

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY
KARLOVY

DIPLOMOVÁ PRÁCE



OPTIMALIZACE SPEKTRÁLNÍ DETEKCE
PROTOPORFYRINU IX METODOU POVRCHEM
ZESÍLENÉHO REZONANČNÍHO RAMANOVA
ROZPTYLU

Magdalena Sládková

Školitel: Doc. RNDr. Blanka Vlčková, CSc.
Školitel-konzultant: Doc. RNDr. Peter Mojzeš, CSc.

Praha 2004

Tato diplomová práce byla vypracována na katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty University Karlovy pod odborným vedením doc. RNDr. Blanky Vlčkové, CSc a doc. RNDr. Petera Mojzeše, CSc.

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně a použila pouze pramenů citovaných v seznamu referencí.

V Praze dne 6.5.2004

Magdalene Sládkové

Magdalena Sládková

Děkuji především své školitelce Doc. RNDr. Blance Vlčkové, Csc za odborné vedení diplomové práce, cenné rady a ochotu kdykoli pomoci.

Dále bych chtěla poděkovat svému školiteli – konzultantovi Doc. RNDr. Peteru Mojžešovi, Csc za cenné rady a pomoc při měření RRS a SERRS spekter a jejich následném zpracování pomocí faktorové analýzy.

Děkuji Prof. MUDr. Milanovi Jirsovi, DrSc za uvedení do tématu a informace o protoporfyrinu IX.

Mgr. Petru Šmejkalovi a Mgr. Karolíně Šiškové děkuji za cenné diskuse a technické zázemí.

RNDr. Miroslavu Šloufovi, Ph.D. a paní Jiřině Hromádkové děkuji za změření vzorků TEM.

Taktéž děkuji všem pracovníkům katedry fyzikální a makromolekulární chemie PřFUK a oddělení fyziky biomolekul MFF za ochotu při řešení technických i odborných problémů.

V neposlední řadě děkuji svým blízkým za morální podporu a vytvoření skvělých podmínek pro studium.

1. ÚVOD	4
1.1. Povrchem zesílený Ramanův a rezonanční Ramanův rozptyl	4
1.2.1. Elektromagnetický mechanismus.....	5
1.2.2. Mechanismy molekulární rezonance.....	9
1.2.3. Ag hydrosoly jako SE(R)RS-aktivní povrchy.....	10
1.2.4. Elektronová, RR a SERRS spektra porfyrinů.....	13
2.3. Protoporfyrin IX: biologický význam a dosavadní spektrální studie	17
2.3.1. Biologický význam protoporfyrinu IX.....	17
1.3.2. Syntéza hemu – vznik protoporfyrinu IX.....	18
1.3.3. Dosavadní výsledky studia PPIX volné báze a jeho komplexů s přechodnými kovy metodami elektronové absorpční, RR a SERRS spektroskopie.....	22
2. CÍL PRÁCE	25
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1. Chemikálie a chemické nádoby	26
3.1.1. Chemikálie.....	26
3.1.2. Chemické nádoby.....	26
3.2. Přístrojové metody	27
3.3. Příprava stříbrného hydrosolu	29
3.4. Příprava roztoků pro měření koncentračních závislostí	30
3.5. Příprava roztoků pro měření závislostí spekter PPIX na pH	30
3.6. Příprava systémů Ag hydrosol/ PPIX	31
3.7. Příprava systémů Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX a Ag hydrosol/ HCl/ PPIX	31
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	32
4.1. Elektronová absorpční (UV-vis) spektra PPIX	32
4.1.1. Elektronová absorpční spektra PPIX v nevodném prostředí.....	32
4.1.1.1. Koncentrační závislost elektronových absorpčních spekter PPIX v DMSO.....	32
4.1.1.2. Koncentrační závislost elektronových absorpčních spekter PPIX v EtOH.....	33

4.1.2. Elektronová absorpční spektra PPIX ve vodném prostředí	34
4.1.2.1. Koncentrační závislost elektronových absorpčních spekter PPIX ve vodném prostředí.....	34
4.1.2.1. Závislost elektronových absorpčních spekter PPIX na pH vodného prostředí	35
4.1.3. Výsledky studia elektronových absorpčních spekter PPIX	38
4.2. Rezonanční Ramanova spektra PPIX	39
4.2.1. RR spektra PPIX v nevodném prostředí.....	39
4.2.2. RR spektra PPIX ve vodném prostředí v závislosti na pH	42
4.2.2.1. RR spektra PPIX v závislosti na pH vodného prostředí měřená s $\lambda_{exc} = 441,6$ nm	42
4.2.2.1. RR spektra PPIX v závislosti na pH vodného prostředí měřená s $\lambda_{exc} = 514,5$ nm	48
4.2.3. Vliv agregace molekul PPIX na RR spektra PPIX	54
4.2.3. Srovnání RR spekter PPIX při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm a $514,5$ nm	54
4.3. SERRS spektra PPIX v systémech s nativním Ag hydrosolem	58
4.3.1. SERRS spektra PPIX při excitaci $\lambda_{exc} = 441,6$ nm.....	61
4.3.2. SERRS spektra PPIX při excitaci $\lambda_{exc} = 514,5$ nm.....	69
4.4. SERRS spektra PPIX v systémech s Ag hydrosolem modifikovaným adsorpcí chloridů na povrch Ag nanočástic v kyselém a neutrálním prostředí.....	75
4.4.1. SERRS spektra systémů Ag hydrosoľ/ NaCl/ PPIX jako funkce koncentrace PPIX při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm	75
4.4.2. SERRS spektra systémů Ag hydrosoľ/ NaCl/ PPIX jako funkce koncentrace PPIX při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm	75
4.4.3. SERRS spektra systémů Ag hydrosoľ/ HCl/ PPIX jako funkce koncentrace PPIX při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm	77
4.4.4. SERRS spektra systémů Ag hydrosoľ/ HCl/ PPIX jako funkce koncentrace PPIX při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm	79
4.4.5. Transmisní elektronová mikroskopie SERRS-aktivních systémů s Ag nanočásticemi a PPIX ve vztahu k mezím SERRS spektrální detekce PPIX.....	87
5. ZÁVĚR	90
6. REFERENCE	94

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ98

1. ÚVOD

1.1. Povrchem zesílený Ramanův a rezonanční Ramanův rozptyl

Spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu je vibračně – spektroskopická metoda. Je založena na efektu, který se nazývá povrchem zesílený Ramanův rozptyl (Surface - enhanced Raman Scattering – SERS) či povrchem zesílený rezonanční Ramanův rozptyl (SERRS). V těchto metodách se úspěšně kombinuje selektivita vibračně spektroskopických metod s vysokou senzitivitou, jenž je způsobena efektem povrchového zesílení. Za dobu svého vývoje našla tato metoda řadu uplatnění, zejména v chemické analýze a v oblasti katalýzy a adsorpce. Podstatně také zasáhla do studia struktury biomolekul a jejich organizovaných systémů.

První zmínka o povrchem zesíleném Ramanově rozptylu je publikována v pracích Fleischmana, van Duynea a Creightona [1-3]. Tento jev byl poprvé pozorován Fleischmanem, jež studoval Ramanova spektra pyridinu adsorbovaného na stříbrné elektrodě [1]. Spektra vykazovala abnormální intenzity. Skutečnost, že se jedná o kvalitativně nový efekt – povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS), při kterém dochází ke zvýšení intenzity Ramanova rozptylu díky efektu povrchového zesílení faktorem až 10^7 – však dokázal až van Duyne [2].

Na základě návrhů mechanismů povrchového zesílení a prvotních experimentálních výsledků [3, 4] bylo zjištěno, že nutnou podmínkou k dosažení nejintenzivnějšího zesílení Ramanova rozptylu efektem povrchu [5, 6] je adsorpce molekuly na povrchy stříbra, zlata, mědi a alkalických kovů, jejichž povrchové nerovnosti jsou menší než vlnová délka excitačního záření. Na površích řady jiných kovů bylo zesílení pozorováno o několik řádů nižší. Mezi tyto kovy patří například palladium a platina. Tyto experimentální výsledky později potvrdil na základě teoretických výpočtů Creighton [7]. Pro SERS spektroskopii je možno využít různé typy nanostrukturních povrchů, například ostrůvkové filmy, za studena nanášené filmy, litograficky připravené mřížky [8], litograficky připravené soubory sféroidních částic [9], Ag elektrody (nerovnosti jsou vytvářeny oxidačně-redukčním cyklem v přítomnosti elektrolytu) a v neposlední řadě

poměrně lehce připravitelné hydrosoly kovů, připravované většinou redukcí soli příslušného kovu vhodným redukčním činidlem ve vodném i nevodném prostředí [10].

Faktor celkového zesílení signálu povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (definován jako poměr intenzity SERS signálu a signálu normálního Ramanova rozptylu za konstantního počtu rozptylujících molekul) je složen z příspěvků dvou hlavních mechanismů SERSu – tzv. elektromagnetického mechanismu (EM) [11,12], jež je u silně vodivých kovů (Ag, Au, Cu) zodpovědný za hlavní část zesílení ($10^4 - 10^5$) a tzv. chemického mechanismu (zesílení $10^1 - 10^2$) [13].

Intenzita rozptýleného záření I je dána vztahem

$$I_{RS} \approx |\vec{P}|^2, \quad (1.1)$$

tedy je úměrná čtverci indukovaného dipólového momentu.

Dipólový moment \vec{P} je dán součinem tenzoru polarizovatelnosti molekuly α a vektoru intenzity elektrické složky elektromagnetického pole \vec{E} :

$$\vec{P} = \alpha \cdot \vec{E}. \quad (1.2)$$

Velikost I je možno ovlivnit buď zvýšením intenzity elektrického pole E v místě, kde se molekula nachází, nebo zvýšením polarizovatelnosti molekuly α . Pro Ramanův rozptyl je významná především změna

polarizovatelnosti $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_k}\right)_0$ podle vibrační souřadnice Q_k

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_k}\right)_0 \cdot Q_k. \quad (1.3)$$

1.2.1. Elektromagnetický mechanismus

Podstatou elektromagnetického mechanismu je interakce dopadajícího elektromagnetického záření s nanočásticí nebo nanostrukturou kovu (Ag, Au, Cu), přičemž dochází k zesílení elektromagnetického pole v blízkosti povrchu.

Vektor intenzity elektrické složky elektromagnetického pole lze vyjádřit ve tvaru:

$$\vec{E} = \vec{E}_i + \vec{E}_M, \quad (1.4)$$

kde \vec{E}_i je intenzita elektrického pole budícího záření, \vec{E}_M je intenzita elektrického pole záření elasticky rozptýleného kovovou částicí podle Mieovy rozptylové teorie. K vyjádření intenzity elektrického pole indukovaného kovovou nanočásticí o poloměru a (například nanočásticí stříbra), kde $a \ll \lambda$, je nutné skutečný tvar nanočástic (v případě Ag se jedná o vyšší polyedry – dodekaedry a ikosaedry) aproximovat izolovanou kovovou koulí. V případě Rayleighovy aproximace - zdroj záření se nachází daleko od místa dopadu – a za předpokladu vztahu mezi vlnovou délkou záření a poloměrem a kovové částice $\lambda \gg 20a$, je možné hodnotu intenzity elektrického pole v místě r získat řešením Laplaceovy rovnice, za uvážení vhodných okrajových podmínek pro tangenciální a normálovou složku elektrického pole v místě $r = a$ [11].

Řešením pak dostáváme potenciál ve tvaru

$$\Phi = -E_0 \cdot r \cdot \cos \theta + g \cdot \left(\frac{a^3}{r^2}\right) \cdot E_0 \cdot \cos \theta, \quad (1.5)$$

kde

$$g = \frac{\varepsilon_i(\lambda_l) - \varepsilon_0}{\varepsilon_i(\lambda_l) + 2\varepsilon_0}, \quad (1.6)$$

přičemž

$$\varepsilon_i(\lambda_l) = \varepsilon_1(\lambda_l) + i\varepsilon_2(\lambda_l) \quad (1.7)$$

je dielektrická funkce kovu (komplexní relativní permitivita), jímž je nanočástice tvořena, závislá na vlnové délce λ_l . ε_0 je dielektrická konstanta homogenního prostředí obklopujícího částici a E_0 je amplituda intenzity elektrického pole budícího záření.

První člen rovnice (1.5) představuje příspěvek elektrického pole dopadajícího záření a druhý člen je příspěvkem dielektrického dipólu indukovaného v kovové kouli o polarizovatelnosti $g \cdot a^3$.

Průměrné elektrické pole v normálovém směru lze vypočítat jako druhou mocninu střední kvadratické hodnoty intenzity pole $\langle E_n^2 \rangle^{1/2}$, získanou z integrace E_n^2 přes element prostorového úhlu $d\Omega = \sin\theta d\theta d\varphi$ s limitami pro θ od 0 do π a pro φ od 0 do 2π

$$E_n = -\frac{\partial\Phi}{\partial r}, \quad (1.8)$$

pak

$$\langle E_n^2 \rangle^{1/2} = (1/3)^{1/2} \cdot E_0 \cdot [1 + 2g(a/r)^3]. \quad (1.9)$$

Intenzita pole indukovaného molekulového dipólu, který je orientovaný kolmo k povrchu koule, bude zesilována na základě změny intenzity elektrického pole podle rovnice (1.9). Toto zesílení, označované jako elektromagnetické, lze vyjádřit vztahem

$$L_n^2(\lambda_l) = \frac{\langle E_n^2 \rangle}{E_0^2} \approx [1 + 2g(a/r)^3]^2. \quad (1.10)$$

Výpočet tangenciálních složek elektrického pole v bodě r se provádí obdobně jako u normálové složky

$$E_t = -\frac{1}{r} \frac{\partial\Phi}{\partial\theta}, \quad (1.11)$$

integrace E_t^2 přes element prostorového úhlu $d\Omega$ pak dává vztah

$$\langle E_t^2 \rangle^{1/2} = (2/3)^{1/2} \cdot E_0 \cdot [1 - g(a/r)^3]. \quad (1.12)$$

Pro složky dipólového momentu molekuly orientované ve směru tangenciálních polí lze vztah elektromagnetického zesílení popsat

$$L_t^2(\lambda_l) = \frac{\langle E_t^2 \rangle}{E_0^2} \approx [1 - g(a/r)^3]^2. \quad (1.13)$$

Obdobné výpočty lze provést i pro záření rozptýlené molekulou. Ve vztahu je však nutno místo vlnové délky dopadajícího záření λ_i uvažovat vlnovou délku rozptýleného záření (uvažujeme Stokesův proces Ramanova rozptylu) λ_s a místo dielektrické funkce $\varepsilon_i(\lambda_i)$ použít hodnotu dielektrické funkce $\varepsilon_i(\lambda_s)$. Získáme tak koeficient zesílení g_0 :

$$g_0 = \frac{\varepsilon_i(\lambda_s) - \varepsilon_0}{\varepsilon_i(\lambda_s) + 2\varepsilon_0}. \quad (1.14)$$

Celkové zesílení Ramanova rozptylu pro jednotlivé normální vibrační módy je možné určit na základě zjištění, která složka tenzoru polarizovatelnosti molekuly α_{ij} je modulována v jejich průběhu, tedy která vykazuje nenulovou změnu podle normální souřadnice dané vibrace. Pokud je hlavní osa molekuly orientována kolmo k povrchu koule (v případě jiné orientace molekuly na povrchu koule je nutné provést transformaci souřadnic), pak pro vibrace příslušející daným složkám tenzoru polarizability platí následující faktory zesílení:

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

Maximální zesílení lze dosáhnout při splnění rezonanční podmínky, kdy je hodnota koeficientu zesílení g (resp. g_0) maximální, tedy:

$$\varepsilon_i(\lambda) \rightarrow -2\varepsilon_0 \Rightarrow \varepsilon_1(\lambda) = -2\varepsilon_0, \varepsilon_2(\lambda) \rightarrow 0. \quad (1.15)$$

Ve vakuu, kde $\varepsilon_0 = 1$ a při splnění rezonanční podmínky ve tvaru $\varepsilon_1 = -2$, má koeficient zesílení g (resp. g_0) hodnotu

$$g = (-3 + i\varepsilon_2) / i\varepsilon_2 \quad \text{pro malé } \varepsilon_2 : g = -3 / i\varepsilon_2. \quad (1.16)$$

Ze vztahu (1.16) plyne závislost zesílení na imaginární složce dielektrické funkce kovu. Čím je ε_2 větší, tím je zesílení signálu menší. Zároveň z tohoto vztahu plyne i závislost zesílení na typu kovu, neboť rezonanční podmínka (pro reálnou část ε) je pro různé kovy splněna při různé vlnové délce excitačního záření. Běžně užívané kovy v SER(R)S spektroskopii, tj. Ag, Au, Cu, mají rezonanční podmínku splněnu v oblasti vlnových délek viditelného záření, tedy v oblasti, v níž se nacházejí vlnové délky emisních linií běžně dostupných laserových pro excitaci Ramanova rozptylu. Navíc je při těchto rezonančních vlnových délkách hodnota ε_2 pro Ag, Au a Cu poměrně nízká, a proto tyto kovy vykazují ostré plasmonové rezonance s malým tlumením. Řada jiných kovů, např. Pt, Pd má tuto podmínku plasmonové rezonance splněnu v oblasti UV záření. Kovy s velkou hodnotou ε_2 (např. právě Pd, Pt) navíc nevykazují ostrou plasmonovou rezonanci.

1.2.2. Mechanismy molekulární rezonance

Pokud se při Ramanově rozptylu shoduje energie budícího záření s energií dovoleného elektronového přechodu v molekule, dochází k významnému zvýšení intenzity neelasticky rozptýleného záření. Tento jev je označován jako rezonanční Ramanův rozptyl (RRS).

V případě molekuly nacházející se v blízkosti SERS-aktivního povrchu může být molekulární mechanismus kombinován s EM mechanismem, pokud jsou pro excitační vlnovou délku splněny současně rezonanční podmínky pro buzení jak povrchových plasmonů v kovu, tak i molekulárního excitovaného stavu. Zatímco při RRS je splnění rezonanční podmínky zřejmé z elektronového absorpčního spektra molekuly, v SERSu je určení příspěvku molekulární rezonance komplikováno interakcí molekuly s povrchem kovu, jež způsobuje porušení elektronových energetických hladin v molekule. Výsledné změny rezonanční podmínky pro molekulu se obtížně stanovují kvůli překrytí slabé absorpce molekul plasmonovou extinkcí souboru kovových nanočástic. Pro spolehlivé zjištění příspěvku molekulární rezonance je tedy potřeba měřit SERS spektra pro různé vlnové délky a vyhodnotit excitační profily pásů.

Z hlediska terminologie jsou v literatuře rozlišovány dva případy. Kriteřiem je skutečnost, zda volná (neadsorbovaná) molekula při dané vlnové délce (apriori splňující plasmonovou rezonanční podmínku) absorbuje (je chromoforem) či nikoli.

1. Nechromoforové molekuly jsou chemisorbovány a dochází ke vzniku povrchového komplexu kov-adsorbát. Excitační záření je v rezonanci s charge-transferovým přechodem v takto vytvořeném povrchovém komplexu. Takový příspěvek je označován jako chemický mechanismus SERSu.
2. Chromoforové molekuly jsou adsorbovány, ale je předpokládáno pouze slabé ovlivnění jejich elektronových hladin. Molekulárně rezonanční podmínka je tak přibližně posuzována podle absorpčního spektra neadsorbované molekuly. Spektra systémů s takovým příspěvkem jsou označována jako SERRS (surface-enhanced resonance Raman scattering) spektra.

Uvedené dělení zjevně nezahrnuje případ chromoforové molekuly silně interagující s povrchem kovu. Takové případy jsou diskutovány v souvislosti s vysvětlením faktorů zesílení až 10^{14} pozorovaných v SERS experimentech na úrovni jedné molekuly.

1.2.3. Ag hydrosoly jako SE(R)RS-aktivní povrchy

Vedle elektrod nebo ostrůvkových filmů jsou hydrosoly kovů nejčastěji užívanými SE(R)RS-aktivními povrchy. Je obecně známo, že nejefektivnější SE(R)RS zesílení poskytují agregované hydrosoly [1,14,15]. Agregace může být vyvolaná buď preagregačním činidlem (např. Cl^- ionty) nebo samotným adsorbátem [16,17]. Dochází při ní ke změně v plasmonové extinkci a v důsledku toho i ke změně barvy hydrosolu. Tyto změny plasmonové extinkce je možné studovat pomocí UV – vis absorpčních spektrometrů. Proces agregace byl studován také pomocí elektronové mikroskopie a bylo prokázáno, že vlivem agregace se částice nezvětšují, ale pouze se spojují v soubory a shluky, v nichž optické excitace jednotlivých částic vzájemně interagují dipól – dipólovými interakcemi [18].

Teoretickým popisem nejjednoduššího souboru „intragujících částic“ se jako první zabývali Aravind *et al* [19], kteří použili modelu dvou interagujících kovových koulí. Vypočetli, že optické odezvy páru výrazně

závisí na vzdálenosti koulí. Jestliže se koule přibližují, objevuje se nové maximum plasmonové extinkce v oblasti vyšších vlnových délek a další maximum v oblasti nižších vlnových délek, které je však velmi blízké maximu extinkce izolované koule. Se zmenšováním vzdálenosti mezi oběma koulemi se maximum v oblasti vyšších vlnových délek vzhledem k maximu plasmonové rezonance jedné izolované koule posunuje dále do nízkofrekvenční oblasti.

Výpočtem faktorů zesílení EM mechanismem SERSu pro tento modelový systém se zabývali Xu *et al* [20]. Zjistili, že zmíněný faktor zesílení v prostoru spojnice dvou Ag koulí, jejichž vzdálenost je výrazně menší než jejich poloměr, může nabývat hodnot až 10^{11} . V téže práci jsou uveřejněny i výsledky obdobných výpočtů pro modelový systém tvořený dvěma pronikajícími koulemi (interpenetrating spheres). V tomto případě jsou maximální hodnoty faktoru zesílení EM mechanismem SERSu vypočteny pro prostory mezi koulemi nestejných poloměrů ($a_1 = 4a_2$, kde a_1 a a_2 jsou poloměry koulí) a činí až 10^8 .

Fornasiero a Grieser se zabývali popisem plasmonové extinkce lineárních agregátů [21]. Zjistili, že degenerovaný excitovaný stav souboru N izolovaných identických koulí částice se vlivem interakce dipól – dipól ve vytvořeném lineárním agregátu rozštěpí na N excitovaných stavů. Podle vzájemné orientace dipólových momentů jednotlivých koulí se původní pás plasmonové extinkce rozštěpí na dva, z nichž jeden se posune k vyšším a druhý k nižším vlnovým délkám. Se zvyšováním počtu částic v agregátu se tyto pásy posunují dále od původního pásu příslušejícího plasmonové extinkci izolované koule. Pomocí modelu lineárního agregátu byla poprvé s úspěchem interpretována absorpční spektra agregovaných Ag koloidů [21].

V práci [22] bylo zjištěno, že spontánní agregace nanočástic Ag a Au hydrosolů v důsledku adsorpce monomerních nízkomolekulárních adsorbátů (např. pyridinu) vede ke vzniku fraktálních agregátů. Vznik silných, prostorově lokalizovaných elektromagnetických polí po vnější optické extinkci fraktálních agregátů (tzv. „hot spots“) byl předpovězen na základě teoretických výpočtů optických odezev fraktálních agregátů v práci [23] a probádán experimentálně v práci [24].

Nejčastěji používaným typem hydrosolu pro SERS a SERRS spektrální studie je hydrosol stříbrný (Ag hydrosol). Důvodem je již zmíněná ostrá

plasmonová rezonance Ag nanočástic. Je připravován zejména chemicky redukcí dusičnanu stříbrného tetrahydridoboritanem sodným [14,15, 25], nebo citronanem (citrátem) sodným [26]. Na způsobu přípravy hydrosolu závisí jeho nejdůležitější chemické vlastnosti (povrchový potenciál, koncentrace a oxidační stav adsorpčních míst na povrchu stříbrných nanočástic), které výrazně ovlivňují schopnost adsorpce jednotlivých molekul na jejich povrch.

Potenciál hydrosolu určený potenciálem elektrické dvojvrstvy na povrchu částic hydrosolu závisí na poměru jednotlivých složek, z nichž je hydrosol připraven, a rovněž na době od přípravy hydrosolu k přidání adsorbátu. Hodnoty potenciálu na povrchu částic hydrosolu se pohybují v rozmezí od $-0,9V$ do $-0,1V$, přičemž stárnutím (aging) hydrosolu se hodnota tohoto potenciálu zvyšuje [27]. Měření potenciálu hydrosolu je velmi složité vzhledem k tomu, že je nutné užít vnějšího, dokonale reverzibilního redoxního systému [27].

Již od prvních SERS spektrálních studií byla věnována pozornost identifikaci dostupných adsorpčních míst na površích nanočástic Ag hydrosolů. Chemická interakce mnoha typů adsorbátů s povrchem byla připisována v řadě prací přítomností stříbrných Ag_n^+ klastrů ($n > 1$) na povrchu Ag nanočástic. V práci Roye *et al* [28] byla prokázána existence klastrů Ag_n^+ na povrchu Ag-elektrody.

Hildebrandt a Stockburger [29] poukázali na význam chemické modifikace nanočástic Ag hydrosolů adsorbujícími se ionty (konkrétně chloridy) pro adsorpci dalších adsorbátů. Na základě studia SERRS spekter rhodaminu 6G identifikovali dva různé typy adsorpčních míst, které však blíže nespécifikovali.

Na přítomnost kladně nabitých adsorpčních míst (obecně označovaných Ag^+) na nemodifikovaných (nativních) površích Ag nanočástic hydrosolů připravovaných redukcí tetrahydroboritanem sodným a jejich zásadní význam pro SERRS porfyrinů volné báze (free - base porphyrins) bylo poukázáno v práci [30]. Bylo prokázáno, že interakce porfyrinu volné báze (5,10,15,20-tetrakis-4-carboxyphenylporphin) s těmito adsorpčními místy vede ke vzniku metalovaného porfyrinu $AgTPPC_4$ spektrálně shodného se synteticky připraveným metaloporfyrinem $AgTPPC_4$. Modifikaci porfyrinů na

povrchů Ag nanočástic (modifikovaných i nemodifikovaných) byla věnována pozornost v řadě dalších prací, např. [31-33].

V pracích [33-43] bylo zjištěno, že na površích Ag nanočástic modifikovaných adsorpcí chloridů se nacházejí dva typy adsorpčních míst lišících se oxidačním stavem: Ag(0) a Ag⁺. Tvorba povrchových specií Ag(0) – TMPyP a Ag⁺ - TMPyP v důsledku interakce porfyriu volné báze H₂TMPyP (5,10,15,20-tetrakis-2-methyl-4-pyridylporphin) s povrchy modifikovanými adsorpcí chloridů a působením thiosulfátu sodného, byla prokázána v pracích [33,43,44].

1.2.4. Elektronová, RR a SERRS spektra porfyrinů

Skelet porfyriuového makrocyklu tvořený čtyřmi pyrrolovými jádry spojenými methinovými můstky má symetrii odpovídající bodové grupě symetrie D_{4h} . V případě metaloporfyrinů s jedním centrálním atomem kovu vázaným ke čtyřem donorovým atomům N pyrrolových jader zůstává tato symetrie zachována. V případě porfyrinů volné báze jsou dva z protilehlých pyrrolových atomů N protonizovány a symetrie porfyriuového makrocyklu je snížena na D_{2h} . Symetrie porfyriuových makromolekul může být dále snížena asymetrickým uspořádáním substituentů, jak je tomu například právě u PPIX.

Elektronová spektra metalovaných porfyrinů (symetrie D_{4h}) jsou

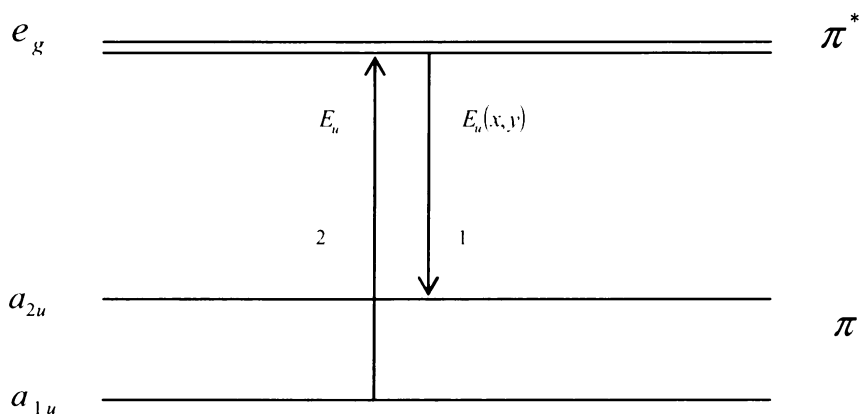


Schéma 1.1: Schématické znázornění Goutermanova čtyř-orbitalového modelu

nejčastěji interpretována na základě Goutermanova čtyř-orbitalového

modelu, zahrnujícího dvojici nejvyšších obsazených (HOMO) π orbitalů o symetrii a_{1u} a a_{2u} a degenerovaný π^* (e_g) orbital jako nejnižší neobsazený orbital (LUMO) (schéma 1.1).

Vzhledem k tomu, že energie dvou obsazených orbitalů a_{1u} a a_{2u} jsou velmi blízké, dochází k silné vzájemné interakci mezi elektronovými přechody $a_{1u} \rightarrow e_g$ a $a_{2u} \rightarrow e_g$ o stejné symetrii E_u . Součtem transičních momentů obou přechodů získáme intenzivní přechod B,

$$\mu_B = \mu_1 + \mu_2, \quad (1.17)$$

zatímco v rozdílovém členu

$$\mu_Q = \mu_1 - \mu_2 \quad (1.18)$$

se tranzitní momenty vzájemně téměř vyruší. První z přechodů dává vznik velmi intenzivnímu pásu B (tzv. Soretovu pásu), druhý mnohem méně intenzivnímu (minimálně o 1 řád) pásu Q.

V případě porfyrinů volných bází se snížení symetrie porfyrinového makrocycly $D_{4h} \rightarrow D_{2h}$ projevuje rozštěpením Q - pásu na čtyři pozorovatelné pásy. Metaloporfyriny a porfyriny volné báze se také zpravidla liší polohou maxima Soretova pásu, který se obvykle nachází pro metaloporfyriny u vyšších hodnot λ než u volných bází.

Tvorba dimerů a vyšších agregátů porfyrinových molekul se projevuje výraznými změnami v elektronových absorpčních spektrech, zejména v oblasti Soretova pásu. V případě vzniku dimerů či vyšších agregátů typu

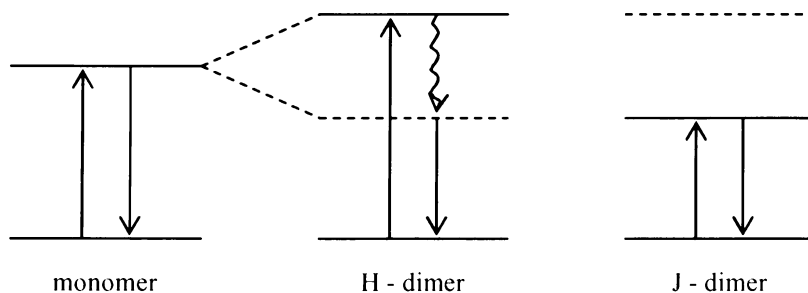


Schéma 1.2: Schématické znázornění štěpení energetických hladin H- a J - agregátů

H- se Soretův pás porfyriu nachází v oblasti nižších vlnových délek, v případě dimerů či vyšších agregátů typu J- pak v oblasti vyšších vlnových délek než Soretův pás izolovaných porfyriinových molekul (monomerů). Štěpení energetických hladin H- a J – agregátů je zobrazeno na schématu 1.2.

O měření a interpretaci elektronových spekter konkrétních porfyriu se opírá volba podmínek, zejména excitačních vlnových délek, pro studium jejich rezonančních Ramanových spekter.

Rezonanční Ramanův rozptyl záření molekulami chromoforů nastává v případě, že energie záření, jímž je Ramanův rozptyl excitován, je blízká nebo rovna energii elektronového přechodu chromoforu s dostatečně velkým momentem přechodu (transitním momentem). Takovému elektronovému přechodu odpovídá intenzivní pás v elektronovém absorpčním spektru. Pro měření rezonančního Ramanova rozptylu volíme tedy takové vlnové délky excitujícího záření, které spadají do kontury výše popsaného pásu v elektronovém spektru chromoforu.

Z řady vyvinutých teoretických popisů procesu rezonančního Ramanova rozptylu je stále nejčastěji používán stacionární popis (označovaný jako „sum - over - state“ přístup), založený na poruchové teorii druhého řádu a podrobně popsany v ref. [45,46]. Na základě tohoto popisu rozlišujeme nejméně dva příspěvky (A a B , v notaci dle ref. [47]) k celkové hodnotě každé z 9-ti složek tenzoru polarizovatelnosti molekuly $\alpha_{\rho\sigma}$ (kde ρ a σ označují jednu z kartézských souřadnic).

Příspěvek (člen) A má původ v rezonanci excitační energie s energií jednoho elektronového přechodu molekuly. Zůstává-li symetrie molekuly (reprezentovaná bodovou grupou) v jejím základním elektronovém stavu zachována i v excitovaném elektronovém stavu (jako konečném stavu rezonančního elektronového přechodu), pak je rezonancí typu A zesílen Ramanův rozptyl prostřednictvím totálně symetrických vibrací molekuly. V případě metaloporfyriu o symetrii D_{4h} se bude jednat o vibrace příslušející symetrické reprezentaci A_{1g} .

Příspěvek členu B se uplatňuje v případě molekul, v jejichž elektronové struktuře nacházíme dva energeticky blízké elektronové přechody a zvolíme-li energii excitujícího záření blízkou energii jednoho z těchto přechodů. Mezi

zmíněnými elektronovými přechody dochází při optické excitaci k vibronické interakci zprostředkované vibracemi o vhodné symetrii. Je patrné, že v případě porfyrinů se bude příspěvek B – členu uplatňovat v důsledku interakce (mísení) B a Q přechodů zprostředkované vibracemi o symetrii (pro bodovou grupu D_{4h})

$$E_u \times E_u = A_{1g} + A_{2g} + B_{1g} + B_{2g} \quad (1.19)$$

a to při excitaci do oblasti Q pásů, zejména do oblasti Q_v pásu.

