

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of macromolecular and physical chemistry**

Doktorský studijní program: Fyzikální chemie
Ph.D. study program: Physical chemistry

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



**Vývoj a optimalizace systémů pro SERS na úrovni jedné
molekuly**

**Development and optimization of systems for SERS on single
molecule level**

RNDr. Magdalena Michlová

Školitel/Supervisor: Prof. RNDr. Blanka Vlčková CSc.

Praha, 2012

Abstrakt

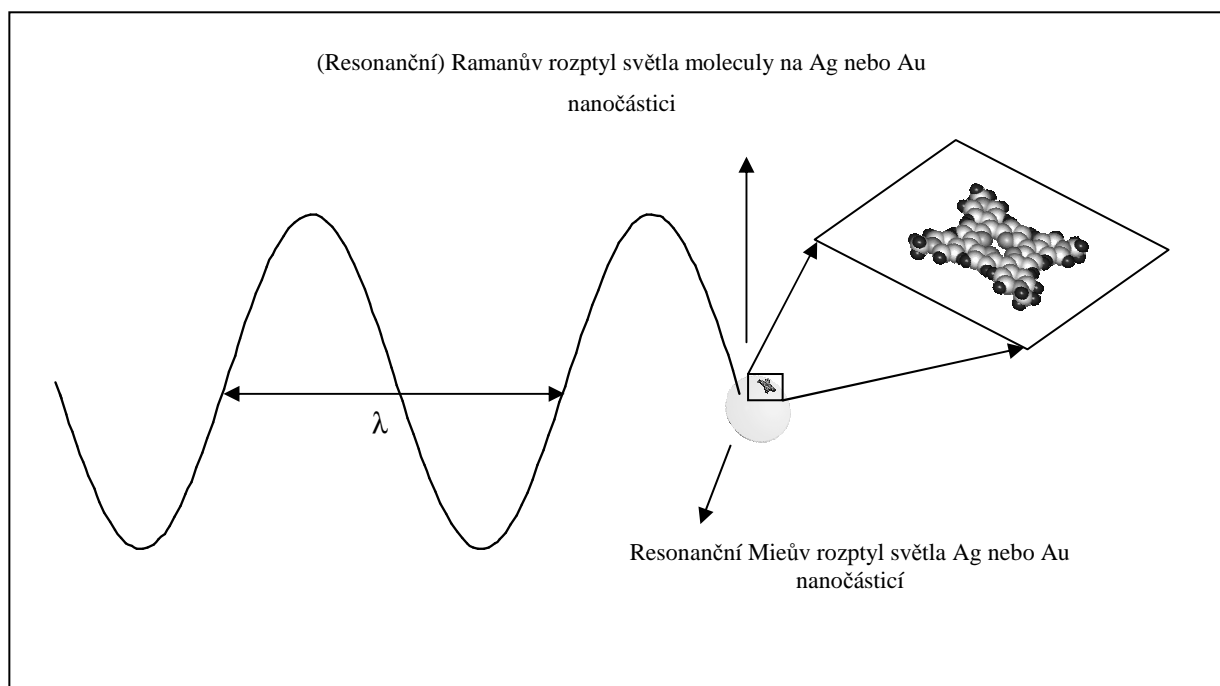
Byly připraveny dimery, malé agregáty a kompaktní agregáty Ag nanočástic (NP), navázané chemicky na povrch pevných podložek. Těmito podložkami byly buď Cu či Au TEM sítě s vrstvou SiO₂ nebo sklíčka, obojí s povrchem funkcionalizovaným 3-aminopropyltrimethoxysilanem (APTMS). Kompaktní agregáty Ag NP obsahující protoporfyrin IX (PPIX) byly připraveny působením chloridů na Ag sol v přítomnosti PPIX. Dimery a malé agregáty Ag NP byly uspořádány s využitím vybraných molekulárních spojek: 4,4'-diaminoazobenzen (DAAB), 4,4'-diaminoterfenyl (DATP) a 5,10,15,20-tetrakis(4-aminofenyl)porfín (TAPP). Jako nejúčinnější postup jejich přípravy se ukázala třístupňová procedura sestávající z (i) navázání izolovaných Ag NP na povrch podložky prostřednictvím NH₂ skupin APTMS, (ii) adsorpce molekulární spojky přes jednu z jejích NH₂ skupin a (iii) připojení dalších Ag NP ke zbývajícím volným NH₂ skupinám. Při této proceduře byla využita funkcionalizace Ag NP citrátovými anionty ke kontrole kolmé adsorpční geometrie molekulárních spojek, přičemž adsorbované citrátové ionty fungovaly jako účinná preorientační matrice. Vzdálenosti mezi jednotlivými dimery či malými agregáty byly určeny dostatečnou vzdáleností mezi izolovanými Ag NP v prvním kroku výše zmíněné třístupňové procedury. Byla také vyvinuta strategie pro měření SERS signálu molekulární spojky z vybraného jednotlivého dimeru či malého agregátu, jehož struktura byla zobrazena pomocí TEM. Jednoznačné korespondence mezi TEM snímkem daného dimeru (či malého agregátu) a změřeným SERS signálem bylo dosaženo použitím Cu nebo Au vyhledávacích TEM sítěk s vrstvou SiO₂, které pomocí polohových souřadnic umožnily nalezení téhož nanoobjektu jak v TEM, tak v Ramanově mikrospektrometru. SERS signál molekulárních spojek vytvářejících dimery a malé agregáty z Ag NP vykazuje časové fluktuace spojené s dosažením úrovně detekce jednotlivých molekul. Stabilita molekulárních spojek v silných optických polích souvisí s jejich kolmou orientací k povrchu Ag NP a je navíc závislá jak na konkrétní molekulární struktuře, tak na morfologii daného plazmonického nanoobjektu. Dimery Ag NP vázaných jedinou molekulou představují optimální systém pro studium dynamiky jednotlivých molekul sledováním časového vývoje SERS signálu dané molekulární spojky. Navíc jsou téměř dokonalou realizací teoretického modelu, který předpovídá přítomnost jediného hot spotu v mezeře mezi oběma Ag NP, takže molekulární spojka se nachází přesně v místě s nejvyšším zesílením SERS pomocí EM mechanismu. Oproti tomu SERS signál z malých agregátů může být superpozicí signálů odrážejících molekulárně-dynamické události probíhající současně v několika různých hot spotech.

Abstract

Dimers and small aggregates as well as compact aggregates of Ag nanoparticles (NPs) were assembled and chemically anchored to supporting surfaces. The supporting surfaces were either glass slides or SiO₂ – coated Cu or Au grids for TEM, both chemically functionalized by 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS). Compact aggregates of Ag NPs incorporating protoporphyrin IX (PPIX) molecules were prepared by adsorption of chlorides in the presence of PPIX. Dimers and small aggregates of Ag NPs were assembled by selected molecular linkers: 4,4'-diaminoazobenzene (DAAB), 4,4'-diaminoterphenyl (DATP) and 5,10,15,20-tetrakis (4-aminophenyl)porphine (TAPP). The most efficient strategy of dimers and small aggregates preparation has been their assembling by a three – step procedure involving (i) attachment of isolated Ag NPs to the NH₂ groups of APTMS functionalized TEM grid, (ii) attachment of molecular linker (with two functional NH₂ groups in para position) to Ag NPs by a one terminal NH₂ group, and (iii) attachment of Ag NPs to the second, free terminal NH₂ group of the linker. In this procedure, the control over the perpendicular orientation of the bifunctional linker and its attachment by one terminal group to Ag NP surface has been accomplished by functionalization of Ag NPs by adsorbed citrate which acted as the adsorbate pre – orienting matrix. The control over the resulting dimer (small aggregate) separation from other dimers and small aggregates has been achieved by a sufficiently wide spacing of Ag NPs in the first step (i) of the three – step procedure. Furthermore, the strategy for obtaining SERS signal of molecular linker from a particular, selected single dimer and/or small aggregate of Ag NPs visualized by TEM has been developed. An unequivocal correspondence between the TEM – imaged dimer (and/or small aggregate) and the SERS signal obtained from it has been accomplished by employment of SiO₂ coated Au finder grids for TEM. An accurate establishment of the positional coordinates of the nanoobject (dimer or aggregate) with respect to the marks (letter or number) on the finder grid enabled to find the same nanoobject both in TEM (for its visualisation) and in the optical microscope which focused exciting laser beam onto it and enabled to obtain SERS signal of the molecular linker from it. The SERS signal of molecular linkers exhibits temporal fluctuations associated with achievement of a single molecule level of detection. Stability of the molecular linkers in strong optical fields appears to be conditioned by the perpendicular orientation of the linker with respect to Ag NP surface, and is further affected by the actual structure of the linker as well as by the nanoobject morphology. Finally, the single molecularly – bridged Ag NP dimer was found to represent an optimal system in which the single molecule dynamics can be followed via time – evolution of the SERS signal of the molecular linker obtained from it. The advantage of a dimer over a small aggregate is, that the SERS signal of the dimer originates from a single hot spot, while, in case of a small aggregate, the SERS signal is a superposition of molecular dynamic events occurring in several hot spots. Furthermore, the molecularly – bridged Ag NP dimer is an exact experimental realization of a model system of Ag NP dimer with a single molecule located in a single hot spot at the interconnect between the two NPs. According to the theoretical model calculations, a dimer of Ag NPs with the molecule located between them is the most efficient light amplification system providing largest enhancement of SERS by the EM mechanism of SERS.

1. Úvod

1.1. Mechanismy povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERSu)



Obr. 1.1.: Schématické znázornění povrchem zesíleného Ramanova rozptylu.

Podstata povrchem zesíleného Ramanova rozptylu spočívá v interakci optické odezvy plazmonických kovových (nejčastěji Ag nebo Au) nanostruktur s odezvami molekul lokalizovaných na (nebo v blízkosti) jejich povrchu (Obr. 1.1). V takovém interagujícím systému je jak intenzita budícího záření, tak intenzita záření neelasticky rozptýleného adsorbovanými molekulami zesílena rezonančním Mieovým rozptylem záření na plazmonické kovové nanostruktuře. Tento mechanismus bývá označován jako elektromagnetický mechanismus (EM). Tento mechanismus je klíčový a nezávisí na povaze adsorbovaných molekul. Vysvětlení podstaty SERS pomocí zesílení světla plazmonickými nanostrukturami bylo publikováno [1] pouhý rok po jeho objevu [2]. V případě, že vlnová délka budícího záření splňuje zároveň EM i molekulární rezonanční podmínku, přispívá molekulární resonance k celkovému zesílení Ramanova rozptylu (SERRS). Mechanismus a aplikace SERS jsou předmětem řady přehledových článků [3 – 13].

