

Miniaturisierte und markierungsfreie Analyse einzelner Mikrofluidsegmente unter Einsatz der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der
**Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der
Technischen Universität Ilmenau**

von Diplom-Ingenieur (FH)

Alexander Mendl

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. J. Michael Köhler
2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Christian Cierpka
3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Michael Maskos

Tag der Einreichung: 20.07.21

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 19.01.22

DOI: 10.22032/dbt.51925

URN: urn:nbn:de:gbv:ilm1-2022000133

Zusammenfassung

Die Mikrofluidsegmenttechnik ermöglicht es, Reaktionen unter optimierten Strömungsverhältnissen und mit einer minimalen Substanzmenge durchzuführen. Besonders für mehrdimensionale Reaktionsscreenings, bei denen die Einflüsse mehrerer Effektoren gleichzeitig untersucht werden, eignet sich diese Technik, da die Segmente geordnet durch das System geführt werden, wodurch die Zusammensetzung jedes einzelnen Segments bekannt ist. Deshalb hat bei dieser meist sehr komplexen und technisch aufwendigen Verfahrensweise die Analyse der Segmente bzw. deren Inhaltsstoffe eine große Bedeutung. Neben der optischen Auswertung oder der Fluoreszenzmessung, bei der die Zielsubstanz mit einer fluoreszierenden Gruppe markiert werden muss, werden aktuell markierungsfreie Detektionsmethoden entwickelt. Diese Detektionsmethoden sind aber noch sehr aufwendig und sind ohne tiefgreifende Fachkenntnisse auf dem jeweiligen Gebiet nicht anzuwenden.

Der Bedarf nach einer einfachen Analysemethode, mit der auch chemische Veränderungen in den Segmenten markierungsfrei detektiert werden können, ist die Grundlage für die Motivation der hier vorgestellten Arbeit. Diese beschreibt eine neue Methode für die markierungsfreie Analyse einzelner Fluidsegmente, die durch einen kompakten Aufbau und eine einfache Anbindung an beliebige Prozesse einen weitverbreiteten Einsatz der Analysetechnik ermöglicht. Die entwickelte Analysemethode beschreibt die erstmalige Kopplung der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (engl. *surface enhanced Raman scattering/ spectroscopy*, SERS) mit einer Umsetzung der seriell erzeugten Segmente auf eine parallele Array-Struktur aus SERS-aktiven Messstellen (SERS-Array). Dieser Umsetzungsschritt entkoppelt die zeitlich kritische Messung von der schnellen Prozessierung der Segmente und ermöglicht zudem einen optimalen optischen Zugang zu den Messstellen, wodurch der Einsatz kompakter Spektrometersysteme ermöglicht wird.

Zur Umsetzung des Konzepts wurde ein neuartiger SERS-aktiver Hydrogel-Film sowie ein Verfahren zum Auftragen des Films auf die Messstellen entwickelt. Bei der Entwicklung des Hydrogel-Films wurde eine Methode zur Herstellung quellbarer, SERS-aktiver Komposit-Sensormaterialien weiterentwickelt, indem die Haftung auf einem Glasträger, die Verdunstung des Lösungsmittels während der Applikation und die SERS-Verstärkung untersucht und angepasst wurden. Weiterhin wurde die Leistungsfähigkeit der entwickelten Analysemethode bestimmt, so zeigt das SERS-Array hervorragende Werte in Bezug auf die Langzeitstabilität. Das Gesamtsystem wurde im Vergleich mit

anderen SERS-basierten Analysemethoden bewertet. Dabei zeigt sich, dass vergleichsweise hohe Frequenzen an Segmenten analysiert werden können und dass die Quantifizierung von Testsubstanzen in einem breiten Konzentrationsbereich, der etwas oberhalb derer der Vergleichssysteme liegt, möglich ist. Anhand einer Desaminierungsreaktion konnte gezeigt werden, dass in dieser Arbeit eine kompakte und einfach adaptierbare Methode für SERS-Messungen entwickelt wurde, die chemische Veränderungen innerhalb von Mikrofluidsegmenten detektieren kann.

Abstract

Segmented flow techniques enables reactions to be carried out under optimized flow conditions and with a minimal amount of substance. This technique is particularly suitable for multidimensional reaction screenings, as the segments are passed through the system in an orderly manner, and thus the history of each individual segment is known. The analysis of the segments or their composition is of great importance in this usually very complex and technically expensive process. In addition to optical detection or fluorescence measurement, in which the target substance must usually be labeled with a fluorescent group, label-free detection methods are currently being developed. However, these methods are still very complex and cannot be used without specialist knowledge in the respective field.

In this work, a new method for label-free analysis of single fluid segments was developed, which allows widespread use of the analytical technique due to a compact design and easy connection to different processes. The developed analytical method includes the first combination of surface enhanced Raman scattering/spectroscopy (SERS) with a transfer of the serially generated fluid segments into a parallel array structure of SERS-active measuring spots (SERS array). This transfer step decouples the time-critical measurement from the fast processing of the fluid segments and allows an optimal optical access to the measuring spots, enabling the use of compact spectrometer systems.

To implement the concept, a novel SERS-active hydrogel film was developed, as well as a method for applying the hydrogel film to the measurement spots. In the development of the hydrogel film, a method for producing swellable, SERS active composite sensor particles was developed by studying and adjusting the adhesion to the glass substrate, the evaporation of the solvent during application and the SERS enhancement. Furthermore, the performance of the developed analytical method was determined. For example, the SERS array shows excellent values in terms of storage and application time. The overall system was evaluated in comparison with other SERS-based analytical methods, showing that a comparatively high frequency of fluid segments can be analyzed and that the quantification of test substances is possible in a wide concentration range, which is slightly above the comparison systems. Using a deamination reaction, it was shown that this work has succeeded in developing a compact and easily adaptable analytical method for SERS measurements that can detect chemical changes within microfluidic segments.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	ii
Abstract	iv
Inhaltsverzeichnis	v
1 Einleitung und Aufgabenstellung	1
2 Aufgabenstellung	5
3 Grundlagen und Forschungsstand	6
3.1 Tropfenbasierte Mikrofluidik.....	6
3.2 Markierungsfreie Detektionsmethoden für segmentierte Prozesse	10
3.2.1 Kopplung segmentierter Prozesse mit Massenspektrometern.....	10
3.2.2 Kopplung segmentierter Prozesse mit der oberflächenverstärkten Raman Spektroskopie	12
3.3 Grundlagen der SERS-Verstärkung	14
3.3.1 Prinzip der SERS-Verstärkung.....	14
3.3.2 Prinzip der chemischen Verstärkung.....	17
3.3.3 Berechnung des SERS-Verstärkungsfaktors.....	17
3.3.4 Plasmonische Nanostrukturen für SERS	19
3.4 Herstellung SERS-aktiver Komposit-Sensorpartikel	21
4 Methoden und Materialien	24
4.1 Beschreibung der Herstellungsmethode für die Polymermatrix.....	24
4.2 Beschreibung der Arbeitsschritte bei der Herstellung des SERS-Arrays	26
4.3 Beschreibung der Testaufbauten für die SERS-Messungen	28
4.4 Beschreibung der Methoden zur Auswertung und zur Bestimmung von Kenngrößen.....	33
4.4.1 Überprüfung der Daten mittels Varianzanalyse	33
4.4.2 Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	35
4.4.3 Bestimmung der Reaktionskomponenten durch eine multivariate Kalibrierung.....	35
4.4.4 Verfahren zur Vorbehandlung der spektroskopischen Daten	38
4.4.5 Analysemethoden zur Untersuchung des SERS-Polymers	40
4.5 Beschreibung der Geräte und Kenngrößen zur Auswahl der Raman-Spektrometer	41
4.6 Beschreibung des Gesamtaufbaus des Analysesystems.....	43
4.7 Beschreibung der Bedienoberfläche zur Steuerung und Auswertung des Raman-Messsystems	44
4.8 Beschreibung der verwendeten SERS-aktiven Partikel und Testsubstanzen	48

5	Ergebnisse und Diskussion	51
5.1	Entwicklung des Analysesystems.....	51
5.1.1	Untersuchung SERS-aktiver Komposit-Sensorpartikel.....	51
5.1.2	Entwicklung eines analytischen Messkonzepts basierend auf den Voruntersuchungen.....	56
5.1.3	Auswahl des Raman-Spektrometers	59
5.1.4	Entwicklung der Segmentdetektion.....	62
5.1.5	Entwicklung der Software zur Steuerung des Analysesystems.....	67
5.2	Entwicklung, Anpassung und Bewertung einzelner Methoden zu Herstellung des SERS-Arrays ...	71
5.2.1	Methodenentwicklung zur Erstellung der Trägerplatte	72
5.2.2	Methodenentwicklung für das Aufbringen des SERS-Polymers	74
5.2.3	Anpassungen der Applikationsmenge an die Geometrie der Messstelle	76
5.2.4	Bewertung der verschiedenen Methoden zur Herstellung des SERS-Arrays	78
5.3	Anpassung der Polymerzusammensetzung zur Verwendung auf den SERS-Arrays	80
5.3.1	Untersuchung der Haftung auf Glas und des Quellverhaltens des SERS-aktiven Polymers ...	80
5.3.2	Untersuchung der Aushärtung der Silbersalz-Monomerlösung durch UV-Licht	83
5.3.3	Untersuchung des Einflusses der Lösemittelzusammensetzung auf die Verdunstung	87
5.4	Untersuchung des Einflusses und Optimierung des Silbergehalts auf die SERS-Verstärkung	89
5.5	Abschließende Bestimmung der Eigenschaften des SERS-Arrays	95
5.5.1	Aufbereitung der SERS-Spektren.....	96
5.5.2	Bestimmung der SERS-Verstärkung der SERS-aktiven Messstellen.....	97
5.5.3	Untersuchung der Wiederholgenauigkeiten der SERS-Arrays.....	98
5.5.4	Untersuchung der Langzeitstabilität der SERS-Arrays.....	101
5.5.5	Analyse einer Sequenz von Segmenten mit abfallender Analytkonzentration.....	102
5.5.6	Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	104
5.5.7	Bewertung der Skalierbarkeit des Analysesystems	107
5.6	Vergleich des entwickelten Analysesystems mit anderen Analysemethoden	108
5.7	Durchführung einer Reaktionsverfolgung mit dem entwickelten Analysesystem	111
5.7.1	Bestimmung der Segmentzusammensetzung anhand einer Farbstofflösung.....	111
5.7.2	Kalibrierung der Adenin- und Hypoxanthin-Konzentration	113
5.7.3	Reaktionsdurchführung	122
6	Schlussfolgerungen	126
6.1	Zusammenhängende Diskussion der Ergebnisse und Ausblick	126
6.2	Auflistung der wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit.....	133
7	Literaturverzeichnis	135

Anhang	146
Abkürzungen	149
Lateinische Symbole	151
Griechische Symbole	152
Veröffentlichungen	153
Zeitschriftenaufsätze.....	153
Veröffentlichte Konferenzbeiträge.....	153
Danksagung	155

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die Miniaturisierung kontinuierlicher Prozesse erhält immer weiter Einzug in die chemischen und biologischen Forschungslabore. In der chemischen Prozesstechnik ermöglicht es die kontinuierliche Fahrweise Prozesse in neuen Druck- oder Temperaturbereichen stattfinden zu lassen. Diese neuen Prozessfenster können dazu genutzt werden, um Prozesse schneller, effizienter beispielsweise im Hinblick auf Raum/Zeit-Ausbeuten oder mit erhöhter Selektivität zu betreiben [1–3]. Aber auch in den Bereichen Prozessentwicklung, Reaktionsoptimierung und Wirkstoffscreening ist die Miniaturisierung ein Vorteil, da sich Versuche im kleinen Maßstab, mit geringem Materialeinsatz und gegebenenfalls vollautomatisch durchführen lassen.

In mikrobiologischen Screenings ist oft eine hohe Anzahl an Versuchen notwendig, um beispielsweise neue Wirkstoffe zu testen oder Mikroorganismen zu untersuchen. Hier können in einem sogenannten Hochdurchsatz-Screening (engl. *high-throughput screening*, HTS) eine Vielzahl an Wirkstoffen, Zielstrukturen oder toxischen Substanzen sowie deren Konzentrationsauswirkungen untersucht werden [4, 5]. In dem HTS-Bereich hat sich in den letzten Jahren eine besondere Prozesstechnik, die tropfenbasierte Mikrofluidik, etabliert. Bei dieser Prozesstechnik werden monodisperse Tropfen von wenigen Pikolitern mit Frequenzen im Kiloherz-Bereich hergestellt [6–8]. Diese Tropfen, welche durch einen zweiten Fluidstrom, der mit dem ersten nicht mischbar ist und als Trägerphase bezeichnet wird, separiert werden, können als abgeschlossene Reaktionsräume angesehen werden. Ein Spezialfall der tropfenbasierten Mikrofluidik ist die Mikrofluidsegmenttechnik, bei der ein kontinuierlicher Prozessstrom durch die Trägerphase in einzelne Kompartimente in den Dimensionen der Mikrokanäle aufgeteilt wird [8, 9]. Im Unterschied zur tropfenbasierten Mikrofluidik bleibt dabei die räumliche Ordnung erhalten, wodurch eine spätere Zuordnung der Segmente zu den Prozessbedingungen erfolgen kann.

Um die jeweiligen Segmente zu erzeugen, können einfache mikrofluidische T-Stücke, aber auch komplexere Düsenstrukturen eingesetzt werden. Die Segmente können dabei ein Volumen von mehreren Pikolitern bis zu wenigen Mikrolitern einnehmen. Durch die Kompartimentierung mit Hilfe der Trägerphase wird das in diesen Kanaldimensionen typische laminare Strömungsprofil unterbunden, wodurch eine enge Verweilzeitverteilung erreicht wird. Innerhalb der Segmente bildet sich ein Strömungsfeld aus, wodurch eine schnelle Vermischung der Flüssigkeiten erfolgt [10–12]. Die Zusammensetzung der Segmente kann sehr flexibel und genau variiert werden, so können

beispielsweise mehrdimensionale Konzentrationsräume untersucht werden. Dabei können die Einflüsse von Reaktanden, Wirkstoffen oder toxischen Stoffen auf Reaktionen, Zielstrukturen oder Mikroorganismen hochaufgelöst identifiziert werden [13]. Weiterhin ermöglicht die segmentierte Prozessführung die automatisierte Durchführung einer Vielzahl an Experimenten mit geringem Material- und Zeiteinsatz.

Die Vielzahl an Experimenten erzeugt jedoch einen erheblichen Messaufwand. Deshalb sind schnelle Methoden notwendig, um die Segmente ohne große Zeitverluste zu analysieren. In mikrobiologischen Screenings kann beispielsweise das Wachstum von Mikroorganismen anhand von optischen Bildern über den Grauwert ausgewertet werden [14]. Weiterhin kommen chromophore und fluoreszierende Moleküle zur Markierung zum Einsatz, die in Verbindung mit der Zielsubstanz eine Signalveränderung erzeugen [15, 16]. Dieses Signal kann durch schnelle optische Detektoren aufgenommen werden, wodurch die Zielsubstanz identifiziert oder quantifiziert werden kann. Diese Methoden sind jedoch nicht für alle Anwendungen zielführend, vor allem dann nicht, wenn das zu analysierende Zielmolekül unbekannt ist. Ein Beispiel hierfür ist die Beeinflussung des Metabolismus von Mikroorganismen mit dem Ziel neue Syntheseleistungen zu untersuchen. Dies wurde im Projekt BactoCat (BMBF KFZ-031A161A) der Technischen Universität Ilmenau und der Friedrich-Schiller-Universität Jena untersucht.

Um neue Syntheseleistungen und daher im Vorfeld unbekannte Analyten zu untersuchen, müssen markierungsfreie Detektionsmethoden zum Einsatz kommen. Die Kopplung von segmentierten Prozessen an Massenspektrometer (MS) oder an Raman-Spektrometer, unter Ausnutzung der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (engl. *surface enhanced Raman scattering/spectroscopy*, *SERS*), ist bereits Gegenstand der aktuellen Forschung.

Küster et al. [17] beschreiben eine Methode für die Massenspektrometrie, bei der die Anbindung über eine Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionisation*, *MALDI*) erfolgt. Bei diesem Verfahren werden die Segmente auf einer MALDI-Platte abgesetzt und im Anschluss mit Hilfe eines Lasers desorbiert und ionisiert. Wink et al. [18] beschreiben eine Methode, die mittels Elektrosprayionisation (ESI) die Segmente direkt aus dem Prozess in ein Massenspektrometer überführt. Als Gegenelektrode zum Massenspektrometer dient der Ausgang des mikrofluidischen Bauteils, welches eigens für diesen Prozess entwickelt wurde.

Neben der Massenspektrometrie ermöglichen auch schwingungsspektroskopische Analysemethoden wie die Infrarot- und Raman-Spektroskopie eine gute Strukturauf-

klärung. Hierbei werden Molekülschwingungen detektiert, die charakteristisch für das jeweilige Molekül oder eine Molekülgruppe sind. Um die meist geringen Empfindlichkeiten im Falle der Raman-Spektroskopie zu umgehen, kann die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie eingesetzt werden. Diese macht sich zu Nutze, dass das durch den geringen Streuquerschnitt schwache Raman-Signal an rauen Metalloberflächen stark verstärkt wird. Meist werden spezielle Silber- oder Goldoberflächen eingesetzt. Dabei werden hohe Signalverstärkungen, die als Verstärkungsfaktoren bezeichnet werden und im Bereich von 10^2 - 10^8 liegen, erreicht [19]. Die Herstellungsmethoden sind dabei sehr vielfältig [20]. Eine Methode besteht darin, die Silberpartikel in einem Polymer einzubetten. Köhler et al. [21] zeigen, dass solche Komposit-Partikel als SERS-aktive Sensorpartikel eingesetzt werden können. Bei den SERS-aktiven Komposit-Sensorpartikeln handelt es sich um Polyacrylamid-Partikel, die in einem mikrofluidischen Prozess hergestellt werden. Die Sensorpartikel enthalten Silberkeime und sind aufgrund ihrer Vernetzung quellbar in wässrigen Lösungen. Zudem kann die Beladung der Partikel mit Silber beeinflusst werden. Die Arbeiten von Visaveliya et al. [22] zeigen, dass sich die Partikel sehr gut für SERS-Messungen eignen.

Für SERS-Messungen an segmentierten Prozessen werden aber meist zuvor hergestellte kolloidale Silbersuspensionen zu den Segmenten dosiert und anschließend mit einem Raman-Mikroskop analysiert [23]. Im Gegensatz kann die Herstellung der Silbernanopartikel auch direkt auf dem mikrofluidischen Chip erfolgen, wodurch die aufwendige Herstellung der Silberpartikel wegfällt [24, 25]. Die erwähnten Methoden ermöglichen es, Änderungen der chemischen Zusammensetzung in Segmenten zu detektieren und dabei die notwendige Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit zu erreichen. Sie sind jedoch sehr aufwendig und mit hohen Investitionskosten verbunden. Beispielsweise ist die Entwicklung eines Moduls zur Überführung der Segmente aus dem mikrofluidischen Chip in ein Massenspektrometer notwendig. Diese Überführung erfordert Expertise sowohl auf dem Gebiet der Massenspektrometrie als auch in der Auslegung mikrofluidischer Systeme. Bei Verwendung der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie als Analysemethode muss die kolloidale Lösung, welche die SERS-Verstärkung bewirkt, im Vorfeld der Versuche frisch hergestellt oder deren Herstellung direkt mit auf dem Chip integriert werden, was Zeit und aufwendiges Equipment erfordert. Zudem erfolgt die Kopplung des Raman-Spektrometers über einen Mikroskopaufbau, der einen optischen Zugang in den Mikrokanal benötigt.

Beide Methoden, die Massenspektrometrie und die SERS-Spektroskopie, sind nach aktuellem technischem Stand für den Einsatz an mikrosegmentierten Prozessen noch

hochkomplexe Entwicklungen, die zumeist an Universitäten oder Forschungslaboren von interdisziplinären Forschungsgruppen betrieben werden. Diese Methoden sind nicht nur sehr kostenintensiv, sondern auch nicht für den Transport in andere Labore geeignet. Somit müssen die Prozesse zu den Analyselaboren gebracht werden. Zuweilen beinhalten die mikrofluidischen Prozesse aber auch sehr aufwendige Aufbauten oder erfordern aus Sicherheitsgründen, beispielsweise im Umgang mit Mikroorganismen, speziell ausgestattete Labore. Somit wird eine Kopplung dieser beiden Techniken selten realisiert.

Es besteht folglich ein erheblicher Bedarf an einer markierungsfreien Detektionsmethode, die eine vergleichsweise einfache Kopplung an mikrofluidische, segmentierte Prozesse ermöglicht. Um solche Methoden in modernen Forschungslaboren zu etablieren, müssen die Systeme portabel sein. D.h. sie müssen zu dem Prozess gebracht werden können und ohne spezielles Expertenwissen auf dem Gebiet der Geräteentwicklung betrieben werden können. Als Analysetechnik ermöglicht die Raman-Spektroskopie neben der hohen molekularen Spezifität durch den Einsatz von sichtbarem Licht die kontaktlose Analyse in wässriger Umgebung. Um eine hinreichend hohe Empfindlichkeit zu erreichen, kann die Methode der oberflächenverstärkten Raman-Streuung für die Analyse der separierten Tropfen angewendet werden. Im Hinblick auf den Einsatz in biotechnischen und chemischen Laboren bietet ein SERS-basiertes Analysesystem optimale Voraussetzungen eine möglichst kompakte und kostengünstige Analysemethode aufzubauen.

2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, ein kompaktes und transportables SERS-Analysesystem zu entwickeln, das bei mikrofluidischen Screenings chemische Veränderungen in seriell anfallenden Fluidsegmenten erfassen kann. Dazu sollten SERS-aktive Komposit-Sensorpartikel untersucht und eine Methodik entwickelt werden, welche die Herstellung des SERS-aktiven Materials aus Grundchemikalien beinhaltet. Neben der Optimierung und Validierung des SERS-Substrates sollte die Robustheit des entwickelten Analysesystems anhand von Testmessungen und der Durchführung eines Reaktionsscreenings gezeigt werden. Die zentralen Fragen, die während dieser Arbeit behandelt wurden, lauten:

1. Welches Ansprechverhalten zeigen SERS-aktive Komposit-Sensorpartikel auf einen Analyten und wie verhalten sich diese bei dynamischen Messungen aufeinanderfolgend wechselnder Testsubstanzen?
2. Wie kann eine robuste SERS-Analysemethode für Fluidsegmente im oberen Nanoliterbereich realisiert werden, die keine aufwendigen fluidischen und softwareseitigen Kopplungen zu dem vorgeschalteten mikrofluidischen Prozess erfordern?
3. Wie kann ein SERS-Substrat zur Analyse einzelner Mikrofluidsegmente reproduzierbar hergestellt werden und inwieweit hat der Herstellungsprozess einen Einfluss auf die SERS-Aktivität?
4. Wie sind die erzielten Werte für den Durchsatz und die Empfindlichkeit einer neu entwickelten kompakten Analysemethode im Vergleich zu bisherigen Methoden zu bewerten?
5. Unter welchen Bedingungen sind mit einer SERS-basierten Analysemethode quantitative Messungen und die Verfolgung chemischer Umwandlungen möglich?

3 Grundlagen und Forschungsstand

In diesem Kapitel sollen die wesentlichen Grundlagen behandelt werden. Dazu wird der aktuelle Forschungsstand, auf dessen Grundlage die Aufgabenstellung formuliert wurde, beschrieben und mit weiteren theoretischen Grundlagen, die zum Verständnis der vorgestellten Arbeiten notwendig sind, dargestellt. Zu Beginn wird die Technik der tropfenbasierten Mikrofluidik beschrieben, ebenso die aktuellen Detektionstechniken und deren Entwicklungsstand für segmentierte Prozesse. Zudem werden die notwendigen Grundlagen der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie sowie einige Methoden zur Herstellung von SERS-aktiven Materialien, insbesondere den SERS-aktiven Komposit-Sensorpartikeln, die an der Technischen Universität Ilmenau entwickelt wurden, dargestellt.

3.1 Tropfenbasierte Mikrofluidik

Die tropfenbasierte Mikrofluidik beruht auf der Manipulation einzelner Tröpfchen (disperse Phase), die durch eine zweite nicht mischbare (Träger-) Phase separiert sind und sich in einem kontinuierlichen Prozessstrom bewegen [26]. Dies kann in kleinen Röhren, Kapillaren oder Mikrokanälen ablaufen. Die einzelnen Tropfen sind untereinander isoliert und können als viele kleine einzelne Reaktionsvolumina angesehen werden. Der große Vorteil dieser Technik gegenüber einer gewöhnlichen einphasigen Strömung ist, dass durch die zweiphasige Prozessführung das aufgrund der kleinen Kanaldimensionen stark ausgeprägte laminare Strömungsprofil gestört wird. Die überwiegend axiale Taylor-Dispersion, die zu einer Verdünnung und Verbreiterung der Strömungsfront führt, wird vermieden [27]. Dies ermöglicht schnelle Mischzeiten und enge Verweilzeitverteilungen (Abbildung 3-1).

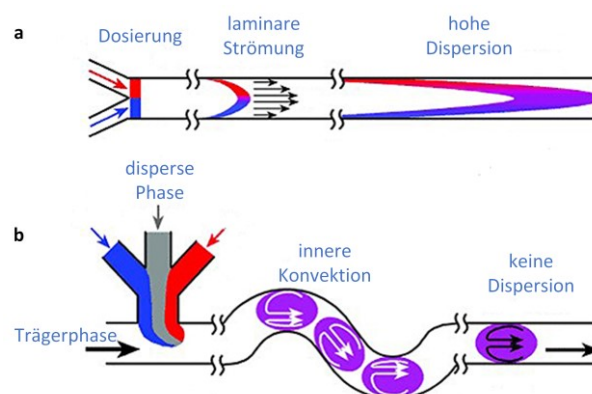


Abbildung 3-1: Laminares Strömungsprofil im kontinuierlichen durchströmten Mikrokanal (a) sowie Pfropfenströmung und interne Konvektion bei segmentierten Flüssen (b) (übernommen und angepasst aus [27])

Zwei für die Tropfenbildung wichtige dimensionslose Kenngrößen sind die Reynolds-Zahl Re und die Kapillarzahl Ca . Die Reynolds-Zahl beschreibt das Verhältnis von Trägheits- zu Zähigkeitskräften und gibt Aufschluss über das Turbulenzverhalten innerhalb des Kanals. Die Kapillarzahl beschreibt das Verhältnis von Viskositätskräften zu Oberflächenspannungen an den Grenzflächen von zwei nicht mischbaren Fluiden. Sie sind definiert als

$$Re = \frac{\rho v d}{\eta} \quad 3.1$$

und

$$Ca = \frac{\eta v}{\sigma}. \quad 3.2$$

Dabei ist ρ die Dichte, v die Strömungsgeschwindigkeit, η die dynamische Viskosität und σ die Oberflächenspannung des Fluids. Die Kanalabmessungen werden über die charakteristische Länge d ausgedrückt.

Die Tropfen werden erzeugt, indem ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom durch eine zweite Phase in einzelne Kompartimente unterteilt wird. In Mikrokanälen überwiegen meist die Viskositätskräfte den Trägheitskräften, wodurch instabile Strömungszustände erreicht werden, in denen die Abspaltung von Tropfen aus dem kontinuierlichen Fluidstrom energetisch begünstigt ist [26]. Zur Tropfenbildung können T-Kreuzungen, bei denen die disperse Phase über den Seitenkanal in den Kanal der Trägerphase eingebracht wird, aber auch komplexere Strukturen zur Strömungsfokussierung (engl. *flow-focusing*) verwendet werden. Bei der Strömungsfokussierung wird die disperse Phase durch zwei entgegengesetzte Ströme der Trägerphase zusammengedrückt und durch eine Engstelle geführt [28, 29]. Dabei bildet die disperse Phase zuerst eine dünne Schicht, die bei Instabilität in einzelne Tropfen zerfällt [30, 31]. Die Tropfenbildung kann allgemein in drei Regime unterschieden werden, die in Abbildung 3-2 dargestellt sind.

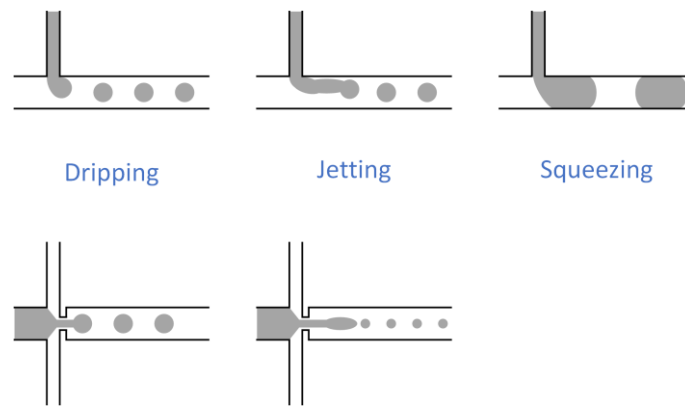


Abbildung 3-2: „Dripping“- , „jetting“- und „squeezing“- Regime in der T-Kreuzung (oben) und „dripping“- und „jetting“-Regime bei der Strömungsfokussierung (unten) (nachgestellt und angepasst aus [32])

Im „dripping“-Regime (dt. *tropfend*) überwiegen die Oberflächenkräfte die Trägheitskräfte. Wenn die Scherkräfte die Rückhaltekraft, die durch die Oberflächenspannung verursacht wird, übersteigen, bildet sich der Tropfen nahe an der T-Kreuzung [33]. Die erzeugten Tropfen haben üblicherweise deutlich kleinere Abmessungen als die Kanäle, ihre Größe kann über die Kapillarzahl gut abgeschätzt werden [34]. Im „squeezing“-Regime (dt. *quetschend*) sind die Scherkräfte kleiner als die Grenzflächenspannung, dadurch wächst der Tropfen in den Kanal der Trägerphase hinein. Durch diese Verengung des Kanals steigt der Druck im Kanal der Trägerphase und schiebt den Tropfen soweit in den Kanal hinein, bis dieser abreißt [35]. In diesem Regime werden Tropfen im Kanal erzeugt, die den gesamten Kanalquerschnitt einnehmen, wodurch die disperse Phase in einzelne Kompartimente (Segmente) eingeteilt wird. Die dritte Form ist das „jetting“-Regime (dt. *ausstoßen*). Dabei bildet sich ein langer Strahl der dispersen Phase, der weit in den Kanal der Trägerphase hineinreicht und erst deutlich hinter der Kontaktstelle in einzelne Tropfen zerfällt. Dieses Regime ist stark von den Verhältnissen der Oberflächenspannung, den Trägheits- und Scherkräften im System abhängig und tritt meist bei einer hohen Kapillarzahl auf [36, 37].

Das „dripping“-Regime wird häufig dann angewendet, wenn die Interaktion mit der Kanalwand nicht gewünscht ist. Beispielsweise bei der Partikelherstellung, oder wenn eine große Population an kleinen Tropfen erzeugt werden soll. Das „squeezing“-Regime findet Anwendung in der Mikrofluidsegmenttechnik, die einen Spezialfall der tropfenbasierten Mikrofluidik darstellt. Die Segmente werden bei dieser Technik geordnet durch das System geführt, folglich sind die einzelnen Segmente adressierbar [38]. Die Vermischung innerhalb der Segmente erfolgt sehr schnell. Aufgrund der durch die umgebende Trägerphase auf das Segment ausgeübten Scherkräfte wird in diesem eine Konvektionsströmung erzeugt [10], diese wird weiter verstärkt, wenn in den Kanälen alternierende Umlenkungen verwendet

werden (siehe Abbildung 3-1 b) [39]. Die innere Konvektion wurde bereits in zahlreichen Arbeiten mittels numerischer Strömungsmechanik (engl. *computational fluid dynamics*, CFD) und Micro-Particle Image Velocimetry (μ PIV) nachgewiesen und charakterisiert [40, 41].

Um Experimente in Segmenten durchführen zu können, steht eine breite Palette an Funktionseinheiten zur Verfügung. Diese können beliebig miteinander verschaltet werden und ermöglichen grundlegende Operationen wie das Erzeugen, Mischen, Dosieren, Sortieren, Verdünnen, Kultivieren und Inkubieren [7, 9, 42, 43]. So findet die Mikrofluidsegmenttechnik Anwendung in vielen Disziplinen wie der chemischen Synthese, der Herstellung von Nanopartikeln, der analytischen Chemie, der Zellkultivierung und des Zellscreenings sowie der Erbgutforschung.

Ein Beispiel, das das Potential der Mikrofluidsegmenttechnik veranschaulicht, ist die Arbeit von Cao [44] über die Erzeugung mehrdimensionaler Konzentrationsräume. In den Untersuchungen wird der Einfluss von drei Effektoren auf das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) ermittelt. Der Aufbau für die Versuche ist in Abbildung 3-3 dargestellt.

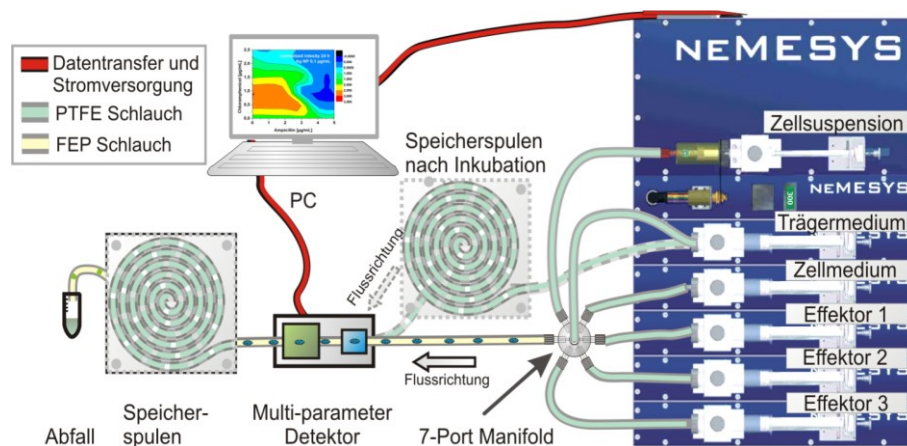


Abbildung 3-3: Versuchsaufbau für das Screening dreidimensionaler Konzentrationsräume und Aufbau der optischen Analyse der Segmente (übernommen aus [44])

Die Dosierung der Zellsuspension, des Trägermediums und der Effektor-Lösungen erfolgt über pulsationsarme Spritzenpumpen und die Segmente werden über ein Verteilerbauteil mit sieben Anschlüssen realisiert. Der dreidimensionale Konzentrationsraum wird durch die komplementäre Variation der Flussraten aller drei Effektoren erzeugt [44]. Nach der Inkubation in langen Schlauchspiralen werden die Segmente anhand der Autofluoreszenz des Bakteriums analysiert, womit sich die Wachstumsraten bestimmen lassen. Die Ergebnisse zeigen durch den multidimensionalen Ansatz neben den Wirkungen der einzelnen Effektoren auch synergetische, antagonistische und kompensatorische Wechselwirkungen der Effektoren [44]. Diese Methode zeigt

eindrucksvoll die Leistungsfähigkeit der Mikrofluidsegmenttechnik für die Aufklärung von Wirkmechanismen in der Toxikologie oder der Arzneimittelforschung.

3.2 Markierungsfreie Detektionsmethoden für segmentierte Prozesse

Bei mikrosegmentierten Prozessen ist es üblich, die Segmente mit optischen Methoden (sichtbarer Bereich und Fluoreszenzsignale) zu analysieren. Die Signale sind meist sehr stark und können über kompakte Spektrometer einfach an die miniaturisierten Bauteile und Kanäle adaptiert werden. Die Informationen über die Struktur der Substanz sind jedoch sehr gering. Daher kommen meist Techniken zum Einsatz, die die Markierung der Zielsubstanz mit chromophoren oder fluoreszierenden Gruppen ermöglichen.

Zur Markierung der Zielsubstanz steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. Unter anderem ist die Markierung von Molekülen, Proteinen, Nukleinsäuren oder Polysacchariden möglich [45, 46]. Doch die Markierung benötigt meist auch komplizierte fluidische Verfahrensschritte und stößt dann an die Grenzen, wenn keine Markierungstechnik für die Zielsubstanz vorhanden ist oder wenn die Zielsubstanz nicht bekannt ist. In diesen Fällen müssen markierungsfreie Methoden eingesetzt werden. Die Herausforderung bei der Adaption dieser Techniken besteht in dem geringen Probenvolumen, der schnellen Messfrequenz sowie dem Einfluss der Trägerphase auf die Messung.

Markierungsfreie Detektionsmethoden ermöglichen es, über physikalisch-chemische Wechselwirkungen strukturelle Informationen über die Segmentzusammensetzung zu generieren. In der chemisch-biologischen Forschung werden zur Strukturaufklärung meist Methoden wie die Kernresonanzspektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR), die Massenspektrometrie (MS) oder auch die Infrarot- und Raman-Spektroskopie eingesetzt. Aktuell wird intensiv an der Kopplung segmentierter Prozesse mit der Massenspektrometrie und der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (engl. *surface enhanced Raman scattering/ spectroscopy*, SERS) gearbeitet. Ausgewählte Methoden werden im Folgenden beschrieben.

3.2.1 Kopplung segmentierter Prozesse mit Massenspektrometern

Bei der Massenspektrometrie (MS) erfolgt die Überführung der Testsubstanz zum Analysesystem durch Ionisation der Substanzen [47]. In der Mikrofluidsegmenttechnik werden dazu die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) oder die Elektrospray-Ionisation (ESI) verwendet. Bei der MALDI-Methode wird die Testsubstanz in der Matrix durch Kokristallisation auf einem Träger gebunden [48]. Durch einen Laser wird die Matrix zusammen mit der Testsubstanz explosionsartig abgelöst und in das MS

überführt. In den Arbeiten von Küster et al. [17] werden die wässrigen Segmente auf einer hydrophoben Platte mit hydrophilen Messstellen abgesetzt. Abbildung 3-4 zeigt ein Schema der Methode.

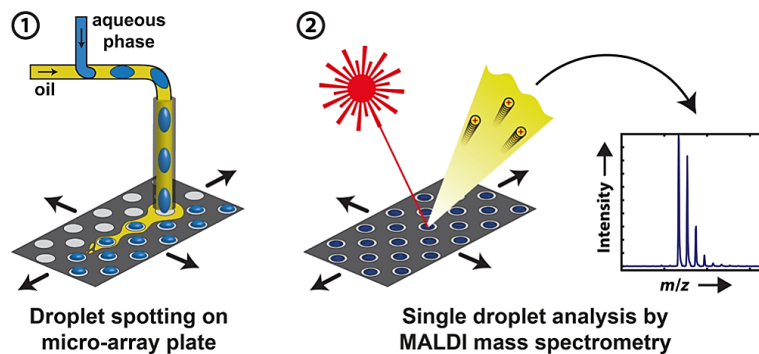


Abbildung 3-4: Methode zur Überführung der Segmente auf eine MALDI-Platte (übernommen aus [17])

Die Tropfen werden dabei mit einer Lichtschranke erkannt und über ein automatisches Positioniersystem auf einer freien Messstelle abgesetzt [17]. Im Nachgang werden die Matrixmoleküle den Stellen mit den Segmenten zugefügt. Die so präparierte Platte kann in konventionellen MALDI-MS Systemen verwendet werden.

Bei der ESI-Methode wird eine Metallkapillare am Ausgang des Mikrokanals, die als Gegenelektrode zum Massenspektrometer geschaltet ist, zur Injektion der Probe verwendet [49]. Die Flüssigkeit wird im elektrischen Feld beschleunigt und ionisiert. Die Überführung der Segmente muss dabei so erfolgen, dass die Trägerphase nicht in das Spektrometer gelangt, da dies zu Problemen bei der Messung führt. Eine Möglichkeit ist die Abtrennung der Segmente von der Trägerphase. Kelly et al. [50] nutzen dafür einen wässrigen Seitenkanal, der durch die fluiddynamische Auslegung die wässrigen Segmente aufnimmt. Dieser wässrige Strom wird weiter zum ESI-Emitter geleitet. Fidalgo et al. [51] überführen die Segmente ebenfalls in einen wässrigen Strom, sie erreichen den Übergang jedoch durch ein schaltbares elektrisches Feld. Dies ermöglicht es, zusätzlich nur bestimmte Tropfen auszuwählen, die zum MS geleitet werden. Abbildung 3-5 zeigt die beiden Bauteile.

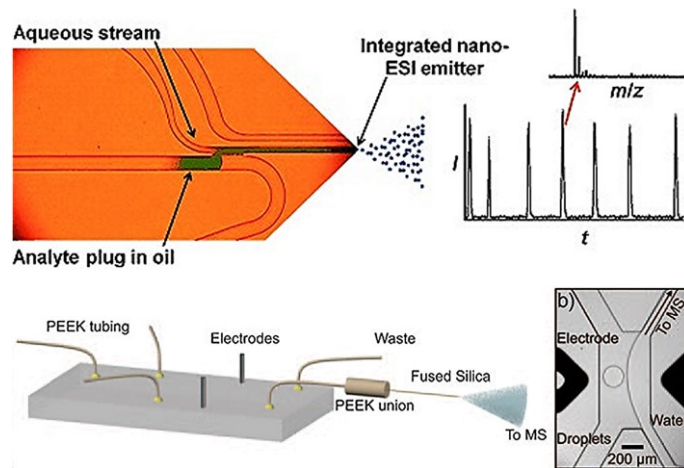


Abbildung 3-5: Abtrennung der Segmente von der Trägerphase mittels fluidodynamischer Auslegung (oben) (übernommen aus [50]) und elektrischem Feld (unten) (übernommen und angepasst aus [51])

Eine weitere Methode, um das Eindringen der Trägerphase in das MS zu verhindern, wird von Beulig et al. [52] beschrieben. Der segmentierte Prozessstrom wird mit der Trägerphase in die Metallkapillare geleitet. Die Gegenelektrode zur Kapillare ist jedoch nicht wie üblich der Spektrometereingang, sondern eine Metallplatte, die gegenüber der Kapillare angeordnet ist. Dieser Aufbau ermöglicht es, das Spektrometer orthogonal zum Sprühnebel zu positionieren. So kann das Eindringen der Trägerphase effektiv verhindert werden [52]. Zusätzlich wird die Trägerphase am Ausgang des mikrofluidischen Bauteils durch einen Kanal abgeführt. Abbildung 3-6 zeigt den Aufbau der Methode.

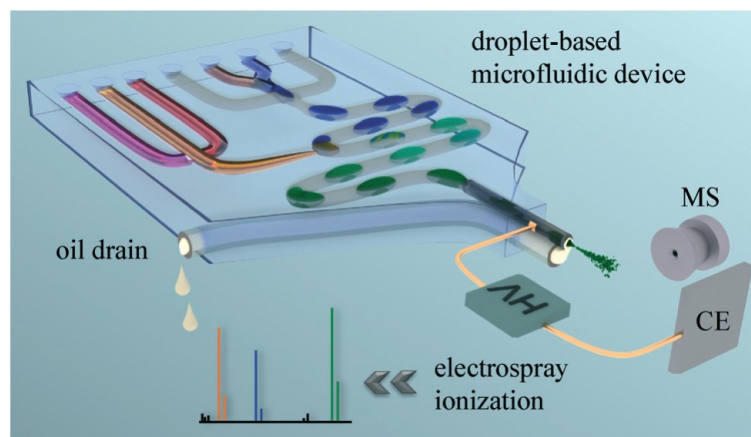


Abbildung 3-6: Methode zur Überführung der Segmente und Abtrennung der Trägerphase durch eine orthogonale Ausrichtung des Spektrometers zum Sprühnebel (übernommen aus [52])

3.2.2 Kopplung segmentierter Prozesse mit der oberflächenverstärkten Raman Spektroskopie

Um SERS-Messungen in Mikrokanälen zu ermöglichen, gibt es bereits erste Methoden [53], jedoch sind die Möglichkeiten bei der segmentierten Prozessführung stark begrenzt. Das liegt vor allem daran, dass bei SERS-Messungen die Testsubstanzen zwingend mit einer

nanostrukturierten Oberfläche, beispielsweise einer Metallnanostruktur, in Kontakt kommen müssen (siehe Kapitel 3.3). Der Kontakt mit der Oberfläche und die damit einhergehende mögliche Querkontaminierung zwischen einzelnen Segmenten stellt ein großes Problem dar, da bei der Mikrofluidsegmenttechnik jedes Segment durchgehend isoliert prozessiert werden soll. Daher werden bei der SERS-Analyse von Flüssigkeitssegmenten in mikrofluidischen Bauteilen zumeist Methoden eingesetzt, die eine Dosierung von kolloidalen Metallpartikeln zu den Segmenten verwenden.

Typischerweise werden die kolloidalen Gold- oder Silberpartikel mit klassischen Batch-Methoden hergestellt und zu den Segmenten dosiert [54]. Durch die induzierte Konvektion innerhalb der Segmente werden eine schnelle Vermischung und eine homogene Verteilung der kolloidalen Partikel innerhalb der Segmente erreicht. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Partikelsynthese in das mikrofluidische Bauteil zu integrieren. Die Synthese erfolgt ebenfalls in Fluidsegmenten, wodurch die Segmente, welche die Nanopartikel enthalten, in einem zweiten Schritt mit den zu analysierenden Segmenten vereinigt werden müssen [24, 25]. Durch die *in situ* Herstellung kann eine bessere Reproduzierbarkeit bei den SERS-Messungen im Vergleich zu den im Batch vorab hergestellten Partikeln erreicht werden.

Die Messung des Raman-Signals erfolgt ebenfalls direkt im Mikrokanal. Dazu ist ein optischer Zugang notwendig, der die Fokussierung des Lasers und die Aufnahme des Signals ermöglicht. Aufgrund der kleinen Abmessungen und der daher notwendigen Fokussierung, werden zur Messung Raman-Mikroskope eingesetzt. Problematisch ist die schnelle Bewegung der Segmente. Meist werden die Prozesse mit langsameren Flussraten durchgeführt, damit Messzeiten von 500 bis 1000 ms realisiert werden können. Unter speziellen Voraussetzungen können hohe Signale erreicht werden, die auch kürzere Messzeiten zulassen. Dies ist beispielsweise durch die Nutzung der oberflächenverstärkten resonanten Raman-Streuung (engl. *surface enhanced resonant Raman scattering/spectroscopy*, SERRS) möglich. Dabei tritt neben dem SERS-Substrat auch der Analyt in Resonanz mit der verwendeten Laserwellenlänge, wodurch die Signalintensität um weitere zwei Größenordnungen verstärkt werden kann [19]. Diese Methode kann aber ausschließlich für chromophore Moleküle eingesetzt werden, denn die Anregung findet meist im sichtbaren Bereich statt. Cecchini et al. [55] erreichen durch Ausnutzung von SERRS bei der Messung von Malachitgrün Messzeiten von 10 μ s.

3.3 Grundlagen der SERS-Verstärkung

Die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (engl. *surface enhanced Raman scattering/spectroscopy*, SERS) beruht auf der Wechselwirkung zwischen Licht mit Molekülen und metallischen Nanostrukturen. Derzeitig sind zwei Prinzipien, die zur Verstärkung des Raman-Signals führen, allgemein anerkannt: die elektromagnetische Verstärkung und die chemische Verstärkung. In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie dargestellt. Dabei sollen besonders die Effekte, die für das Verständnis dieser Arbeit notwendig sind, erläutert werden. Eine vollumfängliche Darstellung der Grundlagen erfolgt hier jedoch nicht, diese ist in der Literatur zu finden [19, 47]. Weiterhin werden die Bestimmung des Verstärkungsfaktors und einige Beispiele für die Herstellung plasmonischer Nanostrukturen dargestellt.

3.3.1 Prinzip der SERS-Verstärkung

Fällt Laserlicht auf eine Metalloberfläche, kann das elektromagnetische Feld des Laserlichts mit der Kreisfrequenz ω_{inc} und der Amplitude E_0 die frei beweglichen Leitungselektronen im Metall resonant anregen. Diese Plasma-Oszillation (Plasmonen), dessen Eigenfrequenz unter anderem von der dielektrischen Funktion des Metalls $\epsilon_{\text{Metall}}(\omega)$ und dem umgebenden Medium $\epsilon_{\text{Medium}}(\omega)$ abhängt, führt zu einer Ladungstrennung im Metall, wodurch ein Dipolmoment $\mu_{\text{ind(Metall)}}$ induziert wird [56]. Abbildung 3-7 zeigt den Vorgang anhand eines Goldpartikels.

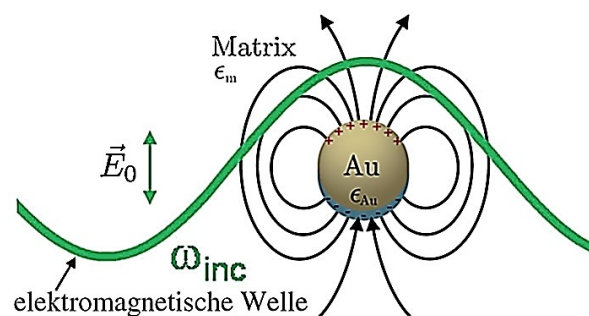


Abbildung 3-7: Induzierter Dipol in einem Goldpartikel durch externe Anregung (übernommen und angepasst aus [56])

Das induzierte Dipolmoment ändert seine Polarität periodisch mit der Kreisfrequenz ω_{inc} des Laserlichts und ist abhängig von der Polarisierbarkeit α . Diese wird durch einen Tensor dargestellt, der das Volumen und die Form der molekularen oder atomaren Elektronenwolke beschreibt [57]:

$$\mu_{ind(Metall)} = \alpha_{Metall} E_0(\omega_{inc}). \quad 3.3$$

Das Metall wird so selber zum Emittor eines elektrischen Feldes $E_{loc}(\omega_{inc})$, das die gleiche Frequenz wie das Anregungsfeld besitzt, jedoch deutlich stärker ist [58]. Auf diese Weise wird die einfallende Strahlung durch die elastische Streuung verstärkt. Diese Art der resonanten Anregung bezeichnet man als dipolare lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz (engl. *localized surface plasmon resonance*, LSPR) [56].

Befindet sich ein Molekül im Bereich der metallischen Nanostruktur, kann auch dort ein Dipolmoment durch das lokale elektrische Feld in der Form

$$\mu_{ind(Molekül)} = \alpha_{Molekül} E_{loc}(\omega_{inc}) \quad 3.4$$

induziert werden. Neben der elastischen Streuung kann im Molekül auch eine inelastische Streuung auftreten, wenn sich die Polarisierbarkeit mit der Molekülschwingung, welche einer oszillierenden Änderung des Abstands der Atomkerne entspricht, verändert [47]. Diese Modulation des einfallenden elektrischen Feldes ist die Grundlage der Raman-Spektroskopie. Das im Molekül induzierte Dipolmoment ist aus drei Termen zusammengesetzt, wobei ω_{vib} die Eigenfrequenz des schwingenden Moleküls darstellt [47]:

$$\mu_{ind(Molekül)} = \mu_{ind}(\omega_{inc}) + \mu_{ind}(\omega_{inc} - \omega_{vib}) + \mu_{ind}(\omega_{inc} + \omega_{vib}). \quad 3.5$$

Der erste Term beschreibt die elastische Rayleigh-, der zweite und dritte die inelastischen Stokes-Raman- und anti-Stokes-Raman-Streuung. Das von dem Molekül gestreute Licht kann wiederum an der Metalloberfläche ein Dipolmoment induzieren und somit, wie auch das anregende Licht, verstärkt werden. Abbildung 3-8 zeigt die elektromagnetische Verstärkungswirkung anhand der Stokes-Raman-Streuung.

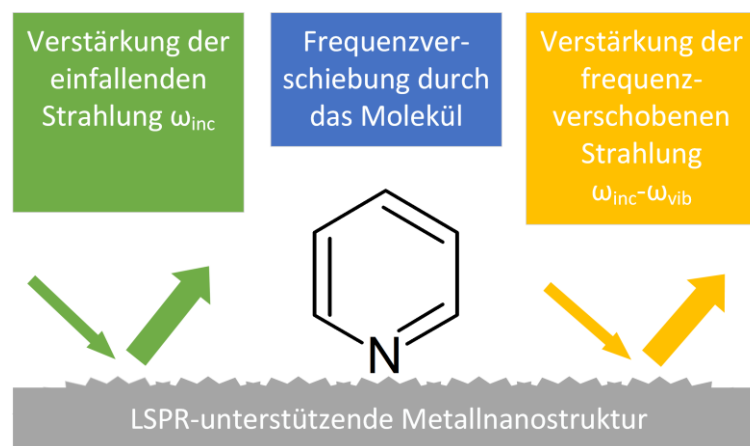


Abbildung 3-8: Verstärkung des Feldes der einfallenden (ω_{inc}) und der frequenzverschobenen ($\omega_{inc} - \omega_{vib}$) Strahlung (nach [56])

Die einfallende Strahlung regt eine LSPR im Metall an und wird elastisch gestreut. Das verstärkte Licht wird wiederum durch das Molekül inelastisch gestreut. Diese frequenzverschobene Strahlung $\omega_{\text{inc}} - \omega_{\text{vib}}$ kann wieder eine LSPR des Metalls anregen und elastisch gestreut werden. Die so verstärkte und frequenzverschobene Strahlung kann im Fernfeld nachgewiesen werden.

Damit hängt die Intensität des SERS-Signals I_{SERS} nicht nur vom elektrischen Feld des einfallenden Lichts $E(\omega_{\text{inc}})$, sondern auch vom elektrischen Feld der frequenzverschobenen Raman-Streuung $E(\omega_{\text{inc}} \pm \omega_{\text{vib}})$ ab. Eine optimale Verstärkung wird erreicht, wenn beide Frequenzen mit der Plasmonenbande der Nanostruktur überlappen, es gilt [56]:

$$I_{\text{SERS}} = I(\omega_{\text{inc}})I(\omega_{\text{inc}} \pm \omega_{\text{vib}}) = |E(\omega_{\text{inc}})|^2 |E(\omega_{\text{inc}} \pm \omega_{\text{vib}})|^2. \quad 3.6$$

Ist die Anregungsfrequenz deutlich größer als die Eigenfrequenz des Moleküls, dann liegen die Anregungsfrequenz und die frequenzverschobene Raman-Frequenz nahe beieinander (typischerweise für Frequenzen im grünen und blauen Bereich), wodurch Gl. 3.6 angenähert werden kann [56]:

$$I_{\text{SERS}} \approx |E(\omega_{\text{inc}})|^4. \quad 3.7$$

Die Reichweite dieses elektromagnetischen Verstärkungsmechanismus ist jedoch lokal sehr eingeschränkt. So nimmt die Stärke des Dipols

$$E(r) \sim r^{-3} \quad 3.8$$

mit zunehmendem Abstand von der Oberfläche stark ab, wodurch auch die Intensität des SERS-Signals

$$I_{\text{SERS}} \sim r^{-12} \quad 3.9$$

stark abnimmt [59, 60]. Durch diese sehr lokale Wirkung der elektromagnetischen Felder wird die Verstärkungsleistung selbst durch die Ausrichtung der Moleküle zur Oberfläche beeinflusst. Zum Beispiel können bei unterschiedlicher Ausrichtung des adsorbierten Moleküls unterschiedliche Schwingungen verstärkt werden [19].

Aber auch die Struktur der Oberfläche bzw. die Anordnung von SERS-aktiven Partikeln hat einen entscheidenden Einfluss auf die SERS-Intensität. Xu et al. [61] haben gezeigt, dass das erzeugte elektromagnetische Feld im Bereich der Verbindungsstelle zweier Partikel am größten ist. Schon durch eine Vergrößerung des Abstandes von 1 nm auf 5,5 nm kann der maximale Verstärkungsfaktor (engl. *enhancement factor*, EF, siehe Kapitel 3.3.3) um drei Größenordnungen absinken. Damit erzeugt nur ein sehr kleiner

Bereich der analysierten Fläche, auch Hotspot genannt, eine hohe Verstärkungsleistung. Wichtig ist dabei, dass Hotspots nicht nur in den Zwischenräumen von Partikeln, sondern auch an scharfen Ecken oder Spitzen auftreten können [56]. Fang et al. [62] untersuchten die Verteilung der Verstärkungsfaktoren auf einer Oberfläche mit Nanokugeln, die mit einem Silberfilm (engl. *Ag film over nanospheres*, AgFON, siehe Kapitel 3.3.4) überzogen sind. Sie zeigten, dass etwa 61 % der Moleküle einen Verstärkungsfaktor kleiner 10^4 haben, aber nur etwa 4 % zur SERS-Intensität beitragen. Etwa 6 % der Moleküle tragen mit einem Verstärkungsfaktor zwischen $10^6 - 10^9$ den Großteil zur SERS-Intensität bei (etwa 60 %). Nur etwa 0,0003 % der Moleküle werden extrem stark verstärkt ($EF > 10^{10}$), was immerhin noch zu etwa 7 % der gesamten SERS-Intensität beiträgt.