Rezonanční Ramanův rozptyl je tedy v případě porfyrinů možno excitovat zářením o vlnových délkách spadajících do oblasti jak Soretova pásu, tak do Q – pásů. V případě excitace do Soretova pásu výrazně dominuje příspěvek A – členu. V případě excitace do oblasti Q – pásů nastává poměrně složitá situace, neboť ačkoli bychom očekávali, že při excitaci do oblasti Q_0 pásu bude dominantní příspěvek A a v případě excitace do oblasti Q_v pásu příspěvek B , nastávají ve skutečnosti složité interferenční efekty mezi jednotlivými typy rezonancí [47,48], které lze interpretovat např. na základě analýzy excitačních profilů rezonančního Ramanova rozptylu.

Při měření SERRS spekter porfyrinů musí být současně splněna jak podmínka plasmonové rezonance pro SERS – aktivní systém, v němž jsou porfyrinové molekuly lokalizovány, tak podmínka molekulární rezonance samotného porfyrinu. Celkový faktor zesílení Ramanova rozptylu porfyrinů je tedy v případě SERRSu dán příspěvkem plasmonové rezonance SERS – aktivního povrchu či systému a molekulární rezonance daného porfyrinu. Tyto příspěvky však nejsou prostě aditivní. Při splnění podmínky plasmonové rezonance totiž klesá příspěvek molekulární rezonance v důsledku tlumení této rezonance způsobené snížením doby života excitovaných vibronických stavů porfyrinových molekul lokalizovaných v blízkosti SERS – aktivního povrchu v důsledku přenosu energie do excitovaných stavů povrchového plasmonu na SERS – aktivním povrchu.

Teorie SERRS pro obecný chromofor byla podrobně prozkoumána v práci [49]. V případě porfyrinu volných bazí má zásadní význam pro optimalizaci jejich SERRS spektrální detekce rovněž identifikace spektrální formy či forem daného porfyrinu poskytující detekovaný SERRS signál. Z řady

publikovaných studií SERRS spekter porfyrinů adsorbovaných na površích nativních i chemicky modifikovaných Ag nanočástic v systémech s hydrosoly těchto nanočástic vyplývá, že významným faktorem ovlivňujícím způsob interakce porfyrinu s povrchem je, kromě jeho vlastní molekulové struktury, i oxidační stav dostupných adsorpčních míst na Ag povrchu (viz. kap. 1.2.3) V případě H₂TMPyP byly identifikovány [33,34] tři rozdílné spektrální formy přiřazené třem typům povrchových species: H₂TMPyP, AgTMPyP a Ag(0)-TMPyP. Zatímco meze SERRS spektrální detekce prvních dvou forem dosahovaly hodnot $10^{-8} - 5 \cdot 10^{-10}$ M [43], v práci [43] byla rovněž stanovena velmi nízká hodnota meze SERRS spektrální detekce povrchové species Ag(0)-TMPyP (identifikované na základě [44]), která činila 10^{-12} M. Z těchto výsledků je patrné, že SERRS spektroskopie umožňuje selektivní a vysoce citlivou detekci porfyrinů v extrémně nízkých koncentracích. Klíčovou roli v dosažení co nejnižších hodnot mezi SERRS spektrální detekce má pak systematická optimalizace SERRS experimentu vzhledem ke konkrétnímu typu porfyrinu.

2.3. Protoporfyrin IX: biologický význam a dosavadní spektrální studie

2.3.1. Biologický význam protoporfyrinu IX

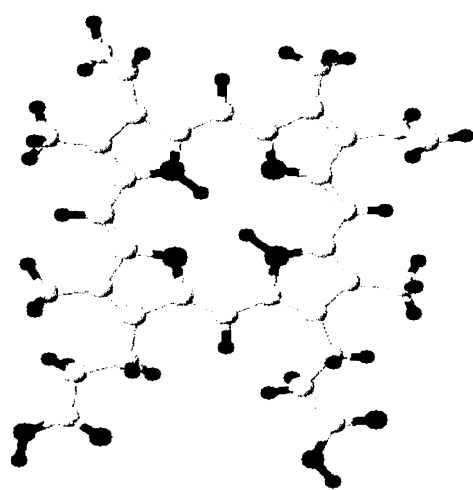


Schéma 1.3: Protoporfyrin IX

Protoporfyrin IX se stal, díky své jedinečné funkci při syntéze hemu v buňce, předmětem řady studií v oblasti diagnostiky a fotodynamické terapie zhoubných nádorů. Následně se vylučuje do krve (v komplexech s bílkoviny, například albuminem) a stolice a jeho zvýšená hladina pravděpodobně indikuje raná stadia zhoubného bujení. Vyskytuje se však ve velmi nízkých koncentracích a za přítomnosti dalších porfyrinů, proto je velmi důležité použít k detekci metody dostatečně selektivní i senzitivní.

Protoporfyrin IX (PPIX) (schéma 1.3)

nejúčinněji absorbuje záření o vlnové délce okolo 400 nm a emituje světlo s maximem ve vlnových délkách 635 a 705 nm [50].

PPIX vzniká v buňce jako poslední meziprodukt při syntéze hemu (schéma 1.9). Je jediný oxidovaný porfyrin v buňce, proto má jako jediný schopnost fluorescence. Ostatní porfyriny se za normálních podmínek v buňce vyskytují pouze v redukované formě jako porfyrinogeny, které nefluoreskují [51].

Celý proces syntézy hemu je regulován kromě dostupnosti substrátů (glycinu a sukcinyl CoA) rovněž zpětnovazebnou inhibicí ALA syntetázy. Tato zpětná vazba je realizována hlavně přítomností hemu v buňce. Přítomný hem je schopen ALA syntetázu inhibovat přímo, případně blokovat transkripci, translaci a transport proteinu do mitochondrií. V praxi tedy postihuje zpětnovazebný účinek hemu pouze syntézu prvního meziproduktu, tj. 5 – aminolevulovou kyselinu, ne však již další kroky cyklu syntézy hemu. Proto nedochází za přirozených podmínek k akumulaci žádného z porfyrinogenních meziproduktů, schopných dát vznik fluoreskující substanci [51].

Bylo prokázáno, že u řady nádorových buněk je aktivita enzymu ferochelatázy velmi snižená a dochází tak k intracelulární akumulaci PPIX [52].

Tento amfifilní porfyrin vykazuje ve vodném prostředí poměrně složité acidobazické chování spojené s tvorbou dimerů a vyšších agregátů [53]. Aktuální struktura PPIX (tedy monomer, dimer či agregát) je ve vodném prostředí funkcí pH.

V případě protonizace dusíků v porfyrinovém makrocyklu, kdy dochází k modifikaci volné báze (free base) na formu diacidickou, byla zjištěna přibližná hodnota disociační konstanty 1,5. Při protonizaci karboxylových skupin se přibližná disociační konstanta pohybuje mezi hodnotami 4,3 až 5,7.

1.3.2. Syntéza hemu – vznik protoporfyrinu IX

Prvním stupněm syntézy porfyrinů u savců je kondenzace glycinu a sukcinyl-CoA za vzniku 5-aminolevulátu [50,54] (schéma 1.4). Reakce je katalyzována 5-aminolevulát syntázou (PLP-enzymem). Tento enzym je

lokalizován na vnitřní straně mitochondriální membrány [55] a významně se

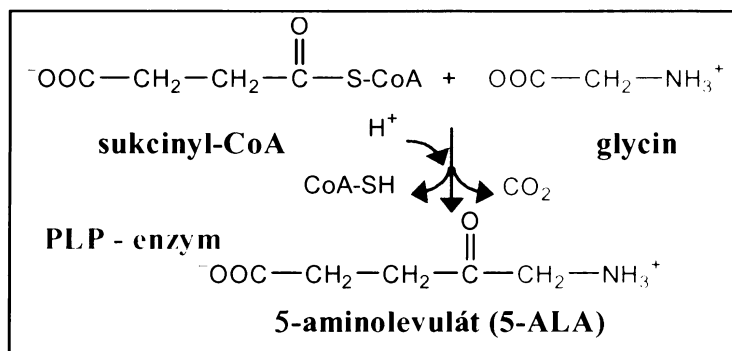


Schéma 1.4: Vznik 5-aminolevulátu

podílí na regulaci celého procesu.

Dvě molekuly 5-aminolevulátu pak kondenzují za odštěpení dvou molekul vody na porfobilinogen (schéma 1.5). Tento proces je katalyzován

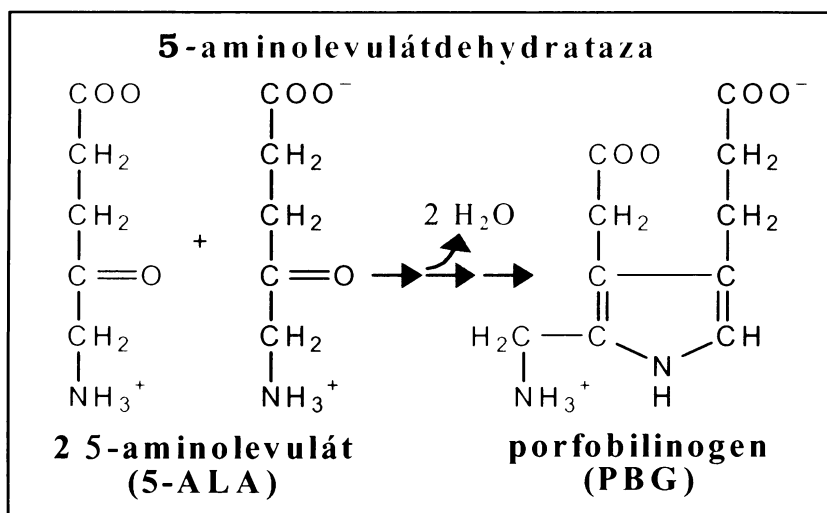


Schéma 1.5: Vznik porfobilinogenu

5-aminolevulátdehydratazou, enzymem uloženým v cytoplasmě. Třetí krok je indukován dvěma cytoplazmatickými enzymy, porfobilinogen deaminázou (PBGD) a uroporfyrinogen III kosyntetázou. Čtyři porfobilinogeny kondenzují „hlava – pata“ za vzniku lineárního tetrapyrrolu, který zůstává vázán na enzym. Z každého vzniklého methylenového můstku se při tom uvolní jeden ion NH_4^+ .

Tento tetrapyrrol se zacykluje za odštěpení posledního NH_4^+ a vzniká uroporfyrinogen III, obsahující již porfinový skelet (schéma 1.6).

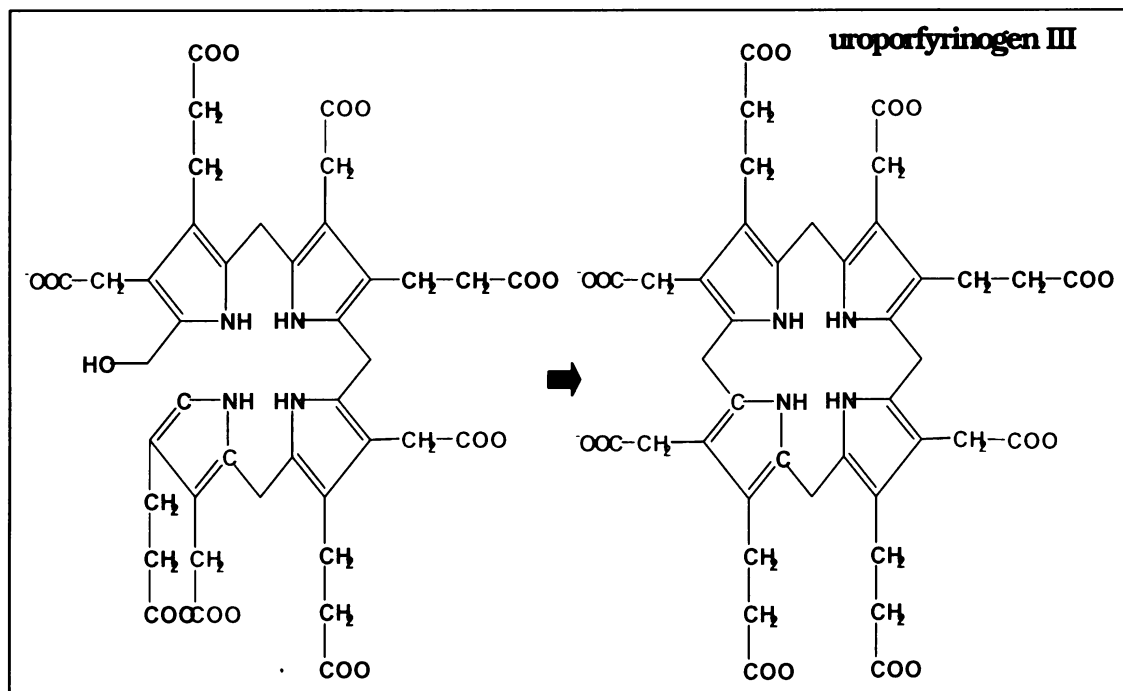


Schéma 1.6: Vznik uroporphyrinogenu III

Následující reakce mění postranní řetězce a stupeň nasycenosti porfinu. Dekarboxylace acetátových substituentů (pomocí cytoplazmatického enzymu uroporphyrinogen dekarboxylázy) za vzniku metylů vede ke vzniku koproporphyrinogenu III [51].

Další proces se cyklicky vrací z cytoplasmy zpět do mitochondrií. Enzym

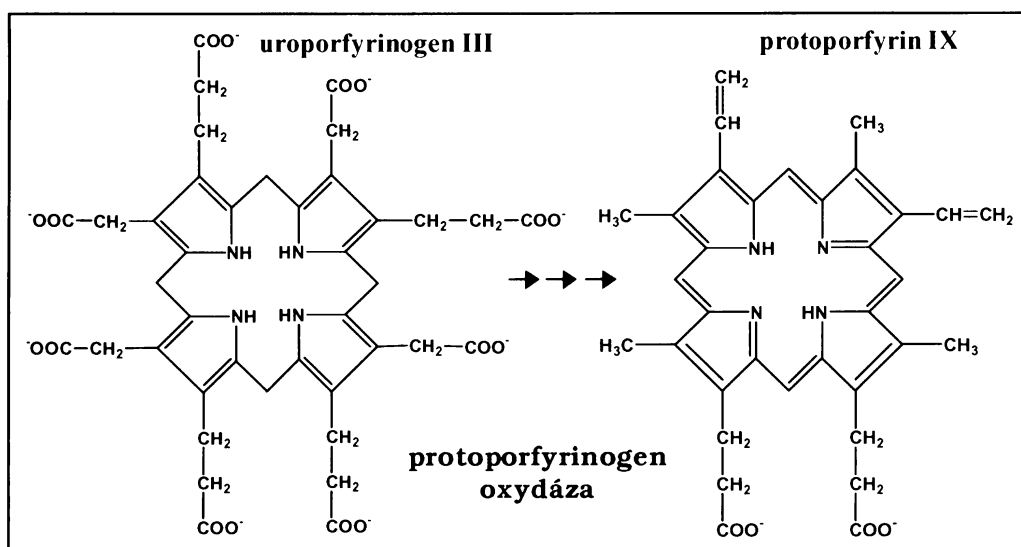


Schéma 1.7: Vznik protoporphyrinu IX

koproporfyriinogen oxydáza, jež se podílí na následujícím kroku, je totiž lokalizován v prostoru mezi membránami mitochondrií. Tento enzym

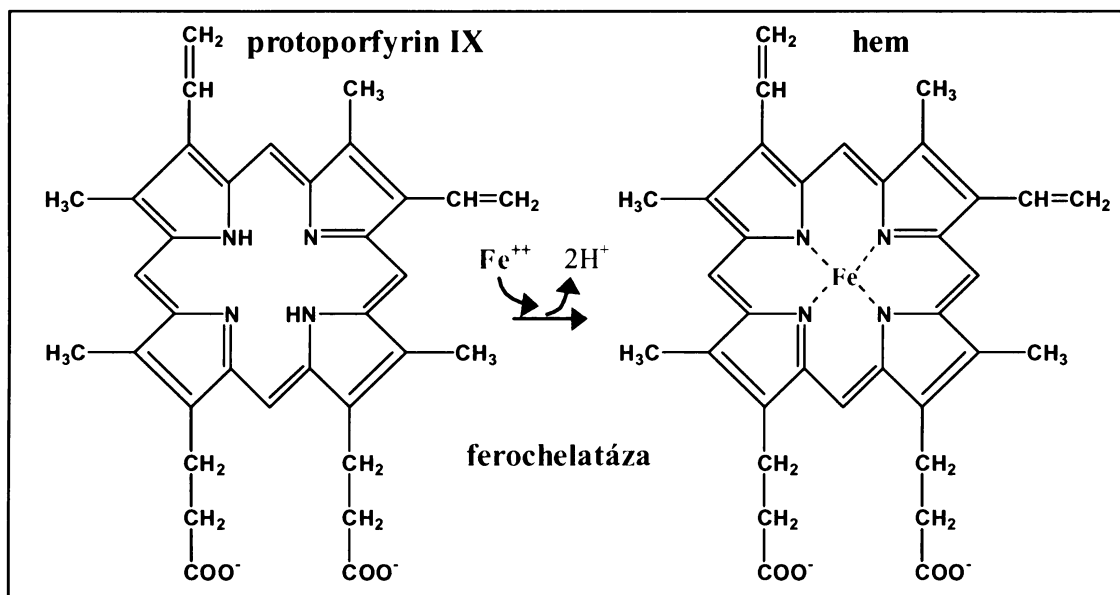


Schéma 1.8: Vznik hemu

dekarboxyluje a oxiduje postranní řetězce propionových kyselin v kruhu A a B na vinylové skupiny za vzniku protoporfyriinogenu IX.

Vytvořením methinových můstků místo methylenových a konverzí dvou propionátů na vinyly vzniká protoporphyrin IX (schéma 1.7). Enzym odpovědný za tento krok, protoporphyrinogen oxydáza, se nachází na vnitřní straně mitochondriální membrány a vykazuje vysokou substrátovou specifitu.

Z protoporphyrinu IX vzniká hem inkorporací iontů železa do tetrapyrrolového jádra (schéma 1.8). Tato fáze se odehrává v mitochondriích působením enzymu ferrochelatázy, který vykazuje velmi nízkou substrátovou specifitu [50].

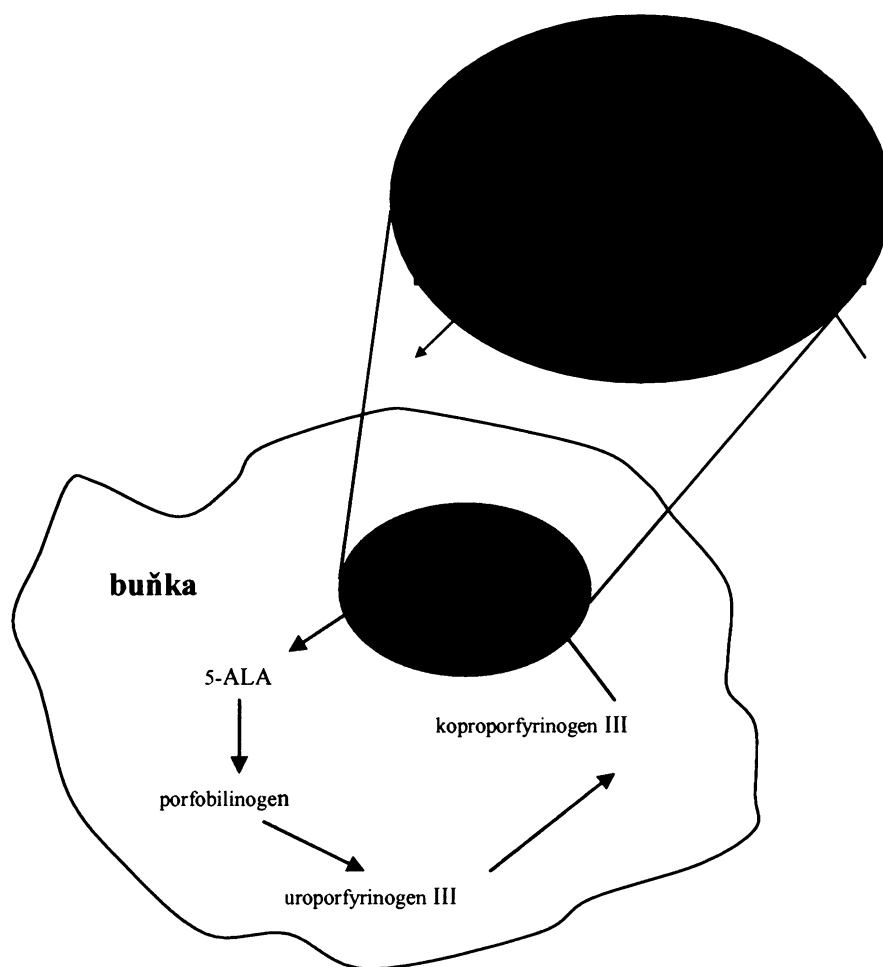


Schéma 1.9: Syntéza hemu

1.3.3. Dosavadní výsledky studia PPIX volné báze a jeho komplexů s přechodnými kovy metodami elektronové absorpční, RR a SERRS spektroskopie

Spektroskopické studium PPIX bylo dosud zaměřeno převážně na metaloporfyriny. Tato situace zřejmě souvisí se skutečností, že význam PPIX volné báze v klinické diagnostice zhoubných nádorů byl rozpoznán poměrně nedávno. Měření a interpretace RR spekter metaloporfyrinu se zaměřilo nejprve na komplexy PPIX s Ni(II) [56], Fe(II) a Fe(III) [57]. Přiřazení pásů v RR spektrech přitom vycházelo z výpočtu analýzy normálních souřadnic (NCA) pro Ni(II)OEP (OEP - octaethylporphine) publikovaného Kitagawou *et al* [58]. Výpočet NCA přímo pro molekulu NiPPIX publikoval později Kitagawa *et al* [59].

Hlavní autor [56,57] (T.G. Spiro) se spolupracovníky pak uveřejnili r. 1990 další rozsáhlou analýzu normálních souřadnic (NCA) pro NiP (P - porphine) a Ni(TPP) (TPP - tetraphenylporphine) [60] a NiOEP [61]. Tyto výpočty se staly východiskem pro přiřazení pásů v RR spektrech řady metaloporfyrinů.

Elektronová a RR spektra komplexů PPIX s Ni(II), Co(II), Cu(II), Zn(II) a Cd(II) a jejich interpretace byly uveřejněny v práci [62].

SERRS spektra adsorbovaných metaloporfyrinů PPIX byla studována především Ag elektrodách [63-65]. V práci [63] byla studována redukce Fe(III) komplexu na Fe(II). Z analýzy SERRS spekter bylo zjištěno, že výběrová pravidla pro SERRS aktivitu vibrací odpovídají pravidlům pro RR rozptyl, který je pak dále zesílen elektromagnetickým mechanismem SERSu. SERRS spektrální studium těchto metaloporfyrinů kovalentně vázaných k Au elektrodě modifikované monovrstvou dimerkaptoalkanů bylo zaměřeno na studium přenosu elektronu mezi porfyrinem a elektrodou [66].

V práci [67] (uveřejněnou současně s vypracováváním této práce) byla spektra FePPIX, adsorbovaného na Ag nanočásticích imobilizovaných na polymerem pokrytém nosném povrchu, studována metodou Ramanovy mikroskopie. SERRS spektra vykazovala časově závislé fluktuace signálu, připisované adsorpčním – desorpčním procesům při detekci SERRS signálu na úrovni jednotlivých molekul.

Elektronová spektra PPIX volné báze byla studována především se studiem agregace tohoto porfyrinu ve vodném prostředí. Inamura a spolupracovníci [68] zjistili přítomnost monomerní formy porfyrinu při pH = 1 (charakterizované maximem Soretova pásu $\lambda_{\max} = 405$ nm) a dimeru při pH = 12 ($\lambda_{\max} = 388$ nm), zatímco v mírně kyselém prostředí o pH = 4,8 pozorovali štěpení Soretova pásu monomeru na dva pásy s maximy při delších i kratších vlnových délkách než v případě monomeru. V pracích [32,69] bylo pozorování pásů 352 a 470 nm vysvětleno tvorbou J- a H – agregátů porfyrinových molekul v neutrálním vodném prostředí. V roztocích porfyrinu v DMSO (dimethylsulfoxidu) a EtOH (ethanolu) bylo pozorování jediného pásu při $\lambda = 408$ nm přisouzeno přítomnosti monomerní formy PPIX (volná báze).

Scolano a spolupracovníci [53] podrobně prostudovali elektronová spektra PPIX ve vodném prostředí v závislosti na pH metodami absorpční

a fluorescenční spektroskopie a rezonančního rozptylu světla (RLS). Ve shodě s předchozími pracemi zjistili, že PPIX je monomerní v rozsahu $\text{pH} = 0 - 3$, dimerní pro $\text{pH} > 8$ a vytváří vyšší agregáty v oblasti $\text{pH} = 3 - 7$. Agregáty izolované z neutrálního vodného prostředí byly studovány rastrovací elektronovou mikroskopií (SEM) a optickou mikroskopií blízkého pole (SNOM). Byly identifikovány útvary protáhlého tvaru o průměrné délce $200 - 500 \text{ nm}$ a šířce 60 nm popsané jako vesikuly. V roztocích PPIX v DMSO byla ve shodě s prací [69] identifikována monomerní forma porfyriu.

RR a SERRS spektra PPIX v neutrálním prostředí při excitaci záření $\lambda_{\text{exc}} = 514,5 \text{ nm}$ byla změřena v pracích [32,69]. Nejnižší hodnota meze SERRS spektrální detekce PPIX v systému s Ag koloidem (hydrosolem Ag nanočástic) preagregovaným přídavkem H_2SO_4 nebo HClO_4 byla 10^{-9} M [69]. Tyto experimenty tak poukázaly na možnosti selektivní a velmi citlivé detekce PPIX metodou SERRS. Zároveň však bylo patrné, že pro optimalizaci SERRS spektrální detekce PPIX v systémech s Ag nanočásticemi umožňující její využití např. pro účely klinické diagnostiky bude třeba uskutečnit systematickou studii elektronových absorpčních, RRS a SERRS spekter PPIX. Jejím cílem bude dosažení nejen co nejnižší hodnoty meze SERRS spektrální detekce, ale i maximální reprodukovatelnosti experimentu. Dalším očekávaným výsledkem takovéto studie je získání poznatků o vzájemných interakcích porfyrin – porfyrin a porfyrin – Ag povrch v systémech vzájemně interagujících porfyrinových molekul.

2. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je optimalizace podmínek spektrální detekce protoporfyrinu IX (PPIX) metodami spektroskopie rezonančního Ramanova rozptylu (RRS) a spektroskopie povrchem zesíleného rezonančního Ramanova rozptylu (SERRS).

K optimalizaci spektrální detekce PPIX byly provedeny následující studie:

1) Měření a interpretace elektronových absorpčních (UV-vis) a RRS spekter PPIX ve vodném prostředí (jako funkce pH) a v nevodném prostředí (ethanol, dimethylsulfoxid)

2) Měření a interpretace SERRS spekter v systému

a) s nativním Ag hydrosolem

- proměření spekter v závislosti na koncentraci PPIX
- analýza souboru spekter pomocí faktorové analýzy (FA)
- identifikace spektrálních forem
- stanovení meze SERRS spektrální detekce PPIX
- charakterizace morfologií SERRS-aktivních systémů metodou transmisní elektronové mikroskopie (TEM)

b) s chemicky modifikovaným Ag hydrosolem (Cl^- anionty)

- proměření spekter v závislosti na koncentraci PPIX
- stanovení meze SERRS spektrální detekce PPIX
- charakterizace morfologií SERRS-aktivních systémů metodou transmisní elektronové mikroskopie (TEM)

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Chemikálie a chemické nádobí

3.1.1. Chemikálie

- **protoporfyrin IX** – PPIX (Porphyrin Products, inc.) – dvojsodná sůl
- **ethanol** - EtOH (Merck), Uvasol
- **dusičnan stříbrný** – AgNO₃ (Aldrich), p.a.
- **dimethylsulfoxid** – DMSO (Merck), Uvasol
- **kyselina chlorovodíková** – HCl (Lachema), p.a.
- **hydroxid sodný** – NaOH (Lachema), p.a.
- **peroxid vodíku** – H₂O₂ (Peroxides, s.r.o.), p.a.
- **kyselina sírová** – H₂SO₄ (Lachema), p.a.
- **kyselina dusičná** – HNO₃ (Lachema), p.a.
- **deionizovaná voda**

3.1.2. Chemické nádobí

Jelikož jsou Ag hydrosoly velmi citlivé na čistotu výchozích látek i chemického nádobí, bylo velmi důležité veškeré chemické nádobí i optické kyvety čistit těmito postupy:

1) Nádobí, jež bylo používáno k přípravě a k práci s Ag hydrosolem, bylo nejprve umyto pod tekoucí vodou a dále bylo ponecháno minimálně 30 minut ve směsi kyselina dusičná : destilovaná voda v poměru 1:1. Poté bylo nádobí opět důkladně umyto pod tekoucí vodou, dále vymyto destilovanou vodou a nakonec vypláchnuto deionizovanou vodou.

2) Nádobí, které přišlo do styku s PPIX, bylo čištěno obdobným způsobem jako v předešlém případě. Avšak místo směsi kyselina dusičná : destilovaná voda (1:1) byla používána směs kyselina sírová : peroxid vodíku v poměru 1:2.

3) Křemenné i skleněné kyvety byly po použití ihned vymyty zředěnou kyselinou dusičnou (1:1) a následně spolu s použitým nádobím čištěny podle potřeby postupem 1 nebo postupem 2.

3.2. Přístrojové metody

Měření R(R)S a SE(R)RS spekter

R(R)S a SE(R)RS spektra byla zaznamenána pomocí multikanálového Ramanova spektrometru vybaveného Monospec-600 monochromátorem a CCD detektorem (Princeton Instruments) chlazeným kapalným N₂. Holografický notch-plus filtr (Kaiser) byl umístěn před vstupní štěrbinu monochromátoru, aby eliminoval Rayleighovo záření z rozptýleného světla. Ramanův rozptyl byl měřen v pravouhlé rozptylové geometrii. Excitace zářením o vlnové délce $\lambda_{\text{exc}} = 514,5 \text{ nm}$ byla prováděna pomocí argonového iontového laseru ILA-120 (Carl-Zeiss, Jena), excitace zářením o vlnové délce $\lambda_{\text{exc}} = 441,6 \text{ nm}$ pomocí He-Cd laseru (Liconix 4230N). Měření bylo prováděno ve speciálních 1 cm kyvetách s pěti leštěnými optickými okénky. Všechna měření byla provedena při obou excitačních vlnových délkách. Spektra byla akumulována 5 minut v 6-ti framech s expozičním časem 5 s. Takto naměřená data byla upravována pomocí programu CSA3 pro odstranění náhodných signálů (tzv. spikes). Vlnočtová kalibrace spekter byla provedena programem Tolkal0.

Měření UV-vis spekter

Pro měření UV-vis spekter byl použit Hewlett-Packard UV-vis absorpční spektrometr (HP 8547) se spektrálním rozmezím 190 –820 nm. Použity byly kyvety o optické dráze (tloušťce) 2 a 10 mm.

Měření TEM

Transmisní elektronová mikroskopie pracuje na principu přímého pozorování a snímání obrazu, kdy proud elektronů prostupující objektem a elektronovou optikou tvoří celistvý, přímo na luminiscenčním stínítku

pozorovatelný obraz s možností fotografického záznamu. Jedná se tedy o princip klasického mikroskopického zobrazení.

Preparáty pro elektronovou mikroskopii byly pozorovány transmisním elektronovým mikroskopem JEOL-JEM 200CX (v Ústřední vojenské nemocnici v Praze - Střešovicích). Použitá zvětšení byla 50 000x – 100000x.

Faktorová analýza (FA)

Faktorová analýza je vícerozměrná statistická metoda, která se v posledních letech hojně využívá v chemii při analýze rozličných souborů experimentálních, například spektroskopických dat [70]. Tato metoda umožňuje redukci souborů N experimentálních spekter $Y_i(\nu), i=1, \dots, N$ na jejich nejmenší dimenzi M bez ztráty spektroskopické informace, například procedurou rozkladu do singulárních hodnot (SVD – Singular Value Decomposition) [71,72]. Každé z N naměřených spekter pak lze vyjádřit vztahem:

$$Y_i(\nu) = \sum_{j=1}^N W_j \cdot V_{ij} \cdot S_j(\nu), \quad (3.1)$$

kde $W_j, j=1, \dots, N$, jsou singulární čísla, $S_j(\nu), j=1, \dots, N$ jednotlivá subspektra a V_{ij} ($N \times N$) je čtvercová matice koeficientů, tj. relativních vah subspekter v jednotlivých experimentálních spektrech, přičemž platí:

$$\int S_j(\nu) \cdot S_k(\nu) \cdot d\nu = 0 \quad \text{pro } j \neq k, \quad \int S_j(\nu)^2 \cdot d\nu = 1$$

$$\sum_{i=1}^N V_{ij} \cdot V_{ik} = 0 \quad \text{pro } j \neq k, \quad \sum_{i=1}^N V_{ij}^2 = 1. \quad (3.2)$$

Nejlépejší aproximace experimentálních spekter pomocí lineární kombinace M spekter pro všechna $M < N$ je dána vztahem:

$$Y_i(\nu) \approx \sum_{j=1}^M W_j \cdot V_{ij} \cdot S_j(\nu). \quad (3.3)$$

Každé experimentální spektrum tedy může být popsáno uvedeným vztahem (3.3). Minimální hodnota M , pro kterou se levá a pravá strana rovnice (3.3) liší pouze experimentální chybou, představuje faktorovou dimenzi M , tj. minimální počet nezávislých složek rozlišitelných v analyzovaném souboru spekter. Její určení je klíčovým bodem faktorové analýzy.