1.1.SERS jediné molekuly

Spektroskopie povrchem zesíleného Ramanova rozptylu jediné molekuly (SM-SERS) má již patnáctiletou historii [14, 15]. Současný vzrůst zájmu o SM-SERS [9, 11, 16 – 20] je součástí oživení zájmu o SERS obecně, za nímž stojí zejména jedinečné fyzikálně-chemické vlastnosti nanosystémů [21] a vývoj v oboru plasmoniky [22]. První zprávu o měření SM-SERS publikovala Kneipp et al. [14]. V jejich mikrospektroskopickém uspořádání byly měřeny velmi malé objemy velmi zředěných malých Ag nanočásticových agregátů, obsahujících kresylovou violeť o koncentraci 10^{-14} M, takže v měřeném objemu se v průměru nacházelo 0,6 molekuly. Intenzita SERS signálu z těchto systémů, měřená v 1 s intervalech, vykazovala fluktuace v čase. Histogramy intenzit získaných takto pro daný Ramanův pás měly Poissonovský profil, namísto Gaussovského, který byl pozorován u vyšších

koncentrací. Poissonovská distribuce intenzit byla přiřazena signálu z 0, 1, 2 nebo 3 molekul. Tyto výsledky okamžitě vyvolaly otázku, zda je možné SM-SER(R)S vysvětlit kombinací EM mechanismu a molekulární rezonance. Odpověď poskytly zejména výpočty Källä a spolupracovníků [23 – 25], které ukázaly, že faktor zesílení EM mechanismem mohou dosáhnout až 1NH₂ skupin 1·10¹¹ pro molekulu v „hot spot“ mezi dvěma Ag nanočásticemi a excitovanou světlem polarizovaným paralelně s osou dimeru. V kombinaci se zesílením molekulární rezonancí tak může celkový faktor zesílení být až 1x10¹⁴, jak bylo experimentálně pozorováno [11]. Navíc, pozorované časové fluktuační intenzity SERS signálu byly interpretovány jako projev dynamického chování jedné nebo několika málo molekul [12, 14, 20, 26, 27].

2. Cíle práce

1. Experimentální realizace, tj. design, příprava a charakterizace souborů Ag nanočástic, pro které byla různými modely teoreticky předpovězena existence „hot spots“ (tj. silných optických polí vybudovaných vhodným zářením).
2. Návrh a testování přístupů k umístění molekul do „hot spots“ a měření jejich SERS nebo SERRS spekter a pokud možno pak i jejich časový vývoj.
3. Interpretace SERS a/nebo SERRS spekter a jejich časového vývoje v souvislosti s dynamikou molekul zabudovaných do konkrétních Ag nanočásticových souborů s cílem přiblížit se na úroveň detekce jediné molekuly a následně sledovat dynamiku jediné molekuly uvnitř daného Ag nanočásticového souboru.
4. Přesné určení faktorů důležitých pro úspěšné umístění molekul do „hot spots“ různých Ag nanočásticových uskupení a faktorů, které ovlivňují stabilitu testovacích molekul v silných optických polích.

3. Materiál a metodika

3.1. Přístrojová technika

Elektronová absorpční spektra byla měřena pomocí UV-Vis spektrometru Perkin Elmer Lambda 12.

Snímky z transmisní elektronové mikroskopie (TEM) byly získány pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEOL JEM 200 CV. Použitá zvětšení se pohybovala od 20 000x to 150 000x.

Snímky z rastrovací elektronové mikroskopie (SEM) vzorků nanosených na mikroskopická sklíčka byly získány pomocí FESEM mikroskopu (Quanta 200 FEG, FEI).

SERRS mikro-Ramanova spektra vybraných agregátů Ag nanočástic chemicky navázaných na derivatizované TEM síťky nebo mikroskopická sklíčka byla měřena pomocí konfokálního optického mikroskopu kombinovaného s Ramanovým spektrometrem Labram-HR (Jobin-Yvon/Horiba) pracujícím ve spektrálním nebo mapovacím režimu. Měření bylo prováděno Ar⁺ laserem s excitační délkou 514.5 nm s výkonem dopadajícího svazku 10 mW a s průměrem stopy ca. 0,7 μm. Doba snímání spekter byla 2 s.

3.2. Přípravy Ag solů a aktivních systémů

Ag hydrosol H I byl připraven redukcí AgNO₃ pomocí NaBH₄ ve vodném prostředí, upraveným postupem [28] popsaným v publikaci [29].

Ag hydrosol H II byl připraven redukcí AgNO₃ pomocí Na₃C₆H₅O₇·2H₂O ve vodném prostředí, postupem popsaným Lee a Meiselem [30].

Organosol pentylaminem stabilizovaných Ag nanočástic byly připraveny redukcí dusičnanu stříbrného tetrahydridoboritanem sodným ve dvoufázovém systému voda/chloroform za přítomnosti octaethylamoniumbromidu.

Příprava chemicky modifikovaných povrchů vhodných pro TEM a mikro-Ramanova měření: na měděné síťky pro TEM mikroskopii potažené vrstvou SiO_x/formvaru byla nejprve na zadní stranu napařena tenká uhlíková vrstva. Přední strana s SiO_x vrstvou byla derivatizována kondenzací par 3-aminopropyltrimethoxysilanu (APTMS) ve vakuu.

Příprava systému Ag hydrosol/NaCl/PPIX obsahující protoporphyrin IX (PPIX) inkorporovaný v kompaktních Ag agregátech: vzorky byly připraveny modifikací Ag nanočástic přidáním NaCl do Ag hydrosolu, následně pak byl přidán vodný roztok PPIX.

Příprava vzorků PPIX inkorporovaného v kompaktních Ag agregátech pro TEM a mikro-Ramanova měření: derivatizovaná síťka byla na 3 hodiny položena na hladinu systému Ag hydrosol/NaCl/PPIX. Pomocí amino skupin na povrchu TEM síťky byly zachyceny kompaktní Ag agregáty Ag nanočástic.

Příprava vzorků obsahujících dimery a malé agregáty připravené ve vodném prostředí pomocí různých molekulárních spojek: pro měření Ramanových spekter a zobrazení TEM téhož vzorku byly dimery a malé agregáty zakotveny na chemicky modifikovaných SiO_x/formvarem pokrytých měděných značených síťkách pro TEM pomocí následující třístupňové procedury zahrnující:

(1) navázání Ag nanočástic na síťku prostřednictvím APTMS v průběhu plování síťky na hladině Ag koloidu

(2) adsorpce molekulární spojky na navázané Ag nanočástice ponořením síťky do roztoku molekulární spojky

(3) opětovné vystavení síťky Ag koloidu, kdy dochází k navázání dalších Ag nanočástic prostřednictvím volných aminoskupin molekulární spojky. Vhodné vzdálenosti agregátů (umožňující výběr individuálních nanoobjektů) bylo dosaženo optimalizací doby jednotlivých kroků přípravy.

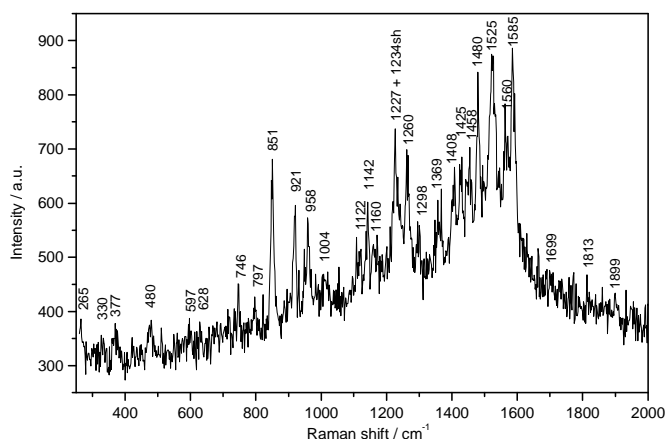
Vzorky dimerů a malých agregátů Ag nanočástic spojených 5, 10, 15, 20 – tetrakis (4-aminofenyl)porfin (TAPP) připravených v organickém prostředí: vzorky byly připraveny smícháním chloroformového roztoku TAPP s organosolem Ag nanočástic stabilizovaných pentylaminem. Podložní sklíčka byla pečlivě omyta a derivatizována ponořením na 3 hodiny do APTMS. Po opláchnutí etanolem byla sklíčka ponořena na 3 hodiny do systému Ag organosol/TAPP.

Vzorky dimerů a malých agregátů Ag nanočástic spojených TAPP připravených ve vodném prostředí: derivatizovaná síťka byla na 3 hodiny položena na hladinu Ag hydrosolu. Pomocí amino skupin na povrchu TEM síťky byly zachyceny Ag nanočástice. Následně byla síťka ponořena do etanolového roztoku TAPP. Nakonec byla síťka opět položena na hladinu Ag hydrosolu.

Příprava vzorků systémů Ag nanočástice / 4,4'-diaminoterfenyl (DATP) a Ag nanočástice / 4,4'-diaminoazobenzen (DAAB): derivatizovaná síťka byla na 3 hodiny položena na hladinu Ag hydrosolu. Pomocí amino skupin na povrchu TEM síťky byly zachyceny Ag nanočástice. Následně byla síťka ponořena do etanolového roztoku DATP nebo DAAB. Nakonec byla síťka opět položena na hladinu Ag hydrosolu.

4. Výsledky a diskuse

4.1. Kompaktní agregáty Ag nanočástic s molekulami PPIX



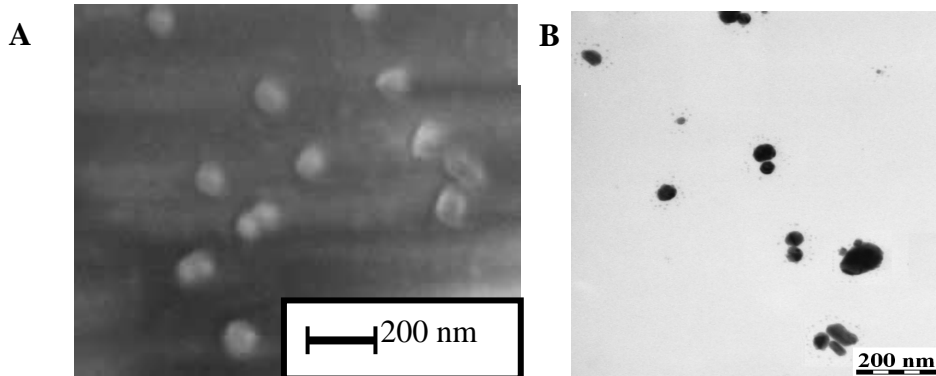
Obrázek 4.1: SERRS spektrum PPIX z jediného kompaktního agregátu chloridy modifikovaných Ag NP

TEM snímky i SERRS mikro-Ramanova spektra jednotlivých kompaktních agregátů chloridy modifikovaných Ag nanočástic byly získány z téhož vzorku agregátů navázaných na povrchu TEM síťky pokryté vrstvou SiO_x a derivatizované APTMS. SERRS spektra z několika jednotlivých agregátů byla měřena při excitaci 514.5 nm. SERRS signál vykazoval jak značné časové fluktuace, tak rozdíly mezi jednotlivými agregáty. Fluktuující signál nicméně obsahoval Ramanovy pásy charakteristické pro PPIX. Příklad takového spektra je na Obrázku 4.1. Počet molekul PPIX připadajících za podmínek experimentu na jeden kompaktní agregát byl odhadnut na cca 40 (nebo méně). Časové fluktuace signálu, které jsou obvykle spojovány s detekcí na úrovni jediné molekuly, naznačují, že k

pozorovanému signálu přispívá z celkového množství připadajícího na jeden agregát pouze několik málo molekul.

4.2. Ag nanočásticové dimery a malé agregáty spojené TAPP

Dimery a malé agregáty Ag nanočástic spojené TAPP byly připraveny jak v prostředí organického

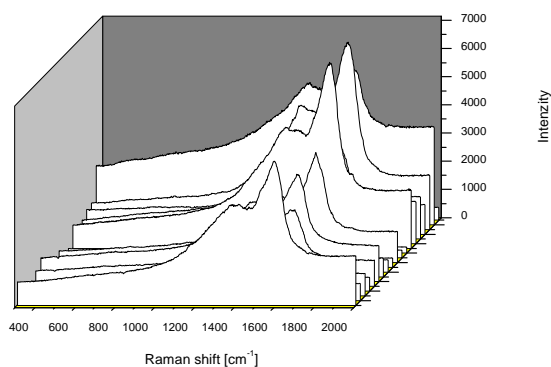


Obrázek 4.2: A) SEM snímek agregátů pentylaminem stabilizovaných Ag NP spojených TAPP, B) TEM snímek vzorku vytvořeného z citrátem stabilizovaných Ag NP a TAPP

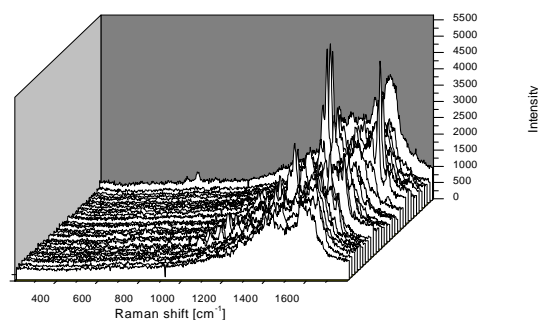
rozpuštědla (pentylaminem stabilizované Ag nanočástice), tak ve vodném prostředí (citrátem stabilizované Ag nanočástice). Následně byly deponovány na skleněné podložky, resp. TEM síťky.

