

## Hochsensitive Bioanalytik mittels oberflächenverstärkter Schwingungsspektroskopie

Thomas G. Mayerhöfer<sup>a,b</sup>, Karina Weber<sup>a,b</sup>, Dana Cialla-May<sup>a,b</sup>, Jürgen Popp<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Leibniz-Institut für Photonische Technologien e.V. (IPHT) Jena

<sup>b</sup> Friedrich-Schiller Universität Jena, Institut für Physikalische Chemie und Abbe Center of Photonics, Jena

Die Schwingungsspektroskopie umfasst eine Gruppe verschiedener Methoden, die in der Analytik wohletabliert sind. Insbesondere die Möglichkeit eine Label-freie Detektion von anorganischen, organischen und biologischen Stoffen anhand ihrer Struktur und den davon abgeleiteten spezifischen molekularen Eigenschaften zu ermöglichen, zeichnet diese Methoden im Vergleich zu anderen analytischen Methoden besonders aus. Allerdings sind die Wirkungsquerschnitte der einzelnen Methoden sehr unterschiedlich und oft nicht ausreichend, um auch für geringste Stoffmengen und Konzentrationen sensitiv zu sein. In solchen Fällen ist es vorteilhaft, sich einer zusätzlichen, quasi vorgeschalteten, Licht-Materie Wechselwirkung mit Hilfe von metallischen Nanostrukturen zu bedienen.

Bei entsprechender Ausgestaltung dieser Nanostrukturen, kann Licht in diese einkopeln und mit den freien Ladungsträgern (Elektronen) wechselwirken. Diese Wechselwirkung führt dazu, dass zeitlich veränderliche Dichten der freien Ladungsträger erzeugt werden, sogenannte Plasmonen. In der unmittelbaren Umgebung der metallischen Nano-Struktur ruft die Wechselwirkung eine substantielle Erhöhung der Feldstärke und damit der Intensität des einfallenden Lichts hervor, oft um mehrere Größenordnungen. Dieser Mechanismus erhöht dementsprechend bei der oberflächenverstärkten Infrarotspektroskopie (SEIRA) den Absorptionsquerschnitt; umso stärker, je ähnlicher sich die Frequenz des Plasmons und die Frequenz der molekularen Schwingung sind. Bei der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (SERS) kommt noch mindestens ein weiterer Effekt hinzu. Hier kommt nicht nur die Feldverstärkung des einfallenden Lichts zum Tragen, sondern auch das inelastisch gestreute Licht kann eine solche Verstärkung erfahren. Deshalb skaliert der Querschnitt der Raman-Streuung in erster Näherung mit der vierten Potenz der Feldverstärkung, im Unterschied zur IR-Absorption, die proportional zur zweiten Potenz der Feld-

verstärkung ist. Dazu kommen noch Effekte, die durch die chemische Bindung zwischen Analyt und Metalloberfläche vermittelt werden und die Verstärkung um ein bis zwei weitere Größenordnungen verstärken können. Da der Wirkungsquerschnitt bei der IR-Spektroskopie von Natur aus wesentlich höher ist, ist die Notwendigkeit einer Signalverstärkung weniger gegeben als bei der Raman-Spektroskopie. Darin begründet liegt die Tatsache, dass SEIRA gewissermaßen noch in den Kinderschuhen steckt, zumindest im Vergleich zu SERS. Trotzdem ist letztere auf dem momentanen Stand noch nicht unbedingt für quantitative analytische Aufgaben gerüstet. Zu gering ist noch die Reproduzierbarkeit der Signale, als dass die Methode für die Routineanalytik geeignet wäre und zu sehr spielen noch Einflüsse wie die Abhängigkeit der Signalverstärkung von den geometrischen Gegebenheiten und der oberflächlichen Zusammensetzung des SERS-Substrats (Veränderungen können hier z.B. durch die von den großen Oberflächen begünstigte Oxidation entstehen; bei Nanopartikeln ist die Signalverstärkung stark von der Aggregation und damit der Zeit nach der Herstellung abhängig) sowie weiteren Einflüssen wie Fluktuationen des Lasers eine Rolle. Eine Möglichkeit um solche Einflüsse weitestgehend auszuschalten, ist die Verwendung der Lab-on-a-Chip-Technologie in

