

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich - Mathematischen

Gesamtfakultät

der Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Dipl.-Phys. Jörg Bochterle

aus Stuttgart

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2013

Nanoantennenverstärkte Infrarotspektroskopie von Molekülen

Gutachter: Prof. Dr. Annemarie Pucci
Prof. Dr. Reiner Dahint

Nanoantennenverstärkte Infrarotspektroskopie von Molekülen

Längliche Metallnanostrukturen mit Ausdehnungen im Mikrometerbereich zeigen im Infraroten antennenartige Plasmonresonanzen und konzentrieren das elektrische Feld des einfallenden Lichts an ihren Enden. Befinden sich Moleküle innerhalb der verstärkten Nahfelder, so werden deren Schwingungsbanden stärker angeregt. Man spricht von oberflächenverstärkter Infrarotspektroskopie (SEIRS). Beleuchtet man Gold-Nanoantennen mit senkrecht zur langen Achse der Antenne polarisiertem Licht, findet man die Plasmonresonanzen im Sichtbaren und kann oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS) betreiben. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass SERS und SEIRS an derselben Nanostruktur möglich sind. Während das Infrarotsignal um einen Faktor von 650 000 verstärkt werden konnte, fiel die SERS-Verstärkung wesentlich geringer aus. In weiteren Experimenten wurden SEIRS und SERS hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit auf den Nachweis von Proteinen untersucht. Zum Nachweis von Proteinen wurden für beide Arten der Spektroskopie optimierte Nanoantennen mit Aptameren funktionalisiert, die ausschließlich an ein spezielles *Target*-Protein binden. Die Proteine konnten mittels SEIRS ab einer Konzentration von 10 Mikromol pro Liter nachgewiesen werden. Der selektive Nachweis des *Target*-Proteins aus einer Proteinmischung konnte nicht erreicht werden, da andere Proteine unspezifisch an die Antennen banden. In einem weiteren Experiment wurde die SEIRS-Signalverstärkung abhängig vom Abstand zur Antennenoberfläche gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Signal von kondensiertem CO, welches als Nahfeldprobe verwendet wurde, erst ab einer Schichtdicke von acht Angström verstärkt wird. Dies wurde der endlichen Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Leitungsbandelektronen außerhalb der Metalloberfläche (*Spillout*) zugeschrieben.

Nanoantenna enhanced infrared spectroscopy of molecules

Elongated metal nanostructures with lengths of about 1 μm exhibit antenna-like plasmon resonances in the infrared and confine the electric field of the incident light at their tips. The vibrational bands of molecules within the enhanced near-fields are excited more efficiently. This effect is called surface enhanced infrared spectroscopy (SEIRS). With the incident field polarized perpendicular to the antenna's long axis, the plasmon resonances move to the visible, where surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) is performed. Using this effect, it was shown that it is possible to do SERS and SEIRS at the same nanostructure. While the infrared signal was enhanced by a factor of 650 000, the enhancement of SERS was much lower. For the detection of proteins, antennas for both kinds of spectroscopy were functionalized with aptamers, which only bind to one certain target protein. It was possible to detect the proteins with SEIRS for concentrations as low as 10 micromols per liter. However, the selective detection of the target protein within a mixture of proteins could not be achieved due to unspecific binding of other proteins. In another experiment, the SEIRS signal enhancement was measured in dependence of the distance from the antennas' surface. It was shown, that the signal of condensed CO, which was used as near-field probe, is only enhanced above a layer thickness of eight angstrom. This was attributed to the spill out of the conduction electrons above the metal surface.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	5
2.1	Elektromagnetische Strahlung in Materie	5
2.2	Dielektrische Funktion von Metallen	6
2.2.1	Drude-Sommerfeld-Modell	6
2.3	Dielektrische Funktion von Molekülen	9
2.3.1	Lorentz-Oszillator	9
2.4	Plasmon-Polaritonen	11
2.5	Lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz	13
2.5.1	Quasi-statische Näherung	13
2.5.2	Ideale Antenne	14
2.5.3	Einfluss des Umgebungsmediums	14
2.5.4	Kinetische Induktivität von Antennen	15
2.5.5	Reale Gold-Nanoantennen	16
2.5.6	Simulationen	17
2.5.7	LSPR-Linienform	18
2.5.8	Nahfeldverstärkung	19
2.5.9	Wechselwirkung zwischen Nanoantennen	21
2.5.10	Nanoantennen- <i>Arrays</i>	22
2.6	Schwingungsspektroskopie	23
2.6.1	IR-aktive Schwingungsmoden	23
2.6.2	Raman-aktive Schwingungsmoden	24
2.6.3	Optische Messungen	25
2.6.4	Dünnschichtnäherung	29
2.7	Oberflächenverstärkte Schwingungsspektroskopie	30
2.7.1	Oberflächenverstärkte IR-Spektroskopie	30
2.7.2	Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie	35
3	Nanoantennenverstärkte IR- und Raman-Spektroskopie an einer Nanostruktur	37
3.1	Experimentelle Grundlagen	37
3.1.1	Raman-Mikroskop	38
3.1.2	Spektrometer und Detektoren	38

Inhaltsverzeichnis

3.1.3	IR-Mikroskop	39
3.1.4	Reflexionsaufbau für Vergleichsmessungen	39
3.1.5	Gold-Nanoantennen auf CaF_2	39
3.1.6	Glatte Goldprobe für Vergleichsmessungen	40
3.1.7	<i>Methylene Blue</i>	41
3.2	Optische Eigenschaften der Nanoantennen	42
3.2.1	Extinktion	42
3.2.2	Nahfeldverteilung	44
3.3	SERS	45
3.3.1	Vergleichsmessung (Raman)	45
3.3.2	SERS-Messungen auf einer Nanoantenne	46
3.3.3	Verstärkungsfaktor	46
3.4	SEIRS	47
3.4.1	Vergleichsmessung (IR)	47
3.4.2	Signalextraktion bei SEIRS Messungen	48
3.4.3	Verstärkungsfaktor	54
4	Proteine	57
4.1	Grundlagen der Biochemie	57
4.1.1	Aufbau von Proteinen	57
4.1.2	Bindung von Proteinen	61
4.1.3	DNA	62
4.1.4	Methoden zum Proteinnachweis	64
4.1.5	Proteinspektroskopie	66
4.2	Untersuchte Proteine	67
4.2.1	BSA	67
4.2.2	MnSOD	67
4.2.3	EBNA-1	68
4.2.4	GIPC-1	68
4.3	Methoden zur Erfassung von Proteinspektren	69
4.3.1	Messungen an getrockneten Proteinen	69
4.3.2	Messungen an gelösten Proteinen	71
4.3.3	Vergleich gelöster und getrockneter Proteine	73
4.4	IR-Spektren der Proteine und Aptamere	74
4.4.1	MnSOD	75
4.4.2	EBNA-1	77
4.4.3	GIPC-1	77
4.4.4	Aptamer gegen EBNA-1	77
5	Antennenverstärkte IR-Spektroskopie von Proteinen	79
5.1	Nanoantennen	79
5.1.1	Probenlayout	79

5.1.2	Vergleich der verschiedenen Proben	80
5.2	Antennenverstärkte Proteinsignale	81
5.2.1	Präparation	81
5.2.2	IR-Messung	82
5.2.3	Signalverstärkung	83
5.2.4	Anzahl der Proteine auf den Nanoantennen	84
5.3	Detektionslimit	84
5.3.1	Präparation	85
5.3.2	IR-Messung	85
5.4	Auflösungsabhängigkeit	87
5.5	Nanoantennenbasierter Biosensor	88
5.5.1	Protokoll für die Funktionalisierung der Nanoantennen	88
5.5.2	SERS-Messungen	89
5.5.3	IR-Messungen	90
5.5.4	Funktionalisierung der Nanoantennen	91
5.5.5	Detektionslimit von MnSOD auf funktionalisiertem Biosensor	92
5.5.6	Nachweis der Selektivität	94
5.5.7	Nachweis von Proteinen in biologischen Proben	97
5.5.8	Experimente mit EBNA-1 und GIPC-1	98
6	Präzisionsvermessung des Nahfelds resonanter Nanoantennen	101
6.1	Theoretische Grundlagen	101
6.1.1	Ladungsträgerdichte an Metalloberflächen	101
6.1.2	Elektronen- <i>Spillout</i> bei plasmonischer Anregung	102
6.1.3	Molekül Adsorption	103
6.2	Experimentelle Grundlagen	104
6.2.1	UHV-Kammer	104
6.2.2	CO	106
6.2.3	Gold-Nanoantennen auf Silizium	106
6.2.4	Vergleichsprobe	106
6.2.5	Präparation und <i>in situ</i> Messung	107
6.3	Bestimmung der Schichtdicke	107
6.4	CO-Signal auf Antennen	109
6.4.1	Verschiebung der Antennenresonanz	111
6.4.2	Verstärktes CO-Vibrationssignal	112
6.5	Spektraler Verlauf des Vibrationssignals für verschiedene d_{CO}	112
6.6	Vergleich der Vibrationssignale und der Resonanzverschiebung	114
6.7	Interpretation des beobachteten Verhaltens	114
6.7.1	Alternative Erklärungen	115
6.8	Signalverstärkung und Nahfeldverteilung	116
6.9	Vergleich mit anderen Messungen	119

7 Zusammenfassung und Ausblick	123
Literaturverzeichnis	128
A Anhang	148
A.1 Optische Eigenschaften der Substrate	148
A.2 Eigenschaften der verwendeten IR-Mikroskope	149
A.2.1 <i>Bruker Hyperion 1000</i>	150
A.2.2 <i>Thermo Scientific Nicolet iN10 MX</i>	151
A.2.3 Charakterisierung der Mikroskope	151
A.3 Elektronenstrahlithographie	152
A.4 Abschätzung der Thermo- und Photodesorption von CO	153
A.5 Übersicht über alle Nanoantennen	156
Publikationsliste	158
Abkürzungs- und Variablenverzeichnis	160
Abbildungsverzeichnis	163
Index	165
Danksagung	167

1 Einleitung

Seit der Erfindung der Spektralanalyse [1] von GUSTAV ROBERT KIRCHHOFF und ROBERT WILHELM BUNSEN im Jahr 1859 hat sich die Spektroskopie zu einem wichtigen Werkzeug in vielen Bereichen der Natur- und Lebenswissenschaften entwickelt. Ursprünglich wurden Spektrallinien im sichtbaren Spektralbereich untersucht, deren Ursache in der Anregung elektronischer Übergänge in Atomen und Molekülen liegt. Das Energiespektrum dieser Übergänge erstreckt sich von einigen hundert Millielektronenvolt (meV) über den sichtbaren und ultravioletten (UV) bis in den Röntgen-Bereich. Energetisch niedriger, zwischen Energien von wenigen meV und etwa 500 meV, liegen Anregungen in Molekülen und Festkörpern, bei denen Atome aus ihrer Ruhelage ausgelenkt und zu Schwingungen angeregt werden. Diese Vibrationen können durch inelastische Elektronenstreuung (HREELS¹ [2]), inelastische Photonenstreuung (Raman-Spektroskopie [3]) und die Absorption von Infrarot-(IR-)Photonen (IR-Spektroskopie [4]) angeregt werden. Die charakteristischen Energien und Intensitäten der Linien liefern Aufschluss über Art und chemische Zusammensetzung des untersuchten Materials. Die geringen Wirkungsquerschnitte der Moleküle bei IR- und Raman-Spektroskopie ($\sim 10^{-20}\text{cm}^2$ und $\sim 10^{-30}\text{cm}^2$) lassen sich durch die Kopplung an Metalloberflächen vergrößern. Bereits 1974 wiesen FLEISCHMANN *et al.* [5] eine Verstärkung des Raman-Signals von Molekülen, die auf rauen Metalloberflächen adsorbiert sind, nach. Sechs Jahre später haben HARTSTEIN *et al.* [6] herausgefunden, dass auch die IR-Absorption von Molekülen auf Metallinseln verstärkt wird. Diese Effekte werden oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS²) und oberflächenverstärkte Infrarot-Absorption (SEIRA³) genannt.

Der Mechanismus der Verstärkung wird über kollektive Oszillationen der freien Leitungselektronen im Metall erklärt. Diese sogenannten Oberflächenplasmonen führen dazu, dass das elektromagnetische Feld des Lichts an der Oberfläche konzentriert wird. Die Verwendung von voneinander isolierten Metallnanopartikeln der geeigneten Größe ermöglicht eine resonante und damit verbesserte Anregung von Oberflächenplasmonen, die wegen der Lokalisierung auf den Nanopartikel als lokalisierte Oberflächenplasmon-Resonanzen (LSPR) bezeichnet werden [7]. Aufgrund ihrer Wechselwirkung mit elektromagnetischer Strahlung, die sich ana-

¹*High Resolution Electron Energy Loss Spectroscopy*

²*Surface Enhanced Raman Scattering*

³*Surface Enhanced Infrared Absorption*

1 Einleitung

log zu der von Radioantennen verhält, werden diese plasmonischen Nanopartikel oft auch Nanoantennen genannt [8].

Maßgeblich für die spektrale Position der LSPR sind die Abmessungen der Nanoantennen. Metallnanokugeln [9], Metallnanozylinder [10] und andere Formen (z.B. [11]) mit Ausdehnungen um die 100 nm, zeigen LSPR im Sichtbaren. Da bei Raman-Spektroskopie meist Anregungswellenlängen im sichtbaren Spektralbereich zum Einsatz kommen, können diese Strukturen für SERS verwendet werden. Größere Antennen mit Ausdehnungen im Mikrometerbereich zeigen die LSPR hingegen im IR-Bereich und finden so bei SEIRS⁴ Anwendung [12].

Durch die Verstärkung des molekularen Vibrationssignals mittels Nanoantennen ist es möglich kleine Mengen von Molekülen zu detektieren. Bei SERS konnten so Signale gemessen werden, die um Faktoren zwischen 10^2 und 10^8 gegenüber den Signalen der Moleküle ohne Metallnanopartikel verstärkt waren [13]. 1997 gelang es sogar Einzelmoleküle nachzuweisen [14, 15]. Bei SEIRS wurden Verstärkungsfaktoren von bis zu einigen hunderttausend nachgewiesen [12, 16, 17]. Dies birgt großes Potential in besonders kritischen Anwendungen, wie beispielsweise der Kontrolle von Trinkwasser und Lebensmitteln [18], der Detektion von Gift- und Sprengstoffen [19, 20] und der Detektion von biologisch und medizinisch relevanten Molekülen [21] und Krankheitserregern [22, 23], bei denen der Nachweis kleinster Mengen essentiell ist.

Bei den vielen Kombinationsmöglichkeiten der Zusammensetzung von Molekülen wird klar, dass eine eindeutige Identifikation eines Materials, selbst bei vollkommener Reinheit, nicht möglich sein wird. Daher ist es hilfreich möglichst viele Informationen aus einer Messung zu erhalten. Da für Raman-Streuung und IR-Absorption unterschiedliche Auswahlregeln gelten, bieten diese beiden Spektroskopiemethoden komplementäre Informationen [24, 25]. Meist werden für Experimente bei denen beide Methoden Anwendung finden, jedoch unterschiedliche plasmonische Substrate zur Verstärkung der Signale verwendet.

In [26, 27] werden SERS und SEIRA am selben Substrat demonstriert, jedoch wurden viele gekoppelte Partikel verwendet um eine spektral sehr breite Resonanz zu erzeugen. Nur so wird einerseits das sichtbare Licht des Raman-Lasers und andererseits die IR-Vibrationen gleichzeitig verstärkt. Ein effektiverer Ansatz, der lineare Nanoantennen ausnutzt, die je nach Polarisationsrichtung zwei verschiedene diskrete LSPR aufweisen, ist in Kapitel 3 in dieser Arbeit beschrieben und in [17] veröffentlicht. Es wird gezeigt, dass es möglich sein wird, SERS und SEIRS an einer Nanostruktur durchzuführen, was bei der Implementierung in einem sogenannten *lab on a chip* von Vorteil sein könnte.

In der medizinischen Diagnostik spielt der Nachweis von Proteinen eine große Rolle. Ein Anwendungsgebiet ist dabei der Nachweis von Krebsmarkern [28–30]. Dabei handelt es sich um Proteine, die von Krebszellen in erhöhtem Maße

⁴Nanoantennenverstärkte IR-Spektroskopie wird als SEIRS bezeichnet (siehe Abschnitt 2.7.1).

ausgestoßen werden und somit die Konzentration dieses Proteins im Blut, Speichel oder Urin des Patienten deutlich anheben. Wird eine erhöhte Konzentration frühzeitig nachgewiesen, so kann bereits im frühen Stadium mit bildgebenden Verfahren (z.B. Magnetresonanztomographie) nach Tumoren gesucht werden, was die Heilungschancen verbessert. Für den Nachweis der Proteine wird meistens die spezifische Wechselwirkung zwischen Proteinen und deren Antikörpern ausgenutzt. Ist der Antikörper vorhanden und auf einer Oberfläche immobilisiert, so lassen sich die Krebsmarker gezielt aus Körperflüssigkeiten von Patienten isolieren. Der Nachweis der gebundenen Proteine wird dann häufig über optische Methoden realisiert. Dabei werden beispielsweise fluoreszente Farbstoffe (ELISA⁵) oder der Brechungsindex der Proteine (SPR-⁶ [31] oder LSPR-*Sensing*⁷ [32]) ausgenutzt. In Kapitel 5 wird gezeigt, dass sich Krebsmarker auch mittels nanoantennenverstärkter IR-Spektroskopie detektieren lassen. Dabei werden analog zu ELISA die Nanoantennen mit Molekülen bedeckt, die nur an den speziellen Krebsmarker binden. Die hier verwendeten Moleküle sind allerdings keine Antikörper, sondern DNA-Fragmente, sogenannte Aptamere, die eine ähnlich hohe Affinität zu den Proteinen aufweisen [33]. SERS- und SEIRS-Messungen werden an Nanoantennen durchgeführt, die sich auf demselben Substrat befinden und somit identisch behandelt wurden.

Im Vergleich zu ELISA bietet diese Methode den Vorteil, dass nach jedem Arbeitsschritt Spektren der adsorbierten Moleküle aufgenommen werden können. Bei ELISA hingegen wird erst im letzten Schritt gemessen. SPR- und LSPR-Sensing ermöglichen, je nach Aufbau, *in situ* Messungen von adsorbierten Molekülen. SERS und SEIRS hingegen liefern zusätzlich die spektrale Signatur der adsorbierten Moleküle.

Im Gegensatz zu den anwendungsbezogenen Versuchen wird in einem weiteren Experiment die räumliche Verteilung des Nahfelds von IR-Nanoantennen untersucht. Diese ist von großem Interesse für die antennenverstärkten Spektroskopiemethoden SERS und SEIRS, da das größte Molekülsignal von den Molekülen zu erwarten ist, die sich im stärksten Feld befinden. Zudem ist der Verlauf des Nahfelds für das grundlegende Verständnis plasmonischer Anregungen wichtig. In der Literatur wird über einige Verfahren berichtet, die sich zur Bestimmung des Nahfeldverlaufs eignen. Neben bildgebenden Methoden wie der Simulation des Nahfelds (Abschnitt 2.5.6), SNOM⁸ [34] oder der lichtinduzierten Verfrachtung von Material innerhalb einer PMMA-Schicht [35], sind auch einige Ansätze zu finden, die die Signalstärke von wachsenden Adsorbatschichten auf Nanoantennen untersuchen. Diese geben zwar nur Auskunft über den Signalverlauf senkrecht

⁵Vergleiche Abschnitt 4.1.4.

⁶*Surface Plasmon Resonance*: Oberflächenplasmon-Polariton auf ausgedehnter Metalloberfläche. Vergleiche Abschnitt 2.4.

⁷Verschiebung der LSPR-Frequenz aufgrund der Brechungsindexänderung.

⁸*Sattering Near-Field Optical Microscope*

1 Einleitung

zur Oberfläche, bieten in dieser Richtung jedoch experimentell wesentlich bessere Auflösungen. Für die Messung wird häufig LSPR-*Sensing* der wachsenden Adsorbatschicht verwendet [36, 37]. Aber auch über SERS von Molekülen, die durch Abstandshalter mit verschiedenen Dicken von den SERS-Substraten [38, 39] ferngehalten wurden und über SEIRA variabel dicker Adsorbatschichten auf rauen Metalloberflächen [40] wurde berichtet. Dabei wurde hauptsächlich das Abklingen des Signals für größer werdende Entfernungen von der Oberfläche untersucht. ZULOAGA *et al.* sagten in [41] jedoch auch eine Abschwächung des elektromagnetischen Felds für angströmskalige Abstände voraus. Sie begründeten ihre These mit der quantenmechanisch möglichen Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Leitungselektronen außerhalb der Metalloberfläche. Die Ladusträgerdichte sorgt dafür, dass im Bereich von wenigen Angström das Nahfeld der Antenne abgeschwächt ist, während man in der klassischen Elektrodynamik eine monoton steigende Feldstärke zur Oberfläche hin erwarten würde.

Die experimentelle Untersuchung dieses Effekts wird in Kapitel 6 beschrieben. Um die hohe räumliche Auflösung bei dünnsten Schichten zu erreichen, wurde im Ultrahochvakuum (UHV) Kohlenstoffmonoxid auf den mit flüssigem Helium gekühlten Antennen adsorbiert. Während des Aufwachsens der CO-Schicht wurde *in situ* der Verlauf der CO-Streckschwingung und die Verschiebung der LSPR mittels IR-Spektroskopie beobachtet. Der Vergleich mit IR-Signalen von CO, das auf einer glatten Goldschicht aufwächst und in Reflexionsgeometrie gemessen wird, zeigt ein Verhalten, das mit klassischer Elektrodynamik nicht erklärt werden kann.

Im nun folgenden Kapitel 2 werden die physikalischen Grundlagen von Licht in Materie, der optischen Eigenschaften von Metallen und Isolatoren, der plasmonischen Anregungen auf ausgedehnten Oberflächen und Nanopartikeln und die Grundlagen der Schwingungsspektroskopie erklärt. Dabei sei erwähnt, dass das Modell zur Beschreibung der plasmonischen Linienform vom Autor weiterentwickelt wurde. Spezielle Grundlagen, die für das Verständnis der Ergebnisse der einzelnen Kapitel notwendig sind, werden zu Beginn des jeweiligen Kapitels erläutert. Gleiches gilt für die experimentellen Aufbauten, da sich diese von Kapitel zu Kapitel unterscheiden.

2 Grundlagen

In diesem Kapitel wird ein Überblick über die physikalischen Grundlagen gegeben, die zum Verständnis dieser Arbeit nötig sind. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf den Grundlagen, die in allen Kapiteln von Bedeutung sind. Sachverhalte, die lediglich in einem Kapitel Anwendung finden, werden zu Beginn des jeweiligen Kapitels erklärt.

Auf eine vollständige Herleitung aller Formeln wird bewusst verzichtet. Der Leser sei auf gängige Lehrbücher [7, 42–48], Doktor- [49–54] und Diplomarbeiten [55–59] in verwandten Themenbereichen und die Diplomarbeit des Autors [60] verwiesen.

2.1 Elektromagnetische Strahlung in Materie

Die Ausbreitung von elektromagnetischer Strahlung wird in der klassischen Elektrodynamik mit den Maxwellgleichungen [43] beschrieben, aus welchen sich in nicht magnetischer ($\mu = 1$) Materie die Telegraphengleichung in folgender Form herleiten lässt:

$$\Delta \vec{E} - \frac{1}{c_0^2} \left(\varepsilon_\infty \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} + \frac{\sigma}{\varepsilon_0} \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \right) = 0. \quad (2.1.1)$$

Die Bedeutung aller Variablen ist im Abkürzungsverzeichnis im Anhang A.5 aufgeführt. Mit dem Ansatz der ebenen Welle $\vec{E} = \vec{E}_0 e^{i(\vec{k}\vec{x} - \omega t)}$ erhält man aus dieser Differenzialgleichung die Dispersionsrelation

$$|\vec{k}|^2 = \frac{\omega^2}{c_0^2} \left(\varepsilon_\infty + i \frac{\sigma}{\varepsilon_0 \omega} \right) = \varepsilon(\omega) \frac{\omega^2}{c_0^2}. \quad (2.1.2)$$

Dabei ist

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon'(\omega) + i\varepsilon''(\omega) = \varepsilon_\infty + i \frac{\sigma}{\varepsilon_0 \omega} \quad (2.1.3)$$

die sogenannte dielektrische Funktion, welche die optischen Materialeigenschaften beschreibt. Die komplexe Brechzahl $\hat{n} = n + i\kappa = \sqrt{\varepsilon(\omega)}$ ist mit der dielektrischen Funktion verknüpft und es gilt $\varepsilon' = n^2 - \kappa^2$ und $\varepsilon'' = 2n\kappa$. Wird die

2 Grundlagen

Dispersionsrelation (2.1.2) in die Gleichung der ebenen Welle¹ eingesetzt, ergibt sich folgende Wellengleichung für das elektrische Feld in Materie

$$\vec{E}(x,t) = \vec{E}_0 e^{i\left(n\frac{\omega}{c_0}x - \omega t\right)} e^{-\kappa\frac{\omega}{c_0}x}. \quad (2.1.4)$$

Die erste Exponentialfunktion beschreibt dabei eine ebene Welle mit einer im Vergleich zum Vakuum um n verringerten Wellenlänge $\lambda = \lambda_0/n = \frac{2\pi}{\omega}c_0/n$. Der zweite Term beschreibt das exponentielle Abklingen der Welle, mit der charakteristischen Eindringtiefe $\delta_{\text{skin}} = \frac{c_0}{\omega\kappa}$. Geht man vom elektrischen Feld zur Intensität $I \propto |\vec{E}|^2$ über, so ergibt sich das Lambert-Beersche Gesetz

$$I(d) = I_0 e^{-\alpha d} = I_0 e^{-\epsilon^* c d}. \quad (2.1.5)$$

In dieser Formulierung wird $\alpha = \frac{2\kappa\omega}{c_0}$ Absorptions- oder Extinktionskoeffizient genannt. Bei der Untersuchung von gelösten Substanzen wird α oft durch den molaren Extinktionskoeffizienten ϵ^* und die molare Konzentration c ersetzt.

2.2 Dielektrische Funktion von Metallen

Alle optischen Eigenschaften eines Materials lassen sich aus der dielektrischen Funktion $\varepsilon(\omega)$ errechnen. Im nun folgenden Abschnitt werden Modelle beschrieben, mit deren Hilfe man die makroskopische dielektrische Funktion aus mikroskopischen Überlegungen herleiten kann. Dies geschieht zuerst für Materialien mit frei beweglichen Ladungsträgern. Anschließend wird das Konzept des Lorentz-Oszillators vorgestellt, mit dem sowohl elektronische als auch Schwingungsanregungen beschrieben werden können.

2.2.1 Drude-Sommerfeld-Modell

Das Drude-Sommerfeld-Modell beschreibt die optischen Eigenschaften von Metallen. Die Leitungsbandelektronen werden als freies Elektronengas beschrieben und können durch ein elektrisches Feld beschleunigt werden. Die Bewegung wird durch Stöße an Gitterdefekten, Phononen oder anderen Elektronen mit der Relaxationsrate² ω_τ gedämpft.

Löst man die Bewegungsgleichung der freien Elektronen im externen elektrischen Wechselfeld

$$m_{\text{eff}}\ddot{\vec{x}} + m_{\text{eff}}\omega_\tau\dot{\vec{x}} = -e\vec{E}_0 e^{-i\omega t}, \quad (2.2.1)$$

¹Ausbreitung in x -Richtung wird ohne Beschränkung der Allgemeinheit angenommen.

²Kehrwert der mittleren Stoßzeit $\tau = 1/\omega_\tau$.

2.2 Dielektrische Funktion von Metallen

so erhält man die zeitabhängige mittlere Elektronengeschwindigkeit und daraus die Stromdichte

$$\vec{j} = Ne\dot{\vec{x}} = \underbrace{\frac{Ne^2}{m_{\text{eff}}\omega_\tau}}_{\sigma(\omega)} \frac{1}{1 - i\frac{\omega}{\omega_\tau}} \vec{E}_0 e^{-i\omega t}. \quad (2.2.2)$$

Der unterklammerte Term entspricht der dynamischen Leitfähigkeit im Ohmschen Gesetz $\vec{j} = \sigma \vec{E}$ und kann durch die Einführung der Plasmafrequenz

$$\omega_p = \sqrt{\frac{Ne^2}{\varepsilon_0 m_{\text{eff}}}} \quad (2.2.3)$$

in der Form

$$\sigma(\omega) = \varepsilon_0 \frac{\omega_p^2}{\omega_\tau} \frac{1}{1 - i\frac{\omega}{\omega_\tau}} \quad (2.2.4)$$

geschrieben werden. Setzt man dies in Gleichung (2.1.3) ein, so erhält man die dielektrische Funktion im Drude-Sommerfeld-Modell

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega\omega_\tau}, \quad (2.2.5)$$

mit entsprechendem Real- und Imaginärteil

$$\varepsilon'(\omega) = \varepsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \omega_\tau^2} \quad \text{und} \quad \varepsilon''(\omega) = \frac{\omega_p^2 \omega_\tau}{\omega^3 + \omega\omega_\tau^2}. \quad (2.2.6)$$

Im infraroten (IR) Spektralbereich ist der Realteil $\varepsilon' < 0$ und nimmt für kleine Energien sehr große Werte an (siehe Abbildung 2.2.1). In den meisten Metallen gilt $\omega_p \gg \omega_\tau$. Daher gilt in erster Näherung, dass der Realteil für $\omega \gtrsim \omega_p$ positiv wird, so dass sich elektromagnetische Strahlung im Metall ausbreiten kann. Für den Imaginärteil gilt immer $\varepsilon'' > 0$. Auch dieser nimmt für kleine Energien sehr große Werte an. Der Einfluss von ε_∞ ist wegen der großen Werte von ε' im IR sehr gering und es wird oft $\varepsilon_\infty \equiv 1$ gesetzt. Die dielektrische Funktion von Metallen wird dann durch die Plasmafrequenz und Relaxationsrate beschrieben, welche durch einen *Fit* an experimentelle Daten bestimmt werden können.

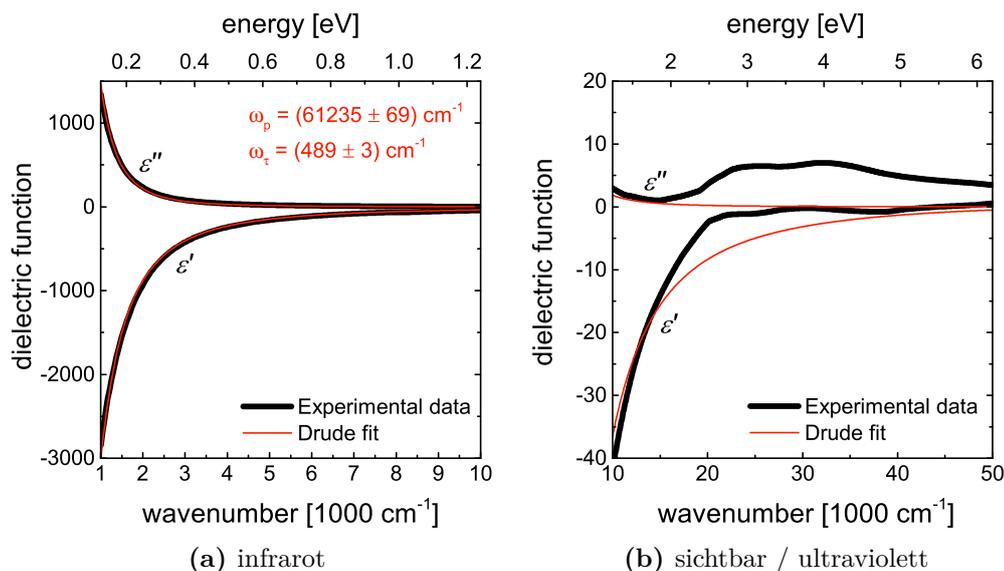


Abbildung 2.2.1: (a) und (b) zeigen die dielektrische Funktion von Gold in verschiedenen Spektralbereichen. Die experimentellen Daten (schwarz) sind aus [61, 62] entnommen. Im infraroten Spektralbereich zwischen 1000 und 8000 cm^{-1} wurde das Drude-Sommerfeld-Modell *angefittet* (rot). Die *Fit*-Parameter sind angegeben (für $\varepsilon_\infty \equiv 1$).

Dielektrische Funktion von Gold

Alle Nanostrukturen und Metalloberflächen, welche im Zuge dieser Arbeit untersucht und für optische Messungen verwendet wurden, sind aus Gold gefertigt. Das inerte Edelmetall besitzt den Vorteil, dass bei Lagerung der Proben an Luft oder durch Experimente in wässriger Lösung die Goldoberfläche nicht korrodiert. Besonders bei Nanostrukturen ist dies, wegen des großen Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen, von Bedeutung.

Die dielektrische Funktion von Gold ist in Abbildung 2.2.1 gezeigt.³ Zwischen 1000 und 8000 cm^{-1} wurde das Drude-Sommerfeld-Modell (Gleichungen (2.2.6)) *angefittet*. Die *Fit*-Parameter hängen vom *Fit*-Bereich ab und sind beispielsweise in [63] mit $\omega_p = 72800 \text{ cm}^{-1}$ und $\omega_\tau = 215 \text{ cm}^{-1}$ angegeben. Das Drude-Modell beschreibt die optischen Eigenschaften von Gold im Infraroten genau, während es im sichtbaren Spektralbereich zu deutlichen Abweichungen kommt. Dies liegt an den dort auftretenden elektronischen Interbandübergängen, die für die charakteristische goldene Farbe verantwortlich sind. Für Frequenzen über 44 000 cm^{-1} wird ε' positiv, was die Transparenz von Gold im Ultravioletten erklärt.

³Die Einheit cm^{-1} ist proportional zur Energie und wird in Abschnitt 2.6.3 erklärt.

2.3 Dielektrische Funktion von Molekülen

Ähnlich wie für die freien Elektronen in Metallen (siehe Abschnitt 2.2.1) lässt sich auch für optisch angeregte Molekülschwingungen ein Modell für die dielektrische Funktion aus der Bewegungsgleichung der Atome herleiten. Ein zusätzlicher Term beschreibt hierbei die Rückstellkraft im harmonisch genäherten Potential. Dieses Oszillatormodell, welches ebenfalls Anwendung in der Beschreibung der elektronischen Polarisierbarkeit und der phononischen Anregung in Festkörpern findet, wird Lorentz-Oszillator genannt und im folgenden Abschnitt beschrieben.

2.3.1 Lorentz-Oszillator

Die dielektrische Funktion des Lorentz-Oszillators ergibt sich als Lösung der Differentialgleichung des getriebenen und gedämpften harmonischen Oszillators und kann sich in der Schreibweise je nach Anwendungsgebiet und Autor unterscheiden, lässt sich aber stets auf folgende Form zurückführen

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\omega_{\text{str}}^2}{\omega_{\text{res}}^2 - \omega^2 - i\omega\gamma}. \quad (2.3.1)$$

Dabei beschreibt ω_{res} die Resonanzfrequenz, ω_{str} die Oszillatorstärke und γ die Dämpfung der Schwingung. Real- und Imaginärteil sind durch

$$\varepsilon'(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\omega_{\text{str}}^2 (\omega_{\text{res}}^2 - \omega^2)}{(\omega_{\text{res}}^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2 \omega^2} \quad (2.3.2)$$

und

$$\varepsilon''(\omega) = \frac{\omega_{\text{str}}^2 \gamma \omega}{(\omega_{\text{res}}^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2 \omega^2} \quad (2.3.3)$$

gegeben. Für die Spektroskopie zusätzlich von Interesse (vergleiche Abschnitt 2.6.4) ist die sogenannte Energieverlustfunktion, welche als $\Im\left(\frac{-1}{\varepsilon(\omega)}\right)$ definiert⁴ ist. Fläche, Halbwertbreite sowie *Peak*-Höhe und -position lassen sich unter den Annahmen $\gamma \ll \omega_{\text{res}}$ und $\omega_{\text{str}} \ll \omega_{\text{res}}$ näherungsweise berechnen⁵ und sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

⁴ $\Im(-1/\varepsilon(\omega))$ bezeichnet den Imaginärteil von $-1/\varepsilon(\omega)$.

⁵Gleichung (2.3.1) lässt sich mit $\bar{\omega}_{\text{str}} = \omega_{\text{str}}^2/2\omega_{\text{res}}$, $\bar{\omega}_{\text{res}} = \omega_{\text{res}}$ und $\bar{\gamma} = \gamma$ durch $\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty + \bar{\omega}_{\text{str}}/(\bar{\omega}_{\text{res}} - \omega - i(\bar{\gamma}/2))$ nähern. Der Imaginärteil der Näherung $\varepsilon''(\omega) = \bar{\omega}_{\text{str}}(\bar{\gamma}/2) / \left((\bar{\omega}_{\text{res}} - \omega)^2 + (\bar{\gamma}/2)^2 \right)$ entspricht dem in [64] über den (nicht getriebenen) gedämpften harmonischen Oszillator hergeleiteten Lorentz-Profil der natürlichen Linienbreite.

	$\Re(\varepsilon(\omega))$	$\Im(\varepsilon(\omega))$	$\Im\left(\frac{-1}{\varepsilon(\omega)}\right)$
ω_{\max}	$\omega_{\text{res}} - \frac{\gamma}{2}$	ω_{res}	$\omega_{\text{res}} + \frac{\omega_{\text{str}}^2}{2\varepsilon_{\infty}\omega_{\text{res}}}$
Maximalwert	$\varepsilon_{\infty} + \frac{\omega_{\text{str}}^2}{2\gamma\omega_{\text{res}}}$	$\frac{\omega_{\text{str}}^2}{\gamma\omega_{\text{res}}}$	$\frac{\omega_{\text{str}}^2}{\varepsilon_{\infty}^2\gamma\omega_{\text{res}}}$
ω_{\min}	$\omega_{\text{res}} + \frac{\gamma}{2}$	\times	\times
Minimalwert	$\varepsilon_{\infty} - \frac{\omega_{\text{str}}^2}{2\gamma\omega_{\text{res}}}$	\times	\times
Halbwertsbreite	\times	γ	γ
Peak-Fläche	\times	$\frac{\pi\omega_{\text{str}}^2}{2\omega_{\text{res}}}$	$\frac{\pi\omega_{\text{str}}^2}{2\varepsilon_{\infty}^2\omega_{\text{res}}}$

Tabelle 2.1: Charakteristische Größen des Lorentz-Oszillators.

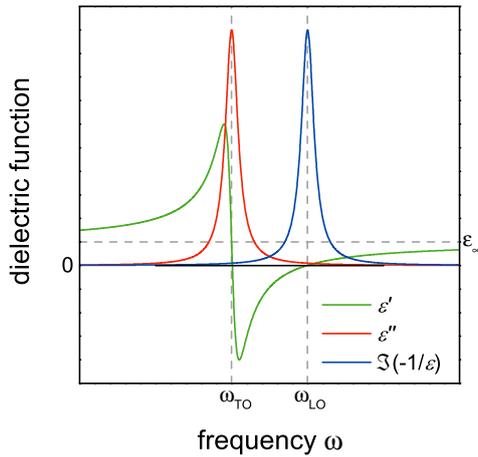


Abbildung 2.3.1: Frequenzabhängigkeit des Realteils (grün), des Imaginärteils (rot) und der Energieverlustfunktion (blau) der dielektrischen Funktion des Lorentz-Oszillators. Die Frequenzen ω_{LO} und ω_{TO} werden in der Literatur häufig verwendet, wobei $\omega_{\text{TO}} = \omega_{\text{res}}$ gilt und ω_{LO} näherungsweise beim Nulldurchgang von ε' liegt.

In Abbildung 2.3.1 ist der frequenzabhängige Verlauf des Realteils, des Imaginärteils und der Energieverlustfunktion der dielektrischen Funktion des Lorentz-Oszillators dargestellt.

Der Realteil geht für $\omega \rightarrow 0$ gegen $\varepsilon'(\omega) \rightarrow \varepsilon_{\text{st}} = \varepsilon_{\infty} + \frac{\omega_{\text{str}}^2}{\omega_{\text{res}}^2}$. Diese Konstante beschreibt die statische Polarisierbarkeit für Frequenzen unterhalb der Resonanzfrequenz des Oszillators und wird in der Literatur (z.B. in [44]) als ε_{st} bezeichnet. Für hohe Frequenzen geht ε' gegen ε_{∞} . Bei $\omega = \omega_{\text{res}}$ ist der Verlauf steil und ε' nimmt den Wert ε_{∞} an. Für $\omega_{\text{str}}^2 > 2\varepsilon_{\infty}\gamma\omega_{\text{res}}$ wird ε' negativ. In diesem Fall spricht man von einem starken Oszillator. Die Nulldurchgänge befinden sich näherungsweise am Maximum des Imaginärteils und der Energieverlustfunktion. Diese Frequenzen werden häufig auch mit ω_{TO} und ω_{LO} bezeichnet. Sie entsprechen näherungsweise der transversal optischen und longitudinal optischen Phononenfrequenz am Γ -Punkt der Phononendispersion [44]. Der Imaginärteil weist sein Maximum bei ω_{res} auf und geht für höhere und niedrigere Frequenzen gegen null. Gleiches gilt für die Energieverlustfunktion die ihr Maximum jedoch bei ω_{LO} aufweist. Während die Halbwertsbreiten von ε'' und $\Im\left(\frac{-1}{\varepsilon(\omega)}\right)$ beide γ betragen, unterscheiden sich die *Peak*-Höhen und -Flächen um einen Faktor von ε_{∞}^2 .

Hat das Material mehrere Anregungszustände, so kann die dielektrische Funktion als Summe aller einzelnen Lorentz-Oszillatoren beschrieben werden.

2.4 Plasmon-Polaritonen

In Metallen und an metallischen Oberflächen sind kollektive Anregungen der Leitungsbandelektronen, sogenannte Plasmonen, möglich. Diese sollen im folgenden Abschnitt kurz beschrieben werden. Eine ausführliche Herleitung findet sich in vielen Lehrbüchern, wie zum Beispiel in [7] oder [46].

In erster Näherung vernachlässigt man die Dämpfung $\omega_{\tau} = 0$ und setzt die Hintergrundpolarisierbarkeit $\varepsilon_{\infty} = 1$. Die dielektrische Funktion im Drude-Modell (Gleichung (2.2.5)) wird damit rein reell und vereinfacht sich zu

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_{\text{p}}^2}{\omega^2}. \quad (2.4.1)$$

Setzt man dies in die Dispersionsrelation (2.1.2) ein, so erhält man die Dispersion des Volumenplasmon-Polaritons (VPP)

$$k(\omega) = \frac{\sqrt{\omega^2 - \omega_{\text{p}}^2}}{c_0}, \quad (2.4.2)$$

welche in Abbildung 2.4.1 rot eingezeichnet ist. Für Frequenzen unterhalb von ω_{p} wird $k(\omega)$ imaginär, so dass keine Welle im Festkörper existieren kann. Ein-

2 Grundlagen

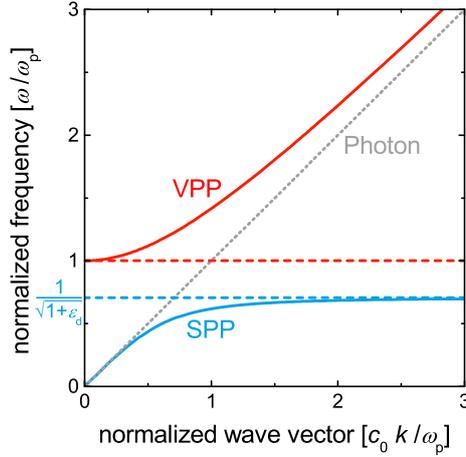


Abbildung 2.4.1: Dispersion des Volumen- (VPP) und Oberflächenplasmon-Polaritons (SPP). Die Frequenzen ω_p und $\omega_p/\sqrt{1+\epsilon_d}$ für die beiden Bedingungen $\epsilon(\omega) = 0$ und $\epsilon(\omega) = -\epsilon_d$ sind für $\epsilon_d = 1$ gestrichelt eingezeichnet. Die Lichtgerade in Vakuum ist ebenfalls gegeben (grau gestrichelt).

fallendes Licht wird daher an der Metalloberfläche reflektiert. Bei $\omega = \omega_p$ wird $k(\omega) = 0$ und $\epsilon(\omega) = 0$. Daraus leitet sich die flache Dispersion des Volumenplasmons ab, welches aufgrund seiner longitudinalen Natur jedoch nicht mit der transversalen elektromagnetischen Welle wechselwirken kann [7]. Für Frequenzen $\omega > \omega_p$ kann Licht ins Metall eindringen und bildet einen Mischzustand aus elektromagnetischer und elektronischer Anregung aus, der zuvor als VPP definiert wurde. Für große Frequenzen wird der Charakter des VPP immer lichtartiger, was sich in der Dispersion durch die Annäherung an die Lichtgerade äußert.

Durch die gebrochene Symmetrie an der Oberfläche von Metallen können sich an der Grenzschicht zwischen Metall und umgebendem Dielektrikum (ϵ_d) Oberflächenplasmon-Polaritonen (SPP⁶) ausbilden. Die Dispersionsrelation

$$k_{\parallel}(\omega) = \frac{\omega}{c_0} \sqrt{\frac{\epsilon(\omega) \epsilon_d}{\epsilon(\omega) + \epsilon_d}} \quad (2.4.3)$$

parallel (\parallel) zur Oberfläche lässt sich unter der Betrachtung der Kontinuität der elektromagnetischen Felder an den Grenzflächen herleiten [7, 65] und ist für $\epsilon_d = 1$ in Abbildung 2.4.1 blau dargestellt. Die elektrische Feldstärke weist ihr Maximum an der Oberfläche auf und nimmt senkrecht dazu exponentiell ab. SPPs können folglich nur entlang der Oberfläche propagieren.

Für $\epsilon(\omega) = -\epsilon_d$ divergiert k . Setzt man Gleichung (2.4.1) in diese Bedingung ein, so erkennt man, dass diese für $\omega = \frac{\omega_p}{\sqrt{1+\epsilon_d}}$ erfüllt ist. In der Nähe dieser Frequenz zeigt das SPP fast ausschließlich seinen plasmonischen Charakter, was sich in einer flachen Dispersion äußert. Für kleine Frequenzen nähert sich diese immer mehr der Lichtgeraden an, so dass die photonischen Eigenschaften dominieren.

⁶Abkürzung ist abgeleitet vom englischen Wort *surface plasmon polariton*.

In Abbildung 2.4.1 stellt man außerdem fest, dass sich die Dispersion des SPP stets unterhalb der Lichtgeraden befindet. Daraus kann geschlossen werden, dass unabhängig von der Frequenz, immer Impuls zur Anregung des SPP fehlt. Dieser fehlende Impuls kann durch geschickte Anregungsgeometrien [66, 67] oder durch den Gittervektor eines künstlichen Defekts der zweidimensionalen Symmetrie [7, 45] erbracht werden.

2.5 Lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz

Oberflächenplasmonen, die auf Metallpartikel beschränkt sind, können nur diskrete Wellenvektoren aufweisen. Im Gegensatz zum SPP einer ausgedehnten Grenzfläche können diese kollektiven Oszillationen direkt an Licht koppeln und werden lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR) genannt.

2.5.1 Quasi-statische Näherung

Sind die Partikel deutlich kleiner als die Wellenlänge des anregenden Lichts, so ist die Phase der elektromagnetischen Welle für alle Elektronen näherungsweise konstant, man spricht von der quasi-statischen Näherung. Nimmt man weiterhin an, dass nur die dipolare Mode angeregt wird, so lässt sich die Polarisierbarkeit α eines runden Metallpartikels mit Radius r durch

$$\alpha(\omega) = 4\pi r^3 \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_d}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_d} \quad (2.5.1)$$

beschreiben [7, 68]. Dabei bezeichnet ε_d wieder die dielektrische Funktion des umgebenden Dielektrikums und $\varepsilon(\omega)$ die dielektrische Funktion des Metalls. Man erkennt, dass α für $\varepsilon(\omega) = -2\varepsilon_d$ groß wird. Vernachlässigt man die Dämpfung im Metall, so ergibt sich aus Gleichung (2.4.1) die Resonanzbedingung

$$\omega_{\text{res}} = \frac{\omega_p}{\sqrt{1 + 2\varepsilon_d}}. \quad (2.5.2)$$

Für Ellipsoide unterscheidet sich die Resonanzbedingung je nach Polarisation der anregenden Strahlung, so dass mehrere Resonanzfrequenzen an einem Ellipsoid auftreten können.

Wie anfangs erwähnt, gilt die quasi-statische Näherung nur für $r \ll \lambda$. Während kugelförmige Teilchen mit $r \approx \lambda$ noch analytisch in der Mie-Theorie [69] beschrieben werden können, sind für längliche Partikel in dieser Größenordnung andere Modelle nötig. Ihre Wechselwirkung mit elektromagnetischer Strahlung ähnelt der von Radioantennen, weshalb die plasmonischen Nanopartikel oft als Nanoantennen bezeichnet werden [8].

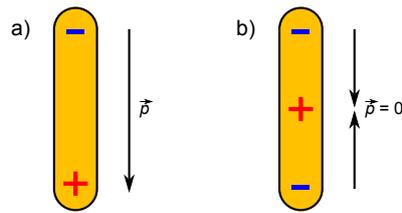


Abbildung 2.5.1: Schematische Darstellung der Ladungsverteilung und des Dipolmoments einer idealen Antenne für $j = 1$ (a) und $j = 2$ (b).

2.5.2 Ideale Antenne

Eine Radioantenne kann als ideale Antenne beschrieben werden, bei deren Beschreibung Verluste und die Trägheit der Elektronen (siehe Abschnitt 2.5.4) vernachlässigt werden. Zudem wird angenommen, dass der Durchmesser $2r$ der zylindrischen Antenne klein ist gegenüber deren Länge L . Die Antenne wird als aufgebogener Schwingkreis mit der elektromagnetischen Induktivität L_{ind} und der Kapazität C zwischen den Antennenenden beschrieben. Die Resonanzfrequenz ergibt sich aus $\omega_{\text{res}} = 1/\sqrt{L_{\text{ind}} \cdot C}$. Beachtet man, dass der Strom durch die Antenne an deren Enden null sein muss, so ergibt sich die Resonanzbedingung der idealen Antenne im Dielektrikum

$$L = j \cdot \frac{\lambda_{\text{res}}}{2n_{\text{d}}}, j \in \mathbb{N}. \quad (2.5.3)$$

Dabei ist $\frac{\lambda_{\text{res}}}{n_{\text{d}}}$ die Wellenlänge im Dielektrikum und j eine natürliche Zahl die höhere Moden beschreibt. Analog zu Gleichung (2.5.2) erkennt man leicht, dass bei konstanter Länge ein größer werdender Brechungsindex des Umgebungsmediums ($n_{\text{d}} = \sqrt{\varepsilon_{\text{d}}}$) eine Verschiebung zu größeren Wellenlängen zur Folge hat. Dies wird in der vorliegenden Arbeit verallgemeinernd als Rotverschiebung bezeichnet.

Betrachtet man die Ladungsverteilung bei höheren Moden ($j \geq 2$), so erkennt man, dass diese für gerade Werte von j immer symmetrisch zur Antennenmitte ist. Das resultierende Dipolmoment \vec{p} ist daher null und eine Kopplung an elektromagnetische Strahlung ist nicht möglich. Diese Moden werden daher auch als *dark modes* bezeichnet. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 2.5.1b skizziert. Alle Moden mit ungeradem j weisen ein resultierendes Dipolmoment auf, können an Strahlung koppeln und werden daher *bright modes* genannt (vergleiche Abbildung 2.5.1a). Durch Brechung der Symmetrie können allerdings auch *dark modes* angeregt werden. Dies kann entweder durch eine Abweichung vom senkrechten Lichteinfall, was zu Retardierungseffekten entlang der Antenne führt [60], oder durch Defekte in der Antennengeometrie [70] erreicht werden.

2.5.3 Einfluss des Umgebungsmediums

Im Gegensatz zu Radioantennen sind Nanoantennen nur selten freistehend. Sie liegen meist auf einem Substrat mit möglichst konstanter und rein reel-

ler Dielektrizitätskonstante ε_d , während der obere Teil der Antenne frei liegt ($\varepsilon_{\text{Luft}} \approx 1$). Es hat sich gezeigt [49, 50, 71], dass die Verwendung eines effektiven Brechungsindex hilfreich ist. Dieser ist als das arithmetische Mittel der beiden Dielektrizitätskonstanten

$$\varepsilon_{\text{eff}} = \frac{\varepsilon_d + \varepsilon_{\text{Luft}}}{2} \quad (2.5.4)$$

definiert.

Bei der idealen Antenne wurde die Rotverschiebung aufgrund des Umgebungsmediums durch eine Verkürzung der anregenden Wellenlänge erklärt. Eine alternative Beschreibung liefert das mikroskopische Bild, bei dem man die vom elektrischen Feld der Antenne induzierte Ladungsträgerverschiebung im Dielektrikum betrachtet. Die induzierten Dipole schwächen das Antennenfeld ab und verringern somit die Rückstellkräfte. Im Bild des mechanischen harmonischen Oszillators resultiert daraus eine Rotverschiebung der Resonanzfrequenz.

2.5.4 Kinetische Induktivität von Antennen

Ob die in dieser Arbeit verwendeten Nanoantennen als plasmonische Partikel aufgefasst oder in der klassischen Antennentheorie beschrieben werden sollten, wird in diesem Abschnitt erläutert.

Die bisher betrachtete Induktivität der Antenne ergibt sich aus der von Faraday entdeckten elektromagnetischen Induktion. Für eine Stabantenne der Länge L und der Querschnittsfläche πr^2 lässt sich die elektromagnetische Induktivität über

$$L_{\text{ind}} = \frac{\mu_0 L}{2\pi} \left(\ln \left(\frac{2L}{r} \right) - \frac{3}{4} \right) \quad (2.5.5)$$

berechnen [72], wobei μ_0 die magnetische Feldkonstante darstellt.

Die Trägheit der Elektronen wurde dabei jedoch vernachlässigt, das heißt $m_{\text{eff}} \rightarrow 0$ angenommen. Dies ist gleichbedeutend mit $\omega_p \rightarrow \infty$ (vgl. Gleichung (2.2.3)) und damit $\varepsilon' \rightarrow -\infty$ (vgl. Gleichung (2.2.5)).⁷ Für kleine Antennen mit großen Resonanzfrequenzen unterscheidet sich die dielektrische Funktion des realen Metalls jedoch deutlich von der des idealen Metalls, so dass die Masse der Elektronen einen nicht mehr vernachlässigbaren Beitrag zur Induktivität der Antenne liefert. Dieser Beitrag kann unter Vernachlässigung der elektromagnetischen Induktivität L_{ind} berechnet werden. Aus dem Kehrbruch der Leitfähigkeit im Drude-Modell (Gleichung (2.2.4)) kann man die Impedanz

$$Z = \frac{1}{\sigma(\omega)} \frac{L}{\pi r^2} = R - i\omega L_{\text{kin}} \quad (2.5.6)$$

⁷Dieses fiktive Material wird als ideales Metall bezeichnet.

2 Grundlagen

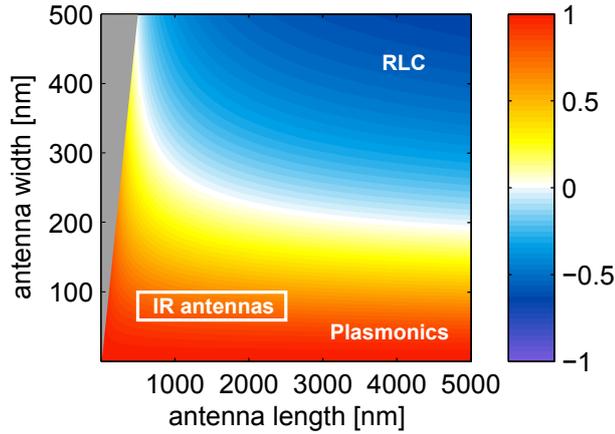


Abbildung 2.5.2:

$(L_{\text{kin}} - L_{\text{ind}}) / (L_{\text{kin}} + L_{\text{ind}})$ in Abhängigkeit der Abmessungen einer zylindrischen Antenne. Die Abmessungen der in dieser Arbeit verwendeten Antennen sind mit einem weißen Rechteck gekennzeichnet. Im roten Bereich dominiert L_{kin} und im blauen L_{ind} . Im weißen Bereich sind beide Größen gleich groß. Es wurde $\omega_p = 72800 \text{ cm}^{-1}$ angenommen.

einer Antenne der Länge L und der Querschnittsfläche πr^2 herleiten [73, 74]. Bei Vernachlässigung der Streuung ($\omega_\tau = 0$) gilt für den Ohmschen Widerstand $R = 0$ und es ergibt sich daraus

$$L_{\text{kin}} = \frac{1}{\varepsilon_0 \omega_p^2} \frac{L}{\pi r^2}. \quad (2.5.7)$$

Über den Vergleich von L_{ind} und L_{kin} lassen sich für Antennen verschiedene Regime definieren. Dominiert L_{ind} , so sollte die Antenne als klassischer RLC-Schwingkreis betrachtet werden. Ist hingegen L_{kin} dominant, so spricht man vom plasmonischen Regime [74].

In Abbildung 2.5.2 ist die Differenz von L_{kin} und L_{ind} , normiert auf deren Summe, dargestellt. Man erkennt, dass sich die in dieser Arbeit betrachteten Nanoantennen deutlich im plasmonischen Regime befinden.

2.5.5 Reale Gold-Nanoantennen

Wie bereits in Abbildung 2.5.2 angedeutet, sind die in dieser Arbeit verwendeten Gold-Nanoantennen (siehe Tabelle A.2) zwischen 500 nm und 2550 nm lang und entweder 60 nm oder 100 nm breit und hoch. Messungen (Abbildung A.5.1) und Simulationen [75, 76] der Resonanzfrequenz von Nanoantennen dieser Größenordnung zeigen immer eine Abweichung von Gleichung (2.5.3). Die Resonanzwellenlänge λ_{res} ist stets größer als die vom Modell der idealen Antenne zu erwartende. Dies liegt daran, dass die Nanoantenne nicht aus einem idealen Metall besteht und Strahlung in die Antennenoberfläche eindringen kann. Für dünne Antennen spielt der endliche Radius r der Antenne somit eine zunehmende Rolle und macht die Resonanzwellenlänge abhängig von r und ω_p des Antennenmaterials.

Die Resonanzbedingung von zylinderförmigen Antennen kann durch eine analytische Näherung von L. NOVOTNY [77] beschrieben werden. Dabei wird die Resonanzwellenlänge aus Gleichung (2.5.3) durch eine effektive Wellenlänge $\lambda_{\text{eff}}(r, \omega_p, \epsilon_{\text{eff}})$ ersetzt, welche vom Radius, dem Antennenmaterial und dem effektiven Umgebungsmedium abhängt. Die Antennengleichung nimmt dann die einfache Form $2L = \lambda_{\text{eff}}$ an. Für Antennengeometrien, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden, vereinfacht sich die Novotny-Gleichung zu einem linearen Zusammenhang mit *Offset*:

$$2L = \lambda_{\text{eff}} = a_1 + a_2 \lambda_{\text{res}}. \quad (2.5.8)$$

Die Parameter a_1 und a_2 lassen sich durch einen *Fit* an experimentelle Daten bestimmen. Aus Gleichung (2.5.8) erkennt man, dass es durch Variation der Antennenlänge L möglich ist, die gewünschte Resonanzwellenlänge zu erhalten. Es sei an dieser Stelle noch einmal auf das Modell der SPPs an ausgedehnten Oberflächen verwiesen. Die Antennen stellen hier eine Oberfläche für diese Art von Anregung dar, welche aber durch die Ausdehnung der Antenne räumlich stark begrenzt ist. Dadurch müssen Randbedingungen für das SPP erfüllt sein. Betrachtet man die Dispersionsrelation des SPPs und normiert die in dieser Arbeit relevanten IR Frequenzen (1000 bis 3500 cm^{-1}) auf ω_p von Gold, so erhält man $\frac{\omega_{\text{IR}}}{\omega_p} \lesssim 0,05$. In Abbildung 2.4.1 erkennt man, dass die Dispersion des SPP im IR beinahe der von Licht entspricht.⁸ Der minimale Unterschied zur Lichtgeraden äußert sich als Abweichung von der Proportionalität zwischen L und λ_{res} , also im Faktor a_1 in Gleichung (2.5.8). Für $\omega \rightarrow 0$ wird dieser Unterschied klein und es geht $a_1 \rightarrow 0$. Die Nanoantenne wird immer idealer. Kleine Teilchen hingegen befinden sich im flachen Teil der Dispersionsrelation und lassen damit ihre Resonanzfrequenz nur geringfügig über die Größe verändern.

2.5.6 Simulationen

Es existieren verschiedene numerische Methoden um die optischen Eigenschaften von Nanostrukturen zu simulieren. Da diese im Rahmen der Arbeit nicht durchgeführt wurden, sich aus Simulationsergebnissen aber wichtige Aussagen ableiten lassen, soll im Folgenden die häufig verwendete *finite difference time domain* (FDTD) Simulationstechnik kurz beschrieben werden. Einzelheiten dazu, und zur ebenfalls häufig verwendeten *boundary element method* (BEM), sind beispielsweise in [49, 55] zu finden.