SEM snímek vzorku připraveného z pentylaminem stabilizovaných Ag nanočástic je na Obrázku 4.2 A. TEM snímek vzorku z citrátem stabilizovaných Ag nanočástic pak na Obrázku 4.2 B.

V SERS spektrech získaných ze vzorků připravených v organickém rozpouštědle dominují pásy grafitického uhlíku a pozorovaný signál vykazuje enormní fluktuace v čase (Obrázek 4.3). Pouze



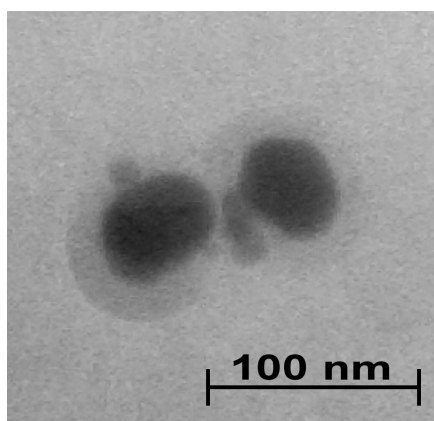
Obrázek 4.3: Časový vývoj SERS spekter ze vzorků na Obrázku 4.2 A



Obrázek 4.4: Časový vývoj SERS spekter ze vzorků na Obrázku 4.2 B

v některých spektrech se objevuje několik úzkých pásů přiřaditelných TAPP. Oproti tomu ve fluktuujícím SERS signálu ze vzorků připravených ve vodném prostředí z citrátem stabilizovaných Ag nanočástic lze jasně rozpoznat charakteristické spektrální pásy TAPP (Obrázek 4.4). SERS signál z obou vzorků ukazuje, že laserové záření o vlnové délce 514.5 nm způsobuje rozklad můstkujících molekul TAPP. Zatímco v případě dimerů a agregátů z pentylaminem stabilizovaných nanočástic je tento rozklad velmi rychlý a v podstatě zabraňuje měření SERS spekter TAPP, v případě citrátem stabilizovaných nanočástic je tento proces podstatně pomalejší a tak lze z těchto dimerů a agregátů získat SERS spektra můstkujícího porfyriu. Jedno z možných vysvětlení tohoto rozdílu spočívá v nízké uspořádanosti pentylaminové stabilizující vrstvy. Ta může dovést k reorientaci molekul porfyriu a vystavit jejich makrocycly přímému kontaktu s povrchem stříbra a v důsledku toho tak urychlit jejich fotorozklad.

4.3. Ag nanočásticové dimery a malé agregáty spojené DATP



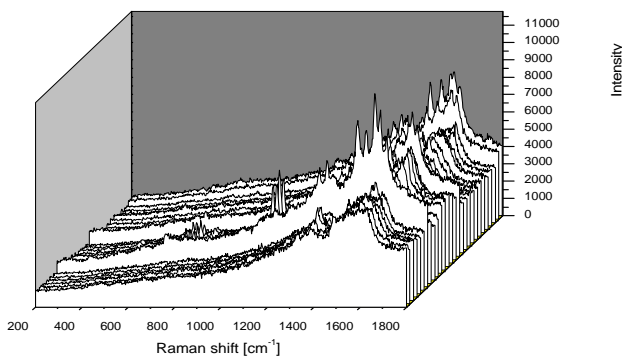
Obrázek 4.5: TEM snímek Ag NP spojeného DATP

Ag NP dimery a malé agregáty vytvořené pomocí rigidní aromatické molekulární spojky 4,4'-diaminoterfenylu (DATP) byly zakotveny na vyhledávacích TEM sítkách s SiO_x vrstvou derivatizovanou pomocí APTMS.

Záměrem cíleného měření SERS signálu z vybraného jednotlivého dimeru nebo malého agregátu bylo získat jednoznačnou korespondenci mezi tímto signálem a morfologií daného agregátu. Toho bylo docíleno určením polohy agregátu pomocí značek na vyhledávací TEM síťce. Tato přesná poloha byla lokalizována jak na optickém snímku před měřením SERS, tak na TEM snímku pro detailní určení morfologie (Obrázek 4.5).

Časový vývoj SERS spekter měřených z tohoto agregátu (Obrázek 4.6) ukazuje fluktuace SERS signálu, při kterých se střídá signál odpovídající DATP se signálem grafitického uhlíku se dvěma charakteristickými širokými pásy. Možným scénářem vysvětlujícím

toto chování je rozklad můstkujících molekul DATP nejméně v jednom z několika hot spots uvnitř agregátu na grafitický uhlík. Protože však pozorovaný signál pravděpodobně pochází z více než

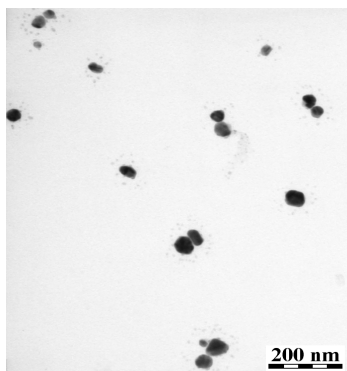


Obrázek 4.6: Časový vývoj SERS signálu z Ag NP agregátu spojeného DATP.

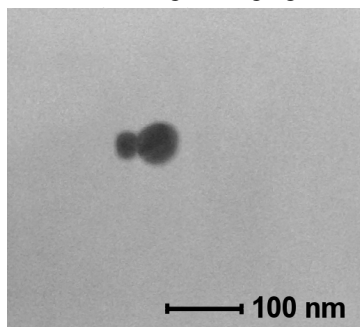
jednoho hot spotu, nemůže být pozorovaný časový vývoj interpretován ve smyslu dynamiky jednotlivých molekul. Nicméně není pochyb o tom, že DATP podléhá v silných optických polích rozkladu na grafitický uhlík.

Získané výsledky tak poskytují experimentální důkaz teoreticky předpovězené přítomnosti velmi silných optických polí v malých agregátech Ag nanočástic vytvořených pomocí molekulárních spojek a důkaz přítomnosti molekulárních spojek v těchto hot spots.

4.4. Ag nanočásticové dimery a malé agregáty spojované DAAB



Obrázek 4.7: TEM snímek Ag NP agregátů



Obrázek 4.8: TEM snímek vybraného Ag NP dimeru spojovaného DAAB

Ag NP byly uspořádány do dimerů a malých agregátů pomocí bifunkční aminoskupinami zakončené molekulární spojky DAAB. Tyto dimery a malé agregáty byly navázány na vyhledávacích TEM sítkách s SiO_x vrstvou derivatizovanou APTMS.

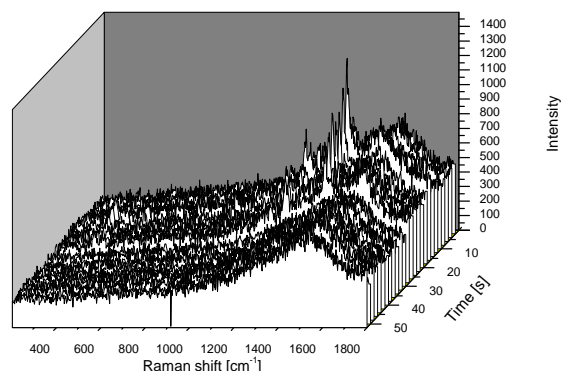
TEM snímek na Obrázku 4.7 ukazuje, že dimery a malé agregáty jsou orientovány paralelně s funkcionalizovaným povrchem TEM sítky. Zjevně, po vytvoření prostřednictvím molekulární spojky, dochází k reorientaci dimeru nebo malého agregátu tak, že všechny Ag nanočástice jsou vázány k chemicky modifikovanému povrchu TEM sítky.

Cílem měření SERS signálu z vybraného jednotlivého dimeru bylo získat jednoznačnou korespondenci mezi tímto signálem a morfologií. Toho bylo docíleno určením polohy agregátu pomocí značek na vyhledávací TEM síťce. Tato přesná poloha byla lokalizována jak na optickém snímku před měřením SERS, tak na TEM snímku pro detailní určení morfologie (Obrázek 4.8).

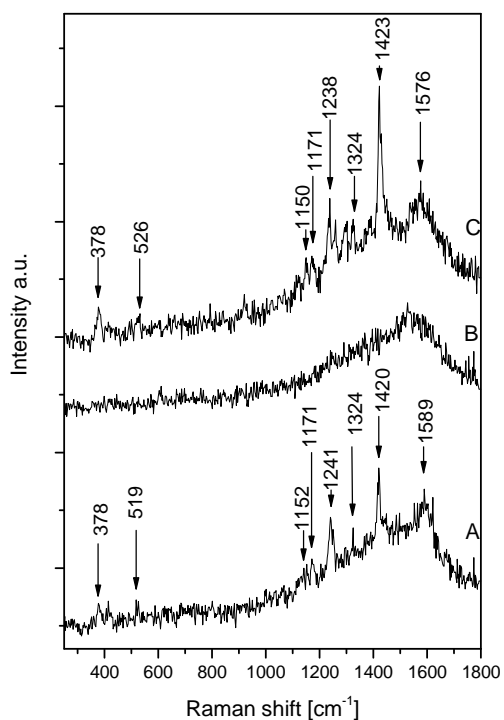
Časový vývoj SERS spekter měřených z tohoto konkrétního dimeru (Obrázek 4.9) vykazuje fluktuace s charakterem signál “in” a signál “off”.

Stav signál “in” v tomto konkrétním časovém vývoji odpovídá 8. a 14. spektru, která obsahují charakteristické spektrální pásy DAAB, zatímco ve stavu signál “off” je pozorováno široké pozadí

(Obrázek 4.9, v detailu na Obrázku 4.10). Srovnání spekter obou signál “in” stavů odhaluje, že většina (9 ze 12) charakteristických pásů DAAB z 8. spektra se objevuje znovu ve 14. spektru (Obrázek 4.10, spektrum C). V širokém pozadí z období signál “off” na Obrázku 4.10, spektrum B lze rozpoznat náznaky pásů grafitického uhlíku.



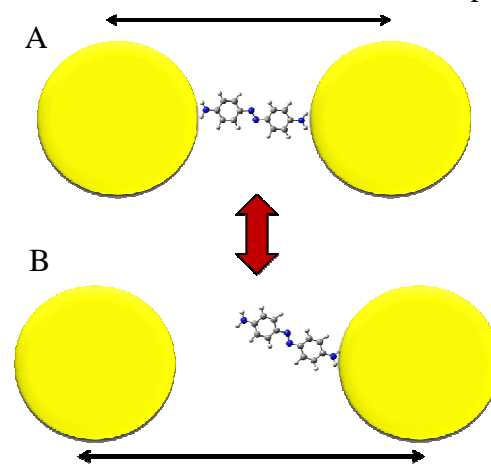
Obrázek 4.9: Časový vývoj SERS signálu z dimeru na Obrázku 4.8



Obrázek 4.10: Detail spekter z periody signál “in”: 8. spektrum (A) a 14. spektrum (C), a spektrum z periody signál “off” (B) ze série SERS spekter z Obrázku 4.16

důvodem vymizení SERS pásů DAAB ze spektra. Znovuvytvoření vazby Ag-NH₂ a potažmo dimeru pak může vést k obnovení spektrálního signálu DAAB.

