

**Fakultät für Physik und Astronomie**  
**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**

Masterarbeit  
im Studiengang Physik  
vorgelegt von  
Robert Julius Wolke  
geboren in Münster (Westfalen)  
2013



**Mikrofluidische Zelle zur *in situ*  
nanoantennenverstärkten Infrarotspektroskopie  
wässriger Lösungen in Transmissionsgeometrie**

Die Masterarbeit wurde von  
Robert Julius Wolke  
ausgeführt am  
Kirchhoff-Institut für Physik  
unter der Betreuung von  
Frau Prof. Dr. Annemarie Pucci



## **Mikrofluidische Zelle zur *in situ* nanoantennenverstärkten Infrarotspektroskopie wässriger Lösungen in Transmissionsgeometrie**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Möglichkeiten zur *in situ* Detektion von Proteinen in wässriger Lösung mit Hilfe von oberflächenverstärkter Infrarotspektroskopie (SEIRS) untersucht. Dabei wurde die Feldverstärkung resonant angeregter Gold-Nanodrähte mit Längen im Mikrometerbereich ausgenutzt, um die Vibrationsbanden der Amidbindungen der Proteine zu verstärken. Der optische Weg des IR Strahls durch Wasser wurde aufgrund der starken Wasserbanden minimiert. Dazu wurde zunächst in Reflexionsgeometrie gemessen, mit Nanoantennen in einem Flüssigkeitskanal auf der Substratunterseite. Aufgrund sehr geringer Intensitäten des detektierten Streulichts konnten keine Proteine detektiert werden. Durch Veränderung der Antennengeometrie lassen sich die Intensitäten aber stark erhöhen. Für Messungen in Transmissionsgeometrie wurde eine mikrofluidische Zelle (MFZ) entwickelt, bei der die Wasserschicht zwischen zwei infrarottransparenten  $\text{CaF}_2$ -Wafers durch einen photolithographisch hergestellten Flüssigkeitskanal auf  $6,3\ \mu\text{m}$  begrenzt ist. Bei *in situ* Messungen von Rinderalbumin (BSA) konnten die Moleküle ab einer Proteinkonzentration von 50 Nanomol pro Liter anhand der verstärkten Amidbanden, sowie der Verschiebung der Resonanzfrequenz nachgewiesen werden. Bei Messungen am getrockneten Substrat konnte eine Detektionsgrenze von 20 Nanomol pro Liter bestimmt werden.

## **A microfluidic device for *in situ* nanoantenna enhanced infrared spectroscopy of aqueous solutions in transmittance geometry**

In this work, the possibilities for using surface enhanced infrared spectroscopy (SEIRS) for *in situ* detection of proteins in aqueous solutions were examined. The field enhancement of resonant gold nanowires with lengths in the infrared range was used to enhance the vibrational bands of the amide bonds in proteins. The optical path of the IR beam in water was minimized to avoid the strong water absorption bands. To achieve this, measurements were performed in reflection geometry, with nanoantennas inside a fluidic channel on the bottom side of the substrate. Due to the very low intensities of the detected scattered light, protein detection was not possible. The intensities can be greatly improved through changes in the antenna geometry. A microfluidic device (MFD) was created for measurements in transmittance geometry. The water layer between two infrared transparent  $\text{CaF}_2$  wafers is limited to  $6.3\ \mu\text{m}$  by a photolithographically fabricated microfluidic channel. *In situ* measurements of bovine serum albumin (BSA) showed that the proteins can be detected down to a concentration of 50 nanomoles per liter by means of the enhanced amide vibrational bands, as well as the antenna resonance shift. In measurements of dried samples, a limit of detection of 20 nanomoles per liter could be achieved.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Optische Eigenschaften von Gold-Nanoantennen</b>	<b>3</b>
2.1	Dielektrische Funktion Metallischer Festkörper . . . . .	3
2.2	Plasmonen . . . . .	5
2.2.1	Volumen- und Oberflächen-Plasmon-Polaritonen . . . . .	5
2.2.2	Lokalisierte Oberflächen-Plasmon-Resonanzen . . . . .	6
2.2.3	Ideale Antennen . . . . .	7
2.2.4	Reale Antennen . . . . .	8
2.2.5	Einfluss des Umgebungsmediums . . . . .	12
2.2.6	Nahfeldverstärkung an plasmonischen Nanostrukturen . . . . .	14
2.2.7	Nanoantennen- <i>arrays</i> . . . . .	15
2.3	Oberflächenverstärkte Infrarotspektroskopie . . . . .	16
2.3.1	Vibrationsspektroskopie . . . . .	16
2.3.2	SEIRS-Effekt . . . . .	18
2.3.3	Linienform der Adsorbatschwingung . . . . .	19
<b>3</b>	<b>Experimentelle Grundlagen</b>	<b>21</b>
3.1	Infrarotspektroskopische Messungen . . . . .	21
3.1.1	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie . . . . .	21
3.1.2	Relativmessungen . . . . .	23
3.1.3	Grundlinienkorrektur . . . . .	23
3.1.4	Infrarotspektroskopische Mikroskopie . . . . .	24
3.2	Proteine . . . . .	25
3.2.1	Struktur und Vibrationsspektrum von Proteinen . . . . .	25
3.2.2	Rinderalbumin (BSA) . . . . .	28
3.3	Infrarot-optische Eigenschaften von Wasser . . . . .	29
<b>4</b>	<b>SEIRS-Messungen wässriger Lösungen in Reflexionsgeometrie</b>	<b>33</b>
4.1	Flüssigkeitszelle zur Messung in Reflexionsgeometrie . . . . .	33
4.1.1	Befüllen der Flüssigkeitszelle . . . . .	34
4.2	Reflexion von Nanoantennen an Luft und in Wasser . . . . .	35
4.3	<i>In situ</i> Messungen von wässriger BSA-Lösung in Reflexionsgeometrie	38
4.3.1	Vorbereitung und Durchführung der Messung . . . . .	39

4.3.2	Ergebnisse . . . . .	39
4.4	Erhöhung der gestreuten Intensität von Nanoantennen- <i>arrays</i> . . . . .	41
<b>5</b>	<b>SEIRS-Messungen von Flüssigkeiten in Transmissionsgeometrie</b>	<b>43</b>
5.1	Mikrofluidische Zelle für SEIRS-Messungen . . . . .	43
5.1.1	Aufbau der Mikrofluidischen Transmissionszelle . . . . .	44
5.1.2	Konstruktion des Mikrofluidischen Kanals aus X AR-P 3100/10 . . . . .	46
5.1.3	Konstruktion des Mikrofluidischen Kanals aus Polydimethylsiloxan (PDMS) . . . . .	51
5.2	Charakterisierung der mikrofluidischen Zelle . . . . .	53
5.2.1	Verwendung der MFZ . . . . .	54
5.2.2	Bestimmung der Schichtdicke . . . . .	54
5.2.3	Bestimmung des Messbereichs . . . . .	57
5.2.4	Transmission von Antennen in Wasser . . . . .	59
5.2.5	Signal zu Rausch Verhältnis . . . . .	62
5.3	<i>Ex situ</i> Detektionsgrenze von BSA auf Nanoantennen . . . . .	66
5.3.1	Vorbereitung und Durchführung der Messung . . . . .	66
5.3.2	Ergebnisse . . . . .	66
5.4	<i>In situ</i> Messungen von wässriger BSA-Lösung in Transmissionsgeometrie . . . . .	68
5.4.1	Vorbereitung und Durchführung der Messung . . . . .	68
5.4.2	Verschiebung der Resonanzfrequenz . . . . .	69
5.4.3	SEIRS-Messungen der Amid-Banden . . . . .	70
5.5	Transmissions-Messungen von BSA in D <sub>2</sub> O auf Nanoantennen . . . . .	74
5.5.1	Vorbereitung und Durchführung der Messung . . . . .	74
5.5.2	SEIRS-Messungen der Amid-Banden . . . . .	74
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>
	<b>Anhang</b>	<b>89</b>
A.1	Probenübersicht . . . . .	89
A.1.1	Nanoantennen Serie S08 . . . . .	89
A.2	Mikrofluidische Zelle zur Messung von SEIRS in Transmissionsgeometrie . . . . .	92
A.2.1	Details der einzelnen Bauteile . . . . .	92
A.2.2	Bedienungsanleitung . . . . .	93
A.3	Posterbeiträge . . . . .	95
A.3.1	DPG Frühjahrstagung 2013 . . . . .	95
A.3.2	538. WE-Heraeus Seminar “Light at the Nanotip” . . . . .	96

# 1 Einleitung

Die Infrarotspektroskopie (IR-Spektroskopie) erlaubt die Untersuchung von Stoffen durch die direkte Anregung der Vibrationszustände der Moleküle mit Hilfe von infrarotem Licht. Aus der spektralen Lage und der Stärke der Absorptionsbanden lässt sich auf die chemische Zusammensetzung von Stoffen schließen. Die Technik ist sowohl *marker-* als auch zerstörungsfrei, und bietet einen hohen Grad an Spezifität. Aus diesem Grund ist IR-Spektroskopie in den Biowissenschaften, der Pharmazie, der Chemie und der Physik weit verbreitet, und wird zur Identifikation und Quantifizierung bekannter und zur strukturellen Analyse unbekannter Stoffe verwendet.

Begrenzt ist die Methode dabei hauptsächlich durch die niedrige Sensitivität infolge der geringen Wirkungsquerschnitte von  $\sim 10^{-20} \text{ cm}^2$ , so dass kleinere Stoffmengen nicht detektierbar sind. Diese Limitierung lässt sich mit Hilfe der oberflächenverstärkten IR-Spektroskopie (SEIRS, von engl.: *surface enhanced infrared spectroscopy*) umgehen. Erstmals beobachtet wurde eine solche Verstärkung der Infrarotabsorption 1980 von HARTSTEIN *et al.* bei Molekülen auf Metallinseln [1]. SEIRS beruht auf der Anregung kollektiver Oszillationen der freien Ladungsträger im Metall, sogenannter Oberflächenplasmonen, und der daraus folgenden Konzentration des elektrischen Felds an der Metalloberfläche. Eine besondere Form stellen die bei isolierten metallischen Nanopartikeln auftretenden lokalisierten Oberflächen-Plasmon-Resonanzen (LSPR, von engl.: *localized surface plasmon resonance*) dar. Durch resonante Anregung dieser Nanoantennen entstehen in deren Umgebung besonders stark erhöhte elektromagnetische Felder, bezogen auf die einfallende Strahlung [2]. Der Grad der Verstärkung und die Resonanzfrequenz können über Größe, Form und Anordnung beeinflusst werden. Nanoantennen ermöglichen die Verstärkung der Vibrationssignale von Molekülen in ihrer Nähe um einen Faktor von einigen hunderttausend [3, 4].

Ziel dieser Arbeit ist die *in situ* (lat.: „an Ort und Stelle“) Detektion von Proteinen in wässriger Lösung mit Hilfe von Nanoantennen. Der Nachweis von Proteinen ist ein wichtiger Bestandteil der medizinischen Diagnostik. So kann eine erhöhte Konzentration bestimmter Proteine im Blut, Speichel oder Urin eines Patienten ein Indiz für Tumore sein, da diese vermehrt von Krebszellen ausgestoßen werden. Durch die frühzeitige Entdeckung solcher Krankheitsbilder mit Hilfe hochsensitiver Methoden wie SEIRS können die Heilungschancen erhöht werden.

## 1 Einleitung

Die Messung an gelösten Proteinen hat mehrere Vorteile. Zunächst besteht bei jeder Abweichung von den natürlichen Bedingungen die Möglichkeit, das zu untersuchende Molekül zu verändern, insbesondere ist bei einer Trocknung des Proteins mit Denaturierung zu rechnen. Wässrige Lösungen erlauben weiterhin die Kontrolle von Temperatur, pH-Wert oder der Ionenkonzentration, um Veränderungen auszuschließen, oder gezielt zu untersuchen.

Ein weiterer wichtiger Vorteil ist die Möglichkeit, *in situ* zu messen. Dadurch ist es möglich, spektrale Veränderungen direkt den veränderten Bedingungen zuzuschreiben. Insbesondere können durch die Messung bedingte Schwankungen, wie etwa die exakte Messposition, ausgeschlossen werden.

*In situ* Messungen in wässriger Lösung sind ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu integrierten Proteinsensoren auf Grundlage von SEIRS.

Wasser weist jedoch selbst mehrere starke Absorptionsbanden im IR auf. Um Messungen in wässriger Umgebung zu ermöglichen, muss die optische Weglänge des IR Strahls durch das Wasser minimiert werden. Eine Möglichkeit stellen Messungen in Reflexionsgeometrie dar, bei denen das von den Nanoantennen durch das Substrat zurückgestreute Licht detektiert wird. Transmissionsmessungen sind technisch weitaus schwieriger umzusetzen, da sie eine Reduzierung der Schichtdicke des Wassers auf wenige Mikrometer voraussetzen.

Die vorliegende Arbeit ist in sechs Kapitel unterteilt. Die zum Verständnis der Experimente notwendigen physikalischen Grundlagen zu den optischen Eigenschaften von Gold-Nanoantennen werden in Kapitel 2 erläutert. In Kapitel 3 wird auf die experimentellen Methoden, sowie die spektroskopischen Eigenschaften der untersuchten Moleküle eingegangen. Die in Reflexionsgeometrie durchgeführten Messungen und Ergebnisse werden in Kapitel 4 vorgestellt. Die Messungen in Transmissionsgeometrie sind in Kapitel 5 dargestellt. Dabei wird ausführlich auf die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte mikrofluidische Zelle eingegangen. Eine Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse beider Kapitel findet sich in Kapitel 6, zusammen mit einem Ausblick auf zukünftige Messungen.

## 2 Optische Eigenschaften von Gold-Nanoantennen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die infrarot-optischen Eigenschaften von Gold-Nanodrähten ausgenutzt, um kleinste Molekülmengen mit Hilfe der Infrarotspektroskopie zu detektieren. Dieses Kapitel erläutert die physikalischen Grundlagen zum Verständnis der lokalisierten Oberflächen-Plasmonen-Resonanzen von Nanoantennen und der daraus folgenden verstärkten Infrarotspektroskopie.

Der erste Abschnitt befasst sich allgemein mit der dielektrischen Funktion metallischer Festkörper im Drude-Modell (2.1). Davon ausgehend findet sich in Abschnitt 2.2 eine kurze Einführung in Plasmonen und die lokalisierten Oberflächen-Plasmonen-Resonanzen metallischer Nanopartikel. Ein besonderer Schwerpunkt liegt hier auf den infrarot-optischen Eigenschaften der im Verlauf dieser Arbeit verwendeten Nanoantennen und Nanoantennen-*arrays*. Die Grundlagen der oberflächenverstärkten Spektroskopie finden sich in Abschnitt 2.3.

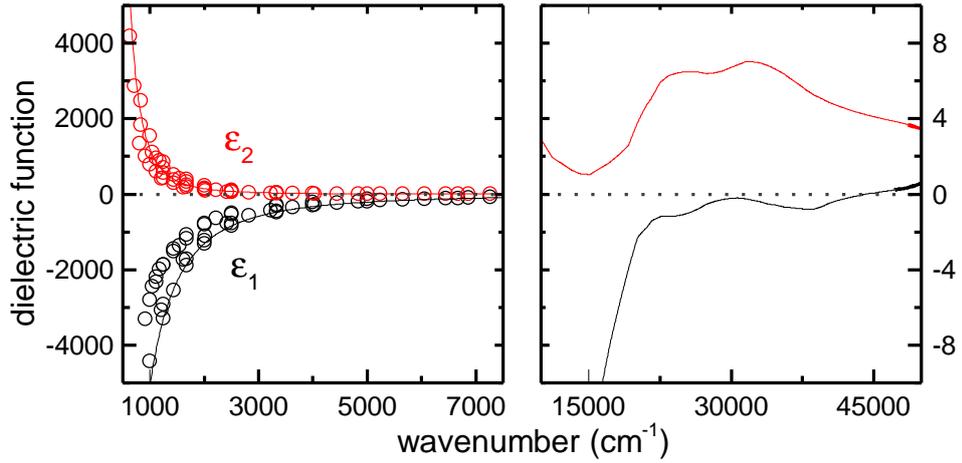
### 2.1 Dielektrische Funktion Metallischer Festkörper

Die optischen Eigenschaften von Festkörpern sind durch ihre (im Allgemeinen komplexe) dielektrische Funktion  $\varepsilon(\omega)$  gegeben. Sie enthält unter anderem Beiträge von permanenten Dipolen und freien Elektronen, sowie von Interband- oder exzitonischen Übergängen. Beschränkt man sich auf Metalle sowie den Infraroten Spektralbereich, so tragen lediglich freie Elektronen zur dielektrischen Funktion bei.

In diesem Fall bietet das Drude-Sommerfeld-Modell des freien Elektronengases eine einfache analytische Beschreibung des optischen Verhaltens von Metallen. P. DRUDE ging 1900 davon aus, dass Metalle aus einem unbeweglichen Hintergrund positiv geladener Atomrümpfe bestehen, die von einem freien Elektronengas umgeben sind. Die freien Elektronen interagieren mit Phononen und Gitterdefekten, die mittlere Zeit zwischen zwei Stößen beträgt  $\tau$  [5]. Im Folgenden soll mit Hilfe dieses Modells die dielektrische Funktion  $\varepsilon(\omega)$  von metallischen Festkörpern im infraroten hergeleitet werden. Für ein nichtmagnetisches ( $\mu = 1$ ), ungeladenes Material lässt sich aus den Maxwell-Gleichungen die Telegraphengleichung

$$c^2 \nabla^2 \vec{E} = \frac{\sigma}{\varepsilon_0} \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} + \varepsilon_\infty \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} \quad (2.1)$$

## 2 Optische Eigenschaften von Gold-Nanoantennen



**Abbildung 2.1:** Real- (schwarz) und Imaginärteil (rot) der dielektrischen Funktion von Gold. Links: Im infraroten Spektralbereich im Drude-Sommerfeld-Modell mit  $\omega_p = 72800 \text{ cm}^{-1}$  und  $\omega_\tau = 216 \text{ cm}^{-1}$ . Die Datenpunkte stammen von ORDAL *et al.* [6, 7]. Rechts: Im sichtbaren Spektralbereich nach den Messungen von JOHNSON und CHRISTY [8, 9].

herleiten. Dabei stellt  $\sigma = \sigma(\omega)$  die komplexe Leitfähigkeit,  $\epsilon_0$  die Dielektrizitätskonstante und  $\epsilon_\infty$  den dielektrischen Hintergrund des Metalls dar. Die Lösung dieser Differentialgleichung lässt sich als ebene Welle mit allgemeiner Dispersionsrelation

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \exp(i(\vec{k}\vec{x} - \omega t)) , \quad |\vec{k}(\omega)|^2 = \epsilon(\omega) \frac{\omega^2}{c^2} \quad (2.2)$$

schreiben. Einsetzen in (2.1) ergibt die dielektrische Funktion von nicht-magnetischen, ungeladenen Materialien:

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_1(\omega) + i\epsilon_2(\omega) = \epsilon_\infty + i \frac{\sigma(\omega)}{\epsilon_0 \omega} . \quad (2.3)$$

Unter den Annahmen des Drude-Sommerfeld-Modells folgt die Leitfähigkeit  $\sigma$  eines Metalles aus der Elektronendichte  $n$ , der Elementarladung  $e$ , der effektiven Masse des Elektrons  $m^*$  und der Relaxationsrate  $\omega_\tau \equiv \tau^{-1}$  zu

$$\sigma(\omega) = \frac{ne^2}{m^* \omega_\tau} \frac{1}{1 - i\omega/\omega_\tau} . \quad (2.4)$$

Durch Einsetzen in (2.3) erhält man letztendlich

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega\omega_\tau}, \quad \omega_p \equiv \sqrt{\frac{ne^2}{\varepsilon_0 m^*}}, \quad (2.5)$$

wobei vereinfachend die materialabhängige Plasmafrequenz  $\omega_p$  eingeführt wurde.

Abb. 2.1 zeigt die dielektrische Funktion von Gold im Infraroten im Drude-Sommerfeld-Modell mit der Plasmafrequenz  $\omega_p = 72800 \text{ cm}^{-1}$  und der Relaxationsrate  $\omega_\tau = 216 \text{ cm}^{-1}$ . Man erkennt eine gute Übereinstimmung mit den Messwerten von ORDAL *et al.* [7]. Im sichtbaren Spektralbereich ist das Drude-Sommerfeld-Modell aufgrund der auftretenden Interbandübergänge nicht mehr zulänglich.

## 2.2 Plasmonen

In Anwesenheit elektrischer Felder verschieben sich die Elektronen eines metallischen Festkörpers gegenüber dem positiv geladenen Rumpf. Aufgrund der Coulomb-Wechselwirkung entstehen Rückstellkräfte, so dass sich kollektive Ladungsträgerschwingungen ausbilden können. In Analogie zum Phonon werden diese als Plasmonen bezeichnet.

In Abschnitt 2.2.1 wird eine kurze, vereinfachte Einführung in Volumen- und Oberflächen-Plasmon-Polaritonen gegeben<sup>1</sup>. Lokalisierte Oberflächen-Plasmon-Resonanzen werden in Abschnitt 2.2.2 behandelt. Die folgenden Abschnitte befassen sich mit den Eigenschaften von Nanoantennen, zunächst im Modell der idealen Antenne (2.2.3), anschließend unter Berücksichtigung von Größeneffekten (2.2.4), und dem Einfluss des Umgebungsmediums auf die Antennenresonanz (2.2.5). Abschnitt 2.2.6 erläutert die Feldverstärkungseffekte an plasmonischen Nanostrukturen. Auf die speziellen Eigenschaften periodischer Nanoantennen-*arrays* werden in Abschnitt 2.2.7 eingegangen.

### 2.2.1 Volumen- und Oberflächen-Plasmon-Polaritonen

Ausgehend der dielektrischen Funktion metallischer Festkörper im Drude-Modell (2.5), erhält man unter der Annahme  $\omega_\tau = 0$

$$\varepsilon_1(\omega) = \varepsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2}, \quad \varepsilon_2(\omega) = 0. \quad (2.6)$$

---

<sup>1</sup>Für eine genauere Behandlung wird an dieser Stelle an die Literatur verwiesen, z.B. NOVOTNY und HECHT [10], MAIER [11].

## 2 Optische Eigenschaften von Gold-Nanoantennen

Die Dispersionsrelation der ebenen Welle (2.2) lässt sich unter Verwendung von (2.6) schreiben als

$$|\vec{k}(\omega)| = \frac{1}{c} \sqrt{\varepsilon_\infty \omega^2 - \omega_p^2}. \quad (2.7)$$

Im Spezialfall  $\omega = \omega_p / \sqrt{\varepsilon_\infty}$  ist  $|\vec{k}(\omega)| = 0$ , und man erhält eine durch das Metall propagierende, longitudinale Welle

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \exp(i(\vec{k}\vec{x} - \omega t)) = \vec{E}_0 \exp(-i\omega t), \quad (2.8)$$

welche als Volumen-Plasmon bezeichnet wird. Für  $\omega > \omega_p / \sqrt{\varepsilon_\infty}$  entsteht ein elektronisch-photonischer Mischzustand, das sogenannte Volumen-Plasmon-Polariton (VPP).

Ist  $\omega < \omega_p / \sqrt{\varepsilon_\infty}$ , so wird  $|\vec{k}|$  rein imaginär, so dass die ebene Welle aus Gleichung (2.2) nicht durch das Metall propagieren kann, sondern reflektiert wird. In diesem Fall können die evaneszenten Felder an der Metalloberfläche eine weitere Art von Plasmon-Polariton erzeugen, welches an die Grenzfläche zwischen Metall und Dielektrikum ( $\varepsilon_D$ ) gebunden ist. Sind bestimmte Resonanzbedingungen erfüllt, können sich solche Oberflächen-Plasmon-Polaritonen (SPP, von engl.: *surface plasmon polariton*) einige Mikrometer weit entlang der Grenzfläche ausbreiten. Senkrecht zur Metalloberfläche fällt die Feldstärke exponentiell ab.

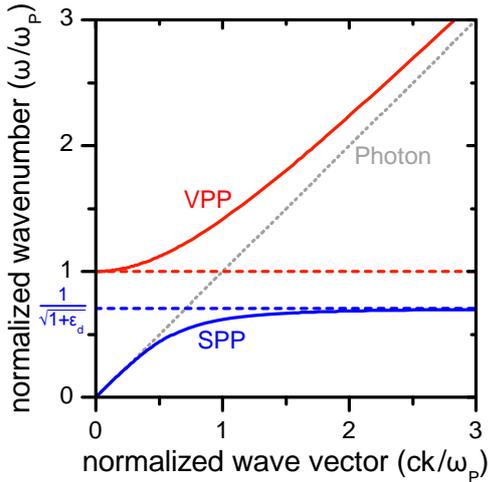
Über die Stetigkeitsbedingungen für elektromagnetische Felder ( $E_{\parallel,1} = E_{\parallel,2}$ ,  $B_{\perp,1} = B_{\perp,2}$ ) folgt aus den Maxwellgleichungen die Dispersionsrelation parallel zur Grenzfläche [12]

$$k_{\parallel}(\omega) = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon(\omega) \varepsilon_D}{\varepsilon(\omega) + \varepsilon_D}}. \quad (2.9)$$

Der Verlauf der Dispersionskurven von VPP und SPP (2.7, 2.9) sind in Abbildung 2.2 dargestellt. Beide Kurven nähern sich der Lichtkurve  $ck = \omega$  asymptotisch für kleine bzw. große Frequenzen an, ohne sie jedoch zu kreuzen. Des Weiteren existiert ein Bereich  $\omega_p / \sqrt{\varepsilon_\infty + \varepsilon_D} \leq \omega \leq \omega_p / \sqrt{\varepsilon_\infty}$  in dem keine Plasmonen angeregt werden können.

### 2.2.2 Lokalisierte Oberflächen-Plasmon-Resonanzen

Im Fall metallischer Nanopartikel ist die Ausbreitung von Oberflächen-Plasmonen auf die Dimension der Struktur begrenzt, so dass von lokalisierten Oberflächen-Plasmon-Resonanzen (LSPR, von engl.: *localized surface plasmon resonance*) gesprochen wird.



**Abbildung 2.2:** Dispersionskurven von Volumen- (VPP) und Oberflächen-Plasmon-Polaritonen (SPP) für  $\varepsilon_\infty = 1$ . Wellenvektor und Wellenzahl sind jeweils auf die Plasmfrequenz normiert. Für große bzw. kleine Werte des Wellenvektors nähern sich die Kurven der Photon-Dispersionskurve ( $ck = \omega$ ) an. Im Frequenzbereich zwischen  $\omega_p$  und  $\omega_p/\sqrt{1 + \varepsilon_D}$  (gestrichelte Linien) kann kein Plasmon-Polariton angeregt werden.

Ist die charakteristische Größe der plasmonischen Nanostrukturen deutlich kleiner als die Wellenlänge der einfallenden Strahlung ( $l \ll \lambda$ ), so lässt sich das optische Verhalten gut mit Hilfe der sogenannten quasistatischen Näherung beschreiben [13–15].

Im Fall der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gold-Nanoantennen ist die quasistatische Näherung allerdings unzureichend, da die räumliche Ausdehnung der Antennen und die Wellenlänge des Infrarotlichts in derselben Größenordnung liegen. Die Vernachlässigung von Retardierungseffekten ist nicht länger zulässig.

### 2.2.3 Ideale Antennen

Die einfachste Betrachtungsweise für Nanoantennen bietet das Modell der idealen Antenne. Dabei werden zylindrische Partikel angenommen, deren Durchmesser sehr klein gegenüber der Länge ist ( $2R \ll L$ ). Außerdem wird die Antenne als perfekter Leiter betrachtet, gleichbedeutend mit einem unendlich großen negativen Realteil ( $\varepsilon_1(\omega) \rightarrow -\infty$ ) und verschwindend kleinem Imaginärteil der dielektrischen Funktion ( $\varepsilon_2(\omega) \rightarrow 0$ ).

Aus der Bedingung, dass an den Antennenenden kein Strom fließt,  $I(x=0) = I(x=L) = 0$ , erhält man die Relation

$$L = j \cdot \frac{\lambda_{\text{res}}}{2n_D}, \quad \text{bzw.} \quad \omega_{\text{res}} = \frac{j}{2Ln_D}, \quad j \in \mathbb{N}, \quad (2.10)$$

wobei  $n_D = \sqrt{\varepsilon_D}$  den Brechungsindex des Umgebungsmediums darstellt. Eine Erhöhung dieses Brechungsindex führt folglich zu einer Rotverschiebung<sup>2</sup> der

<sup>2</sup>Ungeachtet der Lage von infrarotem Licht im elektromagnetischen Spektrum bezeichnet Rotverschiebung eine Verschiebung zu niedrigeren, Blauverschiebung zu höheren Energien.

Resonanzfrequenz. Die natürliche Zahl  $j$  in Gleichung (2.10) steht für höhere Moden (vgl. [2]). Die Moden mit geradem  $j$  weisen eine Ladungsverteilungen symmetrisch zur Achsenmitte, und daher kein Gesamtdipolmoment, auf. Im Realfall ist die Anregung dieser sogenannten Dunkelmoden (engl.: *dark mode*) aufgrund von Defekten in der Antenne [16] oder schrägem Einfall des anregenden Lichts [17] jedoch ebenfalls möglich. Die Moden mit ungeradem  $j$  werden als helle Moden (engl.: *bright mode*) bezeichnet.

### 2.2.4 Reale Antennen

Trägt man die gemessene Resonanzfrequenz von Nanoantennen gegen ihre Länge auf, so ist ersichtlich, dass das Modell der idealen Antenne das System nicht ausreichend beschreibt. Abbildung 2.3 zeigt die Resonanzwellenlänge von Nanoantennen unterschiedlicher Länge auf ZnS [18, 19]. Ebenfalls eingezeichnet sind Berechnungen nach (2.10) für verschiedene Brechungsindices  $n$  (rote Linien), diese sind im Vergleich zu den Messwerten jedoch weitestgehend blauverschoben.

BEM-Simulationen<sup>3</sup> der optischen Eigenschaften von Nanoantennen zeigen eine Rotverschiebung der Resonanzfrequenz für kleinere Antennenradien [21, 22].

Diese Abweichungen sind unter anderem auf die endliche Eindringtiefe des anregenden Lichts  $\delta_{\text{skin}}$  in die Antenne zurückzuführen. Im Fall von Oberflächenplasmonen ist diese durch

$$\delta_{\text{skin}} = \frac{1}{\sqrt{k_{\parallel}^2 - \varepsilon(\omega) \frac{\omega^2}{c^2}}} \stackrel{(2.9)}{=} \frac{c/\omega}{\sqrt{-\frac{\varepsilon(\omega)^2}{\varepsilon(\omega) + \varepsilon_D}}} \quad (2.11)$$

gegeben [23], wobei  $\varepsilon(\omega)$  die dielektrische Funktion des Metalls darstellt. Mit  $|\varepsilon_1(\omega)| \gg \varepsilon_D$  und  $\varepsilon_2(\omega) \rightarrow 0$  folgt

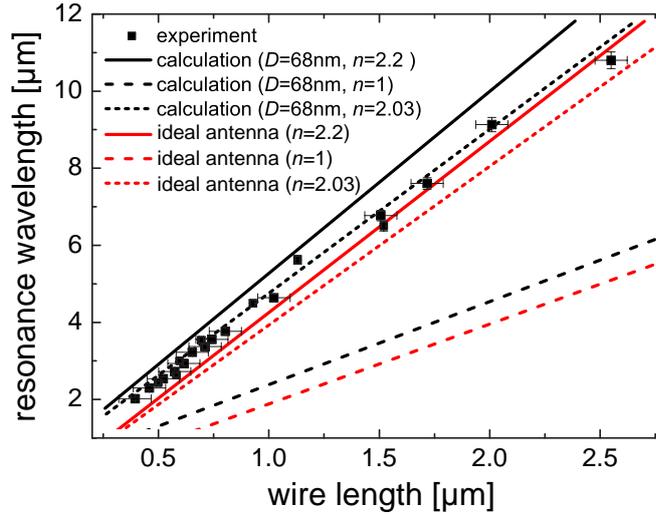
$$\delta_{\text{skin}} \approx \frac{c/\omega}{\sqrt{-\varepsilon_1(\omega)}}, \quad (2.12)$$

so dass die bisher gemachte Annahme eines perfekten Leiters ( $\varepsilon_1(\omega) \rightarrow -\infty$ ) gleichbedeutend mit  $\delta_{\text{skin}} = 0$  ist.

Tatsächlich liegt die Eindringtiefe von Gold im Infraroten bei  $\delta_{\text{skin}} = 22$  nm [24] und ist damit ähnlich der lateralen Ausdehnung typischer Nanoantennen.

---

<sup>3</sup>Simulationen mit der *boundary element method* (BEM) erlauben die Berechnung der optischen Eigenschaften eines Nanoobjekts durch das Lösen der Maxwellgleichung auf der diskretisierten Oberfläche [13, 20].



**Abbildung 2.3:** Resonanzwellenlänge verschiedener Nanodrähte auf ZnS in Abhängigkeit ihrer Länge. Die Breite der Antennen beträgt jeweils  $61 \pm 10$  nm. Die Linien zeigen Berechnungen mit dem Modell der idealen Antenne (2.10) (rot), sowie entsprechende Berechnungen mit Hilfe der Novotny-Formel (2.13) (schwarz) für verschiedene Brechungsindizes  $n$ . Der optimale Brechungsindex liegt bei  $n = 2,03$ , zwischen dem von Vakuum ( $n=1$ ) und ZnS ( $n=2,2$ ). Abgewandelt aus [19].

### Analytische Näherungsformel nach Novotny

Eine analytische Näherungsformel zur Berechnung der Resonanzfrequenzen von Nanoantennen unter Berücksichtigung der endlichen Eindringtiefe wurde 2007 von L. NOVOTNY publiziert [25]. Unter der Annahme, dass  $\varepsilon_2(\omega) = 0$  (vgl. (2.6)), wurde eine effektive Wellenlänge berechnet, welche Gleichung (2.10) erfüllt:

$$\lambda_{\text{eff}}(\lambda; \varepsilon_D, r, \lambda_P, \varepsilon_\infty) = \frac{\lambda}{\sqrt{\varepsilon_D}} \sqrt{\frac{4\pi^2 \varepsilon_D \left[ \frac{r}{\lambda} \tilde{z}(\lambda; \varepsilon_D, \lambda_P, \varepsilon_\infty) \right]^2}{1 + 4\pi^2 \varepsilon_D \left[ \frac{r}{\lambda} \tilde{z}(\lambda; \varepsilon_D, \lambda_P, \varepsilon_\infty) \right]^2} - 4r}. \quad (2.13)$$

Dabei ist  $\lambda$  die Vakuum-Wellenlänge des einfallenden Lichts und  $r$  der Radius der zylindrischen Antenne.  $\tilde{z}$  ist eine Wellenlängenabhängige Funktion, die vom Material der Antennen (über die Plasmawellenlänge  $\lambda_P = 1/\omega_p$  und  $\varepsilon_\infty$ ) und dem Umgebungsmaterial ( $\varepsilon_D$ ) abhängt, den exakten Ausdruck findet man in [25]. Für  $r \rightarrow 0$ ,  $\varepsilon_\infty \rightarrow -\infty$  reduziert sich (2.13) auf  $\lambda_{\text{eff}} = \lambda$ .

## 2 Optische Eigenschaften von Gold-Nanoantennen

Mit dieser Formel nimmt Gleichung (2.10) die Form<sup>4</sup>

$$L \approx j \cdot \left( \frac{Z(\lambda)}{2n_D} \lambda - 2r \right) \sim j \cdot (A + B\lambda) \quad (2.14)$$

an, wobei  $Z(\lambda)$  den Wurzelterm aus (2.13) darstellt. Die zweite Umformung folgt über  $Z(\lambda) \sim a + \frac{b}{\lambda}$ , mit material- und formabhängigen Konstanten  $a$  und  $b$ , bzw.  $A$  und  $B$ .

Abbildung 2.3 zeigt die Unterschiede von NOVOTNYS Formel im Vergleich zum Modell der idealen Antenne. Vor allem bei geringen Drahtlängen ist die ideale Antenne nicht geeignet zur Beschreibung der Messwerte, da der konstante *offset* aus (2.14) fehlt.

### Kinetische Induktivität

Eine weitere Betrachtungsweise für Nanoantennen ist das Bild eines aufgebogenen RLC Schwingkreises (vgl. [26]). Die Resonanzfrequenz ergibt sich aus der Induktivität  $\tilde{L}$  und der Kapazität  $C$  der Antenne gemäß

$$\omega_{\text{res}} = 1/\sqrt{C \cdot \tilde{L}}. \quad (2.15)$$

Anders als bei makroskopischen Antennen muss neben der elektromagnetischen Induktivität  $\tilde{L}_{\text{ind}}$  jedoch auch die kinetische Induktivität  $\tilde{L}_{\text{kin}}$  beachtet werden.  $\tilde{L}_{\text{ind}}$  entspricht dem Anteil der Induktivität, der aus der elektromagnetischen Induktion nach FARADAY folgt.  $\tilde{L}_{\text{kin}}$  folgt aus der Annahme einer endlichen effektiven Elektronenmasse  $m_{\text{eff}}$  und damit Trägheit der Elektronen. Gemäß Gleichung (2.5) folgt daraus eine endliche Plasmafrequenz  $\omega_p$ , was zu einem endlich großen negativen Realteil  $\varepsilon_1(\omega)$  der dielektrischen Funktion führt.