Bei FDTD-Simulationen wird der Raum diskretisiert und in sogenannte Yee-Zellen unterteilt. Die elektromagnetischen Felder werden an jedem Gitterpunkt durch Lösen der Maxwellgleichungen bestimmt. Dabei wird das zeitliche Verhalten

⁸Die Dispersionsrelation der idealen Antenne errechnet sich aus Gleichung (2.5.3), mit $\lambda_{\text{LSPR}} = 2L = \frac{2\pi}{k_{\text{LSPR}}}$ und $\lambda_{\text{res}} = \frac{2\pi c}{\omega_{\text{res}}}$, und entspricht der Dispersion von Licht.

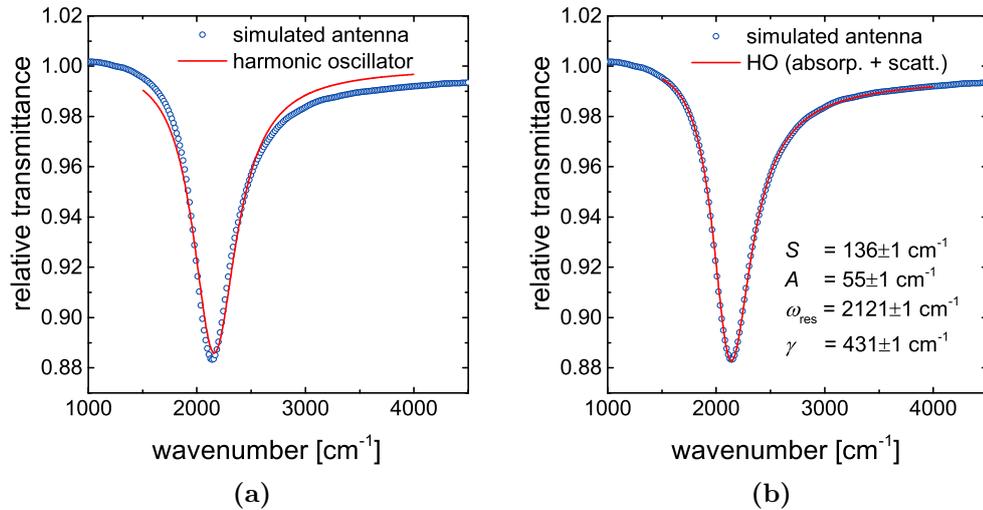


Abbildung 2.5.3: Beschreibung der simulierten [78] LSPR-Linienform mittels getriebenem und gedämpftem harmonischen Oszillator, ohne (a, Gleichung (2.5.9)) und mit (b, Gleichung (2.5.10)) Berücksichtigung der Streuung.

eines Strahlungspulses mit Hilfe der Fourier-Transformation in den Frequenzraum transformiert. So kann an jedem beliebigen Gitterpunkt die Feldintensität in Abhängigkeit der Frequenz errechnet werden und damit sowohl Nah- und Fernfeldspektren als auch elektrische und magnetische Nahfeldkarten erstellt werden.

2.5.7 LSPR-Linienform

Ein mit FDTD simuliertes relatives Transmissionsspektrum⁹ einer Nanoantenne [78] ist in Abbildung (2.5.3) dargestellt. Man erkennt, dass die Nanoantenne bei ungefähr 2100 cm^{-1} resonant ist und an dieser Stelle am wenigsten Licht die Antenne passieren kann. Die Strahlung kann dabei entweder aus der Vorwärtsrichtung gestreut oder von der Antenne absorbiert werden. Welcher Beitrag dominiert, hängt von den Materialeigenschaften und den geometrischen Abmessungen der Antenne ab. Wie sich Streuung und Absorption in der Linienform unterscheiden, soll in diesem Abschnitt beschrieben werden.

Im Gegensatz zu den freien Elektronen im ausgedehnten Festkörper, sollen die Schwingung der freien Elektronen einer Nanoantenne durch einen getriebenen und gedämpften harmonischen Oszillator beschrieben werden. Dessen dielektrische Funktion wurde in Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Zusammen mit Gleichung (2.6.7)

⁹In Abschnitt 2.6.4 wird erklärt, wie die relative Transmission gemessen wird und wie diese mit der dielektrischen Funktion beschrieben werden kann.

lässt sich die relative Transmission einer Antenne über die Absorption einer dünnen Schicht nähern:

$$T_{\text{rel}} \approx 1 - \frac{A^2 \omega^2}{(\omega_{\text{res}}^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2 \omega^2} \quad (2.5.9)$$

Dabei sind in A^2 die Oszillatorstärke und alle Vorfaktoren aus der Berechnung der relativen Transmission zusammengefasst. In Abbildung 2.5.3a ist dieses Modell an die simulierte Antennenresonanz *gefitet*. Man erkennt, dass das Modell des harmonischen Oszillators die Linienform nicht ausreichend beschreibt.

In diesem Modell wurde die Streuung bisher vernachlässigt. Neben der Absorption muss diese im simulierten Transmissionsspektrum jedoch auch berücksichtigt werden [79]. Die Streuung einer Antenne kann über die Abstrahlung eines schwingenden Dipols abgeschätzt werden. Wird die Schwingung wieder durch das Modell des getriebenen und gedämpften harmonischen Oszillators beschrieben, so ist die in den Raumwinkel 4π emittierte gesamte Streuleistung proportional zu $\omega^4 / ((\omega_{\text{res}}^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2 \omega^2)$ [80]. Bis auf den Faktor ω^2 entspricht dies der absorbierten Intensität. In Abbildung 2.5.3b ist dieselbe simulierte Antennenresonanz nun mit einer additiven Kombination aus Absorption und Streuung

$$T_{\text{rel}} = 1 - \left(A^2 + S^2 \frac{\omega^2}{\omega_{\text{res}}^2} \right) \frac{\omega^2}{(\omega_{\text{res}}^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2 \omega^2} \quad (2.5.10)$$

beschrieben.¹⁰ Diese *Fit*-Funktion besitzt einen Parameter mehr und beschreibt die Daten deutlich präziser. Durch die Skalierung des Streuungsterms mit $1/\omega_{\text{res}}^2$ erreicht man, dass die jeweiligen Vorfaktoren S^2 und A^2 miteinander vergleichbar werden. Man erkennt, dass die simulierte Antenne mehr Licht streut als absorbiert. Gleichung (2.5.10) ermöglicht auch die Beschreibung gemessener Spektren von Einzelantennen und ermöglicht so, bei Kenntnis der geometrischen Abmessungen der Antenne, eine kontaktlose Bestimmung der Materialparameter.

2.5.8 Nahfeldverstärkung

Betrachtet man das simulierte Nahfeld einer Nanoantenne, welche resonant angeregt wird (Abbildung 2.5.4), erkennt man eine Überhöhung des lokalen Felds $|\vec{E}|$ im Vergleich zur Feldstärke $|\vec{E}_0|$ der einfallenden Strahlung. Die Feldverstärkung kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden. Der erste Grund ist die resonante Anregung. Das heißt, dass Energie in der Antenne über eine Schwingungsperiode

¹⁰Streuung und Absorption der Antennen müssen aufgrund der Verschiebung zwischen Nah- und Fernfeld nicht zwangsweise dieselbe Dämpfung γ und Resonanzfrequenz ω_{res} aufweisen. Dies kann bei Bedarf in Gleichung (2.5.10) berücksichtigt werden.

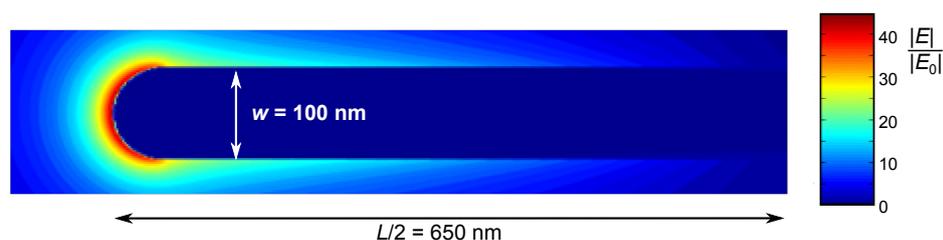


Abbildung 2.5.4: Nahfeldverteilung einer zylindrischen Gold-Nanoantenne mit abgerundeten Enden im Vakuum. Das lokale elektrische Feld E_{loc} wurde auf die Feldstärke der einfallenden Strahlung E_0 normiert [50].

hinaus gespeichert ist, was eine Überhöhung der Feldstärke nahe der Antennenenden zur Folge hat. Der Effekt ist auch bei Nanopartikeln mit $r \ll \lambda$ zu beobachten. Diese weisen im Vergleich zu IR-Nanoantennen Resonanzen im Sichtbaren auf. Der Realteil der dielektrischen Funktion des Metalls ist dort wesentlich weniger negativ, was eine größere Eindringtiefe zur Folge hat [7] und somit für weniger Lokalisation der Strahlung an der Partikeloberfläche sorgt.

Längliche IR-Nanoantennen besitzen aber noch einen zweiten Vorteil, der für die große Feldverstärkung verantwortlich ist. Durch die längliche Form und die große Krümmung an den Antennenenden ist die Feldstärke dort besonders groß. Dieser Effekt ist als *lightning rod effect* [81] bekannt. Im Vergleich zu den in Abbildung 2.5.4 gezeigten Simulationen von Antennen mit perfekt glatter Oberfläche, zeigen reale Nanoantennen mit einer rauen Oberfläche besonders hohe Felder an konvexen Ecken am Antennenende. Bereiche besonders hoher Feldstärken werden als *Hotspots* bezeichnet.

Die Fläche des *Hotspots* auf der Antennenoberfläche wird im Folgenden A_{active} genannt. Für die zylinderförmige Antenne aus Abbildung 2.5.4 kann $A_{\text{active}} = 2 \times 2\pi r^2$ abgeschätzt werden. Vergleicht man zylindrische mit rechteckigen Nanoantennen, so hat sich gezeigt, dass Antennen mit gleicher Querschnittsfläche ($\pi r^2 = W \times H$) ähnliche Eigenschaften haben [82]. Daraus errechnet sich für quaderförmige Antennen $A_{\text{active}} = 4 \times W \times H$. Da die Feldverteilung jedoch stark von der Form der Antennenenden abhängt [55], wird in dieser Arbeit einfachheitshalber

$$A_{\text{active}} = 2WH \quad (2.5.11)$$

über die Querschnittsfläche an beiden Antennenenden abgeschätzt. Diese Definition ist direkt proportional zu A_{active} der zylindrischen Antenne.

Das *Scattering Near-field Optical Microscope* (SNOM) bietet eine Möglichkeit, die Nahfelder von Nanoantennen experimentell mit einer räumlichen Auflösung von bis zu 10 nm zu vermessen und ist beispielsweise in [83] ausführlich erklärt.

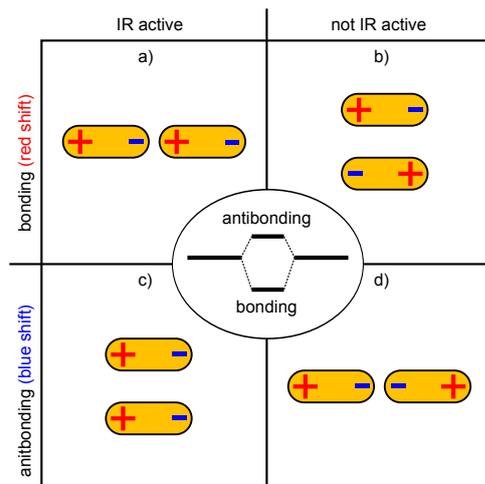


Abbildung 2.5.5: LSPR-Hybridisierung benachbarter Antennen. Die zwei möglichen Anordnungen mit jeweils zwei verschiedenen Ladungsverteilungen lassen sich anhand des resultierenden Dipolmoments in IR-aktiv und nicht-IR-aktiv einteilen. Durch die Wechselwirkung der Ladungen ist die Resonanzfrequenz bei a) und b) rot- und bei c) und d) blauverschoben. Das Termschema in der Mitte zeigt die Analogie zur Molekülphysik.

2.5.9 Wechselwirkung zwischen Nanoantennen

Nähern sich zwei resonant (in der Grundmode $j = 1$) angeregte Nanoantennen einander an, so können diese wechselwirken. Die Resonanzfrequenz wird dadurch verschoben und das Nahfeld verändert. Man spricht von der Nahfeldwechselwirkung.

Die resultierende Verschiebung der Resonanzfrequenz kann analog zur Hybridisierung von Molekülorbitalen verstanden werden [84]. Dies ist in der Mitte von Abbildung 2.5.5 schematisch dargestellt. Die energetisch entarteten Zustände der einzelnen Nanoantennen (links und rechts) hybridisieren bei Verringerung des Abstands zwischen den Antennen. Dabei entsteht ein energetisch abgesenkter und ein angehobener Zustand. Man bezeichnet die Zustände analog zur Molekülphysik als bindend und antibindend. Der Effekt ist sowohl bei Annäherung längs als auch quer zur langen Antennenachse zu beobachten.

In den vier Quadranten in Abbildung 2.5.5 ist die Verteilung der Ladungen schematisch dargestellt. Am Beispiel der in a) dargestellten Anordnung wird gezeigt, dass sich die Verschiebung anschaulich verstehen lässt: Zwischen den unterschiedlichen Ladungen, die sich an der Lücke zwischen den Antennen sehr nahe kommen besteht eine anziehende Wechselwirkung. Dies verringert die Rückstellkraft innerhalb einer Antenne, die durch die gegensätzliche Ladung an den Enden hervorgerufen wird. Im Modell des harmonischen Oszillators wird deutlich, dass eine verringerte Rückstellkraft eine Rotverschiebung der Resonanzfrequenz bedeutet. Analog kann in den drei anderen Fällen argumentiert werden. Betrachtet man das resultierende Dipolmoment beider Antennen, so erkennt man, dass dieses in b) und d) null ist und die Moden somit nicht mit elektromagnetischer Strahlung (unter senkrechtem Einfall [85]) wechselwirken können. Unter schrägem Lichteinfall können aufgrund der Retardierung [60] auch die Moden b) und d) in Abbildung 2.5.5 angeregt werden [50, 55].

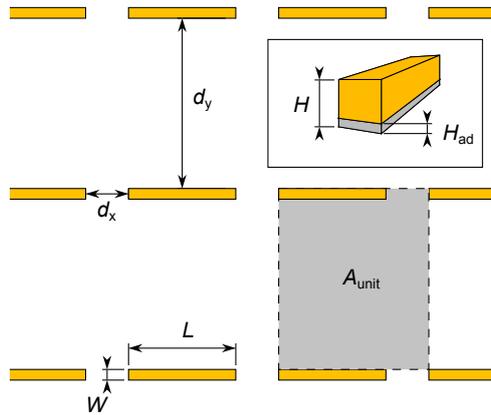


Abbildung 2.5.6: Anordnung der Nanoantennen. Die Flächendichte der Nanoantennen ist durch den Kehrwert der grau schattierten Fläche A_{unit} gegeben. In der eingefügten Skizze ist eine Nanoantenne dreidimensional dargestellt. Die Höhe H der Antennen wird inklusive der Dicke der Haftvermittlerschicht H_{ad} angegeben.

Ebenfalls anschaulich ist die Veränderung der Nahfeldverstärkung zu verstehen. Durch die wechselwirkenden Ladungen an den Antennenenden wird das Nahfeld der Einzelantenne je nach Anordnung verstärkt oder abgeschwächt. Der Effekt auf das Nahfeld setzt jedoch erst unterhalb von 50 nm ein [76].

2.5.10 Nanoantennen-Arrays

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nanoantennen sind in periodischen *Arrays*¹¹ angeordnet. Dadurch wird erreicht, dass viele Nanoantennen parallel vermessen werden können, was zu einer Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses führt. Die Wechselwirkung die in Abschnitt 2.5.9 beschrieben wird, soll dabei in dieser Arbeit möglichst klein gehalten werden, so dass die erforschten Aussagen auf Einzelantennen übertragbar bleiben. Der Kompromiss zwischen kleiner Wechselwirkung und gleichzeitig möglichst hoher Packungsdichte der Antennen kann je nach Anwendung anders ausfallen.

Die Nanoantennen sind näherungsweise quaderförmig und werden durch ihre Länge L , ihre Breite W und ihre Höhe H charakterisiert. Die Höhe H stellt dabei die Gesamthöhe der Antenne dar, also inklusive der Höhe des Haftvermittlers H_{ad} . Die lateralen Abstände zwischen den Antennen werden d_x und d_y genannt, entsprechend parallel (x) und senkrecht (y) zur langen Achse der Antennen. Die charakteristischen Abmessungen sind in Abbildung 2.5.6 gegeben.

Aus den Abmessungen der Antennen und deren Abständen untereinander lässt sich die Flächendichte der Antennen im *Array* aus dem Kehrwert der grau schattierten Fläche A_{unit} errechnen. Es gilt

$$A_{\text{unit}} = (d_x + L) \times (d_y + W) . \quad (2.5.12)$$

¹¹Die Felder mit periodisch angeordneten Nanoantennen werden *Arrays* genannt.

Gittermode

Zusätzlich zur Nahfeldwechselwirkung (Abschnitt 2.5.9) beobachtet man bei Nanoantennen-*Arrays* periodizitätsabhängige Interferenzen, die sogenannte Fernfeldwechselwirkung. Diese führt zu Veränderungen des Antennenspektrums an den Wellenlängen, bei denen $\frac{\lambda}{n_s}$ der Periodizität¹² des Arrays entspricht [16], wobei n_s den Brechungsindex des Substrats beschreibt.

2.6 Schwingungsspektroskopie

Das Potential zwischen zwei kovalent gebundenen Atomen im Molekül wird näherungsweise durch das Morse-Potential beschrieben [64]. Atome sind folglich nicht starr miteinander verbunden, sondern können aus ihrer Ruhelage ausgelenkt werden. In erster Näherung kann das Potential harmonisch genähert werden. Vom harmonischen Oszillator ist bekannt, dass die Resonanzfrequenz von der Masse und der Federkonstante abhängt. Für verschiedene Atome und Bindungen kommen so charakteristische Schwingungsfrequenzen zustande, anhand derer man das Molekül identifizieren kann. Ein Molekül aus j Atomen besitzt $3j - 6$ Schwingungsfreiheitsgrade. Handelt es sich um ein lineares Molekül, so sind es $3j - 5$.

Die Schwingungsspektroskopie beruht auf der Tatsache, dass Schwingungsbanden mit Licht wechselwirken und so messbar werden. Energie und Frequenz der Photonen sind dabei über $E = \hbar\omega$ verknüpft.

Licht kann auf verschiedene Weise mit Molekülschwingungen wechselwirken. Zum einen kann Licht von Molekülen absorbiert (IR-Absorption) werden, andererseits kann Licht gestreut werden. Während bei elastischer (Rayleigh-) Streuung keine Energie übertragen wird, kommt es bei der inelastischen (Raman-) Streuung zu einer Änderung des Schwingungszustands. Im folgenden sollen IR- und Raman-Spektroskopie genauer erklärt werden.

2.6.1 IR-aktive Schwingungsmoden

Weist eine Molekülbindung ein permanente Dipolmoment \vec{p} auf, so ändert sich dieses mit der Bindungslänge. IR-Strahlung deren elektrisches Feld entlang des Dipolmoments polarisiert ist kann an das sich ändernde Dipolmoment koppeln und so die Vibration des Moleküls anregen. In Abbildung 2.6.1 sind Schwingungen einfacher Moleküle skizziert und deren Dipolmoment eingezeichnet. Ist kein permanentes Dipolmoment vorhanden (z.B. N_2) oder kompensieren sich die Dipolmomente mehrerer an der Schwingung beteiligter Bindungen (z.B. symmetrische Steckschwingung von CO_2), so kann die Schwingung nicht angeregt

¹²Unter der Periodizität versteht man $(d_x + L)$ und $(d_y + W)$.

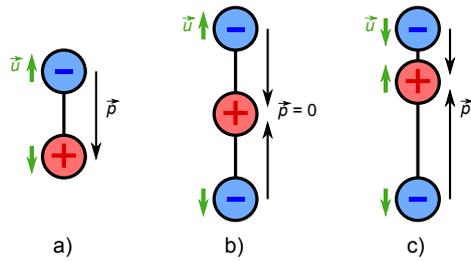


Abbildung 2.6.1: Schematische Darstellung von Molekülschwingungen: (a) Zweiatomiges Molekül mit permanentem Dipolmoment (z.B. CO), (b) symmetrische Steckschwingung (Raman-aktiv: $\frac{\partial[\alpha]}{\partial u} \neq 0$, z.B. CO₂), (c) asymmetrische Steckschwingung (IR-aktiv: $\frac{\partial|\vec{p}|}{\partial u} \neq 0$, z.B. CO₂).

werden. IR-aktive Schwingungsmoden weisen folglich ein Dipolmoment \vec{p} auf, das sich mit der Auslenkung $u = |\vec{u}|$ der Atome ändert. Es gilt: $\frac{\partial p}{\partial u} \neq 0$.

Die Anregung aus dem Grundzustand in den ersten angeregten Vibrationszustand wird quantenmechanisch durch die Absorption eines Photons beschrieben und ist in Abbildung 2.6.2 durch einen roten Pfeil gekennzeichnet.

2.6.2 Raman-aktive Schwingungsmoden

Die Streuung von Photonen an Molekülen wird im quantenmechanischen Bild durch die Absorption des einfallenden Photons und die instantane Emission des gestreuten Photons beschrieben. Das Molekül wird dabei in einen virtuellen Zustand angeregt, der nicht zwangsweise einem realen Anregungszustand des Moleküls entsprechen muss. Der Großteil der gestreuten Photonen wird elastisch gestreut und ändert dabei seine Frequenz nicht. Der inelastisch gestreute Anteil liegt bei ungefähr einem von 10^7 Photonen [86]. Dabei ist sowohl die Abnahme als auch die Zunahme der Photonenenergie möglich. Im ersten Fall, der in Abbildung 2.6.2 schematisch dargestellt ist, relaxiert das Molekül aus dem virtuellen Zustand nicht zurück in den Grundzustand, sondern in einen Vibrationszustand. Die Energiedifferenz zwischen einfallendem und gestreutem Photon entspricht dann genau der Anregungsenergie der Vibration. Dieser Prozess wird Stokes-Streuung genannt.

Bei der Antistokes-Streuung absorbiert das Molekül im angeregten Zustand ein Photon. Bei der Emission relaxiert das Molekül zum energetisch tieferen Zustand und gibt die freiwerdende Energie an das Photon ab. Bei Raumtemperatur tritt Antistokes-streuung etwa 10^{-3} mal seltener auf als Stokes-Streuung.

Das elektrische Feld des Lichts polarisiert das Molekül und induziert ein Dipolmoment

$$\vec{p}_{\text{ind}} = [\alpha] \vec{E},$$

wobei $[\alpha]$ die Polarisierbarkeit des Moleküls beschreibt. Schwingungsmoden bei denen sich die Polarisierbarkeit des Moleküls mit der Auslenkung u der Atome ändert, sind Raman-aktiv. Es gilt: $\frac{\partial[\alpha]}{\partial u} \neq 0$. So ist beispielsweise die nicht-

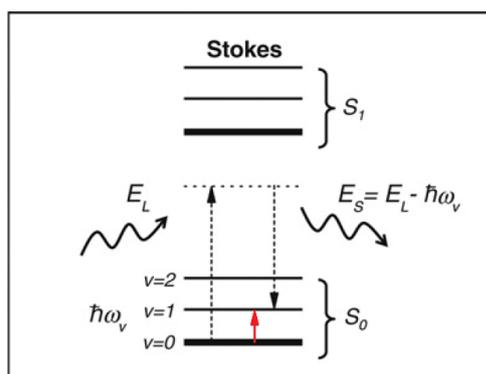


Abbildung 2.6.2: Jablonski-Diagramm der Stokes-Streuung und der IR-Absorption. S_0 und S_1 stellen elektronische Zustände dar, die in mehrere Vibrationsniveaus unterteilt sind. Ein Photon der Laserenergie E_L regt das Molekül in einen virtuellen Zustand an (gestricheltes Niveau). Das gestreute Photon mit Energie E_S hat die Vibrationsenergie $\hbar\omega_{\text{vib}}$ an das Molekül abgegeben. Der rote Pfeil zeigt die IR-Absorption. (Aus [86] entnommen.)

IR-aktive, symmetrische CO_2 Streckschwingung Raman-aktiv, während sich die asymmetrische Streckschwingung nicht anregen lässt (vergleiche Abbildung 2.6.1). Dieses Beispiel illustriert die Auswahlregeln der Schwingungsspektroskopie: Bei zentrosymmetrischen Molekülen, wie zum Beispiel CO_2 oder Benzol, sind Raman-aktive Moden nicht IR-aktiv und umgekehrt. Bei anderen Molekülen gilt dies nicht ausschließlich, spiegelt sich aber in der relativen Intensität der Banden wieder.

Liegt die Energie des virtuellen Zustands bei der Energie eines elektronischen Anregungszustand des Moleküls, so ist der Streuquerschnitt des Moleküls um zwei bis drei Größenordnungen vergrößert. Man spricht von Resonanz-Raman-Streuung (RRS). Die Anwesenheit von elektronischen Anregungszuständen gibt auch die Möglichkeit der Absorption von Licht mit anschließender fluoreszenter Relaxation. Der Fluoreszenzhintergrund überlagert den Stokes-Teil des Raman-Spektrums und ist oftmals störend.

2.6.3 Optische Messungen

Der einfachste Aufbau um spektral aufgelöste Messungen durchführen zu können besteht aus einer Lichtquelle, der zu untersuchenden Probe, einem dispersiven Element und einem Detektor. Schon in diesen Punkten unterscheiden sich Raman- und IR-Spektroskopie grundlegend.

Bei der Raman-Spektroskopie ist die spektrale Auflösung durch die Linienbreite der Lichtquelle begrenzt, weshalb dort Laser zum Einsatz kommen. Die spektrale Information wird durch räumliche Aufspaltung der verschiedenen Wellenlängen mit Hilfe eines Gitters oder Prismas erreicht.

Bei der IR-Spektroskopie kommt eine breitbandige Quelle zum Einsatz. Für hohe Intensitäten kann dafür beispielsweise ein Synchrotron verwendet werden. Für die meisten Anwendungen, so auch in dieser Arbeit, wird ein geheiztes Stück SiC, der sogenannte Global, verwendet. Es gibt einige Vorteile [87], warum im IR

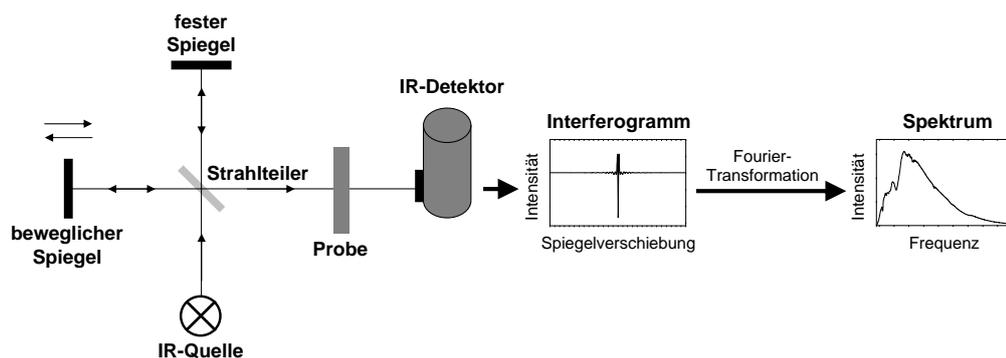


Abbildung 2.6.3: Schematischer Aufbau des FTIR-Spektrometers [54]. Im Interferogramm \tilde{I} wird die am Detektor gemessene Intensität über die Position x des beweglichen Spiegels aufgetragen. Durch Fourier-Transformation erhält man das Spektrum.

kein dispersives Element verwendet, sondern die spektrale Information aus einem Interferometer gewonnen wird. Diese Technik wird Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) genannt und im nächsten Abschnitt näher erklärt.

FTIR

Herzstück der FTIR-Spektroskopie ist das Michelson-Interferometer. Das Licht der Quelle wird in einem Strahlteiler in zwei Teilstrahlen geteilt, wovon einer von einem festen, der andere von einem beweglichen Spiegel auf den Strahlteiler zurückreflektiert wird. Dort werden die beiden Teilstrahlen überlagert und interferieren. Anschließend wird die Probe durchleuchtet und die Strahlung im Detektor (siehe Abschnitt 3.1.2) registriert. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 2.6.3 dargestellt.

Durch die Änderung der optischen Weglänge eines Teilstrahls interferieren je nach Spiegelposition andere Wellenlängen konstruktiv. Dies führt im Detektor zu Intensitätsmodulationen in Abhängigkeit des Gangunterschieds x . Im Interferogramm wird die gemessene Intensität über x dargestellt. Bei gleicher optischer Weglänge der beiden Teilstrahlen ($x = 0$) interferieren alle Wellenlängen konstruktiv, daher wird diese Position auch Weißlicht-Position genannt. Monochromatisches Licht der Wellenlänge $\lambda_0 = \frac{2\pi}{k_0}$ führt folglich zu einer cosinusartigen Modulation der Intensität [87]

$$\tilde{I}(x) = \frac{I_0}{2} (1 + \cos(kx)) . \quad (2.6.1)$$

Eine breitbandige Lichtquelle weist für jedes $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ eine unterschiedliche Intensität $I(k)$ auf. Um das Interferogramm zu errechnen, muss über alle k integriert werden:

$$\tilde{I}(x) = \int_0^{\infty} I(k) (1 + \cos(kx)) dk. \quad (2.6.2)$$

Dieser Ausdruck entspricht dem gemessenen Interferogramm. Der erste Summand stellt dabei einen konstanten *Offset* dar, während der zweite die Modulation der Intensität beschreibt. Um nun das Spektrum $I(k)$ zu erhalten, muss der intensitätsmodulierte Teil des Interferogramms Fourier-transformiert werden:

$$I(k) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} e^{ikx} \tilde{I}(x) dx. \quad (2.6.3)$$

Dies ist in Abbildung 2.6.3 schematisch dargestellt und beispielsweise in [87] ausführlicher erklärt.

Je nach angestrebter spektraler Auflösung $\delta\tilde{\nu} = \delta k/2\pi$ muss der bewegliche Spiegel im Michelson-Interferometer unterschiedliche maximale Gangunterschiede $2\Delta x$ ermöglichen [87]. Es gilt:

$$\delta\tilde{\nu} = \frac{1}{2\Delta x}.$$

Da Gleichung (2.6.3) eine Integration von $x = -\infty$ bis $x = \infty$ voraussetzt, wird das gemessene Interferogramm mit einer Apodisationsfunktion multipliziert um entstehende Nebenmaxima zu vermeiden [87]. In allen Experimenten in dieser Arbeit wurde die *Blackmann-Harris 3-Term* Apodisationsfunktion verwendet.

Zudem wurde Zerofilling (Faktor 2) angewendet um eine Verdopplung der Messpunkte im Spektrum zu erreichen. Die Auflösbarkeit zweier benachbarter Banden wird dadurch aber nicht erhöht [87].

Einheiten in der Spektroskopie

Wie in der Spektroskopie üblich, wird in dieser Arbeit die Energie in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] ausgedrückt. Diese ist über $\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{1}{c_0} \nu = \frac{1}{2\pi c_0} \omega = \frac{1}{2\pi \hbar c_0} E$ mit der Frequenz ν und der Energie E verknüpft. Ist der absolute Zahlenwerte nicht relevant, wird in dieser Arbeit der konstante Faktor $\frac{1}{2\pi c_0}$ vernachlässigt und $\tilde{\nu} = \omega$ gesetzt.

Darstellung der gemessenen Spektren

Um die Transmittivität einer Probe ohne die spektralen Einflüsse der Quelle, des Detektors, des Strahlengangs und des Trägermaterials messen zu können, wird zunächst ein Hintergrundspektrum¹³ $I_0(\omega)$ durch das leere Trägermaterial aufgenommen. Das durch die Probe aufgenommene Spektrum $I(\omega)$, wird dann auf $I_0(\omega)$ normiert um das relative Transmissionsspektrum

$$T_{\text{rel}}(\omega) = \frac{I(\omega)}{I_0(\omega)} \quad (2.6.4)$$

zu erhalten. Unterscheidet sich I nicht von I_0 erhält man $T_{\text{rel}} = 1$, die sogenannte 100%-Linie. Bei Transmissionsmessungen kann am Detektor nicht unterschieden werden, ob fehlendes Licht aus der Vorwärtsrichtung herausgestreut oder absorbiert wurde. Daher wird die Extinktion

$$S(\omega) = 1 - T_{\text{rel}}(\omega) \quad (2.6.5)$$

als Summe von Streuung und Absorption definiert.

In Gleichung (2.1.5) wurde die Intensität in absorbierenden Medien durch exponentielles Abklingen beschrieben. Die physikalisch relevante Größe ist folglich nicht der einfache Quotient aus I und I_0 , sondern der Absorptionskoeffizient α . Aus diesem Grund sollte bei Messungen absorbierender Substanzen, wie zum Beispiel Molekülen, nicht $S(\omega)$ sondern die logarithmische Extinktion

$$S_{\log}(\omega) = A(\omega) = -\log_{10}(T_{\text{rel}}(\omega)) = \log_{10}\left(\frac{I_0(\omega)}{I(\omega)}\right) \stackrel{(2.1.5)}{=} \underbrace{\log_{10}(e)}_{\approx 0,4343} \alpha d \quad (2.6.6)$$

berechnet werden. In der Literatur wird diese Größe als Absorbanz $A(\omega)$ bezeichnet. Konventionell ist die Absorbanz mit dem Logarithmus zur Basis 10 definiert, wodurch sich der konstante Vorfaktor $\log_{10}(e) \approx 0,4343$ ergibt.

Die Unterscheidung zwischen $A(\omega)$ und $S(\omega)$ ist nur für große Werte der Extinktion von Bedeutung, da sich bei geringer Extinktion $A(\omega) = -\log_{10}(T_{\text{rel}}(\omega)) \approx 1 - T_{\text{rel}}(\omega) = S(\omega)$ über die ersten beiden Terme der Taylorentwicklung annähern lässt.

¹³Das Hintergrundspektrum wird in dieser Arbeit auch als „Referenzmessung“ bezeichnet. Nicht-verstärkte Messungen (zum Beispiel IRRAS-Messungen, vergleiche Abschnitt 2.6.4), die zur Berechnung des Verstärkungsfaktors herangezogen werden (vergleiche Gleichung (2.7.3)), werden immer als „Vergleichsmessungen“ bezeichnet.

2.6.4 Dünnschichtnäherung

Häufig wird eine dünne Schicht von zum Beispiel adsorbierten Molekülen auf einem Trägermaterial untersucht. Das Adsorbat wird dabei durch die dielektrische Funktion $\varepsilon_a(\omega)$ und dessen Dicke d charakterisiert. Wenn $d \ll \lambda$ kann die Reflexion und Transmission, unter Berücksichtigung der auftretenden Mehrfachreflexionen an den beiden Grenzflächen, in der Dünnschichtnäherung beschrieben werden [54, 88, 89]. Die Näherung basiert auf den Fresnel Formeln und leitet sich aus der geometrischen Reihe der immer schwächer werdenden Mehrfachreflexionen her.

Transmission

In die Näherung der Dünnschichttransmission geht ein, dass das Trägersubstrat transparent ist und verschwindend wenig absorbiert. Im IR werden meist Ionenkristalle, wie Calciumfluorid (CaF_2) oder Halbleiter mit hinreichend großer Bandlücke (Silizium) verwendet. Da ε_s'' klein ist, wird der Brechungsindex des Substrats als $n_s = \sqrt{\varepsilon_s'}$ genähert. Weiterhin wird senkrecht einfallendes Licht angenommen, so dass das elektrische Feld parallel zur Oberfläche der dünnen Schicht ist. Normiert auf die Transmission des Substrats ohne Adsorbat, ergibt sich die relative Transmission [90] dann zu

$$T_{\text{rel}}(\omega) \approx 1 - 2 \frac{d\omega}{c_0} \frac{1}{(n_s + 1)} \Im(\varepsilon_a(\omega)) . \quad (2.6.7)$$

Reflexion

Für Reflexionsmessungen werden metallische, gut reflektierende Substrat verwendet. Um ein möglichst großes Signal von der dünnen Schicht zu erhalten, wird unter streifendem Einfallswinkel ϑ gemessen [91, 92]. Diese Messtechnik wird Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) genannt. Dabei können nur Schwingungen mit Dipolmoment senkrecht zur Metalloberfläche angeregt werden, da die Feldkomponente parallel zur Metalloberfläche verschwindet und zusätzlich der Spiegeldipol im Metall das äußere Dipolmoment eliminiert. Die Feldkomponente senkrecht zur Metalloberfläche tritt nur bei p-polarisiertem¹⁴ Licht auf. Normiert auf die Reflexion des Substrats ohne Adsorbat, ergibt sich die relative Reflexion [93, 94] zu

$$R_{\text{rel}}(\omega) \approx 1 - 4 \frac{d\omega \sin^2(\vartheta)}{c_0 \cos(\vartheta)} \Im\left(\frac{-1}{\varepsilon_a(\omega)}\right) . \quad (2.6.8)$$

¹⁴ „p“ steht für „parallel“ zur Einfallsebene, welche durch die Oberflächennormale und den \vec{k} -Vektor des einfallenden Lichts aufgespannt wird.

2.7 Oberflächenverstärkte Schwingungsspektroskopie

Aufgrund der charakteristischen Vibrationsfrequenzen von Molekülen sind Raman- (Abschnitt 2.6.2) und IR-Spektroskopie (Abschnitt 2.6.1) häufig verwendete Methoden zur Bestimmung und Charakterisierung von Substanzen. Beiden Methoden sind mit dem Nachteil der extrem kleinen Wirkungsquerschnitten der Moleküle behaftet. Während der Raman-Streuquerschnitt in der Größenordnung zwischen $10^{-29} - 10^{-32} \text{ cm}^2$ liegt [95], ist der IR-Absorptionsquerschnitt mit circa 10^{-20} cm^2 deutlich größer [47, 48], jedoch immer noch vier Größenordnungen kleiner als Fluoreszenz-Wirkungsquerschnitte [95]. Dies hat zur Folge, dass für ein ausreichendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis hohe Intensitäten oder lange Messdauern vonnöten sind.

Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS) und oberflächenverstärkte Infrarot-Absorption (SEIRA) von Molekülen auf rauen Metalloberflächen stellen eine Möglichkeit dar die Kopplung von Licht an Molekülschwingungen zu verbessern. Für beide Effekte werden in der Literatur jeweils zwei Gründe für die Verstärkung gegeben. Einerseits zeigt die raue Metalloberfläche Oberflächenplasmon-Anregungen, welche lokal zu einer Feldverstärkung führen. Andererseits können Ladungsträger von der Oberfläche auf die erste Lage der Moleküle übergehen und so die Molekülschwingung verstärken. Man spricht vom *elektromagnetischen* und *chemischen Effekt*.

Der chemische Effekt beruht auf der Chemisorption von Molekülen auf der Oberfläche, die in Abschnitt 6.1.3 genauer beschrieben wird. Der chemische Effekt wird hauptsächlich mit SERS in Verbindung gebracht und beispielsweise in [96, 97] beschrieben, ist aber nach wie vor umstritten [98]. Er soll daher, wenn nicht ausdrücklich erwähnt, bei der weiteren Betrachtung der Verstärkung vernachlässigt werden.

2.7.1 Oberflächenverstärkte IR-Spektroskopie

In Abbildung 2.5.4 wurde gezeigt, dass das Nahfeld $|\vec{E}_{\text{loc}}|$ an den Enden der Antenne gegenüber dem einfallenden Feld $|\vec{E}_0|$ verstärkt ist. Der Quotient beider Felder wird im Folgenden als elektromagnetischer Verstärkungsfaktor $EF_{\text{el}} = |\vec{E}_{\text{loc}}| / |\vec{E}_0|$ bezeichnet. Da Absorption proportional zur Intensität ($I \propto |\vec{E}|^2$) ist, lässt sich die Verstärkung des Absorptionssignals durch den elektromagnetischen Verstärkungsfaktor

$$EF_{\text{SEIRA}} = EF_{\text{el}}^2 = \frac{|\vec{E}_{\text{loc}}|^2}{|\vec{E}_0|^2} \quad (2.7.1)$$

abschätzen.¹⁵

Diese Art der Verstärkung tritt bei rauen Metalloberflächen oder Metallinselfilmen auf. Metallinselfilme bieten nicht die optimalen Bedingungen für die Verstärkung von Molekülschwingungen. Die Inseln weisen unterschiedliche Größen und Formen und daher verschiedene LSPR-Frequenzen auf. Zudem sind die Abstände zwischen den Inseln klein, was die Resonanzen zusätzlich verbreitert [50].

Die Signalverstärkung ist an der (Nahfeld-)LSPR-Frequenz maximal, an der auch $|\vec{E}_{\text{loc}}(\omega)|$ maximal ist. Daher werden in dieser Arbeit keine Metallinselfilme sondern geordnete *Arrays* von Nanoantennen verwendet, die alle die gleichen Abmessungen haben und somit alle die gleiche LSPR-Frequenz aufweisen. Um maximale Verstärkung zu erhalten, wird die Länge so gewählt, dass die LSPR-Frequenz möglichst genau der Vibrationsfrequenz des Moleküls entspricht.

SNOM-Messungen [99] haben gezeigt, dass das gängige Bild von antennenverstärkter IR-Spektroskopie überdacht werden muss, da IR-Antennen Licht nicht nur absorbieren, sondern hauptsächlich streuen. Dadurch wird nicht nur Energie von der Antenne auf das Molekül transferiert und dort absorbiert, vielmehr sollten Antenne und Molekül als gekoppeltes plasmonisches System aufgefasst werden, das eine andere Streucharakteristik aufweist als eine Antenne ohne Moleküle. Da das vom Molekül gestreute Photon erneut von der Nahfeldverstärkung der Antennen profitiert, wird nach [99] geschlossen, dass für den Prozess der Streuung

$$EF_{\text{SEIRS}} = EF_{\text{el}}^4 = \frac{|\vec{E}_{\text{loc}}|^4}{|\vec{E}_0|^4} \quad (2.7.2)$$

gilt.

Die Frage ob Gleichung (2.7.2) oder Gleichung (2.7.1) für nanoantennenverstärkte IR-Spektroskopie zutreffend ist oder ob je nach Molekülposition auf der Antenne das eine oder andere Modell die passendere Beschreibung liefert, muss noch abschließend geklärt werden. Entgegen der Hypothese von [99] favorisieren kürzlich präsentierte Messergebnisse [100] den quadratischen Zusammenhang.

Um in der Terminologie korrekt zu bleiben, sollte man antennenverstärkte IR-Spektroskopie nicht mehr SEIRA nennen. Das Akronym SEIRS für *Surface Enhanced Infrared Spectroscopy* umgeht den genauen Mechanismus und wird daher oft verwendet [101, 102].

¹⁵Man beachte an dieser Stelle den Unterschied zwischen „Signalverstärkung“ (Messgröße) und „Feldverstärkung“.

Berechnung des Verstärkungsfaktors

Ungeachtet des zuvor beschriebenen Zusammenhangs zwischen Verstärkungsfaktor und lokalem elektrischen Feld, kann durch den Vergleich der gemessenen Signalgrößen von antennenverstärkten I_{ant} und nicht-verstärkten I_{com} Transmissionsmessungen ein Signalverstärkungsfaktor errechnet werden. Der Quotient

$$EF_{\text{meas}} = \frac{I_{\text{ant}}}{I_{\text{com}}} \quad (2.7.3)$$

entspricht der tatsächlich gemessenen Signalverstärkung.

Da die Vergleichsmessung oft nicht in Transmissions- sondern Reflexionsgeometrie aufgenommen wird, muss mit Hilfe von Gleichung (2.6.7) und (2.6.8) die Signalstärke der Transmissionsmessung abgeschätzt werden. Aus Tabelle 2.1 ergibt sich, dass sich $\Im\left(\frac{-1}{\varepsilon_a(\omega)}\right)$ und $\Im(\varepsilon_a(\omega))$ in deren Maximum¹⁶ nur um den Faktor ε_∞^2 unterscheiden. Nimmt man weiter zwei identische Schichten, eine auf transparentem die andere auf metallischem Substrat, an und geht von einer isotropen Verteilung der Dipolmomente (das heißt einer isotropen dielektrischen Funktion $\varepsilon_a(\omega)$) aus, so wird der zu erwartende Unterschied der gemessenen Signale über

$$EF_{\text{IRRAS}} = \frac{1 - R_{\text{rel}}}{1 - T_{\text{rel}}} = \frac{2 \sin^2(\vartheta)}{\varepsilon_\infty^2 \cos(\vartheta)} (n_s + 1) \quad (2.7.4)$$

berechnet. Für große Einfallswinkel ϑ ist dieser Term größer als eins. Reflexionsmessungen von einer dünnen Schicht auf Metallsubstrat liefern folglich ein größeres Signal als einfache Transmissionsmessungen, weshalb Gleichung (2.7.4) im Folgenden als IRRAS-Verstärkungsfaktor EF_{IRRAS} bezeichnet wird.

Das gemessene Vibrationssignal ist proportional zur Konzentration c der Moleküle (Gleichung (2.6.6)) und folglich proportional zur Molekülzahl N pro festem Volumen. Tragen bei einem Experiment unterschiedlich viele Moleküle zum gemessenen Signal bei,¹⁷ so muss der Verstärkungsfaktor mit dem Verhältnis der Molekülanzahl N_0/N_{SEIRS} multipliziert werden. Dabei ist N_0 die Anzahl der Moleküle die zum Vergleichssignal beitragen und N_{SEIRS} die Molekülanzahl im SEIRS-Experiment. Nimmt man eine konstante Bedeckungsdichte an, so entspricht der sogenannte geometrische Verstärkungsfaktor dem Verhältnis der Flächen A_{unit} und A_{active} :

$$EF_{\text{geo}} = \frac{A_{\text{unit}}}{A_{\text{active}}} = \frac{N_0}{N_{\text{SEIRS}}}. \quad (2.7.5)$$

¹⁶gilt für die *Peak*-Höhe aber auch für die *Peak*-Fläche.

¹⁷Bei antennenverstärkten Messungen dominiert das Signal der Moleküle in den *Hotspots* (vergleiche Abschnitt 2.5.8).

Der Verstärkungsfaktor, der meist angegeben wird, berücksichtigt alle zuvor beschriebenen Faktoren und errechnet sich dann über

$$EF_{\text{calc}}^{\text{IR}} = EF_{\text{meas}} \cdot EF_{\text{geo}} \cdot EF_{\text{IRRAS}}. \quad (2.7.6)$$

Experimentell wurden SEIRS-Verstärkungsfaktoren von bis zu $6 \cdot 10^5$ gemessen [12, 17, 101]. Damit ist der Nachweis von einem Attomol¹⁸ von Molekülen möglich.

SEIRS Linienform

Antennenverstärkte Vibrationssignale der Moleküle verlieren ihre in Abschnitt 2.3.1 beschriebene Lorentz-Linienform und werden asymmetrisch. Im Fall von Metallinselfilmen kann die entstehende Asymmetrie der Linien [103, 104] durch die Beschreibung mit Effektiv-Medien-Modellen [105, 106] beschrieben werden [107].

Für SEIRS mittels Nanoantennen ist diese Beschreibung jedoch ungenügend. Man bedient sich hier einem von U. FANO entwickelten Modell zur Beschreibung der asymmetrischen Linienformen, die bei der inelastischen Elektronenstreuung an Heliumatomen auftritt [108]. Die Asymmetrie resultiert aus der Wechselwirkung eines diskreten Zustands mit einem Kontinuum. Übertragen auf die Nanoantennen, stellt die breite LSPR den kontinuierlichen Zustand dar, der mit der wesentlich schmalbandigeren Molekülschwingung wechselwirkt. Das Fano-Profil wird mit

$$\tilde{f}(\epsilon) = \frac{(q + \epsilon)^2}{1 + \epsilon^2} \quad (2.7.7)$$

beschrieben [108], wobei $\epsilon = 2(\omega - \omega_{\text{vib}})/\gamma$ die Frequenz ω , die Vibrationsfrequenz ω_{vib} und die Dämpfung γ der Molekülschwingung enthält, und q die Asymmetrie beschreibt. Abhängig von der Phase zwischen plasmonischer und vibronischer Anregung ändert sich die Asymmetrie der Linie [109]. Für einige Werte für q sind die Linienformen in Abbildung 2.7.1 dargestellt.

Man erkennt, dass die Basislinie für alle q bei eins liegt. Weiterhin lässt sich zeigen, dass die Signalhöhe von Minimum bis Maximum $q^2 + 1$ beträgt. In dieser Arbeit wird die Fano-Formel in folgender, auf die Größe a normierten und auf die Basislinie bei null verschobenen, Form verwendet

$$f(\omega) = \frac{a}{q^2 + 1} \left(\frac{(2(\omega - \omega_{\text{vib}}) + q\gamma)^2}{4(\omega - \omega_{\text{vib}})^2 + \gamma^2} - 1 \right). \quad (2.7.8)$$

¹⁸1 Attomol = $10^{-18} \cdot 6 \cdot 10^{23} = 600\,000$ Moleküle

2 Grundlagen

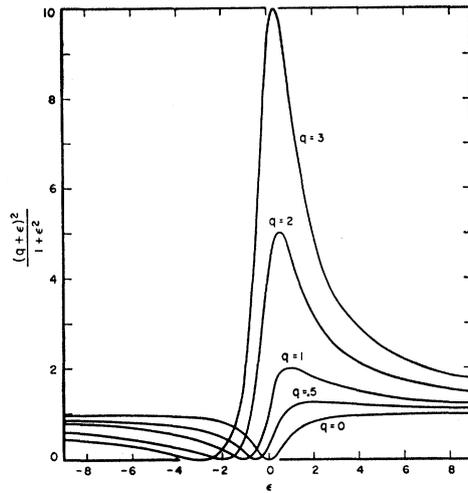


Abbildung 2.7.1: Linienformen $\tilde{f}(\epsilon) = \frac{(q+\epsilon)^2}{1+\epsilon^2}$ aus der Arbeit von U. FANO [108].

Zudem können folgende nützliche Eigenschaften gezeigt werden:

$$f(\epsilon, q) = f(-\epsilon, -q), \quad (2.7.9)$$

$$f(\epsilon, q) = -f\left(\epsilon, -\frac{1}{q}\right), \quad (2.7.10)$$

$$\lim_{q \rightarrow 0^+} f(\epsilon, q) = \frac{-1}{\epsilon^2 + 1}, \quad (2.7.11)$$

$$\lim_{q \rightarrow \pm\infty} f(\epsilon, q) = \frac{1}{\epsilon^2 + 1}, \quad (2.7.12)$$

$$\int_0^{\infty} |f(\epsilon, q)| d\epsilon = \begin{cases} \frac{\pi\gamma}{2} & q = 0 \text{ oder } q = \pm\infty, \\ \infty & \text{sonst.} \end{cases} \quad (2.7.13)$$

Gleichungen (2.7.9) und (2.7.10) beschreiben die Symmetrien der Fano-Linie, Gleichungen (2.7.11) und (2.7.12) zeigen, dass für $q \rightarrow \pm\infty$ und $q = 0$ die Fano-Linienform in eine symmetrische Lorentz-Linie übergeht. Da für SEIRS mittels Nanoantennen

$$\begin{aligned} q < 0 & \text{ für } \omega_{\text{vib}} < \omega_{\text{LSPR}}, \\ q = 0 & \text{ für } \omega_{\text{vib}} = \omega_{\text{LSPR}} \text{ und} \\ q > 0 & \text{ für } \omega_{\text{vib}} > \omega_{\text{LSPR}} \end{aligned}$$

gilt [110], erkennt man, dass wenn die Antenne stark gegenüber der Vibration verstimmt ist, $q \rightarrow \pm\infty$ geht und das Vibrationssignal die nicht verstärkte Lorentz-Linienform annimmt. Bei $\omega_{\text{vib}} = \omega_{\text{LSPR}}$ zeigt das Lorentz-Profil in die entgegengesetzte Richtung, man spricht von Antiabsorption. Gleichung (2.7.13) zeigt, dass die Fläche unter der Fano-Kurve unendlich groß ist.

2.7.2 Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie

Hauptsächlich bei SERS unterscheidet man zwischen chemischem [97, 111] und elektromagnetischem Effekt [98]. Das gemessene SERS-Signal ist dabei proportional zu

$$I_{\text{SERS}} \propto \sigma_{\text{SERS}} \cdot [EF_{\text{el}}(\omega_{\text{Laser}})]^2 \cdot [EF_{\text{el}}(\omega_{\text{Raman}})]^2 \cdot I_{\text{Laser}}, \quad (2.7.14)$$

wobei σ_{SERS} den durch den chemischen Effekt vergrößerten Wirkungsquerschnitt und I_{Laser} die Intensität des Lasers angibt. Da sich Laserfrequenz und Raman-Frequenz unterscheiden, müsste das verstärkte elektromagnetische Feld für den Absorptions- und Emissionsprozess getrennt ausgewertet werden. Da die Felder für beide Frequenzen etwa gleich groß sind, kann der elektromagnetische Verstärkungsfaktor von SERS mit

$$EF_{\text{SERS}} \approx EF_{\text{el}}^4 = \frac{|\vec{E}_{\text{loc}}|^4}{|\vec{E}_0|^4} \quad (2.7.15)$$

genähert werden.

Berechnung des Verstärkungsfaktors

Analog zu Gleichung (2.7.6) muss auch bei SERS die Anzahl der zum Signal beitragenden Moleküle berücksichtigt werden. Die Verstärkung bei der Vergleichsmessung EF_{IRRAS} wird bei SERS jedoch nicht berücksichtigt. Dafür kann mit verschiedenen Laserleistungen (P_{SERS} , P_{Raman}) und Akkumulationsdauern (t_{SERS} , t_{Raman}) gemessen werden. Diese werden in der Berechnung des Verstärkungsfaktors berücksichtigt, der sich zu

$$EF_{\text{calc}}^{\text{Raman}} = \frac{I_{\text{SERS}}}{I_{\text{Raman}}} \cdot \frac{A_{\text{Raman}}}{A_{\text{SERS}}} \cdot \frac{P_{\text{Raman}}}{P_{\text{SERS}}} \cdot \frac{t_{\text{Raman}}}{t_{\text{SERS}}} \quad (2.7.16)$$

ergibt. Wobei $I_{\text{SERS}}/I_{\text{Raman}} = EF_{\text{meas}}$ die gemessene Signalverstärkung ist und $A_{\text{Raman}}/A_{\text{SERS}} = EF_{\text{geo}}$ das Verhältnis der untersuchten Flächen, und damit der zum Signal beitragenden Moleküle,¹⁹ darstellt.

Experimentell wurden Verstärkungsfaktoren von bis zu $EF_{\text{SERS}}^{\text{total}} = 10^{14}$ berichtet [112]. Mit den extrem starken Signalen wurde dann sogar die Detektion von einzelnen Molekülen möglich [14, 15].

¹⁹Unter der Annahme einer identischen Oberflächendichte der Adsorbatmoleküle.

2 Grundlagen

3 Nanoantennenverstärkte IR- und Raman-Spektroskopie an einer Nanostruktur

In diesem Kapitel wird nanoantennenverstärkte IR- und Raman-Spektroskopie an einer einzelnen Nanoantenne demonstriert. Dabei war der Laser für die Raman-Messungen auf eine einzelne Nanoantenne fokussiert, während bei den IR-Messungen viele identische Nanoantennen beleuchtet wurden. Dass sich viele Nanoantennen, bei vernachlässigbarer Wechselwirkung und hinreichender Homogenität, ähnlich verhalten wie einzelne wurde jedoch schon in [49] gezeigt, so dass anzunehmen ist, dass die in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse auch von Einzelantennen zu erwarten wären.

Hinweis: Die in diesem und den Kapiteln 4 und 5 gezeigten Daten sind innerhalb des EU Nanoantennenprojekts¹ in Zusammenarbeit mit Instituten in Frankreich, Spanien, Deutschland, Italien, Israel und Österreich entstanden.

Alle Raman- und Extinktionsspektren im sichtbaren Spektralbereich wurden von CRISTIANO D'ANDREA in der Arbeitsgruppe von PIETRO GUCCIARDI am CNR IPCF Istituto per i Processi Chimico-Fisici in Messina, Italien durchgeführt.

Die Antennen-*Arrays* auf CaF_2 wurden alle von ANDREA TOMA in der Arbeitsgruppe von ENZO DI FABRIZIO am *IIT* in Genua, Italien hergestellt. Der Prozess ist im Anhang A.3 und in [17] beschrieben.

Die FDTD-Simulationen wurden von CHRISTIAN HUCK durchgeführt und sind ebenfalls in [17] veröffentlicht.

3.1 Experimentelle Grundlagen

Bevor auf die Messungen eingegangen wird, sollen in diesem Abschnitt die experimentellen Aufbauten und verwendeten Materialien beschrieben werden.

¹www.nanoantenna.eu

3.1.1 Raman-Mikroskop

Die Raman- und Extinktionsspektren im sichtbaren Spektralbereich wurden an einem *HR800* Spektrometer von *Horiba Jobin-Yvon*, welches an ein *BX51* optisches Mikroskop von *Olympus* gekoppelt war, aufgenommen und von CRISTIANO D'ANDREA durchgeführt. Weitere Details dieser Aufbauten und Experimente sind in [17, 51] beschrieben.

Alle Raman-Messungen wurden in Reflexionsgeometrie aufgenommen. Als Lichtquelle diente ein HeNe-Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm (vergleiche Abbildung 3.2.1) der mit einem Durchmesser von ungefähr 600 nm auf die Probenoberfläche fokussiert war. Die Laserleistung war so gering wie möglich gewählt, so dass einerseits keine Modifikation an den adsorbierten Molekülen auftrat, andererseits aber ein messbares Signal detektiert werden konnte.

3.1.2 Spektrometer und Detektoren

Grundprinzip der modernen IR-Spektroskopie ist die in Abschnitt 2.6.3 beschriebene FTIR-Spektroskopie. Alle in dieser Arbeit gezeigten IR-Messungen wurden nach diesem Prinzip durchgeführt. Der experimentelle Aufbau an den die Experimente dieses Kapitels durchgeführt wurden, steht am Kirchhoff-Institut für Physik in Heidelberg und besteht aus einem *Tensor 27* FTIR-Spektrometer von *Bruker* und einem *Hyperion 1000* IR-Mikroskop vom selben Hersteller. Anders als im Sichtbaren sind optische Linsen für den IR-Spektralbereich problematisch, weshalb Spiegel verwendet werden um das Licht durch das Interferometer und die Versuchsaufbauten zu lenken.

Die vom Global erzeugte IR-Strahlung kann nicht nur durch das IR-Mikroskop (Abschnitt 3.1.3), sondern auch durch die interne Probenkammer des Spektrometers (Abschnitt 4.3.2) und durch eine Ultrahochvakuumkammer (Kapitel 6) gelenkt werden. Die Strahlung wird anschließend von einem MCT²-Detektor registriert. Der gesamte Strahlengang ist in Abbildung 6.2.1 dargestellt.

Der MCT-Detektor wird mit flüssigem Stickstoff auf 77 K gekühlt und beruht auf dem inneren photoelektrischen Effekt im Halbleitermaterial $\text{Hg}_{0,8}\text{Cd}_{0,2}\text{Te}$. Dieses hat eine Bandlücke von 0,1 eV und ermöglicht so die Detektion von Photonen bis zu einer minimalen Frequenz von ungefähr 800 cm^{-1} [87]. Diese Art von Detektor zeigt ein nichtlineares Verhalten zwischen gemessenem Signal und einfallender Intensität, welches jedoch analog-elektronisch oder softwaretechnisch korrigiert werden kann. Bei den in diesem Kapitel gezeigten Mikroskopmessungen wurde das gemessene Signal softwaretechnisch korrigiert.³

²Mercury Cadmium Telluride Detektor

³Für die in Kapitel 6 berichteten Messungen in der UHV-Kammer wurde ein analog-elektronisch korrigierter MCT-Detektor verwendet.

Um den Einfluss der starken IR-Banden von CO_2 und Wasserdampf in der Atmosphäre möglichst gering zu halten, wird das gesamte Spektrometer, der Strahlengang, so wie das Mikroskop mit getrockneter Luft gespült. Diese wird in einem *FT-IR Purge Gas Generator 75-52* von *Parker Balston* aus Pressluft gewonnen.