3.3.2 Prinzip der chemischen Verstärkung

Neben der elektromagnetischen Verstärkung kann auch eine chemische Verstärkung der Raman-Streuung erfolgen. Diese umfasst etwa zwei Größenordnungen und ist damit deutlich schwächer als die elektromagnetische Verstärkung. Das Prinzip der chemischen Verstärkung beruht entweder auf einem Ladungstransfer (engl. *charge transfer*, CT) oder dem Aufbau einer Bindung zwischen dem Molekül und dem Metall. Dadurch ist dieser Prozess, im Gegensatz zur elektromagnetischen Verstärkung, von den chemischen Eigenschaften des Moleküls abhängig. Die Wechselwirkung zwischen dem Molekül und dem Metall bewirkt eine Veränderung der elektronischen Eigenschaften. Dies kann zu einer erhöhten Polarisierbarkeit im Molekül führen, wodurch sich auch der üblicherweise geringe Raman-Streuquerschnitt verändert. Ebenso können Elektronen vom Metall zum Molekül und zurück springen, bei dieser vorübergehenden Ladungsübertagung kann das Molekül in einem angeregten Schwingungszustand verbleiben [47, 56].

In der Fachliteratur werden noch weitere Effekte der chemischen Verstärkung, wie beispielsweise der photoinduzierte CT-Mechanismus, beschrieben [19, 57, 63]. Da der allgemeine Beitrag zur SERS-Verstärkung eher gering ist, wird hier auf eine ausführliche Beschreibung der weiteren Effekte verzichtet.

3.3.3 Berechnung des SERS-Verstärkungsfaktors

Zur Quantifizierung der zuvor beschriebenen Mechanismen der Signalverstärkungen kann die Bestimmung des Verstärkungsfaktors (engl. *enhancement factor*, EF) erfolgen. Dieser ist definiert als die vierte Potenz des Verhältnisses aus dem lokalen Feld E_{loc} und dem einfallenden elektrischen Feld E_{inc} (unter den gleichen Voraussetzungen wie bei Gl. 3.7) [64]:

$$EF \approx \left(\frac{E_{loc}}{E_{inc}} \right)^4. \quad 3.10$$

Die SERS-Verstärkung von einem Molekül (engl. *single molecule enhancement factor*, SMEF) an einem bestimmten Punkt ist damit über das Verhältnis der Intensitäten der Raman- (RS) und der SERS-Messung definiert [65]:

$$SMEF = \frac{I_{SERS}}{I_{RS}}. \quad 3.11$$

Eine experimentelle Bestimmung ist auf dieser Grundlage nur schwer durchzuführen. Daher werden die Intensitäten üblicherweise auf die Anzahl der adsorbierten bzw. die in der Lösung enthaltenen Moleküle normiert [56]. In der Literatur werden dafür einige Methoden vorgestellt, die von Ru et al. [65] kritisch zusammengetragen wurden. Zwei der dort beschriebenen Ansätze zur Bestimmung von EFs sollen nachfolgend erläutert werden.

Am gebräuchlichsten ist der gemittelte SERS EF, dieser ist folgendermaßen definiert:

$$EF = \frac{\frac{I_{SERS}}{N_{\text{Surf}}}}{\frac{I_{RS}}{N_{\text{Vol}}}}. \quad 3.12$$

Die Intensität der SERS-Messung I_{SERS} wird verglichen mit der Intensität der Raman-Messung I_{RS} . Dabei wird die SERS-Messung auf die Anzahl der auf der Oberfläche adsorbierten Moleküle N_{Surf} und die RS-Messung auf die Anzahl an Molekülen im Messvolumen N_{Vol} bezogen. Alle anderen Parameter (Laserleistung, Integrationszeit, etc.) müssen konstant sein.

Der analytische Verstärkungsfaktor (engl. *analytical enhancement factor*, AEF) bietet hier eine praktische Definition des Verstärkungsfaktors:

$$AEF = \frac{\frac{I_{SERS}}{c_{SERS}}}{\frac{I_{RS}}{c_{RS}}}. \quad 3.13$$

Die Intensitätssteigerung wird dabei auf die jeweilige Konzentration (c_{SERS} bzw. c_{RS}) bezogen. Kritisch ist hierbei, dass die SERS-Intensität auf alle Moleküle auf dem SERS-Substrat bezogen wird, also auch auf diejenigen, die sich nicht in der Nähe eines Hotspots befinden und somit nicht verstärkt werden. Der AEF ermöglicht die Beurteilung, um welchen Faktor sich die Bestimmungsgrenze in der praktischen Anwendung nach unten verschieben lässt.

3.3.4 Plasmonische Nanostrukturen für SERS

Die Oberflächenplasmonenresonanz (engl. *localized surface plasmon resonance*, LSPR) ist von zentraler Bedeutung für das Modell der elektromagnetischen SERS-Verstärkung (siehe Kapitel 3.3.1). Die maximale SERS-Verstärkung kann erreicht werden, wenn die Anregungswellenlänge und die frequenzverschobene Wellenlänge mit der Plasmonenbande des Metalls übereinstimmen [56]. Für die experimentellen SERS-Messungen müssen daher Nanostrukturen mit plasmonischen Eigenschaften zur Verfügung stehen. Im Folgenden werden einige ausgewählte Methoden vorgestellt.

Eine simple Methode zur Bereitstellung plasmonischer Nanostrukturen ist die Verwendung einer Nanopartikelsuspension, die mit der Testsubstanz vermischt wird [66]. Die Nanopartikelsuspensionen können leicht hergestellt werden [54] und zeigen eine hohe SERS-Verstärkung. Zudem können die plasmonischen Eigenschaften von Nanopartikeln für einen weiten Wellenlängenbereich über die Größe, Form und Geometrie beeinflusst werden [67, 68]. Jedoch ist die Aggregation der Partikel über die Zeit nur schwer kontrollierbar und damit von Nachteil für die Reproduzierbarkeit der Messungen.

Um unkontrollierte Aggregation zu verhindern, können die Nanopartikel auf einem Trägersubstrat immobilisiert werden. Dies kann beispielsweise durch die Funktionalisierung von Oberflächen mit Anker-molekülen erreicht werden. Die Immobilisierung der Nanopartikel (NP) erfolgt dabei in einem selbstorganisierenden Prozess [69–71]. Weiterhin besteht die Möglichkeit, die Nanopartikel auf einem Zellulose-Papier zu fixieren. Rajapandiyam et al. [72] entwickelten eine Methode zur Photoreduktion einer Silbernitratlösung in einem Filterpapier. Wohingegen Han et al. [73] sich die Technik des Füllfederhalters zu Nutze machen, um eine NP-haltige Tinte auf ein Zellulosepapier aufzutragen. Beide Methoden eignen sich, um schnell eine Vielzahl an SERS-Messstellen aus Grundchemikalien herzustellen. Diese Messstellen können auf einem Substrat und auch in einer 2D-Arrayform angeordnet werden. Abbildung 3-9 zeigt die Methode von Han et al.

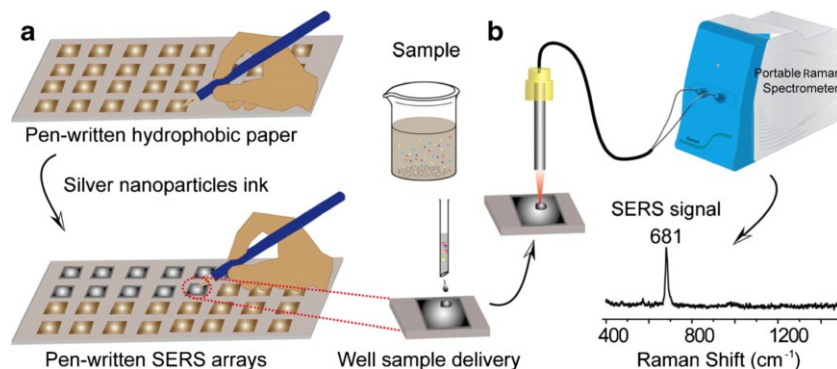


Abbildung 3-9: Methode zum lokalen Beschriften eines Papiers mit SERS-aktiven Tinten (übernommen aus [73])

Eine weitere Methode nutzt Nanokugeln, die mit einem Metallfilm (engl. *silver film over nanospheres*, AgFON) überzogen sind, als SERS-Substrat. Dazu werden Nanokugeln eines beliebigen Materials, die in einer Monolage auf einem Substrat angeordnet sind, mit einer dünnen Silberschicht überzogen. Abbildung 3-10 zeigt die Schritte zur Herstellung eines Ag-FON Substrates. Mit diesen Substraten lassen sich reproduzierbare und regelmäßige Strukturen herstellen, die eine gleichmäßige SERS-Verstärkung liefern und sich daher für theoretische Untersuchungen der Verstärkungsmechanismen eignen [62, 74].

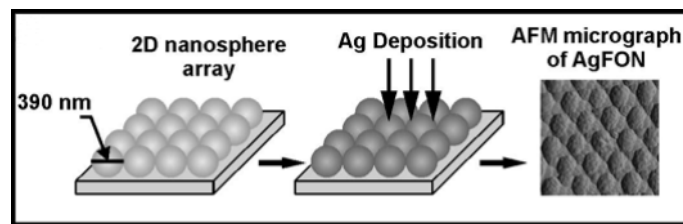


Abbildung 3-10: Aufbau von SERS-Substraten mit einem Silberfilm über angeordneten Nanokugeln (AgFON) (übernommen und angepasst aus [75])

Auch nanolithografische Methoden eignen sich für die Herstellung von SERS-Substraten. Diese Techniken erlauben es, hochpräzise Strukturen im Nanometerbereich zu erzeugen [76]. Abbildung 3-11 zeigt zwei Verfahren zur Erzeugung periodischer metallischer Nanostrukturen.

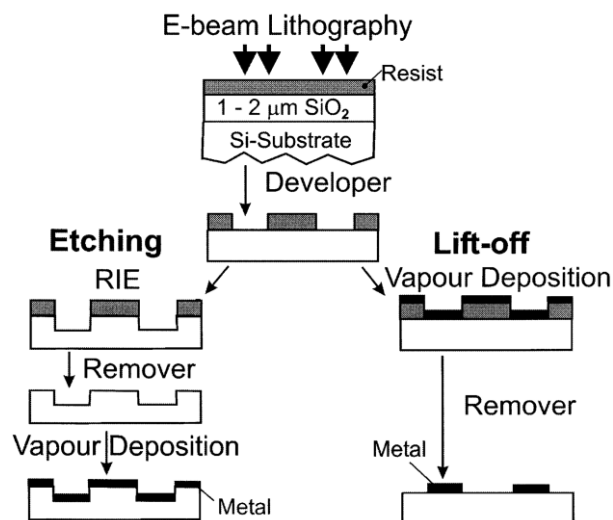


Abbildung 3-11: Zwei Verfahren zur Erzeugung metallischer Nanostrukturen (übernommen und angepasst aus [77])

Bei der Lithografie wird ein Glassubstrat mit einer inerten Schicht überzogen, die mit einem Elektronenstrahl partiell abgetragen wird. Nun kann zum einen die erzeugte Struktur durch eine Gasphasenabscheidung mit einer Metallschicht überdeckt werden, wobei durch das Ablösen der Schutzschicht erhabene Metallstrukturen auf dem Glas-

substrat entstehen (Abbildung 3-11, rechter Prozess). Zum anderen kann das Glassubstrat an den freigelegten Stellen partiell geätzt werden. Nach dem Ablösen der Schutzschicht kann die erhaltene Glasstruktur durch eine Gasphasenabscheidung mit einem Metallfilm überzogen werden. Durch diese Methoden können hochpräzise Strukturen mit bekannten Geometrien erzeugt werden, die eine gute Reproduzierbarkeit ermöglichen.

Im nachfolgenden Kapitel wird eine weitere Methode vorgestellt, bei der plasmonische Silberpartikel in einer Polymermatrix hergestellt werden. Diese Methode ist von besonderer Bedeutung für diese Arbeit, da die Zusammensetzung dieser Komposit-Partikel als Grundlage für die Entwicklung eines SERS-aktiven Hydrogel-Films dient. Neben den hier vorgestellten Methoden gibt es noch eine Vielzahl weiterer Methoden, um plasmonische Strukturen zu erzeugen. Umfangreiche Übersichtsartikel bieten hier einen guten Überblick [78, 79].

3.4 Herstellung SERS-aktiver Komposit-Sensorpartikel

Nach der allgemeinen Einführung zur Erzeugung plasmonischer Strukturen im vorherigen Kapitel, soll in diesem Kapitel eine Methode zur Herstellung von SERS-aktiven Komposit-Sensorpartikeln (SERS-Sensorpartikeln) vorgestellt werden, da die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse auf dieser Herstellungsmethode aufbauen

Die SERS-Sensorpartikel beruhen auf der Idee, die Eigenschaften von Polymerpartikeln mit denen von Nanopartikeln zu kombinieren [21]. Dabei können die Quelleigenschaften der Polymere genutzt werden, um SERS-aktive Hydrogele zu erzeugen, in denen sich Moleküle durch Diffusion ausbreiten können. Die Polymermatrix kann dabei so variiert werden, dass auch stoffselektive Durchlässigkeiten ermöglicht werden [21]. Die Partikel werden unter Verwendung der tropfenbasierten Mikrofluidik hergestellt. Dazu wird eine Silbersalz-Monomerlösung über eine T-Kreuzung in den Kanal der Trägerphase eingebracht. Über die Scherkräfte bilden sich einzelne Tropfen, die nach der Vereinzelung an einer UV-Lampe zum Aushärten vorbeigeführt werden. Die Polymermatrix wird aus Acrylamid und dem Quervernetzer Methylenbisacrylamid (MBA) (19:1) aufgebaut und mit dem Photoinitiator 2-Hydroxy-2-Methylpropiophenon (HMPP) ausgehärtet. Die Ausgangslösung enthält bereits Silbernitrat, das bei der UV-Aushärtung zu elementarem Silber (Silberkeime) reduziert wird. Durch die Zugabe eines Reduktionsmittels (Ascorbinsäure) und weiterem Silbersalz (Silbernitrat) wird nach der Aushärtung an diesen Silberkeimen eine Silbernanopartikelsynthese initiiert. Diese führt dazu, dass die Silberkeime im Polymer und auf der Oberfläche anwachsen (Nachverstärkung) [22].

Visaveliya [80] untersuchte die Einflüsse der Herstellung auf die Eigenschaften der Partikel im Detail. Neben den fluiddynamischen und chemischen Einflüssen auf die Größe und Porosität der Partikel, sind vor allem die Einflüsse auf den Silbergehalt der Partikel hervorzuheben. So bilden sich bei erhöhten Konzentrationen des Reduktionsmittels und des Silbersalzes (Keimbildung und Nachverstärkung) größere Partikel auf der Oberfläche, wodurch sich eine Rotverschiebung und eine Verbreiterung der Plasmonenbande ergeben. Auch das Raman-Signal steigt bei höherem Silbergehalt, jedoch nur so lange bis sich auf der Oberfläche größere Silbercluster bilden, die die Oberfläche bedecken. Diese Clusterbildung führt zu einem Abfall des SERS-Signals [22]. Abbildung 3-12 zeigt ein Schema der Einflüsse bei der Herstellung auf die SERS-Sensorpartikel.

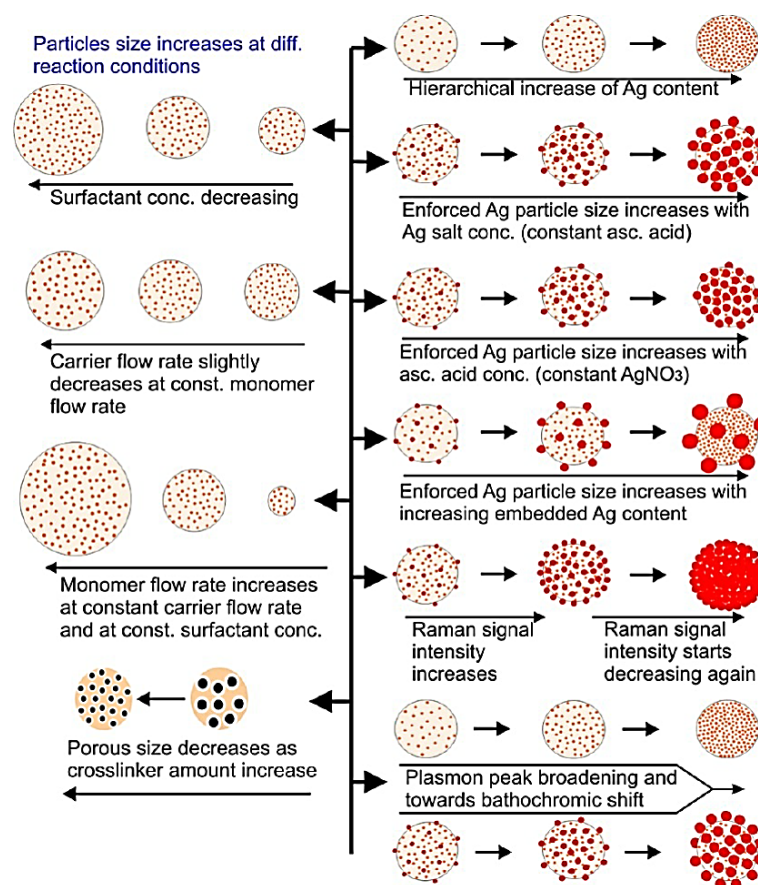


Abbildung 3-12: Schema für maßgeschneiderte SERS-Sensorpartikel - Einflüsse auf die Größe und die Porosität der Partikel, auf den Nanopartikelgehalt innerhalb des Partikels und auf dessen Oberfläche sowie auf die plasmonischen Eigenschaften und das SERS-Signal (übernommen aus [22])

Visaveliya et al. zeigen die guten SERS-Verstärkungen der Sensorpartikel an Messungen verschiedener Biomoleküle (Adenin, Histidin und L-Milchsäure) in einem Glasfläschchen. Zur Aufzeichnung wird ein kompaktes Raman-Spektrometer (532 nm) verwendet. In weiteren Anwendungen zeigen sie die Applikation der Partikel in einem kontinuierlich durchströmten Mikrokanal [81]. Dazu werden die Partikel in einer Glas-kapillare fixiert. Abbildung 3-13 zeigt ein Schema des Aufbaus.

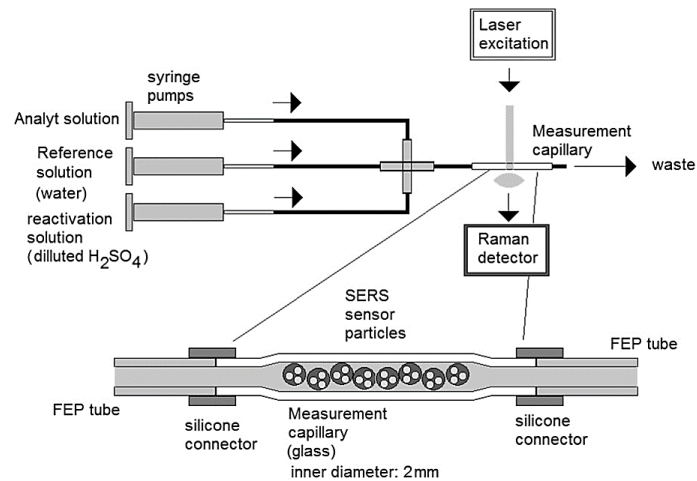


Abbildung 3-13: Schema des Aufbaus für in-situ SERS-Messungen in mikrofluidischen Kanälen (übernommen aus [81])

Die Messungen zeigen, dass nicht nur einzelne Testsubstanzen durch die in-situ Messung detektiert werden können, sondern auch, dass verschiedene alternierende Substanzen (Histidin und Adenin) auf den fixierten SERS-Sensorpartikeln gemessen werden können. Durch die starke Anbindung an den Partikeln ist es jedoch erforderlich, die Testsubstanzen mit einer schwefelsäurehaltigen Lösung von den Partikeln zu waschen [81].

4 Methoden und Materialien

In diesem Kapitel werden die verwendeten Methoden und Materialien beschrieben, die zum Verständnis der in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse notwendig sind. Es werden beispielsweise die einzelnen Schritte zur Herstellung des Polymers und des SERS-Arrays sowie die Versuchsaufbauten, die für die Analysen und Messungen der SERS-Sensorteilchen verwendet werden, beschrieben. Die Methoden, die zur Auswertung der Versuche benötigt werden, werden ebenso wie die Softwareoberfläche zur Steuerung des Systems und zur Auswertung der Versuche vorgestellt. Abschließend werden die verwendeten Testsubstanzen und die Polymerpartikel, die bei den Voruntersuchungen eingesetzt werden, aufgelistet.

4.1 Beschreibung der Herstellungsmethode für die Polymermatrix

Für die Herstellung der Polymermatrix wurde auf bekannte Methoden aus der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) zurückgegriffen. Die einzelnen Arbeitsschritte werden im Detail dargestellt. Anschließend sind die Polymerzusammensetzungen aufgeführt, die in den verschiedenen Versuchen verwendet wurden.

Die dreidimensionale Struktur des Polymers entsteht durch die radikalische Polymerisation von Acrylamid und einem Quervernetzer. Als Quervernetzer wird bei der PAGE standardmäßig *N,N'*-Methylenbisacrylamid (MBA) eingesetzt [82]. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit *N,N'*-Diallylweinsäurediamid (DATD) zur Quervernetzung verwendet, weil bekannt ist, dass dieser die Haftung auf Glasoberflächen verbessert [83] und dass das Hydrogel durch eine oxidative Glykolspaltung mit Natriumperjodat sehr leicht aufgelöst werden kann [84, 85]. Die Strukturformeln von Acrylamid und den Quervernetzern sind in Abbildung 4-1 dargestellt.

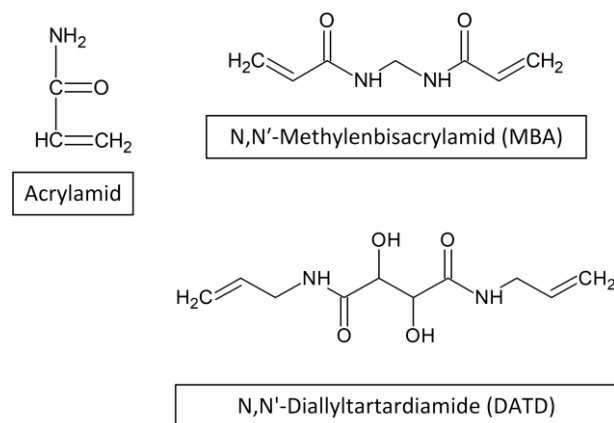


Abbildung 4-1: Strukturformeln der Monomere

Die Polymereigenschaften wie die Porosität oder die Festigkeit können durch den Vernetzungsgrad C und die Totalamidkonzentration T beeinflusst werden [86]. Die beiden Größen können wie folgt berechnet werden [87]:

$$C = \frac{m_{\text{Quervernetzer}}}{m_{\text{Acrylamid}} + m_{\text{Quervernetzer}}} \times 100 \% \quad 4.1$$

$$T = \frac{m_{\text{Acrylamid}} + m_{\text{Quervernetzer}}}{m_{\text{Lösungsmittel}}} \times 100 \% \quad 4.2$$

Die Polymerisation erfolgt über eine radikalische Kettenreaktion, für deren Start der Photoinitiator 2-Hydroxy-2-Methylpropiophenon (HMPP) verwendet wird. Dieser zerfällt unter UV-Strahlung in ein Benzoylradikal und ein 2-Hydroxyl-2-Propylradikal, wodurch die Polymerisation gestartet wird (Abbildung 4-2).

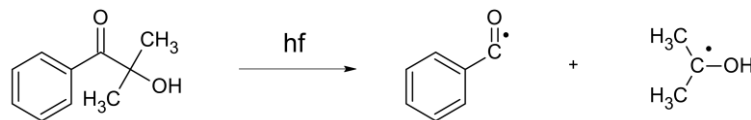


Abbildung 4-2: Zerfall des Radikalstarters 2-Hydroxy-2-Methylpropiophenon

Zur Herstellung der Silbersalz-Monomerlösung werden die Komponenten zusammen mit Silbernitrat, welches für die Entstehung der Silberkeime während der Aushärtung zugegeben wird, in einem Lösungsmittel (Wasser oder Wasser-Ethylenglykol-Mischung) aufgenommen. Als Gehaltsgröße wird in dieser Arbeit die Molalität b (Einheit: mol kg⁻¹) verwendet, da die Stoffmenge des gelösten Stoffes auf die Masse des Lösungsmittels bezogen wird. Somit ist die Molalität unabhängig von auftretenden Volumenkontraktionen und deshalb in der praktischen Arbeit einfacher zu handhaben. Die Nachverstärkung der ausgehärteten Polymere erfolgt durch Zugabe einer wässrigen Ascorbinsäure-Lösung mit nachfolgender Zugabe einer wässrigen Silbernitrat-Lösung. Die verwendeten Polymerzusammensetzungen und Verstärkerlösungen, die für die jeweiligen Untersuchungen in Kapitel 5 verwendet wurden, sind in Tabelle 4-1 aufgelistet.

Tabelle 4-1: Übersicht über die Polymerzusammensetzung bei den Untersuchungen mit: QV - Quervernetzer; C - Vernetzungsgrad; T - Totalamidkonzentration; PI - Photoinitiator; LM - Lösungsmittel; Ag-K - Silbernitrat im Grundpolymer; AscH₂ - Ascorbinsäure; Ag-NV - Silbernitrat bei der Nachverstärkung, var. - variabel, W - Wasser, EG - Ethylenglykol

Kapitel	QV	C [%]	T [%]	b _{PI} [mmol kg ⁻¹]	LM	b _{Ag-K} [mmol kg ⁻¹]	c _{AscH₂} [mmol L ⁻¹]	c _{Ag-NV} [mmol L ⁻¹]
5.3.2	DATD	5	30	var.	Wasser	70	50	50
5.3.3	DATD	5	var.	350	var.	70	-	-
5.4	DATD	5	22,5	5 * b _{Ag-K}	W:EG (1:1)	var.	c _{Ag-NV}	var.
5.5 + 5.7	DATD	5	22,5	50	W:EG (1:1)	5	60	60

4.2 Beschreibung der Arbeitsschritte bei der Herstellung des SERS-Arrays

Zur Herstellung des SERS-Arrays waren mehrere Arbeitsschritte, wie die hydrophobe Beschichtung der Glasoberflächen, der Laserabtrag zur Erzeugung der hydrophilen Stellen sowie die Beladung, Aushärtung und Trocknung des Arrays, notwendig.

Für die Beschichtung der Glasoberflächen mit Octadecyltrichlorsilan (OTS) werden die Borosilikat-Wafer (Schott, Borofloat 33®) zunächst mit Peroxomonoschwefelsäure (Schwefelsäure 98 % und Wasserstoffperoxid 30 % im Verhältnis 3:1) gereinigt, wodurch auch die Dichte der Silanogruppen auf der Oberfläche erhöht wird. Die gereinigten Glasplatten werden für 12 Stunden in eine Lösung von 3 mmol L⁻¹ OTS in Toluol gelegt und anschließend mit Toluol, Ethanol und VE-Wasser gespült. Die so erzeugte hydrophobe Glasoberfläche bildet mit Wasser einen Kontaktwinkel von 110°. Auf den beschichteten Glaswafern mit den Abmaßen von 120 x 60 x 1,1 mm³ wurden durch Laserablation hydrophile Stellen erzeugt. Dafür wurde ein gepulster Laser mit einer Pulsdauer von 10 ps (Super Rapid, Lumera Laser) und einer Wellenlänge von 1064 nm verwendet. Die kurzen Pulse erlauben einen schmelz- und spannungsfreien Abtrag der Glasoberfläche [88]. Der Laserstrahl wird über Galvoscaner (Typ: ScanCube 7, Scanlab AG, Puchheim) bewegt. Die Einflüsse der Leistungsparameter wie die Pulsleistung, der Vorschub und die Repetitionsrate werden in Kapitel 5.2.1 diskutiert. Eine Grundplatte mit 324 runden hydrophilen Stellen ist in Abbildung 4-3 dargestellt.

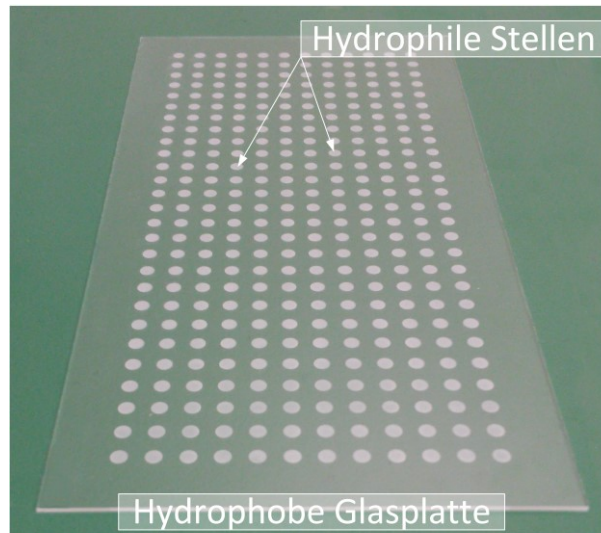


Abbildung 4-3: Abbildung der Grundplatte mit 324 hydrophilen Stellen (2 mm Durchmesser)

Das Auftragen der Silbersalz-Monomerlösung kann, falls nur eine geringe Anzahl an Messstellen notwendig ist, über eine manuelle Dosierung mit einer Kolbenhubpipette (Eppendorf 0,5 - 10 μL) erfolgen. Die Benetzung des gesamten Arrays kann sowohl mit der Tauchbeschichtung als auch mit der automatischen Dosierung durchgeführt werden. Die beiden Methoden zum Auftragen der Silbersalz-Monomerlösung werden in Kapitel 5.2.2 vorgestellt und diskutiert.

Zur Aushärtung des Polymers wurde eine UV-Lampe des Typs BlueWave™ 50 (Dymax® Europe GmbH, Wiesbaden) verwendet. Die Lampe besitzt einen 50 Watt Quecksilber-Strahler mit einer Leistungsdichte von 3 W cm^{-2} bei 365 nm. Über einen 1 m langen Lichtleiter mit einem Durchmesser von 5 mm wird die Strahlung auf die Probe gerichtet. Abbildung 4-4 zeigt den schematischen Aufbau der Aushärtung.

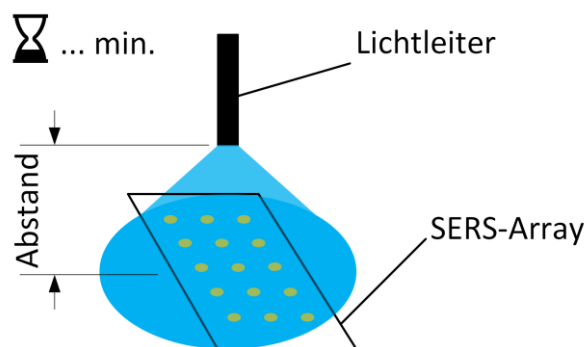


Abbildung 4-4: Schematischer Aufbau der Aushärtung des Polymers

Um eine einheitliche Verteilung der Strahlung auf dem SERS-Array ($120 \times 60 \text{ mm}^2$) zu gewährleisten, ist ein Abstand von mindestens 200 mm notwendig, die Leistungsdichte auf der Probe liegt mit diesem Abstand bei 250 mW cm^{-2} . Die benötigte Beleuchtungszeit wird in Kapitel 5.3.2 bestimmt.

Das Auftragen der Nachverstärkungslösungen erfolgte in gleicher Weise wie die Dosierung der Reaktionsmischung, die Verfahrensschritte werden im Folgenden beschrieben. Wenn die Lösungen manuell oder mit dem in dieser Arbeit entwickelten Positionier- und Dosiersystem dosiert werden, wird das Volumen der Reaktionsmischung angepasst (1,2 μL bei 2 mm großen Messstellen). Bei der Tauchbeschichtung ist verfahrensbedingt keine Anpassung der aufgetragenen Menge möglich. In Abbildung 4-5 ist die Farbänderung der Messstellen durch das Aufwachsen der Silberpartikel bei der automatischen Dosiermethode gut zu beobachten.



Abbildung 4-5: Nachverstärkung der Messstellen durch die Dosierung von Silbernitrat mit dem entwickelten Dosiersystem (links) und komplett benetztes SERS-Array (rechts)

Nach der Aushärtung muss das Polymer getrocknet werden. Die Proben, bei denen Wasser als Lösungsmittel eingesetzt wird, werden 2 h bei 50 °C unter Normaldruck getrocknet, während die Proben, bei denen Ethylenglykol als Lösungsmittel eingesetzt wird, 2 h bei 80 °C und 15 mbar getrocknet werden.

4.3 Beschreibung der Testaufbauten für die SERS-Messungen

Zur Untersuchung und Optimierung des Polymers und der Analyseverfahren wurden verschiedene Testaufbauten für die SERS-Messungen verwendet. Zu Beginn wurden die SERS-Sensorpartikel untersucht. Dazu wurden die Sensorpartikel in der Küvette und im Durchfluss gemessen. Ebenso wurden zur Erzeugung der Segmente Aufbauten benötigt, um die Konzentrationsgradienten in der Sequenz zu erzeugen. Im Folgenden werden diese Aufbauten beschrieben.

Zur Messung der SERS-Sensorpartikel wurde ein FT-Raman-Spektrometer (Typ: MultiRam, Bruker Optics, Ettlingen) mit einer Anregungswellenlänge von 1064 nm verwendet. Bei jeder Messung wurden zehn Spektren gemittelt, wobei die Messzeit eines kompletten Spektrums etwa fünf Sekunden dauerte. Der Messfleck des Spektrometers liegt

bei 1 mm. Die ersten Untersuchungen der Partikeln wurden in einer Küvette durchgeführt, Abbildung 4-6 zeigt den Aufbau der Messung.

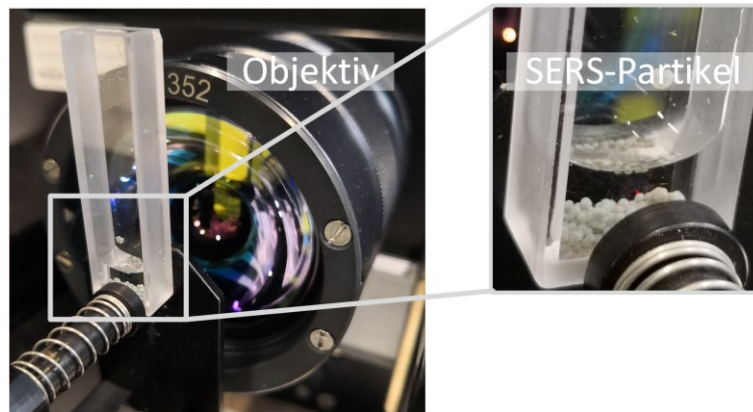


Abbildung 4-6: Positionierung der Küvette in dem FT-Raman-Spektrometer

Die Untersuchung der SERS-Sensorpartikel wurde nach folgendem Ablauf durchgeführt. Eine Küvette (100 QS, Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim) mit einer Schichtdicke von 5 mm wird mit den Sensorpartikeln bis zu einer Füllhöhe von etwa 3 mm befüllt. Anschließend wird 1 mL der Testlösung hinzugegeben. Mit Hilfe eines Pilotlasers und des Mikrometertisches kann die optimale Positionierung der Küvette erfolgen. Zur Untersuchung des Signalverlusts bei falscher Fokussierung, welche in Kapitel 5.1.1 diskutiert wird, wird ebenfalls der Mikrometertisch eingesetzt.

Für die Messung der SERS-Partikel im Durchfluss wurde ein spezielles mikrofluidisches Bauteil mittels Laserablation gefertigt, in dem die SERS-Sensorpartikel fixiert werden können. Dieses besitzt einen Kanal mit einer konstanten Tiefe von 600 μm , dessen Breite sich zur Kanalmitte von 2 mm auf 60 μm verjüngt. Abbildung 4-7 zeigt die Maße und die Integration des Bauteils in das Spektrometer.

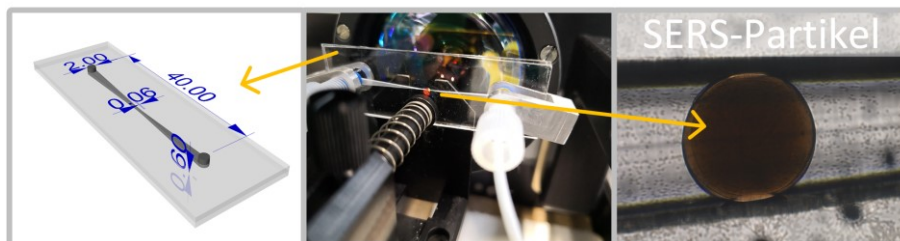


Abbildung 4-7: Zeichnung des mikrofluidischen Kanals (links) zur Fixierung von SERS-Sensorpartikeln, Foto des Bauteils im Spektrometer (Mitte) und Partikel im Mikrokanal (rechts)

Für Messungen können die Partikel über eine Spritze in den Kanal eingebracht werden. Dabei wird dieser zuerst mit VE-Wasser in die Anschlusskapillare eingesaugt und anschließend in das Bauteil gespült. Aufgrund der Verengung des Kanals in nur einer Dimension, wird der Kanal nicht verblockt. Über die Spitze oder ein T-Stück kann der

Partikel mit einer Testlösung oder Flüssigkeitssegmenten (3 μL) umspült werden (Abbildung 4-8).

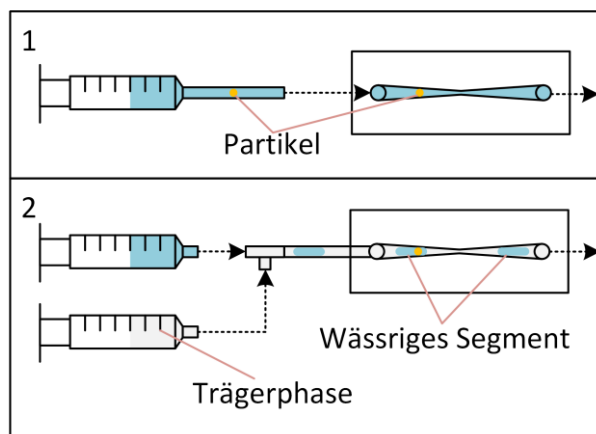


Abbildung 4-8: Applikation der Partikel (1) und der Testschubstoffen (2)

Zur Dosierung werden zwei Spritzenpumpen (TSE Systems GmbH, Bad Homburg) verwendet. Aufgrund der langen Messzeiten erfolgten die Messungen bei gestopptem Durchfluss. Auch hier erfolgte die Positionierung des Partikels anhand eines Pilotlasers und des Mikrometertisches.

Die Optimierung und Untersuchung des SERS-Polymer wurden auf den SERS-Arrays durchgeführt. Für kleinere Versuchsreihen, beispielsweise bei der Polymeroptimierung oder dem Test der SERS-Arrays, wurden die Testschubstoffen manuell mit einer Kolbenhubpipette dosiert. Die Menge der Testlösung orientierte sich an der Menge an SERS-Polymer auf der Messstelle und liegt bei den 2 mm Messstellen bei 1,2 μL . Für die Untersuchung der Segmentdetektion, die Konzentrationsreihen und das Reaktionsscreening wurden Sequenzen von Segmenten mit einem Volumen von 800 nL erzeugt, die mit dem entwickelten Positionier- und Dosiersystem auf dem Array abgesetzt wurden. Der Aufbau, um die Serie an Segmenten zu realisieren, ist in Abbildung 4-9 dargestellt.

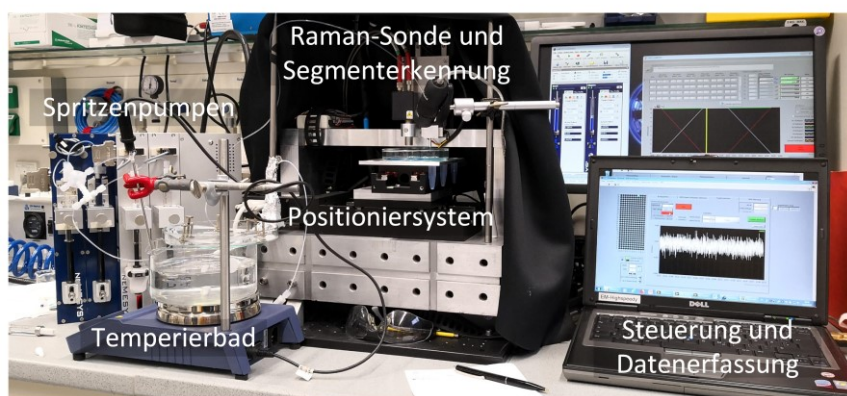
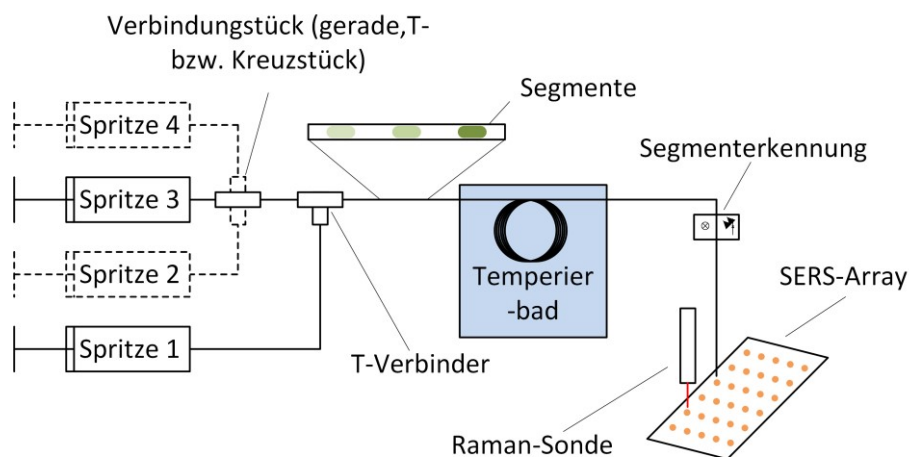


Abbildung 4-9: Schema und Lichtbild des Aufbaus für das Reaktionsscreening und die Konzentrationsrampen

Die Dosierung der wässrigen Lösungen erfolgt mit einer pulsationsarmen Spritzenpumpe (Typ: neMESYS, Cetoni GmbH, Korbussen) mit bis zu vier Dosiereinheiten. Die Lösungen werden in einem Verbindungsstück (Kreuz oder T-Stück, Typ: P-634 bzw. P-632 mit 50 μm Durchgangsloch, Upchurch Scientific) gemischt und in einem darauffolgenden T-Stück durch die Trägerphase (Novec 7500) in einzelne Segmente unterteilt. Die Erzeugung der Segmente und deren Prozessierung werden im Folgenden beschrieben. Die Konzentrationsrampen werden erzeugt, indem die Flussraten im ersten Verbindungsstück kontinuierlich verändert werden, wobei der Gesamtdurchfluss konstant bleibt, um eine einheitliche Segmentgröße zu erhalten. Die angewendeten Volumenstromprofile sind in Abbildung 4-10 verallgemeinert dargestellt. Mit Hilfe der Volumenströme und den Dosierzeiten aus Tabelle 4-2 sowie den Inhaltsstoffen der Spritzen aus Tabelle 4-3 können die Dosierkurven der einzelnen Versuche nachvollzogen werden.

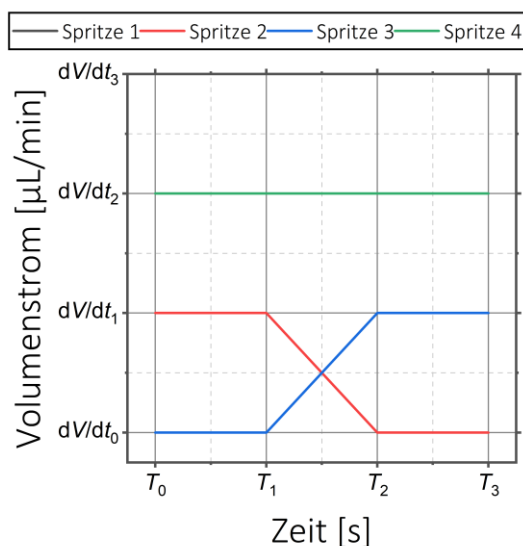


Abbildung 4-10: Verallgemeinerte Darstellung der Volumenstromprofile

Tabelle 4-2: Zuordnungen der Zeiten und Volumenströme im verallgemeinertem Volumenstromprofil

Kapitel	dV/dt_0	dV/dt_1	dV/dt_2	dV/dt_3	T_0	T_1	T_2	T_3	Vol. (Segment)
5.1.4	---	---	var.	var.	0	---	---	80	600 - 800
5.5.5	0	150	---	360	0	20	80	100	500
5.7	0	40	80	200	0	5	40	50	800

Tabelle 4-3: Inhaltsstoffe der Spritzen bei den Versuchen

Kapitel	Spritze 1	Spritze 2	Spritze 3	Spritze 4
5.1.4	Novec 7500	----	----	Wasser
5.5.5	Novec 7500	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Kristallviolett	Wasser	----
5.7.1	Novec 7500	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Basic Blue 3	Wasser	Wasser
5.7.2- 5.7.3	Novec 7500	Wasser	1,2 mol L^{-1} Natriumnitrit	1,5 mmol L^{-1} Adenin in 1,1 mol L^{-1} HAC

Für das Reaktionsscreening werden die Segmente nach der Erzeugung in einer Schlauchspirale, die in einem Wasserbad temperiert wird, gesammelt. Nach Ablauf der Reaktionszeit werden die Segmente zur Segmentdetektion geführt, auf dem SERS-Array abgesetzt und analysiert. Für die Analyse der SERS-Arrays wurden für die unterschiedlichen Untersuchungen teilweise unterschiedliche Parameter verwendet. Beispielsweise wurden bei Messungen eines ganzen SERS-Arrays mit 324 Messstellen kürzere Integrati-

onszeiten verwendet als bei Messungen einzelner Messstellen. Ebenso musste bei der Messung höherer Konzentrationen die Laserleistung verringert werden, um eine Sättigung des Detektors zu verhindern. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 4-4 dargestellt.

Tabelle 4-4: Übersicht über die verwendeten Parameter bei der Messung der SERS-Arrays

Kapitel	Applikation	Laserleistung	Mittelung	Integrationszeit
5.4	<i>manuell</i>	<i>80 mW</i>	<i>keine</i>	<i>800 ms</i>
5.5.1	<i>manuell</i>	<i>60 mW</i>	<i>keine</i>	<i>300 ms</i>
5.5.2	<i>manuell</i>	<i>80 mW</i>	<i>keine</i>	<i>600 ms</i>
5.5.3	<i>manuell</i>	<i>80 mW</i>	<i>keine</i>	<i>300 ms</i>
5.5.4	<i>manuell</i>	<i>80 mW</i>	<i>keine</i>	<i>600 ms</i>
5.5.5	<i>Segmente</i>	<i>80 mW</i>	<i>keine</i>	<i>300 ms</i>
5.5.6	<i>manuell</i>	<i>80 mW</i>	<i>keine</i>	<i>300 ms</i>
5.7	<i>Segmente</i>	<i>60 mW</i>	<i>keine</i>	<i>600 ms</i>

4.4 Beschreibung der Methoden zur Auswertung und zur Bestimmung von Kenngrößen

Im Folgenden werden die verschiedenen Methoden zur Auswertung und Bestimmung der Kenngrößen beschrieben, die für die Diskussion der Ergebnisse verwendet werden. Behandelt werden die Varianzanalyse, die multivariate Kalibrierung sowie die Methoden zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen und zur Charakterisierung des SERS-Polymers.

4.4.1 Überprüfung der Daten mittels Varianzanalyse

In dieser Arbeit wurden die SERS-Arrays auf die Wiederholgenauigkeit der mit ihnen generierten Messergebnisse und die maximale Verwendungsdauer getestet. Um zu überprüfen, ob sich die Messwerte zwischen den einzelnen Messstellen oder nach einer gewissen Lagerzeit unterscheiden, wurde eine Varianzanalyse (engl. *analysis of variance*, ANOVA) durchgeführt.

Die Varianzanalyse überprüft, ob die Verteilungen, aus denen die q Stichproben stammen, alle den gleichen Erwartungswert μ_i haben. Somit lauten die Nullhypothese H_0 und die Alternativhypothese H_1 [89]:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_q \quad 4.3$$

$$H_1: \text{mindestens zwei der } \mu_i \text{ sind verschieden} \quad 4.4$$

Die Überprüfung wurde mit der Software Origin (Origin Pro 2020b, Origin Lab Corporation) durchgeführt. Dabei wurde die Funktion „einfache ANOVA“ verwendet. Diese ermittelt den Varianzanteil einer unabhängigen Variable (Faktor) an der Gesamtvarianz. In dieser Arbeit stellten beispielsweise die Messstellen oder die Lagerzeit der Arrays die Faktoren mit unterschiedlichen Faktorstufen (Nummer der Messstellen oder Zeiteinheiten) dar.

Zunächst wird die Gesamtvarianz aller Messwerte bestimmt, woraus sich der Gesamtmittelwert \bar{x}_{Ges} und die Gesamtvarianz s_{Ges}^2 ergibt. Ebenso wird die Varianz s_1^2 , die auf den Faktor zurückgeführt werden kann, und die Varianz s_2^2 innerhalb der n Faktorstufen (Fehlervarianz) ermittelt. Zur Bestimmung der Varianz innerhalb der Faktoren werden die Mittelwerte \bar{x}_j jeder Faktorstufe gebildet und aus diesen die Varianz ermittelt. Bei der Fehlervarianz werden die einzelnen Abweichungen der Messwerte x_{ji} zu dessen Mittelwert \bar{x}_i aus der Faktorstufe zur Bestimmung verwendet [90]. Die Prüfung, ob die Varianz innerhalb der Faktorstufen gleich der Varianz zwischen den Faktorstufen ist, erfolgt mit einem F-Test. Die Testfunktion v sieht wie folgt aus [91]:

$$v = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad 4.5$$

$$\text{mit } s_1^2 = \frac{1}{(q-1)} \sum_{j=1}^r n_j (\bar{x}_j - \bar{x}_{\text{Ges}})^2 \quad 4.6$$

$$\text{und } s_2^2 = \frac{1}{(n-q)} \sum_{j=1}^r \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ji} - \bar{x}_i)^2 \quad 4.7$$

Bei der Berechnung des F-Tests wurde ein Signifikanzniveau α von 5 % festgesetzt und die Überschreitungswahrscheinlichkeit, auch p -Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit, engl. *probability value*) genannt, bestimmt. Der p -Wert gibt dabei die Wahrscheinlichkeit an, ob das erhaltene Testergebnis oder ein noch extremeres Ergebnis eintritt, wenn die Nullhypothese gültig ist. Liegt der p -Wert über dem Signifikanzniveau, kann die Nullhypothese H_0 angenommen werden, liegt der p -Wert darunter sind mindestens zwei Mittelwerte \bar{x}_j verschieden [91].

4.4.2 Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- (engl. *limit of detection*, LOD) und Bestimmungsgrenze (engl. *limit of quantification*, LOQ) geben an, bis zu welcher minimalen Signalintensität ein eindeutiger Nachweis bzw. eine quantitative Bestimmung erfolgen kann. In dieser Arbeit wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für mehrere Substanzen ermittelt, indem Konzentrationsreihen der Substanzen angefertigt und zusammen mit dem Raman-Hintergrundspektrum ohne Substanz gemessen wurden [92].

Die Intensitäten der Raman-Banden steigen bei niedrigen Konzentrationen zunächst linear mit der Anzahl der analysierten Moleküle. Typischerweise flachen aber die Intensitäten bei SERS-Messungen in Bereichen höherer Konzentration stark ab. Ursache hierfür ist, dass bei höheren Konzentrationen die Anzahl an SERS-Hotspots nicht mehr ausreichend ist. Deshalb sinkt der Anteil der Moleküle, die an einen Hotspot adsorbieren können, was zu einem geringeren Anstieg des Raman-Signals führt. Daher zeigen die Messungen einen linearen Anstieg der Intensität bis zu einer bestimmten Konzentration. Oberhalb dieses linearen Bereichs können die Abweichungen und Messungenauigkeiten zunehmen.

Zur Bestimmung Grenzen wird allgemein definiert, dass der Nachweis einer Substanz erfolgen kann, wenn die Signaländerung die dreifache Standardabweichung überschreitet. Für eine quantitative Bestimmung soll die Signaländerung die zehnfache Standardabweichung überschreiten [92]. Die Berechnung erfolgt nach den Gleichungen 4.8 und 4.9:

$$\text{LOD} = \tilde{x}_{\text{Hintergrund}} + 3 \sigma_{\text{Hintergrund}} \quad 4.8$$

$$\text{LOQ} = \tilde{x}_{\text{Hintergrund}} + 10 \sigma_{\text{Hintergrund}} \quad 4.9$$

Dabei beschreibt \tilde{x} den Mittelwert der Intensität der Hintergrundmessung der betrachteten Schwingungsbande mit der Standardabweichung σ . Die Konzentrationen für das LOD und das LOQ können nun über eine Regression der Intensitäten im linearen Bereich bestimmt werden.

4.4.3 Bestimmung der Reaktionskomponenten durch eine multivariate Kalibrierung

Bei der Reaktionsverfolgung (Kapitel 5.7.2) war die Bestimmung der Konzentrationen von Adenin und Hypoxanthin durch eine Verfolgung der Bandenintensität oder -fläche nicht direkt möglich, da sich die beiden Banden überschneiden. Zwischen den Maxima der beiden Banden liegen nur 14 Wellenzahlen. Deshalb wurde eine multivariate Analyse des

Spektrums durchgeführt. Bei dieser Art der Auswertung werden die Daten auf die wesentlichen Informationen reduziert, anschließend kann mit den reduzierten Daten eine Regression durchgeführt werden. Dazu wurde die Software Unscrambler (Version 10.1, Camo Analytics) verwendet.

Die Daten wurden zuerst einer Hauptkomponentenanalyse (engl. *principal component analysis*, PCA) unterzogen. Die PCA ermöglicht es, einen Überblick über die Daten zu erhalten und diese zu strukturieren. Die Kalibrierung erfolgte anschließend über eine PLS-Regression (engl. *partial least squares*, PLS), sodass die Konzentrationen von Adenin in den Segmenten bestimmt werden konnten. Im Folgenden werden die Methoden der PCA und der PLS erklärt.

Die PCA fasst die vielen sogenannten beobachteten Variablen, beispielsweise die Wellenzahlen eines Spektrums, zu wenigen sogenannten latenten Variablen, den Faktoren oder Hauptkomponenten (engl. *principal component*, PC) zusammen. Die Hauptkomponenten beinhalten die Variablen, die untereinander stark korrelieren und stellen eine Linearkombination dieser Variablen dar. Untereinander sind die Hauptkomponenten damit linear unabhängig. Die Datenmatrix \underline{X} mit den Messwerten wird in die Scoresmatrix \underline{T} , die Faktorenmatrix \underline{P} und eine Residuenmatrix \underline{E} zerlegt. Somit ergibt sich die Form des Hauptkomponentenmodells nach folgender Gleichung [93]:

$$\underline{X} = \underline{T}\underline{P}^T + \underline{E} \quad 4.10$$

Die Hauptkomponenten stehen in den Spalten der Faktorenmatrix \underline{P} , die in transponierter Form im Modell (Gl. 4.10) auftritt. Diese sind für alle Objekte der Datenmatrix gleich und stehen für die Gemeinsamkeiten aller Daten. In der Scoresmatrix stehen die Faktorenwerte, welche die Individualitäten eines jeden Objektes widerspiegeln. Zur Berechnung der Hauptkomponenten wurde der in Unscrambler integrierte NIPLAS-Algorithmus (engl. *nonlinear iterative partial least squares*) verwendet. Dieser berechnet die Hauptkomponenten iterativ nacheinander [93]. Durch die PCA können die Rohdaten genau untersucht und auf Plausibilität geprüft werden. Dazu sollten die Ladungs- und Faktorenwerte nachvollziehbar und erklärbar sein. Weiterhin können Fehlmessungen und Ausreißer identifiziert sowie die Notwendigkeit einer Datenvorbehandlung (siehe Kapitel 4.4.4) abgeklärt werden.

Zur Erstellung der PLS-Modelle wird eine PCA mit den X - und Y -Daten durchgeführt, wobei beide Datenräume aktiv miteinander verbunden sind. Die Zerlegung der X -Daten erfolgt wie bei der PCA nach Gleichung 4.10, die Datenmatrix \underline{Y} wird analog zu den X -Daten in die Scoresmatrix \underline{U} , die Faktorenmatrix \underline{Q} und eine Residuenmatrix \underline{F} zerlegt.

Das Scores-Diagramm stellt die Projektionen der Objekte auf die neuen Hauptachsen (hier PC1 und PC2) dar. So kann festgestellt werden, inwieweit die Objekte von den jeweiligen Hauptkomponenten unterschieden werden können, weshalb das Scores-Diagramm zur Auswahl der Hauptkomponenten geeignet ist. Das Loadings-Diagramm zeigt die Variablen im Raum der Hauptkomponenten. Die einzelnen Faktorenladungen der jeweiligen Hauptkomponenten geben an, welchen Einfluss die Variable auf die Hauptkomponente besitzt. Das Loadings-Diagramm hilft, die wichtigen Variablen zu identifizieren. Im Influence-Diagramm ist der Leverage gegen die restliche x -Varianz aufgetragen. Der Leverage gibt an, wie wichtig ein Objekt für die PCA ist. Eine große X -Restvarianz zeigt, dass das Objekt durch die neuen Koordinaten schlecht beschrieben wird. Objekte, die einen großen Einfluss auf das Modell besitzen aber nur schlecht von diesem beschrieben werden, können so leicht im Influence-Diagramm identifiziert werden. Bei der Erstellung der Modelle wird das Influence-Diagramm verwendet, um die Daten auf Ausreißer zu kontrollieren. Haben diese einen zu großen Einfluss auf das Modell, wird geprüft, ob sie entfernt werden können. Die Daten wurden dazu manuell mit Daten der gleichen Konzentrationen verglichen. Wichen die Daten aufgrund eines schlecht abgesetzten Segments oder einer fehlerhaften Messstelle stark von den Vergleichsdaten ab, wurden diese aus dem Modell entfernt. Das Diagramm mit der erklärten Restvarianz gibt an, welcher Anteil der Gesamtvarianz von den einzelnen Hauptkomponenten beschrieben wird. Dabei sinkt die erklärte Varianz mit jeder weiteren Hauptkomponente. Es sollten daher nur die Hauptkomponenten zur Interpretation genutzt werden, die einen signifikanten Beitrag zur erklärten Restvarianz leisten.

