia – Van Duyne [4] a Creighton [5]. Obaja si totiž všimli, že výsledný signál bol príliš silný na to, aby bolo toto zosilnenie možné prisúdiť len zväčšenému povrchu. Obaja preto navrhli, že v tomto adsorbovanom stave nastáva zosilnenie rozptýleného žiarenia. Van Duyne navrhol ako vysvetlenie zosilnenie elektromagnetického poľa, zatiaľ čo Creightonove vysvetlenie spočívalo v interakcii adsorbovanej látky s kovom. Hoci ani jeden z nich nevystihol úplne presne skutočnosť, v podstate mali pravdu obaja. Ako je už teraz známe, za zosilnenie sú zodpovedné oba mechanizmy tzv. elektromagnetický a tzv. chemický (molekulárny) mechanizmus.

Na začiatku sa odhadovalo, že zosilnenie týmito mechanizmami je rádovo $10^5 - 10^7$. Neskôr boli pozorované v mnohých prípadoch zosilnenia rádu $10^{10} - 10^{11}$. Jednalo sa signál molekuly farbiva a rezonančný SERS (surface-enhanced resonance Raman scattering, SERRS) [6,7,8,9,10,11,12].

Ešte predtým, ako podrobne vysvetlím tieto dva mechanizmy, popíšem, za akých podmienok bol SERS pozorovaný v praxi.

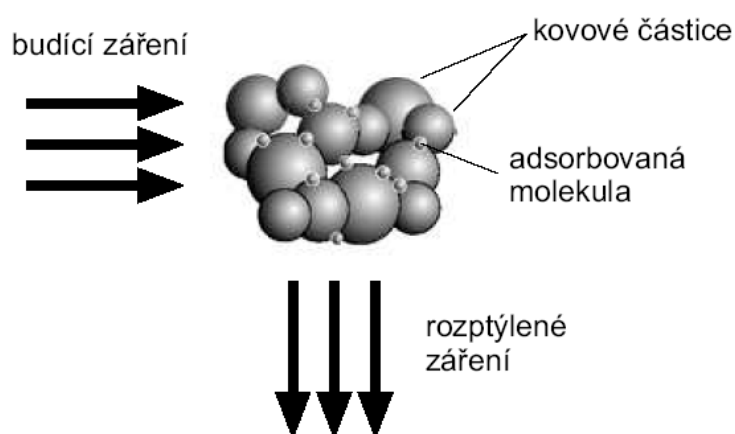
SERS bol vypozerovaný pre veľmi veľa rôznych molekúl. Pre niektoré molekuly funguje lepšie a pre iné horšie, no určite nemôžeme povedať, že by fungoval len pre niekoľko špecifických látok. Pri SERSe sú tieto molekuly adsorbované na kovovom povrchu. Práve tieto povrchy sú dosť špecifické pre SERS. Na základe experimentálnych výsledkov [5,13,14,15] sa zistilo, že všetky tieto povrchy majú dva spoločné rysy: ako materiál sa

používajú iba určité kovy a na povrchu musia byť nerovnosti v nanoškále. Ďalej boli namerané Ramanovské spektrá vysokej intenzity aj v zlato a striebornom koloide (konkrétne sa jednalo o spektrá pyridínu). [16] Tieto zistenia neskôr teoreticky zdôvodnil Creighton [17].

Čo sa materiálu týka, používa sa zlato, striebro a meď. Sú publikované aj experimenty na iných kovoch, ako sú napríklad palládium a platina [18] či alkalické kovy [19, 20], no zlato, striebro a meď zastávajú naozaj dominantné postavenie.

Veľmi dôležité je, aby boli na povrchu nano-nerovnosti. SERS bol síce pozorovaný aj na hladkých povrchoch [21,22], no výrazne lepšie funguje na zdrsnených povrchoch. Jedná sa o nerovnosti v atómovej škále a nanoškále, t.j. nerovnosti veľké rádovo desiatky až stovky nanometrov. To, akým spôsobom povrch s takýmito nerovnosťami získame, nie je podstatné. Preto sú v súčasnosti známe mnohé povrchy, ktoré za na prvý pohľad veľmi odlišujú (hlavne prípravou), no podstatu (práve tieto nerovnosti) majú spoločnú. Historicky prvé boli použité zdrsnené strieborné elektródy, pri ktorých boli nerovnosti vytvorené niekoľkými cyklami oxidačno-redukčných reakcií. Ďalšie používané povrchy sú kovové ostrovčekovité filmy, litograficky pripravené mriežky [23], litograficky pripravené súbory sféroidných častíc [24], koloidy a povrchy pripravené z koloidov atď.

Na nasledujúcom obrázku je znázornené, čo sa deje pri SERS experimente:



Obrázok 2-1: Schematické znázornenie SERS experimentu. Prebrané z [25].

V tomto konkrétnom prípade sa jedná o experiment s použitím agregovaných kovových nanočastíc, ktoré mohli vzniknúť napríklad agregáciou koloidu. Všetko napísané o Ramanovom rozptyle platí aj v tomto prípade. Jediný rozdiel je v tom, že v tomto prípade nastáva silné zosilnenie signálu. Toto zosilnenie je spôsobené práve prítomnosťou kovových nanočastíc. Intenzita rozptýleného žiarenia I je úmerná druhej mocnine dipólového momentu:

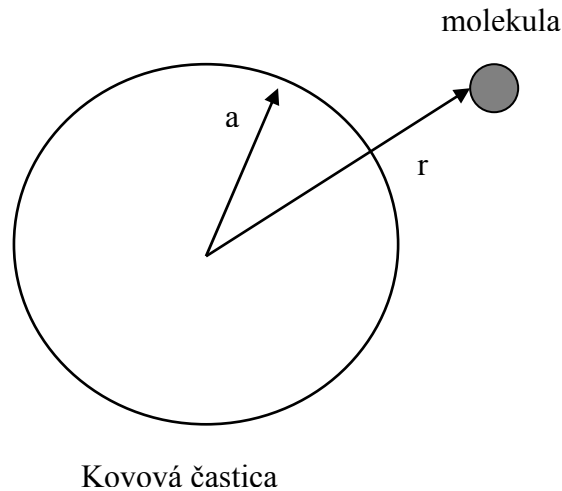
$$I_{RS} \approx |\vec{P}|^2 \quad (5)$$

Podľa vzťahu (3), t.j. $\vec{P} = \vec{\alpha} \cdot \vec{E}$, je možné zosilniť signál dvoma spôsobmi – prostredníctvom zosilnenia elektromagnetického poľa (charakterizovaného veličinou E) v blízkosti kovového povrchu a prostredníctvom zvýšenia polarizovateľnosti molekuly α . V prvom prípade hovoríme o elektromagnetickom zosilnení, v druhom prípade o chemickom zosilnení.

2.1 Elektromagnetický mechanizmus

Dopadajúce žiarenie vyvolá rezonančnú excitáciu tzv. povrchového plazmónu v kove. Oscilujúce plazmóny spôsobia lokálne zosilnenie elektromagnetického žiarenia v blízkosti povrchu, najviac okolo ostrých hrotov a medzi kovovými nanočasticami. Toto zosilnené žiarenie je Ramanovsky rozptýlené molekulou adsorbovanou na povrchu. Následne je v dôsledku rezonančnej interakcie s povrchom zosilnené aj rozptýlené žiarenie. Toto je podstata elektromagnetického zosilnenia. Pozrieme sa naňho teraz podrobnejšie.

Je dobre známy fakt, že na nabitom kovovom telese sa vytvorí najsilnejšie elektrostatické pole práve v oblasti hrotov. Niečo podobné platí pre zosilnenie elektromagnetického poľa v blízkosti nerovností. Práve tieto nerovnosti hrajú úlohu hrotov a to nie len v prípade, keď majú tvar špicatého kužeľa, ale aj keď majú tvar napríklad pologule. Odvodme si vzťah pre zosilnenie tohto poľa v blízkosti maličkovej kovovej guľôčky. [26,27] Reálne častice nemajú guľový tvar. Napríklad čiastočky striebra majú zvyčajne tvar dodekaedrov a ikosaedrov, no guľová aproximácia je v tomto prípade dostatočná. Tvar gule má tú výhodu, že umožňuje relatívne presne dopočítať zosilnenie elektromagnetického poľa a pritom je dosť dobrou aproximáciou mnohých reálnych systémov.



Obrázok 2-2: Schematické znázornenie molekuly v prítomnosti kovovej častice.

Vo všeobecnom prípade potrebujeme na vypočítanie zosilnenia elektromagnetického poľa vyriešiť Maxwellove rovnice. Predpokladajme ale, že veľkosť guľôčky je zanedbateľná v porovnaní s vlnovou dĺžkou elektromagnetického žiarenia, t.j. pre polomer guľôčky a platí:

$$a < \lambda/20 \quad (6)$$

V tomto prípade guľôčka interaguje v každej jej časti s elektromagnetickým poľom v skoro rovnakej fázi, retardáciu elektromagnetického poľa teda môžeme zanedbať a naša úloha redukuje na elektrostatickú úlohu. Vďaka tomuto predpokladu nemusíme riešiť Maxwellove rovnice, ale jednoduchšiu rovnicu Laplaceovu:

$$\nabla\Phi = 0 \quad (7)$$

pričom Φ je elektrostatický potenciál. Ďalej musíme samozrejme stanoviť vhodné okrajové podmienky. V našom prípade musí Φ spĺňať okrajové podmienky na rozhraní guľôčky a v nekonečne. Na rozhraní musí byť potenciál spojitý, t.j. spojitá musí byť jeho normálová aj tangenciálna zložka:

$$-\varepsilon_i \cdot \left. \frac{\partial\Phi_{dnu}}{\partial r} \right|_{r=a} = -\varepsilon_0 \cdot \left. \frac{\partial\Phi_{vonku}}{\partial r} \right|_{r=a} \quad (8)$$

$$-\frac{1}{a} \cdot \left. \frac{\partial \Phi_{dnu}}{\partial \theta} \right|_{r=a} = -\frac{1}{a} \cdot \left. \frac{\partial \Phi_{vonku}}{\partial \theta} \right|_{r=a} \quad (9)$$

kde r označuje vzdialenosť od stredu guľôčky, Φ_{dnu} je potenciál v guľôčke a Φ_{vonku} je potenciál mimo guľôčky. Pre potenciál v nekonečne musí platiť:

$$\Phi = -E_0 \cdot r \cdot \cos \theta \quad (10)$$

kde E_0 označuje časovo-spriemerované elektrické pole dopadajúceho žiarenia a θ označuje doplnok do pravého uhla k uhlu medzi smerovým vektorom \vec{r} (tento vektor smeruje zo stredu guľôčky do bodu v ktorom určujeme potenciál) a vektorom smeru šírenia dopadajúceho žiarenia. Riešenie tohto problému nájdeme napríklad v [28,29]. Výsledkom je potenciál

$$\Phi = -E_0 \cdot r \cdot \cos \theta + g \cdot (a^3 / r^2) E_0 \cdot \cos \theta \quad (11)$$

pričom:

$$g = \frac{\varepsilon_i(\lambda_L) - \varepsilon_0}{\varepsilon_i(\lambda_L) + 2\varepsilon_0} \quad (12)$$

Kde ε_0 označuje permitivitu v homogénnom prostredí obklopujúcom guľovú časticu a ε_i permitivita kovu závislá na vlnovej dĺžke λ_L dopadajúceho žiarenia. ε_i je komplexná permitivita, má reálnu aj imaginárnu časť:

$$\varepsilon_i(\lambda_L) = \varepsilon_1(\lambda_L) + i \cdot \varepsilon_2(\lambda_L) \quad (13)$$

Ako vidíme zo vzorca (11), potenciál Φ sa skladá z dvoch častí. Prvý sčítanec predstavuje potenciál dopadajúceho žiarenia a druhý sčítanec predstavuje potenciál elektrického dipólu umiestneného v strede gule v smere dopadajúceho žiarenia s polarizovateľnosťou $g \cdot a^3$. Preto sa na celkové elektromagnetické pole v mieste molekuly E_M môžeme pozerat' ako na superpozíciu dvoch polí – budiaceho žiarenia E_0 a poľa dipólu E_D :

$$E_M = E_0 + E_D \quad (14)$$

Z potenciálu Φ môžeme dopočítať intenzitu elektrického poľa E . Pre nás je dôležitá stredná hodnota tejto veličiny $\langle E^2 \rangle^{1/2}$, presnejšie stredná hodnota normálovej zložky $\langle E_n^2 \rangle^{1/2}$ a stredná hodnota tangenciálnej zložky $\langle E_t^2 \rangle^{1/2}$. Pre normálovú zložku platí:

$$E_n = -\frac{\partial \Phi}{\partial r} \quad (15)$$

Strednú hodnotu $\langle E_n^2 \rangle^{1/2}$ získame tak, že $\langle E_n^2 \rangle^{1/2}$ prenásobíme elementom priestorového uhla $d\Omega = \sin\theta \cdot d\theta \cdot d\varphi$ a preintegrujeme cez plný priestorový uhol, t.j. v medziach od 0 po π pre uhol θ a od 0 po 2π pre uhol φ . Výsledkom je:

$$\langle E_n^2 \rangle^{1/2} = (1/3)^{1/2} \cdot E_0 \cdot [1 + 2g(a/r)^3] \quad (16)$$

Podobne pre tangenciálnu zložku platí:

$$E_t = -\frac{1}{r} \cdot \frac{\partial \Phi}{\partial \theta} \quad (17)$$

Analogickým spôsobom ako $\langle E_n^2 \rangle^{1/2}$ vypočítame aj $\langle E_t^2 \rangle^{1/2}$ a dostávame:

$$\langle E_t^2 \rangle^{1/2} = (2/3)^{1/2} \cdot E_0 \cdot [1 - g(a/r)^3] \quad (18)$$

Indukovaný molekulového dipól P bude väčší ako bez prítomnosti guľôčky, pretože teraz je v mieste molekuly silnejšie pole. To, čo sa my snažíme zistiť, je práve veľkosť tohto tzv. elektromagnetického zosilnenia. Musíme ale rozlíšiť zosilnenie pre dipól umiestnený „kolmo“ k povrchu gule (t.j. v smere normály k povrchu gule) a „rovnobežne“ s povrchom gule (t.j. v rovine ktorá sa dotýka povrchu gule). Pre elektromagnetické zosilnenie dipólu umiestneného kolmo k povrchu gule platí:

$$L_n^2(\lambda_L) = \frac{\langle E_n^2 \rangle}{E_0^2} \approx [1 + 2g(a/r)^3]^2 \quad (19)$$

A podobne platí pre elektromagnetické zosilnenie dipólu umiestneného rovnobežne s povrchom gule:

$$L_t^2(\lambda_L) = \frac{\langle E_t^2 \rangle}{E_0^2} \approx [1 - g(a/r)^3]^2 \quad (20)$$

Nesmieme ale zabudnúť, že sme zatiaľ vypočítali len zosilnenie elektromagnetického poľa v mieste molekuly. Analogicky môžeme dopočítať zosilnenie žiarenia emitovaného molekulou. Musíme si ale uvedomiť, že v tomto prípade sa nezosilňuje žiarenie s vlnovou dĺžkou λ_L ale žiarenie pochádzajúce z Ramanovho rozptylu, t.j. s vlnovou dĺžkou λ_S (keď uvažujeme a Stokesovom rozptyle). V tomto prípade bude mať teda faktor g tvar:

$$g' = \frac{\varepsilon_i(\lambda_S) - \varepsilon_0}{\varepsilon_i(\lambda_S) + 2\varepsilon_0} \quad (21)$$

Celková intenzita signálu je teda daná vzťahom:

$$I \approx L^2(\lambda_L) \cdot L^2(\lambda_S) \cdot I_L \quad (22)$$

Kde I_L je intenzita budiaceho žiarenia ($I \approx E_0^2$). Faktor celkového elektromagnetického zosilnenia si teda môžeme vyjadriť v tvare:

$$G_{emag} = L^2(\lambda_L) \cdot L^2(\lambda_S) \approx \left| \frac{\varepsilon_i(\lambda_L) - \varepsilon_0}{\varepsilon_i(\lambda_L) + 2\varepsilon_0} \right|^2 \cdot \left| \frac{\varepsilon_i(\lambda_S) - \varepsilon_0}{\varepsilon_i(\lambda_S) + 2\varepsilon_0} \right|^2 \cdot \left(\frac{a}{r} \right)^{12} \quad (23)$$

Toto je koniec výpočtov, teraz sa pozrieme, čo z tohto vzorca vyplýva. Naším cieľom je čo najväčšie elektromagnetické zosilnenie. Preto je vhodné, aby g aj g' dosahovali čo najvyšších hodnôt. Toto splníme tak, že vyberieme taký kov, pre ktorého komplexnú permitivitu platí:

$$\varepsilon_i(\lambda) + 2\varepsilon_0 \approx 0 \quad (24)$$

t.j. pre reálnu zložku ε_1 komplexnej permitivity ε_i platí:

$$\varepsilon_1(\lambda) \approx -2\varepsilon_0 \quad (25)$$

a pre a imaginárnu zložku ε_2 permitivity ε_i platí:

$$\varepsilon_2(\lambda) \approx 0 \quad (26)$$

Toto má platiť pre budiace žiarenie s vlnovou dĺžkou λ_L alebo pre rozptýlené žiarenie s vlnovou dĺžkou λ_S . V praxi väčšinou platí $\lambda_L = \lambda_S$, čo je obzvlášť vhodné, pretože potom je možné splniť túto podmienku pre dopadajúce aj rozptýlené žiarenie.

Pre viditeľnú oblasť splňujú podmienky (25) a (26) práve zlato, striebro a meď.

Vzhľadom k podstate elektromagnetického zosilnenia nie je nutný priamy kontakt molekuly s kovom. Molekula nemusí byť adsorbovaná, hovoríme, že je fyzisorbovaná. Intenzita ale klesá ako $(1/r)^{12}$ pre samostatnú molekulu, resp. ako $(1/r)^{10}$ pre guľovú vrstvu tvorenú molekulami a teda molekuly musia byť veľmi blízko pri povrchu.

2.1.1 Elektromagnetické zosilnenie pre zložitejšie systémy.

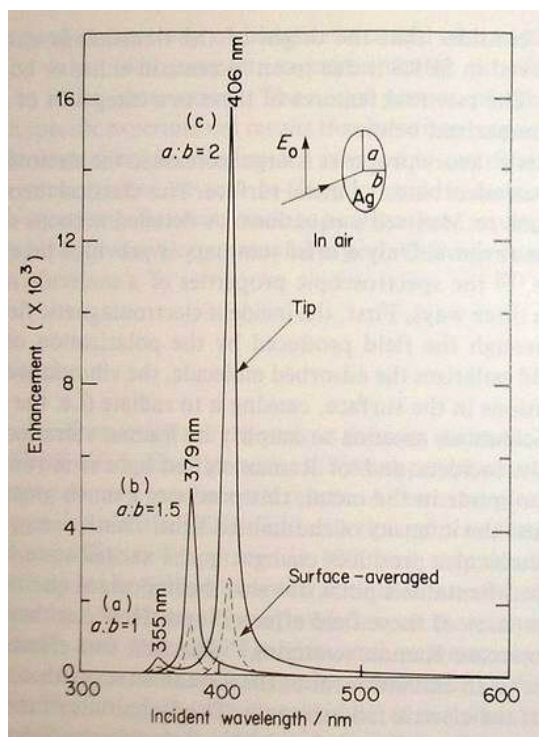
V tomto oddiele si popíšeme (síce výrazne menej detailne ako v predchádzajúcom prípade) ako je to v prípade skutočností podobnejších (a preto komplikovanejších) systémov. Modely reálnych systémov môžeme rozdeliť do dvoch skupín – navzájom neinteragujúce a navzájom interagujúce častice.

2.1.1.1 Neinteragujúce častice

Tento prípad znamená, že môžeme uvažovať stále len o jednej častici. Neznamená to nutne, že v nejakej vzorke je len jedna jediná častica, stačí, aby častice boli dostatočne ďaleko od seba a neovplyvňovali sa. Tento predpoklad je v reálnych systémoch splnený napríklad v koloidoch (pokiaľ neagregujú) a na niektorých pevných povrchoch (pokiaľ na skle umiestnime čiastočky kovu tak, že sú dostatočne vzdialené).

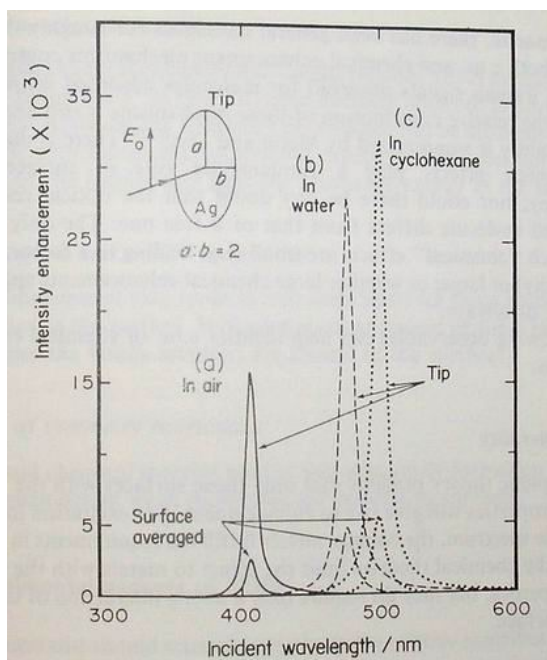
V predchádzajúcej časti sme si odvodili zosilnenie elektromagnetického poľa v blízkosti malej izolovanej kovovej guľôčky. Táto aproximácia ale nie je vždy dostatočná. Preto bola následne odvodená táto teória pre izolované gule rôznych veľkostí [30]. Rozšírením tejto teórie bolo určené zosilnenie aj pre sféroidy [31] a pretiahnuté elipsoidy [32].

V prípade elipsoidov sú zosilnenie aj rezonančná vlnová dĺžka závislé na pomere dĺžky hlavnej a vedľajšej poloosi. Čím väčší je tento pomer, tým väčšie je toto zosilnenie a tým väčšia je rezonančná vlnová dĺžka. Situáciu ilustruje nasledujúci obrázok. Zosilnenie je najsilnejšie na špičoch (plná čiara), no aj zosilnenie spriemerované cez celý povrch je väčšie pre pretiahnutejšie elipsoidy.



Obrázok 2-2: Výsledky elektrostatických výpočtov elektromagnetického poľa pre rôzne strieborné elipsoidy. Čiarkovaná čiara znázorňuje povrchovo-spriemerovanú intenzitu a plná čiara Intenzitu pri hrotoch. Prebrané z [33].

Ďalej bol študovaný aj vplyv permitivity prostredia [34]. Nasledujúci obrázok znázorňuje práve tento efekt. Vidíme, že zosilnenie je silnejšie v prostredí s väčšou permitivitou a že permitivita ovplyvňuje aj posun rezonančnej frekvencie.



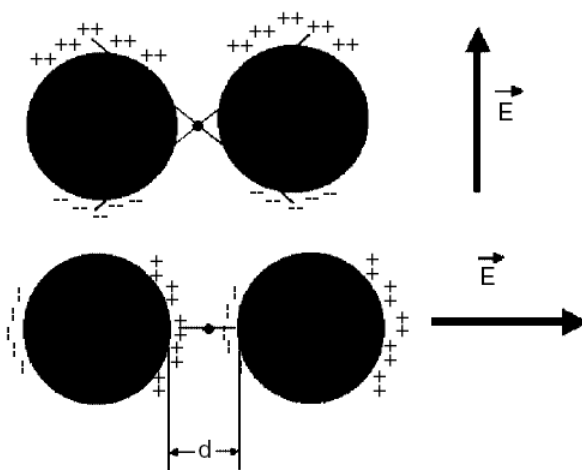
Obrázok 2-3: Výsledky elektrostatických výpočtov elektromagnetického poľa pre strieborný elipsoid s pomerom hlavných osí 2:1 ponorený do prostredí s rôznymi relatívnymi permitivitami (vzduch=1, voda=1,77, cyklohexán=2,04). Čiarkovaná čiara znázorňuje povrchovo-spriemerovanú intenzitu a plná čiara Intenzitu pri hrotoch. Prebrané z [33].

2.1.1.2 Interagujúce častice

V tomto prípade nás zaujíma, aké je elektromagnetické zosilnenie v prípade, keď sú častice dostatočne blízko seba. Vedieť, čo sa deje v blízkosti jednej častice, je samozrejme nevyhnutné, no tým sme sa zaoberali v predchádzajúcom texte.

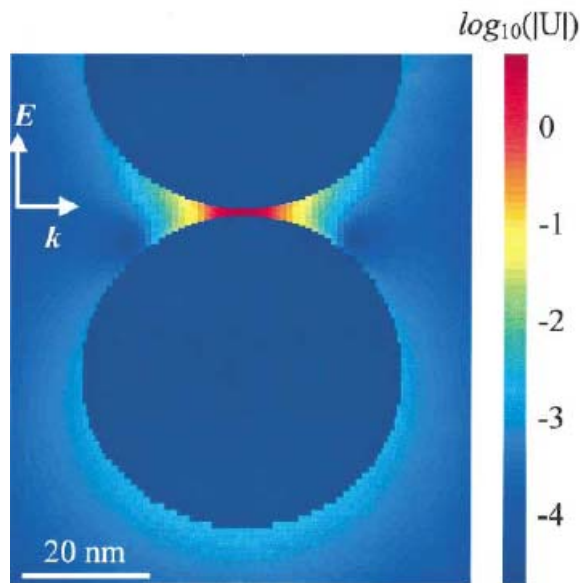
Systémy interagujúcich častíc sú v praxi ešte bežnejšie ako systémy neinteragujúcich častíc. Príkladom môže byť nielen koloid, ktorý zagreguje, ale aj rôzne povrchy (pokiaľ pripravíme povrch tak, že častice uchytené na ňom sú blízko seba, t.j. interakcie medzi nimi nemôžeme zanedbať).

Nasledujúci obrázok ilustruje skutočnosť, že pole medzi dvoma časticami môže byť veľmi zosilnené.



Obrázok 2-4: Elektrické pole v blízkosti dvoch kovových guľ pre rôzne smery intenzity elektrického poľa. Prebraný z [35].

Zosilnenie veľmi závisí na usporiadaní častíc. Na tomto konkrétnom prípade, keď sa jedná o dve častice, je na hornom obrázku elektromagnetické pole zosilnené len relatívne slabo (napríklad 2krát), zatiaľ čo na dolnom obrázku môže byť zosilnenie obrovské. To je spôsobené tým, že v prvom prípade priblíženie guľôčok priblíži kladný a záporný náboj len obmedzene, zatiaľ čo v druhom prípade je priblíženie týchto opačných nábojov skoro neobmedzené (a teda je skoro neobmedzené aj zosilnenie elektrického poľa). Tento prípad znázorňuje nasledujúci obrázok.



Obrázok 2-5: Zosilnenie elektromagnetického poľa (charakterizovaného veličinou $\langle U \rangle = -\langle \mathbf{P} \cdot \mathbf{E}_L \rangle = -1/2 \cdot \alpha \cdot E_L^2$) medzi kovovými guľôčkami pre intenzitu elektrického poľa rovnobežnú so spojnicu guľôčok. Prebraný z [36].

Tieto vzájomné interakcie nie sú vôbec zanedbateľné. Zatiaľ čo maximálne zosilnenie odhadované pre samostatnú guľovú časticu je rádu $10^6 - 10^7$ [31,37,38], pre dve guľové častice je odhadované zosilnenie rádu až 10^{11} , konkrétne v bode medzi guľôčkami vzdialenými od seba 1 nm (t.j. pre vzdialenosť medzi guľôčkami výrazne menšiu ako ich polomer). [36,39,40] Rovnaké zosilnenie je síce odhadované aj pre samostatnú časticu tvaru hrotu [39], no dá sa očakávať, že za väčšinu takýchto veľkých zosilnení môže zhluk častíc a nie jedna častica špeciálneho tvaru. V práci [39] sú uverejnené aj výsledky pre prekrývajúce sa gule či gule rôznych veľkostí.

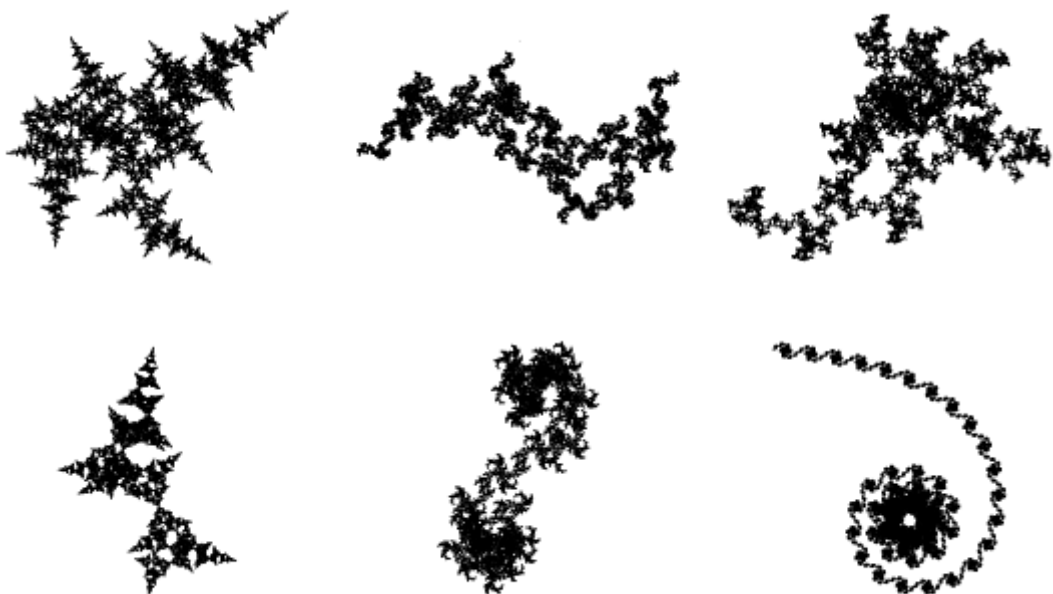
Systémy väčšieho množstva interagujúcich častíc môžeme rozdeliť do troch skupín:

- 1) **1-D systémy** – teoretickým príkladom je retiazka z kovových častíc. V prípade rovnakých pravidelne rozmiestnených častíc dokážeme spočítať výslednú intenzitu od všetkých častíc. Lineárnymi agregátmi sa zaoberali Fornasiero a Grieser. [41] Zistili, že degenerovaný excitovaný stav súboru N rovnakých izolovaných gúľ sa vplyvom dipól-dipólovej interakcie rozštiepi na N excitovaných stavov. Napriek tomu, že sa v praxi s takýmito systémami nestretáme bola táto práca veľmi užitočná. Práve pomocou modelu lineárne zagregovaných častíc boli prvý krát úspešne vysvetlené spektrá striborných agregátov vzniknutých z koloidu.

-
- 2) **2-D systémy** – v tomto prípade sa jedná o častice usporiadané v rovine. Aj v tomto prípade je možné spočítať príspevok od všetkých častíc (v prípade, že sú tieto častice identické a pravidelne rozmiestnené. Príklad takéhoto systému je v [42]. Systémy umiestnené v rovine sú v praxi bežné, jedná sa o prípady, keď sú kovové častice uchytené na nejakom podklade a umiestnené relatívne husto vedľa seba.
- 3) **3-D systémy** – ako názov napovedá aj v tomto prípade, jedná sa o systémy rozložené v priestore. Takéto systémy vzniknú hlavne agregáciou z koloidu, ale aj uchycovaním na podklad – v prípade, že sa na podklad uchytí toľko častíc, že sú v niekoľkých vrstvách na sebe. Špeciálne miesto medzi 3-D systémami patrí tzv. fraktálom.

Všeobecne pre všetky tieto tri typy systémov interagujúcich častíc musíme započítať aj dipól-dipólové interakcie. Budiace žiarenie vyvolá v kovovej častici diopólový moment a tento ďalej interaguje s ostatnými časticami. Detaily toho, ako postupovať v prípade týchto vzájomných interakcií je možné nájsť v [43].

Pozrime sa teraz na fraktály. Fraktál je objekt, ktorý vyzerá rovnako keď sa naňho dívame pri rôznych zväčšeniach, t.j. zblízka či zďaleka. [44] Na nasledujúcom obrázku je niekoľko príkladov fraktálov:



Obrázok 2-6: Ukážka niekoľkých fraktálov. Prebrané z [45].

Hovoríme, že fraktály sú invariantné voči veľkosti a podobné sami sebe. Fraktály nie sú len abstraktným matematickým modelom, v prírode sa relatívne často vyskytujú štruktúry pripomínajúce fraktály. Ako príklad môžeme uviesť napríklad hory, oblaky, riečnu sieť, snehové vločky ako aj list papradia.



Obrázok 2-7: List papradia ako príklad fraktálovej štruktúry vyskytujúcej sa v prírode. Prebrané z [46].

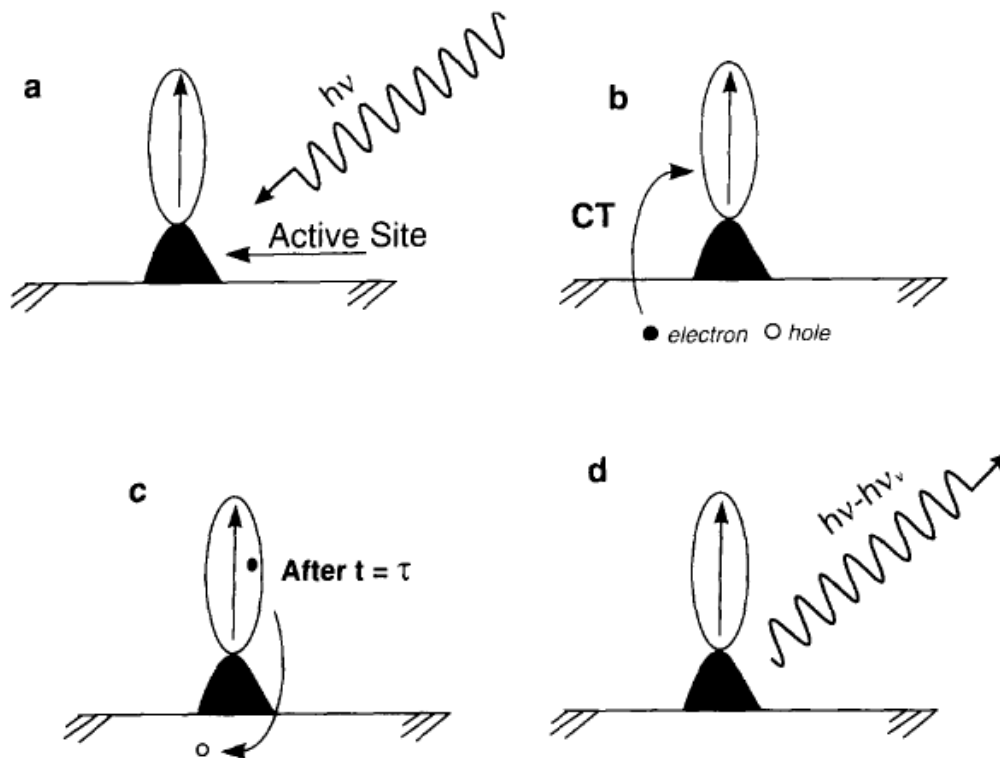
Zatiaľ čo ideálne fraktály môžeme zväčšovať alebo zmenšovať donekonečna, fraktály z prírody majú túto vlastnosť len v obmedzenej škále. Horným limitom je samozrejme prinajmenšom veľkosť celého objektu, dolným prinajmenšom veľkosť atómu. Väčšinou sú tieto hranice samozrejme užšie.