Je všeobecně uznáváno, že fluktuace spekter odrážejí dynamiku jediné nebo několika málo molekul. V tomto konkrétním případě se nabízí jednoduchá hypotéza konzistentní s pozorovaným chováním. Okamžiky, kdy je signál “in”, mohou být přiřazeny Ag NP dimeru spojeném molekulou DAAB (Obrázek 4.11 A), zatímco periody signál “off” odpovídají dočasné ztrátě signálu DAAB způsobené přerušením jedné z vazeb Ag - NH₂ a tedy rozpojení dimeru (Obrázek 4.11 B). Rozpojené nanočástice pravděpodobně zůstávají stále zakotveny k síťce pomocí APTMS, jejich vzdálenost se však může změnit. Jelikož vlnová délka pro rezonanční excitaci silného optického pole v Ag NP dimeru je silně závislá na jejich vzdálenosti [23], excitační vlnová délka 514,5 nm již nebude v rezonanci pokud dojde ke zvětšení vzdálenosti mezi nanočásticemi (Obrázek 4.11 A). To může být



Obrázek 4.11: Dimer Ag NP

A. Spojení molekulou DAAB (signál “in”)
B. Rozpojený stav (signál “off”)

4.5. Faktory ovlivňující stabilitu adsorbátů a molekulárních spojek v silných optických polích

SERS a SERRS signál z jediného kompaktního agregátu obsahujícího molekuly PPIX je tvořen rychle se střídajícími spektry porfyriu a grafitického uhlíku. Spektrum porfyriu je superpozicí free-base a stříbrem metalované formy a indikuje tak přítomnost molekul H₂PPIX i AgPPIX v agregátu. V dříve publikované práci [31], která se zabývá tepelnou stabilitou jiného free-base porfyriu - 5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)-porfinu (TMPyP) v silných optických polích, bylo ukázáno že adsorbované molekuly AgTMPyP vzniklé metalací H₂TMPyP na povrchu Ag nanočástice jsou náchylné k rozkladu na grafitický uhlík, narozdíl od původního H₂TMPyP. Možným vysvětlením pozorovaného chování je, že grafitický uhlík obdobně vzniká rozkladem molekul AgPPIX vzniklých metalací H₂PPIX.

SERRS spektra naměřená z několika dimerů a malých agregátů vytvořených pomocí molekul TAPP jsou diametrálně odlišná pro agregáty z citrátem stabilizovaných Ag nanočástic ve vodném prostředí a pro agregáty z Ag nanočástic stabilizovaných pentylaminem v organickém prostředí. Obzvláště v prvním případě byl pozorován fluktuující SERRS signál molekul TAPP. Molekuly porfyriu jsou zachovány ve free-base formě a jsou s největší pravděpodobností koordinovány jednou nebo dvěma aminoskupinami kolmo k povrchu Ag NP, což umožňuje jejich funkci molekulární spojky. Oproti tomu v druhém případě je pozorován pouze velmi silný, fluktuující signál grafitického uhlíku. Možné vysvětlení tohoto jevu vychází z rozdílné účinnosti preorientující matrice tvořené stabilizujícími molekulami: citrátem nebo pentylaminem. Citrát, bidentátně vázaný dvěma

karboxylovými skupinami k povrchu Ag NP, vytváří velmi účinnou preorientující matici (jak bylo též ukázáno v [32]), která vede k adsorpci porfyrinu v orientaci kolmé k povrchu Ag NP (“standing up”). Neuspořádané alifatické řetězce molekul pentylaminu však dovolují porfyrinu reorientovat se paralelně s povrchem Ag NP a tudíž umožňují jeho metalaci a následný rozklad na grafitický uhlík. Konečně, je třeba zdůraznit, že bylo prokázáno působení citrátu jako účinné preorientující matrice i pro další molekulární spojky DATP a DAAB.

Časový vývoj SERS signálu z dimeru vytvořeného z Ag NP pomocí DAAB vykazuje střídání period "signal in" a "signal off". Tento signal je tvořen SERS spektrálními pásy DAAB a jeho vývoj naznačuje, že se molekuly DAAB nerozkládají v silných optických polích. Na druhou stranu, v časovém vývoji SERS signálu z malých agregátů vytvořených pomocí DATP se střídají spektra DATP a grafitického uhlíku. Při vyhodnocování rozdílů mezi těmito vývoji SERS signálů je třeba vzít v úvahu skutečnost, že v prvním případě pochází signal z jediného hot spotu mezi dvěma Ag NP, zatímco v druhém případě jde o superpozici z několika hot spotů. Nicméně pozorované pásy grafitického uhlíku dokazují, že dochází k rozkladu molekul DATP nejméně v jednom z několika hot spotů. Jak molekulární struktura spojek DAAB a DATP, tak aktuální struktura útvarů z Ag NP (dimer nebo agregát) mohou přispívat k rozdílné náchylnosti k rozkladu molekul. V případě dimerů propojených pomocí DAAB může stabilitu molekul příznivě ovlivnit trans-cis izomerizace, díky níž může docházet k dočasnému oddálení NP v dimeru a tím k „vypnutí“ silného optického pole. To se však nevztahuje na malé agregáty vytvořené pomocí DATP, jelikož (i) DATP je rigidní molekulární spojka a (ii) i v případě dočasného přerušení vazby mezi Ag NP a DATP, zůstávají v agregátu přítomny další hot spots.

5. Závěry

I. Byla vyvinuta metodika uspořádání kompaktních agregátů, dimerů a malých agregátů Ag NP a jejich navázání na pevné povrchy. Těmito povrchy byly buď sklička nebo zlaté cí měděné TEM síťky pokryté vrstvou SiO₂, obojí derivatizované pomocí APTMS. Kompaktní agregáty Ag NP obsahující PPIX byly vytvořeny v hydrosolu a následně chemicky navázány prostřednictvím NH₂ skupin na Cu TEM síťky derivatizované APTMS. Byla tak vyvinuta základní technika přípravy vzorku umožňující pomocí Ramanova mikrospektrometru měřit SERRS spektra adsorbátu (PPIX) z jediného kompaktního agregátu poté, co byl zobrazen v TEM mikroskopu. Podobná strategie byla vypracována pro navázání Ag NP dimerů a malých agregátů uspořádaných pomocí molekulární spojky TAPP v hydrosolu na chemicky funkcionalizované TEM síťky pokryté SiO₂. Ag NP dimery a malé agregáty vytvořené pomocí TAPP z pentylaminem stabilizovaného Ag NP organosolu byly uchyceny na sklíčkách derivatizovaných APTMS a k jejich zobrazení byl použit SEM. Hlavně byla podstatně vylepšena strategie pro měření SERS signálu z konkrétního vybraného jediného Ag NP dimeru nebo malého agregátu, zobrazeného v TEM, vyvinutá a odzkoušená v předchozích studiích. Klíčové body tohoto vylepšení jsou následující:

- 1) Vytvoření dimerů nebo malých agregátů tříступňovou procedurou zahrnující
 - i) navázání izolovaných Ag NP prostřednictvím NH₂ skupin na vyhledávací Au TEM síťky derivatizované APTMS
 - ii) adsorpce molekulární spojky na zakotvené Ag NP jednou z jejích NH₂ skupin
 - iii) navázání další Ag NP pomocí volné NH₂ skupiny adsorbované molekulární spojky
- 2) Funkce molekulární spojky vyžaduje, aby byla adsorbována na Ag NP v kolmé orientaci k jejímu povrchu. To zajišťují adsorbované citrátové ionty (přítomné již z přípravy Ag NP hydrosolu redukcí AgNO₃ pomocí Na₃C₆H₅O₇·2H₂O), které působí jako účinná preorientační matrice. Tento jev byl již demonstrován při studiu dimerů a malých agregátů vytvořených pomocí TAPP, kde citrátové ionty vykazovaly mnohem vyšší preorientující účinek než pentylamin.

3) Kontrola nad výslednou vzdáleností dimerů (malých agregátů) od okolních dimerů či malých agregátů byla docílena díky dostatečné vzdálenosti zachycených Ag NP v prvním kroku (i) třístupňové procedury, dosažené ředěním a dostatečně krátkou dobou expozice derivatizovaného povrchu Ag NP solu.

4) Jednoznačná korespondence mezi TEM zobrazením dimeru (malého agregátu) a z něj získaným SERS signálem byla docílena použitím vyhledávacích Au TEM sítěk pokrytých SiO₂. Přesné určení polohových souřadnic nanoobjektu pomocí značek na vyhledávacích sítkách umožnilo zobrazit konkrétní dimer (malý agregát) v TEM a změřit z něj SERS signál pomocí fokusovaného excitačního laseru v optickém mikroskopu.

II. Ag NP dimery spojené jedinou molekulou představují ideální systém pro studium jednomolekulové dynamiky jedné molekuly pomocí sledování časového vývoje jeho SERS signálu. Výhodou dimeru oproti malým agregátům je, že jeho SERS signál pochází z jediného hot spotu, kdežto u malých agregátů se může jednat o superpozici molekulárních událostí z několika hot spotů. Ag NP dimer s molekulární spojkou je navíc přesnou experimentální realizací teoretického modelu. Podle teoretických výpočtů se mezi nanočásticemi nachází hot spot, tedy místo s největším SERS zesílením EM mechanismem. Je pozoruhodné, že z časového vývoje SERS signálu z Ag NP dimeru vytvořeného pomocí DAAB vyplývá, že molekulární spojka DAAB “přežívá” v takto extrémně silném optickém poli bez známek rozkladu.

1. Introduction

1.1. Mechanisms of Surface - enhanced Raman scattering (SERS)

SERS originates from coupled optical responses of plasmonic metal (such as Ag and Au) nanostructures (nanoparticles, nanowires etc.) and of molecules located on (or in a close proximity of) their surfaces (Fig.1.1). In such coupled system, both the incident light and the light inelastically (Raman) scattered by adsorbed molecules are enhanced by resonance Mie scattering of light by the

