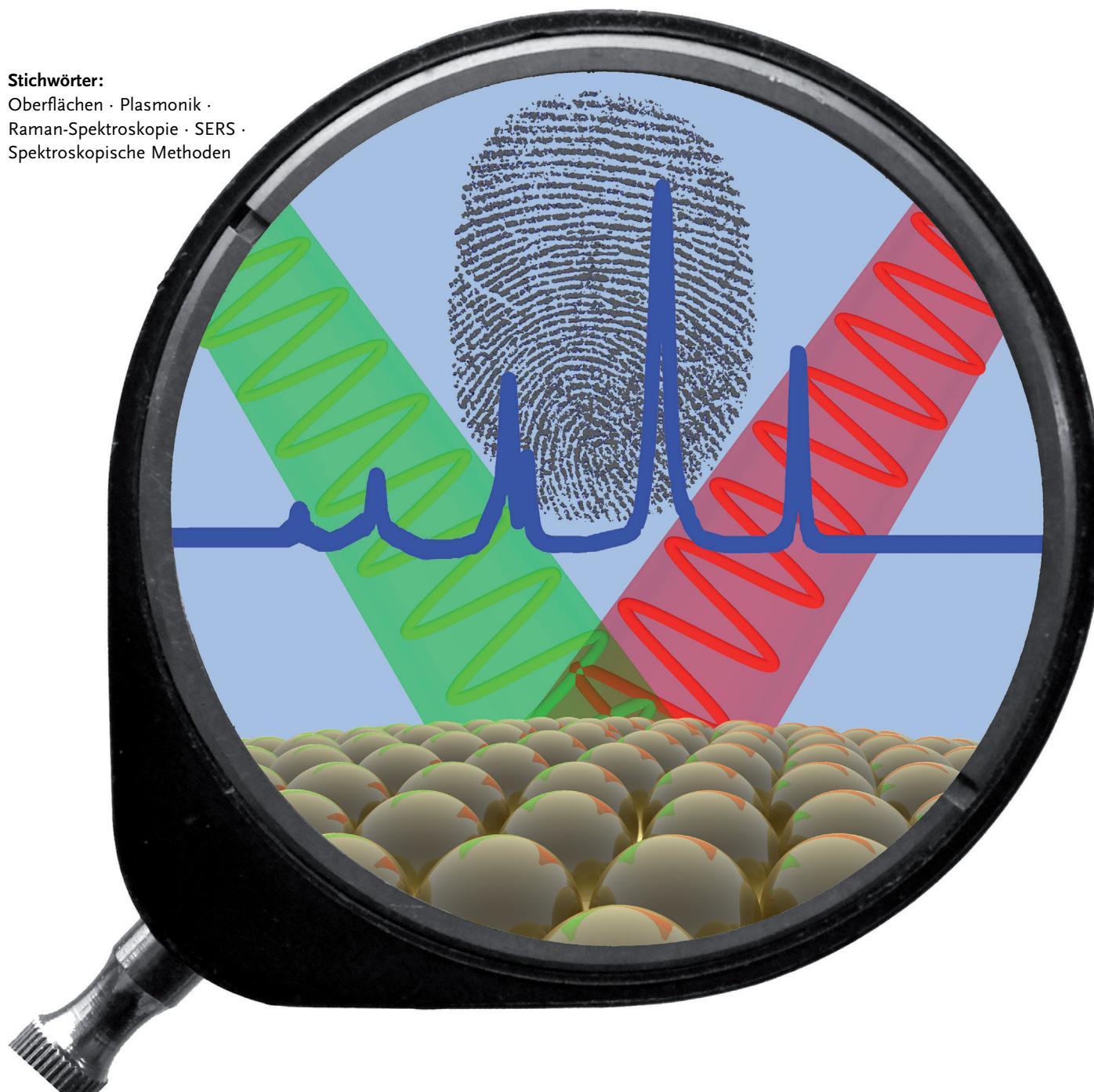


Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie: Konzepte und chemische Anwendungen

Sebastian Schlücker*

Stichwörter:

Oberflächen · Plasmonik ·
Raman-Spektroskopie · SERS ·
Spektroskopische Methoden



**Angewandte
Chemie**

Die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS) hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einer ausgereiften schwingungsspektroskopischen Technik entwickelt, und die Zahl der Anwendungen in der Chemie, den Material- und insbesondere den Lebenswissenschaften steigt rasant. Dieser Aufsatz erklärt die theoretischen Grundlagen von SERS in einem kurzen Tutorium und fasst – basierend auf Ergebnissen aus Originalarbeiten der letzten Jahre – wichtige fundamentale Aspekte, die für das Verständnis von SERS wichtig sind, zusammen. Daran schließt sich ein Abschnitt über neuere Ansätze zur Synthese und Präparation plasmonischer Nanostrukturen an. Chemische Anwendungen von SERS bilden das Herzstück des Aufsatzes. Sie decken eine breite Spanne an Themen ab, von der Katalyse und Spektroelektrochemie bis hin zur Einzelmoleküldetektion und (bio)analytischen Anwendungen.

1. Einleitung

Die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS, surface-enhanced Raman scattering) wurde erstmalig 1973 für auf einer aufgerauten Silberelektrode adsorbiertes Pyridin beobachtet (erste Publikation: 1974)^[1] und 1977 korrekt interpretiert.^[2] Anfänglich wurde SERS von einer relativ kleinen Gruppe von Wissenschaftlern verwendet, die Expertise sowohl in der Elektrochemie als auch der Raman-Spektroskopie besaßen, wobei letztere zu dem Zeitpunkt sehr gute Kenntnisse über Optik und Laser erforderte. Die Beobachtung von Einzelmolekül-SERS im Jahr 1997^[3,4] war ein starker Stimulus für das gesamte Gebiet, denn diese Experimente demonstrierten, dass die Signalstärke der Raman-Streuung mit der der Fluoreszenz konkurrieren kann. Für die schnelle Entwicklung von SERS während der letzten zwei Jahrzehnte waren Fortschritte in der Nanofabrikation und Raman-Instrumentierung gleichermaßen wichtig. Heutzutage erweitern Wissenschaftler aus einer großen Bandbreite von Disziplinen – von Chemie und Physik über die Material- zu den Lebenswissenschaften – unser Wissen über SERS und stehen erst am Anfang, das immense Potential dieser Technik in zahllosen uni- und multidisziplinären Ansätzen zu nutzen.

Mehrere exzellente Übersichtsartikel,^[5–10] Monographien^[11–13] und Themenhefte^[14–18] sowie die Fortschrittsberichte eines Faraday-Diskussionstreffens^[19] zu SERS sind verfügbar. Die zentrale Idee hinter diesem Aufsatz ist die Fokussierung auf die Zusammenfassung von Schlüsselkonzepten und ausgesuchten Beiträgen einzelner Forschungsgruppen während des letzten Jahrzehnts, die für die breite und heterogene Leserschaft der *Angewandten Chemie* von Interesse sind. Dieser Aufsatz enthält somit keine vollständige Liste von Zitaten der sehr umfangreichen SERS-Literatur, sondern verweist den Leser auf neuere SERS-Übersichtsartikel zum betreffenden Thema.

Nach einem kurzen Tutorium zu SERS (Abschnitt 2) werden wichtige Resultate ausgesuchter Beiträge aus Fachzeitschriften zu grundlegenden Aspekten von SERS vorgestellt (Abschnitt 3). Da metallische Nanostrukturen eine Voraussetzung für die Beobachtung von SERS sind, werden

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	4853
2. Ein kurzes Tutorium zu SERS	4854
3. Grundlegende Aspekte von SERS	4856
4. Plasmonische Nanostrukturen für SERS	4865
5. Chemische Anwendungen	4870
6. Schlussfolgerungen und Ausblick	4889

wichtige Entwicklungen bezüglich neuer Konzepte und Synthesen in diesem Gebiet zusammengefasst (Abschnitt 4). Chemische Anwendungen von SERS werden in Abschnitt 5 diskutiert und bilden das Herzstück dieses Aufsatzes. Sie decken eine breite und diverse Spanne an Themen ab, von der Katalyse und Spektroelektrochemie (5.1) bis hin zur Einzelmoleküldetektion (5.2). Analytische Anwendungen von SERS (5.3) beinhalten verschiedene Aspekte wie den Nachweis und das Einfangen von Molekülen als auch die Kombination aus Festphasensynthese und direkter Detektion. Einzelne Unterabschnitte widmen sich bioanalytischen Anwendungen (5.4) einschließlich SERS-Markierungspartikeln (5.5), mit dem Fokus auf den Nachweis von Nukleinsäuren und Proteinen. Die in den jeweiligen Abschnitten beschriebenen Beispiele wurden ausgewählt, um die zugrundeliegenden Konzepte und Strategien anhand von experimentellen und theoretischen Ergebnissen aus Schlüsselfpublikationen zu illustrieren und hervorzuheben. Der letzte Abschnitt enthält Schlussfolgerungen und den Versuch, mögliche zukünftige Richtungen von SERS zu eruieren (Abschnitt 6). Diejenigen Leserinnen und Leser, die sich vorwiegend oder sogar ausschließlich für die chemischen Anwendungen interessieren, mögen die Abschnitte 2 bis 4 überspringen und direkt mit Abschnitt 5 anfangen wollen. Bitte nehmen Sie jedoch zumindest die einfachste und wichtigste „SERS-Gleichung“ als Schlüsselbotschaft mit: SERS = hohe molekulare Spezifität der Raman-Spektroskopie + Metall-Nanostrukturen, die lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanzen unterstützen + hohe Sensitivität. Die Auswahl der in diesem Aufsatz über Konzepte und chemische Anwendungen von SERS erwähnten Beiträge aus der wissenschaftlichen Originalliteratur ist natürlich subjektiv. Ich muss mich daher bei allen Kolleginnen und Kollegen entschuldigen, deren Arbeiten hier nicht im Detail beschrieben und zitiert sind.

[*] Prof. Dr. S. Schlueter

Fakultät für Chemie, Universität Duisburg-Essen

Universitätsstraße 5, 45141 Essen (Deutschland)

E-Mail: sebastian.schluecker@uni-due.de

Homepage: <http://www.uni-due.de/schluecker-lab/>

Bitte konsultieren Sie die zahlreichen exzellenten Übersichtsartikel, Monographien und die darin aufgeführten Originalarbeiten, um einen vollständigen Überblick über die sehr umfangreiche SERS-Literatur zu bekommen.

2. Ein kurzes Tutorium zu SERS

Im Vergleich zur normalen Raman-Spektroskopie erfordert SERS zusätzlich Metallnanostrukturen als integralen Bestandteil. Für das Verständnis von SERS muss man daher nicht nur die Wechselwirkung zwischen Licht und Molekülen/Materie, sondern auch zwischen Licht und metallischen Nanostrukturen betrachten.^[9,11,13,20–24] Die optischen Eigenenschaften von Metallnanostrukturen sind ein zentrales Thema der „Plasmonik“, einem Forschungsgebiet mit einem Namen, der ein Hybrid aus Plasmozillationen (Plasmonen) und Elektronik ist, um die Ankopplung von Photonen zu Ladungsdichtefluktuationen der Leitungselektronen in Metallen anzudeuten. In diesem kurzen Tutorium, das sich an die allgemein chemisch gebildete Leserschaft wendet, wird eine vereinfachte und in den meisten Fällen auch nur qualitative Betrachtung gegeben; dies wird allerdings als ausreichend betrachtet, um die allerwichtigsten Konzepte zu veranschaulichen.

Zunächst muss man sich die Physik von angetriebenen oder erzwungenen Schwingungen in Erinnerung rufen. Ein bekanntes Beispiel aus der klassischen Mechanik ist der angetriebene harmonische Oszillator. Stellen Sie sich z. B. eine Hängebrücke vor, die aufgrund von äußerlich einwirkenden periodischen Antriebskräften, wie z. B. dem Wind, Schwingungen mit sehr großer Amplitude ausführt („Resonanzkatastrophe“). Im Modell des harmonischen Oszillators ist die Eigenfrequenz $\omega = (k/\mu)^{1/2}$ des Oszillators allein durch die Kraftkonstante k und die reduzierte Masse μ bestimmt. Analog zu diesem Beispiel aus der Mechanik kann Laserlicht als elektromagnetische Welle (anstelle des Windes als externe Antriebskraft) die freien Leitungselektronen („Brücke“) im Metall resonant anregen (Plasma-Oszillationen oder kurz Plasmonen). Die Eigenfrequenz ω_{max} von Plasmonen in der Nanostruktur des Metalls hängt, neben weiteren Parametern, von der dielektrischen Funktion des Metalls $\epsilon_{\text{metal}}(\omega)$ sowie des umgebenden Mediums $\epsilon_m(\omega)$ ab. Bei kolloidalem Silber

(gelblich) und Gold (rötlicher Farbton) können lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanzen im sichtbaren Bereich beobachtet und daher mit optischen Frequenzen (ca. 10^{14} – 10^{15} Hz) resonant angeregt werden. Aufgrund der resonanten Anregung wird durch das oszillierende elektrische Feld der eintreffenden Laserstrahlung mit der Kreisfrequenz ω_{inc} und der Amplitude E_0 die Oszillation der Leitungselektronen angetrieben, was z. B. in einem Gold-Nanopartikel (Abbildung 1A) zu einer Ladungstrennung führt. Diese Art von

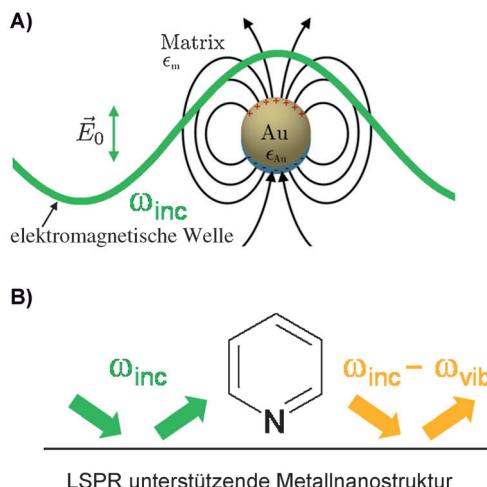


Abbildung 1. Elektromagnetische SERS-Verstärkung. A) Ein Goldnanopartikel wirkt als Nanoantenne, indem eine dipolare lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR) anregt wird. B) Sowohl das einfallende (ω_{inc} grün) als auch das ausgesendete Feld ($\omega_{\text{inc}} - \omega_{\text{vib}}$, orange) werden durch elastische Lichtstreuung an der LSPR-unterstützenden Metallnanostruktur verstärkt.

Resonanz wird als dipolare lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR, localized surface plasmon resonance) bezeichnet. Die Stärke des induzierten Dipols $\mu_{\text{ind(metal)}}$ wird dabei bestimmt durch die Polarisierbarkeit der Metallkugel α_{metal} und der eintreffenden elektrischen Feldstärke $E_0(\omega_{\text{inc}})$: $\mu_{\text{ind}} = \alpha_{\text{metal}} E_0(\omega_{\text{inc}})$. Die Polarität des induzierten Dipols μ_{ind} verändert sich periodisch mit der Kreisfrequenz ω_{inc} der elektromagnetischen Welle als externer Triebkraft. Hier wurde also ein Hertzscher Dipol (siehe elektrische Feldlinien in Abbildung 1A) auf der Nanometerskala generiert, d. h. eine Nanoantenne, welche Strahlung mit der gleichen Frequenz ω_{inc} (grün in Abbildung 1A und B) emittieren kann. Mit anderen Worten: Wir haben eine qualitative Beschreibung von resonanter elastischer Lichtstreuung geliefert, die – ausgehend von einer Metallkugel – im Vergleich zum einfallenden elektrischen Feld $E_0(\omega_{\text{inc}})$ (siehe Abschnitt 3.1) zu einer Verstärkung des lokalen elektrischen Feldes $E_{\text{loc}}(\omega_{\text{inc}})$ in der unmittelbaren Umgebung des Metallpartikels führt. Bitte unterscheiden Sie hier sowohl physikalisch als auch begrifflich klar zwischen Absorption und Streuung sowie der Extinktion als Summe von beiden; an dieser Stelle wird ausschließlich auf die Streuung eingegangen, da diese für die elektromagnetische Verstärkung von Raman-Streuung bei SERS genutzt wird (siehe unten).



Sebastian Schlücker wurde 1973 in Essen geboren – dem Jahr, in dem SERS zum ersten Mal in Southampton (UK) beobachtet wurde. Er promovierte 2002 in physikalischer Chemie an der Universität Würzburg und absolvierte ein Postdoktorat am NIH (Bethesda, USA). Nach einer Professur für Experimentalphysik an der Universität Osnabrück (2008–2012) wurde er 2012 Professor für physikalische Chemie an der Universität Duisburg-Essen. Sein Arbeitsgebiet ist die Nanobiophotonik, insbesondere die Physik und Chemie einzelner plasmonischer Nanostrukturen sowie deren Anwendungen in der Biomedizin und für ultrasensitive molekülspektroskopische Untersuchungen.

Darüber hinaus müssen wir die Interaktion des lokalen elektrischen Feldes $E_{\text{loc}}(\omega_{\text{inc}})$ mit einem Molekül in der Nähe der Oberfläche der Metallkugel betrachten (Abbildung 1B). Ähnlich wie bei dem in der Metallkugel induzierten Dipol können auch in Molekülen Dipole induziert werden. $\mu_{\text{ind}} = \alpha_{\text{molecule}} E_{\text{loc}}(\omega_{\text{inc}})$. Das induzierte Dipolmoment μ_{ind} und das einfallende lokale elektrische Feld $E_{\text{loc}}(\omega_{\text{inc}})$ sind vektorielle Größen, während die elektronische Polarisierbarkeit α_{molecule} des Moleküls, welches die beiden verbindet, ein Tensor zweiten Grades mit neun Komponenten ist; häufig ist der Tensor symmetrisch und nur sechs Komponenten sind von Bedeutung. Das Vorkommen inelastischer Lichtstreuung kann in der klassischen Theorie als Modulation des einfallenden elektrischen Feldes $E_{\text{loc}}(\omega_{\text{inc}})$ durch ein schwingendes Molekül mit der Eigenkreisfrequenz ω_{vib} erklärt werden. Es kommen drei Dipol-Komponenten vor: $\mu_{\text{ind}}(\omega_{\text{inc}})$, $\mu_{\text{ind}}(\omega_{\text{inc}} - \omega_{\text{vib}})$ und $\mu_{\text{ind}}(\omega_{\text{inc}} + \omega_{\text{vib}})$, die der Rayleigh-, Stokes-Raman- und anti-Stokes-Raman-Streuung entsprechen.

Um zu erklären, warum nur diskrete Linien vorkommen und um die verschiedenen Intensitäten für Stokes- und anti-Stokes-Streuung zu verstehen, müssen wir die Quantenmechanik heranziehen. Abbildung 1B zeigt dies am Beispiel der Stokes-Raman-Streuung mit einer Kreisfrequenz $\omega_{\text{inc}} - \omega_{\text{vib}}$ für einen ganz bestimmten Schwingungszustand aus der Gesamtzahl der Normalschwingungen ($3N-6$ für nichtlineare Moleküle bzw. $3N-5$ für lineare Moleküle). Diese frequenzverschobene Strahlung $\omega_{\text{inc}} - \omega_{\text{vib}}$ selber wiederum (linker orangefarbener Pfeil in Abbildung 1B) kann eine LSPR des Metallkolloids in Abbildung 1A anregen. Wieder kann elastische Lichtstreuung ausgehend von einer Metallkugel stattfinden (rechter orangefarbener Pfeil in Abbildung 1B) und die ausgesendete Strahlung kann im Fernfeld nachgewiesen werden. Diese Darstellung ist nicht beschränkt auf die hier besprochenen Metallkolloide, sondern kann auf alle Nanostrukturen angewendet werden, die LSPR unterstützen (siehe Abschnitt 4). Die gesamte SERS-Intensität hängt sowohl vom einfallenden Feld $E(\omega_{\text{inc}})$ als auch vom ausfallenden Feld $E(\omega_{\text{inc}} - \omega_{\text{vib}})$ ab: $I_{\text{SERS}} = I(\omega_{\text{inc}})I(\omega_{\text{inc}} - \omega_{\text{vib}}) = |E(\omega_{\text{inc}})|^2 |E(\omega_{\text{inc}} - \omega_{\text{vib}})|^2$. Eine optimale SERS-Verstärkung erfordert daher, dass sowohl die einfallende Strahlung bei ω_{inc} als auch die Stokes-Raman-verschobene Strahlung bei $\omega_{\text{inc}} - \omega_{\text{vib}}$ mit der Plasmonenbande der Nanostruktur des Metalls überlappen. Für $\omega_{\text{inc}} \gg \omega_{\text{vib}}$ oder $\omega_{\text{inc}} \approx \omega_{\text{inc}} - \omega_{\text{vib}}$, d. h. wenn ω_{inc} (einfallendes Laserlicht) und $\omega_{\text{inc}} - \omega_{\text{vib}}$ (Stokes-Raman-Streuung für eine bestimmte Schwingungs-Raman-Bande) nahe beieinander liegen, ergibt sich die bekannte $|E|^4$ -Näherung für die SERS-Intensität: $I_{\text{SERS}} \approx |E(\omega_{\text{inc}})|^4$. Diese Näherung ist typischerweise gut für Frequenzen ω_{inc} im blauen und grünen Bereich, aber nicht mehr für den roten oder nahinfraroten Bereich.

Da die elektrische Feldstärke der Strahlung eines Dipols mit $E(r) \sim 1/r^3 = r^{-3}$ skaliert, wird eine SERS-Abstandsabhängigkeit von $I_{\text{SERS}} \sim 1/r^{12} = r^{-12}$ theoretisch erwartet und auch experimentell bestätigt (siehe Abschnitt 3.4). Mit anderen Worten: SERS ist ein wahrhaft oberflächenselektiver Effekt. Außerdem ist auch die Ausrichtung des Moleküls relativ zur Oberfläche von Bedeutung, und dies kann nachgewiesen werden: flache vs. schräge vs. senkrechte Ausrichtungen führen zu jeweils unterschiedlichen SERS-Signaturen, da

die verschiedenen Schwingungen des adsorbierten Moleküls – z. B. solche in der Ebene oder aus der Ebene eines aromatischen Ringes heraus (cf. Abbildung 1B) – unterschiedlich verstärkt werden.

Der oben beschriebene elektromagnetische Verstärkungsmechanismus basiert allein aufgrund der Anwesenheit der Metallnanostruktur und Photonen mit passender Frequenz. Um es drastischer auszudrücken: Dieser rein physikalische Effekt erfordert keine Anwesenheit von Molekülen (siehe Abschnitte 3.1 und 3.2) und – wenn überhaupt – dann ausschließlich für die „Frequenz-Konversion“ von ω_{inc} zu $\omega_{\text{inc}} - \omega_{\text{vib}}$ (Abbildung 1B). Die zentrale Aussage hierbei ist, dass sehr starke elektrische Felder der Grund für die signifikant erhöhte Signalstärke sind, die bei SERS gegenüber der normalen Raman-Streuung beobachtet werden kann. So führt z.B. ein Anstieg von $E_{\text{loc}}/E_{\text{inc}} = 100 = 10^2$ zu einem Anstieg der SERS-Intensität um einen Faktor von insgesamt $(E_{\text{loc}}/E_{\text{inc}})^4 = (10^2)^4 = 10^8$ oder einhundert Millionen. Mit anderen Worten: Ein moderater Anstieg von $E_{\text{loc}}/E_{\text{inc}}$ führt zu massiven SERS-Verstärkungen (siehe Abschnitte 3.2 und 3.3). Diese Zahl – 10^8 im angeführten Beispiel – wird als SERS-Verstärkfaktor (EF, enhancement factor) bezeichnet. Er nimmt bei SERS eine zentrale Stellung bei der Quantifizierung der Signalverstärkung ein. Die experimentelle Bestimmung des EF bei SERS erfordert Messungen der SERS-Intensität von auf einer Metalloberfläche adsorbierten Molekülen in Relation zur „normalen“ Raman-Intensität derselben „freien“ Moleküle in Lösung. Beide Intensitäten müssen auf die Anzahl von Molekülen auf der Oberfläche (SERS) bzw. in der Lösung (konventionelles Raman) normiert werden.

SERS ist eine molekülspektroskopische Technik, die auf der plasmonunterstützten Streuung von Molekülen auf oder in der Nähe von Metallnanostrukturen basiert, welche eine LSPR unterstützen. Moleküle sind daher ein intrinsischer und integraler Bestandteil von SERS, und es ist dieser Reichtum an chemischer/molekularer, und zu einem gewissen Grad auch struktureller Information, der SERS zu einer solch wertvollen molekülspektroskopischen Technik macht. Mit anderen Worten: Es gibt kein SERS ohne Moleküle, aber ebenso gibt es kein SERS ohne plasmonische Nanostrukturen (plus Licht natürlich). Für eine theoretische Betrachtung von SERS ist es daher zwingend erforderlich, die Interaktion von Molekülen mit der Metalloberfläche und die elektronischen Eigenschaften des dazugehörigen Adsorbats mit einzubeziehen. Die entsprechenden Effekte werden unter dem Begriff „Chemische Verstärkung“ zusammengefasst (siehe Abschnitt 3.5).

Der nächste Abschnitt behandelt viele Facetten von SERS, die in diesem Tutorium nur kurz angerissen wurden. Wichtige Ergebnisse aus Originalarbeiten der jüngeren Vergangenheit, die unser Wissen über SERS erweitert haben, werden dabei hervorgehoben.

3. Grundlegende Aspekte von SERS

3.1. Feldverstärkung in Edelmetall-Nanostrukturen: Theorie und Experiment

3.1.1. Elektromagnetische Verstärkung: Theorie für einzelne Kugeln und Dimere

Die im Jahre 1997 beschriebenen SERS-Experimente an einzelnen Molekülen gaben den Anstoß, theoretische Untersuchungen über die Größe des elektromagnetischen EF in Metallkolloiden anzustellen, und zwar insbesondere im Hinblick auf den Ursprung sehr hoher EF, die für die Generierung von Einzelmolekül-SERS notwendig sind. Abbildung 2

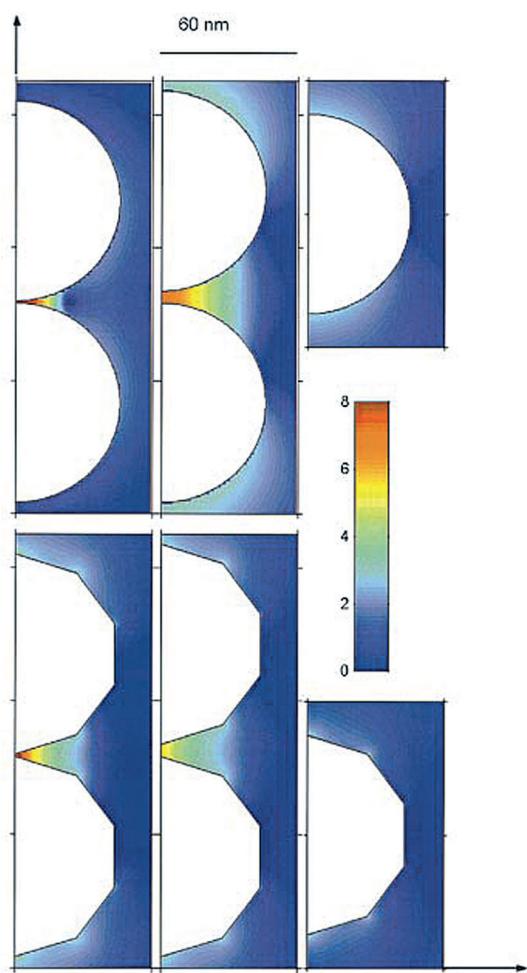


Abbildung 2. Elektromagnetischer Verstärkungsfaktor (farbkodierte log. Skala) für Dimere von Silbernanopartikeln (linke und mittlere Spalte) im Vergleich zu isolierten Silbernanopartikeln (rechte Spalte). Aus Lit. [26].

zeigt den elektromagnetischen EF ($|E|^4$) für dimere Strukturen zweier Kugeln (oben) und zweier Polygone (unten), zusammen mit den entsprechenden isolierten Einzelpartikeln (rechte Spalte). Die Darstellung in 2D zeigt einen horizontalen Querschnitt. Die Farbskala ist logarithmisch, und EF außerhalb der Bandbreite $100\text{--}10^8$ werden jeweils in Dunkelblau bzw. Dunkelrot angezeigt.

Diese Berechnungen machen deutlich, dass isolierte Partikel (rechte Spalte) – entweder einzelne Kugeln oder einzelne Polygone – nicht zu einem großen EF führen. Diese bewegen sich typischerweise im Bereich von nur 10^3 und sind daher für Einzelmolekül-SERS nicht von Bedeutung. Sehr hohe EF können nur in örtlich eng begrenzten Bereichen („Hotspots“) an der Verbindungsstelle von zwei Partikeln beobachtet werden. Die linke und mittlere Spalte zeigen Dimere, in denen die Partikel einen Abstand von 1 bzw. 5.5 nm haben. Durch die Vergrößerung des Abstandes von 1 nm auf 5.5 nm sinkt der maximale EF im Hotspot von ca. $10^{10}\text{--}10^{11}$ um drei Größenordnungen auf ca. $10^7\text{--}10^8$ (besser zu erkennen in Abbildung 2 in Lit. [26]). Ein geringer Abstand zwischen den Partikeln wirkt sich daher günstig auf die Erzeugung extrem starker, gleichzeitig aber auch örtlich sehr eng begrenzter elektrischer Felder aus. Zeitabhängige DFT-Rechnungen sagen voraus, dass bei sehr kurzen Abständen (<1 nm) Quanteneffekte, wie z. B. Tunneln über die Verbindungsstelle des Dimers hinweg, die optische Antwort verändern. Dies führt zu einem deutlich geringeren Anstieg des elektromagnetischen Feldes im Vergleich zu klassischen Vorhersagen.^[27]

Für andere Wellenlängen gilt die gleiche räumliche Abhängigkeit der Verstärkungsfaktoren, aber die Größenordnung ist eine andere.^[26] Auch für Gold wurden Berechnungen angestellt, und die entsprechenden Verstärkungen sind kleiner. Silber ist also plasmonisch aktiver als Gold und wird deshalb allgemein für Einzelmolekül-SERS-Experimente bevorzugt. Andererseits besitzt Gold aber eine größere chemische Inertheit und wird daher in solchen Experimenten bevorzugt, in denen die chemische Stabilität des Kolloids eine größere Rolle spielt als eine maximale Verstärkung. Darüber hinaus nähern sich die dielektrischen Funktionen von Gold und Silber im roten bis nahinfraroten Bereich einander an.^[20]

3.1.2. Wahrscheinlichkeitsverteilung von errechneten SERS-Verstärkungsfaktoren

Hotspots sind örtlich eng begrenzte Regionen, die extreme Feldverstärkungen aufweisen (siehe dunkelrote Bereiche in Abbildung 2). Im Gegensatz dazu kommen Bereiche mit moderaten Verstärkungsfaktoren sehr viel häufiger vor (siehe dunkelblaue Bereiche in Abbildung 2). Die Wahrscheinlichkeit, zufällig ein Molekül in einem Hotspot zu finden, d.h. genau in der Lücke zwischen den Partikeln eines Dimers (Abbildung 2), ist deshalb sehr gering. Es ist hingegen viel wahrscheinlicher, ein Molekül irgendwo auf der Oberfläche eines der beiden Partikel zu finden, wo es nur eine moderate Verstärkung erfährt. Die entsprechende Wahrscheinlichkeitskurve, also die statistische Verteilung der Wahrscheinlichkeit, einen bestimmten EF zu finden, zeigt einen typischen langsam abfallenden Verlauf (Abbildung 3)^[28,29] und spiegelt damit die oben beschriebene qualitative Entwicklung wider: Moderate EF weisen erheblich größere Wahrscheinlichkeiten auf als extreme EF. Bitte beachten Sie, dass die Darstellung doppelt logarithmisch ist, d. h., sowohl x-Werte (EF) als auch y-Werte (Wahrscheinlichkeit) sind auf einer logarithmischen Skala dargestellt.

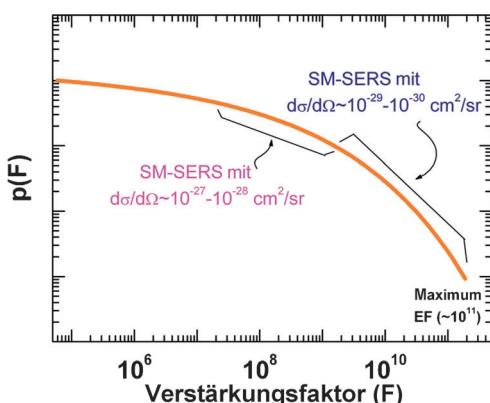


Abbildung 3. Berechnete Wahrscheinlichkeitsverteilung von Verstärkungsfaktoren (EF) in SERS. Aus Lit. [29].

Moleküle mit relativ hohem differentiellem Streuquerschnitt $d\sigma/d\Omega$ in der Größenordnung von $10^{-27}\text{--}10^{-28}\text{ cm}^2\text{sr}^{-1}$ wie z.B. Farbstoffe benötigen „nur“ Verstärkungsfaktoren von $10^7\text{--}10^8$ für Einzelmolekül-SERS (SM-SERS). Dagegen benötigen Moleküle mit „normal“ hohem Streuquerschnitt ($d\sigma/d\Omega$ in der Größenordnung von $10^{-29}\text{--}10^{-30}\text{ cm}^2\text{sr}^{-1}$, zu meist als nichtresonante Moleküle bezeichnet; keine Farbstoffe) extrem große, aber gleichzeitig auch extrem seltene EF von $10^9\text{--}10^{11}$ in SM-SERS. Es sei darauf hingewiesen, dass der Maximalwert des EF in Abbildung 3 ca. 10^{11} beträgt. Diese Wahrscheinlichkeitsverteilung der EF sollte man im Hinterkopf behalten, da sie deutlich macht, dass extrem hohe EF äußerst selten sind. Im Falle von Dimeren z.B. erfahren nur die Moleküle, die im Hotspot liegen (siehe Abbildung 2), sehr hohe EF, während diejenigen außerhalb dieses Bereiches sehr viel niedrigere EF aufweisen. Eine einfache Rechnung veranschaulicht dies: Ein einzelnes Molekül in einem Hotspot mit einem EF von 10^{10} sendet ein gleich intensives Raman-Signal aus wie 10 Millionen Moleküle, die nur einen moderaten EF von 10^3 aufweisen.

Hotsspots werden nicht nur an der Kontaktstelle zwischen zwei Partikeln beobachtet, sondern auch an scharfen Ecken und Spitzen, wobei letztere die Basis für spitzenverstärkte Raman-Streuung (TERS) sind.

3.1.3. Experimenteller Nachweis der ortsspezifischen Verteilung von Verstärkungen

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung von Verstärkungsfaktoren in Abbildung 3 basiert auf Berechnungen, die durch Experimente bestätigt werden müssen. Ensemblemessungen, die auf linearer Raman-Spektroskopie basieren, können die örtliche Verteilung von Verstärkungen nicht bestimmen, da nur Durchschnittswerte ermittelt werden. Deshalb ist nicht-lineare Spektroskopie oder ein sequentieller, Molekül-für-Molekül-Ansatz erforderlich, wobei letzterem wahrscheinlich die Empfindlichkeit fehlen würde, auch die kalten Stellen zu beobachten. Andere Ansätze verfolgen das Photobleichen von adsorbierten Farbstoffmolekülen ebenso wie schwangungsangeregte adsorbierte Farbstoffmoleküle. Beiden Ansätzen fehlt ein klarer Schwellenwert. Im Gegensatz dazu liefert das photochemische Lochbrennen (PHB) einen klaren

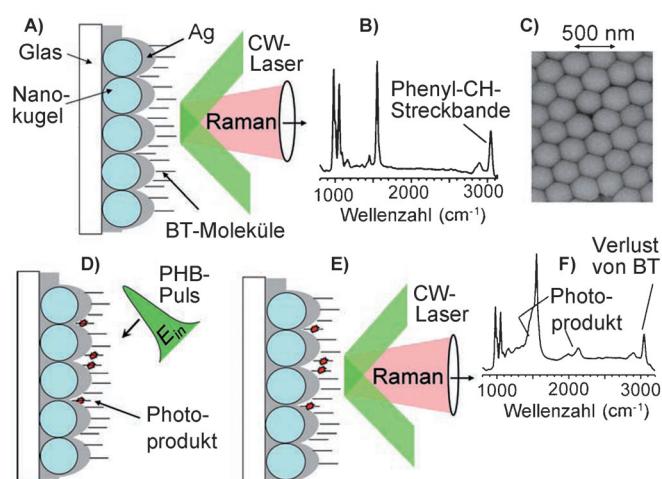


Abbildung 4. Experimenteller Ansatz zur Bestimmung der ortsspezifischen Wahrscheinlichkeitsverteilung von Verstärkungsfaktoren in SERS durch photochemisches Lochbrennen (PHB) von Benzolthiol(BT)-Molekülen auf einem Ag-Film auf Nanokugeln. Aus Lit. [37].