Skupinky strieborných a zlatých častíc vykazujú často práve vlastnosti fraktálov, a to nielen klastre vytvorené agregáciou z koloidu, ale aj kovové ostrovčekovité filmy. [47,48,49,50] Zosilnenie elektromagnetického poľa je v rámci týchto klastrov veľmi nehomogénne. Najsilnejšie zosilnenie je v tzv. hot-spotoch [51,52], ktoré môžu byť malé len niekoľko nanometrov [53,54]. Umiestnenie týchto hot-spotov závisí na usporiadaní fraktálu, excitačnej vlnovej dĺžke a polarizácii budiaceho žiarenia. Pre tieto miesta bolo teoreticky predpovedané zosilnenie až rádu 10^{12} . Skutočnosť túto predpoveď potvrdila, experimentálne boli zistené zosilnenia rádu 10^{14} pre jednu molekulu metanolu. [47,55] Faktor 100 je daný chemickým zosilnením, ktorému sa venujem v nasledujúcom oddiele.

2.2 Chemický mechanizmus

Elektromagnetické zosilnenie vysvetlilo podstatu SERSu, no niektoré otázky ostali nezodpovedané. Pomocou tohto zosilnenia nebolo možné vysvetliť, prečo je zosilnenie v niektorých prípadoch silnejšie až 10^3 -krát ako by malo byť teoreticky a hlavne bolo záhadou to, ako je možné, že pre rôzne molekuly je toto zosilnenie rôzne silné. V prípade čisto elektromagnetického zosilnenia by muselo byť zosilnenie nezávislé na type molekuly, čo odporovalo skutočnosti (napríklad zosilnenie pre molekuly CO a N₂ sa pri rovnakých podmienkach odlišuje 200-krát). Preto sa v prípade SERSu musí vyskytovať aj zosilnenie iného typu, hovoríme o tzv. chemickom (molekulárnom) zosilnení. Jedná sa o mechanizmus, pri ktorom sa zvýši polarizovateľnosť molekuly α , čo vedie podľa vzťahu (3): $\vec{P} = \vec{\alpha} \cdot \vec{E}$ k zosilneniu signálu.

Chemický mechanizmus je ťažšie vysvetliteľný ako elektromagnetický. Pohľad na túto problematiku nie je úplne jednotný a je navrhnutých niekoľko možností ako ho vysvetliť. Nutnou podmienkou chemického zosilnenia je priamy kontakt molekuly s kovom. Vo väčšine prípadov dochádza pri tomto kontakte k tvorbe komplexu a tento jav nazývame chemisorbcia. Nevyžaduje nerovnosti povrchu v nanoškále, ale v atómovej škále. Na tento jav sa môžeme pozeráť tak, že priamym kontaktom molekuly s kovom sa podstatne zmenia vlastnosti molekuly, pretože dochádza k silnej interakcii s elektrónmi kovu, často dokonca k prenosu náboja. V závislosti na type molekuly preto v niektorých prípadoch k zosilneniu dochádza a pre iné molekuly toto zosilnenie nenastáva. Pomocou nasledujúcich dvoch obrázkov sa pokúsím vysvetliť mechanizmus chemického (molekulárneho) zosilnenia. V tomto prípade predpokladám, že zosilnenie je dôsledkom prenosu náboja (to je najrozšírenejšie vysvetlenie tohto javu).



Obrázok 2-8: Prenos náboja spôsobený fotónom

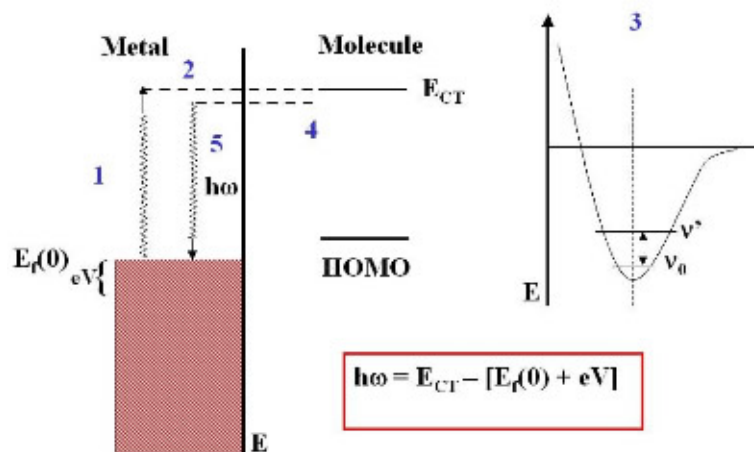
(a) Molekula adsorbovaná na aktívnom mieste. Interakcia molekuly s kovom vedie k vytvoreniu páru elektrón-diera. Tento proces nastáva v zvýšenej miere v prípade nerovnosti v atómovej škále.

(b) Elektrón tuneluje z kovu na molekulu.

(c) V prípade, že elektrón zotrvá na molekule dostatočne k tomu, aby nastala vibračná zmena (čas τ), tuneluje späť so zmenenou energiou

(d) Anihiláciou páru elektrón-diera vznikne Ramanovský fotón. Prebrané z [56].

Pri tomto procese je dôležité, že kvôli vytvoreniu komplexu je energia vonkajších molekulových orbitalov molekuly je blízka energii Fermiho pásu v kove. Toto zosilnenie nastáva, keď rozdiel v energii vonkajších molekulárnych orbitalov a Fermiho energie je blízky energii dopadajúceho žiarenia. Nasledujúci obrázok ilustruje práve toto.



Obrázok 2-9: Vysvetlenie chemického (molekulárneho) mechanizmu z energetického hľadiska.

Podrobnejší popis chemického zosilnenia je možné nájsť v [22,57,58,59, 60,61,62,63].

Veľmi užitočné je na záver porovnať elektromagnetický a chemický mechanizmus zosilnenia medzi sebou [56]:

	Molekulárny (chem.) mechanizmus	Elektromagnetický mechanizmus
<i>Podstata</i>	Rezonančný proces vyžadujúci vytvorenie komplexu molekula-kov.	Zosilnenie lokálneho elektrického poľa
<i>Potrebné nerovnosti</i>	Nerovnosti v atómovej škále	Nerovnosti v nanoškále
<i>Závislosť na vzdialenosti</i>	Krátkodosahový – existuje len pre molekuly priamo adsorbované na kove.	Dlhodosahový – s rastúcou vzdialenosťou rýchlo klesá, no priamy kontakt s kovom nie je nutný
<i>Závislosť na potenciáli</i>	Je závislý na el. potenciáli	Nie je závislý na el. potenciáli
<i>Závislosť na excitačnej vlnovej dĺžke</i>	Je na nej závislý, pretože na nej závisí rezonančná podmienka.	Je závislý, pretože na nej závisí dielektrická konštanta kovu.

2.3 SERS aktívne povrchy

Už v predchádzajúcich častiach som vysvetlil, že povrchy určené k SERS môžu byť pripravené len z určitých kovov (hlavne Au, Ag a Cu) a musia obsahovať nerovnosti v nanoškále. Tejto časti vysvetlím, aké rôzne typy týchto povrchov existujú, ako sa pripravujú a aké majú vlastnosti.

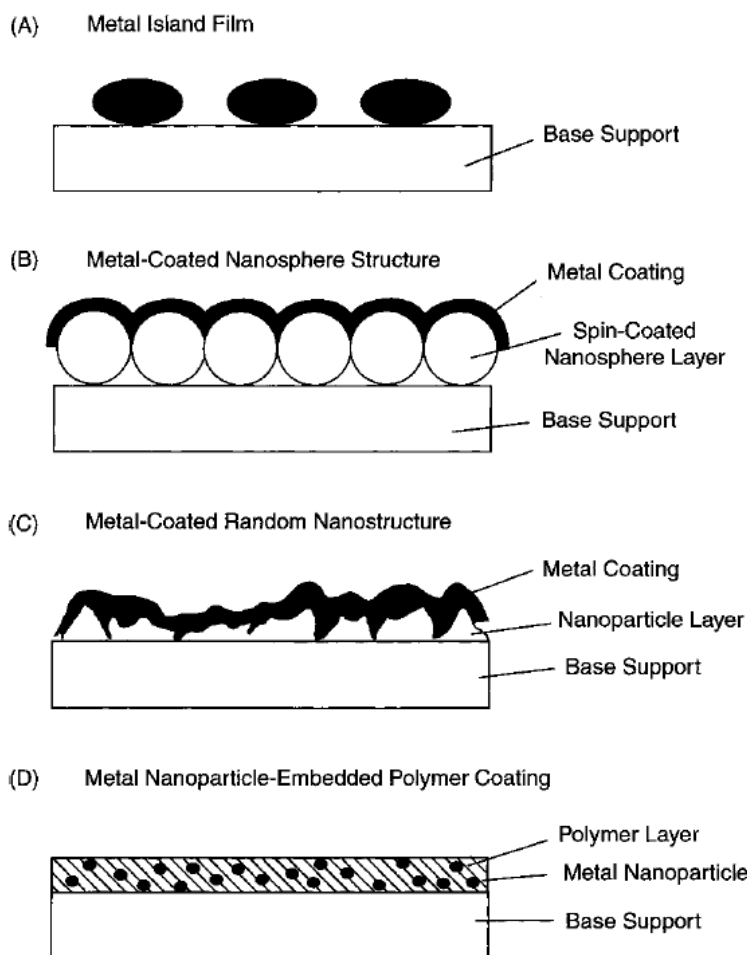
2.3.1 Kovové elektródy

Tento typ povrchov má tú výhodu, že umožňuje pri meraní nastaviť potenciál na elektródach. Pre SERS je nutné samozrejme tieto elektródy upraviť, pretože potrebujeme, aby na nich boli nerovnosti určitých veľkostí. Na začiatku ich vyhladíme (aby sme stále vychádzali z rovnakých počiatočných podmienok) a potom na nich „vyrobíme“ požadované nerovnosti. Tento proces je prebieha tak, že elektródy ponoríme do elektrolytu a necháme na nich prebehnúť niekoľko oxidačno-redukčných cyklov. Počas oxidačného polcyklu sa kov (napr. Ag) „rozpustí“, t.j. vytvorí na povrchu vrstvu AgCl a počas redukčného polcyklu sa AgCl premení späť na Ag. To, aké nerovnosti sa nakoniec vytvoria na povrchu kovu, závisí na počte týchto oxidačno-redukčných cyklov, náboji prenesenom pri jednom cykle, potenciále elektródy a na koncentrácii a iných vlastnostiach elektrolytu. Pokiaľ chceme, aby boli výsledky reprodukovateľné, musíme tieto veličiny sledovať. Je napríklad známe, že pre účely SERSu je vhodné nechať počas oxidačnej polperiódy prejsť vzorkom náboj 20-50 mC.cm⁻², čo odpovedá ekvivalentu 100-200 vrstiev Ag atómov. [64] Nerovnosti na povrchu kovových elektród majú väčšinou rozmery v rozmedzí 25-500 nm.

2.3.2 Kovové ostrovčekovité filmy

Kovové ostrovčekovité filmy vznikajú naparovaním kovu na „podložku“, presnejšie substrát. Substrátom môže byť napríklad sklo alebo kremeň. Aj v tomto prípade je výsledok veľmi závislý na rôznych parametroch ako je rýchlosť naparovania, hrúbka vrstvy a teplota substrátu počas naparovania. Toto naparovanie prebieha vždy vo vákuu. Okrem toho už krátke vystavenie takéhoto povrchu v atmosfére väčšinou spôsobí vznik oxidových vrstiev na povrchu (čo je vo väčšine prípadov nechcené).

V praxi sa stretávame väčšinou s naparovaním pri zvýšenej alebo zníženej teplote. V závislosti na použítom postupe a podmienkach prípravy majú nerovnosti veľkosť 10-600 nm.



Obrázok 2-10: Kovové nanočastice uchytené na substráte. Prebrané z [67].
(A) kovové ostrovčekovité filmy
(B) pravidelná nanoštruktúra pokrytá kovom
(C) nepravidelná nanoštruktúra pokrytá kovom
(D) substrát pokrytý vrstvou polyméru obsahujúcou kovové nanočastice

Inými možnosťami ako získať nerovnosti na povrchu je nanášať kov (napr. striebro) tak, aby vytvoril homogénnu vrstvu, no na substrát s nerovnosťami. Je možné použiť buď zdrsnené substráty s náhodnou veľkosťou nerovností [65] alebo špeciálne pripravené substráty s presne definovanými a pravidelnými nerovnosťami. [24,66] Možné je tiež naniest' na substrát polymérnu vrstvu, ktorá obsahuje kovové nanočastice. Tieto možnosti sú schematicky znázornené na obrázku 2-10.

2.3.3 Kovové koloidy

V praxi sa stretávame s kovovými koloidmi tvorených kovovými časticami tvaru blízkeho guľovému rozptýlenými vo vode. Tieto častice majú veľkosť zvyčajne desiatky nanometrov a distribúcia rozdelenia ich veľkostí je výrazne užšia ako distribúcia rozdelenia veľkosti nerovností na elektródach alebo kovových ostrovčekovitých filmoch. Koloidy je možné pripraviť dvoma spôsobmi – chemicky (redukciou kovových solí) a pomocou laseru.

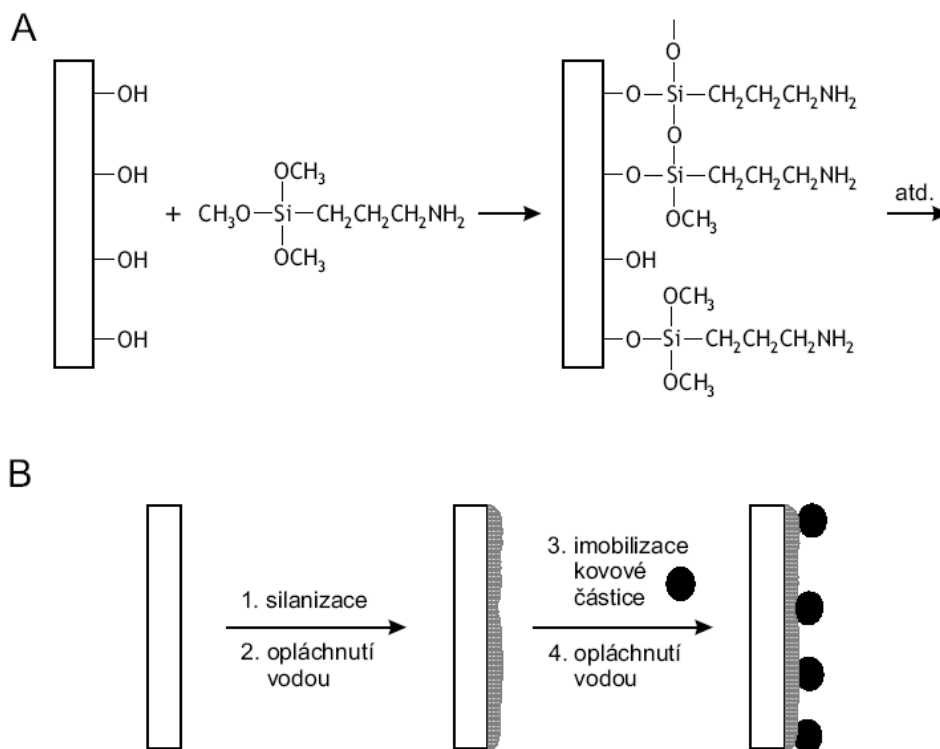
Chemická redukcia kovových solí vhodným redukčným činidlom je najpoužívanejší spôsob. Ako redukčné činidlo sa používa napríklad borohydrid sodný lebo citronan sodný. [16,42,68,69] Samotná príprava je v podstate jednoduchá, len je dôležité venovať zvýšenú pozornosť čistote vody, chemikálií a použitých sklenených nádobiek. V prípade nejakej nečistoty môže koloid zagregovať. Čistému koloidu bráni v agregácii náboj na povrchu kovových častíc. Tieto častice sú totiž na povrchu pokryté aniónmi redukčného činidla. Pridaním adsorbátu do koloidu sa toto vzájomné odpudzovanie kovových častíc zruší, tie sa začnú zhlukovať a vytvárať agregáty. Túto zmenu v koloide je väčšinou možné pozorovať voľným okom (zmenou farby). Vytvorené agregáty sú niekedy výrazne väčšie ako pôvodné kovové častice, a preto sa usadia na dne. Lepším kritériom je samozrejme určiť túto zmenu pomocou extinkčných spektier (SPE, surface plasmon extinction), ktoré môžeme získať pomocou UV-VIS spektroskopie. Agregácia koloidu neprebehne okamžite, jedná sa o postupný dej, ktorý je závislý na mnohých faktoroch, ako sú povrchový potenciál koloidu, jeho chemické vlastnosti ako aj chemické vlastnosti adsorbátu, koncentrácia adsorbátu, teplota atď. Tieto faktory neovplyvňujú len rýchlosť agregácie, ale aj iné podmienky tohto procesu a preto na nich závisia vlastnosti agregátu. Ako som vysvetlil v kapitole 3.1.1.1.2, vo všeobecnosti poskytujú agregované koloidy pre SERS lepší signál ako neagregované.

Druhá možnosť ako pripraviť kovový koloid je pomocou laseru, hovoríme o takzvanej laserovej ablácii³. V tomto prípade sa postupuje tak, že sa vloží kovová fólia do roztoku (najčastejšie vodného, no je možné použiť aj iné roztoky) a ožiari sa vysoko energetickým pulzným laserom, napríklad Nd-YAG laserom. [70,71] Podstata tohto deja spočíva pravdepodobne v odparení kovu. Takto vzniknú chemicky čisté koloidy, kde kovové čiastočky sú len z čistého kovu a na povrchu nie sú pokryté žiadnymi iónmi. Táto vlastnosť môže byť v niektorých prípadoch potrebná, no má za následok, že takto pripravené koloidy sú menej stabilné (kvôli neexistencii coulombovského odpudzovania).

2.3.4 Kovové častice imobilizované na sklenom povrchu

Kovové koloidy vykazujú veľké zosilnenie SERS signálu a preto sa na prvý pohľad zdajú byť veľmi vhodnými k tomuto účelu. Ich použitie ale naráža na jednu veľkú prekážku – ich nestabilita a nereprodukovateľnosť spektrálnych meraní. Dôvodom je agregácia po pridaní adsorbátu, ktorá sa ťažko kontroluje. Pre účely SERSu by bol ideálny koloid, ktorého vlastnosti by sa po pridaní adsorbátu nezmenili. To by sme ale museli zabrániť agregácii, kovové čiastočky by sme museli nejakým spôsobom prinútiť, aby ostali na svojich miestach a neagregovali. Táto myšlienka v podstate vysvetľuje, prečo sa počas minulých 10 rokov začali objavovať povrchy pripravené imobilizáciou kovových častíc z koloidu. Takto pripravené povrchy majú požadované vlastnosti oboch materiálov – imobilizované častice majú rovnaké morfológické vlastnosti (čo znamená aj rovnakú optickú odzvu) ako častice v koloide a sú rovnako stabilné a reprodukovateľné ako pevné povrchy. Prvýkrát bola príprava týchto povrchov popísaná v článkoch [72,73]. Nasledujúci obrázok znázorňuje, ako sa tieto povrchy pripravujú.

³ Napriek tomu, že anglické slovo ablation má český ekvivalent (odstránenie, rozrušenie, odchlípnutie), sa v českej SERS komunite rozšírilo slovo „ablace“ a preto ho ďalej používam aj ja (v poslovenčenej podobe ablácia).



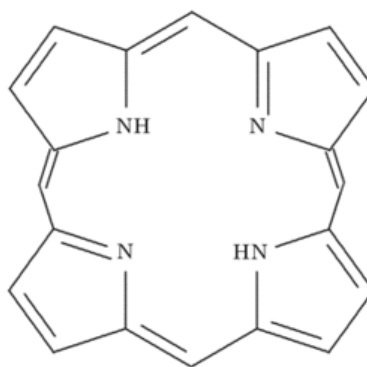
**Obrázok 2-11 Schematické znázornenie procesu silanizácie (A) a imobilizácie kovových častíc (B).
Prevzaté z [25].**

Ako substrát na uchytenie kovových častíc sa používa najčastejšie sklo. Kovové častice sa uchytávajú prostredníctvom organosilanu. Prakticky sa to realizuje tak, že sa substrát ponorí do organosilanu. Na voľné $-OH$ skupiny substrátu sa naviaže organosilan cez svoju $-OR$ skupinu. Pri tomto molekuly silanu interagujú a vytvoria čiastočne usporiadané štruktúry. Silanizovaný substrát je ponorený do koloidu. Väzba koloid-silan je závislá a použitom type silanu, t.j. hlavne na jeho koncovej skupine ($-NH_2$, $-SH$,...). Preto je pre rôzne typy koloidu vhodné použiť rôzne silany. To, či sa podarilo na sklíčko kovové častice naviazať, je možné čiastočne spoznať voľným okom podľa zafarbenia sklíčka. Presnejšiu charakteristiku tohto povrchu ale získame použitím UV-VIS absorpčnej spektroskopie a mikroskopie atómových síl (AFM, atomic force microscopy). Výsledok imobilizácie je závislý na použitom substráte, koloide a silane (aj na koncentrácii silanu), na dobe silanizácie aj dobe ponorenia do koloidu a na teplote. Podrobnejšie je imobilizácia popísaná v [73,74,75] pre zlaté častice a v [76] pre strieborné častice.

3 Porfyríny

3.1 Význam porfyrínov

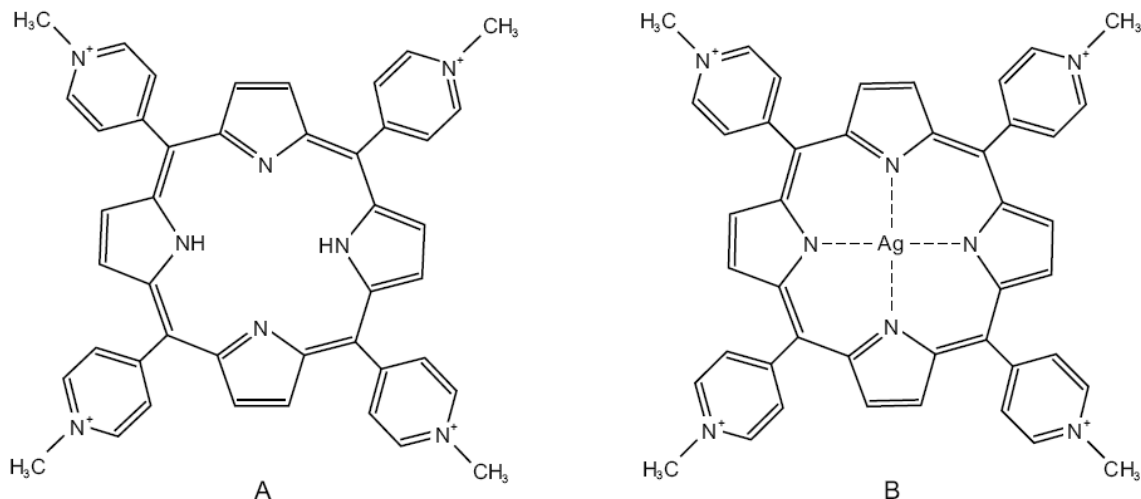
Základnou stavebnou jednotkou všetkých porfyrínov je porfín. Je to planárna heterocyklická zlúčenina tvorená štyrmi pyrolmi. Tento konjugovaný systém robí zlúčeninu farebnou (samotný názov porfyrín pochádza z gréckeho slova, ktoré znamená purpurový).



Obrázok 3-1: Porfín.

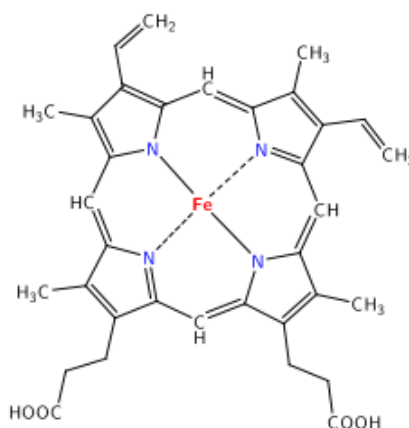
V UV-VIS absorpcii vykazuje tento vysoko konjugovaný makrocyklus veľmi silnú absorpciu pri vlnovej dĺžke okolo 400 nm (tzv. Soretov pás) a ďalej niekoľko slabších absorpčných maxím pri vlnových dĺžkach od 450 do 700 nm.

Vlastnosti porfyrínov (substitučných derivátov porfínu) ovplyvňujú hlavne dva faktory – to, o aké substituenty sa jedná a to, či sa v strede porfyrínu nachádza atóm kovu. V prípade, že sa v porfyríne nachádza atóm kovu (napr. Fe, Zn, Cu, Ni), hovoríme o metalovaných porfyrínoch alebo metaloporfyrínoch. Metaláciu je možné dosiahnuť použitím kovových solí a demetaláciu použitím rôzne silných kyselín. Nasledujúci obrázok znázorňuje dve formy 5,10,15,20-tetrakis(4-pyridyl) porfyrínu (TMPyP). Tento porfyrín som používal počas meraní najčastejšie.



Obrázok 3-2: Molekula TMPyP v svojich dvoch formách v prítomnosti Ag-solí – nemetalovanej (A) a metalovanej (B).

Metalovaná a nemetalovaná forma porfyrínov ma mierne odlišné absorbné aj Ramanovo spektrum. Práve na základe týchto odlišností môžeme rozhodnúť o tom, o akú formu sa jedná.



Obrázok 3-3: Molekula hemu

Porfyríny sú súčasťou mnohých biologicky dôležitých látok. Hem je súčasťou hemoglobínu, ktorý má nesmierne dôležitú úlohu v ľudskom tele (prenos kyslíka). Chlorin, ktorý vznikne redukciou jednej pyrolovej jednotky porfynu, je súčasťou chlorofilu (a ten hrá dôležitú úlohu vo fotosyntéze). V prípade redukcie dvoch pyrolových podjednotiek vznikne bakteriochlorin. Ten má vo fotosyntetizujúcich baktériách podobnú funkciu ako chlorin v rastlinách. Význam a využitie porfyrínov je nesmierne. Jednou veľmi dôležitou oblasťou je fotodynamická terapia rakoviny, ktorej sa venujem v nasledujúcej kapitole.

3.2 Fotodynamická terapia (PDT)

Fotodynamická terapia rakoviny je jednou metód liečby onkologických ochorení. Oproti iným prístupom (ako napríklad chirurgia, rádioterapia a chemoterapia) má veľkú výhodu, a tou je selektívna deštrukcia nádoru [95]. Znamená to, že po jej aplikácii by malo dôjsť k nekróze tumoru a pritom zdravé tkanivo v jeho okolí by malo zostať nepoškodené. Ďalej sa od bežných liečebných metód odlišuje aj v tom, že je možné ju použiť niekoľko krát krátko po sebe. To je užitočné v prípade, že sa nádor nepodarí zničiť na prvýkrát. Možnosť rýchleho opakovania terapeutického postupu u chirurgického zákroku, chemoterapie ani u rádioterapie neexistuje. V porovnaní s chirurgiou ju môžeme použiť aj na nádory, ktoré nie je možné vyoperovať. V neposlednom rade je výhodou aj to, že pacient po fotodynamickej terapii obyčajne nemusí byť hospitalizovaný v nemocnici, čím sa znižujú ekonomické náklady na liečbu [96].

PDT ma samozrejme aj určité nedostatky. Po jej aplikácii sa pokožka stáva fotosenzitívnou a niekedy sa dostaví pocit bolesti. Fotosenzitivita je spôsobená výskytom fotosenzibilizátoru v pokožke. Preto sa pacientom po PDT odporúča vyhýbať sa priamemu slnečnému žiareniu (niekoľko dní až týždňov⁴), ináč by mohlo dôjsť k vzniku popálenín. Pocit bolesti je dôsledok zápalu, ktorý vzniká pri odbúravaní mŕtvych nádorových buniek. Niekedy sa môže vyskytovať aj svrbenie, pocit nevoľnosti, či dávenie, To je ale bežné aj pri iných metódach.

Pri fotodynamickej terapii potrebujeme tri základné veci: O₂, fotosenzibilizátor⁵ a svetlo takej vlnovej dĺžky, ktorým ho dokážeme dostať do excitovaného stavu. Ako zdroje svetla sa používajú rôzne lampy, LED diódy a lasery.

Postup pri fotodynamickej terapii je nasledovný: V prvom kroku sa dopraví fotosenzibilizátor do nádoru. Tam sa svetlom excituje. Po excitácii nastane v karcinóme proces sprostredkovaný fotosenzibilizátorom, v ktorom hrá dôležitú úlohu molekula kyslíka. Jeho výsledkom sú veľmi reaktívne látky, spôsobujúce fotooxidáciu biomolekúl, potrebných k bezporuchovému fungovaniu bunky. V konečnom dôsledku nastane apoptóza či nekróza [97] celého nádorového tkaniva.

⁴ Presná doba závisí na použitom fotosenzibilizátore.

⁵ Fotosenzibilizátorom na báze porfyrínov sa venujem v v texte nižšie.

Jedným z predpokladov fungovania PDT je selektívna lokalizácia a udržiavanie fotosenzibilizátoru v malígnom tkanive. Je to mechanizmus veľmi komplexný, ktorý v súčasnosti nie je úplne pochopený. V tejto oblasti stále prebieha intenzívny výskum. Predpokladá sa, že tento jav je zapríčinený týmito faktormi [98,99,100]:

1. **Vysoká cievna priepustnosť**, spôsobená nekompletnou endotelovou bariérou.
2. **Slabé lymfatické čistenie** nádorových buniek, ktoré môže byť spôsobené buď nevyvinutým lymfatickým obehom, alebo prekážkami v ňom.
3. **Vyššia kyslosť malígneho tkaniva**. (Hoci niektoré štúdie ukazujú, že významne zvýšenú koncentráciu fotosenzibilizátoru v prostredí so zníženým pH nevykazujú všetky fotosenzibilizátory, u protoporfyrínu IX sa to potvrdilo [101]).
4. **Rozdielny medzibunkový priestor** medzi normálnym a nádorovým tkanivom.

Špeciálne pre fotosenzibilizátory založené na porfyrínovej báze môžeme k tomu doplniť:

5. **Nedostatok enzýmu ferrochelatózy**, ktorý je v normálnych bunkách zodpovedný za premenu protoporfyrínu IX na hem, resp. nízke vnútrobunecné zásoby železa, ktoré tiež inhibujú túto premenu [102].
6. **Vysoká afinita porfyrínových fotosenzibilizátorov ku stene ciev v nádore**, pretože sa v nich vyskytuje v relatívne vyššej koncentrácii kolagén.

Lokalizácia jednotlivých fotosenzibilizátorov je samozrejme rozdielna u rôznych tkanív, napr. fotosenzibilizátor protoporfyrín IX sa prednostne akumuluje najmä v sliznici [100]. Podobne je na tom aj časový priebeh hromadenia fotosenzibilizátoru v nádore, u odlišných druhov fotosezitivizérov a malígnych tkanív sa veľmi líši.

V niektorých prípadoch nie je možné PDT použiť. Ak by sme aj k excitácii fotosenzibilizátorov používali svetlo s vlnovou dĺžkou približne 700 nm (ktoré je tkanivom absorbované najmenej⁶) stále sme obmedzený hĺbkou, kam až žiarenie prenikne. Tá je približne centimetrov. Keď je nádor umiestnený hlboko v tele, jediná možnosť, ako ho pomocou PDT zlikvidovať, je použitie endoskopu. Niektoré karcinómy bohužiaľ nie sú endoskopicky dostupné, čo v týchto prípadoch vylučuje použitie PDT.

⁶ V [112] je možné nájsť absorpčné spektrum ľudskej ruky. Najľahšie ňou prechádza červené svetlo až IR žiarenie z oblasti približne 670 až 760 nm

3.3 Porfyríny ako fotosenzibilizátory

Hlavnú úlohu pri PDT hrá fotosenzibilizátor. Práve on sa z najväčšej časti podieľa na úspešnosti terapie. Do úlohy fotosenzibilizátora bolo navrhnutých veľa rozličných látok. U niektorých je ich použitie pri PDT len v teoretickej rovine, iné sú v štádiu klinických testov a ďalšie sú už vo vyspelých krajinách povolené ako liečivá. Pozrime sa na vo všeobecnosti prijímané požiadavky na vlastnosti ideálneho fotosenzibilizátora [103,104,100,105]:

– **Absorpcia v červenej až infračervenej oblasti (> 630 nm),**
aby žiarenie nebolo pohlcované bežným tkanivom.

– **Vysoká účinnosť pri generovaní cytotoxických molekúl**

Po ožiarení svetlom vhodnej vlnovej dĺžky by mal fotosenzibilizátor čo najefektívnejšie tvoriť vysokoreaktívne látky ako napr. singletný kyslík.

– **Nulová toxicita**

Fotosenzibilizátor by mal byť voči organizmu neutrálny, t.j. nemal by priamo ani nepriamo reagovať s dôležitými biomolekulami a tým meniť ich funkcie v organizme. Táto vlastnosť sa samozrejme vyžaduje len dovtedy, kým fotosenzibilizátor nie je vystavený excitačnému žiareniu. Ďalej by mal byť ľahko biologicky odbúrateľný, nemalo by dochádzať k jeho hromadeniu v pečeni, obličkách ani v inom mieste v organizme.

Okrem týchto orgánov často dochádza u PDT k fotosenzitivite pokožky. Z tohto tkaniva sa vo všeobecnosti fotosenzibilizátor vylučuje veľmi pomaly. Preto sa do žiadaných vlastností fotosenzibilizátora niekedy uvádza aj nízka fotocitlivosť pokožky po jeho aplikovaní [100].