Dá se předpokládat, že naměřená experimentální spektra jsou superpozicí spekter $Z_n(\nu)$ čistých forem pomocí vztahu

$$Y_i(\nu) = \sum_{n=1}^L \gamma_{ni} \cdot Z_n(\nu), \quad (3.4)$$

kde L je číslo čisté formy a γ_i udává spektrální frakci n -té formy v n -tém vzorku. Spektra $Z_n(\nu)$ čistých forem mohou být také vyjádřena lineární kombinací relevantních ortonormálních subspekter $S_j(\nu)$

$$Z_n(\nu) = \sum_{j=1}^L C_{nj} \cdot S_j(\nu). \quad (3.5)$$

Cílem je určit rotační matici C_{nj} , pro kterou z (3.3), (3.4), (3.5) platí:

$$\sum_{j=1}^L \gamma_{ni} \cdot C_{nj} = W_j \cdot V_{ij}. \quad (3.6)$$

Získáme-li řešením rovnice (3.6) koeficienty matice C_{nj} , můžeme zkonstruovat spektra čistých forem Z_n podle rovnice (3.5).

3.3. Příprava stříbrného hydrosolu

Stříbrný hydrosol byl připravován redukcí dusičnanu stříbrného tetrahydridoboritanem sodným ve vodném prostředí. Při přípravě bylo použito postupu, jež vychází z práce Garrellové [25] a práce [30].

V 75 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 3,5 mg NaBH_4 a připraven tak $1,2 \cdot 10^{-3}$ M roztok NaBH_4 . Takto připravený roztok byl vložen do ledové lázně a ochlazen na teplotu 2°C .

V 18 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 6,76 mg AgNO_3 a získán $2,2 \cdot 10^{-3}$ M roztok AgNO_3 .

K roztoku NaBH_4 temperovanému na teplotu 2°C bylo za stálého míchání na magnetické míchačce pipetou přikapáváno po kapkách 9 ml připraveného roztoku AgNO_3 . Poté byla baňka uzavřena a vzniklý Ag hydrosol byl míchán dále ještě minimálně 45 minut, aby došlo k jeho rovnoměrnému ohřevu na laboratorní teplotu.

3.4. Příprava roztoků pro měření koncentračních závislostí

U všech studií byl použit stejný postup přípravy. Výchozím bodem byla příprava zásobního roztoku PPIX v příslušném rozpouštědle o koncentraci $c = 10^{-4}$ M. Ve 20 ml rozpouštědla bylo rozpuštěno 1,2 mg PPIX. Následným ředěním zásobního roztoku byly připraveny roztoky o koncentracích $7,5 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $2,5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-5} , $7,5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $2,5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-6} M.

3.5. Příprava roztoků pro měření závislostí spekter PPIX na pH

Vodné roztoky PPIX o daném pH byly připravovány dvěma postupy:

Postup I: Nejprve byly připraveny výchozí roztoky kyseliny či zásady o daném pH. Roztoky o $\text{pH} = 1 - 3$ byly připraveny přidavkem koncentrované HCl , roztoky o $\text{pH} = 3 - 6$ přidavkem zředěné HCl , roztoky o $\text{pH} = 8 - 10$ přidavkem $0,1\text{M NaOH}$, roztoky o $\text{pH} = 11$ a 12 přidavkem 1M NaOH . V 10 ml takto připraveného roztoku bylo rozpuštěno $0,00606$ g PPIX.

Postup II: $0,00606$ g PPIX rozpuštěno v 10 ml deionizované vody. Následně bylo v takto připraveném roztoku pH upravováno výše uvedenými postupy.

3.6. Příprava systémů Ag hydrosol/ PPIX

Vzorky pro měření koncentrační závislosti SERRS spekter PPIX v systémech s nativním Ag hydrosolem byly připravovány tímto postupem: výchozím bodem byla příprava zásobního roztoku PPIX v příslušném rozpouštědle o koncentraci $c = 10^{-3}$ M. Ve 10 ml hydrosolu bylo rozpuštěno 6,06 mg PPIX. Následným ředěním byly připraveny roztoky o koncentracích 10^{-4} , $7.5 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $2.5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-5} , $7.5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-6} , $7.5 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-7}$, $2.5 \cdot 10^{-7}$, 10^{-7} , $7.5 \cdot 10^{-8}$, $5 \cdot 10^{-8}$, $2.5 \cdot 10^{-8}$, 10^{-8} , 10^{-9} M.

3.7. Příprava systémů Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX a Ag hydrosol/ HCl/ PPIX

Systém Ag hydrosol/ NaCl/PPIX: ke 2 ml Ag – hydrosolu bylo přidáno 100 μ l 1 M NaCl a po promíchání bylo dále přidáno 10 μ l vodného roztoku PPIX.

Systémy Ag hydrosol/HCl/PPIX: ke 2 ml Ag – hydrosolu bylo přidáno 10 μ l 1 M HCl a po promíchání bylo dále přidáno 10 μ l vodného roztoku PPIX. V obou případech byly připraveny vzorky o výsledných koncentracích PPIX od 10^{-7} do 10^{-10} M.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1. Elektronová absorpční (UV-vis) spektra PPIX

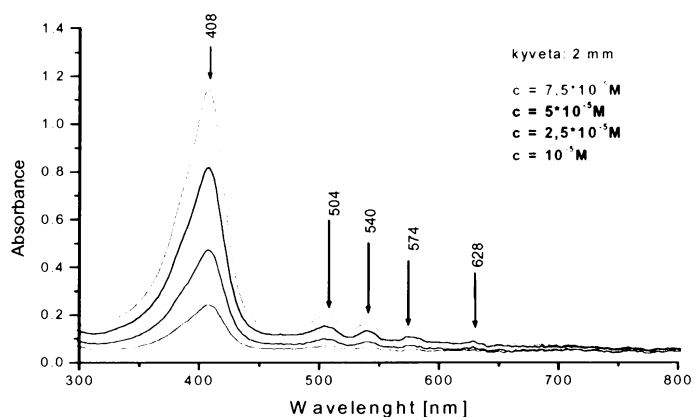
Základem pro optimalizaci RRS a SERRS spektrální detekce PPIX bylo měření a interpretace elektronových absorpčních spekter PPIX ve vodných i nevodných rozpouštědlech. Výsledky studie dále sloužily jako výchozí bod pro studium RRS a SERRS spekter. Z tohoto důvodu byly v grafech průběhů elektronových spekter na obr. 4.3 – 4.11 značeny (jako kolmice k ose vlnových délek) vlnové délky záření použitého k excitaci RRS a SERRS. Z průběhu elektronových absorpčních spekter a hodnot absorbancí při dané excitační vlnové délce použité v RR a SERRS experimentu byla přibližně odhadnuta míra rezonančního zesílení signálu Ramanova a povrchem zesíleného Ramanova rozptylu mechanismy molekulární rezonance.

4.1.1. Elektronová absorpční spektra PPIX v nevodném prostředí

Pro studium elektronových absorpčních spekter v nevodném prostředí byla zvolena dvě rozpouštědla - DMSO a EtOH. Cílem těchto měření bylo získat elektronová absorpční spektra monomerní formy PPIX.

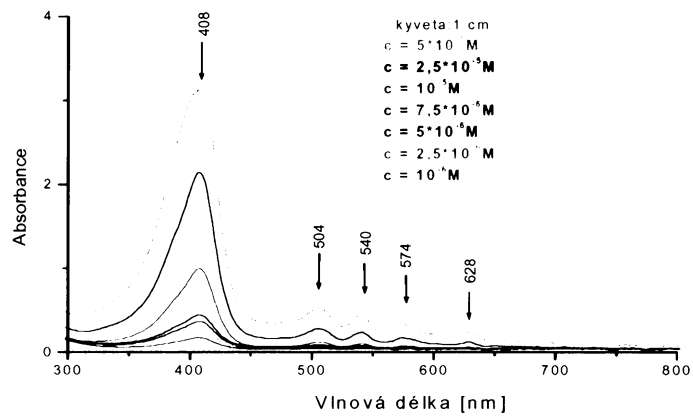
4.1.1.1. Koncentrační závislost elektronových absorpčních spekter PPIX v DMSO

Maximum Soretova pásu se nachází při vlnové délce $\lambda = 408$ nm. Maxima Q-pásů se nachází při vlnových délkách $\lambda = 504, 540, 574$ a 628 nm (obr.

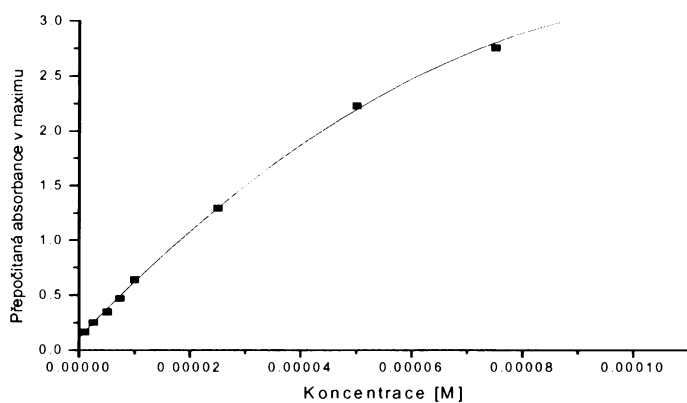


Obr. 4.1: Koncentrační závislost elektronových absorpčních spekter PPIX v DMSO, $c = 10^{-5}$ až $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

4.1, 4.2). Následně byla proměřena koncentrační závislost elektronových spekter PPIX v tomto nevodném rozpouštědle. Poté byla vynesena závislost absorbance v maximu Soretova pásu na koncentraci (obr. 4.3). Avšak závislost absorbance na koncentraci nemá lineární průběh, z čehož vyplývá, že při vyšších koncentracích PPIX dochází v tomto rozpouštědle k asociaci molekul PPIX anebo jejich částečné precipitaci z roztoku.



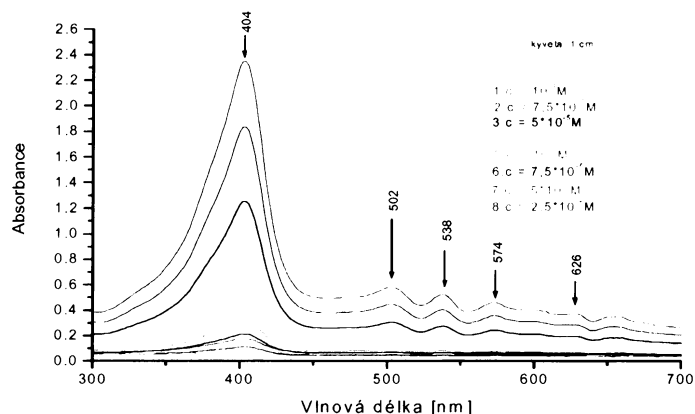
Obr. 4.2: Koncentrační závislost elektronových absorpčních spekter PPIX v DMSO, $c = 10^{-6}$ až $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$



Obr. 4.3: Závislost absorbance v maximu Soretova pásu ($\lambda_{\text{max}} = 408 \text{ nm}$) na koncentraci PPIX v DMSO

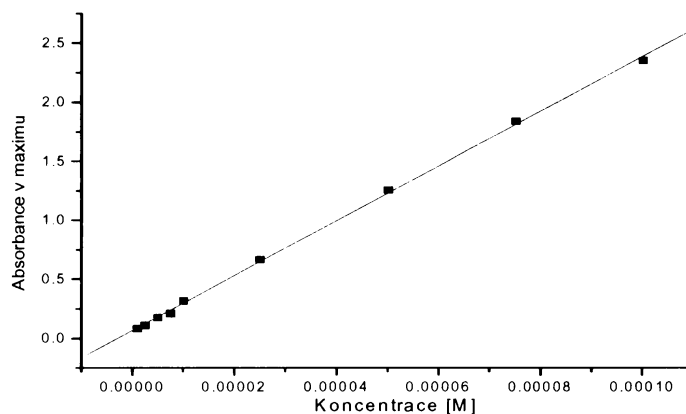
4.1.1.2. Koncentrační závislost elektronových absorpčních spekter PPIX v EtOH

Závislost elektronových absorpčních spekter PPIX byla studována rovněž v EtOH roztocích o koncentraci PPIX 10^{-6} – 10^{-4} M (obr.4.4)



Obr. 4.4: Koncentrační závislost elektronových absorpčních spekter PPIX v EtOH, $c = 10^{-6}$ až 10^{-1} M

Maximum absorbance Soretova pásu PPIX se nachází při vlnové délce $\lambda = 404$ nm a maxima Q-pásů jsou pozorována při vlnové délce $\lambda = 502, 538, 574$ a 626 nm. Závislost absorpce v maximum Soretova pásu na koncentraci PPIX (obr.



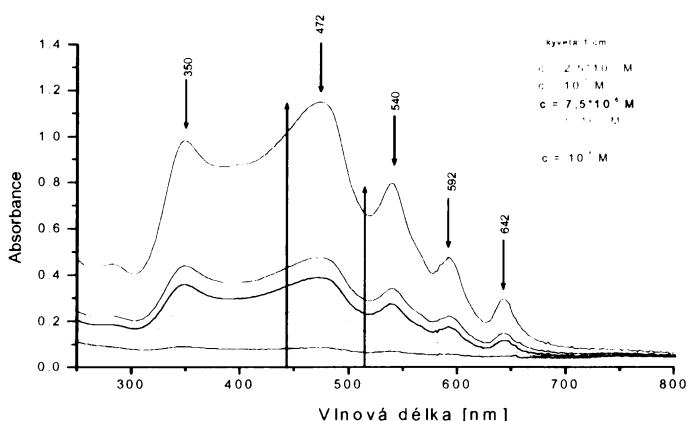
Obr. 4.5: Závislost absorbance v maximumu Soretova pásu ($\lambda_{\max} = 406$ nm) na koncentraci PPIX v EtOH

4.5) je lineární v celém zvoleném oboru koncentrací (splňuje tedy Lambertův-Beerův zákon), z čehož plyne, že při všech zvolených koncentracích se PPIX v EtOH roztocích vyskytuje pouze ve formě monomerní.

4.1.2. Elektronová absorpční spektra PPIX ve vodném prostředí

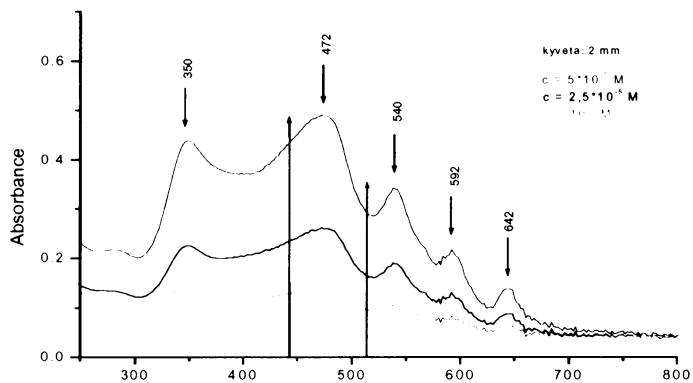
4.1.2.1. Koncentrační závislost elektronových absorpčních spekter PPIX ve vodném prostředí

Základní představu o chování PPIX ve vodném prostředí poskytla studie závislosti elektronových absorpčních spekter PPIX na jeho koncentraci ve vodném roztoku. Spektra PPIX rozpuštěného v deionizované vodě, v rozmezí koncentrací 10^{-6} až $5 \cdot 10^{-5}$ M, která



Obr. 4.6: Koncentrační závislost elektronových absorpčních spekter PPIX ve vodném roztoku $c = 10^{-6}$ až $2,5 \cdot 10^{-5}$ M

jsou uvedena na obr. 4.6 a 4.7. Je patrné, že ve vodném prostředí (pH = 8,3) dochází k agregaci PPIX a vznikají H- a J- agregáty s maximy při vlnových délkách $\lambda_H = 350$ nm a $\lambda_J = 472$ nm. Maxima Q-pásů se nachází při vlnových délkách $\lambda = 540, 592$ a 642 nm. Relativní intenzity všech pásů narůstají se zvyšující se koncentrací a vynesená závislost absorpce v maximech pásů J- a H - agregátů na koncentraci PPIX splňuje Lambertův-Beerův zákon a je tedy v obou případech lineární. Z těchto výsledků je patrné, že ve vodném prostředí se J- a H - agregáty PPIX tvoří již při koncentraci PPIX $c = 10^{-6}$ M.



Obr. 4.7: Koncentrační závislost elektronových absorpčních spekter PPIX ve vodném roztoku, $c = 10^{-5}$ až $5 \cdot 10^{-5}$ M

4.1.2.1. Závislost elektronových absorpčních spekter PPIX na pH vodného prostředí

Závislost elektronových absorpčních spekter PPIX na pH vodného prostředí byla studována na základě dvou různých způsobů přípravy roztoků. V případě postupu I (P I) byl nejprve připraven roztok kyseliny nebo báze o daném pH a v něm byl rozpuštěn PPIX. Tento způsob přípravy je shodný s postupem v ref. [53].

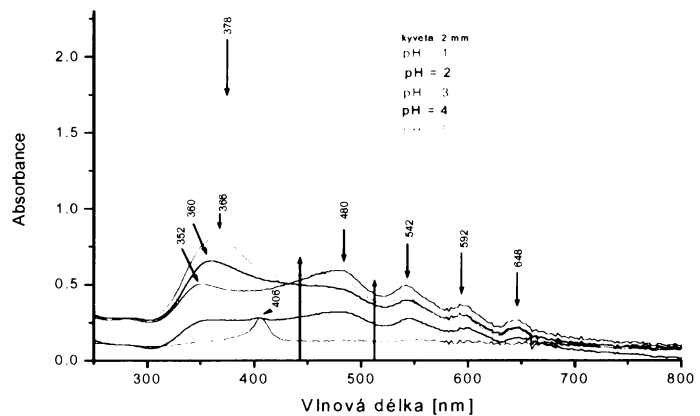
Postup II (P II) byl založen na dodatečné úpravě pH nativního roztoku PPIX o slabě alkalické reakci (pH = 8,3).

Způsob přípravy jednotlivých roztoků pro tyto studie je podrobně popsán v kapitole 3.5..

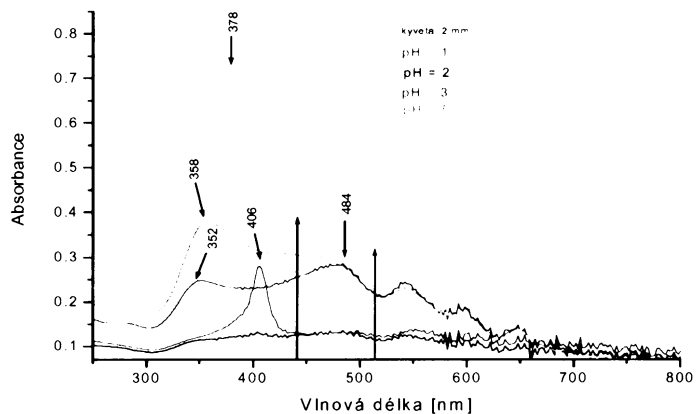
Závislost elektronových absorpčních spekter PPIX na pH vodného prostředí: vzorky připravené postupem I

V těchto studiích byla měřena elektronová absorpční spektra vzorků PPIX o koncentracích 10^{-3} (obr. 4.8) a 10^{-5} (obr. 4.9).

Z obr. 4.8 i 4.9 je patrný vznik monomerní formy PPIX při $\text{pH} = 1 - 2$ s maximem Soretova pásu $\lambda = 406 \text{ nm}$. Intenzita Soretova pásu monomerní formy při $\text{pH} = 2$ výrazně poklesne, což se při dalším zvyšování hodnoty pH projeví se mělkým minimem mezi pozvolna narůstajícími pásy H a J agregátů. Poloha maxima Soretova pásu J-agregátů vykazuje při rostoucí hodnotě pH pouze malé změny a pohybuje se mezi hodnotami $\lambda = 484 - 480 \text{ nm}$. Při pH mezi 2–3 je hodnota absorbance v maximu pásu J-agregátů vyšší než v případě pásu H-agregátů. Již od hodnot $\text{pH} = 4$ (obr. 4.8), resp. $\text{pH} = 5$ (obr. 4.9) se vzájemný poměr absorbancí v maximech J- a H-agregátů změni ve prospěch H-agregátů. Maxima H-agregátů se s rostoucí hodnotou pH od 3 do 5 posunují k vyšším vlnovým délkám: 352 k 366 nm. Vzhledem k poloze maxima pásu H-agregátů při 378 nm (při $\text{pH} = 12$) a jeho přiřazení H-dimeru v pracích [53,68] by tento posun mohl odpovídat poklesu velikosti H-agregátů s rostoucí hodnotou pH . Od $\text{pH} = 4$ je patrný rychlý růst koncentrace H-agregátů a postupný úbytek koncentrace J-agregátů až k velmi nízkým hodnotám. Q-pásky pak mají maxima při $\lambda = 542, 592$ a 648 nm .



Obr. 4.8: Závislost elektronových absorpčních spekter PPIX na pH vodného prostředí, $c = 10^{-3} \text{ M}$

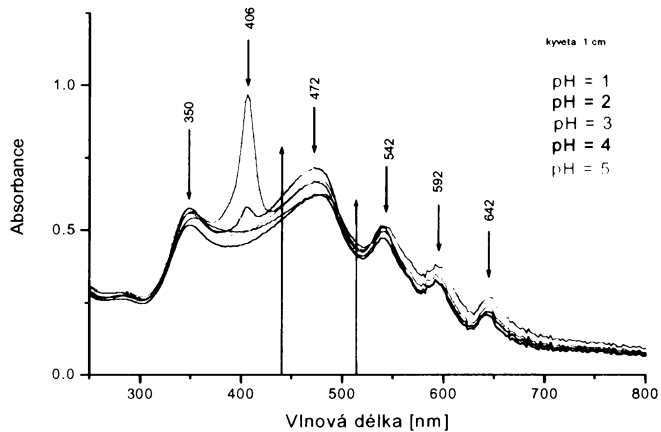


Obr. 4.9: Závislost elektronových absorpčních spekter PPIX na pH vodného prostředí, $c = 10^{-5} \text{ M}$

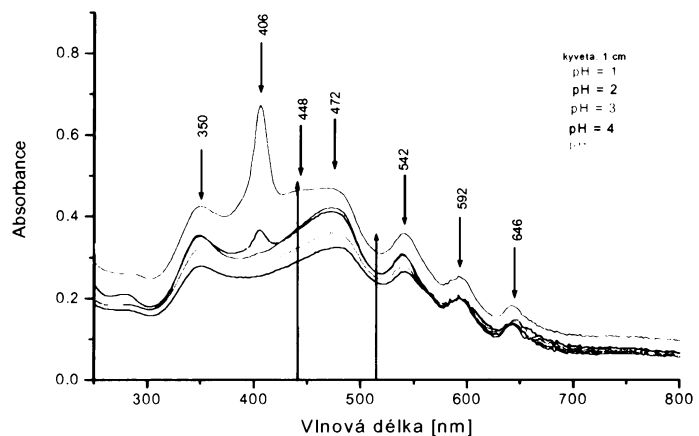
Závislost elektronových absorpčních spekter PPIX na pH vodného prostředí: vzorky připravené postupem II

Rovněž v této studii byla měřena elektronová absorpční spektra vzorků PPIX o koncentracích 10^{-3} (obr. 4.10) a 10^{-5} (obr. 4.11).

Z těchto absorpčních spekter je patrný vliv způsobu přípravy roztoků o daném pH. Hodnota pH je v tomto případě upravována až ve vodném roztoku PPIX (kap. 3.5), dochází tedy nejprve k tvorbě H- a J- agregátů PPIX. Následná změna pH má vliv pouze v případě velmi nízkých hodnoty pH. Při $\text{pH} = 1$ dochází ke vzniku monomerní formy PPIX s maximem při $\lambda = 406$ nm. Jsou zde však stále zastoupeny H- a J- agregáty s maximy v $\lambda_H = 350$ nm a $\lambda_J = 472$ nm. Při nízkých koncentracích PPIX se dále objevuje pás při $\lambda = 448$ nm přiřazovaný diacidické formě. Při $\text{pH} = 2$ dochází k úbytku monomerní formy PPIX. Další úpravou pH nedochází k posunu maxim H- a J- agregátů, nemění se ani poměr jejich



Obr. 5.10: Závislost elektronových absorpčních spekter PPIX na pH vodného prostředí, $c = 10^{-3}$ M



Obr. 5.11: pH závislost elektronových absorpčních spekter PPIX na pH vodného prostředí, $c = 10^{-5}$ M

intenzit. Polohy maxim Q – pásů se taktéž neposunují a jsou pozorovány při hodnotách $\lambda = 542, 592$ a 642 nm. Ze získaných výsledků je patrné, že již vytvořené H- a J- agregáty PPIX jsou stále v alkalickém neutrálním i slabě kyselém prostředí. K částečnému rozpadu obou typů agregátů na monomerní molekuly PPIX dochází až v silně kyselém prostředí o $\text{pH} = 1 - 2$.

4.1.3. Výsledky studia elektronových absorpčních spekter PPIX

1. Byla prokázána přítomnost monomerní formy PPIX v ethanolovém roztoku v rozsahu $10^{-6} - 10^{-4}$ M. Maximum Soretova pásu je při vlnové délce $\lambda = 404$ nm, maxima Q – pásů při vlnové délce $\lambda = 502, 538, 574$ a 626 nm. Vzhledem k těmto výsledkům byly roztoky PPIX v EtOH zvoleny jako nejvhodnější prostředí pro studium rezonančních Ramanových spekter monomerní formy PPIX. Elektronová absorpční spektra monomerního PPIX ve srovnání s vlnovými délkami excitujícího záření pro RRS a SERRS experimenty ukazují, že $\lambda_{\text{exc}} = 441,6$ nm odpovídá úpatí Soretova pásu monomeru, zatímco $\lambda_{\text{exc}} = 514,5$ nm zasahuje do úbočí Q_v – pásu.
2. Elektronová absorpční spektra získaná v této práci pro PPIX ve vodném prostředí se při srovnávacích hodnotách $\text{pH} = 1, 5, 12$ v hlavních rysech (tvar spektra, přítomnost a relativní intenzity pásů) shodují s odpovídajícími spektry v ref. [53]. Vlnové délky maxim Soretova pásu v elektronových absorpčních spektrech PPIX monomeru při $\text{pH} = 1$, H – dimeru při $\text{pH} = 12$ a H – agregátů při $\text{pH} = 5$ se v práci [53] a v této práci téměř shodují (rozdíl vlnových délek o $0 - 4$ nm, maximum pásu J – agregátů při $\text{pH} = 5$ se nachází v této práci při vlnové délce $\lambda = 480$ nm, přičemž v práci [53] bylo pozorováno při vlnové délce $\lambda = 450$ nm. Tento rozdíl by mohl být způsoben odlišným počtem interagujících monomerů v J – agregátech.
3. H- i J – agregáty jsou stále v alkalickém, neutrálním i slabě kyselém prostředí, zatímco v silně kyselém prostředí o $\text{pH} = 1 - 2$ se ustavuje rovnováha mezi agregáty a monomerem.

4. Srovnání elektronových absorpčních spekter H- a J – agregátů PPIX s vlnovými délkami excitačního záření použitého v RRS a SERRS experimentech ukazuje, že vlnová délka $\lambda = 441,6$ nm spadá do úbočí Soretova pásu J – agregátů, zatímco vlnová délka $\lambda = 514,5$ nm je blízká lokálnímu minimu mezi Soretovým pásem J – agregátů a Q – pásem.

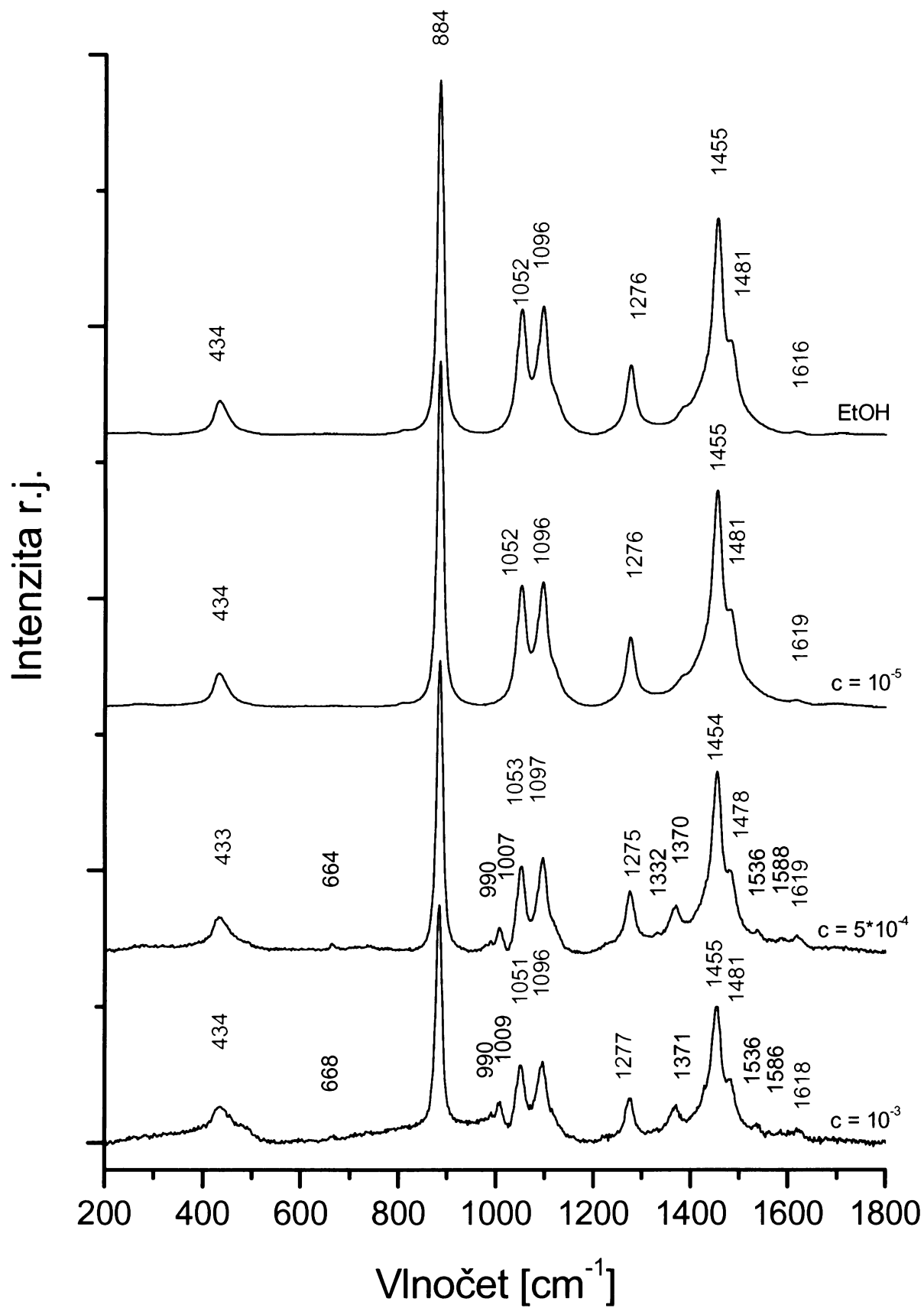
4.2. Rezonanční Ramanova spektra PPIX

V návaznosti na studium elektronových absorpčních spekter PPIX bylo dalším bodem této práce měření a interpretace RR spekter. Pro tyto studie byly použity dvě excitační vlnové délky a to $\lambda_{exc} = 441,6$ nm a $\lambda_{exc} = 514,5$ nm (kap. 4.1.4.). RR spektra byla měřena v EtOH roztoku a ve vodných roztocích PPIX při pH = 1 – 12 (pro vzorky připravené postupy P I a P II).

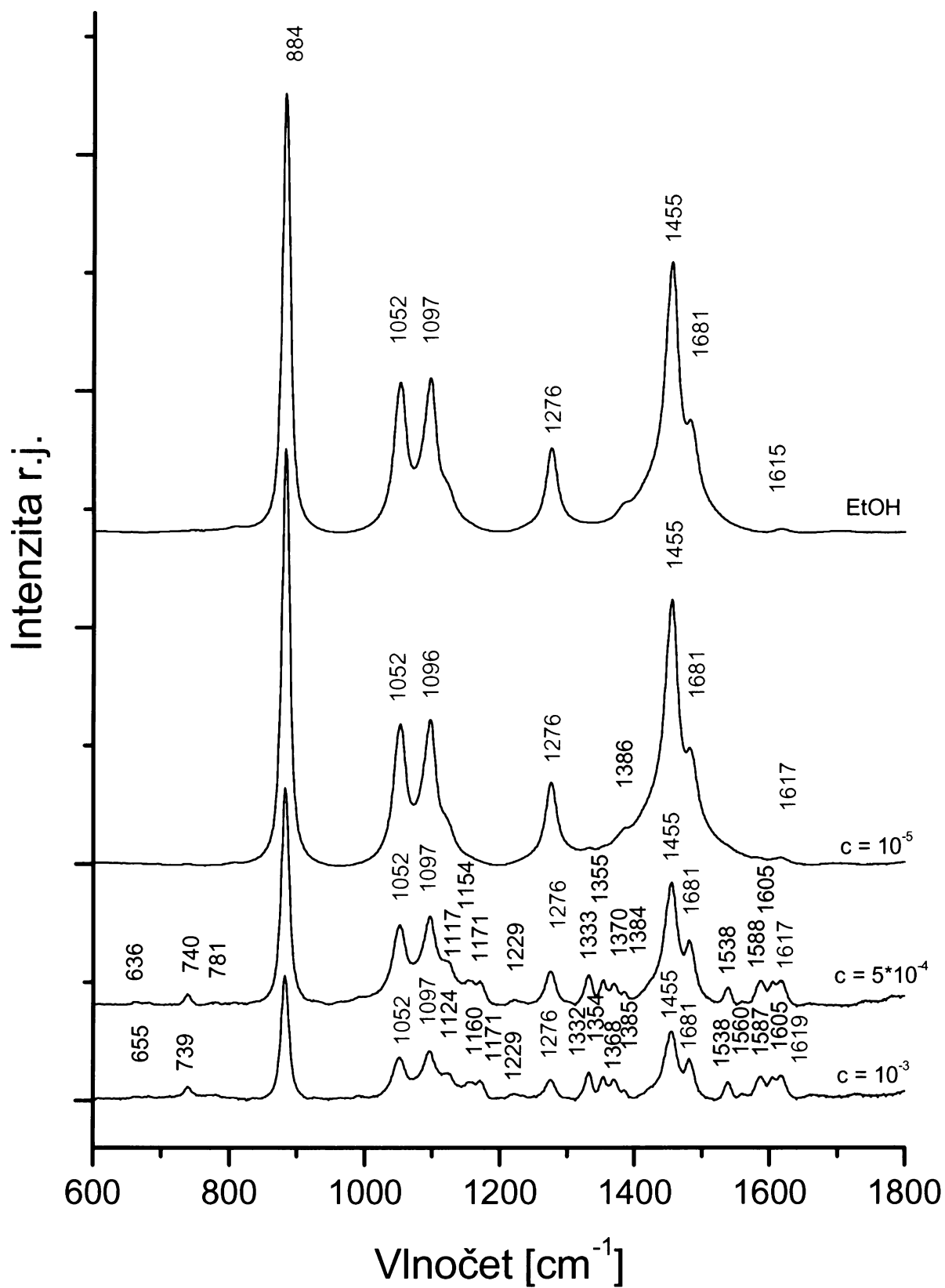
4.2.1. RR spektra PPIX v nevodném prostředí

Pro studium rezonančních Ramanových spekter v nevodném prostředí byl zvolen EtOH, neboť PPIX se v tomto rozpouštědle vyskytuje ve formě monomerní (kap. 4.1.4.). Rezonanční Ramanova spektra PPIX v EtOH (obr. 4.13 - 14) byla proměřena při třech různých koncentracích $c = 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-5}$ a 10^{-5} M.