4.4.4 Verfahren zur Vorbehandlung der spektroskopischen Daten

Vor der Durchführung der PLS-Regression, war die Durchführung einer Datenvorbehandlung notwendig. Es wurden drei Methoden angewendet, die anhand des PLS Ergebnisses in Kapitel 5.7.2 diskutiert werden. Die drei Methoden zur Datenvorbehandlung werden im Folgenden beschrieben.

Die Basislinienkorrektur (BL) wird standardmäßig verwendet, um ansteigende Basislinien aufgrund von Fluoreszenz oder eines Temperatureinflusses zu korrigieren. Die Korrektur wurde mit dem Programm Origin (Origin Pro 2020b, Origin Lab Corporation) durchgeführt. Dabei wurde eine geglättete Basislinie auf Basis der ALS-Korrekturmethode (engl. *asymmetric least squares smoothing*, ALS) verwendet. Die Basislinie wird iterativ berechnet, wobei der Einfluss von Punkten oberhalb der Basislinie mit einem Asymmetriefaktor reduziert werden kann. Somit bleiben die Bandenformen und Höhen weitestgehend

erhalten [94]. In dieser Arbeit wurde ein Asymmetrie-Faktor von 0,001 verwendet. Die Bildung der 1. Ableitung wurde im Programm Unscrambler (Version 10.1, Camo Analytics) durchgeführt. Auch hier wird die Basislinie entfernt, die chemischen Informationen und die Konzentrationsabhängigkeit bleiben jedoch erhalten. Die Standard Normal Variate Transformation (SNV) berechnet den Mittelwert \tilde{y} und die Standardabweichung σ des kompletten Spektrums und korrigiert die Intensitäten y bei jeder Wellenzahl i nach folgender Gleichung [93]:

$$y_{i,SNV} = \frac{y_i - \tilde{y}}{\sigma} \quad 4.12$$

Durch die Zentrierung der Spektren auf dessen Mittelwert bleiben die chemischen Informationen erhalten, während die Intensitätsabhängigkeit verloren geht. Diese Methode wurde ausgewählt, um die konzentrationsbedingte Intensitätsänderung der beiden betrachteten Stoffe (Adenin und Hypoxanthin) zu eliminieren und so die Bandenverschiebung in den Spektren stärker zu gewichten. Abbildung 4-12 zeigt zur Veranschaulichung die Spektren im Bereich der Hauptbanden nach der Vorbehandlung mit der jeweiligen Methode.

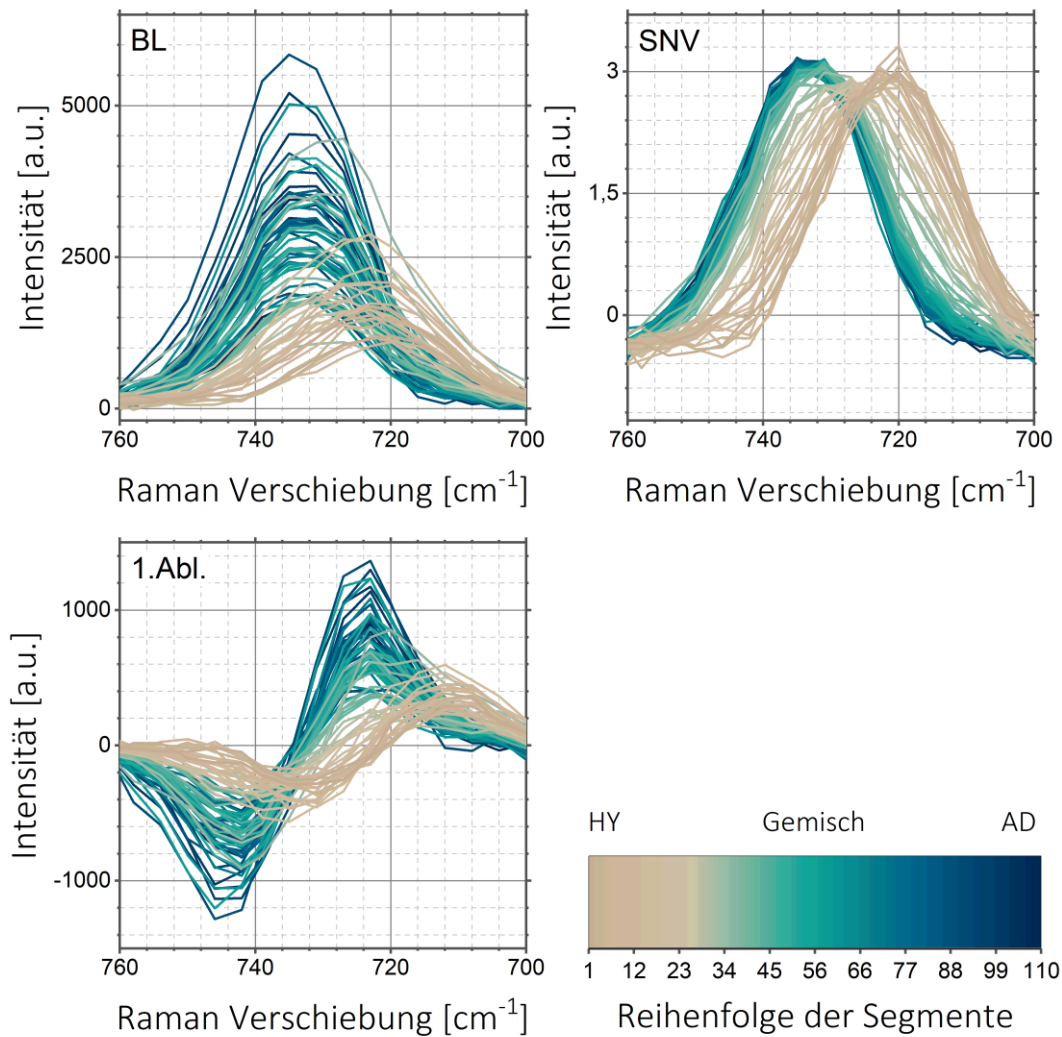


Abbildung 4-12: Verschiedene Methoden der Spektrenvorbehandlung für die Kalibrierspektren mit Adenin (AD), Hypoxanthin (HY) und deren Mischung aus Kapitel 5.7.2

Im Vergleich zur einfachen Basislinienkorrektur wird durch die Bildung der Ableitung der Einfluss auf die Verschiebung der Banden, durch den Nulldurchgang des Maximums, deutlicher abgebildet. Der Einfluss der Intensität ist jedoch weiterhin vorhanden. Durch die Normierung der SNV-Korrektur wird der Intensitätseinfluss in den Spektren vollständig eliminiert und allein die Bandenverschiebung abgebildet. Um zu untersuchen, welche Methode der Datenvorbehandlung am besten geeignet ist, wurden PLS-Modelle mit allen drei Methoden erstellt und die Modellparameter bzw. die Ergebnisse der Kalibrierung in Kapitel 5.7.2 verglichen.

4.4.5 Analysemethoden zur Untersuchung des SERS-Polymers

Die optischen Eigenschaften des SERS-Polymers wurden mittels UV-VIS-Spektroskopie untersucht. Aus den Spektren lassen sich Rückschlüsse auf die Partikelgröße und die Anregung der Oberflächenplasmonen (siehe Kapitel 3.3.4), die für die SERS-Verstärkung

notwendig sind, ziehen. Die Messungen wurden im Durchlicht aufgenommen, wofür die SERS-Polymere auf Glasplatten in den Strahlengang eingebracht wurden. Aus den Daten wurden die Extinktionsspektren berechnet, die Glasplatte diente dabei als Referenz. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem Zeiss-Spektrometer (TYP: MCS 501 UV-NIR 006086). Abbildung 4-13 zeigt die Messung des SERS-Polymers.

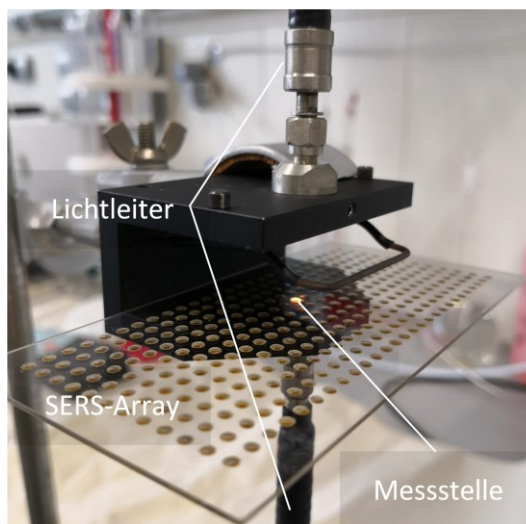


Abbildung 4-13: Messung des SERS-Polymers mit einem UV-VIS-Spektrometer

Neben den optischen Eigenschaften wurde auch die Morphologie der Silberpartikel auf der Oberfläche untersucht. Dazu wurde das SERS-Polymer auf einem Aluminiumträger aufgebracht, 2 h bei 80 °C und 15 mbar getrocknet und in einem Rasterkraftmikroskop (REM, Zeiss Typ: LEO Supra 55 VP) untersucht.

4.5 Beschreibung der Geräte und Kenngrößen zur Auswahl der Raman-Spektrometer

Für den Systemaufbau wurde im Verlauf dieser Arbeit ein kompaktes Raman-Spektrometer ausgewählt, das mittels Lichtleitern und einer Sonde an den Prozess adaptiert werden kann. Das Spektrometer sollte vor allem schnelle Messungen ermöglichen. Die Anregung sollte mit einer Wellenlänge von 785 nm erfolgen, auch wenn die Energie der Strahlung und damit auch das Raman-Signal deutlich geringer als bei kürzeren Wellenlängen sind. Aufgrund der geringeren Strahlungsenergie kommt es jedoch seltener zu Fluoreszenzanregungen, deren hohe Intensität das Raman-Signal überlagern kann [58]. Die Leistungsdaten der Spektrometer, die für Testmessungen ausgewählt wurden, sind in Tabelle 4-6 dargestellt.

Tabelle 4-6: Spezifikationen der getesteten Raman-Spektrometer

Hersteller	Polytec GmbH	Ocean Optics B.V.	Soliton GmbH
Modell	<i>i-Raman Plus</i>	<i>Ventana</i>	<i>EZ-Raman 785</i>
Laserwellenlänge/-leistung	785 nm /300 mW	785 nm /300 mW	785 nm /300 mW
Integrationszeit	> 6 ms	> 10 ms	> 100 ms
Spektrograf	<i>dispersiv</i>	<i>dispersiv</i>	<i>dispersiv</i>
Spektralbereich	175 - 3200 cm^{-1}	160 - 3140 cm^{-1}	100 - 3300 cm^{-1}
Auflösung	4,5 cm^{-1}	6 cm^{-1}	6 cm^{-1}

Die Testmessungen hatten zum Ziel, die Lichtstärke bei kleinen Integrationszeiten zu beurteilen. Dazu wurden Testmessungen von Ethanol, aufgenommen mit geringen Integrationszeiten, bei den verschiedenen Herstellern der Raman-Spektrometer angefordert. Die Daten der Hersteller werden in Kapitel 5.1.3 anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses (engl. *signal-to-noise ratio*, SNR) diskutiert. Das SNR beschreibt, wie deutlich sich das Nutzsignal P_{Signal} vom Rauschsignal P_{Rauschen} absetzt und ist nach Gleichung 4.13 definiert:

$$\text{SNR} = \frac{P_{\text{Signal}}}{P_{\text{Rauschen}}}. \quad 4.13$$

Ein hohes SNR ist vorteilhaft für Messungen mit kurzen Integrationszeiten und diente als ein Auswahlkriterium des Spektrometers. Die Parameter für die bei den Herstellern angefragten Testmessungen sind in Tabelle 4-7 dargestellt.

Tabelle 4-7: Testparameter für die Spektrometerauswahl

Parameter	Wert
Testsubstanz	<i>Ethanol</i>
Anregungswellenlänge	<i>785 nm</i>
Integrationszeit	<i>100 ms und 10 ms</i>
Laserleistung	<i>300 mW</i>
Glättung und Wiederholungen	<i>keine</i>

4.6 Beschreibung des Gesamtaufbaus des Analysensystems

Der Gesamtaufbau des Analysensystems ist in Abbildung 4-14 dargestellt. Der Aufbau und die Auswahl der Komponenten erfolgten unter der Voraussetzung, dass ein kompakter Aufbau und eine einfache Anbindung an den vorgeschalteten mikrofluidischen Prozess ermöglicht werden kann.

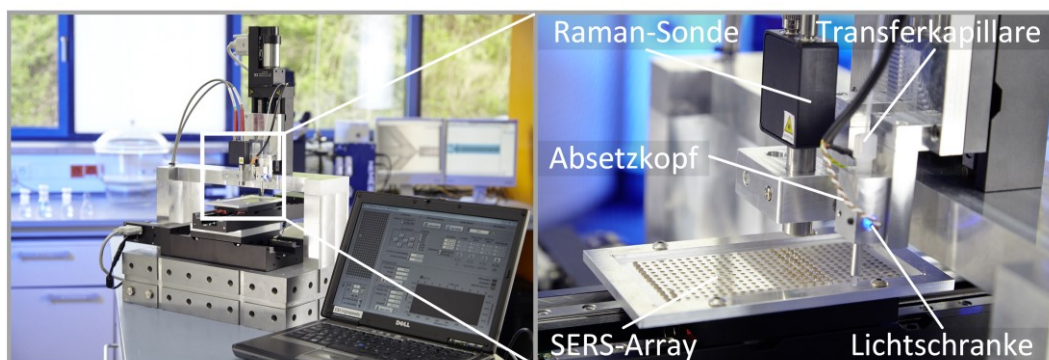


Abbildung 4-14: Lichtbildaufnahme des Gesamtsystems (links) mit Detailansicht (rechts)

Die Verbindung zu dem fluidischen Prozess ist über eine 1/16“ FEP-Kapillare (Fluorethylen-Propylen, Upchurch Scientific) mit einem Innendurchmesser von 500 μm möglich, welche standardmäßig in diesen Kanaldimensionen verwendet wird und im Absetzkopf über ein standardisiertes HPLC-Fitting (Typ: Fitting flanschlos Tefzel UPXP-245, Upchurch Scientific) fixiert werden kann. Im Absetzkopf befindet sich die Lichtschranke, welche die ankommenden Fluidsegmente durch die Kapillarwand detektiert. Die Lichtschranke ist aus einem optischen Sensor (Typ: TLS252R, TAOSTM, Plano, USA), der aus einer Photodiode und einem Transimpedanzverstärker (8 M Ω) besteht, und einer LED mit einer Wellenlänge von 470 nm (Typ: NSPB500AS, Nichia Corporation) aufgebaut. Die Datenerfassung erfolgt über eine USB-Messkarte (USB-6009, National Instruments, Austin, Texas, USA). Die Entwicklung und der Aufbau des Absetzkopfes werden in Kapitel 5.1.4 diskutiert.

Die Grundplatte zum Fixieren des SERS-Arrays ist auf einem Kreuztisch aus zwei Linearmotortischen (Typ: M-404.6PD und Typ: M-414.1PD, Physik Instrumente GmbH, Karlsruhe) mit einem Stellweg von 100 mm in der Breite und 150 mm in der Tiefe montiert (Abbildung 4-15).

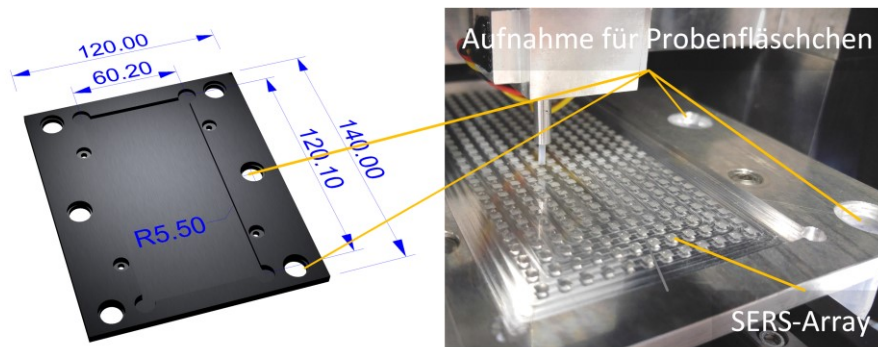


Abbildung 4-15: Technische Zeichnung (links) und Lichtbildaufnahme (rechts) der Grundplatte für das SERS-Array

Neben der Fixierung des SERS-Arrays ist dort auch die Aufnahme von Probenfläschchen aus Kunststoff möglich. Diese werden beim An- bzw. Abfahren der Versuche als Start- bzw. Endposition genutzt. Der Absetzkopf mit der Segmentdetektion und die Halterung der Raman-Sonde (Ocean Optics B.V., Ostfildern) sind an einem vertikal montiertem Linearmotortisch (Typ: M-403.2PD, Physik Instrumente GmbH, Karlsruhe) befestigt, dieser ermöglicht einen Stellweg von 50 mm und ist auf einer Brücke oberhalb der Grundplatte montiert. Somit kann das SERS-Array in horizontaler Ebene bewegt und die Messstellen können unter dem Absetzkopf oder unter der Raman-Sonde positioniert werden, die wiederum zum Einstellen des notwendigen Abstandes in vertikaler Ebene verfahren werden können. Das Raman Spektrometer von Ocean Optics (Typ: Ventana 785, Ocean Optics B.V., Ostfildern) zeigt sich in einem Leistungsvergleich als am besten geeignet (siehe Kapitel 5.1.3), die technischen Details sind in Kapitel 4.5 (Gerät 2) beschrieben.

4.7 Beschreibung der Bedienoberfläche zur Steuerung und Auswertung des Raman-Messsystems

In Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Ilmenau wurde eine Software in LabView (Version 2014, National Instruments Corporation) entwickelt, welche die Steuerung und die Automatisierung des Raman-Messsystems ermöglicht. Die Bedienoberfläche ist in die folgenden vier Bereiche aufgeteilt: *Konfiguration*, *Dosierung/Spotscan*, *Tropfen absetzen* und *SERS-Messung*.

Das Positioniersystem, das Raman-Spektrometer und die Phasendetektion sind in die Software integriert. In der Konfigurationsmaske (Abbildung 4-16) sind alle SERS-Messstellen als auswählbare grüne Punkte (1) dargestellt und können manuell angefahren werden. Die Einrichtung der Kapillare und der SERS-Sonde erfolgt über die Cursor-Tasten. Dabei können die Positionen für den automatischen Ablauf eingerichtet und gespeichert werden (2).

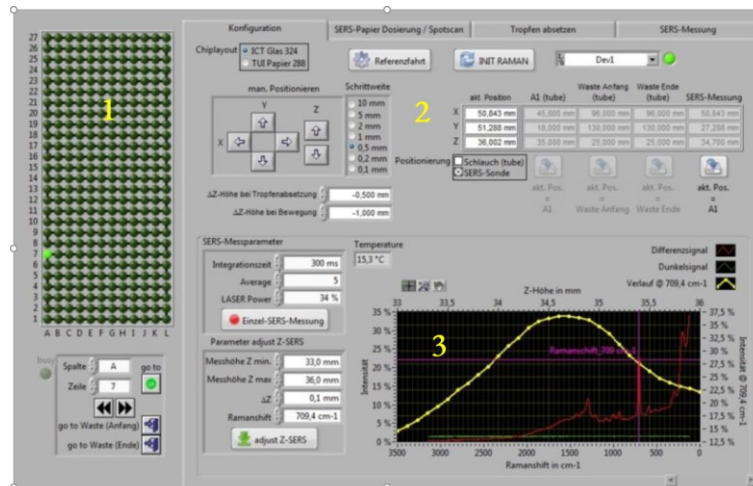


Abbildung 4-16: Konfigurationsmaske für das Raman-Messsystem mit den auswählbaren SERS-Messstellen (1), dem Bereich zum Einrichten der Kapillare (2) und der automatischen Justierung des Laserfokus (3)

Die Einstellung des optimalen Abstands der Raman-Sonde zu der Probe kann über eine automatische Justierung erfolgen. Dabei werden in einem zuvor definierten Bereich verschiedene z-Positionen angefahren und die Raman-Spektren aufgenommen (3). Die Intensität bei einer wählbaren Wellenzahl wird gegen die jeweilige z-Position aufgetragen (gelbe Kurve in Abbildung 4-16). Bei der höchsten Intensität ist die Probe optimal im Fokus der Sonde. Der ermittelte Abstand wird automatisch für die nachfolgenden Messungen abgespeichert.

Zum Absetzen der Tropfen wird das Signal der Lichtschranke im Absetzkopf verwendet. Über- bzw. unterschreitet der Extinktionswert der Photodiode den Schwellwert (gelbe Linie in Abbildung 4-17) wird vom System die nächste Messstelle angefahren. Das Detektorsignal wird gespeichert und kann bei der späteren Auswertung den Segmenten zugeordnet werden.

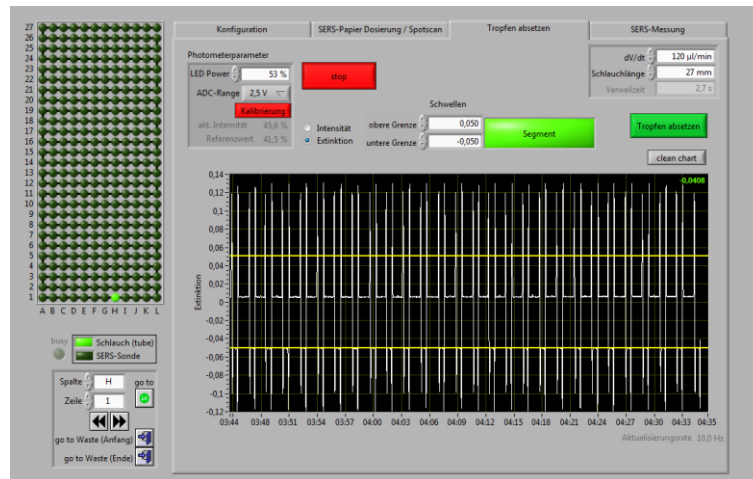


Abbildung 4-17: Maske zur Detektion der Segmente und zum Absetzen der Segmente auf den Messstellen

In der Maske können die Werte für den oberen und den unteren Grenzwert eingetragen werden und so an den jeweiligen Prozess angepasst werden. Ebenso kann die Intensität der LED und die Empfindlichkeit der Photodiode eingestellt werden. Zur Berechnung der Zeit, die ein Segment von der Detektionseinheit bis zum Ende der Kapillare benötigt, müssen die Fließgeschwindigkeit des Prozesses und die Länge der Kapillare bekannt sein. Beide Werte können in dieser Maske eingetragen werden.

Die SERS-Messung erfolgt nach dem Absetzen der Segmente. Es können drei Methoden für die Messung ausgewählt werden (Abbildung 4-18). Bei der Einzelmessung wird das SERS-Spektrum im Zentrum der Messstelle aufgenommen. Alternativ können fünf oder neun Punkte auf der Messstelle analysiert werden. Bei den Mehrfachmessungen wird je ein Spektrum im Zentrum und vier (0° , 90° , 180° , 270°) bzw. acht (0° , 45° , 90° , 135° , 180° , 225° , 270° , 315°) Punkte im Umkreis mit einem wählbaren Radius gemessen.

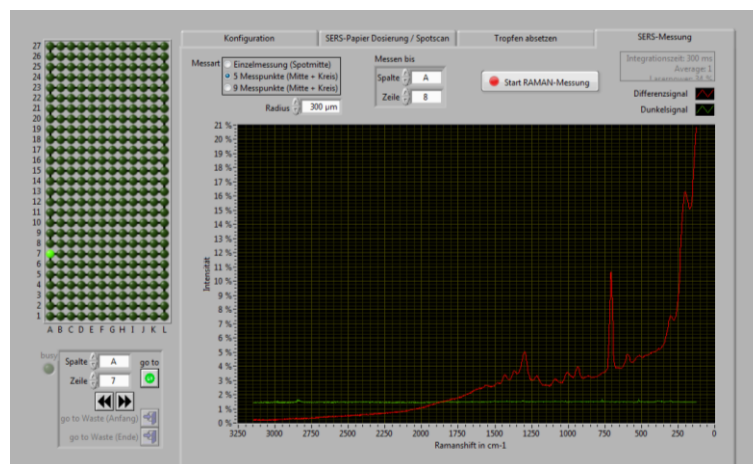


Abbildung 4-18: Bereich für die Raman-Messung an den SERS-Messstellen

Vor jeder Messung wird eine Dunkelmessung durchgeführt, um eventuell auftretende Veränderungen der Umgebungsbedingungen zu kompensieren. Das System

ermöglicht es auch, weitere Messdurchläufe, z.B. mit veränderter Integrationszeit oder Laserleistung, durchzuführen. Ebenso ist es möglich, eine Messstelle Punkt für Punkt (*spotscan*) zu analysieren. Diese Funktion wurde beispielsweise bei der Untersuchung der Wiederholgenauigkeit in Kapitel 5.5.3 angewendet. Dabei wird ein Bildfeld von $4 \times 4 \text{ mm}^2$ abgefahren und die Raman-Spektren mit einer Auflösung von 0,1 mm bzw. 0,2 mm aufgenommen und gespeichert. Die Darstellung in Abbildung 4-19 zeigt die Intensitätsverteilung bei einer bestimmten Wellenzahl. So kann die Homogenität der Verteilung auf der Messstelle untersucht werden.

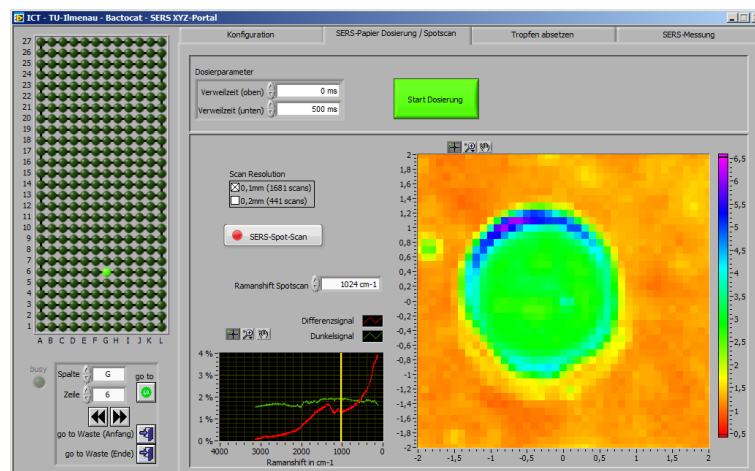


Abbildung 4-19: Maske für die *spotscan*-Funktion

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit einem separaten Programm. Hier können die Daten der Vormessungen (Messstelle ohne Testsubstanz), der Raman-Messung und der Segmentdetektion eingelesen werden. Das Programm ermöglicht die selektive Anzeige aller Spektren. Wenn mehrere Punkte auf einer Messstelle gemessen wurden, können die Spektren der Messstelle gemittelt werden. Hintergrundspektren, etwa die des SERS-Polymers, können subtrahiert werden. Ebenso kann zur ersten Sichtung der Daten eine Basislinienkorrektur und eine Normierung durchgeführt werden. Für die Basislinienkorrektur wird ein Verfahren angewendet, bei dem innerhalb einer vordefinierten Anzahl an Intervallen jeweils das Minimum des Spektrums gesucht wird. Anhand dieser Stützstellen wird mittels einer linearen Funktion oder eines Polynomzugs (Spline) die Basislinie erzeugt. Aus den korrigierten Spektren können Signalverläufe bei ausgewählten Wellenzahlen dargestellt und mit den Daten der Segmentdetektion verknüpft werden. Dies kann die Segmentgröße, der Segmentabstand oder die Extinktion sein. So können spektrale Änderungen zwischen den SERS-Spots anschaulich dargestellt werden (Abbildung 4-20).

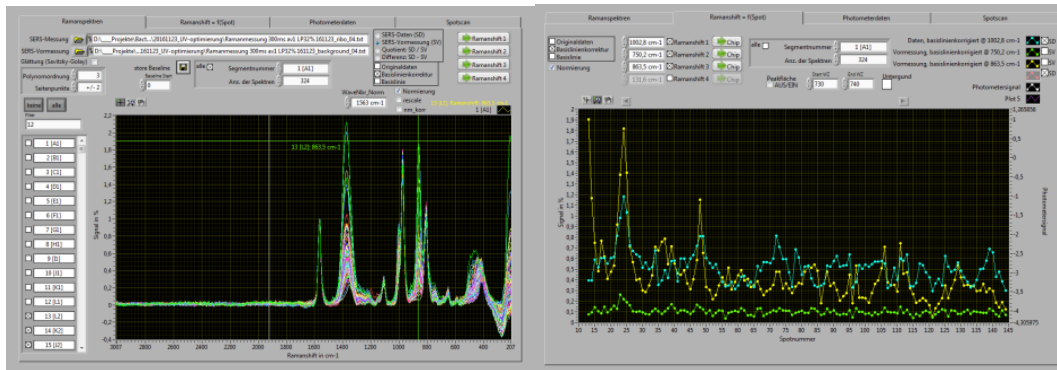




Abbildung 4-20: Raman-Spektren mehrerer Messstellen nach der Basislinienkorrektur (links) und die dazugehörigen Signalverläufe bei drei unterschiedlichen Wellenzahlen (rechts)

4.8 Beschreibung der verwendeten SERS-aktiven Partikel und Testsubstanzen

Zu Beginn dieser Arbeit wurden SERS-aktive Komposit-Sensorpartikel der TU Ilmenau getestet und deren Eigenschaften untersucht. Auf dieser Grundlage erfolgte die Konzepterstellung. Für die Untersuchungen wurden zwei kugelförmige Partikel mit einem Durchmesser von 350 μm verwendet, die mit verschiedenen Konzentrationen einer Silbernitratlösung nachverstärkt wurden. Die Spezifikationen der Partikel und die Zusammensetzung der Reaktionslösung sind in Tabelle 4-8 dargestellt. Die Herstellung der Partikel wird in Kapitel 3.4 beschrieben.

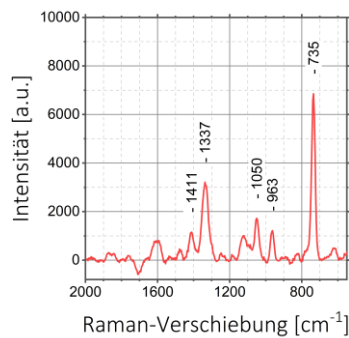
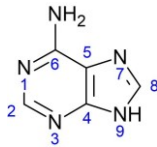
Tabelle 4-8: Eigenschaft der SERS-Sensorpartikel der TU Ilmenau (T: Totalanidkonzentration, C: Vernetzungsgrad, HMPP: 2-Hydroxy-2-Methylpropiophenon)

Bezeichnung		ZG-a1	ZG-a2
Zusammensetzung	T	30 %	30 %
	C	5 % (BIS)	5 % (BIS)
	b_{AgNO_3}	11,2 mmol kg ⁻¹	11,2 mmol kg ⁻¹
	HMPP	48 μmol kg ⁻¹	48 μmol kg ⁻¹
Form		kugelförmig	kugelförmig
Größe		350 μm	350 μm
c_{AgNO_3}		25 mmol L ⁻¹	75 mmol L ⁻¹
Lichtbild			

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene Testsubstanzen verwendet, um das Polymermaterial zu untersuchen und zu testen. Die Optimierung des SERS-Polymers wurde hauptsächlich mit Adenin als Testsubstanz durchgeführt. Dazu wurde die Raman-Bande der Ringatmung bei 735 cm⁻¹ verwendet [95, 96]. Für die Bestimmung des analytischen Verstärkungsfaktors (AEF) wurde Kristallviolett eingesetzt, da dieser Farbstoff auch bei hohen Konzentrationen gut in Wasser löslich ist und mit konventioneller Raman-Spektroskopie gemessen werden kann. Zur Bestimmung des AEF wurde die Raman-Bande bei 1178 cm⁻¹ verwendet, diese wird durch die planare C-H-Deformationsschwingung im 1,4-disubstituierten Benzolring verursacht [97, 98]. Die Reaktionsverfolgung wurde anhand der Desaminierung von Adenin zu Hypoxanthin demonstriert. Durch die Eliminierung der Aminogruppe wird eine Bandenverschiebung der Ringatmung von 735 cm⁻¹ nach 721 cm⁻¹ hervorgerufen, welche sich gut mit dem entwickelten Analyssystem verfolgen lässt [99]. Von den drei genannten Substanzen sowie von Riboflavin wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt. Bei Riboflavin wird die asymmetrische Deformationsschwingung der Methylgruppen bei 1401 cm⁻¹ zur Bestimmung verwendet [97, 100]. Tabelle 4-9 zeigt die Raman-Spektren der Substanzen mit den Strukturformeln und den Bandenzuordnungen.

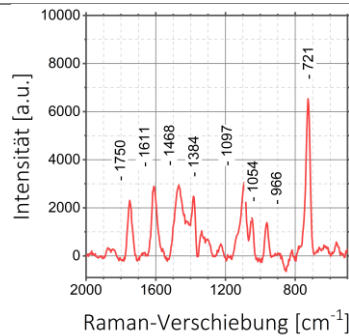
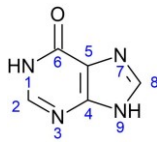
Tabelle 4-9: Raman-Spektren, Strukturformeln und Bandenzuordnung von Adenin, Hypoxanthin Kristallviolett und Riboflavin (v: Streckschwingung; δ : Deformationsschwingung; ip: planar; oop: aus der Ebene raus; as: asymmetrisch)

Adenin



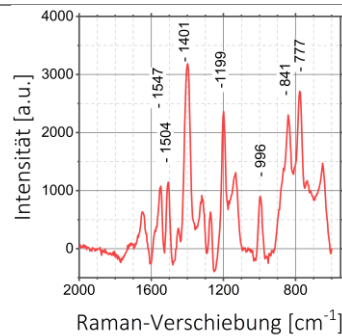
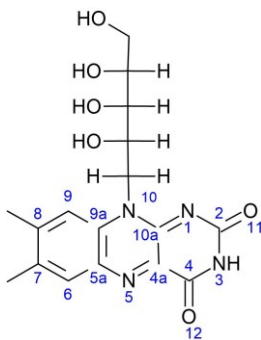
735	Ringatmung Puringerüst
963	v Puringerüst
1050	δ CNH2 / C6N1
1337	v Pyridingerüst
1411	δ NH
1600	δ NH2 arom. Scherschwingung

Hypoxanthin



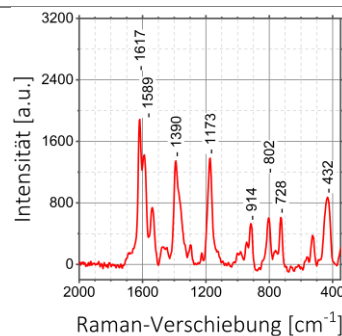
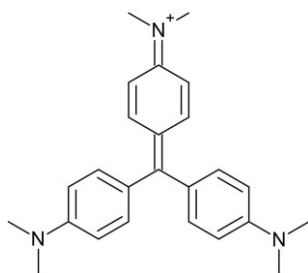
721	Ringatmung
966	v arom. Ring CN CC
1054	v arom. Ring CN CC
1097	v CO
1384	v _{ip} Pyridingerüst
1468	v arom. Ring CN CC
1611	v arom. Ring CN CC 3-fach
1750	v C=O

Riboflavin



1547	δ ip CC arom. / δ as CH3
1504	δ ip NH
1401	δ as CH3
1199	δ CH / δ OH
996	δ CC alip. Gerüstschwingung
841	δ oop CH im Phenanzinring
777	δ oop NH wagging

Kristallviolett



432	δ CC _{Zentrum} C
728	δ CH an 1,4 disubst. Aromat _{ip}
802	δ CH Ring _{oop}
914	v CC Ring
1178	δ CH Ring _{ip}
1390	v C _{Zentrum} C
1589	v CC Ring

5 Ergebnisse und Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit ist die Kopplung von mikrofluidischen segmentierten Prozessen mit der Raman-Spektroskopie unter Verwendung der oberflächenverstärkten Raman-Streuung. Im Folgenden wird die Entwicklung, Charakterisierung und Anwendung dieser Kopplung beschrieben. Zu Beginn werden die Untersuchung von SERS-aktiven Komposit-Sensorpartikeln und die Entwicklung eines Konzepts für den Aufbau eines Analysesystems beschrieben, das eine einfache Kopplung an den mikrofluidischen Prozess sowie einen kompakten und robusten Systemaufbau ermöglichen soll. Anschließend wird die Entwicklung und Optimierung eines neuartigen SERS-aktiven Hydrogel-Films dargestellt. Zudem wird die Leistungsfähigkeit des Analysesystems im Hinblick auf die SERS-Verstärkung und Reproduzierbarkeit charakterisiert und mit anderen Analysemethoden verglichen. Zuletzt werden die Anwendbarkeit durch die Durchführung eines Screening-Versuchs demonstriert und die aus dem Versuch erhaltenen Erkenntnisse dargestellt und bewertet.

5.1 Entwicklung des Analysesystems

Dieser Abschnitt beschreibt die Entwicklung des Analysesystems. Zuerst wird die Untersuchung der SERS-aktiven Komposit-Sensorpartikel (SERS-Sensorpartikel), die an der Technischen Universität Ilmenau hergestellt wurden, beschrieben und deren Eignung für die Messaufgabe diskutiert. Weiterhin wird die Entwicklung mehrerer Konzepte zur Durchführung der Messaufgabe beschrieben und hinsichtlich einer einfachen Kopplung und einer kompakten Bauweise des Gesamtsystems bewertet. Die verwendeten SERS-Sensorpartikel sind in Kapitel 4.8 beschrieben. Die verwendeten Versuchsaufbauten und die Messbedingungen sind in Kapitel 4.3 beschrieben. Als Testsubstanz wurde Adenin verwendet (siehe Kapitel 4.8).

5.1.1 Untersuchung SERS-aktiver Komposit-Sensorpartikel

An dieser Stelle werden die Untersuchungen der SERS-Sensorpartikel beschrieben. Hierzu zählen das Ansprech- und Abklingverhalten auf eine Testsubstanz aber auch mögliche Einflüsse auf das Messergebnis, die von der Fokussierung des Lasers oder dem Silbergehalt der Partikel herrühren. Ebenso sollte das Verhalten bei der Analyse einer Abfolge von Segmenten an einem Partikel experimentell bestimmt werden.

Das Ansprechverhalten auf eine Testsubstanz sowie deren Anreicherung wurde mit dem Partikel ZG-a2 und einer $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ Adeninlösung in Wasser untersucht. Die Sensorpartikel wurden zur Analyse in einer Küvette (siehe Kapitel 4.3) mit den Lösungen

benutzt und in einem FT-Raman-Spektrometer gemessen. Abbildung 5-1 zeigt die mit dem Partikel ZG-a2 gemessenen Raman-Spektren.

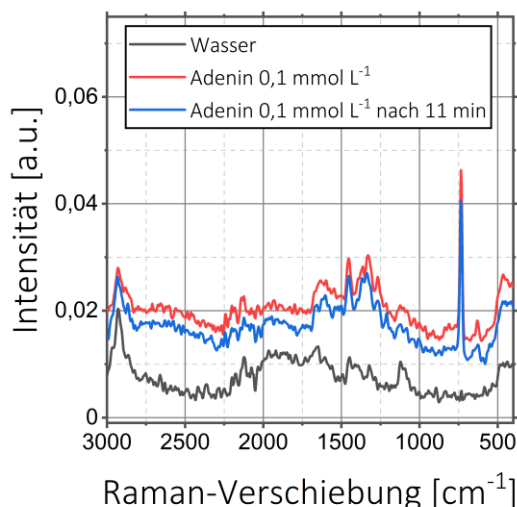


Abbildung 5-1: SERS-Spektren des SERS-Sensorpartikels ZG-a2 in Gegenwart von Wasser und wässriger Analytlösung

Das schwarze Spektrum zeigt die Messung des Partikels (ZG-a2) in wässriger Umgebung. Es ist zu erkennen, dass das Eigensignal der SERS-Sensorpartikel sehr gering ist. Lediglich im Bereich um 2900 cm^{-1} , hier liegen die CH-Schwingungen, und im Bereich um 1100 cm^{-1} , hier liegen die C-C-Schwingung, sind Signale sichtbar. Diese stammen von der Polyacrylamid-Matrix des Polymers. Das rote Spektrum zeigt das Signal der Partikel unmittelbar nach der Zugabe der Testlösung. Die charakteristischen Banden bei 735 cm^{-1} und 1300 cm^{-1} , die beide der Ringschwingung des Adenins zuzuordnen sind (vergl. Kapitel 4.8), sind zu erkennen. Das blaue Spektrum zeigt das Signal der Partikel nach einer Quellzeit von 11 Minuten. Es sind keine Unterschiede in den Intensitäten zu erkennen. Das bedeutet zum einen, dass die Anlagerung des Analyten an die Silberpartikel auf der Oberfläche und im Inneren des Partikels, die für die Verstärkung des Raman-Signals notwendig ist, sehr schnell erfolgt. Es bedeutet zum anderen, dass keine Anreicherung der Testsubstanz in der Polymermatrix oder an den Silberpartikeln stattfindet. Hinsichtlich der Ansprechzeiten muss jedoch auf die relativ lange Dauer der Messung mit dem FT-Raman-Spektrometer hingewiesen werden. Eine Messzeit von 5 Sekunden war notwendig (siehe Kapitel 4.3), um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten.

Während der Messungen zeigte sich ein starker Einfluss der Fokussierung auf die Signalintensität. Da diese Abweichungen gerade im Hinblick auf quantitative Messungen stören, war es notwendig den Einfluss der Fokussierung auf die Signalintensität zu bestimmen. Dazu wurde eine $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ Adenininlösung auf einem Partikel untersucht. Der Sen-

sensorpartikel wurde schrittweise mit dem Mikrometertisch aus der Fokusebene des Lasers gefahren. Die Position, bei der die höchste Intensität des Analyten gemessen wurde, wurde als Referenz gesetzt. Abbildung 5-2 zeigt den prozentualen Abfall der Intensität gegenüber der Referenz in Abhängigkeit zur Positionsveränderung.

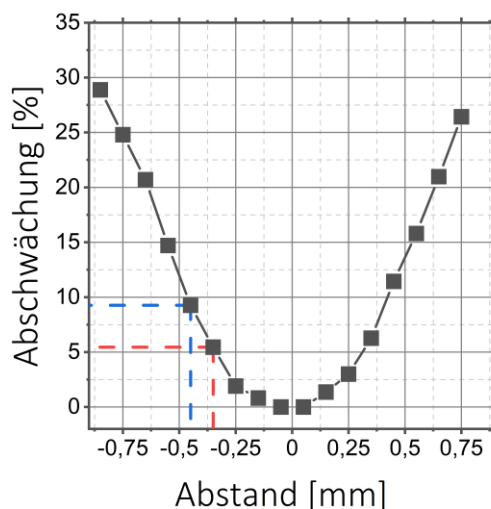


Abbildung 5-2: Abschwächung des Raman-Signals durch Abweichungen von der Fokusebene mit Markierungen bei einer Abweichung von 350 μm (rot) und 450 μm (blau)

Die Messpunkte zeigen einen starken Einfluss der Fokusebene auf die Bandenintensität. Bereits bei einer Abweichung von der Fokusebene um 350 μm reduziert sich die Intensität um 5 %, bei 450 μm sogar um 10 %. Um quantitative Messungen zu ermöglichen, ist bei der Konzepterstellung daher darauf zu achten, dass die Abweichungen von der Fokusebene minimiert werden.

Der Einfluss des Silbergehalts der Sensorpartikel auf die Intensität des SERS-Signals wurde mit den Partikeln der Chargen ZG-a1 und ZG-a2 untersucht. Die Charge ZG-a1 wurde mit einer 25 mmol L^{-1} Silbernitrat-Lösung und die Charge ZG-a2 mit einer 75 mmol L^{-1} Silbernitrat-Lösung hergestellt (siehe Tabelle 4-8). Durch die unterschiedlichen Konzentrationen ergibt sich eine unterschiedliche Beladung der Partikel mit Silber und auch die Oberflächenbeschaffenheit ändert sich mit dem Silbergehalt [22]. Es wurden jeweils drei Partikel mit einer 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Adenininlösung gemessen und die Intensität der Ringschwingungsbande bei 735 cm^{-1} für die Beurteilung herangezogen. Die gemessenen Raman-Spektren sind in Abbildung 5-3 dargestellt.

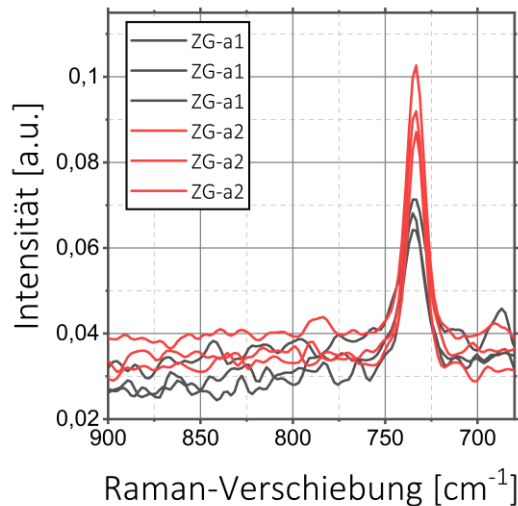


Abbildung 5-3: SERS-Spektren von Adenin an Partikeln mit unterschiedlichem Silbergehalt (ZG-a1: 25 mM, ZG-a2: 75 mM)

Das SERS-Signal der Charge ZG-a2 ist deutlich höher als das der Charge ZG-a1. Das bedeutet, dass die Partikel, die mit der höheren Silberkonzentration hergestellt wurden, auch eine höhere SERS-Verstärkung aufweisen. Dies bestätigt den zuvor erwähnten Einfluss des Silbergehaltes auf die SERS-Verstärkung, eine detaillierte Betrachtung erfolgt in Kapitel 5.4.

Der Einfluss der Trägerphase und das Verhalten bei der Analyse einer kleinen Segmentabfolge wurden untersucht, indem ein SERS-Sensorpartikel (ZG-a1) in einem Mikrokanal fixiert wurde (siehe Kapitel 4.3). Anschließend wurden wässrige Segmente in einer Pentadekan-Trägerphase erzeugt und durch den Mikrokanal gefördert. Bei der Besetzung des Sensorpartikels mit dem jeweiligen Segment oder der Trägerphase wurde ein Raman-Spektrum aufgenommen (Abbildung 5-4). Der Mikrokanal wurde in folgender Reihenfolge an Segmenten durchströmt:

1. Pentadekan (Trägerphase)
2. 0,01 mol L⁻¹ wässrige Adenininlösung
3. Pentadekan (Trägerphase)
4. Wasser

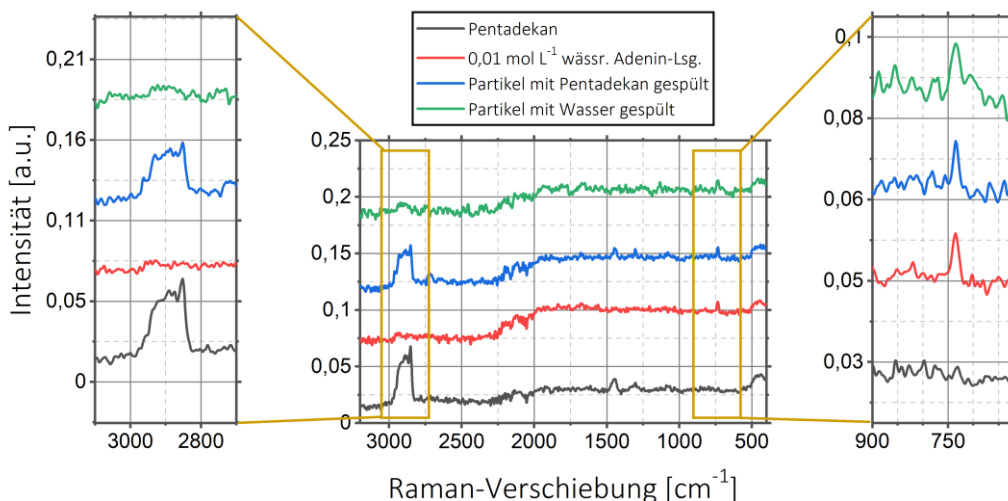


Abbildung 5-4: Raman-Spektren verschiedener Segmente, die am SERS-Sensorpartikel ZG-a2 im Mikrokanal gemessen wurden

Bei den Messungen konnte beobachtet werden, dass der Sensorpartikel im Kanal die Form und Größe der Segmente nicht beeinflusst. Die Analyse der SERS-Signale, die bei den Messungen der einzelnen Segmente erhalten wurden, und die Rückschlüsse auf die Ansprech- und Abklingprozesse werden im Folgenden diskutiert.

Das Signal von Pentadekan (schwarzes Spektrum) lässt sich deutlich von der Adeninlösung (rotes Spektrum) unterscheiden. Die aliphatischen C-H-Schwingungen im Bereich $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ des Pentadekan sind im schwarzen Spektrum sehr dominant. Im roten Spektrum sind diese Banden nicht sichtbar, jedoch erscheint eine Bande bei 735 cm^{-1} , die der Ringschwingung des Adenins zugeordnet werden kann. Dies bedeutet, dass das Segment mit der wässrigen Adeninlösung die Trägerphase von dem SERS-Sensorpartikel verdrängen kann. Jedoch kann die Analytlösung weder von der Trägerphase noch durch ein wässriges Segment verdrängt werden, da die Bande der Ringschwingung des Adenins weiterhin in den Spektren sichtbar ist (blaues und grünes Spektrum). Weitere Versuche zeigten, dass auch nach 10-minütigem Spülen mit Wasser keine Regeneration des Partikels erfolgte. Erst durch Spülen mit einer verdünnten Schwefelsäure mit einem Massenanteil von 3 % konnte eine Regeneration des Partikels erfolgen. Hier erfolgt eine Protonierung des Stickstoffatoms im Purin-Grundgerüst des Adenins, wodurch die Anziehungskräfte zwischen dem Molekül und der Silberoberfläche stark reduziert werden [101]. Die Einschränkungen, die aufgrund der starken Bindung des Analyten entstehen, werden bei der Entwicklung des Analysekonzepts in Kapitel 5.1.2 berücksichtigt und diskutiert. Weiterhin ist zu sehen, dass die Signalintensitäten bei den Messungen im Mikrokanal deutlich geringer sind als bei den Messungen in der Küvette. Dies ist damit zu erklären, dass im Mikrokanal nur ein SERS-Sensorpartikel für die Messung verwendet wird, wohingegen in

der Küvette mehrere Sensorpartikel gemessen werden, da sonst eine genaue Positionierung nicht möglich ist. Zudem sind der Durchmesser des Lasers im Spektrometer und auch der Sammelfleck des Detektors mit ca. 3 mm deutlich größer als der gemessene Sensorpartikel (ca. 350 μm). Somit kann bei der Messung im Mikrokanal, rein aufgrund der optischen Gegebenheiten des Spektrometers, eine geringere Signalstärke als bei der Messung in der Küvette detektiert werden. Mit einer stärkeren Fokussierung wären hier höhere Signale zu erwarten. Weiterhin verursacht das Borosilikatglas des fluidischen Bauteils aufgrund einer schlechteren Oberflächengüte als das Quarzglas der Küvette eine stärkere Signalabschwächung. Diese optischen Einflüsse sind daher auch für die Konzeptentwicklung von Bedeutung und müssen berücksichtigt werden.

5.1.2 Entwicklung eines analytischen Messkonzepts basierend auf den Voruntersuchungen

In diesem Kapitel werden verschiedene Konzepte zur Umsetzung des Analyse-systems vorgestellt, auf Basis der in Kapitel 5.1.1 erworbenen Kenntnisse beurteilt und im Hinblick auf eine kompakte und robuste Lösung bewertet. Dabei sollten die Konzepte auf Basis der SERS-Sensorpartikel entwickelt werden. Die Sensorpartikel zeigten bei den Untersuchungen im vorangegangenen Kapitel eine gute SERS-Verstärkung, zudem kann die Herstellung aus den Grundchemikalien erfolgen, was eine kostengünstige und flexible Bereitstellung des SERS-aktiven Polymers garantiert. Das Einbetten der Silberpartikel in die Polymermatrix hat gegenüber der alleinigen Verwendung von Silber-Nanopartikeln zwei entscheidende Vorteile. Da bei der Herstellung zuerst kleine Silberkeime innerhalb der Polymermatrix hergestellt werden, die später kontrolliert zu größeren Partikeln oder Agglomeraten angereichert werden können, kann eine reproduzierbare Herstellung des SERS-Polymers erfolgen. Die späteren Eigenschaften können so gezielt eingestellt werden [22]. Weiterhin quillt die Matrix aus Polyacrylamid in den wässrigen Segmenten, was zur Folge hat, dass auch das Innere des Polymers zur SERS-Verstärkung des Analyten beiträgt.

Im Folgenden wird ein Konzept diskutiert, bei dem die SERS-Sensorpartikel, wie schon in den Voruntersuchungen gezeigt, in einem Mikrokanal fixiert werden (siehe Kapitel 4.3). Die Fixierung der Sensorpartikel im Kanal ermöglicht eine exakte Positionierung im Strahlengang des Raman-Spektrometers, weshalb reproduzierbare Messungen möglich sind. Durch den zulaufenden Kanal können Verblockungen des Kanals vermieden werden, die Voruntersuchungen zeigten aber, dass eine Regeneration des Polymers notwendig ist. Im Anwendungsfall der Adeninlösung konnte dies durch Spülen mit einer

Schwefelsäurelösung erreicht werden. Für die vorgesehene finale Anwendung ist diese Methode jedoch nicht praktikabel. Um den Analyten von dem Partikel zu lösen, müssten zwischen die zu untersuchenden Segmente zusätzliche Waschsegmente, die die Schwefelsäurelösung enthalten, eingefügt werden. Damit wiederum die Waschlösung nicht in die folgenden Segmente verschleppt würde, müssten weitere, neutrale Waschsegmente (z.B. Wasser) folgen. Diese Methode würde demzufolge den verfahrenstechnischen und apparativen Aufwand deutlich erhöhen, zudem würde hier auch die Gefahr der Querkontamination der Segmente über die SERS-Sensorpartikel stark erhöht. Für kleinere Messaufgaben bei einphasigen Prozessen wurde dieses Konzept an der Technischen Universität Ilmenau weiterverfolgt und erfolgreich umgesetzt [81]. Es konnte gezeigt werden, dass zwei Analyten alternierend auf denselben Sensorpartikeln detektiert werden können.

Ein weiteres naheliegendes Konzept, das auf der direkten online-Analyse der Segmente im Durchfluss beruht, wird im Folgenden beschrieben und bewertet. Dies ähnelt den bereits in Kapitel 3.2 vorgestellten Methoden. In einem ersten Schritt werden die zu analysierenden Segmente mit weiteren Segmenten, die die SERS-aktiven Partikel enthalten, vereinigt. Die Segmente werden daraufhin kontinuierlich an einer Messstelle vorbeigeführt und mit einer Raman-Sonde vermessen. Abbildung 5-5 zeigt den schematischen Aufbau dieses Konzepts.

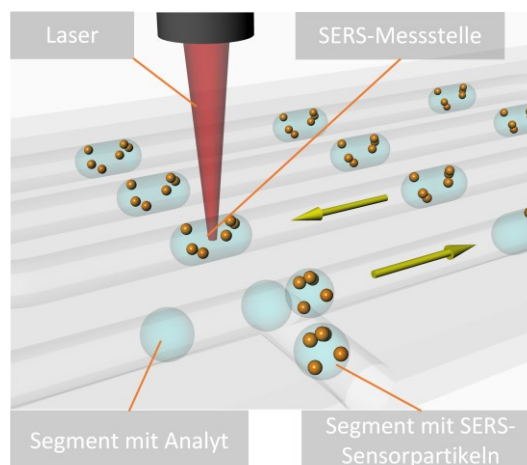


Abbildung 5-5: Schematischer Aufbau für die Online-Analyse im Durchfluss

Die in Kapitel 5.1.1 beschriebenen Untersuchungen machen deutlich, dass schon geringe Abweichungen in der Fokusebene und auch die nicht optimale Ausnutzung der Sammellinse des Detektors zur Signalabschwächung führen. Gerade diese Effekte sind bei der kontinuierlichen spektroskopischen Erfassung der Segmente im Mikrokanal nicht zu vermeiden. Des Weiteren muss bei dieser Methode gewährleistet sein, dass die Messung synchron zu den sich bewegenden Segmenten erfolgt. Andernfalls kann es vorkommen,

dass Raman-Spektren, die an der Grenzfläche der Trägerphase und der Segmente aufgezeichnet werden, Signale der Segmente und der Trägerphase enthalten. Diese Signale müssten entweder im Nachgang aussortiert oder von vornherein vermieden werden. Bei diesem Konzept wäre es daher notwendig, dass die Integrationszeit im Vergleich zur Strömungsgeschwindigkeit sehr kurz ist. Typischerweise haben die Segmente eine hohe Strömungsgeschwindigkeit, so dass die Segmente bzw. die SERS-Partikel nur wenige Millisekunden an der Messstelle gemessen werden können. Um in solchen Zeitfenstern verwertbare Signale zu erhalten, sind rauscharme Detektoren und eine gute Fokussierung notwendig, was den Einsatz kompakter und kostengünstiger Spektrometer erschwert. Durch eine Zwischenlagerung der Segmente oder eine Abstandsvergrößerung könnte die Messzeit erhöht werden, der prozesstechnische Aufwand wird damit aber ebenfalls erhöht. Ein weiterer Nachteil ist die Dosierung der SERS-Partikel. Wird nicht die gleiche Menge an SERS-Partikeln in die Segmente dosiert, kann das Auswirkungen auf die Signalstabilität haben. Zudem wird das Volumen der Segmente erhöht und damit zwangsläufig die Analytkonzentration gesenkt, wodurch das Signal-Rauch-Verhältnis verschlechtert wird.