– **Presne definovaná chemická látka**

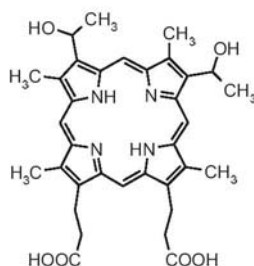
Ako fotosenzibilizátor býva zvyčajne preferovaná jedna konkrétna chemická látka. Pre zmes zloženú z veľkého počtu rôznych látok je ťažšie určiť všetky efekty, ktoré táto zmes spôsobuje. Z tohto dôvodu je ľahšie získať klinické schválenie (a tým možnosť používať daný fotosenzibilizátor v praxi) pre jednoduchú látku ako pre zložitú zmes.

– **Veľký pomer koncentrácií fotosenzibilizátora v nádorovom a v zdravom tkanive**

Cieľená lokalizácia v nádoroch je kľúčovou vlastnosťou fotosenzibilizátorov.

Okrem týchto vlastností môžeme nájsť u niektorých autorov ďalšie žiadané charakteristiky fotosenzibilizátorov ako sú fluorescencia (umožňujúca presnú lokalizáciu fotosenzibilizátoru v organizme [100]) alebo aby energia tripletného stavu fotosenzibilizátora bola vyššia ako $95 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (kvôli účinnému prenosu energie z fotosenzibilizátoru na O_2 , pričom by vznikol singletný kyslík) [107].

Jedným z prvých fotosenzitizátorov, ktorý bol vyskúšaný in vivo v ľudskom organizme (v roku 1913) bol **hematoporfyrín**. Ukázalo sa, že hematoporfyrín je schopný fotodynamickej aktivity. Mal však aj vedľajšie účinky, ako fotosenzitivita pokožky trvajúca až niekoľko mesiacov. Neskôr bolo zistené, že čistý hematoporfyrín sa hromadí v nádore iba minimálne, a preto nie je vhodný na použitie ako fotosenzibilizátor [103].



Obrázok 3-4: Štruktúra hematoporfyrínu. Prebrané z [106].

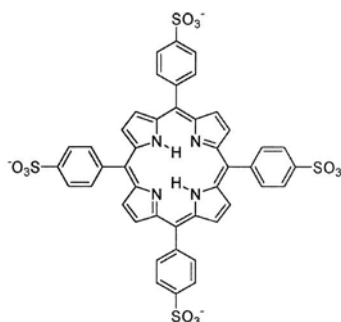
Napriek tomu bola v 70tych a 80tych rokoch vyrobená zmes jeho derivátov (HpD). Tá okrem fotosenzibilizačných vlastností vykazovala aj zvýšenú selektívnu lokalizáciu v nádore. HpD bola pôvodne syntetizovaná nasledovne: produkty reakcie hematoporfyrínu s 5% kyselinou sírovou v kyseline octovej boli ďalej rozpustené vo vode a neutralizované. To viedlo k vytvoreniu zmesi hematoporfyrínu, hydroxyetylvinyldeuteroporfyrínu (HVD), protoporfyrínu a rôznych oligomérnych hematoporfyrínových jednotiek, obsahujúcich medzi sebou esterové, éterové a uhlík–uhlíkové väzby [108,109]. Predpokladalo sa, že aktívna látka je práve dimérická forma hematoporfyrínu, a že HpD obsahuje približne 45 % mono alebo dimérických štruktúr, zvyšok sú vyššie oligoméne porfyríny. Preto sa pristúpilo ku jeho čisteniu, čím vznikol Photofrin[®], obsahujúci až 85 % dimérickej formy hematoporfyrínu [105]. Na to bola použitá HPLC a gélová chromatografia. Aj po vyčistení HpD sa výsledná zmes skladala z veľkého počtu látok. Napriek tomu bola nakoniec klinicky schválená. Photofrin[®] sa už dlhšiu dobu používa ako liek, je povolený napr. v USA, Kanade alebo Japonsku. Vyrába ho spoločnosť QLT PhotoTherapeutics. Vlastnosti HpD ako aj Photofrin[®] sa od vlastností ideálneho fotosenzibilizátoru značne líšia. Je im

vytýkaná najsilnejšia absorpcia na vlnovej dĺžke približne 420 nm (v Soretovom páse), nízka účinnosť pri vzniku cytotoxických látok (u hematoporfyrín derivátov ešte nižšia ako u Photofrinu a 2 až 3 mesačná fotosenzitivita pokožky po ich aplikácii v PDT.

U novších fotosenzibilizátorov patriacich do tejto skupiny boli dosiahnuté lepšie výsledky pri PDT a to najmä z dôvodu ich priaznivejších fotofyzikálnych vlastností, akými sú ich silnejšie absorpcie na cca 700 nm. Patria sem napríklad modifikované porfyríny, chloríny, bakteriochloríny, benzoporfyrínové deriváty či ftalocyaníny.

Modifikované porfyríny

Fotosenzibilizátory v tejto skupine majú charakteristiky podobné prvej generácii fotosenzibilizátorov, no v niektorých vlastnostiach sa od nich odlišujú. Asi najpodstatnejší rozdiel je v tom, že modifikované porfyríny patriace k 2. generácii fotosenzibilizátorov sú vždy definované ako čisté látky s konkrétnym chemickým zložením, zatiaľ čo u fotosenzibilizátorov 1. generácie toto splnené nebolo. Medzi ich spoločné vlastnosti zasa patrí najsilnejšia absorpcia v Soretovom pase (~ 400 nm), množstvo slabších maxim nachádzajúce sa v oblasti 400–650 nm, a obyčajne vysoký kvantový výťažok singletného kyslíka, ktorý je spôsobený dlhou dobou života ich tripletných stavov [107]. Fotofyzikálne vlastnosti modifikovaných porfyrínov môžeme meniť naviazaním rôznych chemických skupín na porfyrínové jadro, ako aj voľbou kovového iónu lokalizovaného v ich strede [110]. Jednou z najčastejšie sa vyskytujúcich podskupín u modifikovaných porfyrínov sú rôzne deriváty tetrafenylporfyrínu (TPP). Medzi základné charakteristiky TPP patrí jeho hydrofobicita. Jednoduchými chemickými reakciami, napr. karboxyláciou či sulfonáciou, je však možné z neho či z jeho derivátov vytvoriť látky veľmi ľahko rozpustné vo vode, akými sú napríklad m-tetra(4-sulfonátofenyl)porfín (TPPS₄). Sledovať zmenu fotofyzikálnych vlastností modifikovaných porfyrínov v závislosti na centrálnom kovovom ióne môžeme práve na rôznych kovových komplexoch TPPS₄ v práci [110].



Obrázok 3-5: Chemická štruktúra TPPS₄.

TPPS₄ vykazuje vlastnosti zaujímavé pre jeho použitie vo fotodynamickej terapii. Preto sa pristúpilo k jeho používaniu napríklad pri liečení rôznych typov rakoviny kože. O jeho účinnosti ako aj o podrobnom postupe pri takejto liečbe sa môžeme dočítať v [111]. V ČR má povolenie k lokálnej aplikácii a bol s úspechom použitý pri liečbe metastáz karcinómu prs [104].

3.4 SERS⁷ štúdium porfyrínov

Porfyríny (a obzvlášť ich free-base forma) sú silno fosforeskujúce molekuly. Preto je ich štúdium pomocou rezonančného Ramanovho rozptylu veľmi problematické. SERS zháša fluorescenciu a preto je na štúdium porfyrínov vhodnejšie. Navyše porfyríny je veľmi vhodné študovať v nízkych koncentráciách, a to z dvoch dôvodov – 1. fyziologické koncentrácie v živých systémoch sú nízke a 2. porfyríny s postrannými reťazcami pri vyšších koncentráciách často agregujú (a teda ich vlastnosti neodpovedajú neagregovaným porfyrínom). Rôzne deriváty porfyrínov boli pomocou SERS študované približne od 80-tych rokov minulého storočia, a to predovšetkým na strieborných povrchoch a v strieborných koloidoch. [77, 78,79,80,81,82,83,84].

Ako bolo zistené, porfyríny sa v prítomnosti striebra metalujú [78] (obr. 4-2 znázorňuje metalovanú aj nemetalovanú formu porfyrínu TMPyP). Tento proces je vo väčšine prípadov nežiadúci, pretože neodpovedá fyziologickým podmienkam. Deriváty porfyrínov sú síce vo fyziologických podmienkach niekedy metalované (napr. hem), no nie sú metalované striebrom. Preto sa hľadali spôsoby, ako metalácii zabrániť. Použitie molekulárnych spacerov sa ukázalo byť účinné v prípade záporne nabitých porfyrínov

⁷ V prípade porfyrínov je správnejšie ako o SERS hovoriť o SERRS, pretože sa naozaj jedná o rezonančného Ramana. V ďalšom texte sa snažím toto dodržiavať. Pre každý prípad sa dopredu ospravedlňujem čitateľovi, ak niekde omylom použijem pomenovanie SERS/SERRS nepresne.

[85,86], no v prípade kladne nabitých porfyrínov (akým je napr. TMPyP) je nájdenie vhodných spacerov veľmi náročné a problematické [n38,n39]. Namerané spektrá tak vyjadrujú spektrum zmiešané z týchto dvoch foriem (metalovanej a nemetalovanej). Nevýhodou tje aj to, že pomer týchto dvoch foriem nie je stály⁸ a spektrá sú nereprodukovateľné. Na druhú stranu kinetika tohto procesu nám môže poslúžiť ako ďalšia charakteristika systému Ag-porfyrín [77,78]. To bolo využité k štúdiu vlastností porfyrínových agregátov, stability povrchu strieborných koloidov [87,88] a interakcií porfyrínov s nukleovými kyselinami [89].

II Ciele práce

Napriek tomu, že spektroskopia povrchom zosilneného Ramanovho rozptylu (SERS) je veľmi účinná metóda pre štúdium molekúl vo veľmi nízkych koncentráciách, jednou z hlavných prekážok pre jej rutinné analytické využitie je zlá reprodukovateľnosť spektrálnych meraní daná nestabilitou použitých aktívnych povrchov a hlavne zlou reprodukovateľnosťou ich prípravy.

V posledných rokoch je veľká pozornosť venovaná pevným SERS-aktívnym povrchom založeným na imobilizovaných koloidných nanočasticiach, pretože tieto povrchy spájajú výhody koloidov (relatívne presne definovaná veľkosť častíc) s výhodami pevných povrchov (stabilita a reprodukovateľnosť týchto povrchov a SERS spektier na nich meraných).

V svojej práci som sa zaoberal pevnými povrchmi pripravenými imobilizáciou strieborných nanočastíc na sklo, ktoré na rozdiel od zlatých, neboli doteraz príliš študované ani používané. Charakter mojej diplomovej práce bol z veľkej časti metodický. Vzhľadom k tomu, že príprava týchto povrchov nie je triviálna ani rutinná záležitosť, mala moja diplomová práca dva hlavné ciele: nielen štúdium biomolekúl prostredníctvom SERS spektroskopie na pevných povrchoch, ale aj nájdenie optimálneho spôsobu ich prípravy.

⁸ Tento pomer závisí hlavne na čase, ktorý uplynul od pridania porfyrínu.

Ideálny SERS-aktívny povrch by mal byť stabilný, homogénny a jeho príprava by mala byť dobre reprodukovateľná (a samozrejme by mali byť stabilné, homogénne a dobre reprodukovateľné aj spektrá z neho). Pretože je príprava týchto povrchov časovo veľmi náročná, dodatočným kritériom môže byť aj jej zjednodušenie.

Cieľom bolo teda nájsť spôsob prípravy, pomocou ktorého by sme získali povrchy s týmito vlastnosťami. Medzi nami študované parametre prípravy patril typ použitého strieborného koloidu, typ a koncentrácia silanu a dĺžka jednotlivých krokov prípravy.

Pri samotnom SERS štúdiu biomolekúl sme sa zamerali na porfyríny ako veľmi významné biomolekuly. Tie sme si vybrali nielen kvôli tomu, že sú veľmi vhodné na SERS štúdium, ale hlavne kvôli ich širokému uplatneniu v biomedicíne. Konkrétne sme sa rozhodli študovať TMPyP ako reprezentanta kladne nabitých porfyrínov, TSPP ako reprezentanta záporne nabitých porfyrínov a TPP ako reprezentanta porfyrínov vo vode nerozpustných.

Očakávali sme, že na strieborných nanočasticiach prebehne metalácia porfyrínov a my získame SERRS spektrá ich metalovanej formy. Výsledky experimentov však ukázali, že sa v skutočnosti na týchto povrchoch vyskytujú vo neporušenej free-base forme, čo samo o sebe je veľmi zaujímavé, pretože SERS štúdium free-base porfyrínov v strieborných koloidoch je práve v dôsledku rýchlej metalácie veľmi problematické. A preto v priebehu experimentov vznikol tretí cieľ práce – vysvetliť, prečo je to tak.

III Experimentálna časť

4 Postup prípravy vzoriek

4.1 Použité chemikálie

Pri experimentoch a ich príprave sme použili tieto chemické látky:

- deionizovanú vodu so špecifickým odporom 18 MΩ.cm v experimentoch pri príprave vzoriek, pri príprave povrchov a pri umývaní sklenených nádob (v niektorých fázach umývania sme bolo postačujúce použitie destilovanej vody, kde sme použili ju);
- kyseliny 96% H₂SO₄, 30% H₂O₂, 35% HCl a 65% HNO₃ (všetky vyrobené firmou Lachema p.a.) na umývanie sklenených nádob a sklíčok;
- dusičnan strieborný AgNO₃, citronan sodný C₆H₅O₇Na₃·2H₂O, borohydrid sodný NaBH₄, (všetky vyrobené firmou Sigma–Aldrich) na prípravu citrátového a borohydridového koloidu;
- 97% 3-aminopropyltrimetoxysilan APTMS, 97% 3-merkaptopropyltrimetoxysilan MPTMS (Sigma–Aldrich) na silanizáciu a 99,8% metanol (Sigma–Aldrich) na silanizáciu a umývanie sklíčok;
- 5,10,15,20-tetrakis(1-metyl-4-pyridyl)porfyrín TMPyP; 5,10,15,20-tetrafenylporfyrintetrasulfonic acid TSPP a 5,10,15,20-tetrafenylporfyrín TPP (Sigma–Aldrich)

4.2 Umývanie sklenených nádob

Vzhľadom k tomu, že koloidy sú nestabilné a pridanie veľmi malého množstva nevhodnej látky môže spôsobiť ich agregáciu, sme použité sklenené nádoby umývali stále veľmi dôkladne v troch fázach:

- 1) Organických nečistôt sme sa zbavovali použitím „pyrane“, t.j. zmesi H_2SO_4 a H_2O_2 v pomere 4:1.
- 2) Kovové nečistoty sme odstránili použitím lúčavky kráľovskej, t.j. zmesi HCl a HNO_3 v pomere 3:1.
- 3) Nakoniec sme nádoby dôkladne prepláchli v deionizovanej vode.

4.3 Príprava koloidov

Strieborný borohydridový koloid sa pripravuje redukciou AgNO_3 redukčným činidlom NaBH_4 za zníženej teploty. [42] My sme postupovali takto:

- 1) Navážili sme 6,76 mg AgNO_3 , rozpustili ho v 18 ml deionizovanej vody a roztok dali ochladiť do chladničky.
- 2) Navážili sme 3,5 mg NaBH_4 a rozpustili ho v 75 ml deionizovanej vody. Tento roztok sme nechali ochladiť na 2 °C.
- 3) Kadičku s roztokom NaBH_4 sme umiestnili na magnetickú miešačku a za stáleho miešania sme doňho po kvapkách napipetovali sme 9 ml roztoku AgNO_3 .
- 4) Miešanie na magnetickej miešačke pokračovalo ešte asi 45 minút – kým sa teplota koloidu nezvýšila na izbovú teplotu.

Strieborný citrátový koloid sa pripravuje redukciou citrónanu sodného. V tomto prípade prebieha redukcia pri zvýšenej teplote [68] a postup prípravy je nasledovný:

- 1) Naváži sa 18 mg AgNO_3 , rozpustí sa v 100 ml deionizovanej vody a roztok sa privedie k varu.
- 2) Pripraví sa 1% roztok citrónanu sodného v deionizovanej vode.
- 3) Do kadičky s roztokom AgNO_3 sa napipetuje sme 2 ml roztoku citrónanu sodného.
- 4) Tento roztok sa varí ešte asi 1 hodinu a potom sa nechá ochladiť na izbovú teplotu.

4.4 Príprava SERS-aktívnych povrchov

Na prípravu SERS-aktívnych povrchov sme používali sklíčka rozmerov 1 cm x 2 cm. Po dôkladnom umytí sme sklíčka silanizovali, približne 30 minút v zvislej polohe.

Silanizácia prebiehala vo väčšine prípadov pomocou teflonového držiaka v sklenenej vaničke v 10% roztoku organosilanu (APTMS, resp. MPTMS) v metanole. Použitie teflonového držiaka umožňuje silanizáciu až 20 sklíčok naraz. V prípade zisťovania toho, aká koncentrácia silanu je najvýhodnejšia, prebiehala silanizácia v niekoľkých skúmavkách a v každej bola koncentrácia silanu iná. Po silanizácii sme sklíčka dôkladne prepláchlí. Dôležité je hlavne prepláchnutie v metanole, aby sme zbavili sklíčko neuchytených molekúl silanu. Už nepatrné množstvo silanu spôsobuje agregáciu koloidu.

Imobilizácia strieborných nanočastíc prebiehala v skúmavkách, do ktorých sme odpipetovali 1 ml koloidu a v zvislej polohe ponorili nasilanizované sklíčka. Nechali sme ich tam niekoľko hodín (väčšinou cca 5 hodín, v niektorých špeciálnych prípadoch aj niekoľko dní). Silanizácia, rovnako ako aj ponorenie do koloidu, prebiehalo na oboch stranách sklíčok a teda aj kovové nanočastice sa nachádzajú na obidvoch stranách. Takto pripravené povrchy je možné skladovať rôznymi spôsobmi. Je možné ich nechať v koloide do ktorého sú ponorené. Vtedy ale môžu nastať problémy v prípade, keď koloid „vypadne“. Preto je lepšie sklíčka z koloidu vybrať, opláchnuť a umiestniť ich buď suché do prázdnych skúmaviek alebo do skúmaviek s deionizovanou vodou. My sme ich vo väčšine prípadov umiestňovali do prázdnych skúmaviek.

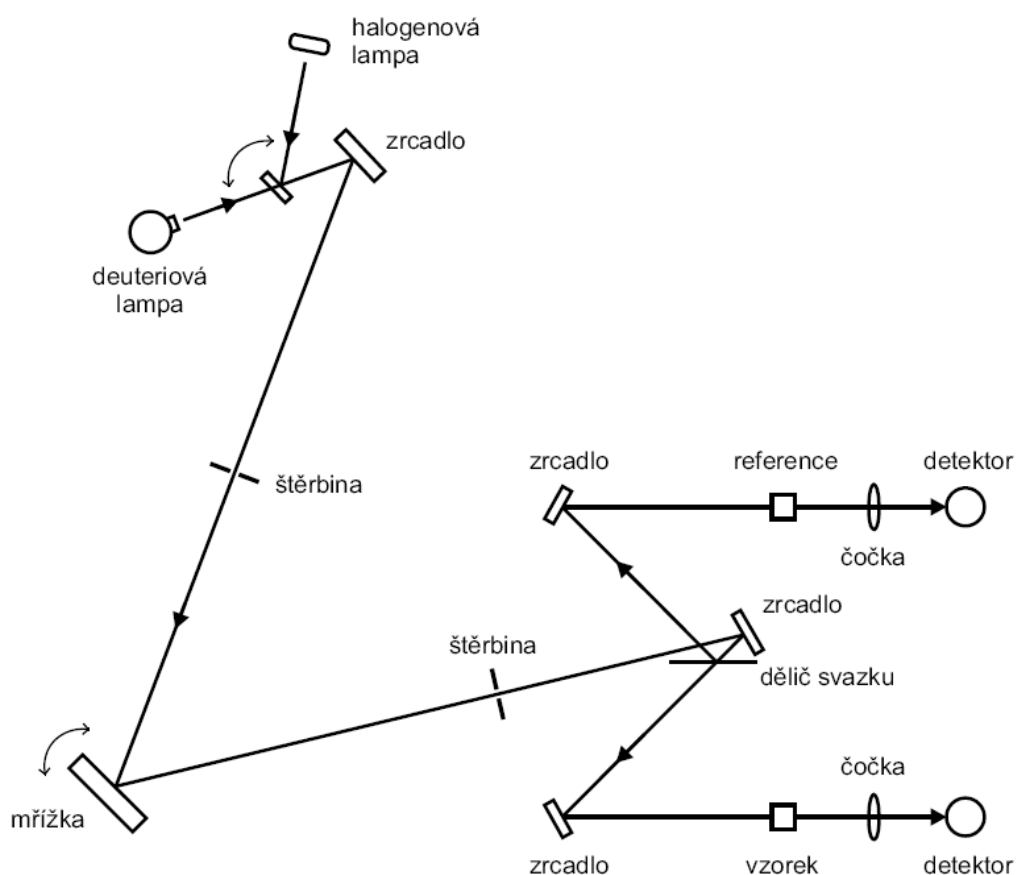
Treba snáď ešte dodať, že prečo silanizácia prebiehala tak, že v silane bolo ponorených naraz viac sklíčok, zatiaľ čo ponorenie nasilanizovaného sklíčka prebiehalo jednotlivo pre každé sklíčko. Koloid je nestabilný a jeho znehodnotenie môže zapríčiniť napr. zvyšok silanu zo sklíčka. V prípade, že sa to stane v skúmavke s jedným sklíčkom, príjdeme len o toto sklíčko. V prípade, že by sme všetky nasilanizované sklíčka ponorili do jedinej nádoby, jednak by sme veľmi zvýšili pravdepodobnosť vypadnutia koloidu a k tomu by sme v tom prípade prišli o všetky sklíčka.

5 Použité experimentálne zariadenia

5.1 UV-VIS absorbčná spektroskopia

Koloid je možné charakterizovať veličinou extinkcia. Jedná sa v podstate o zobecnenie pojmu absorbcia. Absorbciou (resp. absorbným koeficientom) môžeme charakterizovať látky absorbujúce svetlo. Kovový koloid ale svetlo neabsorbuje, v prevažnej miere sa jedná o rozptyl svetla. V tomto prípade už nehovoríme o absorpcii, ale o extinkcii (ktorá zahrňuje absorpciu aj rozptyl svetla) a extinkčnom koeficiente. Extinkčné spektrá koloidov sme merali v kvete širokej 0,2 cm.

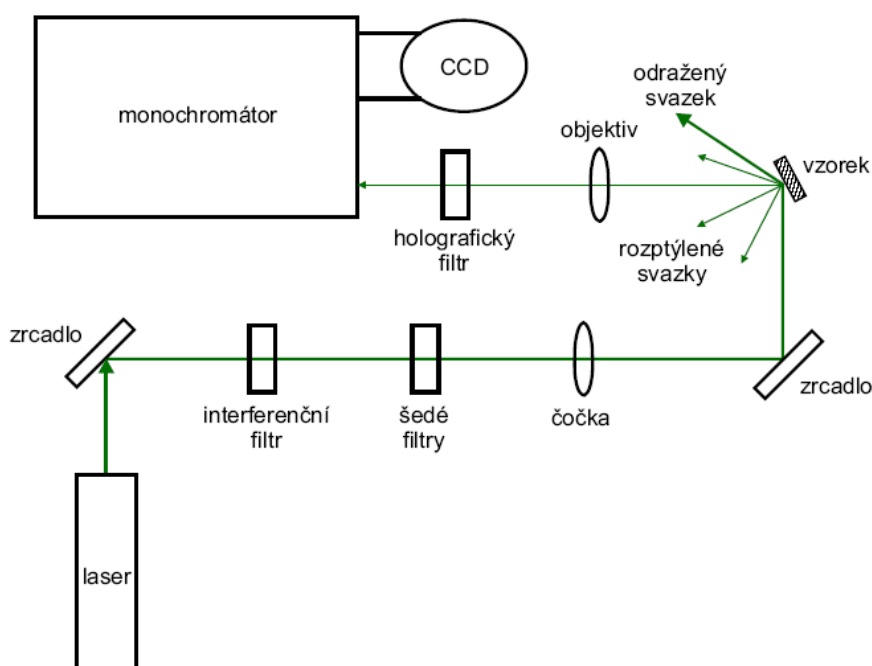
SERS povrchy pripravené na sklíčkach sme charakterizovali extinkčnými spektrami. Všetky merania prebiehali pri izbovej teplote. Extinkčné spektrá sme merali na spektrometri Perkin Elmer Lambda 12. Jeho schému znázorňuje nasledujúci obrázok:



Obrázok 5-1: Schéma spektrometra Perkin Elmer Lanbda 12. Prevzaté z [25].

Tento spektrometer používa dva zdroje žiarenia – halogénovú lampu pre viditeľnú oblasť spektra a deutériovú výbojku pre ultrafialovú oblasť. Meranie prebieha tak, že po vybraní zdroja žiarenia sa pomocou mriežky vyberie konkrétna vlnová dĺžka a pre ňu sa zmeria absorbancia. Jedná sa o dvojpaprskový spektrometer, t.j. po vybraní požadovanej vlnovej dĺžky je paprsok rozdelený na dve. Prvý paprsok prechádza pred vstupom do detektora vzorkou, druhý referenciou. Z týchto dvoch hodnôt sa získa extinkčné spektrum. My sme ako referenciu používali prázdny priestor, spektrá sme snímali rýchlosťou 240 nm/min s krokom 1 nm.

5.2 Meranie Ramanovho rozptylu



Obrázok 5-2: Schéma aparatury pre meranie Ramanovho rozptylu. Prevzaté z [25]

Obrázok 5-2 znázorňuje z čoho sa skladala použitá aparatura:

Zdroj žiarenia bol Ar^+ laser INNOVA 300 firmy Coherent.

Zrkadlá na ceste laserového lúča boli použité z praktických dôvodov (priestorové možnosti laboratória), všetko by fungovalo rovnako dobre aj keby sme nepoužili žiadne zrkadlo a laser by svietil priamo smerom do monochromátora.

Interferenčný filter slúžil k odstráneniu plazmových pásov laseru.

Šedé filtre slúžia k zníženiu intenzity laserového žiarenia, v niektorých prípadoch sme ich používali, vo väčšine však nie.

Šošovka slúžila na zaostrenie laserového zväzku na vzorku.

Na vzorke sa väčšina laserového lúča odrazila, tento odraz sme nasmerovali na tienidlo. Rozptýlené svetlo sa obsahovalo nielen Ramanovsky rozptýlené žiarenie, ale aj žiarenie rozptýlené elastickým rozptylom. Toho sme sa zbavili pomocou **holografického filtru**.

Objektívom bolo žiarenie nasmerované na vstupnú štrbinu monochromátoru. Detekcia prebiehala pomocou **CCD detektoru**, ktorý bol kvôli zvýšeniu citlivosti chladený na -120°C kvapalným dusíkom.

Pri meraní spektier sme používali žiarenie s vlnovou dĺžkou 514,5 nm. Intenzita laseru (v mieste vzorky) bola vo väčšine prípadov cca 150 mW, v niektorých prípadoch sme ju znížili pomocou šedých filtrov na cca 20 mW. Štrbinu monochromátora sme mali nastavenú na šírku 100 µm. Spektrum je v skutočnosti súčet niekoľkých spektier (tento počet nazývame počet akumulácií), z ktorých každé bolo snímané určitý čas. Vo väčšine prípadov sme snímali 60 akumulácií po 5 sekúnd. Každé spektrum sme okalibrovali porovnaním so signálom z ortuťovej výbojky v programe NEOKALSPEX1b.

5.3 Elektrónová mikroskopia

Extinkčné spektrá nám síce o nami pripravených povrchoch poskytnú určité informácie, no elektrónová mikroskopia nám priamo umožní vidieť, aké veľké sú strieborné nanočastice uchytené na sklenom povrchu rovnako ako aj to, ako sú usporiadané.

Elektrónová mikroskopia je všeobecne známa metóda. Preto ju tu nejdeme popisovať podrobnejšie a v prípade záujmu sa s jej princípmi čitateľ môže oboznámiť napr. v [2].

My sme tiež charakterizovali nami pripravené povrchy aj pomocou elektrónovej mikroskopie. Skeny pre naše účely zhotovil RNDr. Miroslav Šlouf z Ústavu Makromolekulárnej Chémie Akadémie Vied Českej Republiky použitím prístroja Quanta 200 FEG firmy FEI. Vzorky boli nepokované. Prístroj pracoval v režime LowVac pri tlaku 60 Pascalov a použití sekundárnych elektrónov.

IV Výsledky a diskusia

6 Príprava a charakterizácia SERS-aktívnych povrchov

Prvým krokom bola príprava a charakterizácia SERS aktívnych povrchov. Rozhodli sme sa používať strieborné častice imobilizované na sklenom povrchu (viz. kapitola 3.2.4). Snažili sme sa nájsť rutinný spôsob prípravy, ktorý by viedol k čo najreprodukovateľnejším SERS povrchom, t.j. povrchy získané pomocou tohto postupu by mali mať veľmi podobné vlastnosti.⁹ Napriek tomu, že príprava daných povrchov je popísaná v niekoľkých článkoch (viz. kapitola 3.2.4), väčšinou sa jedná o imobilizáciu zlatých nanočastíc [74,90], zatiaľ čo strieborné boli používané len zriedkakedy [42,68] Preto sme vychádzali predovšetkým zo súčasných poznatkov iných autorov o príprave zlatých povrchov a pokúšali sa ich aplikovať na povrchy strieborné. Konkrétne sme uvažovali vplyv týchto faktorov:

- použitý koloid (citrátový alebo borohydridový)
- použitý silan (MPTMS alebo APTMS)
- faktor času – to, ako ovplyvní dĺžka niektorej fázy prípravy vlastnosti výsledných SERS aktívnych povrchov
- koncentrácia použitého silanu

Príprava sklíčok je proces relatívne zdĺhavý a závislý na mnohých faktoroch. Napriek maximálnej snahe sme sa nedokázali vyhnúť tomu, že v niektorých prípadoch sa príprava nepodarila (na sklíčka sa častice striebra nenachytali)¹⁰. Z týchto dôvodov nebolo možné pripraviť štatisticky dostatočné množstvo vzoriek. Rovnako nemožný by bol pokus pripraviť sklíčka toľkými spôsobmi, koľko ponúka množstvo nami skúmaných parametrov. Preto sme postupovali tak, že sme stále skúmali vplyv len jedného parametru, pričom ostatné boli konštantné – také, ktoré sme na základe preštudovanej literatúry a minulých poznatkov považovali za optimálne.

⁹ Dôvod je jednoduchý: pre jednu konkrétnu aparáturu SERS spektrum skúmanej látky vypovedá nielen o danej látke, ale aj o použitom SERS-aktívnom povrchu. Napr. dvakrát intenzívnejšie spektrum nemusí vypovedať o dvakrát vyššej koncentrácii skúmanej látky, ale môže sa jednať o použitie povrchu, ktorý viac zosilňuje Ramanovské žiarenie.

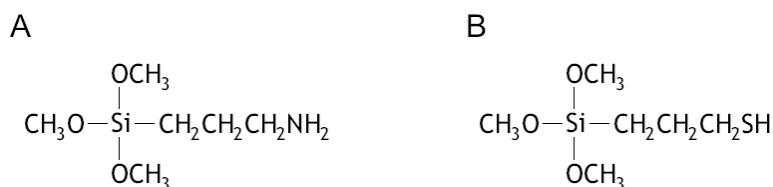
¹⁰ To bolo spôsobené väčšinou „vypadnutím“ koloidu.

6.1 Vplyv použitého koloidu

Pre účely SERSu sme uvažovali nad dvoma typmi koloidov: citrátovým a borohydridovým. Na prípravu SERS sklíčok sme na začiatku používali citrátový koloid. Bohužiaľ po zmeraní niekoľkých SERS spektier sme zistili, že tieto povrchy vykazujú svoj vlastný silný Ramanovský signál, konkrétne sa jednalo o signál grafitického uhlíka. (viz. obr. 8-1) Vzhľadom k tomu, že tvorba grafitického uhlíku je veľmi rýchla a účinná (čo sa u pevných povrchov dá očakávať), nebolo možné pomocou týchto povrchov získať SERS spektrá študovaných látok. Z tohto dôvodu je použitie citrátového koloidu nevhodné a my sme sa rozhodli ďalej používať na SERS experimenty len koloid borohydridový.

6.2 Vplyv použitého silanu

Predpokladá sa, že pri procese silanizácie silan stráca koncovú skupinu a vytvára sa väzba O–Si–O medzi silanom a skleneným substrátom, zatiaľ čo funkčná skupina zostáva orientovaná smerom do roztoku. V prípade APTMS je to skupina –NH₂, v prípade MPTMS je so skupina –SH.



Obrázok 6-1: (A) molekula APTMS, (B) molekula MPTMS

Na základe publikovaných prác [74,75,91] sme očakávali, že APTMS bude na prípravu povrchov vhodnejší. V prípade APTMS sme predpokladali, že protónovaná kladne nabitá aminoskupina bude dobre viazať kovové častice (ktoré sú záporne nabité kvôli iónom na povrchu) prostredníctvom elektrostatickej iónovej interakcie. Počas experimentovania sa nám podarilo pripraviť sklíčka pomocou oboch silanov, no účinnejšia sa javila príprava pomocou MPTMS. Preto sme hľadanie optimálneho spôsobu prípravy prevádzali pomocou MPTMS a zistené výsledky sme aplikovali na APTMS.

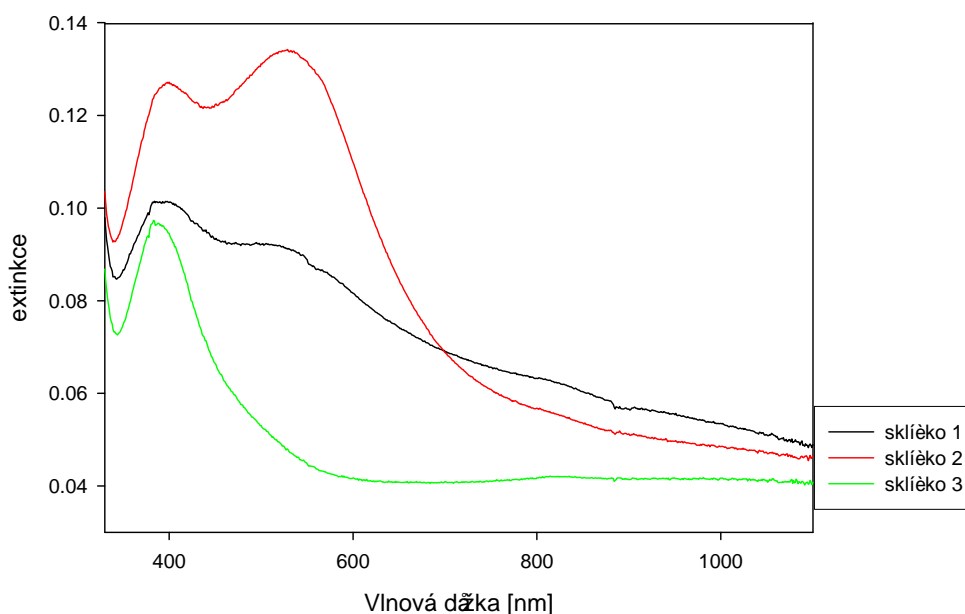
Podobného názoru boli aj autori publikácií [73,92], ktorí tiež používali MPTMS.