3.1.3 IR-Mikroskop

Das vom Spektrometer kommende IR-Licht wird im *Bruker Hyperion 1000* Mikroskop durch einen Polarisator linear polarisiert. Anschließend wird es durch eine Kondensorlinse unterhalb der Probe auf diese fokussiert. Eine Blende vor dem Kondensator legt fest, welcher Teil der Probe beleuchtet wird. Die Probe liegt auf einem computergesteuerten x-y-Tisch der sich im Fokus zwischen Kondensator und dem darüber befindlichen Objektiv befindet. Über dieses Objektiv und weitere Spiegel wird die transmittierte Strahlung auf den MCT-Detektor fokussiert. Zwischen Objektiv und Detektor befindet sich eine weitere Blende, die festlegt, von welchem Teil der Probe Strahlung detektiert wird. Details zum Strahlengang durchs Mikroskop, den Aufbau des Objektivs und zur Charakterisierung des Mikroskops sind im Anhang A.2 gegeben.

3.1.4 Reflexionsaufbau für Vergleichsmessungen

Die IRRAS-Messungen wurden auf einer von D. ENDERS konstruierten Reflexionseinheit mit festem Einfallswinkel von $\vartheta = 83^\circ$ durchgeführt. Die Einheit wird in einem *IFS 66v/S* Spektrometer von *Bruker* betrieben und ist in [52] genauer beschrieben.

3.1.5 Gold-Nanoantennen auf CaF_2

Wegen der niedrigen Intensität der IR-Strahlquelle und der damit verbundenen hohen Messdauern, wurden nicht einzelne Gold-Nanoantennen untersucht, sondern viele identische Antennen, die parallel auf einem CaF_2 -Substrat angeordnet sind. Die Abstände sind so gewählt, dass die Nahfeldwechselwirkung noch keine großen Auswirkungen auf die Resonanz und das Nahfeld der Antennen hat [76], so dass die Ergebnisse auch auf Einzelantennen übertragbar sind. Die Raman-Messungen wurden an einer der Antennen im *Array* durchgeführt.

Die Nanoantennen wurden mittels Elektronenstrahl-Lithographie (EBL) hergestellt. In [17] ist der Prozess detailliert beschrieben. Zur eindeutigen Zuordnung zu den Aufzeichnungen im Laborbuch wird die Probe mit ihrem Arbeitstitel „Antenna #11“ benannt. Sie besteht aus 16 verschiedenen Antennen-*Arrays*. Die *Arrays* sind $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ groß und haben einen Abstand von $300 \mu\text{m}$ in beiden Richtungen untereinander. Die Anordnung der Antennen innerhalb des *Array*

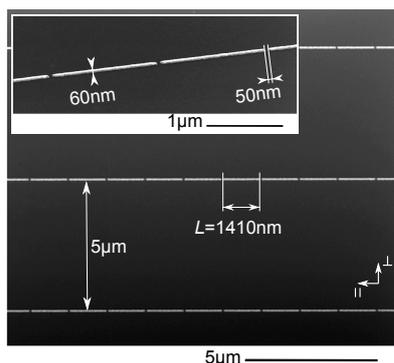


Abbildung 3.1.1: Rasterelektronenmikroskop Aufnahme der Nanoantennen in Array „P5“ auf Probe „Antenna #11“. Die eingefügte Aufnahme zeigt einen kleineren Bildausschnitt in schräger Ansicht. Die Richtungen \parallel und \perp sind eingezeichnet. (Abgeändert aus [17].)

ist in Abbildung 3.1.1 veranschaulicht. Um eine möglichst hohe Antennendichte zu erhalten, wurden für die Experimente in dieser Arbeit vier *Arrays* („P5“ bis „P8“) mit $d_x = 50 \text{ nm}$ verwendet. Bei Abständen in dieser Größenordnung ist das Nahfeld der Antennen durch die Kopplung zusätzlich nur leicht verstärkt und höher lokalisiert als bei einzelnen Antennen. Der relativ große Abstand $d_y = 5 \mu\text{m}$ wurde gewählt um eine abschwächende Wechselwirkung in y -Richtung zu vermeiden. Die Antennen sind $W = H = 60 \text{ nm}$ breit und hoch und werden durch eine 5 nm dicke Titanschicht, alle auf dem gleichen, $10 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$ großen, (100) CaF_2 Substrat gehalten. Die Antennenlängen ($L_{P8} = 710 \text{ nm}$, $L_{P6} = 1110 \text{ nm}$, $L_{P5} = 1410 \text{ nm}$, $L_{P7} = 1910 \text{ nm}$) sind so gewählt, dass die LSPR-Frequenzen zwischen $\omega_{\text{res}} = 3093 \text{ cm}^{-1}$ und $\omega_{\text{res}} = 1286 \text{ cm}^{-1}$ liegen. Alle Abmessungen sind in Tabelle A.2 zusammengefasst.

3.1.6 Glatte Goldprobe für Vergleichsmessungen

IRRAS

Die für IRRAS-Messungen verwendeten Goldsubstrate wurden von *Georg Albert PVD-Beschichtungen* hergestellt. Die 300 nm dicke, polykristalline Goldschicht befindet sich auf einem $25 \times 25 \text{ mm}^2$ großen Glimmersubstrat. Die Oberfläche ist in (111)-Richtung ausgerichtet und weist an den Korngrenzen ein Rauigkeit von wenigen Ångström auf. Informationen zum Herstellungsprozess sind in [113] zu finden.

Raman

Auf demselben CaF_2 -Substrat, auf dem sich auch die Nanoantennen befinden, sind ebenfalls $10 \times 40 \mu\text{m}^2$ große, ausgedehnte Goldflächen mit einer Dicke von 60 nm und einer Rauigkeit von $r_{\text{rms}} \approx 1,1 \text{ nm}$. Diese werden im selben Lithographieschritt wie die Nanoantennen hergestellt.

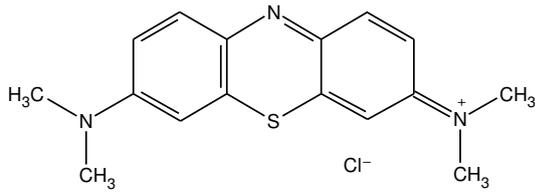


Abbildung 3.1.2: Strukturformel von *Methylene Blue*. (nach [17])

Raman Literatur [116]	Raman Experiment	IR Literatur [117]	IR Experiment	Zurodnung
449	446 und 501	1247	1251	δ (N–C–N)
1390	1393	1397	1384	ν (N–CH ₃)
1600	1624	1600	1591	ν_s (C–N)
		1721	1741	δ_s (C–H ₃)
		2858	2856	ν (C–C)
		2926	2929	unbekannt
				ν_s (C–H ₃)
				ν_{as} (C–H ₃)

Tabelle 3.1: Einige der Vibrationsbanden von MB. Vergleich zwischen gemessenen Frequenzen und Literaturwerten (in cm^{-1}). ν steht für Steck- und δ für Biegeschwingungen. Der Index s steht für symmetrisch und as für asymmetrisch. [17]

3.1.7 *Methylene Blue*

Um die Nahfeldverstärkung und damit die Signalverstärkung von Molekülen experimentell untersuchen zu können, wurden *Methylene Blue* (MB) Moleküle auf der Oberfläche der Antennen abgelagert. Aufgrund der geringen Wirkungsquerschnitte für Raman-Streuung war für die Wahl der Moleküle entscheidend, dass auch ohne die antennenverstärkten Nahfelder das Raman-Signal der Moleküle detektierbar ist. Nur so lässt sich der SERS-Verstärkungsfaktor abschätzen. Ebenso müssen nicht-verstärkte IR-Banden messbar sein, um einen SEIRS-Verstärkungsfaktor (vergleiche Abschnitt 2.7) abschätzen zu können.

Methylene Blue ist eine Substanz, die bei Anregung mit Laserlicht der Wellenlänge 633 nm den resonanten Raman-Prozess (vergleiche Abschnitt 2.6.2) und somit einen vergleichsweise großen Streuquerschnitt aufweist. Das Molekül wird häufig für SERS-Experimente verwendet [114, 115], hat eine Masse von 319,85 g/mol und die chemische Struktur ist in Abbildung 3.1.2 gezeigt. Einige Raman- und IR-aktive Schwingungsmoden von MB sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Zur Präparation der Antennenoberfläche und der Vergleichsproben wurden diese für mindestens eine Stunde in eine $\sim 10^{-4}$ molare wässrige Lösung von MB eingelegt, anschließend mit Reinstwasser gespült und mit N_2 getrocknet. In Wasser gelöst, liegt MB^+ als Kation vor, welches durch partiellen Ladungstransfer an Gold bindet [118]. Neben Monomeren und Dimeren traten auch gut sichtbare

Agglomerate auf den Proben auf. Details zur Unterscheidung von Monomeren und Agglomeraten und zum genauen Bindungsmechanismus von MB an Gold sind in der *Supporting Information* von [17] zu finden. Die vereinzelt Agglomerate auf der Oberfläche konnten bei den Raman-Experimenten gemieden werden. Bei den IR-Messungen wurde dies ebenfalls versucht. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass sich einige Agglomerate innerhalb der beleuchteten Fläche befanden. Für die Abschätzung des Verstärkungsfaktors hat das jedoch keine Folgen, wenn man davon ausgeht, dass die Flächendichte der Agglomerate bei den IRRAS-Messungen identisch ist.

Da das IRRAS-Signal von MB schwach ist, wurde eine weitere Vergleichsprobe präpariert. Dazu wurde ein 1 μl Tropfen einer 33 μM MB-Lösung auf ein CaF_2 -Substrat getropft. Nach ungefähr zwei Stunden war das Wasser verdampft, so dass ein sehr unregelmäßig verteilter, aber hoch konzentrierter Fleck von MB auf der Oberfläche zurückblieb. Diese Probe wird nur zum qualitativen Vergleich mit der IRRAS-Probe verwendet.

3.2 Optische Eigenschaften der Nanoantennen

In einem ersten Schritt soll die Nahfeldverteilung simuliert und die Fernfeld Extinktion der Antennen bei verschiedener Ausrichtung der linearen Polarisation des anregenden Lichts untersucht werden. Damit wird gezeigt, dass die rechteckigen Nanoantennen nicht nur eine dipolare LSPR entlang der langen Antennenachse aufweisen (longitudinale Mode), sondern auch quer zur langen Achse (transversale Mode) eine dipolare LSPR angeregt werden kann. Diese LSPR-Anregungen, sowie die Polarisationsrichtung des zur Anregung verwendeten Lichts, werden als parallel (\parallel) und senkrecht (\perp) bezeichnet. Sie weisen Resonanzfrequenzen im infraroten beziehungsweise im sichtbaren Spektralbereich auf und können so zur Verstärkung von sowohl IR- als auch Raman-aktiven Moden verwendet werden.

3.2.1 Extinktion

Für die Messung des Extinktionssignals wurde die Transmission durch die Antennen-Arrays mit Polarisation parallel und senkrecht zur langen Antennenachse im IR und Sichtbaren gemessen. Die beleuchtete Fläche hatte im IR einen Durchmesser von 58 μm und 100 μm im Sichtbaren, so dass jeweils mehr als 250 Antennen beleuchtet waren. Alle IR-Spektren wurden mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} aufgenommen. In Abbildung 3.2.1 ist $\log\left(\frac{I_0}{I}\right)$ über der Frequenz dargestellt.

Man erkennt, dass bei paralleler Polarisation die LSPR im IR-Spektralbereich auftreten, wobei deren genaue Position von der Länge der Antennen abhängt. Im

3.2 Optische Eigenschaften der Nanoantennen

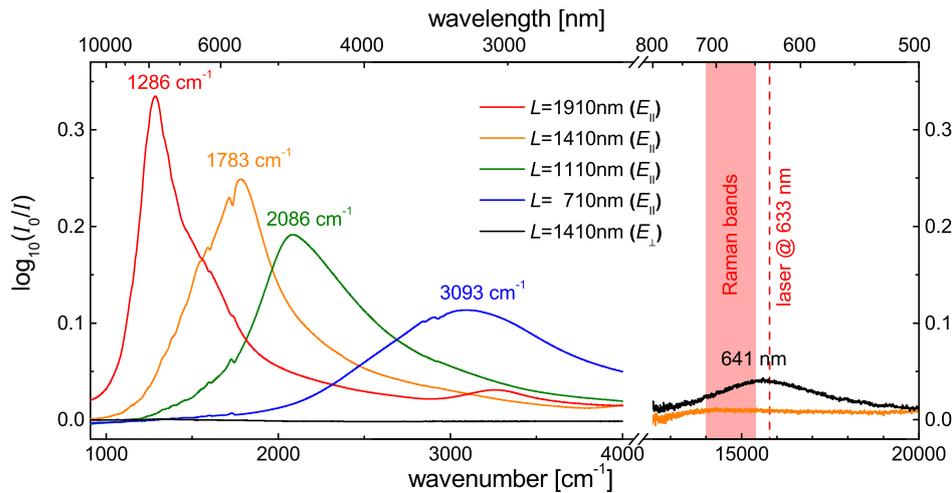


Abbildung 3.2.1: Extinktion ($\log\left(\frac{I_0}{I}\right)$) der Nanoantennen verschiedener Länge bei Ausrichtung der Polarisation \parallel und \perp zur Antennenachse im IR und Sichtbaren. Im Sichtbaren ist die Extinktion unabhängig von der Wellenlänge und daher exemplarisch für $L = 1410$ nm gezeigt. Es befindet sich bereits *Methylene Blue* auf den Antennen, die Fano-artigen Banden im IR stellen nur kleine Änderungen der LSPR dar. Die gestrichelte, rote Linie zeigt die Position des Raman-Anregungslasers und der rot hinterlegte Bereich die Position der Stokes-Linien. [17]

Sichtbaren ist bei dieser Polarisation für alle Längen keine Anregung, beispielsweise höhere Ordnungen der IR-Moden, zu erkennen. Dies ändert sich, wenn die Polarisation um 90° gedreht wird. Dann misst man im Sichtbaren eine LSPR bei etwa 641 nm, die unabhängig von der Länge der Antennen ist. Im IR kann bei paralleler Polarisation keine Anregung beobachtet werden. Durch die Breite (transversale Mode) und die Länge (longitudinale Mode) lässt sich die spektrale Position beider LSPR-Moden unabhängig voneinander festlegen und so optimale SERS und SEIRS Verstärkung erreichen.

Die Antennenlängen sind so gewählt, dass die LSPR-Frequenzen den Bereich der Vibrationsschwingungen abdecken um eine maximale Verstärkung bei bestmöglicher Übereinstimmung der Frequenzen zu erhalten. Es ist mit nur vier Antennenlängen möglich, den gesamten Bereich zwischen 1100 cm^{-1} und 3600 cm^{-1} abzudecken um alle Vibrationsbanden zu verstärken.

Die Breite der Antennen ist so gewählt, dass sowohl die Frequenz des anregenden Lasers als auch die Stokes-verschobenen Raman-Linien (siehe markierte Positionen in Abbildung 3.2.1) eine möglichst große Überlappung mit der Quermode aufweisen.

Es ist an dieser Stelle darauf hinzuweisen, dass die Molekülwechselwirkung mit der Antenne im Nahfeld stattfindet. Die Resonanzfrequenz des Nahfelds kann bei großer Dämpfung des Antennenmaterials gegenüber den hier gezeigten Fern-

feldresonanzen deutlich rot-verschoben sein [119]. Im Fall der hier untersuchten Gold-Antennen ist die zu erwartende Verschiebung jedoch gering einzuschätzen [120].

3.2.2 Nahfeldverteilung

Zur Veranschaulichung der Nahfeldverteilung der longitudinalen und transversalen Mode wurden FDTD Simulationen durchgeführt. Eine ausführliche Beschreibung der Simulationsparameter ist in [17] zu finden. Abbildung 3.2.2 zeigt die quadrierte Nahfeldintensität (vergleiche Abschnitt 2.7.1) der 1410 nm langen Nanoantennen für Anregung im IR und Sichtbaren. In der Simulation wurden fünf Nanoantennen nebeneinander simuliert, wobei die drei mittleren in Abbildung 3.2.2c und 3.2.2d zu sehen sind. Es wurde gezeigt, dass sich die Nahfelder im gezeigten Ausschnitt für fünf oder mehr Antennen nicht ändern. Die in den Simulationen verwendete Antennengeometrie ist in [17] veröffentlicht und versucht die experimentellen Gegebenheiten bestmöglich nachzubilden. Dies beinhaltet auch das Strahlprofil des einfallenden Lichts.

In 3.2.2a und 3.2.2c ist das Nahfeld bei räumlich ausgedehnter, paralleler Anregung bei der simulierten Nahfeld-Resonanzfrequenz (1751 cm^{-1}) dargestellt. In b) und d) wurden die Antennen mit einem Gauß-förmigen, senkrecht polarisierten Strahlprofil angeregt und das Nahfeld bei der Laserwellenlänge (633 nm) ausgewertet. Da das anregende Strahlprofil in d) nach außen hin auf null abfällt, ergibt eine Normierung des Nahfelds auf das Feld des einfallenden Strahls keinen Sinn. c) und d) sind daher auf die maximale, in der gezeigten Ebene auftretende, Feldstärke normiert. Aufgrund des kleinen Bildausschnitts in a) und b), ist dort eine Normierung auf die einfallende Feldstärke sinnvoll, was eine Bestimmung der Feldverstärkung ermöglicht.

In a) und b) erkennt man, dass die Feldverstärkung stark von der Oberflächenkrümmung abhängt und bei realen, rauen Antennenenden eventuell stärker an konvexen Stellen lokalisiert ist. Wegen der unterschiedlichen Dipolmomente und Aspektverhältnisse im Bezug auf die Anregungsrichtung⁴ sind die Nahfelder der transversalen Mode deutlich weniger verstärkt als die der longitudinalen Mode.

Aus c) und d) lässt sich schließen, dass die verstärkten Nahfelder bei paralleler Anregung auf den Bereich der Antennenenden beschränkt sind und bei senkrechter Anregung die höchsten Felder an den Antennenseiten innerhalb des 600 nm großen Anregungsflecks auftreten. Dies kann damit erklärt werden, dass im freien Elektronengas keine Scherkräfte auftreten. Die transversale Mode tritt daher nur an den Stellen der Antenne auf, die auch angeregt werden. Damit lässt sich auch

⁴Die unterschiedlichen Materialeigenschaften von Gold bei höheren Frequenzen können auch eine Rolle spielen.

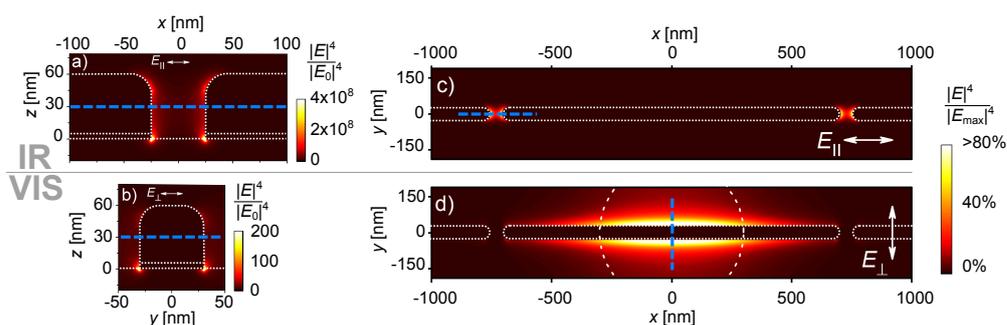


Abbildung 3.2.2: Quadrierte Nahfeldintensität bei paralleler (\parallel , a) und c)) und paralleler (\perp , b) und d)) Anregung. Die Konturen der Antennen sind gepunktet hervorgehoben. In a) und c) wird mit einer ebenen Welle angeregt und das Nahfeld an der simulierten Resonanzfrequenz (1751 cm^{-1}) ausgewertet. a) und c) zeigen das Nahfeld in zwei senkrecht aufeinander stehenden Ebenen, die jeweils durch blau gestrichelte Linien eingezeichnet sind. Gleiches gilt für b) und d). Analog zum Experiment wird in b) und d) mit einem Gauß-förmigen Strahlprofil angeregt. Der gestrichelte Kreis in d) hat einen Durchmesser d_{beam} von 600 nm und zeigt $E_0/E_{0,\text{max}} = 1/e$ des einfallenden Strahls an. Das Nahfeld ist an der Laserwellenlänge (633 nm) ausgewertet. In a) und b) sind die Nahfelder auf die einfallende Feldstärke normiert, während in c) und d) auf die maximale lokale Feldstärke normiert ist (siehe Text). [17]

erklären, weshalb die Extinktion der transversalen Mode unabhängig von der Antennenlänge ist.

In erster Näherung kann analog zu Gleichung (2.5.11) $A_{\text{active}}^{\parallel} \approx 2WH = 7200 \text{ nm}^2$ abgeschätzt werden. Für senkrechte Polarisation wird $A_{\text{active}}^{\perp} \approx 2H \cdot d_{\text{beam}} \approx 7 \cdot 10^4 \text{ nm}^2$ angenommen.

3.3 SERS

Zum Vergleich zwischen antennenverstärktem und nicht verstärktem Raman-Signal von MB, wird in diesem Abschnitt das auf einer ebenen Goldoberfläche aufgenommene Signal und das auf Antennen aufgenommene Signal miteinander verglichen.

3.3.1 Vergleichsmessung (Raman)

Da sich die glatte Goldoberfläche für die Raman-Vergleichsmessung auf derselben Probe wie die Nanoantennen befindet, ist diese unter den exakt gleichen Bedingungen wie die Antennen mit MB versehen worden.

Eine nicht-verstärktes Raman-Spektrum der Vergleichsmessung ist in Abbildung 3.3.1 blau dargestellt. Das dargestellte Spektrum wurde für 30 s akkumuliert

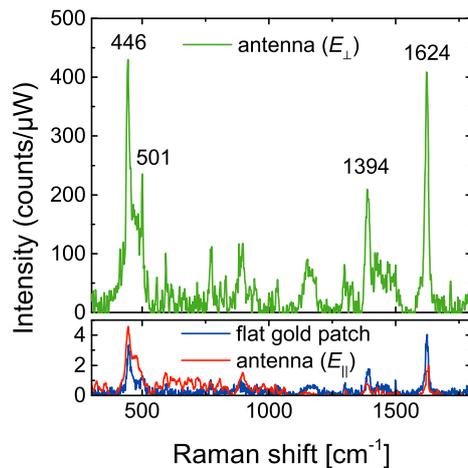


Abbildung 3.3.1: Die Raman-Spektren von MB auf einer flachen Goldoberfläche (blau) und auf einer Antenne mit parallel polarisiertem Licht (rot) zeigen das nicht verstärkte Raman-Signal von MB. Die grüne Linie zeigt das SERS-Spektrum von *Methylene Blue* auf derselben Antenne aber mit senkrecht polarisiertem Licht. Die Intensität ist auf die Laserleistung normiert, die im nicht verstärkten Fall 50 μW und 500 nW bei SERS betrug. Alle Spektren wurden über 30 s akkumuliert. [17]

und ist auf die Laserleistung (50 μW) normiert. Die in Tabelle 3.1 aufgeführten Banden sind zu erkennen.

3.3.2 SERS-Messungen auf einer Nanoantenne

Ein ähnlich starkes Spektrum wird auch gemessen, wenn in paralleler Polarisation auf eine Antenne fokussiert wird. In Abbildung 3.3.1 ist dieses Spektrum rot dargestellt. Es ist dabei unerheblich ob die Antenne in der Mitte beleuchtet wird oder die Lücke zwischen zwei Antennen im Fokus liegt. Die Länge der Antenne hat ebenfalls keine Auswirkung auf die Stärke des Signals. Daraus kann geschlossen werden, dass bei paralleler Anregung keine Verstärkung auftritt und das Signal hauptsächlich von dem auf CaF_2 adsorbierten MB stammt, das dort in der gleichen Dichte adsorbiert wie auf Gold.⁵

Wird die Polarisation senkrecht zu den Antennen eingestellt, so wird die LSPR-Quermode angeregt und man misst bei einer Laserintensität von 500 nW innerhalb von 30 s ein Raman-Signal. Dieses ist in Abbildung 3.3.1, ebenfalls normiert auf die Laserintensität, eingezeichnet. Aufgrund der verschiedenen Laserintensitäten und der anschließenden Normierung unterscheidet sich das Rauschlevel der Spektren in Abbildung 3.3.1.

3.3.3 Verstärkungsfaktor

Im Vergleich zu den nicht verstärkten Signalen, ist das SERS-Signal etwa 100 mal verstärkt. Nach Gleichung (2.7.16) müssen zur Berechnung des SERS-Verstärkungsfaktors $EF_{\text{calc}}^{\text{Raman}}$ zusätzlich die Anzahl der zum Signal beitragenden Moleküle und die Verhältnisse der Laserintensitäten und Akkumulationsdauern

⁵Dies wurde durch ein Spektrum abseits der Antennen verifiziert.

berücksichtigt werden. Letztere sind durch die normierte Darstellung in Abbildung 3.3.1 berücksichtigt, beziehungsweise identisch, so dass nur die Molekülanzahl in Form von zum Signal beitragenden Oberflächen zusätzlich beachtet werden muss. Bei der SERS-Messung wird das Gesamtsignal von den Molekülen innerhalb der *Hotspots* dominiert. Die Oberfläche der *Hotspots* bei senkrechter Anregung wurde in Abschnitt 3.2.2 mit $A_{\text{active}}^{\perp} \approx 2H \cdot d_{\text{beam}} \approx 7 \cdot 10^4 \text{ nm}^2$ abgeschätzt. Im Gegensatz dazu tragen bei der Vergleichsmessung alle Moleküle innerhalb des 600 nm großen Fokus zum Signal bei.

Die Abschätzung des Verstärkungsfaktors der SERS-Messung ergibt damit

$$EF_{\text{calc}}^{\text{Raman}} \approx 100 \cdot \frac{3 \cdot 10^5}{7 \cdot 10^4} \approx 400,$$

was für SERS-Messungen gering ist. Der hauptsächliche Grund dafür ist, dass das verstärkte Nahfeld der Quermode über eine große Strecke ausgedehnt ist. Durch die resonante Anregung ist zwar eine Überhöhung des lokalen Felds möglich, jedoch wird dieses nicht wie bei einer spitz zulaufenden oder dünnen Antenne auf ein kleines Volumen konzentriert.

Aus Abbildung 3.2.2b erkennt man, dass für die höchsten Nahfelder analog zu Gleichung (2.7.15) $EF_{\text{SERS}} = |E_{\text{max}}|^4 / |E_0|^4 \approx 200$ gilt. In Anbetracht der idealisierten Simulationsgeometrie und des nicht berücksichtigten chemischen Effekts stimmt dies mit den Messergebnissen gut überein.

3.4 SEIRS

Dieselben Nanoantennen die für die SERS Messungen verwendet wurden, sind anschließend im IR vermessen worden. Da im freien Elektronengas keine Scherkräfte auftreten, koppeln longitudinale und transversale LSPR nicht und können sich somit nicht gegenseitig beeinflussen. Daher wäre es mit dem entsprechenden experimentellen Aufbau auch möglich beide Messungen zeitgleich durchzuführen.

3.4.1 Vergleichsmessung (IR)

Auch im IR wurden Vergleichsmessungen auf einem flachen Goldsubstrat durchgeführt. Da die beleuchtete Fläche beim verwendeten Aufbau (Abschnitt 3.1.4) mehr als 1 cm groß ist, konnte die Goldfläche auf dem CaF_2 -Substrat der Antennen nicht verwendet werden. Ein in Abschnitt 3.1.6 beschriebenes Goldsubstrat, das zuvor 15 Stunden in einer 33 μM wässrigen MB-Lösung eingelegt war, wurde mit p-polarisiertem Licht⁶ unter 83° Einfallswinkel vermessen. Das so erhaltene IRRAS-Spektrum wurde auf das Spektrum eines sauberen Goldsubstrats normiert

⁶Polarisation parallel zur Einfallsebene.

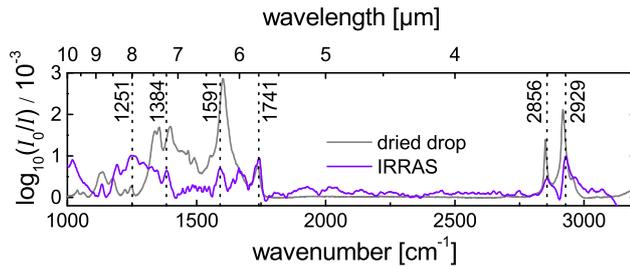


Abbildung 3.4.1: IRRAS-Spektrum von MB auf Gold und Transmissionsspektrum eines getrockneten Tropfens von MB-Lösung. Die Schwingungsbanden sind in Tabelle 3.1 angegeben. [17]

und ist in Abbildung 3.4.1 dargestellt (lila). Es wurde basislinienkorrigiert und aufgrund des hohen Rauschens geglättet (Savitzky-Golay, 2. Ordnung, 25 Punkte, siehe Abschnitt 3.4.2). Um die verrauschten Banden eindeutig dem MB-Molekül zuordnen zu können, wurde wie in Abschnitt 3.1.7 beschrieben, außerdem der Fleck eines verdunsteten Tropfens von MB-Lösung in Transmission vermessen. Das IR-Spektrum ist ebenfalls in Abbildung 3.4.1 dargestellt (grau).

Eine quantitative Auswertung dieses Spektrums ist aufgrund der unbekanntenen Molekülanzahl nicht möglich. Es zeigt jedoch die gleichen Absorptionsbanden wie das IRRAS-Spektrum. Einige Banden sind in der Frequenz verschoben und weisen unterschiedliche relative Intensitäten auf. Dies kann durch die unterschiedliche Messgeometrie, Moleküldichte und die Wechselwirkung mit dem Substrat erklärt werden. Die wichtigsten Banden sind, mit den mittels IRRAS bestimmten Frequenzen, in Tabelle 3.1 aufgelistet. Erwähnenswert ist die im IRRAS-Spektrum stark ausgeprägte Bande bei 1741 cm^{-1} . Sie ist als Schulter auch im Spektrum des getrockneten Tropfens zu erkennen, wird aber in der Literatur nicht erwähnt. Grund ihres Auftretens könnte die Degradation von MB sein [117]. Die IRRAS-Bande bei etwa 1660 cm^{-1} tritt im Transmissionsspektrum des getrockneten Tropfens ebenfalls als Schulter auf, ist aber auch unbekannter Herkunft und in den SEIRS-Spektren (Abbildung 3.4.4) nicht zu finden.

3.4.2 Signalextraktion bei SEIRS Messungen

Für die antennenverstärkten IR-Messungen von MB wurde die longitudinale Mode der Antennenresonanz angeregt. Die Spektren wurden bereits in Abbildung 3.2.1 gezeigt. Die Fano-artigen Abweichungen von der breitbandigen Antennenresonanz treten an den Frequenzen der MB-Vibrationsbanden auf und sind auf die Wechselwirkung mit der LSPR zurückzuführen. In Abbildung 3.4.2a sind, in einem vergrößertem Ausschnitt, die MB-Banden bei 1591 cm^{-1} und 1741 cm^{-1} auf dem breitbandigen LSPR-Untergrund von zwei verschiedenen Antennen zu sehen (schwarze Spektren). In diesem Abschnitt sollen verschiedene Methoden vorgestellt werden, wie man die Vibrations-signale aus solchen Spektren extrahiert.

Basislinienkorrektur

Eine oft verwendete Methode zur Extraktion von *Peaks* auf einem Untergrund ist die sogenannte Basislinienkorrektur. Der Untergrund wird dann entweder von den Messdaten subtrahiert oder dividiert. Die geeignete Methode hängt von der Darstellung der Messdaten ab. Die hier gewählte Darstellung von $\log(I_0/I)$ erfordert eine Subtraktion der Basislinie.⁷

Die Basislinie kann beispielsweise durch den *Fit* eines physikalischen Modells an die Messdaten erhalten werden oder in einem bestimmten Bereich durch den *Fit* eines Polynoms. Bei kleinen Signalen muss das Modell den Untergrund sehr genau beschreiben, da andernfalls die Abweichungen größer sind als die zu extrahierenden Signale. Aus diesem Grund werden die Basislinien hier nicht mit der Gleichung (2.5.10) beschrieben. Ein Polynom-*Fit* hingegen hängt stark von der gewählten Ordnung und den *Fit*-Grenzen ab und eine *Spline*-Kurve von den Positionen der Stützstellen.

Eine reproduzierbare Methode zur Bestimmung einer Basislinie ist die Glättung der Messkurve. Dadurch werden die schmalen Molekülvibrationen herausgeglättet, während die breitbandige LSPR idealerweise unverändert bleibt. Mathematisch existieren es mehrere Glättungsalgorithmen.

Savitzky-Golay. Der Savitzky-Golay-Algorithmus [121] ist einer der bekanntesten und wird auch in dieser Arbeit häufig verwendet um das Rauschen in Spektren zu unterdrücken. Dabei werden eine zuvor wählbare Anzahl von Datenpunkten (*Smoothing Points*) um eine Frequenz ω_{SG} im Spektrum mit einem Polynom (meist zweiten Grades) *gefittet*. Der Wert des Polynoms bei ω_{SG} wird dann für die geglättete Funktion übernommen. So werden alle Datenpunkte durchgegangen. Je größer die Anzahl der *Smoothing Points* gewählt wird, desto glatter wird die Kurve.

Eilers. Eine Alternative stellt der von EILERS veröffentlichte Algorithmus [122] dar. Die Idee ist, dass jedem Messwert y_i ein Wert der geglätteten Kurve z_i zugeordnet wird. Ein Maß für die Glätte der Kurve stellt dabei $R = \sum_i (z_i - z_{i-1})^2$ dar. Analog zu einem *Fit* wird nun versucht die Abweichung $S = \sum_i (y_i - z_i)^2$ zwischen allen y_i und z_i zu minimieren bei gleichzeitiger Bestrafung zu großer Rauigkeit. Dies wird erreicht durch die Minimierung von $Q = S + \lambda R$, wobei λ der vom Nutzer wählbare Grad der erreichten Glätte ist. Vorteil dieser Methode gegenüber dem Savitzky-Golay-Algorithmus ist, dass die Datenpunkte nicht äquidistant verteilt sein müssen und so Bereiche die offensichtlich durch Vibrationsbanden gestört sind, beim Glättungsvorgang vernachlässigt werden können [57].

⁷Durch den Logarithmus entspricht dies einer Division bei der Basislinienkorrektur der relativen Transmission I/I_0 .

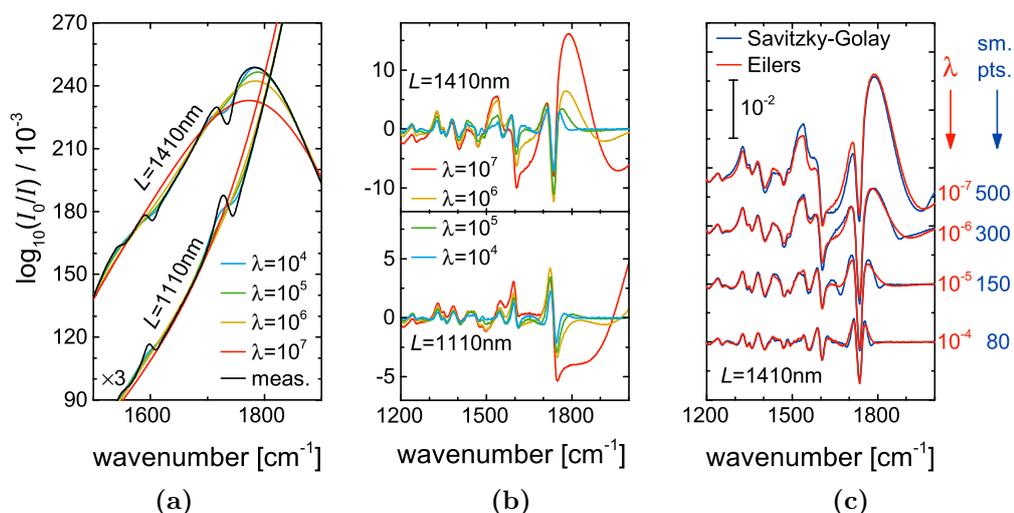


Abbildung 3.4.2: In a) ist die Extinktion der Antennen mit MB für $L = 1410$ nm und $L = 1110$ nm zu sehen (schwarz, Auflösung 2 cm^{-1}). Zusätzlich sind die verschieden stark mit dem Eilers-Algorithmus geglätteten Spektren eingezeichnet. In b) wurden diese als verschiedene Basislinien vom ursprünglichen Spektrum abgezogen. In c) wird der Glättungsmechanismus von EILERS (rot) mit dem von SAVITZKY und GOLAY (blau) anhand der basislinienkorrigierten Spektren von $L = 1410$ nm verglichen. Die Zuordnung zwischen λ und der Anzahl der *Smoothing Points* wurde nach Augenmaß gewählt.

Neben den in Abbildung 3.4.2a dargestellten gemessenen IR-Spektren (schwarz) sind ebenfalls die mit dem Eilers-Algorithmus geglätteten Spektren für verschiedene λ eingezeichnet.⁸ In Abbildung 3.4.2b sind die zugehörigen, basislinienkorrigierten Spektren gezeigt.

Man erkennt, dass mit größer werdender Glätte die Signalstärke des basislinienkorrigierten Spektrums ansteigt. Dies liegt daran, dass die Basislinie bei kleinen λ den Fano-artigen Vibrationsbanden noch folgt. Werden die Werte von λ zu groß, so sieht man speziell bei der Resonanzkurve der 1410 nm langen Antennen in Abbildung 3.4.2a, dass das geglättete Spektrum auch die Spitze der LSPR abflacht. Dies führt im basislinienkorrigierten Spektrum in Abbildung 3.4.2b zu unphysikalischen Artefakten (besonders gut sichtbar oberhalb von 1700 cm^{-1}). Die Wahl eines geeigneten Werts für λ ist erneut der Willkür des Nutzers überlassen und muss mit bedacht gewählt werden.

Um zu zeigen, dass auch der Algorithmus von SAVITZKY und GOLAY ähnliche Ergebnisse liefert, sind in Abbildung 3.4.2c, neben den bereits in Abbildung 3.4.2b oben gezeigten Spektren, zusätzliche Spektren eingezeichnet, bei denen die

⁸Der zusätzliche Parameter p [57] wird in dieser Arbeit nicht variiert und immer $1/2$ gesetzt.

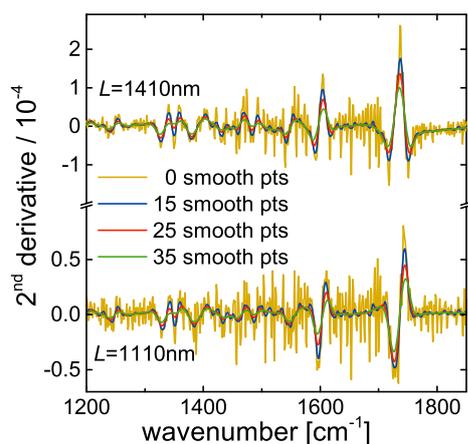


Abbildung 3.4.3: Zweite Ableitung der Extinktion der Antennen mit MB-Molekülen (gelb). Zur Unterdrückung des Rauschens wurde die Ableitungskurve mit verschiedenen vielen *Smoothing Points* mit dem Savitzky-Golay-Algorithmus geglättet.

Basislinie mit dem Savitzky-Golay-Algorithmus erhalten wurde. Die Anzahl der *Smoothing Points* wurde so gewählt, dass eine möglichst gute Übereinstimmung mit dem jeweils korrespondierenden Spektrum erzielt wurde. Die Unterschiede zwischen beiden Methoden sind marginal, so dass auch beim Savitzky-Golay-Algorithmus die vernünftige Wahl des Glättungsparameters entscheidend ist.

Zweite Ableitung

Eine weitere Methode die breitbandige Antennenresonanz von den schmalbandigen Vibrationsbanden zu trennen, ist die Darstellung der zweiten Ableitung der Spektren. Die Krümmung der Vibrationsbanden führt dazu, dass sich diese von der nahezu verschwindend gekrümmten Antennenresonanz abheben. Dabei ist zu beachten, dass sich die *Peak*-Form durch die Ableitung ändert [123]. Ein einfacher Lorentz-*Peak*, der im relativen Transmissionsspektrum ein Minimum darstellt, wird in der zweiten Ableitung nach oben zeigen und auf beiden Seiten kleinere Nebenminima aufweisen. Außerdem verringert sich die Halbwertsbreite, was es möglich macht, dicht beieinanderliegende *Peaks* spektral zu trennen [123]. Dieser Effekt wird beispielsweise häufig in der Proteinspektroskopie verwendet um die verschiedenen strukturellen Komponenten zu trennen [124].

In Abbildung 3.4.3 sind die zweiten Ableitungen⁹ der in Abbildung 3.4.2a dargestellten, nicht geglätteten Spektren abgebildet (gelb). Die Vibrationsbanden sind von einem hohen Rauschpegel überlagert und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis beträgt etwa acht. Durch Glättung mit dem Savitzky-Golay-Algorithmus kann

⁹Genau genommen hat die zweite Ableitung der dimensionslosen Absorbanz (oder relativen Transmission) die Einheit einer Fläche: $(\text{cm}^{-1})^{-2} = \text{cm}^2$. Da die Signalstärke der zweiten Ableitung jedoch nie absolut ausgewertet wird, sondern immer mit der Stärke eines anderen *Peaks* oder des Rauschens verglichen wird, soll in dieser Arbeit die Einheit der zweiten Ableitung unterschlagen werden.

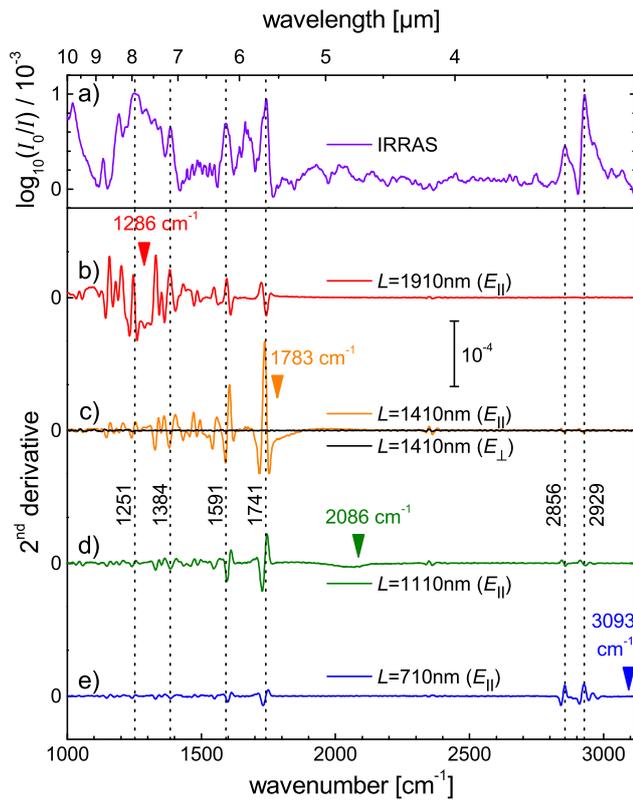


Abbildung 3.4.4: In a) wird das IRRAS-Spektrum aus Abbildung 3.4.1 als Orientierungshilfe gezeigt. In b) bis e) sind die zweiten Ableitungen der Spektren aus Abbildung 3.2.1 dargestellt (identisch skaliert). Die farbigen Dreiecke geben jeweils die Position der LSPR-Frequenz an. Alle Spektren sind mit 25 *Smoothing Points* geglättet. Die angegebenen *Peak-Positionen* sind aus Abbildung 3.4.1 übernommen. [17]

das Rauschen unterdrückt werden, so dass das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei 15 *Smoothing Points* auf etwa 22 ansteigt und bei 25 *Smoothing Points* schon etwa 80 beträgt. Andererseits verringert sich durch die Glättung die absolute *Peak-Größe*. Bei zum Beispiel 25 *Smoothing Points* ist die *Peak-Größe* auf etwa die Hälfte zurückgegangen. So muss auch bei dieser Methode ein vernünftiger Kompromiss gefunden werden, der für diese Messungen auf 25 *Smoothing Points* festgelegt wird. Dieser Wert hängt natürlich vom Rauschen der Messung und deren Auflösung ab und ist kleiner zu wählen für gröbere Auflösungen.

In Abbildung 3.4.4b-e sind die geglätteten zweiten Ableitungen für alle Spektren aus Abbildung 3.2.2 zu sehen. Zur Orientierung bei den *Peak-Positionen* ist in a) das IRRAS-Spektrum aus Abbildung 3.4.1 reproduziert. Außerdem sind die LSPR-Frequenzen der verschiedenen Antennen mit farbigen Dreiecken markiert. Man erkennt, dass Vibrationsbanden im spektralen Bereich um die LSPR besonders große Signale in der zweiten Ableitung liefern. Bei senkrechter Polarisation wird keine LSPR angeregt, daher treten in der zweiten Ableitung auch keine Vibrationsbanden auf.

Dass die Signalgröße des Moleküls von der Abstimmung der LSPR-Frequenz zur Vibrationsfrequenz (dem sogenannten *Detuning*) abhängt, wurde bereits in [12]

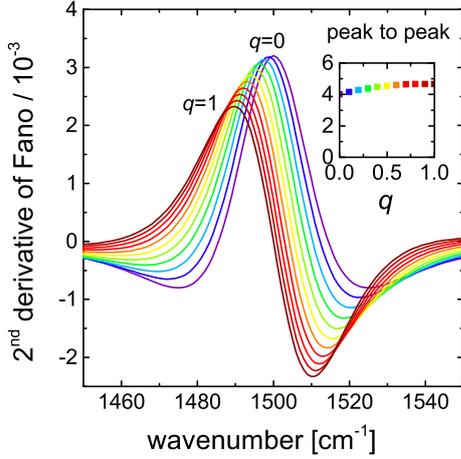


Abbildung 3.4.5: Zweite Ableitung des Fano-Profiles (Gleichung (3.4.1)) für $a = 1$, $\gamma = 50 \text{ cm}^{-1}$, $\omega_{\text{vib}} = 1500 \text{ cm}^{-1}$ und verschiedene Werte für q von 0 bis 1 (Schrittweite 0,1). In der eingefügten Grafik ist die Signalgröße (Minimum bis Maximum) der gezeigten Profile über q dargestellt.

gezeigt. Dass dies ebenfalls für die zweite Ableitung gilt erscheint plausibel, ist aber nicht offensichtlich und soll im Folgenden erläutert werden.

Die zweite Ableitung des Fano-Profiles (Gleichung (2.7.8)) nach der Frequenz ω ergibt sich zu

$$\frac{d^2}{d\omega^2} [f(\epsilon(\omega))] = \frac{a}{q^2 + 1} \cdot \frac{2(2q\epsilon^3 + (3q^2 - 3)\epsilon^2 - 6q\epsilon - q^2 + 1)}{(\epsilon^2 + 1)^3} \cdot \frac{4}{\gamma^2}, \quad (3.4.1)$$

wobei nach wie vor $\epsilon = 2(\omega - \omega_{\text{vib}})/\gamma$ gilt. In Abbildung 3.4.5 ist Gleichung (3.4.1) exemplarisch für $a = 1$, $\gamma = 50 \text{ cm}^{-1}$, $\omega_{\text{vib}} = 1500 \text{ cm}^{-1}$ und verschiedene Werte für q von 0 bis 1 (Schrittweite 0,1) dargestellt. In der eingefügten Grafik ist die Signalgröße (von Minimum zu Maximum) über q aufgetragen und man erkennt, dass diese näherungsweise unabhängig von q ist. Aufgrund der Symmetrien (2.7.9) und (2.7.10) des Fano-Profiles, lässt sich diese Aussage auf $-\infty < q < \infty$ ausdehnen.

Solange die Dämpfung γ und ω_{vib} der Schwingung unabhängig vom *Detuning* sind, was bei gleichbleibender Temperatur und Umgebung anzunehmen ist, so ist die Signalgröße der zweiten Ableitung näherungsweise proportional zur Signalgröße a des Fano-Profiles. Nimmt man weiter an, dass alle Schwingungsbanden eine ähnliche Dämpfung aufweisen, was für MB näherungsweise gegeben ist, so ist nicht nur der Vergleich einer Bande auf verschiedenen langen Antennen sinnvoll, sondern auch der Vergleich verschiedener Banden.

Bewertung der verschiedenen Methoden

Abschließend lässt sich sagen, dass jede der vorgestellten Methoden Vor- und Nachteile aufweist. Während die Basislinienkorrektur mittels *Fit* eines physikalischen Modells oder durch die Beschreibung einer *Spline*-Kurve von vorn

herein ausgeschlossen wurden, liefert die Glättung der Spektren, unabhängig vom angewandten mathematischen Algorithmus, gute Ergebnisse. Die basislinienkorrigierten Spektren liefern Signalgrößen, die den Signalgrößen der Vergleichsmessungen direkt gegenübergestellt werden können. Aufgrund des frei wählbaren Glättungsparameters ist die Basislinie und damit die Signalstärke nicht eindeutig bestimmt.

Die zweite Ableitung hingegen liefert keine absoluten Signalgrößen. In speziellen Fällen ist es zwar möglich diese aus der zweiten Ableitung zu errechnen (siehe Abschnitt 3.4.3), was jedoch nicht immer möglich ist. Wird eine Glättung der zweiten Ableitung für ein vernünftiges Signal-zu-Rausch-Verhältnis nötig, werden auch bei dieser Methode die Signalgrößen von einem frei wählbaren Parameter beeinflusst. Ist man rein am Nachweis eines Signals und nicht an dessen Größe interessiert und ist außerdem, wie in Kapitel 5, eine Glättung aufgrund einer größeren Auflösung nicht nötig, so ist diese Methode unabhängig von Parametern und damit den andern Methoden vorzuziehen.

3.4.3 Verstärkungsfaktor

Zur Abschätzung des SEIRS-Verstärkungsfaktors kann die tatsächliche Signalgröße aus der zweiten Ableitung rekonstruiert werden. Dafür wurde Gleichung (3.4.1) an ein abgeleitetes Spektrum *gefittet* und aus den daraus erhaltenen *Fit*-Parametern ($a, \gamma, q, \omega_{\text{vib}}$) die Größe des Fano-Profil rekonstruiert. Diese Methode liefert jedoch nur bei spektral separierten Banden, die genügend Abstand von der LSPR-Frequenz haben, brauchbare Ergebnisse. Der Einfluss der LSPR in der zweiten Ableitung ist zwar gering, befindet sich die Vibrationsbande jedoch zu nahe an der LSPR-Frequenz, beschreibt Gleichung (3.4.1) die Messdaten nur ungenügend genau. Die Bande bei 1741 cm^{-1} im Graph 3.4.4d ($L = 1110 \text{ nm}$) eignet sich daher für diese Methode und ist in Abbildung 3.4.6 vergrößert, zusammen mit dem besten *Fit*, dargestellt.

Der *Fit*-Parameter $a = I_{\text{ant}} \approx 11 \cdot 10^{-3}$ gibt dabei direkt die Größe des rekonstruierten Fano-Profiles wieder. Ein Vergleich mit der durch Basislinienkorrektur bestimmten *Peak*-Größe (Abbildung 3.4.2b unten) liefert Werte zwischen $I_{\text{ant}} \approx 4 \cdot 10^{-3}$ und $I_{\text{ant}} \approx 8 \cdot 10^{-3}$, je nach Wahl von λ . Die Methode scheint die Signalgröße folglich leicht zu überschätzen. Der Vorteil der Ableitungsmethode liegt jedoch in der Bestimmung des *Detuning*-Parameters q . Dieser ist bei einem Fano-*Fit* an ein basislinienkorrigiertes Spektrum extrem von λ abhängig. Andererseits bietet die Basislinienkorrektur bei dicht nebeneinander liegenden Banden die einzige Möglichkeit die Signalgröße auszulesen. Es muss daher je nach Situation entschieden werden, welche Methode angewendet wird.

Die im vorherigen Absatz bestimmte Signalgröße muss nun mit dem nicht verstärkten Signal von MB verglichen werden. Dieses ergibt sich für die Bande bei 1741 cm^{-1} aus Abbildung 3.4.4a zu $I_{\text{com}} \approx 9 \cdot 10^{-4}$. Nach Gleichung

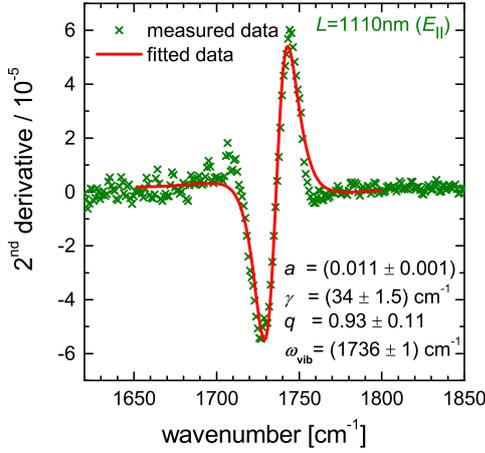


Abbildung 3.4.6: Experimentelle Daten von Abbildung 3.4.4d und der beste *Fit* von Gleichung (3.4.1) daran. Die angegebenen Fehler stellen das 95% Konfidenzintervall des *Fits* dar. [17]

(2.7.3) errechnet man daraus eine messbare Verstärkung zwischen 5 und 12. Aus Gleichung (2.7.4) ergibt sich ein zusätzlicher Faktor von etwa 39, der das IRRAS-Signal in ein Transmissionssignal umrechnet. Aus der Betrachtung der Flächen $A_{\text{unit}}/A_{\text{active}} \approx 1000$ (vergleiche Abschnitt 3.2.2) errechnet sich nach Gleichung (2.7.6) ein Gesamtverstärkungsfaktor zwischen $EF_{\text{calc}}^{\text{IR}} \approx 200\,000$ und $EF_{\text{calc}}^{\text{IR}} \approx 470\,000$.

Wertet man denselben *Peak* (1741 cm^{-1}) auf den besser abgestimmten Antennen der Länge $L = 1410\text{ nm}$ aus, so erhält man eine Signalstärke von $I_{\text{ant}} \approx 15 \cdot 10^{-3}$ (Abbildung 3.4.2b oben, $\lambda = 10^5$) und damit eine Verstärkung von

$$EF_{\text{calc}}^{\text{IR}} \approx 650\,000.$$

Dieser Wert ist etwas größer als die bisher berichteten Verstärkungsfaktoren in SEIRS-Studien [12, 101]. Der Grund hierfür liegt vermutlich in der Präparation der Proben. Bedingt durch den geographisch unterschiedlichen Standort der Messapparaturen wurden die SERS-Messungen einige Tage vor den SEIRS Messungen durchgeführt. Daher konnte das *Methylene Blue* auf den Antennen stärker degradieren, als auf der frisch präparierten Goldoberfläche der IRRAS-Messung. Da der Peak bei 1741 cm^{-1} dem degradierten MB-Molekül zugeschrieben wird und für die Bestimmung von $EF_{\text{calc}}^{\text{IR}}$ ausgewertet wurde, kann eine Überschätzung der tatsächlichen Verstärkung erklärt werden.

Aus der Amplitude des verstärkten Nahfelds in Abbildung 3.2.2a erkennt man, dass $EF_{\text{SEIRA}} = |E_{\text{max}}|^2 / |E_0|^2 \approx 2 \cdot 10^4$ und $EF_{\text{SEIRS}} = |E_{\text{max}}|^4 / |E_0|^4 \approx 4 \cdot 10^8$ gilt. Vernachlässigt man den chemischen Effekt und beachtet, dass der Wert für E_{max} an der unrealistisch scharfen Ecke in der Simulation abgelesen wurde und somit wohl eher kleiner ausfallen wird, so stellt man fest, dass $EF_{\text{calc}}^{\text{IR}} > EF_{\text{SEIRA}}$ ist. Eine Erklärung des antennenverstärkten Signals rein über die elektromagnetische Verstärkung wäre für SEIRA nicht möglich. Nimmt man

jedoch an, dass das antennenverstärkte Signal mit der vierten Potenz des Feldes geht, so wäre eine rein elektromagnetische Verstärkung denkbar.

Zusammenfassung

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass SERS und SEIRS an einer einzelnen Gold-Nanoantenne möglich ist. Es wurden die Verstärkungsfaktoren für beide Methoden abgeschätzt, wobei die Verstärkung der IR-Signale deutlich größer war als die der Raman-Signale. Dies wurde auf die Antennengeometrie zurückgeführt. Ein Ausblick ist in Kapitel 7 zu finden.

4 Proteine

Bevor in Kapitel 5 antennenverstärkte Proteinspektren gezeigt werden, sollen in diesem Kapitel der Aufbau, die Eigenschaften und IR-Spektren der verwendeten Proteine vorgestellt werden.

4.1 Grundlagen der Biochemie

In diesem Abschnitt wird der grundlegende Aufbau der involvierten Substanzen und deren Funktion beschrieben. Es handelt sich dabei um eine oberflächliche Einführung in die Biochemie der Proteine und deren Handhabung. Für ein tiefergehendes Verständnis der Zusammenhänge sei auf die Lehrbücher [125–127] verwiesen.

4.1.1 Aufbau von Proteinen

Proteine sind Makromoleküle, die in jedem Organismus und in nahezu jedem physiologischen Prozess, entscheidende Aufgaben erfüllen. Sie sind lineare Polymere deren Untereinheiten die Aminosäuren bilden. Im Folgenden soll auf Aminosäuren, deren Bindung untereinander und die dreidimensionale Struktur der Proteine eingegangen werden.

Aminosäuren

Wie der Name schon sagt, bestehen Aminosäuren aus einer Amino- ($-\text{NH}_2$) und einer Carboxyl- ($-\text{COOH}$), also Säuregruppe. Bei den in Proteinen vorkommenden α -Aminosäuren sind diese beiden Gruppen an ein zentrales Kohlenstoffatom, das sogenannte C_α -Atom, gebunden. An den beiden anderen Bindungen des sp^3 -hybridisierten C_α -Atoms befindet sich ein Wasserstoffatom und eine je nach Aminosäure unterschiedliche Rest-Gruppe, die auch als Seitenkette bezeichnet wird. Aminosäuren sind chirale Objekte, jedoch kommen in der Natur fast ausschließlich L-Isomere vor. In Abbildung 4.1.1 ist die allgemeine Form einer L- α -Aminosäure veranschaulicht. Zusätzlich sind zwei der insgesamt 20 in Proteinen vorkommenden Aminosäuren exemplarisch gezeigt.

4 Proteine

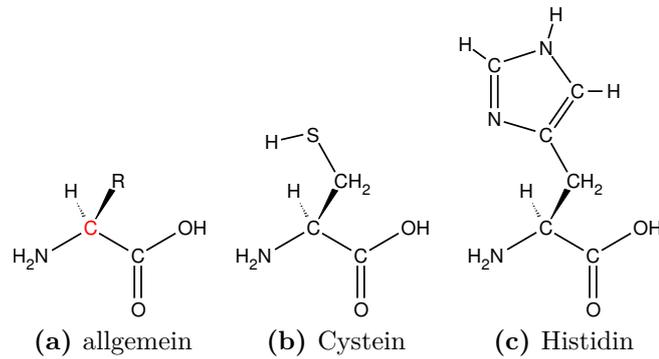


Abbildung 4.1.1: Aminosäuren haben die in 4.1.1a gezeigte allgemeine Form. Sie bestehen aus dem zentralen C-Atom (rot, oft C_α genannt), einer daran gebundenen Aminogruppe ($-\text{NH}_2$), einer Carboxylgruppe ($-\text{COOH}$), einem Wasserstoffatom und einer je nach Aminosäure verschiedenen Restgruppe, hier mit R bezeichnet. Exemplarisch sind zwei in der Natur vorkommende Aminosäuren gezeigt: Cystein in 4.1.1b und Histidin in 4.1.1c.

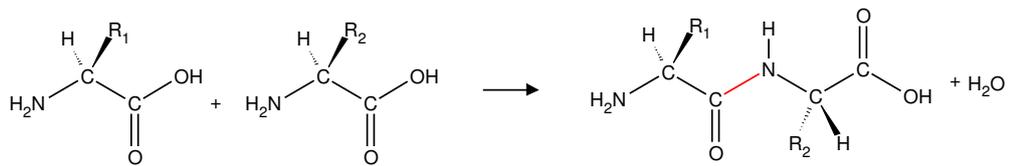


Abbildung 4.1.2: Durch die Abspaltung eines Wassermoleküls verbinden sich zwei Aminosäuren kovalent. Die entstehende Peptidbindung ist rot hervorgehoben.

Peptidbindung

Zwei Aminosäuren können sich unter Zufuhr von Energie kovalent verbinden. Dabei bildet sich die sogenannte Peptidbindung zwischen der Carboxylgruppe der ersten und der Aminogruppe der zweiten Aminosäure unter Abspaltung eines Wassermoleküls aus. Die entsprechende Reaktionsgleichung ist in Abbildung 4.1.2 dargestellt. An den so entstandenen Dimer können auf gleiche Art und Weise weitere Aminosäuren binden und bilden so eine lineare, unverzweigte Polypeptidkette. Die einzelnen Glieder unterscheiden sich dabei nur durch ihre Seitenketten, so dass sich ein durchgängiges, für alle Proteine gleiches Rückgrat ausbildet. Dabei wiederholt sich die Atomreihenfolge $-\text{N}-\text{C}_\alpha-\text{C}-$ ungefähr alle $3,5\text{\AA}$ [125]. Die Richtung der Polypeptidkette ist per Konvention festgelegt und lässt sich am Anfang und Ende der Kette leicht erkennen. Als N-Terminus ist der Anfang mit offener Aminogruppe definiert, während der C-Terminus das gegenüberliegende Ende bezeichnet.