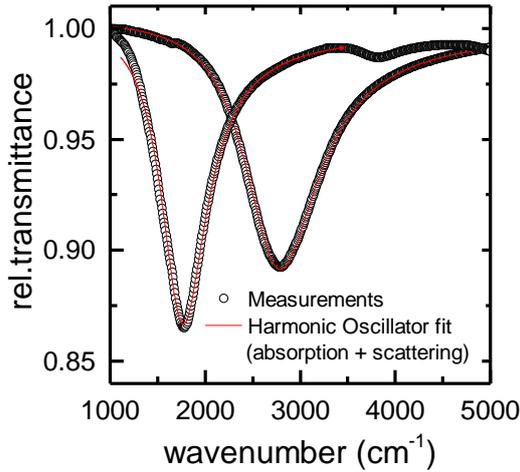
Für eine zylindrische Antenne<sup>5</sup> der Länge  $L$  und Radius  $r$  erhält man aus der Leitfähigkeit im Drude-Sommerfeld-Modell (2.4) die elektromagnetische Impedanz

$$Z = R - i\omega \left( \tilde{L}_{\text{kin}} + \tilde{L}_{\text{ind}} \right) = \frac{1}{\sigma(\omega)} \frac{L}{\pi r^2} \quad (2.16)$$

der Antenne. Dabei ist  $R$  der Ohmsche Widerstand der Antenne. Unter Vernachlässigung von  $\tilde{L}_{\text{ind}}$ , und Verwendung der Plasmafrequenz (vgl. Gleichung (2.5))

<sup>4</sup>Der Faktor  $1/\sqrt{\varepsilon_D}$  im ersten Term von (2.13) ist identisch mit dem Faktor  $1/n_D$  in (2.10).

<sup>5</sup>Eine analoge Beschreibung ist auch für andere Querschnittsformen möglich indem der Faktor  $\pi r^2$  in Gleichung (2.16) und (2.17) entsprechend ersetzt wird.



**Abbildung 2.4:** Gemessene relative Transmissionspektren zweier unterschiedlicher Nanoantennen-arrays (schwarz). An die Messung angepasste Transmissionskurven im Modell des Harmonischen Oszillators unter Berücksichtigung von Absorption und Streuung (rot, Gleichung (2.19)). Für die Amplitudenparameter ergibt sich (von links nach rechts):

$$A_1 = 200 \text{ cm}^{-1}, S_1 = 70 \text{ cm}^{-1}, \\ A_2 = 275 \text{ cm}^{-1}, S_2 = 150 \text{ cm}^{-1}.$$

folgt [14, 23]

$$R = \Re(Z) = \frac{\omega_\tau}{\varepsilon_0 \omega_p^2} \frac{L}{\pi r^2}, \\ \tilde{L}_{\text{kin}} = -\frac{1}{\omega} \Im(Z) = \frac{1}{\varepsilon_0 \omega_p^2} \frac{L}{\pi r^2}. \quad (2.17)$$

Im Vergleich zur kinetischen Induktivität  $\tilde{L}_{\text{kin}}$  berechnet sich die elektromagnetische Induktivität  $\tilde{L}_{\text{ind}}$  klassisch zu

$$\tilde{L}_{\text{ind}} = \frac{\mu_0 L}{2\pi} \left( \ln \left( \frac{2L}{r} \right) - \frac{3}{4} \right), \quad (2.18)$$

wobei  $\mu_0$  die Vakuumpermeabilität darstellt. Ist  $\tilde{L}_{\text{ind}} > \tilde{L}_{\text{kin}}$ , so lässt sich die Antenne mit Hilfe des klassischen RLC-Schwingkreises beschreiben.

Im Fall von im infraroten Spektralbereich resonanten Gold-Nanoantennen mit  $L = 500 \dots 3000 \text{ nm}$ ,  $r = 30 \dots 100 \text{ nm}$ ,  $\omega_p = 72800 \text{ cm}^{-1}$  [7] ist  $\tilde{L}_{\text{kin}} > \tilde{L}_{\text{ind}}$ , man spricht vom plasmonischen Regime [14].

### Linienform

Abbildung 2.4 zeigt Transmissionspektren zweier Nanoantennen-arrays mit unterschiedlichen Antennenlängen. Die charakteristische Linienform der Antennenresonanz lässt sich über das Modell eines getriebenen Harmonischen Oszillators mit Dämpfung beschreiben:

$$T(\omega) = 1 - \left( A^2 + S^2 \frac{\omega^2}{\omega_{\text{res}}^2} \right) \cdot \frac{\omega^2}{(\omega^2 - \omega_{\text{res}}^2)^2 + \gamma^2 \omega^2}. \quad (2.19)$$

## 2 Optische Eigenschaften von Gold-Nanoantennen

$\omega_{\text{res}}$  und  $\gamma$  stellen die Resonanzfrequenz und Dämpfung des harmonischen Oszillators dar.  $A^2$  ist die Amplitude des absorptiven Anteils der Resonanz.  $S^2$  ist die Amplitude der über alle Raumwinkel integrierten Streuleistung des Oszillators.  $A$  und  $S$  haben jeweils die Dimension einer Frequenz bzw. Wellenzahl.

Wie in Abbildung 2.4 dargestellt, lassen sich gemessene Transmissionsspektren gut mit Gleichung (2.19) beschreiben. Aufgrund des nicht konstanten Brechungsindex des Substrats ( $\text{CaF}_2$ ) ist eine präzise Beschreibung der Messkurve für Frequenzen unterhalb von  $\sim 1500 \text{ cm}^{-1}$  mit dieser Formel nicht möglich.

### 2.2.5 Einfluss des Umgebungsmediums

Gleichung (2.10) bzw. (2.13, 2.14) zeigen eine Anhängigkeit der Resonanzfrequenz von der dielektrischen Umgebung der Nanoantenne an. Dies ist anschaulich durch die Verringerung der Wellenlänge des einfallenden Lichts zu erklären. In der mikroskopischen Betrachtung findet eine Verringerung der Rückstellkräfte durch die Ausrichtung der Dipolmomente in der näheren Umgebung der Antenne statt, die Schwingungsfrequenz nimmt ab. Dieser Effekt ist umso größer, je größer die Polarisierbarkeit des Mediums ist.

Bei realen Nanoantennen ist das Umgebungsmedium für gewöhnlich nicht isotrop, da die Antennen nur einseitig auf einem Substrat fixiert sind. Die Auswirkung dieser Anisotropie ist auch in Abbildung 2.3 zu beobachten. Der Brechungsindex, für den die Novotny-Formel die Messdaten optimal beschreibt, liegt mit  $n = 2,03$  zwischen den Werten für ZnS ( $n = 2,2$ ) und Vakuum ( $n = 1$ ).

Generell lassen sich substratgebundene Antennen gut über ein effektives Medium

$$\varepsilon_{\text{D,eff}} = \frac{\varepsilon_{\text{S}} + \varepsilon_{\text{M}}}{2}. \quad (2.20)$$

beschreiben, dessen Dielektrizitätskonstante das arithmetische Mittel der dielektrischen Funktionen von Substrat  $\varepsilon_{\text{S}}$  und Umgebungsmedium  $\varepsilon_{\text{M}}$  ist.

### Näherungsformel zur Berechnung der Resonanzverschiebung für verschiedene Medien

Bei den Messungen im Verlauf dieser Arbeit sind die Antennen oft von Wasser anstelle von Luft umgeben, so dass die Resonanzfrequenzen rotverschoben sind. Zwar lässt sich diese Änderung der Resonanzfrequenz grob mit dem Modell der idealen Antenne beschreiben, so dass für den Wechsel von Medium A (Dielektrizitätskonstante  $\varepsilon_{\text{A}}$ ) zu Medium B ( $\varepsilon_{\text{B}}$ ) gilt:

$$\omega_{\text{A}} \cdot \sqrt{\varepsilon_{\text{A}}} = \frac{1}{2L} = \omega_{\text{B}} \cdot \sqrt{\varepsilon_{\text{B}}}. \quad (2.21)$$

Ausgehend von der Beschreibung mit Hilfe der effektiven Wellenlänge von L. NOVOTNY [25] (vgl. Abschnitt 2.2.4) soll an dieser Stelle eine verbesserte Abschätzung der Resonanzverschiebung beim Wechsel des Umgebungsmediums hergeleitet werden.

Für genügend kleine Antennen-Radien  $R$  und  $\omega_\tau = 0$  gilt

$$\frac{\lambda_{\text{eff}}}{2\pi R} = \left(13,74 - \frac{2}{\pi}\right) - \frac{0,12}{\varepsilon_A} \left(\varepsilon_\infty + 141,04 \varepsilon_A + \frac{\lambda}{\lambda_P} \sqrt{\varepsilon_\infty + 141,04 \varepsilon_A}\right), \quad (2.22)$$

wobei  $\varepsilon_A$  die dielektrische Funktion des Umgebenden Materials A ist. Die numerischen Faktoren sind direkt aus [25] übernommen. Im Resonanzfall gilt definitionsgemäß  $\lambda_{\text{eff}} = 2L$ , wobei  $L$  die Länge der Antenne bezeichnet. Mit der Resonanzfrequenz  $\omega_A = 1/\lambda$  und  $\lambda_P = 1/\omega_P$  erhält man durch Umformen von Gleichung (2.22)

$$\frac{2L}{2\pi R \cdot 0,12} + 141,04 = \frac{109,2 - \varepsilon_\infty}{\varepsilon_A} + \frac{\omega_P}{\omega_R \varepsilon_A} \underbrace{\sqrt{\varepsilon_\infty + 141,04 \varepsilon_A}}_{\approx 12\sqrt{\varepsilon_A}}. \quad (2.23)$$

Der Fehler, der aufgrund der Vereinfachung des Wurzelterms in (2.23) entsteht, liegt für  $\varepsilon_\infty = 11$  und  $\varepsilon_A = 1 \dots 2$  im Bereich von  $\pm 0,3\sqrt{\varepsilon_A}$ .

Die linke Seite von Gleichung (2.23) ist unabhängig vom Umgebungsmedium. Für ein weiteres Umgebungsmedium B mit der dielektrischen Funktion  $\varepsilon_B$  und der Resonanzfrequenz  $\omega_B$  in Medium B gilt dann

$$\frac{109,2 - \varepsilon_\infty}{\varepsilon_A} + \frac{12 \omega_P}{\omega_A \sqrt{\varepsilon_A}} = \frac{109,2 - \varepsilon_\infty}{\varepsilon_B} + \frac{12 \omega_P}{\omega_B \sqrt{\varepsilon_B}}. \quad (2.24)$$

Diese Gleichung lässt sich nach  $1/\omega_B$  auflösen, man erhält letztlich

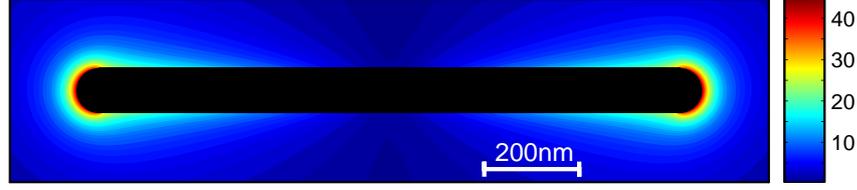
$$\frac{1}{\omega_B} = \sqrt{\frac{\varepsilon_B}{\varepsilon_A}} \frac{1}{\omega_A} - \frac{K}{\sqrt{\varepsilon_B}} \left(1 - \frac{\varepsilon_B}{\varepsilon_A}\right), \quad K \equiv \frac{109,2 - \varepsilon_\infty}{12 \omega_P}. \quad (2.25)$$

Der Faktor  $K$  im zweiten Term ist unabhängig vom Umgebungsmedium und wird vollständig durch die dielektrische Funktion des Antennenmaterials im Drudemodell definiert (vgl. Gleichung (2.6)).

Der erste Term von (2.25) ist analog zu (2.21). Der durch die effektive Wellenlängen-Betrachtung auftretende zusätzliche Korrekturterm ist in etwa eine Größenordnung kleiner. Alternativ lässt sich Gleichung (2.25) auch als

$$\frac{1}{\omega_{\text{res}} \sqrt{\varepsilon_D}} + \frac{K}{\varepsilon_D} = \text{konst.} \quad (2.26)$$

## 2 Optische Eigenschaften von Gold-Nanoantennen



**Abbildung 2.5:** Berechnete Feldstärkeverteilung einer resonant angeregten zylindrischen Nanoantenne (schwarz) mit  $R = 50$  nm,  $L = 1,3$   $\mu$ m, normiert auf die Feldstärke des anregenden Lichts. Abgewandelt aus [13].

schreiben. Man beachte, dass gilt:

$$A \rightarrow A : \quad \frac{1}{\omega_A} = \sqrt{\frac{\varepsilon_A}{\varepsilon_A}} \frac{1}{\omega_A} - \frac{K}{\sqrt{\varepsilon_A}} \left(1 - \frac{\varepsilon_A}{\varepsilon_A}\right) = \frac{1}{\omega_A}, \quad (2.27)$$

$$\begin{aligned} A \rightarrow B \rightarrow C : \quad \frac{1}{\omega_C} &= \sqrt{\frac{\varepsilon_C}{\varepsilon_B}} \left( \sqrt{\frac{\varepsilon_B}{\varepsilon_A}} \frac{1}{\omega_A} - \frac{K}{\sqrt{\varepsilon_B}} \left(1 - \frac{\varepsilon_B}{\varepsilon_A}\right) \right) - \frac{K}{\sqrt{\varepsilon_C}} \left(1 - \frac{\varepsilon_C}{\varepsilon_B}\right) \\ &= \sqrt{\frac{\varepsilon_C}{\varepsilon_A}} \frac{1}{\omega_A} - \frac{K}{\sqrt{\varepsilon_C}} \left( \frac{\varepsilon_C}{\varepsilon_B} - \frac{\varepsilon_C \varepsilon_B}{\varepsilon_B \varepsilon_A} + 1 - \frac{\varepsilon_C}{\varepsilon_B} \right) \\ &= \sqrt{\frac{\varepsilon_C}{\varepsilon_A}} \frac{1}{\omega_A} - \frac{K}{\sqrt{\varepsilon_C}} \left(1 - \frac{\varepsilon_C}{\varepsilon_A}\right) \hat{=} A \rightarrow C. \end{aligned} \quad (2.28)$$

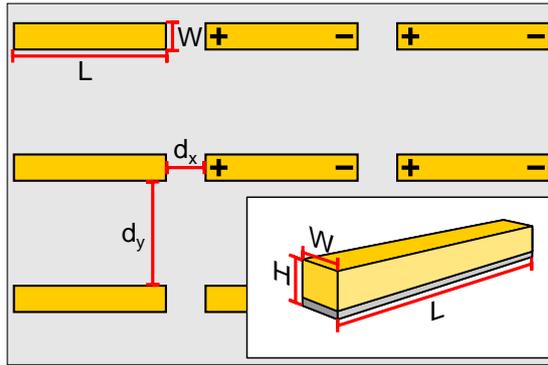
(2.25) ist also in sich konsistent. Gleichung (2.28) zeigt, dass man (2.25) auch sukzessiv anwenden kann, z.B. im Fall stark dispersiver Umgebungsmedien wie Wasser (vgl. Abschnitt 3.3), bei denen die Dielektrizitätskonstante an der Resonanzposition im Voraus nicht bekannt ist.

### 2.2.6 Nahfeldverstärkung an plasmonischen Nanostrukturen

An der Oberfläche metallischer Nanostrukturen können sich infolge lokalisierter Oberflächen-Plasmonen starke elektromagnetische Felder ausbilden. Diese starken Nahfelder bilden die Grundlage der oberflächenverstärkten Infrarotspektroskopie [1, 3, 27, 28] (siehe Abschnitt 2.3).

Abbildung 2.5 zeigt eine Simulation der Nahfeldverteilung an einer 1,3  $\mu$ m langen zylindrischen Nanoantenne, welche resonant angeregt wird. An den Antennenenden erreicht die Feldverstärkung einen Faktor von über 40 im Vergleich zur Stärke des einfallenden Lichts.

Dies ist vor allem durch die geringe Eindringtiefe  $\delta_{\text{skin}}$  in das Metall bedingt. Im Fall von Oberflächen-Plasmonen ist  $\delta_{\text{skin}} \propto 1/\sqrt{-\varepsilon_1(\omega)}$  (vgl. (2.12)). Im infraroten Spektralbereich ist  $\varepsilon_1(\omega)$  besonders stark negativ, die Feldverstärkung ist dementsprechend höher als im sichtbaren Bereich (vgl. Abb. 2.1).



**Abbildung 2.6:** Schematische Darstellung eines Antennenarrays. Die Ladungsverteilung im angeregten *array* ist mit +, – gekennzeichnet.

Schematische Darstellung einer einzelnen Antenne. Angaben der Antennenhöhe  $H$  beinhalten die Höhe der Haftvermittlerschicht (grau).

Des Weiteren bilden sich starke Felder an Orten hoher Krümmung. Im Fall der Nanoantennen begünstigt dieser sogenannte Blitzableitereffekt (engl.: *lightning rod effect*) die Feldverstärkung an den Antennenenden [29]. Bei dünneren Antennen ist folglich eine höhere Verstärkung zu erwarten. Allerdings erhöht sich bei geringerem Durchmesser auch die Streurrate von Elektronen an der Drahtoberfläche, was zu einer Absenkung der Leitfähigkeit und somit der Feldstärke an den Antennenenden führt.

### 2.2.7 Nanoantennen-arrays

Für die in den Kapiteln 4 und 5 dieser Arbeit beschriebenen Messungen wurden Nanoantennen-arrays verwendet, d.h. großflächige ( $\sim 100 \times 100 \mu\text{m}^2$ ), periodische Anordnungen gleich ausgerichteter Nanoantennen. Abbildung 2.6 zeigt einen Ausschnitt eines arrays schematisch. Durch die relative Nähe der Antennen zueinander treten Wechselwirkungen auf, welche sich sowohl auf das Nah- als auch das Fernfeld auswirken. Daher beeinflussen die Abstände  $d_x$  in longitudinaler,  $d_y$  in transversaler Richtung<sup>6</sup> die optischen Eigenschaften des arrays.

Analog zur Orbitalhybridisierung in Molekülen führt die Interaktion zu bindenden und antibindenden Zuständen mit verringerter bzw. erhöhter Energie. Die Art der Wechselwirkung ist dabei durch die Ladungsverteilung im *array* gegeben. Regt man ein rechtwinklig periodisches *array* (wie in Abb. 2.6 gezeigt) durch Lichteinfall an, ist die Verteilung translationssymmetrisch, alle lokalisierten Plasmonen schwingen phasengleich. Eine antisymmetrische Ladungsverteilung ist aufgrund des fehlenden effektiven Dipolmoments nicht IR-aktiv (vgl. Abschnitt 2.3.1).

<sup>6</sup>Longitudinal bezeichnet hier die Richtung parallel, transversal senkrecht zur langen Antennenachse. Diese Achsen werden auch als x- bzw. y-Richtung bezeichnet.

In Transversalrichtung erhöhen die zusätzlichen Effektivladungen die Rückstellkräfte und die Dämpfung der Plasmonen. Dies führt zu einer Blauverschiebung und Verbreiterung der Resonanz, welche für kleine  $d_y$  größer wird. Je nach Antennenabstand sind relative Blauverschiebungen von bis zu 20% beobachtet worden [22].

In x-Richtung führt die Interaktion zu einer Verringerung der Rückstellkräfte, kleine Lücken  $d_x$  führen zu einer Reduzierung der Plasmonenenergie. Messungen an *arrays* ergaben eine Rotverschiebung von  $\sim 10\%$  bei einer Lücke von  $d_x = 40$  nm im Vergleich zu nicht koppelnden ( $d_x = 5 \mu\text{m}$ ) Antennen [22, 30].

### Gittermode

Neben der oben beschriebenen Nahfeld-Wechselwirkungen kann bei Antennen-*arrays* eine Gittermode beobachtet werden, welche aufgrund von Fernfeld-Wechselwirkung der Antennen entsteht. Diese Wechselwirkungen treten auf, wenn

$$L + d_x = \frac{1}{\omega_{\text{res}} n}, \quad W + d_y = \frac{1}{\omega_{\text{res}} n}, \quad (2.29)$$

wobei  $n$  den effektiven Brechungsindex bezeichnet. Dies entspricht dem Fall, dass die Periodizität des *arrays* einer vollen Wellenlänge entspricht.

## 2.3 Oberflächenverstärkte Infrarotspektroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wird die oberflächenverstärkte Infrarotspektroskopie (SEIRS, von engl.: *surface enhanced infrared spectroscopy*) zur Detektion kleinster Molekülmengen verwendet. Die Absorptionsquerschnitte der Infrarotspektroskopie sind mit  $\sim 10^{-20} \text{ cm}^2$  sehr gering [31]. Mit Hilfe der starken Nahfelder an plasmonsichen Nanostrukturen (vgl. Abschnitt 2.2.6) lässt sich die Sensitivität jedoch stark verbessern.

Die Grundlagen der Infrarotspektroskopie werden in Abschnitt 2.3.1 erklärt. Abschnitt 2.3.2 geht auf die Verstärkung des Absorptionssignals ein. Die asymmetrische Linienform der verstärkten Vibrationsbanden werden in Abschnitt 2.3.3 behandelt.

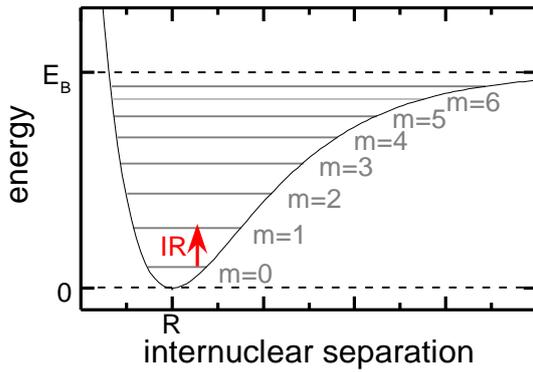
### 2.3.1 Vibrationsspektroskopie

Ein Molekül aus  $N$  Atomen verfügt über insgesamt  $3N$  Freiheitsgrade, von denen  $3N - 6$  Freiheitsgrade<sup>7</sup> den Relativbewegungen der beteiligten Atome zu einander zugeschrieben werden, die sogenannten Vibrationsfreiheitsgrade.

---

<sup>7</sup>Lineare Moleküle weisen bei niedrigen Temperaturen einen weiteren Vibrationsgrad auf, welcher einen inaktiven Rotationsgrad ersetzt.

### 2.3 Oberflächenverstärkte Infrarotspektroskopie



**Abbildung 2.7:** Morsepotential (2.30) in Abhängigkeit des interatomaren Abstands, mit diskreten Energieniveaus  $E_m$  aus der Lösung der Schrödingergleichung. Bei der IR-Absorption (rot) werden Vibrationszustände direkt über Absorption eines Photons der entsprechenden Energie angeregt.

Das Potential zwischen zwei Atomen im Molekül kann mit Hilfe des Morse-Potentials [32, 33]

$$V(r) = E_D \cdot \left(1 - e^{-a(r-R)}\right)^2 \quad (2.30)$$

beschrieben werden, wobei  $E_D \equiv V(r \rightarrow \infty)$  die Dissoziationsenergie,  $R$  den Abstand der Atome im Potentialminimum und  $a$  eine charakteristische Größe darstellt. Die Schrödingergleichung ist für das Morsepotential analytisch lösbar, es ergeben sich diskrete Energieniveaus:

$$E_m = h\nu \cdot \left(m + \frac{1}{2}\right) - \frac{(h\nu)^2}{4E_D} \cdot \left(m + \frac{1}{2}\right)^2 \quad m \in \mathbb{N} \quad (2.31)$$

wobei  $h$  das Planck'sche Wirkungsquantum darstellt. Die natürliche Zahl  $m$  wird als Schwingungsquantenzahl bezeichnet<sup>8</sup>. Die Grundfrequenz  $\nu$  hängt vom Morseparameter  $a$  und der Teilchenmasse ab. Das Morsepotential  $V(r)$  und die diskreten Energieniveaus  $E_m$  sind schematisch in Abbildung 2.7 dargestellt.

Bei der Infrarotspektroskopie werden die Vibrationszustände direkt durch Absorption von Photonen der entsprechenden Energien angeregt. Eine Kopplung des Photons an den Vibrationszustand ist nur möglich, wenn die Schwingung das elektrische Dipolmoment des Moleküls ändert. Solche Schwingungsmoden nennt man IR-aktiv. Aufgrund der komplexen Wechselwirkungen zwischen Atomen in Molekülen lassen sich Vibrationsenergien bestimmten funktionalen Gruppen in Molekülen zuweisen.

<sup>8</sup>In der Literatur wird häufig  $\nu$  als Symbol der Schwingungsquantenzahl verwendet. An dieser Stelle wird  $m$  verwendet, um Verwechslung mit der Frequenz zu vermeiden.

### 2.3.2 SEIRS-Effekt

Moleküle, welche auf plasmonischen Nanostrukturen physis- oder chemisorbiert sind, weisen infolge der starken Nahfelder verstärkte Vibrationsmoden auf.

Erstmals beobachtet wurde diese oberflächenverstärkte Infrarotabsorption (SEIRA, von engl.: *surface enhanced infrared absorption*) 1980 von HARSTEIN *et al.* bei der Untersuchung von Molekül-Monolagen auf bzw. unter Metallinseln [1]. Die Verstärkung ist proportional zur Erhöhung der Intensität

$$EF_{\text{SEIRA}} = \frac{|E_{\text{loc}}|^2}{|E_0|^2}, \quad (2.32)$$

wobei  $E_{\text{loc}}$  die Feldstärke des Nahfeldes und  $E_0$  die Feldstärke des einfallenden Lichts ist. Untersuchungen der Nahfelder plasmonischer Strukturen mit einem optischen Rasternahfeldmikroskop (SNOM, von engl.: *scanning nearfield optical microscope*) zeigen, dass zusätzlich zum einfallenden Licht auch das am SNOM-*tip* gestreute Licht plasmonisch verstärkt wird [34]. Falls das vom Molekül gestreute Licht ebenfalls verstärkt wird, gilt

$$EF_{\text{SEIRS}} = \frac{|E_{\text{loc}}|^2}{|E_0|^2} \cdot \frac{|E_{\text{loc}}|^2}{|E_0|^2} = \frac{|E_{\text{loc}}|^4}{|E_0|^4}. \quad (2.33)$$

Der Zusammenhang zwischen Nahfeld- und Signalverstärkung ist allerdings noch nicht vollständig untersucht, daher wird der allgemeinere Begriff der oberflächenverstärkten Infrarotspektroskopie (SEIRS) verwendet. Neue Ergebnisse von DREGELY *et al.* legen jedoch die quadratische Abhängigkeit (2.32) nahe [35].

Die Absorptionsverstärkung hängt in großen Teilen von der Art und Form des plasmonischen Substrats ab.

Metallinseln, wie sie von HARSTEIN *et al.* verwendet wurden, weisen verbreiterte Plasmonresonanzen auf. Dies liegt an der unterschiedlichen Größe der Metallinseln, die Resonanzfrequenzen sind infolgedessen nicht alle gleich. Die Signalverstärkung ist nicht maximal, denn nicht alle Adsorbat-Moleküle sehen das maximale Nahfeld.

Aufgrund der guten Kontrollierbarkeit der Plasmonenresonanz (vgl. Abschnitt 2.2.4), der guten Lokalisierung der Feldverstärkung (*hotspots*) und der relativ einfachen Herstellung haben sich Nanoantennen (sowie Antennendimere und Antennen-*arrays*) als Substrat für SEIRS-Messungen etabliert [3, 18, 36, 37]. NEUBRECH *et al.* gelang eine Verstärkung der  $\text{CH}_2$ -Banden von Oktadekanthiol (ODT,  $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$ ) um mehr als fünf Größenordnungen an einzelnen

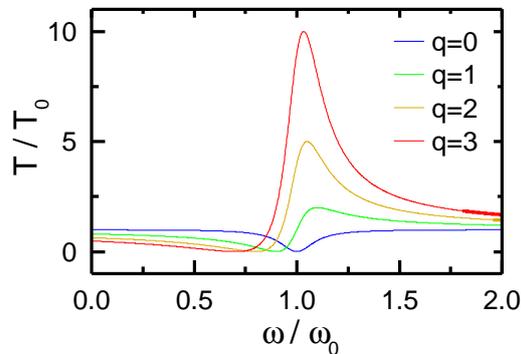
Gold-Nanoantennen [3, 13]. Aber auch andere Nanostrukturen wie metallische Hohlkugeln (*nanoshells*) [38, 39] oder verschiedene Kreuzstrukturen [40, 41] sind geeignet.

### 2.3.3 Linienform der Adsorbatschwingung

Bei SEIRS-Messungen ist eine asymmetrische Linienform der Molekülschwingung zu beobachten. Solche Linienformen wurden erstmals 1961 von U. FANO im Rahmen der Atomphysik untersucht und beschreiben die Kopplung eines diskreten Zustands an ein Kontinuum [42]. Sie lassen sich allgemein über

$$T(\omega; q) = T_0 \left( \frac{(q + \kappa(\omega))^2}{1 + \kappa^2(\omega)} \right), \quad \kappa(\omega) = \frac{\omega - \omega_0}{\Gamma} \quad (2.34)$$

beschreiben, wobei  $\omega_0$  die Resonanzfrequenz,  $T_0$  die Amplitude und  $\Gamma$  die Breite der Adsorbatschwingung ist. Der Parameter  $q$  stellt die Kopplungsstärke des Systems dar. Für  $q = 0$  reduziert sich (2.34) auf eine invertierte Lorentzkurve, für höhere Werte entsteht ein für Fano-Kurven typischer asymmetrischer *Doppelpeak* (vgl. Abb. 2.8). Im Grenzfall  $q \rightarrow \infty$  entsteht ein *Lorentzpeak* mit  $T(\omega \rightarrow \omega_0) \rightarrow \infty$ . Für negative Werte von  $q$  wird die Asymmetrie der Linie vertauscht.



**Abbildung 2.8:** Fano-Kurven (2.34) für  $\Gamma = \omega_0/10$  und verschiedene Kopplungsstärken  $q$ . Mit zunehmender Kopplung verändert sich die Linienform von einer Lorentzkurve ( $q = 0$ ) zu einem asymmetrischen *Doppelpeak*.

Bei SEIRS stellt die breitbandige Plasmonenresonanz das Kontinuum, die schmalbandige Absorption den diskreten Zustand dar. Der Parameter  $q$  wird dabei durch das Verhältnis von Resonanz- und Vibrationsfrequenz ( $\omega_{\text{res}}$  bzw.  $\omega_{\text{vib}}$ ), dem sogenannten *detuning*, bestimmt. Dabei ist der Betrag von  $q$  umso größer, je näher  $\omega_{\text{vib}}/\omega_{\text{res}}$  an 1 ist. Des Weiteren ist  $q > 0$  für  $\omega_{\text{vib}}/\omega_{\text{res}} < 1$  und  $q < 0$  für  $\omega_{\text{vib}}/\omega_{\text{res}} > 1$ . Effektiv bedeutet dies, dass bei SEIRS-Messungen ausgehend von Mitte der Plasmonenresonanz stets zunächst ein *Aufwärts-peak* zu beobachten ist.

## 2 Optische Eigenschaften von Gold-Nanoantennen

Dabei ist zu beachten, dass die maximale Nahfeldverstärkung im Vergleich zum im Fernfeld detektierten Absorptionsmaximum rotverschoben ist. ZULOAGA und NORDLANDER beschreiben dies durch einen sinusförmig getriebenen harmonischen Oszillator [43]. Das Absorptionsmaximum entspricht der maximalen Leistung des Systems und liegt bei der Resonanzfrequenz des ungedämpften Oszillators  $\omega_0$ . Das Maximum der Schwingungsamplitude, welches dem Nahfeld-Maximum entspricht, ist durch die Dämpfung  $\beta$  leicht rotverschoben:

$$\omega_{\text{NF}} = \sqrt{\omega_0^2 - \frac{\beta^2}{2}}. \quad (2.35)$$

## 3 Experimentelle Grundlagen

Dieses Kapitel befasst sich mit den experimentellen Methoden, sowie den spektroskopischen Eigenschaften der untersuchten Moleküle.

Abschnitt 3.1 behandelt die Grundlagen der Fourier-Transformations-Infrarot-Mikroskopie. Im Anschluss werden die grundlegenden Eigenschaften von Proteinen, insbesondere das Vibrationsspektrum, erläutert (3.2). Abschnitt 3.3 befasst sich mit den infrarot-optischen Eigenschaften von Wasser und schwerem Wasser.

### 3.1 Infrarotspektroskopische Messungen

Für die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten SEIRS Messungen wurde ein IR Mikroskop verwendet, welches an ein FTIR-Spektrometer (Fourier-Transformations-Infrarot) gekoppelt ist.

Die Funktionsweise von FTIR Spektroskopie wird in Abschnitt 3.1.1 erläutert. Details zur Messmethode werden in 3.1.2 beschrieben. In Abschnitt 3.1.3 wird eine Methode zur Grundlinienkorrektur vorgestellt, welche im Verlauf dieser Arbeit verwendet wird. Der verwendete Messaufbau, inklusive des IR-Mikroskops ist in Abschnitt 3.1.4 beschrieben. Für eine Beschreibung der verwendeten Proben sei an dieser Stelle auf den Anhang A.1 verwiesen.

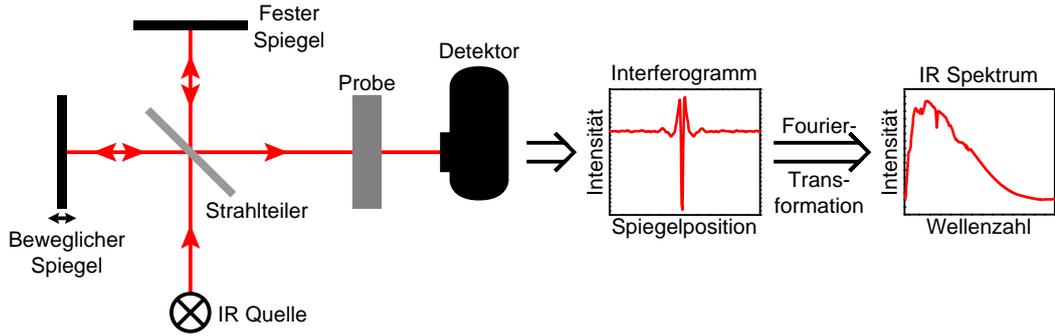
#### 3.1.1 Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie

Anders als bei der dispersiven Spektroskopie<sup>1</sup> wird bei der Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie das Spektrum aus einem Interferogramm berechnet. Der Vorteil dieser Methode liegt in den wesentlich kürzeren Messzeiten, wodurch sich das Signal zu Rausch Verhältnis (SNR, von engl.: *signal to noise ratio*) deutlich verbessern lässt. Abb. 3.1 zeigt schematisch den Aufbau eines FTIR-Spektrometers. Ein Globar<sup>2</sup> dient als Lichtquelle mit kontinuierlichem Spektrum. Mit Hilfe eines Strahlteilers aus Kaliumbromid (KBr) wird der Strahl auf zwei Spiegel gelenkt. Durch Verschieben eines dieser Spiegel lassen sich beliebige Gangunterschiede  $\Delta x$  der Teilstrahlen erzeugen, so dass bei der Zusammenführung der Teilstrahlen ein

<sup>1</sup>Bei der dispersiven Spektroskopie wird das Spektrum mit Hilfe von Gittern räumlich aufgelöst.

<sup>2</sup>Ein Globar (von engl.: *glow bar*, Leuchtstab) ist ein zum glühen gebrachter Siliziumkarbid-Stab.

### 3 Experimentelle Grundlagen



**Abbildung 3.1:** Aufbau eines FTIR-Spektrometers. Das Licht einer breitbandigen IR-Quelle wird mit Hilfe eines Michelson-Interferometers moduliert, und in Abhängigkeit der Spiegelposition detektiert. Durch Fouriertransformation dieses Interferogrammes entsteht ein IR-Spektrum.

Interferogramm  $I(\Delta x)$  entsteht. Mathematisch lässt sich dies durch das Integral des Betragsquadrats der Feldstärken über den gesamten Frequenzbereich darstellen.

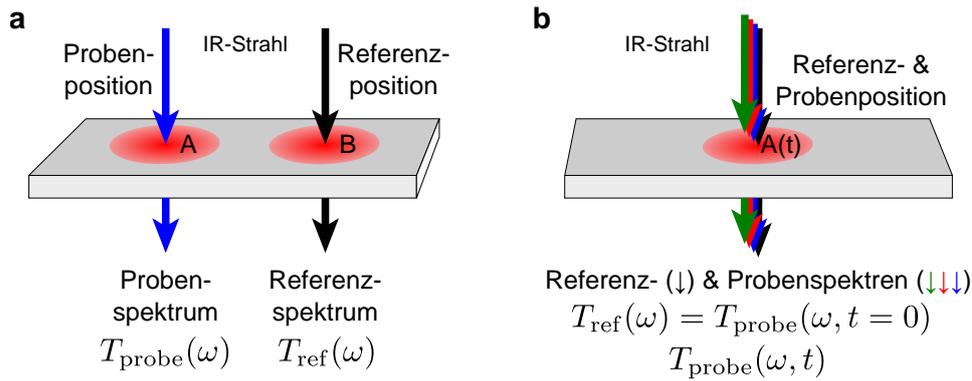
$$\begin{aligned}\vec{E}(\Delta x, k) &= \frac{\vec{E}_{in}(x, t)}{2} \cdot (1 + e^{ik\Delta x}) \\ I(\Delta x) &= \int_0^{\infty} |\vec{E}(\Delta x, k)|^2 dk = \underbrace{\int_0^{\infty} I(k) dk}_{=const.} + \int_0^{\infty} I(k) \cos(k\Delta x) dk\end{aligned}\quad (3.1)$$

wobei  $\vec{E}_{in}(x, t)$  der Feldvektor des einfallenden Strahls und  $I(k) = \frac{|\vec{E}_{in}|^2}{2}$  ist. Zwar enthält dieses Interferogramm  $I(\Delta x)$  bereits sämtliche spektralen Informationen. Für eine Analyse ist diese Form jedoch unzulänglich. Durch eine Fourier-Rücktransformation von (3.1) erhält man das Spektrum  $I(k)$ .

$$I(k) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} I(\Delta x) e^{ik\Delta x} d(\Delta x)\quad (3.2)$$

Ein so gemessenes Spektrum enthält neben spektroskopischen Informationen über die Probe auch das spektrale Profil der Lichtquelle [13, 44].

Im Verlauf dieser Arbeit wird in Bezug auf Messungen von *scans* gesprochen. Ein *scan* bezeichnet dabei eine vollständige Bewegung des Spiegels in eine Richtung, so dass ein vollständiges Interferogramm vorliegt. Zur Verbesserung der Gesamtintensität und damit des SNR wird über viele *scans* gemittelt.



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung des Prinzips der Relativmessung.

(a) Räumlich getrennte Messpositionen für Probe und Referenz.