6.3 Vplyv dĺžky času jednotlivých krokov prípravy

V tejto fáze hľadania optimálneho spôsobu prípravy SERS sklíčok už bolo naše skúmanie obmedzené na imobilizáciu strieborných častíc z borohydridového koloidu pomocou MPTMS. Ďalším krokom bolo určenie optimálneho spôsobu z hľadiska času. Zjednodušene môžeme prípravu sklíčok opísať ako dej pozostávajúci z dvoch krokov: ponorenie čistých sklíčok do silanu a ponorenie nasilanizovaných sklíčok do koloidu. Pre oba kroky je potrebné stanoviť čas, ako dlho by mali prebiehať. Na začiatku som volil koncentráciu silanu a dobu silanizácie aj dobu ponorenia nasilanizovaných sklíčok do koloidu takú, aká bola publikovaná článkoch o úspešných prípravách zlatých povrchov [74,90], t.j. 10% koncentráciu silanu v metanole, dobu silanizácie 30 minút a dobu ponorenia nasilanizovaných sklíčok v koloide niekoľko (cca 4 – 6) hodín.

Na začiatku som sa pokúsil zistiť optimálnu dobu silanizácie sklíčok. Po niekoľkých pokusoch som prišiel k záveru, že na dobe silanizácie v určitom rozmedzí (cca 20 minút – 50 minút) prakticky nezáleží. Pre dlhšie doby silanizácie sú výsledky horšie, na sklíčka silanizované niekoľko hodín (cca 1 hodinu – 3 hodiny) sa nachytalo menej strieborných nanočastíc z koloidu ako na sklíčka silanizované kratšiu dobu. Vysvetlenie tohto zdanlivého paradoxu spočíva pravdepodobne v tom, že v prípade dlhej doby silanizácie prebieha oxidácia –SH skupín, ktoré týmto strácajú schopnosť viazať kovové nanočastice. Na základe týchto pokusov som sa rozhodol silanizovať sklíčka približne 40 minút a tento čas som dodržiaval vo všetkých ďalších prípravách.

Ďalej som potreboval zistiť optimálnu dobu ponorenia nasilanizovaných sklíčok do koloidu. Tá nemôže byť príliš krátka (aby sa na sklíčka stihli nachytať strieborné nanočastice), no ani príliš dlhá (aby v koloide neprebehli príliš veľké zmeny, napr. príliš silná agregácia). Všimnime si teraz vplyv agregácie na extinkčné spektrá SERS substrátov:

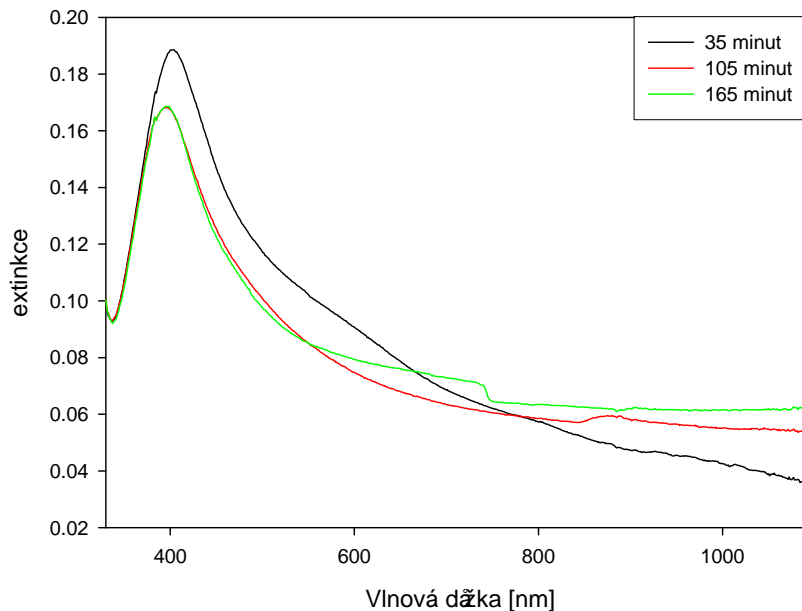


Obrázok 6-2: Vzhľad extinkčných spektier SERS substrátov vzhľadom k agregácii.

Maximum absorpčného pásu sklíčka č. 3 (približne 400 nm) odpovedá substrátu, ktorý vznikol z neagregovaných častíc. Vidíme, že graf znázorňujúci extinkčný koeficient vzorky č. 2 má 2 maximá (okolo 400 nm a okolo 550 nm). To odpovedá dvom typom častíc, z ktorých vznikol substrát – neagregované (izolované) častice (400 nm) a zagregované (resp. vzájomne interagujúce) častice (550 nm). Na začiatku sa na sklíčko prichytia neagregované častice. Postupne ako ich pribúda, sa častice môžu dostávať bližšie k sebe. Výsledkom je plynulé rozšírenie (ale len smerom doprava!) pásu odpovedajúceho neagregovaným časticiam (čo dokumentuje sklíčko č. 1). Samozrejme nie je možné vylúčiť v niektorých prípadoch i prichytenie niektorých agregátov vytvorených priamo v koloide.

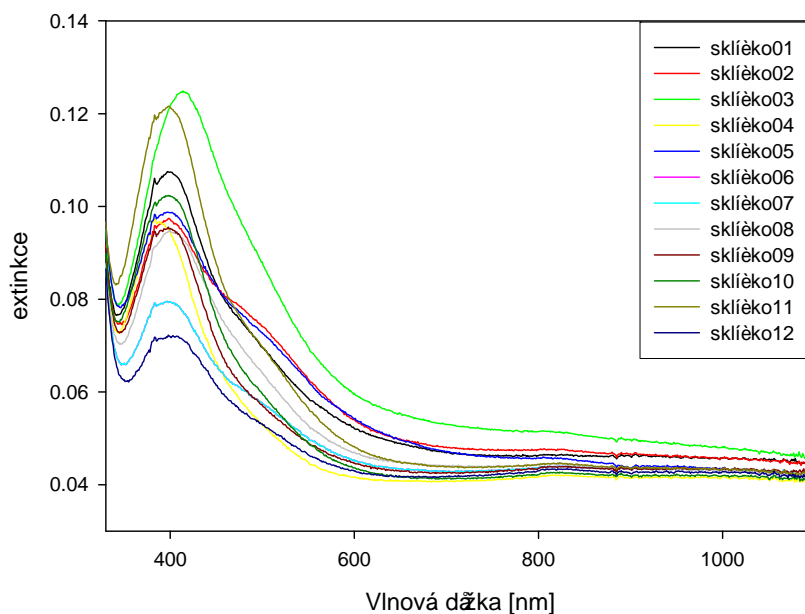
Preto som sa rozhodol preskúmať, ako sa menia extinkčné spektrum nasilanizovaných sklíčok ponorených do koloidu v závislosti na čase. Postupoval som tak, že som nasilanizované sklíčko ponoril na nejakú dobu do koloidu, premeral jeho extinkčné spektrum a vrátil som ho do koloidu. Po nejakom čase som premeral extinkčné spektrum znovu. Toto som spravil pre niekoľko sklíčok, pričom som sledoval zmeny v ich extinkcii v priebehu 3 hodín. Tento postup ale nebol ideálny z dvoch dôvodov. 1. Ako sa ukázalo, tri hodiny nie sú dostatočným časovým intervalom na to, aby sa podstatne zmenilo extinkčné spektrum sklíčka (napr. v dôsledku agregácie). 2. Vyberaním a opätovným ponáraním

sklíčka do koloidu môžeme narušiť priebeh silanizácie, napríklad sa môžu oxidovať –SH skupiny silanu prichyteného na skle. Pre ilustráciu uvádzam časový priebeh extinkčných spektier z jedného sklíčka (obr. 7-3).

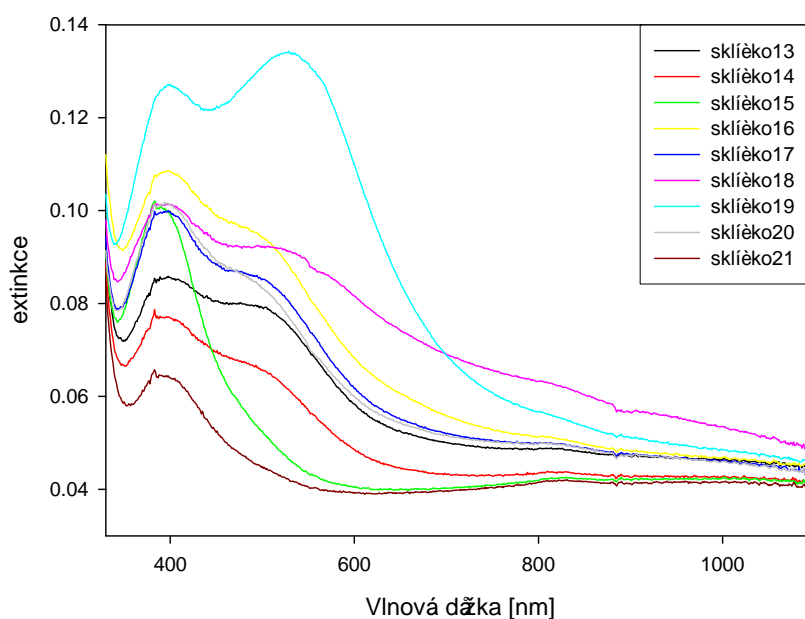


Obrázok 6-3: Závislosť extinkčného spektra SERS substrátu na čase ponorenia do koloidu.

Preto som sa rozhodol, že preskúame ako sa prejaví rozdiel medzi štandardnou dobou ponorenia (t.j. niekoľko hodín) a dobou ponorenia výrazne dlhšou. Štandardným postupom som pripravil 21 sklíčok. Po silanizácii som všetky sklíčka ponoril do koloidu. Sklíčka 01 až 12 som vybral z koloidu po 6 hodinách, sklíčka 13 až 21 ostali v koloide 74 hodín. Potom som ich vybral a premeral som ich extinkčné spektrá.



Obrázok 6-4: Extinkčné spektrá sklíčok namočených do koloidu 6 hodín.



Obrázok 6-5: Extinkčné spektrá sklíčok namočených do koloidu 74 hodín.

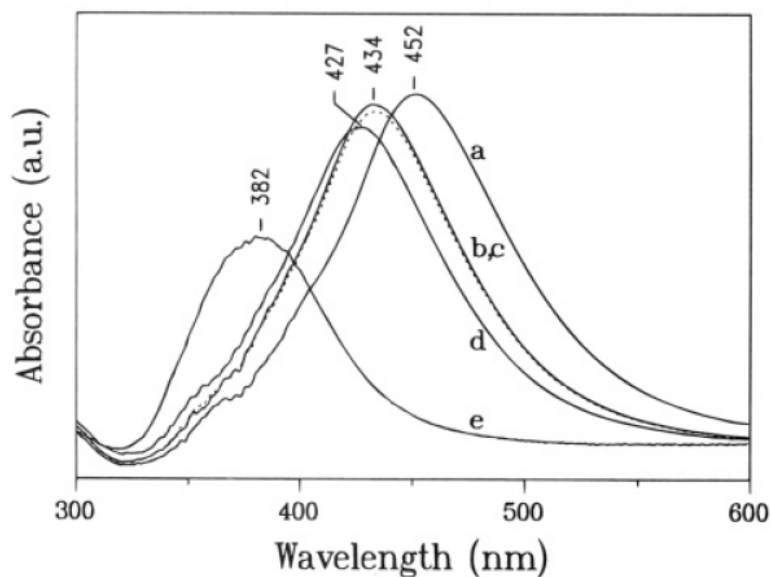
Z grafov vidíme, že náš predpoklad sa potvrdil.

Extinkčné spektrá na obrázku 6-4 vypovedajú o tom, že sa na sklíčkach prichytili neagregované častice, resp. že agregácia prebehla v malej miere.

Obrázok 6-5 zase vypovedá o tom, že v prípade dlhšieho ponorenia do koloidu sa na sklíčka vyskytuje i väčšie množstvo vzájomne interagujúcich či agregovaných častíc.

Za zmienku stojí povšimnutie, že aj v prípade výrazne dlhšej doby ponorenia sa nezvýšila extinkcia sklíčok pri vlnovej dĺžke cca 400 nm. 6 hodín preto môžeme považovať za čas, pri ktorom už systém prešiel do stavu, kedy sa už na sklíčka nenachytá viac neagregovaných častíc.

Naše výsledky môžeme porovnať s výsledkami iných autorov, napríklad [73]. Ich výsledky znázorňuje nasledujúci obrázok.



Obrázok 6-6: Absorbčné spektrum sklíčka s imobilizovanými kovovými časticami ponoreného do:
(a) benzénu
(b) hexánu
(c) 2-propanolu (bodkovaná čiara)
(d) vody
(e) vzduchu

Nám vyšlo maximum extincie okolo 400 nm (naše merania prebiehali na vzduchu), tvar spektier veľmi podobný ako ich. Treba si ale uvedomiť, že oni používali citrátový koloid (my sme používali borohydridový) a MPTMS rozpúšťali v 2-propanole s prídavkom vody (my sme používali metanol). Preto je prirodzené, nimi zistené maximum extincie sa odlišuje od nášho.

Hoci agregácia častíc môže byť výhodná vďaka posunu podmienok plazmónovej rezonancie do oblasti našej excitačnej vlnovej dĺžky (514.5 nm) a vyššiemu SERS zosilneniu, je zdrojom väčšej nereprodukovateľnosti prípravy strieborných povrchov. Preto sme sa rozhodli pri príprave ďalej používať približne 6-hodinovú dobu ponorenia nasilanizovaných sklíčok do koloidu, kde sa agregácia ešte príliš neprejavuje.

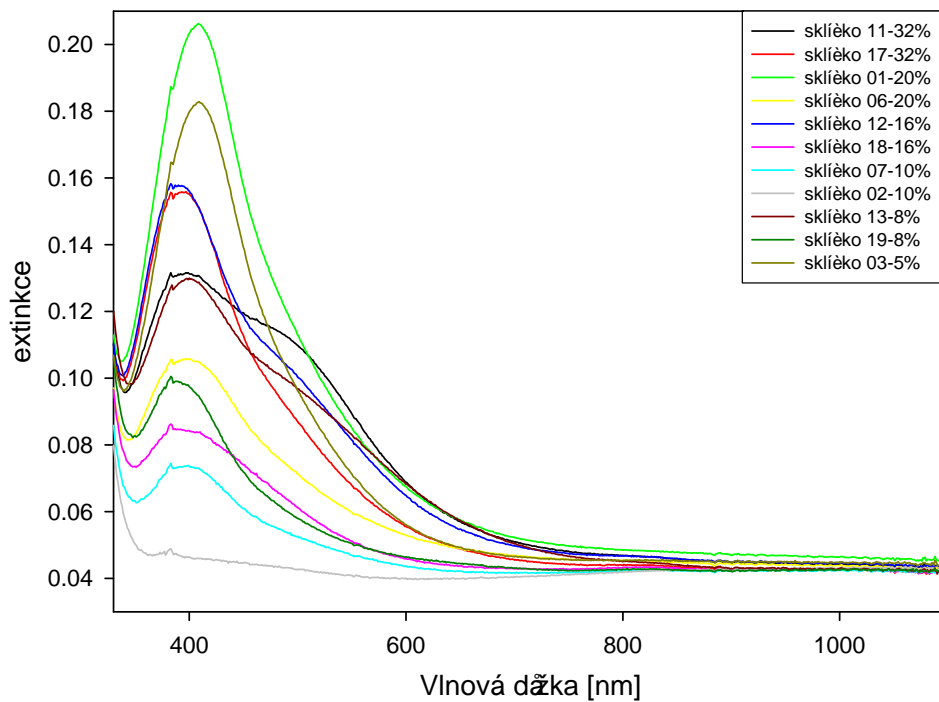
6.4 Vplyv koncentrácie použitého silanu

Vplyv koncentrácie použitého silanu som skúmal tak, že som pripravil 22 sklíčok štandardným postupom (umytie sklíčok, silanizácia v merkaptosilane trvajúca cca 40 minút a ponorenie do koloidu trvajúce cca 6 hodín). Ich príprava sa odlišovala len v koncentrácii použitého silanu. Zvolil som tieto koncentrácie (jedná sa o objemové koncentrácie, t.j. akú časť roztoku silan+metanol tvorí silan):

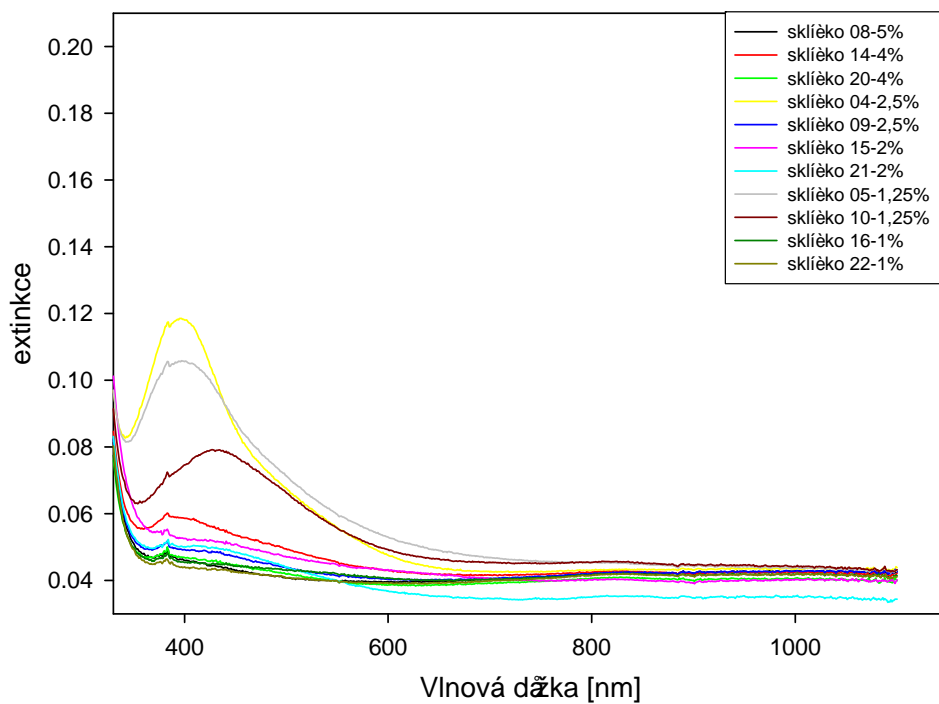
Koncentrácia	Sklička
32%	11, 17
20%	01, 06
16%	12, 18
10%	02, 07
8%	13, 19
5%	03, 08
4%	14, 20
2,5%	04, 09
2%	15, 21
1,25%	05, 10
1%	16, 22

Tabuľka 6-1: Rôzne koncentrácie silanu použité pri príprave sklíčok

Sklička som opäť charakterizoval pomocou extinkčných spektier. Tieto spektrá uvádzam v obrázkoch na nasledujúcej strane.



Obrázok 6-7: Extinkčné spektrá sklíčok pripravených pomocou koncentrovanejšieho silanu



Obrázok 6-8 Extinkčné spektrá sklíčok pripravených pomocou menej koncentrovaného silanu

Hoci je zrejmé, že príprava je bohužiaľ veľmi nereprodukovateľná (dve sklíčka pre tú istú koncentráciu silanu dávajú veľmi odlišné spektrá), dajú sa vypozerovať dva jasné závery:

1. Väčšia úspešnosť prípravy v prípade použitia koncentrovanejšieho silanu

Zatiaľ čo v prípade použitia koncentrovanejšieho silanu môžeme považovať prípravu za úspešnú v 10 prípadoch z 11 (sklíčko 02 považujeme za neúspech), v prípade použitia menej koncentrovanejšieho silanu sa nám podarilo pripraviť sklíčka vhodné na SERS len v 3 prípadoch z 11 (sklíčka 04, 05 a 10).

2. Kvalitnejšie sklíčka v prípade použitia koncentrovanejšieho silanu

Aj keď si ďalej budeme všimáť len úspešne pripravené sklíčka, stále sa javí použitie koncentrovanejšieho silanu výhodnejším. Takto pripravené sklíčka majú silnejšiu extinkciu, čo vypovedá o väčšom množstve imobilizovaných strieborných nanočastíc na ich povrchu. (Toto sa potvrdilo aj pri samotných SERS meraniach).

Celkovo môžeme vplyv koncentrácie použitého silanu zosumarizovať do nasledujúceho záveru:

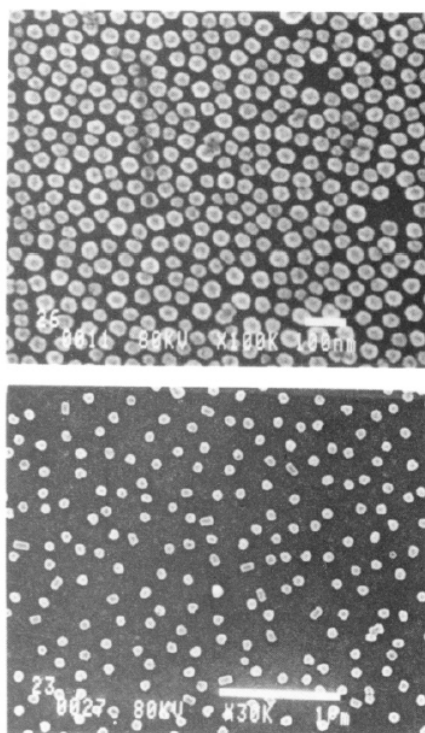
Pri príprave SERS aktívnych povrchov je možné použiť silan zriedený v širokej škále koncentrácií. My sme dokázali pripraviť vhodné povrchy už pomocou silanu koncentrácie 1,25%. Vhodnejšie sa ale javia byť vyššie koncentrácie (približne 10% a viac), pri ktorých je jednak vyššia úspešnosť prípravy povrchov a povrchy takto pripravené sú vhodnejšie na účely SERS. My sme ďalej používali na prípravu koncentráciu silanu približne 20%.

Pre túto koncentráciu sme sa rozhodli aj napriek tomu, že iní autori [73] používali koncentráciu približne 2,5%. Oni ale používali odlišný koloid a tiež MPTMS rozpúšťali v inom rozpúšťadle ako my, preto sa naše závery môžu odlišovať.

6.5 Charakterizácia SERS povrchov pomocou elektrónovej mikroskopie

Na základe nielen našich skúseností, ale aj v minulosti publikovaných výskumov sa zdá, že príprava strieborných povrchov je vo všeobecnosti menej účinná a problematickejšia ako príprava zlatých povrchov.

Toto potvrdzujú aj závery autorov [73], získané aj na základe elektrónovej mikroskopie. Ako znázorňuje nasledujúci obrázok, strieborné častice sú umiestnené relatívne ďaleko od seba (v porovnaní so zlatými časticami). To je spôsobené tým, že strieborné častice sa prichytávajú horšie a sú tam prichytenú menej stabilne.



**Obrázok 6-9: obraz sklíčok získaný pomocou elektronového mikroskopu
hore: imobilizované zlaté častice; dole: imobilizované strieborné častice
Prevzaté z [73].**

Toto vysvetlenie je podložené aj ďalším výsledkom práce [73]. Ten hovorí, že SERS povrchy pripravené týmito spôsobmi sú síce celkovo veľmi stabilné, no zlaté sú stabilnejšie ako strieborné – zatiaľ čo nebol zistený žiaden úbytok zlatých nanočastíc zo sklíčok, strieborných nanočastíc zo sklíčok s postupom času mierne ubúdalo.

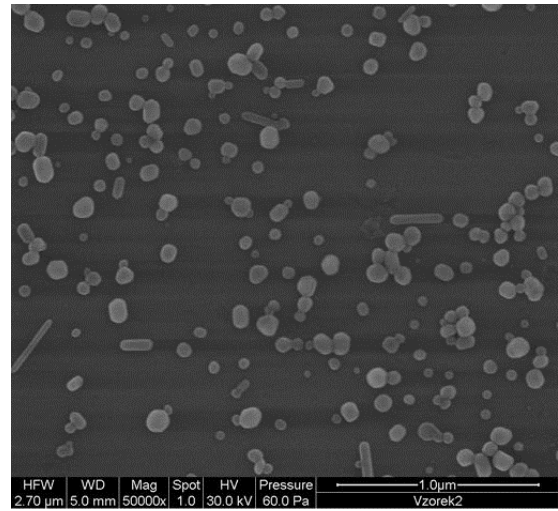
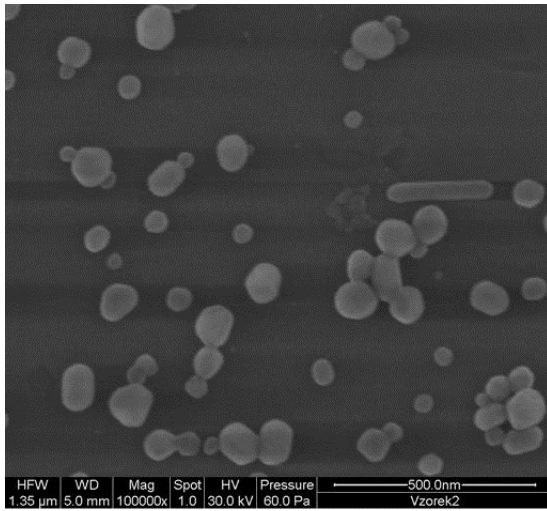
Vzhľadom k tomu, že sme počas experimentov používali prevažne povrchy pripravené z borohydridového koloidu, sme nechali spraviť skeny jedného povrchu pripraveného z citrátového koloidu a troch povrchov pripravených z borohydridového koloidu. Výsledky sú na obrázkoch 6-10 až 6-13 (stále pri dvoch rôznych zväčšeniach), pričom všetky údaje vrátane popisu vzorku sú v dolnom prúžku každého obrázku.

Tieto snímky potvrdzujú to, že strieborné nanočastice sú uchytené na skle relatívne ďalej od seba (v porovnaní so zlatými časticami z obr. 6-9).

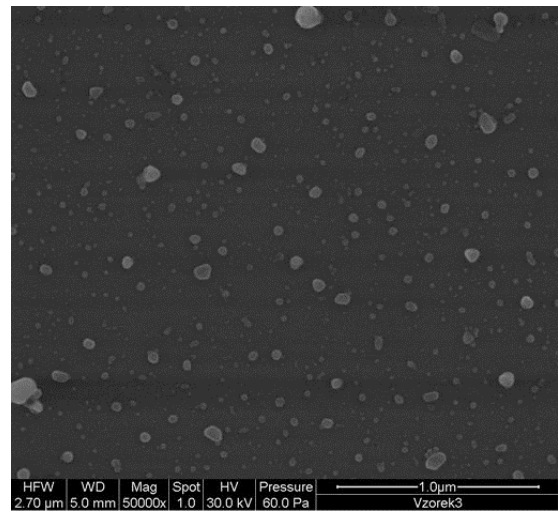
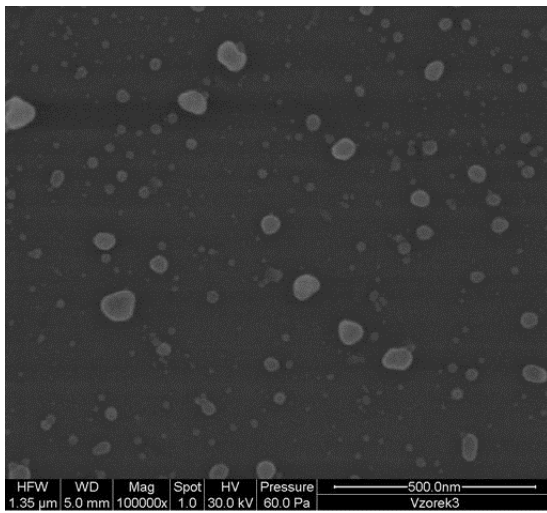
Celkovo sa dá z týchto obrázkov vypožorovať niekoľko vecí:

1. Nanočastice z citrátového koloidu sú väčšie ako nanočastice z borohydridového koloidu (vzorka 2 oproti ostatným vzorkám). Navyše je medzi nimi relatívne veľký podiel tyčinkovitých útvarov (to je typické pre citrátový koloid).
2. Sklíčka nie sú dobre reprodukovateľné – častice (ich veľkosť aj usporiadanie) z rôznych sklíčok pripravených z borohydridového koloidu sa odlišujú. (vzorky 3, 4 a 5)
3. V rámci jedného sklíčka je síce na rôznych miestach rôzne usporiadanie častíc, no ich veľkosť a tvar sú podobné (vzorka 5)
4. Na sklíčkach sa vyskytujú jednotlivé častice (resp. malé agregáty do desiatok častíc). Presne to sme predpokladali pre nami zvolený spôsob prípravy.

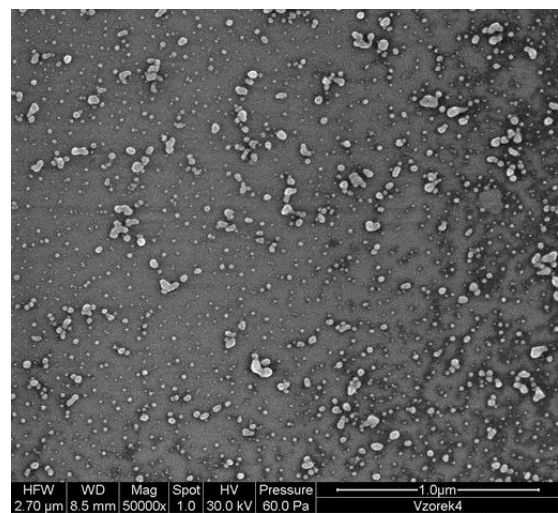
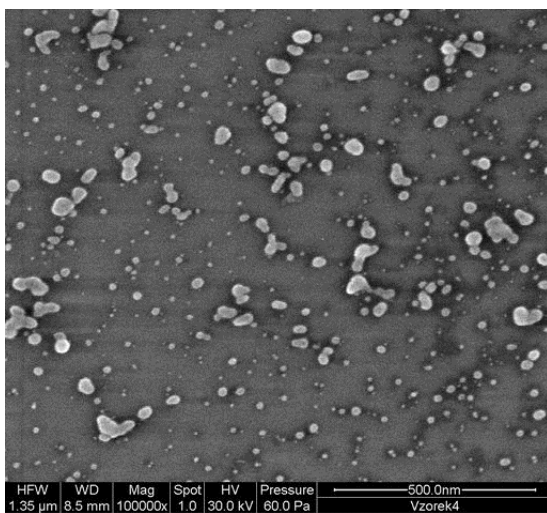
Mali by sme vysvetliť body 2) a 3). K tomu si stačí uvedomiť, že každé sklíčko bolo ponorené do koloidu oddelene v samostatnej skúmavke. Použili sme síce rovnaký koloid, no v rôznych skúmavkách mohla prebehnúť agregácia v rôznej miere a preto je výsledok taký, ako keby sme sklíčka ponárali do rôznych koloidov. Preto sú na rôznych sklíčkach rôzne typy častíc a na jednom sklíčku na rôznych miestach len jeden typ častíc.



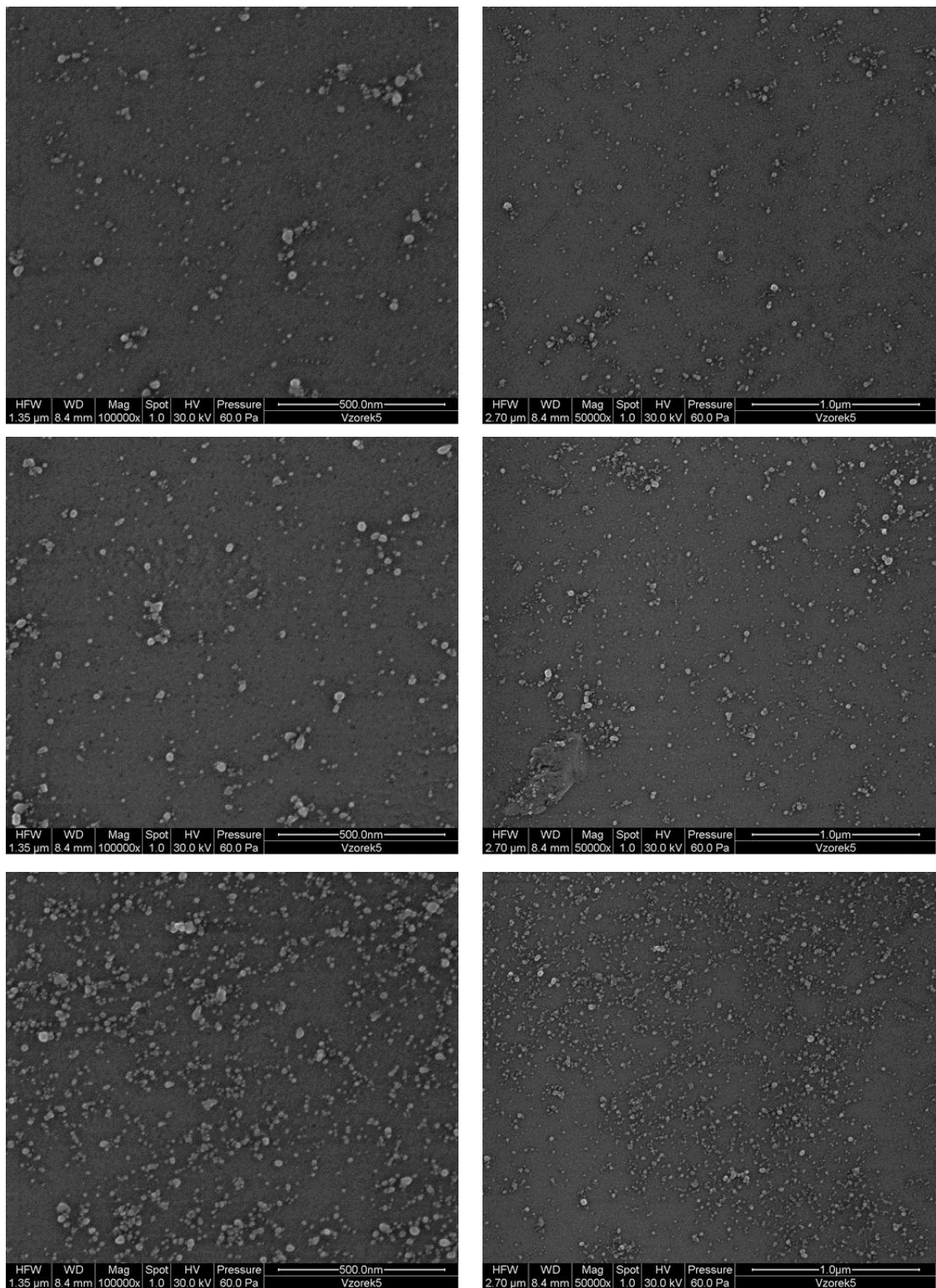
Obrázok 6-10: Snímok povrchu pripraveného z citrátového koloidu



Obrázok 6-11: Snímok povrchu pripraveného z borohydridového koloidu, vzorka 3



Obrázok 6-12: Snímok povrchu pripraveného z borohydridového koloidu, vzorka 4



Obrázok 6-13: Snímok z divoch rôznych miest povrchu pripraveného z borohydridového koloidu, vzorka 5

6.6 Zhrnutie výsledkov

Výsledky tejto kapitoly môžeme zhrnúť do popisu optimálneho spôsobu prípravy SERS-aktívnych povrchov získaných imobilizáciou strieborných nanočastíc na sklenenom substráte:

SERS-aktívne povrchy sa nám podarilo získať pomocou orohydridového aj citrátového koloidu. Sklíčka pripravené z citrátového koloidu však pri spektrálnych meraniach vykazovali veľmi silný signál grafitického uhlíka, čo ich robí nevhodnými pre účely SERS spektroskopie. Na imobilizáciu je možné používať merkaptosilan aj aminosilan. Vhodná doba ponorenia sklíčok do silanu je približne 30 až 40 minút. Úspešnosť prípravy rovnako ako aj kvalita sklíčok je ovplyvnená koncentráciou použitého silanu. Čím koncentrovanejší silan, tým lepšie výsledky, dostatočná je ale koncentrácia cca 20%, preto odporúčam používať túto koncentráciu. Optimálna doba ponorenia nasilanizovaného sklíčka do koloidu je cca 6 hodín. Dlhšie doby ponorenia (niekoľko dní) vedú k výskytu agregátov na sklíčku, čo je nežiadúce kvôli zlej reprodukovateľnosti prípravy. Takto pripravené sklíčka s imobilizovanými striebornými časticami je možné uskladňovať na vzduchu aj vo vode, sklíčka vykazujú veľkú stabilitu.