Um die Synthetisierung von Peptidbindungen zu erleichtern kann die OH-Gruppe der Carboxylgruppe durch N-Hydroxysuccinimide (NHS) ersetzt werden [128].

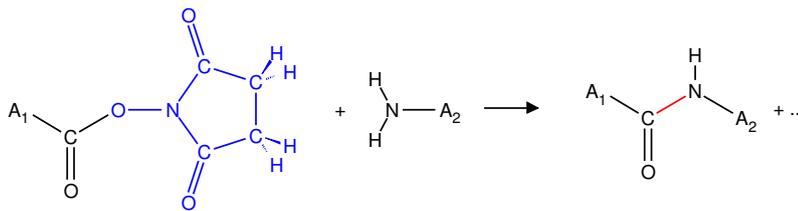


Abbildung 4.1.3: Die Verwendung von N-Hydroxysuccinimide (NHS, blau) macht die künstliche Peptidsynthese effizienter.

Diese Estergruppe löst sich leichter vom restlichen Molekül und ermöglicht so die Bildung einer Peptidbindung zur Aminogruppe eines zweiten Moleküls. Dieser Vorgang ist in Abbildung 4.1.3 schematisch abgebildet.

Primärstruktur

Proteine unterscheiden sich in erster Linie in der Sequenz der Aminosäuren und der Länge der linearen Kette. Die Sequenz wird Primärstruktur des Proteins genannt. Diese bestimmt wie sich die Polypeptidkette unter geeigneten Umständen faltet. Die biologische Funktion des Proteins kommt jedoch erst durch seine dreidimensionale Struktur zustande.

Sekundärstruktur

Zwischen den Carbonyl- (C=O) und den sekundären Aminogruppen (N-H) des Proteinrückgrats können Wasserstoffbrücken zu einer Bindung zwischen nicht direkt benachbarten Gruppen innerhalb der Kette führen. Diese zusätzlichen Bindungen führen zu einer übergeordneten Struktur, die in vielen Fällen regelmäßig ist. Die häufigsten so entstehenden Sekundärstrukturen sind α -Helix und β -Faltblatt, welche in Abbildung 4.1.4 dargestellt sind. Bei der α -Helix bilden sich die Wasserstoffbrücken zwischen jeder i -ten und $(i + 4)$ -ten Aminosäure aus und bilden so eine eng gewickelte Helix mit einer Gewindesteigung von 5,4 Å und einem Durchmesser des Rückgrats von 3,6 Å [125]. Im Gegensatz dazu bilden sich beim sehr flachen β -Faltblatt Wasserstoffbrücken zwischen zwei oder mehreren benachbarten Strängen aus. Diese können parallel oder antiparallel verlaufen. Die beschriebenen Sekundärstrukturen sind in Abbildung 4.1.4 verdeutlicht. Außerdem ermöglichen unregelmäßige Abschnitte der Polypeptidkette Übergänge und Richtungswechsel innerhalb des Proteins. Diese werden als Kehren und Schleifen bezeichnet.

Tertiärstruktur

Zusätzlich zu den Sekundärstrukturen faltet sich das Protein zu einem dreidimensionalen Gebilde. Dabei tragen Disulfidbrücken zwischen zwei Cystein

4 Proteine

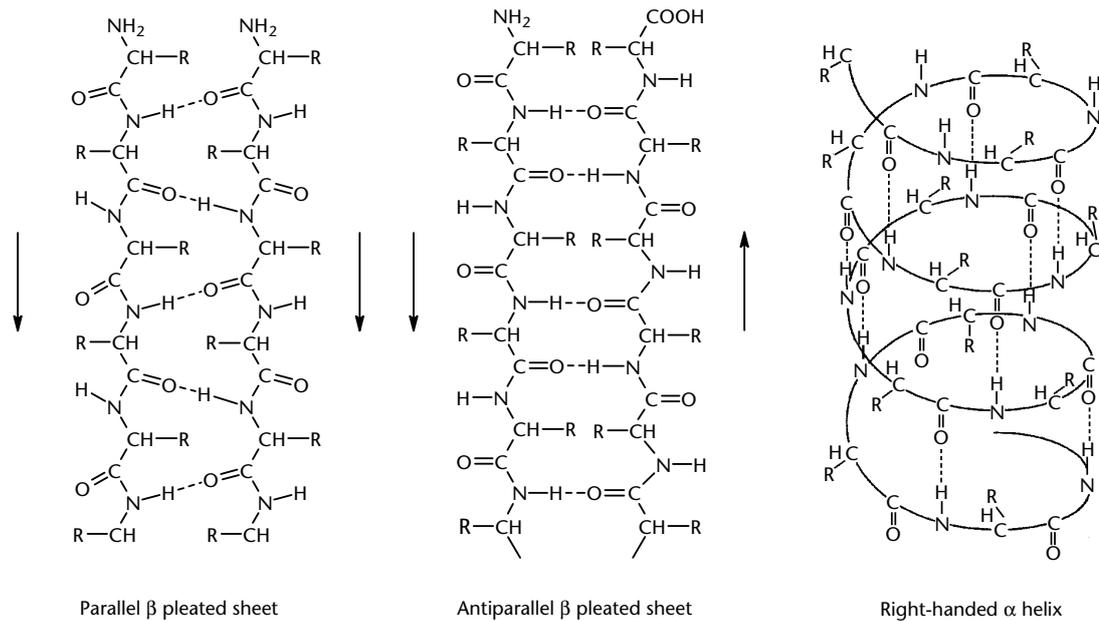


Abbildung 4.1.4: Struktur von parallelem, antiparallelem β -Faltblatt und der α -Helix. [129]

Seitenketten, Wasserstoffbrücken, ionische Bindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen zur Stabilisierung der sogenannten Tertiärstruktur bei [125]. Die Faltung hat eine große Auswirkung auf die Eigenschaften des Proteins. Sind zum Beispiel alle unpolare Seitengruppen ins Innere des Proteins gerichtet und alle polare nach außen, so wird das Protein wasserlöslich und im Inneren können wasserunlösliche Stoffe transportiert werden.

Quartärstruktur

Einige Proteine bestehen zusätzlich aus mehreren Untereinheiten mit nicht verbundenen Polypeptidketten. Diese lagern sich aneinander an und bilden so die Quartärstruktur.

Denaturierung

Für die biologische Funktion des Proteins ist die dreidimensionale Struktur entscheidend. Diese wird zwar durch die Primärstruktur vorgegeben, kann aber durch äußere Einflüsse wie zum Beispiel Temperatur oder pH-Wert verändert werden. Man spricht in diesem Fall von der Denaturierung des Proteins. In manchen Fällen kann dies erwünscht sein und durch Zugabe von bestimmten chemischen Substanzen (zum Beispiel *8M urea*) erreicht werden. Sollen sich die Proteine jedoch so verhalten wie im Körper eines Lebewesens, so muss versucht

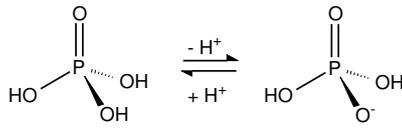


Abbildung 4.1.5: Pufferwirkung der Phosphorsäure. In stärker basischem Milieu ist eine weitere Deprotonierung zu HPO_4^{2-} und PO_4^{3-} möglich.

werden die Umgebungsbedingungen bestmöglich zu reproduzieren. Dazu werden die Proteine häufig nicht in reinem Wasser sondern in sogenannten Puffern gelöst. Dies sind wässrige Lösungen von Salzen und Puffermolekülen, mit denen ein isotonomischer Salzgehalt und ein möglichst stabiler pH-Wert erreicht werden kann. Um den pH-Wert, also die Protonen- beziehungsweise H_3O^+ -Konzentration, der Lösung zu regulieren, werden Moleküle als Puffer verwendet, die Protonen aufnehmen oder abgeben. Ein Beispiel dafür ist die Phosphorsäure (H_3PO_4), deren Deprotonierung in Abbildung 4.1.5 gezeigt ist.

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich *Phosphate Buffered Saline* (PBS) von Sigma Aldrich (P5493) als Puffer verwendet. Außerdem kamen Tris¹ und HEPES² als Puffersubstanz zum Einsatz.

4.1.2 Bindung von Proteinen

Bei der Bindung von Proteinen an andere Substanzen oder Oberflächen unterscheidet man zwischen spezifischen und unspezifischen Bindungen. Unspezifische Bindungen können von vielen Proteinen eingegangen werden, während spezifische Bindungen immer nur von einem Protein oder einer Proteinklasse eingegangen werden können.

Unspezifische Bindung

Die häufigste Ursache für unspezifische Bindungen stellt die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Oberfläche und Protein dar. Durch die Verwendung von Detergenzien³ können elektrostatisch gebundene Proteine wieder gelöst werden. Jedoch bleiben dabei immer Rückstände der Detergenzien auf der Oberfläche zurück.

Unspezifische Bindungen können auch kovalenter Natur sein. Obwohl Gold als chemisch inert gilt, zeigen Thiolgruppen (SH) eine hohe Affinität zu Goldoberflächen. Die Bindungsstärke der Au-S-Bindung ist vergleichbar mit der zwischen zwei Schwefelatomen [130]. Das Wasserstoffatom entweicht in Form von H_2 [130].

¹Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

²2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

³Moleküle mit einem polaren und einem unpolaren Ende, auch Tenside genannt. Häufig werden Polysorbat 20 (*Tween 20*) und Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet.

4 Proteine

So können beispielsweise Proteine, die Cystein enthalten, über deren Thiolgruppe eine kovalente Bindung zu einer Goldoberfläche ausbilden.

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden werden Oberflächen meist durch andere Moleküle geblockt. Für Goldoberflächen werden zu diesem Zweck ebenfalls Moleküle mit einer Thiol-Gruppe (zum Beispiel Mercaptoethanol) verwendet. Sind diese auf der Goldoberfläche regelmäßig angeordnet spricht man von einem self-assembled monolayer (SAM). Eine ausführliche Betrachtung der Ausrichtung und Anordnung von Alkanthiol-SAMs auf Gold findet sich in [49].

Antikörper

Spezifische Proteinbindungen kommen in der Natur meistens zwischen Proteinen und Antikörpern zustande. Antikörper werden im Organismus gebildet um Fremdstoffe zu binden und Infektionen zu verhindern. Sie selbst sind ebenfalls Proteine und werden auch Immunglobulin (Ig) genannt, während die Substanz (meist das Protein), an die der Antikörper spezifisch bindet, als Antigen bezeichnet wird. Antikörper haben eine Y-Form, wobei sich die Antigenbindungsstellen an den Enden der beiden Arme befinden. Der Teil des Proteins, der vom Antikörper erkannt wird, heißt Epitop, wobei die Selektivität der Bindung auf der geometrischen Form der Antigenbindungsstelle und des Epitops beruht. Dies wird oft als Schlüssel-Schloss-Prinzip bezeichnet.

DNA-Sonden

Es existieren auch DNA-Fragmente, die spezifisch an Proteine binden. Diese werden auch Aptamere genannt und in den folgenden Abschnitten beschrieben.

4.1.3 DNA

In Abbildung 4.1.6a ist der chemische Aufbau der DNA dargestellt. DNA besteht aus zwei Strängen, die in gegensätzlicher Richtung verlaufen. Das Rückgrat der DNA (grau hinterlegt) bilden abwechselnd angeordnete Phosphatgruppen (rot) und Desoxyribose Zuckereinheiten (schwarz: (R)). Die Kohlenstoffatome des Zuckers sind von 1' bis 5' durchnummeriert, wodurch sich die Bezeichnung der Richtung des Strangs ableitet (5'- und 3'-Ende). An den Zuckereinheiten befinden sich die vier verschiedenen Basen (grün: Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) und Guanin (G)), wobei A und T beziehungsweise C und G jeweils komplementär über Wasserstoffbrücken (blau) miteinander binden. Die beiden Stränge winden sich umeinander und bilden so die berühmte Doppelhelix (siehe Abbildung 4.1.6b) mit einem Durchmesser von 2,37 nm und einer Länge pro Wendelgang von 3,3 nm auf 10 Basenpaare aus.

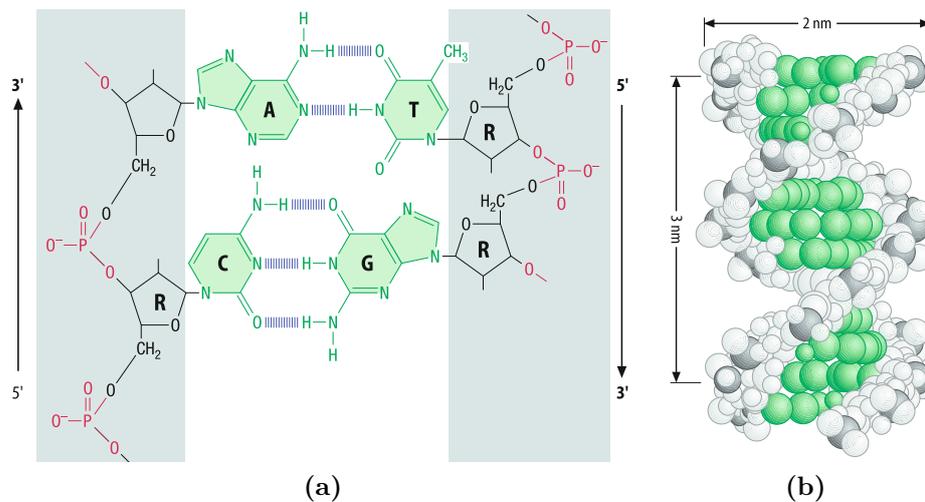


Abbildung 4.1.6: In (a) wird die chemische Zusammensetzung von DNA gezeigt, während in (b) die dreidimensionale Struktur dargestellt ist. [126]

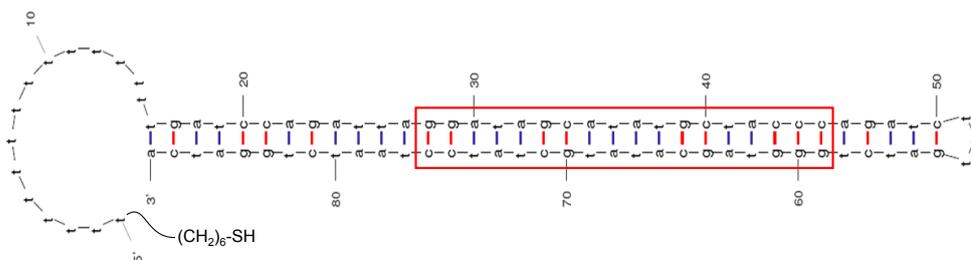


Abbildung 4.1.7: Basensequenz der EBNA-1 bindenden DNA-Sonde. Die 18 rot umrandeten Basenpaare sind für die spezifische Erkennung von EBNA-1 verantwortlich. Am 5' Ende befindet sich eine Verlängerung aus 16 T, die eine Immobilisierung auf den Goldantennen mittels einer zusätzlichen $(\text{CH}_2)_6\text{SH}$ -Gruppe ermöglicht. [33]

DNA-Sonden

Als DNA-Sonden (oder Aptamere) werden DNA-Fragmente bezeichnet, die eine spezifische Bindung zu einzelnen Substanzen aufweisen. Die Basensequenzen dieser synthetisierten Fragmente werden häufig durch aufwändige rekursive Verfahren experimentell bestimmt. Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Sonden wurden in der Gruppe von VALERIE PAVLOV in San Sebastian entwickelt und ihre Affinität zum EBNA-1 Protein experimentell mit Hilfe der QCM-Methode bestimmt. Auch das Aptamer für MnSOD wurde von dieser Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Abbildung 4.1.7 zeigt exemplarisch die Basensequenz der EBNA-1 bindenden DNA-Sonde.

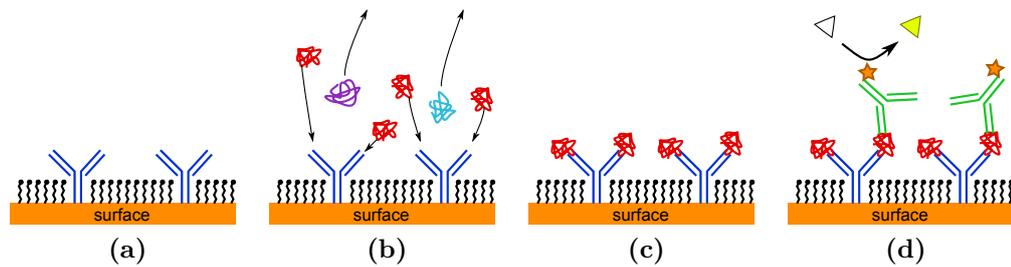


Abbildung 4.1.8: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der ELISA Methode. (a) zeigt die Antikörper (blau) und das Molekül das die Oberfläche blockt (schwarz). In (b) ist dargestellt, dass nur die passenden Proteine (rot) an die Antikörper binden, die anderen werden abgewaschen. Die gebundenen Proteine (c) werden in (d) von sekundären Antikörpern (grün) detektiert. An diese ist ein Enzym (Sternsymbol) gebunden welches ein farbloses Molekül (Dreieck) in ein fluoreszierendes umsetzt.

4.1.4 Methoden zum Proteinnachweis

Der Nachweis von einem bestimmten Protein wird immer mit Hilfe der spezifischen Bindung an einen Antikörper oder ein Aptamer durchgeführt. Kann dabei sichergestellt werden, dass keine anderen Proteine unspezifisch binden, so können diese abgewaschen werden und nur die nachzuweisenden Proteine, die sogenannten *Target*-Proteine, bleiben zurück und werden detektiert. Die am weitesten verbreitete Methode wird im folgenden Abschnitt schematisch erklärt.

ELISA

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ist ein Verfahren zum Nachweis von einem bestimmten Protein aus einer Lösung, die viele verschiedenen Proteine enthält. Dafür werden Antikörpern verwendet, die spezifisch an das nachzuweisende Protein binden. Es gibt verschiedene Vorgehensweisen („direkt“, „indirekt“, „*Sandwich*“), die Logik des Nachweises bleibt jedoch immer gleich und wird nachfolgend am *Sandwich Assay* beschrieben.

Dabei werden die Antikörper des nachzuweisenden Proteins auf einer inerten Oberfläche adsorbiert. Die restliche Oberfläche wird durch ein anderes Molekül blockiert um unspezifische Bindung zu vermeiden (Abbildung 4.1.8a). Dann wird die Lösung, welche das nachzuweisende Protein enthält, auf die Oberfläche gegeben (Abbildung 4.1.8b). Das *Target*-Protein bindet an den Antikörper und alle ungebundenen Proteine werden anschließend abgewaschen (Abbildung 4.1.8c). Der Nachweis des gebundenen Proteins geschieht durch die Zugabe eines zweiten Antikörpers, der ebenfalls an das Antigen bindet. Dieser könnte durch eine fluoreszierende oder radioaktive Markierung direkt sichtbar gemacht werden. Bei

ELISA ist jedoch am sekundären Antikörper ein Enzym⁴ kovalent gebunden. Nach erneutem Waschen wird eine Lösung mit Molekülen⁵ aufgebracht, welche von dem Enzym in einen Farbstoff umgesetzt werden (Abbildung 4.1.8d). Die entstehende Färbung ist proportional zum vorhandenen Enzym, also auch zur Anzahl der Proteine. ELISA ermöglicht es damit quantitative Aussagen über die Proteinkonzentration zu treffen und wird daher sowohl in der biologischen Forschung als auch in der Medizin häufig eingesetzt. Es lässt sich damit weniger als 10^{-9} g eines Proteins nachweisen [125].

Der Zeitaufwand beträgt zwischen vier und acht Stunden, je nach Anzahl der Inkubationsschritte.⁶ Jeder dieser Schritte dauert typischerweise eine Stunde. Anschließend muss 10-15 Minuten gewaschen werden, um die ungebundenen Moleküle von der Oberfläche zu lösen, bevor der nächste Inkubationsschritt begonnen wird.

Markierungsfreier Nachweis

Neben den Nachweismethoden die auf der Verwendung von fluoreszierenden, radioaktiven oder enzymatischen Markern basieren, existieren auch eine ganze Reihe sogenannter markierungsfreier Nachweise, welche verschiedene Eigenschaften ausnutzen, in denen sich Proteine unterscheiden. Einige Beispiele werden im Folgenden aufgeführt. Durch Elektrophorese⁷ können Proteine in porösen Gelen durch deren unterschiedliche Mobilität nach ihrer Größe sortiert werden [125]. Bei einer anderen Methode wird die Masse der Proteine verwendet um die spezifische Bindung von Proteinen an Antikörper, die auf einer Quarzkristall-Mikrowaage (QCM) immobilisiert sind, nachzuweisen [33]. Es ist aber auch möglich die spektrale Verschiebung der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) [31] oder der lokalisierten Oberflächenplasmonresonanz (LSPR) [32] zu messen, die aufgrund der Änderung des Brechungsindex durch spezifisch gebundene Proteine zu erklären ist.

Nachteil dieser Methoden ist, dass jede andere Substanz, welche die gleiche Mobilität, Masse oder Brechungsindex aufweist, zum selben Ergebnis führt. Daher wird in dieser Arbeit versucht, die spezifisch gebundenen Proteine zusätzlich anhand ihrer Schwingungsbanden mittels Raman- und IR-Spektroskopie zu identifizieren.

⁴Enzyme sind Katalysatoren, die Reaktionen in biologischen Systemen um ein Vielfaches ($\sim 10^7$) beschleunigen.

⁵Achtung: Das vom Enzym umgesetzte Molekül wird von Biologen „Substrat“ genannt,[127] während Physiker darunter das feste Trägermaterial der Proben verstehen (z.B. CaF_2 -Substrat).

⁶Den Vorgang bei dem die Oberfläche den verschiedenen Lösungen ausgesetzt wird, bezeichnet man als Inkubation.

⁷Eine spezielle Anwendung ist SDS-PAGE [125].

Absorptions- bande	Wellenzahl (cm^{-1})	Vibrationsmode
Amid-I	1620-1700	CO ν (83), CN ν (15), CCN δ (11)
Amid-II	1515-1555	NH ib (49), CN ν (33), CO ib (12), CC ν (10)
Amid-III	1200-1330	NH ib (52), CC ν (18), CN ν (14), CO ib (11)

Tabelle 4.1: Die drei wichtigsten Amid-Banden. Dabei steht ν für Streck-, δ für Deformations- und ib für *in-plane* Biegeschwingungen. Die eingeklammerten Zahlen geben die Verteilung der potentiellen Energie wieder. Zahlenwerte und Zuordnung sind aus [131] und den dort aufgeführten Referenzen entnommen.

4.1.5 Proteinspektroskopie

Da sich die einzelnen Aminosäuren in Proteinen nur durch ihre Seitenketten unterscheiden und sich so eine immer gleiche Rückgratstruktur bildet, weisen IR-Spektren von verschiedensten Proteinen ähnliche Banden auf. Diese werden Amid-Banden genannt und von I bis VII und mit A und B nummeriert [131]. Diese Banden sind gekoppelte Schwingungen mehrerer Molekülbindungen, die jedoch meist von einer Schwingung dominiert werden. In Tabelle 4.1 sind die drei wichtigsten Amid-Banden mit deren zugeordneten Schwingungsmoden aufgeführt. Im IR-Spektrum (siehe Abbildung 4.3.1) sind die Amid-I- und Amid-II-Bande am stärksten ausgeprägt.

Durch die Wasserstoffbrücken, welche die Sekundärstruktur fixieren, werden die Bindungsstärken im Proteinrückgrat leicht verändert. Dadurch ändern sich auch die Vibrationsfrequenzen der Amid-Banden und erlauben es anhand der Spektren Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur des untersuchten Proteins zu ziehen. Da Proteine meist mehrere Sekundärstrukturen aufweisen, sind die Banden aus den verschiedenen spektralen Merkmalen zusammengesetzt. Zur Identifizierung der spektralen Bestandteile müssen die einzelnen Amid-Banden zerlegt werden. Dies kann beispielsweise mit Hilfe der zweiten Ableitung erreicht werden (vergleiche Abschnitt 3.4.2).

Im Bereich zwischen 1800 und 2800 cm^{-1} sind keine Absorptionsbanden in Proteinspektren zu erwarten. Dennoch weicht bei Messungen an Proteinkörnern das Spektrum in diesem Bereich von der 100%-Linie ab und zeigt zu höheren Wellenzahlen weniger transmittierte Intensität. Dieser Effekt kann mit resonanter Mie-Streuung an den Proteinagglomeraten erklärt werden [132]. Tritt dieser Effekt auf, können die Frequenzen der Amid-I-Bande um bis zu 20 cm^{-1} verschoben werden [133].

4.2 Untersuchte Proteine

Im folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten Proteine beschrieben und es wird auf die Funktion des jeweiligen Proteins im Organismus eingegangen. In Tabelle 4.2 sind die Anzahl der Aminosäuren und die Masse der Proteine zusammengefasst.

Protein	Aminosäuren	Masse [kDa]	Quelle
BSA	580	67	[134, 135]
MnSOD	4×198	4×22	[136, 137]
EBNA-1	146	16	[138]
GIPC-1	333	42	[139]

Tabelle 4.2: Verwendete Proteine.

4.2.1 BSA

BSA (*bovine serum albumin*) ist ein Proteine, welches in der Wissenschaft sehr oft verwendet wird. Es ist das am häufigsten vorkommende Protein im Serum von Rindern. Durch seine gut Wasserlöslichkeit und die vorhandenen unpolare Hohlräume ermöglicht BSA den Transport von hydrophoben Substanzen im Blut [134]. BSA besteht aus 580 Aminosäuren [134] und hat eine Masse von 67 kDa⁸ [135]. Die Größe von BSA wird in [134] mit etwa $80 \times 80 \times 30 \text{ \AA}$ und in [140] in hydrierter Form, mit $140 \times 40 \times 40 \text{ \AA}$ angegeben.

4.2.2 MnSOD

Mangan Superoxid-Dismustase (MnSOD) ist ein Protein mit enzymatischen Eigenschaften, das in den Mitochondrien menschlicher Zellen vorkommt. Seine Aufgabe besteht darin Superoxid-Anionen (O_2^-), die sehr reaktionsfreudig sind und andere Proteine oder DNA angreifen könnten, in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umzuwandeln ($2 \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$) [141]. Im Blutplasma von Eierstockkrebspatientinnen [142], bei tödlich verlaufenen Blutvergiftungen [143], sowie in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit von Patienten mit bösartigen Tumoren wurde eine bis zu 45-fach größere Konzentration [28] von MnSOD gemessen. MnSOD besteht aus vier identischen Proteinsträngen⁹ mit einer Masse von jeweils 22 kDa die je ein Mn_3^+ -Ion beherbergen [136, 137]. In Abbildung 4.2.1 ist die dreidimensionale Struktur des Rückgrats von MnSOD dargestellt. Die unterschiedlichen Sekundärstrukturen sind eingefärbt. Die verwendeten MnSOD-

⁸1 Da = 1 atomare Masseneinheit \approx Masse von H-Atom

⁹Man spricht von einem Homotetramer.

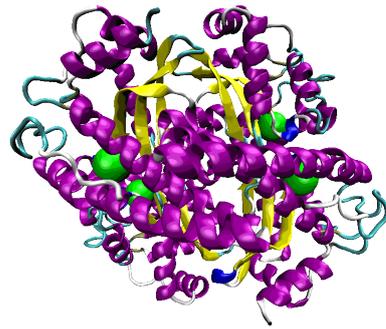


Abbildung 4.2.1: Dreidimensionale Struktur von MnSOD [144]. Die verschiedenen sekundären Strukturen sind unterschiedlich eingefärbt: α -Helix lila, β -Faltblatt gelb und die Mn_3^+ -Ionen grün.

Proteine stammen von *USBiological* (Referenz S8060-25N) und wurden in der Arbeitsgruppe von MARC LAMY DE LA CHAPELLE in Paris gefriergetrocknet.

4.2.3 EBNA-1

Das Epstein-Barr Virus ist ein menschliches Herpes Virus mit dem mehr als 90% der Weltbevölkerung infiziert sind. Das Virus wird für einige Krankheiten sowie Krebserkrankungen verantwortlich gemacht [29], in deren Zusammenhang immer eine erhöhte Konzentration des *Epstein-Barr nuclear antigen 1* (EBNA-1) Proteins nachgewiesen werden konnte. EBNA-1 kommt im Zellkern vor, bindet an DNA und ist für die Replikation und Transkription des viralen Genoms von Bedeutung.

EBNA-1 besteht aus zwei identischen Untereinheiten mit jeweils 641 Aminosäuren [145]. Bei den in dieser Arbeit verwendeten EBNA-1₄₆₁₋₆₀₇ Proteinen¹⁰ handelt es sich um eine verkürzte Variante des EBNA-1 Proteins, das jedoch dieselbe Funktionalität zeigt. Die dreidimensionale Struktur ist in Abbildung 4.2.2 gezeigt. Es wurde nach dem in [147] beschriebenen Verfahren hergestellt und hat eine Masse von 16 kDa [138]. Das Protein wurde von VALERIE PAVLOVS Arbeitsgruppe aus San Sebastian, Spanien zur Verfügung gestellt.

Mit der QCM-Methode (vergleiche Abschnitt 4.1.4) konnten EBNA-1 bis zu einer minimalen Konzentration von 50 nM markerfrei nachgewiesen werden [33].

4.2.4 GIPC-1

Die natürliche Immunabwehr produziert Antikörper gegen alle nicht körpereigenen Substanzen und Zellen, so auch gegen Brust- und Eierstockkrebszellen. Der „27.B1 IgM“ Antikörper wurde aus Plasma von Brustkrebspatientinnen isoliert und seine spezifische Bindung an das in Brust- und Eierstockkrebspatientinnen

¹⁰ Aminosäuresequenz von EBNA-1₄₆₁₋₆₀₇ [146]:

```
1 kggwfgkhrq qggsnpkfen iaeglrala rshverttde gtwvagvfvy ggskslynl  
61 rrgtalaipq crltplsrp fgmappgpq pglpresivc yfmvflqthi faevlkdaik  
121 dlvmtpapt enirvtvcvf dgdvdlp.
```

4.3 Methoden zur Erfassung von Proteinspektren

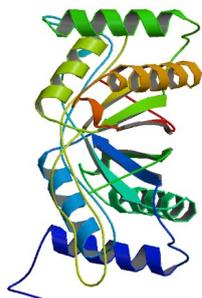


Abbildung 4.2.2: Dreidimensionale Struktur von EBNA-1 [148]. Um die Polypeptidkette besser verfolgen zu können, ist diese vom einen zum anderen Ende im Farbverlauf des Regenbogens dargestellt.

erhöht vorkommende Protein GIPC-1¹¹ nachgewiesen [30]. GIPC-1 ist bei der Regulierung der Signaltransduktion zwischen Zellen involviert und hat eine Masse von 42 kDa [30, 139]. Da Patientinnen sowohl eine erhöhte Konzentration der Antikörper als auch der Antigene aufweisen, die IgM Pentamere aber mit einer Masse von ungefähr 970 kDa deutlich schwerer sind, lassen sich die Antikörper besser nachweisen. In [30] wurde das IgM mit einer Konzentration von nur etwa 30 fM nachgewiesen.

Am N-Terminus des GIPC-1 Proteins sind zusätzlich sechs Histidin Aminosäuren angebracht die eine hohe Affinität zu Nickel aufweisen. Dieses sogenannte *His-Tag* wird zur Purifikation des Proteins ausgenutzt. Das Protein wurde von der Gruppe von ROBERT S. MARKS in Beer Sheva, Israel zur Verfügung gestellt.

4.3 Methoden zur Erfassung von Proteinspektren

Es gibt mehrere Möglichkeiten IR-Spektren von Substanzen aufzunehmen. Bedingt durch den hohen Preis der Proteine, scheiden materialintensive Verfahren wie beispielsweise das Pressen von KBr-Pellets aus. Die verwendeten Verfahren werden im Folgenden beschrieben.

4.3.1 Messungen an getrockneten Proteinen

Proteine werden meist in getrocknetem Zustand und bei -80°C gelagert. Durch den Prozess der Gefriertrocknung weisen die Körner des Proteinpulvers Durchmesser von mehreren hundert Mikrometern auf. Probiert man eines dieser Körner mittels IR-Transmissionsmessungen zu untersuchen, so stößt man auf das Problem

¹¹Aminosäuresequenz von GIPC-1 [149]:

```
1 mplglgrrkk applvneea epgrgglvg epgplggga ggpqmgldppp ppalrprlvf
61 htqlahgspt griegftnvk elygiaeaf rlptaevmfc tlthkvdmd kllggqgle
121 dfifahvkgq rkevevfke dalgtitdn gayafikri kegsvidhih lisvgdmiea
181 ingqslgcr hyevarllke lprgrftlk lteprkafdm isqrsaggrp gsgpqlgtgr
241 gtlrlrsrgp atvedlpsaf eekaiekvdd llesymgird telaatmvel gkdkrnpdel
301 aealderlgd fafpdefvfd vwaigadkv gry.
```

4 Proteine

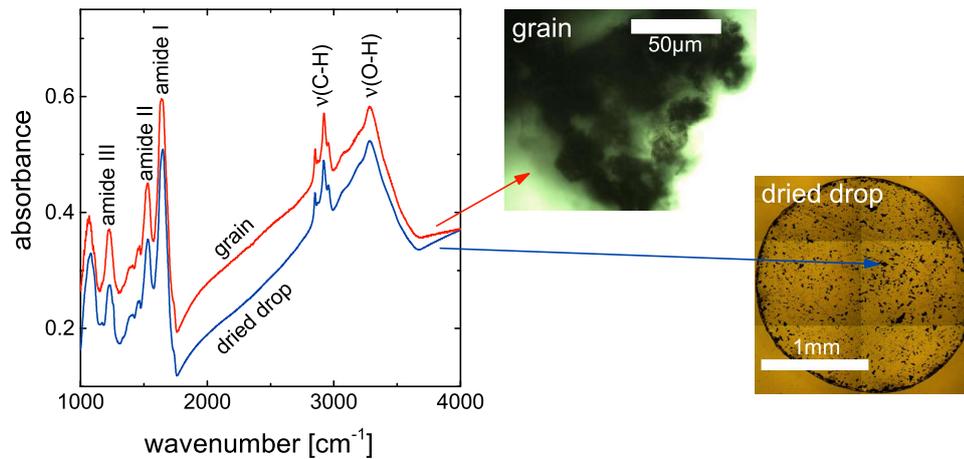


Abbildung 4.3.1: IR-Transmissionsspektren eines Korns (*grain*) des gefriergetrockneten MnSOD-Proteinpulvers und des Rückstandes eines Tropfens nach der Verdunstung des Wassers (*dried drop*). Die Positionen der Amid-I, II und III-Banden sind ebenso markiert, wie die C-H und O-H Streckschwingungen. Zusätzlich sind mikroskopische Aufnahmen des Korns und des eingetrockneten Tropfens gezeigt.

der inhomogenen optischen Weglänge durch das Korn (Abbildung 4.3.1). An einigen Stellen ist das Korn so dick, dass keine IR-Strahlung transmittiert wird, daher muss im Randbereich der Körner gemessen werden. Ein Spektrum ist in Abbildung 4.3.1 dargestellt. Aufgrund der Größe der Körner kommt es zu Mie-Streuung, was im Spektrum zu einem breitbandigen Untergrund führt [150]. Außerdem kann es zur Verschiebung der *Peak*-Positionen kommen [132, 133].

Um die Probleme zu umgehen, wurden die Proteine in einem zweiten Experiment in Wasser gelöst und ein etwa 1 μl großer Tropfen der Lösung auf ein CaF₂-Substrat gegeben. Nach wenigen Minuten war das Wasser verdunstet und die Reste des getrockneten Tropfens wurden im IR-Mikroskop untersucht. Wie in Abbildung 4.3.1 zu erkennen ist, bilden die Überreste des getrockneten Tropfens auch keine homogene Schicht sondern viele kleine Agglomerate, so dass auch dort Mie-Streuung auftritt und durch die inhomogene und zudem unbekannte Schichtdicke eine Bestimmung der dielektrischen Funktion nicht möglich ist. Zudem erkennt man anhand der Spektren, dass der Wassergehalt (OH-Schwingungen) im äußeren Ring auch nach mehreren Stunden erhöht bleibt. Daher werden nur Spektren des inneren Bereich verwendet.

Abbildung 4.3.1 zeigt exemplarisch zwei Spektren die von MnSOD. Aus Darstellungsgründen sind zwei Spektren gewählt, die ähnliche Absorbanz aufweisen. Die Messungen variieren jedoch deutlich. Die relativen Intensitäten und die Position der *Peaks* einer einzelnen Messung sind relativ stabil.



Abbildung 4.3.2: Foto der verwendeten *AquaSpec* Messzelle [151]. Die Metallanschlüsse unten rechts sind zur Temperaturstabilisierung der Messzelle, wurden aber in dieser Arbeit nicht verwendet. Oben rechts ist die Zuleitung zu sehen, unten links die Ableitung. Der IR-Strahl geht durch das runde Loch in der Mitte.

Es lässt sich daraus schließen, dass der Lösungs- und Trocknungsprozess die Proteine in ihrer Struktur unbeschädigt lässt. Diese Erkenntnis ist wichtig für die in Kapitel 5 durchgeführten Experimente. Im nächsten Abschnitt soll überprüft werden, ob sich die Spektren gelöster und getrockneter Proteine unterscheiden.

4.3.2 Messungen an gelösten Proteinen

Der Vergleich der Spektren getrockneter und gelöster Proteine ist naheliegend, da Proteine in der Natur meist in wässriger Lösung vorkommen. Durch die Trocknung bleibt zwar die Primärstruktur erhalten, die Faltung der Proteinkette kann sich aber ändern, so dass deren biologische Funktion verloren gehen kann (vergleiche Abschnitt 4.1.1). Neben den biologischen Gründen stellt die homogene Verteilung der Proteine im Lösungsmittel und die bekannte Dicke der Küvette (Messzelle) einen weiteren Vorteil dar. Obwohl die Küvette ein sehr geringes Volumen von 50 μl aufweist, ist dieses Verfahren für teure Proteine zu kostspielig.

Nomenklatur für Konzentrationsangaben von Lösungen

Um der Terminologie folgen zu können, werden die gebräuchlichen Angaben der Konzentration einer Lösung hier kurz erläutert:

- 100 ml einer „ x -prozentigen Lösung“ enthalten x g des gelösten Stoffs.
- Ein Liter einer einmolaren Lösung enthält ein Mol des gelösten Stoffs. ($1 \text{ M} = 1 \text{ mol/l}$)

Flüssigkeitszelle für Transmissionsmessungen

Für die Messung von gelösten Molekülen wurde die *AquaSpec A 741/Q* Messzelle von *Bruker* verwendet. Sie besteht aus zwei CaF_2 -Substraten, die in einem Abstand von 7,1 μm miteinander verklebt sind. Über die mit einer 50 μl Spritze befüllten Zuleitung wird die Lösung zwischen die CaF_2 -Substrate gepresst und

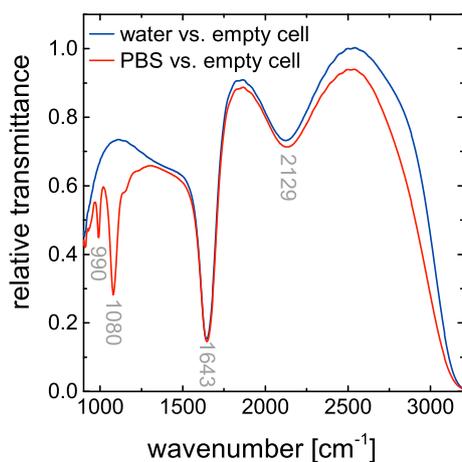


Abbildung 4.3.3: Transmission durch Wasser (blau) und PBS (rot) in der *AquaSpec* Messzelle. In beiden Fällen ist die Referenzmessung mit der leeren Zelle aufgenommen worden. Die Absorptionsbanden von PBS bei 1080 cm^{-1} und 990 cm^{-1} , sowie die Absorptionsbanden von Wasser bei 1643 cm^{-1} (Biegeschwingung) und 2129 cm^{-1} (Kombination aus Biegeschwingung und Librationsmode) sind gekennzeichnet.

in Transmission vermessen. Ein Bild der Messzelle ist in Abbildung 4.3.2 zu sehen. Die Messzelle wurde in der Probenkammer des *Tensor 27* Spektrometers betrieben und der Strahlengang mit getrockneter Luft gespült.

Transmission durch Wasser

Ein großes Problem bei IR-Messungen in wässriger Lösung ist die Absorption von Wasser selbst. Diese bewirkt, dass die Eindringtiefe nur wenige zehn Mikrometer beträgt. Daher ist die Dicke der Messzelle mit $7,1\text{ }\mu\text{m}$ gewählt. Nur so ist gewährleistet, dass IR-Licht im *Fingerprint*-Bereich¹² des Proteins die Lösung passieren kann. In Abbildung 4.3.3 ist das relative Transmissionsspektrum von Wasser in der Messzelle zu sehen. Das Transmissionsspektrum der leeren Zelle wurde als Referenz verwendet. Man erkennt die starke Absorption der OH-Streckschwingung oberhalb von 3000 cm^{-1} , die OH-Biegeschwingung bei 1643 cm^{-1} und die Librationsmode der Wassermoleküle unterhalb von 1000 cm^{-1} . Die Bande bei 2129 cm^{-1} ist eine Kombinationsmode von Biegeschwingung und Librationsmode [152]. Man erkennt, dass gerade an der Position der stärksten Proteinbande (Amid-I-Bande) die Biegeschwingung von Wasser absorbiert, so dass nur ungefähr 15% des Lichts zur Verfügung stehen. Dies führt bei Transmissionsmessungen durch Wasser zu einem größeren Rauschlevel an der Amid-I-Bande, was aber in den weiter unten gezeigten Spektren nicht weiter auffällt.

In Abbildung 4.3.3 wird zudem ein Spektrum des häufig verwendeten PBS-Puffers (vergleiche Abschnitt 4.1.1) gezeigt. Zusätzlich zur Absorption von Wasser zeigt das PBS-Spektrum zwei scharfe Absorptionsbanden bei 1080 cm^{-1} und 990 cm^{-1} .

¹²In der IR-Spektroskopie wird der Bereich zwischen einigen hundert Wellenzahlen und 2000 cm^{-1} als *Fingerprint*-Bereich bezeichnet, weil die meisten Moleküle dort charakteristische Schwingungen aufweisen.

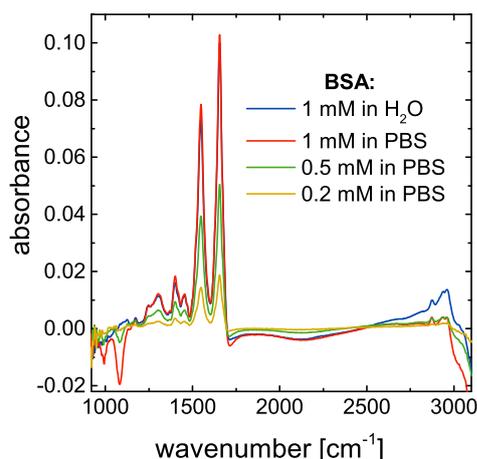


Abbildung 4.3.4: IR-Spektrum verschiedener Konzentrationen von BSA in Wasser und PBS. Durch die Verdrängung des jeweiligen Lösungsmittels erscheint dessen Signal (Abbildung 4.3.3) bei hohen Konzentrationen in umgekehrter Richtung. Die Signalstärke des Proteins ist direkt proportional zu Konzentration.

Spektren gelöster Proteine

Zur Bestimmung von Proteinspektren wird immer das Spektrum des entsprechenden Lösungsmittels (Wasser oder PBS) als Referenz verwendet. In Abbildung 4.3.4 sind IR-Spektren von gelöstem BSA dargestellt. Die Spektren in Wasser und PBS (blau und rot) sind beinahe deckungsgleich und unterscheiden sich nur in den Bereichen, in denen sich auch die Spektren der Lösungsmittel unterscheiden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass durch die Zugabe von Proteinen zur Lösung Moleküle des Lösungsmittels verdrängt werden und so die Dichte abnimmt. Dadurch sind die Banden der Lösungsmittel im Referenzspektrum stärker ausgeprägt und erscheinen so im relativen Transmissionsspektrum in umgekehrter Richtung. Durch die Anwesenheit der Puffermoleküle wird das Proteinspektrum folglich nicht beeinflusst.¹³

In Abbildung 4.3.4 sind ebenfalls verschiedene Konzentrationen von BSA in PBS dargestellt. Man erkennt, zum Beispiel an der Intensität der Amid-I-Bande, dass die Signalstärke direkt proportional zur Konzentration ist. Dies ist nach Gleichung (2.1.5) und (2.6.6) auch zu erwarten.

4.3.3 Vergleich gelöster und getrockneter Proteine

Da BSA das einzige Protein ist, das in ausreichender Menge zur Verfügung stand, wurden diese Experimente nur mit BSA durchgeführt.

In Abbildung 4.3.5 sind oben die Spektren von gelöstem (Spektrum aus Abbildung 4.3.4), gefriergetrocknetem (*grain*) und verdunstungsgetrocknetem (*dried drop*)

¹³Es wäre an dieser Stelle denkbar die dielektrische Funktion des Proteins zu bestimmen. Dazu müsste die Lösung als unabhängige Mischung zweier Materialien modelliert werden. Das Vorgehen wird in [153] für die Bestimmung der dielektrischen Funktion des Kations eines Moleküls beschrieben, wird in dieser Arbeit jedoch nicht verfolgt.

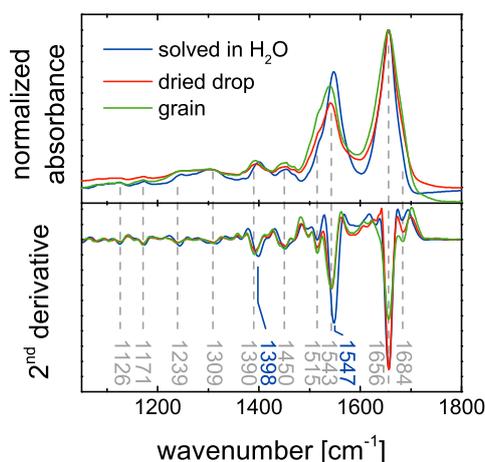


Abbildung 4.3.5: Im oberen Teil sind normierte Spektren von gelöstem und getrocknetem BSA dargestellt. Deren zweite Ableitung (geglättet mit Savitzky-Golay, 2. Ordnung und 25 *Smoothing Points*) ist unten gezeigt. Die Positionen der stärksten *Peaks* sind für die getrockneten Proteine in grau angegeben. Die gegenüber der trockenen Proteine verschobenen Vibrationsfrequenzen der gelösten Proteine, sind zusätzlich in blau gegeben.

BSA abgebildet. Da die Intensität der Spektren je nach Korn und Position im Tropfen stark unterschiedlich ist, wurden die Spektren so skaliert, dass sie bestmöglich übereinander liegen. Dies ändert nichts an der relativen *Peak*-Intensität und der *Peak*-Position, auf die im Folgenden eingegangen wird. Zur genauen Bestimmung der *Peak*-Position wurde von jedem oben dargestellten Spektrum die 2. Ableitung gebildet. Die Hintergründe dazu sind in Abschnitt 3.4.2 beschrieben. Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurden die Ableitungen geglättet (Savitzky-Golay, 2. Ordnung, 25 *Smoothing Points*). Durch die Glättung ist es möglich, dass sich die Frequenz von *Peaks*, die sich auf einem asymmetrischen Untergrund befinden, leicht verschiebt. Dieser Effekt lässt sich leider nicht vermeiden, trifft aber auf alle geglätteten Ableitungen, aufgrund der ähnlichen Form, gleichermaßen zu.

Man erkennt, dass obwohl sich die Spektren sehr ähneln, einige *Peaks* in Lösung deutlich verschoben sind. Die Vibrationsfrequenzen der verschobenen *Peaks* sind in Abbildung 4.3.5 blau markiert. Die Verschiebung kann einerseits auf die Wechselwirkung mit Wasser zurückgeführt werden, andererseits kann aber auch die in [132] berichtete Mie-Streuung an den getrockneten Proteinkörnern dafür verantwortlich sein.

Wie der Vergleich zwischen Korn und getrocknetem Tropfen zeigt, ist die beobachtete Verschiebung der Banden in Lösung ein reversibler Prozess.

4.4 IR-Spektren der Proteine und Aptamere

Analog zu den IR-Spektren von getrocknetem BSA in Abbildung 4.3.5 wurden für alle verwendeten Proteine und den Aptamer gegen EBNA-1 Transmissionspektren bestimmt. Diese wurden alle normiert und sind in Abbildung 4.4.1 jeweils im oberen Teil dargestellt. Im unteren Bereich jeder Teilabbildung sind

die zweiten Ableitungen der darüber gezeigten Spektren zu sehen, die ebenfalls geglättet wurden. Alle Protein-Spektren wurden mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} aufgenommen und die Ableitungen mit 25 *Smoothing Points* geglättet. Die Spektren des Aptamers in Abbildung 4.4.1d wurden mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} gemessen und die Ableitungen mit 15 *Smoothing Points* geglättet. In den folgenden Abschnitten wird auf die einzelnen Spektren eingegangen.

4.4.1 MnSOD

Die Spektren von MnSOD in Abbildung 4.4.1a wurden bereits in [141] veröffentlicht. Die Spektren in der hier gewählten Darstellung der Absorbanz zeigen deutlich weniger Abweichungen voneinander. Selbst der Unterschied zwischen den Spektren eines getrockneten Tropfens und eines Kornes sind marginal. Einzig in der Bande bei 1261 cm^{-1} scheint sich das rote Spektrum des Kornes von den restlichen Spektren (getrocknete Tropfen) zu unterscheiden. Dieser *Peak* tritt jedoch auch bei manchen Spektren der getrockneten Tropfen auf und ist auf die Instabilität des Messaufbaus zurückzuführen. Diese sehr scharfe Bande zeigt die typische „Plus-Minus“-Struktur, die aus der spektralen Verschiebung der dort auftretenden Bande im Einkanalspektrum (vergleiche Abbildung A.2.3a) resultiert.

Die Amid-I-Bande zeigt in der zweiten Ableitung mehrere Beiträge. Die Bande bei 1657 cm^{-1} ist charakteristisch für die dominierende α -Helix-Struktur. Die Schultern bei 1627 cm^{-1} und 1695 cm^{-1} sind auf Vibrationen des β -Faltblatts zurückzuführen [131, 154].

Die Amid-II-Bande zeigt Komponenten bei 1515 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} und 1545 cm^{-1} , welche durch *random*, β -Faltblatt und α -Helix Sekundärstruktur zu erklären sind [154].

Die Amid-III-Bande besteht aus *Peaks* bei 1217 cm^{-1} und 1239 cm^{-1} . Diese können dem Histidine Anion und dem β -Faltblatt beziehungsweise der unregelmäßigen Struktur zugeordnet werden [154, 155].

Die restlichen Banden werden der Absorption von Seitenketten zugeordnet. Die stärksten sind 1084 cm^{-1} , 1415 cm^{-1} , 1454 cm^{-1} und 1467 cm^{-1} , welche der Reihenfolge nach auf C-C und C-O Vibrationen [156] die Streckschwingung der COO-Gruppen, die Biegeschwingung der CH₂-Gruppen und die Biegeschwingung der CH₃-Gruppen zurückzuführen sind [141].

Die C-H und O-H Streckschwingungen zwischen 2800 cm^{-1} und 3500 cm^{-1} sind in Abbildung 4.4.1 nicht dargestellt, aber für MnSOD in Abbildung 4.3.1 gezeigt. In [141] wird ausführlich auf die Raman-Moden von MnSOD eingegangen. Während manche Banden im Raman-Spektrum stark ausgeprägt sind, erscheinen diese nur schwach oder gar nicht im IR-Spektrum und umgekehrt. Diese Unterschiede in der Intensität der Banden offenbaren die Komplementarität der beiden

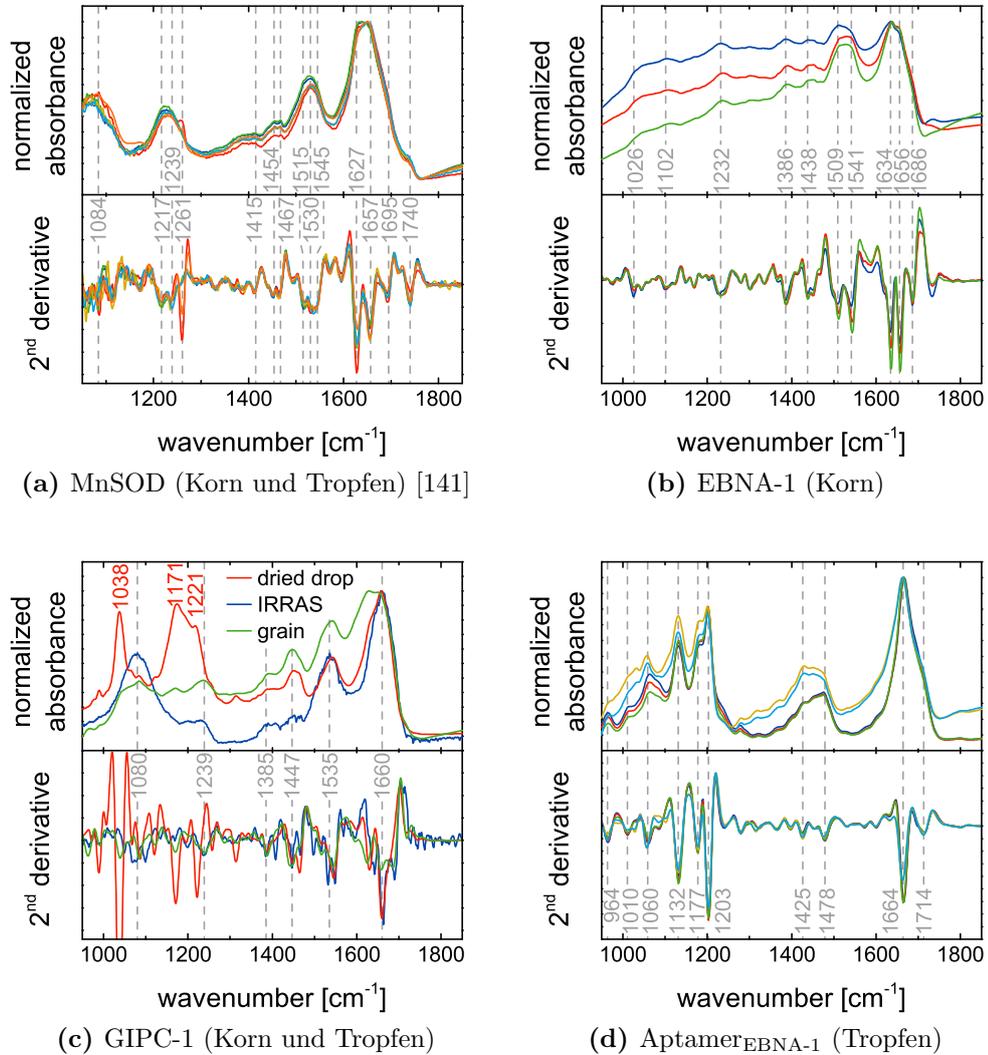


Abbildung 4.4.1: IR-Spektren von MnSOD (a), EBNA-1 (b), GIPC-1 (c) und Aptamer_{EBNA-1}(d) und deren 2. Ableitung. Die Spektren sind auf die Amid-I-Bande normiert und die Ableitungen geglättet (25 *Smoothing Points* in (a), (b) und (c), 15 in (d) wegen 4 cm^{-1} statt 2 cm^{-1} Auflösung). Von den stärksten Banden sind die Frequenzen angegeben.

Messmethoden und unterstreichen den Nutzen IR- und Raman-Messungen an derselben Probe durchzuführen (vergleiche Kapitel 3 und 5).

4.4.2 EBNA-1

In Abbildung 4.4.1b sind die Transmissionsspektren von drei verschiedenen EBNA-1 Körnern gezeigt. Ebenso wie bei MnSOD erkennt man bei 1656 cm^{-1} den Beitrag der α -Helix und bei 1634 cm^{-1} den des β -Faltblatts zur Amid-I-Bande. Bei 1541 cm^{-1} ist die Signatur der α -Helix in der Amid-II-Bande zu erkennen. Die Amid-III-Bande ist bei 1232 cm^{-1} zu sehen. Weitere *Peaks*, die von den Seitenketten der Aminosäuren verursacht werden, sind ebenfalls gekennzeichnet.

4.4.3 GIPC-1

Die relativen Transmissionsspektren von GIPC-1 sind in Abbildung 4.4.1c gezeigt. Dabei ist neben dem Spektrum des eingetrockneten Tropfens und eines Kornes auch ein in IRRAS-Konfiguration gemessenes Spektrum dargestellt. Details zur IRRAS-Probe sind in Abschnitt 5.2 erläutert. Grund für die Darstellung des zusätzlichen Spektrums ist die große Abweichung zwischen den Spektren des eingetrockneten Tropfens und des Kornes.

Alle drei Spektren weisen die Hauptkomponente der Amid-I-Bande bei 1660 cm^{-1} auf, was der α -Helix zugeordnet werden kann. Sie zeigen jedoch unterschiedliche Nebenmaxima in der zweiten Ableitung. Gleiches gilt für die Amid-II-Bande, die um 1535 cm^{-1} (α -Helix) zentriert ist. Die Banden bei 1447 cm^{-1} und bei 1385 cm^{-1} , welche auch im Spektrum von EBNA-1 zu erkennen sind, sind auch bei GIPC-1 in allen Spektren zu erkennen. Doch während die Amid-III-Bande bei 1239 cm^{-1} und die Bande bei 1080 cm^{-1} nur im IRRAS-Spektrum und bei den Spektren des Kornes zu erkennen sind, zeigt das Spektrum des eingetrockneten Tropfens starke Absorptions-*Peaks* bei 1038 cm^{-1} , 1171 cm^{-1} und 1221 cm^{-1} . Die Bande bei 1171 cm^{-1} taucht zwar auch im Spektrum von BSA auf (Abbildung 4.3.5), die anderen Banden werden jedoch in keinem anderen Proteinspektrum in dieser Arbeit gemessen. Außerdem ist die Intensität dieser Banden vergleichbar mit der Amid-I-Bande, was gegen den Beitrag von Seitenketten spricht, der deutlich schwächer zu erwarten wäre. Es wird daher vermutet, dass es sich hierbei um eine Verunreinigung handelt, die in den anderen Proben nicht auftritt.

4.4.4 Aptamer gegen EBNA-1

In Abbildung 4.4.1d sind Transmissionsspektren eines eingetrockneten Tropfens der wässrigen Lösung des Aptamers gegen EBNA-1 (Aptamer_{EBNA-1}) gezeigt. Das Aptamer ist ein DNA-Fragment, das aus dem DNA-Rückgrat und den vier verschiedenen Basen besteht. Die Struktur und chemische Zusammensetzung ist

4 Proteine

in Abbildung 4.1.7 und 4.1.6a dargestellt. Das Spektrum unterscheidet sich daher grundlegend von den zuvor gezeigten Proteinspektren.

Das Spektrum weist eine starke Bande bei 1664 cm^{-1} auf. Eine etwas schwächere Bande, mit den zwei Komponenten bei 1478 cm^{-1} und 1425 cm^{-1} , liegt neben den Bändern bei 1203 cm^{-1} , 1177 cm^{-1} und 1132 cm^{-1} , die eine ähnlich starke Intensität wie das Band bei 1664 cm^{-1} aufweisen. Die Zuordnung der Banden ist für diese Arbeit nicht maßgeblich. Ein detaillierter Überblick ist beispielsweise in [157, 158] zu finden.

Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde der Aufbau und das IR-Spektrum von Proteinen erklärt. Es wurde gezeigt, dass sich die Spektren von Proteinen durch den Lösungs- und Trocknungsprozess kaum verändern und sich die Spektren der vier untersuchten Proteine unterscheiden lassen. Da in Organismen tausende verschiedene Proteine vorkommen, wird klar, dass eine eindeutige Identifizierung mittels IR-Spektroskopie nicht realisierbar ist. Durch die im nächsten Kapitel beschriebene Kopplung der Vibrationsmoden an die LSPR von Nanoantennen und die dadurch resultierende Fano-artige Linienform, wird die Zuordnung von Proteinspektren weiter erschwert.

5 Antennenverstärkte IR-Spektroskopie von Proteinen

Die zuvor untersuchten Proteine sollen nun mittels nanoantennenverstärkter IR-Spektroskopie in geringsten Mengen nachgewiesen werden. Zuerst wird auf die dafür verwendeten Nanoantennen eingegangen. Anschließend werden Experimente zur Detektion von Proteinen auf Nanoantennen vorgestellt und das Detektionslimit bestimmt. Im letzten Schritt werden Versuchen beschrieben, bei denen Nanoantennen funktionalisiert werden um spezielle *Target*-Proteine spezifisch nachweisen zu können.