(b) Referenz- und Probenspektrum werden an der selben Position aufgenommen, Veränderungen im Spektrum kommen durch Veränderungen in der Probe selbst zustande. Diese Art der Messung wird *in situ* genannt.

### 3.1.2 Relativmessungen

Das spektrale Profil der Lichtquelle ist im Falle des verwendeten Globars ein Schwarzkörperspektrum, welches von diversen Umgebungseinflüssen beeinflusst wird. Um diese und andere Störquellen, wie etwa Absorption im Strahlengang aus dem Spektrum zu entfernen, lassen sich Relativmessungen durchführen.

Das Prinzip ist in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt. Zusätzlich zu dem eigentlich zu messenden Spektrum  $T_{\text{probe}}(\omega)$  wird dafür noch ein Referenzspektrum  $T_{\text{ref}}(\omega)$  aufgenommen. Durch Division dieser Spektren werden alle konstanten spektralen Bestandteile ausgelöscht.

$$T_{\text{rel}}(\omega) = \frac{T_{\text{probe}}(\omega)}{T_{\text{ref}}(\omega)} \quad (3.3)$$

Ein spezieller Fall dieser Messungen sind *in situ* Messungen. Hierbei werden Proben und Referenzmessung an der selben Stelle durchgeführt, die Probe selbst wird zwischen den Messungen verändert (Abb. 3.2b).

Aus Gründen der Eindeutigkeit wird im Verlauf dieser Arbeit die Bezeichnung „relativ“ für räumlich getrennte Proben- und Referenzmessung verwendet. Zeitlich variierte Messungen werden mit „Änderung der ...“ (engl.: „*change in ...*“) bezeichnet.

### 3.1.3 Grundlinienkorrektur

Bei FTIR-Messungen, wie auch bei vielen anderen analytische Messmethoden, sind die untersuchten Signale häufig mit einer Grundlinie überlagert, wodurch die

### 3 Experimentelle Grundlagen

quantitative Analyse des Systems erschwert wird. Eine im Rahmen dieser Arbeit besonders wichtige Grundlinie ist die Resonanzkurve der Nanoantennen (vgl. 2.3.2).

Eine reproduzierbare Möglichkeit zur Grundlinienkorrektur bietet die Methode der asymmetrischen kleinsten Quadrate (AsLS, von engl.: *asymmetric least squares*) von P. EILERS [45]. Bei diesem Verfahren wird eine Grundlinie  $\vec{z}$  an die Messwerte  $\vec{y}$  angepasst, indem der Ausdruck

$$S = \sum_i w_i (y_i - z_i)^2 + \lambda \sum_i (\Delta^2 z_i)^2, \quad w_i = \begin{cases} p & \text{für } y_i > z_i \\ 1 & \text{für } y_i = z_i \\ 1 - p & \text{für } y_i < z_i \end{cases} \quad (3.4)$$

minimiert wird. Der erste Term entspricht der Anpassung der Grundlinie an die Messwerte. Der Parameter  $p$  ( $0 \leq p \leq 1$ ) erlaubt dabei eine stärkere Gewichtung von Abweichungen der Grundlinie von der gemessenen Kurve nach oben ( $p > 0,5$ ) bzw. unten ( $p < 0,5$ ). Diese asymmetrische Behandlung erlaubt die geringere Beachtung von *peaks* bei der Anpassung der Grundlinie.

Der zweite Term in (3.4) glättet die Grundlinie  $\vec{z}$ , dabei sind die Differenzen zweiter Ordnung  $\Delta^2 z_i = (z_i - z_{i-1}) - (z_{i-1} - z_{i-2})$  das Maß für die Rauigkeit von  $\vec{z}$ .  $\lambda$  ist ein Skalierungsfaktor, welcher die relative Gewichtung der beiden Terme bestimmt. Die Grundlinie ist bei einer festen Anzahl von Iterationen durch die beiden Parameter  $p$  und  $\lambda$  eindeutig bestimmt.

Zusätzlich besteht bei der Grundlinienkorrektur die Möglichkeit, bestimmte Spektralbereiche von der Anpassung auszunehmen, indem dort  $w_i = 0$  gesetzt wird. So entsteht eine glatte Weiterführung der Grundlinie, welche beliebig von den Messwerten abweichen kann [46].

#### 3.1.4 Infrarotspektroskopische Mikroskopie

Für die SEIRS-Messungen in dieser Arbeit wurde ein kommerzielles IR-Mikroskop (BRUKER HYPERION 1000) verwendet, welches sowohl in Transmission als auch in Reflexionsgeometrie arbeiten kann.

Zu diesem Zweck wird der durch das Interferometer modulierte Strahl eines FTIR-Spektrometers (BRUKER TENSOR 27) in das Mikroskop gekoppelt. Mit Hilfe eines Schwarzschildobjektivs<sup>3</sup> (Kondensator) wird der Strahl in einer Ebene fokussiert. Ein weiteres, identisches Schwarzschildobjektiv (Objektiv) fängt den Strahl ein. Zudem übernimmt das Objektiv in Reflexionsgeometrie zusätzlich die Funktion

---

<sup>3</sup>Schwarzschildobjektive verwenden eine Spiegelanordnung anstelle von Linsen, da letztere den IR-Strahl absorbieren würden.

des Kondensors. Die verwendeten Objektive haben eine 36-fache Vergrößerung, der Einstrahlwinkel beträgt  $10,3^\circ - 30^\circ$  [22].

Ein in XYZ-Richtung verstellbarer Probenstisch ermöglicht die genaue Positionierung (bis auf  $1\ \mu\text{m}$  in XY) der Probe im Fokus des Strahls. Zur Betrachtung der Probe verfügt das Mikroskop zudem über eine Lichtquelle im sichtbaren Spektralbereich, sowie eine CCD-Kamera, mit welcher sich die verwendeten Nanoantennen auflösen lassen. Kreisförmige Lochblenden ober- und unterhalb des Probenstischs erlauben die Einstellung des betrachteten Probenbereichs, Einschübe für Polarisatoren sind sowohl vor (Polarisator) als auch hinter der Probe (Analysator) vorhanden.

Die Detektion der Strahlung erfolgt über einen Quecksilber-Cadmium-Tellur-Detektor (MCT-Detektor, von engl.: *mercury cadmium telluride*). Der Halbleiter  $\text{Hg}_{0,8}\text{Cd}_{0,2}\text{Te}$  weist bei 77 K eine Bandlücke von 0,1 eV auf, was  $\sim 800\ \text{cm}^{-1}$  entspricht. Die gemessene Änderung der Leitfähigkeit des Halbleiters ist proportional zur Einfallenden Lichtintensität [47–49].

## 3.2 Proteine

Die Kapitel 4 und 5 behandeln antennenverstärkte Spektroskopie von Proteinen. Dieser Abschnitt bietet zunächst eine kurze Einführung<sup>4</sup> in deren Molekularstruktur und das daraus resultierende Vibrationsspektrum (vgl. Abschnitt 2.3.1). Besonders hervorgehoben ist die Rückgratstruktur von Proteinen und die in den folgenden Kapiteln untersuchten Amid I und Amid II Vibrationsbanden (3.2.1). Abschnitt 3.2.2 befasst sich mit dem untersuchten Protein Rinderalbumin.

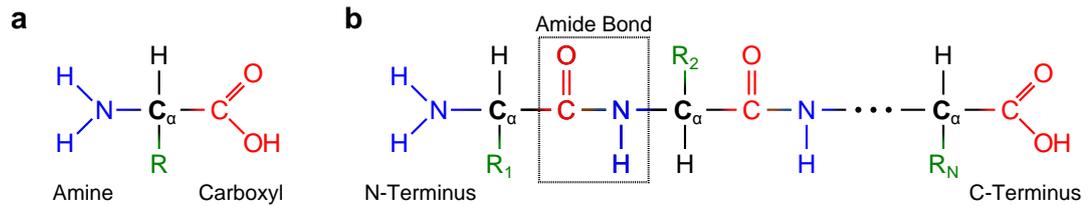
### 3.2.1 Struktur und Vibrationsspektrum von Proteinen

Alle Proteine bestehen aus einer langen Kette unterschiedlicher  $\alpha$ -Aminosäuren. Dabei handelt es sich um Moleküle, die sowohl eine Amin- ( $-\text{NH}_2$ ) als auch eine Carboxylgruppe ( $-\text{COOH}$ ) aufweisen. Carboxylgruppen wirken aufgrund der einfachen Proton-Dissoziation als Säure. Bei den sogenannten  $\alpha$ -Aminosäuren sind diese funktionalen Gruppen, wie in Abbildung 3.3a dargestellt, direkt benachbart, das verbindende Kohlenstoffatom wird mit  $\text{C}_\alpha$  bezeichnet. Die anderen zwei Bindungen des  $\text{C}_\alpha$ -Atoms sind durch ein Wasserstoffatom, sowie eine für die Aminosäure charakteristische Restgruppe R besetzt. So entspricht z.B. die Restgruppe  $-\text{CH}_3$  der Aminosäure Alanin,  $-\text{CH}_2-\text{SH}$  dem Cystein und  $-\text{CH}_2-\text{OH}$  dem Serin. Insgesamt kommen in natürlichen Proteinen 21 solcher Aminosäuren vor<sup>5</sup>, diese bezeichnet man als proteinogen.

<sup>4</sup>Für eine ausführlichere Beschreibung sei an dieser Stelle an die Fachliteratur verwiesen [50, 51].

<sup>5</sup>Viele Lehrbücher sprechen von hier von 20, die 21. Aminosäure ist das erst kürzlich entdeckte Seleno-Cystein ( $-\text{CH}_2-\text{SeH}$ ) [52].

### 3 Experimentelle Grundlagen



**Abbildung 3.3:** Vereinfachte Strukturformel von  $\alpha$ -Aminosäuren und Peptidketten (Proteinen).

(a) Eine  $\alpha$ -Aminosäure besteht aus einer Amin- ( $-\text{NH}_2$ , blau), einer Carboxyl- ( $-\text{COOH}$ , rot) und einer organischen Restgruppe (R, grün), welche alle an einem Zentralen Kohlenstoffatom ( $\text{C}_\alpha$ ) hängen.

(b) In einer Peptidkette sind viele (unterschiedliche)  $\alpha$ -Aminosäuren (Restgruppen  $\text{R}_i$ ) durch eine Reaktion der Amin- und Carboxylgruppen aneinandergelagert. Die so entstehende Bindung nennt man Peptid- oder Amid-Bindung. Die Restgruppen der Aminosäuren bilden die Seitenketten des Makromoleküls, sie sind alternierend angeordnet. Das Amino-Ende der Kette wird als N-Terminus, das Carboxylende als C-Terminus bezeichnet.

Unter Abspaltung von Wasser und Zufuhr von Energie lassen sich Amin- und Carboxylgruppen verschiedener Aminosäuren kovalent verbinden, die entstehende Bindung nennt man *trans*-Peptid-, oder auch Amid-Bindung. Auf diese Weise lässt sich eine größere Menge Aminosäuren zu einer unverzweigten Kette verbinden, wie sie schematisch in Abbildung 3.3b dargestellt ist. Die sogenannten Peptidketten bestehen aus einem periodischen Rückgrat  $-\text{C}_\alpha-\text{CO}-\text{NH}-$ , welches sich etwa alle  $3,5 \text{ \AA}$  wiederholt. Die Restgruppen der beteiligten Aminosäuren bleiben unverändert, und bilden die Seitenketten des Makromoleküls.

Peptidketten aus bis zu 10 Aminosäuren-Monomeren werden als Oligopeptide bezeichnet, bei bis 100 Monomeren spricht man von Polypeptiden. Proteine oder auch Makropeptide sind hingegen aus über 100 Aminosäuren-Monomeren aufgebaut, teilweise auch über 1000.

#### Konformation von Proteinen

Neben der beschriebenen Primärstruktur, die vollständig über die Reihenfolge der Aminosäuren definiert ist, besitzen Proteine höhergeordnete räumliche Strukturen, deren Form auf die Primärstruktur zurück zu führen ist. Diese Strukturen, auch als Konformation bezeichnet, können in Sekundär-, Tertiär-, und Quartärstruktur unterteilt werden.

Sie sind Folge von Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten des Proteins, etwa der Van-der-Waals-Interaktion, Wasserstoffbrücken oder auch Disulfidbrücken

**Tabelle 3.1:** Vibrationsbanden der Amid-Bindungen im Protein-Rückgrat [53].

Schwingung	Art der Schwingung <sup>a</sup>	Frequenz [cm <sup>-1</sup> ]	Intensität
Amid III	N–H-Beugung in Ebene und C–N-Streckung (in Phase)	1200 – 1400	mittelstark
Amid II	N–H-Beugung in Ebene und C–N-Streckung (außer Phase)	~1550	stark
Amid I	C=O-Streckung	~1650	sehr stark
Amid B	N–H-Streckung	3030 – 3100	schwach
Amid A	N–H-Streckung	3270 – 3310	mittelstark

<sup>a</sup>Jeweils größter Beitrag zur Schwingung.

(nur Cystein–Cystein). Typische Sekundärstrukturen sind die  $\alpha$ -Helix, bei der die Seitenketten radial nach außen gerichtet sind, oder das  $\beta$ -Faltblatt. Die Tertiärstruktur wird durch die relative Lage der Sekundärstrukturen (Domänen) zueinander definiert. Die Konformation bestimmt die Funktionalität des Proteins.

Bei der Quartärstruktur handelt es sich um den Zusammenschluss mehrerer Proteine zu einem funktionalen Ganzen. So ist beispielsweise Hämoglobin ein Tetramer aus je zwei unterschiedlichen Makropeptiden. Nicht alle Proteine weisen eine Quartärstruktur auf.

### Vibrationsbanden von Proteinen

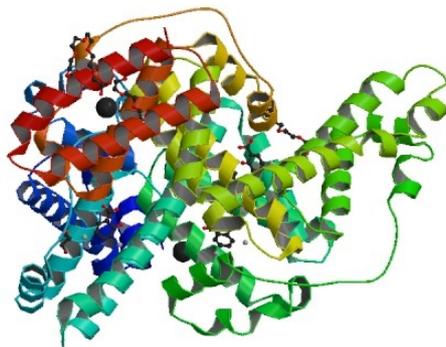
Aufgrund der großen Anzahl beteiligter Atome weisen Proteine für gewöhnlich zehntausende von Vibrationsfreiheitsgraden auf. Durch das oben beschriebene strenge Aufbauschema und die hohe Wiederholrate gleicher Strukturen wird die Anzahl der Vibrationsbanden auf einige wenige reduziert. Besonders dominant sind dabei die Vibrationsbanden der Rückgratstruktur, sie sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Eine Übersicht über die Vibrationsbanden der proteinogenen Aminosäuren-Seitenketten findet sich u.a. in [54].

Im Verlauf dieser Arbeit werden die starken Amid I und Amid II-Banden untersucht. Bei der Amid I-Bande um  $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$  handelt es sich hauptsächlich um die Streckerschwingung der C=O-Bindung. Weitere, kleinere Anteile der Vibrationsmode sind die gegenphasige C–N Streckung,  $C_\alpha$ –C–N Deformation und die N–H Beugung in der Ebene [54].

Die Amid II-Bande bei  $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$  ist die gegenphasige Kombination der N–H Beugung in der Ebene und der C–N Streckung. Zusätzlich gibt es kleine Beiträge durch C–O Beugung und Streckung von  $C_\alpha$ –C sowie N– $C_\alpha$  [54].

Beide Vibrationsbanden sind weitestgehend unabhängig von der Art der Seitenketten des Proteins. Verschiedene Sekundärstrukturen weisen jedoch deutliche Unterschiede in der Amid I auf. So liegt diese im antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts bei  $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$ , mit einer schwächeren Nebenbande bei  $\sim 1685\text{ cm}^{-1}$ . In einer  $\alpha$ -Helix liegt sie bei  $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$ . Proteine, welche Domänen mit unterschiedlichen Sekundärstrukturen aufweisen, zeigen dementsprechend verschiedene Komponenten in den Amidbanden [54].

#### 3.2.2 Rinderalbumin (BSA)



**Abbildung 3.4:** Darstellung des Proteins BSA. Die Sekundärstruktur besteht vorwiegend aus  $\alpha$ -Helices, die hier dargestellte Tertiärstruktur besteht aus drei Domänen.

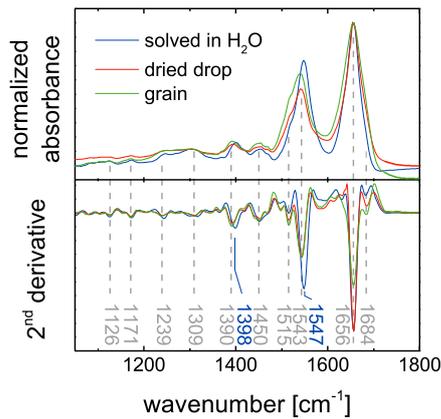
Bild aus RCSB PDB ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)), PDB ID: 4JK4 [55].

Rinderalbumin (BSA, von engl.: *bovine serum albumin*) ist das häufigste Protein des Rinderserums und ist für den Transport hydrophober Stoffe im Blutkreislauf zuständig. Das Protein besteht aus 581 Aminosäuren und hat eine Masse von  $67\text{ kDa}$ <sup>6</sup>. Die Sekundärstruktur ist großteils  $\alpha$ -helikal, die Tertiärstruktur ist herzförmig, mit drei ausgeprägten Domänen (vgl. Abb. 3.4). Dabei weisen die hydrophoben Endgruppen nach Innen und bilden Taschen. Nach außen hin ist das Protein hydrophil, was eine hohe Beweglichkeit in wässrigen Lösungen (Blutplasma) zur Folge hat .

BSA wird häufig für wissenschaftliche Zwecke verwendet, z.B. zur Kalibration von Testverfahren in der Immunologie. Des Weiteren wird BSA verwendet, um unspezifische Bindungen anderer Moleküle auf Kunststoffoberflächen (z.B. von Mikrotiterplatten) zu verhindern [56–58].

Vibrationsspektren von BSA in gelöster und trockener Form sind in Abbildung 3.5 gezeigt, zur besseren Zuordnung der Frequenzen der Absorptionsbanden ist zusätzlich die zweite Ableitung der Spektren gezeichnet. Die Amid I und II Banden sind deutlich bei  $1656\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $1543\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten, wobei letztere in Lösung leicht zu  $1547\text{ cm}^{-1}$  verschoben ist.

<sup>6</sup>1 Da (Dalton) entspricht in etwa der Masse eines Wasserstoffatoms und wird auch als atomare Masseneinheit bezeichnet.



**Abbildung 3.5:** Normierte Absorbanzspektren von BSA in gelöster und trockener Form, sowie deren zweite Ableitung (geglättet mit 25 Punkten). Die Zahlenwerte geben die Frequenzen der Absorptionsbanden an, in Lösung verschobene Peaks sind zusätzlich in blau eingezeichnet. Aus [14].

Als Lösungsmittel für BSA wird im Verlauf dieser Arbeit phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, von engl.: *phosphate buffered saline*) verwendet. Dabei handelt es sich um eine Lösung von Kochsalz (NaCl), Kaliumchlorid (KCl) und Phosphaten ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) in Wasser. PBS ist isotonisch und hat einen pH-Wert von 7,4. Im Rahmen dieser Arbeit werden Lösungen von BSA in PBS als wässrig bezeichnet.

### 3.3 Infrarot-optische Eigenschaften von Wasser

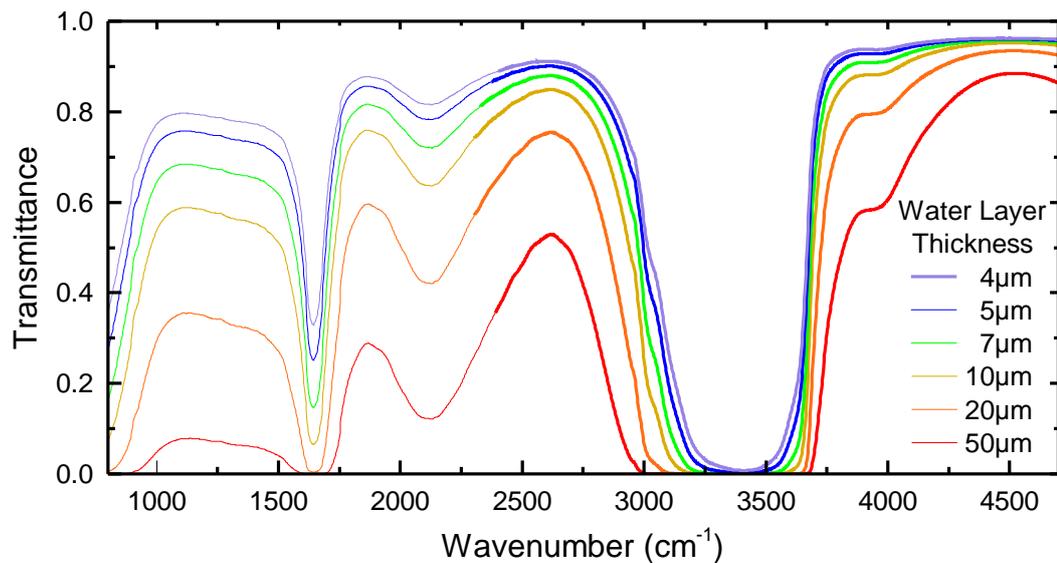
Im Verlauf dieser Arbeit wurden SEIRS-Messungen von Molekülen in wässrigen Lösungen durchgeführt. Wasser ist selbst ein starker Absorber im infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums, in Tabelle 3.2 sind die Absorptionsbanden und ihre relativen Intensitäten aufgeführt. Aus den starken Absorptionslinien ergeben sich zwei Auswirkungen auf die durchgeführten Messungen, welche im Folgenden erläutert werden.

**Tabelle 3.2:** Vibrationsbanden von Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) und schwerem Wasser ( $\text{D}_2\text{O}$ ) in flüssigem Zustand im Bereich von  $1000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  [59, 60].

Schwingung	Frequenz [ $\text{cm}^{-1}$ ]		Intensität <sup>a</sup>	
	$\text{H}_2\text{O}$	$\text{D}_2\text{O}$	$\text{H}_2\text{O}$	$\text{D}_2\text{O}$
Biegeschwingung	1639	1206	0,47	0,50
Kombination Biegeschwingung und Libration	2134	—	0,09	—
Symmetrische Streckung	3261	2407	0,94	1,00
Antisymmetrische Streckung	3351	2476	1,00	1,13

<sup>a</sup>Absorbanz, normiert auf antisymmetrische Streckschwingung.

### 3 Experimentelle Grundlagen



**Abbildung 3.6:** Transmissionsspektren von Wasser für verschiedene Schichtdicken, berechnet mit SCOUT [9]. Eine Zuordnung der Absorptionsbanden findet sich in Tabelle 3.2. Im Bereich der Amid I-Vibration von Proteinen um  $1650\text{ cm}^{-1}$  (vgl. Tab. 3.1) fällt die Transmission stark ab. Für eine Transmittivität von über 20% sind Schichtdicken von weniger als  $7\text{ }\mu\text{m}$  nötig.

Zunächst ist die Absorption selbst zu beachten. Abbildung 3.6 zeigt berechnete Infrarot-Transmissionsspektren von dünnen Wasserschichten im Vakuum bei senkrechtem Einfall. Im Bereich der Streckschwingungen ( $\sim 3200 - 3600\text{ cm}^{-1}$ ) wird auch bei sehr geringen Schichtdicken fast kein Licht transmittiert. Auch bei der Biegeschwingung ( $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ ) fällt die Transmission stark ab. Für ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist eine möglichst hohe Intensität nötig, für IR-Transmissionmessungen der Amidbanden ( $1550 - 1650\text{ cm}^{-1}$ , vgl. Abschnitt 3.2.1) sollte die Schichtdicke daher unter  $10\text{ }\mu\text{m}$  liegen.

Weiterhin ist zu beachten, dass die Wassermoleküle in unmittelbarer Nähe der Nanoantennen an deren Nahfeld koppeln können. Dies kann wie bei Absorbatmolekülen zu SEIRS-Effekten der Wasserabsorptionsbanden führen, wenn die Resonanzfrequenz der Antennen ähnlich der Vibrationsenergie ist.

Eine mögliche Alternative zur Umgehung dieser Schwierigkeiten ist die Messung in Reflexionsgeometrie, bei der die Eindringtiefe des detektierten Lichts ebenfalls im Bereich von wenigen Mikrometern liegt [37].

### 3.3 Infrarot-optische Eigenschaften von Wasser

Die Verwendung von schwerem Wasser (Deuteriumoxid,  $D_2O$ ) stellt eine weitere Alternative dar. Aufgrund der größeren Masse der beteiligten Wasserstoffatome verfügt  $D_2O$  über geringere Vibrationsenergien. Die Biegeschwingung von  $D_2O$  liegt bei  $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ , die Streckschwingungen bei  $\sim 2400 - 2500\text{ cm}^{-1}$  (vgl. Tab. 3.2). Dadurch wird einerseits die Transmittivität der Wasserschicht in der Nähe der Amidbanden erhöht. Außerdem lässt sich bei Verwendung schweren Wassers die Überlagerung der Wasserbanden mit den Vibrationen des Proteinrückgrats vermeiden.



## 4 SEIRS-Messungen wässriger Lösungen in Reflexionsgeometrie

In diesem Kapitel werden die *in situ* SEIRS-Messungen wässriger Lösungen in Reflexionsgeometrie vorgestellt. Dabei wird ein breiter Flüssigkeitskanal auf der Oberseite durch einen  $\text{CaF}_2$ -Wafer abgeschlossen, auf dessen Unterseite Nanoantennen befestigt sind. Das durch die Adsorbatmoleküle modifizierte Streulicht der Antennen wird detektiert.

Diese Art der Messung ist weitgehend unabhängig von der Dicke der Wasserschicht, eine mikrofluidische Zelle wird daher für die Messungen nicht benötigt.

Abschnitt 4.1 beschreibt die Flüssigkeitszelle, die für diese Messungen verwendet werden. Untersuchungen zur Reflektivität der Proben werden in Abschnitt 4.2 vorgestellt. *In situ* SEIRS-Messungen von BSA in Reflexionsgeometrie sind in Abschnitt 4.3 zu finden. Abschnitt 4.4 geht auf Verbesserungsmöglichkeiten zur Detektion des Streulichts von Antennen-*arrays* ein.

### 4.1 Flüssigkeitszelle zur Messung in Reflexionsgeometrie

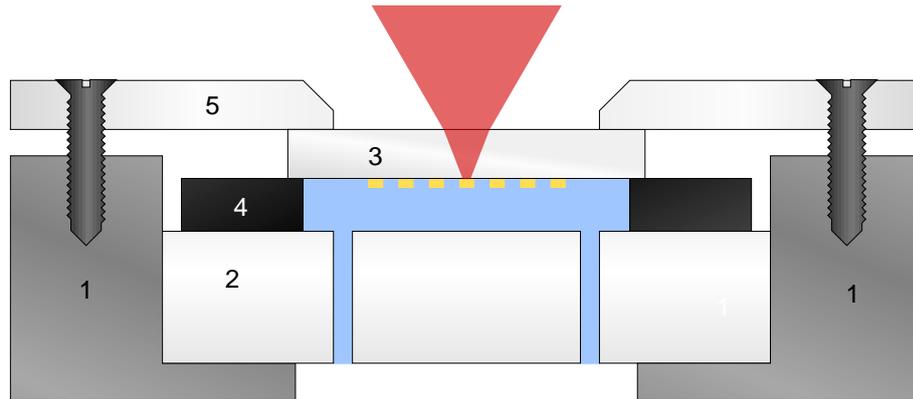
Der Aufbau der für die Reflexionsmessungen in diesem Kapitel verwendeten Flüssigkeitszelle ist in Abb. 4.1 schematisch dargestellt.

Hauptbestandteil der Zelle ist ein an zwei Stellen durchbohrter Teflon<sup>1</sup>-Block, welcher in das Aluminiumgehäuse eingebettet ist. Die Bohrlöcher verfügen auf der Unterseite über 1/4"-28 Gewindeanschlüsse für den Anschluss der Zu- und Ableitungsschläuche. Teflon ist ein leicht zu reinigendes und chemisch inertes Material, welches einfach zu verarbeiten ist. Auf dem Block wird ein Abstandshalter aus Viton<sup>2</sup> von etwa 1 mm Dicke platziert, welcher den Flüssigkeitskanal von vier Seiten begrenzt. Auf diesem Abstandshalter wird ein  $\text{CaF}_2$ -Wafer mit Nanoantennen platziert, so dass sich die Golddrähte im Inneren des Kanals befinden. Zur

---

<sup>1</sup>Polytetrafluorethylen (PTFE), Markenname der Fa. DUPONT.

<sup>2</sup>Fluorkautschuk (FPM), Markenname der Fa. DUPONT.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der verwendeten Reflexions-Flüssigkeitszelle als Schnittansicht.

- (1) Gehäuse aus Aluminium zur Platzierung im Mikroskop.
- (2) Gebohrter Teflon-Block mit Anschlüssen für externe Schläuche.
- (3)  $\text{CaF}_2$ -Wafer ( $10 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$ ) mit Nanoantennen.
- (4) Viton-Folie mit ausgestanzter Aussparung für den Flüssigkeits-Kanal.
- (5) Abdeckung aus Plexiglas zur Fixierung des Antennenwafers.

Fixierung wird eine Plexiglas-Deckplatte mit dem Aluminiumgehäuse verschraubt. Der IR-Strahl trifft durch eine Aussparung in der Mitte dieser Platte direkt auf den Antennenwafer.

Der Flüssigkeitskanal ist näherungsweise elliptisch ( $a = 11 \text{ mm}$ ,  $b = 6 \text{ mm}$ ), das Gesamtvolumen beträgt etwas weniger als  $0.2 \text{ ml}$ .

Da die Anschlüsse der Reflexionszelle unterhalb des Kanals angebracht sind, muss der Kondensator des Mikroskops (vgl. Abschnitt 3.1.4) ausgebaut werden, um Messungen durchzuführen. Des Weiteren ist die Haftreibung der Anschlusschrauben im Teflonblock sehr gering, so dass eine zusätzliche Fixierung der Anschlüsse notwendig ist, um ein Herausdrehen der Schrauben zu verhindern.

#### 4.1.1 Befüllen der Flüssigkeitszelle

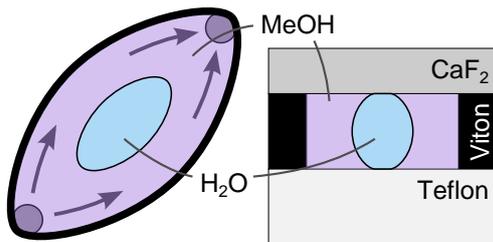
Zum Betrieb der Zelle wird eine peristaltische Pumpe<sup>3</sup> (REGLO DIGITAL ISM 597, ISMATEC) verwendet. Um Verunreinigungen in den Messungen zu verhindern, wird die Pumpe im Ablauf der Zelle platziert. Der Zulauf wird so kurz wie möglich gehalten, um die benötigten Flüssigkeitsmengen gering zu halten.

<sup>3</sup>Bei einer peristaltischen (Schlauch-) Pumpe wird durch zyklisches mechanisches Verformen eines Schlauchs ein Druckgradient gebildet.

## 4.2 Reflexion von Nanoantennen an Luft und in Wasser

Luftbläschen, welche sich häufig beim Befüllen der Zelle bilden, lassen sich nur mit mehrfacher Änderung der Durchflussrichtung und hoher Flussrate entfernen. Dadurch können bei der ersten Befüllung der Zelle mehrere Milliliter des Mediums nötig sein. Teilweise ist sogar ein Verkippen der Zelle notwendig, eine exakte Repositionierung zum Spektrenvergleich ist dabei nur sehr schwer möglich.

Beim Wechsel des Mediums in der Zelle empfiehlt es sich daher, zunächst wenige Mikroliter entgegen der eigentlichen Flussrichtung zu pumpen, um sicherzustellen, dass der Zulauf vollkommen frei von Luftbläschen ist.



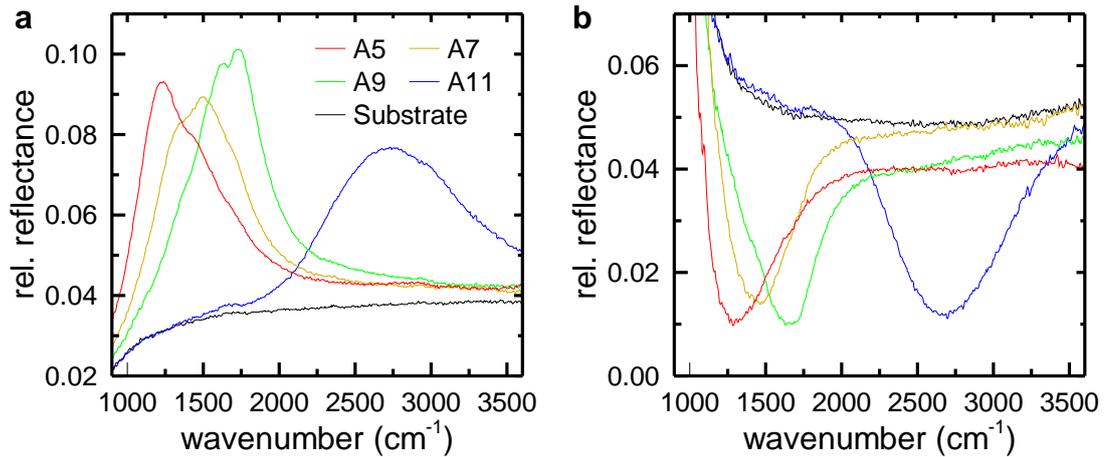
**Abbildung 4.2:** Schematische Skizze zum Wechsel der Flüssigkeit in der Reflexionszelle von Wasser zu Methanol (MeOH), dargestellt von oben (links) und als Schnittansicht (rechts). Im Zentrum der Zelle bildet sich bei geringer Flussrate eine Wasserblase.

Ähnliche Probleme wurden beim direkten Austausch der untersuchten Flüssigkeit beobachtet. Wird Methanol in die mit Wasser gefüllte Zelle gepumpt, so sind ringförmig um die Zellenmitte regenbogenartige Dünnschichtinterferenzmuster zu beobachten. Weiteres Pumpen mit niedriger Flussrate lässt die Interferenzen weitestgehend unverändert. Der Methanol fließt am weniger hydrophoben Zellenrand entlang und stabilisiert dadurch die Wasserblase in der Zellenmitte. Erst durch wiederholtes Pumpen bei hoher (maximaler) Flussrate lässt sich die Zelle vollständig mit Methanol füllen.

## 4.2 Reflexion von Nanoantennen an Luft und in Wasser

Das Messprinzip der Reflexionszelle sieht vor, das von den Antennen auf der Waferunterseite gestreute Licht zu detektieren. Zu diesem Zweck wurde die Reflektivität der Proben der Reihe S08 (vgl. A.1.1) an Luft und mit Wasser in der Reflexionszelle untersucht.

Messungen von J. ZIMMERMANN an der Probe S08#1 haben gezeigt, dass die Intensität des detektierten Lichts an der Antennenresonanz im Vergleich zum Substrat abnimmt, wenn sich die Antennen an der Waferunterseite befinden. Auf der Waferoberseite ist hingegen eine Verstärkung des Signals zu beobachten. In beiden Fällen wurde das  $\text{CaF}_2$ -Substrat als Referenz verwendet, so dass keine Informationen zur Gesamtintensität des Signals vorliegen [61].



**Abbildung 4.3:** Reflexionsspektren verschiedener Antennenarrays (vgl. Tab. A.1.1), sowie des reinen Substrats, der Probe S08#2, relativ zur Reflexion des Goldspiegels auf der Probe (je 1000 *scans*, 8 cm<sup>-1</sup> Auflösung).

(a) Antennen und Spiegel auf der Oberseite des Wafers.

(b) Antennen und Spiegel auf der Unterseite des Wafers.

Bei Antennen in der mit Wasser gefüllten Reflexionszelle ist es nicht sinnvoll die Referenz auf dem Substrat zu messen. Aufgrund der ähnlichen Brechungsindizes von CaF<sub>2</sub> ( $n=1,41$ ) und Wasser ( $n \approx 1,31$ ) ist die Reflektivität der CaF<sub>2</sub>-Wasser-Grenzschicht sehr gering. Des weiteren führen die Absorptionsbanden von Wasser zu einer starken spektralen Abhängigkeit der Reflektivität.

Aus diesem Grund wurde eine Ecke der Probe S08#2 mit einem Goldspiegel versehen, welcher zur Aufnahme des Referenzspektrums verwendet wurde.

Die  $\sim 200$  nm dicke Goldschicht wurde mittels Sputterdeposition<sup>4</sup> aufgebracht, wobei zur besseren Haftung der Goldatome auf dem Substrat eine Titan-Haftsicht von  $\sim 10$  nm verwendet wurde.

Reflexionsmessungen an Luft von verschiedenen *arrays*, sowie des reinen Substrats, der Probe S08#2 an der Ober- bzw. Unterseite des Wafers sind in Abbildung 4.3 dargestellt (jeweils 1000 *scans*, 8 cm<sup>-1</sup> Auflösung). Die Referenz wurde mittig auf dem Goldspiegel gemessen.

<sup>4</sup>Bei der Sputterdeposition lagern sich Atome auf dem Substrat an, die zuvor durch Ionenbeschuss aus einem Festkörper (*target*) gelöst werden [62].