Vyššie popísaným postupom¹¹ sme dokázali pripraviť mnoho veľmi kvalitných sklíčok. Pri tomto procese však hrá veľkú úlohu aj náhodný faktor (resp. faktory nami neovplyvniteľné), a preto sa kvalita sklíčok získaných identickým postupom dosť odlišuje. Po príprave sklíčok odporúčam pretriediť ich na vhodné a menej vhodné pre účely SERS.

¹¹ Za zmienku stoja ešte dve poznámky praktického charakteru:

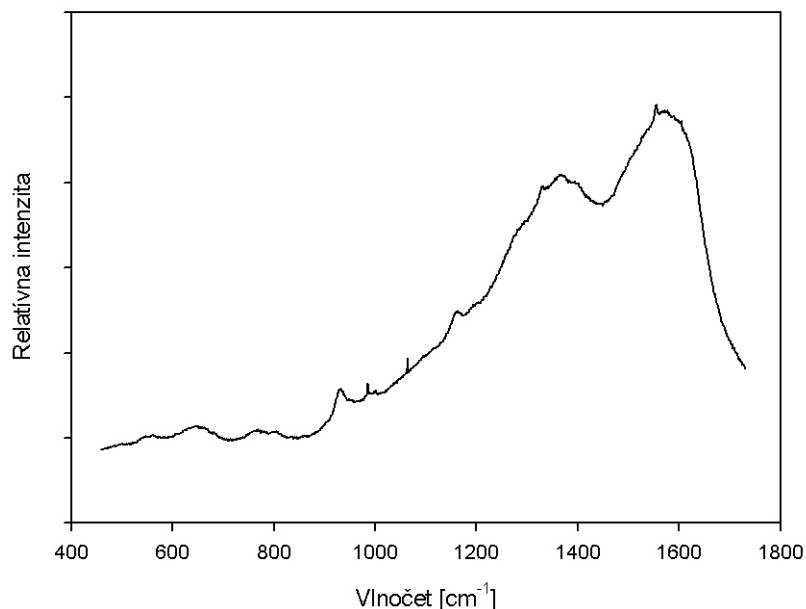
Po silanizácii je dôležité sklíčka veľmi dobre opláchnuť, aby sme ich zbavili všetkého nenaviazaného silanu. Už jeho veľmi malé množstvo spôsobí rýchlu agregáciu koloidu (a teda sa na sklíčka nenaviažu žiadne strieborné nanočastice). Silan sa samozrejme neviaže len na ponorené sklíčka, ale aj na steny sklenej nádoby v ktorej silanizácia prebieha. Toto je treba mať na pamäti hlavne pre nízke koncentrácie silanu a pre nádoby, kde je relatívne veľký povrch vzhľadom k objemu (napr. keď silanizácia sklíčka prebieha v skúmavke). V tomto prípade je vhodné skúmavku najprv vypláchnuť silanom.

7 Merania SERS spektier z povrchov

7.1 Merania na povrchoch pripravených z citrátového koloidu

Naše merania sme začali na sklíčkach pripravených z citrátového koloidu pomocou aminosilanu. Spektrá látok, ktoré sme začali premeriavať, nevyzerali tak, ako sme očakávali.

Uvedomili sme si, že sa pravdepodobne jedná o grafitický uhlík. Ten vzniká zmenou chemickej štruktúry citrátových molekúl prichytených na povrchu strieborných nanočastíc po ožiarení intenzívnym laserovým žiarením. Spektra získaná z týchto meraní naozaj odpovedali známym spektrám grafitického uhlíka.[93] Preto sme premerali spektrum čistého povrchu bez porfyrínu. To je na nasledujúcom obrázku.



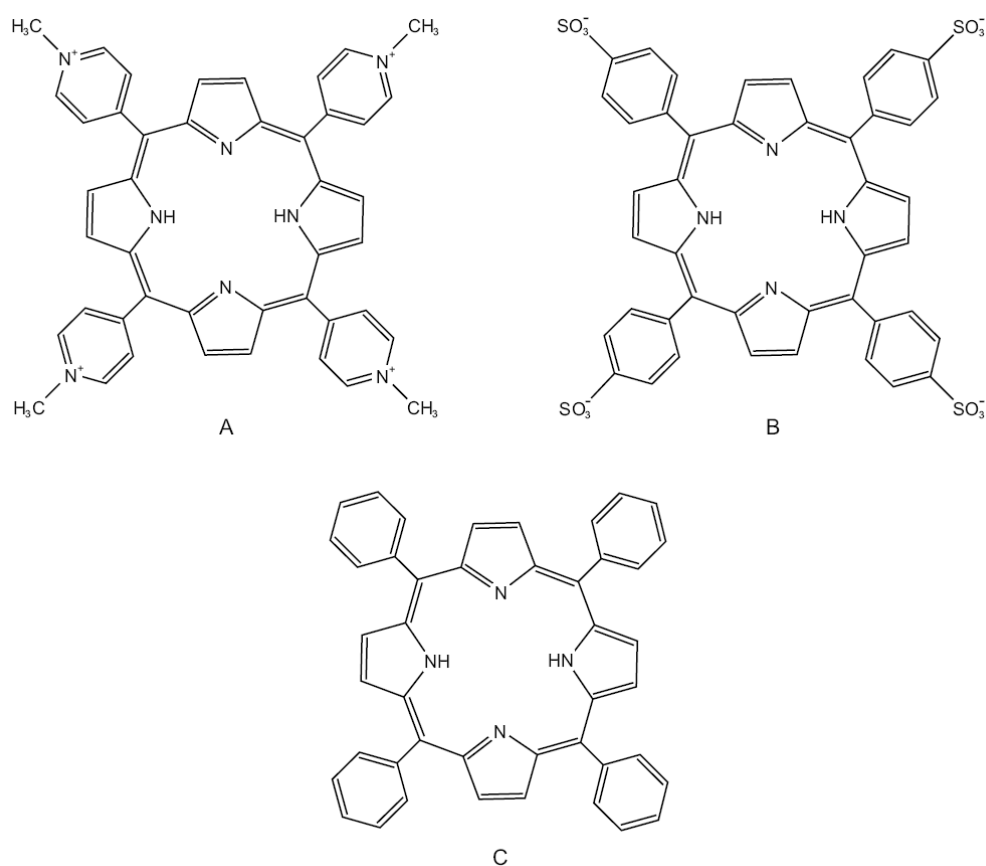
Obrázok 7-1: SERS spektrum povrchu čistého pripraveného z citrátového koloidu. (Toto spektrum odpovedá spektru grafitického uhlíka.)

Náš predpoklad sa naozaj potvrdil, jedná sa o grafitický uhlík. Toto meranie prebiehalo pri intenzite laseru 160 mW. Znížili sme intenzitu laserového žiarenia na 20 mW (pomocou filtrov), aby sme zistili, či tento jav nastáva aj tejto nižšej intenzite. Aj v tomto prípade mali spektrá tento tvar. V tomto prípade bolo možné pozorovať, ako tento jav prebieha. Určitý čas (cca 1 minútu) sa toto spektrum postupne vytváralo, nakoniec sme získali spektrum analogické tomu na predchádzajúcom obrázku.

Preto sme zamietli používanie citrátového koloidu a všetky nasledujúce spektrá sú zo sklíčok pripravených z borohydridového koloidu.

7.2 Merania na povrchoch pripravených z borohydridového koloidu

Pomocou pripravených povrchov sme sa rozhodli merať spektrá porfyrínov, konkrétne kladne nabitého TMPyP (obr. 7-2 A), záporne nabitého TSPP (obr. 7-2 B) a vo vode nerozpustného TPP (obr. 7-2 C) bez náboja. Rozhodli sme sa pre ne, pretože sú vhodné pre účely SERRSu a sú to látky, ktoré majú široké praktické uplatnenie (viz. kap. 3).

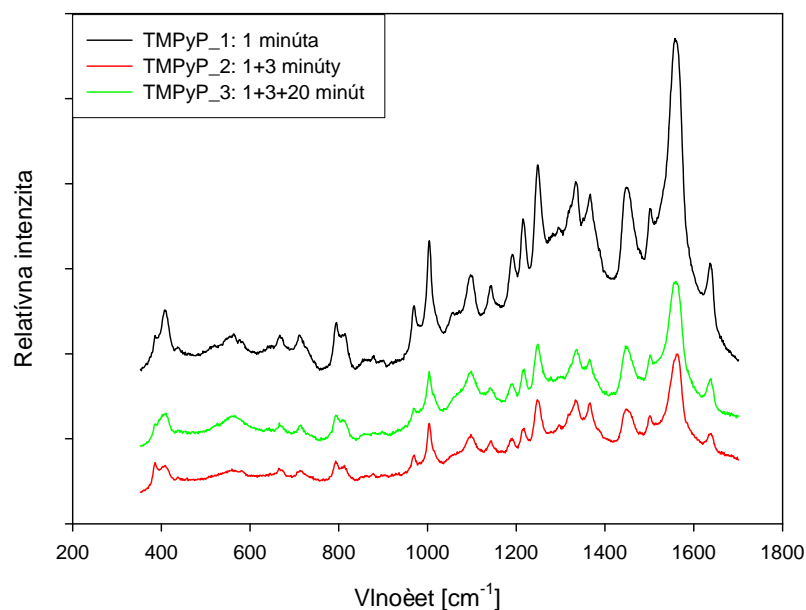


Obrázok 7-2: (A) molekula TMPyP, (B) molekula TSPP, (C) molekula TPP. Prevzané z [25].

7.2.1 TMPyP

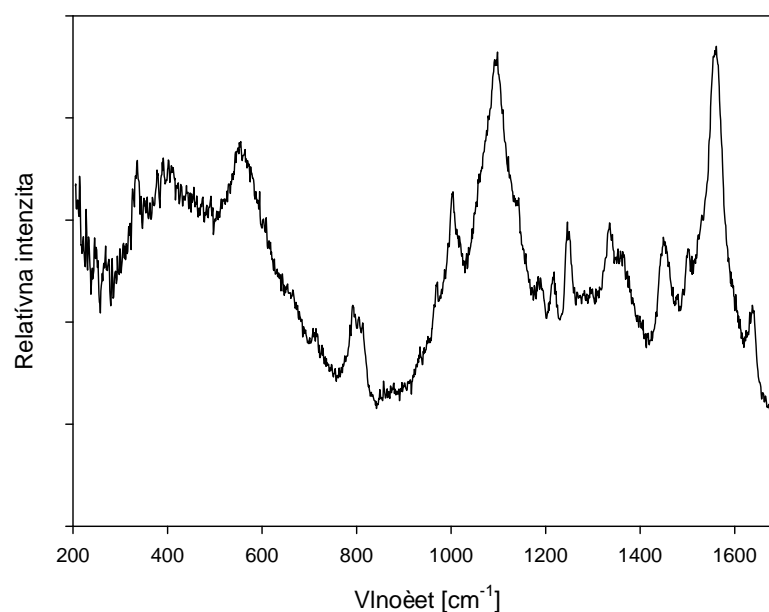
7.2.1.1 Prvé merania

Rozhodli sme sa premerať SERS spektrum TMPyP a aj to, ako sa mení v čase. Tieto merania prebiehali pomocou sklíčka ktorého snímky z elektrónového mikroskopu máme označené ako „vzorka 4“. Výkon laseru bol 20 mW. Sklíčko som ponoril (na 1 minútu) do TMPyP koncentrácie $1 \cdot 10^{-6}$ M a premeral jeho spektrum (TMPyP_1). Ponoril som ho opäť do koloidu (na 3 minúty) a premeral spektrum (TMPyP_2). Opäť som ho ponoril do koloidu (na 20 minút) a premeral spektrum (TMPyP_3). Tieto spektrá sú v nasledujúcom obrázku:



Obrázok 7-3: SERS spektrum TMPyP merané po rôznej dobe ponorenia sklíčka do TMPyP koncentrácie $1 \cdot 10^{-6}$ M.

Ďalej nás zaujímalo, že pre akú koncentráciu sme schopní pomocou SERS detekovať TMPyP. Z predchádzajúceho grafu je vidieť, že pre koncentráciu $1 \cdot 10^{-6}$ M sme získali veľmi pekné spektrá. Ďalej sme zisťovali, či je možné detekovať aj nižšiu koncentráciu. Skúsili sme $5 \cdot 10^{-7}$ (tiež na cca 20 minút). Výsledok je v nasledujúcom obrázku. Spektrá je poznať, no objavuje sa už signál skla.

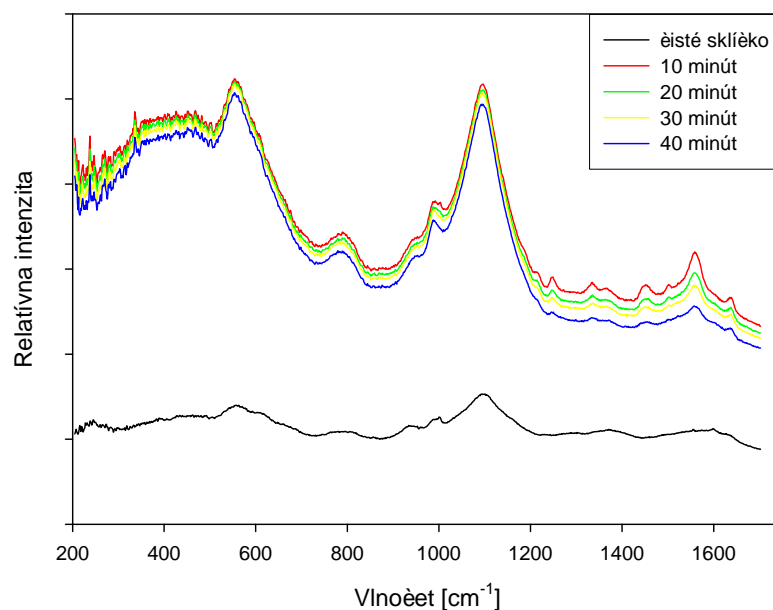


Obrázok 7-4: SERRS spektrum TMPyP koncentrácie $5 \cdot 10^{-7}$.

7.2.1.2 Metalácia porfyrínu

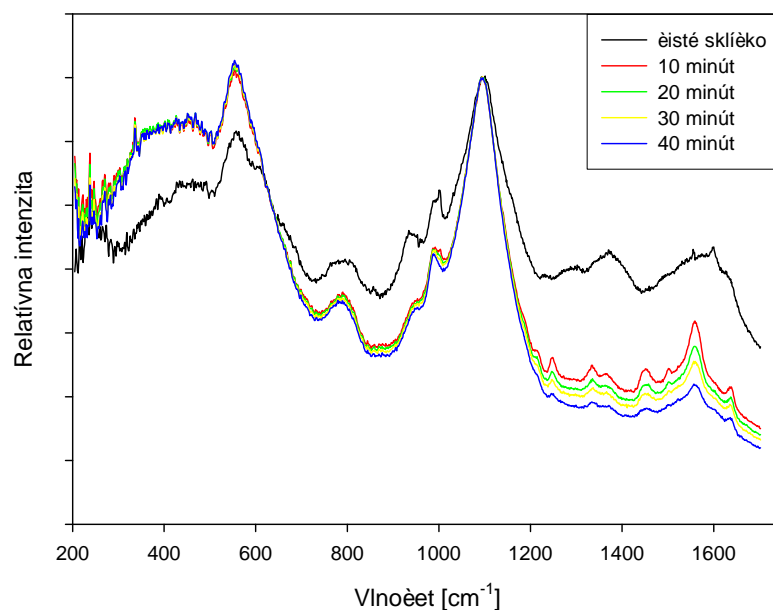
Z predchádzajúcich spektier sa zdá, že TMPyP sa na sklíčkach nachádza v nemetalovanej podobe, čo je vzhľadom výsledkom publikovaným na samotných Ag koloidoch, kde dochádza k rýchlej metalácii [78], prekvapivé. Preto sme sa rozhodli preskúmať proces metalácie (väzba atómu Ag dovnútra porfyrínového makrocyklu). Z [78] vieme, že spektrálne markery metalovanej formy sú pásy 392, 1337 (a tiež 1010, 1541) cm^{-1} a voľnej báze 328, doublet 1330+1359 (a tiež 1000, 1550) cm^{-1} . (Naše experimentálne spektrum s presným popisom pásov je uvedené nižšie.)

Na začiatku sme premerali SERRS spektrum čistého sklíčka. Potom sme ho ponorili na 2 minúty do TMPyP koncentrácie $1 \cdot 10^{-6}$ M. 10 minút od začiatku ponorenia sme premerali jeho SERRS spektrum. Od tohto okamžiku sme nepohli sklíčkom ani sme nemenili žiadne nastavenie a SERRS spektrum sme premerali ešte trikrát (stále po 10 minútach). Tieto spektrá sú v nasledujúcom obrázku. Pozorného čitateľa určite prekvapí, prečo sú tieto spektrá výrazne horšie (t.j. výrazná časť signálu je tvorená sklom a len malá porfyrínom) ako spektrá na obr. 7-3, hoci bola použitá rovnaká koncentrácia porfyrínu. Je to dané nehomogenitou sklíčok. Zatiaľ čo spektrá na obr. 7-5 sú z náhodne vybraného miesta, na detekciu spektier z obr. 7-3 sme museli hľadať miesta s najlepším signálom.



Obrázok 7-5: SERRS spektrá TMPyP koncentrácie 1.10^{-6} M merané z jedného miesta s časovým odstupom spolu so SERS signálom skla.

V grafe je vidieť, že hlavnú časť spektier tvorí vo všetkých prípadoch sklo. Ponúka sa nám možnosť študovať spektrá TMPyP tak, že od nameraných spektier odčítame spektrum skla. Zatiaľ čo spektrá TMPyP sú si veľmi podobné (pretože pri ich meraní sme nepohli sklíčkom), spektrum čistého skla je inej intenzity (pretože sme ho merali pri inej polohe sklíčka ako ostatné spektrá). Preto musíme spektrá najprv nanormovať na signál skla. Nasledujúci obrázok znázorňuje tieto spektrá prenásobené takými hodnotami, aby mali všetky rovnakú intenzitu pri vlnóčte 1096 cm^{-1} (signál skla).

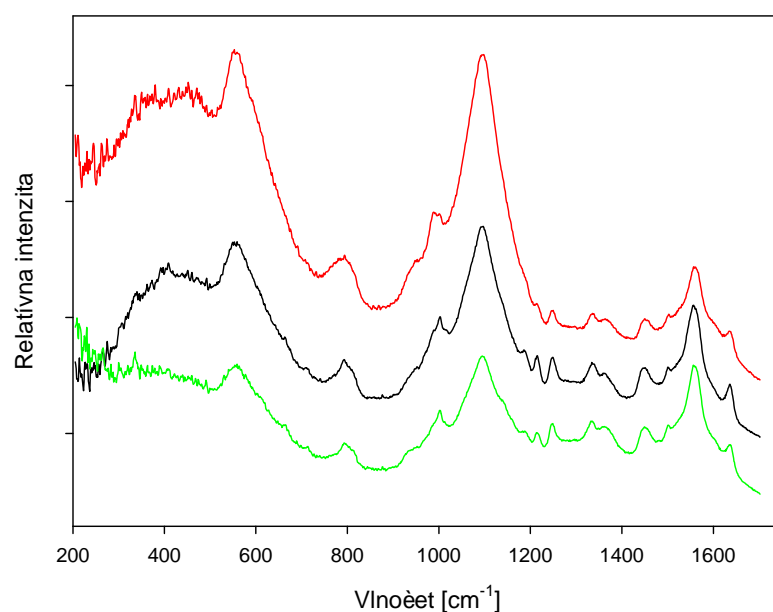


Obrázok 7-6: SERS spektrá TMPyP koncentrácie 1.10^{-6} M merané z jedného miesta s časovým rozstupom spolu so SERS signálom skla po vynormovaní na intenzitu signálu skla.

Vidíme, že spektrá „10 minút“ - „40 minút“ sa po normovaní prekrývajú ešte viac ako v predchádzajúcom prípade. To je dané tým, že aj intenzita laseru mierne kolíše a týmto nanormovaním sme sa tohto vplyvu zbavili. Môžeme povedať, že tomto prípade je signál skla dobrým interným štandardom. Pre všetkých 5 spektier ale niečo takéto neplatí – signál skla je v prípade čistého sklíčka výrazne odlišný od signálu skla v ostatných spektrách. Tento zdanlivý paradox je ale možné ľahko vysvetliť:

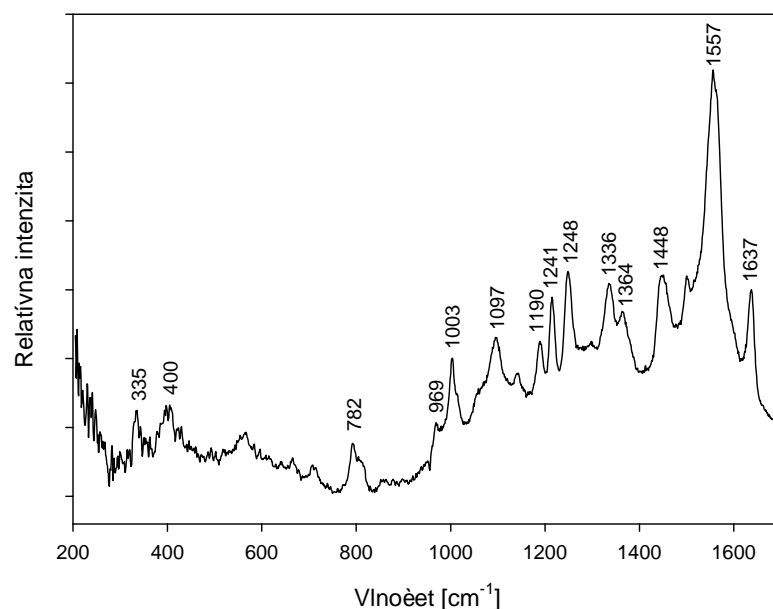
Samotné sklo a aj jeho pokrytie striebornými časticami je nehomogénne. K tomu ešte je sklo amorfná látka. Z týchto dôvodov je signál skla na rôznych miestach skla rôzny. Preto je odčítavanie signálu skla od spektier možné nanajvyš v prípade, že medzi meraniami nezmeníme žiadne nastavenie a signál zbierame z jediného miesta. Hoci nemôžeme považovať sklo za ideálny interný štandard, vhodnejší intenzitní štandard v našich systémoch nemáme.

Vráťme sa ale späť k samotným spektrám. Zdá sa, že metalácia naozaj neprebieha. Pre kontrolu sme premerali spektrá z ďalších miest na sklíčku (v tomto prípade sa teda jedná o signál zbieraný 40 minút po ponorení sklíčka do TMPyP koncentrácie 1.10^{-6} M. Tie sú v nasledujúcom obrázku.



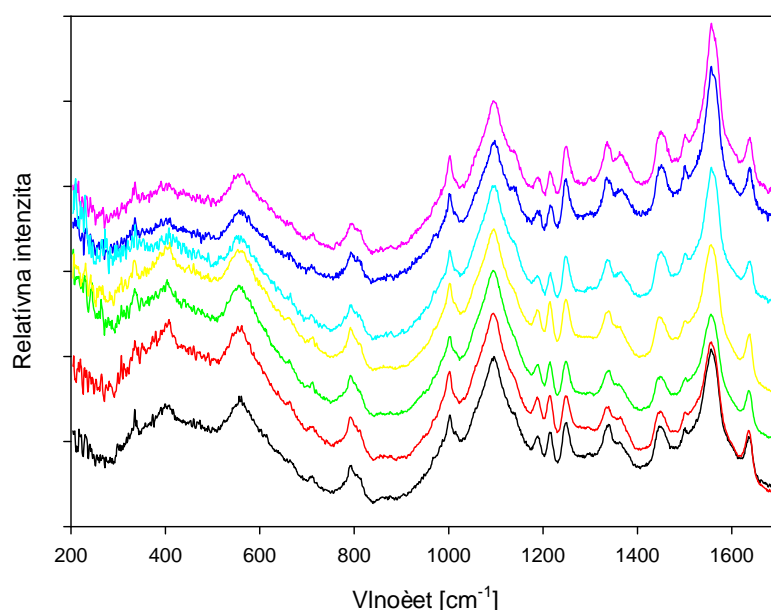
Obrázok 7-7: SERRS spektrá TMPyP koncentrácie 1.10^{-6} M merané z rôznych miest sklíčka cca 40 minút po ponorení sklíčka do TMPyP.

V týchto spektrách je signál pofyrínu ešte lepší. Preto sme hľadali ďalej a nakoniec sa nám podarilo nájsť na sklíčku miesto, kde bola síce intenzita signálu výrazne slabšia, no pomer TMPyP/sklo bol výrazne lepší. (obr. 8-7).



Obrázok 7-8: SERRS spektrum TMPyP s popisom spektrálnych pásov (merané cca 40 minút po ponorení sklíčka do TMPyP koncentrácie 1.10^{-6} M)

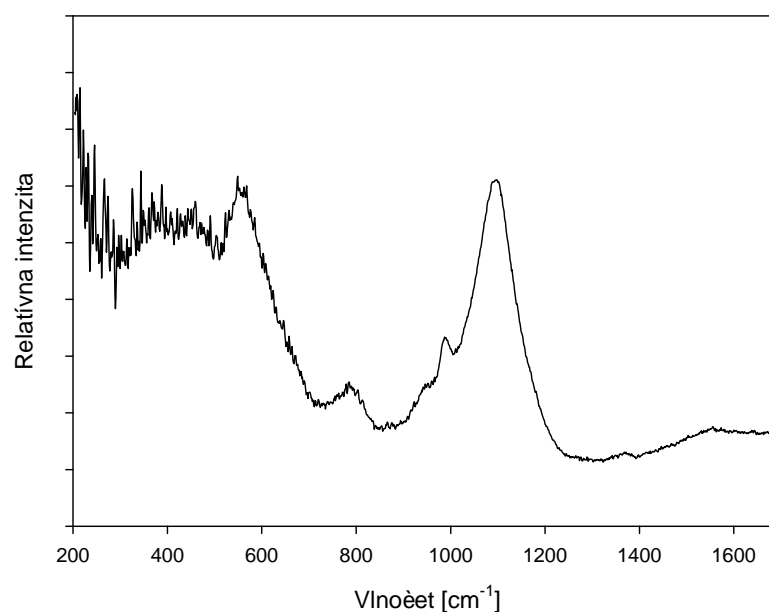
Tieto pásy síce neodpovedajú presne výsledkom [78], no rozdiel môžeme pripísať rôznym aparatúram a nepresnostiam v kalibrácii. Celkovo môžeme povedať, že TMPyP je naozaj v pôvodnej nemetalovanej podobe. Zaujímalo nás, či náhodou metalácia nenastáva po dlhšom čase. Preto sme z toho istého sklíčka premerali niekoľko spektier o deň neskôr. Tie sú v nasledujúcom obrázku (kvôli ilustratívnosti som ich nanormoval na signál skla a poposúval tak, aby sa príliš neprekrývali).



Obrázok 7-9: SERRS spektrá TMPyP koncentrácie 1.10^{-6} M merané z rôznych miest sklíčka cca 1 deň po ponorení sklíčka do TMPyP.

Vidíme, že signál sa nezmenil a aj po dni je porfyrín nachytný na sklíčku v nemetalovanej podobe. Navyše je vidieť, že rôzne miesta vykazujú veľmi podobný signál.

Aby sme vylúčili možnú prítomnosť signálu rezonančného Ramanova rozptylu, premerali sme niekoľko krát spektrum čistého sklíčka (t.j. bez strieborných nanočastíc), na ktoré sme kvapli TMPyP koncentrácie 1.10^{-6} M. V tomto prípade sme získali signál čistého skla, v spektre nie je vidieť žiaden porfyrín. Jedno takéto spektrum je na nasledujúcom obrázku. Tento experiment potvrdzuje, že nami merané spektrá porfyrínov zo strieborných nanočastíc sú SERRS spektrá porfyrínov.

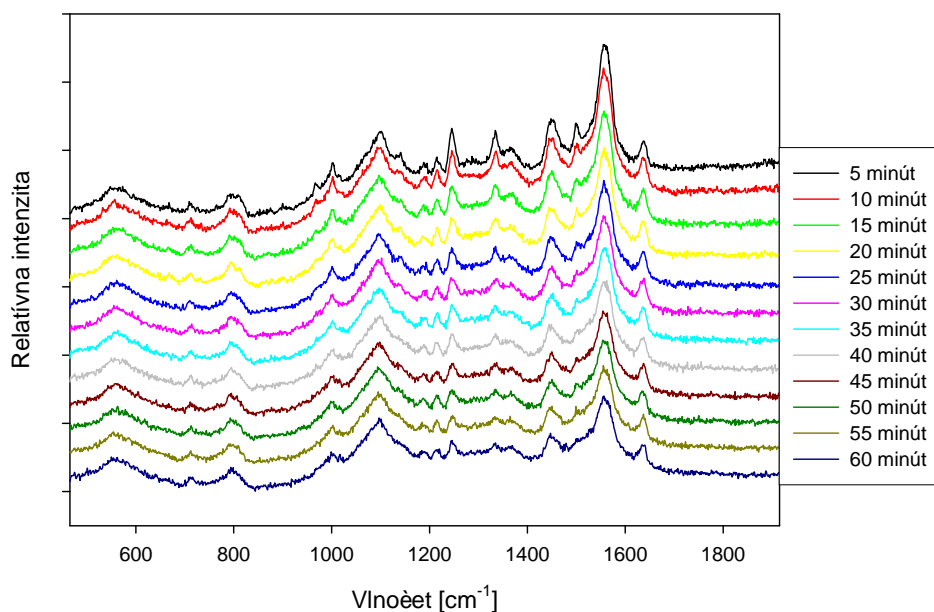


Obrázok 7-10: Spektrum sklíčka s kvapkou TMPyP (je to SERS spektrum skla)

7.2.1.3 Merania pri vyššej koncentrácii ($1 \cdot 10^{-5}$ M)

Pri koncentrácii $1 \cdot 10^{-6}$ M sa nám nepodarilo rutinne získať spektrá, pri ktorých by bol signál TMPyP dostatočne silný v porovnaní so signálom skla. Niekoľko takýchto spektier sa nám síce podarilo získať, jednalo sa však o zriedkavé prípady a navyše v týchto prípadoch bol celkový signál dosť slabý. Preto sme sa rozhodli premerať ešte raz časový vývoj SERRS spektier (teraz pri koncentrácii $1 \cdot 10^{-5}$ M).

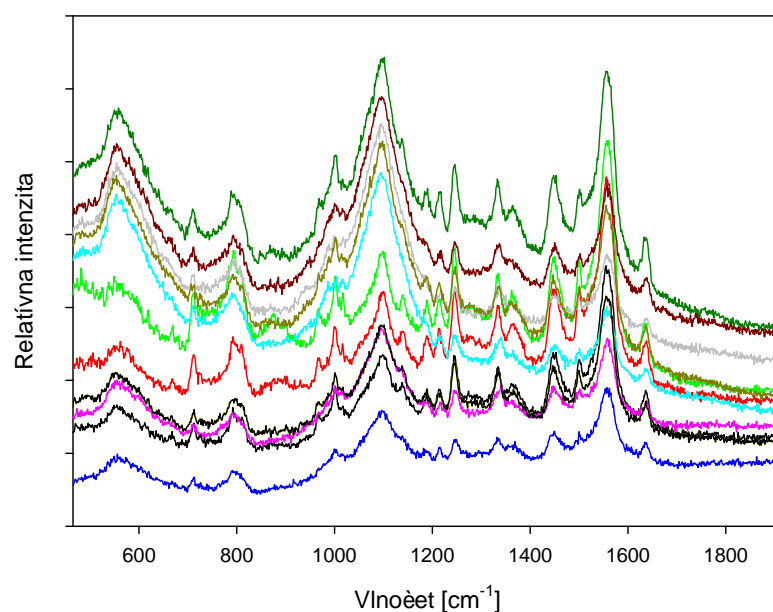
Sklíčko som namočil na 2 minúty do $1 \cdot 10^{-5}$ M TMPyP. SERRS spektrum som odmeral 5 minút potom. Sklíčko som nepohol a SERRS spektrum som premeral každých 5 minút až do času 1 hodina. Tieto spektrá sú v nasledujúcom obrázku (spektrá nie sú upravované, sú len voči sebe posunuté o konštantnú hodnotu aby sa neprekrývali).



Obrázok 7-11: SERRS spektrá TMPyP koncentrácie $1 \cdot 10^{-5}$ M merané z jedného miesta na sklíčku s časovým odstupom 5 minút.

