

Integrierte online SERS Detektion in mikrofluidischen Systemen mit segmentiertem Fluss

Tim-Arne Meier¹, Detlev Belder¹

¹ Universität Leipzig, Linnéstr. 3, 04103 Leipzig
belder@uni-leipzig.de

Kurzfassung

In der vorliegenden Arbeit wird ein mikrofluidisches System vorgestellt, das es ermöglicht oberflächenverstärkte Ramanspektroskopie als Detektionsmethode in mikrofluidischen Trenn- und Reaktionssystemen einzusetzen. Dazu wurde ein *Interface* entwickelt, das wässrige Analytlösungen und Silbernanopartikel in Mikrotröpfchen segmentiert und so eine *memory effect* freie Detektion mit ausreichenden Akquisitionszeiten direkt auf dem Chip ermöglicht. Dieses System wurde mit Hilfe verschiedener Materialien und Fertigungstechniken umgesetzt. Darüber hinaus wurde anhand einer Modellreaktion gezeigt, dass eine metallkatalysierte Reaktion ohne weitere Aufbereitung mit Hilfe der Ramanspektroskopie überwacht und verfolgt werden kann. Zu diesem Zweck wurde eine geeignete organische Reduktion adaptiert und der Reaktionsverlauf mittels UV-VIS-Spektroskopie und Ramanspektroskopie beobachtet.

Schlüsselwörter: SERS, Mikrofluidik, Mikrotröpfchen, Mikroreaktionssysteme, Silbernanopartikel

Einleitung

Mikrofluidische Systeme bieten die Möglichkeit Trenntechniken oder chemische Synthesen auf kleinstem Raum mit entsprechenden Detektionssystemen zu kombinieren. Durch den deutlich geringeren Verbrauch an Reagenzien und Probenmaterial und die direkte Kopplung verschiedener Applikationen auf einem einzigen Chip, lassen sich hiermit äußerst effiziente Analysensysteme schaffen. Leider stellt die Untersuchung von Realproben noch immer ein Problem dar, da die hierfür zumeist genutzte Fluoreszenzdetektion häufig ein zeitaufwändiges, invasives und in der Regel irreversibles *Labeling* notwendig macht und die alternative Massenspektrometrie zu einer Zerstörung der Analyten führt.

Oberflächenverstärkte Ramanspektroskopie (*surface-enhanced Raman spectroscopy* / SERS) rückt in diesem Zusammenhang immer mehr in den Fokus, da sie, selbst für geringste Analytmengen, eine labelfreie Detektionsmethode darstellt. Darüber hinaus bietet die Ramanspektroskopie, ähnlich wie die Infrarotspektroskopie (IR), durch die *fingerprint*-Sensitivität strukturelle Informationen über die jeweiligen Analyten. Im Gegensatz zu IR-Spektroskopie beruht der Ramaneffekt nicht auf der Absorption, sondern auf der inelastischen Streuung von Licht. Der Ramaneffekt ist jedoch außerordentlich schwach ausgeprägt. Bringt man allerdings den jeweiligen Analyten an eine aufgeraute Edelmetalloberfläche, so lässt sich

eine deutliche Verstärkung des Effektes beobachten [1].

Die Implementierung oberflächenverstärkter Ramanspektroskopie in mikrofluidische Chips ist jedoch eine große Herausforderung, da stationäre Substrate, wie beispielsweise *aufgesputterte* Metalloberflächen einen störenden *memory effect* hervorrufen. Durch diesen erhält man, aufgrund von Adsorptionsprozessen, ein falsch positives Analytsignal.