Použity byly dvě excitační vlnové délky - $\lambda_{exc} = 441,6$ nm odpovídá úpatí Soretova pásu monomeru a $\lambda_{exc} = 514,5$ nm zasahuje do úbočí Q_v – pásu monomeru. RR spektra vzorků PPIX v EtOH jsou uvedena na obr. 4.13 ($\lambda_{exc} = 441,6$ nm) a 4.14 ($\lambda_{exc} = 514,5$ nm). Získání úplného spektra PPIX bylo znemožněno částečným překryvem pásů PPIX pásy EtOH. Signál PPIX je výrazně intenzivnější při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm, tedy při excitaci do oblasti Q – pásu monomeru, jak bylo očekáváno z interpretace elektronových absorpčních spekter. Vlnočty pásů monomerní formy PPIX v RR spektru měřeném s $\lambda_{exc} = 514,5$ nm jsou uvedeny v tab. 4.1.



Obř. 4.13: RR spektra PPIX v EtOH při $\lambda_{\text{exc}} = 441,6 \text{ nm}$
(vlnočet pász EtOH jsou vyznačeny červeně)



Obr. 4.14: RR spektra PPIX v EtOH při $\lambda_{exc} = 514.5$ nm (vlnočty pásů EtOH jsou vyznačeny červeně)

4.2.2. RR spektra PPIX ve vodném prostředí v závislosti na pH

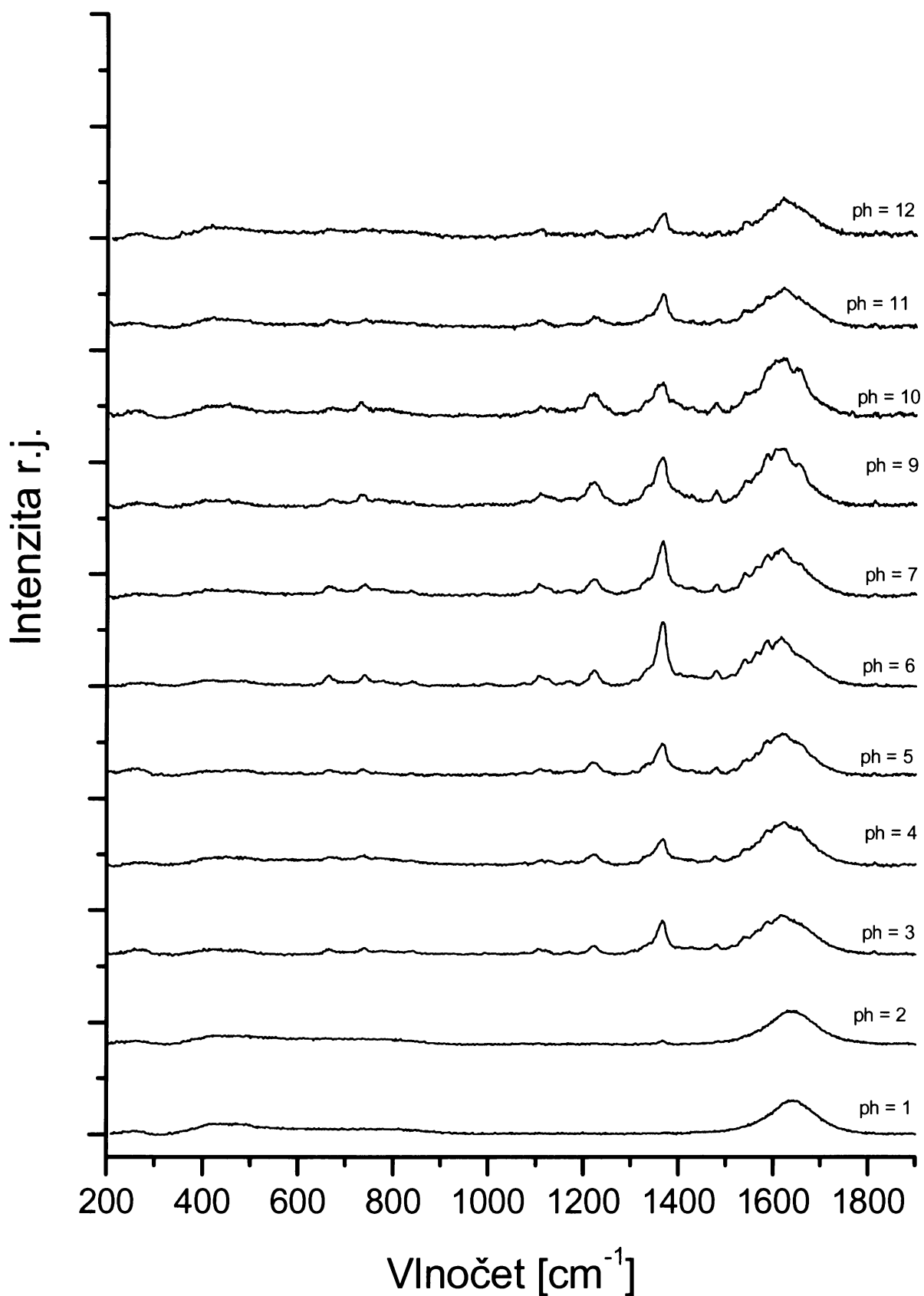
RR spektra PPIX v závislosti na pH vodného prostředí byla změřena pro vzorky připravované postupy P I a P II při koncentracích PPIX 10^{-5} a 10^{-3} M a při vlnových délkách excitujícího záření 441,6 a 514,5 nm. Naměřená spektra jsou uvedena na obr. 4.15 až 4.23.

4.2.2.1. RR spektra PPIX v závislosti na pH vodného prostředí měřená s $\lambda_{\text{exc}} = 441,6 \text{ nm}$

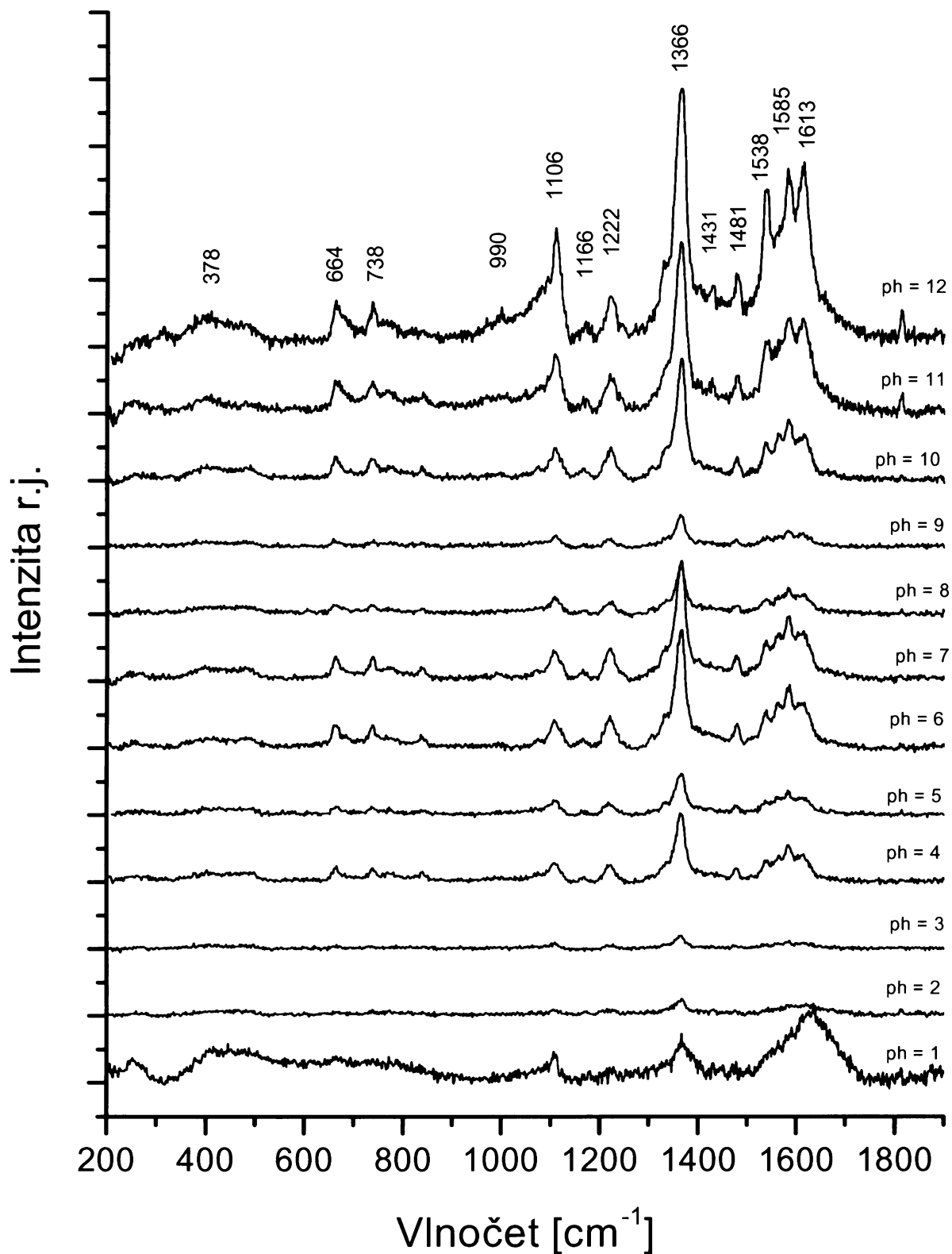
a) RR spektra vzorků vodných roztoků PPIX připravených P I

RR spektra vodných roztoků PPIX o $\text{pH} = 1 - 12$ (připravených P I) a o koncentracích PPIX 10^{-5} a 10^{-3} M ukazují obr. 4.15 a 4.16. Ve spektrech na obr. 4.15 (pro $c = 10^{-5}$ M) je patrný velmi intenzivní pás vibrace δ (H-O-H) molekul H_2O s maximem při 1634 cm^{-1} . Ve spektrální oblasti $1500 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ jsou pásy PPIX pozorovány pouze jako raménka na tomto velmi intenzivním pásu. Při $\text{pH} = 1$ není pozorován žádný z pásů PPIX, při $\text{pH} = 2$ pouze jeden pás při 1370 cm^{-1} . V rozmezí $\text{pH} = 3 - 12$ je pozorováno nejméně 5 charakteristických pásů PPIX. Koncentraci 10^{-5} M lze pokládat za koncentrační hodnotu meze RR spektrální detekce PPIX ve vodném prostředí o $\text{pH} = 3 - 12$.

Ve spektrech vzorku o koncentraci 10^{-3} M (obr. 4.16) jsou při $\text{pH} = 1$ pozorovány pouze dva pásy PPIX při 1366 cm^{-1} a 1107 cm^{-1} . Spektra vzorků o $\text{pH} = 2 - 12$ vykazují již nejméně deset charakteristických pásů PPIX. Příkladem je detailní spektrum vzorku o $\text{pH} = 7$ na obr. 4.23A. Spektra na obr. 4.16 ($c = 10^{-5}$ M) vykazují pozorovatelné rozdíly v absolutních intenzitách (spektra nejsou normována).



Obr. 4.15: RR spektra vzorků vodných roztoků PPIX(připravených postupem P I) jako funkce pH při $\lambda_{exc} = 441,6 \text{ nm}$ a $c = 10^{-5} \text{ M}$

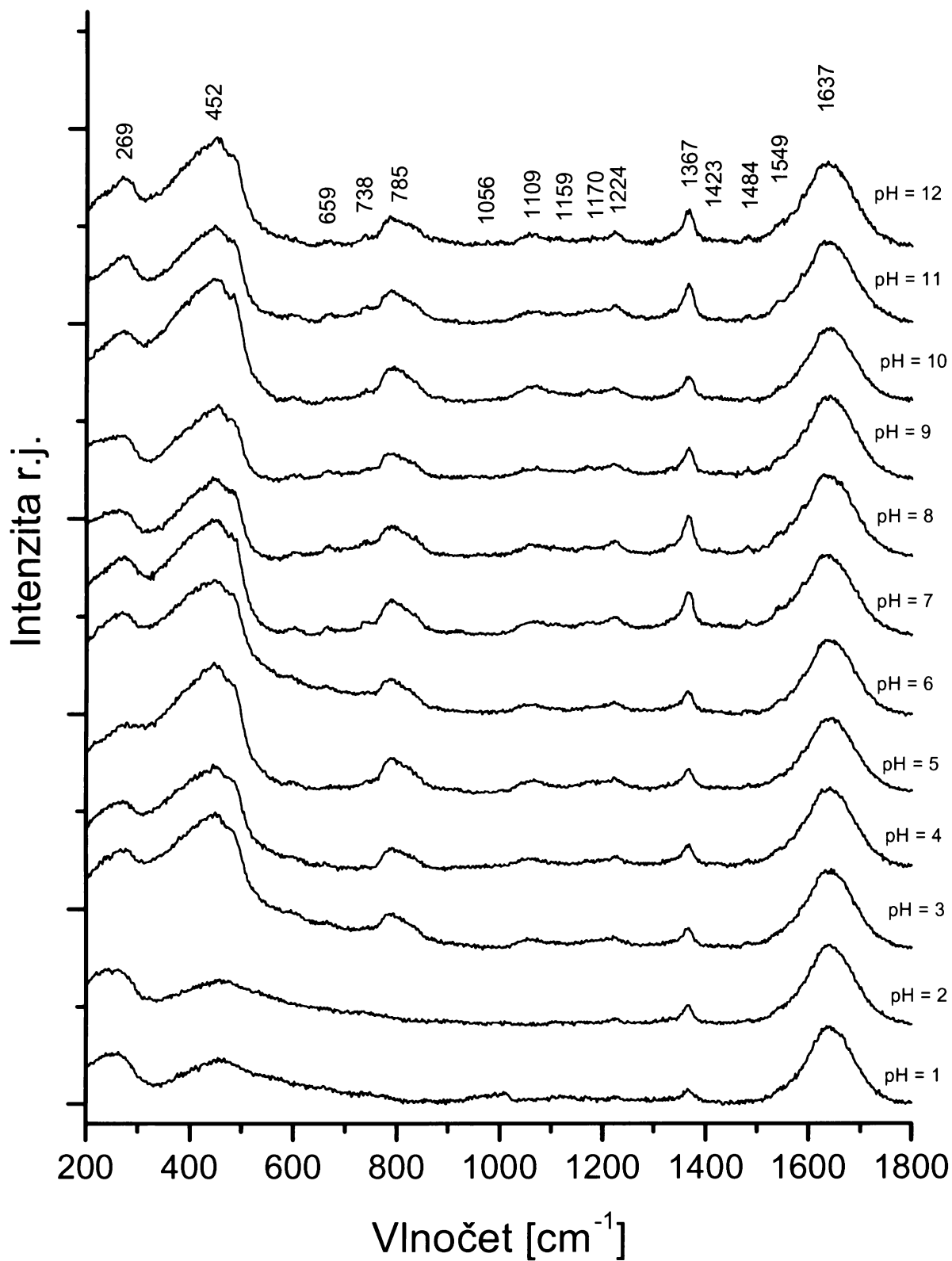


Obr. 4.16: RR spektra vzorků vodných roztoků PPIX (připravených postupem P I) jako funkce pH při $\lambda_{\text{exc}} = 441,6 \text{ nm}$ a $c = 10^{-5} \text{ M}$

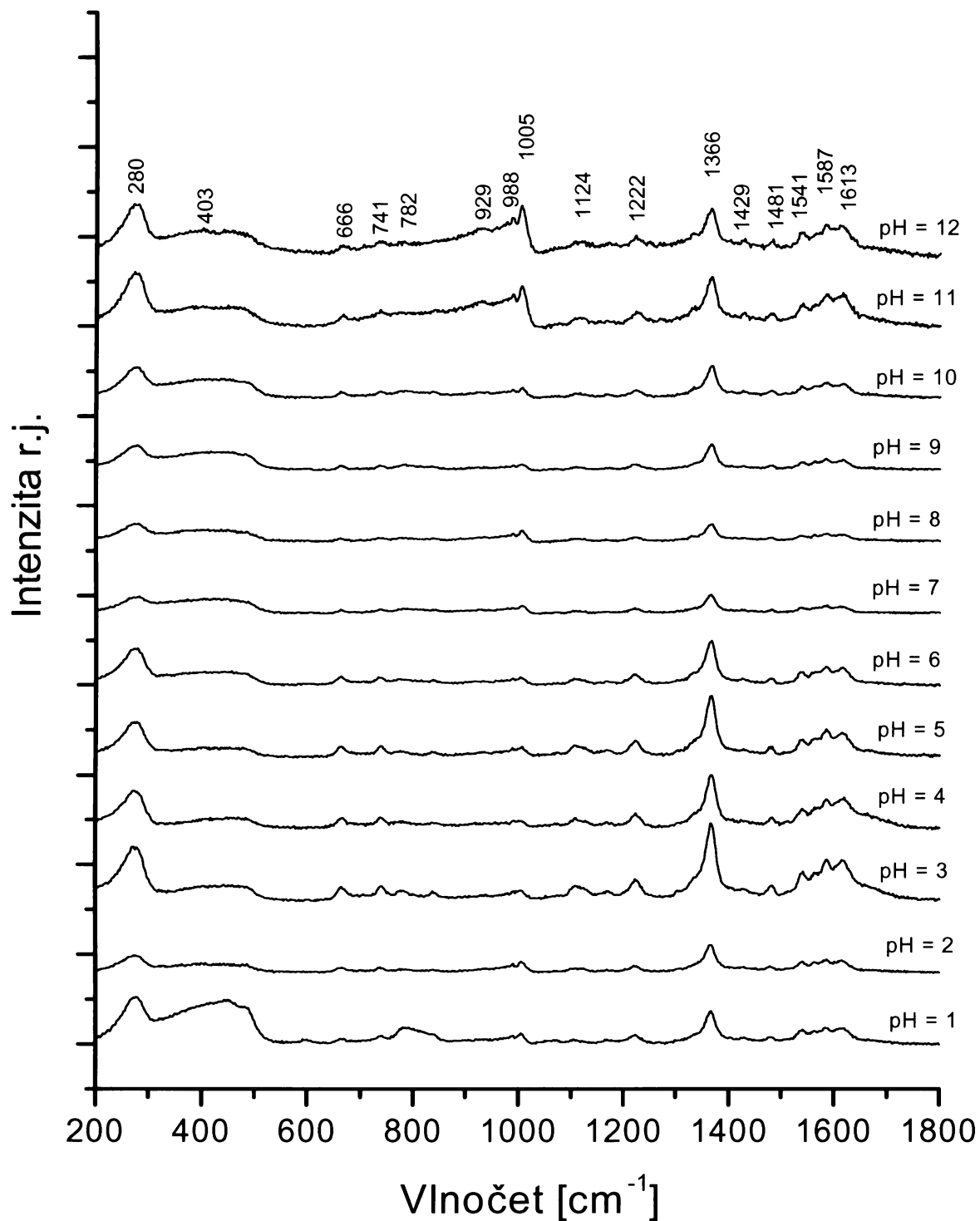
Tyto změny však neodpovídají poměrným změnám absorpční při $\lambda_{\text{exc}} = 441,6 \text{ nm}$ PPIX. Je pravděpodobné, že tyto rozdíly mají původ ve výrazných změnách pozadí způsobených pravděpodobně změnami v rozptylu i absorpci záření se změnami velikosti agregátů PPIX, anebo jsou důsledkem částečné precipitace PPIX z roztoku. Rozdíly tak mají spíše náhodný charakter než jasnou závislost na pH. Značné nereprodukovatelnosti při měření elektronových absorpčních spekter PPIX jako funkce pH v pracích různých autorů bylo poukázáno i v práci [53]. Vlnočty pásů jako funkce pH však zůstávají bez zásadních změn. Výjimkou je pokles (při pH = 11) a vymizení (při pH = 12) pásů 1562 cm^{-1} a 831 cm^{-1} . Na základě interpretace elektronových absorpčních spekter by mohlo jít o spektrální projevy rozpadu J- a H – agregátů za vzniku H – dimerů. Naopak velmi nízké hodnoty signálu RR při pH = 1 (pro vzorky o koncentraci 10^{-3} M i 10^{-5} M) a při pH = 2 (pro $c = 10^{-5} \text{ M}$) jsou zřejmě důsledkem velmi nízké hodnoty absorpance převládající monomerní formy PPIX při hodnotě $\lambda_{\text{exc}} = 441,6 \text{ nm}$.

b) RR spektra vzorků vodných roztoků PPIX připravených P II

RR spektra vodných vzorků PPIX o pH = 1 – 12 (připravených P II) o koncentracích PPIX 10^{-5} M a 10^{-3} M ukazují obr. 4.17 a 4.18. Spektra vzorků o $c = 10^{-5} \text{ M}$ (obr 4.17) nevykazují změny v počtu spektrálních pásů (odpovídající aktivitě vibrací), ani v hodnotách jejich vlnočtů. Pás 1637 cm^{-1} přísluší δ (H-O-H) vibraci molekul vody. Původ širokých pásů 269 cm^{-1} a 452 cm^{-1} je zatím nejasný. Tyto pásy (na rozdíl od pásu 1637 cm^{-1} molekul H_2O) nemají odpovídající partnery ve spektrech vzorků připravených P I. Spektra vzorků o $c = 10^{-3} \text{ M}$ (obr. 4.18) rovněž nevykazují změny v počtu spektrálních pásů ani jejich vlnočtů v celé oblasti pH = 1 – 12. Tento výsledek opět dobře odpovídá interpretaci elektronových absorpčních spekter, která ukazují na přítomnost H- i J – agregátů ve vodných roztocích připravených P II při všech hodnotách pH. Při pH = 1 a pH = 2 jsou H- i J – agregáty v rovnováze s monomerním, avšak vzhledem k velmi malé absorpční monomerního PPIX při $\lambda_{\text{exc}} = 441,6 \text{ nm}$ lze očekávat, že RR signál monomeru bude překryt RR signálem agregátů.



Obr. 4.17: RR spektra vzorků vodných roztoků PPIX (připravených postupem P II) jako funkce pH při $\lambda_{\text{exc}} = 441,6 \text{ nm}$ a $c = 10^{-5} \text{ M}$



Obr. 4.18: RR spektra vzorků vodných roztoků PPIX (připravených postupem P II) jako funkce pH při $\lambda_{exc} = 441,6 \text{ nm}$ a $c = 10^{-3} \text{ M}$

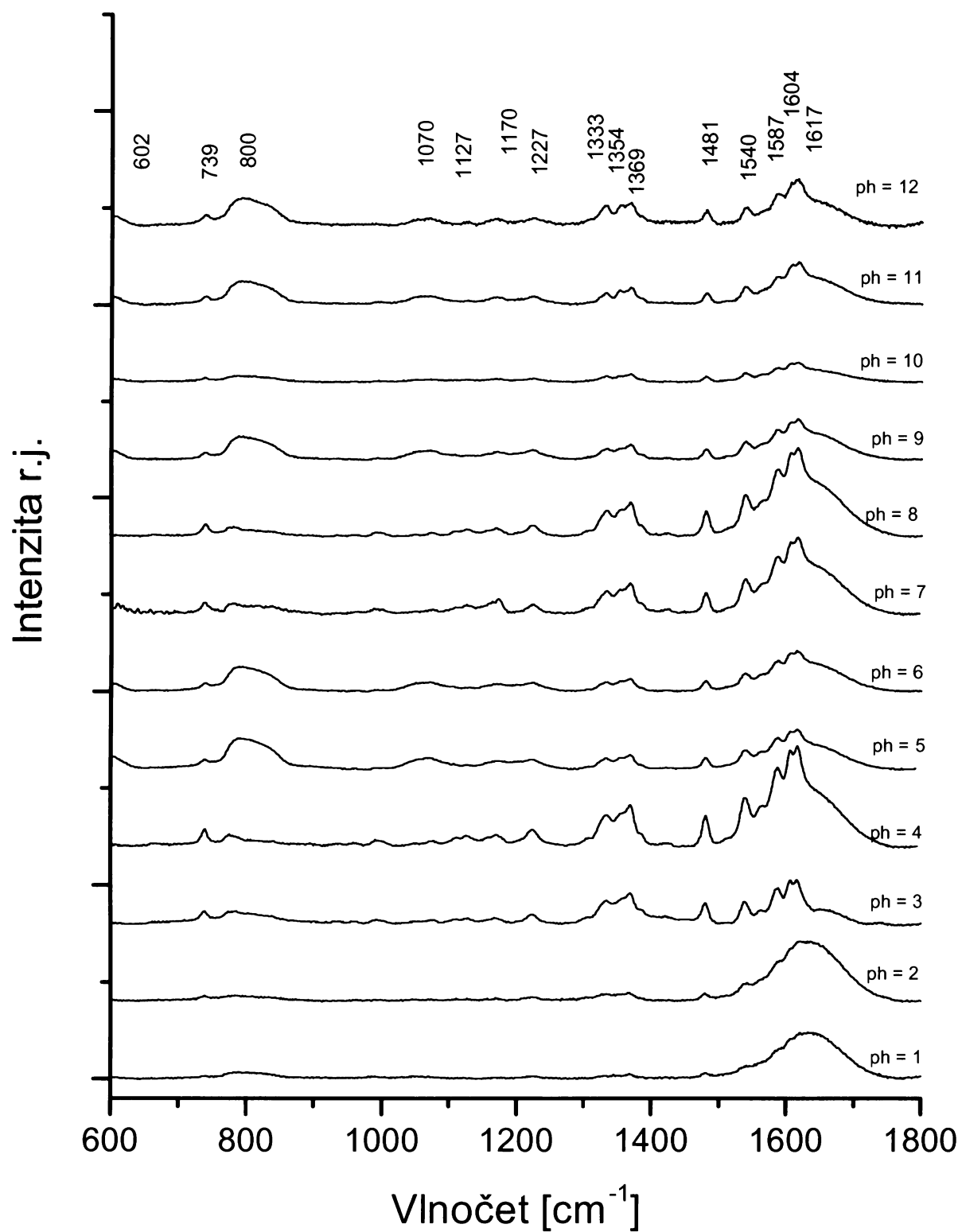
4.2.2.1. RR spektra PPIX v závislosti na pH vodného prostředí měřená s $\lambda_{exc} = 514,5 \text{ nm}$

a) RR spektra vzorků vodných roztoků PPIX připravených P I

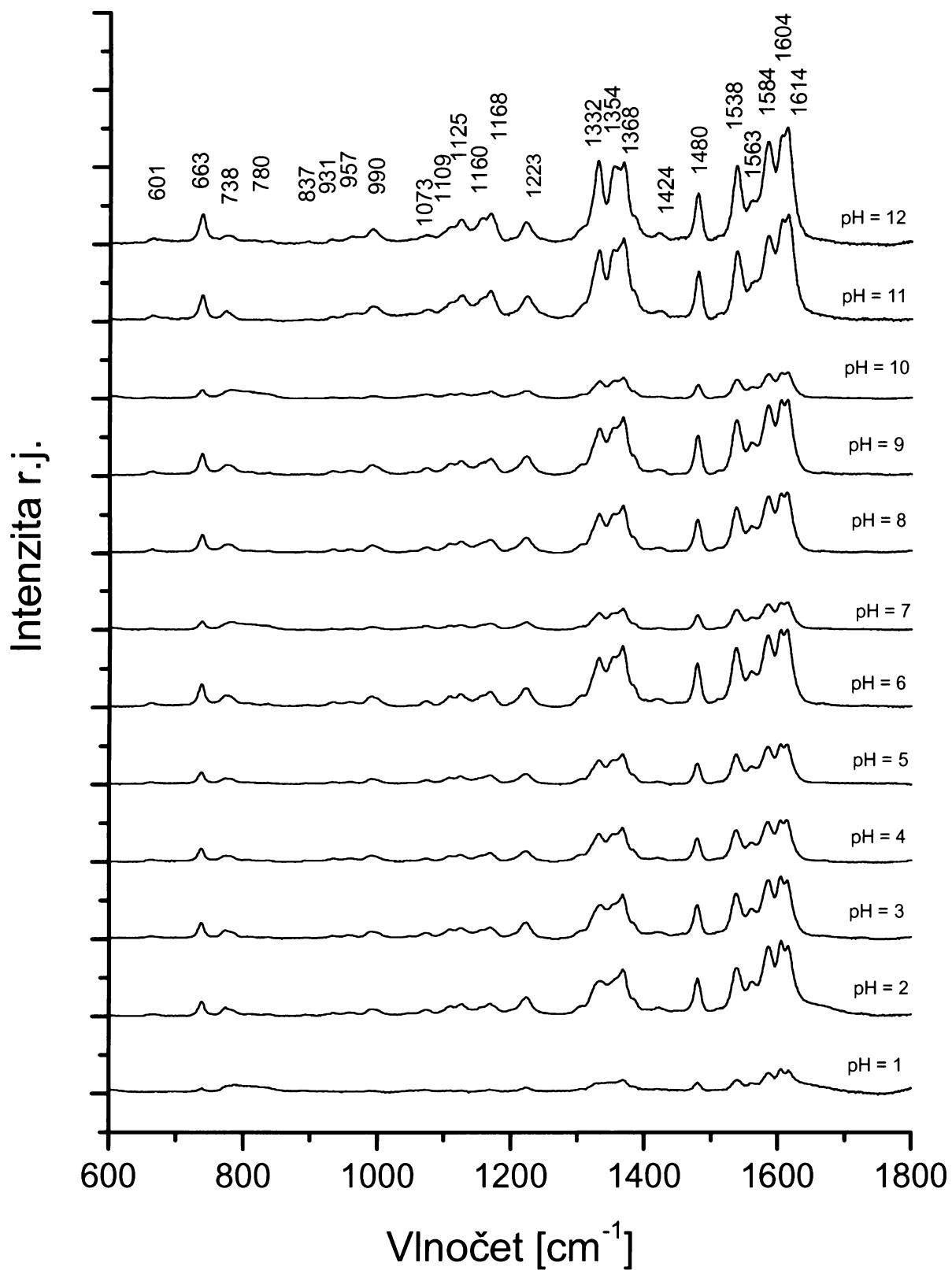
RR spektra vodných roztoků PPIX o $\text{pH} = 1 - 12$ (připravených P I) o koncentraci PPIX 10^{-5} a 10^{-3} M ukazují obr. 4.19 a 4.20. Pro vzorky s koncentrací 10^{-5} M o $\text{pH} = 1$ lze rozlišit v RR spektru právě tři charakteristické pásy (jedná se tedy o koncentrační hodnotu meze RR spektrální detekce). Ve spektrech vzorků o $\text{pH} = 2 - 12$ lze rozlišit více než patnáct charakteristických pásů PPIX, které jsou analogické s pásy ve spektrech vzorků o koncentraci PPIX 10^{-3} M v celém rozsahu $\text{pH} = 1 - 12$. Výjimkou je široký pás při $750 - 800 \text{ cm}^{-1}$ pozorovaný ve spektrech vzorků o koncentraci 10^{-5} M s relativně nízkými hodnotami signálu PPIX. Je patrné, že RR spektra PPIX v těchto vzorcích nevykazují významnou závislost ani na koncentraci, ani na pH vodného roztoku. Výjimkou by mohla být pouze nevýrazná změna poměru relativních intenzit pásů 1605 a 1613 cm^{-1} jako funkce pH, pozorovaná pro spektra vzorků o koncentraci 10^{-3} M (obr. 4.20). RR spektrum PPIX ve vodném prostředí při $\text{pH} = 7$ je ukázáno v detailu na obr. 4.23B.

b) RR spektra vzorků vodných roztoků PPIX připravených P II

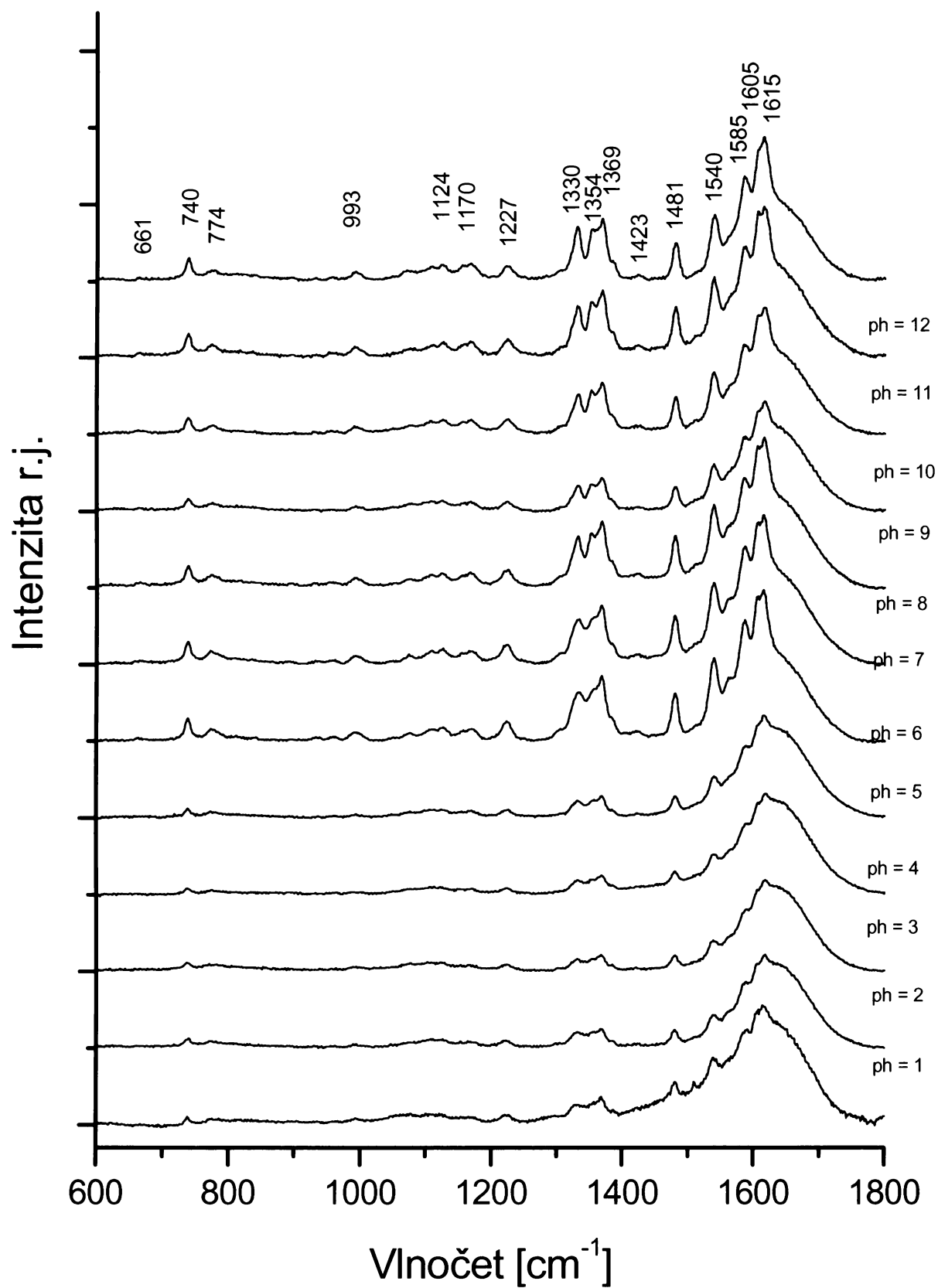
RR spektra vzorků vodných roztoků PPIX o $\text{pH} = 1 - 12$ (připravených P II) jsou uvedena na obr. 4.21 a 4.22. Vlnočty a intenzity pásů PPIX v RR spektrech nevykazují zásadní změny se změnou koncentrace. Ve spektrech vzorků o $c = 10^{-5}$ M je patrný široký pás $\delta \text{H}_2\text{O}$ (obdobně jako ve vzorcích připravených P I). Spektra vzorků o $\text{pH} = 6 - 12$ vykazují systematicky vyšší signál RR než vzorky o $\text{pH} = 1 - 5$. Z absorpčních při $\lambda_{exc} = 514,5 \text{ nm}$ v elektronových absorpčních spektrech nelze jednoznačně posoudit, zda jde o důsledek nárůstu absorpce při $\lambda_{exc} = 514,5 \text{ nm}$.