Kombination mit SERS (LoC-SERS). [1, 2] Neben einer automatisierten Messung und reproduzierbaren Messbedingungen, erlaubt sie außerdem auch noch einen hohen Probandendurchsatz, was LoC-SERS zu einem wertvollen (bio-)analytischen Werkzeug macht. Ein entsprechender mikrofluidischer Chip ist in der Abbildung 1 dargestellt.

Der in Abbildung 1 dargestellte Chip verfügt über sechs Einlässe und einem Auslass. Alle Reagenzien werden über ein Computer kontrolliertes Pumpensystem in den Chip eingebracht. Kurz nach dem Haupteinlass des Chips (im oberen Abschnitt des Bildes), wird dem mineralisches Öl der Analyt (hier: Levofloxacin, kurz: Levo) und Wasser zugesetzt. Aufgrund der fehlenden Mischbarkeit bilden sich Wassertropfen aus, in denen der Analyt gelöst ist. In einem weiteren Einlass wird das SERS-aktive Silberkolloid mit einer 1 M wässrigen KCl-Lösung ver- und dem Analyt-Wasser-Tropfen zugemischt. Durch folgende, mäanderförmige Kanalabschnitte wird die Vermischung von Analyt und Silberkolloid/KCl-Lösung sichergestellt.

Um Memoryeffekten vorzubeugen, wurde die Oberfläche der Kanäle mit Oktadecyltrichlorosilan beschichtet und ist damit hydrophob. Der Messpunkt kann variabel im Kanalsystem gesetzt werden, allerdings sollte auf eine gute Durchmischung der Tropfen

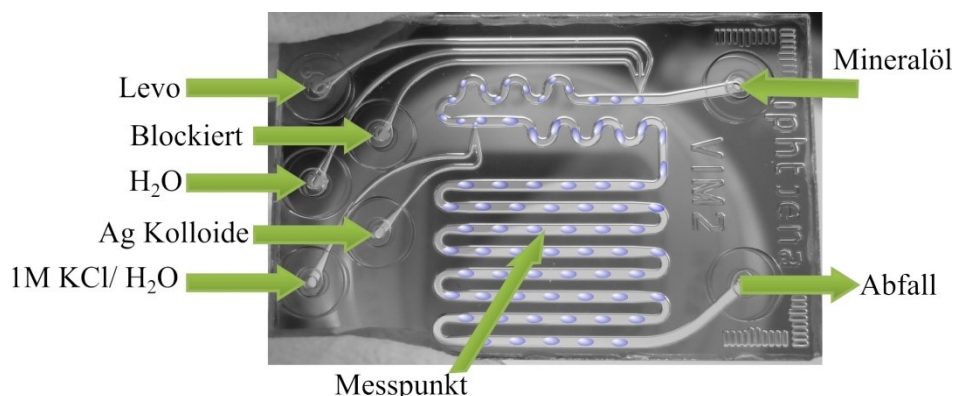


Abb. 1: Bild eines tropfenbasierten, mikrofluidischen Chips, wie er für die LoC-SERS Methode Verwendung findet.

geachtet werden. Die Messung selbst erfolgt mit einem Raman-Mikroskop bei einer Wellenlänge von 514 nm. Abbildung 2 zeigt LoC-SERS Spektren von Levo mit unterschiedlichen Konzentration zwischen 0,714 und 100  $\mu\text{M}$ . [3]