Da die bislang diskutierten Ansätze einige Einschränkungen aufweisen, wird im Folgenden ein weiteres Konzept für die Umsetzung der Messaufgabe vorgestellt. Es handelt sich um eine atline-Analyse der Segmente auf einem speziell präparierten Träger (im Weiteren als SERS-Array bezeichnet). Dazu werden die zu untersuchenden Segmente aus dem mikrofluidischen Prozess heraus auf einem Träger abgelegt. Auf diesem Träger befinden sich hydrophile Stellen (im Weiteren als SERS-Messstellen bezeichnet), auf denen die abgelegten Segmente mit einer Raman-Sonde analysiert werden können. Diese Art des seriell-parallelen Transfers wurde bereits für die markierungsfreie Analyse von Segmenten mittels MALDI-MS erfolgreich angewendet [17]. Eine Kopplung mit einem SERS-Array wurde bisher allerdings noch nicht realisiert. Abbildung 5-6 zeigt eine schematische Darstellung dieses Ansatzes.

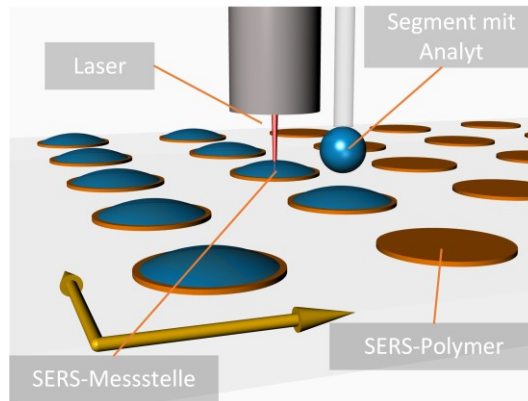


Abbildung 5-6: Konzept für die atline-Analyse der Segmente auf einem SERS-Array

Dieses Konzept erlaubt eine genaue Positionierung des SERS-Substrats an einzelnen Messstellen und ermöglicht eine leichte Ansteuerung der SERS-aktiven Oberfläche. Daher ist bei diesem Analyseverfahren keine aufwendige Optik notwendig, wie es bei der Fokussierung in einen Strömungskanal der Fall wäre. Zudem entfällt die zeitliche Limitierung für die Messung, die bei den anderen Konzepten durch die Bewegung der Segmente unumgänglich ist. Beides begünstigt den Einsatz kompakter Spektrometer mit einem einfachen optischen Aufbau. Ein weiterer Vorteil ist, dass eine höhere Messempfindlichkeit erreicht werden kann. Während bei den anderen Konzepten durch die Dosierung der Partikellösung eine Verdünnung des Analyten erfolgt, kann durch das Ablegen der Segmente ein Teil des Lösemittels (meist Wasser) verdampfen, was zu einer Aufkonzentrierung des Analyten und als Folge dessen zu einem höheren Raman-Signal führen kann.

Aufgrund der in Kapitel 5.1.1 gewonnenen Erkenntnisse zum Verhalten der SERS-Sensorpartikel und der in diesem Kapitel dargestellten Betrachtungen zu den Vor- und Nachteilen der verschiedenen Messkonzepte, wird das Konzept der atline-Messung als am geeignetsten für die gestellte Messaufgabe angesehen. Es ermöglicht eine einfache Anbindung an den segmentierten Prozess und eine robuste Messung der SERS-Signale.

5.1.3 Auswahl des Raman-Spektrometers

Die im vorherigen Kapitel zur Umsetzung der Messaufgabe ausgewählte Methodik ermöglicht aufgrund der Ablage der Segmente auf dem SERS-Array eine sehr einfache Anbindung der Raman-Spektroskopie. Die Notwendigkeit einer Fokussierung des Strahlengangs durch einen Mikroskop-Aufbau wird vermieden und es können Spektrometer mit einer Raman-Sonde eingesetzt werden. Das ermöglicht die gestellte Messaufgabe mit einem kompakten Aufbau zu realisieren. Der Einsatz von Kompaktspektrometern ist aber mit Einschränkungen, beispielsweise bei der erreichbaren spektralen Auflösung und des

Signal-Rausch-Verhältnisses, verbunden. Im Folgenden wird die Untersuchung dieser Parameter mit dem Ziel, ein geeignetes Gerät auszuwählen, beschrieben und diskutiert.

Eine wichtige Eigenschaft eines Spektrometers ist die spektrale Auflösung. Eine geringe spektrale Auflösung führt zu einer Verbreiterung der Banden, die dazu führen kann, dass Informationen im Spektrum, wie etwa die Aufspaltung von Banden, verloren gehen [58]. Um die Verbreiterungen im vorliegenden Fall zu untersuchen, wurden Raman-Spektren der gleichen Probe (fünf Partikel der Charge ZG-a2 in einer $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ Adeninslösung) bei unterschiedlichen spektralen Auflösungen gemessen. Die Messungen erfolgten direkt hintereinander, ohne die Probe aus dem Probenraum zu entfernen. Die Bande bei 735 cm^{-1} und deren Halbwertsbreite (HWB), die als Maß für die Breite der Banden gilt, sind in Abbildung 5-7 dargestellt.

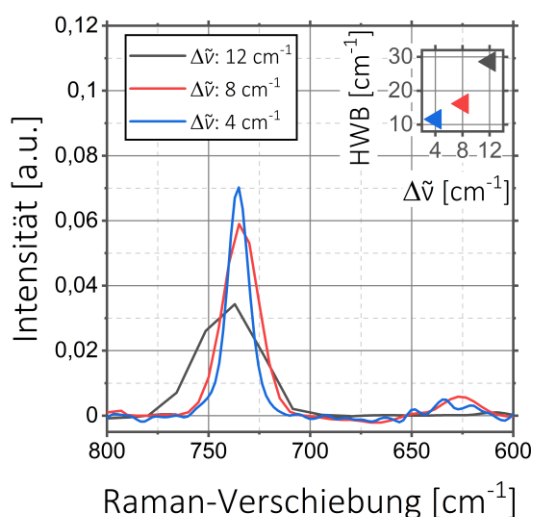


Abbildung 5-7: Raman-Spektren und deren Verbreiterung bei unterschiedlicher spektraler Auflösung

Anhand der Raman-Spektren ist eine deutliche Verbreiterung der Banden und damit einhergehend ein Rückgang der Bandenintensität durch die Reduzierung der spektralen Auflösung zu beobachten. Bei der Änderung der Auflösung ($\Delta\tilde{\nu}$) von 4 cm^{-1} auf 8 cm^{-1} erhöht sich die HWB von $11,6 \text{ cm}^{-1}$ auf $16,2 \text{ cm}^{-1}$ und bei weiterer Änderung der Auflösung auf 12 cm^{-1} erhöht sich die HWB auf $28,6 \text{ cm}^{-1}$. Es zeigt sich, dass eine hohe spektrale Auflösung von Vorteil für den Informationsgehalt der Spektren ist. Somit sollte die Auflösung möglichst hoch (kleiner 8 cm^{-1}) gewählt werden, da im gemessenen Bereich bei den betrachteten Signalen schon eine deutliche Verbreiterung eintritt. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass anders als bei dem hier verwendeten FT-Spektrometer, bei dem verfahrensbedingt die Verringerung der Auflösung eine längere Messzeit und eine höhere Bandenintensität zur Folge hat, die Bandenintensität bei dispersiven Spektrographen, wie sie üblicherweise in modernen kompakten Spektrometern zu finden sind, sinkt (bei glei-

cher Messzeit) [58]. Dies ist bedingt durch die Verkleinerung des Eintrittspalts, die notwendig ist, um eine höhere Auflösung zu erreichen. Somit ist auch die Bandenintensität von Bedeutung für die Auswahl des Spektrometers. Diese wird im Folgenden anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses (engl. *signal-to-noise ratio*, SNR) der gemessenen Raman-Spektren (siehe Gleichung 4.13) beurteilt.

Im Vorfeld der Spektrometer-Auswahl wurden daher von verschiedenen Herstellern Testmessungen mit Ethanol angefordert. Die getesteten Geräte und Testparameter sind in Kapitel 4.5 angegeben. Die Spektren der Testmessungen wurden auf die Bandenintensität der aliphatischen C-C-Schwingung (883 cm^{-1}) normiert und sind in Abbildung 5-8 dargestellt. Da das Gerät von Soliton in diesem Bereich einen leichten Anstieg der Basislinie zeigte, wurden die Daten mit einer Basislinienkorrektur überarbeitet und ausgewertet (Soliton korr. in Abbildung 5-8).

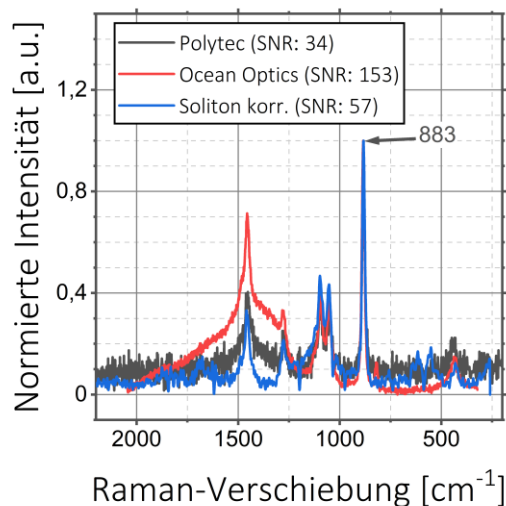


Abbildung 5-8: Raman-Spektren von Ethanol, gemessen mit den verschiedenen Spektrometern

Anhand der Raman-Spektren ist eine unterschiedliche Ausprägung des Rauschens optisch bereits gut erkennbar. Das Gerät von Ocean Optics zeigt mit einem berechneten SNR von 153 den höchsten und damit besten Wert. Die beiden anderen Geräte zeigen eine geringeres und damit schlechteres SNR (Polytec: 34, Soliton: 57). Somit zeigt sich, dass sich das Gerät von Ocean Optics bezüglich der vorher definierten Auswahlkriterien am besten für die gestellte Messaufgabe eignet. Es bietet das beste Signal-Rausch-Verhältnis sowie eine gute spektrale Auflösung (siehe Kapitel 4.5). Neben den hier beschriebenen Performance-Gründen ist bei diesem Gerät auch der Zugang zu LabView-Treibern, die für die Softwareentwicklung (siehe Kapitel 5.1.5) hilfreich sind, vorteilhaft. Es sei jedoch erwähnt, dass die Beurteilung der Geräte nur im Hinblick auf die in dieser Arbeit beschriebene Anwendung bei sehr kurzen Messzeiten erfolgte. Typischerweise werden

diese Geräte bei längeren Messzeiten eingesetzt, die hier jedoch nicht berücksichtigt wurden und daher die Beurteilung dahingehend anders ausfallen kann.

5.1.4 Entwicklung der Segmentdetektion

In Abschnitt 5.1.2 wurde das Konzept für das Analysesystem vorgestellt. Ein wichtiger Schritt für dessen Umsetzung ist die Detektion der Fluidsegmente. Diese sollten durch einen optischen Aufbau im Schlauch erkannt werden. Die Entwicklung dieser Zelle wird in diesem Kapitel beschrieben. Bei der Entwicklung sollten die folgenden Punkte berücksichtigt werden:

1. Die Detektion sollte berührungslos und direkt in der Transferkapillare stattfinden. Somit sollten Querkontaminationen oder die Teilung von Segmenten vermieden werden.
2. Das Detektionssignal sollte keine zeitliche Drift zeigen und sollte von äußeren Einflüssen, wie z.B. Umgebungslicht, nicht beeinträchtigt werden. So sollte gewährleistet werden, dass die Detektion auch über längere Versuchsreihen zuverlässig funktioniert.
3. Die Segmente sollten direkt aus einer Transferkapillare abgesetzt werden. Es sollte sichergestellt werden, dass die Kapillare gut fixiert werden kann, um ein reproduzierbares Absetzen der Tropfen zu gewährleisten.
4. Die Transmissionssignale der einzelnen Segmente sollten gespeichert werden, um diese den späteren SERS-Messungen zuordnen zu können.

Mit diesen Voraussetzungen wurde eine Zelle entworfen und in der mechanischen Werkstatt am Fraunhofer ICT aus Aluminium gefertigt. Abbildung 5-9 zeigt ein 3D-Modell und ein Bild der Zelle.

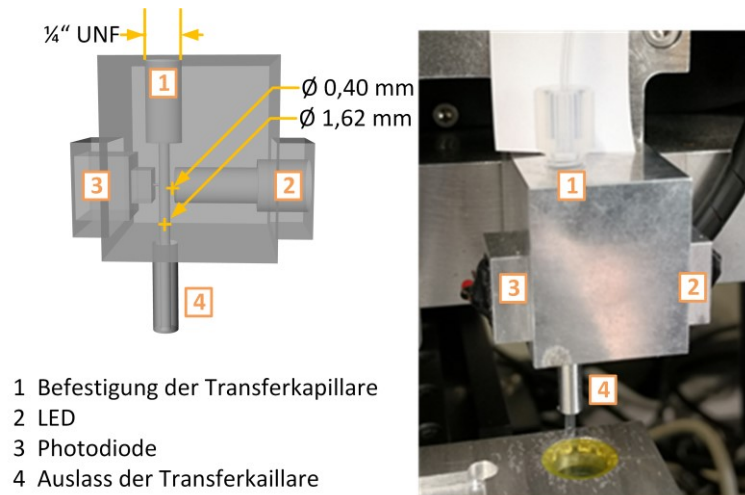


Abbildung 5-9: 3D-Modell der Zelle für die Tropfendetektion (links) und Lichtbildaufnahme (rechts)

An der Oberseite besitzt die Zelle ein Gewinde ($\frac{1}{4}$ " UNF), mit welchem die Transferkapillare mit einer HPLC-Verschraubung fixiert werden kann. Senkrecht zur Kapillare können eine LED und eine Photodiode eingesetzt werden. Zwischen der LED und der Photodiode befindet sich eine Bohrung mit einem Durchmesser von 400 Mikrometern. Die verwendeten Komponenten sind in Abschnitt 4.6 beschrieben. Aus früheren Arbeiten [102] ist bekannt, dass diese Geometrie eine Verfälschung des Signals durch das Streulicht in der Zelle oder durch die Kapillarwand verhindert. Das Austrittsende der Kapillare wird durch einen Aluminiumstutzen geführt, der das Verbiegen der Kapillare verhindert.

Im Folgenden wird das Messprinzip der Segmentdetektion erklärt. Aus der Spannung der Photodiode, die proportional zur einfallenden Lichtstärke ist, wird die Extinktion berechnet. Passiert ein Segment die Photodiode, ändert sich die Extinktion. Der Signalverlauf, der während des Durchgangs eines Fluidsegments entsteht, ist in Abbildung 5-10 dargestellt.

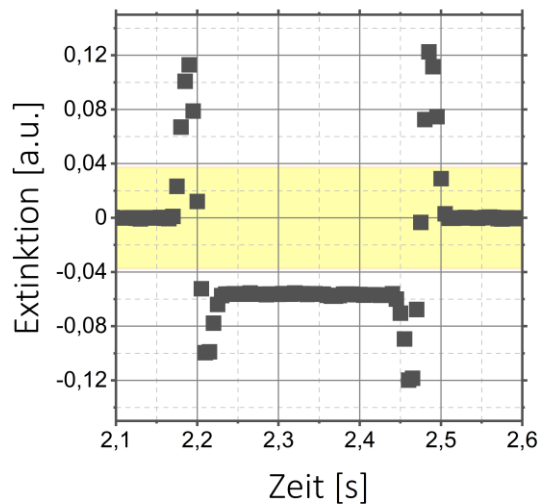


Abbildung 5-10: Signal der Photodiode beim Durchtritt eines Fluidsegments

Beim Durchtritt eines Fluidsegments durch die Zelle steigt die Extinktion zuerst kurz an und fällt daraufhin stark ab, bevor ein konstanter Wert über die Segmentdauer erreicht wird. Am Ende des Fluidsegments steigt die Extinktion erneut stark an und fällt anschließend auf den Wert der Trägerphase ab. Die Artefakte bei dem Ein- und Austritt der Fluidsegmente sind auf Reflektionen an den Phasengrenzen zurückzuführen. Bei der Software-Erkennung der Segmente müssen diese Artefakte berücksichtigt werden, um eine Fehlererkennung beziehungsweise eine doppelte Erkennung eines Fluidsegments zu verhindern.

Die Erkennung der Fluidsegmente wurde wie folgt umgesetzt. Das Signal der kontinuierlichen Phase wird aufgenommen, die Extinktion berechnet und der Wert als Nulllinie verwendet. Zudem wird eine obere und untere Grenze festgelegt (gelber Bereich in Abbildung 5-10). Der Anfang eines Fluidsegments wird festgelegt, wenn das Signal eine dieser Grenzen überschreitet und auch die folgenden acht Werte außerhalb der Grenzen liegen. Damit soll sichergestellt werden, dass durch Artefakte am Anfang keine Fehlererkennung stattfindet. Unterschreitet das Signal wieder die Grenze (inklusive der nächsten acht Werte), wird das Ende des Segments festgelegt. Die weitere Programmierung der Segmentdetektion wird in Kapitel 5.1.5 beschrieben.

Eine zuvor definierte wichtige Eigenschaft ist die Signalstabilität des optischen Systems. Eine Abweichung über einen längeren Zeitraum könnte dazu führen, dass die Grundlinie der Trägerphase außerhalb der vorher festgelegten Extinktionsgrenzen liegt und damit die Segmente nicht mehr richtig erkannt werden. Zur Überprüfung der Stabilität der Grundlinie wurden über einen Zeitraum von etwa 60 Sekunden mehrere Fluidseg-

mente abgesetzt und anschließend das Signal der Trägerphase weitere 15 Minuten aufgenommen. Die Signalverläufe sind in Abbildung 5-11 dargestellt.

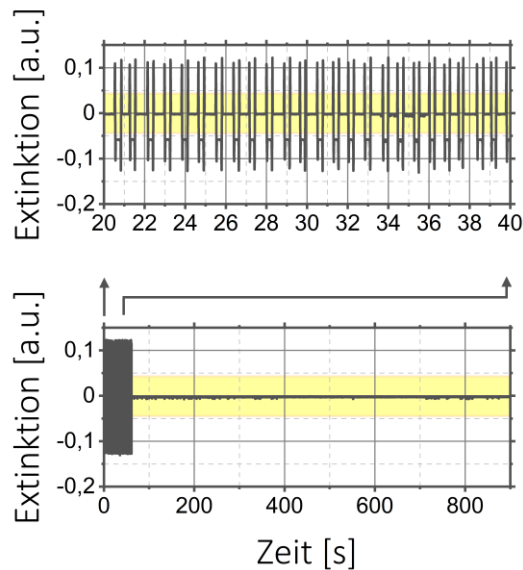


Abbildung 5-11: Stabilität der Segmentdetektion über 900 Sekunden

Im oberen Diagramm ist der Signalverlauf während der Segmenterkennung dargestellt. Die Grundlinie und die Basislinie bleiben stabil, auch über einen längeren Zeitraum von etwa 15 Minuten kann keine Abweichung der Grundlinie festgestellt werden (unteres Diagramm). Somit ist auch ein Absetzen größerer Segmentreihen oder ein langsames Absetzen über einen längeren Zeitraum problemlos möglich, ohne dass es zu Fehlerkennungen kommt.

Entscheidend für die Leistungsfähigkeit des Analysesystems ist die Geschwindigkeit, mit der die Segmente abgesetzt werden können. Dabei muss stets sichergestellt werden, dass die Segmente auf den SERS-Messstellen abgesetzt werden und dass jeweils nur ein Segment abgesetzt wird. Sollten dabei Fehler auftreten, stimmt die Zuordnung der Segmente zu den SERS-Messungen nicht mehr und dies kann zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führen. Zur Überprüfung der zeitlichen Abfolge wurden Segmente bei verschiedenen Volumenströmen auf einem leeren Array abgesetzt. Abbildung 5-12 zeigt das Absetzen zwei aufeinanderfolgender Tropfen in einer Bilderabfolge, die aus einer Hochgeschwindigkeitsaufnahme stammen.

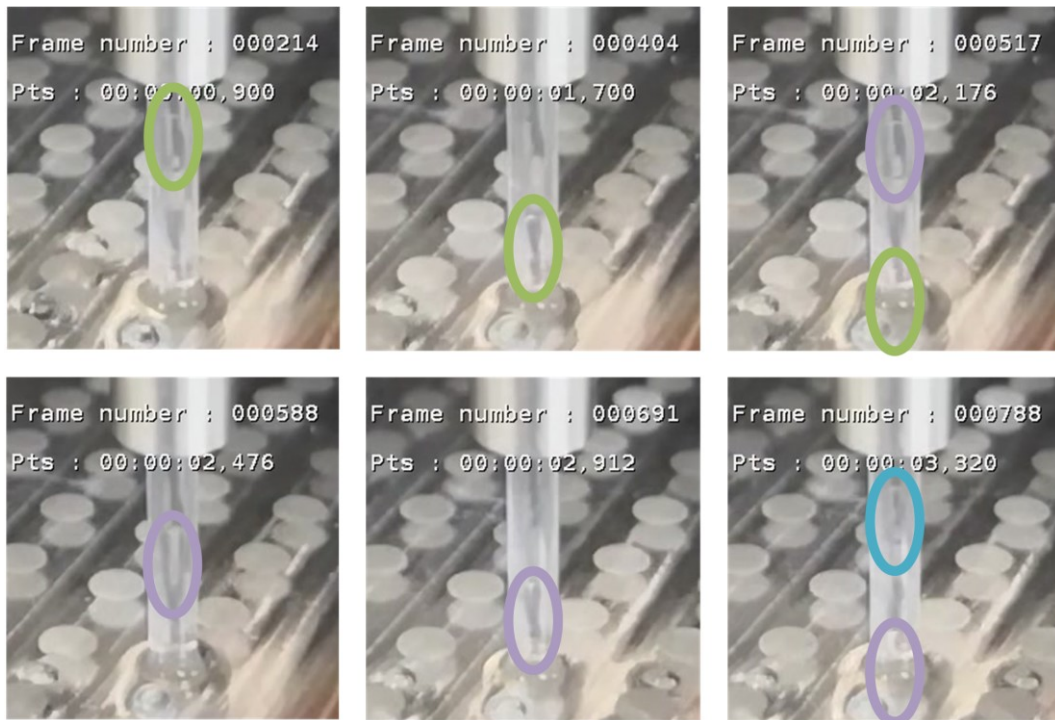


Abbildung 5-12: Absetzen der Fluidsegmente (unterschiedlich farblich markiert) auf dem SERS-Array (Bilder aus einem Hochgeschwindigkeitsvideo mit 240 Frames pro Sekunde; Pts: „Picture timestamps“)

Sobald das erste Fluidsegment (grüne Markierung im Bild nach 900 ms) detektiert wird, wird die Transferkapillare über dem Absetzpunkt positioniert. Bevor das erste Fluidsegment vollständig abgesetzt ist, wird bereits das zweite Fluidsegment detektiert (Bild nach 1,7 s) und verlässt den Absetzkopf (violette Markierung in Bild nach 2,176 s). Sobald die berechnete Absetzzeit (siehe Kapitel 5.1.5) verstrichen ist, wird der nächste Absetzpunkt angefahren (Bild nach 2,912 s). Während das zweite Fluidsegment abgesetzt wird, verlässt das dritte Fluidsegment (blaue Markierung in Bild bei 3,320 s) den Absetzkopf. Hier muss sichergestellt werden, dass die Zeitabstände zwischen den Segmenten lang genug sind, um die Transferkapillare über der nächsten Absetzstelle zu positionieren.

Um dies zu untersuchen, wurden Fluidsegmente bei verschiedenen Geschwindigkeiten im Abstand von 2 mm auf einem Glasträger abgesetzt. Nach dem Absetzen wurde die Anzahl der detektierten und abgesetzten Fluidsegmente verglichen sowie überprüft, ob alle Absetzstellen befüllt waren. Zum Erzeugen der Fluidsegmente wurde der in Kapitel 4.3 beschriebene Aufbau verwendet. Der Gesamtdurchfluss wurde im Bereich von 90 - 150 $\mu\text{L min}^{-1}$ variiert. Dabei wurde jeweils ein Verhältnis von 2:1 der Trägerphase zur dispersen Phase eingehalten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5-1 aufgelistet.

Tabelle 5-1: Ergebnisse des Geschwindigkeitstests zur Fluidsegment-Ablage

\dot{V}_T / \dot{V}_D (Träger/Dispers) [$\mu\text{L min}^{-1} / \mu\text{L min}^{-1}$]	Mittlerer Abstand [s]	Segment- volumen [nL]	Segmente (detektiert/abgesetzt)	Fehler beim Absetzen
100/50	0,439 $\pm 0,0487$	614 ± 125	45/45	5 Messstellen unbesetzt
80/40	0,675 $\pm 0,0530$	683 ± 100	42/42	keine
60/30	1,29 $\pm 0,0840$	833 $\pm 75,4$	39/39	keine

Bei den geringen Gesamtflussraten ($90 \mu\text{L min}^{-1}$ und $120 \mu\text{L min}^{-1}$) traten keine Fehler beim Absetzen der Fluidsegmente auf. Erst bei einem Gesamtfluss von $150 \mu\text{L min}^{-1}$ konnten Fehler festgestellt werden. Bei dieser Flussrate wurden 45 Fluidsegmente detektiert und auch 45 Absetzstellen angefahren, jedoch wurden auf fünf Stellen keine Segmente abgesetzt. Diese waren entweder im Zwischenraum oder auf den falschen Messstellen abgesetzt worden. Zwischen den Fluidsegmenten wurde ein mittlerer Zeitabstand von 439 ms gemessen, diese Zeit reicht nicht aus, um zuverlässig die nächste Messstelle anzufahren. Ein Zeitabstand von 675 ms reicht hingegen aus, um die Fluidsegmente zuverlässig abzusetzen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Entwicklung der Zelle zur Erkennung der Fluidsegmente zusammengefasst. Die Zelle ermöglicht den einfachen Anschluss von segmentierten Prozessen über eine Standardkapillare. Diese kann über eine Verschraubung und den Stützen unterhalb der Zelle fixiert werden. So kann die Kapillare exakt über dem Absetzpunkt positioniert werden. Der optische Aufbau erlaubt die kontaktlose Erkennung und ist über einen längeren Zeitraum stabil, sodass auch große Segmentreihen abgesetzt werden können. Mit dem Aufbau können Fluidsegmente in einer Frequenz von 1,5 Hz im Abstand von 2 mm abgesetzt werden.

5.1.5 Entwicklung der Software zur Steuerung des Analysesystems

Die Software zur Steuerung des Analysesystems wurde in Zusammenarbeit mit der TU Ilmenau in dem Projekt BactoCat (BMBF KFZ-031A161A) entwickelt. Hierzu wurde die Systementwicklungssoftware LabVIEW® von National Instruments (Austin, Texas, USA) verwendet, die auf einer grafischen Programmiersprache nach dem Datenflussmodell basiert. Die entwickelten Programme werden als virtuelle Instrumente (VIs) bezeichnet und bestehen aus einem Frontpanel, als grafische Benutzeroberfläche, und dem Blockdi-

agramm, das den Programmcode enthält. LabVIEW® eignet sich besonders für die hier vorliegende Aufgabe, da es eine sehr gute Hardwareanbindung besitzt und zudem eine schnelle Visualisierung und Verarbeitung der Daten ermöglicht. Das entwickelte Programm sollte folgende Funktionen aufweisen:

- **Hardware-Integration:** Die verwendeten Komponenten sollten vollständig über die Software konfiguriert werden können. Das beinhaltet beispielsweise die Initialisierung der Linearmotortische, die Einstellung der Laserleistung, die Einstellung der Parameter für das Spektrometer (z.B. Integrationszeit, Mittelung der Spektren) sowie die Parameter für die Tropfenerkennung (Lichtintensität der LED und Spannungsbereich der Photodiode).
- **Segmente Absetzen:** Die Segmente sollten automatisch erkannt werden und auf der vorgesehenen Stelle auf dem SERS-Array abgesetzt werden. Die Daten sollten für die spätere Auswertung zur Verfügung stehen.
- **Raman-Messung:** Die Analyse der Messstelle sollte automatisch ablaufen. Vor jeder Messung sollte eine automatische Dunkelmessung erfolgen.
- **Datenvisualisierung:** Unmittelbar nach der Messung sollten einfache Methoden zur Datenvisualisierung und Aufbereitung zur Verfügung stehen (z.B. Basislinienkorrektur, Spektren vergleichen und subtrahieren).

Der gesamte Quellcode des Hauptprogramms ist sehr komplex und es ist nicht möglich diesen im vorliegenden Format so abzubilden, dass er von Außenstehenden ohne größeren Aufwand nachvollzogen werden kann. Im Folgenden sollen jedoch die Struktur der Messsoftware sowie deren Hauptfunktionen erläutert werden. Die Hauptfunktionen sind die Steuerung der Linearmotortische und des Raman-Spektrometers sowie die Erzeugung der Daten.

Die Messsoftware steuert das System während der Versuchsdurchführung. Nach Programmstart erfolgt eine Initialisierung, bei der die Kommunikation aller Systemkomponenten überprüft, die gespeicherten Werte geladen und eine Referenzfahrt der Achsen durchgeführt werden. Danach läuft das Programm in drei parallelen Schleifen, welche die drei Hauptkomponenten abbilden. Diese enthalten den Programmcode für die analogen Ein- und Ausgabesignale, die Achsenbewegung und die Raman-Messung. Die drei Hauptschleifen verwenden Ereignisstrukturen, welche die einzelnen Funktionen der jeweiligen Komponente enthalten. Abbildung A-1 im Anhang zeigt einen kleinen Ausschnitt des

Programmcodes. Zur besseren Verdeutlichung ist ein vereinfachter Ablauf des Programmes in einem Flussdiagramm dargestellt (Abbildung 5-13).

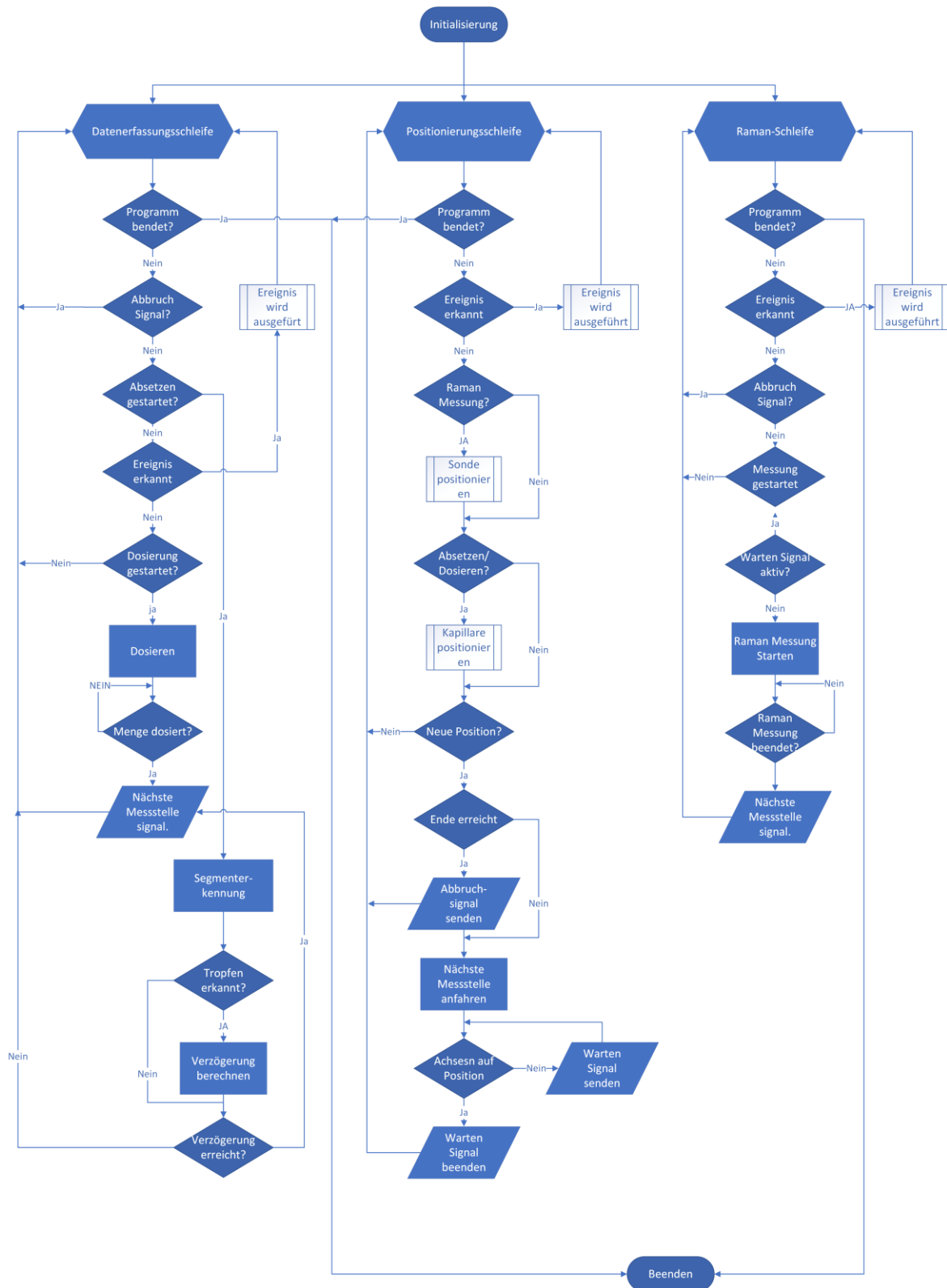


Abbildung 5-13: Vereinfachte Darstellung der Programmstruktur der Messsoftware

Generell laufen die drei Schleifen unabhängig voneinander, sind aber durch einzelne Steuersignale oder Ereignisse (im LabVIEW-Code als „occurrences“ bezeichnet) synchroni-

siert. Wird beispielsweise von der Datenerfassungsschleife oder der Raman-Schleife der Wert „next spot“ aktiviert, wird von der Positionierungsschleife die nächste Messstelle angefahren. Solange die Bewegung der Achsen erfolgt, wird eine „occurrence“ mit dem Wert „wait“ ausgelöst [103]. Folgeaktionen die durch die Bewegung der Achsen beeinträchtigt werden, wie beispielsweise die Raman-Messung warten bis die „occurrence“ mit dem Wert „wait“ aufgelöst ist. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden im Folgenden nur die wichtigsten Funktionen und Abläufe im Flussdiagramm aufgeführt. Alle weiteren Funktionen, wie etwa Werteingaben oder manuelle Bedienungselemente, sind unter dem Begriff Ereignis im Flussdiagramm zusammengefasst. Eine Übersicht dieser weiteren Funktionen ist in Tabelle A-1 dargestellt.

Die Datenerfassungsschleife steuert die Segmentdetektion für das Absetzen der Segmente und außerdem die Dosierung der Reaktionslösung bei der Herstellung des SERS-aktiven Hydrogels (siehe Kapitel 5.2.2). Zu Beginn der Schleife wird abgefragt, ob ein Abbruchsignal vorliegt. Ein Abbruchsignal kann beispielsweise aus der Positionierungsschleife gesendet werden, wenn das Ende des Arrays erreicht ist und keine Segmente mehr abgesetzt werden können. Weiter wird abgefragt, ob die Segmentdetektion gestartet ist. Ist das nicht der Fall, wird abgefragt, ob ein weiteres Ereignis, wie zum Beispiel eine Werteingabe oder ein Wartesignal, vorliegt. Anschließend wird geprüft, ob die Dosierfunktion gestartet ist, andernfalls springt das Programm zurück an den Anfang der Datenerfassungsschleife.

Ist das Absetzen der Segmente gestartet, wird das Signal der Photodiode ausgelesen. Sobald ein Segment erkannt wird, wird die Absetzzeit aus der Fließgeschwindigkeit und der Länge der Kapillare berechnet. Die Werte werden zusammen mit weiteren Informationen über das Segment (Segmentnummer, Länge und Position) in einem Cluster gespeichert. Die einzelnen Segmentcluster werden in einem Array zwischengespeichert. Anschließend wird überprüft, ob die Verzögerung, die notwendig ist bis das Segment auf dem Array abgesetzt worden ist, abgelaufen ist. Ist dies der Fall, wird ein Signal an die Positionierungsschleife gesendet, damit die nächste Messstelle angefahren wird. Anschließend springt die Programmierung wieder zurück an den Anfang der Datenerfassungsschleife.

Die Positionierungsschleife reagiert auf einkommende Signale zur Positionierung der Raman-Sonde und der Transferkapillare. Zu Beginn wird überprüft, ob ein Abbruchsignal oder ein Startsignal für ein weiteres Ereignis (siehe Tabelle A-1) vorliegt. Ist dies nicht der Fall, erfolgt die Abfrage, ob die Kapillare oder die Raman-Sonde über der Messstelle positioniert werden soll. Weiterhin wird abgefragt, ob eine neue Messstelle

angefahren werden soll und überprüft, ob das Ende des Arrays erreicht ist. Ist das Ende erreicht, wird ein Abbruchsignal gesendet, andernfalls wird eine neue Messstelle angefahren. Während sich die Achsen bewegen, wird ein Wartesignal gesendet. Dadurch werden die Dosierung und die Raman-Messung so lange verzögert, bis die Bewegung abgeschlossen ist. Anschließend springt die Positionierungsschleife erneut auf den Anfang.

Die Raman-Schleife steuert die automatische Analyse der Messstellen. Zu Beginn wird überprüft, ob ein Abbruchsignal oder ein Startsignal für ein weiteres Ereignis (siehe Tabelle A-1) vorliegen. Anschließend wird abgefragt, ob die Raman-Messung gestartet ist. Ist dies der Fall, wird zuerst eine Dunkelmessung gestartet, die das Hintergrundsignal bestimmt. Anschließend wird die Messung gestartet. Nach Abschluss der Messung werden die Daten in einer Textdatei gespeichert und signalisiert, dass die nächste Messstelle angefahren werden kann. Anschließend springt die Programmierung auf den Anfang der Raman-Schleife zurück.

Der hier vorgestellte Programmablauf ermöglicht die Steuerung der relevanten Prozessschritte wie das Absetzen der Segmente oder die Raman-Messung. Die notwendigen Messparameter, wie die Integrationszeit, die Laserleistung oder die Lichtstärke der Photodiode können direkt in der Software eingegeben und mit den Messungen abgespeichert werden. Diese Daten werden während der Messung angezeigt. Zur Visualisierung und zur Auswertung wird ein separates Programm verwendet. Dieses und die Bedienoberfläche der Messsoftware sind in Kapitel 4.7 beschrieben.

5.2 Entwicklung, Anpassung und Bewertung einzelner Methoden zu Herstellung des SERS-Arrays

Im vorherigen Kapitel wurde die Entwicklung des Analysesystems beschrieben. Zur Umsetzung des Konzepts war die Entwicklung eines SERS-Arrays, auf dem die quellfähigen SERS-aktiven Messstellen angeordnet sind, notwendig. Verschiedene quellbare SERS-aktive Polymerpartikel sind bereits entwickelt und untersucht worden [22, 101, 104]. Auch über die Anordnung von SERS-Strukturen auf einem Array wurde bereits berichtet [72, 73, 105]. Ein neuer Ansatz in dieser Arbeit ist die Realisierung eines quellbaren Polymerfilms auf einer Substratoberfläche, der für SERS-Messungen eingesetzt werden kann. In diesem Kapitel wird die Entwicklung der verschiedenen Prozessschritte zu Herstellung des SERS-Arrays beschrieben. Zuerst wird die Entwicklung und Umsetzung einer Trägerplatte beschrieben. Nachfolgend werden Methoden zum Auftragen der SERS-aktiven Polymerschicht vorgestellt und hinsichtlich der Handhabung, Automatisierungs-

fähigkeit und der Oberflächenwölbung bewertet und diskutiert. Abschließend wird die Bewertung von zwei Dosiermethoden anhand von Untersuchungen dargestellt.

5.2.1 Methodenentwicklung zur Erstellung der Trägerplatte

Der Aufbau des SERS-Arrays erfolgte auf einer Glasplatte. Hierzu wurden hydrophile Vertiefungen auf einer hydrophoben Oberfläche hergestellt. Dies ist aus mehreren Gründen, sowohl für die Herstellung als auch die Verwendung des SERS-Arrays, hilfreich. Es wird so sichergestellt, dass beim Aufbringen der wasserbasierten Reaktionslösung die Flüssigkeit in den hydrophilen Vertiefungen bleibt. Zudem verhindert es, dass sich die Fluidsegmente beim Absetzen nicht auf der normalerweise hydrophilen Glasoberfläche ausbreiten.

Im Folgenden wird die entwickelte Methode zur Erstellung der Trägerplatte beschrieben. Um auf der Glasoberfläche hydrophobe Eigenschaften zu erzeugen, wird die Trägerplatte mit einer Trichlorsilan-Verbindung (Octadecyltrichlorsilan, OTS) beschichtet. Das Beschichtungsverfahren wird in Kapitel 4.2 beschrieben. Mittels Laserablation werden hydrophile Stellen durch einen partiellen Abtrag der oberen Glasschicht und damit auch der Beschichtung erzeugt. Das Verfahren ist in Abbildung 5-14 dargestellt.

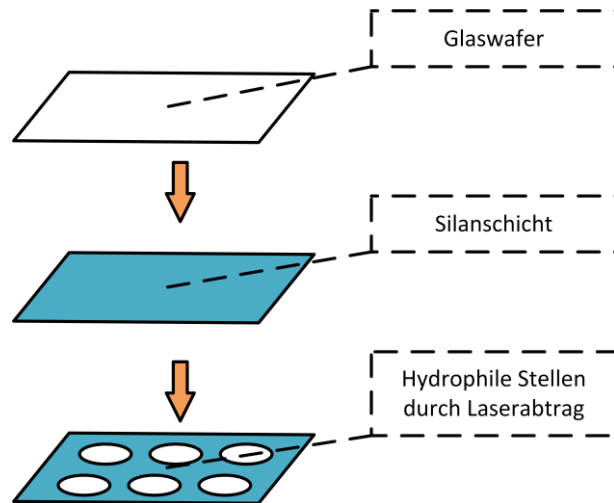


Abbildung 5-14: Realisierung eines Arrays mit diskreten SERS-Messstellen

Die Form und Tiefe der freigelegten Stellen muss präzise und reproduzierbar hergestellt werden können. Zu große Abweichungen würden dazu führen, dass die Flächen ungleichmäßig mit den Fluidsegmenten gefüllt werden, wodurch die Reproduzierbarkeit der SERS-Messungen beeinträchtigt werden kann. Zum Abtrag wird ein Ultrakurzpulslaser mit einer Pulsdauer von 10 ps und mit einer Wellenlänge von 1064 nm verwendet. Der Laser ermöglicht einen präzisen Abtrag der Oberfläche von nur wenigen Mikrometern. Es können Vertiefungen mit variablen Geometrien, Abständen und Tiefen erzeugt werden und die

direkte Materialbearbeitung erlaubt eine schnelle Umsetzung des gewünschten Layouts. Die Haupteinflussfaktoren auf die Bearbeitung sind die Pulsleistung, der Vorschub und die Repetitionsrate des Lasers. In einer Versuchsreihe wurden die Parameter identifiziert, bei denen ein möglichst geringer aber gleichmäßiger Abtrag erfolgt. Abbildung 5-15 zeigt die Abtragtiefe in Abhängigkeit der Bearbeitungsparameter.

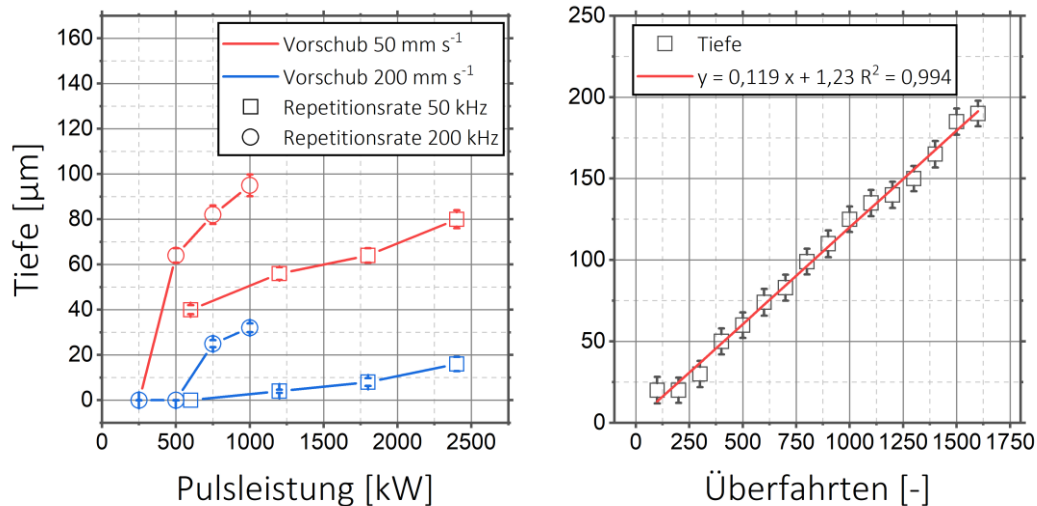


Abbildung 5-15: Abtragtiefe nach fünf Überfahrten bei verschiedenen Prozessbedingungen (links) und Abtragtiefe in Abhängigkeit der Anzahl an Überfahrten (rechts)

Wie zu erwarten, steigt der Abtrag bei steigender Pulsleistung. Aber auch der Vorschub und die Repetitionsrate beeinflussen den Abtrag und die benötigte Pulsleistung, bei der ein Abtrag erfolgt. Je größer das Verhältnis aus Vorschub zu Repetitionsrate ist, desto kleiner ist die Überlappung der einzelnen Laserpulse bei der Überfahrt. Daher erfolgt bei einer starken Überlappung der Laserpulse ein höherer Materialabtrag und es wird eine geringere Pulsleistung benötigt, um einen Abtrag zu erreichen. Weiterhin wurde untersucht, wie sich der Materialabtrag bei steigender Anzahl an Überfahrten verhält. Es wurde ein hoher Vorschub (200 mm s^{-1}), eine geringe Repetitionsrate (50 kHz) und eine geringe Pulsleistung ($1,2 \text{ MW}$) gewählt, um einen möglichst geringen Materialabtrag zu erhalten. Es zeigt sich ein lineares Verhalten mit einem Abtrag von ca. 120 nm je Überfahrt, was eine sehr präzise Materialbearbeitung ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Trägerplatten für die SERS-Arrays hergestellt (Tabelle 5-2).

Tabelle 5-2: Trägerplatten, die während dieser Arbeit als SERS-Arrays hergestellt wurden

Bezeichnung	Form der Vertiefung	Anzahl	Abstand	Durchmesser/Seitenlänge	Tiefe
TR-324-200r	rund	324	2 mm	2 mm	200 μm
TR-324-20r	rund	324	2 mm	2 mm	20 μm
TR-324-200q	quadratisch	324	2 mm	2 mm	200 μm
TR-324-20q	quadratisch	324	2 mm	2 mm	20 μm
TR-1296-200r	rund	1296	1 mm	1 mm	200 μm

Es wurden Trägerplatten mit runden und quadratischen Vertiefungen hergestellt. Weiterhin wurden verschiedene Tiefen angefertigt. Im folgenden Kapitel, in dem das Aufbringen der Polymerlösung vorgestellt wird, werden die einzelnen Vor- und Nachteile der Designs untersucht und diskutiert.

5.2.2 Methodenentwicklung für das Aufbringen des SERS-Polymers

Ein Schritt bei der Herstellung des SERS-Arrays ist das Aufbringen der Monomer- und Nachverstärkungslösung auf die Trägerplatte. Ein gleichmäßiges Auftragen der Lösungen ist notwendig, um die Reproduzierbarkeit der SERS-Messungen an verschiedenen Messstellen zu gewährleisten. Zum Aufbringen der Lösungen wurden eine Tauchbeschichtung und ein Dosierverfahren untersucht. In diesem Kapitel werden zuerst die beiden Methoden vorgestellt. Anschließend werden die Untersuchungen der Methoden beschrieben und hinsichtlich der Handhabung und Automatisierungsfähigkeit bewertet. Eine schematische Darstellung der Verfahren ist in Abbildung 5-16 dargestellt.

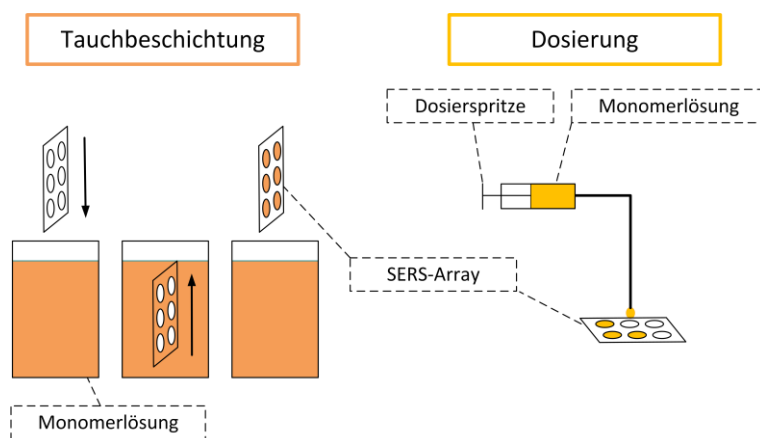


Abbildung 5-16: Schema für die Tauchbeschichtung (links) und das Dosierverfahren (rechts)

Die Tauchmethode ist ein einfaches Verfahren, um die hydrophilen Stellen der Trägerplatte mit den Lösungen zu benetzen. Dabei wird die Trägerplatte vollständig in die

Lösung eingetaucht. Es ist jedoch eine relativ große Flüssigkeitsmenge notwendig, um die Platte vollständig unterzutauchen. Beispielsweise wird für eine Platte mit den Abmaßen von $60 \times 120 \text{ mm}^2$ ein Volumen von ca. 224 mL ($20 \times 80 \times 140 \text{ mm}^3$) benötigt, wohingegen nur etwa 350 μL (324 Messstellen mit ca. 1,1 μL Flüssigkeit) der Flüssigkeit auf der Platte verbleiben. Das Herausziehen der Platte muss in einer gleichmäßigen Geschwindigkeit und mit konstantem Winkel zur Flüssigkeitsoberfläche erfolgen, um eine gleichmäßige Benetzung aller Messstellen zu erhalten. Wird der Vorgang manuell durchgeführt, müssen diese beiden Parameter berücksichtigt werden. Eine Automatisierung dieses Vorgangs ist daher sinnvoll, bei der die Platte unter einem definierten Winkel in eine Vorrichtung eingespannt und über einen Motor mit definierter Geschwindigkeit abgesenkt und angehoben wird.

Bei der Dosiermethode wird die entsprechende Menge der Flüssigkeit über eine Spitze in die jeweilige Messstelle dosiert. Ein großer Flüssigkeitsüberschuss, wie bei der Tauchmethode ist hier nicht notwendig. Auch bei dieser Methode kann eine Automatisierung des Vorgangs erfolgen, da das manuelle Dosieren sehr aufwendig ist. Dazu werden die Lösungen über eine Spritzenpumpe mit angeschlossener Kapillare dosiert. Zur Positionierung der Kapillare über den Vertiefungen kann dieselbe Apparatur wie zum Absetzen der Segmente verwendet werden (siehe Kapitel 4.2).

Die Oberflächeneigenschaften spielen bei der Tauchbeschichtung eine entscheidende Rolle. Die Flüssigkeit darf nur auf den hydrophilen Stellen zurückbleiben, andernfalls könnten Teile des Monomers zwischen den Messstellen aushärten und zu Querkontaminationen zwischen den Messstellen führen. Die hydrophobe Oberfläche wird durch eine Beschichtung mit Octadecyltrichlorsilan erzeugt, wodurch sich ein Kontaktwinkel von 107° mit Wasser ergibt (siehe Kapitel 4.2). Um zu untersuchen, ob die überschüssige Flüssigkeit von der Trägerplatte zuverlässig abläuft, wurde eine Farbstofflösung auf die Trägerplatte mit Durchmessern von 1 mm bzw. 0,2 mm aufgebracht und mit einer Spritze wieder abgesaugt. Zusätzlich wurden mit der Dosiermethode die hydrophilen Stellen benetzt. Abbildung 5-17 zeigt den zeitlichen Verlauf der Versuche in einer Bilderreihe.

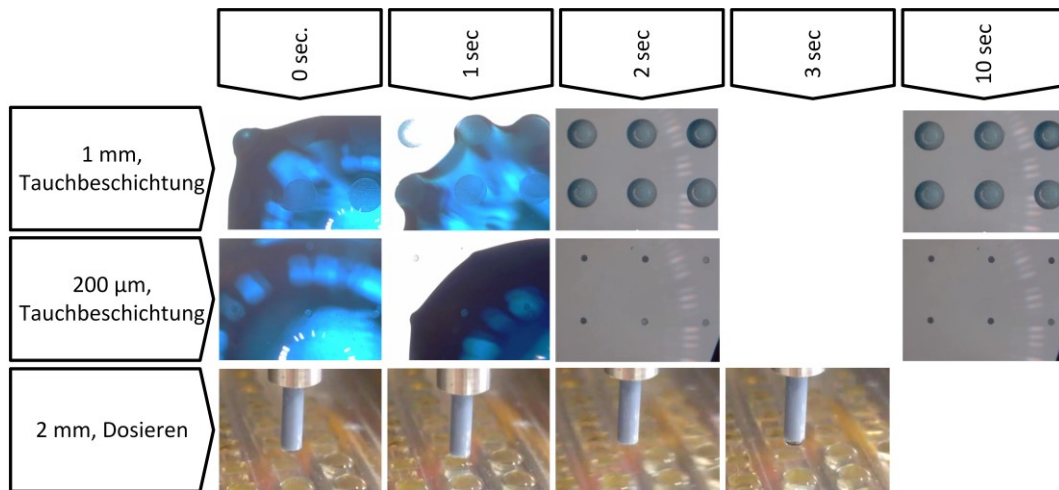


Abbildung 5-17: Benetzung mehrerer Messstellen durch Tauchbeschichtung (oben und mittig) und durch Dosierung mit dem Positioniersystem (unten)

Durch die Tauchbeschichtung wurde die Flüssigkeit präzise auf die hydrophilen Stellen mit 1 mm bzw. 0,2 mm Durchmesser aufgetragen. Es blieben keine Flüssigkeitsreste in den Zwischenräumen zurück, die bei der anschließenden Belichtung aushärten könnten. Somit kann mit der Tauchbeschichtung ein exaktes und reproduzierbares Auftragen der Lösungen auf die Messstellen erfolgen. Bei den 0,2 mm Messstellen war sofort nach dem Benetzen die Verdunstung der Flüssigkeit zu erkennen (die Stellen erscheinen dunkler). Dieser Vorgang war zwar bei den 1 mm Messstellen nicht in gleichem Ausmaß zu sehen, darf aber auch bei dieser Größe nicht vernachlässigt werden. Die Auswirkungen der schnellen Verdampfung werden daher in Kapitel 5.3.3 weiter untersucht und diskutiert. Auch bei der Dosiermethode erfolgte eine präzise Benetzung der hydrophilen Stellen und der Zwischenraum war frei von Flüssigkeit. Damit wird auch bei dieser Methode die Bildung eines Polymerfilms zwischen den Messstellen unterbunden.

5.2.3 Anpassungen der Applikationsmenge an die Geometrie der Messstelle

Die Untersuchung der SERS-Sensortartikel in Abschnitt 5.1.1 zeigte, dass mit einer Messsonde eine genaue Fokussierung erforderlich ist, da geringe Abweichungen von der Fokusebene einen deutlichen Intensitätsverlust bedeuten können. Dies bedeutet, dass auch eine gekrümmte Oberfläche des SERS-aktiven Polymers, die sich aufgrund der Oberflächenspannung der nicht ausgehärteten Silbersalz-Monomerlösung ergibt, zu Messfehlern führen kann. Im Folgenden wird daher die Untersuchung zur Anpassung der Applikationsmenge beschrieben. Dazu wurde die Füllmenge variiert und die Abweichungen der SERS-Intensitäten wurden an verschiedenen Stellen des Polymers untersucht. Zum Befüllen wurde die Dosiermethode verwendet, da bei der Tauchbeschichtung die Flüssigkeitsmenge nicht variiert werden kann. Die Menge der Verstärkerlösungen wurde

der Dosiermenge der Silbersalz-Monomerlösung angepasst. Abbildung 5-18 zeigt verschiedene SERS-Messstellen mit unterschiedlichen Formen, Vertiefungen und Füllmengen. Die Lichtbildaufnahmen wurden in einem Winkel von 45° aufgenommen, um die Krümmung der Oberfläche zu verdeutlichen.