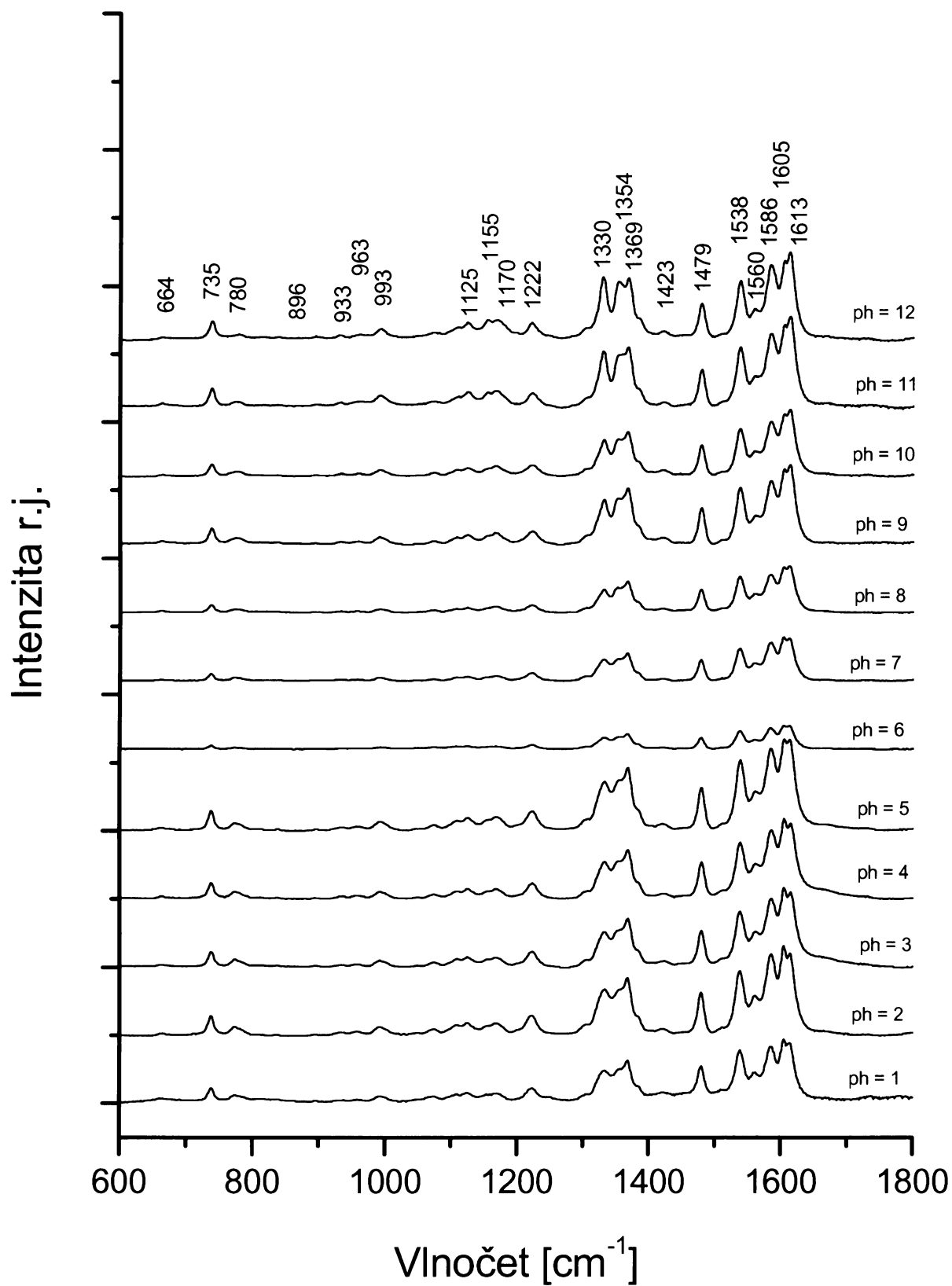
Obr. 4.19: RR spektra vzorků vodných roztoků PPIX (připravených postupem P I) jako funkce pH při $\lambda_{\text{exc}} = 514,6 \text{ nm}$ a $c = 10^{-5} \text{ M}$



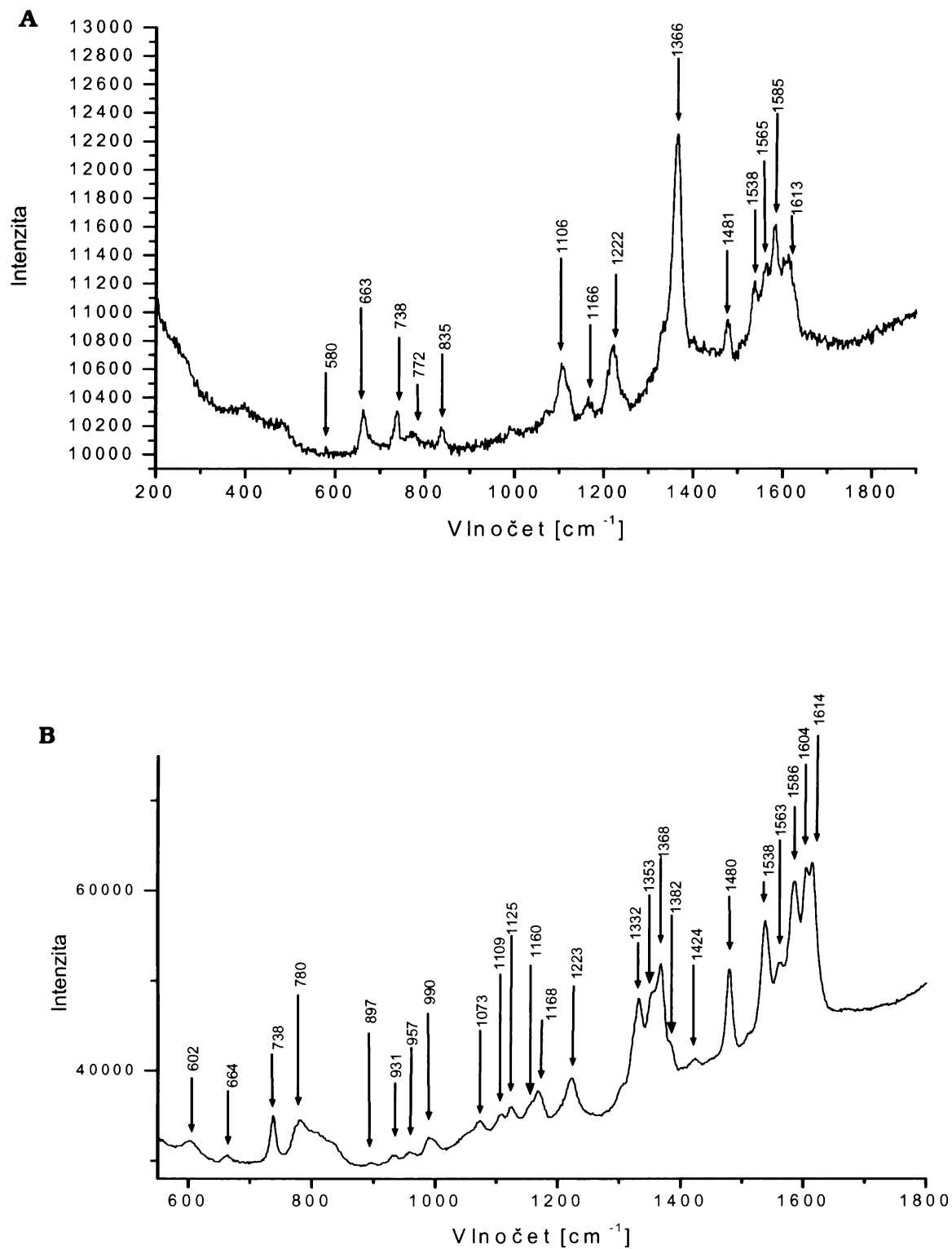
Obr. 4.20: RR spektra vzorků vodných roztoků PPIX (připravených postupem P I) jako funkce pH při $\lambda_{\text{exc}} = 514,5 \text{ nm}$ a $c = 10^{-3} \text{ M}$



Obr. 4.21: RR spektra vzorků vodných roztoků PPIX (připravených postupem P II) jako funkce pH při $\lambda_{\text{exc}} = 514,5 \text{ nm}$ a $c = 10^{-5} \text{ M}$



Obr. 4.22: RR spektra vzorků vodných roztoků PPIX (připravených postupem P II) jako funkce pH při $\lambda_{\text{exc}} = 514,5 \text{ nm}$ a $c = 10^{-3} \text{ M}$



Obr. 4.23: Srovnání RR spekter vodných roztoků PPIX při pH = 7 připravených postupem PI a o c = 10^{-3} M
A) $\lambda_{\text{exc}} = 441,6$ nm
B) $\lambda_{\text{exc}} = 514,5$ nm

4.2.3. Vliv agregace molekul PPIX na RR spektra PPIX

Vliv agregace na RR spektra PPIX je posuzován na základě srovnání vlnočtů pásů v RR spektrech monomerní formy PPIX v ethanolovém roztoku a agregované formy PPIX ve vodném roztoku při pH = 4 (J- i H – agregáty) excitovaných $\lambda_{exc} = 514,5$ nm uvedených v tab. 4.1.

Z tab. 4.1 je patrné, že ke všem pozorovaným pásům monomerní formy PPIX existují pásy odpovídajících vlnočtů ve spektru agregované formy PPIX. V případě třinácti pásů jde o shodu vlnočtů v rozmezí $0 - 2$ cm^{-1} , pouze v případě dvou pásů jde o rozdíl vlnočtů 6 cm^{-1} { 1229 cm^{-1} (m) \rightarrow 1223 cm^{-1} (a); 1619 cm^{-1} (m) \rightarrow 1613 cm^{-1} (a)}. Zatímco pás 1229 cm^{-1} je velmi slabým pásem v RR spektru monomeru PPIX v EtOH a odečítání jeho vlnočtu je proto zatíženo chybou, pásy 1619 cm^{-1} v monomeru a 1613 cm^{-1} ve spektru agregátů jsou v obou případech dobře rozlišitelné.

Dále je ovšem třeba uvážit, že k osmi pásům pozorovaným ve spektru agregované formy nebylo možno najít odpovídající pásy ve spektrech monomerní formy v důsledku přítomnosti intenzivních pásů EtOH překrývajících pásy PPIX.

Ze srovnání v tab. 4.1 lze usoudit, že vibrace vlastního porfyrinového makrocyklu nejsou významně ovlivněny tvorbou agregátů, o čemž svědčí zejména shoda vlnočtů pásů v oblasti $1300 - 1400$ cm^{-1} a $1500 - 1600$ cm^{-1} citlivých na změny velikosti centrální části makrocyklu (core size markers). Ukazuje se, že indikátorem agregačního stavu PPIX (monomer ve srovnání s J- a H – agregáty) by mohl být pouze pás 1619 cm^{-1} (monomer) \rightarrow 1613 cm^{-1} (agregát), který je v pracích [56,57,59] shodně přisuzován vibraci $\nu(\text{C}=\text{C})$ vinylových skupin.

4.2.3. Srovnání RR spekter PPIX při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm a $514,5$ nm

Ze srovnání RR spekter vodných roztoků PPIX o pH = 7 a $c = 10^{-3}$ M při excitaci $\lambda_{exc} = 441,6$ nm a $514,6$ nm (obr. 4.23 a tab. 4.2) vyplývá, že RR intenzita pásů PPIX je podstatně ovlivněna volbou vlnové délky excitujícího záření. Z tab. 4.2 je patrné, že všechny pásy pozorované ve spektru při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm byly nalezeny rovněž ve spektru při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm, přičemž RR spektrum při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm obsahuje navíc ještě dalších deset spektrálních pásů.

Tab. 4.1: Srovnání vlnočtů pásů v RR spektrech monomerní formy PPIX (v EtOH roztoku) a agregované formy PPIX (ve vodném roztoku o pH = 4) v oblasti 600 – 1700 cm⁻¹ a pokusné přiřazení pásů

MONOMER (EtOH)	J- a H - AGREGÁTY	PŘÍŘAZENÍ
665	664	v ₇
739	738	v ₁₆
EtOH	775	γ (CH ₂) vinyl
EtOH	837	v ₆
EtOH	933	v ₃₂
EtOH	961	v ₃₁
EtOH	990	v ₅
EtOH	1074	v ₂₃
EtOH	1109	v (C _p -C _{vinyl})
1124	1124	v ₂₂
1160	1160	v ₃₀
1171	1170	v (C _p -C _{vinyl})
1229	1223	v ₁₃
1332	1332	v ₂₁
1354	1354	δ (=CH ₂)
1368	1367	v ₄
1385	1382	v ₂₀
EtOH	1479	δ (=CH ₂)
1538	1537	v ₃
1560	1560	v ₁₁
1587	1585	v ₂
1605	1604	v ₁₉
1619	1613	v (C=C) vinyl

Tab. 4.2: Srovnání vlnočtů pásů v RR spektrech ve vodném roztoku o pH = 7 a c = 10⁻³ M (připravených P I) měřených λ_{exc} = 441,6 nm a 514,5 nm v oblasti 600 – 1700 cm⁻¹ a pokusné přiřazení pásů

λ_{exc} = 441,6 nm	PŘÍŘAZENÍ	λ_{exc} = 514,5 nm	PŘÍŘAZENÍ
-		601	V24
664	v ₇	663	v ₇
738	v ₁₆	738	v ₁₆
772	γ (CH ₂) vinyl	780	γ (CH ₂) vinyl
835	v ₆	837	v ₆
-		931	v ₃₂
-		957	v ₃₁
990	v ₅	990	v ₅
-		1073	v ₂₃
1106	v (C _p -C _{vinyl})	1109	v (C _p -C _{vinyl})
-		1125	v ₂₂
-		1160	v ₃₀
1166	v (C _p -C _{vinyl})	1168	v (C _p -C _{vinyl})
1222	v ₁₃	1223	v ₁₃
-		1332	v ₂₁
-		1354	v ₂₀
1366	v ₄	1368	v ₄
-		1424	v ₂₉
1481	δ (CH ₂) ₂	1480	δ (CH ₂) ₂
1538	v ₃	1538	v ₃
1565	v ₁₁	1563	v ₁₁
1585	v ₂	1586	v ₂
-		1604	v ₁₉
1613	v (C=C) vinyl	1614	v (C=C) vinyl

Pokusné přiřazení pásů uvedené v tab. 4.1 a 4.2 vycházelo z následujících úvah a uveřejněných prací:

Excitační vlnová délka $\lambda_{exc} = 441,6$ nm spadá do oblasti Soretova pásu PPIX. Na základě interpretace elektronových spekter porfyrinů ve vztahu k mechanismům jejich rezonančního Ramanova rozptylu (kap. 1.2.4.), dochází v tomto případě k rezonančnímu zesílení prostřednictvím A - členu (Franck - Condonův mechanismus) a aktivní by měly být pouze totálně symetrické vibrace (v aktuální bodové grupě symetrie molekuly). Zatímco metaloporfyriny, jejichž RR spektra byla interpretována v pracích [56 - 61], mají symetrii porfyrinového skeletu D_{4h} , PPIX coby porfyrin volná báze má symetrii porfyrinového skeletu D_{2h} . Snížení symetrie $D_{4h} \rightarrow D_{2h}$ má za následek zvýšení počtu totálně symetrických reprezentací A_{1g} a B_{1g} bodové grupy D_{4h} [73]. Prvním bodem pokusného přiřazení bylo tedy přiřazování pásů v RR spektru PPIX při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm vibracím porfyrinového skeletu příslušejícím symetrickým reprezentacím A_{1g} a B_{1g} NCA Ni(II)OEP publikované Spirem a spolupracovníky v referenci [61]. Pásky příslušející vibracím vinylových substituentů byly přiřazovány na základě dřívější práce Spira a spolupracovníků [56], v níž byly vibrace vinylové skupiny v molekule NiPPIX přiřazeny na základě izotopových substitucí. Stejným způsobem byly přiřazeny odpovídající pásky ve spektru při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm. Další deset dosud nepřijížených pásů v tomto spektru bylo pokusně přiřazováno pásům vibrací netotálně symetrických v bodové grupě symetrie D_{2h} (tj. příslušejícím původním symetrickým reprezentacím A_{2g} a B_{2g} v bodové grupě symetrie D_{4h}) v referenci [61]. Excitace $\lambda_{exc} = 514,5$ nm totiž zasahuje do blízkosti vibronického Q - pásu PPIX, a tudíž lze (kap. 1.2.4.) očekávat příspěvek B - členu (Herzberg - Tellerův mechanismus) a rezonanční zesílení totálně symetrických i netotálně symetrických Ramansky aktivních vibračních módů (původních A_{1g} , B_{1g} , A_{2g} a B_{2g} v bodové grupě symetrie D_{4h}).

4.3. SERRS spektra PPIX v systémech s nativním Ag hydrosolem

Hlavním cílem experimentů popsaných v této a následující kapitole (4.4.) bylo zjistit minimální koncentraci PPIX, kterou ještě lze detegovat pomocí SERRS spektroskopie (mez SERRS spektrální detekce PPIX). Celková koncentrace roztoku PPIX v systémech s nativním Ag hydrosolu se pohybovala v rozmezí od 0 – 10^{-4} M.

SERRS spektra byla excitována vlnovými délkami $\lambda_{exc} = 441,6$ nm a 514,5 nm. Zatímco excitace $\lambda_{exc} = 441,6$ nm zasahuje do relativně úzkého excitačního pásu neagregovaných nanočástic Ag hydrosolu ($\lambda_{max} \sim 400$ nm), pro efektivní zesílení Ramanova rozptylu při excitaci $\lambda_{exc} = 514,5$ nm je nutná přítomnost agregátů Ag nanočástic v hydrosolu. V tom případě se pás plasmonové extinkce výrazně rozšiřuje do oblasti vyšších vlnových délek a zasahuje až do červené oblasti spektra.

Vzhledem k tomu, že agregační stav SERS-aktivního systému výrazně mění jeho rozptylové vlastnosti, pro porovnávání intenzity SERRS spekter naměřených na různě agregovaných vzorcích je potřebný vnitřní intenzitní standard. Podstata problému spočívá v tom, že zvyšující se elastický rozptyl a absorpce hydrosolu, spolu s rostoucí absorpcí PPIX (pokud absorbuje v oblasti excitace), způsobují zkracování dráhy, kterou excitační paprsek urazí ve vzorku, a stopy která se zobrazuje na vstupní šěrbinu monochromátoru (a detektor). Tím se zmenšuje jak celkový excitační objem vzorku, tak intenzita excitace v jednotlivých místech vzorku. Tento problém lze zmírnit tím, že se optický signál sbírá pouze z malého objemu těsně u vstupu excitačního paprsku do vzorku. Při uvážení dalších nepříznivých faktorů, jakými je možné kolísání celkového excitačního výkonu laseru, rozptyl a reabsorpce SERRS signálu na částicích vzorku mezi excitačním objemem a stěnou kyvety a částečná sedimentace agregovaného hydrosolu v průběhu experimentu, je zřejmé, že intenzitní normování SERRS spekter nemá triviální a univerzálně bezproblémové řešení. Nejlepší přístupem je normování SERRS spekter na vnitřní standard, kterým by měl být takový pás v Ramanově spektru, jehož intenzita by byla nezávislá na koncentraci PPIX a SERRS-mechanismu pro danou vlnovou délku.

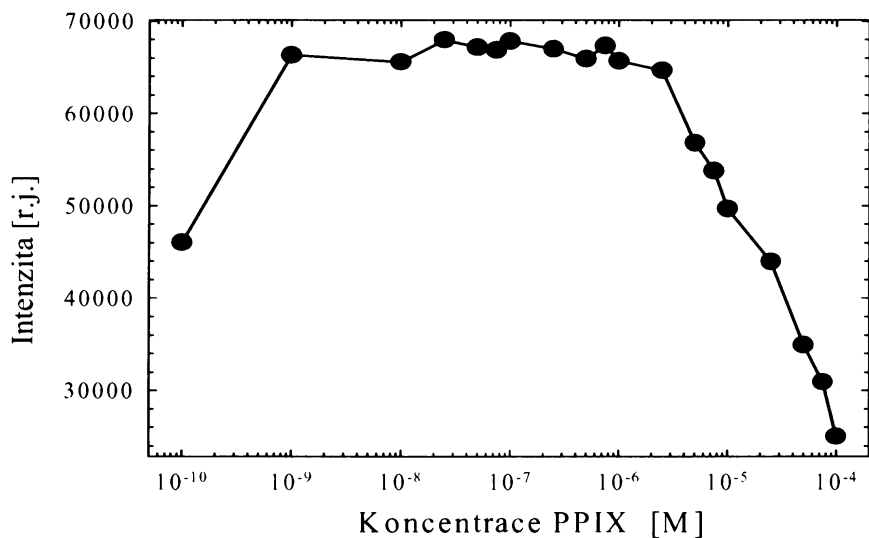
Vzhledem k tomu, že do SERRS-aktivního systému není vhodné přidávat žádné další látky, jako nejpraktičtější řešení pro vnitřní intenzitní standard

se nabízí využití valenčních vibrací molekul vody v oblasti $\sim 2800 - 3800 \text{ cm}^{-1}$. Voda představuje podstatnou a přirozenou složku Ag hydrosolů a její symetrické a antisymetrické valenční vibrace způsobují silný (pro používané excitace $\lambda_{\text{exc}} = 441,6 \text{ nm}$ a $514,5 \text{ nm}$ nerezonanční) Ramanův rozptyl, který za normálních podmínek dovoluje relativně spolehlivě normalizovat SERRS spektra (tento pás svojí celkovou intenzitou obvykle řádově odpovídá intenzitě SERRS signálu PPIX v oblasti $0 - 2000 \text{ cm}^{-1}$). Problém nastává, pokud má nějaká součást SERRS-systému v uvedené oblasti nezanedbatelný vlastní signál, ať už ve formě vlastního Ramanova rozptylu (pokud ho nelze lehce odlišit a následně odečíst na základě odlišné pološířky pásů Ramanova rozptylu), nebo fluorescence. Právě překryv širokého Ramanova pásu vody s obecně širokými fluorescenčními pásy PPIX je kritický. Pokud je fluorescence silnější než Ramanův rozptyl vody, nelze jednotlivé příspěvky odlišit, a tento pás nelze použít k normování spekter.

V případě excitace $\lambda_{\text{exc}} = 441,6 \text{ nm}$ spadá interval $2800 - 3800 \text{ cm}^{-1}$ (Ramanův pás valenčních vibrací vody) do spektrální oblasti $504 - 531 \text{ nm}$ (vlnová délka fotonů odpovídajících Stokesovu mechanismu Ramanova rozptylu), kde PPIX zjevně nemá významnější fluorescenci. Naproti tomu, v případě excitace $\lambda_{\text{exc}} = 514,5 \text{ nm}$ tento interval spadá do červené oblasti $600 - 640 \text{ nm}$, kde pozorujeme silnou vlastní fluorescenci PPIX (fluorescenční pás s maximem na cca 620 nm , [53]). Jak je zřejmé z obr. 4.24, při excitaci $\lambda_{\text{exc}} = 441,6 \text{ nm}$ v oblasti valenčních vibrací vody nedochází k nárůstu signálu v důsledku fluorescence, spíše pozorujeme jeho postupný pokles počínaje od koncentrace $\sim 3 \times 10^{-6} \text{ M}$, přičemž se tvar spektra prakticky nemění. Tento pokles souvisí pravděpodobně se zvýšeným elastickým rozptylem excitačního záření na agregovaném hydrosolu. Pokud by SERRS spektra nebyla normalizována na uvedený pás vody, porovnáním neupravených spekter (pro tento konkrétní experiment) bychom se v oblasti koncentrací PPIX $10^{-9} - 10^{-6} \text{ M}$ dopustili pouze zanedbatelné chyby, nicméně při koncentraci 10^{-4} M by intenzita nenormovaného spektra představovala pouze $\sim 1/3$ jeho skutečné intenzity.

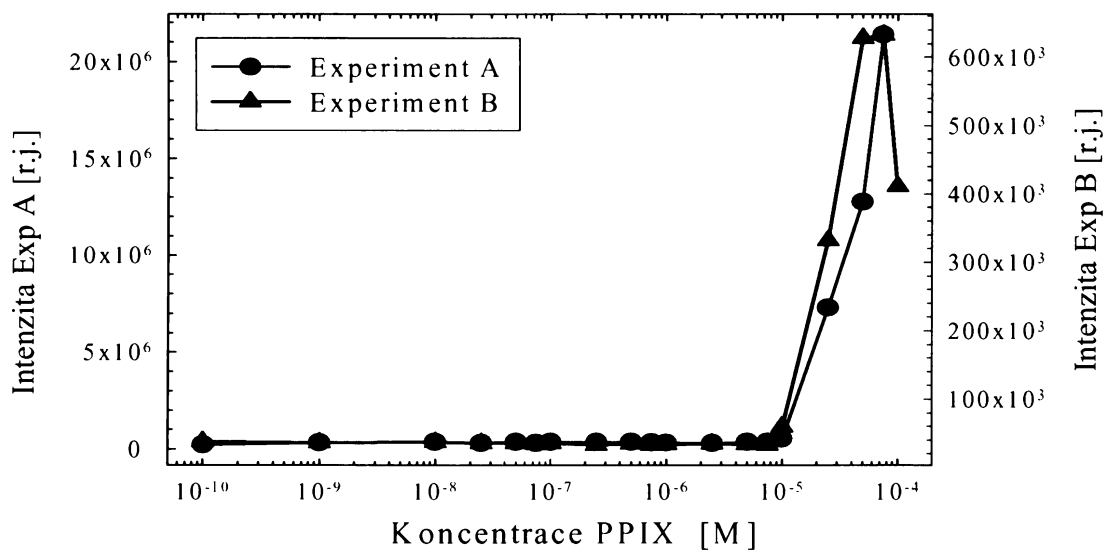
Naopak při excitaci $\lambda_{\text{exc}} = 514,5 \text{ nm}$ (obr. 4.25), je patrný silný nárůst signálu (až o dva řády) počínaje od koncentrace $c = 10^{-5} \text{ M}$, jehož zdrojem je pravděpodobně vlastní fluorescenci PPIX. Výsledky porovnávané na obr. 4.25 jsou ze dvou nezávislých experimentů, přičemž uvedená intenzita

představuje nekorigovaný celkový signál akumulovaný detektorem za konstantní časový úsek.



Obr. 4.24: Porovnání celkové intenzity maxima signálu detegovaného v oblasti valenčních vibrací vody (intenzitní standard) pro excitaci 441.6 nm, jako funkce koncentrace PPIX v SERS-systému. Vzorek s koncentrací PPIX 10⁻¹⁰ M představuje ve skutečnosti Ag hydrosol bez přídavku PPIX (uvedeno tímto způsobem kvůli problémům s nulovou koncentrací v logaritmické škále).

Na rozdíl od excitace $\lambda_{\text{exc}} = 441,6$ nm, kdy se tvar spektra v této oblasti zachovával (a přesně odpovídal známému spektru valenčních vibrací vody), prudký nárůst intenzity pro excitaci $\lambda_{\text{exc}} = 514,5$ nm je doprovázen rovněž



Obr. 4.25: Porovnání celkové intenzity maxima signálu detegovaného v oblasti valenčních vibrací vody (intenzitní standard) pro excitaci $\lambda_{\text{exc}} = 514,5$ nm, jako funkce koncentrace PPIX v SERS-systému.

změnou tvaru pásů, což podporuje vysvětlení, že se jedná o fluorescenci.

Důvodem, proč se tato fluorescence objevuje při koncentracích vyšších a rovných $c = 10^{-5}$ M souvisí pravděpodobně s přítomností molekul PPIX, které již nejsou v přímém kontaktu s Ag nanočásticemi a jejichž fluorescence tudíž není zhášena.

Z tohoto hlediska lze tedy informaci o objevení se silné fluorescence při $c = 10^{-5}$ M považovat za významnou, přestože znemožňuje normalizaci SERRS spekter.

4.3.1. SERRS spektra PPIX při excitaci $\lambda_{exc} = 441,6$ nm

Pro studium povrchem zesílených rezonančních Ramanových spekter PPIX byly připraveny vzorky PPIX v systému s Ag hydrosolem (postup přípravy v kap. 3.6.) o koncentraci $c = 10^{-4} - 10^{-9}$ M (obr. 4.26). Tento soubor spekter byl podrobně zpracován pomocí faktorové analýzy (obr. 4.27). Před samotnou faktorovou analýzou byla všechna spektra normalizována na vnitřní standard a upravena tak, aby měla identický průběh pozadí (background). Dále byl od všech spekter odečten příspěvek Ramanova rozptylu samotného hydrosolu (zejména široký pás v oblasti 1640 cm^{-1} deformačních vibrací vody). Nicméně bylo zjištěno, že SERRS spektrum čistého Ag hydrosolu obsahuje navíc řadu slabých, ale dobře identifikovatelných pásů, které vymizí po přidání minimálního množství PPIX ($\sim 10^{-9}$ M). Pravděpodobně se jedná o SERRS signál produktů hydrolyzy tetrahydridoboritanu sodného. Jakmile je do SERRS-systému přidán PPIX (a to i v koncentracích, které nestačí na pozorování SERRS signálu PPIX samotného), tyto pásy vymizí (nebo jejich intenzita značně poklesne). Pravděpodobně se jedná o důsledek vytěsnění hydrolytických produktů (např. boritanových aniontů) z povrchu koloidních částic, ale plné vysvětlení mechanismu by vyžadovalo provést systematictější experimenty. Důsledkem těchto procesů je skutečnost, že spektru samotného hydrosolu odpovídá spíše SERRS spektrum hydrosolu s minimální koncentrací PPIX (kdy se ve spektrech ještě neprojevují pásy PPIX), než SERRS spektrum opravdu čistého hydrosolu, odečtením kterého je vnesena do spekter systematická chyba ve formě několika negativních pásů (přeodečtený signál). Proto bylo v úpravách, které vyžadovaly eliminaci příspěvku Ag

hydrosolu odečteno SERRS spektrum naměřené pro nejnižší koncentraci PPIX v sérii. Při uvádění některých výsledků v tomto případě chybí údaj pro nejnižší koncentraci. V případech, kde nebylo nutné příspěvek vody eliminovat, jsou do analýzy zahrnuty i spektra s nejnižší měřenou koncentrací PPIX.

Po této, v některých případech i poměrně složité úpravě, byla spektra podrobena faktorové analýze. Na obr. 4.27 jsou zobrazena první čtyři subspektra (S1 – S4), viriální koeficienty (V1 – V4), střední odchylka a singulární hodnoty pro sérii normovaných a na příspěvek koloidu korigovaných SERRS spekter excitovaných při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm.