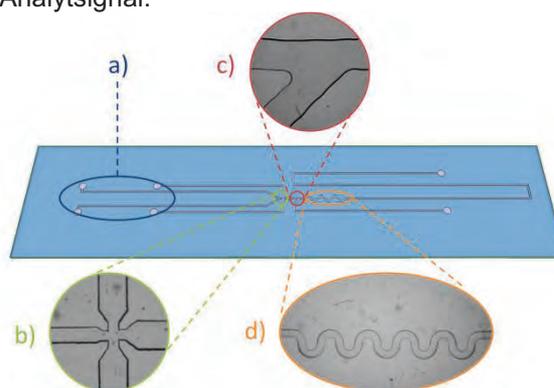


Abb. 1: Schematisches Chiplayout, mit 200 µm breiten Kanälen, bestehend aus a) zwei Einlässen für wässrige (links) und zwei für hydrophobe Lösungen (rechts) b) dem Interface für die Tröpfchengenerierung c) einem integrierten Dispenser und d) einer on-chip Mischstruktur.

Diesen Einschränkungen kann man entgegen wirken, indem Edelmetallnanopartikel in einem segmentierten Fluss als SERS-Substrate genutzt werden [2]. Hierzu wird die wässrige

Analysenlösung mittels eines Flussfokussierers in einzelne Tröpfchen unterteilt, die in einer hydrophoben Trägerlösung weiterbefördert werden.

Dadurch wird sowohl Kreuzkontamination zwischen den einzelnen Tröpfchen, als auch Adsorption der Nanopartikel an den Kanalwänden effektiv unterbunden. Zusätzlich kann über Variation der Flussraten die Akquisitionszeit auf einer breiten Skala variiert werden. Auf diese Weise wird zum einen eine online SERS-Detektion erhalten und weiterhin der *memory effect* vermieden.

Chipdesign und -fertigung

Wir haben ein Chipdesign (s. Abb. 1) entwickelt, das es uns ermöglicht Reaktionen oder Trennungen, die im kontinuierlichen Fluss stattfinden, mit einer *on-chip* SERS Detektion in Mikrotröpfchen zu kombinieren.

Dazu wurde hinter dem Flussfokussierer eine Funktionalität zur Dispersion integriert, die die Möglichkeit bietet eine Silbernanopartikel-suspension als SERS-Substrat direkt in individuelle Tröpfchen zu injizieren. Auf diese Weise kann gewährleistet werden, dass die Nanopartikelsuspension keine unerwünschten Einflüsse auf vorhergehende Trennungen oder Reaktionen hat.

Als Chipmaterialien wurden neben Polydimethylsiloxan (PDMS) auch eine Kombination aus Glas und Polyethylenglykoldiacrylat (PEG-DA) ausgewählt.

Für die Reaktorchips wurde vorzugsweise PDMS verwendet, da mit diesem, aufgrund der starken Hydrophobizität, eine optimale Tröpfchengenerierung bei minimaler Wandkontamination gewährleistet werden kann. Diese Chips wurden mittels der von Gitlin *et. al.* entwickelten *double casting* Methode [3] hergestellt.

Die mit einem in unserer Gruppe entwickelten Flüssigphasenlithographieverfahren [4] angefertigten PEG-DA Chips bieten im Gegensatz zu PDMS eine große Beständigkeit auch bei hohen Drücken. Dies ist insofern von Bedeutung, da sie für die Hochdruck-Chipchromatographie genutzt werden sollen, bei der Drücke von bis zu 400 bar erreicht werden können. Hierfür wurde das Chipdesign dementsprechend abgeändert (s. Abb. 2).

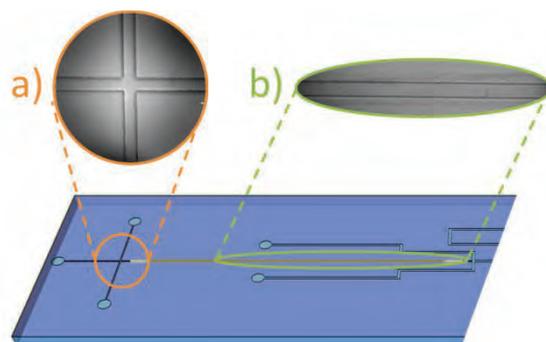


Abb. 2: Chromatographiechip-Layout mit Funktionalität zur Tröpfchengenerierung; Dieses verfügt über a) ein Injektionskreuz und b) einen ca. 100 μm breiten Kanal zur Implementierung einer gepackten partikulären Säule (schematisch dargestellt).