Schwellenwert für das elektrische Feld als Anhaltspunkt, was die entsprechende Analyse der örtlichen Verteilung von Verstärkungen maßgeblich vereinfacht.^[37]

Der experimentelle Ansatz ist in Abbildung 4^[37] schematisch dargestellt. Die SERS-aktive Nanostruktur ist eine auf Nanokugeln aufgetragene Silberschicht (AgFON, Ag film over nanospheres, Abbildung 4A), und zwar 330 nm große Nanokugeln überzogen mit einer 150 nm dicken Silberschicht (REM-Bild in Abbildung 4C). Die Silberoberfläche des AgFON wird bedeckt durch eine selbstangeordnete Monolage aus Thiobenzol (BT) als Reportermolekül. Da Thiobenzol in Lösung keine elektronische Absorption in der Nähe der hier verwendeten Laseranregung bei 532 nm aufweist, wird angenommen, dass molekulare elektronische Resonanzen vernachlässigbar sind und dass hier vor allem die elektromagnetische Verstärkung eine Rolle spielt.

Das SERS-Spektrum des BT-Reportermoleküls (Abbildung 4B), das durch grüne cw-Laseranregung angeregt wurde (Abbildung 4A), weist die charakteristischen Schwings-Raman-Banden von Aromaten auf (Banden der Phenyl-CH-Streckschwingungen bei ungefähr 3000 cm^{-1}). Unter Belichtung mit einem starken 1-ps-Laserpuls (PHB-Pulse in Abbildung 4D) werden BT-Moleküle in ein Fotoproduct umgewandelt. Hier ist es wieder wichtig, dass der Ansatz mit dem PHB-Laser die notwendige Kontrolle und Selektivität für die experimentelle Abfrage der lokalen Verstärkung sicherstellt. Photoschädigung kommt nur an den Stellen mit den größten Verstärkungen vor, gefolgt von Molekülen an Stellen mit stufenweise kleiner werdenden Verstärkungen. Mit anderen Worten: Die Stärke des PHB-Pulses macht es möglich, nur diejenigen Moleküle zu untersuchen, die sich an Stellen mit einer Verstärkung größer als dem scharfen Schwellenwert befinden. Nach der Photokonversion kann die Beschaffenheit der selbstorganisierten Monolage, die nun eine Mischung aus Photoproduct und BT-Molekülen enthält, durch einen grünen cw-Laser mit geringer Leistung untersucht werden (Abbildung 4E).

Das SERS-Spektrum der belichteten SAM auf dem AgFON-Substrat weist aufgrund der Anwesenheit des Photoproducts neue Schwingungs-Raman-Banden im Bereich von 1550 cm^{-1} und $2100\text{--}2200\text{ cm}^{-1}$ auf (siehe Abbildung 4F). Gleichzeitig weist die Intensität der CH-Streckbande bei 3000 cm^{-1} auf einen Verlust von BT-Molekülen hin (Abbildung 4F). Die vergleichbaren SERS-Intensitäten des Photoproducts und BT – zusammen mit dem Fehlen offensichtlicher Effekte auf die AgFON-Oberflächenplasmonenresonanz aufgrund andauernder gepulster PHB-Bestrahlung – stützen die Schlussfolgerung, dass PHB-Pulse nicht das AgFON als SERS-Substrat verändern, sondern lediglich die Photokonversion von BT auslösen. Das Anrege(PHB 1 ps 532 nm)-Abfrage(Raman cw 532 nm)-Experiment wurde mit unterschiedlichen Laserleistungsdichten durchgeführt, und die Intensität der aromatischen CH-Streckbande bei 3000 cm^{-1} wurde als spektral sauber abgetrennter Marker für die Überwachung der Bildung des Photoproducts (Abbildung 4A) genutzt. Nach 1000 Pulsen wird ein konstantes Raman-CH-Strecksignal beobachtet, was darauf hinweist, dass der Abfall der Intensität durch Photoschädigung von BT abgeschlossen ist.

Ein Modell wurde entwickelt, mit Hilfe dessen – ausgehend von der Annahme, dass jeder PHB-Puls eine konstante Wahrscheinlichkeit zur Induzierung von Photoschäden hat – die Verteilung örtlicher Verstärkungen berechnet werden kann. Aus dieser Gleichung kann der zentrale Schluss gezogen werden, dass die relative Intensität I/I_0 umgekehrt proportional zu E_{in} ist, d.h., je größer die Feldstärke E_{in} (Laserleistungsdichte) ist, umso niedriger ist die BT-Intensität aufgrund der verstärkten Bildung des Photoproducts. Die Darstellung von I/I_0 als eine Funktion von $1/E_{\text{in}}$, wie in Abbildung 5 gezeigt, veranschaulicht die Übereinstimmung der experimentellen Daten mit dem Modell.

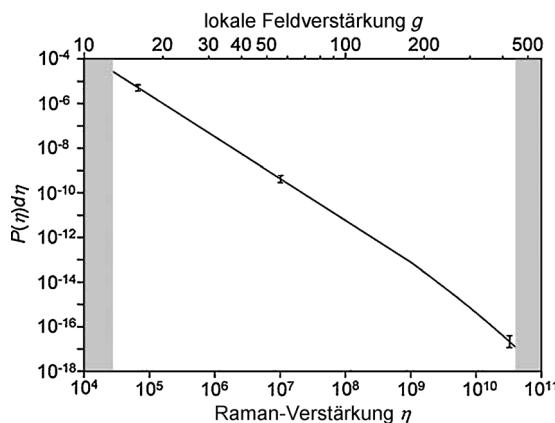


Abbildung 5. Wahrscheinlichkeitsverteilung der Raman-Verstärkungsfaktoren, bestimmt aus Daten, die mit dem in Abbildung 4 gezeigten Experiment erhalten wurden. Aus Lit. [37].

Berechnungen zufolge tragen nur 63 von insgesamt 1 Million Molekülen (!) an „heißen Stellen“ (Verstärkung $> 10^9$) zu 24 % des SERS-Signals insgesamt bei, wobei die „kältesten Stellen“ 61 % der Moleküle umfassen, aber nur zu 4 % zur SERS-Intensität insgesamt beitragen.^[37] Diese Her-

angehensweise kann im Prinzip auch auf jedes andere SERS-Substrat angewendet werden.

3.1.4 Experimentelle Bestimmung der Abstandsabhängigkeit von SERS in einem Dimer-Modell

Moleküle in der Lücke zwischen zwei Silber- oder Gold-nanopartikeln weisen SERS-Intensitäten auf, die im Vergleich zur normalen Raman-Streuung um mehrere Größenordnungen erhöht sind, in manchen Fällen bis hinunter auf die Einzelmolekülebene. Parameter wie z.B. die Abhängigkeit der SERS-Signale von der Größe und Form des NP-Dimers sowie die Rolle der Polarisation des einfallenden Lichtes wurden untersucht. Die elektromagnetische Theorie sagt vorher, dass die Entfernung zwischen zwei Partikeln die Feldverstärkung im Hotspot des Dimers entscheidend bestimmt. Auf experimentellem Wege hingegen ist es sehr schwer, eine Abstandskontrolle im Sub-Nanometerbereich zu erreichen, da es sehr schwierig ist, die Trennung während der SERS-Messungen präzise und flexibel durchzuführen.

Dies wurde aber erreicht durch eine Kombination von SERS und dem Verfahren des mechanisch kontrollierten Bruchkontakte, anhand dessen die SERS-Signale von Molekülen, die sich in einer Nanolücke zwischen zwei Goldelektroden auf einem Silizium-Chip befinden (siehe Abbildung 6),^[38] gemessen werden. Die beiden Elektroden spitzen

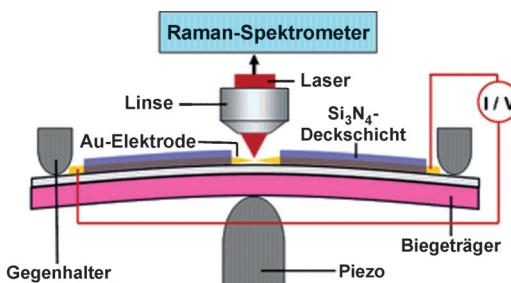


Abbildung 6. Experimenteller Aufbau der Raman-Spektroskopie mit mechanischem Bruchkontakt. Aus Lit. [38].

repräsentieren ein Modell eines Gold-Dimers mit einem wohldefinierten Abstand. Die Abstandsgröße kann mechanisch durch einen piezoelektrischen Messfühler mit Auflösung im Sub-Nanometerbereich kontrolliert werden (Abbildung 6). Diese sehr präzise und stabile Einstellung des Elektrodenabstands ist eine Voraussetzung, um die Variation der SERS-Intensität als eine Funktion des Abstands der Partikel in einem Dimer kontrollieren zu können, da es insbesondere der Abstand zwischen zwei einzelnen Partikeln (hier: die zwei Elektroden) ist, der in entscheidender Weise die elektromagnetische Verstärkung bestimmt.

Die Ergebnisse der SERS-Messungen mit Abstandskontrolle im Ångström-Bereich sind in Abbildung 7^[38] dargestellt. Verringert man die Lücke von 0.8 nm auf 0.6 nm und schließlich auf 0.4 nm, steigt das SERS-Signal von 1,4-Benzoldithiol kontinuierlich an. Ähnliche Ergebnisse werden mit anderen Molekülproben wie z.B. 4-Aminothiophenol erzielt. Gegenwärtig liegt die Erfolgsrate bei der Untersuchung von

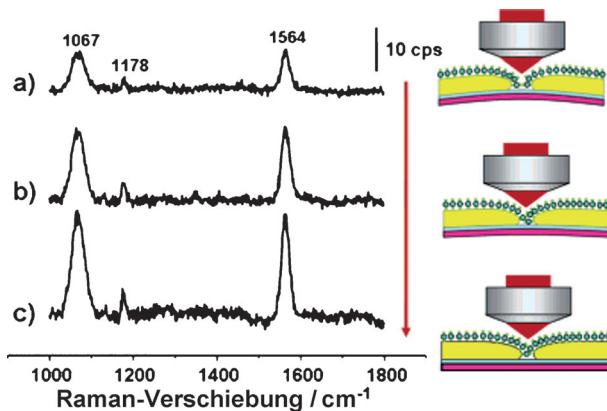


Abbildung 7. SERS-Spektren von 1,4-Benzoldithiol bei unterschiedlichen Partikelabständen: a) 0.8 nm, b) 0.6 nm und c) 0.4 nm. Aus Lit. [38].

abstandsabhängigen SERS-Spektren bei etwa 20 % mit Raum für experimentelle Verbesserungen.

Es ist wahrscheinlich, dass viele weitere interessante Studien aus diesem Ansatz, SERS und das Verfahren mechanisch kontrollierter Bruchkontakte zu verbinden, folgen werden, mit Anwendungen in der Einzelmolekül-Schwingungsspektroskopie, in der molekularen Elektronik, der Sensorik und in anderen Gebieten, in denen die Synergien von Sub-nm-Abstandskontrolle, molekularer Identifikation, Orientierung und – zu einem gewissen Grad – auch struktureller Information, erforscht werden können.

3.2. Jenseits einzelner Kugeln und Dimere: von Trimeren zu Superstrukturen

3.2.1. Experimentelle Struktur-Wirkungs-Beziehung in Gold-Dimeren und -Trimeren

Struktur-Wirkungs-Beziehungen kommen in der physikalisch-organischen Chemie häufig vor, aber ihre Anwendung für plasmonische Nanostrukturen und SERS ist wegen der Variationen in der Größe der kolloidalen Partikel (Monodispersität), ihres Aggregationszustandes (Clustergröße) und ihrer geometrischen Anordnung (z.B. lineare vs. L-förmige Trimere)^[39–40] eine größere Herausforderung. Korrelative LSPRS-HR-TEM-SERS-Experimente mit Dutzenden von einzelnen glasbeschichteten Gold-Dimeren und -Trimeren wurden durchgeführt, um die wichtigsten physikalischen Parameter zu bestimmen, die sehr hohe Verstärkungsfaktoren (EFs) in diesen Hotspot-Strukturen hervorbringen. Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse von korrelativen LSPRS-HR-TEM-SERS-Experimenten mit glasbeschichteten dimeren und trimären Nanoantennen.^[39] Die beiden Dimere in Abbildung 8a und b zeigen gleiche Strukturen, aber sehr unterschiedliche LSPR-Spektren. Ihr entsprechender EF befindet sich jedoch in derselben Größenordnung. Dies deutet darauf hin, dass die Abstandsgröße für den EF der Nanostruktur von entscheidender Bedeutung ist, was die zuvor beschriebenen Ergebnisse bestätigt (siehe Hinweise in Lit. [39]). Auch die Trimere mit linearen (Abbildung 8c) und gekrümmten Geometrien (Abbildung 8d) haben unterschiedliche LSPR-

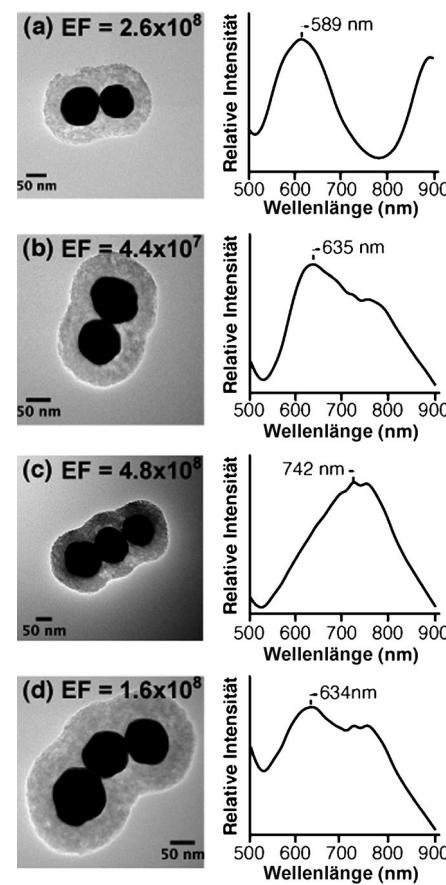


Abbildung 8. HR-TEM-Bilder und zugehörige Einzelpartikel-LSPR-Spektren von glasbeschichteten Goldnanopartikel-Dimeren und -Trimeren. Aus Lit. [39].

Spektren, aber gleiche EF. Da ihr EF denen der Dimere ähnelt, scheint die Addition von Hotspots nicht zu einer zusätzlichen Verstärkung zu führen. Im Gegensatz zu Dimeren weisen Trimere hingegen eine quasi-polarisierungsunabhängige optische Antwort auf.^[41]

Insgesamt zeigten die korrelativen HR-TEM-SERS-Experimente, dass alle stark SERS-aktiven Dimer- und Trimer-Nanoantennen entweder koaleszierte oder getrennte NP-Kerne aufwiesen, mit Abstandsgrößen im Bereich <1 nm – eine Erkenntnis, die im Einklang steht mit den Ergebnissen von Rechnungen mittels der Finite-Elemente-Methode (FEM).

3.2.2. Plasmonische 3D-Superstrukturen durch Selbstassemblierung von Satelliten auf einem Kern

Dimere zeichnen sich dadurch aus, dass sie einen einzigen Hotspot in der Lücke und – durch ihre im Vergleich zu einer Einzelkugel reduzierten Symmetrie – eine hohe anisotrope optische Antwort aufweisen. Maximale Signale werden beobachtet, wenn die Laserpolarisation parallel zur Achse des Dimers ist, während eine senkrechte Orientierung nicht zu einer resonanten Anregung der longitudinalen Plasmonenmode führt. Die Herstellung von plasmonischen 3D-Superstrukturen mit mehr als zwei Partikeln stellt die nächste

Komplexitätsebene dar und ist ein wichtiges Thema in der Materialwissenschaft.^[42–46] Besonders Verfahren, die auf Selbstassemblierung basieren, gehören zu den vielversprechendsten Bottom-up-Ansätzen. Im Gegensatz zu Dimeren mit nur einem Hotspot können Assemble bzw. Cluster eine ganze Serie von Hotspots aufweisen (Abbildungen 9 und 10). Für N Satelliten, die eine einzelne zentrale Kugel (Kern) umkreisen und sich gegenseitig berühren, beträgt die Anzahl der Hotspots $2N-1=N$ (zwischen den Satelliten und dem Kern) und $N-1$ (zwischen den Satelliten), d.h. die Anzahl der Hotspots steigt linear mit der Gesamtzahl der Kugeln ($N+1$). Darüber hinaus wird eine quasi-isotrope optische Antwort – im Gegensatz zur charakteristischen $|\cos\theta|^2$ -Abhängigkeit von Dimeren (wobei θ der Winkel zwischen der Laserpolarisation und der Dimerachse ist) – theoretisch erwartet, was auch auf Einzelpartikeloberfläche experimentell belegt wurde.^[41]

Abbildung 9 zeigt elektronenmikroskopische Bilder von SERS-aktiven selbstassemblierten 3D-Superstrukturen. 80 nm große Gold-Kerne wurden mit Raman-Reportermolekülen inkubiert und mit einer sehr dünnen Silica-Hülle

Methode bestätigen zusammen die plasmonische Kopplung zwischen dem Kern und den Satelliten-Partikeln, wobei die Hotspots sowohl zwischen Kern und Satelliten als auch zwischen den Satelliten auftreten (Abbildung 10). Derartige Computersimulationen sind generell sehr aufschlussreich für das Verständnis von plasmonischer Kopplung in komplexen Metallnanostrukturen und insbesondere dem Vorkommen von Hotspots.

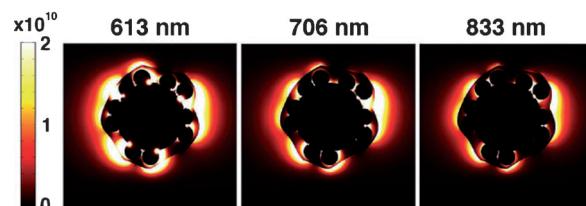


Abbildung 10. Räumliche $|E|^4$ -Verteilung in einem 2D-Ausschnitt eines computergenerierten 3D-Modells basierend auf der einzelnen Superstruktur in Abbildung 9d. Drei unterschiedliche LSPR bei 613, 706 und 833 nm können beobachtet werden. Aus Lit. [46].

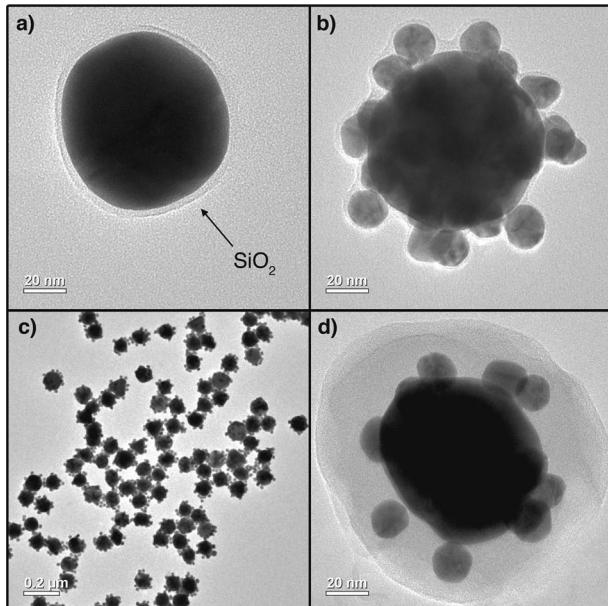


Abbildung 9. TEM-Bilder a) eines 80 nm großen Gold-Kerns mit ultradünner Silica-Schale, b,c) einer 3D-Superstruktur mit 20 nm großen, auf dem Kern selbstassemblierten Gold-Satelliten bei b) hoher und c) niedriger Auflösung und d) einer glasumhüllten 3D-Superstruktur. Aus Lit. [46].

verkapselt (Abbildung 9a),^[46] unter Verwendung eines in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Protokolls. Die ultradünne Glashülle wurde mit einer binären Mischung von Silanen, inklusive einem Aminosilan, funktionalisiert. Negativ geladene, Citrat-stabilisierte 20 nm Goldkugeln haben sich um diesen positiv geladenen ($-\text{NH}_3^+$) glasverkapselten 80 nm Kern herum assembliert (Abbildung 9b,c). Schließlich wurde die 3D-Struktur durch eine Silica-Verkapselung stabilisiert (Abbildung 9d). Korrelative HR-REM-Dunkelfeld-LSPR/SERS-Experimente mit einzelnen SERS-aktiven 3D-Superstrukturen sowie Berechnungen mittels der Finite-Elemente-

Der folgende Abschnitt beschreibt den direkten experimentellen Nachweis von Hotspots.

3.3. Experimenteller Nachweis von Hotspots: Isolierung, Untersuchung und Lokalisierung von Hotspots

3.3.1. Isolierung und Erforschung des Hotspots zwischen zwei Silbernanowürfeln

Berechnungen zu Dimeren von Nanokugelchen (siehe Abschnitt 3.1) haben gezeigt, dass diese Objekte ideale Kandidaten für die Erzielung großer Feldverstärkungen sind, da sich Hotspots an der Verbindungsstelle zwischen den beiden Kugeln bilden. Die Untersuchung einzelner Dimere würde es sogar möglich machen, die Feldverstärkung in den Hotspots zu quantifizieren und wertvolle Informationen zu liefern, um die spezielle Struktur der Hotspots mit der experimentell beobachteten SERS-Intensität in Beziehung zu setzen. Es ist daher von zentraler Bedeutung, den Signalbeitrag von Molekülen in den Hotspots zu bestimmen. Aber nicht nur die wenigen Moleküle in den Hotspots mit den größten Verstärkungen, sondern auch die Moleküle an den „kälteren Stellen“ tragen zum Gesamtsignal bei (siehe Abschnitte 3.1.2 und 3.1.3 zur Wahrscheinlichkeitsverteilung der EF). Deshalb ist es notwendig, den Signalbeitrag der Moleküle innerhalb und außerhalb des Hotspots voneinander zu trennen. Andernfalls würde nur ein (niedrigerer) EF-Mittelwert nachgewiesen und nicht der tatsächlich höhere EF_{dimer} des Hotspots.

Eine elegante Form der selektiven Entfernung von Molekülen an der Oberfläche von Metallnanostrukturen ist das Plasmaätzen. Diese Technik wird genutzt, um den Hotspot zwischen zwei Silbernanowürfeln zu isolieren und anschließend den SERS-Verstärkungsfaktor dieses speziellen Hotspots zu messen.^[47] Zunächst wurde anhand einzelner Silbernanowürfel gezeigt, dass Plasmaätzen die Reportermoleküle 4-Methylthiobenzol (4-MTB) und 1,4-Benzoldithiol (1,4-

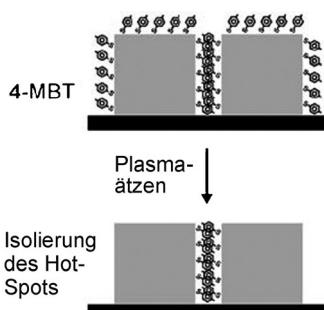


Abbildung 11. Isolierung von Molekülen in einem Hotspot durch Plasmaätzen. Eine selbstorganisierte Monolage von 4-Methylbenzolthiol (4-MBT) wird auf der Oberfläche eines Dimers von Silbernanowürfeln erzeugt. Plasmaätzen entfernt die oberflächengebundenen Moleküle, außer denjenigen zwischen den Würfeln. Aus Lit. [47]

BDT), die beide eine selbstassemblierte Monolage auf der Silberoberfläche bilden, entfernt. Dann wurde das Verfahren ausgeweitet auf Nanowürfel-Dimere mit einem engen Zwischenraum zwischen den beiden sich fast berührenden Würfeln (Abbildung 11). Nach dem Eintauchen des Nanowürfel-Dimers in eine 4-MTB-Lösung bildet sich eine selbstassemblierte Monolage auf der gesamten Oberfläche des Dimers aus (Abbildung 11 oben). 4-MBT-Moleküle, die sich in der engen Lücke zwischen den beiden Würfeln befinden, verhalten sich gegenüber dem Sauerstoffplasma wie eine resistente Multilage. Deshalb braucht es viel länger, im Hotspot befindliche 4-MBT-Moleküle zu entfernen, als solche außerhalb des Hotspots, also z.B. an der Würfeloberseite. Allgemein führt Plasmaätzen zum selektiven Entfernen von Molekülen, die nicht im Hotspot liegen (Abbildung 11 unten). Interessanterweise ist nach der Entfernung von Molekülen außerhalb des Hotspots nur eine geringe Abnahme der SERS-Intensität auszumachen (Abbildung 12). Dies zeigt, dass die Moleküle im Hotspot (also die Moleküle, die nicht durch Plasmaätzen entfernt wurden, aber die größte Verstärkung erfahren) den größten Beitrag zum SERS-Signal leisten.

Nach dem Plamaätzen wurde der Silbernanowürfel in eine 1,4-BDT-Lösung eingetaucht, um zu zeigen, dass das Plasmaätzen zu keiner nennenswerten Änderung der Ober-

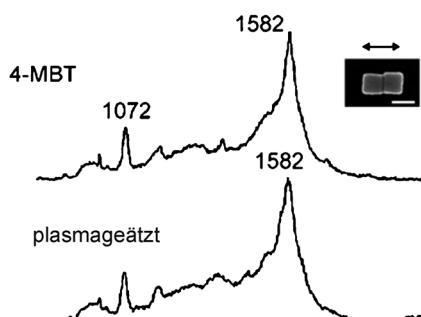


Abbildung 12. SERS-Spektren von 4-MBT vor und nach Plasmaätzen, gemessen bei paralleler Laserpolarisation bezüglich der Dimer-Achse. Das Signal nimmt nur sehr geringfügig ab, was belegt, dass die 4-MBT-Moleküle im Hotspot mit Abstand am meisten zur Signalverstärkung beitragen (vgl. Abbildung 11). Aus Lit. [47].

fläche des Silberwürfel-Dimers geführt hat. 1,4-BDT ist ein Dithiol, das stark auf der Silberoberfläche haftet, was vermutlich die treibende Kraft für die Entfernung von 4-MTB aus den Hotspots ist.

Die Quantifizierung von EF erfordert einen Schätzwert der Anzahl der Moleküle in den Hotspots. Die Autoren gehen davon aus, dass jedes 4-MBT-Molekül einen Platzbedarf von 0.49 nm^2 hat. Da die Nanowürfel eine Kantenlänge von 100 nm haben, entspricht dies etwa 200 Schichten von 4-MBT-Molekülen in vertikaler Richtung (Abbildung 11). Auf der Basis dieser Annahmen wurde ein Verstärkungsfaktor von $\text{EF}_{\text{dimer}} = 2.2 \times 10^7$ bestimmt.

Moleküle in einem Hotspot erfahren nicht nur maximale Verstärkung (EF_{dimer}), sondern ihr SERS-Signal zeigt auch eine charakteristische Polarisierungsabhängigkeit. Maximale SERS-Signale werden beobachtet, wenn die Laserpolarisation parallel zur Dimer-Achse ausgerichtet ist (Abbildung 12 oben). Bei einer Ausrichtung im 45° -Winkel tritt eine weniger starke Anregung der entsprechenden Plasmonenresonanz auf, und die experimentell beobachtete SERS-Intensität ist niedriger als bei der parallelen Ausrichtung. Bei einer senkrechten Ausrichtung fällt die SERS-Intensität sogar noch stärker ab (Abbildung 13 oben). In diesem Fall tragen die im Hotspot gelegenen Moleküle nicht weiter zum SERS-Signal bei, das nun durch die Moleküle außerhalb des Hotspots bestimmt wird. (Abbildung 13 unten).

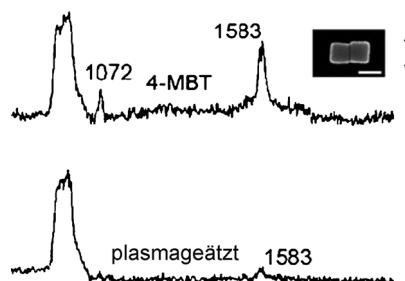


Abbildung 13. SERS-Spektren von 4-MBT vor und nach Plasmaätzen, gemessen bei senkrechter Laserpolarisation bezüglich der Dimer-Achse. Das Signal nimmt drastisch ab, was belegt, dass sich die 4-MBT-Moleküle im Hotspot befinden (vgl. Abbildung 11). Aus Lit. [47].

Die aufgezeigte Methodik des Plasmaätzens ist wertvoll, da sie in der Lage ist, einen einzelnen Hotspot zu isolieren, indem gezielt Moleküle außerhalb des Hotspots entfernt werden können, um anschließend die Eigenschaften des Hotspots zu untersuchen und dessen Verstärkungsfaktor zusammen mit seinem polarisationsabhängigen Verhalten zu bestimmen.

3.3.2. Direkter Nachweis der hohen räumlichen Lokalisierung von Hotspots in SERS

Die kontrollierte Ablagerung von Molekülen direkt im Hotspot und in klar definierten Abständen zum Hotspot bildet die Basis für den Nachweis der starken räumlichen Lokalisierung von Hotspots. SERS-Messungen am selben Typus von Analyten an unterschiedlichen Positionen auf verschiedenen Nanostrukturen mit identischen Abmessungen

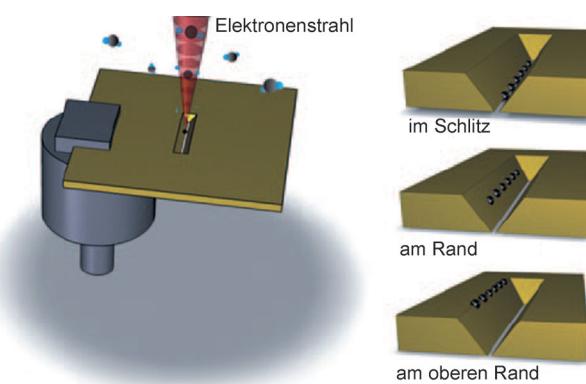


Abbildung 14. Lokale Abscheidung von kohlenstoffhaltigen Nanopartikeln (CNP) in einem Nanoschlitz durch Zersetzung von gasförmigen Vorstufen mittels Elektronenstrahlolithographie. Aus Lit. [48].

ermöglichen den Vergleich zwischen den dazugehörigen SERS-Intensitäten. Abbildung 14 veranschaulicht die experimentelle Methodik der gezielten punktuellen Abscheidung von amorphen kohlenstoffhaltigen Nanopartikeln (CNP) auf verschiedene Stellen eines Goldnanoschlitzes: direkt im Schlitz (oben rechts), an der Seitenwand (Mitte rechts) und am oberen Rand (unten rechts).^[48] CNP werden als Analyte für SERS genutzt und werden lokal durch die Zersetzung von gasförmigen Ausgangsstoffen abgelagert, in diesem Fall Hexadecan. Die Umwandlung vom Gas zum Festkörper wird durch einen Elektronenstrahl herbeigeführt, der die hohe räumliche Lokalisierung der gezielten Ablagerung garantiert (Abbildung 14a ganz oben links). Querschnittsaufnahmen eines im Nanoschlitz abgelagerten CNP, die mit energieaufgelöster Transmissionselektronenmikroskopie gemacht wurden, zeigten eine hohe räumliche Kontrolle der Ablagerung.

Darüber hinaus wurde die Verteilung der optischen Feldverstärkung im Nanoschlitz mithilfe der Finite-Differenzen-Zeitdomänen-Methode (FDTD) berechnet. Die Lokalisierung des Hotspots im Nanoschlitz wird klar aus den entsprechenden Falschfarben-Bildern ersichtlich. Zur Berechnung der SERS-Verstärkung kann die $|E|^4$ -Näherung genutzt werden (siehe Abschnitt 2). So wurde z.B. in diesem Fall ein Anstieg der SERS-Intensität um den Faktor $350^2 = 62\,500$ berechnet.

Abbildung 15 zeigt Raman-Falschfarbenbilder der abgelagerten CNP an drei verschiedenen Stellen (vgl. Abbildung 14): direkt im Nanoschlitz (NS), an der Seitenwand und an der obersten Ecke des NS. Die Raman-Bilder, in denen der Nanoschlitz-Bereich durch eine weiße Box angezeigt ist, demonstrieren eindeutig, dass hohe SERS-

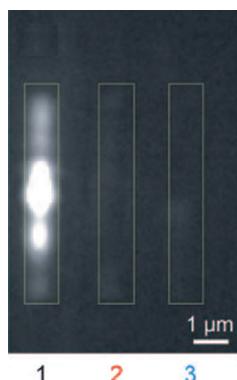


Abbildung 15. Raman-Bilder von CNP 1) im Nanoschlitz (NS), 2) am Rand und 3) am oberen Rand des NS (vgl. Abbildung 14). Die Aufnahmen belegen den starken Verstärkungseffekt der direkt im Hotspot gelegenen CNP am Boden des Schlitzes. Aus Lit. [48].

Signale nur dann beobachtet werden können, wenn die CNP direkt in dem plasmonisch aktiven Gold-Nanoschlitz abgelagert werden. Die entsprechenden SERS-Spektren zeigen die spektral breiten Beiträge von amorphem Kohlenstoff und zeigen die folgende Reihenfolge von experimentell beobachteten SERS-Intensitäten als eine Funktion der Lage der CNP im Gold-Nanoschlitz (NS): im NS \gg am Rand des NS $>$ am oberen Rand.

Insgesamt verdeutlichen diese Ergebnisse den überwältigenden Beitrag von nur einigen wenigen, direkt im Hotspot gelegenen Analyt-Molekülen zum SERS-Gesamtsignal.

3.4. Abhängigkeit der Verstärkung vom Abstand zwischen Molekül und Metalloberfläche

Der Abstand zwischen dem Molekül und der Metalloberfläche ist ein wichtiger Parameter, der die SERS-Signalstärke bestimmt. Ein einfaches Modell für die abstandsabhängige Verstärkung beschreibt diese als Nahfeld-Wechselwirkung zwischen einem oszillierenden Dipol im Zentrum einer Metallkugel und einem Molekül mit dem Abstand R zum Kern der Kugel, aus der sich eine Abstandsabhängigkeit von R^{-12} ergibt.

3.4.1. Spitzenverstärkte Messungen

Abbildung 16 zeigt Ergebnisse von spitzenverstärkter Raman-Streuung (TERS) auf einwandigen Kohlenstoff-Nanoröhren (SWCNT) mit einer scharfen Spitz (Abbil-

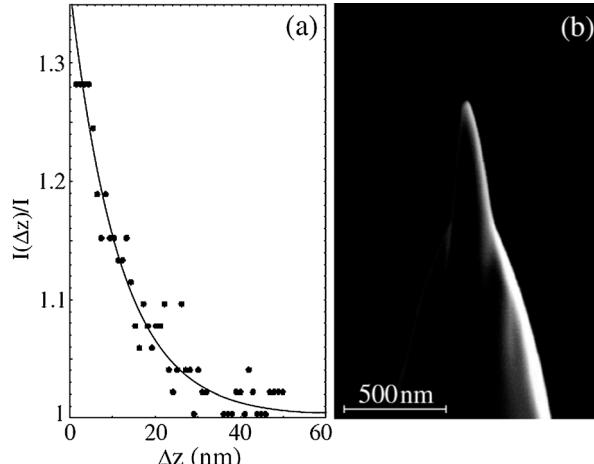


Abbildung 16. a) Abhängigkeit der Raman-Intensität des G'-Signals einwandiger Kohlenstoff-Nanoröhren (SWCNTs) vom Abstand zwischen Spitz und SWCNT. b) REM-Bild einer scharfen Spitz. Aus Lit. [49]

dung 16b), die von der Oberfläche entfernt wurde (Abbildung 16a).^[49] Die jeweiligen TERS-Intensitäten folgen eindeutig einem inversen Potenzgesetz. Der analytische Ausdruck, der das Raman-Intensitätsprofil beschreibt, beinhaltet einige weitere Parameter: die laterale Distanz zwischen dem Molekül und dem zentralen Punkt unter der Spitz, den

Spitzenradius und die Tunnelspaltbreite. Der Spitzenradius (typischer Wert: 20 nm) war viel kleiner als die Wellenlänge der Laseranregung.