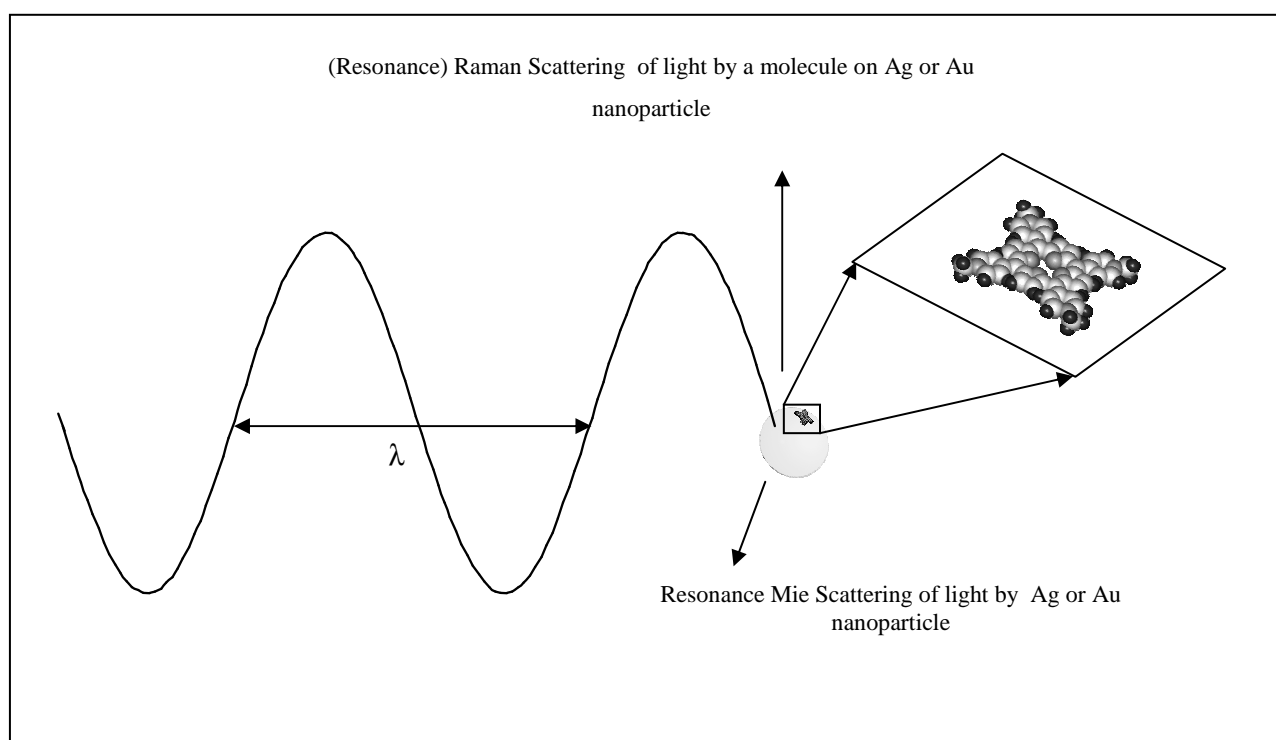


Fig. 1.1.: Schematic depiction of surface-enhanced Raman scattering.

plasmonic metal nanostructures. This, in a nutshell, is the electromagnetic (EM) mechanism of SERS. The EM mechanism of SERS is the principal mechanism of SERS and operates independently on the nature of the target molecular species. Explanation of the phenomenon of SERS on the basis of the light amplification by free-electron-like (plasmonic) metal nanostructures has been published [1] just one year after its discovery [2]. Provided that the wavelength of incident light obeys simultaneously with the EM resonance condition also a molecular resonance condition, molecular resonances contribute to the overall enhancement of Raman scattering. The mechanisms and applications of SERS have been the subject of several seminal review and feature articles [3 -13].

1.2. Single molecule SERS

Single molecule surface-enhanced Raman spectroscopy (SM-SERS) has been reported about fifteen years ago [14, 15], The growing interest in SM-SERS [9, 11, 16 – 20] is part of a resurgence of interest in SERS generally which has emerged from several contributing causes, among them the unique physical and chemical properties of nanostructures [21] and the development of the field of plasmonics [22].

SM-SERS has been reported for the first time by Kneipp et al. [14]. In their Raman microspectroscopic measurements of very small volumes of a highly diluted hydrosol of small Ag nanoparticle aggregates containing cresyl violet in 1×10^{-14} M concentration, there was on average 0.6 molecules in the probed volume. SERS signal obtained from this system in 1 s intervals showed temporal fluctuations. A histogram of signal intensities for a particular Raman band showed, instead of a Gaussian profile obtained for more concentrated systems, a Poisson distribution of signal intensities, which was attributed to acquisition of the signal from 0, 1, 2 or 3 molecules. Kneipp's results immediately evoked a question whether single molecule SERS and SERRS are explicable by a combination of the EM and molecular resonance mechanisms. The answer was provided chiefly through calculations of Kall and coworkers [23 – 25], which have shown that, indeed, for a molecule located in a hot spot between two Ag nanoparticles and excited by light polarized parallel to the dimer axis, the EM mechanism enhancement can be of 1×10^{11} , and when combined with another three orders of magnitude provided by a molecular resonance, it can achieve the 1×10^{14} enhancement [11] observed experimentally. In addition to that, observation of temporal fluctuations of the SERS signal (so called “blinking”) has been interpreted as manifestation of a dynamic behavior of a single, or of very few molecules [12, 14, 20, 26, 27].

2. Aims of the study

1. Experimental realization, i.e. design, preparation and characterization of Ag nanoparticle assemblies for which the presence of hot spots (i.e. strong optical fields after an appropriate optical excitation) has been predicted theoretically in accurate or simplified models previously published.
2. Designing and testing approaches to localization of molecules into the hot spots and obtaining of SERS or SERRS signal of these molecules, and, whenever possible, also its time-evolution.
3. Interpretation of the SERS and/or SERRS spectra and their temporal evolutions in terms of dynamics of molecules incorporated into a particular Ag nanoparticle assembly, with an ultimate goal to approach single molecule level of detection, and, consequently a possibility to follow single molecule dynamics within a particular Ag nanoparticle assembly
4. Pinpointing of the factors which are important for a successful localization of molecules into hot spots in various Ag nanoparticle assemblies and of the factors which affect the stability of the testing molecules in strong optical fields.

3. Material and methods

3.1. Instrumentation

Electronic absorption spectra were measured with a Perkin Elmer Lambda 12 UV-Vis spectrometer.

Transmission electron microscopy (TEM) images of the samples were obtained with a JEOL JEM 200 CV transmission electron microscope. The instrumental magnification varied from 20 000 to 150 000.

Scanning electron microscopy (SEM) images of samples deposited on glass slides were obtained with a FESEM microscope (Quana 200 FEG, FEI).

SERS micro-Raman spectra of selected Ag nanoparticle aggregates attached to chemically derivatized TEM grids or glass slides were collected through a confocal optical microscope using a micro-Raman Labram-HR spectrometer (Jobin-Yvon/Horiba) operating in either the spectral or the imaging mode. Measurements were performed with the 514.5 nm Ar⁺ laser excitation line with incident laser power of 10 mW and a laser spot size of ca. 0,7 μm. Spectral acquisition time was 2 s.

3.2. Preparation procedures

Ag hydrosol H I was prepared by reduction of AgNO₃ by NaBH₄ in aqueous ambient, in particular by a modification [28] of the procedure originally reported in [29].

Ag hydrosol H II was prepared by reduction of silver nitrate (AgNO₃) by sodium citrate (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O) in aqueous ambient according to the procedure by Lee and Meisel [30].

Pentylamine stabilized Ag nanoparticle organosol was prepared by a reduction of silver nitrate with sodium borohydride in water/chloroform two phase system in the presence of octaethylammoniumbromide.

Preparation of chemically modified supporting surfaces for TEM and micro-Raman measurements: SiO_x/formvar coated copper grids for TEM microscopy (Agar Scientific, Ltd.) were pre-treated by vapor-deposition of a thin carbon layer on their reverse sides. The outer SiO_x layer of the grids was derivatized by 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) through condensation of the reagent vapor onto the grids and removal of the excess reagent in vacuo.

Preparation of samples of protoporphyrin IX (PPIX) / Ag nanoparticle systems: Ag hydrosol/NaCl/PPIX systems containing PPIX incorporated in compact Ag nanoparticle aggregates. Samples were prepared by modification of Ag nanoparticles by addition of NaCl to Ag hydrosol, followed by addition of aqueous solution of PPIX.

Preparation of samples of PPIX incorporated in compact Ag nanoparticle aggregates for TEM and micro-Raman measurements: The derivatized grids were allowed to float on the surface of Ag hydrosol/NaCl/PPIX system for 3 h to enable the attachment of compact aggregates of Ag nanoparticles to the amine-groups on the surface of the derivatized grids.

Preparation of samples of dimers and small aggregates in aqueous ambient by selected molecular linker: To enable for Raman spectral probing and TEM imaging of the same sample, the dimers and small aggregates were assembled on chemically derivatized SiO_x/formvar coated copper grids for TEM microscopy by a three-step procedure involving:

- (1) tethering the Ag nanoparticles to the grids with APTMS during floating of the grids on Ag colloid surface
- (2) attaching the linker molecules to the tethered Ag nanoparticles during immersion of the grids into solution of molecular linker
- (3) exposing the grids to Ag nanoparticle hydrosol for a second time, during which additional nanoparticles linked to the particles already tethered to the grid surface through the free amine groups of the linker molecules. The appropriately wide spacing of aggregates (allowing for a single nano-object selection) was accomplished by optimization of the preparation steps duration.

Preparation of samples of 5, 10, 15, 20 – tetrakis (4-aminophenyl) porphine (TAPP)-bridged Ag nanoparticle dimers and small aggregates originating from the organic ambient: Samples were prepared by mixing of chloroform solutions of TAPP with the organosol of pentylamine-capped Ag nanoparticles under constant stirring. Glass slides were thoroughly cleaned and derivatized by immersion into neat APTMS for 3h. After rinsing with ethanol, the slides were immersed into the Ag organosol-TAPP system for 3 h.

Preparation of samples of TAPP-bridged Ag nanoparticle dimers and small aggregates originating from the aqueous ambient: The derivatized TEM grids were allowed to float on the surface of a Ag nanoparticle hydrosol to allow Ag nanoparticles to bond to the amine-groups on the

surface of the derivatized grids. Subsequently, the grids were immersed in a solution of TAPP in ethanol. Finally, the grids were allowed to float again on the surface of Ag nanoparticle hydrosol.

Preparation of samples of Ag nanoparticle / 4, 4' - diaminoterphenyl (DATP) systems and Ag nanoparticle / 4, 4' - diaminoazobenzene (DAAB) systems: The derivatized TEM grids were allowed to float on the surface of Ag nanoparticle hydrosol. Subsequently, the grids were immersed in a solution of DATP or DAAB in ethanol. Finally, the grids were allowed to float again on the surface of Ag nanoparticle hydrosol.

4. Results and discussion

4.1. Compact Ag nanoparticle aggregates incorporating PPIX molecules

TEM images as well as SERRS-micro-Raman spectra of single compact aggregates of chloride-

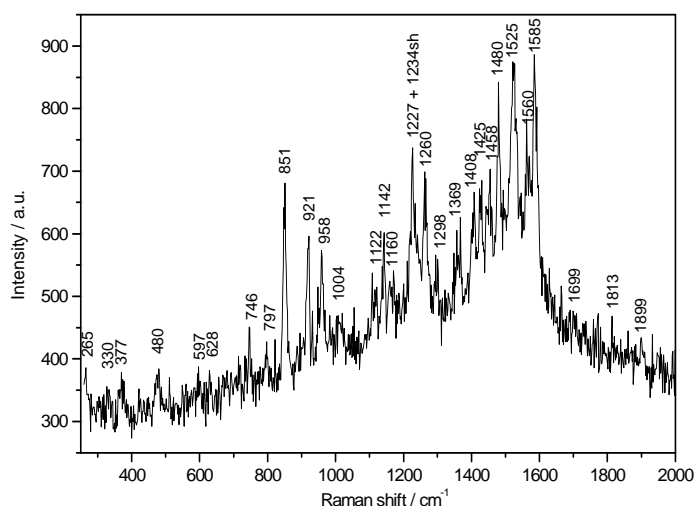


Figure 4.1: SERRS spectrum of PPIX obtained from a single aggregate of chloride-modified Ag nanoparticles incorporating PPIX molecules

modified Ag nanoparticles incorporating PPIX molecules were acquired from the same sample of the aggregates attached to the surface of APTMS derivatized, SiO_x coated TEM grid. SERRS spectra from several single compact aggregates were acquired using 514.5 nm excitation. The SERRS signal showed large temporal fluctuations as well as variations from one aggregate to another. Nevertheless, within the signal fluctuations, SERRS spectra showing the characteristic bands of PPIX were obtained in Figure 4.1. The number of PPIX molecules per a single compact aggregate was estimated to be ca 40 (or less) under the conditions of our experiment. Temporal fluctuations of the signal which are usually associated with a single molecule level of detection indicated, that only a few of the overall amount of molecules per aggregate actually contribute to the detected signal.