## 4.2 Reflexion von Nanoantennen an Luft und in Wasser

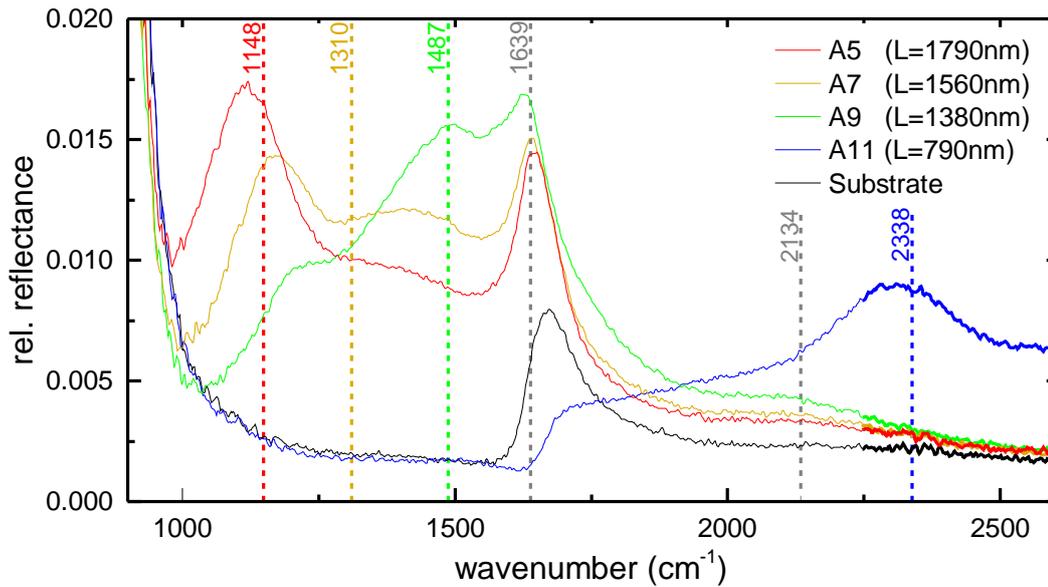
In Übereinstimmung mit [61] zeigt die Plasmonenresonanz der Antennen auf der Oberseite nach oben, die Reflektivität beträgt bis zu 10% des am Goldspiegel reflektierten Lichts. Dabei liegt der Beitrag des Substrats bei etwa 3,5%, mit einem starken Abfall unterhalb von  $1500\text{ cm}^{-1}$ .

Auf der Waferunterseite (4.3b) führt die Antennenresonanz zu einer Verringerung der Intensität von etwa 5% (Anteil des  $\text{CaF}_2$ -Wafers) auf 1%. Dies liegt daran, dass die Antennen im Vergleich zum Substrat ein optisch dichtere Medium darstellen. Licht, welches an den Antennen gestreut wird (im Folgenden „gestreutes Licht“), weist folglich einen Phasensprung von  $180^\circ$  im Vergleich zum Einfallenden Licht auf. Licht, welches von der  $\text{CaF}_2$ -Luft-Grenzschicht reflektiert wird („reflektiertes Licht“), behält hingegen seine ursprüngliche Phase. Infolgedessen interferieren gestreutes und reflektiertes Licht destruktiv miteinander, was zu einer Verringerung der Intensität an der Resonanzposition führen kann, wenn der Anteil des gestreuten Lichts kleiner ist als der Anteil des reflektierten.

Bei Reflexion an der Oberseite des Wafers ist dieser Effekt nicht zu beobachten, da in diesem Fall auch das am Substrat reflektierte Licht einen Phasensprung von  $180^\circ$  aufweist. Somit ist die Interferenz konstruktiv. Neben den Messungen an Luft wurde die relative Reflexion von *arrays* und Substrat gegen den Goldspiegel auch in der mit Wasser gefüllten Reflexionszelle vermessen (jeweils 1000 *scans*, Auflösung  $8\text{ cm}^{-1}$ ). Die entsprechenden Spektren sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Die farbig gestrichelt markierten Resonanzfrequenzen in Wasser wurden unter Verwendung von (2.25) sukzessiv aus den entsprechenden Frequenzen in Luft (vgl. A.1.1) berechnet, wobei ( $|\omega_{i+1} - \omega_i| < 0.01\text{ cm}^{-1}$ ) als Konvergenzkriterium verwendet wurde.

Anders als bei Reflexionsmessungen der Antennen der Reihe S08 auf der Waferunterseite an Luft, tritt hier im Resonanzfall eine deutliche Verstärkung auf. Dies ist Folge der abgeschwächten Reflexion an der  $\text{CaF}_2$ -Wasser-Grenzschicht im Vergleich zu  $\text{CaF}_2$ -Luft. Abseits der Wasserabsorption liegt die Reflektivität des Substrats bei lediglich etwa 0.25%. Aufgrund dieser Verringerung dominiert der Anteil des Lichts, welches von den Antennen gestreut wird, und es ist trotz der destruktiven Interferenz ein verstärktes Signal im Bereich der Antennenresonanzen zu beobachten. Jüngste Ergebnisse von A. HASENKAMPF bestätigen einen solchen Einfluss der relativen Intensitäten von gestreutem und reflektiertem Licht auf die Linienform der Antennenresonanz [63].

Dennoch liegt die Gesamtintensität selbst im Resonanzfall bei weniger als 2% des einfallenden Lichts, abseits der Resonanzen verschwindet der Beitrag der Antennen zum detektierten Signal fast vollständig.



**Abbildung 4.4:** Reflexionsspektren verschiedener Antennen-*arrays*, sowie des reinen Substrats, der Probe S08#2 in Wasser, relativ zur Reflexion des Goldspiegels auf der Probe (je 1000 *scans*,  $8\text{ cm}^{-1}$  Auflösung). Die farbigen gestrichelten Linien und Zahlen markieren die mit Gleichung (2.25) berechnete Resonanzfrequenz des jeweiligen *arrays* in Wasser (vgl. Tab. A.1.1). Die Absorptionsbanden von Wasser sind grau eingezeichnet.

Weiterhin zeigt Abbildung 4.4 einen starken Einfluss der Wasserabsorption auf die Linienform der Plasmonenresonanzen. Vor allem beim *array* A11 ist eine starke Fano-Kopplung an die Wasser-Beugeschwingung bei  $1639\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten. Im Bereich der Kombinationsschwingung ( $2134\text{ cm}^{-1}$ ) befindet sich eine plateauartige Struktur. Des Weiteren tritt bei allen *arrays* eine Absenkung der Reflexion um  $1300\text{ cm}^{-1}$  auf. Besonders deutlich ist dies bei A7 zu sehen, wo das Reflexionsmaximum stark von der Resonanzfrequenz der Antennen abweicht.

### 4.3 *In situ* Messungen von wässriger BSA-Lösung in Reflexionsgeometrie

Eine wichtige Charakteristik eines jeden Sensors ist die Detektionsgrenze (LOD, von engl.: *limit of detection*). Sie gibt die minimale nachzuweisende Konzentration des untersuchten Stoffes mit dem Sensor an. Zur Bestimmung des LOD von Proteinen *in situ* in der Reflexionszelle wurden SEIRS-Messungen von sukzessiv höher konzentrierten BSA-Lösungen durchgeführt.

### 4.3.1 Vorbereitung und Durchführung der Messung

Die Messungen wurden am Antennen-*array* A9 ( $L = 1380$  nm) der Probe S08#3 (vgl. A.1.1) durchgeführt. Vor Beginn der Messung wurden Verunreinigungen der Probe in einem Niederdruck-Sauerstoffplasma (PVA TEPLA TECHNICS 100-E, 0,2 mbar, 10 min, 150 W) entfernt. Die Reflexionszelle wurde zunächst bei hoher Flussrate mit PBS gespült. Die Reflexion des *arrays* in PBS wurde gemessen, diese Messung wurde in den darauf folgenden Messungen als Referenz verwendet. Anschließend wurden jeweils 0,5 ml BSA-Lösung bei einer Flussrate von 4 ml/min in die Zelle gepumpt, und die Transmission mit 100 *scans* und  $4 \text{ cm}^{-1}$  Auflösung gemessen. Die BSA-Konzentration<sup>5</sup> wurde vor jeder Messung sukzessiv erhöht, von  $1 \cdot 10^{-12}$  M,  $2 \cdot 10^{-12}$  M,  $5 \cdot 10^{-12}$  M,  $1 \cdot 10^{-11}$  M, ... bis hin zu  $1 \cdot 10^{-4}$  M.

Der Behälter mit der Lösung befand sich in unmittelbarer Nähe der Reflexionszelle, das Innenvolumen der Zuleitung beträgt etwa 0,1 ml. Infolgedessen waren die Türen des Spülkastens am Mikroskop während der gesamten Messungen geöffnet, um die Umgebungsluft möglichst stabil zu halten.

### 4.3.2 Ergebnisse

Abbildung 4.5a zeigt Reflexionsspektren der Nanoantennen für verschiedene Konzentrationen von BSA von  $10^{-9}$  M bis  $10^{-4}$  M, sowie für reines PBS. Als Referenzmessung wurde ein zweites PBS-Spektrum verwendet.

Auffällig ist zunächst der große Rauschhintergrund der Messungen. Im dargestellten Bereich von  $1300 - 1900 \text{ cm}^{-1}$  lässt sich das Rauschen zu

$$R_{\text{Ref}} = (4,8 \pm 0,2)\% \quad (4.1)$$

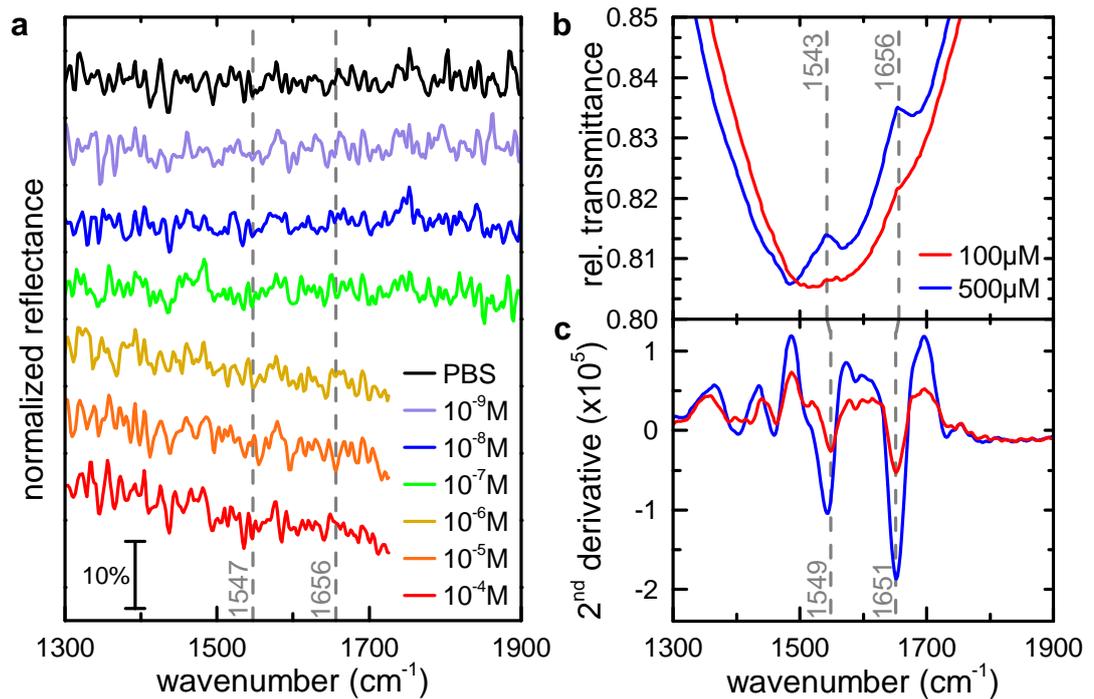
abschätzen, indem die halbe Differenz des maximalen und minimalen Werts betrachtet wird. Dabei wurde über die ersten vier Spektren in Abbildung 4.5a gemittelt. Das Rauschen ist eine direkte Folge der geringen Intensitäten bei Messungen in Reflexionsgeometrie.

Ab einer Konzentration von  $10^{-6}$  M ist eine breitbandige Abweichung von der 100%-Linie unterhalb von  $1750 \text{ cm}^{-1}$  zu beobachten. Die Abweichung für alle folgenden Spektren identisch, so dass davon auszugehen ist, dass es sich dabei um eine mechanische Verschiebung der Reflexionszelle handelt.

An den Positionen der Amidbanden ( $1547 \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $1656 \text{ cm}^{-1}$ ) sind auch bei genauer Betrachtung keine Veränderungen im Spektrum zu beobachten, die über das hohe Rauschniveau hinaus gehen.

---

<sup>5</sup>Die Konzentration von Lösungen wird in dieser Arbeit über ihre Molarität, d.h. Anzahl der Moleküle pro Liter der Lösung angegeben, als Einheit wird  $1 \text{ M} = 1 \text{ mol/l}$  verwendet.



**Abbildung 4.5:** Messungen zum Detektionslimit von BSA auf Nanoantennen *in situ* in Reflexionsgeometrie.

(a) Reflexionsspektren (100 *scans*, Auflösung 4 cm<sup>-1</sup>) des arrays A9 in wässrigen BSA-Lösungen für verschiedene BSA-Konzentrationen (sukzessiv erhöht) sowie reinem PBS, normiert auf die Reflexion der Antennen in reinem PBS. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Absorptionsbanden von BSA. Zur besseren Darstellung sind die Spektren gegeneinander verschoben, und nicht alle aufgenommenen Spektren dargestellt.

(b) Relatives Transmissionsspektrum (1000 *scans*, 4 cm<sup>-1</sup> Auflösung) des arrays A9 unmittelbar nach Abschluss der *in situ*-Messungen (rot), sowie relatives Transmissionsspektrum nach erneuter Inkubation in 500 μM BSA-Lösung für 20 min (blau).

(c) Zweite Ableitung der Spektren aus **b**. Die Zahlenwerte und gestrichelten Linien repräsentieren die Peakpositionen bei 100 μM (rot).

Zur Überprüfung der Adsorption von BSA auf den Antennen während der *in situ* Messungen wurde die Probe im Anschluss der Messung aus der Reflexionszelle ausgebaut, mit PBS und Wasser abgespült und mit Stickstoff getrocknet. Die Probe wurde ohne weitere Inkubation in BSA-Lösung *ex situ* vermessen, das Ergebnis ist als rote Kurve in Abbildung 4.5**b** dargestellt. Im relativen Transmissionsspektrum des Antennenarrays sind Fano-artige Aufwärts-Peaks zu beobachten.

Betrachtet man die zweite Ableitung der relativen Transmission (Abb. 4.5c), so lassen sich die Peakpositionen zu  $1549\text{ cm}^{-1}$  sowie  $1651\text{ cm}^{-1}$  bestimmen. Diese Werte weichen nur geringfügig von der Position der Amidbanden von BSA ( $1543\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $1656\text{ cm}^{-1}$ ) ab.

Nach Abschluss dieser Messung wurden die Antennen für weitere 30 min in  $500\text{ }\mu\text{M}$  BSA-Lösung inkubiert und anschließend erneut mit den selben Parametern vermessen. Das relative Transmissionsspektrum, sowie dessen zweite Ableitung sind in Abbildung 4.5b,c in blau dargestellt. Die Absorptionslinien beider Amidbanden sind deutlich stärker als zuvor. Die Form des Ableitungsspektrums stimmt mit dem ersten überein, so dass sich die Absorptionslinien eindeutig adsorbiertem BSA zuordnen lässt.

## 4.4 Erhöhung der gestreuten Intensität von Nanoantennen-arrays

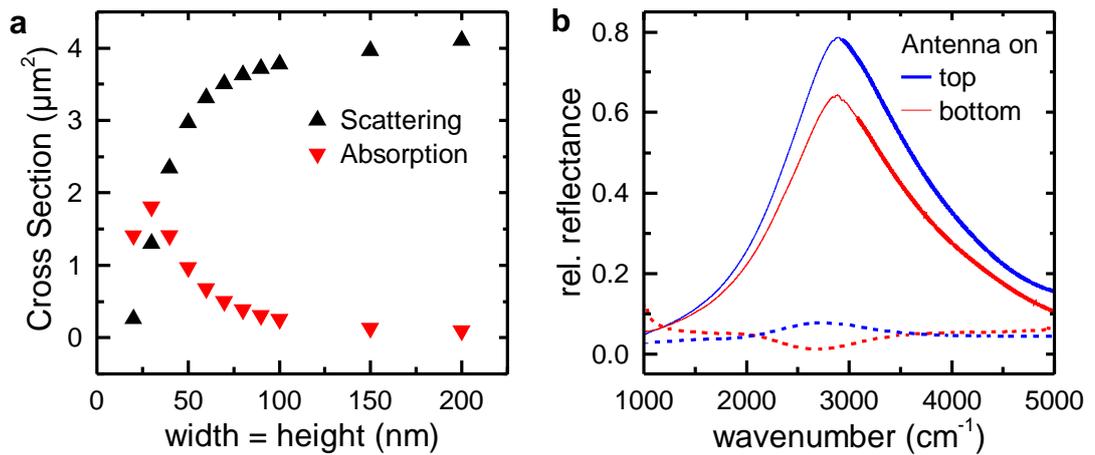
An dieser Stelle ist ersichtlich, dass Reflexionsmessungen an Nanoantennen-arrays stark davon abhängen, wie viel Licht die Antennen in Richtung Detektor streuen.

Eine Möglichkeit den Streuquerschnitt der Antennen-arrays zu erhöhen, ist die Erhöhung des Antennendurchmessers. Abbildung 4.6a zeigt den Streu- und Absorptionsquerschnitt einzelner Nanoantennen ( $L=1000\text{ nm}$ ) aus FDTD-Simulationen<sup>6</sup> für unterschiedliche quadratische Querschnitte von Einzelantennen im Bereich von  $20\text{ nm} - 200\text{ nm}$ . Für höhere Antennenbreiten und -dicken steigt der Streuquerschnitt bei gleichzeitiger Abnahme des Absorptionsquerschnitts.

Deutlich wichtiger als der Streuquerschnitt der Antennen ist die Fernfeldverteilung des an den Antennen gestreuten Lichts, da das zur Detektion verwendete Schwarzschildobjektiv nur einen kleinen Teil des Raumwinkels einnimmt.

Abbildung 4.6b zeigt Reflexionsmessungen an Luft an einem array der Probe SEIRA4a, sowie an S08#2-A11 (vgl. 4.3). Der wesentliche Unterschied der arrays ist der verkleinerte transversale Antennenabstand  $d_y = 1\text{ }\mu\text{m}$  bei SEIRA4a ( $d_y = 5\text{ }\mu\text{m}$ ), welcher dazu führt, dass das Licht vermehrt in den Raumwinkel des Objektivs gestreut wird. In beiden Fällen dominiert das von den Antennen gestreute Licht das Spektrum, so dass auch auf der Antennenunterseite ein Intensitätsmaximum entsteht (vgl. Abschnitt 4.2). Die Reflektivität beträgt bis zu 80% bei Antennen auf der Waferoberseite und 65% auf der Waferunterseite.

<sup>6</sup>Das *finite difference time domain* (FDTD) Verfahren erlaubt die numerische Berechnung der optischen Eigenschaften eines Nanoobjekts durch das Lösen der Maxwellgleichungen in einem diskreten Raster [46, 64].



**Abbildung 4.6:** (a) Streu- und Absorptionsquerschnitt aus FDTD-Simulationen einzelner Nanoantennen ( $L = 1000$  nm) bei Variation des Querschnitts ( $H = W$ ) von 20 nm – 200 nm [65].

(b) Relative Reflexion des *arrays* L4 der Probe SEIRA4a (durchgezogene Linien  $L = 1180$  nm,  $W = H = 60$  nm,  $d_x = 100$  nm,  $d_y = 1$   $\mu\text{m}$ ), an der Ober- und Unterseite des Substrats mit je 6000 *scans* und  $2$   $\text{cm}^{-1}$  Auflösung. Zur Referenzmessung wurde ein Goldspiegel auf der Probe verwendet [65]. Entsprechende Messungen an S08#2-A11 (gestrichelt, vgl. 4.4).

In wässriger Umgebung ist keine starke Abnahme der Reflektivität zu erwarten. Das SNR skaliert in etwa mit  $1/\sqrt{I}$ , wobei  $I$  die detektierte Intensität des Einkanalpektrums ist. Eine Verbesserung der Reflektivität von 2% auf 60% entspricht einer Reduzierung des Rauschens um einen Faktor  $\sqrt{30} \approx 5,5$ . Verbunden mit einer Mittelung über mehr *scans* und Reduzierung der Auflösung lässt sich das in Abschnitt 4.3.2 beobachtete Rauschen um mehr als eine Größenordnung reduzieren.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit präsentierten ADATO und ALTUG Messungen zur *in situ* Detektion gelöster Moleküle in Reflexionsgeometrie. Die dabei verwendeten *arrays* unterscheiden sich von Proben der Reihe S08 sowohl durch breitere und höhere Antennen ( $W = 200$  nm,  $H = 100$  nm), als auch durch eine geringere Gitter-Periodizität ( $L + d_x = W + d_y = 2,75$   $\mu\text{m}$ ) [37].

## 5 SEIRS-Messungen von Flüssigkeiten in Transmissionsgeometrie

Die *in situ* Messungen von Proteinen in wässriger Lösung in Reflexionsgeometrie lieferten aufgrund der geringen Intensitäten keine brauchbare Sensitivität (siehe Kap. 4). In Anbetracht dieser Probleme wurde eine neue, mikrofluidische Zelle (MFZ, engl.: MFD, von *microfluidic device*) konstruiert, welche Transmissionsmessungen wässriger Lösungen erlaubt.

Der folgende Abschnitt (5.1) beschreibt zunächst den prinzipiellen Aufbau der Zelle, sowie genauer die Konstruktion des mikrofluidischen Kanals in der Zelle. Abschnitt 5.2 zeigt verschiedene Messungen zu charakteristischen Kenngrößen der konstruierten MFZ. Messungen zur Detektionsgrenze von BSA *ex situ* auf Nanoantennen werden in Abschnitt 5.3 vorgestellt. Im Anschluss werden analoge *in situ* SEIRS-Messungen von BSA in wässriger Lösung präsentiert (5.4). Zur Vermeidung der Überlagerung der Proteinbanden mit der Wasserabsorptionsbande wurden weitere Messungen in schwerem Wasser durchgeführt, diese finden sich in Abschnitt 5.5.

### 5.1 Mikrofluidische Zelle für SEIRS-Messungen

Die für die in den folgenden Abschnitten 5.4 und 5.5 präsentierten SEIRS Messungen in Transmissionsgeometrie verwendete mikrofluidische Zelle wurde im Rahmen dieser Arbeit entworfen und konstruiert. Ziel der MFZ ist es, die Absorption des Wassers vor allem im Bereich der Biegeschwingung ( $\sim 1639 \text{ cm}^{-1}$ , vgl. Abschnitt 3.3) zu reduzieren, indem die optische Weglänge durch die Flüssigkeit auf wenige Mikrometer begrenzt wird. Dadurch soll die Detektion von Proteinen in wässriger Lösung anhand derer Amidbanden (vgl. Abschnitt 3.2.1) ermöglicht werden.

Ähnliche infrarot-transparente mikrofluidische Zellen wurden bereits mehrfach erfolgreich eingesetzt [66–69]. Um optische Transparenz im sichtbaren und infraroten Spektralbereich zu gewährleisten werden zumeist  $\text{CaF}_2$ -Wafer verwendet, zwischen denen eine dünne, mikrostrukturierte Schicht als Abstandhalter dient.

CHAN *et al.* verwendeten ein automatisiertes Pippetiersystem um Strukturen aus Paraffin-Mikrotröpfchen zu konstruieren. Die erstarrten Tröpfchen werden durch äußeren Druck auf die Dicke eines geeigneten Spacers gequetscht, um die Flüssigkeitskanäle abzudichten [70].

Eine weitere Möglichkeit zur Strukturierung der Mikrofluidischen Zellen sind dicke Photolacke, wie z.B. der für Mikroelektronik entwickelte Negativlack<sup>1</sup> SU-8 [68]. Die Haftung dieses Lackes auf  $\text{CaF}_2$  ist jedoch deutlich geringer als auf Silizium. Eine Alternative bietet der haftverstärkte Positivlack X AR-P 3100/10 (Allresist GmbH)<sup>2</sup>, der erstmals von BIRARDA *et al.* für IR-transparente MFZ verwendet wurde [66, 71–73].

Im Verlauf dieser Arbeit wurde daher zunächst dieser Photolack für die Mikrostrukturierung der Zelle verwendet. Später wurde zusätzlich das Polymer Polydimethylsiloxan (PDMS; SYLGARD® 184, Dow Corning) verwendet. PDMS ist aufgrund seiner einfachen Handhabung ein beliebtes Material zur Herstellung mikrofluidischer Systeme. Das im sichtbaren und nahinfraroten Spektralbereich transparente Material weist im mittleren infraroten (MIR) mehrere Vibrationsbanden auf, so dass übliche Verfahren zur Strukturierung der Kanäle<sup>3</sup> für MIR-Transparente Systeme nicht anwendbar sind.

Eine zusätzliche Anforderung an die verwendete MFZ ist, die Nanoantennen im Inneren des Kanals austauschen zu können. Dies bedeutet, dass die Strukturierung auf einen einzigen Wafer beschränkt werden muss. Außerdem ist eine permanente Versiegelung des Systems nicht wünschenswert.

Der folgende Abschnitt 5.1.1 behandelt zunächst den generellen Aufbau und die Funktionsweise der verwendeten MFZ. Im Anschluss wird genauer auf die Strukturierung des Mikrofluidischen Kanals mit dem Photoresist X AR-P 3100/10 (5.1.2) und dem Polymer PDMS (5.1.3) eingegangen.

### 5.1.1 Aufbau der Mikrofluidischen Transmissionszelle

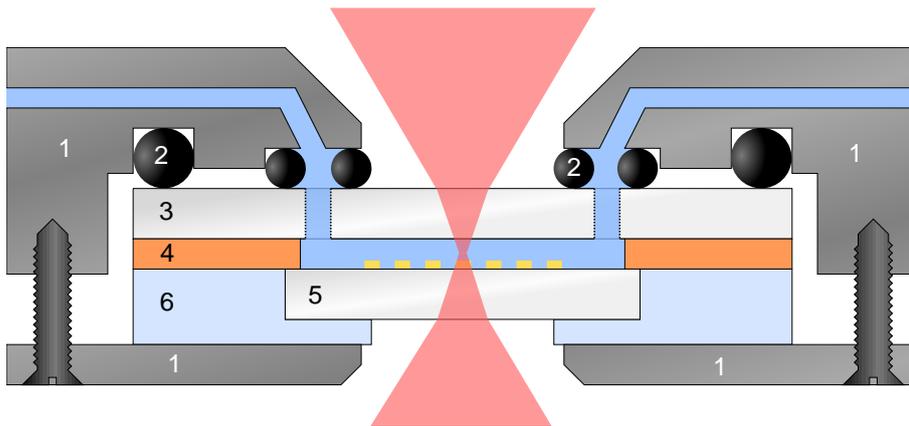
Der Aufbau der im Rahmen dieser Arbeit konstruierten MFZ ist in Abb. 5.1 schematisch dargestellt. Der Mikrofluidische Kanal im Zentrum des Aufbaus besteht aus je einem  $10 \times 10 \text{ mm}^2$  und einem  $20 \times 20 \text{ mm}^2$  großen  $\text{CaF}_2$ -Wafer, sowie einer zusätzlichen Dichtung aus PDMS.

---

<sup>1</sup>Bei negativen Photolacken löst sich beim Entwicklungsschritt der unbelichtete Teil des Lacks, bei positiven Lacken der belichtete.

<sup>2</sup>Im Folgenden wird dieser Photolack oft mit XARP bezeichnet.

<sup>3</sup>Im Standardverfahren wird PDMS über ein aus Photolack erstelltes Negativ der Struktur gegossen und in polymerisiertem Zustand abgezogen, um einseitig offene Kanäle zu erhalten, welche sich mit Glas oder PDMS abdichten lassen.



**Abbildung 5.1:** Schematische Darstellung der verwendeten Mikrofluidischen Zelle als Schnittansicht.

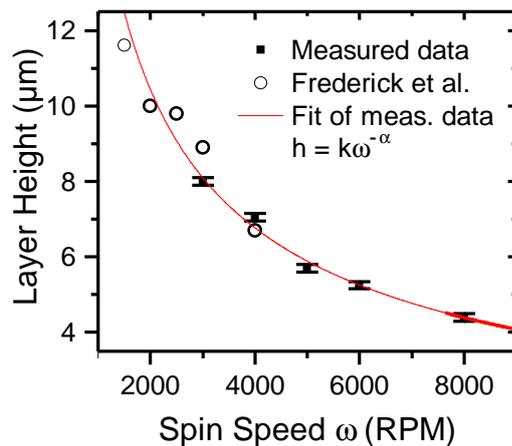
- (1) Gehäuse aus eloxiertem Aluminium mit Anschlüssen für externe Schläuche.
- (2) Viton® O-Ringe als ebene Auflagefläche (groß) und als Dichtung (klein).
- (3)  $\text{CaF}_2$ -Wafer ( $20 \times 20 \times 1 \text{ mm}^3$ ) mit Bohrlöchern.
- (4) 5–10  $\mu\text{m}$  dicke Schicht XARP Photoresist mit zentraler Aussparung.
- (5)  $\text{CaF}_2$ -Wafer ( $10 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$ ) mit Nanoantennen.
- (6) Flexible Dichtung aus PDMS ( $\sim 20 \times 20 \times 1,5 \text{ mm}^3$ ) um den Antennenwafer.

Der größere Wafer (im Folgenden Strukturwafer genannt) trägt die strukturierte Schicht aus Photolack, die gleichzeitig die Seitenwände des mikrofluidischen Kanals ausmacht und den Abstand der beiden Wafer (und somit die Dicke der Wasserschicht) in der MFZ definiert. Über Bohrlöcher im Wafer lässt sich der Kanal mit den Anschlüssen im Gehäuse verbinden.

Der kleinere Wafer (Antennenwafer) trägt die Nanoantennen für die SEIRS-Messungen in der Zelle. Eine weitere Präparation des Wafers ist nicht nötig, was den Wechsel der Antennen so einfach wie möglich gestaltet. Um den mikrofluidischen Kanal wasserdicht zu schließen, ist der Antennenwafer in ein Stück PDMS eingebettet, welches glatt mit der Oberseite des Wafers abschließt.

Die beiden Wafer und die PDMS-Dichtung werden in einem zweiteiligen Gehäuse mit Hilfe von vier Schrauben zusammen gepresst. Das Gehäuse besteht aus Aluminium und wurde durch das Eloxal-Verfahren<sup>4</sup> korrosionsbeständig gemacht. Das obere Gehäuseteil enthält Bohrungen, mit denen die Zelle über 1/4"-28-Anschlüsse an mit Zu- und Ableitungen verdunden werden kann. Die Dichtung zwischen Strukturwafer und Gehäuse erfolgt über Viton O-Ringe

<sup>4</sup>Beim Eloxal-Verfahren (Elektrolytische Oxidation von Aluminium) wird eine 5–25  $\mu\text{m}$  dicke Oxid/Hydroxid-Schicht an der Metalloberfläche gebildet.



**Abbildung 5.2:** Schichtdicke von XARP auf  $\text{CaF}_2$ , aufgetragen gegen die Rotationsgeschwindigkeit des Spincoaters in Umdrehungen pro Minute (RPM), für eine Spinzeit von 30 s. Entsprechende Messungen von FREDERICK *et al.*, entnommen aus [73]. Fit der Messdaten ergibt  $k = 1199 \pm 457$ ,  $\alpha = 0,624 \pm 0,046$ .

Beide Teile des Gehäuses verfügen über Aussparungen für Heizfolien (Minco Silikongummi-Thermofoil™) mit einer Heizleistung von maximal 25 W bei Raumtemperatur (15 W bei 100 °C). Zur Temperaturkontrolle lässt sich ein Thermoelement auf der unteren Gehäuseplatte fixieren, so dass der Messfühler in Kontakt zu der PDMS-Dichtung steht. Dies ermöglicht die Beobachtung der Temperaturabhängigkeit des Spektroskopie-Signals, etwa bei Konformationsänderungen der adsorbierten Moleküle.

### 5.1.2 Konstruktion des Mikrofluidischen Kanals aus X AR-P 3100/10

Das erste Material, welches im Verlauf dieser Arbeit zur Konstruktion des Mikrofluidischen Kanals verwendet wurde, ist der Photolack X AR-P 3100/10, ein Experimentalmuster der Firma Allresist GmbH. Dieser Positivresist wurde für Flusssäure-Ätzungen entwickelt, was eine hohe Viskosität bedingt. Durch Rotationsbeschichtung (engl.: *spin coating*)<sup>5</sup> erhält man daher Schichtdicken im Bereich von 1–10 µm [73, 75].

#### Beschichtung und Entwicklung der Wafer

Die Strukturierung der  $\text{CaF}_2$ -Wafer mit dem Photolack XARP wurde unter Reinraumbedingungen (Reinraumklasse ISO 7) im Mikrostrukturlabor des 4. Physikalischen Instituts der Universität Stuttgart durchgeführt.

<sup>5</sup>Beim *spin coating* wird ein Tropfen des Materials auf ein schnell rotierendes Substrat gegeben. Durch Zentrifugalkraft und interne Kräfte entsteht so eine homogene Schicht. Eine gründlichere Beschreibung findet sich u.a. in [74].

Der Photolack wurde durch Rotationsbeschichtung aufgetragen. Dazu wurde der Wafer zunächst im *spin coater* platziert, und mit Unterdruck festgehalten. Anschließend wird ein Tropfen Photolack mittig auf den Wafer gegeben, und dann auf 3000–8000 Umdrehungen pro Minute (RPM, von engl.: *revolutions per minute*) beschleunigt (Beschleunigung 100%, Verzögerung 75%). Die Rotationszeit beträgt 30 s. Um überschüssiges Lösungsmittel aus dem Lack zu verdampfen und die Haftung am Wafer zu verbessern, wurde eine Temperung (engl.: *soft- od. pre-bake*) für 120 s auf einer Heizplatte bei 90 °C durchgeführt. Zur Belichtung der Probe wurde die i-Linie einer Quecksilberdampfampe ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ,  $P = 275 \text{ W}$ ) verwendet (KARL SÜSS MJB UV400). Die Belichtungszeit beträgt 15 s, als Maske dient eine gebohrte Aluminiumplatte. Der belichtete Teil der Probe wurde für 5 s im Entwickler AR 300-26 (AllResist GmbH, [76]) gelöst, anschließend wurden die Proben mit Reinstwasser gespült. Härtung (engl.: *hard-bake*) des Photolacks erfolgte für weitere 120 s bei 90 °C auf der Heizplatte.

Abbildung 5.2 zeigt die Abhängigkeit der Schichtdicke bei einer Spin-Zeit von 30 s von der Drehgeschwindigkeit des Spincoaters. Zur Bestimmung der Schichtdicke wurde ein Profilometer (VEECO DEKTAK 150) verwendet. Eine einfache Modellbeschreibung [74, 77] ergibt

$$h[\mu\text{m}] = (1199 \pm 457) \cdot \omega[\text{RPM}]^{-(0,624 \pm 0,046)}, \quad (5.1)$$

in guter Übereinstimmung mit analogen Messdaten von FREDERICK *et al.* [73].

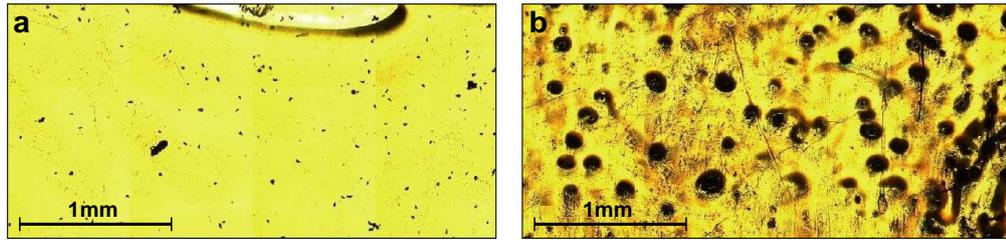
### Bohrung des beschichteten Wafers

Die Voraussetzung für einen schnellen Wechsel des Antennenwafers ist, dass der Strukturwafer sowohl die Bohrlöcher zum Anschluss an das Gehäuse besitzt, als auch die Schicht Photolack trägt.

In einem ersten Versuch wurde zunächst die Beschichtung durchgeführt. Die Bohrung erfolgte anschließend mit einem Ultraschallbohrer<sup>6</sup> in der glastechnischen Werkstatt des Physikalischen Instituts der Universität Heidelberg.

Für die Bohrung ist eine Fixierung des Substrats mit Bienenwachs notwendig, so dass die beschichtete Seite ungeschützt unter dem Bohrer liegt. Abbildung 5.3 zeigt optische Aufnahmen zweier beschichteter Wafer. Die Lackschicht des gebohrten Wafers (5.3b) ist von Bohrstaub überzogen. Die hohe Löslichkeit des Photolacks in polaren Lösungsmitteln (insbesondere Aceton, Ethanol und Iso-Propanol), auch nach der Aushärtung auf der Heizplatte, macht ein Reinigen des Photolacks von diesem Bohrstaub nicht möglich.

<sup>6</sup>Beim Ultraschallbohrer wird der Bohrkopf mit Hilfe eines Piezoelements in Schwingung versetzt, anstelle zu rotieren, wodurch die Spannung im Substrat reduziert wird.



**Abbildung 5.3:** Optische Aufnahme zweier XARP-beschichteter CaF<sub>2</sub>-Wafer. (a) Ungebohrter Wafer. Bis auf kleinere Verunreinigungen ist die Schicht intakt. (b) Mit einem Ultraschallbohrer durchbohrter Wafer; das Bohrloch befindet sich etwa 2 mm oberhalb des Aufnahmerands. Der Wafer ist vollständig mit grobem Bohrstaub bedeckt.

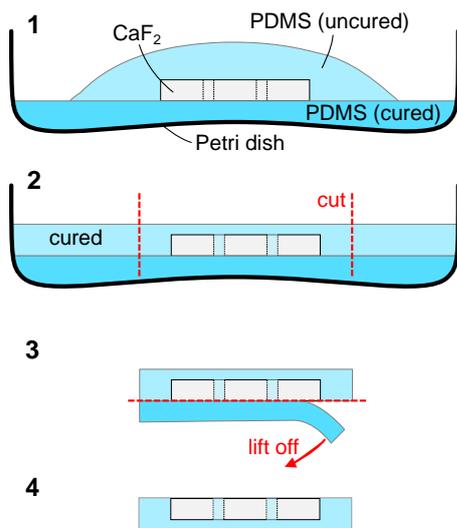
### Beschichtung eines gebohrten Wafers

Daher wurde in einem weiteren Versuch die Reihenfolge vertauscht und ein durchbohrter Wafer beschichtet.