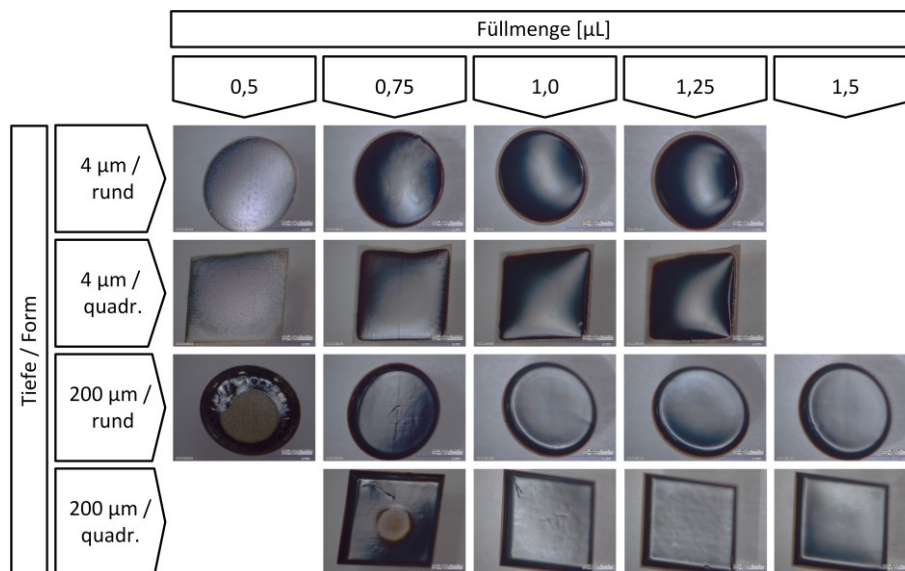


Abbildung 5-18: Lichtbildaufnahmen der SERS-Messstellen mit verschiedenen Geometrien und Füllmengen

Die flachen Messstellen wurden bereits mit einer geringen Füllmenge von $0,5 \mu\text{L}$ vollständig benetzt. Sowohl bei den runden als auch bei den quadratischen Stellen nahm die konvexe Krümmung mit der Füllmenge zu. Bei den tiefen Messstellen zeigte sich, dass sich die wässrige Silbersalz-Monomerlösung an der Wand der Vertiefung ansammelte. Dort sind die Oberflächenkräfte aufgrund der relativ hohen Rauheit größer als auf dem Boden. Somit ergab sich bei den runden Messstellen erst bei einer Füllmenge von $0,75 \mu\text{L}$ und bei den quadratischen Messstellen bei einer Füllmenge von $1 \mu\text{L}$ eine vollständige Benetzung. Aufgrund der hohen Oberflächenkräfte an der Wand entstand eine konkave Krümmung der Oberfläche. Mit zunehmender Füllmenge nahm diese ab und wechselte in eine konvexe Krümmung. An diesem Übergangspunkt sollten die Signalabweichungen, die aufgrund der Defokussierung des Lasers entstehen (vergl. Kap. 5.1.1), am geringsten sein. Es wurden SERS-Messungen mit einer $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ Adeninlösung an den Messstellen zur Untersuchung dieser Auswirkungen durchgeführt. Die Intensitäten und Abweichungen sind in Abbildung 5-19 dargestellt. Die Intensitäten wurden jeweils an fünf Stellen im Radius von $500 \mu\text{m}$ gemessen und die Standardabweichung sowie die relativen Intensitätsabweichungen innerhalb der Messstelle berechnet.

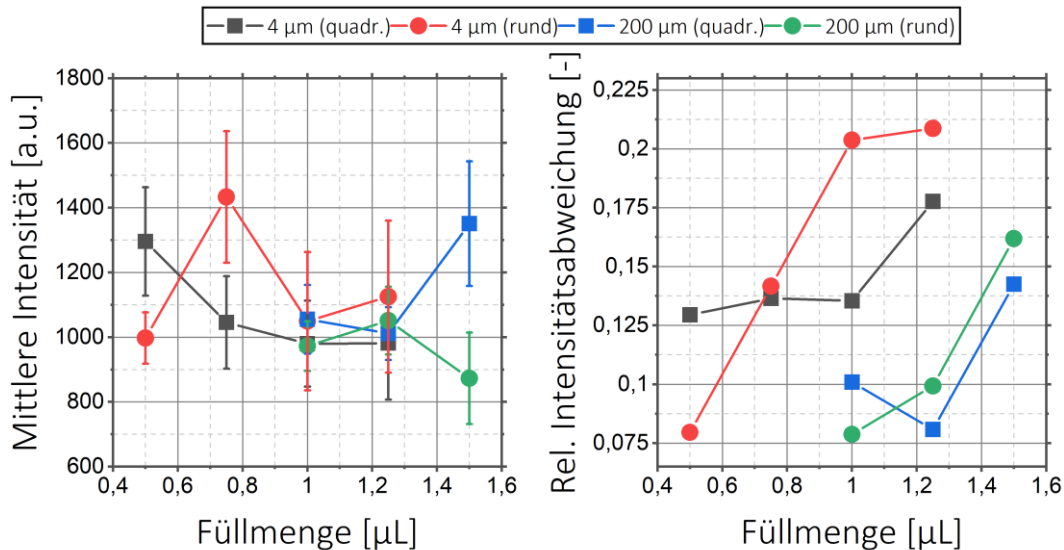


Abbildung 5-19: Mittlere Intensitäten der Raman-Messung an den SERS-Messstellen (links) und relative Abweichung der Intensitäten (rechts) in Abhängigkeit der Tiefe, Form und Füllmenge

Die mittleren Intensitäten zeigen bei den hier verwendeten Füllmengen und Formen zwar kleine Schwankungen, aber keinen einheitlichen Trend. Bei den Messungen wurde der Fokus des Lasers bei jeder Messstelle neu eingerichtet (vergl. Kapitel 4.7), wodurch Höhenunterschiede aufgrund der unterschiedlichen Füllmenge zwischen den Messstellen kompensiert wurden. Es zeigt sich aber ein Trend hinsichtlich der relativen Abweichung der Werte. Diese nimmt mit steigender Füllmenge zu. Eine Ausnahme zeigt sich bei den Werten der quadratischen Messstellen mit 200 µm Tiefe, hier nimmt die relative Intensitätsabweichung zwischen einer Füllmenge von 1 µL und 1,25 µL ab, steigt dann aber bei einer Füllmenge von 1,5 µL an. Dies kann durch den Krümmungswechsel von konkav zu konvex erklärt werden, da ein Minimum der Krümmung durchschritten wird, wodurch auch der Fehler durch die Defokussierung gering wird. Für Messstellen mit einer Tiefe von 4 µm zeigen sich die geringsten Abweichungen bei einer Füllmenge von 0,5 µL. Die Messstellen mit einer Tiefe von 200 µm zeigen bei einer Füllmenge zwischen 1 µL und 1,25 µL die geringsten Abweichungen. Für diese Messstellen sollte die Füllmenge der Silbersalz-Monomerlösung innerhalb der hier bestimmten Grenzen liegen. Bei einer Änderung der Durchmesser, Form oder Tiefe der Messstellen, müssen die optimalen Füllmengen erneut bestimmt werden, um geringe Abweichungen innerhalb der Messstellen zu gewährleisten.

5.2.4 Bewertung der verschiedenen Methoden zur Herstellung des SERS-Arrays

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen aus den beiden vorangegangenen Kapiteln bewertet und mit dem Ziel, die geeignetere Methode zu identifizieren,

diskutiert. Sowohl die Tauchbeschichtung als auch die Dosiermethode wurden im Laufe dieser Arbeit angewendet.

Beide Methoden lassen sich gut umsetzen und einfach automatisieren. Die Tauchbeschichtung ist dabei die schnellere Methode, da das ganze Array mit mehr als 300 Messstellen in einem Tauchgang von ca. 10 Sekunden benetzt werden kann. Die Dosiermethode benötigt hingegen ca. 5 Minuten, da jede Vertiefung einzeln angefahren wird. Die Tauchbeschichtung hätte somit aufgrund der Schnelligkeit und der guten Skalierbarkeit Vorteile für die Herstellung einer großen Anzahl an SERS-Arrays. Die Dosiermethode lässt sich jedoch gut anwenden, um eine Stückzahl von 10 bis 20 SERS-Arrays am Tag herzustellen. Für die Tauchbeschichtung wird deutlich mehr Flüssigkeit benötigt, um die gleiche Anzahl an SERS-Arrays zu benetzen, als bei der Dosiermethode. Dies ist gerade beim Aufbringen der Silbersalz-Monomerlösungen kritisch, da die Lösungen durch das Silbernitrat und den Photoinitiator nicht über einen längeren Zeitraum stabil sind und auch nicht wiederverwertet werden können. Somit ist der Materialverlust im Vergleich zur Dosiermethode deutlich höher. Weiterhin zeigen die Untersuchungen, dass es vorteilhaft ist die Füllmenge der Messstellen so anzupassen, dass die Krümmung der Oberfläche, verursacht durch die Oberflächenspannung der Monomerlösung, minimal ist. Das ist nur mit der Dosiermethode möglich, da das dosierte Volumen über die Spritzenpumpe eingestellt werden kann. Bei der Tauchbeschichtung ist die Füllmenge durch die Oberflächenkräfte der Trägerplatte und der Flüssigkeiten bestimmt. Es entstehen ausschließlich konvexe Oberflächen.

Zusammenfassend ist das Dosierverfahren das flexiblere Verfahren beim Auftragen der verschiedenen Flüssigkeiten. Es kann dieselbe Apparatur zur Dosierung wie für das Absetzen der Segmente verwendet werden. Zudem ist die Methode aus ökologischer und ökonomischer Sicht aufgrund des geringeren Materialverlusts zumindest für kleinere Stückzahlen zu bevorzugen. Ein Nachteil ist, dass die Dauer zur Aufbringung der verschiedenen Lösungen (ca. 5 Minuten) verhältnismäßig lang ist und hier von einer Verdunstung des Lösemittels (Wasser) ausgegangen werden muss. Die Untersuchung dieses Vorgangs und eine Anpassung der Silbersalz-Monomerlösung wird in Kapitel 5.3.3 beschrieben, welche die Verdunstung des Lösemittels reduziert. Die Geometrie der Messstellen hat keinen Einfluss auf die Messungen, solange das Dosiervolumen angepasst ist. Im Verlauf der Arbeit werden alle Geometrien für die Polymerentwicklung und Experimente verwendet.

5.3 Anpassung der Polymerzusammensetzung zur Verwendung auf den SERS-Arrays

Das SERS-Array beinhaltet Messstellen aus einer quellbaren Polymermatrix, in der Silberpartikel für die SERS-Verstärkung eingebunden sind. Dazu war auf Grundlage der Zusammensetzung der SERS-aktiven Komposit-Sensorpartikel, deren Untersuchung in Kapitel 5.1.1 beschrieben ist, ein SERS-aktiver Hydrogel-Film zu entwickeln. In diesem Kapitel wird die Untersuchung und Anpassung der Polymerzusammensetzung zur Verwendung auf den Arraystrukturen beschrieben. Im ersten Abschnitt wird die Untersuchung des Einflusses der Polymerzusammensetzung auf die Haftung am Glas und das Quellverhalten des Polymers beschrieben und diskutiert. Im zweiten Abschnitt wird die Optimierung des Vorgangs der Aushärtung des Polymers dargestellt. Im dritten Kapitel wird die Untersuchung und Anpassung der Lösemittelzusammensetzung hinsichtlich der Verdunstung beschrieben.

5.3.1 Untersuchung der Haftung auf Glas und des Quellverhaltens des SERS-aktiven Polymers

Die Eigenschaften von Gelen auf Basis von Acrylamid können über ihren Vernetzungsgrad C und die Totalamidkonzentration T beeinflusst werden (siehe Kapitel 4.1). In diesem Abschnitt wird die Untersuchung des Einflusses dieser beiden Faktoren auf die Haftung des Polymers am Glas der Arrayplatte und die Quelleigenschaften beschrieben. Dabei wurden die Auswirkungen von zwei Quervernetzern, N,N'-Diallylweinsäurediamid (DATD) und N,N'-Methylenbisacrylamid (MBA), untersucht. MBA wird standardmäßig in der Gelelektrophorese eingesetzt und auch in den SERS-Sensorpartikeln der Technischen Universität Ilmenau verwendet, DATD hingegen bietet eine gute Haftung und kann durch Glykolspaltung wieder gelöst werden (siehe Kapitel 4.1). Es wurden Proben hergestellt, bei denen der Vernetzungsgrad, die Totalamidkonzentration und der Quervernetzer, wie in Tabelle 5-3 dargestellt, variiert wurden.

Tabelle 5-3: Übersicht über die verwendeten Quervernetzer und Konzentrationen (für die Versuchreihe mit 18 Proben wurden alle Parameter kombiniert)

Parameter	Variable		
Quervernetzer	MBA	DATD	
Totalamidkonzentration T [%]	30	10	5
Vernetzungsgrad C [%]	25	15	5

Generell soll die Monomerlösung eine hohe Totalamidkonzentration aufweisen, damit das Polymer bei der Trocknung nicht zu stark schrumpft. Für jede Kombination der in Tabelle 5-3 aufgeführten Parameter wurde eine Probe von 5 mL Volumen angefertigt. Die Proben wurden in einer Glasschale ausgegossen und 15 Minuten unter der UV-Lampe ausgehärtet. Die Haftung und die Festigkeit des Polymers wurden beurteilt und in verschiedene Kategorien eingeteilt. Die Kriterien für die Einteilung der Polymere ist in Tabelle 5-4 dargestellt.

Tabelle 5-4: Beurteilungskriterien der Polymere nach der Aushärtung

Kategorien	Beobachtung
5	Das Polymer löst sich vom Glas
4	Das Polymer ist starr und bildet Risse
3	Das Polymer ist fest und haftet gut an dem Glas
2	Das Polymer ist gelartig und haftet gut an dem Glas
1	Das Polymer ist flüssig

Das Polymer sollte für den Einsatzzweck formstabil sein und gut an der Glasoberfläche haften. Dies erfüllen die Polymere, die mit der Kategorie 3 bewertet werden. Ist das Polymer zu flüssig, sodass es durch das Auftragen der Flüssigkeiten weggespült werden kann, wird es mit einer geringeren Kategorie bewertet. Die Polymere, die höher als Kategorie 3 bewertet werden, sind sehr starr, bilden Risse beim Trocknen und können sich von der Glasoberfläche lösen.

Zusätzlich wurde die Quellfähigkeit des Polymers bestimmt. Dazu wurden je drei Proben 12 h lang bei 50 °C getrocknet und ausgewogen. Die Proben wurden anschließend zum Quellen in VE-Wasser gelegt. Nach fünf Minuten wurden die Proben aus dem Wasser genommen, das überschüssige Wasser durch einen schwachen Druckluftstrom entfernt und die prozentuale Wasseraufnahme bestimmt. Die Ergebnisse bei den verschiedenen

Zusammensetzungen sind in Abbildung 5-20 grafisch dargestellt und zusätzlich im Anhang in Tabelle A-2 aufgelistet.

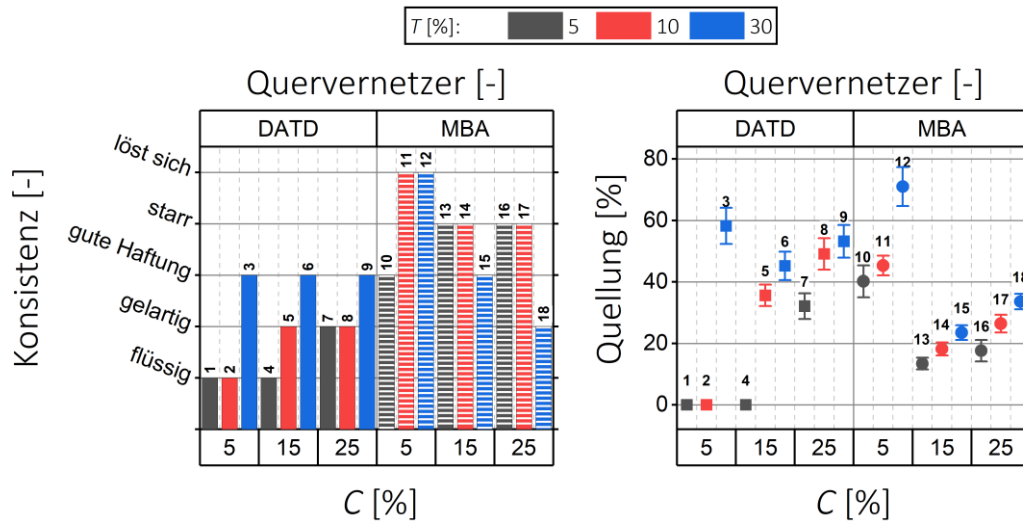


Abbildung 5-20: Darstellung der Festigkeit (links) und der Quellung (rechts) in Abhängigkeit vom Quervernetzeranteil C , der Totalamidkonzentration T und der Quervernetzer-Art (Probennummern befinden sich oberhalb der Balken bzw. Punkte)

Nach der Aushärtung der Proben wurde die Konsistenz des Polymers nach den Kriterien in Tabelle 5-4 beurteilt. Einige Zusammensetzungen härteten nicht aus und blieben folglich flüssig, wie es bei den Proben 1, 2 und 4 zu sehen ist. Bei diesen Zusammensetzungen wurden DATD als Quervernetzer in geringer Konzentration und eine geringe Totalamidkonzentration verwendet. Erst bei einer Totalamidkonzentration größer 10 % oder bei einem Quervernetzeranteil größer 15 % waren die Polymere, die DATD als Quervernetzer enthielten, fest. Ein Teil der Proben löste sich nach einiger Zeit vom Glas. Dies konnte bei den Zusammensetzungen der Proben 11 und 12 beobachtet werden. Es handelte sich um Proben, bei denen MBA als Quervernetzer in niedriger Konzentration eingesetzt wurde. Es war ein Vernetzungsgrad von größer 5 % erforderlich, damit sich die Proben nicht von der Glasoberfläche lösten. Zudem waren die Polymere, die mit MBA als Quervernetzer hergestellt wurden, sehr spröde, so dass sich beim Trocknen Risse im Polymer bildeten. Zwei Proben, die Rissbildung zeigten, sind in Abbildung 5-21 stellvertretend dargestellt.

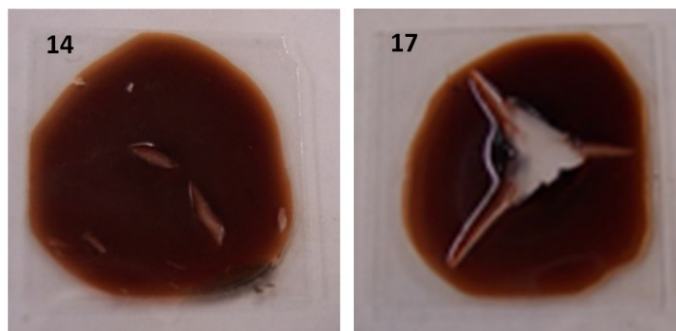


Abbildung 5-21: Rissbildung in den Polymer-Proben 14 und 17

Weiterhin wurden die Quelleigenschaften untersucht. Von den Proben 1, 2 und 4 konnten keine Quelleigenschaften bestimmt werden, da die Proben flüssig waren. Ebenso zeigte sich die Bestimmung bei den Proben 11 und 12 als schwierig, weil die Proben sich von der Glasoberfläche lösten. Bei den übrigen Proben nahmen mit steigender Totalamidkonzentration bei gleichzeitig gleichbleibendem Quervernetzeranteil die Quelleigenschaften zu. Dies war insofern zu erwarten, da die Konzentration an Polymer in der Monomerlösung höher und somit auch die resultierende Polymermasse größer war. Weitere Unterschiede im Quellverhalten zeigten sich zwischen den Quervernetzern. Die Proben mit DATD als Quervernetzer zeigten größtenteils eine höhere Aufnahmefähigkeit als die Proben mit MBA.

Aus den Versuchen kann geschlussfolgert werden, dass die Polymere mit MBA sehr fest werden und nur schlecht auf dem Glasträger haften, was sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen deckt (siehe Kapitel 4.1). Die Polymere mit DATD ermöglichen tendenziell eine bessere Wasseraufnahme und haften besser auf dem Glasträger. Zudem kann die Quellfähigkeit des Polymers, unabhängig von dem eingesetzten Quervernetzer, durch eine höhere Totalamidkonzentration erhöht werden. Weiterhin hat DATD gegenüber MBA den Vorteil, dass das Polymer durch Glykolspaltung wieder aufgelöst werden kann und deshalb der Glasträger wiederverwendet werden kann (siehe Kapitel 4.1). Probe 3 zeigte mit DATD als Quervernetzer bei einem Quellvermögen von 58,2 % und einer guten Haftung auf dem Glas die besten Eigenschaften der hier untersuchten Zusammensetzungen. Daher diente diese Zusammensetzung als Grundlage für die weiteren Polymeroptimierungen.

5.3.2 Untersuchung der Aushärtung der Silbersalz-Monomerlösung durch UV-Licht

Die radikalische Polymerisation wird durch UV-Bestrahlung gestartet. Dies ermöglicht einen definierten Energieeintrag und gewährleistet eine reproduzierbare Aushärtung der Proben gewährleisten. Um das Polymer auszuhärten, wurde der Radikalstarter 2-Hydroxy-2-Methylpropiophenon verwendet. Dieser zerfällt durch Absorption von UV-Licht (siehe

Kapitel 4.1). Zum einen induzieren die Radikale die Vernetzung des Polymers, zum anderen wird so das Silbernitrat in der Ausgangsmischung zu elementarem Silber reduziert, das die Kristallisationskeime für die spätere Nachverstärkung bildet (siehe Kapitel 3.4). Es muss nicht nur sichergestellt sein, dass der Energieeintrag über das Array homogen ist, sondern auch, dass die Belichtungszeit und die Konzentration des Photoinitiators (PI) ausreichen, um das Polymer auszuhärten und das Silbernitrat vollständig umzusetzen. Deshalb wurde der Einfluss der Konzentration des Photoinitiators und der Belichtungsdauer auf die Umsetzung des Silbernitrates in der Silbersalz-Monomerlösung untersucht.

Zur Untersuchung des Einflusses der PI-Konzentration auf die Umsetzung des Silbernitrats, wurde der Photoinitiator (PI) bei konstanter Silberkonzentration im Verhältnis 1:1, 1:5 und 1:10 ($b_{\text{AgNO}_3}:b_{\text{PI}}$) variiert. Die Polymerzusammensetzung und Verstärkerlösungen sind in Kapitel 4.1 beschrieben. Die Proben wurden 30 Minuten unter der UV-Lampe belichtet, um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten. Abbildung 5-22 zeigt die Lichtbildaufnahmen der Polymere. Die Proben wurden im Durchlicht aufgenommen. Um die Vergleichbarkeit der Farben zu gewährleisten, wurde ein Weißabgleich durchgeführt.

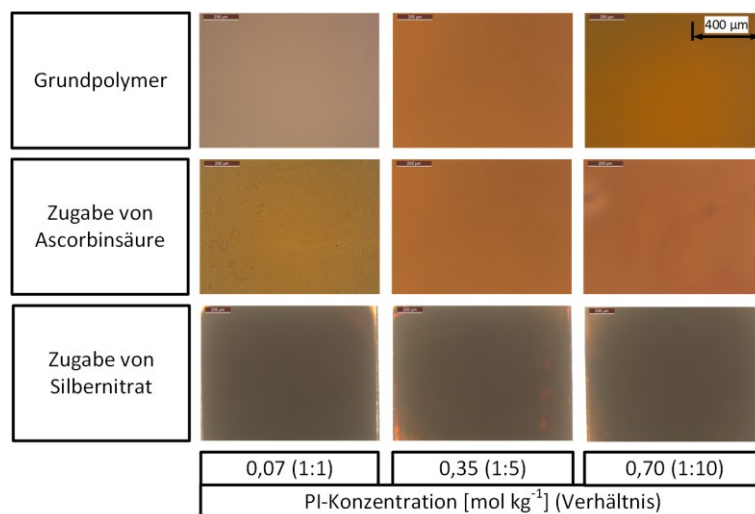


Abbildung 5-22: Mikroskopische Aufnahmen der hergestellten SERS-Polymerproben mit unterschiedlicher Konzentration des Photoinitiators

Die Mikroskopische Aufnahmen zeigen, dass sich die Farbe des Grundpolymers mit zunehmender Konzentration des Photoinitiators ändert. Durch eine dunklere Färbung wird angezeigt, dass hier ein größerer Anteil an elementarem Silber während der UV-Belichtung entsteht. Die Aufnahmen der Proben, die mit einem einfachen PI-Anteil hergestellt wurden, zeigen ebenfalls nach der Zugabe der Ascorbinsäure eine Verdunklung. Das weist darauf hin, dass die Konzentration des PI in der Ausgangslösung zu gering ist, um während der UV-Bestrahlung das Silbernitrat vollständig umzusetzen. Auf den Aufnahmen der

Polymere mit fünf- und zehnfachem PI-Überschuss zeigen sich bei der Zugabe von Ascorbinsäure keine Veränderungen. Durch die Nachverstärkung mit Silbernitrat ist bei allen Aufnahmen eine Verdunklung der Polymere zu erkennen, was zeigt, dass hierdurch mehr elementares Silber im Polymer entsteht. Von den nachverstärkten Proben wurden zusätzlich REM-Aufnahmen angefertigt, diese sind in Abbildung 5-23 dargestellt.

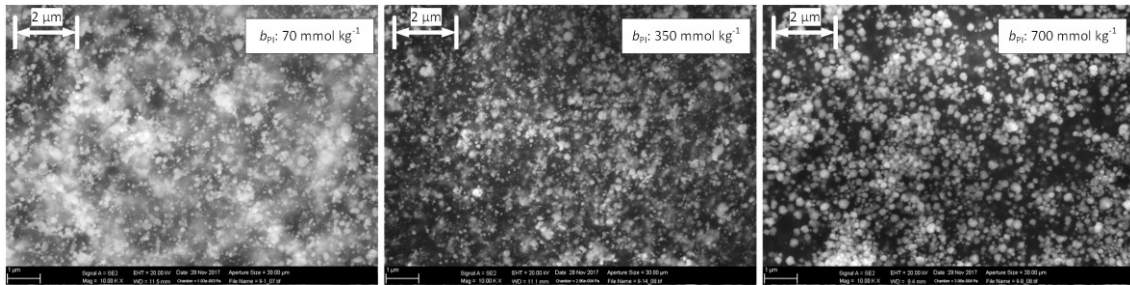


Abbildung 5-23: REM-Aufnahmen der nachverstärkten SERS-Polymerproben mit unterschiedlichen Konzentrationen des Photoinitiators

Auf den Aufnahmen lässt sich eine leichte Zunahme der Silberpartikelgröße mit zunehmender PI-Konzentration erkennen. Zudem ist bei einfachem PI-Anteil (70 mmol kg^{-1}) ein Schleier aus feinen Partikeln zu sehen. Diese könnten sich bei Zugabe der Ascorbinsäure bilden, wenn das Silbernitrat bei der UV-Bestrahlung nicht komplett umgesetzt wird.

Weiterhin wurde der Einfluss der Belichtungszeit mit der UV-Lampe untersucht. Hierbei sollte die Belichtungszeit bestimmt werden, bei der die eingesetzte Menge an Silbernitrat vollständig umgesetzt wird. Dazu wurde eine Silbersalz-Monomerlösung (siehe Tabelle 4-1) mit 350 mmol kg^{-1} Photoinitiator hergestellt. Die Lösungen wurden auf ein Array mit quadratischen 2 mm Messstellen dosiert und unterschiedlich lang unter der UV-Lampe belichtet. Die Messstellen wurden unter dem Mikroskop und mittels UV-VIS-Spektroskopie untersucht. Abbildung 5-24 zeigt die Mikroskopaufnahmen der ausgehärteten Polymere.

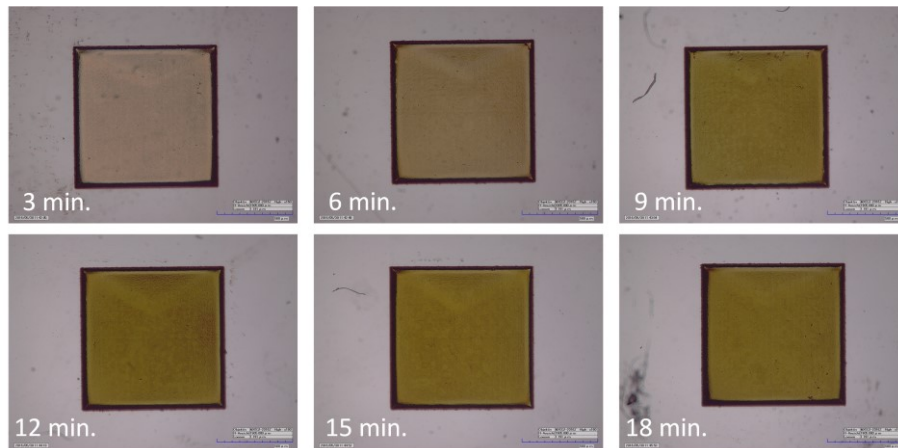


Abbildung 5-24: Mikroskopaufnahmen der SERS-Polymere mit unterschiedlicher Belichtungszeit unter der UV-Lampe

Alle Proben waren bereits nach einer Belichtungsdauer von drei Minuten vollständig ausgehärtet. Auf den Mikroskopaufnahmen ist jedoch zu sehen, dass sich das Polymer bei weiterer Belichtung dunkler färbt. Erst ab einer Belichtungszeit von neun Minuten ist keine Farbveränderungen mehr zu erkennen. Diese optischen Änderungen können auch anhand der UV-VIS-Spektren beobachtet werden (Abbildung 5-25).

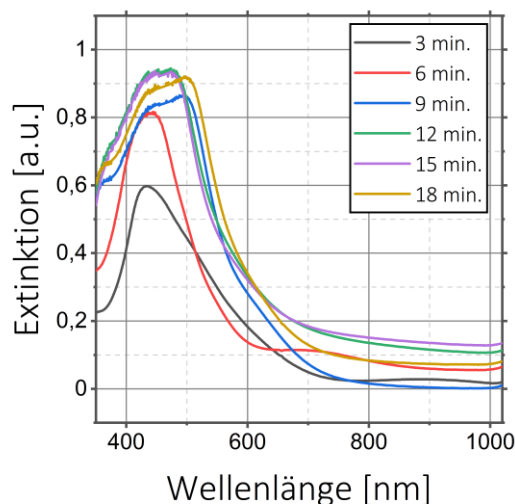


Abbildung 5-25: UV-VIS Spektren der SERS-Polymerproben bei verschiedenen Belichtungszeiten

Die Breite der Absorptionspeaks nimmt bis zu einer Belichtungszeit von neun Minuten stark zu. Bei längeren Belichtungszeiten ändern sich die Absorptionskurven nur noch minimal. Da die Absorptionskurven stark mit den Partikelgrößen korrelieren [106, 107], kann davon ausgegangen werden, dass die Partikel nach neun Minuten ihre maximale Größe erreicht haben.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass die Konzentration an Photoinitiator die Partikelgröße der nachverstärkten Proben beeinflusst. Eine zu geringe

Konzentration führt dazu, dass sich eine Fraktion an sehr kleinen Partikeln bildet, die nicht erwünscht ist. Dies kann optisch oder über die REM-Aufnahmen überprüft werden. In diesem Fall reicht ein einfacher PI-Anteil nicht aus, um die gleiche Menge Silbernitrat im Polymer vollständig zu reduzieren, während ein fünffacher Anteil an Photoinitiator für die vollständige Reduktion des Silbernitrats ausreicht. Eine Belichtungszeit von neun Minuten ist ausreichend, um das Polymer auszuhärten und das Silbernitrat vollständig zu Silber umzusetzen.

5.3.3 Untersuchung des Einflusses der Lösemittelzusammensetzung auf die Verdunstung

Generell wird bei der Herstellung von PAA-Gelen Wasser als Lösungsmittel eingesetzt. Die Vorversuche zum Aufbringen der Monomerlösung auf das Array zeigten, dass die Lösemittelverdunstung einen negativen Einfluss auf die Gleichmäßigkeit der Messstellen haben kann. Die Beladung des Arrays dauert etwa fünf Minuten, während dieser Zeit muss gewährleistet sein, dass das Lösemittel nicht verdunstet. In diesem Kapitel wird die Untersuchung des Einflusses der Lösemittelzusammensetzung auf die Verdunstung beschrieben. Dazu wurde Ethylenglykol in verschiedenen Anteilen dem Wasser zugesetzt. Wasser besitzt bei 20 °C einen Dampfdruck von 234 mbar, Ethylenglykol hingegen nur einen von 0,07 mbar [108]. Durch das gelöste Monomer verringert sich dieser zusätzlich. Entscheidend für die Anwendbarkeit ist die Löslichkeit der Monomere in dem Lösungsmittel. In Kapitel 5.3.1 hat sich gezeigt, dass eine Totalamidkonzentration von 30 % vorteilhaft für das Quellverhalten und die Haftung des Polymers an der Glasoberfläche des SERS-Arrays ist. Daher wurden verschiedene Mischungen von Wasser und Ethylenglykol als Lösungsmittel untersucht. Tabelle 5-5 zeigt die maximale Menge an Acrylamid, die bei verschiedenen Anteilen an Ethylenglykol im Lösemittel gelöst werden kann.

Tabelle 5-5: Maximale Löslichkeit von Acrylamid bei unterschiedlichem Anteil an Ethylenglykol im Lösungsmittel

Anteil Ethylenglykol	Maximale Totalamidkonzentration
0 %	> 30,0 %
33 %	30,0 %
50 %	22,5 %
67 %	15,6 %

In reinem Wasser ist die Löslichkeit von Acrylamid sehr hoch. Bis zu einem Anteil von 33 % EG lösten sich 30 % Monomer, bei einem Anteil von 50 % EG nur noch maximal 22,5 % Monomer. Bei weiterer Erhöhung des Ethylenglykolanteils auf 66 %, lag die maximale Aufnahme von Monomer bei lediglich 15,6 %. Um die Einflüsse der Lösemittelzusammensetzung auf die Verdunstung während des Herstellungsprozesses zu ermitteln, wurden der zeitliche Massenverlust verschiedener Proben mit einem Volumen von 3 μL auf einem Glaträger untersucht. Abbildung 5-26 zeigt den zeitlichen Massenverlust der Proben mit verschiedenen EG-Anteilen.

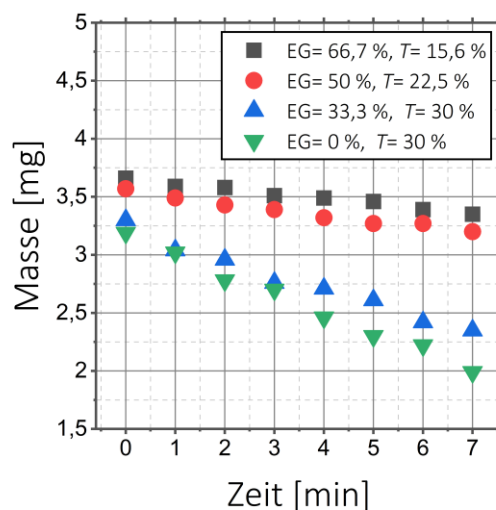


Abbildung 5-26: Zeitlicher Massenverlust der Acrylamid-Proben mit unterschiedlichen EG-Anteilen

Aus dem Diagramm ist ersichtlich, dass der Massenverlust bei reinem Wasser als Lösungsmittel am größten ist (etwa 40 % nach 7 min). Mit einem EG-Anteil von 33 % ist eine leichte Verringerung (auf etwa 30 % nach 7 min) und bei einem EG-Anteil von 50 % bzw. 67 % eine starke Absenkung des Massenverlusts (auf etwa 10 % bzw. 8 % nach 7 min) zu erkennen.

Die vorherigen Versuche haben gezeigt, dass eine deutliche Reduzierung der Verdunstung von 40 % auf unter 10 % durch einen EG-Anteil größer 50 % erreicht werden

kann. Jedoch hat dies auch Auswirkungen auf die Löslichkeit des Monomers. So kann ein maximaler EG-Anteil von 22,5 % realisiert werden. Um eventuelle negative Einflüsse auf diese Parameter durch die veränderte Lösemittelzusammensetzung zu identifizieren, wurden analog zu den Versuchen in Kapitel 5.3.1 die Konsistenz und Haftung der Probe untersucht. Dabei zeigte sich, dass auch bei dieser Zusammensetzung die Konsistenz und Haftung an dem Glas des SERS-Arrays gut sind (Kategorie 3). Deshalb wurde für die weiteren Versuche ein EG-Anteil von 50 % im Lösemittel verwendet.

5.4 Untersuchung des Einflusses und Optimierung des Silbergehalts auf die SERS-Verstärkung

Das entwickelte SERS-Polymer soll die Analyse geringer Substanzmengen in Fluidsegmenten mit Volumina im oberen Nanoliterbereich ermöglichen. Das SERS-Polymer muss somit eine hohe SERS-Verstärkung bei gleichzeitig guter Reproduzierbarkeit aufweisen. Die SERS-Verstärkung hängt stark von der Anregung von Oberflächenplasmonen ab, die wiederum durch die Form und Größe der Silberpartikel beeinflusst wird [106, 107]. In diesem Kapitel wird die Untersuchung der Auswirkung des Silbergehalts im Polymer auf die SERS-Verstärkung beschrieben.

Es wurden die Silbernitrat-Konzentrationen bei der Keimbildung (Ag-K) und die bei der Nachverstärkung (Ag-NV) variiert und der Einfluss auf die SERS-Verstärkung untersucht. Hierbei sollte eine hohe SERS-Verstärkung und eine geringe Messabweichung erreicht werden. Die mit Silber beladenen Polymere wurden mittels REM- und UV-VIS-Aufnahmen untersucht. Die erste Messreihe beinhaltet die Variation der Modalität b von Ag-K im Bereich von 10 - 100 mmol kg⁻¹ in drei Stufen und die Variation der Stoffmengenkonzentration c von Ag-NV im Bereich von 10 - 200 mmol L⁻¹ in vier Stufen (vergl. Kapitel 4.1). Für die Messreihe wurde die in Kapitel 4.1 beschriebene Polymergrundmischung verwendet. Die Dosierung der Lösungen erfolgte manuell durch eine Kolbenhubpipette. Abbildung 5-27 zeigt die mit unterschiedlichem Silbergehalt hergestellten SERS-Polymere.

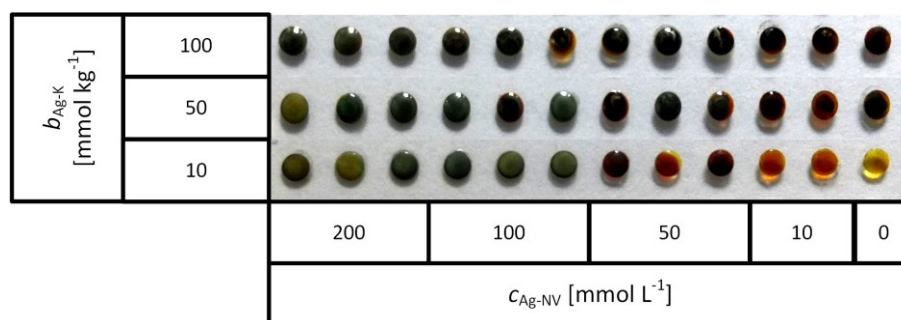


Abbildung 5-27: Lichtbildaufnahme der SERS-Messstellen mit unterschiedlichem Silbergehalt

Mit steigender Konzentration an Ag-K ist eine Veränderung der Farbe des Polymers ($c_{\text{Ag-NV}}$: 0 mmol L^{-1}) von gelb zu braun zu erkennen. Aufgrund der höheren Konzentration des Silbernitrats in der Lösung bilden sich größere Silberpartikel, wodurch diese Farbänderung entsteht. Durch die unterschiedlich beladenen Verstärkerlösungen (Ag-NV) ist eine geringere Transparenz des Polymers und eine grün-gräuliche Einfärbung erkennbar. Auch hier entstehen durch die höher konzentrierten Lösungen größere Silberpartikel, welche die Farbveränderungen verursachen. Für die Messungen der Raman-Intensität wurden die Messstellen anschließend mit $1 \mu\text{L}$ einer $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ Adeninlösung benetzt. Die Messbedingungen sind in Kapitel 4.3 beschrieben. Abbildung 5-28 zeigt die gemessenen Intensitäten der Ringschwingung von Adenin bei 735 cm^{-1} .

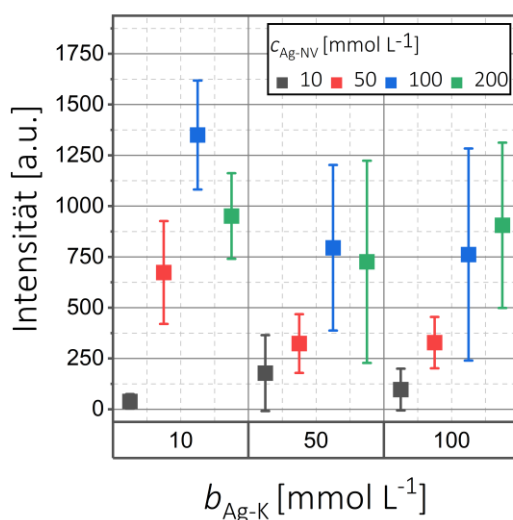


Abbildung 5-28: Raman-Intensitäten der Adenin-Ringschwingung bei Variation des Silbergehalts ($c_{\text{Ag-K}}$: $10 - 100 \text{ mmol kg}^{-1}$; $c_{\text{Ag-NV}}$: $10 - 200 \text{ mmol L}^{-1}$)

Bei einer Silberkonzentration von 10 mmol kg^{-1} Ag-K steigt die Intensität bis zu Ag-NV von 100 mmol L^{-1} an, eine weitere Erhöhung der Silberkonzentration führt zu einer geringeren Intensität. Dies ist auch bei einer Konzentration von 50 mmol kg^{-1} des Ag-K zu beobachten. Abweichend davon steigt bei einer Ag-K Konzentration von 100 mmol kg^{-1} die Intensität mit zunehmender Konzentration an Ag-NV. Weiter ist aus dem Diagramm ersichtlich, dass bei einer Konzentration an Ag-K von 10 mmol L^{-1} die höchsten Intensitäten erreicht werden können, wenn jeweils dieselben Konzentrationen an Ag-NV betrachtet werden. Die Daten bei den höheren Konzentrationen an Ag-K zeigen stark erhöhte Standardabweichungen. Die Standardabweichungen bei einem Gehalt des Ag-K von 10 mmol kg^{-1} liegen im Bereich $19 - 22 \%$, bei einem Gehalt von 100 mmol kg^{-1} bei $44 - 70 \%$.

Zusätzlich wurden REM-Aufnahmen der Polymere angefertigt (Abbildung 5-29). Die Aufnahmen wurden mit einer hohen Spannung (20 kV) aufgenommen und zeigen somit die Silberpartikel auf der Oberfläche und innerhalb des Polymers.

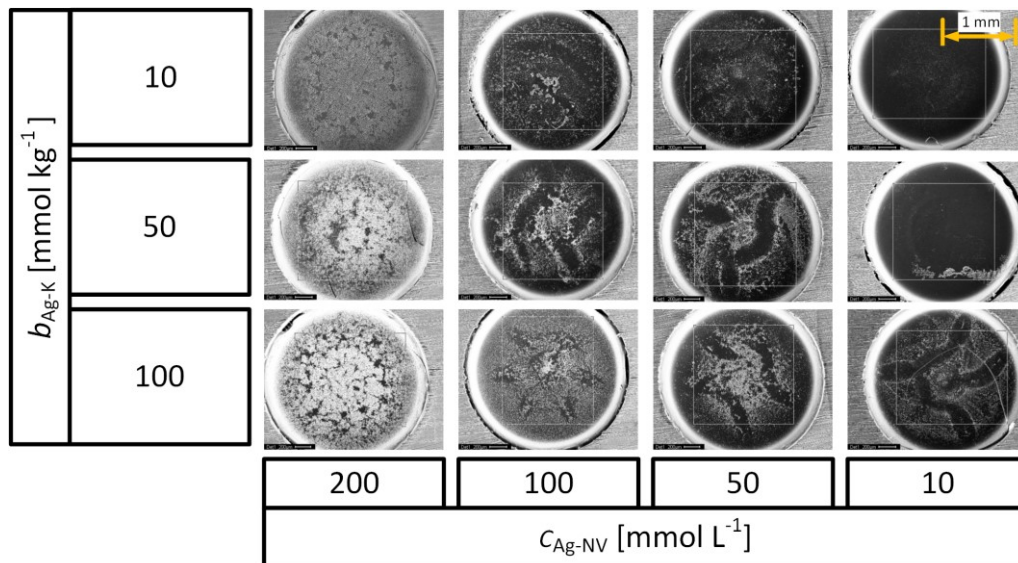


Abbildung 5-29: Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop der Polymere mit unterschiedlichem Silbergehalt

Die Aufnahmen zeigen das Anwachsen der Silberpartikel bei höherem Silbergehalt im Grundpolymer $b_{\text{Ag-K}}$ und auch bei der Nachverstärkung $c_{\text{Ag-NV}}$. Auffällig ist die ungleichmäßige Verteilung der Partikel im Polymer, teilweise sind längliche Stellen mit wenig bis keinen Silberpartikeln zu erkennen. Diese fleckenartige Verteilung der Partikel zeigt sich bei den Aufnahmen der Polymere mit 10 mmol kg^{-1} Ag-K kaum und steigt mit zunehmender Konzentration an Ag-K. Mit höheren Konzentrationen an Ag-NV wird die ungleiche Verteilung der Silberpartikel im Polymer geringer, hier erfolgt eine Überlagerung durch die neu aufgewachsenen Partikel. Weiter ist zu erkennen, dass bei einer Konzentration von 200 mmol L^{-1} an Ag-NV, das Silber fast eine geschlossene Schicht bildet.

Das Anwachsen der Partikel lässt sich auch an den UV-VIS-Spektren der Polymere erkennen. Die Proben wurden, wie in Kapitel 4.4.5 beschrieben, im Durchlicht gemessen und die Spektren in Abbildung 5-30 dargestellt. Aufgrund der Durchlichtmessung zeigen die Spektren an der linken Flanke einen Anstieg der Extinktion ($< 350 \text{ nm}$), diese resultiert aus der Adsorption des Glasträgers.

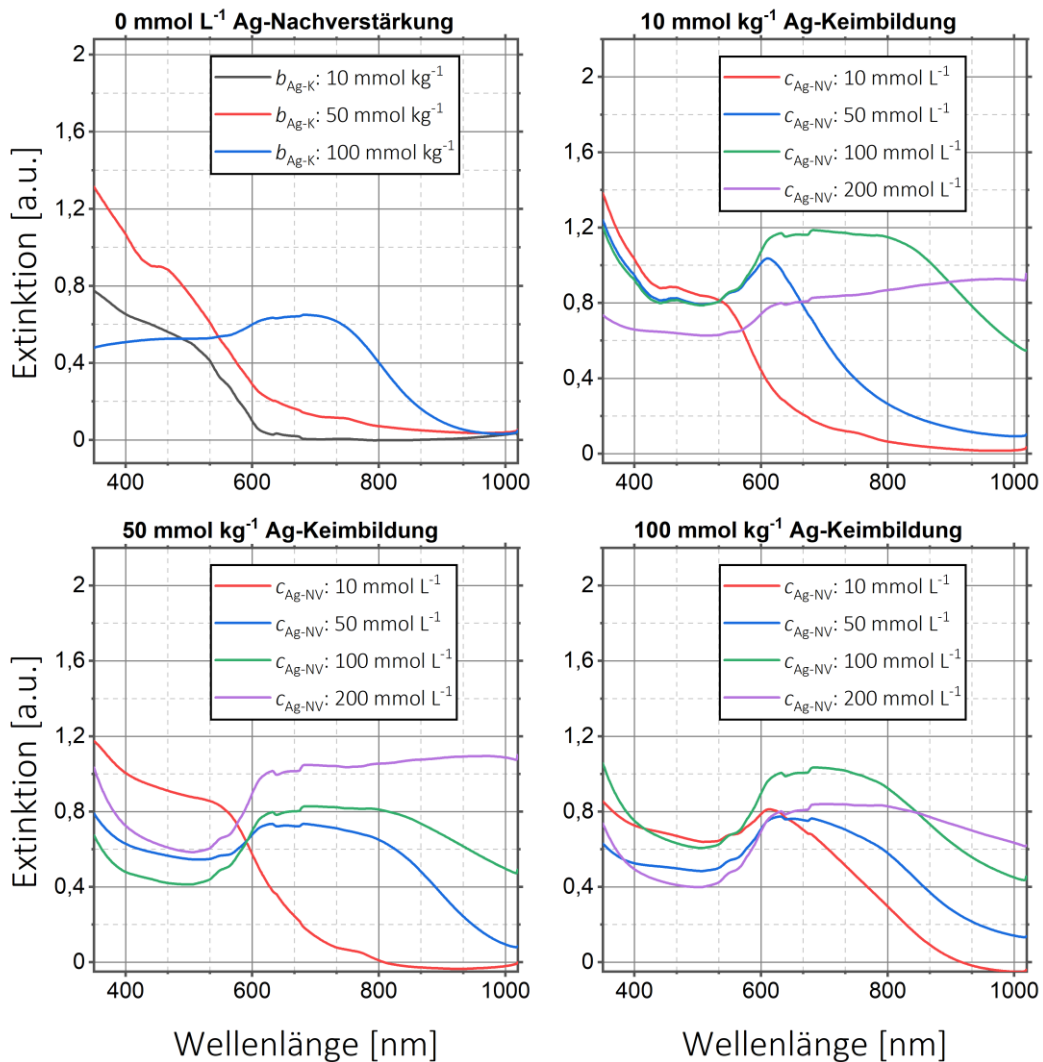


Abbildung 5-30: UV-VIS-Spektren der SERS-Polymerproben mit unterschiedlichem Silbergehalt

Schon bei Erhöhung des Silberanteils im Grundpolymer (Ag-K) ist eine starke Verbreiterung der Absorptionsbande und vor allem eine Verschiebung hin zu höheren Wellenlängen zu erkennen (Abbildung 5-40 oben links). Der gleiche Trend ist in stärkerer Ausprägung bei der Nachverstärkung zu erkennen. Für die drei verschiedenen Konzentrationen an Ag-K (10, 50, 100 mmol kg⁻¹) verbreitern sich die Absorptionen in Richtung der höheren Wellenlängen. Diese beiden Beobachtungen lassen sich folgendermaßen erklären. Betrachtet man kugelförmige Silberpartikel mit einem Durchmesser im Bereich von 50 nm, zeigt sich eine relativ scharfe Absorptionsbande im Bereich um 400 nm, bei größeren Partikeln verschiebt sich das Absorptionsmaximum in Richtung höherer Wellenlängen. Je breiter dabei die Partikelverteilung ist, desto breiter ist auch die Absorptionsbande, liegt eine bimodale Verteilung vor, treten zwei Absorptionsmaxima auf. Auch die Partikelform verändert die Breite und Lage der Absorptionsbanden sehr stark [107]. Bei dem hier untersuchen SERS-aktiven Polymer beobachtet man eine Überlagerung

dieser Effekte. Wie aus den REM-Aufnahmen (Abbildung 5-29) ersichtlich ist, bilden sich auf der Oberfläche Agglomerate an Partikeln verschiedener Partikelgrößen. Die Partikel und Agglomerate wachsen mit einem höheren Silbergehalt, wodurch eine Rotverschiebung der Absorption erfolgt. Die Verbreiterung kann durch eine breitere Verteilung der Partikelgröße erklärt werden, bimodale oder die Häufung kugelförmiger Partikel einer bestimmten Größe können sowohl anhand der REM-Aufnahmen als auch durch das Fehlen scharfer Absorptionsbanden ausgeschlossen werden. Bei geringeren Ag-K-Anteilen ist eine stärkere Rotverschiebung erkennbar als bei hohen. Das deutet darauf hin, dass bei geringen Ag-K-Konzentrationen die Partikel stärker anwachsen. Die Rotverschiebung der Absorptionsbanden ist insofern erforderlich, da die einfallende Laserstrahlung (785 nm) für die Anregung der Oberflächenplasmonen absorbiert werden muss (siehe Kapitel 3.3). Bei einem Gehalt von 10 mmol kg⁻¹ Ag-K wird eine Konzentration von 100 mmol L⁻¹ für die Nachverstärkung benötigt, damit das Polymer im Bereich der Anregungswellenlänge absorbiert. Bei höheren Konzentrationen von Ag-K reicht bereits eine Konzentration von 50 mmol L⁻¹ bei der Nachverstärkung aus, um eine Absorption des Anregungslasers zu erreichen.

Die gerade beschriebene erste Messreihe zeigt, dass eine geringe Silberkonzentration im Grundpolymer zu einer höheren SERS-Verstärkung und zu einer homogeneren Verteilung der Silberpartikel im Polymer führt, was sich positiv auf die Wiederholbarkeit auswirkt. Die Konzentration der Nachverstärkerlösung muss hoch genug sein ($c_{\text{Ag-NV}}$: 50 mmol L⁻¹ - 100 mmol L⁻¹), damit sich die optischen Eigenschaften im Polymer derart verändern, dass das zur Anregung der Oberflächenplasmonen verwendete Laserlicht von 785 nm absorbiert wird. Die Konzentration darf aber nicht zu hoch ($c_{\text{Ag-NV}}$: 100 mmol L⁻¹ - 200 mmol L⁻¹) sein, damit das Polymer nicht vollständig mit Silber zugesetzt wird. Dadurch sinkt die Anzahl an kleinen Zwischenräumen, in denen die Oberflächenplasmonen wirken können, was eine geringere SERS-Verstärkung zur Folge hat (siehe Kapitel 3.3.1).

Es wurde eine zweite Testreihe durchgeführt, die den optimalen Silbergehalt für eine hohe SERS-Verstärkung weiter eingrenzen sollte. Aufgrund der Erkenntnisse aus der ersten Testreihe wurde ein geringer Gehalt von Silbernitrat im Grundpolymer (1, 5, 10 mmol kg⁻¹) verwendet. Die Nachverstärkung erfolgte mit Lösungen in zehn verschiedenen Stufen im Konzentrationsbereich von 15 mmol L⁻¹ bis 200 mmol L⁻¹. Die feine Abstufung soll gewährleisten, dass die Konzentration bestimmt werden kann, bei der die Oberfläche des Polymers mit einem Silberfilm bedeckt wird und die SERS-Verstärkung abnimmt. Für die Messungen der Raman-Intensität wurden die Messstellen anschließend mit 3 µL einer

100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Adeninlösung benetzt. Die Messbedingungen sind in Kapitel 4.3 beschrieben. Die Raman-Intensitäten der verschiedenen Polymere sind in Abbildung 5-31 dargestellt.

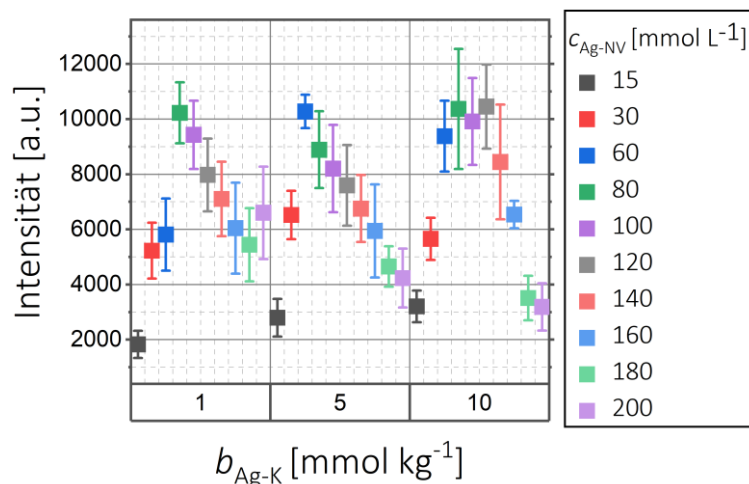


Abbildung 5-31: Raman-Intensitäten der Adenin-Ringschwingung bei Variation des Silbergehalts ($b_{\text{Ag-K}}$: 1 - 10 mmol kg^{-1} ; $c_{\text{Ag-NV}}$: 15 - 200 mmol L^{-1})

Wie in der ersten Testreihe sind ein Anstieg der Signalintensität mit steigender Konzentration der Verstärkerlösung bis zu einem gewissen Punkt und ein Abfall bei höheren Konzentrationen zu erkennen. Der Gehalt von Ag-K hat bei gleichen Ag-NV einen geringen Einfluss auf die Intensitäten, aus dem sich aber kein Trend ableiten lässt. Besonders bei niedrigen ($<60 \text{ mmol L}^{-1}$) und hohen ($>140 \text{ mmol L}^{-1}$) Konzentrationen für Ag-NV sind die Intensitäten in Abhängigkeit der Konzentrationen an Ag-K nicht eindeutig. Die besten Verstärkungen werden mit Verstärkerlösungen mit Konzentrationen zwischen 60 und 120 mmol L^{-1} erzielt. Die Standardabweichungen liegen zwischen 10 % und 30 %.

