

Anwendung SERS-aktiver Nanostrukturen in der Medikamentenüberwachung und Lebensmittelanalytik

Dana Cialla-May^{1,2,3}, *Karina Weber*^{1,2,3}, *Jürgen Popp*^{1,2,3}

¹ *Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Physikalische Chemie und Abbe Center of Photonics, Helmholtzweg 4, 07743 Jena, Deutschland,*

dana.cialla-may@uni-jena.de

² *Leibniz-Institut für Photonische Technologien (IPHT) Jena, Albert-Einstein-Straße 9, 07745 Jena, Deutschland*

³ *InfectoGnostics Forschungscampus Jena e.V., Zentrum für Angewandte Forschung, Philosophenweg 7, 07743 Jena, Deutschland*

Abstract:

Die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS), die auf der Verwendung von funktionalen Metallnanostrukturen beruht, zeigt ein großes Potential als analytische Methode. Dies wird auf ihre molekulare Spezifität sowie hohen Sensitivität zurückgeführt. Durch die Kombination von SERS mit mikrofluidischen *Lab-on-a-chip*-Ansätzen können Untersuchungen unter reproduzierbaren Bedingungen sowie im Hochdurchsatz durchgeführt werden. Am Beispiel von Methotrexat und Levofloxacin, einem Chemotherapeutikum sowie einem Antibiotikum, kann das Potential der *Lab-on-a-chip*-SERS-Technologie für die Medikamentenüberwachung aufgezeigt werden. Darüber hinaus wird in diesem Beitrag der Einsatz von SERS-aktiven Strukturen in der Lebensmittelanalytik erläutert. Dies umfasst den Nachweis der Lebensmittelfarbstoffe Sudan III, welcher indirekt krebserregend wirkt und zum Färben von z.B. Gewürzpulvern oder Palmöl eingesetzt wird, sowie Azorubin (E122) in Getränkeproben.

Keywords: SERS, Mikrofluidik, Medikamentenüberwachung, Lebensmittelanalytik

Einleitung

Spezifische und sensitive Detektionsmethoden für eine schnelle Analyse sind von großer Bedeutung in der Medikamentenüberwachung und Lebensmittelanalytik. Die Raman-Spektroskopie hat in den letzten Jahren an Bedeutung für bioanalytische Fragestellungen gewonnen, was auf ihrer molekulare *Fingerprint*-Spezifität zurückzuführen ist. Jedoch kann der spezifische Nachweis kleiner Konzentrationen, die in der Medikamentenüberwachung und Lebensmittelanalytik relevant sind, nicht erbracht werden. Dies ist auf die inhärent schwache Raman-Streuung zurückzuführen. Durch die Wechselwirkung von Molekülen mit an Metallnanostrukturen angeregten starken elektromagnetischen Feldern werden spezifische Raman-Moden um mehrere Größenordnungen verstärkt. Dieser Effekt ist als oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (*surface enhanced Raman spectroscopy*, SERS) bekannt [1-3]. SERS-aktive Strukturen können mittels *Bottom-up*- und *Top-down*-Verfahren sowie durch Selbstorganisation und *Template*-gestützte Ansätze hergestellt werden. Durch die Kombi-

nation dieser hochspezifischen und sensitiven Methode mit mikrofluidischen Funktionselementen können spektroskopische Untersuchungen im Hochdurchsatz durchgeführt und eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet werden [4]. Beispielsweise sind tropfenbasierte, mikrofluidische *Lab-on-a-chip*-Ansätze verfügbar [5-8]. Über Dosieranschlüsse werden wässrige Tropfen in einem Ölstrom generiert, die den Analyten, die SERS-aktiven Silbernanopartikel und das Aktivierungsganz enthalten. Die SERS-Spektren werden im Hochdurchsatz durch Fokussieren des Laserstrahls in den Kanal aufgenommen.