Dabei ist ein Schattenwurf durch die Bohrlöcher zu erwarten. Um diesen Effekt zu minimieren wurde zunächst ein zweistufiger Prozess verwendet, in dem sich der Lack erst für 20 s bei relativ geringer Drehzahl (1000 RPM, technisch begrenzt) auf dem Wafer verteilen soll. Insbesondere sollen sich in diesem Schritt die Bohrlöcher mit Photolack füllen. Anschließend wurde die Drehzahl für weitere 20 s auf 3000–8000 RPM erhöht. Die Trocknung des Lacks ist allerdings schon nach dem ersten Prozessschritt stellenweise so weit fortgeschritten, dass anstelle einer homogenen Schicht eine Art konzentrisches Wellenmuster entsteht. Zudem fließt der Lack in den schmalen Spalt zwischen Substratunterseite und *spin coater*, anstelle die Bohrlöcher zu versiegeln.

Anstelle des Photolacks wurde PDMS verwendet, um die Bohrlöcher während der Beschichtung zu verschließen. Das Vorgehen ist in Abbildung 5.4 dargestellt. Zunächst wird eine PDMS-Schicht von etwa 5–10 mm Dicke präpariert, die als ebene Grundfläche für das weitere Vorgehen dient. Eine entsprechende Menge Präpolymer und Vernetzer werden im Massenverhältnis 10:1 vermischt. Das Gemisch wird für 5 min im Ultraschallbad entgast und in eine Petrischale gegeben. Restliche Luftblasen lassen sich mit einem leichten Stickstoff-Strahl entfernen. Die Schicht wird für 45 min bei 100 °C im Ofen polymerisiert [78].

Der gebohrte Wafer wird so auf die ausgehärtete PDMS-Schicht gelegt, dass sich keine Luftbläschen zwischen Wafer und PDMS befinden. Frisch angerührtes PDMS wird über den Wafer gegossen, wobei darauf geachtet wird, dass sich die Bohrlöcher vollständig mit PDMS füllen. Nach dem Aushärten dieser zweiten Schicht für



**Abbildung 5.4:** Schematische Darstellung zum Verschließen der Bohrlöcher mit PDMS.

**1.** Der Wafer wird glatt auf eine ausgehärtete PDMS-Schicht gelegt und mit neu angerührtem PDMS überzogen. Die Schicht härtet glatt und parallel zum Wafer aus.

**2.** Der Bereich um den Wafer wird ausgeschnitten.

**3.** Die PDMS-Schichten werden voneinander getrennt. Stellenweise wird eine Rasierklinge (o.ä.) benötigt.

**4.** Der Wafer verbleibt in der oberen PDMS-Schicht.

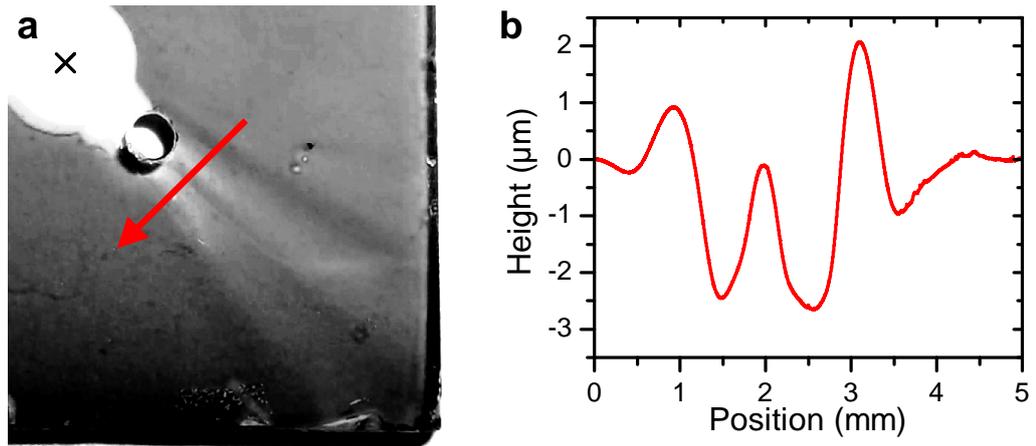
weitere 45 min bei  $100^\circ\text{C}$  wird der Bereich um den Wafer mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und die PDMS-Schichten voneinander getrennt. Es empfiehlt sich, auf einer Seite direkt am Wafer herab zu schneiden, und die Grenzschicht leicht anzuritzen. Anschließend lassen sich die Schichten einfach auseinander ziehen. Stellenweise sollte vorsichtig mit der Rasierklinge geholfen werden, damit das PDMS nicht reißt. Es ist nicht nötig, dass das PDMS in den Bohrlöchern bleibt. Das PDMS unterhalb des Wafers verhindert das Abfließen des Photolacks bei der Beschichtung, so dass die Löcher mit Photolack verstopft werden können.

PDMS und das PDMS-Präpolymer sind beinahe unlöslich [79], fertige PDMS-Schichten lassen sich als Ganzes leicht entfernen. Daher sollte bei Fehlern im Prozess das Polymer als ganzes ausgehärtet werden, um nicht entfernbare Überreste zu vermeiden.

Der so präparierte Wafer wird wie oben beschrieben beschichtet, wobei auf saubere Einbettung geachtet werden muss, da lediglich das PDMS im *spin coater* angesaugt wird.

Das Ergebnis ist in Abbildung 5.5 dargestellt. Die Photolack-Schicht ist zwar weitestgehend homogen. Der Bereich radial hinter den Bohrlöchern weist jedoch trotz Versiegelung der Löcher eine Wellenstruktur auf, die schon mit bloßem Auge erkennbar ist. Profilometer-Messungen ergeben für eine  $7\ \mu\text{m}$  dicke Schicht eine Abweichung von insgesamt  $5\ \mu\text{m}$ . Ein Abdichten des Kanals durch einen starren zweiten Wafer, wie es die Konstruktion vorsieht, ist dadurch unmöglich.

Zwar füllt sich der mikrofluidische Kanal aufgrund der hohen Kapillarkräfte zwischen den Wafern mit Wasser. Der für einen Abfluss durch das zweite Bohrloch



**Abbildung 5.5:** Beschichtung eines durchbohrten  $\text{CaF}_2$ -Wafers mit XARP. Die Bohrlöcher wurden kehrseitig mit PDMS versiegelt.

(a) Fotografie einer Ecke des Wafers, der Kanal wurde bereits entwickelt. Das Zentrum des Wafers ist mit  $\times$  bezeichnet, radial hinter dem Bohrloch ist die Lackschicht deutlich inhomogen.

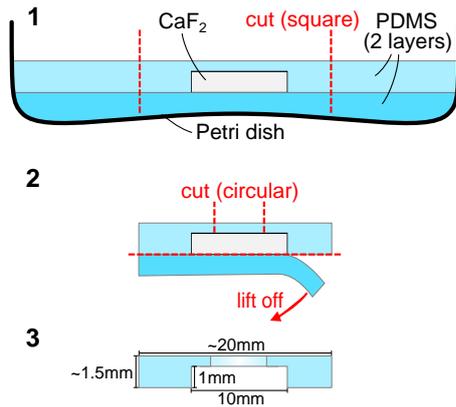
(b) Profilometer-Messungen entlang der in a eingezeichneten roten Linie, normiert auf die Schichtdicke von  $7\ \mu\text{m}$ . Anstelle einer homogenen Schicht sind Variationen von bis zu  $2\ \mu\text{m}$  nach oben und  $3\ \mu\text{m}$  nach unten zu beobachten.

nötige Druck lässt sich allerdings nicht aufbauen. Das Wasser fließt entlang der Unebenheiten nahe der Bohrlöcher aus der Zelle heraus.

### Flexible Dichtung aus PDMS

Aus diesem Grund wird die flexible PDMS Dichtung benötigt. Diese liegt dicht um den Antennenwafer, und schließt einseitig glatt mit dessen Oberfläche ab (vgl. Abb. 5.1). Im Wesentlichen stellt die Dichtung eine flexible Vergrößerung des Antennenwafers auf  $20 \times 20\ \text{mm}^2$  dar, welche dicht mit der Photolackschicht des Strukturwafers abschließt.

Die Herstellung der PDMS-Dichtung geschieht analog zur Versiegelung der Bohrlöcher (vgl. Abb. 5.4) und ist in Abbildung 5.6 dargestellt. Ein  $10 \times 10 \times 1\ \text{mm}^3$  großer  $\text{CaF}_2$ -Wafer wird flach auf eine glatte PDMS-Schicht gelegt, und mit einer etwa  $1,5\ \text{mm}$  dicken Schicht flüssigem PDMS übergossen. Eventuelle Luftbläschen im PDMS lassen sich mit Hilfe eines leichten Stickstoffstrahls entfernen. Nach dem Auspolymerisieren des PDMS wird ein ca.  $20 \times 20\ \text{mm}^2$  großes Stück um den Wafer herum ausgeschnitten, und die untere PDMS-Schicht vorsichtig unter Zuhilfenahme einer Rasierklinge entfernt. In der Mitte wird ein etwa  $7\ \text{mm}$  großes Loch mit Hilfe eines Cuttermessers ausgeschnitten und entfernt, damit sich kein PDMS im



**Abbildung 5.6:** Schematische Darstellung zur Herstellung der PDMS-Dichtung.

1. Ein  $10 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$  großer Wafer wird analog zu Abb. 5.4 in eine Schicht PDMS eingebettet. Ein quadratisches Stück von etwa 20 mm Kantenlänge um den Wafer wird ausgeschnitten.
2. Die untere PDMS-Schicht wird entfernt. In die Mitte der Dichtung wird ein kreisförmiges Loch ( $d \approx 7 \text{ mm}$ ) geschnitten.
3. Der Wafer wird entfernt.

optischen Pfad der Zelle befindet. Dabei kann z.B. die untere Gehäuseplatte der MFZ als Schablone verwendet werden.

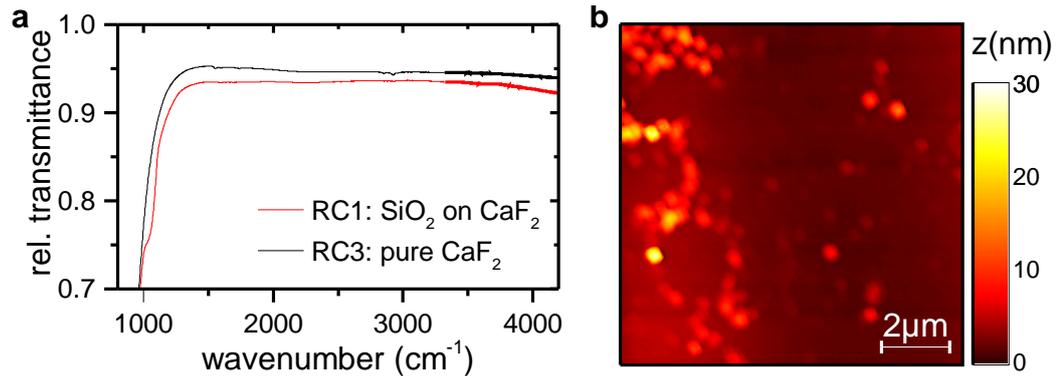
### 5.1.3 Konstruktion des Mikrofluidischen Kanals aus Polydimethylsiloxan (PDMS)

Aufgrund der Probleme mit der homogenen Beschichtung des gebohrten Wafers mit XARP wurde versucht, den Kanal vollständig aus PDMS zu konstruieren.

Durch die höhere Polymerisierungszeit von PDMS im Vergleich zur Trockenzeit von XARP ist das Ausheilen von Unebenheiten in der Schichtdicke nach der Beschichtung möglich. Die Herstellung dünner PDMS-Schichten wurden in der Vergangenheit bereits untersucht [77]. Des Weiteren ist PDMS kompatibel mit den meisten gängigen Lösungsmitteln [79], was einen vielseitigen Einsatz der MFZ ermöglicht. Ein grundlegendes Problem ist aber die sehr geringe Haftung von PDMS auf  $\text{CaF}_2$ .

GRENCI *et al.* fanden heraus, dass eine 10 nm dünne  $\text{SiO}_2$ -Schicht auf einem  $\text{CaF}_2$ -Wafer das Oberflächenverhalten dominiert, das Infrarotspektrum aber weitestgehend erhält [71]. Ein so präparierter Wafer verspricht eine verbesserte Haftung von PDMS auf dem Substrat und ermöglicht die Anwendung gängiger Protokolle zur Präparation auf Silizium.

Zu diesen Protokoll gehört die plasma-aktivierte Verbindung von PDMS mit siliziumhaltigen Stoffen und Substraten, wie sie vielfach in der Herstellung von PDMS-basierten Mikrofluidischen Zellen verwendet wird. Durch ein Sauerstoff-Plasma entstehen Silanolgruppen ( $\text{Si-OH}$ ) an der PDMS-Oberfläche (vermutlich durch Oxidation von Methyl-Gruppen [80]). Bei Kontakt zu anderen analog aktivierten Oberflächen (z.B. Glas, Silizium, Polyethylen, Polystyrol) entstehen  $\text{Si-O-X}$ -Brücken ( $\text{X} = \text{Si}, \text{C}, \dots$ ), die beide Stoffe permanent verbinden [80–83].



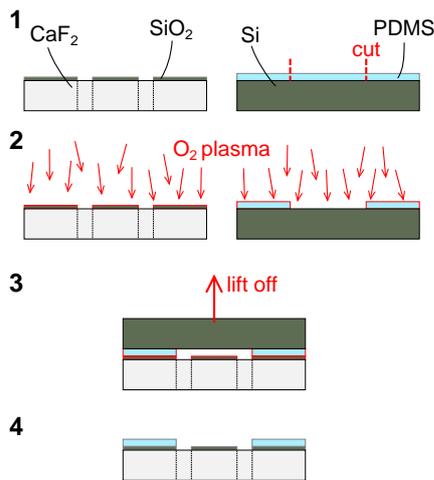
**Abbildung 5.7:** (a) Transmissionspektren eines SiO<sub>2</sub>-besputterten (RC1) sowie eines unmodifizierten CaF<sub>2</sub>-Wafers (RC3). Die asymmetrische Si–O–Si-Streckschwingung bei 1080 cm<sup>-1</sup> [84] ist deutlich zu erkennen, oberhalb von 1200 cm<sup>-1</sup> ist die Transmission aber nur geringfügig beeinträchtigt. (b) AFM-Aufnahme der Oberfläche von RC1 nach dem Sputtervorgang. Inseln von etwa 20 nm Höhe und 200 nm Durchmesser sind zu erkennen.

Zu diesem Zweck wurde zunächst eine  $\sim 20$  nm dicke SiO<sub>2</sub>-Schicht durch Sputterdeposition auf einen CaF<sub>2</sub>-Wafer aufgetragen. Abbildung 5.7a zeigt IR-Transmissionsspektren von SiO<sub>2</sub> auf CaF<sub>2</sub> im Vergleich zu reinem CaF<sub>2</sub>. Mit Ausnahme der asymmetrischen Si–O–Si-Streckschwingung bei 1080 cm<sup>-1</sup> ist das Spektrum weitgehend unverändert, die für Si-Wafer typische Reflektivität ist nicht zu beobachten. Eine Untersuchung der Probenoberfläche im Rasterkraftmikroskop (AFM, von engl.: *atomic force microscope*, Abb. 5.7b) zeigt einen SiO<sub>2</sub>-Inselfilm.

Zur Herstellung und Fixierung des Mikrofluidischen Kanals aus PDMS auf dem Strukturwafer (vgl. Abb. 5.8) wurde dieser mit einer SiO<sub>2</sub> Schicht besputtert.

Durch Rotationsbeschichtung wird PDMS auf einen hinreichend großen Si-Wafer<sup>7</sup> aufgetragen, bei 3700 RPM für 5 min entsteht eine etwa 7 µm dünne Schicht (vgl. KOSCHWANEZ *et al.* [77]). Die vergleichsweise hohe Spinzeit ist notwendig, da PDMS eine hohe Viskosität aufweist und, anders als z.B. Photolacke, kein Lösungsmittel enthält, das während der Beschichtung verdunstet. Die genaue Schichtdicke hängt auch vom Fortschritt der Polymerisierung ab, also der Zeit seit dem Mischen von Präpolymer und Vernetzer. Zur schnellen Polymerisierung der Schicht wird der Wafer für 10 min auf eine Heizplatte bei 150 °C gelegt.

<sup>7</sup>Das Material dieses Wafers ist nicht wichtig, es wird aber eine glatte Oberfläche benötigt.



**Abbildung 5.8:** Schematische Darstellung zur Herstellung des Mikrofluidischen Kanals mit PDMS.

1. SiO<sub>2</sub> wird auf den gebohrten CaF<sub>2</sub>-Wafer aufgesputtert. Ein Si-Wafer wird dünn mit PDMS beschichtet. Der Kanal wird manuell ausgeschnitten und entfernt.
2. Die SiO<sub>2</sub>-Schicht und das PDMS werden im Sauerstoffplasma aktiviert.
3. Die aktivierten Oberflächen werden in Kontakt gebracht, PDMS und SiO<sub>2</sub> verbinden sich.
4. Nach entfernen des Si-Wafers bleibt der Mikrofluidische Kanal zurück.

Mit Hilfe eines Niederdruck-Sauerstoffplasmas (DIENER ELECTRONIC PICO E, 40 kHz, 1,9 mbar, 30 s, ~160 W) werden die SiO<sub>2</sub>- und die PDMS-Oberfläche aktiviert. Anschließend werden die aktivierten Oberflächen in Kontakt gebracht, so dass sich SiO<sub>2</sub> und PDMS verbinden, der Si-Wafer wird daraufhin entfernt.

Die Aktivierung der SiO<sub>2</sub>-Oberfläche der besputterten CaF<sub>2</sub>-Wafer und dünner PDMS-Schichten wurde zunächst mit Hilfe größerer (~3×3×1 mm<sup>3</sup>) PDMS-Stücke überprüft. In beiden Fällen konnten permanente Verbindungen erreicht werden, eine Variation der Parameter bei der Plasmaaktivierung ergab keine merklichen Unterschiede in der Qualität der Bindungen.

Eine Verbindung dünner PDMS-Schichten mit besputterten CaF<sub>2</sub>-Wafers konnte allerdings nicht erreicht werden. Auch die Verbindung dünner Schichten zu Silizium-Wafers war nicht möglich. Da sich die Oberflächen nachweislich im Plasma aktivieren lassen, liegt der Schluss nahe, dass das Problem darin besteht, einen flächendeckenden Kontakt zwischen der starren Waferoberfläche und der Oberfläche der PDMS-Schicht herzustellen.

## 5.2 Charakterisierung der mikrofluidischen Zelle

Vor der Verwendung der MFZ für die *in situ* SEIRS Messungen von Proteinen, wurden einige charakteristische Eigenschaften der Zelle untersucht.

Abschnitt 5.2.1 befasst sich mit der Befüllung und Benutzung der Zelle. Messungen zur Schichtdicke des Wassers im mikrofluidischen Kanal werden in Abschnitt 5.2.2 gezeigt. In Abschnitt 5.2.3 findet sich ein Raster scan der MFZ zur Bestimmung der effektiv ausleuchtbaren Probenfläche. Das Transmissionsspektrum von

Nanoantennen-*arrays* in der MFZ weist einige Besonderheiten auf, diese werden in Abschnitt 5.2.4 erläutert. Zuletzt wurden, insbesondere im Hinblick auf die Reflexionsmessungen im vorigen Kapitel, Messungen zum SNR und zur Messstabilität durchgeführt (5.2.5).

### 5.2.1 Verwendung der MFZ

Durch das geringe Volumen des mikrofluidischen Kanals und die hydrophoben  $\text{CaF}_2$ -Seitenwände sind hohe Druckgradienten nötig, um die Zelle zu befüllen. Eine peristaltische Pumpe, wie sie für die Reflexionszelle verwendet wurde, ist daher nicht geeignet. Zum Befüllen der MFZ werden statt dessen Injektionsspritzen mit einem Volumen von 1 ml verwendet. Mit diesen ist es möglich, die Zelle mit Flussraten von etwa 0,1 ml/min zu befüllen, dies entspricht einer Fließgeschwindigkeit von  $\sim 0,2$  cm/s in der Zuleitung und durchschnittlich  $\sim 5$  cm/s in der Zelle selbst.

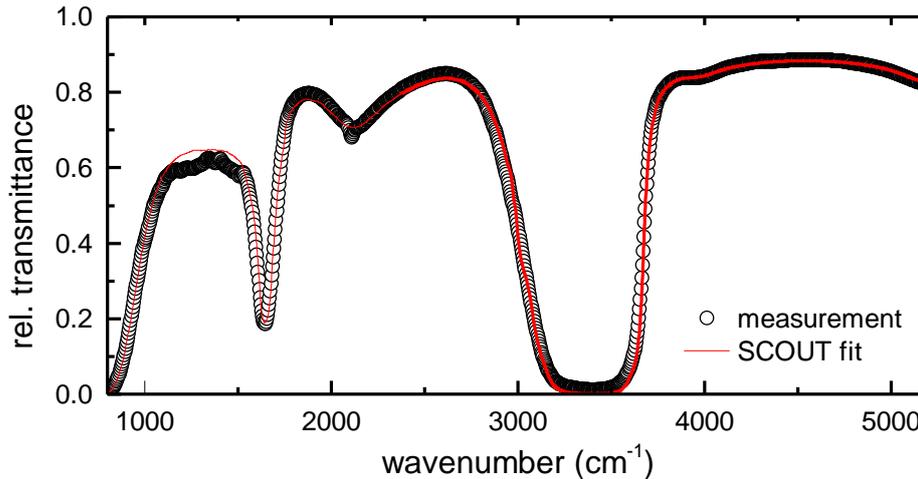
Bei höheren Drücken kann die MFZ undicht werden. In diesem Fall bleibt ausgelauene Flüssigkeit (bis zu einem gewissen Volumen) aufgrund der Oberflächenspannung in der Vertiefung um den Strukturwafer hängen, so dass keine Flüssigkeit in den Messaufbau tropft.

Zur Erhöhung der Messstabilität wurde eine im Vergleich zur Reflexionszelle etwas längere Zuleitung (0,2 ml – 0,3 ml) verwendet, so dass ein Öffnen des Spülkastens am Mikroskop zum Wechsel der Flüssigkeit nicht nötig ist.

Anders als bei der Reflexionszelle kommt es nur sehr selten vor, dass sich Luftbläschen in der Zelle fangen. Zudem passiert dies nur bei der ersten Befüllung der Zelle. Luftbläschen, die zu einem späteren Zeitpunkt in die Zelle injiziert werden, werden durch die Kapillarkräfte des Wassers verdrängt, und stellen kein Problem dar.

### 5.2.2 Bestimmung der Schichtdicke

Zur Bestimmung der Schichtdicke lassen sich verschiedene Methoden verwenden. Zunächst besteht die Möglichkeit, die relative Transmission der wassergefüllten Zelle mit einem aus den dielektrischen Funktionen von Wasser und  $\text{CaF}_2$  berechneten Spektrum zu vergleichen. Des Weiteren treten zwischen den beiden  $\text{CaF}_2$ -Wafers der MFZ Dünnschichtoszillationen auf, insbesondere wenn diese mit Luft gefüllt ist. Anhand der Periodizität der Oszillationen im Spektrum lässt sich die Schichtdicke bestimmen.



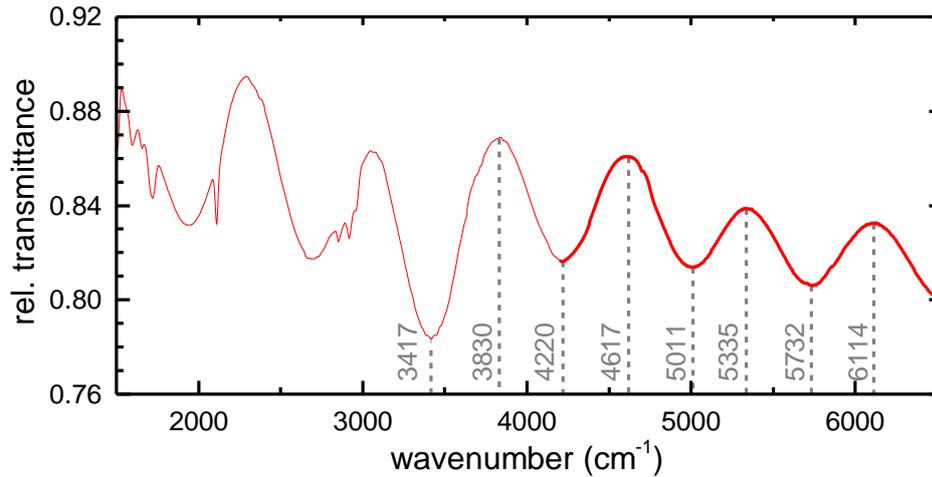
**Abbildung 5.9:** Relative Transmission der mit Wasser gefüllten Transmissionszelle bei 500 *scans*,  $8\text{ cm}^{-1}$  Auflösung, gemessen in der Probenkammer des FTIR-Spektrometers, gegen Leerkanal. Der *fit* wurde mit der Software SCOUT [9] aus den dielektrischen Funktionen von  $\text{CaF}_2$  und Wasser berechnet, die freien Parameter waren die Dicke der Wasserschicht, sowie ein linearer Skalierungsfaktor.

### Optisches Modell

Zum Vergleich der Transmission der MFZ mit dem optischen Modell wurde die Zelle in der Probenkammer des FTIR-Spektrometers vermessen, und auf den Leerkanal referenziert (je 500 *scans*,  $8\text{ cm}^{-1}$  Auflösung). Die Verwendung der Probenkammer hat den Vorteil, dass der Strahl senkrecht auf die MFZ trifft, anstatt wie im Mikroskop mit einem Einfallswinkel von  $10,3^\circ - 30^\circ$ . Zudem ist eine Leerkanalmessung ohne Neufokussierung des Strahls möglich. Um bei MCT-Detektoren auftretende nichtlineare Effekte<sup>8</sup> zu vermeiden, wurde ein DTGS-Detektor verwendet.

Die so gemessene relative Transmission der MFZ ist in Abbildung 5.9 in schwarz dargestellt. Mit Hilfe der Software SCOUT [9] ließ sich ein Spektrum an die Messdaten anpassen, welches aus den dielektrischen Funktionen von Wasser und  $\text{CaF}_2$  berechnet wurde. Dazu wurde die Transmission einer dünnen Wasserschicht zwischen zwei jeweils 1 mm dicken  $\text{CaF}_2$ -Wafeln simuliert. Die Schichtdicke des Wassers  $d$  wurde als freier Parameter zum Anpassen der Simulation an die Daten verwendet. Um Abweichungen in der Messintensität (z.B. durch Abschneiden des IR-Strahls mit der MFZ) zu kompensieren, wurde das errechnete Spektrum mit

<sup>8</sup>Bei Messungen im Mikroskop wird die Nichtlinearität des Detektors durch die Messsoftware kompensiert.



**Abbildung 5.10:** Relative Transmission der luftgefüllten Transmissionszelle (500 *scans*,  $8 \text{ cm}^{-1}$  Auflösung), gemessen in der Probenkammer des FTIR-Spektrometers, gegen Leerkanal. Die Positionen der Maxima und Minima der Dünnschichtoszillationen sind in grau dargestellt.

einem konstanten Faktor multipliziert. Man erhält somit eine Schichtdicke von

$$d_{\text{SCOUT}} = (6,06 \pm 0,34) \mu\text{m} \quad (5.2)$$

als Mittelwert von vier *fits* mit verschiedenen Frequenzbereichen.

### Dünnschichtoszillationen

In der Transmissionszelle treten, insbesondere wenn diese mit Luft gefüllt ist, Dünnschichtoszillationen auf. Diese sind Folge stehender Wellen innerhalb der dünnen Schicht zwischen den Wafern. Aus der Bedingung, dass die Schichtdicke einem halbzahligen Vielfachen der Wellenlänge im Medium entsprechen muss, folgt für den Frequenzabstand zweier Maxima [17]

$$\Delta\omega = \frac{1}{2nd}. \quad (5.3)$$

wobei  $n$  den Brechungsindex der Schicht darstellt.

Analog zum vorherigen Abschnitt, wurde in der Probenkammer des Spektrometers das relative Transmissionsspektrum der MFZ gegen Leerkanal aufgenommen.

Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 5.10 dargestellt. Um die Absorptionsbanden von Wasserdampf und Kohlendioxid zu vermeiden, werden die Oszillationen

im Bereich von  $3200$  bis  $6200 \text{ cm}^{-1}$  ausgewertet. Für die Oszillationsperiode erhält man durch Mittelwertbildung der Frequenzdifferenzen aufeinanderfolgender Maxima bzw. Minima

$$\Delta\omega = (770,6 \pm 57,2) \text{ cm}^{-1} \quad (5.4)$$

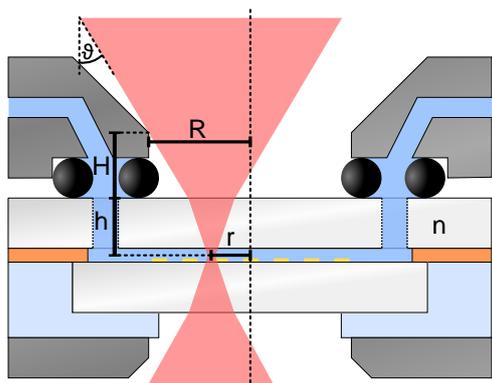
und somit, mit  $n = 1$  (Luft), in guter Übereinstimmung mit (5.2):

$$d_{\text{DSO}} = \frac{1}{2n\Delta\omega} = (6,49 \pm 0,48) \mu\text{m}. \quad (5.5)$$

Dünnschichtoszillationen treten auch auf, wenn die MFZ mit Wasser gefüllt ist (vgl. Abschnitt 5.2.4). Aufgrund der stark abgeschwächten Reflektivität der Grenzschichten im Inneren der Zelle ist die Intensität der Oszillationen aber deutlich geringer.

### 5.2.3 Bestimmung des Messbereichs

Aufgrund des schrägen Einfallswinkels im Mikroskop kann nicht die gesamte Probenfläche voll ausgeleuchtet werden. Insbesondere bei Relativmessungen spielt die laterale Reichweite des IR-Strahls in der MFZ eine große Rolle, um ein Abschneiden des Strahls zu vermeiden.



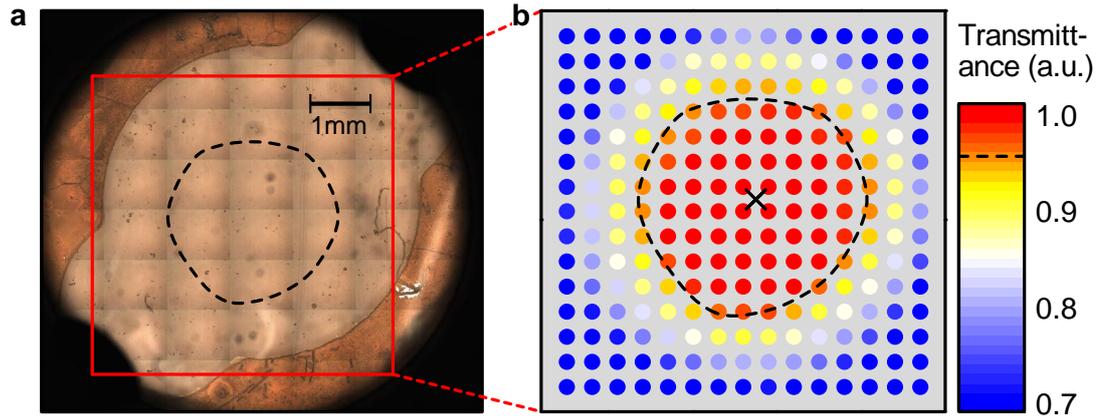
**Abbildung 5.11:** Schematische Darstellung der MFZ zur Berechnung des möglichen Messbereichs. Der fokussierte IR-Strahl des Mikroskops berührt im Grenzfall die Seitenwand der Messöffnung im Gehäuse.

Mit  $R = 3,5 \text{ mm}$ ,  $H = 4,8 \pm 0,2 \text{ mm}$ ,  $h = 1 \text{ mm}$ ,  $\vartheta = 30^\circ$  und  $n = 1,41$  folgt  $r = (0,35 \pm 0,12) \text{ mm}$  (vgl. (5.6)).

Eine erste Abschätzung dieser Reichweite ergibt sich aus der Geometrie der MFZ und dem verwendeten Schwarzschildobjektiv. Da der Öffnungswinkel der Fasen im Gehäuse der MFZ größer als der Öffnungswinkel des IR-Strahls ist, gilt gemäß Abbildung 5.11 für den Radius der (kreisförmigen) lateralen Reichweite

$$r_{\text{geo}} = R - H \tan \vartheta - h \tan \left( \sin^{-1} \left( \frac{\sin \vartheta}{n} \right) \right) = (0,35 \pm 0,12) \text{ mm} \quad (5.6)$$

wobei  $R = 3,5 \text{ mm}$ ,  $H = 4,8 \pm 0,2 \text{ mm}$ ,  $h = 1 \text{ mm}$ ,  $\vartheta = 30^\circ$  und  $n = 1,41$  ( $\text{CaF}_2$ ) eingesetzt wurde.



**Abbildung 5.12:** Rasterscan der Probe RC3 in der MFZ mit Strukturwafer RCb4 zur Bestimmung des räumlichen Messbereichs.

(a) Übersichtsaufnahme der Mikrofluidischen Zelle im Mikroskop. Am Rand der Zelle ist die Schicht aus Photolack zu sehen. Die gestrichelte Linie entspricht 95% der maximalen Transmission.

(b) Räumlich aufgelöste relative Transmission (100 scans,  $32 \text{ cm}^{-1}$  Auflösung) an  $15 \times 15$  Messpunkten mit je  $0,3 \text{ mm}$  Abstand in x- und y-Richtung, integriert von  $2400 \text{ cm}^{-1} - 2700 \text{ cm}^{-1}$  und normiert auf das Maximum. Die laterale Ausdehnung des detektierten IR-Strahls im Fokus beträgt etwa  $83,3 \mu\text{m}$ . × bezeichnet die Referenzposition, die gestrichelte Linie markiert 95% der maximalen Transmission.

Zur Überprüfung dieses Wertes wurde ein Rasterscan der MFZ mit dem  $\text{CaF}_2$ -Wafer RC3 (ohne Antennen) durchgeführt, als Strukturwafer wurde RCb4 verwendet (vgl. A.1). Ein quadratisches Raster von  $15 \times 15$  Messpunkten mit je  $0,3 \text{ mm}$  Abstand in x- und y-Richtung wurde im sichtbaren Bereich der MFZ definiert. An jedem Punkt des Gitters wurde die Transmission relativ zur Wafermitte mit je 100 scans bei einer Auflösung von  $32 \text{ cm}^{-1}$  gemessen. Die Relativspektren wurden anschließend von  $2400 \text{ cm}^{-1} - 2700 \text{ cm}^{-1}$  integriert und auf das Maximum normiert.

Das Ergebnis ist in Abbildung 5.12 dargestellt. Im Zentrum des sichtbaren Ausschnittes der MFZ ist ein nahezu kreisförmiger Bereich hoher Transmittivität ( $> 95\%$ ) zu erkennen. Eine Vermessung dieser 95%-Linie ergibt

$$r_{\text{mess}} = (1,313 \pm 0,021) \text{ mm} \quad (5.7)$$

für den Radius der lateralen Reichweite. Dieser Wert ist deutlich größer als der geometrisch ermittelte. Dies lässt sich dadurch erklären, dass nur ein kleiner Teil der IR-Strahlung unter dem maximalen Einfallswinkel von  $30^\circ$  einfällt. Gemäß

Gleichung (5.6) ist  $r > 0,349$  mm für  $\vartheta < 30^\circ$ , d.h. für den Großteil des einfallenden Lichts. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass der tatsächliche maximale Einfallswinkel aufgrund von Beugungseffekten am Zellenrand kleiner als die durch das Schwarzschildobjektiv gegebenen  $30^\circ$  ist.

Der ausgemessene Messbereich ist kleiner als die Ausdehnung der Antennenfelder in den S08 Nanoantennen-Proben ( $2,58 \times 1,38$  mm<sup>2</sup>  $\cong$  1,46 mm Radius, vgl. Abschnitt A.1.1). Bei der Positionierung des Antennenwafers sollte darauf geachtet werden, den Wafer dementsprechend leicht gegen die Mitte der Zelle verschoben einzubauen.

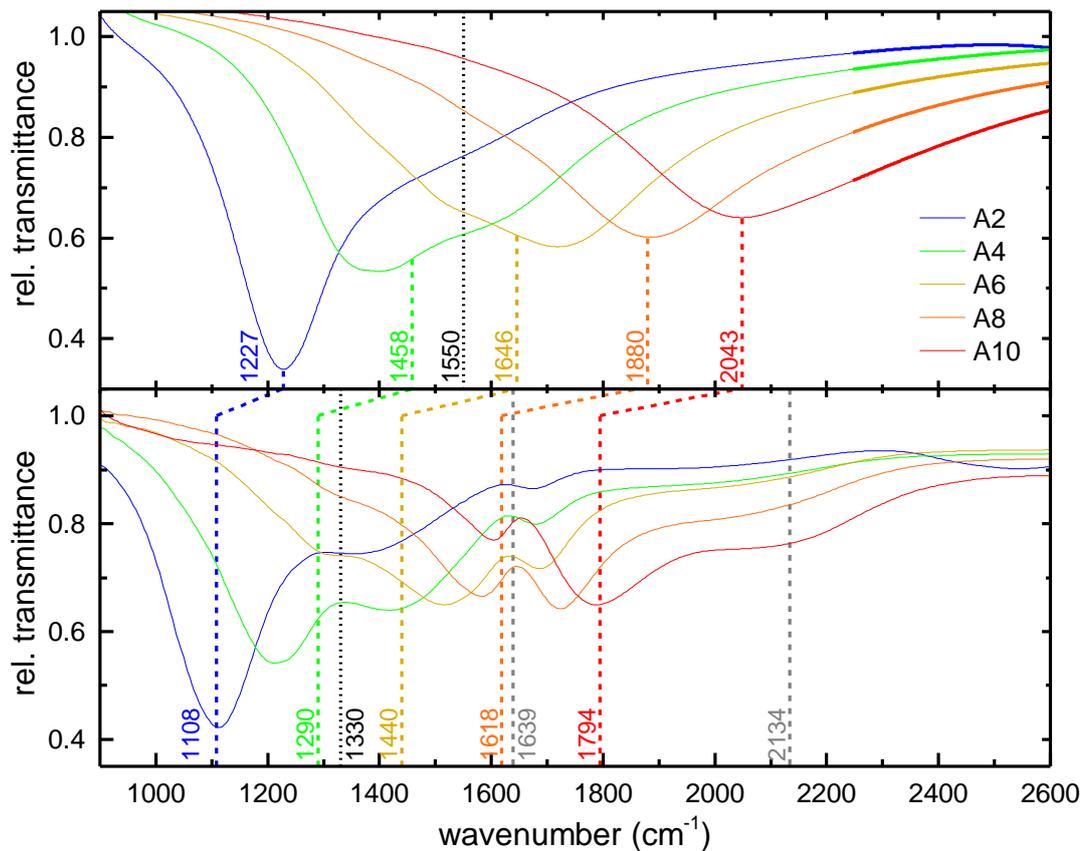
Des Weiteren sollte vor einer Messung die Position der zu vermessenden Antennen-*arrays* anhand einer Übersichtsaufnahme im optischen überprüft werden. Dies gilt insbesondere für Messungen auf den außen liegenden *arrays*, vor allem den Eckfeldern A1, A10, B3 und B12, aber auch A4, A7, B6 sowie B9 (vgl. Abb. A.1.1).