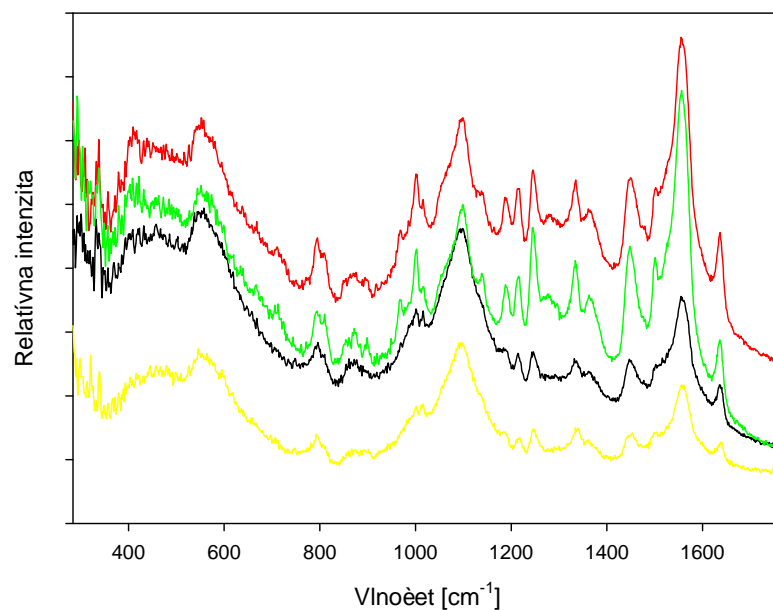
Z týchto spektier opäť vidieť, že TMPyP je v nemetalovanej podobe. Avšak jediným jasným dôkazom toho, že sa jedná o čisto nemetalovanú formu TMPyP, je prevedenie faktorovej analýzy. Tú popisujem v kap. 8.1.2 a úpravy spektier ktoré jej predchádzajú v kapitole 8.1.1 a jej výsledky pre túto sadu spektier sú na obr. 9-5. Tieto výsledky naozaj potvrdili, že sa jedná o free-base formu TMPyP. Druhé subspektrum zrejme odpovedá zmene pomeru intenzity signálu porfyrínu a skla.

Aby sme zistili, či je signál zo sklíčka homogénny a či na inom mieste nenájdeme porfyrín v metalovanej podobe, premerali sme SERRS signál ešte z niekoľkých iných miest. Tieto spektrá sú (neupravované) v nasledujúcom obrázku.



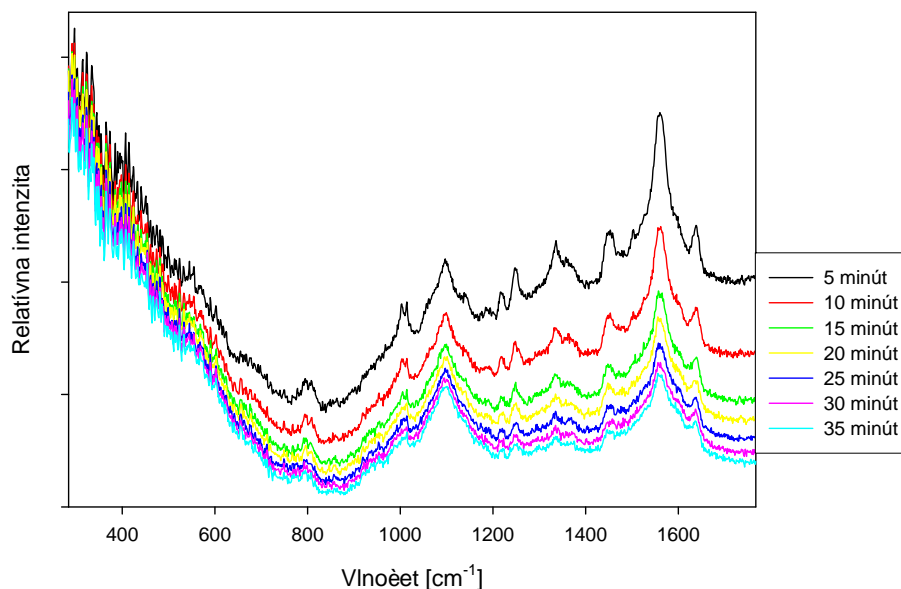
Obrázok 7-12: SERRS spektrá TMPyP koncentrácie $1 \cdot 10^{-5}$ M merané z rôznych miest na sklíčku cca 1 hodinu po ponorení sklíčka do TMPyP.

Ani v tomto prípade sme nenašli spektrum, ktoré by vypovedalo o tom, že sa TMPyP metaluje. Pre prípad, že by tento proces trval dlhšie, sme premerali signál z niekoľkých miest tohto sklíčka ešte raz o deň neskôr. Tieto spektrá sú v nasledujúcom obrázku (spektrá nie sú upravované žiadnym spôsobom). Vidíme, že metalácia nenastala ani po 24 hodinách.



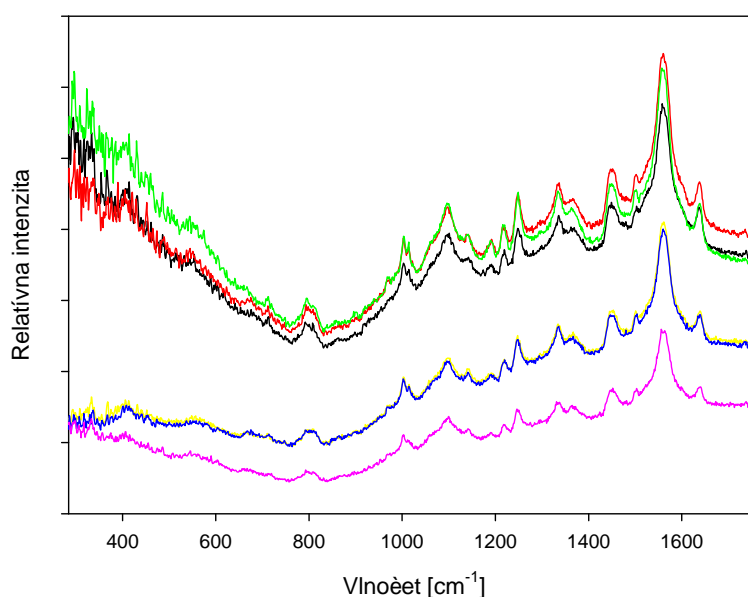
Obrázok 7-13: SERRS spektrá TMPyP koncentrácie $1 \cdot 10^{-5}$ M merané z rôznych miest na sklíčku cca 1 deň po ponorení sklíčka do TMPyP.

Rozhodol som sa merania zopakovať s iným sklíčkom ešte raz. Sklíčko som namočil na 2 minúty do $1 \cdot 10^{-5}$ M TMPyP. SERRS spektrum som odmeral 5 minút potom. Sklíčko som nepohol a SERRS spektrum som premeral každých 5 minút ešte päťkrát. Tieto spektrá sú v nasledujúcom obrázku (spektrá nie sú upravované žiadnym spôsobom).



Obrázok 7-14: SERRS spektrá TMPyP koncentrácie $1 \cdot 10^{-5}$ M merané z jedného miesta na sklíčku s časovým odstupom 5 minút.

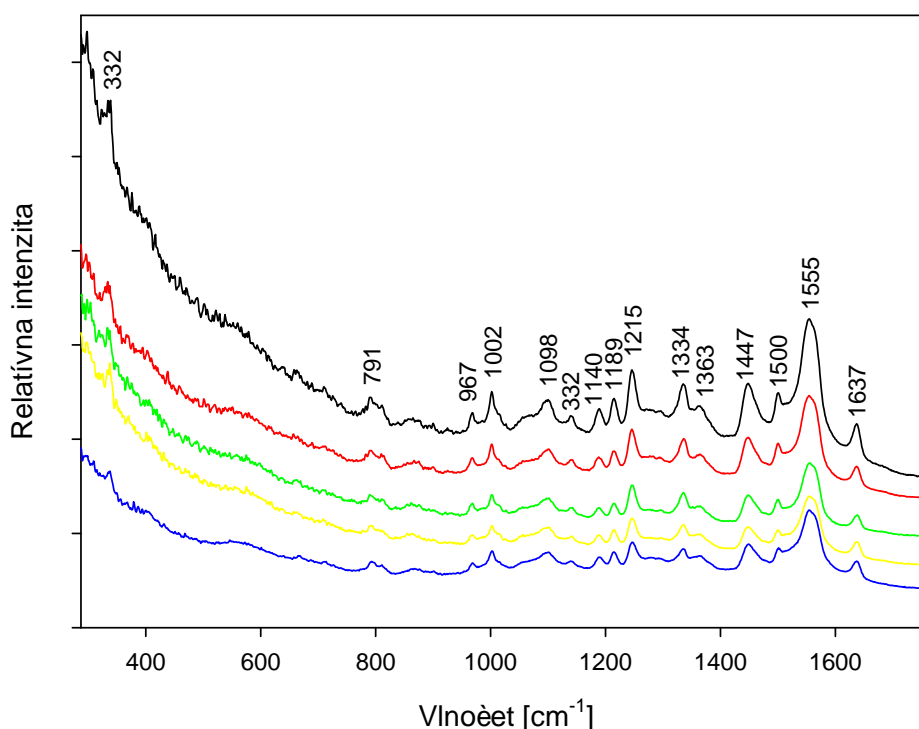
Následne som opäť premeral signál z rôznych miest (viz. nasledujúci obrázok, spektrá nie sú upravované). Tieto merania tiež potvrdili, že TMPyP sa nemetaluje.



Obrázok 7-15: SERRS spektrá TMPyP koncentrácie $1 \cdot 10^{-5}$ M merané z rôznych miest na sklíčku cca 40 minút po ponorení sklíčka do TMPyP.

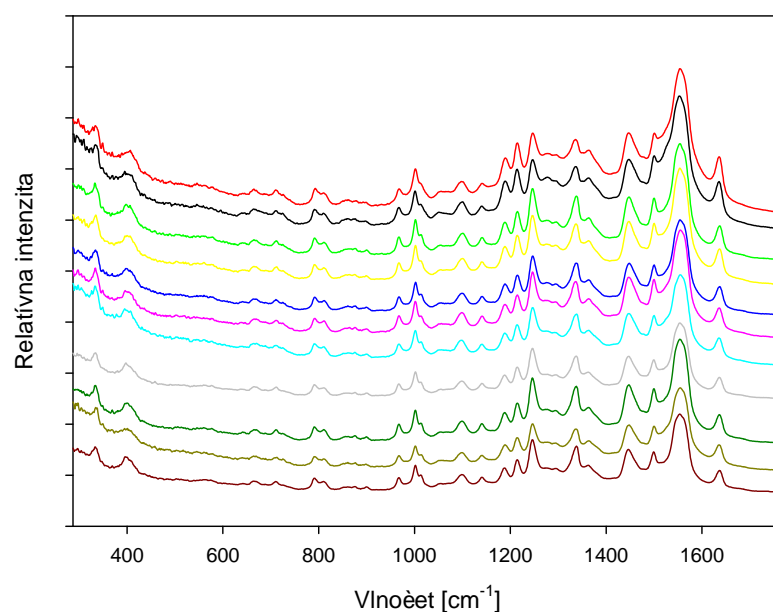
7.2.1.4 Povrchy pripravené pomocou aminosilanu

Keď sa nám neskôr podarilo pripraviť sklíčka aj pomocou aminosilanu, premerali sme SERRS spektrá aj na nich. Na začiatku sme premerali signál sklíčka ponoreného do TMPyP koncentrácie $5 \cdot 10^{-8}$ M, ale signál porfyrínu sme nezískali. Preto sme koncentráciu zvýšili na $1 \cdot 10^{-7}$ M. Tieto spektrá (kvôli prehľadnosti voči sebe posunuté) sú v nasledujúcom obrázku.



Obrázok 7-16: SERRS spektrá TMPyP koncentrácie $1 \cdot 10^{-7}$ M merané z rôznych miest na sklíčku s popisom spektrálnych pásov.

Na tomto obrázku je už dobre poznať spektrum TMPyP. Na záver sme zvýšili koncentráciu na $1 \cdot 10^{-6}$ M. Tieto spektrá (opäť kvôli prehľadnosti voči sebe posunuté) sú v nasledujúcom obrázku.



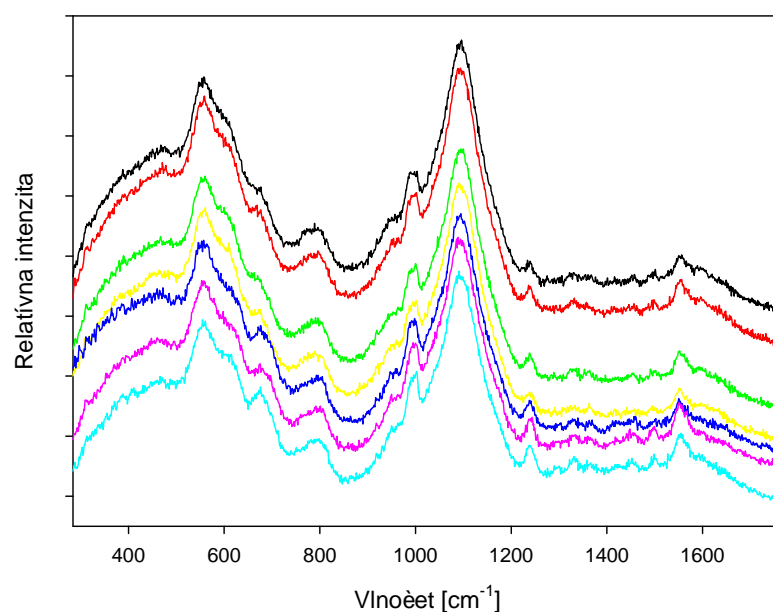
Obrázok 7-17: SERRS spektrá TMPyP koncentrácie $1 \cdot 10^{-6}$ M merané z rôznych miest na sklíčku.

Aj merania na sklíčkach pripravených pomocou aminosilanu potvrdili, že TMPyP sa na imobilizovaných kovových nanočasticiach nemetaluje.

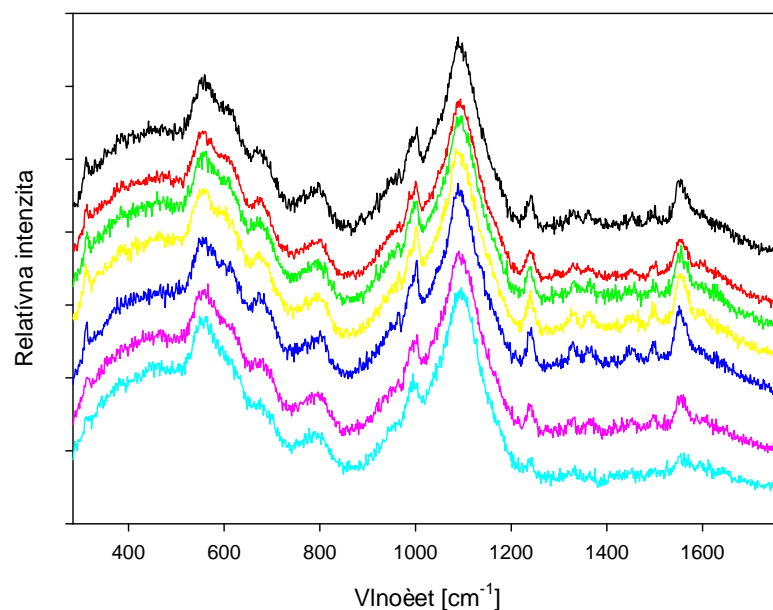
7.2.2 TSPP

SERRS spektrá TSPP sme premeriavali zo sklíčok ponorených do vodného roztoku TSPP koncentrácie $1 \cdot 10^{-5}$ M. Na začiatku sme sklíčko ponorili na 3 minúty.

Ďalej sme sa rozhodli porovnať, aký je rozdiel medzi spektrami meranými pri plnom (150 mW) a zníženom (23 mW) výkone laseru. Na nasledujúcich dvoch obrázkoch sú signály získané z rôznych miest jedného vzorku.



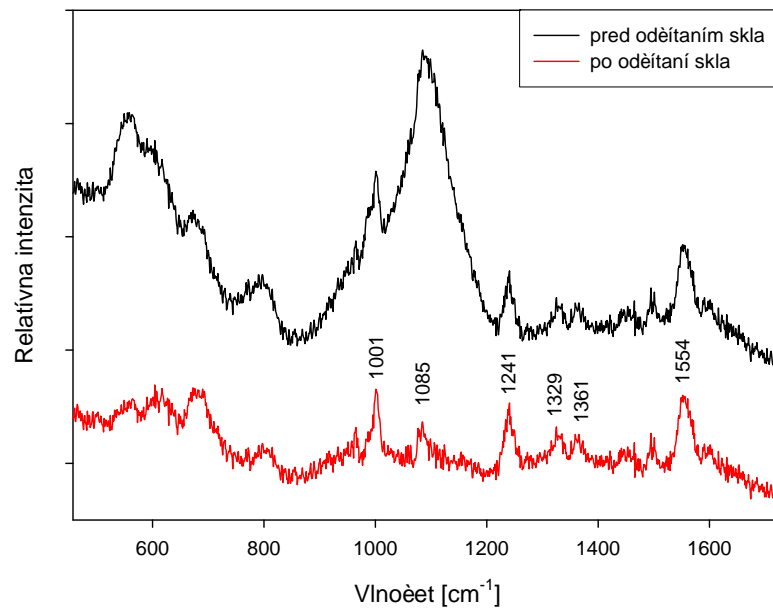
Obrázok 7-18: SERRS spektrá TSPP koncentrácie 1.10^{-5} M merané z rôznych miest na sklíčku pri výkone laseru 150 mW.



Obrázok 7-19: SERRS spektrá TSPP koncentrácie 1.10^{-5} M merané z rôznych miest na sklíčku pri výkone laseru 23 mW.

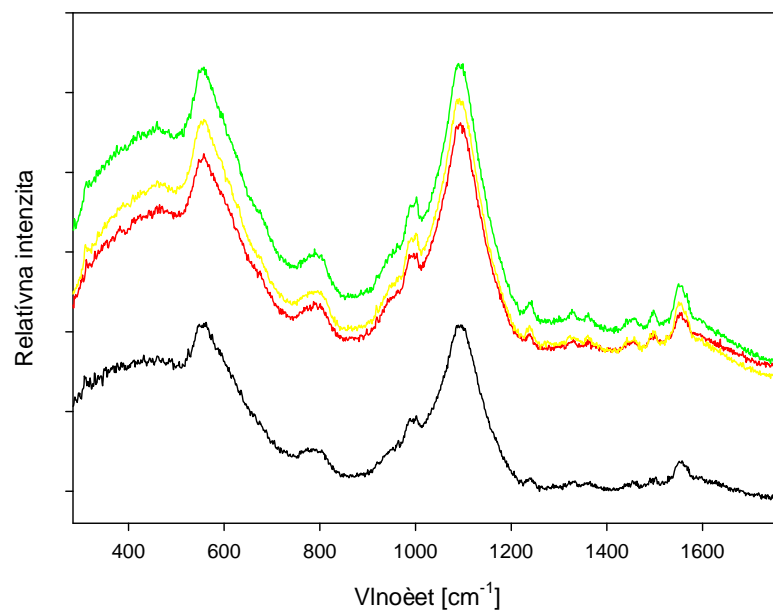
Spektrálne pásy v oblasti 1300-1700 cm⁻¹ patria TSPP, oblasť nižších vlnóètov je bohužiaľ z väčšiny prekrytá silným signálom skla. Napriek tomu, že v druhom prípade je výkon skoro 7-krát menší, pomer signálu skla a porfyrínu je zostáva rovnaký. Pre účely odčítania

polôh spektrálnych pásov sme od jedného spektra (meraného pri výkone laseru 23 mW) odčítali spektrum skla. Tieto dve spektrá (pred aj po odčítaní skla) sú s označenými spektrálnymi pásmi v nasledujúcom obrázku.



Obrázok 7-20: SERRS spektrum TSPP koncentrácie 1.10^{-5} M pred a po odčítaní skla (s označenými spektrálnymi pásmi).

Ďalej som sklíčko ponoril do TSPP na 100 minút.



Obrázok 7-21: SERRS spektrum TSPP koncentrácie 1.10^{-5} M po ponorení do TSPP na dobu 100 minút.

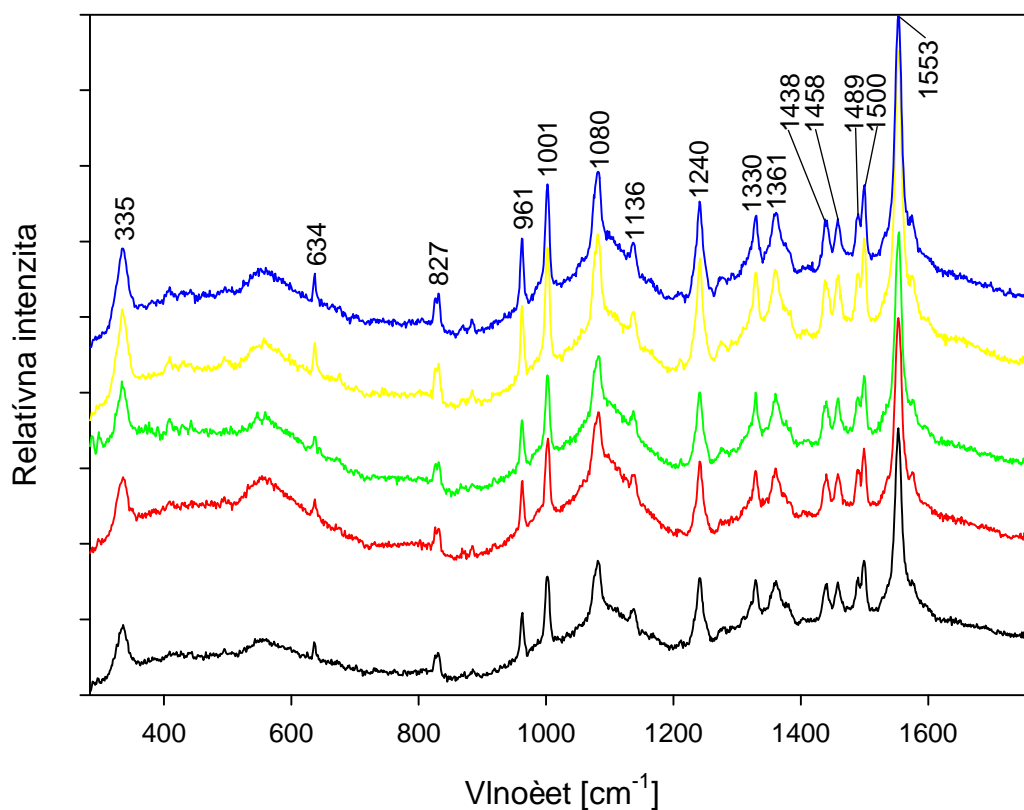
Po premeraní posledného spektra (v grafe vykreslené čiernou farbou) som sklíčkom nepohol a premeriaval som časovú závislosť po dobu 20 min. Spektra sa ale už nemenili, čo sa dalo vzhľadom k dlhému času ponorenia sklíčka do porfyrínu očakávať.

Dlhšie časy ponorenia (100 minút, viz obr. 8-21), nevedli k lepším výsledkom, pre veľmi dlhé časy (1 deň) dokonca signál porfyrínu výrazne klesal.

7.2.3 TPP

TPP patrí medzi vo vode nerozpustné porfyríny, a preto pevné SERS aktívne povrchy poskytujú ideálnu možnosť ich merania bez priamej interferencie rozpúšťadla.

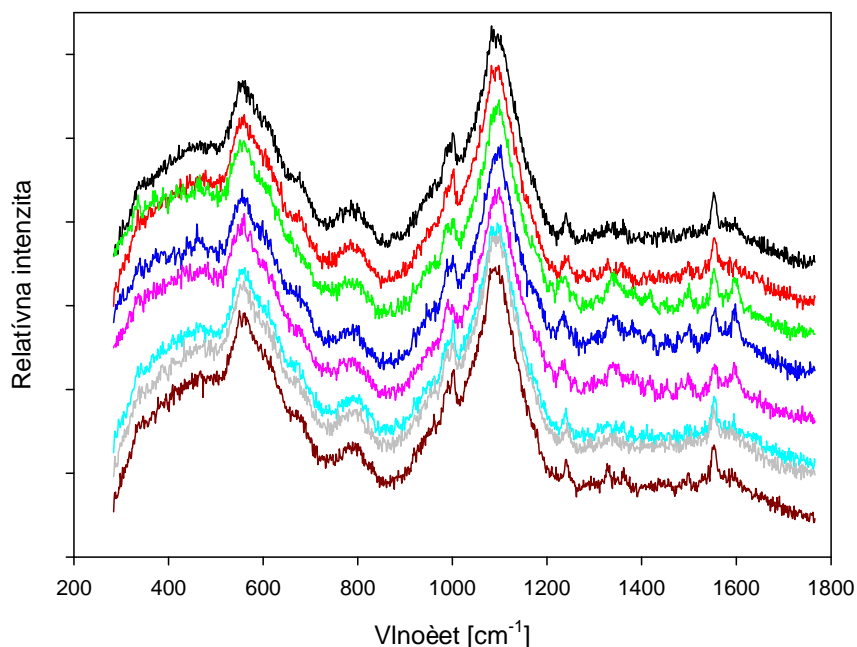
SERRS spektrá TPP sme na začiatku premeriavali pri koncentrácii $1 \cdot 10^{-5}$ M po ponorení do TPP na 2 minúty. Tieto spektrá sú v nasledujúcom obrázku.



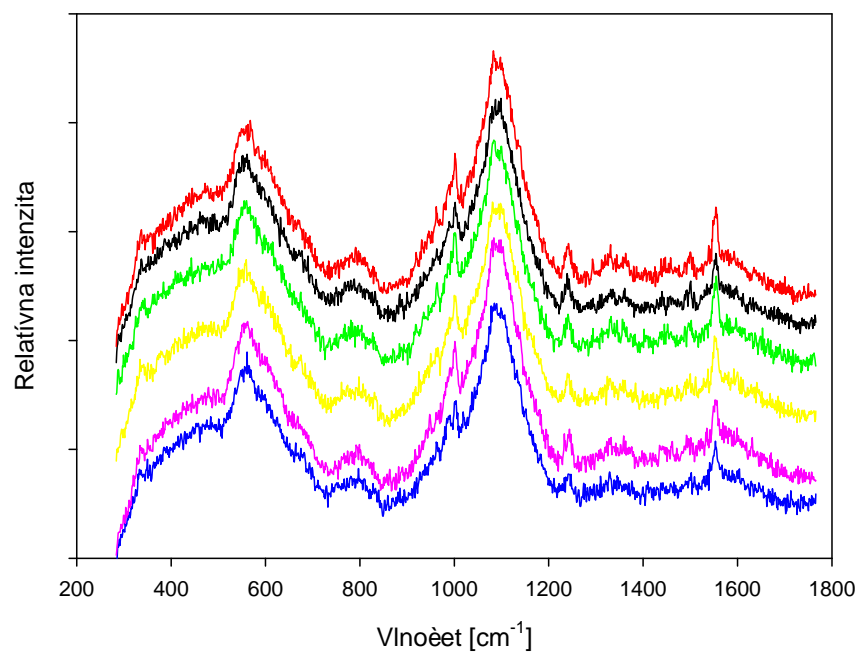
Obrázok 7-22: SERRS spektrá TPP koncentrácie $1 \cdot 10^{-5}$ M merané z rôznych miest vzorku.

V prípade tohto porfyrínu sme získali veľmi intenzívne spektrá s prakticky zanedbateľným príspevkom signálu skla. Preto sme premerali i koncentračnú závislosť.

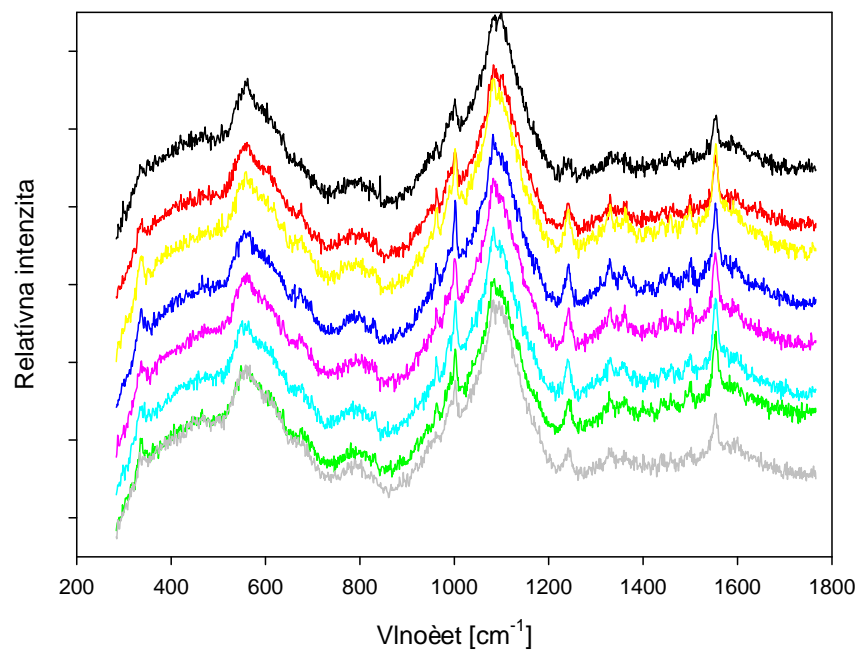
Meranie prebiehalo tak, že sme sklíčko ponorili na 2 minúty do TPP koncentrácie $1 \cdot 10^{-7}$ M, premerali niekoľko spektier. Potom sme ho ponorili do TPP koncentrácie 2-krát väčšej a toto niekoľko krát zopakovali. Výsledkom bolo niekoľko SERRS spektier pre tieto koncentrácie: $1 \cdot 10^{-7}$ M, $2 \cdot 10^{-7}$ M, $4 \cdot 10^{-7}$ M, $8 \cdot 10^{-7}$ M, $1,6 \cdot 10^{-6}$ M, $3,2 \cdot 10^{-6}$ M a $6,4 \cdot 10^{-6}$ M. Tie sú v nasledujúcich obrázkoch.



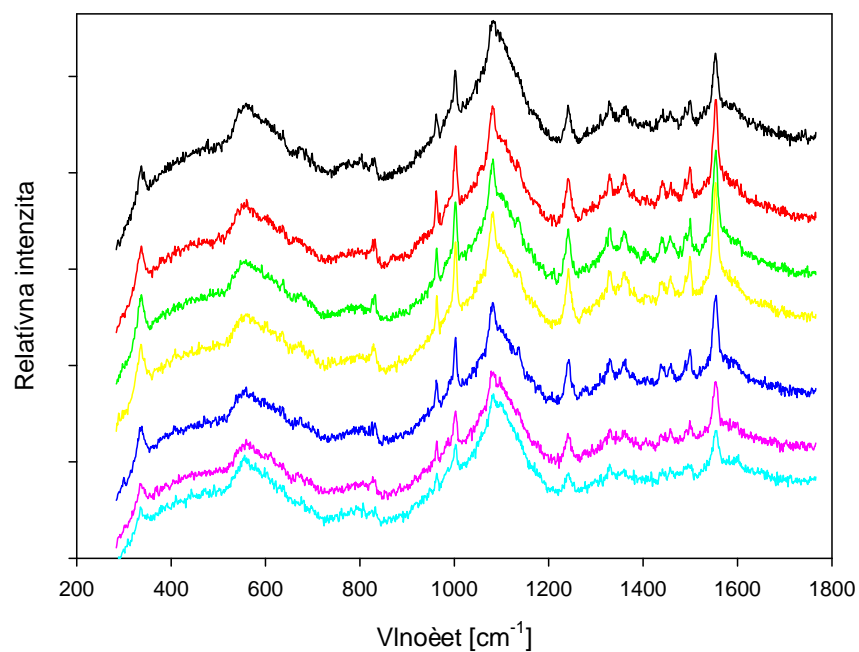
Obrázok 7-23: SERRS spektrá TPP koncentrácie $1 \cdot 10^{-7}$ M merané z rôznych miest vzorku.



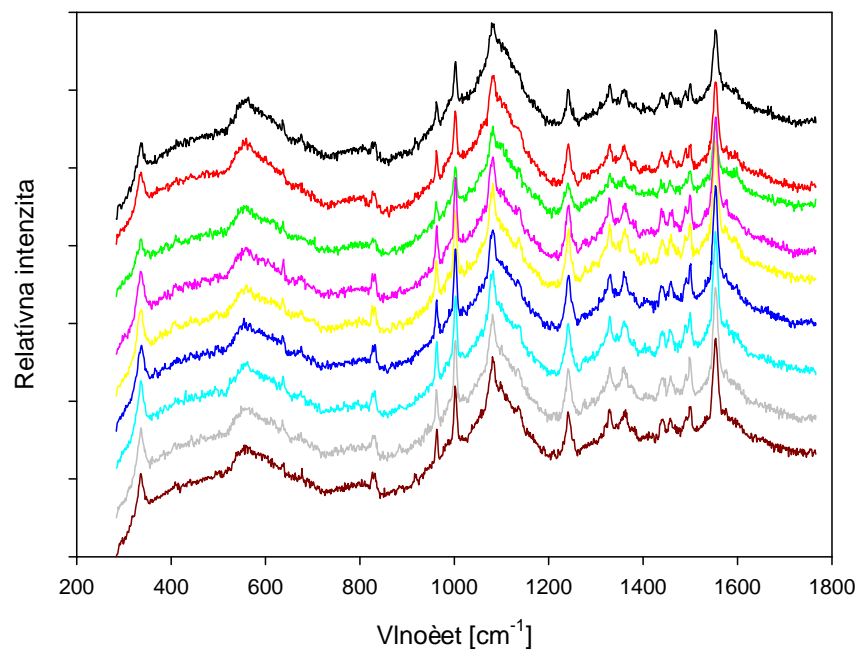
Obrázok 7-24: SERRS spektrá TPP koncentrácie 2.10^{-7} M merané z rôznych miest vzorku.