5.1 Nanoantennen

Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse wurden auf mehreren verschiedenen Nanoantennen-*Arrays* gemessen. Alle Proben sind auf CaF_2 gefertigt und unterscheiden sich nur in wenigen Merkmalen voneinander. Im nächsten Abschnitt werden zunächst die verschiedenen Proben vorgestellt und deren Abmessungen genau beschrieben, bevor in Abschnitt 5.1.2 die optischen Eigenschaften der verschiedenen Proben verglichen werden.

5.1.1 Probenlayout

Die Abmessungen aller Nanoantennen sind in Tabelle A.2 zusammengefasst. Hier folgt eine kurze Übersicht der einzelnen Proben:

- „Antenna #9“ ist identisch zu der in Abschnitt 3.1.5 beschriebenen Probe „Antenna #11“.
- „S08#01“ bis „S08#08“ sind acht identische Proben. Alle Abmessungen, bis auf die Längen der Nanoantennen, sind von „Antenna #11“ übernommen. Die *Arrays* „A1“ bis „A10“ decken den spektralen *Fingerprint*-Bereich zwischen 1000 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} ab. „A11“ und „A12“ verstärken Signale bis 3500 cm^{-1} .
- „S08#09“ bis „S08#14“ sind sechs Proben, deren Abmessungen genau mit denen von „S08#01-08“ übereinstimmen. Sie wurden jedoch an einer

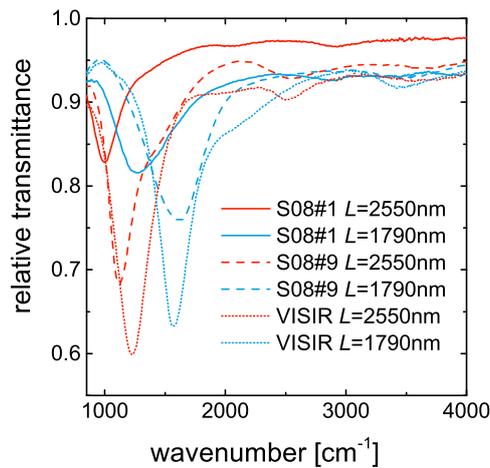


Abbildung 5.1.1: Relative Transmissionspektren von zwei verschiedenen Antennenlängen (rot und blau) auf drei verschiedenen Proben. Durchgezogene und gestrichelte Spektren stammen von Proben mit exakt den gleichen Abmessungen, aber aus unterschiedlichen Produktionen. Die gepunkteten Spektren sind von Proben, die bis auf $d_y = 3,25 \mu\text{m}$ baugleich mit den anderen ($d_y = 5 \mu\text{m}$) sind. Die Spektren sind mit unpolarisiertem Licht aufgenommen.

anderen Aufdampfanlage hergestellt [159] und 3 nm Cr anstelle der zuvor gewählten 5 nm Ti verwendet.

- „VISIR#01“ bis „VISIR#15“ sind 15 identische Proben, die jeweils drei Felder mit Antennen aufweisen, die im Mittelinfraroten (MIR) resonant sind. Die dazugehörigen Längen sind 1000 nm, 1790 nm und 2550 nm. Die restlichen Abmessungen sind identisch zu den Proben der „S08“ Reihe, wobei d_y auf 3250 nm verringert wurde um eine noch höhere Packungsdichte zu erreichen. Zudem befinden sich auf jeder Probe fünf identische Felder mit Nanoantennen-Dimeren, die LSPR-Frequenzen im Sichtbaren aufweisen. Diese Felder werden für SERS-Messungen verwendet. So kann sichergestellt werden, dass beide Arten von Antennen bei der Präparation den gleichen Molekülen ausgesetzt werden und somit SERS- und SEIRS-Messungen direkt vergleichbar sind.

5.1.2 Vergleich der verschiedenen Proben

Abbildung 5.1.1 zeigt exemplarisch die Spektren von Antennen gleicher Länge aus verschiedenen Probenreihen. Man erkennt einen deutlichen Unterschied zwischen „S08#1“ und „S08#9“, obwohl diese Proben geometrisch baugleich sind. „S08#9“ zeigt eine wesentlich höhere Extinktion und eine deutliche Blauverschiebung der Resonanz. Beides spricht für eine erhebliche Verbesserung der Qualität der Antennen und lässt sich in Simulationen durch eine veränderte Streurrate und Plasmafrequenz im Drude-Modell erreichen [57]. Die Erhöhung der Antennendichte bei den „VISIR“-Proben führt zu einer weiteren höheren Extinktion.



Abbildung 5.2.1: Licht-mikroskopische Aufnahme eines Nanoantennen-Arrays der Probe „Antenna #9“ nach der Inkubation mit GIPC-1. Die Antennen sind als horizontale Linien zu erkennen. GIPC-1-Agglomerate sind deutlich zu sehen. Der Bildausschnitt ist 100 μm breit.

5.2 Antennenverstärkte Proteinsignale

In diesem Abschnitt soll gezeigt werden, dass Proteine mittels Nanoantennenverstärkter IR-Spektroskopie nachgewiesen werden können. Analog zu Kapitel 3 wird die Verstärkung des Signals abgeschätzt.

5.2.1 Präparation

Für die Abschätzung eines Verstärkungsfaktors ist es wichtig, dass die Oberflächendichte der Moleküle auf den Antennen und der Vergleichsprobe bekannt oder zumindest vergleichbar ist. Idealerweise wird dies durch die Adsorption von Molekülen in einer homogenen Monolage erreicht. Daher wird bei der Präparation darauf geachtet Agglomerate zu vermeiden.

Es stellt sich heraus, dass dies bei Proteinlösungen keines Falls trivial ist. Es wurde eine Lösung aus gefriergetrocknetem GIPC-1 und Reinstwasser, mit einer Konzentration von 140 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\approx 2 \mu\text{M}$), angesetzt. Durch mehrfaches Aufziehen in einer Pipette¹ löste sich das Protein, so dass mit bloßem Auge keine Agglomerate zu erkennen waren. Die Probe „Antenna #9“ wurde für zwei Stunden in die Lösung eingelegt, anschließend mit Reinstwasser gründlich abgespült und mit N_2 getrocknet. Abbildung 5.2.1 zeigt eine Licht-mikroskopische Aufnahme eines Antennen-Arrays nach der Inkubation auf der deutlich Agglomerate zu erkennen sind. Diese ließen sich auch nicht mit mehrfachem Spülen der Probe mit Reinstwasser entfernen.

Auch die flache Goldoberfläche (vergleiche Abschnitt 3.1.6), die für die IRRAS-Vergleichsmessung identisch präpariert wurde, zeigt eine ähnliche Bedeckung an Agglomeraten. Nimmt man an, dass die Bedeckung auf beiden Proben identisch ist und beachtet, dass die Größe der Agglomerate ($< 5 \mu\text{m}$) deutlich kleiner als die beleuchtete Fläche ($83 \mu\text{m}$) ist, so mitteln sich die Beiträge der Agglomerate

¹Zur Durchmischung von Lösungen wird häufig ein sogenanntes *Vortex* (Schüttelgerät) verwendet. Proteine können dadurch jedoch verändert werden[149] (analog zum Schlagen des Eischnees).

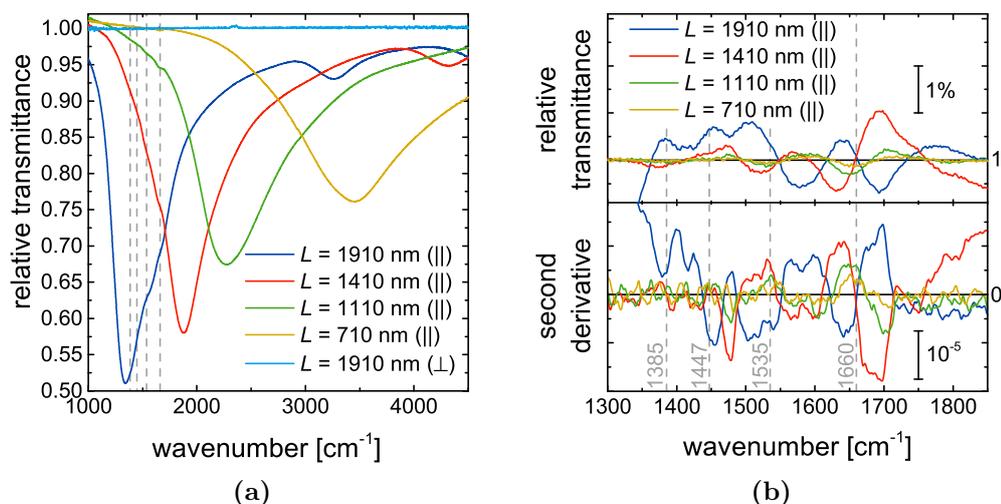


Abbildung 5.2.2: In (a) sind relative Transmissionsspektren von „Antenna #9“ mit GIPC-1 zu sehen. In (b) sind oben die basislinienkorrigierten (Savitzky-Golay, 300 *Smoothing Points*) Spektren aus (a) gezeigt. In (b) sind unten die 2. Ableitungen (geglättet mit 35 *Smoothing Points*) der Spektren aus (a) abgebildet. Vier Banden (Frequenzen aus Abbildung 4.4.1c) von GIPC-1 sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

heraus und man kann das Verhältnis der Moleküle trotz Agglomeraten analog zur Monolage über die Flächen abschätzen.

5.2.2 IR-Messung

Relative Transmissionsspektren der Antennen mit GIPC-1 sind in Abbildung 5.2.2a zu sehen. Das Fano-artige Signal der GIPC-1 Banden ist nur als leichte Änderung der LSPR-Linienform zu erkennen. Zur besseren Orientierung sind die Positionen der Amid-I- und Amid-II-Bande, sowie zwei weiterer Banden eingezeichnet. Analog zu den Messungen in Kapitel 3 ist bei senkrechter (\perp) Polarisation keine Anregung der LSPR im IR zu sehen. Gleiches gilt für die Vibrationsbanden von GIPC-1. Daraus kann geschlossen werden, dass das Transmissionssignal der GIPC-1 Agglomerate ohne Antennen nicht messbar ist. Aus diesem Grund wird bei der Berechnung des Verstärkungsfaktors der Vergleich mit der IRRAS-Messung (Abbildung 4.4.1c) herangezogen.

Um die GIPC-1 Signale bei paralleler (\parallel) Polarisation von den breitbandigen Antennenresonanzen zu trennen, wurde, wie in Abschnitt 3.4.2 und 3.4.2 beschrieben, eine Basislinienkorrektur (Savitzky-Golay-Filter) und die zweite Ableitung der Spektren gebildet. Beides ist in Abbildung 5.2.2b dargestellt.

Im Unterschied zu den Vibrationsbanden kleinerer Moleküle bei denen wenige Atome zur Schwingungsbande beitragen, sind die Vibrationsbanden von Proteinen eine kollektive Anregung verschiedener Schwingungen. Die Halbwertsbreite der Proteinbanden ist daher deutlich größer und beeinflussen die LSPR-Linienform daher über einen breiteren Bereich. Bei der Erzeugung der Basislinie muss somit stärker geglättet werden.² Dies führt in der Nähe der LSPR-Frequenz zu Abweichungen, die Vibrationsbanden in diesem Bereich überlagern. In Abbildung 5.2.2b äußert sich das als „Ausbrechen“ der blauen und roten Kurve bei niedrigen beziehungsweise hohen Wellenzahlen.

Zur Bestätigung des basislinienkorrigierten Spektrums, sind unten in Abbildung 5.2.2b die zweiten Ableitungen der Spektren aus (a) gezeigt. Die zu erwartenden Vibrationsfrequenzen von GIPC-1 sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet. Aufgrund der spektralen Breite der Banden sind sie auch in dieser Darstellung nicht als einzelne Banden zu erkennen und verschwimmen in einer undefinierten Signalform.

Die theoretisch zu erwartende Linienform ist ohnehin unklar. Das Fano-Profil der antennenverstärkten Vibrationssignale ist aufgrund der Kopplung zur LSPR breiter als das nicht verstärkte Signal des gleichen Moleküls. Diesen Sachverhalt erkennt man beispielsweise deutlich in Abbildung 6.5.1. Es ist daher denkbar, dass beispielsweise die Amid-I- und Amid-II-Banden durch die Kopplung an die LSPR miteinander wechselwirken können. Welche Auswirkungen dies auf die Linienform hat ist bisher noch nicht bekannt.

5.2.3 Signalverstärkung

Trotz des Problems der genauen Beschreibung der Linienform der verstärkten Amid-Banden kann in Abbildung 5.2.2b bei den Antennen der Länge $L = 1410$ nm eine Signalstärke der Amid-I-Bande von ungefähr 2% abgelesen werden. Die IRRAS-Vergleichsmessung weist eine Singalstärke der Amid-I-Bande von ungefähr 4,2% auf. Daraus ergibt sich nach Gleichung (2.7.3) eine „Verstärkung“ von $EF_{\text{meas}} \approx 0,5$. Unter Berücksichtigung der Faktoren, die sich aus IRRAS Geometrie ($EF_{\text{IRRAS}} \approx 39$) und Molekülanzahl ($EF_{\text{geo}} \approx 1026$, vergleiche Tabelle A.2) ergeben, lässt sich nach Gleichung (2.7.6) einen Verstärkungsfaktor von

$$EF_{\text{calc}}^{\text{IR}} \approx 20\,000$$

abschätzen. Dieser Wert ist deutlich kleiner als der in Abschnitt 3.4.3 errechnete Wert für die Verstärkung der *Methylene-Blue*-Signale, was auf die Größe der Moleküle und der Agglomerate zurückzuführen ist. MB-Moleküle sind im Vergleich zu Proteinen klein und befinden sich somit im verstärkten Nahfeld

²Ein Ausschluss der Protein-Banden bei der Erzeugung der Basislinie [57] ist aufgrund deren Breite nicht praktikabel.

der Antennen. Bei den in diesem Experiment beobachteten Agglomeraten, mit Durchmessern von knapp 1 μm , sind einige Proteine soweit von der Antennenoberfläche entfernt, dass diese nicht mehr vom verstärkten Nahfeld profitieren. Bei der Vergleichsmessung auf dem Goldspiegel trägt das Signal dieser Proteine jedoch zum gemessenen Signal bei.

5.2.4 Anzahl der Proteine auf den Nanoantennen

An dieser Stelle wird abgeschätzt, wie viele Proteine zum antennenverstärkten Signal beitragen. Dazu soll angenommen werden, dass ein Protein eine Fläche von $5 \times 5 \text{ nm}^2$ auf der Oberfläche einnimmt (vergleiche Abschnitt 4.2.1). Geht man davon aus, dass das antennenverstärkte Signal hauptsächlich von den *Hotspots* an den Antennenenden kommt, und schätzt A_{active} einer Antenne über Gleichung (2.5.11) mit 7200 nm^2 ab, so reichen 288 Proteine aus um die Antennenenden zu bedecken. Das IR-Signal stammt von ungefähr 650 Nanoantennen der beleuchteten Fläche und entspricht somit ungefähr 300 Zeptomol des Proteins. Diese Abschätzung vernachlässigt die vorhandenen Agglomerate und sollte daher nur als Anhaltspunkt verstanden werden.

Da Proteine nicht nur an den Antennenenden sondern auf der gesamten Goldoberfläche adsorbieren soll im Folgenden abgeschätzt werden, wie viele Proteine benötigt werden um die Goldoberfläche der gesamten Probe zu bedecken. Es wird davon ausgegangen, dass die Proteine nicht auf der CaF_2 Oberfläche adsorbieren. Die gesamte Oberfläche einer Antenne der Länge $L = 1410 \text{ nm}$ beträgt $260\,000 \text{ nm}^2$ worauf nach dieser Abschätzung etwa 10 000 Proteine Platz finden. Das gesamte *Array* besteht aus etwa 1350 Antennen. Daraus ergibt sich die Oberfläche aller Antennen in einem *Array* zu ungefähr $350 \mu\text{m}^2$. Ein Großteil der Goldoberfläche auf der Probe ist jedoch nicht die Oberfläche der Antennen, sondern durch die L-förmigen Marker und die Beschriftung der *Arrays* gegeben. Deren Oberfläche lässt sich mit ungefähr $4000 \mu\text{m}^2$ pro *Array* abschätzen. Die verwendete Probe Antenna #11 weist 6×16 *Arrays* auf und bietet somit Adsorptionsplätze für etwa 10^{10} Proteine. Bei der Konzentration von $2 \mu\text{M}$ entspricht dies der Anzahl der Proteine in einem Tropfen von ungefähr 14 nl.

5.3 Detektionslimit

Die Messungen in diesem Abschnitt wurden von ROBERT WOLKE unter der Anleitung des Autors durchgeführt. Die Auswertung erfolgte vom Autor.

Eine wichtige Kenngröße für Biosensoren ist das Detektionslimit. Es gibt an, bis zu welcher Konzentration der Analyt, also das nachzuweisende Protein, detektiert werden kann. Genau genommen ist die Angabe einer Konzentration nur dann sinnvoll, wenn der Sensor die detektierten Proteine wieder frei gibt und es zu

keiner Akkumulation kommt. Andernfalls muss nur genug Lösung vorhanden sein und diese so lange über den Sensor gespült werden, bis die Oberfläche des Sensors mit Proteinen gesättigt ist. Da die Proteine auf den Antennen akkumulieren, ist bei der Angabe des Detektionslimits zusätzlich die Zeit der Inkubation zu beachten.

Im Gegensatz zum vorherigen Abschnitt, in dem ein Protein mit medizinischer Relevanz auf den Nanoantennen untersucht wurde, soll es bei der Bestimmung des Detektionslimits nur auf die Fähigkeit der Antennen, Proteine zu detektieren, ankommen. BSA eignet sich für diese Aufgabe hervorragend. Neben den Kostengründen, löst sich BSA gut in Wasser³ und kann sowohl über die Cystein Aminosäuren an Goldoberflächen binden als auch elektrostatisch aufgrund seiner polaren und unpolaren Seitenketten.

5.3.1 Präparation

Alle Messungen wurden an der Probe S08#4 durchgeführt. Diese wurde sukzessive für 15 Minuten in verschiedenen stark konzentrierte BSA-Lösungen getaucht, mit Wasser abgespült, in N₂ getrocknet und anschließend im IR-Mikroskop gemessen. Begonnen wurde mit der niedrigsten BSA-Konzentration (10⁻¹⁰ M), welche für jede weitere Messung um den Faktor 10 erhöht wurde.

5.3.2 IR-Messung

Alle Messungen wurden an einem *Array* durchgeführt. Die Spektren sind in Abbildung 5.3.1a dargestellt.

Zur Extraktion des verstärkten Vibrationssignals wurde, wie bei den zuvor beschriebenen Experimenten, die zweite Ableitung von allen Spektren gebildet. Diese ist für das Spektrum von 10⁻¹⁰ M in Abbildung 5.3.1b gezeigt (schwarz). An den markierten Stellen, an denen das Signal von BSA zu erwartet wird, sind Signale zu erkennen, jedoch sind diese nicht dem Protein zuzuordnen. Ein erneuter Blick auf Abbildung 5.3.1a zeigt die dort gut sichtbaren Banden von Wasserdampf im Strahlengang. Diese haben jedoch in allen Spektren ähnliche Intensität, was darauf zurückzuführen ist, dass alle Messungen direkt nach dem Einlegen der Probe ins Mikroskop und dem Schließen der Türen des Spülkastens gestartet wurden. Die identischen Bedingungen bei den Messungen führen dazu, dass das Hintergrundsignal auch in der zweiten Ableitung konstant ist. Aus diesem Grund wurde bei allen weiteren zweiten Ableitungen, die in Abbildung 5.3.1b dargestellt sind, das Hintergrundsignal (schwarz) abgezogen. Das störende Wassersignal wird dadurch fast vollständig entfernt.

³Gute Wasserlöslichkeit ist die Grundvoraussetzung für seine Aufgabe als Transportprotein im Blut.

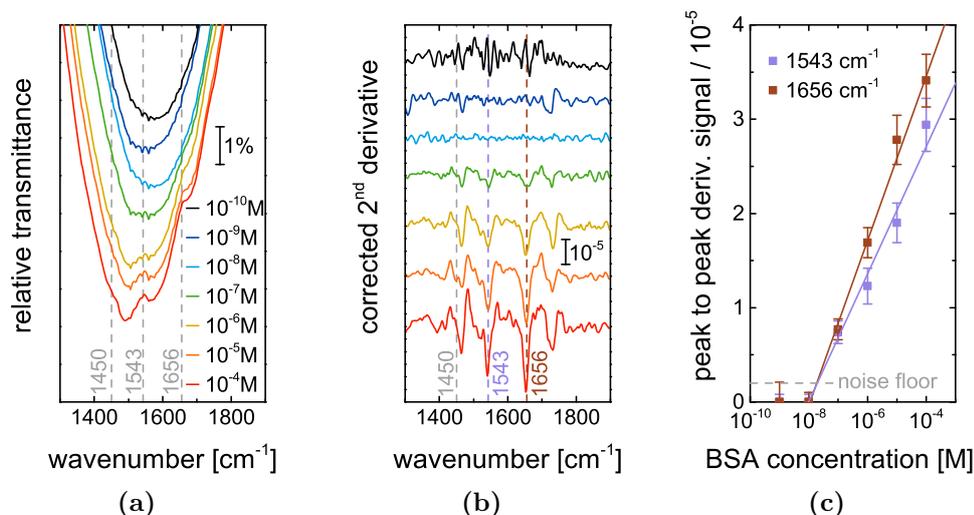


Abbildung 5.3.1: In (a) sind relative Transmissionsmessungen (Auflösung 4 cm^{-1} , 1000 *Scans*) desselben Arrays ($L = 1460\text{ nm}$) gezeigt. Vor jeder Messung wurde die Probe 15 Minuten in wässriger BSA-Lösung (Konzentration sukzessive erhöht) inkubiert. Die Vibrationsbanden von BSA (vergleiche Abbildung 4.3.5) sind eingezeichnet. In (b) sind die zweiten Ableitungen (15 *Smoothing Points*) der Kurven aus (a) dargestellt. Der Wasserdampf-Hintergrund (zweite Ableitung von 10^{-10} M , schwarz) wurde von allen anderen Spektren abgezogen. Für 10^{-9} M bis 10^{-4} M (Farben wie in (a)) ist die Differenz gezeigt. Die Stärke (*peak to peak*) der Amid-I- und Amid-II-Bande von BSA ist in (c) über der Konzentration aufgetragen. An die Datenpunkte (10^{-9} M ausgenommen) wurde eine Gerade *gefittet*.

Man erkennt, dass sich an den markierten Frequenzen ab einer Konzentration von 10^{-7} M ein Signal von BSA abzeichnet. Die Signalstärke der Amid-I- und Amid-II-Bande (*peak to peak*) ist in Abbildung 5.3.1c über der Konzentration der BSA-Lösung aufgetragen. An die Signalstärke (10^{-9} M ausgenommen) wurde eine Gerade⁴ *gefittet*. Das Rauschlevel (*noise floor*) liegt etwa bei $2 \cdot 10^{-5}$ und schneidet die *Fit*-Geraden beider Amid-Banden bei einer Konzentration von ungefähr $2 \cdot 10^{-8}\text{ M}$. Dieser Wert stellt das Detektionslimit für BSA bei 15 minütiger Inkubation dar.

In [125] wird das Detektionslimit von ELISA (vergleiche Abschnitt 4.1.4) mit 10^{-9} g angegeben. Dies entspricht bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-8}\text{ M}$ einem Volumen von ungefähr $1\text{ }\mu\text{l}$. Beachtet man, dass in Abschnitt 5.5 $20\text{ }\mu\text{l}$ große Tropfen verwendet wurden, so ist es durchaus realistisch anzunehmen, dass dieses Volumen ausreicht um Nanoantennen zu inkubieren. Die Sensitivität des

⁴Eine Gerade in der Darstellung einer logarithmischen Abszisse entspricht einer logarithmischen Funktion: $y = m(\log x) - c$.

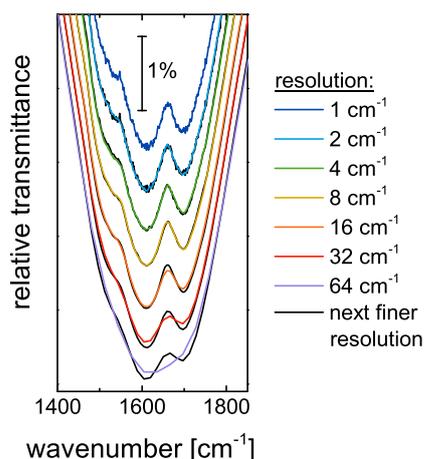


Abbildung 5.4.1: Relative Transmissionsmessungen von *Array A8* auf Probe *S08#3* nachdem diese für 3 Stunden in 500 μM BSA-Lösung eingelegt war. Die Auflösung wurde zwischen 1 cm^{-1} und 64 cm^{-1} variiert. Die Messdauer wurde konstant auf insgesamt 5 Minuten (für Referenz- und Probenmessung) gehalten. Jedes (bis auf 1 cm^{-1}) Spektrum ist mit dem Spektrum der nächst feineren Auflösung in schwarz hinterlegt.

Nanoantennensensors ist folglich vergleichbar mit der von ELISA, bei einer Verkürzung der Inkubationsdauer von einer Stunde bei ELISA auf 15 Minuten.

5.4 Auflösungsabhängigkeit

Um eine möglichst kurze Messzeit ohne den Verlust von Information bei der nanoantennenverstärkten IR-Spektroskopie von Proteinen zu ermöglichen, wird in diesem Abschnitt die optimale Auflösung⁵ für diese Art von Messung bestimmt. Für möglichst große Signale der Amid-Banden wurde eine Nanoantennenprobe (*S08#3*) für 3 Stunden in eine 0,5 mM BSA-Lösung eingelegt und anschließend gespült und getrocknet. Wie im vorherigen Abschnitt wurden die Spektren von *Array A8* gemessen. Dabei waren die Messpositionen (Referenz und Probe) für alle Messungen identisch und nur die Auflösung wurde von 1 cm^{-1} bis 64 cm^{-1} verändert. Die Anzahl der *Scans* wurde dabei so variiert, dass jede Messung in 5 Minuten beendet war. Das heißt es wurden 100 (1 cm^{-1}), 187 (2 cm^{-1}), 326 (4 cm^{-1}), 545 (8 cm^{-1}), 789 (16 cm^{-1}), 1071 (32 cm^{-1}) und 1250 (64 cm^{-1}) *Scans* jeweils für Referenz- und Probenmessung, aufgenommen. Die Spektren sind in Abbildung 5.4.1 zu sehen. Alle Spektren (bis auf 1 cm^{-1}) sind mit dem Spektrum der nächst feineren Auflösung schwarz hinterlegt. Das heißt, hinter dem Spektrum der Auflösung 64 cm^{-1} ist das (darüber in rot gezeigte) Spektrum der Auflösung 32 cm^{-1} erneut dargestellt (in schwarz).

Man erkennt, dass die Amid-I-Bande für die Auflösungen 16 cm^{-1} und größer jeweils vom Spektrum mit der nächst feineren Auflösung abweicht. Bei 8 cm^{-1} ist die Abweichung in dieser Darstellung nicht mehr zu erkennen. Die zwischen 70 und 100 cm^{-1} breiten Amid-Banden können folglich mit 8 cm^{-1} bereits hinreichend aufgelöst werden.

⁵Bei der FTIR-Spektroskopie ist die Messdauer ungefähr reziprok proportional zur Auflösung.

5.5 Nanoantennenbasierter Biosensor

Für Biosensoren ist neben der hohen Sensitivität auch eine hohe Selektivität wichtig, die durch die Funktionalisierung der Antennenoberfläche erreicht werden soll. Das Prinzip ist in Abschnitt 4.1.4 beschrieben. Die genaue Vorgehensweise⁶ wird im Folgenden beschrieben.

5.5.1 Protokoll für die Funktionalisierung der Nanoantennen

Die Antennenoberfläche wird mit einem Aptamer (Abschnitt 4.1.3) funktionalisiert, der spezifisch an das *Target*-Protein bindet. Um eine Immobilisierung des DNA-Strangs auf der Goldoberfläche zu ermöglichen, ist dieser am 5' Ende mit einer Thiolgruppe versehen (siehe Abbildung 4.1.7). Die Aptamere sind in 1 M KCl Pufferlösung gelöst, deren hohe Ionenkonzentration die Abstoßung der Aptamere untereinander verringert und so eine höhere Packungsdichte auf der Oberfläche ermöglicht.

Im nächsten Schritt werden noch nicht bedeckte Stellen der Antennenoberfläche mit Mercaptoethanol ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$, „ME“) geblockt, was eine unspezifische Bindung der Proteine an die Antennen verhindern soll.

In diesem Zustand ist der Sensor einsatzbereit und kann getestet werden. Dafür wird nach und nach die Konzentration des *Target*-Proteins erhöht und die gemessene Signalstärke gegen die Konzentration aufgetragen (analog zu Abschnitt 5.3). Anschließend wird mit frisch präparierten Sensoren die Selektivität mit negativen Kontrollproben getestet. Dazu wird auf einer Probe BSA anstatt des *Target*-Proteins aufgebracht und auf einer anderen Probe wird die Oberfläche nur geblockt, so dass auch das *Target*-Protein nicht haften kann.

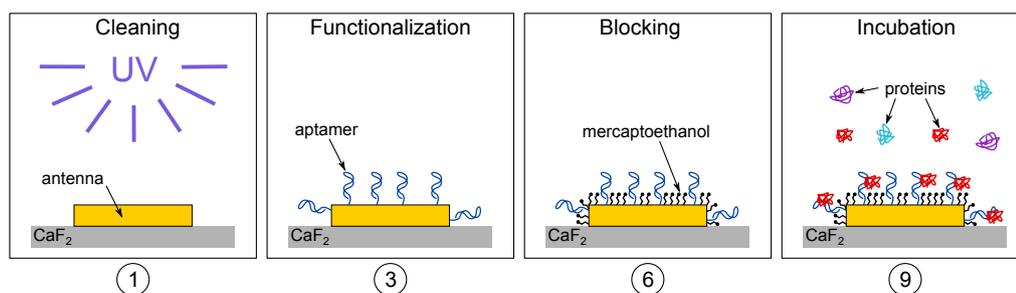


Abbildung 5.5.1: Funktionalisierung der Nanoantennen. Die einzelnen Arbeitsschritte sind wie im Text nummeriert.

⁶Diese wird von Biologen „Protokoll“ genannt.

Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 5.5.1 schematisch dargestellt und werden im Folgenden beschrieben:

1. Reinigung: UV-Ozon-Reinigung der Nanoantennen für 30 Minuten mit anschließendem Waschen in Ethanol (2×5 Minuten)
2. Messungen: SERS und SEIRS
3. Funktionalisierung: 20 μl Tropfen Aptamer Lösung (100 ng/ μl in 1 M wässriger KCl-Lösung) auf Nanoantennen für eine Stunde bei Raumtemperatur in kleinem abgeschlossenen Volumen um Verdunstung zu vermeiden
4. Waschen: 5 Minuten in Pufferlösung (1 M KCl in H_2O), dann 5 Minuten in H_2O zur Vermeidung von Salzkristallen und anschließend Trocknen mit Druckluft (geringe Strömungsgeschwindigkeit)
5. Messungen: SERS und SEIRS
6. Blocken: 20 μl Tropfen Mercaptoethanollösung (2 mM Lösung in Ethanol) auf Nanoantennen für eine Stunde bei Raumtemperatur in abgeschlossenem Volumen
7. Waschen: 5 Minuten in Ethanol mit anschließend Trocknen mit Druckluft
8. Messungen: SERS und SEIRS
9. Inkubation: 20 μl Tropfen Proteinlösung (verschiedene Konzentrationen in Tris-Pufferlösung bei einem pH-Wert von 8,2) auf Nanoantennen für eine Stunde bei Raumtemperatur in abgeschlossenem Volumen
10. Waschen: 5 Minuten in Tris-Pufferlösung, dann 5 Minuten in H_2O und anschließend Trocknen mit Druckluft
11. Messungen: SERS und SEIRS

5.5.2 SERS-Messungen

Die in diesem Abschnitt vorgestellten SERS-Messungen wurden von MAXIMILIEN COTTAT und CRISTIANO D'ANDREA an einem *Xplora* Spektrometer von *Horiba Jobin Yvon* an der Ben Gurion Universität in Beer-Sheva in Israel durchgeführt. Experimentelle Details dazu sind in [51] angegeben.

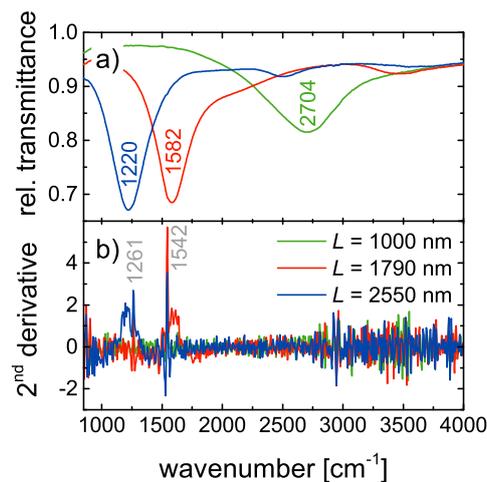


Abbildung 5.5.2: In (a) sind exemplarisch die relativen Transmissionsspektren der Probe VISIR#7 dargestellt und die Position der LSPR beschriftet. Die entsprechenden zweiten Ableitungen sind in (b) gezeigt. Die beiden scharfen Linien, deren Wellenzahlen angegeben sind, lassen sich durch Instabilität des Aufbaus erklären und können im Folgenden ignoriert werden.

5.5.3 IR-Messungen

Die IR-Messungen wurden an einem Thermo Scientific Nicolet iN10 MX (siehe Anhang A.2.2) durchgeführt. Dieses verfügt über keinen Polarisator, so dass die gemessene LSPR-Extinktion im Vergleich zu Messungen mit linear polarisiertem Licht nur halb so groß ist. Dafür verfügt der MCT-Detektor über 8 Pixel, so dass Spektren von 8 verschiedenen Punkten ($25 \times 25 \mu\text{m}^2$) der Oberfläche gleichzeitig aufgenommen werden können. Durch Abrastern der Oberfläche wird an jedem Punkt der Oberfläche ein Spektrum aufgenommen. Die räumliche Auflösung beträgt folglich $25 \mu\text{m}$ und analog zu Abbildung 5.4.1 wird mit einer spektralen Auflösung von 8 cm^{-1} gemessen. Das Referenzspektrum wurde auf dem CaF_2 -Substrat, abseits der Antennen, für jedes Pixel mit 256 *Scans* aufgenommen. Die Spektren der 16 Pixel die das $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ große Antennen-Array abdecken, wurden mit 16 *Scans* aufgenommen und anschließend gemittelt. Besonders stark abweichende Pixel, beispielsweise durch defekte Arrays oder an dessen Rand, wurden von der Mittelung ausgeschlossen.

Abbildung 5.5.2 zeigt in (a) die relativen Transmissionsspektren einer der „VISIR“ Proben und in (b) die dazugehörigen zweiten Ableitungen (ohne Glättung, vergleiche Abschnitt 5.4). Die Resonanzfrequenzen der LSPR sind in (a) gegeben, aber auch in (b) für die Antennen der Länge $L = 1790 \text{ nm}$ und $L = 2550 \text{ nm}$ zu erkennen. Die LSPR der Antennen mit $L = 1000 \text{ nm}$ ist breiter und das Rauschen größer, weshalb diese Resonanz in der zweiten Ableitung nicht sichtbar ist. Zusätzlich sind in (b) scharfe Banden bei 1261 cm^{-1} und 1542 cm^{-1} zu erkennen. Diese sind durch Instabilitäten des IR-Mikroskops zu erklären (vergleiche Anhang A.2.3) und können im Folgenden ignoriert werden.

Weitere Banden von eventuellen Verschmutzungen der Antennenoberfläche sind nicht zu erkennen. Es konnte auch keine Veränderung der Spektren durch die

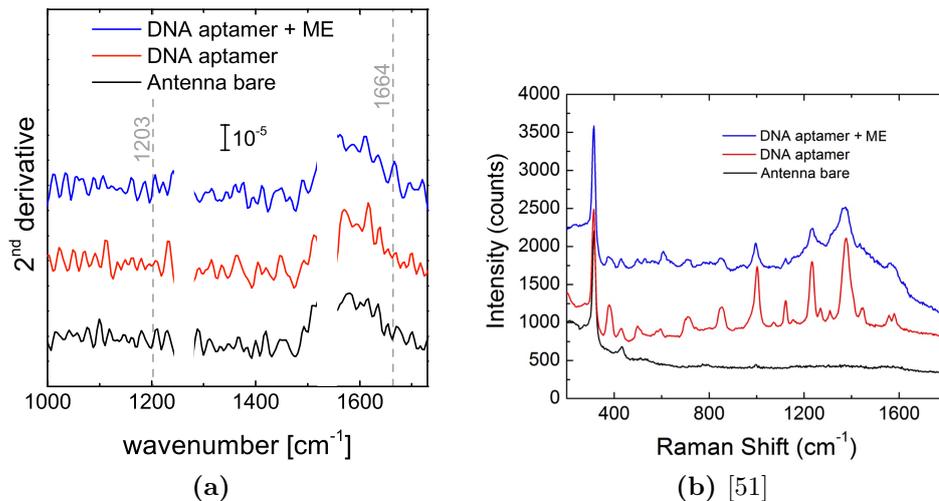


Abbildung 5.5.3: In (a) sind die zweiten Ableitungen der relativen Transmission von IR-Antennen der Länge $L = 1790$ nm nach den angegebenen Protokoll-Schritten gezeigt. Die Kurven sind gegeneinander verschoben. Die Stellen an denen Artefakte auftauchen, sind ausgeblendet. Außerdem sind die Frequenzen markiert, an denen Banden des Aptamers zu erwarten sind. In (b) sind die zugehörigen SERS Spektren gezeigt (nicht basislinienkorrigiert oder verschoben). [51]

UV-Ozon-Reinigung erkannt werden. Diese wurde dennoch für jede Probe durchgeführt.

Da die stärksten Banden von Aptameren und Proteinen bei ca. 1650 cm^{-1} zu erwarten sind, werden im Folgenden nur die Spektren der Antennen mit $L = 1790$ nm ausgewertet. Außerdem wird immer nur die zweite Ableitung der relativen Transmissionsspektren gezeigt.

5.5.4 Funktionalisierung der Nanoantennen

Zur Überprüfung der Funktionalisierung wurden nach jedem Bearbeitungsschritt mehrere SERS und SEIRS-Spektren der Antennen aufgenommen. In Abbildung 5.5.3a sind die IR-Spektren nach der UV-Ozon-Reinigung (Schritt 2, schwarz), nach der Funktionalisierung (Schritt 5, rot) und nach dem Blocken (Schritt 8, blau) gezeigt. Neben den Artefakten bei 1261 cm^{-1} und 1542 cm^{-1} sind keine Banden zu erkennen. Zur Orientierung sind die Positionen der stärksten Banden des Aptamers⁷ gekennzeichnet (vergleiche Abbildung 4.4.1d).

⁷In Abbildung 4.4.1d sind Spektren des EBNA-1 Aptamers gezeigt, während hier das MnSOD Aptamer verwendet wurde. Bei beiden Molekülen handelt es sich um DNA-Stränge, die ein ähnliches Absorptionsspektrum aufweisen.

An derselben Probe wurden ebenfalls SERS-Messungen durchgeführt. Die aus jeweils zehn Messungen an verschiedenen Stellen der Dimer-Antennen gemittelten und unter den identischen Bedingungen [51] aufgenommenen Spektren sind in Abbildung 5.5.3b dargestellt. Im Gegensatz zu den IR-Messungen kann hier ein eindeutiges Signal des Aptamers erkannt werden [51]. Das Signal wird zwar durch die Anwesenheit des Blockermoleküls ME leicht abgeschwächt, ist aber dennoch deutlich zu erkennen. Der Effekt der Verdrängung von adsorbierten Molekülen durch andere ist aus der Literatur bekannt [130].

Obwohl die Funktionalisierung der Nanoantennen im IR nicht nachzuweisen war, kann aufgrund der SERS Ergebnisse von einer erfolgreichen Funktionalisierung ausgegangen werden. Beide Messmethoden wurden an verschiedenen Nanoantennen durchgeführt, welche sich jedoch auf derselben Probe befanden und unter demselben Tropfen inkubiert wurden. Man kann daraus schließen, dass die mit SERS nachgewiesene Funktionalisierung auch auf den IR-Antennen vorhanden ist. Der Grund für das nicht detektierbare IR-Signal muss in zukünftigen Messungen noch geklärt werden. Da Aptamere aus einigen tausend Atomen bestehen, kann ausgeschlossen werden, dass alle Dipolmomente parallel zur Antennenoberfläche ausgerichtet sind.

5.5.5 Detektionslimit von MnSOD auf funktionalisiertem Biosensor

Im Gegensatz zu dem in Abschnitt 5.3 bestimmten Detektionslimit für unspezifisch gebundenen Proteine wird in diesem Abschnitt das Detektionslimit der funktionalisierten Nanoantennen bestimmt. Die funktionalisierten und geblockten Nanoantennen wurden, in Schritt 9 des Protokolls, für eine Stunde mit einem 20 μl Tropfen MnSOD Lösung mit der Konzentration⁸ 1 pM bedeckt und anschließend gewaschen und getrocknet. Sowohl IR- als auch SERS-Messungen lassen keine Änderung des Spektrums erkennen. Daher wurde die Konzentration bei einer zweiten, fertig funktionalisierten Probe um eine Größenordnung erhöht und Schritt 9 bis 11 wiederholt. Im nächsten Schritt wurde bei der ersten Probe die Konzentration erneut um Faktor 10 erhöht. Durch die abwechselnde Verwendung von zwei verschiedenen Proben wird so die Konzentration bei einer Probe in Hunderterschritten erhöht, so dass die vorherige Menge an Proteinen nur 1% (statt 10%) der höheren Konzentration beträgt und vernachlässigt werden kann. Die Konzentration wurde so bis 10 μM in Zehnerschritten erhöht und als letztmögliche Konzentration für eine Stunde in einer 45 μM Lösung inkubiert.

⁸Besonders bei geringer Konzentration und kleinen Tropfen können aufgrund der Adsorption von Proteinen an den Wänden des Gefäßes und der Pipette Fehler in der Konzentration auftreten. Um den Fehler so klein wie möglich zu halten, wurden immer mindestens 2 ml der Lösung angesetzt und die Pipette vor der Aufnahme des Tropfens mehrfach befüllt und entleert um die Wände abzusättigen.

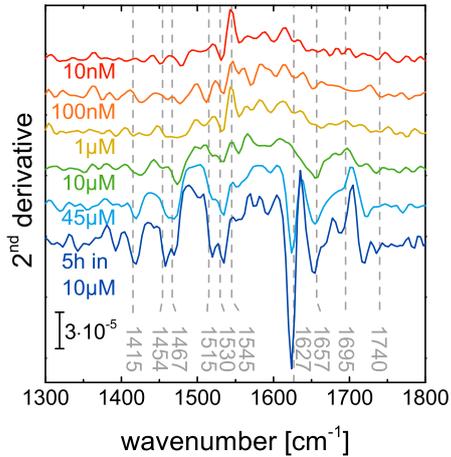


Abbildung 5.5.4: Zweite Ableitungen der relativen Transmission von funktionalisierten und geblockten Antennen ($L = 1790$ nm), die für eine Stunde in verschiedenen hohen Konzentrationen von MnSOD inkubiert wurden. Beim letzten Spektrum (dunkelblau) wurden die Antennen fünf Stunden inkubiert. Die Spektren sind gegeneinander verschoben und die Frequenzen der MnSOD-Banden sind aus Abbildung 4.4.1a übernommen.

Da sich die Spektren der niedrigen Konzentrationen nicht von denen aus Abbildung 5.5.3a unterscheiden, sind in Abbildung 5.5.4 nur die Spektren ab 10 nM gezeigt. Man erkennt bis zu einer Konzentration von 1 μ M keine Signatur des Proteins. Ab 10 μ M ist vor allem die Amid-I-Bande bei 1657 cm^{-1} zu erkennen. Diese ist bei 45 μ M noch deutlich stärker ausgeprägt. Zusätzlich ist bei der höchsten Konzentration auch der Beitrag des β -Faltblatts bei 1627 cm^{-1} zu erkennen.

Um zu testen ob die Oberfläche der Antennen nach der einstündigen Inkubation gesättigt ist, wurde die zuletzt in 10 μ M inkubierte Probe für fünf weitere Stunden in der gleichen Konzentration inkubiert (dunkelblaues Spektrum). Man erkennt, dass trotz etwa fünf mal geringerer Konzentration im Vergleich zu 45 μ M das Signal deutlich größer ist. Daraus kann geschlossen werden, dass durch eine längere Inkubation ein wesentlich besseres Detektionslimit zu erwarten wäre. Andererseits wurde die Funktion der Aptamere mit der QCM-Methode auch für einstündige Inkubation gezeigt [138].

Bis auf die Bande bei 1740 cm^{-1} sind alle Banden aus Abbildung 4.4.1a auch in den hier gezeigten antennenverstärkten Spektren zu erkennen. Durch die Fano-artige Linienform kommt es jedoch besonders an den Banden die weit von der LSPR-Frequenz (≈ 1580 cm^{-1}) entfernt sind zu einer asymmetrischen Linienform und damit zu einer Verschiebung des Minimums in der zweiten Ableitung (vergleiche Abbildung 5.2.2b). Trotz dieser Verschiebung lässt die Signatur auch bei antennenverstärkten Spektren eine Unterscheidung von Proteinen zu, die unterschiedliche IR-Spektren aufweisen. Eine eindeutige Identifikation von MnSOD aus einer Mischung aller existierenden Proteine ist jedoch nicht zu erwarten.

Das Detektionslimit bei einer Inkubation von einer Stunde liegt zwischen 1 μ M und 10 μ M. Durch eine Erhöhung der Inkubationsdauer oder eine bessere Durchmischung der Lösung während der Inkubation könnte das Detektionslimit auf eine Konzentration deutlich unter 1 μ M gesenkt werden.

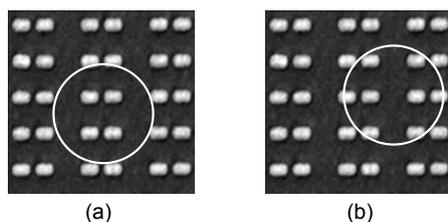


Abbildung 5.5.5: SEM-Aufnahme der Nanoantennendimer für SERS. Die Kreise mit 600 nm Durchmesser symbolisieren den Laserfokus und sind so ausgerichtet, dass in (a) zwei Dimere beleuchtet werden und in (b) sechs.

SERS-Messungen

Die entsprechenden SERS-Messungen, die an der gleichen Probe durchgeführt wurden und in [51] veröffentlicht sind, zeigen ein unterschiedliches Verhalten für verschiedene Messpositionen. Während die Spektren von einigen wenigen (etwa 1 von 10) Messpositionen die klare Signatur von MnSOD [141] aufweisen, ist an den meisten Stellen innerhalb der Nanoantennen-Arrays kein Unterschied zum Signal der Aptamere zu erkennen. Es kann daraus geschlossen werden, dass die Bedeckung der Nanoantennen mit Proteinen inhomogen ist. Das Signal der Proteine wird nur dann verstärkt, wenn sich diese im *Hotspot* in der Mitte des Dimers befinden. Im Gegensatz zu kleinen Molekülen, die sich relativ homogen auf Goldoberflächen anordnen, kann es bei den mehrere Nanometer großen Proteinen zu statistisch bedingten Schwankungen der Molekülanzahl im *Hotspot* kommen. Zudem wird bei den SERS-Messungen der Laser auf ungefähr 600 nm fokussiert. Damit hängt die auch Anzahl der Antennen, die beleuchtet werden, stark von der Ausrichtung des Lasers zu den Antennen ab. Dies ist in Abbildung 5.5.5 dargestellt. Bei den IR-Messungen wird hingegen über das gesamte Antennen-Array gemittelt, so dass die Spektren unabhängig von der Messposition reproduzierbare Ergebnisse liefern.

5.5.6 Nachweis der Selektivität

Für einen Molekülsensor ist es nicht nur wichtig, kleinste Mengen des Analyts detektieren zu können, der Sensor muss zudem selektiv auf den Analyten reagieren. Um dies zu testen werden sogenannte „negative Kontrollen“ durchgeführt. Die Messungen in Abschnitt 5.5.5 werden in dieser Terminologie als „positive Kontrolle“ bezeichnet. Im Fall des vorliegenden MnSOD-Biosensors wurden dafür zwei Proben präpariert.

Die erste Probe wurde, wie zuvor beschrieben, mit Aptameren funktionalisiert und mit Mercaptoethanol geblockt (Schritt 1 bis 8). Die Probe wurde in Schritt 9 jedoch in einer 10 μ M Lösung von BSA inkubiert, welche keine spezifische Bindung mit dem Aptamer aufweist und somit in Schritt 10 von der Oberfläche abgespült werden sollte. Dies ist schematisch in Abbildung 5.5.6a dargestellt. In Abbildung 5.5.7 (Mitte) sind die Spektren der funktionalisierten Antennen vor (blau) und nach (gelb) der Inkubation in BSA in der Mitte gezeigt. Zum Vergleich

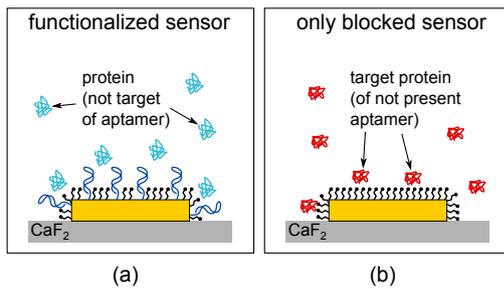


Abbildung 5.5.6: Negative Kontrollen: In (a) wird getestet ob auch ein anderes Protein (BSA, nicht *Target*) auf den funktionalisierten Antennen adsorbieren kann. In (b) wird getestet ob das *Target*-Protein (MnSOD) auch ohne Aptamere nachgewiesen wird.

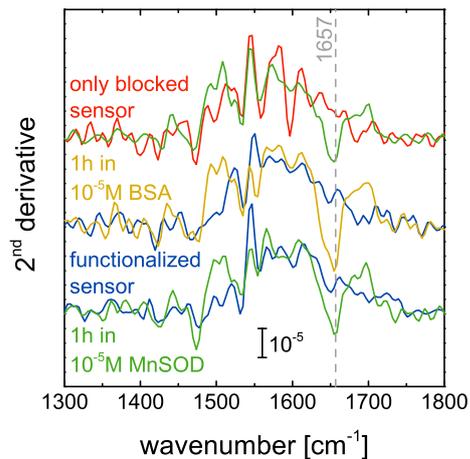


Abbildung 5.5.7: Zweite Ableitungen der relativen Transmission von drei verschiedenen Proben. Zwei davon sind mit Aptameren funktionalisiert und mit ME geblockt (blau). Die Oberfläche der anderen Probe wurde nur mit ME geblockt (rot). Diese Proben wurden eine Stunde mit Proteinlösungen (MnSOD=grün, BSA=gelb) der gleichen Konzentration inkubiert. Dabei stellen die oberen beiden Kurvenpaare die negative Kontrolle dar, während unten die positive Kontrolle dargestellt ist (grünes Spektrum aus Abbildung 5.5.4).

sind darunter die Spektren des gleichen Experiments mit MnSOD gezeigt, bei dem eine Wechselwirkung zwischen Protein und Aptamer stattfindet und ein Proteinsignal erwartet wird (positive Kontrolle). Bei der positiven und negativen Kontrolle ist die auftretende Amid-I-Bande vergleichbar stark ausgeprägt und in beiden Fällen vom Signal der α -Helix (1657 cm^{-1}) dominiert. Auch Anhand anderer Banden sind die Spektren kaum zu unterscheiden. Aufgrund der ähnlichen Anzahl an Aminosäuren (vergleiche Tabelle 4.2), die etwa proportional zur Signalstärke ist, kann daraus geschlossen werden, dass MnSOD und BSA vergleichbar gut an der Antennenoberfläche haften.

Bei der Präparation der zweiten Probe wurden die Schritte 3 bis 5 ausgelassen, so dass die gesamte Antennenoberfläche mit ME geblockt ist (Abbildung 5.5.6b). Dadurch sollte nach dem Waschen in Schritt 10 kein Protein an den Antennen haften bleiben. Die Spektren der geblockten Antennen vor (rot) und nach (grün) der Inkubation in einer $10 \mu\text{M}$ Lösung von MnSOD für eine Stunde sind in Abbildung 5.5.7 oben dargestellt. Auch in diesem Fall ist die Amid-I-Bande mit ähnlicher Intensität wie beim positiven Experiment (Abbildung 5.5.7 unten) zu erkennen.

Daraus kann geschlossen werden, dass die unspezifische Bindung der Proteine an die Antennenoberfläche durch die Blockierung mit ME nicht erfolgreich war. Zur Erklärung sind zwei Ursachen denkbar. Erstens könnte die Monolage, die ME auf der Oberfläche ausbildet, nicht vollkommen geschlossen sein. Dadurch ist es möglich, dass die Proteine durch Thiolgruppen (Cystein) an die Goldoberfläche binden. Da diese Bindung stark ist, wäre diese Art der unspezifischen Bindung nur schwer zu unterdrücken. Die andere Möglichkeit ist, dass die Proteine durch elektrostatische Wechselwirkung an der geblockten Oberfläche haften. Dies scheint eine realistische Erklärung zu sein, da viele Proteine sowohl polare als auch unpolare Domänen aufweisen. Durch den Einsatz von Detergenzien (vergleiche Abschnitt 4.1.2), die ihrerseits eine polare und eine unpolare Seite aufweisen, könnten die elektrostatisch gebundenen Proteine beim Waschen in Schritt 10 abgelöst werden. Dieses Verfahren hätte jedoch auch Nachteile, denn die Detergenzien lösen zwar die nicht spezifisch gebundenen Proteine ab, setzen sich dafür aber selbst auf allen Oberflächen ab und können durch Spülen mit Wasser nicht entfernt werden. Die IR- und Raman-aktiven Moden der Detergenzien würden dann ebenfalls durch die Nanoantennen ein verstärktes Signal liefern. Bei geschickter Wahl des Detergenz könnte dafür gesorgt werden, dass sich die Banden möglichst wenig mit den Proteinbanden überlagern. Außerdem können Proteine durch die Anwesenheit von Detergenzien denaturieren, was dazu führen kann, dass spezifisch gebundene Proteine ebenfalls abgelöst werden. Diese Problematik liegt jedoch auch bei ELISA vor und ist mit der richtigen Dosierung lösbar.

SERS-Messungen

Bei den negativen Kontrollen wurde bei den SERS-Messungen kein Signal der Proteine detektiert. C. D'ANDREA schließt in [51] daraus, dass die negativen Kontrollen erfolgreich waren und nur die *Target*-Proteine an den Antennen haften bleiben. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den IR-Messergebnissen. Beachtet man, dass bei den Experimenten in Abschnitt 5.5.5 (positive Kontrolle) auch nur die wenigsten Messungen die Proteine nachweisen konnten, so erscheint die Schlussfolgerung aus [51] gewagt. Schätzt man ab, dass in etwa 90% der Messpositionen kein Protein-Signal gemessen wird und nimmt weiter an, dass 20 Messpositionen für die negative Kontrolle vermessen wurden, so liegt die Wahrscheinlichkeit kein Signal zu messen bei $(0,9)^{20} \approx 12\%$. Bei Messungen mit EBNA-1 (vergleiche Abschnitt 5.5.8), die analog zu den hier berichteten Versuchen mit MnSOD durchgeführt wurden, traten auch in den SERS-Spektren der negativen Kontrollen deutliche Änderungen auf, die in [51] zwar erwähnt, jedoch nicht erklärt werden.

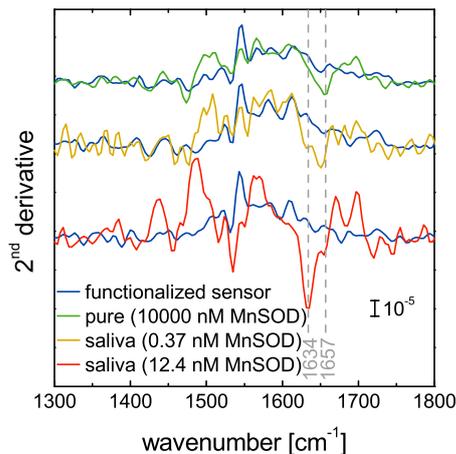


Abbildung 5.5.8: Zweite Ableitungen der relativen Transmission von drei verschiedenen Proben. Das obere Kurvenpaar ist bereits als positive Kontrolle aus Abbildung 5.5.7 bekannt. Die anderen beiden Proben wurden für eine Stunde in Speichel von Patienten eingelegt, dessen MnSOD-Konzentration zuvor mit ELISA bestimmt wurde (siehe Legende). Die angegebenen Frequenzen sind charakteristisch für α -Helix (1657 cm^{-1}) und β -Faltblatt (1634 cm^{-1}).

5.5.7 Nachweis von Proteinen in biologischen Proben

Mit der fehlgeschlagenen negativen Kontrolle, wird es nicht möglich sein MnSOD-Proteine in Körperflüssigkeiten eines Patienten nachzuweisen. Die Idee des Experiments ist es, die funktionalisierten Antennen in Schritt 9 für eine Stunde in Körperflüssigkeiten, die das *Target*-Protein enthalten, zu inkubieren. Beim Waschen sollten alle unspezifisch gebundenen Proteine von den Antennen abgewaschen werden, so dass nur das *Target*-Protein zurückbleibt. Über den Vergleich der gemessenen Signalgröße mit der in Abschnitt 5.5.4 für verschiedene Konzentrationen des reinen Proteins bestimmten Signalgröße, soll auf die Konzentration des *Target*-Proteins in der Körperflüssigkeit geschlossen werden.

Als Körperflüssigkeit wurden Speichelproben von zwei Patienten verwendet. Die MnSOD-Konzentration wurde zuvor mittels ELISA zu $0,37\text{ nM}$ und $12,4\text{ nM}$ bestimmt und liegt somit für beide Patienten deutlich unterhalb des zuvor bestimmten Detektionslimits ($\approx 1\text{ }\mu\text{M}$) der funktionalisierten Nanoantennen und sollte daher zu keinem Signal führen. In Abbildung 5.5.8 sind die davon abweichenden Ergebnisse der Messungen dargestellt. Zum Vergleich ist oben das Spektrum von $10\text{ }\mu\text{M}$ reinem MnSOD gezeigt.

Obwohl kein Signal zu sehen sein dürfte, ist bei beiden Speichelproben ein starkes Signal der Amid-I-Bande zu erkennen. Wie durch die fehlgeschlagene negative Kontrolle zu erwarten, adsorbieren verschiedenste Proteine auf den Antennen und führen so zu einem großen Proteinsignal. Dass es sich hierbei nicht um MnSOD handelt, kann jedoch anhand des Spektrums gezeigt werden. Während MnSOD einen hohen Anteil an α -Helix Struktur aufweist, der zu einem *Peak* der Amid-I-Bande bei 1657 cm^{-1} führt, zeigen die unspezifisch gebundenen Proteine eine deutliche Signatur des β -Faltblatts (*Peak* bei 1634 cm^{-1}) [124, 160]. Im Vergleich der beiden Patienten kann sowohl eine unterschiedliche Zusammensetzung als

auch verschiedene Mengen an Proteinen in den Speichelproben nachgewiesen werden.

5.5.8 Experimente mit EBNA-1 und GIPC-1

Neben den bisher beschriebenen Experimenten mit MnSOD wurden auch Versuche mit EBNA-1 und GIPC-1 durchgeführt. Auch bei diesen Experimenten konnte die unspezifische Bindung von Proteinen an die Antennenoberfläche nicht unterdrückt werden. Daher werden die Vorgehensweise und die Ergebnisse dieser Experimente im Folgenden kurz zusammengefasst.

EBNA-1

Die gleichen Experimente die in den vorhergehenden Abschnitten für MnSOD beschrieben sind, wurden auch mit Aptameren durchgeführt, die spezifisch an EBNA-1 binden (vergleiche Abbildung 4.1.7 und 4.4.1d). Die Konzentration von EBNA-1 wurde von $3 \cdot 10^{-10}$ M bis $3 \cdot 10^{-7}$ M immer um Faktor zehn erhöht. Das Detektionslimit wurde zu $3 \cdot 10^{-8}$ M bestimmt, wobei die nächsthöhere Konzentration kaum stärkere Signale lieferte. Die Frage, warum der Nanoantennensensor bei EBNA-1 fast drei Größenordnungen sensitiver ist als bei MnSOD könnte mit der etwa fünffachen Masse von MnSOD zusammenhängen. Das größere Protein (MnSOD) weist eine verringerte Diffusionskonstante auf [161], so dass weniger Proteine auf die Oberfläche auftreffen. Andererseits ist die Signalstärke proportional zur Anzahl der Aminosäuren und sollte daher für das größere Protein ein stärkeres Signal liefern. Dabei ist zu beachten, dass sich aufgrund des abfallenden Nahfelds für größere Entfernungen von der Antennenoberfläche kleine Proteine im stärkeren Feld befinden. Für ein abschließendes Urteil sind diese Überlegungen jedoch zu vage. Das Ergebnis von EBNA-1 deckt sich dessen ungeachtet mit dem Detektionslimit von BSA ($2 \cdot 10^{-8}$ M).