3.4.2. Atomlagenabscheidung

In TERS-Experimenten kann die plasmonisch aktive Spitze mithilfe von AFM oder STM exakt in z -Richtung zurückgezogen werden, um so die Abstandsabhängigkeit der Signalstärke zu bestimmen. Eine Möglichkeit, dies in SERS-Experimenten zu erreichen, ist die Benutzung eines Abstandhalters mit einer variablen Länge von wenigen Ångström bis zu 100 nm. Die beschichtete plasmonische Oberfläche muss dabei lochfrei sein, um eine direkte Interaktion mit dem Sondenmolekül zu verhindern. Die Atomlagenabscheidung ist ein Verfahren, derartige Abstandhalter herzustellen, indem sehr einheitliche und kontrollierte dünne Schichten produziert werden. Abbildung 17 zeigt SERS-Er-

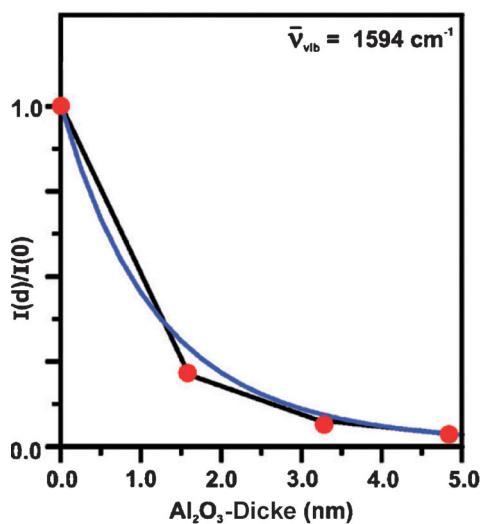


Abbildung 17. Abhängigkeit der Raman-Intensität des Pyridin-Signals bei 1594 cm^{-1} von der Dicke der Al_2O_3 -Schicht auf einem auf Nano-kugeln aufgetragenen Ag-Film. Aus Lit. [51].

gebnisse von Pyridin, das auf eine Al_2O_3 -Schicht auf einem AgFON-Substrat aufgebracht wurde (siehe Abschnitt 4.2.2.2).^[51] Die Intensität der Pyridinbande bei 1594 cm^{-1} ist als Funktion der Al_2O_3 -Dicke dargestellt. Die experimentellen Daten folgen einer R^{-10} -Abstandsabhängigkeit. Im Gegensatz zu den TERS-Experimenten, die nur ein einzelnes Molekül/SWCNT (Abschnitt 3.4.1) untersucht haben, wird hier die gesamte Oberfläche (Skalierung proportional zu R^2 für eine Kugel) untersucht (d.h. 10^{-12} pro Molekül $\times 10^2 = 10^{-10}$ insgesamt)

Ein anderes Verfahren basiert auf molekularen Abstandhaltern, die DNA und Gold-Nanoschalen als plasmonisches Substrat nutzen.^[52]

3.5. Jenseits von reiner Plasmonik: „chemische“ Beiträge und Resonanz-Raman-Beiträge

Derzeitige Modelle zur Erklärung der experimentell beobachteten Signalverstärkungen bei SERS enthalten zwei Faktoren: die elektromagnetische (EM) und die „chemische“ Verstärkung (CE). Der EM-Mechanismus beschreibt das verstärkte lokale elektromagnetische Feld aufgrund resonanter Anregung von Plasmasillationen (Plasmonen) in der Metallnanostruktur. Dieser rein physikalische Effekt ist mit Abstand der dominierende Faktor, mit Standard-EF in der ganzen Bandbreite von 10^3 bis 10^{10} .^[20] Bitte erinnern Sie sich an die Grundformel für den induzierten Dipol $\mu_{\text{ind}} = \alpha_{\text{molecule}} E_{\text{loc}}(\omega_{\text{inc}})$, die für die klassische Beschreibung des Raman-Effekts benutzt wurde, und beachten Sie, dass die EM-Verstärkung über die Zunahme des lokalen elektrischen Feldes E_{loc} auftritt. Tatsächlich ist für die lokalen Feldverstärkungen, die durch die Anregung der LSPR entstehen, das Vorhandensein von Molekülen völlig irrelevant; letztere sind nur notwendig für die „Frequenz-Verschiebung“ von ω_{inc} zu $\omega_{\text{inc}} - \omega_{\text{vib}}$ über Raman-Streuung (Abbildung 1B). Eine direkte Wechselwirkung zwischen dem Molekül und der darunterliegenden Metallooberfläche hingegen wird durch diesen Effekt nicht erfasst.

Demgegenüber bezieht sich der CE-Mechanismus auf die elektronischen Eigenschaften des Adsorbats und vollzieht sich durch einen Anstieg in der elektronischen Polarisierbarkeit $\alpha_{\text{molecule@metal}}$ des adsorbierten Moleküls; CE-Verstärkungen betragen ein oder zwei Größenordnungen, sind damit also viel kleiner als der EM-Beitrag. Erstens kann der Ladungstransfer (CT) zwischen dem Molekül in seinem elektronischen Grundzustand und dem Metall die Polarisierbarkeit des Moleküls verändern, was wiederum zu einer Veränderung des Raman-Streuquerschnitts des Moleküls führt. Derselbe Effekt tritt in der Koordinationschemie auf, wo Ligandenmoleküle an ein metallisches Zentrum gebunden sind. Zweitens unterscheiden sich die Energieniveaus des Adsorbatmoleküls üblicherweise von denen der ungebundenen oder „freien“ Moleküle. Nehmen wir z.B. an, dass die Wellenlänge der Laseranregung nicht übereinstimmt mit einem elektronischen Übergang im „freien“ Molekül, wohl aber mit dem des adsorbierten Moleküls. Die resonante Anregung von elektronischen Übergängen in Molekülen ist unter dem Begriff Resonanz-Raman-Streuung (RR) bekannt. Zur gleichen Zeit können neue elektronische Anregungskanäle durch photoinduzierten CT auftreten, d.h. durch CT vom Metall zum adsorbierten Molekül. Dies ist ein wesentlicher Bestandteil des sogenannten CT-Resonanz-Modells, bei dem die Übergangsenergien von dem Abstand zwischen molekularen und metallischen Energieniveaus abhängen. Diese unterschiedlichen Prozesse experimentell zu entflechten, ist nicht leicht (siehe Abschnitt 3.5.1) und mitunter sogar unmöglich.

Elektronenstrukturrechnungen an Molekülen auf Metalloberflächen/-Clustern sind daher ein sehr wertvolles Hilfsmittel, um die Rolle der oben angesprochenen Beiträge separat unter kontrollierten und a priori wohldefinierten Bedingungen zu untersuchen.^[53,54] Die Grenzflächenstruktur eines Molekül-Metall-Clusters und seine optischen Eigen-

schaften können auf atomarer Skala über Elektronenstrukturrechnungen modelliert werden. Verschiedene Parameter können untersucht werden, beispielsweise die Bindungssituation zwischen Molekül und Metallnanostruktur, der Effekt der Oberflächenrauigkeit auf atomarer Skala, Beiträge von molekularen und Ladungstransfer-Resonanzen, der Einfluss der Laseranregungswellenlänge sowie die Wellenlänge der Stokes-Raman-Streuung. Mit anderen Worten: Elektronenstrukturrechnungen können dazu dienen, die Rolle der Einzelbeiträge unter den kontrollierten und wohldefinierten Bedingungen eines Computer-, „Experiments“ zu entkoppeln.

3.5.1. Elektronenstrukturrechnungen an einem Modellsystem: *Pyridin@Ag₂₀*

Aufgrund der hohen Rechenkapazitäten für elektronische Strukturrechnungen legen die meisten Berechnungen kleine Clusterverbindungen zugrunde, um metallische Oberflächen zu imitieren. Darüber hinaus berücksichtigen die meisten Berechnungen nur statische Raman-Streuung und können deshalb nur die chemische Verstärkung darstellen. Zeitabhängige Dichtefunktionaltheorie (TDDFT) und eine Kurzzeitnäherung für den Raman-Streuquerschnitt wurde auf Pyridin (C_{2v} -Symmetrie), welches über ein Stickstoffatom senkrecht an einen Ag-Cluster (T_d -Symmetrie) gebunden ist, angewendet. Zwei verschiedene Konfigurationen – beide mit C_s -Symmetrie – wurden wegen ihrer sehr unterschiedlichen lokalen chemischen Umgebungen untersucht: der Oberflächen(S)-Komplex mit oberseitiger Bindung von Pyridin auf eine der vier Flächen des tetraedischen Ag-Clusters, das die (111)-Oberfläche von kubisch-flächenzentriertem (fcc) Silber repräsentiert (Abbildung 18a); und der Vertex(V)-Komplex

Anbindung an Silber können einige Unterschiede im Raman-Spektrum beobachtet werden. Die Intensität der gesamten Raman-Streuung ist beim V-Komplex verstärkt um den Faktor 4, beim S-Komplex um den Faktor 8. Die höhere Verstärkung beim S-Komplex entspricht den Erwartungen, da sie mit einer stärkeren Py-Ag-Interaktion einhergeht. Die beobachtete chemische Verstärkung kommt durch die Veränderungen in den elektronischen Eigenschaften zustande, insbesondere die erhöhte Polarisierbarkeit aufgrund von Ladungstransfer vom Pyridin zum Silber nach Anbindung. Dies führt außerdem zu Wellenzahlverschiebungen, insbesondere für jene Normalmoden, die Kernbewegungen des N-Atoms entlang der N-Ag-Bindung beinhalten. Modenspezifische Unterschiede werden nicht nur bei Bandenpositionen beobachtet, sondern auch bei den relativen Raman-Intensitäten. Zusätzlich zum chemischen Effekt werden auch die anderen beiden Einflussfaktoren – der Ladungstransfer und die elektromagnetische Verstärkung – berechnet. Der Ladungstransfer(CT)-Beitrag wurde für die CT-Anregung (471 nm) mit der größten Oszillatorträrke berechnet. Die Raman-Streuintensitäten sind etwa 10⁴-mal größer im Vergleich zur normalen Raman-Streuung beim Pyridin, d.h., der stattfindende Ladungstransfer erhöht die chemische Verstärkung um weitere drei Größenordnungen. Entsprechend wurde die elektromagnetische Verstärkung für den S- und V-Komplex bei einer einfallenden Wellenlänge von 365 und 363 nm berechnet. Es ist wichtig, sich zu vergegenwärtigen, dass man aufgrund der limitierten Größe des Clusters mit nur 20 Silberatomen nicht von einer echten kollektiven Oszillation sprechen kann, sondern es vielmehr als mikroskopisches Modell einer Plasmonanregung in einem Silber-NP betrachten sollte.

3.5.2. Potentialabhängiges SERS an einzelnen Hotspots

Die Abgrenzung des CT-Beitrages einerseits und SERS-Intensitätsvariationen durch molekulare Neuausrichtung, die durch ein externes Potential induziert wird, andererseits, wird durch die Nutzung mehrerer Laseranregungslinien im sichtbaren Bereich möglich. Der Effekt molekularer Neuausrichtungen auf die SERS-Spektren sollte unabhängig sein von der Anregungsenergie. Der CT-Beitrag hingegen sollte abhängig sein von der Anregungsenergie, da er vom Überlapp der eingehenden Photonenenergie und der CT-Übergangsenergie abhängt. Elektrochemische SERS-Experimente werden typischerweise an angerauten Elektroden („bulk“) mit großer Inhomogenität bezüglich der plasmonischen Verstärkung durchgeführt, denn dort gibt es sowohl Hotspots mit extremen Verstärkungen als auch Regionen mit nur mäßiger Verstärkung. Aus diesem Grund ist es schwierig, die Beiträge der einzelnen Mechanismen zu quantifizieren, da man hierzu Kenntnisse über zahlreiche Parameter haben müsste, die praktisch nicht greifbar sind: Verteilung der Hotspots, molekulare Orientierung und die Verteilung auf einer höchst inhomogenen Oberfläche. Die Komplexität der Lage kann dadurch entschärft werden, dass SERS-Signale von einzelnen Hotspots unter elektrochemischen Bedingungen aufgenommen werden.^[55] Abbildung 19 zeigt REM-Bilder von aggregierten Silbernanopartikeln bei niedriger (a) und hoher

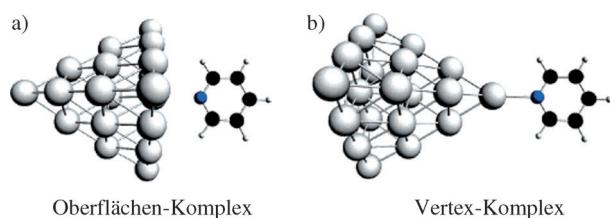


Abbildung 18. Der Py@Ag₂₀-Cluster kann a) einen Oberflächen-Komplex oder b) einen Vertex-Komplex bilden. Aus Lit. [53].

mit Pyridinanbindung an eine der Ecken des Ag-Clusters, das eine Stelle mit einem adsorbierten Atom repräsentiert (Abbildung 18b). In beiden Komplexverbindungen kann ein Elektronendichtetransfer vom Pyridinring und dem zentralen Silberatom zur N-Bindungsregion hin beobachtet werden, in Übereinstimmung mit dem Ladungstransfer vom Pyridin zum Ag-Cluster insgesamt. Die N-Ag-Bindungslänge ist im V-Komplex kürzer als im S-Komplex, was auf eine stärkere Interaktion im Bereich des adsorbierten Atoms hinweist.

Die Raman-Spektren des Pyridins im S- und im V-Komplex wurden simuliert. Der Raman-Wechselwirkungsquerschnitt im normalen Pyridin-Spektrum hat die Ordnung 10⁻³¹ cm² sr⁻¹. Die beiden dominierenden Raman-Banden bei 978 und 1022 cm⁻¹ sind Ringmoden zugeordnet. Mit der

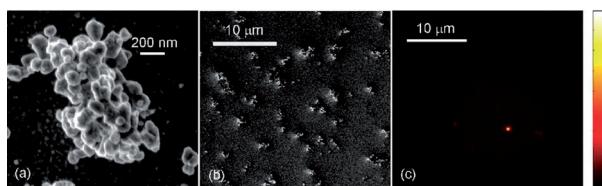


Abbildung 19. a,b) REM-Bilder von Silber-Inseln und c) Raman-Falschfarbenbild, das einen einzelnen Hotspot zeigt. Aus Lit. [55].

Auflösung (b) vor der Anwendung von Potentialrampen. 4-Mercatopyridin (4-MPy) wurde aufgrund seiner Eigenschaft, über die Thiolgruppe stark an die Silberoberfläche zu binden, sowie wegen seiner C_{2v} -Symmetrie, als Sondenmolekül ausgewählt, was die Identifizierung molekularer Neuaustrichtungen vereinfacht. In Abbildung 19 rechts sieht man ein SERS-Falschfarbenbild, das einen einzelnen Hotspot zeigt. Wellenlängen- und potentialabhängige SERS-Spektren von 4-MPy-Molekülen wurden auf einzelnen Hotspots innerhalb der Inselstrukturen des Silbers registriert. Die angewendete Potentialrampe treibt beim Durchstimmen des Fermi-Niveaus des Metalls das System Molekül@Metall in die CT-Resonanz hinein und wieder aus ihr heraus, während die unterschiedlichen Laseranregungswellenlängen die Unterscheidung von CT-Beiträgen (wellenlängenabhängig) von der molekularen Reorientierung (wellenlängenunabhängig) erlauben. Referenzmessungen wurden mit einem zweiten Probenmolekül, R6G, durchgeführt. Diese Referenzexperimente erfolgten separat, d.h. R6G und 4-MPy wurden nie innerhalb desselben Experimentes coadsorbiert. Durch die Kenntnis des absoluten Raman-Querschnitts für R6G kann der absolute Raman-Querschnitt für 4-MPy (und jedes andere Molekül) bestimmt werden, ohne dass man die (normalerweise experimentell nicht erreichbare) absolute Größe der EM-Verstärkung kennt. Die Autoren schlossen daraus, dass der Raman-Streuquerschnitt der stärksten Bande von 4-MPy sich in der Größenordnung von etwa 10^{-26} cm^2 bewegt, was mindestens 3 Größenordnungen stärker ist als bei ähnlichen, kleinen organischen Molekülen in Abwesenheit von elektronischer Resonanz, z.B. Benzol. Da die kleinste elektronische Anregung von 4-MPy bei 324 nm auftritt, wird diese zusätzliche Verstärkung um 3 Größenordnungen dem chemischen Mechanismus zugeschrieben, weil in diesen SERS-Experimenten 4-MPy weit entfernt von elektronischen Resonanzen angeregt wird. Insgesamt betrachtet ist dieser Ansatz besonders hilfreich für Molekül@Metall-Systeme mit CT-Anregung im sichtbaren Bereich, die sich natürlicherweise mit der Plasmonresonanz des Metalls überschneidet.

4. Plasmonische Nanostrukturen für SERS

Die ideale plasmonische Nanostruktur für SERS – oft als SERS-Substrat bezeichnet

– ist chemisch stabil, leicht reproduzierbar herstellbar und weist einen räumlich einheitlichen, hohen EF auf. Zahlreiche Ansätze für die Synthese verschiedener SERS-Substrate wurden in einer ganzen Reihe von Buchartikeln und Übersichtsartikeln zusammengefasst.^[33,56–66] In diesem Abschnitt werden nur einige ausgewählte plasmonische Nanostrukturen hervorgehoben. Silber und Gold sind die bei weitem am häufigsten genutzten Metalle für SERS. In Abschnitt 4.1 werden Metall-NP als Substrate für die Nutzung von kolloidbasierter SERS behandelt, während sich Abschnitt 4.2 mit Arrays und Filmen befasst. Strategien zur Oberflächenfunktionalisierung zur Anreicherung und zum Fangen von Molekülen werden in Abschnitt 5.3 besprochen.

4.1. Metallnanopartikel als SERS-Substrate

4.1.1. Metallnanopartikel mit sehr dünner Glasummantelung (SHINERS)

Abbildung 20 zeigt verschiedene Modalitäten von plasmonunterstützter Raman-Streuung. In Abbildung 20a werden blanke Au-Nanokugeln wie ein Film auf einen soliden Träger aufgebracht, und die zu untersuchenden Moleküle – angezeigt als blaue Punkte – stehen in direktem Kontakt mit der Metalloberfläche. Dieser Kontaktmodus trifft auch auf Übergangsmetall-beschichtete NP zu (Abbildung 20b), was die Anwendbarkeit von SERS auf andere Wellenlängenbereiche und Übergangsmetall-katalysierte Reaktionen erweitert. Im Gegensatz dazu operiert die spitzenverstärkte Raman-Streuung (TERS, tip-enhanced Raman scattering) im kontaktfreien Modus (Abbildung 20c): Die Au-Spitze, die als Raman-Signalverstärker fungiert, und die Probenmoleküle auf der Oberfläche werden voneinander getrennt. Dieser leistungsstarke Ansatz von chemischer Bildgebung auf der Nanometerskala ermöglicht es, ein beliebiges Substrat ohne zusätzliche Einschränkungen hinsichtlich der Materialbeschaffenheit und der Oberflächentopographie abzufragen. Hüllen-isolierte (ummantelte) Nanopartikel-Raman-Spek-

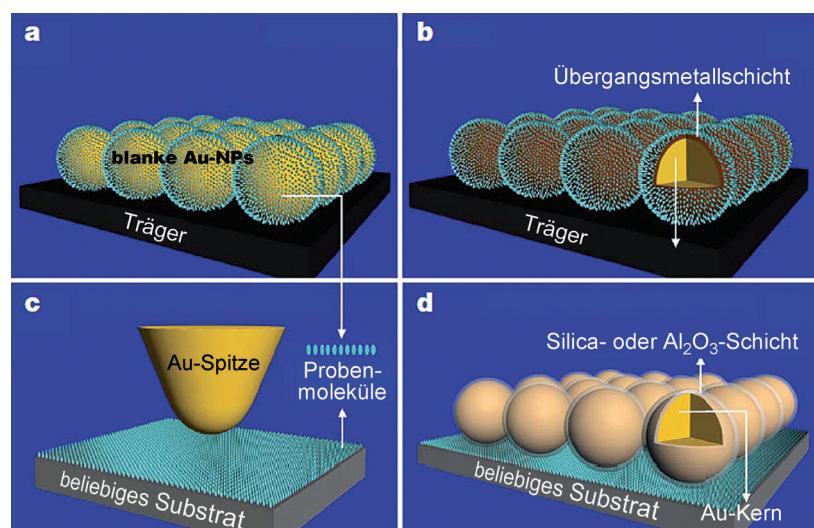


Abbildung 20. Unterschiedliche Modalitäten von SERS. Siehe Haupttext für Einzelheiten. Aus Lit. [67].

troskopie (SHINERS, shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman scattering)^[67,68] funktioniert auch im kontaktfreien Modus, indem man Au-Nanokugeln benutzt, die durch eine 2 nm dünne Glashülle geschützt sind (Abbildung 20d), welche die Goldoberfläche gegen die detektierenden Moleküle isoliert und dadurch eine möglicherweise störende Interaktion verhindert. Andererseits führt der sehr kurze Metall-Molekül-Abstand (SERS-Abstandsabhängigkeit, siehe Abschnitt 3.4) von 2 nm noch immer zu einem signifikant NP-verstärkten Raman-Signal im Vergleich zum Kontaktmodus. Da die gesamte Oberfläche mit einem „intelligenten Staub“ aus Au/SiO₂-Partikeln bedeckt ist, werden die darunterliegenden Moleküle von einer großen Anzahl von „Spitzen“ gleichzeitig „abgefragt“. Die starke Verdichtung der Au/SiO₂-Partikel, die als Monolage auf einer weichen Au-Oberfläche vorhanden sind, wurde durch REM sichtbar gemacht. Die Dicke der Glashülle kann durch HR-TEM sichtbar gemacht werden. Neben der Verkapselung mit Silica kann auch eine sehr dünne Aluminiumoxidhülle verwendet werden. Insgesamt bietet diese Methodik eine sehr große Flexibilität, da sie praktisch auf allen Oberflächen anwendbar ist, indem sie sich als „intelligente Schicht“ ihrer Topographie anpasst und dadurch über „räumliches Multiplexing“ auf der gesamten Oberfläche gleichzeitig wirkt. Ebenso wichtig ist, dass der kontaktfreie Modus die direkte Metall-Molekül-Interaktion verhindert – die Quelle vieler Unregelmäßigkeiten, die im konventionellen SERS-Kontaktmodus (Abbildung 20a) beobachtet werden. Dies führt zu aussagefähigeren Resultaten, da die NP nur die gewünschte Signalverstärkung liefern, ohne gleichzeitig die vibronischen Eigenschaften bzw. die Konformation des Moleküls bei Adsorption auf der Metalloberfläche zu verändern.

4.1.2. Anisotropes Ätzen von Silbernanopartikeln

Die Fähigkeit, zwischen unterschiedlichen kristallographischen Flächen und Wachstumsrichtungen unterscheiden zu können, ist von entscheidender Bedeutung für die Kontrolle der Form einkristalliner Metall-NP.^[69,70] Die Lage der Plasmonenbande und die Streueigenschaften hängen von der Größe, der Form und der Umgebung der Partikel ab. Einzelne Silber- und Gold-Nanokugeln mit Plasmonenbanden jeweils im blauen bzw. grünen Bereich weisen nur moderate EF auf. Im Gegensatz zu hochgradig symmetrischen und isotropen kolloidalen Nanokristallen zeigen plasmonische Nanostrukturen mit scharfen Ecken und Kanten deutlich erhöhte Feldverstärkungen. Die kontrollierte Synthese solcher anisotropen Partikel mit hoher Ausbeute und Reinheit ist deshalb ein vielversprechender Ansatz für plasmonisch hochaktive Nanostrukturen mit Einzelpartikelssignalstärke.

Ähnlich wie die Kontrolle in Bezug auf Größe und Form der NP^[69,70] kann auch der entgegengesetzte Prozess – selektives Ätzen – für die kontrollierte Generierung von anisotropen Nanostrukturen genutzt werden. Anisotropes Ätzen von oktaedrischen Silber-NP^[31] wurde entwickelt, indem man eine 9:1-Mischung aus NH₄OH und 30% H₂O₂ für selektives Ätzen der (100)-Nanokristallflächen benutzte. Abbildung 21 zeigt schematisch die Konversion des Achtecks (links) in einen sternförmigen Oktagon (rechts) über ein

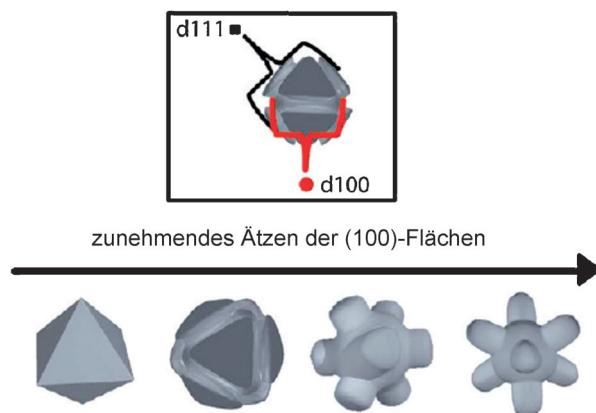


Abbildung 21. Anisotropes Ätzen von oktaedrischen Ag-Nanopartikeln. Aus Lit. [31].

verstärktes anisotropes Ätzen der (100)-Flächen. Auch quantitative Daten der Kinetik wurden erhalten, welche die Selektivität der 9:1(NH₄OH/H₂O₂)-Mischung für die (100)-Flächen veranschaulichen. Die durchschnittliche Dicke der NP in beide Richtungen (d100 und d111) wurde durch die entsprechenden REM-Bilder bestimmt und als Funktion der Konzentration der Ätzflüssigkeit ermittelt. Während sich d100 mit c(H₂O₂) schnell ändert, verändert sich d111 kaum. Die Differenz in der Abnahme, bestimmt über eine lineare Kurvenanpassung, beträgt mehr als das 20fache.

Die optischen Eigenschaften jeder der vier Zustände beim Ätzen, beginnend bei den achtseitigen Partikeln, wurden auf Einzelpartikel-Ebene durch Dunkelfeldmikroskopie charakterisiert (Abbildung 22). Alle Partikelmorpholo-

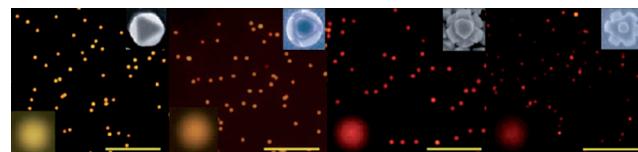


Abbildung 22. Einzelpartikel-Dunkelfeldbilder von durch anisotropes Ätzen erzeugten NP. Aus Lit. [31].

gien weisen aufgrund ihrer charakteristischen und individuellen elastischen Streuspektren unterschiedliche Farben auf – von gelb-grün bei achtseitigen bis zu rot bei den achtarmigen Strukturen. Neben diesen Einzelpartikel-LSPR-Experimenten wurde gezeigt, dass alle Partikel auch Einzelpartikel-SERS-Empfindlichkeit aufweisen, wobei ein nichtresonantes Sondenmolekül und 1 s Integrationszeit verwendet wurden.

Insgesamt zeigen diese anisotropen Silber-NP interessante plasmonische Eigenschaften, mit LSP-Resonanzen, die den sichtbaren bis nahinfraroten Bereich abdecken und aufgrund ihrer intrinsischen Kanten und Ecken hohe Streuquerschnitte aufweisen.

4.1.3. Dimere von Silbernanopartikeln

Dimere von Edelmetallnanokugeln sind aufgrund des Vorkommens eines Hotspots im Zwischenraum der beiden Kugeln hoch effiziente plasmonische Substrate für SERS (siehe Abschnitt 3.1). Während kolloidale Cluster oder Aggregate nasschemisch routinemäßig weitgehend unkontrolliert durch die Zugabe von Salz präpariert werden, ist ihre kontrollierte Synthese eine deutlich größere Herausforderung. Ein eleganter und direkter Weg hin zu Dimeren aus Silbernanokugeln beginnt bei Silber-Nanowürfeln (Abbildung 23 links).^[71] Das Hinzufügen geringer Mengen einer

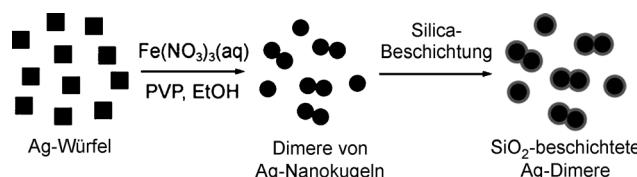


Abbildung 23. Synthese von Ag-Nanokugel-Dimeren aus Ag-Würfeln. Aus Lit. [71].

wässrigen $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ -Lösung zu einer Suspension aus Ag-Nanowürfeln ergibt Dimere von Ag-Nanokugeln durch Ätzen und Dimerisierung. Das Eisensalz $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ hat eine wichtige Doppelfunktion in diesem Prozess. Erstens ist es ein starkes nasses Ätzmittel, um Silber über die Oxidation von Ag(s) zu Ag^+ aufzulösen. Zweitens führt es als ionische Spezies bzw. Elektrolyt zur Herabsetzung der Stabilität des kolloidalen Systems. Somit dient es einerseits als Äzhilfe bei der Umwandlung von Ag-Würfeln in Ag-Kugeln und löst andererseits die darauf folgende Dimerisierung der Ag-Kugeln aus. Außerdem ist die Anwesenheit von Polyvinylpyrrolidonin (PVP) erforderlich. Ohne PVP kommt der Ätzprozess nicht voran. Darüber hinaus wurden auch keine Dimeren gebildet, wenn die Reaktion in Wasser durchgeführt wurde, vermutlich durch die schnelle Bildung einer Hülle aus Fe(OH)_3 , welche die Dimerbildung verhindert. In einem zweiten Schritt (Abbildung 23 rechts) sind die Dimeren der Ag-Nanokugeln mit einer Silicahülle ummantelt. Dies ist notwendig, um zu belegen, dass sich die Dimeren tatsächlich in der Lösung gebildet haben und nicht erst auf dem Substrat während der Präparation der Probe für die elektronenmikroskopische Analyse.

Die elektronenmikroskopischen Bilder in Abbildung 24 zeigen die entstandenen Ag-Nanokugel-Dimeren, die aus Ag-Würfeln mit einer Kantenlänge von ca. 100 nm stammen. Die hohe Zahl von Dimeren, hervorgehoben durch weiße und schwarze Ellipsen, zeugen von der hohen Ausbeute von etwa 66 %, basierend auf $N = 150$ Ag-NP. Eine sehr kleine Lücke von nur 0.67 nm oder 670 pm – dies entspricht der Länge von wenigen C-C-Bindungen – ist im HR-TEM-Bild in Abbildung 24C zu erkennen. Das TEM-Bild, das von der Probe mit Silicahülle gemacht wurde, enthält auch eine große Zahl von Dimeren, wodurch sehr überzeugend belegt wird, dass sich die Dimeren tatsächlich in der Suspension gebildet haben und nicht erst bei der Aufbringung auf das Gitternetz zur REM- oder TEM-Analyse. Polarisationsabhängige SERS-Messun-

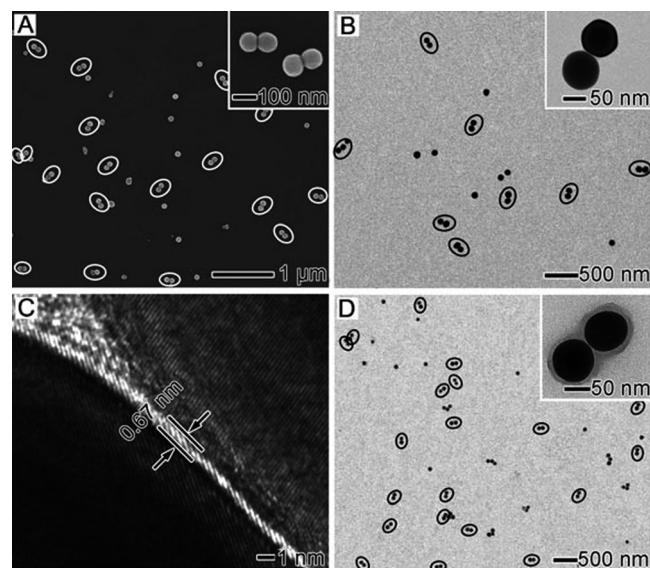


Abbildung 24. REM- und TEM-Bilder von Ag-Nanokugel-Dimeren, die eine sehr kleine Lücke zwischen den Partikeln erkennen lassen. Aus Lit. [71].

gen von Ag-Nanokugel-Dimeren mit 4-Methylthiobenzol (4-MBT) als Sondenmolekül weisen unter Laseranregung, die parallel oder senkrecht zur Dimerachse (vgl. Abschnitt 3.3.1.) erfolgt, die erwartete richtungsabhängige Verstärkung auf. Auch größere Cluster als Dimeren können hergestellt werden, basierend auf einer eleganten stöchiometriekontrollierten Heteroassemblierung von NP.^[44]

Um die größenabhängigen optischen Eigenschaften der betreffenden Dimeren und Assemblate systematisch beurteilen zu können, ist die Kontrolle der Größe und Mono-dispersität von quasi-sphärischen AgNP^[72] erforderlich.

4.2. Nanostrukturierte Arrays und Beschichtungen als SERS-Substrate

4.2.1. Nanostrukturierte, durch Nanokugel-Lithographie hergestellte SERS-2D-Substrate

Nanokugel-Lithographie (NSL, nanosphere lithography) ist eine elegante, sehr effiziente und besonders flexible Methode zur Nanostrukturierung, die in besonderem Maße die Kontrolle über Größe und Form der NP sowie den Partikel-abstand ermöglicht. Die folgende Beschreibung von NSL bezieht sich auf die einfachste Anordnung, ein einfach gepacktes periodisches Partikelarray.^[73–76] Eine hexagonal dicht gepackte Monolage aus Nanokugeln ordnet sich selbst auf der Oberfläche eines Substrats an (Abbildung 25 oben). Mittels Ausgasung rücken die Nanokugeln durch Kapillarkräfte enger zusammen. Die daraus resultierende 2D-Monolage aus Nanokugeln dient dann als kolloidale Kristallmaske (Seitenansicht: Abbildung 25 oben rechts; oben: Abbildung 26) für die folgende Aufbringung von Metall, entweder durch Be-dampfung oder durch elektrochemische Abscheidung (Abbildung 25 Mitte).^[76] Durch die C_3 -symmetrischen Spalten (Abbildung 26) kann das abgeschiedene Metall das Substrat

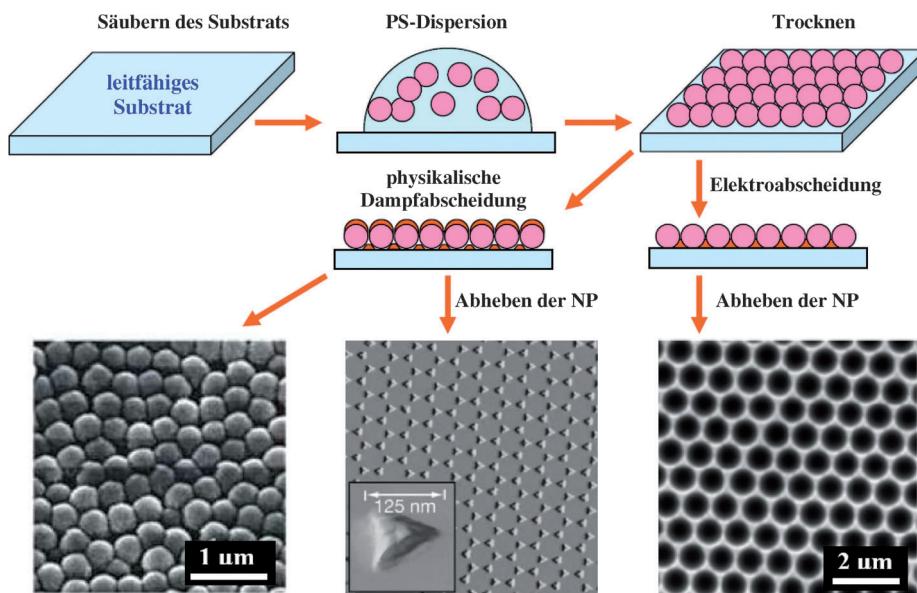


Abbildung 25. Nanokugel-Lithographie zur Herstellung von nanostrukturierten SERS-Substraten.
PS = Polystyrol. Aus Lit. [76].