Das für die Messungen in Abschnitt 5.4 verwendete Antennenfeld A8 liegt zentrierter auf dem Antennenwafer, so dass keine Beeinträchtigung der Transmissionsmessungen durch die Messgeometrie zu erwarten ist.

### 5.2.4 Transmission von Antennen in Wasser

Abbildung 5.13 zeigt die relative Transmission der *arrays* A2, A4, A6, A8, und A10 der Probe S08#11 an Luft, sowie in der MFZ aufgenommene Spektren derselben *arrays* in Wasser. Die relative Transmission der Antennen-*arrays* ist eine komplexe Überlagerung von Plasmonenresonanz, Wechselwirkung mit dem umgebenden Wasser und Dünnschichtoszillationen.

Die Resonanzfrequenzen sind aufgrund des erhöhten effektiven Brechungsindex rotverschoben. Diese Verschiebung wurde über Gleichung (2.25) berechnet. Die Formel wurde sukzessiv bis zur Konvergenz ( $|\omega_{i+1} - \omega_i| < 0.01$  cm<sup>-1</sup>) angewandt, um Abweichungen aufgrund der Dispersion der (effektiven) dielektrischen Funktionen zu vermeiden. Im Fall der *arrays* A2 und A10 entspricht die Berechnung bis auf wenige Wellenzahlen der Messung. Bei A4 und A6 lassen sich nur schwer Aussagen treffen, da die Resonanzkurven sowohl in Luft als auch in Wasser eine starke Störung der Linienform aufweisen, welche auf Gittereffekte zurückzuführen ist. Tendenziell ist aber auch hier eine gute Beschreibung mit Hilfe von Formel (2.25) möglich. Lediglich beim *array* A8 weicht die Berechnung deutlich ab. Diese Abweichung ist auf die direkte Nähe der Resonanz zur Wasserabsorption, und damit die starken Variationen der dielektrischen Funktion von Wasser zurück zu führen.



**Abbildung 5.13:** Relative Transmission verschiedener *arrays* von S08#11 an Luft (oben) und in der mit Wasser gefüllten MFZ (unten). Die farbig gestrichelten Linien geben die Resonanzfrequenz an Luft, sowie die daraus iterativ mit Gleichung (2.25) ermittelte Resonanzfrequenz in Wasser an. Die Absorptionsbanden von Wasser sind grau markiert. Die schwarz gestrichelte Linien markieren jeweils eine breitbandige Störung der Resonanzkurven, die auf Gittereffekte zurückzuführen ist.

Alle *arrays* weisen an der Position der Biegeschwingung von Wasser ( $1639\text{ cm}^{-1}$ ) eine deutliche Fanokurve auf. Die Intensitätsmodulation beträgt je nach Detuning zwischen 2% (A2) und 10% (A8). Die Halbwertsbreite beträgt etwa  $70\text{ cm}^{-1}$ , gemessen am Aufwärtsspeak bei A8. Bei der Kombinationsschwingung bei  $2134\text{ cm}^{-1}$  ist keine starke Wechselwirkung mit den Antennen zu beobachten. Die an dieser Stelle zu beobachtende breitbandige Struktur ist Folge von Unterschieden in den Dünnschichtoszillationen in Proben- und Referenzmessung, und werden im folgenden Abschnitt behandelt.

Des Weiteren sind in den Transmissionsspektren an Luft breitbandige Störungen im Antennenprofil infolge von Gittereffekten bei  $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$  zu beobachten. Diese treten bei allen späteren Proben der Serie S08 (#9–#14) auf. Diese Effekte sind auch bei den in Wasser aufgenommenen Spektren zu sehen, rotverschoben nach  $\sim 1330 \text{ cm}^{-1}$ . Je nach Resonanzfrequenz der Antenne ergibt sich eine schwache Erhöhung (vgl. A2, A8 an Luft) oder Verringerung der Absorption (vgl. A4, A6 an Luft) des *arrays*. A2 und A6 in wässriger Umgebung legen sogar einen fanoartigen *Doppelpeak* nahe. Ein Vergleich der jeweiligen Frequenzen, sowie der effektiven Brechungsindizes an diesen Frequenzen zeigt

$$\frac{\omega_{\text{H}_2\text{O}}}{\omega_{\text{Luft}}} = 0,858 \sim 0,823 = \frac{n_{\text{eff,Luft}}(\omega_{\text{Luft}})}{n_{\text{eff,H}_2\text{O}}(\omega_{\text{H}_2\text{O}})} \quad (5.8)$$

wobei  $\omega_i$  die Frequenz der Störsignale und  $n_{\text{eff},i}$  die effektiven Brechungsindices angeben. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Strukturen um den selben Effekt handelt, dessen Ursprung bei den Antennen selbst liegt, etwa Interferenzeffekte innerhalb des *arrays*. Die Struktur um  $1330 \text{ cm}^{-1}$  lässt sich daher als Gittermode in wässriger Umgebung identifizieren.

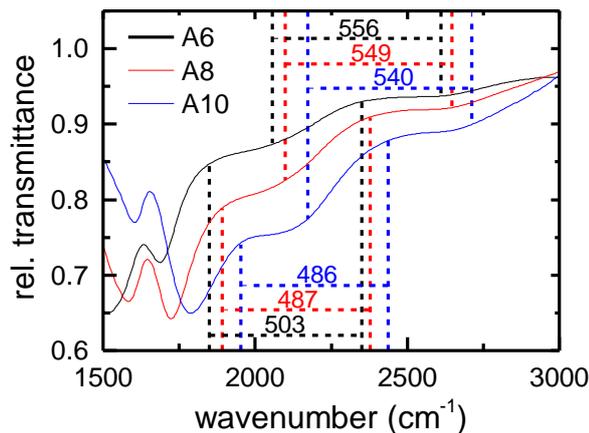
### **Einfluss der Dünnschichtoszillationen**

Betrachtet man die relative Transmission von Antennen-*arrays* in der MFZ, so lassen sich an manchen Stellen Oszillationsmuster erkennen, welche sich mit der Plasmonenresonanz überlagern. Sie sind Folge von Dünnschichtoszillationen innerhalb der Wasserschicht. Gemäß Gleichung (5.5) gilt für die Oszillationen innerhalb der Wasserschicht mit  $d = (6,49 \pm 0,48) \mu\text{m}$  und  $n = 1.32$ :

$$\Delta\omega = \frac{1}{2nd} = (584 \pm 43) \text{ cm}^{-1} \quad (5.9)$$

Bei Aufnahmen im Mikroskop kann diese einfache Formel allerdings nicht verwendet werden. Zunächst muss der schräge Lichteinfall von  $\vartheta = 10,3^\circ \dots 30^\circ$  [22] berücksichtigt werden. Dadurch wird die effektive Schichtdicke um den Faktor  $1/\cos(\vartheta)$  vergrößert. Alle Winkel erzeugen unabhängig voneinander Oszillationen verschiedener Frequenzen und Intensitäten, das Integral über alle Winkel führt zu einer Schwebung.

Des Weiteren treten die Oszillationen sowohl in Proben- als auch Referenzmessungen auf, dabei unterscheiden sie sich aufgrund der Antennenresonanz in den Intensitäten und folglich in der Form der Schwebung. Eine analytische Beschreibung der Oszillationen ist aufgrund der Vielzahl unbekannter Parameter unmöglich. In Abbildung 5.14 ist erneut die relative Transmission verschiedener Antennen-*arrays* in der MFZ dargestellt. Im Bereich von  $1800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$  sind Minima und



**Abbildung 5.14:** Dünnschichtoszillationen in der relativen Transmission verschiedener *arrays* von S08#11 in der mit Wasser gefüllten MFZ. Die gestrichelten Linien markieren Maxima und Minima der effektiven Dünnschichtoszillationen, die Zahlen gegen den jeweiligen Frequenzabstand in  $\text{cm}^{-1}$  an.

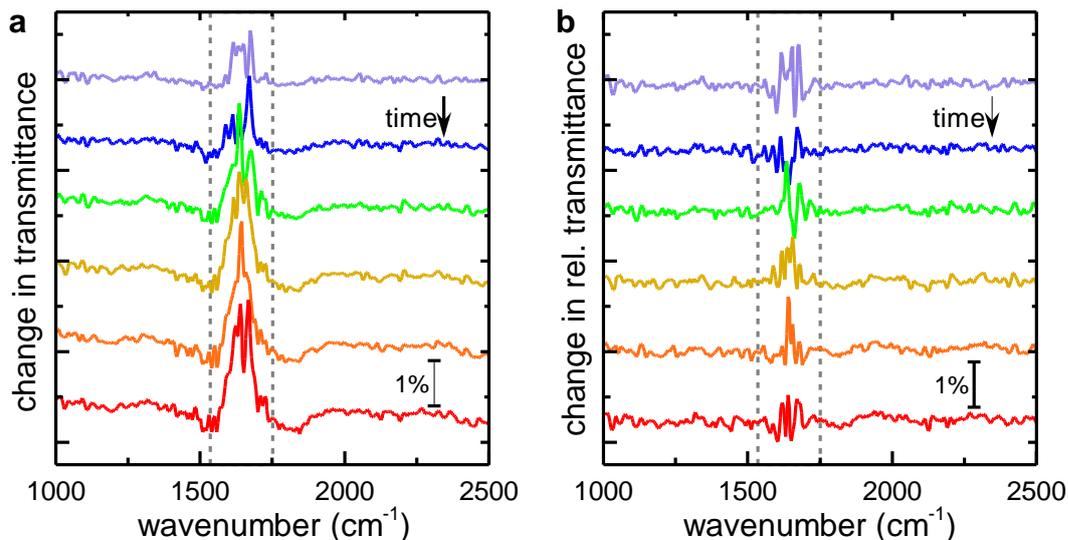
Maxima der effektiven Dünnschichtoszillationsmuster markiert. Unterhalb von  $1800 \text{ cm}^{-1}$  überlagern sich die Oszillationen zu stark mit der Wasserabsorption und Gittermode um  $1330 \text{ cm}^{-1}$  um auswertbar zu sein. Oberhalb von  $3000 \text{ cm}^{-1}$  befinden sich zunächst die Wasserstreckenschwingungen, bei noch höheren Frequenzen sind die Intensitätsunterschiede in Probe und Referenz zu gering, die Oszillationen heben sich auf.

Die Verschiebung der Muster untereinander ist eine direkte Folge der unterschiedlichen Intensitäten. Die Abstände der Maxima, bzw. der Minima, weichen jedoch nur geringfügig voneinander ab. Mit  $486 - 503 \text{ cm}^{-1}$ , bzw.  $540 - 556 \text{ cm}^{-1}$  liegen sie in derselben Größenordnung wie bei der einfachen Betrachtung nach Gleichung (5.9). Aufgrund der Winkelverteilung und der Schwebung sind die Messwerte erwartungsgemäß etwas geringer. Die geringeren Abstände der Maxima sind auf Ungenauigkeiten beim Ablesen aufgrund der Nähe zur Plasmonenresonanzfrequenz zurück zu führen.

### 5.2.5 Signal zu Rausch Verhältnis

Die in der Reflexionszelle durchgeführten Messungen haben gezeigt, dass eine möglichst hohe Grundintensität kritisch für die Detektion von Molekülsignalen ist. Bei Transmissionsmessungen hat die Absorption des Signals durch die Wasserschicht einen großen spektralen Einfluss auf die Gesamtintensität und somit auf das SNR der Messungen.

Abbildung 5.15a zeigt die Veränderung in der Transmission des Antennen-*arrays* S08#11-A8 ohne äußeren Eingriff im Verlauf mehrerer Minuten. Im Bereich der Antennenresonanz, bzw. der Wasserabsorptionsbande, sind starke Veränderungen im Spektrum zu beobachten. Dabei handelt es sich um eine Veränderung der Intensität der Wasserabsorption, z.B. durch leichte Schwankungen in der Schichtdicke.



**Abbildung 5.15:** Änderung der Einkanaltransmission und relativen Transmission von S08#11-A8 (je 100 *scans*,  $8 \text{ cm}^{-1}$  Auflösung, Strukturwafer RCb2) in der mit Wasser gefüllten MFZ mit zunehmender Zeit nach Messung der Referenz. In beiden Fällen ist dieselbe Messreihe dargestellt, der zeitliche Abstand aufeinanderfolgender Messungen beträgt etwa 60 Sekunden. Die grau gestrichelten Linien begrenzen den von der Statistik ausgenommenen Bereich.

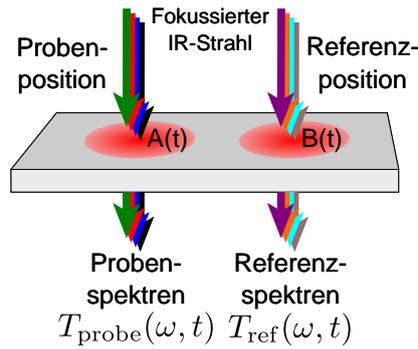
(a) Mit zunehmender Zeit ist in der Nähe der Antennenresonanz/Wasserabsorption um  $1639 \text{ cm}^{-1}$  eine breitbandige Veränderung der Spektren zu beobachten.

(b) Durch die zeitnahe Aufnahme der räumlichen Referenz bei jedem Spektrum verschwinden die breitbandigen Veränderungen größtenteils, der Rauschhintergrund steigt ein wenig.

Außerhalb des durch die gestrichelten Linien markierten Bereichs der Absorptionsbanden ergibt sich das Hintergrundrauschen aus der halben Differenz des maximalen und minimalen Werts (analog zu (4.1)) zu

$$R_{\text{TR}} = (0,31 \pm 0,06)\%, \quad (5.10)$$

wobei erneut über die obersten vier gezeigten Spektren gemittelt wurde. Dies entspricht einer Verbesserung des SNR um eine Größenordnung im Vergleich zu den Reflexionsmessungen. Teil dieser Verbesserung ist Folge der Auflösung der Transmissionsmessungen, welche im Vergleich zu den Reflexionsmessungen halbiert wurde. Dies beläuft sich aber lediglich auf einen Faktor von  $\sqrt{2}$ .



**Abbildung 5.16:** Verändertes Messprinzip für in situ Messungen in instabiler Umgebung. Zu jedem Zeitpunkt werden Relativspektren aufgenommen, diese werden anschließend auf die relative Transmission zu Beginn der Messung referenziert (vgl. Gl. (5.11)).

### Änderung der relativen Transmission

Um die kurzfristigen Schwankungen in den Messungen zu kompensieren, kann man die Veränderung der relativen Transmission

$$T_{\text{rel}}(\omega, t) = \frac{T_{\text{probe}}(\omega, t)}{T_{\text{ref}}(\omega, t)} \bigg/ \frac{T_{\text{probe}}(\omega, t = 0)}{T_{\text{ref}}(\omega, t = 0)} \quad (5.11)$$

betrachten (vgl. Abb. 5.16). Die Veränderung in der relativen Transmission bei der Messreihe aus Abbildung 5.15a ist in Abbildung 5.15b dargestellt. Die starke Änderung im Bereich der Wasserabsorption wird durch die jeweils zeitnahe räumliche Referenzierung kompensiert. Zu sehen sind reine 100%-Linien, wobei der Bereich um  $1639 \text{ cm}^{-1}$  aufgrund der starken Absorption von Wasser ein deutlich verstärktes Hintergrundrauschen aufweist, welches direkt auf die reduzierte Gesamtintensität zurückfällt.

Verglichen mit der Veränderung der Transmission steigt das Rauschsignal abseits der Wasserbande leicht von 0,31% auf

$$R_{\text{Rel.TR}} = (0,35 \pm 0,06)\% . \quad (5.12)$$

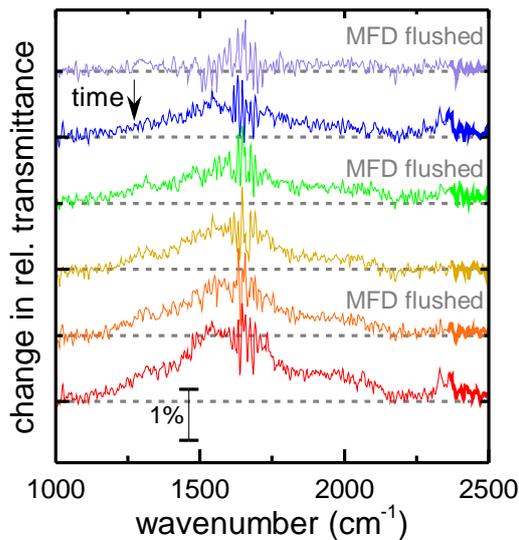
Dies liegt daran, dass bei der Änderung der relativen Transmission vier (anstelle von zwei) Spektren miteinander verrechnet werden, wobei sich das Rauschen der einzelnen Spektren gemäß der Gaußschen Fehlerfortpflanzung addiert.

Im Bereich der Wasserabsorptionsbande liegt das Hintergrundrauschen der relativen Transmission bei

$$R_{\text{Rel.TR}_{1640 \text{ cm}^{-1}}} = (1,44 \pm 0,27)\% . \quad (5.13)$$

### Stabilität der Messungen

Neben dem generellen SNR ist auch die längerfristige Messstabilität eine wichtige Charakteristik der MFZ. Bei der Betrachtung von Änderungsspektren erschwert



**Abbildung 5.17:** Veränderung der relativen Transmission von S08#11-A8 (je 100 *scans*,  $4\text{ cm}^{-1}$  Auflösung, Strukturwafer RCb4) in der mit Wasser gefüllten MFZ über einen Zeitraum von 30 min – 120 min nach Messung der Referenz. Zu Beginn, und nach jeder zweiten Messung wurde die Injektionsspritze ausgetauscht und 0,5 ml Reinstwasser injiziert. Im Verlauf der Messungen bildet sich zunehmend eine breitbandige Abweichung von der 100%-Linie aus.

jede Art von Instabilität die Auswertung. Dabei sind Auswirkungen von Intensitätsschwankungen am Detektor ebenso zu berücksichtigen wie mechanische Schwankungen beim automatischen Anfahren der Messpositionen mit dem XY-Tisch des Mikroskops. Ein weiterer Faktor ist die Stabilität der MFZ gegenüber ihrer Bedienung, etwa dem Wechsel der Injektionsspritze oder der Injektion von Flüssigkeiten.

Abbildung 5.17 zeigt Änderungsspektren der relativen Transmission des *arrays* A8 der Probe S08#11 (Strukturwafer RCb4) im Zeitraum von 30 min – 120 min. Dabei wurde vor jeder zweiten Messung die Spritze an der Zuleitung entfernt, neu mit Reinstwasser aufgezoogen und wieder angeschlossen. Anschließend wurden jeweils 0,5 ml Flüssigkeit durch die MFZ gepumpt.

Neben dem oben behandelten Hintergrundrauschen weisen die späteren Spektren eine breitbandige Abweichung von der Grundlinie von bis zu etwa 1,2% auf. Die Form dieser Abweichung ähnelt stark der Form der Antennenresonanz (vgl. Abb. 5.13) und hat ihr Maximum im Bereich von  $1480\text{ cm}^{-1}$  –  $1720\text{ cm}^{-1}$ . Sie entspricht folglich einer Verringerung der Intensität der Antennenresonanz. Ein Grund für eine solche Schwankung sind z.B. weitgehend konstante *offsets* in der Intensität der Probe- und Referenz-Einkanalspektren.

Eine genauere Betrachtung der Spektren in Abbildung 5.17 zeigt, dass die Abweichung stetig ansteigt. Insbesondere ist keine größere Veränderung der Spektren nach der erneuten Injektion der MFZ zu beobachten, die Zelle ist also stabil gegenüber ihrer Verwendung.

## 5.3 *Ex situ* Detektionsgrenze von BSA auf Nanoantennen

Zum Vergleich des Detektionslimits der Amidbanden von BSA auf Nanoantennen *in situ* in der MFZ, wird an dieser Stelle eine entsprechende Messung *ex situ* am getrockneten Substrat vorgestellt. Die Messung wurde vom Autor durchgeführt, die Auswertung stammt von J. BOCHTERLE, eine ausführlichere Beschreibung findet sich in dessen Dissertation [14].

### 5.3.1 Vorbereitung und Durchführung der Messung

Die Messungen wurden alle auf dem Antennen-*array* A8 der Probe S08#4 durchgeführt. Die Probe wurde vor Beginn der Messreihe in einem Sauerstoffplasma (vgl. 4.3.1) gereinigt und anschließend in Ethanol gelagert. Die Probe wurde vor jeder Messung für 15 min in 1 ml wässriger BSA-Lösung inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe entnommen, mit PBS und Wasser abgespült und mit Stickstoff getrocknet. Anschließend wurde das *array* im Mikroskop mit 1000 *scans* und  $4\text{ cm}^{-1}$  Auflösung vermessen.

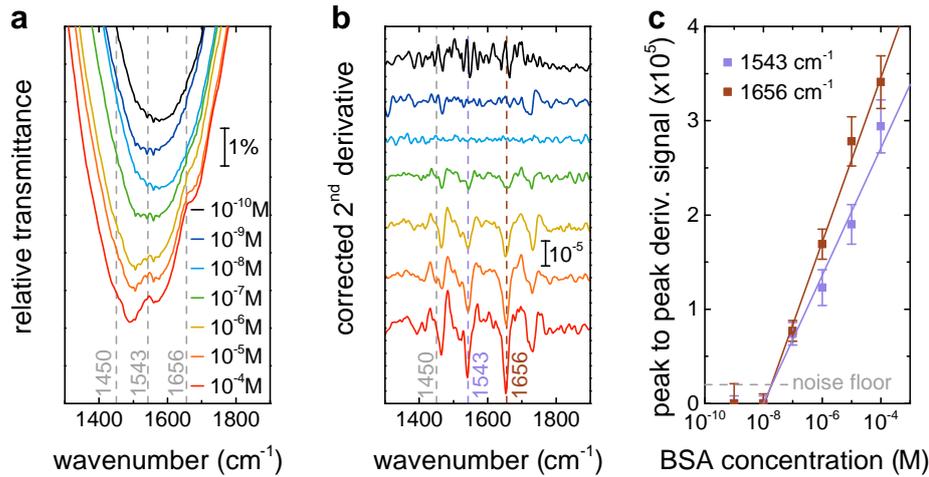
Die Konzentration der Lösung wurde nach jeder Messung sukzessiv um eine Größenordnung erhöht. Begonnen wurde bei  $10^{-10}\text{ M}$ , die Messungen wurden bis  $10^{-4}\text{ M}$  durchgeführt.

### 5.3.2 Ergebnisse

Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 5.18 dargestellt. In den relativen Transmissionsspektren in Abbildung 5.18a lassen sich bei höheren Konzentrationen an den Vibrationsfrequenzen der Amid I und Amid II Banden ( $1656\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $1543\text{ cm}^{-1}$ , vgl. 3.5) deutliche Fano-*peaks* erkennen. Außerdem sind in allen Spektren deutliche Absorptionsbanden von Wasserdampf zu beobachten. Diese sind Folge einer instabilen Messumgebung durch die kurz gehaltenen Messzeiten.

Zur Quantifizierung der Absorptionsstärke wird die zweite Ableitung betrachtet (Abb. 5.18b). Die schmalbandigen Wasserbanden führen dabei zu starkem Rauschen in den Spektren. Aufgrund der gleichbleibenden Messbedingungen sind die Wasserbanden allerdings für alle Spektren nahezu identisch. Zur Korrektur der Spektren wurde die zweite Ableitung für  $10^{-10}\text{ M}$  (unkorrigiert dargestellt) vom Rest der Spektren subtrahiert.

### 5.3 Ex situ Detektionsgrenze von BSA auf Nanoantennen



**Abbildung 5.18:** Messungen zum Detektionslimit von BSA auf dem *array* A8 ( $L = 1460$  nm) der Probe S08#4. Abgewandelt aus [14].

(a) Relative Transmissionspektren (1000 *scans*, Auflösung  $4 \text{ cm}^{-1}$ ) nach je 15 minütiger Inkubation in wässriger BSA-Lösung mit sukzessiv erhöhter Konzentration. Zur besseren Darstellung sind die Spektren gegeneinander verschoben. Die stärksten Vibrationsbanden von BSA sind gestrichelt grau gestrichelt markiert.

(b) Zweite Ableitung der Spektren in a, geglättet mit 15 Punkten. Der konstante Wasserdampf-Hintergrund (zweite Ableitung von  $10^{-10}$  M, schwarz) wurde von den folgenden Spektren ( $10^{-9}$  M...  $10^{-4}$  M, farbig) subtrahiert, hier ist die Differenz angegeben.

(c) Stärke (*peak to peak* in zweiter Ableitung) der Absorptionsbanden Amid I ( $1656 \text{ cm}^{-1}$ ) und Amid II ( $1543 \text{ cm}^{-1}$ ), gegen die logarithmisch aufgetragene BSA-Konzentration. Bei den Messwerten wurde jeweils ab  $10^{-8}$  M ein linearer *fit* durchgeführt.

Abbildung 5.18c zeigt die Signalstärke der Vibrationsbanden in Abhängigkeit der BSA-Konzentration. An die Messpunkte wurde jeweils eine Gerade (in der logarithmischen Darstellung) angepasst. Das LOD für BSA auf Nanoantennen ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Geraden mit dem Hintergrundrauschen, und liegt sowohl für Amid I, als auch für Amid II bei etwa  $2 \cdot 10^{-8} \text{ M} = 20 \text{ nM}$ .

## 5.4 *In situ* Messungen von wässriger BSA-Lösung in Transmissionsgeometrie

Analog zu den Messungen in Reflexionsgeometrie in Kapitel 4 wurde die MFZ verwendet, um *in situ* SEIRS Messungen von BSA in wässriger Lösung in Transmissionsgeometrie durchzuführen. Dabei wurde ebenfalls das Detektionslimit bestimmt.

### 5.4.1 Vorbereitung und Durchführung der Messung

Die Messung wurde mit dem Strukturwafer RCb4 und der Antennenprobe S08#11 durchgeführt, hauptsächlich am *array* A8 ( $L = 1460$  nm). Analog zu 4.3.1 wurde die Probe zuvor in einem Sauerstoffplasma gereinigt und bis zum Einbau in die MFZ in Ethanol gelagert. Mit Ausnahme des Strukturwafers wurden sämtliche Bauteile der MFZ, die mit der Lösung in Kontakt kommen, vor dem Zusammenbau mit Ethanol im Ultraschallbad gereinigt und durch einen Stickstoffstrahl getrocknet.

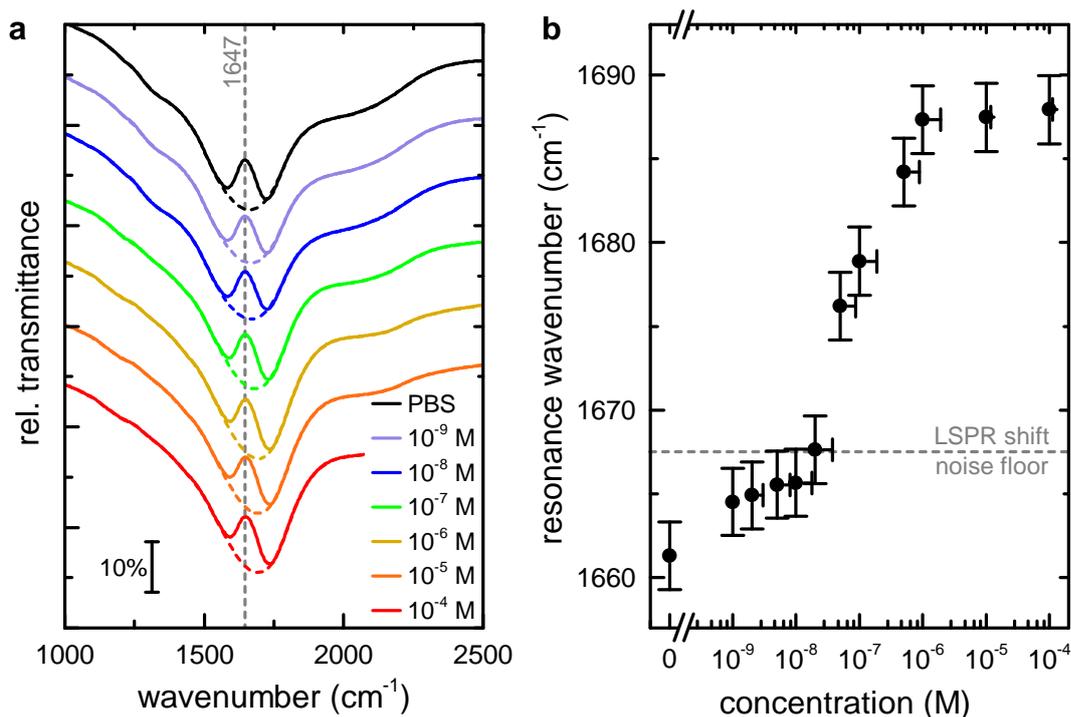
Zur Injektion der BSA-Lösungen und PBS wurden zwei verschiedene Spritzen verwendet. Die BSA-Spritze wurde, zusammen mit der Zuleitung der MFZ, vor Beginn der Messung gründlich mit  $100 \mu\text{M}$  BSA und anschließend PBS gespült, um eine Absättigung der Kunststoffoberflächen zu erreichen.

Zu Beginn der Messung wurde die MFZ mit 1 ml PBS gespült und die *arrays* A1–A12 mit je  $10 \times 50$  *scans* und Auflösung  $8 \text{ cm}^{-1}$  vermessen.

Anschließend wurde jeweils 0,5 ml BSA-Lösung im Verlauf von ca. 5 min bei einer möglichst konstanten Flussrate in die Zelle gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden 0,5 ml PBS injiziert, um sicherzustellen, dass nur adsorbierte Proteine detektiert werden. Die in den folgenden Abschnitten gezeigten Spektren wurden jeweils nach dem Spülschritt aufgenommen.

Die Konzentration der injizierten BSA-Lösung wurde nach jedem Messzyklus (Injektion, Inkubation, Spülen) sukzessiv erhöht, und die relative Transmission des *arrays* A8 gemessen. Beginnend bei  $1 \cdot 10^{-9}$  M wurden Konzentrationen von  $2 \cdot 10^{-9}$  M,  $5 \cdot 10^{-9}$  M,  $1 \cdot 10^{-8}$  M, ...  $1 \cdot 10^{-6}$  M verwendet, sowie  $1 \cdot 10^{-5}$  M und  $1 \cdot 10^{-4}$  M. Nach der Messung von  $1 \cdot 10^{-6}$  M wurden erneut alle *arrays* A1–A12 vermessen, bevor die Konzentration weiter erhöht wurde.

Bei den Messungen zu  $2 \cdot 10^{-7}$  M sowie  $1 \cdot 10^{-6}$  M gab es jeweils technische Probleme, es liegen daher keine Daten vor. Die in diesem Kapitel gezeigten Spektren zu  $1 \cdot 10^{-6}$  M stammen aus der Vermessung aller *A-arrays*, und sind aufgrund des erhöhten zeitlichen Abstands zwischen Injektion und Messung nur bedingt mit den anderen Messwerten vergleichbar.



**Abbildung 5.19:** SEIRS-Messungen von PBS in der MFZ auf S08#11-A8 nach Inkubation der Antennen *in situ* mit wässriger BSA-Lösung (Konzentration sukzessiv erhöht). Zur besseren Darstellung sind die Spektren gegeneinander verschoben, und nicht alle aufgenommenen Spektren dargestellt.

(a) Relative Transmission (durchgezogene Linien) mit 500 *scans* und 8 cm<sup>-1</sup> Auflösung, sowie Wasserbanden-korrigierte relative Transmission (gestrichelt). Zur Korrektur wurde AsLS verwendet ( $\lambda = 2000$ ,  $p = 0.4$ , vgl. 3.1.3), der Bereich von 1550–1750 cm<sup>-1</sup> wurde ausgenommen. Die grau gestrichelte Linie markiert die konstante Position der Wasserbande.

(b) LSP-Resonanzfrequenz, aufgetragen gegen die BSA-Konzentration an den Antennen. Zur Bestimmung der Position wurde nahe der Resonanz eine Gaußkurve an die korrigierte Transmission angepasst. Die Fehler in der Konzentration ergeben sich aus der kumulativen Summe aller vorhergehenden Konzentrationen.

### 5.4.2 Verschiebung der Resonanzfrequenz

Abbildung 5.19a zeigt die relativen Transmissionsspektren von S08#11-A8 nach Inkubation mit verschiedenen BSA-Konzentrationen. Zunächst ist eine breitbandige Veränderung der Spektren zu beobachten. Diese zeigt sich vor allem an der relativen Lage der Wasserabsorption (1647 cm<sup>-1</sup>) im Bezug auf die Antennenresonanz. Des Weiteren verändert sich die Form der Resonanzkurve für große Wellenzahlen.

Diese Veränderungen sind Folge einer Blauverschiebung der Antennenresonanz, welche gemäß Gleichung (2.14) einer Verringerung des effektiven Brechungsindex in der Nähe der Nanoantennen entspricht.

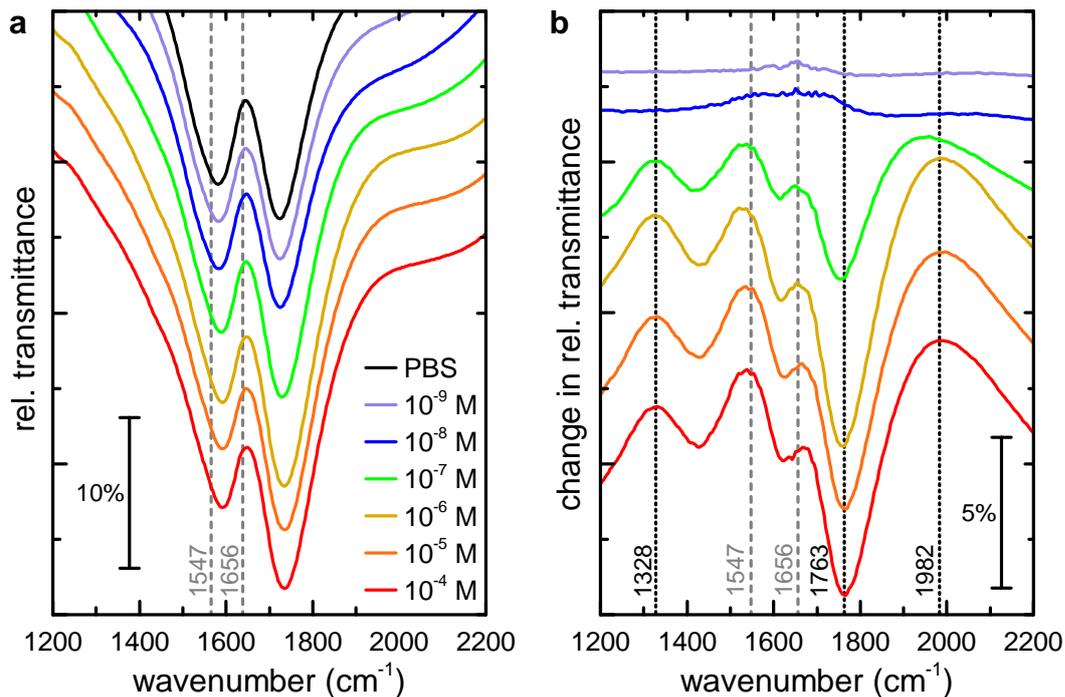
Zur genaueren Untersuchung der Verschiebung wurde eine Grundlinienkorrektur der Spektren durchgeführt ( $\lambda = 2000$ ,  $p = 0.4$ , vgl. 3.1.3), unter Ausnahme des Bereichs um die Wasserbande von  $1550 \text{ cm}^{-1} - 1750 \text{ cm}^{-1}$ . Die so erhaltenen Grundlinien (nicht die grundlinienkorrigierten Spektren) sind in Abbildung 5.19a gestrichelt dargestellt. Die Blauverschiebung der Resonanz ist deutlich zu erkennen.

Trägt man die Resonanzfrequenz der Antennen gegen die BSA-Konzentration auf (Abb. 5.19b), so ist ab  $2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$  eine deutliche Verschiebung zu beobachten, welche nahezu linear mit dem Logarithmus der Konzentration ansteigt. Ab  $10^{-6} \text{ M}$  tritt eine Sättigung der Blauverschiebung ein, bedingt durch die vollständige Bedeckung der Oberfläche der Nanoantennen durch Moleküle. Die Fehler der Konzentration stellen jeweils die Summe aller vorherigen Konzentrationen dar, um bereits adsorbierte Moleküle zu berücksichtigen. Infolge dessen wurde die Konzentration tendenziell unterschätzt, die Fehler sind daher nur in positiver Richtung gegeben.

### 5.4.3 SEIRS-Messungen der Amid-Banden

Die relativen Transmissionsspektren für verschiedene BSA-Konzentrationen sind in Abbildung 5.20a vergrößert dargestellt. An den markierten Positionen der Amidbanden sind durch die Überlagerung mit der Wasserabsorption und der Resonanzverschiebung in dieser Darstellung keine Fano-Absorptionsbanden zu beobachten. Betrachtet man die Änderung der relativen Transmission bezüglich des Spektrums vor Inkubation der Antennen (Abb. 5.20b), so ist zunächst wieder eine breitbandige Abweichung von der 100%-Linie von etwa 1% zu beobachten (vgl. 5.2.5). Ab einer Konzentration von  $10^{-7} \text{ M}$  bilden sich mehrere charakteristische Strukturen in den Änderungsspektren, die auf die Adsorption von BSA-Molekülen auf der Antennenoberfläche zurück zu führen sind.