Z relativních velikostí singulárních hodnot je patrné, že k souboru spekter přispívají hlavně první dvě subspektra, tedy v souboru naměřených spekter se vyskytují dvě základní spektrální formy PPIX, forma I (FI – metalovaná) a forma II (FII – free base, tj. nemetalovaná forma), viz obr. 4.28. Uvedená spektra čistých forem byla extrahována ze subspekter S1 a S2 za zjednodušujícího předpokladu, že vývoj systému lze plně popsat právě dvěma subspektry (což do jisté míry platí). Vzájemné srovnání vlnočtů pozorovaných pásů obou čistých forem a jejich srovnáním s vlnočty pásů v RR spektrech při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm spolu s přiřazením pásů (provedeným způsobem popsaným v kap. 4.2) je uvedeno v tab. 4.3. Z tab. 4.3 je patrné, že vlnočty pásů F II (nemetalované) se velmi dobře shodují s vlnočty pásů v RR spektrech PPIX, což potvrzuje, že F II odpovídá porfyrinu volné báze. Z tvaru malého, nicméně nezanedbatelného třetího subspektra a nenulové třetí singulární hodnoty je však patrná přítomnost další spektrální komponenty v souboru spekter. Pravděpodobně se jedná o formu, která se vyskytuje v malé koncentraci, nebo má spektrum podobné spektru jedné z majoritních forem. Z průběhu viriálních koeficientů V3 na koncentraci PPIX se dá soudit, že by se mohlo jednat o formu objevující se při vyšších koncentracích PPIX ($c > 10^{-5}$ M). Subspektrum S3 v podstatě odráží rozdíl mezi SERRS spektry při koncentraci 3×10^{-5} M a 10^{-4} M.

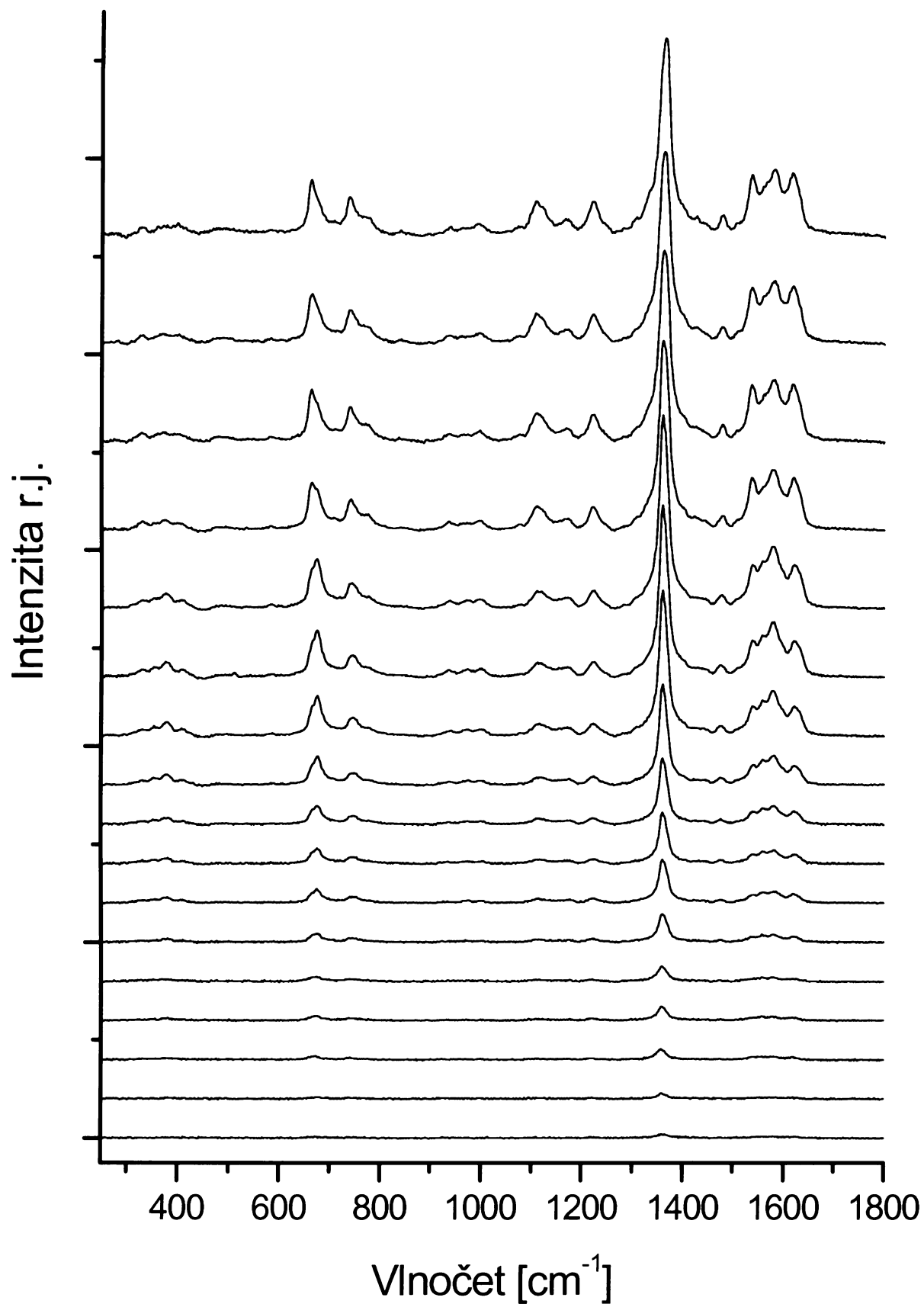
Ze závislosti průběhů viriálních koeficientů V1 a V2 na koncentraci PPIX je dále patrný ostrý zlom, ke kterému dochází při koncentraci 10^{-5} M. Dá se říct, že právě při této koncentraci dochází k transformaci spektrální formy I na spektrální formu II. Postupné zvyšování koncentrace PPIX od 0 do 10^{-5} M má za následek více-méně pouze nárůst SERRS signálu, který (v prvním přiblížení) dobře odpovídá spektrální formě I. Od koncentrace 10^{-5} M se

objevuje nová spektrální forma II, přičemž celková intenzita SERS signálu se dále nemění, pouze dochází k přibývání formy II na úkor formy I.

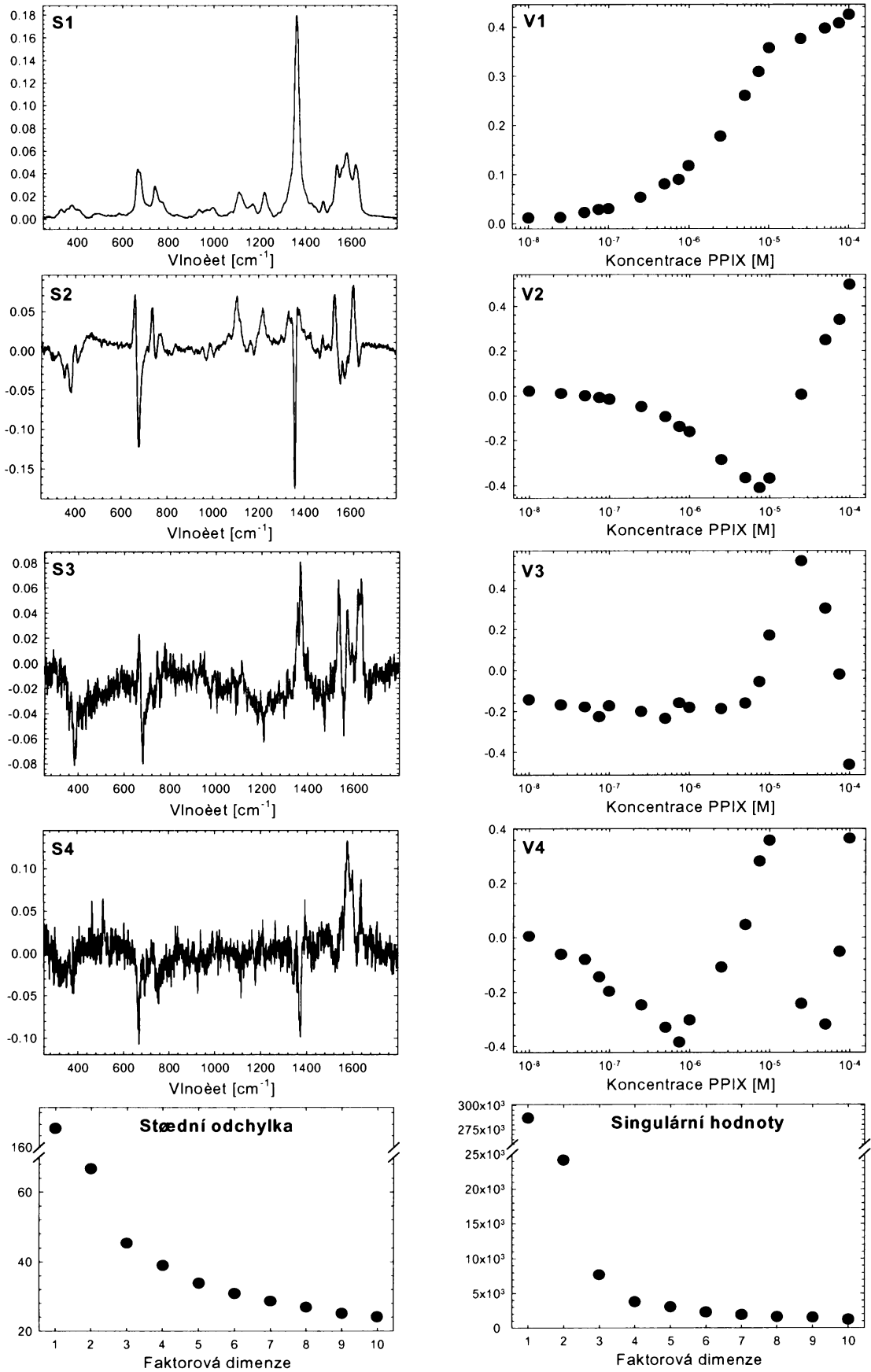
Protože z předchozích výsledků bylo zřejmé, že v o oblasti $0 - 10^{-5}$ M se v SERRS systému pozoruje pouze spektrální forma I, k určení meze SERRS spektrální detekce PPIX při excitaci $\lambda_{exc} = 441,6$ nm bylo použito pouze SERRS spektra PPIX o koncentraci $c = 7,5 \cdot 10^{-6} - 10^{-9}$ M (obr. 4.29). Pozadí analyzovaných spekter pro tuto faktorovou analýzu však byla upravována odlišným způsobem, protože od spekter nebyl odečítán příspěvek hydrosolu (tj. deformační vibrace vody δ H₂O). Na druhou stranu, tímto postupem bylo do analýzy zahrnuto i spektrum s $c \sim 10^{-9}$ M. Výsledek faktorové analýzy je na obr. 4.29. Z grafu průběhu koeficientů V1 na koncentraci PPIX jsou zřejmé tři oblasti, ve kterých lze závislost V1 na logaritmu koncentrace PPIX proložit lineární závislostí. První oblast odpovídá koncentracím, kdy je koeficient V1 (platí i pro další koeficienty) stejně velký jako pro SERRS systém, ve kterém ještě není vidět žádný SERRS signál PPIX, a lze ho tedy proložit konstantní závislostí s nulovou směrnici. Druhou oblastí jsou koncentrace, pro které V1 nabývá významně vyšších hodnot, než je tomu v první oblasti a ve které lze hodnoty V1 proložit lineární závislostí s nenulovou směrnici. Třetí oblast tvoří koncentrace, kde lze hodnoty V1 také proložit lineární závislostí, ale s jinou směrnici. V grafu V1 (obr. 4.29) byly body prvních dvou oblastí proloženy přímkami, jejichž průsečík lze interpretovat jako mez SERRS spektrální detekce PPIX, určenou faktorovou analýzou. Hodnota meze spektrální detekce tedy leží přibližně při koncentraci $c = 6 \cdot 10^{-8}$ M.

Mez detekce lze definovat v závislosti na kritériu, které stanovíme pro určení detegovatelného signálu. Kritériem může být bezpečné pozorování jistého počtu pásů Ramanova rozptylu dané látky, přičemž nemůže dojít k záměně s obdobnými pásy samotného hydrosolu (viz výše). Ze samotných naměřených SERRS spekter PPIX byla tímto způsobem mez spektrální detekce PPIX určena pro koncentraci $c = 2,5 \cdot 10^{-8}$ M, kdy jsou jasně patrné tři charakteristické pásy PPIX. Při koncentraci $c = 5 \cdot 10^{-8}$ M je však již patrné sedm charakteristických pásů, což zaručuje například selektivitu PPIX vůči Fe-PPIX.

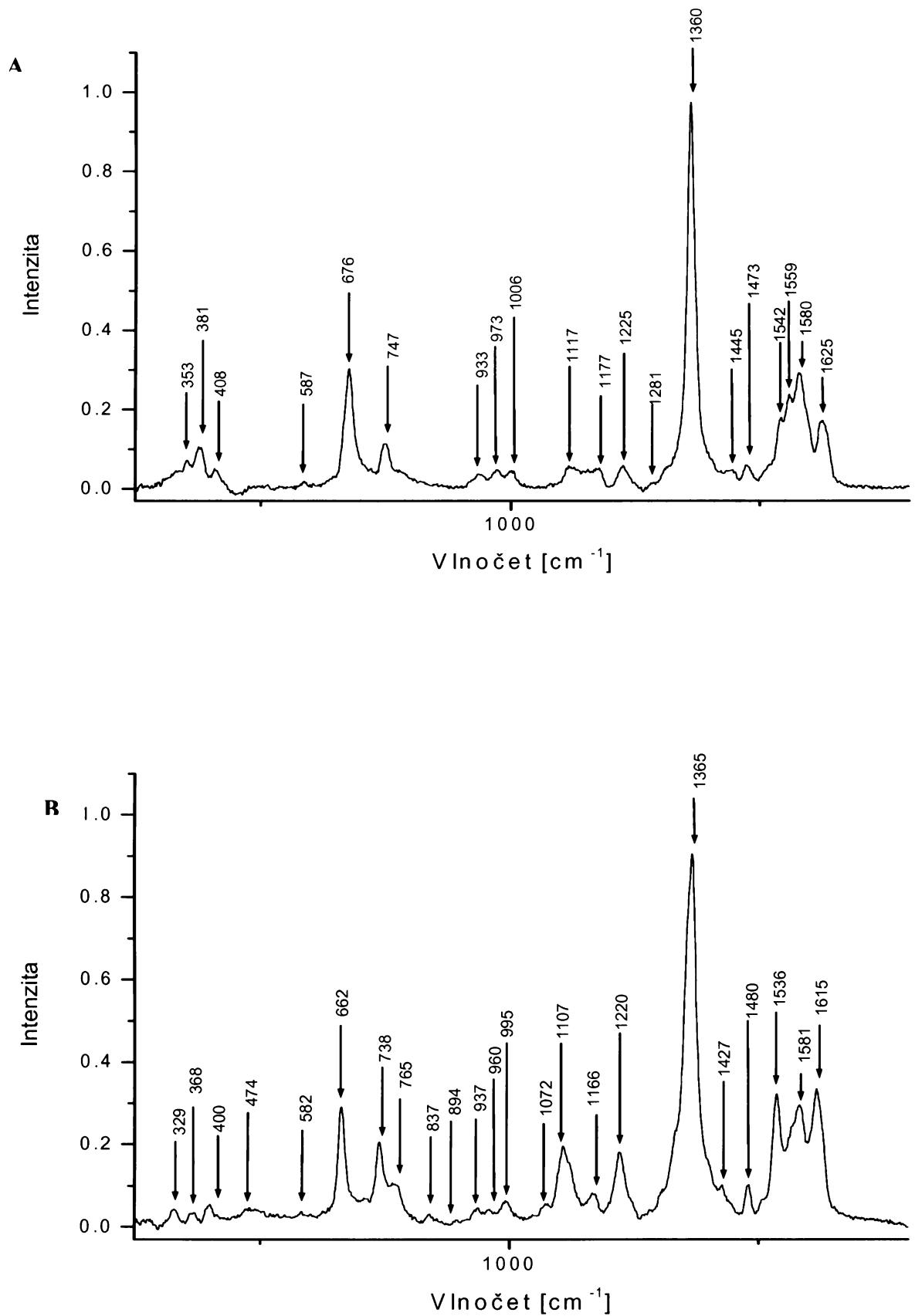
Z grafu V1 (obr. 4.29) je dále patrný zlom mezi druhou a třetí koncentrační oblastí, a to při koncentraci $c = 10^{-6}$ M.



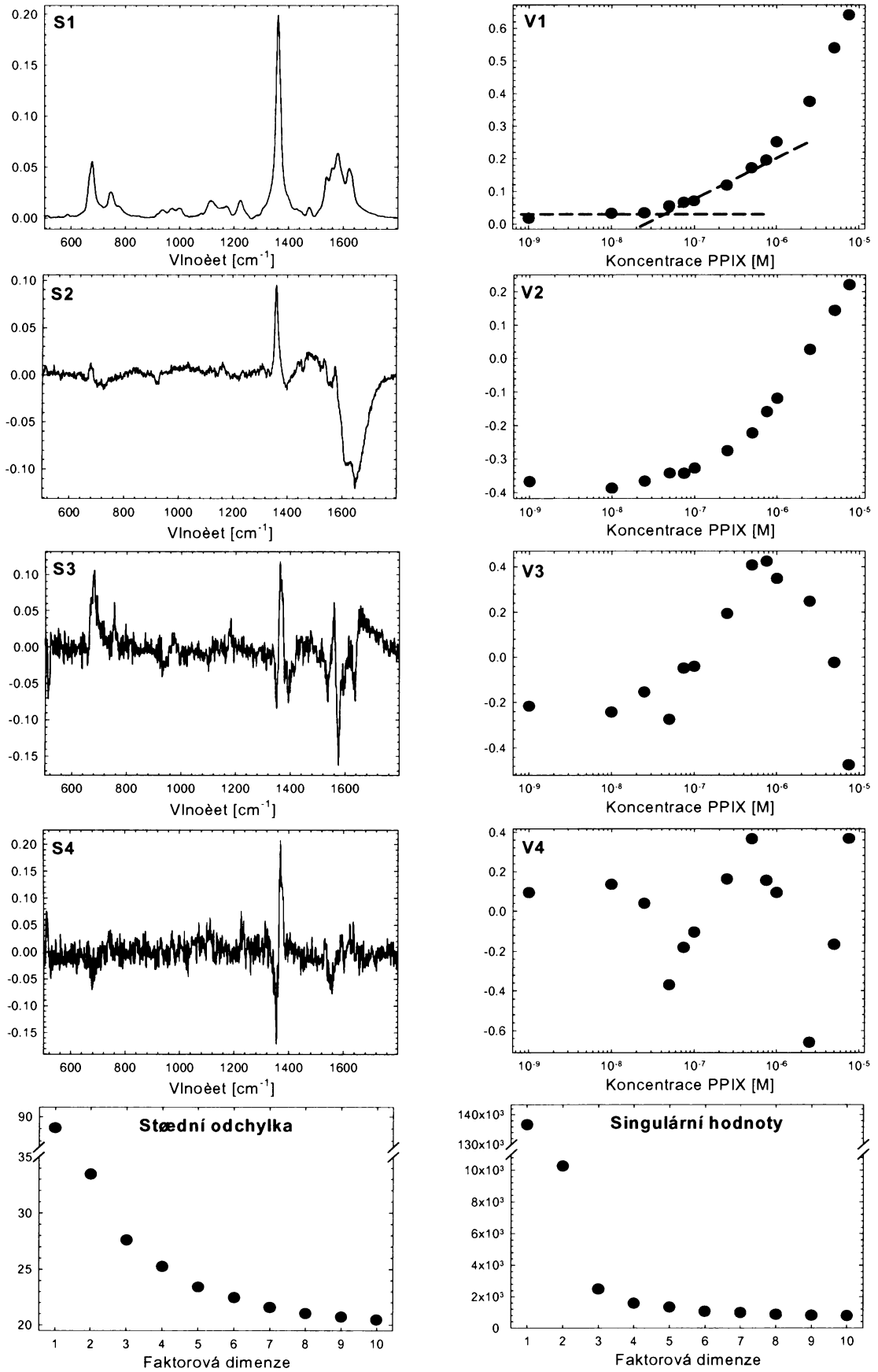
Obr. 4.26: Soubor normovaných SERRS spekter PPIX o koncentracích 10^{-8} – 10^{-4} M, excitovaných $\lambda_{exc} = 441,6$ nm. Pozadí všech spekter a bylo korigováno na základě faktorové analýzy. Ze spekter byl jednotným způsobem odečten příspěvek rozpouštědla (vody).



Obr. 4.27: Výsledky faktorové analýzy normalizovaných SERRS spekter PPIX pro koncentrace 10⁻⁸ – 10⁻⁴ M, excitovaných $\lambda_{exc} = 441.6$ nm



Obr. 4.28: Spektrální formy PPIX získané z faktorové analýzy při excitaci $\lambda_{exc} = 441.6 \text{ nm}$
A) spektrální forma I
B) spektrální forma II



Obr. 4.29: Výsledky faktorové analýzy normalizovaných SERS spekter PPIX pro koncentrace $c = 10^{-9} - 7.5 \cdot 10^{-6}$ M, excitovaných $\lambda_{exc} 441,6$ nm

Tab. 4.3: Srovnání vlnočtů pásů v spektrech formy F I a F II PPIX a RR spektrech PPIX (ve vodném roztoku o pH = 7) v oblasti 300 – 1700 cm⁻¹ při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm

SERRS F1	SERRS F2	RR	PŘÍRAZENÍ
-	329	-	ν_8 (free base)
353	368	-	
381	-	-	ν_8 (metallo)
408	400	-	ν_{33}
587	582	-	ν_{24}
676	662	662	ν_7
747	738	738	ν_{16}
-	765	-	
933	937	-	ν_{32}
973	960	-	ν_{31}
1006	995	990	ν_5
1117	1107	1106	ν (C _p -C) vinyl
1171	1166	1166	ν (C _p -C) vinyl
1225	1220	1222	ν_{13}
1281	-	-	
1360	1365	1366	ν_4
1445	1427	-	ν_{29}
1473	1480	1481	δ (=CH ₂) vinyl
1542	1536	1538	ν_3
1559	-	1565	ν_{11}
1580	1581	1585	ν_2
1625	1615	1613	ν (C=C) vinyl

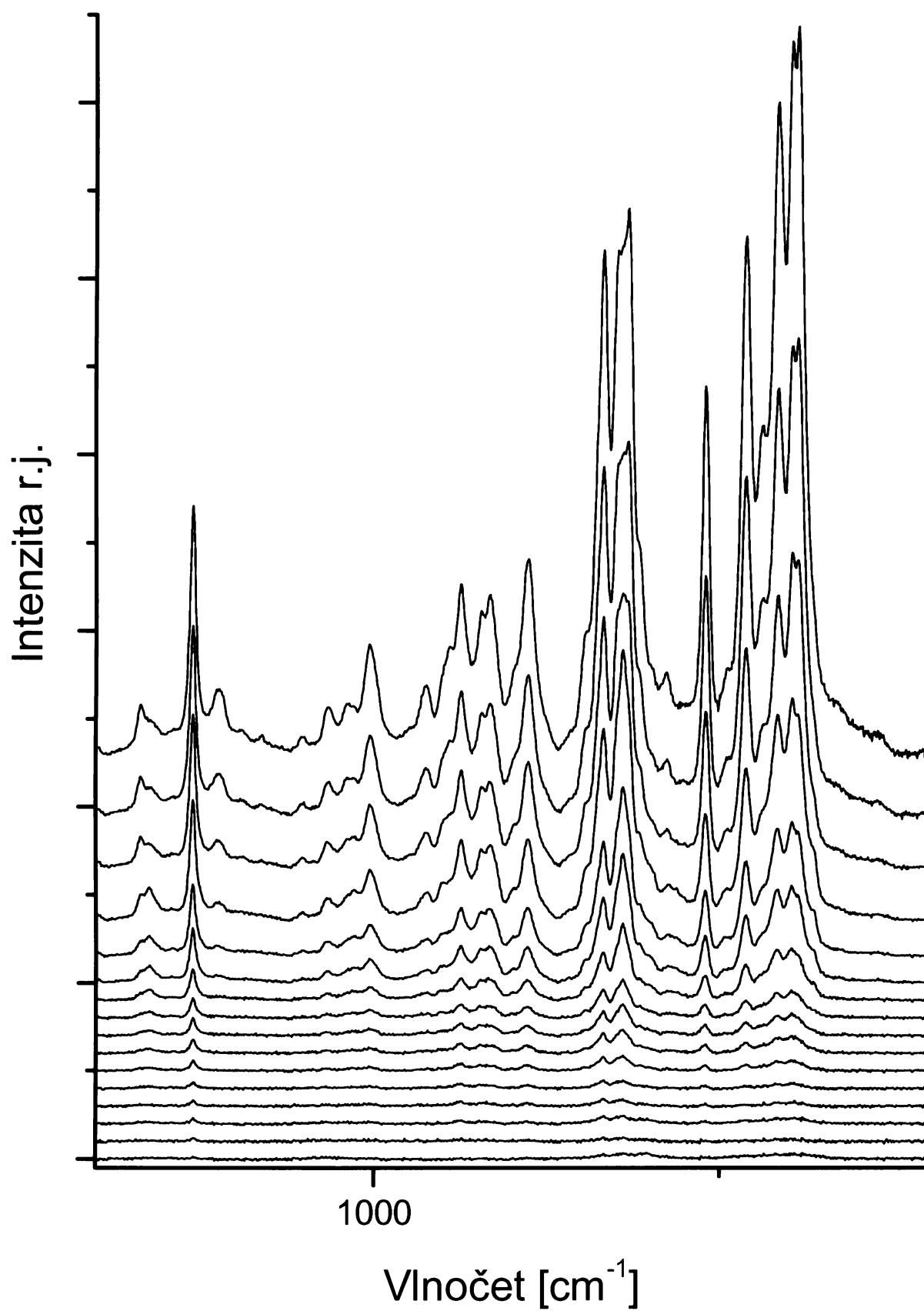
4.3.2. SERRS spektra PPIX při excitaci $\lambda_{exc} = 514,5$ nm

Pro studium povrchem zesílených rezonančních Ramanových spekter PPIX při excitaci 514,5 nm byly připraveny vzorky PPIX v Ag hydrosolu o koncentraci $c = 7,5 \cdot 10^{-5} - 10^{-9}$ M (obr. 4.30). Tento soubor spekter byl dále zpracován pomocí faktorové analýzy (obr. 4.31) podobným způsobem, jako při excitaci $\lambda_{exc} = 441,6$ nm. Nicméně, vzhledem k problémům s fluorescencí v oblasti signálu vnitřního standardu, nebylo možno SERS spektra při koncentracích nad 10^{-5} M spolehlivě znormovat. Pozadí analyzovaných spekter bylo před zpracováním faktorovou analýzou upraveno stejným způsobem jako pozadí spekter v kap. 4.3.1.. Na obr. 4.31 jsou zobrazena první čtyři subspektra (S1 – S4), viriální koeficienty (V1 – V4), střední odchylka a singulární hodnoty. Z grafu singulárních hodnot je patrné, že k celkovému souboru spekter významně přispívají, podobně jako při excitaci 441,6 nm, pouze první dvě subspektra. Příspěvek třetího subspektra, vzhledem k příspěvkům prvních dvou subspekter, je zanedbatelný a v prvním přiblížení byl brán jako nepodstatný, i když pravděpodobně odpovídá přítomnosti třetí formy, spektrálně podobné předchozím. Lineární kombinací prvních dvou subspekter dostáváme taktéž dvě spektrální formy PPIX (obr. 4.32) - formu I (F I - metalovaná) a formu II (F II - free base, tj. nemetalovaná). Vlnočty pásů obou forem jsou spolu s vlnočty pásů v RR spektrech PPIX a přiřazením pásů uvedeny v tab. 4.4.

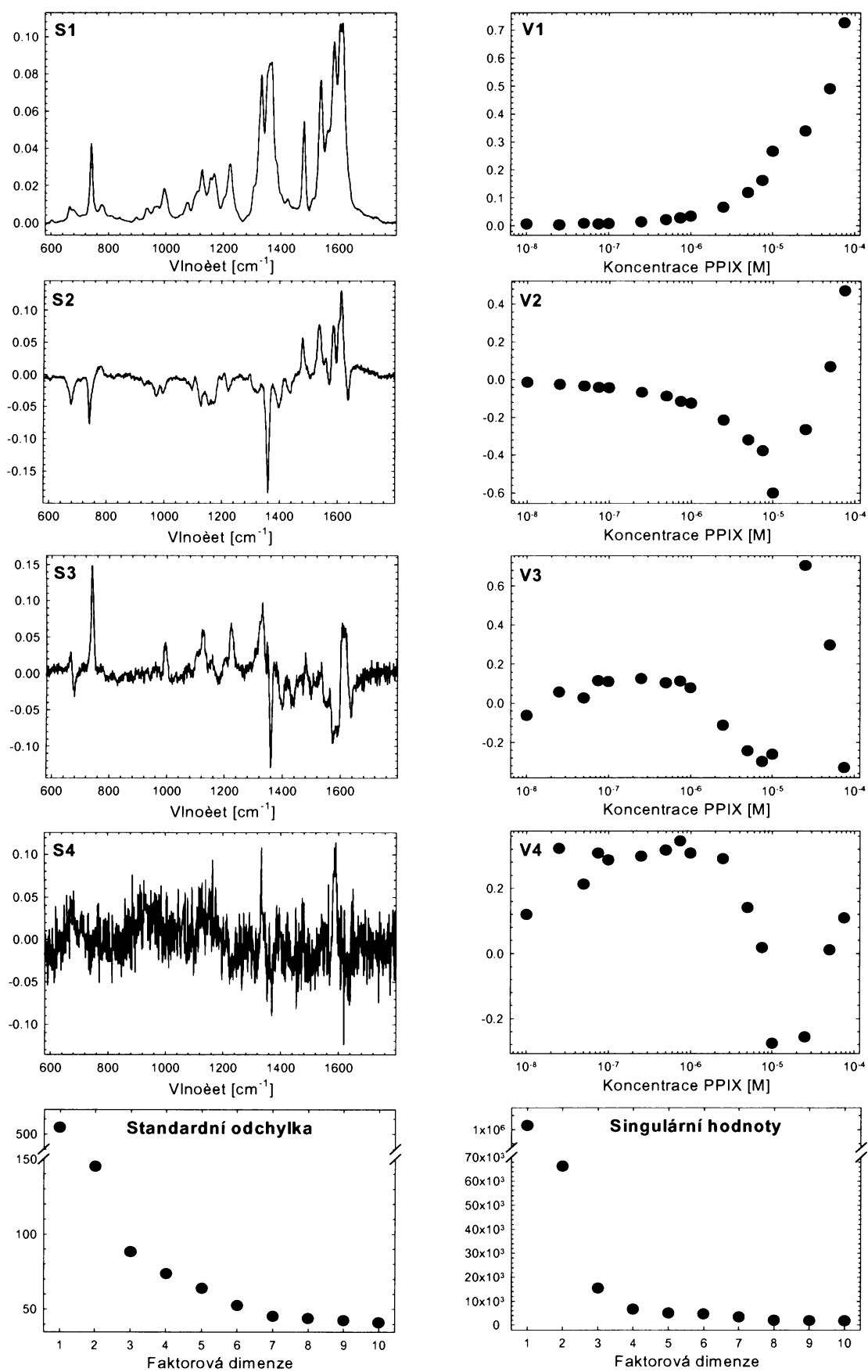
Z grafu viriálních koeficientů V1 jako funkce logaritmu koncentrace PPIX (obr. 4.31) je opět patrný zlom při koncentraci $c = 10^{-5}$ M. Tento zlom, podobně jako při excitaci 441,6 nm, interpretujeme jako koncentraci, při které dochází k transformaci F I na F II.

K určení meze SERRS spektrální detekce PPIX pomocí faktorové analýzy byl použit soubor spekter PPIX v rozmezí koncentrací $c = 10^{-9} - 7,5 \cdot 10^{-6}$ M (obr. 4.33), a to obdobným způsobem jako v případě excitace 441,6 nm. Tento soubor spekter byl upravován stejným způsobem jako soubor předešlý (kap.4.3.1).