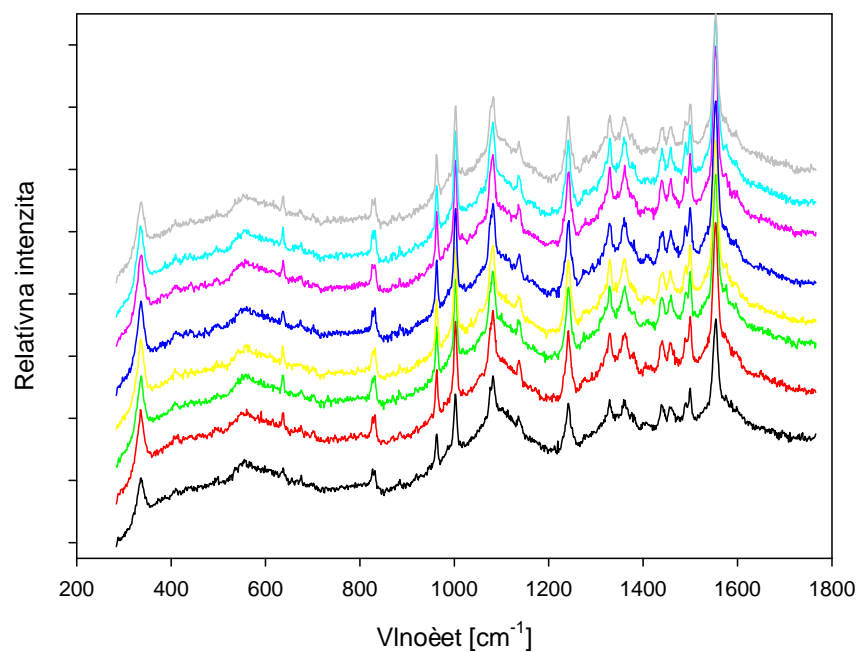
Obrázok 7-25: SERRS spektrá TPP koncentrácie 4.10^{-7} M merané z rôznych miest vzorku.



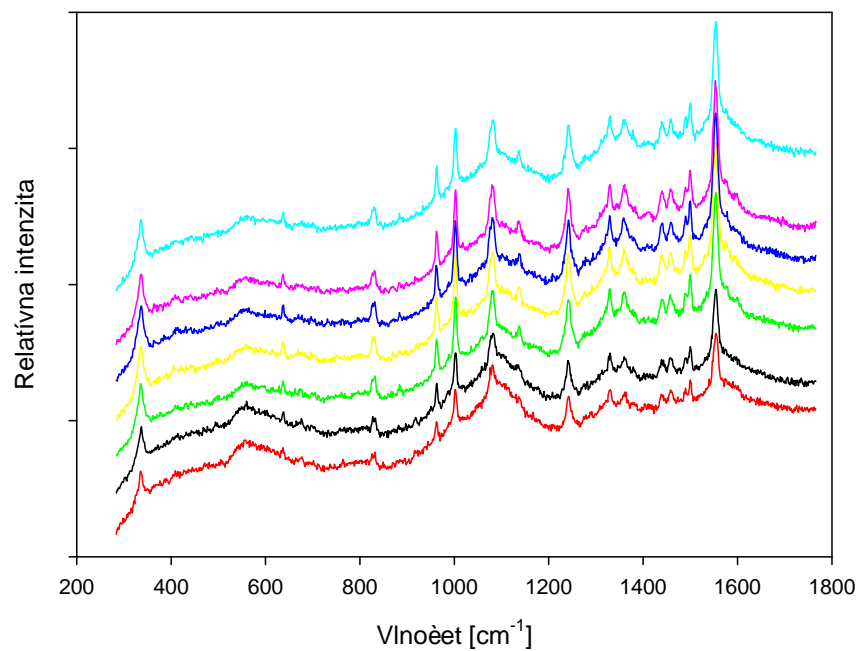
Obrázok 7-26: SERRS spektrá TPP koncentrácie 8.10^{-7} M merané z rôznych miest vzorku.



Obrázok 7-27: SERRS spektrá TPP koncentrácie $1,6.10^{-6}$ M merané z rôznych miest vzorku.



Obrázok 7-28: SERRS spektrá TPP koncentrácie $3,2 \cdot 10^{-6}$ M merané z rôznych miest vzorku.



Obrázok 7-29: SERRS spektrá TPP koncentrácie $6,4 \cdot 10^{-6}$ M merané z rôznych miest vzorku.

7.3 Zhrnutie výsledkov

Celkovo môžeme štúdium porfyrínov pomocou SERS spektroskopie na strieborných nanočasticiach imobilizovaných na sklenených podložkách zhrnúť ako úspešné. Podarilo sa nám získať spektrá všetkých troch (kladne nabitého TMPyP, záporne nabitého TSPP a vo vode nerozpustného TPP) pri rôznych podmienkach (ako napr. koncentrácia, čas ponorenia atď). V ideálnych prípadoch sa nám podarilo získať spektrá porfyrínov koncentrácie $1 \cdot 10^{-7}$ M (TMPyP a TPP). Zatiaľ čo pre TMPyP aj TPP sa nám podarilo získať výrazné spektrá, TSPP vykazoval slabý signál. To je spôsobené pravdepodobne coulombovským odpudzovaním medzi TSPP a borátovými aniónmi na povrchu strieborných nanočastíc a adsorpcie je teda veľmi obtiažna.

Podobne obtiažna adsorpcia bola pozorovaná pre aniónový 5,10,15,20-tetrakis(4-karboxyfenyl)porfyrín [86].

Pevné povrchy sa ukázali byť veľkou výhodou pri štúdiu TPP. Pri meraniach v koloide pri nízkych koncentráciách býva nezanedbateľný signál rozpúšťadla, pri meraniach na pevných povrchoch sme sa signálu rozpúšťadla zbavili úplne. Na druhú stranu je treba zdôrazniť, že vhodnými povrchmi so len naše strieborné povrchy, pretože na obdobných zlatých povrchoch sa kvalitný SERS signál TPP nepodarilo získať. [25].

Pri týchto experimentoch na strieborných povrchoch sme prekvapivo zistili, že sa porfyrín nemetaloval. Vzhľadom k tomu, že sa v samotnom koloide sa metaluje veľmi rýchlo, sme si položili otázku, prečo je to tak. Ňou sa zaoberám v nasledujúcej kapitole.

8 Merania SERS spektier priamo z koloidu

Z meraní popísaných v predchádzajúcej kapitole vyplýva, že na imobilizovaných strieborných časticiach neprebíha metalácia porfyriínu. Toto je zaujímavý a prekvapivý výsledok, pretože v koloide metalácia prebieha, dokonca veľmi rýchlo (prakticky všetok porfyriín sa nametaluje do niekoľkých minút). Naším najlepším vysvetlením tohto paradoxu sa zdala byť prítomnosť silanu. Preto sme sa rozhodli preskúmať, že ako prebieha metalácia porfyriínu v koloide v prítomnosti silanu (a ako závisí na koncentrácii silanu).

V prípade porfyriínu môžeme očakávať, že SERRS signál je súčtom dvoch zložiek – metalovanej a nemetalovanej (free-base). Pri pohľade na spektrum je síce možné povedať, že sa v spektre nachádza jedna alebo druhá zložka, no iba približne. Pokiaľ chceme presnejšiu kvantifikáciu (t.j. koľko je tam ktorej zložky), postupujeme tak, že najprv získame spektrum oboch čistých foriem (metalovanej a free-base) pomocou faktorovej analýzy a v nasledujúcom kroku rozložíme namerané spektrum do práve týchto dvoch zložiek. Keď tento postup aplikujeme na spektrá merané po sebe, tak získame kinetiku metalácie. V nasledujúcom texte podrobnejšie opíšem tento postup.

8.1 Postup pri spracovaní SERS spektier

Tento postup môžeme zhrnúť do niekoľkých krokov, ktoré podrobnejšie popisujem ďalej:

1. Zbavenie spektier pozadia
2. Rozklad skupiny spektier na subspektrá pomocou faktorovej analýzy
3. Konštrukcia spektier čistej (free-base, nemetalovanej) a metalovanej formy porfyriínu zo subspektier získaných faktorovou analýzou.
4. Stanovenie pomeru nemetalovanej a metalovanej formy pre spektrum (spektrá).

8.1.1 Zbavenie spektier pozadia

SERS spektrum by malo teoreticky vyzerat tak, že „leží“ na x-ovej ose a z tejto osi vybiehajú pásy charakteristické pre danú látku. Ideálne by bolo od spektier odčítať pozadie a vykresľovať čisté spektrá (t.j. spektrá zbavené pozadia). S týmto je ale spojený jeden veľký problém – neexistuje spôsob, akým by sme dokázali presne určiť, aké je spektrum pozadia odpovedajúce konkrétnemu SERS spektru. Touto úpravou by sme preto spektrá určitým spôsobom skreslili. Navyše SERS spektrá porfyrínov majú veľmi úzke pásy, a teda nám prítomnosť pozadia príliš nevaďí. SERS spektrá uverejnené v predchádzajúcich kapitolách neboli určené na ďalšie spracovanie. Aby sme sa vyhli práve tomuto problému (skreslenie spektier), uverejňovali sme ich priamo také, ako sme ich namerali.

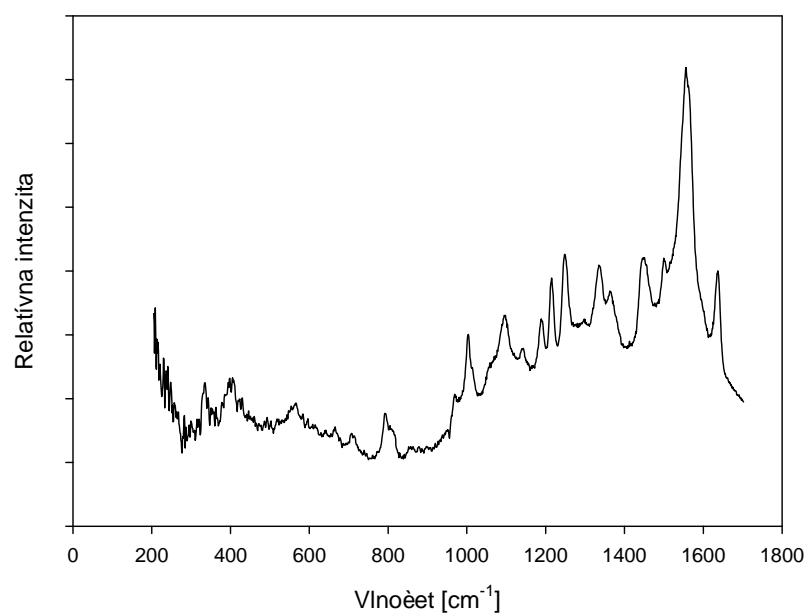
Iná je situácia v prípade, keď potrebujeme spektrá ďalej spracovávať, pretože faktorová analýza je veľmi citlivá na akékoľvek zmeny v spektrách, vrátane zmien pozadia. V tom prípade je nutné zbaviť ich pozadia. My sme postupovali takto:

1. Od každého spektra sme odčítali takú lineárnu funkciu, aby spektrum začínalo aj končilo na hodnote „0“. Týmto sme získali pomocné spektrá.
2. Stanovili sme spektrá, ktoré by podľa našich očakávaní mali tvoriť pozadie, tzv. bázu.
3. Konečné spektrá sme získali z pomocných spektier tak, že sme od nich odčítali spektrá báze s vhodnými váhami (postupovali sme tzv. metódou ortogonálnych diferencií).

Prvým krokom spracovania je upraviť toto spektrum tak, aby začínalo na hodnote „0“.

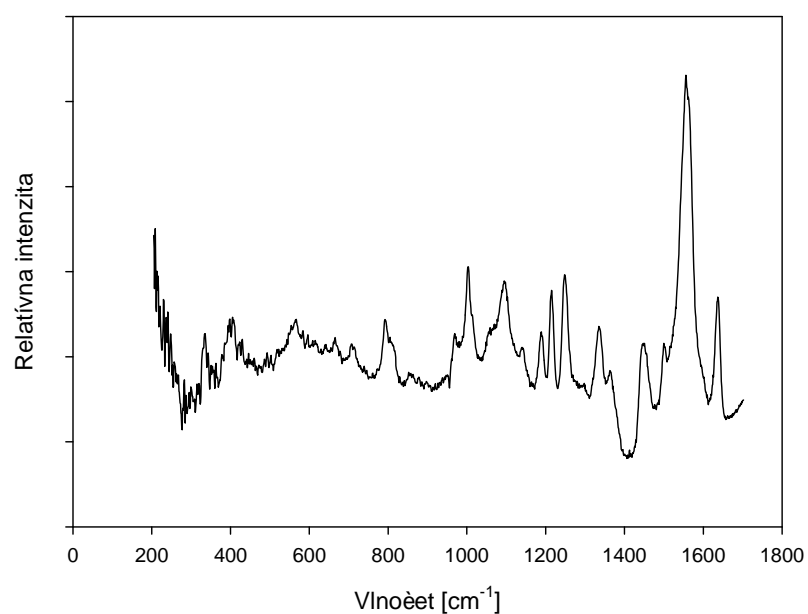
V ďalšom kroku nasleduje voľba báze a jej odčítanie od spektra s vhodnými váhami. Po zvolení báze je už proces jednoznačný – bázu najprv ortogonalizujeme a potom od nameraného spektra postupne odčítame všetky vektory báze prenasobené váhami, ktoré sú stále určené skalárnym súčinom daného vektora báze a nameraného spektra.

Ilustrujme si tento postup na jednom konkrétnom spektre (obrázok 8-1).



Obrázok 8-1: Spektrum TMPyP ako ukážka neupraveného spektra

Nejednoznačná je voľba báze. My sme ako bázu volili polynómy 4. stupňa, pretože každú funkciu je možné približne vyjadriť ako polynóm (čím vyšší stupeň polynómu zvolíme, tým viac sa bude podobať pôvodnej funkcii). Po odčítaní tejto báze vyzerá spektrum takto:



Obrázok 8-2: Spektrum TMPyP po odčítaní pozadia

Samozrejme sme mohli zvoliť aj polynóm iného stupňa. 4. stupeň sme zvolili, pretože po vyskúšaní na niekoľkých spektrách sa zdal byť optimálny – polynómy nižšieho stupňa nedokázali dostatočne dobre zbaviť spektrá pozadia a polynómy vyššieho stupňa nepriniesli žiadne podstatné vylepšenie oproti polynómu 4. stupňa.

Po zbavení SERS spektier pozadia môžeme pristúpiť k ďalšiemu kroku – faktorovej analýze.

8.1.2 Faktorová analýza

Faktorovú analýzu sme prevádzali rovnako ako autori článku v [78] pomocou programu FA8asc.exe napísaného doc. Jiřím Bokom CSc. na základe algoritmu „singular value decomposition“ popísaného v [94]. Výstupom z tohto algoritmu je množina ortonormálnych subspektier S_j , váh W_j a hodnôt V_{ij} reprezentujúcich relatívnu prítomnosť subspektra S_j v každom experimentálnom spektre $Y_i(\nu)$. Dané experimentálne spektrum môžeme potom vyjadriť približne ako:

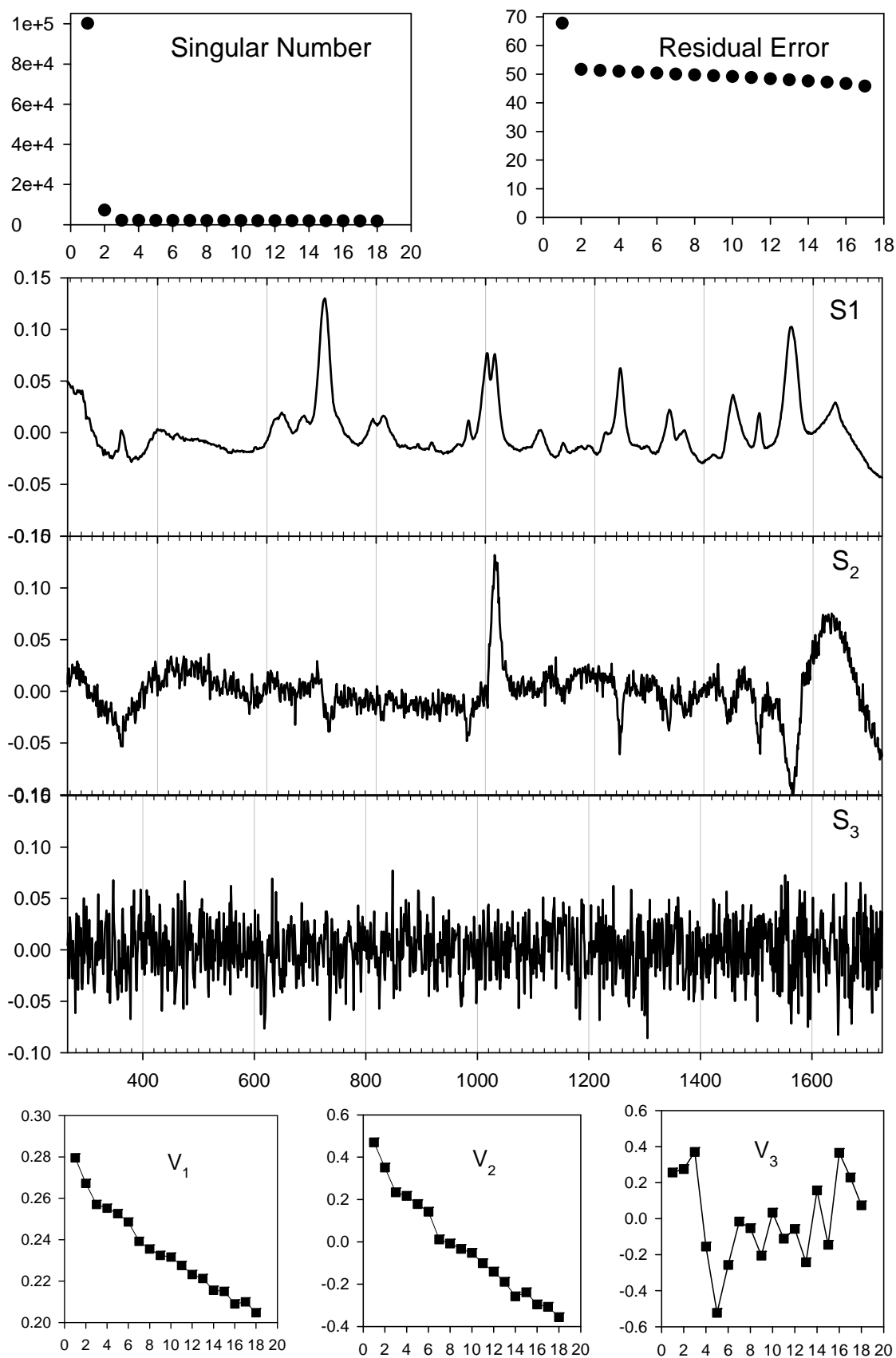
$$Y_i(\nu) = \sum_{j=1}^M W_j V_{ij} S_j(\nu) \quad (27)$$

Dimenzia M reprezentuje minimálny počet nezávislých komponent prítomných v experimentálnych spektrách, pomocou ktorých je možné rekonštruovať experimentálne spektrá $Y_i(\nu)$ s čo najväčšou možnou presnosťou. Hodnotu M je možné získať z reziduálnej chyby aproximácie.

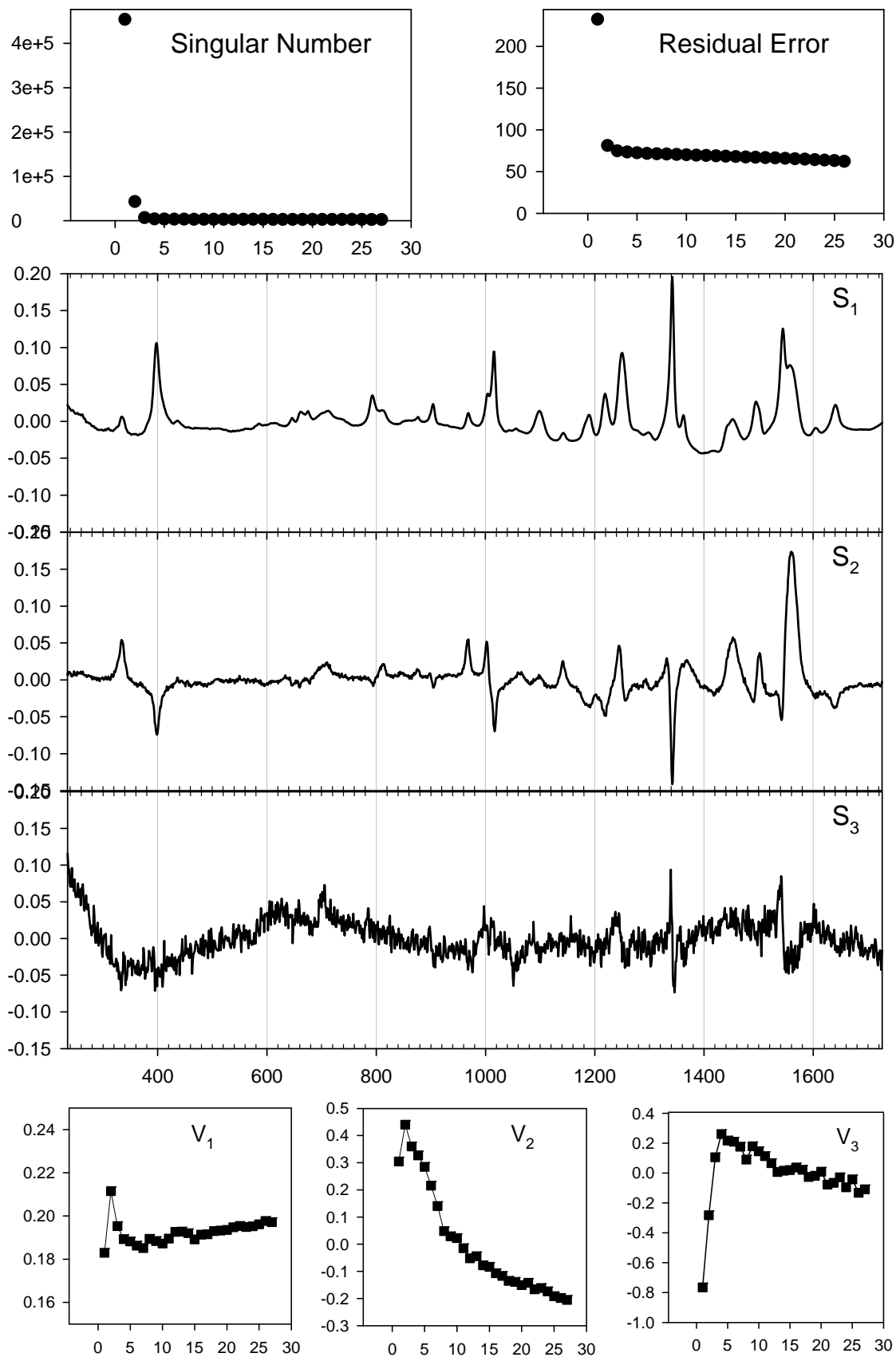
Pre ilustráciu uvádzam na nasledujúcich dvoch stranách (obr. 8-3 a 8-4) výsledky faktorovej analýzy pre dve sady spektier. Z výsledkov pre prvú sadu spektier je možné odhadnúť, že metalácia neprebíhala a naopak z výsledkov pre druhú sadu spektier sa dá odhadnúť, že metalácia prebiehala (v druhom subspektre sú zreteľné negatívne peaky odpovedajúce metalovanej forme).

V oboch týchto prípadoch vidíme (na základe reziduálnej chyby), že naše experimentálne spektrá môžeme skonštruovať z dvoch subspektier a ďalšie subspektrá môžeme považovať za šum. K tým istým výsledkom sme prišli aj pre iné sady spektier.

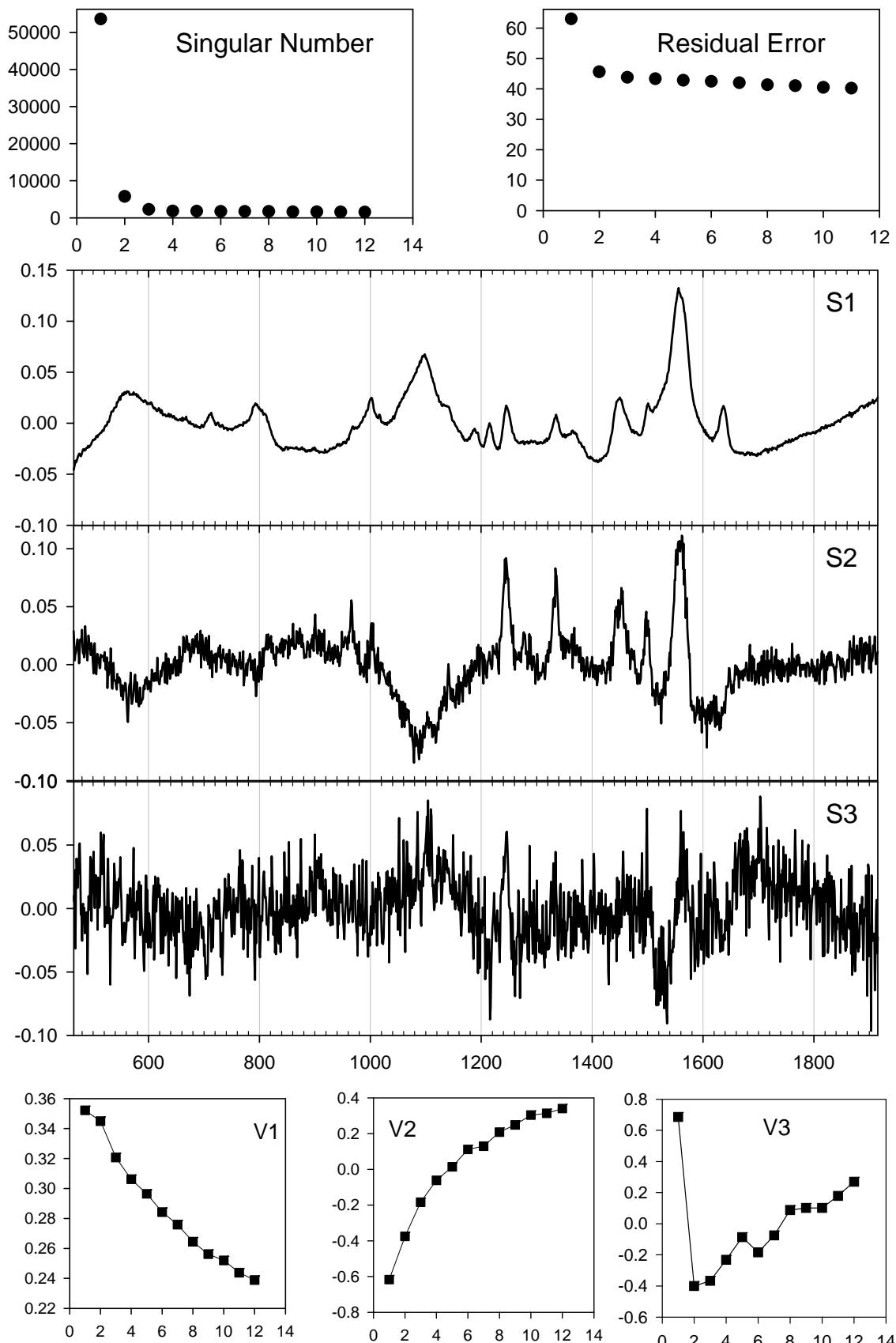
Na tretej strane (obr. 8-5) uvádzam výsledky faktorovej analýzy pre sadu spektier z obrázka 7-11.



Obrázok 8-3: Ukážka výsledku faktorovému analýzy: súbor spektrier pri ktorých pravdepodobne nedošlo k metalácii.



Obrázok 8-4: Ukážka výsledku faktorovej analýzy: súbor spektrier pri ktorých pravdepodobne došlo k metalácii.



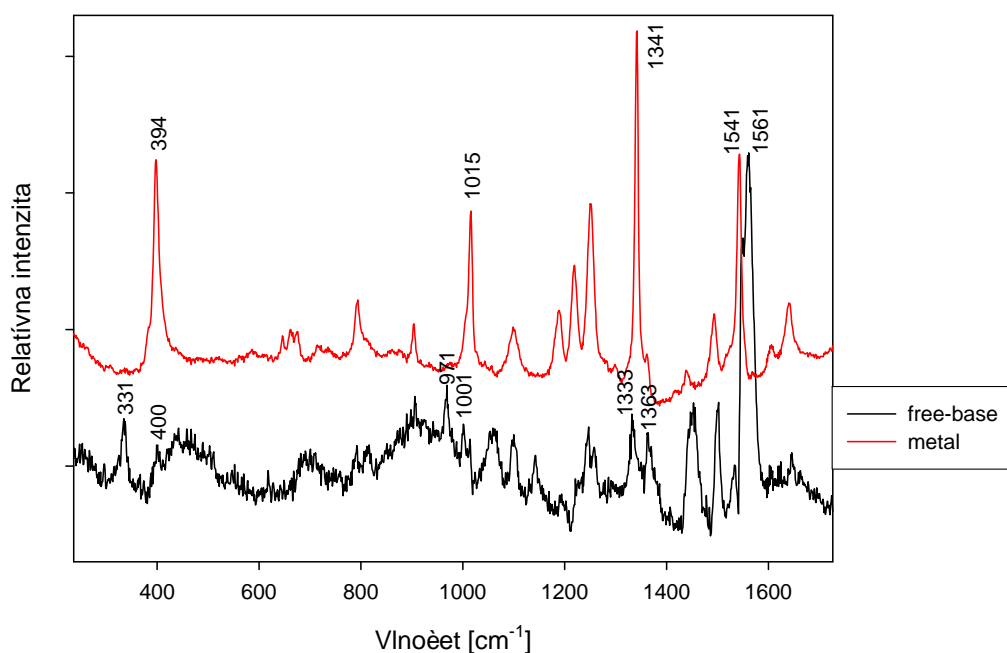
Obrázok 8-5: Výsledok faktorovej analýzy pre sadu spektier z obrázka 7-11.

8.1.3 Získanie spektier metalovanej a nemetalovanej formy TMPyP

Subspektrá S_1 a S_2 sú získané faktorovou analýzou (tj. čisto matematickým postupom). Fyzikálna interpretácia týchto subspektier je taká, že prvé subspektrum reprezentuje vážený priemer experimentálnych spektier a druhé subspektrum nesie väčšinu zmien medzi spektrami. Pre nás nie je konečným cieľom skonštruovať experimentálne spektrá zo subspektier získaných faktorovou analýzou, ale skonštruovať ich zo spektier s fyzikálnym významom. V našom prípade očakávame, že nimi budú spektrá metalovanej a nemetalovanej formy porfyrínu. Je dôležité sledovať spektrálne zmeny pre rozsahy vlnočtu $300\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, $950\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$, $1330\text{-}1360\text{ cm}^{-1}$ a $1540\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$. Zatiaľ čo nemetalovaný TMPyP sa vyznačuje pásmi 328 , 965 , 1000 , 1334 , 1359 a 1550 cm^{-1} , metalovaný AgTMPyP sa vyznačuje pásmi 392 , 1010 , 1337 a 1541 cm^{-1} [78]. Ako však bolo zistené [77], pásy nachádzajúce sa v oblastiach $950\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ a $1540\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ vykazujú spektrálne zmeny aj bez prítomnosti striebra (spôsobené pravdepodobne vzájomnou interakciou molekúl). Preto je najvhodnejšie rozlišovať metalovanú a nemetalovanú formu TMPyP pomocou pásov nachádzajúcich sa v oblastiach $300\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ a $1330\text{-}1360\text{ cm}^{-1}$.

Spektrum nemetalovanej a metalovanej formy porfyrínu sme určili ako vhodnú lineárnu kombináciu subspektier S_1 a S_2 (získaných faktorovou analýzou zo sady spektier pre čistý TMPyP). Kritériom pre túto lineárnu kombináciu bolo to, aby sa v spektre metalovanej formy nenachádzali pásy patriace nemetalovanej forme a naopak (rozhodovali sme sa podľa pásov 327 , 1334 a 1360 cm^{-1} charakteristických pre free-base formu a pásov 390 a 1337 cm^{-1} charakteristických pre metalovanú formu) a aby v spektách neboli prítomné žiadne pásy z negatívnou intenzitou.

Nakoniec sme obe spektrá nanormovali na pás 1095 cm^{-1} , ktorého intenzita by nemala závisieť na metalácii. Tieto spektrá sú v nasledujúcom obrázku.



Obrázok 8-6: Spektrá metalovanej a nemetalovanej formy TMPyP

8.1.4 Stanovenie pomeru metalovanej a nemetalovanej formy TMPyP

Posledným krokom pri spracovaní spektier bolo stanovenie experimentálnych spektier Y_j ako váženého súčtu normovaných spektier nemetalovanej (P_1) a metalovanej (P_2) formy:

$$Y_j(i) = a_j P_1(i) + b_j P_2(i) \quad (28)$$

Pričom i je index spektrálneho bodu a j je index spektra odpovedajúceho časovému oneskoreniu t_j . a_j a b_j sme určili fitovaním pomocou programu Sumfit2s.exe napísaného doc. Jiřím Bokom CSc. Fit sme previedli raz pre oblasť $300-460 \text{ cm}^{-1}$ a pre oblasť $1300-1400 \text{ cm}^{-1}$. Nakoniec sme určili pomer $a_j/(a_j+b_j)$, t.j. aká časť TMPyP je v nemetalovanej forme. Naše výsledky sú v nasledujúcej subkapitole.

8.2 Výsledky

Rozhodli sme sa preskúmať ako prebieha metalácia TMPyP priamo v koloide v prítomnosti silanu. V podstate máme dve možnosti: 1) pridať do koloidu silan a až následne TMPyP alebo 2) pridať silan aj porfyrín naraz. Rozhodli sme sa pridávať silan aj porfyrín naraz. Tento spôsob síce neodpovedá presne situácii s imobilizovanými striebornými časticami na sklenených povrchoch, no poskytuje radu výhod. V prípade pridania najprv silanu a až potom porfyrínu by v pokusoch vystupoval ďalší parameter (čas medzi pridaním), ktorý by sme museli brať do úvahy a pokúsiť sa nájsť jeho optimálnu hodnotu.

Hlavné dva dôvody pre pridávanie silanu a TMPyP naraz boli ale tie, že sme po predbežných pokusoch s merkaptosilanom vedeli, že:

- 1) Silan má silnejšiu afinitu k strieborným nanočasticami, t.j. po pridaní obsadí povrch týchto nanočastíc a metalácia TMPyP prebieha veľmi obtiažne.
- 2) Po pridaní silanu koloid zagreguje (čomu sme tiež chceli zamedziť).