Experimenteller Aufbau

Für SERS Messungen werden die Chips auf einem inversen Olympus IX71 Mikroskop (Olympus, Tokio) platziert. Als Anregungslichtquelle wurde zur Aufnahme der Kristallviolettspektren ein 473 nm CW DPSS Laser (Coboldt, Stockholm) verwendet. Für die Reaktionsüberwachung kam ein 632 nm HeNe Laser (Melles Griot, Bensheim) zum Einsatz. Die Raman Spektren wurden mithilfe eines Acton SP2750 Raman Spektrometers und einer ProEM 1600 CCD Kamera (Princeton Instruments, Acton) aufgenommen.

Ergebnisse

Um die Funktionsfähigkeit der Chips zu überprüfen, wurden zunächst Vorversuche mit Kristallviolett als Modellanalyt durchgeführt. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass sich die vorgeschlagenen Chiplayouts hervorragend für die geplanten Experimente eignen. So konnte zum einen Kristallviolett bis zu einer Konzentration von 10 μM in Tröpfchen ohne störenden *memory effect* detektiert werden (s. Abb. 3 a)). Zum anderen war es möglich, mithilfe des implementierten Dispensers, eine Nanopartikelsuspension zeitgesteuert in individuelle Tröpfchen einzubringen (s. Abb. 3 b)).

Um die Eignung des Chipdesigns für die Reaktionsüberwachung mittels oberflächenverstärkter Ramanspektroskopie zu überprüfen, wurde zunächst eine geeigneten Modellreaktion evaluiert. An dieser Stelle wurde die von Esumi *et. al.* vorgestellte Reduktion von p-Nitrophenol zu p-Aminophenol [5] ausgewählt, die, in abgewandelter Form, schon erfolgreich mit Ramanspektroskopie verfolgt werden konnte [6].

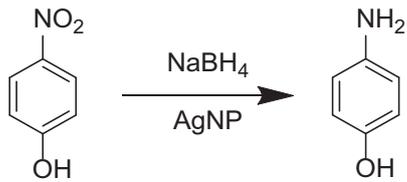


Abb. 4: Reaktionsgleichung der beschriebenen Reduktion von *p*-Nitrophenol

Als Katalysator wurde eine Silbernanopartikelsuspension verwendet, die nach der von Leopold *et. al.* entwickelten Methode hergestellt wurde [7]. Die Eignung dieser Partikel als Katalysator für die oben genannte Reaktion wurde zunächst durch Verfolgung des Reaktionsverlaufs mittels UV/VIS-Absorptionsspektroskopie bestätigt (s. Abb. 5).