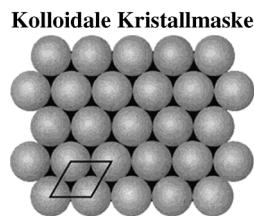


Abbildung 26. Kolloidale Kristallmaske zur Verwendung als Templat.
Aus Lit. [74].

erreichen, während alle anderen Regionen des Substrats durch die kolloidale Kristallmaske blockiert werden. Es können drei unterschiedliche Arten von nanostrukturierten SERS-Substraten hergestellt werden (Abbildung 25 unten), die von der Dicke der aufgebrachten Metallschicht abhängen. Physikalische Gasphasenabscheidung auf der Kristallmaske bringt eine FON-Oberfläche hervor (Abbildung 25 unten). Durch das Entfernen der Metallkugeln mittels Ultraschallbehandlung der Sondenmoleküle bilden sich dreieckige AgNP mit P_{6nm} -Symmetrie (Abbildung 25 unten Mitte und Abbildung 26). Durch resonante Plasmonanregung rufen die Metallspitzen große Feldverstärkungen hervor. Die elektrochemische Ablagerung mit anschließender Entfernung der Kugeln ergibt einen dünnen strukturierten Film mit regelmäßig angeordneten Metallinseln (Abbildung 25 unten rechts).

4.2.2. Aluminiumoxidbeschichtungen auf einem Silberfilm-auf-Nanokugel-Substrat

Die Stabilität plasmonischer SERS-Substrate bestimmt die Breite ihres Anwendungsbereichs. Schlüsselparameter sind die Stabilität (Unempfindlichkeit) gegenüber chemischen Veränderungen, insbesondere Oxidation, und die To-

lerierung verschiedener physikalischer Bedingungen, z.B. hohe Temperaturen. Außer der Stabilität ist die Oberflächenfunktionalisierung ein weiterer wichtiger Aspekt, da diese die Selektivität für analytische Anwendungen mit einschließt. Affinitätsbeschichtungen mit Analyt-spezifischen Liganden bringen gezielt den Analyten aus der Probenlösung auf die Oberfläche zur SERS-Detektion. Oft werden Thiol-haltige Moleküle benutzt, da diese auf der Metalloberfläche selbstorganisierte Monoschichten bilden. Allerdings kann es durch Photooxidation und thermische Desorption des Thiols zu Defekten bei der Beschichtung kommen. Demgegenüber ist Aluminiumoxid ein Beschichtungsmaterial, das gleich mehrere der oben beschriebenen Voraussetzungen erfüllt: extreme Stabilität gegenüber Oxidation und gegenüber hohen Temperaturen sowie starke und vorhersehbare Interaktion mit polaren Analyten wie z.B. Carbonsäuren. Darüber hinaus bietet die Atomlagenabscheidung von Aluminiumoxid eine präzise Kontrolle über Dicke und Oberflächenbedeckung. Die Möglichkeit, sehr dünne (ca. 1 nm) Beschichtungen aus Aluminiumoxid auf solide SERS-Substrate^[77] aufzubringen, ist wichtig, da die Nachweismöglichkeiten innerhalb des ganzen Systems durch den Abstand zwischen dem Analyt und der Metalloberfläche gesteuert werden (vgl. SERS-Abstandsabhängigkeit, siehe Abschnitt 3.4); dieselben Betrachtungen waren auch schon für den SHINERS-Ansatz von Bedeutung (Abschnitt 4.1.1). Abbildung 27 zeigt ein REM-Bild eines Aluminiumoxid-modifizierten AgFON-Substrats.

Über Oxidation und gegenüber hohen Temperaturen sowie starke und vorhersehbare Interaktion mit polaren Analyten wie z.B. Carbonsäuren. Darüber hinaus bietet die Atomlagenabscheidung von Aluminiumoxid eine präzise Kontrolle über Dicke und Oberflächenbedeckung. Die Möglichkeit, sehr dünne (ca. 1 nm) Beschichtungen aus Aluminiumoxid auf solide SERS-Substrate^[77] aufzubringen, ist wichtig, da die Nachweismöglichkeiten innerhalb des ganzen Systems durch den Abstand zwischen dem Analyt und der Metalloberfläche gesteuert werden (vgl. SERS-Abstandsabhängigkeit, siehe Abschnitt 3.4); dieselben Betrachtungen waren auch schon für den SHINERS-Ansatz von Bedeutung (Abschnitt 4.1.1). Abbildung 27 zeigt ein REM-Bild eines Aluminiumoxid-modifizierten AgFON-Substrats.

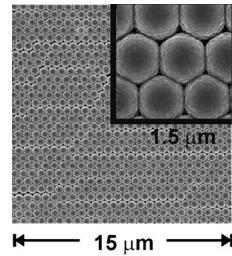


Abbildung 27. REM-Bild eines Al_2O_3 -modifizierten AgFON. Aus Lit. [77].

4.2.3. Anordnungen von Nanokugeln mit kontrollierten Abständen unter 10 nm

Beschichtet man Goldnanokugeln mit einer etwa 2.2 nm dicken Lage aus Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und legt diese unter Normalbedingungen auf ein Glas, auf das Indiumzinnoxid (ITO) aufgebracht wurde, so bilden sich sechseckige, dichtgepackte Einzellagen-NP-Anordnungen (Abbildung 28A).^[78] Der durchschnittliche Teilchenabstand, den die REM-Bilder zeigen, liegt bei 8 nm (Abbildung 28B). Abbildung 28C zeigt ein REM-Bild einer Monolage aus isolierten Goldkugeln auf ITO-Glass. Die plasmonischen Eigenschaften sind in Abbildung 28D dargestellt. Die Anordnung zeigt eine Plasmonbande im roten bis nahinfraroten

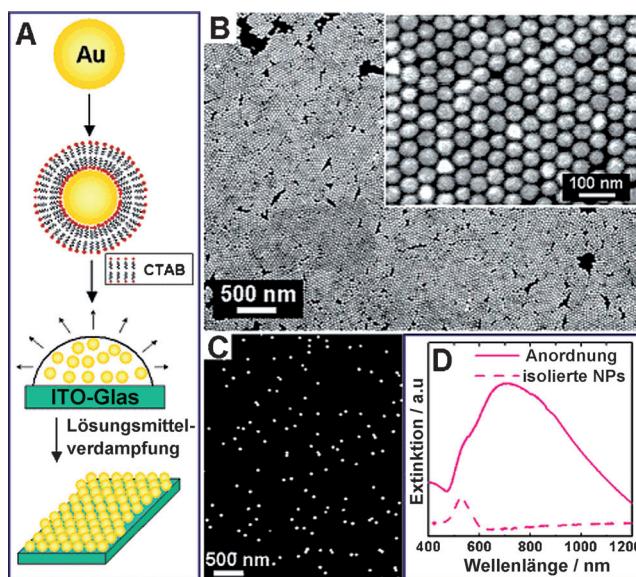


Abbildung 28. Anordnung von Gold-Nanokugeln mit Partikelabständen unter 10 nm. Aus Lit. [78].

Bereich, im Gegensatz dazu haben die eingesetzten einzelnen AuNP eine Plasmonbande bei etwa 500 nm.

4.2.4. Exponentiell gewachsene Filme durch Schicht-für-Schicht-Abscheidung

Der Nachweis von Analyten in sehr geringen Konzentrationen durch SERS anhand von soliden plasmonischen Substraten erfordert, dass Regionen mit sehr hohen Feldverstärkungen (Hotspots) für den Analyten zugänglich sind. Idealerweise haben die Moleküle außerdem eine lange Verweilzeit, um SERS-Signale über einen relativ langen Zeitraum emittieren zu können. Nanopartikel innerhalb einer Polymermatrix gewähren beides: den Zugang zu den Hotspots und eine lange Verweilzeit.

Dünne Filme, die mittels exponentieller Schicht-für-Schicht-Abscheidung (e-LBL, exponential layer-by-layer deposition) präpariert wurden, sind ein vielversprechendes Beispiel solcher Materialien, da sie durch anorganische NP/Metall-NP penetriert werden können, wobei die Zusammensetzung ihrer Schichten es ermöglicht, molekulare Systeme in Lösung zu analysieren. Abbildung 29 zeigt die elektronenmikroskopische Charakterisierung von e-LBL-Filmen, die mit AgNP infiltriert wurden.^[79] Abbildungen 29 A und B zeigen von oben aufgenommene REM-Bilder des e-LBL-Films nach 24 h des Eintauchens in unterschiedlicher Vergrößerung. Abbildungen 29 C und D sind entsprechende TEM- und STEM-Querschnittsaufnahmen des Films nach Ionenstrahlbehandlung (FIB, focused ion beam).

Diese dünnen Filme wurden für den Nachweis von Dioxinen als Beispiel für „ungewöhnliche“ oder „schwierige“ Analyte benutzt, da sie keine oberflächensuchende Gruppe aufweisen. Dieser Ansatz für den Nachweis mittels SERS basiert daher auf molekularem Fangen durch den e-LBL-Film und nicht – wie bei den üblicherweise angewandten Kon-

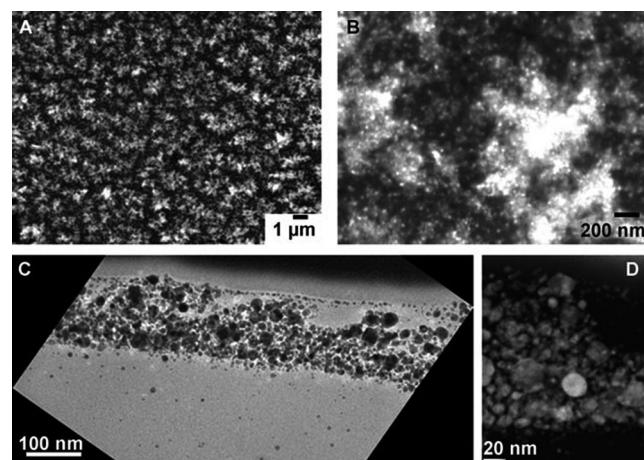


Abbildung 29. Dünne Filme, hergestellt durch exponentielle schichtweise Abscheidung. Aus Lit. [79].

zepten – darauf, den Analyten auf der Metalloberfläche zu adsorbieren (vgl. Abschnitt 5.3.2).

Der E-LBL-Ansatz bietet allerdings keine Kontrolle über die Orte der Hotspots. Das folgende Beispiel zeigt eine rational konstruierte Metallnanostruktur mit Hotspots an genau definierten Positionen.

4.2.5. Silber-Nanodraht-Bündel

Silber-Nanodrähte sind ein sehr wirksames Mittel, um Hotspots an der Kontaktstelle zwischen den Spitzen be-nachbarter Ag-Nanodrähte zu erhalten. Sie können in einem hochgeordneten Templat aus porösem Aluminiumoxid (PAO) durch elektrochemische Abscheidung mit anschließender kontrollierter Auflösung der Aluminiumoxidmatrix hergestellt werden. Abbildung 30 zeigt REM-Bilder von Ag-PAO-Templaten, die durch teilweise Auflösung der Aluminiumoxidmatrix erhalten wurden.^[80]

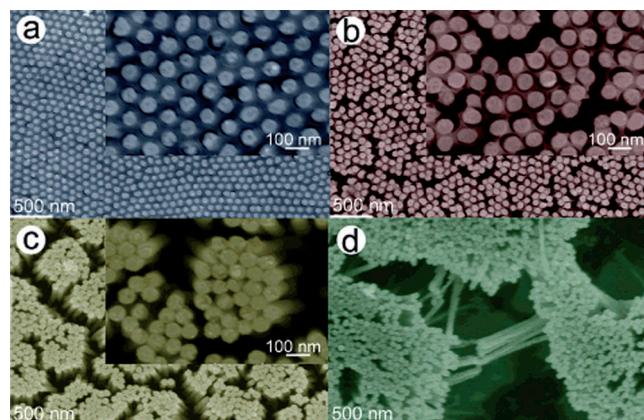


Abbildung 30. REM-Bilder von Silber-Nanodrähten. Aus Lit. [80].

5. Chemische Anwendungen

SERS verbindet den molekularen Informationsgehalt der Schwingungs-Raman-Spektroskopie mit der durch plasmon-unterstützte Streuung bedingten hohen Empfindlichkeit. Bei SERS ist die Raman-Streuung von Molekülen auf oder in der Nähe von Nanostrukturen, welche lokalisierte Oberflächenplasmonresonanzen (LSPR) unterstützen, um mehrere Größenordnungen erhöht (Abschnitte 2–4). Dieser Abschnitt behandelt eine thematisch breit gestreute, vielfältige Reihe von chemischen Anwendungen von SERS und ist deshalb das Herzstück des gesamten Aufsatzes. Er beginnt mit der spektroelektrochemischen Untersuchung von adsorbierten Molekülen auf rauen Metallfilmen bzw. Elektroden, also einer klassischen Anwendung von SERS.^[1,2]

5.1. Spektroelektrochemie und Katalyse

Die Identifizierung von Intermediaten und die Aufklärung von Reaktionsmechanismen sind ein zentrales Thema in der Chemie. Dies schließt die organische, anorganische, physikalische und theoretische Chemie sowie Biochemie und molekulare Biophysik mit ein. Dieser Unterabschnitt konzentriert sich auf die Anwendung von SERS in der Katalyse^[81] und Elektrochemie.^[76,82,83] Die Größe der untersuchten Moleküle bewegt sich zwischen zweiatomigen Molekülen,^[84] aromatischen Systemen^[85,86] bis hin zu Proteinen, die an Modellmembranen gebunden sind.^[87–90]

5.1.1. Beobachtung der Elektroreduktion an Bismut-modifizierten Au-Oberflächen

Die Elektroreduktion von molekularem Sauerstoff stand lange im Fokus der elektrochemischen Forschung, da es sich um einen wichtigen Prozess bei der Korrosion und bei Kraftstoffzellen handelt. Zwei Reaktionswege, die bei Kraftstoffzellen besondere Bedeutung haben, wurden in sauren Medien identifiziert: 1) ein direkter Vier-Elektronen-Reaktionsweg vom Sauerstoff zum Wasser ohne Intermediate und 2) ein Zwei-Elektronen-Reaktionsweg mit einem Peroxid-Intermediate. Der Reaktionsweg hängt von der Beschaffenheit der Elektrode ab: Die Elektroreduktion von molekularem Sauerstoff vollzieht sich über Reaktionspfad (1) auf Pt- und Ag-Oberflächen, während Pfad (2) auf Au-Oberflächen überwiegt. Es wird intensiv nach Materialien geforscht, die Pt ersetzen könnten, denn Pt ist teuer und relativ wenig effizient für den Prozess. Dies führt daher, dass molekularer Sauerstoff eine hohe Dissoziationsenergie (494 kJ mol^{-1}) besitzt, die zu langsamer Kinetik und großen Überkapazitäten bei dem 4-Elektronen-Reaktionsweg führt. Aber die Suche gestaltet sich schwierig, da wir nur ein eingeschränktes Verständnis von den einzelnen Mechanismen der O_2 -Elektroreduktion auf Pt oder einem beliebigen anderen Material in der sauren elektrochemischen Umgebung haben. Forschungen zum Mechanismus der Sauerstoff-Elektroreduktion beruhen in starkem Maße auf voltammetrischen Methoden, welche aber den Mechanismus – Reaktionsweg (1) vs. (2) – nicht eindeutig mit molekularer Spezifi-

zität bestimmen und auch keine Intermediate, insbesondere nicht Superoxid, identifizieren können. Deshalb wurde SERS benutzt, um die Intermediate zu untersuchen, die mit der Elektroreduktion von molekularem Sauerstoff auf Bi-modifizierten polykristallinen Au-Oberflächen zusammenhängen, welche als Modellsystem dienen.^[84] Im Gegensatz dazu sind Untersuchungen mittels Oberflächen-Infrarot-Spektroskopie beschränkt; einerseits durch die Interferenzen aus der Lösung oberhalb der Elektrodenoberfläche und andererseits aufgrund der geringen Empfindlichkeit im niedrigen Wellenzahlbereich, in dem die Schwingungsbanden aufgrund von Metalloxid- und Metallhydroxidmoden üblicherweise vorkommen.

Abbildung 31 links zeigt das SERS-Spektrum im Bereich $600\text{--}1200 \text{ cm}^{-1}$ von polykristallinem Au in einer Lösung, ($\text{Au}(\text{poly})$), die $0.5 \text{ mM} \text{Bi}^{3+}$ und $0.1 \text{ M} \text{HClO}_4$ angereichert mit

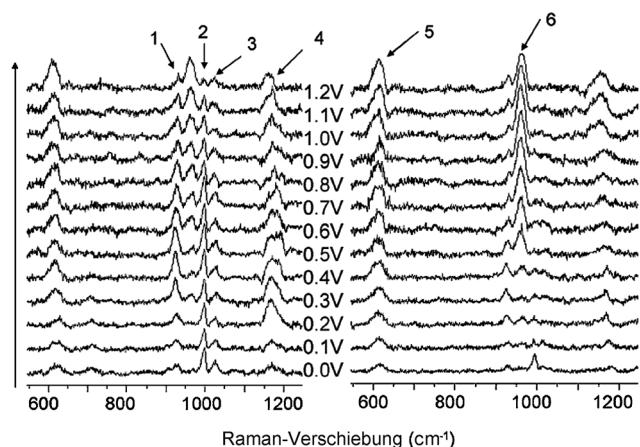


Abbildung 31. Elektrochemische SERS-Studie der Sauerstoff-Elektroreduktion von Bi-modifizierten polykristallinen Au-Oberflächen. Aus Lit. [84].

O_2 enthält. Die Folge auf der rechten Seite gibt die Anodenrampe von 0 bis 1.2 V wieder, die Folge auf der rechten Seite die Kathodenrampe. Insgesamt können sechs Schwingungs-Raman-Banden ausgemacht werden. Die Banden 1–4 wurden auch in SERS-Kontrollexperimenten beobachtet, die mit $\text{Au}(\text{poly})$ in einer Lösung aus $0.1 \text{ M} \text{HClO}_4$ angereichert mit O_2 ausgeführt wurden, also ohne Bi^{3+} . Vor allem das Vorhandensein von Bande 4 in Abbildung 31 lässt vermuten, dass Superoxid eines der Intermediate für die O_2 -Elektroreduktion sowohl bei Bi-modifizierten als auch für reine $\text{Au}(\text{poly})$ -Oberflächen ist. Insgesamt wurden mehrere Signale, die O_2 , HO_2 , Bi-OH und Bi_2O_2 zugeordnet werden können, durch die SERS-Messungen detektiert, was die Vermutung nahelegt, dass diese Spezies Intermediate während der O_2 -Elektroreduktion sind. Superoxid scheint eine wichtige Rolle zu spielen, denn es kann sowohl beim reinen Au als auch bei Bi-modifizierten Au-Oberflächen beobachtet werden. Außerdem lässt die Beobachtung von Superoxid vermuten, dass die Vier-Elektronen-Reduktion von O_2 auf der Bi-modifizierten Oberfläche über einen schrittweisen Mechanismus verläuft.

DFT-Rechnungen zur O₂-Adsorption auf reinen und Bismut-modifizierten Oberflächen wurden durchgeführt, um Einsichten in die Elektronenstruktur und Energetik zu erhalten. Die Adsorptionsenergie für molekularen Sauerstoff steigt von -0.928 eV auf -2.322 eV , was auf eine Stabilisierung der O₂-Adsorption auf der Au-Oberfläche durch die adsorbierte Bi-Schicht deutet. Die Länge der O-O-Bindung erhöht sich von 126 pm für die Au-Oberfläche auf 136 pm auf der Bi/Au-Oberfläche, was nahe an dem experimentell für Superoxid O₂⁻ bestimmten Wert ist.

Zusätzlich deuten die Mulliken-Ladungen an den Bi- und O-Atomen vor und nach der O₂-Adsorption auf einen Elektronendichtetransfer auf das O₂-Molekül hin, begleitet von einer partiellen Oxidation des Bi-Atoms. Diese kombinierten DFT/SERS-Untersuchungen liefern wertvolle mechanistische Einblicke; sie sprechen auch stark dafür, dass der erste Schritt, die Konversion von O₂ in HO₂, wieder stärker in den Fokus rücken sollte.

5.1.2. SERS-Verfolgung der Reduktion von Benzylchlorid an einer Silberelektrode

Die Spaltung von Kohlenstoff-Halogen-Bindungen mittels elektrochemischer Reduktion an inertnen Elektroden ist von Bedeutung in Gebieten wie der elektrochemischen Synthese, Umweltanwendungen und mechanistischen Studien zum Elektronentransfer. In diesem Kontext zeigen Silberkathoden eine überraschend große elektrokatalytische Aktivität. Wie bereits im ersten Beispiel erwähnt (Abschnitt 5.1.1) kann die Voltammetrie alleine nicht die transienten Oberflächenintermediate in situ mit der notwendigen chemischen Spezifität auf molekularem Niveau nachweisen. Auch in diesem Beispiel – der elektrochemischen Reduktion von Benzylchlorid (PhCH₂Cl) an einer Silberelektrode in Acetonitril – kam der Beleg für die Existenz eines entsprechenden Reaktionsintermediats aus einer kombinierten SERS/DFT-Untersuchung.^[85] Das Cyclovoltammogramm (CV) zeigt eine einzelne Bande für eine irreversible Reduktion; für einen Potentialdurchlauf von 0.5 V s^{-1} wird ein Maximalwert von $E_p = -1.82\text{ V}$ gegenüber der Standardkalomelelektrode (SKE) beobachtet. Potentialabhängige SERS-Spektren wurden im voltammetrischen Bereich von -0.6 bis -2.2 V aufgenommen. Bei Potentialen mit positiveren Werten als -1.2 V spiegeln die Banden in den SERS-Spektren die von freiem PhCH₂Cl wider, allerdings mit einigen signifikanten Unterschieden, die auf eine schwache Wechselwirkung zwischen PhCH₂Cl und der Silberoberfläche hindeuten. Zwei drastische spektrale Änderungen werden bei -1.2 bzw. -1.6 V beobachtet. Bei -1.2 V erscheint eine intensive, ungewöhnlich starke Bande bei ca. 800 cm^{-1} , die ihr Maximum bei -1.4 V erreicht. Zudem wird eine breite Bande bei 350 cm^{-1} beobachtet; sie wird der Ag-C-Streckschwingung zugeordnet und belegt daher, dass zumindest ein Reaktionsintermediat über eine C-Ag-Bindung stark an die Oberfläche gebunden ist. Bei -1.6 V und darüber hinaus taucht eine

Banden bei ca. 1000 cm^{-1} auf, die ihre maximale Intensität bei -1.8 V erreicht.

Mittels DFT berechnete Spektren ermöglichen einen direkten Vergleich mit experimentellen Daten. Zielsetzung ist die eindeutige spektrale Zuordnung von experimentell beobachteten Raman-Banden zu unterschiedlichen chemischen Spezies, in diesem Fall den auf der Oberfläche gebundenen Intermediaten. Abbildung 32 zeigt die mittels DFT berech-

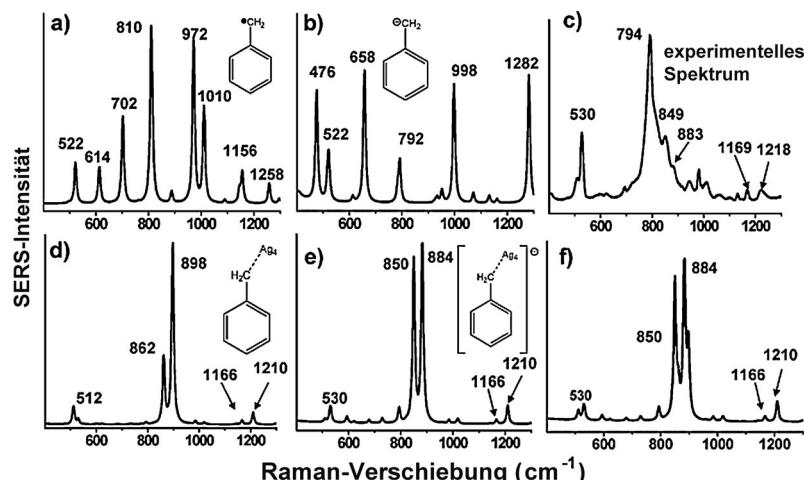


Abbildung 32. Mit DFT berechnete Raman-Spektren verschiedener Benzylspezies sowie das experimentelle Raman-Spektrum (c). Aus Lit. [85].

neten Spektren des freien/ungebundenen Benzylradikals (a) und des Benzylanions (b) sowie ihre entsprechenden Addukte mit einem Ag₄-Cluster (c,d). Eine Superposition der vorhergesagten Spektren in (d) und (e) im Verhältnis 1:5 (f) liefert eine gute Übereinstimmung mit dem experimentellen SERS-Spektrum (c) bei -1.4 V gegenüber der SKE. Insgesamt weisen die Daten darauf hin, dass sowohl das neutrale als auch das anionische Benzyl-Silber-Addukt gebildet wurden, wobei die anionische Spezies über den größeren voltammetrischen Bereich dominiert.

Diese kombinierte SERS/DFT-Untersuchung gestattet mechanistische Einblicke in die katalytischen Eigenschaften von Silberelektroden für die Elektroreduktion: Benzylchlorid ist auf der Silberoberfläche schwach adsorbiert, wird zuerst zu einem gebundenen Benzylradikal und dann weiter zum gebundenen Benzylanion reduziert. Dieser Reaktionsweg unterscheidet sich komplett vom konzertierten Reduktions-Schritt an inertnen Elektroden, sodass die Thermodynamik und Kinetik des ersten Reduktionsschrittes verändert ist. Eine besondere Stärke von SERS bei mechanistischen Aufklärungen in situ sind daher solche Situationen, in den eine starke Interaktion der Reaktanten und der katalytisch aktiven Metalloberfläche vorliegt.

5.1.3. Verfolgung Platin-katalysierter Reaktionen in kolloidaler Suspension

Die SERS-Verfolgung katalytischer Reaktionen in kolloidaler Suspension erfordert Nanopartikel, die zwei verschiedene Funktionalitäten – plasmonische und katalytische

Aktivität – in eine bifunktionelle Entität integrieren. Die zentrale Herausforderung ist daher das rationale Design und die Synthese hybrider Metallnanostrukturen, die sowohl hohe plasmonische/SERS-Aktivität als auch große Oberflächen des katalytisch aktiven Metalls besitzen. Die himbeerförmigen Au/Pt/Au-Kern/Schale-NP in Abbildung 33 erfüllen diese

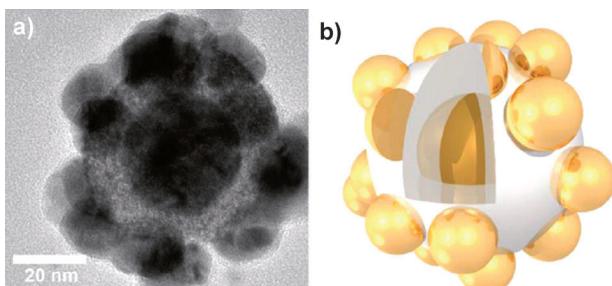


Abbildung 33. a) HR-TEM-Bild einer Au/Pt/Au-Nanohimbeere und b) ein computergeneriertes 3D-Modell. Aus Lit. [86].

Kriterien für Platin-katalysierte Reaktionen:^[86] ein HR-TEM-Bild einer einzelnen „Himbeere“ zusammen mit einem computergenerierten Modell der Kern/Schale-Struktur mit einer großen Pt-Oberfläche für katalytische Reaktionen ist gezeigt. Die plasmonische Kopplung zwischen dem 80 nm großen Au-Kern (alleine schon SERS-aktiv) und den kleinen Au-Satelliten (alleine nicht ausreichend SERS-aktiv) verleiht der gesamten Superstruktur plasmonische Aktivität und macht sie damit bifunktionell.

In einer Machbarkeitsstudie wurde die Hydridreduktion einer aromatischen Nitrokomponente zum entsprechenden Anilinderivat mittels SERS verfolgt (Abbildung 34). Mit zunehmender Menge an NaBH₄ (von unten nach oben) nimmt die Intensität der charakteristischen Banden der Nitro-Komponente ab, und die Schwingungsbanden des Azoderivats nehmen anfänglich zu und verschwinden schließlich.

Negative Kontrollexperimente mit einer Mischung von Au- und Pt-NP zeigten nicht diese kombinierte katalytische/SERS-Aktivität. Die Zerlegung der sich spektral überlagernden Beiträge der Nitro-, Azo- und Anilin-Komponenten mittels nicht-negativer Matrixfaktorisierung erlaubt die Quantifizierung der Beiträge von allen drei Spezies in jedem SERS-Spektrum. Im Prinzip können auch unbekannte Spezies mit diesem kombinierten multivariaten/schwingungsspektroskopischen Ansatz identifiziert werden; dazu muss lediglich die Anzahl der chemischen Komponenten, nicht aber Wissen über deren spektrale Signaturen *a priori* vorhanden sein. Dieser Ansatz könnte sich bei mechanistischen Untersuchungen katalytischer Reaktionen als nützlich erweisen. Eine derzeitige Limitierung der Au/Pt/Au-Nanohimbeeren ist, dass sie auf Reaktionen von Molekülen mit einer oberflächensuchenden Gruppe beschränkt sind. Strategien, um Moleküle ohne solche Gruppen nahe der Metalloberfläche zu fangen (siehe Abschnitt 5.3.2), könnten diese Limitierung umgehen und die Anwendbarkeit auf eine viel breitere Palette von katalytischen Transformationen ermöglichen.

5.1.4 Elektronentransfer zwischen Proteinen und Modellmembranen an Elektroden

Inter- und intramolekulare Elektronentransfer(ET)-Reaktionen können durch Proteindynamik kontrolliert oder limitiert sein. Proteine, die an Elektroden mit biokompatiblen Filmen immobilisiert sind, ermöglichen die Untersuchung dieser fundamentalen Phänomene unter kontrollierten Bedingungen, obwohl sie unvermeidlich von den physiologischen Bedingungen abweichen. Die simultane Echtzeitverfolgung von Struktur, ET-Kinetik und Konfigurationsfluktuationen von Cytochrom C (Cyt), das elektrostatisch an einer SAM-bedeckten Elektrode adsorbiert war, wurde mit zeitaufgelöster Zwei-Farben-SERRS-Spektroskopie verfolgt.^[87] Die Anwendung von Potenzialsprüngen initiiert die Proteinorientierung relativ zur Elektrodoberfläche zusätzlich zum Netto-ET. Die zeitaufgelösten Zwei-Farben-SERRS-Experimente (413 und 514.5 nm) fragen das Häm-Chromophor ab und erlauben die Bestimmung der Zeitkonstante sowohl für die Proteinorientierung als auch den ET als Funktion der SAM-Kettenlänge. Die schwingungsspektroskopische Basis für diese Fülle an biophysikalischen Informationen, die über SERRS-Experimente verfügbar sind, ist durch die Selektivität der Resonanz-Raman(RR)-Streuung bezüglich der Normalmodensymmetrie und die Selektivität von SERS bezüglich der Orientierung relativ zur Oberfläche bedingt. Das RR-Intensitätsverhältnis $v_{10}(B_{1g})/v_4(A_{1g})$ wird als Marker für die Proteinorientierung verwendet, genauer für das Ausmaß der senkrechten Orientierung. Abbildung 35 A zeigt die SERRS-Spektren von Cyt an Elektroden, die mit C₅-, C₁₀- und C₁₅-langen SAM bedeckt sind. Mit zunehmender Kettenlänge (Abbildung 35 B) nimmt das Intensitätsverhältnis $v_{10}(B_{1g})/v_4(A_{1g})$ für die oxidierte Form (Fe³⁺, Kreise) rapide ab, für die reduzierte Form (Fe²⁺, Quadrate) aber nur langsam. Für eine gegebene SAM weist das Intensitätsverhältnis $v_{10}(B_{1g})/v_4(A_{1g})$ eine positive Korrelation mit dem angelegten Potenzial auf (Abbildung 35 C). Insgesamt

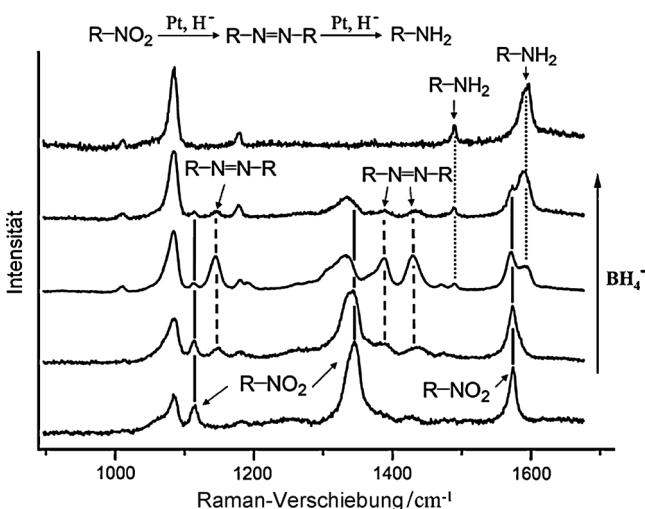


Abbildung 34. SERS-Spektren der Pt-katalysierten Hydridreduktion von 4-Nitrothiophenol zum entsprechenden Anilinderivat unter Verwendung von Au/Pt/Au-Nanohimbeeren. Aus Lit. [86].

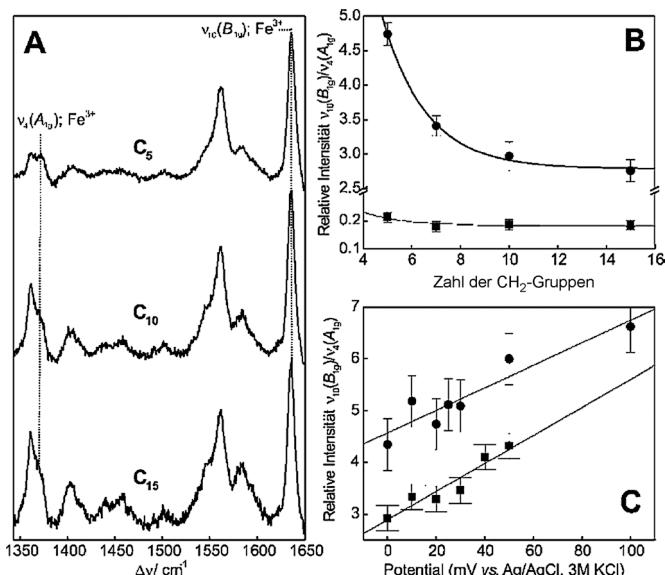


Abbildung 35. SERRS-Spektren von Cytochrome C auf Elektroden, die mit SAM unterschiedlicher Kettenlänge beschichtet wurden. Das Intensitätsverhältnis $\nu_{10}(B_{1g})/\nu_4(A_{1g})$ ist ein Marker für die Proteinorientierung. Aus Lit. [87].

scheint das elektrische Feld an der Cyt/SAM-Grenzfläche die Orientierung von Cyt zu kontrollieren.

Kinetische Informationen über die Orientierung/Reorientierung der Häm-Einheit in Cyt können über zeitaufgelöste Anrege(Potenzialsprung)/Abfrage(SERRS)-Experimente erhalten werden. Die Anwendung eines Potenzialsprungs erlaubt die kinetische Verfolgung der Rückkehr in den Gleichgewichtszustand. Die experimentell bestimmten Geschwindigkeitskonstanten für die Reorientierung hängen stark von der Kettenlänge der SAM ab. Diese Beobachtung ist qualitativ konsistent mit einem einfachen elektrostatischen Modell, in dem die Ladungsdichte am Terminus der SAM (COO^-) die Aktivierungsbarriere für die Orientierung des Komplexes oberhalb der Schwelle der thermischen Energie (kT) zusätzlich zum Netto-ET bestimmt: Diese Reorientierung ist schnell für dicke SAM oder schwache elektrische Felder, während sie drastisch langsamer und geschwindigkeitsbestimmend im Falle von kurzen SAM oder hohen elektrischen Feldern wird. Diese Resultate implizieren, dass lokale elektrische Felder sowohl die mittlere Orientierung als auch die Mobilität von Cyt in elektrostatisch gebundenen Komplexen bestimmen. Die Kontrolle der Netto-ET-Geschwindigkeiten durch elektrische Felder über die Modulation der Proteindynamik könnte daher ein weit verbreitetes Phänomen in der Bioelektrochemie sein.