Die Reproduzierbarkeit wie sie mittels LoC-SERS sichergestellt werden kann, ermöglicht also die Detektion von einer Levo-Lösung mit einer Konzentration von weniger als 1  $\mu\text{M}$ . In der medizinischen Diagnostik ist außerdem die Detektion von Levofloxacin von besonderer Bedeutung, da dieser antibiotische Wirkstoff sowohl bei grampositiven als auch gramnegativen Bakterien zur Anwendung kommen kann. Levo zählt zu den Medikamenten mit nur ungenügend empfindlichem oder gar keinem Indikator. Daher ist für seinen therapeutischen Effekt die Medikamentenspiegelbestimmung (*Therapeutic Drug Monitoring, TDM*) von speziellem Interesse. Dieser Spiegel wird vorzugsweise im Urin bestimmt. Daher wurden die LoC-SERS-Messungen auch mit humanem Urin als Matrix vorgenommen. Aufgrund der wesentlich komplexeren Zusammensetzung mit Anteilen von z.B. Harnstoff, Kreatinin etc., verschiebt sich die Nachweisgrenze im Vergleich zu Messungen in Reinstwasser deutlich und liegt für die verschiedenen Patientenproben bei 0,058 mM bis 0,16 mM. Eine lineare Abhängigkeit der Intensität von der Konzentration zwischen 0,45 mM und 1,8 mM konnte für alle untersuchten Urinproben gezeigt werden. [4]

Von klinisch relevanten Anwendungen ist SEIRA noch ein gutes Stück weit entfernt. Bislang wurden oft die gleichen metallischen Nano-Teilchen wie sie für die Raman-Spektroskopie eingesetzt wurden auch für die IR-Spektroskopie verwendet. Diese sind jedoch aufgrund ihrer Größe hauptsächlich für die Verstärkung von Licht mit Wellenlängen im sichtbaren Bereich ausgelegt und zeigen im IR nur vergleichsweise geringe Verstärkungen. Kolloidale Systeme sind weiterhin aufgrund der im IR normalerweise nicht erwünschten Streuung generell weniger geeignet. Stattdessen empfiehlt sich für die IR-Spektroskopie der Einsatz von strukturierten metallischen Oberflächen. Die vielleicht einfachste Struktur

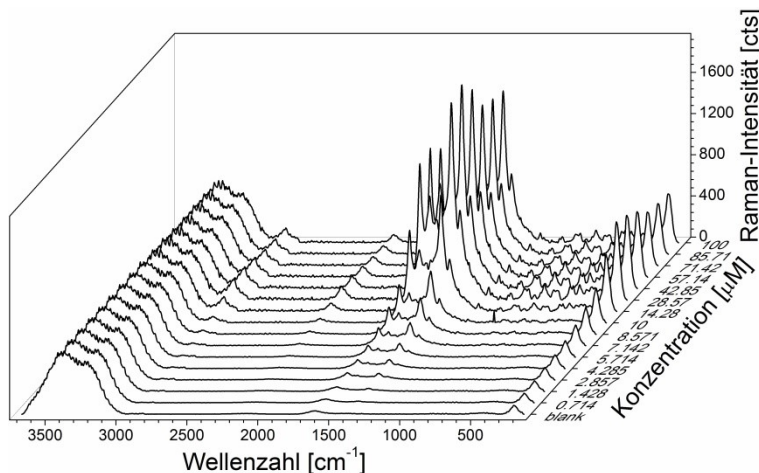


Abb. 2: Mittelwert-SERS-Spektren von Levo in der mikrofluidischen Plattform für verschiedene Konzentrationen. Das mittlere Spektrum von Wasser in derselben Plattform ist zum Vergleich ebenfalls dargestellt (blank).