Die Proben wurden ebenso wie die erste Testreihe mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die Aufnahmen bei einer Ag-NV Konzentration von 30 mmol L^{-1} , 100 mmol L^{-1} und 160 mmol L^{-1} sind in Abbildung 5-32 dargestellt. Auch hier ist zu erkennen, dass die Partikel erst anwachsen (30 mmol L^{-1} und 100 mmol L^{-1}) und bei höheren Konzentrationen (160 mmol L^{-1}) die Oberfläche zunehmend zuwächst, wodurch auch ungleichmäßigere Strukturen und Aggregate auf der Oberfläche entstehen.

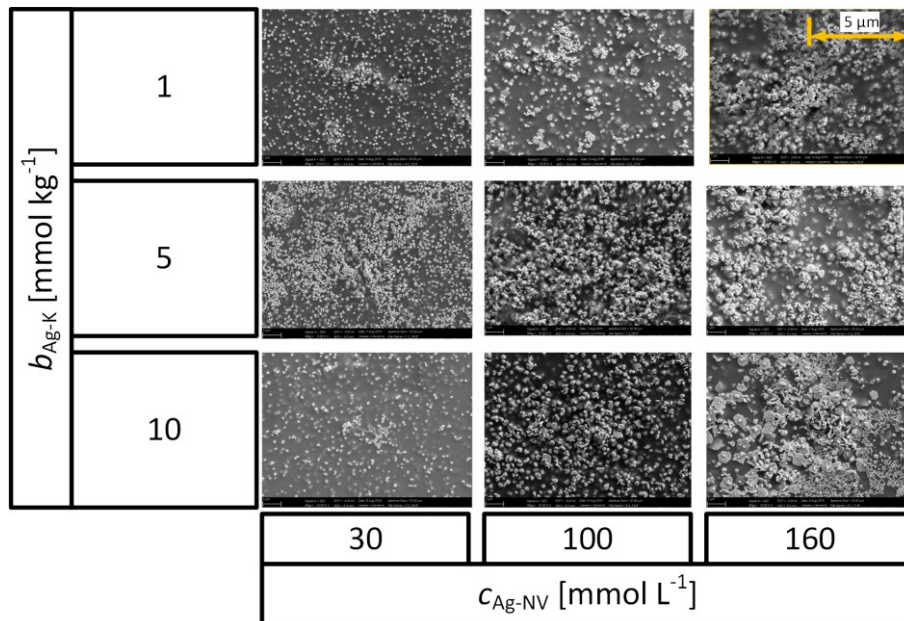


Abbildung 5-32: Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop ausgewählter SERS-Polymere der zweiten Testreihe mit unterschiedlichem Silbergehalt

Die Untersuchungen zeigten, dass die Konzentrationen der für die Nachverstärkung verwendeten Silbernitrat-Lösungen einen starken Einfluss auf die SERS-Verstärkung haben. Die höchsten SERS-Verstärkungen werden mit Konzentrationen im Bereich von 80 mmol L^{-1} - 120 mmol L^{-1} erreicht. Die REM- und die UV-VIS-Aufnahmen zeigen, dass die Silberpartikel zunächst mit steigenden Konzentrationen wachsen, wodurch sich die optischen Eigenschaften verändern. Bei weiter erhöhten Konzentrationen wachsen die Partikel zu stark an und bilden einen Film auf der Oberfläche, wodurch die Verstärkungsleistung der Polymere sinkt. Der Gehalt von Ag-K hat nur einen geringen Einfluss auf die SERS-Verstärkung. Bei einem sehr hohen Gehalt ($> 50 \text{ mmol L}^{-1}$) nimmt die SERS-Verstärkung leicht ab. Die Proben mit hohem Ag-K zeigen aber eine deutlich schlechtere Wiederholbarkeit der Versuche. Die relativen Standardabweichungen liegen bei einem Ag-K-Gehalt von 100 mmol kg^{-1} (30 - 60 %) mehr als doppelt so hoch als bei 5 mmol kg^{-1} (10 - 30 %). Um eine optimale SERS-Verstärkung im Polymer und eine gute Wiederholbarkeit zu erreichen, ist ein Ag-K-Gehalt von 10 mmol kg^{-1} oder kleiner und eine Ag-NV-Konzentration zwischen 80 mmol L^{-1} und 120 mmol L^{-1} notwendig. Eine genauere Angabe des Bereichs kann aufgrund der Signalschwankungen, die im Bereich von etwa 20 % liegen, nicht erfolgen.

5.5 Abschließende Bestimmung der Eigenschaften des SERS-Arrays

Entscheidend für die Beurteilung des in dieser Arbeit entwickelten Analysesystems ist die Leistung des SERS-Arrays. Dessen Charakterisierung wird im Folgenden anhand der SERS-

Verstärkung sowie der Reproduzierbarkeit und der Langzeitstabilität der SERS-Arrays beschrieben. Zusätzlich wird die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen vorgestellt. Zum Schluss des Kapitels werden die Möglichkeiten der Skalierbarkeit des entwickelten Analysesystems diskutiert. Aufgrund der Erkenntnisse der vorherigen Kapitel, wurden die Untersuchungen mit der optimierten Polymerzusammensetzung auf einem SERS-Array mit 324 Messstellen durchgeführt. Die Polymerzusammensetzung ist in Kapitel 4.1 beschrieben, während Messbedingungen für die unterschiedlichen Versuche in Kapitel 4.3 aufgeführt sind.

5.5.1 Aufbereitung der SERS-Spektren

Bekanntermaßen werden Raman-Spektren stark durch die Erwärmung der Probe oder durch Fluoreszenz beeinträchtigt [47]. Durch eine Erwärmung ist im Bereich höherer Wellenzahlen ein Anstieg der Basislinie zu beobachten, wohingegen durch die Fluoreszenz einer Probe ein Anstieg der Basislinie im Bereich geringerer Wellenzahlen zu beobachten ist. Abbildung 5-33 zeigt die Raman-Spektren des Polymers der Probe und dessen Subtraktionsspektrum. Das Subtraktionsspektrum wird einmal mit und einmal ohne vorheriger Basislinienkorrektur erzeugt. Als Probe wurde 1,3 μL einer 0,1 mmol L^{-1} Adeninslösung verwendet.

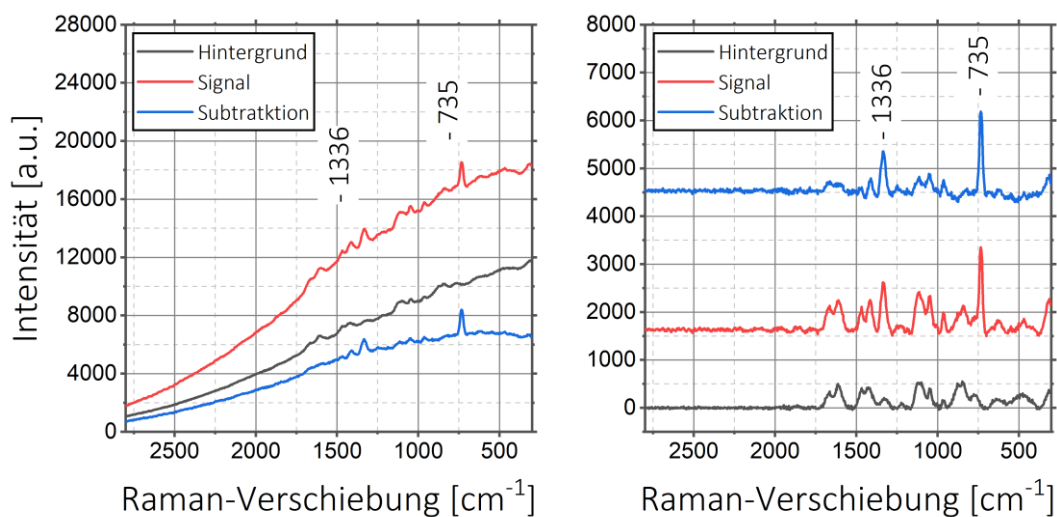


Abbildung 5-33: Raman-Spektren von Adenin am SERS-Polymer gemessen: Hintergrundspektrum, Signal und Subtraktionsspektrum ohne (links) und mit Basislinienkorrektur (rechts)

Das Spektrum des Polymers zeigt ein schwaches Hintergrundsignal und eine leichte Fluoreszenz (schwarzes Spektrum im linken Diagramm). Die Fluoreszenz ist im Spektrum der Testlösung deutlich stärker ausgeprägt, zusätzlich sind die für Adenin charakteristischen Banden bei 735 cm^{-1} und 1330 cm^{-1} (vergl. Kapitel 4.8) klar erkennbar

(rotes Spektrum im linken Diagramm). Durch die Subtraktion der Spektren wird die Fluoreszenz deutlich reduziert und der Hintergrund des Polymers entfernt (blaues Spektrum im linken Diagramm). Zur Auswertung der Intensitäten und zum Vergleich mehrerer Messungen ist der Basislinienanstieg im Subtraktionsspektrum hinderlich. Durch eine Basislinienkorrektur der Spektren vor der Subtraktion kann der Anstieg, der durch die Fluoreszenz der Probe verursacht wird, eliminiert werden und nur der Anteil der Probe wird im Raman-Spektrum abgebildet (blaues Spektrum im linken Diagramm). Diese Funktionen wurden entsprechend in die Software zur Auswertung der Spektren integriert (siehe Kapitel 4.7).

5.5.2 Bestimmung der SERS-Verstärkung der SERS-aktiven Messstellen

Eine oft benutzte Methode zur Charakterisierung eines SERS-aktiven Substrates ist die Bestimmung des Verstärkungsfaktors (EF). In dieser Arbeit wurde der analytische Verstärkungsfaktor (AEF) verwendet (siehe Kapitel 3.3.3). Dieser gibt an, um welchen Faktor die Nachweisgrenze durch den Einsatz des SERS-Substrates gesenkt werden kann. Zur Bestimmung des AEFs wurde Kristallviolett als Analyt verwendet. Für die konventionelle Raman-Messung wurde eine Konzentration von 5 mmol L^{-1} und für die SERS-Messung eine Konzentration von $1 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ eingesetzt. Abbildung 5-33 zeigt die Raman-Spektren.

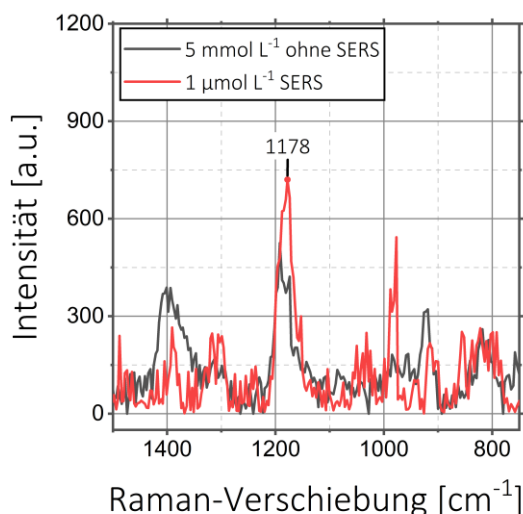


Abbildung 5-34: Raman-Signal von Kristallviolett bei verschiedenen Konzentrationen, mit und ohne SERS-Verstärkung

Die Bande der CH-Ringschwingung bei 1178 cm^{-1} wird durch das SERS-Substrat stark verstärkt. Bei den hier gewählten Konzentrationen liegen die Intensitäten in der gleichen Größenordnung. Der AEF wird nach Gleichung 3.13 aus den Intensitäten und den

Konzentrationen berechnet. Für Kristallviolett ergibt sich damit ein Verstärkungsfaktor von $1,02 \times 10^4$ auf dem SERS-Polymer. Dieser bedeutet, dass durch das SERS-Substrat Konzentrationen, die um den Faktor 10.000 geringer sind, gemessen werden können.

Wie schon in Kapitel 3.3.3 beschrieben, existieren in der Literatur mehrere Definitionen des Verstärkungsfaktors, was den direkten Vergleich mit anderen SERS-Substraten erschwert. Am häufigsten wird die Intensität auf die Anzahl der Moleküle bezogen, die an der Oberfläche adsorbiert sind. Für das entwickelte SERS-Polymer bedeutet dies, dass zum einen die Zahl der Partikel bzw. SERS-aktiven Stellen im Polymer, zum anderen die Anzahl der tatsächlich auf der Oberfläche adsorbierten Moleküle bestimmt werden muss. Beides kann bei den hier vorliegenden Oberflächenverhältnissen nur abgeschätzt werden und würde zu großen Fehlern führen. Da bei dieser Arbeit die analytische Funktion des SERS-Substrates im Vordergrund steht, werden in Kapitel 5.5.6 die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für verschiedene Substanzen bestimmt. Diese dienen in Kapitel 5.6 als Grundlage für den Vergleich mit anderen Methoden, die SERS-Messungen an einzelnen Segmenten ermöglichen.

5.5.3 Untersuchung der Wiederholgenauigkeiten der SERS-Arrays

Entscheidend für den Einsatz der SERS-Arrays ist die Wiederholgenauigkeit der Messungen. Es muss sichergestellt werden, dass zum einen die Messungen auf verschiedenen Messstellen vergleichbar sind und zum anderen das Signal auf den SERS-Messstellen homogen ist bzw. dass die Intensitätsschwankungen gering sind.

Um die Wiederholgenauigkeiten zu untersuchen wurden 175 SERS-Messstellen mit einer $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ Adeninlösung benetzt und gemessen. Jede Messstelle wurde zudem an fünf verschiedenen Punkten vermessen. Diese fünf unterschiedlichen Punkte werden im Folgenden als Messpunkte bezeichnet und sind so von den Messstellen, welche die einzelnen Einheiten des SERS-Arrays bezeichnen, zu unterscheiden. Die Messparameter sind in Kapitel 4.3 angegeben. Abbildung 5-35 zeigt die gemittelten Raman-Spektren und die Intensität der Ringschwingung des Adenin-Moleküls von 175 SERS-Messstellen.

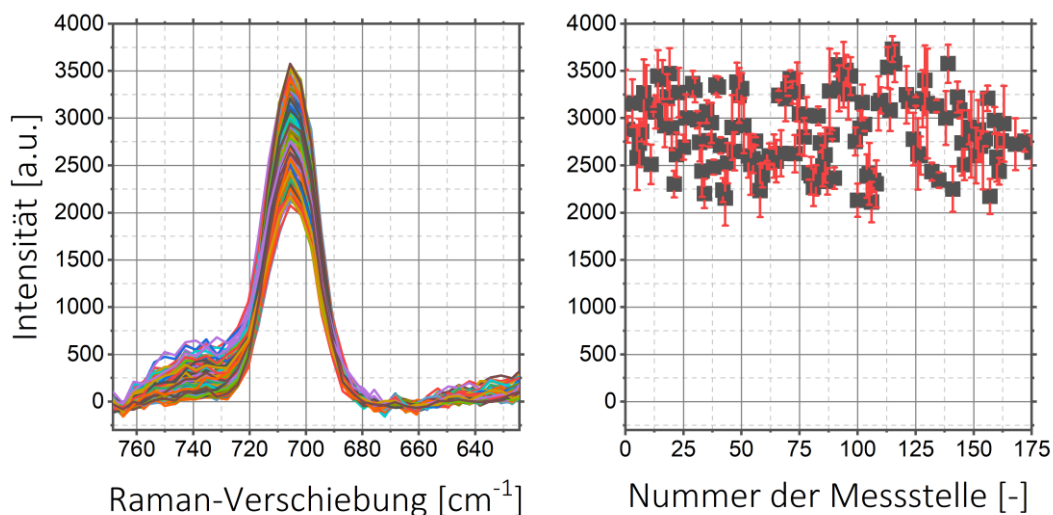


Abbildung 5-35: Raman-Spektrum von Adenin (links) und Intensität bei 735 cm^{-1} (rechts) von 175 SERS-Messstellen

Die Intensität des Bandenmaximums schwankt im Intensitätsbereich zwischen 2000 und 3500 Einheiten, woraus sich ein Mittelwert von 2869 Einheiten mit einer Standardabweichung von 389 Einheiten (13,6 %) ergibt. Es ist auffällig, dass die Abweichungen einzelner Messpunkte innerhalb der Messstellen teilweise geringer sind als für die Messstellen untereinander. Um zu prüfen, ob sich die Abweichungen der Messpunkte innerhalb der Messstellen von denen zwischen verschiedenen Messstellen unterscheiden, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Es wurden die Intensitäten aller Messungen (je fünf Punkte auf 175 Messstellen) als abhängige Variable verwendet. Als Faktoren wurden die Nummern der jeweiligen Messstelle verwendet. Weitere Parameter der Varianzanalyse sind in Kapitel 4.4.1 dargestellt. Demnach unterscheiden sich bei einem Niveau von 5 % die Mittelwerte der Grundgesamtheit bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit (p -Wert) von $7,41 \times 10^{-219}$ signifikant. D.h. die Unterschiede zwischen den Messstellen weichen von denen innerhalb des Polymers an einer Messstelle ab.

Um die Abweichungen innerhalb der Messstellen genauer zu untersuchen, wurden auf drei Messstellen 500 Messpunkte im Abstand von 0,2 mm aufgenommen. Abbildung 5-36 zeigt stellvertretend für eine geringe und hohe Standardabweichung die hochauflösende Aufnahme für zwei Messstellen.

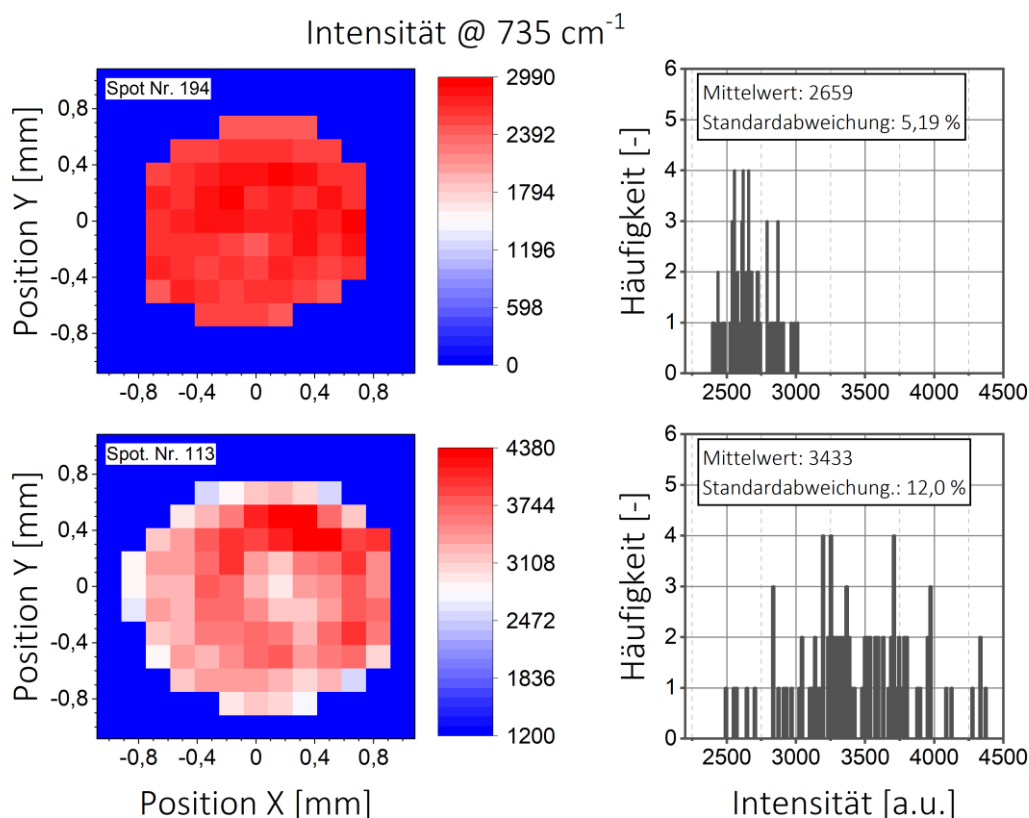


Abbildung 5-36: Hochauflösende Rasteraufnahme und Häufigkeitsdiagramme von zwei ausgewählten Messstellen

Die Aufnahmen zeigen, dass die Intensitäten zu den Rändern hin leicht abfallen. Die Häufigkeitsverteilungen zeigen keine signifikanten Ausreißer innerhalb der Messstellen. Auch bei der Messstelle mit der höheren Standardabweichung zeigt sich eine Verteilung ähnlich der Normalverteilung. Die Abweichungen innerhalb und zwischen den Messstellen können mehrere Ursachen haben. Erstens entstehen die Silberpartikel durch nasschemische Reduktion von Silbernitrat in einem selbstorganisierenden Prozess. Daher kann hierdurch von einer gewissen Streuung in der Verteilung und Form der Silberpartikel ausgegangen werden. Zweitens können die Messstellen durch Benetzungseffekte während der Polymerisation zu unterschiedlichen Oberflächenformen, besonders an den Rändern, führen, die auch das Raman-Signal beeinflussen können (vergl. Kapitel 5.1.1). Drittens ist die SERS-Verstärkung nur an bestimmten Stellen möglich, so muss sich der Analyt in der Nähe eines Hotspots befinden, um eine Verstärkung des Raman-Signals zu erhalten. Alle drei Ursachen tragen zur Gesamtstandardabweichung des SERS-Substrates bei, die aus den fünf Messpunkten aller 175 Messstellen bestimmt wurde. Im Mittel ergibt sich ein Wert von 7,0 % mit einem Minimum von 0,6 % und einem Maximum von 14,4 %. Für andere SERS-aktive Substrate, die Nanostrukturen aus selbstorganisierten Prozessen verwenden, werden Abweichungen von 10 - 30 % beschrieben [109–111]. Bei SERS-aktiven Substraten,

die sehr symmetrische Strukturen verwenden, werden Abweichen von 5 % beschrieben [112]. Verglichen mit diesen Werten liegt das hier entwickelte SERS-Array in dem gleichen Bereich wie die von anderen Nanostrukturen aus selbstorganisierten Prozessen. Sehr symmetrische oder periodische Strukturen zeigen geringere Abweichungen, sind aber auch deutlich aufwendiger in der Herstellung. Eine weitere Einordnung der Messgenauigkeiten des entwickelten Gesamtsystems im Vergleich zu anderen Analysemethoden an einzelnen Fluidsegmenten erfolgt in Kapitel 5.6.

5.5.4 Untersuchung der Langzeitstabilität der SERS-Arrays

Neben der Wiederholgenauigkeit ist auch die Langzeitstabilität der entwickelten SERS-Arrays eine wichtige Kenngröße für die Anwendung. Nach der Herstellung und Trocknung (siehe Kapitel 4.2) wurden die Arrays luftdicht verpackt und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gelagert. Um die Langzeitstabilität zu untersuchen, wurde ein Array über einen längeren Zeitraum wiederholt für Messungen einer $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ Adeninlösung eingesetzt. Zum einen wurden in bestimmten Abständen neue Messstellen mit der Testlösung benetzt und gemessen, zum anderen wurden die Messstellen mehrere Tage nach dem Aufbringen der Testlösung erneut gemessen. Bei der erneuten Messung wurde untersucht, ob sich die Signale im Laufe der Zeit verändern. Es wurden jeweils fünf Messstellen mit je fünf Messpunkten für die Messungen verwendet.

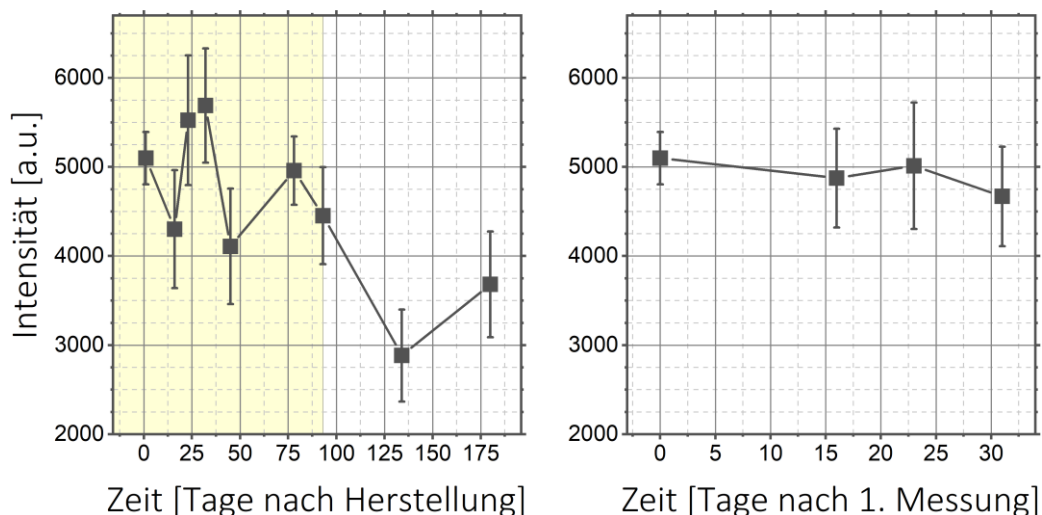


Abbildung 5-37: Testreihe von Messstellen mit unterschiedlichem Alter (links) und Entwicklung des Signals auf denselben Messstellen über die Zeit (rechts)

Für beide Testreihen wurden Varianzanalysen durchgeführt, um zu untersuchen, ob der zeitliche Faktor einen signifikanten Einfluss auf die Messungen hat. Dabei dienten alle Messungen als abhängige Variablen. Im Fall der ersten Testreihe, bei der unterschied-

dlich alte Messstellen für die Messungen benutzt wurden, ergibt sich ein p -Wert von $5,76 \times 10^{-4}$. Das bedeutet, dass sich die Mittelwerte bei einem Niveau von 5 % signifikant unterscheiden. Werden nur die ersten 93 Tage betrachtet, ergibt sich ein p -Wert von $5,15 \times 10^{-2}$. In diesem Fall unterscheiden sich die Werte bei einem Niveau von 5 % nicht signifikant. Folglich kann über die ersten 93 Tage (gelbe Markierung in Abbildung 5-37 links) kein zeitlicher Einfluss auf das Signal der Messstellen beobachtet werden, erst nach 130 Tagen ist dies der Fall. In der zweiten Testreihe, bei der eine bereits gemessene Messstelle in einem Zeitraum von 31 Tagen immer wieder gemessen wurde, ergibt sich ein p -Wert von $4,85 \times 10^{-1}$. Das beutet, dass sich die Mittelwerte bei einem Signifikanzniveau von 5 % nicht signifikant unterscheiden. Folglich ist kein zeitlicher Einfluss nachweisbar. Die Untersuchungen in diesem Kapitel zeigten, dass die SERS-Arrays bis zu 93 Tage nach der Herstellung verwendet und dass die Signale bereits verwendeter Messstellen noch über einen Zeitraum von 31 Tagen ausgelesen werden können.

5.5.5 Analyse einer Sequenz von Segmenten mit abfallender Analytkonzentration

In diesem Abschnitt soll untersucht werden, ob das Absetzen der Fluidsegmente und deren automatische Messung zuverlässig funktionieren. Es wurde eine Sequenz von Segmenten, die verschiedene Konzentrationen des Farbstoffs Kristallviolett beinhalten, auf einem Array abgesetzt. Die Fluidsegmente wurden aus zwei Spritzen, eine gefüllt mit der Farbstofflösung und die andere gefüllt mit Wasser, erzeugt und deren Durchflüsse in entgegengesetzten Rampen verändert (siehe Kapitel 4.3). Abbildung 5-38 zeigt die gemessenen Raman-Spektren.

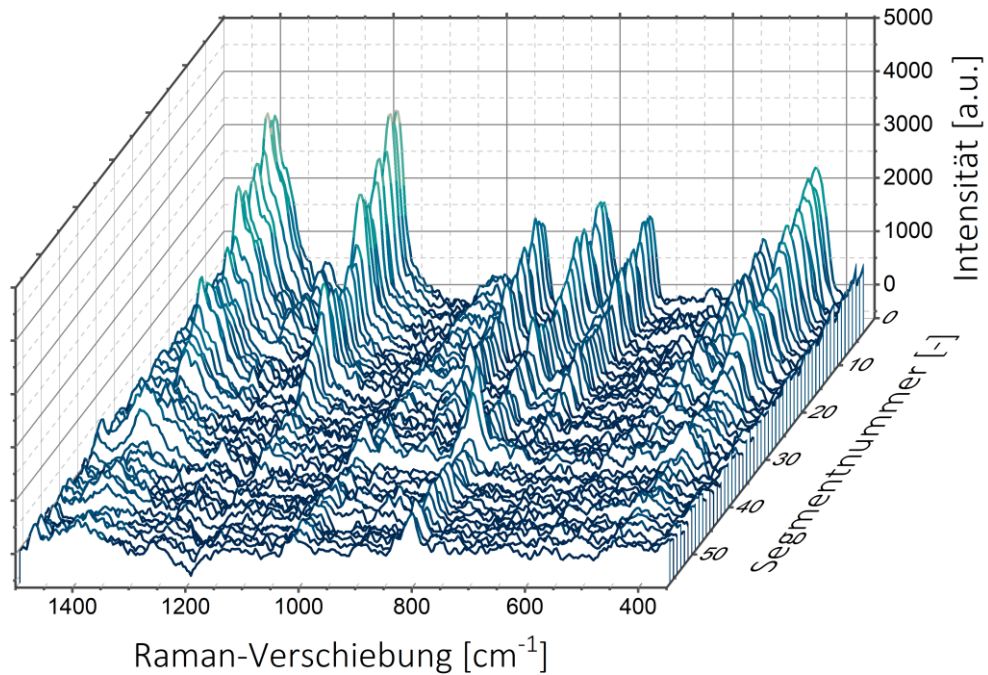


Abbildung 5-38: Raman-Spektren einer Konzentrationsreihe mit Kristallviolett

Die Segmentreihe erstreckte sich über 56 Segmente. Die ersten Segmente enthielten den Farbstoff in einer Konzentration von $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, welche durch Wasser sukzessive auf null verdünnt wurde. Bei den hier gezeigten Spektren wurde kein Hintergrund abgezogen, weshalb am Ende der Konzentrationsreihe die Banden der Polymermatrix noch sichtbar sind. Der Konzentrationsverlauf des Farbstoffs wird anhand der Bande bei 1178 cm^{-1} deutlich. Während des Absetzens der Fluidsegmente wurde die Extinktion jedes einzelnen Fluidsegments an der Photodiode gemessen. Durch die unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen in den Segmenten ergibt sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz eine Signaländerung. Abbildung 5-39 zeigt ein Streudiagramm der Extinktion und der Intensität der Raman-Bande bei 1177 cm^{-1} .

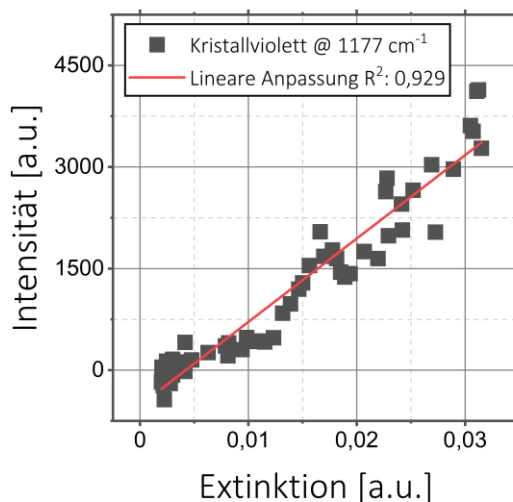


Abbildung 5-39: Streudiagramm der Extinktion und der Raman-Intensität der Segmente

Im Streudiagramm wird die Korrelation zwischen der Bandenintensität und der Extinktion der Photodiode sichtbar. Mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,929 zeigt sich eine gute Korrelation der beiden Messgrößen. Dies bedeutet, dass zum einen das Absetzen der Fluidsegmente aus der Konzentrationsreihe auf die Messstellen und zum anderen die SERS-Messung der Segmente zuverlässig durchgeführt werden kann. Dies belegt, dass die Zuordnung der seriellen Segmente im Schlauch zu den parallelen Messstellen auf dem SERS-Array erhalten bleibt. Folglich kann der hier entwickelte kompakte Messaufbau verwendet werden, um einzelne Segmente mittels SERS-Spektroskopie zu analysieren. Zusätzlich zu den schwingungsspektroskopischen Daten kann auch die Opazität der Segmente gemessen und für die Auswertung verwendet werden.

5.5.6 Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

In diesem Kapitel werden die Nachweis- (engl. *limit of detection*, LOD) und Bestimmungsgrenzen (engl. *limit of quantification*, LOQ) verschiedener Substanzen ermittelt. Die Grenzwerte geben die unterste Intensität an, bei der ein Nachweis beziehungsweise eine quantitative Bestimmung der Testsubstanz noch eindeutig möglich ist. Die Bestimmung erfolgt nach der in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Methode und wurde auf dem SERS-Array durchgeführt. Es wurden Konzentrationsreihen der Substanzen Adenin (AD), Hypoxanthin (HY), Riboflavin (RF) und Kristallviolett (KV) gemessen und die Werte für die Nachweis- und Bestimmungsgrenze bestimmt. Die Messbedingungen sind in Kapitel 4.3 aufgeführt. Die Konzentrationsreihen und die aufgenommenen Raman-Spektren sind in Abbildung 5-40 dargestellt.

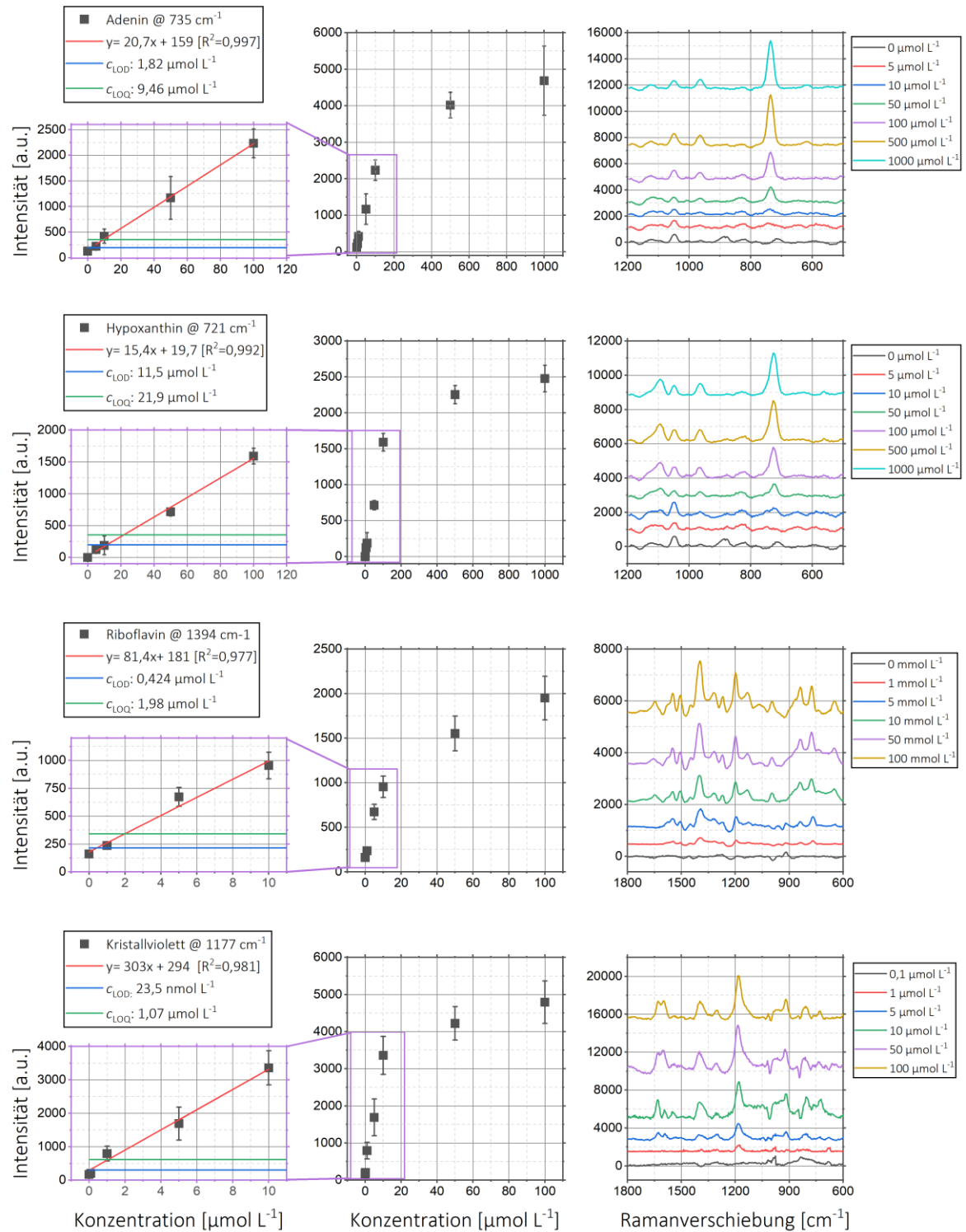


Abbildung 5-40: Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Adenin, Hypoxanthin, Riboflavin und Kristallviolett (links: linearer Bereich, mittig: untersuchter Bereich, rechts: SERS-Spektren)

Auffällig ist, dass der lineare Bereich bei den Testsubstanzen unterschiedlich ausgeprägt ist. Die obere Grenze liegt im Fall von Adenin und Hypoxanthin bei 100 mmol L^{-1} , bei den Molekülen Riboflavin und Kristallviolett liegt diese bei 10 mmol L^{-1} . Das bedeutet, dass bei gleicher Anzahl und Verteilung der Silbercluster auf der Messstelle weniger

Moleküle verstärkt werden können. Eine Erklärung für die Abweichung der oberen Grenze des linearen Bereichs liegt in der Größe der Moleküle. Die Moleküle Riboflavin und Kristallviolett sind deutlich größer (siehe Kapitel 4.8) und blockieren so schon bei geringeren Konzentrationen die Adsorption weiterer Moleküle an benachbarten Hotspots [113]. Aber auch bei den Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zeigen sich Unterschiede, die berechneten Werte sind in Tabelle 5-6 dargestellt.

Tabelle 5-6: Übersicht der Bestimmungsgrenzen verschiedener Substanzen unter Angabe der jeweiligen Konzentrationen (c) [$\mu\text{mol L}^{-1}$], Intensitäten (I) [a.u.] und Standardabweichungen (σ) [a.u.]

Testsubstanz	Bande [cm^{-1}]	Linearer Bereich [mmol L^{-1}]	Hintergrund		LOD		LOQ	
			I	σ	I	c	I	c
Adenin	735	< 100	128	22,6	196	1,82	354	9,46
Hypoxanthin	725	< 100	128	22,6	196	11,5	354	21,9
Riboflavin	1394	< 10	160	18,1	215	0,424	342	1,98
Kristallviolett	1177	< 10	166	45,0	301	0,0235	616	1,07

Die Konzentration für die Nachweisgrenze bei Kristallviolett liegt bei 23,5 nmol L⁻¹. Die Werte für Riboflavin, Adenin und Hypoxanthin liegen um eine bis drei Größenordnungen darüber. In ähnlicher Weise verhalten sich auch die Werte für die Bestimmungsgrenze. Im Folgenden wird die Ursache für die Abweichungen bei den Nachweis- und Bestimmungsgrenzen diskutiert. Die Strukturformeln der Testsubstanzen sind in Kapitel 4.8 dargestellt.

Ein Einflussfaktor für die Berechnung der Grenzwerte ist die Standardabweichung des Hintergrundspektrums bei der betrachteten Schwingungsbande. Für die Nachweisgrenze muss das Signal, abzüglich der Hintergrundintensität, den 3-fachen, für die Bestimmungsgrenze den 10-fachen Wert erreichen (siehe Gleichung 4.8 und 4.9). Die Hintergrundintensität und Standardabweichung der jeweiligen Banden und die resultierenden Grenzwerte sind in Tabelle 5-6 aufgeführt. Es zeigt sich, dass die Hintergrundwerte und deren Standardabweichungen im gleichen Bereich liegen. Die Abweichungen im Bereich der Bande von Kristallviolett sind dabei sogar am höchsten, was den Nachweis bzw. die Bestimmung tendenziell erschwert. Dementsprechend ist keine nennenswerte Abhängigkeit der Grenzwerte von dem betrachteten Spektralbereich festzustellen. Damit ein Molekül durch das lokale elektromagnetische Feld verstärkt werden kann, muss es sich sehr nahe an der Metalloberfläche befinden, weshalb die Anbindung des Moleküls einen starken Einfluss auf die SERS-Verstärkung und damit auch

auf die erreichten Grenzwerte hat. Meng et al. [114] haben gezeigt, dass Kristallviolett in wässriger Umgebung als Kation vorliegt. Das positiv geladene Molekül kann sich durch elektrostatische Anziehung stark an negativ geladenen Silberkolloiden anlagern. Liang et al. [115] berichten, dass das Molekül über die freien Elektronenpaare der Aminogruppen mit der Silberoberfläche interagiert. Kristallviolett kann demnach eine starke Anbindung durch elektrostatische Wechselwirkung im Falle einer negativ geladenen Oberfläche oder durch Anlagerung über die beiden Aminogruppen erreichen. Aus diesem Grund liegen hier gute Bedingungen für eine hohe SERS-Verstärkung vor.

Riboflavin lagert sich nach Yun et al. [116] über die Aminogruppe (N3) und die Carbonylgruppe (O12) des Uracil-Rings an die Silberoberfläche an. Adenin interagiert nach Grajcar et al. [117] über eine Aminogruppe (C6N) und über das Stickstoffatom des Purin-Grundgerüsts mit der Oberfläche. Nach Chowdhury et al. [99] lagert sich Hypoxanthin über das N3-Atom im Purin-Grundgerüst an. Obwohl sich die Moleküle Adenin und Hypoxanthin nur durch den Austausch der Aminogruppe gegen eine Carbonylgruppe unterscheiden, ändert sich die Anbindung an die Silberoberfläche erheblich, wodurch auch die schwächere SERS-Verstärkung bzw. die höheren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Hypoxanthin im Vergleich zu Adenin erklärt werden können.

Für detailliertere Aussagen müssten weitere Untersuchungen stattfinden. Die Bestimmung des zeta-Potentials der Oberfläche in Verbindung mit quantenmechanischen Berechnungen wie der Dichtefunktionaltheorie (DFT) könnten zur weiteren Aufklärung der Anbindungs- und Verstärkungsvorgänge beitragen. In dieser Arbeit sollte jedoch die Systementwicklung im Vordergrund stehen und insbesondere die Validierung der Methode stattfinden. Daher wurde an dieser Stelle auf weitere Untersuchungen verzichtet.

5.5.7 Bewertung der Skalierbarkeit des Analysesystems

Das verwendete Design mit 2 mm großen Messstellen, ermöglicht die Analyse von 324 Fluidsegmenten mit einem Volumen im Bereich von 800 - 2000 nL. Für kleinere Fluidsegmente bzw. größere Sequenzen von Fluidsegmenten werden im Folgenden die Skalierungsmöglichkeiten diskutiert.

Sollen Fluidsegmente mit geringeren Volumina analysiert werden, muss auch eine Anpassung der Größe der Messstelle erfolgen. Um dies zu ermitteln, wurden verschiedene Durchmesser der Messstellen auf ihr Aufnahmevermögen untersucht. Dabei wurde das Volumen der Segmente variiert und die Benetzung der Messstellen visuell begutachtet. Das minimale Segmentvolumen gibt an, welches Volumen die Messstelle vollständig bedeckt. Das maximale Segmentvolumen gibt an, welches Volumen von der Messstelle aufge-

nommen werden kann, ohne dass Flüssigkeit über den Rand der Messstelle tritt. Tabelle 5-7 zeigt die möglichen Segmentvolumina für die verschiedenen Größen der Messstelle.

Tabelle 5-7: Mögliche Segmentvolumina für unterschiedlich große Messstellen

Durchmesser [μm]	Geometrie	Tiefe [μm]	Volumen der Vertiefung [nL]	Segmentvolumen [nL]
500	<i>rund</i>	500	98,2	50-200
1000	<i>rund</i>	500	393	200-500
1500	<i>rund</i>	500	884	500-800
2000	<i>rund</i>	500	1500	800-2000

Für Segmente mit einem Volumen von 500 - 800 nL ergibt sich ein Durchmesser der Messstelle von 1,5 mm. Für ein Segmentvolumen von 200 - 500 nL ein Durchmesser von 1 mm und für 50 - 200 nL ein Durchmesser von 0,5 mm. Die jeweiligen Füllmengen für die Silbersalz-Monomerlösungen müssen, wie in Kapitel 5.2.3 für die 2 mm Messstellen beschrieben, angepasst werden, um die Oberflächenwölbung und dadurch verursachte Messabweichungen zu minimieren. Bei einer Verkleinerung der Messstellen kann auch eine Reduktion des Abstandes auf dem SERS-Array erfolgen. So kann beispielsweise der Abstand für die 1 mm großen Messstellen auf 1 mm verkleinert werden (siehe Kapitel 4.2). Damit ergeben sich 1296 Messstellen auf dem Array. Eine weitere Erhöhung der Anzahl an Messstellen könnte durch eine weitere Verkleinerung der Abstände oder eine Vergrößerung des Arrays erfolgen.

5.6 Vergleich des entwickelten Analysesystems mit anderen Analysemethoden

In diesem Kapitel soll die entwickelte SERS-Analysemethode im Vergleich zu anderen Arbeiten aus der Literatur bewertet werden. Die Analysemethoden werden anhand der Leistungsdaten, die im vorherigen Kapitel bestimmt wurden, verglichen. Daher werden nachfolgend die Parameter Durchsatz, Bestimmungsgrenzen und die Standardabweichung der Messung diskutiert. Als Vergleich werden Arbeiten anderer Arbeitsgruppen herangezogen, die SERS-Messungen an einzelnen Fluidsegmenten beschreiben. Die erreichten Werte der Analysemethoden die hier verglichen werden, sind in Tabelle 5-8 aufgelistet.

Tabelle 5-8: Überblick über die Leistungsdaten anderer Methoden zur Analyse einzelner Fluidsegmente mittels SERS (TA: Testanalyt; SERS: SERS-Substrat; f : Frequenz der Segmente [Hz]; I : Integrationszeit [s]; V : Segmentvolumen [μL]; NG: Nachweisgrenze [$\mu\text{mol L}^{-1}$]; LB: Linearer Bereich [$\mu\text{mol L}^{-1}$]; VC: Variationskoeffizient [%]; AD: Adenin; KV: Kristallviolett; MG: Malachitgrün)

Autor	TA	SERS	f	I	V	NG	LB	VC
Diese Arbeit	AD	Ag-Polymer	1,5	0,5	1	1,84	bis 100	13,6
Diese Arbeit	KV	Ag-Polymer	1,5	0,5	1	0,0235	bis 10	13,6
Dugandžić [24]	AD	Ag-NP (kont.)	< 0,34	1	n.a.	0,0327	bis 6	8 - 13
Dugandžić [24]	AD	Ag-NP (Batch)	< 0,34	1	n.a.	0,145	bis 1	8 - 13
Strehle [118]	KV	Gold-NP (Batch)	0,1	n.a.	180	~ 0,5	> 10	4,9
Cecchini [55]	MG	Ag-NP (Batch)	14	0,01	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Analysesystem können Fluidsegmente mit einer Frequenz von 1,5 Hz analysiert werden, ohne dass in der Fluidführung weitere Maßnahmen, wie etwa eine Abstandsvergrößerung oder eine Zwischenlagerung der Segmente erfolgen muss. Die erreichte Frequenz ist deutlich höher, als es von vergleichbaren Systemen berichtet wird. Strehle et al. [118] beschreiben Messungen an Segmenten mit Kristallviolett bei einer Frequenz von 0,1 Hz. Dugandžić et al. [24] beschreiben bei der Messung von Adenin, dass für jedes Segment drei Spektren mit einer Integrationszeit von 1 s aufgenommen werden, wodurch sich eine Frequenz größer 0,34 Hz nicht realisieren lässt. Beide Analysesysteme liegen etwa um dem Faktor 5 - 15 unter dem Durchsatz des in dieser Arbeit entwickelten Analysesystems. Eine Ausnahme bildet die Methode von Cecchini et al. [55]. Hier wird eine sehr schnelle Messmethode für Malachitgrün mit bis zu 14 Hz vorgestellt. Dabei werden Integrationszeiten von 10 μs durch Nutzung der oberflächenverstärkten resonanten Raman-Streuung (engl. *surface enhanced resonant Raman scattering/spectroscopy*, SERRS) möglich.

Die Nachweisgrenzen, die in dieser Arbeit für die Testsubstanz Adenin erzielt wurden, liegen bei 1,82 $\mu\text{mol L}^{-1}$ mit einem linearen Bereich bis 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Für Kristallviolett liegt die Nachweisgrenze bei 23,5 nmol L^{-1} mit einem linearen Bereich bis 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Dugandžić et al. vergleichen zwei Methoden für die Herstellung der kolloidalen Silberpartikel, die zu den Fluidsegmenten zudosiert werden. Mit Partikeln, die

in einem Batchprozess hergestellt werden, wird eine Nachweisgrenze von $0,145 \mu\text{mol L}^{-1}$ und mit Partikeln, die direkt auf dem mikrofluidischen Chip hergestellt werden und zu den Segmenten dosiert werden, wird eine Nachweisgrenze von $32,7 \text{ nmol L}^{-1}$ erreicht. Dugandžić et al. [24] berichten weiterhin, dass durch die Herstellung der Silberpartikel auf dem Chip nicht nur die Nachweisgrenze reduziert, sondern auch der lineare Bereich von $1 \mu\text{M}$ auf $6 \mu\text{M}$ ausgeweitet werden kann. Strehle et al. [118] berichten von einer Methode, bei der kolloidale Goldpartikel eingesetzt werden, um Kristallviolett zu detektieren. Dabei konnten Konzentrationen bis $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ gemessen werden. Ein linearer Bereich zeigt sich bis $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, wobei höhere Konzentrationen nicht gemessen wurden, weshalb die obere Grenze des linearen Bereichs nicht bekannt ist.

Die Messungenauigkeiten, die bei der Messung von zwei aufeinanderfolgenden Segmenten bzw. zwischen zwei Messstellen auftreten, wurden in dieser Arbeit für das SERS-Array mit 14 % bestimmt. Aus den Messdaten von Dugandžić et al. [24] ergeben sich Abweichungen zwischen 8 und 13 %. Strehle et al. [118] berichten von Messungen an Segmenten mit Kristallviolett, bei denen die Abweichungen im Bereich von 5 % liegen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der hier vorgestellte kompakte Messaufbau zur Analyse einzelner Fluidsegmente im Vergleich zu anderen Systemen eine deutlich höhere Frequenz bei der Segmentanalyse ermöglicht. Aufgrund des großen linearen Bereichs, in dem die hier entwickelten SERS-Polymere verwendet werden können, lassen sich damit auch höhere Konzentrationen genau bestimmen. Die Nachweisgrenzen der Vergleichssysteme sind bei Adenin um ein bis zwei Größenordnungen besser. Bei Kristallviolett können mit dem entwickelten SERS-Polymer niedrigere Konzentrationen detektiert werden als bei der Analysemethode von Strehle et al. [118] angegeben, wobei eine Bestimmung der Nachweisgrenze nicht explizit durchgeführt wurde. Die Vergleichssysteme zeichnen sich vor allem durch eine gute Reproduzierbarkeit aus. Die gute Vermischung und die daraus resultierende gute Verteilung der Silberpartikel innerhalb der Segmente wirken sich hier positiv aus [119]. Zusätzlich kommen bei diesen Methoden Raman-Mikroskope zum Einsatz, die aufgrund des optischen Aufbaus und der Verwendung rauscharmer Spektrometer eine reproduzierbare Messung ermöglichen. Die SERS-Arrays dieser Arbeit können jedoch im Vorfeld der Messungen hergestellt werden und bieten zudem noch die Möglichkeit, durch das wiederholte Analysieren der Messstellen, die Messparameter optimal anzupassen ohne den Versuch wiederholen zu müssen. Zudem kann bei dem hier entwickelten Analysesystem ein kompaktes Spektrometersystem eingesetzt und so auf den Einsatz eines großen und technisch aufwendigen Raman-Mikroskops verzichtet werden. Für einen portablen Einsatz in

verschiedenen Laboren und an verschiedenen Prozessen ist das entwickelte Analysesystem in den beschriebenen Grenzen bestens geeignet. Es lässt sich anwendungsorientiert relativ schnell und flexibel an verschiedenste Prozesse adaptieren.

5.7 Durchführung einer Reaktionsverfolgung mit dem entwickelten Analysesystem

In diesem Kapitel wird der Einsatz des entwickelten SERS-Analysesystems für die Verfolgung einer Desaminierungsreaktion von Adenin zu Hypoxanthin beschrieben. Adenin ist als eine der vier Nukleinbasen ein wichtiger Baustein im menschlichen Körper. Er ist an vielen biochemischen Prozessen, wie beispielsweise dem Energietransfer in Form von Adenosintriphosphat oder als essentieller Bestandteil an der Bildung der DNA, RNA und verschiedenen Nukleosiden und Nukleotiden, beteiligt [120, 121]. Daher können kleine Änderungen an diesem Molekül empfindliche Störungen in den biochemischen Abläufen im Körper verursachen [122, 123]. Die Desaminierung von Adenin zu Hypoxanthin läuft normalerweise nur sehr langsam ab. Dieser Prozess kann jedoch durch Effektoren, wie die Temperatur oder die Gegenwart eines Reduktionsmittels, stark beschleunigt werden [124, 125]. So können etwa Nitrite als Reduktionsmittel dienen [126]. Adenin zeigt zudem, durch seine Eigenschaft an Silber anzulagern, eine gute SERS-Verstärkung. Aufgrund dessen eignet sich die Desaminierung von Adenin zu Hypoxanthin besonders gut, um die Leistungsfähigkeit des entwickelten SERS-Analysesystems zu demonstrieren.

Zuerst wird die Kalibrierung der Segmentzusammensetzung durch eine Farbstoffkonzentration beschrieben. Weiterhin wird die Bestimmung der Konzentrationen von Adenin und Hypoxanthin in den Segmenten durch eine multivariate Kalibrierung vorgestellt. Anschließend werden die Untersuchung und Auswertung des Reaktionscreenings bei Einsatz verschiedener Nitritkonzentrationen und verschiedener Temperaturen beschrieben.

5.7.1 Bestimmung der Segmentzusammensetzung anhand einer Farbstofflösung

Für die Reaktionsdurchführung ist es notwendig, dass die Zusammensetzung der Segmente aus den einzelnen Reaktionslösungen bekannt ist. Dazu wurde eine Farbstofflösung (Basic Blue 3) in demselben Aufbau und unter denselben Prozessbedingungen untersucht, die später für die Reaktion benutzt wurden (siehe Kapitel 4.3). Die Konzentration der Farbstofflösung in den Fluidsegmenten wurde mit Hilfe der Segmentdetektion (Photodiode) bestimmt. Ziel war es, später die Konzentrationen anderer, nicht optisch detektierbarer Substanzen (wie Natriumnitrit) in den Segmenten berechnen zu können.

Zuerst musste sichergestellt werden, dass die Konzentration des Farbstoffs im linearen Bereich des Lambert Beer'schen Gesetzes liegt. Dazu wurden die Extinktionen von Fluidsegmenten mit bekannten Konzentrationen vermessen. Abbildung 5-41 zeigt die Kalibriergerade von Basic Blue 3 im Konzentrationsverlauf von 1-14 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

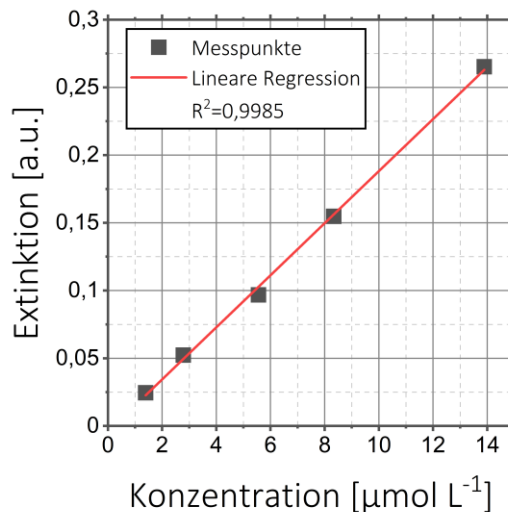


Abbildung 5-41: Extinktionsverlauf und Kalibriergerade von Basic Blue 3 gemessen mit Hilfe der Segmentdetektion

Die Extinktion zeigt im gewählten Konzentrationsbereich einen linearen Verlauf. Daher wurde für die weitere Kalibrierung der Segmentzusammensetzung eine Konzentration von 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ eingesetzt. Es wurden 150 Segmente mit steigender Farbstoffkonzentration erzeugt und die Extinktionen der Segmente mit Hilfe der Segmentdetektion (Photodiode) bestimmt (Abbildung 5-42). Es wurden drei Durchgänge realisiert, um die Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung zu bestimmen.