5.2. Einzelmolekülnachweis

Im Jahr 1997 wurde in zwei bahnbrechenden Arbeiten über den Nachweis von einzelnen Molekülen mittels SERS berichtet.^[3,4,91–94] Im ersten Fall wurde der Farbstoff Rhodamin 6G (R6G) auf mittels Citratreduktion hergestellten AgNP unter normalen Umgebungsbedingungen nachgewie-

sen. Starke SERS-Intensitätsfluktuationen auf der Sekunden-Zeitskala wurden beobachtet, die als Diffusion von R6G-Molekülen auf der Oberfläche in die Hotspots hinein und wieder heraus interpretiert wurden. Unabhängig davon wurde SM-SERS auch für Kristallviolett (CV) mit Aggregaten von AgNP in Suspension nachgewiesen. In diesen und nachfolgenden SM-SERS-Studien wurden verschiedene Argumente angeführt, um den Nachweis von einzelnen Molekülen zu belegen. Typischerweise wurden Intensitätsfluktuationen in Kombination mit statistischen Analysen als Beleg für SM-SERS-Verhalten als ausreichend betrachtet. Allerdings sind diese Ansätze mit einer Reihe von Schwierigkeiten verbunden.^[95] Erstens sind niedrige Farbstoffkonzentrationen, bei denen hypothetisch im Mittel nur ein Farbstoffmolekül pro Kolloidpartikel vorliegt, kein zufriedenstellender Beleg. Zweitens zeigen SERS-Spektren starke Intensitätsfluktuationen, sowohl Intensitätsänderungen als auch spektrale Änderungen sowie alternierende An/Aus-Perioden, die Blinken genannt werden. Letzteres wurde typischerweise als charakteristisches Verhalten für SM-Emission angesehen. Allerdings können diese Fluktuationen auch bei hohen Farbstoffkonzentrationen sowie unter anderen Umständen beobachtet werden. Ein deutlicher Fortschritt war die Einführung des Bi-Analyt-Ansatzes (BiASERS),^[95] bei dem zwei Analyten (z. B. zwei Farbstoffe) mit spektral unterschiedlichen SERS-Signaturen miteinander um die Oberflächenadsorption konkurrieren. Kurz danach wurde der gleiche Ansatz um die Verwendung von zwei Isotopologen desselben Farbstoffs erweitert.^[96]

5.2.1. Wellenzahl-basierte Ansätze für Einzelmolekül-SERS

5.2.1.1. Der Bi-Analyt-Ansatz: Spektrale Unterscheidung in der Wellenzahldomäne

Die Verwendung von zwei unterschiedlichen Analytmolekülen mit einer oberflächensuchenden Gruppe, aber einem unterschiedlichen SERS-Spektrum, ist ein eleganter Weg, um Einzelmolekülverhalten bei SERS zu demonstrieren (Bi-Analyt-SERS oder BiASERS).^[95] Abbildung 36 zeigt SERS-Spektren von Rhodamin 6G (R6G) (A), einem Benzotriazol-Farbstoff (BTZ) (C) und einer Kombination von beiden (B). Die Spektren wurden an verschiedenen Positionen in einem SERS-mikrospektroskopischen Experiment aufgenommen (unten). Wenn nur ein einzelnes Molekül vorliegt, dann ist die Wahrscheinlichkeit entweder R6G oder BTZ vorzufinden 1:1. Im Falle von zwei Molekülen ist die Wahrscheinlichkeitsverteilung für das Vorliegen von $2 \times \text{R6G}$ oder $1 \times \text{R6G}/1 \times \text{BTZ}$ oder $2 \times \text{BTZ}$ 1:2:1, d. h. die Wahrscheinlichkeit, zwei Moleküle R6G oder BTZ gleichzeitig im Laserfokalvolumen vorzufinden, beträgt nur jeweils 25 %. Für zwei Moleküle ($n=2$) haben wir einfach die binomische Formel $(a+b)^2 = b^2 + 2ab + a^2$ mit $a = \text{R6G}$ und $b = \text{BTZ}$ verwendet. Für n Moleküle sinkt die Wahrscheinlichkeit, entweder nur a oder nur b vorzufinden, d. h. a^n oder b^n , signifikant entsprechend der Binomialverteilung.

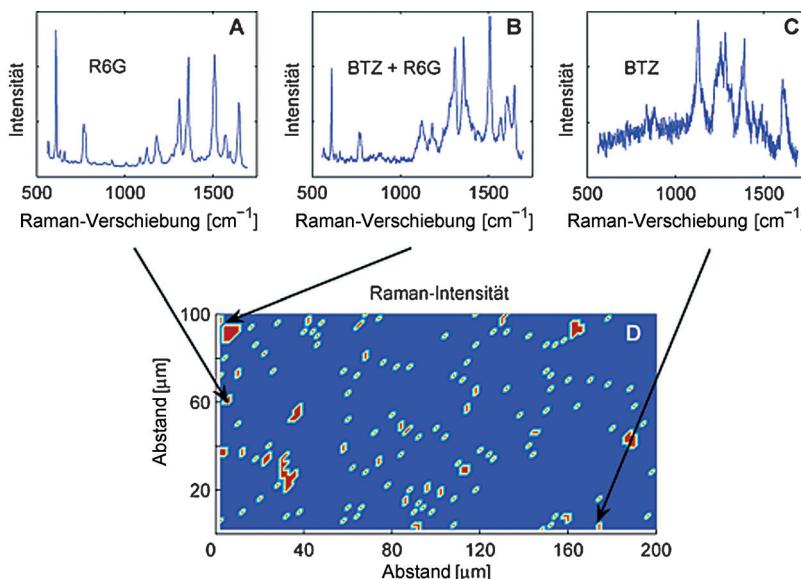


Abbildung 36. Bi-Analyt-SERS (BiASERS) für die Wellenzahldomänen-basierte Demonstration von Einzelmolekül-SERS. Aus Lit. [95].

5.2.1.2. Der Isotopologen/Bi-Analyt-Ansatz mittels Isotopensubstitution

Die Interpretation von Bi-Analyt-SM-SERS-Resultaten (Abschnitt 5.3.1.1; SM = Einzelmolekül) erfordert Kenntnisse über die unterschiedlichen Raman-Streuquerschnitte, Absorptionsspektren und Oberflächenbindungsaffinitäten, da die beiden Analyten unterschiedliche schwingungsspektroskopische und elektronische Eigenschaften als auch unterschiedliche Oberflächenbindungseigenschaften aufweisen. Der Wellenzahlen-basierte Ansatz mit zwei Isotopologen ist ein sehr eleganter Ansatz, der auf den Vorteilen des BiASERS-Ansatzes aufbaut, aber gleichzeitig die Limitierung vermeidet, die durch die Verwendung von zwei chemisch

unterschiedlichen Analyten entsteht. In dieser Hinsicht kann er als ein sehr wichtiger Spezialfall des BiASERS-Ansatzes betrachtet werden, der auf dem „selben“ Molekül basiert. Genauer gesagt basiert er auf zwei Isotopologen, d.h. Molekülen, die sich nur in ihrer Isotopenzusammensetzung unterscheiden. Die Verwendung von zwei Isotopologen, z.B. R6G-d₄ und R6G-d₀ (Abbildung 37), für SM-SERS hat signifikante zusätzliche Vorteile, da beide dasselbe elektronische Absorptionsspektrum, denselben Raman-Streuquerschnitt und dieselbe Oberflächenbindungsaffinität aufweisen.

Die Wellenzahl(„Frequenz“)-basierte Diskriminierung zwischen zwei Isotopologen ist aufgrund ihres unterschiedlichen Schwingungs-Raman-Spektrums möglich: Wellenzahlpositionen und Intensitäten von Banden solcher Normalmoden, die C-D-Einheiten involvieren, sind aufgrund des Masseneffekts unterschiedlich. Dies ist in Abbildung 38 für R6G-d₄ und R6G-d₀ gezeigt. Anhand der beiden Banden bei 622 cm^{-1} (R6G-d₀) und 610 cm^{-1} (R6G-d₄) ist eine eindeutige Unterscheidung zwischen beiden Isotopologen möglich; die Behauptung des Vorliegens von Einzelmolekülverhalten ist qualitativ daher geradlinig. Wenn im Mittel nur ein Molekültyp auf jedem Nanopartikel adsorbiert ist, dann enthält jedes SM-SERS-Spektrum nur den spektralen Fingerabdruck von einem der beiden Isotopologen, während es beide Fingerabdrücke für größere Oberflächenbedeckungen aufweist. Quantitativ sollten die Wahrscheinlichkeiten für die Beobachtung der beiden Isotopologen der Binomialverteilung folgen.

Der Isotopologenansatz wurde nicht nur auf künstliche Isotopologe angewendet, sondern auch auf natürliche Isotopologe zur Demonstration der natürlichen Isotopenvertei-

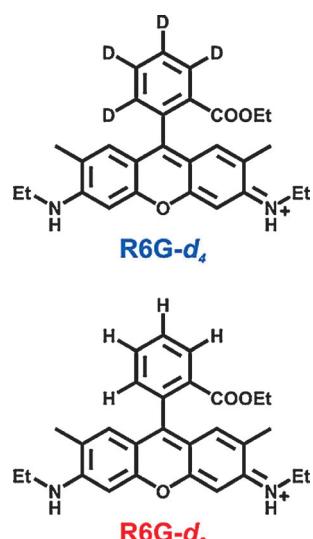


Abbildung 37. R6G-d₄ und R6G-d₀ für die Verwendung im Isotopologen-Ansatz der Einzelmolekül-SERS. Aus Lit. [96].

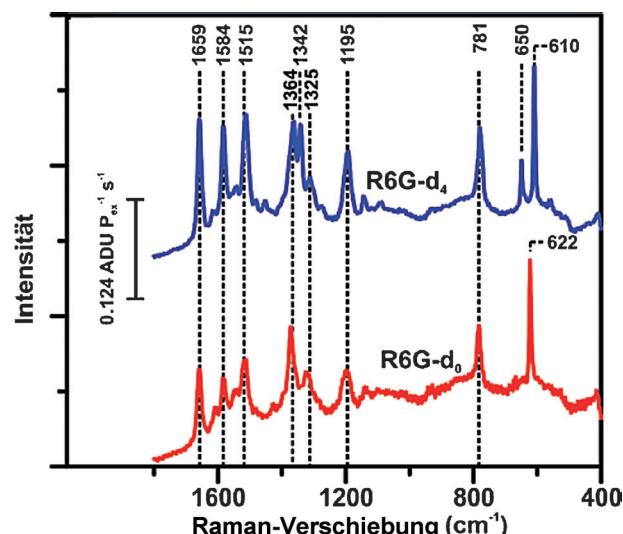


Abbildung 38. Isotopologen/BiASERS-Ansatz für die Wellenzahl-basierte Demonstration von Einzelmolekül-SERS. Aus Lit. [96].

lung von Elementen wie z. B. Kohlenstoff, beispielsweise über die hoch lokalisierte Strettschwingung einer Cyanogruppe als Sonde.^[97]

Der Wellenzahl(„Frequenz“)-basierte Ansatz zum Nachweis von Einzelmolekülverhalten sollte der neue „Goldstandard“ für SM-SERS werden, da er die Nachteile und Zweideutigkeiten früherer Ansätze eliminiert. Die chemische Synthese der entsprechenden Isotopologen – obwohl möglicherweise aufwändig und daher anspruchsvoller und/oder teuer für andere Moleküle – sollte den Aufwand definitiv wert sein; nur Resultate, die mit diesem Ansatz erhalten wurden, können direkt und unzweideutig interpretiert werden und werden dazu beitragen, dass SM-SERS eine generell und breit akzeptierte Einzelmolekültechnik wird.

5.2.1.3. Einzelmolekül-SERS von nichtresonanten Molekülen

Für resonante Moleküle wie Farbstoffe mit differentiellen Streuquerschnitten in der Größenordnung von $10^{-27} \text{ cm}^2 \text{ sr}^{-1}$ für die intensivsten Raman-Banden reichen Verstärkungsfaktoren in der Größenordnung von 10^8 vollkommen aus, um SM-SERRS zu erhalten.^[97] Rechnungen sagen elektromagnetische Feldverstärkungen (EF) in Hotspots von 10^{10} – 10^{11} für bestimmte Konfigurationen wie z. B. Dimere aus Metall-NP voraus (siehe Abschnitt 3.1). Diese extremen EF-Werte sollten ausreichend sein, um die Lücke zwischen resonanten und nichtresonanten Molekülen zu schließen, da letztere differentielle Streuquerschnitte in der Größenordnung von $10^{-30} \text{ cm}^2 \text{ sr}^{-1}$ aufweisen. Mit anderen Worten: Der 1000fach niedrigere Raman-Streuquerschnitt von nichtresonanten im Vergleich zu resonanten Molekülen wird durch den 1000fach höheren EF kompensiert. Abbildung 39 zeigt das Absorptions-

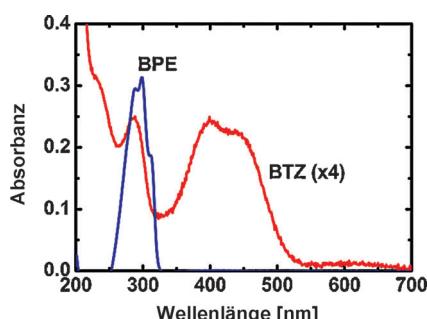


Abbildung 39. Absorptionsspektrum von BPE („nichtresonantes“ Molekül) und BTZ („resonantes“ Molekül). Aus Lit. [29].

onsspektrum des nichtresonanten Moleküls 1,2-Di-(4-pyridyl)ethylen (BPE) und des Benzotriazolfarbstoffs 3-Methoxy-4-(5'-azobenzotriazolyl)phenylamin (BTZ, resonantes Molekül) für den Einsatz in BiASERS-Experimenten.^[97]

Einige Aspekte müssen bei der Durchführung von SM-SERS-Experimenten an nichtresonanten Molekülen berücksichtigt werden.^[97] Zunächst einmal muss man die Verteilungsfunktion der EF-Werte im Hinterkopf haben (siehe Abschnitte 3.1.2 und 3.1.3): Nur die Moleküle an den Stellen mit den höchsten möglichen Verstärkungsfaktoren von etwa 10^{11} können detektiert werden. Da nichtresonante Moleküle

deutlich weniger anfällig für Photobleichen sind, kann dieser Zahlenwert durch die anwendbare Laserleistungsdichte und die Integrationszeit teilweise reduziert werden. Nichtsdestoweniger kann vom Standpunkt der rein elektromagnetischen Verstärkung nur ein viel schmälerer Bereich von sehr großen Verstärkungen am Ende der Verteilungsfunktion genutzt werden, um die Signale erfassbar zu machen. Dieser kleine Bereich von extrem hohen Verstärkungen entspricht einer viel kleineren effektiven Anzahl von Hotspots, die genutzt werden kann. Nur die enge Region um den EF-Maximalwert herum kann genügend Verstärkung liefern, um SM-SERS zu generieren. Zusätzlich zu diesen statistischen Aspekten bezüglich der EF-Verteilung werden auch Kontaminationsaspekte kritisch, da konkurrierende Moleküle mit ähnlich schwachen Raman-Streuquerschnitten auch beitragen und die Analyse komplizieren können. Um solche Kontaminationen zu minimieren, muss auch das SERS-Substrat optimiert werden. Anstelle der Citrat-Reduktionsmethode wurde Natriumborhydrid als Reduktionsmittel verwendet. Abbildung 40 zeigt die SM-SE(R)RS-Spektren von BPE und BTZ zusammen mit den betreffenden Ensemble-Spektren als Referenz. Die Autoren schlussfolgern, dass – aufgrund ihrer überzeugenden experimentellen Demonstration – im Prinzip jedes beliebige Molekül, das auf dem Substrat adsorbieren kann, auf dem Einzelmolekülniveau mit SERS nachgewiesen werden kann.

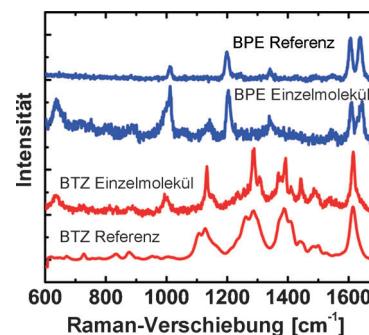


Abbildung 40. SM-SERS-Spektren von BPE und BTZ sowie die entsprechenden Ensemble-Spektren als Referenz. Aus Lit. [29].

Struktur-Aktivität-Korrelationen für einzelne Partikel haben gezeigt, dass Dimere von Ag-Nanokristallen die einfachste von mehreren möglichen Konfigurationen sind, die SM-SE(R)RS generieren können.^[98]

Zusätzlich zu diesem plasmonischen/EF-Aspekt ist es wichtig, die Anwesenheit der Moleküle in den Hotspots zu „forcieren“. Hierfür existieren verschiedene Ansätze, z. B. Langmuir-Blodgett-Schichten,^[92,94] Kontaktstellen zwischen Goldnanosternen und einer planaren Goldoberfläche^[99] sowie DNA-modifizierte AuNP.^[100,101]

5.3. Analytische Anwendungen: Sensorik, Fangen, Festphasensynthese

5.3.1. Sensorik

Die Sensorik von Biomolekülen mit plasmonischen Nanostrukturen ist ein sich stark entwickeltes Gebiet mit zahlreichen Anwendungen.^[102–104]

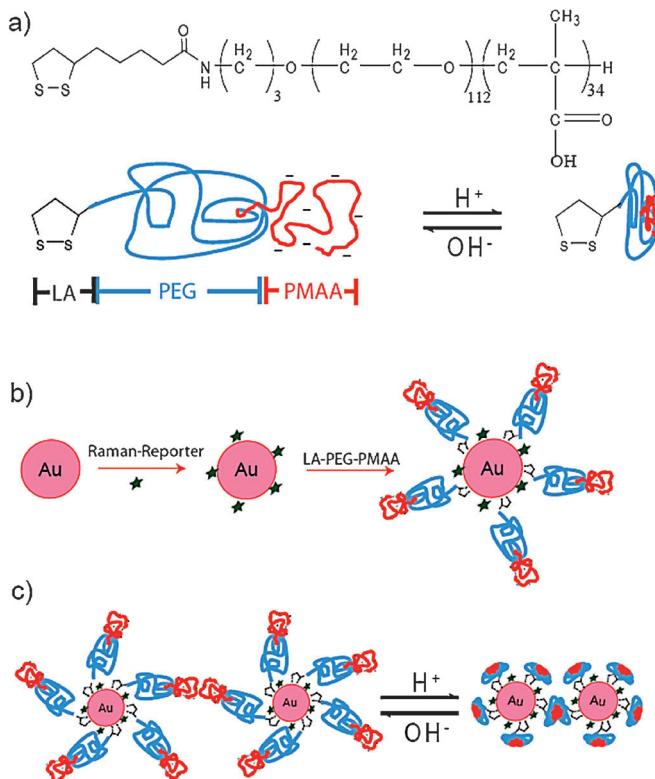


Abbildung 41. Polymethacrylsäure (PMAA) geht pH-abhängige Konformationsänderungen ein, die für pH-Sensorik durch plasmonische Kopplung und SERS genutzt werden. Aus Lit. [105].

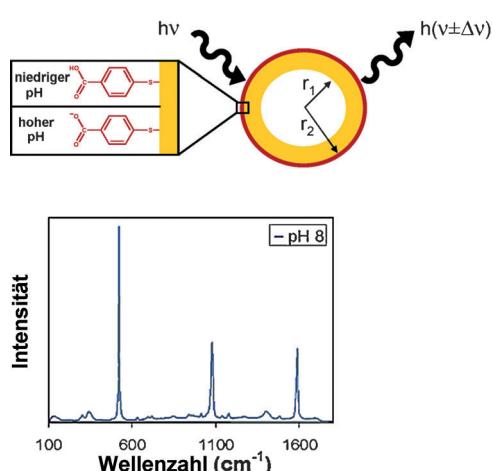


Abbildung 42. Das SERS-Spektrum von 4-Mercaptobenzoësäure (4-MBA) wird für die komplett optische pH-Sensorik mittels Gold-Nanoschalen, beschichtet mit einer SAM von 4-MBA, als nanoskaligem pH-Meter genutzt. Aus Lit. [106].

5.3.1.1. Stimulus-responsive Nanopartikel für pH-Sensorik über plasmonische Kopplung und SERS

Plasmonische Kopplungen können zu sehr hohen elektromagnetischen Feldverstärkungen führen (siehe Abschnitte 3.1.1 und 3.2.2). Eine interessante Frage ist, ob plasmonische Kopplungen durch molekulare Konformationsänderungen induziert werden können. Stimulus-responsive Polymere wie z.B. Polymethacrylsäure (PMAA) bieten diese Möglichkeit, da sie reversible Konformationsänderungen als Antwort auf Umgebungsfaktoren wie den pH-Wert aufweisen (Abbildung 41 a).^[105] Bei pH > 4 sind die Carbonsäuren deprotoniert, die PMAA-Segmente sind hydrophil und weisen eine sterisch anspruchsvollere Konformation („random-coil“) auf. Bei pH < 3 sind die PMAA-Segmente nahezu neutral und leicht hydrophob; das Molekül nimmt eine kondensierte oder kollabierte Gestalt an (Abbildung 41 a). Das pH-responsive PMAA-Segment ist an einen amphiphilen Polyethylenglykol(PEG)-Block und eine terminale Lipinsäure(LA)-Ankergruppe gebunden (Abbildung 41 a). Kolloidales Gold wird zunächst mit organischen Farbstoffen als Raman-Reportermolekülen und dann mit LA-PEG-PMAA-Blockcopolymeren (Abbildung 41 b) inkubiert. Bei pH > 4 zeigen diese beschichteten SERS-NP aufgrund der starken sterischen und elektrostatischen Abstoßung keine plasmonische Kopplung (Abbildung 41 c links). Bei pH < 3 jedoch liefert die komprimierte Konformation kleine Cluster von beschichteten SERS-NP (Abbildung 41 c rechts). Die entsprechenden SERS-Spektren (nicht gezeigt hier) demonstrieren die prinzipielle Machbarkeit: Bei pH 7 wird kein SERS-Signal beobachtet, im Gegensatz zu pH 3. Der Prozess ist reversibel, wie der zweite Zyklus zeigt.

Insgesamt erlaubt diese Strategie die Kontrolle über Abstände und plasmonische Interaktionen zwischen Block-Copolymer-beschichteten Metall-NP.

5.3.1.2. Optische pH-Bestimmung mit einem nanoskaligen pH-Meter

Ein gleichermaßen eleganter Weg zur markierungsfreien Bestimmung des pH-Wertes mittels SERS ist die Ausnutzung des schwingungsspektroskopischen Unterschiedes zwischen der protonierten und deprotonierten Form von Säuren. 4-Mercaptobenzoësäure (4-MBA) ist ein ideales Raman-Reportermolekül, das stark an Gold- oder Silber-Oberflächen bindet. Das Schwingungs-Raman-Spektrum (Abbildung 42) der protonierten Form (COOH, Carbonsäure) unterscheidet sich signifikant von der deprotonierten/ionischen Form (COO⁻, Carboxylat).^[106] Mit einer selbstorganisierten Monolage aus 4-MBA beschichtete Gold-Nanoschalen können daher als ein komplett optisches, nanoskaliges pH-Meter betrachtet werden, das den lokalen pH auf der Oberfläche der Nanoschalen bestimmen kann (Abbildung 42). Dieser markierungsfreie SERS-Ansatz wurde kurz darauf zur Bestimmung des lokalen pH in lebenden Zellen, z.B. in Endosomen, verwendet.^[107–109]

5.3.1.3. Sensorik polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe: Ausnutzung von Wirt-Gast-Interaktionen

Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet von SERS ist die Umweltanalytik.^[110] Ein Beispiel für extrem umweltgefährliche Stoffe sind polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAH), die vorwiegend während der unvollständigen Verbrennung von Kohle, Öl, Gas und Tabak entstehen. Viele von ihnen haben sich als stark karzinogen erwiesen. PAH wie z.B. Coronen (blau in Abbildung 43 Mitte links) besitzen kon-

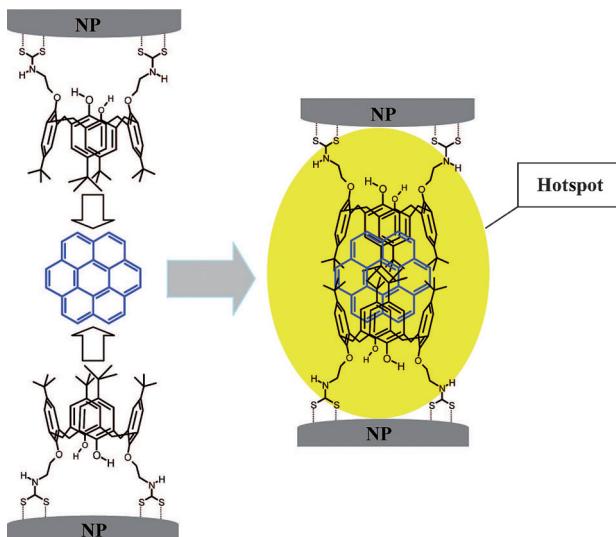


Abbildung 43. Sensorik von polycyclischen Kohlenwasserstoffen („Gäste“; blau: Coronen) durch SERS in einem Hotspot durch Verwendung von Dithiocarbamat-„Wirt“-Konjugat-funktionalisierten Silber-NP. Aus Lit. [111].

densierte Benzolringe als gemeinsames molekulares Strukturelement; sie weisen eine sehr geringe Affinität für die Adsorption an metallische Oberflächen auf, da sie keine funktionellen Gruppen besitzen, insbesondere keine Heteroatome wie Schwefel und Stickstoff; sie sind daher eine wichtige, aber schwierig mittels SERS nachzuweisende Substanzklasse. Die Ausnutzung von Wirt-Gast-Interaktionen, einem bekannten Konzept aus der supramolekularen Chemie, ist der Schlüssel zur hochsensitiven und spezifischen Detektion von PAH mittels SERS.^[111–113] Die Oberfläche von Silber-NP wird mit Dithiocarbamat-Gastmolekül-Konjugaten funktionalisiert. Abbildung 43 zeigt die Bildung eines Hotspots in der Partikel-Kontaktstelle, wenn zwei Wirt-funktionalisierte Silber-NP zusammen ein Coronen-Molekül als Gast binden.^[111] Dieses elegante Konzept wurde erfolgreich auf andere PAH inklusive Pyren und Triphenylen angewendet. Affinitätskonstanten und Nachweisgrenzen wurden für jeden PAH aus konzentrationsabhängigen SERS-Untersuchungen bestimmt.^[111]

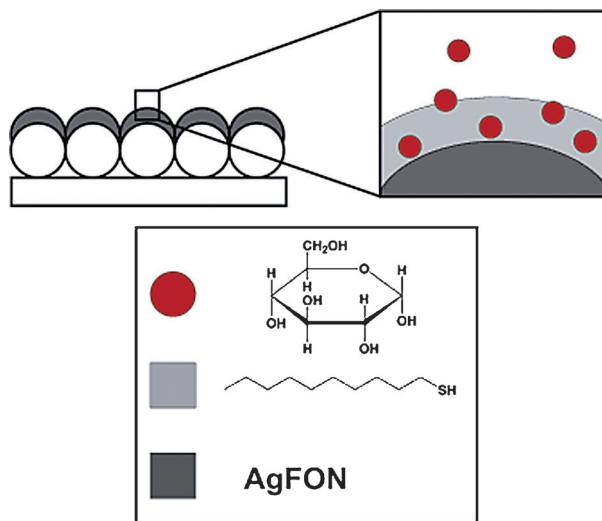


Abbildung 44. Nachweis von Glukose auf einem Silberfilm über Nano-kugeln. Die Grenzflächenbeschichtung mit 1-Decanthiol gewährleistet die erforderliche Anreicherung. Aus Lit. [114].

5.3.1.4. Sensorik von Glukose

Patienten mit *Diabetes mellitus* müssen ihren Glukosespiegel regelmäßig verfolgen, da ihr Körper selber kein Insulin produzieren kann. Insulin ist ein Hormon, das den Glukosestoffwechsel reguliert. Die resultierenden großen Fluktuationen des Glukosespiegels können schwerwiegende Komplikationen wie z.B. Nieren- und Herzkrankheiten verursachen. Die meisten Patienten benutzen ein Fingerstichinstrument, um Blutstropfen in einer unangenehmen und schmerzhaften Prozedur zu erhalten. Daher versuchen viele Forschungsgruppen, minimal invasive und biologisch kompatible Methoden zur quantitativen Glukosebestimmung zu entwickeln, darunter Techniken wie die MIR-Absorptionspektroskopie und die Laserpolarimetrie. Konventionelle Raman-Spektroskopie kann Glukose in physiologisch relevanten Konzentrationen *in vitro* nachweisen. Zum Vergleich: Der Raman-Streuquerschnitt von Glukose ist nur fünfmal kleiner als der von Benzol und 50-mal größer als der von Wasser. Allerdings ist die Laserbelastung im Sinne der Leistungsdichte und Belichtungszeit relativ hoch, insbesondere höher als physiologisch akzeptabel. Die Signalverstärkung bei SERS überwindet diese Limitierung unter Beibehaltung der hohen chemischen Spezifität der Schwingungs-Raman-Spektroskopie. Ein AgFON (Abschnitt 4.2.1) als SERS-Substrat in Kombination mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (PLS) zur chemometrischen Auswertung wurde erfolgreich für die quantitative Glukosebestimmung eingesetzt. Ein zentrales Element ist die Verwendung einer Grenzflächenbeschichtung auf der Oberfläche des AgFON-Substrates zur Generierung eines Glukose-Gradienten (Abbildung 44).^[114] Ein Dutzend verschiedener Oberflächenfunktionalisierungen wurde untersucht, aber nur unverzweigte Alkanthiole haben sich als effektiv erwiesen; in dieser Arbeit wurde 1-Decanthiol (1-DT) verwendet. Es ist wichtig zu betonen, dass ohne diese Grenzflächenbeschichtung Glukose nicht nachgewiesen werden konnte, da die

notwendige Anreicherung – Glukose in enger räumlicher Nähe zur plasmonischen AgFON-Oberfläche – in diesem Fall fehlt. Konzentrationsabhängige Untersuchungen im Bereich von 0–250 mM wurden durchgeführt, um die Genauigkeit dieses Ansatzes und die Nachweisgrenze zu bestimmen. Eine chemometrische Analyse (PLS/LOO; partial least squares/leave-one-out) zur Datenauswertung wurde verwendet, da das Analyt-Spektrum (Glukose) von komplexen Beiträgen der Matrix überlagert ist. Auftragen der mittels PLS vorhergesagten Konzentrationen als Funktion der tatsächlichen Konzentrationen lieferten ein mittleres Fehlerquadrat (RMSEP; root-mean squared error of prediction) von $1.8 \text{ mM} = 33.1 \text{ mg dL}^{-1}$ für den physiologisch relevanten Konzentrationsbereich (Abbildung 45). Dieser Zahlenwert

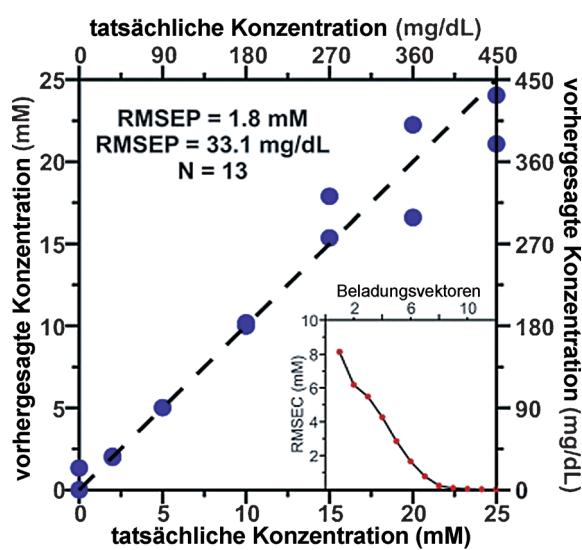


Abbildung 45. Konzentrationsabhängige SERS-Messungen von Glukose mit dem in Abbildung 44 gezeigten Verfahren. Aus Lit. [114].

ist nahe der für medizinische Anwendungen benötigten Nachweisgrenze. Die für die Auftragung in Abbildung 45 benutzten Kalibrierungsvektoren enthalten charakteristische Schwingungs-Raman-Banden von Glukose, d.h., sie enthalten Anteile aus dem Glukosespektrum, die nicht mit Banden der Oberflächenbeschichtung oder anderer Analyte überlappen. Allerdings kann 1-DT nicht als die optimale SAM angesehen werden, hier ist sicherlich noch Raum für Verbesserungen. Die Autoren bemerken, dass sie bessere Monolagen mit einem höheren Verteilungskoeffizienten und geringeren spektralen Überlagerungen mit den Raman-Banden von Glukose suchen. Eine weitere Verbesserung wäre der Wechsel von einer Laseranregung im sichtbaren Spektralbereich, die in dieser Studie verwendet wurde, zum „biologischen Fenster“ in der nahinfraroten Region zwischen ca. 700–1200 nm.

5.3.2. Einfangen

Neben der Partitionierung (siehe Abschnitt 5.3.1.4) sind das Fangen und „in Käfige sperren“^[115] weitere vielverspre-

chende Ansätze, um Analytmoleküle in kleine Volumina nahe der Metalloberfläche zu zwingen.

5.3.2.1. Gold-Nanofinger

Eine Ausweitung des Ansatzes mit Silbernanodrähten (siehe Abschnitt 4.2.5) basiert auf Gold-Nanofingern zum Fangen und Detektieren von Molekülen. Dieser Ansatz adressiert zwei zentrale Aspekte: a) Kontrolle über die kritischen Subnanometer-Abmessungen, was mit konventionellen Nanofabrikationsschemata schwierig zu erreichen ist; b) der Analyt muss sich nicht notwendigerweise im Hotspot befinden, auch wenn der Hotspot präzise hergestellt wird. Goldbeschichtete flexible Polymerfinger können beide Funktionen ausführen: Sie können sich schließen, um die Moleküle zu fangen, und gleichzeitig können sie reproduzierbare Hotspots bilden.^[116] Dieses System ist daher eine generische Plattform für das Fangen von Molekülen und deren Detektion mittels SERS. Abbildung 46 zeigt die Gold-Finger in der offenen (a) und geschlossenen (b) Form; die entsprechenden REM-Bilder sind in (c) und (d) gezeigt. Dicht gepackte quadratische Anordnungen von freistehenden Polymer-Nanofingern wurden mittels Nanoprägelithographie gefolgt von Goldbeschichtung hergestellt. Das Schließen der Finger erfolgt durch Kapillarkräfte, die nach der Benetzung der Finger mit Flüssigkeit und der darauf folgenden Verdunstung der Flüssigkeit auftreten. Abbildung 46e zeigt schematisch, wie die Moleküle mit den Nanofingern gefangen werden. Die räumliche Verteilung der elektrischen Feldstärke dieser Konfiguration, berechnet mit

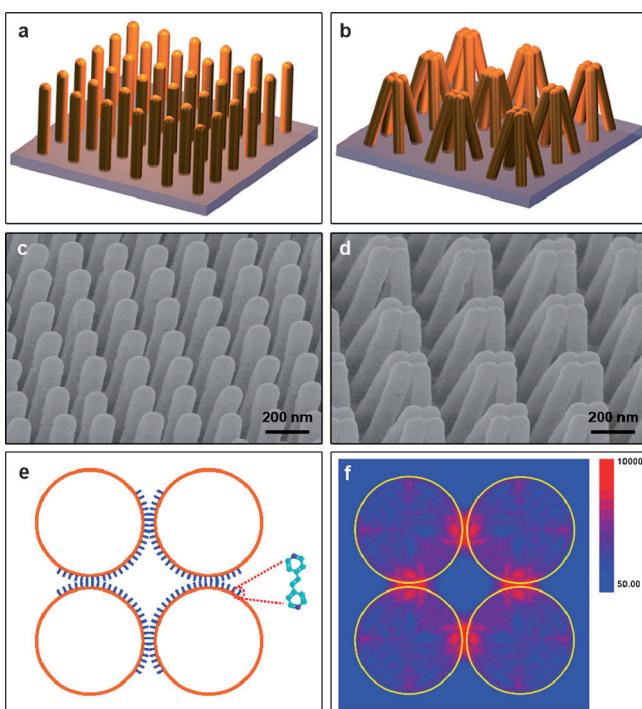


Abbildung 46. Gold-Finger in der a) offenen und b) geschlossenen Form. c, d) Zugehörige REM-Bilder. e) Schematische Darstellung mit eingefangenen Analytmolekülen. f) Ergebnis einer Computersimulation mit deutlich erkennbaren Hotspots. Aus Lit. [116].

der diskreten Dipol-Näherung (DDA), demonstriert das Vorliegen von Hotspots an der Kontaktstelle zwischen zwei benachbarten Goldfingern.