besteht dabei aus periodisch angeordneten Stäbchen aus Gold, so genannten Nanoantennen, mit einer Länge von etwa 1  $\mu\text{m}$  und einer Dicke von 50 nm auf einem Glassubstrat. [5] Die Länge ist dabei in erster Näherung proportional zur Resonanzwellenlänge. Um die plasmonische Feldverstärkung der Nanoantennen zu vergrößern, kann man unter ihnen einen Spiegel (eine unstrukturierte Metallschicht), ebenfalls aus Gold, anbringen und zwischen Antenne und Spiegel eine Schicht aus einem dielektrischen Material wie z.B.  $\text{SiO}_2$  oder  $\text{Al}_2\text{O}_3$  abscheiden. Nach Optimierung der Dicke dieser dielektrischen Schicht und des Abstands der Stäbchen voneinander, kann die Stärke der Plasmonenresonanz und damit die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge nicht nur sehr groß, sondern quasi perfekt werden. Dazu erhöht man die Dicke der unstrukturierten Metallschicht, bis sie praktisch kein Licht mehr transmittiert (im MIR sorgen Dicken von etwa 50 nm bereits dafür, dass weniger als ein Promille des eingestrahlten

Lichtes transmittiert wird). Modelrechnungen zeigen, dass dann die Reflexion aufgrund der Plasmonenresonanz einen Wert von ebenfalls weniger als ein Promille annehmen kann. Da die Summe aus Absorption, Reflexion und Transmission gleich 1 ist, beträgt die Absorption dann nahezu 100 %. Eine Struktur mit diesen Eigenschaften nennt man einen "perfekten Absorber".

Auch die entsprechend komplementäre Struktur, welche aus periodisch angeordneten Schlitzen in einer metallischen Schicht besteht, ist plasmonisch aktiv. In dieser Struktur sorgt die Anregung von Plasmonen dafür, dass durch die Schlitze deutlich mehr Licht einer bestimmten Wellenlänge hindurchtreten kann, als man geometrisch erwarten würde. Diese "außerordentliche optische Transmission" [6] kann ebenfalls zur Verstärkung der schwingungsspektroskopischen Anregung verwendet werden, da sie ebenso mit einer Erhöhung der Feldstärken einhergeht. Allerdings müsste dazu die Schicht auf ein Substrat abgeschieden werden, welches selbst genügend Durchlässigkeit für MIR Strahlung besitzt. Eine alternative Möglichkeit besteht darin, statt der Transmission die Reflexion zu messen. Um die Empfindlichkeit zu verstärken, kann man das Prinzip der außerordentlichen optischen Transmission mit dem des perfekten Absorbers kombinieren. [7] Dazu bringt man auf einer unstrukturierten Schicht aus Gold eine Schicht aus einem Dielektrikum, beispielsweise  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , auf und darauf wiederum eine Goldschicht, aus der periodisch Schlitze von 1  $\mu\text{m}$  Länge und 50 nm Breite über Elektronenstrahlolithografie herausgeschnitten werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 3 dargestellt.

Bei diesen Schlitzzstrukturen wird im Gegensatz zu den Nano-Antennen die Resonanzwellenlänge nicht durch die Länge bestimmt, sondern durch den Abstand zwischen den Schlitzen senkrecht zur Länge (Periode  $b$  in Abbildung 3). Um nahezu perfekte Absorption bei einer Wellenlänge zu erhalten, wird als Schichtdicke des Dielektrikums 90 nm und als Abstand zum nächsten Schlitz 860 nm bei einer Breite des Schlitzes von 50 nm gewählt (diese

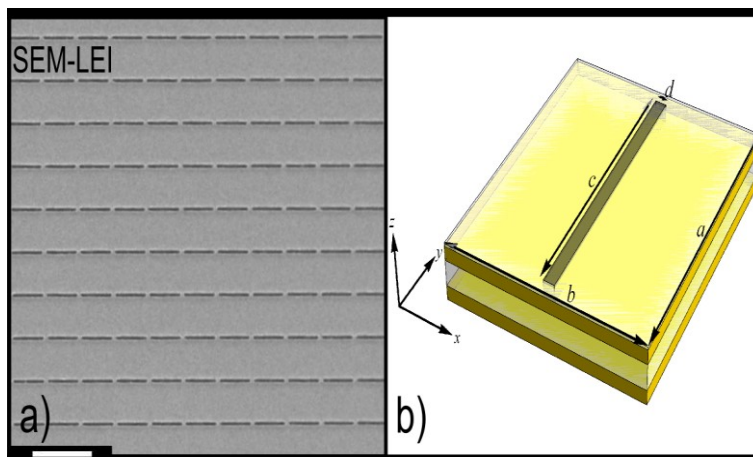


Abb. 3: Struktur des IR-aktiven Schlitzzsubstrats. a) SEM Bild, b) Struktur der Elementarzelle des Schlitzzsubstrates  $a = 1100 \text{ nm}$ ,  $b = 910 \text{ nm}$ ,  $c = 1000 \text{ nm}$ ,  $d = 50 \text{ nm}$ .