Die negativen Kontrollen, die analog zu den in Abschnitt 5.5.6 durchgeführt wurden, scheiterten ebenfalls. Das heißt auch bei EBNA-1 ist die detektierte Signalgröße unabhängig von der Anwesenheit der Aptamere. Auch BSA liefert ein minimal größeres Signal als das positive Experiment mit MnSOD, obwohl keines detektiert werden sollte.

Die Ergebnisse der SERS-Messungen sind analog zu Abschnitt 5.5.6 zu interpretieren. Das heißt, das gemessene Proteinsignal hängt stark von der Messposition ab, wobei auch hier etwa ein Spektrum von zehn ein messbares Proteinsignal aufweist. Im Gegensatz zu den negativen Kontrollen bei MnSOD wurde bei EBNA-1 ein deutliches Signal der unspezifisch gebundenen Proteine auch mittels SERS nachgewiesen.

GIPC-1

Bei den Experimenten mit GIPC-1 sollte das Protein selbst als Funktionalisierung an Stelle der Aptamere verwendet werden und der GIPC-1-Antikörper in Blutserum nachgewiesen werden. Auch bei diesem Experiment konnte der Antikörper aufgrund von unspezifisch gebundenen Proteinen nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassung

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass das Proteinsignal von GIPC-1 durch die Antennen um einen Faktor von ungefähr 20 000 verstärkt wird. Dieses Signal stammt von etwa 650 Antennen, die jeweils knapp 300 Proteine innerhalb ihrer *Hotspots* aufweisen. Das Detektionslimit des Nanoantennensensors wurde für BSA, das unspezifisch an die Antennenoberfläche bindet, zu $2 \cdot 10^{-8}$ M bestimmt. Wohingegen die Detektion von MnSOD auf funktionalisierten Antennen erst ab einer Konzentration von 10 μ M möglich war. Trotz Funktionalisierung und Blocken der Oberfläche konnten unspezifisch gebundene Proteine nicht vermieden werden. Bei der Untersuchung von Speichel zeigte sich, dass die unspezifisch gebundenen Proteine anhand ihrer Amid-I-Bande von den *Target*-Proteinen unterschieden werden können. Ein Ausblick ist in Kapitel 7 zu finden.

5 Antennenverstärkte IR-Spektroskopie von Proteinen

6 Präzisionsvermessung des Nahfelds resonanter Nanoantennen

Ziel der durchgeführten Messungen ist es bei Nanoantennen, die mit einer Schicht von Molekülen überzogen sind, die Wechselwirkung zwischen plasmonischer und vibronischer Anregung in Abhängigkeit der Schichtdicke zu untersuchen. Daraus sollen Rückschlüsse auf das lokale Feld der Nanoantenne gezogen werden.

Vorbereitende Messungen der in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse sind in der Diplomarbeit des Autors [60] beschrieben. Zusätzliche Messungen und die komplette Auswertung der Daten sind im Rahmen dieser Arbeit entstanden und zum großen Teil in [162] veröffentlicht worden. Die folgenden Abschnitte orientieren sich an dieser Veröffentlichung.

6.1 Theoretische Grundlagen

Neben der Struktur und kollektiver Anregungen der Oberfläche, beschäftigt sich die Oberflächenphysik mit der Untersuchung und Beschreibung der Wechselwirkung zwischen Kristalloberflächen und Teilchen (Adsorbate). Gerade in der Nanotechnologie, bei der das Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen groß wird, spielen Oberflächeneffekte eine wichtige Rolle.

In den zwei folgenden Abschnitten soll erklärt werden, wie die Oberfläche eines Metalls beschrieben werden kann und welche Mechanismen zur Adsorption von Molekülen auf Oberflächen führen. Eine ausführliche Betrachtung ist zum Beispiel in den Lehrbüchern [163–165] gegeben.

6.1.1 Ladungsträgerdichte an Metalloberflächen

Das periodische Potenzial in dem sich die freien Ladungsträger der Metalle bewegen, wird durch die positiv geladenen Atomrümpfe mit den stärker gebundenen, unbeweglichen Elektronen verursacht. Eine vereinfachte Beschreibung bietet das *Jellium*-Modell. Dabei wird die positive Hintergrundladung der Atomrümpfe verschmiert und als konstant angenommen. Das Metall wird damit durch einen konstanten Potenzialtopf mit endlicher Barriere an der Oberfläche beschrieben.

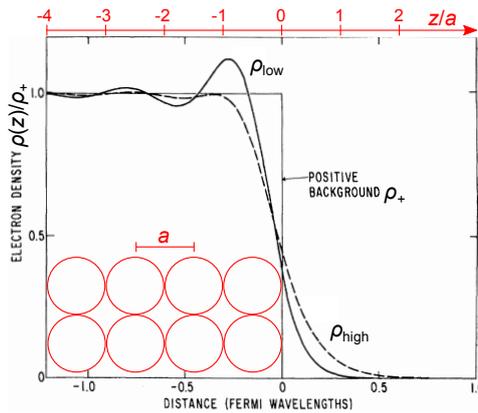


Abbildung 6.1.1: Elektronendichte an der Metalloberfläche im Jellium-Modell. Die roten Kreise symbolisieren Metallatome mit Gitterabstand a . Zwei verschiedene Elektronendichten (ρ_{low} und ρ_{high}) sind normiert auf die positive Hintergrundladung ρ_+ eingezeichnet (aus [166], überarbeitet nach [163]).

Die Tiefe des Potenzialtopfs wird so gewählt, dass sie der Austrittsarbeit des Metalls entspricht. Meist wird die Oberfläche, also der Sprung aufs Nullpotenzial, einen halben Gitterabstand nach der letzten Gitterebene gesetzt. In Abbildung 6.1.1 sind Metallatome durch rote Kreise symbolisiert und das dazugehörige Jellium-Potenzial als positive Hintergrundladung ρ_+ eingezeichnet.

Löst man die Schrödingergleichung für die Elektronen im Potenzialtopf und errechnet aus der Lösung die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Elektronen, also die Ladungsträgerdichte, erhält man für Metalle mit einer hohen Elektronendichte die gestrichelte Verteilung ρ_{high} und für eine niedrige Elektronendichte die durchgezogene Verteilung ρ_{low} . In beiden Fällen ist zu erkennen, dass die Elektronendichte über die Grenzen des Festkörpers hinaus ins Vakuum ragt. Dieser Effekt wird als Elektronen-*Spillout* bezeichnet. Je nach Facette der Metalloberfläche kann dieser Effekt unterschiedlich ausgeprägt sein [167].

An der Grenzschicht bildet sich so automatisch eine Dipolschicht aus negativ geladenen Elektronen außen und positiv geladenen Rümpfen innen. Die in Abbildung 6.1.1 sichtbaren Friedel-Oszillationen nehmen zum Inneren des Festkörpers hin ab, so dass die Elektronendichte die Hintergrundladung genau kompensiert.

6.1.2 Elektronen-*Spillout* bei plasmonischer Anregung

Betrachtet man einen Metallpartikel im *Jellium*-Modell, so lassen sich auch in diesem Modell LSPR-Anregungen beschreiben. ZULOAGA *et al.* haben dies für 5 nm lange Silber-Ellipsoide numerisch berechnet und das Nahfeld (Abbildung 6.1.2a) ausgewertet [41]. Für dieselben Partikel wurde die Nahfeldverteilung auch mittels klassischer Elektrodynamik bestimmt. Für beide Fälle ist der Verlauf des Nahfelds am spitzen Ende des Partikels in Abbildung 6.1.2b dargestellt.

Man erkennt, dass beide Beschreibungen für große Abstände von der Oberfläche dieselbe Feldstärke ergeben. Für Abstände unterhalb von 3 \AA ist das quantenmechanische Feld abgeschwächt, während die klassische Berechnung monoton zur Oberfläche hin ansteigt. Die Abschwächung für sehr kleine Abstände wird durch

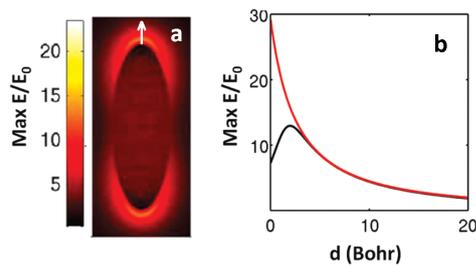


Abbildung 6.1.2: Nahfeldverteilung eines plasmonisch angeregten Silberpartikels ($L = 5$ nm) bei quantenmechanischer Beschreibung. (b) zeigt die Feldstärke entlang des weissen Pfeils in (a) für klassische (rot) und quantenmechanische (schwarz) Berechnung der LSPR (aus [41]). (20 Bohr ≈ 1 nm)

den Elektronen-*Spillout* erklärt, der eine endliche Ladungsträgerdichte auch außerhalb der Metalloberfläche bedingt. Aus berechnungstechnischen Gründen konnten keine größeren Partikel simuliert werden. Die Autoren in [41] sagen jedoch für Partikel „realistischerer Größen“ eine längere Reichweite des Elektronen-*Spillouts* voraus.

6.1.3 Molekül Adsorption

Es existieren zwei verschiedene attraktive Wechselwirkungsmechanismen zwischen einer Oberfläche und einem darauf befindlichen Adsorbat. Diese sollen im Folgenden kurz skizziert werden. Ausführlicher werden die Zusammenhänge beispielsweise in [53, 168] beschrieben.

Chemisorption

Analog zur chemischen Bindung in einem Molekül kann die Chemisorption von Adsorbaten auf einer Oberfläche betrachtet werden. Durch Hybridisierung der Molekülorbitale mit Orbitalen der Oberflächenatome (bei Gold speziell mit dem d -Band [169]) kommt es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung. Hierbei wird die elektronische Struktur des Adsorbats verändert, so dass sich auch die Vibrationsfrequenzen der betroffenen Molekülbindungen verschieben können. In extremen Fällen kann die Chemisorption sogar zur Dissoziation des Moleküls führen.

In diesem Kapitel ist die Adsorption von CO auf Gold von Interesse. CO kann unter bestimmten Bedingungen auf Gold chemisorbieren, was im Folgenden beschrieben wird. Bildet sich eine kovalente Bindung zwischen CO und Gold aus, so kommt es zum Überlapp des bindenden 5σ - und des antibindenden $2\pi^*$ -Molekülorbitals mit dem d -Band von Gold. Das CO Molekül orientiert sich mit dem Kohlenstoffatom zum Metall [170]. Die Besetzung des $2\pi^*$ Orbitals (*back donation* genannt) verringert die Stärke der Molekülbindung und sorgt so für eine deutlich verringerte Frequenz der Streckschwingung. Während das freie CO-Molekül eine Schwingungsfrequenz von 2143 cm^{-1} aufweist [171], und die Frequenz des physisorbierten Moleküls nur wenige Wellenzahlen niedriger ist,

weist chemisorbiertes CO eine Schwingungsfrequenz zwischen 2108 cm^{-1} und 2122 cm^{-1} auf [172–175].

Physisorption

Aufgrund der van-der-Waals-Kräfte zwischen Adsorbat und Oberfläche kann es zu attraktiver Wechselwirkung und somit zur Adsorption kommen. Diese Art der Bindung ist vergleichsweise schwach und kann durch Erhitzen der Oberfläche gelöst werden. Außerdem wird die elektronische Struktur und damit das zu erwartende Vibrationsspektrum nur minimal verändert. Das heißt die Vibrationsfrequenzen des Moleküls in Gasphase und als Adsorbat sind ähnlich.

Im Gegensatz zur Chemisorption können bei tiefen Temperaturen der Oberfläche auch mehrere Lagen des Moleküls adsorbieren. Ein Beispiel aus dem Alltag ist die Adsorption von Luftfeuchtigkeit am kalten Bierglas. Da nur die ersten Monolagen unter Einfluss der Oberfläche stehen, ist das Multilagenwachstum weitgehend oberflächenunabhängig.

6.2 Experimentelle Grundlagen

Um Fehler durch die Probenpositionierung bei verschiedenen Messungen ausschließen zu können, kann man das Wachstum dünner Schichten auf Nanoantennen *in situ* beobachten. Dazu ist es nötig IR-Strahl und Moleküle auf der Probe zu platzieren ohne die Position zu verändern. Denkbar sind dafür Aufdampf- oder Kondensationsexperimente, wobei erstere bei strukturierten Oberflächen zu Schattenwurf führen können und somit keine homogene Bedeckung garantieren. Die Physisorption von Kohlenstoffmonoxid (CO) auf gekühlten Oberflächen ermöglicht das Wachstum homogener Filme mit einer Dickenauflösung in der Größenordnung von einem Angström.

In diesem Abschnitt wird der Versuchsaufbau und die Vorgehensweise bei den Messungen beschrieben. Das IR-Spektrometer, der Detektor und der Strahlengang wurden bereits in Abschnitt 3.1.2 erklärt.

6.2.1 UHV-Kammer

Für die Messung von adsorbiertem CO auf gekühlten Substraten muss im Ultrahochvakuum (UHV) gearbeitet werden. Die verwendete Kammer ist schematisch in Abbildung 6.2.1 dargestellt. Neben den Flanschen zur Ein- und Auskopplung der IR-Strahlung durch KBr-Fenster sind außerdem eine Druckmessröhre, ein Massenspektrometer (*Pfeiffer QMG 220 M3, Prisma Plus*) und ein Feindosierventil mit 12 bar CO-Versorgung angeschlossen. Die Kammer wird über eine Turbomolekularpumpe abgepumpt. Bei Erreichen eines konstanten Drucks wird

6.2 Experimentelle Grundlagen

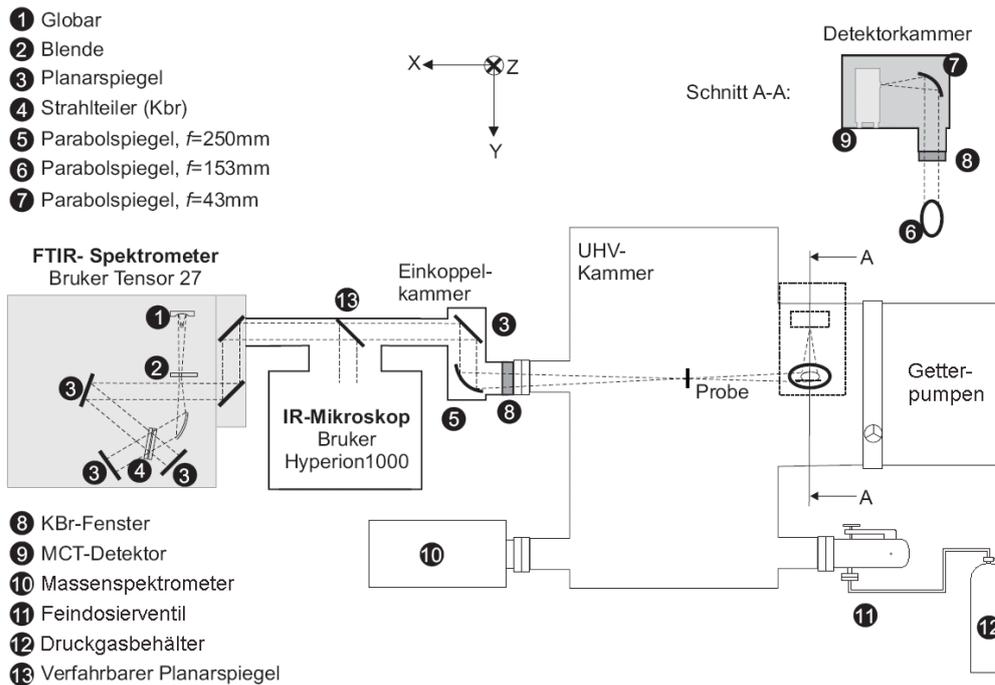


Abbildung 6.2.1: IR-Strahlengang (abgeändert aus [176])

die Kammer durch ein Plattenventil abgeschlossen und nur noch über Getterpumpen (Ionen Getter Pumpe und Titan Sublimations Pumpe) gepumpt. Der Probenhalter ist thermisch an einen Kryostaten gekoppelt. Durch Kühlung mit flüssigem Helium kann die Probe so auf etwa 18 K abgekühlt werden. Einzelheiten zur Temperaturmessung sind in [60] beschrieben.

In der Kammer herrscht ein Basisdruck von $p \approx 5 \cdot 10^{-11}$ mbar. Durch Öffnen des Feindosierventils und gleichzeitigem Pumpen mit den Getterpumpen kann ein Gleichgewichtsdruck von $1 \cdot 10^{-8}$ mbar erreicht werden. Das Restgas besteht näherungsweise aus reinem CO, welches auf der gekühlten Probe kondensiert. Anders als bei gerichteten Verdampfungsexperimenten, adsorbiert das freie CO-Gas auf unterschiedlich ausgerichteten Oberflächen näherungsweise mit der gleichen Dicke d_{CO} .

Der nahezu parallele ($NA = 0,08$), linear polarisierte IR-Strahl ist auf die Probenposition fokussiert und hat dort einen Durchmesser (doppelte Halbwertsbreite) von 3,8 mm [60]. Die UHV-Kammer und der Probenhalter sind so konstruiert, dass *in situ* Transmissionsmessungen unter senkrechtem Lichteinfall und IRRAS-Messungen unter $72,5^\circ$ Einfallswinkel möglich sind.

6.2.2 CO

Kohlenstoffmonoxid (CO) ist bei Raumtemperatur gasförmig und weist die C≡O-Streckschwingung bei 2143 cm^{-1} auf [171]. Unter UHV-Bedingungen adsorbiert CO auf gekühlten Goldoberflächen wobei Chemisorption nur bei gestuften [177] und rauen Oberflächen auftritt, die nicht über 290 K ausgeheilt wurden [178]. Bei Temperaturen unterhalb von 32 K [177] physisorbieren mehrere Monolagen von CO und bilden so eine homogen wachsende Schicht. CO-Eis liegt bei diesen Temperaturen in fcc-Kristallstruktur mit einem Netzebenenabstand von $1,6\text{ \AA}$ in (111)-Richtung vor [179]. Die dielektrische Funktion von CO-Eis ist in [180] veröffentlicht. Die Reinheit des CO-Gases (vom Hersteller *Linde* mit 99,997% angegeben) wurde mittels Massenspektrometrie überprüft [60].

6.2.3 Gold-Nanoantennen auf Silizium

Da der IR-Strahl innerhalb der UHV-Kammer einen Durchmesser von ungefähr 3,8 mm hat [60], wurde ein Nanoantennen-*Array* mit einer Ausdehnung von $4 \times 4\text{ mm}^2$ hergestellt. Aufgrund der hohen Wärmeleitfähigkeit [181] und der optischen Eigenschaften im IR (Anhang A.1.2) eignet sich Silizium besonders gut für dieses Experiment. Die ungefähr 3 nm dicke natürliche SiO_2 -Schicht wurde nicht entfernt, da die spektrale Position des Oberflächenphonon-Polaritons [60] um 1200 cm^{-1} [182] keinen Einfluss auf den Bereich der CO-Streckschwingung um 2140 cm^{-1} hat. Das Antennen-*Array* ist exzentrisch auf dem $10 \times 15 \times 1\text{ mm}^3$ großen Si-Substrat aufgebracht, so dass Referenzmessungen auf dem reinen Substrat neben den Antennen möglich sind. Die Abmessungen der Antennen ($L = 800\text{ nm}$, $W = H = 100\text{ nm}$) sind so gewählt, dass die LSPR-Frequenz möglichst nahe an der Frequenz der CO-Streckschwingung liegt. Die Abstände ($d_x = 1\text{ }\mu\text{m}$, $d_y = 5\text{ }\mu\text{m}$) zwischen den Antennen sind groß genug um die Wechselwirkung zwischen den Antennen (vergleiche Abschnitt 2.5.9) vernachlässigen zu können [183]. Dies erlaubt es die Ergebnisse mit Messungen an Einzelantennen vergleichen zu können. Die verwendeten Proben „D01“ und „D03“ sind identisch und wurden nach Entwurf des Autors von AKIHIKO OHI und DOMINIK ENDERS in der Arbeitsgruppe von TADA AKI NAGAO an der *MANA foundry station* am *NIMS* in Tsukuba, Japan hergestellt.

6.2.4 Vergleichsprobe

Die verwendete IRRAS-Probe wurde von *Georg Albert PVD-Beschichtungen* gefertigt. Sie besteht aus einer 200 nm dicken, polykristallinen Goldschicht, die mittels einer Titanhaftvermittlerschicht auf einem Silizium (100) Wafer gehalten wird. Dieser wurde nachträglich auf die Größe von $15 \times 10\text{ mm}$ zugeschnitten um in

den UHV-Probenhalter zu passen. Die Goldoberfläche weist eine RMS-Rauigkeit von 4 nm auf. Details zum Herstellungsprozess sind in [113] zu finden.

6.2.5 Präparation und *in situ* Messung

Die Proben wurden unter UHV-Bedingungen mittels flüssigem Helium auf etwa 18 K gekühlt. Um ungewollte Adsorbate zu desorbieren, die während des Kühlvorgangs aus dem Restgas auf der Probe adsorbiert waren, wurde die gekühlte Probe mittels Elektronenstoßheizung auf 370 K geheizt. Nach weniger als einer Minute fiel die Temperatur wieder auf 18 K, so dass das Referenzspektrum der sauberen Probe aufgenommen werden konnte. Anschließend wurde das Feindosierventil geöffnet und ein CO-Partialdruck von 10^{-8} mbar eingestellt. Die IR-Spektren der wachsenden CO-Schicht auf den Antennen wurden mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} *in situ* aufgenommen. Die Dosis D (in Langmuir $1 \text{ L} = 1,33 \cdot 10^{-6} \text{ mbar} \cdot \text{s}$), der die Probe ausgesetzt wird, errechnet sich aus

$$D(t) = \frac{1}{1,07 \cdot 1,33 \cdot 10^{-6}} \int_0^t p(t') dt',$$

wobei der gemessene Druck in mbar angegeben wird und der Vorfaktor von $1/1,07$ die höhere Sensitivität der Druckmessröhre auf CO kompensiert.

6.3 Bestimmung der Schichtdicke

Zuerst wird das Adsorptionsverhalten von CO auf gekühltem Gold und Silizium untersucht. Dazu wurden relative Transmissionsmessungen einer wachsenden CO-Schicht auf Silizium (kleine Grafik in Abbildung 6.3.1) und relative Reflexionsmessungen einer wachsenden CO-Schicht auf der flachen Goldoberfläche unter einem Einfallswinkel von $72,5^\circ$ (kleine Grafik in Abbildung 6.3.1) durchgeführt. In Abbildung 6.3.1 ist die *Peak*-Höhe der CO-Schwingung für beide Experimente ausgewertet. Man erkennt sowohl für die Reflexions- als auch für die Transmissionsmessung, dass sich die Steigung für kleine Dosen von der von großen Dosen unterscheidet.

Während in Abbildung 6.3.1 die *Peak*-Höhe ausgewertet wurde, ist in Abbildung 6.3.2b die *Peak*-Fläche bei verschiedenen Schichtdicken aufgetragen.¹ Hier ist der Verlauf nahezu linear, was mit einem konstanten Haftkoeffizienten² erklärt

¹Da diese Messungen zur Bestimmung der Schichtdicke dienen, wurden die Spektren analog zur Auflösung der dielektrischen Funktion [180] mit 1 cm^{-1} aufgenommen. Die Transmissionsmessungen mussten dafür unter einem Winkel von 45° durchgeführt werden um Dünnschichtinterferenzen [60] des Si-Substrats zu vermeiden.

²Der Haftkoeffizient gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein auf die Oberfläche auftreffendes Gasteilchen dort haften bleibt.

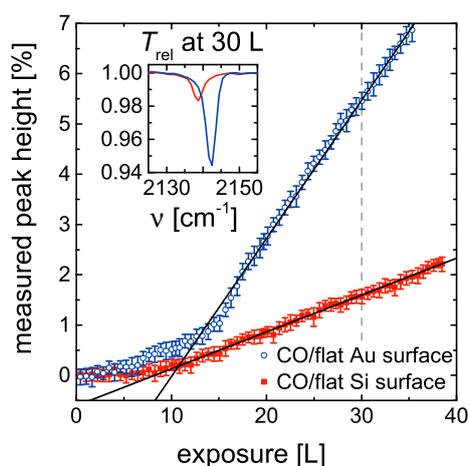


Abbildung 6.3.1: Stärke der CO-Absorptionsbande für verschiedene CO-Dosen. Die durchgezogenen Linien zeigen einen linearen *Fit* an die Messdaten oberhalb von 15 L. Bei der Reflexionsmessung (blau) stammt das Signal von der CO-Schicht auf einer Seite der Probe, während in Transmissionsgeometrie (rot) auch die CO-Schicht auf der Rückseite des Si-Wafers zum Signal beiträgt. Die Spektren bei 30 L sind in der eingefügten Grafik gezeigt (Auflösung 2 cm^{-1}).

werden kann. Daraus folgt, dass die verschiedenen Steigungen in 6.3.1 nicht auf verringerte Adsorption oder die Ausrichtung der Dipolmomente für sehr dünne CO-Schichten zurückzuführen sind, sondern durch eine erhöhte Dämpfung (Linienbreite) für dünne Schichten hervorgerufen wird. Daher wird für die weitere Auswertung die von der Dämpfung unabhängige *Peak*-Fläche verwendet.

Zusätzlich zu den gemessenen Spektren wurden mit der Software SCOUT [184] Spektren von CO-Eis für einige Schichtdicken in der gleichen Geometrie wie im Experiment berechnet. Dazu wurde die in [180] veröffentlichte dielektrische Funktion von CO-Eis verwendet. Auch für diese Spektren wurden die *Peak*-Flächen berechnet und in Abbildung 6.3.2a über der jeweiligen Schichtdicke aufgetragen. Ein Vergleich zwischen gemessener und berechneter *Peak*-Fläche ermöglicht damit eine Umrechnung der Dosis in eine Schichtdicke. Zur Bestimmung des Umrechnungsfaktors ξ wurden Ursprungsgeraden an die Messungen und Rechnungen *gefittet*. Aus deren Steigungen (siehe Abbildung 6.3.2) ergibt sich

$$\xi_{\text{Au}} = (1,302 \pm 0,015) \text{ L}/\text{\AA}, \quad \xi_{\text{Si}} = (1,300 \pm 0,005) \text{ L}/\text{\AA}.$$

Aus der sehr guten Übereinstimmung wird geschlossen, dass CO bei 18 K einen vom Oberflächenmaterial unabhängigen Haftkoeffizienten aufweist.

Der angegebene Fehler wurde aus dem Standardfehler des *Fits* errechnet. Die Abweichung der Messpunkte von der *Fit*-Geraden und die Ungenauigkeit in der Bestimmung der *Peak*-Flächen sind mit etwa 10% abzuschätzen. Die Fehler der dielektrische Funktion aus [180] werden deutlich kleiner abgeschätzt und daher vernachlässigt. Innerhalb der dominanten Fehler ist mit dieser Methode aber dennoch eine Schichtdickenauflösung von etwa zwei Angström zu erwarten.

Bei dieser Methode wird angenommen, dass die gegebene dielektrische Funktion unabhängig von der Schichtdicke ist. Mit einem Netzebenenabstand von $1,6 \text{ \AA}$

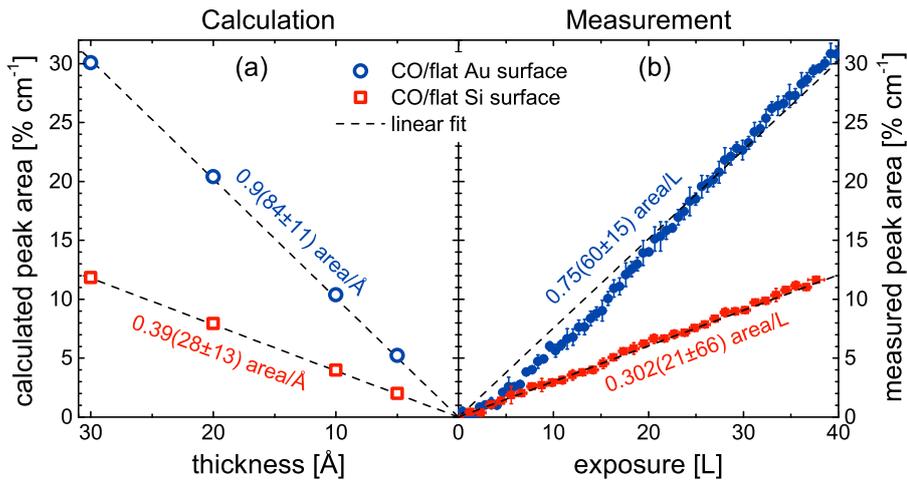


Abbildung 6.3.2: Bestimmung der Schichtdicke durch den Vergleich von berechneten (a) und gemessenen (b) CO-*Peak*-Flächen für verschiedene Dosen. Bei den Transmissionsmessungen (rot) wurden die CO-Schichten auf Vorder- und Rückseite des Si-Wafers betrachtet. Die Reflexionsdaten (blau) sind ebenfalls in Abbildung 6.6.1 dargestellt. Die gestrichelten Geraden gehen durch den Ursprung und stellen den besten *Fit* an die jeweiligen Mess- beziehungsweise Rechnungsdaten dar. [162]

sind dünne CO-Schichten jedoch nur wenige Atomlagen dick. Die makroskopische Beschreibung der optischen Eigenschaften mittels der dielektrischen Funktion ist in diesem Fall sicherlich nur näherungsweise richtig und kann die Abweichungen der Messdaten (Abbildung 6.3.2) vom linearen Verhalten erklären.

6.4 CO-Signal auf Antennen

Die Veränderungen im Spektrum der Antennenresonanz die durch die CO-Schicht hervorgerufen werden, sollen im Folgenden am Beispiel einer $d_{CO} = 29,5 \text{ \AA}$ dicken Schicht erläutert werden.

Die verschiedenen Messgeometrien sind in Abbildung 6.4.1a schematisch dargestellt. Ohne CO-Schicht wurden Transmissionsspektren vom Si-Substrat (S) und den Antennen (A) durchgeführt. Die Messung der Antennen mit CO-Schicht wird (C) genannt. Jede dieser drei Messungen kann mit linear polarisiertem Licht parallel (\parallel) oder senkrecht (\perp) zur langen Antennenachse durchgeführt werden. In Abbildung 6.4.1b sind die gemessenen relativen Transmissionsspektren gezeigt. Alle Spektren sind auf das Spektrum des leeren Si-Wafers (S) in der jeweiligen Polarisatorstellung normiert. Ohne CO erkennt man bei paralleler Polarisierung ($A_{\parallel}/S_{\parallel}$) die breite Antennenresonanz mit maximaler Extinktion bei $\omega_{\text{res}} = 1962 \text{ cm}^{-1}$. Dieser Wert wurde durch einen Polynom-*Fit* zweiter Ordnung an die unmittelbare Umgebung der Resonanzfrequenz bestimmt. Wird die

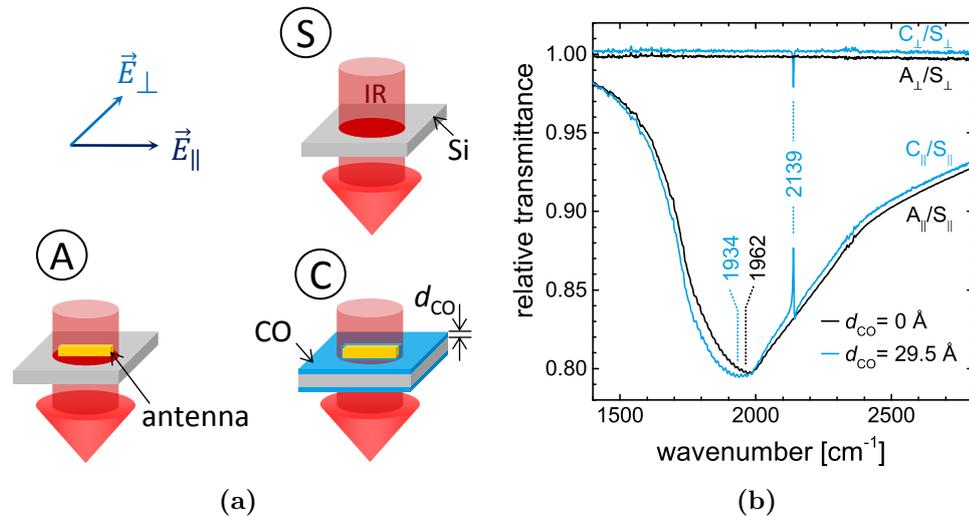


Abbildung 6.4.1: In (a) werden die Messgeometrien schematisch dargestellt, wobei die Antenne das Antennen-Array repräsentiert. (b) zeigt die dazugehörigen relativen Transmissionsspektren. Die Messungen sind nach den jeweiligen Geometrie (S), (A) und (C) benannt, wobei die Polarisation (\parallel oder \perp zur Antenne) ist im Index vermerkt ist. Zusätzlich sind die Resonanzfrequenz des Plasmons und die Vibrationsfrequenz der CO-Streckschwingung gegeben. [162]

Polarisation um 90° gedreht (A_\perp/S_\perp) so verschwindet diese Resonanz und die 100%-Linie zeigt an, dass das Licht in diesem Frequenzbereich nicht mehr mit den Antennen wechselwirkt.

Betrachtet man in dieser Polarisation das relative Transmissionsspektrum der mit CO überzogenen Probe (C_\perp/S_\perp), so erkennt man den Absorptions-Peak der CO-Streckschwingung bei 2139 cm^{-1} . Dieser tritt in gleicher Größe auch bei Messungen ohne Antennen auf (Abbildung 6.3.1), was durch die geringe Bedeckung der Oberfläche mit Goldantennen ($\sim 1\%$) auch so zu erwarten ist. Das gemessene Signal stammt folglich nicht von den Antennen, sondern vom CO welches zwischen den Antennen und auf der Rückseite der Probe auf Silizium adsorbiert ist.

Für parallele Polarisation (C_\parallel/S_\parallel) koppelt die Antennenresonanz an die CO-Moleküle, die sich im verstärkten Nahfeld der Antenne befinden. Dies führt zu einer Fano-artigen Linienform der CO-Streckschwingung bei 2139 cm^{-1} und aufgrund der größeren Polarisierbarkeit der Antennenumgebung zu einer Rotverschiebung der Resonanzfrequenz auf $\omega_{\text{res}} = 1934 \text{ cm}^{-1}$.

Um die Verschiebung der Resonanzfrequenz und die Entwicklung des CO-Signals genauer untersuchen zu können, wird im Folgenden das Antennenspektrum mit

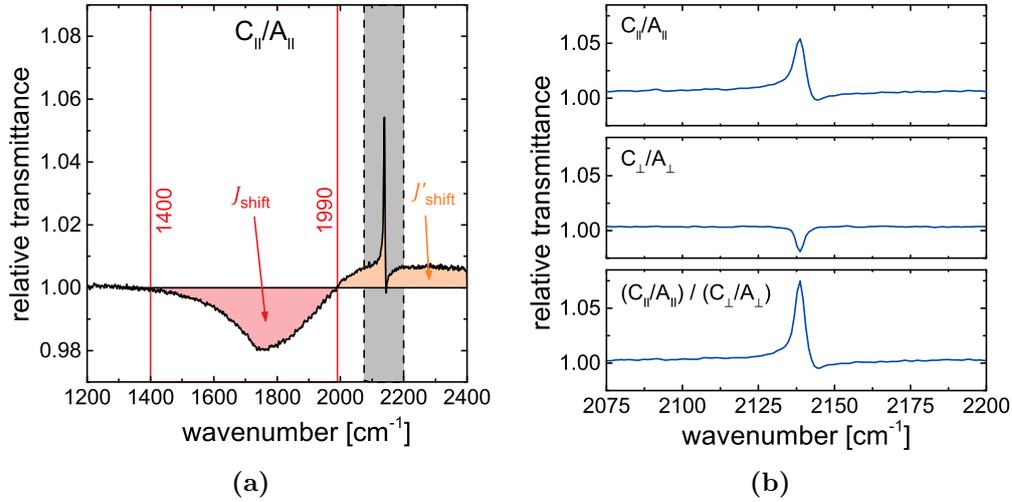


Abbildung 6.4.2: (a) zeigt die relativen spektralen Änderungen des Antennenspektrums, die durch eine $29,5 \text{ \AA}$ dicke CO-Schicht hervorgerufen werden. Die Fläche J_{shift} wird durch Integration zwischen 1400 cm^{-1} und 1990 cm^{-1} berechnet. Der grau hinterlegte Bereich ist in (b) oben vergrößert dargestellt und eine Überlagerung von antennenverstärktem und nicht verstärktem Signal. Im mittleren Graphen von (b) ist das nicht verstärkte Signal von CO, welches zwischen den Antennen und auf der Rückseite des Si-Wafers adsorbiert ist, gezeigt und unten das korrigierte, antennenverstärkte CO-Signal. [162]

CO auf das ohne normiert ($\frac{C_{||}/S_{||}}{A_{||}/S_{||}} = C_{||}/A_{||}$). In dieser Darstellung werden nur die Änderungen sichtbar, die durch die CO-Schicht hervorgerufen werden.

6.4.1 Verschiebung der Antennenresonanz

Das Spektrum $C_{||}/A_{||}$ ist in Abbildung 6.4.2a abgebildet. Man erkennt eine breite Absenkung zwischen 1400 cm^{-1} und 1990 cm^{-1} (rote Fläche J_{shift} , Integral innerhalb der angegebenen Grenzen) und eine Anhebung (orange Fläche J'_{shift}) oberhalb von 1990 cm^{-1} . Diese Struktur resultiert aus der Rotverschiebung der Antennenresonanz. Ist die Verschiebung klein gegenüber der Halbwertsbreite der Resonanz, so besteht in erster Näherung ein linearer Zusammenhang zwischen der Verschiebung und der Fläche J_{shift} beziehungsweise J'_{shift} , wobei $|J_{\text{shift}}| = |J'_{\text{shift}}|$ gilt. Aufgrund der Asymmetrie der Antennenresonanz und der CO-Vibrationsbande ist J_{shift} jedoch spektral eindeutiger definiert und wird daher für die weitere Auswertung verwendet. Durch lineare Interpolation zwischen $\Delta\omega_{\text{res}}(d_{\text{CO}} = 0 \text{ \AA}) = 0 \text{ cm}^{-1}$ und der aus Abbildung 6.4.1b abgelesenen Verschiebung $\Delta\omega_{\text{res}}(d_{\text{CO}} = 29,5 \text{ \AA}) = 28 \text{ cm}^{-1}$, lässt sich so für jede Schichtdicke die

Verschiebung $\Delta\omega_{\text{res}}(d_{\text{CO}})$ aus der gemessenen Fläche J_{shift} errechnen. In Abbildung 6.6.1 ist $\Delta\omega_{\text{res}}$ über d_{CO} aufgetragen.

Die in Abbildung 6.4.1b bestimmte Verschiebung von $\Delta\omega_{\text{res}} = 28 \text{ cm}^{-1}$ ist aufgrund der asymmetrischen Resonanzkurve und der großen Halbwertsbreite stark von den Grenzen des Polynom-*Fits* abhängig und daher fehlerbehaftet. Dieser Fehler pflanzt sich durch die lineare Interpolation direkt auf die absoluten Werte bei anderen Schichtdicken fort. Vergleicht man jedoch verschiedene Schichtdicken untereinander, wie in der späteren Auswertung durchgeführt, so tritt dieser Fehler lediglich als Proportionalitätskonstante auf und hat keinen Einfluss auf den Verlauf der gemessenen Verschiebung.

6.4.2 Verstärktes CO-Vibrationssignal

Der in Abbildung 6.4.2a grau hinterlegte Bereich ist im oberen Graph von Abbildung 6.4.2b vergrößert dargestellt. Da CO nicht nur auf den Antennen sondern großteils in den Zwischenräumen und auf der Rückseite des Si-Wafers adsorbiert, stellt dieses Signal eine Überlagerung des Fano-artigen antennenverstärkten CO-Signals und der normalen IR-Absorption von CO dar. Wie in Abbildung 6.4.1b gezeigt, kann das nicht verstärkte CO-Signal bei senkrechter Polarisation gemessen werden. Das entsprechende Spektrum (C_{\perp}/A_{\perp}) für $d_{\text{CO}} = 29,5 \text{ \AA}$ ist analog zum oberen Graphen in Abbildung 6.4.2b im mittleren Graphen gezeigt. Zur Bestimmung des reinen antennenverstärkten CO-Signals, wird $C_{\parallel}/A_{\parallel}$ durch C_{\perp}/A_{\perp} geteilt.³ Das so erhaltene Spektrum ist im unteren Graphen von Abbildung 6.4.2b dargestellt und wird zur weiteren Auswertung verwendet.

6.5 Spektraler Verlauf des Vibrationssignals für verschiedene d_{CO}

Alle gemessenen Spektren wurden mit der zuvor beschriebenen Methode korrigiert, so dass in Abbildung 6.5.1a nur der antennenverstärkte Anteil der CO-Vibration für verschiedene Schichtdicken dargestellt ist. Im Vergleich zu den verstärkten CO-Signalen, sind für dieselben Schichtdicken Spektren von CO auf einer flachen Goldschicht gezeigt. Diese wurden bis auf die Messgeometrie (Reflexion mit Einfallswinkel $72,5^{\circ}$) unter den gleichen experimentellen Bedingungen aufgenommen und sind in Abbildung 6.5.1b dargestellt. Die relativen Reflexionsmessungen sind auf das Spektrum desselben Goldspiegels vor dem Öffnen des CO-Feindosierventils normiert.

Man erkennt bereits in dieser Darstellung, dass obwohl die *Peak*-Stärke bei 11 \AA ungefähr gleich ist, das Signal in (b) deutlich gleichmäßiger zunimmt als in (a).

³Um ein Relativspektrum zu erhalten muss dividiert werden. Aufgrund der wenige Prozent großen Signale, liefert eine Subtraktion ohnehin beinahe identische Ergebnisse.

6.5 Spektraler Verlauf des Vibrationssignals für verschiedene d_{CO}

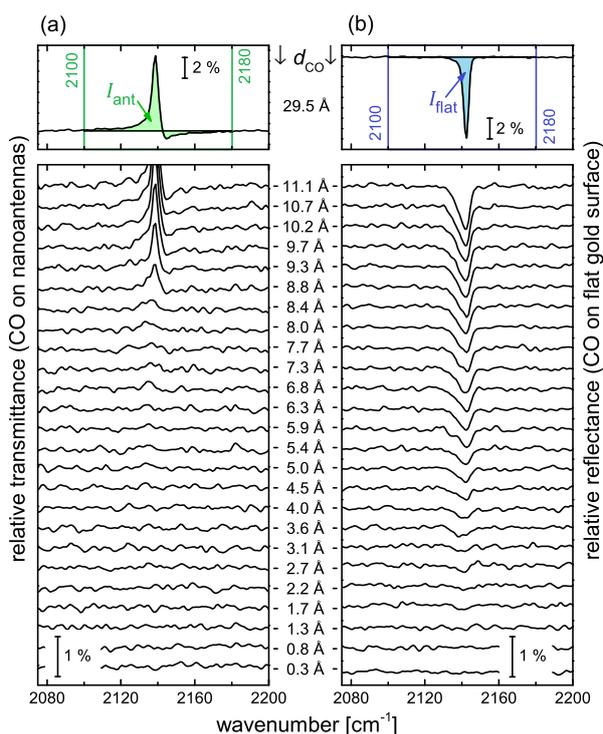


Abbildung 6.5.1: CO-Signal für wachsende Schichtdicken von CO auf Antennen (a) und einer flachen Goldoberfläche (b). Die Spektren in (a) wurden nach der zuvor beschriebenen Methode korrigiert, wobei das Spektrum bei 29,5 Å dem unteren in Abbildung 6.4.2b entspricht. Die Signalgrößen (I_{ant} , grün und I_{flat} , blau) werden für beide Oberflächen aus der Fläche zwischen Spektrum und der Basislinie zwischen 2100 cm⁻¹ und 2180 cm⁻¹ bestimmt. [162]

Dort ist bis unter 8 Å kein Signal erkennbar. Für $d_{\text{CO}} > 8 \text{ \AA}$ ist die Fano-artige Linienform des antennenverstärkten Signals festzustellen. Die leichte Asymmetrie im Reflexionsspektrum kann durch die Wechselwirkung oszillierender Dipole in ungeordneten Systemen erklärt werden [185], ist aber für die weitere Auswertung belanglos. Für eine quantitative Auswertung wurde zwischen 2100 cm⁻¹ und 2180 cm⁻¹ die Fläche zwischen CO-Signal und der Basislinie bestimmt. Dafür wurden Flächen ober- und unterhalb der Basislinie addiert. Die Fläche der antennenverstärkten Signale wird als I_{ant} bezeichnet, während I_{flat} die CO-Signale der flachen Goldschicht beschreibt. Wie in Abschnitt 2.7.1 gezeigt, ist die Fläche unter dem Fano-Profil rein rechnerisch unendlich groß. Bei dem hier gewählten, festen, endlichen Integrationsintervall ergibt sich eine endliche Fläche, die quantitativ ausgewertet werden kann.

Um Verwechslungen zu vermeiden, wird hier ausdrücklich darauf hingewiesen, dass sich die hier bestimmten Flächen I_{ant} und I_{flat} von den in Abbildung 6.4.2a bestimmten Flächen J_{shift} und J'_{shift} grundlegend unterscheiden.

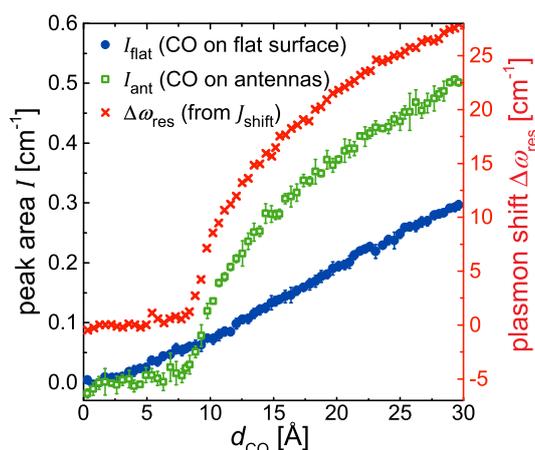


Abbildung 6.6.1: Die in Abbildung 6.5.1 gezeigten Flächen I_{ant} (grün) und I_{flat} (blau) sind über der Schichtdicke dargestellt. Außerdem ist die Verschiebung der Antennenresonanz $\Delta\omega_{\text{res}}$ (rot) gegeben (rote Ordinate). [162]

6.6 Vergleich der Vibrationssignale und der Resonanzverschiebung

Die in Abbildung 6.5.1a bestimmten Flächen I_{ant} und I_{flat} sind in Abbildung 6.6.1 über der Schichtdicke aufgetragen. In dieser Darstellung wird der bereits angedeutete Unterschied deutlich veranschaulicht. Während das CO-Signal auf einer flachen Goldoberfläche nahezu linear mit der Schichtdicke wächst (vergleiche Abbildung 6.3.2), setzt das antennenverstärkte Signal erst bei ungefähr 8 Å ein und wächst dann zunächst schnell an. Für sehr große Schichtdicken (>100 nm) würde man erwarten, dass das komplette Nahfeld der Antennen mit CO gefüllt ist und ein weiteres Wachstum von d_{CO} keinen Einfluss auf das antennenverstärkte CO-Signal hat. Von diesem Sättigungsbereich sind die durchgeführten Experimente jedoch weit entfernt.

Neben dem Verlauf der CO-Vibrationsbande ist in Abbildung 6.6.1 zudem die in Abschnitt 6.4.1 bestimmte Verschiebung der Antennenresonanzfrequenz $\Delta\omega_{\text{res}}$ über der Schichtdicke aufgetragen. Das zum antennenverstärkten CO-Signal identische Verhalten ist offensichtlich und bedeutet, dass nicht nur das CO-Signal, sondern auch die Antenne selbst unempfindlich für Schichtdicken unter 8 Å ist.

6.7 Interpretation des beobachteten Verhaltens

Das identische Verhalten von CO-Signal und LSPR-Verschiebung und der Unterschied zum Verhalten von CO auf flachen Goldoberflächen legt eine im Nahfeld begründete, plasmonische Ursache des beobachteten Effekts nahe.

Mit dem quantenmechanischen Effekt des *Spillouts* von Elektronen, wie er in Abschnitt 6.1.2 und in [41] beschrieben wird, lassen sich die Beobachtungen erklären.

Durch die endliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Elektronen außerhalb der Metalloberfläche, wird das Nahfeld in deren unmittelbarer Nähe abgeschwächt. Daher ist weder die Antenne sensitiv auf die Änderung der Polarisierbarkeit, noch kann die CO-Streckschwingung effektiv an die Plasmonresonanz koppeln. Jedoch auch bei der glatten Goldoberfläche sollten die Leitungsbandelektronen eine Aufenthaltswahrscheinlichkeit oberhalb der Grenzfläche haben (vergleiche Abschnitt 6.1.1), weshalb der Effekt auch dort auftreten sollte. In [41] wird gezeigt, dass je nach Form des plasmonischen Nanopartikels der Elektronen-*Spillout* und damit die Abschwächung des Nahfelds unterschiedlich ausfällt. Dies zeigt, dass der *Spillout* durch die plasmonische Anregung beeinflusst wird und daher an der Oberfläche der resonant angeregten Antenne stärker ausgeprägt ist als bei der glatten Goldoberfläche. Bei Nanopartikeln mit hohen Aspektverhältnissen, einer Größe von mehreren zehn Nanometern und einer rauen Oberfläche ist laut [41], aufgrund der höheren elektronischen Zustandsdichte und des in der Rechnung vernachlässigten Spiegelpotentials, eine Beeinflussung des Nahfelds bis um die 5 Å denkbar. Da die in dieser Arbeit verwendeten IR-Antennen, im Vergleich zu plasmonischen Nanopartikeln mit LSPR im Sichtbaren, ein noch größeres Aspektverhältnis aufweisen, ist durchaus denkbar, dass der gemessene Effekt auch für 8 Å noch auf den Elektronen-*Spillout* zurückgeführt werden kann.

6.7.1 Alternative Erklärungen

Obwohl die beschriebene Erklärung des gemessenen Signalverlaufs durch das abgeschwächte Nahfeld aufgrund des erhöhten Elektronen-*Spillouts* bei plasmonischen Anregungen plausibel erscheint, soll in diesem Abschnitt die Möglichkeit einer alternativen Erklärung erörtert werden.

Verunreinigungen der Oberfläche durch Rückstände des Photolacks von der Herstellung könnten ein Grund für die Behinderung der Adsorption sein [49]. Diese können jedoch ausgeschlossen werden, da der verwendete Photolack eine starke IR-Absorptionsbande bei 1726 cm^{-1} aufweist, die in Abbildung 6.4.1b zu sehen sein müsste. Eine mögliche Oxidation der Goldoberfläche [186] könnte erklären, warum das Signal der Monolage (vergleiche Abschnitt 6.1.3) nicht beobachtet wird. Da in Abschnitt 6.3 aber gezeigt wurde, dass CO bei 18 K auf Silizium und Gold in gleicher Rate adsorbiert, ist folglich anzunehmen, dass dies auch für Goldoxid gelten würde. Eine verzögerte Adsorption ist damit folglich nicht zu erklären.

Alternativ könnte man das gemessene Verhalten auch über verzögerte Adsorption oder durch Orientierung des CO-Dipolvektors parallel zur Goldoberfläche für Schichten mit $d_{\text{CO}} < 8\text{ Å}$ erklärt werden. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da im IRRAS-Experiment ebenfalls nur Dipolmomente senkrecht zur Metalloberfläche angeregt werden können und trotzdem Signale unterhalb von 8 Å beobachtet werden. Die Rauigkeit und Orientierung der Goldoberfläche von Antennen und

flacher Schicht kann auf mikroskopischer Skala als ähnlich angenommen werden, da beide Proben vor dem Adsorptionsexperiment auf deutlich über 290 K [178] ausgeheizt wurden. Die Erkenntnis aus [178] erklärt nebenbei bemerkt auch warum in keinem der durchgeführten Experimente zwischen 2108 cm^{-1} und 2122 cm^{-1} das Signal von chemisorbiertem CO [172–175] beobachtet wurde.

Der einzige Unterschied, der zwischen flacher Goldoberfläche und Nanoantennen verbleibt, ist die Verteilung der mittels IR-Strahlung zugeführten Energie. Während sich diese bei der flachen Goldoberfläche gleichmäßig verteilt, wird sie bei den Antennen auf ein kleines Volumen konzentriert. Es kann gezeigt werden, dass sowohl die Erwärmung der Antennen durch die absorbierte Strahlung als auch die Photonen-induzierte Desorption von CO-Molekülen bei den durchgeführten Experimenten keinen nennenswerten Beitrag zum Schichtwachstum auf den Antennen liefert. Die detaillierte Argumentation der Abschätzung ist in Anhang A.4 zu finden.

Mit einer Erklärung des beobachteten Verhaltens über die Abwesenheit von CO-Molekülen kann außerdem das plötzlich auftretende Signal nach 8 \AA CO-Schichtdicke nicht erklärt werden. Man könnte versuchen ein Szenario zu konstruieren in dem nicht die Photodesorption sondern die durch Photonen aktivierte Oberflächendiffusion für das Fehlen von adsorbierten CO-Molekülen in den *Hotspots* verantwortlich ist. Dann könnte argumentiert werden, dass nach 8 \AA alle Plätze für die aus den *Hotspots* diffundierenden CO-Moleküle besetzt sind und somit der Prozess gestoppt wird. Aber auch bei der Diffusion gilt trotz niedrigerer Aktivierungsenergie, dass CO nur im Bereich der Schwingungsbande absorbiert (vergleiche Anhang A.4) und somit auch in diesem Fall die Anzahl der Photonen nicht ausreicht einen nennenswerten Teil der CO-Moleküle über die Diffusionsbarriere anzuregen.

Es sei angemerkt, dass die Rolle der in Abbildung 6.3.1 beobachteten Veränderung der Dämpfung der CO-Schwingung ungeklärt bleibt.

6.8 Signalverstärkung und Nahfeldverteilung

Um den Unterschied zwischen I_{ant} und I_{flat} zu verdeutlichen ist in Abbildung 6.8.1a der Quotient $I_{\text{ant}}/I_{\text{flat}}$ dargestellt. Zusätzlich ist der *Fit* einer einfachen Monopolnäherung, welche weiter unten erklärt wird, dargestellt. Die verwendete Funktion (6.8.1) wurde an die Datenpunkte oberhalb von 15 \AA *gefittet* und stellt den nach der klassischen Elektrodynamik zu erwartenden Verlauf des Quotienten dar.

Dieses Signal entspricht jedoch nicht dem Verlauf des Nahfelds, denn I_{ant} und I_{flat} geben jeweils das Signal der gesamten CO-Schicht an, also integriert über alle darunterliegenden Schichten. Dies muss bei der Formulierung der *Fit*-Funktion beachtet werden, welche im Folgenden erklärt wird.

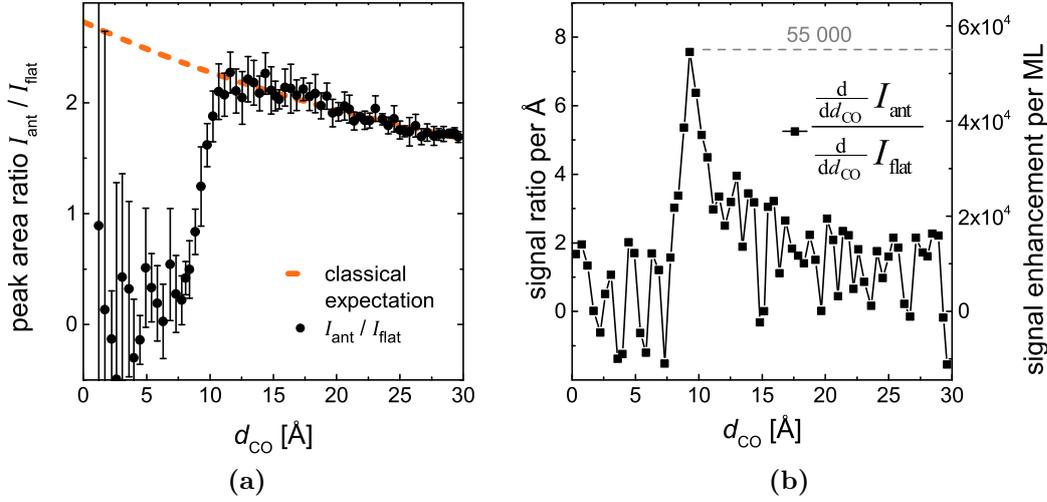


Abbildung 6.8.1: Der Quotient $I_{\text{ant}}/I_{\text{flat}}$ ist zusammen mit dem *Fit* von Gleichung (6.8.1) an die Datenpunkte oberhalb von 15 \AA in (a) gegeben. Die *Fit*-Funktion beschreibt das klassische Verhalten einer Punktladung. In (b) ist der Quotient der Ableitungen von I_{ant} und I_{flat} nach d_{CO} gegeben. Dieser ist proportional zur Verstärkung des CO-Signals im jeweiligen Abstand von der Oberfläche und kann auf die Dicke der Monolage normiert werden (rechte Ordinate). [162]

Klassisches Modell

Für die Reflexionsmessung kann man ein konstantes elektrisches Feld an der Oberfläche annehmen. Daraus folgt, dass in jedem Abstand \tilde{d} das IR-Signal proportional zur einfallenden Intensität ist: $I_{\text{IR}} = a \cdot I_0$. Integriert man über alle IR-Signale von null bis d_{CO} , so erhält man $I_{\text{flat}} = \int_0^{d_{\text{CO}}} I_{\text{IR}} d\tilde{d} = a I_0 d_{\text{CO}}$. Damit entspricht a der Steigung von I_{flat} in Abbildung 6.6.1.

Aufgrund der Länge der Antenne, nimmt man an, dass das Nahfeld an einem Antennenende hauptsächlich durch die dort angesammelten Ladungsträger hervorgerufen wird. Das Nahfeld verhält sich folglich wie das Coulomb-Feld einer Punktladung am Ort d_0 . Dies wurde auch in [187] angenommen. Die Feldstärke E im Abstand \tilde{d} ist dann gegeben durch $E(\tilde{d}) = \bar{A} \cdot (\tilde{d} - d_0)^{-2}$, wobei im Parameter \bar{A} die Ladung und die Proportionalitätskonstanten enthalten sind. Nahe an der Oberfläche, von der aus gesehen sich die Ladungsträger nicht wie eine Punktladung verhalten, sondern deren räumliche Verteilung aufgelöst werden kann, ist dieses Modell sicherlich nur näherungsweise zutreffend, soll aber der Einfachheit halber hier für die Diskussion genügen. Das von den Molekülen in Abstand \tilde{d} absorbierte Licht ist proportional zur dort herrschenden lokalen Intensität. Da man die exakte Ladungsdichte nicht kennt, fasst man alle Proportionalitätskonstanten in A' zusammen. Wegen $I \propto E^2$ ergibt sich

$I_{\text{SEIRA}} = A' \cdot (\tilde{d} - d_0)^{-4} \cdot I_0$. Durch Integration über die gesamte Schichtdicke d_{CO} erhält man $I_{\text{ant}} = \int_0^{d_{\text{CO}}} I_{\text{SEIRA}} d\tilde{d} = A' \frac{1}{3} \left((d_{\text{CO}} - d_0)^{-3} + d_0^{-3} \right) I_0$. Der Quotient ergibt sich dann zu

$$\frac{I_{\text{ant}}}{I_{\text{flat}}} = -A \frac{\left((d_{\text{CO}} - d_0)^{-3} + d_0^{-3} \right)}{d}, \quad (6.8.1)$$

wobei alle Konstanten in A zusammengefasst wurden. Der *Fit* dieser Funktion an die Messdaten ergibt $d_0 = -103 \text{ \AA}$ und ist in Abbildung 6.8.1a gestrichelt eingezeichnet.

Nimmt man wie in [162] an, dass das IR-Signal proportional zur vierten Potenz des lokalen E-Felds ist [99], so müssen lediglich die Exponenten in Gleichung (6.8.1) durch -7 ersetzt werden. Der damit erhaltene *Fit* liegt innerhalb der in Abbildung 6.8.1a verwendeten Breite der Linie (vergleiche [162]). Rückschlüsse auf den Mechanismus der Signalverstärkung (E^2 oder E^4) sind mit diesen Messungen daher nicht möglich.

Signalverstärkung als Funktion des Abstands

Zur Abschätzung der Signalverstärkung in einem bestimmten Abstand von der Oberfläche muss die Ableitungen von I_{ant} und I_{flat} nach d_{CO} betrachtet werden. Diese geben genau das Signal für das letzte hinzugekommene Angström der Schicht an. In Abbildung 6.8.1b ist der Quotient beider Ableitungen gegeben. Um die ohnehin sehr großen Fehler, die bei der Bildung des Differenzenquotienten fehlerbehafteter Daten zwangsweise entstehen, gering zu halten, wurde statt der Ableitung von I_{flat} die in Abbildung 6.3.2a bestimmte Steigung von 0,0098 verwendet. Für bessere Übersichtlichkeit sind keine Fehler in Abbildung 6.8.1b angegeben. Vielmehr sollte die Fluktuation der Datenpunkte als Ungenauigkeit der Ableitung verstanden werden.