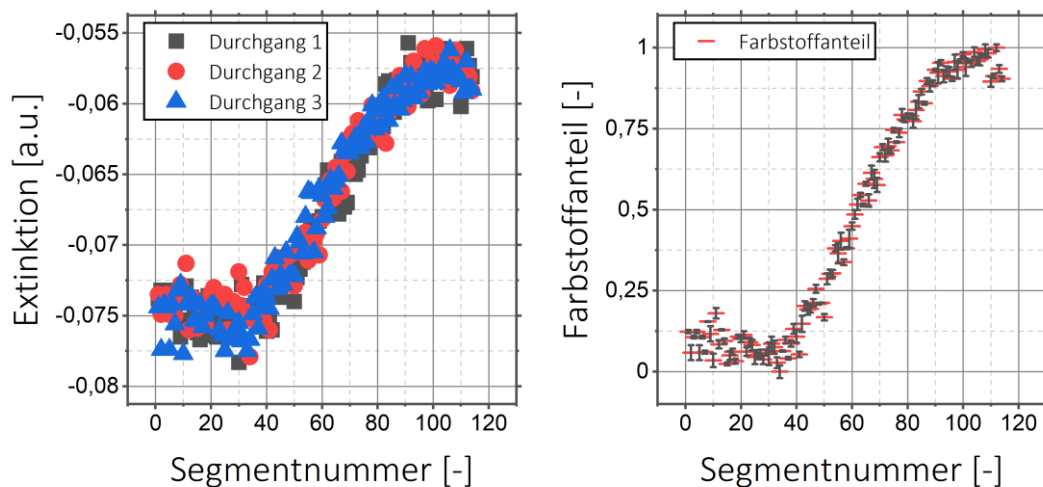


Abbildung 5-42: Extinktionen, gemessen für Basic Blue 3 in der Mitte der Segmente

Die Verläufe zeigen, dass die Konzentration ab dem vierzigsten Segment ansteigt. Etwa bei dem hundertsten Segment wird die maximale Konzentration erreicht. Die drei Wiederholungen zeigen kaum Abweichungen untereinander, was bestätigt, dass die Dosierung der Lösungen und die Tropfenerzeugung reproduzierbar sind. Aus den gemittelten Extinktionen wurde mit Hilfe der Kalibriergerade (Abbildung 5-41) der Farbstoffanteil bestimmt. Dieser Farbstoffanteil lässt sich auf zukünftige Experimente übertragen, wenn dieselben Prozessbedingungen verwendet werden. Somit sind auch in zukünftigen Experimenten die Stoffmengenanteile in den einzelnen Segmenten bekannt, auch wenn der eingesetzte Stoff nicht direkt gemessen werden kann. Mit Hilfe der ermittelten Segmentzusammensetzung wurden die Konzentrationen von Adenin (Kapitel 5.7.2) und Natriumnitrit (Kapitel 5.7.3) in den nachfolgend beschriebenen Experimenten bestimmt.

5.7.2 Kalibrierung der Adenin- und Hypoxanthin-Konzentration

Um quantitative Aussagen über den Reaktionsfortschritt machen zu können, muss eine Kalibrierung des Raman-Signals erfolgen. Es wurden hierzu Fluidsegmente beginnend mit reiner Hypoxanthin-Lösung langsam verdünnt bis hin zur reinen Adenin-Lösung (siehe Kapitel 4.3). Da beide Stoffe gegenläufig dosiert wurden, war die Gesamtkonzentration beider Substanzen in allen Segmenten konstant, wie es bei der späteren Umsetzung von Adenin zu Hypoxanthin auch der Fall war. Die Segmente wurden auf einem SERS-Array abgesetzt und gemessen. Abbildung 5-43 zeigt die Raman-Spektren der gemessenen Sequenz.

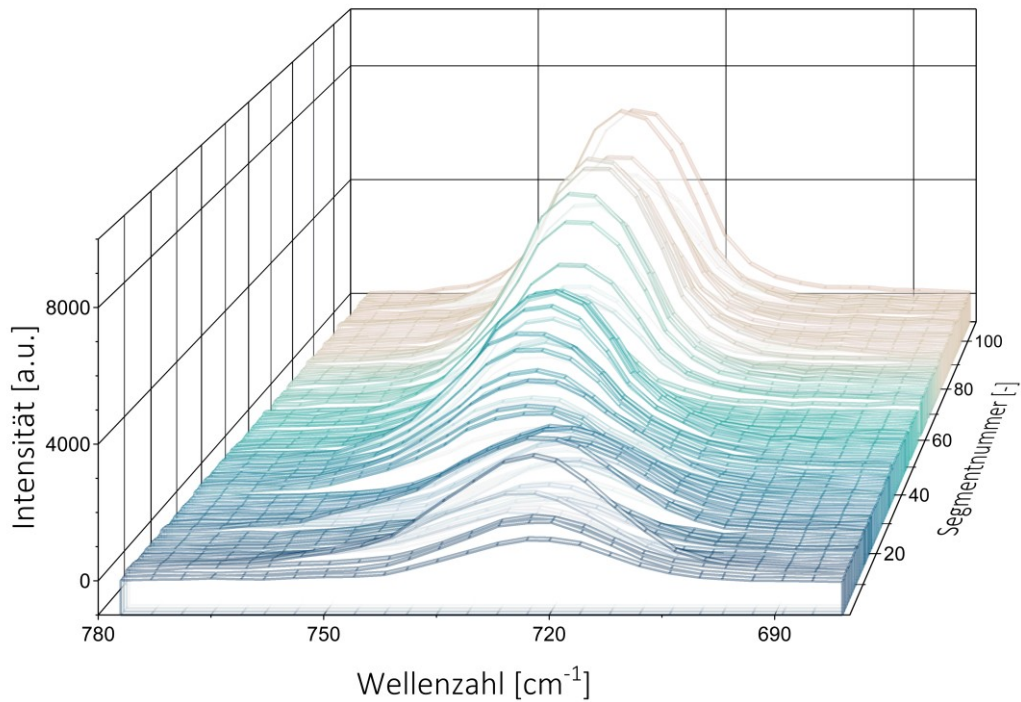


Abbildung 5-43: 3D Grafik der Raman-Spektren der Segmentreihe von Adenin- und Hypoxanthin-Lösungen sowie deren Mischungen aus der Kalibrierung (blau: reine Hypoxanthin-Lösung, braun: reine Adenin-Lösung)

Es ist deutlich zu sehen, wie sich die Intensität der Bande im Verlauf der Fluidsegmente (Segment 1 - 110) von Hypoxanthin zu Adenin deutlich erhöht und das Maximum des Spektrums sich im Verlauf der Segmente hin zu höheren Wellenzahlen verschiebt. Auch die Breite nimmt im Bereich der Mischung zu. Hier überlagern sich die Spektren von Hypoxanthin und Adenin. Durch die Überlagerung der Banden ist eine univariate Kalibrierung anhand der Bandenhöhe oder -fläche, wie sie standardmäßig angewandt wird, nicht möglich. Hingegen kann die Lage der Bande Aufschluss über die Zusammensetzung geben. Abbildung 5-44 zeigt die Verschiebung der Bandenlage von zwei Kalibrierdurchgängen.

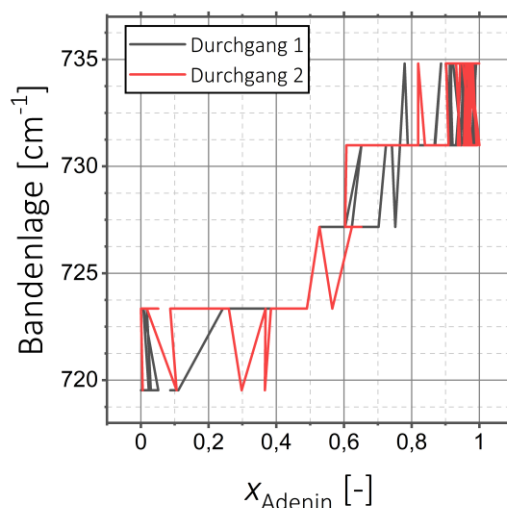


Abbildung 5-44: Bandenlage in Abhängigkeit des Anteils an Adenin

Die Lage der Bande verschiebt sich mit steigendem Adeninanteil hin zu höheren Wellenzahlen. Die Verschiebung der Bande umfasst jedoch nur 14 Wellenzahlen und das Spektrometer arbeitet mit einer Auflösung von etwa 4 - 6 Wellenzahlen. Deshalb ergeben sich nur fünf diskrete Zustände, weshalb keine genauere Kalibrierung der Konzentration erreicht werden kann.

Eine verlässlichere Konzentrationsbestimmung kann durch eine multivariate Kalibrierung erfolgen. Dabei kann anstelle von nur einer Wellenzahl, ein größerer Bereich oder auch das gesamte Spektrum für die Kalibrierung verwendet werden (siehe Kapitel 4.4.3). Zuerst muss der Bereich des Spektrums festgelegt werden, der für die Auswertung verwendet werden soll. Die charakteristischen Banden der beiden Stoffe liegen im Bereich von 690 - 780 cm⁻¹. Der Vorteil der multivariaten Kalibrierung liegt darin, dass auch andere Bereiche identifiziert werden können, die mit der Adenin-Konzentration korreliert sind. Daher wurde vorab eine Hauptkomponentenanalyse (engl. *principal component analysis*, PCA) durchgeführt. Es sollten die Bereiche des Spektrums identifiziert werden, welche die größten Unterschiede beziehungsweise die größte Varianz aufweisen. Die Faktoren, in diesem Fall die Wellenzahlen, werden dabei zu neuen Hauptkomponenten zusammengefasst (vgl. Kapitel 4.4.3). Anhand der beschriebenen Varianz können die relevanten Hauptkomponenten für den vorliegenden Datensatz ausgewählt werden. Abbildung 5-45 zeigt die erklärte Varianz der Hauptkomponenten und den Scores-Plot.

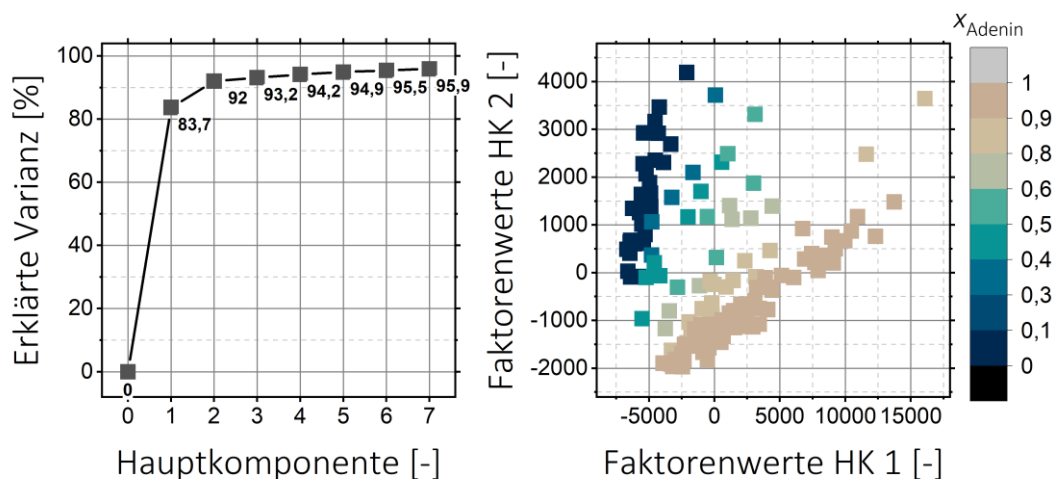


Abbildung 5-45: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse: Erklärte Varianz und Scores-Diagramm

Die erste Hauptkomponente beschreibt etwa 84 % der Varianz in den Daten, die zweite Hauptkomponente beschreibt weitere 8 %. Das Scores-Diagramm zeigt, dass sich die Faktorenwerte mit steigender Adenin-Konzentration schräg zwischen den ersten beiden Hauptkomponenten bewegen, was bedeutet, dass die Adenin-Konzentration von den ersten beiden Hauptkomponenten beschrieben wird. Bei höherer Adenin-Konzentration nimmt der Anteil der ersten Hauptkomponente zu, wohingegen der Anteil der zweiten Hauptkomponente abnimmt. Die Ladungen der Faktoren geben an, welchen Einfluss die verschiedenen Faktoren auf die Hauptkomponente besitzen. Die Faktorenwerte (engl. *loadings*) sind in Abbildung 5-46 dargestellt.

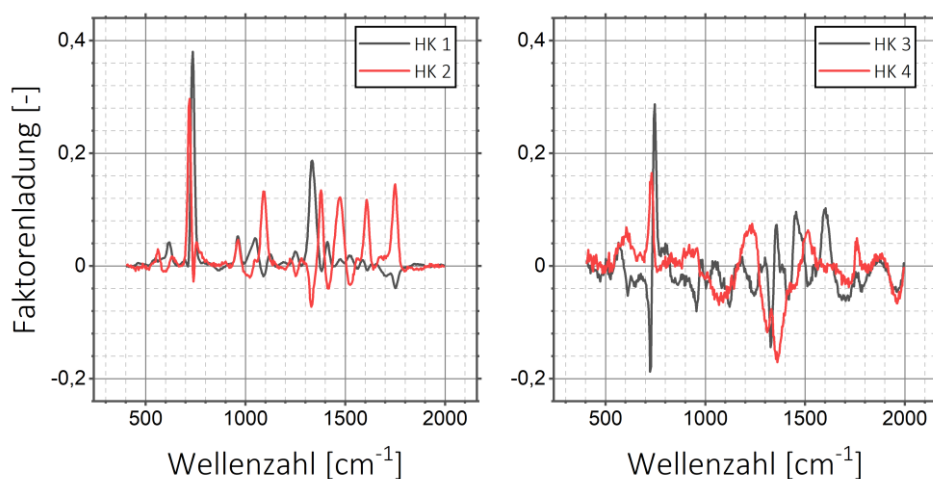


Abbildung 5-46: Faktorenwerte für die ersten vier Hauptkomponenten

Die erste Hauptkomponente wird stark von den Wellenzahlen bei 735 cm⁻¹ und 1337 cm⁻¹ beeinflusst. Dies entspricht der Lage der Banden in dem SERS-Spektrum von Adenin (vergleiche Kapitel 4.8). Die zweite Hauptkomponente hängt stark von der Wellenzahl 721 cm⁻¹ ab, dies entspricht der Lage der Bande in dem Spektrum von Hypo-

xanthin. Hinzu kommen noch weitere starke Einflüsse der Banden bei 966 cm^{-1} , 1097 cm^{-1} , 1384 cm^{-1} , 1468 cm^{-1} , 1611 cm^{-1} und 1750 cm^{-1} , die ebenfalls dem SERS-Spektrum von Hypoxanthin zugeordnet werden können (siehe Kapitel 4.8). Die dritte und vierte Hauptkomponente trägt jeweils noch etwa 1 % zur erklärten Varianz bei. Bei der dritten Hauptkomponente dominieren die Wellenzahlen im Bereich der Hauptbanden der beiden Stoffe. Wellenzahlen kleiner 730 cm^{-1} haben einen negativen Einfluss, Wellenzahlen größer 730 cm^{-1} einen positiven Einfluss auf die Hauptkomponente.

Die Hauptkomponentenanalyse hat gezeigt, dass sich zumindest die ersten beiden Hauptkomponenten stark an den beiden Reinspektren orientieren. Daher sollten für die Kalibrierung nicht nur die Verschiebung der Hauptbande im Spektralbereich $700 - 760\text{ cm}^{-1}$ sondern der komplette Spektralbereich von $400 - 2000\text{ cm}^{-1}$ als Variablen verwendet werden.

Der erste Schritt bei der Kalibrierung ist die Datenvorbehandlung. Es wurden drei verschiedene Methoden verwendet (siehe Kapitel 4.4.3):

1. Basislinienkorrektur (BL)
2. Erste Ableitung (1. Abl.)
3. Basislinienkorrektur und Standard Normal Variate (SNV) Korrektur

Mit allen drei Methoden der Datenvorbehandlung wurde eine Regression mit der Methode der partiellen kleinsten Fehlerquadrate (engl. *partial least squares regression*, PLSR) durchgeführt (siehe Kapitel 4.4.3). Aus dem kompletten Datensatz mit 191 Spektren wurden 34 Spektren entnommen. Diese Daten flossen nicht mit in die Kalibrierung ein, sondern dienten lediglich zur Validierung des Modells (Testdatensatz). Der Stoffmengenanteil an Adenin diente als Zielvariable.

Die PLSR, die mit den basislinienkorrigierten Daten durchgeführt wurden, schlägt fünf PLSR-Komponenten (PLSR-K) vor, um 96,3 % des Datensatzes zu erklären. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-47 dargestellt.

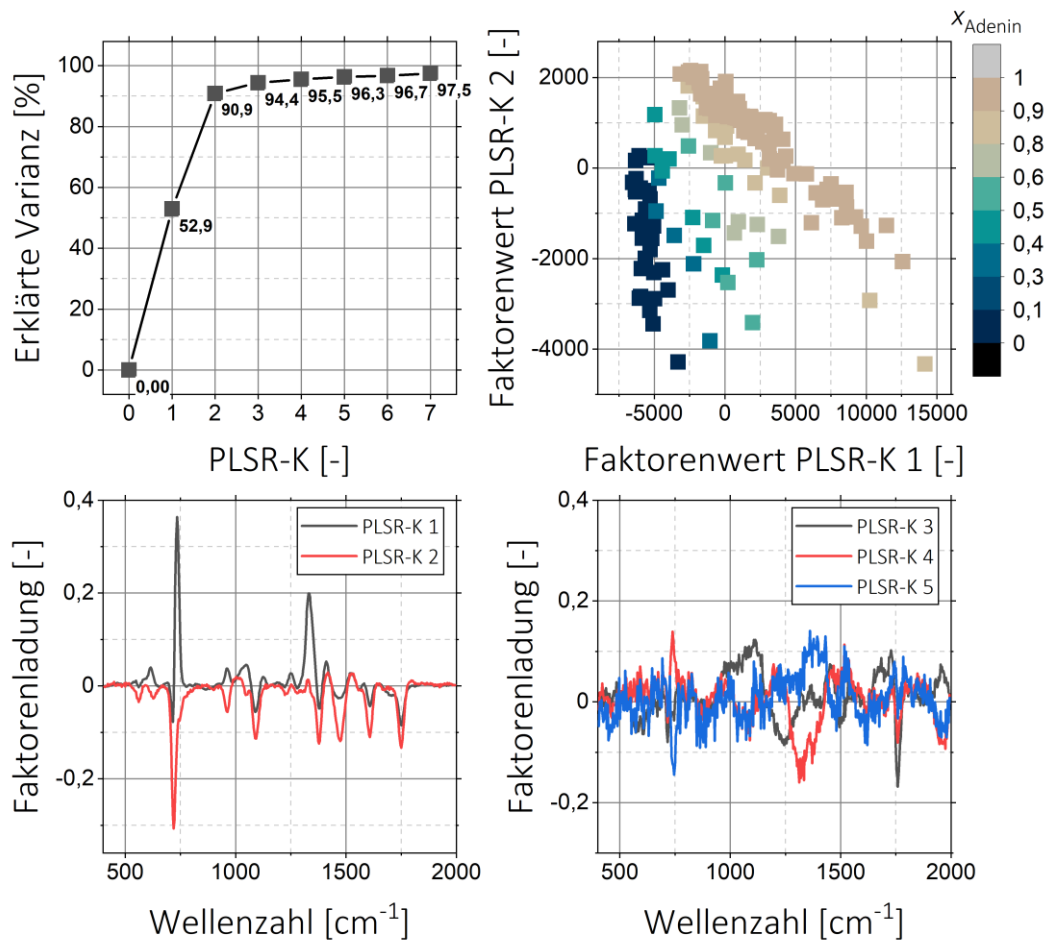


Abbildung 5-47: Ergebnisse der PLSR mit den baselinienkorrigierten Daten (erklärte Varianz, Faktoren- und Ladungswerte)

Die erste PLSR-K beschreibt 52,9 % der Varianz. Die gewichteten Ladungen der Faktoren (engl. *loadings*) zeigen, dass die Komponente, wie schon bei der PCA, hauptsächlich die Banden des Adenin-Spektrums abbildet (735 cm^{-1} und 1337 cm^{-1}). Die zweite PLSR-K beschreibt weitere 38,0 % der Varianz. Hier spiegeln die Faktorenladungen die Banden des Hypoxanthins wieder. Diese sind negativ, da die Summe der Einzelgehalte beider Stoffe in allen Segmenten konstant bleibt. Deshalb wirkt sich eine hohe Konzentration von Hypoxanthin negativ auf die Zielgröße Adenin aus. Die dritte PLSR-K beschreibt weitere 3,5 % der Varianz der Daten. Hier ist die Faktorenladung bei 1750 cm^{-1} stark negativ. Diese Bande findet sich im Spektrum von Hypoxanthin wieder. Die vierte PLSR-K beschreibt weitere 1,1 % und die fünfte 0,8 %. Die Faktorenladungen sind hier weder stark ausgeprägt, noch können sie physikalisch erklärt werden. Hier handelt es sich hauptsächlich um das Rauschen in den Spektren. Die Faktorenwerte (engl. *scores*) der ersten beiden Hauptkomponenten zeigen, wie schon aus der erklärten Varianz ersichtlich, dass mit steigendem Adeninanteil die ersten beiden PLSR-K ansteigen, wohingegen bei der

dritten und vierten Komponente keine signifikante Änderung bei steigender Adenin-Konzentration ersichtlich ist.

Die PLSR, welche mit der 1. Ableitung der Daten durchgeführt wurde, schlägt vier PLSR-Komponenten für das Modell vor, um 96,4 % der Varianz zu erklären. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-48 dargestellt.

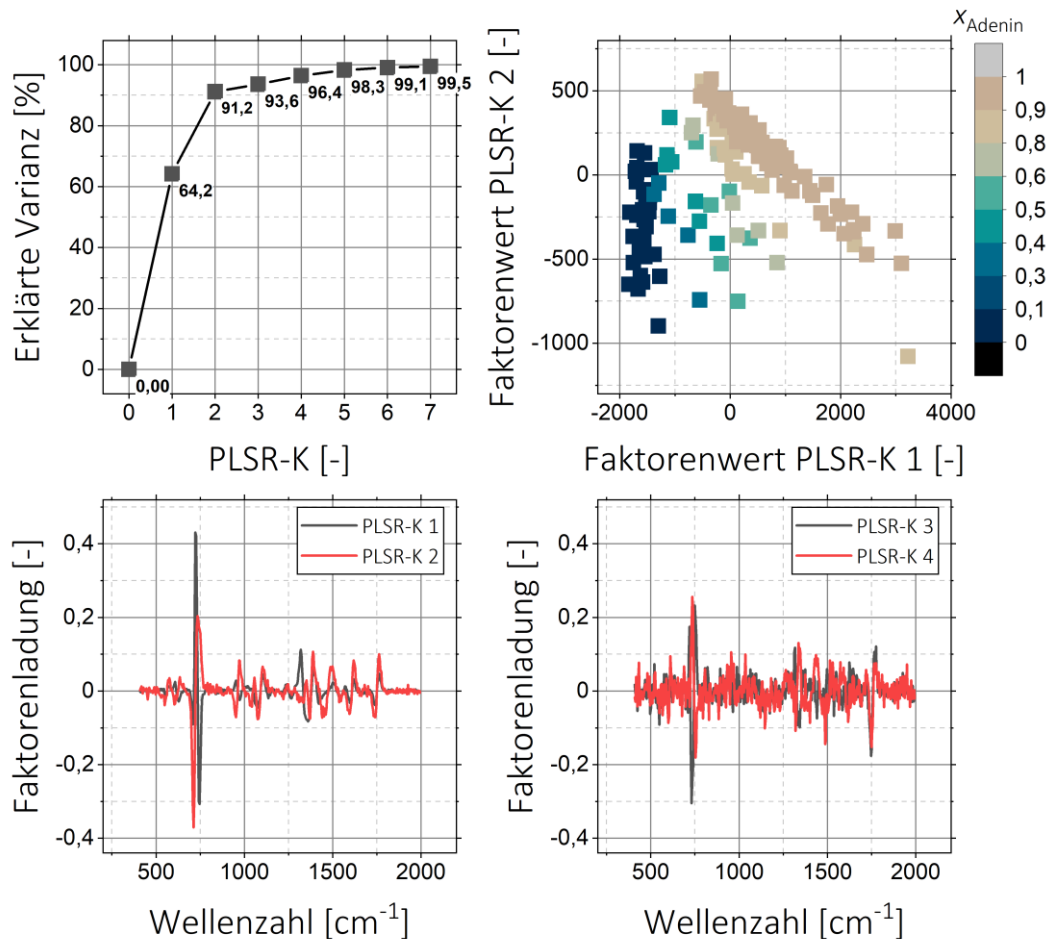


Abbildung 5-48: Ergebnisse der PLSR, die mit der 1. Ableitung der Daten durchgeführt wurde (erklärte Varianz, Faktoren- und Ladungswerte)

Die erste PLSR-Komponente erklärt dabei 64,2 % der Varianz. Die gewichteten Ladungen der Faktoren repräsentieren auch in diesem Fall das abgeleitete Spektrum von Adenin. Die zweite PLSR-K beschreibt weitere 27 % der Varianz und repräsentiert das abgeleitete und invertierte Spektrum von Hypoxanthin. Die Faktorenwerte verhalten sich ähnlich wie bei den basislinienkorrigierten Daten. Der Anteil an Adenin hat einen starken Einfluss auf die erste PLSR-K und ebenso noch einen Einfluss auf die zweite PLSR-K. Die weiteren PLSR-K sind nicht stark mit dem Adenin-Anteil verknüpft, allerdings beschreibt die dritte PLSR-K weitere 2,5 % und die vierte weitere 2,8 % der Varianz.

Für die mit der SNV-Korrektur vorbehandelten Daten werden bei der PLSR zwei Komponenten vorgeschlagen um 99,5 % der Varianz zu beschreiben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-49 dargestellt.

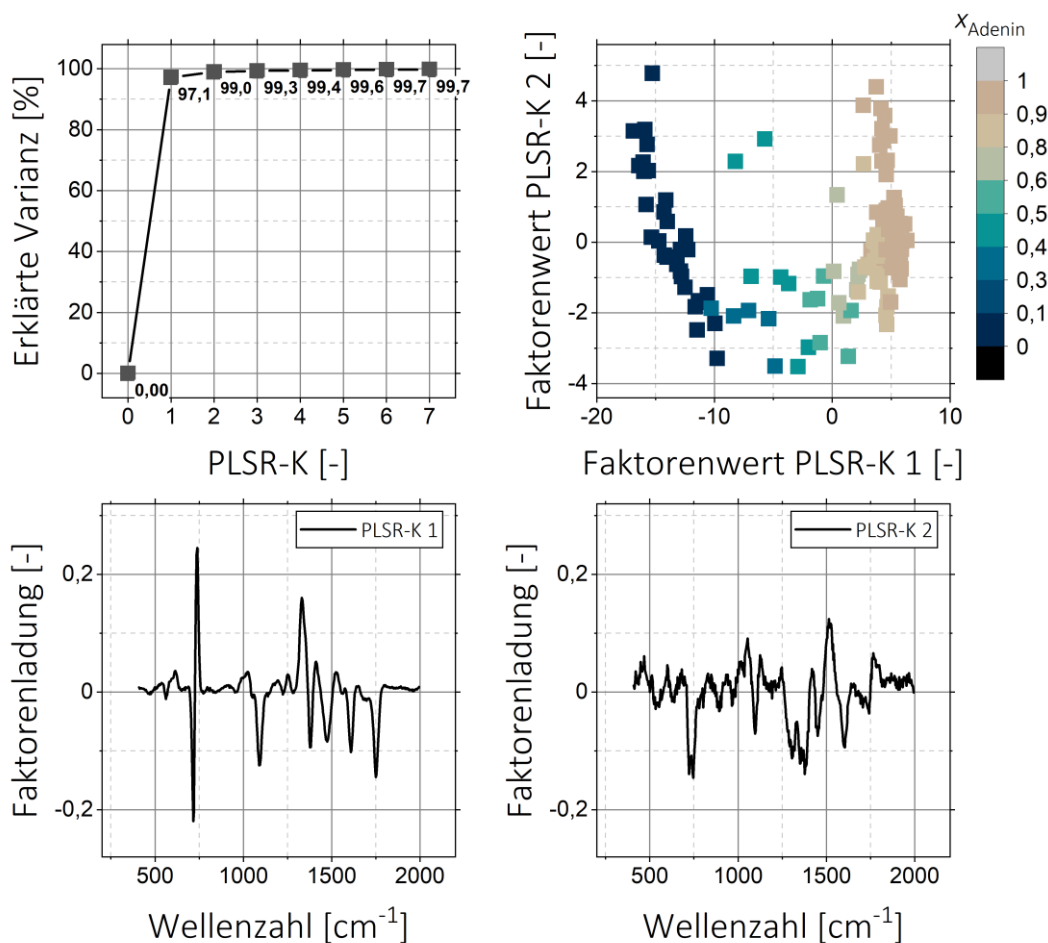


Abbildung 5-49: Ergebnisse der PLSR mit den SNV-korrigierten Daten (erklärte Varianz, Faktoren- und Ladungswerte)

Die erste PLSR-Komponente beschreibt 97,1 % der Varianz des Datensatzes. Die gewichteten Faktorenladungen der ersten PLSR-K sind im Bereich der Hauptbande von Adenin (735 cm^{-1}) stark positiv, im Bereich der Hauptbande von Hypoxanthin (721 cm^{-1}) stark negativ ausgeprägt. Weiterhin sind die Faktoren 1097, 1337, 1384, 1611 und 1750, die den Wellenzahlen entsprechen, in der PLSR-Komponente relevant. Die Faktoren, welche dem Hypoxanthin zugeordnet werden können (1097, 1384, 1611 und 1750) sind, wie bereits erwähnt, negativ beladen. Die zweite PLSR-Komponente beschreibt weitere 1,9 % der Varianz und beinhaltet starke Ladungen in Bereich der Banden von Adenin und Hypoxanthin. Die Faktorenwerte der ersten Hauptkomponente zeigen eine starke Korrelation mit der Adenin-Konzentration, wohingegen die zweite PLSR-K nur noch schwach von der Adenin-Konzentration abhängt.

Im Vergleich findet die PLSR mit den SNV-korrigierten Daten eine PLSR-Komponente, die 97 % des Datensatzes beschreibt, während bei den anderen mindesten zwei Komponenten benötigt werden, um einen ähnlichen Anteil des Datensatzes zu beschreiben. Bei dieser Kalibrierung liegt ein Datensatz vor, der von einer Variablen, dem Anteil von Adenin, abhängig ist. Da die Gesamtmenge an Hypoxanthin und Adenin konstant ist, ist der Hypoxanthin-Anteil abhängig von der Adenin-Konzentration. Die PLSR-Komponenten im Modell sind linear unabhängig. Deshalb sollte die hier vorliegende Fragestellung, rein aufgrund der physikalischen Abhängigkeiten, mit einer PLSR-Komponente beschrieben werden können. Zwei starke PLSR-Komponenten, wie es bei den basislinienkorrigierten Daten, bei denen die eine von der Adenin-Konzentration und die andere von der Hypoxanthin-Konzentration abhängig ist, würden bedeuten, dass die beiden Konzentrationen sich unabhängig voneinander verändern. Aus diesem Grund spiegelt das Modell mit den SNV-korrigierten Daten die physikalischen Gegebenheiten am besten wider. Auch bei der Betrachtung der Regressionsgeraden wird mit diesem Modell das beste Bestimmtheitsmaß mit 0,990 gegenüber 0,964 mit den abgeleiteten Daten und 0,963 mit den basislinienkorrigierten Daten erreicht (siehe Abbildung 5-50). Daher wird das Modell mit den SNV-korrigierten Daten für die Auswertung der Versuche verwendet.

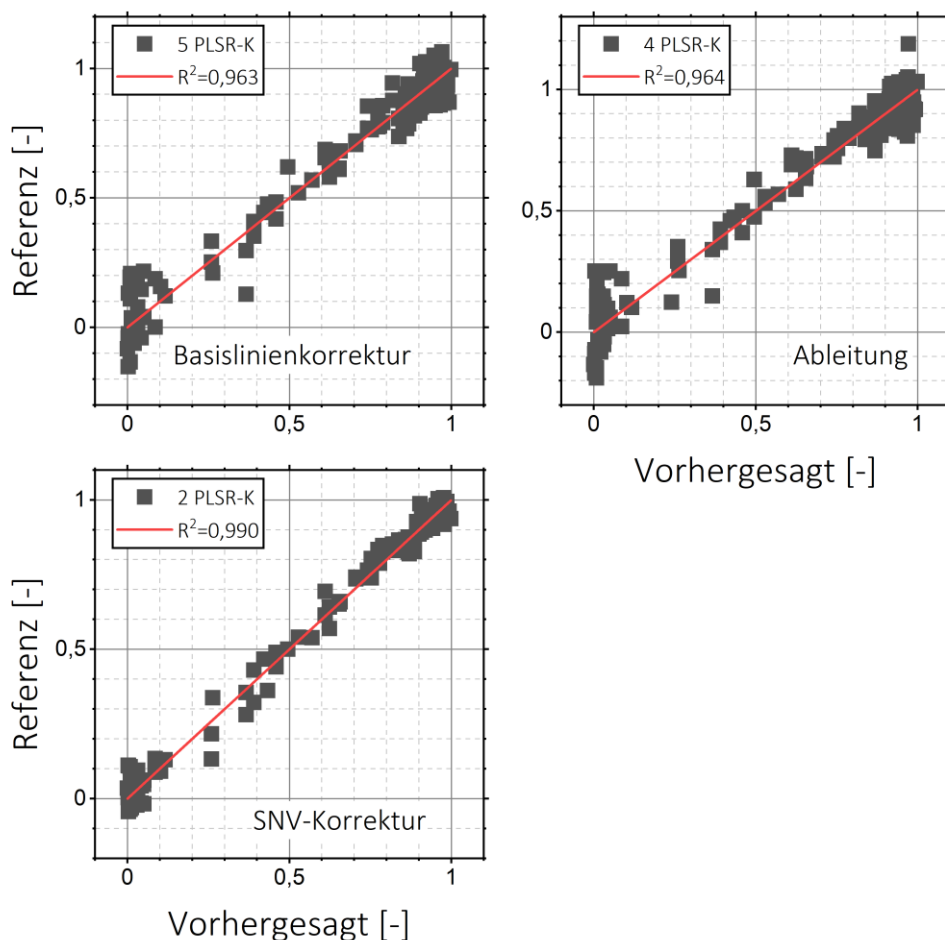


Abbildung 5-50: Regressionsgeraden für die drei verschiedenen Datensätze

5.7.3 Reaktionsdurchführung

Bei der Umsetzung von Adenin zu Hypoxanthin wird die primäre Aminogruppe durch eine Hydroxylgruppe unter Abspaltung von elementarem Stickstoff ersetzt. Dies geschieht in Anwesenheit salpetriger Säure. Durch die Entstehung von elementarem Stickstoff ist eine Rückreaktion ausgeschlossen, jedoch berichten van Slyke et al. [127], dass die Reaktion teilweise, insbesondere bei Aminosäuren teilweise nur sehr langsam (bei Cytosin und Guanin) oder gar nicht stattfindet (bei Guanidin und Kreatin). Die Reaktionsgleichung ist in Abbildung 5-51 dargestellt.

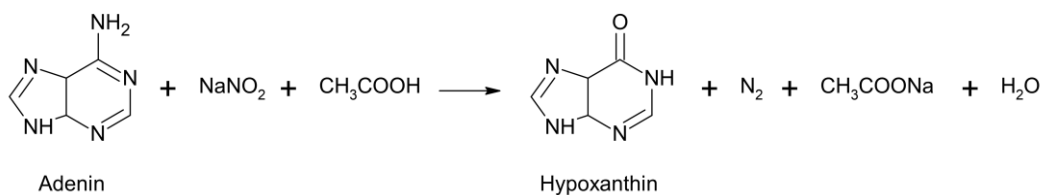


Abbildung 5-51: Reaktionsgleichung der Desaminierung von Adenin

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurden die Temperatur und die Nitrit-Konzentration verändert, um die Einflüsse dieser beiden Parameter auf den Umsatz der

Reaktion zu untersuchen. Der Aufbau für die Umsetzung von Adenin zu Hypoxanthin wird in Kapitel 4.3 beschrieben. Es wurden 100 Segmente mit einem Volumen von jeweils 800 nL erzeugt und deren Nitrit-Konzentration bei konstanter Adenin-Konzentration variiert. Die Segmente wurden in der Schlauchschleife zwei Stunden bei der entsprechenden Temperatur (50 °C, 70 °C, 80 °C) gelagert und anschließend auf einem SERS-Array abgesetzt. Jeder Versuch wurde dreimal durchgeführt. Die Messparameter sind in Kapitel 4.3 angegeben. Die Raman-Spektren der einzelnen Versuche wurden gemittelt und mittels der SNV-Korrektur verarbeitet. Anhand der Verschiebung der Bande kann bereits die Umsetzung von Adenin abgeschätzt werden. Abbildung 5-52 zeigt die Raman-Spektren im Bereich der Hauptbande und die Verschiebung des Bandenmaximums.

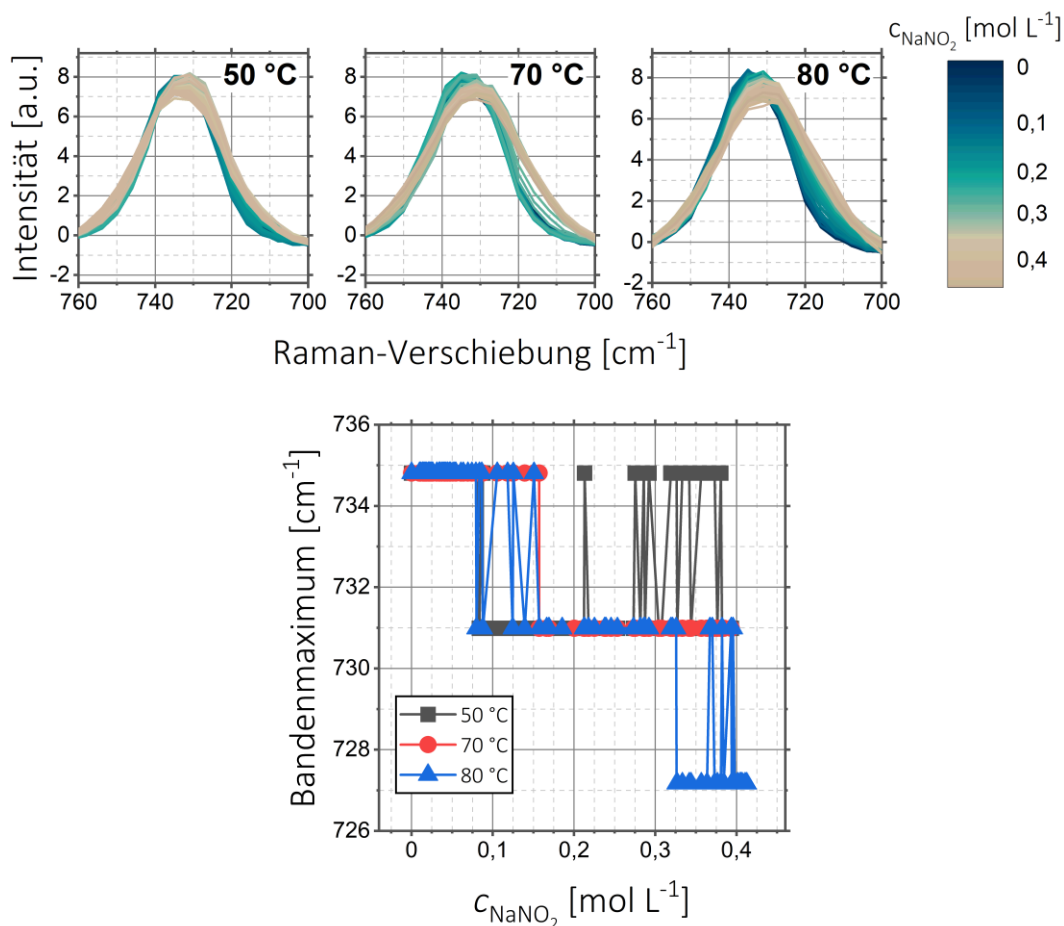


Abbildung 5-52: Raman-Spektrum im Bereich der Hauptbande und Verschiebung des Bandenmaximums in Abhängigkeit der Nitrit-Konzentration

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich das Maximum der Hauptbande bei 735 cm^{-1} in den Versuchen bei 50 °C kaum verschiebt. In den Versuchen bei 70 °C und 80 °C verschiebt sich das Maximum jedoch sehr deutlich. Abhängig von der Nitrit-Konzentration schwankt das Maximum der Bande bei 50 °C bei hohen Nitrit-Konzentrationen bis zu 0,4 mol L^{-1} zwischen 735 cm^{-1} und 731 cm^{-1} . Bei 70 °C verschiebt sich das Bandenmaximum

bei einer Nitrit-Konzentration von etwa $0,16 \text{ mol L}^{-1}$ auf 731 cm^{-1} und ändert sich bei höherer Nitrit-Konzentration nicht mehr. Bei 80 °C erfolgt die Verschiebung von 735 cm^{-1} auf 731 cm^{-1} ebenfalls bei einer Nitrit-Konzentration von $0,16 \text{ mol L}^{-1}$, bei $0,32 \text{ mol L}^{-1}$ verschiebt sich das Maximum um einen weiteren Schritt auf 727 cm^{-1} . Wie bereits erwähnt, lässt die unzureichende Spektrometerauflösung keine genaueren Aussagen zu.

Daher wurden die Daten mit der in Kapitel 5.7.2 durchgeführten Kalibrierung ausgewertet. Abbildung 5-53 zeigt die Entwicklung des Anteils an Hypoxanthin in den Segmenten bei verschiedenen Nitrit-Konzentrationen und Temperaturen.

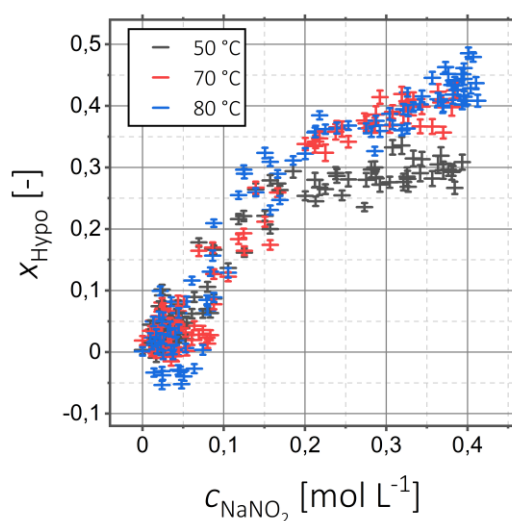


Abbildung 5-53: Stoffmengenanteil an Hypoxanthin bei unterschiedlichen Nitritkonzentrationen und Temperaturen

Bis zu einer Nitritkonzentration von etwa $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ steigt der Anteil an Hypoxanthin bei allen drei Temperaturen nahezu linear mit der Nitrit-Konzentration. Bei höheren Konzentrationen wird der Verlauf flacher. Bei 50 °C steigt der Anteil noch bis etwa 30 % bei einer Nitrit-Konzentration von $0,4 \text{ mol L}^{-1}$. Bei 70 °C erhöht sich der maximale Anteil an Hypoxanthin auf etwa 40 % und bei 80 °C auf etwa 46 %. Somit kann ein starker Einfluss der Reaktion von der Nitrit-Konzentration festgestellt werden. Ebenso zeigt sich ein Einfluss der Temperatur auf den Reaktionsfortschritt. Der Umsatz der Reaktion kann von 30 % auf über 46 % gesteigert werden.

Das hier vorgestellte Reaktionsscreening mit etwa 900 analysierten Segmenten (je 100 Segmente bei drei Temperaturstufen und drei Wiederholungen) zeigt, dass das Analysesystem eine Vielzahl an Experimenten mit einem minimalen Zeit- und Materialeinsatz durchführen kann. Dies unterstreicht die Leistungsfähigkeit des Analysesystems in Bezug auf den Durchsatz der Versuche. Weiterhin zeigt sich, dass das Analysesystem trotz der miniaturisierten Hardware gerade im Bereich der optischen Schnittstelle und des

Spektrometers ausreichend robust in Bezug auf die Mess- und Wiederholgenauigkeit ist, um größere Reaktionsscreenings durchzuführen. Neben den in Kapitel 5.5.6 dargestellten konzentrationsabhängigen Signaländerungen konnte gezeigt werden, dass das Analysesystem auch für die Analyse von stofflichen Umwandlungen eingesetzt werden kann. Die hier vorherrschende Beschränkung durch die Auflösung des Spektrometers konnte durch den Einsatz einer multivariaten Kalibrierung umgangen werden. Dies und die kompakte Bauweise sowie die automatisierten Prozessschritte ermöglichen es, das Analysesystem flexibel in verschiedenen Laboren einzusetzen, um stoffliche Informationen über die Segmentzusammensetzung bei Screenings in einem Volumenbereich von 800 - 2000 nL zu erhalten.

6 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wird die Entwicklung eines Analysesystems für mikrofluidische segmentierte Prozesse beschrieben. Das System ermöglicht es, einzelne Fluidsegmente aus mikrofluidischen Prozessen zu erkennen und deren chemischen Bestandteile unter Ausnutzung der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (engl. *surface enhanced Raman spectroscopy*, SERS) zu messen. In diesem Kapitel erfolgt eine zusammenhängende Diskussion der Ergebnisse gefolgt von der Darstellung der wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit.

6.1 Zusammenhängende Diskussion der Ergebnisse und Ausblick

SERS-aktive Polyacrylamid-Partikel (SERS-Sensorpartikel), welche ursprünglich an der Technischen Universität Ilmenau entwickelt wurden, zeigen eine hohe SERS-Verstärkung und dienen deshalb als Grundlage für die Entwicklung von drei Konzepten für die SERS-Messungen an einzelnen Fluidsegmenten. Eine Bewertung der Konzepte erfolgte nach experimenteller Analyse der SERS-Sensorpartikel hinsichtlich einer robusten und kompakten Messapparatur für Fluidsegmente mit Volumina im oberen Nanoliter-Bereich. Die SERS-Sensorpartikel zeigen ein schnelles Ansprechen auf die Testsubstanz, sowie ein zeitlich konstantes Verhalten. Das erste Konzept, das den statischen Einsatz der Partikel vorsah, wurde nicht umgesetzt, weil die Anbindung der Testsubstanzen am bzw. im SERS-aktiven Polymer teilweise so stark ist, dass anschließend umfangreiche Waschvorgänge notwendig sind, um die Testsubstanz und damit verbundenen Querkontaminationen wieder zu entfernen. Die Testsubstanz Adenin kann beispielsweise nur durch eine angesäuerte Lösung wieder von dem SERS-Sensorpartikel gelöst werden. Der prozesstechnische Aufwand, der notwendig wäre, um zwischen die zu analysierenden Segmente Waschsegmente einzufügen, würde der hier gestellten Aufgabe, eine robuste und kompakte Messmethode zu entwickeln, widersprechen.

Das zweite Konzept, bei dem die SERS-Sensorpartikel in die Segmente dosiert werden sollten, lehnt sich an den bekannten Methoden anderer Arbeitsgruppen an, welche eine kolloidale Silberlösung zu den Segmenten dosieren. Insbesondere wird die Abhängigkeit der Messzeit von der Fließgeschwindigkeit der Segmente als Nachteil betrachtet, da eine hohe Segmentfrequenz bzw. -geschwindigkeit nur kurze Integrationszeiten zur Aufnahme des Raman-Spektrums zulässt. Zwar kann durch eine Zwischenlagerung oder Abstandsvergrößerung der Segmente eine zeitliche Entzerrung erzielt werden, der prozesstechnische Aufwand wird dadurch allerdings stark erhöht. Um einen optischen Zugang mit wenig Signalverlust in den Fluidkanal zu gewährleisten, muss ein hoher technischer

Aufwand betrieben werden. Die Messung wird zusätzlich erschwert, da eine genaue Fokussierung auf die SERS-Sensorpartikel nicht gewährleistet werden kann, weil sich die Partikel innerhalb der Segmente frei bewegen können. Die Fokussierung zeigte bei der Untersuchung der SERS-Sensorpartikel einen großen Einfluss auf die Signalstärke der Messung. So schwächt eine minimale Abweichung bei der Fokussierung von $450\ \mu\text{m}$ das Signal bereits um 10 % ab. Zudem muss für die Messung im Mikrokanal eine zusätzliche Fokussierung, beispielsweise durch ein Mikroskop, erfolgen um eine hohe Signalintensität zu gewährleisten. Deshalb wurde eine Umsetzung dieses Konzepts im Hinblick auf die gestellte Messaufgabe, einen kompakten und robusten Messaufbau zu entwickeln, als nicht sinnvoll erachtet.

Um möglichst viele methodische Fehlerquellen auszuschließen und die Verwendung von relativ einfachen optischen Aufbauten wie einer Raman-Sonde zu ermöglichen, wurde ein neuartiges Konzept entwickelt und umgesetzt. Bei diesem Konzept werden die Fluidsegmente auf eine Array-Struktur mit SERS-aktiven Messstellen überführt, indem jedes Segment auf einer separaten Messstelle, die einen quellbaren, SERS-aktiven Hydrogel-Film enthält, abgesetzt wird. Sowohl das Absetzen von seriell anfallenden Segmenten auf parallele Messstellen als auch die Anordnung von SERS-Messstellen in einer Arraystruktur sind bereits bekannte Methoden. Durch die Kopplung dieser beiden Techniken wird jedoch eine neuartige Messmethode realisiert, die in vielerlei Hinsicht vorteilhaft ist. Zum einen erfolgt eine zeitliche Entkopplung der Messung von der Frequenz und Geschwindigkeit der Segmente, zum anderen ermöglicht diese Methode einen direkten optischen Zugang zu dem SERS-aktiven Polymer und eine exakte Positionierung der SERS-aktiven Oberfläche in der Fokusebene der Raman-Sonde. Dies erlaubt den Einsatz von Raman-Spektrometern, die ohne aufwendige optische Systeme auskommen und dadurch einen kompakten Aufbau ermöglichen. Die technische Umsetzung, Validierung und Testung dieses Konzeptes erfolgten im weiteren Verlauf dieser Arbeit.

Um die Fluidsegmente zuverlässig abzusetzen, wurde eine Zelle entwickelt, die durch eine optische Lichtschranke die Segmente detektiert. Die entwickelte Durchflusszelle ist so konstruiert, dass äußere Einflüsse das Signal nicht stören können. So ist gewährleistet, dass die Signale über einen längeren Zeitraum ($> 10\ \text{min}$) stabil bleiben und eine zuverlässige Detektion der Tropfen erfolgen kann. Das entwickelte System kann Segmente mit einer Frequenz von bis zu 1,5 Hz zuverlässig absetzen. Die Segmentdetektion ist in die Software zur Steuerung des Analysesystems integriert und ermöglicht es, dass die Verbindung zum vorgeschalteten fluidischen Prozess nur über die Transferkapillare erfolgt und keine weitere Kommunikationsschnittstelle benötigt wird. Auf diese Weise kann eine

einfache Anbindung des Analysesystems an verschiedene fluidische Prozesse stattfinden. Die Software, die in der Entwicklungsumgebung LabView® entwickelt wurde, ist in drei parallellaufende Schleifen aufgeteilt. Diese steuern die analogen Ein-/Ausgabensignale, die Achsenbewegung und die Raman-Messung. Die parallele Programmierung ermöglicht es, durch die Nutzung interner Variablen die Prozessschritte in unterschiedlichen Reihenfolgen ablaufen zu lassen. Dadurch ist es möglich, Abläufe wie das Absetzen der Segmente, die Raman-Messung und die Dosierung der Silbersalz-Monomerlösung, mit derselben Software zu steuern.

Das SERS-Array, auf dessen SERS-aktiven Messstellen die Fluidsegmente abgesetzt werden, ist auf einer hydrophoben Glasplatte aufgebaut, auf der hydrophile Stellen durch Laserablation zuvor erzeugt werden. Durch die Verwendung von gepulster Laserstrahlung (10 ps) erfolgt ein definierter Abtrag der Oberfläche (120 nm pro Überfahrt). Mit diesem Verfahren wurden im Laufe dieser Arbeit Arrays mit 324 runden und quadratischen hydrophilen Stellen hergestellt.

Der SERS-aktive Hydrogel-Film wird durch das Auftragen einer Silbersalz-Monomerlösung, bestehend aus Acrylamid, Quervernetzer, Silbernitrat und einem Photoinitiator, sowie anschließender photochemischer Aushärtung direkt auf dem Arraysubstrat erzeugt. Durch die Zugabe eines Reduktionsmittels (Ascorbinsäure) und zusätzlichem Silbernitrat wird das Polymer weiter mit elementarem Silber angereichert. Zum Aufbringen der Monomerlösung werden die Tauchbeschichtung und die Dosiermethode angewendet. Mit beiden Methoden ist eine gleichmäßige und exakte Benetzung der Messstellen realisierbar. Die Dosiermethode hat aber zwei Vorteile, zum einen wird weniger Ausgangsmaterial benötigt, das aufgrund der Lichtempfindlichkeit von Silbernitrat ohnehin nicht lange aufbewahrt und auch nicht wiederaufbereitet werden kann. Zum anderen kann durch die Dosiermethode die Füllmenge pro Messstelle exakt eingestellt werden. Das ist von Vorteil, da je nach Füllmenge die Oberfläche des Polymers, aufgrund der Benetzung und der Oberflächenspannung, unterschiedlich stark gekrümmt ist. Diese Abweichungen von der Fokusebene sind ausreichend, um Schwankungen in der Signalintensität zu verursachen. Beispielsweise hat das Raman-Signal bei runden Messstellen mit 200 µm Tiefe bei einer Füllmenge von 1,0 µL eine Abweichung von 5 % und bei einer Füllmenge von 1,5 µL bereits von 16 %. Daher ist die Dosiermethode zu bevorzugen und wurde für die Herstellung der SERS-Arrays in dieser Arbeit verwendet. Bei der Aushärtung ist ein fünffacher Überschuss des Photoinitiators im Vergleich zur Silberkonzentration und eine Belichtungszeit größer neun Minuten notwendig, um das Polymer vollständig auszuhärten und zu gewährleisten, dass das Silbernitrat in der

Silbersalz-Monomerlösung zu elementarem Silber reduziert wird. Andernfalls fällt das Silbernitrat bei der anschließenden Nachverstärkung als fein verteiltes Silber aus, ein reproduzierbares Wachstum der Partikel ist dadurch nicht gewährleistet.

Die Entwicklung des neuartigen SERS-Substrates in Form eines Hydrogel-Films erfolgte auf Grundlage der Zusammensetzung der SERS-Sensorteilchen. Zur Applikation auf einem Glasträger musste die Polymerzusammensetzung vor allem hinsichtlich der Haftung, der Quellung, der Aushärtung sowie der Lösemittelverdampfung während des Herstellungsprozesses verändert werden. Die Untersuchungen zeigten, dass das Polymer durch den Quervernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid (MBA) sehr spröde wird, schlecht auf dem Glas haftet und das Quellverhalten bei unter 30 % liegt. Die Polymere, bei denen der Quervernetzer N,N'-Diallylweinsäurediamid (DATD) verwendet wurde, sind weicher und haben eine gute Haftung sowie ein gutes Quellverhalten (30 - 60 %). Der Anteil an Quervernetzer beeinflusst die Härte der Polymere. Ist beispielsweise der Anteil von DATD zu gering, bleiben die Lösungen flüssig und haben keine gute Bindung zum Glasträger. Weiterhin zeigte sich, dass durch eine Erhöhung der Gesamtmenge an Acrylamid in der Monomerlösung (Totalamidkonzentration) die Quelleigenschaften des späteren Polymers beeinflusst werden können. Unabhängig von dem verwendeten Quervernetzer steigt die Fähigkeit Wasser aufzunehmen mit der Totalamidkonzentration leicht an. Gute Gesamteigenschaften sowie eine gute Haftung auf dem Glasträger und eine Quellung von 61 % werden für das Polymer mit DATD als Quervernetzer, einer Totalamidkonzentration von 30 % und einem Vernetzungsgrad von 5 % erreicht. Jedoch wird in der Zeitspanne, die zum Aufbringen der Monomerlösung notwendig ist (ca. fünf Minuten), eine starke Verdunstung des Lösemittels (Wasser) beobachtet, welche nicht steuerbar ist und so zu ungleichmäßigen SERS-Messstellen führen kann. Durch die Zugabe von Ethylenglykol (50 %) ins Lösungsmittel kann der relative Masseverlust eines Tropfenvolumens mit ca. 3 µL in sieben Minuten von 40 % auf 10 % reduziert werden. Die resultierende Änderung des Lösungsvermögens von 30 % auf 22,5 %, bezogen auf die Totalamidkonzentration, zeigt keine Auswirkungen auf die Konsistenz und Haftung des Polymers.