Kontrollexperimente wurden durchgeführt, um zu demonstrieren, dass das eigentliche Fangen der Moleküle zwischen den Spitzen der Goldfinger erfolgt. Das SERS-Signal bei Eintauchen in eine Lösung mit dem Analyten und Trocknen, d.h. der konzertierten Aktion aus dem vermuteten Molekülfangen und Fingerschließen, war zweimal so hoch im Vergleich zu einer sequentiellen Abfolge, in der nur das Lösungsmittel zum Schließen der Finger verdampft und dann anschließend das Analytmolekül zugegeben wurde.

5.3.2.2. Hohle Silica-Nanopartikel als temporär stabile SERS-Substrate

Die große Oberflächenenergie und die daraus resultierende Instabilität von Metallkolloiden führt zu deren Aggregation und nicht reproduzierbaren SERS-Spektren. Die Stabilität von Metallkolloiden ist daher von entscheidender Bedeutung, um reproduzierbare SERS-Signale zu erhalten. Der Schutz von metallischen Nanopartikeln durch Stabilisierungsreagentien kann die Aggregation der Partikel vermeiden, die plasmonischen/optischen Eigenschaften der Partikel sollen dabei aber unverändert bleiben. Silica-Hohlshalen mit Goldnanopartikeln im Inneren, die durch Verkapselung von AuNP-Kernen in porösen Silicamembranen erhalten wurden, erfüllen beide Kriterien (Abbildung 47)

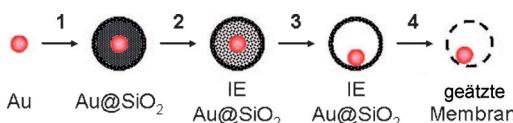


Abbildung 47. Synthese von $\text{SiO}_2@\text{Au}$ -Nanopartikeln. Analytmoleküle können durch die kleinen Öffnungen der geätzten SiO_2 -Struktur diffundieren und stehen dann im Schaleninneren für SERS mittels AuNP zur Verfügung. IE steht für „intern geätzt“. Aus Lit. [117].

rechts).^[117] Die Porosität der Membran erlaubt es den Molekülen, durch das Silicanetzwerk zu diffundieren und in Kontakt mit dem Goldkern zu kommen. Zunächst werden AuNP in einer Silicahülle verkapselt (Schritt 1 in Abbildung 47). Das selektive Ätzen der internen Silicamatrix in diesen $\text{Au}@\text{SiO}_2$ -Partikeln (Schritt 2), die weniger dicht und vernetzt ist als die stark vernetzte externe Silicamatrix, führt zu intern geätzten $\text{Au}@\text{SiO}_2$ -Partikeln. Durch Verlängerung der Zeit für das Ätzen wurden hohle intern geätzte $\text{Au}@\text{SiO}_2$ -Partikel mit frei beweglichen Au-Kernen (Schritt 3) und abschließend hohle, intern geätzte $\text{Au}@\text{SiO}_2$ -Partikel mit einer geätzten externen Membran (Schritt 4) erhalten. Abbildung 48 zeigt TEM-Bilder von Nanopartikeln, die im Verlauf der Synthese der hohlen intern geätzten $\text{Au}@\text{SiO}_2$ -Partikel erhalten wurden.

Der Ätzprozess wurde mittels UV/Vis-Extinktionsspektroskopie verfolgt, und ein Modell zur Erklärung der Bildung der Silicamembran wurde vorgestellt.

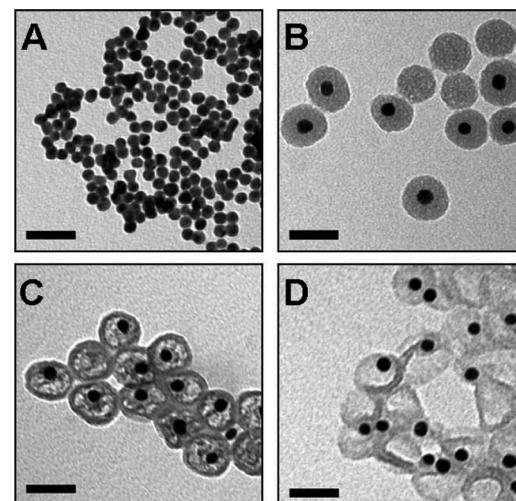


Abbildung 48. TEM-Bilder der $\text{SiO}_2@\text{Au}$ -Nanopartikel. Aus Lit. [117].

5.3.2.3. Thermoresponsive Nanokomposite als Molekülfallen für SERS

Die überwiegende Mehrheit der analytischen Anwendungen von SERS basiert auf der Adsorption des Analyten auf einer Metalloberfläche. Stickstoff- und Schwefel-haltige Komponenten, die normalerweise relativ hohe Affinitäten für Silber- und Goldoberflächen aufweisen, können daher mehr oder weniger routinemäßig mit SERS detektiert werden.

Die Kontrolle der Oberflächenladung ist ein alternativer Ansatz, um den Analyten direkt auf die Metalloberfläche oder in deren Nähe zu bringen, z.B. mittels elektrostatischer Anziehung. Beispiele für diesen Ansatz sind Carbonsäuren und Amine. Für Alkohole, Ether und andere Sauerstoff-haltige Gruppierungen sowie für Moleküle ohne funktionelle Gruppen ist dies hingegen kaum nützlich.

Wie kann man Moleküle ohne funktionelle Gruppen, d.h. Moleküle ohne oberflächensuchende Gruppen, fangen und nahe an das plasmonische Substrat für die SERS-Detektion bringen (siehe SERS-Abstandsabhängigkeit in Abschnitt 3.4)? Thermoresponsive Mikrogele, die einen Goldkern enthalten, sind ein vielversprechender Ansatz dafür. Die Polymerhülle kann temperaturkontrolliert aufquellen oder kollabieren; diese Volumenänderung kann ausgenutzt werden, um Moleküle ohne funktionelle Gruppen zu fangen und sie ausreichend nahe an den Metallkern zu bringen.

Die Synthese der SERS-aktiven Nanokomposite in Abbildung 49^[118] beginnt mit Cetyltrimethylammoniumbromid-(CTAB)-beschichteten, 67 nm großen Gold-Nanokugeln, die mit einer dünnen Polystyrol(PS)-Hülle beschichtet sind. Das thermoresponsive Mikrogel um den AuNP@PS-Kern wird durch Polymerisation von *N*-Isopropylacrylamid (NIPAM) und einem Vernetzungsreagens gebildet. Die Größe des 67 nm Au-Kerns in diesen AuNP@pNIPAM-Nanokompositen kann durch keiminduziertes Wachstum mittels HAuCl_4 und Ascorbinsäure als Reduktionsmittel erhöht werden. Die resultierenden 116 nm Au-Kerne zeigen eine signifikant höhere Streuintensität im Vergleich zu den 67 nm Au-Kernen.

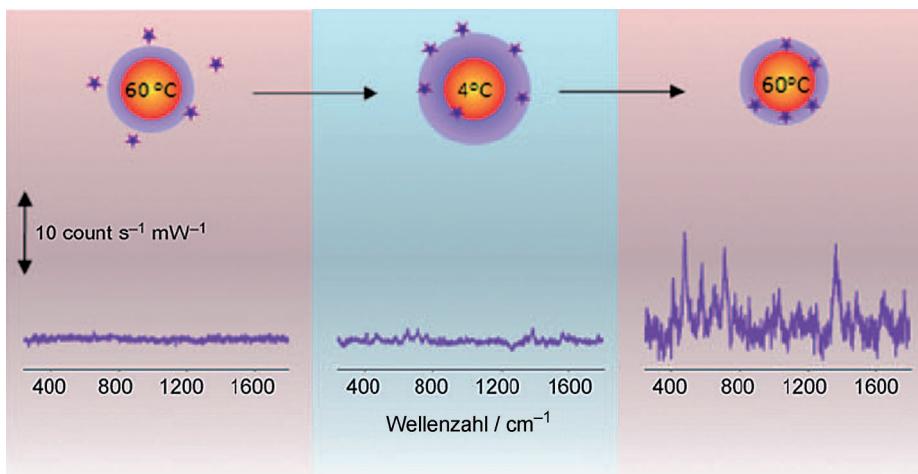


Abbildung 49. SERS-Nachweis von Molekülen ohne oberflächensuchende Gruppen mithilfe von thermoresponsiven Polymeren auf AuNP. Aus Lit. [118].

Abbildung 49 zeigt schematisch die Anwendung dieser AuNP@pNIPAM-Nanokomposite für den Nachweis von nicht-interagierenden Analyten, d.h. Molekülen ohne Prädisposition für eine Adsorption auf die Goldoberfläche. Bei 4°C (Abbildung 49 Mitte) werden aufgrund des großen Abstands zwischen Analytmolekülen und Au-Kernen keine SERS-Signale beobachtet. Beim Erhitzen auf 60°C (Abbildung 49 rechts) kontrahiert die thermoresponsive Hülle und SERS kann jetzt detektiert werden. Das Mikrogel hat mehrere zentrale Vorteile: 1) Die poröse Schutzschicht aus pNIPAM erhöht die Langzeitstabilität des kolloidalen Nanokomposit. 2) Die Hülle verhindert die plasmonische Kopplung zwischen den Partikeln und sorgt damit für ein sehr reproduzierbares SERS-Signal, was eine notwendige Bedingung für eine Quantifizierung mittels SERS ist. 3) Der SERS-Signalbeitrag der pNIPAM-Hülle selber ist gering. Dies ist wichtig für eine ultrasensitive Anwendung, die auf einem Nanokompositssystem mit niedrigem Eigensignal basiert.

5.3.3. SERS für den direkten Nachweis festphasengebundener Substanzen

5.3.3.1. SERS-Detektion mit externen plasmonischen Nanostrukturen

Die Festphasensynthese (SPS; solid-phase synthesis) von Peptiden hat die bioorganische Synthese revolutioniert. Die Matrix in der SPS ist in vielen Fällen ein modifiziertes Polystyrolharz mit einem niedrigen Beladungsgrad von typischerweise ca. 100 pmol pro Harzkügelchen. Dies gestaltet die Analyse von festphasengebundenen Substanzen direkt auf dem Harzkügelchen schwierig. Jeder spektroskopische Ansatz, die Moleküle auf einem einzelnen μm -großen SPS-Kügelchen nachzuweisen, hat mit dem niedrigen Beladungsgrad und der Anwesenheit eines Überschusses der Festphasenmatrix selber zu kämpfen. Abbildung 50 zeigt schematisch, wie Kolloid-basiertes SERS zum direkten und markierungsfreien Nachweis von artifiziellen Peptidrezeptoren (**1**), die auf der Polystyroloberfläche eines μm -großen Kügelchen gebunden sind, eingesetzt werden kann.^[119] Kolloidale Sil-

berpartikel mit einem Durchmesser von ca. 20 nm werden zur Oberfläche hinzugegeben. Bei resonanter Laseranregung erfährt nur die festphasengebundene Komponente **1**, die sich sehr nah an der Silberoberfläche befindet, die hohe Nahfeldverstärkung und ist im entsprechenden SERS-Spektrum beobachtbar. Im Gegensatz dazu kann die Festphasenmatrix selber, d.h. die Polystyroloberfläche, aufgrund des zu großen Abstands vom Silberkolloid nicht detektiert werden. Ein zentraler Nachteil dieses Ansatzes ist, dass die nackten Silberpartikel direkt mit dem interessierenden

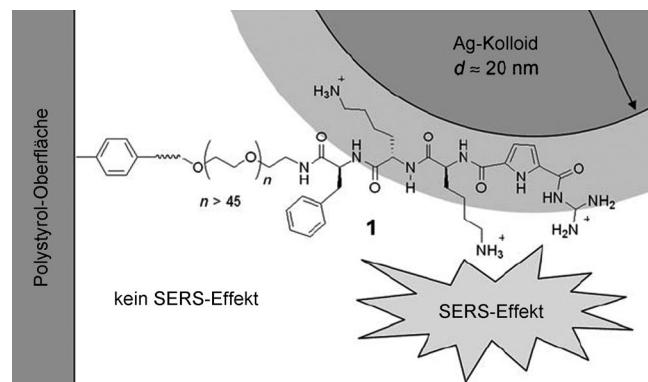


Abbildung 50. SERS-Nachweis von festphasengebundenen Molekülen mithilfe von kolloidalem Silber. Aus Lit. [119].

Analyten interagieren können und seine elektronischen und schwingungsspektroskopischen Eigenschaften bzw. seine Konformation verändern können.

5.3.3.2. Integrierte Festphasensynthese und markierungsfreie SERS-Analyse mit plasmonisch aktiven Mikrokügelchen

Ein jüngerer Ansatz umgeht dieses Problem und integriert beide Funktionalitäten – SPS und die direkte markierungsfreie SERS-Analyse auf dem Kügelchen – in eine einzelne bifunktionelle Einheit (Abbildung 51).^[120] Die Oberfläche von einzelnen μm -großen Kügelchen ist vollständig von 80 nm großen AuNP mit einer ultradünnen Silicahülle bedeckt (Abbildung 51a,b), so wie beim SHINERS-Ansatz (Abschnitt 4.1.1). Die Oberfläche der Silicahülle wird dann mit Aminogruppen für die nachfolgende SPS functionalisiert (Abbildung 51c). REM-Bilder zeigen eine dichte Packung der Gold/Silica-Kern/Schale-NP auf der Oberfläche der μm -großen Kügelchen (Abbildung 51d,e). Die ultradünnen Silicahüllen (2–3 nm) kann in den TEM-Bildern klar erkannt werden (nicht gezeigt). Direkte und markierungsfreie SERS-Mikrospektroskopie hat das Vorliegen von Aminosäuren und

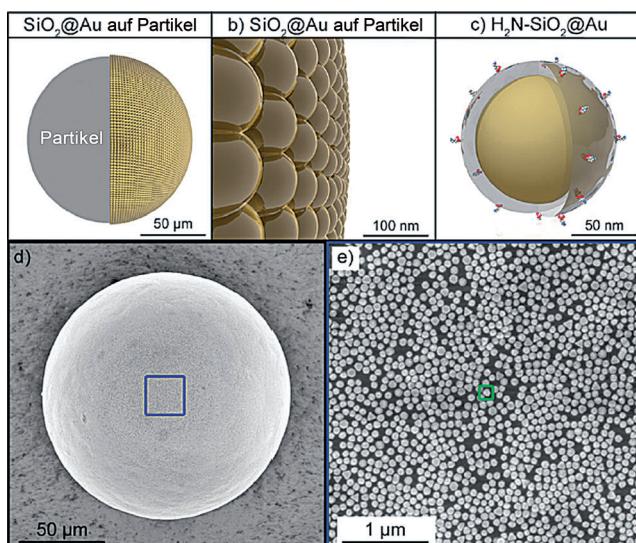


Abbildung 51. Mikropartikel, beschichtet mit 80 nm großen AuNP mit sehr dünner Silicahülle, für die integrierte Festphasensynthese und direkte SERS-Detektion. Aus Lit. [120].

Peptiden demonstriert, als auch die Möglichkeit, zwischen diesen aufgrund ihrer schwingungsspektroskopischen Signatur zu differenzieren. Um generell anwendbar zu sein, muss das Konzept natürlich auch für längere Oligopeptide funktionieren.

5.4. Bioanalytische Anwendungen: Nukleinsäuren und Proteine

SERS hat ein großes Potenzial für bioanalytische Anwendungen in vitro und in vivo.^[121–125] Dieser Abschnitt konzentriert sich auf den Nachweis von Nukleinsäuren und Proteinen als besonders wichtigen Klassen von Biomakromolekülen.

5.4.1. Nachweis von Nukleinsäuren

5.4.1.1. DNA/RNA-Nachweis über Nanopartikel mit Raman-spektroskopischem Fingerabdruck

Ein wichtiger Schritt in der Nanobiotechnologie war die Verwendung von Oligonukleotid-funktionalisierten NP für den hochempfindlichen und selektiven Nachweis von DNA^[126,127] mittels Silberabscheidung zur Signalverstärkung und einem Flachbrettscanner als Detektor. Ein Nachteil dieses Ansatzes ist die inhärente Beschränkung auf nur eine Farbe (Grauskala). Der Multiplex-Nachweis von verschiedenen DNA/RNA-Sequenzen erfolgte mithilfe von Metallkolloiden, die mit Raman-Farbstoff-markierten Oligonukleotiden mit Alkylthiol-Termini funktionalisiert waren. In diesem Fall wurde SERRS zur Detektion benutzt; SERRS tritt auf, wenn die Laseranregungswellenlänge mit einer elektronischen Absorption des Moleküls auf der Oberfläche einer plasmonisch aktiven Nanostruktur zusammenfällt. Die zusätzliche Signalverstärkung aufgrund der molekularen elektronischen Resonanz macht SERRS zu einer besonders empfindlichen schwingungsspektroskopischen Technik.

Kleine AuNP mit einem Durchmesser von ca. 13 nm (Abbildung 52 oben) wurden mit Cy3-markierten, Alkylthiol-terminierten Oligonukleotidsträngen funktionalisiert.^[128] Zur

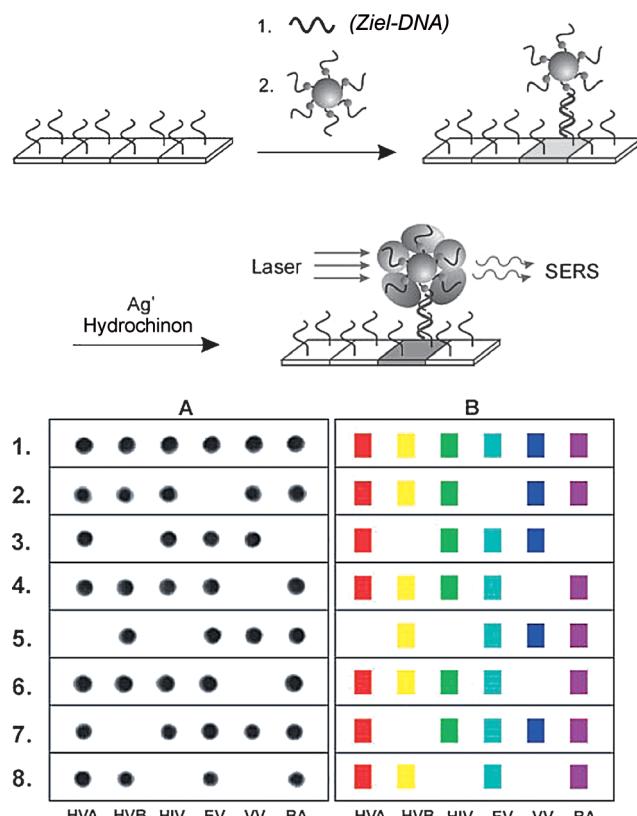


Abbildung 52. DNA-Nachweis mit farbstoffmarkierten Oligonukleotid-funktionalisierten AuNP mit anschließender Silberfärbung für die SERRS-Detektion. Aus Lit. [128].

Hybridisierung wurden die Analyt-DNA und die kleinen AuNP-SERS-Sonden sequenziell zum mit der entsprechenden Fängersequenz funktionalisierten Chip gegeben. Als nächstes wurde eine Silberverstärkung durch Reduktion von Silberionen mit Hydrochinon durchgeführt, um eine empfindliche SERRS-Detektion des Hybridisierungsvorgangs zu erzielen.

Flachbrettscannerbilder des Chips vor (A) und nach der Silberentwicklung (B) wurden aufgenommen (Abbildung 52 unten). Sie belegen, dass die entsprechenden Signale auf dem Chip nur nach Silberfärbung detektiert werden können. Ein typisches Raman/SERRS-Spektrum zeigt die charakteristischen Schwingungsbanden des Farbstoffs Cy3. Ein SERRS-Intensitätslinienprofil (nicht gezeigt) wurde durch horizontales Abrastern mit dem Laserstrahl (ca. 25 µm Durchmesser) entlang des Chips und Auftragung der intensiven Raman-Markerbande bei ca. 1192 cm⁻¹ erhalten. SERRS wird an allen Stellen mit Silberfärbung (Maxima im Intensitätsprofil) beobachtet, während zwischen diesen Stellen keine Signale auftreten (Minima im Intensitätsprofil).

In einer Multiplexversion dieses Ansatzes wurden sechs käuflich erhältbare Farbstoffe – Cy3, TAMRA, Texas-Red,

Cy3.5, Rhodamin 6G und Cy5 – an verschiedene Oligonukleotidsequenzen für sechs verschiedene Analytmoleküle inklusive mehrerer Viren gebunden (Abbildung 52 unten). Die Raman-Spektren von sechs verschiedenen Farbstoff-markierten NP sind in einer einzelnen Farbe kodiert dargestellt (Abbildung 52 rechts unten). Die Fluoreszenz der Farbstoffmoleküle wird durch den strahlungslosen Energie-transfer vom molekularen Fluorophor auf das Metall gelöscht; anders formuliert: bei Metall-zu-Farbstoff-Abständen unterhalb von wenigen Nanometern dominiert SERRS über Fluoreszenz.

Die Selektivität dieses Ansatzes wurde mithilfe eines Mikroarrays mit acht verschiedenen Testreihen und anschließender Silberfärbung ermittelt. Sowohl Flachbrettscannerbilder (Grauskala) als auch SERRS-kodierte Bilder (Abbildung 52 unten) wurden aufgenommen und analysiert. In der ersten Testreihe (Reihe 1), in der alle acht unterschiedlichen Zielstränge hinzugefügt wurden, zeigen alle Stellen dieselbe Graustufenintensität nach Silberabschei-

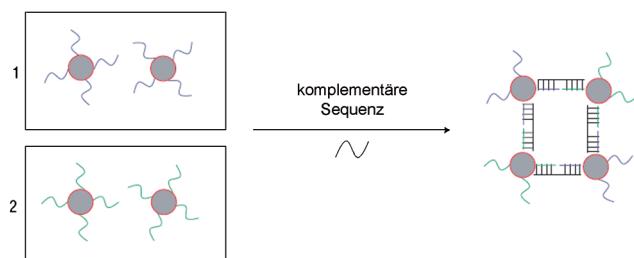


Abbildung 53. Kontrollierte DNA-basierte Selbstassemblierung von Farbstoff-kodierten Oligonukleotid-funktionalisierten Silberkolloiden. Aus Lit. [133].

dung. Ihre „Identität“ kann leicht über das entsprechende Falschfarben-kodierte Raman-Spektrum ermittelt werden, da die Korrelation zwischen Oligonukleotidsequenz und dem entsprechenden SERRS-Spektrum des Farbstoffs bekannt ist. Verschiedene Kombinationen von Zielsträngen, insbesondere „Lass-Einen-Aus“- und „Lass-Zwei-Aus“-Experimente, wurden in den anderen sieben Testreihen (Reihen 2–8) durchgeführt. Die Konzentration der Zielstränge in allen Experimenten (jeweils 100 pm) wurde konstant gehalten. In diesem Satz von Experimenten wurden keine falsch-positiven oder falsch-negativen Resultate beobachtet. Eine nicht-optimierte Nachweisgrenze von 20 fm wurde ermittelt.

Dieser Beitrag war sehr einflussreich auf bioanalytische SE(R)RS-Anwendungen und hat eine Reihe weiterer Forschungsaktivitäten zur Multiplex-Detektion von Nukleinäuren und anderen Molekülen, insbesondere Proteinen (Abschnitt 5.4.2), stimuliert.

5.4.1.2. Quantitative Multiplex-Detektion mittels SERRS

Nach dieser Machbarkeitsstudie (Abschnitt 5.4.1.1) mussten mehrere analytische Schlüsselparameter untersucht werden, bevor SERRS für die DNA-Routinedetektion eingesetzt werden konnte.^[129–131] Dies umfasst den für quantitative Vorhersagen zugänglichen Konzentrationsbereich, die

Nachweisgrenze für leicht verfügbare und als Raman-Reporter eingesetzte Farbstoffe und die optimalen Pufferbedingungen.^[131] Multiplexing wurde erreicht, indem SERRS von sieben Farbstoffen mit einer einzelnen Laserwellenlänge angeregt wurde. Eine Alternative ist die Verwendung von zwei Laseranregungswellenlängen – jede davon abgestimmt auf die elektronische Absorption einer Teilmenge an Farbstoffen.^[132] Die Nachweisgrenze für Farbstoff-markierte Oligonukleotide war im Bereich von 3–30 pm für den Multiplex-SERRS-Assay.

5.4.1.3. DNA-basierte Selbstassemblierung von Farbstoff-kodierten Nanopartikeln zu größeren Clustern

Die DNA-basierte Selbstassemblierung bei molekularer Erkenntnis eines Zielstranges ist ein mächtiger und eleganter Ansatz, um eine plasmonische Kopplung zwischen metallischen NP zu erzielen. Dieses ursprünglich für Oligonukleotid-markierte AuNP entdeckte Konzept^[126,127] wurde auf einen Sandwichassay ausgedehnt, bei dem mit Raman-Farbstoffen und Oligonukleotiden beschichtete AgNP eingesetzt werden (Abbildung 53).^[133] Benzotriazole wurden aufgrund ihrer hohen Affinität für Silberoberflächen und ihrer großen Raman-Streuquerschnitte als Raman-Farbstoffe verwendet; sie liefern entsprechend intensive SERRS-Signale. Ein mit einer Monolage aus Benzotriazolen functionalisiertes Kolloid wurde dann mit zwei verschiedenen, nicht-komplementären 5'-Thiol-funktionalisierten Oligonukleotidsequenzen (**1** und **2** in Abbildung 53) inkubiert. Eine Hybridisierung findet statt, wenn eine zu den beiden Sequenzen (**1** und **2**) komplementäre Zielsequenz zu den Raman-Farbstoff-funktionalisierten DNA/AgNP-Konjugaten hinzugefügt wird. Die kontrollierte DNA-basierte Assemblierung kann mit dem bloßen Auge über den Farbumschlag von Gelb (einzelne Silberpartikel) zu Grün-Blau (Assemblate) verfolgt werden. Um die sequenzspezifische Diskriminierung der DNA-Silber-Konjugate zu testen, wurde das assemblierte Kolloid erhitzt und abgekühlt. Die Schmelzkurven, ermittelt über die Exinktion bei der Wellenlänge der Plasmonbande, zeigen einen scharfen Übergang, so wie er auch für andere Oligonukleotid-NP-Konjugate beobachtet wurde.^[133] Dies ist ein wichtiger Befund, der demonstriert, dass die DNA-Kolloid-Konjugate in der Lage sind, eine sequenzspezifische Hybridisierung einzugehen.

Abbildung 54 zeigt die SERRS-Spektren von DNA- und Raman-Farbstoff-funktionalisierten Silberkolloiden, die bei Einsatz einer vollständig komplementären Zielsequenz (**1**, starkes SERRS-Signal) und einer halb-komplementären Sequenz (**2**, schwaches SERRS-Signal) erhalten wurden.^[133] Der Einschub in Abbildung 54 zeigt das betreffende Hybridisierungsprofil, das bei Auftragung der Intensität der Raman-Bande bei 1368 cm^{-1} des Benzotriazolfarbstoffs als Funktion der Zeit erhalten wurde. Diese Ergebnisse zeigen klar den Übergang von nicht-aggregierten Raman-Farbstoff-funktionalisierten AgNP („Aus“-Zustand) zu definierten Assemblaten über DNA-Hybridisierung („An“-Zustand). Die Verwendung mehrerer Raman-Farbstoffe für die SERRS-Verfolgung dieses Prozesses anstelle der Erfassung über das Extinktionsspektrum bietet den Vorteil, das Multiplexing-

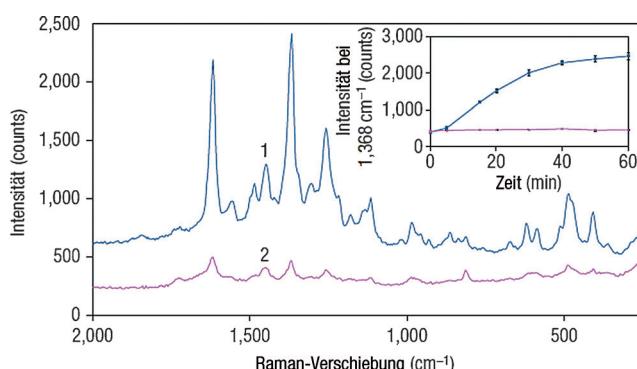


Abbildung 54. DNA-basierte Selbstassemblierung von Farbstoff-kodierten Oligonukleotid-funktionalisierten Silberkolloiden, die vollständig komplementären (1) und halb-komplementären (2) DNA-Strängen ausgesetzt wurden. Aus Lit. [133].

potential der Schwingungsspektroskopie zu nutzen, da verschiedene Raman-Farbstoffe mit unterschiedlichen SERRS-Spektren für unterschiedliche Oligonukleotid-Zielsequenzen kodieren können.

5.4.1.4. Direkter markierungsfreier sub-mikromolarer Nachweis von Mononukleotiden

Zusätzlich zu den oben beschriebenen SERRS-Markierungsstrategien werden auch klassische markierungsfreie Verfahren zur DNA-Detektion eingesetzt. Ein möglicher Ansatz zur Reduktion der chemischen Komplexität ist zunächst die Analyse der Mononukleotide anstelle der komplexeren Oligo- oder Polynukleotide. Auch für den Routinenachweis von Mononukleotiden wird eine Kombination aus empfindlichem Nachweis und Reproduzierbarkeit benötigt. Eine hohe Empfindlichkeit in Kolloid-basierten Ansätzen kann durch die Verwendung aggregierter Partikel erreicht werden, da diese Hotspots in den Kontaktstellen zwischen Partikeln durch plasmonische Kopplung aufweisen.

Man fand, dass Elektrolyte wie $MgSO_4$, die nicht stark an die Oberfläche des Silbersols binden, zu sehr starken SERS-Verstärkungen führen. Die höhere Ladung des Mg^{2+} -Ions im Vergleich zu den einfach geladenen Kationen der Alkalimetalle, wie Na^+ oder K^+ , induziert eine stärkere Aggregation und liefert daher höhere SERS-Verstärkungen. In diesen „ Mg^{2+} -aggregierten“ Kolloiden binden anionische Analyte wie Mononukleotide an die Metallocberfläche und besetzen, durch den Austausch mit den bei der Lee-Meisel-Synthese eingeführten und nur schwach gebundenen Citrat-Ionen, somit Oberflächenbindungsstellen.

Abbildung 55 zeigt, dass das einfache Konzept der Verwendung von $MgSO_4$ als Elektrolyt zur Kolloidaggregation drastische Konsequenzen bezüglich der SERS-Signalstärke hat.^[134] Spektrum (a) wurde mit 100 ppm dAMP in Abwesenheit externer Aggregationsreagentien erhalten und zeigt nicht die charakteristischen Raman-Banden von dAMP. Spektrum (b) wurde in Gegenwart eines Überschusses an gelöstem Chlorid als Aggregationsreagens erhalten; hier kann nur die charakteristische Bande der Ag-Cl-Bindung bei 245 cm^{-1} (nicht gezeigt) beobachtet werden. Bei $MgSO_4$ -induzierter Aggregation (Spektrum c) jedoch können selbst bei 100 ppb (10000fach höhere Verdünnung als in Spektrum b) die charakteristischen Raman-Banden von dAMP detektiert werden. Die SERS-Spektren (d) bis (f) zeigen die Konzentrationsabhängigkeit, die im Bildeinschub aufgetragen ist. Die Nachweisgrenze ist ca. 3 ppb oder 10^{-8} M . Auch von anderen Nukleotiden wurden qualitativ hochwertige SERS-Spektren aufgenommen und verglichen. Ihre Spektren sind hinreichend verschieden voneinander, was die Grundlage einer markierungsfreien schwingungsspektroskopischen Identifizierung von Mononukleotiden darstellt. Vorteile dieses Ansatzes sind die Geschwindigkeit der Analyse, die Kompatibilität mit anderen Hochdurchsatzmethoden und eine angemessen hohe, sub-mikromolare Empfindlichkeit.

Dieser markierungsfreie Ansatz wurde vor kurzem zum Nachweis von Einzelbasen-Fehlpaarungen in kurzen DNA-Strängen (23- und 25-nukleotid) über die entsprechenden Differenzspektren, welche spektrale Signaturen der ausgetauschten Nukleotide enthalten, eingesetzt.^[135]

5.4.1.5. Direkte und markierungsfreie Detektion der DNA-Hybridisierung

Der Nachweis von ausgesuchten Nukleinsäuresequenzen in Hybridisierungssassays ist in der Molekularebiologie und Forensik weit verbreitet. Typischerweise wird die Ziel-DNA fluoreszenzmarkiert. Markierungsfreie Ansätze schließen auch metallische NP und ihre Farbänderung aufgrund von plasmonischer Kopplung bei Hybridisierung ein. Im Unterschied dazu bietet SERS die Möglichkeit zur markierungsfreien DNA-Detektion basierend auf dem schwingungsspektroskopischen Fingerabdruck der jeweiligen molekularen Komponenten. Eine Herausforderung für die markierungsfreie SERS-basierte DNA-Detektion ist die Unterscheidung eines spezifischen Signals bei der Hybridisierung von Ziel-

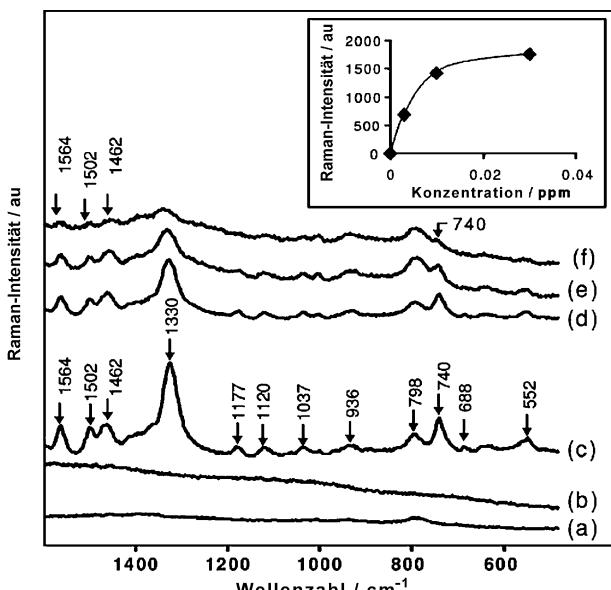


Abbildung 55. Markierungsfreie SERS-Detektion von Mononukleotiden mit unterschiedlichen Salzen zum Induzieren der Kolloidaggregation (a–c). Konzentrationsabhängige Messungen ergeben eine mikromolare Nachweisempfindlichkeit (d–f; Einschub). Aus Lit. [134].

und Fängersequenz, da beide Stränge dieselben vier DNA-Basen enthalten. Abbildung 56a zeigt, dass das SERS-Spektrum von thermisch vorbehandelter DNA auf Au-Nanoschalen (AuNS, Silicakern und Au-Schale) von einer Bande bei 736 cm^{-1} , die der Ringatmungsschwingung von Adenin zugeordnet werden kann, dominiert ist. Die zentrale Idee ist nun das Entfernen von Adenin aus dem Fängerstrang, indem es durch sein Isomer 2-Aminopurin ersetzt wird, welches eine andere spektrale Signatur hat, aber dieselbe Hybridisierungseffizienz besitzt.^[136] Abbildung 56b zeigt das SERS-Spektrum von 2-Aminopurin-substituierter DNA, die an die AuNS-Oberfläche über die Thiolgruppe über ihr 5'-Ende bindet. Anstelle einer Adeninbande bei 736 cm^{-1} (Abbildung 56a) wird jetzt eine Bande von 2-Aminopurin bei

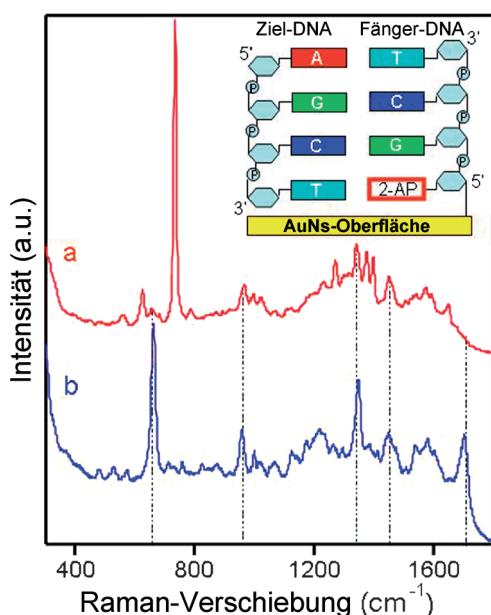


Abbildung 56. SERS-Spektren von a) nativer DNA und b) 2-Aminopurin-modifizierter DNA. Die Ziel-DNA kann durch das charakteristische Adenin-Signal bei 736 cm^{-1} identifiziert werden (a; Einschub). Aus Lit. [136].