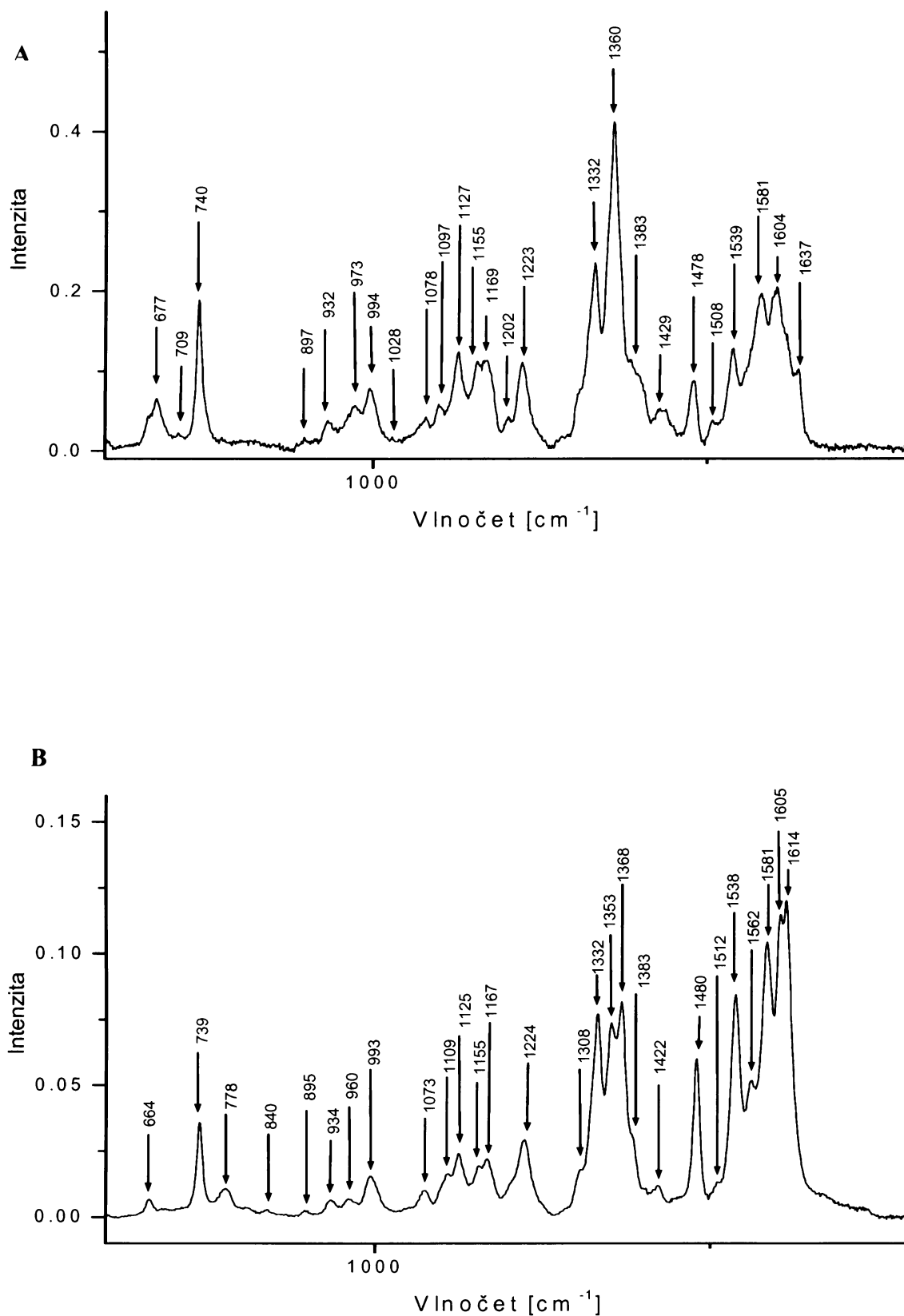
V grafu viriálních koeficientů V1 (obr. 4.33) byly body proloženy dvěma směnicemi a jejich průsečík označil mez SERRS spektrální detekce PPIX určenou faktorovou analýzou. Hranice detekce, plně v souladu s postupem použitým při excitaci $\lambda_{exc} = 441,6$ nm byla stanovena na $c \sim 8 \times 10^{-8}$ M.



Obr. 4.30: Soubor normovaných SERS spekter PPIX o koncentracích 10^{-8} – 10^{-4} M, excitovaných $\lambda_{exc} = 514,5$ nm. Pozadí všech spekter a bylo korigováno na základě faktorové analýzy. Ze spekter byl jednotným způsobem odečten příspěvek rozpouštědla (vody).



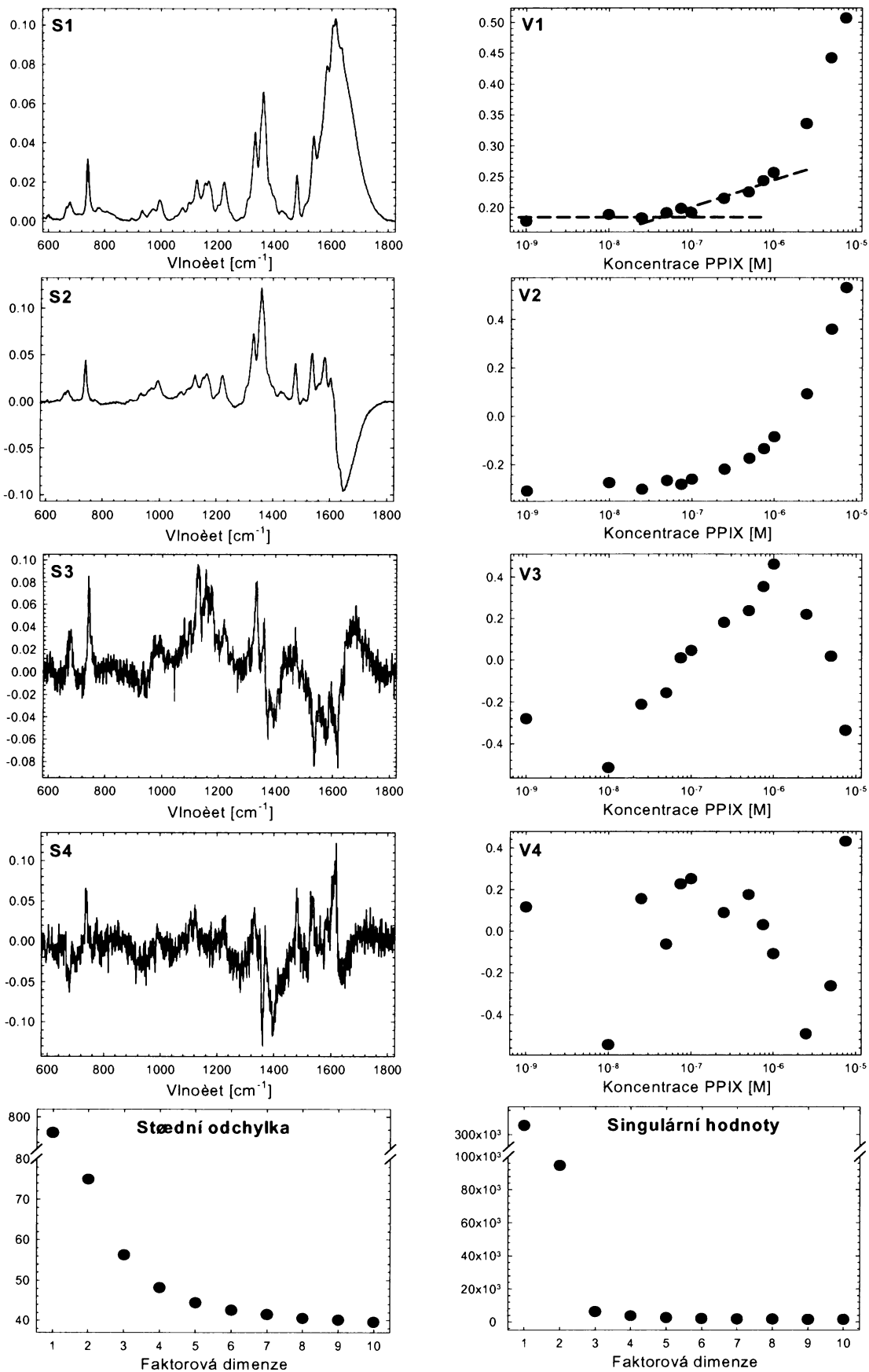
Obr. 4.31: Výsledky faktorové analýzy normalizovaných SERS spekter PPIX pro koncentrace 10⁻⁸ – 10⁻⁴ M, excitovaných $\lambda_{exc} = 514.5$ nm



Obr. 4.32: Spektrální formy PPIX získané z faktorové analýzy při excitaci $\lambda_{\text{exc}} = 514,6 \text{ nm}$

A) spektrální forma I

B) spektrální forma II



Obr. 4.33: Výsledky faktorové analýzy normalizovaných SERS spekter PPIX pro koncentrace $c = 10^{-9} - 7.5 \cdot 10^{-6}$ M, excitovaných $\lambda_{\text{exc}} = 514,5$ nm

Tab. 4.4: Srovnání vlnočtů pásů v spektrech formy F I a F II PPIX a RR spektrech PPIX (ve vodném roztoku o pH = 7) v oblasti 300 – 1700 cm⁻¹ při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm

SERRS F1	SERRS F2	RR	PŘÍRAZENÍ
677	664	664	v ₇
740	739	738	v ₁₆
-	778	780	γ (CH ₂) vinyl
932	934	931	v ₃₂
973	960	957	v ₃₁
994	993	990	v ₅
1028	-	-	
1078	1073	1073	v ₂₃
1097	1109	1109	ν (C _p -C _{vinyl})
1127	1125	1125	v ₂₂
1155	1155	1160	v ₃₀
1169	1167	1168	ν (C _p -C _{vinyl})
1202	-	-	
1223	1224	1223	v ₁₃
-	1308	-	
1332	1332	1332	v ₂₁
-	1353	1354	v ₂₀
1360	-	-	
-	1368	1368	v ₄
1383	1383	1383	v ₄₀
1429	1422	1424	v ₂₉
1478	1480	1480	δ (CH ₂) ₂
1508	1512	-	v ₂₈
1539	1538	1538	v ₃
-	1562	1563	v ₁₁
1581	1581	1586	v ₂
1604	1605	1604	v ₁₉
1637	1614	1614	ν (C=C) vinyl

4.4. SERRS spektra PPIX v systémech s Ag hydrosolem modifikovaným adsorpcí chloridů na povrch Ag nanočástic v kyselém a neutrálním prostředí

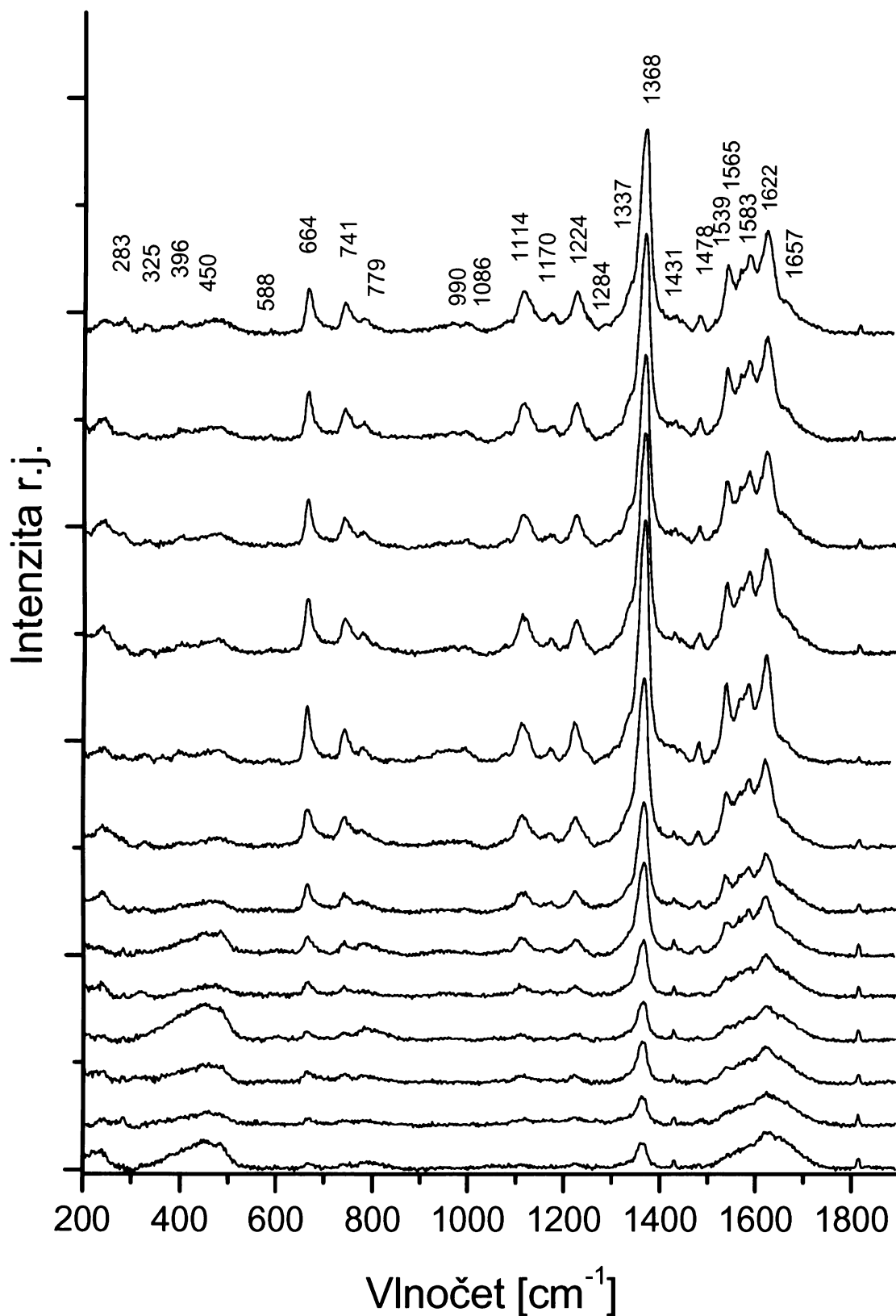
Byla proměřena závislost SERRS spekter systémů Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX a Ag hydrosol/ HCl /PPIX v rozmezí koncentrací $c = 10^{-7} - 10^{-10}$ M při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm a 514,5 nm. Postup přípravy SERRS – aktivních systémů je detailně popsán v kap. 3.5.6.. Koncentrace HCl a NaCl byla konstantní vždy v celém souboru vzorků o proměnné koncentraci PPIX.

4.4.1. SERRS spektra systémů Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX jako funkce koncentrace PPIX při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm

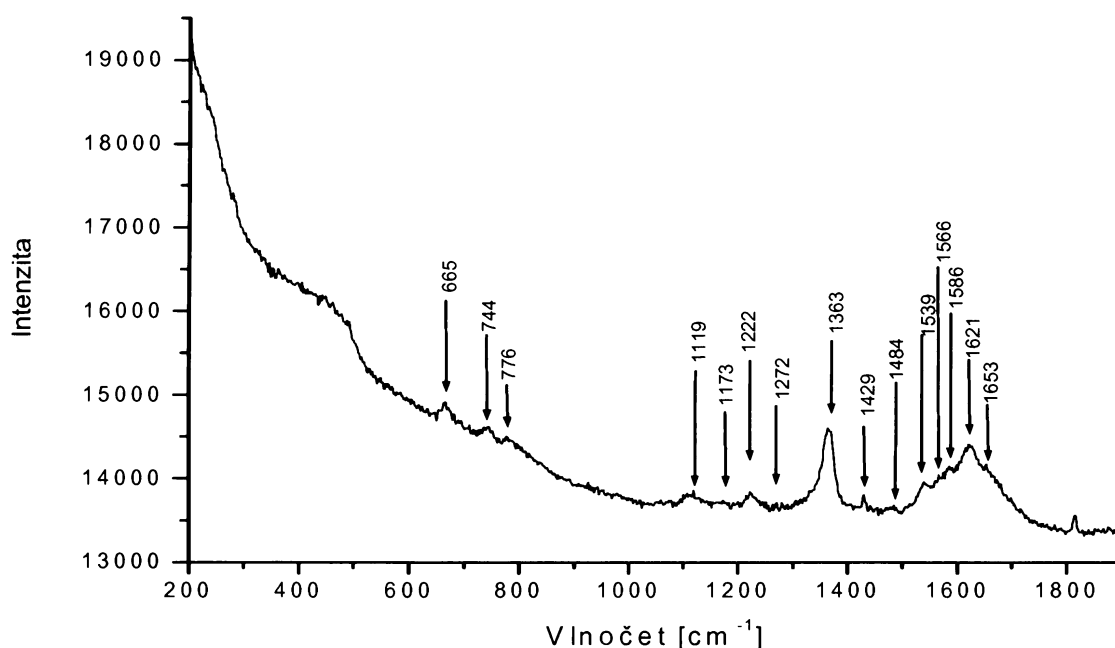
SERRS spektra systémů Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX v závislosti na celkové koncentraci PPIX v systému ($10^{-7} - 10^{-10}$ M) ukazuje obr. 4.34. V SERRS spektrech nedochází k významným změnám vlnočtů ani relativních intenzit pásů PPIX s klesající koncentrací PPIX. SERRS spektra systému o koncentraci $c = 10^{-7}$ M (vlnočty uvedeny v tab. 4.5) vykazují pásy odpovídající F I a F II PPIX identifikovaným FA v kap 4.3.1. Při koncentraci $c = 5 \cdot 10^{-10}$ M je detegováno ještě osm charakteristických pásů PPIX, při koncentraci $c = 10^{-10}$ M již pouze nejintenzivnější pás spektra při 1360 cm^{-1} . Za koncentrační hodnotu meze SERRS spektrální detekce PPIX pokládáme koncentraci $c = 5 \cdot 10^{-10}$ M, umožňující jednoznačnou identifikaci PPIX (obr. 4.35).

4.4.2. SERRS spektra systémů Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX jako funkce koncentrace PPIX při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm

SERRS spektra systémů Ag hydrosol/ NaCl /PPIX v závislosti na celkové koncentraci PPIX v systému ($10^{-7} - 10^{-10}$ M) jsou vynesena na obr. 4.36. V SERRS spektrech nedochází k významným změnám vlnočtů ani relativních intenzit pásů PPIX s klesající koncentrací PPIX. Vlnočty i relativní intenzity pásů ve spektru systému o koncentraci $c = 10^{-7}$ M PPIX odpovídají týmž parametrům ve spektru F II PPIX získaném z FA, pouze s následujícími malými odlišnostmi od spektra F II: pás 1352 cm^{-1} má vyšší



Obr. 4.34: Soubor nenormovaných SERRS spekter systému Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX o koncentracích 10^{-8} – 10^{-4} M, excitovaných $\lambda_{exc} = 441,6$ nm

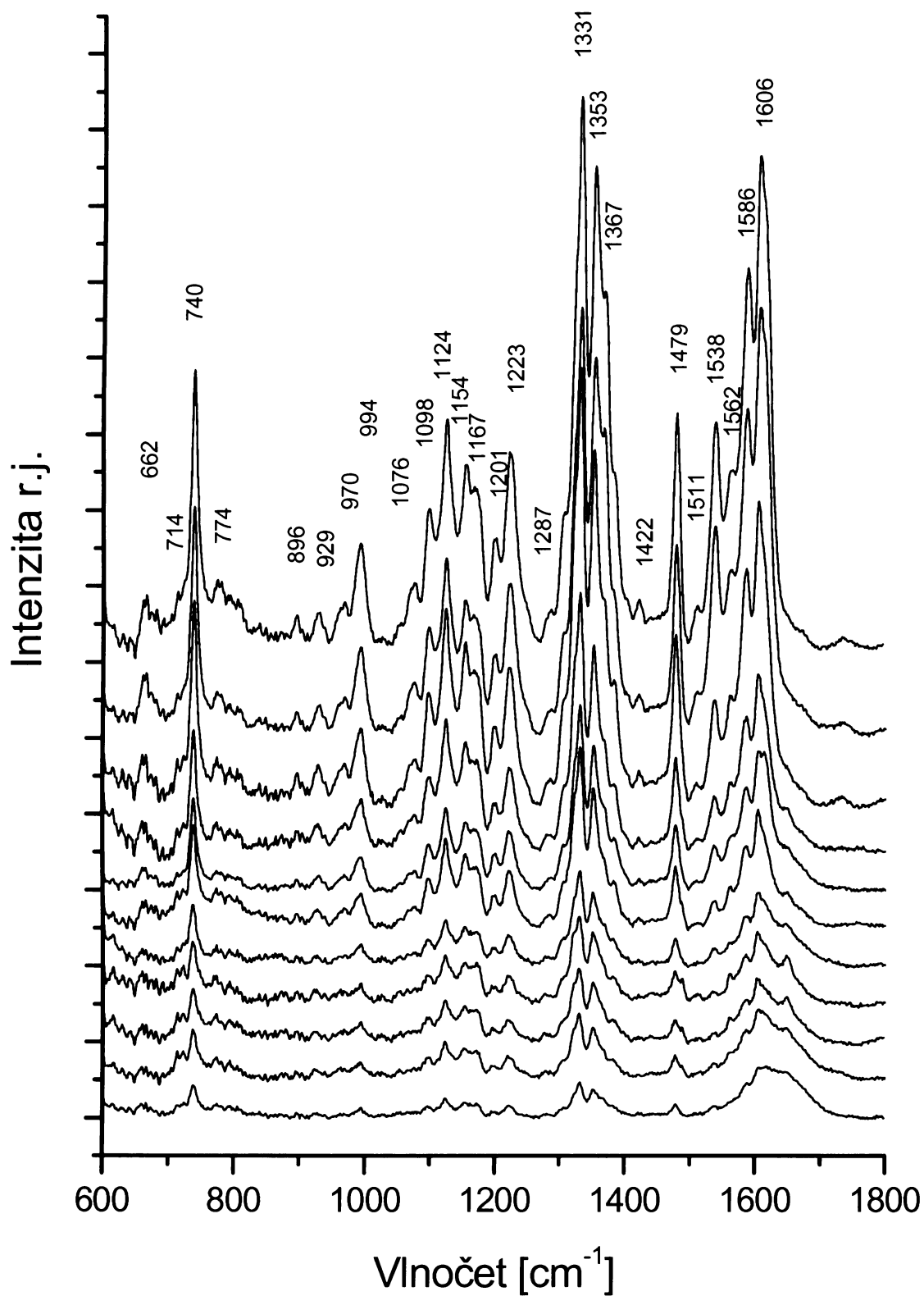


Obr. 4.35: SERRS spektrum systému Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX o koncentracích $5 \cdot 10^{-10}$ M, excitace při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm

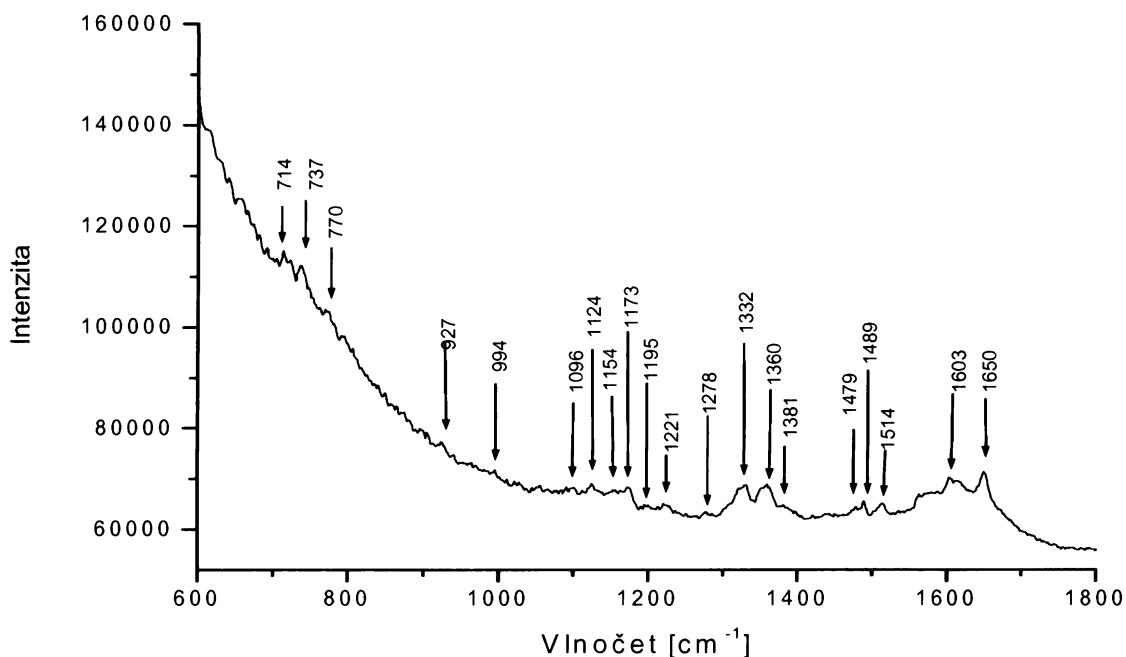
relativní intenzitu než pás 1368 cm^{-1} , pás 1614 cm^{-1} má nižší relativní intenzitu než pás 1605 cm^{-1} . Při koncentraci $c = 10^{-10}$ M je detegováno ještě sedm charakteristických pásů PPIX (tab. 4.6, obr. 4.37). Tuto koncentraci pokládáme za koncentrační hodnotu meze selektivní SERRS spektrální detekce PPIX systémů Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm.

4.4.3. SERRS spektra systémů Ag hydrosol/ HCl/ PPIX jako funkce koncentrace PPIX při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm

V SERRS spektrech systémů Ag hydrosol/ HCl/ PPIX nebyla pozorována významná změna v aktivitě vibrací v závislosti na koncentraci PPIX (obr. 4.38). Získané SERRS spektrum jednoznačně neodpovídá žádné z forem F I, F II získaných z FA SERRS spekter s nemodifikovaným Ag hydrosolem. Tato nová spektrální forma PPIX je pracovně označována jako FIII. Zatímco vlnočty pásů (tab. 4.7) 661 a 738 cm^{-1} odpovídají F I, pásy 1125 a 1173 cm^{-1}



Obr. 4.36: Soubor nenormovaných SERS spekter systému Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX o koncentracích 10^{-8} – 10^{-4} M, excitovaných $\lambda_{exc} = 514,5$ nm

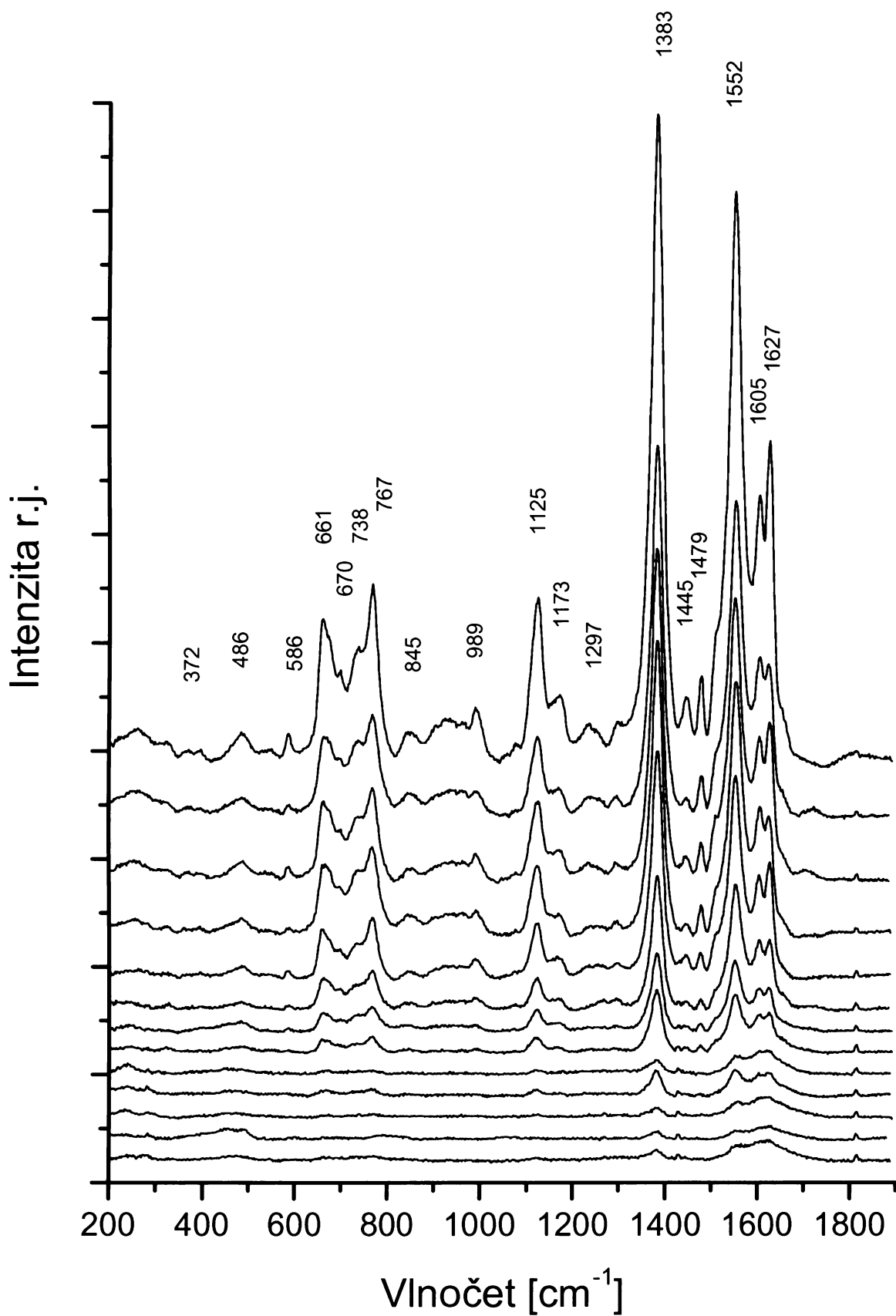


Obr. 4.37: SERRS spektrum systému Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX o koncentracích 10^{-10} M, excitace při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm

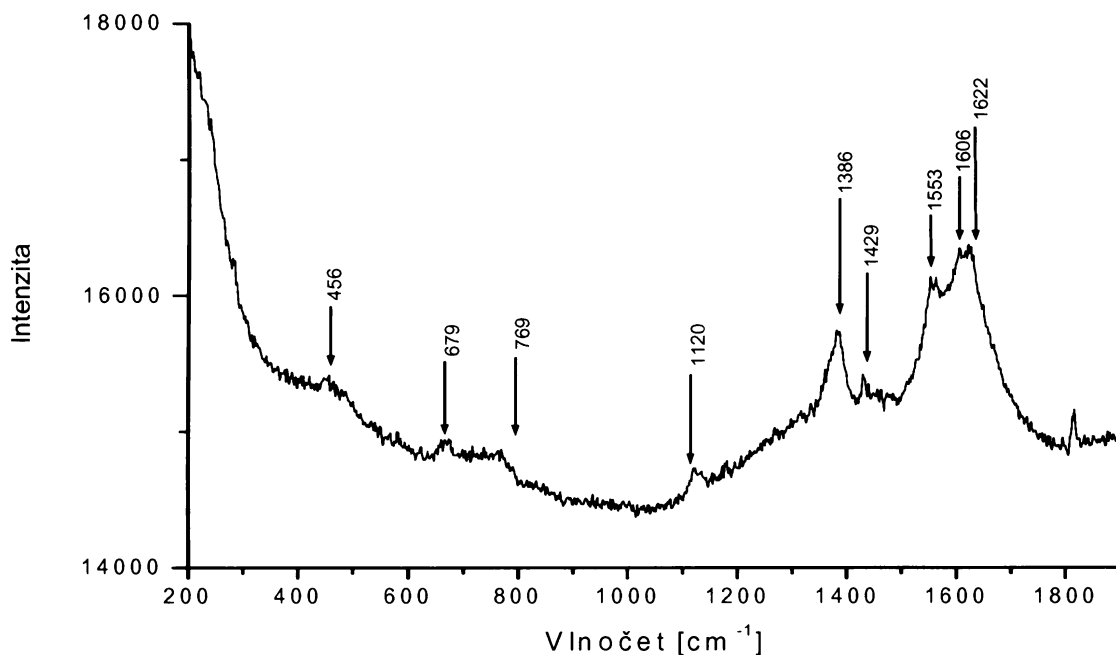
F I i F II, pás 1225 cm^{-1} u obou forem chybí. Nejintenzivnější pás ν_4 při 1360 cm^{-1} (F I), resp. 1365 cm^{-1} (F II) je posunut k hodnotě 1383 cm^{-1} , pás ν_2 1580 cm^{-1} (F I), resp. 1585 cm^{-1} je posunut k hodnotě 1552 cm^{-1} . Pás 1606 cm^{-1} , který byl pro F I a F II aktivní pouze při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm je ve spektru F III aktivní i při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm. Pás ν (C=C)_{vinyl} je pozorován při 1627 cm^{-1} . V SERRS spektru vzorku o koncentraci $c = 7,5 \cdot 10^{-10}$ M je detegováno sedm charakteristických pásů (tab. 4.7, obr. 4.39). Tato hodnota koncentrace je označena jako koncentrační hodnota meze selektivní SERRS spektrální detekce PPIX v uvedeném systému. Nejintenzivnější pás ve spektru při 1386 cm^{-1} je detekován ještě ve spektru při koncentraci $c = 10^{-10}$ M.