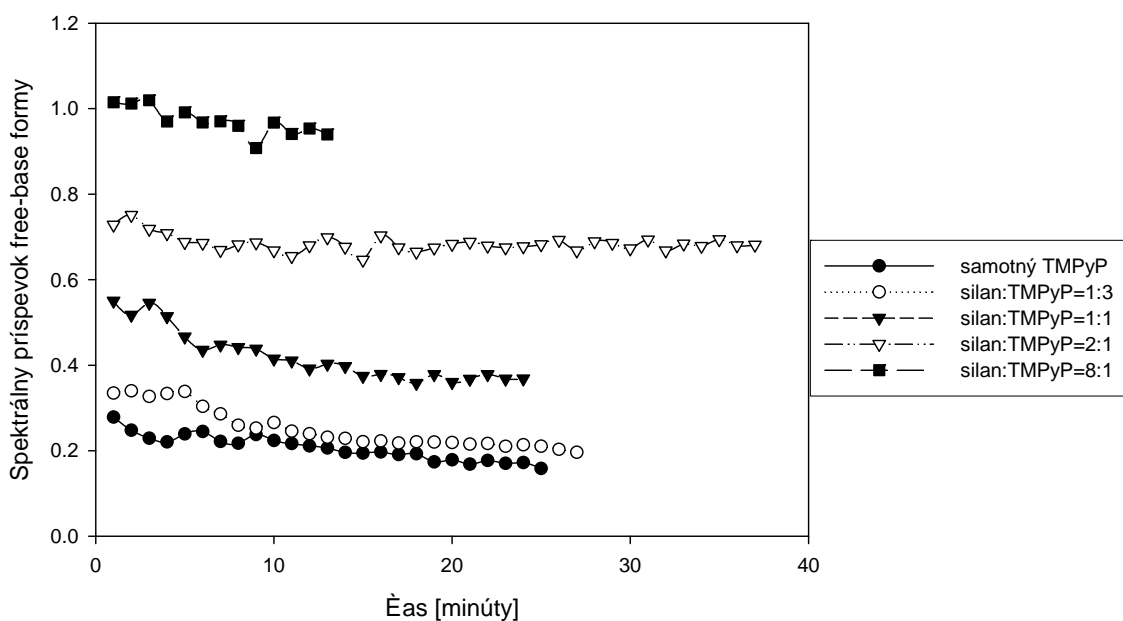
K tomu, aby sme zistili, ako ovplyvňuje prítomnosť silanu metaláciu porfyrínu, je dôležité správne odhadnúť koncentráciu silanu. V opačnom prípade získame signál buď len silanu alebo len TMPyP.

Po predbežných pokusoch s merkaptosilanom sme našli približne takú koncentráciu silanu, ktorú môžeme považovať za „medznú“ (t.j. v SERRS spektre koloidu po pridaní TMPyP aj silanu bolo vidieť aj TMPyP aj silan). Jednalo sa o pridanie 5 μl TMPyP koncentrácie $5 \cdot 10^{-5}$ M rozpusteného vo vode a 5 μl silanu koncentrácie 1:10000 (objemovo) rozpusteného v metanole do kyvety s 0,5 ml koloidu. Výsledná koncentrácia v kyvete bola teda $5 \cdot 10^{-7}$ M pre TMPyP a $1 \cdot 10^{-7}$ M pre silan¹². Kvôli prehľadnosti sme si tento pomer stanovili ako normu, túto koncentráciu sme nazvali „silan:TMPyP=1:1“. Ďalej uvádzam koncentrácie relatívne vzhľadom k tejto. Napr. koncentrácia „silan:TMPyP=2:1“ znamená, že v pridanej kvapke bolo dvakrát viac silanu ako v našej „norme“. Množstvo pridaného TMPyP (5 μl koncentrácie $5 \cdot 10^{-5}$ M) bolo konštantné pre všetky experimenty.

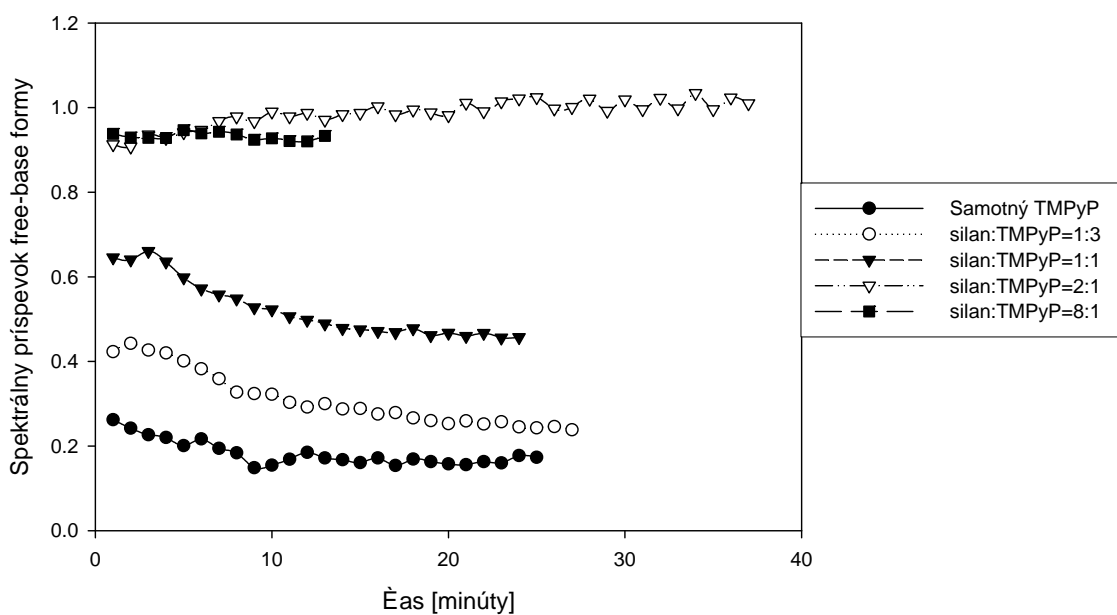
¹² Vzhľadom k tomu, že merkaptosilan a aminosilan sú dve rôzne látky, objemovej koncentrácii 1:10000 odpovedajú dve rôzne molárne koncentrácie ($9,6 \cdot 10^{-6}$ M pre merkaptosilan a $1,03 \cdot 10^{-5}$ M pre aminosilan). Tento rozdiel je ale pre naše účely zanedbateľný.

8.2.1 Merkaptosilan

Merania sme previedli pre rôzne koncentrácie. Výsledky sú v nasledujúcich dvoch obrázkoch (fity pre oblasti $300-460\text{ cm}^{-1}$ a $1300-1400\text{ cm}^{-1}$).



Obrázok 8-7: Časová závislosť pomeru nemetalovanej formy TMPyP pre rôzne koncentrácie merkaptosilanu. (Fit prevedený v oblasti $300-460\text{ cm}^{-1}$)



Obrázok 8-8: Časová závislosť pomeru nemetalovanej formy TMPyP pre rôzne koncentrácie merkaptosilanu. (Fit prevedený v oblasti $1300-1400\text{ cm}^{-1}$)

To, že výsledky sú rovnaké pre obidve fitované oblasti (s výnimkou koncentrácie „silan:TMPyP=2:1“¹³), môžeme považovať za potvrdenie ich správnosti.

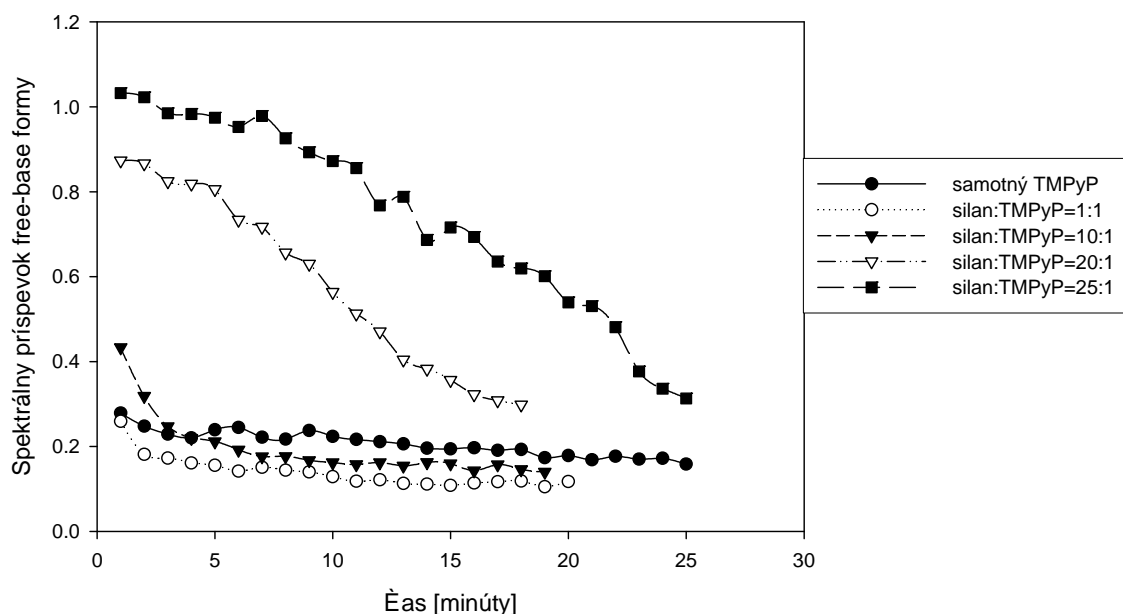
Z práce autorov [78] vieme, že porfyrín sa bez prítomnosti silanu metaluje z asi 70 percent. Výsledky našich experimentov sa s týmito výsledkami približne zhodujú. V prítomnosti merkaptosilanu sa ale táto hodnota mení. Pre veľmi nízke koncentrácie aminosilanu sú výsledky totožné s čistým TMPyP (čo sa dalo očakávať), s rastúcou koncentráciou silanu rastie pomer prítomnej free-base formy, ktorý pre vysoké koncentrácie silanu dosahuje až 100 percent. Samozrejme je nutné povedať, čo je to „vysoká“ a „nízka“ koncentrácia merkaptosilanu. Naše merania prebiehali pri koncentrácii TMPyP $5 \cdot 10^{-7}$ M a rozmedzí koncentrácií pre merkaptosilan od $3,3 \cdot 10^{-8}$ M po $8 \cdot 10^{-7}$ M. Na základe našich výsledkov odhadujem, že koncentrácii TMPyP rovnej $5 \cdot 10^{-7}$ M odpovedajú medzné koncentrácie merkaptosilanu $1 \cdot 10^{-8}$ M a $1 \cdot 10^{-6}$ M.

Čo sa kinetiky týka, v niektorých grafoch je možné vidieť mierny úbytok free-base formy. Postupný úbytok free-base formy nemôžeme na základe našich výsledkov ani podporiť ani vyvrátiť. Táto zmena je malá, v nami skúmanom časovom horizonte môžeme považovať pomer free-base formy za približne konštantný (pričom táto konštanta závisí na koncentrácii merkaptosilanu). Kinetiku tohto systému má zmysel študovať pre výrazne dlhší časový horizont.

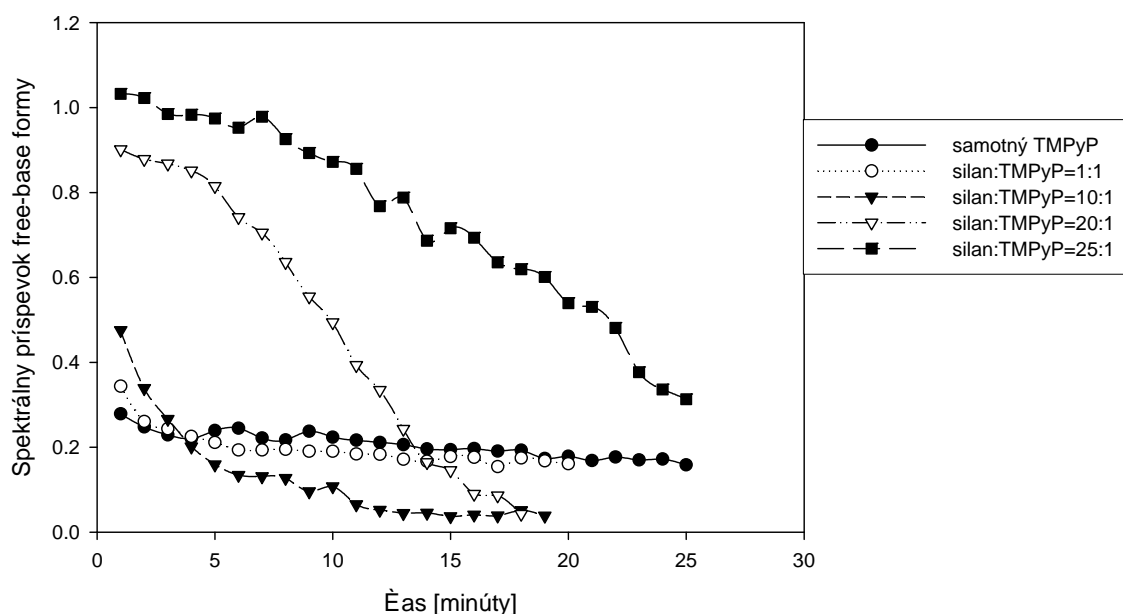
¹³ V tomto prípade sme pre fit v oblasti $1300\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ získali očividne chybné hodnoty – príspevok metalovanej formy TMPyP bol záporný, čo je samozrejme z fyzikálnych dôvodov nemožné. Preto za smerodajne berieme v prípade koncentrácie 2:1 výsledky získané fitom v oblasti $300\text{-}460\text{ cm}^{-1}$.

8.2.2 Aminosilan

Experiment sme zopakovali aj pre aminosilan. Výsledky pre fity 300-460 cm^{-1} a 1300-1400 cm^{-1} sú v nasledujúcich dvoch grafoch:



Obrázok 8-9: Časová závislosť pomeru nemetalovanej formy TMPyP pre rôzne koncentrácie aminosilanu. (Fit prevedený v oblasti 300-460 cm^{-1})



Obrázok 8-10: Časová závislosť pomeru nemetalovanej formy TMPyP pre rôzne koncentrácie aminosilanu. (Fit prevedený v oblasti 1300-1400 cm^{-1})

Aj v prípade aminosilanu sa výsledky pre fity v oblastiach 300-460 cm^{-1} a 1300-1400 cm^{-1} v podstate zhodujú (čo môžeme opäť považovať za potvrdenie ich správnosti).

Hlavný záver z experimentov s merkaptosilanom (t.j. že silan svojou prítomnosťou posúva rovnováhu medzi free-base a metalovanou formou porfyrínu v prospech free-base) ostáva v platnosti aj v tomto prípade.

Oproti merkaptosilanu však aminosilan vykazuje dva rozdiely:

- 1) Na získanie spektier, v ktorých bolo poznať aj porfyrín aj silan, bolo nutné v prípade aminosilanu použiť vyššie koncentrácie silanu.
- 2) Zatiaľ čo merkaptosilan dostatočne účinne bráni metalácii porfyrínu, aminosilan metalácii zabraňuje len na začiatku a postupne sa porfyrín metaluje. Presnejšie by bolo asi povedať, že prítomnosť aminosilanu metalácii nezabráni, iba ju spomalí. Časovú závislosť sme premeriavali len 25 minút, no už po takomto čase sa porfyrín nametaluje skoro tak ako bez prítomnosti silanu.

8.3 Zhrnutie výsledkov

Celkovo by som výsledky našich experimentov zhrnul takto:

Prítomnosť silanu vo všeobecnosti bráni metalácii TMPyP. To nastáva pravdepodobne tak, že sa silan naviaže na strieborné nanočastice a bráni kontaktu molekulám porfyrínu s povrchom strieborných nanočastic.

V prípade aminosilanu je presnejšie hovoriť nie ako o zabránení metalácie ale o jej spomalení. Zatiaľ čo metalácia TMPyP v čistom koloide je veľmi rýchly proces (prebehne v prvých minútach; nie je síce úplná, to je ale spôsobené tým, že jej bránia borátové ióny na povrchu koloidu), v prípade pridania aminosilanu sa táto metalácia výrazne spomalí a je možné ju pozorovať v širšej časovej škále (desiatky minút). Predpokladáme, že to je spôsobené tým, že na začiatku sa aminosilan prichytí na strieborné nanočastice, no TMPyP ho postupne vytláča.

Merkaptosilan má afinitu k strieborným nanočasticiam oveľa vyššiu ako aminosilan. Jeho pridanie do koloidu metalácii bráni alebo ju spomalí natoľko, že v priebehu desiatok minút je veľmi nevýrazná.

Tieto experimenty nie sú úplne totožné s experimentmi na pevných povrchoch. Nie je ale možné postupovať tak, že by sme študovali závislosť metalácie porfyrínu na koncentrácii silanu použitého pri príprave sklíčok. Toto ale nie je z praktických dôvodov možné, pre nízke koncentrácie silanu sa strieborné nanočastice na sklenený povrch vôbec nenaviažu. Naopak môžeme očakávať, že taký koncentrovaný silan, ako sme používali pri príprave povrchov, zabráni metalácii porfyrínu úplne.

Toto môžeme považovať za vysvetlenie toho, prečo na sklíčkach s imobilizovanými striebornými nanočasticami neprebíha metalácia porfyrínov. Je to spôsobené prítomnosťou silanu na týchto nanočasticiach, ktorý pravdepodobne vychytáva kladne nabité strieborné častice, ktoré sa preto nemôžu zabudovávať do porfyrínového makrocyclu a tým porfyrín metalovať. Možnosť, že sa porfyrínové molekuly na pevných povrchoch nemetalujú, pretože sú naviazané kolmo k povrchu, je veľmi nepravdepodobná, pretože metalace nebola pozorovaná ani pri nízkych, evidentne podpokryvových koncentráciách. Napriek tomu že experimenty priamo na koloidoch ukazujú, že merkaptosilan je v tomto podstatne účinnejší ako aminosilan, v prípade pevných povrchov metalácii úspešne zabraňujú obe.

V Záver

Celkovo môžeme skonštatovať, že dve hlavné ciele diplomovej práce (t.j. nájdenie optimálneho spôsobu prípravy SERS-aktívnych povrchov získaných imobilizáciou strieborných nanočastíc na sklenenú podložku a využitie týchto povrchov k štúdiu biomolekúl prostredníctvom povrchom zosilneného Ramanovho rozptylu) boli splnené. Počas SERS experimentov sme narazili na jednu zaujímavú otázku (prečo na imobilizovaných strieborných nanočasticách neprebíha metalácia porfyrínu). Preto sme si vytýčili ako ďalší cieľ zodpovedanie tejto otázky. Aj tento cieľ sa nám podarilo splniť.

Závery týkajúce sa prípravy povrchov sú tieto:

1. Povrchy je možné pripraviť z borohydridového aj citrátového koloidu. Pre účely SERS je ale citrátový koloid nevhodný.
2. Na imobilizáciu strieborných nanočastíc je možné použiť obe nami testované silany (merkaptosilan aj aminosilan)
3. Optimálna koncentrácia silanu je cca 20%.
4. Optimálna doba silanizácie je cca 30 minút.
5. Optimálna doba ponorenia nasilanizovaného sklíčka do koloidu je cca 6 hodín.

Treba však poznamenať, že hoci je týmto postupom možné získať kvalitné povrchy vhodné k SERS účelom, výsledok nie je dopredu jasný a ani najprísnejšie dodržanie tohto postupu nezaručí úspešnosť prípravy.

Ako biomolekuly určené k SERS štúdiu sme si vybrali porfyríny. Závery týkajúce sa SERS experimentov na nich môžeme zhrnúť do týchto bodov:

1. Použitím pripravených strieborných povrchov je možné získať kvalitné spektrá porfyrínov.
2. Obzvlášť vhodné k tomuto účelu sa ukázal byť TMPyP (ako zástupca kladne nabitého porfyrínu) a TPP ako zástupca vo vode nerozpustného porfyrínu. Ich spektrá sa nám podarilo získať aj pri koncentrácii $1 \cdot 10^{-7}$ M.

-
3. Spektrá záporne nabitého TSPP nedosahovali kvalitu vyššie spomenutých porfyrínov. To bolo spôsobené pravdepodobne coulombovským odpudzovaním medzi TSPP a borátovými aniónmi na povrchu strieborných nanočastíc.
 4. Výhody SERS spektroskopie pomocou povrchov s imobilizovanými striebornými nanočasticami sú najzjavnejšie v prípade TPP. Pri experimentoch v koloide tvorí nezanedbateľnú časť signálu rozpúšťadlo. SERRS spektrum TPP nepodarilo získať dokonca ani pomocou zlatých povrchov.
 5. SERRS spektrá porfyrínov jasne ukazujú, že nedochádza k ich metalácii (ktorá prebieha v koloide). Strieborné povrchy teda (prekvapivo) poskytujú možnosť ako získať SERRS spektrá porfyrínov vo svojej natívnej nemetalovanej forme.

Pri skúmaní, prečo na strieborných povrchoch nedochádza k metalácii porfyrínu, sme pomocou experimentov v koloide prišli k nasledujúcim záverom:

1. Naše merania potvrdili známy fakt, že v koloide dochádza k metalácii porfyrínu.
2. Prítomnosť silanu však tento proces výrazne ovplyvní: prítomnosť merkaptosilanu tomuto procesu zabráni a prítomnosť aminosilanu tento proces výrazne spomalí.

Napriek tomu, že strieborné povrchy a strieborný koloid nie sú úplne ekvivalentné systémy a pri experimentoch v koloide sme používali koncentráciu o mnoho rádov nižšiu ako pri príprave povrchov, môžeme na základe našich výsledkov s koloidmi predpokladať, že na našich pevných strieborných povrchoch nedochádza k metalácii porfyrínu v dôsledku prítomnosti silanu, ktorý z koloidných častíc na seba naviaže kladne nabité striebro.

VI Literatúra

- [1] Kneipp K., Kneipp H., Itzkan I., Dasari R. R., Feld M. S., *J. Phys.: Condens. Matter* **2002**, 14, 597.
- [2] Prosser V. a kol.: *Experimentální metody biofyziky*, Academia, Praha, **1989**.
- [3] Fleischmann M., Hendra P. J., McQuillan A. J., *Chem. Phys. Lett.* **1974**, 26, 163.
- [4] Jeanmaire D. J., Van Duyne R. P., *J. Electroanal. Chem.* **1977**, 84, 1.
- [5] Albrecht M. G., Creighton J. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 5215.
- [6] Bachackashvilli A., Efrima S., Katz .B, Priel Z., *Chem. Phys. Lett.* **1983**, 94, 571.
- [7] Kneipp K., Hinzmann G., Fassler D., *Chem. Phys. Lett.* **1983**, 99, 5
- [8] Hildebrandt P., Stockburger M., *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 5935
- [9] Pettinger B., *Chem. Phys. Lett.* **1984**, 110, 576.
- [10] Kneipp K., Kneipp H., Rentsch M., *J. Mol. Struct.* **1987**, 156, 3,
- [11] Pettinger B., Krischer K., *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1987**, 45, 133.
- [12] Kneipp K., *Exp. Tech. Phys.* **1988**, 36, 161.
- [13] Moskovits M., *J. Chem. Phys.* **1978**, 69, 4159.
- [14] Weitz D.A., Moskovits M., Creighton J.A.,: *Structure and Chemistry at interfaces: new laser and optical technology*, VHC Publisher, Peerfield Brach Florida, Eds. Hall and Ellis A.B. **1986**.
- [15] Garrel R. L., *Anal. Chem.* **1988**,6, 401.
- [16] Creighton J. A., Blatchford C. G., Albrecht M. G., *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, **1979**, 75, 790.
- [17] Creighton J. A., Eadon D. G., *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1991**, 87, 3881.
- [18] Tian Z. Q., Ren B., Wu D. Y., *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 9463.
- [19] Lund R. A., Smardzewski R. R., Tevault D., E., *J. Chem. Phys.* **1984**, 88, 1731.
- [20] Moskovits M. *Rev. Mod. Phys.* **1985**; 57, 783.
- [21] Otto et al., *J. Mol. Struct.* **2003**, 501, 661.
- [22] Champion, A., Kambhampati P., *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 241.
- [23] Sanda P. N., Warlaumont J. M., Demuth J. E., Tang J. C., Cristmann K., Bradley J. A., *Phys. Rev. Lett.* **1980**, 45, 1519.
- [24] Liao P. F., Bergman J. G., Chmela D. S., Wokaun A., Mengailis J., Hawryluk A.M., Economou N.P., *Chem Phys. Lett.* **1981**, 82, 355.

-
- [25] Hajduková N., *Diplomová práce*, Univerzita Karlova, Praha, **2005**.
- [26] Sládková M., *Diplomová práce*, Univerzita Karlova, Praha, **2004**.
- [27] Šišková M., *Diplomová práce*, Univerzita Karlova, Praha, **2003**.
- [28] Birke R.L., Lombardi J.R., in *Advances in laser spectroscopy*. Edd. Heydn and Son, London **1982**, p. 290.
- [29] Jackson J. D., *Classical Electrodynamics*, Wiley & Sons, Inc. **1975**.
- [30] Kerker M., Wang D. S., Chew H., *Appl. Opt.* **1980**, 19, 4159.
- [31] Wang D. S., Kerker M., *Phys. Rev. B* **1981**, 24, 1777.
- [32] Barber P. W., Chány R. K., Massoudi H., *Phys. Rev. Lett.* **1983**, 50, 997.
- [33] Cotton T.M., In *Spectroscopy of Surfaces* (Clark R. J. H., Hester R. E. Eds.), Wiley & Sons, Chichester, **1988**, p. 90.
- [34] Kotler Z., Nitzan A., *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 2011.
- [35] Moskovits M., *J. Raman Spectrosc.* **2005**, 36, 485.
- [36] Xu H., Kall M., *Phys. Rev. Lett.* **2002**, 89, 246802.
- [37] Kerker M., Siiman O., Bumm L. A., Wang D. S., *Appl. Opt.* **1980**, 19, 3253.
- [38] Zeman E. J., Schatz G. C., *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 634.
- [39] Xu H. X., Aizpurua J., Kall M., Apell P., *Phys. Rev. E* **2000**, 62 4318.
- [40] Inoue M., Ohtaka K., *J. Phys. Soc. Japan* **1983**, 52, 3853.
- [41] Fornasiero D., Grieser F., *J. Phys. Chem.*, **1987**, 78, 3213.
- [42] Vlčková B., Šloufová I., *Nano Letters*, **2002**, 2, 121.
- [43] Aravind P.K., Nitzan A., Metiu H., *Surf. Sci.* **1981**, 110, 189.
- [44] <http://en.wikipedia.org/wiki/Fractal>
- [45] http://mathworld.wolfram.com/images/eps-gif/CurlicueFractal_900.gif
- [46] <http://www.home.aone.net.au/~byzantium/ferns/f7.gif>
- [47] Kneipp K., Kneipp H., Kartha V. B., Manoharan R., Deinum G., Itzkan I., Dasari R. R., Feld M. S., *Phys. Rev. E* 1998, 57, R6281.
- [48] Weitz D. A., Oliveria M., *Phys. Rev. Lett.* **1984**, 52, 1433.
- [49] Stockman M. I., Shalaev V. M., Moskovits. M., Botet R., George T. F. *Phys. Rev. B* **1992**, 46, 2821.
- [50] Yamaguchi Y., Weldon M. K., Morris M. D., *Appl. Spectrosc.* **1999**, 53, 127.
- [51] Shalaev V. M., *Phys. Rep.* **1996**, 272, 61.
- [52] Sarychev A. K., Shalaev V. M., *Phys. Rep.* **2000**, 335, 275.

-
- [53] Safanov V. P., Shalaev V. M., Markel V. A., Danilova Y. E., Lepeshkin N. N., Kim W., Rautian S. G., Armstrong R. L., *Phys. Rev. Lett.* **1998**, 80, 1102.
- [54] Kneipp K. et al, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, 84, 3470.
- [55] Kneipp K., Wang Y., Kneipp H., Perelman L. T., Itzkan I., Dasari R. R., Feld M. S., *Phys. Rev. Lett.* **1997**, 78, 1667.
- [56] Brolo A.G., Irish D.E., Smith B.D., *J. Mol. Struct.* **1997**, 405, 29.
- [57] Otto A., *Surface-enhanced Raman scattering: 'classical' and 'chemical' origins Light Scattering in Solids IV. Electronic Scattering, Spin Effects, SERS and Morphic Effects* ed Cardona M. and Guntherodt G., (Berlin: Springer) **1984**, 289
- [58] Otto A., Mrozek I., Grabhorn H., Akemann W., *J. Phys.: Condens. Matter* **1992**, 4, 1143
- [59] Jiang J. D., Burstein E., Kobayashi H., *Phys. Rev. Lett.* **1986**, 57, 1793.
- [60] Arenas J. F., Woolley M. S., Tocon I. L., Otero J. C., Marcos J. I. *J. Chem. Phys.* **2000**, 112, 7669.
- [61] Persson B. N., *J Chem. Phys. Lett.* **1981**, 82, 561.
- [62] Otto A., *Phys. Status Solidi* **2001**, 188, 1455.
- [63] Kambhampati P., Child C. M., Foster M. C., Champion A., *J. Chem. Phys.* **1998**, 108, 5013.
- [64] Efrima S. in Conway B.E., White R.E., Boris J. O'M. (Eds.), *Modern Aspects of Electrochemistry*, Vol. 16, Plenum, New York, **1985**, 253ff.
- [65] Murray C. H. in Chang R. K., Furtak T. E. (Eds.), *Surface Enhanced Raman Scattering*, Plenum, New York, **1985**, 203.
- [66] Vo-Dinh T., Hiromoto M.Y.K., Neguj G. M., Moody R.L., *Anal. Chem.* **1984**, 56, 1667.
- [67] Vo-Dinh T., Stokes D. L., Griffin G. D., Volkan M., Kim U. J., Simon M. I., *J. Raman Spectrosc.* **1999**, 30, 785.
- [68] Lee P. C., Meisel D., *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 3391.
- [69] Frens G., *Nature* 1973, **241**, 20.
- [70] Fojtík A., Henglein A., Bunsenges B. *Phys. Chem.* **1993**, 97, 252.
- [71] Nedderson J., Chumanov G., Cotton T. M., *Appl. Spectrosc.* **1993**, 47, 1959.
- [72] Freeman R. G., Grabar K. C., Allison K. J., Bright R. M., Davis J. A., Jackson, M. A., Smith P. C., Walter D. G., Natan M. J., *Science* **1995**, 267, 1629.
- [73] Chumanov G., Sokolov K., Gregory B. W., Cotton T. M., *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 9466.
- [74] Keating C. D., Musick M. D., Keefe M. H., Natan M. J., *J. Chem. Educ.* **1999**, 76, 949.

-
- [75] Olson L. G., Lo Y., Beebe T. P., Harris J. M., *Anal. Chem.* **2001**, 73, 4268.
- [76] Grabar K. C., Allison K. J., Baker B. E., Brigit R. M., Brown K. R., Freeman R. G., Fox A. P., Kratiny Ch. D., Musick M. D., Natan M. J., *Langmuir* **1996**, 12, 2353.
- [77] Hanzlíková J., Procházka M., Štěpánek J., Baumruk V., Bok J., Anzenbacher P., *J. Raman Spectrosc.* **1998**, 29, 575.
- [78] Procházka M., Štěpánek J., Turpin P.-Y., Bok J., *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 1543.
- [79] Cotton T. M., Schultz S. G., Van Duyne R. P., *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 6528.
- [80] Itabashi M., Kato K., Itoh K., *Chem. Phys. Lett.* **1983**, 97, 5282.
- [81] Shoji K., Kobayashi Y., Itoh K., *Chem. Phys. Lett.* **1983**, 102, 179.
- [82] Kim M., Tsujimo T., Itoh K., *Chem. Phys. Lett.* **1986**, 125, 364.
- [83] Itoh K., Sugii T., Kim M., *J. Phys. Chem.* **1988**, 92, 1568.
- [84] Mou Ch., Chen D., Wang X., Zhang B., He T., Xin H., Liu F., *Chem. Phys. Lett.* **1991**, 179, 237.
- [85] Matějka P., Vlčková B., Vohlídal J., Pančoška P., Baumruk V., *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 1361.
- [86] Vlčková B., Matějka P., Šimonová J., Čermáková K., Pančoška P., Baumruk V., *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 9719.
- [87] Procházka M., Štěpánek J., Hanzlíková J., Mojzeš P., Baumruk V., Anzenbacher P., In *Spectroscopy of Biological Molecules* (Merlin J. C. et al., Eds.), Kluwer Academic Publisher, London, **1995**, p. 227.
- [88] Procházka M., Štěpánek J., Turpin P.-Y., Bok J., In *Proceedings of International Symposium on Progress in Surface Raman Spectroscopy-Theory, Techniques and Applications* (Tian Z. Q., Ren B. eds.), **2000**, p. 179.
- [89] Procházka M., Štěpánek J., Turpin P.-Y., Bok J., *J. Mol. Struct.* **1999**, 483, 221.
- [90] Bernard S., Felidj N., Truong S., Peretti P., Lévi G., Aubard J., *Biopolymers* **2002**, 67, 314.
- [91] Seitz O., Chehimi M. M., Cabet-Deliry E., Truong S., Felidj N., Perruchot C., Greaves S. J., Watts J. F., *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2003**, 218, 225.
- [92] Goss Ch. A., Charych D. H., Majda M., *Anal. Chem.* **1991**, 63, 85.
- [93] Otto A. J., *Raman Spectrosc.* **2002**, 33, 593
- [94] Malinowski, E. R., *Factor Analysis in Chemistry*, Wiley: New York, **1991**
- [95] Photodynamic therapy <http://www.radapharma.ru/eng/pdt/comparison/index.php>
- [96] Benefits of PDT, <http://www.cancerpdt.com/benefits.html>

-
- [97] Vitale M., Zauli G., Falcieri E.: Apoptosis vs. necrosis, <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/research/cytotech/apopto/data/chap10.htm>
- [98] Konan Y. N., Gurny R., Allemann R., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2002**, 66, 89.
- [99] Ochsner M., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1997**, 39, 1.
- [100] Phillips D., *Science Progress*, **1993/1994**, 77/(3/4), 295.
- [101] Friberg E. G. et al.: *Cancer Letters* **2003**, xx, 1
- [102] Morgan J., Oseroff A. R., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**, 49, 71.
- [103] Brown J. E., Brown B. B., Vernon D.I., Expert Opinion on Investigational Drugs, **1999**, 8, 1967.
- [104] Lovčinský M., *Diplomová práce*, Univerzita Karlova, Praha, **1997**
- [105] Types of photosensitisers, <http://www.bmb.leeds.ac.uk/pdt/individualPs.htm>
- [106] Molnár A., *Diplomová práce*, Univerzita Karlova, Praha, **2003**
- [107] DeRosa M. C., Crutchley R. J., *Coordination Chemistry Reviews*, **2002**, 233-234, 351
- [108] Bonnett R., Martinez G., *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9513.
- [109] Sharman W. M. a kol., *Drug Discovery Today*, **1999**, 4/11, 507.
- [110] Kubát P., Mosinger J., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **1996**, 96, 93.
- [111] Jirásková M. a kol., *Experiences with local photodynamic therapy with TPPS₄ and non-coherent light in Czech Republic*, <http://www.photobiology.com/photobiology99/contrib/Jiraskova/>
- [112] Smith K.C., *Laser in Photomedicine and Photobiology*, Springer Series in Optical Sciences 22), Springer-Verlag, 1980, p. 58