4.2. TAPP-bridged Ag nanoparticle dimers and small aggregates

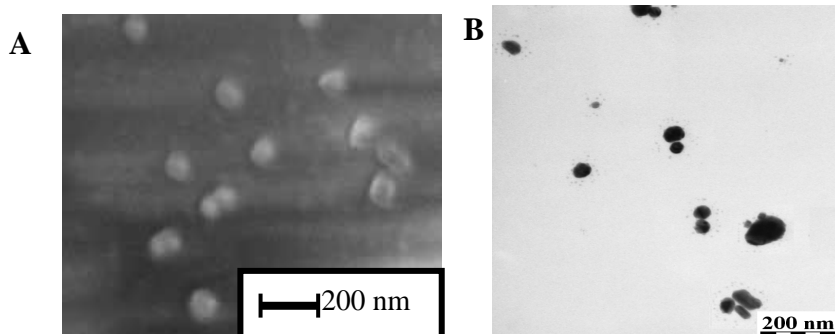


Figure 4.2: A) SEM image of a sample of TAPP – bridged, pentylamine-capped Ag nanoparticles, B) TEM image of a sample of TAPP – citrate-capped Ag NPs

Dimers and small aggregates of Ag nanoparticles bridged (linked) by TAPP were prepared both in organic (pentylamine-derivatized Ag nanoparticles) and in the aqueous ambient (citrate-derivatized Ag nanoparticles) and assembled on glass slides and on TEM grids, respectively.

SEM image of a sample of TAPP-bridged, pentylamine

capped Ag nanoparticles and TEM image of that of TAPP bridged, citrate capped Ag NPs are shown in Figure 4.2 A and B, respectively. SERS spectra obtained from the sample of TAPP-bridged,

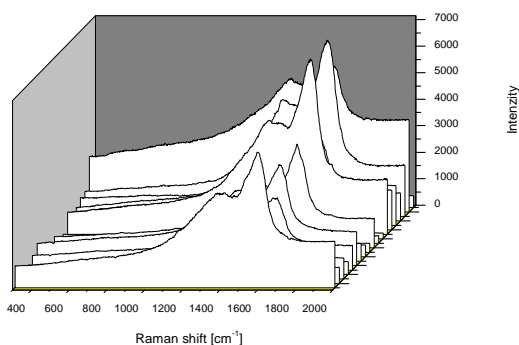


Figure 4.3: Time-evolution of SERS spectra obtained from the samples shown in Fig. 4.2 A

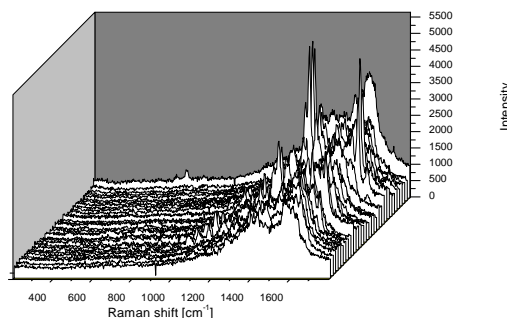


Figure 4.4: Time-evolution of SERS spectra obtained from the samples shown in Fig. 4.2 B

pentylamine capped Ag NPs are governed by the signal of graphitic carbon, which shows enormous temporal fluctuations of the signal intensity (Figure 4.3), and, in some of these spectra, a few narrow bands attributable to TAPP. By contrast, SERS spectra obtained from the sample of TAPP bridged, citrate capped Ag NPs show temporal fluctuations of the signal in which the characteristic spectral bands of the bridging TAPP molecules can clearly be distinguished (Figure 4.4). SERS signals collected from both samples indicate that bridging TAPP molecules undergo photodecomposition. For pentylamine capped dimers and small aggregates, this decomposition is very fast and actually prevents detection of a meaningful porphyrin signal, for citrate capped dimers and aggregates, the process is much slower and allows for TAPP detection. One of the possible explanations of this difference can be related to a low ordering of the capping pentylamine monolayer which might be responsible for re-orientation of porphyrin molecules and for a direct contact between the porphyrin macrocycle and Ag NP surface, which in turn, may promote photodecomposition of TAPP molecules.

4.3.DATP-bridged Ag nanoparticle dimers and small aggregates

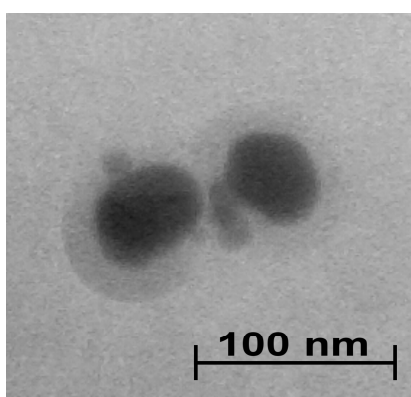


Figure 4.5: TEM image

Ag NPs were assembled into dimers and small aggregates by a bifunctional, amine-terminated rigid aromatic linker 4,4'-diaminoterphenyl (DATP). The aggregates were assembled on the surfaces of SiO_x-coated TEM finder grids functionalized by APTMS.

The intention in carrying out the SERS spectral measurements from a selected single dimer and/or aggregate was to obtain an unequivocal correspondence between the morphology of the

aggregate and the SERS signal obtained from it. This was accomplished by determination of the aggregate position with help of the markers on a finder grid. This exact aggregate position was

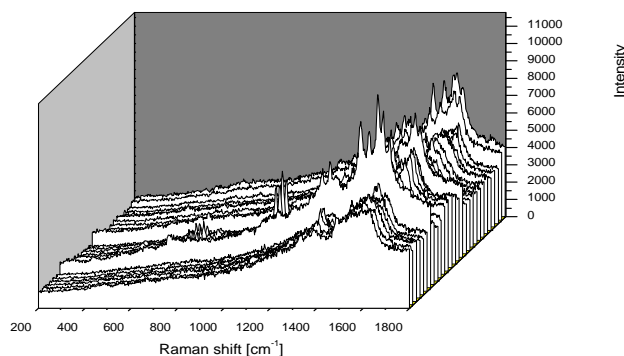


Figure 4.6: Time-evolution of SERS signal of a selected DATP-bridged Ag nanoparticle aggregate.

located on both the optical image of the sample prior to the SERS measurement, and on the TEM image, which revealed the aggregate morphology in detail (Figure 4.5).

Time-evolution of SERS spectra measured from this particular aggregate (Figure 4.6) shows that the SERS signal fluctuates in time. In particular, the signal of DATP alternates with that of graphitic carbon, represented by two distinct, rather broad bands. A possible scenario explaining the observed blinking pattern is decomposition of the bridging DATP molecule in at least one of the several hot spots within the aggregate into graphitic carbon. However, since the observed signal likely originates from more than one hot spot, the observed time evolution cannot be interpreted in terms of a single molecular dynamics event. Nevertheless, the observed results indicate that DATP molecules decompose in strong optical fields into graphitic carbon.

Our results thus provide experimental evidence for the presence of the theoretically predicted strong optical fields in small, molecularly-bridged Ag NP aggregates and for the localization of the bifunctional linking molecules in these hot spots.

4.4. DAAB-bridged Ag nanoparticle dimers and small aggregates

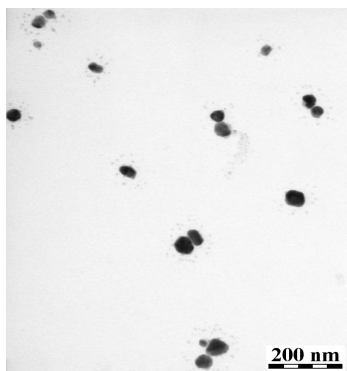


Figure 4.7: TEM image of DAAB-linked Ag nanoparticle aggregates

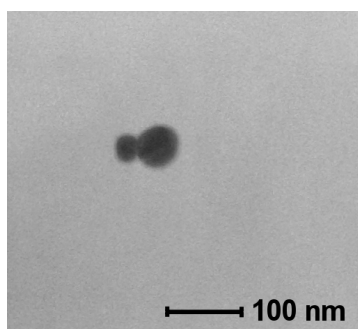


Figure 4.8: TEM image of a selected DAAB-linked Ag nanoparticle dimer

Ag NPs were assembled into dimers and small aggregates by a bifunctional, amine-terminated linker DAAB. The dimers and small aggregates were assembled on the surfaces of SiO_x-coated TEM finder grids functionalized by APTMS.

The TEM image in Figure 4.7 shows that the dimers are oriented parallel to the surface of the functionalized TEM grid. It appears that after formation of the dimer, i.e. after the attachment of a second Ag NP to the second (i.e. still free) amine-group of the DAAB linker, the dimer re-orientates with respect to the surface in such a way that both Ag NPs in the dimer are attached to the APTMS-functionalized TEM grid surface.

In SERS spectral measurements from a selected single dimer and/or aggregate, our intention was to obtain an unequivocal correspondence between the morphology of the selected Ag nanoparticle dimer and the SERS signal obtained from it. This was accomplished by determination of the dimer position with respect to the markers on a finder grid. This exact position of the dimer with respect to the markers was located on both the optical image of the sample prior to the SERS measurement, and on the TEM image, which revealed the details of its morphology (Figure 4.8).

Time-evolution of SERS spectra measured from this particular dimer (Figure 4.9) shows that the SERS signal fluctuates, giving rise to an “in” and “off” signal pattern. The “in” signal observed in this particular

time-evolution in the 8th and 14th spectrum of the series contains characteristic marker bands of DAAB, while the “off” signal consists of a broad background (Figure 4.9, details in Figure 4.10). Comparison of the two “in” spectra reveals that 9 of the 12 characteristic bands of DAAB observed in the 8th spectrum (Figure 4.10, spectrum A) were detected also in the 14th spectrum (Figure 4.10, spectrum C). We can thus conclude

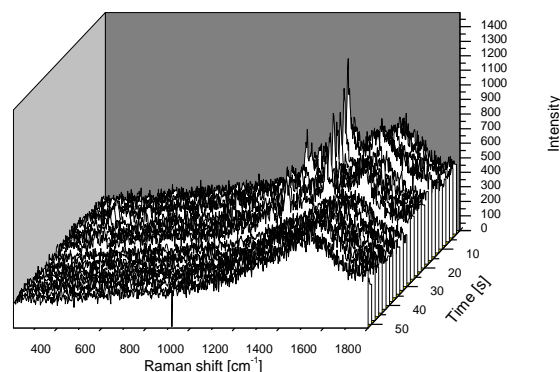


Figure 4.9: Time-evolution of SERS signal obtained from the dimer shown in Figure 4.8

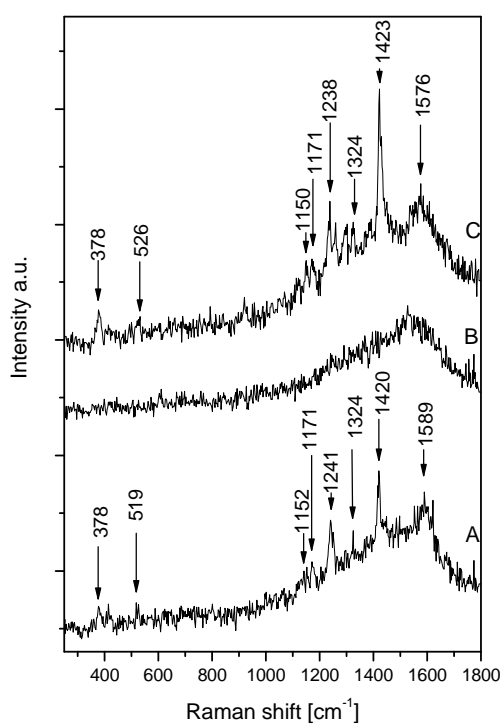


Figure 4.10: The “signal in” spectra, namely the 8th (A) and the 14th (C) spectrum, and the signal “off” spectrum (B) within the SERS spectral set depicted in Figure 4.9

interparticle distance [23], it is probable that the 514.5 nm excitation wavelength suitable for excitation of a strong optical field in the bridged dimer (Figure 4.11 A) is no longer “in resonance” with the disconnected (and hence elongated) dimer which is the reason why no SERS signal of DAAB is observed. After remaking of this Ag-NH₂ bond, the bridging of two Ag nanoparticles by DAAB is resumed, and the SERS signal of DAAB is recovered.

that the majority of SERS spectral bands of DAAB were recovered in the second signal “in” spectrum. The broad background in Figure 4.10, spectrum B shows traces of graphitic carbon spectral bands.