geometrischen Parameter ergeben sich aus den dielektrischen Funktionen der einzelnen Materialien). Die Dicke der strukturierten Goldschicht beträgt ebenfalls 50 nm. Die Feldverstärkung erfolgt bei dieser Art von plasmonischer Struktur in den Schlitzen, da alles Licht, das auf die Struktur fällt, durch die Schlitze hindurchtreten muss, um dann in der plasmonisch aktiven Metall-Nichtleiter-Metall Struktur absorbiert zu werden. Dementsprechend sollte der Analyt möglichst ebenfalls in den Schlitzen konzentriert werden. Dazu bringt man auf der zweiten Goldschicht, bevor die Schlitze hineingeschnitten werden, noch eine dünne SiO<sub>2</sub> Schicht auf. Diese verhindert, dass Analyten mit Affinität zu Gold, beispielsweise mittels einer Thiolgruppe, in Arealen binden, die nicht im Bereich vergrößerter Feldstärken liegen. Analyte, die eine solche Affinität zu Gold nicht aufweisen, können perspektivisch über in den Schlitzen angebrachte Fänger-moleküle in den Schlitzen immobilisiert werden.

Der Nachweis der prinzipiellen Funktion wurde mit Hilfe des klassischen Modell-Analyten Oktadecanthalol erbracht. Oktadecanthalol kann aufgrund seiner Thiolgruppe direkt an Gold anbinden. Darüber hinaus besteht es aus einer Kette aus CH<sub>2</sub>-Gruppen, die in einer CH<sub>3</sub>-Gruppe endet. Diese Gruppen haben ihre Valenzschwingungen im Bereich knapp unter 3000 cm<sup>-1</sup>, deshalb wurde die Wellenzahl der Plasmonenschwingung im Substrat auf 3000 cm<sup>-1</sup> abgestimmt. Die Valenzschwingungen der CH<sub>2</sub>-Gruppen können deutlich im Spektrum bei 2854 cm<sup>-1</sup> und bei 2928 cm<sup>-1</sup> ausgemacht werden.

Die Intensitäten dieser Schwingungen sind erheblich stärker als man für eine monomolekulare Schicht erwarten würde. Tatsächlich zeigen TEM-Aufnahmen (ohne Abbildung), dass die Schlitze zumindest teilweise gefüllt sind, d.h. der Analyt wird zusätzlich in den Schlitzen konzentriert – ein weiterer Vorteil gegenüber den Nanoantennen. Tatsächlich sind die Intensitäten der Schlitzsubstrate damit um ein bis zwei Größenordnungen größer als die anderer plasmonisch aktiver Substrate für die IR-Spektroskopie.

Ein Nachteil, den aber sowohl die Schlitzsubstrate als auch die Nanoantennen besitzen, ist, dass sie nur auf einen begrenzten Wellenzahlenbereich abstimbar sind, d.h. für