4.4.4. SERRS spektra systémů Ag hydrosol/ HCl/ PPIX jako funkce koncentrace PPIX při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm

SERRS spektra PPIX v oboru koncentrací $c = 10^{-7} - 10^{-8}$ M se shodují se spektrem získaným při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm v oboru koncentrací $c = 10^{-7} - 7,5 \cdot 10^{-10}$ M ve vlnočtech osmi charakteristických pásů F III (tab. 4.8, obr. 4.40) konkrétně: 661 (661), 738 (738), 1224 (1225), 1172 (1173),



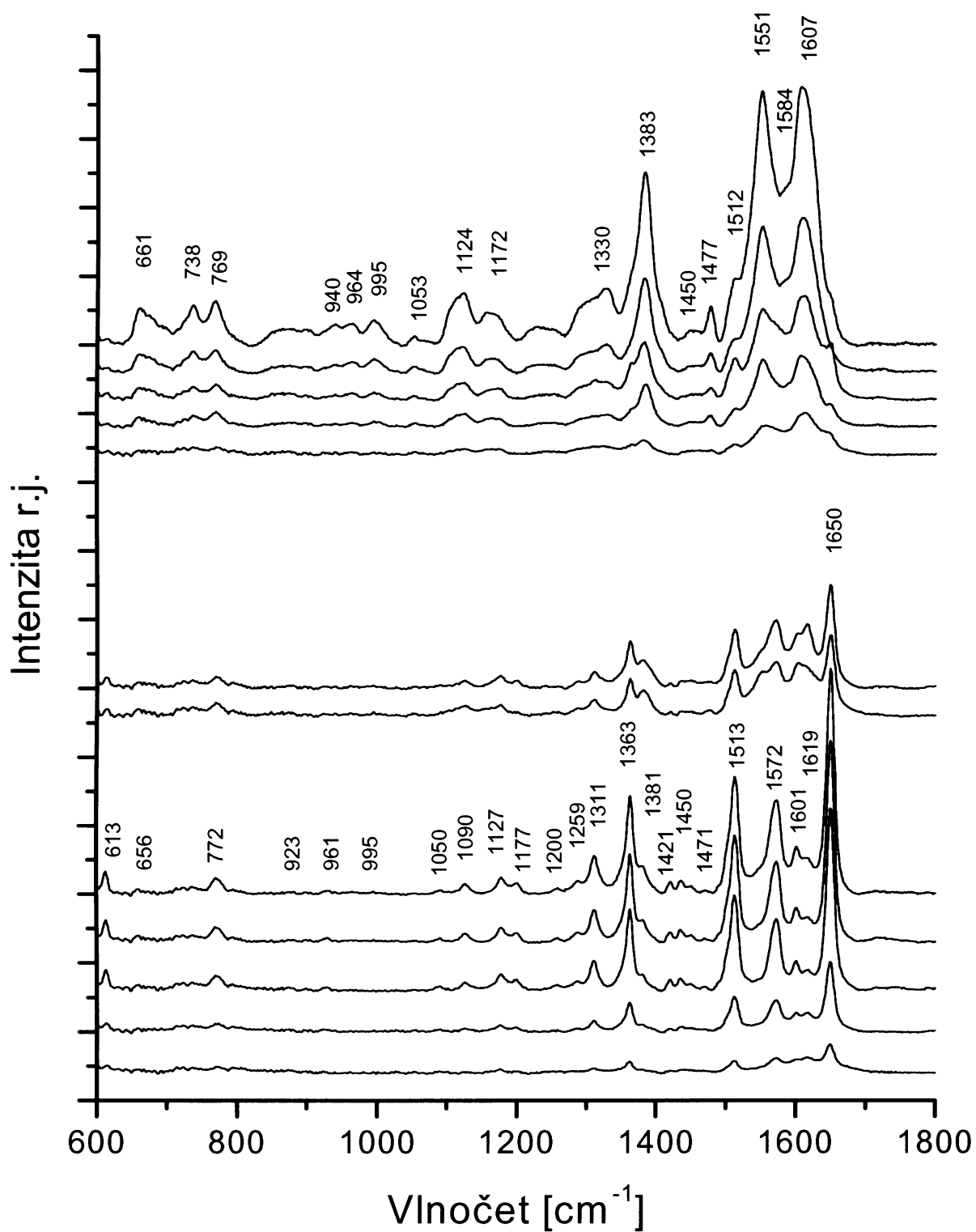
Obr. 4.38: Soubor nenormovaných SERRS spekter systému Ag hydrosol/ HCl/ PPIX o koncentracích 10^{-8} – 10^{-4} M, excitovaných $\lambda_{exc} = 441,6$ nm



Obr. 4.39: SERRS spektrum systému Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX o koncentraci $7,5 \cdot 10^{-10}$ M, excitace při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm

1383 (1383), 1477 (1479), 1551 (1552), 1607 (1605) cm^{-1} . Přiřazení spektrální formy F III PPIX konkrétní povrchové species není jednoznačné. Hodnota pH v systémech s HCl je cca 2,3, což vzhledem k hodnotě $\text{pK}_A = 1,5$ protonizace pyrrolových N na $[\text{H}_4\text{PPIX}]^{2+}$ ukazuje na možnou přítomnost diacidické formy PPIX v systému. Na přítomnost diacidické formy ukazuje i vlnočet nejintenzivnějšího pásu ve spektru 1383 cm^{-1} ve srovnání se spektrem $[\text{H}_4\text{TMPyP}]^{2+}$ v práci [43].

V oboru koncentrací $c = 7,5 \cdot 10^{-9} - 10^{-9}$ M se v SERRS spektrech systému Ag hydrosol/ HCl/ PPIX objevují nové pásy o vlnočtech 1312, 1363, 1513, 1572 a 1650 cm^{-1} . Tyto pásy se velmi dobře shodují se SERRS spektry rhodaminu 6G jako kontaminantu řady SERRS spektrálních vzorků uveřejněnými v práci [74]. Mez SERRS spektrální detekce rhodaminu 6G je 10^{-14} M, a tudíž pouze několik molekul postačuje ke kontaminaci vzorku. Zdrojem rhodaminu 6G jsou pravděpodobně popisovače a to i tehdy, nejsou-li v daném experimentu k popisu chemického nádobí použity. Spektra v oboru koncentrací $c = 7,5 \cdot 10^{-9} - 10^{-9}$ M byla proto z další interpretace vyloučena. Je však patrné, že mez detekce F III PPIX by ani v nepřítomnosti kontaminantu nedosáhla hodnoty koncentrace $c = 10^{-10}$ M,



Obr. 4.40: Soubor nenormovaných SERRS spekter systému Ag hydrosol/ HCl/ PPIX o koncentracích 10^{-8} – 10^{-4} M, excitovaných $\lambda_{exc} = 514,5$ nm

jíž je dosaženo v případě systému Ag hydrosol/ NaCl /PPIX.

Tab. 4.5: Vlnočty pásů v SERRS spektrech systémů Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX při $\lambda_{exc} = 441,6 \text{ nm}$

c = 10⁻⁷ M	c = 5*10⁻¹⁰ M
327	-
396	-
664	665
741	744
779	776
(990)	-
(1086)	-
1114	1119
1170	-
1224	1222
(1284)	-
(1337)	-
1368	1363
1478	-
1539	1539
(1565)	-
1583	1586
1622	-
1657	-

Tab. 4.6: Vlnočty pásů v SERRS spektrech systémů Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX
při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm

c = 10⁻⁷ M	c = 2,5*10⁻¹⁰ M	c = 10⁻¹⁰ M
666	-	-
739	738	737
897	896	-
928	922	-
970	-	-
994	995	-
1075	-	-
1098	1097	-
1125	1125	1124
1154	1154	-
1167	-	1173
1201	1196	-
1222	1223	1221
1331	1332	1332
1352	1352	1360
1367	1366	-
1422	1421	-
1479	1479	-
1511	1510	-
1538	1539	-
1564	-	-
1586	1588	-
1605	1605	1603
1604	-	-

Tab. 4.7: Vlnočty pásů v SERRS spektrech systémů Ag hydrosol/ HCl/ PPIX při $\lambda_{exc} = 441,6 \text{ nm}$

c = 10^{-7} M	c = $5 \cdot 10^{-10} \text{ M}$
486	-
586	-
661	-
670	679
698	-
738	-
767	769
845	-
989	-
1125	1120
1173	-
1383	1383
1445	-
1479	-
1552	1553
1605	1606
1627	1622

Tab. 4.8: Vlnočty pásů v SERRS spektrech systémů Ag hydrosol/ HCl/ PPIX při $\lambda_{exc} = 514,5 \text{ nm}$

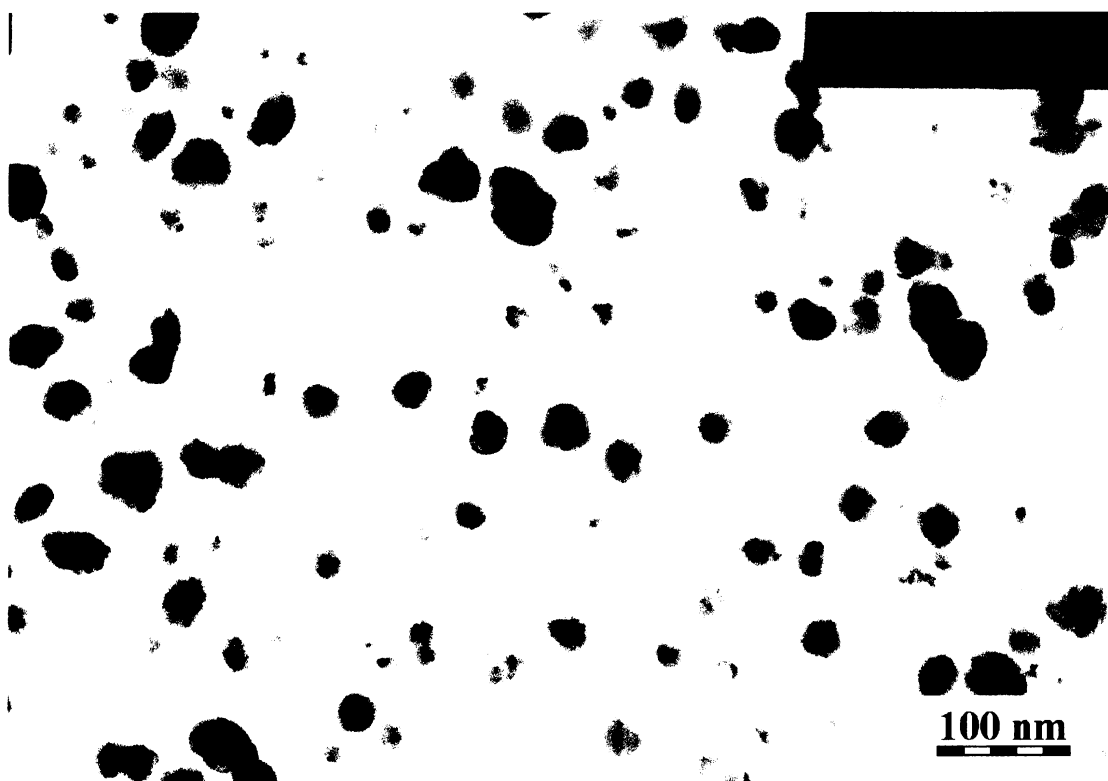
c = 10⁻⁷ M	c = 7,5*10⁻⁹ M	c = 10⁻⁹ M
-	613	613
661	658	656
738	-	-
769	772	772
940	923	927
964	961	-
995	995	-
1053	1050	-
-	-	1090
1124	1127	1126
1172	1177	1177
-	-	1200
-	(1259)	(1259)
-	1312	1311
1330	-	-
-	1363	1363
1383	1382	1381
-	(1421)	1421
(1450)	(1451)	(1450)
1477	1474	(1471)
(1512)	1513	1513
1551	1552	-
(1584)	1572	1572
1607	1604	1601
-	-	(1619)
-	1650	1650

4.4.5. Transmisní elektronová mikroskopie SERRS-aktivních systémů s Ag nanočásticemi a PPIX ve vztahu k mezím SERRS spektrální detekce PPIX

TEM snímky systémů Ag hydrosol /PPIX (obr. 4.41), Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX (obr. 4.42) a Ag hydrosol/ HCl/ PPIX (obr. 4.43) umožňují porovnání morfologií Ag nanočástic a jejich souborů v jednotlivých typech SERRS-aktivních systémů. Koncentrace PPIX byla ve všech systémech 10^{-7} M, koncentrace modifikujícího činidla v modifikovaných systémech byla $5 \cdot 10^{-2}$ M v případě NaCl a $5 \cdot 10^{-3}$ M v případě HCl. V systému s nemodifikovanými Ag nanočásticemi (nativním Ag hydrosolem) (obr. 4.41) je patrná podstatná frakce izolovaných Ag nanočástic. Jelikož plasmonová rezonance izolovaných nanočástic ve vodném prostředí nastává v okolí $\lambda = 400$ nm, lze pro systémy s izolovanými Ag nanočásticemi očekávat větší příspěvek zesílení EM mechanismem při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm než při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm. Tomu odpovídá i zjištění, že mez detekce PPIX při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm je poněkud nižší než při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm, ačkoli studie RR spekter ukazuje na větší příspěvek rezonančního zesílení Ramanova rozptylu při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm.

V systému s PPIX a Ag nanočásticemi modifikovanými adsorpcí chloridů v neutrálním prostředí (přídavek NaCl) (obr. 4.42) jsou pozorovány malé kompaktní agregáty Ag nanočástic. Na základě výpočtů v ref. [20] a experimentů v ref. [43] lze pro tyto systémy očekávat významně větší faktory zesílení EM mechanismem (až do hodnot 10^8) než pro systémy s izolovanými nanočásticemi, přičemž lze, vzhledem ke tvorbě agregátů, očekávat větší faktor zesílení pro $\lambda_{exc} = 514,5$ nm než pro $\lambda_{exc} = 441,6$ nm. Skutečně pro systém Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX byla pro $\lambda_{exc} = 514,5$ nm zjištěna nejnižší hodnota meze SERRS spektrální detekce ($c = 10^{-10}$ M) ze všech studovaných systémů.

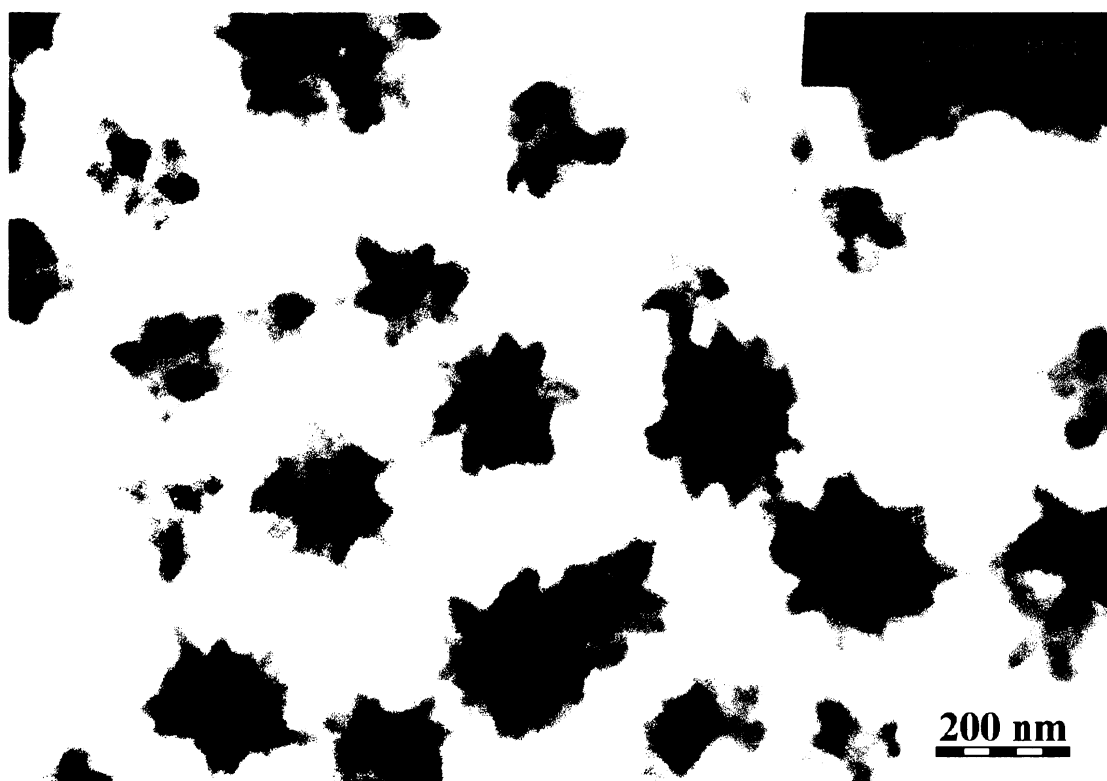
V systémech s PPIX a Ag nanočásticemi modifikovanými adsorpcí chloridů v kyselém prostředí jsou pozorovány morfologicky velmi zajímavé útvary příslušející malým agregátům Ag nanočástic s dosud nejasnou lokalizací PPIX molekul. V těchto systémech však nebylo dosaženo nižší meze SERRS spektrální detekce PPIX než v systému Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX (obr. 4.43). Agregáty na obr 4.43 by mohly představovat zajímavý systém pro studium metodou SERRS-mikrospektroskopie.



Obr. 4.41: TEM systému PPIX s nativním Ag hydrosolem o koncentraci $c = 10^{-7}$ M



Obr. 4.42: TEM systému Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX o koncentraci $c = 10^{-7}$ M



Obr 4.43: TEM systému Ag hydrosol/ HCl/ PPIX o koncentraci $c = 10^{-7}$ M

5. ZÁVĚR

1. Měření a interpretace elektronových absorpčních spekter prokázala existenci monomerní formy PPIX v ethanolovém roztoku. Měření a interpretace elektronových absorpčních spekter vzorků PPIX připravených rozpuštěním PPIX ve vodných roztocích o daném pH ukázala existenci monomerní formy PPIX při $\text{pH} = 1 - 2$, H- a J- agregátů při $\text{pH} = 3 - 5$, H - agregátů či dimerů při $\text{pH} = 12$. Výsledky studie ve vodném prostředí jsou ve shodě s výsledky v práci [53]. Dále bylo prokázáno, že H- a J - agregáty PPIX jsou stále v alkalickém, neutrálním a slabě kyselém prostředí, v silně kyselém prostředí jsou agregáty v rovnováze s monomerní formou.
2. Studie RR spekter monomerní formy PPIX v ethanolovém roztoku a monomerních a agregovaných forem PPIX ve vodném prostředí jako funkce pH při excitaci do oblasti Soretova pásu ($\lambda_{\text{exc}} = 441,6 \text{ nm}$) a do oblasti Q - pásu ($\lambda_{\text{exc}} = 514,5 \text{ nm}$) přinesla následující výsledky:
 - A) RR spektra monomerní a agregované formy PPIX na obou excitačních vlnových délkách jsou shodná z hlediska vlnočtů i relativních intenzit pozorovaných pásů s výjimkou posunu pásu $\nu(\text{C}=\text{C})$ vinylu z 1619 cm^{-1} (monomerní forma) na 1613 cm^{-1} (agregovaná forma). Změna vlnočtu pásu vibrace $\nu(\text{C}=\text{C})$ vinylu u agregované formy oproti formě monomerní může být přímým důsledkem mezimolekulových interakcí v agregátu, anebo důsledkem změny v zapojení vinylové skupiny do elektronové delokalizace v systému makrocyclus - vinylové skupiny.
 - B) Pokusné přiřazení pásů v RR spektrech jak monomerní, tak agregované formy PPIX měřených při $\lambda_{\text{exc}} = 441,6 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{exc}} = 514,5 \text{ nm}$ ukázalo, že
 - i) pásy RR spekter excitovaných $\lambda_{\text{exc}} = 441,6 \text{ nm}$ je možno pokusně (s využitím vibračního přiřazení v ref. [56,57,59]) přiřadit vibracím totálně symetrickým v bodové grupě D_{2h} odpovídající symetrii makrocyclů porfyrinů - volných bazí a vibracím vinylových skupin. V souladu s literaturou [,] je při této excitační vlnové délce uvažován pouze příspěvek Franck - Condonova mechanismu rezonančního zesílení Ramanova rozptylu.

ii) srovnání RR spekter excitovaných $\lambda_{exc} = 441,6$ nm a $\lambda_{exc} = 514,5$ nm spolu s pokusným přiřazením pásů ukázaly, že při excitaci $\lambda_{exc} = 514,5$ nm jsou aktivní rovněž vibrace netotálně symetrické, což je v souladu s působením Herzberg – Tellerova mechanismu rezonančního zesílení Ramanova rozptylu při vlnové délce excitace spadající do Q_v pásu porfyrinů.

C) RR spektra monomerní i agregované formy PPIX vykazují výrazně větší poměr signál/ šum při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm než při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm. V RR spektrech monomerní formy PPIX v ethanolovém roztoku měřených při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm bylo možné při koncentraci $c = 5 \cdot 10^{-4}$ M detegovat jedenáct charakteristických pásů PPIX, v RR spektru agregované formy PPIX ve vodném roztoku o pH = 7 bylo při stejné hodnotě vlnové délky o koncentraci $c = 10^{-5}$ M detegováno více čtrnáct charakteristických pásů PPIX. Excitační vlnová délka $\lambda_{exc} = 514,5$ nm byla shledána vhodnější než $\lambda_{exc} = 441,6$ nm pro detekci PPIX metodou RR spektroskopie.

3. Studium SERRS spekter PPIX v systému s nemodifikovanými Ag nanočásticemi (nativním Ag hydrosolem) a s Ag nanočásticemi modifikovanými adsorpcí chloridů v neutrálním (přídavek NaCl) a kyselém (přídavek HCl) prostředí zaměřené na optimalizaci SERRS spektrální detekci PPIX přineslo následující výsledky:

A) Faktorová analýza (FA) souboru SERRS spekter PPIX v systémech s nativním Ag hydrosolem, proměřených v závislosti na koncentraci PPIX při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm a $\lambda_{exc} = 514,5$ nm, prokázala přítomnost dvou spektrálních forem PPIX – F I a F II, přičemž byla získána spektra obou čistých forem PPIX při obou hodnotách excitačních vlnových délek. F I byla identifikována jako Ag metalovaná forma PPIX (AgPPIX), F II přísluší PPIX – volné bázi a vlnočty jejich SERRS spektrálních pásů odpovídají RR spektrům PPIX. Dále byly pomocí FA stanoveny koncentrační hodnoty SERRS spektrální detekce PPIX: $c = 6 \cdot 10^{-8}$ M při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm a $c = 8 \cdot 10^{-8}$ M při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm. TEM snímky systémů ukazují přítomnost významné frakce izolovaných Ag nanočástic v těchto systémech. Nižší mez detekce PPIX při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm než při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm, která kontrastuje s vyšším rezonančním zesílením Ramanova rozptylu PPIX lze

uspokojivě vysvětlit vyšším příspěvkem EM mechanismu SERRSu při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm v systému s izolovanými Ag nanočásticemi.

- B)** Studium SERRS spekter systémů s PPIX a Ag nanočásticemi modifikovanými adsorpcí chloridů v neutrálním prostředí (systémy Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX) jako funkce koncentrace PPIX při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm a $\lambda_{exc} = 514,5$ nm prokázalo přítomnost pásů spektrálních forem F I a F II identifikovaných pomocí FA v systémech s nativními Ag nanočásticemi. Koncentrační hodnoty mezi SERRS spektrální detekce PPIX v systému Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX dosahují hodnot $c = 7,5 \cdot 10^{-10}$ M při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm a $c = 10^{-10}$ M při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm. TEM snímky systémů ukazují na přítomnost malých kompaktních agregátů Ag nanočástic. Jejich přítomnost velmi dobře vysvětluje skutečnost, že mez SERRS spektrální detekce při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm je nižší než při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm.
- C)** V SERRS spektrech systémů s PPIX a Ag nanočásticemi modifikovanými adsorpcí chloridů v kyselém prostředí (systémy Ag hydrosol/ HCl/ PPIX) měřených jako funkce koncentrace PPIX byla identifikována další spektrální forma PPIX označená jako F III a připisovaná zatím pokusně diacidické formě PPIX $[H_4PPIX]^{2+}$. Mez detekce PPIX nabývala v tomto systému při $\lambda_{exc} = 441,6$ nm a $\lambda_{exc} = 514,5$ nm vyšších hodnot než v případě systému Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX.
- 4.** Optimálním systémem pro SERRS spektrální detekci PPIX je systém Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX při excitační vlnové délce $\lambda_{exc} = 514,5$ nm. V tomto systému jsou Ag nanočástice v hydrosolu modifikovány adsorpcí chloridů v neutrálním prostředí. Tato modifikace vede ke tvorbě kompaktních agregátů Ag nanočástic, do nichž jsou zřejmě začleněny molekuly PPIX. Pro tento systém je při excitaci $\lambda_{exc} = 514,5$ nm dosaženo optimální koincidence plasmonové rezonance malých kompaktních agregátů s molekulární rezonancí molekul PPIX. Výsledná koncentrační hodnota meze SERRS spektrální detekce je $c = 10^{-10}$ M. Přitom je detegováno sedm charakteristických pásů PPIX, umožňujících selektivní identifikaci molekuly. Koncentrační hodnota SERRS spektrální detekce PPIX v systému Ag hydrosol/ NaCl/ PPIX při $\lambda_{exc} = 514,5$ nm je o 4 – 5

řádů nižší než koncentrační hodnota meze RR spektrální detekce PPIX při téže vlnové délce.

6. REFERENCE

- [1] Fleischmann M.,Hendra.P.J., McQuillan a.J.: Chem. Phys. Lett. 26, 163 (1974)
- [2] Jeanmarie D.L., van Duyne R.: J.Electroanal. Chem. 84, 1 (1977)
- [3] Albrecht M. G., Creighton J.A.: J. Am. Chem. Soc. 99, 5215 (1977)
- [4] Moskovits M.: J. Chem. Phys, 69, 4159 (1978)
- [5] Weitz D. A., Moskovits M., Creighton J. A.: *Structure and chemistry at interfaces: new laser and optical technology*, VHC Publisher, Peerfield Beach Florida, Eds. Hall R.B. and Ellis A.B. (1986)
- [6] Garrel R.L.: Anal. Chem. 6, 401 (1988)
- [7] Creighton J.A., Eadon D.G.: J.Chem. Soc. Faraday Trans. 87, 3881 (1991)
- [8] Sanda P.N., Warlaumont J.M., Demuth J.E., Tsang J.C., Cristmann K., Bradley J.A.: Phys. Rev. Lett. 45, 1519 (1980)
- [9] Liao P.F., Bergman J.G., Chemla D.S., Wokaun A., Mengailis J., Hawryluk A.M., Economou N.P.: Chem. Phys. Lett. 82, 355 (1981)
- [10] Creighton J.A.: *Metal Colloids in Surface Enhanced Raman Scattering*, R.K. Chang and T.E. Furtak, Eds, str. 312, Plenum Press, New York 1982
- [11] Birke R.L., Lombardi J.R. in *Advences in laser spectroscopy, Edd.Heydn and Son., London* 290 – 294 (1982)
- [12] Creighton J.A.: *Spectroscopy of Surfaces*, Edited by R.J.H. Clark and R.E. Hester, John Wiley & Sons Ltd. (1991)
- [13] Campion A., Ivanecky J.E., Child C.M., Foster M.: J. Am. Chem. Soc. 117, 11807 (1995)
- [14] Creighton J.A., Blatchford C.G., Albrecht M.G.J.: J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2, 75(5), 790 (1979)
- [15] Suh J.S., DiLella D.P., Moskovits M.: J. Chem. Phys., 78, 1540 (1983)
- [16] Laserna J.J., Torres E.L., Winefordner J.D.: Anal. Chim. Acta., 200, 469 (1987)
- [17] Heard S.M., Grieser D.P., Barraclough C.G.: Chem. Phys. Lett., 95, 154 (1983)
- [18] Moskovits M., Suh J.S.: J. Phys. Chem., 88, 5526 (1984)
- [19] Aravind P.K., Nitzan A., Metiu H.: Surf. Sci., 110, 198 (1981)
- [20] Xu H., Aizpurua J., Käll M., Apell P.: Phys. Rev. E, 62, 4318 (2000)

- [21] Fornasiero D., Grieser F.: *J. Phys. Chem.*, **78**, 3213 (1987)
- [22] Weitz D. A., Lin M. Y., Sandroff C. J.: *Surf. Sci.*, **158**, 147 (1985)
- [23] Stockman M. I., Shalaev V. M., Moskovits M., Botet R. and George T. F.: *Phys. Rev. B.*, **46**, 2821 (1992)
- [24] Zhang P., Haslett T. L., Douketis C., Moskovits M.: *Phys. Rev. B.*, **57**, 15513 (1998)
- [25] Ahern A.A., Garrell R.L.: *Anal. Chem.*, **59**, 2813 (1987)
- [26] Lee P.C., Meisel D.: *J. Phys. Chem.*, **86**, 3391 (1982)
- [27] Wetzell H., Gerischer H., Pettinger B.: *Chem. Phys. Lett.*, **85**, 178 (1982)
- [28] Roy D., Furtak T.E.: *Chem. Phys. Lett.*, **124**, 299 (1986)
- [29] Hildebrandt P., Stockburger M.: *J. Phys. Chem.*, **88**, 5935 (1984)
- [30] Vlčková B., Matějka P., Šimonová J., Pančoška P., Čermáková K., Baumruk V.: *J. Phys. Chem.*, **97**, 9719 (1993)
- [31] Procházka M., Mojzeš P., Turpin P.-Y., Štěpánek J., Bok J.: *J. Phys. Chem. B*, **101**, 3161 (1997)
- [32] Vlčková B., Šmejkal P., Michl M., Procházka M., Mojzeš P., Lednický F., Pflieger J.: *J. Inorg. Biochem.*, **79**, 295 (2000)
- [33] Procházka M., Turpin P.-Y., Štěpánek J., Vlčková B.: *J. Raman Spectrosc.*, **33**, 758 (2002)
- [34] Srnová-Šloufová I., Šišková K., Vlčková B., Štěpánek J.: *Proceedings of XVIIIth ICORS, Budapest, 25-30 August, Hungary*, , 277-278 (2002)
- [35] Srnová-Šloufová I., Šišková K., Vlčková B., Štěpánek J. – manuscript in preparation
- [36] Šloufová I.: *PhD Thesis, Charles University, Prague*, (2000)
- [37] Wang C., Liu C., Wang M.; Shen T.: *Spectrochim. Acta Part A*, **55**, 991 (1999)
- [38] Creighton J. A.: *In Proceedings of International Symposium on Progress in Surface Raman Spectroscopy – Theory, Techniques and Applications, Xiamen, China, August 14 -17, Plenary lecture.*, 11-16 (2000)
- [39] Moskovits M.: *J. Mol. Catal.*, **82**, 195 (1993)
- [40] Kim M., Itoh K.: *J. Phys. Chem.*, **91**, 126 (1987)
- [41] Srnová I., Vlčková B., Němec I., Šlouf M., Štěpánek J.: *J. Mol. Struct.*, **482-483**, 213 (1999)
- [42] Srnová-Šloufová I., Vlčková B., Snoeck T. L., Stufkens D. J., Matějka, P.: *Inorg. Chem.*, **39**, 3551 (2000)

- [43] Šišková K., Diplomová práce, Univerzita Karlova, Praha, 2003
- [44] Procházka M., Vlčková B., Štěpánek J., Turpin P.-Y. – článek v přípravě
- [45] Albrecht A. C., *J. Chem. Phys.* **34**, 1476 (1961)
- [46] Kiefer W. in *Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications*, Schrader B., Ed., VCH Weinheim, 1995, p. 468
- [47] Spiro T. G. In *Biological Applications of Raman Spectroscopy*, Vol. II, Spiro T.G., Ed., John Wiley & Sons, New York, 1988
- [48] Spiro T.G., Czernuszewicz R.S., Li X.-Y.: *Coord. Chem. Rev.* **100**, 541 (1990)
- [49] Weitz D.A., Garoff S., Gersten J.I., Nitzan A.: *J. Chem. Phys.* **78**, 5324 (1983)
- [50] Babjuk M., Petřík R., Jirsa M.: *Fluorescenční diagnostika nádorů močového měchýře*, Triton, Praha 2001
- [51] Peng Q., Berg K., Moan J., Kongshuang M., Nesland J.M.: *Photochem. Photobiol.* **65**, 235 (1997)
- [52] Krieg R.C., Fickweiler S., Wolfbeis O.S., Kongshuang M., Knuechel R.: *Photochem. Photobiol.* **72**, 226 (2000)
- [53] Scolaro L.M., Castriciano M., Romeo A., Patanè S., Cefali E., Allegrini M.: *J. Phys. Chem. B.* **106**, 2453 (2002)
- [54] Vodrážka Z.: *Biochemie – Kniha druhá*, Academia, Praha 1999, p. 106
- [55] May B.K., Bawden M.J.: *Semin. Hematol.*, **26**, 150 (1989)
- [56] Choi S., Spiro T.G., Langry K.C., Smith K.M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4338 (1982)
- [57] Choi S., Spiro T.G., Langry K.C., Smith K.M., Budd D.L., La Mar G.N.: *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4346 (1982)
- [58] Kitagawa T., Abe M., Ogoshi H.: *J. Chem. Phys.*, **69**, 4516 (1979)
- [59] Lee H., Kitagawa T., Abe M., Pandey R.K., Leung H.-K., Smith K.M.: *Journal of Molecular Structure*, **146**, 337 (1986)
- [60] Li X.-Y., Czernuszewicz R.S., Kincaid J.R., Su Y.O., Spiro T.G.: *J. Phys. Chem.*, **94**, 31 (1990)
- [61] Li X.-Y., Czernuszewicz R.S., Kincaid J.R., Stein P., Spiro T.G.: *J. Phys. Chem.*, **94**, 47 (1990)
- [62] He L.T., Lei T.Q., Jiang T.L.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1**, 7 (1990)
- [63] Sanchez L.A., Spiro T.G.: *J. Phys. Chem.*, **89**, 763 (1985)
- [64] Shelnut J.A., Ginley D.S.: *J. Phys. Chem.*, **89**, 5473 (1985)

- [65] McMahon J.J., Baer S., Melendres C.A.: *J. Phys. Chem.*, **90**, 1572 (1986)
- [66] Pilloud D.L., Chen X., Dutton P.L., Moser C.C.: *J. Phys. Chem.*, **104**, 2868 (2000)
- [67] Bizzarri A.R., Cannistrado S.: *Chem. Physics* **290**, 297 (2003)
- [68] Inamura I., Uchida,: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **64**, 2005 (1991)
- [69] Šmejkal P.: *Doktorská disertační práce – v přípravě*
- [70] Malinowski E.R.: *Factor Analysis in Chemistry*, Wiley, New York (1991)
- [71] Hanzlíková J., Procházka, M., Štěpánek, J., Baumruk, V., Bok, J., Anzenbacher P. Jr. *J. Raman Spectrosc.* **29**, 575 (1998),
- [72] Hanuš J., Chmelová K., Štěpánek J., Turpin P.-Y., Bok J. Rosenberg I., Točík Z.: *J. Raman Spectrosc.*, **30**, 669 (1999)
- [73] Ross S. D., *Inorganic Infrared and Raman Spectra*, McGraw-Hill, London, 1972, Appendix 2, p. 299
- [74] Sanchez-Cortez S., Jancura D., Garcia-Ramos J. V. in *Surface-enhanced Raman Spectra of Biological Molecules*, Carmone P., Navarro R., Hernanz A., Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1997, p. 602

7. seznam použitých zkratk a symbolů

DMSO	dimethylsulfoxid
EtOH	ethanol
EM	elektromagnetický mechanismus
FA	faktorová analýza
F I	forma I
F II	forma II
F III	forma III
H ₂ TMPyP	5, 10, 15, 20-tetrakis (2-methyl-4-pyridyl) porphin
H ₂ TPPC ₄	5, 10, 15, 20 – tetrakis (4-carboxyphenyl) porphin
NCA	analýza normálních souřadnic
OEP	octaethylporphine
PPIX	protoporfyriin IX
RLS	rezonanční rozptyl světla
RRS	rezonanční Ramanův rozptyl
RS	Ramanův rozptyl
SEM	rastrovací elektronová mikroskopie
SERRS	povrchem zesílený rezonanční Ramanův rozptyl
SERS	povrchem zesílený Ramanův rozptyl
SNOM	optická mikroskopie blízkého pole
SVD	rozklad do singulárních hodnot
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TPP	tetraphenylporphin