It is generally agreed that blinking reflects the dynamics of a single, or very few molecules. A simple hypothesis which appears to be pertinent to the signal fluctuations pattern observed in our particular case is thus proposed. The “in” signals are assigned to Ag nanoparticle dimer bridged by DAAB (Figure 4.11 A), while the “off” signal periods are attributed to a temporally limited loss of the DAAB signal caused by breaking of one of the Ag-NH₂ bonds which leads to disconnection of the DAAB bridge (Figure 4.18B). The disconnected nanoparticles are supposed to remain tethered to the grid by APTMS chains, however, the distance between them increases.

Since the wavelength for resonance excitation of strong optical field in a Ag nanoparticle dimer is strongly dependent on

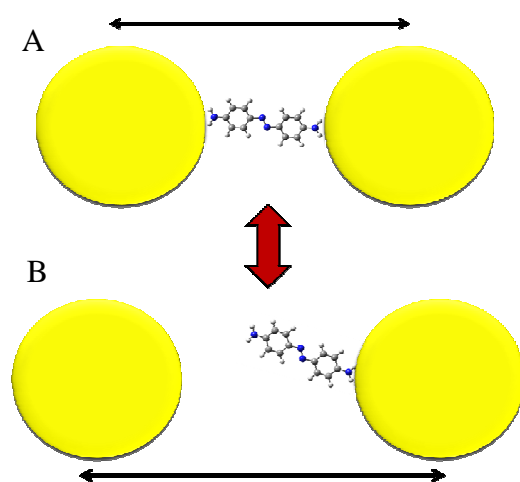


Figure 4.11: Ag NP dimer

- A) bridged by DAAB (signal “in”)
- B) disconnection of the DAAB bridge (signal “off”)

4.5. Factors affecting stability of adsorbates and linkers in strong optical fields

SERS and SERRS signal from a single compact aggregate incorporating PPIX molecules shows rapid alternations of the porphyrin and of the graphitic C signal. The porphyrin signal is a superposition of the free-base and of the Ag metallated porphyrin spectral features, and indicates the presence of both H₂PPIX and Ag PPIX molecules in the aggregate. In a previously published study [31] dealing with the thermal stability of another free-base porphyrin, 5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl) porphine (TMPyP), in strong optical fields, it has been demonstrated that Ag TMPyP surface species formed by Ag metallation of H₂ TMPyP on Ag nanoparticle surface is prone to decomposition to graphitic C, in contrast to the native H₂ TMPyP. On the basis of this result, we propose tentatively that the graphitic C signal probably originates from decomposition of Ag PPIX molecules formed by H₂PPIX metallation.

SERRS spectra obtained from several dimers and small aggregates bridged by TAPP molecules are markedly different for aggregates assembled from the citrate-capped Ag NPs in aqueous ambient and from the pentylamine-capped Ag NPs in organic ambient. In particular, in the former case,

fluctuating SERRS signal of TAPP molecules has been detected. The porphyrin molecules are preserved in the free-base form, and they are most probably attached to Ag NP surface by one or two amine groups of the peripheral aminophenyl substituents, adopting a perpendicular orientation to Ag NP surface and acting as molecular linkers of Ag NPs. On the other hand, in the latter case, only very strong, fluctuating signal of graphitic C is observed. A possible explanation stems from the difference in the quality of the pre-orienting matrices formed by the capping molecules: citrate and/or pentylamine. Citrate, bidentately coordinated by two carboxylate groups to Ag NP surface, forms a very efficient pre-orienting matrix (as demonstrated also in [32]) ensuring adsorption of the porphyrin in the perpendicular orientation with respect to Ag NP surface ("standing up"). By contrast, the aliphatic chains of pentylamine molecules are most probably twisted and randomly oriented, thus allowing for re-orientation of porphyrin molecules into a parallel orientation with Ag NPs surface, their metallation and decomposition to graphitic C. Finally, it should be emphasized that citrate has been shown to act as an efficient pre-orienting matrix for other linkers, namely DATP and DAAB.

Time-evolution of SERS signal obtained from the DAAB-bridged Ag NP dimer shows alternation of "signal in" and "signal off" periods. The SERS signal is constituted by SERS spectral bands of DAAB, and its evolution indicates that DAAB molecules do not decompose in strong optical fields. On the other hand, time-evolution of SERS signal from DATP-bridged small aggregate shows alternations of DATP and of the graphitic C signal. Considering the differences between the time-evolutions of SERS signal from the DAAB-bridged Ag NP dimer and from DATP-bridged Ag NP aggregate, we have to take into account that, in the former case, the SERS signal originates from a single hot spot between the two Ag NPs, while, in the latter case, the SERS signal represents a superposition of signals obtained from several hot spots. Nevertheless, observation of strong graphitic carbon signal indicates decomposition of DATP molecule(s) in at least one of the several hot spots. Both the molecular structure of DAAB and DATP linkers and the actual structure of Ag NP assembly (dimer or aggregate) can contribute to their different propensity towards decomposition. In the case of the DAAB-bridged dimer, a trans-cis isomerization of DAAB could possibly play a positive role in the Ag NP-DAAB bond breaking which leads to increased distancing of the NPs in the dimer and to a temporal "switch off" of the strong field which, in turn, can be responsible for DAAB molecule(s) preservation. By contrast, none of these possibilities applies to the case of DATP-bridged small Ag NP aggregate, since (i) the DATP linker molecule is rigid and (ii) even in the case of a temporal single Ag NP-DATP bond breaking, the remaining hot spots in the aggregate will remain preserved.

5. Conclusions

- I. Methodologies of assembling compact aggregates, dimers and small aggregates of Ag NPs and of their anchoring to supporting surfaces have been developed. The supporting surfaces were either glass slides or SiO_x – coated Cu or Au grids for TEM, both chemically functionalized by APTMS. Compact aggregates of Ag NPs were assembled and PPIX molecules were incorporated into them in a hydrosol system and subsequently, they were chemically attached to NH₂ terminal groups of APTMS – functionalized Cu grids for TEM. The basic methodology for preparation of a sample from which SERRS spectra of an adsorbate (PPIX) could be obtained by Raman microspectroscopy from a single compact aggregate after visualization of the sample by TEM has thus been developed. A similar strategy has been elaborated for attachment of Ag NP dimers and small aggregates assembled by a TAPP linker in a hydrosol system to chemically functionalized, SiO₂ coated TEM grids. Ag NP dimers and small aggregates bridged by TAPP and assembled and in a pentylamine – stabilized Ag NP organosol were attached to APTMS – functionalized glass slides and SEM has been employed for their visualization. Finally, the strategy for obtaining SERS signal of molecular linker from a particular, selected single dimer and/or small aggregate

of Ag NPs visualized by TEM has been developed by further substantial refinement of the procedures elaborated and tested in the previous studies. The key points of this refinement were:

- 1) assembling of dimers and small aggregates by a three – step procedure involving
 - i) attachment of isolated Ag NPs to the NH₂ groups of the APTMS functionalized Au finder TEM grid
 - ii) attachment of molecular linker (with two functional NH₂ groups in para position) to Ag NPs by a one terminal NH₂ group
 - iii) attachment of Ag NPs to the second, free terminal NH₂ group of the linker
- 2) Control over the perpendicular orientation of the bifunctional linker and its attachment by one terminal group to Ag NP surface has been accomplished by functionalization of Ag NPs by adsorbed citrate (in the course of the Ag NP hydrosol preparation by reduction AgNO₃ by Na₃C₆H₅O₇·2H₂O) which acted as the adsorbate pre – orienting matrix. The evidence for the importance of the pre – orienting matrix for a successful function of a linker has been provided already in the study of TAPP bridged dimers and aggregates assembled in the sol systems, in which adsorbed citrate manifested itself to be a substantially better pre – orienting matrix than pentylamine..
- 3) Control over the resulting dimer (small aggregate) separation from other dimers and small aggregates by a sufficiently wide spacing of Ag NPs in the first step (i) of the three – step procedure, achieved by dilution and by very short time of exposure of the derivatized surface to Ag sol.
- 4) An unequivocal correspondence between the TEM – imaged dimer (and/or small aggregate) and the SERS signal obtained from it has been accomplished by employment of SiO₂ coated Au finder grids for TEM. An accurate establishment positional coordinates of the nanoobject (dimer or aggregate) with respect to the marks (letter or number) on the finder grid enabled to find the same nanoobject both in TEM (for its visualisation) and in the optical microscope which focused exciting laser beam onto it and enabled to obtain SERS signal of the molecular linker from it.

II. The single molecularly – bridged Ag NP dimer represents an optimal system in which the single molecule dynamics can be followed via time – evolution of the SERS signal of the molecule linker obtained from it. The advantage of a dimer over a small aggregate is, that the SERS signal of the dimer originates from a single hot spot, while, in case of a small aggregate, the SERS signal is a superposition of molecular dynamic events occurring in several hot spots. Furthermore, the molecularly – bridged Ag NP dimer is an exact experimental realization of a model system of Ag NP dimer with a single molecule located in a single hot spot at the interconnect between the two NPs. According to the theoretical model calculations, a dimer of Ag NPs with the molecule located between them is also the most efficient light amplification system providing largest enhancement of SERS by the EM mechanism. Importantly, evaluation of the temporal fluctuation of SERS signal of DAAB linker obtained from the DAAB – bridged Ag NP dimer shows, that the DAAB linker “survives” in such extreme by strong optical field without decomposition.