807 cm^{-1} beobachtet (Abbildung 56b). Der Einschub in Abbildung 56 zeigt das Hybridisierungsschema für den 2-Aminopurin-substituierten DNA-Fängerstrang und den nativen/unmarkierten Adenin-haltigen DNA-Zielstrang. Nur letzterer enthält Adenin und zeigt die charakteristische und intensive Bande bei 736 cm^{-1} . Mit anderen Worten: Die Bande bei 736 cm^{-1} ist ein Marker für die Hybridisierung des nativen/unmarkierten DNA-Zielstrangs (links im Einschub, mit A = Adenin) und dem modifizierten DNA-Fängerstrang (rechts im Einschub, mit 2-AP = 2-Aminopurin). Die Intensität der 2-AP-Bande bei 807 cm^{-1} ist konstant und hängt nur von der Packungsdichte der Fänger-DNA auf der Oberfläche der AuNS ab. Das Intensitätsverhältnis 736 cm^{-1} (A)/ 807 cm^{-1} (2-AP) ist daher ein quantitativer Marker für das Ausmaß der Hybridisierung. Zusammenfassend hat dieser Beitrag die markierungsfreie SERS-Detektion von Hybridisierungsvorgängen mithilfe von 2-AP-modifizierten Fängersträngen demonstriert.

5.4.1.6. Unterscheidung von Mutationen in DNA-Sequenzen

DNA-Hybridisierungssassays können auch zur Unterscheidung von genomischen Mutationen in DNA genutzt werden, was wichtig für die DNA-basierte Diagnostik und Forensik ist. Üblicherweise werden entweder Methoden für Moleküle in Lösung oder für an Oberflächen immobilisierte Moleküle verwendet. Die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) beispielsweise ist eine weit verbreitete lösungsbasierte Methode. Oberflächenbasierte Methoden bieten den Vorteil, dass die Bedingungen lokal an der Oberfläche kontrolliert werden können. Darüber hinaus eröffnen sie die Möglichkeit zum räumlichen Multiplexing in einem Array-Format, was die Basis für einfache und portable Biosensoren (Lab-on-a-Chip) bildet. Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR, surface plasmon resonance) ist beispielsweise eine weit verbreitete Technik zur Detektion von Bindungsvorgängen über Änderungen des lokalen Brechungsindex. Bisher wurden nur wenige Ansätze zur Schmelzkurvenbestimmung über differentielle Denaturierung auf einer Oberfläche verwendet. Gegenwärtig ist die Fluoreszenzspektroskopie die bevorzugte Technik zur Detektion von Mutationen, bei der solche Hybridisierungs/Denaturierungs-Strategien eingesetzt werden.

Abbildung 57 oben zeigt drei REM-Bilder eines SERS-Substrates (SSV, sphere segment void; vgl. Abschnitt 4.2.1) mit unterschiedlicher Auflösung, zusammen mit einer computergenerierten Darstellung.^[137] Modifizierte Fängerstränge enthalten ein Disulfid am 3'-Ende zur starken Bindung an die Au@SSV-Oberfläche sowie Hexaethylenglykol-Abstandhalter am 5'-Ende, um sicherzustellen, dass die Fänger/Abfrage-Sequenzen nicht zu dicht auf der Oberfläche gepackt sind und somit sowohl eine effiziente Hybridisierung zu ermöglichen als auch eine Kreuzhybridisierung zu vermeiden. Nach der Immobilisierung des Fänger/Abfrage-Oligonukleotids wird die Oberfläche mit Mercaptohexanol behandelt, um nicht-spezifisches Binden zu verhindern. Dann hybridisieren die markierten Zielsequenzen zum Oberflächen-gebundenen Fängerstrang, wobei sich die Marker nahe an der Oberfläche für eine effiziente SERS-Generierung befinden (Abbildung 57 unten links). Die differenzielle Denaturierung wird entweder durch eine kontinuierliche Temperatur- oder Potential-Erhöhung erreicht, die auf die Oberfläche angewendet wird (Abbildung 57 unten rechts). Schließlich wird durch Waschen und Entfernen verbliebener Ziel-DNA-Stränge die Oberfläche für die Wiederbenutzung für andere markierte

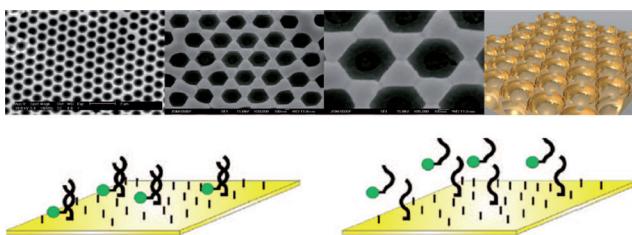


Abbildung 57. SERRS-basierte DNA-Schmelzanalyse von markierten Ziel-Sequenzen durch Hybridisierung mit Oligonukleotiden auf der Oberfläche eines Metallfilms über Gold-Nanokugeln. Aus Lit. [137].

Zielsequenzen recycelt. Abbildung 58 zeigt Ergebnisse einer SERRS-basierten, thermisch induzierten Schmelzanalyse von drei verschiedenen Ziel-DNA-Strängen: Wildtyp (Quadrat, □), Einzelpunktmutante (Kreis, ●) und Dreifachmutante (Dreieck, ▲). Die Schmelztemperatur für die DNA des Wildtyps beträgt 51.0 °C, während die für die Einzelpunktmutante 46.8 °C und für die Dreifachmutante 39.3 °C ist.

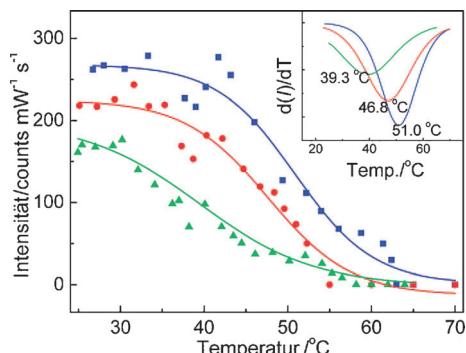


Abbildung 58. SERRS-basierte DNA-Schmelzkurven. Aus Lit. [137].

keine Mutation), Einzelpunktmutante (Kreise) und Dreifachmutante (Dreiecke, Dreifachdeletion). Die DNA des Wildtyps besitzt die höchste Schmelztemperatur (51.0 °C), was aufgrund der vollständigen Übereinstimmung mit der Fänger/Abfrage-Sequenz erwartet wird. Die Schmelztemperatur für die DNA der Einzelpunktmutante beträgt 46.8 °C, d.h., sie ist 4.2 °C niedriger im Vergleich zum Wildtyp. Die Schmelztemperatur für die DNA der Dreifachmutante ist am niedrigsten (39.3 °C), was durch die nicht perfekte Übereinstimmung aufgrund der Dreifachdeletion bedingt ist. Die SERRS-Spektren wurden von rund 12 500 Molekülen auf der Oberfläche erhalten. Dies demonstriert, dass die präsentierte Methode der SERRS-basierten Schmelzkurvenbestimmung eine sehr empfindliche Technik ist, mit der einzelne Mutationen nachgewiesen werden können.

5.4.2. Protein-Nachweis

Proteine sind eine weitere sehr wichtige Klasse von Biomakromolekülen, und es existieren verschiedene Konzepte für ihren SE(R)RS-basierten Nachweis.^[138, 139]

5.4.2.1. Raman-Farbstoff-markierte Nanopartikelsonden für den Proteinnachweis

Das Konzept der mit Raman-Farbstoffen markierten AuNP für den DNA/RNA-Nachweis (Abschnitt 5.4.1.1) kann auch auf den Proteinnachweis angewendet werden. Abbildung 59 zeigt zwei verschiedene Sonden, die zum Nachweis von Interaktionen zwischen kleinen Molekülen und Proteinen (A: Typ I) und von Protein-Protein-Interaktionen (B: Typ II) entwickelt wurden.^[140] Sonden des Typs I bestehen aus ca. 13 nm großen AuNP, die mit hydrophilen, Alkylthiol-terminierten Oligonukleotiden (A_{20}) bedeckt sind. Jedes Oligonukleotid enthält ein Erkennungselement für kleine Moleküle, wie beispielsweise Biotin, am einen Ende und ist mit einem Farbstoff am anderen Ende modifiziert. Insgesamt werden sehr stabile und wasserlösliche Partikel für den Einsatz in komplexen Assay-Umgebungen erhalten, die spezifisch an das betreffende Zielmolekül über ihre Erkennungs-

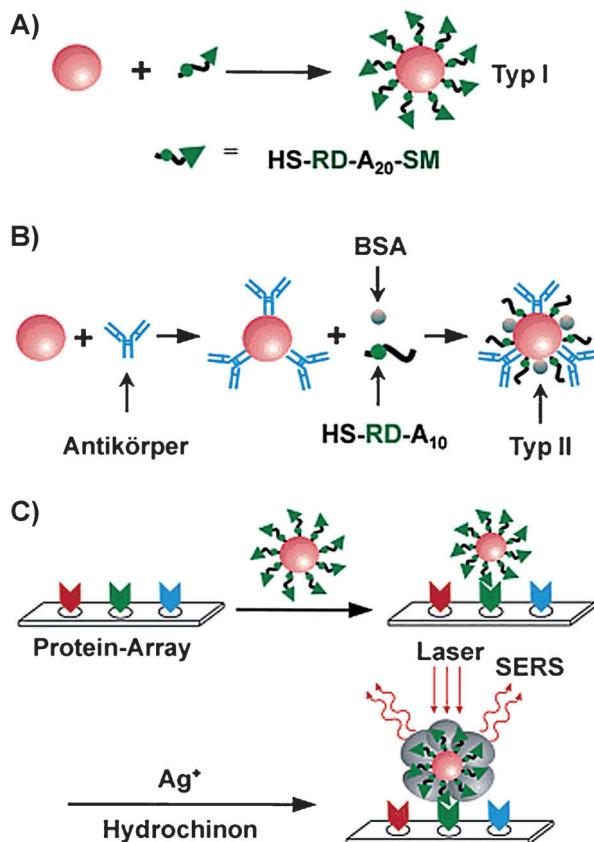


Abbildung 59. Zwei Nanopartikelsonden (A: Typ I, B: Typ II; RD = Raman-Farbstoff, SM = kleines Molekül) für den Proteinnachweis. SERS-Detektion von Typ-I-Sonden erfolgt nach Immobilisierung auf einem Chip und Silberfärbung. Aus Lit. [140].

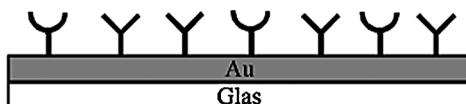
einheit binden und eine charakteristische Raman/SERRS-Signatur des Farbstoffs liefern. Wie bereits beim DNA/RNA-Nachweis bemerkt, ist die geringe Linienbreite von Schwingungs-Raman-Banden die physikalische Grundlage für Multiplexing-Anwendungen mit Raman-Farbstoff/Reporter-Molekülen. Sonden des Typs II bestehen auch aus ca. 13 nm großen AuNP, allerdings in Kombination mit einem Antikörper zur Zielmolekül(Antigen)-Erkennung, sowie mit Raman-Farbstoff-modifizierten Alkylthiol-terminierten Oligonukleotiden zur Identifizierung über die charakteristische SERRS-Signatur und Rinderserumalbumin (BSA) zur Passivierung der Metallooberfläche.

Abbildung 59C zeigt die Anwendung dieser Sonden in einem Proteinarray-Format. Der Proteinchip wurde durch Aufbringen der Proteinfösung auf ein funktionalisiertes Glasplättchen hergestellt. Dann wurden die Chips mit den Raman-Farbstoff-markierten Nanopartikelsonden inkubiert. Nach Waschen und Silberfärbung können graue Punkte auf dem Chip mit dem bloßen Auge erkannt werden. Eine anschließende Raman-spektroskopische Abfrage mit einer faseroptischen Sonde liefert das jeweilige SERRS-Spektrum des Farbstoffs. Die Effizienz und Selektivität der Sonden des Typs I und II wurden in einem Screening mit verschiedenen Zielmolekülen bestimmt.

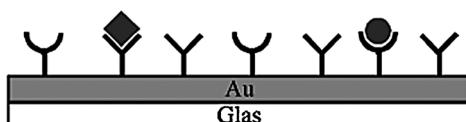
5.4.2.2. Immunassays zum Proteinnachweis in Lösung

Sandwich-Immunassays werden routinemässig in der klinischen Diagnostik eingesetzt. Abbildung 60 zeigt die Verwendung eines Raman-markierten Goldkolloids in einem Sandwich-Format.^[141] Zuerst wird die Gold-beschichtete

A) Funktionalisierung mit dem Antikörper



B) Inkubation mit der Probe, Fangen der Antigene



C) Zugabe des SERS-Reagens

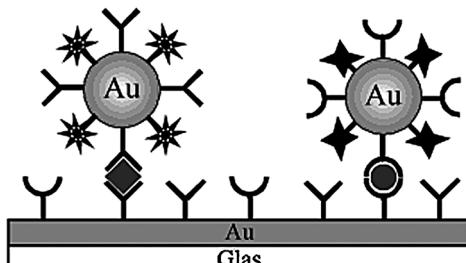


Abbildung 60. SERS-Sandwich-Immunassay für den Proteinnachweis. Aus Lit. [141].

Glasoberfläche mit dem Fängerantikörper functionalisiert (Abbildung 60A). Dann wird der beschichtete Chip mit der Probe inkubiert, um das Ziel-Antigen aus der Lösung zu fangen (Abbildung 60B). Bei Zugabe des Raman-markierten Kolloids mit dem Detektionsantikörper bildet sich der Sandwich-Komplex.

Dieses Konzept wurde zum SERS-basierten Nachweis des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) verwendet, einem 33 kDa schweren Glykoprotein und Marker für das Prostatakarzinom in Serumtests.^[141] Der experimentelle Aufbau zum Nachweis der PSA-Konzentration in humanem Serum mittels SERS besteht aus einem zweigeteilten Faserbündel zur Kopplung der Laserquelle an den Raman-Abfragekopf, der das Licht auf die Probenfläche fokussiert, und vom Abfragekopf zum Spektrometer/CCD-System zur Detektion. Für die Synthese des Raman-Reporter-markierten Immun-goldkolloids wurde 5,5'-Dithiobis(succinimidyl-2-nitrobenzoat) (DSNB) als Raman-Reportermolekül benutzt, welches

bereits für die anschließende Biokonjugation aktiviert ist. DSNB wird aus der entsprechenden Biscarbonsäure mittels konventioneller N-Hydroxysuccinimid(NHS)-Esterchemie hergestellt. Die Zugabe des Disulfids DSNB zum Goldkolloid führt zur Bildung einer selbstorganisierten Monolage auf der Metalloberfläche. Der NHS-Ester-Terminus kann dann anschließend mit dem Antikörper unter Ausbildung einer Amidbindung reagieren.

Konzentrationsabhängige Sandwich-Immunassays zum PSA-Nachweis wurden durchgeführt (nicht gezeigt). Das SERS-Spektrum röhrt vom Nitroarylthiol-Raman-Reporter her, der auf der Oberfläche der ungefähr 32 nm großen AuNP chemisorbiert vorliegt. Die intensive Raman-Bande bei 1340 cm^{-1} wird der symmetrischen Nitro-Streckschwingung zugeordnet. Diese Bande des Raman-Reportermoleküls kann im Konzentrationsbereich von 1000 ng mL^{-1} bis 0.001 ng mL^{-1} PSA beobachtet werden (60 s Belichtungszeit). Eine Probe ohne PSA wurde als Negativkontrolle eingesetzt. In der entsprechenden Dosis-Antwort-Kurve für den Nachweis von freiem PSA in Humanserum sind die Mittelwerte enthalten, die durch Mittelung über verschiedene Stellen der Oberfläche für jede Probe bestimmt wurden. Die Abweichungen betragen typischerweise 10 %. Basierend auf diesen Daten wurde eine Nachweisgrenze von ca. 1 pg mL^{-1} in Humanserum (60 s Belichtungszeit) ermittelt. Dieser empfindliche SERS-Immunassay ist somit zum Nachweis von PSA in klinisch relevanten Konzentrationen geeignet, da normale Konzentrationen von gesamtem PSA in freier und komplexierter Form zwischen 4 und 10 ng mL^{-1} liegen. Die Autoren haben danach einen Ansatz vorgestellt, um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Antigen-Fangens über einen rotierenden Stab schneller zu gestalten.^[142] Dies reduzierte die Zeit für den Assay von 24 h auf 25 min und lieferte zudem eine 10fach niedrigere Nachweisgrenze.

5.4.2.3. Immunhistochemie: SERS-Mikroskopie zur Protein-Lokalisierung in Geweben

Die Immunhistochemie zur selektiven Lokalisierung von Proteinen in Gewebeproben ist eine zentrale Methode in der Histopathologie. Die Machbarkeit der Immun-SERS-Mikroskopie^[143–145] wurde anhand der selektiven Lokalisierung von PSA in Prostatagewebeschnitten mit einem SERS-markierten Primärantikörper gegen PSA demonstriert. In den letzten Jahren wurden verschiedene Raman-Reportermoleküle und Metallkolloide mit verschiedenen Formen und Größen zur Gewebe-Bildgebung eingesetzt. Ein neueres Beispiel ist der Einsatz von Goldnanosternen, die durch hydrophile, Ethylenglykol-modifizierte Arylhiole als Raman-Reporter stabilisiert sind (siehe Abschnitt 5.4.5).^[146–147]

Abbildung 61 oben zeigt TEM-Bilder von ca. 60 nm großen Goldnanostenen (A), einem einzelnen Goldnanostern (B) und einer seiner Spitzen bei höherer Vergrößerung (C).^[147] Abbildung 61 unten links zeigt Ergebnisse von Experimenten zur Gewebebildgebung mit Goldnanostenen, die an einen Antikörper gegen den Tumorsuppressor p63, einem p53-Homologen, konjugiert sind. Ein Weißlichtbild des Prostatagewebeschnittes ist mit dem entsprechenden SERS-Falschfarbenbild, konstruiert anhand der Intensitäten der

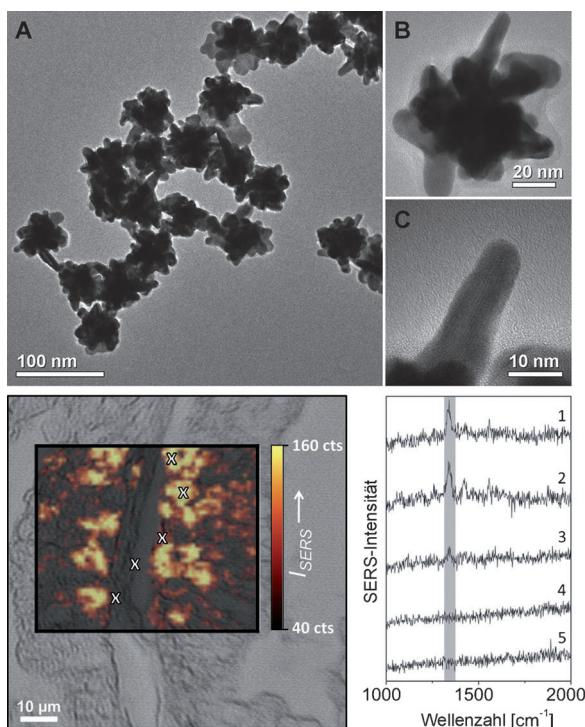


Abbildung 61. Immunhistochemie mit hydrophil stabilisierten Gold-Nanosternen als SERS-Marker, die an Antikörper gegen p63 konjugiert sind. Aus Lit. [147].

Raman-Markerbande der SERS-Partikel bei 1340 cm^{-1} (Abbildung 61 unten rechts), in einer Überlagerung dargestellt. Spektren von fünf ausgesuchten Stellen (Abbildung 61 unten rechts) zeigen, dass die spektrale Signatur der SERS-Nanopartikel nur in den Basalzellen des Epithels (1–3), nicht aber im Bindegewebe (4) oder im Lumen (5) beobachtet wird. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse das selektive Vorliegen von p63 in den Basalzellen der benignen Prostata. Auch die Machbarkeit für die entsprechende nichtlineare Variante der Immun-SERS-Mikroskopie, die oberflächenverstärkte kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung (immuno-SECARS, CARS = coherent anti-Stokes Raman scattering), wurde demonstriert.^[148]

5.4.3. Nachweis Sequenz-spezifischer DNA-Protein-Interaktionen

Die Verfolgung molekulärer Interaktionen ist ein wichtiger Aspekt der bioanalytischen Chemie. Abbildung 62 A zeigt das molekulare Grundgerüst zur selektiven Abfrage von DNA-Protein-Interaktionen. Ein doppelsträngiges Oligonukleotid C (Oligo-C) enthält eine Bindestelle für das Zielprotein und bietet dem Protein genügend Raum, um in das zu bildende Assemblat zu gelangen.^[149] An jedem Ende von Oligo-C befindet sich ein 12 Basenpaare langer Einzelstrang-Überhang mit einer Sequenz, die komplementär zu den Oligonukleotiden A bzw. B (Oligo-A bzw. Oligo-B) ist. Das Zielprotein wird über die Erkennungsregion von Oligo-C erkannt, während Oligo-A- und Oligo-B-markierte AuNP an die Einzelstrang-Überhänge an beiden Enden von Oligo-C binden und ein Assemblat bilden. Das Zielprotein ist mit

einem Raman-Farbstoff für einen empfindlichen SERRS-Nachweis nach Silber-Abscheidung markiert (siehe Abschnitt 5.4.1.1). Nichtspezifische DNA-Protein-Bindungen können in Kontrollexperimenten mit Nichterkennungsstellen identifiziert werden. Assemblate mit und ohne Erkennungssequenzen wurden auf ein Glasplättchen aufgebracht, worauf dann Silber abgeschieden wurde. Abbildung 62 B zeigt, dass die Cluster bereits im Weißlichtbild bei 50facher Vergrößerung sichtbar sind. Raman-Bildgebung wurde durchgeführt, um die SERRS-Aktivität des Assemblates zu testen. Die SERS-Falschfarbenbilder (Abbildung 62 C) basieren auf der integrierten Raman-Intensität der Bande des Raman-Farbstoffs bei 1641 cm^{-1} . Die SERRS-Spektren in Abbildung 62 D demonstrieren, dass nur für Erkennungssequenzen starke SERRS-Signale beobachtet werden (durchgezogene Linien), im Gegensatz zu den Nichterkennungssequenzen (gepunktete Linien), was auf wenige bis gar keine nichtspezifischen Proteinbindungen hinweist.

5.4.4. Rationales Design und Synthese von SERS-Markern: Chemische Überlegungen

Eine große Vielzahl unterschiedlicher SERS-Marker, d.h. mit Raman-Reportermolekülen functionalisierte Metallkolloide, für die Konjugation an Zielmolekül-spezifische Liganden wie Antikörper, Oligonukleotide etc. wurde entwickelt. Mit Raman-Farbstoffen markierte AuNP in Kombination mit anschließender Silberfärbung nach Zielmolekülerkennung sind nur ein Beispiel, welches in den vorangegangenen Abschnitten (5.4.1.1 und 5.4.2.1) vorgestellt wurde. Ein Nachteil ist, dass die notwendige plasmonische/SERS-Aktivität erst nach Silberfärbung auf den Chips erhalten wird. In vielen Anwendungen, darunter Assays (5.4.2.2) sowie zelluläre und Gewebekonjugation (5.4.2.3), ist es allerdings vorteilhafter, nachfolgende Färbeschritte zu vermeiden und SERS-Partikel zu verwenden, die „autonom“ in dem Sinne sind, als dass sie das betreffende SERS-Signal ohne weitere chemische Schritte liefern.

Vorteile der Verwendung von selbstorganisierten Monolagen aus Raman-Reportermolekülen auf der Oberfläche eines SERS-Partikels (Abbildung 63 links^[138,141] und rechts^[146]) sind die hohe SERS-Signalstärke aufgrund der maximalen Oberflächenbedeckung mit Raman-Reportermolekülen, eine hoch reproduzierbare spektrale Signatur aufgrund der uniformen Ausrichtung der Raman-Reportermoleküle innerhalb der SAM und die Eliminierung oder zu- mindest Minimierung der Coadsorption von anderen Molekülen, welche zu unerwünschten spektralen Interferenzen führen würde. Das ursprüngliche Design in Abbildung 63 links führt zu zwei Komplikationen: Die dichte Packung der Raman-Reporter in der SAM führt zur sterischen Hinderung (erschwerte Biokonjugation des entsprechenden Zielmolekül-spezifischen Liganden), und die Stabilität des Kolloids hängt stark vom jeweiligen Raman-Reporter ab (Zetapotential). Diese wichtigen Aspekte wurden in einem verbesserten Design für SERS-Marker, das in Abbildung 63 rechts gezeigt ist, adressiert.^[146] Eine hydrophile Stabilisierung der SAM-beschichteten SERS-NP wird durch kovalente Konjugation von Monoethylenglykolen (MEG) bzw. Triethylenglykolen

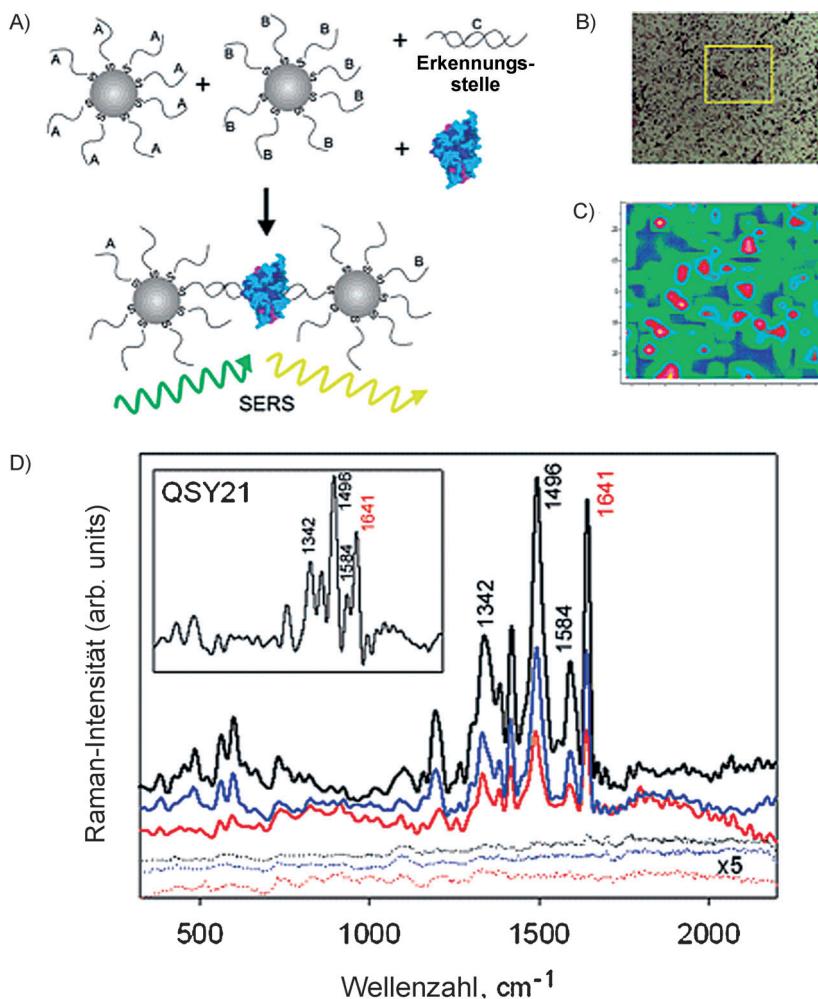


Abbildung 62. SERS-basierter Nachweis von sequenzspezifischen DNA-Protein-Wechselwirkungen nach Assemblierung von mit Oligonukleotiden A und B markierten AuNP. Oligo-A und -B binden an die Einzelstrangüberhänge in den mit Oligo-C markierten Doppelsträngen, welche die Erkennungsstelle für das Raman-Farbstoff-markierte Zielprotein enthalten. Aus Lit. [149].

(TEG) mit terminalen Carbonsäuregruppen an die Raman-Reportermoleküle erzielt. Die terminalen COOH-Gruppen der längeren TEG-Abstandhalter sind sterisch zugänglich. Darüber hinaus kann die Biokonjugation über die Stöchiometrie der kurzen (MEG) und längeren (TEG) hydrophilen Einheiten kontrolliert werden, wobei typische Verhältnisse zwischen 100:1 und 1000:1 liegen.

Zur Stabilisierung und Verkapselung von SERS-Partikeln können auch verschiedene Polymere^[150,151] verwendet werden. Abbildung 64 oben zeigt die Coadsorption von Raman-Reportern und Polyethylenglykol (PEG) mit Thiolgruppen.^[150] Farbstoffe wie Malachitgrün können als Raman-Reporter eingesetzt werden und liefern intensive SERRS-Signale. Die PEGylierung sichert die notwendige Stabilität des Kolloids und minimiert nichtspezifische Bindungen. Diese SERS-Marker wurden für die erste SERS-Anwendung *in vivo* zur Tumorlokalisierung in einem Mausmodell eingesetzt.^[150]

Die Verkapselung von SERS-Markern ist ein wichtiger Aspekt, da sie die Desorption der Raman-Reporter von der

Metalloberfläche verhindern kann. Beispielsweise wurden Polymer-verkapselte SERS-Marker durch Selbstassemblierung von Raman-Reportern (2-Thio-Naphthalin) und amphiphilen Blockcopolymeren in einer Eintopfreaktion hergestellt.^[151] Eine sehr interessante Route zur Verkapselung von SERS-Partikeln ist die Verwendung einer Glashülle, da hierbei chemisch und mechanisch sehr stabile Partikel erhalten werden. Erste Ansätze hierzu begannen mit einer Submonolagenbedeckung über die Coadsorption von Raman-Reportermolekülen (ca. 5 %) und Amino- oder Mercaptosilanen (ca. 95 %) auf der Metalloberfläche, um vitreophile Partikel für die anschließende Glasverkapselung über einen Sol-Gel-Prozess (Stöber-Synthese) zu erhalten.^[152,153] Die Glasverkapselung von SERS-Partikeln mit einer kompletten SAM, d.h. 100 % Oberflächenbedeckung mit Raman-Reportern (Abbildung 65),^[154,155] war eine signifikante Verbesserung, da ca. 20-mal signalstärkere SERS-Partikel im Vergleich zu denen mit nur Monolagenbedeckung derselben Raman-Reporter erhalten werden.^[154]

Schlussendlich ist es auch wichtig zu betonen, dass für quantitative Messungen die Homogenität, insbesondere die Monodispersität, der kolloidalen Proben

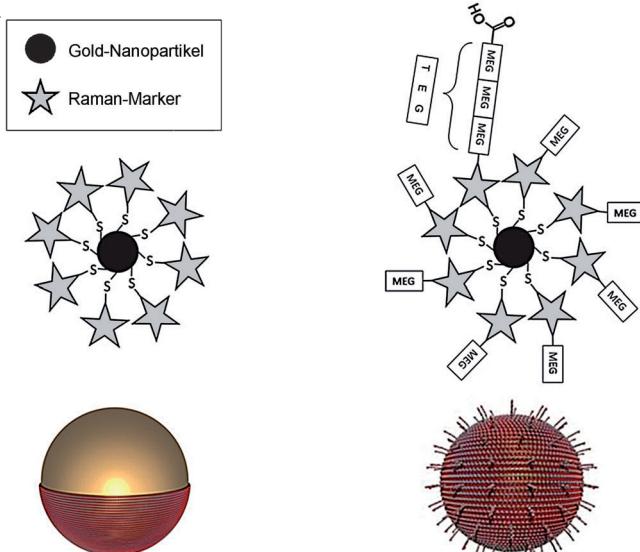


Abbildung 63. Rationales Design von SERS-Markern. Links: Selbstanorganisierte Monolage ohne hydrophile Stabilisierung und mit sterischer Hinderung für die Biokonjugation. Rechts: Hydrophil stabilisiertes AuNP für die kontrollierte Biokonjugation über Carboxylgruppen an den Enden der längeren TEG-Abstandhalter. Aus Lit. [146].

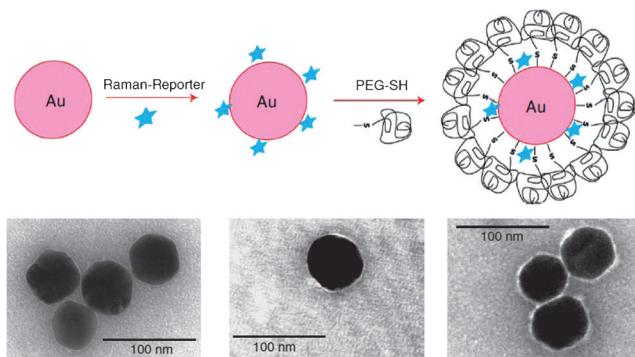


Abbildung 64. Rationales Design von SERS-Markern. Oben: Hydrophil stabilisierter SERS-Marker, der durch Coadsorption von Raman-Reportermolekülen und thiolierten PEG-Molekülen erhalten wird. Unten: TEM-Bilder der SERS-Marker. Aus Lit. [150].

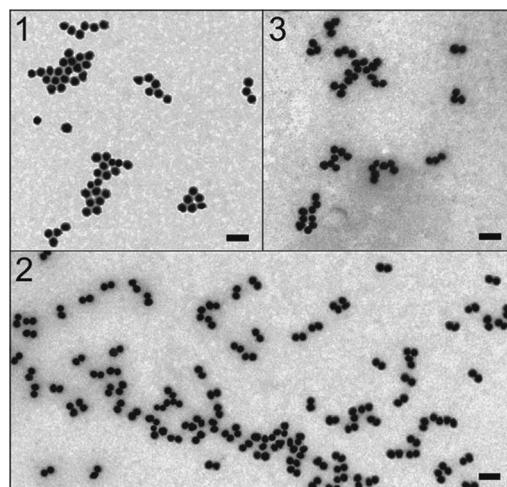


Abbildung 66. TEM-Bilder von getrennten glasverkapselten SERS-Markern: 1) Monomere, 2) Dimere, 3) Trimere. Aus Lit. [157].

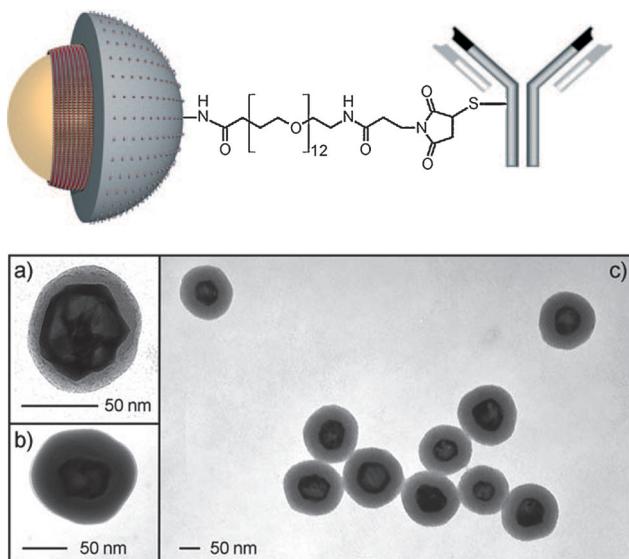


Abbildung 65. Glasverkapselte SERS-Marker in Form von hohen Au/Ag-Nanoschalen mit Arylthiol-SAM (100% Bedeckung). Die Funktionalisierung der Glasoberfläche mit Aminogruppen und heterobifunktionalen Abstandhaltern ermöglicht die Biokonjugation mit Antikörpern und anderen Liganden. Aus Lit. [154].

wichtig ist. Dichtegradientenzentrifugation beispielsweise erlaubt die Trennung von glasverkapselten Monomeren von den deutlich stärker SERS-aktiven glasverkapselten Dimeren und Trimeren.^[156,157] Abbildung 66 zeigt TEM-Bilder von glasverkapselten quasi-sphärischen 60 nm großen AuNP als Monomere (1), Dimere (2) und Trimere (3) nach Trennung. Die Cluster (Dimere, Trimere) zeigen Einzelpartikel-Signalstärke und sind daher ideale SERS-Partikel.^[157]

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

SERS hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einer ausgereiften schwingungsspektroskopischen Technik entwickelt, und die Zahl der Anwendungen in der Chemie, den Material- und insbesondere den Lebenswissenschaften steigt rasant.