Der breite Doppelpeak bei  $1763 \text{ cm}^{-1}$  und  $1982 \text{ cm}^{-1}$  folgt direkt aus der Blauverschiebung. Der bei  $\sim 1328 \text{ cm}^{-1}$  zu beobachtende *peak* entspricht der in Abschnitt 5.2.4 beschriebenen Gittermode. Die Frequenz der Gittermode ist unabhängig vom Brechungsindex im Nahfeld und damit der Bedeckung der Antennen mit Molekülen, da es sich um ein Phänomen des Fernfeldes handelt. Infolge der Resonanzverschiebung ist die Gittermode weniger stark ausgeprägt. Die Verringerung der Intensität des Abwärtspeaks in der relativen Transmission führt zu dem im Änderungsspektrum zu beobachtenden Aufwärtspeak.



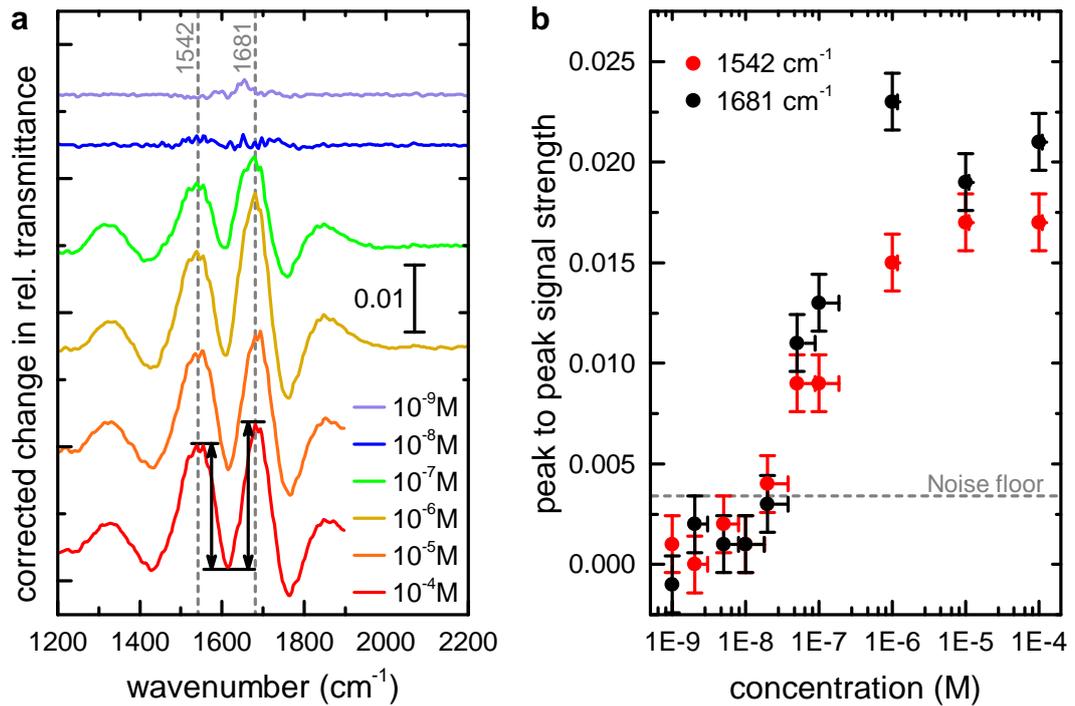
**Abbildung 5.20:** SEIRS-Messungen von PBS in der MFZ auf S08#11-A8 nach Inkubation der Antennen *in situ* mit wässriger BSA-Lösung (Konzentration sukzessiv erhöht). Zur besseren Darstellung sind die Spektren gegeneinander verschoben, und nicht alle aufgenommenen Spektren dargestellt.

(a) Relative Transmissionsspektren (je 500 *scans*, Auflösung  $8 \text{ cm}^{-1}$ ). Die Positionen der Amid I und II Vibrationsbanden von BSA sind grau gestrichelt eingezeichnet.

(b) Veränderung der relativen Transmission. Die schwarz gepunkteten Linien markieren weitere charakteristische Frequenzen der Änderungsspektren.

Des Weiteren sind zwei deutliche *peaks* an den Vibrationsenergien der Amidbanden zu beobachten. Zur Verdeutlichung der Signale wurde mit AsLS eine Grundlinienkorrektur durchgeführt ( $\lambda = 2000$ ,  $p = 0.3$ ). Ein jeweils  $60 \text{ cm}^{-1}$  breiter Frequenzbereich um die Amid I und Amid II Banden wurde von der Korrektur ausgenommen. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.21a dargestellt.

Beide Amidbanden sind deutlich zu erkennen. Die Amid II Bande liegt bei  $1542 \text{ cm}^{-1}$ , Amid I ist zu  $1681 \text{ cm}^{-1}$  verschoben. Bei einem reinen Fano-Effekt würden die Maxima beider Banden im Spektrum näher zusammen rücken, unabhängig von der spektralen Lage des Nahfeld-Maximums (vgl. 2.3.3). Die Verschiebung der Amid I Bande weg von Amid II folgt also vielmehr aus systematischen Fehlern in der Grundlinienkorrektur, die durch die Nähe der Bande zur Wasserabsorption und



**Abbildung 5.21:** Verstärkte Amidbanden auf S08#11-A8.

(a) Grundlinienkorrigierte Änderung der relativen Transmission (vgl. 5.20b). Die Bereiche von  $1547 \pm 30 \text{ cm}^{-1}$  sowie  $1656 \pm 30 \text{ cm}^{-1}$  um die grau gestrichelt dargestellten Amidbanden wurden ausgenommen. Die zur Auswertung der Signalstärke verwendeten *peaks* sind im untersten Spektrum beispielhaft schwarz skizziert. Zur besseren Darstellung sind die Spektren gegeneinander verschoben, und nicht alle aufgenommenen Spektren dargestellt.

(b) Signalstärke (*peak to peak*) der Amidbanden bei  $1542 \text{ cm}^{-1}$  (rot) und  $1681 \text{ cm}^{-1}$  (schwarz) aus a, aufgetragen gegen die Konzentration von BSA auf den Antennen. Die Fehler in der Konzentration ergeben sich aus der kumulativen Summe aller vorhergehenden Konzentrationen.

Antennenresonanz entstehen. Aus diesem Grund lassen sich keine Aussagen über die Fano-Linienform beider Banden treffen. Abbildung 5.21b zeigt die Signalstärke beider Banden in Abhängigkeit der Konzentration. Als Grundlinie zur Ausmessung der Signalstärke wurde der tiefste Punkt zwischen den *peaks* verwendet.

Der Verlauf der Signalstärke ähnelt dem der Resonanzverschiebung in Abb. 5.19b. Beide Vibrationsbanden sind ab einer Konzentration von  $5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$  deutlich zu erkennen, sehr schwache Peaks sind auch schon bei  $2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$  zu sehen. Wie bei der Verschiebung der LSPR-Frequenz ist auch bei den Amidbanden bei höheren Konzentrationen eine Sättigung zu beobachten. Das *in situ* Detektionslimit der

#### 5.4 In situ Messungen von wässriger BSA-Lösung in Transmissionsgeometrie

Amidbanden von BSA auf Nanoantennen in der MFZ entspricht somit dem oben gezeigten *ex situ* Detektionslimit an trockenen Antennen (5.3). Allerdings ist eine klare Referenzmessung der unmodifizierten Nanoantennen vor der Inkubation zwingend erforderlich, da aufgrund der Wasserbande keine deutlichen Amidbanden im relativen Transmissionsspektrum erkennbar sind.

## 5.5 Transmissions-Messungen von BSA in D<sub>2</sub>O auf Nanoantennen

Wie in Kapitel 3.3 erläutert, stellt die Verwendung von schwerem Wasser als Lösungsmittel eine Möglichkeit dar, die Überlagerung der Amidbanden durch Wasserabsorption zu vermeiden.

### 5.5.1 Vorbereitung und Durchführung der Messung

Analog zur Messung in PBS wurde der Strukturwafer RCb4 verwendet, die Messungen wurden an S08#12 durchgeführt. Die Probe wurde vor Beginn der Messung plasmagereinigt und bis zum Einbau in die MFZ in Ethanol gelagert. Gehäuse, O-Ringe und PDMS-Dichtung der MFZ wurde im Ultraschallbad in Ethanol gereinigt.

Zur Injektion von D<sub>2</sub>O und den BSA-Lösungen wurden zwei verschiedene Spritzen verwendet. Zuleitung und BSA-Spritze wurden vor Beginn der Messung mit 100 µM BSA in D<sub>2</sub>O und anschließend mit D<sub>2</sub>O gespült.

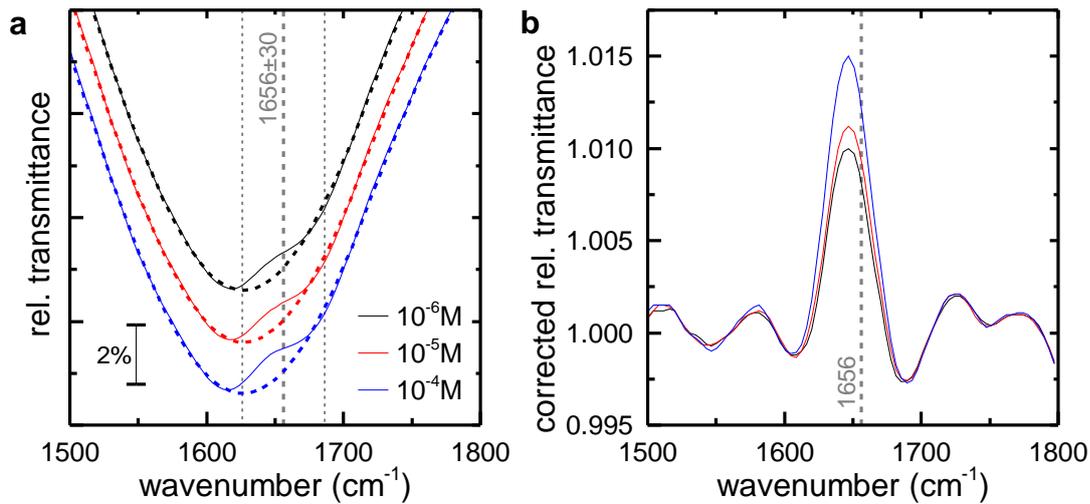
Zu Beginn der Messung wurde die MFZ mit 1 ml D<sub>2</sub>O gespült. Anschließend wurde jeweils 0,4 ml BSA-Lösung im Verlauf von ca. 5 min bei einer möglichst konstanten Flussrate in die Zelle gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden 0,4 ml D<sub>2</sub>O injiziert und anschließend das *array* B8 vermessen.

Die Konzentration der injizierten BSA-Lösung wurde sukzessiv erhöht (10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-5</sup> M, 10<sup>-4</sup> M).

### 5.5.2 SEIRS-Messungen der Amid-Banden

Abbildung 5.22a zeigt die relative Transmission des *arrays* B8 als durchgezogene Linien. Im Bereich der Amid I Bande (1656 cm<sup>-1</sup>) ist in allen Spektren eine Abweichung von der idealen Antennenkurve zu beobachten. Im Bereich der Amid II Bande (1547 cm<sup>-1</sup>) ist jedoch kein *peak* in den Spektren zu beobachten.

Zur Verdeutlichung der Amidbande wurde mit AsLS jeweils eine Basislinie berechnet. Dabei ist zu beachten, dass aufgrund der auch in D<sub>2</sub>O auftretenden Dünnschichtoszillationen weite Teile der Spektren nicht verwendet werden konnten. Eine Korrektur der Oszillationen würde zu einer unerwünschten Korrektur der gesuchten Amidbanden führen. Korrigiert man die Oszillationen nicht, so weicht die Grundlinie vor allem im Zentrum der Antennenresonanz deutlich von den Messwerten ab.



**Abbildung 5.22:** SEIRS-Messungen von  $D_2O$  in der MFZ auf S08#12-B8 nach Inkubation der Antennen *in situ* mit Lösungen von BSA in  $D_2O$  (Konzentration sukzessiv erhöht).

(a) Relative Transmissionsspektren (durchgezogene Linien) mit je 500 *scans*,  $8\text{ cm}^{-1}$  Auflösung, sowie mit AsLS bestimmte Grundlinien. Der grau markierte Bereich von  $1656 \pm 30\text{ cm}^{-1}$  wurde von der Korrektur ausgenommen. Zur Besseren Darstellung sind die Spektren gegeneinander verschoben,

(b) Grundlinienkorrigierte relative Transmission aus a, die Position der Amid I bande ist grau gestrichelt markiert.

Aus diesem Grund wurde die Grundlinienkorrektur auf den dargestellten Bereich von  $1500\text{ cm}^{-1} - 1800\text{ cm}^{-1}$  beschränkt, wobei der Bereich der Amid I Bande um  $1656 \pm 30\text{ cm}^{-1}$  ausgenommen wurde. Der Bereich der Amid II Bande konnte nicht ausgenommen werden, da sonst nicht genug Datenpunkte für eine gute Grundlinie vorhanden waren. Als AsLS-Parameter wurden  $\lambda = 200$  und  $p = 0,3$  gewählt.

Die Basislinien sind in Abbildung 5.22a gestrichelt dargestellt, die Grundlinienkorrigierten Spektren in Abbildung 5.22b. Im Bereich der Amid I Bande weisen alle drei Spektren einen deutlichen *peak* auf, mit einem Maximum bei  $1647\text{ cm}^{-1}$ . Diese Verschiebung ist Folge der leicht asymmetrischen Linienform durch das *detuning* von Antennenresonanz und Amidbande. Durch den Anstieg der Amplitude mit zunehmender BSA-Konzentration lässt sich der *peak* eindeutig der Amidbande zuordnen.



## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Möglichkeiten zur Detektion von Proteinen in wässriger Lösung mit Hilfe von antennenverstärkter Infrarotspektroskopie untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine mikrofluidische Zelle entwickelt, welche *in situ* SEIRS-Messungen von Molekülen in wässriger Lösung in Transmissionsgeometrie ermöglicht. *In situ* SEIRS-Messungen von Proteinen wurden am Beispielprotein BSA sowohl in Reflexions- als auch Transmissionsgeometrie durchgeführt.

### Reflexionsmessungen

In Reflexionsgeometrie werden die Antennen durch das Substrat hindurch angeregt, so dass keine Verluste durch das Wasser entstehen. Die entsprechende Flüssigkeitszelle wurde von J. BOCHTERLE im Rahmen seiner Doktorarbeit entwickelt.

Bei Messungen an Antennenproben der Reihe S08 konnte gezeigt werden, dass diese das einfallende Licht nur sehr schwach in Richtung des Detektors streuen. Diese schwache Streuamplitude führt zu einer Reduktion der detektierten Intensität im Fall von Antennen auf der Waferunterseite an Luft. Dieses Verhalten ist auf Interferenzeffekte zwischen dem an den Antennen gestreuten und am Substrat reflektierten Licht zurück zu führen. Bestärkt wird diese Theorie durch eine Inversion der Antennenresonanz in wässriger Umgebung infolge der reduzierten Reflektivität der Grenzschicht.

Allerdings liegt die Intensität des detektierten Lichts im gesamten untersuchten Spektralbereich ( $1000\text{ cm}^{-1} - 3000\text{ cm}^{-1}$ ) bei weniger als 2% der einfallenden Intensität. Aus diesem Grund war eine Detektion von Proteinen anhand der verstärkten Amidbanden für Konzentrationen bis zu  $1 \cdot 10^{-4}\text{ M}$  in einer angemessenen Messzeit nicht möglich, da die Signale im Rauschen untergehen. Eine Möglichkeit zur Verbesserung des SNR ist die Verwendung einer stärkeren Strahlquelle.

Durch Veränderungen in der Geometrie der Antennen lässt sich deren Streuquerschnitt deutlich erhöhen, Reflektivitäten von 80% an der Resonanzfrequenz sind möglich. *arrays* aus solchen Antennen versprechend deutlich bessere Ergebnisse bei der Proteindetektion, eine entsprechende Arbeit wurde von ADATO und ALTUG veröffentlicht [37].

## Transmissionsmessungen

Für Transmissionsmessungen muss aufgrund der starken Absorption von Wasser die Schichtdicke der Wasserschicht auf unter  $10\ \mu\text{m}$  reduziert werden. Bei der verwendeten Mikrofluidischen Zelle wird ein Photolack als Abstandhalter zwischen zwei  $\text{CaF}_2$ -Wafers verwendet. Zur Versiegelung wird eine flexible PDMS-Dichtung verwendet. Die Zelle wurde so konstruiert, dass keine permanente Versiegelung und keine weitere Präparation des Antennenwafers notwendig ist. Dies ermöglicht eine maximale Flexibilität durch den einfachen Austausch der verwendeten Antennenprobe.

So konnte eine Schichtdicke von  $6,28 \pm 0,36\ \mu\text{m}$  erreicht werden. Dies entspricht einer Transmittivität von etwa  $60\% - 80\%$  im Bereich von  $1100\ \text{cm}^{-1} - 3000\ \text{cm}^{-1}$ , in der Nähe der Wasserabsorption sinkt die Intensität auf etwa  $20\%$ . Die im Mikroskop ausleuchtbare Probenfläche hat einen Durchmesser von  $(2,63 \pm 0,04)\ \text{mm}$ .

Kurzfristige Schwankungen im Spektrum lassen sich kompensieren, in dem die Änderung der relativen Transmission anstelle der Änderung der Einkanaltransmission betrachtet wird. Langfristige Stabilität ( $> 30\ \text{min}$ ) ist nicht gegeben. Relative Änderungen der spektralen Intensität von bis zu  $1,5\%$  treten infolge der Instabilität des verwendeten Detektors auf.

Es konnte gezeigt werden, dass *in situ* SEIRS-Messungen von Proteinen in wässriger Lösung möglich sind. Verstärkte Vibrationsbanden der Amidbindungen von BSA sind aufgrund der spektralen Überlagerung mit der Wasser-Beugeschwingung bei  $1639\ \text{cm}^{-1}$  nur in der relativen Änderung der Spektren zu beobachten. Aus den Amidbanden, sowie aus der Blauverschiebung der Antennenresonanz konnte jeweils eine Detektionsgrenze für BSA von  $5 \cdot 10^{-8}\ \text{M}$  bestimmt werden.

Im Vergleich dazu konnte *ex situ* eine Detektionsgrenze von  $2 \cdot 10^{-8}\ \text{M}$  erreicht werden.

Trotz des geringeren Volumens ( $0,4\ \text{ml}$ ) ist die Antennenoberfläche bei *in situ* Inkubation schon bei Konzentrationen von  $10^{-6}\ \text{M}$  vollständig bedeckt. Bei der Messung am getrockneten Substrat (Inkubationsvolumen:  $1\ \text{ml}$ ) ist aber auch bei  $10^{-4}\ \text{M}$  noch keine Sättigung der Banden zu beobachten. Der große Unterschied in der Bedeckung lässt sich durch die verbesserten Transportbedingungen in der MFZ erklären, die Moleküle werden aktiv an die Antennen gespült. Des Weiteren lassen sich nicht adsorbierte Moleküle aufgrund der hohen Fließgeschwindigkeiten besser abspülen.

Bei Messungen der Proteine in schwerem Wasser war die Amid I Bande deutlich sichtbar. Die schwächere Amid II Bande konnte nicht beobachtet werden, da die komplexe Form des Spektrums die automatische Grundlinienkorrektur mit AsLS erschwert.

## **Ausblick**

Die Möglichkeit *in situ* SEIRS-Messungen an Antennen durchzuführen, erlaubt die Durchführung zeitaufgelöster Messungen, etwa zur Untersuchung der Adsorptionskinetik der Moleküle auf den Antennen. Solche Untersuchungen erfordern jedoch eine genaue Kontrolle des Flusses in der MFZ. Dies lässt sich etwa durch Verwendung einer Spritzenpumpe realisieren, welche konstante Flussraten von wenigen Mikrolitern pro Stunde bei hohem Druck ermöglichen können.

Des Weiteren verfügt die vorgestellte MFZ über Möglichkeiten zur Temperaturkontrolle der untersuchten Lösungen. Temperaturabhängige Änderungen im Spektrum, etwa infolge der Denaturierung von Proteinen, lassen sich *in situ* beobachten und untersuchen.

Bei den *in situ* Proteinmessungen im Rahmen dieser Arbeit banden die Moleküle nur unspezifisch mit der Goldoberfläche. Ein wichtiger nächster Schritt bei der Entwicklung eines Biosensors ist die Funktionalisierung der Antennenoberfläche mit Antikörpern, an welche nur bestimmte Proteine spezifisch binden. Gleichzeitig muss die unspezifische Bindung verhindert werden. Zwar sind solche Funktionalisierungsschichten in den Biowissenschaften weit verbreitet. Untersuchungen an getrockneten Proben haben jedoch gezeigt, dass sich übliche Verfahren zur Funktionalisierung von Oberflächen möglicherweise nicht auf Nanopartikel übertragen lassen [14].

## **Transmissionsgeometrie oder Reflexionsgeometrie?**

Ein wichtiger Punkt im Bezug auf weitere Experimente ist die Frage der besseren Messgeometrie für SEIRS-Messung von Proteinen in wässriger Lösung.

Zunächst ist die absolute detektierte Intensität im Bereich der untersuchten Amidbanden wichtig. Neben der direkten Auswirkung auf das SNR wirken sich Schwankungen in der Messstabilität bei geringen Intensitäten deutlich stärker aus.

## 6 Zusammenfassung

In Transmissionsgeometrie ist diese infolge der Wasserabsorption sehr gering. Eine Erhöhung der Intensität lässt sich nur durch eine weitere Verringerung der Schichtdicke erreichen. Dies führt aber zu einer Erhöhung des zum Befüllen der Zelle nötigen Drucks, und damit zu Schwierigkeiten beim Abdichten der Zelle. Zusätzlich wird die Intensität durch die Plasmonenresonanz weiter reduziert, so dass das SNR gerade im Bereich der untersuchten Vibrationsbanden besonders gering ist.

In Reflexionsgeometrie ist ein deutlich geringerer Einfluss der Wasserbande auf die Gesamtintensität zu erwarten. Des Weiteren sind die Messungen unabhängig von der Schichtdicke der Flusszelle, welche lediglich die Flussrate und das untersuchte Messvolumen beeinflussen. Die Antennenresonanz führt zu einer starken Erhöhung der Intensität und damit verringertem Rauschen im Bereich der untersuchten Vibrationsbanden.

Der weitaus größere Vorteil von Reflexionsmessungen ist jedoch die deutlich einfachere Konstruktion der Flusszellen. Insbesondere ist die Konstruktion von mikrofluidischen Flusszellen aus PDMS nach Vorbild der im sichtbaren Spektralbereich verwendeten Zellen möglich. Anstatt der thermischen Versiegelung lässt sich der Kanal analog zu den Flusszellen in dieser Arbeit rein mechanisch Abdichten. Insbesondere erleichtert dies die Integration von Reflexionszellen in komplexere mikrofluidische Systeme. Unter Verwendung von Mikroventilen und -pumpen ist so z.B. ein geschlossener Inkubationskreislauf möglich, bei dem ein begrenztes Probenvolumen über mehrere Minuten hinweg stetig an den Antennen vorbei fließt.

# Literaturverzeichnis

- [1] HARTSTEIN, A., J. R. KIRTLEY und J. C. TSANG: *Enhancement of the Infrared Absorption from Molecular Monolayers with Thin Metal Overlayers*. Phys. Rev. Lett., 45:201–204, Juli 1980.
- [2] AIZPURUA, J., GARNETT W. BRYANT, LEE J. RICHTER, F. J. GARCÍA DE ABAJO, BRIAN K. KELLEY und T. MALLOUK: *Optical properties of coupled metallic nanorods for field-enhanced spectroscopy*. Phys. Rev. B, 71:235420, Juni 2005.
- [3] NEUBRECH, F., A. PUCCI, T. W. CORNELIUS, S. KARIM, A. GARCÍA-ETXARRI und J. AIZPURUA: *Resonant Plasmonic and Vibrational Coupling in a Tailored Nanoantenna for Infrared Detection*. Phys. Rev. Lett., 101:157403, Oktober 2008.
- [4] D'ANDREA, C., J. BOCHTERLE, A. TOMA, C. HUCK, F. NEUBRECH, E. MESSINA, B. FAZIO, O. M. MARAGO, E. DI FABRIZIO, M. LAMY DE LA CHAPELLE, P. G. GUCCIARDI und A. PUCCI: *Optical Nanoantennas for Multiband Surface-Enhanced Infrared and Raman Spectroscopy*. ACS Nano, 7(4):3522–3531, 2013.
- [5] DRUDE, PAUL: *Zur Elektronentheorie der Metalle*. Annalen Der Physik, 306(3):566–613, 1900.
- [6] ORDAL, M. A., L. L. LONG, R. J. BELL, S. E. BELL, R. R. BELL, R. W. ALEXANDER, JR. und C. A. WARD: *Optical properties of the metals Al, Co, Cu, Au, Fe, Pb, Ni, Pd, Pt, Ag, Ti and W in the infrared and far infrared*. Appl. Opt., 22(7):1099–1119, April 1983.
- [7] ORDAL, M. A., R. J. BELL, R. W. ALEXANDER, JR., L. L. LONG und M. R. QUERRY: *Optical properties of fourteen metals in the infrared and far infrared: Al, Co, Cu, Au, Fe, Pb, Mo, Ni, Pd, Pt, Ag, Ti, V, and W*. Appl. Opt., 24(24):4493–4499, Dezember 1985.
- [8] JOHNSON, P. B. und R. W. CHRISTY: *Optical Constants of the Noble Metals*. Phys. Rev. B, 6:4370–4379, 1972.
- [9] THEISS, W.: *SCOUT - software package for optical spectroscopy*. W.Theiss Hard- and Software Dr.-Bernhard-Klein-Str. 110 D-52078 Aachen, Germany, 05 2011. Version 3.48.
- [10] NOVOTNY, LUKAS und BERT HECHT: *Principles of nano-optics*. Cambridge University Press, 2008.

## Literaturverzeichnis

- [11] MAIER, STEFAN A.: *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. Springer US, 1. Auflage, 2007.
- [12] PITARKE, J. M., V. M. SILKIN, E. V. CHULKOV und P. M. ECHENIQUE: *Theory of surface plasmons and surface-plasmon polaritons*. Rep. Prog. Phys., 70(1):1, 2007.
- [13] NEUBRECH, FRANK: *Oberflächenverstärkte Infrarot-Spektroskopie mittels Gold-Nanoantennen*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, 2008.
- [14] BOCHTERLE, JÖRG: *Nanoantennenverstärkte Infrarotspektroskopie von Molekülen*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, 2013.
- [15] BOHREN, C. F. und D. R. HUFFMANN: *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. John Wiley and Sons, New York, 1983.
- [16] NEUBRECH, F., A. GARCIA-ETXARRI, D. WEBER, J. BOCHTERLE, H. SHEN, M. LAMY DE LA CHAPELLE, G. W. BRYANT, J. AIZPURUA und A. PUCCI: *Defect-induced activation of symmetry forbidden infrared resonances in individual metallic nanorods*. Appl. Phys. Lett., 96(21):213111, 2010.
- [17] BOCHTERLE, JÖRG: *Temperaturabhängigkeit der infrarot-optischen Eigenschaften von Gold-Nanostreifen*. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, 2010.
- [18] NEUBRECH, F., T. KOLB, R. LOVRINCIC, G. FAHSOLD, A. PUCCI, J. AIZPURUA, T. W. CORNELIUS, M.E. TOIMIL-MOLARES, R. NEUMANN und S. KARIM: *Resonances of individual metal nanowires in the infrared*. Appl. Phys. Lett., 89(25):253104–253104–3, 2006.
- [19] NEUBRECH, F., D. WEBER, R. LOVRINCIC, A. PUCCI, M. LOPES, T. TOURY und M. LAMY DE LA CHAPELLE: *Resonances of individual lithographic gold nanowires in the infrared*. Appl. Phys. Lett., 93(16):163105, 2008.
- [20] BREBBIA, C. A., J. C. TELLES und L. C. WROBEL: *Boundary Element Techniques*. Springer Verlag, Berlin, 1984.
- [21] BRYANT, G. W., F. J. GARCIA DE ABAJO und J. AIZPURUA: *Mapping the Plasmon Resonances of Metallic Nanoantennas*. Nano Lett., 8(2):631–636, 2008.
- [22] WEBER, DANIEL: *Nanogaps for Nanoantenna-Assisted Infrared Spectroscopy*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, 2011.
- [23] STAFFARONI, M., J. CONWAY, S. VEDANTAM, J. TANG und E. YABLONOVITCH: *Circuit analysis in metal-optics*. Photonics and Nanostructures - Fundamentals and Applications, 10(1):166 – 176, 2012.

- [24] HUCK, CHRISTIAN: *Kleine Lücken zwischen Nanoantennen*. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, 2012.
- [25] NOVOTNY, LUKAS: *Effective Wavelength Scaling for Optical Antennas*. Phys. Rev. Lett., 98:266802, 2007.
- [26] DEMTRÖDER, WOLFGANG: *Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik*, Band 2. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 5. überarbeitete Auflage, 2009.
- [27] PUCCI, A., F. NEUBRECH, J. AIZPURUA, T. W. CORNELIUS und M. LAMY DE LA CHAPELLE: *One-Dimensional Nanostructures*, Kapitel Electromagnetic Nanowire Resonances for Field-Enhanced Spectroscopy, Seiten 175–213. Springer Verlag, 2008.
- [28] PUCCI, A., F. NEUBRECH, D. WEBER, S. HONG, T. TOURY und M. LAMY DE LA CHAPELLE: *Surface enhanced infrared spectroscopy using gold nanoantennas*. Physica Status Solidi B, 247(8):2071–2074, 2010.
- [29] LIAO, P. F. und A. WOKAUN: *Lightning rod effect in surface enhanced Raman scattering*. J. Chem. Phys., 76(1):751–752, 1982.
- [30] WEBER, D., P. ALBELLA, P. ALONSO-GONZÁLEZ, F. NEUBRECH, H. GUI, T. NAGAO, R. HILLENBRAND, J. AIZPURUA und A. PUCCI: *Longitudinal and transverse coupling in infrared gold nanoantenna arrays: long range versus short range interaction regimes*. Opt. Express, 19(16):15047–15061, August 2011.
- [31] VOLKAMER, R., P. SPIETZ, J. BURROWS und U. PLATT: *High-resolution absorption cross-section of glyoxal in the UV-vis and {IR} spectral ranges*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 172(1):35–46, 2005.
- [32] MORSE, PHILIP M.: *Diatomic Molecules According to the Wave Mechanics. II. Vibrational Levels*. Phys. Rev., 34:57–64, Juli 1929.
- [33] DEMTRÖDER, WOLFGANG: *Experimentalphysik 3: Atome, Moleküle und Festkörper*, Band 3. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 4. überarbeitete Auflage, 2010.
- [34] ALONSO-GONZÁLEZ, P., P. ALBELLA, M. SCHNELL, J. CHEN, F. HUTH, A. GARCÍA-ETXARRI, F. CASANOVA, F. GOLMAR, L. ARZUBIAGA, L.E. HUESO, J. AIZPURUA und R. HILLENBRAND: *Resolving the electromagnetic mechanism of surface-enhanced light scattering at single hot spots*. Nat. Comm., 3:684, Februar 2012.
- [35] DREGELY, D., F. NEUBRECH, HUIGAO DUAN und HARALD GIESSEN: *Quantitative mapping of plasmonic near-field intensity using infrared far-field vibrational spectroscopy*. In: *Frühjahrstagung der deutschen Physikalischen Gesellschaft*, Nummer O 7.2, Regensburg, März 2013.

- [36] NEUBRECH, F., D. WEBER, D. ENDERS, T. NAGAO und A. PUCCI: *Antenna Sensing of Surface Phonon Polaritons*. J. Phys. Chem. C, 114(16):7299–7301, April 2010.
- [37] ADATO, RONAN und HATICE ALTUG: *In-situ ultra-sensitive infrared absorption spectroscopy of biomolecule interactions in real time with plasmonic nanoantennas*. Nat. Comm., 4:2154, Juli 2013.
- [38] KUNDU, J., F. LE, P. NORDLANDER und N. J. HALAS: *Surface enhanced infrared absorption (SEIRA) spectroscopy on nanoshell aggregate substrates*. Chemical Physics Letters, 452(1–3):115–119, 2008.
- [39] LEVIN, C. S., J. KUNDU, A. BARHOUMI und N. J. HALAS: *Nanoshell-based substrates for surface enhanced spectroscopic detection of biomolecules*. Analyst, 134:1745–1750, 2009.
- [40] BROWN, L. V., K. ZHAO, N. KING, H. SOBHANI, P. NORDLANDER und N. J. HALAS: *Surface-Enhanced Infrared Absorption Using Individual Cross Antennas Tailored to Chemical Moieties*. J. Am. Chem. Soc., 135(9):3688–3695, 2013.
- [41] CHEN, K., R. ADATO und H. ALTUG: *Dual-Band Perfect Absorber for Multispectral Plasmon-Enhanced Infrared Spectroscopy*. ACS Nano, 6(9):7998–8006, 2012.
- [42] FANO, UGO: *Effects of Configuration Interaction on Intensities and Phase Shifts*. Phys. Rev., 124(6):1866–1878, 1961.
- [43] ZULOAGA, JORGE und PETER NORDLANDER: *On the Energy Shift between Near-Field and Far-Field Peak Intensities in Localized Plasmon Systems*. Nano Lett., 11(3):1280–1283, 2011.
- [44] SINGER, KILIAN: *Infrarot-optische und statische Leitfähigkeitsuntersuchungen von ultradünnen Cu-Filmen auf Si(111)-7×7*. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, 2000.
- [45] EILERS, PAUL H. C.: *A Perfect Smoother*. Anal. Chem., 75(14):3631–3636, 2003.
- [46] VOGT, JOCHEN: *Präparation von Nanolücken zwischen Nanoantennen zur oberflächenverstärkten Infrarot-Spektroskopie*. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, 2008.
- [47] NEUBRECH, FRANK: *Untersuchung plasmonischer und thermischer Eigenschaften von Goldnanodrähten mittels Infrarot-Spektroskopie*. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, 2006.
- [48] WEBER, DANIEL: *Vorstudien zur antennenresonanzverstärkten Raman-Spektroskopie mit Anregung im nahen Infrarot-Spektralbereich*. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, 2008.

- [49] WOLKE, ROBERT: *Oberflächenverstärkte Spektroskopie von Mercapto-Undekansäure auf Gold-Nanoantennen*. Bachelorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, 2011.
- [50] BANNWARTH, HORST, BRUNO P. KREMER und ANDREAS SCHULZ: *Basiswissen Physik, Chemie und Biochemie*. Springer Lehrbuch, 2. überarb. und erw. Auflage, 2011.
- [51] NELSON, DAVID L. und MICHAEL M. COX: *Lehninger Biochemie*. Springer Lehrbuch, Berlin, Heidelberg, 3. vollst. überarb. und erw. Auflage, 2001.
- [52] STADTMAN, THRESSA C.: *Selenocysteine*. *Annu. Rev. Biochem.*, 65:83–100, 1996.
- [53] BARTH, ANDREAS und CHRISTIAN ZSCHERP: *What vibrations tell about proteins*. *Q. Rev. Biophys.*, 35:369–430, Oktober 2002.
- [54] BARTH, ANDREAS: *Infrared spectroscopy of proteins*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1767:1073–1101, 2007.
- [55] SEKULA, B., K. ZIELINSKI und A. BUJACZ: *Crystallographic studies of the complexes of bovine and equine serum albumin with 3,5-diiodosalicylic acid*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 60C:316–324, 2013. PDB ID: 4JK4.
- [56] KRASOVSKII, V. I., I. A. NAGOVITSYN, G. K. CHUDINOVA, V. V. SAVRANSKII und V. A. KARAVANSKII: *Interaction of Gold Nanoparticles with Bovine Serum Albumin*. *Bulletin Of The Lebedev Physics Institute*, 34:321–324, 2007.
- [57] BUJACZ, ANNA: *Structures of bovine, equine and leporine serum albumin*. *Acta Cryst.*, D68(10):1278–1289, Oktober 2012.
- [58] PUTNAM, FRANK W. (Herausgeber): *The Plasma Proteins: Structure, Function, and Genetic Control*, Band 1. Academic Press, Inc., New York, 2. Auflage, 1975.
- [59] LAPPI, S. E., B. SMITH und S. FRANZEN: *Infrared spectra of  $H_2^{16}O$ ,  $H_2^{18}O$  and  $D_2O$  in the liquid phase by single-pass attenuated total internal reflection spectroscopy*. *Spectrochim. Acta A*, 60(11):2611–2619, 2004.
- [60] EISENBERG, D. und W. KAUZMANN: *The structure and properties of water*. Oxford University Press, 1969.
- [61] ZIMMERMANN, JOHANNES: *Voruntersuchungen zur Nanoantennen-unterstützten in-situ Infrarotspektroskopie in Flüssigkeiten*. Bachelorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, 2012.
- [62] MARTIN, P. J.: *Ion-based methods for optical thin film deposition*. *J. Mater. Sci.*, 21(1):1–25, Januar 1986.