6. Reference / References

- [1] M. Moskovits, *J. Chem. Phys.* 69 (1978) 4159
- [2] D.L. Jeanmaire, R.P.V. van Duyne, *J. Electroanal. Chem.* 84 (1977) 1
- [3] M. Moskovits, *Rev. Mod. Phys.* 57 (1985) 783.
- [4] J.A. Creighton, *Spectroscopy of Surfaces*, R.J.H. Clark, R.E. Hester (Eds.), John Wiley & Sons, New York, 1988, p. 37
- [5] A. Otto, in: M. Cardona, G. Guntherodt (Eds.), *Light in Solids IV*, Springer-Verlag, Berlin, 1984, p. 289
- [6] T.M. Cotton, *Spectroscopy of Surfaces*, R.J.H. Clark, R.E. Hester (Eds.), John Wiley & Sons, New York, 1988, p. 91
- [7] D.A. Weitz, S. Garoff, J.I. Gersten, A. Nitzan, *J. Chem. Phys.* 78 (1983) 5324
- [8] A. Champion, P. Kambhampati, *Chem. Soc. Rev.* 27 (1998) 241
- [9] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R.R. Dasari, M.S. Feld, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2957
- [10] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R.R. Dasari, M.S. Feld, *J. Phys. Condens. Matter* 14 (2002) R597.
- [11] M. Moskovits, L.L. Tay, J. Yang, T. Haslett, *Top. Appl. Phys.* 82 (2002) 215
- [12] M. Moskovits, *J. Raman Spectr.* 36 (2005) 485
- [13] G.A. Baker, D.S. Moore, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1751.
- [14] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L.T. Perelman, I. Itzkan, R.R. Dasari, M.S. Feld, *Phys. Rev. Lett.* 78 (1997) 1667.
- [15] S. Nie, S.R. Emory, *Science* 275 (1997) 1102
- [16] A.M. Michaels, J. Jiang, L. Brus, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 11965.
- [17] K.A. Bosnick, J. Jiang, L. Brus, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 8096.
- [18] W.E. Doering, S. Nie, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 311.
- [19] P.C. Andersen, M.L. Jacobson, K.L. Rowlen, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 2148.
- [20] A.R. Bizarri, S. Cannistraro, *Phys. Rev. Lett.* 94 (2005) 068303.
- [21] G. Schmid, *Nanoparticles: From Theory to Application*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004
- [22] S.A. Maier, *Curr. Nanosci.* 1 (2005) 17.
- [23] H. Xu, J. Aizpurua, M. Käll, et al.: *Phys. Rev. E* 62 (2000) 4318
- [24] P. Johansson, H. Xu, M. Käll, *Phys. Rev. B* 72 (2005) 035427.
- [25] M. Käll, H. Xu, P. Johansson, *J. Raman Spectrosc.* 36 (2005) 510
- [26] H. Xu, E.J. Bjerneld, M. Käll, L. Borjesson, *Phys. Rev. Lett.* 83 (1999) 4357
- [27] M. Sladkova, B. Vlckova, P. Mojzes, M. Slouf, C. Naudin, G. Le Bourdon, *Faraday Discuss.* 132 (2006) 121
- [28] B. Vlčková, P. Matějka, J. Šimonová, P. Pančoška, K. Čermáková, V. Bamruk, *J. Phys. Chem.*, 97, (1993) 9719
- [29] A.M. Ahern, R.L. Garrell, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2813
- [30] Lee P. C., Meisel D.: *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 3391
- [31] K. Šišková, B. Vlčková, P.-Y. Turpin, A. Thorel, M. Procházka, *J. Phys. Chem. C* 115 (2011) 5404
- [32] K. Šišková, B. Vlčková, P.-Y. Turpin, A. Thorel, A. Grosjean, *Vib. Spec.*, 48 (2008) 44

7. Seznam publikací / Selected publications

7.1. Seznam recenzovaných publikací / List of publications

1. **M. Sládková**, B. Vlčková, I. Pavel, K. Šišková, M. Šlouf: *Surface-enhanced Raman scattering from single molecularly bridged silver nanoparticle aggregate*- Journal of Molecular Structure (2009), 924-26, 567
2. B. Vlčková, M. Moskovits, I. Pavel, K. Šišková, **M. Sládková**, M.Šlouf: *Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy from a molecularly-bridged silver nanoparticle dimer* Chemical Physics Letters (2008), 455, 131
3. B. Vlčková, I. Pavel, **M. Sládková**, K. Šišková, M. Šlouf; *Single molekule SERS: Perspectives of analytical applications*, Journal of Molecule Structure (2007), 834, 452
5. **M. Sládková**, B. Vlčková, P. Mojzeš, M. Šlouf, C. Naudin, G. Le Bourdon: *Probing strong optical fields in compact aggregates of silver nanoparticles by SERRS of protoporphyrin IX*, Faraday Discussion (2006) 132, 121

7.2. Seznam konferenčních příspěvků / List of conference contributions

1. **M. Sládková**, B. Vlčková, K. Šišková, I Pavel, M. Šlouf: “Surface-enhanced Raman scattering from a single molecularly bridged silver nanoparticle aggregate”, XXIX European Congress on Molecular Spectroscopy, Rijeka, Croatia, 31.8 – 5.9. 2008, Book of Abstracts, p. 340
2. **M. Sládková**, B. Vlčková, I. Pavel, K. Šišková, M. Moskovits, M. Šlouf: “Vývoj a optimalizace systému pro SERRS spektrální detekci na úrovni jedné molekuly”, 13. spektroskopická konference, Lednice, Česká Republika, 21-18.06.2007, Proceedings, p. 36
3. P. Šmejkal, B. Vlčková, I. Pavel, M. Moskovits, **M. Sládková**, K. Šišková, M. Šlouf: “Nanocomposites with strong optical resonances: Silver nanoparticles-organic molecules systems” 2nd Multifunctional Nanocomposites and Nanomaterials Conference, Sharm El Sheikh, Egypt, 11–13.1. 2008, Proceedings of the ASME, p. 193
4. M. Dvořáková, **M. Sládková**, B. Vlčková: “Využití elektronové absorpční spektroskopie ke studiu agregace kationtového porfyritu ve vodném prostředí”, 13. spektroskopická konference, Lednice, Česká Republika, 21-18.06.2007, Proceeding, p. 92
5. **M. Sládková**, B. Vlčková, P. Šmejkal, P. Mojzeš, M. Šlouf: “SERRS spectral study of protoporphyrin IX in system with native Ag hydrosol modified by chlorides in acidic and neutral ambient”, 12th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Paris, France, 1.-6.9. 2007, Book of Abstracts, p. 301
6. B. Vlčková, M. Moskovits, I. Pavel, **M. Sládková**, K. Šišková, M. Šlouf: “Single molekule SERS: perspectives of analytical applications” 28th European congress on molecular spectroscopy, Istanbul, Turkey, 3. – 8. 9. 2006; Book of Abstracts, p. 10

7. **M. Sládková**, B. Vlčková, M. Moskovits, I. Pavel: “Temporally fluctuating SERS signals from porphyrin-bridged silver nanoparticle dimers and small aggregates”, 2nd International Conference on Bioengineering and Nanotechnology, Santa Barbara, California, 5.–7.9. 2006, Abstracts SBE's, p. 30
8. **M. Sládková**, K. Šišková, T. Tomblér, B. Vlčková, M. Moskovits: “Possibilities to control spacing of Ag nanoparticle dimers and aggregates attached to chemically functionalized supporting surfaces: AFM study” International Conference NANO'06, Brno, Czech Republic, November 13.–15. 2006, Abstract Booklet, p. 71 – ISBN: 80-214-3308-6.
9. P. Šmejkal, B. Vlčková, M. Moskovits, I. Pavel, **M. Sládková**, E. Pavlova: “SERS spectral probing of dimers of silver nanoparticles molecularly bridged by various molecules” International Conference NANO'06, Brno, Czech Republic, 13.–15.11. 2006, Abstract Booklet p.35 (ISBN: 80-214-3308-6)
10. B. Vlčková, **M. Sládková**, K. Šišková, P. Mojzeš, M. Šlouf: “Surface-enhanced Raman spectral probing of porphyrins: Towards single molecule detection” ESF Research Conference Biological Surfaces and Interfaces, San Feliu de Guixols, Spain, 18–23 6. 2005, Book of Abstracts p.172.
11. B. Vlčková, M. Moskovits, I. Pavel, **M. Sládková**, K. Šišková, P. Šmejkal, M. Šlouf, J. Hromádková: “Probing strong optical fields in molecularly bridged silver nanoparticle dimers and small aggregates by surface-enhanced Raman scattering” Twelfth Annual International Conference on Composites- Nano Engineering (ICCE-12), August 1–6.8. 2005, Tenerife, Spain. Proceedings Session Nano 6, CD-file Vlckova.pdf
12. B. Vlčková, M. Moskovits, **M. Sládková**, I. Pavel, M. Šlouf, K. Šišková: “Comparing temporally fluctuating SERS signals from samples of porphyrin-bridged silver nanoparticle dimers and small aggregates prepared in the aqueous and in the organic ambient” International Conference NANO'05, Brno, Czech Republic, 8–10.11. 2005; Abstract Booklet p.90 (ISBN: 80-214-3044-3)
13. **M. Sládková**, B. Vlčková, P. Mojzeš, M. Šlouf, G. LeBourdon, C. Naudin: “Probing strong optical fields in compact aggregates of silver nanoparticles by SERRS of protoporphyrin IX”; International Conference NANO'04, Brno, Czech Republic, 13–15.11. 2004, Brno, Proceedings p. 224 (ISBN: 80-214-2793-0)

Životopis

RNDr. Magdalena Michlová

narozena: 04.06.1980

VZDĚLÁNÍ:

vysokoškolské:

2009 udělen titul RNDr

2004 – dosud **UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie
obor: fyzikální chemie (probíhající postgraduální studium)

1998 – 2004 **UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta

obor: fyzikální chemie (magisterský studijní program)

středoškolské:

1994 – 1998 **EKO GYMNÁZIUM PRAHA, o.p.s.** v Praze 10 – maturitní zkouška

ostatní:

08/2003 11th Summer School on Vibrational Spectroscopy in Biophysics and Biochemistry

02/2006 praktický kurz „Optická spektrální analýza“

jazykové znalosti:

06/2005 anglický jazyk – certifikovaná zkouška PET

PRAXE (PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI):

12/2011 - dosud **mateřská dovolená**

11/2009 – 12/2011 **vývojový pracovník, od 11/2010 hlavní řešitel grantu**

Optaglio s.r.o.

- práce na projektech: Fotovoltaický panel nové generace – řešitel grantu

▪ Amorfnní oxidové nanovrstvy – vývojový pracovník

01/2007 – 12/2009 **vědecký pracovník**

Univerzita Karlova v Praze – Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

11/2005 – 06/2006 **vedoucí odborný referent-specialista**

Ministerstvo životního prostředí, Odbor environmentálních rizik

02/2005 – 06/2005 **vedoucí odborný referent-specialista**

Ministerstvo životního prostředí, Odbor environmentálních rizik

PEDAGOGICKÁ ČINNOST:

2004 – 2008 **Univerzita Karlova v Praze - Přírodovědecká fakulta**

- - výuka I. a II. ročníků biologických oborů na PŘF UK – Obecná chemie

Curriculum vitae

RNDr. Magdalena Michlová

born: 04.06.1980

EDUCATION:

Graduate studies:

2009 RNDr degree
2004 – present **CHARLES UNIVERZITY IN PRAGUE**
Faculty of Science, Department of macromolecular and physical chemistry
Ph.D. study program: **Physical chemistry**
1998 – 2004 **CHARLES UNIVERZITY IN PRAGUE**
Faculty of Science, Department of macromolecular and physical chemistry
Master study program: **Physical chemistry**

High school education:

1994 – 1998 **EKO GYMNÁZIUM PRAHA, o.p.s.** in Prague 10

Others:

08/2003 11th Summer School on Vibrational Spectroscopy in Biophysics and Biochemistry
02/2006 practical course „Optical spectral analysis“

Language skills:

06/2005 english language – certified exam PET

EXPERIENCE:

12/2011 - present **maternity leave**
11/2009 – 12/2011 **research and development, from 11/2010 project principal investigator Optaglio s.r.o.**
- projects: New generation photovoltaic devices – principal investigator
Amorphous oxidic nanolayers – researcher
01/2007 – 12/2009 **research associate**
Charles Univerzity in Prague, Faculty of Science, Department of macromolecular and physical chemistry
11/2005 – 06/2006 **leading specialist**
Ministry of the Environment, Department of environmental risks
02/2005 – 06/2005 **leading specialist**
Ministry of the Environment, Department of environmental risks

TEACHING EXPERIENCE:

2004 – 2008 **Charles Univerzity in Prague - Faculty of Science**
- General chemictry - excercises