Lab-on-a-chip-SERS für die Medikamentenüberwachung im Hochdurchsatz

Am Beispiel von Methotrexat (MTX), einem Folsäure-Analogon und -Antagonist, kann das Potential der *Lab-on-a-chip*-Methode aufgezeigt werden [9]. Dazu wurden Silbernanopartikel als SERS-aktives Substrat verwendet, die nach einem Protokoll von Leopold et al. [10] hergestellt wurden. Die Verabreichung von MTX in der medizinischen Behandlung von Krebspatienten ist mit gefährlichen Vergiftungserscheinungen

nungen verbunden, die bei Konzentrationen auftreten können, die 10 μM überschreiten. Bei Gabe der Injektionen während des Behandlungszyklus muss gewährleistet sein, dass die Konzentration von MTX in Blutplasma auf einen Wert geringer als 1 μM gefallen ist. Unter Verwendung unserer *Lab-on-a-chip*-SERS-Technologie konnte erfolgreich gezeigt werden, dass MTX im therapeutischen Bereich zwischen 10 μM und 0,1 μM im Hochdurchsatz quantitativ nachgewiesen werden kann.

Darüber hinaus wurde daran gearbeitet, mittels *Lab-on-a-Chip*-SERS das Medikament Levofloxacin nachzuweisen [11]. Levofloxacin ist ein Fluorchinolon, welches bakterizid wirkt und somit sowohl im medizinischem, wie auch im Umweltbereich eine große Bedeutung einnimmt. In Abbildung 1A ist das Raman-Spektrum des Feststoffs dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass Levofloxacin über die Carboxylat-Gruppe an die Silberoberfläche anbindet und senkrecht bzw. leicht geneigt zur Silberoberfläche orientiert ist. Darüber hinaus sinkt bei Anwesenheit von Chlorid-Ionen die Signalintensität deutlich ab (siehe Abbildung 1B). Deshalb wurde die Bestimmung der Nachweisgrenze in Abwesenheit von Elektrolyten durchgeführt. Die ermittelte Nachweisgrenze kann mit etwa 0,8 μM angegeben werden und der linear-dynamische Bereich erstreckt sich zwischen 1 und 15 μM . Dies konnten durch die Normalisierung der SERS-Signale auf die Raman-Bande bei 230 cm^{-1} erreicht werden, die der Ag-O-Streckschwingung zugeordnet werden kann und durch die Levofloxacin-Moleküle hervorgerufen wird, die sich in der ersten Schicht auf der Metalloberfläche befinden.

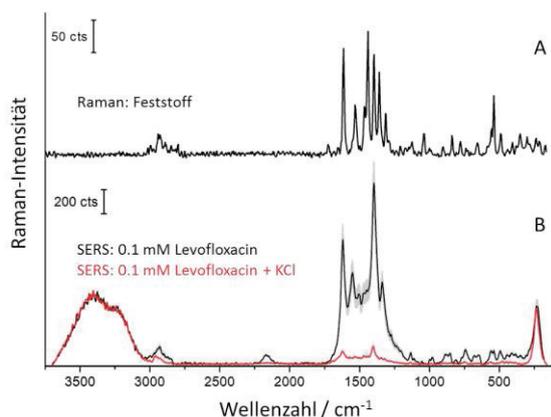


Abbildung 1: (A) Raman-Spektrum von Levofloxacin (Feststoff), (B) SERS-Spektren einer 0,1mM Levofloxacin-Lösung in Ab- bzw. Anwesenheit von KCl.