Die elektromagnetische Verstärkung wurde theoretisch und experimentell als der dominante Mechanismus identifiziert. Computersimulationen basierend auf klassischer Physik können die räumliche und spektrale Abhängigkeit der Felderhöhung in plasmonischen Nanostrukturen bestimmen. Bei sehr kleinen Abständen (< 1 nm) können quantenmechanische Effekte wie Tunneln auftreten, welche direkt die Qualität der Plasmonmoden beeinflussen können. Man wird daher sehen müssen, in welchen Fällen die klassische/makroskopische Beschreibung ausreichend ist und wann die ausgefilterten quantenmechanischen/mikroskopischen Behandlungen notwendig sind. Dies erfordert sicherlich zusätzliche Experimente, welche diesen Aspekt untersuchen. Idealerweise werden diese Experimente an einzelnen Nanostrukturen durchgeführt, um die strukturellen/geometrischen Eigenschaften mit ihren optischen Eigenschaften korrelieren zu können. Verglichen mit der elektromagnetischen Verstärkung ist die „chemische“ Verstärkung schwieriger zu erfassen, sowohl theoretisch als auch experimentell. In diesem Gebiet gibt es sicherlich noch einige offene Fragen zu klären, um diesen Beitrag quantitativ zu bestimmen. Nochmals, solche Untersuchungen sollten auf dem Niveau einzelner, wohldefinierter plasmonischer Nanostrukturen unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden. Die theoretische Beschreibung des „chemischen“ Effekts ist vermutlich eine größere Herausforderung verglichen mit der elektromagnetischen Verstärkung, da sie – neben anderen Faktoren – die akkurate Vorhersage der vibronischen Eigenzustände der in einer bekannten Konfiguration adsorbierten Moleküle erfordert. Auch die Beschreibung der Metalloberfläche selber muss akkurat sein. Quantenchemiker verwenden hier häufig atomare Cluster als weitgehend lokalisierte Systeme für die Beschreibung der Metalloberfläche, während Quantenphysiker Ansätze mit ebenen Wellen, die in der Oberflächen- und Festkörperphysik häufig verwendet werden, nutzen. Eine gute Kommunikation zwischen den relativ disjunkten Gruppierungen der SERS-Experimentatoren und den Theoretikern der „quantenchemischen“ und „quantenphysikalischen“ Elektronenstrukturrechnungen ist hier notwendig, um unser

Verständnis der Grundlagen von SERS als einem multidisziplinären Phänomen an der Schnittstelle von Chemie, Molekülelektronik, Plasmonik/metallischen Nanostrukturen und der Oberflächen/Festkörperphysik zu erweitern. Obwohl die ersten vielversprechenden Experimente zur Spektroelektrochemie an Molekülen auf wohldefinierten plasmonischen Nanostrukturen vorliegen, muss noch eine Reihe von systematischen Studien an verschiedenen molekularen Systemen – von Farbstoffen bis hin zu nichtresonanten Molekülen – durchgeführt werden. Das Durchstimmen sowohl der Laseranregungswellenlänge und des Potentials scheint eine Grundvoraussetzung zur Kontrolle der externen Bedingungen zu sein. Insgesamt wären engere Kooperationen und Interaktionen zwischen Theoretikern und Experimentatoren höchst wünschenswert.

Auch die Methoden der Nanofabrikation wurden im letzten Jahrzehnt weiter verfeinert. Ebene/2D-SERS-Substrate können mit physikalischen „Top-down“-Ansätzen reproduzierbar und mit hoher Präzision hergestellt werden. Die Erzeugung von 3D-SERS-Substraten ist allerdings immer noch eine Herausforderung.^[158] Und Kolloid-basierte Ansätze scheinen vielversprechend zu sein, die nächste Dimension der Nanofabrikation für SERS und Plasmonik im Allgemeinen zu erschließen. Andere Materialien jenseits der klassischen SERS-Substrate, wie in Abschnitt 4 besprochen, werden vermutlich an Bedeutung gewinnen. Vielversprechende Beispiele sind Graphen-verstärkte Raman-Streuung (GERS)^[159] und Metallocid-NP-verstärkte Raman-Streuung (MONERS).^[160] Diese Materialien eröffnen neue faszinierende Möglichkeiten. Auch das rationale Design von hybriden Nanostrukturen mit zwei oder mehr Materialien in zwei- oder sogar mehrfunktionellen Einheiten ist sehr vielversprechend (siehe Abschnitt 5.3.1) und man kann sich viele neue Anwendungsmöglichkeiten vorstellen.

Die Kolloidchemie für die konventionelle „Bottom-up“-Synthese von metallischen NP hat sich auch rapide verbessert, insbesondere im Hinblick auf großen- und formselektive Synthesemethoden. Leider wird die Reinheit des Kolloids im Sinne einer wohldefinierten Kolloidzusammensetzung in vielen Kolloid-basierten SERS-Anwendungen ignoriert, und es ist meiner Meinung nach notwendig, hier das allgemeine Bewusstsein für diesen Aspekt zu schärfen. Im scharfen Gegensatz zu den korrelativen Struktur-Aktivitäts-Experimenten an einzelnen Nanopartikeln, die Resultate für einzelne wohldefinierte Objekte liefern, sollten konventionelle Ensemble-Experimente an kolloidalen Proben mit größerer Vorsicht interpretiert werden, da üblicherweise die Ensemble-Zusammensetzung gar nicht bis wenig charakterisiert ist. In vielen Publikationen werden Metallkolloide nur mittels UV/Vis/NIR-Extinktionsspektroskopie anstelle auch mit der Elektronenmikroskopie als zentraler zusätzlicher Technik charakterisiert. Dynamische Lichtstreuung, welche eine ausgereifte und weit verbreitete Technik für reine und wohldefinierte Kolloide ist, liefert mehr oder weniger nutzlose Resultate im Falle von Mischungen. Die unbekannte Zusammensetzung der kolloidalen Mischung mit Monomeren, Dimeren, Trimeren und größeren Aggregaten macht es nahezu unmöglich, Resultate auf dem Ensemblelevel quantitativ zu vergleichen. Ein Gedankenexperiment: Eine für den Expe-

rimentator „reine“ Kolloidsuspension liefert sehr starke SERS-Signale, die tatsächlich von 10 % hoch SERS-aktiven Dimeren in einer kolloidalen Suspension mit 20 nm großen AuNP herrühren. Im Vergleich dazu liefert ein tatsächlich viel wohldefinierteres Kolloid mit nur 0.1 % Dimeren in einer kolloidalen Suspension von 80 nm großen AuNP bei derselben Laseranregungswellenlänge weniger Signal. Diese Unterschiede könnte man irreführenderweise – wenn man sich der Problematik der Zusammensetzung des Kolloids nicht bewusst ist – darauf zurückführen, dass 20 nm große AuNP möglicherweise bessere SERS/Streuereigenschaften als 80 nm große AuNP besitzen, was selbstverständlich eine falsche Schlussfolgerung ist. Nur wenn dem Experimentator bekannt ist, dass tatsächlich 100-mal mehr Dimere im 20 nm-Au-Kolloid vorhanden sind, die typischerweise das gesamte SERS-Signal bei Anregung ihrer longitudinalen Plasmonmode dominieren, können verlässliche Schlussfolgerungen gezogen werden. Es ist dieses Bewusstsein über die Probenzusammensetzung kombiniert mit minimalem theoretischen Wissen, welches notwendigerweise alle Experimentatoren besitzen sollten. Hauptsächlich präparativ arbeitende Chemiker mögen überrascht von derartigen Kommentaren sein, da sie es gewohnt sind, ihre Substanzen eingehend zu charakterisieren. Ich empfehle stark, sich diese Standards auch für SERS in Erinnerung zu rufen und aufrechtzuerhalten. Neben der Charakterisierung von Kolloidproben bedeutet dies natürlich auch, dass „perfekte“ Synthesemethoden mit Monodispersitäten > 90 % entwickelt werden sollten oder, was realistischer ist und parallel dazu erfolgen sollte, die Implementierung von entsprechenden Trenntechniken zur Isolierung reiner Kolloidfraktionen. Vermutlich ist es nicht unrealistisch zu erwarten, dass die eine oder andere in der Literatur vorliegende Schlussfolgerung unter diesem Aspekt revidiert werden muss.

Die Einzelmolekül-SERS-Spektroskopie hat in den letzten Jahren solide Konzepte entwickelt, um das Vorliegen einzelner Moleküle mittels des Bi-Analyt/Isotopologen-Ansatzes eindeutig nachzuweisen. Ursprünglich angebrachte, als vage einzustufende Argumente basierend auf dem Blinken müssen somit nicht mehr herangezogen werden. Was verbleibt ist, diese mächtige Technik auf eine viele größere Bandbreite von Molekülen auszudehnen. Der Schlüssel in der Einzelmolekül-SERS-Spektroskopie und dem ultrasensitiven SERS-Nachweis von Molekülen im Allgemeinen ist es sicherzustellen, dass das betreffende Molekül so lange wie möglich in räumlich hochlokalierten Regionen mit extremen Felderhöhungen (Hotspots) verbleibt. Für die meisten analytischen Anwendungen ist es vermutlich ausreichend und zielführender, nicht zuviel Wert auf die nur sehr spärlich vorhandenen Stellen mit extremen Felderhöhungen zu legen, sondern besser die viel häufiger vorhandenen Stellen mit kleineren, aber immer noch ausreichend hohen Verstärkungen auszunutzen.

SERS wird derzeit vorwiegend auf Moleküle mit oberflächensuchenden Gruppen angewendet, da nur Moleküle auf oder nahe der Metalloberfläche die großen Verstärkungen bei resonanter Laseranregung erfahren. Chemiker haben kreative Ideen entwickelt, um auch „ungewöhnliche“ Analyten ohne diese Gruppen nachzuweisen. In einigen Fällen

wurden Konzepte aus der supramolekularen Chemie (Wirt-Gast) verwendet, und man kann realistischerweise erwarten, dass erst bei Ausweitung der Diversität der nachweisbaren Analyte SERS wirklich zu einer noch breiter akzeptierten analytisch-spektroskopischen Methode wird.

In der molekularen Biophysik oder biophysikalischen Chemie verspricht die Kombination von SERS mit der Raman-optischen Aktivität (ROA) zu SEROA neue Möglichkeiten zur Differenzierung von chiralen Molekülen.^[161]

Auch die Integration in SERS-basierte Fasersensoren scheint vielversprechend.^[162,163] Die Kombination von SERS mit anderen analytischen Techniken wie Trennmethoden^[164] und Mikrofluidik^[165–168] hat immer noch ein großes Potential. Ähnlich wie bei dem oben diskutierten Problem der Kolloidreinheit/Zusammensetzung ist die Interpretation von SERS-Spektren sehr komplexer Mischungen eine Herausforderung. Multivariate/chemometrische Ansätze können bei diesem Problem natürlich sehr hilfreich sein, aber in vielen Schritten wäre ein vorheriger Trennschritt natürlich extrem hilfreich, da das betreffende SERS-Spektrum einer reinen Fraktion mit Referenzspektren aus Datenbanken verglichen werden kann. Zahlreiche andere spannende analytische Anwendungen von SERS wurden hier nicht besprochen, z.B. in der Kunst und Archäologie,^[169,170] der Forensik^[171] und beim Nachweis von Pharmazeutika.^[172,173] Diese Gebiete der anwendungsorientierten Wissenschaft sind ein gutes Beispiel dafür, wie SERS als „spektroelektrochemischer“ Effekt, der in den 1970er Jahren entdeckt wurde, sich dahin entwickelt hat, dass er heutzutage zur Lösung zahlreicher Probleme der angewandten Wissenschaften beitragen kann.

Bioanalytische Anwendungen von SERS haben sogar noch stringenter Anforderungen an Metallkolloide bezüglich ihrer Stabilität unter physiologisch relevanten Bedingungen, Biokonjugation an diverse Liganden sowie Biokompatibilität. Während Analytiker es bevorzugen, unter den wohldefinierten Bedingungen eines gereinigten Systems zu arbeiten, betrachten Biologen und Mediziner dies typischerweise als biologisch oder klinisch nicht relevant. Es werden mehr SERS-Arbeiten benötigt, welche die Anwendbarkeit auf echte biologische und klinische Proben demonstrieren. Die Krebsdiagnostik ist sicherlich ein wichtiger Bereich, in dem SERS sowohl *in vitro* an Gewebeabschnitten als auch *in vivo* in Kleintieren Beiträge liefern kann. Die vielversprechende Kombination mit der räumlich versetzten Raman-Spektroskopie (SORS, spatially offset Raman spectroscopy) zu SESORS^[174] erlaubt die Aufnahme von Raman-Signalen aus mm oder sogar cm entfernten Regionen unter der Geweboberfläche. Auch die Kombination aus Diagnostik und Therapie zum sich rasant entwickelnden Feld der „Theranostik“ kann man sich mit SERS-Partikeln vorstellen. Jüngst wurde auch die superauflösende Mikroskopie mit SERS demonstriert.^[175] Für biomédizinische Anwendungen relevante Aspekte sind die Nanotoxikologie^[176] und die Bio-distribution von SERS-Partikeln, bevor man überhaupt an einen Einsatz im Menschen denken kann.

SERS sollte man als Teil einer ganzen Familie von oberflächenverstärkten/modifizierten Spektroskopiemethoden sehen, so wie die oberflächenverstärkte Infrarot-Absorptionspektroskopie (surface-enhanced infrared absorption,

SEIRA) und die oberflächen/metallverstärkte oder -modifizierte Fluoreszenz (surface/metal-enhanced fluorescence, SEF/MEF).^[177] Aus einem breiteren Blickwinkel heraus kann man SERS als ein Untergebiet der Plasmonik und Nanophotonik mit Molekülen auffassen.

Der Vergleich der Leistungsfähigkeit von SERS mit anderen Techniken ist natürlich auch notwendig. Die Stärke von SERS liegt im hohen molekularen Informationsgehalt kombiniert mit hoher Empfindlichkeit, Quantifizierbarkeit und Multiplexing-Nachweis. Gerade der Vergleich von SERS mit Fluoreszenz-basierten Ansätzen ist ganz wichtig, da Fluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie als extrem empfindliche und weit verbreitete Techniken in vielen Bereichen der Leben- und Naturwissenschaften verwendet werden. Zukünftige SERS-Arbeiten *in vitro* und *in vivo* in den nächsten Jahren müssen überzeugend demonstrieren, welche zusätzlichen Informationen erhalten werden können.

Die Einführung von Standards, um die in verschiedenen Laboren erhaltenen Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, war u.a. das Themen einer Sitzung während der letzten Internationalen Raman-Konferenz (ICORS, International Conference on Raman Spectroscopy) 2012 im indischen Bangalore. Auch oder vielmehr gerade SERS als Unterdisziplin der Raman-Spektroskopie könnte sicherlich von solchen Standardisierungsansätzen profitieren.

Schlussendlich sollten wir auch darüber nachdenken, wie wir gut zugängliche Trainingsmöglichkeiten zu den Grundlagen der Raman-Spektroskopie und SERS im Speziellen anbieten, sowohl vor Ort in Workshops und Sommerschulen als auch ortsunabhängig über die Möglichkeiten des Internets. Das ist insbesondere für diejenigen SERS-Experimentatoren wichtig, die keine fundierte Ausbildung in Chemie und Physik erhalten haben. Ein grundlegendes Verständnis der Konzepte und Prinzipien ist jedoch absolut unerlässlich für eine umfassende und kritische Interpretation von SERS-Spektren.

Ich danke Dr. Magdalena Gellner, Dr. Dennis Steinigeweg und Dr. Wei Xie für die Unterstützung bei der Erstellung von Grafiken.

Eingegangen am 18. Juli 2012,
veränderte Fassung am 3. November 2012
Online veröffentlicht am 7. April 2014

- [1] M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, 26, 163.
- [2] D. L. Jeanmaire, R. P. Van Duyne, *J. Electroanal. Chem. Interfac. Electrochem.* **1977**, 84, 1.
- [3] S. Nie, S. R. Emory, *Science* **1997**, 275, 1102.
- [4] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Phys. Rev. Lett.* **1997**, 78, 1667.
- [5] M. Moskovits, *Rev. Mod. Phys.* **1985**, 57, 783.
- [6] A. Otto, *J. Raman Spectrosc.* **1991**, 22, 743.
- [7] A. Campion, P. Kambhampati, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 241.
- [8] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *J. Phys. Condens. Matter* **2002**, 14, R597.
- [9] M. Moskovits, *J. Raman Spectrosc.* **2005**, 36, 485.
- [10] P. L. Stiles, J. A. Dieringer, N. C. Shah, R. P. Van Duyne, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, 1, 601.

- [11] R. Aroca, *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, Wiley, New York, **2006**.
- [12] *Surface-Enhanced Raman Scattering: Physics and Applications*, Bd. 103 von *Topics in Applied Physics* (Hrsg.: K. Kneipp, M. Moskovits, H. Kneipp), Springer, Berlin, **2006**.
- [13] E. Le Ru, P. Etchegoin, *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects*, Elsevier, Amsterdam, **2009**.
- [14] Z. Q. Tian, *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 466.
- [15] D. Graham, R. Goodacre, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 883.
- [16] P. G. Etchegoin, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7348.
- [17] J. Popp, T. Mayerhöfer, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 1717.
- [18] Surface Enhanced Raman Spectroscopy web themed issue, *Chem. Commun.* **2011**, Guest editors: D. Graham, Z. Tian, R. Van Duyne; <http://www.rsc.org/sers>.
- [19] Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Faraday Discussions No 132 (held at Imperial College London 19–21 September **2005**), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2006**.
- [20] P. G. Etchegoin, E. C. Le Ru in *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (Hrsg.: S. Schlücker), Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, S. 1–37.
- [21] W. E. Smith, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 955.
- [22] S. E. J. Bell, N. M. S. Sirimuthu, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1012.
- [23] S. E. J. Bell, A. Stewart in *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (<Hrsg.: S. Schlücker), Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, S. 71–86.
- [24] K. A. Willets, R. P. Van Duyne, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 267.
- [25] V. Myroshnychenko, J. Rodríguez-Fernández, I. Pastoriza-Santos, A. M. Funston, C. Novo, P. Mulvaney, L. M. Liz-Marzán, F. J. García de Abajo, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1792.
- [26] H. Xu, J. Aizpurua, M. Käll, P. Apell, *Phys. Rev. E* **2000**, *62*, 4318.
- [27] J. Zuloaga, E. Prodan, P. Nordlander, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 887.
- [28] E. C. Le Ru, P. G. Etchegoin, M. Meyer, *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 204701.
- [29] P. G. Etchegoin, E. C. Le Ru, M. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2713.
- [30] H. Liang, Z. Li, W. Wang, Y. Wu, H. Xu, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 4614.
- [31] M. J. Mulvihill, X. Y. Ling, J. Henzie, P. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 268.
- [32] T. K. Sau, A. L. Rogach, F. Jäckel, T. A. Klar, J. Feldmann, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 1805.
- [33] Y. Wang, E. Wang in *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (Hrsg.: S. Schlücker), Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, S. 39–69.
- [34] E. Bailo, V. Deckert, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 921.
- [35] T. Ichimura, S. Kawata in *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (Hrsg.: S. Schlücker), Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, S. 305–321.
- [36] B. Pettinger, P. Schambach, C. J. Villagómez, N. Scott, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, *63*, 379.
- [37] Y. Fang, N. H. Seong, D. D. Dlott, *Science* **2008**, *321*, 388.
- [38] J. H. Tian, B. Liu, X. Li, Z. L. Yang, B. Ren, S. T. Wu, N. Tao, Z. Q. Tian, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14748.
- [39] K. L. Wustholz, A. I. Henry, J. M. McMahon, R. G. Freeman, N. Valley, M. E. Piotti, M. J. Natan, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10903.
- [40] A. I. Henry, J. M. Bingham, E. Ringe, L. D. Marks, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 9291.
- [41] D. Steinigeweg, M. Schütz, S. Schlücker, *Nanoscale* **2012**, DOI: 10.1039/C2NR31982A.
- [42] Y. Min, M. Akbulut, K. Kristiansen, Y. Golan, J. Israelachvili, *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 527.
- [43] K. J. M. Bishop, C. E. Wilmer, S. Soh, B. A. Grzybowski, *Small* **2009**, *5*, 1600.
- [44] Y. Wang, G. Chen, M. Yang, G. Silber, S. Xing, L. H. Tan, F. Wang, Y. Feng, X. Liu, S. Li, H. Chen, *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 87.
- [45] Z. Nie, A. Petukhova, E. Kumacheva, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 15.
- [46] M. Gellner, D. Steinigeweg, S. Ichilmann, M. Salehi, M. Schütz, K. Kömpe, M. Haase, S. Schlücker, *Small* **2011**, *7*, 3445.
- [47] P. H. C. Camargo, M. Rycenga, L. Au, Y. X. Xia, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2180.
- [48] C. Chen, J. A. Hutchison, F. Clemente, R. Kox, H. Uji-I, J. Hofkens, L. Lagae, G. Maes, G. Borghs, P. Van Dorpe, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 10116; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9932.
- [49] A. Hartschuh, E. J. Sánchez, X. S. Xie, L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*, 095503.
- [50] B. Pettinger, *Mol. Phys.* **2010**, *108*, 2039.
- [51] J. A. Dieringer, A. D. McFarland, N. C. Shah, D. A. Stuart, A. V. Whitney, C. R. Yonzon, M. A. Young, X. Zhang, R. P. Van Duyne, *Faraday Discuss.* **2006**, *132*, 9.
- [52] S. Lal, N. K. Grady, G. P. Goodrich, N. J. Halas, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 2338.
- [53] L. Zhao, L. Jensen, G. C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2911.
- [54] L. Jensen, C. M. Aikens, G. C. Schatz, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1061.
- [55] T. Shegai, A. Vaskevich, I. Rubinstein, G. Haran, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14390.
- [56] G. A. Baker, D. S. Moore, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 1751.
- [57] M. J. Banholzer, J. E. Millstone, L. Qin, C. A. Mirkin, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 885.
- [58] S. Lal, N. K. Grady, J. Kundu, C. S. Levin, J. B. Lassiter, N. J. Halas, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 898.
- [59] R. J. C. Brown, M. J. T. Milton, *J. Raman Spectrosc.* **2008**, *39*, 1313.
- [60] K. Hering, D. Cialla, K. Ackermann, T. Doerfer, R. Moeller, H. Schneidewind, R. Mattheis, W. Fritzsche, P. Rösch, J. Popp, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 113.
- [61] X.-M. Lin, Y. Cui, Y.-H. Xu, B. Ren, Z.-Q. Tian, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 1729.
- [62] S. Guo, S. Dong, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 16704.
- [63] M. Fan, G. F. Andrade, A. G. Brolo, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *693*, 7.
- [64] D. Cialla, A. März, R. Böhme, F. Theil, K. Weber, M. Schmitt, J. Popp, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 27.
- [65] X. Gong, Y. Bao, C. Qiu, C. Jiang, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 7003.
- [66] G. V. P. Kumar, *J. Nanophotonics* **2012**, *6*, 064503.
- [67] J. F. Li, Y. F. Huang, Y. Ding, Z. L. Yang, S. B. Li, X. S. Zhou, F. R. Fan, W. Zhang, Z. Y. Zhou, D. Y. Wu, B. Ren, Z. L. Wang, Z. Q. Tian, *Nature* **2010**, *464*, 392.
- [68] J. R. Anema, J. F. Li, Z. L. Yang, B. Ren, Z. Q. Tian, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2011**, *4*, 129.
- [69] Y. Xia, Y. Xiong, B. Lim, S. E. Skrabalak, *Angew. Chem.* **2008**, *121*, 62; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *48*, 60.
- [70] X. Lu, M. Rycenga, S. E. Skrabalak, B. Wiley, Y. Xia, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, *60*, 167.
- [71] W. Li, P. H. C. Camargo, L. Au, Q. Zhang, M. Rycenga, Y. Xia, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 168; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 164.
- [72] D. Steinigeweg, S. Schlücker, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8682.
- [73] T. R. Jensen, M. D. Malinsky, C. L. Haynes, R. P. Van Duyne, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 10549.
- [74] C. L. Haynes, R. P. Van Duyne, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 5599.
- [75] S. Mahajan, J. J. Baumberg, A. E. Russell, P. N. Bartlett, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 6016.

- [76] D. Y. Wu, J. F. Li, B. Ren, Z. Q. Tian, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1025.
- [77] X. Zhang, J. Zhao, A. V. Whitney, J. W. Elam, R. P. Van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10304.
- [78] H. Wang, C. S. Levin, N. J. Halas, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14992.
- [79] S. Abalde-Cela, S. Ho, B. Rodríguez-González, M. A. Correa-Duarte, R. A. Álvarez-Puebla, L. M. Liz-Marzán, N. A. Kotov, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5430; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5326.
- [80] S. J. Lee, A. R. Morrill, M. Moskovits, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2200.
- [81] H. Kim, K. M. Kosuda, R. P. Van Duyne, P. C. Stair, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4820.
- [82] Z.-Q. Tian, B. Ren, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2004**, *55*, 197.
- [83] B. Ren, Y. Cui, D.-Y. Wu, Z.-Q. Tian in *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (Hrsg.: S. Schlücker), Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, S. 191–218.
- [84] X. Li, A. A. Gewirth, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5252.
- [85] A. Wang, Y. F. Huang, U. K. Sur, D. Y. Wu, B. Ren, S. Rondinini, C. Amatore, Z. Q. Tian, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9534.
- [86] W. Xie, C. Herrmann, K. Kömppe, M. Haase, S. Schlücker, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19302.
- [87] A. Kranich, H. K. Ly, P. Hildebrandt, D. H. Murgida, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9844.
- [88] D. H. Murgida, P. Hildebrandt, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 937.
- [89] H. K. Ly, M. Sezer, N. Wisitruangsakul, J. J. Feng, A. Kranich, D. Millo, I. M. Weidinger, I. Zebger, D. H. Murgida, P. Hildebrandt, *FEBS J.* **2011**, *278*, 1382.
- [90] P. Hildebrandt, J.-J. Feng, A. Kranich, K. H. Ly, D. F. Martín, M. Martí, D. H. Murgida, D. A. Paggi, N. Wisitruangsakul, M. Sezer, I. M. Weidinger, I. Zebger in *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (Hrsg.: S. Schlücker), Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, S. 219–240.
- [91] X. M. Qian, S. M. Nie, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 912.
- [92] N. P. W. Pieczonka, R. F. Aroca, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 946.
- [93] K. L. Wustholz, C. L. Brosseau, F. Casadio, R. P. Van Duyne, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7350.
- [94] N. P. W. Pieczonka, G. Moula, A. R. Skarbek, R. F. Aroca in *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (Hrsg.: S. Schlücker), Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, S. 87–101.
- [95] E. C. Le Ru, M. Meyer, P. G. Etchegoin, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 1944.
- [96] J. A. Dieringer, R. B. Lettan II, K. A. Scheidt, R. P. Van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 16249.
- [97] E. J. Blackie, E. C. Le Ru, P. G. Etchegoin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14466.
- [98] J. P. Camden, J. A. Dieringer, Y. Wang, D. J. Masiello, L. D. Marks, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12616.
- [99] L. Rodríguez-Lorenzo, R. A. Álvarez-Puebla, I. Pastoriza-Santos, S. Mazzucco, O. Stéphan, M. Kociak, L. M. Liz-Marzán, F. J. García de Abajo, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4616.
- [100] D. K. Lim, K. S. Jeon, J. H. Hwang, H. M. Kim, S. Kwon, Y. D. Suh, J. M. Nam, *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 60.
- [101] D. K. Lim, L. S. Jeon, J. H. Hwang, H. Kim, S. Kwon, Y. D. Suh, J. M. Nam, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 452.
- [102] J. N. Anker, W. P. Hall, O. Lyandres, N. C. Shah, J. Zhao, R. P. Van Duyne, *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 442.
- [103] K. C. Bantz, A. F. Meyer, N. J. Wittenberg, H. Im, Ö. Kurtuluş, S. H. Lee, N. C. Lindquist, S.-H. Oh, C. L. Haynes, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 11551.
- [104] Y. B. Zheng, B. Kiraly, P. S. Weiss, T. J. Huang, *Nanomedicine* **2012**, *7*, 751.
- [105] X. Qian, J. Li, S. Nie, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7540.
- [106] S. W. Bishnoi, C. J. Rozell, C. S. Levin, M. K. Gheith, B. R. Johnson, D. H. Johnson, N. J. Halas, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1687.
- [107] J. Kneipp, H. Kneipp, B. Wittig, K. Kneipp, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2819.
- [108] J. Kneipp, H. Kneipp, B. Wittig, K. Kneipp, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2010**, *6*, 214.
- [109] J. Kneipp in *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (Hrsg.: S. Schlücker), Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, S. 285–304.
- [110] R. A. Álvarez-Puebla, L. M. Liz-Marzán, *Energy Environ. Sci.* **2010**, *3*, 1011.
- [111] L. Guerrini, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 953.
- [112] L. Guerrini, Z. Jurasekova, C. Domingo, M. Pérez-Méndez, P. Leyton, M. Campos-Vallette, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, *Plasmonics* **2007**, *2*, 147.
- [113] L. Guerrini, P. Leyton, M. Campos-Vallette, C. Domingo, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes in *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (Hrsg.: S. Schlücker), Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, S. 103–128.
- [114] K. E. Shafer-Peltier, C. L. Haynes, M. R. Glucksberg, R. P. Van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 588.
- [115] R. A. Alvarez-Puebla, L. M. Liz-Marzán, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 43.
- [116] M. Hu, F. S. Ou, W. Wu, I. Naumov, X. Li, A. M. Bratkovsky, R. S. Williams, Z. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12820.
- [117] M. Roca, A. J. Haes, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14273.
- [118] R. A. Álvarez-Puebla, R. Contreras-Cáceres, I. Pastoriza-Santos, J. Pérez-Juste, L. M. Liz-Marzán, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 144; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 138.
- [119] C. Schmuck, P. Wich, B. Küstner, W. Kiefer, S. Schlücker, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4870; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4786.
- [120] M. Gellner, S. Niebling, H. Y. Kuchelmeister, C. Schmuck, S. Schlücker, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12762.
- [121] I. Chourpa, F. H. Lei, P. Dubois, M. Manfait, G. D. Sockalingum, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 993.
- [122] K. W. Kho, C. Y. Fu, U. S. Dinish, M. Olivo, *J. Biophotonics* **2011**, *4*, 667.
- [123] W. Xie, P. Qiu, C. Mao, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 5190.
- [124] J. A. Dougan, K. Faulds, *Analyst* **2012**, *137*, 545.
- [125] J. Kneipp, H. Kneipp, K. Kneipp, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1052.
- [126] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, *382*, 607.
- [127] J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1959.
- [128] Y. Wei, C. Cao, R. Jin, C. A. Mirkin, *Science* **2002**, *297*, 1536.
- [129] D. Graham, K. Faulds, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1042.
- [130] R. Stevenson, K. Faulds, D. Graham in *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (Hrsg.: S. Schlücker), Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, S. 241–262.
- [131] K. Faulds, W. E. Smith, D. Graham, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 412.
- [132] K. Faulds, F. McKenzie, W. E. Smith, D. Graham, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1861; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1829.
- [133] D. Graham, D. G. Thompson, W. E. Smith, K. Faulds, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 548.
- [134] S. E. J. Bell, N. M. S. Sirimuthu, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15580.
- [135] E. Papadopoulou, S. E. J. Bell, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9224; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9058.
- [136] A. Barhoumi, N. J. Halas, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12792.
- [137] S. Mahajan, J. Richardson, T. Brown, P. N. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15589.
- [138] M. D. Porter, R. J. Lipert, L. M. Siperko, G. Wang, R. Narayanan, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1001.
- [139] X. X. Han, B. Zhao, Y. Ozaki, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 1719.
- [140] Y. C. Cao, R. Jin, J. M. Nam, C. S. Thaxton, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14676.

- [141] D. S. Grubisha, R. J. Lipert, H. Y. Park, J. Driskell, M. D. Porter, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5936.
- [142] J. D. Driskell, J. M. Uhlenkamp, R. J. Lipert, M. D. Porter, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4141.
- [143] S. Schlücker, B. Küstner, A. Punge, R. Bonfig, A. Marx, P. Ströbel, *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37*, 719.
- [144] S. Schlücker, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 1344.
- [145] S. Schlücker in *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (Hrsg.: S. Schlücker), Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, S. 263–283.
- [146] C. Jehn, B. Küstner, P. Adam, A. Marx, P. Ströbel, C. Schmuck, S. Schlücker, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7499.
- [147] M. Schütz, D. Steinigeweg, M. Salehi, K. Kömpe, S. Schlücker, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4216.
- [148] S. Schlücker, M. Salehi, G. Bergner, M. Schütz, P. Ströbel, A. Marx, I. Petersen, B. Dietzek, J. Popp, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 7081.
- [149] A. J. Bonham, G. Braun, I. Pavel, M. Moskovits, N. O. Reich, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14572.
- [150] X. Qian, X. H. Peng, D. O. Ansari, Q. Yin-Goen, G. Z. Chen, D. M. Shin, L. Yang, A. N. Young, M. D. Wang, S. Nie, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 83.
- [151] M. Yang, T. Chen, W. S. Lau, Y. Wang, Q. Tang, Y. Yang, H. Y. Chen, *Small* **2009**, *5*, 198.
- [152] W. E. Doering, S. Nie, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6171.
- [153] S. P. Mulvaney, M. D. Musick, C. D. Keating, M. J. Natan, *Langmuir* **2003**, *19*, 4784.
- [154] B. Küstner, M. Gellner, M. Schütz, F. Schöppler, A. Marx, P. Ströbel, P. Adam, C. Schmuck, S. Schlücker, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1984; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1950.
- [155] M. Schütz, B. Küstner, M. Bauer, C. Schmuck, S. Schlücker, *Small* **2010**, *6*, 733.
- [156] G. Chen, Y. Wang, L. H. Tan, M. X. Yang, L. S. Tan, Y. Chen, H. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4218.
- [157] D. Steinigeweg, M. Schütz, M. Salehi, S. Schlücker, *Small* **2011**, *7*, 2443.
- [158] K. A. Stoerzinger, J. Y. Lin, T. W. Odom, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1435.
- [159] X. Ling, L. Xie, Y. Fang, H. Xu, H. Zhang, J. Kong, M. S. Dresselhaus, J. Zhang, Z. Liu, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 553.
- [160] L. Li, T. Hutter, A. S. Finnemore, F. M. Huang, J. J. Baumberg, S. R. Elliott, U. Steiner, S. Mahajan, *Nano Lett.* **2012**, *12*, 4242.
- [161] S. Abdali, E. W. Blanch, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 980.
- [162] P. R. Stoddart, D. J. White, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 1761.
- [163] C. Shi, Y. Zhang, C. Gu, B. Chen, L. Seballos, T. Olson, J. Z. Zhang, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, *9*, 2234.
- [164] A. J. Hobro, B. Lendl, *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (Hrsg.: S. Schlücker), Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, S. 155–171.
- [165] L. Chen, J. Choo, *Electrophoresis* **2008**, *29*, 1815.
- [166] Y. S. Huh, A. J. Chung, D. Erickson, *Microfluid. Nanofluid.* **2009**, *6*, 285.
- [167] Y. Yin, T. Qiu, W. Zhang, P. C. Chu, *J. Mater. Res.* **2011**, *26*, 170.
- [168] T. Henkel, A. März, J. Popp, *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (Hrsg.: S. Schlücker), Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, S. 173–190.
- [169] K. Chen, M. Leona, T. Vo-Dinh, *Sens. Rev.* **2007**, *27*, 109.
- [170] F. Casadio, M. Leona, J. R. Lombardi, R. P. Van Duyne, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 782.
- [171] A. G. Ryder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 489.
- [172] S. C. Pinzarlu, I. Pavel, N. Leopold, W. Kiefer, *J. Raman Spectrosc.* **2004**, *35*, 338.
- [173] S. C. Pinzarlu, I. Pavelin, *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (Hrsg.: S. Schlücker), Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, S. 129–154.
- [174] N. Stone, M. Kerssens, G. R. Lloyd, K. Faulds, D. Graham, P. Matousek, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 776.
- [175] S. M. Stranahan, K. A. Willets, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3777.
- [176] B. J. Marquis, S. A. Love, K. L. Braun, C. L. Haynes, *Analyst* **2009**, *134*, 425.
- [177] I. A. Larmour, D. Graham, *Analyst* **2011**, *136*, 3831.