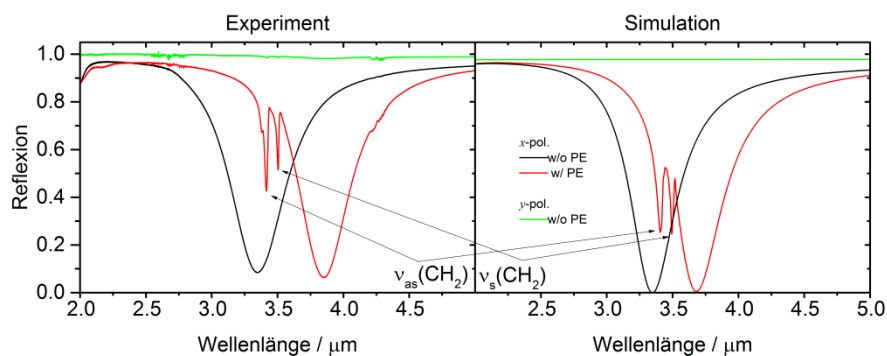


Abb. 4: Vergleich der experimentellen Spektren von mit Oktadecanthalol gefüllten Schlitzsubstraten (linkes Bild) mit den entsprechenden simulierten Spektren (Schwarze Kurven: senkrecht zur Schlitzachse polarisiertes Licht, ungefüllte Schlitze; Rote Kurven: senkrecht zur Schlitzachse polarisiertes Licht, gefüllte Schlitze; grüne Kurven: parallel zur Schlitzachse polarisiertes Licht, gefüllte Schlitze).

andere Wellenzahlenbereiche muss man die Strukturen verändern. Eine Alternative dazu sind etwa Strukturen aus Graphen, die über das Anlegen einer Spannung die Verschiebung der Plasmonenresonanz erlauben. Allerdings ist die Verstärkung dieser Substrate relativ gering und liegt einige Größenordnungen unter der der Schlitzsubstrate. Eine elegante Alternative wäre; statt eines 50 nm breiten Schlitzes einen Schlitz mit einer Breite von nur 10 nm herauszuschneiden (bei ansonsten gleichbleibenden Parametern). Eine Folge ist, dass sich das Plasmophon in den Bereich zwischen den Valenzschwingungen und den Fingerprint-Bereich schiebt und gleichzeitig die Verstärkung so groß wird, dass sie über den gesamten Spektralbereich ausreichend ist. Diese Schlitze könnten sich als ultimative Werkzeuge für die analytische IR-Spektroskopie entwickeln, sobald so geringe Breiten technologisch erreichbar sind.

#### Literatur

- [1] A. März, T. Henkel, D. Cialla, M. Schmitt, J. Popp, *Droplet formation via flow-through microdevices in Raman and surface enhanced Raman spectroscopy-concepts and applications, Lab on a Chip*, 11 (2011) 3584-3592.
- [2] I.J. Hidi, A. Muhlig, M. Jahn, F. Liebold, D. Cialla, K. Weber, J. Popp, *LOC-SERS: towards point-of-care diagnostic of methotrexate, Analytical Methods*, 6 (2014) 3943-3947.
- [3] I.J. Hidi, M. Jahn, K. Weber, D. Cialla-May, J. Popp, *Droplet based microfluidics: spectroscopic characterization of levofloxacin and its SERS detection, Physical Chemistry Chemical Physics*, 17 (2015) 21236-21242.
- [4] I.J. Hidi, M. Jahn, M.W. Pletz, K. Weber, D. Cialla-May, J. Popp, *Toward Levofloxacin Monitoring in Human Urine Samples by Employing the LoC-SERS Technique, The Journal of Physical Chemistry C*, (2016). DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b01005
- [5] C. Huck, J. Vogt, M. Sendner, D. Hengstler, F. Neubrech, A. Pucci, *Plasmonic Enhancement of Infrared Vibrational Signals: Nanoslits versus Nanorods, ACS Photonics*, 2 (2015) 1489-1497.
- [6] T.W. Ebbesen, H.J. Lezec, H.F. Ghaemi, T. Thio, P.A. Wolff, *Extraordinary optical transmission through sub-wavelength hole arrays, Nature*, 391 (1998) 667-669.
- [7] T.G. Mayerhöfer, R. Knipper, U. Hübner, D. Cialla-May, K. Weber, H.-G. Meyer, J. Popp, *Ultra Sensing by Combining Extraordinary Optical Transmission with Perfect Absorption, ACS Photonics*, (2015).