Lebensmittelanalytik unter Verwendung plasmonischer Metallnanostrukturen

Im Fall der Lebensmittelanalytik sind die Anforderungen an eine SERS-gestützte Analyse

verschieden zur Medikamentenüberwachung. Es werden SERS-aktive Oberflächen benötigt, die für eine einmalige Verwendung geeignet sind und Bedingungen wie eine einfache Herstellung verbunden mit geringen Kosten sowie effizienter Signalverstärkung erfüllen. Es konnte gezeigt werden, dass enzymatisch-generierte Nanopartikel (EGNPs) als *Bottom-up*-Strukturen den genannten Anforderungen genügen. Dazu werden Biotin-markierte Linkermoleküle auf Oberflächen aufgebracht. Basierend auf der Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin wird ein Enzymkomplex an die Oberfläche angebunden und eine enzymatisch-gesteuerte Metallabscheidungsreaktion führt zur Ausbildung wüstenrosen-artiger Silbernanostrukturen. Die EGNPs können in ihrer Leistungsfähigkeit als SERS-Substrat noch weiter verbessert werden, wenn sie mit Aluminiumoxid in einer Atomlagenabscheidung beschichtet werden [12]. Dies führt einerseits zur Reduzierung des Hintergrundsignals sowie zur Erhöhung der Stabilität gegen Umwelteinflüsse.

Die EGNPs wurden darüber hinaus mit lipophilen Sensorschichten modifiziert. Somit kann Sudan III, eine indirekt krebserregende Substanz, die in Chilipulver, Palmöl oder Gewürzmischungen gefunden wird, im Hintergrund von Riboflavin sowie in Extrakten von Paprikapulver nachgewiesen werden [13], da in die lipophilen Sensorschichten bevorzugt kleine, wasserunlösliche Moleküle wie Sudan III angereichert werden. Alle wasserlöslichen Matrixbestandteile werden durch diese Auftrennung des Stoffgemischs von der Metalloberfläche entfernt und tragen somit nicht zum Gesamtspektrum bei.

Tabelle 1: Konzentrationsbestimmung von E122 in Getränkeproben mittels SERS

Probe	HPLC (mg/L)	SERS (mg/L)
Energiedrink	26 \pm 2,6	27 \pm 5
Grenadine	280 \pm 28,0	355 \pm 77
Erdbeerwodka	12 \pm 1,2	18 \pm 4
Passionsfruchtwodka	1,7 \pm 0,2	4,7 \pm 1,8
Himbeerlimonade	4 \pm 0,4	5,3 \pm 1,4
Blutorangenlimonade	<0,1	<0,2
Himbeersirup	<0,1	<0,2

Schließlich kann das Potential einer SERS-gestützten Analyse am Beispiel von Azorubin (E122) in kommerziell erhältlichen Getränken mit unterschiedlicher Komplexität (Zuckergehalt, Alkoholkonzentration) aufgezeigt werden

[14]. Dazu wurden SERS-aktive Oberflächen, hergestellt durch *Nanosphere*-Lithographie (NSL), mit der zu untersuchenden Substanz belegt. Alle Getränkeproben wurden 1:5 mit Wasser vermischt, was einer sehr einfachen Probenvorbereitung und Handhabung entspricht. Es konnte eine gute Übereinstimmung zwischen der detektierten Konzentration unter Verwendung von SERS sowie dem Goldstandard HPLC, einer laborgebundenen Methode, erreicht werden (siehe Tabelle 1).

Zusammenfassung

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die SERS-Methode aufgrund ihrer hohen Spezifität und Sensitivität ein großes Potential für die Medikamentenüberwachung und Lebensmittelanalytik besitzt. SERS kann in Kombination mit weiteren Funktionselementen wie z.B. mikrofluidischen Bauteilen sowie mit, in ihrer Handhabung einfachen, Probenvorbereitungsprotokollen eingesetzt werden. Dies wurde am Beispiel der Medikamente MTX und Levofloxacin sowie der Lebensmittelfarbstoffe Sudan III und Azorubin untermauert.

Danksagung

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) wird für die Finanzierung der Projekte 'QuantiSERS' und 'Jenaer Biochip Initiative 2.0' im Rahmen des Programms 'Unternehmen Region – InnoProfile Transfer' gedankt.