- [63] HASENKAMPF, ANTON. Persönliche Korrespondenz, Oktober 2013.
- [64] YEE, K.: *Numerical solution of initial boundary value problems involving maxwell's equations in isotropic media*. IEEE Transactions on Antennas and Propagation, 14(3):302–307, 1966.
- [65] HUCK, CHRISTIAN. Persönliche Korrespondenz, Oktober 2013.
- [66] BIRARDA, G., G. GRENCI, L. BUSINARO, B. MARMIROLI, S. PACOR und L. VACCARI: *Fabrication of a microfluidic platform for investigating dynamic biochemical processes in living samples by FTIR microspectroscopy*. Microelectron. Eng., 87:806–809, 2010.
- [67] BIRARDA, G., G. GRENCI und L. VACCARI: *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, Kapitel Synchrotron Radiation Infrared Microspectroscopy (SR-IRMS) of living-cells in physiological environment, Seiten 422–432. FORMATEX, 2010.
- [68] HINSMANN, P., J. FRANK, P. SVASEK, M. HARASEK und B. LENDL: *Design, simulation and application of a new micromixing device for time resolved infrared spectroscopy of chemical reactions in solution*. Lab. Chip, 1:16–21, 2001.
- [69] CHAN, K. L. ANDREW und SERGEI G. KAZARIAN: *FT-IR Spectroscopic Imaging of Reactions in Multiphase Flow in Microfluidic Channels*. Anal. Chem., 84:4052–4056, 2012.
- [70] CHAN, K. L. A., X. NIU, A. J. DE MELLO und S. G. KAZARIAN: *Rapid prototyping of microfluidic devices for integrating with FT-IR spectroscopic imaging*. Lab. Chip, 10:2170–2174, 2010.
- [71] GRENCI, G., G. BIRARDA, E. MITRI, L. BUSINARO, S. PACOR, L. VACCARI und M. TORMEN: *Optimization of microfluidic systems for IRMS long term measurement of living cells*. Microelectron. Eng., 98:698–702, 2012.
- [72] VACCARI, L., G. BIRARDA, L. BUSINARO, S. PACOR und G. GRENCI: *Infrared Microspectroscopy of Live Cells in Microfluidic Devices (MD-IRMS): Toward a Powerful Label-Free Cell-Based Assay*. Anal. Chem., 84:4768–4775, 2012.
- [73] FREDERICK, J., C. SANDT, S. LEFRANCOIS, G. GRENCI, L. VACCARI, F. MALLOGGI und P. DUMAS: *A Microfluidic Device For Single Cell Infrared Microspectroscopy Analysis at the SMIS Beamline*. Poster, 2012.
- [74] NORRMAN, K., A. GHANBARI-SIAHKALI und N. B. LARSEN: *6 Studies of spin-coated polymer films*. Annual Report on the Progress of Chemistry Section C: Physical Chemistry, 101:174–201, 2005.

- [75] ALLRESIST GMBH: *Haftverstärkter Positivresist X AR-P 3100/10*. Vorläufige Produktinformation für Experimentalmuster, Januar 2007.
- [76] ALLRESIST GMBH: *Entwickler AR 300-26 und AR 300-35*. Produktinformationen, September 2011.
- [77] KOSCHWANEZ, J. H., R. H. CARLSON und D. R. MELDRUM: *Thin PDMS Films Using Long Spin Times or Tert-Butyl Alcohol as a Solvent*. PLoS ONE, 4(2):e4572, Februar 2009.
- [78] FRANK, MIKE: *PDMS Mold Preparation Procedures*. MEMS Lab., Department of Mechanical Engineering, College of Engineering, SDSU, San Diego, CA.
- [79] NG LEE, J., C. PARK und G. M. WHITESIDES: *Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices*. Anal. Chem., 75:6544–6554, 2003.
- [80] McDONALD, J. COOPER und GEORGE M. WHITESIDES: *Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices*. Acc. Chem. Res., 35(7):491–499, 2002.
- [81] JO, B.-H., L.M. VAN LERBERGHE, K.M. MOTSEGOOD und D.J. BEEBE: *Three-dimensional micro-channel fabrication in polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer*. Journal of Microelectromechanical Systems, 9(1):76–81, 2000.
- [82] SATYANARAYANA, S., R. N. KARNIK und A. MAJUMDAR: *Stamp-and-stick room-temperature bonding technique for microdevices*. Journal of Microelectromechanical Systems, 14(2):392–399, 2005.
- [83] SAMEL, B., M. K. CHOWDHURY und G. STEMME: *The fabrication of microfluidic structures by means of full-wafer adhesive bonding using a poly(dimethylsiloxane) catalyst*. J. Micromech. Microeng., 17(8):1710, 2007.
- [84] GUNDE, MARTA KLANJŠEK: *Vibrational modes in amorphous silicon dioxide*. Physica B, 292(3–4):286–295, 2000.



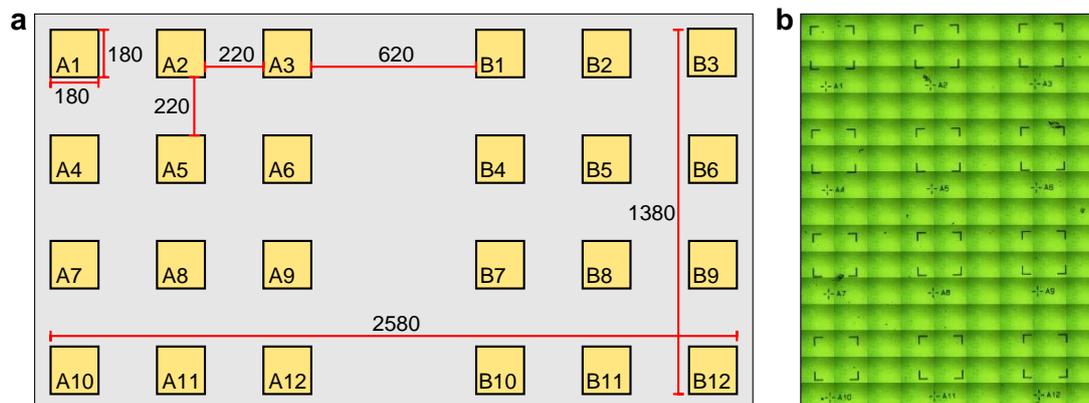
# Anhang

## A.1 Probenübersicht

Eine Übersicht über alle verwendeten Proben findet sich in Tabelle A.1.2.

Generell handelt es sich bei Proben mit der Bezeichnung „RCn“, wobei  $n$  für eine durchgehende Nummerierung steht, um einfache  $\text{CaF}_2$ -Wafer mit einer Größe von  $10 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$ . „RCbn“ bezeichnet größere  $\text{CaF}_2$ -Wafer ( $20 \times 20 \times 1 \text{ mm}^3$ ). „S08#n“ bezeichnet Antennenproben, welche ausführlicher in Abschnitt A.1.1 beschrieben sind.

### A.1.1 Nanoantennen Serie S08



**Abbildung A.1.1:** Probenlayout der Proben S08#1–#12.

(a) Schematische Darstellung. Alle Längenangaben in  $\mu\text{m}$ , die Antennenfelder sind jeweils  $100 \times 100 \mu\text{m}$  groß. Die Felder A[n] und B[n] sind jeweils identisch. Eine Auflistung der Antennenlängen und resultierenden Resonanzfrequenzen findet sich in Tabelle A.1.1.

(b) Übersichtsaufnahme der Felder A1–A12 der Probe S08#9 im Mikroskop.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Nanoantennen-Arrays verwendet, welche elektronenstrahlolithographisch hergestellt worden sind. Als Substrat wurde jeweils ein  $\text{CaF}_2$ -Wafer von  $10 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$  Größe verwendet. Die Antennenlänge variiert je nach Array von 500 bis 2550 nm (vgl. A.1.1). Der Querschnitt der Antennen beträgt stets  $60 \times 60 \text{ nm}$ , wobei die Höhe die Dicke der Haftvermittlerschicht (Titan bei S08#1–8, Chrom bei #9–14) von 10 nm eingeschlossen ist.

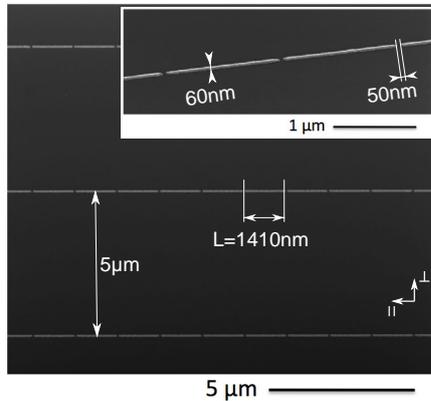
Unter Berücksichtigung der von WEBER untersuchten Interaktion von Antennen [22] wurde ein hoher transversaler Abstand von  $5\ \mu\text{m}$  gewählt. Der longitudinale Abstand beträgt  $50\ \text{nm}$  um die Gesamttextinktion zu maximieren.

**Tabelle A.1.1:** Antennenlängen und Resonanzfrequenzen der verschiedenen *Arrays* der Probenreihe S08 ( $W = H = 60\ \text{nm}$ ,  $d_x = 50\ \text{nm}$ ,  $d_y = 5\ \mu\text{m}$ ).

Feld	Antennenlänge [nm]	Resonanzfreq. #1–8		Resonanzfreq. #9–14	
		Luft [ $\text{cm}^{-1}$ ] <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O [ $\text{cm}^{-1}$ ] <sup>b</sup>	Luft [ $\text{cm}^{-1}$ ] <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O [ $\text{cm}^{-1}$ ] <sup>b</sup>
A1, B1	2550	1002	942	1148	1048
A2, B2	2310	1068	989	1227	1108
A3, B3	2110	1147	1047	1286	1154
A4, B4	1940	1209	1094	1458	1290
A5, B5	1790	1280	1149	1558	1370
A6, B6	1670	1367	1217	1646	1440
A7, B7	1560	1484	1310	1747	1518
A8, B8	1460	1623	1422	1880	1618
A9, B9	1380	1706	1487	1960	1740
A10, B10	1300	1782	1543	2043	1794
A11, B11	790	2754	2338	3315	2728
A12, B12	500	4210	3636	4905	4155

<sup>a</sup>Gemessen an S08#1 bzw. S08#11.

<sup>b</sup>Gemäß (2.25) iterativ berechnet aus der Resonanzfrequenz an Luft.



**Abbildung A.1.2:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von S08#1. Dargestellt ist das Feld A9 [4].

Tabelle A.1.2: Übersicht aller verwendeten Proben.

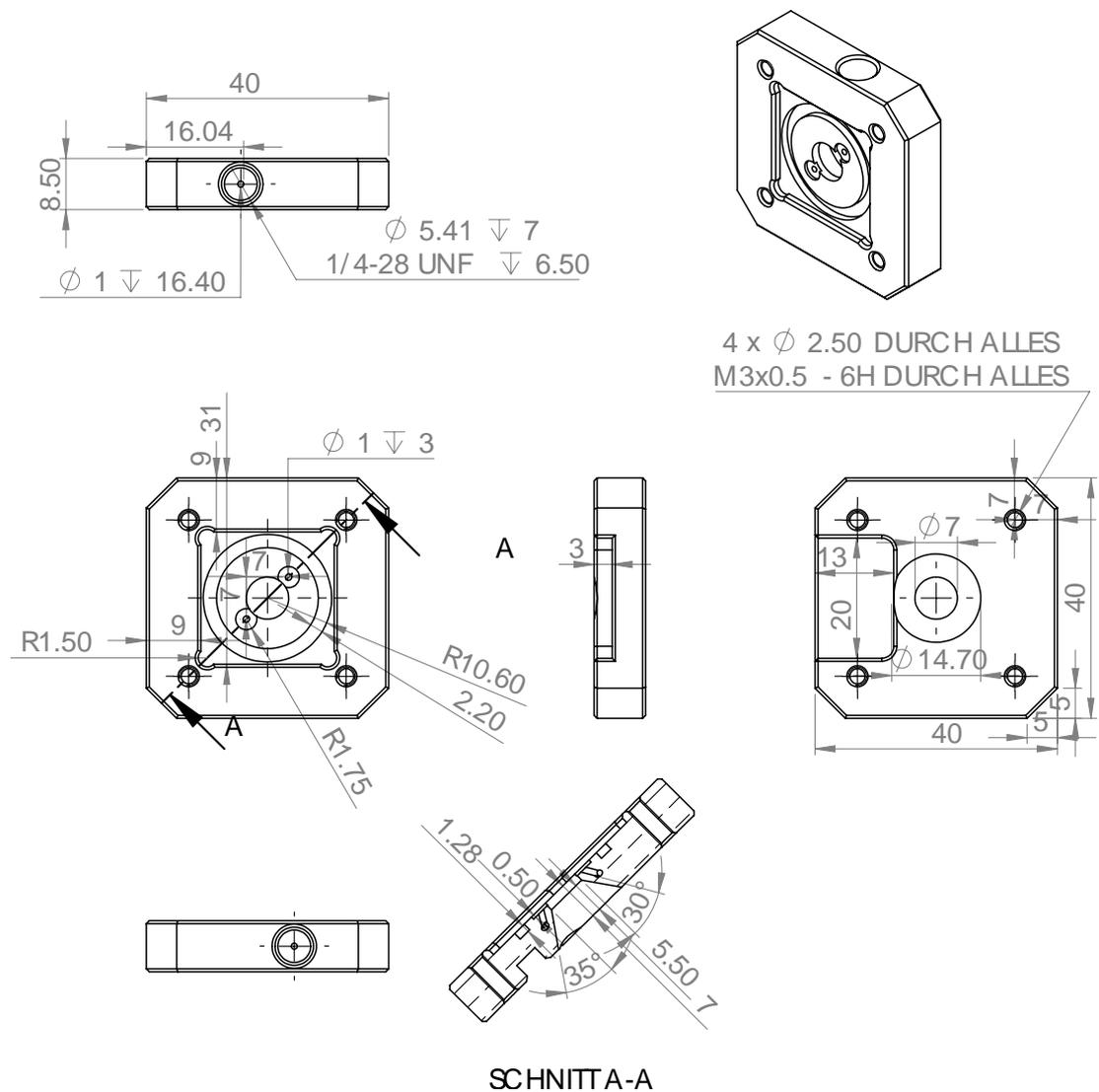
Probe	Art	Verwendung	Zustand
RC1	CaF <sub>2</sub>	SiO <sub>2</sub> -besputtert, PDMS	10 nm SiO <sub>2</sub> -Schicht, PDMS-Stücke auf Wafer
RC2	10 × 10 mm <sup>2</sup>	SiO <sub>2</sub> -besputtert, PDMS	10 nm SiO <sub>2</sub> -Schicht, PDMS-Stücke auf Wafer
RC3		—	gut
RC4		XARP, durchbohrt	durchbohrt
RC5		XARP	XARP
RCb1	CaF <sub>2</sub> ,	durchbohrt, XARP	zerstört
RCb2	20 × 20 mm <sup>2</sup>	XARP, SiO <sub>2</sub> -besputtert, PDMS	durchbohrt, XARP-Kanal (9,3 µm), schmutzig, verkratzt
RCb3		durchbohrt, XARP	zerstört
RCb4		durchbohrt, XARP	durchbohrt, XARP-Kanal (6,5 µm), XARP teilweise gelöst
RCb5		—	neu
S08#1	Antennen	Funktionalisierungstest	Antennen abgelöst nach Cysteamin 12h
S08#2	auf CaF <sub>2</sub>	Reflektivitätsmessungen	Goldspiegel, unbekanntes Molekül
S08#3		LoD BSA Reflektion	BSA 5 · 10 <sup>-4</sup> M
S08#4		LoD BSA trocken	BSA 10 <sup>-4</sup> M
S08#9		Funktionalisierungstest	stark verschmutzt nach Biotin
S08#11		LoD BSA Transmission	BSA 10 <sup>-4</sup> M
S08#12		BSA in D <sub>2</sub> O	BSA 10 <sup>-4</sup> M

## A.2 Mikrofluidische Zelle zur Messung von SEIRS in Transmissionsgeometrie

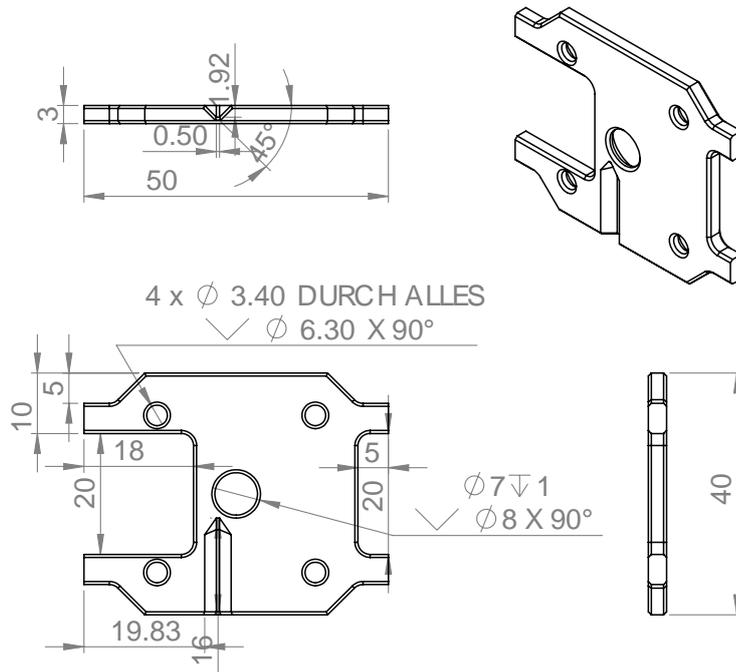
In diesem Abschnitt wird ausführlicher auf die technischen Details der verwendeten Transmissions-MFD eingegangen.

### A.2.1 Details der einzelnen Bauteile

#### Oberes Gehäuseteil



### Unteres Gehäuseteil



### O-Ringe

Viton/FPM, groß: 17,17 mm × 1,78 mm, klein: 1,15 mm × 1,00 mm

### Externe Anschlüsse

VICI Cheminert Low Pressure Fittings  
[http://www.vici.com/cfit/cfit\\_lp.php](http://www.vici.com/cfit/cfit_lp.php)

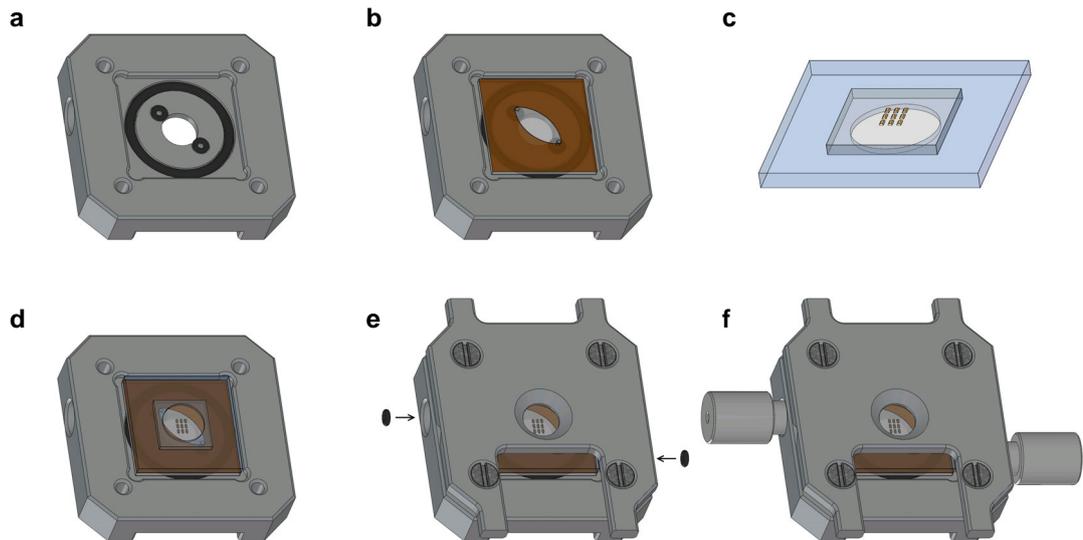
### Heizfolien

MINCO Silikongummi Thermofoil™, Typ HR 5542 R42.2 L12B  
Ø31,75 mm, Innen Ø15,24 mm, Widerstand 42,2 Ω, selbstklebend  
<http://www.mincoglobal.de/products/heaters.aspx?id=2110>

## A.2.2 Bedienungsanleitung

### Zusammenbau

1. Großen (17,17 mm × 1,78 mm) und kleine (1,15 mm × 1,00 mm) O-Ringe auf Unterseite des Anschlussblocks platzieren (**a**).
2. Strukturwafer mit dem Photolack nach oben auf den O-Ringen platzieren (genaue Ausrichtung ist noch nicht nötig) (**b**).



3. Antennenwafer in PDMS-Dichtung einsetzen, so dass die Antennen auf der Oberseite liegen (Handschuhe benutzen) (c).
4. PDMS-Dichtung und Antennenwafer auf Strukturwafer platzieren, so dass der Antennenwafer den offenen Kanal bedeckt.
5. Vorsichtig an allen Seiten andrücken.
6. Wafer und Dichtung in der Zelle ausrichten (d).
7. Deckplatte vorsichtig aufsetzen und anschrauben.
8. Kleine O-Ringe in den Bohrungen für Zu- und Ableitung platzieren.
9. Zu- und Ableitungsschläuche anschrauben (darauf achten, dass die O-Ringe zentriert bleiben) (e).

### Reinigung

Alle Bauteile der MFD mit Ausnahme des Strukturwafers(!), können mit Ethanol, Aceton oder Isopropanol gereinigt werden. Um jeglichen Kontakt des Strukturwafers mit Reinigungsmittel zu vermeiden, empfiehlt es sich, alle Teile im Anschluss mit Reinstwasser zu spülen.

Zur Reinigung der PDMS-Dichtung sollte man diese zuerst mit Aceton, dann Ethanol und zuletzt Reinstwasser spülen, jedoch nicht längerfristig einlegen, da eine Einlagerung der Moleküle in der Polymerstruktur möglich ist.

Eine gründliche Reinigung des Strukturwafers ist aufgrund der hohen Löslichkeit von XARP nicht möglich. Der Wafer lässt sich aber mit Reinstwasser spülen, um grobe Verunreinigungen zu entfernen.

# A.3 Posterbeiträge

## A.3.1 DPG Frühjahrstagung 2013 in Regensburg



### In Situ Measurements of Protein Solutions with Nanoantenna Enhanced Infrared Spectroscopy

Robert J. Wolke<sup>1</sup>, Jörg Bochterle<sup>1</sup>, Frank Neubrech<sup>1,2</sup> and Annemarie Pucci<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kirchhoff-Institute for Physics, Heidelberg University, Im Neuenheimer Feld 227, 69120 Heidelberg, Germany  
<sup>2</sup> 4th Physics Institute and Research Center SCoPE, University of Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, 70550 Stuttgart, Germany



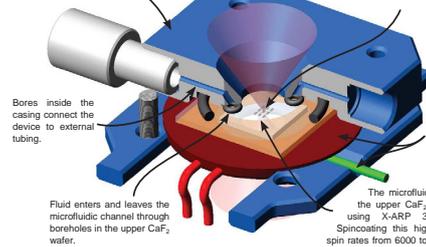
e-mail: wolke@kip.uni-heidelberg.de

#### Abstract

Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) of aqueous solutions is a difficult task due to the strong absorption bands of water in the range of 1550-1750  $\text{cm}^{-1}$  and 3000-3700  $\text{cm}^{-1}$ , in order to enable measurements in transmission geometry, the thickness of the water layer should not exceed 10  $\mu\text{m}$ . We are in the process of creating a microfluidic device (MFD) having nanoscopic metal rods inside the flow channel to utilize the signal enhancement seen in Surface-Enhanced Infrared Spectroscopy (SEIRS). This approach allows *in situ* SEIRS experiments in transmission geometry. Using photolithography, a flat microfluidic channel is constructed from photoresist on top of a calcium fluoride ( $\text{CaF}_2$ ) wafer and closed off using a second  $\text{CaF}_2$  wafer. SEIRS enhancement is achieved by micrometer long gold nanoantennas featuring localized surface plasmon resonance (LSPR) frequencies in the IR range. They are attached to the surface of the second wafer and can be exchanged easily. Our setup enables many new possibilities like *in situ* monitoring of protein binding kinetics to functional layers on the antennas or temperature dependent monitoring of protein conformation changes.

#### Microfluidic Device for *in situ* SEIRS of Aqueous Solutions

A casing of anodized aluminum provides both corrosion resistance and biocompatibility. Total size: 50x40x13mm



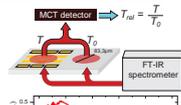
Gold nanoantenna in the channel allow for *in situ* SEIRS measurements using the focused IR beam of FT-IR microscopy setups. They are attached to the lower  $\text{CaF}_2$  wafer which can be easily exchanged. This allows tailoring of the used nanoantennas for specific applications.

Polyimide heater foil and thermocouple enable temperature control of the system.

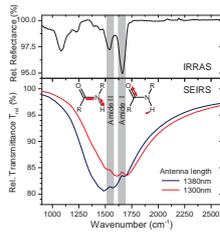
The microfluidic channel is inscribed onto the upper  $\text{CaF}_2$  wafer via photolithography, using X-ARP 3100/10 (Altehas GmbH). Spincoating this high viscosity photoresist with spin rates from 6000 to 10000 RPM yields 4 to 9  $\mu\text{m}$  thick layers. No adhesion enhancer is needed even on  $\text{CaF}_2$  [2].

#### Nanoantenna Enhanced IR Spectroscopy

Infrared (IR) spectroscopy offers a non-invasive, tracer-free method of molecular analysis by excitation of vibrational modes. However, due to a low extinction cross section, it is not normally possible to detect small amounts of molecules. Surface enhanced IR spectroscopy uses the near-field enhancing effects of plasmonic excitation of metal nanoparticles to enhance the IR signal of adsorbed molecules by as much as five orders of magnitude, corresponding to the detection of less than one attomol of particles [1].



To the right is a schematic depiction of the measurement principle for SEIRS experiments in transmission geometry, with typical spectra ( $T_s$ ,  $T_a$  and  $T_{ref}$ ) shown below. The characteristic asymmetric antenna resonance can be seen at 1650  $\text{cm}^{-1}$  for this array. The inset shows an SEM image of a typical nanoantenna array as it is used in experiments.

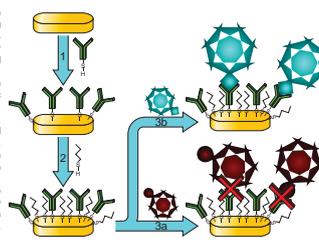


IR reflection absorption (IRRAS) spectrum of the protein bovine serum albumin (BSA) adsorbed to the antenna surface. The Amide I and II vibrational bands examined here originate from a backbone structure present in all proteins.

In the SEIRS measurement, the vibrational bands appear as asymmetric upward peaks due to fanlike coupling of plasmonic and molecular excitation. The number of molecules contributing to the signal is about three orders of magnitude lower than in the IRRAS spectrum.

#### Functionalization and Protein Binding

All proteins share a similar structure, which includes the backbone containing the strong Amide I and II vibrational bands. This renders identification of specific proteins, as is desired by many applications in biochemistry, medicine and pharmacy, quite difficult. By functionalizing the nanowire surface with antibodies, it is possible to bind only specific proteins to the antennas.



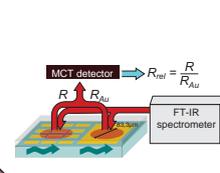
In the case of gold nanowires, thiolated antibodies can be used for functionalization (1). The remaining free gold surface is blocked with nonfunctional molecules (e.g. alkanethiols), in order to prevent unspecific binding to the surface (2). Most proteins can not bind to the functionalized antenna, so that no signal change is observed after mixing (3a). If the protein matches the antibody, it sticks to the antenna, and a SEIRS signal can be measured (3b).

#### A simpler approach: *In situ* SEIRS of Aqueous Solutions in Reflection Geometry

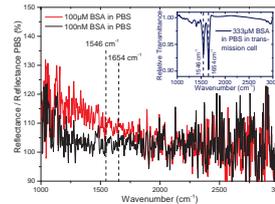
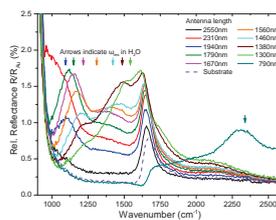
A first attempt to perform *in situ* SEIRS measurements of aqueous solutions was done in reflection geometry.

The basic setup is depicted below. Since there is hardly any reflection at the  $\text{CaF}_2$ -water-interface, a gold mirror next to the antennas was used for reference spectra.

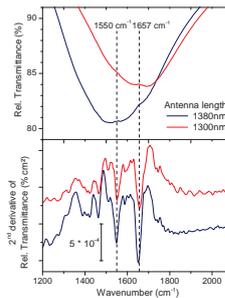
For *in situ* measurements, the reference is the spectrum of the negative sample (e.g. the solvent).



Rel. reflectance spectra of nanoantenna arrays in water for different antenna lengths. The total reflected intensity is quite low even at the antenna resonances (coloured arrows, shifts from the dry air resonances estimated using [3]). A coupling between the plasmonic excitation and the water vibration (in plane bending mode) is observed at 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$ .



*In situ* reflectance measurements for two different concentrations of BSA in PBS, after 4-10 min of contact. Neither Amide band is observed due to extremely low signal to noise ratio. The inset shows the transmittance (no antenna) of a 7  $\mu\text{m}$  thick film of BSA in PBS with much higher S/N. The amide bands can be observed in the dry transmittance spectra taken afterward (no additional contact time with BSA).



#### Conclusion and Outlook

Because of the very low signal to noise ratio, it is not possible to detect small amounts of proteins *in situ* using the reflection geometry setup described above. Measurements of protein solutions in transmission geometry present a much higher signal to noise ratio, even without plasmonic enhancement effects. One can assume that adding the signal strength inherent to SEIRS enables *in situ* detection of trace amounts of molecules in a solvent. The proximity of the Amide I vibrational band to a strong water absorption feature may present a problem: a constant water layer thickness is critical. Furthermore, with the addition of functional layers to the nanoparticles, a specific *in situ* sensor for low protein concentrations can be constructed for medical or biological applications.

#### Literature and Acknowledgements

[1] F. Neubrech *et al.*: Resonant Plasmonic and Vibrational Coupling in a Tailored Nanotantenna for Infrared Detection, PRL 101 157403, 2008  
 [2] G. Birarda *et al.*: Fabrication of a microfluidic platform for investigating dynamic biochemical processes in living samples by FTIR microspectroscopy, Microelectron. Eng. 87 806-809, 2010  
 [3] L. Novotny: Effective Wavelength Scaling for Optical Antennas, PRL 98 266802, 2007

The authors acknowledge financial support by the European project NANOANTENNA (FP7-"health"). JB acknowledges financial support by the Heidelberg Graduate School for Fundamental Physics.

# A.3.2 538. WE-Heraeus Seminar "Light at the Nanotip" in Bad Honnef



## In Situ Surface Enhanced Infrared Spectroscopy of Aqueous Solutions

Robert J. Wolke<sup>1</sup>, Jörg Bochterle<sup>1</sup>, Frank Neubrech<sup>1,2</sup> and Annemarie Pucci<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kirchhoff-Institute for Physics, Heidelberg University, Im Neuenheimer Feld 227, 69120 Heidelberg, Germany  
<sup>2</sup> 4th Physics Institute and Research Center SCoPE, University of Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, 70550 Stuttgart, Germany

e-mail: wolke@kip.uni-heidelberg.de

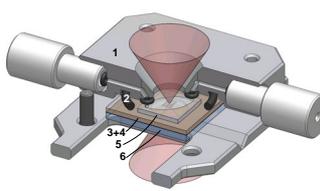


### Abstract

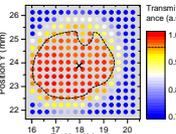
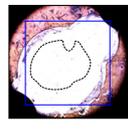
Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) of aqueous solutions is a difficult task due to the strong absorption bands of water in the range of 1550-1750  $\text{cm}^{-1}$  and 3000-3700  $\text{cm}^{-1}$ . In order to enable measurements in transmission geometry, the thickness of the water layer should not exceed 10  $\mu\text{m}$ .

We have created a microfluidic device (MFD) having nanoscopic metal rods inside the flow channel to utilize the signal enhancement seen in Surface-Enhanced Infrared Spectroscopy (SEIRS). This approach allows *in situ* SEIRS experiments in transmission geometry. Using photolithography, a flat microfluidic channel is constructed from photoresist on top of a calcium fluoride ( $\text{CaF}_2$ ) wafer and closed off using a second  $\text{CaF}_2$  wafer. A flexible seal made of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) is used for non-permanent sealing of the microfluidic channel. SEIRS enhancement is achieved by micrometer long gold nanoantennas featuring localized surface plasmon resonance (LSPR) frequencies in the IR range. They are attached to the surface of the second wafer and can be exchanged easily. Our setup enables many new possibilities like *in situ* monitoring of protein binding kinetics to functional layers on the antennas or temperature dependent monitoring of protein conformation changes.

### Microfluidic Device for *in situ* SEIRS of Aqueous Solutions

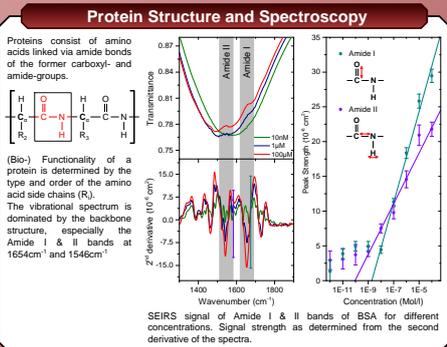
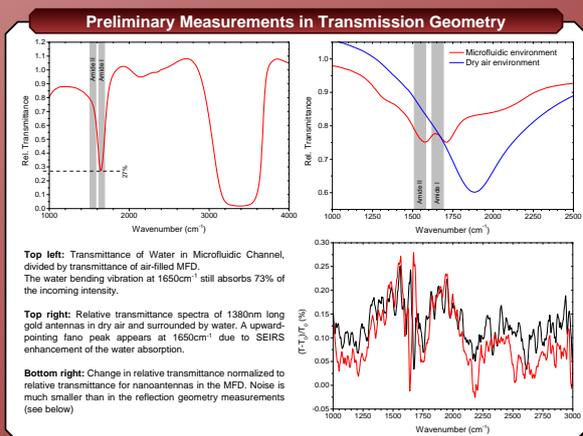
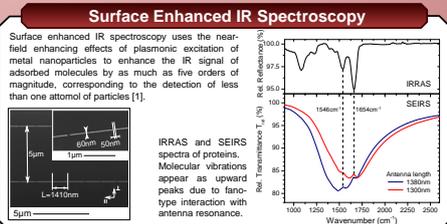


- Anodized aluminum casing with integrated fluid channels and connectors
- O-Rings for sealing
- $\text{CaF}_2$ -Wafer (20x20x1mm) with  $\text{\O}1\text{mm}$  drilled holes
- Thin layer X AR-P 3100/10 Photoresist, spun onto (3): Microfluidic channel walls and spacer
- $\text{CaF}_2$ -Wafer (10x10x1mm) with gold nanowires for SEIRS enhancement
- Flexible PDMS seal, encases antenna wafer, cut out in middle for MIR transparency

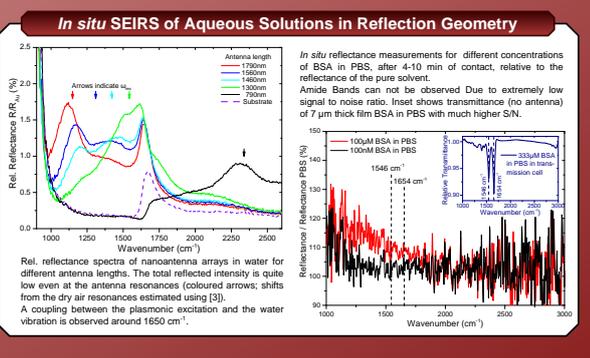
**Technical Data:**

- Size: 50x40x13mm
- Total fluid volume: ~100  $\mu\text{l}$
- Typical flow rate: ~5-20  $\mu\text{l/s}$
- Effective measurement range:  $\text{\O}3\text{mm}$  with 36X Schwartzschild objective



### Conclusion and Outlook

Because of the very low signal to noise ratio, it was not possible to detect small amounts of proteins *in situ* in reflection geometry, due to extremely low signal to noise ratio. Measurements of protein solutions in transmission geometry present a higher signal to noise ratio, even without plasmonic enhancement effects. Using a specially designed Microfluidic Device to limit the optical path through the solution, one can combine such measurements with the signal strength inherent to SEIRS, to enable *in situ* detection of trace amounts of molecules in a solvent. The proximity of the Amide I vibrational band to a strong water absorption feature may present a problem; a constant water layer thickness is critical. Furthermore, with the addition of functional layers to the nanoparticles, a specific *in situ* sensor for low protein concentrations can be constructed for medical or biological applications.



### Literature and Acknowledgements

[1] F. Neubrech et al.: Resonant Plasmonic and Vibrational Coupling in a Tailored Nanotip for Infrared Detection, PRL 101 157403, 2008  
 [2] G. Bararda et al.: Fabrication of a microfluidic platform for investigating dynamic biochemical processes in living samples by FTIR microscopy, Microelectron. Eng. 87 806-809, 2010  
 [3] L. Novotny: Effective Wavelength Scaling for Optical Antennas, PRL 98 266802, 2007

The authors acknowledge financial support by the European project NANOANTENNA (FP7-"health"). JB acknowledges financial support by the Heidelberg Graduate School for Fundamental Physics.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich im Verlauf dieser Arbeit und meines Studiums unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt dabei

Prof. Dr. Annemarie Pucci für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, sowie die Bereitstellung des interessanten Themas und die Betreuung der Arbeit.

Prof. Dr. Wolfgang Petrich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Der Arbeitsgruppe Pucci am Kirchhoff-Institut der Universität Heidelberg für die gute Zusammenarbeit, die hilfreichen Diskussionen und die durchweg gute Arbeitsatmosphäre.

Besonderer Dank geht dabei an Jörg Bochterle für Einführung in das Thema, sowie die gute Betreuung und Korrekturlesung dieser Arbeit.

Der Arbeitsgruppe Giessen am 4. physikalischen Institut der Universität Stuttgart, insbesondere Prof. Dr. Harald Giessen, der die Kooperation zwischen den Arbeitsgruppen ermöglicht hat.

Besonders hervorheben möchte ich zudem Dr. Frank Neubrech für die Koordination des Projekts, sowie die hilfreichen Ratschläge und Diskussionen.

Des Weiteren danke ich Monika Ubl für die Einführung in die Mikrostrukturierung und Betreuung im Mikrostrukturlabor, sowie Martin Mesch für die Hilfe bei der Strukturierung von PDMS.

Volker Hampel von der mechanischen Werkstatt des Kirchhoff-Institut für die Fertigung des Gehäuses der MFZ, sowie Rainer Stadler von der glastechnischen Werkstatt des Physikalischen Instituts Heidelberg für die Bohrung der CaF<sub>2</sub>-Wafer.

An letzter Stelle danke ich meiner Eltern, meinen Geschwistern und meiner Freundin Franziska, die mich jederzeit bestmöglich unterstützt haben.



**Erklärung:**

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Heidelberg, den 7. Januar 2014

.....