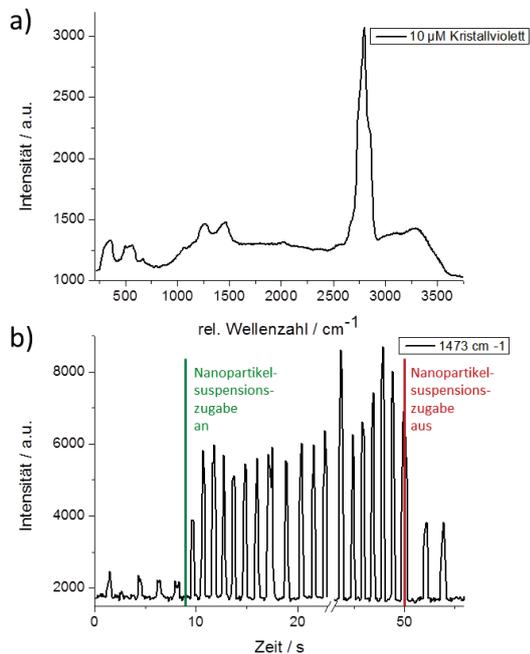


Abb. 3: a) SERS-Spektrum einer $10\ \mu\text{M}$ Kristallviolettlösung, in einem Mikrotropfen, erzeugt mit folgenden Flussraten: Ölphase zweimal je $600\ \mu\text{L}/\text{min}$, Kristallviolett- und Silbernanopartikelsuspensionsphase je $200\ \mu\text{L}/\text{min}$. b) Verlauf der Intensität bei einer Indikatorwellenzahl des SERS-Spektrums von Kristallviolett ($1473\ \text{cm}^{-1}$) über 60 Sekunden. Nach neun Sekunden wurde die on-chip Nanopartikelzugabe gestartet und nach 50 Sekunden wieder gestoppt. In beiden Fällen konnte ein nahezu sofortiger Effekt beobachtet werden. Zugleich lässt die gleichbleibende Basislinie auf ein Ausbleiben des memory effects schließen.

Dazu wurden $0,7\ \text{mL}$ VE Wasser, $0,15\ \text{mL}$ der Silbernanopartikelsuspension, $0,15\ \text{mL}$ einer *p*-Nitrophenollösung ($2\ \text{mM}$) und $0,5\ \text{mL}$ einer Natriumborhydridlösung ($30\ \text{mM}$) in einer Quarzküvette vermischt und anschließend die

Absorption im Wellenlängenbereich von 250 – $600\ \text{nm}$ vermessen.

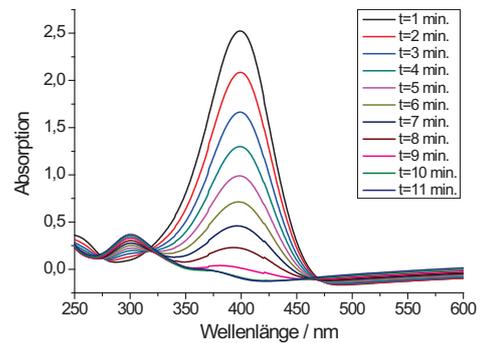


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf des Absorptionsspektrums der Reaktionslösung

Wie dem zeitlichen Verlauf in Abb. 5 entnommen werden kann, wird unter diesen Bedingungen nach ca. zehn Minuten ein vollständiger Umsatz erzielt, was am Verschwinden des Absorptionsmaximums von *p*-Nitrophenol bei $400\ \text{nm}$ beobachtbar ist. Das ansteigende Maximum bei $300\ \text{nm}$ lässt sich dem entstandenen Produkt *p*-Aminophenol zuordnen.

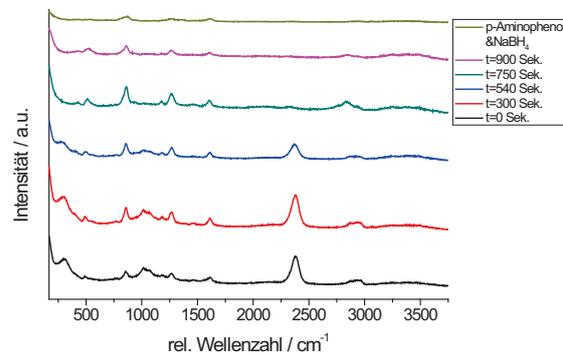


Abb. 6: Zeitlicher Verlauf des SERS-Spektrums der Reaktionslösung

Um die Reaktion auch per oberflächenverstärkter Ramanspektroskopie beobachten zu können, wurden die Konzentrationsverhältnisse der Reaktion angepasst. So wurden $0,3\ \text{mL}$ der Silbernanopartikelsuspension, $0,3\ \text{mL}$ einer *p*-Nitrophenollösung ($6\ \text{mM}$) und $0,3\ \text{mL}$ einer Natriumborhydridlösung ($300\ \text{mM}$) in einer Quarzküvette durchmischt und diese auf einem Ramanmikroskop platziert. Nach dem Start der Reaktion wurde alle 30 Sekunden ein Spektrum des Reaktionsgemisches aufgenommen (Aufnahmezeit: $5\ \text{Sek.}$) und die Reaktion über 30 Minuten verfolgt (s. Abb. 6). Wie dargestellt konnte hierbei in den ersten fünf Minuten keine signifikante Veränderung des Spektrums beobachtet werden.