Das in Abbildung 6.8.1b dargestellte Verhältnis entspricht der messbaren Verstärkung EF_{meas} des CO-Signals einer 1 \AA dicken CO-Schicht im Abstand d von der Oberfläche. Da CO-Eis einen Netzebenenabstand von $1,6 \text{ \AA}$ aufweist, ist eine Angabe des Verstärkungsfaktors je Monolage jedoch aussagekräftiger. Diese erhält man durch Multiplikation von EF_{meas} mit 1,6. Wie in Abschnitt 2.7.1 erklärt, muss dieser Verstärkungsfaktor noch mit $EF_{\text{geo}} = \frac{9.18 \cdot 10^6 \text{ nm}^2}{2 \cdot 10^4 \text{ nm}^2}$ und $EF_{\text{IRRAS}} \approx 10$ multipliziert werden um den Verstärkungsfaktor je Monolage im *Hotspot* der Antenne zu erhalten.⁴ Die errechnete Verstärkung ist auf der rechten Ordinate in Abbildung 6.8.1b gegeben. Man sieht, dass die Monolage im Abstand von ungefähr 10 \AA die maximale Verstärkung von etwa 55000 erfährt.

⁴Der Vergleich zur Transmissionsmessung in Abbildung 6.3.2 ist nicht möglich, da diese unter 45° Einfallswinkel gemessen wurde.

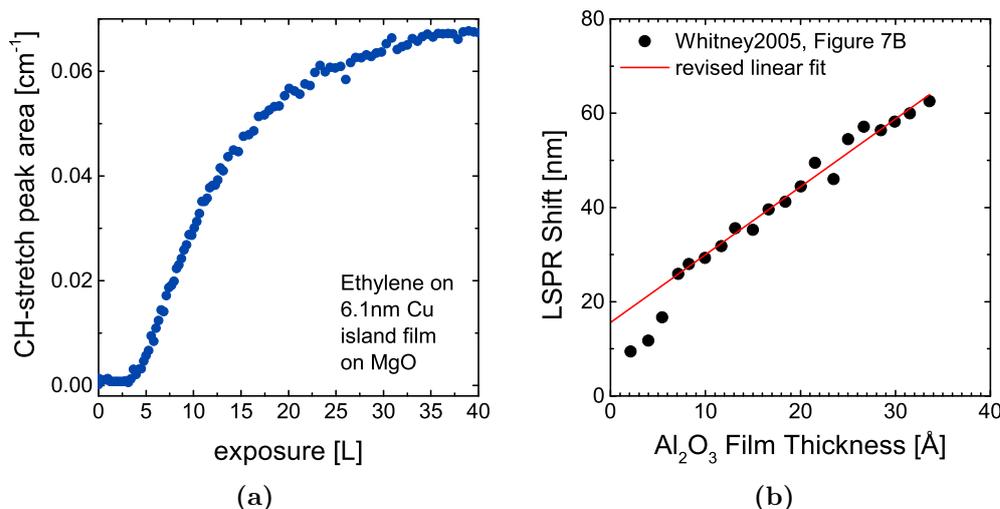


Abbildung 6.9.1: In (a) ist die *Peak*-Fläche der CH-Streckschwingung bei 2973 cm^{-1} von Ethen, das bei etwa 75 K auf einem Kupfer-Insellfilm auf MgO adsorbiert ist, über der Dosis aufgetragen [188]. In (b) ist die Verschiebung der LSPR-Resonanz ungefähr 100 nm großer Ag-Dreiecke über der Schichtdicke von darauf aufgewachsenem Al_2O_3 aufgetragen. Die Datenpunkte sind aus Abbildung 7B aus [36] reproduziert und der lineare *Fit* an die Datenpunkte oberhalb von 7 \AA ist gegeben.

6.9 Vergleich mit anderen Messungen

Neben dem hier berichteten Verhalten von CO auf Goldantennen konnte in der Literatur und unveröffentlichten Messungen aus dem Jahr 2001 ein sehr ähnliches Verhalten auch für andere Adsorbate auf anderen plasmonischen Oberflächen gefunden werden. Die Abweichung für angströmskalige Schichten wurde jedoch entweder nicht beachtet oder konnte nicht erklärt werden. Die Messergebnisse können auch für diese Systeme über die Nahfeldabschwächung, bedingt durch den *Spillover* der Wellenfunktion der Elektronen, interpretiert werden.

Es handelt sich dabei um Adsorptionsexperimente von Ethen ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$) auf Kupferinsellfilmen die 2001 von M. SINTHER in der Gruppe von A. PUCCI durchgeführt wurden. Die Kupferinsellfilme wurden durch aufdampfen von Cu mit einer äquivalenten Schichtdicke von $6,1\text{ nm}$ auf einer $\text{MgO}(001)$ -Oberfläche hergestellt [188]. Metallinsellfilme weisen analog zu Nanoantennen LSP-Resonanzen auf. Durch die kleineren und variierenden Ausdehnungen der Inseln liegt die LSPR im sichtbaren Spektralbereich, hat aber Ausläufer bis ins IR, die dort analog zu Nanoantennen für verstärkte Vibrationssignale sorgen können. Die Probe wurde auf ungefähr 75 K abgekühlt und einem Ethen-Partialdruck von $3 \cdot 10^{-8}\text{ mbar}$ ausgesetzt. In Abbildung 6.9.1a ist die *Peak*-Fläche der CH-Streckschwingung (ν_{11}) über der Dosis aufgetragen. Unterhalb von 4 L ist kein Signal von Ethen

zu sehen. In erster Näherung kann durch die etwas größere Ausdehnung von Ethen im Vergleich zu CO ein kleinerer Umrechnungsfaktor $\xi^{\text{C}_2\text{H}_4} < \xi^{\text{CO}} = 1,3$ angenommen werden, so dass 4L einer Schichtdicke von mehr als $d_{\text{C}_2\text{H}_4} > 3 \text{ \AA}$ entsprechen. Die anderen IR-aktiven Banden zeigen dasselbe Verhalten [188]. Auch bei Cu auf KBr ist dieser Effekt zu beobachten [188].

Ein anderes experimentelles Ergebnis, das auf den *Spillout* von Elektronen zurückgeführt werden kann, ist in [36] veröffentlicht. Im Gegensatz zum zuvor erläuterten System wurden in [36] keine IR-Absorptionsbanden von dünnen Adsorbatschichten untersucht, sondern die Verschiebung der LSPR-Frequenz beobachtet. Lithographisch hergestellte Ag-Nanodreiecke mit Abmessungen von $100 \times 90 \times 30 \text{ nm}^3$ und LSPR-Wellenlängen von $\lambda_{\text{res}} \approx 550 \text{ nm}$ wurden durch *Atomic Layer Deposition* (ALD) mit dünnen Schichten von Al_2O_3 überzogen. Durch die geänderte Polarisierbarkeit der Antennenumgebung erfährt die LSPR eine Rotverschiebung, welche in Abbildung 6.9.1b über der Schichtdicke aufgetragen ist. Der von den Autoren behauptete lineare Zusammenhang zwischen Verschiebung und Schichtdicke tritt jedoch erst oberhalb von 7 \AA auf, darunter fällt die Verschiebung deutlich kleiner aus. Dieser Effekt ist, wie in [41] erläutert, für die Nanopartikel mit dem größten Aspektverhältnis (in Abbildung 6.9.1b gezeigt) am stärksten ausgeprägt, bei dickeren Dreiecken jedoch auch zu erkennen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich der in den Daten von SINTHER *et al.* [188] gefundene Verlauf sehr ähnlich wie der Verlauf der CO-Schwingungsbande I_{ant} verhält. In beiden Fällen handelt es sich um IR-Banden, wobei sich die plasmonischen Proben sowohl in Struktur als auch im Material unterscheiden. Der von WHITNEY *et al.* [36] gefundene Verlauf verhält sich sehr ähnlich wie die Verschiebung der Antennenresonanz $\Delta\omega_{\text{res}}$, wobei sich ebenfalls Struktur und Material der Nanopartikel und außerdem deren plasmonisch resonanter Spektralbereich unterscheiden. Eine gleichzeitige Betrachtung der schichtdickenabhängigen Verschiebung von I_{ant} und $\Delta\omega_{\text{res}}$ ist jedoch nur mit den in dieser Arbeit untersuchten Nanoantennen möglich.

Im Gegensatz dazu zeigen SERS Messungen, die unterschiedlich dicke Abstandsschichten zwischen der plasmonischen Oberfläche und des Raman-aktiven Moleküls verwenden, ein zur Oberfläche hin monoton wachsendes Signal [38, 39]. Anders als bei den zuvor berichteten Experimenten, handelt es sich bei den hier verwendeten SERS-Substraten jedoch nicht um getrennte Nanopartikel sondern um raue, durchgängige Oberflächen. Analog zur Diskussion des Unterschieds zwischen IRRAS-Messung und Antennen-Messung in Abschnitt 6.7 kann auch hier argumentiert werden, dass der *Spillout* nur bei resonant angeregten Nanopartikeln mit hohem Aspektverhältnis so groß ist, dass er durch diese Art von Experiment gemessen werden kann.

Zusammenfassung

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass das Vibrationssignal von sehr dünnen CO-Schichten nicht durch Nanoantennen verstärkt wird. Außerdem ist eine Verschiebung der LSPR-Frequenz nicht zu erkennen. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die CO-Schicht bis zu einer Dicke von 8 Å im abgeschwächten Nahfeld der Antennen befindet. Die Abschwächung konnte dem Elektronen-*Spillout* bei plasmonischer Anregung zugeschrieben werden. Alternative Erklärungen wurden ausgeschlossen. Der gleiche Effekt konnte auch in anderen Messungen in der Literatur gefunden werden.

7 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kombinierbarkeit von SERS und SEIRS an einer Nanoantenne, die Detektion von Proteinen mittels SERS und SEIRS und der Signalverlauf anntennenverstärkter IR-Signale für angströmskalige Abstände von der Oberfläche untersucht. Die drei Themen sollen in den folgenden Abschnitten einzeln zusammengefasst werden. Zudem wird für jedes Experiment ein Ausblick gegeben.

SERS und SEIRS an einer Nanoantenne

Es wurde gezeigt, dass SERS und SEIRS an einer Nanoantenne möglich sind. Die simultane Verstärkung von sichtbarer und IR-Strahlung wurde dadurch erreicht, dass je nach Polarisation die LSPR entlang der kurzen oder langen Antennenachse angeregt wurde. Wobei die transversale Mode resonant im Sichtbaren ist und daher für SERS verwendet wird, während die longitudinale Anregung bei SEIRS Anwendung findet. Bedingt durch die unterschiedlichen Auswahlregeln für Ramanstreuung und IR-Absorption lassen sich durch die Kombination von SERS und SEIRS komplementäre Informationen der Adsorbatvibrationen messen.

Die IR-Signale des Adsorbatmoleküls *Methylene Blue* wurden durch die Antenne bis zu 650 000fach verstärkt. Dies ist einer der größten je gemessenen Verstärkungsfaktoren für SEIRS, könnte aber aufgrund der Degradierung des MB-Moleküls zu groß abgeschätzt sein. Im Gegensatz dazu betrug der Verstärkungsfaktor für SERS 400. Dies ist auf die schwache Fokussierung des Nahfelds bei transversaler Anregung zurückzuführen.

Es wurde demonstriert, dass je nach Länge der Nanoantenne IR-Schwingungen in verschiedenen Spektralbereichen verstärkt werden. Zur Extraktion der Schwingungsbanden aus den gemessenen Spektren wurden Methoden zur Basislinienkorrektur und die Verwendung der zweiten Ableitung vorgestellt und miteinander verglichen.

Ausblick

Um den SERS-Verstärkungsfaktor zu verbessern, könnten neben der IR-Antenne separate Nanoantennen, die wie in Kapitel 5 für SERS optimiert sind, hergestellt werden. Da beide Arten von Antennen nicht mit der Strahlung der jeweils anderen Wellenlänge wechselwirken (vergleiche Abbildung 3.2.1), beeinflussen sich diese

nicht gegenseitig, so dass beide Arten von Antennen dicht nebeneinander auf dem Substrat angebracht werden könnten.

Während die relativ geringe Verstärkung im durchgeführten Versuch bei SERS bis zu einem gewissen Maße durch eine Erhöhung der Laserintensität kompensierbar war, ist dies bei SEIRS aufgrund der heute üblichen IR-Strahlungsquelle (Global) nicht möglich. Für ein vernünftiges Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei vertretbarer Messdauer wurde daher an vielen Nanoantennen gleichzeitig gemessen. Der Schluss, dass SERS und SEIRS an einer Einzelantenne möglich wären, ist dennoch gerechtfertigt, da die Wechselwirkung zwischen den Antennen gering einzustufen ist. Für die Messung an Einzelantennen ist es möglich Synchrotronstrahlquellen zu nutzen. Diese haben eine etwa drei Größenordnungen höhere Intensität. Da Strahlzeit an diesen Einrichtungen nur begrenzt zur Verfügung steht, ist Synchrotronstrahlung nicht praktikabel für eine Anwendung von nanoantennenverstärkter IR-Spektroskopie, beispielsweise in Krankenhäusern. Die Fortschritte bei der Entwicklung neuer Quantenkaskadenlaser [189] sind jedoch beachtlich. Es handelt sich dabei um Laser deren Wellenlänge im IR-Spektralbereich über mehrere hundert Wellenzahlen durchstimmbare ist. So könnte es in Zukunft möglich sein, die Intensität der IR-Lichtquelle um weitere fünf Größenordnungen gegenüber der Synchrotronstrahlung zu steigern [190]. Bedingt durch die schmale Bandbreite des Lasers kann zusätzlich auf den FTIR-Aufbau verzichtet werden, so dass eine Implementierung in einem tragbaren Gerät denkbar wäre. Eine Messung an Einzelantennen sollte damit kein Problem darstellen.

Es sei an dieser Stelle kritisch angemerkt, dass die tatsächlich gemessene Verstärkung des IR-Signals EF_{meas} nur ungefähr zehn beträgt. Die Verstärkungsfaktoren von mehreren hunderttausend werden hauptsächlich durch die Annahme errechnet, dass nur die Moleküle an den Antennenenden zum Signal beitragen. Da Moleküle jedoch auf der gesamten Antenne und eventuell sogar auf dem Substrat adsorbieren, ist der errechnete Verstärkungsfaktor nur ein theoretischer Wert. Durch die Entwicklung gezielter Abdeckungsverfahren der Antennen (siehe z.B. Abdeckung durch PMMA in [57]) und die Weiterentwicklung von mikro- oder nanofluidischen *Chips* [191], kann es möglich werden kleinste Mengen an Molekülen tatsächlich nur in den *Hotspots* der Antennen zu deponieren. Durch den Einsatz dieser Techniken gewinnt die Möglichkeit SERS und SEIRS an einer einzelnen oder sehr wenigen, räumlich begrenzt angeordneten, Nanostrukturen durchzuführen an Attraktivität.

Nanoantennenverstärkte IR-Spektroskopie von Proteinen

Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass es möglich ist Proteine auf Nanoantennen mittels IR-Spektroskopie nachzuweisen. Bei einer 15-minütigen Inkubation war der Nachweis von unspezifisch gebundenen Proteinen ab einer Konzentration von 10^{-7} M möglich. Die Angabe des Detektionslimits in Form

einer Konzentration ist in den Lebenswissenschaften weit verbreitet. Da die Amid-Banden der Proteine proportional zur Anzahl der Peptidbindungen sind, ist eine solche Angabe immer im Zusammenhang mit der Proteinmasse, der Inkubationsdauer und den Transportbedingungen innerhalb der Lösung während der Inkubation zu sehen. Besteht beispielsweise ein stetiger Fluss der Lösung über die Nanoantennen, so werden mehr Proteine auf die Antennenoberfläche treffen als wenn die Lösung nur aufgrund der Diffusion durchmischt wird.

Die Extraktion der Amid-Banden, anhand derer auf die Sekundärstruktur der Proteine geschlossen werden kann und durch welche die Proteine zumindest teilweise identifiziert werden können, stellte sich als nicht trivial heraus. Durch die Wechselwirkung mit den Nanoantennen verbreitern sich die ohnehin schon breiten Amid-Banden noch weiter. Durch die Fano-artige Linienform wird eine genaue Extraktion der Schwingungsbanden mittels Basislinienkorrektur oder der zweiten Ableitung des Spektrums aufwendiger. Es konnte dennoch gezeigt werden, dass sich nahe der LSPR-Frequenz, bei der die Fano-Linien nahezu symmetrisch sind, die Signatur der α -Helix von der des β -Faltblatts unterscheiden lassen.

Beim Versuch die Nanoantennen zu funktionalisieren konnte das Aptamer mittels IR-Spektroskopie nicht nachgewiesen werden. Durch die Messung von SERS Spektren an derselben Probe wurde die Anwesenheit der Aptamere jedoch nachgewiesen. Nach dem Blocken unspezifischer Adsorptionsplätze konnten die *Target*-Proteine bei einer einstündigen Inkubation ab einer Konzentration von 10 μM detektiert werden. Der Unterschied zum Detektionslimit für unspezifisch gebundene Proteine auf unbehandelten Nanoantennen lässt sich über die Anwesenheit der Blocker-Moleküle erklären.

Jedoch konnten auch bei den negativen Kontrollversuchen adsorbierte Proteine nachgewiesen werden. Daraus wird geschlossen, dass Proteine unspezifisch an die Antennenoberfläche binden und somit eine selektive Detektion eines speziellen Proteins unmöglich machen. Dies war auch beim Versuch das *Target*-Protein aus Speichel von Patienten zu detektieren der Fall. Trotz gescheiterter Unterdrückung der unspezifischen Bindung konnte anhand der IR-Signatur der adsorbierten Proteine festgestellt werden, dass diese eine andere Sekundärstruktur als das *Target*-Protein aufweisen.

Der Grund für die unspezifische Bindung liegt vermutlich im Reinigungsschritt nach der Inkubation, welcher aus Waschen der Proben in Wasser bestand. Bei ELISA oder QCM werden Detergenzien eingesetzt, die eine Ablösung der unspezifisch gebundenen Proteine erleichtern, sich ihrerseits jedoch auf allen Oberflächen absetzen. Aufgrund des IR- und Raman-Signals der Detergenzien wurde daher im Zuge dieser Arbeit auf deren Einsatz verzichtet. Eine genauere Untersuchung dieses Sachverhalts scheint aus jetziger Perspektive lohnenswert.

Ein grundlegendes Problem bei den in dieser Arbeit berichteten Protein-Experimenten ist die Notwendigkeit der Messung im trockenen Zustand. Dies hat zur Folge, dass im letzten Waschen vor der Messung nicht mit Pufferlösung gespült

7 Zusammenfassung und Ausblick

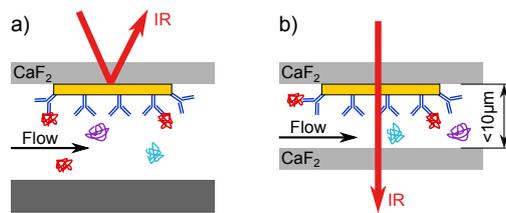


Abbildung 7.0.1: Schematische Darstellung von Durchflusszellen. In (a) wird das reflektierte Licht detektiert, in (b) das transmittierte. Wegen der starken Absorption von Wasser darf die Dicke der Flüssigkeit in (b) $10 \mu\text{m}$ nicht überschreiten.

werden kann, da die Salze dieser Lösungen bei der Trocknung kristallisieren und so eine Messung unmöglich machen. Es ist nicht klar, ob die spezifische Bindung zwischen Aptamer und *Target*-Protein durch den Trocknungsprozess beeinflusst wird.

Ausblick

Bei einige Messmethoden zum Proteinnachweis (z.B. QCM-Methode) wird innerhalb einer Flüssigkeitszelle gemessen. Die Goldoberfläche muss dabei nie getrocknet werden, da die Messungen *in situ* durchgeführt werden. Eine Denaturierung der Proteine durch Trocknung kann damit ausgeschlossen werden.

Bei IR-Messungen innerhalb einer Flüssigkeitszelle stellt die hohe Absorption von Wasser jedoch ein grundlegendes Problem dar (vergleiche Abschnitt 4.3.2). Durch spezielle Messgeometrien muss die optische Weglänge des IR-Strahls in Wasser so gering wie möglich gehalten werden.

Andererseits bieten *in situ* Messverfahren für antennenverstärkte IR-Spektroskopie auch Vorteile. Es wird ermöglicht, dass ohne Verschiebung der Nanoantennen immer an derselben Stelle gemessen werden kann. Änderungen im Spektrum sind folglich auch bei nicht perfekt homogenen Nanoantennenarrays nur auf die Änderungen in der Antennenumgebung zurückzuführen. Zudem erlangt man durch *in situ* Messungen bei geeigneter zeitlicher Auflösung Aufschluss über die Adsorptionskinetik.

Unter Berücksichtigung der beschriebenen Vor- und Nachteile wurde vom Autor im Zuge dieser Arbeit eine Reflexions-Durchflusszelle konstruiert, deren Funktionsweise in Abbildung 7.0.1a schematisch dargestellt wird. Der Aufbau ist in der vom Autor betreuten Bachelorarbeit von JOHANNES ZIMMERMANN [192] und der Masterarbeit von ROBERT WOLKE [193] näher erklärt. Vorteil dieser Messgeometrie ist es, dass die Nanoantennen durch das Substrat hindurch angeregt werden und so das IR-Licht nicht durch Wasser abgeschwächt wird. Bei den Messungen wurden nur ungefähr 2% der einfallenden Strahlung von den Antennen der Probe S08#3 zurück gestreut, wodurch bei angemessener Messdauer das Protein-Signal im Rauschen unterging. Neueste Messungen an dichteren Antennenarrays zeigen jedoch, dass bis zu 85% der Strahlung von den Antennen durch das Substrat hindurch zurückgestreut werden können. Mit solchen Proben

erscheinen die Messungen in dieser Zelle wieder sehr aussichtsreich. Allerdings wurde erst kürzlich eine ähnliche Arbeit veröffentlicht [194].

Ein alternativer Ansatz wurde von ROBERT WOLKE verfolgt, der in Zusammenarbeit mit dem Autor eine Transmissions-Durchflusszelle entwickelt hat, deren schematische Darstellung in Abbildung 7.0.1b zu finden ist. Hierbei konnte die Dicke des Flüssigkeitskanals durch die Verwendung eines Photolacks auf wenige Mikrometer reduziert werden. Auf der Rückseite des Kanals befindet sich eine zweiter CaF_2 -Wafer, so dass in Transmission gemessen werden kann. Testmessungen der mit Wasser befüllten Transmissions-Durchflusszelle lieferten vielversprechende Ergebnisse.

Mit dieser Technik könnte die Verwendung von schaltbaren mikrofluidischen *Chips* [195] es ermöglichen, verschiedene Antennenarrays oder Einzelantennen auf einer Probe unterschiedlich zu funktionalisieren. Damit wäre es möglich mehrere verschiedene Proteine in einem Test nachzuweisen.

Nahfeldverlauf resonanter Nanoantennen

Zu guter Letzt wurde in der vorliegenden Arbeit der Verlauf des antennenverstärkten Vibrationssignals für sehr kleine Abstände von der Antennenoberfläche untersucht. Dies wurde durch die Adsorption von CO auf gekühlten Nanoantennen realisiert. Es wurde gezeigt, dass sowohl die Verschiebung der LSPR-Frequenz als auch das antennenverstärkte CO-Vibrationssignal erst ab einer Schichtdicke von ungefähr 8 \AA nachweisbar sind. Eine verzögerte Adsorption konnte durch Vergleichsmessungen an glatten Goldoberflächen ausgeschlossen werden. Ebenso sind die Desorption und Diffusion als Ursache für das gemessene Verhalten als nicht relevant abgeschätzt worden. Der Verlauf des Signals wurde über das Profil des Nahfelds der Nanoantenne erklärt, welches durch den *Spillout* der Leitungsbandelektronen in unmittelbarer Nähe der Oberfläche abgeschwächt wird.

Der berichtete Verlauf wurde neben den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen auch in den Messdaten anderer Arbeiten [36, 196] beobachtet. Deren Autoren waren jedoch nicht auf diese Auffälligkeit eingegangen.

Der Spillout von Elektronen bei plasmonischer Anregung von Nanopartikeln und der messbare Einfluss auf deren optische Eigenschaften wurde inzwischen in einem anderen Experiment von SAVAGE *et al.* gezeigt. Dabei wurde die Beeinflussung der LSPR-Frequenz von zwei gekoppelten Nanoantennen durch den Tunnelstrom zwischen beiden Antennen untersucht [197]. Es konnte eine Abweichung von dem durch klassische Elektrodynamik vorhergesagten Verlauf der LSPR-Verschiebung bei einem Abstand unterhalb von ungefähr 3 \AA gemessen werden.

Ausblick

Vor allem im Hinblick auf Fragestellungen der Oberflächenphysik mit Adsorbaten sind diese Ergebnisse von Interesse. Es bleibt zu klären, welchen Einfluss die plasmonisch angeregten Elektronen des Metalls auf die CO-Moleküle haben, die sich innerhalb des Elektronen-*Spillouts* befinden. Andererseits ist nicht geklärt, welchen Effekt die Moleküle ihrerseits auf den *Spillout* der Elektronen haben. Schlussendlich bleibt zu sagen, dass der hier beobachtete Effekt für größere Moleküle (z.B. *Methylene Blue* oder Proteine) aufgrund ihrer Ausdehnung nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Literaturverzeichnis

- [1] KIRCHHOFF, G. und R. BUNSEN: *Chemische Analyse durch Spectralbeobachtungen*. Annalen der Physik, 186(6):161–189, 1860.
- [2] IBACH, HARALD und DOUGLAS L. MILLS: *Electron energy loss spectroscopy and surface vibrations*. Academic Press, New York [u.a.], 1982.
- [3] RAMAN, C.V. und K.S. KRISHNAN: *A New Type of Secondary Radiation*. Nature, 121:501–502, Feb. 1928.
- [4] NICHOLS, ERNEST F.: *A Study of the Transmission Spectra of Certain Substances in the Infra-Red*. Phys. Rev. (Series I), 1:1–18, Jul 1893.
- [5] FLEISCHMANN, M., P.J. HENDRA und A.J. MCQUILLAN: *Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode*. Chemical Physics Letters, 26(2):163 – 166, 1974.
- [6] 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(3):201–204, Jul 1980.
- [7] MAIER, STEFAN A: *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. Springer US ; Springer Verlag, Boston, MA, 1st ed. Auflage, 2007.
- [8] NOVOTNY, LUKAS und NIEK VAN HULST: *Antennas for light*. Nat Photon, 5(2):83–90, Februar 2011.
- [9] WANG, HUI, CARLY S. LEVIN und NAOMI J. HALAS: *Nanosphere Arrays with Controlled Sub-10-nm Gaps as Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates*. Journal of the American Chemical Society, 127(43):14992–14993, 2005.
- [10] GUILLOT, N., H. SHEN, B. FREMAUX, O. PERON, E. RINNERT, T. TOURY und M. LAMY DE LA CHAPELLE: *Surface enhanced Raman scattering optimization of gold nanocylinder arrays: Influence of the localized surface plasmon resonance and excitation wavelength*. Applied Physics Letters, 97(2):023113, 2010.

- [11] JÄCKEL, F., A.A. KINKHABWALA und W.E. MOERNER: *Gold bowtie nanoantennas for surface-enhanced Raman scattering under controlled electrochemical potential*. Chemical Physics Letters, 446(4-6):339 – 343, 2007.
- [12] NEUBRECH, FRANK, ANNEMARIE PUCCI, THOMAS WALTER CORNELIUS, SHAFQAT KARIM, AITZOL GARCIA-ETXARRI und JAVIER AIZPURUA: *Resonant Plasmonic and Vibrational Coupling in a Tailored Nanoantenna for Infrared Detection*. Phys. Rev. Lett., 101(15):157403, 2008.
- [13] LE RU, E. C., E. BLACKIE, M. MEYER und P. G. ETCHEGOIN: *Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study*. The Journal of Physical Chemistry C, 111(37):13794–13803, 2007.
- [14] KNEIPP, KATRIN, YANG WANG, HARALD KNEIPP, LEV T. PERELMAN, IRVING ITZKAN, RAMACHANDRA R. DASARI und MICHAEL S. FELD: *Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)*. Phys. Rev. Lett., 78:1667–1670, Mar 1997.
- [15] NIE, SHUMING und STEVEN R. EMORY: *Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering*. Science, 275(5303):1102–1106, 1997.
- [16] ADATO, RONEN, AHMET A. YANIK, JASON J. AMSDEN, DAVID L. KAPLAN, FIORENZO G. OMENETTO, MI K. HONG, SHYAMSUNDER ERRAMILI und HATICE ALTUG: *Ultra-sensitive vibrational spectroscopy of protein monolayers with plasmonic nanoantenna arrays*. Proc. Natl. Acad. Sci., 106(46):19227–19232, 2009.
- [17] D'ANDREA, CRISTIANO, JÖRG BOCHTERLE, ANDREA TOMA, CHRISTIAN HUCK, FRANK NEUBRECH, ELENA MESSINA, BARBARA FAZIO, ONOFRIO M MARAGO, ENZO DI FABRIZIO, MARC LAMY DE LA CHAPELLE, PIETRO GIUSEPPE GUCCIARDI und ANNEMARIE PUCCI: *Optical Nanoantennas for Multiband Surface-Enhanced Infrared and Raman Spectroscopy*. ACS Nano, 7(4):3522–3531, 2013.
- [18] WANG, YULING, KYUWAN LEE und JOSEPH IRUDAYARAJ: *Silver Nanosphere SERS Probes for Sensitive Identification of Pathogens*. J. Phys. Chem. C, 114(39):16122–16128, 2010.
- [19] HALVORSON, REBECCA A. und PETER J. VIKESLAND: *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for Environmental Analyses*. Environ. Sci. Technol., 44(20):7749–7755, 2010.

- [20] SYLVIA, JAMES M., JAMES A. JANNI, J. D. KLEIN und KEVIN M. SPENCER: *Surface-Enhanced Raman Detection of 2,4-Dinitrotoluene Impurity Vapor as a Marker To Locate Landmines*. *Anal. Chem.*, 72(23):5834–5840, 2000.
- [21] VITOL, ELINA A., ZULFIYA ORYNBAYEVA, MICHAEL J. BOUCHARD, JANE AZIZKHAN-CLIFFORD, GARY FRIEDMAN und YURY GOGOTSI: *In Situ Intracellular Spectroscopy with Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)-Enabled Nanopipettes*. *ACS Nano*, 3(11):3529–3536, 2009.
- [22] YANIK, AHMET A., MIN HUANG, OSAMI KAMOHARA, ALP ARTAR, THOMAS W. GEISBERT, JOHN H. CONNOR und HATICE ALTUG: *An Optofluidic Nanoplasmonic Biosensor for Direct Detection of Live Viruses from Biological Media*. *Nano Letters*, 10(12):4962–4969, 2010.
- [23] ISOLA, NARAYANA R., DAVID L. STOKES und TUAN VO-DINH: *Surface-Enhanced Raman Gene Probe for HIV Detection*. *Anal. Chem.*, 70(7):1352–1356, 1998.
- [24] LEVIN, CARLY S., JANARDAN KUNDU, BENJAMIN G. JANESKO, GUSTAVO E. SCUSERIA, ROBERT M. RAPHAEL und NAOMI J. HALAS: *Interactions of Ibuprofen with Hybrid Lipid Bilayers Probed by Complementary Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopies*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(45):14168–14175, 2008. PMID: 18942873.
- [25] SMITH, MERRITT, KAITLYN STAMBAUGH, LAUREN SMITH, HYE-JIN SON, AMANDA GARDNER, SCOTT CORDOVA, KRYSTAL POSEY, DONALD PERRY und ALEXANDRU S. BIRIS: *Surface-enhanced vibrational investigation of adsorbed analgesics*. *Vibrational Spectroscopy*, 49(2):288 – 297, 2009.
- [26] LE, FEI, DANIEL W. BRANDL, YAROSLAV A. URZHUMOV, HUI WANG, JANARDAN KUNDU, NAOMI J. HALAS, JAVIER AIZPURUA und PETER NORDLANDER: *Metallic Nanoparticle Arrays: A Common Substrate for Both Surface-Enhanced Raman Scattering and Surface-Enhanced Infrared Absorption*. *ACS Nano*, 2(4):707–718, 2008.
- [27] LAL, SURBHI, NATHANIEL K. GRADY, JANARDAN KUNDU, CARLY S. LEVIN, J. BRITT LASSITER und NAOMI J. HALAS: *Tailoring plasmonic substrates for surface enhanced spectroscopies*. *Chem. Soc. Rev.*, 37:898–911, 2008.
- [28] COBBS, CHARLES S., DANIEL S. LEVI, KENNETH ALDAPE und MARK A. ISRAEL: *Manganese Superoxide Dismutase Expression in*

- Human Central Nervous System Tumors*. Cancer Research, 56(14):3192–3195, 1996.
- [29] MIDDELDORP, JAAP M., ANTOINETTE A.T.P BRINK, ADRIAAN J.C VAN DEN BRULE und CHRIS J.L.M MEIJER: *Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 45(1):1 – 36, 2003.
- [30] SALAMA, ORLY, SEBASTIEN HERRMANN, ALINA TZIKNOVSKY, BENJAMIN PIURA, MICHAEL MEIROVICH, ILYA TRAKHT, BRENT REED, LESLIE I. LOBEL und ROBERT S. MARKS: *Chemiluminescent optical fiber immunosensor for detection of autoantibodies to ovarian and breast cancer-associated antigens*. Biosensors and Bioelectronics, 22(7):1508 – 1516, 2007.
- [31] HOA, X.D., A.G. KIRK und M. TABRIZIAN: *Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress*. Biosensors and Bioelectronics, 23(2):151 – 160, 2007.
- [32] MCFARLAND, ADAM D. und RICHARD P. VAN DUYN: *Single Silver Nanoparticles as Real-Time Optical Sensors with Zeptomole Sensitivity*. Nano Letters, 3(8):1057–1062, 2003.
- [33] GARAI-IBABE, GAIZKA, RUTA GRINYTE, EFIM I. GOLUB, ALLON CANAAN, MARC LAMY DE LA CHAPELLE, ROBERT S. MARKS und VALERI PAVLOV: *Label free and amplified detection of cancer marker EBNA-1 by {DNA} probe based biosensors*. Biosensors and Bioelectronics, 30(1):272 – 275, 2011.
- [34] SCHNELL, M., A. GARCIA-ETXARRI, J. ALKORTA, J. AIZPURUA und R. HILLENBRAND: *Phase-Resolved Mapping of the Near-Field Vector and Polarization State in Nanoscale Antenna Gaps*. Nano Lett., 10(9):3524–3528, 2010.
- [35] HUBERT, CHRISTOPHE, ANNA RUMYANTSEVA, GILLES LERONDEL, JOHAN GRAND, SERGEĀ KOSTCHEEV, LAURENT BILLOT, ALEXANDRE VIAL, RENAUD BACHELOT, PASCAL ROYER, SHIH-HUI CHANG, STEPHEN K. GRAY, GARY P. WIEDERRECHT und GEORGE C. SCHATZ: *Near-Field Photochemical Imaging of Noble Metal Nanostructures*. Nano Letters, 5(4):615–619, 2005.
- [36] WHITNEY, ALYSON V., JEFFREY W. ELAM, SHENGLI ZOU, ALEX V. ZINOVEV, PETER C. STAIR, GEORGE C. SCHATZ und RICHARD P. VAN DUYN: *Localized Surface Plasmon Resonance Nanosensor: A*

- High-Resolution Distance-Dependence Study Using Atomic Layer Deposition.* J. Phys. Chem. B, 109(43):20522–20528, 2005.
- [37] WILLETS, KATHERINE A. und RICHARD P. VAN DUYN: *Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing.* Annual Review of Physical Chemistry, 58(1):267–297, 2007.
- [38] KENNEDY, B. J., S. SPAETH, M. DICKEY und K. T. CARRON: *Determination of the Distance Dependence and Experimental Effects for Modified SERS Substrates Based on Self-Assembled Monolayers Formed Using Alkanethiols.* J. Phys. Chem. B, 103(18):3640–3646, 1999.
- [39] DIERINGER, JON A., ADAM D. MCFARLAND, NILAM C. SHAH, DOUGLAS A. STUART, ALYSON V. WHITNEY, CHANDA R. YONZON, MATTHEW A. YOUNG, XIAOYU ZHANG und RICHARD P. VAN DUYN: *Introductory Lecture Surface enhanced Raman spectroscopy: new materials, concepts, characterization tools, and applications.* Faraday Discuss., 132:9–26, 2006.
- [40] JOHNSON, ERIC und RICARDO AROCA: *Surface-enhanced infrared spectroscopy of monolayers.* J. Phys. Chem., 99(23):9325–9330, 1995.
- [41] ZULOAGA, JORGE, EMIL PRODAN und PETER NORDLANDER: *Quantum Plasmonics: Optical Properties and Tunability of Metallic Nanorods.* ACS Nano, 4(9):5269–5276, 2010.
- [42] ASHCROFT, NEIL W. und N. DAVID MERMIN: *Solid state physics.* Brooks/Cole Thomson Learning, Singapore [u.a.], 33. [repr.], (College Edition) Auflage, 2006.
- [43] JACKSON, JOHN DAVID: *Klassische Elektrodynamik.* de Gruyter, Berlin [u.a.], 4., überarb. Aufl. Auflage, 2006.
- [44] HUNKLINGER, SIEGFRIED: *Festkörperphysik.* Oldenbourg-Verl., München, 2., verb. Aufl. Auflage, 2009. lt. Verl. auch im Set erhältlich, zusammen mit: Kristallmodelle / Rüdiger Borchardt; Siegfried Turowski.
- [45] RAETHER, HEINZ: *Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings.* Nummer 111 in *Springer tracts in modern physics ; 111 ; Springer tracts in modern physics.* Springer, Berlin ; Heidelberg [u.a.], 1988.
- [46] NOVOTNY, LUKAS und BERT HECHT: *Principles of nano-optics.* Cambridge University Press, Cambridge [u.a.], Repr. with corrections Auflage, 2008.

- [47] AROCA, RICARDO: *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [48] PUCCI, A., F. NEUBRECH, J. AIZPURUA, T. CORNELIUS und M. LAMY DE LA CHAPELLE: *One-Dimensional Nanostructures*, Band 3, Kapitel 8, Seiten 175–215. Springer, 2008.
- [49] NEUBRECH, FRANK: *Oberflächenverstärkte Infrarot-Spektroskopie mittels Gold-Nanoantennen*. Doktorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2008.
- [50] WEBER, DANIEL: *Nanogaps for Nanoantenna-Assisted Infrared Spectroscopy*. Doktorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2011.
- [51] D'ANDREA, CRISTIANO: *Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Pathology Biomarkers*. Doktorarbeit, Università Degli Studi di Messina, 2013.
- [52] ENDERS, DOMINIK: *Surface Enhanced Infrared Absorption on Au Nanoparticle Films for Optical Biosensing*. Doktorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2005.
- [53] MENG, FANZHEN: *IR Spectroscopy Studies of Silver and Copper Nanofilms*. Doktorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2007.
- [54] KLEVENZ, MARKUS: *Infrarot-Spektroskopie und Dampfdruckmessungen an Siliziummonoxid, Siliziumdioxid und Forsterit*. Doktorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2009.
- [55] HUCK, CHRISTIAN: *Kleine Lücken zwischen Nanoantennen*. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2012.
- [56] NEUBRECH, FRANK: *Untersuchung plasmonischer und thermischer Eigenschaften von Goldnanodrähten mittels Infrarot-Spektroskopie*. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2006.
- [57] VOGT, JOCHEN: *Präparation von Nanolücken zwischen Nanoantennen zur oberflächenverstärkten Infrarot-Spektroskopie*. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2013.
- [58] WEBER, DANIEL: *Vorstudien zur antennenresonanzverstärkten Raman-Spektroskopie mit Anregung im nahen Infrarot-Spektralbereich*. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2008.
- [59] ROHLACK, ENNO: *Mid-Infrared Assisted Raman Spectroscopy*. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2009.

- [60] BOCHTERLE, JOERG: *Temperaturabhängigkeit der infrarot-optischen Eigenschaften von Gold-Nanostreifen*. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2008.
- [61] JOHNSON, P. B. und R. W. CHRISTY: *Optical Constants of the Noble Metals*. Phys. Rev. B, 6:4370–4379, Dec 1972.
- [62] LYNCH, DAVID W. und W. R. HUNTER: *Handbook of Optical Constants of Solids*. Academic Press handbook series. Academic Press, San Diego, 1998.
- [63] ORDAL, M. A., ROBERT J. BELL, JR R. W. ALEXANDER, 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, 1985.
- [64] DEMTRÖDER, WOLFGANG: *Molekülphysik*. Oldenbourg, München ; Wien, 2003. Teilw. auf dem Titelblatt fälschlich: Molekülphysik.
- [65] PITARKE, J M, V M SILKIN, E V CHULKOV und P M ECHENIQUE: *Theory of surface plasmons and surface-plasmon polaritons*. Reports on Progress in Physics, 70(1):1, 2007.
- [66] OTTO, ANDREAS: *Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection*. Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei, 216(4):398–410, August 1968.
- [67] KRETSCHMANN, ERWIN: *Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen*. Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei, 241(4):313–324, August 1971.
- [68] MAIER, STEFAN A. und HARRY A. ATWATER: *Plasmonics: Localization and guiding of electromagnetic energy in metal/dielectric structures*. Journal of Applied Physics, 98(1):011101, 2005.
- [69] MIE, GUSTAV: *Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen*. Annalen der Physik, 330(3):377–445, 1908.
- [70] NEUBRECH, F., A. GARCIA-ETXARRI, D. WEBER, J. BOCHTERLE, H. SHEN, M. LAMY DE LA CHAPPELLE, G. W. BRYANT, J. AIZPURUA und A. PUCCI: *Defect-induced activation of symmetry forbidden infrared resonances in individual metallic nanorods*. Applied Physics Letters, 96(21):213111, 2010.

- [71] DVOYNENKO, M.M, A.V GONCHARENKO, V.R ROMANIUK und E.F VENGER: *Effects of dimension on optical transmittance of semicontinuous gold films*. Physica B: Condensed Matter, 299:88 – 93, 2001.
- [72] STÖCKER, HORST: *Taschenbuch der Physik*. Deutsch, Frankfurt am Main, 6., korr. Aufl. Auflage, 2010. Auch mit CD-ROM erschienen.
- [73] STAFFARONI, MATTEO: *Circuit Analysis in Metal-Optics, Theory and Applications*. Doktorarbeit, EECS Department, University of California, Berkeley, May 2011.
- [74] 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.
- [75] BRYANT, GARNETT W., F. JAVIER GARCIA DE ABAJO und JAVIER AIZPURUA: *Mapping the Plasmon Resonances of Metallic Nanoantennas*. Nano Letters, 8(2):631–636, Februar 2008.
- [76] 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(23):235420, Jun 2005.
- [77] NOVOTNY, LUKAS: *Effective Wavelength Scaling for Optical Antennas*. Physical Review Letters, 98(26):266802, 2007.
- [78] VOGT, JOCHEN: *Private Kommunikation*, Mai 2013. FDTD Simulation des Drahts.
- [79] PISCHEL, JAN: *Private Kommunikation*, 2013.
- [80] DEMTRÖDER, WOLFGANG: *Experimentalphysik 2*. Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 5 Auflage, 2009. In: Springer-Online.
- [81] LIAO, P. F. und A. WOKAUN: *Lightning rod effect in surface enhanced Raman scattering*. The Journal of Chemical Physics, 76(1):751–752, 1982.
- [82] 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*. Applied Physics Letters, 93(16):163105, 2008.
- [83] SCHNELL, MARTIN: *Infrared Nanophotonics based on Metal Antennas and Transmission Lines*. Doktorarbeit, University of the Basque Country (UPV/EHU) and nanoGUNE, March 2012.

- [84] NORDLANDER, P., C. OUBRE, E. PRODAN, K. LI und M. I. STOCKMAN: *Plasmon Hybridization in Nanoparticle Dimers*. Nano Letters, 4(5):899–903, 2004.
- [85] NEUBRECH, FRANK, DANIEL WEBER, JULIA KATZMANN, CHRISTIAN HUCK, ANDREA TOMA, ENZO DI FABRIZIO, ANNEMARIE PUCCI und THOMAS HÄRTLING: *Infrared Optical Properties of Nanoantenna Dimers with Photochemically Narrowed Gaps in the 5 nm Regime*. ACS Nano, 6(8):7326–7332, 2012.
- [86] LE RU, ERIC und PABLO ETCHEGOIN: *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects*. Elsevier, 2009.
- [87] GÜNZLER, HELMUT und HERBERT MICHAEL HEISE: *IR-Spektroskopie*. VCH, Weinheim [u.a.], 3., neubearb. Aufl. Auflage, 1996.
- [88] PUCCI, ANNEMARIE: *IR spectroscopy of adsorbates on ultrathin metal films*. physica status solidi (b), 242(13):2704–2713, 2005.
- [89] TROLLMANN, JENS: *Infrarot-Ellipsometrie an organischen Halbleitern*. Diplomarbeit, Heidelberg University, 2010.
- [90] LEHMANN, A.: *Theory of Infrared Transmission Spectra of Thin Insulating Films*. physica status solidi (b), 148(1):401–405, 1988.
- [91] GREENLER, ROBERT G.: *Infrared Study of Adsorbed Molecules on Metal Surfaces by Reflection Techniques*. The Journal of Chemical Physics, 44(1):310–315, 1966.
- [92] GREENLER, ROBERT G.: *Design of a reflection-absorption experiment for studying the ir spectrum of molecules adsorbed on a metal surface*. Journal of Vacuum Science and Technology, 12(6):1410–1417, nov 1975.
- [93] BERREMAN, D. W.: *Infrared Absorption at Longitudinal Optic Frequency in Cubic Crystal Films*. Phys. Rev., 130(6):2193–, Juni 1963.
- [94] MCINTYRE, J.D.E. und D.E. ASPNES: *Differential reflection spectroscopy of very thin surface films*. Surface Science, 24(2):417–434, 1971.
- [95] BAKER, GARYA. und DAVIDS. MOORE: *Progress in plasmonic engineering of surface-enhanced Raman-scattering substrates toward ultra-trace analysis*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 382(8):1751–1770, 2005.

- [96] LANGRETH, DAVID C.: *Energy Transfer at Surfaces: Asymmetric Line Shapes and the Electron-Hole-Pair Mechanism*. Phys. Rev. Lett., 54:126–129, Jan 1985.
- [97] OTTO, ANDREAS: *The 'chemical' (electronic) contribution to surface-enhanced Raman scattering*. J. Raman Spectrosc., 36(6-7):497–509, 2005.
- [98] MOSKOVITS, MARTIN: *Persistent misconceptions regarding SERS*. Phys. Chem. Chem. Phys., 15:5301–5311, 2013.
- [99] ALONSO-GONZALEZ, P., P. ALBELLA, M. SCHNELL, J. CHEN, F. HUTH, A. GARCIA-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. Commun., 3:684, Februar 2012.
- [100] DREGELY, DANIEL, FRANK NEUBRECH, HUIGAO DUAN, RALF VOGELGESANG und HARALD GIESSEN: *Vibrational near-field mapping of planar and buried three-dimensional plasmonic nanostructures*. Nat Commun, 4:–, Juli 2013.
- [101] NEUBRECH, F. und A. PUCCI: *Plasmonic enhancement of vibrational excitations in the infrared*. Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of, PP(99):1, 2012.
- [102] NEUBRECH, FRANK und ANNEMARIE PUCCI: *Surface-enhanced infrared spectroscopy*. Spectroscopy Europe, 24(5):1–8, 2012.
- [103] KRAUTH, O., G. FAHSOLD und A. PUCCI: *Asymmetric line shapes and surface enhanced infrared absorption of CO adsorbed on thin iron films on MgO(001)*. The Journal of Chemical Physics, 110(6):3113–3117, 1999.
- [104] KRAUTH, OLIVER, GERHARD FAHSOLD, NORBERT MAGG und ANNEMARIE PUCCI: *Anomalous infrared transmission of adsorbates on ultrathin metal films: Fano effect near the percolation threshold*. The Journal of Chemical Physics, 113(15):6330–6333, 2000.
- [105] BRUGGEMAN, DAG: *The calculation of various physical constants of heterogeneous substances. I. The dielectric constants and conductivities of mixtures composed of isotropic substances*. Ann. Phys, 24(132):636–679, 1935.
- [106] MAXWELL-GARNETT, J. C.: *Colours in Metal Glasses and in Metallic Films*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series

- A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character, 203(359-371):385–420, 1904.
- [107] PRIEBE, A., M. SINTHER, G. FAHSOLD und A. PUCCI: *The correlation between film thickness and adsorbate line shape in surface enhanced infrared absorption*. The Journal of Chemical Physics, 119(9):4887–4890, 2003.
- [108] FANO, U.: *Effects of Configuration Interaction on Intensities and Phase Shifts*. Phys. Rev., 124(6):1866–1878, Dezember 1961.
- [109] BORTCHAGOVSKY, E. G. und U. C. FISCHER: *On the modulation of optical transmission spectra of thin dye layers by a supporting medium*. The Journal of Chemical Physics, 117(11):5384–5392, 2002.
- [110] GIANNINI, VINCENZO, YAN FRANCESCATO, HEMMEL AMRANIA, CHRIS C. PHILLIPS und STEFAN A. MAIER: *Fano Resonances in Nanoscale Plasmonic Systems: A Parameter-Free Modeling Approach*. Nano Lett., 11(7):2835–2840, 2011.
- [111] OTTO, A.: *Surface-enhanced Raman scattering of adsorbates*. Journal of Raman Spectroscopy, 22(12):743–752, 1991.
- [112] KNEIPP, KATRIN, YANG WANG, HARALD KNEIPP, IRVING ITZKAN, RAMACHANDRA R. DASARI und MICHAEL S. FELD: *Population Pumping of Excited Vibrational States by Spontaneous Surface-Enhanced Raman Scattering*. Phys. Rev. Lett., 76:2444–2447, Apr 1996.
- [113] ALBERT, GEORG: *Herstellung und Charakterisierung polykristalliner GoldschicGold zur Verwendung in der Nanolithographie*. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 1996.
- [114] FAZIO, BARBARA, CRISTIANO D’ANDREA, FRANCESCO BONACCORSO, ALESSIA IRRERA, GIUSEPPE CALOGERO, CIRINO VASI, PIETRO GIUSEPPE GUCCIARDI, MARIA ALLEGRINI, ANDREA TOMA, DANIELE CHIAPPE, CHRISTIAN MARTELLA und FRANCESCO BUATIER DE MONGEOT: *Re-radiation Enhancement in Polarized Surface-Enhanced Resonant Raman Scattering of Randomly Oriented Molecules on Self-Organized Gold Nanowires*. ACS Nano, 5(7):5945–5956, 2011.
- [115] LAURENT, G., N. FÉLIDJ, J. AUBARD, G. LÉVI, J. R. KRENN, A. HOHENAU, G. SCHIDER, A. LEITNER und F. R. AUSSENEGG: *Evidence of multipolar excitations in surface enhanced Raman scattering*. Phys. Rev. B, 71(4):045430, Jan 2005.

- [116] NAUJOK, ROBERTA R., ROBERT V. DUEVEL und ROBERT M. CORN: *Fluorescence and Fourier Transform surface-enhanced Raman scattering measurements of methylene blue adsorbed onto a sulfur-modified gold electrode*. Langmuir, 9(7):1771–1774, 1993.
- [117] YU, ZHIQIANG und STEVEN S. C. CHUANG: *Probing Methylene Blue Photocatalytic Degradation by Adsorbed Ethanol with In Situ IR*. The Journal of Physical Chemistry C, 111(37):13813–13820, 2007.
- [118] ZUTIC, VERA, VESNA SVETLICIC, JEAN CLAVILIER und JEAN CHEVALET: *Supramolecular phenomena in organic redox films at electrodes: Part II. The methylene blue/leucomethylene blue redox couple at the gold electrode*. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 219:183 – 195, 1987.
- [119] ZULOAGA, JORGE und PETER NORDLANDER: *On the Energy Shift between Near-Field and Far-Field Peak Intensities in Localized Plasmon Systems*. Nano Letters, 11(3):1280–1283, 2011.
- [120] ALONSO-GONZALEZ, P., P. ALBELLA, F. NEUBRECH, C. HUCK, J. CHEN, F. GOLMAR, F. CASANOVA, L. E. HUESO, A. PUCCI, J. AIZPURUA und R. HILLENBRAND: *Experimental Verification of the Spectral Shift between Near- and Far-Field Peak Intensities of Plasmonic Infrared Nanoantennas*. Phys. Rev. Lett., 110:203902, Mai 2013.
- [121] SAVITZKY, A. und M.J.E. GOLAY: *Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures*. Anal. Chem., 36:1627, 1964.
- [122] EILERS, PAUL H. C.: *A Perfect Smoother*. Analytical Chemistry, 75(14):3631–3636, 2003.
- [123] MADDAMS, W. F. und P. B. TOOKE: *Quantitative Conformational Studies on Poly(vinyl Chloride)*. Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry, 17(6):951–968, 1982.
- [124] SUSI, HEINO und D. MICHAEL BYLER: *Protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy: Second derivative spectra*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 115(1):391 – 397, 1983.
- [125] BERG, JEREMY M., JOHN L. TYMOCZKO und LUBERT STRYER: *Biochemie*. Springer-Spektrum-Lehrbuch. Springer Spektrum, Berlin ; Heidelberg, 7. Aufl. Auflage, 2013.
- [126] LÖFFLER, GEORG: *Basiswissen Biochemie*. Springer-Lehrbuch ; SpringerLink : Bücher. Springer, Berlin, Heidelberg, 7. komplett überarbeitete Auflage Auflage, 2008.

- [127] NELSON, DAVID L. und MICHAEL M. COX: *Lehninger Biochemie*. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin ; Heidelberg [u.a.], 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Auflage, 2001.
- [128] ANDERSON, GEORGE W., JOAN E. ZIMMERMAN und FRANCIS M. CALLAHAN: *The Use of Esters of N-Hydroxysuccinimide in Peptide Synthesis*. Journal of the American Chemical Society, 86(9):1839–1842, 1964.
- [129] COZZONE, ALAIN J: *Proteins: Fundamental Chemical Properties*, Kapitel na, Seite na. John Wiley & Sons, Ltd, 2010.
- [130] LOVE, J. CHRISTOPHER, LARA A. ESTROFF, JENNAH K. KRIEBEL, RALPH G. NUZZO und GEORGE M. WHITESIDES: *Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology*. Chemical Reviews, 105(4):1103–1170, 2005.
- [131] COOPER, E.A.; KNUTSON, K.: *Fourier transform infrared spectroscopy investigations of protein structure*. Pharmaceutical biotechnology, 7:101–143, 1995. cited By (since 1996) 29.
- [132] BASSAN, PAUL, ACHIM KOHLER, HARALD MARTENS, JOE LEE, HUGH J. BYRNE, PAUL DUMAS, EHSAN GAZI, MICHAEL BROWN, NOEL CLARKE und PETER GARDNER: *Resonant Mie Scattering (RMieS) correction of infrared spectra from highly scattering biological samples*. Analyst, 135(2):268–277, 2010.
- [133] BIRD, BENJAMIN, MILOS MILJKOVIC und MAX DIEM: *Two step resonant Mie scattering correction of infrared micro-spectral data: human lymph node tissue*. Journal of Biophotonics, 3(8-9):597–608, 2010.
- [134] KRASOVSKII, V., I. NAGOVITSYN, G. CHUDINOVA, V. SAVRANSKII und V. KARAVANSKII: *Interaction of gold nanoparticles with bovine serum albumin*. Bulletin of the Lebedev Physics Institute, 34:321–324, 2007. 10.3103/S1068335607110036.
- [135] BUJACZ, ANNA: *Structures of bovine, equine and leporine serum albumin*. Acta Crystallographica Section D, 68(10):1278–1289, Oct 2012.
- [136] WERBER, MOSHE M. und LAWRENCE A. GREENSTEIN: *Biochemical and Stability Properties of Recombinant Human MnSOD*. Free Radical Research, 12(1):335–348, 1991.
- [137] BORGSTAHL, GLORIA E. O., HANS E. PARGE, MICHAEL J. HICKEY, MICHAEL J. JOHNSON, MAURICE BOISSINOT, ROBERT A. HALLEWELL,

- JAMES R. LEPOCK, DIANE E. CABELLI und JOHN A. TAINER: *Human Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase Polymorphic Variant Ile58Thr Reduces Activity by Destabilizing the Tetrameric Interface*. *Biochemistry*, 35(14):4287–4297, 1996.
- [138] GARAI-IBABE, GAIZKA: *Private Kommunikation*, 2013.
- [139] VETR, HELGA: *Private Kommunikation*, 2012.
- [140] SQUIRE, PHIL G., PETER. MOSER und CHESTER T. O’KONSKI: *Hydrodynamic properties of bovine serum albumin monomer and dimer*. *Biochemistry*, 7(12):4261–4272, 1968.
- [141] DAVID, CATALINA, CRISTIANO D’ANDREA, ELOISE LANCELOT, JÖRG BOCHTERLE, NICOLAS GUILLOT, BARBARA FAZIO, ONOFRIO M. MARAGÒ, ANGELA SUTTON, NATHALIE CHARNAUX, FRANK NEUBRECH, ANNEMARIE PUCCI, PIETRO G. GUCCIARDI und MARC LAMY DE LA CHAPELLE: *Raman and IR spectroscopy of manganese superoxide dismutase, a pathology biomarker*. *Vibrational Spectroscopy*, 62(0):50 – 58, 2012.
- [142] DALAN, ALTAY BURAK, ARZU ERGEN, HÜLYA YILMAZ, ATEŞ KARATEKE und TURGAY ISBIR: *Manganese superoxide dismutase gene polymorphism, MnSOD plasma levels and risk of epithelial ovarian cancer*. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 34(5):878–884, 2008.
- [143] BRENNER, THORSTEN, STEFAN HOFER, CLAUDIA ROSENHAGEN, JOCHEN STEPPAN, CHRISTOPH LICHTENSTERN, JÄGERGEN WEITZ, THOMAS BRUCKNER, IVAN K. LUKIC, EIKE MARTIN, ANGELIKA BIERHAUS, URSULA HOFFMANN und MARKUS A. WEIGAND: *Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) and Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) as Early Predictors for Survival in Patients with Severe Sepsis or Septic Shock*. *Journal of Surgical Research*, 164(1):e163 – e171, 2010.
- [144] ID PDB: 1ZTE from <http://www.pdb.org>.
- [145] AMBINDER, R F, M A MULLEN, Y N CHANG, G S HAYWARD und S D HAYWARD: *Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1*. *Journal of Virology*, 65(3):1466–1478, 1991.
- [146] JAFARI, NAGHMEH, GIJSBERT P. VAN NIEROP, GEORGES M.G.M. VERJANS, ALBERT D.M.E. OSTERHAUS, JAAP M. MIDDELDORP und ROGIER Q. HINTZEN: *No evidence for intrathecal IgG synthesis to*

- Epstein Barr virus nuclear antigen-1 in multiple sclerosis*. Journal of Clinical Virology, 49(1):26 – 31, 2010.
- [147] ODDO, CRISTIAN, ELEONORA FREIRE, LORI FRAPPIER und GONZALO DE PRAT-GAY: *Mechanism of DNA Recognition at a Viral Replication Origin*. Journal of Biological Chemistry, 281(37):26893–26903, 2006.
- [148] ID PDB: 1VHI from <http://www.pdb.org>.
- [149] BRANGEL, POLINA: *Private Kommunikation*, 2013.
- [150] BASSAN, PAUL, HUGH J. BYRNE, FRANCK BONNIER, JOE LEE, PAUL DUMAS und PETER GARDNER: *Resonant Mie scattering in infrared spectroscopy of biological materials - understanding the 'dispersion artefact'*. Analyst, 134(8):1586–1593, 2009.
- [151] BRUKER OPTICS, ETTLINGEN: *AquaSpec user manual*, 5. Auflage, 2006.
- [152] SEEHUSEN, JAANE: *Schwingungsdynamik von intra- und intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen*. Doktorarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2011.
- [153] GLASER, TOBIAS, SEBASTIAN BECK, BERND LUNKENHEIMER, DANIELA DONHAUSER, ANDREAS KÖHN, MICHAEL KRÖGER und ANNEMARIE PUCCI: *Infrared study of the MoO₃ doping efficiency in 4,4'-bis(N-carbazolyl)-1,1'-biphenyl (CBP)*. Organic Electronics, 14(2):575 – 583, 2013.
- [154] VEDANTHAM, GANESH, H.GERALD SPARKS, SAMIR U. SANE, STELIOS TZANNIS und TODD M. PRZYBYCIEN: *A Holistic Approach for Protein Secondary Structure Estimation from Infrared Spectra in H₂O Solutions*. Analytical Biochemistry, 285(1):33 – 49, 2000.
- [155] SCHWEITZER-STENNER, REINHARD: *Advances in vibrational spectroscopy as a sensitive probe of peptide and protein structure: A critical review*. Vibrational Spectroscopy, 42(1):98 – 117, 2006. A Collection of Papers Presented at the 3rd International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS-3), Delavan, WI, USA, 14-19 August 2005 - Part 1.
- [156] CAEL, JOHN J., JACK L. KOENIG und JOHN BLACKWELL: *Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates : Part IV. Identification of configuration- and conformation-sensitive modes for -glucose by normal coordinate analysis*. Carbohydrate Research, 32(1):79 – 91, 1974.