Referenzen

- [1] S. Pahlow, A. Maerz, B. Seise, K. Hartmann, I. Freitag, E. Kaemmer, R. Boehme, V. Deckert, K. Weber, D. Cialla, J. Popp, Bioanalytical application of surface- and tip-enhanced Raman spectroscopy, *Engineering In Life Sciences* 12, 131-143 (2012); doi: 10.1002/elsc.201100056
- [2] D. Cialla, S. Pollok, C. Steinbrücker, K. Weber, J. Popp, SERS-based detection of biomolecules, *Nanophotonics* 3, 383-411 (2014); doi: 10.1515/nanoph-2013-0024
- [3] D. Cialla, A. Maerz, R. Boehme, F. Theil, K. Weber, M. Schmitt, J. Popp, Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403, 27-54 (2012); doi: 10.1007/s00216-011-5631-x
- [4] A. März, T. Henkel, D. Cialla, M. Schmitt, J. Popp, Droplet formation via flow-through micro-devices in Raman and surface enhanced Raman spectroscopy—concepts and applications, *Lab on a Chip* 11, 3584-3592 (2011); doi: 10.1039/c1lc20638a
- [5] A. März, S. Trupp, P. Rösch, G. J. Mohr, J. Popp, Fluorescence dye as novel label molecule for quantitative SERS investigations of an antibiotic, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402, 2625-2631 (2012); doi: 10.1007/s00216-011-5273-z
- [6] A. März, T. Bocklitz, J. Popp, Online-Calibration for Reliable and Robust Lab-on-a-Chip Surface Enhanced Raman Spectroscopy Measurement in a Liquid/Liquid Segmented Flow, *Analytical Chemistry* 83, 8337-8340 (2011); doi: 10.1021/ac2015799
- [7] A. März, B. Mönch, P. Rösch, M. Kiehntopf, T. Henkel, J. Popp, Detection of thiopurine methyltransferase activity in lysed red blood cells by means of lab-on-a-chip surface enhanced Raman spectroscopy (LOC-SERS), *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400, 2755-2761 (2011); doi: 10.1007/s00216-011-4811-z
- [8] A. Walter, A. März, W. Schumacher, Petra Rösch, J. Popp, Towards a fast, high specific and reliable discrimination of bacteria on strain level by means of SERS in a microfluidic device, *Lab on a Chip* 11, 1013-1021 (2011); doi: 10.1039/c0lc00536c
- [9] I. J. Hidi, A. Mühlig, M. Jahn, F. Liebold, D. Cialla, K. Weber, J. Popp, LOC-SERS: towards point-of-care diagnostic of methotrexate, *Analytical Methods* 6, 3943-3947 (2014); doi: 10.1039/c3ay42240b
- [10] 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, *Journal of Physical Chemistry B* 107, 5723-5727 (2003); doi: 10.1021/jp027460u
- [11] I. J. Hidi, M. Jahn, K. Weber, D. Cialla-May, J. Popp, Droplet based microfluidics: spectroscopic characterization of levofloxacin and its SERS detection, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 21236-21242 (2015); doi: 10.1039/C4CP04970E.
- [12] S. Yüksel, M. Ziegler, S. Goerke, U. Hübner, K. Pollok, F. Langenhorst, K. Weber, D. Cialla-May, J. Popp, Background-Free Bottom-Up Plasmonic Arrays with Increased Sensitivity, Specificity and Shelf Life for SERS Detection Schemes, *J. Phys. Chem. C* 119, 13791-13798 (2015); doi: 10.1021/acs.jpcc.5b01389
- [13] M. Jahn, S. Patze, T. Bocklitz, K. Weber, D. Cialla-May, J. Popp, Towards SERS based applications in food analytics: Lipophilic sensor layers for the detection of Sudan III in food matrices, *Analytica Chimica Acta* 860, 43-50 (2015); doi: 10.1016/j.aca.2015.01.005
- [14] V. Peksa, M. Jahn, L. Štolcová, V. Schulz, J. Proška, M. Procházka, K. Weber, D. Cialla-May, J. Popp, Quantitative SERS Analysis of Azorubine (E 122) in Sweet Drinks, *Analytical Chemistry* 87, 2840-2844 (2015); doi: 10.1021/ac504254k