Ab der fünften Minute ist ein deutliches Absinken der Intensität der Indikatorbande bei 2379 cm^{-1} zu erkennen und nach 15 Minuten entspricht das Spektrum des Reaktionsgemisches dem des Produktes. Diese Resultate zeigen, dass es prinzipiell möglich ist den Verlauf der beschriebenen Reaktion mittels Ramanspektroskopie zu verfolgen. Die Unterschiede zu der in Abb. 5 beschriebenen Variante im Reaktionsablauf lassen sich durch die veränderten Konzentrationen erklären.

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist eine erfolgreiche Implementierung der oberflächenverstärkten Ramanspektroskopie in mikrofluidische Systeme und ihre Kombination mit mikrofluidischen Trenn- und Reaktionssystemen. Dazu wurde ein Chipdesign entwickelt, das mittels eines Interfaces zu Tröpfchengenerierung, eine totvolumenfreie Kopplung von solchen Applikationen zu einem SERS-Detektionssystem bietet.

Des Weiteren wurde die oberflächenverstärkte Ramanspektroskopie zur Verfolgung einer organischen, metallkatalysierten Reaktion verwendet. Dies bietet in Zukunft die Möglichkeit dieses System in einen mikrofluidischen Chip einzubringen und auch auf andere organische und anorganische Reaktionen auszuweiten.

Unser Ansatz SERS-Detektion in mikrofluidische Chips zu integrieren bietet großes Potential, da er eine labelfreie, nicht invasive, *online* Detektion ermöglicht. Darüber hinaus bietet das Tröpfcheninterface zusätzlich die Möglichkeit für weitere Reaktionen bzw. Analyseschritte.

Referenzen

- [1] M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan, Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chemical Physics Letters* 2, 163–166 (1974); doi: 10.1016/0009-2614(74)85388-1.
- [2] K. R. Strehle, D. Cialla, P. Rösch, T. Henkel, M. Köhler, J. Popp, A Reproducible Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Approach. Online SERS Measurements in a Segmented Microfluidic System, *Analytical Chemistry* 4, 1542–1547 (2007); doi: 10.1021/ac0615246.
- [3] L. Gitlin, P. Schulze, D. Belder, Rapid replication of master structures by double casting with PDMS, *Lab on a Chip* 20, 3000–3002 (2009); doi: 10.1039/B904684D.
- [4] S. Jezierski, L. Gitlin, S. Nagl, D. Belder, Multistep liquid-phase lithography for fast prototyping of microfluidic free-flow-electrophoresis chips, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 8, 2651–2656 (2011); doi: 10.1007/s00216-011-5351-2.
- [5] K. Esumi, R. Isono, T. Yoshimura, Preparation of PAMAM- and PPI-Metal (Silver, Platinum, and Palladium) Nanocomposites and Their Catalytic Activities for Reduction of 4-Nitrophenol, *Langmuir* 1, 237–243 (2003); doi: 10.1021/la035440t.
- [6] V. Joseph, C. Engelbrekt, J. Zhang, U. Gernert, J. Ulstrup, J. Kneipp, Characterizing the Kinetics of Nanoparticle-Catalyzed Reactions by Surface-Enhanced Raman Scattering, *Angewandte Chemie International Edition* 30, 7592–7596 (2012); doi: 10.1002/anie.201203526.
- [7] N. Leopold, B. Lendl, A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride, *The Journal of Physical Chemistry B* 24, 5723–5727 (2003); doi: 10.1021/jp027460u.