Literaturverzeichnis

- [157] BANYAY, MARTINA, MUNNA SARKAR und ASTRID GRÄSLUND: *A library of IR bands of nucleic acids in solution*. Biophysical Chemistry, 104(2):477 – 488, 2003.
- [158] MANTSCH, HENRY H.: *Infrared spectroscopy of biomolecules*. Wiley, New York [u.a.], 1996.
- [159] TOMA, ANDREA: *Private Kommunikation*, 2013.
- [160] JACKSON, MICHAEL und HENRY H. MANTSCH: *Protein secondary structure from FT-IR spectroscopy: correlation with dihedral angles from three-dimensional Ramachandran plots*. Canadian Journal of Chemistry, 69(11):1639–1642, 1991.
- [161] DEMTRÖDER, WOLFGANG: *Experimentalphysik 1*. Springer-Lehrbuch. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 5 Auflage, 2008. In: Springer-Online.
- [162] BOCHTERLE, JÖRG, FRANK NEUBRECH, TADAAKI NAGAO und ANNEMARIE PUCCI: *Angstrom-Scale Distance Dependence of Antenna-Enhanced Vibrational Signals*. ACS Nano, 6(12):10917–10923, 2012.
- [163] HENZLER, MARTIN und WOLFGANG GÖPEL: *Oberflächenphysik des Festkörpers*. Teubner-Studienbücher : Physik. Teubner, Stuttgart, 2., durchges. Aufl. Auflage, 1994.
- [164] IBACH, HARALD: *Physics of surfaces and interfaces*. Springer, Berlin ; Heidelberg [u.a.], 2006.
- [165] ZANGWILL, ANDREW: *Physics at surfaces*. Cambridge Univ. Press, Cambridge [u.a.], Repr. Auflage, 1996.
- [166] LANG, N. D. und W. KOHN: *Theory of Metal Surfaces: Charge Density and Surface Energy*. Phys. Rev. B, 1:4555–4568, Jun 1970.
- [167] SMOLUCHOWSKI, R.: *Anisotropy of the Electronic Work Function of Metals*. Phys. Rev., 60:661–674, Nov 1941.
- [168] PISCHEL, JAN: *Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie an Adsorbaten auf der glatten und aufgerauhten Cu(110)-Oberfläche*. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2010.
- [169] CHORKENDORFF, IB und JOHANNES W. NIEMANTSVERDRIET: *Concepts of modern catalysis and kinetics*. Wiley-VCH, Weinheim, 2003.

- [170] PRIEBE, ANDREAS: *Oberflächenverstärkte Infrarotabsorption von CO auf ultradünnen Metallfilmen*. Doktorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2002.
- [171] EWING, GEORGE E.: *Infrared Spectra of Liquid and Solid Carbon Monoxide*. J. Chem. Phys., 37(10):2250–2256, November 1962.
- [172] KOTTKE, MICHAEL L., ROBERT G. GREENLER und HARLAND G. TOMPKINS: *An infrared spectroscopic study of carbon monoxide adsorbed on polycrystalline gold using the reflection-absorption technique*. Surface Science, 32(1):231–243, Juli 1972.
- [173] LEMIRE, CELINE, RANDALL MEYER, SHAMIL SHAIKHUTDINOV und HANS-JOACHIM FREUND: *Do Quantum Size Effects Control CO Adsorption on Gold Nanoparticles?* Angewandte Chemie International Edition, 43(1):118–121, 2004.
- [174] LEMIRE, C., R. MEYER, SH. K. SHAIKHUTDINOV und H. J. FREUND: *CO adsorption on oxide supported gold: from small clusters to monolayer islands and three-dimensional nanoparticles*. Surface Science, 552(1-3):27–34, März 2004.
- [175] MEIER, D.C. und D.W. GOODMAN: *The influence of metal cluster size on adsorption energies: CO adsorbed on Au clusters supported on TiO₂*. Journal of the American Chemical, VOL. 126, NO. 6(6):1892–1899, 2004.
- [176] LOVRINCIC, ROBERT: *Quanten-Size-Effekte und Phasenübergänge in Bismut-Nanodrähten*. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2005.
- [177] GOTTFRIED, J.M., K.J. SCHMIDT, S.L.M. SCHROEDER und K. CHRISTMANN: *Adsorption of carbon monoxide on Au(110)-(1x2)*. Surface Science, 536:206 – 224, 2003.
- [178] DUMAS, P., R.G. TOBIN und P.L. RICHARDS: *Interaction of CO molecules with evaporated silver, gold, and copper films: an infrared spectroscopic investigation using a thermal detection technique*. J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom., 39:183–189, 1986.
- [179] VEGARD, I.: *Struktur und Leuchtfähigkeit von festem Kohlenoxyd*. Z. Phys. A Hadrons Nucl., 61:185–190, 1930.
- [180] PALUMBO, M. ELISABETTA, GIUSEPPE A. BARATTA, MARK P. COLLINGS und MARTIN R. S. MCCOUSTRA: *The profile of the 2140 cm⁻¹ solid CO band on different substrates*. Phys. Chem. Chem. Phys., 8:279–284, 2006.

- [181] KORTH KRISTALLE, GMBH: *www.korth.de*. online, 2013.
- [182] NEUBRECH, FRANK, DANIEL WEBER, DOMINIK ENDERS, TADAAKI NAGAO und ANNEMARIE PUCCI: *Antenna Sensing of Surface Phonon Polaritons*. J. Phys. Chem. C, 114(16):7299–7301, April 2010.
- [183] WEBER, DANIEL, PABLO ALBELLA, PABLO ALONSO-GONZÁLEZ, FRANK NEUBRECH, HAN GUI, TADAAKI NAGAO, RAINER HILLENBRAND, JAVIER AIZPURUA und ANNEMARIE PUCCI: *Longitudinal and transverse coupling in infrared gold nanoantenna arrays: long range versus short range interaction regimes*. Opt. Express, 19(16):15047–15061, Aug 2011.
- [184] 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.
- [185] PERSSON, B. N. J. und R. RYBERG: *Vibrational interaction between molecules adsorbed on a metal surface: The dipole-dipole interaction*. Phys. Rev. B, 24:6954–6970, Dec 1981.
- [186] RAIBER, KEVIN, ANDREAS TERFORT, CARSTEN BENNDORF, NORMAN KRINGS und HANS-HENNING STREHBLOW: *Removal of self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold by plasma cleaning*. Surface Science, 595:56 – 63, 2005.
- [187] CVITKOVIC, A., N. OCELIC und R. HILLENBRAND: *Analytical model for quantitative prediction of material contrasts in scattering-type near-field optical microscopy*. Opt. Express, 15(14):8550–8565, Jul 2007.
- [188] SINTHER, MATHIAS: *UHV-Studien zur oberflächenverstärkten Infrarotabsorption auf rauen Kupferfilmen*. Doktorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Juni 2002.
- [189] FAIST, JEROME, FEDERICO CAPASSO, DEBORAH L. SIVCO, CARLO SIRTORI, ALBERT L. HUTCHINSON und ALFRED Y. CHO: *Quantum Cascade Laser*. Science, 264(5158):553–556, 1994.
- [190] WEIDA, MILES J. und BRANDON YEE: *Quantum cascade laser-based replacement for FTIR microscopy*. Proc. SPIE, 7902:79021C–79021C–7, 2011.
- [191] CAO, HAN, ZHAONING YU, JIAN WANG, JONAS O. TEGENFELDT, ROBERT H. AUSTIN, E. CHEN, WEI WU und S.Y. CHOU: *Fabrication of 10 nm enclosed nanofluidic channels*. Applied Physics Letters, 81(1):174–176, 2002.

- [192] ZIMMERMANN, JOHANNES: *Voruntersuchungen zur Nanoantennen-unterstützten in-situ Infrarotspektroskopie in Flüssigkeiten*. Bachelorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2012.
- [193] WOLKE, ROBERT: *Mikrofluidische Zelle zur in situ nanoantennenverstärkten Infrarotspektroskopie wässriger Lösungen in Transmissionsgeometrie*. Masterarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2013.
- [194] ADATO, RONEN und HATICE ALTUG: *In-situ ultra-sensitive infrared absorption spectroscopy of biomolecule interactions in real time with plasmonic nanoantennas*. Nat Commun, 4:–, Juli 2013.
- [195] DUFFY, DAVID C, OLIVIER J A SCHUELLER, SCOTT T BRITAIN und GEORGE M WHITESIDES: *Rapid prototyping of microfluidic switches in poly(dimethyl siloxane) and their actuation by electro-osmotic flow*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 9(3):211, 1999.
- [196] SINTHER, MATHIAS: *Ethylene on a 5nm Cu island film on MgO*. 2001.
- [197] SAVAGE, KEVIN J., MATTHEW M. HAWKEYE, RUBEN ESTEBAN, ANDREI G. BORISOV, JAVIER AIZPURUA und JEREMY J. BAUMBERG: *Revealing the quantum regime in tunnelling plasmonics*. Nature, advance online publication:–, November 2012.
- [198] WETZEL, STEFFEN: *Infrarotspektroskopische Untersuchung von Siliziumoxiden, Silikaten, deren Wechselwirkung mit Metallinseln sowie Dampfdruckmessungen an Siliziummonoxid*. Doktorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2012.
- [199] BRUKER OPTICS, ETTLINGEN: *Hyperion user manual*, 3rd Auflage, 2010.
- [200] SPECTRA PHYSICS: *Reflecting Microscope Objectives*, 2004.
- [201] THERMO ELECTRON SCIENTIFIC INSTRUMENTS LLC, Madison, WI USA: *Thermo Scientific Nicolet iN10 MX Infrared Imaging Microscope - Product Specifications*, 2008.
- [202] CHRISTIAN RIEDINGER, BRUKER OPTICS: *Private Kommunikation*, 2013.
- [203] MUÑOZ CARO, G. M., JIMÉNEZ-ESCOBAR, A., MARTÍN-GAGO, J. Á., ROGERO, C., ATIENZA, C., PUERTAS, S., SOBRADO, J. M. und TORRES-REDONDO, J.: *New results on thermal and photodesorption of CO ice using the novel InterStellar Astrochemistry Chamber (ISAC)*. A&A, 522:A108, 2010.

A Anhang

A.1 Optische Eigenschaften der Substrate

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Gold-Nanoantennen auf IR-transparenten Substraten (Silizium (Si) und Calciumfluorid (CaF_2)) verwendet. Die optischen Eigenschaften von CaF_2 und Si sind zusammen mit dem relativen Transmissionspektrum (gegen Leerkanal) in Abbildung A.1.1 und A.1.2 zu finden. Sie zeichnen sich durch eine hohe Transmittivität und geringe Dispersion im MIR-Spektralbereich aus. Daher wird meist die Dämpfung im Substrat vernachlässigt und $\varepsilon'' = 0$ gesetzt. Damit wird der Brechungsindex rein reell $\hat{n} = n$. In der gesamten Arbeit wird $n_{\text{CaF}_2} = 1,40$ (vergleiche Abbildung A.1.1) und $n_{\text{Si}} = 3,42$ (vergleiche Abbildung A.1.2) angenommen.

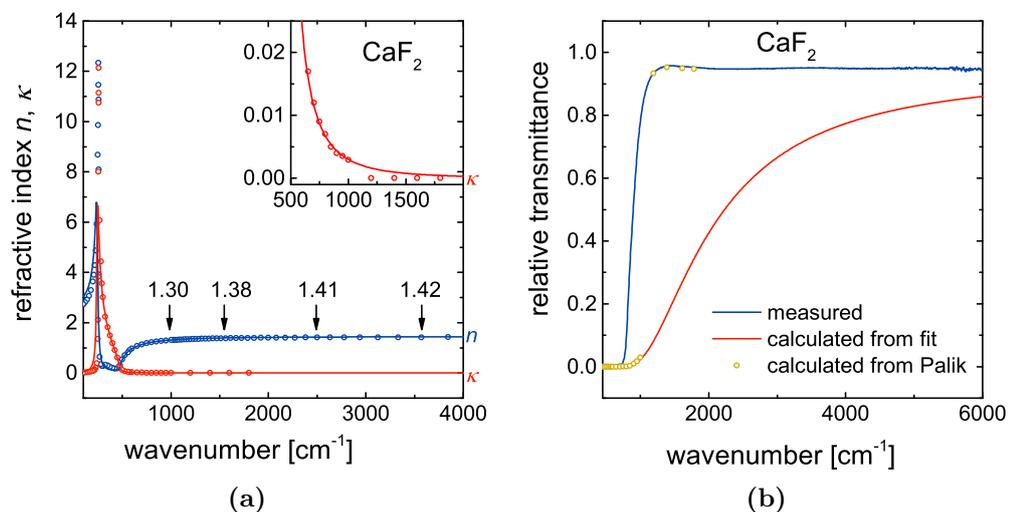


Abbildung A.1.1: (a) Brechungsindex von CaF_2 im MIR. Die Kreise zeigen Daten aus [62], die durchgezogene Linie zeigt einen *Fit* von Gleichung (2.3.1) an die Daten. (b) Das blaue Spektrum zeigt die gemessene relative Transmission durch ein CaF_2 -Substrat. Mit SCOUT[184] wurde die Transmission aus den Daten von (a) errechnet.

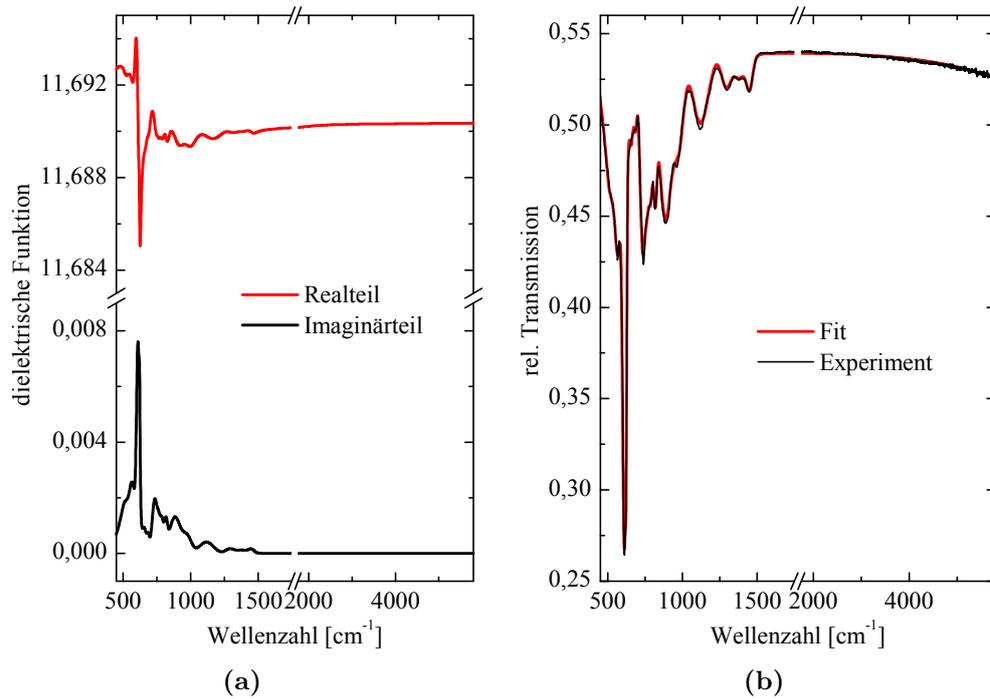


Abbildung A.1.2: In (a) ist die dielektrische Funktion von Silizium gezeigt. Diese wurde durch den *Fit* eines Modells an die Transmission eines Siliziumsubstrats berechnet und ist in (b) zusammen mit der Messung gezeigt. ((a) und (b) sind aus [198] entnommen)

Im Gegensatz zu Si hat CaF_2 den zusätzlichen Vorteil, dass es nicht nur im MIR sondern auch im sichtbaren Spektralbereich transparent ist. Damit eignet sich CaF_2 hervorragend als Substrat für Experimente, bei denen sowohl IR-Messungen als auch Raman-Messungen mit Laserwellenlängen im Sichtbaren an derselben Probe durchgeführt werden. Ein Nachteil ist, dass unterhalb von ungefähr 800 cm^{-1} kein Licht transmittiert wird (Reststrahlenbande).

A.2 Eigenschaften der verwendeten IR-Mikroskope

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene IR-Mikroskope verwendet. Die Messungen in Kapitel 5.5 wurden an einem *Thermo Scientific Nicolet iN10 MX* der Ben Gurion Universität in Beer Sheva, Israel aufgenommen. Alle anderen IR-Mikroskopiemessungen wurden an einem *Bruker Hyperion 1000* in Heidelberg am Kirchhoff-Institut für Physik durchgeführt. Die Eigenschaften beider Mikroskope werden im Folgenden beschrieben.

A.2.1 Bruker Hyperion 1000

Der Strahlengang des *Bruker Hyperion 1000* ist in Abbildung A.2.1a dargestellt. Kondensator und Objektiv sind baugleich und werden durch eine Schwarzschildoptik realisiert. Ein Querschnitt des Schwarzschildobjektivs¹ des *Hyperion 1000* Mikroskops ist in Abbildung A.2.1b dargestellt. Die charakteristischen Abmessungen sind in Tabelle A.1 festgehalten.

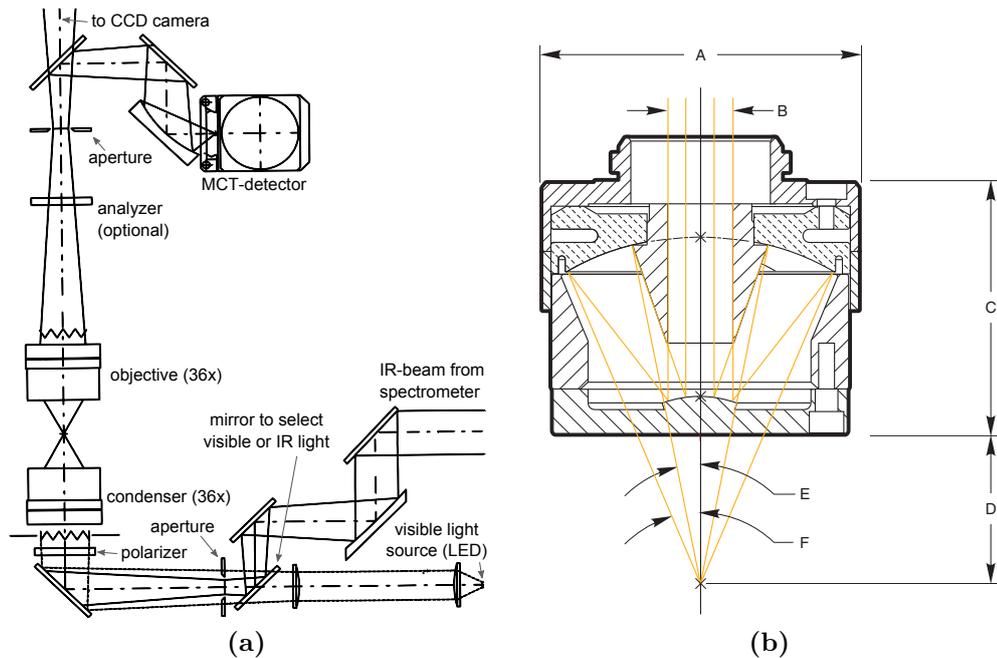


Abbildung A.2.1: In (a) ist der Strahlengang des *Hyperion 1000* IR-Mikroskops schematisch dargestellt. (b) zeigt eine detaillierte Darstellung des Schwarzschildobjektivs. Objektiv und Kondensator sind baugleich. Die charakteristischen Maße und Winkel sind in Tabelle A.1 gegeben. (a) ist aus [199] und (b) aus [200] entnommen.

	<i>Hyperion 1000</i>	<i>Nicolet iN10 MX</i>
Vergößerung	36 x	15 x
Arbeitsabstand (D)	10,4 mm	16 mm
Numerische Apertur	0,5	0,7
Maximaler Winkel (F)	30°	43,5°
Minimaler Winkel (E)	10,3°	20°

Tabelle A.1: Charakteristische Eigenschaften der Mikroskopobjektive. Die Buchstaben D, E und F beziehen sich auf Abbildung A.2.1b. Die numerische Apertur berechnet sich aus $NA = \sin(F)$. Daten aus [200, 201].

¹Teilweise auch als Cassegrain-Objektiv bezeichnet.



Abbildung A.2.2: *Nicolet iN10 MX* IR-Mikroskop [201]. Der Probenraum wurde durch eine Plastikfolie abgeschlossen. Globalar und Interferometer sind direkt im Mikroskop verbaut. Ein Polarisator konnte nicht eingebaut werden.

A.2.2 Thermo Scientific Nicolet iN10 MX

Im Gegensatz zum Hyperion 1000 muss dieses Mikroskop nicht an ein Spektrometer angekoppelt werden, denn sowohl Globalar als auch das Michelson-Interferometer sind direkt im Mikroskop verbaut. Dies führt zu geringeren Verlusten und einer größeren Intensität auf der Probe, was wiederum schon bei kurzen Messungen zu guten Signal-zu-Rausch-Verhältnissen führt (vergleiche Abbildung A.2.3b). In Abbildung A.2.2 ist eine Foto des Mikroskops zu sehen.

Zur Verringerung der Umwelteinflüsse wurde der Probenraum mit einer Plastikfolie abgeschlossen. Durch die offenen Schwarzschildobjektive wird der so abgeschlossene Probenraum mit getrockneter Luft (gleicher *Purge Gas Generator*) gespült und bietet so nach zehn Minuten stabile Messbedingungen.

A.2.3 Charakterisierung der Mikroskope

In Abbildung A.2.3a sind normierte Einkanalspektren beider Mikroskope zu sehen. Man erkennt, dass die Sensitivität des Detektors im *Nicolet* stärker auf den spektralen Bereich zwischen 1200 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} konzentriert ist, während der Detektor des *Hyperion* breitbandiger ist. Das MCT-Spektrum des *Nicolet* ist mit einer Auflösung von 8 cm^{-1} aufgenommen, während die anderen Spektren mit 4 cm^{-1} aufgenommen wurden. Die Wasserbanden kommen aus diesem Grund und wegen der Spülung mit getrockneter Luft beim *Nicolet* MCT Spektrum nicht zum tragen. Neben den Wasserbanden sind zusätzliche Banden in beiden Spektren zu erkennen. Diese können durch leichte Verschiebungen zwischen Referenz- und Probenspektrum zu scharfen „Plus-Minus“-Strukturen im Spektrum führen, welche speziell in der Ableitung hervortreten (vergleiche Abbildung 4.4.1a und 5.5.2). Die schärfsten Banden bei 1261 cm^{-1} und 1542 cm^{-1} treten im *Nicolet* sowohl bei der Messung mit einem MCT-Detektor als auch bei

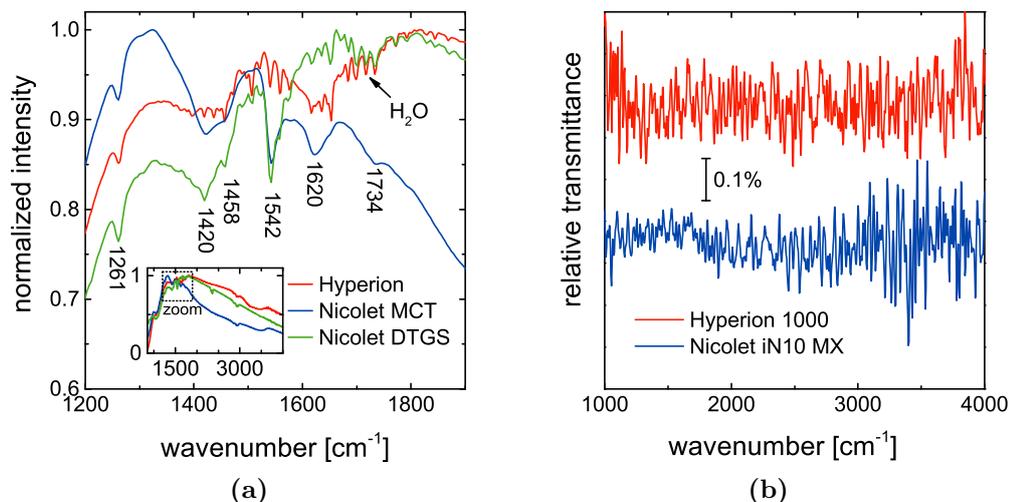


Abbildung A.2.3: In a) sind die Einkanalspektren durch CaF_2 von beiden Mikroskopen gezeigt. Die Positionen markanter Absorptionen sind beschriftet. Die Auflösung beim Hyperion betrug 2 cm^{-1} , beim Nicolet 8 cm^{-1} . In B ist der Vergleich des Rauschens der 100%-Linie beider Mikroskope dargestellt. In beiden Fällen ist die Transmission durch CaF_2 mit jeweils 16 *Scans* und 8 cm^{-1} Auflösung, $25 \times 25 \mu\text{m}$ beleuchteter Fläche beim *Nicolet* und $33,3 \mu\text{m}$ Durchmesser der beleuchteten Fläche beim *Hyperion* gezeigt. Beide Spektren sind ohne Polarisator aufgenommen.

der Verwendung eines DTGS-Detektors² auf. Der genaue Ursprung der Banden ließ sich jedoch nicht klären.

In Abbildung A.2.3b sind 100%-Linien gezeigt, die unter möglichst identischen Bedingungen an den beiden Mikroskopen aufgenommen wurden. Man erkennt, dass im sensitiven Bereich unterhalb von 2000 cm^{-1} das Rauschen beim *Nicolet iN10 MX* trotz der knapp 30% kleineren Messfläche (bedingt durch die Blende) nur etwa halb so groß ist wie bei der Messung am *Hyperion 1000*.

A.3 Elektronenstrahlolithographie

Alle in dieser Arbeit verwendeten Nanoantennen wurden mittels Elektronenstrahlolithographie (EBL) hergestellt. Dabei wird eine Schicht Photolack auf das gereinigte Substrat aufgebracht. Der Photolack wird im Rasterelektronenmikroskop (SEM) beschrieben und anschließend entwickelt. Um eine gute Adhäsion zwischen Antennen und Substrat sicher zu stellen wird eine wenige Nanometer dicke Haftvermittlerschicht aus Titan oder Chrom unter der Goldschicht aufgedampft. Abschließend wird beim sogenannten *Lift-off* der verbliebene Photolack

²Pyroelektrischer *Deuterated Triglycine Sulfate* IR-Detektor, siehe [60].

A.4 Abschätzung der Thermo- und Photodesorption von CO

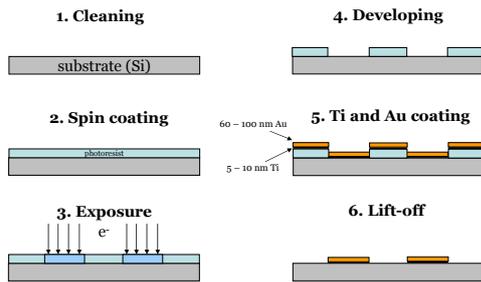


Abbildung A.3.1: Arbeitsschritte bei der Herstellung der Nanoantennen mittels Elektronenstrahlolithographie (entnommen aus [50]).

und das darauf befindliche Metall abgelöst, so dass nur die Nanoantennen auf dem Substrat zurückbleiben. Der Prozess ist in Abbildung A.3.1 veranschaulicht und in [17, 60] detailliert beschrieben. Die Abmessungen der zu schreibenden Strukturen wurden vom Autor dieser Arbeit festgelegt. Am Herstellungsprozess selbst war dieser jedoch nicht beteiligt.

A.4 Abschätzung der Thermo- und Photodesorption von CO

In diesem Abschnitt ist die detaillierte Argumentation gegen die durch IR-Strahlung induzierte Desorption von CO von den Antennen aus Kapitel 6.7.1 beschrieben.

Aufheizung der Antennenenden führt zu Thermodesorption

Es soll abgeschätzt werden, ob sich die Antennenenden durch die Konzentration der eingestrahlten Energie soweit erhitzen, dass sie die Desorptionstemperatur von CO übersteigen.

Zuerst soll die Strahlungsleistung der IR-Strahlung in der UHV-Kammer abgeschätzt werden. Der Hersteller des Spektrometers (*Bruker*) gibt die Strahlungsleistung des Globars innerhalb des Probenraums des Spektrometers bei der größten Blende mit 25 mW an [202]. Um dies zu verifizieren, kann die Strahlungsleistung über das Stefan-Boltzmann-Gesetz $P = \sigma AT^4 \approx 750 \text{ mW}$ abgeschätzt werden. Wobei σ eine Konstante, $A \approx 3 \text{ mm}^2$ die Fläche des Globars und $T \approx 1500 \text{ K}$ dessen Temperatur ist [202]. Laut Bruker kommt folglich $1/30$ der Globalleistung in der Probenkammer an, was als realistisch eingeschätzt wird. Da wegen der größeren Distanz anzunehmen ist, dass auf dem Strahlengang in die UHV-Kammer mehr Leistung verloren geht als in der Probenkammer, stellt $P \lesssim 25 \text{ mW}$ eine obere Abschätzung der eingestrahlten Leistung dar. Durch die verwendete 1 mm Blende wird ein Teil der Strahlung abgeblockt. Im Vergleich zur größten Blende

A Anhang

(6 mm) ist die Leistung um Faktor 36 reduziert. Die Leistung der IR-Strahlung auf der Probe wird mit

$$P_{\text{in}}^{\text{UHV}} \lesssim 700 \mu\text{W}$$

abgeschätzt.

Für die Abschätzung der Leistung pro Antenne wird außerdem angenommen, dass die beleuchtete Fläche auf den Antennen einen Durchmesser von 2 mm hat und homogen ausgeleuchtet wird. Dies entspricht etwa der Halbwertsbreite des Gaußförmigen Strahlprofils [60]. Die beleuchtete Fläche ist demnach etwa 3 mm^2 groß, wobei jede einzelne Antenne eine Fläche von $A_{\text{unit}} \approx 9 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2$ einnimmt. Aus Abbildung 6.4.1b sieht man, dass davon etwa 20% mit der Antenne wechselwirken. Nimmt man an, dass die gesamte Leistung von der Antenne absorbiert wird, so ergibt sich diese zu

$$P_{\text{in}}^{\text{ant}} \lesssim \frac{9 \cdot 10^{-6}}{3} \cdot 0,2 \cdot 700 \mu\text{W} \approx 400 \text{ pW}. \quad (\text{A.4.1})$$

Der Abtransport der Wärme wird über die Wärmeleitung des unter der Antenne befindlichen Si abgeschätzt. Aus [44] (Bild 7.16) entnimmt man $\Lambda_{\text{Si}}(20 \text{ K}) \approx 2000 \text{ W/mK}$. Der Einfachheit halber wird angenommen, dass sich jede Antenne auf einem ihrer Grundfläche $A_{\text{ant}} = 8 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2$ entsprechenden Si-Sockel der Höhe $\Delta d = 5 \text{ mm}$ befindet. Dies ist der durchschnittliche seitliche Abstand zum Probenhalter, dem Reservoir. Es gilt

$$P_{\text{out}}^{\text{ant}} \gtrsim \Lambda_{\text{Si}} \frac{\Delta T}{\Delta d} A_{\text{ant}} \approx 32 \text{ nW/K} \cdot \Delta T.$$

Im Gleichgewicht muss $P_{\text{in}}^{\text{ant}} = P_{\text{out}}^{\text{ant}}$ gelten. Damit ergibt sich $\Delta T \lesssim 13 \text{ mK}$. Dies reicht nicht um die Antenne von 18 K auf 25 K zu erwärmen.³ Auf gleiche Weise kann die Wärmeleitung innerhalb der Antenne abgeschätzt werden. Der Temperaturunterschied zwischen Antennenmitte und Antennenende beträgt $\Delta T \approx 10^{-6} \text{ K}$, wenn man davon ausgeht, dass die Erwärmung nur an den *Hotspots* an den Antennenenden entsteht.

Eine lokale Überschreitung der Desorptionstemperatur kann mit dieser Abschätzung daher ausgeschlossen werden.

Photoneninduzierte Desorption oder Diffusion

Neben der temperaturbedingten Desorption könnte die Absorption von Photonen die nötige Energie zur Desorption liefern. Die Bindungsenergie von CO-Eis

³Die angegebenen Werte entsprechen den eigenen stark fehlerbehafteten Temperaturmessungen. Literaturwerte zur Desorption von CO-Eis sind in [177] zu finden.

A.4 Abschätzung der Thermo- und Photodesorption von CO

wird mit $E_d = k_B \cdot 834 \text{ K}$ angegeben, was 580 cm^{-1} entspricht [203], wobei k_B die Boltzmann-Konstante darstellt. Innerhalb des Schwarzkörperspektrums des Globars absorbiert CO im Bereich der Schwingungsbande bei 2138 cm^{-1} . Daraus folgt, dass ein absorbiertes Photon dem CO-Molekül genügend Energie zuführt, um dieses von der Oberfläche zu lösen.

Es soll nun abgeschätzt werden, welcher Anteil von $P_{\text{in}}^{\text{ant}}$ auf den absorbierenden Spektralbereich fällt. Dieser wird großzügig und analog zu Abbildung 6.5.1 zwischen 2100 und 2180 cm^{-1} abgeschätzt. Geht man in erster Näherung davon aus, dass der MCT-Detektor in jedem Spektralbereich gleich sensitiv ist, so kann aus dem Einkanalspektrum der Anteil des Spektralbereichs zwischen 2100 und 2180 cm^{-1} von der gesamten emittierten Strahlung des Globars abgeschätzt werden. Er beträgt etwa 1%.

Im Folgenden soll die Anzahl der Photonen mit der Anzahl der auf der Oberfläche auftreffenden Moleküle verglichen werden. Die Photonenzahl errechnet sich aus der auf eine Antenne einfallenden Leistung (Gleichung (A.4.1)) und der Energie eines Photons ($\hbar\omega_{\text{vib}} \approx 4,25 \cdot 10^{-20} \text{ J}$). Die Anzahl der Photonen der passenden Energie, die mit einer Antenne wechselwirken, errechnet sich dann zu

$$n_{\text{ph}} \approx \frac{P_{\text{in}}^{\text{ant}}}{\hbar\omega_{\text{vib}}} \cdot 0,01 \approx 10^8 \text{ s}^{-1}.$$

Geht man davon aus, dass diese Photonen im Nahfeld der Antennenenden konzentriert werden, so stehen diese Photonen der Anzahl der auf A_{active} auftreffenden CO-Moleküle gegenüber. Diese Anzahl der CO-Moleküle n_{CO} ist durch die Dichte der auftreffenden Moleküle $Z = \frac{p}{\sqrt{2\pi mk_B T}}$ [163] und die Fläche $A_{\text{active}} \approx 2 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2$ gegeben und ergibt sich zu

$$n_{\text{CO}} = Z \cdot A_{\text{active}} = \frac{p}{\sqrt{2\pi mk_B T}} A_{\text{active}} \approx 600 \text{ s}^{-1}.$$

Dabei ist $m \approx 4,6 \cdot 10^{-26} \text{ kg}$ die Masse der Gasteilchen und $T \approx 300 \text{ K}$ deren Temperatur beim Druck $p \approx 10^{-8} \text{ mbar} = 10^{-6} \text{ kg/ms}^2$.

Zur Abschätzung des Anteils der CO-Moleküle, die ein Photon absorbieren, schätzt man den IR-Wirkungsquerschnitt grob mit $\sigma_{\text{IR}} \approx 10^{-20} \text{ cm}^2 = 10^{-24} \text{ m}^2$ ab [48]. Betrachtet man eine Sekunde, so liefert der Vergleich zwischen dem Wirkungsquerschnitt aller 600 Moleküle und der Fläche A_{active} die Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon von einem CO-Molekül absorbiert wird. Es gilt: $600 \cdot \sigma_{\text{IR}} / A_{\text{active}} \approx 3 \cdot 10^{-8}$. Damit werden ungefähr 3 der 10^8 Photonen die pro Sekunde einfallen von CO-Molekülen absorbiert. Diese drei Moleküle, von den 600 pro Sekunde auftreffenden, werden sofort wieder desorbieren. Dies ist ein Anteil von 0,5% der als nicht relevant eingeschätzt werden kann. Da es sich um eine großzügige Abschätzung handelt, fällt der Anteil wohl eher noch geringer aus.

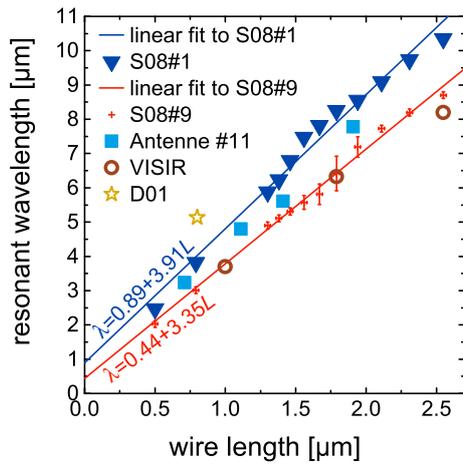


Abbildung A.5.1: LSPR-Wellenlängen verschiedener Proben für unterschiedliche Antennenlängen. Probe S08#1 und #9 wurden mit Gleichung 2.5.8 gefittet.

A.5 Übersicht über alle Nanoantennen

Im Folgenden werden die einzelnen, in dieser Arbeit verwendeten, Nanoantennen-Arrays beschrieben. Alle charakteristischen Größen sind in Tabelle A.2 zusammengefasst. Die angegebenen Dimensionen entsprechen immer den nominalen Werten für die Präparation. Mittels SEM wurden in Stichproben die Abmessungen der Proben vom Hersteller kontrolliert. Abweichungen in L betragen maximal 20 nm und in W maximal 15 nm [159]. Die LSPR-Wellenlängen einiger Proben sind in Abbildung A.5.1 über der Antennenlänge aufgetragen.

Tabelle A.2: Abmessungen aller Nanoantennen-Arrays.

Probe und Substrat	Array	L [nm]	ω_{res} [cm ⁻¹]	W, H [nm]	H_{ad} [nm]	d_x [nm]	d_y [nm]	A_{unit} [nm ²]	A_{active} [nm ²]	$\frac{A_{\text{unit}}}{A_{\text{active}}}$
D01/D03 Si(111)		800	1950	100	5 (Ti)	1000	5000	$9,18 \cdot 10^6$	20 000	459
Antenna #9,	P8	710	3093	60		50	5000	$3,85 \cdot 10^6$	7200	534
Antenna #11	P6	1110	2086	60	5	50	5000	$5,87 \cdot 10^6$	7200	815
CaF ₂ (100)	P5	1410	1783	60	(Ti)	50	5000	$7,39 \cdot 10^6$	7200	1026
	P7	1910	1286	60		50	5000	$9,92 \cdot 10^6$	7200	1377
	A1, B1	2550		60		50	5000	$13,2 \cdot 10^6$	7200	1827
	A2, B2	2310		60		50	5000	$11,9 \cdot 10^6$	7200	1659
	A3, B3	2110		60		50	5000	$10,9 \cdot 10^6$	7200	1518
	A4, B4	1940		60		50	5000	$10,1 \cdot 10^6$	7200	1399
S08#01-#08 ^a	A5, B5	1790		60	5 (Ti) ^a	50	5000	$9,31 \cdot 10^6$	7200	1293
&	A6, B6	1670		60	&	50	5000	$8,70 \cdot 10^6$	7200	1209
S08#09-#14 ^b	A7, B7	1560		60	3 (Cr) ^b	50	5000	$8,15 \cdot 10^6$	7200	1131
	A8, B8	1460		60		50	5000	$7,64 \cdot 10^6$	7200	1061
CaF ₂ (100)	A9, B9	1380		60		50	5000	$7,24 \cdot 10^6$	7200	1005
	A10, B10	1300		60		50	5000	$6,83 \cdot 10^6$	7200	949
	A11, B11	790		60		50	5000	$4,25 \cdot 10^6$	7200	590
	A12, B12	500		60		50	5000	$2,78 \cdot 10^6$	7200	387
VISIR #1-#15	1L, 1R	1000	2695	60		50	3250	$3,48 \cdot 10^6$	7200	483
	2L, 2R	1790	1578	60	3	50	3250	$6,09 \cdot 10^6$	7200	846
CaF ₂ (100)	3L, 3R	2550	1225	60	(Cr)	50	3250	$8,61 \cdot 10^6$	7200	1195
	VIS ^c	2×100	VIS	60		200	200	$0,11 \cdot 10^6$	7200^d	18,4

^aTi-Adhäsionsschicht, Au-Qualität möglicherweise mangelhaft.

^bCr-Adhäsionsschicht, Au-Qualität deutlich besser (siehe Abbildung 5.1.1)

^cAnstatt Einzelantennen hat diese Probe Dimere mit einer Lücke von 20 nm.

^dDa beim Dimer das Feld in der Lücke dominiert, wird A_{active} mit zwei Antennenenden pro Dimer berechnet.

Publikationsliste

Publikationen in Journalen (*peer-reviewed*)

C. D'ANDREA, 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, A. PUCCI *Optical Nanoantennas for Multiband Surface-Enhanced Infrared and Raman Spectroscopy* ACS Nano, 7(4), pp 3522-3531, 2013

J. BOCHTERLE, F. NEUBRECH, T. NAGAO, AND A. PUCCI *Angstrom-Scale Distance Dependence of Antenna-Enhanced Vibrational Signals* ACS Nano, 6(12), pp 10917-10923, 2012

C. DAVID, C. D'ANDREA, E. LANCELOT, J. BOCHTERLE, N. GUILLOT, B. FAZIO, O. M. MARAGÒ, A. SUTTON, N. CHARNAUX, F. NEUBRECH, A. PUCCI, P. G. GUCCIARDI, M. LAMY DE LA CHAPELLE *Raman and IR spectroscopy of manganese superoxide dismutase, a pathology biomarker* Vibrational Spectroscopy, 62, 50-58, 2012

F. NEUBRECH, A. GARCIA-ETXARRI, D. WEBER, J. BOCHTERLE, H. SHEN, M. LAMY DE LA CHAPELLE, G. W. BRYANT, J. AIZPURUA, A. PUCCI *Defect-induced activation of symmetry forbidden infrared resonances in individual metallic nanorods* Applied Physics Letters, 96(21):213111, 2010

Conference Proceedings

J. BOCHTERLE, F. NEUBRECH, D. ENDERS, T. NAGAO, A. PUCCI *Nano-Optics for Enhancing Light-Matter Interactions on a Molecular Scale*, Springer, Seiten 399-400, 2012

Im Rahmen dieser Arbeit betreute Bachelor- und Masterarbeiten

JOHANNES ZIMMERMANN, *Voruntersuchungen zur Nanoantennen-unterstützten in-situ Infrarotspektroskopie in Flüssigkeiten*, Bachelorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2012

ROBERT WOLKE, *Mikrofluidische Zelle zur in situ nanoantennenverstärkten Infrarotspektroskopie wässriger Lösungen in Transmissionsgeometrie* (vorläufiger Titel), Masterarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2013 (Abgabe 15. Oktober)

Abkürzungs- und Variablenverzeichnis

Abkürzungen

BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
EBL	<i>Electron Beam Lithography</i>
EBNA-1	<i>Epstein-Barr Nuclear Antigen-1</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FDTD	<i>Finite Difference Time Domain</i>
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot (Spektroskopie)
IR	Infrarot
IRRAS	<i>Infrared Reflection Absorption Spectroscopy</i>
LSPR	<i>Lokalized Surface Plasmon Resonance</i>
MB	<i>Methylene Blue</i>
MCT	<i>Mercury Cadmium Telluride</i> IR Detektor
ME	Mercaptoethanol
MIR	Mittelinfrarot
MnSOD	<i>Manganese Superoxide Dismutase</i>
NHS	<i>N-Hydroxysuccinimide</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
QCM	<i>Quartz Crystal Microbalance</i>
RRS	Resonanz-Raman-Streuung
SAM	<i>Self-Assembled Monolayer</i>
SEIRA	<i>Surface Enhanced Infrared Absorption</i>
SEIRS	<i>Surface Enhanced Infrared Spectroscopy</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscope</i>
SERS	<i>Surface Enhanced Raman Scattering</i>
SNOM	<i>Scattering Near-Field Optical Microscope</i>
SPP	Oberflächen (<i>Surface</i>) Plasmon-Polariton
UHV	Ultrahochvakuum
UV	Ultraviolett
VIS	Sichtbarer Spektralbereich (<i>visible</i>)
VPP	Volumen Plasmon-Polariton

Variablen

A	Absorbanz $A(\omega) = \log_{10}(I_0(\omega)/I(\omega))$
a	Amplitude des normierten Fano-Profiles
a_1, a_2	Parameter in der vereinfachten Novotny-Gleichung
A_{active}	Bereich der Antennenoberfläche mit hoher Feldstärke
A_{unit}	Kehrwert der Antennendichte im <i>Array</i>
C	Kapazität
c	molare Konzentration
c_0	Vakuumlichtgeschwindigkeit
d	Dicke der Schicht
d_x, d_y	Abstand zwischen den Antennen
\vec{E}, \vec{E}_0	elektrisches Feld
E	Energie
e	Elementarladung
EF_{el}	Verstärkungsfaktor des elektrischen Felds (E nhancement F actor)
$EF_{\text{SEIRA/SEIRS}}$	Verstärkungsfaktor des IR-Signals (E nhancement F actor)
EF_{SERS}	Verstärkungsfaktor des Raman-Signals (E nhancement F actor)
f, \bar{f}	Fano-Funktion
H	Höhe der Antenne
H_{ad}	Dicke des Haftvermittlers
\hbar	reduz. Plancksches Wirkungsquantum $\hbar = 6,58 \cdot 10^{-16} \text{ eV s}$
I, I_0	Intensität
\vec{j}	Stromdichte
j	Natürliche Zahl $j \in \mathbb{N}$
\vec{k}	Wellenvektor $ \vec{k} = 2\pi/\lambda$
L	Antennenlänge
L_{ind}	elektromagnetische Induktivität
L_{kin}	kinetische Induktivität
m_{eff}	effektive Elektronenmasse
\hat{n}	komplexe Brechzahl $\hat{n} = n + i\kappa$
n	Brechungsindex
N	Ladungsträgerdichte oder Anzahl, kontextabhängig
\vec{p}	Dipolmoment
q	Asymmetriefaktor der Fano-Funktion
R	Ohmscher Widerstand
r	Radius
$R_{\text{rel}}(\omega)$	relative Reflexion $R_{\text{rel}}(\omega) = I(\omega)/I_0(\omega)$
$S(\omega)$	Extinktion
t	Zeit
$T_{\text{rel}}(\omega)$	relative Transmission $T_{\text{rel}}(\omega) = I(\omega)/I_0(\omega)$

Abkürzungs- und Variablenverzeichnis

\vec{u}	Auslenkung der Atome aus deren Ruhelage
W	geometrische Breite der Antenne
\vec{x}	Ortsvektor $\vec{x} = (x, y, z)$
$\dot{\vec{x}}, \ddot{\vec{x}}$	zeitliche Ableitungen des Ortes (Geschwindigkeit, Beschleunigung)
x, y, z	Kartesische Ortsraumkoordinaten
α	Absorptionskoeffizient
$[\alpha]$	Polarisierbarkeit
δ_{skin}	Eindringtiefe
ε_0	dielektrische Feldkonstante
ε_∞	Hintergrundpolarisierbarkeit
$\varepsilon(\omega)$	dielektrische Funktion $\varepsilon(\omega) = \varepsilon'(\omega) + i\varepsilon''(\omega)$
ε_a	dielektrische Funktion des Adsorbats
ε_d	dielektrische Funktion des Dielektrikums (häufig $\varepsilon_d = 1$ für Vakuum)
ε_s, n_s	dielektrische Funktion und Brechungsindex des Substrats
ϵ^*	molarer Extinktionskoeffizient
γ	Dämpfung im harmonischen Oszillator
κ	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
λ_0	Wellenlänge im Vakuum
λ_{res}	Resonanzwellenlänge
μ	magnetische Permeabilität
μ_0	magnetische Feldkonstante
ν	Frequenz
$\bar{\nu}$	Wellenzahl $\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$
ω	Kreisfrequenz
ω_{LSPR}	LSPR Resonanzfrequenz
ω_p	Plasmafrequenz
ω_{res}	Resonanzfrequenz
ω_{str}	Oszillatorstärke
ω_τ	Stoß- / Relaxationsrate
$\omega_{\text{LO}}, \omega_{\text{TO}}$	transversal- und longitudinal-optische Phononenfrequenz
ω_{vib}	Resonanzfrequenz der Molekylvibration
ρ	Ladungsträgerdichte
σ	Leitfähigkeit
\Re, \Im	Real- und Imaginärteil des Arguments
\parallel, \perp	parallel und senkrecht

Abbildungsverzeichnis

2.2.1	Dielektrische Funktion von Gold	8
2.3.1	Dielektrische Funktion des Lorentz-Oszillators	10
2.4.1	Dispersion des Volumen- und Oberflächenplasmon-Polaritons	12
2.5.1	Darstellung der Ladungsverteilung	14
2.5.2	Differenz zwischen L_{kin} und L_{ind}	16
2.5.3	LSPR-Linienform	18
2.5.4	Nahfeldverteilung einer Nanoantenne	20
2.5.5	LSPR-Hybridisierung benachbarter Antennen	21
2.5.6	Anordnung der Nanoantennen	22
2.6.1	Schematische Darstellung von Molekülschwingungen	24
2.6.2	Jablonski-Diagramm für IR- und Raman-Streuung	25
2.6.3	Schematischer Aufbau der FTIR-Spektrometers	26
2.7.1	Fano-Linienform	34
3.1.1	Rasterelektronenmikroskop Aufnahme der Nanoantennen	40
3.1.2	Strukturformel von <i>Methylene Blue</i>	41
3.2.1	Extinktion im IR und Sichtbaren bei \parallel und \perp Polarisierung	43
3.2.2	Nahfeldverteilung der longitudinalen und transversalen Mode	45
3.3.1	Raman- und SERS-Spektren von <i>Methylene Blue</i>	46
3.4.1	IRRAS-Spektrum und Spektrum eines getrockneten Tropfens von MB	48
3.4.2	Basislinienkorrektur von antennenverstärkten MB-Signalen	50
3.4.3	Glättung der Zweite Ableitung von antennenverstärkten MB-Signalen	51
3.4.4	Zweite Ableitungen der IR-LSPR-Spektren	52
3.4.5	<i>Peak</i> -Größe der 2. Ableitung eines Fano-Profiles	53
3.4.6	<i>Fit</i> der 2. Ableitung	55
4.1.1	Chemische Struktur von Aminosäuren	58
4.1.2	Peptidbindung zweier Aminosäuren	58
4.1.3	Peptidsynthese mittels NHS	59
4.1.4	β -Faltblatt und α -Helix	60
4.1.5	Funktionsweise des Puffers	61
4.1.6	Aufbau der DNA	63
4.1.7	Basensequenz der EBNA-1 bindenden DNA-Sonde	63
4.1.8	Schritte der ELISA Methode	64
4.2.1	Dreidimensionale Struktur von MnSOD	68

Abbildungsverzeichnis

4.2.2	Dreidimensionale Struktur von EBNA-1	69
4.3.1	Spektren von getrockneten MnSOD Proteinen	70
4.3.2	<i>AquaSpec</i> Messzelle	71
4.3.3	Transmission durch Wasser und PBS	72
4.3.4	Verschiedene Konzentrationen von BSA in wässriger Lösung	73
4.3.5	Spektren von gelöstem und getrocknetem BSA	74
4.4.1	IR-Spektren von MnSOD, EBNA-1, GIPC-1 und Aptamer _{EBNA-1}	76
5.1.1	Optische Eigenschaften gleicher Antennen	80
5.2.1	GIPC-1-Agglomerate auf einem Antennen- <i>Array</i>	81
5.2.2	Signal von GIPC-1 auf Nanoantennen	82
5.3.1	Kalibrierungskurve der Signalstärke von BSA auf Nanoantennen	86
5.4.1	Abhängigkeit der Signalstärke der Amid-Banden von der Auflösung	87
5.5.1	Funktionalisierung der Nanoantennen	88
5.5.2	Antennenresonanzen und deren zweite Ableitung der Probe VISIR#7	90
5.5.3	SERS und SEIRS Signal der Funktionalisierung	91
5.5.4	MnSOD auf funktionalisierten Nanoantennen	93
5.5.5	SEM-Aufnahme der Nanoantennendimer für SERS	94
5.5.6	Negative Kontrollen	95
5.5.7	Negative Kontrollexperimente zum Nachweis der Selektivität	95
5.5.8	Speichelproteine auf funktionalisierten Nanoantennen	97
6.1.1	Elektronendichte an Metalloberflächen	102
6.1.2	Nahfeldverteilung bei quantenmechanischer Beschreibung	103
6.2.1	IR-Strahlengang	105
6.3.1	Stärke der CO-Absorptionsbande für verschiedene CO-Dosen	108
6.3.2	Bestimmung der Schichtdicke	109
6.4.1	Einfluss der CO-Schicht auf die Antennenresonanz	110
6.4.2	Bestimmung der Resonanzverschiebung und des CO-Signals	111
6.5.1	CO-Signal für verschiedene Schichtdicken	113
6.6.1	Schichtdickenabhängiger Verlauf der CO-Signale	114
6.8.1	Verlauf der Verstärkung des CO-Signals	117
6.9.1	Abweichungen im Nahfeld bei anderen Messungen	119
7.0.1	Schematische Darstellung von Durchflusszellen	126
A.1.1	Optische Eigenschaften von CaF ₂ im MIR	148
A.1.2	Optische Eigenschaften von Si im MIR	149
A.2.1	<i>Hyperion 1000</i> IR Mikroskop und Schwarzschildoptik	150
A.2.2	<i>Nicolet iN10 MX</i> IR-Mikroskop	151
A.2.3	Vergleich des Leerkanals beider Mikroskope	152
A.3.1	Elektronenstrahl-Lithographie	153
A.5.1	LSPR-Wellenlängen verschiedener Proben	156

Index

- Absorbanz, 28
- Absorptionskoeffizient, 6, 28
- Adsorption, 84, 103
- Agglomerate, 70
- Amid-Banden, 66, 87
- Aminosäuren, 57
- Antikörper, 62, 68
- Aptamer, 63, 77, 89, 92
- Array, 22
- Auflösung, 27, 87

- Basislinienkorrektur, 49
- Brechungsindex, 5, 148
- BSA, 67, 74, 85

- Calciumfluorid, 148
- Chemischer Effekt, 30
- Chemisorption, 103

- Dämpfung, 9, 108
- Dünnschichtnäherung, 29
- Denaturierung, 60
- Desorption, 154
- Detektionslimit, 84, 92
- Dielektrische Funktion, 5, 8, 108
- Dispersionsrelation, 5, 12
- DNA, 62
- Drude-Sommerfeld-Modell, 6, 7, 15

- EBNA-1, 67, 68, 77, 98
- Eilers-Algorithmus, 49
- Eindringtiefe, 6
- Einkanalspektrum, 151
- Elektronen-Spillout, 102
- Elektronenstrahlithographie, 152

- ELISA, 64, 86, 96, 97
- Energieverlustfunktion, 9
- Extinktion, 28
- Extinktionskoeffizient, 6

- Fano-Profil, 33, 53, 54
- Fernfeldwechselwirkung, 23
- Fingerprint-Bereich, 72
- Flächenfaktor, 55
- FTIR, 26
- FTIR-Spektrometer, 38

- Getrockneter Tropfen, 42, 70
- GIPC-1, 67, 69, 77, 81, 98
- Gittermode, 23
- Globar, 25
- Gold, 8
- Goldsubstrat, 40, 106

- Höhere Moden, 14
- Haftvermittler, 22, 152
- Halbwertsbreite, 10
- Harmonischer Oszillator, 9
- HEPES, 61
- Hintergrundpolarisierbarkeit, 5
- Hotspot*, 20

- Immobilisierung, 88
- Immunglobulin (Ig), 62
- Induktivität, 15
- Infrarot-Absorption, 23
- IR-Absorptionsquerschnitt, 30
- IR-aktiv, 24
- IRRAS, 29
- IRRAS-Messungen, 39, 40, 105

Index

- Jellium*-Modell, 101, 102
- Kohlenstoffmonoxid, 106
Konzentration, 6, 92
- Lambert-Beersche Gesetz, 6
Langmuir, 107
Lichtgerade, 12
Lightning rod effect, 20
Longitudinale Mode, 42
Lorentz-Oszillator, 9
LSPR, 13, 18, 80, 82, 90
- MCT-Detektor, 38
Mercaptoethanol, 88, 94
Methylene Blue, 41
Mikroskop, 39, 149
MnSOD, 67, 70, 75, 92
Molare Lösung, 71
- Nahfeld, 19, 30, 45, 103
Nahfeldwechselwirkung, 21
Nanoantennen, 22, 39, 79, 106, 156
Novotny-Gleichung, 17
- Oberflächenplasmon-Polariton, 12
Oszillatorstärke, 9
- PBS, 61, 72
Peptidbindung, 58
Physisorption, 104
Plasmafrequenz, 7
Präparation, 41
Primärstruktur, 59
Protokoll, 89
Puffer, 61, 88
Purge Gas Generator, 151
- QCM, 65
Quasi-statische Näherung, 13
- Raman-aktiv, 24
Raman-Mikroskop, 38
Raman-Streuquerschnitt, 30
Raman-Streuung, 24
- Relative Reflexion, 29
Relative Transmission, 28
Resonanz-Raman-Streuung, 25
Rot-Verschiebung, 43
Rotverschiebung, 14, 15, 21, 111
- SAM, 62
Savitzky-Golay-Algorithmus, 49
Schwingungsspektroskopie, 23
SEIRA, 30
SEIRS, 31
Sekundärstruktur, 59
SERS, 35, 46, 92
Signalgröße, 53
Silizium, 149
Smoothing Points, 49, 52
SNOM, 20, 31
- Target*-Protein, 64, 88
Telegraphengleichung, 5
Transversale Mode, 42
Tris, 61, 89
- Ultrahochvakuum, 104
Unspezifische Bindung, 61
- Vergleichsmessung, 45, 47
Verstärkungsfaktor, 33, 35, 47, 55, 83
Vibrationsmoden, 23
Volumenplasmon-Polariton, 11
- Wasser, 72
Wellenzahl, 27
- Zweite Ableitung, 51

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich im Laufe meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben. Besonderer Dank geht an:

Frau Prof. Dr. Annemarie Pucci für die Bereitstellung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung. Besonders bedanken möchte ich mich für die großzügige Unterstützung, welche mir u.a. die Teilnahme an vielen internationalen Konferenzen ermöglicht hat. So konnte ich nicht nur mein fachliches Wissen erweitern, sondern auch Kontakte zu anderen Wissenschaftlern aufbauen, die auf ähnlichen Fachgebieten forschen.

Herrn Prof. Dr. Reiner Dahint für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Frank Neubrech für sein immer offenes Ohr für wissenschaftliche Probleme und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Auch die gemeinsamen wissenschaftlichen Aufenthalte werden mir stets in guter Erinnerung bleiben.

Allen Mitarbeitern der Heidelberger Nanoantennenuntergruppe für die produktive und kollegiale Zusammenarbeit sowie allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der gesamten Arbeitsgruppe für die Hilfsbereitschaft und Expertise sowohl bei theoretischen als auch experimentellen Problemen. Spezieller Dank geht dabei an Christian Huck, Jochen Vogt und Steffen Wetzell.

Den Teams der mechanischen und elektronischen Werkstatt des Kirchhoff-Instituts in Heidelberg für die Anfertigung der benötigten Bauteile.

Prof. Dr. Tadaaki Nagao, Dr. Dominik Enders and Mr. Akihiko Ohi from NIMS in Japan, for the fabrication of the „D01/D03“ nanoantennas.

Prof. Dr. Enzo Di Fabrizio und Andrea Toma for the fabrication of all the other nanoantenna samples investigated in this thesis.

All researchers who participated in the „EU Nanoantenna Project“, especially Cristiano D’Andrea and Maximilien Cottat for the very good cooperation.

Allen geldgebenden Institutionen: HGSFP, Graduiertenakademie und Nanoantenna Project (FP7-HEALTH-F5-2009-241818-NANOANTENNA)

Julia Horrer möchte ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit meinen ganz besonderen Dank aussprechen. Ihre Unterstützung möchte ich in meinem Leben nicht vermissen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich im Studium und während der Doktorarbeit bestmöglich unterstützt haben.