Durch die Variation des Silbergehalts im Grundpolymer (Ag-K) und bei der Nachverstärkung (Ag-NV), bei der Silberkeime im Polymer erzeugt werden (Ag-K) und anwachsen (Ag-NV), können die SERS-Verstärkung und die Messgenauigkeit des SERS-Polymers beeinflusst werden. Bei einer Konzentration von Ag-K kleiner 10 mmol L⁻¹ erfolgt eine homogenere Verteilung der Silberpartikel, wodurch gleichzeitig eine geringere Streuung bei der Messung auftritt. Die Konzentration von Ag-NV hat einen starken Einfluss auf die SERS-Verstärkung. Anhand von REM- und UV-VIS-Aufnahmen der Polymere

ist ersichtlich, dass zu Beginn die Partikelgröße und -anzahl mit der Silberkonzentration steigen, weshalb auch die SERS-Verstärkung steigt. Ab einer bestimmten Konzentration kommt es zu ungleichmäßigen Strukturen auf der Oberfläche bis hin zu einer Bedeckung mit einem Silberfilm. Infolgedessen sinkt die SERS-Verstärkung. Dies wird bei Ag-NV Konzentrationen größer 120 - 200 mmol L⁻¹ beobachtet. Bei einer geringen Konzentration an Ag-K (< 10 mmol L⁻¹) und einer mittleren Konzentration an Ag-NV (80 - 100 mmol L⁻¹) weisen die Polymere die höchsten SERS-Verstärkungen und die geringsten Messabweichungen auf.

Die mit dem optimierten SERS-aktiven Hydrogel-Film hergestellten SERS-Arrays weisen gute Werte bezogen auf die Wiederholgenauigkeit der Raman-Messungen und die Verwendungsdauer auf. So können die SERS-Arrays nicht nur über einen längeren Zeitraum (93 Tage) nach der Herstellung verwendet werden, sondern auch noch 30 Tage nachdem die SERS-Messstellen beladen wurden, ohne dass signifikante Signalverluste auftreten. Dies ermöglicht zum einen, die SERS-Arrays zu bevorraten, und zum anderen, die Parameter bei der Raman-Messung durch wiederholte Messungen zu optimieren, da die Signale auch noch sehr lange nach den Versuchen ausgewertet werden können. Aus diesen Gründen eignet sich diese Methode besonders für Screening-Anwendungen, die aufgrund ihrer Komplexität nicht beliebig oft wiederholt werden können. Beispiele sind die Untersuchung mehrdimensionaler Konzentrationsräume, das Hintereinanderschalten mehrerer Prozessschritte oder die Verwendung seltener Kulturen von Mikroorganismen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen auf den SERS-Messstellen wurde eine Abweichung von 13,6 % ermittelt. Die Abweichungen innerhalb der Messstellen schwanken von 0,6 % bis 14,4 %. Diese Schwankungen können durch nicht gleichmäßige Bedingungen bei der Dosierung der Lösungen oder durch Höhenunterschiede der Messstellen verursacht werden.

Zusätzlich zu den SERS-Daten können auch die Daten der Segmenterkennung genutzt werden, um die Opazität der Segmente, beispielsweise hervorgerufen von Farbstoffen oder erhöhter Biomasse, zu bestimmen. Die so gewonnenen Extinktionswerte können später den Messstellen zuverlässig zugeordnet werden. Durch die Analyse einer Sequenz mit steigender Konzentration des Farbstoffs Kristallviolett konnte gezeigt werden, dass die Extinktionswerte gut mit den Raman-Intensitäten korrelieren und das Überführen der seriell anfallenden Segmente auf parallele Messstellen zuverlässig erfolgt.

Um die Leistungsfähigkeit einordnen zu können, wurde das entwickelte Analysesystem mit anderen Messmethoden verglichen, die SERS-Messungen an einzelnen Fluidsegmenten ermöglichen. In Bezug auf den Durchsatz an Segmenten ist das entwickel-

te Analysensystem mit einer Frequenz von 1,5 Hz gegenüber den Systemen von Dugandžić et al. [24] (<0,34 Hz) und Strehle et al. [118] (0,1 Hz) überlegen. Eine Methode, die von Cecchini et al. [55] angewendet wird, erreicht mit 14 Hz eine höhere Frequenz und damit den höchsten Durchsatz an Segmenten. Diese Methode nutzt zusätzlich zu SERS noch die resonante Raman-Streuung (SERRS) aus, was jedoch nur auf chromophore Moleküle anwendbar ist, da die Anregung meist im sichtbaren Bereich stattfindet. Während in dieser Arbeit ein kompaktes Raman-Spektrometer verwendet wird, kommen bei den Vergleichssystemen hochauflösende und hochpreisige Raman-Mikroskope zum Einsatz, die eine deutlich höhere Empfindlichkeit erreichen. Trotzdem konnten in dieser Arbeit durch die optimierte Messmethode geringe Nachweisgrenzen erreicht werden. So liegt die erreichte Nachweisgrenze von Adenin mit $1,87 \mu\text{mol L}^{-1}$ nur um zwei Größenordnungen höher als im Vergleichssystem von Dugandžić et al. [24] mit $32,7 \text{ nmol L}^{-1}$. Für Kristallviolett wurde mit dem entwickelten System eine Nachweisgrenze von $23,5 \text{ nmol L}^{-1}$ erreicht, wohingegen Strehle et al. [118] nur $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ als geringste gemessene Konzentration angeben, jedoch ohne explizite Bestimmung der NG. Die Messungenauigkeiten des SERS-Arrays liegen mit 13,6 % zwischen den Messstellen nur etwas höher als die von Dugandžić et al. [24] (8 - 13 %) und Strehle et al. [118] (4,9 %). Die Messungen zeigen aber auch, dass die obere Grenze des linearen Bereichs, in dem eine zuverlässige Quantifizierung möglich ist, auf dem SERS-Array mit $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ deutlich höher liegt als beispielsweise bei der Methode, die von Dugandžić et al. [24] vorgestellt wurde ($6 \mu\text{mol L}^{-1}$). Dadurch kann Adenin bis etwa $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ und Kristallviolett bis etwa $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ zuverlässig quantifiziert werden.

Das Analysensystem wurde zur Untersuchung der Desaminierung von Adenin zu Hypoxanthin verwendet. Adenin ist als ein wichtiger Baustein im menschlichen Körper an vielen Prozessen, wie zum Beispiel beim Energietransfer oder in der Erbgutspeicherung, beteiligt. Die Desaminierung von Adenin mit Natriumnitrit eignet sich gut für die Demonstration in dieser Arbeit, da Adenin eine gute Anbindung an die Silberoberfläche hat, was vorteilhaft für die SERS-Verstärkung ist. Die Bestimmung der Konzentrationen von Adenin und Hypoxanthin kann nicht über die Bandenhöhen erfolgen, da die beiden Hauptbanden sich überlagern. Über die Verschiebung des Bandenmaximums kann zwar der Anteil der jeweiligen Stoffe abgeschätzt werden, was sich wegen der geringen Verschiebung von 14 Wellenzahlen bei einer Auflösung von 4 - 6 Wellenzahlen allerdings als zu ungenau erwiesen hat. Aus diesem Grund wurde die Konzentration über eine multivariate Kalibrierung (PLSR) bestimmt.

Durch die Datenvorbehandlung der Spektren mittels SNV-Transformation, bei der das Spektrum auf seinen Mittelwert zentriert wird, kann das Modell mit der besten Näherung im Vergleich zur Basislinienkorrektur und der 1. Ableitung erhalten werden. Das Modell mit den SNV-transformierten Daten spiegelt auch die physikalischen Bedingungen am besten wieder. So werden bei diesem Modell 97 % der Varianz des Datensatzes mit der ersten PLSR-Komponente, die positive Faktorenladungen im Bereich der Raman-Banden von Adenin und negative Faktorenladungen im Bereich der Raman-Banden von Hypoxanthin aufweist, beschrieben. Dies ist insofern mit den physikalischen Gegebenheiten stimmig, weil zum einen die Hauptkomponenten des Modells linear unabhängig voneinander sind und zum anderen die Konzentration von Adenin und Hypoxanthin durch die Umsetzung voneinander abhängig sind. Die beiden anderen Modelle enthalten zwei dominante PLSR-Komponenten, wobei die erste Komponente Faktorenladungen im Bereich der Raman-Banden von Adenin und die zweite im Bereich von Hypoxanthin beinhalten.

Bei dieser unter normalen Bedingungen sehr langsamen Reaktion zeigten die Analysen mit dem SERS-Analysesystem, dass sowohl die Temperatur als auch die Konzentration an Natriumnitrit einen starken Einfluss auf den Umsatz der Reaktion haben. So steigt der Umsatz bis zu einer Konzentration von 200 mmol L⁻¹ linear und bei höheren Konzentrationen bis zu 400 mmol L⁻¹ asymptotisch gegen einen Maximalwert an. Durch eine Temperaturerhöhung kann der Umsatz von 30 % bei 50 °C auf 40 % bei 70 °C bzw. 46 % bei 80 °C erhöht werden.

Abschließend ist festzuhalten, dass die entwickelte Methode durch Überführung der seriellen Segmente auf eine parallele Arraystruktur mit einem neuartigen SERS-aktiven Hydrogel-Film die Messung so weit vereinfacht, dass sie in einem kompakten System umgesetzt werden kann. Deshalb ist es möglich, die Methode sehr einfach und ortsunabhängig einzusetzen. Das SERS-Analysesystem ermöglicht neben der Identifizierung und der Quantifizierung von Stoffen innerhalb der Segmente auch die Reaktionsverfolgung mit minimalem Materialeinsatz. Somit können die chemischen und physikalischen Einflüsse auf die jeweilige Reaktion analysiert werden und zum Verständnis der ablaufenden Mechanismen beitragen.

Zukünftig kann das entwickelte Analysesystem in mikrobiologischen Screenings angewendet werden, bei denen Veränderungen im Metabolismus oder Veränderungen der Aktivität von Mikroorganismen untersucht werden. Eine naheliegende Anwendung ist die Konzentrationsverfolgung von Adenin, das von Mikroorganismen als Stickstoffquelle verwendet wird. Weiterhin besteht mit der entwickelten Methodik die Möglichkeit,

Fluidsegmente aus einer Schlauchspule verzögert zu analysieren. Dies würde den Zugang zu kinetischen Informationen bieten. Da jedoch die Absetzvorgänge im Sekundenbereich liegen und Mehrfachmessungen notwendig sind, würde eine zeitliche Auflösung im hohen einstelligen Minutenbereich liegen.

6.2 Auflistung der wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit

Ein transportables Analysesystem, das seriell anfallende Fluidsegmente schnell analysiert, war das zentrale Ziel dieser Arbeit, um die Lücke einer fehlenden, markierungsfreien und kompakten Messmethode zu schließen und für eine Vielzahl von Anwendungen Zugang zur chemischen Analyse von Fluidsegmenten zu ermöglichen. Aus diesem Grund wurde bei der Entwicklung der Analysemethode besonders auf die Robustheit der Messung und einen kompakten Messaufbau geachtet. Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit verschiedene Fragestellungen formuliert, untersucht und beantwortet. Die wichtigsten Erkenntnisse sind im Folgenden dargestellt.

1. Die Adsorption des Analyten erfolgt instantan und vollständig und ist somit bei der Raman-Messung nicht geschwindigkeitsbestimmend. Jedoch können die Analyten derart stark an die SERS-aktiven Komposit-Sensorpartikel adsorbieren, dass eine dynamische Messung aufeinanderfolgender Testsubstanzen an einem Sensorpartikel sehr aufwendig ist.
2. Durch die Überführung der seriell anfallenden Fluidsegmente auf eine Trägerplatte mit parallelen SERS-Messstellen kann der Messaufwand derart reduziert werden, dass kompakte Prozessspektrometer ohne aufwendige Maßnahmen zur Fokussierung verwendet werden können. Eine optische Segmentdetektion ermöglicht das Absetzen ohne Softwareschnittstelle zum vorgeschalteten Prozess. Die einzige fluidische Verbindung zum vorgeschalteten Prozess kann durch eine Transferkapillare realisiert werden.
3. Die Herstellung eines polymeren SERS-Substrats mit parallelen Messstellen in Form eines Arrays kann reproduzierbar durch eine automatische Dosierung einer Silbersalz-Monomerlösung erfolgen. Eine Wölbung der Oberfläche des Polymers kann durch eine Anpassung der Dosiermenge minimiert werden, um starke Signalabweichungen auf den Messstellen durch Defokussierung zu unterbinden. Durch den Silbergehalt in der Ausgangslösung und in einer Nachverstärkungs-Lösung kann die Wiederholbarkeit und die Höhe der SERS-Verstärkung optimiert werden.

4. Durch das in dieser Arbeit entwickelte Analysesystem kann der Durchsatz für die SERS-Analyse einzelner Segmente mit 1,5 Hz mindestens um den Faktor fünf im Vergleich zu bisherigen Methoden gesteigert werden. Die Linearität ist auch bei höheren Konzentrationen gegeben, wodurch die Analyten in höheren Konzentrationsbereichen als bei den Vergleichssystemen quantitativ bestimmt werden können. Abstriche in Bezug auf die Empfindlichkeit der Messungen sind jedoch aufgrund der geringeren Leistungsfähigkeit kompakter Spektrometer nicht zu vermeiden.

5. Voraussetzung für die Analyse einer Substanz ist deren Raman- bzw. SERS-Aktivität. Quantitative Messungen sind innerhalb gewisser Konzentrationsgrenzen (abhängig von der Testsubstanz) möglich, in denen sich das Raman-Signal linear mit der Konzentration ändert. Die Abweichungen liegen mit einer relativen Standardabweichung von 14 % im Bereich anderer SERS-Methoden. Chemische Umwandlungen können anhand von Bandenverschiebungen verfolgt werden und durch multivariate Auswertemethoden kann die geringere spektrale Auflösung der kompakten Detektoren ausgeglichen werden. Zudem können durch eine zeitlich verzögerte Analyse der Mikrofluidsegmente kinetische Informationen erzeugt werden.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Hessel, V., Löwe, H., Müller, A., Kolb, G. (2005) *Chemical Micro Process Engineering*, Wiley, Weinheim.
- 2 Wiles, C. and Watts, P. (2012) Continuous flow reactors: a perspective. *Green Chemistry*, **14** (1), 38–54.
- 3 Tabeling, P. (2005) *Introduction to microfluidics*, Oxford Univ. Press, Oxford.
- 4 Macarron, R., Banks, M.N., Bojanic, D., Burns, D.J., Cirovic, D.A., Garyantes, T., Green, D.V.S., Hertzberg, R.P., Janzen, W.P., Paslay, J.W., Schopfer, U., Sittampalam, G.S. (2011) Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nature Reviews Drug Discovery*, **10** (3), 188–195.
- 5 James Inglese and Douglas S. Auld (2008) High Throughput Screening (HTS) Techniques: Applications in Chemical Biology, in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, American Cancer Society, pp. 1–15.
- 6 Theberge, A.B., Mayot, E., El Harrak, A., Kleinschmidt, F., Huck, W.T.S., Griffiths, A.D. (2012) Microfluidic platform for combinatorial synthesis in picolitre droplets. *Lab on a Chip*, **12** (7), 1320–1326.
- 7 Martin, K., Henkel, T., Baier, V., Grodrian, A., Schön, T., Roth, M., Köhler, J.M., Metze, J. (2003) Generation of larger numbers of separated microbial populations by cultivation in segmented-flow microdevices. *Lab on a Chip*, **3** (3), 202–207.
- 8 Song, H., Chen, D.L., Ismagilov, R.F. (2006) Reactions in droplets in microfluidic channels. *Angewandte Chemie - International Edition*, **45** (44), 7336–7356.
- 9 Köhler, J.M. and Cahill, B.P. (2014) *Micro-segmented flow: Applications in chemistry and biology*, Springer, Berlin.
- 10 Tice, J.D., Song, H., Lyon, A.D., Ismagilov, R.F. (2003) Formation of Droplets and Mixing in Multiphase Microfluidics at Low Values of the Reynolds and the Capillary Numbers. *Langmuir*, **19** (22), 9127–9133.
- 11 Malsch, D., Kielpinski, M., Merthan, R., Albert, J., Mayer, G., Köhler, J.M., Suse, H., Stahl, M., Henkel, T. (2008) μ PIV-Analysis of Taylor flow in micro channels. *Chemical Engineering Journal*, **135**, S166-S172.
- 12 Günther, A. and Jensen, K.F. (2006) Multiphase microfluidics: from flow characteristics to chemical and materials synthesis. *Lab on a Chip*, **6** (12), 1487–1503.
- 13 Cao, J., Kürsten, D., Schneider, S., Knauer, A., Günther, P.M., Köhler, J.M. (2012) Uncovering toxicological complexity by multi-dimensional screenings in

- microsegmented flow: modulation of antibiotic interference by nanoparticles. *Lab on a Chip*, **12** (3), 474–484.
- 14 Zang, E., Brandes, S., Tovar, M., Martin, K., Mech, F., Horbert, P., Henkel, T., Figge, M.T., Roth, M. (2013) Real-time image processing for label-free enrichment of Actinobacteria cultivated in picolitre droplets. *Lab on a Chip*, **13** (18), 3707–3713.
 - 15 Inoue, I., Wakamoto, Y., Moriguchi, H., Okano, K., Yasuda, K. (2001) On-chip culture system for observation of isolated individual cells. *Lab on a Chip*, **1** (1), 50–55.
 - 16 Villa, M.M., Bloom, R.J., Silverman, J.D., Durand, H.K., Jiang, S., Wu, A., Dallow, E.P., Huang, S., You, L., David, L.A. (2020) Interindividual Variation in Dietary Carbohydrate Metabolism by Gut Bacteria Revealed with Droplet Microfluidic Culture. *mSystems*, **5** (3), e00864-19.
 - 17 Küster, S.K., Fagerer, S.R., Verboket, P.E., Eyer, K., Jefimovs, K., Zenobi, R., Dittrich, P.S. (2013) Interfacing droplet microfluidics with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: label-free content analysis of single droplets. *Analytical Chemistry*, **85** (3), 1285–1289.
 - 18 Wink, K., Mahler, L., Beulig, J.R., Piendl, S.K., Roth, M., Belder, D. (2018) An integrated chip-mass spectrometry and epifluorescence approach for online monitoring of bioactive metabolites from incubated Actinobacteria in picoliter droplets. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **410** (29), 7679–7687.
 - 19 Schlücker, S. (2010) *Surface enhanced Raman spectroscopy: Analytical, biophysical and life science applications*, Wiley-VCH, Weinheim.
 - 20 Mosier-Boss, P.A. (2017) Review of SERS Substrates for Chemical Sensing. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, **7** (6), 142.
 - 21 Köhler, J.M., März, A., Popp, J., Knauer, A., Kraus, I., Faerber, J., Serra, C. (2013) Polyacrylamid/silver composite particles produced via microfluidic photopolymerization for single particle-based SERS microsensors. *Analytical Chemistry*, **85** (1), 313–318.
 - 22 Visaveliya, N., Lenke, S., Köhler, J.M. (2015) Composite Sensor Particles for Tuned SERS Sensing: Microfluidic Synthesis, Properties and Applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*, **7** (20), 10742–10754.
 - 23 März, A., Henkel, T., Cialla, D., Schmitt, M., Popp, J. (2011) Droplet formation via flow-through microdevices in Raman and surface enhanced Raman spectroscopy-concepts and applications. *Lab on a Chip*, **11** (21), 3584–3592.

-
- 24 Dugandžić, V., Hidi, I.J., Weber, K., Cialla-May, D., Popp, J. (2016) In situ hydrazine reduced silver colloid synthesis - Enhancing SERS reproducibility. *Analytica Chimica Acta*, **946**, 73–79.
 - 25 Gao, R., Choi, N., Chang, S.-I., Lee, E.K., Choo, J. (2014) Real-time analysis of diaquat dibromide monohydrate in water with a SERS-based integrated microdroplet sensor. *Nanoscale*, **6** (15), 8781–8786.
 - 26 Angelescu, D.E. (2011) *Highly integrated microfluidics design*, Artech House, Boston, Mass.
 - 27 Song, H., Tice, J.D., Ismagilov, R.F. (2003) A microfluidic system for controlling reaction networks in time. *Angewandte Chemie - International Edition*, **42** (7), 768–772.
 - 28 Dreyfus, R., Tabeling, P., Willaime, H. (2003) Ordered and disordered patterns in two-phase flows in microchannels. *Physical Review Letters*, **90** (14), 144505.
 - 29 Lashkaripour, A., Rodriguez, C., Ortiz, L., Densmore, D. (2019) Performance tuning of microfluidic flow-focusing droplet generators. *Lab on a Chip*, **19** (6), 1041–1053.
 - 30 Rayleigh (1878) On The Instability Of Jets. *Proceedings of the London Mathematical Society*, **s1-10** (1), 4–13.
 - 31 Müller, U. (2016) Strömungen mit mehreren Phasen, in *Prandtl - Führer durch die Strömungslehre: Grundlagen und Phänomene*, 14. Auflage, Springer Fachmedien, Wiesbaden, pp. 477–542.
 - 32 Vladisavljević, G., Al Nuamani, R., Nabavi, S. (2017) Microfluidic Production of Multiple Emulsions. *Micromachines*, **8** (3), 75.
 - 33 Baroud, C.N., Gallaire, F., Dangla, R. (2010) Dynamics of microfluidic droplets. *Lab on a Chip*, **10** (16), 2032–2045.
 - 34 Erb, R.M., Obrist, D., Chen, P.W., Studer, J., Studart, A.R. (2011) Predicting sizes of droplets made by microfluidic flow-induced dripping. *Soft Matter*, **7** (19), 8757–8761.
 - 35 Garstecki, P., Fuerstman, M.J., Stone, H.A., Whitesides, G.M. (2006) Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction-scaling and mechanism of break-up. *Lab on a Chip*, **6** (3), 437–446.
 - 36 Kovalchuk, N.M., Sagisaka, M., Steponavicius, K., Vigolo, D., Simmons, M.J.H. (2019) Drop formation in microfluidic cross-junction: jetting to dripping to jetting transition. *Microfluidics and Nanofluidics*, **23** (8), 103.
 - 37 Nunes, J.K., Tsai, S.S.H., Wan, J., Stone, H.A. (2013) Dripping and jetting in microfluidic multiphase flows applied to particle and fiber synthesis. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **46** (11), 114002.
-

-
- 38 Li, D. (2015) *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, Springer New York, New York, NY, s.l.
- 39 Song, H., Bringer, M.R., Tice, J.D., Gerdt, C.J., Ismagilov, R.F. (2003) Experimental test of scaling of mixing by chaotic advection in droplets moving through microfluidic channels. *Applied Physics Letters*, **83** (12), 4664–4666.
- 40 Malsch, D. (2014) Strömungsphänomene der tropfenbasierten Mikrofluidik. Technische Universität Ilmenau. Dissertation.
- 41 Angeli, P. and Gavriilidis, A. (2008) Hydrodynamics of Taylor flow in small channels: A Review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part C: Journal of Mechanical Engineering Science*, **222** (5), 737–751.
- 42 Köhler, J.M., Henkel, T., Grodrian, a., Kirner, T., Roth, M., Martin, K., Metze, J. (2004) Digital reaction technology by micro segmented flow - components, concepts and applications. *Chemical Engineering Journal*, **101** (1-3), 201–216.
- 43 Kenig, E.Y., Su, Y., Lautenschleger, A., Chasanis, P., Grünewald, M. (2013) Micro-separation of fluid systems: A state-of-the-art review. *Separation and Purification Technology*, **120**, 245–264.
- 44 Cao, J. (2015) Mikrofluidisches System mit integrierter Multisensorik für mehrdimensionale Screenings in der miniatorisierten Umwelttoxikologie. Technische Universität Ilmenau. Dissertation.
- 45 Sahoo, H. (2012) Fluorescent labeling techniques in biomolecules: a flashback. *RSC Advances*, **2** (18), 7017.
- 46 Roger, O., Collic-Jouault, S., Ratiskol, J., Siquin, C., Guezennec, J., Fischer, A., Chevotot, L. (2002) Polysaccharide labelling: impact on structural and biological properties. *Carbohydrate Polymers*, **50** (3), 273–278.
- 47 Skoog, D.A. and Leary, J.J. (1996) *Instrumentelle Analytik: Grundlagen - Geräte - Anwendungen*, Springer, Berlin.
- 48 Karas, M. and Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, **60** (20), 2299–2301.
- 49 Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (New York, N.Y.)*, **246** (4926), 64–71.
- 50 Kelly, R.T., Page, J.S., Marginean, I., Tang, K., Smith, R.D. (2009) Dilution-free analysis from picoliter droplets by nano-electrospray ionization mass spectrometry. *Angewandte Chemie - International Edition*, **48** (37), 6832–6835.
-

-
- 51 Fidalgo, L.M., Whyte, G., Ruotolo, B.T., Benesch, J.L.P., Stengel, F., Abell, C., Robinson, C.V., Huck, W.T.S. (2009) Coupling microdroplet microreactors with mass spectrometry: reading the contents of single droplets online. *Angewandte Chemie - International Edition*, **48** (20), 3665–3668.
- 52 Beulig, J.R., Warias, R., Heiland, J.J., Ohla, S., Zeitler, K., Belder, D. (2017) A droplet-chip/mass spectrometry approach to study organic synthesis at nanoliter scale. *Lab on a Chip*, **17** (11), 1996–2002.
- 53 Jahn, I.J., Žukovskaja, O., Zheng, X.-S., Weber, K., Bocklitz, T.W., Cialla-May, D., Popp, J. (2017) Surface-enhanced Raman spectroscopy and microfluidic platforms: challenges, solutions and potential applications. *The Analyst*, **142** (7), 1022–1047.
- 54 Lee, P.C. and Meisel, D. (1982) Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry*, **86** (17), 3391–3395.
- 55 M. P. Cecchini, J. Hong, C. Lim, J. Choo, T. Albrecht, A. J. Demello and J. B. Edel (2011) Ultrafast Surface Enhanced Resonance Raman Scattering Detection in Detection in Droplet-Based Microfluidic Systems. *Analytical Chemistry*, **83** (8), 3076–3081.
- 56 Schlücker, S. (2014) Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie: Konzepte und chemische Anwendungen. *Angewandte Chemie*, **126** (19), 4852–4894.
- 57 Aroca, R.F. (2006) *Surface-enhanced vibrational spectroscopy*, Wiley, Chichester.
- 58 McCreery, R.L. (2000) *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA.
- 59 Hartschuh, A., Sánchez, E.J., Xie, X.S., Novotny, L. (2003) High-resolution near-field Raman microscopy of single-walled carbon nanotubes. *Physical Review Letters*, **90** (9), 95503.
- 60 Dieringer, J.A., McFarland, A.D., Shah, N.C., Stuart, D.A., Whitney, A.V., Yonzon, C.R., Young, M.A., Zhang, X., van Duyne, R.P. (2006) Surface enhanced Raman spectroscopy: new materials, concepts, characterization tools, and applications. *Faraday Discussions*, **132**, 9–26.
- 61 Xu, Aizpurua, J., Kall, Apell, P. (2000) Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced raman scattering. *Physical Review. E, Statistical physics, plasmas, fluids, and related interdisciplinary topics*, **62** (3 Pt B), 4318–4324.
- 62 Fang, Y., Seong, N.-H., Dlott, D.D. (2008) Measurement of the distribution of site enhancements in surface-enhanced Raman scattering. *Science*, **321** (5887), 388–392.
-

-
- 63 Xie, Y., Wu, D.Y., Liu, G.K., Huang, Z.F., Ren, B., Yan, J.W., Yang, Z.L., Tian, Z.Q. (2003) Adsorption and photon-driven charge transfer of pyridine on a cobalt electrode analyzed by surface enhanced Raman spectroscopy and relevant theories. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **554-555**, 417–425.
- 64 Ding, S.-Y., You, E.-M., Tian, Z.-Q., Moskovits, M. (2017) Electromagnetic theories of surface-enhanced Raman spectroscopy. *Chemical Society Reviews*, **46** (13), 4042–4076.
- 65 Le Ru, E.C., Blackie, E., Meyer, M., Etchegoin, P.G. (2007) Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. *J. Phys. Chem. C*, **111** (i), 13794–13803.
- 66 Kneipp, K., Wang, Y., Kneipp, H., Perelman, L.T., Itzkan, I., Dasari, R.R., Feld, M.S. (1997) Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Physical Review Letters*, **78** (9), 1667–1670.
- 67 Jensen, T.R., Malinsky, M.D., Haynes, C.L., van Duyne, R.P. (2000) Nanosphere Lithography: Tunable Localized Surface Plasmon Resonance Spectra of Silver Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, **104** (45), 10549–10556.
- 68 Bastús, N.G., Merkoçi, F., Piella, J., Puentes, V. (2014) Synthesis of Highly Monodisperse Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles of up to 200 nm: Kinetic Control and Catalytic Properties, *Chemistry of Materials*, **26**(9), 2836–2846. *Chemistry of Materials*, **26** (9), 2836–2846.
- 69 Freeman, R.G., Grabar, K.C., Allison, K.J., Bright, R.M., Davis, J.A., Guthrie, A.P., Hommer, M.B., Jackson, M.A., Smith, P.C., Walter, D.G., Natan, M.J. (1995) Self-Assembled Metal Colloid Monolayers: An Approach to SERS Substrates. *Science (New York, N.Y.)*, **267** (5204), 1629–1632.
- 70 Toderas, F., Baia, M., Baia, L., Astilean, S. (2007) Controlling gold nanoparticle assemblies for efficient surface-enhanced Raman scattering and localized surface plasmon resonance sensors. *Nanotechnology*, **18** (25), 255702.
- 71 Ma, Z., Le Tian, Qiang, H. (2009) A facile approach for self-assembled gold nanorods monolayer films and application in surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, **9** (11), 6716–6720.
- 72 Rajapandiyam, P. and Yang, J. (2014) Photochemical method for decoration of silver nanoparticles on filter paper substrate for SERS application. *Journal of Raman Spectroscopy*, **45** (7), 574–580.
- 73 Han, C., Li, Y., Jia, Q., Bradley, L.H., Gan, Y., Yao, Y., Qu, L., Li, H., Zhao, Y. (2017) On-demand fabrication of surface-enhanced Raman scattering arrays by pen writing, and
-

- their application to the determination of melamine in milk. *Microchimica Acta*, **184** (8), 2909–2917.
- 74 Stropp, J., Trachta, G., Brehm, G., Schneider, S. (2003) A new version of AgFON substrates for high-throughput analytical SERS applications. *Journal of Raman Spectroscopy*, **34** (1), 26–32.
- 75 Yonzon, C.R., Lyandres, O., Shah, N.C., Dieringer, J.A., Duyne, R.P. (2006) Glucose Sensing with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Surface-Enhanced Raman Scattering*, **103**, 367–379.
- 76 Broers, A.N., Hoole, A., Ryan, J.M. (1996) Electron beam lithography—Resolution limits. *Microelectronic Engineering*, **32** (1-4), 131–142.
- 77 Kahl, M., Voges, E., Kostrewa, S., Viets, C., Hill, W. (1998) Periodically structured metallic substrates for SERS. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **51** (1-3), 285–291.
- 78 Lee, S. and Choi, I. (2019) Fabrication Strategies of 3D Plasmonic Structures for SERS. *BioChip Journal*, **13** (1), 30–42.
- 79 Jeon, T.Y., Kim, D.J., Park, S.-G., Kim, S.-H., Kim, D.-H. (2016) Nanostructured plasmonic substrates for use as SERS sensors. *Nano Convergence*, **3** (1), 18.
- 80 Visaveliya, N. (2015) Microfluidic Synthesis and Assembly of Multi-Scale Polymer Composite Particles Towards Sensoric and Labeling Applications. Technische Universität Ilmenau. Dissertation.
- 81 Visaveliya, N., Lenke, S., Groß, A., Köhler, J.M. (2015) Microflow SERS Measurements Using Sensing Particles of Polyacrylamide/Silver Composite Materials. *Chemical Engineering & Technology*, **38** (7), 1144–1149.
- 82 Jansohn, M. and Rothhämel, S. (2012) *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- 83 Baumann, G. and Chrambach, a. (1976) A highly crosslinked, transparent polyacrylamide gel with improved mechanical stability for use in isoelectric focusing and isotachopheresis. *Analytical Biochemistry*, **70**, 32–38.
- 84 Anker, H.S. (1970) A solubilizable acrylamide gel for electrophoresis. *FEBS Letters*, **7** (3), 293.
- 85 Späth, P.J. and Koblet, H. (1979) Properties of SDS-polyacrylamide gels highly cross-linked with N,N'-diallyltartardiamide and the rapid isolation of macromolecules from the gel matrix. *Analytical Biochemistry*, **93**, 275–285.
- 86 Westermeier, R. (2006) *Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*, Wiley-VCH, Hoboken.

-
- 87 Baker, J.P., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M. (1995) Swelling properties of acrylamide-based ampholytic hydrogels: comparison of experiment with theory. *Polymer*, **36** (5), 1061–1069.
- 88 Hülsenberg, D., Harnisch, A., Bismarck, A. (2008) *Microstructuring of glasses*, Springer, Berlin.
- 89 Marinell, G. (1998) *Multivariate Verfahren: Einführung für Studierende und Praktiker*, 5. Auflage, De Gruyter, Berlin, Boston.
- 90 Bamberg, G., Baur, F., Krapp, M. (2011) *Statistik*, 16. Auflage, Oldenbourg Wissenschaftsverlag, München.
- 91 Bortz, J. and Schuster, C. (eds) (2010) *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*, 7. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- 92 MacDougall, D., Crummett, W.B., et al. (1980) Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Analytical Chemistry*, **52** (14), 2242–2249.
- 93 Kessler, W. (2008) *Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik: Ein Lehrbuch*, 1. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim.
- 94 He, S., Zhang, W., Liu, L., Huang, Y., He, J., Xie, W., Wu, P., Du, C. (2014) Baseline correction for Raman spectra using an improved asymmetric least squares method. *Analytical Methods*, **6** (12), 4402–4407.
- 95 Grajcar, L. and Baron, M.-H. (2001) A SERS probe of adenylyl residues available for intermolecular interactions. Part I - adenylyl 'fingerprint'. *Journal of Raman Spectroscopy*, **32** (11), 912–918.
- 96 Majoube, M. (1985) Vibrational spectra of adenine and deuterium-substituted analogues. *Journal of Raman Spectroscopy*, **16** (2), 98–110.
- 97 Socrates, G. (2001) *Infrared and Raman characteristic group frequencies: Tables and charts*, 3. Auflage, Wiley, Chichester.
- 98 Meng, W., Hu, F., Jiang, X., Lu, L. (2015) Preparation of silver colloids with improved uniformity and stable surface-enhanced Raman scattering. *Nanoscale Research Letters*, **10** (1), 1–8.
- 99 Chowdhury, J., Mukherjee, K.M., Misra, T.N. (2000) A pH dependent surface-enhanced Raman scattering study of hypoxanthine. *Journal of Raman Spectroscopy*, **31** (5), 427–431.
- 100 Dendisová-Vyškovská, M., Kokaislová, A., Ončák, M., Matějka, P. (2013) SERS and in situ SERS spectroscopy of riboflavin adsorbed on silver, gold and copper substrates.
-

- Elucidation of variability of surface orientation based on both experimental and theoretical approach. *Journal of Molecular Structure*, **1038**, 19–28.
- 101 Pinheiro, P.C., Fateixa, S., Nogueira, H.I.S., Trindade, T. (2013) SERS study on adenine using a Ag/poly(t-butylacrylate) nanocomposite. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **101**, 36–39.
- 102 Bošković, D. (2010) Experimentelle Bestimmung und Modellierung des Verweilzeitverhaltens mikrofluidischer Strukturen. Technische Universität Ilmenau. Dissertation.
- 103 Georgi, W. and Hohl, P. (2015) *Einführung in LabVIEW*, 6. Auflage, Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG, München.
- 104 Zhang, Q., Wang, X.-D., Tian, T., Chu, L.-Q. (2017) Incorporation of multilayered silver nanoparticles into polymer brushes as 3-dimensional SERS substrates and their application for bacteria detection. *Applied Surface Science*, **407**, 185–191.
- 105 Yang, T., Guo, X., Wu, Y., Wang, H., Fu, S., Wen, Y., Yang, H. (2014) Facile and label-free detection of lung cancer biomarker in urine by magnetically assisted surface-enhanced Raman scattering. *ACS Applied Materials and Interfaces*, **6** (23), 20985–20993.
- 106 Lee, K.-S. and El-Sayed, M.A. (2006) Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition. *The Journal of Physical Chemistry B*, **110** (39), 19220–19225.
- 107 Lu, X., Rycenga, M., Skrabalak, S.E., Wiley, B., Xia, Y. (2009) Chemical synthesis of novel plasmonic nanoparticles. *Annual Review of Physical Chemistry*, **60**, 167–192.
- 108 Verein Deutscher Ingenieure and VDI-Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen (2013) *VDI-Wärmeatlas: Mit 320 Tabellen*, 11. Auflage, Springer Vieweg, Berlin.
- 109 Keating, M., Chen, Y., Larmour, I.A., Faulds, K., Graham, D. (2012) Growth and surface-enhanced Raman scattering of Ag nanoparticle assembly in agarose gel. *Measurement Science and Technology*, **23** (8), 84006.
- 110 Kaminska, A., Inya-Agha, O., Forster, R.J., Keyes, T.E. (2008) Chemically bound gold nanoparticle arrays on silicon: assembly, properties and SERS study of protein interactions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **10** (28), 4172–4180.
- 111 Fan, M., Andrade, G.F.S., Brolo, A.G. (2011) A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, **693** (1-2), 7–25.

-
- 112 Cho, W.J., Kim, Y., Kim, J.K. (2012) Ultrahigh-density array of silver nanoclusters for SERS substrate with high sensitivity and excellent reproducibility. *ACS nano*, **6** (1), 249–255.
- 113 Pérez-Jiménez, A.I., Lyu, D., Lu, Z., Liu, G., Ren, B. (2020) Surface-enhanced Raman spectroscopy: benefits, trade-offs and future developments. *Chemical Science*, **11** (18), 4563–4577.
- 114 Meng, W., Hu, F., Zhang, L.-Y., Jiang, X.-H., Lu, L.-D., Wang, X. (2013) SERS and DFT study of crystal violet. *Journal of Molecular Structure*, **1035** (October), 326–331.
- 115 Liang, E.J., Ye, X.L., Kiefer, W. (1997) Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Crystal Violet in the Presence of Halide and Halate Ions with Near-Infrared Wavelength Excitation. *The Journal of Physical Chemistry A*, **101** (40), 7330–7335.
- 116 Yun, M.-J., Cheong, B.-S., Cho, H.-G. (2019) Surface-enhanced Raman Spectroscopy and Density Functional Theory Studies of Riboflavin, Lumiflavin, and Lumichrome Adsorbed on Silver Colloids. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **40** (12), 1183–1190.
- 117 Grajcar, L., Huteau, V., Huynh-Dinh, T., Baron, M.-H. (2001) A SERS probe for adenyl residues available for intermolecular interactions. Part II - Reactive adenyl sites in highly diluted DNA. *Journal of Raman Spectroscopy*, **32** (12), 1037–1045.
- 118 Strehle, K.R., Cialla, D., Rösch, P., Henkel, T., Köhler, J.M., Popp, J. (2007) A reproducible surface-enhanced raman spectroscopy approach. Online SERS measurements in a segmented microfluidic system. *Analytical Chemistry*, **79** (4), 1542–1547.
- 119 März, A., Ackermann, K.R., Malsch, D., Bocklitz, T.W., Henkel, T., Popp, J. (2009) Towards a quantitative SERS approach--online monitoring of analytes in a microfluidic system with isotope-edited internal standards. *Journal of biophotonics*, **2** (4), 232–242.
- 120 Alrawashdeh, A.I., Almatarneh, M.H., Poirier, R.A. (2013) Computational study on the deamination reaction of adenine with OH⁻ / n H₂O (n = 0, 1, 2, 3) and 3H₂O. *Canadian Journal of Chemistry*, **91** (7), 518–526.
- 121 Neidle, S. (1999) *Oxford handbook of nucleic acid structure*, Oxford University Press, Oxford, New York.
- 122 Glaser, R., Rayat, S., Lewis, M., Son, M.S., Meyer, S. (1999) Theoretical studies of DNA base deamination. 2. Ab initio study of DNA base diazonium ions and of their linear, unimolecular dediazonation paths. *Journal of the American Chemical Society*, **121** (26), 6108–6119.
-

- 123 Zhang, A., Yang, B., Li, Z. (2007) Theoretical study on the hydrolytic deamination reaction mechanism of adenine-(H₂O)_n (n = 1-4). *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, **819** (1-3), 95-101.
- 124 Karran, P. and Lindahl, T. (1980) Hypoxanthine in Deoxyribonucleic Acid: Generation by Heat-Induced Hydrolysis of Adenine Residues and Release in Free Form by a Deoxyribonucleic Acid Glycosylase from Calf Thymus. *Biochemistry*, **19** (26), 6005-6011.
- 125 Wang, S. and Hu, A. (2016) Comparative study of spontaneous deamination of adenine and cytosine in unbuffered aqueous solution at room temperature. *Chemical Physics Letters*, **653**, 207-211.
- 126 Hodgen, B., Rayat, S., Glaser, R. (2003) Nitrosative Adenine Deamination: Facile Pyrimidine Ring-Opening in the Dediazonation of Adeninediazonium Ion. *Organic Letters*, **5** (22), 4077-4080.
- 127 van Slyke, D.D. (1910) Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der aliphatischen Aminogruppen; einige Anwendungen derselben in der Chemie der Proteine, des Harns und der Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **43** (3), 3170-3181.

Anhang

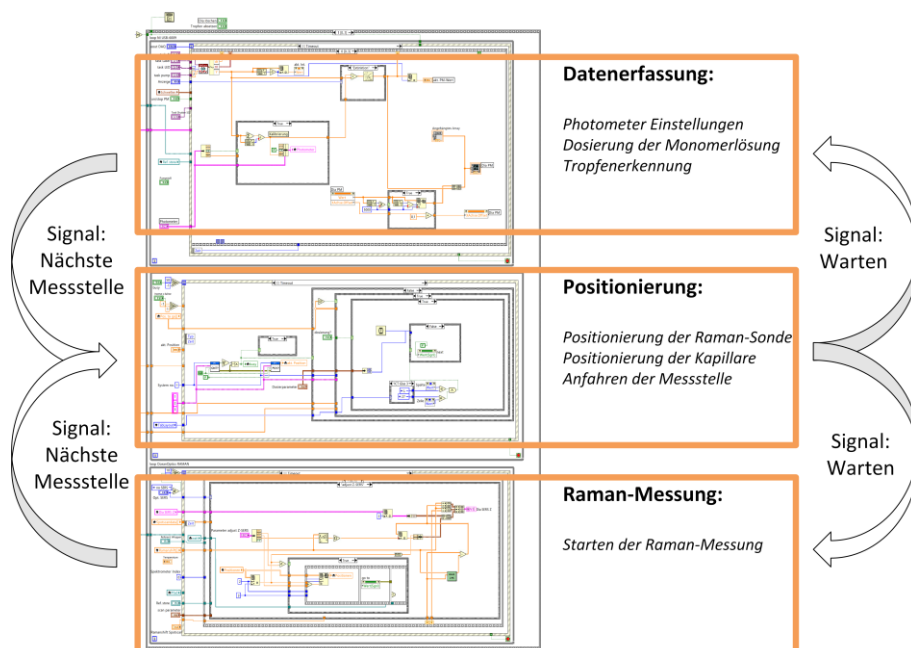


Abbildung A-1: Ausschnitt des LabVIEW Codes zur Verdeutlichung der Programmstruktur bestehend aus drei parallelen Schleifen

Tabelle A-1: Funktionen des Programms

Schleife	Ereignis	Funktion	Auslöser
Datenerfassung	<i>Photometer Einstellungen</i>	<i>Festlegen der LED Intensität und des Messbereichs der Photodiode</i>	<i>Wertänderung</i>
	<i>Start/Stop Photometer</i>	<i>Die Datenerfassung des Photometers wird gestartet bzw. gestoppt</i>	<i>Schalter</i>
	<i>Schwelle für Segmentdetektion</i>	<i>Die Extinktionswerte für die Segmentdetektion werden festgelegt</i>	<i>Wertänderung</i>
	<i>Durchfluss und Kapillarlänge</i>	<i>Die Fließgeschwindigkeit und die verwendete Kapillarlänge werden festgelegt</i>	<i>Wertänderung</i>
	<i>Laserleistung</i>	<i>Einstellung der Laserleistung für die Ramanmessung</i>	<i>Wertänderung</i>
Positionierung	<i>Manuelle Positionierung</i>	<i>Manuelle Positionierung des Arrays über das Steuerkreuz</i>	<i>Schalter</i>
	<i>Referenzfahrt</i>	<i>Referenzfahrt der Achsen durchführen</i>	<i>Schalter</i>
	<i>Layout Array</i>	<i>Hier kann zwischen verschiedenen Layouts des Arrays (Anzahl Zeilen/Spalten) gewählt werden</i>	<i>Wertänderung</i>
	<i>Positionen einlernen</i>	<i>Festlegung der Positionen für die erste Messstelle und die Positionen der Auffangbehälter</i>	<i>Schalter</i>
	<i>Gehe zu ...</i>	<i>Die Auffangbehälter sowie das direkte Anfahren der Messstelle sind möglich</i>	<i>Schalter</i>
Raman	<i>z-Justage</i>	<i>Raman-Messungen an mehreren z-Positionen werden durchgeführt, um den Sondenabstand zu optimieren</i>	<i>Schalter</i>
	<i>Spotscan</i>	<i>Mapping der SERS-Messstelle im Abstand von 0,1 oder 0,2 mm</i>	<i>Schalter</i>
	<i>Einzelmessung</i>	<i>Führt eine manuelle Raman-Messung aus</i>	<i>Schalter</i>

Tabelle A-2 Eigenschaften der verschiedenen Polymermischungen (T: Totalamdkonzentration; C: Vernetzungsgrad; Kategorie nach Tabelle 5-4: 1 - flüssig, 2 - gelartig, 3 - fest, 4 - starr, 5 - löst sich; DATD: N,N'-Diallylweinsäurediamid; MBA: N,N'-Methylenbisacrylamid)

Probe	Quervernetzer	T [%]	C [%]	Konsistenz [Kategorie]	Quellung [%]	Standardabweichung [%]
1	DATD	5	5	1	-	-
2	DATD	10	5	1	-	-
3	DATD	30	5	3	58,2	5,9
4	DATD	5	15	1	-	-
5	DATD	10	15	2	35,6	3,5
6	DATD	30	15	3	45,2	4,6
7	DATD	5	25	2	32,1	4,2
8	DATD	10	25	2	49,1	5,1
9	DATD	30	25	3	53,2	5,32
10	MBA	5	5	3	40,2	5,2
11	MBA	10	5	5	45,3	3,2
12	MBA	30	5	5	71,0	6,3
13	MBA	5	15	4	13,4	1,9
14	MBA	10	15	4	18,2	2,1
15	MBA	30	15	3	23,5	2,4
16	MBA	5	25	4	17,6	3,5
17	MBA	10	25	4	26,4	2,9
18	MBA	30	25	2	33,6	2,5

Abkürzungen

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
AEF	Analytical enhancement factor
AgFON	Ag film over nanospheres
Ag-K	Silbernitrat im Grundpolymer
Ag-NV	Silbernitrat bei der Nachverstärkung
ALS	Asymmetric least squares smoothing
ANOVA	Analysis of variance
AscH₂	Konzentration der Ascorbinsäure
BL	Basislinienkorrektur
Ca	Kapillarzahl
CE	Chemische Verstärkung
CT	Ladungstransfer
DATD	N,N'-Diallylweinsäurediamid
E. coli	Escherichia coli
EF	Enhancement factor
EG	Ethylenglykol
EM	Elektromagnetische Verstärkung
ESI	Elektrosprayionisation
FEP	Fluorethylen-Propylen
FT	Fourier Transformation
HMPP	2-Hydroxy-2-Methylpropiophenon
HTS	High-throughput screening
HWB	Halbwertsbreite
LED	Light emitting diode
LOD	Nachweisgrenze, engl. <i>limit of detection</i>
LOQ	Bestimmungsgrenze, engl. <i>limit of quantification</i>
LSPR	Localized surface plasmon resonance
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionisation
MBA	N,N'-Methylenbisacrylamid
MS	Massenspektrometer
NIPLAS	Nonlinear iterative partial least squares
NMR	Nuclear magnetic resonance
NP	Nanopartikel

OTS	Octadecyltrichlorsilan
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Principal component
PCA	Principal component analysis
PI	Photoinitiator
PLS	Partial least squares
<i>p</i>-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit, engl. <i>probability value</i>
QV	Quervernetzer
<i>Re</i>	Reynolds-Zahl
REM	Rasterkraftmikroskop
RS	Raman scattering/spectroscopy
SERRS	Surface enhanced resonant Raman scattering/spectroscopy
SERS	Surface enhanced Raman scattering/spectroscopy
SMEF	Single molecule enhancement factor
SNR	Signal-Rausch Verhältnis, engl. <i>signal-to-noise ratio</i>
SNV	Standard normal variate
Surf	Oberfläche
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen

Lateinische Symbole

<i>Symbol</i>	<i>Bedeutung</i>	<i>Einheit</i>
b	Molalität	mol kg^{-1}
c	Konzentration	mol L^{-1}
C	Vernetzungsgrad	%
d	Charakteristische Länge	m
\underline{E}	Residuenmatrix der X-Daten	-
E_{loc}	Lokales elektrisches Feld	V m^{-1}
f	Frequenz	s^{-1}
\underline{F}	Residuenmatrix der Y-Daten	-
h	Plancksches Wirkungsquantum	J s
H_0	Nullhypothese	-
H_1	Alternativhypothese	-
I	Intensität	kg s^{-3}
N	Anzahl	-
n	Anzahl der Faktorstufen	-
\underline{P}	Faktorenmatrix der \underline{X} -Daten	-
q	Anzahl der Stichproben	-
\underline{Q}	Faktorenmatrix der \underline{Y} -Daten	-
r	Abstand	m
s^2	Varianz	-
T	Totalamidkonzentration	%
\underline{T}	Scoresmatrix der \underline{X} -Daten	-
\underline{U}	Scoresmatrix der \underline{Y} -Daten	-
v	Testfunktion	-
x	Stoffmengenanteil	-
\underline{X}	Datenmatrix	-
\underline{Y}	Datenmatrix	-

Griechische Symbole

<i>Symbol</i>	<i>Bedeutung</i>	<i>Einheit</i>
σ	Standardabweichung	-
μ_i	Erwartungswert	-
α	Polarisierbarkeit	$\text{A}^2 \text{s}^4 \text{kg}^{-1}$
δ	Deformationsschwingung	-
ε	Dielektrizitätskonstante	$\text{A s V}^{-1} \text{m}^{-1}$
η	Dynamische Viskosität	$\text{Kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$
μ_{ind}	Induziertes Dipolmoment	A m^2
ν	Streckschwingung	-
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl	cm^{-1}
ρ	Dichte	Kg m^{-3}
σ	Oberflächenspannung	Kg s^{-2}
ω_{inc}	Einfallende Kreisfrequenz	s^{-1}
ω_{vib}	Eigenfrequenz des schwingenden Moleküls	s^{-1}

Veröffentlichungen

Zeitschriftenaufsätze

- A. Mendl, J.M. Köhler, D. Bošković, S. Löbbecke
Novel SERS-based process analysis for label-free segmented flow screenings.
In: Lab on a Chip (2020) 20, 2364-2371
DOI: 10.1039/D0LC00367K.
- A. Mendl, D. Bošković, H. Kröber, T. Türcke, S. Löbbecke
Flexibles Mikroreaktionssystem für die Prozessoptimierung.
In: Chemie- Ingenieur- Technik 80 (2008), Nr.9, 1261-1261
DOI: 10.1002/cite.200750670
- D. Bošković, A. Mendl, S. Löbbecke
Charakterisierung der Verweilzeitverteilung in mikrofluidischen Bauteilen.
In: Chemie- Ingenieur- Technik 80 (2008), Nr.9, 1323-1323
DOI: 10.1002/cite.200750812

Veröffentlichte Konferenzbeiträge

- A. Mendl, S. Löbbecke, D. Bošković, J.M. Köhler
SERS-based Analytical System for Microfluidic Segmented Flow Processes.
In: 18. Heiligenstädter Kolloquium, Heiligenstadt, Deutschland (2016), 453
ISBN 978-3-00-054165-0
- A. Mendl, J.M. Köhler, D. Bošković
Fast Reaction Screening Combining Segmented Flow Microfluidics and Surface
Enhanced Raman Spectroscopy.
In: 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life
Sciences (MicroTAS); Basel, Schweiz (2016), 1368-1369
ISBN 978-1-7334190-0-0
- A. Mendl, S. Löbbecke, J.M. Köhler
SERS Analytical Module for High-Throughput Screenings in Droplet-based
Microfluidics.
In: Implementation of microreactor technology in biotechnology. 3rd
International Conference, Opatja, Kroatien (2015)
ISBN 978-961-6756-58-7
- W. Schweikert, F. Schnürer, A. Mendl, S. Müller
Trace Level Detection of Explosives by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy
(SERS) for Defense Applications: Best Practice.
In: Proc. SPIE 11166, Counterterrorism, Crime Fighting, Forensics, and
Surveillance Technologies III, Straßburg, Frankreich (2019)
DOI 10.1117/12.2532780
- A. Mendl, S. Panić, T. Klahn, D. Bošković
Detection of Unstable Process Conditions During Continuous Nitrate Ester
Production.

- In: Energetic materials. Past, present and future: 50th International Annual Conference of the Fraunhofer ICT, Karlsruhe, Deutschland (2019)
- D. Bošković, T. Türcke, A. Mendl, S. Löbbbecke
Fast and Save Production of Liquid Explosives in a Continuous Pilot Plant Employing Microreaction Technology.
In: Energetic materials - characterization, modelling and validation: 40th International Annual Conference of ICT, Karlsruhe, Deutschland (2019), 23.1-23.6
 - D. Bošković, A. Mendl, W. Schweikert, S. Panić, S., Löbbbecke
New Infrared and Raman Spectroscopic Tools for Reaction Monitoring of Microreaction Processes.
In: 14th International Conference on Micro Reaction Technology (IMRET 14), Peking, China (2016)
 - D. Bošković, S. Panić, A. Mendl, T. Klahn, S. Löbbbecke
Process Spectroscopy for In-Line Reaction Monitoring and Integrated Process Control.
In: 15th International Conference on Micro Reaction Technology (IMRET 15), Karlsruhe, Deutschland (2018)

Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit konnte ich auf die Unterstützung vieler Personen vertrauen, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. An dieser Stelle möchte ich mich bei diesen Personen herzlich bedanken.

Allen voran möchte ich mich bei Professor Dr. J. Michael Köhler vom Institut für Chemie und Biotechnik an der Technischen Universität Ilmenau für die interessante Aufgabenstellung und sein persönliches Engagement bei der Betreuung dieser Arbeit bedanken. Seine stete Diskussionsbereitschaft und wertvollen Anmerkungen waren mir eine große Hilfe.

Herrn Professor Dr. Christian Cierpka von der Technischen Universität Ilmenau und Professor Dr. Michael Maskos von der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz möchte ich für die freundliche Übernahme der Gutachten bedanken.

Herrn Dr. Stefan Löbbecke und Herrn Dr. Dušan Bošković möchte ich für die engagierte Betreuung dieser Arbeit am Fraunhofer-Institut für Chemische Technologie bedanken. Die vielen ergiebigen Diskussionen haben einen großen Anteil an dem Gelingen dieser Arbeit. Ich danke ihnen auch dafür, dass sie mir den notwendigen Freiraum zum Vollenden dieser Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Professor Dr. Uwe Ritter, Herrn Professor Dr. Steffen Strehle und Herrn Dr. G. Alexander Groß von der Technischen Universität Ilmenau möchte ich mich für die bereitwillige Mitwirkung an der Promotionskommission bedanken.

Allen Mitarbeitern der Mikro-Gruppe am Fraunhofer-Institut für Chemische Technologie, insbesondere Herrn Tobias Türcke, Herrn Hartmut Kröber, Frau Wenka Schweikert, Frau Maud Schwarzer, Herrn Slobodan Panić und Frau Ligia Rădulescu, möchte ich für das optimale Arbeitsumfeld bedanken. Sie haben mich in vielen Bereichen unterstützt und haben durch ihre Ideen und technischen Lösungen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ihnen gilt mein herzlicher Dank.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Fachgebiets Physikalische Chemie/Mikroreaktionstechnik an der Technischen Universität Ilmenau, insbesondere Herrn Steffen Schneider, Frau Dr. Jialan Cao, Herrn Dr. Nikunj Kumar Visaveliya, Frau Katja Bergmann und Frau Katarina Wetzels möchte ich mich für die Unterstützung und konstruktiven Diskussionen bedanken. Sie haben mich herzlich in der Arbeitsgruppe aufgenommen.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) möchte ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Projekts BactoCat (Neue Syntheseleistungen

durch Kopplung mikroorganismischer und Metall-Nanopartikel-katalysierter Prozesse in der Mikroreaktionstechnik, Kennzeichen: 031A161A) danken.

Letztendlich möchte ich mich herzlich bei meiner Familie bedanken. Meine Eltern Sonja und Lothar und meine Schwester Constanze haben mich auf meinem Weg immer begleitet und unterstützt, ihr Vertrauen hat mir sehr geholfen und mich gestärkt. Meiner Frau Johanna und meinen Kindern Laila und Mina möchte ich mich für die stete Motivation und die Unterstützung, aber auch für die Geduld, die sie gerade gegen Ende dieser Arbeit aufbringen mussten, bedanken.